论著

文章编号:1000-5404(2012)05-0378-05

Geminin基因过表达对VSMCs表型转化的影响

李林峪,张园园,舒茂琴 (400038 重庆,第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所)

[摘要] **目的** 探讨Geminin基因过表达对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)表型转化的影响。**方法** 构建真核表达载体pEGFP-N1-Geminin,脂质体2000介导转染不同表型(去分化型和分化型)的大鼠VSMCs株,设置阳性组、阴性组和空白组($n=3$),检测转染效果、VSMCs主要表型标志物(α-actin、OPN)和肌动蛋白相关蛋白1(actin related protein,ARP1)的变化情况。**结果** Geminin基因成功过表达VSMCs株。与2个对照组(阴性组和空白组)比较,分化型VSMCs中表型标志物(α-actin和OPN)及ARP1含量变化不大;去分化型VSMCs中,OPN在阳性组中表达下调,与2个对照组(阴性组和空白组)比较差异具有统计学意义($P<0.05$),α-actin和ARP1在阳性组中表达上调,与2个对照组(阴性组和空白组)比较差异具有统计学意义($P<0.05$),免疫共沉淀实验结果提示经protein G plus-Agarose沉淀ARP1相互作用蛋白复合物后,用Geminin抗体进行Western blot检测,可以检测到Geminin的表达。**结论** Geminin基因过表达有助于VSMCs由去分化型向分化型转化;免疫共沉淀结果提示Geminin和ARP1之间存在相互作用,ARP1可能参与了上述VSMCs表型转化过程。

[关键词] Geminin;ARP1;过表达;血管平滑肌细胞;表型转化

[中图法分类号] R322.12; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Geminin over-expression promotes differentiation in rat vascular smooth muscle cells from dedifferentiation

Li Linyu, Zhang Yuanyuan, Shu Maoqin (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of Geminin in the phenotypic transformation of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** After an eucaryotic plasmid vector pEGFP-N1-Geminin was constructed, VSMCs strains of different phenotypes (dedifferentiated phenotype by cultured in present of serum, and differentiated phenotype by cultured without serum) were transfected with aid of lipofectamine 2000. Cells transfected with pEGFP-N1 and blank plasmids served as negative control and blank control. The expression of Geminin, actin related protein 1 (ARP1), and VSMCs phenotypic makers α-actin and osteopontin (OPN) were detected with Western blotting. The interaction between Geminin and ARP1 were analyzed with co-immunoprecipitation. **Results** Geminin was successfully overexpressed in VSMCs strains after transfection. Comparing with negative and blank controls, Geminin overexpression resulted in obviously down-regulation of OPN protein in the dedifferentiation cells, but significantly up-regulation in α-actin and ARP1 ($P<0.05$). However, these changes of above-mentioned markers and ARP1 were not significantly changed in differentiated cells. Co-immunoprecipitation indicated that interaction between Geminin and ARP1 was found in Geminin-overexpressed VSMCs strains with dedifferentiated phenotype. **Conclusion** Geminin may play a role in the phenotypic transformation of VSMCs from dedifferentiation to differentiation. The interaction between Geminin and ARP1 suggests that ARP1 may be involved in this process.

[**Key words**] Geminin; actin related protein 1; overexpression; vascular smooth muscle cells; phenotypic transformation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971228). Corresponding author: Shu Maoqin, Tel: 86-23-68773050, E-mail: shumaoqin@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30971228)

[通信作者] 舒茂琴,电话:(023)68773050,E-mail:shumaoqin@ sina.com

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的表型转化是高血压及血管成形术后再狭窄等血管疾病细胞增殖中关键性的起始环节[1-3],涉及合成表型和收缩表型之间的相互转化。合成表型(去分化型)增殖潜能强,其主要表型标志物是骨桥蛋白(osteopontin, OPN);收缩表型(分化型)增殖能力弱,其主要表型标志物是 α 肌动蛋白(α-actin)。当 VSMCs 发生表型转化时,其主要表型标志物也会发生变化,通过对其表型标志物的检测,可以了解其所处的表型状态。Geminin 基因,也被称为起始特许阻遏子(a repressor of origin licensing),作为细胞增殖周期调控的多功能蛋白质,在调节细胞增殖中发挥着重要作用[4]。我们的前期研究提示 Geminin 存在于 VSMCs 中,并参与介导了 VSMCs 的表型转化[5]。近期国内外有研究提示,干扰 Geminin 基因表达后,会引起细胞 DNA 及中心体的过度增殖,而 Geminin 基因过表达会抑制细胞增殖。肌动蛋白在 VSMCs 的表型转化过程中起着举足轻重的作用,当 VSMCs 由去分化型向分化型转化时,肌动蛋白逐渐聚集并发挥其作用。ARP1 作为肌动蛋白家族中的一员,是参与细胞多种活动(包括增殖)的功能蛋白[6]。在增殖的细胞中,它与 Geminin 共同存在于中心体中。但 Geminin 基因过表达是否会引起 VSMCs 表型转化,ARP1 是否参与其中,我们知之甚少,本研究就此问题进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

感受态大肠杆菌 DH5α 购自北京天根公司,pEGFP-N1 载体由本实验室保存,VSMCs 株(A10)由第三军医大学大坪医院心内科实验室惠赠。Trizol 购自 Gibco BRL 公司,KOD-plus 高保真酶、连接酶 T_4 Lignase、Rever Tra Ace-a-逆转录试剂盒购自 Toyobo 公司,限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*sac*Ⅱ 购自 TaKaRa 公司,MakerD10 000、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自北京天根公司,氯仿、异丙醇、无水乙醇均为国产分析纯。DMEM 高糖培养基、胰酶、HBSS 缓冲液购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自天津灏洋生物制品公司,lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 购自 TaKaRa 公司。PageRuler Prestained Protein Ladder 购自 Fermentas 公司。羊抗大鼠 ARP1、兔抗大鼠 Geminin、OPN、α-actin、β-actin、GAPDH 多克隆抗体及相应的二抗购自 Santa Cruz 公司。SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate 购自 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 VSMCs 株的培养 根据文献[7]方法,利用 10% 的 DMEM 高糖培养基培养 A10 细胞株。采用血清刺激(24 h)和无血清培养(24 h)分别获得去分化型和分化型 VSMCs。

1.2.2 真核表达载体 pEGFP-N1-Geminin 的构建和转染效果鉴定 以 GenBank 上提供的 Geminin mRNA 序列(序列号 001106112.1)设计引物(由上海生工生物工程有限公司合成)扩增 Geminin 基因序列所用的上下游引物分别为:Geminin-1:5′-CCCAAGCTTATGAATCTCAGTATGAAGCAGAAA-3′, PGeminin-2:5′-TCCCCGCGGTGTACACGCCGTGCCATCGG-3′,预期片段大小为 772 bp。Trizol 试剂提取培养的 A10 细胞株的总 RNA,*Hind*Ⅲ、*sac*Ⅱ双酶切 Geminin 和 pEGFP-N1,连接酶 T_4 进行连接。质粒抽提试剂盒进行质粒抽提,命名为 pEGFP-N1-Geminin,紫外分光光度计检测质粒浓度,内切酶及测序鉴定。取对数生长期的 VSMCs,待细胞密度达到 80% 左右时,利用脂质体 2000 转染法进行转染。实验设置阳性组(pEGFP-N1-Geminin)、阴性组(pEGFP-N1-空质粒)和空白组($n=3$)。转染后培养至镜下观察细胞密度约 90% 后提蛋白,行 Western blot 检测,按比例加入 Geminin、β-actin 一抗,于 4 ℃孵育过夜;TBST 洗涤后加入与一抗匹配的二抗,室温孵育 1.5 h;TBST 洗涤后发光试剂 A 和 B 以 1∶1 比例混匀,压片、显影、定影、洗片。结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描,各组均与内参β-actin 比较后进行半定量分析,以检测细胞内 Geminin 基因蛋白表达水平。

1.2.3 表型标志物测定 采用与 1.2.2 相同的方法转染、培养、蛋白提取及 Western blot 检测,不同的是所用一抗的区别,一抗分别加入羊抗大鼠 OPN、α-actin、GAPDH、β-actin,加入相匹配的二抗后,其余步骤同 1.2.2。

1.2.4 ARP1 测定及 ARP1 与 Geminin 蛋白间的相互作用 对不同表型的 VSMCs 过表达 Geminin 后提取蛋白,ARP1 含量测定方法同 1.2.2Western blot 检测,不同的是所用一抗的区别,一抗加入羊抗大鼠 ARP1。利用免疫共沉淀技术来验证 ARP1 与 Geminin 蛋白之间的相互作用关系,采用 10% 的 DMEM 高糖培养基培养的 A10 细胞株,细胞不做过表达处理,提取蛋白方法同前,DU800 蛋白浓度检测仪测定蛋白浓度后,设置 IgG 组、阳性组、Input 组,每组取 300 μg 蛋白样品直接进行一抗孵育,分别加入 1 μl 的 IgG、15 μl 的 ARP1 抗体、15 μl 的 Geminin 抗体,再用裂解液定容至 500 μl 后 4 ℃摇床上孵育过夜。另取 EP 管 3 个分别加入 15 μl 的磁珠后 PBS 清洗,将孵育过夜后的物品加入其中,室温摇床孵育后 PBS 清洗,加入 40 μl 的上样 Buffer 后煮沸变性,离心取上清进行 Western blot 检测,一抗均加入 Geminin 抗体,其余步骤同前。

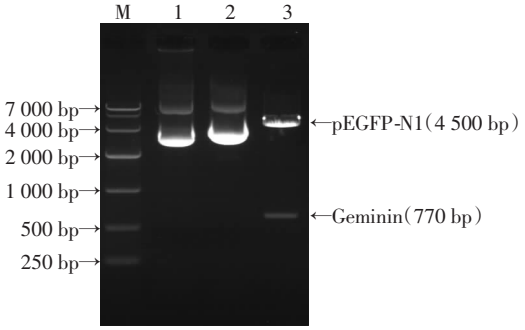
1.3 统计学方法

数据统计分析方法采用 Sigma plot 8.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 载体的酶切鉴定

用 Trizol 试剂抽提的总 RNA,$D(260)/D(280)$ 在 1.8~2.0 之间,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测示条带清晰,弥散少,RNA 抽提的质量好,构建的 pEGFP-N1-Geminin 表达载体转化扩增及质粒抽提后以 *Hind*Ⅲ、*sac*Ⅱ进行双酶切后行琼脂糖凝胶电泳以鉴定质粒酶切结果(图 1)显示有 770 bp 及 4.5 kb 两个条带,符合 Geminin 目的基因及 pEGFP-N1 空白载体的相对分子质量大小,经测序证实为正确的 pEGFP-N1-Geminin 质粒。

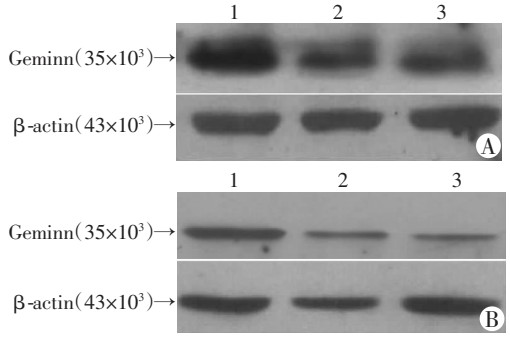


1:pEGFP-N1 空载体;2:pEGFP-N1-Geminin 载体;3:pEGFP-N1-Geminin 载体的酶切结果;M:标准

图1 琼脂糖凝胶电泳对 pEGFP-N1-Geminin 重组质粒的酶切鉴定

2.2 过表达效果鉴定

pEGFP-N1-Geminin 表达载体转染 VSMCs 后,荧光显微镜下被过表达的 VSMCs 可见绿色荧光,转染效率大约 60% 左右。去分化型组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(1.16±0.04)、(0.38±0.04)、(0.35±0.03)。分化型组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(1.04±0.03)、(0.38±0.03)、(0.39±0.03)。不同表型的 VSMCs 经过表达后,阳性组 Geminin 蛋白含量明显高于阴性组和空白组,差异有统计学意义($P<0.05$),阴性组和空白组差异不显著($P>0.05$)。见图2。



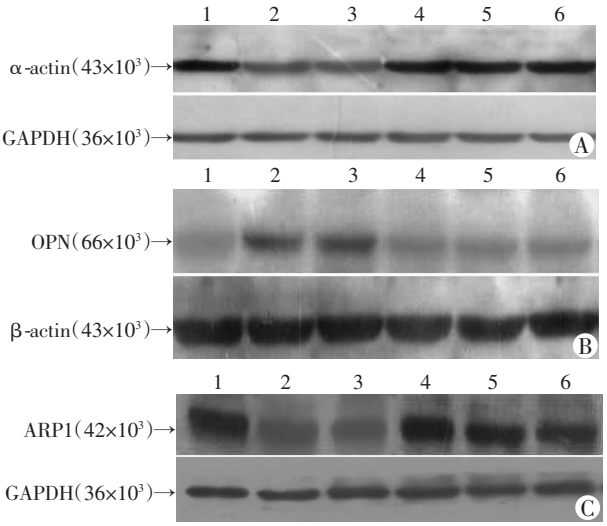
A:去分化型 VSMCs;B:分化型 VSMCs

1:Geminin 过表达阳性组;2 Geminin 过表达阴性组;3:Geminin 过表达空白组

图2 Western blot 检测不同表型 VSMCs 过表达后 Geminin 蛋白的表达

2.3 α-actin、OPN 的变化

α-actin 蛋白测定时,去分化型 VSMCs 组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(1.14±0.03)、(0.84±0.03)、(0.82±0.02);分化型 VSMCs 组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(1.14±0.03)、(1.14±0.02)、(1.12±0.02)。去分化型 VSMCs 经过表达 Geminin 后,阳性组 α-actin 蛋白含量明显高于阴性组和空白组($P<0.05$),阴性组和空白组差异不显著($P>0.05$);分化型 VSMCs 经过表达 Geminin 后,阳性组、阴性组和空白组蛋白含量差异不显著($P>0.05$);且去分化型 VSMCs 阳性组和分化型 VSMCs 的3组间蛋白含量比较差异不显著($P>0.05$),见图3A。OPN 蛋白测定时,去分化型 VSMCs 组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(0.33±0.03)、(0.65±0.03)、(0.62±0.03);分化型 VSMCs 组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(0.31±0.02)、(0.34±0.03)、(0.30±0.02)。去分化型 VSMCs 经过表达 Geminin 后,阳性组 OPN 蛋白含量明显低于阴性组和空白组($P<0.05$),阴性组和空白组差异不显著($P>0.05$);分化型 VSMCs 经过表达 Geminin 后,阳性组、阴性组和空白组蛋白含量差异不显著($P>0.05$);且去分化型 VSMCs 阳性组和分化型 VSMCs 的3组间蛋白含量比较差异不显著($P>0.05$),见图3B。

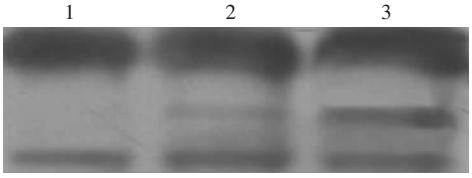


A:α-actin 蛋白的表达;B:OPN 蛋白的表达;C:ARP1 蛋白的表达 1-3 为去分化型 VSMCs(1:Geminin 过表达阳性组;2:Geminin 过表达阴性组;3:Geminin 过表达空白组);4-6 为分化型 VSMCs(4:Geminin 过表达阳性组;5:Geminin 过表达阴性组;6:Geminin 过表达空白组)

图3 Western blot 检测不同表型 VSMCs 过表达 Geminin 后表型标志物和 ARP1 的表达

2.4 ARP1 的变化及 ARP1 与 Geminin 之间的相互作用

去分化型 VSMCs 组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(1.27±0.03)、(0.98±0.03)、(0.96±0.03);分化型 VSMCs 组中阳性组、阴性组和空白组的相对光密度平均值分别为(1.31±0.03)、(1.31±0.03)、(1.32±0.03)。去分化型 VSMCs 经过表达 Geminin 后,阳性组 ARP1 蛋白含量明显高于阴性组和空白组($P<0.05$),阴性组和空白组差异不显著($P>0.05$);分化型 VSMCs 经过表达 Geminin 后,阳性组、阴性组和空白组蛋白含量差异不显著($P>0.05$);且去分化型 VSMCs 阳性组和分化型 VSMCs 的3组间蛋白含量比较差异不显著($P>0.05$),见图3C。利用免疫共沉淀技术验证 ARP1 与 Geminin 蛋白之间的相互作用,结果提示 IgG 组、阳性组及 Input 组均出现了 25×10^3 的轻链和 55×10^3 的重链,IgG 组中无目的条带,Input 组中目的条带明显(图4)。



1:IgG 组;2:阳性组;3 Input 组

图 4 免疫共沉淀技术验证 Geminin 与 ARP1 蛋白间的相互作用

3 讨论

VSMCs 的表型转化是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等疾病的关键环节,了解哪些因素在 VSMCs 的表型转化中起作用,又是通过哪些环节参与其调节的,将为治疗上述疾病找到突破口。VSMCs 是具有增殖潜能的细胞,有合成表型(去分化型)和收缩表型(分化型),OPN 和 α-actin 分别作为去分化型和分化型 VSMCs 的主要表型标志物,当 VSMCs 发生表型转化时,其主要表型标志物也会发生变化,通过对其表型标志物的检测,可以了解其表型状态。目前获得不同表型的 VSMCs 技术已经非常成熟,采用血清刺激和无血清培养即可获得去分化型和分化型的 VSMCs,为后续的实验研究奠定了坚实的基础。Geminin 是真核细胞增殖-分化协同作用的关键分子,它精确的调节 DNA 复制,是阻滞去分化型细胞 DNA 再复制的关键因子[4]。我们的前期实验通过激光共聚焦实验提示,血清刺激 24 h 获得去分化型 VSMCs,检测 Geminin 几乎全部定位于核内,参与调控细胞增殖过程;而无血清培养获得分化型 VSMCs 者,Geminin 几乎全部存在于胞浆内,确保 VSMCs 分化状态的维持,进一步证实,它参与介导了 VSMCs 收缩型与合成型间的转化,在表型分化中起关键性作用[5]。近期国内外有研究提示,干扰 Geminin 基因表达后,会引起细胞基因及中心体的过度增殖,而 Geminin 基因过表达,可以影响肿瘤细胞生长,抑制其增殖。本研究显示不同表型的 VSMCs 过表达 Geminin 基因后,会产生不同的影响,去分化型 VSMCs 变化显著,主要表现为 OPN 表达下调和 α-actin 表达上调;而分化型 VSMCs 无明显变化。上述结果提示 Geminin 基因过表达可以引起 VSMCs 发生表型转化,具体表现为由去分化型向分化型转化,但其机制需要进一步探讨。

已经得到证实的是,肌动蛋白(actin)参与细胞骨架组装,在 VSMCs 表型转化过程中其含量的升高提示 VSMCs 由去分化型向分化型的转化。而肌动蛋白是一个家族群,包括一些保守的肌动蛋白和多种肌动蛋白相关蛋白[8],肌动蛋白和肌动蛋白相关蛋白常发挥协同作用共同调节参与的多种活动(包括增殖、迁移运动等)[9]。其家族成员之一 ARP1 被称为中心小体肌动蛋白(centractin-α)[6],也是肌动蛋白-肌动蛋白激活蛋白复合物的一员,是其中含量最丰富的蛋白,在细胞的许多活动中发挥着重要作用,负责细胞器微细管运送和使中心小体相关蛋白质流向阴极末端[13-16],在 VSMCs 的表型转化中,它协同肌动蛋白发挥作用[15-18]。近期研究表明,在具有无限增殖能力的细胞(HeLa 细胞)中,Geminin 和 ARP1 共同定位于中心体上,并通过免疫共沉淀技术证实 Geminin 与 ARP1 之间存在相互作用[6]。我们的前期实验结果提示:在去分化型 VSMCs 中,Geminin 基因主要定位于细胞核,参与细胞增殖;而在分化型 VSMCs 中,主要定位于细胞质。由此我们推测,在涉及 VSMCs 增殖变化的表型转化中两者也存在相互作用,共同调节 VSMCs 的表型转化。为此,我们首先通过对不同表型的 VSMCs 进行 Geminin 基因过表达,检测其 ARP1 是否发生变化,进一步验证我们的假设。实验结果表明,与对照组相比,去分化型 VSMCs 阳性组的 ARP1 蛋白表达水平有所上调,上调后水平与分化型 VSMCs 大致相当;分化型 VSMCs 三个分组中蛋白水平均无明显变化。以上结果进一步说明在 Geminin 基因过表达引起 VSMCs 表型转化的同时,ARP1 的表达也受到影响,提示 ARP1 可能参与了 VSMCs 的表型转化。为了验证上述观点,我们采用了免疫共沉淀技术。结果提示,Geminin 与 ARP1 蛋白之间存在相互作用。综合上述实验结果,表明 Geminin 过表达 VSMCs 后可以引起 VSMCs 由去分化型向分化型转化,而 ARP1 可能参与了 Geminin 调节 VSMCs 表型转化这一过程。

参考文献:

[1] Newby A C, Zaltsman A B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia[J]. J Pathol, 2000, 190(3): 300-309.

[2] 李建涛, 舒茂琴, 冯媛媛. ORC1 基因 RNA 干扰对大鼠血管平滑肌细胞表型的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(6): 491-494.

[3] 江明宏, 舒茂琴, 傅晓岚, 等. ORC1 在大鼠血管平滑肌细胞 G1/S 和 S 期的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 301-304.

[4] 杨宁, 柳惠图, 张伟. 多功能蛋白 Geminin 的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(9): 915-924.

[5] 周叶萍, 舒茂琴. Geminin 在血管平滑肌细胞分化表型转化中的介导作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(17): 1816-1819.

[6] Lu F, Lan R, Zhang H, *et al*. Geminin is partially localized to the centrosome and plays a role in proper centrosome duplication[J]. Biol Cell, 2009, 101(5): 273-285.

[7] 闫纯英, 杨敏, 陈畅, 等. 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的培养与鉴定[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(10): 1190-1191.

[8] Aoyama N, Oka A, Kitayama K, *et al*. The actin-related protein

hArp8 accumulates on the mitotic chromosomes and functions in chromosome alignment [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(4): 859 - 868.
[9] 彭毅, 龚小卫, 姜勇. 肌动蛋白相关蛋白2/3复合体的结构、功能与调节[J]. 生理科学进展, 2004, 35(4): 306 - 310.
[10] 叶绽蕾, 张迪, 苗一非, 等. 肌动蛋白相关蛋白(ARP2/3)在神经树突棘可塑性中的研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2007, 7(6): 411 - 415.
[11] Li Y, Uruno T, Haudenschild C, *et al*. Interaction of cortactin and Arp2/3 complex is required for sphingosine - 1 - phosphate - induced endothelial cell remodeling[J]. Exp Cell Res, 2004, 298(1): 107 - 121.
[12] Andrianantoandro E, Pollard T D. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin[J]. Mol Cell, 2006, 24(1): 13 - 23.
[13] Machaidze G, Sokoll A, Shimada A, *et al*. Actin filament bundling and different nucleating effects of mouse Diaphanous - related formin FH2 domains on actin/ADF and actin/cofilin complexes[J]. J Mol Biol, 2010, 403(4): 529 - 545.
[14] Chen E S, Zhang K, Nicolas E, *et al*. Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly[J]. Nature, 2008, 451(7179): 734 - 737.
[15] Birukova A A, Smurova K, Birukov K G, *et al*. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho - dependent mechanisms[J]. J Cell Physiol, 2004, 201(1): 55 - 70.
[16] Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes[J]. Microvasc Res, 2009, 77(1): 53 - 63.

(收稿:2011-11-12;修回:2011-12-09)
(编辑 栾 嘉)

(上接377页)

侧附件切除术+大网膜切除术。剖视标本见左侧卵巢切面呈灰黄色,其间见2个3 cm直径囊腔,内见油脂及毛发。术后病理结果提示切除组织中大量坏死伴钙化,见少许残留肿瘤细胞;左卵巢成熟型畸胎瘤。术后继续以BEP方案化疗4疗程后,血清AFP值降至正常(9.75 ng/ml),复查盆腹腔MRI示肝脏转移灶消退近95%(图2)。后因博来霉素用量达极限量,遂仅用EP巩固化疗3疗程后结束治疗,门诊随访。

2 讨论

卵巢卵黄囊瘤多见于儿童及青少年女性,在小儿卵巢恶性肿瘤中约占60%。20世纪70年代之前,卵黄囊瘤的存活率仅为13%,近几十年来由于采用以铂类为基础的联合化疗方案,在早期卵黄囊瘤患者中五年生存率达95%[2]。由于卵黄囊瘤患病人群年纪轻,较少体检另因该瘤生长速度快,易早期转移,故待症状明显而就医时多属晚期,而分期是影响预后的重要因素,因此应高度重视儿童及青少年的腹胀及腹部不适症状,提高对此病的警惕性,做到早诊断早治疗。

目前卵黄囊瘤的治疗原则为手术联合化疗的综合治疗,基本手术范围应包括切除卵巢原发肿瘤、大网膜及盆腔内种植瘤。只要子宫及对侧卵巢未受累,无论期别早晚,均可保留生育功能[3]。对于所有患者均需化疗,BEP方案已成为治疗卵巢恶性生殖细胞肿瘤的"金标准方案",持续缓解率达96%[4]。因为卵黄囊瘤较少见,其预后因素存在争议,尽管国内学者认为影响该瘤预后的主要因素为临床分期及化疗,足量及正规的化疗非常重要,能显著改善预后[5],但最近欧洲和日本的临床观察发现术后残留癌灶大小均与预后明显相关[6-7]。考虑到本例患者入院时的凶险病情,且根据当时情况估计手术亦难以达到满意的细胞减灭术,我们在获得病理学依据后选择了术前化疗。本例提示:对于此类危重患者,无法经受手术打击,可以考虑先行腹腔包块穿刺术获取病理学依据后,化疗1~2个疗程,待患者一般情况好转,病灶有所减小后再考虑手术治疗。

卵巢卵黄囊瘤发生肝实质转移,预后险恶,尚未见有治愈病例的报道。黄慧芳等[8]通过肝动脉插管将PVB方案中的DDP加用5-FU直接滴入肝内,首次控制了卵黄囊瘤的肝实质转移。该例患者就诊时即已发生弥漫性肝转移,合并胸水、腹水,全身情况极差,给予BEP方案化疗2个疗程后患者一般情况明显好转,6个疗程后MRI提示肝脏病灶几乎完全消退,提示BEP静脉化疗对控制肝脏转移性肿瘤的反应性可能主要取决于肿瘤本身对药物的反应性,而不仅仅是给药途径。

鉴于该例患者表现出对BEP化疗方案的良好反应性,我们设想对于这类情况,能否考虑以单纯化疗取代手术及化疗的综合治疗,避免手术带给像本例一样的年轻未育患者生理及心理上的影响,这还有待于对本例的远期预后随访及更多患者治疗的临床观察结果。

参考文献:

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 278 - 285.
[2] Dallenbach P, Bonnefoi H, Pelte M F, *et al*. Yolk sac tumours of the ovary: an update[J]. Eur J Surg Oncol, 2006, 32(10): 1063 - 1075.
[3] Zanetta G, Bonazzi C, Cantu M, *et al*. Survival and reproductive function after treatment of malignant germ cell ovarian tumors[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(4): 1015 - 1020.
[4] 夏守国, 刘小兵, 张国楠. 卵巢恶性生殖细胞肿瘤的治疗[J]. 现代妇产科进展, 2000, 9(1): 49 - 50.
[5] 张惜阴. 实用妇产科学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 703 - 704.
[6] Cicin I, Saip P, Guney N, *et al*. Yolk sac tumours of the ovary: evaluation of clinicopathological features and prognostic factors[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 146(2): 210 - 214.
[7] Umezu T, Kajiyama H, Terauchi M, *et al*. Long - term outcome and prognostic factors for yolk sac tumor of the ovary[J]. Nagoya J Med Sci, 2008, 70(1/2): 29 - 34.
[8] 黄慧芳, 吴葆桢, 郎景和, 等. 肝动脉插管治疗卵巢内胚窦瘤肝转移一例报告[J]. 中华妇产科杂志, 1989, 24(2): 121 - 122.

(收稿:2011-10-21;修回:2011-11-07)
(编辑 吴培红)