DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.013

3 讨论

利用SELEX技术筛选到TGF-β RⅡ适应配体的研究结果将在另文中报道，本研究择重于筛选过程中核酸-蛋白复合物分离方法的差异，对筛选富集库亲和力的影响。

经典SELEX实验系采用液相结合、滤膜分离、酚/氯仿回收方法从随机库中捕获亲和核酸序列[1]，由于酚/氯仿回收过程较为繁琐，以后又出现了多种改良方法，将靶目标预先吸附到固相支持物上再进行筛选，即是其中之一[2]，固相支持物可以是磁珠、凝胶、干燥的硝酸纤维膜、尼龙膜、微量滴定板、带荷纸等，利用改良方法已筛选到多种靶蛋白的适应配体。但我们在实践中发现，经典方法更容易富集到目的序列，除用微量滴定板作为支持物外，我们也曾采用过干燥的硝酸纤维膜和尼龙膜，在最初4轮筛选中均未能富集到TGF-β RⅡ亲和序列；Kimoto[3]在分离*Raf*-1 RNA适应配体时也发现，硝酸纤维膜分离法较Sepharose 4B基质吸附分离法更容易富集到亲和序列，而且饱和富集库中亲和序列的多样性优于吸附分离法来源的富集库；Carey[4]报道吸附到硝酸纤维膜上的R17蛋白不再具有与其核酸配体结合的特性。

综上所述，在行SELEX实验时，采用经典方法获取某种靶蛋白适应配体的成功几率高于固-液相筛选改良法。总体而论，经典方法中核酸与蛋白结合过程在溶液中进行，这样保证了蛋白、核酸分子的天然构象，同时溶液中核酸与蛋白分子间的运动、接触、碰撞可全方位进行；而蛋白预先吸附到固相支持物上，这一过程可能改变蛋白的天然构象或遮蔽蛋白分子中与核酸结合表位，另一方面蛋白分子不能自由运动，减少了核酸分子与蛋白分子接触、碰撞的几率，其次仅有被吸附的蛋白分子参与结合反应，蛋白投入量与实际反应量有一定差异，这些因素都不利于从核酸随机库中富集到目的序列。当然，不是所有的蛋白都会受到上述不利因素的影响，我们建议在最初几轮筛选中采用经典方法更能保证快速富集到相关目的序列。

参考文献：

[1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.

[2] Drolet D W, Jenison R D, Smith D E, *et al*. A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment(SELEX)[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 1999, 2(5): 271-278.

[3] Kimoto M, Shirouzu M, Mizutani S, *et al*. Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(2): 697-704.

[4] Carey J, Lowary P T, Uhlenbeck O C. Interaction of R17 coat protein with synthetic variants of its ribonucleic acid binding site[J]. Biochemistry, 1983, 22(20): 4723-4730.

（编辑 张 宁）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)08-0682-02

乳腺导管内乳头状瘤漏诊3年后致癌变1例

One case of canceration of breast intraductal papilloma misdiagnosed for 3 years

张 帆，姜 军 （第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

患者，女，45岁。因左乳头溢血1年余入院。查体：一般情况良好，双乳腺形态正常，未触及包块，挤压左乳晕区左乳头有血性溢液，双腋窝无肿大淋巴结。溢液细胞学检查未见癌细胞。乳腺钼靶摄片未见异常。溢液乳腺导管造影发现主导管扩张，其下方近分支处管型有破坏，见不规则充盈缺损约0.5 cm。术前考虑为导管内乳头状瘤，在局麻下行扩张导管切除术。术中冰冻及术后石蜡切片均报告：左乳腺腺病。术后顺利出院，溢血停止。3年后，患者左乳腺原切口旁出现一包块，再次就诊并入院。查体：左乳内上象限原切口疤痕旁一2 cm×1.5 cm×1.5 cm包块，质中，轻压痛，可推动，无乳头回缩及局部皮肤改变，挤压乳晕区无乳头溢液，双腋窝无肿大淋巴结。超声检查发现左乳内上象限2 cm×1 cm×1 cm包块，边界不清，无包膜，回声减弱不均质。于局麻下行乳腺包块切除并送冰冻，报告为乳腺导管内乳头状瘤，局部疑有癌变。遂改为全麻，行左乳单纯切除。术后石蜡切片见：导管上皮细胞增生活跃，呈乳头状增生，部分区域细胞异型，排列极向紊乱，并见浸润，

（下转686页）

作者简介：张 帆(1977-)，男，贵州省瓮安县人，硕士，医师，主要从事乳腺甲状腺外科方面的研究。电话：(023)68754000-73075

收稿日期：2002-05-14；修回日期：2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

提示蚊黑化免疫反应表达的蛋白成分可释放入血淋巴并明显影响蚊体内疟原虫孢子增殖。

斯氏按蚊是约氏疟原虫的易感蚊种，感染约氏疟原虫后 PO 活性无明显变化，喂硝喹后雌斯氏按蚊血淋巴中 PO 活性显著升高，原位杂交也发现用药组 PPO mRNA 表达较强[5]。本研究也观察到应用硝喹后，约氏疟原虫感染的雌斯氏按蚊可发生完全黑化。正常感染时，斯氏按蚊不视约氏疟原虫动合子和卵囊为异物，这可能是长期进化相互适应的结果，而用药后，蜕变的疟原虫动合子和卵囊可能被斯氏按蚊视为异己成分，从而激活按蚊体内 PPO 系统，引起黑化包被反应。SDS-PAGE 分析显示血淋巴中存在较多差异蛋白带，这可能与黑化过程 PPO 级联反应的一系列蛋白酶和蛋白因子如前酚氧化酶活化因子 1、PPO、PO、丝氨酸蛋白酶、多巴色素转化酶、多巴色素异构酶、多巴脱羧酶和多巴胺色素异构酶等变化有关[8,9]。寻找引起疟原虫黑化包被的识别分子是媒介生物学的一个重要目标，而"差异策略"是解决这一问题途径，如基因定位克隆、基因差异显示，但这种基因策略在涉及新的蛋白质参与时难以获得满意结果。感染约氏疟原虫斯氏按蚊吸饲硝喹糖水后其血淋巴蛋白表达有差异，利用二维电泳分析策略具有诸多优点，进一步进行血淋巴差异蛋白分析，找出其多肽差异，根据这些差异蛋白质的氨基酸序列获得 DNA 克隆，深入研究和进行黑化相关蛋白的差异筛选和鉴定，将逐步解开疟原虫卵囊黑化机制。

参考文献：

[1] Shahabuddin M, Fields I, Bulet P, *et al*. *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin[J]. Exp Parasitol, 1998, 89(1): 103—112.

[2] Shahabuddin M, Costero A. Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes[J]. Insect Biolchem Mol Biol, 2001, 31(3): 231—240.

[3] Dushay M S, Eldon E D. Drosophila immune responses as models for human immunity[J]. Am J Hum Genet, 1998, 392(6671): 93—97.

[4] Dimopoulos G, Richman A, Muller H M, *et al*. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(21): 11508—11513.

[5] 时超美，黄复生，况明书，等. 斯氏按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化的关系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，2000，18(1)：11—13.

[6] 黄复生，王兴相. 硝喹对约氏疟原虫卵囊和子孢子作用的观察[J]. 第三军医大学学报，1991，13(1)：1—4.

[7] Han Y S, Chun J, Schwartz A, *et al*. Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding[J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(7-8): 553—562.

[8] Kwon T H, Kim M S, Choi H W, *et al*. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia larvae*[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(20): 6188—6196.

[9] Johnson J K, Li J, Christensen B M. Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(11): 1125—1135.

（编辑 王 红）

（上接 682 页）

周围腺病改变。病理诊断为导管内乳头状瘤癌变。术后经过顺利，至今已随访 10 年，肿瘤无转移及复发。

讨论

导管内乳头状瘤是女性常见乳腺良性肿瘤之一，高发年龄为 45～50 岁，主要表现为乳头溢液，发生率为 70%～85%，其中血性及浆液性溢液各约 50%。部分病例可因肿瘤增大或乳管阻塞后积液扩张出现乳晕周围质软包块，包块直径多小于 2 cm。结合典型症状体征及术前乳腺导管造影发现，常可于术前明确导管内乳头状瘤诊断。文献[1,2]报道发生癌变者占导管内乳头状瘤的 10%～11.72%。但对于导管内乳头状瘤癌变患者要在术前确诊较为困难。病程长、血性溢液、包块较大等应怀疑癌变可能。癌变后为低度恶性，不易发生区域淋巴结及远处转移，治疗效果较好。本例首次入院溢液导管造影曾发现主导管下方近分支处管型有破坏，见不规则充盈缺损约 0.5 cm，术前诊断为导管内乳头状瘤。行扩张导管切除术时冰冻及石蜡切片均显示为腺病，未见导管内乳头状瘤，显然不能解释造影所见的管型破坏及充盈缺损。以上未引起术者重视，未进一步寻找原因。虽然术后乳头溢液消失，但消失原因并非切除病变所致，而源于溢液导管的结扎。以上失误终导致 3 年后发现的导管内乳头状瘤癌变。导管内乳头状瘤瘤体常较小，术中肉眼常不能分辨，适当的手术切除范围往往是完整切除导管内乳头状瘤的保证，故对自溢液乳管注入美蓝后染色的导管腺体区域完整切除是手术成功的关键。术后应加强随访，以便及时发现异常并正确处理。

关键词：乳腺；导管内乳头状瘤；癌变；
中图法分类号：R737.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴晓芝，张振华，吴广平，等. 乳腺导管内乳头状瘤癌变的细胞学分析[J]. 中国医科大学学报，2001，30(2)：141.

[2] 曲宏岩，赵龙滨，徐海涛. 乳管内乳头状瘤的诊断及治疗[J]. 实用肿瘤学杂志，2000，14(3)：202.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net