论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1496-05

转染 hRAMP1 的间充质干细胞对心肌梗死后局部血管再生的作用

赵然尊,龙仙萍,刘志江,王冬梅,石 蓓 (563003 贵州 遵义,遵义医学院第一附属医院心血管内科)

[摘要] **目的** 探讨腺病毒介导 hRAMP1 基因转染间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)移植对心肌梗死后新生血管生成及其可能机制。**方法** 密度梯度离心并贴壁培养获得兔骨髓 MSCs,并分别转染 pAd2-hRAMP1 或 pAd2-EGFP 后给予 CGRP 刺激,ELISA 法测定细胞培养上清液中 VEGF 和 HGF 水平。建立心肌梗死再灌注兔模型,采用随机数字表法分为 MSC^{hRAMP1} 组(pAd2-hRAMP1 转染 MSCs 移植)、MSC^{null} 组(pAd2-EGFP 转染 MSCs 移植)组和对照组(等量生理盐水注射)($n=10$)。2 周时 Western blot 检测心肌梗死组织促血管生长因子 VEGF 和 HGF 蛋白表达;4 周时 TTC 染色测定心肌梗死面积比;抗 CD31 免疫组化染色检测心肌梗死区及梗死周边区新生毛细血管密度。**结果** CGRP 诱导 72 h 后 MSC^{hRAMP1} 培养上清液中 VEGF 和 HGF 水平显著高于 MSC^{null} 组[VEGF:(1 859.4±267.4) *vs* (1 344.4±137.2);(1 052.2±239.3) *vs* (683.8±150.5) pg/ml,$P<0.05$]。细胞移植后 4 周 TTC 染色检测显示 MSC^{hRAMP1} 组心肌梗死面积显著降低对照组和 MSC^{null} 组[(10.1±2.9)% *vs* (30.6±2.7)% 和 (22.5±3.2)%,$P<0.05$];抗 CD31 免疫组化染色显示,MSC^{hRAMP1} 组的梗死区和梗死交界区新生毛细血管计数明显高于对照组和 MSC^{null} 组($P<0.05$);Western blot 检测显示细胞移植后 2 周 MSC^{hRAMP1} 组心肌梗死区促血管生长因子 VEGF 和 HGF 蛋白表达显著高于对照组和 MSC^{null} 组($P<0.05$)。**结论** MSC^{hRAMP1} 能通过提高梗死区心肌组织中促血管生长因子 VEGF 和 HGF 的表达,促进心肌梗死区和梗死交界区新生毛细血管生成,降低心肌梗死面积。

[关键词] 受体活性修饰蛋白-1;间充质干细胞;心肌梗死;再血管化;细胞因子
[中图法分类号] R364.33; R394.1; R542.22 [文献标志码] A

MSCs with hRAMP1 overexpression improve revascularization in a rabbit model of myocardial infarction

Zhao Ranzun, Long Xianping, Liu Zhijiang, Wang Dongmei, Shi Bei (Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of human receptor activity modified protein 1 (hRAMP1)-overexpressing mesenchymal stem cells (MSCs) by adenovirus vector on infarcted related revascularization and its potential mechanism in a rabbit model of myocardial infarction. **Methods** Thirty 4- to 5-month-old health male rabbits were developed to myocardial infarction (MI) and reperfusion models by ligating left ventricular branch of coronary artery for 60 min, and then divided into MSC^{hRAMP1} group ($n=10$), MSC^{null} group ($n=10$) and control group ($n=10$) according to whether they were received intravenously injection of MSCs transfected with adenovirus vector encoding hRAMP1 gene and enhanced green fluorescent protein (EGFP), of MSCs transfected with adenovirus vector encoding only EGFP without hRAMP1 gene or of equally volume of phosphate buffered saline (PBS). The protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in infracted myocardium were measured by Western blotting in 2 weeks following MI. MI was evaluated by TTC staining for infracted area, and capillary density in infarcted region and its border region were tested by anti-CD31 immunohistochemistry staining. VEGF and HGF levels in the supernatant were quantified by ELISA assay in 24 and 72 h after induction of CGRP in cultured MSCs. **Results** The levels of VEGF and HGF in the cultured supernatant of MSC^{hRAMP1} group were significantly higher than in the supernatant of MSC^{null} group when they were induced by CGRP for 72 h. Furthermore, there was a significant decrease in the area ratio of MI in MSC^{hRAMP1} group than in MSC^{null} and control group by TTC staining. Also, compared with MSC^{null} and control groups, capillary density indicated by CD31-positive cells in the infarcted and border region was statistically augmented in MSC^{hRAMP1} group by immunohistochemistry assay.

[基金项目] 国家自然科学基金(81060014);贵州省国际合作项目(黔科合外G字[2010]0732)
[通信作者] 石 蓓,E-mail:shibei2147@163.com

The protein expression of VEGF and HGF detected by Western blotting were much higher in MSC^{hRAMP1} group compared with MSC^{null} and control group at 2 weeks following MSCs delivery. **Conclusion** Gene modified MSCs with hRAMP1 overexpression have the powerful potential to increase capillary density and improve revascularization through more secretion of VEGF and HGF in infarcted and border region.

[**Key words**] receptor activity modified protein-1; mesenchymal stem cells; myocardial Infarction (MI); revascularization; cytokine factor

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81060014) and the International Cooperation Project of Guizhou Province ([2010] 0732).
Corresponding author: Shi Bei, E-mail:shibei2147@163.com

干细胞治疗心肌梗死获得了广泛的基础与与临床研究,其主要作用机制涉及干细胞促进梗死心肌血管再生[1]以及干细胞可能分化为心肌细胞或心肌样细胞[2]以重建心室收缩功能。其中,干细胞促进心肌血管再生具有最重要的意义,因为新生血管为心肌梗死区细胞提供了生存所必需的物质条件,这不仅有利于梗死交界区缺血和顿抑心肌的功能恢复,也为心肌细胞再生提供了保障。间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)具有多向分化潜能和低免疫原性[3],是细胞移植的种子细胞之一,但也存在血管再生能力不足[4]。新近研究发现,降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide,CGRP)具有显著地促进肿瘤血管生成的作用;而受体活性修饰蛋白1(receptor activity modifying protein 1,RAMP1)是CGRP发挥作用的关键受体亚单位[5]。因此,本研究探讨了过表达人RAMP1(human RAMP,hRAMP1)的腺病毒载体转染MSCs(MSC^{hRAMP1})后移植治疗心肌梗死的兔模型,观察其对心肌梗死后血管再生的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

表达hRAMP1基因和增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP)基因的腺病毒载体(pAd2-hRAMP1)和仅含EGFP的腺病毒载体(pAd2-EGFP),本实验实验室保存,经Western blot酶切鉴定以及基因测序显示hRAMP1基因序列正确[6]。DMEM培养基(Sigma公司);胎牛血清(HyClone);淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司);CGRP(Sigma公司);兔血管内皮生长因子(VEGF)和肝细胞生长因子(HGF)的ELISA试剂盒(上海西塘生物公司);小鼠抗兔CD34、CD45、CD44和CD29抗体(US Biological公司);小鼠抗人RAMP1单克隆抗体(Abnovo公司);小鼠抗兔CD31单克隆抗体和小鼠抗兔β-actin单克隆抗体(均为Abcam公司);小鼠抗兔VEGF和HGF多克隆抗体(武汉博士德公司);HRP标记通用型二抗(北京中杉金桥公司)、TTC染色剂(南京奥多福尼生物科技有限公司),图像处理系统为德国莱卡公司的Leica Qwin Plus。

1.2 MSCs培养和腺病毒载体转染

采用密度梯度离心后贴壁培养获得兔骨髓源MSCs。取同一批次动物以3%戊巴比妥钠(1 ml/kg耳缘静脉注射)麻醉,无菌下抽取股骨骨髓,以1.073 g/ml的淋巴细胞分离液(Percoll液)2 000 r/min离心20 min,小心吸取交界面处细胞混悬液,加入磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤离心后取细胞沉淀以DMEM培养基(含10% FBS、100 U/ml青霉素和80 U/ml链霉素),于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。每2~3天更换培养液,细胞增殖至80%左右融合时行细胞传代。取第3~5代培养细胞行流式细胞仪检测细胞表面抗原CD44、CD29、CD45和CD34的表达,证实为MSCs。当MSCs生长至60%~70%密度时行腺病毒感染。弃培养基,PBS洗2次,加入1 ml无血清DMEM,估计细胞总数后以感染复数200加入pAd2-hRAMP1或pAd2-EGFP 5~10 μl,轻轻摇动混匀后置于37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育,每隔15 min摇动培养瓶1次,4 h后加入适量完全培养基培养过夜,第2天更换新鲜培养基后继续培养,期间观察病毒感染情况并拍照。

1.3 ELISA法检测腺病毒转染的MSCs对CGRP诱导的细胞因子分泌作用

取第3~5代消化MSCs按每孔2×10^5个细胞接种于6孔板,次日行pAd2-hRAMP1和pAd2-EGFP感染,相应转染细胞分别以MSC^{hRAMP1}和MSC^{null}表示。更换培养基,加入1.5 ml新鲜培养基(含CGRP 15 μg,终浓度为10 μg/ml),于24 h和72 h后收集培养上清液,每组细胞每个时间点设3个复孔,以ELISA法测定上清液中VEGF和HGF水平。ELISA方法严格按照试剂盒操作说明进行。

1.4 建立心肌梗死再灌注模型、分组与细胞移植

取4~5月龄新西兰雄性大白兔30只,体质量(1.80±0.50)kg,购自第三军医大学实验动物中心。按照文献[7]方法建立心肌缺血再灌注模型。简述如下:3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉麻醉兔,于胸骨左缘第2~4肋间离断肋骨后,纵行切开心包膜,充分暴露心脏及左心耳部位,于左心耳下方5~10 mm内避开静脉后以6.0号丙烯线贯穿暂时结扎左室支,造成左室支供血区心肌缺血坏死。持续60 min后松弛结扎线,恢复心肌灌注,关闭胸腔。心肌梗死成功标准:结扎血管的远端供血区心肌组织颜色苍白及心电图检测到ST段持续性抬高。建模成功后连续3 d肌注青霉素80×10^4 U/d预防感染。共完成心肌梗死再灌注模型30只,按随机数字法分为MSC^{hRAMP1}组(pAd2-hRAMP1转染MSC移植)、MSC^{null}组(pAd2-EGFP转染MSC移植)组和对照组(等量生理盐水注射,$n=10$)。细胞移植于模型建立后24 h内进行(一般于梗死后第2天进行)。胰蛋白酶消化细胞,以无血清DMEM制成单细胞悬液,10^8个MSC^{hRAMP1}、MSC^{null}细胞或等体积生理盐水分别经耳缘静脉缓慢注射。

1.5 Western blot检测心肌梗死局部血管生长因子的表达

细胞移植后2周每组随机取3只动物处死,取梗死区及梗死周围5 mm心肌组织加入适量组织裂解液,碾磨匀浆并离心

后取上清,应用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,以20 μl样品行10% SDS-PAGE电泳,继之电转移蛋白至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭1 h后,加入小鼠抗兔VEGF(1∶200)和小鼠抗兔HGF(1∶200)一抗4 ℃孵育过夜,加入山羊抗小鼠HRP(1∶2 000)二抗室温下孵育2~3 h,显色,曝光洗片。以β-actin作为内参,凝胶成像系统分析各条带光密度值,计算各条带与内参条带的光密度比值作为蛋白含量半定量分析。

1.6 心肌梗死面积比测定

于细胞移植后4周断颈处死剩余动物,打开胸腔后取心脏置于-20 ℃冰箱中冷冻10 min,从心尖至心底横切成1~2 mm的组织切片,继之将切片置于0.1% TTC溶液中,37 ℃孵育10 min,非心肌梗死区染色为红色,梗死区不染色;然后置于4%多聚甲醛溶液中固定15 min,拍照后以Image tool 3.0软件分别计算出心肌梗死面积以及整个心室面积的总和。计算左心室梗死面积比=组织切片梗死区面积/组织切片总面积×100%。

1.7 免疫组化检测心肌梗死局部新生血管及毛细血管密度

取梗死心肌及梗死交界区心肌组织,石蜡包埋后制成4 μm厚切片,以小鼠抗兔CD31抗体(1∶100)进行免疫组化染色。每只动物取5个切片,每个切片取5个高倍视野进行CD31阳性细胞计数。取CD31阳性细胞计数均值作为心肌梗死区新生毛细血管密度值。

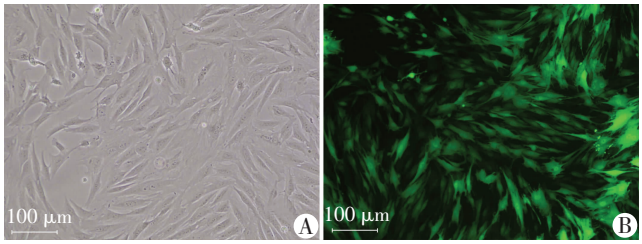
1.8 统计学处理

应用SPSS 16.0软件进行统计学分析。定量资料采用$\bar{x} \pm s$表示,组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析。

2 结果

2.1 MSCs培养鉴定及腺病毒感染

经密度梯度离心后贴壁培养获得的兔骨髓源MSCs培养至第3~5代时,贴细胞壁呈鱼群状、涡旋状生长,细胞形态为均一的长梭形。细胞经流式细胞仪鉴定表面CD34、CD45、CD44和CD29抗原表达情况,显示为CD34和CD45抗原阴性而CD29和CD44抗原阳性表达。转染腺病毒感染后细胞生长状态良好,荧光显微镜观察显示,病毒感染率约为80%(图1)。



A:培养第5代MSCs;B:pAd2-hRAMP1转染MSCs后72 h表达EGFP

图1 兔骨髓源MSCs培养及pAd2-hRAMP1腺病毒载体转染结果

2.2 腺病毒转染MSCs对心肌梗死面积的影响

腺病毒转染的MSCs移植后4周处死动物行心肌组织TTC染色以评价过表达hRAMP1的MSCs移植是否减少心肌梗死面积。TTC染色后正常心肌呈砖红色,而梗死心肌组织呈乳白色。对照组和MSC^{null}组的平均梗死面积比分别为(30.6±2.7)%和(22.5±3.2)%,而MSC^{hRAMP1}组平均心肌梗死面积仅为(10.1±2.9)%。与对照组和MSC^{null}组比较,MSC^{hRAMP1}组心肌梗死面积显著降低($P<0.05$)。

2.3 腺病毒转染MSCs对心肌梗死后新生血管及毛细血管密度影响

为了探讨MSC^{hRAMP1}移植降低心肌梗死面积的机制,应用抗CD31免疫组化检测心肌梗死及周边区新生毛细血管密度。CD31为内皮细胞特异性抗原,通过计数心肌组织CD31阳性细胞定义为新生毛细血管(图2)。无论是在心肌梗死区还是在梗死周边区,MSC^{hRAMP1}组的CD31阳性细胞数均明显高于对照组和MSC^{null}组($P<0.05$);计算心肌梗死区及梗死交界区毛细血管密度值显示,MSC^{hRAMP1}组[(25.3±3.8)、(34.2±4.1)],比对照组[(13.9±3.6)、(18.1±2.5)]和MSC^{null}组[(17.3±2.7)和(22.4±3.0)]的毛细血管密度值相应的增加($P<0.05$)。

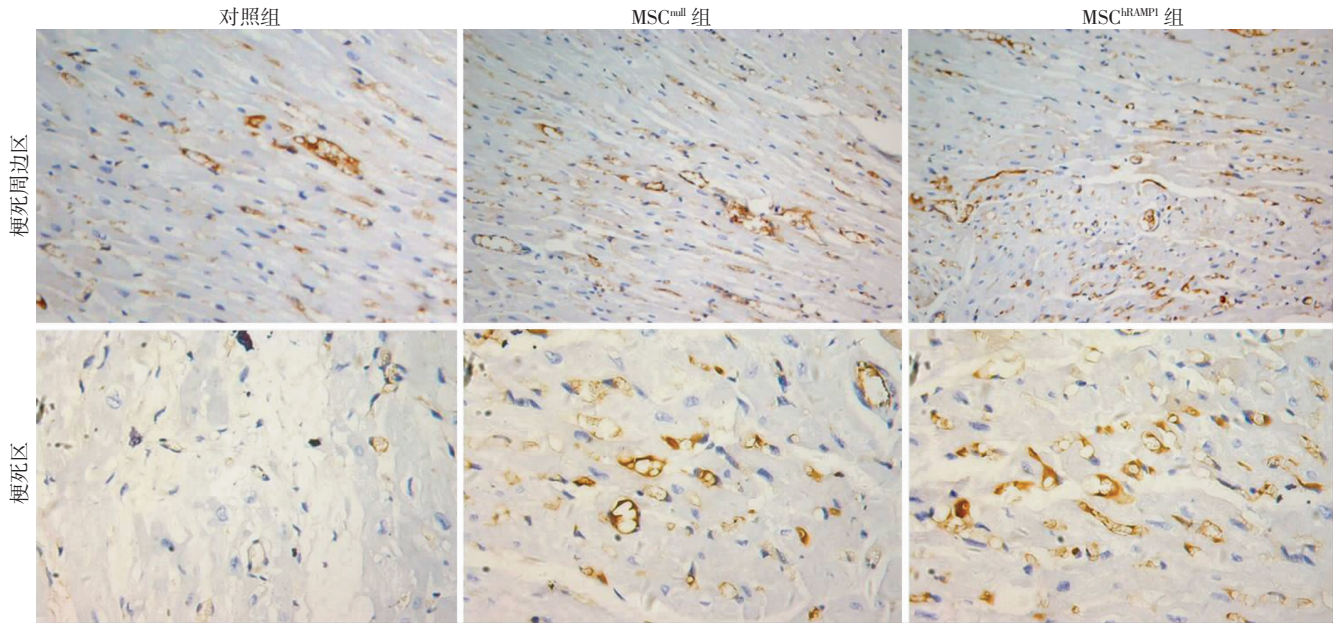
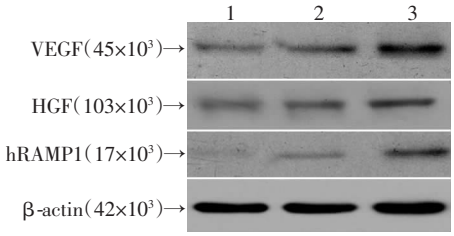


图2 各组兔心肌梗死后2周时梗死区及梗死交界区抗CD31免疫组化观察结果 (SABC ×100)

2.4 腺病毒转染 MSCs 对心肌梗死组织促血管生长因子表达的影响

Western blot 结果显示，MSC^{hRAMP1} 组心肌梗死区和梗死交界区心肌组织可见 hRAMP1 蛋白表达，而对照组和 MSC^{null} 组则未见 hRAMP1 蛋白表达，这提示细胞移植后 MSC^{hRAMP1} 募集至心肌梗死及周边区心肌组织区存活并表达 hRAMP1 蛋白。同时，伴随着 hRAMP1 蛋白表达，与对照组和 MSC^{null} 组相比，MSC^{hRAMP1} 组梗死心肌组织的促血管生长因子 VEGF 和 HGF 表达增加（$P<0.05$），见图 3。



1：对照组；2：MSC^{null} 组；3：MSC^{hRAMP1} 组

图 3 Western blot 检测各组心肌梗死区及梗死交界区促血管生长因子 hRAMP1、VEGF 和 HGF 表达

2.5 腺病毒转染 MSCs 对 CGRP 诱导的细胞生长因子分泌的影响

腺病毒转染 MSCs 后给予 CGRP 刺激，结果发现 24 h 时，与 MSC^{null} 组比较，MSC^{hRAMP1} 组的细胞培养上清液中，VEGF 和 HGF 水平均值有增高趋势（$P>0.05$），至 72 h 时，二者显著升高（$P<0.05$），这提示腺病毒转染 MSCs 过表达 hRAMP1 增加 CGRP 诱导的促细胞生长因子分泌作用。见表 1。

表 1 腺病毒转染 MSCs 后不同时间给予 CGRP 对细胞促血管生长因子分泌的影响（ng/ml，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

时间	MSC^{null} 组		MSC^{hRAMP1} 组	
	VEGF	HGF	VEGF	HGF
24 h	1 147.3±125.5	421.9±99.7	1 222.1±89.6	539.4±107.4
72 h	1 344.4±137.2	683.8±150.5	1 859.4±267.4[a]	1 052.2±239.3[a]

a：$P<0.05$，与 24 h 比较

3 讨论

心肌梗死后血管再生有利于增加梗死与缺血损伤心肌供血，促进顿抑心肌功能恢复，减少心肌纤维化和抑制心室重构，预防和延缓心力衰竭发生。许多基础研究已经发现，经外周静脉或冠状动脉移植 MSCs 或心肌内注射 MSCs 均可以促进心肌梗死后血管再生[8-10]。由于心脏是一个自主神经丰富的器官，受心交感神经和心迷走神经双重支配，并在心脏周围形成心神经丛，调节心脏的功能活动。因此，本研究将重要神经调节肽 CGRP 的受体亚单位 RAMP1 基因通过腺病毒载体介导转染 MSCs，观察 hRAMP1 基因修饰的 MSCs 在心肌梗死后血管再生中作用，结果显示，与对照组和 MSC^{null} 比较，MSC^{hRAMP1} 能显著地促进心肌梗死区和梗死交界区新生血管形成，增加毛血管密度，其促进血管再生作用可能与细胞移植后梗死和交界区心肌组织表达促血管生长因子 VEGF 和 HGF 增加有关。

心肌梗死后，局部损伤心肌组织可以释放多种细胞因子如基质细胞间质源因子-1α（SDF-1α）、干细胞因子（SCF）和 HGF 等，这些细胞生长因子一方面促进了局部微环境中心肌细胞、内皮细胞的生长或再生，促进新生血管生成，另一方面，又可以募集循环中干/祖细胞迁移至损伤部位，参与心肌损伤后修复[11]。因此，MSC^{hRAMP1} 移植后局部心肌组织表达 VEGF 和 HGF 增加可能是心肌组织表达这两种细胞因子增加以及 MSC^{hRAMP1} 旁分泌双重作用的结果。但 Western blot 结果显示，MSC^{hRAMP1} 移植后梗死心肌组织局部的 VEGF 和 HGF 蛋白表达水平显著高于 MSC^{null} 组，这表明除了局部心肌组织表达细胞因子增加外，还可能与腺病毒载体介导的 hRAMP1 基因增强了 MSCs 本身的旁分泌作用有关。但这需要进一步的体外细胞培养实验予以证明。

CGRP 是一种调节血管舒缩活性神经肽，可调节肺血管活性[12]和促进成骨细胞增殖[13]。新近有研究显示，C GRP 与 RAMP1 组成的受体结合后介导了肿瘤[14]和肢体缺血后的新生血管生成。Toda 等[14]研究显示，在人脐静脉内皮细胞与成纤维细胞共培养中，CGRP 促进胶管形成；且在 CGRP 基因敲除小鼠（$CGRP^{-/-}$）中 VEGF 表达下调，而内源性 CGRP 则通过 RAMP1 受体激活腺苷环化酶（cAMP）促进 VEGF 表达，进而促进肿瘤相关的血管生成以及肿瘤生长。Zheng 等[15]研究显示，内源性 CGRP 能促进肢体缺血小鼠模型的再血管化，且这一作用可能与 CGRP/RAMP1 引起内皮细胞的 AMPK-eNOS 途径激活有关[16]。因此，腺病毒载体介导 hRAMP1 基因转染 MSCs 后，可能与心脏自主神经系统释放的内源性 CGRP 结合，促进 MSCs 分泌 VEGF，或者使缺血损伤的心肌组织表达促血管生成因子 VEGF 等增加，进而显著地促进心肌梗死后血管再生。

总之，MSC^{hRAMP1} 移植治疗心肌梗死可通过提高梗死组织局部促细胞生长因子 VEGF 等表达而促进新生血管生成，这为心肌梗死的细胞治疗提供了一个新的治疗选择。

参考文献：

[1] Bailey A S, Jiang S, Afentoulis M, *et al*. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells [J]. Blood, 2004, 103(1): 13-19.

[2] Murry C E, Soonpaa M H, Reinecke H, *et al*. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts [J]. Nature, 2004, 428(6983): 664-668.

[3] Dwyer R M, Khan S, Barry F P, *et al*. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer [J]. Stem Cell Res Ther, 2010, 1(3): 25.

[4] Nesselmann C, Ma N, Bieback K, *et al*. Mesenchymal stem cells and cardiac repair [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(5B): 1795-1810.

[5] Hay D L, Poyner D R, Sexton P M. GPCR modulation by RAMPs [J]. Pharmacol Ther, 2006, 109(1/2): 173 - 197.
[6] 石蓓, 宋付凯, 赵然尊, 等. 重组人RAMP-1基因腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 遵义医学院学报, 2010, 33(4): 330 - 332.
[7] 石蓓, 刘志江, 赵然尊, 等. 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心脏功能及损伤血管再狭窄的影响[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(32): 2269 - 2273.
[8] Paul D, Samuel S M, Maulik N. Mesenchymal stem cell: present challenges and prospective cellular cardiomyoplasty approaches for myocardial regeneration [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(8): 1841 - 1855.
[9] Choi Y H, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy [J]. Hum Gene Ther, 2011, 22(1): 3 - 17.
[10] Williams A R, Hare J M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease [J]. Circ Res, 2011, 109(8): 923 - 940.
[11] Beohar N, Rapp J, Pandya S, *et al*. Rebuilding the damaged heart: the potential of cytokines and growth factors in the treatment of ischemic heart disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(16): 1287 - 1297.
[12] 蔡宇红, 孙国成, 毛云英, 等. 先天性心脏病肺动脉高压患儿血浆ET-1、CGRP、TXA_2及肺组织中其受体的变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(3): 253 - 256.
[13] 周燕, 张纲, 卓贤露, 等. 降钙素基因相关肽对兔成骨细胞增殖和TGF-β1表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(5): 412 - 414.
[14] Toda M, Suzuki T, Hosono K, *et al*. Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36): 13550 - 13555.
[15] Zheng S, Li W, Xu M, *et al*. Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(6): C1485 - C1492.
[16] Mishima T, Ito Y, Hosono K, *et al*. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physio, 2011, 300(2): H431 - H439.

(收稿:2012-01-06;修回:2012-03-29)
(编辑 栾 嘉)

(上接1491页)

的主要治疗一般为铂类联合3代化疗药物的化疗,尽管目前化疗仍然是其主要治疗手段,但各种方案的客观反应率(ORR)仅为20% ~30%,中位OS为8 ~10个月,1年生存率30% ~40%[2],化疗的疗效已达到一个平台,且毒副反应限制了它的应用。吉非替尼的临床应用为NSCLC提供了全新的治疗手段,已经成为晚期NSCLC最重要的治疗措施之一,并极大地提高了NSCLC的生存时间和生活质量。在最初的研究中发现吉非替尼对东方人、腺癌、不吸烟和女性患者疗效更好,被称为优势人群[1]。后来的研究[3-6]发现,这类人群之所以疗效更好,主要跟其EGFR突变率高有关。IPASS研究是发现EGFR突变为吉非替尼获益的分子标志物最重要的临床研究[3],因此,被誉为具有里程碑意义的研究,其结果得到了随后几个大型临床研究的证实[4-6]。因此,多个国际肺癌治疗指南均将吉非替尼等EGFR-TKIs列为EGFR突变患者的一线治疗。同样,INFORM研究表明[7],吉非替尼维持治疗是一种有效的治疗策略,但主要获益对象也是EGFR突变患者。从目前的研究结果来看,晚期NSCLC如果要一线应用EGFR-TKIs一定要是EGFR突变患者,二线和维持治疗最好也用于EGFR突变患者;对EGFR野生型或突变状态未知的患者,一线只能应用化疗[1,6]。

本例患者在确诊时已是晚期,错过了手术治疗的最佳时机,按当时的肺癌治疗指南给予患者6个周期的化疗并获得部分缓解,随后患者接受了吉非替尼维持治疗,在服吉非替尼3个月后肿瘤病灶消失,变为纤维条索病灶,经7年多的维持治疗及观察,病灶处始终为条索样改变,无任何局部复发或转移表现,生活质量如常人。我们认为,该患者生存超过5年,已经度过了复发和转移的危险期,其局部的纤维条索影类似于结核病灶愈合后遗留的条索影,对患者生存和生活没有影响。晚期NSCLC能生存8年以上极为少见,推测该患者存在EGFR突变,才能获得如此良好的疗效。我们有理由相信,如果能选择合适的人群,通过靶向治疗完全有可能把肺癌变为慢性病。

该患者采用的是吉非替尼维持治疗,在2004年维持治疗的概念尚未得到广泛的认同。从近年的研究来看维持治疗基本上得到了肺癌专家的认可,目前维持治疗有效的药物包括靶向治疗的吉非替尼及厄洛替尼和化疗药物中的培美曲塞,均可以改善患者的生存时间好生活质量[7]。吉非替尼或厄洛替尼作为维持治疗最好用于EGFR突变的NSCLC,主要是肺腺癌,培美曲塞仅适合于肺腺癌患者,且要求患者的一般情况要较好。

参考文献:

[1] Cataldo V D, Gibbons D L, Perez-Soler R, *et al*. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib[J]. N Engl J Med, 2011, 364(10): 947 - 955.
[2] Schiller J, Harrington D, Belani C P, *et al*. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2002, 346(2): 92 - 98.
[3] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S, *et al*. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947 - 957.
[4] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, *et al*. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(3): 239 - 246.
[5] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, *et al*. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2380 - 2388.
[6] Zhou C, Wu Y L, Chen G, *et al*. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8): 735 - 742.
[7] Zhang L, Ma S, Song X, *et al*. Gefitinib versus placebo as maintenance therapy in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (INFORM; C-TONG 0804): a multicentre, double-blind randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(5): 466 - 475.

(收稿:2012-05-29;修回:2012-06-19)
(编辑 王 红)