

先天性巨结肠患者 SEMA3C/SEMA3D 基因错义突变对 Semaphorin 3 蛋白表达的影响

姜 茜 李 颀 张 震 肖 萍 苏 琳 苗春越 李 龙

摘 要 **目的** 明确先天性巨结肠患者携带的 5 个 SEMA3C/SEMA3D 基因错义突变对 Semaphorin 3 蛋白表达的影响作用。**方法** 将野生型和突变型 AP-tagged SEMA3 质粒分别转染 HEK293T 细胞,72h 后收集细胞培养液上清并提取细胞总蛋白,利用融合蛋白 N-末端含有的碱性磷酸酶在底物 PNPP 存在时可以发生颜色变化的特性,通过对各野生型和突变型质粒转染后所表达的 AP-SEMA3 蛋白在特定波长的吸光值进行检测以达到蛋白定量的目的。**结果** 5 个错义突变中的 4 个(SEMA3C: V337M; SEMA3D: H424Q、V457I、P615T)都会不同程度地影响相应 Semaphorin 3 蛋白的表达和分泌,说明它们可能通过严重影响蛋白的表达量而妨碍蛋白功能的正常行使。**结论** Semaphorin 3 作为一类经典的神经元轴突导向因子,很可能参与了肠神经系统的发育调控并在功能失常的情况下引发先天性巨结肠缺陷表型。

关键词 先天性巨结肠 SEMaphorin 3 基因 错义突变 碱性磷酸酶 蛋白表达

中图分类号 R393

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.015

Effect of Missense Mutation in SEMA3C/SEMA3D Gene Detected in Hirschsprung Disease Patients on Semaphorin 3 Protein Expression.

Jiang Qian, Li Qi, Zhang Zhen, et al. Department of Medical Genetics, Department of General Surgery, Department of Pathology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Abstract **Objective** To dissect the effect of missense mutation in SEMA3C/SEMA3D gene detected in Hirschsprung disease (HSCR) patients on Semaphorin 3 protein expression. **Methods** We used transient transfections of wild-type and mutant AP-SEMA3C/3D fusion protein constructs into HEK293T cells to measure concentrations of the secreted and expressed Sema ligands using colorimetric assays. **Results** Four (SEMA3C: V337M; SEMA3D: H424Q, V457I, P615T) out of five HSCR variants showed marked reductions in protein expression and secretion. **Conclusion** As classical axon guidance cues, Semaphorin 3 family members may participate in manipulating the development of the enteric nervous system, and exert pathological roles in predisposing people to HSCR.

Key words Hirschsprung disease; Semaphorin 3 gene; Missense mutation; Alkaline phosphatase; Protein expression

先天性巨结肠(hirschsprung disease, HSCR, OMIM# 142623)又称肠无神经节细胞症(congenital aganglionosis),是导致功能性肠梗阻的最常见的小儿消化道畸形,属典型肠神经系统(enteric nervous system, ENS)先天发育异常性疾病。主要病理特征是病变肠段肌间神经丛和黏膜下神经丛神经节细胞缺如伴神经纤维增生、肠道神经调节紊乱,以致受累肠段持续异常收缩,近端结肠代偿性扩张、增厚,形成巨结肠。现已明确 HSCR 是一种神经嵴细胞(neural crest

cell, NCC)源性疾病,发病与胚胎期 NCC 在肠道内的迁移、增殖、分化、成熟异常有关。根据受累肠段的范围,本病可分为短段型(最常见,约占全部 HSCR 的 80%)、长段型(15%)及全结肠型(5%)3 种。HSCR 平均发生率 1/5000,存在明显种族差异:亚洲人群最高,为 2.8/10000^[1]。我国属高发生率国家。近年来通过连锁分析、全基因组关联分析研究、基因敲除以及动物模型研究发现并确定了至少 11 个基因携带的高外显率、罕见致病突变(high penetrance, rare mutation)以及低外显率、常见单核苷酸多态性(low penetrance, common polymorphism),可以解释部分表型与基因型之间的关联^[2]。尽管如此,在所有已知易感基因累积发现的突变仅能解释不足 10% 的患者的发病原因,高度提示其他致病基因或危险因子的存在^[3]。

Semaphorins 家族基因编码的分子是一类系统发生学上高度保守的分泌型或跨膜糖蛋白,属较早发现

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81300266);北京市自然科学基金资助项目(面上项目)(7142029);北京市优秀人才培养个人项目(2013D003034000007)

作者单位:100020 北京,首都儿科研究所遗传研究室(姜茜);100020 北京,首都儿科研究所附属儿童医院普通(新生儿)外科(李颀、张震、李龙),病理科(肖萍);安徽医科大学(苏琳);北京大学首都儿科研究所教学医院(苗春越)

通讯作者:李龙,电子信箱: lilong23@126.com

的经典的神经元轴突导向因子(axon guidance cues)。根据结构特征共可分为8个亚族,其中Semaphorin 3(SEMA3)是唯一表达于脊椎动物的分泌型蛋白,包括7个亚类分子(SEMA3A~SEMA3G),可通过自分泌或旁分泌等方式在局部和远距离都发挥调控作用^[4]。从最初发现时起,Semaphorins家族分子即因在神经系统的发育过程中发挥重要作用而备受关注,其功能主要包括调节神经元迁移,神经元极性、增殖和分化,树突棘的密度及其成熟,轴突生长、修剪和突触成熟等^[5-8]。近期Semaphorin 3家族分子在ENS发育乃至HSCR中的作用开始逐渐受到学界关注^[9,10]。本研究拟对前期在HSCR患者筛查、发现的5个SEMA3C/SEMA3D基因错义突变进行细胞功能实验,以检测其对Semaphorin 3蛋白表达的影响作用及各自程度,从而为该基因家族参与疾病发生提供更多证据。

材料与方法

1. 细胞系和质粒:HEK293T细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。N-端AP-tagged野生型小鼠SEMA3C和SEMA3D表达质粒由美国约翰霍普金斯大学Aravinda Chakravarti教授馈赠。

2. 主要试剂和液体配制:细胞转染试剂Lipofectamine 2000和质粒大提试剂盒(PureLink[®] HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit)购自Invitrogen公司。突变诱导试剂盒(QuikChange[®] Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits)购自Agilent Technologies公司。AP-SEMA3融合蛋白定量检测试剂(2×SEAP)组分PNPP、Diethanolamine Substrate Buffer购自Thermo Fisher Scientific公司;L-Homoarginine hydrochloride、BSA购自Sigma公司。蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitor Cocktail Tablets)购自Roche公司。HEK293T细胞培养液:添加青霉素、链霉素及10%胎牛血清的DMEM。2×SEAP:1mmol/L MgCl₂, 4mol/L Diethanolamine, 4.5mg/ml L-Homoarginine hydrochloride, 1mg/ml BSA, 8.9mg/ml PNPP。lysis buffer:1% Triton, 10mmol/L Tris (pH 8.0)。

3. 实验方法:(1)突变质粒诱导及构建:登陆Agilent QuikChange Primer Design网站设计引物,按照突变诱导试剂盒说明书的步骤合成突变质粒DNA,进而转化相应感受态细胞进行质粒扩增和提取。(2)HEK293T细胞转染:体外培养

处于健康状态的HEK293T细胞(传代20代以内),待汇合度接近100%时以1:4传代于预先经多聚赖氨酸(0.1mg/ml)包被的10cm细胞培养皿中,大约24h后将培养液更换为无抗生素的10%胎牛血清DMEM。8μg质粒DNA(已经构建好的5种突变质粒及相应野生型全长cDNA表达质粒)与12μl Lipofectamine 2000分别于400μl DMEM液中室温放置5min,混合后颠倒混匀,室温放置20min,简短、快速离心后将质粒DNA与转染试剂的混合液加入10cm细胞培养皿中,超净台内水平轻柔混匀,放置于37℃孵箱内继续培养。转染后12h,将细胞培养液置换为低血清含量的OPTI-MEM培养液(Invitrogen公司)并于置换培养液72h后收集培养皿内含有AP-SEMA3融合蛋白的液体,室温2000×g离心5min以去除细胞残渣,将上清转移至新的50ml Corning管中于4℃保存备用。(3)AP-SEMA3融合蛋白定量检测:参照Flanagan等^[11]的方法,将含有AP-SEMA3融合蛋白的培养液上清或总蛋白用lysis buffer按不同比例稀释至100μl,与事先加至Corning Costar Cell Culture板中的100μl 2×SEAP混合,锡箔纸包裹避光转移至versamax microplate reader,将机器波长读取值调整至405nm并将检测时间总长和间隔分别设定为60s和15s,放入细胞培养板开始进行检测。(4)HEK293T细胞总蛋白提取:向10ml lysis buffer内加入1片蛋白酶抑制剂,反复颠倒混匀以助溶解。收集培养液上清之后的HEK293T细胞用预冷的PBS清洗1遍,然后彻底吸净PBS,加入含蛋白酶抑制剂的lysis buffer,用一次性细胞刮将细胞刮下并转移至1.5ml Ep管内。冰上放置30min后4℃低温离心机离心,12000r/min,20min,最后将上清转移至新的Ep管中保存备用。(5)AP-SEMA3与FLAG-Hoxb7质粒双转染:为了除外野生型与各突变型质粒转染效率不同对融合蛋白表达量差异的可能干扰作用,笔者建立了一组AP-SEMA3质粒与FLAG-Hoxb7质粒双转染实验,并用60μg HEK293T细胞胞质蛋白进行蛋白质免疫印迹分析。

结 果

1.5个SEMA3C/SEMA3D基因错义突变:研究者前期对254例先天性巨结肠患者的3个Semaphorin 3家族基因(SEMA3A、SEMA3C、SEMA3D)进行测序筛查,一共发现了12个错义突变位点,经过受累氨基酸化学性质分析、序列保守性分析和生物信息学预测,最终决定选取其中的5个突变进行细胞功能实验。突变位点的详细信息见表1。

表1 5个SEMA3C/SEMA3D基因错义突变位点详细信息

突变位点					保守性		生物信息学预测	
染色体位置	基因	氨基酸改变	所在功能域	dbSNP号	GERP分值	8种不同种属间	SEMA3家族分子间	SIFT
Chr7: 80430074	SEMA3C	S329G	SEMA	-	4.73	是	是(除SEMA3F)	tolerated
Chr7: 80427530	SEMA3C	V337M	SEMA	rs1527482	5.72	是	是(除SEMA3E)	damaging
Chr7: 84651849	SEMA3D	H424Q	SEMA	rs141893504	0.09	是	是	damaging
Chr7: 84651752	SEMA3D	V457I	SEMA	rs142496795	5.67	是	是	damaging
Chr7: 84636183	SEMA3D	P615T	Ig	rs117730916	6.01	是(除zebrafish)	是	damaging

2. AP - SEMA3 融合蛋白的检测:利用融合蛋白 N - 末端含有的碱性磷酸酶在底物 PNPP 存在时可以发生颜色变化的特性,可以对各野生型和突变型质粒转染后所表达的 AP - SEMA3 蛋白在特定波长的吸光值进行检测以达到蛋白定量的目的。图 1 为同一 AP - SEMA3 融合蛋白在不同稀释比例下(2、4、10、20、50 及 200 倍)的显色结果,可见随着稀释比例的增加,颜色逐渐变浅,说明光强度的变化与反应体系中融合蛋白量的多少呈正相关。对上述稀释倍数的 AP - SEMA3C WT(野生型)和 AP - SEMA3D WT 蛋白吸光值进行检测后发现(图 2),稀释比例过低时(如 2 倍稀释)可能存在光强度过饱和情况,导致吸光值检测结果不随时间的延长而上升,而稀释比例过高时(如 200 倍稀释),则光强度太弱而与阴性对照的区别不大。此外,为了除外各组质粒转染效率不同对目的蛋白表达可能产生的干扰作用,笔者还建立了一组 AP - SEMA3 质粒与 FLAG - Hoxb7 质粒双转染实验,并对提取的 HEK293T 细胞胞质蛋白分别进行 FLAG - 抗体和 actin - 抗体蛋白质免疫印迹分析,结果显示不同质粒之间的转染效率没有明显差异(结果未显示)。

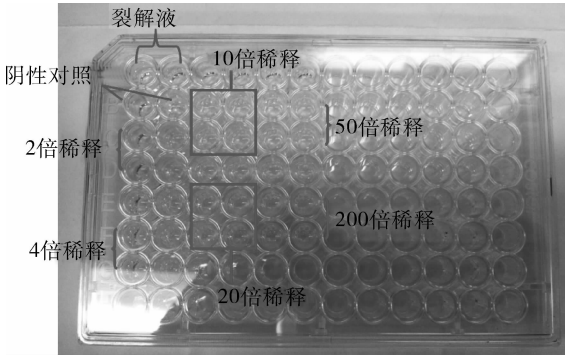


图 1 不同 AP - SEMA3 融合蛋白稀释比例下的显色结果
图中所示为同一 AP - SEMA3 融合蛋白在不同稀释比例下(2、4、10、20、50 及 200 倍)的显色结果,可见随着稀释比例的增加,颜色逐渐变浅,说明光强度的变化与反应体系中融合蛋白量的多少呈正相关

3. SEMA3C/SEMA3D 基因错义突变对 Semaphorin 3 蛋白表达的影响:鉴于上述结果,笔者最终决定采用 20 倍稀释比例对转染后 HEK293T 细胞培养液上清及胞质中的 AP - SEMA3 融合蛋白进行定量检测。5 个错义突变中的 4 个都会不同程度地影响相应 Semaphorin 3 蛋白的分泌和表达(培养液上清:SEMA3C S329G: 0.95 ± 0.07 , V337M: 0.45 ± 0.02 ; SEMA3D H424Q: 0.62 ± 0.05 ; SEMA3D V457I:

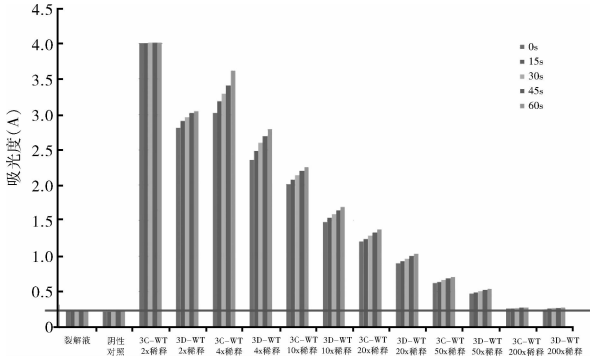


图 2 AP - SEMA3C WT(野生型)和 AP - SEMA3D WT 融合蛋白在不同稀释比例下的吸光度检测结果
稀释比例过低时(如 3C - WT 2 倍稀释)可能存在光强度过饱和情况,导致吸光度检测结果不随时间的延长而上升;而稀释比例过高时(如 3C - WT、3D - WT 200 倍稀释),则光强度太弱而与阴性对照(裂解液、阴性对照)的区别不大

0.87 ± 0.04 , P615T: 1.02 ± 0.08 , $n = 5$, one - way ANOVA, $P < 0.01$; HEK293T 细胞胞质提取物:SEMA3C S329G: 1.06 ± 0.15 , V337M: 0.38 ± 0.04 ; SEMA3D H424Q: 0.65 ± 0.15 ; SEMA3D V457I: 0.60 ± 0.12 , P615T: 0.78 ± 0.19 , $n = 3$, one - way ANOVA, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),说明即使是这些基因的点突变也可能会严重影响蛋白的表达量,从而妨碍蛋白功能的正常行使,详见图 3、图 4。

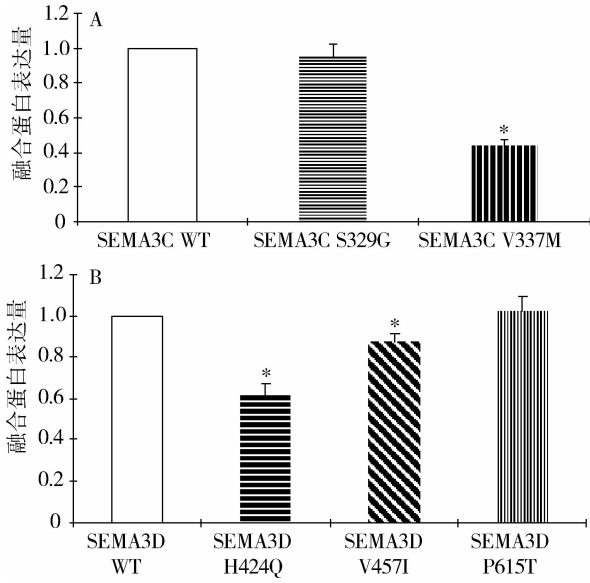


图 3 野生型及突变型质粒转染 HEK293T 细胞培养液上清中的 AP - SEMA3 融合蛋白定量检测结果
与野生型相比,SEMA3C V337M(A)和 SEMA3D H424Q、V457I(B)均显著减少上清液中 Semaphorin 3 蛋白的分泌量($n = 5$, one - way ANOVA, * $P < 0.01$)

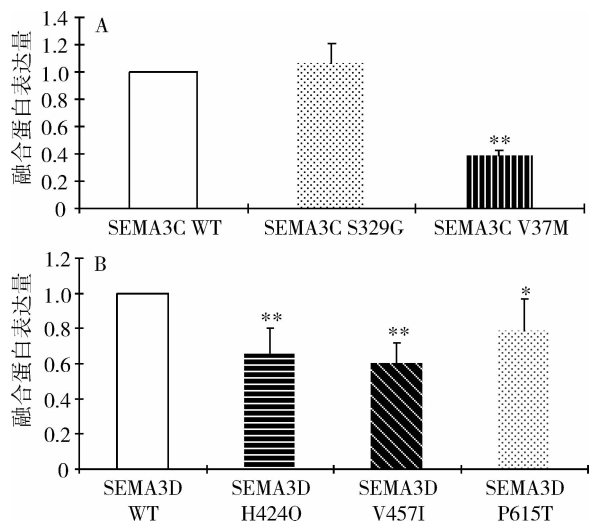


图4 野生型及突变型质粒转染 HEK293T 细胞胞质提取物中的 AP-SEMA3 融合蛋白定量检测结果

与野生型相比,SEMA3C V337M (A) 和 SEMA3D H424Q、V457I、P615T (B) 均显著减少胞质提取物中 Semaphorin 3 蛋白的表达量 ($n=3$, one-way ANOVA, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

讨 论

先天性巨结肠是一种与遗传有关的多基因、多因素参与的复杂疾病,可散发,也可呈家族性遗传。目前已经鉴定的 11 个 HSCR 相关易感基因,主要来自于 ENS 发育中起主要作用的 2 个信号通路 (RET、EDNRB),以及可调控、影响这些基因表达的转录因子的编码基因和其他几个在神经系统发育中已明确具有重要作用的基因。组成 ENS 的神经细胞均来源于 NCC,后者在胚胎期从神经轴的两个不同水平进入肠道,称为肠神经嵴细胞 (enteric neural crest cell, ENCC),在肠间充质中迁移、增殖、定居和分化,最终聚集成规律排列的神经节并发出突起相互联系,形成两个重要的神经丛,完成信号传递以及靶细胞的支配。这一发育过程具有严格的时间窗,不仅取决于 ENCC 的内部特质,也受到肠道微环境中多种外部信号分子 (主要是间叶组织细胞表达、分泌的蛋白) 的引导和影响,缺一不可^[12, 13]。

对特定基因敲除小鼠的研究发现,不同发育期胚胎肠道内一些蛋白的表达浓度和位置会显著影响 ENCC 的迁移路径、聚集程度、空间定位和排列方式,从而可能在病理状态下导致 ENS 功能失常而显现出与人类 HSCR 相似的表型^[14]。由此可见,对于先天性巨结肠的病因研究,需要从仅仅关注 ENCC 的早期发育和变化过程转移到肠道微环境对神经网络的形成以及一些精细环节的调控机制上来,着眼于神经元

的定向迁移和成熟,神经元突起的生长方向、诱导/抑制分子、靶细胞识别以及突触的特异性建立等精细调控过程,为解释本病的一系列特征性、复杂现象 (例如疾病严重程度及临床表现的差异和“非经典遗传方式”的表象等) 拓展研究思路。

近期研究发现,新生儿正常肠段的肌间神经丛神经节细胞、肠道黏膜层和内环、外纵两层平滑肌内都有 SEMA3A 蛋白表达,而 HSCR 患者无神经节病变肠段平滑肌层内的 SEMA3A 表达量无论是与正常对照相比,还是与患者自身的正常肠段相比都有显著增加,说明该基因编码的蛋白产物可能是本病的危险因素之一^[15]。选取中国东北地区 119 例 HSCR 患者和 93 例正常对照进行单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分析后发现,患者 SEMA3A 基因内的一个 SNP risk allele (G allele) 基因型频率明显高于对照组人群,说明该基因可能显著增加中国北方人群的 HSCR 患病风险^[9]。最近报道的 200 例西班牙 HSCR 患者 SEMA3A 和 SEMA3D 基因的突变筛查结果,发现了数个有可能导致蛋白功能缺失的严重错义突变,进一步免疫组化分析证实了其中 3 个突变蛋白在患者病变肠段表达量的增加,也支持该类分子参与 HSCR 发病的可能性^[10]。

本研究在发现 HSCR 患者携带的 SEMA3C/SEMA3D 基因错义突变的基础上,利用 HEK293T 细胞培养、野生型和突变型质粒转染以及通过测定吸光值定量检测融合蛋白表达的方法,证实 5 个突变中的 4 个都会不同程度地影响 Semaphorin 3 蛋白的表达 (以 HEK293T 细胞胞质提取物为检测对象,代表已合成但是尚未分泌至胞外的融合蛋白),而且其中 3 个突变质粒转染组相应蛋白的分泌也显著降低。与之相比,SEMA3C S329G 没有引起任何 Semaphorin 3 蛋白量的变化,提示该突变位点可能不具备病理意义,或者至少不是通过影响蛋白表达而在 HSCR 发病中发挥作用。前已述及,胚胎发育过程中肠道微环境的某些分子表达位置和浓度梯度的变化可以通过影响 ENCC 的迁移路径、聚集程度、空间定位和排列方式参与 ENS 发育的调控, Semaphorin 3 作为一类经典的神经元轴突导向因子,很可能在自身表达失衡 (降低或升高) 的情况下干扰 ENS 的正常发育;另一方面,已有多个实验证实 HSCR 患者肠组织内确实存在 Semaphorin 3 蛋白表达失调的现象,提示该家族分子很可能在功能失常的情况下引发 HSCR 缺陷表型。通过构建蛋白质模型发现,本研究中引起蛋白质合成

和分泌均减少的 3 个突变 (SEMA3C V337M; SEMA3D H424Q, V457I) 都可能显著降低蛋白稳定性, 从而可能由于突变蛋白降解量增加导致上述变化。至于 SEMA3C S329G 是否可能干扰蛋白活性, 以及 SEMA3D P615T 合成量减少的原因, 则需要进一步开展功能实验予以探究。

参考文献

- 1 Amiel J, Sproat - Emison E, Garcia - Barcelo M, *et al.* Hirschsprung disease consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review [J]. J Med Genet, 2008, 45 (1): 1 - 14
- 2 Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease [J]. Transl Res, 2013, 162 (1): 1 - 15
- 3 Eichler EE, Flint J, Gibson G, *et al.* Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11 (6): 446 - 450
- 4 Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules [J]. Cell, 1993, 75 (7): 1389 - 1399
- 5 Pasterkamp RJ. Getting neural circuits into shape with semaphorins [J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13 (9): 605 - 618
- 6 Osborne NJ, Begbie J, Chilton JK, *et al.* Semaphorin/neuropilin signaling influences the positioning of migratory neural crest cells within the hindbrain region of the chick [J]. Developmental Dynamics, 2005, 232 (4): 939 - 949
- 7 Carrillo RA, Olsen DP, Yoon KS, *et al.* Presynaptic activity and CaMKII modulate retrograde semaphorin signaling and synaptic refinement [J]. Neuron, 2010, 68 (1): 32 - 44
- 8 Yu HH, Moens CB. Semaphorin signaling guides cranial neural crest cell migration in zebrafish [J]. Dev Biol, 2005, 280 (2): 373 - 385
- 9 Wang LL, Zhang Y, Fan Y, *et al.* SEMA3A rs7804122 polymorphism is associated with Hirschsprung disease in the Northeastern region of China [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012, 94 (2): 91 - 95
- 10 Luzón - Toro B, Fernández RM, Torroglosa A, *et al.* Mutational spectrum of Semaphorin 3A and Semaphorin 3D Genes in Spanish Hirschsprung patients [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e54800
- 11 Flanagan JG, Leder P. The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts [J]. Cell, 1990, 63 (1): 185 - 194, 11
- 12 Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. The enteric nervous system [J]. Dev Biol, 2012, 366 (1): 64 - 73
- 13 Gershon MD, Tennyson VM. Microenvironmental factors in the normal and abnormal development of the enteric nervous system [J]. Prog Clin Biol Res, 1991, 373: 257 - 276
- 14 Zhang Y, Kim TH, Niswander L. Phactr4 regulates directional migration of enteric neural crest through PP1, integrin signaling, and cofilin activity [J]. Genes Dev, 2012, 26 (1): 69 - 81
- 15 Wang LL, Fan Y, Zhou FH, *et al.* Semaphorin 3A expression in the colon of Hirschsprung disease [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2011, 91 (9): 842 - 847 (收稿日期: 2014 - 06 - 15)
(修回日期: 2014 - 07 - 28)

γ - 生育三烯酚与 5 - 氟尿嘧啶联用对人胃癌细胞 SGC - 7901 的增殖抑制作用

姜佳佳 孙文广 屠越华 阎雅更 董凤丽 葛 声

摘 要 目的 离体条件下研究 γ - 生育三烯酚 (γ - tocotrienol, γ - T3) 与 5 - 氟尿嘧啶 (5 - FU) 联合应用对人胃癌细胞 SGC - 7901 增殖抑制的作用方式。**方法** 采用 CCK - 8 法用不同浓度 5 - FU (0、30、50、70、90、110 μ mol/L)、不同浓度 γ - T3 (0、5、10、20、30、40 μ mol/L) 以及不同浓度 5 - FU (0、30、50、70、90、110 μ mol/L) 联合 γ - T3 (20 或 30 μ mol/L) 分别作用于对数生长期的 SGC - 7901 细胞 48h, 测定各药物对 SGC - 7901 细胞增殖抑制率, 并通过两药相互作用系数 (coefficient of drug interaction, CDI) 值^[1]判定 5 - FU 和 γ - T3 联合作用效果。用 Annexin V - FITC/PI 双染的流式细胞术法分别检测 5 - FU (30 μ mol/L) 和 γ - T3 (20 μ mol/L) 单独应用及两药联合应用 48h 诱导 SGC - 7901 细胞凋亡情况。**结果** 5 - FU 和 γ - T3 均可抑制 SGC - 7901 细胞的增殖, 并随着浓度的增加抑制作用增强 ($P < 0.05$), 增殖抑制作用呈明显的剂量效应关系; 而联合应用与对照组和单药组相比对 SGC - 7901 细胞的增殖抑制作用增强, 有增效作用, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 流式细胞术凋亡结果表明, 5 - FU 和 γ - T3 均可诱导 SGC - 7901 细胞发生凋亡的作用 ($P < 0.05$), 5 - FU 和 γ - T3 联合较单独应用, 诱导细胞凋亡的作用增强 ($P < 0.05$)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81273061)

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第一医院临床营养科 (姜佳佳、阎雅更、董凤丽); 201306 上海交通大学附属第六人民医院东院临床营养科 (孙文广、屠越华、葛声)

通讯作者: 孙文广, 电子信箱: kuerabc@126.com