DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.022
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
50 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0050-05

视网膜母细胞瘤中基因杂合缺失现象的研究

府伟灵,汪江华,张晓莉,周来新,雷曼平,华 川 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 由于Rb1基因的失活可能不是引发视网膜母细胞瘤(RB)的唯一因素,因此,此项课题中我们通过探索第13号染色体上基因杂合缺失(LOH)现象发生的机率以及通过家系分析确定标记位点缺失的遗传学来源,试图探明其它可能参与RB发生发展的基因存在的位点,并试图寻找和确定具有诊断及预后价值的LOH检测指标。方法 16个RB患者成对的肿瘤与其相应血清标本在13号染色体上14个微卫星标记处通过荧光PCR进行扩增,分析测定LOH;并通过对患者家庭进行分析确定标记位点缺失的遗传学来源。结果 16个RB患者中,12个在13号染色体上一个或一个以上位点发生LOH。其中三个位点,D13S265、D13S263和D13S153(位于Rb1基因内),LOH发生机率最高,分别是8个、8个和9个。12个LOH阳性标本中有10个标记位点的缺失被确定发生在父系来源的染色体中。LOH阳性及阴性组肿瘤的发生时间分别为504 d和1 086 d。结论 在位点D13S263(13q14.1—14.2)和D13S265(13q31—32)处可能含有某些未知基因参与RB的发生发展;在我们的实验群体中标记位点缺失大多选择性地发生在父系来源的染色体中;此外,LOH阳性组的患者RB确诊时间早于LOH阴性组,其中D13S263和D13S265两个位点的LOH现象可能对RB的早期诊断具有一定提示作用。

关键词:视网膜母细胞瘤;RB1基因;微卫星标记;杂合性缺失
中图法分类号:R394.2;R739.702 文献标识码:A

Studies on loss of heterzygosity in retinoblastoma

FU Wei-ling, WANG Jiang-hua, ZHANG Xiao-li, ZHOU Lai-xin, LEI Man-pin, HUA chuan (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To identify the specific loci containing suspected genes which might play roles in the onset or progress of retinoblastoma (RB) by investigating the incidence of loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 13 and the parental origin of deletion with linkage analysis, and to explore the diagnostic and prognostic significance of LOH at specific loci. Methods Paired blood and RB tumor samples from 16 patients were analyzed with fluorescent PCR for LOH at 14 microsatellite marker loci on chromosome 13. Linkage analyses were also performed to identify the parental origin of deletion. Results Of the 16 patients, 12 had LOH at one or more loci. Three markers, D13S265, D13S263 and D13S153 (within *Rb*1), showed the highest incidence of LOH, i.e. 8/12, 8/12 and 9/12 respectively. Ten of 12 LOH cases showed the preferential loss of paternal alleles. The ages when diagnosis was made in LOH and non-LOH cases were 504 and 1 086 d respectively. Conclusions Loci D13S263 (13q14.1-14.2) and D13S265 (13q31-32) might contain some unidentified genes related to the tumorigenesis of RB. Most cases in our study showed the preferential loss of paternal alleles. In addition, the age when diagnosis was made was significantly lower in patients with LOH than in those without LOH, and LOH at D13S263, and D13S265 might be used as one of diagnostic indicators at an early age. More data are needed to confirm our findings.

Key words: retinoblastoma; RB1 gene; microsatellite DNA; loss of heterozygosity

视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤,起源于未分化的视网膜母细胞,当Rb1基因功能纯合丧失时。其恶性程度高,严重危害患儿的视力与生命。大多数RB呈现为散发型,主要是由于非遗传性的体细胞突变所致;另约40%的RB为遗传型,呈常染色体显性遗传。

与RB发病密切相关的Rb1基因,位于13号染色体长臂14区,是第一个被克隆和确定的人类肿瘤抑制基因[1]。分子水平的研究确定几乎所有患者均表现为13q14处Rb1基因功能的纯合丧失。Knudson用二次突变假说来解释RB的家族性和散发性。该假说认为家族性RB由于子代所有体细胞均带有一次突变,当任何一个视网膜母细胞再次发生突变时即诱发肿瘤;而散发性的RB由于两次突变均发生于一个视网膜母细胞,因此机率很小,所以发病较迟且单发,亦不易产生第二次恶性肿瘤[2]。此假说已被大量实验所验证。

多态性的DNA微卫星位点的杂合缺失(LOH)现象在正常组织与肿瘤组织之间比较所反映出的是一种发生于体细胞的基因缺失。这种体细胞的基因缺失其中一个最主要的现象是肿瘤抑制基因的缺失。如果在某类肿瘤中,LOH反复出现在某染色体的某个片段处,这将提示该位点可能含有与该肿瘤形成密切相关的某肿瘤抑制基因。因此LOH方法已被常规运用在全基因组范围内探索与致癌相关新的基因研究中。此外,LOH的研究还将具有临床诊断价值,即人们期望某类肿瘤应常规地进行某个或某几个位点的LOH测定来辅助临床诊断、治疗及预后等[3~6]。

作者简介:府伟灵(1955—),男,江苏省吴县人,博士,主任医师,教授,主要从事生物芯片研制及其在临床实验诊断中的应用研究、医院感染的分子流行病学研究以及临床分子微生物学方面的研究,发表论文50余篇。电话:(023)68754429, E-mail:weilingfu@yahoo.com

收稿日期:2001-10-30;修回日期:2001-12-12

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

由于 RB 中关于 13q14 区基因缺失的现象被普遍报道, 目前大多研究还主要集中在 Rb1 基因及 13q14 区内的若干个遗传标志, 但是 Rb1 基因的失活可能不是引发 RB 的唯一因素[7-10], 因此为试图探明 RB 发生发展机制中究竟有无其它基因的参与和作用以及确定其具体位点, 在此项课题中我们利用分布于 13 号染色体上的 14 个呈高度多态性的遗传学微卫星标志, 通过比较和统计一系列 RB 与其相应血清标本 DNA 中不同遗传标志处的 LOH 现象, 探索与视网膜母细胞瘤发生发展密切相关的可疑新基因位点; 并试图寻找和确定具有诊断及预后价值的 LOH 检测指标, 以及确定基因缺失的遗传学来源。

1　材料与方法

1.1　研究对象

参与本研究的 16 例 RB 患者均是近 3 年我校 3 所附属医院就诊的门诊病人, 包括 10 个男孩和 6 个女孩, 并且我们还同时收集了所有患者父母的血标本。由于 16 例病人均无家族遗传史, 因此根据临床表现我们将其分为两组, 散发的双眼患者 12 例和散发的单眼患者 4 例, 见表 1。我们获取了患者被摘除的眼球标本及其血液标本, 并征得了所有患者的同意参与本次研究。

表 1　患者资料

Tab 1　Clinical data of RB patients

Number	Sex	Age at diag(days)	RB	H(43.75%)	MR(50%)
1	M	342	B	P	N
2	M	360	B	N	P
3	M	181	B	N	N
4	F	521	B	P	N
5	M	452	U	N	N
6	F	1836	B	P	P
7	F	939	B	N	N
8	M	138	B	P	P
9	M	1146	U	P	P
10	M	996	U	N	P
11	M	624	B	P	N
12	M	1228	B	N	N
13	F	589	B	N	P
14	M	598	B	P	P
15	M	311	U	N	N
16	M	1134	B	N	N

M: Male; F: Female; B: Bilateral; U: Unilateral; H: Hypoevolutism; MR: Mental retardation; P: Positive; N: Negative

1.2　试剂及器材

试剂盒: DNA 提取试剂盒 QIAmp(r) Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany); LOH 测定试剂盒 ABI PRISM(r) Linkage Mapping Set-MD10 (PE Applied Biosystems, USA)。

主要仪器: PCR 仪 Perkin Elmer Thermal Cycler 9700 (From Perkin Elmer Co. Norwalk, USA); 测序仪 ABI PRISM 377 Sequencer (From Perkin Elmer Co. Norwalk, USA); 手术显微镜 Dissecting Microsocope (From Leica)。

分析软件: Genescan Analysis 3.0。

1.3　实验方法

1.3.1　微卫星位点信息　　本研究中所选用的微卫星标志共有 14 个, 分布于 13 号染色体。这些标志对基因组分辨率约为 10 cM。

1.3.2　RB 细胞的微量采样　　石蜡包埋的眼组织制成 10~15 张 15μm 厚的切片。在 40× 手术显微镜下进行 RB 肿瘤组织的采样, 注意分辨瘤组织和正常视网膜、血管组织及血细胞等。准确的采样为正确的实验分析提供了保证。

1.3.3　DNA 提取　　对于石蜡包埋的眼组织, 从中提取 DNA 首先需要用二甲苯将石蜡去除。去除石蜡的肿瘤标本以及血细胞中 DNA 提取均按试剂盒操作说明进行。

1.3.4　微卫星位点的荧光 PCR　　所有的 14 个微卫星标志的 5′-端的引物均由三种不同的荧光标记, [FAM]、[HEX] 和 [NED], 分别在基因分析软件中呈现蓝、绿、黄三色。这些微卫星标志经过专门设计使得引物扩增条件基本一致, 复性温度为 55 ℃, 反应总体积为 15 μl, [Mg^{2+}] 2.5 mmol/L; 250 mmol/L dNTP; 0.6 U AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶; 10× PCR 缓冲液; 引物 3pmol。PCR 具体反应条件为:

94 ℃ 12 min 激活 TaqGold 活性
94 ℃ 15 s 55 ℃ 15 s 72 ℃ 30 s × 10 cycles
89 ℃ 15 s 55 ℃ 15 s 72 ℃ 30 s × 30 cycles
72 ℃ 30 min
4 ℃ 保存

1.3.5　PCR 产物的混合　　由于不同位点 PCR 产物长度不同, 以及长度相近的位点可标记不同荧光加以区分, 因此可将每个标本的若干个位点扩增产物按不同比例混合在一起。三种不同荧光标记的产物通常比例为[FAM]∶[HEX]∶[NED] = 1∶2∶2。

1.3.6　测序仪上电泳测定 PCR 产物　　每个样品的 PCR 混合产物在电泳前与一定量的甲酰胺、葡聚糖蓝及分子大小标准混合, 95 ℃变性 5 min 后立即置于冰中冷却。然后在 377 测序仪凝胶同一个泳道中电泳。实验中我们采用的是 GeneScan™-400/350 HD ROX 分子大小标准, 它由于是用不同的荧光标记(呈现为红色), 因此当将它与每一个样品同时加入同一个泳道一起电泳时, 根据其所提示的 DNA 片段大小范围(™-400/350 HD ROX 指示范围分别在 50~400 bp 和 35~350 bp 之间), 可以尽可能消除不同的凝胶之间、不同的泳道之间的误差(批内、批间误差), 并且可提供 PCR 产物的准确大小, 即等位基因的数目及碱基长度, 从而判断它们的杂合或纯合状态。测序仪分析软件将自动储存电泳图象和数据结果, 利用 Genescan Analysis 3.0 软件可进行分析处理。

1.3.7　LOH 结果分析　　如果一个患者其正常组织的某个微卫星标志处表现为杂合的两个等位基因, 我们定义这个患者为该微卫星标志位点的信息个体, 而相应的肿瘤组织在该位点表现为纯合的一个等位基因时, 则记录为 LOH 阳性结果。对于某些标本无论正常组织还是瘤组织均为杂合状态, 可以按以下公式计算确定是否是 LOH:

$$LOH=\frac{\text{正常组织的第 2 个峰值大小/正常组织的第 1 个峰值大小}}{\text{肿瘤组织的第 2 个峰值大小/肿瘤组织的第 1 个峰值大小}}$$

当计算出的比值小于等于 0.67 时(这个数值相当于肿瘤组织的峰值低于正常组织的 33%), 确定为 LOH。

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

2 结果

2.1 患者信息，见表 1。

2.2 典型的 LOH 电泳图谱，见图 1

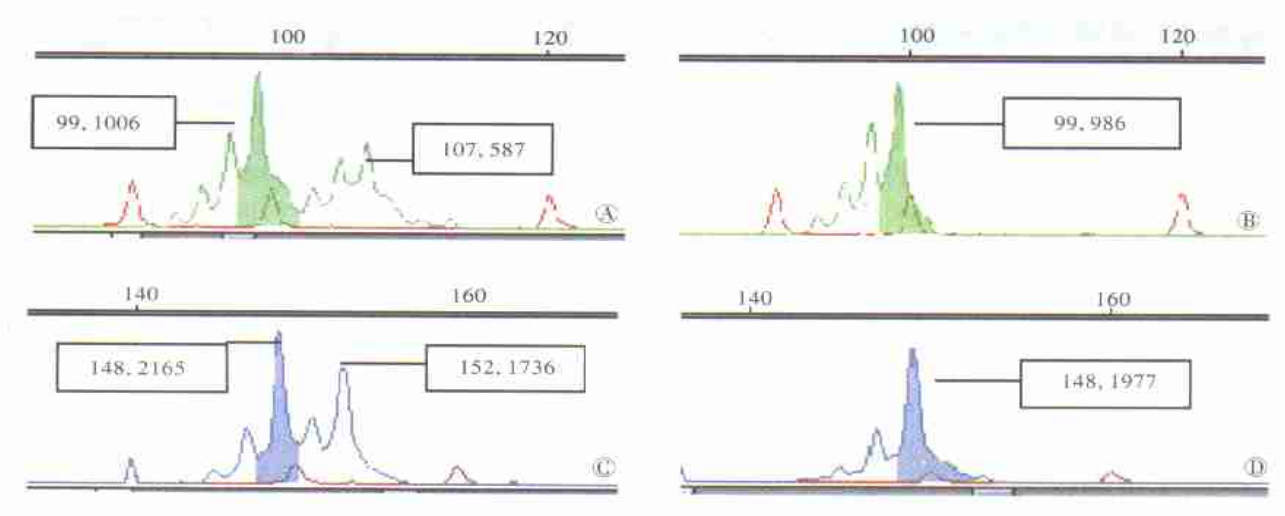


图 1 两个 RB 患者肿瘤及血标本的 LOH 电泳图谱

Fig 1 LOH electropherogram of tumor and blood samples from 2 RB patients

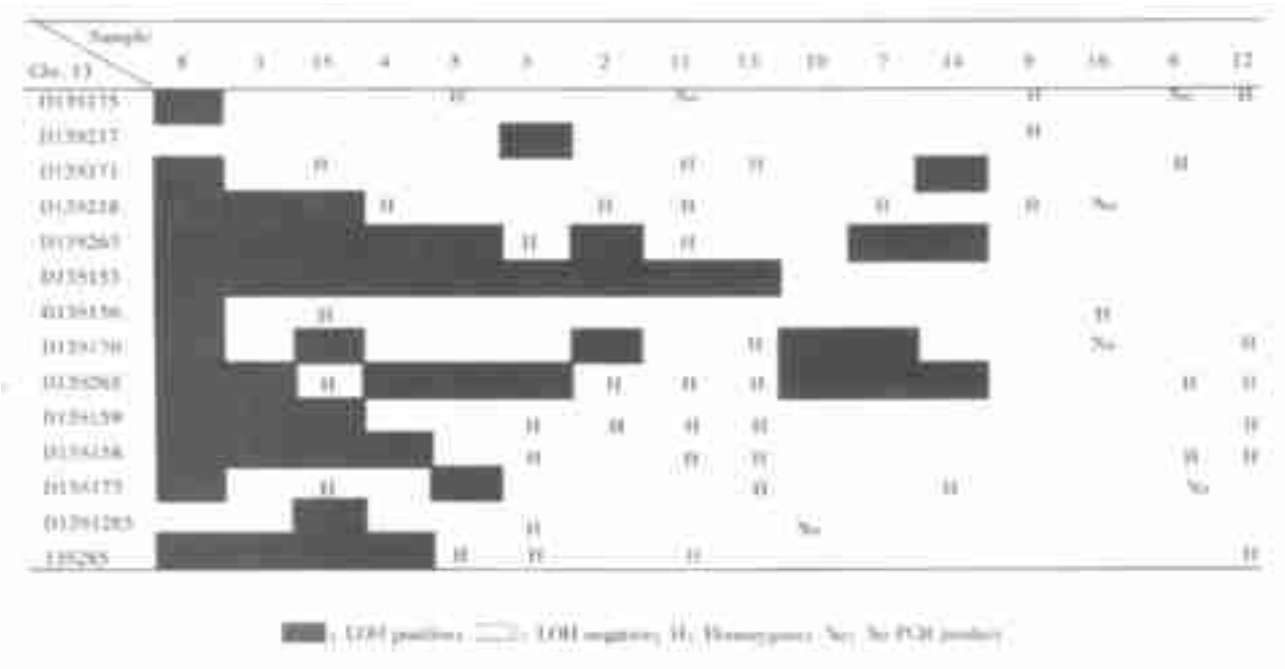
A: The genotype of locus D13S285 from the blood DNA of patient No. 15. Two different alleles exist at this locus, one is 99 bp and the other 107 bp; B: The genotype of locus D13S285 from the tumor DNA of patient No. 15. Only one allele (99 bp) indicates the loss of the allele of 107 bp; C: The genotype of locus D13S218 from the blood DNA of patient No. 8. Two different alleles exist at this locus, one is 148 bp and the other 152 bp; D: The genotype of locus D13S218 from the tumor DNA of patient No. 8. Only one allele (148 bp) indicates the loss of the allele of 152 bp

2.3 13 号染色体上 LOH 结果

课题中选用的 14 个微卫星位点的杂合度在 62.5% ~ 100%之间，平均 80.75%。较高的杂合度保证了稳定可靠的 LOH 实验结果。本研究中 16 个 RB 标本中有 12 个在 13 号染色体上发生 LOH。这 14 个位点 LOH 发生机率平均为 29.7%，其中有 8 个位点 LOH 发生率超过 25%。三个 LOH 发生机率最高的位点分别是位于 13q31－32 的 D13S265(8/12)，位于 13q14.1－14.2 的 D13S263(8/12) 和位于 Rb1 基因内的 D13S153(9/12)。LOH 结果详见表 2。

表 2 13 号染色体上 LOH 结果

Tab 2 LOH results of microsatellite markers in chromosome 13



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

2.4　家系分析电泳图谱示例, 见图 2

实验中我们利用 14 个微卫星位点中 3 个 LOH 发生机率最高的位点进行家系连锁分析, 这三个位点是位于 13q31－32 的 D13S265(8/12), 位于 13q14.1－14.2 的 D13S263(8/12)和位于 Rb1 基因内的 D13S153(9/12)。我们得到的结论是在 12 个 LOH 阳性标本中有 10 个标记位点的缺失发生在父系来源的染色单体上。

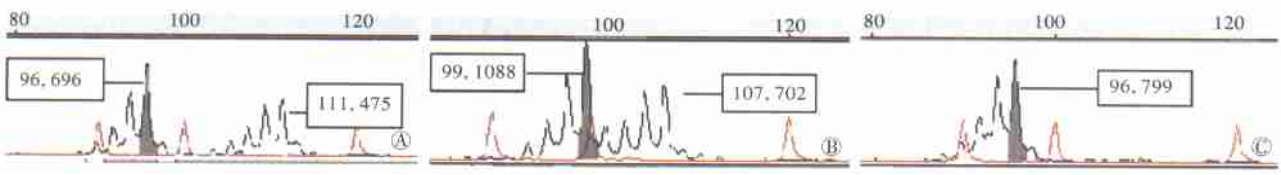


图 2　一个家庭的 LOH 测定电泳图谱

Fig 2　LOH electropherogram of one family

A: Locus D13S153 of the patient's mother; The mother has 2 hetero alleles at locus D13S153, 96 bp and 111 bp respectively. B: Locus D13S153 of the patient's father; The father also has 2 hetero alleles at this loci, 99 bp and 107 bp. C: Locus D13S153 of the patient; The patient has only 1 homo allele (96 bp), indicating the loss of D13S153 inherited from the father

3　讨论

本研究中我们通过对 16 个 RB 患者 13 号染色体上 LOH 现象的测定, 试图探索与 RB 发生发展密切相关的可疑基因位点。16 个患者中 75%(12/16)在 13 号染色体上发生了 LOH, 这与以往 Cavenee 等[11] 1986 年报道的 70%相近, 但高于 Zhu 等[12] 1992 年报道的 63%和 Munier 等[13] 1997 年报道的 55%, 其原因可能与病人来源有关。参与我们这次实验研究的患者均无 RB 家族史, 且患儿的父母亦均未发现有 Rb1 基因的突变(未发表的资料)。而 Zhu 等和 Munier 等的研究中存在遗传型和非遗传型两组 RB 患者, 因此也许遗传型和非遗传型的 RB 中 LOH 发生机率的确存在不同而造成这样的差异; 此外, RB 肿瘤中存在不同的克隆, 一些可能发生了 LOH, 一些没有, 因此这也会造成 LOH 发生机率的差异。

实验中我们利用 14 个微卫星位点中 LOH 发生机率最高的 3 个位点进行家系连锁分析, D13S265、D13S263 和 D13S153, 得到在 12 个 LOH 阳性标本中有 10 个微瘟星位点的缺失被确定发生在父源的染色单体上。我们认为此现象的发生可能是由于精子形成过程中细胞分裂的次数多于卵子形成分裂的次数, 而使父系来源的 13 号染色体发生缺失或重排的机率升高。最近 Lavanchy[14] 也有同样的报道, 但与 Chiu 等[15] 1997 的研究结果正好相反。目前为止, 此现象有待进一步研究。

Munier 等[13] (1997)报道 LOH 在女性 RB 患者中发生机率远高于男性患者, 他们认为可能是由于女性的基因组大约是男性基因组的 1.7 倍, 较长的基因组发生重组的机率就会较高, 因而造成这种差异。但我们的实验中未能发现这种差异, 男孩女孩 LOH 发生率均等。在 12 个发生 LOH 的患者中, 9 个在 13S153 发生缺失, 在 D13S263 和 D13S265 均为 8 个, 因此这三个位点是 13 号染色体上最易发生缺失的位点。我们分析认为可能在 D13S265 存在的 13q31－32 区域和 D13S263 存在的 13q14.1－14.2 区域存在某些与 RB 相关的未知肿瘤抑制基因, 有待进一步确定。

通过统计比较, LOH 阳性组(12 例)和 LOH 阴性组(4 例)平均 RB 确诊时间为 504 d 和 1 086 d($P<0.05$), 相差显著。这一结论与文献[13, 16] 报道一致, 表明发生 LOH 的患者比未发生 LOH 的患者平均确诊时间早。当我们将 LOH 阳性患者再分为两组时, 1 组 7 例, 为不仅发生 D13S153 缺失, 而且还在 D13S265 或 D13S263 两个位点中至少一个发生缺失的患者; 另 1 组 5 例, 为剩余的 LOH 阳性患者。我们发现这两组的 RB 确诊时间分别为 329 和 749 d ($P<0.05$), 相差显著。由此我们初步推论 D13S263 和 D13S265 两个位点的 LOH 现象可能与 RB 患者的早期诊断相关。

实验中我们还在 9 个发生 D13S153 缺失的患儿中发现, 有 4 个(第 1, 4, 8, 11)患儿存在生长迟缓, 另有 3 个患儿(第 2, 3, 8)存在智力低下。目前为止, 关于这种症状的出现究竟是由于 Rb1 基因的缺失造成的, 还是因为发生其它染色体区域的缺失所致还无法作出解释。

由于有限的 RB 标本数量, 我们很难作出十分确定的结论, 因此还将进一步收集更多的临床标本进行 LOH 的研究分析。

参考文献:

[1] Lee W H, Bookstein R, Hong F, *et al*. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence [J]. Science, 1987, 235(4 794): 1 394－1 399.

[2] Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, 68: 820.

[3] Dietrich W F, Radany E H, Smith J S, *et al*. Genome-wide search for loss of heterozygosity in transgenic mouse tumors reveals candidate tumor suppressor genes on chromosomes 9 and 16[J]. Proc Natl Acad Sci USA,

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

1994, 91(20): 9 451—9 455.
[4] Canzian F, Salovaara R, Hemmink A, *et al*. Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors[J]. Cancer Res, 1996, 56(14): 3 331—3 337.
[5] Richard C B, Stephen N T, Stanley R H, *et al*. A national cancer insitute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial redisposion: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58: 5 248—5 257.
[6] Ignacio I W, Moying T, Anirban M, *et al*. Genome-wide allelotyping analysis reveals multiple sites of alletic loss in gallbladder carcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61: 3 795—3 800.
[7] Alfred G, Knudson. Antioncogenes and human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci Usa, 1993, 90(23): 10 914—10 921.
[8] Mills M D, Windle J J, Albert D M. Retinoblatoma in transgenic mice: models of hereditary retinoblastoma[J]. Surv Ophthalmol, 1999, 43(6): 508—518.
[9] Doz F, Peter M, Schleiermacher G, *et al*. N-MYC amplification, loss of heterozygosity on the short arm of Chromosome 1 and DNA ploidy in retinoblastoma[J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(4): 645—649.
[10] Venkateswara R. Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma Review[J]. Cancer, 1986, 58: 663—671.
[11] Carvenee W K, Koufos A, Hansen M F. Recessive mutant genes predisposing to human cancer[J]. Mutat Res, 1986, 168: 3—14.
[12] Zhu X, Dunn J M, Goddard A D, *et al*. Mechanism of loss of heterozygosity in retinoblastoma[J]. Cytogenet Cell Genet, 1992, 59(4): 248—252.
[13] Munier F L, Thonney F, Bamlmer A, *et al*. Prognostic factors associated with loss of heterozygosity at the RB1 locus in retinoblastoma[J]. Ophthalmic genetics, 1997, 18(1): 7—12.
[14] Lavanchy L, Munier F L, Cousin P, *et al*. Molecular characterization of the deletion in retinoblastoma patients with 13q14 cytogenetic anomalies [J]. Ophthalmic Genetics, 2001, 22(1): 1—10.
[15] Chiu L L, Lai P S, Low P S, *et al*. Molecular Studies of Loss of Heterozygosity in Retinoblastoma[J]. Ann Acad Med Singapore, 1997, 26(3): 315—319.
[16] Mitsuo V Kato, Kanji Ishizaki, Yosuke Ejima, *et al*. Loss of heterozygosity on chromosome 13 and its association with delayed growth of retinoblastma[J]. Int J Cancer, 1993, 54(6): 922—926.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)01-0054-02

钙离子再灌注后两种胶质细胞凋亡规律比较研究

Comparative research of apoptosis rules of two glia cells after Ca^{2+} reperfusiont

马海涵, 伍亚民, 廖维宏, 刘 媛, 邵 阳, 杨恒文, 曾 林, 龙在云 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室, 重庆 400042)

近年来, 凋亡现象与神经系统疾病之间的关系正随着研究的不断深入而得到更多的认识; 神经胶质细胞是中枢神经系统结构和功能的重要组成部分, 在病理条件下其凋亡的特性和规律必然影响到其功能实现。目前, 对于星型胶质细胞和少突胶质细胞在钙离子再灌注条件下的凋亡发生规律尚无明确报道。本实验在对星形胶质细胞和少突胶质细胞分离培养、纯化的基础上, 用钙离子再灌注法诱导凋亡, 观察在相同凋亡诱导因素作用下两种细胞凋亡发生发展的规律及其间的差异。

1 材料与方法

1.1 标本来源及模型建立

培养并纯化星形胶质细胞和少突胶质细胞[1]。用文献[2]所载钙离子再灌注法诱导细胞发生凋亡。

1.2 试剂与方法

S-P kit 购自北方同正公司, TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒购自博士德公司, 实验过程按试剂盒操作说明。分别把纯化后的星形胶质细胞和少突胶质细胞制成细胞悬液, 70%酒精固定, PI 染色及 RNA 酶处理后, 上机后进行 FCM 检测。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39370689)
作者简介: 马海涵(1972—), 女, 河南省邓州市人, 博士研究生, 从事中枢神经系统损伤及再生方面研究。电话: (023)68757433
收稿日期: 2001-06-23; 修回日期: 2001-11-29

2 结果

应用 Tiger 计算机图像分析系统计算每平方毫米 TUNEL 染色阳性细胞数, 结果见表 1。FCM 检测结果见表 2。

表 1 TUNEL 阳性细胞数($/mm^2$, $\bar{x}\pm s$)

分组	n	在灌注时间(t/h)			
		3	12	24	48
Ast	5	1.4±0.55 **	7.2±1.30 **	13.6±1.82 *##△	15.2±1.48 *
Oli	5	9.8±2.39	17.2±1.64	21.4±1.95	21.6±2.61

**: $P<0.01$ *vs* Oli; ##: $P<0.01$ *vs* 3 h; △: $P<0.05$ *vs* 12 h

表 2 流式细胞仪所测凋亡比率(%, $\bar{x}\pm s$)

分组	n	在灌注时间(t/h)			
		3	12	24	48
Ast	5	4.07±2.13 **14.69±3.52 **	19.64±4.67 **##△	19.67±2.63 **	
Oli	5	15.22±2.38	24.79±1.38	39.73±4.16 ##△	39.25±3.44

**: $P<0.01$ *vs* Oli; ##: $P<0.01$ *vs* 3 h; △: $P<0.05$ *vs* 12 h

1.3 统计学方法

应用 Tiger 计算机图像分析系统计算每平方毫米 TUNEL 染色阳性细胞数, 根据流式细胞仪检测收集凋亡比率数据, 采用 t 检验进行统计学处理。

(下转 57 页)

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