论著

文章编号:1000-5404(2009)12-1172-05

shRNA 抑制 Smad3 基因的表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad7 表达的影响

但 洋,沈为民,果 磊 (重庆医科大学附属第一医院整形烧伤外科,重庆 400016)

摘 要:目的 构建抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblast,KFB)Smad3 基因表达的 shRNA 真核表达载体。研究 Smad3 shRNA 对 KFB Smad7 表达的影响。**方法** 用前期实验筛选出的 1 对最有效 siRNA 重组构建 Smad3 shRNA 表达质粒。通过脂质体介导的方法,将 Smad3 shRNA 转染到 KFB,用 RT-PCR 及 Western blot 的方法检测 Smad3、Smad7 在不同时间点(0~9 d)表达的变化。**结果** ①RT-PCR 和 Western blot 的结果证实 Smad3 shRNA 载体构建成功。②转染 Smad3 shRNA 后,随着时间的延长,KFB 中 Smad3 的 mRNA 与蛋白表达都显著减低,到 72 h 作用最强。光密度分析与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。Smad7 的 mRNA 与蛋白表达都明显升高($P<0.05$)。**结论** 体外构建的 shRNA-Smad3 RNAi 真核表达载体能显著抑制 KFB Smad3 的表达。Smad3 可能对 Smad7 起反向调节的作用。

关键词:瘢痕疙瘩;成纤维细胞;Smad3;Smad7;RNA 干扰;shRNA

中图法分类号:R394-33;R394.2;R619.6 **文献标识码**:A

Effects of the inhibition of Smad3 by short hairpin RNA on the expression of Smad7 in keloid fibroblasts

DAN Yang, SHEN Wei-min, GUO Lei (Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 40016, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector containing short hairpin RNA (shRNA) targeting the inhibition of Smad3 gene segment in keloid fibroblasts (KFBs) and to investigate the effects on the expression of Smad7 in KFBs. **Methods** A couple of the most effective siRNA screened from former experiments were used to recombine the plasmids of Smad3 shRNA, and then Smad3 shRNA was transfected into KFBs by LyoVec TM. The expressions of Smad3 and Smad7 at different time points (0~9 d) were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** ① The recombinant Smad3 shRNA vectors were identified by RT-PCR and Western blotting. ② The expressions of mRNA and protein of Smad3 in KFBs decreased significantly in a time-dependent manner after transfection of Smad3 shRNA and reached the lowest point at 72 hours in the experimental group. Optical density analysis revealed a significant difference between the experimental group and the control group ($P<0.05$). In contrast, the expressions of mRNA and protein of Smad7 increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** The recombinant Smad3 shRNA vector can suppress the expression of Smad3 in KFBs, suggesting Smad3 may play a role in reverse regulation of Smad7.

Key words: keloid; fibroblasts; Smad3; Smad7; RNA interference; short hairpin RNA

已有研究表明瘢痕疙瘩的形成与成纤维细胞对转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)的敏感性增加密切相关[1]。Smad 蛋白在 TGF-β1 的信号传导中起着重要的作用,Smad3 和 Smad7 是瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblast,KFB)内 2 种作用相反的 TGF-β/Smad 信号通路中重要的信号传导分子[2,3]。本实验运用 PGE-l 载体,构建了 Smad3 的短发夹状 RNA(shRNA)真核表达载体,观察 KFB Smad3 基因沉默后 Smad3 和 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达的变化。从而探讨这 2 个信号转导分子在瘢痕疙瘩治疗中的作用,为探讨瘢痕疙瘩治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、T_4DNA 连接酶和 $MgCl_2$(Promega 公司),限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xba*Ⅰ(MBI 公司),胎牛血清(四季青),DMEM 培养基(Gibco 高糖型)、Lipofectamine™ 2000(Invitrogen, USA),羊抗 Smad3 多克隆抗体、兔抗 Smad7 多克

作者简介:但 洋,男,湖北省赤壁市人,硕士研究生,医师,主要从事瘢痕防治方面的研究。E-mail: danieldan008@yahoo.com.cn

通信作者:沈为民,E-mail:swm19570115@sina.com

收稿日期:2008-08-30;修回日期:2008-10-12

隆抗体(Santa Cruz 公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),DNA Marker Ⅰ(北京天根),质粒抽提试剂盒(Omega 公司),G418(Sigma 公司)。PVDF 膜 Marker(晶美生物公司)。用设计出的 siRNA 筛选出有效的 siRNA,并在重庆医科大学高校神经病学重点实验室合成带荧光标记 PGE-l 质粒的 shRNA 表达载体。

1.2　实验方法

1.2.1　人瘢痕疙瘩皮肤原代细胞的培养　　采用组织块法培养人瘢痕疙瘩皮肤原代细胞。标本来源于本科室收治的病史为 1 年左右青年患者耳部皮肤瘢痕疙瘩。手术切取瘢痕疙瘩,无菌条件下用 0.05% 醋酸氯己定清洗、消毒约 5 min 后去除皮下组织,剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块,按适当间隔放置在涂有大鼠鼠尾胶原的培养瓶中使其固定于培养瓶底。6 h 后小心加入少量含体积分数为 20% 的胎牛血清的 DMEM 培养液,置入温箱原代培养。1 周内不要观察和翻动,待细胞 70% ~80% 融合后传代,用第 4 ~8 代处于对数生长期的成纤维细胞进行转染实验。

1.2.2　Smad3 shRNA 的设计和合成　　我们前期根据人 Smad3 基因编号(NM_005902)序列特征,依照 siRNA 的设计原则[5],合成 3 对 siRNA,经实验筛选出有效的 1 对 siRNA(正义链:5′-GGAGAAAUGGUGCGAGAAGTT-3′;反义链:5′-CUUCUCGCACCAUUUCUCCTCC-3′)合成 GFP 荧光标记的 shRNA 表达载体。中间通过 9 对碱基对的回折序列(TCTCTTGAA)将此 2 段序列相连,形成茎环结构,在 3′端添加 5 个 T,作为 RNA 聚合酶Ⅲ的终止子。

1.2.3　Smad3 shRNA 质粒的构建　　合成 1 对 62 nt 寡核苷酸链,溶解在 ddH_2O 中,正义链和反义链的 Oligos 退火形成双链 DNA(dsDNA),分别与经过酶切回收后的线性化 Pge-1 质粒载体连接,得到重组质粒,命名为 Smad3 shRNA。转化感受态细胞,37 ℃培养过夜筛选,获得阳性转化子菌落。

1.2.4　Smad3 shRNA 质粒的鉴定　　挑选阳性转化单菌落扩增,提取质粒。用 Omega 质粒小抽抽提试剂盒提取重组质粒,对提取质粒用 *Sal* Ⅰ酶切鉴定,经初步的电泳鉴定成功后,送大连宝生物工程技术服务有限公司进行序列测定。对符合构建要求的质粒进行转染实验。

1.2.5　实验分组及转染　　实验分为空白对照组(Lipofectamine™2000 + KFB)、实验组(Smad3 shRNA + KFB)、阴性对照组(shRNA-HK + KFB)。转染前 1 d 用 0.25% 胰酶将 KFB 细胞消化并计数,使其在转染日能达到 90% ~95% 融合。用 Lipofectamine™2000 转染 Smad3 shRNA 载体,按转染试剂说明书进行。转染 24 h 后加真核抗性的抗生素 G418(400 μg/ml),并分别在 24、48、72 h,7 d 和 9 d 在荧光显微镜下观察转染率,72 h 后未转染的 KFB 大多被杀死,改用维持量200 μg/ml继续培养,8 d 后荧光显微镜下转染率为 70% ~80%。分别在转染后的不同时间点 6、12、24、48、72 h,6 d 和 9 d 检测 Smad3、Smad7 的 mRNA 及其蛋白的表达变化。

1.2.6　RNA 提取及 RT-PCR 检测

1.2.6.1　总 RNA 提取及逆转录　　采用改良异硫氰酸胍法(Trizol 试剂)提取细胞总 RNA,按试剂说明书进行。逆转录采用 TaKaRa 逆转录试剂盒。

1.2.6.2　Smad3、Smad7 的引物设计和合成　　Smad3、Smad7 和内参照的基因序列通过 GenBank 获得。根据 Primer 5.0 软件自行设计后交由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成。Smad3 引物正义链:5′-CCAGCCATGTCGTCCATCCT-3′,反义链:5′-TCACGCAGACCTCGTCCTTC-3′,扩增产物大小为 372 bp;Smad7 引物正义链:5′-CTTCATCAAGTCCGCCACAC-3′,反义链:5′-CCGGCTGTTGAAGATGACCT-3′,扩增产物大小为 258 bp;GAPDH 引物正义链:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,反义链:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,扩增产物大小为 450 bp。β-actin 引物正义链:5′-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3′,反义链:5′-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3′,扩增产物大小为 216 bp。

1.2.6.3　PCR 扩增　　PCR 总反应体积为 50 μl,PCR 反应条件为 94 ℃预变性 5 min,然后进入 94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共循环 30 次,最后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后取10 μl PCR 产物,用 2% 琼脂糖凝胶(含 0.2 mg/L EB)电泳后以凝胶成像系统成像及进行扫描定量分析,以所测得吸光度值与内参照吸光度值的比值代表半定量值。

1.2.7　蛋白的提取及 Western blot 检测

1.2.7.1　总蛋白的提取　　弃去培养基,用预冷的生理盐水洗细胞 2 次,加入细胞蛋白裂解液,冰上放置 5 min 后用细胞刮子刮取细胞,收集至 1.5 ml Eppendorf 管中,用超声粉碎仪在冰上进行超声粉碎,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,留取上清,用微量蛋白/核酸测定仪利用标准曲线法测定总蛋白浓度。

1.2.7.2　Western blot 检测　　按分子克隆实验指南配制及灌制 10% 分离胶和 5% 积层胶,取总蛋白 20 μg 的样品,加入 5 × SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min 后,电泳、转膜,加入合适浓度的 Smad3(1∶400)及 Smad7(1∶300)抗体 4 ℃孵育过夜。再用 1∶2 000 山羊抗兔 lgG 二抗,孵育 1 h,DAB 显色分别检测 PVDF 膜上 Smad3、samd7 蛋白的表达量。以 β-actin 为内参照,观察各组样品蛋白表达变化。

1.2.8　MTT 法检测 KFB 细胞的增殖　　取对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后,制成单细胞悬液,调整细胞数为 1×10^6/ml。取 96 孔板。每孔接种 200 μl,做好分组标志,每个时间点取出 1 块板检测。每孔加入 MTT 溶液 20 μl,继续孵育 4 h,吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜(DMSO),充分振荡 10 min,酶标(570 nm 波长)测定每孔的吸光度值[D(570)]。以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。重复实验 3 次。

1.3　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析,各组间资料行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　质粒的构建和鉴定

2.1.1　Smad3 shRNA 表达载体的酶切鉴定　　构建成功的质粒载体大小为 4 893 bp,插入在质粒 Pge-1 的 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ之间,若插入正确,质粒就能被 *Sal* Ⅰ酶切出 1 条约 400 bp 的 DNA 小带。经酶切鉴定分析,Smad3 shRNA 符合设计要求。

2.1.2　Smad3 shRNA 表达载体的序列测定　　根据质粒图谱,选用 T_3 启动子引物(5′-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3′)作

进一步的序列测定,测序结果提示碱基序列完全正确。

2.2 G418 筛选结果

实验组、阴性对照组由于质粒载体 Pge-1 上带绿色荧光 GFP,在荧光显微镜下可见荧光,说明转染成功,24 h 时荧光表达率大约 40%(图 1),G418 作用 8 d 后荧光表达率大约为 70%,筛选有效。

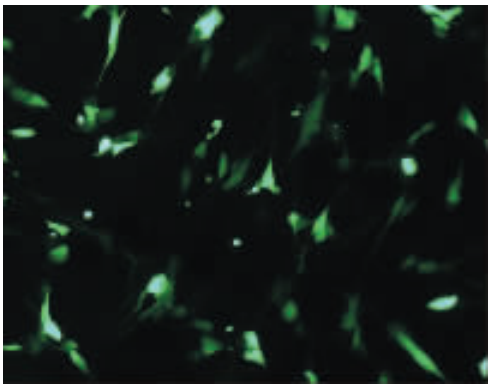


图 1 KFB 转染 Smad3 shRNA 荧光表达情况

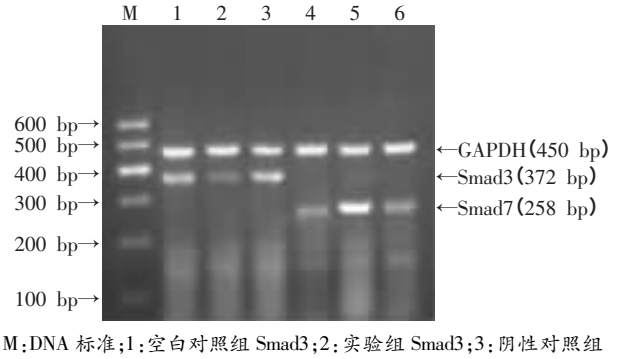
(倒置荧光显微镜×100)

2.3 Smad3、Smad7 mRNA 表达的结果

Smad3 和 Smad7 引物的扩增基因片段经电泳和 EB 染色后,结果显示扩增片段大小与所设计的大小完全一致,分别为 258 bp 和 372 bp。转染 72 h 后可见 Smad3 mRNA 表达显著减弱,与阴性对照组和空白对照组相比,Smad3 mRNA 电泳条带灰度值均显著降低($P<0.05$),说明 shRNA-Smad3 干扰是有效的(图 2)。Smad3 mRNA 表达从 12 h 后开始受到抑制,到 72 h 作用最强,第 9 天后,Smad3 mRNA 表达受抑制作用开始减弱($P<0.05$,图 3A)。而 Smad7 mRNA 表达从 12 h 后开始增强,到 72 h 表达最强($P<0.05$),然后又逐渐减弱(图 3B)。见表 1。

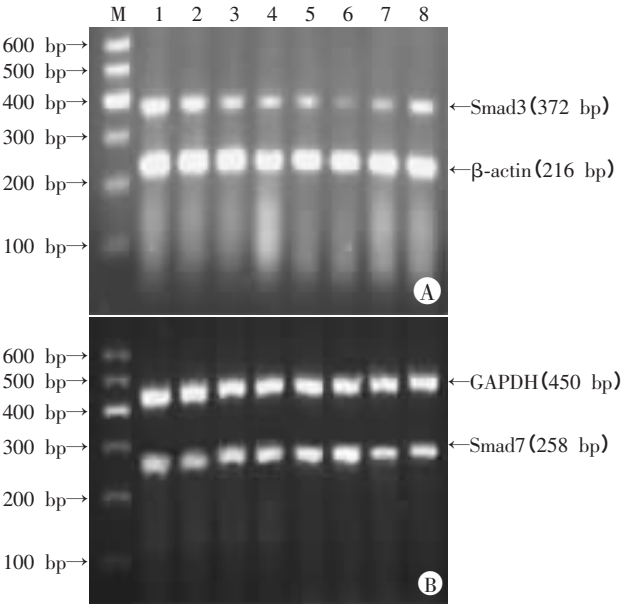
2.4 Smad3、7 的 Western blot 结果

转染作用后检测 6、12、24、72 h,6、9 d 的 Smad3、Smad7 蛋白的表达水平,转膜 72 h 后可见实验组 Smad3 蛋白表达显著减弱(表 1)。对照组 Smad3 蛋白变化不大,实验组减低约 76.5%(图 4)。可见转染 Smad3 shRNA 后,Smad3 蛋白表达明显受抑制,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。Smad7 蛋白表达明显增强,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),最强增加 303%,见图 4,表 1。3 d 后达到高峰,这与 Smad3、Smad7 mRNA 的表达变化相同。



M:DNA 标准;1:空白对照组 Smad3;2:实验组 Smad3;3:阴性对照组 Smad3;4:空白对照组 Smad7;5:实验组 Smad7;6:阴性对照组 Smad7

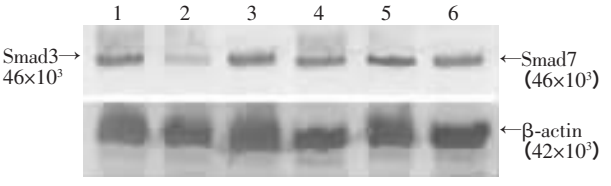
图 2 KFB 转染 72 h 后各组 Smad3、Smad7 mRNA 的表达



A:Smad3 mRNA; B:Smad7 mRNA

M:DNA 标准;1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 48 h; 6: 72 h; 7: 6 d; 8: 9 d

图 3 KFB 转染 Smad3 shRNA 各时间点 Smad3、Smad7 mRNA 的表达

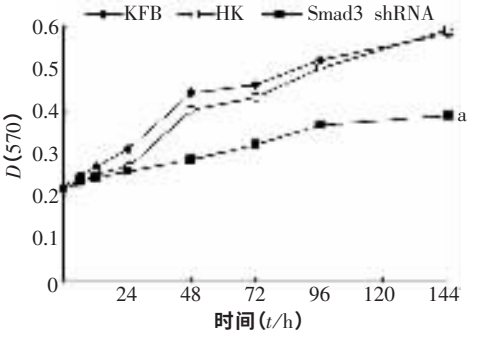


1:空白对照组 Smad3;2:实验组 Smad3;3:阴性对照组 Smad3;4:空白对照组 Smad7;5:实验组 Smad7;6:阴性对照组 Smad7

图 4 KFB 转染 Smad3 shRNA 72 h 后各组 Smad3、Smad7 蛋白的表达

2.5 Smad3 shRNA 重组质粒对细胞增殖的影响

与未转染组相比,经 MTT 检测,转染了 Smad3 shRNA 质粒的 KFB 细胞,6、12、24 h 吸光度[$D(570)$]值变化不明显,而24 h 后吸光值明显下降,说明 24 h 细胞生长受抑制(图 5)。转染阴性质粒 HK 的细胞与未进行转染的 KFB 细胞比,转染后增值均未受到影响。



a: $P<0.05$,与对照组 KFB,阴性对照组 HR 比较

图 5 KFB 转染 Smad3 shRNA 后对细胞生长的影响

表 1　KFB 转染 Smad3 shRNA 后各时间点 Smad3、Smad7 mRNA 和蛋白表达情况　($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	6 d	9 d
Smad3 mRNA	1.75 ±0.05	1.40 ±0.21	1.10 ±0.16[a]	0.96 ±0.04[a]	0.44 ±0.14[a]	0.49 ±0.16[a]	0.66 ±0.23[a]
空白对照组 1	1.88 ±0.31	1.87 ±0.25	1.86 ±0.05	1.84 ±0.16	1.80 ±0.27	1.84 ±0.19	1.85 ±0.10
阴性对照组 2	1.84 ±0.14	1.82 ±0.03	1.80 ±0.02	1.79 ±0.32	1.78 ±0.05	1.81 ±0.10	1.83 ±0.12
Smad3 蛋白	49.01 ±7.27	38.29 ±2.16	30.96 ±2.32	21.56 ±4.56[b]	16.30 ±3.56[b]	19.14 ±5.15[b]	23.16 ±3.74[b]
空白对照组 3	53.27 ±5.51	53.08 ±3.37	52.13 ±1.08	52.55 ±6.55	52.90 ±4.40	53.44 ±1.19	54.33 ±2.78
阴性对照组 4	51.48 ±3.47	50.41 ±3.21	50.27 ±4.36	50.32 ±3.21	49.27 ±2.36	51.24 ±4.74	52.43 ±2.43
Smad7 mRNA	0.74 ±0.21	1.11 ±0.41	1.14 ±0.31[c]	1.19 ±0.18[c]	1.76 ±0.23[c]	1.40 ±0.13[c]	1.25 ±0.25[c]
空白对照组 5	0.59 ±0.16	0.58 ±0.12	0.59 ±0.20	0.57 ±0.24	0.58 ±0.11	0.82 ±0.19	0.58 ±0.18
阴性对照组 6	0.58 ±0.42	0.57 ±0.48	0.63 ±0.36	0.58 ±0.13	0.57 ±0.24	0.58 ±0.32	0.56 ±0.42
Smad7 蛋白	15.51 ±2.26	19.14 ±3.49	23.38 ±1.34	40.37 ±5.26[d]	56.06 ±5.13[d]	48.15 ±5.26[d]	44.08 ±2.16[d]
空白对照组 7	12.72 ±3.07	13.31 ±2.11	13.20 ±1.89	11.55 ±1.01	12.45 ±3.27	11.97 ±3.33	12.67 ±4.55
阴性对照组 8	12.01 ±2.42	12.83 ±2.42	12.21 ±1.24	10.92 ±2.52	11.53 ±1.31	0.42 ±2.63	10.65 ±2.21

a: $P<0.05$,与对照组 1、2 比较; b: $P<0.05$,与对照组 3、4 比较; c: $P<0.05$,与对照组 5、6 比较; d: $P<0.05$,与对照组 7、8 比较

3　讨论

目前认为,Smads 蛋白在 TGF-β1 信号转导中起重要作用[6]。TGF-β1 首先与其受体Ⅱ结合并将其激活,再与受体Ⅰ结合通过磷酸化途径激活受体Ⅰ,活化的受体Ⅰ依次磷酸化 Smad2、3 羧基端的 SSXS 模序,从而激活 Smad2、3,而 Smad2、3 是受体Ⅰ的唯一底物。活化的 Smad2、3 形成同型复合体,并与 Smad4 结合形成异型复合体后,易位于胞核,单独或(和)其他转录调节因子协同调节靶基因的表达[7]。Smad7 通过与 Smad2、3 竞争相结合受体Ⅰ以及干扰 Smad2、3 和 Smad4 的结合来抑制 TGF-β1 信号的传导,阻止 R-Smads 的磷酸化。未磷酸化的 R-Smads 不能与通用型 Smad4 结合形成异源复合物,进而不能转位到细胞核调控靶基因的转录。抑制性 Smad7 通过其反馈调节作用抑制 R-Smad 的活化促进 TGF-β1 受体的降解对抗 TGF-β1 的作用[8]。不仅如此,研究表明,病理性瘢痕疙瘩成纤维细胞产生的胶原显著多于正常成纤维细胞,Ⅰ、Ⅲ型前胶原 mRNA 也显著增多而成纤维细胞中过表达的 Smad3 加强胶原基质的收缩,过表达的 Smad7 则抑制这一过程[9]。Smad3、Smad7 分别在 TGF-β1 信号系统中发挥重要作用,已有不少报道,但少见报道瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad3、Smad7 关联表达的研究。

瘢痕疙瘩成纤维细胞是由瘢痕疙瘩组织培养得来,是研究皮肤瘢痕疙瘩的理想体外模型。在前期研究中,我们采用化学合成的 siRNA,成功实现了对 KFB Smad3 的基因沉默,获得了(30.5 ±1.03)% 的抑制效率。但实验结果也提示,siRNA 作用时间短,对本细胞转染率低,不适合进一步体内研究。为了进一步研究 Smad3、7 表达的相互作用,本实验通过构建能稳定转染 shRNA 表达载体,来稳定转染针对 Smad3 的siRNA。实验结果显示,转染后瘢痕疙瘩的成纤维细胞的 Smad3 基因 mRNA,蛋白表达都减低,表明 Smad3-shRNA 表达载体能有效的干扰 KFB 特异的靶位点,引起目标基因表达受抑制。而设立的对照组无明显变化,说明我们的抑制是有效的、特异的。MTT 的结果也显示,干扰后抑制了 KFB 细胞的增长,这也说明干扰是有效的。随着时间的延长,抑制后的 Smad3 的 mRNA 逐渐减低,在第 3 天 Smad3 mRNA 抑制最为明显(76.5 ±1.11)%,而 Smad7 的 mRNA 表达也逐渐增强,第 3 天 Smad7 mRNA 增强最为明显(66.4 ±4.12)%。通过 Western blot 技术对 Smad7 基因的蛋白质表达水平的量化检测,蛋白水平在受到干扰后 24 h 出现明显变化,在第 3 天变化最明显(77.3 ±6.3)%,显示出与 Smad3、Smad7 mRNA 的表达水平较为一致的变化趋势。结果提示,RNA 干扰作用使 Smad3 表达下调,从而使 Smad3 表达相应减少,而对应 Smad7 基因表达开始增加,这提示 Smad7 作为 KFB 内 TGF-β1 信号通路中的抑制性信号分子,可能通过某种机制反馈调节作用抑制兴奋性信号分子 Smad3 的表达。其机制可能是 RNA 干扰作用,特异性的抑制了 Smad3 的表达,使得 Smad3 不能与 Smad4 形成复合物,从而抑制信号的传递。而由于 Smad7 与受体Ⅰ的亲和力大于 R-Smad,也促进抑制 Smad3 与受体Ⅰ相互作用和磷酸化,从而引起 Smad3 表达减低,Smad7 表达增强。Schiller 等[10]也认为 Smad7 可通过阻止 Smad3 形成复合物和 samd 的磷酸化过程作用,使 Smad3 表达减低。最近的研究结果也提示,Shizuya 等[11]认为 Smad7 高表达可抑制 Smad2/3 信号的转导,抑制体内外视网膜色素上皮细胞的纤维生成反应,减少胶原Ⅰ、Ⅲ的合成。

本实验证实 Smad3 shRNA 使 KFB 细胞 Smad3 mRNA 和蛋白配体依赖性的下调,同时引起 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达迅速增加。所有这些结果都提示,Smad3 与 Smad7 起反向调节的作用,体内人为的抑制 Smad3 的高表达或增加 Smad7 的表达是否可以减少瘢痕的发生,值得进一步研究。

参考文献:

[1] Bettinger D A, Yager D R, Diegelmann R F, *et al*. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis[J]. Plast Reconstr Surg, 1996, 98(5): 827-832.

[2] Schultze-Mosgau S, Blaese M A, Grabenbauer G, *et al*. Smad-3 and Smad-7 expression following anti-transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1)-treatment in irradiated rat tissue[J]. Radiother Oncol, 2004, 70(3): 249-259.

[3] Schiffer M, Von-Gersdorff G, Bitzer M, *et al*. Smad proteins and transforming growth factor beta signaling[J]. Kidney Int Suppl, 2000, 77: S45-S52.

[4] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, *et al*. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002, 26(2): 199-213.

[5] Bottinger E P, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(10): 2600-2610.

[6] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(22): 3056-3062.

[7] Massague J, Blain S W, Lo R S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders[J]. Cell, 2000, 103(2): 295-309.

[8] Yu H, Bock O, Bayat A, *et al*. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2006, 59(3): 221-229.

[9] Flanders K C. Smad3 as a mediator of the fibrotic response[J]. Int J Exp Pathol, 2004, 85(2): 47-64.

[10] Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing[J]. J Dermatol Sci, 2004, 35(2): 83-92.

[11] Saika S, Yamanaka O, Nishikawa-Ishida I, *et al*. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model[J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125(5): 647-654.

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)12-1176-01

小肠嵌入移位节育环致闭袢绞窄性肠梗阻1例

吴国庆,杨日高,穆 宇,张渝科,益小平 (解放军324医院普通外科,重庆 400020)

肠梗阻原因很多,小肠嵌入节育环致急性闭袢性肠梗阻罕见,我院于2008年3月27日诊治1例节育环移位腹腔致急性绞窄性肠梗阻,报告如下。

1 临床资料

患者,女性,49岁,无明显诱因出现脐周及左下腹疼痛1 d,开始持续性隐痛,进行性加重,后为剧烈性绞痛,恶心、呕吐,呕吐物为胃内容物,无鲜血及臭味,同时肛门停止排气、排便,经当地医院治疗无好转,急诊入院。既往病史无特殊,1982年结婚置入一节育环不知去向,1985年妊娠顺产1男婴后4个月再置入一节育环至今未受孕。查体:神清, 血压70/40 mmHg、体温36.0 ℃、脉搏80次/min、呼吸24次/min,腹膨隆,全腹肌紧、压痛、反跳痛,移浊可疑,可闻金属肠鸣音,腹穿抽出不凝血,腹部立卧位片见中上腹多个液气平面,左下腹及子宫内分别可见一节育环。血常规 WBC 12.9×10^9/L、中性粒细胞80.8%、RBC 2.38×10^{12}/L、HGB 71 g/L、PLT 259×10^9/L。诊断:(1)急性弥漫性腹膜炎:①肠绞窄坏死穿孔? ②肿瘤破裂? (2)休克(感染、出血)。急诊手术探查:下腹正中切口入腹见腹腔大量暗红色血性液体约1 000 ml,部分小肠发黑、缺血、坏死,在发黑的小肠根部可见一金属节育环,节育环一侧壁与乙状结肠内侧粘连,环内嵌入约180 cm空回肠,远端距回盲部约40 cm,嵌入肠管出血、坏死,其余肠管正常。诊断"小肠嵌入移位节育环致闭袢绞窄性肠梗阻",离断节育环、切除坏死段小肠,行小肠吻合,术后经抗感染治疗,患者痊愈出院,随访10个月,一般情况好。



图1 小肠嵌入移位节育环致闭袢绞窄性肠梗阻的X线表现

作者简介:吴国庆,男,安徽省黄山市人,主任医师,主要从事普通外科方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68762058,E-mail: wuguoqing a8626@163.com

通信作者:杨日高, E-mail: yangrg6699@yahoo.cn

收稿日期:2009-03-18;**修回日期:**2009-04-21

(下转1180页)