DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.013
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
782 2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)07-0782-04

人CTLA4Ig和EGFP双基因共表达逆转录病毒载体构建及鉴定

贺伟峰,吴 军,易绍萱,罗高兴,陈希炜,郑峻松,马 兵,雷 晓 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 构建并鉴定人CTLA4Ig和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)双基因共表达逆转录病毒载体。方法 利用基因重组技术将IRES序列与CTLA4Ig和EGFP基因构建到逆转录病毒载体中,脂质体法将重组质粒pCTLA4Ig-IRES2-EGFP转染PA317细胞,在G418选择压力下,通过流式细胞检测筛选得到高效共表达CTLA4Ig和EGFP并能产生高滴度重组逆转录病毒的PA317细胞克隆,MTT法测定CTLA4Ig生物学活性。结果 成功构建出含IRES序列的CTLA4Ig和EGFP双基因共表达逆转录病毒载体,生物学活性测定表明CTLA4Ig生物学活性没有受到影响。结论 IRES序列调控CTLA4Ig与EGFP双基因在细胞中同时独立表达。

关键词:CTLA4Ig;EGFP;IRES2;逆转录病毒;双基因共表达
中图法分类号:R373;R394.2 文献标识码:A

Construction and identification of dicistronic retrovirus expression vector to coexpress human CTLA4Ig and EGFP genes

HE Wei-Feng, WU Jun, YI Shao-xuan, LUO Gao-xing, CHEN Xi-wei, ZHENG Jun-song, MA Bing, LEI Xiao (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstracts: Objective To construct a dicistronic retrovirus expression vector to coexpress both human CTLA4Ig and EGFP genes. Methods Internal ribosomal entry site (IRES) sequence, CTLA4Ig and EGFP cDNA were recombined with retroviral vector pLXSN with gene recombination technique. The recombinant plasmid was transferred into retrovirus packaging cell line PA317 by using lipofectamine. The resistant clones were selected by G418, and then the clones coexpressing CTLA4Ig and EGFP genes were screened with FACS. The biological activities of CTLA4Ig in the culture were determined with MTT assay. Results The Mo-MuLV-based retrovirus vector with EGFP and CTLA4Ig gene was successfully constructed by two-gene recombination. CTLA4Ig in the culture remained the intact biological activities. Conclusion CTLA4Ig and EGFP genes are simultaneously and individually expressed in PA317 cell line by the regulation of IRES sequence.

Key words: CTLA4Ig; EGFP; IRES2; retrovirus; dicistronic

CTLA4基因是1987年Brunet等从小鼠细胞毒性T细胞(CD8+T)功能相关基因的cDNA差示文库(Subtracted library)中分离到的第四个特异性基因。可溶性CTLA4Ig是人CTLA4分子胞外区(Extracellular domain)与人免疫球蛋白γ1绞链区、CH2、CH3区组成的融合蛋白,与B7有高度的亲和力,可以竞争性地阻断B7与CD28结合[1,2]。EGFP受紫外线激发后即可发出明亮的绿色荧光,可在荧光显微镜下直接观察到。因而,EGFP常被作为报告分子用于检测细胞中目的蛋白的表达和定位[3,4]。IRES元件能够启动真核细胞的多顺反子转录单位的两个或多个蛋白的同时分别表达,而且蛋白之间互不影响彼此功能[5~7]。为了获得带有EGFP报告基因和人CTLA4Ig基因的逆转录病毒载体,我们通过两次基因重组将人CTLA4Ig基因、IRES元件与EGFP基因一起构建到逆转录病毒载体中;通过脂质体转染,将构建好的重组逆转录病毒质粒转染逆转录病毒包装细胞系PA317;在G418选择压力下,通过流式细胞检测筛选得到高效共表达CTLA4Ig和EGFP并能产生高滴度重组逆转录病毒的PA317细胞克隆;对其进行了安全性检测实验、滴度检测试验、共聚焦检测等。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和细胞

质粒pUC19-CTLA4Ig由烧伤研究所易绍萱副研究员提供,pIRES2-EGFP质粒购于美国CLONTECH公司,pLXSN质粒、大肠杆菌JM109、PA317细胞株、NIH 3T3细胞株由烧伤研究所保存。

1.2 酶和试剂

质粒提取试剂盒、脂质体转染试剂盒DOSPER、限制性内切酶*Sal*Ⅰ、*BamH*Ⅰ、*Xho*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*Stu*Ⅰ购于ROCHE生物公司,G418购于GIBCO公司,PE标记的鼠抗人CTLA-4单抗购于Pharmingen公司

1.3 pCTLA4Ig-IRES2-EGFP表达载体的构建

分别用*Sal*Ⅰ和*Hind*Ⅲ单酶切pUC19-CTLA4Ig和pIRES2-EGFP质粒,0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒被完全切开后,PCR片段回收试剂盒回收线性化pUC19-CTLA4Ig和pIRES2-EGFP片段,经Klenow酶将粘端填平后,再经PCR片段回收试剂盒回收填平后pUC19-CTLA4Ig和pIRES2-EGFP片段,经*BamH*Ⅰ酶切后产生一端是平端另一端是粘端的CTLA4Ig cDNA目的片段和

基金项目:国家基金资助重点项目(39993430-2);国家自然科学基金资助面上项目(39970756);国家科技部资助重点项目(96-920-20-10)
作者简介:贺伟峰(1974-),男,河南省双峰县人,硕士,医师,主要从事烧伤以及移植免疫方面的研究。电话:(023)68754000-73172
收稿日期:2001-09-11;修回日期:2002-01-08

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

pIRES2-EGFP 载体片段, 琼脂糖凝胶电泳分别回收 1.2 kb CTLA4Ig 片段和 5.4 kb pIRES2-EGFP 载体片段, 以载体:插入片段为 1∶3 的摩尔比, 按 DNA 快速连接质粒。kit 说明连接, 即用 5 倍 DNA 稀释缓冲液将片段和载 DNA 稀释至 10μl, 加入 2 倍连接缓冲液 10μl, 混合后加入 1μl T4DNA 连接酶, 室温连接 1 h, 取 2μl 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 挑选阳性转化菌落, *Xho* Ⅰ、*BamH*Ⅰ 酶切鉴定重组。

1.4　pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP 逆转录病毒表达载体的构建

分别提取酶切鉴定证实的 pCTLA4Ig-IRES2-EGFP 表达质粒和 pLXSN 表达载体质粒 DNA, 经 *Xho* Ⅰ、*Stu* Ⅰ 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳分别回收 3.6 kb 含 CTLA4Ig 和 EGFP 的基因片段和 5.7 kb pLXSN 载体片段, 以载体∶插入片段为 1∶3 的摩尔比, 按 DNA 快速连接试剂盒说明连接, 转化冷冻保存的 JM109 感受态菌, 挑选阳性转化克隆, 扩增, 提取质粒, *Xho* Ⅰ、*Stu* Ⅰ 双酶切鉴定重组子。

1.5　包装细胞转染及 PA317 细胞克隆的筛选

采用脂质体介导的基因转移方法将含人全长 pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP 的重组逆转录病毒载体转染 PA317 包装细胞, 用含 500μg/ml G418 的选择培养基筛选, 通过克隆环分别挑取单个抗性克隆, 扩增后取部分细胞经 PE 标记的鼠抗人 CTLA4Ig 抗体作常规荧光免疫染色, 流式细胞挑选出 EGFP 和 CTLA4Ig 共强表达的 PA317 细胞克隆, 收集上清进行病毒滴度测定。

1.6　病毒滴度测定

将对数生长期 NIH3T3 细胞接种于 6 孔板中(1× 10^5/孔), 每孔加不同浓度的病毒上清及终浓度为 8μg/ml Polybrene 培养 12 h, 按 1∶10 传代培养 48 h, 筛选 2 周, 克隆形成后甲醇固定, Giemsa 染色, 计数克隆, 计算病毒滴度。

1.7　转染细胞上清 CTLA4Ig 的生物学活性测定

CTLA4Ig 在人混合淋巴细胞反应中的作用: 将两个不同供者的外周血单个核细胞按每孔各 1× 10^5 接种至 96 孔板中, 每孔分别加入经亲和层析柱纯化后获得的 CTLA4Ig 基因转染 PA317 细胞培养上清液 30μl、60μl, 37 ℃、5% CO_2 培养 6 d 后, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 10μl, 继续培养 4 h, 然后离心, 甩去上清, 加入溶解液(100% DMSO), 150μl/孔, 轻轻震荡, 待 MTT 结晶完全溶解, 10 min 后, 用 DG-3 022 型酶联免疫检测仪于 570 nm 处, 测 *A* 值并记录结果, 结果以 3 孔均值表示。

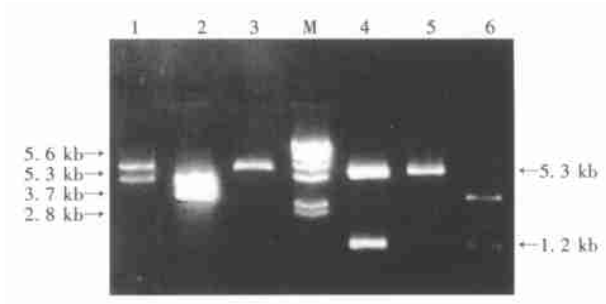
1.8　病毒安全性检测

NIH3T3 细胞转染病毒 72 h 后, 换无血清的 DMEM 培养液继续培养 48～72 h 收集上清, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清再进行病毒滴度的测定以观察是否有野生型的病毒生成。

2　结果

2.1　pCTLA4Ig-IRES2-EGFP 质粒构建及 pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP 逆转录病毒表达载体的构建

pCTLA4Ig-IRES2-EGFP 重组载体经 *BamH*Ⅰ 和 *Xho*Ⅰ 双酶切, 1.2%凝胶电泳, 紫外透射反射检测仪上观察可见一条 1.2 kb 目的片段和 5.3 kb 载体片段, 见图 1, 与预期的结果相符, 表明 CTLA4Ig 已被成功的插入到 pIRES2-EGFP 中。pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP 重组载体进经 *Xho* Ⅰ、*Stu* Ⅰ 双酶切, 1.2%凝胶电泳, 紫外透射反射检测仪上观察可见一条 3.6 kb 的目的片段和 5.7 kb 的载体片段见图 1, 与预期的结果相符, 表明 CTLA4Ig 已被成功地插入到 pIRES2-EGFP 中。



1: pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP(*Xho* Ⅰ, *Stu* Ⅰ); 2: pIRES2-EGFP(*Xho* Ⅰ, *Stu* Ⅰ); 3: pLXSN(*Xho* Ⅰ, *Stu* Ⅰ); 4: PCTLA4Ig-IRES2-EFP(*Hind* Ⅲ, *BamH* Ⅰ); 5: pIRES2-EGFP(*BamH* Ⅰ); 6: pUC19-CTLA4Ig(*Xho* Ⅰ, *Hind* Ⅲ)

图 1　**pCTLA4Ig-IRES2-EGFP 及 pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP** 质粒构建及酶切鉴定

Fig 1　Construction and identification of pCTLA4Ig-IRES2-EGFP and pLXSN-CTLA4Ig-IRES2-EGFP plasmids

2.2　强表达 CTLA4Ig 和 EGFP 的 PA317 细胞克隆的筛选及病毒滴度的测定

根据不同 PA317 克隆的 PE 标记抗 CTLA4 与 EGFP 的双色流式细胞图, 我们选择 6 个 EGFP 和 CTLA4Ig 均强表达的细胞克隆(clone1、colne 10、clone11、clone13、clon14、clone15)进行大规模扩增, 并测定滴度, 它们的滴度都在 10^6pfu/ml 之上。

2.3　共聚焦检测 PA317 细胞克隆中 CTLA4Ig 和 EGFP 的表达及细胞定位

共聚焦显微镜下观察在绿色荧光激发通道 EGFP 受激发, 细胞发出明亮的绿色荧光; 在红色荧光激发通道, 抗人 CTLA4 抗体的 PE 标记受激发, 细胞发出明亮的红色荧光。共聚焦分析可见, 绿色荧光与红色荧光的强弱分布位置基本一致, 且都分布在胞质中, 见图 2。

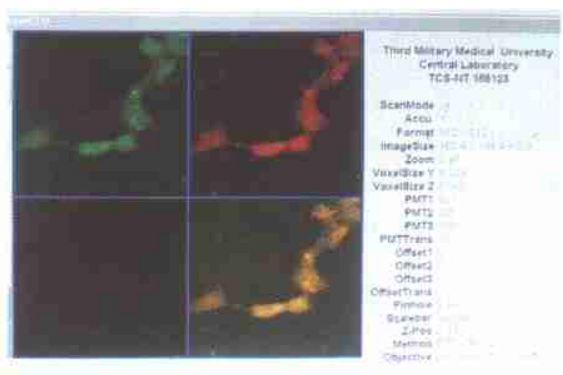


图 2　激光共聚焦观察 **EGFP**(绿色荧光)和 **CTLA4Ig**(红色荧光)的表达(× 250)

Fig 2　Laser-scanning confocal microscopic observation of PA317 cells coexpressing both human CTLA4Ig (Red fluorescence) and EGFP (Green fluorescence) (× 250)

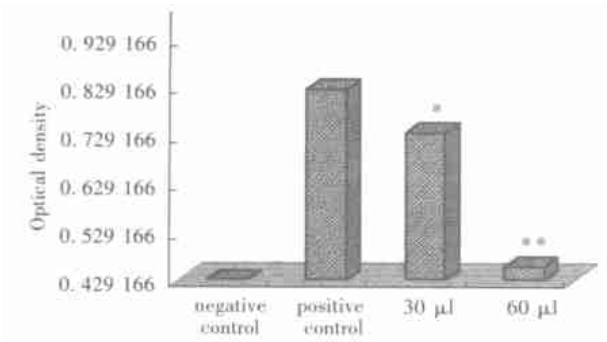
2.4　Dot-ELISA 检测上清中的 CTLA4Ig

以挑选出的 PA317 细胞克隆的无血清上清经 Protein A 亲和层吸柱纯化浓缩后进行膜 ELISA 检测, 结果阳性。

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

2.5 纯化 CTLA4Ig 对 PBMC 增殖活性的影响

在人-人外周血混合淋巴细胞反应体系中，分别加入 30 μl 和 60 μl Protein A 纯化的转染 CTLA4Ig 的 PA317 细胞上清，Protein A 纯化空载体转染 PA317 细胞上清作为阴性对照。结果表明，加入 60 μl Protein A 纯化转染 PA317 细胞上清，能显著抑制人外周血 MLR，抑制率为 92.74%；而加入 30 μl Protein A 纯化转染 PA317 细胞上清，抑制率为 22.75%；同样体积的 Protein A 纯化空载体转染 PA317 细胞上清，则无此作用，经单因素方差分析，差异有显著性意义（$P<0.05\sim0.01$），见图 3。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* positive control

图 3 纯化 **CTLA4Ig** 对人外周血 **MLR** 的抑制作用

Fig 3 Inhibitory effect of CTLA4Ig in the supernatant of PA317 cell culture on two-way mixed lymphocyte reaction

2.6 病毒安全性检测和感染病毒后 NIH3T3 细胞中 CTLA4Ig 和 EGFP 的表达

用感染逆转录病毒的 NIH3T3 细胞上清作病毒滴度分析，细胞作免疫荧光检测，结果显示上清中没有感染性逆转录病毒产生。

3 讨论

1991 年 Linsley 等利用分子生物学的方法，将人 CTLA4 的胞外区与人 IgG Cγ1 的铰链区和恒定区 CH2、CH3 cDNA 融合，构建了可溶性 CTLA4Ig。CTLA4Ig 可封闭 APC 上的 B7 分子，从而阻断共刺激通路，调节 T 细胞活性，在混合淋巴细胞反应中能抑制淋巴细胞的增殖，最大抑制率可达 90%以上，给小鼠注射 CTLA4Ig 可完全抑制它对颗粒性抗原和可溶性抗原的初次抗体反应[9]。由于 B7/CD28 辅助信号系统在免疫系统的激活中起重要作用，CTLA4 Ig 主要在抗原启动、活化 T 细胞阶段起作用，更重要的是，CTLA4Ig 通过抑制抗原反应性细胞的克隆扩增而诱导免疫耐受[10]。但由于 B7 分子是非特异性的共刺激信号，因此只有在封闭其的同时与特异性的抗原共同作用于 T 淋巴细胞才能诱导出抗原特异性免疫耐受，而抗原递呈细胞则是联系两者的桥梁。

本实验所用的逆转病毒表达载体 pLXSN 是大小为 5 864 bp 含有多个克隆位点的通用逆转录病毒载体，它来源于 moloney 小鼠白血病病毒（MoMLV），是 LN 载体的一种，由 Miller 等在逆转录病毒载体 N2 基础上构建的新一代载体，在结构上属 VIP（Vectors with internal promoter 带有内部启动子载体）。pLXSN 不仅去除了病毒的结构基因组 gag，pol，env，而且将 gag 基因的翻译起始密码子 ATG 变成终止子 TAG，将 5′端 MoMLV 序列用相应的小鼠肉瘤病毒（MoMSV）序列所取代，进一步减少了同源重组的概率，使逆转录病毒载体介导的基因转移隐患大大降低，具有较高的安全性。pLXSN 经 PA317 包装后可获得较高的病毒滴度，是其它逆转录病毒载体的 10～15 倍。

IRES 序列源自小 RNA 病毒科 mRNA 5′端的一段非翻译区，具有内核糖体进入位点的功能，其优点在于将 IRES 与多个非相关基因连接在一起，可同时转录成一条单链 mRNA，但翻译又是各自独立的，这样就可保证用 IRES 序列连接的非相关基因各自独立的表达。

报告基因发挥作用的前提是实现双基因的共同表达。共表达策略主要有三：①应用两个独立的启动子；②用目的基因和标记基因产物构建一个嵌合的双功能蛋白质；③应用内部核糖体进入位点（IRES）序列。在实践中，研究者们发现：应用双启动子存在启动子抑制现象，不能保证两个基因同时表达；嵌合蛋白的效率很高，但抗体工程的工作繁琐而复杂；目前最成功的手段是应用 IRES 序列。转录时，在上游启动子的控制下，两个基因及 IRES 序列同时转录成一条单链 mRNA。但是，两个基因的翻译是独立的。目的基因多为帽依赖型，而标记基因则由 IRES 控制，其可行性和高效性在双基因逆转录病毒载体中的应用已获验证。IRES 的应用，使单个载体的参与避免了启动子抑制现象，可同时保证多种蛋白质的合成。

EGFP 由 238 个氨基酸组成的绿色荧光蛋白，其基因于 1992 年首先从水母 *Aequorea victoria* 克隆出来。多肽内部包括一个天然形成的生色团，后者包括的咪唑环由 65 位丝氨酸，66 位酪氨酸和 67 位甘氨酸残基自动环化形成。EGFP 的突变体较野生型自发荧光更强，因而检测更为灵敏。

Ana Lim 利用 EGFP 基因研究了逆转录病毒载体转移多种细胞系的情况，如：K562，HeLa，J774A.1（小鼠巨噬细胞系），TF-1（人骨髓 CD34 髓系多能干祖细胞系）。其构建的逆转录病毒载体中并不包含常规的 neo 基因。因为 EGFP 的存在，借助流式细胞仪和自动克隆系统，免却了 G418 较长周期的筛选，使病毒的包装更为简单和迅速。

在实验中，为了高效、长期稳定的获得高滴度的逆转录病毒，并且能够直观的观察目的基因的表达强弱，我们将 EGFP 报告基因（EGFP）用 IRES 元件与基因相连，再一起构建到逆转病毒表达载体 pLXSN 中。

我们先通过流式细胞检测，根据 EGFP 和 CTLA4Ig 双表达高效地筛选出 6 个强表达的 PA317 细胞克隆。结果显示，表达 CTLA4Ig 的细胞不一定表达 EGFP，但表达 EGFP 的细胞均表达 CTLA4Ig，而且 EGFP 强表达的细胞表达 CTLA4Ig 也强。再通过病毒滴度测定来筛选出高滴度病毒 PA317 细胞克隆（与 EGFP 表达强度相关），

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

分析该细胞克隆后, 发现两种蛋白在细胞中同时表达, 表达分布基本一致, 表达强度呈正相关, 说明 EGFP 在本实验中可作为目的蛋白表达强弱的标志。Dot-ELISA 实验和混合淋巴细胞增殖反应说明 CTLA4Ig 具有完全的生物学活性, 说明 CTLA4Ig 和 EGFP 是分开独立表达的。当用该细胞克隆生产出来的病毒转染 3T3 细胞时仍发现两种蛋白在转染细胞中同时表达, 且表达强度呈正相关, 这说明 EGFP 在本实验中可作为病毒转染效率和被转染细胞中目的基因表达强度的标志。因此在实验中可以利用 EGFP 来检测病毒包装细胞是否发生了目的基因的丢失, 并可用来检测病毒是否将目的基因转入靶细胞和在靶细胞中表达的强弱。

参考文献:

[1] Page D M, Kane L P, Allison J P, *et al*. Two signals are required for negative selection of CD4+、CD8+ thymocytes by T-cell receptor peptide antagonists[J]. J Immunol, 1993, 151(4): 1 868—1 880.

[2] Kearney E R, Walunas T L, Karr R W, *et al*. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells *in vivo* is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1 032.

[3] Cormack B P. FACS-optimized mutants of the *Aequor eavictoria* green-fluorescent protein[J]. Gene, 1992, 111(2): 229—233.

[4] Chalfie M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5 148): 802—805.

[5] Flasshove M, Bardenheuer W. Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126(7): 391—399.

[6] Venkatesan A, Dasgupta A. Novel fluorescence-based screen to identify small synthetic internal ribosome entry site elements[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(8): 2 826—2 837.

[7] Wang X, Wan H, Korzh V, *et al*. Use of an IRES bicistronic construct to trace expression of exogenously introduced mRNA in zebrafish embryos[J]. Biotechniques, 2000, 29(4): 814—820.

[8] Linsley P S, Wallace P M, Johnson J, *et al*. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule[J]. Science, 1992, 257(5 071): 792—795.

[9] Judge T A, Tang A, Spain L M, *et al*. The in vivo mechanism of action of CTLA4Ig[J]. J Immunol, 1996, 156(6): 2 294—2 299.

（编辑　陈聪连）

（上接 781 页）

2.2　诊断

IC 的诊断, 特别是早期诊断一直是个难点, 目前认为必须是典型临床症状、膀胱镜检查和病理学检查三方面结合起来进行。1987 年 Niaddkd 提出的 4 条诊断标准被广泛接受: ①功能性膀胱容量小于 350 ml; ②麻醉下膀胱镜检查有 Hunner' s 溃疡或许多特征性血管球; ③症状持续 1 年以上; ④无感染或其它已知的膀胱炎病因, 无膀胱原位癌[1]。我院 5 例均符合此标准。Hunner' s 溃疡为 IC 确诊指标之一, 出现率不到 10%, 膀胱水压扩张后出现草莓状斑片出血、裂隙及特征性血管球也曾被认为是早期诊断指标, 但近年有报道正常膀胱水压扩张后也会有同样表现[4]。光镜下膀胱平滑肌细胞内肥大细胞计数已被认为无诊断意义, 代之以逼尿肌细胞内肥大细胞数与粘膜内肥大细胞数之比(> 0. 75 有诊断意义), 或电镜观察下激活的肥大细胞占肥大细胞总数比率[5]。

2.3　治疗

由于 IC 的病因不明, 因此无特异性治疗方法。抗组胺药、抗胆碱能药、抗炎药、镇静药、麻醉药、激素等多药物多方法联合保守治疗可使 90% 病例缓解症状, 10% 仍需外科治疗。常用方法有: ①膀胱水压扩张: 既为诊断方法, 同时也是一种治疗, 绝大部分可缓解症状, 但缓解期短, 复发率高, 可能与膀胱壁内神经轴突受损及再生有关。②口服药物: 羟嗪、阿米替林、多虑平等药, 既可改善 IC 患者焦虑症状, 也具有抑制神经末梢、肥大细胞释放神经肽及细胞因子的作用, 改善局部症状, 有效率可达 30% ~ 40%; 木聚硫钠(Pentosan Polysulfate Sodium, 商品名 Elmiron), 具有弱的抗凝血和纤维蛋白溶解作用, 对能降低膀胱壁渗透性的膀胱表面粘蛋白有改变作用, 治疗 IC 的有效率可达 50% 以上[6]。③膀胱灌注: 二甲亚砜(DMSO)在木聚硫钠被批准前是治疗 IC 首选药, 具有消炎止痛、松弛肌肉、溶解胶原、抑制肥大细胞等药理作用, 有效率为 50% ~ 90%, 但停药后复发率可达 35% ~ 40%, 绝大部分复发者对 DMSO 再次治疗仍有效。肝素可抑制纤维母细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞增生, 有抗炎与粘膜保护作用, 和氨基葡聚糖(GAG)一样有抗粘附作用, 与 DMSO 合用可使复发率下降到 20%[7]。近年有报道认为卡介苗(BCG)膀胱灌注有效率可达 60%, 具体机制不祥。我院 5 例病人中曾有一例患者行 BCG 灌注 2 次, 因局部刺激症状严重而停止。④症状严重且对保守治疗无效, 或已发展成为器质性小膀胱的患者, 可采用经尿道溃疡部电灼术、膀胱松解术、膀胱去神经术、膀胱重建术等手术处理, 但病例及术式的选择一定要慎重。

关键词: 间质性膀胱炎; 病因学; 诊断; 治疗
中图法分类号: R694. 3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Gillenmater J Y, Wein A J. Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases workshop on interstitial cystitis[J]. J Urol, 1988, 140(1): 203—206.

[2] Held P J, Hanno P M, Wein A J, *et al*. Epidemiology of interstitial cystitis [A]: in Hanno PM, Staskin DR, Krane RJ. Interstitial cystitis[M]. New York: Springer-Verlag, 1990. 29—48.

[3] Elbadawi: Interstitial Cystitis: A Critique of current concept with a new proposal for pathologic diagnosis and pathogenesis[J]. Urol, 1997, 49(5A Suppl): 14—40.

[4] Waxman J A, Sulak P J, Kucehl T J. Cystoscopic findings consistent with interstitial cystitis in normal women undergoing tubal ligation[J]. J Urol, 1998, 160(5): 1 663—1 667.

[5] Hofmeister M A, Fang H E, Ratliff T L, *et al*. Mast cells and nerve fibers in interstitial cystitis: An algorithm for histologic diagnosis via quantitattive image analysis and morphometry(QIAM)[J]. Urol, 1997, 49(5A Suppl): 41—47.

[6] Ho N J, Kosiol J A, Parsons C L, *et al*. Natual history of interstitial cystitis in 274 patients receiving sulfatool polysacharide therapy[J]. Urol, 1999, 53(6): 1 133—1 139.

[7] 杨富林, 王仁顺. 膀胱内灌注药物治疗间质性膀胱炎近况[J]. 临床泌尿外科杂志, 1995, 10(6): 375—377.

（编辑　潘式文）

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