

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.001

基于生物信息学分析肺炎链球菌 LytR 蛋白特征*

吴凯峰¹, 张兢之¹, 查 何¹, 刘 雁¹, 童华波¹, 潘 卫², 王正蓉²
(1. 贵州省遵义市第一人民医院/遵义医学院第三附属医院检验科 563000;
2. 贵州医科大学检验医学院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的** 研究肺炎链球菌 spr1759(LytR)蛋白的基本理化性质,初步分析预测该蛋白的结构与功能。**方法** 利用 Bioedit、TMHMM、TargetP 和 ExPASy 等多种生物信息学软件对肺炎链球菌 spr1759 蛋白进行分析,并对其功能预测。利用 TMHMM 软件对比肺炎链球菌 spr1759 蛋白与炭疽芽孢杆菌 BAS5115 蛋白和枯草芽孢杆菌 DJ97_1211 二级结构差异;利用 Megalign 软件分析它们之间的氨基酸序列相似性。**结果** 肺炎链球菌 spr1759 蛋白为一亲水性蛋白,其相对分子质量为 37.56×10^3 ,等电点为 5.11,存在 1 个跨膜区。肺炎链球菌 spr1759 蛋白属于 LytR_cpsA_psr 超家族,可能具有阴离子细胞壁多聚物合成相关酶的功能。与其他细菌蛋白比对发现,该蛋白与炭疽芽孢杆菌 BAS5115 蛋白和枯草芽孢杆菌 DJ97_1211 具有相似的跨膜结构域,均含有 1 跨膜结构;肺炎链球菌 spr1759 蛋白与炭疽芽孢杆菌 BAS5115 蛋白和枯草芽孢杆菌 DJ97_1211 蛋白氨基酸序列具有较高同源性,全长序列相似性分别为 35.7% 和 32.5%。**结论** 肺炎链球菌 LytR 蛋白是具有跨膜结构的亲水性蛋白,可能具有阴离子细胞壁多聚物合成相关酶学功能。

[关键词] 肺炎;链球菌属;肺炎链球菌;LytR 蛋白;生物学信息学分析
[中图法分类号] R378.1+4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3125-04

Study on characteristics of Streptococcus pneumoniae LytR protein based on bioinformatics*

WU Kaifeng¹, ZHANG Jingzhi¹, ZHA He¹, LIU Yan¹, TONG Huabo¹, PAN Wei², WANG Zhengrong²
(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zunyi/Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. College of Laboratory Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To study the basic physicochemical properties of Streptococcus pneumoniae spr1759 (LytR) protein and to preliminarily analyze its structure and function. **Methods** Streptococcus pneumoniae spr1759 protein was analyzed by using multiple bioinformatic softwares including Bioedit, TMHMM, TargetP and ExPASy, and its functions were predicted. The secondary structure differences were compared between Streptococcus pneumoniae spr1759 protein and Bacillus anthracis BAS5115 protein or Bacillus subtilis DJ97_1211 protein by using the TMHMM software. The amino acid sequence similarity between them was analyzed by using the Megalign software. **Results** Streptococcus pneumoniae spr1759 protein was a hydrophilic protein with a relative molecular weight of 37.56×10^3 , an isoelectric point of 5.11, and one transmembrane region. Streptococcus pneumoniae Spr1759 belonged to the LytR_cpsA_psr superfamily and might have the function of anionic cell wall polymer synthesis related enzyme. Protein structure comparison revealed that this protein had a transmembrane structure domain similar to that of Bacillus anthracis BAS5115 protein and Bacillus subtilis DJ97_1211, and all contained one transmembrane structure. Streptococcus pneumoniae spr1759 protein had higher homology with the amino sequence of Bacillus anthracis BAS5115 protein and Bacillus subtilis DJ97_1211, and the full length sequence similarities were 35.7% and 32.5%, respectively. **Conclusion** Streptococcus pneumoniae LytR protein is a hydrophilic protein with one transmembrane structure, which may have the function of anionic cell wall polymer synthesis related enzyme.

[Key words] pneumoniae; streptococcus; streptococcus pneumoniae; LytR protein; bioinformatic analysis

肺炎链球菌是社区获得性肺炎最常见的细菌性病原菌,其所致的肺炎也是重症社区获得性肺炎入住重症监护室最常见的原因^[1]。2013 年,全球约有 40 万 6 岁以下儿童死于肺炎链球菌感染^[2]。此外,全球

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31600115,81560324)。 作者简介:吴凯峰(1985—),副主任医师,博士,主要从事病原微生物致病机制和防治方面的研究。

也正面临较为严峻的肺炎链球菌抗生素耐药,以及 7 价或 13 价肺炎链球菌蛋白结合疫苗在地区之间保护效果不一和保护率有限等问题^[3-4]。为切实提高对肺炎链球菌感染的防治能力,需要深入了解肺炎链球菌的分子致病基础。

磷壁酸是革兰阳性细菌细胞壁重要的多糖分子。在肺炎链球菌中,磷壁酸也是一种极为重要的毒力因子^[5-6],该分子在感染过程中有着与其他细菌磷壁酸相似的生物学功能,且可能具有某些新特征。当细菌磷壁酸显著减少时,相应的肺炎链球菌的生理学功能将严重受损,细菌致病力也将明显降低^[5]。由此可见,研究磷壁酸的合成过程对指导设计新型抗菌药物或疫苗具有重要的理论价值。本课题组前期研究发现 RafX 蛋白参与了磷壁酸的生物合成,体内外研究显示,RafX 蛋白与肺炎链球菌毒力有密切关系,RafX 基因缺陷的肺炎链球菌毒力明显下降^[7]。然而,肺炎链球菌磷壁酸并未因 RafX 蛋白的缺失而完全减少^[7],因此,本课题组猜测还存在替代途径参与磷壁酸的合成。

肺炎链球菌存在一个名为 LytR_cps_psr (LCP) 蛋白家族,该家族蛋白被认为与细菌胞外多糖共价连接至细胞壁肽聚糖有关^[8-9],该家族成员包括 spr1759 (LytR)、Cps2A 和 Psr 等。其中,LytR 蛋白功能尚未完全清楚。闵迅等^[10]前期已利用原核表达方式对肺炎链球菌 LytR 蛋白(肺炎链球菌 R6 菌株即 spr1759)进行过表达,晶体生长及衍射分析,然而由于技术原因,尚未对结构进行解析和功能研究。因此,本研究试图利用生物信息学方法,从美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中提取肺炎链球菌 R6 标准菌株的 spr1759 基因及其编码蛋白序列,分析其基本理化性质、结构功能特征等,为肺炎链球菌的 LytR 蛋白功能研究及细菌致病机制和防治策略研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 肺炎链球菌 spr1759 基因及其编码氨基酸序列和生物信息学策略 从 NCBI 数据库检索并下载肺炎链球菌 R6 标准菌株 spr1759 及其编码全长氨基酸序列(protein ID 为 NP_359351.1)。本研究主要利用 BioEdit Sequence Alignment Editor、TMHMM、ExPASy、Megalign 等多种软件对 LytR 进行分析。所用在线工具的网址链接参见前期文献报道^[11]。

1.2 方法

1.2.1 肺炎链球菌 LytR 蛋白的理化性质预测 利用 Bioedit Sequence Alignment Editor 软件对 spr1759 蛋白氨基酸组成进行分析。从 NCBI 数据库 Protein 数据字库搜索 NP_359351.1 获得 FASTA 格式的全长蛋白序列,使用 Bioedit 软件打开 spr1759 蛋白序列文件,点击 Sequence,找到 Protein,再选择 Amino Acid Composition,获得蛋白构成信息。利用

ProtParam 预测相关 spr1759 蛋白原子组成、等电点、不稳定系数进行预测。进入 ExPASy ProtParam 网站,输入 spr1759 蛋白序列,点击 Compute parameters,即可获取相关参数,其中,GRAVY 值为正,提示疏水性强;GRAVY 为负,提示亲水性强。此外,再利用 ProtScale 预测 spr1759 蛋白的疏水性/亲水性,进入 ExPASy ProtScale 网站,输入 spr1759 蛋白序列,选择 Kyte & Doolittle,点击 Submit,获得 Kyte 和 Doolittle 疏水分析信息,预测值为正,表明疏水性强;反之,负值表示亲水性强。

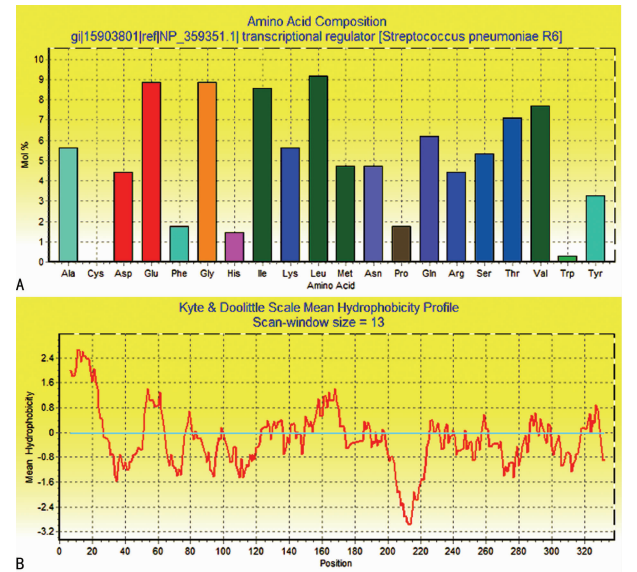
1.2.2 肺炎链球菌 spr1759 蛋白的结构功能预测 分别利用 Tmpred 和 TMHMM 对 spr1759 蛋白进行跨膜螺旋结构预测。进入 ExPASy Tmpred 网站,输入 spr1759 蛋白序列,点击 Run Tmpred;进入 TMHMM Server V. 2.0,输入 spr1759 蛋白序列,点击 Submit,获得跨膜螺旋结构信息。利用 SignalP 预测其信号肽;进入 SignalIP 4.1 Server,输入 spr1759 蛋白序列,点击 Submit,获得信号肽信息。利用 InterProScan 和 SMART 对 spr1759 蛋白的功能域进行分析。进入 EMBL-EBI InterPro 网站,输入 spr1759 蛋白序列,点击 Submit,获得功能域信息;进入 SMART 主页,输入 spr1759 蛋白序列,点击 Sequence SMART,获得功能域信息。利用 SOPMA 和 Predict-protein 预测蛋白质长 spr1759 蛋白的 2 级结构。进入 SOPMA 的 2 级结构预测网站,输入 spr1759 蛋白序列,点击 Submit,获得 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲比例。进入 Predictprotein 网站,输入 spr1759 蛋白序列,点击 PredictProtein,登录获得二级结构信息。将来源不同细菌的序列输入 Megalign 软件进行序列间比对。

2 结果

2.1 spr1759 蛋白的理化特征 肺炎链球菌 spr1759 蛋白理论等电点为 5.11,相对分子质量为 37.56×10^3 ,由 338 个氨基酸残基构成,包含 31 个 Leu (9.2%),30 个 Glu (8.9%),30 个 Gly (8.9%),29 个 Ile (8.6%);该蛋白碱性氨基酸和酸性氨基酸总数分别为 39 个 (11.5%) 和 45 个 (13.3%) (图 1A)。全长 spr1759 蛋白氨基酸脂肪指数 97.16, GRAVY 值为 -0.218,稳定指数为 44.95,属于不稳定蛋白。从图 1B 可见,全长 spr1759 蛋白肽链,亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,第 214 位氨基酸残基分值最低(-3.000),第 10 位氨基酸残基分值最高(2.700)。

2.2 一级结构中所含结构和功能域特征序列分析 InterProScan 分析结果显示,spr1759 蛋白仅含有 1 个结构功能域,属于细胞壁相关转录衰减因子(图 2A)。另外,用 NCBI 网站分析软件对全长 spr1759 蛋白进行了保守结构域的分析,发现 *S. pneumoniae* spr1759 蛋白属于 LytR_cpsA_psr 超家族蛋白(图 2B),其 E 值为 $1.24e^{-93}$,提示一种阴离子细胞壁多聚

物合成相关酶的功能。SMART 分析进一步支持了上述分析结果, spr1759 蛋白该结构域属于 LytR_cps_psr 结构域。

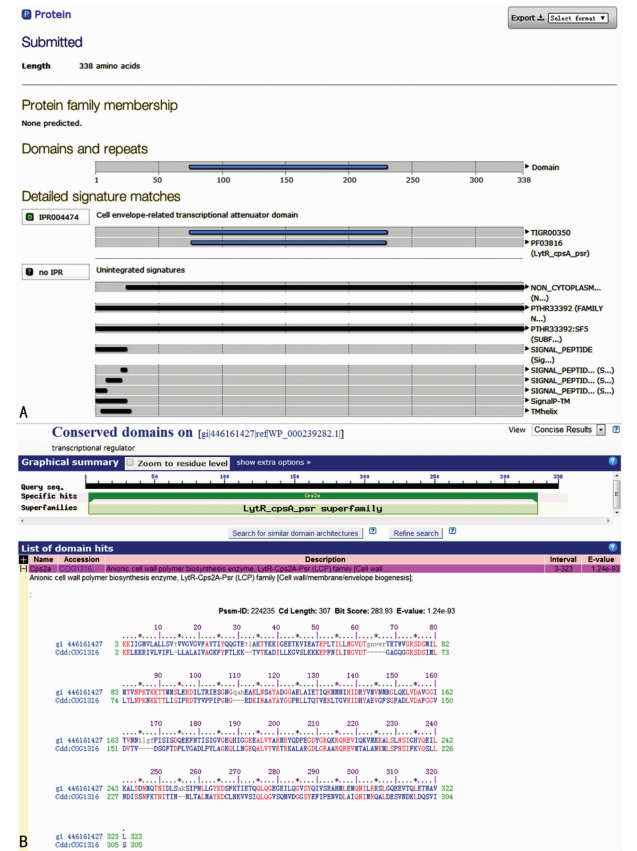


A: spr1759 氨基酸组成; B: Kyte 和 Doolittle 疏水性分析

图 1 肺炎链球菌 spr1759 蛋白氨基酸组成分布和疏水性

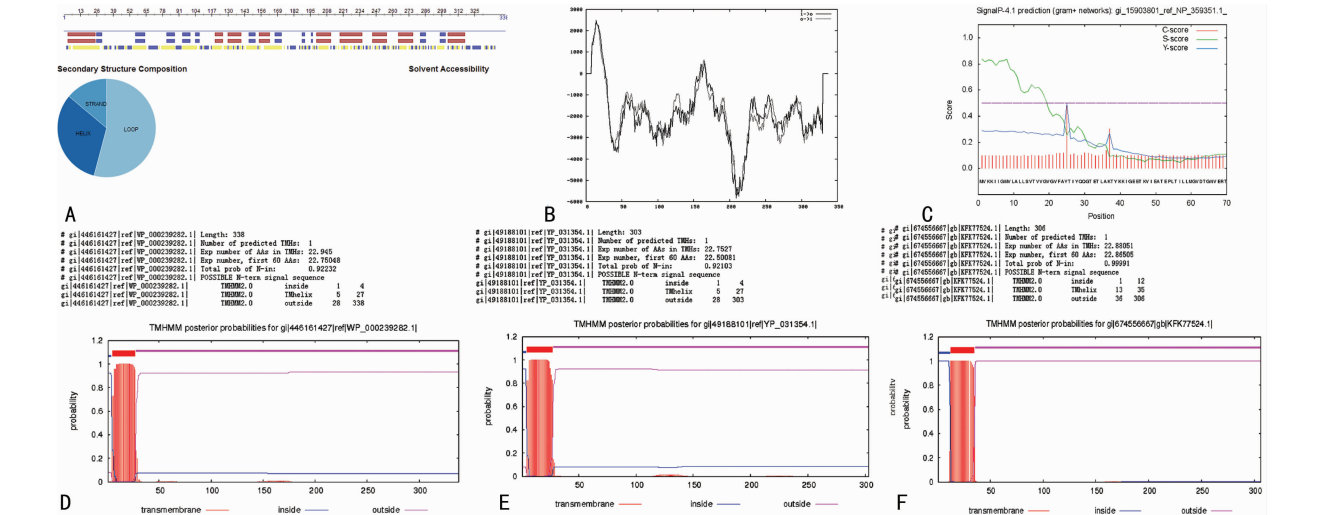
2.3 2 级结构特征 spr1759 蛋白 SOPMA 预测结果显示, 该蛋白 α -螺旋占 48.52%, β -折叠占 17.16%, β -转角占 7.40%, 无规则卷曲占 26.92%。Predict-protein 预测结果与 SOPMA 基本一致, 从图 3A 可见, α -螺旋和 β -折叠散在分布蛋白中, 作为整个蛋白的刚性支撑结构, α -螺旋占 31.95%, β -折叠 13.91%; 无规则卷曲结构为蛋白的柔性区域, 占 54.14%。Tm-pred 预测跨膜结构提示, 该蛋白总分值大于 0, 最高值达 2500, 在氨基端具有跨膜结构(图 3B)。LytR 蛋白进行信号肽分析发现, 该蛋白存在信号肽切割点, 位于蛋白第 24 和第 25 位氨基酸之间, cut-off 值为

0.420(图 3C), InterProScan 分析结果进一步证实了 SignalP 和 Tmpred 的预测结果。利用 TMHMM 软件对 *S. pneumoniae* spr1759 蛋白(图 3D)与 LytR 家族蛋白成员 *B. anthracis* BAS5115(图 3E)和 *B. subtilis* DJ97_1211(图 3F)进行了 2 级结构跨膜区域的对比, 发现 3 者均含有 1 个跨膜结构(TM)和胞外结构。



A: InterProScan 预测肺炎链球菌 R6 spr1759 蛋白一级结构中的保守功能域; B: NCBI 蛋白保守结构域分析

图 2 生物信息学分析肺炎链球菌 spr1759 的保守结构域



A: 以 Predictprotein 预测蛋白结构; B: 使用 Tmpred 预测蛋白跨膜结构; C: SignalP 预测信号肽, 利用 TMHMM 分析; D: Streptococcus pneumoniae spr1759 跨膜结构; E: Bacillus anthracis BAS5115 跨膜结构; F: Bacillus subtilis DJ97_1211 跨膜结构

图 3 肺炎链球菌 R6 LytR 的拓扑结构、二级结构特征

2.4 系列比对 为了进一步明确肺炎链球菌 spr1759 蛋白的功能,本研究将其与 LytR-Cps-Psr 家族其他成员的一级结构进行比对,结果显示,Streptococcus pneumoniae LytR *vs.* Bacillus anthracis BAS5115, Streptococcus pneumoniae LytR *vs.* Bacillus subtilis DJ97_1211 蛋白序列一级结构比对 spr1759 与 BAS5115 和 DJ97_1211 序列相似性分别为 35.7%和 32.5%(图 4),相似性超过 30.0%。

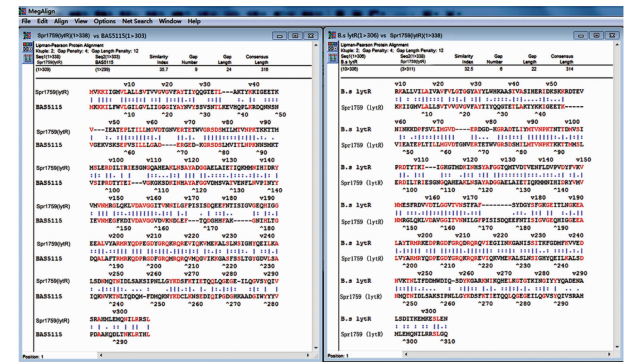


图 4 LytR 家族蛋白成员一级结构对比

3 讨论

任何一种抗菌药的使用总是会伴随着耐药菌的逐渐增加而失去功效,例如,我国肺炎链球菌临床分离株对红霉素几乎全部耐药^[12]。因此,为能长期有效控制细菌感染,人类需要不断研发与原有抗菌药物无交叉耐药性的新抗菌药,这就需要不断挖掘新的作用靶点。

LCP 蛋白家族在很多阳性细菌中具有重要作用,主要参与细胞壁合成^[8,13]。通过系列分析本课题组发现肺炎链球菌也存在类似蛋白, LytR 蛋白就是其中之一。为了探究其可能的生物学功能,本研究利用生物信息学软件对蛋白进行分析,结果发现该蛋白预测相对分子质量为 37.56×10^3 ,具有跨膜结构,脂溶性差,亲水性好,这一预测结果与闵迅等^[10]前期研究是吻合的。闵迅等利用原核表达系统对蛋白进行过表达,结果发现带有跨膜结构(信号肽部分片段)无法实现蛋白游离表达,而将跨膜结构(氨基端 30 氨基酸)去除后,成功实现了蛋白的可溶表达,一方面证实了该蛋白具有跨膜结构,位于氨基端;另一方面也提示使用 TMHMM 和 Tmpred 等生物信息学软件分析蛋白跨膜结构域是一种快速、简便和正确的方式。

使用 InterProScan 和 SMART 对 LytR 蛋白结构域进行分析发现,该蛋白具有 Lcp 蛋白家族功能结构域,属于细胞壁代谢相关转录衰减因子,然而从细胞定位分析和跨膜结果预测并不支持其作为转录因子的功能,此外,EBERHARDT 等^[14]已经利用 GFP 蛋白示踪的方法显示肺炎链球菌 LytR 蛋白(spr1759)位于细菌细胞膜,因此,该蛋白是一种转录因子的可

能性较小。序列比对分析结果显示,肺炎链球菌 LytR 蛋白与炭疽杆菌的 BAS5115 二级结构相似,都含有 1 个跨膜结构域和 1 个功能结构域;二者一级结构相似性超过 30%,说明二者具有较高的同源性。查阅文献发现,炭疽杆菌 BAS5115 具有酶学功能^[15],因此,本课题组认为 spr1759 可能也具有酶学的功能。那么,肺炎链球菌 spr1759 蛋白功能究竟如何,仍需进一步研究。

综上所述,本课题组利用生物信息学对肺炎链球菌 LytR 蛋白的理化性质,跨膜结构和功能进行了分析,结果提示 LytR 蛋白可能参与肺炎链球菌细胞壁多糖的组装连接过程。目前,通过抑制 LytR 蛋白发挥抗菌作用的药物尚未见报道,本研究提示 LytR 可能具有这一重要酶学功能,将为后续 LytR 蛋白的定位和功能实验室研究奠定基础,也将为未来针对 LytR 蛋白靶点药物的开发铺垫。

参考文献

[1] WUNDERINK R, WATERER G. Clinical practice. Community-acquired pneumonia[J]. N Engl J Med, 2014, 370 (6):543-551.

[2] WALKER C, RUDAN I, LIU L, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea[J]. Lancet, 2013, 381 (9875):1405-1416.

[3] SHEN M, YAO R, YUE H, et al. Serotype prevalence and antibiotic susceptibility patterns of pneumococcal isolates in Zunyi city, China[J]. Saudi Med J, 2017, 38(12):1243-1249.

[4] KANG L, LIU M, XU W, et al. Molecular epidemiology of pneumococcal isolates from children in China[J]. Saudi Med J, 2016, 37(4):403-413.

[5] XU H, WANG L, HUANG J, et al. Pneumococcal wall teichoic acid is required for the pathogenesis of Streptococcus pneumoniae in murine models[J]. J Microbiol, 2015, 53(2):147-154.

[6] HESS N, WALDOW F, KOHLER T P, et al. Lipoteichoic acid deficiency permits normal growth but impairs virulence of Streptococcus pneumoniae [J]. Nat Commun, 2017, 8(1):2093.

[7] WU K, HUANG J, ZHANG Y, et al. A novel protein, RafX, is important for common cell wall polysaccharide biosynthesis in Streptococcus pneumoniae: implications for bacterial virulence[J]. J Bacteriol, 2014, 196 (18): 3324-3334.

[8] KAWAI Y, MARLES-WRIGHT J, CLEVERLEY R, et al. A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins[J]. EMBO J, 2011, 30(24):4931-4941.

[9] MALM S, MAASS S, SCHAIBLE U, et al. In vivo virulence of Mycobacterium tuberculosis depends(下转第 3133 页)

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.002

GDNF 基因治疗对帕金森病小鼠 TH 阳性神经元 损害及胃肠功能障碍的影响*

吴少璞,祁亚伟,李 学,杨红旗,马建军[△]
(河南省人民医院神经内科,郑州 450002)

[摘要] **目的** 研究巨噬细胞介导的胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)基因治疗对帕金森病小鼠临床症状,以及对黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元损害和胃肠功能障碍的影响。**方法** 60只小鼠分为对照组、实验组和健康组。实验组小鼠接受表达GDNF的慢病毒骨髓干细胞转导,对照组和健康组小鼠注射生理盐水。移植后对照组和实验组通过MPTP建立帕金森模型,健康组注射生理盐水。比较3组小鼠建模后行为学变化、TH阳性(H⁺)多巴胺能神经神经元细胞免疫组织化学染色结果和神经元数目数目、体质量变化、胃排空率和肠推进率。**结果** GDNF在移植后的小鼠中成功表达。实验组小鼠爬杆时间明显长于健康组并明显短于对照组($P<0.05$),实验组小鼠转棒停留时间明显短于健康组并明显长于对照组($P<0.05$)。对照组、实验组和健康组小鼠的(TH⁺)多巴胺能神经神经元数目分别为:(8 610.26±833.64)、(1 117.54±1 037.18)、(1 369.87±1 440.16)×10⁻⁴/μm³,差异有统计学意义($P<0.01$);实验组小鼠黑质中的TH⁺多巴胺神经元纤维比对照组更密、颜色更深,比健康组更疏、颜色更浅。造模前后对照组和实验组小鼠体质量明显下降;实验组小鼠体质量、胃排空率、小肠推进率明显低于健康组且高于对照组($P<0.05$)。**结论** GDNF基因疗法能够明显改善帕金森病小鼠的运动协调能力,修复TH⁺神经元细胞损伤,改善胃肠道功能障碍。

[关键词] 帕金森病;基因;胶质细胞源性神经营养因子;黑质酪氨酸羟化酶阳性;胃肠功能障碍
[中图法分类号] R741.05 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3129-05

Effect of GDNF gene therapy in treating tyrosine hydroxylase positive neuron damage and gastrointestinal dysfunction in Parkinson mice*

WU Shaopu, QI Yawei, LI Xue, YANG Hongqi, MA Jianjun[△]

(Department of Neurology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of macrophage-mediated glial-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy on clinical symptoms, tyrosine hydroxylase (TH) positive neuron damage and gastrointestinal dysfunction in Parkinson mice. **Methods** Sixty mice were divided into the control group, experimental group and healthy group. The experimental group mice received the transduction of bone marrow stem cells expressing GDNF lentivirus, the control group and healthy group were injected with normal saline. After transplantation, the control group and experimental group built the Parkinson model by MPTP, while the healthy group was injected by normal saline. The behavior change, immunohistochemical staining results of substantia nigra tyrosine hydroxylase positive (H⁺) dopaminergic neuron and neurons number, body mass change, gastric emptying rate and intestinal propulsive rate after constructing the model were compared among 3 groups. **Results** GDNF was expressed successfully in mice after transplantation. The pole-climbing time in the experimental group was significantly longer than that in the healthy group and significantly shorter than that in the control group ($P<0.05$); the stick-turning standing time in the experimental group was significantly shorter than that in the healthy group and significantly longer than that in the control group ($P<0.05$). The numbers of TH⁺ dopaminergic neuron in the control group, experimental group and healthy group were (8 610.26±833.64), (1 117.54±1 037.18) and (1 369.87±1 440.16) × 10⁻⁴/μm³ separately, which showed statistically significant difference ($P<0.01$); the substantia nigra TH⁺ dopaminergic neurofibrils in the experimental group were more dense and darker compared with the control group, and more scatter and lighter compared with the healthy group. The body mass before and after constructing the model in the experi-

* 基金项目:河南省科技攻关计划项目(162102310283)。 作者简介:吴少璞(1984—),主治医师,硕士,主要从事帕金森病的诊断和治疗方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:majj1124@163.com。

mental and control group was significantly decreased; the body mass, gastric emptying rate and intestinal propulsive rate in the experimental group were significantly lower than those in the healthy group and higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The GDNF gene therapy could significantly improve the motor coordination ability of PD mice, meanwhile repair TH⁺ neuron damage and improves gastrointestinal dysfunction.

[Key words] Parkinson disease; gene therapy; glial-derived neurotrophic factor; TH⁺; gastrointestinal dysfunction

帕金森病(PD)是一种中枢神经退行性疾病,其临床症状除了静止性震颤、姿势不稳等运动障碍以外,还表现为胃肠道功能障碍等非运动障碍。PD主要是由于患者大脑黑质多巴胺能神经元发生退行性病变而导致的神经元坏死和神经功能受损。目前对于PD发病的具体机制尚不明确,但普遍认为PD是由于多巴胺含量下降引起的;其临床治疗以减轻临床症状、促进神经元修复为主^[1]。胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)能修复退化的多巴胺神经元,促进黑质纹状体多巴胺系统的再生,是目前活性最强的神经元保护因子^[2]。目前关于GDNF与PD动物模型的研究主要有两种,除了通过GDNF直接输注,还有通过病毒为载体的基因改造疗法或经基因工程改造后再通过细胞介导输注^[3]。GDNF相对分子质量大,难以透过血脑屏障,且必须通过持续性给予才能起到较好的神经修复作用,直接输注的效果不佳。本文通过GDNF基因疗法研究其对PD小鼠模型的神经修复作用和对胃肠功能的影响,为基因治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性C57BL/6J小鼠60只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[许可证编号SCXK(京)2006-0009]。(24±2)℃、(55±5)%相对湿度、12 h日夜循环适应性喂养7 d,6周龄,体质量(20±2)g。小鼠分为对照组($n=15$)、实验组($n=30$)和健康组($n=15$)。

1.2 方法

1.2.1 GDNF慢病毒质粒巨噬细胞特异性合成启动子构建 慢病毒载体的巨噬细胞特异性合成启动子构建参照BIJU等^[4]报道,该序列包含两个顺式作用元件:CAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)和融合蛋白-1(AML-1),采用CD68迷你启动子代替质粒中原来的p47phox的迷你基因启动以提高特异性,然后用大鼠GDNF基因(Genbank编号:nm019139,STS 50-685)取代报告基因(GFP)。设计引物的上游引物为5'-CGG AAT TCG GTA CCG AGC TCT TAC GC-3',下游引物为5'-CGA CCG GTA CTG GGT GGC CTC CAG TG-3';使用标准的PCR分子扩增程序,PCR反应条件为30 s 30次 94℃,56℃ 30 s,72℃ 1 min。并对产生的结构进行测序,以验证插入位点,以及GDNF基因的完整性。获得由慢病毒载体的293T细胞瞬时转染产生的3个包装质粒(pmdlG/pMDlg-

pRRE,pRSV Rev和PMD.G)构成的慢病毒质粒。

1.2.2 慢病毒转导与骨髓细胞移植^[5] 在骨髓注射前4 d给供体小鼠注射150 mg/kg 氟尿嘧啶。用stempro-34-sfm完全培养基(Gibco公司)冲洗供体小鼠的股骨和胫骨骨髓获得骨髓细胞,添加200 mmol/L谷氨酰胺,100 IU/mL青霉素,100 μ g/mL链霉素,5 U/mL肝素制作单细胞悬液。使用淋巴细胞培养基富集骨髓间充质干细胞并采用密度梯度分离法分离,进行体外过夜培养,第2天使用400 μ L浓缩病毒上清液重悬获得的细胞悬液。在含有RetroNectin蛋白(Takara)的图层板上,4 μ g/mL硫酸鱼精蛋白存在下进行6 h感染。感染后经小鼠尾静脉注射(1~2)×10⁶细胞。实验组小鼠接受表达GDNF的慢病毒骨髓干细胞转导,对照组和健康组小鼠进行等量灭菌生理盐水注射。

1.2.3 PD模型建立^[6] 移植后8周,给予对照组和观察组小鼠1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP,美国Sigma公司)生理盐水腹腔注射:第1天15 mg/kg,第2天25 mg/kg,第3~7天30 mg/kg。前两天进行低剂量注射是为了避免周围毒性导致动物死亡。健康组在相同的方案下进行生理盐水腹腔注射。建立模型第7天对造模小鼠进行PD行为学检测,从对照组和观察者中分别挑选12、24只造模成功的小鼠入组;健康组选取12只健康小鼠入组。在最后1次MPTP/生理盐水注射1周后处死动物。

1.2.4 观察指标

1.2.4.1 RT-PCR检测GDNF表达 分别于移植GDNF的慢病毒骨髓干细胞转染后第1、3、5、8周从实验组挑选3只小鼠验证GDNF的表达:使用8%水合氯醛进行麻醉,在麻醉成功后,向小鼠心脏注射肝素化冰生理盐水,断头取脑。提取小鼠黑质总RNA,提取方法为TRzol试剂提取法,按照试剂盒(购自江莱生物)说明进行反转录。取反转录产物进行RT-PCR检测,以 β -actin mRNA转录水平作为内参,反应循环参数设置。预变性:94℃ 5 min;PCR反应:94℃ 30 s,56℃ 60 s,72℃ 2 min,共35个循环;72℃延伸10 min。

1.2.4.2 行为学观察 通过爬杆试验和转棒行为试验来评价小鼠的四肢运动协调能力。(1)爬杆试验:测试时间为MPTP注射第1、5、7天及最后1次注射

后 7 d;在 0.5 m 长(直径 0.8 cm)的木棍一侧固定直径 0.25 m 的软木球,木杆上缠绕纱布,记录小鼠从软木球上出发走完整个木棍的时间,即爬杆时间。(2)转棒行为学检测:测试时间为注射第 7 天及最后 1 次注射后 7 d,提前 3 d 开始使用转棒行为学仪器训练 3 组动物,每天转速 12 r/min,训练 5 min,测试时记录 3 组小鼠在 20 r/min 转速下的棒上停留时间。

1.2.4.3 黑质酪氨酸羟化酶阳性(Tyrosine hydroxylase⁺,TH⁺)多巴胺能神经神经元数目 于最后 1 次注射 MPTP/生理盐水后第 7 天,使用 8%水合氯醛进行麻醉,在麻醉成功后,向小鼠心脏注射肝素化冰生理盐水,断头取脑。于冰上进行小鼠脑组织冠状切片,厚度约为 1 mm,然后进行免疫组织化学染色,在光学显微镜下观察结果,详细操作严格按照说明书进行,试剂盒由江莱生物提供。同时采用光学分流法对 3 组小鼠脑组织中的多巴胺能神经元细胞进行计数。

1.2.4.4 体质量变化 MPTP 具有全身毒性作用,会导致小鼠发生营养障碍,体质量下降。分别在皮下注射前 1 天,注射第 1 天,注射第 7 天,最后 1 次注射后第 7 天对 3 组小鼠进行称重,比较 3 组动物的体质量变化。

1.2.4.5 胃肠道功能 配置淀粉糊:向 125 mL 蒸馏水中添加 5.0 g 羧甲基纤维素钠,8.0 g 奶粉,4.0 g 蔗糖,4.0 g 淀粉,1.5 g 活性炭末,搅拌配置成均匀的糊状物。所有小鼠在最后一次注射 MPTP/生理盐水后第 7 天处死前 18 h 进行禁食,然后进行淀粉糊灌胃,灌胃剂量 0.025 mL/g,灌胃后 20 min 处死小鼠,结扎幽门和贲门,分离胃和小肠,称胃的质量,质量记为 M;对胃进行解剖除去内容物生理盐水冲洗晾干,

再次称重,记为 m。同时平铺小肠,测量幽门至盲肠的长度 L₁、幽门至小肠中淀粉糊处的长度 L₂。胃排空率=[1-(M-m)/灌胃质量]×100%;小肠推进率=L₂/L₁×100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑组织中 GDNF 在 mRNA 水平的表达 在移植 GDNF 的慢病毒骨髓干细胞转染后,GDNF 在小鼠脑组织中成功表达,并且从第 1 周到第 8 周小鼠脑组织中 GDNF 的表达逐渐增强,见图 1。

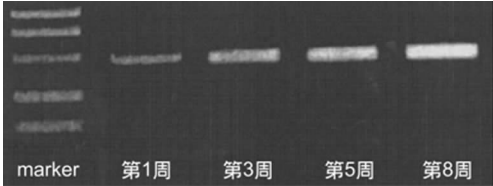


图 1 实验组小鼠脑组织中 GDNF 的表达

2.2 行为学观察 注射 MPTP/生理盐水造模第 1、7 天,以及最后 1 次注射后 7 d,3 组小鼠爬杆时间比较差异有统计学意义($P<0.05$),实验组小鼠爬杆时间明显长于健康组且短于对照组($P<0.05$)。注射 MPTP/生理盐水造模第 7 天,以及最后 1 次注射后 7 d,3 组小鼠转棒停留时间差异有统计学意义($P<0.05$),实验组小鼠停留时间明显短于健康组且长于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组小鼠爬杆时间和转棒停留时间比较($\bar{x}\pm s$)										
组别	<i>n</i>	爬杆时间(min)			<i>F</i>	<i>P</i>	转棒停留时间(s)		<i>t</i>	<i>P</i>
		第 1 天	第 7 天	注射后 7 d			第 7 天	注射后 7 d		
对照组	12	6.05±1.32	7.42±1.36	7.69±1.38	5.064	0.012	32.21±5.06	29.04±3.23	1.829	0.081
实验组	12	4.98±1.01 ^a	6.27±1.15 ^{ab}	5.32±1.29 ^{ab}	4.016	0.027	40.92±4.81 ^{ab}	45.37±4.05 ^{ab}	2.452	0.023
健康组	12	4.61±0.94	4.53±1.07 ^a	4.67±1.11 ^a	0.067	0.934	81.45±9.16 ^a	78.56±10.17 ^a	1.245	0.226
<i>F</i>		5.521	17.654	18.947			187.408	166.64		
<i>P</i>		0.008	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01		

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与健康组比较

表 2 3 组小鼠体质量变化比较($\bar{x}\pm s$)							
组别	<i>n</i>	注射前 1 d	第 1 天	第 7 天	注射后 7 d	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	12	26.37±1.54	22.12±1.40 ^b	14.63±1.25	17.35±1.24	174.12	<0.01
实验组	12	25.88±1.37	23.92±1.48 ^b	18.14±1.80 ^{ab}	21.06±1.19 ^{ab}	62.863	<0.01
健康组	12	25.69±1.46	26.29±1.46	26.06±1.39 ^a	25.13±1.31 ^a	1.554	0.213
<i>F</i>		0.694	25.067	183.255	116.738		
<i>P</i>		0.506	<0.01	<0.01	<0.01		

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与健康组比较

2.3 TH⁺多巴胺能神经神经元数目 对照组、实验组和健康组小鼠的 TH⁺多巴胺能神经神经元数目分别为:(8 610.26±833.64)、(1 117.54±1 037.18)、(1 369.87±1 440.16)×10⁻⁴/μm³。3 组两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。免疫组织化学染色结果显示实验组小鼠黑质中的 TH⁺多巴胺神经纤维比对照组更密,颜色更深;实验组小鼠黑质中的 TH⁺多巴胺神经纤维比健康组更疏,颜色更浅,见图 2。

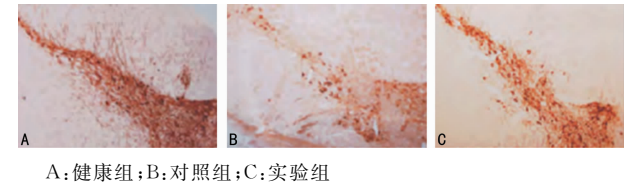


图 2 3 组小鼠黑质中 TH⁺多巴胺神经染色结果(×20)

2.4 体质量变化 造模前 1 d 3 组小鼠体质量无明显差异;注射 MPTP/生理盐水第 1、7 天,以及最后 1 次注射后 7 d 时 3 组小鼠体质量比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中实验组小鼠注射第 7 天及注射后 7 d 体质量均明显低于健康组且高于对照组($P<0.05$),见表 2。

2.5 胃肠道功能 实验组小鼠的胃排空率、小肠推进率均明显低于健康组且高于对照组($P<0.05$),见表 3。

表 3 3 组小鼠的胃排空率和肠推进率比较(̄x±s)			
组别	n	胃排空率(%)	肠推进率(%)
对照组	12	42.27±10.50	48.01±12.24
实验组	12	51.89±11.62 ^{ab}	54.47±11.35 ^{ab}
健康组	12	63.15±9.14 ^a	66.83±13.75 ^a
F		11.957	7.039
P		<0.01	0.028

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与健康组比较

3 讨 论

PD 是因多巴胺能神经元发生退行性变化而导致神经退化坏死所致,其临床特征主要为运动障碍。此外,98%以上的患者还会出现非运动障碍,其中胃肠道功能障碍是 PD 患者最明显的非运动障碍,发生率约为 80%^[7]。目前 PD 尚无根治之法,临床治疗以缓解患者症状为主,既不能恢复坏死的神经元也不能很好地终止病理进程。GDNF 是目前公认最佳神经保护因子,具有促进神经细胞分化和再生长的功能^[8]。但 GDNF 是一种大分子,直接注射难以透过血脑屏障,疗效不佳。GDNF 基因修饰是改善 PD 的最有效途径,但目前尚处于动物实验摸索研究阶段^[9]。慢病毒载体介导通过基因重组构建表达 GDNF 的慢病毒,再包装、注射进入体内,免疫反应小,安全性高^[10]。本文通过慢病毒质粒巨噬细胞获得表达 GDNF 的慢病

毒质粒并进行转染,使得 GDNF 在 小鼠脑组织中成功表达。

本文采用爬杆试验、转棒试验比较 3 组小鼠的运动协调能力。结果表明,实验组小鼠的运动协调能力明显优于对照组并明显弱于健康组,巨噬细胞介导基因治疗能有效改善 PD 小鼠的运动障碍。PD 发病的一个最重要原因是其脑内黑质中的多巴胺含量下降,导致神经元细胞受损。MPTP 的体内代谢产物能够通过抑制多巴胺合成酶 TH 的活性来降低小鼠黑质中多巴胺含量^[11];TH 是多巴胺合成的限速酶^[12]。本研究中实验组小鼠脑组织中神经元数目明显低于健康组且高于对照组($P<0.05$)。免疫组织化学染色结果显示,实验组小鼠黑质中的 TH⁺多巴胺神经纤维比对照组更密集,颜色更深,比健康组更疏,颜色更浅。说明 GDNF 基因移植后能明显促进小鼠脑组织中的神经元细胞的再生,改善修复受损的神经元。分析认为通过基因工程改造后的骨髓干细胞经过小鼠尾静脉移植能够跨过血脑屏障,与局部组织整合,并表达 GDNF,进一步通过丝裂原活化蛋白激酶-蛋白激酶 C 信号通路提高 TH 阳性表达^[13],提高多巴胺的合成,抑制神经元细胞凋亡,有助于神经纤维修复^[14]。段奎甲等^[15]通过 GDNF 基因修饰神经干细胞并移植 PD 大鼠体内发现 GDNF 基因修饰移植的大鼠较 GFP 基因移植的大鼠的多巴胺神经分化更多,其 TH⁺阳性表达也明显更高,该方法能够明显改善 PD 大鼠的运动障碍,与本文研究结果类似。

除了典型的运动障碍、神经元损害外,PD 患者胃肠道功能障碍的最明显的表现是胃排空延迟;胃肠道功能损害会进一步引起体质量下降,并且随着病情发展,胃肠道功能障碍会随之加重^[16]。本研究结果发现注射 MPTP 第 1 天对照组和实验组小鼠表现出明显的体质量下降,且对照组明显低于实验组;造模第 7 天及造模后第 7 天对照组小鼠体质量无明显变化,对照组和试验组小鼠体质量明显下降,且对照组明显低于实验组。同时实验组小鼠的胃排空率、小肠推进率均明显低于健康组且高于对照组,说明实验组小鼠的胃排空功能和肠道蠕动明显优于对照组但明显弱于健康组,GDNF 的基因治疗能明显改善 PD 小鼠的胃肠道功能障碍。研究认为 PD 患者发生胃肠道功能障碍的原因可能是脑组织中的中枢神经系统发生变性退化,导致神经递质的减少,对胃肠道蠕动的调控变弱^[17]。同时有学者报道 PD 大鼠体内的胃肠道多巴胺神经数量明显低于健康大鼠^[18]。分析认为小鼠移植表达 GDNF 的巨噬细胞,能够促进脑组织中多巴胺合成,修复与胃肠道蠕动相关的受损神经,改善 PD 小鼠的胃肠道功能障碍。

综上所述,GDNF 基因疗法治疗 PD 小鼠能够明

显改善 PD 小鼠的运动障碍,促进脑组织中受损的 TH 阳性神经元细胞再生,修复神经纤维,提高胃肠道蠕动,改善胃肠道功能障碍。但是其具体机制尚不清楚,还需要进行进一步的分子生物学研究。

参考文献

[1] RINALDUZZI S, TROMPETTO C, MARINELLI L, et al. Balance dysfunction in Parkinson's disease[J]. Biomed Res Int, 2015; 434683.

[2] 王思, 刘菲. 胶质细胞源性神经营养因子治疗帕金森病研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2015, 42(1): 89-92.

[3] LE GRAND J N, GONZALEZ-CANO L, PAVLOU M A, et al. Neural stem cells in Parkinson's disease: a role for neurogenesis defects in onset and progression[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(4): 773-797.

[4] BIJU K, ZHOU Q, LI G M, et al. Macrophage-mediated GDNF delivery protects against dopaminergic neurodegeneration: a therapeutic strategy for Parkinson's disease[J]. Mol Ther, 2010, 18(8): 1536-1544.

[5] HE W J, QIANG M, MA W Q, et al. Development of a synthetic promoter for macrophage gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(9): 949-959.

[6] 谢金鹿, 耿希文, 何婷婷, 等. 高效帕金森病大鼠模型建立方法的研究[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2017, 31(2): 159-163.

[7] 马成猛, 王训, 杨任民. 帕金森病患者胃肠功能障碍研究进展[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(8): 122-125.

[8] 杨晓帆, 韩鹏飞, 臧兆萍, 等. 人胶质细胞源性神经营养因子转染大鼠神经干细胞移植对老年帕金森病大鼠的作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(22): 6339-6341.

[9] TERESHCHENKO J, MADDALENA A, BHR M, et al.

Pharmacologically controlled, discontinuous GDNF gene therapy restores motor function in a rat model of Parkinson's disease[J]. Neurobiol Dis, 2014, 65(4): 35-42.

[10] 杜向东, 范雁. 慢病毒载体介导的帕金森病基因治疗新进展[J/CD]. 中华脑科疾病与康复杂志(电子版), 2015, 5(3): 188-191.

[11] 胡雅岑, 徐倩, 郭纪峰, 等. MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型黑质脑组织 DNA 甲基化研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(3): 277-285.

[12] 张阳, 张志坚, 俞晓岚, 等. 慢病毒介导新型 Tet-On 系统调控大鼠 GDNF 和 TH 双基因表达对帕金森病大鼠的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 251-256.

[13] RENGMARK A, PIHLSTROM L, LINDER J, et al. Low frequency of GCH1 and TH mutations in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2016, 29(4): 109-111.

[14] HOANG Q Q. Pathway for parkinson disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(7): 2402-2403.

[15] 段奎甲, 王向鹏, 杨智勇, 等. GDNF 基因修饰神经干细胞移植治疗大鼠帕金森病[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(1): 32-38.

[16] 李静, 陈为安, 张旭, 等. 早期与中晚期帕金森病患者非运动症状的比较研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(34): 4201-4204.

[17] 赵振向, 李晔, 刘怡琳, 等. 帕金森病肠道起源的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(12): 107-109.

[18] PFEIFFER R F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2016, 22(1): 119-122.

(收稿日期: 2018-02-22 修回日期: 2018-05-10)

(上接第 3128 页)

on a single homologue of the LytR-CpsA-Psr proteins[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3936.

[10] 闵迅, 钟文, 赵沙沙, 等. 肺炎链球菌假想转录因子 LytR 的表达, 纯化, 晶体生长及优化[J]. 生物医学工程学报, 2013, 30(4): 6.

[11] 刘洪波, 阳广菲, 欧维琳, 等. 柯萨奇病毒 A6 型 VP1 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(4): 536-541.

[12] LIU Y, WANG H, CHEN M, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of Streptococcus pneumoniae isolated from children in China younger than 5 years[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 61(3): 256-263.

[13] CHAN Y, KIM H, SCHNEEWIND O, et al. The capsular polysaccharide of Staphylococcus aureus is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes[J]. J Biol Chem, 2014, 289(22): 15680-15690.

[14] EBERHARDT A, HOYLAND C N, VOLLMER D, et al. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in Streptococcus pneumoniae[J]. Microb Drug Resist, 2012, 18(3): 240-255.

[15] LISZEWSKIZ, CHAN Y, LUNDERBERG J. LytR-CpsA-Psr enzymes as determinants of Bacillus anthracis secondary cell wall polysaccharide assembly[J]. J Bacteriol, 2015, 197(2): 343-353.

(收稿日期: 2018-02-23 修回日期: 2018-05-08)

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.003

沉默 DNA-PKcs 对肝癌耐药细胞 Bel7402/5-Fu 凋亡的影响*

李大玉,余春波,朱欣婷,刘喜平,范芳,李长福[△]
(遵义医学院生化教研室,贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 研究 DNA 依赖蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)基因沉默后对肝癌耐药细胞 Bel7402/5-Fu 细胞凋亡的影响。**方法** 实验分为空白对照组、脂质体对照组、NC 对照组、siDNA-PKcs 实验组。采用噻唑蓝(MTT)法检测耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的耐药性;采用阳离子脂质体法将 siDNA-PKcs 寡核苷酸片段转染 Bel7402/5-Fu 细胞;Real-time PCR 和 Western blot 分别检测细胞 DNA-PKcs mRNA 及蛋白的表达情况;倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化(Hoechst33342 染色法);流式细胞术检测细胞凋亡情况(AnnexinV/PI 双染法);Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤-2 相关 x 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-x 基因长片段(Bcl-xl)蛋白的表达情况。**结果** MTT 检测 Bel7402/5-Fu 细胞的半抑制浓度(IC₅₀)明显增高,耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的耐药指数为 13.13;DNA-PKcs 的 mRNA 与蛋白表达水平明显减少,设计的 siDNA-PKcs 特异序列能有效沉默细胞 DNA-PKcs 的表达;Hoechst-33342 染色检测结果显示 siDNA-PKcs 实验组细胞体积缩小、细胞核边集、呈亮蓝色;流式细胞术检测结果显示,siDNA-PKcs 实验组细胞凋亡率比其余组增加($P<0.01$);Western blot 检测结果显示 siDNA-PKcs 实验组 Bax 蛋白表达水平比其余组高,Bcl-xl 蛋白表达水平比其余组低($P<0.01$)。**结论** siDNA-PKcs 能诱导肝癌耐药细胞 Bel7402/5-Fu 细胞凋亡,并能上调促凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达水平,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xl 的蛋白表达水平。

[关键词] 肝肿瘤;药物耐受性;DNA 依赖性蛋白激酶催化亚基;肝癌耐药细胞;细胞凋亡;机制
[中图法分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3134-04

Effect of siDNA-PKcs promoting cell apoptosis of multidrug-resistant
hepatocellular carcinoma cell line Bel7402/5-Fu*

LI Dayu, YU Chunbo, ZHU Xinting, LIU Xiping, FAN Fang, LI Changfu[△]
(Teaching and Researching Section of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000 China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of DNA dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) silence on cellular apoptosis of multidrug-resistant (MDR) hepatocellular carcinoma cell Bel7402/5-Fu. **Methods** The cases were divided into the blank control group, liposomes control group, negative control (NC) group and siDNA-PKcs experimental group. The drug resistance of Bel7402/5-Fu cell line was determined by using MTT. The cationic liposome method was adopted to transfect siDNA-PKcs oligonucleotide fragment to Bel7402/5-Fu. Real-time PCR and western blot were used to detect the expression levels of DNA-PKcs mRNA and protein. The cellular morphology change was observed by the inverted fluorescence microscope (Hoechst33342 staining method). The cell apoptosis was detected by using flow-cytometry (Annexin V/P dual staining). The expression levels of cell apoptosis related proteins Bax and Bcl-xl protein were determined by western blot. **Results** The hemi-inhibitory concentration (IC₅₀) of Bel7402/5-Fu cells detected by MTT was significantly increased. The drug resistance index of drug resistance Bel7402/5-Fu was 13.13. The expression level of DNA-PKcs mRNA was significantly decreased. The designed siDNA-PKcs specific sequence effectively silenced the expression of DNA-PKcs. The Hoechst-33342 staining detection results showed that the cellular volume was shrunk, nuclear had margination with bright blue. The flow-cytometry detection results showed that the apoptosis rate in the siDNA-PKcs experimental group was increased compared with the other groups ($P<0.01$). The western blot detection results showed that the expression level of Bax protein in the siDNA-PKcs experimental group was higher than those in the other groups ($P<0.01$) and the Bcl-xl protein level in

* 基金项目:贵州省社发攻关项目[黔科合 SY(2013)3004];2016 年硕士科研启动资金[F-829]。 作者简介:李大玉(1978—),实验师,硕士,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: lcf1976@126.com。

the experimental group was lower than those in the other groups ($P < 0.01$). **Conclusion** siDNA-PKcs could induce the apoptosis of MDR hepatocellular carcinoma cells, up-regulate the expression level of apoptosis-promoting protein Bax and inhibit the expression level of antiapoptotic proteins Bcl-xl protein.

[Key words] liver neoplasms; drug tolerance; DNA-PKcs; drug-resistant hepatocellular carcinoma cell; apoptosis; mechanism

原发性肝癌(HCC)是临床常见的消化系统恶性肿瘤之一,临床治疗主要是包括手术、放疗、化疗、介入治疗等的综合治疗,其中化疗对 HCC 的治疗有着重要作用,但化疗过程中形成的多药耐药(MDR)是导致化疗失败的重要原因之一^[1]。DNA 依赖蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)是 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK)的催化亚单位,在细胞内有许多重要的功能和作用,包括细胞凋亡信号传导^[2]、免疫细胞分化、基因重组性监视等。前期研究显示,当沉默 DNA-PKcs 表达后 Bel7402/5-Fu 细胞 P-糖蛋白(P-gp)表达下调,同时化疗敏感性增加^[3]。ZHANG 等^[4]研究结果显示,当沉默神经胶质瘤细胞 DNA-PKcs 后,其化疗敏感性增加,提示 DNA-PKcs 对肿瘤耐药有一定关系,但其影响肝癌耐药的功能及机制还未清楚。本研究以 siDNA-PKcs 转染 Bel7402/5-Fu 肝癌耐药细胞,检测 DNA-PKcs 沉默后对肝癌耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的凋亡及其机制的影响,探讨 DNA-PKcs 影响肝癌耐药的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料 Bel7402/5-Fu 细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司;小干扰 RNA(siRNA)寡核苷酸购自上海吉玛基因生物技术有限公司;Lipofectmine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;Hoechst33342 染色液购自上海碧云天生物技术公司;Annexin V-EGFP/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司;小鼠抗 B 细胞淋巴瘤-2 相关 x 蛋白(Bax)、小鼠抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-x 基因长片段(Bcl-xl)、抗体购自美国 Proteintech 公司;兔抗 DNA-PKcs 抗体购自美国 Assay biotech 公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 Bel7402 和 Bel7402/5-Fu 细胞培养在含 10% 的胎牛血清的 1640 培养液中,置于 37℃、5% 的二氧化碳孵箱中培养,观察细胞生长情况,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 分组与转染 实验分为空白对照组、脂质体对照组、阴性 siRNA 对照组(NC 对照组)、siDNA-PKcs(针对 DNA-PKcs 基因转录水平表达的 siRNA)实验组。取对数生长期细胞种于培养板中,96 孔板按 $(8 \sim 10) \times 10^3$ /孔接种细胞,6 孔板按 $(6 \sim 8) \times 10^5$ /孔接种细胞,分组培养,当融合度为 70%~90%时进行

转染,配制 siDNA-PKcs-脂质体复合体,并加入对应孔中,培养箱内培养 5 h 后换液。

1.2.3 Bel7402/5-Fu 细胞耐药性检测 培养 Bel7402 和 Bel7402/5-Fu 细胞,分别接种 96 孔板,按 1×10^4 /孔加入其中,培养 12 h,在对应孔内分别加入浓度为 0、10、20、40、80、160、320、640 mg/L 的 5-氟尿嘧啶(5-Fu),细胞在培养箱中再孵育 48 h 后,弃上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗两次,然后每孔加入无血清-无抗生素培养基 180 μ L 和 20 μ L 噻唑蓝(MTT),培养箱内再孵育 4 h 后,小心吸掉上层液(切勿吸掉底部结晶),每孔加二甲基亚砜(DMSO)150 μ L,振荡 30 s 使结晶全部溶解后,490 nm 波长测定其吸光度值(A 值),并计算半数抑制剂量(IC_{50})值及 Bel7402/5-Fu 细胞的耐药指数(耐药细胞 IC_{50} /亲本细胞 IC_{50})。

1.2.4 Hoechst33342 染色法检测细胞形态学变化 将 Bel7402/5-Fu 细胞接种于 6 孔板中,12 h 后转染,用含 200 mg/L 5-Fu 的培养基进行培养,48 h 后处理细胞,Hoechst33342 染色(按试剂盒说明书操作),倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 将 Bel7402/5-Fu 细胞接种于 6 孔板,12 h 后转染,用含 200 mg/L 5-Fu 的培养基进行培养,48 h 后收集细胞,PBS 洗细胞两次,用 Annexin V-EGFP/PI 双染(按试剂盒说明书操作),1 h 内流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.2.6 Western blot 检测 DNA-PKcs、Bax、Bcl-xl 蛋白表达情况 提取各组细胞总蛋白,二喹啉甲酸法(BCA)检测定量样品蛋白水平,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,转膜,5%牛血清清蛋白封闭 1 h,分别加入小鼠抗 Bax 抗体(1:1 000)、小鼠抗 Bcl-xl 抗体(1:1 000)和兔抗 DNA-PKcs 抗体(1:1 000),孵育过夜(4℃),Tris 缓冲生理盐水吐温(TBST)洗膜 3 次,10 分钟/次,分别加 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,10 分钟/次,电化学发光(ECL)发光显色,ImageJ 定量分析软件分析灰度比。

1.2.7 Real-time PCR 检测 DNA-PKcs 的 mRNA 表达情况 使用 Trizol 试剂提取 RNA,使用寡聚(dT)18 引物(0.5 μ g/ μ L)以总体积为 10 μ L 的 RT 试剂盒进行反转录,用 cDNA 和 SYBR Premix Ex Taq™ II 在荧光 PCR 仪上进行实时 PCR,引物为序列如下。

DNA-PKcs 正向 5'-GTG ACA AGG CAA CTG TAT GAG C-3';反向 5'-ACA CCG ACC ACA AAA ATC TCT T-3'。β-actin 正向 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3';反向 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3',通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析计算各基因的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件包对实验数据进行分析处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测细胞耐药性 结果显示,耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的 IC₅₀ 值[(683.93±9.38)mg/L]比亲本细胞 Bel7402 的 IC₅₀ 值[(52.09±6.46)mg/L]高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的耐药指数为 13.13。

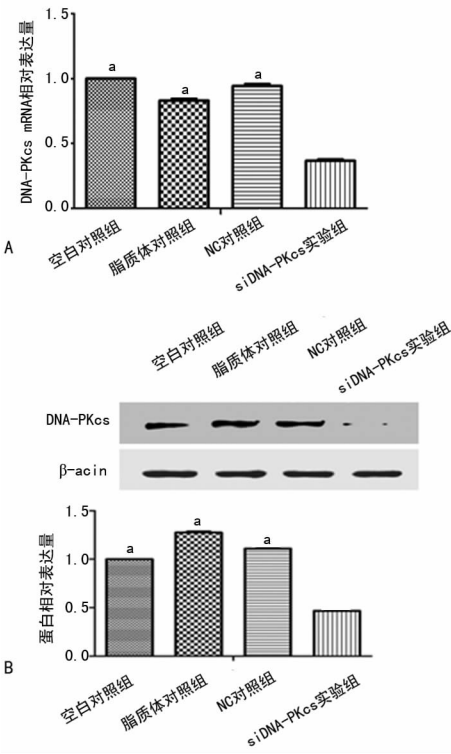


Figure 1: siDNA-PKcs effect on DNA-PKcs mRNA and protein expression. A: Real-time quantitative PCR detection of cell DNA-PKcs mRNA levels; B: Western blot detection of cell DNA-PKcs protein expression and protein level semi-quantitative analysis.

Figure 1 siDNA-PKcs effect on cell DNA-PKcs mRNA and protein expression

2.2 siDNA-PKcs effect on liver cancer resistant cell Bel7402/5-Fu DNA-PKcs mRNA and protein expression When cells Bel7402/5-Fu were transfected with siDNA-PKcs, the expression levels of DNA-PKcs mRNA and protein expression were significantly downregulated ($P < 0.01$); Blank control group, Lipid control group, NC control group, no significant difference ($P > 0.05$), see Figure 1.

2.3 Hoechst33342 staining method detection of cell morphology changes After cell transfection with siDNA-PKcs, cell volume decreased, cell nucleus edge, bright blue; Control group cell morphology no obvious change, cell transfection with siDNA-PKcs after apoptosis phenomenon, see Figure 2.

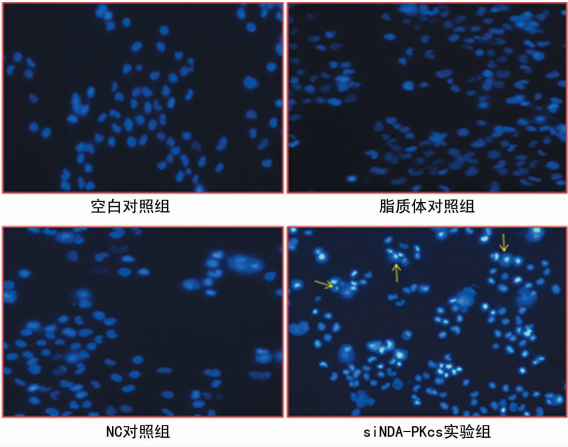


Figure 2 Cell apoptosis morphology images (Hoechst33342 staining, ×100)

2.4 Flow cytometry technology detection of cell apoptosis When cells were transfected with siDNA-PKcs, the results of flow cytometry detection showed that the apoptosis rate of the siDNA-PKcs experimental group was significantly increased compared to the other groups ($P < 0.01$); Blank control group, Lipid control group, NC control group, no significant difference ($P > 0.05$), see Figure 3.

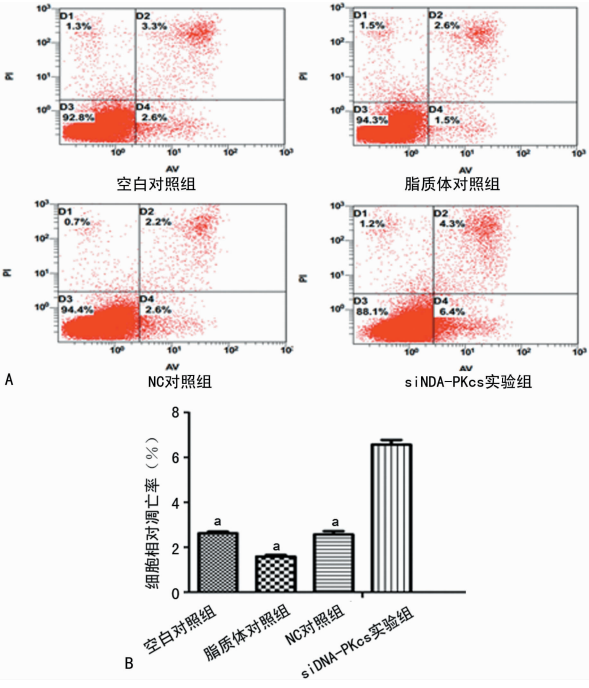
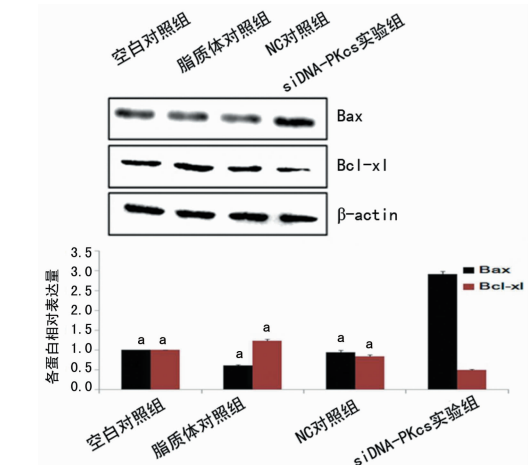


Figure 3: siDNA-PKcs effect on cell apoptosis flow analysis. A: Flow cytometry detection of cell apoptosis; B: Semi-quantitative analysis of cell apoptosis in each group.

Figure 3 siDNA-PKcs effect on cell apoptosis flow analysis

2.5 Western blot detection of Bax, Bcl-xl protein expression When cells were transfected with siDNA-PKcs, the results of Western blot detection showed that the expression of Bax protein was upregulated, Bcl-xl protein expression was downregulated, compared to the other groups, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), see Figure 4.



^a: $P < 0.01$, 与 siDNA-PKcs 实验组比较

图 4 siDNA-PKcs 影响 Bax、Bcl-xl 蛋白表达的分析 (Western blot)

3 讨论

HCC 是常见的恶性肿瘤之一,临床主要采用以手术为主的联合多种方法的综合治疗,其中化疗对肿瘤的治疗具有重要的意义,但化疗过程中容易形成 MDR 而影响肿瘤的治疗效果。肿瘤耐药是一个多重因素综合作用的复杂过程,如肿瘤细胞凋亡通路受阻^[5]、DNA 损伤修复能力增强等。DNA-PKcs 是 DNA-PK 的催化亚单位,DNA-PKcs 有很多磷酸化位点,可通过自身磷酸化或磷酸化下游分子参与细胞内的多种生物学活动,包括参与双链断裂的 DNA 修复^[6-7]和细胞凋亡途径的信号传导等^[8]。DNA-PKcs 在不同的细胞活动中发挥了不同的生物学功能。

在胃癌细胞中,当抑制 PARP1 的活性时,增加了 DDP 诱导的 DNA 损伤和细胞凋亡,其机制是通过影响 DNA-PKcs 的稳定性,从而减少 DNA 损伤修复的能力,提高化疗敏感性^[9]。HU 等^[10]研究胰腺癌细胞发现,抑制细胞 DNA-PKcs 的表达会增加细胞的化疗敏感性。当 DNA-PKcs 的功能缺失时,将引起 A549 细胞 ATM 的激活和 p53 的反应,进一步调控细胞周期^[11]。DNA-PKcs 具有调节细胞凋亡的功能^[12]。ZOU 等^[13]报道发现,DNA-PKcs 与 Bcl-2 呈正相关。当 siRNA 沉默人肝癌 HepG2 中 DNA-PKcs 表达后,激活 Caspase-3 和 p53,同时下调 Bcl-2 和外源谷胱甘肽(GSH)的表达,通过抑制磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/核因子-kappaB (PI3K/Akt/NF-κB) 途径,促进顺铂(DDP)和 5-Fu 联合应用引起的细胞凋亡及 DNA 损伤^[14]。下调骨肉瘤细胞中 DNA-PKcs 表达后,以增进凋亡^[15]和 G1 阻滞提高细胞对顺铂的敏感性^[16]。以上研究结果提示 DNA-PKcs 可能通过对不同途径或凋亡通路中的分子进行调控,从而影响不同肿瘤细胞的耐药性。本实验中,当 HCC 耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的 DNA-PKcs 表达沉默后,形态学检

测结果显示,细胞体积缩小,染色质边聚,呈亮蓝色,这些形态学上的改变提示细胞出现凋亡现象。进一步用流式细胞术检测凋亡,结果显示凋亡率增加。同时,免疫印迹检测 Bax、Bcl-xl 蛋白表达水平,结果显示 Bax 蛋白表达水平增加、Bcl-xl 蛋白表达水平减少,提示沉默 DNA-PKcs 的表达能促进 HCC 耐药细胞 Bel7402/5-Fu 的细胞凋亡,增加化疗敏感性。这说明 DNA-PKcs 可通过细胞某个凋亡途径影响肝癌细胞的耐药,其机制可能与 siDNA-PKcs 上调 Bax 蛋白表达水平和下调 Bcl-xl 蛋白表达水平有关,但具体的机制还需进一步的实验研究。

参考文献

- [1] YAN J,ZHOU Y,CHEN D X,et al. Effects of mitochondrial translocation of telomerase on drug resistance in hepatocellular carcinoma cells[J]. J Cancer, 2015, 6(2): 151-159.
- [2] LIU X X,SUN C,JIN X D,et al. Genistein sensitizes sarcoma cells in vitro and in vivo by enhancing apoptosis and by inhibiting DSB repair pathways[J]. J Radiat Res, 2016, 57(3): 227-237.
- [3] 梁大敏,束波,杨加伟,等. shRNA 沉默 DNA-PKcs 表达对肝癌耐药细胞 BEL7402/5-FU 耐药性的影响[J]. 遵义医学院学报, 2014, 37(3): 304-307.
- [4] ZHANG Z H,FAN X Y,ZHAO Z T,et al. RNA interference targeting DNA-PKcs inhibits glioma cells malignancies and enhances temozolomide sensitivity[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2017, 97(31): 2463-2467.
- [5] 石迪. 肿瘤多药耐药的研究现状及进展[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(5): 1074-1076.
- [6] DONG J,ZHANG T,REN Y F,et al. Inhibiting DNA-PKcs in a non-homologous end-joining pathway in response to DNA double-strand breaks[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 22662-22673.
- [7] VAN OORSCHOT B,GRANATA G,DI FRANCO S,et al. Targeting DNA double Strand break repair with hyperthermia and DNA-PKcs inhibition to enhance the effect of radiation treatment[J]. Oncotarget, 2016, 7(40): 65504-65513.
- [8] JIA L,LU X A,LIU G H,et al. Endostatin sensitizes p53-deficient non-small-cell lung cancer to genotoxic chemotherapy by targeting DNA-dependent protein kinase catalytic subunit[J]. J Pathol, 2017, 243(2): 255-266.
- [9] WANG Q,XIONG J P,QIU D P,et al. Inhibition of PARP1 activity enhances chemotherapeutic efficiency in cisplatin-resistant gastric cancer cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017(92): 164-172.
- [10] HU H,HE Y,WANG Y D,et al. micorRNA-101 silences DNA-PKcs and sensitizes pancreatic cancer(下转第 3141 页)

论著 · 基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.004

秋龙筋中药制剂对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠的降糖作用及机制研究

林文东¹,杨维群^{1△},施水液²,张美佳²,程 晶¹,洪建兵³

(1.泉州医学高等专科学校基础医学部,福建泉州 362000;2.福建省晋江市中西医结合医院内科 362200;
3.福建省泉星生物有限公司,福建南安 362300)

[摘要] **目的** 探讨秋龙筋中药制剂对链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病大鼠的降糖作用及作用机制,为进一步深入开发提供依据。**方法** 将 24 只大鼠分为正常组、模型组、阳性药组及实验组,模型组、阳性药组及实验组使用 STZ 诱导造模。正常组及模型组给予生理盐水,阳性药组给予盐酸二甲双胍,实验组给予秋龙筋中药制剂干预。给药结束后检测血清学指标;采集肝脏组织,检测肝糖原水平。**结果** 实验组大鼠血中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、空腹血糖(FBG)、丙二醛(MDA)、游离脂肪酸(FFA)、糖化血红蛋白(GHb)、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平明显低于模型组,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、肝糖原水平明显高于模型组($P<0.05$)。**结论** 采用秋龙筋中药制剂对 STZ 诱导糖尿病大鼠干预后,可有效降低其体内血糖水平,提高胰腺 β 细胞功能。

[关键词] 链脲菌素;糖尿病,实验性;秋龙筋中药制剂;降糖作用;机制
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3138-04

Study on hypoglycemic effect and related mechanism of Qiulongjin Chinese medicine preparation on STZ-induced diabetic rats

LIN Wendong¹,YANG Wiequn^{1△},SHI Shuiye²,ZHANG Meijia²,CHENG Jing¹,HONG Jianbing³

(1. Department of Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian 362000, China;
2. Internal Medicine, Jinjiang Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Jinjiang, Fujian 362200, China; 3. Fujian Spring Star Biological Co., Ltd., Nanan, Fujian 362300, China)

[Abstract] **Objective** To study the hypoglycemic effect and mechanism of Qiulongjin Chinese medicine preparation on STZ-induced diabetic rats. **Methods** Twenty-four rats were divided into the normal group, model group, positive drug group and experimental group. The model group, positive drug group and experimental group used STZ to induce the model construction. The normal group and model group were given normal saline, the positive drug group was given metformin hydrochloride, and the experimental group was given Qiulongjin Chinese medicine preparation intervention. The serological indexes were detected at the end of medication. Liver tissue was collected and liver glycogen level was detected. **Results** The levels of LDL-C, TC, TG, FBG, MDA, FFA, GHb, NO and TNF-α in the experimental group were significantly lower than those in the model group, while the levels of HDL-C, SOD, GSH and liver glycogen were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Adopting Qiulongjin Chinese medicine preparation for conducting the intervention on STZ-induced diabetic rats could effectively decrease the blood glucose level and increases the pancreatic β cellular function.

[Key words] streptozocin; diabetes mellitus, experimental; Qiulongjin Chinese medicine preparation; hypoglycemic effect; mechanism

糖尿病是因胰岛素分泌量绝对或相对不足而导致的脂肪、糖、蛋白质代谢紊乱等为特点的内分泌性疾病^[1]。随着我国人民生活水平的改善,经济条件的发展,糖尿病的临床发病率越来越高,已成为严重威胁人民生活健康的主要威胁之一^[2]。现阶段临床试验仍在积极探索治疗糖尿病的有效方法,这也是目前医疗学术研究一个热点^[3]。秋龙筋中药制剂是民间中医自拟方,有改善糖尿病症状的作用。本研究选择

作者简介:林文东(1979—),实验师,本科,主要从事动物实验与基础医学实验方面的研究。 △ 通信作者, E-mail:745687571@qq.com。

链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病大鼠为实验对象,对秋龙筋中药制剂的降糖作用及机制进行研究,为该民间方药的进一步深入开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究选取 24 只 6~7 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠(合格证编号:2015000509957、2015000510718),体质量 200~241 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号:SCXK(沪)2012-0002],所有大鼠均置于相对湿度为 45%~60%,光照 12 h,温度为 23~25 ℃的环境中饲养,实验场所是泉州医学高等专科学校屏障系统动物实验室[许可证号:SYXK(闽)2016-0001]。

1.1.2 主要仪器 本研究中所用 ST-360 型酶标仪,购自上海科华实验系统有限公司,T6 紫外可见分光光度计购自北京普利生有限公司。

1.1.3 试剂与药物 秋龙筋中药制剂为民间中医自制方剂,组方:中草药秋龙筋 35 g,野山参 3 g,太子参 5 g,天花 5 g,葛根 5 g。用约 1.50 L 水先浸泡 30 min,中火烧开后改用温火,煎约 20 min,药水剩下约 0.50 L,沉淀后倒出;另加水 1.00 L 继续烧开后约剩 0.25 L 时,倒出与第 1 遍药水混合使用。

盐酸二甲双胍购自中美上海施贵宝制药有限公司(国药准字 H20023371);STZ 购自美国 Sigma 公司;氢氧化钠、柠檬酸均购自上海国药集团;高脂高糖饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2017-0008];胰岛素 ELISA 试剂盒购自默克公司;高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、葡萄糖测定试剂盒均购自艾康生物技术(杭州)有限公司;一氧化氮(NO)试剂盒、糖化血红蛋白(GHb)试剂盒、肝糖原、游离脂肪酸(FFA)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;C 肽(C-P)试剂盒、胰岛素(Fins)试剂盒、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)试剂盒均购自武汉默沙克生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模及给药 本研究选用 24 只雄性 SD 大鼠,饲养 3 d 后,采用随机数字表法随机分为 4 组,即正常组、模型组、阳性药组、实验组,每组 6 只。模型组、阳性药组、实验组大鼠均使用 1%STZ 腹腔注射 55 mg/kg,使用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 0.01 mol/L 造模,用高脂高糖饲料进行喂养,正常组注射等体积缓冲液。造模完成 48 h 后,采集尾静脉血检测血中空腹血糖,若血糖水平大于 16.7 mmol/L 则判定造

模成功。阳性药组每天早上 9 点灌胃给药盐酸二甲双胍,给药浓度为 150 mg/kg;实验组同时时间点灌胃给药秋龙筋中药制剂,给药浓度为 200 mg/kg;模型组及正常组同期灌胃等体积的生理盐水,每天 1 次,连续给药 28 d。实验全程所有大鼠均自由饮水,饲养标准颗粒饲料。

1.2.2 检测指标 每组动物在实验结束后乙醚麻醉,腹主动脉取血,检测血清中空腹血糖(FBG)、TG、TC、LDL-C、HDL-C、INS、GHb、SOD、C-P、谷胱甘肽(GSH)、MDA、SOD、FFA、NO 及 TNF-α 水平,所有操作均严格遵照试剂盒说明书进行操作。采集肝脏组织,检测肝糖原水平,严格遵照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 处理数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠给药前后体质量变化情况 给药后模型组、阳性药组及实验组 3 组大鼠体质量明显低于正常组($P < 0.05$),阳性药组及实验组大鼠体质量明显高于模型组($P < 0.05$),且实验组大鼠体质量明显低于阳性药组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠给药前后体质量比较($\bar{x} \pm s$,g)			
组别	<i>n</i>	给药前	给药后 28 d
正常组	6	287.21±13.21	365.28±14.29
模型组	6	290.32±15.78	242.31±17.42 ^a
阳性药组	6	289.38±14.88	334.21±16.35 ^{ab}
实验组	6	291.34±14.82	310.64±15.98 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与正常组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较;^c: $P < 0.05$,与阳性药组比较

2.2 给药后各组大鼠血脂及血中 FBG、Fins、C-P 水平变化情况 与正常组及阳性药组相比,模型组及实验组大鼠血中 TG、TC、LDL-C 水平明显较高,HDL-C 水平明显较低($P < 0.05$);实验组大鼠血中 TG、TC、LDL-C 水平明显低于模型组,HDL-C 水平明显高于模型组($P < 0.05$)。模型组及实验组大鼠血中 FBG 水平高于正常组及阳性药组($P < 0.05$),Fins 及 C-P 水平明显低于正常组及阳性药组($P < 0.05$),实验组大鼠血中 FBG 水平低于模型组($P < 0.05$),Fins 及 C-P 水平明显高于模型组($P < 0.05$),见表 2。

2.3 给药后各组大鼠血中 SOD、MDA、GSH、FFA、GHb、NO、肝糖原及 TNF-α 水平检测结果 与正常组及阳性药组比较,模型组及实验组血中 MDA 水平明显较高,SOD 及 GSH 水平明显较低($P < 0.05$);实

表 2 给药后各组大鼠血脂及血中 FBG、Fins、C-P 水平检测结果(̄x±s)

组别	n	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	FBG(mmol/L)	Fins(mIU/L)	C-P(pg/L)
正常组	6	0.64±0.21	2.20±0.34	1.35±0.21	1.48±0.13	6.21±0.56	21.42±3.19	368.28±20.31
模型组	6	1.95±0.33 ^a	3.75±0.41 ^a	2.62±0.35 ^a	0.94±0.11 ^a	19.83±2.19 ^a	14.22±2.34 ^a	227.38±13.21 ^a
阳性药组	6	0.72±0.18 ^{ab}	2.33±0.29 ^b	1.42±0.33 ^{ab}	1.42±0.14 ^{ab}	6.42±0.74 ^b	20.98±2.42 ^b	357.14±32.38 ^b
实验组	6	1.22±0.11 ^{abc}	2.69±0.28 ^{abc}	1.89±0.26 ^{abc}	1.13±0.09 ^{abc}	11.23±1.21 ^{abc}	18.38±1.84 ^{abc}	321.38±21.94 ^{abc}

^a:P<0.05,与正常组比较;^b:P<0.05,与模型组比较;^c:P<0.05,与阳性药组比较

表 3 给药后各组大鼠血中 SOD、MDA、GSH、FFA、GHb、NO、肝糖原及 TNF-α 水平检测结果(̄x±s)

组别	n	SOD(U/L)	MDA(nmol/L)	GSH(mg/L)	FFA(μmol/L)	GHb(mmol/L)	NO(μmol/L)	肝糖原(mg/g)	TNF-α(pg/L)
正常组	6	85.34±4.29	4.99±0.64	3.81±0.54	268.93±43.25	17.03±0.85	27.48±5.32	12.28±1.04	102.32±12.25
模型组	6	71.47±4.36 ^a	9.54±1.21 ^a	2.13±0.32 ^a	522.38±38.43 ^a	24.84±1.13 ^a	52.38±8.39 ^a	7.32±0.87 ^a	129.48±14.34 ^a
阳性药组	6	84.53±5.15 ^b	5.02±0.57 ^b	3.78±0.41 ^b	291.44±37.65 ^b	17.84±0.74 ^b	28.84±6.84 ^b	11.52±1.21 ^b	100.94±15.29 ^b
实验组	6	79.38±4.12 ^{abc}	7.13±0.98 ^{abc}	3.09±0.62 ^{abc}	321.43±39.47 ^{abc}	19.32±0.94 ^{abc}	32.55±6.19 ^{abc}	9.12±0.91 ^{abc}	110.84±13.27 ^{abc}

^a:P<0.05,与正常组比较;^b:P<0.05,与模型组比较;^c:P<0.05,与阳性药组比较

验组血中 MDA 水平明显低于模型组,SOD 及 GSH 水平明显高于模型组(P<0.05)。实验组大鼠血中 FFA、GHb、TNF-α 及 NO 水平明显低于模型组,肝糖原水平明显高于模型组(P<0.05);实验组大鼠 TNF-α 水平明显高于阳性药组(P<0.05),见表 3。

3 讨 论

维持机体内血糖水平稳定多是通过利用、贮存及转化血中葡萄糖的动态平衡实现的^[4]。C-P 也是人体内由胰腺 β 细胞合成并分泌的产物,因其不被肝脏代谢和摄取,也不受外源性胰岛素影响,所以血中 C-P 水平可作为评估胰腺 β 细胞功能的重要指标之一^[5]。有研究指出,在糖尿病早期,机体肾小球内皮细胞功能异常,导致大量生成 NO,而过量 NO 则会进一步转化为过硝酸根离子等自由基,通过其细胞毒作用对胰腺 β 细胞的功能及结构造成损害^[6]。

STZ 致糖尿病大鼠采用秋龙筋中药制剂给药后,机体 C-P 及胰岛素水平明显提高,NO 水平明显降低。本研究结果提示,秋龙筋中药制剂可能具有调节糖尿病大鼠受损的胰腺 β 细胞功能。有学者指出血糖水平与体内糖化血红蛋白水平呈明显正相关,机体内糖化血红蛋白水平可有效反映机体内蛋白质糖基化水平^[7]。秋龙筋中药制剂可有效降低糖尿病大鼠体内 GHb 及 FBG 水平,笔者分析认为这可能是通过上调大鼠体内肝糖原的合成并改善胰腺 β 细胞分泌功能而实现。

有研究指出,在 2 型糖尿病患者体内,可见明显的脂代谢紊乱症状,并伴有明显的 TC、TG、LDL-C 水平异常升高,HDL-C 水平异常降低^[8]。糖尿病大鼠体内氧化自由基水平增高,使细胞膜增强脂质过氧化作用,降低血中 GSH 及 SOD 水平,并提高 MDA 水平^[9]。采用秋龙筋中药制剂给药后,可有效提高糖尿

病大鼠血中 SOD、HDL-C 及 GDH 水平,并降低大鼠血中 MDA、TG、TC 及 LDL-C 水平。结果表明,秋龙筋中药制剂可减少脂质过氧化,清除自由基,有效防止糖尿病脂肪代谢并发症的发生及发展。

TNF-α 是机体内重要的具有多种生物活性的细胞活性因子,在机体免疫应答及炎性反应过程中起到重要的调节作用^[10-11]。有研究指出,脂肪组织是内源性 TNF-α 的主要来源,其参与机体内的诸多代谢过程,包括脂质代谢、胰岛素代谢、葡萄糖代谢等,在机体的胰岛素抵抗过程中起到十分重要的作用^[12]。TNF-α 可有效调节脂肪细胞基因,降低体内脂蛋白酯酶水平,抑制脂肪细胞分化,加速脂肪分解,并升高血清中 FFA 水平^[13-14]。研究指出,FFA 升高可加速糖异生,降低胰岛素清除率,使胰高血糖素水平升高,抑制糖原合成及骨骼肌利用葡萄糖作用,导致机体出现胰岛素抵抗^[15]。本研究结果显示,在 STZ 诱导的糖尿病大鼠血中,FFA 及 TNF-α 水平均明显升高,提示该模型大鼠可能出现胰岛素抵抗。而 STZ 诱导的糖尿病大鼠采用秋龙筋中药制剂干预后可有效降低其血中 FFA 及 TNF-α 水平,提示秋龙筋中药制剂可有效抑制胰岛素抵抗,调节胰岛素水平。

综上所述,采用秋龙筋中药制剂对 STZ 诱导糖尿病大鼠干预后,可有效降低体内血糖水平,提高胰腺 β 细胞功能,改善糖脂代谢紊乱及胰岛素抵抗,抗脂质过氧化并促进肝糖原合成。

参考文献

[1] MAHMOUD A M,AHMED O M,ASHOUR M B,et al. In vivo and in vitro antidiabetic effects of citrus flavonoids;a study on the mechanism of action[J]. Int J Diabetes Dev Ctries,2015,35(3):250-263.
[2] GAO D W,ZHAO M,QI X M,et al. Hypoglycemic effect

- of Gynostemma pentaphyllum saponins by enhancing the Nrf2 signaling pathway in STZ-inducing diabetic rats[J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(2): 221-230.
- [3] 李小英, 肖新华. 第 51 届欧洲糖尿病研究学会 (EASD) 年会热点聚焦[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2015, 31(11): 1004-1006.
- [4] LI Y G, JI D F, ZHONG S, et al. Hypoglycemic effect of deoxynojirimycin-polysaccharide on high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice via regulation of hepatic glucose metabolism[J]. Chem Biol Interact, 2015, 225(6097): 70-79.
- [5] MA Y G, ZHANG Y B, BAI Y G, et al. Berberine alleviates the cerebrovascular contractility in streptozotocin-induced diabetic rats through modulation of intracellular Ca^{2+} handling in smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Diabetol, 2016, 15(1): 63.
- [6] 吕娟, 白甫, 魏鹏飞. 姬松茸多糖对糖尿病大鼠氧自由基及炎症相关因子的影响[J]. 贵州医药, 2017, 41(2): 139-140.
- [7] SEINO Y, KAKU K, INAGAKI N, et al. Fifty-two-week long-term clinical study of luseogliflozin as monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise[J]. Endocr J, 2015, 62(7): 593-603.
- [8] 王俊, 于微, 徐健, 等. 2 型糖尿病患者脂代谢异常情况及血清载脂蛋白含量分析[J]. 卫生研究, 2016, 45(4): 587-592.
- [9] GHOLAMI M, HEMMATI M, TAHERI-GHAHFAROKHI A, et al. Expression of glucokinase, glucose 6-phosphatase, and stress protein in streptozotocin-induced diabetic rats treated with natural honey[J]. Int J Diabetes Dev Ctries, 2016, 36(1): 125-131.
- [10] Sabahi Z, Namadi S R, Moein M. Antidiabetic and synergistic effects study of anthocyanin fraction from berberis integerrima fruit on streptozotocin-induced diabetic rats model[J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 2(1): 43-50.
- [11] 张雪利. TNF- α , PARP 及施万细胞凋亡在糖尿病痛性周围神经病变中的作用[J]. 医学综述, 2015, 21(23): 4317-4319.
- [12] DOMEKOUO U L, LONGO F, TARKANG P A, et al. Evaluation of the antidiabetic and antioxidant properties of Morinda lucida stem bark extract in streptozotocin intoxicated rats[J]. Pak J Pharm Sci, 2016, 29(3): 903-911.
- [13] 李振, 宋国华, 肖强, 等. 高密度脂蛋白对脂肪细胞腺苷酸激活蛋白激酶的调节作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(9): 804-809.
- [14] CHIS I C, COSERIU A, SIMEDREA R, et al. In vivo effects of quercetin in association with moderate exercise training in improving Streptozotocin-Induced aortic tissue injuries[J]. Molecules, 2015, 20(12): 21770-21786.
- [15] 曹荟哲, 哈小琴, 李雪雁, 等. 游离脂肪酸致胰岛素抵抗的分子机制[J]. 解放军医学杂志, 2017, 42(1): 81-85.
- (收稿日期: 2018-02-11 修回日期: 2018-05-25)
-
- (上接第 3137 页)
- cells to gemcitabine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 483(1): 725-731.
- [11] FINZEL A, GRYBOWSKI A, STRASEN J, et al. Hyperactivation of ATM upon DNA-PKcs inhibition modulates p53 dynamics and cell fate in response to DNA damage[J]. Mol Biol Cell, 2016, 27(15): 2360-2367.
- [12] CALLÉN E, JANKOVIC M, WONG N, et al. Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes[J]. Mol Cell, 2009, 34(3): 285-297.
- [13] ZOU K, LIU C G, ZHANG Z, et al. The effect of elemene on lung adenocarcinoma A549 cell radiosensitivity and elucidation of its mechanism[J]. Clinics, 2015, 70(8): 556-562.
- [14] FANG Y, CHAI Z T, WANG D S, et al. DNA-PKcs deficiency sensitizes the human hepatoma HepG2 cells to cisplatin and 5-fluorouracil through suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 399(1/2): 269-278.
- [15] YF Z, LI S T, ZHU Y R, et al. Identification of DNA-PKcs as a primary resistance factor of salinomycin in osteosarcoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(48): 79417-79427.
- [16] LI X, TIAN J G, BO Q Y, et al. Targeting DNA-PKcs increased anticancer drug sensitivity by suppressing DNA damage repair in osteosarcoma cell line MG63[J]. Tumour Biol, 2015, 36(12): 9365-9372.
- (收稿日期: 2018-02-15 修回日期: 2018-05-10)

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.005

青蒿琥酯逆转人卵巢癌 3AO 细胞所致 T 淋巴细胞的免疫抑制研究

陈 晓,高英芳,张志敏,张雪玲,王 岩,郝红娟
(河北省石家庄市第四医院妇产科 050011)

[摘要] **目的** 研究新型抗瘤中药制剂青蒿琥酯(ART)对 T 淋巴细胞表面免疫因子的影响。**方法** 噻唑蓝(MTT)法筛选对卵巢癌 3AO 细胞增殖无明显影响的最高 ART 浓度。收集经 ART 预处理后的 3AO 细胞培养上清液(ART-S 组)及连续两次再培养上清液(ART-S₁ 组和 ART-S₂ 组),以不经 ART 作用的相应同步培养的 3AO 细胞培养上清液作对照(Con-S 组、Con-S₁ 组、Con-S₂ 组),以完全培养基代替 3AO 细胞培养上清液组为正常对照组(Con 组),流式细胞计数法分析各组上清液对 T 细胞表面 CD3 ϵ^+ 、CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 、IL-2R α^+ 免疫功能指标的影响。**结果** 对 3AO 细胞增殖无明显影响的最高 ART 浓度为 12.50 mg/L。Con 组的 CD3 ϵ^+ 、CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 、IL-2R α^+ 细胞表达阳性率分别为(86.07 $\pm$ 10.05)%、(25.09 $\pm$ 5.84)%、(39.11 $\pm$ 5.83)%。Con-S 组 3 项免疫指标明显受抑制,抑制率分别为(50.17 $\pm$ 8.02)%、(87.51 $\pm$ 9.17)%、(64.84 $\pm$ 9.74)%。ART 直接作用后可明显下调单纯的 3AO 肿瘤细胞所致的 3 项 T 细胞免疫功能抑制。**结论** 青蒿琥酯对人卵巢癌 3AO 细胞所致 T 淋巴细胞免疫功能有一定的逆转作用。

[关键词] 青蒿琥酯;卵巢肿瘤;3AO 细胞;免疫抑制;逆转
[中图法分类号] R73-36⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3142-04

Artesunate for reversing human ovarian cancer 3AO cell caused T lymphocytes immunosuppression
CHEN Xiao,GAO Yingfang,ZHANG Zhimin,ZHANG Xueling,WANG Yan,HAO Hongjuan
(Department of Gynecology and Obstetrics,Shijiazhuang Municipal Fourth
Hospital,Shijiazhuang,Hebei 050011,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of new type anti-tumor Chinese medicine artesunate (ART) on T lymphocyte surface immune factors by in vitro experiment. **Methods** The MTT method was used to screen the maximum ART concentration without significant effect on human ovary caner 3AO cells proliferation. The 3AO cell culture supernatant and successive two times re-culture supernatants after ART treatment were collected as the ART-S group,ART-S₁ group and ART-S₂ group,and corresponding synchronized 3AO cell culture supernatant without ART action served as the control groups (Con-S group,Con-S₁ group and Con-S₂ group),the complete medium instituting the 3AO cell culture supernatant served as the normal control group (Con group). The effects of supernatant in each group on T lymphocyte surface immune functional indexes of CD3 ϵ^+ ,CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ and IL-2R α^+ were analyzed by using flow-cytometry. **Results** The maximum ART concentration without significant effect on 3AO cell proliferation was 12.50 mg/L. The expression positive rates of CD3 ϵ^+ ,CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ and IL-2R α^+ cells in the Con group were (86.07 $\pm$ 10.05)%, (25.09 $\pm$ 5.84)% and (39.11 $\pm$ 5.83)% respectively. Those indexes in the Con-S group were significantly repressed ($P<0.05$),the suppression rates were (50.17 $\pm$ 8.02)%, (87.51 $\pm$ 9.17)% and (64.84 $\pm$ 9.74)% respectively. After ART direct action,the suppression of 3 T lymphocyte immune function caused by simply 3AO tumor cell was obviously down-regulated. **Conclusion** ART has a certain reversion effect on T lymphocyte immune function caused by human ovarian cancer 3AO cells.

[Key words] artesunate;ovarian neoplasms;3AO cells;immunosuppression;reversion

卵巢癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,确诊时多数已至晚期,预后较差。目前,临床多采用手术切除及术后化疗方法治疗,但 80% 患者会出现复发和病灶转移^[1]。医学界对卵巢癌的发病机制进行了深入的研究,发现卵巢癌细胞分泌的多种免疫因子异常超表达,从而使机体处于免疫抑制状态,并导致肿瘤细胞

的“免疫逃逸”^[1]。随着肿瘤免疫学的广泛研究,肿瘤免疫生物学治疗已经成为肿瘤治疗的新型辅助治疗模式,具体包括抗体免疫导向疗法、接种肿瘤疫苗的特异性主动免疫疗法、癌基因表达封闭及抑癌基因恢复的基因疗法、肿瘤血管生成拮抗方法、表观遗传修饰等^[2]。然而,上述几种肿瘤免疫疗法多处于试验研

究阶段,缺点为作用靶点单一,且毒副反应较明显。抗癌中药制剂具有多靶点的优点,不仅可明显干扰肿瘤细胞的增殖,上调机体免疫功能,还可增强放化疗敏感性、降低毒副反应^[3]。本课题组前期的试验结果显示,砷剂、黄芪、川芎嗪、猪苓多糖、苦参碱和青蒿素衍生物等可有效逆转结直肠癌所致免疫抑制,弥补放化疗和肿瘤生物制剂在临床使用中的不足^[4]。其中,青蒿琥酯(ART)可抑制自然杀伤细胞(NK)杀伤抑制及结直肠癌细胞株 Colon26 所致的 CD3 ϵ - ζ ⁺ 表达抑制,但其在卵巢癌免疫抑制中的作用鲜见相关报道。本研究旨在原有报道的基础上,体外试验研究 ART 对卵巢癌所致 T 细胞免疫抑制的影响,以进一步验证 ART 具有逆转肿瘤免疫抑制的作用,为解决卵巢癌治疗中的瓶颈难题提供新思路和新依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 人卵巢癌 3AO 细胞为河北医科大学基础医学院免疫教研室宋淑霞教授惠赠。外周血取自健康的女性志愿者(共 20 名),年龄 17~22 岁,平均(19.33 $\pm$ 1.45)岁,所有志愿者均已知情同意,本研究操作均遵循石家庄市第四医院科学规范。

1.1.2 主要试剂 DMEM 购自北京海克隆生物化学制品有限公司;标准胎牛血清购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;植物血凝素(PHA)、噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司;二甲亚砜(DMSO)购自天津市永大化学试剂开发中心;淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司;青蒿琥酯粉剂购自桂林南药股份有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD3 ϵ 单抗(CD3-FITC)及 CD4 单抗(CD4-PE)、藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗人 CD25(IL-2R α)单抗(CD25-PE)及 CD247(CD3 ζ 链)单抗(CD247-PE)购自美国 eBioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 试验分组 按照细胞培养上清液进行分组。完全培养基组为正常对照(Con)组,不含及含 ART 的完全培养基组分别为 Con-S 组和 ART-S 组,连续两次 ART 再培养组为 ART-S₁ 组及 ART-S₂ 组,不经 ART 作用的同步两次再培养组为 Con-S₁ 组及 Con-S₂ 组。

1.2.2 人外周血单个核细胞(PBMC)的制备 抽取健康女性志愿者外周血 15~20 mL 入抗凝管, Hank's 液 1.5 倍稀释,淋巴细胞分离液沿管壁缓慢加入(淋巴细胞分离液与稀释前血液等体积),保持清晰的分层状态。2 000 r/min 离心 20 min 后吸取液体界 PBMC 层入新离心管, Hank's 液轻柔清洗,加完全培养液制备细胞悬液。

1.2.3 MTT 法检测 0.25%胰蛋白酶消化处于对数增长期的 3AO 细胞,完全培养基重悬至 2 $\times$ 10⁸/L,

接种于 96 孔板 48 h。细胞培养结束前 4 h,每孔加入 MTT(5 g/L) 20 μ L。细胞培养结束后离心弃上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,酶联免疫检测仪检测 A_{492 nm} 值。

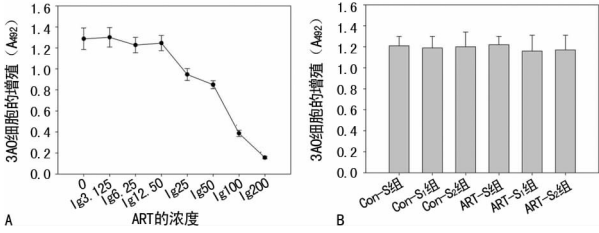
1.2.4 ART 作用及作用后再培养的 3AO 细胞培养上清液的制备 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期 3AO 细胞,分别用不含和含 ART 的完全培养基重悬至 2 $\times$ 10⁸/L,使 ART 的终浓度为 12.50 mg/L。预试验已证明 12.50 mg/L 的 ART 对 3AO 细胞增殖无明显影响。培养 48 h 后收集不含及含 ART 作用的细胞培养上清液(Con-S 组和 ART-S 组)。彻底清洗掉残余药物,重悬细胞至初始接种浓度,收集连续两次 ART 再培养上清液(ART-S₁ 及 ART-S₂),以不经 ART 作用的同步再培养上清液(Con-S₁ 组及 Con-S₂ 组)作对照。台盼蓝染色法进行活细胞计数,MTT 法进行细胞增殖率检测(A_{492 nm} 值),细胞培养上清液-70 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.5 ART 对 T 淋巴细胞表面活化信号分子表达的影响 参考文献[5]报道,培养瓶中分别加入 0.25 mL 的 PBMC(1 $\times$ 10⁷/mL)和 PHA(20 mg/L)及 0.5 mL 的待测上清液,以完全培养基为正常对照(Con 组)。培养 48 h 后消化、重悬细胞,并取 1 $\times$ 10⁶ 个细胞分别加入 CD4-FITC 及 CD25-PE 或 CD3-FITC 及 CD247-PE 单抗各 20 μ L,室温避光孵育 20 min。离心弃上清液后悬浮细胞,流式细胞仪检测 CD3 ϵ ⁺、CD3 ϵ ⁺ ζ ⁺、IL-2R α ⁺ 阳性细胞表达百分率,表达抑制率(%)=[(Con 组阳性细胞表达百分率-Con-S 和 ART-S 各组阳性细胞表达百分率)/Con 组阳性细胞表达百分率] $\times$ 100%。相同荧光素标记的人 Isotype IgG 作为阴性对照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行方差齐性分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, F 检验进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), q 检验进一步对多个样本间进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试验用 ART 浓度的确定 添加不同浓度的 ART 作用于 3AO 细胞,MTT 检测结果显示,最高浓度为 12.50 mg/L 的 ART 对 3AO 细胞增殖与 Con 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1A。ART-S 和 Con-S 组的培养基作用 3AO 细胞 48 h 及作用后连续两次再培养 3AO 细胞,MTT 法结果显示,与未经 ART 作用同步培养的 3AO 细胞相比,12.50 mg/L 的 ART 未明显影响细胞增殖($P>0.05$),见图 1B。本课题组考察了 Con 组、Con-S 组和 Con-S₁ 组、Con-S₂ 组对 PMBC 增殖的影响,MTT 检测结果显示,各组的 A_{492 nm} 值分别为 0.28 $\pm$ 0.03、0.29 $\pm$ 0.06、0.29 $\pm$ 0.05 和 0.28 $\pm$ 0.04,差异无统计学意义($P>0.05$)。



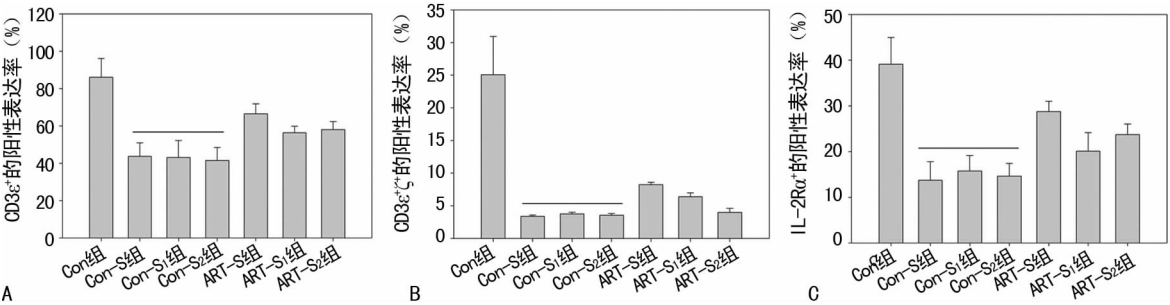
A:不同浓度的 ART 细胞的 A₄₉₂ nm 值;B:各组细胞的 A₄₉₂ nm 值

图 1 MTT 法检测结果

2.2 ART 对 3AO 细胞所致 T 淋巴细胞表面活化信号分子表达抑制的影响 在 Con 组,淋巴细胞 CD3 ϵ^+ 、CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 、IL-2R α^+ 阳性细胞百分率分别为 (86.07 $\pm$ 10.05)%、(25.09 $\pm$ 5.84)%、(39.11 $\pm$ 5.83)%。Con-S 组、Con-S₁ 组和 Con-S₂ 组中 3 项免疫功能指标均明显受抑 ($P<0.05$)。与 Con-S 组相比,ART-S 组中 T 淋巴细胞表面 CD3 ϵ^+ 、CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 、IL-2R α^+ 的表达抑制明显下降 ($P<0.05$)。ART-S₁

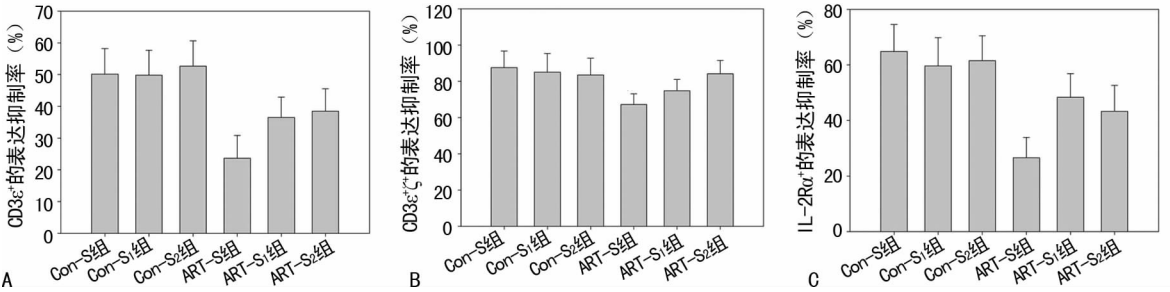
组对免疫功能抑制作用与 Con-S₁ 组相比均明显降低 ($P<0.05$)；ART-S₂ 组对 CD3 ϵ^+ 及 IL-2R α 表达抑制的逆转作用与 Con-S₂ 组相比明显增加 ($P<0.05$)，但是对 CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 的表达抑制无明显逆转作用 ($P>0.05$)，见图 2。

2.3 ART 对 T 淋巴细胞表面活化信号分子表达抑制率的影响 在 Con-S 组中,CD3 ϵ^+ 、CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 、IL-2R α^+ 阳性细胞表达抑制率分别为 (50.17 $\pm$ 8.02)%、(87.51 $\pm$ 9.17)%、(64.84 $\pm$ 9.74)%。与 Con-S 组相比,ART-S 组中 CD3 ϵ^+ 、CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 、IL-2R α^+ 表达抑制率明显降低 ($P<0.05$)。与 Con-S₁ 组和 Con-S₂ 组相比,ART-S₁ 组和 ART-S₂ 组对 CD3 ϵ^+ 、IL-2R α^+ 的表达抑制率有明显下调 ($P<0.05$)，Con-S₂ 组与 ART-S₂ 组中 CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 的表达抑制率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 3。



A:各组 CD3 ϵ^+ 的阳性表达;B:各组 CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 的阳性表达;C:各组 IL-2R α^+ 的阳性表达

图 2 ART 对 T 淋巴细胞表面 3 种免疫功能指标表达的影响



A:各组 CD3 ϵ^+ 的表达抑制率;B:各组 CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 的表达抑制率;C:各组 IL-2R α^+ 的表达抑制率

图 3 ART 对 T 淋巴细胞表面 3 种免疫功能指标的抑制效率

3 讨 论

卵巢癌是严重危害女性身心健康的恶性肿瘤之一^[6]。常规采用的手术切除和放化疗治疗后患者 5 年生存率不足 30%^[7]，手术及术后放化疗多加重卵巢癌所致的免疫抑制。

患者被诊断为卵巢癌时多数已至癌症晚期,此时肿瘤细胞已经跨过“免疫消除”和“免疫均衡”阶段,进入到“免疫逃逸”阶段^[8]。经典的手术及术后化疗会进一步加重免疫抑制。因此,寻找具有肿瘤免疫抑制作用的逆转类药物成为肿瘤治疗的关键所在,但此类药物目前尚处于试验阶段,初步研究结果与目标疗效尚有一定差距。

考虑到抗癌中医制剂具有清热解毒、以毒攻毒、活血化瘀、化痰祛湿、软坚散结、扶正祛邪的作用特点^[5],本课题组前期选取苦参碱和青蒿素衍生物(清热解毒类)、砷剂(以毒攻毒类)、川芎嗪(活血化瘀类)、猪苓多糖(软坚散结类)、黄芪(扶正祛邪类)6 味中药,研究其在直肠癌所致免疫抑制中的逆转作用,结果显示我国科学工作者自主研发的抗癌药 ART 对结直肠肿瘤免疫抑制的下调效应强而持久^[9]。另有文献报道,ART 抑制人 Tenon 囊成纤维细胞和人肺腺癌细胞系 A549 的增殖^[10-11],并将乳腺癌细胞阻滞在 G₂/M 期^[12],提示 ART 具有抑制肿瘤细胞增殖作用。与现有的抑瘤药物相比,ART 注射液制剂具有

起效较快、作用较强,促进肿瘤细胞的分化和凋亡、调控肿瘤新生血管形成的作用^[13],但其对卵巢癌免疫抑制的影响尚未见报道。

CD3 ζ 链是一种受体激活的蛋白酪氨酸激酶底物,受体与配体的结合导致 ζ 链发生酪氨酸磷酸化,参与淋巴细胞胞内活化信号的转导。CD3 ϵ 链基因缺陷可致 T 细胞信号传导缺陷^[14]。IL-2R 分布于活化的 T 细胞、NK 细胞和 B 细胞表面,其 α 链对形成高亲和力受体有重要意义。考虑到上述 3 种免疫因子在免疫细胞信号转导中的重要作用,本研究考察 ART 对其表达的调控作用。

肿瘤细胞自身分泌的免疫抑制物质可以引起肿瘤免疫抑制,且肿瘤细胞的分泌功能取决于自身的增殖活性。ART 超过一定浓度范围后可影响免疫细胞的增殖,在本研究中,12.50 mg/L ART 用 3AO 细胞 48 h,及连续两次 48 h 传代培养的细胞,其 $A_{492\text{ nm}}$ 值与未经药物作用同步对照培养的 3AO 之间差异无统计学意义($P>0.05$)。单纯的 3AO 细胞培养上清液对 PBMC 的增殖率的影响与完全培养基代替 3AO 细胞培养上清液的 Con 组相比也无明显差异,说明单纯的 3AO 细胞培养上清液对免疫细胞的增殖无影响。

本研究收集添加或不添加 ART(12.50 mg/L)的 3AO 细胞培养上清液,各种培养上清液处理 PBMC 后检测 ART 对 3AO 所致 T 淋巴细胞表面免疫因子的表达抑制是否具有逆转作用。流式细胞术结果显示,ART 可明显下调卵巢癌 3AO 细胞所致 CD3 ϵ^+ 、CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 和 IL-2R α^+ 的表达抑制,但是不可以完全消除表达抑制,提示 ART 可以与其他抗癌药物组方以调整癌症患者的免疫抑制。崔激等^[5]报道了 ART 明显下调小鼠结肠癌细胞 Colon26 所致 NK 细胞的杀伤抑制和脾细胞表面 CD3 $\epsilon^+\zeta^+$ 的表达抑制。本研究与崔激的研究结果一致,提示 ART 可能通过降低癌细胞所致靶细胞表面免疫因子的表达抑制,进而激活免疫应答反应。卵巢癌细胞可以分泌多种免疫抑制因子,使机体处于免疫抑制状态,是卵巢癌免疫抑制的机制之一^[1],本研究将在未来的工作中考察 ART 对卵巢癌细胞分泌免疫因子的影响,结合 ART 与其他抗癌药物联合用药对免疫抑制的逆转作用,以期获得逆转卵巢癌免疫抑制的最佳方剂。

目前,肿瘤免疫抑制作用是制约手术、放化疗及肿瘤生物治疗的瓶颈性难题,其中关键的是肿瘤细胞所致 T 淋巴细胞免疫抑制^[15]。因此,研发具有 T 淋巴细胞免疫抑制逆转效应的新型多靶点抗癌药物已经成为医学热点。本研究通过体外卵巢癌细胞的免疫抑制试验证明了 ART 对卵巢癌所致 T 淋巴细胞免疫抑制的下调有一定的逆转作用,初步证明了 ART 具有抗癌潜力,为考察 ART 的抗癌机制提供了理论依据。

参考文献

[1] 张红梅,徐娟,娄鉴芳,等. 卵巢癌患者外周血单个核细胞

Toll 样受体 2 的表达及其诱导的 IL-10 表达[J]. 南京医科大学学报,2014,34(4):490-494.

[2] 周游,孔祥银,蒋敬庭. 表观遗传修饰在肿瘤免疫治疗中的意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2016,23(5):727-731.

[3] TIN M M,CHO C H,CHAN K,et al. Astragalus saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft[J]. Carcinogenesis, 2007,28(6):1347-1355.

[4] LI G,ZENG Y,CHEN X,et al. Human ovarian tumour-derived chaperone-rich cell lysate (CRCL) elicits T cell responses in vitro[J]. Clin Exp Immunol,2007,148(1):136-145.

[5] 崔激,王润田,胡建军,等. 抗肿瘤中药制剂逆转结肠癌 NK 细胞免疫抑制的靶分子探讨[J]. 江苏医药,2011,37(5):509-512.

[6] KUBECEK O,LACO J,SPACEK J,et al. The pathogenesis, diagnosis, and management of metastatic tumors to the ovary;a comprehensive review[J]. Clin Exp Metastasis,2017,34(5):295-307.

[7] LE T,WILLIAMS K,SETERMAN M,et al. Histopathologic assessment of chemotherapy effects in epithelial ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and delayed primary surgical debulking[J]. Gynecol Oncol,2007,106(1):160-163.

[8] 崔激,王雅卓,郝淑维. 卵巢癌免疫生物学治疗策略研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(9):1282-1290.

[9] HENDRIKSEN I C,MTOVE G,KENT A,et al. Population pharmacokinetics of intramuscular artesunate in African children with severe malaria; implications for a practical dosing regimen[J]. Clin Pharmacol Ther,2013,93(5):443-450.

[10] 陈静,陈艺,邹秀兰,等. 青蒿琥酯对人 Tenon 囊成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. 眼科新进展,2017,37(6):523-526.

[11] 马宏境,曾妮,黄少祥. 青蒿琥酯对人肺腺癌细胞系 A549 增殖的抑制作用及机制[J]. 山东医药,2017,57(25):42-44.

[12] 寿柳梅,陈凯,林芳,等. 青蒿琥酯通过自噬通路诱导乳腺癌细胞 G₂/M 周期阻滞[J]. 中华实验外科杂志,2017,34(4):555-558.

[13] ZENG Q P,ZHANG P Z. Artesunate mitigates proliferation of tumor cells by alkylating heme-harboring nitric oxide synthase[J]. Nitric Oxide,2011,24(2):110-112.

[14] 张素倩,唐文静,吴俊峰,等. 1 例 CD3 ϵ 缺陷致重症联合免疫缺陷病的临床和免疫学特征分析[J]. 免疫学杂志,2016,32(5):421-425.

[15] LIN R,CHEN L,CHEN G,et al. Targeting miR-23a in CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression[J]. J Clin Invest, 2014, 124 (12): 5352-5367.

(收稿日期:2018-02-22 修回日期:2018-05-10)

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.006

脑白质病变与帕金森病伴认知功能障碍发生的相关性*

彭泽艳¹,董舒阳¹,周华东^{2△}

(1.蚌埠医学院研究生院,安徽蚌埠 233030;2.陆军军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

[摘要] **目的** 探讨脑白质病变(WML)与帕金森病(PD)患者认知功能障碍的相关性。**方法** 纳入 60 岁以上的 PD 患者 412 例,收集患者年龄、临床特征和磁共振 WML 影像学资料,并进行认知功能障碍的神经心理学评估。WML 的严重程度按 Fazekas 视觉模拟评分法分为 0~3 级。认知功能障碍分为轻度认知功能障碍(MCI)和痴呆。根据 PD 患者的认知功能状态,分为 PD 认知功能正常组(PD-NC 组, $n=329$)、帕金森轻度认知功能障碍组(PD-MCI 组, $n=46$)及帕金森痴呆组(PDD, $n=37$)。探讨 PD 患者认知功能障碍的危险因素,以及 WML 严重程度与 PD 患者认知功能障碍之间的关系。**结果** 在调整了混杂因素后,多因素 Logistics 回归分析结果显示 PD 患者的年龄、病程、低教育水平、高血压、糖尿病、高脂血症、UPDRS part III 评分及改良 H&Y 分期数值及 WML 是 PD 发生认知功能障碍的危险因素($P<0.05$)。同时 Logistics 回归分析结果显示,WML Fazekas 3 级与 PD-MCI 明显相关($OR=2.52,95\%CI:1.83\sim3.21$),同时 WML Fazekas 2 级及 Fazekas 3 级均与 PDD 明显相关(2 级, $OR=2.27,95\%CI:1.58\sim2.89$;3 级, $OR=2.86,95\%CI:1.94\sim3.87$)。**结论** WML 是 PD 患者的认知功能障碍一种重要的危险因素,同时 WML 的严重程度与 PD 患者的认知功能障碍发生存在明显相关性。

[关键词] 帕金森病;脑白质病变;认知功能障碍**[中图分类号]** R741**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3146-05**Correlation between cerebral white matter lesions and occurrence of Parkinson's disease complicating cognitive impairment***PENG Zeyan¹, DONG Shuyang¹, ZHOU Huadong^{2△}

(1. Postgraduate School, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030, China; 2. Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between the cerebral white matter lesions (WML) and cognitive impairment in the patients with Parkinson's disease (PD). **Methods** Four hundreds and twelve patients with PD aged more than 60 years old were included in this study. The data of age, clinical characteristics and MRI of WML were collected, and the neuropsychological evaluation of cognition function impairment was performed. The severity of WML was divided into the grade 0—3 according to the Fazekas visual analogue scale. The cognitive function impairment was divided into the mild cognitive impairment (MCI) and dementia. According to the cognitive function status of the PD patients, the cases were divided into the PD with normal cognitive function group (PD-NC group, $n=329$), PD with mild cognitive impairment group (PD-MCI group, $n=46$) and PD dementia group (PDD group, $n=37$). The risk factors of cognitive impairment in PD patients and the relationship between the severity of WML and cognitive impairment in the PD patients were investigated. **Results** After adjusting the confounding factors, the multivariate Logistic regression analysis results showed that the age, disease course, low educational level, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, UPDRS part III score, improved H&Y staging value and WML were the risk factors of cognitive impairment in PD ($P<0.05$). Meanwhile the Logistic regression analysis results indicated that the Fazekas grade 3 of WML was significantly correlated with PD-MCI ($OR=2.52,95\%CI:1.83-3.21$), meanwhile the Fazekas grade 2 and 3 of WML all were correlated with PDD (grade 2, $OR=2.27,95\%CI:1.58-2.89$; grade 3, $OR=2.86,95\%CI:1.94-3.87$). **Conclusion** WML is an important risk factor for cognitive function impairment in PD patients. And the severity of WML has significant correlation with the cognitive function impairment occurrence in PD patients.

[Key words] Parkinson disease; cerebral white matter lesions; cognitive function impairment

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81571258);蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(Byycx1613)。 作者简介:彭泽艳(1985—),住院医师,硕士,主要从事帕金森病、脑白质病变及认知功能障碍方面的研究。 △ 通信作者, E-mail:zhouhuad@163.com。

帕金森病(PD)和认知功能障碍是老年人群常见的、缓慢进展的神经退行性疾病,常在同一个老年个体中发生^[1]。有研究显示,65 岁以上的人群中 PD 的发生率为 1.7%,认知功能障碍的发生率为 5%~10%^[2-3]。随着中国老年人口的急速增加,PD 和认知功能障碍的防治已成为老年医学研究中的重点课题。20%~25% 的 60 岁以上的 PD 患者同时伴有认知功能障碍,其中约 17% 的 PD 患者伴有痴呆^[1]。目前 PD 患者认知功能障碍的病因及机制尚不完全清楚,其中高血压、糖尿病、血脂异常、吸烟、饮酒已经被证明与老年人群的 PD、认知功能障碍发生有关。随着磁共振成像(MRI)的发展和广泛应用,脑白质病变(WML)与 PD 和认知功能障碍的关系引起了神经病学研究学者的关注。WML 被认为是一种脑小血管疾病,通常在 MRI 的检查中可被观察到^[4],目前有不少研究已经证明 WML 与认知功能障碍的发生明显相关^[5]。有文献报道,在 65 岁以上的老年人群中,30%~55% 的 PD 患者伴有 WML^[6]。但是,目前仍少有文献研究 WML 对 PD 伴认知功能障碍发生所起的作用及相关作用机制。因此,本课题组对此进行研究,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 7 月至 2017 年 6 月在大坪医院野战外科研究所神经内科住院的 60 岁以上的 412 例 PD 患者纳入研究,其中男 223 例,女 189 例,平均年龄(69.7 ± 3.8)岁。纳入标准:年龄大于或等于 60 岁;被诊断为 PD;头颅 MRI 影像学资料完整;能配合神经心理学测试。排除标准:有明确脑卒中、脑外伤及颅内肿瘤病史;有其他可能引起锥体外系症状及运动功能障碍的疾病;非 PD 的痴呆或认知功能下降;有其他可能影响认知功能的神经系统疾病,如颅内感染、中枢神经系统脱髓鞘疾病、一氧化碳中毒等;因失语或其他原因不能配合神经心理评估。本研究获陆军军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会批准,所有研究对象签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床一般资料收集 入院后,收集所有纳入患者的年龄、性别、教育水平、BMI 等基本资料,以及吸烟、饮酒情况,高血压、糖尿病、高脂血症、冠心病、颅内肿瘤、脑卒中等病史。

1.2.2 PD 的诊断 PD 的诊断依照我国 2016 年制定的 PD 临床诊断标准^[7]。具体如下:诊断 PD 基于 3 个核心运动症状,即必须存在运动迟缓,并且至少存在静止性震颤或肌强直 2 项症状中的 1 项;上述症状必须显而易见。对患者 PD 症状严重程度的判断基于统一 PD 评定量表第 3 部分(UPDRS part III,运动检

查)及改良 Hoehn & Yahr 分期(H&Y)^[8-9]。UPDRS part III 量表共 14 项,每项按照相应症状严重程度不同为 0~4 分,无症状为 0 分,分数越高相应症状越重^[8]。改良 H&Y 分期按照症状严重程度不同分为 1~5 期共 7 个分期(包括 1.5、2.5 期),1 期仅有单侧症状;1.5 期有单侧症状及轴向(躯体)症状;2 期有双侧症状但无平衡功能障碍;2.5 期有轻度双侧症状,能从后拉测试中恢复;3 期为轻至中度的双侧症状,存在姿势不稳,但能自理;4 期为有严重的功能障碍,但站立和行走时不需要辅助;5 期为卧床或需轮椅辅助。分期数值越高,表示 PD 症状越重^[9]。

1.2.3 认知功能的评估 认知功能障碍的神经心理学评估方法:(1)采用简易精神状态评价量表(MMSE)中文版评价 PD 患者的认知状态。MMSE 量表共 10 项 30 分,低教育水平者(受教育年限小于 6 年)小于或等于 20 分,高教育水平者(受教育年限大于或等于 6 年)小于或等于 24 分,被诊断为认知功能障碍^[10]。(2)通过 Barthel 指数量表评价日常生活能力,共 10 项 100 分,分数越高代表患者独立生活能力越强,>60 分表示有轻度功能障碍,41~60 分为中度功能障碍,≤40 分为重度功能障碍^[11]。本研究中,轻度认知功能障碍(MCI)的患者 Barthel 指数评分应大于 60 分。(3)使用蒙特利尔认知评估量表(MoCA)对 PD 患者的各认知功能领域(注意力、执行力、记忆力、语言能力及视觉空间能力)进行评估^[12]。

1.2.4 WML 的诊断 WML 诊断标准:脑室旁和大脑深部区域在 T2WI 和 FLAIR 像呈高信号的斑块状或片状病变,并且排除留空信号^[13]。WML 严重程度的分级诊断基于 Fazekas 视觉模拟评分法^[5],分为 Fazekas 0~3 级共 4 个等级。(1)0 级表示无 WML;(2)1 级表示存在点状病灶:单个病灶直径小于或等于 9 mm,或簇状病灶直径小于 20 mm;(3)2 级表示存在融合的病变,但病变中无桥状连接:单个病灶面积 10~20 mm,或簇状病灶直径大于或等于 20 mm;(4)3 级表示存在融合的病变,但是单个或融合为病灶直径大于或等于 20 mm。

WML 的检测采用 3.0 T MRI 进行头颅扫描(德国 Siemens,MAGNETOM Verio 3.0T),自旋回波序列头部 T1WI、T2WI、FLAIR 轴位和 T1WI 矢状位扫描,T1WI 重复时间(TR)450 ms,回波时间(TE)15 ms,T2WI TR 4 000 ms,TE 120 ms。所有患者进行横断面扫描,层厚 3.0~6.0 mm,层间距 0.3~0.6 mm,根据需要进行矢状面及冠状面扫描。所有 MRI 影像的 WML 诊断均由有经验的神经内科医师进行评估。

1.2.5 PD-MCI 及 PDD 的诊断 PD-MCI 和 PDD

分别基于国际运动学会(MDS)于 2012 年及 2007 年制定的诊断标准^[14-15]。PD-MCI 的诊断标准为:(1)患者被确诊为 PD。(2)PD 患者认知功能逐渐下降。(3)神经心理测验已确认患者认知缺陷。(4)认知功能障碍不足以干扰功能独立性,但可能在复杂的功能任务上存在少许困难^[14]。PDD 的诊断标准为:(1)患者被确诊为 PD。(2)患者痴呆在 PD 发病后 1 年出现。(3)智能减退并影响患者日常生活。(4)患者的认知功能评估注意力、执行力、记忆力及视觉空间能力中有 2 项下降^[15]。根据认知功能状态的不同,将纳入研究的 PD 患者分为 PD 认知功能正常组(PD-NC 组, $n=329$)、PD 伴轻度认知功能障碍组(PD-MCI 组, $n=46$)及 PD 伴痴呆组(PDD 组, $n=37$)。

1.2.6 观察指标 所有符合入组标准的 PD 患者均收集临床一般资料,进行认知功能评估,完善颅脑 MRI 检查,并进行 PD-MCI、PDD 和 WML 的诊断。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验,计量资料符合正态分布、方差齐的数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,不服从正态分布的使用非参数检验。使用多因素 Logistic 回归分析 PD 患者认知功能障碍的危险因素及 WML 严重程度与 PD 患者认知功能障碍之间的关系,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PD 伴认知功能障碍的临床特点 与 PD-NC 组相比,PD-MCI 组和 PDD 组患者年龄明显较高,PD 病程明显较长,低教育水平、高血压、糖尿病、高脂血症、WML 发生的比例明显较高,UPDRS part III 评分及改良 H & Y 分期数值明显较高($P<0.05$),MMSE 评分和 Barthel 指数评分较低($P<0.05$)。同时,PDD 组与 PD-NC 组相比,BMI 明显较高,见表 1。

2.2 相关危险因素的 Logistics 回归分析 在调整了

年龄、BMI、PD 病程、低教育水平、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症、UPDRS part III 评分、改良 H & Y 分期及 WML 后,多因素 Logistics 回归分析结果显示年龄、PD 病程、低教育水平、高血压、糖尿病、高脂血症、UPDRS part III 评分、改良 H & Y 分期分值与 PD-MCI 和 PDD 明显相关,WML 也与 PD-MCI 和 PDD 明显相关($OR:2.28,95\%CI:1.63\sim2.85;OR:2.59,95\%CI:1.64\sim3.37$)。同时,BMI、吸烟与 PDD 也明显相关,见表 2。

2.3 WML 与 PD 伴认知功能障碍的关系 与 PD-NC 组患者相比,PD-MCI 组患者中 WML Fazekas 3 级的比例明显较高($19.6\% vs. 5.5\%,P=0.001$),同时 PDD 组患者中 WML Fazekas 2 级及 3 级的比例也明显较高($21.7\% vs. 7.3\%,P=0.003;29.7\% vs. 5.5\%,P=0.001$),见图 1。

表 1 PD 伴认知功能障碍的临床特点

项目	PD-NC 组 ($n=329$)	PD-MCI 组 ($n=46$)	PDD 组 ($n=37$)
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	69.2 $\pm$ 4.7	70.6 $\pm$ 4.1 ^a	71.3 $\pm$ 3.9 ^a
PD 病程($\bar{x}\pm s$,年)	3.2 $\pm$ 1.4	3.8 $\pm$ 1.7 ^a	4.1 $\pm$ 1.8 ^a
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	24.8 $\pm$ 1.9	25.3 $\pm$ 1.7	25.5 $\pm$ 1.8 ^a
男性[$n(\%)$]	179(54.4)	24(52.2)	20(54.1)
低教育水平[$n(\%)$]	104(31.6)	22(47.8) ^a	20(54.1) ^a
吸烟[$n(\%)$]	85(25.8)	17(37.0)	16(43.3) ^a
饮酒[$n(\%)$]	78(23.7)	15(32.6)	14(37.8)
高血压[$n(\%)$]	162(49.2)	31(67.4) ^a	26(70.3) ^a
糖尿病[$n(\%)$]	135(41.0)	27(58.7) ^a	23(62.2) ^a
高脂血症[$n(\%)$]	117(35.6)	24(52.2) ^a	20(54.1) ^a
冠心病[$n(\%)$]	108(32.8)	21(45.7)	18(48.7)
腔隙性脑梗死[$n(\%)$]	141(42.9)	25(54.4)	22(59.5)
WML[$n(\%)$]	74(22.5)	19(41.3) ^a	24(64.9) ^a
UPDR Spart III 评分($\bar{x}\pm s$,分)	20.8 $\pm$ 9.6	24.6 $\pm$ 9.3 ^a	25.7 $\pm$ 9.4 ^a
改良 H&Y 分期($\bar{x}\pm s$,分)	1.7 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.5 ^a	2.1 $\pm$ 0.8 ^a
MMSE 评分($\bar{x}\pm s$,分)	28.5 $\pm$ 2.1	21.7 $\pm$ 1.6 ^a	18.4 $\pm$ 1.3 ^a
Barthel 指数评分($\bar{x}\pm s$,分)	95.1 $\pm$ 3.7	76.8 $\pm$ 4.4 ^a	49.3 $\pm$ 4.2 ^a

^a: $P<0.05$,与 PD-NC 组比较

表 2 PD 伴认知功能障碍相关危险因素的 Logistics 回归分析

项目	PD-MCI 组		PDD 组	
	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P
年龄	1.65(1.37~1.96)	0.024	2.03(1.61~2.42)	0.006
BMI	1.14(0.93~1.32)	0.078	1.39(1.15~1.58)	0.041
PD 病程	1.52(1.26~1.81)	0.039	1.75(1.43~1.97)	0.018
低教育水平	1.59(1.30~1.98)	0.033	1.77(1.46~2.04)	0.017
吸烟	1.08(0.87~1.25)	0.114	1.44(1.18~1.73)	0.045
高血压	1.61(1.28~1.97)	0.029	1.89(1.52~2.31)	0.011
糖尿病	1.53(1.24~1.86)	0.035	1.85(1.59~2.07)	0.015
高脂血症	1.47(1.18~1.69)	0.042	1.72(1.50~1.94)	0.020
UPDRSpart III 评分	1.76(1.39~2.09)	0.023	1.96(1.63~2.25)	0.009
改良 H&Y 分期	1.94(1.66~2.27)	0.014	1.98(1.71~2.38)	0.002
WML	2.28(1.63~2.85)	0.008	2.59(1.64~3.37)	0.001

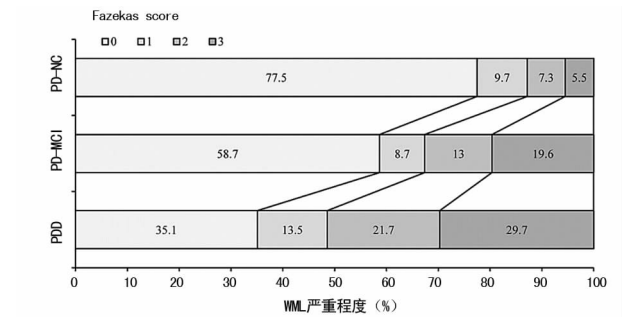


图1 WML程度与PD伴认知功能障碍的关系

2.4 WML程度与PD伴认知功能障碍的Logistics回归分析 使用多因素Logistics回归分析研究WML变严重程度与PD患者认知功能障碍之间关系。在调整了年龄、BMI、PD病程、低教育水平、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症、UPDRS part III评分、H & Y等级及WML后,Logistics回归分析结果显示WML Fazekas 3级与PD-MCI明显相关($OR=2.52$, $95\%CI: 1.83\sim3.21$),同时WML Fazekas 2级及Fazekas 3级均与PDD明显相关(2级, $OR=2.27$, $95\%CI: 1.58\sim2.89$; 3级, $OR=2.86$, $95\%CI: 1.94\sim3.87$),见表3。

表3 WML程度与PD伴认知功能障碍的Logistics回归分析

WML Fazekas 分级	PD-MCI 组		PDD 组	
	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P
0	1.00		1.00	
1	1.08(0.83~1.26)	0.104	1.15(0.92~1.34)	0.076
2	1.44(0.94~1.70)	0.056	2.27(1.58~2.89)	0.008
3	2.52(1.83~3.21)	0.001	2.86(1.94~3.87)	0.001

3 讨论

本研究结果显示,在中国老年人群中,WML增加了PD伴认知功能障碍的发生风险,并且WML的严重程度与PD患者认知功能障碍的严重程度也有明显相关性。KANDIAH等^[16]基于新加坡老年人群的研究结果显示,WML是PD患者出现认知功能障碍的一种重要的独立危险因素。KOSHIMORI等^[17]的研究结果显示,许多澳大利亚的PD患者都被发现同时存在WML,尤其是在双侧的额叶及颞叶的皮质下部分,而这些部位与患者的执行能力和其他认知功能均有明显相关性。所以他们认为这些部位的WML对PD患者的认知功能障碍而言,是一种早期的病理基础。一项韩国的研究则发现,WML体积的大小是PD-MCI向PDD转化的一种重要的预测指标^[18]。也有研究通过磁共振弥散张量(DTI)观察PD患者脑白质纤维完整性,结果显示脑白质纤维完整性破坏的严重程度与PD患者认知功能障碍的严重程度密切

相关^[19]。

关于PD伴认知功能障碍的其他危险因素,有研究进行了报道。一项美国的前瞻性研究对141名年龄为62~73岁的PD患者进行随访,结果显示认知功能正常的PD患者在随访6年的过程中大约有一半发展为PD-MCI,而所有新发的PD-MCI在5年内均发展为PDD。同时他们认为更差的UPDRS运动功能评分是PD患者出现认知功能障碍的预测指标^[20]。一项来自于挪威、英国、美国、西班牙、意大利的多中心研究纳入了1346例PD患者,平均年龄为67.5岁,其中25.8%的PD患者被诊断为PD-MCI,而PD-MCI患者最常见的症状为记忆力下降^[21]。目前有研究者认为PD患者的认知功能障碍也与年龄、低教育程度、PD的病程长短、PD患者运动功能及语言功能障碍的严重程度有关^[22]。还有部分研究还认为PD-MCI是PDD的一种重要危险因素,并且随PD-MCI的程度加重,PDD的风险也随之增加^[23]。

WML增加PD伴认知功能障碍发生的机制目前尚不完全清楚。有研究表明,血管危险因素与认知障碍的发生是密切相关的^[24]。而WML是一种小血管疾病,WML的发生目前已被证实与高血压密切相关,并且与糖尿病和血脂异常等血管危险因素也有关系^[25]。本研究结果显示WML在中国老年PD患者中有较高的发生率,同时存在着较多的血管危险因素,所以WML与PD患者认知功能障碍的关系可能与血管危险因素有一定相关性。目前,WML导致认知功能障碍的机制已被许多文献证实。其基本机制是WML造成脑白质纤维完整性破坏,使大脑皮质的各脑叶间联系发生中断,两侧大脑半球之间联系异常,与情感和思维相关的神经环路受到破坏^[26]。WML与黑质纹状体中多巴胺的病理性损失也有关,从而加重PD患者的锥体外系症状^[6]。有研究证明,严重PD的运动功能症状与PD患者的认知功能障碍也明显相关^[20]。因此,WML对神经环路的破坏和多巴胺病理性损失的影响,可能与PD患者的认知功能障碍有关。

此项研究仍存在一些局限性。(1)此研究为一项横断面研究,没有对PD伴认知功能障碍进行前瞻性研究,也没有能够进行WML对PD-MCI向PDD转化影响的研究。(2)本项目仅对WML的严重程度进行的分级,而没有按照WML部位进行分类研究,如WML可以分为脑室旁和大脑深部区域。(3)DTI可以对脑白质纤维完整性进行更精准地观察,由于条件的限制,此项研究仅采用磁共振的T2WI和FLAIR像对WML进行观察。

此研究结果显示,WML是PD患者发生认知障碍的重要危险因素。通过控制WML可能对PD

伴认知功能障碍的防治有重要作用。

参考文献

- [1] SVENNINGSSON P, WESTMAN E, BALLARD C, et al. Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(8):697-707.
- [2] ZHANG Z X, ROMAN G C, HONG Z, et al. Parkinson's disease in China: prevalence in Beijing, Xian, and Shanghai [J]. *Lancet*, 2005, 365(9459):595-597.
- [3] HUGO J G M, COGNITIVE I. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment [J]. *Clin Geriatr Med*, 2014, 30(3):421-442.
- [4] HABES M, ERUS G, TOLEDO J B, et al. White matter hyperintensities and imaging patterns of brain ageing in the general population[J]. *Brain*, 2016, 139(Pt 4):1164-1179.
- [5] PRINS N D, SCHELTENS P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: an update [J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(3):157-165.
- [6] BOHNEN N I, ALBIN R L. White matter lesions in Parkinson disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(4):229-236.
- [7] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组, 中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍专业. 中国帕金森病的诊断标准(2016 版)[J]. *中华神经科杂志*, 2016, 49(4):268-271.
- [8] HUGHES A J, DANIEL S E, KILFORD L, et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1992, 55(3):181-184.
- [9] GOETZ C G, POEWE W, RASCOL O, et al. Movement disorder society task force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations [J]. *Mov Disord*, 2004, 19(9):1020-1028.
- [10] LEES R, SELVARAJAH J, FENTON C, et al. Test accuracy of cognitive screening tests for diagnosis of dementia and multidomain cognitive impairment in stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45(10):3008-3018.
- [11] WALES K, CLEMSON L, LANNIN N, et al. Functional assessments used by occupational therapists with older adults at risk of activity and participation limitations: a systematic review[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0147980.
- [12] PASI M, SALVADORI E, POGGESI A, et al. White matter microstructural damage in small vessel disease is associated with Montreal cognitive assessment but not with mini mental state examination performances: vascular mild cognitive impairment Tuscany study [J]. *Stroke*, 2015, 46(1):262-264.
- [13] SMITH E E. Leukoaraiosis and stroke[J]. *Stroke*, 2010, 41(10):S139-143.
- [14] LITVAN I, GOLDMAN J G, TRSTER A I, et al. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: movement disorder society task force guidelines [J]. *Mov Disord*, 2012, 27(3):349-356.
- [15] EMRE M, AARSLAND D, BROWN R, et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2007, 22(12):1689-1707.
- [16] KANDIAH N, MAK E, NG A, et al. Cerebral white matter hyperintensity in Parkinson's disease: a major risk factor for mild cognitive impairment[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2013, 19(7):680-683.
- [17] KOSHIMORI Y, SEGURA B, CHRISTOPHER L, et al. Imaging changes associated with cognitive abnormalities in Parkinson's disease[J]. *Brain Struct Funct*, 2015, 220(4):2249-2261.
- [18] SUNWOO M K, JEON S, HAM J H, et al. The burden of white matter hyperintensities is a predictor of progressive mild cognitive impairment in patients with Parkinson's disease[J]. *Eur J Neurol*, 2014, 21(6):e50-922.
- [19] CHEN Y S, CHEN M H, LU C H, et al. Associations among cognitive functions, plasma DNA, and white matter integrity in patients with Early-Onset Parkinson's Disease [J]. *Front Neurosci*, 2017(11):9.
- [20] PIGOTT K, RICK J, XIE S X, et al. Longitudinal study of normal cognition in Parkinson disease [J]. *Neurology*, 2015, 85(15):1276-1282.
- [21] AARSLAND D, BRONNICK K, WILLIAMS-GRAY C, et al. Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis[J]. *Neurology*, 2010, 75(12):1062-1069.
- [22] VASCONCELLOS L F, PEREIRA J S. Parkinson's disease dementia: Diagnostic criteria and risk factor review [J]. *J Clin Exp Neuropsychol*, 2015, 37(9):988-993.
- [23] HOOGLAND J, BOEL J A, DE BIE R M, et al. Mild cognitive impairment as a risk factor for Parkinson's disease dementia[J]. *Mov Disord*, 2017, 32(7):1056-1065.
- [24] GORELICK P B, SCUTERI A, BLACK S E, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association[J]. *Stroke*, 2011, 42(9):2672-2713.
- [25] MAILLARD P, CARMICHAEL O T, REED B, et al. Cooccurrence of vascular risk factors and late-life white-matter integrity changes [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(4):1670-1677.
- [26] FILLEY C M, FIELDS R D. White matter and cognition: making the connection[J]. *J Neurophysiol*, 2016, 116(5):2093-2104.

论著 · 临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.007

阴性症状为主的首发精神分裂症患者血清 p-mTOR 和 IL-10 水平变化及相关性分析*

赵心灵,曾 勇,于 玲,李 明,李 婷,张缙涛,王婷婷,熊 鹏[△]
(昆明医科大学第一附属医院精神科,昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨以阴性症状为主的精神分裂症血清磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、白细胞介素 10(IL-10)水平变化及其与精神分裂症的相关性。**方法** 采用 ELISA 测定 56 例以阴性症状为主的首发未服药精神分裂症和 56 例健康对照者血清中 p-mTOR、IL-10 水平,采用阳性与阴性症状量表(PANSS)评定精神分裂症患者症状。**结果** 研究组血清 p-mTOR 值高于对照组[(4.38±1.30)ng/L vs. (3.88±0.76)ng/L],差异有统计学意义($P<0.05$);p-mTOR 与 PANSS 阴性症状评分呈正相关($r=0.283, P<0.05$)。而研究组血清 IL-10 水平与对照组比较差异无统计学意义,但是与 PANSS 总分呈负相关($r=-0.507, P<0.01$)。研究组血清 p-mTOR 与 IL-10 水平呈正相关($r=0.437, P=0.001$)。健康组血清 p-mTOR 与 IL-10 水平呈负相关($r=-0.403, P=0.002$)。**结论** mTOR 信号通路活性增高可能与阴性症状为主精神分裂症的病理机制相关, mTOR 活性越高,阴性症状越严重;mTOR 信号通路激活后还可能与 IL-10 水平相关。

[关键词] 精神分裂症;白细胞介素 10;mTOR;阴性症状

[中图法分类号] R749 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3151-04

Change of serum p-mToR and IL-10 levels in first episode schizophrenia patients with predominant negative symptoms and correlation analysis*

ZHAO Xinling, ZENG Yong, YU Ling, LI Ming, LI Ting, ZHANG Jintao, WANG Tingting, XIONG Peng[△]
(Department of Psychiatry, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the change of serum p-mTOR and IL-10 levels in the schizophrenia patients with predominant negative symptoms and its correlation with schizophrenia. **Methods** Serum p-mTOR and IL-10 levels were detected in 56 schizophrenia patients with predominant negative symptoms and 56 healthy controls by adopting the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The schizophrenia symptoms were assessed by adopting the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS). **Results** The values of serum p-mTOR in the study group was higher than that in the control group [(4.38±1.30)ng/L vs. (3.88±0.76)ng/L], the difference was statistically significant ($P<0.05$); the p-mTOR level was positively correlated with the PANSS score ($r=0.283, P<0.05$). The serum IL-10 level had no statistical difference between the study group and control group. And the serum IL-10 level was negatively correlated with the PANSS score ($r=-0.507, P<0.01$). The serum p-mTOR and IL-10 levels in the study group had a positive correlation ($r=0.437, P=0.001$). The serum p-mTOR and IL-10 levels in the health group had a negative correlation ($r=-0.403, P=0.002$). **Conclusion** The p-mTOR signal pathway activity increase might be related with the pathological mechanism in the implicated in the schizophrenia patients with predominant negative symptoms. The higher the p-mTOR activity, the severe the negative symptoms. The p-mTOR signal pathway activation might be associated with serum IL-10 level.

[Key words] schizophrenia; IL-10; mToR; negative symptoms

精神分裂症是精神科最难治疗的重性精神疾病 之一,其中以阴性症状为主的精神分裂症预后更差,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360210)。 作者简介:赵心灵(1986—),主治医师,在读硕士,主要从事精神分裂症方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: xp6945399@163.com。

目前其发病机制仍不明确,但神经免疫异常不断被验证^[1-2]。雷帕霉素靶蛋白(mTOR,激活后为磷酸化-mTOR,即 p-mTOR)信号通路障碍可影响神经网络、突触形成及神经可塑性相关蛋白的合成,更重要的是还参与神经元的免疫反应调节及白细胞介素(IL)-10 的抗炎效应^[2-3]。精神分裂症存在 mTOR 活性异常,降低与增高均已被揭示^[3],且 mTOR 与明确的认知、情感障碍相关,mTOR 拮抗剂能明显逆转神经发育过程中 mTOR 高活化后所致的行为紊乱^[4-6]。mTOR 级联反应通路中人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)、结节硬化症基因(TSC)1、TSC2 与精神分裂症相联系^[7]。mTOR 通路还可被精神分裂症断裂基因 1(DISC1)负性调控^[3]。既往 IL-10 血清水平被发现在精神分裂症患者中异常,并多次被报道涉及阴性症状及认知损害^[8-9];IL-10 不仅能减缓脂多糖(LPS,来源于细菌)所致的黑质多巴胺能神经元的损耗而发挥神经保护作用^[10-11],其表达能被抗精神病药物上调,与后者的治疗作用关系密切^[12]。值得注意的是,mTOR 被激活后下调了信号转导与转录激活因子 3(STAT3)水平,从而抑制了 IL-10 的释放^[13]。由此可见,mTOR、IL-10 与精神分裂症密切相关。目前外周血清 mTOR 与精神分裂症的研究比较少见,特别是以阴性症状为主的精神分裂症。因此,本课题组对此进行研究,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院精神科 2016 年 5 月至 2017 年 4 月门诊就诊及住院治疗的首发未服用抗精神病药物精神分裂症患者。纳入标准:(1)符合国际疾病与相关健康问题统计分类(ICD-10)精神分裂症的诊断标准;(2)阳性与阴性症状量表(PANSS)总分大于或等于 60 分;(3)首发未服药;(4)无电休克治疗史。排除标准:(1)有精神发育迟滞、癫痫、脑炎等脑器质性疾病或其他神经系统疾病史;(2)曾诊断为其他精神障碍,或最近 1 个月服用过抗精神病药物;(3)有免疫、内分泌或代谢障碍等系统性疾病;(4)有药物或精神活性物质滥用史;(5)具有明显自杀、危害自身或他人风险倾向。以阴性症状为主的研究组入组条件:(1)PANSS 量表中与阴性症状和瓦解思维/认知

相关的 14 项条目(P2、N1~6、G5、G7、G10、G11、G13、G15、G16)总分大于 40 分;(2)与阳性症状相关的 8 项条目(P1、P3、P5、P6、N7、G1、G9、G12)总分小于 22 分,并且 P1、P3、P6、G9 这 4 个条目中评分大于 4 分的条目不超过 2 项,且 4 项条目评分均小于或等于 5 分。按照纳入与排除标准收集阴性症状为主的研究组 56 例。对照组来自本院体检中心的健康体检者。纳入标准为无现患精神疾病或病史且无精神疾病家族史,排除标准同研究组。对照组共入组 56 名。该研究已通过伦理委员会批准。所有被试者或其监护人(家属)均签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清蛋白因子浓度检测 患者于入组当日或次日清晨,用促凝管取空腹肘静脉血约 5 mL,血样静置后以 3 000 r/min 离心 10 min,取血清分装,置于一 20 ℃储存待检;对照组入组时同法采血、分装、储存。采用 ELISA,用美国 Merck Milli-pore 公司生产的试剂盒及其配套试剂检测 p-mTOR 及对应的 IL-10 血清水平。每份血清都进行双份检测,结果取其平均值。

1.2.2 PANSS 量表评估 由经过量表培训并达到合格要求的两名精神科医师共同对患者进行精神检查,并结合家属提供的有关信息的评价打分。

1.3 统计学方法 采用 SPSS21.0 软件进行统计分析,研究组与健康对照组的血清 p-mTOR 经过对数转换后采用独立样本 *t* 检验,两组血清 IL-10 水平经对数转换后采用独立样本 *t* 检验;组间性别、吸烟比较采用 χ^2 检验,年龄、BMI、血清蛋白因子水平比较采用 *t* 检验。研究组血清 p-mTOR、IL-10 水平与 PANSS 评分的关系采用 Pearson 相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 研究组与健康对照组的社会人口学资料年龄、性别和 BMI、吸烟比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 两组血清 p-mTOR 及 IL-10 比较 研究组与健康对照组血清 p-mTOR 取对数值后比较差异有统计学意义($t = 2.489, P < 0.05$);两组血清 IL-10 水平取对数值后比较差异无统计学意义($P = 0.863$),见表 2。

表 1 研究组与对照组的一般资料

组别	<i>n</i>	性别(<i>n</i>)		年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	吸烟(<i>n</i>)	PANSS 总分 ($\bar{x} \pm s$, 分)	PANSS 阴性 ($\bar{x} \pm s$, 分)	PANSS 阳性 ($\bar{x} \pm s$, 分)
		男	女						
研究组	56	29	27	24.55±7.83	21.27±3.03	10	77.34±8.21	24.29±4.09	16.43±3.43
对照组	59	28	31	28.24±7.12	21.26±3.02	15			

表 2 两组血清 p-mTOR 与 IL-10 取对数值后比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	n	p-mTOR	IL-10
研究组	56	4.38±1.30 ^a	5.36±0.82
对照组	56	3.88±0.76	5.39±0.53

^a: $P<0.05$,与对照组比较

2.3 研究组 p-mTOR、IL-10 水平分别与 PANSS 评分的相关性 研究组血清 p-mTOR 与 PANSS 阴性症状评分呈正相关($r=0.283, P<0.05$),但是与 PANSS 总分无统计学相关性($r=-0.077, P>0.05$)。研究组 IL-10 水平与 PANSS 总分呈负相关($r=-0.507, P<0.01$),研究组 IL-10 水平与 PANSS 阴性症状评分无统计学相关性($r=-0.098, P>0.05$)。

2.4 两组 p-mTOR 与 IL-10 水平的相关性 研究组血清 p-mTOR 水平与 IL-10 水平均经对数转换后分析呈正相关($r=0.437, P=0.001$);对照组血清 p-mTOR 与 IL-10 经对数转换后分析呈负相关($r=-0.403, P=0.002$),见图 1、2。

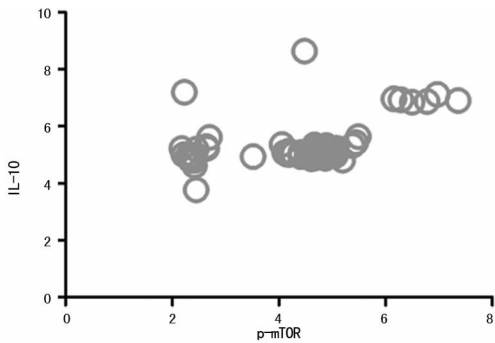


图 1 研究组血清中 p-mTOR 与 IL-10 水平的相关性(对数值)

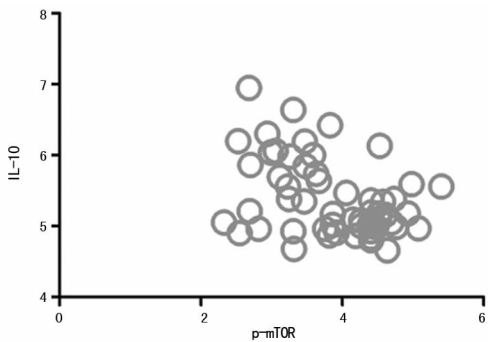


图 2 对照组血清中 p-mTOR 与 IL-10 水平的相关性(对数值)

3 讨 论

以阴性症状为主的精神分裂症是临床治疗的重点与难点。现有的抗精神病药物对阴性症状的疗效都不理想,这可能与抗精神病药物未能减轻阴性症状的神经病理异常有关。本研究结果提示研究组外周血清 p-mTOR 水平高于对照组,这与既往研究一

致^[3];且 p-mTOR 水平与 PANSS 阴性症状评分呈正相关,说明 p-mTOR 水平越高,患者阴性症状越重。可认为 mTOR 信号通路过度活化参与以阴性症状为主的精神分裂症的发病机制。而研究组与对照组血清 IL-10 水平比较差异无统计学意义,这与先前研究部分一致,不过也有研究揭示首发精神分裂症 IL-10 与阴性症状负相关^[13-14]。本研究结果显示 IL-10 水平与 PANSS 总分呈负相关,这间接揭示 IL-10 水平可部分反映精神分裂症病情程度。本研究还发现研究组血清 p-mTOR 与 IL-10 呈正相关,与对照组相反,结合研究组 p-mTOR 水平增高,说明阴性症状为主患者已被诱导 mTOR 过度活化,IL-10 虽受到影响,但还未达到统计学的增高异常。该影响可能仅限于 mTOR 活性增高时,mTOR 活性低下时,IL-10 生成不一定降低。

近期动物研究发现母体免疫激活(MIA)可致后代发生类精神分裂症行为异常,被认为是疾病起点,而后致细胞因子等蛋白变化,影响神经环路、突触形成及可塑性,使后代终身的精神疾病易感性增加。这些病理过程均可归因于 mTOR 通路障碍^[2]。说明 mTOR 通路与精神分裂症免疫调控异常的密切关系。本研究发现 mTOR 活性越高,阴性症状越重,而雷帕霉素为 mTOR 的特异性拮抗剂,早已被用于动物及细胞研究中^[3,6],以后或许成为以阴性症状为主精神分裂症早期识别与治疗的新契机。另外,注射抗炎因子可部分逆转 MIA 后代的行为异常^[2],可能是由于 IL-10 对中枢小胶质细胞活化后各种促炎细胞因子的拮抗效应,从而减轻神经退化表现^[10,14-15]。细胞研究也显示部分抗精神病药物的抗炎特性依赖胶质细胞的强烈激活,并涉及外周或大脑 IL-10 的效应^[16]。而本研究未显示研究组与对照组 IL-10 水平有明显差异,可能与样本量小、病程短有关。既往无健康人群外周血清 mTOR 与 IL-10 关系的医学数据。本研究结果说明阴性症状为主患者 mTOR 对 IL-10 的调控机制不同于健康组。因在先前的研究中,外源性 LPS 可激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路增加 IL-10 的表达,雷帕霉素抑制 LPS 诱导的 IL-10RNA 及蛋白的表达^[17-18]。是否表明阴性症状为主患者受到细菌 LPS 等的刺激,而过度激活了 mTOR,使抗炎因子 IL-10 生成增多。这可能揭示了阴性症状的发病机制,不过这仅是推测。或者还有这种可能,研究组 mTOR 通路下游还存在其他影响 IL-10 的调控通路,抵消了本身的调控关系。因为细胞研究发现,mTOR 抑制剂降低 IL-10 的表达时,并未通过信号传导子及转录激活子 3(STAT3)通路产生效应,间接说明可能存在下游其他通路影响^[19]。该研究样本量小,未来需扩大样

本,将年龄、饮食、压力等影响蛋白水平因素纳入研究,低血糖状态也可能影响 mTOR 活性^[20]。并定量测定磷酸肌醇-3 激酶、蛋白激酶 B、STAT3 等调控蛋白,进一步验证 mTOR、IL-10 与阴性症状为主精神分裂症关系,进一步阐释以阴性症状为主精神分裂症免疫调控的小分子通路异常机制。

总之,mTOR 信号通路活性增高可能与阴性症状为主精神分裂症的病理机制相关,mTOR 活性越高,阴性症状越严重;mTOR 信号通路激活后还可能与 IL-10 水平相关。

参考文献

- [1] CARBON M, CORRELL C U. Thinking and acting beyond the positive; the role of the cognitive and negative symptoms in schizophrenia[J]. *CNS Spectr*, 2014, 19 Suppl 1: S38-52.
- [2] ESTES M L, MCALLISTER A K. Maternal immune activation; implications for neuropsychiatric disorders[J]. *Science*, 2016, 353(631): 772-777.
- [3] GURURAJAN A. Is the mTOR-signalling cascade disrupted in Schizophrenia? [J]. *J Neurochem*, 2014, 129(3): 377-387.
- [4] ZHOU M, LI W D, HUANG S, et al. mTOR inhibition ameliorates cognitive and affective deficits caused by discl knockdown in adult-born dentate granule neurons [J]. *Neuron*, 2013, 77(4): 647-654.
- [5] EHNINGER D, LI W D, FOX K, et al. Reversing neurodevelopmental disorders in adults [J]. *Neuron*, 2008, 60(6): 950-960.
- [6] EHNINGER D, HAN S, SHILYANSKY C, et al. Reversal of learning deficits in a Tsc^{2+/-} mouse model of tuberous sclerosis[J]. *Nat Med*, 2008, 14(8): 843-848.
- [7] ZHANG Q T, HONG W, LI H Z, et al. Increased ratio of high sensitivity C-reactive protein to interleukin-10 as a potential peripheral biomarker of schizophrenia and aggression[J]. *Int J Psychophysiol*, 2017(114): 9-15.
- [8] KUNZ M, CERESER K M, GOI P D, et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia; differences in pro- and anti-inflammatory balance [J]. *Rev Bras Psiquiatr*, 2011, 33(3): 268-274.
- [9] PEDRINI M, MASSUDA R, FRIES G R, et al. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity[J]. *J Psychiatr Res*, 2012, 46(6): 819-824.
- [10] ARIMOTO T, CHOI D Y, LU X, et al. Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra[J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(6): 894-906.
- [11] DE WITTE L, TOMASIK J, SCHWARZ E, et al. Cytokine alterations in first-episode schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment[J]. *Schizophr Res*, 2014, 154(1/3): 23-29.
- [12] 陈银涛, 于秉治, 武迪迪. PI3K/Akt/mTOR 信号通路及临床相关肿瘤抑制剂[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(10): 949-956.
- [13] KUBISTOVA A, HORACEK J, NOVAK T, et al. Increased interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in first episode schizophrenia patients versus healthy controls[J]. *Psychiatr Danub*, 2012, 24 Suppl 1: S153-156.
- [14] MONJI A, KATO T A, MIZOGUCHI Y, et al. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013(42): 115-121.
- [15] XIU M H, YANG G G, TAN Y L, et al. Decreased interleukin-10 serum levels in first-episode drug-naïve schizophrenia; relationship to psychopathology [J]. *Schizophr Res*, 2014, 156(1): 9-14.
- [16] OBUCHOWICZ E, BIELECKA-WAJDMAN A M, PAULSAMOJEDNY M, et al. Different influence of antipsychotics on the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines depends on glia activation; an in vitro study[J]. *Cytokine*, 2017, 94(6): 37-44.
- [17] BAKER A K, WANG R P, MACKMAN N, et al. Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages by reducing IL-10 expression[J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(11/12): 2249-2255.
- [18] JØRGENSEN P F, WANG J E, ALMLF M, et al. Siroli-mus interferes with the innate response to bacterial products in human whole blood by attenuation of IL-10 production[J]. *Scand J Immunol*, 2001, 53(2): 184-191.
- [19] OHTANI M, NAGAI, KONDO S, et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells[J]. *Blood*, 2008, 112(3): 635-643.
- [20] GIEASON L G, LU D, WITTERS L A, et al. The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10341-10351.

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.008

枸橼酸咖啡因治疗新生儿呼吸窘迫综合征的临床研究*

尚彪^{1,2},董文斌^{1△},刘娟²,白静²,田鹏²,丁小燕²

(1.西南医科大学附属医院新生儿科,四川泸州 646000;2.四川省南充市中心医院新生儿科 637000)

[摘要] **目的** 探究枸橼酸咖啡因治疗新生儿呼吸窘迫综合征(NRDS)的疗效。**方法** 将收治的 90 例 NRDS 患儿分为枸橼酸咖啡因组和氨茶碱组、对照组,每组各 30 例,在使用肺表面活性物质(PS,固尔苏)替代治疗及机械通气等基础上,咖啡因组用枸橼酸咖啡因药物进行治疗,氨茶碱组用氨茶碱药物进行治疗,对照组仅给予基础治疗。治疗前后检测患者的呼吸力学变化,治疗后仍无效的患者给予持续的常频机械通气或鼻持续气道正压通气(nCPAP)治疗。**结果** 咖啡因组整体有效率达到 86.7%,氨茶碱组整体有效率为 73.3%,对照组整体有效为 56.7%,咖啡因组明显高于氨茶碱组及对照组($P<0.05$);咖啡因组与氨茶碱组、对照组相比,内源性呼气末正压、气道阻力均明显较低($P<0.05$),咖啡因组静态顺应性水平明显高于氨茶碱组($P<0.05$);咖啡因组机械通气和 nCPAP 治疗的时间明显短于氨茶碱组及对照组($P<0.05$);治疗后,3 组的 PaCO₂ 和 PaO₂ 比较差异有统计学意义($P<0.05$),咖啡因组 PaCO₂ 最低,PaO₂ 最高。**结论** 使用枸橼酸咖啡因药物方法联合肺表面活性物质治疗呼吸窘迫的新生儿对呼吸力学影响有效。

[关键词] 呼吸窘迫综合征,新生儿;枸橼酸咖啡因;氨茶碱;呼吸力学;新生儿

[中图法分类号] R722.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3155-03

Clinical effect of caffeine citrate on respiratory mechanics in neonatal respiratory distress syndrome*

SHANG Biao^{1,2}, DONG Wenbin^{1△}, LIU Juan², BAI Jing², TIAN Peng², DING Xiaoyan²

(1. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Neonatology, Nanchong Municipal Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of caffeine citrate in treating neonatal respiratory distress syndrome (NRDS). **Methods** Ninety cases of NRDS were divided into the caffeine citrate group, aminophylline group and control group, 30 cases in each group. On the basis of using pulmonary surfactant (PS, Curosurf) replacement therapy and mechanical ventilation, the caffeine citrate group was treated with caffeine citrate, the aminophylline group was treated with aminophylline and the control group was given the basic treatment. The changes of respiratory mechanics were detected before and after treatment. The invalid cases after treatment were given continuous normal frequency mechanical ventilation or nCPAP. **Results** The overall effective rate in the caffeine citrate group reached 86.7%, which was 73.3% in the aminophylline group and 56.7% in the control group, the caffeine citrate group was significantly higher than the aminophylline group and control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the aminophylline group and control group, endogenous end-expiratory pressure and airway resistance in the caffeine citrate group were significantly lower, and the static compliance level in the caffeine citrate group was significantly higher than that in the aminophylline group ($P<0.05$); the mechanical ventilation and nCPAP treatment time in the caffeine citrate group was significantly lower than those in the aminophylline group and control group ($P<0.05$). PaCO₂ and PaO₂ after treatment had statistical difference among 3 groups ($P<0.05$); PaCO₂ in the caffeine citrate group was lowest and PaO₂ was highest. **Conclusion** Using the caffeine citrate medication method combined with PS substance in treatment of NRDS has the effect on respiratory mechanics.

[Key words] respiratory distress syndrome, newborn; citrate caffeine; aminophylline; respiratory mechanics; neonate

新生儿呼吸窘迫综合征(NRDS)是由于出生时或(PS)缺乏及肺结构发育不成熟所致的疾病,主要见于出生后短期内肺泡功能不成熟导致肺表面活性物质早产儿,在生后最初 2 d 逐渐加重^[1]。临床上, NRDS

* 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会普及科研课题(16PJ207)。 作者简介:尚彪(1982—),主治医师,在读硕士,主要从事新生儿疾病方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: dongwenbin2000@163.com。

表现为早期出现的呼吸窘迫,包括紫绀、呻吟、吸气性三凹征及呼吸急促,甚至发生呼吸衰竭,血气分析可提示呼吸衰竭的严重性,一般体质量越轻,胎龄越小,越容易发生^[2-3]。目前欧洲指南推荐治疗新生儿呼吸窘迫除了使用 PS 物质(固尔苏)替代治疗,还联用甲基黄嘌呤类药物等兴奋呼吸中枢治疗^[2]。有研究表明,枸橼酸咖啡因因较茶碱药物存在不良反应小,疗效更佳,半衰期长,易于给药等优点,是联合 PS 物质治疗新生儿呼吸窘迫的理想药物^[4-8]。本文对收治的 90 例存在呼吸窘迫的新生儿进行分组对比,发现使用枸橼酸咖啡因药物治疗 NRDS 效果令人满意,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将南充市中心医院新生儿科收治的 90 例存在呼吸窘迫的新生儿分为咖啡因组、氨茶碱组 and 对照组,每组各 30 例。咖啡因组用枸橼酸咖啡因药物进行治疗,其中男 16 例,女 14 例,体质量为(1 196±174)g,胎龄为(26.2±3.7)周;氨茶碱组用氨茶碱药物进行治疗,其中男 14 例,女 26 例,体质量为(1 126±163)g,胎龄为(27.6±2.8)周;对照组男 12 例,女 18 例,体质量为(1 202±159)g,胎龄为(27.2±2.8)周。排除标准:败血症患者;重度窒息和遗传代谢疾病者。3 组一般资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 咖啡因组、氨茶碱组和对照组新生儿均放入培养恒温箱保温,生后 6 h 内给予 PS 物质(固尔苏)替代治疗,治疗剂量 200 mg/kg,用插管—表面活性剂—拔管(INSURE)方法气管内给药^[9],然后给予常频机械通气或经鼻持续气道正压通气(nCPAP)及营养支持、预防抗感染等治疗,出生 12~24 h 内,咖啡因组首次注入 20 mg/kg 枸橼酸咖啡因,24 h 后改为 5.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[10];氨茶碱组首次注入 5.0 mg/kg 氨茶碱,12 h 后改为每次 2.5 mg/kg,每 12 小时 1 次;对照组不给予枸橼酸咖啡因或氨茶碱治疗;治疗后仍无效的患者给予持续的 nCPAP 或常频机械通气治疗,同时于治疗开始前及治疗后 6 h 使用呼吸机并用呼气末阻断法测定内源性呼气末正压,与此同时记录下气道阻力。治疗前及治疗后 7 d 测动脉血气分析指标。

1.2.2 检测指标 (1)治疗 1~3 d,呼吸窘迫现象明显减少且消失,无呼吸暂停,吸氧浓度小于或等于

30%,吸气峰压(PIP)≤15 cm H₂O 或无需辅助通气者为显效;(2)治疗 4~5 d,呼吸窘迫现象缓解并消失,呼吸暂停次数小于或等于 3 次/天,吸氧浓度小于或等于 30%,PIP≤15 cm H₂O 或转为 nCPAP 治疗为有效;(3)治疗 5~7 d,呼吸窘迫现象缓解并消失,PIP≤15 cm H₂O 吸氧浓度小于或等于 30%,呼吸暂停次数小于或等于 3 次/天或可转为 nCPAP 治疗,为基本有效;(4)治疗 7 d 以上,呼吸窘迫现象仍不缓解,吸氧浓度大于或等于 30%且呼吸暂停次数大于或等于 3 次/天,仍需要辅助通气或者死亡为无效。整体有效率为显效率、基本有效率、有效率的总和。治疗开始前 1 h 内及治疗后 24 h 使用呼吸机并用呼气末阻断法测定内源性呼气末正压,与此同时记录下气道阻力。治疗前 1 h 及治疗后 3 d 测动脉血气分析指标。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 Spearman 相关系数进行相关性分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组使用不同药物的疗效对比 咖啡因组整体有效率达到 86.7%,氨茶碱组整体有效率为 73.3%,对照组整体有效为 56.7%,咖啡因组明显高于氨茶碱组及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组治疗疗效对比						
组别	<i>n</i>	显效(<i>n</i>)	有效(<i>n</i>)	基本有效(<i>n</i>)	无效(<i>n</i>)	整体有效率(%)
咖啡因组	30	10	9	7	4	86.7
氨茶碱组	30	6	8	8	8	73.3
对照组	30	2 ^a	6	9	13 ^a	56.7 ^a
χ^2		6.667	0.818	0.341	6.757	6.757
<i>P</i>		0.036	0.664	0.843	0.034	0.034

^a: $P<0.05$,与咖啡因组比较

2.2 3 组呼吸力学在治疗前及治疗后 24 h 的变化 咖啡因组与氨茶碱组、对照组相比,内源性呼气末正压、气道阻力均明显较低,咖啡因组静态顺应性水平明显高于氨茶碱组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 3 组机械辅助通气和 nCPAP 治疗时间及治疗前后的血气指标比较 咖啡因组机械辅助通气和 nCPAP 治疗时间明显短于氨茶碱组及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后,3 组的 PaCO₂ 和 PaO₂ 比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 2 3 组呼吸力学在治疗前后的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	内源性呼气末正压(cm H ₂ O)		气道阻力(cm H ₂ O·L ⁻¹ ·s ⁻¹)		静态顺应性(mL/cm H ₂ O)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
咖啡因组	30	7.4±2.8	4.1±2.6	20.1±2.2	15.7±2.1	25.4±1.5	30.2±3.9
氨茶碱组	30	7.9±2.4	6.0±3.1 ^a	19.8±2.9	18.3±2.1 ^a	25.8±2.7	28.1±3.8
对照组	30	8.0±3.2	7.9±3.1 ^{ab}	19.7±2.3	20.1±2.0 ^{ab}	25.9±3.8	25.8±3.9 ^a
<i>F</i>		0.390	12.506	0.210	34.353	0.263	9.717
<i>P</i>		0.678	<0.01	0.811	<0.01	0.770	<0.01

^a: $P<0.05$,与咖啡因组比较;^b: $P<0.05$,与氨茶碱组比较

表 3 3 组机械通气和 nCPAP 治疗时间及治疗前后的血气指标(̄±s)

组别	n	机械通气和 nCPAP 治疗时间(d)	pH		PaCO ₂ (mm Hg)		PaO ₂ (mm Hg)	
			治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
咖啡因组	26	2.7±0.5	6.9±0.4	7.1±0.4	53.8±8.1	42.6±7.2	48.8±9.2	62.3±9.1
氨茶碱组	22	3.7±0.6 ^a	7.1±0.6	7.3±0.6	53.1±7.9	47.8±6.9 ^a	51.2±9.6	56.3±7.8 ^a
对照组	17	4.5±0.8 ^{ab}	6.9±0.5	7.2±0.6	53.7±7.6	49.8±6.7 ^a	47.2±9.6	55.2±7.3 ^a
F		44.489	1.160	0.855	0.052	6.310	0.899	4.919
P		<0.01	0.320	0.430	0.950	0.003	0.412	0.010

^a:P<0.05,与咖啡因组比较;^b:P<0.05,与氨茶碱组比较

3 讨 论

NRDS 多发于早产儿,刚出生不久就会出现呼吸衰竭和呼吸困难等症状,发病机制主要是因为肺泡表面的活性物质不足,从而造成肺泡萎陷,产生大量分流,形成了严重的肺内低氧血症^[11]。目前临床上治疗 NRDS 主要是尽早使用 PS 物质和辅助通气。除此以外,欧美 NRDS 防治指南指出,联合枸橼酸咖啡因对 NRDS 治疗更佳^[2]。枸橼酸咖啡因作为甲基黄嘌呤药物的代表,除了治疗早产儿原发性呼吸暂停外,还可以增强延髓化学传感器对二氧化碳的敏感性,使呼吸规律,潮气量增加,抑制磷酸二酯酶,增加环磷酸腺苷 cAMP 水平。枸橼酸咖啡因作用于各种神经介质如多巴胺等,同时通过钙动员增加舒张压和呼吸动力,减少膈肌疲劳,增强儿茶酚胺改善氧合作用,可广泛地用于早产儿疾病的治疗和预防中^[12-13]。YODER 等^[14] 研究后认为在出生后的 24 h 内早期应用咖啡因联合 PS 预防性治疗可以提高肺表面张力及肺功能。而动物实验研究表明,在出生 12~24 h 内经咖啡因治疗的动物与未经咖啡因治疗的相比,呼吸道阻力明显降低,呼吸系统顺应性明显升高^[15]。美国病理家协会(CAP)研究也证实,与安慰剂组相比,咖啡因治疗组能将将有创机械通气或者任何气道正压通气和氧气疗法的应用治疗时间缩短 1 周^[15-16]。KASSIM 等^[17] 甚至认为咖啡因通过改善肺部肌肉功能来抵御 NRDS。本研究也发现使用枸橼酸咖啡因治疗 NRDS 的整体有效率明显高于氨茶碱组和对照组,咖啡因组使用了枸橼酸咖啡因药物治疗后,呼吸力学得到了极大的改善,其原因可能与枸橼酸咖啡因枸橼酸咖啡因具有可以舒缓支气管,缓解膈肌疲劳的作用有关。也有研究者认为其原因可能是枸橼酸咖啡因可以刺激肺泡上皮细胞分泌的活性物质有关^[18-19]。国内郑伟等^[20] 认为早产儿应用枸橼酸咖啡因可增加局部组织血氧供应,有助于组织氧合,尤其是 nCPAP 辅助通气的 RDS 早产儿。此外,咖啡因组的机械辅助通气时间明显要短于氨茶碱组及对照组,可能是咖啡因组有效余气量、吸气末最大压力及呼气末最大压力均明显升高,而且观察到呼吸系统顺应性明显增加、气道阻力降低,这些药效学行为通过改善呼吸肌的力量,在一定程度上辅助早产儿脱离机械通气^[21]。

综上所述,在使用 PS 物质替代治疗基础上联合使用枸橼酸咖啡因药物方法治疗呼吸窘迫的新生儿安全有效,易于给药且呼吸力学改变明显,有助脱离机械通气,临床积极有效,可作为 PS 联合治疗 NRDS 的推荐药物,值得推广和运用。

参考文献

[1] SWEET D G,CARNIELLI V,GREISEN G,等. 欧洲新生儿呼吸窘迫综合征防治指南(2010)[J]. 中华儿科杂志, 2011,49(1):27-33.

[2] SWEET D G,CARNIELLI V,GREISEN G,et al. European consensus guidelines on the management of respiratory distress syndrome-2016 update [J]. Neonatology, 2016,111(2):107.

[3] 邵青梅,叶鸿瑁,丘小汕. 实用新生儿学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社,2011:59-417.

[4] SCHOEN K,YU T,STOCKMANN C,et al. Use of methylxanthine therapies for the treatment and prevention of apnea of prematurity[J]. Pediatric Drugs,2014,16(2):169-177.

[5] GANNON B A. Theophylline or caffeine: which is best for apnea of prematurity? [J]. Neonatal Network,2000, 19(8):33-36.

[6] 王素敏. 咖啡因与氨茶碱治疗早产儿原发性呼吸暂停的疗效比较及护理分析[J]. 中国药业,2015(9):69-70.

[7] ARANDA J V,BEHARRY K,VALENCIA G B,et al. Caffeine impact on neonatal morbidities[J]. J Matern Fetal Neonatal Med,2010,23 Suppl 3:S20-23.

[8] PICONE S,BEGETTA M,PAOLILLO P. Caffeine citrate;when and for how long. A literature review[J]. J Matern Fetal Neonatal Med;2012,25(3):11-14.

[9] 黄西林,陈丹,李小萍,等. INSURE 策略治疗新生儿呼吸窘迫综合征的临床研究[J]. 中国当代儿科杂志,2013,15(1):9-13.

[10] ABDELHADY H,NASEF N,SHABAAN A E,et al. Caffeine therapy in preterm infants[J]. World J Clin Pediatr,2015,4(4):81.

[11] 余加林. 新生儿呼吸窘迫综合征的防治[J]. 中国实用儿科杂志,2003,18(11):643-646.

[12] SHRESTHA B,JAWA G. Caffeine citrate-Is it a silver bullet in neonatology? [J]. Pediatr Neonatol,2017,58(5) 1-7.

(下转第 3161 页)

- LINCK W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables; a combined analysis of 2 596 patients from seven EORTC trials[J]. *Eur Urol*, 2006, 49(3): 466-477.
 - [2] JOUDI F, KONETY B. Fluorescence cystoscopy and bladder surveillance[J]. *Curr Opin Urol*, 2004, 14(5): 265-270.
 - [3] LOPEZ-BELTRAN A, MONTIRONI R. Non-invasive urothelial neoplasms; according to the most recent WHO classification[J]. *Eur Urol*, 2004, 46(2): 170-176.
 - [4] SOBIN LH G M, WITTEKIND C. TNM Classification of malignant tumors, UICC international union against cancer[M]. 7th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009: 262-265.
 - [5] CHEN W, ZHENG R, BAAD P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
 - [6] 马旭东, 王全好. 浅表膀胱癌的治疗现状[J]. *广东医学*, 2008, 29(6): 1055-1056.
 - [7] RICHARDS K A, SMITH N D, STEINBERG G D. The importance of transurethral resection of bladder tumor in the management of nonmuscle invasive bladder cancer; a systematic review of novel technologies[J]. *J Urol*, 2014, 191(6): 1655-1664.
 - [8] 贾永中, 肖序仁. Revolix 2 μ m 激光治疗浅表膀胱肿瘤的疗效观察[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2008, 23(11): 826-827.
 - [9] DIIVRIK R T, YILDIRIM Ü T, ZORLU F, et al. The Effect of repeat transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with T1 tumors of the bladder who received intravesical mitomycin: a prospective, randomized clinical trial[J]. *J Urol*, 2006, 175(5): 1641-1644.
 - [10] RINK M, BABJUK M, CATTO J W, et al. Hexyl aminolevulinate-guided fluorescence cystoscopy in the diagnosis and follow-up of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a critical review of the current literature[J]. *Eur Urol*, 2013, 64(4): 624-638.
 - [11] BURGER M, GROSSMAN H B, DROLLER M, et al. Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with hexaminolevulinate cystoscopy: a meta-analysis of detection and recurrence based on raw data[J]. *Eur Urol*, 2013, 64(5): 846-854.
 - [12] KAMAT A M, COOKSON M, WITJES J A, et al. The impact of blue light cystoscopy with hexaminolevulinate (HAL) on progression of bladder cancer: a new analysis[J]. *Bladder Cancer*, 2016, 2(2): 273-278.
 - [13] YANG Y, WEI Z T, ZHANG X, et al. Transurethral partial cystectomy with continuous wave laser for bladder carcinoma[J]. *J Urol*, 2009, 182(1): 66-69.
 - [14] ZHONG C, GUO S, TANG Y, et al. Clinical observation on 2 micron laser for non-muscle-invasive bladder tumor treatment: single-center experience[J]. *World J Urol*, 2010, 28(2): 157-161.
 - [15] INOUE K, ANAI S, FUJIMOTO K, et al. Oral 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic diagnosis using fluorescence cystoscopy for non-muscle-invasive bladder cancer: a randomized, double-blind, multicentre phase II / III study[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2015, 12(2): 193-200.
- (收稿日期: 2018-02-02 修回日期: 2018-05-20)
-
- (上接第 3157 页)
- [13] DAVIS P G, SCHMIDT B, ROBERTS R S, et al. Caffeine for apnea of prematurity trial: benefits may vary in subgroups[J]. *J Pediatr*, 2010, 156(3): 382-387.
 - [14] YODER B, THOMSON M J. Lung function in immature baboons with respiratory distress syndrome receiving early caffeine therapy: a pilot study. [J]. *Acta Padiatrica*, 2005, 94(1): 92.
 - [15] SCHMIDT B, ROBERTS R S, DAVIS P, et al. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(19): 2112-2121.
 - [16] LEON A E, MICHENZI K, MA C X, et al. Serum caffeine concentrations in preterm neonates[J]. *Amer J Perinatol*, 2007, 24(1): 39-47.
 - [17] KASSIM Z, GREENOUGH A, RAFFERTY G F. Effect of caffeine on respiratory muscle strength and lung function in prematurely born, ventilated infants[J]. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(12): 1491.
 - [18] 李会敏, 戎惠娟, 刘伟, 等. 人性化管理配合枸橼酸咖啡因治疗早产儿原发性呼吸暂停 38 例[J]. *中国药业*, 2015(7): 106-107.
 - [19] KÖROGLU O A, MACFARLANE P M, BALAN K V, et al. Anti-inflammatory effect of caffeine is associated with improved lung function after lipopolysaccharide-induced amnionitis[J]. *Neonatology*, 2014, 106(3): 235-240.
 - [20] 郑伟, 李旭芳, 张炼, 等. 枸橼酸咖啡因对呼吸窘迫综合征早产儿脑和肠道氧代谢的影响[J]. *医药导报*, 2017, 36(8): 901-904.
 - [21] KASSIM Z, GREENOUGH A, RAFFERTY G F. Effect of caffeine on respiratory muscle strength and lung function in prematurely born, ventilated infants[J]. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(12): 1491.
- (收稿日期: 2018-02-28 修回日期: 2018-05-16)