论著

文章编号:1000-5404(2013)14-1466-05

胸腺素β4壳聚糖纳米粒的制备及其对NF-κB表达调节治疗兔角膜创伤

计 岩,赵 敏,邬桂玉 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆市眼科学重点实验室)

[摘要] **目的** 考察胸腺素β4壳聚糖(thymosin β4 chitosan, Tβ4/CS)纳米粒的体外性质及其在兔角膜创伤中通过调节核转录因子NF-κB的表达修复角膜的作用。**方法** 采用离子交联法制备Tβ4/CS纳米粒,考察纳米粒粒径、zeta电位、包封率及体外释放情况。2.0 mg/L的Tβ4/CS纳米粒混悬液滴兔眼,右眼为实验眼,左眼为对照眼,HE染色观察眼表组织学变化,并观察其是否有眼表毒性。建立兔角膜创伤模型,右眼作为实验眼,采用单纯随机抽样法,分为Tβ4/CS纳米粒组(A组)、Tβ4滴眼液组(B组)、损伤对照组(C组),每组20只。治疗后1、3、7、14 d大体观察及HE染色观察角膜修复情况,并使用RT-PCR方法检测角膜核转录因子NF-κB的表达。**结果** Tβ4/CS纳米粒大部分呈规则的球型,粒径为(354.0±1.6)nm,zeta电位为(22.5±0.7)mV,包封率为(76.2±2.8)%,体系较为稳定,具有缓释功能。Tβ4/CS纳米粒滴眼液对兔眼睑、结膜、角膜无损害;明显下调兔创伤角膜中的NF-κB的表达促进角膜修复,各时间点各组间差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 胸腺素β4壳聚糖纳米粒滴眼液通过下调兔创伤角膜中的NF-κB的表达促进角膜修复,对兔眼表无损害。

[关键词] 角膜创伤愈合;胸腺素β4;纳米粒;药物缓释;核转录因子
[中图法分类号] R772.2;R944.9;R966 [文献标志码] A

Preparation of thymosin β4 chitosan nanoparticles and its efficiency in treatment of corneal trauma by regulating NF-κB

Ji Yan, Zhao Min, Wu Guiyu (Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the *in vitro* properties of nanoparticles containing thymosin β4 chitosan (Tβ4/CS), and determine its effect on the repair of rabbit corneal wound by regulating the expression of nuclear transcription factor NF-κB. **Methods** The ionotropic gelation was employed to produce Tβ4/CS nanoparticles. Then particle size, zeta potential, encapsulation efficiency and release *in vitro* were studied. Tβ4/CS nanoparticle suspension drops, 2.0 mg/L, was used to drop on the eyes of the rabbit for the toxicity of the particles, while the right eyes were set as normal control. HE staining was used to stain the ocular surface tissue, to observe whether there exists ocular surface toxicity or not. In rabbit corneal trauma model, all rabbits' right eyes were set as the experimental subject, and the rabbits were divided into Tβ4/CS nanoparticle group (A), Tβ4 group (B) and control group (C), with 20 animals in each group. General observation and HE staining were carried in the corneal wound on 1, 3, 7, and 14 d after treatment, and RT-PCR was used to detect the expression of corneal nuclear transcription factor NF-κB. **Results** Tβ4/CS nanoparticles were mostly in round shape, in a diameter of 354.0±1.6 nm, with a zeta potential of 22.5±0.7 mV, and encapsulation efficiency of (76.2±2.8)%. The produced Tβ4/CS nanoparticles were stable, with a sustained-released function. The toxicity test indicated that Tβ4/CS nanoparticles eye drops, 2.0 mg/L, were not harmful for the rabbit eyelids, conjunctiva, and cornea. The Tβ4/CS nanoparticles down-regulated the expression of NF-κB in rabbit traumatic corneal to promote corneal repair significantly, at each time point than the other 2 groups ($P<0.01$). **Conclusion** The thymosin β4 chitosan nanoparticles eye drops can be used to promote corneal repair in the rabbit traumatic corneal by down-regulating NF-κB, without any harm to the ocular surface.

[**Key words**] corneal wound healing; thymosin β4; nanoparticles; drug delivery; nuclear transcription factor NF-κB

Supported by the Science Foundation of Chongqing Commission of Science and Technology (CSTC2008AC0086) and the Project of First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (YXJJ2009-09). Corresponding author: Zhao Min, Tel: 86-23-89011262, E-mail: minzhao2002@yahoo.com.cn

[基金项目] 重庆市科委科学基金(CSTC2008AC0086);重庆医科大学附属第一医院课题(YXJJ 2009-09)
[通信作者] 赵 敏,电话:(023)89011262,E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130125.1140.007.html(2013-01-25)

胸腺素 β4(thymosin β4,Tβ4)是一种重要的激动蛋白调节分子,其参与介导多种生物学反应,与抗细胞凋亡,控制炎性反应、促进神经系统发育、促进创伤愈合、参与肿瘤发生与转移、调节肌动蛋白平衡等生理、病理过程密切相关[1-4]。目前载药壳聚糖纳米粒已成为药剂学领域的研究热点,壳聚糖(chitosan,CS)纳米粒可缓释药物,靶向给药,还可增加蛋白、核苷酸等药物的稳定性,使其包裹药物不易被降解[5-6]。不同程度的角膜创伤伤及前弹力层或基质层引起角膜瘢痕形成,破坏角膜的透明性和完整性导致视功能下降。本研究结合胸腺素 β4 及壳聚糖纳米粒的优点制备了眼用胸腺素 β4 壳聚糖(thymosin β4 chitosan,Tβ4/CS)纳米粒,探讨其性质及其在兔角膜创伤模型中对核转录因子 NF-κB 的调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

thymosin beta4 Tβ4 冻干粉剂,Tβ4 ELISA 试剂盒(西安吉诺泰生物科技有限公司),壳聚糖盐酸盐(上海生工生物工程技术服务有限公司),三聚磷酸钠(上海国药集团化学试剂有限公司),激光粒度分析仪 Zetasizer(英国 Malvern 公司),TECNAI-10 型透射电镜(荷兰飞利浦公司),低温离心机(Sigma 公司),Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒(TOYOBO 公司)。

新西兰大白兔,雌雄不限,体质量约 2.5 kg,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 Tβ4/CS 纳米粒的制备及表征

1.2.1 Tβ4/CS 纳米粒制备 采用离子交联法制备 Tβ4/CS 纳米粒[7],1.0 mg/mL CS 溶液在磁力搅拌下,缓慢滴加浓度为 0.5 mg/mL 的 TPP 溶液(蒸馏水配制)。CS 与 TPP 的质量比分别为 2∶1、3∶1、4∶1、5∶1、6∶1,滴加完毕后继续磁力搅拌 30 min,即得空白 CS-NPs 纳米粒的混悬液。观察 CS-NPs 纳米粒的混悬液的状态,其中质量比 3∶1时空白壳聚糖纳米粒为最佳。同样的方法在向混悬液中适量逐滴加入不同浓度的 Tβ4 溶液(0.5、1、1.5、2、2.5 mg/L),将混悬液 4 ℃ 15 000 r/min 高速离心 40 min,弃上清液,收集沉淀备用。

1.2.2 Tβ4/CS 纳米粒粒径、zeta 电位、多分散性检测及包封率测定 室温条件下取 Tβ4/CS 纳米粒混悬液,加去离子水稀释 10 倍,置激光粒度分析仪中测定纳米粒的粒径大小、zeta 电位及多分散性。取 Tβ4/CS 纳米粒混悬液,4 ℃ 15 000 r/min 离心 40 min,收集上清液,ELISA 法测定上清液中 Tβ4 含量。包封率 =(Tβ4 总量 - 上清液中 Tβ4 含量)/Tβ4 总量 ×100%。

1.2.3 Tβ4/CS 纳米粒体外释药 离心收集的纳米粒沉淀复溶于含 1 mL PBS 液的离心管中,置于 37 ℃ 水浴中轻微振荡,间隔 1.5、3、6、12、24、36、48 h 时段后,4 ℃ 15 000 r/min 离心 40 min,收集上清液,ELISA 法测定上清液中 rhEGF 含量。

1.3 眼表毒性测定

取新西兰大白兔 5 只,右眼为实验眼,左眼为对照眼。实验眼每次滴入 2.0 mg/L(纳米粒包封率最好)的 Tβ4/CS 纳米粒子混悬液 30 μL,每 30 分钟 1 次,共 6 h。对照眼在相同时间滴入等量医用生理盐水。在首次滴入后的 3、6、24 h 分别采用过量的戊巴比妥钠(18 mg/kg)静脉注射后,空气栓塞法处死。每只眼取角膜、结膜及眼睑组织标本 2 份,以甲醛固定后,苏木精-伊红(HE)染色行组织学切片观察。角膜、结膜及眼睑组织的观察根据以下几方面:角结膜及眼睑组织有无水肿,有无嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞及肥大细胞浸润,或其他异常改变。

1.4 角膜创伤动物模型的建立及用药

取新西兰大白兔 60 只,均以右眼作为实验眼,实验前裂隙灯显微镜检查排除角膜疾病。采用单纯随机抽样法,分为 Tβ4/CS 纳米粒组(A 组)、Tβ4 滴眼液组(B 组)、损伤对照组(C 组),每组 20 只。2% 戊巴比妥钠1.5 mL/kg耳缘静脉注射,盐酸奥布卡因表面麻醉。待动物麻醉后,常规消毒铺巾开睑,剪除第 3 眼睑。用 7.5 mm 环钻在角膜中央划痕,并沿划痕剔除 1/3 厚度板层角膜,制作成角膜损伤模型。术后 A、B、C 组每天分别用 2.0 mg/L Tβ4/CS 纳米粒滴眼液、2.0 mg/L Tβ4 滴眼液、无菌 PBS 滴眼 4 次/d,并且滴妥布霉素 3 次/d。给药 1 周后,改为滴妥布霉素 2 次/d,连续使用 7 d 后停药以预防感染。

1.5 实验观察

1.5.1 角膜大体情况及组织病理学观察 分别在 1、3、7、14 d每组分别处死 5 只动物,沿角膜缘剪区角膜,部分固定于 4% 多聚甲醛中,常规石蜡包埋切片,HE 染色。部分组织迅速冷冻备用。

1.5.2 RT-PCR 检测角膜 NF-κB mRNA 的表达 取 1、3、7、14 d 处死兔角膜按照 Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒步骤逆转录为 cDNA,平衡 cDNA 浓度后产物进行 PCR。引物序列如下,NF-κB 上游:5′-GGAGGGGAATGGGAGGAACTATG-3′,下游:5′-GGCCACGTTGAGAAGGAGGGAG-3′。β-actin 上游:5′-ACCCCG-TGCTGCTGACCGAG-3′,下游:5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′,扩增长度 249 bp。反应体系 20 μL。94 ℃退火90 s,共循环 30 次,对所得数据进行分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经过 Levene 检验方差齐,各组测试指标的总体均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 Tβ4/CS 纳米粒的表征分析

通过激光粒度分析仪 Zetasizer 检测的结果显示,质量浓度 2 mg/L 的 Tβ4/CS 纳米粒大部分呈规则的球型(图 1),粒径为(354.0 ± 1.6)nm,zeta 电位为(22.5 ± 0.7)mV,包封率为(76.2 ± 2.8)%,体系较为稳定。

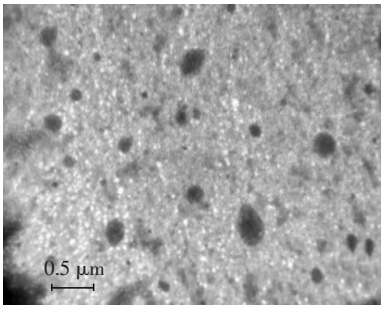


图 1 透射电镜观察载胸腺素 β4 壳聚糖纳米粒形态

2.2 Tβ4/CS 纳米粒的释药曲线

Tβ4/CS 纳米粒在体外存在明显的突释现象,18 h 释放量占总量 70%,18 ~48 h 为缓释,48 h 后药物几乎完全释放(图 2)。

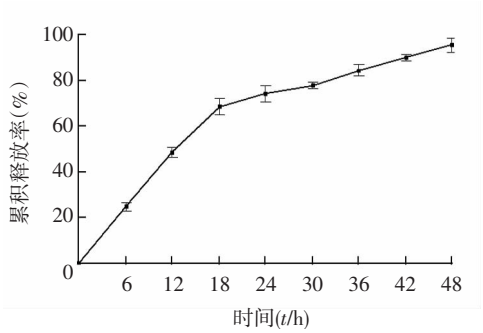


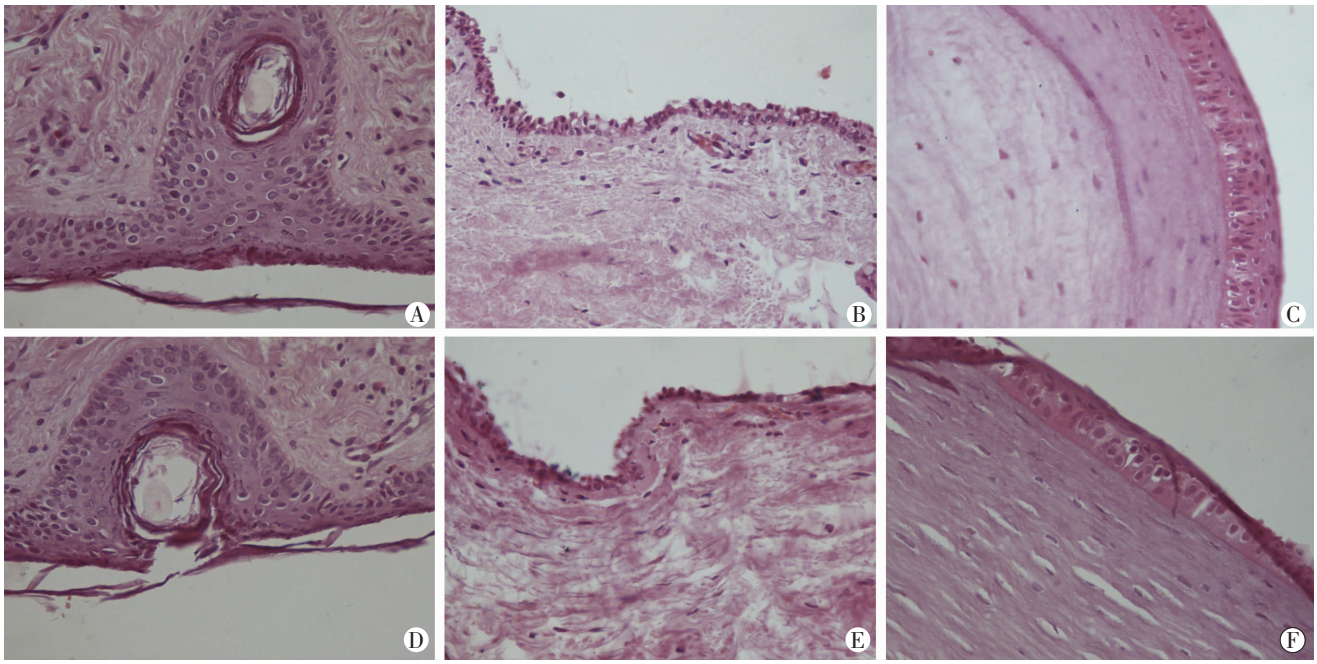
图 2 载胸腺素 β4 壳聚糖纳米粒释放胸腺素 β4 的累积曲线

2.3 眼表毒性观测

实验眼及对照眼的眼睑、结膜、组织学结构观察无任何差异;角结膜上皮细胞结构正常,无异常炎症细胞浸润;角膜上皮细胞连接紧密,5 层结构清晰,基质层中的细胞与上皮平行;眼睑组织腺体丰富,毛囊结构清晰可见;此外,角结膜及眼睑组织均无水肿(图 3)。

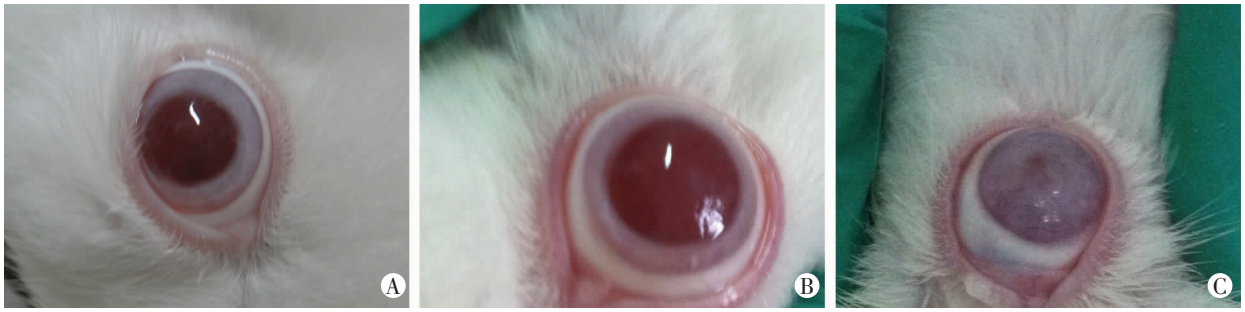
2.4 角膜大体观察及组织病理学观察

Tβ4/CS 纳米粒滴眼液可有效治疗角膜浅层基质损伤。术后 14 d 时 Tβ4/CS 纳米粒组角膜创面完全恢复至正常厚度,透明度提高,角膜上皮荧光素染色均为阴性,新生血管明显减少;Tβ4 滴眼液组角膜创面也有较好恢复,透明度提高,角膜上皮荧光素染色均为阴性;损伤对照组角膜透明度较低,大量角膜瘢痕形成(图 4)。角膜组织病理学观察差异较大,损伤对照组基质层角膜明显水肿,增厚,基质层见大量淋巴细胞浸润,新生血管长入基质层中,基质层中细胞排列紊乱,是角膜混浊的组织学基础;Tβ4/CS 纳米组兔眼角膜恢复正常厚度,角膜上皮完整连续,基质胶原纤维排列大体整齐,角膜上皮与基质连接紧密;Tβ4 滴眼液组角膜上皮较为连续,上皮细胞及基质胶原纤维排列欠整齐,上皮与基质连接较疏松(图 5)。



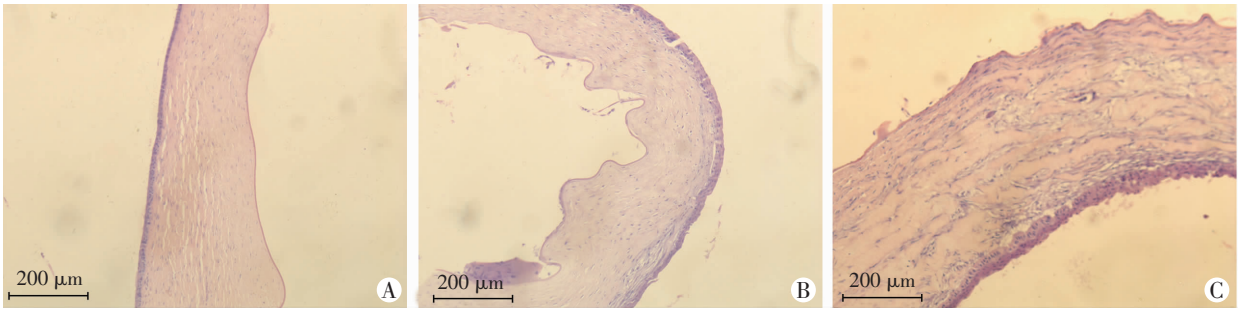
A ~ C:分别为实验眼眼睑、结膜、角膜;D ~ F:分别为对照眼眼睑、结膜、角膜

图 3 兔实验眼与对照眼眼睑、结膜、角膜组织病理学观察 (HE ×400)



A:Tβ4/CS 纳米粒组;B:Tβ4 滴眼液组;C:损伤对照组

图 4 术后 14 d 各组兔角膜大体观

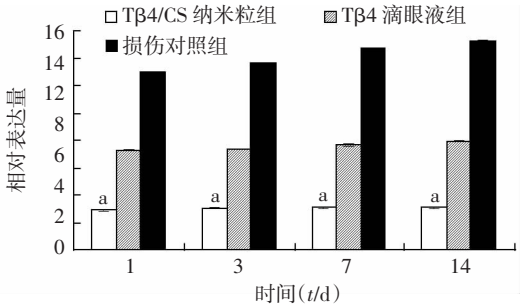


A:Tβ4/CS 纳米粒组;B:Tβ4 滴眼液组;C:损伤对照组

图 5　HE 染色观察各组术后 14 d 各组兔角膜组织病理学变化

2.5　兔角膜 NF-κB mRNA 的表达

结果见图 6。Tβ4/CS 纳米粒组、Tβ4 滴眼液组、损伤对照组兔角膜中 NF-κB 在术后 1、3、7、14 d 各组间表达差异有统计学意义($P<0.01$),Tβ4/CS 纳米粒组 NF-κB mRNA 的表达较其他 2 组显著降低($P<0.01$)。



a:$P<0.01$,与其他 2 组比较

图 6　RT-PCR 检测各组角膜创伤后 NF-κB mRNA 的表达水平

3　讨论

壳聚糖是一种无毒,体内可降解的天然碱性多糖,在医药领域用途广泛。有学者用其制作壳聚糖膜,且证实其具有抑制纤维组织增生的作用[8]。近年来壳聚糖纳米粒用来包封药物,改善药物性能的研究已被广泛报道。Tβ4 参与炎症早期级联激活反应,调节细胞因子和趋化因子,调节基底膜溶解和坏死组织的清除[9];与纤维蛋白和胶原相交联,促进胶原纤维重排与基底膜重建;促进内皮细胞分化,迁移,形成血管样结构,促进创伤处基底膜重建,血管生成,加速创伤愈合[10]。但蛋白类药物存在易变性,给药时易被局部酶水解,半衰期短的问题。角膜创伤后启动一系列的炎症进程,释放大量的趋化因子诱导中性粒细胞、巨噬细胞等进入损伤区域,并且许多前炎性因子释放增加,使损伤局部炎症失调,使角膜组织破坏严重难以愈合。

本实验采用离子交联法制备载 Tβ4 壳聚糖纳米粒,制备过程中未使用任何有毒试剂,对蛋白无任何破坏。Tβ4 壳聚糖纳米粒提高了 Tβ4 的稳定性,减少局部给药时被酶水解量,延长其半衰期。Tβ4 等电点为 5.1,中性环境下带负电,能很好地与表面带正电壳聚糖分子进行交联,从而得到比较高的包封率为(76.2±2.8)%。体外释放实验观察到药物在第 1 天有明显的突释现象,考虑主要是微粒表面吸附的药物短时间内从微粒表面脱落,导致药物浓度急剧升高,这本身并不是微粒内包裹的药物得以释放的结果。

正常角膜存在 NF-κB 的基础性表达,在角膜发育过程和正常生理活动中起到一种稳定作用。在静息状态下,NF-κB 通过 P65 亚基存在的锚定蛋白重复序列与其抑制物抑制蛋白 κB(inhibitory kappaB, IκB)结合,以失活状态存在于胞浆内[11]。NF-κB 活化后,可增强 TNFα 和 IL-1β 的基因转录,使 TNFα 和 IL-1β 产生和释放增多,进而 TNFα 和 IL-1β 再次激活 NF-κB;NF-κB 活化后还可使 IL-6 和 IL-8 产生和释放增多,导致初始的炎症信号进一步放大。Sosne 等[3]研究 Tβ4 在体外对角膜碱烧伤后 NF-κB 的作用,发现 NF-κB 的活性被降低,细胞核内 p65 蛋白的表达量降低,Tβ4 是通过抑制 NF-κB 来调节角膜炎症反应的程度。研究表明,阻断 NF-κB 活化信号调节通路,可减少炎性因子 TNFα 的产生,从而减轻炎症反应[12]。本实验证实在兔角膜创伤中 Tβ4 壳聚糖纳米粒滴眼液及 Tβ4 滴眼液可明显下调角膜中 NF-κB 的表达。使用 Tβ4 壳聚糖纳米粒滴眼液兔角膜透明度明显提高,并且 Tβ4 壳聚糖纳米粒滴眼液兔角膜组织病理学检查角膜上皮与基质贴合紧密,炎性细胞浸润较少,这与 Tβ4 纳米粒下调 NF-κB 的表达密切相关。

总之,本实验选择简单易行的方法在室温下制备了 Tβ4 壳聚糖纳米粒滴眼液,具备包封率好、缓释及对眼表无毒性等特点。Tβ4 壳聚糖纳米粒滴眼液在兔角膜创伤中可抑制 NF-κB 的表达,从而阻断其介导的反应通路,有效治疗兔角膜创伤,在治疗角膜创伤中有较大的应用价值。

参考文献:

[1] Moon H S, Even-Ram S, Kleinman H K, *et al*. Zyxin is upregulated in the nucleus by thymosin beta4 in SiHa cells[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(17): 3425-3431.

[2] Qiu P, Kurpakus-Wheater M, Sosne G. Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration [J]. J Cell Physiol, 2007, 212(1): 165 - 173.
[3] Sosne G, Qiu P, Christopherson P L, *et al*. Thymosin beta 4 suppression of corneal NFkappaB: a potential anti-inflammatory pathway[J]. Exp Eye Res, 2007, 84(4): 663 - 669.
[4] Sosne G, Albeiruti A R, Hollis B, *et al*. Thymosin beta4 inhibits benzalkonium chloride-mediated apoptosis in corneal and conjunctival epithelial cells in vitro[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(3): 502 - 507.
[5] Hasanovic A, Zehl M, Reznicek G, *et al*. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(12): 1609 - 1616.
[6] Zhang X G, Teng D Y, Wu Z M, *et al*. PEG-grafted chitosan nanoparticles as an injectable carrier for sustained protein release[J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(12): 3525 - 3533.
[7] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato J L, *et al*. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines[J]. Pharm Res, 1997, 14(10): 1431 - 1436.
[8] 商旭敏, 金中秋, 周和政, 等. 壳聚糖膜在兔眼巩膜瓣下的降解及对眼内压的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 338 - 341.
[9] Badamchian M, Fagarasan M O, Danner R L, *et al*. Thymosin beta (4) reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(8): 1225 - 1233.
[10] Wyczolkowska J, Walczak-Drzewiecka A, Wagner W, *et al*. Thymosin beta4 and thymosin beta4-derived peptides induce mast cell exocytosis[J]. Peptides, 2007, 28(4): 752 - 759.
[11] Diep Q N, El-Mabrouk M, Cohn J S, *et al*. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. Circulation, 2002, 105(19): 2296 - 2302.
[12] Chuang Y H, Chuang W L, Huang S P, *et al*. Inhibition of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activation attenuates ureteric damage in obstructive uropathy[J]. Pharmacol Res, 2009, 60(4): 347 - 357.

(**收稿**:2012-12-07;**修回**:2013-01-17)
(编辑 张 维)

(上接1465页)

罕见的杯状细胞、泡沫样细胞、具神经内分泌性质的Paneth样细胞[1];②癌细胞排列成乳头状、筛孔状及腔内乳头状,有时伴有粉刺状坏死,可见几种结构并存,并可见间质纤维化反应;③DAP多见于前列腺移行带区或外周带区[2];④DAP有单纯型和DAP-PA混合型,单纯型DAP少见(0.2% ~0.8%),更多的是和PA并存的混合型(约5%)[3]。免疫组织化学染色可协助诊断:大多数DAP的PSA、PSAP和P504S多数染色阳性,34βE12、P63多不表达。有个案报道TTF-1在DAP阳性表达[4],但本组5例TTF-1染色均为阴性。

在形态学上易与DAP混淆的疾病主要有转移性腺癌、高级别前列腺上皮内瘤变(HGPIN)、尿路上皮癌导管内播散(UCI)、前列腺导管内癌(IDC-P)等[5]。尤其需要强调的是HGPIN、IDC-P与DAP的鉴别,三者在来源、组织病理学特征、进展及预后等方面均有很大差异。HGPIN属癌前病变,在PA细胞周围常可见到,组织结构与DAP类似的有筛状和乳头状,瘤细胞多呈立方状,异型性不显著,胞核增大深染但病理性核分裂象少见,腺腔内无粉刺样坏死,生物学行为相对惰性[6];IDC-P则是PA进展的晚期事件,组织结构有筛状和实体状,癌细胞多形性显著,胞核显著增大且病理性核分裂象多见,常伴粉刺样坏死,性质较恶,预后不佳[7]。

与PA相比,混合型DAP恶性度高,进展快[3,8]。本组病例中2例混合型DAP患者出现转移并死亡,3例单纯型DAP患者均存活,预后无显著差异。研究显示,多数单纯型DAP(87%)虽然Gleason评分高(8~10分),但术后生存时间显著长于混合型DAP。他们推测单纯型和混合型DAP可能源自不同的肿瘤干细胞,认为将Gleason评分系统用于DAP值得商榷[9]。

DAP患者血清PSA水平变化不一,本组病例中1例T_{2a}的患者术前血清PSA水平升高明显(17.3 ng/mL),另1例T_{3a}患者术前血清PSA水平大致正常(4.0 ng/mL),术后2例死亡患者均出现生化复发,这提示我们血清PSA水平对本病的诊断及随访有一定作用,但用于评价肿瘤分期还有待深入研究[10]。

鉴于此,当患者出现下尿路梗阻或肉眼血尿及尿频等症状,血清PSA水平正常或略高时,临床医师要警惕DAP的可能并积极行病理活检。病理医师诊断DAP需完善鉴别诊断并明确分型(单纯型/混合型)。对于单纯型DAP,虽然目前缺乏前瞻性研究,但建议临床可以采取相对保守的治疗策略。

参考文献:

[1] Lee T K, Miller J S, Epstein J I. Rare histological patterns of prostatic ductal adenocarcinoma[J]. Pathology, 2010, 42(4): 319 - 324.
[2] Samaratunga H, Duffy D, Yaxley J, *et al*. Any proportion of ductal adenocarcinoma in radical prostatectomy specimens predicts extraprostatic extension[J]. Hum Pathol, 2010, 41(2): 281 - 285.
[3] Amin A, Epstein J I. Pathologic stage of prostatic ductal adenocarcinoma at radical prostatectomy: effect of percentage of the ductal component and associated grade of acinar adenocarcinoma[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(4): 615 - 619.
[4] Lim T K, Teo C, Giron D M, *et al*. Thyroid transcription factor-1 may be expressed in ductal adenocarcinoma of the prostate: a potential pitfall[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(8): 941 - 943.
[5] Guo C C, Epstein J I. Intraductal carcinoma of the prostate on needle biopsy: Histologic features and clinical significance[J]. Mod Pathol, 2006, 19(12): 1528 - 1535.
[6] Egevad L, Allsbrook W C, Epstein J I. Current practice of diagnosis and reporting of prostatic intraepithelial neoplasia and glandular atypia among genitourinary pathologists[J]. Mod Pathol, 2006, 19(2): 180 - 185.
[7] Pickup M, Van-der-Kwast T H. My approach to intraductal lesions of the prostate gland[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(8): 856 - 865.
[8] Seipel A H, Wiklund F, Wiklund N P, *et al*. Histopathological features of ductal adenocarcinoma of the prostate in 1 051 radical prostatectomy specimens[J]. Virchows Arch, 2013, 462(4): 429 - 436.
[9] Tu S M, Lopez A, Leibovici D, *et al*. Ductal Adenocarcinoma of the prostate: clinical features and implications after local therapy[J]. Cancer, 2009, 115(13): 2872 - 2880.
[10] 黄盛松, 吴登龙, 张惠箴, 等. 前列腺导管腺癌临床病理和诊治特点分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30(6): 382 - 385.

(**收稿**:2013-05-29;**修回**:2013-06-18)
(编辑 汪勤俭)