

利用 RNA 干扰技术抑制 Galectin-3 的表达对人大肠癌细胞系 LOVO 增殖和凋亡的影响

程变巧, 耿炎, 武金宝, 姜泊

Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Cheng Bian-qiao, Studying for doctorate, Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jang Bo, Professor, Tutor of doctor, Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Received: 2006-10-10
Accepted: 2006-11-12

Influences of inhibiting Galectin-3 by RNA interference technique on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cells LOVO

Abstract

AIM: To observe the relationship of expression of Galectin-3 with the proliferation and apoptosis of tumor cells and explore the RNA interference technique for anticancer gene therapy.

METHODS: The experiment was performed at the Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital from June 2005 to December 2006. Four galectin-3 small interfering RNA (siRNA) was constructed by chemistry synthesis according to primer design software (accession No. NM-002306 in PubMed). Effective siRNA was collected, and then transfected into colorectal cancer LOVO (as Galectin-3sRNA group). Non-transfected cells were used as normal control, and negative RNA as blank control. Western-blot was used to verify the interference result. Cell proliferation (absorbance value) was observed by MTT after interference for 24, 48 and 72 hours. Cell apoptosis was measured with flow cytometer.

RESULTS: Galectin-3sRNA was successfully transfected by direct transfer. After 72 hours, the cytoplasm protein was extracted after collecting cells. Western-blot showed that the expression of Galectin-3 was markedly decreased in Galectin-3sRNA group in gray value (55.790) than normal control (97.234) and blank control group (90.459) ($P < 0.05$).Cell proliferation: Cells proliferated still in the Galectin-3sRNA group after 24, 48 and 72 hours, but very slowly, and the A value was lower than the normal control group and blank control group (24 hours: 1.018 ± 0.002 , 1.478 ± 0.185 , 1.169 ± 0.005 ; 48 hours: 2.049 ± 0.008 , 2.635 ± 0.003 , 2.532 ± 0.009 ; 72 hours: 2.512 ± 0.506 , 3.213 ± 0.006 , 3.060 ± 0.002 ; P all = 0.000). Cell apoptosis rate: The apoptosis mostly appeared in the middle and advanced stages. It was higher in the Galectin-3sRNA group than the normal control group and blank control group [early stage: (15.900 ± 5.08)%, (3.813 ± 3.05)%, (5.780 ± 1.56)%; middle and advanced stages: (19.750 ± 0.780)%, (5.050 ± 0.120)%, (7.667 ± 0.145)%; P all = 0.000].

CONCLUSION: The galectin-3sRNA is successfully transfected in vivo and the expression is significantly decreased. The interference of galectin-3sRNA inhibits the proliferation of the tumor cells, but promotes the apoptosis of tumor cells.

Cheng BQ, Geng Y, Wu JB, Jiang B. Influences of inhibiting Galectin-3 by RNA interference technique on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cells LOVO. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(16):3104-3107 (China) [www.zgckf.com/zgckf/pumalupfiles/07-16/16k-3104(ps).pdf]

摘要

目的: 观察 Galectin-3 表达与肿瘤细胞增殖和凋亡的关系, 探讨利用 RNA 干扰技术作为肿瘤基因治疗的方法。

方法: 实验于 2005-06/2006-12 在南方医院消化研究所完成。从 PubMed 的序列号 NM-002306 中按照引物设计软件设计并化学合成 4 条 Galectin-3 小干扰片断, 从中选出有效的干扰片断, 并顺势转染大肠癌细胞系 LOVO (为 Galectin-3sRNA 组), 用未转染细胞做为正常对照, 以转染阴性干扰片断作为空白对照, 免疫印记法验证干扰结果, MTT 方法观察干扰后 24, 48 和 72 h 各组细胞增殖吸光度(A 值), 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

结果: 用顺势转染的方法成功转染了 Galectin-3sRNA 片断, 转染后 72 h 收集细胞并提取细胞浆蛋白, 免疫印记法验证结果显示 Galectin-3sRNA 组灰度值 (55.790) 与正常对照 (97.234) 及空白对照的灰度值 (90.459) 相比, galectin-3 表达明显减弱 ($P < 0.05$)。细胞增殖情况: 干扰后 24, 48 和 72 h Galectin-3sRNA 组细胞继续生长, 但细胞生长减慢, A 值低于正常对照和空白对照 (24 h: 1.018 ± 0.002 , 1.478 ± 0.185 , 1.169 ± 0.005 ; 48 h: 2.049 ± 0.008 , 2.635 ± 0.003 , 2.532 ± 0.009 ; 72 h: 2.512 ± 0.506 , 3.213 ± 0.006 , 3.060 ± 0.002 ; P 均 = 0.000)。细胞凋亡率: 各组中凋亡中晚期均多于早期, Galectin-3sRNA 组高于正常对照和空白对照 [早期: (15.900 ± 5.08)%, (3.813 ± 3.05)%, (5.780 ± 1.56)%; 中晚期: (19.750 ± 0.780)%, (5.050 ± 0.120)%, (7.667 ± 0.145)%; P 均 = 0.000]。

结论: 成功转染并抑制了 galectin-3 在大肠癌细胞系 LOVO 中的表达, 干扰后细胞增殖减慢, 凋亡增加。

关键词: 大肠癌; Galectin-3sRNA; 增殖; 细胞凋亡

程变巧, 耿炎, 武金宝, 姜泊. 利用 RNA 干扰技术抑制 Galectin-3 的表达对人大肠癌细胞系 LOVO 增殖和凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(16):3104-3107 [www.zgckf.com/zgckf/pumalupfiles/07-16/16k-3104(ps).pdf]

南方医科大学南方医院消化研究所, 广东省广州市 510515

程变巧, 女, 1976 年生, 河南省漯河市人, 汉族, 广东省南方医科大学在读博士, 主要从事大肠癌基因早期诊断和治疗研究。

通讯作者: 姜泊, 教授, 博士生导师, 南方医科大学南方医院消化研究所, 广东省广州市 510515

中图分类号 R574.6
文献标识码 B
文章编号: 1673-8225
(2007)16-03104-04收稿日期: 2006-10-10
修回日期: 2006-11-12
(06-50-10-7294N-Q)

0 引言

国内大肠癌发病率逐年增高, 且死亡率在所有消化道肿瘤中上升最快。大肠癌环绕肠 1 周约需要 1.5 年, 快的增长率是导致其生存率降低的主要原因之一。抑制癌的增殖促进其凋亡可达到降低死亡率的目的, 有效地敲除与癌

有关的基因的表达可望降低肿瘤的发生率。干扰技术作为一种从反向研究基因特别是癌基因的生物作用, 已经被用到基因的信号转导方面。Galectin-3 是动物血凝素 Lectin 家族成员之一, 是目前认为与大肠癌发展关系比较密切的基因^[1], 目前在大肠癌中的研究还少有报道。本实验从干扰的角度从负向来研究干扰后 Galectin-3 与大肠癌增殖和凋亡的关系, 以其对

Gal-3 在大肠癌中的生物学作用进行了解,有望为大肠癌的基因诊断和治疗提供一个靶点。

1 材料和方法

设计:以细胞为观察对象,对比观察。

单位:南方医院消化病研究所。

材料:实验于 2005-06/2006-12 在南方医院消化研究所完成。Lovo 细胞株来自 ATCC (美国组织培养保藏中心),由中国科学院上海细胞生物学研究所提供,病理分期为 Duke's D 期。Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, 美国) Opti-MEM I (Gibco, 美国)。蛋白裂解液(碧云天, 中国); 半干电转仪(Bio-Rad, 美国), PVDF 膜(Bio-Rad, 美国), ECL 化学发光试剂盒(Pharmacia, 美国); 胶片, Galectin-3 人抗大鼠(Santa Cruz); 羊抗大鼠 IgG-FITC (博士德, 中国); Bradford 试剂盒(博士德, 中国)。MTT 和 DMSO 溶液(威佳, 广州), 酶标仪, 流式细胞仪, Annexin-V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒(凯基, 南京)。

设计、实施、评估者:设计由南方医院消化病研究所大肠癌课题组所有研究生共同参与,在全科博士生导师评估后,由第一作者实施。实验采用了盲法评估。

方法:

细胞培养:在 37℃, 体积分数为 0.05 的 CO₂ 条件下, 培养于含体积分数为 0.01 的新生牛血清、100 IU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 中, 根据生长情况传代。

合成 Galectin-3siRNA 并转染 LOVO 细胞:根据 GeneBank 提供的 Galectin-3 编码区序列 NM_002306, 由上海吉玛制药有限公司设计并化学合成 2 对 siRNA, sense:5'-gcc caa ugc aaa cag aau udt dt-3', anti-sense:5'-aau ucu guu ugc auu ggg cdt dt-3'。sense:5'-ugg agc acc ugg agc uua adt dt-3', anti-sense:5'-aua agc ucc agg ugc ucc adt dt-3'; negative control:5'-uuc ucc gaa cgu guc acg utt-3', anti-sense:5'-acg uga cac guu cgg aga att-3'。参照 Lipofectamine 2000™ 产品说明书, 用 2.5 g/L 胰酶消化 LOVO 细胞并调整细胞浓度为 1×10⁵/μL, 按 2 μL/孔接种入 6 孔板, 用无抗生素培养液培养 24 h 至细胞密度达到 90% 左右。撤去原培养液, 用无血清的

RPMI-1640 轻洗细胞 2 遍, 按 2 μL/孔加入 Opti-MEM I 溶液。用 Opti-MEM I 240 μL 和 230 μL 稀释 10 μL Lipofectamine 2000™ 和 20 μL 的 Galectin-3siRNA, 室温静置 5 min。混合上述两种液体, 室温静置 20 min。每孔对应加入 500 μL 转染混合液, 左右轻摇混匀。置于 37℃, 体积分数为 0.05 的 CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 6 h 后更换无抗生素的含体积分数为 0.1 的小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 48 h 后检测干扰效果。

Western-Blot 检测干扰效果:蛋白提取及 Western-blot 在室温下用 1×PBS 冲洗 LOVO 细胞 3 次, 收集细胞。5 000 r/min 离心后加入蛋白裂解液 200 μL, 100 mmol/L PMSF 20 μL 匀浆, 冰上膨胀 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 分装后-20℃保存。采用 Bradford 法在紫外分光光度仪上绘制蛋白标准曲线, 检测蛋白浓度。

Western-blot 取 20 μg 胞浆蛋白以 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离。半干电转移至 PVDF, 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 Galectin-3 单克隆抗体(稀释浓度为 1 200), 于 4℃封闭袋中摇床上过夜。二抗(HRP)标记的羊抗大鼠(1 200)室温封闭 1 h, DAB 法显色结果, 凝胶图像分析系统检测蛋白质印记条带灰度。

MTT 法检测细胞增殖:消化细胞并调整细胞数, 使每孔细胞数为 4 000 个。培养 24 h 后更换无抗生素的培养液, 同前加入混合干扰, 每孔 50 μL, 分别设正常对照组, 和 Gal-3siRNA 组, 每组设 6 个孔, 以不加细胞的孔作为空白对照孔, 分别于干扰后 24, 48 和 72 h 在酶标仪上测定各孔吸光度(A)值。

流式细胞仪检测细胞凋亡:细胞准备和干扰过程同前。设正常对照组和 Galectin-3siRNA 组。干扰 72 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化细胞约 2 min, 1×PBS 洗细胞 2 次, 2 000 r/min 离心 5 min, 调整细胞计数为 1×10⁶ L⁻¹, 每管加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞后加入 2 μL Annexin-V-EGFP 混匀后加入 5 μL 的 PI 染液混匀室温避光静置 5 min, 流式细胞仪检测凋亡。

主要观察指标:正常对照组和 Galectin-3siRNA 组干扰后不同时间点细胞增

课题背景:前期实验已经证实 Galectin-3 在大肠癌细胞 LOVO 中 mRNA 和蛋白水平有表达, 但 Galectin-3 在大肠癌中起那种生物学作用以及机制如何仍不清楚, 而干扰技术是目前研究基因功能和信号通路的较好方法, 因此, 本文在前期试验的基础上从干扰角度对 Galectin-3 在大肠癌中的生物学作用作初步探讨。

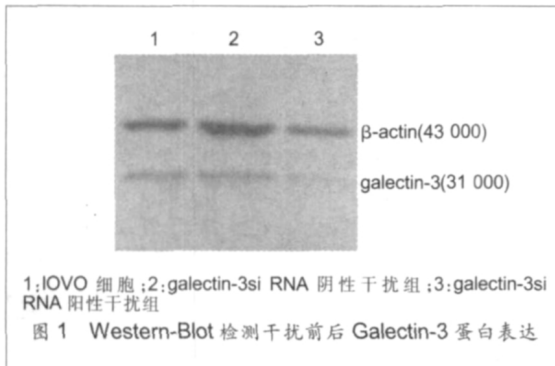
术语解析: Galectins 是动物血凝素 Lectin 家族成员之一,在细胞与细胞、细胞与基质之间起特异性黏附分子作用。Galectin-3 根据表达部位,有其相应的生物学功能。包括细胞生长、细胞黏附、炎症反应、免疫调节、肿瘤转化转移以及细胞凋亡等。目前研究认为 galectin-3 在细胞膜表达主要参与细胞的黏附,在细胞内表达主要参与细胞的增殖和凋亡。

殖和凋亡情况。

统计学分析:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件进行方差分析,组间比较用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。统计学处理部分由南方医科大学统计学教研室校对。

2 结果

2.1 干扰前后 Galectin-3 蛋白表达 以与 galectin-3 基因无关的序列作为阴性对照组,无干扰细胞作为空白对照组。免疫印记结果显示:galectin-3sRNA 与空白和阴性对照组相比干扰后蛋白表达明显减弱。干扰前与干扰后的条带灰度值分别为 55.790, 90.459, 97.234, Galectin-3/ β -actin 和 Galectin-3sRNA/ β -actin 灰度值分别为 0.973 6, 0.956 2 和 0.611 357, 干扰阳性组与阴性组比较,方差 $F = 18.506 (P = 0.001)$ 。后两组比较 $F = 2.187 (P = 0.137)$,结果如图 1。



2.2 各组大肠癌细胞增殖情况比较 MTT 结果显示 galectin-3 干扰后细胞继续生长,但细胞生长明显减慢($F = 149.710, P = 0.000$),见表 1。

表 1 galectin-3 干扰对人大肠癌细胞 LOVO 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, A$)

组别	t(干扰后)/h		
	24	48	72
正常对照组	1.478 \pm 0.185 ^a	2.635 \pm 0.003 ^a	3.213 \pm 0.006 ^a
空白对照组	1.169 \pm 0.005 ^a	2.532 \pm 0.009 ^a	3.060 \pm 0.002 ^a
Galectin-3sRNA 组	1.018 \pm 0.002	2.049 \pm 0.008	2.512 \pm 0.506

与同期 Galectin-3sRNA 组比较,* $P = 0.000$

2.3 各组大肠癌细胞凋亡情况比较 用流式细胞仪检测结果显示在整个细胞周期中都有凋亡,但主要发生在中晚期,galectin-3 干扰后细胞凋亡增加,见表 2。

表 2 galectin-3 干扰对人大肠癌细胞 LOVO 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

凋亡期	正常对照组	空白对照组	Galectin-3sRNA 组
早期	3.813 \pm 0.305 ^a	5.780 \pm 0.560 ^a	15.900 \pm 0.508
中晚期	5.050 \pm 0.120 ^a	7.667 \pm 0.145 ^a	19.750 \pm 0.780

与同期 Galectin-3sRNA 组比较,* $P = 0.000$

3 讨论

Galectin-3 是动物血凝素 Lectin 家族成员之一,因与含 -半乳糖苷残基的糖复合物具有很高的亲和力而得名^[2]。Galectin-3 具有两个重要的结构功能区:C-末端为碳氢识别位点,与不同的配体结合,发挥不同的生物学功能;N-末端含有一个 9 个氨基酸的重复序列,可作为基质蛋白酶结合的底物。因 galectin-3 在结构上缺乏转移到内质网的信号序列,此结构具有传递信号的作用^[3,4]。目前从大体水平已经验证出 galectin-3 在多种细胞,包括上皮细胞,肿瘤细胞(甲状腺癌^[3],肝癌^[4]、大肠癌^[5]、胃癌^[6]等)表达,从机制方面初步发现 Galectin-3 可存在细胞的不同部位,在细胞内表达主要促进其增殖和抑制其凋亡。

Inohara 等^[7]通过构建 galectin-3 重组体并与正常的人类纤维原细胞 MP-70 的静止期的细胞群共培养,刺激了 DNA 的合成从而首先报道了 galectin-3 可以作为一个有丝分裂原的证据。对其机制的进一步探讨发现主要通过 ERK1/2-MEK1/2 信号通路促进细胞的增殖^[8-15]。对细胞凋亡的影响主要发生在 G1 后期,这主要参与了对 G1-S 细胞周期 E 和 A 的表达下调和它们的抑制蛋白 P21W AF1C IP1 和 P27K IP1 的表达上调的调控而进行的。Kim 等^[9]提示 galectin-3 介导的与 cyclinD1 有关的激酶的激活有助于细胞通过 G1 早期的凋亡敏感点。

RNA 干扰是近年来兴起的分子生物学技术,由于介导了精确的基因沉默,非常适于阻滞肿瘤细胞或组织中异常或突变蛋白的表达。应用 RNA 干扰技术抑制相关基因的表达,可以起到抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用,达到治疗肿瘤的目的^[9]。本试验通过构建 galectin-3 的小干扰片段并顺势转染大肠癌细胞 LOVO,结果发现干扰前蛋白灰度(97.234)与干扰后(55.790)相比, $P = 0.001$,这说明成功转染了 galectin-3 小干扰片段,从

同行评价: Galectin-3 是一种半乳糖结合蛋白,广泛分布于正常细胞和肿瘤组织中,与细胞黏附、增殖、凋亡等有关。已有报道表明 Galectin-3 的表达与许多肿瘤的侵袭转移有关。文章利用 RNA 干扰技术研究 Galectin-3 的表达对人大肠癌细胞系 LOVO 增殖和凋亡的影响,研究结果具有一定的理论意义,并可为临床应用提供研究基础。

而阻断了 galectin-3 在此细胞中的表达。用 MTT 方法对干扰前后细胞增殖的影响发现,正常对照组和空白对照组比较 $P > 0.05$,与用 galectin-3 的小干扰片断干扰后相比, $P = 0.010$,说明干扰后细胞生长减慢,galectin-3 在大肠癌中可能是通过促进其增殖的^[16-18]。对流式细胞仪检测结果发现,galectin-3 在细胞周期的各期都有凋亡,但主要发生在中晚期,但两者相比无明显统计学意义。此外,转染后细胞周期的各期凋亡都增加,正常对照组和空白对照组比较无统计学意义,但与转染后阳性组比较 $P = 0.007$,这说明 galectin-3 的凋亡主要发生在中晚期,通过抑制细胞的凋亡而调控其在大肠癌中的表达。

目前虽然对 galectin-3 在大肠癌中的研究日趋增加,但其确切机制还不清楚。Bresalier^[20]在 2004 年对大肠癌血清中 galectin-3 的循环配体——一种相对分子质量为 40 000 的糖化结合珠蛋白的发现,使得 galectin-3 被认为有可能是大肠癌诊断和预后的肿瘤标记物。因此对 galectin-3 进行深入的研究有望对未来大肠癌的早期诊断和预后提供一个靶点。

4 参考文献

- Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology* 1997;113(6):2003-2005
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, et al. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994;269(33):20807-20810.
- Barbottazzi A. Improving accuracy of cytology for nodular thyroid lesions. *Lancet* 2000;355(9216):1661-1662
- Maeda N, Kawada N, Seki S, et al. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2003;278(21):18938-18934
- Schoepfner HL, Raz A, Ho SB, et al. Expression of an endogenous galectose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer* 1995;75(12):2818-2826
- Baldus SE, Zibes TK, Wengarten M, et al. Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. *Tumour Biol* 2000;21(5):258-266
- Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res* 1998;245(2):294-302
- Kim HR, Lim HM, Billian H, et al. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res* 1999;59(16):4148-4154
- Fukumori T, Okana N, Takenaka Y, et al. Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(6):3114-3119
- Nakahara S, Okana N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 2005;10(2):267-275
- Cecchi B, Lavara L, Rinaldo, et al. Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2006;26(12):4746-4757
- Zubietta MR, Fuman D, Battio M, et al. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol* 2006;168(5):1666-1675
- Stihlman BN, Hsu DK, Pang M, et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol* 2006;176(2):778-789
- Okana N, Nakahara S, Takenaka Y, et al. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* 2005;65(17):7546-7553
- Fukumori T, Takenaka Y, Okana N, et al. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer Res* 2004;64(10):3376-3379
- Lachin LP, Zakov Z, Smetna K JR, et al. Glycophenotype of psoriatic skin. *Folia Biol (Praha)* 2006;52(1-2):10-15
- Cvejić D, Šavín S, Petrović I, et al. Galectin-3 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in papillary thyroid carcinoma. *Exp Oncol* 2005;27(3):210-214
- Maeda NK, Awada N, Seki S, et al. Involvement of Galectin-1 and Galectin-3 in proliferation and migration of rat hepatic stellate cells in culture. *Comp Hepatol* 2004;3 Suppl 1:S10
- 郝嘉, 严俊, 郭红. 干扰技术沉默黏附斑激酶诱导心脏成纤维细胞失巢凋亡[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(25): 43-45
- Bresalier RS, Byrd JC, Tessler D, et al. A circulating ligand for galectin-3 is a haptoglobin-related glycoprotein elevated in individuals with colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127(3):741-748
- Gay J, Bramonti J, Garcia-Villar R, et al. Alterations of intestinal motor responses to various stimuli after *Nippostrongylus brasiliensis* infection in rats: role of mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12(6):207-214
- Barbara G, Vallance BA, Collins SM. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* 1997;113(2):1224-1232
- Ait-Belgnaoui A, Han W, Lamine F, et al. Lactobacillus fermentis treatment suppresses stress-induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cells cytoskeleton contraction. *Gut* 2006;32(2):1256-1261
- 张根水, 魏毅, 卞兆祥. 两种内脏痛觉超敏大鼠模型的比较研究[J]. *医学理论与实践*, 2004, 17(7):745-747
- Welting O, Van Den Wijngaert RM. Abnormal levels of neuropeptide Y and peptide YY in the colon in irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;15(1):55-62
- Cooke HI. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann N Y Acad Sci* 2006;915(4):77-80
- Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Foreman RD, et al. Attenuation by spinal cord stimulation of a nociceptive reflex generated by colorectal distention in a rat model. *Auton Neurosci* 2003;104:17-24
- Azz Q, Thompson WG. Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology* 2006;114(3):559-578
- 魏志军. 白术对小鼠胃肠道活动的影响的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2003, 10(4):196-197