

· 论 著 ·

Tim-3 在人肝癌细胞中的表达及其对细胞增殖与迁移能力的影响*

魏 东,匡 怡,刘孟刚,周 波,陈 平[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科,重庆 400042)

摘要:目的 研究 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域分子-3(Tim-3)在人肝癌细胞系中的表达及其对肝癌细胞肿瘤生物学行为的影响。方法 采用荧光实时定量 PCR(FQ-PCR)和蛋白免疫印迹方法检测人正常肝细胞株 L02 和肝细胞肝癌(HCC)细胞株 HepG2、SMMC7721 中 Tim-3 在 mRNA 和蛋白质水平的表达。运用 siRNA 转染技术沉默 Tim-3 基因在 HepG2 细胞株中的表达,免疫印迹筛选干扰效率最高的基因片段。MTT 和细胞划痕实验检测沉默 Tim-3 基因后对细胞增殖、迁移能力的影响。结果 FQ-PCR 及免疫印迹方法检测显示,人 HCC 细胞株 HepG2、SMMC7721 中 Tim-3 mRNA 和蛋白的表达均较正常肝细胞株 L02 明显增高($P < 0.05$)。转染 Tim-3 siRNA 后,肝癌细胞株 HepG2 中 Tim-3 蛋白水平表达明显降低。与对照组比较,细胞的增殖、迁移能力显著下降。结论 Tim-3 mRNA 及蛋白水平在肝癌细胞株中表达明显升高,促进细胞的增殖、迁移。

关键词:癌,肝细胞;T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域分子 3;细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-1975-04

Expression of Tim-3 in hepatocellular carcinoma cells and its effect on cell proliferation and migration ability*

Wei Dong, Kuang Yi, Liu Menggang, Zhou Bo, Chen Ping[△]

(Department of Hepatobiliary Surgery, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the expression of T cell immunoglobulin mucin-3(Tim-3) in hepatocellular carcinoma(HCC) cell line and its influence on the oncobiological behavior of HCC cells. Methods The expression of Tim-3 mRNA and protein in human normal liver cell line L02 and HCC cell line HepG2 and SMMC7721 was assessed by FQ-PCR and Western blot. The siRNA Tim-3 fragments were designed to silence the Tim-3 gene expression in HepG2 cell. HepG2 cells were transfected with siRNA by using LipofectamineTM 2000. The expression of Tim-3 protein was detected after transfection by Western blot to screen the effective siRNA fragment. The proliferation and migration potential of hepG2 cells was evaluated after Tim-3 gene silence by the cell growth curve MTT assay and the wound healing assay. Results Both expressions of Tim-3 mRNA and protein in human HCC cell line HepG2 and SMMC7721 were significantly higher than those in normal liver cell line L02($P < 0.05$). After siRNA transfection, the protein expression of Tim-3 in experimental group was significantly lower than that of the control group. Compared with control group, the proliferative activity and the migration ability were decreased significantly. Conclusion Expressions of Tim-3 mRNA and protein are increased in HCC cell line. Tim-3 expression promotes HCC cell proliferation and migration.

Key words: carcinoma, hepatocellular; T cell immunoglobulin mucin-3; cell proliferation

原发性肝癌是临床常见的恶性肿瘤之一,全世界每年约有 75 万例肝癌新确诊病例,70 万例死亡病例,其中约一半发生在中国^[1]。肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)作为最主要的组织学亚型占原发性肝癌的 70%~85%。约 78% 的 HCC 源于乙型肝炎病毒(53%)或丙型肝炎病毒(25%)所致的慢性感染^[2]。近年来肝癌的治疗研究取得了较大的进展,但因为其高转移率和高复发率的特性,总体预后仍然不乐观。肿瘤的生物特性是影响预后的根本因素,而癌的转移复发正是癌生物学特性最集中的表现^[3]。因而,对肝癌细胞增殖、侵袭转移相关领域的实验研究不但具有重要的理论意义,而且具有重要的科研临床应用价值。

T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子-3(T cell immunoglobulin and mucin domain-3, Tim-3)最先被发现其表达于终末分化的 Th1 细胞上,是区分 Th1 和 Th2 细胞的表面标志^[4]。进一步研究发现在 CD8T 细胞、调节性 T 细胞(Treg)、Th17、树突状细胞(DC)、自然杀伤细胞(NK)、巨噬细胞、肥大细胞和其他淋巴细胞亚群都存在 Tim-3 的表达,并对细胞因子分泌起着重

要的调节作用,从而在多细胞水平上参与肿瘤免疫^[5-6]。目前的研究证明, Tim-3 的表达与肿瘤相关的免疫抑制显著相关。近来, Tim-3 被发现反常表达于黑色素瘤细胞,并使肿瘤细胞黏附力降低,促进肿瘤细胞存活^[7]。Zhuang 等^[8]也发现 Tim-3 高表达于非小细胞肺癌,且这种表达是患者的独立预后影响因素。然而, Tim-3 与 HCC 的关系目前研究较少。Li 等^[9]在对人 HCC 组织研究中发现相对于正常肝脏组织及对应癌旁组织, Tim-3 在肝癌组织中高表达。本研究主要从 mRNA 及蛋白质水平测定 Tim-3 在肝癌细胞系中的表达,发现相对于正常肝细胞, Tim-3 在肝癌细胞系中存在高表达。作者还发现,在肝癌细胞系中抑制 Tim-3 的表达能够影响肿瘤细胞的增殖和侵袭能力。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 实验室冻存的两个肝癌细胞系运用于本研究(HepG2、SMMC7721),人正常肝细胞系 L02 做为对照。3 株细胞系培养于含 10% 胎牛血清的培养基中,稳定传代 2~3 代后取对数生长期细胞进行实验。Trizol 试剂盒为 Invitrogen

公司产品,逆转录试剂盒(Fermentas 公司),BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司),Tim-3 抗体(Abcam 公司),HRP 标记羊抗鼠 IgG(Santa 公司),NC 膜(Pierce 公司)、滤纸(Whatman 公司),蛋白裂解液及其他 Western blot 试剂(湖南远泰),Lipofectamine™ 2000 试剂(Invitrogen 公司),MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(南京凯基生物)。

1.2 方法

1.2.1 FQ-PCR 检测肝癌细胞系中 mRNA 表达

细胞样本,用 6 孔板培养细胞,按试剂盒说明书提取总 RNA。提取的总 RNA 按照 Fermentas 公司 FQ-PCR 反应试剂盒说明进行反转录和 PCR 扩增。根据 Gene Bank 中相应的序列,以 Primer Premier5.0 软件设计引物,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(引物序列见表 1)。PCR 反应体系中含 SYBR Green PCR Master mix 12.5 μ L,上、下游引物各 1 μ L,模板 cDNA 1 μ L,加 ddH₂O 共 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C,20 s;58.5 $^{\circ}$ C,20 s;72 $^{\circ}$ C,20 s,共 40 个循环,循环结束后进行融点曲线分析。

1.2.2 Western blot 检测肝癌细胞系中蛋白表达

细胞裂解提取总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后电转于 NC 膜,5%脱脂奶

粉(PBS 配制)封闭,漂洗后加一抗、二抗孵育,化学发光法显色,胶片曝光并显影。阳性条带用 Gel pro4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析,测其累积光密度(integrated optical density,IOD)参考值。

表 1 PCR 引物资料

引物	序列
Homo-HAVCR2/ TIM-3-F	5- gtggaggagccaatgagta-3
Homo-HAVCR2/ TIM-3-R	5- tgetccatcagctggacag-3
片段长度	189 bp TM:60.0
Homo- β -actin-F	5- cattaaggagaagctgtgct -3
Homo- β -actin-F	5- gttgaagtagtttcgtgga -3
片段长度	208 bp

1.2.3 siRNA 序列的设计

从 GenBank 中检索获得人源 Tim-3 基因序列,根据 siRNA 设计原则,采用 Ambion 公司的 siRNA targetDesigner 设计软件,设计 3 个针对 Tim-3 的特异 siRNA,其序列及阴性对照见表 2。各序列由上海吉玛制药有限公司合成。

表 2 siRNA 序列

序列名称	sense(5'-3')	antisense(5'-3')
siRNA- Tim-3-311	GGUCCUCAGAAGUGGAAUATT	UAUCCACUUCUGAGGACCTT
siRNA- Tim-3-451	GUGCUCAGGACUGAUGAAATT	UUUCAUCAGUCCUGAGCACTT
siRNA- Tim-3-750	GAGCCUCCUGAUUAAAATT	AUUUUAUUCAGGGAGGCUCTT
阴性对照 RNAi(siRNA-NC)	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.4 转染 siRNA 及筛选试验

选择 Tim-3 表达最高的细胞进行转染。转染前 1 d,将对数生长期的细胞按 5×10^4 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板,选择 24 h 内细胞融合度达 70% 时转染。以 Opti-MEM™ I 低血清培养基混悬 Lipofectamine™ 2000 及 siRNA。将 siRNA- Lipofectamine™ 2000 复合物加入到每一个包含细胞和培养基的孔中。37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱孵育 24~72 h,在转染率最高的时间点于荧光显微镜下观察细胞转染数量,并采用 Western blot 检测 Tim-3 蛋白,以确定最佳干预片段。

1.2.5 Western blot 检测转染后 Tim-3 蛋白的表达

转染后 24 h,提取各组细胞蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 NC 膜,5%的脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后,加入一抗(Tim-3,1:500;GAPDH,1:800)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入二抗(Tim-3,山羊抗兔,1:4000;GAPDH,山羊抗鼠,1:8000)室温下孵育 2 h,化学发光法显影。

1.2.6 MTT 法检测 Tim-3 基因沉默对细胞增殖能力的影响

将 100 μ L 细胞密度为 1×10^4 /mL 的细胞悬液接种于 96 孔板中,分别于 0、12、24、48、72、96 h 后,于每孔加入 50 μ L MTT (5 mg/mL),37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后吸尽上清液,加入 150 μ L DM-SO,酶标仪在 570 nm 波长处检测每孔的光密度(OD 值)。细胞存活率计算:先将各测试孔的 OD 值减去本底 OD 值(完全培养基加 MTT,无细胞)得出各受试孔 OD 值。正常培养细胞作为空白对照(HePG2 组),转染空载体细胞作为阴性对照(siRNA-NC 组)。以时间为横坐标,增殖率为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.7 细胞划痕实验检测 Tim-3 基因沉默对细胞迁移能力的影响

将各组细胞接种于 6 孔板,当细胞达 90% 以上融合时,用 10 μ L 枪头划痕(0.5 mm),并立即更换无血清培养基洗涤 3 次,放入 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养 72 h。取出 6 孔板拍照,观察测

量划痕宽度。

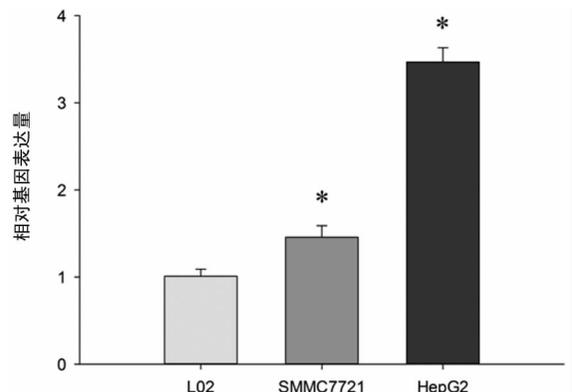
1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FQ-PCR 测定 Tim-3 mRNA 在细胞株中表达情况

HepG2、SMMC7721 和 L02 细胞株 Tim-3 mRNA 表达水平分别为 3.468 ± 0.140 、 1.456 ± 0.133 和 1.009 ± 0.128 。Tim-3 mRNA 在肝癌细胞 HepG2、SMMC7721 中的表达均高于正常肝细胞 L02,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



*: $P < 0.05$, 与 L02 组比较。

图 1 PCR 检测 Tim-3 在各组细胞中 mRNA 水平表达

2.2 Western blot 检测 Tim-3 蛋白表达

Western blot 实验显示 Tim-3 蛋白在 HepG2、SMMC7721 和 L02 细胞株中均有表达(图 2),灰度值分别为 0.193 ± 0.007 、 0.077 ± 0.001 、 0.027 ± 0.001 。Tim-3 在肝癌细胞 HepG2、SMMC7721 中的表达均高于正常肝细胞 L02,差异均有统计学意义($P < 0.05$),

见图 2。

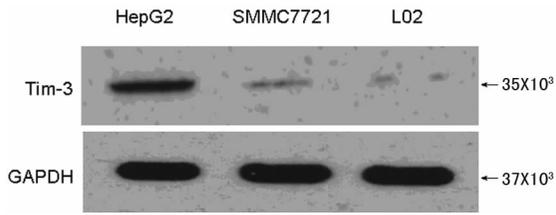


图 2 Western blot 检测 Tim-3 在各组细胞中蛋白水平表达

2.3 质粒转染效率的检测 选择 Tim-3 表达较高的 HepG2 细胞进行后续实验。选定转染后 24 h 为最佳作用时间,经荧光镜下视野与光镜下视野对比可知(分别计数白光和荧光下细胞数量,二者比较)细胞的转染效率均达到 80% 以上,见图 3。

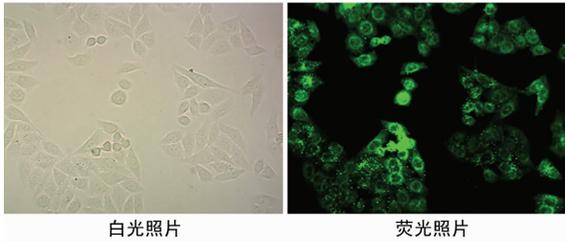


图 3 脂质体转染 Tim-3 siRNA 的 HepG2 显微图片(×200)

2.4 筛选转染效率较高的 siRNA 片段 Western blot 分析显示,siRNA-451 组细胞中 Tim-3 蛋白的表达水平较 siRNA-311、siRNA-750、siRNA 阴性对照、细胞正常培养组显著降低。siRNA-451 干扰效果最好,选择其为实验的干预片段,见图 4。

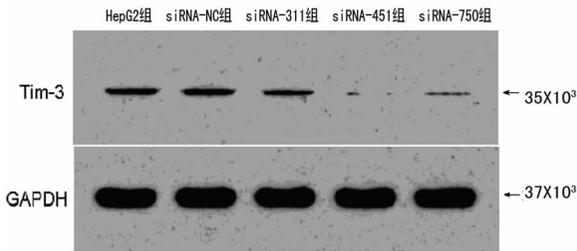


图 4 Western blot 检测各组细胞中 Tim-3 蛋白表达

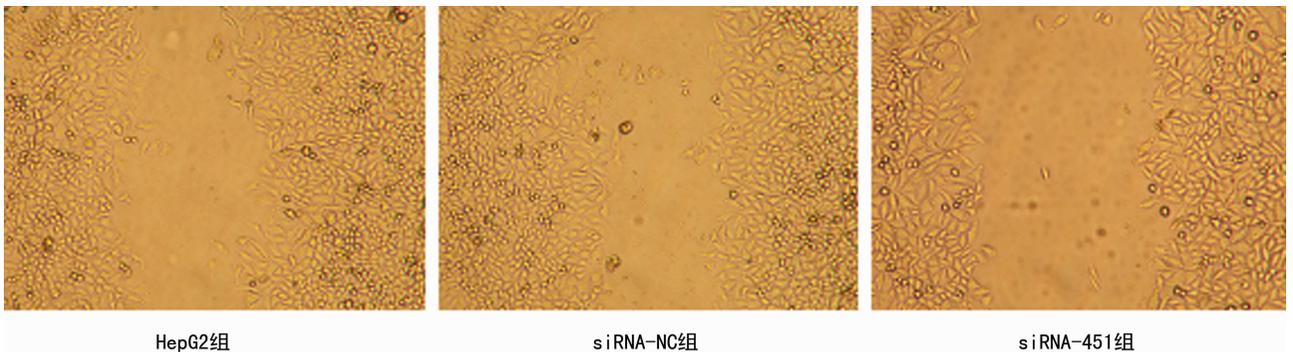


图 7 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力(72 h)

3 讨论

越来越多的研究证据证实 Tim-3 参与了肿瘤的免疫调节。不仅如此,目前已有部分研究证实, Tim-3 不仅表达于多种肿瘤相关的免疫细胞,并对细胞因子分泌起着重要的调节作用,而且也异位表达于多种肿瘤细胞,如黑色素瘤细胞、肺癌细胞、肾透明细胞癌细胞等^[7-8,10]。在急性髓性白血病的研究中还发

2.5 MTT 检测各组细胞增殖活力变化 结果显示, siRNA-451 组细胞的增殖率从接种后 24 h 开始显著降低,见图 5。将 96 h 末的吸光值作为细胞增殖数来比较 3 组细胞(HepG2、HepG2-NC、HepG2-451)的增殖能力,发现 siRNA-451 组细胞的增殖能力是 HepG2 细胞的 74%($P < 0.05$),见图 6。

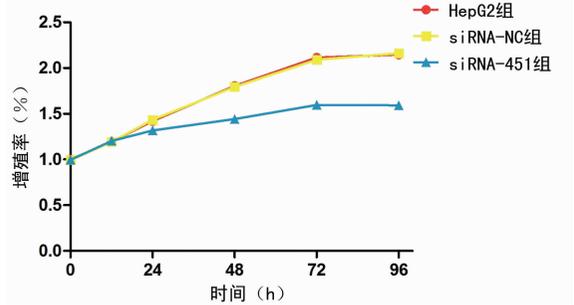
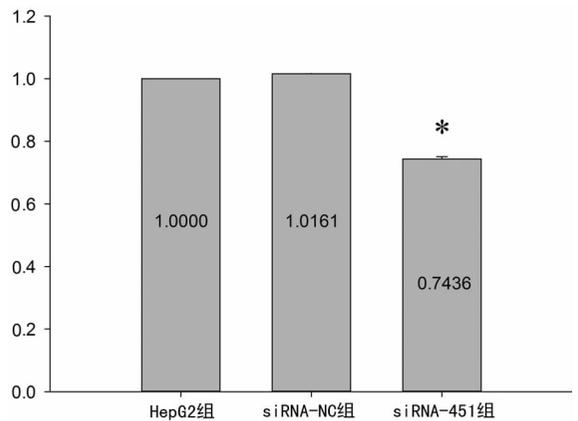


图 5 3 组细胞生长曲线



*: $P < 0.05$, 与 HepG2 组和 siRNA-NC 组比较。

图 6 3 组细胞增殖能力对比

2.6 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力的变化 siRNA-451 组与对照组相比细胞迁移速率明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。提示在抑制了 Tim-3 基因表达后,细胞的增殖能力和划痕修复能力下降,沉默 Tim-3 基因可降低 HepG2 细胞的迁移能力,见图 7。

现 Tim-3 表达于白血病干细胞而不表达于正常造血干细胞^[11]。Tim-3 为什么会异位表达于肿瘤细胞,是否也异位表达于其他肿瘤细胞,其在肿瘤发生、发展中究竟发挥了怎样的功能目前仍然不清楚,有待进一步研究。

Li 等^[9]在 HCC 组织中研究发现, Tim-3 表达较对应癌旁组织明显增高,用石蜡包埋组织行免疫组化研究发现在 HCC

组织中 Tim-3 阳性的细胞数量与患者总的生存期呈负相关。本研究用 FQ-PCR 及 Western blot 方法检测人 HCC 细胞株 HepG2、SMMC7721, 发现 Tim-3 无论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平的表达均较正常肝细胞株 L02 明显增高 ($P < 0.05$), 证实 Tim-3 在肝癌细胞中有确切表达。针对 Tim-3 与肿瘤关系, 以往研究发现 Tim-3 表达于多种免疫细胞, 主要通过参与导致 T 细胞功能障碍过程或耗竭及扩增髓系来源抑制细胞在肿瘤免疫中起着负向调控作用。Chiba 等^[12] 研究发现肿瘤浸润性 DC 通过 Tim-3 与高迁移率蛋白 B1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 结合抑制核酸介导的肿瘤固有免疫应答。然而, 对 Tim-3 异位表达于肿瘤细胞的研究较少。本实验证实 Tim-3 亦异位表达于肝癌细胞, 为进一步研究 Tim-3 在肝癌细胞株表达的作用, 运用 siRNA 抑制 Tim-3 表达, 通过 Western-blot 检测转染 siRNA-Tim-3-451 质粒后人肝癌细胞株 HepG2 中 Tim-3 蛋白表达水平明显下调。随后通过细胞增殖实验和细胞划痕实验研究抑制 Tim-3 表达后对细胞增殖、迁移能力的影响。结果显示抑制 Tim-3 表达后细胞增殖、迁移能力较 HepG2 组和 siRNA-NC 组明显减弱 ($P < 0.05$)。说明 Tim-3 能够促进肝癌细胞增殖、迁移。而增殖、迁移能力是肿瘤细胞生物学行为的基本特征, 是肿瘤复发、转移的重要原因。因此, Tim-3 可能在 HCC 复发、转移过程中发挥重要作用。本实验是基于体外基础上的, 有待于进一步在体内实验中证实。

Tim-3 在肿瘤细胞中的表达与肿瘤之间存在什么样的关系、具体机制是怎样的, 目前仍然不清楚。Huang 等^[13] 研究发现 Tim-3 表达于淋巴瘤来源的内皮细胞, 通过激活 IL-6-STAT3 通路抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞活化和 Th1 细胞极化并导致免疫耐受, 促进淋巴瘤的发展和播散。IL-6-STAT3 在肿瘤侵袭和生长过程中起着重要作用^[14-18]。Yang 等^[15] 发现在 HCC 中 IL-6-STAT3 通路于肿瘤的侵袭、生长、转移有关。因此, 本研究猜想 Tim-3 通过 IL-6-STAT3 通路促进肿瘤的侵袭、生长、转移, Tim-3 可能成为判断 HCC 患者预后的一个重要指标。Ju 等^[19] 发现阻断 Tim-3 后能够促进 NK92 细胞分泌 IFN- γ 并增加其对 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞的细胞毒性。阻断 Tim-3 后也可增加外周血单核细胞和 NK 细胞的细胞毒性。Sakuishi 等^[20] 报道, 在小鼠实体瘤中大部分肿瘤浸润性淋巴细胞存在 Tim-3 和 PD-1 共表达, 以 Tim-3 和 PD-1 途径结合为靶点在控制肿瘤的生长上有很高的活性。在人类肿瘤中亦发现类似现象^[21]。Chiba 等^[12] 研究发现 Tim-3 通过肿瘤浸润性 DCs 抑制细胞毒性化疗药物的抗肿瘤效果。Li 等^[9] 在乙型肝炎病毒相关的 HCC 中研究发现阻断 Tim-3 信号通路能够增加肿瘤浸润性 Tim-3 阳性 T 淋巴细胞功能。因此, 以 Tim-3 为治疗靶点可能会改善肝癌等恶性肿瘤患者的预后。

综上所述, Tim-3 不仅对抗肿瘤免疫起负性调控作用, 也通过在肿瘤细胞上的直接表达影响肿瘤的侵袭、生长、转移。本文在 HCC 的研究中发现 Tim-3 在肝癌细胞中高表达, 抑制 Tim-3 的表达能够抑制细胞的增殖、转移。因此, 进一步开发 Tim-3 作为肿瘤的预后判断因子和以其为靶点治疗肿瘤的研究是非常必要和可行的。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
[2] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infec-

tions to cirrhosis and primary liver cancer worldwide[J]. J Hepatol, 2006, 45(4): 529-538.
[3] 汤钊猷. 转移复发-肝癌研究的重中之重[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(1): 2.
[4] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease[J]. Nature, 2002, 415(6871): 536-541.
[5] Nakae S, Iikura M, Suto H, et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells[J]. Blood, 2007, 110(7): 2565-2568.
[6] Nakae S, Iikura M, Suto H, et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells[J]. Blood, 2007, 110(7): 2565-2568.
[7] Wiener Z, Kohalmi B, Poczka P, et al. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(4): 906-914.
[8] Zhuang X, Zhang X, Xia X, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 137(6): 978-985.
[9] Li H, Wu K, Tao K, et al. Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, 56(4): 1342-1351.
[10] Yuan J, Jiang B, Zhao H, et al. Prognostic implication of TIM-3 in clear cell renal cell carcinoma[J]. Neoplasma, 2014, 61(1): 35-40.
[11] Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(6): 708-717.
[12] Chiba S, Baghadi M, Akiba H, et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1[J]. Nat Immunol, 2012, 13(9): 832-842.
[13] Huang X, Bai X, Cao Y, et al. Lymphoma endothelium preferentially expresses Tim-3 and facilitates the progression of lymphoma by mediating immune evasion[J]. J Exp Med, 2010, 207(3): 505-520.
[14] Yun UJ, Park SE, Jo YS, et al. DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has anti-senescence and growth-promoting functions in human tumors[J]. Cancer Lett, 2012, 323(2): 155-160.
[15] Yang X, Liang L, Zhang XF, et al. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway[J]. Hepatology, 2013, 58(1): 158-170.
[16] Li S, Wang N, Brodt P. Metastatic cells can escape the proapoptotic effects of TNF-alpha through increased autocrine IL-6/STAT3 signaling[J]. Cancer Res, 2012, 72(4): 865-875.

多数患者中获得了良好的治疗效果。

综上所述,本院建立的大坪医院卒中绿色通道模式,为 AIS 患者接受正规静脉溶栓治疗提供了必要的客观基础,通过对这一模式的逐年完善,本院 DNT 中位数达到 NINDS 所建议的 60 min,虽然时间窗内到院患者远低于“中国急性卒中溶栓现状分析”中展示的 16% 的 3 h 内到院率,但总体溶栓率达到 3.68%,时间窗内到院 AIS 患者的溶栓率更达到了 74.30%。

与其他发达国家相比,本院静脉溶栓的 DNT 仍存在明显差距,如芬兰的赫尔辛基模式 DNT 的中位数仅 20 min^[11],澳大利亚墨尔本模式为 25 min^[12],美国 VSA 模式为 39 min^[13]。而本研究最短 DNT 为 20 min,中位数仍在 60 min 左右,这说明本院院内延误的缩短方面仍有相当大的提升空间。除通过强化相关人员绿色通道意识,加强科室协作沟通外,本院拟在缩短检验时间方面进行努力,如采用床旁快速凝血检验系统取代静脉检验凝血功能,而检验时间的缩短还有可能提高 CT 室床旁静脉溶栓率,更进一步缩短 DNT。

然而,由于目前极低的时间窗内就诊率,仅依赖院内延误的缩减,并不能从根本上改变本院 AIS 的低溶栓率现状。只有将院内绿色通道扩大到院前,大幅度缩短院前延误,才能提高静脉溶栓率,从根本上降低 AIS 致残、致死率^[14]。这就需要加强 AIS 的宣教工作,提高患者尽早就诊的自救意识,并建立以有溶栓条件医院为中心,1 h 车程为半径的缺血性卒中救治体系,使患者在发病后能够在最近的医院尽快完成必要的检查,在卒中小组指导下于转运前尽早获得 rt-PA 溶栓治疗,在此基础上在整个西部地区形成多个卒中救治圈,使更多的 AIS 患者获益。

参考文献:

- [1] The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke[J]. *N Engl J Med Overseas Ed*, 1995, 333(24):1581-1587.
- [2] Davis SM, Donnan GA, Parsons MW, et al. Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial[J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7(4):299-309.
- [3] Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke[J]. *N Engl J Med Overseas Ed*, 2008, 359(13):1317-1329.
- [4] Lees KR, Bluhmki E, von KR, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an up-

dated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials[J]. *Lancet*, 2010, 375(9727):1695-1703.

- [5] 重组组织型纤溶酶原激活剂治疗缺血性卒中共识专家组. 重组组织型纤溶酶原激活剂静脉溶栓治疗缺血性卒中中国专家共识(2012 版)[J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(12):1006-1010.
- [6] Broderick JP, Palesch YY, Demchuk AM, et al. Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(10):893-903.
- [7] Ciccone A, Valvassori L. Endovascular treatment for acute ischemic stroke[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(10):904-913.
- [8] Kidwell CS, Jahan R, Gornbein J, et al. A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(10):914-923.
- [9] IST-3 collaborative group. Effect of thrombolysis with alteplase within 6 h of acute ischaemic stroke on long-term outcomes (the third International Stroke Trial [IST-3]): 18-month follow-up of a randomised controlled trial[J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(8):768-776.
- [10] Sandercock P, Wardlaw JM, Lindley RI, et al. The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2012, 379(9834):2352-2363.
- [11] Meretoja A, Strbian D, Mustanoja S, et al. Reducing in-hospital delay to 20 minutes in stroke thrombolysis[J]. *Neurology*, 2012, 79(4):306-313.
- [12] Meretoja A, Weir L, Ugalde M, et al. Helsinki model cut stroke thrombolysis delays to 25 minutes in Melbourne in only 4 months[J]. *Neurology*, 2013, 81(12):1071-1076.
- [13] Ford AL, Williams JA, Spencer M, et al. Reducing door-to-needle times using Toyota's lean manufacturing principles and value stream analysis[J]. *Stroke*, 2012, 43(12):3395-3398.
- [14] Jin H, Zhu S, Wei JW, et al. Factors associated with pre-hospital delays in the presentation of acute stroke in urban China[J]. *Stroke*, 2012, 43(2):362-370.

(收稿日期:2014-01-08 修回日期:2014-03-28)

(上接第 1978 页)

- [17] Kong LY, Gelbard A, Wei J, et al. Inhibition of p-STAT3 enhances IFN-alpha efficacy against metastatic melanoma in a murine model[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(9):2550-2561.
- [18] Tu B, Du L, Fan QM, et al. STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2012, 325(1):80-88.
- [19] Ju Y, Hou N, Meng J, et al. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B[J]. *J*

Hepatol, 2010, 52(3):322-329.

- [20] Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(10):2187-2194.
- [21] Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(10):2175-2186.

(收稿日期:2013-12-28 修回日期:2014-02-26)