

良刺激的耐受情况。

本研究从心肌肥厚、凋亡及纤维化三个方面来分析 Sal A 对压力超负荷导致心室重构的保护作用。Sal A 处理可改善压力超负荷大鼠的心肌直径、胶原容积分数、心脏体重比,以上从形态学和病理学上证实 Sal A 对心肌肥厚及纤维化有改善作用。压力超负荷大鼠的 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白水平上升,且 Bcl-2 水平降低,表明压力超负荷大鼠出现心肌凋亡,而给予 Sal A 处理后尽管与正常大鼠有差异,但异常的凋亡相关基因的蛋白水平均获改善。以上证据指出 Sal A 对压力超负荷大鼠的心室重构有保护作用。研究指出氧化应激在发生心室重构的发生、发展中起促进作用,改善氧化应激相关指标可逆转心室重构^[15]。本研究采用 DHE 探针染色发现,未处理的压力超负荷大鼠的活性氧自由基水平较高,而给予 Sal A 处理后其水平降低,提示 Sal A 具有改善氧化应激的作用,为改善心室重构的可能机制。

本研究中血流动力学数据和病理学均有差异,血流动力学的长期改变是心肌细胞重构的基础,而心肌细胞重构反过来可以加剧血流动力学的改变,两者是相辅相成的,探讨两者的相关意义对于压力超负荷导致心功能减退及心室重构的研究和治疗具有重要价值,本研究下一步将深入两者的关系。

综上所述,Sal A 可改善压力超负荷大鼠的心功能及包括心肌肥大、纤维化及凋亡在内的心室重构。

[参考文献]

- [1] Hua Y, Xu X, Shi GP, et al. Cathepsin K knockout alleviates alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. *Hypertension*, 2013, 61(6): 1184–1192
- [2] Chan W, Duffy SJ, White DA, et al. Acute left ventricular remodeling following myocardial infarction: coupling of regional healing with remote extracellular matrix expansion[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012, 5(9): 884–893
- [3] Fu J, Huang H, Liu J, et al. Tanshinone IIA protects cardiac myocytes against oxidative stress-triggered damage and apoptosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568(1–3): 213–221
- [4] Shan H, Li X, Pan Z, et al. Tanshinone IIA protects against sudden cardiac death induced by lethal arrhythmias via repression of microRNA-1 [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(5): 1227–1235
- [5] Yang L, Zou X, Liang Q, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate depresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through MEK/ERK pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(1): 65–73
- [6] 于翠翠, 刘军锋, 车 鑫, 等. 丹酚酸 A 中有关物质含量的测定方法 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(19): 94–97
- [7] Hill JA, Karimi M, Kutschke W, et al. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload [J]. *Circulation*, 2000, 101(24): 2863–2869
- [8] 张新磊, 李明慧, 杨少华, 等. 人参皂苷 Rg1 对心肌肥厚模型大鼠的保护作用及机制研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(3): 332–336
- [9] 唐忠志, 郑 智, 唐 璞, 等. 丹参对自发性高血压大鼠心肌纤维化的逆转作用及其机制研究 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2002, 31(3): 292–294
- [10] You J, Wu J, Jiang G, et al. Olmesartan attenuates cardiac remodeling through DLL4/Notch1 pathway activation in pressure overload mice [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 61(2): 142–151
- [11] Takefuji M, Wirth A, Lukasova M, et al. G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure [J]. *Circulation*, 2012, 126(16): 1972–1982
- [12] 杨秀颖, 强桂芬, 张 莉, 等. 丹酚酸 A 对缺血/再灌注心肌的保护作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(8): 1072–1076
- [13] Yang XY, Qiang GF, Zhang L, et al. Salvianolic acid A protects against vascular endothelial dysfunction in high-fat diet fed and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(10): 884–894
- [14] 张 莉, 张维库, 赵 莹, 等. 丹酚酸 A 的研究与进展 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(19): 2603–2609
- [15] 周淑娴, 周 艳, 雷 娟, 等. 氧化应激对大鼠心肌梗死后心室重构的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(11): 2030–2034

[收稿日期] 2013-07-25

Galectin-3 重组真核表达载体的构建及其在 NIH/3T3 细胞中的表达

胡圳圳, 蒋秀琴, 高才杰, 郑大同*

(南京医科大学第二附属医院中心实验室, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的: 构建半乳糖凝集素-3(Gal-3)的真核表达载体, 在 NIH/3T3 细胞中表达, 并检测其表达。方法: 通过 DNA 重组技术和 PCR 方法从人肿瘤细胞克隆 Gal-3 基因, 插入真核表达载体 pEGFP-N1 中, 通过酶切和测序鉴定重组载体的正确性; 采用脂质体转染技术将重组质粒 pEGFP-Gal-3 瞬时转染 NIH/3T3 细胞, 经荧光和 Western blot 方法检测 Gal-3 表达, MTT 法检测 Gal-3 对 NIH/3T3 细胞增殖的影响。结果: 限制性内切酶鉴定和核酸序列测序证实成功构建含 Gal-3 的重组真核表达载体 pEGFP-Gal-3。以重组质粒瞬时转染 NIH/3T3 细胞, 检测到 Gal-3 蛋白表达, 并证实 Gal-3 蛋白促进 NIH/3T3 细胞增殖。结论: 成功构建的 pEGFP-Gal-3 真核表达载体在小鼠 NIH/3T3 细胞中成功表达, 并促进 NIH/3T3 细胞增殖。

[关键词] 半乳糖凝集素-3; NIH/3T3 细胞; 细胞增殖

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-018-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140104

Construction of recombinant eukaryote expression vector encoding gene of galectin-3 and its expression in NIH/3T3 cells

Hu Zhenzhen, Jiang Xiuqin, Gao Caijie, Zheng Datong*

(Center Laboratory, Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To construct recombinant eukaryote expression vector containing Gal-3 gene and detect protein expression in NIH/3T3 cells. **Methods:** Gal-3 gene was obtained by PCR from cancer cells. PCR product of Gal-3 was then clone into the eukaryote expression vector pEGFP-N1, then the recombinant vector pEGFP-Gal-3 was transfected into the NIH/3T3 cells. After the transfection of the recombinant vector, the protein expression of Gal-3 in NIH/3T3 cells was detected by Western blot. The effect of Gal-3 on cell proliferation was investigated by MTT assay. **Results:** The recombinant eukaryote expression vector encoding Gal-3 was constructed restriction enzyme analysis and nucleic acid sequence successfully. The expression of Gal-3 in NIH/3T3 cells transiently transfected by recombinant plasmid could be detected by Western blot. In addition, Gal-3 protein could promote the proliferation of NIH/3T3 cells. **Conclusion:** The new recombinant expression vector pEGFP-Gal-3 was constructed and expressed successfully in NIH/3T3 cells of rats. Furthermore, our study found that Gal-3 protein could promote the proliferation of NIH/3T3 cells.

[Key words] galectin-3 NIH/3T3 cell; cell proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01): 018-021]

半乳糖凝集素-3(Gal-3), 属于半乳糖凝集素家族(galectin family)成员, 广泛表达于正常组织和肿瘤组织中, 参与多种生理和病理过程, 包括细胞生长和凋亡、细胞粘附及新生血管形成和肿瘤浸润与转移等^[1-2], 使 Gal-3 作为疾病治疗的新靶点成为可能。目前有关 Gal-3 的许多生物学功能及其发挥效应的

机制尚未完全明了, 值得深入研究。本研究通过构建 Gal-3 蛋白的真核表达载体, 转染小鼠胚胎成纤维细胞(NIH/3T3), 观察人 Gal-3 蛋白的表达, 为进一步研究 Gal-3 的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠胚胎成纤维细胞株 NIH/3T3 购自中国科学院细胞库; EcoR I 和 BamH I 限制性核酸内切酶购自美国 NEB 公司; Quant cDNA 第一链合成试剂

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2012NJMU088)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dtzheng@njmu.edu.cn

盒、Taq 酶购自瑞士 Roch 公司; 胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自德国 Macherey-Nagel 公司; T4 连接酶、转染试剂 LipofectamineTM 购自美国 Invitrogen 公司; 卡那霉素和 MTT 购自美国 Sigma 公司; GFP 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 Gal-3 基因的扩增

一步法抽取细胞总 RNA, 根据 GenBank (NM002306.3) Gal-3 序列设计如下引物, 上游引物: 5'-CCGGAATTCGCCACCATGGCAGACAATTTTCGCTC-3' (下划线表示 *EcoR* I 的酶切位点); 下游引物: 5'-CGCGGATCCCGTATCATGGTATATGAAGCACTG-3' (下划线表示 *Bam*H I 的酶切位点)。PCR 引物由上海 Invitrogen 公司合成。用 Gal-3 两端引物进行 PCR 扩增, 具体反应条件如下: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 30 s, 55.8℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 6 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的基因的长度为 774 bp (Gal-3 基因长度加上保护碱基、酶切位点及 kozak 序列), 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收及纯化目的基因片段。

1.2.2 重组质粒 pEGFP-Gal-3 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 分别双酶切 Gal-3 片段和 pEGFP-N1 载体, 2 个酶切产物纯化后用 T4 连接酶于 16℃ 条件下连接过夜。取适量连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 并将转化后的大肠杆菌涂布在含有卡那霉素的 LB 固体培养基上 37℃ 倒置培养。18 h 后, 随机挑取单克隆菌落, 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 同时经进一步基因测序正确后, 采用去内毒素质粒大量提取试剂盒获得大量重组质粒, 该质粒命名为 pEGFP-Gal-3。

1.2.3 质粒 pEGFP-Gal-3 瞬时转染

转染前 24 h 将 NIH/3T3 细胞传代至 6 孔细胞培养板中, 在含 10% 胎牛血清的无抗生素 DMEM 培养液培养。转染的当天细胞处于 80% 的汇合率。在无菌 EP 管中制备: 溶液 A, 2 μ g 的质粒, 加入无血清无抗生素的 DMEM 培养液 100 μ l 和 Plus 试剂 4 μ l, 混匀; 溶液 B, 取脂质体 10 μ l, 加入无血清无抗生素的 DMEM 培养液 100 μ l, 混匀。溶液 A 室温下孵育 15 min 后与溶液 B 混合, 将混合液室温下孵育 15 min。用无血清无抗生素 DMEM 培养液洗板 2 次, 加入 0.8 ml 无血清无抗生素 DMEM 培养液, 将 pEGFP-Gal-3、脂质体混合液加入培养孔内。37℃, 5% CO₂ 培养 4 h 后, 换 1 ml 完全 DMEM 培养液。培养 48 h 后倒置荧光显微镜下观察绿色荧光表

达情况。

1.2.4 Western blot 检测 Gal-3 表达

RIPA 蛋白裂解液裂解 NIH/3T3 细胞后提取总蛋白, BCA 比色法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸 10 min 使其变性, 取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳条件为 90 V 电泳 30~40 min, 待溴酚蓝迁移出积层胶位置再换用 120 V 电泳 90 min, 电泳完毕后将蛋白经全湿电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 抗 GFP 抗体 (1:1 000) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜, 羊抗鼠 IgG-HRP (1:1 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 暗室中加入 ECL 液孵育 4 min 后曝光和显影。

1.2.5 MTT 法检测 Gal-3 对细胞增殖的影响

转染 24 h 后, 细胞无血清饥饿 24 h。取细胞制成单细胞悬液, 用完全培养基调整细胞浓度至 2×10^4 个/ml, 每孔 200 μ l 接种于 96 孔培养板, 继续培养。分别于 0、24、48、72 h 按 20 μ l/孔加入 MTT (5 mg/ml), 继续孵育 4 h 后终止培养, 每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 10 min。酶标仪测定光密度值, 波长为 490 nm。

1.3 统计学方法

检测数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS13.0 分析实验数据, 组间比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 表示有统计学差异。

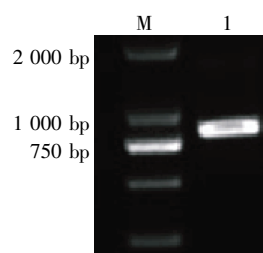
2 结果

2.1 PCR 扩增目的基因片段

从肿瘤细胞中提取总 RNA, 以此为模板, RT-PCR 扩增 Gal-3 基因片段, 并进行琼脂糖凝胶电泳鉴定 (图 1), 在 774 bp 左右可见目的条带。

2.2 重组质粒 pEGFP-Gal-3 的鉴定

限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切重组质粒, 产生大小两个片段 (图 2 A), 分别代表载体 pEGFP-N1 和 Gal-3 基因片段。核酸序列测定显示克隆的基因序列与 GenBank 上所公布的 Gal-3 基因序



M: DNA 标准; 1: galectin-3。

图 1 目的基因 Gal-3 PCR 扩增电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of Gal-3 PCR amplification

列一致 (图 2 B)。提示 Gal-3 基因成功克隆到 pEGFP-N1 载体中。

2.3 重组质粒 pEGFP-Gal-3 瞬时转染 NIH/3T3 细胞的鉴定

使用脂质体法将重组质粒 pEGFP-Gal-3 转染 NIH/3T3 细胞,48 h 后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光,GFP 阳性率在 30%以上(图 3),这些阳性细胞被认为可以表达目的基因,显示转染成功。

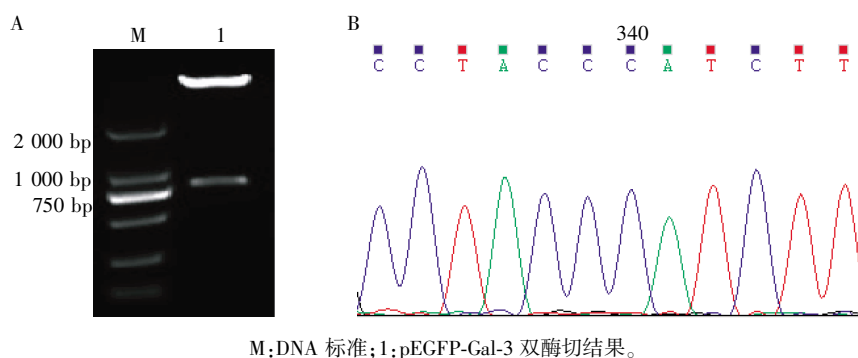


图 2 重组质粒 pEGFP-Gal-3 *EcoR* I、*Bam* H I 双酶切鉴定(A)及部分测序结果(B)

Figure 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid(A), and part results of sequencing(B)

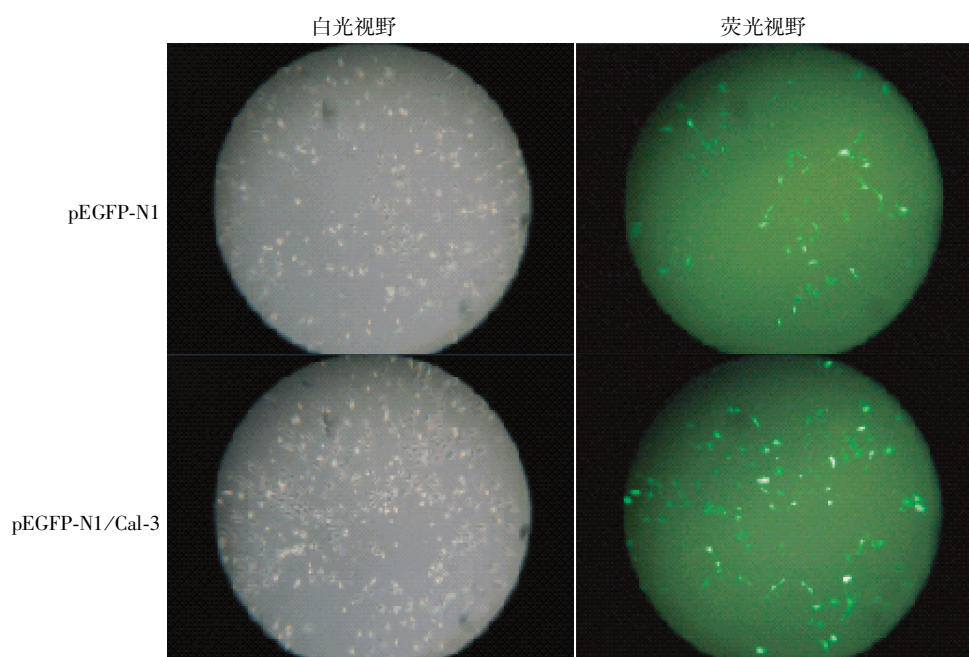


图 3 GFP 在转染的 NIH/3T3 细胞中的荧光表达

Figure 3 EGFP Fluorescence in transfected NIH/3T3 cells

2.4 重组质粒转染 NIH/3T3 细胞中 Gal-3 蛋白的表达

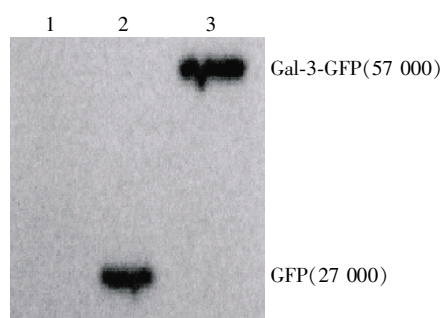
我们用 RIPA 裂解液提取转染目的基因的 NIH/3T3 细胞总蛋白,用 Western blot 鉴定 GFP 和 Gal-3-GFP 重组蛋白的表达。结果表明,转染空载体 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-Gal-3 的两个细胞株分别显示大小约为 27 000 和 57 000 的蛋白条带(图 4),与目的蛋白分子量大小一致。该结果进一步验证了 GFP 和 Gal-3-GFP 重组蛋白在 NIH/3T3 细胞中的表达。

2.5 Gal-3 基因表达对 NIH/3T3 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示,转染 pEGFP-Gal-3 的 NIH/3T3 细胞增殖能力显著高于未转染和转染 pEGFP-N1 的 NIH/3T3 细胞($P < 0.05$,图 5)。表明 Gal-3 可明显促进 NIH/3T3 细胞增殖。

3 讨论

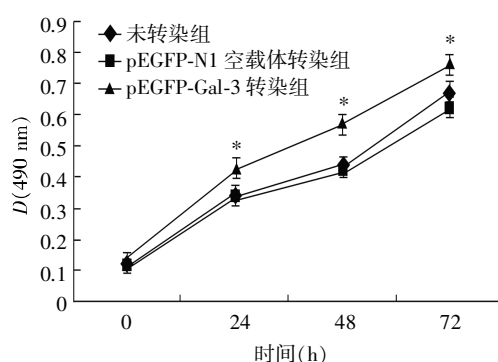
半乳糖凝集素家族(galectin family)在结构上都有 1 或 2 个糖识别域 (the carbohydrate recognition domain,CRD),对 β 半乳糖苷有特殊的亲和力^[3-4]。



1: 未转染组; 2: pEGFP-N1 空载体转染组; 3: pEGFP-Gal-3 转染组。

图 4 EGFP 重组蛋白在 NIH/3T3 细胞中的表达

Figure 4 Expression of EGFP recombination protein in transfected NIH/3T3 cells



与未转染组相比, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 5 表达 Gal-3 促进 NIH/3T3 细胞增殖

Figure 5 Expression of Gal-3 gene promotes NIH/3T3 cell proliferation

Galectin 根据 CRD 不同分为 3 类: 原型结构、串联重复结构和嵌合体结构。Gal-3 是该家族中唯一具有嵌合体结构的蛋白^[1-2,5]。近年来的研究显示 Gal-3 与肿瘤侵袭和转移的某些过程密切相关, 如肿瘤血管生成、细胞基质相互作用、肿瘤细胞沿血管播散及渗出^[6-7]。Gal-3 在肿瘤中的这些功能使其有望成为一种可靠的肿瘤转移诊断标记物及癌症治疗靶向蛋白。为进一步研究 Gal-3 的作用机制, 本研究从人肿瘤细胞克隆 Gal-3 基因, 插入真核表达载体 pEGFP-N1 中, 构建了包含 Gal-3 基因的真核表达载体 pEGFP-Gal-3。获得的真核表达载体经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后电泳, 同样可见与预期长度相符的片段。测序结果证明, PCR 扩增获得并克隆的 Gal-3 片段序列与 GenBank 中的序列完全一致。通过上述实验可以证明成功构建并获得了包含 Gal-3 的真核表达载体。

为进一步研究目的基因 Gal-3 的表达, 本研究采用脂质体转染技术将重组质粒 pEGFP-Gal-3 瞬

转染 NIH/3T3 细胞, 通过荧光观察和 Western blot 方法检测 Gal-3 的表达情况。实验中将 pEGFP-Gal-3 和 pEGFP-N1 空质粒采用脂质体的方法转染 NIH/3T3 细胞, 转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察到绿色荧光的表达, 初步证明构建的质粒转染细胞成功, 目的基因 Gal-3 得以表达。通过 Western blot 进一步鉴定转染后 NIH/3T3 细胞 Gal-3 蛋白的表达情况, 结果显示转染了 pEGFP-Gal-3 的 NIH/3T3 细胞中明显可见 Gal-3-GFP 融合蛋白的表达, 而对照组只有 GFP 蛋白的表达。通过上述实验结果证明已成功构建 pEGFP-Gal-3 的真核表达载体, 能够在 NIH/3T3 细胞中表达。

Gal-3 调控细胞生长的机制是当前的热点之一。pEGFP-Gal-3 转染 NIH/3T3 细胞后, 本研究用 MTT 法对其表达的 Gal-3 的功能进行了检测。与未转染组相比, 表达 pEGFP-N1 的 NIH/3T3 细胞的生长趋势未发生明显变化, 而表达 Gal-3 的细胞其生长受到明显促进, 表明 Gal-3 促进 NIH/3T3 细胞增殖。

本研究为进一步研究 Gal-3 在肿瘤发生发展中的作用及机制, 以及针对 Gal-3 的分子靶向治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression [J]. Immunol Res, 2012, 52(1-2): 100-110
- [2] Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. Galectin-3 and metastasis [J]. Glycoconj J, 2004, 19(7-9): 543-549
- [3] Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins [J]. Cell, 1994, 76(4): 597-598
- [4] Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(1): 29-41
- [5] Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential [J]. Expert Rev Mol Med, 2008, 10(1): e17
- [6] Wesley UV, Vemuganti R, Ayvaci ER, et al. Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling [J]. Brain Res, 2013, 1496(1): 1-9
- [7] Friedrichs J, Manninen A, Muller DJ, et al. Galectin-3 regulates integrin α 2 β 1-mediated adhesion to collagen-I and -IV [J]. J Biol Chem, 2008, 283(47): 32264-32272

[收稿日期] 2013-07-29

晚期糖基化终产物对心肌成纤维细胞的老化及纤维化的影响

方 敏¹, 李世玲¹, 王俊宏¹, 郭 妍^{1,2*}

(¹南京医科大学第一附属医院老年心血管科, 江苏 南京 210029; ²江苏盛泽医院心血管科, 江苏 苏州 215228)

[摘要] 目的:探讨晚期糖基化终产物(AGEs)诱导心肌成纤维细胞老化及纤维化的相关机制。方法:用 AGEs(200 $\mu\text{g/ml}$)及抗 RAGE 抗体(2 $\mu\text{g/ml}$)、TGF- β 1/smad 通路抑制剂(SB431542, 10 $\mu\text{mol/L}$)干预大鼠心肌成纤维细胞 72 h。观察老化相关指标 β -半乳糖苷酶的活性及 p16 的表达;Western blot 检测 TGF- β 1、p-smad2/3、MMP-2 的水平。结果:AGEs 干预 72 h 后,AGEs 组细胞老化指标 β -半乳糖苷酶的活性及 p16 的表达水平较对照组明显升高($P < 0.01$),伴有 TGF- β 1、p-smad2/3、MMP-2 水平的显著增高,而给予抗 RAGE 抗体或 SB431542 干预后, β -半乳糖苷酶的活性及 p16 的表达水平较 AGEs 组明显下降,同时 TGF- β 1、p-smad2/3、MMP-2 的水平也显著下降。结论:推测 AGEs 可与其受体 RAGE 作用诱导心肌成纤维细胞的老化,而 TGF- β 1/smad 信号通路引发的心肌纤维化可能参与了这一过程。

[关键词] AGEs; RAGE; TGF- β /smad; 心肌老化; 心肌纤维化

[中图分类号] R587.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-022-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140105

Aging and fibrosis effects of advanced glycation end products on cardiac fibroblasts

Fang Min¹, Li Shiling¹, Wang Junhong¹, Guo Yan^{1,2*}

(¹Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Cardioangiopathy, Shengze Hospital of Jiangsu Province, Suzhou 215228, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms of cardiac fibroblasts aging and fibrosis induced by advanced glycosylation end-products (AGEs). **Methods:** Neonatal rat cardiac fibroblasts were incubated for 72h with AGEs (200 $\mu\text{g/ml}$), anti-RAGE antibody (2 $\mu\text{g/ml}$) and TGF β /smad signaling pathway inhibitor (SB431542, 10 $\mu\text{mol/L}$). Senescence-associated beta galactosidase activity and p16 expression were observed; MMP-2, TGF- β 1 and p-smad2/3 were measured by Western blot. **Results:** After intervened with AGEs for 72 h, senescence-associated beta galactosidase activity and the level of p16 in the AGEs group were significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$), accompanied with significant increases of the expressions of TGF- β 1, p-smad2/3 and MMP-2. However, senescence-associated beta galactosidase activity and the expression of p16 were remarkably down-regulated after the pretreatment of anti-RAGE antibody and SB431542 compared with those of the AGEs group, meanwhile, the levels of TGF- β 1, p-smad2/3 and MMP-2 were also significantly decreased. **Conclusion:** We conclude that AGEs could induce cardiac fibroblasts aging through binding to its receptor RAGE, and cardiac fibrosis induced by TGF- β /smad pathway could be involved in this process.

[Key words] AGEs; RAGE; TGF- β /smad; cardiac aging; cardiac fibrosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):022-026]

晚期糖基化终产物(AGEs),是以蛋白质、脂肪及核酸的氨基及还原糖(葡萄糖、果糖、戊糖等)为原料,在生理环境中发生非酶催化反应(Maillard 反

应)生成的稳定共价化合物,随着年龄的增加,在体内含量增加^[1],糖尿病加速此过程。本课题组既往研究发现 AGEs 与心肌老化及舒张功能障碍密切相关^[2];同时其他学者也发现 AGEs 与纤维化相关^[3],但 AGEs 在心肌成纤维细胞老化及心肌纤维化过程中的具体作用及机制目前尚不明确。因此,本文着重于研究 AGEs 诱导心肌成纤维细胞老化及纤维化的潜在机制。

[基金项目] 江苏省科技厅自然科学基金(BK2011382),江苏省“六大人才高峰”(2011WSN-029),江苏省卫生厅科技项目(Z201301)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoyan51@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料

Sprague-Dawley (SD) 乳大鼠, 1~3 日龄 (南京医科大学实验动物中心)。DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司; II 型胶原酶购自美国 BIOSHARP 公司; AGEs 购自美国 Calbiochem 公司 (121800); 抗 RAGE 抗体购自美国 R&D 公司 (AF1616); SB431542 购自美国 Gene Operation 公司 (ITB1001-0050MG); β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自海门碧云天; p16 购自美国 Santa Cruz 公司; TGF- β 1、MMP-2 抗体购自美国 Epitomics 公司; smad2/3、p-smad2/3 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 心肌成纤维细胞的提取及培养

SD 乳大鼠心肌成纤维细胞的提取及培养, 参照文献提供方法^[7], 并加以改进。无菌条件下, 取 1~3 d SD 乳大鼠于 75% 酒精中消毒, 开胸取心脏, 在预冷的 PBS 中去除血液及大血管、心房组织, PBS 洗 3 遍, 剪碎, 加入 0.1% II 型胶原酶于 37℃、200 r/min 恒温摇床消化 20 min, 每隔 3~5 min 收集上清液, 直至消化完全, 加入 1~2 ml 胎牛血清终止消化。过滤上清液, 于 4℃、1 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 吹匀, 接种于 10 cm 平皿, 于 5% CO₂ 孵箱静置 2 h 后, 弃悬浮液, 贴壁的为心肌成纤维细胞。

1.2.2 实验分组及干预

本实验采用第 3 代细胞, 经无血清 DMEM 高糖培养基饥饿 24 h 后进行干预。分为 4 组, 正常对照组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 未予以任何干预; AGEs 组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 予以 200 μ g/ml AGEs; AGEs+抗 RAGE 抗体 (具有中和作用的抗体) 组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 2 μ g/ml 抗 RAGE 抗体作用 2 h 后^[5], 予以 200 μ g/ml AGEs; AGEs+SB431542 组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 10 μ mol/L SB431542 作用 2 h 后^[6], 培养液中加以 200 μ g/ml AGEs。各组细胞均干预 72 h。

1.2.3 Western blot 检测心肌老化及纤维化相关蛋白

收集细胞后加入细胞裂解液, 离心 (4℃, 12 000 r/min, 20 min), 取上清弃沉淀。BCA 法测定蛋白浓度, 并加入相应 Loading Buffer。等量蛋白 30 μ g/孔, 通过 SDS-PAGE 分离, 电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗, 4℃ 过夜, 二抗 (兔抗) 作用 2 h。显色液为 ECL 化学发光试剂, 检测目的蛋白。

Alpha Ease FC 及 GraphPad Prism 5.0 软件分析目的蛋白条带灰度值, 并与内参 GAPDH 相比, 测定目的蛋白的表达水平, 每组细胞重复测定 3 次, 计算其均值及标准差。

1.2.4 β -半乳糖苷酶染色

根据试剂盒说明书步骤, 并参照有关文献所述方法^[4], 在 pH6.0 时检测 β -半乳糖苷酶的活性。将第 3 代 SD 乳大鼠心肌成纤维细胞均匀铺入 6 孔板, 加药干预 72 h, 吸弃培养基, PBS 洗涤, 1 ml β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15 min; 吸弃固定液, PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min; 每孔加入染色工作液 (包括 X-Gal 溶液) 1 ml; 37℃ 孵育过夜; 普通光学显微镜下 (100 倍), 计数胞质蓝染细胞数, 每个视野计数至少 100 个细胞, 每组取 5 个视野, 计算细胞染色阳性率, 染色阳性率 (%) = 染色阳性细胞数 / 总细胞数 \times 100%。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS13.0 软件分析处理, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AGEs 对心肌成纤维细胞老化的影响

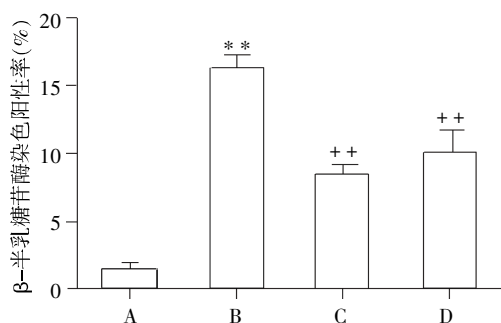
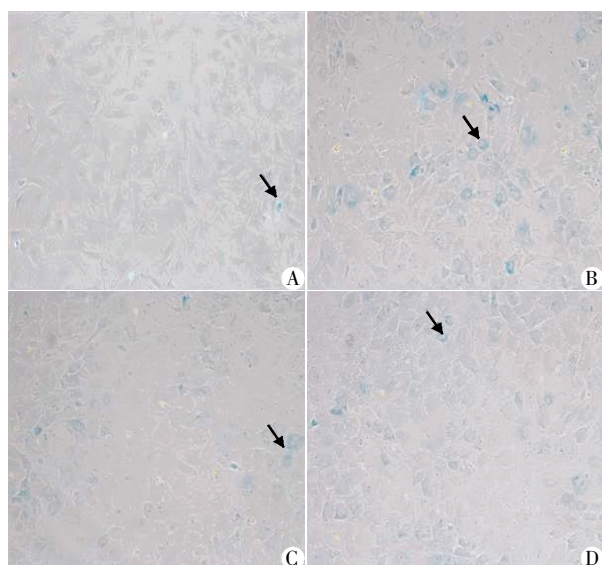
与正常对照组相比, AGEs 组 β -半乳糖苷酶染色阳性率显著增加 (正常组: 1.6% \pm 0.9%, AGEs 组: 16.4% \pm 1.5%, $P < 0.01$); p16 的表达量较对照组明显升高 1.6 倍 ($P < 0.01$); 而抗 RAGE 抗体及 SB431542 预处理后, β -半乳糖苷酶染色阳性率分别为 8.6% \pm 1.3% 和 1.2% \pm 0.7%, 较 AGEs 干预组显著降低 ($P < 0.01$, 图 1); p16 的表达较 AGEs 组分别降低 1.7 倍、2.1 倍 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.2 AGE-RAGE 轴对乳鼠心肌成纤维细胞 MMP-2 表达的影响

与正常对照组相比, AGEs 组 MMP-2 的表达量显著增加 2.1 倍 ($P < 0.05$), 而抗 RAGE 抗体及 SB431542 预处理后, MMP-2 的表达较 AGEs 组分别减少 2.3 倍、2.5 倍 ($P < 0.01$, 图 3)。

2.3 AGEs 对 TGF- β 1 smad 信号通路的影响

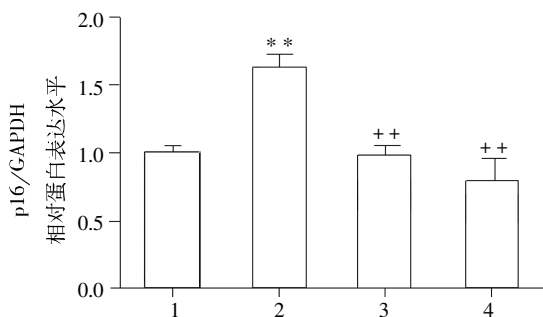
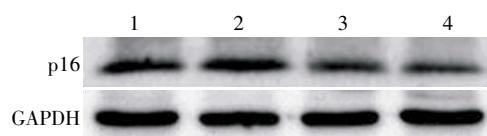
与正常对照组相比, AGEs 组 TGF- β 1 上调 1.5 倍 ($P < 0.05$)、p-smad2/3 上调 1.6 倍 ($P < 0.01$), 抗 RAGE 抗体及 SB431542 预处理后, TGF- β 1 的表达分别较 AGEs 组下调 1.8 倍、1.6 倍 ($P < 0.05$), p-smad2/3 分别下调 1.4 倍、2.0 倍 ($P < 0.01$, 图 4)。



A: 对照组; B: 200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; C: 2 $\mu\text{g/ml}$ 抗 RAGE 抗体+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; D: 10 $\mu\text{mol/L}$ SB431542+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h。图中箭头所指的蓝染细胞, 为 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 AGEs 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 β -半乳糖苷酶染色

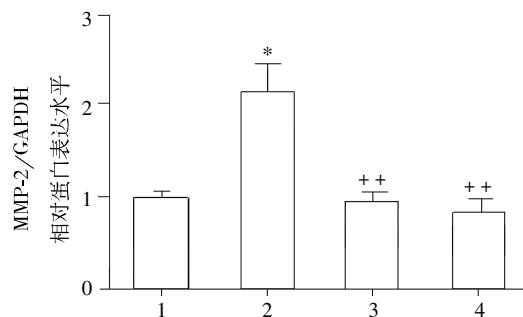
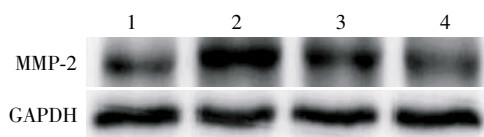
Figure 1 β -galactosidase staining



1: 对照组; 2: 200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; 3: 2 $\mu\text{g/ml}$ 抗 RAGE 抗体+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ SB431542+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h。与 1 组比较, ** $P < 0.01$; 与 2 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 Western blot 检测乳鼠心肌成纤维细胞中 p16 的表达情况

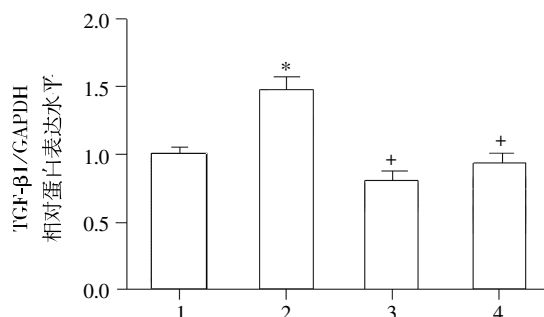
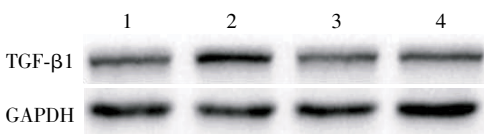
Figure 2 The expression of p16 in neonatal cardiac fibroblasts by Western blot



1: 对照组; 2: 200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; 3: 2 $\mu\text{g/ml}$ 抗 RAGE 抗体+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ SB431542+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h。与 1 组比较, * $P < 0.05$; 与 2 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 AGE-RAGE 轴对乳鼠心肌成纤维细胞中 MMP-2 表达的影响

Figure 3 Effects of AGE-RAGE axis on MMP-2 expression in neonatal cardiac fibroblasts



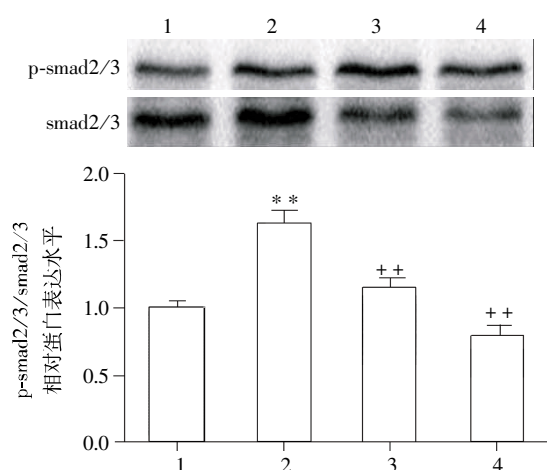
1: 对照组; 2: 200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; 3: 2 $\mu\text{g/ml}$ 抗 RAGE 抗体+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ SB431542+200 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预 72 h。与 1 组比较, * $P < 0.05$; 与 2 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 Western blot 检测乳鼠心肌成纤维细胞中 TGF-β1 水平

Figure 4 The level of TGF-β1 in neonatal cardiac fibroblasts by Western blot

3 讨论

大分子末端的还原性氨基与葡萄糖等还原糖分子中的醛基形成可逆的 Schiff 碱, 在发生 Amadori 重排后, 经过一系列脱水重排反应, 最终形成 AGEs。AGEs 不仅可以与相邻蛋白上游离的氨基以共价键结合形成交联结构直接影响细胞和组织的功能, 参与疾病的发生; 同时, 也可以与细胞表面特异性受体 RAGE 结合形成 AGE-RAGE, 从而激活细胞



1: 对照组;2:200 µg/ml AGEs 干预 72 h;3:2 µg/ml 抗 RAGE 抗体+200 µg/ml AGEs 干预 72 h;4:10 µmol/L SB431542+200 µg/ml AGEs 干预 72 h。与 1 组比较, ** $P < 0.01$; 与 2 组比较, ++ $P < 0.01$ 。
图 5 Western blot 检测乳鼠心肌成纤维细胞中 TGF- β 1 水平
Figure 5 The level of smad in neonatal cardiac fibroblasts by Western blot

内多种信号级联反应,上调细胞内相关指标的表达式,导致机体的病理变化,介导疾病的发生^[5,7-9],此外,大量实验表明,AGEs 与老化的发生发展更是密切相关^[8]。

老化的过程与 p16 显著相关,大多数老化的细胞都可表达蛋白 p16^[10-12],它是位于细胞核内的一种细胞分裂周期关键酶——CDK4 的抑制因子。而老化细胞在体外识别的一个重要标志是老化相关的 β -半乳糖苷酶(溶酶体活性增加的一个标志物)^[9]。本研究通过测定乳鼠心肌成纤维细胞 p16 蛋白的表达及 β -半乳糖苷酶活性,发现 AGEs 可上调乳鼠心肌成纤维细胞 p16 蛋白的含量,并促使 β -半乳糖苷酶活性增高,表明 AGEs 可加速心肌成纤维细胞老化过程。由于 RAGE 是 AGEs 的天然受体,是 AGEs 发挥其生物学作用的一个重要中间环节,本研究采用具有中和活性的抗 RAGE 抗体来研究 AGEs 促进心肌成纤维细胞老化是否通过 RAGE 起作用。结果发现抗 RAGE 抗体干预 72 h 后,心肌成纤维细胞的 p16 表达量较 AGEs 组明显降低,同样 β -半乳糖苷酶的活性也较 AGEs 明显下降,表明 AGEs 主要是通过细胞表面的 RAGE 相结合,激活胞内信号通路进而引发心肌老化,但目前具体的作用机制还不甚明了。

心肌老化主要表现为心肌纤维化^[4],既往研究发现在 AGEs 诱导的心肌老化过程中,心脏 AGE 修饰的胶原积聚,交联增加,左室重量与体重比率增加,连接组织生长因子(CTGF)基因和蛋白表达增

加,上述情况可以被 AGE 阻滞剂 ALT-711 改善;同时电镜下可观察到心肌结构间质增生,线粒体不规则,闰盘模糊^[2,7],表明 AGEs 诱导的心肌老化过程中伴随着纤维化的发生。然而,AGEs 诱导的心肌老化过程中纤维化的具体机制如何仍需进一步研究。

心肌成纤维细胞与心肌纤维化密切相关,心肌成纤维细胞是心肌层非心肌细胞的主要成分,而它可以通过产生细胞外基质(ECM)如胶原蛋白、基质金属蛋白酶(MMPs)等在维持心脏结构功能中发挥重要作用^[4]。调节 ECM 代谢的细胞因子中,与 ECM 积聚关系最为密切、研究最多的是转化生长因子- β (TGF- β)^[13],而 smad 蛋白家族是介导 TGF- β 信号的主要因子,TGF- β 1 与其受体(如 T β RI)结合,激活 smad 蛋白(主要是 smad2/3),促使其磷酸化,将信号从细胞表面转导至细胞核,引发 ECM 的形成,参与纤维化的发生过程^[14-18]。然而,在 AGEs 诱导的心肌成纤维细胞老化的过程中,TGF- β /smad 信号通路的作用如何却未见报道。本研究发现 AGEs 不仅上调了乳鼠心肌成纤维细胞 TGF- β 1 及 p-smad2/3 的水平,还增加了 MMP-2 的表达量,而 SB431542(通过与通路下游 T β RI 结合后,阻断活化的 TGF- β /smad 信号通路)干预后,细胞内 MMP-2、TGF- β 1 及 p-smad2/3 的表达量较 AGEs 组也明显减少,提示 AGEs 诱导的心肌成纤维细胞老化过程中,或许伴随着 TGF- β /smad 信号通路诱导的心肌纤维化的发生。

综上所述,AGEs 可与心肌成纤维细胞表面的 RAGE 结合,诱导细胞老化,而这一过程或许伴随着 TGF- β /smad 信号通路引发心肌纤维化的发生。这些结果表明,AGEs 及其下游的信号通路可能为临床预防和治疗老年人群中糖尿病并发症、心血管疾病、肾脏病等提供一个新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Takahashi M,Oikawa M,Nagano A. Effect of age and menopause on serum concentrations of pentosidine,an advanced glycation end product [J]. J Gerontol A Biol Med Sci,2000,55(3):M137-140
- [2] Guo Y,Lu M,Qian J,et al. Alagebrium chloride protects the heart against oxidative stress in aging rats [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci,2009,64(6):629-635
- [3] Sun YM,Su Y,Li J,et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy [J]. Biochem Biophys Res Commun,2013,433(4):359-361
- [4] Jazbutyte V,Fiedler J,Kneitz S,et al. MicroRNA-22 in-

- creases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart[J]. *Age (Dordr)*, 2013, 35(3): 747-762
- [5] Zhang X, Song Y, Han X, et al. Liquiritin attenuates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction via RAGE/NF- κ B pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 374(1-2): 191-201
- [6] Xu H, Zhang X, Wang H, et al. Continuous cyclic mechanical tension increases ank expression in endplate chondrocytes through the TGF- β 1 and p38 pathway[J]. *Eur J Histochem*, 2013, 57(3): e28
- [7] Liu J, Wang J, Chen X, et al. Ginkgo biloba extract EGB761 protects against aging-associated diastolic dysfunction in cardiomyocytes of D-galactose-induced aging rat[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 418748
- [8] Neves D. Advanced glycation end-products: a common pathway in diabetes and age-related erectile dysfunction [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(Suppl): 49-69
- [9] Penfield JD, Anderson M, Lutzke L, et al. The role of cellular senescence in the gastrointestinal mucosa [J]. *Gut Liver*, 2013, 7(3): 270-277
- [10] Wang Y, Zang X, Chen P. High expression of p16INK4a and low expression of Bmi1 are associated with endothelial cellular senescence in the human cornea [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 803-815
- [11] Bazarov AV, Van Sluis M, Hines WC, et al. p16(INK4a)-mediated suppression of telomerase in normal and malignant human breast cells [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(5): 736-746
- [12] Coppé JP, Rodier F, Patil CK, et al. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(42): 36396-36403
- [13] Schuppan D, Koda M, Bauer M, et al. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2000, 63(4): 366-370
- [14] Dai Y, Khaidakov M, Wang X, et al. MicroRNAs involved in the regulation of postischemic cardiac fibrosis[J]. *Hypertension*, 2013, 61(4): 751-756
- [15] Davignon J, Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins[J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(6): 543-559
- [16] Malhotra N, Kang J. SMAD regulatory networks construct a balanced immune system [J]. *Immunology*, 2013, 139(1): 1-10
- [17] Massagué J. TGF β signalling in context[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(10): 616-630
- [18] Small EM. The actin-MRTF-SRF gene regulatory axis and myofibroblast differentiation[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012, 5(6): 794-804
- [19] Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 137-188

[收稿日期] 2013-06-27

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmn.njmu.edu.cn>

多西环素对大鼠体外循环后肺内 MMP-9 和 TIMP 活性和基因表达的影响

王常田,程晓峰,张 雷,吴海卫,许 飏,李德闽

(南京军区南京总医院心胸外科,江苏 南京 210002)

[摘要] **目的:**探讨多西环素对大鼠体外循环后肺内基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和组织基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)活性和基因表达的影响。**方法:**健康雄性 SD 大鼠 36 只随机分为对照组、体外循环组(CPB 组)和治疗组,分别于手术结束时(T1)和手术结束后 6 h(T2)收集支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织标本。Western blot 法测定 BALF 中 MMP-9 和 TIMP-1 的蛋白活性,RT-PCR 法测定肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达。**结果:**治疗组大鼠肺组织水肿减轻,BALF 的中性粒细胞减少;CPB 组 BALF 中 MMP-9 活性明显升高,CPB 后 6 h 表达最强,治疗组 MMP-9 活性较 CPB 组有明显下降,TIMP-1 的活性在 CPB 组和治疗组于 CPB 结束后呈较弱的增强趋势,两组间相同时间点的表达差异不明显;CPB 组和治疗组 MMP-9mRNA 表达增强,但治疗组 MMP-9 mRNA 的表达在相应时间点较治疗组下降;TIMP-1 mRNA 在治疗组表达增强,且 T2 时间点显著增强;MMP-9/TIMP-1 mRNA 在 CPB 组和治疗组均有显著增大,但治疗组中 T2 时间点 MMP-9/TIMP-1 mRNA 比值较 CPB 组明显下降。**结论:**CPB 可以引起大鼠术后肺内 MMP-9 的活性和基因表达增强,导致术后早期肺内 MMP-9/TIMP-1 mRNA 表达失衡,多西环素可以抑制 CPB 后大鼠肺组织内 MMP-9 蛋白水平和 mRNA 的表达,还可能上调 TIMP-1 的表达而间接抑制 MMP-9 mRNA 表达,改善 MMP-9/TIMP-1 的比例失衡。

[关键词] 基质金属蛋白酶-9;组织基质金属蛋白酶抑制剂-1;多西环素;体外循环

[中图分类号] R654.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-027-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140106

Effects of doxycycline on MMP-9 and TIMP-1 activity and mRNA expression in lung after cardiopulmonary bypass in rats

Wang Changtian, Cheng Xiaofeng, Zhang Lei, Wu Haiwei, Xu Biao, Li Demin

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** This study was aimed to investigate the effects of doxycycline on the activity and mRNA expression of MMP-9 and TIMP-1 in CPB in a rat model. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n = 12$, respectively): the sham group, the CPB group, and the CPB+Dox group. The rats were executed at the termination of CPB (T1), 6h after termination of CPB (T2), respectively. BALF and lung tissues were harvested at T1 and T2. The activity of MMP-9 and TIMP-1 was detected by Western-blot analysis. The expression of MMP-9 and TIMP-1 in lung tissue was detected by RT-PCR. **Results:** The edema of lung tissue was significantly reduced in the CPB+Dox group, and neutrophils were decreased in the CPB group. The activity of MMP-9 in the CPB+Dox group decreased significantly compared with that in the CPB group and the highest expression occurred after 6 h. The activity of TIMP-1 had a weaker increasing trend in the CPB and the CPB+Dox group after the ending of CPB, and the expression difference was not obvious in the response time of the two groups. The expression of MMP-9 mRNA was significantly increased after CPB in the CPB and the CPB+Dox group, but significantly decreased at T2 time point in the CPB+Dox group. The ratio of MMP-9/TIMP-1 was significantly increased in the CPB and CPB+Dox group, but the ratio in CPB+Dox group was significantly lower than that of CPB group at T2 time. **Conclusion:** CPB could induce the increasing of the activity and mRNA of MMP-9 of lung, causing the ratio of MMP-9/TIMP-1 imbalanced severely at the early postoperative. Doxycycline could inhibit the expression of MMP-9 activity and mRNA in rat lung tissue after CPB, and may increase the expression of TIMP-1 in rats after CPB, and inhibit the expression of MMP-9 mRNA indirectly, which could improve the ratio of MMP-9/TIMP-1 imbalance.

[Key words] matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinases-1; doxycycline; cardiopulmonary bypass

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01): 027-031]

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)可以导致全身炎性反应,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是主要并发症之一^[1],基底膜的损伤和修复在 ALI 发生发展过程中发挥重要作用^[2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是参与细胞外基质降解的主要酶类, MMP-9 主要来源于炎性细胞,其作用底物主要是 IV、V 型胶原,与 ALI 有关^[3]。组织基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是内源性 MMPs 抑制剂,在 pmol 水平对 MMPs 就有很好的亲和性,是一种理想的抑制剂。近年来在 ALI 过程中 MMPs/TIMPs 的失衡逐步受到研究者的重视^[4],但在 CPB 所致 ALI 过程中的研究较少。本实验通过建立大鼠体外循环动物模型,从支气管肺泡灌洗液蛋白活性、肺组织 mRNA 等不同水平观察 MMP-9 和 TIMP-1 在体外循环术后肺内的表达,探讨 MMP-9 和 TIMP-1 在 CPB 所致 ALI 中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级健康纯种成年雄性 SD 大鼠,体重 500~600 g,月龄 5~6 个月,由南京军区南京总医院比较医学科提供,实验动物许可证号:SYXK(军)2007-029。

1.2 方法

1.2.1 大鼠体外循环建立

雄性 SD 大鼠 36 只,在 SPF 级动物屏障环境下饲养。温度 22℃,相对湿度 50%~60%,分笼饲养,予以标准饲料,自由取水。术前 24 h 禁食,自由饮水。2%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射麻醉。麻醉成功后仰卧、固定于操作台,四肢接心电导联,股动脉穿刺动态监测血压,尾动脉穿刺连接动脉泵管,右侧颈内静脉置带网状侧孔的 16G 导管作静脉引流并接储血槽。所有管路妥善固定于体表。预充液按晶胶比 1:4 配制,胶体选用羟乙基淀粉 200,预充量 10 ml^[5]。

1.2.2 动物分组处理

36 只大鼠随机分为 3 组,每组 12 只。对照组(A 组, sham):麻醉后仅进行股动脉、尾动脉和颈静脉插管及肝素化等处理,不进行体外循环;体外循环组(B 组, CPB):麻醉、动静脉插管及肝素化后进行体外循环。体外循环时间 60 min,术中维持收缩压在 75~120 mmHg,体外循环过程中不降温、不给地塞米松及乌司他丁等药物;体外循环 + 药物组(C 组, CPB + Dox):术前 1 周开始予以多西环素(Dox)30 mg/kg 进行灌胃治疗,每天 1 次,7 d 后接受 CPB。分

别于手术结束时(T1)和手术结束后 6 h(T2)处死大鼠,收集支气管肺泡灌洗液(brchoalveolar lavage fluid, BALF)和肺组织标本,对照组分别在相应时间点取材。

1.2.3 标本的收集和保存

按预定时间点处死各组大鼠,打开胸腔完整取出心肺,取右上肺置于-75℃冰箱冻存,用于测定 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达。左肺组织先称湿重,然后用 4℃生理盐水行支气管肺泡灌洗,每次灌洗量为 2 ml,共 4 次,收集灌洗液并记录回收量, BALF 以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液保存于-75℃冻存待用;离心后沉淀用 1 ml 生理盐水稀释,进行中性粒细胞计数。左肺灌洗结束后,置于烤箱中 60℃干燥至恒重,称取干重。

1.2.4 Western blot 法测定 BALF 中 MMP-9 及 TIMP-1 的蛋白活性

提取 BALF 中总蛋白;将 30 μg 蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离;电转法转移至聚偏乙烯氟化物膜,然后与 1:1 000—抗溶液反应(羊抗鼠 MMP-9 和 TIMP-1 多克隆抗体);漂洗后再与 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的二抗(兔抗羊 IgG)孵育 2 h;与 NEN 化学发光试剂反应 3~5 min,暗盒中使 X 线片曝光 10~30 s,经显影定影后,凝胶扫描成像系统分析目的条带。Image J 分析程序软件进行电脑推算法测定与内参 β-actin 灰度比值,重复 3 次取平均值。

1.2.5 RT-PCR 法测定肺组织 MMP-9/TIMP-1 mRNA 的表达

TRIzol 法提取 RNA,具体方法按其说明进行。采用 NCBI/Primer-BLAST 设计 PCR 引物。取 5 μg RNA、Oligo dT(18)1.5 μl 和无核酸酶的双蒸水加入 0.2 ml 灭菌无核酸酶 PCR 管至总体积 10 μl 在 70℃保温 10 min,然后加入 RNase 抑制剂(40 U/μl)0.5 μl、10 × AMV Reaction Buffer 2.5 μl、dNTPs (10 mmol/L)1 μl、DTT (1 mol/L)1.5 μl、逆转录酶(AMV)1 μl、无核酸酶的双蒸水 8.5 μl,混匀后 2 000 r/min 离心 20 s;42℃保温 45 min,然后 72℃保温 10 min,即进行反转录,反应体系为 2×的 RTmix 10 μl、模板(cDNA 稀释 10 倍)1 μl、引物 F 和 R(5 pmol/μl)混合物 2 μl、无核酸酶的双蒸水 7 μl,总共 20 μl。放置样品于循环仪并启动热循环,进行 40 个循环的扩增(DA7600),每个热循环包括 95℃ 25 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s,最后 72℃保温 10 min,PCR 反应完成后,采用 2.0%的琼脂糖凝胶电泳进行分析,大鼠的 MMP-9 和 TIMP-1 基因表达采用 MMP-9 和

TIMP-1 与 β -actin 的光密度比值表示。

1.3 统计学方法

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理,组间均数比较采用方差分析法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠手术后肺的 W/D 值和 BALF 中性粒细胞数

三组大鼠术后肺的湿/干重比值 (W/D) 和 BALF 中性粒细胞数见表 1。各组之间差异明显,在 T2 时间点,B 组的 W/D 值明显高于 A 组和 C 组 ($P <$

0.01)。而 C 组则介于 A 组和 B 组之间,明显低于 B 组而高于 A 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中性粒细胞变化趋势与 W/D 值一致。

2.2 BALF 中 MMP-9 和 TIMP-1 活性测定

Western blot 法测定 3 组大鼠 BALF 中的 MMP-9 和 TIMP-1 活性 (图 1), 结果显示 B 组中 MMP-9 的活性在两个时间点均明显高于 A 组和 C 组 (T1 1.04 ± 0.06 vs 1.19 ± 0.09 , 1.09 ± 0.04 , $P < 0.01$; 0.86 ± 0.01 vs 1.14 ± 0.04 , 1.11 ± 0.11 , $P < 0.01$)。而 A 组和 C 组之间无显著差异。TIMP-1 的活性改变类似于 MMP-9, B 组的 TIMP-1 活性高于 A 组和 C 组。

表 1 肺的 W/D 值和 BALF 中性粒细胞数

Table 1 The ratio of lung W/D and neutrophils counts in BALF

($\bar{x} \pm s$)

检测指标	A 组		B 组		C 组	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
W/D	3.6 ± 0.4	4.0 ± 0.3	$6.7 \pm 0.8^{**}$	$8.9 \pm 0.9^{**}$	$4.5 \pm 0.7^{\Delta}$	$5.6 \pm 0.8^{\Delta}$
中性粒细胞数($\times 10^9/L$)	4.5 ± 0.3	4.7 ± 0.5	$10.7 \pm 1.2^{**}$	$13.9 \pm 1.9^{**}$	$8.6 \pm 0.9^{\Delta}$	10.9 ± 1.1

与 A 组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 B 组相比, $^{\Delta}P < 0.01$ ($n = 6$)。

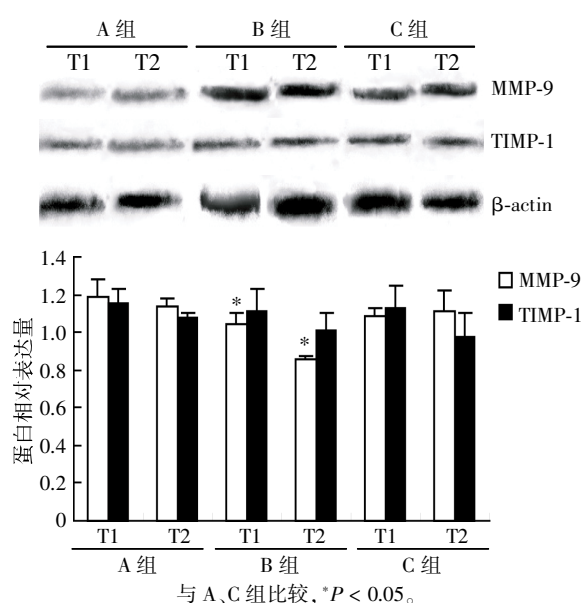


图 1 Western blot 法测定大鼠 BALF 中的 MMP-9 和 TIMP-1 活性

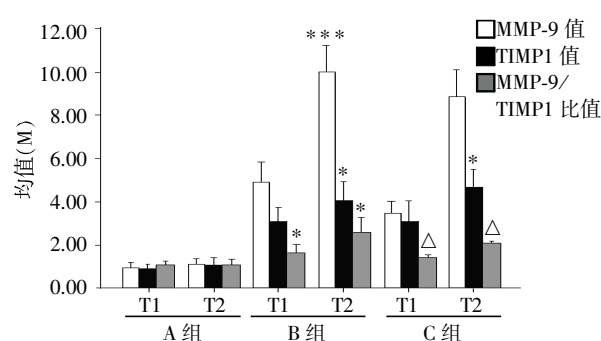
Figure 1 The activity of MMP-9 and TIMP-1 in BALF by Western blot analysis

2.3 肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的测定

对肺组织内 MMP-9、TIMP-1 mRNA 进行 RT-PCR 测定 (图 2)。其中 B 组中 MMP-9 mRNA 的表达在 T2 时间点与其他两组相比达到峰值 ($P < 0.001$)。B 组和 C 组的 TIMP-1 mRNA 在两个时间点均明显增强, 与 A 组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 但

两组之间无显著差异。

MMP-9/TIMP-1 mRNA 表达的比值 B 组明显高于其他两组, 有意义的是 C 组较 B 组在两个时间点均明显下降, 表明在 C 组中 MMP-9 的增强得到了抑制, 增长的幅度不及 TIMP-1 的增长, 所以比值出现下降趋势。



与 A 组比较, $^{*}P < 0.05$; 与 B 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图 2 RT-PCR 测定肺组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达
Figure 2 MMP-9 and TIMP-1 gene expression by using RT-PCR

3 讨论

体外循环下心内直视手术开展以来, 术后肺功能障碍一直受心外科、体外循环及重症监护医师的共同关注, 并积极探索其发生发展的机制以及防治

方法以抑制或减轻其反应程度。目前国内外学者对其基本病理改变较为一致的认识是体外循环过程激活了各种炎症因子继而损伤肺泡毛细血管基底膜,从而引起肺泡内液体增多,肺内分流增加,影响气体交换^[6]。在本研究中,大鼠经 CPB 后肺水增加,支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞明显增多,存在不同程度的急性肺损伤。

肺泡基底膜的成分包括有 IV 型胶原、纤维连接蛋白等,致其损害必须有蛋白水解酶的参与,因此 MMPs 作为具有降解基底膜功能的酶类在各种原因所致急性肺损害中的作用越来越受人们的关注。本研究中 CPB 后大鼠 BALF 中 MMP-9 的活性明显增加,肺内 MMP-9 mRNA 的表达亦明显增强。表明 CPB 通过各种途径激活了 MMP-9 的表达并促进中性粒细胞肺内迁移和肺泡毛细血管通透性增加^[7]。

作为 MMPs 的内源性抑制剂,TIMPs 最初被认为主要调节 MMPs 活性,抑制细胞外基质更新,而目前研究发现其具有多重功能,可以直接通过细胞表面受体或间接通过调节蛋白酶活性而起作用,如 TIMP-2 结合于整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 是 TIMP 家族成员首次作用于细胞表面受体的描述;TIMP-1 则结合于 CD63 而抑制细胞生长和凋亡^[8]。采用多西环素作为外源性 MMPs 抑制进行干预,发现治疗组支气管肺泡灌洗液 MMP-9 活性及肺组织内 MMP-9 基因表达受到抑制,说明多西环素可以抑制 CPB 后肺组织内 MMP-9 蛋白水平和 mRNA 的表达。肺组织内 TIMP-1 mRNA 的表达在 CPB 组内两时间点未见显著差异,但在治疗组内可见 CPB 结束后 6 h 较 CPB 结束时明显增强,两者间有显著差异,说明多西环素可能促进大鼠肺内 TIMP-1 mRNA 的表达,提高 CPB 后肺内 TIMP-1 的含量,从而间接抑制 MMP-9 的活性和表达。通过对 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 比值的进一步分析,CPB 组和治疗组较对照组 MMP-9/TIMP-1 均显著增大,表明 CPB 后肺内 MMP-9 mRNA 表达的增长幅度明显大于 TIMP-1 mRNA 的增长,造成 MMP-9 和 TIMP-1 表达的比例严重失衡。CPB 组和治疗组在 CPB 结束时 MMP-9/TIMP-1 差异不明显,而在 CPB 结束后 6 h 治疗组的 MMP-9/TIMP-1 较 CPB 组显著下降,说明治疗组在 CPB 结束以后肺内 MMP-9 表达受到抑制,而同时 TIMP-1 表达反而上调,MMP-9/TIMP-1 比值的下降说明 MMP-9/TIMP-1 的比例严重失衡得到有效控制或逆转。

本研究证实了多西环素在大鼠 CPB 过程中对 MMP-9 具有明显的抑制作用,结合文献^[9-12]分析其

可能机制:①通过对 MMP-9 的金属离子的络合作用直接抑制 MMP-9 活性;②减少中性粒细胞肺内滞留,减少 MMP-9 的释放;③可能通过上调内源性抑制剂如 TIMP-1 的水平而抑制 MMP-9 活性及表达;④通过抑制细胞因子的转录,间接抑制 MMP-9 的转录、活化、激活;⑤可能通过上调肺内其他蛋白或细胞因子水平而抑制 MMP-9。

众多研究已经证实,多西环素对 MMP-9 的抑制可能并非通过单一途径进行,而是多种途径的综合作用。具体机制尚需进一步深入研究,尤其要充分认识 MMPs 前体的激活和锚合等机制,也许能够提供一种方法来抑制潜在而有害的 MMPs 激活相关过程而保留其有益功能。

[参考文献]

- [1] Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(2): S715-720
- [2] Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000, 33(7): 749-754
- [3] Sochor M, Richter S, Schmidt A, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 with doxycycline reduces pancreatitis-associated lung injury[J]. *Digestion*, 2009, 80(2): 65-73
- [4] Chirco R, Liu XW, Jung KK, et al. Novel functions of TIMPs in cell signaling [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(1): 99-113
- [5] Dong GH, Wang CT, Li Y, et al. Cardiopulmonary bypass induced microcirculatory injury of the small bowel in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(25): 3166-3172
- [6] González-López A, Albaiceta GM. Repair after acute lung injury: molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Crit Care*, 2012, 16(2): 209-215
- [7] 王常田, 申 翼. 心肺转流对大鼠血浆和肺内基质金属蛋白酶-9 的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2011, 24(3): 242-245
- [8] Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities[J]. *Sci Signal*, 2008, 8(1): re6
- [9] Doroszko A, Hurst TS, Polewicz D, et al. Effects of MMP-9 inhibition by doxycycline on proteome of lungs in high tidal volume mechanical ventilation-induced acute lung injury [J]. *Proteome Sci*, 2010, 8(1): 3-16
- [10] Shapira L, Soskolne WA, Houry Y, et al. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide 2 induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion[J]. *Infect Immun*, 1996, 64(3): 825-

828

- [11] Waldow T, Witt W, Buzin A, et al. Prevention of ischemia/reperfusion-induced accumulation of matrix metalloproteinases in rat lung by preconditioning with nitric oxide[J]. J Surg Res, 2009, 152(2): 198-208

- [12] Sochor M, Richter S, Schmidt A, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 with doxycycline reduces pancreatitis-associated lung injury[J]. Digestion, 2009, 80(2): 65-73

[收稿日期] 2013-07-02

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定,建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张××[1] 研究发现……”,“李××等[2]认为……”,“模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:
主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者,出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。

(本刊编辑:接雅俐)

单中心 10 年 40 岁以下急性心肌梗死患者临床特征与治疗现状分析

李小荣¹, 张凤祥¹, 陈明龙¹, 杨兵¹, 杜为¹, 刘榜霞¹, 满艺龙¹, 肖锋¹, 高宇平², 靳春荣², 汪道武¹, 贾永平^{2*}, 曹克将^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院心脏科, 江苏 南京 210029; ²山西医科大学第一附属医院心内科, 山西 太原 030001)

[摘要] 目的: 分析单中心 10 年来 40 岁以下急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者的发病诱因、梗死部位及治疗方式选择等特点。方法: 收集并分析 1999 年 1 月~2009 年 1 月诊断为 AMI 的青年(≤ 40 岁)患者的临床资料, 收集同期老年(60~75 岁)患者进行配对比较。结果: 青年组 106 例, 老年组 112 例。46.23% 的青年人无明确的病因, 饮酒为其独特的诱因。青年组以前壁受累为主, 其次为下壁/后壁; 而老年组以下壁/后壁受累为主, 其次为前壁。与老年组相比, 青年组左室收缩末期内径较小($P < 0.01$), 而左室射血分数无明显差异。青年组单纯溶栓治疗、溶栓治疗 + 择期支架植入治疗率明显较老年组高($P < 0.01$)。结论: 青年人应注重体检, 改善生活方式。青年 AMI 较多累及前壁, 临床治疗虽积极, 但与指南推荐仍有较大差距, 部分医院应加快绿色通道建立, 使更多患者获益。

[关键词] 急性心肌梗死; 青年人; 诱因; 治疗

[中图分类号] R541.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-032-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140107

The clinical and therapeutic features of acute myocardial infarction in patients less than 40 years old: 10 years of experience in a single center

Li Xiaorong¹, Zhang Fengxiang¹, Chen Minglong¹, Yang Bing¹, Du Wei¹, Liu Bangxia¹, Man Yilong¹, Xiao Feng¹, Gao Yuping², Jin Chunrong², Wang Daowu¹, Jia Yongping^{2*}, Cao Kejiang^{1*}

(¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this single center study was to investigate the characteristics of predisposing factors, location of infarction selection of treatment and etc. in patients younger than 40 years with acute myocardial infarction (AMI). **Methods:** We collected and analyzed the clinical data of 218 patients with AMI from January 1999 to January 2009. All characteristics were compared between young (≤ 40 yrs) and elder patients(60~75 yrs). **Results:** There were 106 cases in the young group and 112 cases in the elder group. There were 46.23% patients in the young group without a clear etiology, and drinking was one of the distinctive predisposing factors for young patients. For the young group, AMI was localized in 54.64% anterior wall, followed by 48.45% inferior and posterior wall; however, for the elder group, AMI was localized mainly in 58.33% inferior and posterior wall. Compared with the elder group, the left ventricular end-systolic diameter in the young group was smaller ($P < 0.01$), while with no significant difference in left ventricular ejection fraction. Young patients were more likely to be treated with thrombolytic therapy, thrombolytic therapy plus selective stent implantation than the elder patients. **Conclusion:** Young people should pay attention to physical examination and improve the lifestyle. Young patients are more likely to have AMI in the anterior wall. Although clinical treatment is positive, it is still has a big disparity compared with the guidelines recommendation. Hospitals should speed up the establishment of green channel to benefit more patients.

[Key words] acute myocardial infarction; young patients; predisposing factors; treatment

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):032-035]

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CB531105); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI1B13); 江苏省心血管病临床医学研究中心项目(BL2012011); 江苏高校优势学科建设工程

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiaoyongping2002@126.com; kjcao@njmu.edu.cn

相对于中老年患者,40 岁以下人群急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)发病率较低^[1]。有学者报道 35 岁以下 AMI 占有 AMI 的 2.00%~4.96%^[2-3],45 岁以下 AMI 占有 AMI 的 9.7%~11.7%^[4-5]。总体而言,大多数研究集中于 50 岁或 45 岁以下心肌梗死人群的危险因素、冠状动脉特点,而并未详细阐述其发病诱因、梗死部位、治疗特点等^[6-7]。本文回顾性调查分析了单中心 10 年 40 岁以下 AMI 患者的临床特征,在分析青年人 AMI 的危险因素、临床表现及冠状动脉造影特点的基础上^[1],本文进一步分析青年人群常见的发病诱因、梗死部位、心脏结构特征及目前的治疗现状等。

1 对象和方法

1.1 对象

1999 年 1 月~2009 年 1 月期间入住南京医科大学第一附属医院心内科且出院诊断为 AMI 的所有 40 岁以下患者(青年组,年龄≤40 岁)共 106 例,收集同期年龄 60~75 岁 AMI 患者(老年组)112 例(抽样)作为对照组行配对比较。入选、排除标准参见本课题组前期研究^[1]。

1.2 方法

收集整理患者的发病诱因、发病至住院所需时间、住院期间的治疗方案等。入院后行 18 导联心电图,根据心电图动态演变结果判断心肌梗死为 ST 段抬高型心肌梗死(ST segment elevated myocardial infarction, STEMI)或非 ST 段抬高型心肌梗死(non-ST segment elevated myocardial infarction, NSTEMI)^[8]。STEMI 患者进行心电图定位诊断^[9]:前间隔 V1~V3,前壁 V1~V4,广泛前壁 V1~V6,高侧壁 I、avL,下壁 II、III、avF,后壁 V7、V8、V9,右室 V3R、V4R、V5R。入院后 1 周内行二维超声心动图检查观察其心脏结构特征。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料符合正态分布的采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,不符合正态分布则采用中位数±四分位数间距($M \pm Q$)表示,组间比较采用秩和检验;计数资料用例数与率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 发病诱因

本研究入选患者人数、年龄、性别等一般情况见本课题组前期研究^[1]。两组患者发病诱因的分析比

较见表 1。与老年组相比,饮酒是 40 岁以下人群发生 AMI 的独特的诱因($P < 0.01$)。而对于老年人,用力排便、寒冷也常是发病的独特诱因。

表 1 两组患者发病诱因的比较

Table 1 The comparison on predisposing factors between two groups [n(%)]

发病诱因	青年组(n=106)	老年组(n=112)
无明显诱因	49(46.23)	42(37.50)
劳累	16(15.09)	24(21.43)
熟睡	16(15.09)	21(18.75)
饮酒	9(8.49)**	0
饱食	7(6.60)	7(6.25)
精神刺激	4(3.77)	3(2.68)
排便	0*	6(5.36)
寒冷	0	3(2.68)
其他	5(4.72)	6(5.36)

其他:包括服药、针灸、饮凉水、输液及驾车等。与老年组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 梗死类型及部位

青年组 STEMI 者 97 例(91.5%)。其中,单纯前壁心肌梗死 28 例(26.4%),下壁+后壁 16 例(15.1%),单纯下壁 15 例(14.2%),广泛前壁 13 例(12.3%),前壁+下壁 5 例(4.7%),前壁+高侧壁 5 例(4.7%),前间隔 4 例(3.8%),下壁+后壁+右室 4 例(3.8%),下壁+右室 3 例(2.8%),前间隔+下壁 1 例(0.9%),广泛前壁+下壁 2 例(1.9%),后壁 1 例(0.9%)。

老年组 STEMI 者 96 例(85.7%)。其中,单纯前壁心肌梗死 24 例(21.4%),下壁+后壁 19 例(17.0%),单纯下壁 17 例(15.2%),广泛前壁 6 例(5.4%),下壁+右室 6 例(5.4%),前间隔 6 例(5.4%),前壁+下壁 5 例(4.5%),前壁+下壁+右室 3 例(2.7%),前壁+高侧壁 3 例(2.7%),前间隔+下壁+后壁 2 例(1.8%),下壁+后壁+右室 2 例(1.8%),广泛前壁+下壁+高侧壁 1 例(0.9%),后壁 1 例(0.9%),高侧壁 1 例(0.9%)。

两组相比,梗死部位无明显差异。两组梗死累及的心室壁亦未见明显差异(表 2)。

2.3 心脏结构特征

两组心脏结构特征见表 3。青年组 AMI 患者左心室收缩末期内径明显较小($P = 0.027$)。

2.4 治疗现状

青年组 AMI 患者发病(42.50 ± 92.00)min 后来院,而老年组来院时间为(60.00 ± 150.00)min,两组间无统计学差异($P = 0.110$)。两组的治疗情况见表 4。

表 2 两组间梗死累及部位比较

Table 2 The comparison on infarction involving walls between two groups [n(%)]

梗死累及部位	青年组(n=97)	老年组(n=96)
前壁	53(54.64)	42(43.75)
广泛前壁	15(15.46)	7(7.29)
下壁/后壁	47(48.45)	56(58.33)
右室	7(7.22)	11(11.46)
累及单个部位	61(62.89)	55(57.29)
累及多个部位	36(37.11)	41(42.71)

前壁包括累及单纯前壁、广泛前壁者;下壁/后壁包括累及下壁或后壁或均累及者。

表 3 两组间心脏结构功能的比较

Table 3 The comparison on cardiac parameters between two groups

参数	青年组(n=80)	老年组(n=80)
LVESd	34.41 ± 7.06 *	36.49 ± 10.25
LVEDd	52.94 ± 5.86	53.45 ± 6.84
RVd	18.98 ± 5.66	18.03 ± 5.18
LVEF	54.49 ± 13.27	50.64 ± 14.72

与老年组比较,* $P < 0.05$ 。LVESd:左室收缩末期内径;LVEDd:左室舒张末期内径;RVd:右室内径;LVEF:左室射血分数。

表 4 两组间治疗方案的比较

Table 4 The comparison on therapeutic regimen between two groups [n(%)]

治疗方案	青年组(n=106)	老年组(n=112)
普通药物治疗	36(33.96)**	77(68.75)
单纯溶栓治疗	31(29.25)**	14(12.50)
急诊 PTCA	1(0.94)	1(0.89)
单纯择期介入治疗	23(21.70)	16(14.29)
溶栓+择期介入治疗	15(14.15)*	4(3.57)

与老年组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。PTCA:经皮冠状动脉腔内血管成形术。

3 讨论

青年人,尤其在 40 岁以下的人群中,AMI 发生率较低,本研究纳入单中心 10 年内所有发生 AMI 的青年患者总计 108 例,分析发现约近半数青年 AMI 患者无明显诱因,53% 的患者梗死可累及前壁,左室收缩末期内径明显较小,溶栓治疗率明显较高。

目前大多数研究并未就 40 岁以下人群的发病诱因行详细研究。本研究中 46.23% 的青年组患者发病前无明确诱因,这提示即使对于 40 岁以下的青壮年人群,也应定期体检,关注严重心血管疾病发生的风险。与老年人相比,劳累、熟睡诱发 AMI 的几率较小,而饮酒是青年人 AMI 独特的诱发因素。另外,有 7 例青年 AMI 患者发病前有暴饮暴食情况,起病时间往往在晚餐后。这可能与当代青年人不良的生活

方式有关,也提示年轻人应该尽量减少饮酒、暴饮暴食等不良生活习惯。

在本研究中,两组均以 STEMI 多见,青年组 STEMI 达 91.5%,但两组间无显著差异。Al-Khadra 等^[10]的研究发现 45 岁以下人群中 92.3% 为 STEMI,这与本文的结果相似。另外本研究发现 54.64% 的青年组患者左室前壁受累(不包括前间隔),而 Tatli 等^[2]发现 35 岁以下 AMI 人群中 65% 的梗死部位累及左室前壁,这与前期研究中 58.82% 的青年组患者冠脉病变以单支病变为主相符合^[1],但本研究结果中该比例相对较小的原因可能在于未将前间隔受累纳入前壁受累组,也有可能因为与 Tatli 等的研究中纳入人群不一样所致。Wong 等^[6]发现 45 岁以下新加坡汉族人群中 34.5% 的患者梗死部位累及左室前壁,这可能与年龄、地域差异都有一定的关系。而 Al-Khadra 等^[10]的研究发现 45 岁以下人群中 55.4% 的前壁受累,与本研究高度一致。青年 AMI 多因冠脉狭窄、堵塞所致,但仍有达 30% 的患者冠脉解剖正常,可能与冠脉持续痉挛有关^[2]。本研究发现青年人左室收缩末期内径明显减小,左室射血分数也有增大的趋势,这也提示青年人基础心功能好,如积极抢救则成功率高。

本研究中青年组积极治疗(包括溶栓治疗、溶栓治疗+择期支架植入治疗)率明显较老年组高,而老年组普通药物治疗率高。这一方面可能因为青年人是社会的主要劳动者、家庭的顶梁柱,其临床症状典型,诊断容易;另一方面可能因为青年人基础疾病较少,积极抢救成功率高,故无论是医方还是患方家属都更倾向于积极治疗。而老年人则因其多脏器功能差、易发生感染、心功能差、无痛性心肌梗死等,导致从症状出现到寻求医疗救助时间较长,往往错过最佳治疗时间,或因为家庭经济能力有限而导致积极治疗较少,或是因为老年人禁忌证较多而不宜进行积极治疗。但在我们所调查的医院,即使青年人治疗积极,大多以溶栓治疗和择期支架植入为主,急诊 PCI 很少,这与指南要求和推荐的“建立急诊绿色通道、急诊 PCI”治疗理念仍有较大差距^[11],也提示部分医院需要进一步加强贯彻学习指南规范化治疗方案,加强心内科急诊介入队伍的建设与发展。

总而言之,青年 AMI 患者近半数无明确的发病诱因,但需限酒、改善生活方式以减少 AMI 发生。青年人 AMI 多累及前壁,心脏结构功能较好,其治疗明显较老年人积极,但与当前指南推荐尚有较大差距,尚需进一步规范、加强。

[参考文献]

- [1] 李小荣,贾永平,张凤祥,等. 单中心 10 年 40 岁以下急性心肌梗死患者危险因素及冠脉造影特点分析[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版,2010,30 (11):1618-1622
- [2] Tatli E,Aktoz M,Buyuklu M,et al. The relationship between coronary artery disease and uric acid levels in young patients with acute myocardial infarction [J]. Cardiol J,2008,15(1):21-25
- [3] Rallidis LS,Lekakis J,Panagiotakos D,et al. Long-term prognostic factors of young patients (≤ 35 years) having acute myocardial infarction;the detrimental role of continuation of smoking[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil,2008,15(5):567-571
- [4] Chen YL,Bhasin A,Youssef AA,et al. Prognostic factors and outcomes in young chinese patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty[J]. Int Heart J,2009,50(1):1-11
- [5] Chua SK,Hung HF,Shyu KG,et al. Acute ST-elevation myocardial infarction in young patients;15 years of experience in a single center [J]. Clin Cardiol,2010,33(3):140-148
- [6] Wong CP,Loh SY,Loh KK,et al. Acute myocardial infarction;Clinical features and outcomes in young adults in Singapore[J]. World J Cardiol,2012,4(6):206-210
- [7] Incalcaterra E,Caruso M,Lo Presti R,et al. Myocardial infarction in young adults;risk factors,clinical characteristics and prognosis according to our experience[J]. Clin Ter,2013,164(2):e77-82
- [8] Wright RS,Anderson JL,Adams CD,et al. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/ Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2007 Guideline):a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. Circulation,2011,123 (18):2022-2060
- [9] Wagner GS,Macfarlane P,Wellens H,et al. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram;part VI:acute ischemia/infarction;a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee,Council on Clinical Cardiology;the American College of Cardiology Foundation;and the Heart Rhythm Society;endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology [J]. Circulation,2009,119 (10):e262-270
- [10] Shah SS,Noor L,Shah SH,et al. Myocardial infarction in young versus older adults;clinical characteristics and angiographic features[J]. JAMC,2010,22(2):187-190
- [11] O'Gara PT,Kushner FG,Ascheim DD,et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction;a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. Circulation,2013,127 (4):e362-425

[收稿日期] 2013-06-13

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖!

DC-CIK 联合化疗治疗晚期胃癌的近期疗效观察

蔡俊霞,吴锦昌,王 彬,谭 洁*

(南京医科大学附属苏州市立医院肿瘤科,江苏 苏州 215001)

[摘要] 目的:探讨树突状细胞(dendritic cell,DC)共培养细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer,CIK)联合化疗治疗晚期胃癌患者的近期疗效。方法:选取 28 例确诊为晚期胃癌并采用 DC-CIK 联合化疗的患者为联合治疗组,选取临床资料相近的同期进行单纯化疗的 28 例晚期胃癌患者为对照组,观察两组患者治疗前后外周血中 T 细胞亚群、细胞因子及卡氏评分(Karnofsky,KPS)的变化及临床疗效,并记录其不良反应。结果:联合治疗组患者治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD56⁺和 CD4⁺/CD8⁺的比例无明显变化($P > 0.05$),对照组 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺的比例治疗后明显下降($P < 0.05$);联合治疗组的细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 的水平治疗后有所上升($P < 0.05$),治疗组 IL-2、IL-12 和 TNF- α 的水平治疗后有所下降($P < 0.05$)。联合治疗组的疾病控制率为 78.6%,与对照组(53.6%)的差别有统计学意义($P < 0.05$),KPS 评分总提高率为 82.14%,与对照组的 57.14%差别有统计学意义($P < 0.05$)。结论:与单纯化疗相比,DC-CIK 联合化疗能提高患者的免疫功能及生活质量,DC-CIK 免疫治疗联合化疗可望成为胃癌有效的过继免疫治疗方法。

[关键词] 树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;胃癌;过继免疫治疗

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2014)01-036-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140108

Short-term curative efficacy of DC-CIK cell-therapy combined with chemotherapy on patients with advanced gastric cancer

Cai Junxia, Wu Jinchang, Wang Bin, Tan Jie*

(Department of Oncology, Suzhou Municipal Hospital Affiliated to NJMU, Suzhou 215001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate clinical effects of dendritic cells (DC) co-cultured with cytokine-induced killer cells (CIK) combined with chemotherapy on patients with advanced gastric cancer. **Methods:** Twenty-eight patients with advanced gastric cancer who were treated with DC-CIK combined with chemotherapy, were taken as the combined treatment group. Another twenty-eight patients who were treated with chemotherapy alone during the same period were taken as controls. T lymphocyte subtypes, intra-cellular cytokines in peripheral blood of the patients and performance status (Karnofsky, KPS) were compared between the two groups. The clinical effects were analysed. The safety were observed. **Results:** The ratios of CD3⁺, CD4⁺, CD56⁺ and CD4⁺/CD8⁺ did not change obviously in the combined treatment group and decreased in the control group after treatment, which showed significant statistical differences ($P < 0.05$). The IL-12 and IFN- γ were increased after treatment in the combined treatment group ($P < 0.05$). The IL-2, IL-12 and TNF- α were decreased in the control group after treatment ($P < 0.05$). The disease control rate (DCR) of the combined therapy group and the control group were 78.6% and 53.6% respectively, which showed a significant difference ($P < 0.05$). The effective rate of KPS were 82.14% and 57.14% respectively ($P < 0.05$). **Conclusion:** DC-CIK cells combined with chemotherapy can improve immune functions and elevate life quality of the patients in comparison to those who take chemotherapy alone. DC-CIK cells combined with chemotherapy is likely to be an effective adoptive immunotherapy for gastric cancer.

[Key words] dendritic cells; cytokine induced killer cells; gastric cancer; adoptive immunotherapy

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):036-040]

[基金项目] 苏州市科技发展计划项目(SZS201004)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lxqlj710@hotmail.com

我国胃癌患者诊断时 85%处于晚期^[1],手术、化疗、放疗等传统治疗方法虽有一定成效,但 60%的患者术后会出现局部复发和转移^[2],其 5 年生存率

仅为 25%^[3],新的治疗手段显得尤为重要。免疫治疗既能直接杀死肿瘤细胞又能增加机体免疫功能^[4],无明显不良反应,已成为肿瘤治疗的第 4 个主要方法^[5]。树突状细胞(DC)和细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)共培养(DC-CIK)可促进 CIK 的增殖和成熟,增强 CIK 的细胞毒活性,CIK 也能促进 DC 的成熟,并且使其分泌大量白介素-2(IL-2)^[6],所获得的 DC-CIK 细胞由于细胞毒活性强及安全可靠成为该领域极具发展前景的免疫细胞。本研究通过将 DC 与 CIK 共培养后联合化疗治疗晚期胃癌患者,与单纯化疗对比,观察其近期疗效、不良反应及对免疫功能、生活质量的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2009 年 2 月~2013 年 2 月病理学方法确诊为晚期胃癌并给予 DC-CIK 联合化疗的患者 28 例为联合治疗组,选择同期临床资料相近的 28 例接受单纯化疗的晚期胃癌患者为对照组(表 1)。入选标准:重要脏器功能正常,无自身免疫疾病,卡氏评分>60 分,预计生存期超过 6 个月,治疗前心、肝、肾功能大致正常。患者或家属签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

表 1 两组患者的临床资料情况

Table 1 Distribution of demographic and clinical characteristics in two groups

临床特征	<i>n</i>	联合治疗组	对照组	χ^2	<i>P</i>
性别[n(%)]				0.100	>0.05
男	43	21(75.0)	22(78.6)		
女	13	7(25.0)	6(21.4)		
中位年龄(岁)	59(36~79)	62(41~77)	58(36~79)		
胃癌部位[n(%)]				0.772	>0.05
贲门部	21	10(35.7)	11(39.2)		
胃体部	23	13(46.4)	10(35.7)		
胃窦部	12	5(17.9)	7(25.0)		
病理类型[n(%)]				0.331	>0.05
低分化腺	13	7(25.0)	6(21.4)		
中分化腺	36	17(60.7)	19(67.9)		
黏液腺	7	4(14.3)	3(10.7)		
术后复发转移/晚期(<i>n</i>)	30/26	17/11	13/15		
转移部位[n(%)]				0.486	>0.05
肝	9	4(14.3)	5(17.9)		
腹腔	7	4(14.3)	3(10.7)		
肺	7	3(10.7)	4(14.3)		
盆腔	5	2(7.1)	3(10.7)		
骨	7	3(10.7)	4(14.3)		
治疗方式(<i>n</i>)				1.560	>0.05
首治/单纯手术	17	8	9		
一线化疗	18	11	7		
二线或以上化疗	21	9	12		
放疗	5	2	3		
治疗前 KPS 评分(分)	51	74.64 ± 8.81	74.28 ± 8.36		>0.05

1.2.1 DC 细胞的体外培养和扩增

化疗前 2 d 采集患者自体外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC),用生理盐水洗涤 4 次,然后使用 RPMI1640 培养基(加拿大维森特公司)调节细胞密度至 $2.5 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$ 个/ml,将细胞接种于 6 孔培养板,置 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 90 min 后吸取未贴壁的外周血淋巴细胞

(peripheral blood lymphocyte,PBL),于孔中加入 DC 诱导培养液(含 5%自体血浆、100 ng/ml rhGM-CSF、50 ng/ml rhIL-4),置 37℃、5%CO₂ 培养箱中诱导,第 3 天进行 1/3 换液,第 5 天收获未成熟 DC(imDC),加入终浓度为 20 ng/ml IL-1β、5 μg/ml PGE-2、20 ng/ml TNF-α,诱导 DC 成熟,第 7 天收获成熟 DC(mDC)。

1.2.2 CIK 的体外培养

PBMC 贴壁培养后收获 PBL, 重悬于 5% 自体血浆 RPMI1640 培养液中, 调整细胞密度至 2.5×10^6 个/ml, 铺入预先包被有 anti-CD3 mAb 的 75 cm² 培养瓶中, 添加 IFN- γ (1 000 U/ml), 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育, 第 2 天添加 IL-1 α (终浓度 10 ng/ml)、IL-2 (终浓度 250 U/ml), 继续培养; 第 3 天用含 5% 自体血浆 RPMI1640 培养液进行添液, 此后实时观察细胞状态适当添液或扩瓶。

1.2.3 DC 与 CIK 共培养

CIK 培养至第 7 天, 将细胞合并至 1 瓶, 将收获的 mDC 加入 CIK 细胞悬液中, 同时补充自体血浆浓度至 10%, 添加 IL-2 至终浓度 250 U/ml, 轻轻吹打混匀, 按照每瓶 60 ml 平均分配到 75 cm² 培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 共培养 2~3 d 后至细胞达到回输数量可启动回输。

1.2.4 DC-CIK 质量控制

每次治疗前 24 h 和治疗前 2 h, 对 DC-CIK 细胞取样, 按照《中华人民共和国药典》2010 版方法进行细胞活率、内毒素和革兰氏染色等检测, 细胞活率 > 90%, 待检测结果均为阴性后收集 9~13 d 诱导扩增后获得的 DC-CIK 细胞, 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次后配成 100 ml 液体静脉回输, 每天输 1 次, 回输细胞 $(5.0 \pm 0.5) \times 10^8$ 个/次, 连续 5 次为 1 个疗程。

1.2.5 化疗方案

对照组给予 OF 方案: 奥沙利铂 120 mg/(m²·d) d1+5-FU 500 mg/(m²·d) d1~5, 根据不良反应调整剂量。联合治疗组给予 OF+DC-CIK 方案, 患者行化疗前 2 d 采集细胞培养 DC-CIK 细胞, 第 3 天起行化疗, 细胞培养成熟后回输给患者, 28 d 为 1 个治疗

周期, 治疗 2 周期后评价疗效。

1.2.6 疗效判定

参照 RECIST 近期疗效判定标准, 每 2 周期进行评价。采用影像学检查对比治疗前后瘤体大小, 分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、稳定 (SD) 和恶化 (PD)。计算有效率 = (CR+PR)/(CR+PR+SD+PD), 疾病控制率 (DCR) = (CR+PR+SD)/(CR+PR+SD+PD), 对于 CR 或 PR 的患者, 于 4 周后复评。按 NCI《急性和亚急性毒性反应的表现和分度标准》评价免疫治疗毒性反应。

1.2.7 流式细胞仪检测 T 细胞亚群及胞内细胞因子的水平

抽取患者治疗前后外周血送本院生物治疗中心, 分别进行 T 细胞亚群检测, 包括 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺、CD4⁺/CD8⁺; 另外同时检测细胞因子, 包括 IL-2、IL-10、IL-12、IFN- γ 和 TNF- α 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件包录入数据和统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效评价

实验结果显示, 联合治疗组完全缓解 0 例, 部分缓解 14 例, 稳定 8 例, 恶化 6 例, 有效率达 50.0%, 疾病控制率达 78.6%。对照组完全缓解 0 例, 部分缓解 10 例, 稳定 5 例, 恶化 13 例, 有效率达 35.7%, 疾病控制率达 53.6%。两组有效率的比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.167, P > 0.05$), 疾病控制率的比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.900, P = 0.045$, 表 2)。

表 2 治疗后两组患者疗效的比较分析

Table 2 Therapeutic effect of chemotherapy+DC-CIK or chemotherapy on advanced gastric cancer patients (n)

组别	n	完全缓解	部分缓解	稳定	进展	有效率 (%)	控制率 (%)
联合治疗组	28	0	14	8	6	50.0	78.6 [*]
对照组	28	0	10	5	13	35.7	53.6

与对照组比较, $^*P < 0.05$ 。

2.2 治疗前后外周血淋巴细胞表型变化

实验结果显示对照组治疗后患者外周血中 CD3⁺、CD4⁺ 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值较治疗前降低 ($P < 0.05$), 联合治疗组治疗后与治疗前比较无明显变化 ($P > 0.05$, 表 3)。由此说明本实验室培养的 DC-CIK 细胞可以改善患者的免疫功能。

2.3 治疗前后外周细胞因子变化

实验结果显示, 联合治疗组的细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 的水平治疗后有所上升 ($P < 0.05$), IL-10 水平治疗后无明显变化, 对照组 IL-2、IL-12 和 TNF- α 的水平治疗后有所下降 ($P < 0.05$), IL-10 有所上升, 但是无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 4)。结果提示, DC-CIK 免疫治疗增加患者细胞因子的水平, 提高患者免疫功能。

表 3 联合治疗组和对照组治疗前后患者外周血 T 细胞亚群的变化

Table 3 Changes of T cell subgroup in peripheral blood before and after DC-CIK +chemotherapy or chemotherapy ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD56 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
联合治疗组					
治疗前	56.88 ± 5.10	29.81 ± 4.64	26.92 ± 3.80	21.94 ± 5.52	1.11 ± 0.64
治疗后	57.18 ± 5.10	30.31 ± 4.70	26.76 ± 4.26	21.44 ± 5.27	1.12 ± 0.53
对照组					
治疗前	58.52 ± 4.28	30.00 ± 4.57	26.17 ± 4.74	25.39 ± 4.61	1.15 ± 0.45
治疗后	54.68 ± 4.92 ^{*#}	26.62 ± 4.74 ^{*#}	23.55 ± 5.12 ^{*#}	22.98 ± 4.14 [*]	1.10 ± 0.61 [#]

与同组治疗前比较, * $P < 0.05$; 与联合治疗组治疗后比较 [#] $P < 0.05$ 。

表 4 联合治疗组和对照组治疗前后患者外周血细胞因子的变化

Table 4 Changes of intra-cellular cytokines in peripheral blood before and after DC-CIK +chemotherapy or chemotherapy (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-2	IL-10	IL-12	IFN- γ	TNF- α
联合治疗组					
治疗前	1.52 ± 0.51	1.88 ± 0.48	1.65 ± 0.42	1.64 ± 0.42	1.65 ± 0.50
治疗后	1.60 ± 0.45	1.89 ± 0.49	1.88 ± 0.41 [*]	1.94 ± 0.36 [*]	1.60 ± 0.50
对照组					
治疗前	1.57 ± 0.32	1.73 ± 0.43	1.75 ± 0.36	1.78 ± 0.41	1.68 ± 0.5
治疗后	1.39 ± 0.34 [*]	1.84 ± 0.50	1.65 ± 0.38 [*]	1.75 ± 0.40	1.58 ± 0.47 [*]

与同组治疗前比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 胃癌患者生活质量的评价

联合治疗组和对照组 KPS 较治疗前评分提高 10 分以上者分别为 23 例 (82.14%) 和 16 例 (57.14%), 2 组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.139$, $P < 0.05$), 2 组治疗后疼痛减轻 3 分以上者分别为 6 例 (60%) 和 5 例 (41.67%), 2 组比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.733$, $P > 0.05$)。

2.5 DC-CIK 联合化疗的安全性评价

28 例患者在 DC-CIK 治疗过程中有 4 例出现发热, 最高温度达 39℃, 持续时间 1~2 h, 给予处理后可消退, 1 例出现轻度皮疹, 原因不明, 给予对症处理后缓解, 未发生其他不良反应。

3 讨 论

肿瘤的发生、发展和机体免疫功能息息相关。我国胃癌患者诊断时 85% 处于晚期^[1], 晚期胃癌患者本身肿瘤负荷较重, 免疫功能已较低下, 加上患者经过手术、放化疗之后免疫功能进一步损伤, 这是肿瘤复发和转移的重要原因, 60% 的患者术后会出现局部复发和转移^[2]。化疗只能杀灭一定数量的肿瘤细胞, 但是微小残留病灶的清除依赖于调动并增强自身免疫功能清除肿瘤细胞。免疫治疗既能直接杀伤肿瘤细胞, 又能调节免疫功能, 无明显不良反应, DC 及 CIK 是该领域极具发展潜力的免疫细胞。DC-

CIK 已在各种肿瘤中取得一定的疗效, 但是在晚期胃癌中运用的报道较少。有研究发现化疗后给予免疫治疗有 1+1>2 的效益^[7], 基于以上研究本研究将化疗和 DC-CIK 联合治疗应用于晚期胃癌患者。

CIK 是人外周血单个核细胞在体外由多种细胞因子诱导而成的对多种肿瘤具有杀伤活性的细胞毒性 T 细胞。它是同时表达 CD3⁺、CD56⁺ 的异质细胞群, 兼具 T 细胞特异性杀伤及 NK 细胞非主要组织相容性复合体 (MHC) 限制性杀伤能力^[8]。研究发现 CIK 细胞对耐药的肿瘤细胞也有杀伤作用^[9-10], 这是 CIK 应用于已经耐药的晚期胃癌患者的基础。DC 是目前发现体内功能最强的专职抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC), 能摄取、加工及提呈抗原, 并能刺激初始型 T 细胞的活化和增殖。DC 细胞能有效提呈抗原多肽, 高表达共刺激分子和粘附分子, 为 T 细胞活化做准备, 分泌大量的抗瘤因子如 IL-2、TNF- α 与 IFN- γ ^[11-13]。DC 和 CIK 共培养可促进 CIK 的体外增殖和成熟, 增强 CIK 的细胞毒活性, 同时 CIK 也能促进 DC 的成熟, 两者相互作用。Marten 等^[6] 研究发现 CIK 可以使 DC 高表达 CD80、CD86 和 MHC-I、MHC-II, 促使 DC 分泌大量 IL-2, DC 可以促进 CIK 高表达 CD28 和 CD40。Schmidt 等^[14] 研究发现 DC-CIK 可降低 CIK 细胞群中的免疫抑制 T 细胞 (Treg) 而增强抗肿瘤活性。

本研究结果显示,联合治疗组患者治疗后外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD56⁺细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺比值较治疗前无明显变化($P > 0.05$),对照组 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺的比例治疗后明显下降($P < 0.05$),说明 DC-CIK 可以增强患者免疫功能。联合治疗组疾病控制率达 78.6%,对照组疾病控制率为 53.6%,两组疾病控制率的比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。联合治疗组和对照组 KPS 较治疗前评分提高 10 分以上者 23 例(82.14%)和 16 例(57.14%),2 组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.139, P < 0.05$),说明 DC-CIK 治疗后可以提高患者生存质量。联合治疗组的细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 的水平治疗后有所上升($P < 0.05$),对照组 IL-12、IL-2 和 TNF- α 的水平治疗后有所下降($P < 0.05$),TNF- α 、IL-2、IL-12 刺激 NK 细胞或 CTL 的杀伤活性,既能抑制肿瘤细胞增殖又能直接杀伤肿瘤细胞,并且能减少肿瘤的复发和转移^[15-16]。IL-12 与肿瘤进展相关,在患者出现远处转移或恶液质时,IL-12 呈最低水平^[17],IFN- γ 具有较强的抗肿瘤和免疫调节作用等。有研究发现,IFN- γ 的量与患者疾病进展时间和总生存期呈正相关^[18]。

DC-CIK 细胞在回输过程中有 6 例患者出现发热,最高温度达 39℃,持续时间约 1~2 h,给予处理后可消退,1 例患者出现轻度皮疹,原因不明,给予对症处理后缓解,未发生其他不良反应。总的来说,DC-CIK 联合化疗治疗晚期胃癌具有较好的安全性及有效性,具有较好的临床推广价值。

[参考文献]

- [1] Varadhachary G, Ajani JA. Gastric cancer [J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2005, 3(2): 118-124
- [2] Ajani JA. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer[J]. Oncologist, 2005, 10(3): 49-58
- [3] Yoshihara M, Hiyama T, Yoshida S, et al. Reduction in gastric cancer mortality by screening based on serum pepsinogen concentration; a case-control study [J]. Scand J Gastroenterol, 2007, 42(6): 760-764
- [4] Larmonier N, Fraszczak J, Lakomy D, et al. Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(1): 1-11
- [5] Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer; a clinical path to effective cancer immunotherapy [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(4): 299-308
- [6] Marten A, Ziske C, Schotker B, et al. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations [J]. J Immunother, 2001, 24(6): 502-510
- [7] Zhou P, Liang P, Dong B, et al. Phase I clinical study of combination therapy with microwave ablation and cellular immunotherapy in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biol Therapy, 2011, 11(5): 450-456
- [8] Wang P, Yu J, Gao S, et al. Experimental study on the treatment of intracerebral glioma xenograft with human cytokine-induced killer cells [J]. Cell Immunol, 2008, 253(1-2): 59-65
- [9] 李世俊, 张连生, 柴 晔, 等. 树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共培养对多药耐药肿瘤细胞系的杀伤活性 [J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(10): 733-737
- [10] Niu Q, Wang W, Li Y, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(4): 449-456
- [11] Galluzzi L, Senovilla L, Vacchelli E, et al. Dendritic cell-based interventions for cancer therapy [J]. Oncol Immunology, 2012, 1(7): 1111-1134
- [12] Kalinski P, Muthuswamy R, Urban J, et al. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies [J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(3): 285-295
- [13] Sabado RL, Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment [J]. Immunotherapy, 2010, 2(1): 37-56
- [14] Schmidt J, Klemp C, Markus W, et al. Release of ic3b from apoptotic tumor cells induces tolerance by binding to immature dendritic cells in vitro and in vivo [J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(1): 31-38
- [15] Kane A, Yang I. Interferon-gamma in brain tumor immunotherapy [J]. Neurosurg Clin N Am, 2010, 21(1): 77-86
- [16] Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, et al. TNF- α and Tumor Lysate promote the maturation of dendritic cells for immunotherapy for advanced malignant bone and soft tissue tumors [J]. PLoS ONE, 2012, 7(12): e52926
- [17] Shibata M, Nezu T, Kanou H, et al. Decreased production of interleukin-12 and type 2 immune responses are marked in cachectic patients with colorectal gastric cancer [J]. J Clin Gastroenterol, 2002, 34(4): 416-420
- [18] Wheeler CJ, Black KL, Liu G, et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients [J]. Cancer Res, 2008, 68(14): 5955-5964

[收稿日期] 2013-06-29

玻璃化冷冻囊胚复苏移植与新鲜囊胚移植的临床结局比较

赵 静,张姝秋,张军强,陈小燕,赵 纯,凌秀凤*

(南京医科大学附属南京妇幼保健院生殖中心,江苏 南京 210004)

[摘要] **目的:**比较新鲜囊胚移植周期与玻璃化冷冻囊胚复苏移植周期的临床结局。**方法:**回顾性分析 2009~2011 年本院生殖中心完成的 874 例囊胚移植周期,其中新鲜囊胚移植周期(A 组)280 例,冻融囊胚复苏移植周期(B 组)594 例,比较两组临床妊娠率、种植率、妊娠结局及新生儿情况等各项指标。**结果:**①A 组平均移植胚胎数显著高于 B 组,分别为 (1.88 ± 0.47) 和 (1.70 ± 0.53) 个;临床妊娠率及种植率 A 组(43.93%、24.96%)显著低于 B 组(55.39%、40.51%, $P < 0.05$);②A 组和 B 组的流产率、早产率、单胎率、多胎率分别为 13.82%、32.46%、70.16%、29.84%和 16.72%、33.84%、71.86%、28.14%,孕龄分别为 (265.49 ± 14.45) d、 (264.43 ± 16.08) d 均无统计学差异($P > 0.05$)。两组中仅 B 组见 1 例异位妊娠,而 A 组无异位妊娠;③A 组和 B 组巨大儿、生长受限及新生儿出生缺陷发生率分别为 6.00%、19.66%、1.70%和 9.40%、17.82%、0.90%,两组间无统计学差异。**结论:**玻璃化冷冻囊胚复苏移植显著提高了囊胚移植的种植率及妊娠率,且并没有增加新生儿出生缺陷、流产率、早产率,也没有增加巨大儿和新生儿生长受限的出生比率。因此,玻璃化冻融囊胚移植技术是安全有效的,值得在临床上应用推广。

[关键词] 玻璃化冷冻;囊胚移植;妊娠结局

[中图分类号] Q492.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-041-03

doi:10.7655/NYDXBNS20140109

Comparison of clinical outcomes between vitrified-thawed blastocyst transfer and fresh blastocyst transfer

Zhao Jing, Zhang Mianqiu, Zhang Junqiang, Chen Xiaoyan, Zhao Chun, Ling Xiufeng*

(Department of Reproduction, Nanjing Maternity and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the clinical outcomes between fresh blastocyst transfer with vitrified-thawed blastocyst transfer.

Methods: From 2009 to 2011, 874 cases of blastocyst transfer cycles were performed in our center, including 280 cases of fresh blastocyst transfer (group A), and 594 cases of vitrified-thawed blastocyst transfer (group B). Meanwhile a retrospective analysis was performed on the two groups by comparing clinical pregnancy rate, implantation rate, pregnancy outcomes and neonatal status.

Results: ①The number of transferred embryos in group A (1.88 ± 0.47) was higher than that of group B (1.70 ± 0.53), and the clinical pregnancy rate and implantation rate of group A was significantly lower than that of group B (43.93%, 24.96% and 55.39%, 40.51%, respectively, $P < 0.05$). ②No statistical differences were found in the rate of abortion, premature delivery rate, gestational age, pregnancy rate and multiple pregnancy rate in group A (13.82%, 32.46%, 265.49 ± 14.45 d, 70.16%, 29.84%, respectively) and group B (16.72%, 33.84%, 264.43 ± 16.08 d, 71.86%, 28.14%, respectively). In group B, there was only one case of ectopic pregnancy, while no ectopic pregnancy in group A. ③There were no statistical differences in macrosomia, growth restriction and the rate of birth defect between group A (6%, 19.66%, 1.7%, respectively) and group B (9.4%, 17.82%, 0.9%, respectively). **Conclusion:** Vitrified-thawed blastocysts transplantation significantly improved blastocyst implantation rate and pregnancy rate, and did not increase neonatal birth defects, miscarriage, premature delivery rate, and there was no increase of macrosomia and neonatal growth restriction ratio at birth. Therefore, vitrified-thawed blastocysts transfer is an effective and safe protocol in ART practice.

[Key words] vitrification; blastocyst transfer; clinical outcome

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):041-043]

[基金项目] 国家自然科学基金(81100420, 812707010), 江苏省自然科学基金(BK2012520), 南京医科大学重点实验室开放课题(SKLRM-KF-1203), 南京市卫生局十二五重大项目(ZDX12009)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xiufengling@hotmail.com

由于囊胚期胚胎移植可以更好地选择胚胎的发育潜力,有利于胚胎着床,可提高每个周期的妊娠率,因此目前在临床上得到较为广泛的应用^[1]。同时玻璃化冷冻技术经过近年来的迅猛发展,已经成为囊胚冷冻的主要方法。本文对2009~2011年本院生殖中心共874例囊胚移植周期进行回顾性分析,比较新鲜囊胚移植及冷冻囊胚复苏移植在临床妊娠率、妊娠结局等方面的差异。

1 对象和方法

1.1 对象

2009~2011年本院生殖中心共完成874例囊胚移植周期,其中280例新鲜囊胚移植周期(A组),594例冻融囊胚复苏移植周期(B组)。不孕原因包括盆腔输卵管因素、多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症和男性因素等。超促排卵周期均采用长方案或短方案,取卵后根据患者情况采用自然授精或卵胞浆内单精子注射授精,受精后的第3天进行胚胎形态评级,并挑选2~3个优质胚胎冷冻或移植,剩余胚胎经患者知情同意后行囊胚培养,120~144 h(d5或d6)观察,将发育成囊胚的胚胎移植或冷冻。

1.2 方法

1.2.1 胚胎冷冻及复苏

囊胚冷冻:采用玻璃化冷冻法进行囊胚冷冻。囊胚复苏:移植前1 d复苏囊胚,常规行辅助孵出。在囊胚复苏后14~16 h显微镜下观察其形态并对其进行质量评估,囊胚腔重新扩张判断为囊胚存活。选择囊胚腔较大,滋养层细胞和内细胞团较好的囊胚进行移植。

1.2.2 子宫内膜的准备

子宫内膜的成熟和胚胎发育的同步性是移植成功的关键。对于月经周期正常、排卵有规律的患者采用自然周期:从月经第9~10天开始超声监测卵泡发育和内膜发育的情况。在内膜厚度 ≥ 8 mm时,于排卵之后给予黄体酮40 mg/d,第5天复苏胚胎,第6天胚胎移植。而对于月经周期不正常、没有排卵或排卵不规律、多囊卵巢综合征或有其他特殊情况的患者,则采用雌孕激素替代周期:从月经的第3天口服雌激素(补佳乐3 mg/d,bid \times 7 d),如果子宫内膜的厚度 < 7 mm,可以将雌激素的用量加大到4~6 mg/d bid。当内膜厚度 ≥ 8 mm时,加用黄体酮80 mg/d,于第5天复苏胚胎,第6天胚胎移植。

1.2.3 妊娠结局判定

胚胎移植后14 d进行血HCG测定,检查阳性者14 d后行超声检查示子宫内见孕囊及原始心管搏动即为临床妊娠。

1.3 统计学方法

使用SPSS13.0软件进行卡方检验、*t*检验。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般情况及临床妊娠结局比较

两组中患者年龄比较无统计学差异($P > 0.05$)。A组移植胚胎数显著高于B组($P < 0.05$),而临床妊娠率及种植率显著低于B组,两组间有统计学差异($P < 0.05$,表1)。

表1 两组的临床妊娠结局

Table 1 The clinical pregnancy outcomes of two groups

	A组	B组
ET周期(d)	280	594
患者年龄(岁)	30.97 \pm 4.77	30.27 \pm 4.20
移植胚胎数(n)	1.88 \pm 0.47	1.70 \pm 0.53*
妊娠数(n)	123	329
临床妊娠率(%)	43.93(123/280)	55.39(329/594)*
种植率(%)	24.96(147/589)	40.51(412/1017)*

与A组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 两组分娩结局比较

两组流产率、早产率、孕龄、单胎率、多胎率均无统计学差异($P > 0.05$);B组仅有1例异位妊娠,而A组无异位妊娠发生(表2)。

表2 两组的分娩结局

Table 2 The delivery outcome of two groups

	A组	B组
流产率(%)	13.82(17/123)	16.72(55/329)
早产率(%)	32.46(37/114)	33.84(112/331)
孕龄(d)	265.49 \pm 14.45	264.43 \pm 16.08
单胎率(%)	70.16(87/124)	71.86(240/334)
多胎率(%)	29.84(37/124)	28.14(94/334)
异位妊娠(n)	0	1

2.3 两组新生儿情况比较

两组巨大儿、生长受限及出生缺陷发生率均无统计学差异($P > 0.05$,表3)。

表3 两组新生儿情况

Table 3 The newborns of two groups (%)

	A组	B组
巨大儿	6.14(7/114)	9.36(31/331)
生长受限	19.66(23/114)	17.82(59/331)
出生缺陷	1.75(2/114)	0.91(3/331)

3 讨论

随着实验室培养系统的不断完善,囊胚培养越来越普遍,由于囊胚结构的特殊性,慢速冷冻不能取得很好的效果。玻璃化冷冻具有操作方便、高效等特点,该技术可以用于各阶段胚胎和卵子的冷冻,这些年来玻璃化冷冻技术已成为冷冻囊胚的主要方法^[2-3],有逐渐取代慢速冷冻的趋势。玻璃化冷冻是在极低温度下、迅速的降温过程中使高黏度液体中的细胞内外迅速形成玻璃样固体的方法。在此过程中,冷冻保护剂中的囊胚胞浆会达到极高黏度、充分脱水,完全避免了冰晶形成,从而大大减少了胚胎细胞的损伤。有文献报道囊胚玻璃化冷冻可提高每个卵巢刺激周期的累积妊娠率^[4-5]。在本研究中,冻囊胚周期中移植的胚胎较少,却获得了较高的种植率及妊娠率,与鲜囊胚相比均有统计学差异,说明进行冻融囊胚移植能够提高囊胚移植的成功率。因此囊胚冻融移植已成为辅助生殖技术不可缺少的重要手段,不仅提高了一次取卵的累计妊娠率,同时可以减少多胎妊娠的风险及卵巢过度刺激综合征的发生,并且可以对剩余胚胎进行冷冻保存,减少了再次取卵的痛苦。

本文认为冻融周期之所以较新鲜周期有较高的种植率和临床妊娠率可能是因为冻融周期的子宫内膜有更好的容受性。研究表明,良好的种植环境是胚胎种植成功及临床妊娠的关键,子宫内膜容受性可能影响胚胎的着床^[6-7]。除此之外,由于囊胚冻融过程存在一定的退化率,以往有研究证明,发育潜能较低、胚胎质量较差的囊胚可能在冻融过程之后不能实现再次扩张^[8]。因此本文认为囊胚复苏本身能淘汰掉一部分发育潜能不佳的囊胚,所以冻融之后可以获得更高的种植率和临床妊娠率。因此,可以认为正是由于冻融囊胚移植具有更好的子宫内膜容受性、胚胎发育和子宫内膜的同步性以及冻融过程本身能淘汰一部分发育潜能不佳的囊胚,所以与新鲜囊胚移植相比能够获得更加满意的临床妊娠结果。同时由于冻融囊胚复苏移植减少了每个周期胚胎移植的数目,也提供了减少多胎妊娠发生率的可能,目前本中心两组数据的多胎妊娠率虽没有统计学差异,但冻融囊胚复苏周期的多胎发生率有减少的趋势。两组中仅有1例异位妊娠,说明囊胚移植并不增加异位妊娠的发生。新鲜囊胚移植与冻融囊胚复苏移植的新生儿出生缺陷分别为1.7%及0.9%,无显著性差异,与先前报道的玻璃化冷冻发

生新生儿缺陷的为1.4%的几率相仿^[9],同时也与自然妊娠的人群相仿。另外本中心的数据显示冻融囊胚复苏移植周期并没有增加流产率及早产率,而新生儿的孕龄、巨大儿出生率及胎儿生长受限的发生率与新鲜囊胚移植周期相比也没有统计学差异,说明冻融胚胎复苏移植周期可以获得与新鲜囊胚移植类似的妊娠结局。

本文分析结果显示,玻璃化冷冻囊胚复苏移植周期可以获得更好的临床妊娠率,同时并没有增加新生儿的早产率、生长缺陷、巨大儿出生率及胎儿生长受限的发生率,因此,玻璃化冻融囊胚移植技术是安全有效的,值得在临床上应用推广。

[参考文献]

- [1] Blake DA, Farquhar CM. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, 17: CD002118
- [2] Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination [J]. Reprod Biomed Online, 2005, 11(5): 608-614
- [3] 张军强, 武 恂, 李秀玲, 等. Cryotop 玻璃化冻融人类囊胚 79 例报告[J]. 生殖医学杂志, 2009, 18(6): 516-519
- [4] Huang JV, Chung JT, Tan SL, et al. High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 14(4): 464-470
- [5] Tong GQ, Cao SR, Wu X, et al. Clinical outcome of fresh and vitrified-warmed blastocyst and cleavage-stage embryo transfers in ethnic Chinese ART patients [J]. J Ovarian Res, 2012, 5(1): 27
- [6] 赵庆红, 杨 菁, 尹太郎, 等. 玻璃化冻融胚胎移植结局的相关影响因素 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(18): 3293-3296
- [7] Zhu DD, Zhang JJ, Cao SR, et al. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles: time for a new embryo transfer strategy? [J]. Fertil Steril, 2011, 95(5): 1691-1695
- [8] Shu Y, Watt J, Gebhardt J, et al. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of available thawed blastocyst for transfer. [J]. Fertil Steril, 2009, 91(2): 401-406
- [9] Takahashi K, Mukaida T, Goto T, et al. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study[J]. Fertil Steril, 2005, 84(1): 88-92

[收稿日期] 2013-05-27

膳食铁摄入与妊娠期糖尿病的相关性研究

吴金凤¹, 顾平¹, 王颖¹, 朱蓉²

(¹南京医科大学护理学院, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属南京妇幼保健院产科门诊, 江苏 南京 210004)

[摘要] 目的:探索膳食铁摄入与妊娠期糖尿病(GDM)的相关性,为 GDM 的防治提供参考。方法:在产检孕妇中,根据 75 g 糖耐量试验(OGTT)筛选出 GDM 患者 108 例为 GDM 组,随机选择糖耐量正常孕妇 108 例作为对照组进行病例对照研究。通过问卷调查、膳食调查和铁负荷水平检测,比较两组孕妇膳食铁摄入量和铁负荷指标的差异,并采用多因素 Logistic 回归分析计算 GDM 与高膳食铁摄入的 OR 值。结果:GDM 组孕妇膳食铁摄入量显著高于对照组($P < 0.01$);GDM 组血清铁蛋白水平为(84.64 ± 68.19) $\mu\text{g/L}$,与对照组(57.87 ± 55.77) $\mu\text{g/L}$ 比较,差异有统计学意义($P = 0.002$);高膳食铁摄入与 GDM 患病风险的 OR 值为 1.037(95%可信区间为 1.007~1.069)。结论:高水平膳食铁摄入与 GDM 的患病风险存在正相关。

[关键词] 妊娠;糖尿病;膳食;铁负荷

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2014)01-044-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140110

Correlation study on dietary iron intake and gestational diabetes mellitus

Wu Jinfeng¹, Gu Ping¹, Wang Ying¹, Zhu Rong²

(¹School of Nursing, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the correlation between dietary iron intake and gestational diabetes mellitus (GDM), and provide a reference for the prevention of GDM. **Methods:** Totally 108 cases of GDM in prenatal women were selected according to OGTT (75 g glucose tolerance test) as GDM group, randomly selected 108 cases of pregnant women with normal glucose tolerance as the control group. Case-control analysis was carried out between the two groups. Through questionnaire survey, dietary survey and detection of iron overload level, the dietary iron intake and iron overload index were compared between the two groups. The OR values between GDM and its risk factors were analyzed by using multi-factor regression analysis. **Results:** The dietary iron intake in GDM was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The mean serum ferritin in GDM was (84.64 ± 68.19) $\mu\text{g/L}$, which was higher than the value of normal group (57.87 ± 55.77) $\mu\text{g/L}$ ($P = 0.002$). The OR value of high dietary iron intake and risk of GDM was 1.037 (95% confidence interval was 1.007~1.069). **Conclusion:** The high level of dietary iron intake is positively correlated with GDM.

[Key words] gestation; diabetes; diet; iron overload

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):044-047]

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是指在妊娠期发生或首次发现的不同程度的糖代谢异常, 全球发病率为 1%~14%^[1]。随着人们生活水平的提高, 孕妇普遍受到家庭的重视, 过度增加营养, 使得 GDM 的患病率逐年增加。可以预见, 在不久的将来 GDM 将会成为中国最严峻的健康问题之一。美国所有 GDM 患者中, 由于肥胖和超重而导致的 GDM 还不足 50%^[2], 说明其他一些因素对降低

GDM 的发病率也是十分必要的。近年来, GDM 的营养因素引起了学术界的广泛关注。然而, 探索营养素与 GDM 关系的流行病学研究多数将焦点集中于三大营养物质, 对微量元素摄入量的研究较少。本研究旨在了解 GDM 患者日常饮食中微量元素铁的摄入水平, 并进一步探讨膳食铁摄入与 GDM 的相关性, 试图从另一个层面找到能够预防 GDM 发生, 控制 GDM 发展和改善 GDM 结局的最佳途径。