

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180420.1408.011.html>

tumstatin 基因修饰巨核细胞联合化疗 抑制肺腺癌小鼠皮下移植瘤生长

王章飞¹, 罗以勤¹, 李娟², 娄蓉³

摘要 目的 探讨肿瘤抑素(tumstatin)转基因巨核细胞联合化疗对肺腺癌小鼠生存率的影响和皮下移植瘤生长的抑制作用。方法 制备 tumstatin 转基因巨核细胞,通过小鼠背部接种肺腺癌 A549 细胞,建立小鼠肺腺癌移植瘤模型。小鼠皮下瘤长径达到 5 mm 后随机分为 4 组:生理盐水对照组(A组,对照组)、吉西他滨(GEM)化疗组(B组,单纯化疗组)、GEM 联合巨核细胞组(C组)、GEM 联合 tumstatin 转基因巨核细胞组(D组);其中 B、C、D 三组为治疗组。对各组小鼠分别进行给药 24 d,每 3 d 测 1 次肿瘤体积。在治疗第 15 天眼球取血,通过血液分析仪检测血细胞值;第 24 天剥离瘤体,测量大小及质量,免疫组织化学法检测肿瘤内微血管密度(MVD),HE 染色检测肿瘤组织坏死情况,治疗期间记录小鼠生存情况。结果 各治疗组肿瘤体积生长曲线显著慢于生理盐水组,其中 D 组瘤体生长最慢且该组生存率较单纯化疗组(B组)得到明显提高;与其他三组相比,D 组小鼠皮下瘤 MVD 受到显著抑制并引起肿瘤组织重度坏死,且相应小鼠体内保持较正常的血细胞水平。结论 tumstatin 转基因巨核细胞联合化疗较单独化疗显著抑制肿瘤新生血管生长并可提升肺腺癌小鼠的生存率。

关键词 tumstatin; 巨核细胞; 血小板; 化疗; 肺腺癌

中图分类号 R 73-36; R 331.1+43

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0547-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.011

化疗是恶性肿瘤临床治疗的常用方法之一,而多数化疗药易引起患者骨髓抑制使患者血小板减少,临床上为提高患者耐受常预防性或治疗性地输注血小板。然而,多数研究^[1-2]表明血小板活化后释放的细胞因子能促进肿瘤新生血管形成,最终促进肿瘤的生长和转移,使患者预后较差。tumstatin

是一种近些年发现的内源性血管生成抑制因子,可通过功能性受体特异性地诱导血管内皮细胞凋亡、抑制其增殖,降低了新生血管的生成,从而使肿瘤生长得到抑制^[3]。该研究在携带 tumstatin 基因的慢病毒转导 CD34⁺ 细胞经体外扩增培养后生成有抗血管生成作用的巨核细胞/血小板^[4]和非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(non-obese diabetic/server combined immune-deficiency, NOD/SCID)鼠体内产生有抑制血管形成且保持正常聚集功能的血小板研究基础上^[5],建立 NOD/SCID 小鼠 A549 细胞肺腺癌移植瘤模型,体内研究 tumstatin 转基因巨核细胞联合化疗药 GEM 对肿瘤的抑制作用和小鼠生存率的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 NOD/SCID 鼠 24 只,♀,体质量(19±1)g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物有限公司。A549 肺腺癌细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞中心。NK 细胞抑制剂 anti-asialo GM1 购自美国 BioLegend 公司;GEM 购自江苏豪森药业股份有限公司;鼠抗人 CD31 mAb 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;巨核细胞体外诱导培养基购自加拿大 STEMCELL 公司;CD34 磁珠购自德国 Miltenyi Biotec 公司;tumstatin 转基因巨核细胞由安徽省立医院输血科细胞培养室制备。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞培养 肺腺癌 A549 细胞培养于含 100 ml/L 胎牛血清、 1×10^5 U/L 链霉素和 1×10^5 U/L 青霉素的 RPMI-1640 培养液中,在 37℃、50 ml/L CO₂ 培养箱内常规传代培养。

1.2.2 tumstatin 转基因巨核细胞的制备 参照文献^[4],从新生儿脐带血中分离单个核细胞,用免疫磁珠法筛选 CD34⁺ 细胞,用携带 tumstatin 的慢病毒转染 CD34⁺ 细胞,用 STEMCELL 无血清培养基,在前面实验的基础上选用 STEMCELL 扩增效率更高的组合细胞因子在 37℃、50 ml/L CO₂ 培养箱内常规传代培养,培养 1 周后计算转染效率。以表达 ZsGreen 绿色

2017-12-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M209);安徽自然科学基金(1608085MH229)

作者单位:安徽医科大学附属安徽省立医院¹ 检验科、² 输血科,合肥 230001

³ 安徽省妇幼保健院病理科,合肥 230001

作者简介:王章飞,男,硕士研究生;

罗以勤,男,副教授,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail: luoyiqin2003@163.com

荧光的细胞为转染阳性细胞。统计同一视野下转染阳性细胞数和总细胞数; 转染效率 = ZsGreen 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。CD41a 是巨核细胞和血小板的特异性抗体, 在体外扩增第 11 天流式分析 CD34⁺CD41a⁺ 的表达。将培养细胞进行涂片并瑞氏染色观察细胞形态。输注到小鼠体内的巨核细胞均为体外扩增培养 11~15 d 的巨核细胞。

1.2.3 肺腺癌模型的制作及给药 取对数生长的 A549 细胞, 计数 1×10^6 的细胞悬浮于 0.2 ml 生理盐水中皮下注射到小鼠背部。植入后约第 45 天提取肿瘤, 去除坏死组织和非癌组织后, 将癌细胞癌组织切成大小约 2 mm $\times$ 2 mm 的小块悬浮于生理盐水中, 以 0.2 ml/只皮下注射到 NOD/SCID 小鼠背部。待瘤体直径大于 5 mm^[6] 以后将小鼠随机分为 4 组 (每组 6 只): 生理盐水对照组 (A 组, 对照组)、GEM 化疗组 (B 组, 单纯化疗组)、GEM 联合巨核细胞组 (C 组)、GEM 联合 tumstatin 转基因巨核细胞组 (D 组); 其中 B、C、D 三组为治疗组。各治疗组第 1、3、5 天腹腔注射 60 mg/g 的 GEM, 第 2、4、6 天 C、D 组分别经尾静脉注射巨核细胞和 tumstatin 转基因修饰巨核细胞 5×10^5 /只, 输注巨核细胞同时输注 20 μ l asialo GM1 抗血清 (自然杀伤细胞抑制剂), 生理盐水对照组每天注射等量的生理盐水, 上述 6 d 为一个疗程, 给药 4 个疗程, 共 24 d。治疗期间, 每 3 d 测量 1 次肿瘤体积和小鼠质量, 绘制肿瘤生长曲线。在治疗的第 15 天对每组活着的小鼠眼眶取血 0.5 ml, 用希森美康 xs-800i 血细胞分析仪进行分析。治疗第 24 天小鼠以颈椎脱臼法处死, 剥离出瘤体, 剔除多余的结缔组织, 测量瘤体的长径和短径并称重, 以 40 g/L 甲醛溶液固定瘤体, 石蜡包埋, 以 3 μ m 厚度连续切片。治疗期间记录小鼠生存情况, 绘制各组小鼠生存曲线。

1.2.4 评估抗肿瘤活性 通过监测肿瘤生长速率评估抗肿瘤活性, 并使用游标卡尺测量肿瘤大小, 肿瘤大小用二维尺度测定, 用下式计算: 肿瘤体积 = $\pi/6 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$, 取肿瘤体积平均值, 绘制肿瘤生长曲线。抑瘤率以 T/C 值进行计算。T/C 值是抗肿瘤功效的重要指标, T/C 值 < 0.42 , 认为有效^[7]。

1.2.5 HE 染色 取肿瘤蜡块, 低温处理后以最大面积做 3 μ m 厚度切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色法处理后, 在 100 倍光学显微镜下寻找坏死面积最高区域, 200 倍光学显微镜下随机选 3 个视野进行拍照, 观察肿瘤组织坏死情况。

1.2.6 SP 免疫组织化学染色 取肿瘤蜡块 3 μ m 切片, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 常规免疫组化步骤。微血管密度 (microvessel density, MVD) 计数参照 Weidner 法^[8]: ① 以血管内皮细胞染成棕黄色或棕色为 CD31 阳性; ② 切片在 100 倍光学显微镜下观察 MVD 最高区域, 200 倍光学显微镜下选择不重复视野计数十个视野 CD31 阳性的微血管数, 取平均值作为 MVD。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件分析, 实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用非配对 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 生长曲线用线性回归分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 tumstatin 转基因巨核细胞 慢病毒感染的 CD34⁺造血干细胞荧光显微镜分析、计算得出细胞转染阳性率为 91.2%。流式分析显示在体外扩增第 11 天, CD34⁺CD41a⁺ 达到 62.3%。瑞氏染色形态学分析显示 tumstatin 转基因细胞呈现出典型的巨核细胞形态, 胞质内充满大小不等的紫红色颗粒或血小板, 细胞周围可见有血小板堆集; 表明转基因的表达并不影响 CD34⁺细胞诱导分化为巨核细胞和血小板, 见图 1。

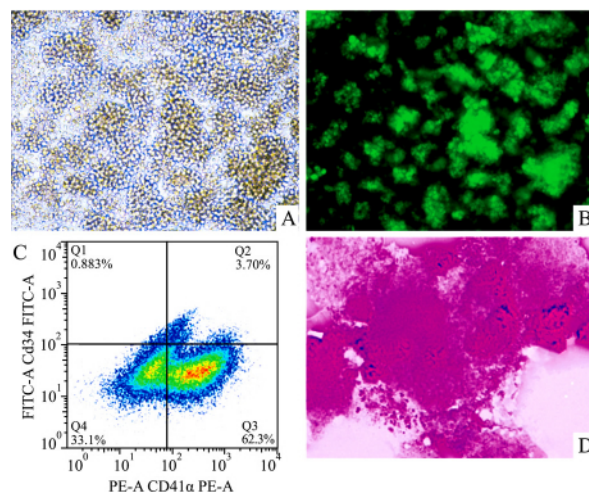


图1 绿色荧光蛋白 ZsGreen 在转染细胞的表达及 CD34⁺诱导分化巨核细胞流式图和形态学鉴定图

A: 转染并换液 72 h 后光学显微镜观察结果 $\times 100$; B: 换液后 72 h 荧光显微镜下观察转染结果 $\times 100$; C: 转染后细胞第 11 天 CD34 和 CD41a 表达率; D: 转染后的巨核细胞和血小板 $\times 1\,000$

2.2 联合治疗对肺腺癌皮下肿瘤的抑制作用 给药前, 游标卡尺测量并计算出的各组肺腺癌小鼠皮

下移植瘤体积大小无明显差异。经腹腔和尾静脉给予 GEM 和转基因、非转基因巨核细胞以后,治疗组较对照组均出现不同程度的抑制作用,见图 2,生长曲线表明生理盐水对照组在 24 d 内显示出连续的肿瘤体积增加,第 15 天以后出现快速生长,对各组生长曲线进行回归分析发现 A 组生长最快(生长速率 $k = 0.010\ 57\ \text{cm}^3/\text{d}$),见图 3A。GEM 组(生长速率 $k = 0.004\ 626\ \text{cm}^3/\text{d}$)和 GEM 联合巨核细胞组(生长速率 $k = 0.006\ 244\ \text{mm}^3/\text{d}$)皮下肿瘤生长到 18 d 和 24 d,显示出相对缓慢的回归,但前期作用不明显,而 GEM 联合 tumstatin 转基因巨核细胞组(生长速率 $= 0.002\ 589\ \text{cm}^3/\text{d}$)显示出持续的肿瘤体积抑制达 24 d,表明更高更稳定的疗效。

从图 3B 可以看出,治疗组 3 组中只有 GEM 联合 tumstatin 转基因巨核细胞组在 20 d 以后 T/C 值 < 0.42 ,显示出良好的疗效。相比之下,化疗组和非转基因巨核细胞联合组显示的 T/C 值在大多数时间点远远超过 0.42,表明疗效相对较差。

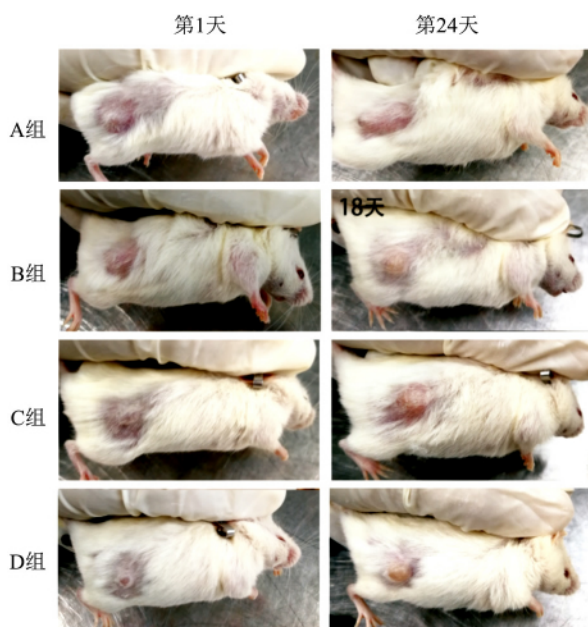


图 2 小鼠给药前和给药后肿瘤大小

2.3 联合治疗提高血细胞值及单纯化疗小鼠生存率 GEM 给药前,各组小鼠的体质量均为 $(19 \pm 1)\text{ g}$,毛发平顺,活动能力(攀爬、移动)强,给药 1 周后开始出现体重下降、毛发勃起、活动力减弱、脱毛,其中单纯化疗组脱毛和体重减轻最明显,而生理盐水组小鼠体质量、毛发等并无明显变化。给药 15 d 后眼眶取的血用血细胞分析仪进行分析发现,B 组外周血中三系细胞显著减少,血小板远低于 A 组($P <$

0.01)。C、D 组的白细胞远高于 A 组,血小板较未添加巨核细胞的 B 组有明显提高($P < 0.01$),而红细胞略低于生理盐水组,见表 1,在给药 18 d 时 B 组小鼠全部死亡,D 组还有部分存活,见图 3,对比单

表 1 第 15 天小鼠血细胞值

组别	n	红细胞($\times 10^{12}$)	白细胞($\times 10^9$)	血小板($\times 10^9$)
A 组	6	8.540 ± 0.035	2.270 ± 0.217	$1\ 017.00 \pm 75.60$
B 组	4	$6.010 \pm 0.107^{**}$	$0.195 \pm 0.034^{**}$	$248.50 \pm 2.89^{**}$
C 组	5	7.770 ± 0.147	4.160 ± 0.154	$1\ 196.80 \pm 46.34^{##}$
D 组	5	8.066 ± 0.688	11.302 ± 1.199	$1\ 297.00 \pm 41.20^{##}$

与 A 组比较: $^{**} P < 0.01$; 与 B 组比较: $^{##} P < 0.01$

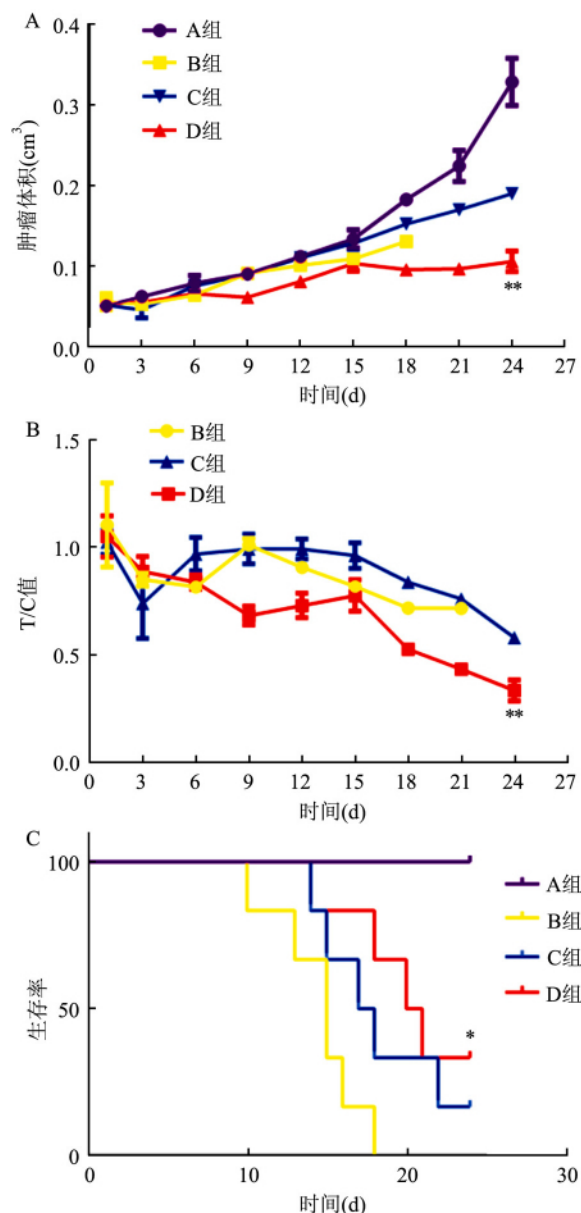


图 3 小鼠皮下肿瘤的生长曲线、T/C 值和生存曲线

A: 各组小鼠肺腺癌皮下瘤生长曲线; B: 各治疗组肿瘤体积与对照组肿瘤体积的比值(T/C); C: 各组小鼠的生存曲线; 与 A 组比较: $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$

纯化化疗小鼠的生存率得到显著提高 ($P < 0.05$)。

2.4 联合化疗对肺腺癌小鼠肿瘤组织坏死的影响

处死小鼠后取出瘤体进行 HE 染色, 结果显示, 对照组皮下瘤组织以轻、中度坏死为主, 治疗组以中、重度坏死为主, 细胞核萎缩、变形及破碎, 细胞排列稀疏, 以胞质着粉红色及紫色为主, 肿瘤坏死程度高于生理盐水组; 其中化疗组和巨核细胞联合化疗组以中度坏死为主, 坏死程度略高于对照组, 而 tumstatin 转基因巨核细胞联合化疗组以重度坏死为主, 坏死程度高于其他 3 组。见图 4。

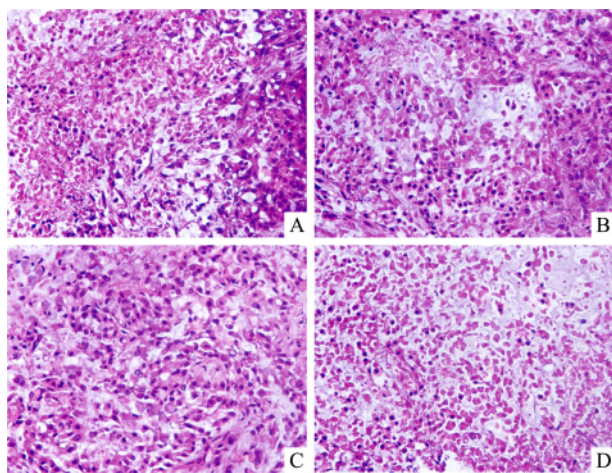


图 4 各给药组小鼠瘤体坏死情况 HE × 200

A: 生理盐水对照组; B: GEM 化疗组(第 18 天); C: GEM 联合巨核细胞组; D: GEM 联合 tumstatin 转基因巨核细胞组

2.5 联合化疗对肺腺癌小鼠肿瘤微血管形成的影响

免疫组织化学测定给药 24 d 后的各组移植瘤小鼠皮下 MVD(化疗组取第 18 天肿瘤组织), 结果表明, 生理盐水组肿瘤组织微血管新生最为明显, 治疗组 MVD 均低于生理盐水对照组, 其中 tumstatin 转基因巨核细胞联合化疗组的 MVD 最低, 其次为 GEM 化疗组(18 d)和巨核细胞联合化疗组, 与生理盐水对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且 tumstatin 转基因巨核细胞联合化疗组肿瘤微血管新生抑制作用最明显, 见图 5。

3 讨论

恶性肿瘤如肺癌, 发病率逐年增加, 严重威胁人类健康, 化疗是其临床治疗的常用方法之一。但多数化疗药像卡铂、紫杉醇、GEM 等药物会造成骨髓抑制, 导致不同程度的血小板减少, 限制了临床化疗药物的剂量和应用。目前, 临床上主要采取直接血小板输注进行临床治疗, 而血小板对肿瘤生长和转移具有强烈的促进作用, 常引起预后不良^[1-2]。

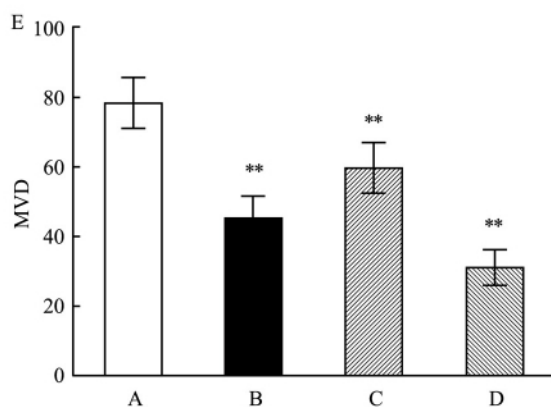
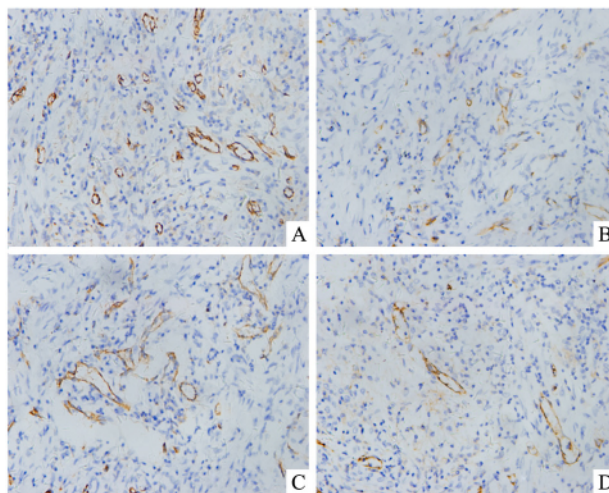


图 5 各组小鼠肺腺癌微血管生长情况 × 200

A: 生理盐水对照组; B: GEM 化疗组(第 18 天); C: GEM 联合巨核细胞组; D: GEM 联合 tumstatin 转基因巨核细胞组; E: 各组小鼠瘤体的 MVD; 与生理盐水对照组比较: ** $P < 0.01$

已知肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的形成, 当肿瘤直径达到 1 ~ 2 mm 时, 血管生成对维持肿瘤生长至关重要^[9]。研究^[10-11]表明, 血管生成调节蛋白大部分被证实贮存在血小板 α -颗粒, 生理或病理条件下血小板活化释放多种血管生成调节因子参与调节血管生成, 其中促进因子持续地占有主导地位。为此, 笔者设想通过携带相关基因的慢病毒转导巨核细胞/血小板前体细胞, 经扩增培养生成具有抗血管生成作用的血小板, 利用其靶向作用在肿瘤部位释放血管生成抑制因子治疗肿瘤。

tumstatin 是来源于基底膜 IV 型胶原 $\alpha 3$ 链 C 末端非胶原区的内源性新生血管生成抑制因子, 分子量为 30.54 ku, 主要经过 MMP-9 降解基膜的 IV 型胶原 $\alpha 3$ 链产生, 体内外实验证明 tumstatin 是通过特异性结合肿瘤血管内皮细胞表面上调的 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体(主要是 $\beta 3$)抑制内皮细胞蛋白质合成, 最终抑制肿瘤生长和转移, 其抗血管生成能力至少是 endostatin 的 10 倍^[12]。本研究用 tumstatin 基因修饰

造血干细胞 CD34⁺ 细胞,在巨核细胞/血小板特异的 Gplb α 启动子作用下靶向表达 tumstatin,以 A549 肺腺癌细胞接种较少发生排斥反应及移植瘤抗宿主病的 NOD/SCID 小鼠建立的肺腺癌异位移植瘤模型为研究对象。在对小鼠肺腺癌治疗过程中连续用化疗药物 GEM 作用于肿瘤细胞,主动抑制血小板产生,然后输注基因修饰的巨核细胞,血小板在体内产生并在肿瘤部位活化,释放目标蛋白,从而达到抗血管生成和化疗的联合作用。结果表明,单纯输注化疗药显著抑制了小鼠血小板和各项血细胞的产生,而输注基因修饰的巨核细胞提高了小鼠血小板水平,提高了小鼠生存率,但还是存在一定的排斥反应,白细胞较对照组升高很多。MVD 的测定结果表明 tumstatin 转基因巨核细胞有很高的抗肿瘤血管新生的作用,这也可能是 tumstatin 抑制了内皮细胞蛋白质合成,使内皮细胞的凋亡增加从而使肿瘤生长得到抑制。该方法在一定程度上解决了化疗药物的使用引起的患者血小板减少症和血小板的输注引起的肿瘤新血管生成增加的弊端,具有基因治疗的优势(如肿瘤治疗针对性强、靶向性高和非细胞毒性等)。另外,基因修饰的巨核细胞在体内不能永久生存,因此转基因巨核细胞的输注引起人体基因突变概率低,这使基因治疗联合化疗在发挥更大的抗肿瘤效果的同时减少了出现不良反应的可能。而对肿瘤细胞具有目标特异性的血小板若采用患者自身分离培养的携带目的蛋白作为输送载体的血小板,可以有效避免机体的免疫排斥反应,具有更高的安全性。同时本研究有一定局限性,选择的 GEM 的肿瘤杀伤作用不强,但高度抑制骨髓造血,使小鼠过早死亡,影响了肿瘤转移的研究,因此 tumstatin 基因和 GEM 对抑制肿瘤转移的作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] Apolseth T O, Hervig T, Wentzel - Larsen T, et al. A prospective observational study of the effect of platelet transfusions on levels of platelet - derived cytokines, chemokines and interleukins in acute leukaemia patients with severe chemotherapy - induced cytopenia [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011, 22(1): 52 - 62.
- [2] Bottsford - Miller J, Choi H J, Dalton H J, et al. Differential platelet levels affect response to taxane - based therapy in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(3): 602 - 10.
- [3] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively J C, et al. tumstatin, an endothelial cell - specific inhibitor of protein synthesis [J]. *Science*, 2002, 295(5552): 140 - 3.
- [4] Li J, Luo J, Luo Y Q, et al. Overexpression of tumstatin in genetically modified megakaryocytes changes the proangiogenic effect of platelets. [J]. *Transfusion*, 2014, 54(8): 2106 - 17.
- [5] 任蓉蓉, 罗以勤, 李娟, 等. Tumstatin 转基因巨核细胞在 NOD/SCID 鼠体内产生抗新生血管作用血小板 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(4): 511 - 5.
- [6] Pranatharathi S, Patel M D, Malshe V C, et al. Asialoglycoprotein receptor targeted delivery of doxorubicin nanoparticles for hepatocellular carcinoma [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 20 - 9.
- [7] Lorusso P M, Aukerman S L, Polin L, et al. Antitumor efficacy of interleukin - 2 alone and in combination with adriamycin and dacarbazine in murine solid tumor systems [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(18): 5876 - 82.
- [8] Banerji S, Ni J, Wang S X, et al. LYVE - 1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph - Specific Receptor for Hyaluronan [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(4): 789 - 801.
- [9] Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process [J]. *Curr Mol Med* 2003, 3(7): 643 - 51.
- [10] Italiano J E, Richardson J L, Patel S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released [J]. *Blood*, 2008, 111(3): 1227 - 33.
- [11] Battinelli E M, Markens B A, Jr I J. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet α granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis [J]. *Blood*, 2011, 118(5): 1359 - 69.
- [12] Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, et al. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin [J]. *J Biol Chem* 2001, 276(18): 15240 - 8.

Tumstatin transgenic megakaryocyte combined with chemotherapy inhibits angiogenesis in subcutaneous lung adenocarcinoma cancer xenografts in mice

Wang Zhangfei¹, Luo Yiqin¹, Li Juan², et al

(¹ Clinical Laboratory, ² Dept of Blood Transfusion, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of tumstatin transgenic megakaryocytic cells combined with chemotherapy on the survival rate of lung adenocarcinoma mice and the inhibitory effect on the growth of subcutaneous xenografts. **Methods** Preparation of tumstatin transgenic megakaryocytes; an ectopic mouse model of lung adenocarcinoma was established by subcutaneously inoculating lung adenocarcinoma A549 cells into the back of mice. The

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180420.1408.012.html>

SOX9 及 WNT 信号通路分子 在高氧暴露致早产大鼠肺损伤中的表达及意义

严隆丽, 全裕凤, 张 华, 柳秋菊, 赵日红, 刘 曼

摘要 目的 观察 SOX9 及 WNT 信号通路分子在高氧暴露早产鼠肺组织中的表达, 探讨高氧暴露早产大鼠肺组织损伤的发病机制。方法 将 72 只 1 日龄早产 SD 大鼠随机均分为高氧组和空气组, 每组 36 只, 各组再随机均分为生后 3 d 组、5 d 组、9 d 组, 每组 12 只。高氧组早产鼠置于氧体积分数为 95% 的氧箱中。各组分别在相应的时间处死动物后收集肺组织标本。采用苏木精-伊红(HE)染色法观察肺组织的病理改变, 采用 RT-PCR 及 Western blot 法检测 SOX 9 及 WNT 信号通路中关键因子 β -连环蛋白(β -catenin)及下游因子淋巴增强因子(LEF-1)、肺泡表面活性蛋白 C(SPC)、 α -平滑肌激动蛋白(α -SMA)在早产大鼠肺组织中的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 空气各组肺组织结构基本正常, 高氧 3 d 组肺组织见明显渗出、大量炎症细胞浸润、出血性改变及肺泡压缩, 高氧 5 d 组和 9 d 组可见肺间隔增宽及肺泡结构紊乱。与空气组比, 高氧组 β -catenin、LEF-1、SPC 及 α -SMA mRNA 及蛋白表达均增加($P < 0.05$), 且随着高氧暴露天数的增加而增加; SOX9 因子在高氧暴露 3 d 和 5 d 时 mRNA 和蛋白表达均高于空气组($P < 0.01$), 且高氧暴露 3 d 组核酸

及蛋白表达量高于高氧暴露 5 d 组, 高氧暴露 9 d 时与空气组无明显变化($P > 0.05$), 且表达量低于高氧 5 d 组。结论

高氧暴露通过激活 WNT 信号通路致早产大鼠肺组织损伤; SOX 9 基因在高氧暴露早产大鼠肺组织中可能通过抑制 WNT 信号通路来参与高氧肺损伤。

关键词 SOX9; WNT 信号通路; 高氧肺损伤; 早产大鼠
中图分类号 R 722

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0552-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.012

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是新生儿常见的慢性呼吸系统疾病, 其发病率随着胎龄及出生体质量的减少而增加, 严重威胁到了新生儿的生命及生存质量。研究^[1]显示早产儿肺发育不成熟、长期吸入高浓度氧、感染等是 BPD 发生的常见原因, 但其发病机制仍不明确。目前, 越来越多研究^[2]表明遗传因素在 BPD 的发病中起着重要作用, 同时, 与高氧肺损伤相关的分子机制也有了较多的研究, 但仍然不太完善。WNT 信号通路是一条在进化上高度保守的信号传导通路, 对胚胎动物各器官的发育起着关键作用, 近年来研究^[3]证实其在胚胎肺发育过程中起着必不可少的作用, 贯穿了整个鼠胚胎肺发育过程。SOX9 因子属于 SOX 转录因子家族, 是细胞核内 WNT 信号通路的

2017-12-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81360105)

作者单位: 桂林医学院附属医院新生儿科 桂林 541001

作者简介: 严隆丽, 女, 硕士研究生;

全裕凤, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: Qyfxse@163.com

mice were then randomly divided into 4 groups: normal saline control group was group A, gemcitabine chemotherapy group was group B, gemcitabine combined with megakaryocytes group was group C, gemcitabine combined with tumstatin transgenic megakaryocytes group was group D, and the latter three groups were the treatment group. The mice in each group were administered for 24 days, and the tumor volume was measured every 3 days. Blood samples were taken from the 15th day, blood cell values were measured by blood cell analyzer. On day 24, the tumor was dissected and the size and quality were measured. The microvessel density (MVD) was tested by immunohistochemistry. Tumor necrosis was detected by hematoxylin and eosin staining. Survival of mice was recorded during treatment. **Results** The tumor volume growth curve of the treatment group was significantly slower than that of the normal saline group. The survival rate of the tumstatin transgenic megakaryocytic cells was the slowest. The survival rate was significantly improved compared with the chemotherapy group (group B). Compared with the normal saline group and other treatment groups, group D significantly inhibited tumor MVD and caused severe necrosis of tumor tissue, and the corresponding mice maintained a normal blood cell level. **Conclusion** The combination of tumstatin monocyte megakaryocytosis can enhance the survival rate of lung adenocarcinoma mice and inhibit the MVD of lung adenocarcinoma significantly.

Key words tumstatin; megakaryocytes; platelet; chemotherapy; lung adenocarcinoma