论著

文章编号:1000-5404(2011)11-1110-05

Pyk2/PI3K/NF-κB 在心脏成纤维细胞表型转化及迁移中的作用

郝 嘉,游 凯,陈 林,肖颖彬 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心)

【摘要】 **目的** 用短发夹 RNA 干扰技术选择性下调大鼠心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts,CFs)中富含脯氨酸的酪氨酸激酶2(prolein-rich tyrosine kinase 2,Pyk2)的表达,检测 Pyk2/PI3K/NF-κB 在细胞表型转化及迁移的作用。**方法** 利用 Pyk2 特异短发夹 RNA 质粒载体,转染血管紧张素Ⅱ刺激的原代培养大鼠心脏成纤维细胞。使用 Transwell 小室模型、体外划痕法检测细胞迁移变化,并结合免疫荧光观察 α-平滑肌肌动蛋白表达变化。蛋白印迹法检测 Pyk2 和磷酸化磷酸肌醇3激酶(phosphoinositide-3-kinase,PI3K) p85 亚基的蛋白水平,EMSA 检测核转录因子 κB(NF-κB)活性。**结果** Transwell 实验显示 CFs 跨膜细胞数随培养时间延长而上升,但 Pyk2 shRNA 转染组在不同时相点跨膜细胞数较对照组均明显减少,在6 h 分别为[(19.1±6.1)和(30.8±8.6),$P<0.05$],在 12 h 分别为[(37.7±12.4)和(53.6±11.3),$P<0.05$],而在24 h 分别为[(78.9±18.5)和(102.3±21.7),$P<0.01$]。转染 Pyk2 shRNA 后 α-平滑肌肌动蛋白表达明显受抑制,绿色阳性染色细胞的比例下降,荧光强度减弱。体外划痕法显示 Pyk2 shRNA 转染组细胞迁移距离明显下降,在24 h 分别为0.838 mm 和1.213 mm($P<0.05$),在48 h 分别为1.626 mm 和2.049 mm($P<0.01$)。Pyk2 shRNA 转染组 Pyk2 和 PI3K p85 表达的相对条带强度较对照组减弱(0.47 vs 0.61,$P<0.05$),磷酸化 PI3K p85 表达水平也较对照组有明显降低(0.31 vs 0.42,$P<0.05$)。NF-κB 平均光密度分别为2.17 和3.59($P<0.05$)。**结论** Pyk2/PI3K/NF-κB 可能是促进 CFs 向肌成纤维细胞表型转化和介导细胞迁移的重要信号途径,Pyk2 可能成为防治心脏纤维化的新靶点。

【关键词】 富含脯氨酸的酪氨酸激酶2;心脏成纤维细胞;表型;迁移

【中图法分类号】 R322.11;R394-33;R394.2 【文献标志码】 A

Pyk2/PI3K/NF-κB improves phenotypic transition and migration of cardiac fibroblasts *in vitro*

Hao Jia, You Kai, Chen Lin, Xiao Yingbin (Center of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To down-regulate the expression of prolein-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) in cultured adult rat cardiac fibroblasts (CFs) with short hairpin RNA interference, and evaluate the role of Pyk2/PI3K/NF-κB in cell phenotypic transition and migration. **Methods** The Pavu6+27-Pyk2 shRNA expression vector was constructed by gene recombination, then transfected into cultured adult rat CFs stimulated by angiotension Ⅱ. Untransfected cells (control), cells transfected with Pavu6+27 vector (empty vector) and those transfected with negative shRNA vector (negative control) were used as control. Transwell chamber test and *in vitro* scratching assay were adopted to evaluate the cell migration. Change of α-smooth muscle actin (α-SMA) in CFs was analyzed in transwell chamber by immunofluorescence. The protein expressions of Pyk2 and phosphate phosphoinositide-3-kinase protein (PI3K) p85 subunit in CFs were determined by Western blotting. Electrophoretic mobility shift assay was employed to determine the activation of NF-κB. **Results** After Pyk2 shRNA transfection, transwell assay showed the number of migrated CFs was increased with the prolongation of culture. However, comparing to control group, the number of migrated CFs in Pyk2 shRNA transfection group was deceased significantly after transfection (19.1±6.1 *vs* 30.8±8.6 at 6 h, 37.7±12.4 *vs* 53.6±11.3 at 12 h, 78.9±18.5 *vs* 102.3±21.7 at 24 h, $P<0.05$, 0.01). But no difference was found among these control, empty vector and negative control. Immunofluorescence staining showed that α-actin expression and migration in CFs was inhibited after Pyk2 shRNA transfection. *In vitro* scratching assay revealed there were

【基金项目】 国家自然科学基金(30700822)

【通信作者】 肖颖彬,电话:(023)68774607,E-mail:xiaoyb@vip.sina.com

significant difference between the migration distance of CFs with Pyk2 shRNA transfection and control (0.838 *vs* 1.213 mm at 24 h, 1.626 *vs* 2.049 mm at 48 h, $P<0.05$, 0.01). The protein expression of Pyk2 (0.47 *vs* 0.61) and phosphated PI3K p85 (0.31 *vs* 0.42) were declined after Pyk2 shRNA transfection ($P<0.05$). Electrophoretic mobility shift assay demonstrated that the NF-κB DNA binding activity was reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Pyk2/PI3K/NF-κB signal pathway might be critical in mediating CFs migration and phenotypic transition, Pyk2 is a promising therapeutic candidate in myocardial fibrosis.

[Key words] prolein-rich tyrosine kinase 2; cardiac fibroblasts; phenotype; migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100063). Corresponding author: Xiao Yingbin, Tel: 86-23-68774607, E-mail: xiaoyb@vip.sina.com

心肌间质纤维化通过降低心室顺应性、损伤心肌细胞间的电偶联、增加氧弥散距离、降低心脏收缩能力等机制伴随多种心脏疾病进程，作为心肌间质纤维化效应细胞的心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts，CFs)极有望成为心肌重塑和心衰的新治疗靶标[1]。心肌胶原和其他基质蛋白的合成是个复杂过程，它与CFs迁移并由收缩型CFs转变为合成型、胶原合成的转录和翻译后调节、基质金属蛋白酶介导的胶原降解等有关[2]。我们的前期研究表明脯氨酸的酪氨酸激酶2(prolein-rich tyrosine kinase 2，Pyk2)可在风心病心肌标本和原代培养的大鼠CFs中表达，并与心肌纤维化密切相关，但Pyk2对CFs表型转化及迁移的影响和涉及的机制尚不明了。因此，我们利用前期成功构建的Pyk2特异短发夹RNA质粒载体，转染血管紧张素Ⅱ刺激的原代培养大鼠CFs进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和用品

Western blot检测试剂盒、免疫荧光试剂盒、DOTAP脂质体转染试剂、Transwell小室、Pyk2抗体(Tyr402)、磷酸化PI3K p85(Tyr458)抗体，PI3K p85抗体和α-平滑肌肌动蛋白抗体分别由相关公司提供。常规条件下行细胞培养，刺激因素为10^{-7} mol/L的血管紧张素Ⅱ。

1.2 靶向Pyk2的短发夹小分子干扰RNA的设计、构建和筛选[3]

根据Pyk2的核苷酸序列，利用在线设计工具设计1对阴性对照序列和3对shRNA序列，Blast分析设计序列的特异性，两端悬垂*Sal*Ⅰ、*Xba*Ⅰ的酶切位点后合成DNA序列。Pyk2反向重复片段经退火成互补双链，酶切后回收，经T_4连接酶连接到经SalⅠ和XbaⅠ酶切的载体Pavu6+27中，转入大肠杆菌JM109中扩增、筛选、酶切鉴定后测序。采用DOTAP脂质体转染CFs，G418进行筛选。RT-PCR法和Western blot法检测不同重组子转染CFs后Pyk2 mRNA和蛋白表达，选取沉默效率最高的Pyk2 shRNA重组质粒进行下一步实验。

1.3 实验分组

按我们既往实验方法分组[4]，即转染后CFs分为4个实验组：未转染对照组(Control)、Pavu6+27空白质粒转染组(Empty vector)、阴性对照RNA干扰质粒转染组(Negative shRNA vector)和Pavu6+27-Pyk2重组质粒转染组(Pavu6+27-Pyk2 shRNA)。

1.4 Transwell小室迁移实验

实验方法参照文献[5]。往Pyk2 shRNA转染组Transwell上室滴加将转染后的1×10^5细胞悬液，对照组中加入未转染的CFs细胞悬液。下室加入DMEM/F12培养基，37 ℃孵育6、12、24 h后，取出上室，棉签拭去上室滤膜内表面残存细胞，4%多聚甲醛固定，PBS洗涤后HE染色。每张滤膜高倍镜下随机取5个视野(×400)取均值。

1.5 免疫荧光检测α-平滑肌肌动蛋白表达

往Transwell上室滴加将转染后的1×10^5细胞悬液，对照组加未转染的CFs细胞悬液。下室加入DMEM/F12培养基，37 ℃孵育6、12、24 h后，取出上室，棉签拭去上室滤膜内表面残存细胞。上室以95%乙醇固定15 min，PBS洗3次。0.1% Triton X-100破膜10 min，PBS洗3次，血清封闭30 min，加α-平滑肌肌动蛋白绿色荧光一抗4 ℃孵育过夜，PBS洗3次。加二抗，室温避光孵育1h，PBS洗3次。细胞核用4-6-二醚基-2-2-苯胺基(DAPI)显示蓝色荧光。以不加一抗的细胞作为阴性对照。荧光显微镜下观察拍照。

1.6 体外划痕法测定迁移能力

转染24 h后，用无菌20 μl的枪头划痕，造成细胞间的刮沟，每孔划3条痕，每组分3个复孔。每组随机取8点标记并于倒置显微镜下观察划痕宽度的变化，每24小时观察1次，连续观察2 d。细胞迁移能力以迁移率表示：

迁移率=(原划痕宽度－现划痕宽度)/原划痕宽度。

1.7 Western blot法检测转染后Pyk2和PI3K蛋白表达

转染24 h后，每孔细胞中加入80 μl蛋白上样缓冲液，放置5 min后，吸入小离心管，沸水浴中放置10 min后，4 ℃冰箱中冷却。取30 μl上样，12% SDS-PAGE凝胶电泳。转膜后，放入脱脂奶粉中封闭4 ℃过夜。Pyk2多克隆抗体和磷酸化磷酸生成磷脂酰肌醇3(phosphoinositide-3-kinase protein，PI3K) p85抗体1∶500与膜杂交37 ℃ 60 min，TBS洗涤，二抗1∶5 000，杂交60 min，TBS洗涤后加入显色剂5% DAB显色。GAPDH为内参照蛋白。

1.8 EMSA法检测转染后NF-κB活性

凝胶迟滞电泳实验(EMSA)检测核转录因子κB(NF-κB)

的具体方法是：在转染24 h后，按Pierce公司操作说明抽提细胞核蛋白和测定蛋白浓度，按照试剂盒说明进行^{32}P-dATP标记探针，终浓度为1.75 fmol/L。根据蛋白浓度，在同一实验中取等量的核蛋白样品。于室温中向上述反应体系加入同位素标记的寡核苷酸探针1L，总反应体系为20 L，冰上孵育30 min后上样。15～18mA恒流电泳40～60 min，待溴酚蓝指示剂移过胶面3/4时，停止电泳，取胶封膜，-70 ℃放射自显影48 h。凝胶成像系统扫描图像。

1.9 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件，进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Transwell细胞跨膜迁移分析

用Pavu6+27-Pyk2 shRNA质粒转染CFs后6、12、24 h，Transwell结果显示CFs跨膜的细胞数随培养时间延长而上升，但Pavu6+27-Pyk2重组质粒转染组在不同时相点跨膜细胞数均较对照组明显减少，在6 h分别为[(19.1±6.1)和(30.8±8.6)，$P<0.05$]，在12 h分别为[(37.7±12.4)和(53.6±11.3)，$P<0.05$]，而在24 h分别为(78.9±18.5)和(102.3±21.7)，$P<0.01$]。设置的空白质粒转染组和阴性对照组的跨膜迁移细胞与对照组相比无明显差异。见表1、图1。

表1 Transwell小室分析不同转染时间各组细胞跨膜迁移变化($\bar{x} \pm s$)

组别	转染6 h后	转染12 h后	转染24 h后
对照组	30.8±8.6	53.6±11.3	102.3±21.7
Pavu6+27空质粒转染组	29.2±6.9	52.5±13.2	104.1±19.4
阴性RNA干扰质粒转染组	28.4±7.2	50.2±10.1	99.5±22.8
Pavu6+27-Pyk2重组质粒转染组	19.1±6.1[a]	37.7±12.4[a]	78.9±18.5[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.2 免疫荧光法检测α-平滑肌肌动蛋白变化

在Transwell小室中，与细胞迁移能力相关的α-平滑肌肌动蛋白在血管紧张素Ⅱ刺激后可见明显表达，免疫荧光呈现明显绿色荧光，胞核蓝染，与相差显微镜下黑白细胞图像三重叠加，可见转染Pyk2 shRNA后α-平滑肌肌动蛋白表达明显受抑制(图2)，绿色阳性染色细胞的比例下降，荧光强度减弱，绿色荧光不能清楚显示细胞轮廓。空白质粒转染组和阴性对照组的细胞荧光表达情况与对照组相比无明显差异。

2.3 体外划痕法测定迁移能力

对照组24 h迁移1.213 mm，而Pyk2 shRNA转染组细胞迁移能力明显下降，24 h迁移0.838 mm，二者相比差异显著($P<0.05$)。对照组48 h迁移2.049 mm；Pyk2 shRNA转染组48 h迁移1.626 mm，二者相比差异十分显著($P<0.01$)。与对照组相比，空白质粒转染组和阴性对照组在不同时间点的细胞迁移距离无明显差异。见表2。

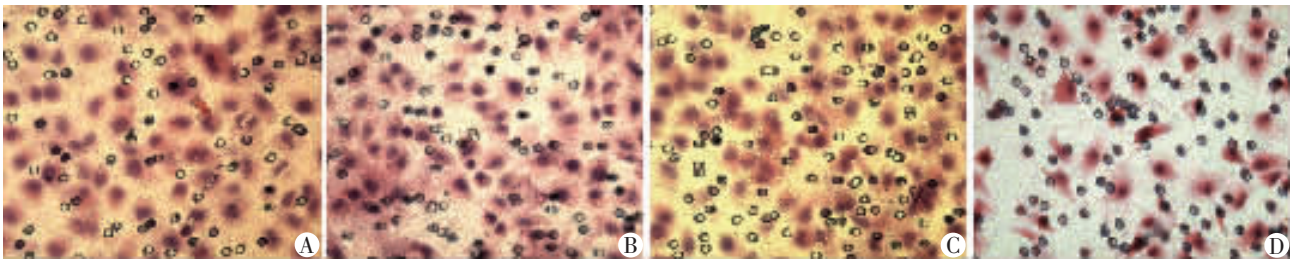
2.4 各组Pyk2和PI3K蛋白表达水平

Pyk2 shRNA转染组Pyk2表达的相对条带强度较对照组减弱(0.47 *vs* 0.61，$P<0.05$)，磷酸化PI3K p85表达水平也较对照组有明显降低(0.31 *vs* 0.42，$P<0.05$)。空白质粒转染组和阴性对照组的蛋白表达水平与对照组相比无明显变化。见图3。

表2 体外划痕法测定各组细胞迁移能力($\bar{x} \pm s$)

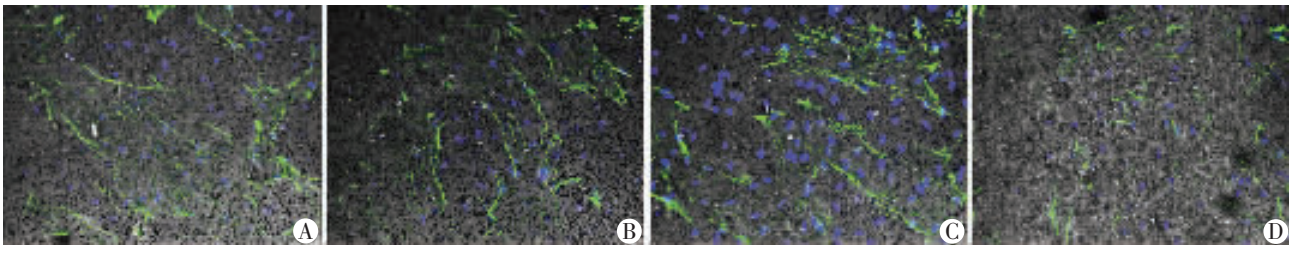
组别	24 h迁移距离(mm)	48 h迁移距离(mm)	24 h迁移率	48 h迁移率
对照组	1.213±0.049	2.049±0.062	0.61	0.97
Pavu6+27空质粒转染组	1.179±0.082	1.964±0.113	0.53	0.89
阴性RNA干扰质粒转染组	1.086±0.074	1.903±0.147	0.57	0.92
Pavu6+27-Pyk2重组质粒转染组	0.838±0.058[a]	1.626±0.301[b]	0.35	0.72

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较



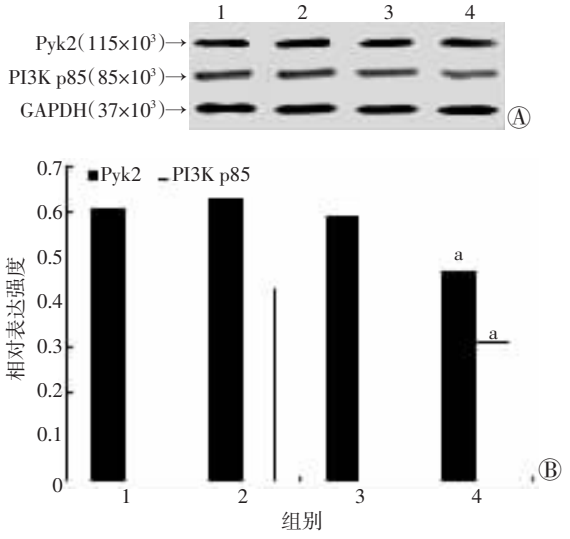
A：未转染组；B：空白质粒转染组；C：阴性shRNA转染组；D：Pyk2 shRNA转染组

图1 转染后24 h各组细胞迁移观察 (HE ×400)



A：未转染组；B：空白质粒转染组；C：阴性shRNA转染组；D：Pyk2 shRNA转染组

图2 转染后24 h各组细胞α-平滑肌肌动蛋白的表达 (荧光染色 ×400)

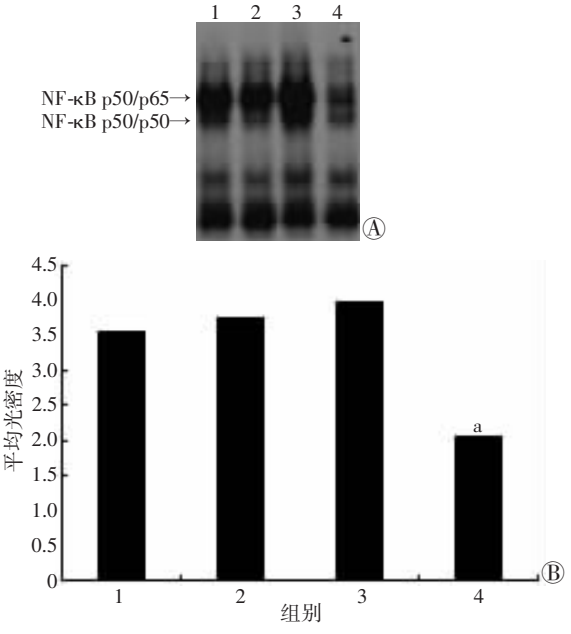


1：对照组 2：空白质粒组 3：阴性对照组 4：转染组
a：$P<0.05$，与对照组比较
A：Western blot 结果 B：半定量分析结果

图 3　转染后 24 h 各组细胞 Pyk2 和 PI3K p85 蛋白表达

2.5　各组 NF-κB 活性

Pavu6 +27-Pyk2 shRNA 质粒转染 CFs 后 NF-κB 活性明显降低，Pyk2 shRNA 转染组和对照组两组的 NF-κB 平均光密度分别为 2.17 和 3.59，差异显著（$P<0.05$）。空白质粒转染组和阴性对照组的 NF-κB 活性与对照组相比无明显变化。见图 4。



A：EMSA 法检测结果，B：半定量分析结果
1：未转染组 2：空白质粒转染组 3：阴性 shRNA 转染组 4：Pyk2 shRNA 转染组　a：$P<0.05$，与对照组比较

图 4　EMSA 法检测转染后 24h 各组细胞 NF-κB 活性和变化

3　讨论

心肌纤维化是指单位质量心肌组织中的胶原含量-胶原浓度增加，主要表现为间质中胶原的异常堆积和胶原浓度的显著增高。它可引起心肌结构紊乱、组织异质性增高，是发生心律失常的结构基础，也是猝死和慢性心功能不全的潜在危险因素。CFS 参与细胞外基质的合成和沉积，与心脏发育、结构、细胞信号系统、物质代谢等密切相关；它还可与心肌细胞、其他 CFS 甚至内皮细胞之间相互接触，影响电机械功能、细胞因子分泌和血管生成[6]。但 CFS 过度增殖以及细胞外基质合成增加将导致纤维组织增生甚至心肌纤维化。

黏着斑激酶家族成员 Pyk2 是一种酪氨酸蛋白激酶，它能被包括整合素在内的多种细胞外信号激活，参与多条信号通路的传递，在细胞信号转导过程中发挥重要作用，调节着细胞的生长、分化、凋亡和黏附等生理过程[7]。研究表明 Pyk2 不仅在心脏中高表达，还参与了心肌肥大、心脏衰竭、高血压病等一系列心血管病理生理进程。吴浩等[8]在肾性高血压大鼠肥厚心肌中，采用免疫组化法检测出了心肌组织中 Pyk2 及磷酸化 Pyk2 表达，并使用缬沙坦干预后发现它可有效地下调 Pyk2 及 p-Pyk2 表达，并改善心肌肥厚，其机制可能是 Pyk2 信号通路通过下调肌浆网钙离子 ATP 酶基因的转录从而参与心肌重塑。鉴于 Pyk2 在心肌细胞内的慢性激活对心肌重塑有不良的调节作用，它的重要性正日趋引起关注[9]。

目前针对 Pyk2 信号通路的研究主要集中在心肌细胞上，而 Pyk2 在心脏另一重要效应细胞—CFS 中的作用尚不明了。新近研究提示 Pyk2 与内皮细胞和平滑肌细胞迁移密切相关，并是极有潜力的血管疾病治疗靶点[10]。Pyk2 还可促进巨噬细胞、破骨细胞、乳腺癌等肿瘤细胞的迁移，特别是 Bataller 等[11]发现血管紧张素Ⅱ可促进肝星形细胞迁移及 α-平滑肌肌动蛋白表型转换在肝纤维化中发挥重要作用。与之相类似的，心脏各种刺激因子诱导 CFs 迁移到损伤处，α 平滑肌肌动蛋白的阳性表达增多，出现增殖表型向致纤维化表型转换，从而使细胞增殖、迁移和分泌细胞因子功能等发生明显变化[12]。这种病理过程在心肌纤维化进程甚至是心脏恶性重塑中发挥重要作用[13]。基于此，我们推测 Pyk2 也可能在 CFs 表型转化及迁移中可能发挥重要作用。

研究表明，Pyk2-PI3K 信号通路可能是介导内皮细胞等迁移的关键因素[14]。PI3K 家族与细胞增殖、抗凋亡、细胞迁移、膜泡转运、细胞癌性转化等众多过程相关，它可增加细胞的运动能力、降低细胞间的黏附力，还能增加核转录因子的活性使基质金属蛋白酶 2、9 产量增加，影响细胞外基质合成和降解。PI3K 既是 Pyk2 的下游信号分子，又是 NF-κB 激活的上游事件[15]。NF-κB 二聚体接受 PI3K 下传信号后从 NF-κB/IκB 三聚体复合物释放，发生核转位从细胞质进入细胞核，与特定基因启动子或增强子区域的 κB 位点序列特异性结合，启动或调节基因的转录，这种信号级

联反应的结果最终导致细胞增殖、迁移。

本实验利用既往成功构建和应用的 Pyk2-shRNA 载体转染血管紧张素Ⅱ刺激的 CFs，发现靶向 Pyk2 的 RNA 干扰技术可有效 CFs 中 α-平滑肌肌动蛋白表达，抑制 CFS 表型向肌成纤维细胞转换，并使用 Transwell 小室模型、体外划痕法检测到细胞迁移能力在转染 Pavu6 +27-Pyk2 shRNA 后下降。我们进一步检测了 Pyk2 的下游信号分子，发现磷酸化 PI3K p85 表达降低，NF-κB 活性被抑制，这些结果初步表明在血管紧张素Ⅱ刺激 CFs 发生表型转换和迁移的过程中，Pyk2/PI3K/NF-κB 可能是重要信号介导途径，结合我们以往对 Pyk2 在 CFS 增殖中的研究结果[2]，我们可推测 Pyk2 有望成为心脏间质纤维化防治的新靶点。

参考文献：

[1] Porter K E, Turner N A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling[J]. Pharmacol Ther, 2009, 123(2): 255 - 278.

[2] Krenning G, Zeisberg E M, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2010, 225(3): 631 - 637.

[3] 郝嘉，郭红，吕伟，等. PYK2 靶向短发夹 RNA 干扰重组体的构建及鉴定[J]. 中国病理生理杂志，2006，22(11): 2278 - 2280.

[4] 郝嘉，严俊，肖颖彬. PYK2 小干扰 RNA 对成年大鼠心脏成纤维细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(23): 2331 - 2334.

[5] 曹川，戴霞，李世荣，等. 三羟基异黄酮对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及侵袭作用的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(17): 1644 - 1646.

[6] Souders C A, Bowers S L, Baudino T A. Cardiac fibroblast: the renaissance cell[J]. Circ Res, 2009, 105(12): 1164 - 1176.

[7] Riggs D, Yang Z, Kloss J, *et al*. The Pyk2 FERM regulates Pyk2 complex formation and phosphorylation[J]. Cell Signal, 2011, 23(1): 288 - 296.

[8] 吴浩，陈清枝，邢淑华，等. 肾性高血压大鼠肥厚心肌中 Pyk2 表达和激活的变化及缬沙坦的干预研究[J]. 现代医学，2009，37(2): 100 - 104.

[9] Lipinski C A, Loftus J C. Targeting Pyk2 for therapeutic intervention[J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(1): 95 - 108.

[10] Angelucci A, Bologna M. Targeting vascular cell migration as a strategy for blocking angiogenesis: the central role of focal adhesion protein tyrosine kinase family[J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(21): 2129 - 2145.

[11] Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, *et al*. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(9/10): 1346 - 1355.

[12] Porter K E, Turner N A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling[J]. Pharmacol Ther, 2009, 123(2): 255 - 278.

[13] Santiago J J, Dangerfield A L, Rattan S G, *et al*. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation *in vivo* and *in vitro*: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts[J]. Dev Dyn, 2010, 239(6): 1573 - 1584.

[14] Basile J R, Afkhami T, Gutkind J S. Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(16): 6889 - 6898.

[15] Sousa L P, Carmo A F, Rezende B M, *et al*. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(4): 396 - 405.

（收稿 2010-11-03 修回 2011-01-04）

（编辑 王 红）

（上接 1109 页）

2 讨论

除个别 ALS 家系表现为常染色体隐性遗传外，绝大多数家系均表现为常染色体显性遗传性状。我们发现的这一家系基本符合常染色体显性遗传疾病的家系特点，根据 El Escorial ALS 国际诊断标准[1]及辅助检查结果，该家系成员符合 ALS 诊断标准。

FALS 病例具有家族遗传背景，提示该病可能与遗传因素有关。1993 年研究发现 FALS 的第 2 对染色体上的铜、锌超氧化物歧化酶（Cu/Zn superoside dismutase，SOD1）有突变[2]。约 5% 的 SALS 和 10% ~20% 的 FALS 都与 SOD1 基因突变有关。通过对转染了人突变 SOD1 基因的转基因小鼠的研究已经明确，SOD1 基因突变后 SOD 抗氧化活性下降，通过激活 caspase 途径引起细胞凋亡而引起 ALS 发病[3]。国内席静等[4]对 1 个 6 代共计 237 人家系中的 8 例 FALS 患者、卢锡林等[5]对 4 个家系的 15 例 FALS 患者的 SOD1 基因第 1 ~5 号外显子，分别进行了 PCR - SSCP 分析，均没有发现 SOD1 基因突变。我们研究了重庆地区另外 1 个常染色体显性遗传的 ALS 大家系，证实家系存在一种不同于目前文献报道的、新的 SOD1 基因突变类型[6]。

参考文献：

[1] Brooks B R. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical Limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors[J]. J Neurol Sci, 1994, 124(Suppl): 96 - 107.

[2] Beck M, Sendtner M, Toyka K V. Novel SOD1 N86K mutation is associated with a severe phenotype in familial ALS[J]. Muscle Nerve. 2007, 36(1): 111 - 114.

[3] Magrane J, Hervias I, Henning M S, et al. Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(23): 4552 - 4564.

[4] 席静，张成，卢锡林，等. 家族性 ALS 的临床特征及基因分析[J]. 中风与神经疾病杂志，2006，23(1): 41 - 43.

[5] 卢锡林，姚晓黎，张成，等. 肌萎缩侧索硬化症 SOD1 基因突变特点[J]. 中山大学学报（医学科学版），2006，27(1): 80 - 82.

[6] 胡俊，史树贵，李露斯，等. 肌萎缩侧索硬化症家系铜锌超氧化物歧化酶基因突变位点的检测[J]. 医学研究生学报，2005，18(11): 963 - 965.

（收稿 2011-02-14 修回 2011-04-20）

（编辑 王小寒）