

阿托伐他汀是一种新型合成的阻滞选择性 32 羟基 23 甲基戊 2 酰辅酶 A 还原酶抑制剂,其通过竞争性抑制肝细胞总胆固醇合成,有效降低总胆固醇、甘油三酯、LDL-C 水平,缩小斑块的脂质,减轻斑块表面张力,增加内皮细胞,加固斑块纤维帽,恢复内皮功能,减弱单核细胞的趋化作用,减少斑块巨噬细胞数量抑制巨噬细胞分泌酶的能力,从而稳定斑块,防止斑块破裂,减少冠心病事件。北欧辛伐他汀生存研究(4S)表明,调制治疗可减少冠心病事件的发生,使总病死率减少 30%。他汀类药物用于 ACS 早期干预报道不少,但对新疆维吾尔族 ACS 患者的有效性和安全性未见有报道。本研究发现,阿托伐他汀可降低新疆维吾尔族 ACS 患者血清 hs-CRP 及血总胆固醇、LDL-C 水平,负荷剂量给药后这种作用更为显著,提示降脂达标能够稳定易损斑块,调脂强度与维吾尔族急性冠脉综合征患者血清 hs-CRP 浓度的下降趋势相关。本研究同样发现,每日 1 次 40mg/L 的阿托伐他汀对新疆维吾尔族 ACS 患者是安全的。本研究病例数较少、随访时间短,关于阿托伐他汀是否长期使用可以进一步减少心脑血管事件的发生,还需要进一步增加研究例数,延长随访时间,争取多中心合作、多民族间比较,以便更客观的评价他汀类药物

对 ACS 患者的冠状动脉内斑块的影响及其安全性。

# 参考文献

- 1 Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, *et al.* Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(1):29-38
- 2 Patti G, Pasceri V, Colonna G, *et al.* Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(12):1272-1278
- 3 ACC/AHA Guidelines for the management of patients with unstable angina and non ST segment elevation myocardial infarction. A report of American college of cardiology American heart association task force on practice guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(7):970-1062
- 4 Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, *et al.* Intensive versus moderate lipid lowering with statin after acute coronary syndromes[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(15):1495-1504
- 5 Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, *et al.* C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(12):836-843
- 6 袁月,王艳.阿托伐他汀对急性心肌梗死患者 C-反应蛋白及血脂的影响[J]. *四川医学*, 2009, 30(8):1265-1267
- 7 许海涛.不同剂量瑞舒伐他汀对急性冠状动脉综合征患者介入术后的影响[J]. *辽宁医学院学报*, 2009, 30(3):229-232

(收稿:2011-05-12)

(修回:2011-05-07)

## 膀胱尿路上皮癌中 miRNA-300 的差异表达

徐 锋 高建平 张征宇 葛京平 位志峰 程 文

**摘 要** **目的** 探讨 miRNA-300 在膀胱尿路上皮癌中的差异表达与其生物学行为的关系。**方法** 常规提取 30 例膀胱尿路上皮癌及 5 例正常膀胱黏膜组织中总 RNA,应用荧光定量 RT-PCR 方法检测标本中 miRNA-300 的表达情况。**结果** 与正常膀胱黏膜上皮组织相比,膀胱尿路上皮癌中 miRNA-300 表达明显下调( $P < 0.01$ )。**结论** miRNA-300 的差异表达极可能为促进膀胱尿路上皮癌的发生及发展因素之一。

**关键词** miRNA-300 膀胱尿路上皮癌 实时荧光定量

**Expression of miRNA-300 in Urothelial Carcinoma of the Bladder.** Xu Feng, Gao Jianping, Zhang Zhengyu, Ge Jingping, Wei Zhifeng, Cheng Wen. Department of Urology Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command PLA, Jiangsu 210002, China

**Abstract Objective** To investigate the gene expression disparity and its relationship with biological behavior of miRNA-300 in urothelial carcinoma of the bladder (BUC). **Methods** Thirty BUC and five normal bladder mucosa tissues were collected and the total RNA was extracted routinely. The miRNA-300 expression was detected by using real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results** The expression of miRNA-300 was significantly down-regulated in BUC tissues than those in normal bladder mucosa. **Conclu-**

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772278);南京军区南京总医院青年课题(2009-2011)

作者单位:210002 南京军区南京总医院泌尿外科

通讯作者:程文,副主任医师,医学博士,博士后,电子信箱:chengwen30@hotmail.com

sion miRNA - 300 may Participate in the pathogenesis and development of BUC.

**Key words** miRNA - 300; Urothelial carcinoma of the bladder; Real - time quantitative

膀胱尿路上皮癌是膀胱癌中最常见的组织学类型(90%)。多发性和术后复发率高是膀胱癌的特点<sup>[1]</sup>。膀胱癌的发病机制尚未完全阐明,现认为多层次、多基因的网络紊乱有关<sup>[2]</sup>。很多研究证实了在肿瘤的形成过程中 miRNAs 都有受累,存在 miRNAs 的异常表达或缺失,其在肿瘤的发生过程中发挥癌基因或抑癌基因的作用<sup>[3]</sup>。miRNA - 300 是新近发现的一种 miRNA,但其在膀胱癌尿路上皮癌中的表达状况尚未见研究报道。本研究应用基因芯片技术,从临床手术标本中研究了膀胱尿路上皮癌与正常膀胱黏膜中 miRNA - 300 表达状况,探讨其与膀胱尿路上皮癌发生的关系,以期阐明膀胱尿路上皮癌发生的分子机制提供新的依据。

### 材料与方法

1. 材料:标本均来源于我科手术切除的新鲜标本:收集 5 例正常膀胱黏膜上皮组织(取材于成人尿道下裂手术)和 30 例膀胱尿路上皮癌标本(6 例为膀胱全切术后迅速剖开膀胱,于癌肿中心取材,另 24 例膀胱镜活检取材),取材后冲去污物,转存液氮中备用。标本均经病理证实为膀胱尿路上皮癌。

2. 芯片制备:基因芯片类型为含 2400 个探针的 miRCURY LNA<sup>TM</sup> microRNA Arrays(上海康成生物有限公司实验室提供)<sup>[2]</sup>。

3. 总 RNA 抽提:取液氮保存的组织 50mg,用 BioPulverizer<sup>TM</sup> 冷冻粉碎组织后加入 1ml Trizol<sup>[3]</sup>,匀浆后室温放置 5min,使样品充分裂解。再加入 0.2ml 的氯仿,剧烈振荡混匀后室温放置 3 ~ 5min 使其自然分相。4℃ 12000r/min 离心 15min。样品会分成 3 层:上层的无色的水相(含 RNA),中间层核,下层的红色酚氯仿相。取上层水相,加入 0.5ml 异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置 10min,4℃ 离心,12000g × 10min,弃上清。加入 1ml 乙醇,轻轻洗涤沉淀。4℃ 离心,7500g × 5min,弃上清。晾干,加入适量的无 RNA 酶的水溶解。

4. RNA 质量检测:(1)使用 Nanodrop ND - 1000 测定 RNA 在分光光度计 260、280 和 230nm 的吸收值,以计算浓度并评估纯度。取 4 μl RNA 样品,加水至 1ml 混匀后转入分光光度计的石英比色杯中,校正零点后分别读出 260、280 和 230nm 吸光度 A 值,检测 RNA 的纯度和浓度。(2)变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。配置好琼脂糖凝胶,取 DEPC 处理过的 500μl 小离心管混合以下试剂:电泳缓冲液(10 ×)2μl、甲醛 3.5μl、甲酰胺 10μl、RNA 样品 45μl,置 60℃ 保温 10min,冰上速冷。加入 3μl 的上样缓冲液混匀,取适量加样于凝胶点样孔内。同时点 RNA 标准样品。打开电泳仪,稳压 7.5V/cm 电泳。电泳结束后通过紫外透视仪观察。

1.5miRNA 芯片杂交采用 miRCURY<sup>TM</sup> Array Power 标记试

剂盒,按照说明书进行,用标记酶将 Hy3<sup>TM</sup> 荧光基团标记 miRNA,获得用于与芯片杂交的荧光探针。进行芯片杂交,在标准条件下使用 Phalanx<sup>TM</sup> 热收缩杂交袋,将标记好的探针和 miRCURY<sup>TM</sup> 芯片杂交。杂交后,取出芯片,用 miRCURY<sup>TM</sup> Array 清洗缓冲试剂盒洗片,芯片干燥后立即扫描。

6. 芯片扫描及数据处理:使用 GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片,芯片图像的原始荧光强度数据由 GenePix pro V6.0 完成分析,数据进行分析运算。

7. 实时定量 RT-PCR:采用实时定量 RT - PCR 方法检测了芯片中 hsa - miRNA - 300 在膀胱尿路上皮癌组织及膀胱正常黏膜上皮组织的表达,采用 U6RNA 作为内标,进行归一化。构建 miRNA - 300 及内参 U6 的 Realtime PCR 反应体系,两者均按以下程序进行扩增:95℃,3min;40 个 PCR 循环[95℃,15s;60℃,20s;72℃,20s;78℃,20s(收集荧光)]。为建立产物的熔解曲线,扩增反应结束后按(95℃,15s;60℃,20s;72℃,20s;99℃,15s);并从 72℃ 缓慢加热到 99℃(自动进行 - 变速率为 2%)。相应的 PCR 引物见表 1。

表 1 用于 miRNA 实时定量 RT - PCR 的引物

| 引物                | 序列(5' → 3')                  |
|-------------------|------------------------------|
| U6                | 正向 GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT |
|                   | 反向 CGCTTCACGAATTTCGCTGTCAT   |
| hsa - miRNA - 300 | 正向 CGCTATACAAGGGCAGACT       |
|                   | 反向 CAGTGCCTGTCGTGGAGT        |

8. PCR 产量的定量校正和判定分析:用 U6 的复制数作为校正基数,通过 Light Cycler 软件获得各样本中 miRNA - 300 的 Ct(cycle threshold)值,与同样本中 U6 的 Ct 值相减,即获得该样本中 miRNA - 300 的 ΔCt 值。再以正常膀胱黏膜的 ΔCt 值作为校正,得出 - ΔΔCt 值,按目的基因表达量 = 2<sup>-ΔΔCt</sup> 公式计算各样本 miRNA - 300 的含量。

9. 统计学方法:数据以 SPSS13.0 统计软件完成。实验所得数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. RNA 质量鉴定结果:标本提取的 RNA,在电泳后能观察到 28S、18S、5.8S(5S),特别是 28S 清晰的带型,通常认为所提取的 RNA 未被降解,可以用提取的 RNA 进行后续实验。分光光度法检测 RNA 纯度, OD260/OD280 的值在 1.91 ~ 2.04 之间, OD260/OD230 的值在 1.86 ~ 2.29 之间。

2. miRNA - 300 的 RT - PCR 验证结果:采用荧光定量 RT - PCR 方法检测 hsa - miRNA - 300 基因

在膀胱尿路上皮癌组织和正常膀胱黏膜中的表达。  
miRNAs 定量 PCR 扩增曲线和 PCR 溶解曲线(图 1、

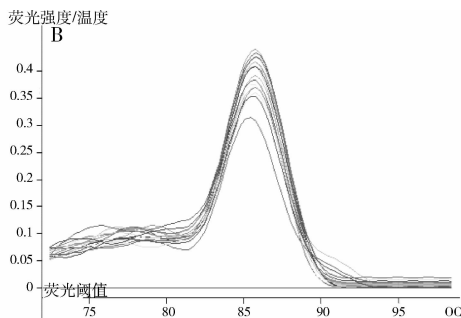
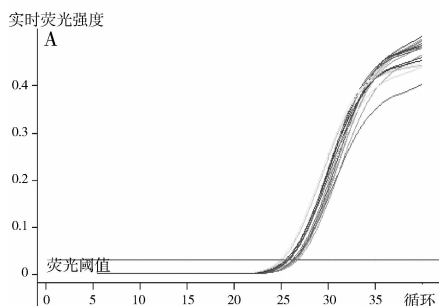


图 1 miRNA - 300 的实时定量 RT - PCR 结果

A. miRNA - 300 扩增曲线; B. miRNA - 300 溶解曲线

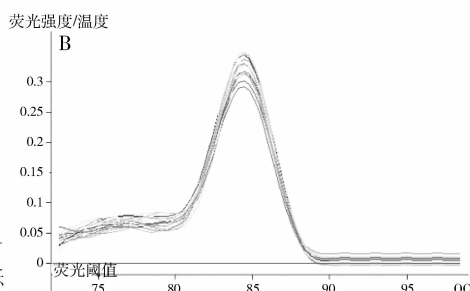
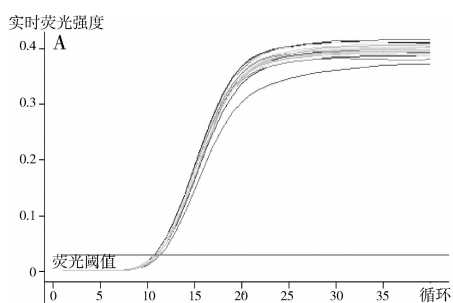


图 2 U6 的实时定量 RT - PCR 结果

A. U6 扩增曲线; B. U6 溶解曲线

3. 定量分析结果:miRNA - 300 在膀胱尿路上皮癌和正常膀胱黏膜组织中表达水平分别为  $0.578 \pm 0.034$  和  $1.000$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 讨 论

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长约 19 ~ 25 个核苷酸的单链非编码 RNA, 广泛存在于植物和动物中, miRNA 与其靶 mRNA 的 3' - UTRs (3' 非编码区) 特异性结合, 引起靶 mRNA 的翻译抑制或切割降解, 调控基因的表达, 来参与细胞凋亡、细胞分化、细胞增殖、生长发育等生命过程<sup>[4,5]</sup>。已有研究表明某些 miRNA 直接参与了肿瘤的形成, 这些 miRNA 具有类似致癌基因的功能, 称为“onco - miRNA”。Costinean 等<sup>[6]</sup>建立了一种 B 细胞高表达 miR - 155 的转基因小鼠, 该鼠表现出前 B 细胞增殖明显等白血病前期现象, 随后出现恶性 B 细胞淋巴瘤, 从而证实了 miR - 155 直接参与了 B 细胞淋巴瘤的发生和发展。

miRNA 表达具有组织和时期特异性, 已有令人信服的证据表明, miRNA 参与了包括神甲状腺癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肝癌及白血病等多种肿瘤的发生、发展过程, 其中某些 miRNA 发挥着抑

图 2), 显示溶解曲线呈单峰, 引物的特异性较好。说明本研究芯片结果真实可靠。

癌基因或癌基因的功能直接参与了肿瘤的形成。这些肿瘤组织中存在特定的 miRNA 的表达谱, 不同肿瘤具有不同的 miRNA 表达谱, 这种特异性表达谱将有助于临床上对肿瘤的诊断及治疗, 因此有人预测 miRNA 将成为肿瘤早期诊断及预后评估的新靶标。Kota 等<sup>[7]</sup>将在肝癌细胞中低表达的 miR - 26a, 转染至肝癌小鼠的体内, 发现小鼠体内癌细胞发生凋亡或者增殖抑制。Saito 等<sup>[8]</sup>发现膀胱癌组织中 miR - 126 显著性低表达, 经 5 - Aza - CdR 及 PBA 处理可引起多种肿瘤细胞(包括膀胱癌细胞系 T<sub>24</sub>)的 miR - 126 附近 CpG 岛 DNA 甲基化降低, 从而引起 miR - 126 的高表达。从而为针对 miRNA 的膀胱癌治疗提供了线索。我们以 miRNAs 芯片为平台初步发现在膀胱尿路上皮癌细胞与正常膀胱黏膜上皮细胞中 miRNA - 300 明显低表达, 提示 miRNA - 300 极可能与膀胱尿路上皮癌的发生和发展有关。

目前 miRNA - 300 在膀胱尿路上皮癌恶性转化中的作用方面的研究国内、国际均未见报道。本实验室拟应用基因转染技术上调 miRNA - 300 表达对膀胱尿路上皮癌 BIU - 87 细胞增殖和凋亡的作用, 探讨

miRNA-300 在膀胱尿路上皮癌发生、发展中的作用,为膀胱尿路上皮癌的早期筛选诊断和靶细胞治疗基因提供新的生物学标记,有望为膀胱尿路上皮癌的诊疗、预后判断等寻求到新的手段。

#### 参考文献

- 1 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学(上册)[M]. 济南:山东科技出版社, 2004:4478
- 2 Wen C, Zhifeng W, Jianping G, et al. Effects of Combined siRNA-TERT on Telomerase Activity and Growth of Bladder Transitional Cell Cancer BIU-87 Cells[J]. Huazhong Univ Sci Technol[Med Sci], 2010, 30(3):391-396
- 3 Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(12):580-587
- 4 程文, 高建平, 张征宇, 等. II 级膀胱尿路上皮癌 microRNA 差异表

达及意义[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(1):48-52

- 5 解鹏, 徐锋, 程文, 等. 膀胱尿路上皮癌差异表达微小 RNA 筛选、验证及意义[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(48):3391-3394
  - 6 Costinean S, Zaneni N, Pekarsky Y, et al. PreB cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high grade lymphoma in E(mu)2miR155 transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(18):7024-7029
  - 7 Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model[J]. Cell, 2009, 137(6):1005-1017
  - 8 Saito Y, Friedman JM, Chihara Y, et al. Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(3):726-731
- (收稿:2011-01-27)  
(修回:2011-03-16)

## 滋益方治疗气阴两虚型 2 型糖尿病的疗效分析

刘 颖 林 兰 倪 青 李鸣镝

**摘 要** **目的** 评价滋益方治疗气阴两虚型 2 型糖尿病的临床疗效。**方法** 气阴两虚型 2 型糖尿病患者 189 例随机分为研究组(常规西药基础上加服滋益方)与对照组(仅常规西药),疗程 12 周。以空腹血糖(FBG)、餐后 2h 血糖(P2BG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、体重指数(BMI)等糖脂代谢指标及其变化评价滋益方的疗效。以治疗前后肝肾功能检查评价其安全性。**结果** 研究组 FBG、P2BG、HbA1c 与治疗前比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),TC、TG 组内及组间均有降低趋势,但无统计学意义( $P > 0.05$ ),BMI 两组间比较有统计学意义。**结论** 在西医治疗基础上加服滋益方可更好地控制血糖,并有利于控制体重增加。

**关键词** 滋益方 2 型糖尿病 气阴两虚

**Curative Effect Evaluation of Ziyi Granules for Deficiency of both Qi and Yin in Type 2 Diabetes Mellitus Patients.** Liu Ying, Lin Lan, Ni Qing, et al. Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China

**Abstract Objective** To study the efficacy of ziyi granules for deficiency of both qi and yin in type 2 diabetes mellitus. **Methods** One hundred and eighty nine patients were divided into two groups as the trial group and the control group. The trial group were given ziyi granules besides the western medicine routine treatment, and the control group were given the western medicine routine treatment only. Both of the two groups were treated for 12 weeks. The FBG, P2BG, HbA1c, TC, TG, BMI of two groups were compared to evaluate the efficacy of ziyi granules. **Results** After the treatment, FBG, P2BG, HbA1c in the trial group were significantly different compared with before treatment. ( $P < 0.05$ ). While compare the FBG, P2BG, HbA1c after treatment between two groups, it was significantly different too. The difference of TC, TG between the two groups was insignificant ( $P > 0.05$ ). The difference of BMI between the two groups was significant. **Conclusion** In the treatment of type 2 DM patients, western medicine combined with ziyi granules can get better efficacy than western treatment only.

**Key words** Ziyi granules; Type 2 diabetes mellitus; Deficiency of both qi and yin

2 型糖尿病是因多基因遗传和环境因素使机体

胰岛素分泌缺陷、或胰岛素作用障碍,使糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱,最后引起多系统、多脏器功能损害以至衰竭的内分泌代谢性疾病。林兰教授于 20 世纪 80 年代创立糖尿病 3 型辨证理论体系,将糖尿病分为阴虚热盛、气阴两虚、阴阳两虚 3 型。其中气阴两