论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0132-05

靶向 Peroxiredoxin Ⅰ基因的 shRNA 真核表达载体的构建及生物学功能鉴定

郭启帅[1],黄 曦[2],张 俊[1],李少林[1] (400016 重庆,重庆医科大学放射医学教研室[1];401520 重庆,重庆市合川区人民医院肿瘤科[2])

【摘要】 **目的** 构建针对 Peroxiredoxin Ⅰ(*Prx* Ⅰ)基因的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)真核表达载体,观察下调 *Prx* Ⅰ基因表达后对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学功能的影响。**方法** 构建针对 *Prx* Ⅰ基因的 shRNA 真核表达载体,经酶切和测序鉴定正确后,转染入乳腺癌 MCF-7 细胞。流式细胞术检测细胞转染效率,RT-PCR 及 Western blot 分别检测干扰前后 *Prx* Ⅰ mRNA 和蛋白表达,MTT 法及流式细胞术检测干扰前后乳腺癌 MCF-7 细胞体外的增殖情况及细胞周期和细胞凋亡。**结果** 成功构建真核表达载体 pGPU6-HK、pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4,并转染入乳腺癌 MCF-7 细胞中,转染率为 80% 左右,RT-PCR 及 Western blot 分析表明转染 pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4 后的细胞 EGFR mRNA和蛋白表达均不同程度地受抑,以 pGPU6-*Prx*3 为甚,其 mRNA 和蛋白表达抑制率分别为 82.6% 和 80.5%。与未转染组和 pGPU6-HK 组相比,pGPU6-*Prx*3 组的细胞生长明显延迟($P<0.05$),细胞凋亡率显著增加,G_1 期细胞明显增多,而 S 期细胞减少($P<0.05$)。**结论** 靶向 *Prx* Ⅰ基因的 shRNA 真核表达载体构建成功,能够特异性下调乳腺癌 MCF-7 细胞的 *Prx* Ⅰ基因的表达,并明显抑制乳腺癌细胞增殖,促进细胞凋亡,调控细胞周期再分布。

【关键词】 RNA 干扰;Peroxiredoxin Ⅰ;乳腺癌

【中图法分类号】 R394-33;R394.3 **【文献标志码】** A

Construction of short hairpin RNA eukaryotic expression vectors targeting peroxiredoxin Ⅰ and identification of their biological functions

Guo Qishuai[1], Huang Xi[2], Zhang Jun[1], Li Shaolin[1] ([1]Department of Radiation Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Oncology, Hechuan Peoples' Hospital, Chongqing, 401520, China)

【Abstract】 **Objective** To construct short hairpin RNA (shRNA) eukaryotic expression vectors targeting peroxiredoxin Ⅰ (*Prx* Ⅰ) gene and investigate the effect of down-regulating *Prx* Ⅰ expression on the biological functions of breast carcinoma MCF-7 cells. **Methods** The eukaryotic expression vectors targeting *Prx* Ⅰ gene were constructed and then transfected into MCF-7 cells. Transfection efficiency was evaluated by flow cytometry. The mRNA and protein expressions of *Prx* Ⅰ in MCF-7 cells were detected by RT-PCR and Western blotting. The proliferation of MCF-7 cells was determined by MTT assay. The cell cycle and apoptosis were evaluated by flow cytometry. **Results** The eukaryotic expression vectors pGPU6-HK(negative control), pGPU6-*Prx*1, pGPU6-*Prx*2, pGPU6-*Prx*3 and pGPU6-*Prx*4 were successfully constructed and then transfected into MCF-7 cells respectively. Transfection efficiency was about 80%. The expression of *Prx* Ⅰ in MCF-7 cells transfected with 4 *Prx* vectors were inhibited significantly at both mRNA and protein levels, especially in the cells with pGPU6-*Prx*3, whose inhibitory rates were 82.6% and 80.5% respectively at mRNA and protein levels. When pGPU6-*Prx*3 group was compared with untransfected group and the group transfected with pGPU6-HK, the cell proliferation was markedly delayed ($P<0.05$), the cell apoptosis rate was significantly increased, and the cells were arrested in G1 phase and S phase were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Eukaryotic expression vectors of shRNA *Prx* Ⅰ is successfully constructed, and specifically down-regulate the *Prx* Ⅰ expression at mRNA and protein levels. Transfection of pGPU6-*Prx*3 vector significantly in-

【基金项目】 国家自然科学基金(30970843)

【通信作者】 李少林,电话:(023)68485060,E-mail:shaolinli202@sina.com

hibits cell proliferation, induces cell apoptosis, and regulates cell phase redistribution in MCF-7 cells.

[Key words] RNA interference; peroxiredoxin Ⅰ; breast carcinoma

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30970843). Corresponding author: Li Shaolin, Tel: 86-23-68485060, E-mail: shaolinli202@sina.com

Peroxiredoxin 蛋白是新近发现的一类过氧化物酶,在清除活性氧族中发挥着重要作用,可保护细胞免受过氧化反应造成的细胞膜损伤[1]。Peroxiredoxin Ⅰ(*Prx* Ⅰ)是 Peroxiredoxin 蛋白家族成员之一,在乳腺癌、肺癌、结直肠癌等多种肿瘤细胞中高表达[2-5]。研究表明 *Prx* Ⅰ与肿瘤的发生、发展、放化疗敏感性等密切相关,并可作为预后的生物学标志[6-10],是肿瘤基因治疗理想靶点。本实验构建靶向 *Prx* Ⅰ基因的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)真核表达载体,观察 *Prx* Ⅰ基因下调后对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学功能的影响,旨在为乳腺癌基因治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于中科院上海细胞库,大肠杆菌 JM109 为本教研室保存,含有 U6 启动子的 pGPU6/GFP/Neo 质粒购自上海吉玛公司。Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司,限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Bbs* Ⅰ、*Pst* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶及 RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司,RNA 抽提试剂盒购自 QIANGEN 公司,去内毒素质粒抽提试剂盒为 OMEGA 公司产品,羊抗人 *Prx* Ⅰ抗体及鼠抗人 β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司,shRNA 序列、*Prx* Ⅰ及 β-actin 引物均由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *Prx* Ⅰ shRNA 设计及合成 从 GenBank 查找 *Prx* Ⅰ基因序列(NM_002574),根据 siRNA 基本设计原则,采用 Ambion 公司的在线设计工具设计 siRNA,在候选靶序列中选取 4 条序列,并设计阴性对照(表 1),经 BLAST 比对分析与人类其他基因编码序列无同源性。用上述 5 个序列构建重组质粒,中间设计 9 个碱基(TTCAAGAGA)发夹序列,正义链模板的 5′端添加 CACC,与 *Bbs* Ⅰ酶切后形成的粘端互补;反义链模板的 5′端添加 GATC,与 *Bam*H Ⅰ酶切后形成的粘端互补,交上海生物工程公司合成。

表 1 *Prx* Ⅰ基因的靶序列及位点

基因	靶序列(5′→3′)	位点
*Prx*1	GCACCATTGCTCAGGATTATG	669~689
*Prx*2	GCTGATGAAGGCATCTCGTTC	701~721
*Prx*3	GCTCTGTGGATGAGACTTTGA	792~812
*Prx*4	GCCTTCCAGTTCACTGACAAA	824~844
阴性对照(HK)	GTTCTCCGAACGTGTCACGT	

1.2.2 靶向 *Prx* Ⅰ基因的 shRNA 真核表达载体的构建 将合成好的 siRNA 序列退火形成双链,分别用 *Bam*H Ⅰ和 *Bbs* Ⅰ酶切 pGPU6/GFP/Neo 载体,电泳,胶回收,加入 T_4 DNA 连接酶将 shRNA 连接入载体中,转化大肠杆菌 JM109,在含 Kana 抗性(终浓度为 30 μg/ml)的 LB 培养液中筛选,挑取单克隆菌落扩增,抽提重组质粒,分别用 *Bam*H Ⅰ、*Pst* Ⅰ酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,对酶切鉴定正确的重组质粒送英骏公司测序。将构建成功的载体分别命名为 pGPU6-HK、pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4。

1.2.3 细胞培养及转染 将乳腺癌 MCF-7 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养,待细胞汇合度达 90% 时,用 0.25% 胰酶消化传代。转染前 1 d 以 2.5×10^5/孔细胞种植于 6 孔板,培养至 50% ~60% 融合度时,参照 Lipofectamine™2000 说明书将重组质粒转染入细胞中。实验分为 6 组:未转染组、pGPU6-HK、pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4 组。转染后第 48 小时采用流式细胞检测转染效率。

1.2.4 RT-PCR 半定量检测 *Prx* Ⅰ mRNA 的表达 转染 48 h 后,收集各组细胞,提取细胞总 RNA。取 1 μl RNA 逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 反应。反应体系 50 μl,扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。*Prx* Ⅰ上游引物:5′-AGGAAATGCTAAAATTGGGCACC-3′,下游引物 5′-TCTTTGCTCTTTTGGACATCAGG-3′,扩增片段为 570 bp;内参 β-actin 上游引物:5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′,下游引物:5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′,扩增片段为 285 bp。1.0 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像,结果采用 Quantity One 软件进行分析。

1.2.5 Western blot 检测 *Prx* Ⅰ蛋白表达 转染 48 h 后,收集各组细胞,提取总蛋白,并进行定量。取 40 μg 总蛋白选择 12% 分离胶和 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,完毕后将蛋白电转印至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h 后加羊抗人 *Prx* Ⅰ一抗(稀释至 1∶500) 4 ℃过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,然后加 HRP 标记的二抗(稀释至 1∶1 000) 温育 2 h,再用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,采用化学发光法显影,胶片定影。Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片,结果采用 Quantity One 软件进行分析,同时设置 β-actin 为内参对照。

1.2.6 MTT 绘制细胞生长曲线 取生长对数期细胞,以 3×10^3 个/孔细胞接种于 96 孔板,按照脂质体操作说明进行转染。实验分为未转染组、pGPU6-HK、pGPU6-*Prx*3 组。培养 0、12、24、36、48、60、72 h 分别加入 5 mg/ml MTT 20 μl,继续培养 4 h,吸去孔内培养基,加入 DMSO 200 μl 于振荡器上振摇,待蓝色晶体完全溶解后,在酶标仪上测定 570 nm 处的光密度值

[D(570)]。以各时间点的 D(570)绘制细胞生长曲线。实验重复3次。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞，制成单细胞悬液，以 2×10^5/ml 2 ml 接种于6孔培养板中，常规培养。实验分为3组：未转染组、pGPU6-HK、pGPU6-*Prx*3组，每组设3个复孔。转染后48 h常规消化，1 000×g 离心5 min，弃上清，收集细胞，PBS洗2次，按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作，置流式细胞仪测定每个样本中的凋亡细胞所占比率。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期 细胞培养及实验分组同1.2.7。转染后48 h常规消化，1 000×g 离心5 min，弃上清，PBS洗2次，用预冷的70%的乙醇固定过夜，离心收集细胞沉淀，加入碘化丙啶1 ml后4 ℃避光温育30 min，于1 h行流式细胞检测每个样本中的细胞周期。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析或2个独立样本的 t 检验。

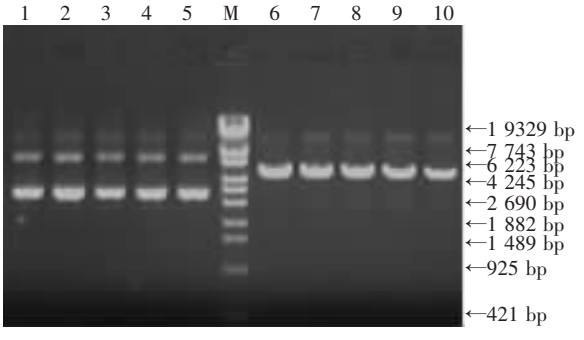
2 结果

2.1 流式细胞仪检测转染效率

细胞转染后第48小时通过流式细胞仪检测转染效率发现：未转染组转染率为0%，而转染重组质粒各组的转染率均在80%左右。证明重组质粒转染成功，可进行后续实验。

2.2 重组质粒单酶切及测序鉴定

在质粒 pGPU6/GFP/Neo 的 *Bam*HⅠ和 *Bbs*Ⅰ酶切位点间含有1个 *Pst*Ⅰ酶切位点，而插入目的基因片段后，*Pst*Ⅰ酶切位点被取代，因此不能被 *Pst*Ⅰ所酶切。*Pst*Ⅰ单酶切结果显示两条带，1条超螺旋的 SC 构型，1条松散开环的 OC 构型；而 *Bam*HⅠ酶切只显示1条带。提示重组质粒能够被 *Bam*HⅠ切开，而不能被 *Pst*Ⅰ切开。经测序，5种重组质粒序列与设计完全一致，证明构建成功(图1)。



M：标准；1～5：pGPU6-HK、pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4 *Pst*Ⅰ酶切；6～10：pGPU6-HK、pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4 *Bam*HⅠ酶切

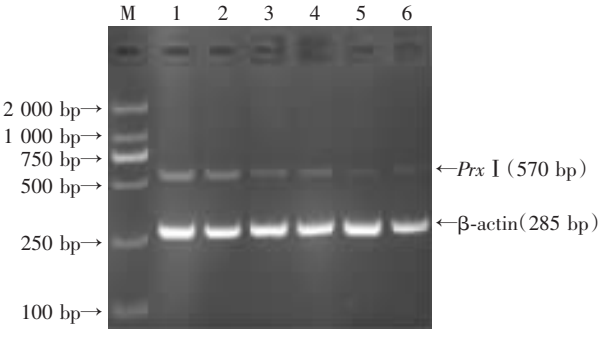
图1 重组质粒的单酶切鉴定

2.3 半定量 RT-PCR 检测各组 *Prx*Ⅰ mRNA 的表达

pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4 组在转染后第48小时 MCF-7 细胞中 *Prx*Ⅰ mRNA 的表达具有不同程度的降低，pGPU6-*Prx*3 组最为明显，其 *Prx*Ⅰ mRNA 表达抑制率为82.6%，与未转染及 pGPU6-HK 组比较差异具有显著性($P<0.01$)，而未转染组及 pGPU6-HK 组比较差异无显著性($P>0.05$)。见图2。

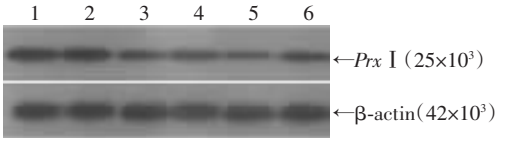
2.4 Western blot 检测 *Prx*Ⅰ蛋白的表达

pGPU6-*Prx*1、pGPU6-*Prx*2、pGPU6-*Prx*3、pGPU6-*Prx*4 组中 *Prx*Ⅰ蛋白表达明显降低，以 pGPU6-*Prx*3 组降低最为明显，其蛋白表达抑制率达80.5%，与未转染组和 pGPU6-HK 组相比，差异具有显著性($P<0.01$)，但空白对照组和 pGPU6-HK 组比较差异无显著性($P>0.05$)。见图3。



M：DNA 标准(DL 2000)；1：未转染组；2：pGPU6-HK 组；3：pGPU6-*Prx*1 组；4：pGPU6-*Prx*2 组；5：pGPU6-*Prx*3 组；6：pGPU6-*Prx*4 组

图2 RT-PCR 检测各组 *Prx*Ⅰ mRNA 表达

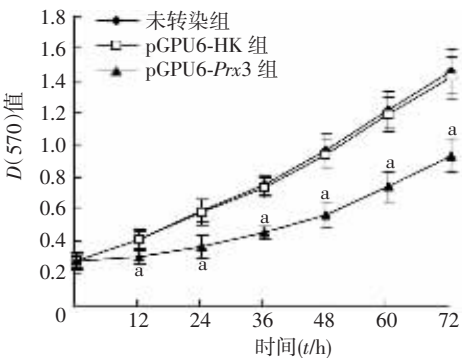


1：未转染组；2：pGPU6-HK 组；3：pGPU6-*Prx*1 组；4：pGPU6-*Prx*2 组；5：pGPU6-*Prx*3 组；6：pGPU6-*Prx*4 组

图3 Western blot 检测各组 *Prx*Ⅰ蛋白表达

2.5 MTT 绘制细胞生长曲线

根据所测的各时间点的 D(570)值绘制生长曲线，发现转染 pGPU6-*Prx*3 重组质粒的细胞在12～72 h时其生长速度显著低于未转染组及 pGPU6-HK 组($P<0.05$)。见图4。

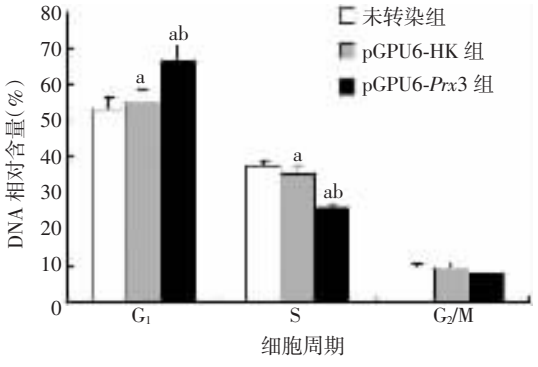


a：$P<0.05$，与未转染组及 pGPU6-HK 组比较

图4 MTT 绘制细胞生长曲线

2.6 流式细胞检测细胞周期和细胞凋亡

与未转染组及 pGPU6-HK 组比较，pGPU6-*Prx*3 组中的细胞凋亡率显著增加（1.09 ± 0.24 *vs* 35.02 ± 2.37，$P < 0.01$；1.12 ± 0.27 *vs* 35.02 ± 2.37，$P < 0.01$），G_1 期细胞比例明显增多，而 S 期细胞减少；根据细胞周期的特点：G_1 期细胞增加，S 期细胞减少，表明细胞增殖减慢。即下调 *Prx* Ⅰ基因表达后，乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖明显受抑。见图 5。



a：$P < 0.05$，与未转染组比较；b：$P < 0.05$，与 pGPU6-HK 组比较

图 5　流式细胞仪检测细胞周期

3　讨论

Peroxiredoxin 是新近发现的相对分子质量在（20 ~ 30）×10^3一类过氧化物酶，广泛存在于原核和真核生物中。哺乳动物的 *Prx* 家族包括 6 个成员：*Prx* Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ。研究[11 - 13]显示 *Prx* 具有强大的抗氧化和清除自由基、参与细胞增殖与分化及细胞信号转导、增强 NK 细胞活性、保护自由基敏感蛋白等功能。*Prx* Ⅰ属于 *Prx* 家族中的一员，含有 2 个半胱氨酸残基，定位于细胞质，在包括乳腺癌在内的多种肿瘤组织中高表达。Cha 等[2]通过定量 PCR 的方法检测发现，185 例乳腺癌标本中有 181 例（97.8%）的 *Prx* Ⅰ mRNA 表达量高于正常乳腺组织的 2 倍；Western blot 检测 8 例乳腺癌标本有 7 例存在 *Prx* Ⅰ蛋白表达，而 6 例正常乳腺标本均未检测到 *Prx* Ⅰ的表达。*Prx* Ⅰ表达上调可增强肿瘤细胞的抗氧化能力，减少活性氧自由基的产生，是肿瘤细胞抗凋亡和耐药的重要原因[14]。以 *Prx* Ⅰ为靶点，通过下调其表达，可以抑制肿瘤细胞增殖，逆转化疗耐药，提高肿瘤细胞的放射敏感性[15 - 19]。这些证据均提示 *Prx* Ⅰ是肿瘤基因治疗的理想靶点。

目前对基因功能研究采用手段主要有：反义寡核苷酸、核酶、RNA 干扰及抗体阻断等技术。由于 RNA 干扰具有高效性、高特异性的特点，目前广泛应用于基因功能、细胞信号转导的研究，并在艾滋病、乙型肝炎和一些恶性肿瘤的基因治疗方面取得了巨大的进展[20 - 21]。本实验选取 *Prx* Ⅰ基因作为靶点，以 pGPU6 作为载体，构建靶向 *Prx* Ⅰ基因的 shRNA 真核表达载体，通过酶切及测序鉴定正确无误后，将重组质粒转染入高表达 *Prx* Ⅰ基因的人乳腺癌 MCF-7 细胞中。为防止脱靶效应，本实验选取了 4 个靶位，通过 RT-PCR 及 Western blot 检测发现，4 个重组质粒对 *Prx* Ⅰ的表达均有不同程度的抑制作用，尤以 pGPU6-*Prx*3 重组质粒最为显著，其 mRNA 和蛋白表达抑制率分别达 82.6% 和 80.5%。因此在后续实验中选取 pGPU6-*Prx*3 重组质粒进行生物学功能的鉴定。流式细胞检测结果显示：pGPU6-*Prx*3 组中的 G_1 期细胞比例明显增多，而 S 期细胞减少，且细胞凋亡率显著增加。MTT 结果进一步证实转染 pGPU6-*Prx*3 重组质粒后，乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖明显受抑。推测其作用机制可能与下调乳腺癌细胞中的 *Prx* Ⅰ基因后，细胞内的活性氧自由基不能有效清除，致使细胞膜受损，细胞凋亡增加，细胞周期重新分布，最终使细胞生长延迟。

本实验成功构建靶向 *Prx* Ⅰ基因真核表达载体，并筛选出抑制效果最佳的 1 条 shRNA。通过初步鉴定证实了 *Prx* Ⅰ基因与乳腺癌细胞的增殖等恶性生物学功能相关，为后续对 *Prx* Ⅰ基因功能的深入研究奠定了基础。

参考文献：

[1] Manevich Y, Sweitzer T, Pak J H, *et al*. 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(18): 11599 - 11604.

[2] Cha M K, Suh K H, Kim I H. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 93.

[3] Park J H, Kim Y S, Lee H L, *et al*. Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung[J]. Respirology, 2006, 11(3): 269 - 275.

[4] Kim J H, Bogner P N, Baek S H, *et al*. Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(8): 2326 - 2333.

[5] Wu X Y, Fu Z X, Wang X H. Peroxiredoxins in colorectal neoplasms [J]. Histol Histopathol, 2010, 25(10): 1297 - 1303.

[6] Cao J, Schulte J, Knight A, *et al*. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity[J]. EMBO J, 2009, 28(10): 1505 - 1517.

[7] Ma D, Warabi E, Yanagawa T, *et al*. Peroxiredoxin I plays a protective role against cisplatin cytotoxicity through mitogen activated kinase signals[J]. Oral Oncol, 2009, 45(12): 1037 - 1043.

[8] Zhang B, Wang Y, Su Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy[J]. Cancer Lett, 2009, 286(2): 154 - 160.

[9] Chen M F, Keng P C, Shau H, *et al*. Inhibition of lung tumor growth

and augmentation of radiosensitivity by decreasing peroxiredoxin I expression[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 64(2): 581-591.

[10] Kim J H, Bogner P N, Ramnath N, *et al*. Elevated peroxiredoxin 1, but not NF-E2-related factor 2, is an independent prognostic factor for disease recurrence and reduced survival in stage I non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(13): 3875-3882.

[11] Rhee S G, Chae H Z, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38(12): 1543-1552.

[12] Lee Y M, Park S H, Shin D I, *et al*. Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease[J]. J Biol Chem, 2008, 283(15): 9986-9998.

[13] 章波, 向渝梅, 白云, 等. 小鼠 peroxiredoxin 基因家族的生物信息学分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 847-849.

[14] Chang J W, Jeon H B, Lee J H, *et al*. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(2): 507-512.

[15] 罗弋, 庞华, 李淑杰, 等. 人源噬菌体抗体对 Peroxiredoxin Ⅰ高表达肺腺癌细胞增殖的抑制作用[J]. 癌症, 2009, 28(10): 1061-1066.

[16] Luo Y, Pang H, Li S, *et al*. Production and radioimmunoimaging of novel fully human phage display recombinant antibodies and growth inhibition of lung adenocarcinoma cell line overexpressing *Prx* Ⅰ[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(14): 1369-1377.

[17] Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(5/6): 768-777.

[18] Zhang B, Wang Y, Liu K, *et al*. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against peroxiredoxin I enhances the radiosensitivity of human intestinal cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(3): 660-667.

[19] Zhang B, Su Y, Ai G, *et al*. Involvement of peroxiredoxin I in protecting cells from radiation-induced death[J]. J Radiat Res (Tokyo), 2005, 46(3): 305-312.

[20] Huang D D. The potential of RNA interference-based therapies for viral infections[J]. Curr HIV/AIDS Rep, 2008, 5(1): 33-39.

[21] Martinez M A. Progress in the therapeutic applications of siRNAs against HIV-1[J]. Methods Mol Biol, 2009, 487: 343-368.

(收稿 2010-09-28 修回 2010-10-25)

(编辑 龙 亮)

(上接131页)

3 d。口服乙烯雌酚抗术后阴茎勃起,必要时给予适当的止痛剂。切口勿需拆线,愈合后可自行脱落,术后禁止性生活1个月。

2 结果

本组154例手术时间20~30 min,切口Ⅰ期愈合149例,切口轻度感染5例,给予局部伤口处理和口服抗生素治疗后1周内愈合;局部水肿轻,一般在术后1周内基本消失;术后随访125例,平均随访时间1年。患者对手术效果尤其是切口形状均表示非常满意,其中随访已婚或有性伴侣者89例,对性生活表示满意。

3 讨论

包皮过长在男性青少年和成人中均非常普遍。在卫生不良的情况下,过长的包皮容易引发包皮龟头炎,甚至可能并发阴茎癌[2]。目前,国内医疗机构将包皮环切术作为一个常规的外科治疗手段,对于切口的美观重视不够。在国外,早已认识到包皮环切术本质是一种美容手术,对于手术切口的形状要求非常高,因此包皮环切术多由整形美容外科医生实施。随着国内患者对于阴茎美学要求的提高,对于传统包皮环切术做出美容方面的改进势在必行。我们发现在不改变整个手术主要设计框架的前提下[3-4],对其中一些具体操作步骤做出某些改良,就能取得十分满意的美容效果。传统手术描述对于切口的设计多注重在包皮外板上,但在实践中我们发现其实最终的切口形状和切口的宽度是由所切割的内板所决定的。有鉴于此,我们将切口设计在包皮内板上。按照距离和平行冠状沟1 cm的传统要求术前用手术记号笔画出切口。一般手术学教材和医师在实施的时候往往忽略画出手术切口线这一步骤,认为麻烦或是没有必要,但在具体切割的时候由于出血和各种主观因素的影响,凭借经验的做法随意性很大,往往使得切口不整齐和左右两侧不对称。而画线则能让术者在实施剪切的时候可以按图索骥,非常从容和精确。此外,在传统手术操作中,在背侧和腹侧剪开后,裂开的内外板之间是使用血管钳钳夹在一起作为切割标记的,由于血管钳尖端接触面积比较大,加之不同情况下钳夹的组织量会有所不同,这样定位的时候往往不够精确,有时会造成剪切后左右两侧明显不对称。而我们改进为用缝合牵引线的办法则成功解决了这一弊端,缝合后打结线结为一点而非一个接触面,有效保证了两端的对称性。经过这两项简单的改进,术后切口愈合好,切口瘢痕不明显,切口愈合线整齐,患者均对术后阴茎外观及功能非常满意,故将传统包皮环切术提升到美容手术的级别,值得我国广大的各级医疗机构借鉴和推广。

参考文献:

[1] 李玉勤, 徐少华, 董国徽. 三种包皮环切术治疗包茎及包皮过长的方法与疗效比较[J]. 中国现代医生, 2008, 46(15): 53-54.

[2] 沈海源. 包皮过长危害多[J]. 家庭医学: 上半月, 2007, (3): 36.

[3] 金锡御, 俞天麟. 泌尿外科手术学[M]. 北京: 人民军医出版杜, 2005: 3-325.

[4] 梅骅. 泌尿外科手术学[J]. 中华泌尿外科杂志, 1999, 20(9): 534-536.

(收稿 2010-09-21 修回 2010-10-13)

(编辑 王 红)