

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.003

超声微泡联合 pDsRed2-N1-CD/UPRT 融合自杀基因 对肺癌细胞的杀伤作用

刘元银¹, 杨 燕², 雷淑慧³, 蒋幼凡¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科, 重庆 400010; 2. 四川省攀枝花市中心医院呼吸内科, 攀枝花 617067;
3. 重庆市铜梁县人民医院重症监护科, 重庆 402560)

【摘要】目的: 探讨超声微泡联合 pDsRed2-N1-CD/UPRT 融合自杀基因在肺癌 A549 细胞中的表达水平及其杀伤作用。方法: 提取前期构建的 pDsRed2-N1-CD/UPRT 质粒, 转染肺癌 A549 细胞, 分为 A 组: 空白对照组; B 组: 脂质体+质粒; C 组: 超声照射+脂质体+质粒; D 组: 超声照射+微泡+脂质体+质粒。荧光显微镜下观察质粒的转染情况, 免疫细胞化学法及 Western blot 法检测胞嘧啶脱氨酶(Cytosine deaminase, CD)、尿嘧啶磷酸核糖转移酶(Uracil phosphoribosyltransferase, UPRT)在各组细胞中的蛋白表达水平, MTT 法检测超声微泡联合 CD/UPRT 质粒对肺癌 A549 细胞的生长抑制作用。结果: 超声微泡能提高 A549 细胞中 CD/UPRT 质粒转染率达 $(54.8 \pm 2.59)\%$ 。免疫细胞化学与 Western blot 结果均显示联合超声微泡后 CD、UPRT 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。在前体药物 5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)作用下, CD/UPRT 质粒转染对细胞有一定的杀伤作用, 联合超声微泡后, 细胞的生长抑制率明显升高 ($P < 0.05$)。结论: 超声微泡能提高 CD/UPRT 质粒在肺癌 A549 细胞中的转染率及 CD、UPRT 在细胞中的蛋白表达, 从而增强 CD/UPRT 对肺癌 A549 细胞的杀伤作用。

【关键词】超声微泡; 自杀基因; 胞嘧啶脱氨酶; 尿嘧啶磷酸核糖转移酶; 肺癌

【中国图书分类法分类号】R734.2; R730.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-10-22

Therapy of lung cancer by ultrasound microbubble combined with pDsRed2-N1-CD/UPRT fusion suicide gene in vitro

LIU Yuanyin¹, YANG Yan², LEI Shuhui³, JIANG Youfan¹

(1. Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Respiratory Medicine, the Central Hospital of Panzhihua in Sichuan Province;

3. Intensive Care Unit, the People's Hospital of Tongliang County in Chongqing)

【Abstract】Objective: To explore the killing effect and enhancing transduction efficiency of ultrasound microbubble combined with pDsRed2-N1-CD/UPRT fusion suicide gene on lung cancer A549 cells in vitro. **Methods:** Pre-constructed recombinant plasmid pDsRed2-N1-CD/UPRT was extracted, and then the recombinant plasmid was transfected to A549 cells. There were four test groups treated by different agents, Group A: blank control; Group B: plasmid with lipofectamine transfection; Group C: plasmid with lipofectamine transfection combined with ultrasound irradiation; Group D: plasmid with lipofectamine transfection combined with ultrasound microbubble. The transduction efficiency of target cells was detected by fluorescent microscope. The immunocytochemical method and western blot were used to observe the protein expression of CD/UPRT in A549 cells. Meanwhile, the direct killing effect of CD/UPRT gene on lung cancer A549 cells was measured by MTT assay respectively. **Results:** Ultrasound microbubble could improve the transduction efficiency of CD/UPRT gene into A549 cells to $(54.8 \pm 2.59)\%$. Immunocytochemical method and western blot showed the protein expression of CD/UPRT in A549 cells increased significantly when combined with ultrasound microbubble ($P < 0.05$). CD/UPRT had slight killing effect on A549 cells treated by 5-fluorouracil. The inhibitory rate against growth of transfected A549 cells increased significantly when combined with ultrasound microbubble ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ultrasound microbubble can enhance the killing effect of CD/UPRT gene on lung cancer A549 cells through promoting the transduction efficiency and protein expression of CD/UPRT, thereby shows curative effect on lung cancer.

【Key words】ultrasound microbubble; suicide gene; cytosine deaminase (CD); uracil phosphoribosyltransferase (UPRT); lung cancer

作者介绍: 刘元银 (1986-), 女, 硕士,

研究方向: 肺癌的诊断与治疗。

通信作者: 蒋幼凡, 女, 教授, Email: zengzuo1992@sina.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: CSTC, 2008BB5240)。

随着肿瘤基因治疗的研究不断深入,运用自杀基因(Suicide gene)治疗各种恶性肿瘤的研究越来越多,胞嘧啶脱氨酶(Cytosine deaminase, CD)和尿嘧啶磷酸核糖转移酶(Uracil phosphoribosyltransferase, UPRT)基因是研究比较成熟的自杀基因,然而却面临着体内基因转染率较低,靶向性较差的问题。超声微泡是一种新型载体,能将目的基因、病毒、药物等高效导入靶点,从而可以促进肿瘤的靶向治疗^[1-3]。肺癌是死亡率很高的恶性肿瘤之一,本研究是在前期研究的基础上,以超声微泡介导前期构建的 pDsRed2-N1-CD/UPRT 融合自杀基因转染肺癌 A549 细胞^[4],从而探讨其促进自杀基因在肺癌细胞中的表达效率及杀伤作用,为肺癌的基因治疗提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

A549 细胞由重庆医科大学基础研究所提供;pDsRed2-N1-CD/UPRT 质粒已前期构建并菌液保存,吸光度(Optical density, OD)_{260 nm/280 nm} 值为 1.86,浓度为 235.3 ng/ μ l^[4];无内毒素质粒大量提取试剂盒和 Lipofectamine™ 转化试剂购自百泰克公司;超声微泡由重庆医科大学超声影像研究所研制,微泡外壳材料为白蛋白,内含一定浓度的全氟丙烷气体,微泡平均直径(1.5 ± 0.5) μ m,其浓度 2×10^9 个/ml。羊抗 CD 多克隆抗体及兔抗 UPRT 多克隆抗体(Abcam 公司)为一抗,鼠抗羊 IgG(Sigma 公司)及羊抗兔 IgG(Sigma 公司)为二抗。ECL 发光试剂盒从凯基生物公司购得,其余 Western blot 所需试剂均从碧云天购得。SABC 试剂盒购自碧云天公司,DAB 显色试剂盒从博士德生物工程有限公司购得。5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)为重庆医科大学超声影像研究所保存;UGT1025 型超声基因转染治疗仪由重庆医科大学超声影像研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 质粒扩增及提取 将前期实验保存的含 pDsRed2-N1-CD/UPRT 质粒的菌液 2 ml,加入至 200 ml LB 培养基(Amp⁺)中,于 37℃恒温摇床中水平震荡过夜,用无内毒素质粒大量提取试剂盒提取质粒,并测定质粒 DNA 的浓度和纯度。提取好的质粒保存在-20℃冰箱中。

1.2.2 超声微泡造影剂与自杀基因的融合 采用静电吸附法,将制备的带负电荷的脂膜氟碳微汽泡与 pDsRed2-N1-CD/UPRT 以 3:1 的比例混合,在 4℃下混合 2~3 h,通过静电吸附作用,使质粒包裹入微泡外壳,合成为能穿过毛细血管的携带基因的超声微泡造影剂。

1.2.3 细胞培养及转染 用含 10%胎牛血清的新鲜 1640 培养液培养 A549 细胞,隔天换液 1 次,每 3~5 d 传代 1 次,分为 A:空白对照组;B:脂质体+质粒组;C:超声照射+脂质体+质粒组;D:超声照射+微泡+脂质体+质粒组。采用脂质体法,参考 Lipofectamine™ 转化试剂操作说明,介导质粒或质粒与微泡造影剂混合物转染 A549 细胞,联合或不联合超声照射,

依据前期实验筛选的超声照射参数,1.0 W/cm² 低能量超声照射 40 s 时细胞转染率及存活率均较高^[4],故超声照射选用 1.0 W/cm² 低能量超声作用于细胞培养板底部约 40 s。细胞转染后 12、24 h 用荧光显微镜观察各组红色荧光蛋白的表达情况,细胞内带有红色荧光的细胞即为转染成功的细胞。计算转染率,采用双盲法计数每 100 个细胞中的阳性细胞数,重复计数 5 次,取平均值即为其细胞转染率。

1.2.4 免疫细胞化学法检测 CD/UPRT 蛋白的表达 将分别处理 24 h 后的 A549 细胞按 5×10^4 个/ml 的密度分别接种于铺有 24 mm×24 mm 盖玻片的 6 孔板中,继续培养 24 h,制成细胞爬片,吸出培养基,用 PBS 充分轻轻洗涤,4%多聚甲醛固定,双氧水去除内源性过氧化物酶,然后按 SABC 试剂盒操作步骤进行,CD 工作浓度 1:250,UPRT 工作浓度 1:300,对照实验中用不含抗体的 PBS 缓冲液代替一抗。DAB 显色,苏木素复染,脱水及透明后封片,正置显微镜下观察并随机取特定 5 个部位摄像,采用 IPP16.0 软件检测阳性细胞累积光密度值(Integrated optical density, IOD)进行半定量分析。

1.2.5 Western blot 印迹检测 CD/UPRT 蛋白的表达水平 取各组细胞,按照碧云天全蛋白提取试剂盒说明书步骤提取 A549 细胞蛋白,采用碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度并用裂解液调整蛋白浓度为 1 mg/ml。蛋白样品与 5×蛋白上样 buffer 按 4:1 混合后 100℃加热 5 min 使蛋白变性,在 10%~15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,采用湿转法将凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上,5%BSA 封闭 1 h,先后加入特异性一抗(CD 1:500,UPRT 1:500)4℃过夜和相对应的二抗常温孵育 2 h,TBST 充分洗涤后经 ECL 发光显影。采用特异性基因光密度/管家基因光密度(β -actin)相对定量。Quantity One4.6.2 图像分析软件分析。

1.2.6 MTT 法检测 A549 细胞的增殖 将细胞分 5 组:a 组(A 组);b 组(A 组+50 μ g/ml 5-FU);c 组(B 组+50 μ g/ml 5-FU);d 组(C 组+50 μ g/ml 5-FU);e 组(D 组+50 μ g/ml 5-FU),各组设 5 个平行孔,分别接种于 96 孔板,培养 24 h 细胞贴壁后,除 a 组外,选取对细胞杀伤作用不大的 50 μ g/ml 5-FU 作用于上述转染细胞^[4],分别加入 50 μ g/ml 5-FU 的完全培养液继续培养 24、48 h,采用 MTT 法检测细胞的增殖水平,并计算细胞生长抑制率,以缓冲液代替 5-FU 处理的 A 组细胞作为对照组,细胞生长抑制率(%)=(1-试验组 OD 值)/对照组 OD 值)×100%。

1.3 统计学分析

实验数据使用 SPSS17.0 统计分析软件处理,所得数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均先行方差齐性检验,数据服从方差齐性再进行方差分析,各组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验进行处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

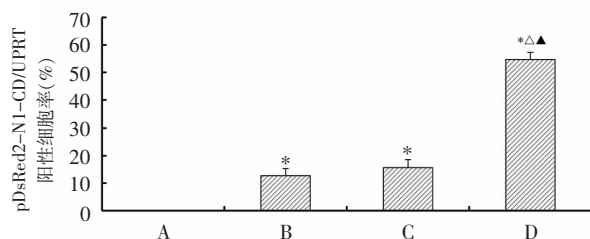
2.1 质粒的扩增与提取

质粒扩增提取后测浓度与纯度,其浓度为 620.6 ng/ μ l,

OD值为 1.89。

2.2 荧光显微镜下观察超声微泡联合 pDsRed2-N1-CD/UP-RT 对 A549 细胞转染率的影响

A 组在 12 h 与 24 h 均未见红色荧光蛋白的表达, B 组、C 组与 D 组均可见红色荧光蛋白表达, 荧光显微镜下观察发现后 3 组 12 h 时红色荧光蛋白表达较弱, 24 h 红色荧光蛋白表达较 12 h 有所增加, 未行统计学分析两者是否存在差异。各组 24 h 的转染率分别为 B 组(13.0±2.35)%、C 组(15.6±2.98)%、D 组(54.8±2.59)%。B 组转染率较 C 组升高不明显, B 组与 C 组之间无统计学意义, D 组与 B 组、C 组比较其差别均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1、2。



注: 与 A 组比较 * $P<0.05$; 与 B 组比较 Δ $P<0.05$; 与 C 组比较 ▲ $P<0.05$

图 1 pDsRed2-N1-CD/UPRT 阳性细胞率 (%)

Fig.1 pDsRed2-N1-CD/UPRT-positive cell ratio

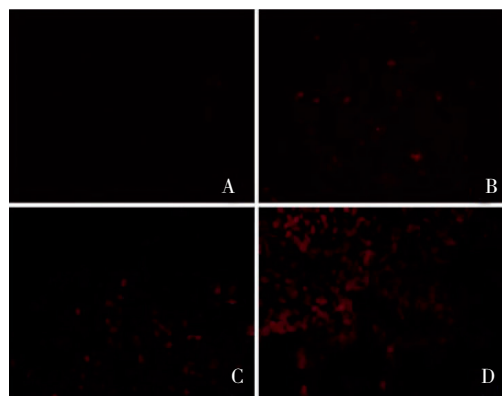


图 2 荧光显微镜下观察质粒转染 24 h 后红色荧光蛋白在 A549 细胞中的表达 (200 ×)

Fig.2 Expression of red fluorescent protein in transfected A549 cells detected by fluorescent microscope

2.3 免疫细胞化学法检测 CD/UPRT 蛋白表达

对照实验: 省略一抗用 PBS 缓冲液代替一抗, 检测结果为阴性, 证实此免疫组织化学检测结果是特异性的。免疫细胞化学检测结果提示 A 组细胞内未见棕黄色颗粒, B 组、C 组、D 组均可见棕黄色颗粒, CD 主要分布在胞浆, UPRT 在胞核与胞浆均有分布, 核均为苏木素复染呈蓝色, 两两比较采用 q 检验, B 组、C 组与 A 组比较差异有统计学意义($P<0.05$), B、C 2 组之间相比较差异无统计学意义($P>0.05$); D 组 CD/UPRT 蛋白的表达较 B 组、C 组增多, D 组与其余各组相比差异均有统计学意义($P<0.05$), 见图 3、4, 表 1。

2.4 Western blot 印迹检测 CD/UPRT 蛋白的表达

A 组 CD、UPRT 蛋白表达很少, B、C、D 组均有 CD、UPRT 蛋白表达, B 组、C 组与 A 组比较差异均有统计学意义($P<$

0.05), B、C 2 组之间相比较差异无统计学意义($P>0.05$); D 组 CD、UPRT 蛋白的表达最高, 与其余各组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 5 及表 2。

表 1 免疫细胞化学检测 A549 细胞中 CD/UPRT 表达 (IOD, $\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.1 Expression of CD/UPRT in A549 cells detected by the immunocytochemical method (IOD, $\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	IOD值	
	CD	UPRT
A组	1.438 ± 0.123	1.496 ± 0.059
B组	3.716 ± 0.117*	5.568 ± 0.070*
C组	3.822 ± 0.146*	5.622 ± 0.055*
D组	15.888 ± 0.192*Δ▲	17.602 ± 0.072*Δ▲

注: 与 A 组比较 * $P<0.05$; 与 B 组比较 Δ $P<0.05$; 与 C 组比较 ▲ $P<0.05$

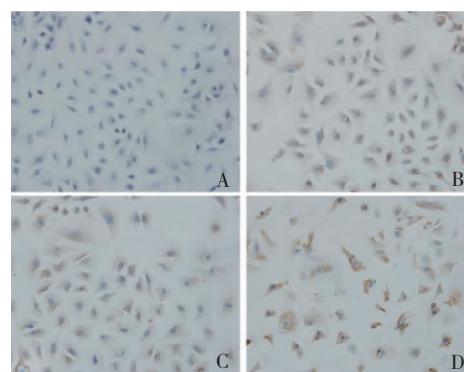


图 3 免疫细胞化学检测 CD 蛋白表达 (200 ×)

Fig.3 The expression of CD observed by the immunocytochemical method

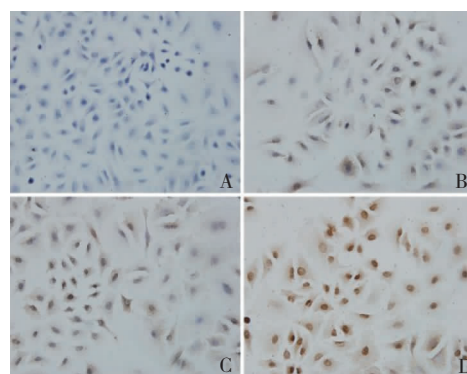


图 4 免疫细胞化学检测 UPRT 蛋白表达 (200 ×)

Fig.4 Expression of UPRT observed by the immunocytochemical method

表 2 Western blot 检测 A549 细胞中 CD/UPRT 蛋白的相对表达 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 Relative expression of CD/UPRT in A549 cells measured by western blot ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	A组	B组	C组	D组
CD	0.238 ± 0.084	0.496 ± 0.011*	0.518 ± 0.019*	0.734 ± 0.027*Δ▲
UPRT	0.288 ± 0.015	0.498 ± 0.013*	0.522 ± 0.026*	0.754 ± 0.023*Δ▲

注: 与 A 组比较 * $P<0.05$; 与 B 组比较 Δ $P<0.05$; 与 C 组比较 ▲ $P<0.05$

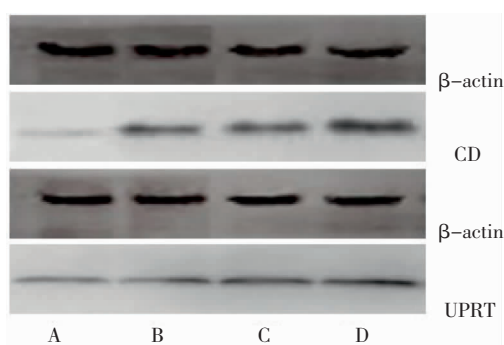


图5 Western blot 检测 A549 细胞中 CD/UPRT 蛋白的表达

Fig.5 Expression of CD/UPRT in A549 cells measured by Western blot

2.5 超声微泡联合融合自杀基因对 A549 细胞的杀伤作用

实验结果显示 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 5-FU 对 A549 细胞的生长抑制影响较小, b 组细胞生长抑制率为 6.34% (24 h) 及 7.11% (48 h), 其余 c、d、e 各组 24 h 生长抑制率为: 24.04%、25.68%、57.16%, 48 h 生长抑制率分别为: 26.62%、28.16%、63.67%。c 组、d 组分别与 b 组相比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), c 组的细胞生长抑制率比 d 组稍有增加, 二者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), e 组与其他各组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

CD 和 UPRT 自杀基因是目前研究比较成熟的自杀基因^[9], 广泛应用于脑胶质瘤、结肠癌、前列腺癌、肝癌、喉癌等肿瘤研究中。CD/UPRT 融合自杀基因是最新发现的与肺癌密切相关的自杀基因之一, Huang Q 等^[6]的研究发现, CD/UPRT 对肺癌细胞有较强的杀伤作用, 在 10~1 000 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC 作用下转染 CD/UPRT 腺病毒质粒后第 4 天 A549 细胞生存率下降至 30.57%~8.62%, 其杀伤机制主要是通过直接杀伤与旁观杀伤效应来实现的, 因此该融合目的基因对肺癌的临床治疗研究可能是一个有效的途径。

自杀基因对肿瘤细胞发挥直接杀伤与旁效应的关键是利用载体导入肿瘤细胞内, 目前病毒载体及非病毒载体均存在转染率低、靶向性差等缺点, 限制了自杀基因在临床的运用。Fogar P 等^[7]的研究就发现 CD/UPRT 融合自杀基因治疗

胰腺癌效果并不佳。为增加自杀基因的杀伤效应, 研究者们从各个角度进行探索, Johnson AJ 等^[8]从增加自杀基因本身的肿瘤杀伤作用出发, 将 CD 进行基因突变, 发现突变的 bCD (1525) 与传统 CD/5-FC 及 CD/UPRT 融合自杀基因相比较, 对肿瘤有更强大的直接杀伤能力及旁效应。Lemken ML 等^[9]则通过改善载体的转染效率角度进行研究, 利用单纯疱疹病毒外壳蛋白 (HSV-1 tegument protein VP22) 在靶细胞周围大量表达这一特性, 将 VP22 与酵母菌来源的 SuperCD (即 CD/UPRT 融合自杀基因) 经基因重组后相互融合成 VP22-SuperCD, 再行转染肝癌细胞, 发现 VP22-SuperCD 与腺病毒-CD/UPRT (Ad-SuperCD) 相比, 前者对细胞的杀伤作用显著增加, 且免疫荧光检测发现正是通过 VP22 在细胞间发挥“招募”作用导致的。Christensen CL 等^[10]研究也发现一种与小细胞肺癌特别相关的神经内分泌因子——胰岛细胞瘤相关转录因子 (Insulinoma associated-1, INSM1), 并将 CD/UPRT 与之融合, 体内外研究均发现该融合质粒对肺癌生长的抑制作用与 Ad-CD/UPRT 相比明显增加。所以从载体角度改善自杀基因的转染率是主要的研究方向之一。

超声微泡作为一种安全、靶向、新型的载体, 不仅能提高自杀基因的转染率, 靶向性强, 而且微泡在超声波作用下, 通过发挥空泡效应能增强自杀基因对肺癌细胞的杀伤作用^[2]。同时超声微泡增加化疗药物在肿瘤病灶的聚集, 减少化疗药物的剂量, 从而可以减少化疗药物带来的全身不良反应^[11]。故前期研究便将超声微泡与 CD/UPRT 自杀基因相互融合, 在脂质体的介导下研究超声微泡对自杀基因转染率及对肺癌细胞的直接杀伤及旁观效应的影响, 研究发现超声微泡能增强 CD/UPRT 基因对肺癌细胞的直接杀伤和旁效应, 并筛选了超声照射参数, 发现 5-FU 浓度 $> 50 \mu\text{g/ml}$, $> 50\%$ 转染质粒的条件下, 超声波在 1.0 W/cm² 能量下作用 40 s, 不会损伤细胞及目的基因的 DNA, 质粒对肺癌细胞杀伤作用较强, 细胞转染率较高且 A549 细胞存活状态最佳。期望低水平的 5-FU 作用下, 增加融合自身基因 CD/UPRT 的转染率与表达水平, 利用直接杀伤及旁效应, 联合超声微泡的空泡效应, 降低化疗药物的毒性作用, 为临床运用奠定基础。

本研究在前期体外实验的基础上, 旨在研究超声微泡联合自杀基因是否能通过增加质粒的转染率、上调 CD/UPRT 的蛋白表达从而增强对肺癌 A549 细胞的杀伤作用。利用超声微泡联合脂质体, 转染 CD/UPRT 于肺癌 A549 细胞中。实验

表 3 MTT 法检测 A549 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Tab.3 Inhibitory rate against growth of A549 cells measured by MTT ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	24 h		48 h	
	OD值	抑制率 IR (%)	OD值	抑制率 IR (%)
a组(A组)	0.562 $\pm$ 0.057	—	0.960 $\pm$ 0.023	—
b组(A组+50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU)	0.526 $\pm$ 0.006	6.34	0.891 $\pm$ 0.010	7.11
c组(B组+50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU)	0.427 $\pm$ 0.006*	24.04	0.704 $\pm$ 0.015*	26.62
d组(C组+50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU)	0.417 $\pm$ 0.005*	25.68	0.689 $\pm$ 0.014*	28.16
e组(D组+50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU)	0.241 $\pm$ 0.015* Δ $\blacktriangle$	57.16	0.349 $\pm$ 0.014* Δ $\blacktriangle$	63.67

注: 与 b 组比较 *, $P < 0.05$; 与 c 组比较 Δ , $P < 0.05$; 与 d 组比较 $\blacktriangle$, $P < 0.05$

结果显示,荧光显微镜下发现超声照射+微泡+脂质体+质粒组转染率比单用脂质体转染高 40%左右,而单独超声照射对脂质体介导的质粒转染增加不明显,这与 Zheng X 等^[1]的研究结果一致。脂质体联合超声微泡转染质粒能明显上调 CD/UPRT 蛋白的表达,说明超声微泡对质粒的损伤较小,能增加自杀基因的稳态表达。脂质体联合超声微泡可以明显抑制 A549 细胞的增殖,生长抑制率最高达 63.67%,而脂质体转染组或单独联合超声照射组的细胞生长抑制率仅有 28.16%。这表明超声微泡能有效地促进脂质体转染目的自杀基因,证实了超声微泡能在一定程度上提高自杀基因的转染效率,平稳持续表达 CD/UPRT 蛋白,增强了自杀基因的抗肿瘤效应,为以后包括肺癌在内的肿瘤临床治疗提供了一个新的途径。

参 考 文 献

- [1] Zheng X, Ji P, Hu J. Sonoporation using microbubbles promotes lipofectamine-mediated siRNA transduction to rat retina[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2011, 11 (3): 147-152.
- [2] Bazan-Peregrino M, Arvanitis C D, Rifai B, et al. Ultrasound-induced cavitation enhances the delivery and therapeutic efficacy of an oncolytic virus in an in vitro model[J]. *J Control Release*, 2012, 157 (2): 235-242.
- [3] Ibsen S, Benchimol M, Simberg D, et al. Localized activation and cellular effects of ultrasound triggered drug delivery vehicles with encapsulated microbubbles[J]. *J Acoust Soc Am*, 2011, 130 (4): 2503.
- [4] 杨 燕, 蒋幼凡. 超声微泡联合 pDsRed2-N1-CD/UPRT 融合自杀基因治疗肺癌的机制[J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23 (9): 938-941.
- [5] Yang Y, Jiang Y F. Mechanism of therapy of lung cancer by ultrasound microbubble combined with pDsRed2-N1-CD/UPRT fusion suicide gene[J]. *Chin J Biologicals*, 2010, 23 (9): 938-941.
- [5] Erbs P, Regulier E, Kintz J, et al. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene[J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (14): 3813-3822.
- [6] Huang Q, Chen D, Fu X, et al. Inhibitory effect of pulmonary carcinoma by adenovirus-mediated CD/UPRT gene[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2006, 26 (5): 591-593.
- [7] Fogar P, Navaglia F, Basso D, et al. Suicide gene therapy with the yeast fusion gene cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase is not enough for pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2007, 35 (3): 224-231.
- [8] Johnson A J, Ardiani A, Sanchez-Bonilla M, et al. Comparative analysis of enzyme and pathway engineering strategies for 5FC-mediated suicide gene therapy applications[J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18 (8): 533-542.
- [9] Lemken M L, Graeppler F, Wolf C, et al. Fusion of HSV-1 VP22 to a bifunctional chimeric super CD suicide gene compensates for low suicide gene transduction efficiencies[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30 (5): 1153-1161.
- [10] Christensen C L, Gjetting T, Poulsen T T, et al. Targeted cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl transferase suicide gene therapy induces small cell lung cancer-specific cytotoxicity and tumor growth delay[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (8): 2308-2319.
- [11] Sorace A G, Warram J M, Umphrey H, et al. Microbubble-mediated ultrasonic techniques for improved chemotherapeutic delivery in cancer[J]. *J Drug Target*, 2012, 20 (1): 43-54.

(责任编辑:冉明会)

个案与短篇

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.004

以偏侧肢体无力起病的低钾型周期性瘫痪误诊 1 例报道

刘晓波

(重庆市丰都县人民医院神经内科, 丰都 408200)

【中国图书分类法分类号】R746.3

【文献标志码】B

【收稿日期】2012-01-29

低钾型周期性瘫痪是以反复发作的对称性骨骼肌迟缓性瘫痪、伴血清钾降低、补钾后能迅速缓解为特征的疾病。但以偏侧肢体无力起病的低钾型周期性瘫痪尚未见报道,现将我院收治的这例患者报道如下。

1 病例资料

患者,男,58岁,工程师。因左侧肢体乏力 3 h 于 2010 年 8 月 26 日入院。入院前 3 h,患者于起床时感左侧肢体乏力,

作者介绍:刘晓波(1970-),男,副主任医师,

研究方向:脑血管疾病。

但能独立行走,不伴语言障碍、吞咽困难及肢体麻木。门诊头颅 CT 示:双侧基底节区腔隙性脑梗死。故门诊以“脑梗死”收住我科。否认“甲亢”、“高血压”等病史。病前晚上饮 52°白酒约 300 ml。入院查体:T37.1℃,R18 次/min,P78 次/min,BP 132/78 mmHg,步入病房,一般内科检查正常。神经系统检查:神志清楚,吐词清楚,两侧瞳孔等大形圆,直径 3 mm,对光反射灵敏,颅神经(-),颈软,左侧肢体肌张力减低,左侧上肢肌力 5-级,左侧下肢近端肌力 4 级、远端 5-级,右侧肢体肌力 5 级,感觉正常,上肢腱反射,左侧膝反射(+),右侧膝反射(++),双侧踝反射(+),两侧病理征(-)。入院诊断:右侧脑梗

(下转第 134 页)