



姜润生,男,1957年6月生,汉族,教授,博士研究生导师,昆明医科大学校长。1983年7月毕业于昆明医学院临床医学专业获学士学位。主要教学成果:2001年获教育部国家级教学成果奖二等奖;2009年获云南省教学成果一等奖。2010年以来,作为项目负责人承担了与拟招博士生导师研究方向相关的科研项目:科技部国家软科学研究计划《云南省区域卫生规划与卫生资源配置研究》;云南省自然科学基金《云南省城市社区预防和控制艾滋病健康促进研究》;中华医学基金会《云南多民族边疆地区农村卫生人员培训项目》;中华医学基金会《中国云南省和泰国宋卡府农村卫生人力资源的比较研究》;香港研究资助局《应用系统架构评估香港、深圳、昆明和上海的基层保健服务》;云南省委宣传部《云南省基层医疗卫生人才资源现状与对策研究》等。主要科研成果奖:2003年获云南省人民政府科学技术奖励三等奖;2007年获云南省教育厅云南省优秀教育工作者称号;2011年获云南省委高校工委、云南省教育厅第二届“云南教育功勋奖”等。主编并出版教材主要有:全国高等医学院校规划教材《社会医学》,及《乡村医生规范化培训实用教材》等。在国内外公开学术刊物上发表论文共10余篇,其中SCI文章2篇,最有影响的科研论文有:《Development and validation of a quality of life instrument for patients with drug dependence:Comparisons with SF-36 and WHOQOL-100》,《The hypertension scale of the system of Quality of Life Instruments for Chronic Diseases, QLICD-HY:A development and validation study》等。

## 中国全科医学的发展历程与展望

全科医学又称家庭医学,是一个面向个人、社区与家庭,整合临床医学、预防医学、康复医学以及人文社会学科相关内容于一体的综合性临床二级专业学科<sup>[1]</sup>。全科医学源于18世纪的欧美,1969年作为一个新的临床专业学科正式建立,中国于20世纪80年代末引入全科医学。笔者对我国全科医学的发展历程和成效进行归纳总结,并对其发展前景进行前瞻性思考。

### 1 我国全科医学的发展历程

#### 1.1 引入探索阶段

20世纪80年代后期中国大陆正式从国外引入全科医学概念。世界家庭医生学会(WONCA)主席Rajakumar和Peter Lee受邀先后访问我国并介绍全科医学,以此同时,中华医学会也派员参加世界家庭医生组织年会及亚太地区会议交流学习全科医学。在WONCA的支持下,1989年我国召开了第一届国际全科医学学术会议并成立了北京全科医学学会。首都医科大学率先在国内开展全科医学教育,成立了全国第一家全科医学培训中心,

在多位国际友人的帮助下开始向全国传播全科医学理念。1993年11月,中华医学会全科医学分会成立,并于1995年成为世界家庭医生组织成员,标志着全科医学学科在我国诞生。在此期间,国内部分地区开始尝试开展全科医生培养和全科医疗服务等工作,如首都医科大学开展了临床医学专业全科医学方向的试点班并成立了全科医学教研室、原上海医科大学附属中山医院成立了全科医疗科并提供服务。由于社会认同度低、缺乏政策支持,总体而言,这一时间全科医学还处于引入、传播和探索阶段,在中国大陆未广泛开展。

#### 1.2 起步发展阶段

1997年1月发布的《中共中央、国务院关于卫生改革与发展决定》明确提出“加快发展全科医学、培养全科医生”,这为国内全科医学发展提供了前所未有的政策支持,全科医学步入到一个新的发展阶段。随后,国内有关部门相继出台了一系列惠及全科医学发展的政策文件,全国各地积极开展全科医学人才培养和全科医疗服务工作,各种学术交流活动逐渐活跃。1999年12月“全国全科医学教育工作会议”在北京召开,标志着我国全科

医学教育工作的全面启动与实施。从 2000 年开始, 全国持续开展了全科医师岗位培训和中西部城市社区卫生人员培训项目, 北京、浙江、上海等地还开展了四年制全科医师规范化培训试点项目, 全科医师继续医学教育也逐渐在全国各省、区、直辖市开展。部分地区制定实施了全科医师职称系列和晋升标准。全国高等医学院校相继成立了全科医学院、系、研究所及培训中心, 普遍开设全科医学相关课程和加强学科建设。复旦大学、首都医科大学等还开展了全科医学专业的硕士研究生教育。此阶段, 全科医学的政策环境得到显著改善, 为全科医学的可持续发展奠定了坚实基础。

### 1.3 蓬勃成长阶段

自 2009 年 4 月《中共中央国务院关于深化医药卫生体制改革的意见》正式颁布后, 更有益于我国全科医学发展的大环境日趋形成, 全科医学在我国跨入到一个新的发展时期。2010 年 4 月, 国家发展改革委、卫生部等 6 部委印发了《以全科医生为重点的基层医疗卫生队伍建设规划》, 对我国全科医学人才的培养、吸引、使用、评价和激励办法进行了规定。2011 年 7 月颁布实施的《国务院关于建立全科医生制度的指导意见》, 对建立中国特色全科医生制度做出了全方位的顶层设计, 明确提出到 2020 年, 在我国初步建立起充满生机和活力的全科医生制度, 基本形成统一规范的全科医生培养模式和“首诊在基层”的服务模式, 基本实现城乡每万名居民有 2~3 名合格的全科医生等目标任务。在此良好政策环境的促进下, 目前我国的全科医学在学科发展、人员培养、服务提供、培训基地建设等方面均呈现出蓬勃发展的态势, 正沿着规范化、专业化的道路稳健前进。

## 2 我国全科医学发展的初步成效

### 2.1 全科医学的政策支持环境初步创建

自 1997 年后, 我国各级政府对全科医学日益重视, 制定出台了一系列促进全科医学发展的政策文件, 初步创建了多层面的政策支持环境。一是中共中央、国务院颁布的文件, 包括《中共中央国务院关于卫生改革与发展决定》、《中共中央国务院关于深化医药卫生体制改革的意见》、《国务院关于发展城市社区卫生服务的指导意见》、《国务院关于建立全科医生制度的指导意见》等; 二是政府职能部门制定的文件, 包括

《关于发展全科医学教育的文件》、《关于加强高等医学院校全科医学、社区护理学教育和学科建设的意见》、《关于加强城市社区卫生人才队伍建设的指导意见》、《以全科医生为重点的基层医疗卫生队伍建设规划》等; 三是各类全科医生培养要求与标准, 包括《全科医生规范化培养标准(试行)》、《助理全科医生培训标准(试行)》、《基层医疗卫生机构全科医生转岗培训大纲(试行)》等。

### 2.2 全科医学教育体系基本构建

进入新世纪以来, 在政府、学校、学术组织等共同努力和推动下, 近年来我国全科医学教育取得较快的发展, 基本构建了适合我国国情全科医学教育体系。主要包括医学院校本科生全科医学课程教育、全科医生转岗培训、全科医师规范化培训、助理全科医生培养、全科医学继续教育、全科医学研究生教育、全科医学师资培训等。随着我国医药卫生体制改革的不断深入, 加快完善中国特色全科医学教育体系已成为当务之急。

### 2.3 初步造就了一支全科医生队伍

借鉴国际经验, 结合国情, 我国先期主要采取全科医师岗位培训、全科医师骨干培训、全科医师规范化培训、继续教育等方式培养全科医生。自 2009 年起, 兼顾当前与长远的发展, 国家对全科医生的培养途径进行了规范统一, 目前主要通过全科医生转岗培训和规范化培训两个途径培养全科医生。历经 10 a 的不懈努力, 截至目前, 我国已拥有注册为全科医疗科的执业医师 8 万余名, 占执业医师总数的 4.3%。初步组建了一支提供基层医疗保健服务的全科医生队伍。

## 3 我国全科医学的发展展望

### 3.1 发展全科医学是社会发展的必然要求

在城镇化、工业化、人口老龄化和经济全球化的影响下, 慢性退行性疾病、与生活方式及行为有关的疾病等逐渐成为影响人类健康的主要因素, 已造成重大疾病负担。国际经验表明, 随着传染病、环境卫生等问题得到改善, 医疗卫生服务将会逐步转变为以个人为中心、以家庭为单位和以社区为基础的医疗保健服务, 即全科学服务<sup>[2]</sup>。随着社会经济的快速发展, 我国的疾病谱和死亡谱也发生了深刻变化, 人群健康问题面临着严峻挑战, 力图通过“专科化的医院服务模式”应对挑战已显现出前景黯淡, 故加强基层医疗卫生工作已成为重要选项。基层医疗卫生服务水平的关键

在于医疗卫生人才。因此,发展全科医学、培养全科医生,向个人和家庭提供集预防、保健、诊断、治疗、康复、健康管理一体化的全科医疗服务,必将成为社会发展的新要求。

### 3.2 发展全科医学是现代医学变革的必然趋势

过度专科化的医疗服务模式所导致的医药费用不断上升、过度医疗、医患关系淡漠等问题越来越引起人们的担忧和反思。目前,医学正酝酿着新的革命,其引领变革主要基于社区的健康促进工作。多国的医疗实践也证明,全科医疗服务是最佳的基层医疗服务方式,以全科医师为骨干的社区卫生服务是低成本、高效率的医疗体系的基础。世界卫生组织和世界家庭医生组织共同指出:在新世纪中,为满足民众对基本卫生保健的需要和需求,全科医生与专科医生的比例应至少达到 1:1。因此,以患者人和基层社区为中心的全科医学将会成为 21 世纪医学的重要发展方向。

### 3.3 发展全科医学是建立基本医疗卫生制度的必需举措

《中共中央国务院关于深化医药卫生体制改革的意见》明确提出:建立健全覆盖城乡居民的基本医疗卫生制度。实现人人享有基本医疗卫生服务成为了我国医药卫生事业改革的重要任务。培养大批

合格的全科医生,建立以全科医生为核心的基层卫生服务团队,提供综合性的基层医疗保健,形成基层首诊、双向转诊、上下协作的医疗卫生服务体系,是许多国家保证人人享有基本医疗卫生服务的通行做法和成功经验<sup>[1]</sup>。多年来,我国基层医疗卫生人才队伍建设相对滞后,合格的全科医生数量严重不足,严重制约了基层医疗卫生事业的发展。大力发展全科医学,建立全科医生制度,为基层培养大批“下得去、留得住、用得好”的合格全科医生,是建立基本医疗卫生制度的客观要求和必要举措。

### [参考文献]

- [1] 吕兆丰,郭爱民. 全科医学概论[M]. 北京:高等教育出版社,2010: 2-10.
- [2] 姜春燕,刘力戈,李敏. 结合西方国家全科医学发展史反思我国的全科医学现状[J]. 临床和实验医学杂志, 2012,11(15):1 253-1 254.
- [3] 杨辉,SHANE THOMAS,COLETTE BROWNING,等. 从澳大利亚等西方国家全科医学发展史引发的思考[J]. 中国全科医学,2007,10(11):863-867.

(2012-07-10 收稿)

## 秀丽线虫野生株系和缺氧敏感株系的差异蛋白质组学研究

李华玲<sup>1,2)</sup>, 陈文飞<sup>1)</sup>, 陈欣虹<sup>1)</sup>, 周晓霞<sup>1)</sup>, 张成岗<sup>2)</sup>

(1) 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001; 2) 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 100850)

**[摘要]** **目的** 研究秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 野生株系 N2 和缺氧敏感株系 (ia04) 的差异蛋白质, 为进行线虫在缺氧环境下的应答机制研究奠定基础. **方法** 同步化培养 2 种株系的线虫, 培养至 L4 期时, 常规方法提取总蛋白, 采用双向电泳分离和串联质谱分析, 搜索 Swiss-Prot 线虫数据库, 鉴定蛋白种类并根据基因本体论 (gene ontology, GO) 进行分析. **结果** 质谱成功鉴定了其中的 25 个差异显著蛋白 (ratio > 2.0,  $P < 0.05$ ), 其中 N2 株系检测到的表达量比 ia04 株系高的主要是热休克蛋白 (HSP-70, HSP-60)、GTP 结合蛋白 (TAG-210)、乙酰辅酶 A 脱氢酶中链 (GN=T); ia04 株系检测到的表达量比 N2 高的是延伸因子 (EFT-3) 和铁硫蛋白 -1 (ISP-1), 在 ia04 株系中, HSP 的含量明显低于 N2 株系, 说明这可能是 ia04 株系对缺氧敏感的原因之一. 根据 GO 注释结果发现, 鉴定到的这些差异蛋白与线虫的 DNA 合成及生长发育的相关性较大. **结论** 蛋白质组学的方法为线虫缺氧的研究提供了有参考价值的数据, 不同株系差异蛋白的发现可促进对缺氧应答机制的了解, 且可从蛋白质水平揭示重要表型的基因表达机制.

**[关键词]** 秀丽线虫; 缺氧敏感株系 (ia04); 蛋白质组学; 热休克蛋白

**[中图分类号]** Q816 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0004 - 06

## Proteomic Studies of Wild Type N2 and Hypoxia-sensitivity Strain (ia04) in *Caenorhabditis Elegans*

LI Hua - ling<sup>1,2)</sup>, CHEN Wen - fei<sup>1)</sup>, CHEN Xin - hong<sup>1)</sup>, ZHOU Xiao - xia<sup>1)</sup>, ZHANG Cheng - gang<sup>2)</sup>

(1) Medical College of Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225001; 2) State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the different proteins between wild type N2 and hypoxia-sensitivity strain (ia04) and lay the foundation for studying the response mechanism of *C.elegans* during hypoxia. **Methods** The worms of two strains were cultured synchronously to L4 stage. Then the total proteins were extracted by using routine method. After that, two-dimensional electrophoresis was performed and the selected protein spots were then identified by MALDI/TOF/TOF tandem mass spectrometry and search the Swiss-Prot database. Go term (Gene Ontology) analysis was also performed. **Results** Twenty-five significantly different spots were finally identified by MS (ratio > 2.0,  $P < 0.05$ ). The expression levels of main proteins identified in N2 were higher than those in ie04 strain: heat shock proteins (HSP-70 and HEP-60), Putative GTP-binding protein (TAG-210), Probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (GN = T). The expression levels of main proteins identified in ie04 strain were higher than those in N2 strain: Elongation factor-1 alpha (EFT-3) and Iron-sulfur protein (ISP-1). The expression level of HSP in ie04 strain was obviously lower than in N2 strain, it may be the one reason why worms of ie04 strain were sensitivity to hypoxia. According to the Go term, most proteins identified were related to the development and DNA synthesis of *C. elegans*. **Conclusions** Proteomic research can offer the valuable reference data to study the hypoxia in *C. elegans*. Different proteins found in different strains may promote

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81100862)

**[作者简介]** 李华玲 (1971 ~), 女, 江苏扬州市人, 医学博士, 讲师, 主要从事缺氧的分子机制研究工作.

the understanding of the hypoxia responsive mechanism and uncover the mechanism of important phenotype gene expression at the protein level.

[Key words] *C.elegans*; Hypoxia-sensitivity strain; Proteomics; Heat-shock protein

秀丽线虫 (*C.elegans*) 作为重要的模式生物在生命科学的发展过程中发挥着举足轻重的作用, 在不同的环境下, 对线虫已经进行了基因水平的大规模分析, 而对线虫进行蛋白质组学的分析会加深对它的了解. 已有研究报道线虫是研究蛋白质组学的一个很好的模式生物, 并有完整的技术路线. 大规模分析线虫在特定生理条件时蛋白质表达谱已被证明是一种具有优势的技术策略. 近年来, 线虫已被广泛用于与人类神经疾病相关的蛋白质研究中, 如阿尔茨海默病、帕金森病、衰老、缺氧等的研究<sup>[1-4]</sup>.

缺氧同样能够引起秀丽线虫发生相应的生理和行为学变化, 并可保护机体免受缺氧损伤. 研究表明秀丽线虫的缺氧应答通路和人类的相关通路之间具有高度的保守性, 缺氧也可启动线虫一系列细胞应答 (*hif-1* 通路) 以减轻缺氧造成的损伤, 更重要的是, 其神经系统的基本结构和人类有高度保守性, 如突触蛋白、离子通道、神经递质等. 大量研究表明秀丽线虫的缺氧诱导因子无论在结构和功能上都与人类具有高度保守性<sup>[5]</sup>.

Powell-Coffman 实验室报道秀丽线虫的 *hif-1* 基因是哺乳动物 *hif-1*  $\alpha$  亚基的同源基因, *hif-1* 的功能缺失突变体可导致秀丽线虫丧失抗低氧损伤能力<sup>[6]</sup>. 因此, 秀丽线虫已经成为低氧损伤的重要模式生物, 可望为阐明细胞或动物的缺氧应答通路提出新的思路和研究路线.

已有研究还运用全基因组芯片技术大规模筛选缺氧应答反应基因, 对线虫的不同株系抗缺氧损伤及其通路也有所研究和发现, 但与缺氧有关的线虫蛋白质方面的报道还不多, 其相应的分子机理更尚未阐明. 因此完全可以利用线虫为模式生物, 通过高通量的蛋白质组学技术筛选变化的蛋白质, 更进一步揭示缺氧应答通路的分子机制. 本实验室已获得 *hif-1* 突变的缺氧敏感株系 (*ia04*), 基于此, 本研究对线虫的野生株系 N2 和 *hif-1* 突变株系 (*ia04*) 的 L4 期蛋白质样品通过二维电泳和质谱法进行了差异蛋白表达谱的研究分析, 为研究哺乳动物的低氧信号通路和应答方面提供有价值的线索, 同时丰富线虫的蛋白质数据库, 并将为解析动物及人体体内缺氧相关疾病的分子机制提供新科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 线虫来源** 野生型秀丽线虫 N2 和 *hif-1* 突变株系 (*ia4*) 购自美国秀丽线虫遗传中心 (Caenorhabditis Genetics Center). 大肠杆菌 OP50 (Streptomycin<sup>+</sup>) 由日本东京女子大学三谷昌平惠赠.

**1.1.2 试剂及器材** 丙烯酰胺、N, N'-甲叉双丙烯酰胺、Tris 碱、甘氨酸、SDS、过硫酸铵、CHAPS、尿素、硫脲购自 Sigma 公司; 碘乙酰胺、TEMED 购自 Fluka 公司; 胰蛋白酶、三氟乙酸 (TFA)、乙腈等购自 Bio-Rad 公司; IPG 干胶条、Pharmalyte<sup>TM</sup>、IPG buffer 和 IPG 矿物油、IPG 胶槽清洁液购自 GE healthcare; 蛋白酶抑制剂 cocktail 为 Roche 产品. 硫酸链霉素、次氯酸钠等其它试剂均为国产分析纯.

双向电泳仪 Ettan<sup>TM</sup> IPGphor<sup>TM</sup> II IEF System & Ettan<sup>TM</sup> DALTsix Large Vertical System 和扫描仪 ImageScanner (Amersham), 质谱仪 (ABI 4800 TOF TOF), 2-D Quant Kit (Ettan<sup>TM</sup> Sample Preparation Kits and PlusOne<sup>TM</sup> Reagents) (Amersham Biosciences), 体式显微镜 (Nikon).

### 1.2 方法

**1.2.1 提取线虫蛋白质** 线虫按标准的程序培养在 NGM 的 9 cm 的培养皿内, 以大肠杆菌 OP50 为食物, 当线虫野生株系 N2 和缺氧敏感的株系 (*hif-1* 缺失) 有卵时同时进行同步化处理 (次氯酸钠、氢氧化钠), 同步化培养后的虫卵在 20 °C 下 16 h 后, 转移到含有 OP50 的 NGM 培养基中培养 (20 °C), 在 L4 期时经 M9 (3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g/L NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) 缓冲液洗脱后移入 EP 管中, 清洗至液体透明时提取蛋白质. 先加入等体积的裂解液 [7 M 尿素, 2M 硫脲, 4% (W/V) CHAPS, 60 mM DTT, 1% (V/V) 蛋白酶抑制剂], 混匀后在液氮中反复冻融 2 次, 并将线虫磨成细粉, 收集到 EP 管中, 匀浆液再经冰浴超声处理, 最后冷冻离心 (13 000 r/min, 30 min, 4 °C), 取上清液作为蛋白样品, 蛋白质的浓度用 2D-定量试剂盒 (GE Healthcare) 测定.

**1.2.2 双向电泳** 参照 Bio-Rad 双向电泳使用手册操作。采用胶内加样，将 100  $\mu\text{g}$  总蛋白与重水化液 7 mol/L 尿素 2% CHAPS、60 mmol/L DTT 和 0.5% (体积比) 两性电解质 PharmalyteTM3-10 混合，终体积 375  $\mu\text{L}$ 。将 IPG 干胶条胶面向下放入胶槽，覆盖一层矿物油，置于 IPGphor 等电聚焦仪电极板上，20  $^{\circ}\text{C}$  重水化和等电聚焦，总电压时间积 60 kVh，将聚焦后的胶条在含 1% DTT 的平衡液 2% SDS，50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8，6 mol/L 尿素，30% (体积比) 甘油中平衡 15 min，再于含 2.5% 碘乙酰胺的平衡液中平衡 15 min 后，将胶条移至 0.75 cm 厚、12% SDS 均匀胶上端，用 0.5% 琼脂糖封胶进行电泳。电泳条件设置为恒定电流 20 mA/胶，30 min 后改为恒定电流 30 mA/胶，电泳至指示剂溴酚蓝前沿达胶底线，然后进行考马斯亮蓝染色，以备鉴定。

**1.2.3 图像分析** 用 ImageScanner (Amersham

Biosciences) 扫描仪扫描胶图，扫描软件: LabScan (Version 3.01, Amersham pharmacia biotech)。参数: 透射式 (transmissive); 分辨率: 300 dpi。用 ImageMaster™ 5.0 分析软件对图像进行分析，包括背景消减、斑点自动检测、匹配等。自动检测后在多窗口下进行人工编辑，除去杂质造成的假点、杂点、误配的点等。自动进行差异点的统计学分析，选取差异点的原则是:  $t$ -test 计算所得  $P < 0.05$ , volume ratio  $> 2.0$ 。

**1.2.4 质谱鉴定、数据库搜索** 胶内酶切: 用解剖刀切除胶上待鉴定的蛋白点 (1 ~ 2  $\text{mm}^2$  大小) 置离心管中，加入 100  $\mu\text{L}$  脱色液 (乙腈: 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3=1:1$ ) 浸泡并振荡，重复此步骤至蓝色褪尽，真空干燥，加入 15  $\mu\text{L}$  胰蛋白酶液 (0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )，4  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min，待被胶块吸收后，补充酶解缓冲液 (25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )，使胶完全浸没，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h 过夜。向胶块中加入 100  $\mu\text{L}$

表 1 经质谱鉴定得到的线虫野生型 N2 株系和缺氧敏感的株系 ia04 的差异表达蛋白

Tab. 1 List of differentially expressed proteins in wild type N2 and hypoxia sensitivity ia04 strains respectively, identified through peptide mass fingerprint

差异点编号	蛋白质名称	SP 名称	理论分子量	理论等电点	株系 (倍数)	分值
766	热休克蛋白 70 kDa Hsp-3	P27420	72979	4.95	N2(2.59)	106
803	未知蛋白 C52b9.8	Q22944	156032	8.73	N2	57
827	分子伴侣 Hsp-60 线粒体	P50140	60064	5.31	N2(4.06)	59
955	蛋白 unc-87 的异构体 c	P37806	60409	9.07	N2(1.875)	84
987	GTP 结合蛋白 tag-210	P91917	44323	6.44	N2(2.38)	103
1032	酰基 CoA 脱氢酶 GN=T	Q22347	44790	8.37	N2(1.69)	80
1048	精氨酸激酶 a F46H5.3	Q10454	44140	6.84	N2	62
1080	肌动蛋白 4 act-4	Q6A8K1	40400	5.56	N2	70
1081	未知蛋白 C16a3.10	Q8MNV6	39024	8.70	N2	57
1093	乙醇脱氢酶 1. sodh-1	Q17334	37672	6.07	N2	137
1097	蛋白质 C31C9.2	O17626	34670	6.34	N2	78
1106	40S 核糖体蛋白 Rps-0	P46769	30684	5.49	N2	252
1143	未知蛋白 K08d9.4	Q9TXN5	37837	9.72	N2(2.05)	60
1255	蛋白质 R01E6.3a Cah-4	Q21614	31333	9.09	N2	177
1322	Fk506- 结合蛋白家族 5 Fkb-5	Q95Q60	34139	7.59	N2(1.93)	86
1399	延伸因子 2 eft-2	P29691	94735	6.10	N2	65
1010	蛋白质 F44A6.1a Nuch-1	Q20384	53158	4.84	ia04(1.719)	76
1030	腺苷三磷酸酶亚基 A vha-13	Q9XW92	66418	5.09	ia04	101
1197	延伸因子 1 Eft-3	P53013	50636	9.07	ia04(1.78)	165
1208	蛋白质 T24B8.4	Q22715	93755	9.89	ia04	57
1307	肌钙蛋白 T mup-2	Q27371	47013	4.97	ia04	59
1424	蛋白质 ZK829.4	Q23621	58758	6.90	ia04(1.8)	395
1474	原肌球蛋白 e lev-11	Q27249_1	29614	4.72	ia04	166
1623	铁-硫蛋白 1 isp-1	O44512	29691	8.81	ia04(3.83)	271
1833	蛋白质 Y62E10A.1 rla-2	Q9U1X9	10865	4.46	ia04	495

提取液 I (5%三氟乙酸 TFA), 40 °C 水浴 1 h, 收集上清, 再加入 100  $\mu$ L 提取液 II (50%乙腈, 2.5% TFA), 30 °C 水浴 1 h, 收集上清. 合并上清, 真空干燥, 质谱分析.

质谱鉴定: 采用串联飞行质谱仪 4800 TOF TOF 获取肽片段序列, 使用正反射模式, 一级平均 1 500 次激光打靶结果, 二级平均 3 000 次. 使用 4 800 校准混合物为外标校靶, mass tolerance 在 0.1 Da 以内. 对质量范围为 600 ~ 4 000 Da、最小信噪比 (S/N) 为 15 的母离子峰进行串联 TOF/TOF 分析. MS 和 MS/MS 结果联合查询线虫数据库, Total score > 64 并且至少有一个肽段匹配 (best ion score > 30) 的结果被接受. 检索参数见表 1.

**1.2.5 基因本体论 (gene ontology, GO) 功能注释** 首先在用 EBI-EMBL 的 dbfetch 检索质谱获得的蛋白质, 得到和 Swiss-Prot、Pfam、NCBI nr、SuperFamily 数据库等的交叉注释信息. 登录 <http://www.geneontology.org>, 输入对应的序列号, 即可得到注释信息. 基于 GO 分析进行蛋白功能分类.

2 结果

## 2 结果

### 2.1 线虫野生型 N2 株系和缺氧敏感株系 hif-1 (ia04) L4 期总蛋白双向电泳图谱

本研究同时大规模培养 2 种株系线虫, 至成虫有卵时同步化处理, 16 h 幼虫出来, 移入 NGM 培养皿中至生长到 L4 期, 然后同时提取蛋白质并定量后, 进行双向电泳, 每个样品重复跑 3 块胶, 共 6 块胶一起进行电泳, 这样尽可能减少误差, 建立了分辨率较高、重复性较好的 (匹配率 > 85%) 线虫蛋白质的二维电泳图谱 (见图 1).

经过考马斯亮蓝染色, 扫描图像保存后, 对电泳图谱用 ImageMaster™ 5.0 软件分析, 在野生型 N2 株系的双向凝胶图上共检测到约 1 500 个蛋白点,

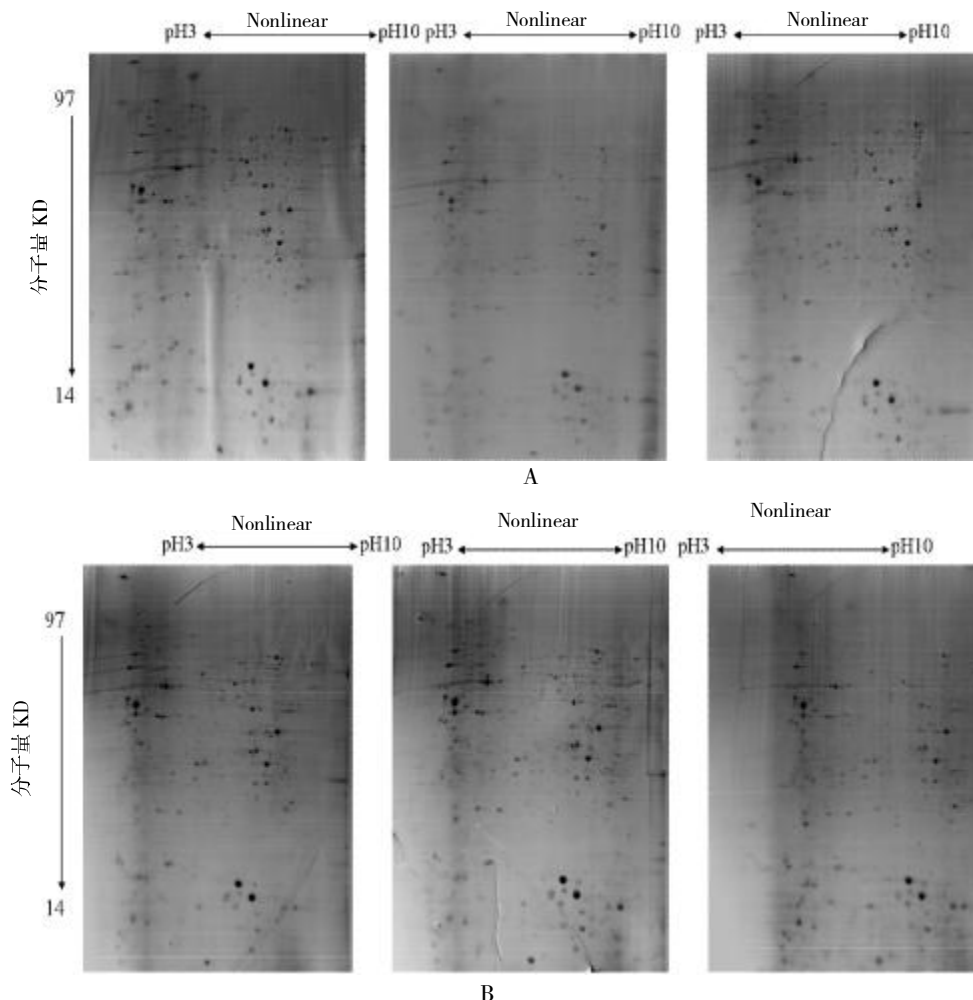


图 1 线虫蛋白质的 2D 图, 蛋白质样品(1 mg) 从 L4 期提取

Fig. 1 2-D maps of *C. elegans* proteins. Protein samples (1mg) extracted from L4 stage

A:野生型株系 N2; B:缺氧敏感的株系 ia04. 各重复 3 次, 匹配率 > 85%. 使用 18 cm pH 3 ~ 10 非线性 IPG 胶条对蛋白质样品进行等电聚焦分离, 然后用 12.5%的 SDS-PAGE 进行二向分离.

在缺氧敏感的株系共检测到约 1 700 个蛋白点。

## 2.2 鉴定蛋白点的选择

分析结果显示, 在 N2 株系中表达而在 hif-1 突变的株系中检测不到的蛋白质有 43 个, 而表达差异倍数在 2.0 倍以上的有 16 个; 在 hif-1 突变的株系中表达而在 N2 株系中检测不到的蛋白质有 61

个。另外, 在 2 个株系都有而且表达差异倍数在 2.0 倍以上的点有 19 个, 并呈统计学显著差异 ( $P < 0.05$ )。结合胶图上每个点的位置和形状, 选取每个株系各自特有的差异点和变化大于 2.0 倍以上的共计 65 个点, 对这些差异表达蛋白质点进行质谱分析。

表 2 质谱鉴定蛋白质的基因本体论分析

Tab. 2 Go analysis of proteins identified through peptide mass fingerprint

GO 注册号	GO 注释	蛋白质数目	百分数 (%)	P
GO:0044249	细胞生物合成过程	6	17.65	0.009 181
GO:0009790	胚胎发育	12	35.29	0.017 014
GO:0048513	器官发育	6	17.65	0.017 816
GO:0048731	系统发展	6	17.65	0.023 849
GO:0009791	胚胎后期发育	9	26.47	0.025 673
GO:0007548	性分化	5	14.71	0.039 939
GO:0009792	出生前发育	11	32.35	0.040 635
GO:0003006	生殖进化过程	5	14.71	0.044 406
GO:0044444	细胞质部分	8	23.53	0.003 215
GO:0044424	细胞内部分	15	44.12	0.003 900
GO:0005622	细胞内	16	47.06	0.007 311
GO:0043229	细胞器	13	38.24	0.009 043
GO:0005737	细胞质	9	26.47	0.011 101
GO:0043232	细胞内非膜结合的器官	6	17.65	0.022 646
GO:0017076	嘌呤核苷酸结合	18	52.94	0.001 83
GO:0032553	核苷酸结合	17	50.00	0.009 73
GO:0016817	水解酶类	7	20.59	0.007 10
GO:0008026	ATP- 依赖的解链酶活性	4	11.76	0.001 081
GO:0003746	翻译延长因子 t	2	5.88	0.041 699

## 2.3 差异表达蛋白质点的质谱鉴定

用刀片在考染胶上切取对应的点进行胶内酶解后经 MALDI-TOF-TOF 质谱 (ABI-4800 型) 分析得到肽片段串联图谱后, 查询 Swiss-Prot 线虫数据库, 对于所选的 65 个蛋白点, 最终通过质谱成功鉴定了 25 个差异显著蛋白, 蛋白鉴定情况见表 1, 16 个蛋白是 N2 株系中检测到的, 其中表达上调的有 7 个: FKB-5, K08D9.4, TAG-210, UNC-87, HSP-60, GN=T 和 HSP-3; 缺氧敏感的株系 ia04 中检测到的蛋白质有 9 个, 其中表达上调的有 4 个: NUCB-1, EFT-3, ZK829.4 和 ISP-1。

## 3 讨论

为了对所鉴定的蛋白质进行功能分析, 首先基

于基因本体论对差异表达蛋白进行功能注释<sup>[7]</sup>。提交的 25 个蛋白有 19 个输出, 表 2 为鉴定蛋白质的 GO 分析, 列出了 GO 注册号、GO 注释术语、包含的蛋白数目、所占的百分比和概率 (与蛋白质组数据相关的基因功能分类在数据库共同出现的概率)。可以发现最大数目的蛋白质包括胚胎发育 (35.29%)、细胞内部 (47.06%)、嘌呤核苷酸结合 (52.94%)、脱氧核苷酸结合 (50.00%) 以及细胞质膜 (26.47%) 相关的蛋白等, 表明鉴定到的差异蛋白与线虫的生长发育, DNA 合成的相关性较大。

除了一些目前还没有明确解释的转录本外, N2 株系中鉴定的蛋白是细胞骨架蛋白 (ACT-4)、脱氢酶 (SODH-1)、激酶 (F46H5.3)、核糖体 (RPS-0)、延伸因子 (EFT-2); N2 株系中蛋白表达量比 ia04 株系高的主要是热休克蛋白 (HSP-70, HSP-60)、GTP 结合蛋白 (TAG-210)、乙酰辅酶 A



脱氢酶中链蛋白 (GN=T); ia04 株系中鉴定的蛋白是 V 形 ATP 酶催化亚基 A (VHA-3) 和原肌球蛋白异构体 C (LEV-11); ia04 株系中蛋白表达量比 N2 高的是延伸因子 (EFT-3) 和铁硫蛋白 -1 (ISP-1)。热休克蛋白 (HSP) 在不同物种中都被公认是应激蛋白, 而在 ia04 株系中, HSP 的含量明显低于 N2 株系, 这可能是 ia04 株系对缺氧敏感的原因之一。

HSP 家族广泛存在于从原核生物到人的整个生物界, 结构上具有高度保守性, 有普遍的生物学意义<sup>[8]</sup>。HSP 也是伴侣蛋白, 其作用是与新合成、未折叠、错折叠或聚集的蛋白质结合, 使某些蛋白质聚集体解离, 加速正确的肽链折叠和重折叠; 维持某些肽链的伸展状态以利其跨膜转位, 在线粒体、内质网等不同的区域内发挥作用<sup>[9]</sup>; 同时还促进某些变性蛋白的降解和清除; 重新激活某些酶的作用, 以维护细胞的功能和生存<sup>[10]</sup>。HSP 被诱导产生的因素很多, 包括缺血、缺氧、高温等刺激。它的诱导表达作为一种对外界应激的保护性反应, 可帮助细胞维持代谢、结构完整, 被认为是保护细胞、对抗损伤的主要蛋白质, 在线虫 ia04 株系中, HSP 的含量明显降低, 说明在 *hif-1* 突变时, 对 HSP 蛋白的影响很大。

N2 株系中 GTP 结合蛋白 (TAG-210)、乙酰辅酶 A 脱氢酶中链蛋白 (GN=T)、激酶 (F46H5.3) 都有助于能量的产生, 供机体在应激时利用, 而在线虫 ia04 株系中, 能量的供应也明显不足, 从而表现出缺氧敏感的特性。

综上所述, 本研究建立了稳定的技术体系, 首次对线虫野生株系 N2 和缺氧敏感株系 ia04 进行了蛋白质表达谱的研究, 发现了主要的差异蛋白质, 但这只是与缺氧相关研究的一小部分, 本实验室将继续对不同株系之间的差别进行分析, 如对线虫 N2 株系和缺氧耐受株系 *daf-2* (e1370) 的研究。

## [参考文献]

- [1] VON STETINA S E, WATSON J D, FOX R M, et al. Cell-specific microarray profiling experiments reveal a comprehensive picture of gene expression in the *C. elegans* nervous system[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(7): 135.
- [2] BOYD-KIMBALL D, POON H F, LYNN B C, et al. Proteomic identification of proteins specifically oxidized in *Caenorhabditis elegans* expressing human Aβ(1-42): implications for Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(9): 1 239 - 1 249.
- [3] DONG M Q, VENABLE J D, AU N, et al. Quantitative mass spectrometry identifies insulin signaling targets in *C. elegans*[J]. *Science*, 2007, 317(5 838): 660 - 663.
- [4] LI H, REN C, SHI J, et al. A proteomic view of *Caenorhabditis elegans* caused by short-term hypoxic stress[J]. *Proteome Sci*, 2010, 8: 49.
- [5] SHEN C, NETTLETON D, JIANG M, et al. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21): 20 580 - 20 588.
- [6] JIANG H, GUO R, POWELL-COFFMAN J A. The *Caenorhabditis elegans* *hif-1* gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(14): 7 916 - 7 921.
- [7] ZHU H, BILGIN M, BANGHAM R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips[J]. *Science*, 2001, 293(5 537): 2 101 - 2 105.
- [8] TUTAR L, TUTAR Y. Heat shock proteins; an overview[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11(2): 216 - 222.
- [9] SHIRASU K. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60: 139 - 164.
- [10] CANDIDO E P. The small heat shock proteins of the nematode *Caenorhabditis elegans*: structure, regulation and biology[J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 2002, 28: 61 - 78.

(2012-07-07 收稿)

## 携带 EGFP 基因的腺病毒在大鼠脑和肺的表达

赵嵩月<sup>1)</sup>, 陈彤<sup>1)</sup>, 周艳<sup>2)</sup>, 李鸿钧<sup>2)</sup>, 陈丽玲<sup>1)</sup>, 杨如萍<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学药学院, 云南昆明 650500; 2) 中国医学科学院北京协和医学院生物医学研究所, 云南昆明 650118)

**[摘要] 目的** 探讨携带增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因重组腺病毒经大鼠鼻腔给药后在大鼠脑部和肺部的表达, 为腺病毒经鼻腔给药的靶向性研究提供依据; 并对比腺病毒液加入粘性纤维蛋白原液, 是否可有利于腺病毒在大鼠脑部和肺部的表达. **方法** 大鼠 12 只, 随机分为 3 组, 每组 4 只, 分别鼻腔滴入 EGFP 重组腺病毒液、EGFP 重组腺病毒纤维蛋白原液和对照生理盐水. 腺病毒组每次每只鼻孔滴入 20  $\mu$ L 病毒液; 腺病毒纤维蛋白原液组每日每只鼻孔注入 40  $\mu$ L 病毒蛋白胶溶液; 生理盐水组每日每只鼻孔注入 20  $\mu$ L 生理盐水, 每日 1 次, 连续滴鼻 7 d, 第 9 天对大鼠进行心脏灌注, 取脑组织及肺组织做冰冻切片, 共聚焦荧光显微镜下观察冰冻切片荧光表达. **结果** 在 2 组给药大鼠的肺切片中均观察到了绿色荧光的表达, 而在大鼠脑部各部位的切片中未看到明显的绿色荧光表达. **结论** 腺病毒通过鼻腔给药可以到达大鼠肺部, 可作为腺病毒携带基因治疗肺部靶向给药的载体.

**[关键词]** 鼻腔给药; 腺病毒; 绿色荧光蛋白; 冰冻切片

**[中图分类号]** Q789 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0010 - 04

## Expression of the Recombinant Adenovirus Carrying Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) in Brain and Lung Tissues of Rats

ZHAO Song - yue<sup>1)</sup>, CHEN Tong<sup>1)</sup>, ZHOU Yan<sup>2)</sup>, LI Hong - jun<sup>2)</sup>, CHEN Li - ling<sup>1)</sup>, YANG Ru - ping<sup>1)</sup>

(1) School of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical School, Kunming Yunnan 650118, China)

**[Abstract] Objective** To investigate the expression of the recombinant adenovirus carrying the enhanced green fluorescent protein (EGFP) in rats' brain and lung by nasal administration, so as to provide a basis for targeting transport of adenovirus by intranasal administration. **Methods** 12 rats were randomly divided into 3 groups (n = 4), rats in 3 groups were respectively given instillation of EGFP recombinant adenovirus fluid, EGFP recombinant adenovirus added by viscous fiber protein solution and control group instillation of saline by nasal administration. Rats in the adenovirus fluid group were given instillation of 20  $\mu$ L adenovirus fluid from each nostril. Rats in the adenovirus added by viscous fiber protein liquid group were given instillation of 40  $\mu$ L adenovirus added by viscous fiber protein liquid each nostril. Rats in the control group were given instillation of 20  $\mu$ L saline. The administration was once a day and lasted for 7 days. Rats were given heart perfusion on the 9th day, and lung and brain tissues were collected for frozen section, and the fluorescence signals in frozen sections were observed by confocal fluorescence microscopy. **Results** We observed the expression of green fluorescent protein in the lung tissues of rats in the two treatment groups, but no green fluorescent expression in brain tissues. **Conclusion**

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目 (60109012)

**[作者简介]** 赵嵩月 (1987~), 女, 白族, 云南大理市人, 药物化学硕士, 助理工程师, 主要从事药物制剂工作.

**[通讯作者]** 陈彤. E-mail:chentongdoc@163.com

Adenovirus can target rats' lungs by intranasal administration, so it can be used for the carrier of pulmonary targeted drug delivery system.

[**Key words**] Nasal administration; Adenovirus; Enhanced green fluorescent protein; Frozen section

腺病毒 (Adenovirus) 是 1953 年由 Rowe 等学者从健康人腺体组织的细胞培养中发现的<sup>[1]</sup>, 直径约 80~110 nm, 由于腺病毒载体具有宿主范围广、包装容量大、转染效率高、安全性好, 能有效地把外源基因转运到各种靶细胞和组织中等突出的优势<sup>[2-5]</sup>, 它已经成为继反转录病毒载体后被广泛应用的载体系统, 尤其在基因治疗和疫苗载体领域成为最受青睐的载体. 鼻腔给药作为一种全身性给药方式, 近年来受到人们重视, 尤其是鼻腔给药靶向到脑已成为研究热点. 鼻腔给药可以用来治疗中枢神经系统疾病如阿尔茨海默病、帕金森氏病、脑肿瘤、中枢神经系统感染、偏头痛、中风等<sup>[6,7]</sup>. 鼻腔给药当药物微粒小于 5  $\mu\text{m}$ , 会被吸入肺部. 鼻腔给药相较于其他给药途径具有患者依从性好、起效快、生物利用度高等优点.

本研究以绿荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 重组腺病毒, 通过鼻腔给药, 旨在探讨腺病毒载体在大鼠脑和肺的表达情况, 为腺病毒作为外源基因或疫苗载体通过鼻腔给药方式, 靶向肺部或脑部, 用于基因或疫苗治疗奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器** 冰冻切片机 (Leica 30505); 共聚焦荧光显微镜 (CLS, 美国/Thorlabs); 10  $\mu\text{L}$  移液器 (德国 eppendorf).

**1.1.2 药品及试剂** EGFP 基因重组腺病毒溶液: 中国协和医科大学生物研究所李鸿钧博士赠送, 滴度:  $1 \times 10^7$  PFU/mL; 纤维蛋白原: 云南兰茂生物制药有限公司赠送; 乌拉坦; 4%多聚甲醛; 0.1 mol/L PBS; 生理盐水.

**1.1.3 实验动物** SD 大鼠 12 只, 雌性, 体重 200~220 g, 昆明医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (滇) 2005-008.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组** SD 大鼠 12 只, 实验室适用性饲养 24 h 后, 随机分为 3 组, 每组 4 只. 腺病毒组, 腺

病毒纤维蛋白原组, 对照组 (生理盐水), 并进行标记与编号.

**1.2.2 给药** 腺病毒组: 将大鼠以垂直位抓取, 用 10  $\mu\text{L}$  的移液器吸取 10  $\mu\text{L}$  腺病毒, 分别给大鼠每鼻孔 10  $\mu\text{L}$ , 给药后继续垂直抓取 1 min, 给 2 次药, 共 40  $\mu\text{L}$ , 连续给药 7 d; 腺病毒纤维蛋白原组: 取纤维蛋白原 1 瓶, 加入 0.5 mL 的生理盐水, 溶解, 精密加入 0.5 mL 腺病毒溶液, 混匀, 将大鼠以垂直位抓取, 每次每只鼻孔各 10  $\mu\text{L}$  给药后继续垂直抓取 1 min, 给 4 次药, 共 80  $\mu\text{L}$ , 连续给药 7 d; 空白组给予生理盐水每只每鼻孔 10  $\mu\text{L}$ , 给 2 次药, 共 40  $\mu\text{L}$ , 连续给药 7 d.

**1.2.3 心脏灌注及冰冻切片** 连续给药 7 d 后, 第 9 天进行大鼠心脏灌注: 用乌拉坦 (1 mL/100 g) 麻醉大鼠, 将大鼠仰卧固定开腹, 开胸 (止血钳夹剑突, 剪刀沿胸骨左右两侧剪开, 胸廓前翻) 充分暴露胸腔, 剪开右心耳, 将心脏用止血钳固定, 用剪刀将左心室剪开, 用剪掉针头的头皮针从左心室进入插进主动脉, 先灌注 PBS 液 150 mL 左右, 等肝脏肾脏等器官由血红色变为苍白色, 静脉流出的 PBS 液无色时, 再灌注 4%多聚甲醛 150 mL 左右, 在灌注多聚甲醛时, 大鼠肌肉会出现震颤, 继而摆后肢, 尾巴变直, 表明灌注到位, 断头取脑, 新鲜脑组织浸入蔗糖溶液 (30%) 沉底 24 h 后进行脱水后做冰冻切片, 做大脑冠状切片, 片厚 14  $\mu\text{m}$ , 主要取嗅球、大脑前部、大脑中部、大脑后部、小脑及延髓部位的切片, 在荧光显微镜下 475 nm 处观察脑组织中的绿色荧光; 同时做肺部冰冻切片, 片厚 14  $\mu\text{m}$ , 在荧光显微镜下 475 nm 处观察脑组织中的绿色荧光.

## 2 结果

腺病毒组和腺病毒纤维蛋白原组大鼠的肺切片, 观察到了绿色荧光的表达, 表达率 100.00%, 95%CI 为 29.24%~100.00%, 见图 1. 而腺病毒组和腺病毒纤维蛋白原组大鼠各部位的脑切片中未看到明显的绿色荧光表达 (见图 2~4).

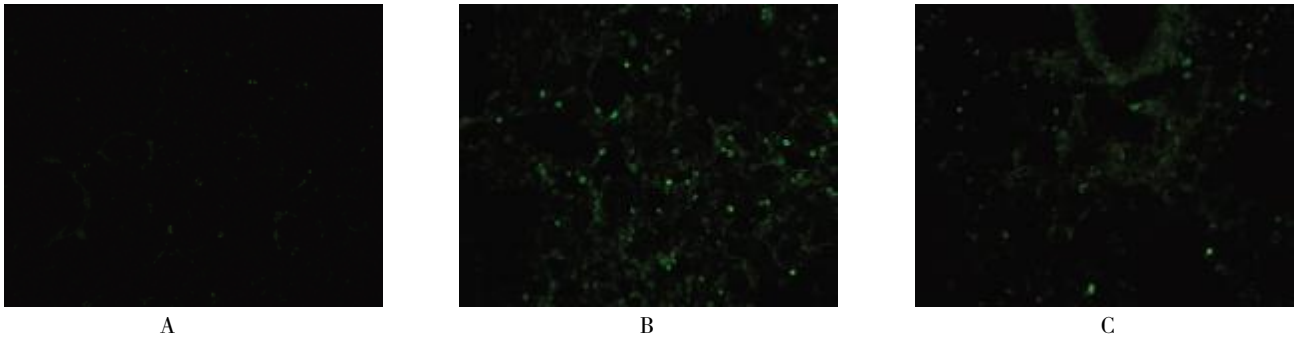


图 1 各组给药 7 d 后肺组织中 EGFP 表达 (荧光显微镜 × 200)

Fig. 1 EGFP expression in lung tissues on the 7th day after nasal administration(fluorescence microscope × 200)

A:对照组; B:腺病毒组; C:腺病毒纤维蛋白原组.

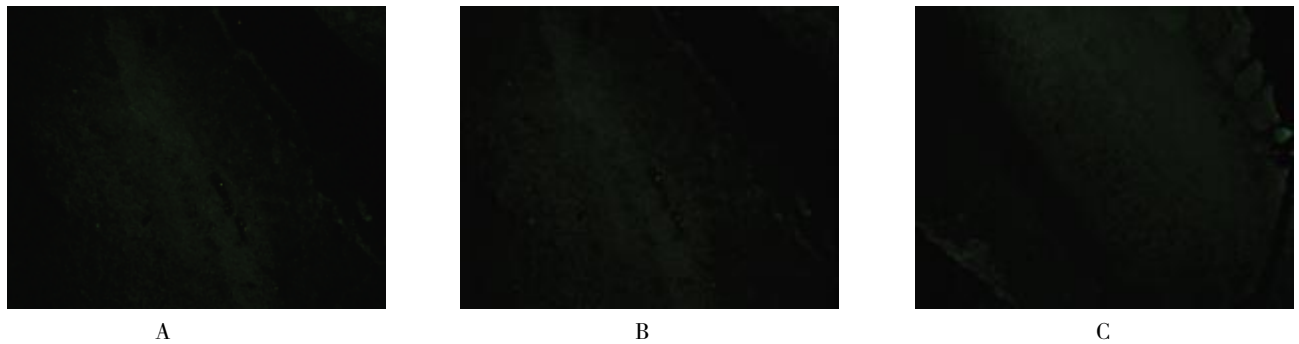


图 2 各组给药 7 d 后大脑嗅球 EGFP 表达 (荧光显微镜 × 200)

Fig. 2 EGFP expression in cerebrum olfactory bulb on the 7th day after nasal administration(fluorescence microscope × 200)

A:对照组; b:腺病毒组; c:腺病毒生物蛋白胶组.

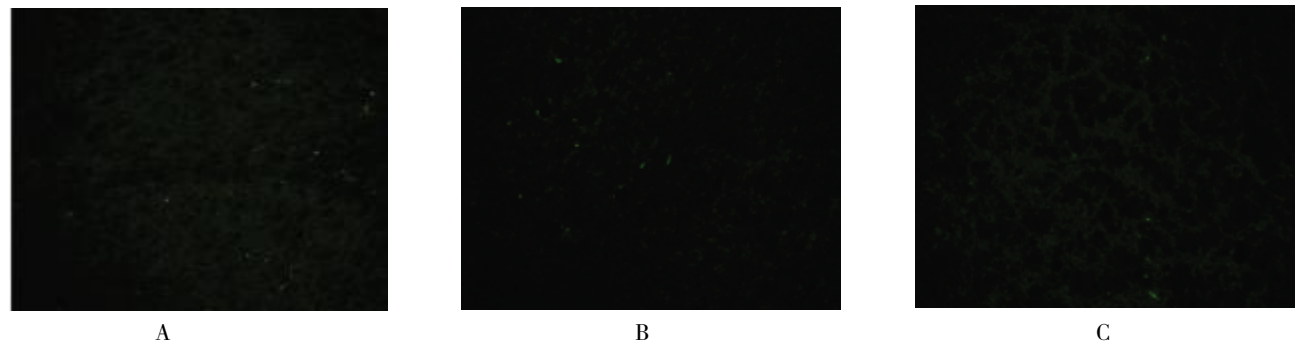


图 3 各组给药 7 d 后大脑内 EGFP 表达 (荧光显微镜 × 200)

Fig. 3 EGFP expression in cerebrum on the 7th day after nasal administration(fluorescence microscope × 200)

A:对照组; B:腺病毒组; C:腺病毒纤维蛋白原组.

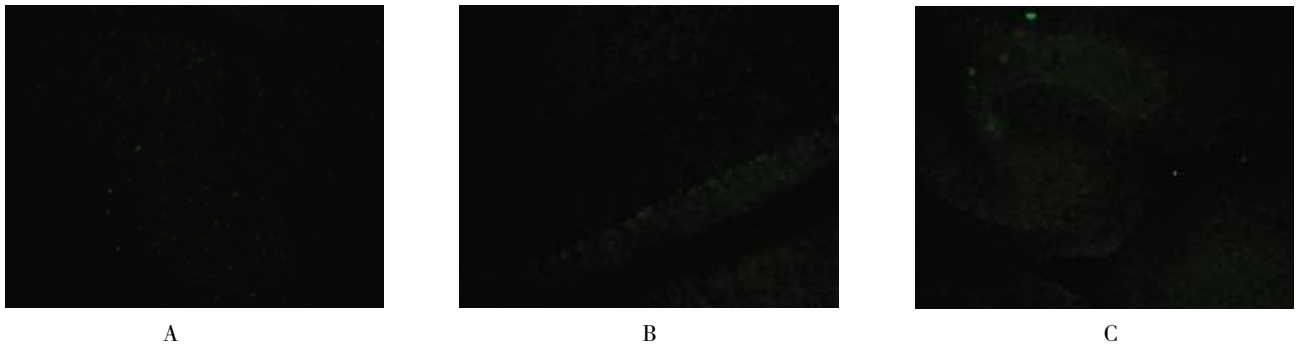


图 4 各组给药 7 d 后小脑内 EGFP 表达 (荧光显微镜  $\times 200$ )

Fig. 4 EGFP expression in cerebellum on the 7th day after nasal administration (fluorescence microscope  $\times 200$ )

A: 对照组; B: 腺病毒组; C: 腺病毒纤维蛋白原组.

### 3 讨论

医用生物蛋白胶, 又称猪源纤维蛋白胶、纤维蛋白封闭剂、纤维蛋白粘合剂, 是采用高科技生物技术从经严格检疫的哺乳动物血中提纯, 经过灭菌消毒, 冻干制成的纤维蛋白原和凝血酶冻干粉, 模拟人体自身凝血反应最后阶段而起作用的一种现代生物工程产品. 使用时需用特殊的器械稀释及混合纤维蛋白原和凝血酶, 可喷出极细的有粘性的雾滴. 实验设计的开始思路为: 将腺病毒分散于纤维蛋白胶溶液中, 当此纤维蛋白胶溶液与凝血酶溶液通过特殊的器械混合喷出, 形成极细的有粘性的雾滴粘附于鼻腔, 通过鼻腔与大脑的特殊通路进入大脑, 但由于大鼠的鼻腔狭小, 此器械不能插入大鼠鼻腔, 喷出的雾滴无法进入鼻腔, 后将腺病毒分散于纤维蛋白胶溶液中, 用  $10 \mu\text{L}$  移液器吸取, 将移液器插入大鼠鼻腔, 再推入鼻腔. 因纤维蛋白胶溶液有一定的粘性, 可在鼻腔中有较长时间的停留, 更有利于腺病毒进入脑部及肺部并有长时间的表达, 实验结果证实: 腺病毒组和腺病毒纤维蛋白原组的大鼠的肺切片都观察到了绿色荧光的表达, 但脑切片中未看到明显的绿色荧光表达.

腺病毒组和腺病毒纤维蛋白原组的大鼠用 4% 多聚甲醛灌注后, 取肺部在紫外灯下观察, 观察到绿色荧光.

腺病毒通过鼻腔给药可以到达肺部, 可作为基因治疗肺部靶向给药的载体.

### [参考文献]

- [1] RUSSELL W C. Update on adenoviruses and its vectors [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(11): 2 573 - 2 604.
- [2] BONNIE A E, MATTHEW D, HAVENGA J E, et al. Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector CROSS-reactivity [J]. *J Virol*, 2006, 80(24): 12 009 - 12 016.
- [3] ERIC J KREMER, SYLVIE B, MIGUEL C, et al. Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer [J]. *J Virol*, 2000, 74(1): 505 - 512.
- [4] KIMBERLY M, NIA TB, KSCHMITZ, et al. Effect of pre-existing immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors [J]. *J Virol*, 2007, 81(12): 6 594 - 6 604.
- [5] YOUSSEF J, DAVID J. Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of P450 prodrug-activation genes for cancer therapy [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(1): 292 - 303.
- [6] 刘坤鹏, 邓雪飞, 韩卉, 等. 嗅神经的形态学特点及其临床意义 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2007, 25(6): 618 - 621.
- [7] 赵红梅, 刘新峰. 经鼻给药-有效避开血脑屏障的中枢用药途径 [J]. *中国临床神经科学*, 2003, 11(3): 320 - 322.

(2012 - 07 - 24 收稿)