

癌基因家族。Cx43 是一种主要的细胞间隙连接蛋白,其表达异常与多种疾病的发生有关。近来研究表明,多种癌细胞中都有 Cx43 表达下降, Cx43 基因表现出肿瘤抑制基因的特点^[1]。在神经系统和循环系统尚未建立或未发育完善的早期胚胎,长距离信息传递难以进行,胚胎各部分细胞的增生,分化与生长发育离不开细胞间化学信息的交换。Maass *et al*^[9]发现Cx43无义突变可造成信息传递缺陷,影响神经细胞的迁移、增生及细胞凋亡过程。Bronner-Fraser *et al*观察了神经嵴细胞迁移过程中的细胞直接接触,发现细胞间黏附改变扰乱了神经嵴细胞的迁移,从而导致神经管缺陷(neural tube defects, NTDs)^[8]的发生。Huang *et al*^[10]报道,转染的 Cx43cDNA 的人胶质瘤细胞 Cx43mRNA 表达水平升高,生长速度减慢,转染 Cx43 基因的细胞增生活性明显下降,凋亡现象并未增加,提示 Cx43 基因主要通过抑制细胞增生,而不是通过诱导凋亡调控细胞生长。本结果与之相似, Cx43 在扩张段肠管中高表达(55.3%),而在痉挛段和移行段肠管中低表达(23.7%, 18.4%)。由于 Pax3 是调控基因, Cx43 是结构基因,我们认为 Cx43 可能是 Pax3 的负表达调控基因, HD 可抑制 Cx43 的表达,使其对 Cx43 基因的转录抑制增高,使 Cx43 低表达,造成缝隙连接紊乱,进而发生 HD。Cx43 在 HD 肠管组织中出现 SSCP 异常泳动带,同时也提示 Cx43 基因的突变是杂合性的。关于 HD 的发生机制及预防措施是目前研究的热点, Pax3 和 Cx43 在消化道神经丛内的发育过程中十分重要, Pax3 和 Cx43 表达水平的改变则可引起 HD,其机制可能有:细胞凋亡、氧自由基的参与及引起调控基因表达的改变。Pax3 和 Cx43 基因突变与 HD 的分子生物学基础研究还需扩大样本数量以及完善随

访资料有待深入研究。

4 参考文献

- 1 Chi N, Epstein JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 2002;18:41-47
- 2 Krysko DV, Mussche S, Leybaert L, D'Herde K. Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *J Histochem Cytochem* 2004;52:1199-1207
- 3 Milewski RC, Chi NC, Li J, Brown C, Lu MM, Epstein JA. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development* 2004;131:829-837
- 4 Roberts C, Sutherland HF, Farmer H, Kimber W, Halford S, Carey A, Brickman JM, Wynshaw-Boris A, Scambler PJ. Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2002;22:2318-2328
- 5 Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennett MV, Lampe PD, Laird DW, Verselis VK. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2556-2561
- 6 Teunissen BE, Jansen AT, van Amersfoort SC, O'Brien TX, Jongsma HJ, Bierhuizen MF. Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 2003; 322:123-136
- 7 Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Regulation of hematopoiesis by gap junction-mediated intercellular communication. *J Leukoc Biol* 2001;70:341-347
- 8 Wiggan O, Fadel MP, Hamel PA. Pax3 induces cell aggregation and regulates phenotypic mesenchymal-epithelial interconversion. *J Cell Sci* 2002;115:517-529
- 9 Maass K, Ghanem A, Kim JS, Saathoff M, Urschel S, Kirfel G, Grummer R, Kretz M, Lewalter T, Tiemann K, Winterhager E, Herzog V, Willecke K. Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43. *Mol Biol Cell* 2004; 8 [Epub ahead of print]
- 10 Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng ZL, Boynton AL. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin43 (Cx43). *Cancer Res* 1998;58:5089-5096

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

SARS 患者肝脾心肺组织中病毒的分离和鉴定

朱雷, 胡燕, 沈宏辉, 戚扬, 赵景民, 辛绍杰, 赵敏, 程云, 赵根田, 貌盼勇

朱雷, 胡燕, 沈宏辉, 戚扬, 赵景民, 辛绍杰, 赵敏, 程云, 赵根田, 貌盼勇, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所病毒研究室 北京市 100039
项目负责人: 貌盼勇, 100039, 北京西四环中路 100 号, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所病毒研究室. maopy302@yahoo.com.cn
电话: 010-66933315 传真: 010-63831874
收稿日期: 2004-06-30 接受日期: 2004-07-27

摘要

目的: 从 SARS 患者尸检肝、脾、心、肺组织中分离病毒并鉴定及评定中和抗体与 SARS 病程的关系。

方法: 取各组织 100 g/L 匀浆后的上清, 接种非洲绿猴肾单层细胞, 观察细胞病变; 采用 RT-PCR 及序列分析等技

术鉴定病毒并研究其生物学特性; 将收集的 SARS 患者早期和恢复期血清做中和实验。

结果: 分别从 SARS 患者尸检肝、脾、心、肺等组织中分离到致细胞病变的病毒, 用各组织的病变细胞提取的 RNA 为模板分别扩增出部分 S 区和 N 区的 DNA 片段, 经 DNA 序列分析表明所有 S 区和 N 区的核苷酸序列均与 GenBank 上的 SARS 冠状病毒该区域的序列完全一致, 中和实验显示所做 10 份 SARS 患者双份血清均有中和抗体效价的 4 倍升高, 轻症患者中和抗体产生时间明显早于重症患者。

结论: 从 SARS 患者尸检肝、脾、心、肺组织中分离到的均为 SARS 冠状病毒, 证实 SARS 冠状病毒可直接侵害患者的肝、脾、心、肺脏器。所有 SARS 患者均可产生中和抗体, 中和抗体产生时间与疾病进程有一定关系。

朱雷, 胡燕, 沈宏辉, 戚扬, 赵景民, 辛绍杰, 赵敏, 程云, 赵根田, 貌盼勇. SARS 患者肝脾心肺组织中病毒的分离和鉴定. 世界华人消化杂志 2004; 12(9):2256-2258

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2256.asp>

0 引言

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)是一种新的急性呼吸道传染病。自2002年11月首发于中国广东省之后, 迅速传播到亚洲其他国家及北美、欧洲的几十个国家和地区, 至2003年月全球累计发病 8422 例, 涉及 32 个国家和地区, 死亡 812 例, 死亡率 9.6%, 对人类的生命和健康造成了严重的威胁。2003-04-16 世界卫生组织宣布引起 SARS 的病原为一种新的冠状病毒, 与以往的冠状病毒有较大的区别^[1-7]。病理学研究发现^[2], SARS 冠状病毒侵害人的多个主要脏器, 并从患者鼻、咽拭子、含漱液、肺、肾等组织中分离到 SARS 冠状病毒。为了进一步证实 SARS 冠状病毒对多器官的侵害, 我们利用 Vero 细胞对 SARS 患者肝、脾、心、肺等尸检组织中的病毒进行了分离和鉴定, 同时了解中和抗体与 SARS 病程的关系, 我们用 10 份 SARS 患者双份血清做了中和实验。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 标本来源本院 1 例 SARS 死亡患者解剖病例的肝、脾、心、肺等尸检组织, Vero 细胞(本室保存), DMEM 细胞培养液(Gibco), Viral RNA Mini Kit (Qiaamp), AMV 反转录酶(promega)。

1.2 方法 分别采集肝、脾、心、肺等尸检组织, 加石英砂研磨后用 Hanks 液制成 100 g/L 的悬液, 经 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 加 1 000 ku/L 青霉素和链霉素, 除菌后备用。Vero 细胞生长液为含 100 ml/L 新生牛血清的 DMEM 液, 含 100 ku/L 青霉素及链霉素, 用 75 g/L NaHCO₃ 调整 pH 至 7.0-7.2; 维持液含 20 ml/L 新生牛血清, 其余同生长液。标本悬液分别接种已长成单层的 5 ml 培养瓶, 37 °C 吸附 1 h 后换维持液, 置 50 ml/L CO₂ 培养箱 35 °C 培养, 每日观察细胞病变, 连续观察 7 d, 传代时经 -60 °C 和室温冻融 2 次。RT-PCR 按文献[5]发表的 SARS 冠状病毒基因核苷酸序列设计合成引物, S 区正向引物序列为: 5' - gttatggctcgcgctgcgttct-3', 反向引物序列为: 5' - ttccaagtgcgaagaatgggtgact-3', N 区正向引物序列为: 5' - ccggatccatgtctgataatggacccca-3', 反向引物序列为: 5' - ccggaattctcatgagtgttatgcctgag-3'。S 区目的 PCR 产物长 200 bp, N 区目的 PCR 产物长 1 247 bp。使用 QIAamp 公司的 Viral RNA Mini Kit 从病变细胞中提取病

毒 RNA。逆转录时加 20 pmol/L 随机引物, 5 μl 病毒 RNA, 0.5 μl AMV 反转录酶(promega), 1 X 反应缓冲液, 1 μl 10 mmol/L dNTP, 5 u RNA 酶抑制剂, 1 μl 0.1 mol/L 的 DTT, 用水补足 20 μl, 反应条件为: 37 °C 60 min, 94 °C 灭活 5 min。PCR 反应条件为: 95 °C 2 min 热启动, 然后 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 40 s, 反复 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后测序(博奥公司)。将上述分离的病毒用 DMEM 培养液按 10 倍递增稀释(10⁻¹-10⁻⁸)后, 分别加入含 Vero 细胞微量培养板中, 每个稀释度加 2 孔, 同时设细胞对照, 置 37 °C 培养, 每日镜检细胞病变, 以确定病毒滴度。将 SARS 患者双份血清分别进行 1:20-1:160 稀释度稀释, 然后与 100 TCID₅₀ 的 SARS 冠状病毒作中和, 置 37 °C 作用 1 h 后, 分别滴加到含 Vero 细胞的 96 孔微量细胞培养板中, 每孔 50 μL, 每个稀释度加 4 孔。病毒对照孔滴加 25 μL, 并补加 25 μL 生长液, 同时细胞对照孔补加 50 μL 生长液。置 37 °C 培养, 每日镜检细胞病变, 以 3 d 细胞病变结果为准, 以能保护 50% 细胞孔完全不产生细胞病变的最高血清稀释度计算中和效价。

2 结果

SARS 患者尸检心肺标本接种细胞, 在第 1 代即可分离到病毒, 而肝脾标本接种细胞后第 2 代方可分离到病毒。分别以 4 种组织进行病毒分离的细胞培养上清提取的 RNA 为模板, 扩增出 S 区 200 bp 和 N 区 1 247 bp 长度的核苷酸片段(图 1, 2)。经序列分析表明, 从所有 4 份标本所分离病毒中扩增出的 S 区和 N 区核苷酸序列都与 SARS 冠状病毒 BJ01 株(GenBank 的登录号: AY278488)上的该区域的序列完全一致。

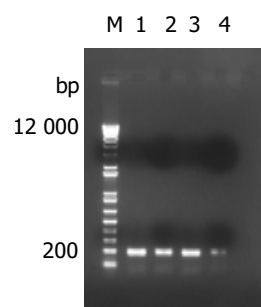


图 1 S 区基因 PCR 产物 10 g/L 凝胶电泳检测。M: DNA 分子质量标准; 1-4: 从肺心脾肝组织标本中分离病毒的 PCR 扩增片段。

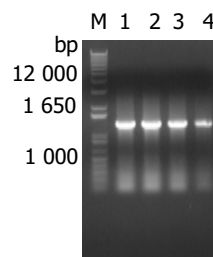


图 2 N 区基因 PCR 产物 10 g/L 凝胶电泳检测。M: DNA 分子质量标准; 1-4: 从肺心脾肝组织标本中分离病毒的 PCR 扩增片段。

从SARS患者尸检肝脾心肺组织中分离的病毒的病毒滴度均为 $10^{-5.5}$ 。用10份SARS患者早期和恢复期血清做中和实验,5例临床分型^[4]较轻患者中,有4例中和抗体产生时间均在发病后20 d之前,仅1例在发病后21 d产生中和抗体;而5例临床分型较重患者,均在发病20 d之后产生中和抗体,且有3例在30 d之后产生。

3 讨论

经中和试验和病毒基因序列分析,证实我们从1例死亡患者的多个组织器官中分离到病毒为SARS冠状病毒,同时我们采用上述引物直接从该SARS患者肝脾心肺尸检组织进行RT-PCR扩增,扩增出的核苷酸序列与分离到的SARS冠状病毒完全相同(结果未在本篇中显示),表明我们分离的病原体确实来自尸检组织,进一步证实了SARS冠状病毒可以感染和损害患者多个脏器器官,从而导致患者死亡。从病毒分离结果看,病毒对心肺组织侵害要强于肝脾组织,这一方面可能提示肝脾组织对SARS冠状病毒感染的敏感性弱于心肺组织,另一方面脾脏是人体最大的外周免疫器官,其中所富含的免疫细胞和抗体可杀灭部分病毒,以上两种因素都有可能使该SARS患者肝脾组织中SARS冠状病毒含量低于心肺组织。以前发现的人类冠状病毒主要是侵犯呼吸道和肠道,引起上呼吸道感染和腹泻,且症状多不严重,极少有累及多个脏器的报道。此次流行的SARS冠状病毒的嗜性与以往的冠状病毒有较大的差异,对多种脏器均有严重侵害。

中和实验结果显示,10例SARS患者双份血清均有中和抗体效价的4倍升高,但SARS患者发病开始8d内无中和抗体产生,这与采用ELISA等免疫学方法检测SARS患者血清中特异性抗体的结果一致^[8],证明中和实验也不能用于SARS冠状病毒感染的早期诊断,仅可作为确诊诊断或流行病学调查。中和实验结果还表明,临床症状较轻的患者大多产生中和抗体时间早于临床症状较重的患者,且中和效价较高,提示特异性中

和抗体通过抑制病毒的复制,减缓了疾病的发展和进程。由于实验中所用标本较少,二者间确切关系有待进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Grcen K, Tellier R, Draker R, Adachi D, Ayers M, Chan AK, Skowrons OM, Slit I, Simor AE, Slutsky AS, Doyle PW, Krajden M, Petric M, Brunham RC, McGeer AJ. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003;348:1995-2005
- 2 赵景民, 周光德, 孙艳玲, 王松山, 杨建法, 毛远丽, 潘登, 貌盼勇, 程云, 王业东, 辛绍杰, 周先志, 陆江阳, 李铃, 陈菊梅. 1例地方传染性非典型肺炎病例病理及病原学发现. *解放军医学杂志* 2003;28:379-382
- 3 聂青和, 罗新栋, 惠武利. 一种新型传染病:严重急性呼吸综合征. *世界华人消化杂志* 2003;11:881-887
- 4 邹正升, 杨永平, 陈菊梅, 辛绍杰, 张伟, 周先志, 胡良平. 严重急性呼吸综合征临床分期与分型特点及其意义探讨. *解放军医学杂志* 2003;28:777-780
- 5 Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, pandoh PK, Petescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andnov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Krajden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003;300:1399-1404
- 6 Ksiazied TG, Erdman D, Goldsmith C S, Zaki SR, Peret T, Emery S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, ILing AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, Fields B, Dekisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, Leduc JW, Bellini WJ. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966
- 7 Drosten C, Gunther S, Preiser W, Van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Mannguerre JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-1976
- 8 陆海英, 霍娜, 王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 李杰, 李永华, 高晓明, 赵振东, 庄辉, 徐小元. 影响SARS患者血特异性IgG抗体产生的因素. *世界华人消化杂志* 2004;12:723-725

上腹部手术后腹腔镜胆囊切除术 30 例

王五俊, 勾承月, 王桂杰, 于金波, 张晓东

王五俊, 于金波, 天津市北辰医院 天津市北辰区 300400
勾承月, 天津市南开医院 天津市南开区 300100
王桂杰, 张晓东, 天津市第一中心医院 天津市南开区 300192
项目负责人: 王五俊, 300400, 天津市北辰区北医道, 天津市北辰医院微创外科。
电话: 022-26837058
收稿日期: 2004-05-29 接受日期: 2004-06-17

摘要

目的: 探讨上腹部手术后腹腔镜胆囊切除术的可行性和应用价值。

方法: 镜下分离原手术区粘连, 进达胆囊区, 常规行胆囊