论著

文章编号:1000-5404(2007)02-0112-05

特异性反义寡核苷酸抗小鼠呼吸道合胞病毒感染的研究

周 娟,崔玉霞,杨锡强,王莉佳,蒋利萍 (重庆医科大学儿童医院免疫研究室,重庆 400014)

提 要:目的 比较研究特异性抑制呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的反义核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, AS-ODN)和利巴韦林对RSV感染小鼠的治疗作用,寻求安全有效的抗RSV药物。**方法** 特异性AS-ODN和利巴韦林滴鼻治疗RSV感染BALB/c鼠,空斑形成实验检测肺组织病毒滴度,RT-PCR和免疫组织化学分析RSV mRNA和蛋白表达水平,支气管肺泡灌洗液(BALF)白细胞计数、肺组织病理学检查了解气道炎症和治疗副作用。**结果** 0.2、0.4 mg AS-ODN和0.8 mg利巴韦林能降低RSV感染小鼠肺组织病毒滴度,空斑抑制率分别为34.48%、46.75%和23.02%,与感染对照组比较差异显著($P<0.05$)。0.4 mg AS-ODN抑制RSV mRNA和蛋白表达,抑制率分别为30.54%和29.41%,0.4 mg利巴韦林治疗降低17.65%的RSV蛋白表达。AS-ODN和利巴韦林都降低RSV感染小鼠BALF中白细胞总数,对肺组织病理性改变没有明显改善作用,与感染对照组比较差异不显著($P>0.05$)。单独AS-ODN和利巴韦林滴鼻不会引发明显肺炎症病理损害。**结论** AS-ODN在小鼠体内有比利巴韦林更强的抗RSV作用,经滴鼻治疗没有明显毒副作用,是安全而有效的抗RSV制剂。

关键词: 呼吸道合胞病毒;反义核苷酸;利巴韦林;治疗

中图法分类号: R524;R373.1;R511.05 **文献标识码:** A

Study on specific antisense oligonucleotide against respiratory syncytial virus in mice

ZHOU Juan, CUI Yu-xia, YANG Xi-qiang, WANG Li-jia, JIANG Li-ping (Department of Immunology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To compare the effects of antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) and Ribavirin against respiratory syncytial virus (RSV) in mice. **Methods** BALB/c mice infected of RSV were nasally dropped with AS-ODN (0.2, 0.4 mg) or Ribavirin (0.4, 0.8 mg). Seventy-two hours after infection, pulmonary viral titer was detected by plaque forming experiment, pulmonary RSV N gene mRNA expression was assayed by RT-PCR, and viral protein was detected by immunohistochemistry. To represent respiratory tract inflammation and side-effect caused by AS-ODN or Ribavirin, leukocytes and the subgroup cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted and pulmonary histopathologic changes were examined. **Results** Pulmonary titer of mice treated with 0.2, 0.4 mg AS-ODN or 0.8 mg Ribavirin decreased as compared with that of infected control mice, and the plaque forming inhibition ratio was 34.48%, 46.75% and 23.02% respectively. AS-ODN (0.4 mg) inhibited the expressions of pulmonary RSV N gene mRNA and protein by 30.54% and 29.41% respectively. Ribavirin (0.4 mg) decreased RSV protein expression by 17.65%. Furthermore, AS-ODN and Ribavirin both at dose of 0.4 mg dramatically decreased total number of leukocytes in BALF, but did not significantly improve pulmonary histopathologic changes. The mice merely dropped with AS-ODN or Ribavirin both at dose of 0.4 mg appeared no visible pulmonary histopathologic changes. **Conclusion** AS-ODN shows more potent anti-RSV activity than Ribavirin in mice, and their application through nasal drop has no obvious noxious and side effects. So AS-ODN is an efficient and safe anti-RSV agent.

Key words: respiratory syncytial virus; antisense oligonucleotide; Ribavirin; treatment

人呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是全球婴幼儿下呼吸道感染首位病毒病原体,儿童2岁前都至少感染过一次RSV[1],多数发生再感染,与日后发生喘息密切相关,严重危害健康。但目前尚无安全有效的RSV疫苗和抗病毒药物。随着对RSV基因结构和功能的深入研究,基因治疗成为具有

基金项目:国家自然科学基金(30340045)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340045)
作者简介:周 娟(1977-),女,重庆市人,博士研究生,主要从事儿童感染与免疫性疾病方面的研究。电话:(023)60605084,E-mail: zhoujuan1112@yahoo.com.cn
通讯作者:杨锡强,电话:(023)63624479,E-mail: xqyang@eta.cq.cn
收稿日期:2006-02-13;修回日期:2006-04-07

潜力的新兴治疗途径[2]。本研究在 RSV 感染小鼠体内,比较观察特异性抑制 RSV 重要活性/保守序列的反义寡核苷酸(AS-ODN)和临床应用抗 RSV 药物利巴韦林的抗病毒效应。

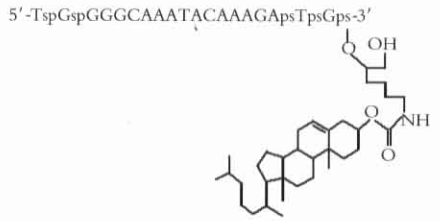
1　材料与方法

1.1　病毒和细胞培养

Hep-2 细胞接种 RSV 标准 A2 株病毒(购于中国预防医学科学院病毒研究所),用含 2% 胎牛血清(FBS)DMEM 培养至细胞病变达 90% ~100%,吸取培养液,4 ℃,3 000 × *g* 离心 10 min 收集上清,-80 ℃储存备用。

1.2　反义寡核苷酸和利巴韦林

自行设计的反义寡核苷酸(AS-ODN)序列为 5′-TGGGGCAAATACAAAGATG-3′,针对 RSV 复制中起重要作用的 N 蛋白基因组序列,其互补序列为 1 124 ~ 1 142 序列(GenBank No. M74568),该序列在 RSV 不同株间高度保守,计算机辅助分析其二级结构暴露、易接近。在前期细胞实验中已证实该 AS-ODN 的抗 RSV 活性。AS-ODN 由中国军事医学科学院放射医学研究所 ABI392 DNA/RNA 合成仪合成,3′端连接胆固醇(3′-胆固醇-TEG CPG 购自美国 Glen Research 公司),5′端和 3′端的 2 ~3 个核苷酸进行硫代修饰(图 1),高效液相色谱纯化。利巴韦林注射液由西南药业股份有限公司生产。



AS-ODN 的 3′端连接胆固醇,图中 sp(ps)部分表示硫代修饰的部分核苷酸

图 1　胆固醇连接和硫代修饰的 AS-ODN 结构示意图

1.3　小鼠 RSV 感染及处理

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠(购自中国科学院上海实验动物中心),8 ~ 12 周龄、体质量 18 ~ 22 g,饲养于重庆医科大学动物中心。在重庆医科大学儿童医院 P2 实验室(生物安全 2 级)进行病毒学实验。小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 0.06 mg/g 麻醉后,鼻腔缓慢滴入 10^6 PFU/50 μl RSV A2 株病毒液,按随机数字表法分组,每组 8 只(除特殊说明外),感染后 24、48 h 给予 2 次滴鼻治疗,A 组 0.2 mg AS-ODN,B 组 0.4 mg AS-ODN,C 组 0.4 mg 利巴韦林,D 组 0.8 mg 利巴韦林,都分别溶于 50 μl PBS 中,感染对照组 E 组滴入 50 μl PBS。感染后 72 h 处死小鼠。未感染 RSV,0.4 mg AS-ODN 或利巴韦林滴鼻的小鼠为阴性对照;未经任何处理的小鼠为空白对照。

1.4　空斑形成抑制实验

感染后 72 h 处死小鼠,无菌条件下取右肺称质量,按10 ml/g 加入预冷肺组织平衡液(含 0.218 mol/L 蔗糖,4.8 mmol/L 谷氨酰胺,30 mmol/L $MgCl_2$,25 mmol/L Hepes,200 U/ml 青霉素,200 μg/ml 链霉的磷酸盐缓冲液,pH 7.4,过滤除菌)匀浆,4 ℃,2 500 × *g* 离心 10 min 收集上清。3 × 10^5/ml Vero 细胞接种至 6 孔培养板,10% FBS 的 1640 培养至单层致密无孔细胞,接种 10^{-2}稀释的肺组织悬液 100 μl,设复孔,病毒吸附 2 h 后覆盖含 1.5% 的琼脂糖凝胶和 2% FBS 的 1640 培养基,培养 5 d,5 mg/ml MTT 显色,计数空斑,计算病毒滴度和空斑形成抑制率。

$$\text{病毒滴度(PFU/ml)} = \text{稀释度} \times \frac{P1 + P2 + \cdots + Pn}{n} \times \frac{1}{v}$$

P:该滴度下每孔空斑数之和;*n*:孔数;v:每孔所加的病毒液体积(ml)。

1.5　RT-PCR

Trizol 法提取小鼠肺组织总 RNA。逆转录反应取 RNA 模板 4 μl,50 pmol 6mer 随机引物(TaKaRa 公司),混合后 65 ℃反应 5 min,加 5 × RT Buffer 4 μl,1.0 nmol/L dNTP,20 U Rnase Inhibitor (TaKaRa 公司),200 U M-MLV 逆转录酶(Promega 公司),充分混匀后 42 ℃静置水浴 60 min。PCR 反应体系为 cDNA 2 μl、5 × PCR buffer 5 μl、Hot start *Taq* DNA 聚合酶 2 U,上、下游引物各 1 μmol/L,补水至 25 μl。PCR 反应 RSV N 基因引物 5′-TCTGGTCTTACAGCCGTGAT(F)-3′和 5′-CCAGCAGCATTGCCTAATAC(R)-3′,产物 460 bp,β-actin 引物 5′-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATC(F)-3′和 5′-GTAGCCACGCTCGGTCAGGATCTTCAT(R)-3′,产物 366 bp。扩增条件 RSV N 基因为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 变性 40 s,46 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 40 个循环,72 ℃再延伸 7 min。β-actin 为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 变性 40 s,60 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 30 个循环,72 ℃再延伸 7 min。取 5 μl 反应产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,以 RSV N 基因和 β-actin 的表达比率作半定量分析。

1.6　免疫组织化学检查

用 RSV 抗原免疫组织化学 S-P 染色试剂盒(北京中杉生物技术公司),一抗为山羊抗 RSV 整体病毒抗原多克隆抗体(US-Biological, USA)。4% 多聚甲醛固定肺组织,常规切片,各步操作按试剂盒说明进行,DAB 显色后显微镜下观察。未滴加一抗的切片作同一标本的阴性对照。图像分析采用北航真彩色病理图像分析系统 4.0,平均光密度反映染色强弱。

1.7　支气管肺泡灌洗液白细胞计数

处死小鼠后气管插管,用 0.5 ml 预冷生理盐水灌洗 2 次,收集支气管肺泡灌洗液(BALF),血球计数仪计数白细胞总数。4 ℃,1 000 × *g* 离心 10 min,取细胞沉渣涂片,Wright 染色,显微镜下计数 200 个白细胞,按中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞形态学特点分类计数。

1.8　肺组织病理学检查

取未经支气管肺泡灌洗的小鼠肺组织,4% 多聚甲醛固定,常规 HE 染色,光镜观察形态结构。参照 Cimolai 系统[3]对肺部病理学评分,包括 5 个分类评分系统:细支气管和支气管浸润数目、浸润程度、管腔内渗出程度、血管周围浸润频度、实质性肺炎严重度合并后记分。

(A)细支气管和支气管周围浸润部位百分率:0 = 无;1 =

少许(<25%);2=许多(25%~75%);3=全部(>75%)。(B)细支气管和支气管周围浸润定性:0=无,偶见轻微浸润或支气管周围淋巴细胞团块;1=轻度,有间断浸润环;2=中度,完全或新月形浸润环<5个细胞厚度;3=重度,完全的浸润环≥5个细胞厚度。(C)细支气管和支气管腔渗出:0=无;1=轻度,<25%腔闭合;2=重度,≥25%腔闭合。(D)血管周围浸润百分率:0=无;1=少许(<10%);2=许多(10%~50%);3=大多数(>50%)。(E)肺实质性炎症:0=无;1=轻度,斑状实质性浸润;2=重度,斑状融合的实质性浸润。

病理评分=A+3(B+C)+D+E(最低为0分,最高为26分)。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,SPSS 10.0软件进行方差分析和均数间多重比较。

2 结果

2.1 空斑形成抑制实验

0.2 mg、0.4 mg AS-ODN和0.8 mg利巴韦林滴鼻都能抑制小鼠RSV感染后肺组织病毒空斑形成,使病毒滴度下降,与对照组比较 $P<0.05$。对病毒复制抑制作用AS-ODN比利巴韦林更显著,0.4 mg AS-ODN比0.2 mg AS-ODN更强。0.4 mg利巴韦林治疗对肺组织病毒滴度没有明显影响。见表1。

表1 AS-ODN和利巴韦林对RSV感染小鼠肺组织病毒负荷的影响

组别	例数	病毒滴度(lgPFU/g)	空斑数目	空斑抑制率(%)
0.2 mg AS-ODN组	8	5.71±0.08[a]	52.48±1.78[a]	34.48
0.4 mg AS-ODN组	9	5.64±0.13[a]	42.65±2.18[a]	46.75
0.4 mg利巴韦林组	7	5.86±0.12	75.61±2.10	5.61
0.8 mg利巴韦林组	8	5.78±0.09[a]	61.66±1.92[a]	23.02
感染对照组	6	5.90±0.08	80.10±1.81	-

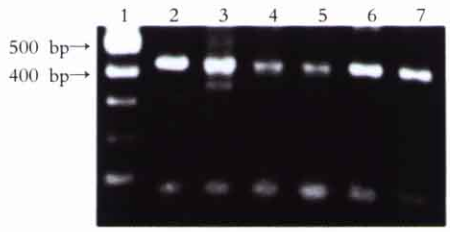
a:$P<0.05$,与感染对照组比较

2.2 RT-PCR(图2)

感染对照组肺组织RSV N基因mRNA相对表达率为(89.45±23.42)%,0.4 mg AS-ODN组为(62.13±11.78)%,两组比较 $P<0.05$,0.4 mg AS-ODN组下降30.54%。0.4 mg利巴韦林组N基因mRNA相对表达率为(75.16±15.96)%,与对照组比较 $P>0.05$。

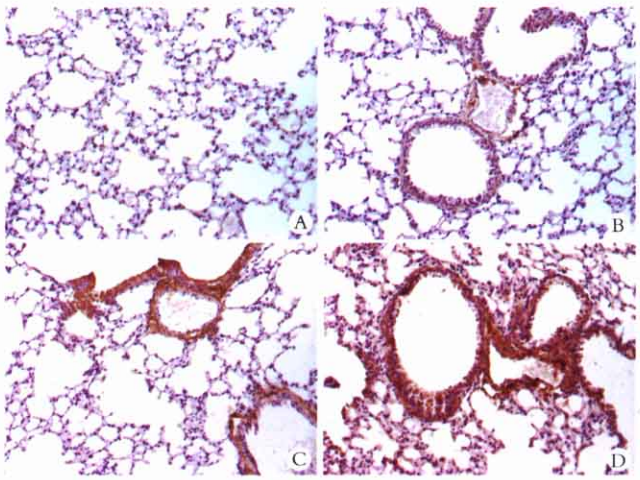
2.3 免疫组织化学检测

未加一抗的感染组肺组织切片和空白对照组RSV抗原免疫组化未见非特异性染色,感染对照组和各治疗组呈棕黄色阳性反应(图3)。RSV抗原主要分布在细支气管、毛细支气管和肺泡上皮细胞细胞质内,毛细血管周围与上皮细胞交界处也有分布。病变轻的上皮细胞完整,RSV抗原阳性染色沿气道壁规则分布;病变严重的上皮细胞坏死脱落,阳性染色分布不均匀,管腔内有形态不规则的脱落阳性染色细胞。感染对照组RSV抗原平均光密度(0.34±0.03),0.4 mg AS-ODN治疗组和0.4 mg利巴韦林组分别为(0.24±0.04)和(0.28±0.04),与感染对照组比较分别下降29.41%和17.65%,差别有统计学意义($P<0.05$)。



1:标准;2、3:感染对照组;4、5:AS-ODN组;6、7:利巴韦林组

图2 感染小鼠肺组织RSV N基因mRNA表达



A:空白对照组;B:0.4 mg AS-ODN组;C:0.4 mg利巴韦林组;D:感染对照组

图3 肺组织RSV抗原免疫组织化学检测 (S-P×250)

2.4 支气管肺泡灌洗液白细胞计数

0.4 mg AS-ODN组和0.4 mg利巴韦林组BALF中白细胞总数与感染对照组比较都降低,气道炎症细胞减少。各组BALF白细胞分类都以淋巴细胞为主,AS-ODN组单核细胞比例增加,与感染对照组比较差异显著($P<0.05$),其他白细胞亚类比例都没有明显差别,见表2。

表2 BALF白细胞计数及亚类分类计数($\bar{x}\pm s$)

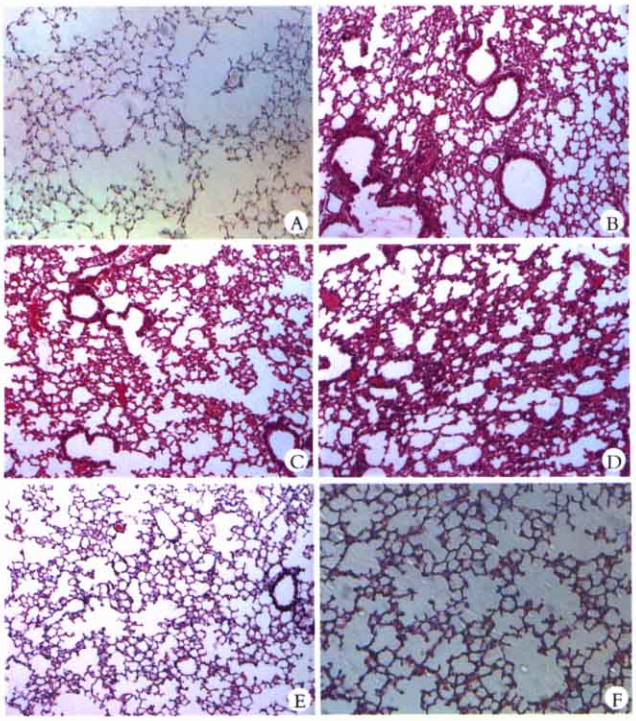
组别	例数	白细胞($\times10^5$)	淋巴细胞(%)	单核细胞(%)	中性粒细胞(%)	嗜酸性粒细胞(%)
0.4 mg AS-ODN组	8	4.89±1.25[a]	66.63±13.12	21.87±6.32[a]	8.26±3.54	3.24±1.41
0.4 mg利巴韦林组	8	5.56±1.86[a]	74.37±15.59	15.31±7.97	6.29±3.28	4.02±1.87
感染对照组	6	7.43±2.36	77.51±18.23	13.56±7.02	7.56±3.89	1.37±0.98

a:$P<0.05$,与感染对照组比较

2.5 肺组织病理学检查

结果见图4。空白对照组肺组织细支气管和肺泡结构清晰,无炎症细胞浸润,组织学评分(0.54±0.08),感染对照组肺组织炎症细胞浸润明显,以淋巴细胞为主,上皮细胞充血肿胀,肺泡隔增宽、断裂,红细胞漏出,病理学评分(14.23±3.37)。0.4 mg AS-ODN组和0.4 mg利巴韦林组病理学评分分别为(13.45±2.94)和(12.57±3.03),与感染对照组比较,炎症细胞浸润有所减少。感染对照组、AS-ODN组和利巴韦林组病理评分都比空白对照组显著升高($P<0.05$)。

未感染RSV单纯0.4 mg AS-ODN或0.4 mg利巴韦林滴鼻的阴性对照组肺组织没有明显炎症反应,评分为(0.61±0.09)和(0.74±0.08),与空白对照比较差异不显著($P>0.05$)。说明0.4 mg AS-ODN或0.4 mg利巴韦林滴鼻不会造成肺部炎症反应,没有局部毒副作用。



A:空白对照组; B:0.4 mg AS-ODN组; C:0.4 mg利巴韦林组; D:感染对照组; E:0.4 mg AS-ODN阴性对照组; F:0.4 mg利巴韦林阴性对照组

图4　小鼠肺组织病理学检查　(HE×100)

3　讨论

RSV是常见的呼吸道病原体,每年全球有6 500万人感染,超过40万儿童死亡。初次感染不能产生有效的免疫保护作用,再发感染常见。RSV是有高度多态性的RNA病毒,极易发生突变,逃逸机体免疫应答和治疗的清除作用[4]。正是因为抑制病毒基因表达产物的诸多困难,抗病毒基因治疗越来越受到关注。AS-ODN是15~30核苷酸的单链DNA或RNA,与互补的靶RNA序列特异性结合,在多个水平抑制基因表达,本研究所用的是应用最多的反义DNA。自美国食物和药品管理局(FDA)批准第一个AS-ODN药物fomivirsen上市以来,已有30多种AS-ODN药物进入临床试验,在肿瘤、炎症和病毒感染的治疗等方面展现令人鼓舞的应用前景[5,6]。利巴韦林是传统的广谱抗病毒药物,1986年FDA批准雾化吸入治疗RSV感染,但近年来其效果备受争议[1]。本研究观察自行设计的AS-ODN对小鼠RSV感染的治疗效应,并与利巴韦林进行比较,以寻求安全、有效的抗RSV药物。

AS-ODN是以RNA为靶点的基因治疗方式,它一方面按碱基互补配对直接结合靶RNA,基因封闭作用阻碍病毒转录和翻译;另一方面激活胞内核酸酶(RNase)H,降解靶RNA,降低病毒基因表达。AS-ODN与靶RNA作用直接而灵活、特异性高、亲和力强,其靶位点设计直接影响治疗效果。我们设计抗RSV的AS-ODN是针对病毒核衣壳N蛋白,N蛋白是病毒复制所必须的多聚酶复合体的重要组成部分,还保护病毒基因组RNA不受降解。此外,我们设计AS-ODN的靶序列在RSV各个株之间高度保守,软件分析其二级结构暴露,AS-ODN能接近,有效发挥广谱抗RSV作用。本研究表明AS-ODN能明显抑制RSV感染小鼠肺组织病毒空斑数、病毒RNA和蛋白表达,抑制作用随剂量增加而增强,强于相同给药剂量的利巴韦林。

我们采用滴鼻给予胆固醇连接和部分硫代修饰的AS-ODN来提高其稳定性和吸收效率。硫代修饰的AS-ODN抵抗核糖核酸酶降解,体内稳定性增加,半衰期延长;带负电的硫代修饰使AS-ODN更易与细胞表面的结合,导入效率提高;硫代修饰还激活RNase H,增强AS-ODN作用[7]。但硫代修饰降低AS-ODN与靶RNA的亲和力,激活补体系统,有一定细胞毒性,因此我们只修饰AS-ODN两端的2~3个核苷酸,最大限度降低它的毒副作用。我们检查只给予AS-ODN滴鼻的小鼠肺组织,未见炎症病理损害,说明AS-ODN没有明显的局部毒副作用。AS-ODN的3′端连接脂溶性胆固醇,使其细胞导入效率增加[8],同时抵抗外切酶从3′端开始的降解作用,增强稳定性。我们采用滴鼻给药方式有如下优势:首先AS-ODN分子量小,能到达小气道,未经肝脏代谢,生物利用度高;其次Ⅱ型肺泡上皮细胞产生肺泡表面活性物质,其主要成分卵磷脂在肺局部pH值下有阳离子脂质体特性,增加AS-ODN摄取和运转,使肺成为AS-ODN治疗的理想靶器官;最后气道给药在局部靶器官直接发挥作用,减少全身毒副作用。用于预防哮喘的第一个吸入性AS-ODN药物已在欧美进入Ⅱ期临床实验[9,10],吸入性AS-ODN治疗RSV感染同样是具有潜力的治疗方式。

早期一些研究显示吸入利巴韦林能改善RSV感染临床症状,但20世纪90年代后越来越多研究显示利巴韦林不能缩短患者住院时间和改善喘息症状[1],对它的作用需要重新认识。我们研究发现0.8 mg利巴韦林滴鼻才能降低RSV感染小鼠肺组织病毒滴度,作用弱于0.2 mg AS-ODN,0.4 mg利巴韦林滴鼻对RSV滴度和基因表达没有明显影响,说明利巴韦林抗

RSV感染的作用是有限的。RSV感染的炎症反应与病毒复制、免疫病理损伤相关，AS-ODN组和利巴韦林组虽然BALF中炎症细胞总数降低，但肺组织病理学没有明显改善，说明抗病毒治疗同时还需联合抗炎治疗、免疫治疗，综合治疗才能达到理想的效果。AS-ODN组BALF中单核细胞比例增加，这可能与寡核苷酸非特异性的免疫刺激作用相关，这种非特异性的作用对于抗病毒免疫是有积极作用的[10]。

本研究滴鼻给予RSV感染小鼠AS-ODN和利巴韦林治疗，部分硫代修饰和胆固醇连接的AS-ODN抑制病毒滴度和基因表达，显示出比利巴韦林更强的抗RSV活性，没有明显毒副作用，是安全有效的抗RSV感染的新途径。

参考文献：

[1] Black C P. Systematic Review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection[J]. Respir Care, 2003, 48(3): 209-233.

[2] Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, *et al*. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA[J]. Nat Med, 2005, 11(1): 50-55.

[3] Cimolai N, Taylor G P, Mah D, *et al*. Definition and application of a histopathological scoring scheme for an animal model of acute Mycoplasma pneumoniae pulmonary infection[J]. Microbial Immunol, 1992, 36(5): 465-478.

[4] Zhao X, Sullender W M. *In vivo* selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab[J]. J Virol, 2005, 79(7): 3962-3968.

[5] Pirollo K F, Rait A, Sleer L S, *et al*. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice[J]. Pharmacol Ther, 2003, 99(1): 55-77.

[6] Le-Calvez H, Yu M, Fang F. Biochemical prevention and treatment of viral infections - a new paradigm in medicine for infectious diseases[J]. Virol J, 2004, 1(1): 12.

[7] Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(8): 1628-1644.

[8] Barnard D L, Sidwell R W, Xiao W, *et al*. 2-5A-DNA conjugate inhibition of respiratory syncytial virus replication: effects of oligonucleotide structure modifications and RNA target site selection[J]. Antiviral Res, 1999, 41(4): 119-134.

[9] Tanaka M, Nyce J W. Respirable antisense oligonucleotides: a new drug class for respiratory disease[J]. Respir Res, 2001, 2(1): 5-9.

[10] Nyce J. Respirable antisense oligonucleotides: a new, third drug class targeting respiratory disease[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2002, 2(5): 533-536.

（编辑　王小寒）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)02-0116-01

血管密度与结直肠癌关系的研究

靳明林，石　彦，曾冬竹，蔡志民，王自强，余佩武　（第三军医大学西南医院普通外科，重庆 400038）

如何减少结直肠癌术后复发和转移，目前仍无有效的方法。我们对结直肠癌微血管密度的研究，旨在为开展抗结直肠癌血管形成治疗，减少术后复发和转移，以提高临床疗效。

1　材料与方法

1.1　一般资料

选取我院普通外科手术切除的完整结直肠癌标本62例，来源于男性35例，女性27例；患者年龄25～86岁，平均53岁。

1.2　药品与仪器

上海产214型碳素墨水，6%右旋糖酐注射液和10%甲醛溶液配成混合液；QD3X线双重造影硫酸钡加入混合液内配成50%硫酸钡混合液。立体显微镜计每平方毫米微血管密度。

1.3　方法

1.3.1　标本灌注和固定　新鲜标本动脉端以混合液灌注，静脉排尽残余血液后结扎；继续加压灌注50%硫酸钡混合液至全标本墨染（压力13～15 kPa）。置于10%甲醛固定48 h。

1.3.2　大体观察　经上述处理的标本从肿瘤对侧剖开，测量肿瘤大小，观察肿瘤大体类型。

1.3.3　病理检查　标本制成石蜡切片HE染色。显微镜下观察细胞分化程度及组织学类型。

1.3.4　透明大切片制作和观察　流水冲洗标本24 h，75%乙醇开始梯度脱水，逐次增加5%至100%并重复100%浓度，每梯度48 h。冬青油透明标本48 h。切取厚1～2 mm制成透明大切片。每例标本取肿瘤远、近端及中心部位3处瘤组织，取肿瘤远、近端2 cm及肿瘤近端4 cm 3处肠黏膜组织。在10×25倍立体显微镜下计每平方毫米微血管密度，取3个观察值的均值。

1.4　统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件对所测血管参数的均值、标准差、标准误、变异系数进行方差分析。

（下转120页）

作者简介：靳明林（1955－），男，河北省邯郸市人，硕士，副主任医师，副教授，主要从事肛门、大肠疾病的诊断和治疗方面的研究。电话：(023)68765267

通讯作者：余佩武，电话：(023)68754161，E-mail：yupeiwu01@sina.com

收稿日期：2006-01-22；修回日期：2006-05-10