论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0964-05

正常与脑缺血大鼠脑皮质线粒体的比较蛋白质组学研究

杨涌涛[1],陈康宁[1],贺伟峰[2],黄河清[1],刘国军[1],周振华[1],冉 鸿[1] (第三军医大学西南医院:[1]神经内科,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 采用比较蛋白质组学方法观察正常与脑缺血大鼠脑皮质线粒体蛋白表达差异。**方法** SD大鼠按随机数字表法分为正常组和缺血组,采用改进的栓线法制备大脑中动脉栓塞(middle cerebral antery occlusion, MCAO)模型,分离大鼠缺血及正常大脑皮层,纯化线粒体蛋白进行二维电泳和凝胶图像分析,对差异蛋白质用HPLC-Chip/MS纳流液质联用技术进行序列分析,经Spectrum Mill搜索NCBInr数据库后鉴定蛋白质。**结果** 正常与脑缺血大鼠脑皮层线粒体蛋白表达存在显著差异,这些差异蛋白经鉴定,主要为TUC-4b、肌酸激酶同工酶、HS1结合蛋白、线粒体核糖体蛋白S27、异柠檬酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、二氢硫辛酸脱氢酶、泛醌-细胞色素C还原酶、琥珀酸辅酶A还原酶、细胞色素氧化酶、F1-ATP beta链、热休克蛋白70、热休克蛋白60、脂酰辅酶A脱氢酶等差异线粒体蛋白。**结论** 脑缺血可以导致皮层线粒体相关蛋白表达改变,提示其作用可能与线粒体能量代谢、凋亡有关。

关键词: 脑缺血;线粒体;蛋白质组学;凋亡

中图法分类号: R329.27;R394-33;R743.31 **文献标识码:** A

Comparative proteomic analysis on cerebral cortex mitochondria between ischemic and normal cerebral contex in rats

YANG Yong-tao[1], CHEN Kang-ning[1], HE Wei-feng[2], HUANG He-qing[1], LIU Guo-jun[1], ZHOU Zhen-hua[1], RAN Hong[1] ([1]Department of Neurology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Chongqing Key Laboratory of Proteomics of Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the proteins related to ischemia in the mitochondia of cerebral cortex. Methods Totally 7 adult male SD rats were inflicted by middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 6 h with nylon monofilament. Another 7 rats served as normal control. Then cerebral cortex were collected and mitochondria were extracted and purified. After 2-dimensional electrophoresis and PDQuest for gel image analysis, the MS/MS of the peptides from the differential proteins digested by tripsin were analyzed by HPLC-Chip/MS and the original data were pre-processed by Spectrum Mill then searched in NCBInr database. Results Specific protein spots were identified as TUC-4b, CKB, HS1 binding protein, mitochondrial ribosomal protein S27, dihydrolipoamide dehydrogenase, malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase (NAD +) alpha, dihydrolipoamide S-acetyltransferase, cytochrome c oxidase subunit Vla, succinate-coenzyme A ligase, ubiquinol-cytochrome c reductase core protein, ATP synthase beta subunit, heat shock 70×10^3 protein, heat shock 60×10^3 protein, acyl-coenzyme A dehydrogenase family. Conclusion Cerebebral ischemia affects the proteins related to cerebral cortex mitochondria, which suggests that these proteins may be correlated with the energy metabolism and apoptosis of mitochondria.

Key words: cerebral ischemia; mitochondria; proteomics; apoptosis

脑血管病是严重危害人类健康的疾病之一,其发病机制、治疗及预后一直是神经学科研究的热点问题。众多研究表明,脑缺血时线粒体在细胞凋亡的过程中处于中心地位。线粒体在整合各种死亡刺激信号、决定细胞命运的过程中起着枢纽作用[1]。脑缺血时线粒体蛋白自身表达的差异可能是线粒体在凋亡过程中起决定作用的物质基础,研究这些差异蛋白对缺血性神经元损伤的防治有着重要意义。

我们在建立了脑皮质线粒体的二维电泳和质谱分

作者简介:杨涌涛,女,河南省洛阳市人,硕士,医师,主要从事缺血性脑血管病发病机制和临床治疗方面的研究。电话:(023)68754148,E-mail:smile_z@163.com

通信作者:陈康宁,电话:(023)68754154,E-mail:ckn640827@126.com

收稿日期:2007-12-04;修回日期:2008-01-25

析的基础上,比较正常与脑缺血 SD 大鼠皮层线粒体蛋白表达谱的差异,对差异蛋白进行鉴定及功能分析,以便更好地了解脑缺血的病理机制,为寻找疾病诊断的标志物、探索药物作用靶点提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　动物模型及分组

健康成年雄性 SD 大鼠(Ⅱ级)15 只,体质量 250 ~ 300 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心,按随机数字表法分为正常组、缺血 6 h 组,每组各 7 只。参照Longa 等[2] 的方法,线栓法建立(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。大鼠术后清醒后参照 Kuluz 等[3] 的神经缺陷评分标准进行神经功能缺陷评分,其评分达 3 分者视为造模成功。

1.2　线粒体提取和纯化

大鼠在缺血 6 h 断头取脑,冰上快速分离大脑皮质,切除额极,立即将分离的皮层组织置于 4 ℃分离介质(0.25 mol/L 蔗糖,10 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L K^+-EDTA,pH 7.4)中。经 Teflon 玻璃匀浆器制成匀浆液,Ficoll 密度梯度离心法[4] 分离并纯化线粒体。分离纯化的线粒体沉淀用 2.4 ml 25% Nycodenz 悬浮,按下列不连续的密度梯度在超速离心管中铺层:1 ml 34% Nycodenz,1.6 ml 25% Nycodenz,2.4 ml 25% Nycodenz,1.6 ml 23% Nycodenz,0.6 ml 25% Nycodenz。52 000 × g 4 ℃离心 90 mim,吸出 20% 与 23% 交界面上的线粒体溶于 Nycodenz 分离介质(0.25 mol/L 蔗糖,5 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L Na^+-EDTA,0.5 mmol/L EGTA pH 7.4)中。10 000 × g 离心 10 min,重复 1 次[5]。所得沉淀即为二次纯化的线粒体。

1.3　分离线粒体的电镜观察

将提纯的线粒体沉淀 1 mm^3 置于 3% 戊二醛固定液中固定,冲洗后用 1% 锇酸固定,丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋,制超薄切片后用 2000EX 型透射电镜观察,记录并拍照。

1.4　蛋白质样品的制备和双向凝胶电泳

线粒体样品两两混合,每组共进行 6 次双向电泳。用裂解液(7 mol/L Urea, 2 mol/L thiourea, 2% CHAPS,0.4% DTT, 0.5% Bio-Lyte pH 3 ~ 10,0.5% Bio-Lyte pH 6 ~ 11)溶解纯化的线粒体,在室温下混匀器上振荡 12 h。25 000 × g 离心 60 min,取上清, -70 ℃冻存备用。线粒体蛋白提取物经 Bradford 法定量后取 100 μg(银染)与重泡胀溶液混合,总体积 350 μl 与 IPG 胶条共同泡胀 14 h,等电聚焦在 17 ℃按设定程序进行:600 V: 2.15 h,3 500 V: 4 h,3 500 V: 1.28 h,最终达 14 000 Vh 止。等电聚焦结束后,每根 IPG 胶条用 10 ml 平衡液(1.5 mol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L Urea, 20% 甘油, 2% SDS)平衡 2 次,每次 12 min,第 1 次为还原过程,平衡液内加 DTT 0.2 g,第 2 次平衡为烷基化过程,平衡液内加碘乙酰胺 0.25 g。然后用 12% 凝胶做第 2 向 SDS-PAGE 电泳,以 20 mA 恒流电泳 20 min,加大电流至 40 mA 恒流电泳至溴酚蓝到达胶的底线。按文献[6]所述方法进行银染。

1.5　凝胶图像采集与分析

染色、脱色完成后的双向电泳凝胶通过 GS800 Calibrated Densitometer 扫描仪(Bio-Rad 公司)以及 Quantity One 4.5.0 扫描软件(Bio-Rad 公司)进行扫描获取图像,数字化图像文件运用 PDQuest 7.3 分析软件(Bio-Rad 公司)对图像进行分析。为消除误差,将同组的 6 张 2-DE 凝胶拟合成 1 张平均胶,然后进行组间比较。选择对照组大鼠线粒体凝胶图像为参考胶,缺血组大鼠线粒体蛋白凝胶图像与之进行配比分析,寻找差异蛋白点。参照文献[7],将蛋白质表达水平上升或下降 200% 的点选择为目标点,进行鉴定。

1.6　胶内酶解

选择凝胶上目的蛋白斑点,切下后放入 1.5 ml 的样品管中。用 25 mmol/L 碳酸氢铵溶解乙腈配成 50% 乙腈溶液,取 100 μl 脱至无色,用 speed Vac 真空干燥后,向每只样品管中加入 25 μl 10 mmol/L DTT 溶液。于 56 ℃中反应 60 min,弃上清,向每只 EP 管中分别加入 25 μl 用 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液配的 55 mmol/L 碘乙酰胺,室温黑暗中反应 45 min,使蛋白烷基化。弃上清后用 100 μl 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液清洗胶条。弃去清洗液后,speed Vac 真空干燥后加入 30 μl 32.5 ng/μl 的胰蛋白酶溶液。4 ℃保持 5 min 后 37 ℃震摇 8 h。抽取上清 20 μl,以 20 000 r/min 离心 10 min 后取上清 16 μl 置于新的样品管中,加入 1 μl 10% 的甲酸溶液,振荡混匀后取 10 μl 上样分析。

1.7　质谱分析及质谱数据库搜寻

HPLC-Chip-ESI/MS/MS 条件(Agilent 公司):①纳流泵:流速:0.3 μl/min, 流动相:A 为 98.9% 的水 + 0.1% 甲酸 + 1% 乙腈, B 为 99.9% 的乙腈水 + 0.1% 甲酸,梯度洗脱。②毛细管泵:流速:4 μl/min,流动相:99% 的水 + 1% 乙腈。③进样量:8 μl。④质谱采集参数:Mass Range Mode :200 ~ 2 200;CapV: 1 800;Ion Source Type : ESI(+);Dry Temp(set) : 250 ℃; Dry Gas (set): 4.00 L/min。质谱数据用 Spectrum Mill 处理后搜索 NCBInr 数据库进行鉴定。检索物种选择 RATTUS NORVEGICUS,消化酶选 Trypsin,仪器选择 Agilent ESI ion trap,最大允许漏切点设为 2,母离子质量误差为 ±2.5,子离子质量误差为 ±0.7。

2　结果

2.1　线粒体提取质量

分离线粒体的透射电镜观察显示,提取的沉淀中主要成分是线粒体。纯化的线粒体为圆形或椭圆形,多数线粒体有完整的膜性结构,保持了较完整的嵴结构,少数线粒体有肿胀、嵴稀疏,线粒体纯度超过 95%(图 1)。

2.2　蛋白质表达变化

双向凝胶电泳(2-DE)凝胶经银染(100 μg)后可检测到约 460 个蛋白点(图 2),且重复性好。用 PDQuest 7.3 软件对对照组和缺血组大鼠线粒体蛋白图谱进行分析比较, 显示 2 组线粒体蛋白质 2-DE 图谱有显著差异,匹配率为(65.0 ± 7.4)% (n = 6)。缺血组大鼠线粒体蛋白图谱中有 59 个蛋白斑点表达量与对照组有显著差异,其中 52 个点表达量高于对照组,6 个点只出现在缺血组,1 个点只在对照组表达。

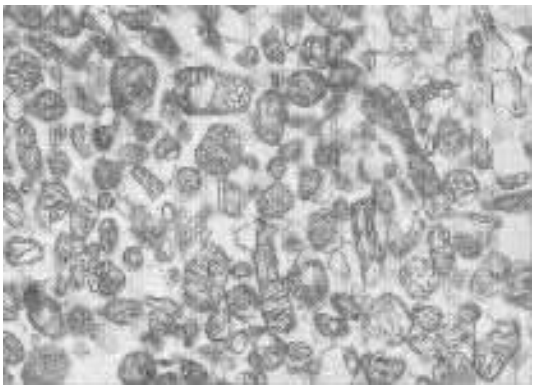
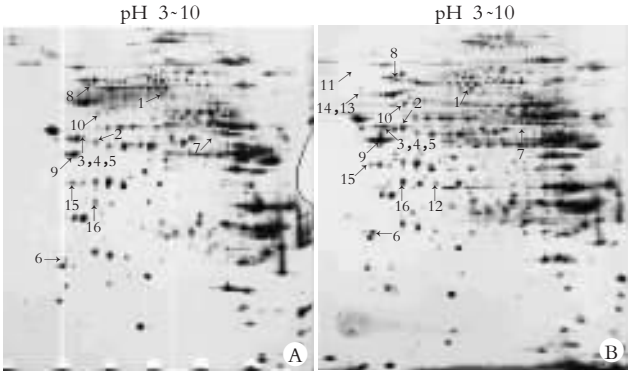


图1 线粒体提取物透射电镜观察 （TEM×12 500）



A：对照组（蛋白点11~14不表达）；B：缺血组 1~16：差异蛋白点

图2 2组大鼠脑皮质线粒体双向电泳银染图谱

2.3 蛋白质鉴定

2-DE凝胶电泳图进行扫描后，通过PDQuest 7.3软件筛选出两者间表达量相差2倍以上的差异表达蛋白质点，选取其中最明显的20个差异蛋白质点进行切割，对差异蛋白质用HPLC-Chip/MS纳流液质联用技术测定酶解后的肽段的MS/MS，原始数据经Spectrum Mill搜索NCBInr数据库，成功鉴定出16个蛋白。除HS1结合蛋白表达量降低外，均为表达上调蛋白，见表1。

表1 缺血组和正常组大鼠脑皮质线粒体差异表达蛋白的质谱鉴定

序号	蛋白名称	鉴定的肽段	AA覆盖率(%)	相对分子质量	等电点
1	泛醌－细胞色素C还原酶	13	34	54 829.1	5.57
2	肌酸激酶同功酶	19	67	45 248.5	5.50
3	脂酰辅酶A脱氢酶	11	22	68 843.6	7.59
4	TUC-4b	14	32	73 160.9	5.98
5	含EH结构域蛋白	3	7	60 791.4	6.03
6	F1-ATP beta链	6	18	56 353.8	5.18
7	HS1结合蛋白	7	34	31 448.4	4.80
8	异柠檬酸脱氢酶	5	16	41 176.8	6.47
9	丙酮酸脱氢酶	6	14	61 207.7	6.34
10	二氢硫辛酸脱氢酶	4	10	54 038.4	7.96
11	热休克蛋白70	22	38	72 347.3	5.07
12	苹果酸脱氢酶	3	12	36 484.3	5.92
13	热休克蛋白60	2	3	93 611.9	6.36
14	琥珀酸辅酶A还原酶	4	18	50 306.4	7.57
15	线粒体核糖体蛋白S27	4	12	47 648.5	5.22
16	细胞色素C氧化酶	2	34	9 665.9	6.35

3 讨论

我们采用颈内动脉插入线栓法建立MCAO模型，大鼠术后清醒后严格按神经功能评分，达3分者视为造模成功。造模6 h脑组织大体观察肉眼所见：颅内无出血或血肿，缺血侧脑组织苍白肿胀。TTC染色显示正常脑组织为红色，梗死区为白色，位于左侧大脑中脑中动脉供血区，证实大鼠大脑中动脉闭塞模型制作成功[8]。本实验中我们通过Ficoll和Nycodenz两步密度梯度离心纯化线粒体，并通过透射电镜对线粒体沉淀进行纯度和质量鉴定，发现多数线粒体结构完整，纯度超过95%。

凝胶图像分析与质谱鉴定：为消除误差，将同组的6张2-DE凝胶拟合成1张平均胶，然后进行组间比较。组内匹配率达到了98%，组间匹配率达到了70%，充分证明了本实验方法的重复性、稳定性都较高。对差异蛋白质用HPLC-Chip/MS液质联用技术对酶解后的肽段的MS/MS进行分析，原始数据经Spectrum Mill搜索NCBInr数据库进行鉴定。我们所使用的HPLC-Chip/MS液质联用技术的灵敏性是正常的LC/MS系统的3 500倍，是传统的纳流LC/MS灵敏度的5倍，保证了蛋白鉴定的准确性。

本研究比较分析了缺血组和对照组大鼠皮层线粒体蛋白表达图谱，观察到脑缺血6 h后大量线粒体蛋白发生了显著的变化，提示脑缺血可能影响到了线粒体氧化磷酸化、物质转运及凋亡等过程。

本研究在脑缺血组发现了高表达的TUC-4b蛋白。它属于TUC家族。TUC家族的蛋白是由unc-33基因编码，在发育神经系统的新生神经元中表达，它涉及信号转导及神经元极性。TUC-4b是TUC-4a的变异体，仅仅在胚胎发育时及神经损伤后表达，它可以调节神经元轴突的延伸和分支，这种机制可能涉及到生长锥的膜转运[9]。脑缺血损伤后TUC-4b蛋白高表达，可能是机体在脑缺血发生后启动了神经的自我修复机制，其机制还有待进一步阐明。

本研究结果显示HS1结合蛋白（HAX-1蛋白）在脑缺血组表达量降低，提示HAX-1蛋白的表达可能和缺血后细胞凋亡有关。Suzuki等[10]首先于1997年应用酵母双杂交系统发现HAX-1蛋白是和Src酪氨酸激酶的底物HS1相互作用的蛋白质。它作为一种新的细胞凋亡调节蛋白，具有强大的凋亡抑制作用。HAX-1蛋白广泛表达于多种组织、细胞及多种细胞株中，主要呈点状分布于线粒体内，少量分布于内质网和核膜[11]。近年来HAX-1蛋白在细胞凋亡中的调节作

用引起很多学者的关注。Jiang 等[12]证实了 HAX-1 蛋白在银屑病中过表达。新近研究表明,HAX-1 蛋白被表达于含氧量低的进展期肿瘤中[13],并表达于许多不同的转移性肿瘤中。HAX-1 在脑缺血时表达量明显增高,提示它可能参与了细胞凋亡过程中的一个重要环节,具体机制还有待进一步探讨。

线粒体核糖体蛋白 27 作为线粒体核糖体的组成部分,对于线粒体必需蛋白的翻译必不可少。研究表明与凋亡密切相关的两种蛋白 GTP 结合蛋白 DAP3 (death associated protein3) 和 PDCD9 (programmed cell death protein 9) 实际为线粒体核糖体小亚基组成蛋白 MRPs29 和 MRPs30[14],提示线粒体核糖体与细胞凋亡可能也有密切关系。线粒体核糖体蛋白 27 拥有的保守序列可以刺激鸟苷酸从 G 蛋白上分离。这种哺乳动物线粒体核糖体小亚基结合蛋白可能是 GTP 核糖体结合蛋白的一个功能部分。我们在脑缺血组发现了表达上调的线粒体核糖体蛋白 27,推测它可能是脑缺血后凋亡信号的传导过程中的一个重要环节,具体机制还有待进一步证明。

线粒体肌酸激酶同工酶属于肌酸激酶同工酶家族成员。存在于细胞内线粒体内膜和外膜间隙,是细胞能量代谢的关键酶之一。在细胞内线粒体肌酸激酶、胞浆型的肌酸激酶、肌酸及磷酸肌酸共同组成了细胞内的能量缓冲和转移系统,即肌酸激酶/磷酸肌酸循环。线粒体肌酸激酶与线粒体 ATP/ADP 载体相互偶联,其活性受线粒体内 ATP/ADP 底物浓度调节,对维持细胞内 ATP 池的稳定、调节细胞和组织的能量代谢起关键作用。肌酸激酶途径被认为是 ATP 缺乏情况下一条重要的补偿途径。此外粒体肌酸激酶还是线粒体渗透转移孔的功能和结构单位,由线粒体肌酸激酶调节的 PTP 的开放在由线粒体通路导致的细胞凋亡中可能起关键作用。本研究提示线粒体肌酸激酶在脑缺血组表达增加,并且在银染图谱上为平行分布的两个点,主要由于肌酸激酶甲基化的原因。脑缺血后线粒体肌酸激酶表达量增高可能与能量代谢的代偿和细胞的凋亡有关,其机制还有待进一步的研究。

热休克蛋白又称应激蛋白,是一类在结构上高度保守的多肽家族,广泛存在于原核、真核细胞中,参与多肽或蛋白质的折叠、组装或转运及细胞的损伤与修复等多种复杂的功能活动。热休克蛋白 60 就是受应激而诱导的线粒体基质蛋白质,与线粒体内的蛋白折叠和组装有关。另外发现脑缺血后热休克蛋白 70 表达还与神经元凋亡间有联系[15],并进一步证明热休克蛋白 70 合成的增加能阻止细胞启动自杀程序,减少细胞凋亡。本研究结果显示热休克蛋白 70、热休克蛋白 60 在脑缺血组表达量增高,提示缺血后氧化应激反应增强,脑缺血保护机制启动。

三羧酸循环的关键酶:本研究结果显示参与三羧酸循环的关键酶苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、二氢硫辛酰氨脱氢酶及线粒体呼吸链复合物泛醌 - 细胞色素 C、琥珀酸辅酶 A 还原酶、细胞色素 C 氧化酶、F1-ATP 合酶 beta 链 H^+ 转运体在脑缺血组表达量增高,可能提示脑缺血后能量代谢发生障碍。6 h 损伤的神经系统能量需求明显增加,作为代偿反应的能量代谢途径中的关键蛋白水平相应增加[16]。

通过对这些差异表达蛋白质生物学功能的初步研究,提示它们可能与脑缺血有关。深入研究分析这些蛋白质,对差异蛋白进行再验证和下游功能分析将有助于进一步了解脑缺血发生的病理生理机制,寻找更好的预测指标和药物干预靶点。

虽然蛋白质组学能够高通量、规模化地研究蛋白的变化,但是其本身也存在一定的局限性。例如二维凝胶电泳有分离容量的先天限制,染色转移等环节操作困难费时,低丰度蛋白难以辨别,和质谱技术的连用已经成为蛋白质组学研究的瓶颈,还需从技术上作进一步的改进。由于蛋白质组学会产生假阳性的结果,所以对发现的差异蛋白还需进行进一步的验证来保证实验的正确性。

参考文献:

[1] Endo H, Kamada H, Nito C, *et al*. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats[J]. J Neurosci, 2006, 26(30): 7974 - 7983.

[2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.

[3] Kuluz J W, Prado R J, Dietrich W D, *et al*. The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats[J]. Stroke, 1993, 24(12): 2023 - 2029.

[4] 柳君泽, 高文祥, 蔡明春, 等. ATP 浓度和缺氧暴露对大鼠脑线粒体 RNA 和蛋白质体外合成的影响[J]. 生理学报, 2002, 54(6): 485 - 489.

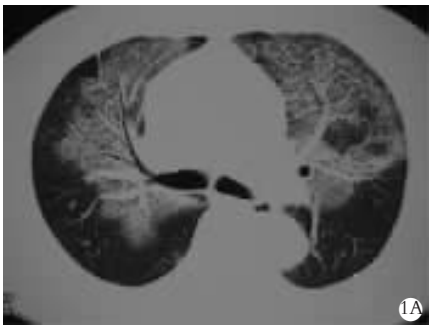
[5] Jiang X S, Dai J, Sheng Q H, *et al*. A comparative proteomic strategy for subcellular proteome research: ICAT approach coupled with bioinformatics prediction to ascertain rat liver mitochondrial proteins and indication of mitochondrial localization for catalase[J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(1): 12 - 34.

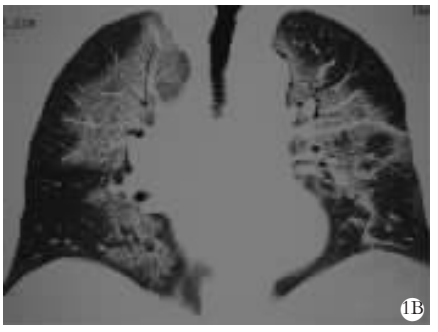
[6] Mortz E, Krogh T N, Vorum H, *et al*. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis[J]. Proteomics, 2001, 1(11): 1359 - 1363.

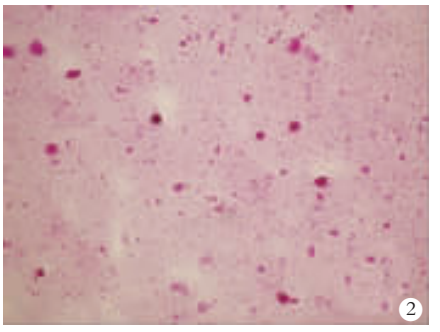
[7] Paulson L, Martin P, Persson A, *et al*. Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats[J]. J Neurosci Res, 2003, 71(4): 526 – 533.
[8] 陈力学, 姜利人, 刘宝松, 等. 全胞缺血再灌注后神经元凋亡的时相和分布特征[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 531 – 534.
[9] Quinn C C, Chen E, Kinjo T G, *et al*. TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone[J]. J Neurosci, 2003, 23(7): 2815 – 2823.
[10] Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, *et al*. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases [J]. J Immunol, 1997, 158 (6): 2 736 – 2 744.
[11] Mirmohammadsadegh A, Tartler U, Michel G, *et al*. HAX-1, identified by differential display reverse transcription polymerase chain reaction, is overexpressed in lesional psoriasis[J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(6): 1045 – 1051.
[12] Jiang Y, Zhang W, Kondo K, *et al*. Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(6): 453 – 462.
[13] Sarnowska E, Grzybowska E A, Sobczak K, *et al*. Hairpin structure within the 3′UTR of DNA polymerase beta mRNA acts as a post-transcriptional regulatory element and interacts with Hax-1[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(16): 5499 – 5510.
[14] Smits P, Smeitink J A, van-den-Heuvel L P, *et al*. Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(14): 4686 – 4703.
[15] Bivik C, Rosdahl I, Ollinger K. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(3): 537 – 544.
[16] 陈 建, 高钰琪, 黄 瑊, 等. 高原鼠兔和 Wistar 大鼠骨骼肌线粒体比较蛋白质组学初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 97 – 100.

(编辑 吴培红)

(上接963页)







A:横断面; B: 冠状面

图1 患者胸部64排CT表现

图2 患者支气管肺泡灌洗液沉渣PAS染色阳性结果 (×100)

年底,全世界仅有300余例报道,其病因及发病机制一直未明。PAP的组织病理学特征是肺泡和远端小气道大量磷脂蛋白样表面活性物质沉积[2]。目前认为,特发性PAP的形成主要是肺泡巨噬细胞清除肺泡表面活性物质功能障碍所致,并非由于肺泡表面活性物质产生过多[2]。本病主要表现为咳嗽、进行性呼吸困难、呼吸音降低,胸部X线片、CT示双肺弥漫性阴影自肺门向外放射。确诊靠病理检查结果,支气管肺泡灌洗液染色检查对PAP也具有诊断价值。典型的肺泡灌洗液呈乳状,光镜下见形态不规则、大小不等的嗜酸性颗粒状物质,PAS染色阳性,AB染色阴性。本病临床表现无特异性,易与其他肺疾病相混淆而造成误诊。当同时出现以下情况时需考虑本病可能[3]:原因不明的咳嗽、渐进性呼吸困难,经抗感染、抗结核、利尿治疗无效;胸部X线片示双肺弥漫性分布结节状、羽毛状、斑片状及网状阴影,自两肺门向外放射,部分融合成片,类似肺水肿表现;血气表现为不同程度的缺氧;肺功能检查最常表现为限制性肺通气功能障碍和弥散障碍。高分辨CT检查价值更大,除能发现病变肺组织呈毛玻璃状表现外,叶间、叶内胸膜增厚而不规则,可见弥漫性肺泡充盈而肺门淋巴结通常无肿大,病灶无钙化。本例即根据高分辨CT的表现为线索而最终确诊。

支气管肺泡灌洗迄今仍是唯一有效的治疗PAP的方法。灌洗方法分经纤维支气管镜灌洗和经Carlen's双腔管全肺灌洗。全肺灌洗疗效较好但创伤较大,手术风险大,患者常难以接受,而后者操作相对简单,安全性大,但效果比前者差,常需多次灌洗,该例患者经多次灌洗也取得了较好效果。

关键词: 支气管肺泡灌洗;肺泡蛋白沉着症;CT
中图法分类号: R563 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Costello J F, Moriarity D C, Branthwaite M A, *et al*. Diagnosis and management of alveolar proteinosis: the role of electromicroscopy[J]. Thorax, 1975, 30(2): 121 – 132.
[2] 周贤梅, 白久武, 蔡后荣, 等. 粒-巨噬细胞集落刺激因子及肺表面活性蛋白在肺泡蛋白沉积症患者肺内的表达[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(11): 832 – 835.
[3] 范 峰, 李惠萍, 何国钧, 等. 肺泡蛋沉着症6例报告并文献复习[J]. 中国实用内科学杂志, 2005, 25(2): 125 – 126.

(编辑 龙 亮)