论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1124-05

靶向P75的siRNA对人乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

陈素莲[1],马 佳[1],张 枫[2],余新超[3],李翠云[3],杨清玲[1],陈昌杰[1] (233030 安徽 蚌埠,蚌埠医学院:生化与分子生物学教研室[1],临床检验诊断学实验中心[2],生物科学系[3])

[摘要] **目的** 构建P75特异小干扰RNA(siRNA)表达载体,并观察其对神经生长因子(NGF)促乳腺癌细胞生长及凋亡的影响。**方法** 通过GenBank提供的P75 mRNA序列,设计3对能转录短发夹状RNA的DNA序列,构建pSilencer™4.1-CMV neo质粒重组载体,转染乳腺癌SKBR3细胞;通过实时荧光定量PCR和Western blot筛选RNA干扰效果最强的干扰片段;以此干扰片段转染至乳腺癌SKBR3细胞,利用G418筛选稳定表达P75-siRNA的SKBR3细胞株,命名为P75-siRNA;MTT检测P75干扰后NGF对细胞增殖作用的影响;流式细胞术检测细胞凋亡;建立荷乳腺癌小鼠模型,观察P75干扰后对小鼠肿瘤生长和凋亡相关蛋白表达的影响。**结果** 序列测定表明成功构建P75-siRNA表达载体,实时荧光定量PCR和Western blot检测结果显示P75 mRNA和蛋白表达下调,尤以P75 2-siRNA干扰片段效果显著;MTT检测显示,NGF能刺激细胞增殖,与NGF组相比,P75-siRNA干扰后细胞增殖率均明显增高($P<0.05$);与空白对照组相比,NGF+P75-siRNA组和NGF组的细胞凋亡率明显降低($P<0.05$),NGF+P75-siRNA组更为明显;荷乳腺瘤小鼠中,P75-siRNA组小鼠的肿瘤生长明显超过未转染组和空载体转染组($P<0.05$),且P75-siRNA组Caspase-3表达下降,Bcl-2表达增加,Bax表达下降($P<0.05$)。**结论** P75特异干扰表达载体能有效降低P75的表达,增强NGF促乳腺癌SKBR3细胞的增殖作用和抗凋亡作用,从而使肿瘤生长更为明显。

[关键词] 乳腺癌;P75;siRNA

[中图法分类号] R394.2; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

Effect of siRNA transfection targeting P75 gene on proliferation and apoptosis in human breast cancer cells

Chen Sulian[1], Ma Jia[1], Zhang Feng[2], Yu Xinchao[3], Li Cuiyun[3], Yang Qingling[1], Chen Changjie[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2]Experimental Center of Clinical Laboratory and Diagnosis, [3]Department of Bioscience, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233030, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct an expression vector of P75 small interfering RNA (siRNA), and to determine its effects on the cell proliferation and apoptosis in breast cancer cells SKBR3 induced by nerve growth factor (NGF). **Methods** According to the mRNA complete sequence of P75 gene in GenBank, 3 pairs of DNA sequence transcribing short hairpin RNAs of P75 were selected and designed, and then constructed with the vector of pSilencer™4.1-CMV neo plasmid. After the vectors were transfected into SKBR3 cells, the strongest interference effect of them was chosen by fluorescent quantitation PCR and Western blotting. Then the obtained vector was transfected into SKBR3 cells after confirmed by sequencing. The stable cell line expressing P75 siRNA was selected by G418 assay. MTT assay was performed to assess the cell proliferation induced by NGF after P75 interference and the cell apoptosis was evaluated by flow cytometry (FCM). The mouse model of transplanted breast carcinoma was constructed by SKBR3 cells. The effect of P75 siRNA on the growth of the tumor and the expression of apoptosis relevant proteins were observed on the tumor-bearing mice. **Results** The expressing vector of P75 siRNA was successfully constructed. The mRNA and protein levels of P75 were decreased after P75 interference, especially with the vector of P75 2-siRNA. MTT assay showed that NGF significantly stimulated the proliferation of SKBR3 cells and the proliferation was more significant when combined with P75-siRNA in comparison with blank control($P<0.05$). The apoptotic rate was obviously lower

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金(KJ2010B119);蚌埠医学院科研课题(Byky1205)

[通信作者] 陈昌杰, E-mail:tochenchangjie@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130125.1140.010.html(2013-01-25)

in the cells treated by NGF + P75-siRNA and NGF along compared with the cells transfected with blank vector ($P<0.05$). Those cells after NGF + P75-siRNA treatment had the lowest apoptotic rate ($P<0.05$). In the mouse model of transplanted breast cancer, tumor growth in P75-interfering group was more obvious than un-transfection group and blank carrier transfection group ($P<0.05$) as well as a decrease in Caspase-3 and Bax expression and an increase in Bcl-2 expression. **Conclusion** The vector of P75 siRNA decreases the expression of P75 in SKBR3 cells effectively, and enhances the cell proliferation and anti-apoptosis of NGF. So it leads to tumor grow more obviously.

[**Key words**] breast cancer; P75; siRNA

Supported by the Natural Science Foundation of Anhui Provincial Department of Education (KJ2010B119) and the Research Project of Bengbu Medical College (Byky1205). Corresponding author: Chen Changjie, E-mail: tochenchangjie@163.com

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及其受体酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor, TrkA)和P75神经营养因子受体(P75 neurotrophin receptor, P75 NTR)在中枢神经系统、周围神经系统等许多组织中表达。此外,研究发现,NGF及其受体P75的表达水平在肿瘤发生、发展及预后等方面具有重要作用,以其相互作用为靶点可抑制乳腺癌细胞的存活、增殖、侵袭等[1-2]。本研究以P75基因为靶基因,设计与之同源的19 nt寡核苷酸,经退火形成双链DNA,将该片段克隆到pSilencer™ 4.1-CMV neo中,在哺乳细胞内可产生双链小干扰RNA(siRNA),对目的基因发挥抑制作用。在构建真核干扰载体后,观察对乳腺癌细胞生长和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞株SKBR3及大肠杆菌DH5α由本实验室保存,pSilencer™4.1-CMV neo真核表达载体购自Ambion公司,质粒抽提纯化试剂盒和T_4 DNA连接酶购自TaKaRa公司,真核转染试剂Lipofectamine™2000和Trizol购自Invitrogen公司,cDNA合成试剂盒购自MBI公司,G418购自美国Alexis公司,SYBR Premix *Ex-Taq* (Perfect Real Time)实时荧光定量PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,P75和β-actin一抗购自北京中杉金桥公司。兔抗人Bcl-2、Caspase-3和Bax一抗购自碧云天生物技术公司。BALB/c裸鼠,雌性,4~6周龄,体质量(20±2)g,15只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 P75特异性siRNA转录模板的设计和制备 获取P75基因的全长序列(GenBank序列号:NM_002507.3),应用Ambion公司网址所提供siRNA target finder and design tools设计siRNA的转录模板:含19个寡核苷酸、*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ酶切位点及用于形成茎环结构的9 bp序列,共55 bp,合成的模板形成发夹状。针对序列的不同部位,共设计3对转录模板,由上海生工生物工程公司合成,分别稀释至1 μg/μL,各取2 μL与退火缓冲液混匀后90 ℃ 3 min再降到37 ℃ 1 h形成双链。3对转录模板序列分别如下:P75 1上游5′-GATCCAGCCTGCAACCTGGGCGAGTTCAAGAGACTCGCCCAGGTTGCAGGCTTTA-3′,下游5′-AGCTTAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGTCTCTTGAACTCGCCCAGGTTGCAGGCTG-3′;P75 2上游5′-GATCCGCAGAACACCGTGTGCGAGTTCAAGAGACTCGCACACGGTGTTCTGCTTA-3′,下游5′-AGCTTAGCAGAACACCGTGTGCGAGTCTCTTGAACTCGCACACGGTGTTCTGCG-3′;P75 3上游5′-GATCCACTCCACAGCGACAGTGGCTTCAAGAGAGCCACTGTCGCTGTGGAGTTTA-3′,下游5′-AGCTTAAACTCCACAGCGACAGTGGCTCTCTTGAAGCCACTGTCGCTGTGGAGTG-3′。

1.2.2 P75特异的siRNA表达载体的构建及序列测定 取pSilencer™ 4.1-CMV neo与退火后的双链siRNA模板混合,在T_4 DNA连接酶的作用下,22 ℃ 1 h, 65 ℃ 10 min,形成重组质粒(P75-siRNA)。将重组质粒和Ambion公司试剂盒提供的阳性对照质粒和阴性对照转染至感受态细胞DH5α。感受态细菌制备和转化参照文献[3]。挑取阳性克隆扩增培养后,抽提并纯化质粒,由上海生工生物工程公司测序并鉴定阳性克隆。

1.2.3 细胞培养及转染 乳腺癌细胞株SKBR3用含10%小牛血清的DMEM培养液于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养。转染前1 d胰酶消化细胞并计数,细胞铺板,使其在转染日密度达到90%。转染步骤按Lipofectamine™ 2000说明书进行,6~8 μg的P75 1-siRNA质粒、P75 2-siRNA质粒、P75 3-siRNA质粒,分别用15 μL Lipofectamine™ 2000转染至SKBR3细胞,空白对照不加以双蒸水替代质粒。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应 cDNA合成:转染P75 1-siRNA、P75 2-siRNA、P75 3-siRNA 48 h,收集转染组和空白对照组约10^6个SKBR3细胞,用Trizol试剂提取总RNA,随机引物反转录合成cDNA;实时荧光定量PCR反应使用引物:P75上游5′-AACCTGGAGACCTCATCTTCGC-3′,下游5′-GGTAGTTTGTTTGTGGGTGGCT-3′。实时PCR反应操作按SYBR Premix *Ex Taq*说明书进行,反应体系20 μL。条件:95 ℃ 10 s, 95 ℃ 5 s, 55 ℃ 30 s, 40个循环。每份标本均检测3次,每个样本及内参均设置3个重复反应孔。SDS软件自动生成溶解曲线图谱、扩增曲线图谱及基因表达相对定量结果。为调整添加到反应中的模板量可能存在的差异,将GAPDH作为内对照(从目标基因的表达水平中减去内对照的表达水平)。GAPDH引物:上游5′-GGTCTCCTCTGACTTCAACA-3′,下游5′-AGCCAAATTCGTTGTCATAC-3′。基因表达图谱显示与校正器相比目标样本的表达水平或折叠水平。折叠表达变化通过以下方程式计算:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$。根据基因表达图谱选取干扰效果最为明显的细胞株。

1.2.5 Western blot 检测 P75 蛋白表达 分为空白对照组、转染 P75 1-siRNA、P75 2-siRNA 和 P75 3-siRNA 组，48 h 后提取蛋白，定量并进行 SDS-PAGE 电泳，120 V 电泳 90 min，然后 200 mA 2 h 电转印于 PVDF 膜上。用封闭液（1×TBST，5% 脱脂奶粉）室温振摇封闭 2 h，洗膜。加入兔抗人 P75 一抗（1∶200），室温孵育 2 h，洗膜，加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG（1∶2 000）室温孵育 1.5 h，洗膜。最后用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号，在 Bio-Rad 凝胶仪上成像，以表示 P75 蛋白的表达水平。

1.2.6 G418 筛选稳定建立转染株 取上述干扰效果最明显的细胞株，在 37 ℃、5% CO_2 中保温 24 h 后将细胞传代至新鲜培养基中，48 h 后加入抗生素 G418（600 μg/mL）筛选，约 3 周可以获得阳性单克隆，用含 300 μg/mL G418 的培养液扩大培养，8～12 周可获得稳定表达 P75-siRNA 的 SKBR3 细胞。

1.2.7 MTT 测 P75 干扰后 NGF 对细胞增殖作用的影响 实验分 3 组：空白对照组、NGF 组和 NGF + P75-siRNA 组。按 2×10^4/mL 接种于 96 孔板，细胞贴壁后更换无血清 DMEM 培养液，37 ℃、5% CO_2 中培养 6 h，细胞同步化后用含 10 % 小牛血清的 DMEM 培养液 100 μL（含 100 ng/μL NGF）[3]，继续培养 24、48、72 h，然后每孔加 20 μL MTT 继续培养 4 h，弃培养液，加入二甲亚砜（DMSO）100 μL，振荡使结晶完全溶解，30 min 后用酶标仪检测 490 nm 处的光密度值[D(490)]，每组平均 5 个复孔，重复 3 次。

1.2.8 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡 实验分组同 1.2.7，调整细胞数为 2×10^5/mL，接种于 6 孔板，每孔 2 mL，48 h 后收集细胞用 70% 乙醇固定，加 RNase 酶（25 g/L）1. 5 μL，37 ℃ 2 h，再加 PI（50 μg/mL）12 μL，混匀，避光，冰上放置 30 min，取 10^6 个细胞用流式细胞仪检测。

1.2.9 肿瘤质量测定 实验分为未转染组、空载体转染组和 P75-siRNA 组。取约 0.1 mL 经不同处理的细胞悬液（约含 1×10^6 个细胞），用带 6 号针头的注射器沿着小鼠右侧第二乳房脂肪垫下接种。每组接种 5 只小鼠，每日观察小鼠粪便性状、精神神经症状、体质量变化等外观特征和行为活动。于 4 周后处死，剥去肿瘤及肺组织，称取瘤质量。

1.2.10 Western blot 检测原发肿瘤凋亡相关蛋白 分组同 1.2.9，取原发肿瘤组织提取蛋白，定量，电泳，转膜，再分别以兔抗人一抗 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 室温孵育，其余操作同体外实验中的 Western blot 方法。

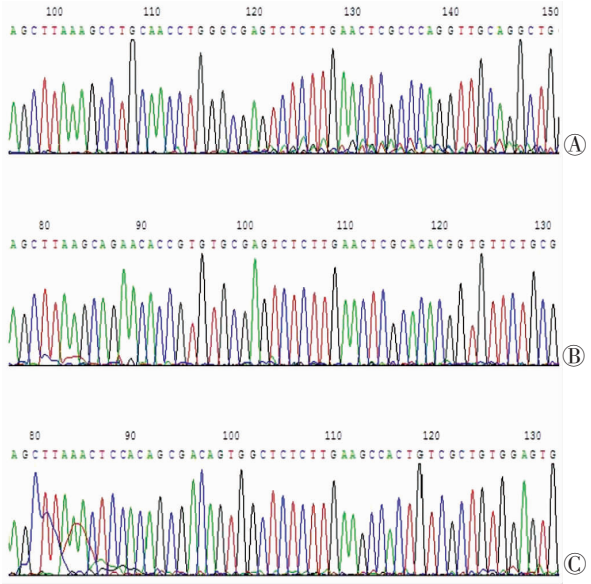
1.3 统计学分析

以上实验均重复 3 次，数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 表达载体的构建和鉴定

退火形成的双链与载体连接后，转化大肠杆菌 DH5α，转染 P75-siRNA 及阳性对照质粒的细菌均长出较多的菌落，未转染质粒的细菌在含氨苄青霉素的平板上不能生长，随机取 5 个克隆，扩大培养后，提取质粒，测序证明序列完全正确。见图 1。

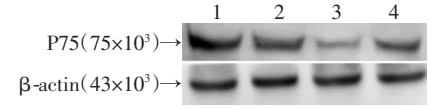


A：P75 1-siRNA；B：P75 2-siRNA；C：P75 3-siRNA

图 1 P75-siRNA 测序结果

2.2 干扰后各组 P75 mRNA 和蛋白的表达

与空白对照相比，3 组 P75 mRNA 水平均下降[P75 1-siRNA、P75 2-siRNA、P75 3-siRNA 分别为（0. 90 ± 0. 06）、（0. 44 ± 0. 07）、（1. 00 ± 0. 16）]，其中以 P75 2-siRNA 组最为明显，和空白对照相比，其相对定量值下降最为明显（0. 44 ± 0. 07 *vs* 2. 60 ± 0. 22）。Western blot 检测结果也显示，相对于空白对照组，P75 2-siRNA 组 P75 蛋白水平下降最显著。故以 P75 2-siRNA 进行后续实验。见图 2。

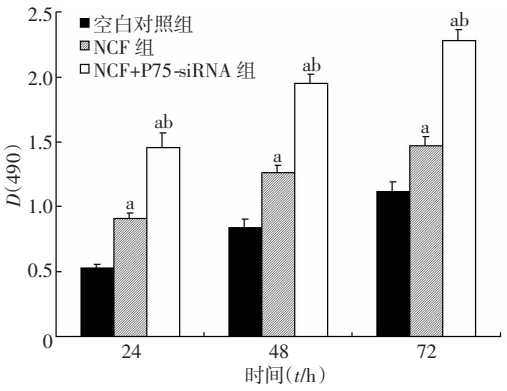


1：空白对照组；2：P75 1-siRNA 组；3：P75 2-siRNA 组；4：P75 3-siRNA 组

图 2 Western blot 检测各组细胞 P75 蛋白的表达

2.3 MTT 检测细胞增殖情况

相对于空白对照组，NGF 可刺激 SKBR3 细胞的增殖（$P<0.05$）。相对于 NGF 组，NGF + P75-siRNA 组可进一步提高 NGF 刺激细胞的增殖效应（$P<0.05$）。见图 3。



a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与 NGF 组比较

图 3 MTT 法检测 SKBR3 细胞增殖率

2.4 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡

相对于空白对照组(14.13±0.61),NGF可抑制SKBR3细胞的凋亡($P<0.05$)。相对于NGF组(9.53±0.51),NGF+P75-siRNA组(2.90±0.62)可进一步提高NGF抑制细胞凋亡的效应($P<0.05$)。

2.5 小鼠乳腺原发肿瘤的生长

相对于未转染组和空载体转染组,P75-siRNA组小鼠的肿瘤生长速度最快($P<0.05$),未转染组、空载体转染组和NGF+P75-siRNA组肿瘤的质量分别是(0.80±0.10)、(0.82±0.07)、(1.49±0.08)g。见图4。

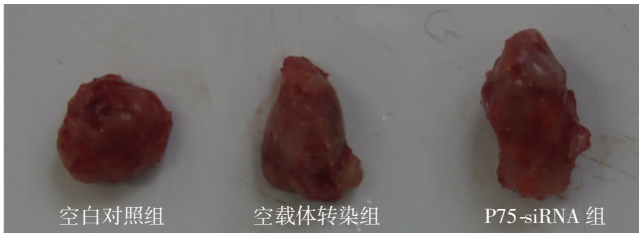
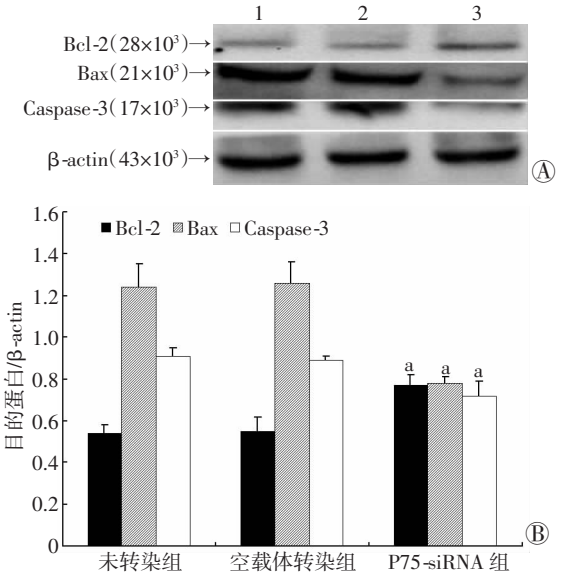


图4 各组小鼠肿瘤生长大体观察

2.6 Western blot检测小鼠乳腺原发肿瘤Caspase-3、Bcl-2、Bax的表达

相对于未转染组和空载体转染组,NGF+P75-siRNA组Caspase-3表达下降,Bcl-2表达增加,Bax表达下降,Bcl-2/Bax比例增加($P<0.05$)。见图5。



A:Western blot检测结果 1:未转染组;2:空载体转染组;3:P75-siRNA组;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与未转染组比较

图5 Western blot检测各组小鼠乳腺原发肿瘤Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白的表达

3 讨论

NGF通过与靶细胞表面的神经生长因子受体(NGFR)结合而介导生物学效应。NGF有2种受体,分别为高亲和力受体TrkA和低亲和力受体P75。近年来发现,NGF及其受体在乳腺癌、肝癌等多种肿瘤中均有表达,并影响肿瘤的发生、发展[4-5]。其中,TrkA信号通路的激活有促进肿瘤细胞增殖的作用[6],而P75则被认为是1个潜在的抑癌基因。P75是单链跨膜糖蛋白,胞内区包含肿瘤坏死因子受体相关因子结合位点和Ⅱ型死亡结构域等,因而P75信号途径的激活可以诱导细胞的凋亡[7]。此外,TrkA和P75信号通路之间存在"串话"关系[8-9],当P75与TrkA受体共同表达时,一方面TrkA对P75介导的信号通路具有抑制效应,另一方面P75能增强NGF诱导的TrkA NTR活化。NGF在不同肿瘤细胞的生物学作用可能与TrkA和P75在不同类型的肿瘤中表达水平相关。前期研究发现TrkA和P75的表达与乳腺肿瘤的恶性程度有关,TrkA/P75可以成为乳腺癌治疗的分子靶点[10],并利用RNA干扰技术成功构建了si-TrkA表达载体[3],本研究进一步构建si-P75真核表达载体,观察NGF-P75轴调控乳腺癌生长和凋亡的作用,从而为利用RNAi技术调整乳腺癌细胞株中TrkA/P75表达比例,检测不同比例TrkA/P75对乳腺癌进展的作用,为临床化疗药物敏感性、耐药性的影响提供依据。

本研究将人工合成的3对P75特异性siRNA转录模板构建了能在真核细胞内表达的重组质粒,并利用实时荧光定量PCR技术和Western blot检测3对干扰片段的效率,选择干扰效率最明显的干扰片段转染至乳腺癌SKBR3细胞,利用G418筛选稳定表达P75-siRNA的单克隆细胞,有效地克服了直接向细胞内导入siRNA基因沉默片段,维持时间短,转染效率不高,效果不确定的缺点。体外实验中,MTT和凋亡检测结果显示,相对于空白对照组,NGF能有效促进乳腺癌细胞株SKBR3细胞的增殖和凋亡抑制作用。P75干扰后增强了NGF的这一效应。我们进一步通过动物实验验证了P75的干扰效应,P75-siRNA组小鼠肿瘤生长明显超过空白对照组和空载体转染组,且凋亡刺激蛋白Caspase-3和Bax表达下调,而抗凋亡因子Bcl-2表达上调。前期研究中发现SKBR3细胞同时表达TrkA NTR和P75 NTR[8]。本研究通过RNAi技术使P75的表达下降,导致细胞内TrkA/P75的比例升高,此时NGF主要通过TrkA信号通路发挥作用,这可能也是导致肿瘤增殖的原因之一。目前研究表明,P75介导的凋亡信号通路存在JNK的活化以及下游的一系列事件:c-Jun磷酸化,Bad等的激活,Bax线粒体易位及Caspase激活[11-12]。在过度表达P75的细胞中,凋亡的产生通过JNK依赖的机制;而在表达较少时,通过p38MAPK及c-Jun独立机制引发凋亡[13]。我们后续将进一步构建不同TrkA/P75比例的乳腺癌细胞株,从而探讨NGF通过TrkA和P75 NTR后增殖、凋亡相关信号蛋白的变化,以阐明其分子机制。

参考文献:

[1] Gezginci-Oktayoglu S, Bolkent S. 4-Methlycatechol prevents NGF/p75

(NTR)-mediated apoptosis *via* NGF/TrkA system in pancreatic β cells [J]. Neuropeptides, 2011, 45(2): 143 – 150.
[2] Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, *et al*. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 346 – 351.
[3] 杨清玲, 陈昌杰, 高艳军, 等. 神经生长因子受体TrkA和p75在乳腺肿瘤中的表达及意义[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2011, 40(4): 423 – 428.
[4] Rasi G, Serafino A, Bellis L, *et al*. Nerve growth factor involvement in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(37): 4986 – 4995.
[5] Takei Y, Laskey R. Tumor necrosis factor alpha regulates responses to nerve growth factor, promoting neural cell survival but suppressing differentiation of neuroblastoma cells[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(3): 855 – 864.
[6] Demont Y, Corbet C, Page A, *et al*. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein[J]. J Biol Chem, 2012, 287(3): 1923 – 1931.
[7] Skeldal S, Sykes A M, Glerup S, *et al*. Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain in p75 neurotrophin receptor shedding and apoptosis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(52): 43798 – 43809.
[8] Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, *et al*. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR) [J]. Bioessays, 2011, 33(8): 614 – 625.
[9] Bassili M, Birman E, Schor N F, *et al*. Differential roles of Trk and p75 neurotrophin receptors in tumorigenesis and chemoresistance *ex vivo* and *in vivo*[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2010, 65(6): 1047 – 1056.
[10] 陈昌杰, 章菊, 刘臣彪, 等. TrKA特异小干扰RNA表达载体构建及对乳腺癌细胞增殖的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2009, 21(1): 36 – 41.
[11] Kenchappa R S, Tep C, Korade Z, *et al*. p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17[J]. J Biol Chem, 2010, 285(26): 20358 – 20368.
[12] Shen J, Wu Y, Xu J Y, *et al*. ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs *via* modulation of Bcl-xL, Bax, and BAD[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(1): 35 – 46.
[13] Khwaja S, Quann J, Pattabiraman N, *et al*. Carprofen induction of p75NTR-dependent apoptosis *via* the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(11): 3539 – 3545.

(**收稿**:2012-11-19;**修回**:2013-01-10)
(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2013)11-1128-01

急性缺血性脑卒中早期磁共振弥散加权成像阴性1例

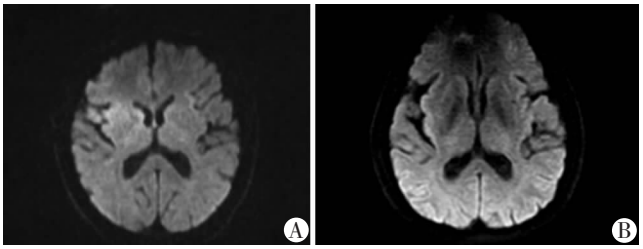
曹 笃,牟 君,魏有东,谢 鹏 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[**关键词**] 磁共振弥散加权成像;急性缺血性脑卒中;阴性
[**中图法分类号**] R743.304 [**文献标志码**] B

磁共振弥散加权成像(diffusion-weighted imaging, DWI)目前被认为是诊断急性缺血性脑卒中的"金标准",但近年国内外均有报道DWI首次诊断急性缺血性脑卒中可出现假阴性或阴性表现[1-2],但复查DWI多有异常发现。现报告早期2次DWI均未发现病灶的急性缺血性脑卒中1例。

1 临床资料

患者,男性,61岁,2013年4月2日凌晨因"突发右侧肢体无力,伴吐词不清6 h"入院。6 h前患者无明显诱因突发右侧肢体活动不灵,麻木,吐词不清,不伴头晕、头痛,意识丧失等。发现血压高1个月余,最高血压192/106 mmHg。吸烟20年,约40支/d,饮白酒20年,约150 mL/d。查体:血压182/94 mmHg。神清,吐词含糊。双侧瞳孔等大等圆,光敏。右侧鼻唇沟稍浅,伸舌右偏,示齿口角稍左偏。右侧肢体肌力Ⅲ级,左侧Ⅴ级。右侧偏身痛觉减退,右侧巴氏征阳性,余神经系统及心肺腹查体未见明显异常。入院诊断:①脑梗死,②原发性高血压3级(极高危)。NIHSS评分:9分。血脂:TG 2.30 mmol/L, LDL 2.95 mmol/L。入院当日头颅CT未见出血,头颈部CTA:双侧颈内动脉颅内段多发钙化,未见管腔明显狭窄;右侧颈总动脉分叉前走行迂曲,局部管腔稍狭窄;双侧大脑中动脉、后动脉远端管腔稍欠均匀。发病约36 h头颅MRI提示:双侧额叶、半卵圆中心、基底节区多发缺血灶,DWI未见急性梗死灶(图1A)。患者经阿司匹林、阿托伐他汀、疏血通及康复训练等治疗,第5天右侧肢体肌力及吐词不清症状较入院时好转,右下肢及上肢近端肌力Ⅳ级,远端Ⅲ级。继续抗血小板、改善循环及康复训练治疗,第8天右侧肢体肌力恢复至Ⅳ$^+$级,吐词基本清晰,遗留右侧偏身痛觉减退。同日复查头颅MRI,DWI仍未见急性梗死灶(图1B)。



A:2013年4月3日; B: 2013年4月9日
图1 左侧内囊急性梗死患者2次DWI阴性表现

(下转1140页)

[**通信作者**] 谢 鹏, E-mail:xiepeng58@21cn.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130516.1137.001.html (2013-05-16)