论著

文章编号:1000-5404(2014)01-0050-05

A20突变体对前列腺癌细胞炎症反应因子及凋亡抑制基因表达的影响

王艳艳,但 刚,胡宗海,吴丽娟 (610083 成都,成都军区总医院临床实验医学研究与保障中心)

[摘要] **目的** 通过构建A20突变体真核载体,获取A20突变体,研究其对前列腺癌细胞PC-3M细胞炎症反应因子及凋亡抑制基因表达的影响。**方法** 构建A20突变体pEGFP-C1表达载体,提取质粒,限制性内切酶酶切鉴定并测序。质粒DNA转染COS7细胞,用LPS诱导PC-3M细胞产生炎症反应,利用Western blot法检测PC-3M细胞A20,IκB-α、pERK1/ERK2、pJNK、Bcl-2;利用ELISA检测NF-κB、TNF-α、IL-6等的水平。**结果** 限制性内切酶酶切鉴定与DNA测序证实合成A20突变体真核载体寡核苷酸链插入正确。Western blot检测结果表明转染后PC-3M细胞A20蛋白表达显著增。A20突变体抑制IκB-α的降解,ERK1/ERK2、JNK磷酸化及凋亡抑制基因Bcl-2的表达。ELISA法检测结果表明,A20突变体能显著抑制NF-κB、TNF-α、IL-6的表达($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 成功构建人A20突变体真核表达载体,A20突变能抑制炎症反应因子及凋亡抑制基因。

[关键词] A20突变体;核因子κB;前列腺癌;炎症反应因子;凋亡抑制基因
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.25 [文献标志码] A

Effect of A20 mutant on expression of inflammatory factors and anti-apoptosis genes in PC-3M cells

Wang Yanyan, Dan Gang, Hu Zonghai, Wu Lijuan (Center of Clinical Laboratory Medicine Research and Services, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct an eukaryotic expression vector of A20 mutant, which expresses A20 stably, and evaluate its effects on the expression of inflammatory factors and anti-apoptosis genes in prostate cancer PC-3M cells. **Methods** The domain of A20 in inhibiting NF-κB activity was designed based on the gene sequence of natural A20. Then the sequence of A20 mutant was subcloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-C1, which was identified and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Subsequently, the constructed recombinant plasmid pEGFP-C1-hA20 mutant was transfected into COS 7 cells to replicate the plasmid, and then the expression of protein A20, IκB-α, pERK1/ERK2、pJNK and Bcl-2 were detected in PC-3M cells after transfection by Western blotting. The concentrations of NF-κB, TNF-α and IL-6 in the supernatant were determined by ELISA. **Results** Restriction enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the obtained sequence of mutant was correct. Western blotting indicated that the expression of protein A20 was enhanced after the pEGFP-C1 plasmid was transfected into the PC-3M cells. After stimulation with LPS, the degradation of IκB-α and phosphorylation of ERK1/ERK2 and JNK were inhibited after A20 mutant pretreatment. The expression of Bcl-2 was obviously increased, but decreased significantly after A20 mutant pretreatment. After stimulation with LPS for 24 h, the concentrations of NF-κB, TNF-α and IL-6 in the supernatants of PC-3M cells were obviously increased in the blank and control groups, but those levels were significantly reduced in mutant group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** The eukaryotic expression vector of A20 mutant is successfully constructed, which expresses A20 stably and suppresses the expression of inflammatory factors and anti-apoptosis genes in PC-3M cells.

[**Key words**] A20 mutant; NF-κB; prostate cancer; inflammatory factors; anti-apoptosis gene

Supported by the Project of Basic Research of Sichuan Provincial Department of Science and Technology(2011JY0037). Corresponding author: Wu Lijuan, Tel: 86-28-86571052, E-mail: wulijuan1638@126.com

[基金项目] 四川省科技厅基础研究项目(2011JY0037)
[通信作者] 吴丽娟,电话:(028)86571052,E-mail:wulijuan1638@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131107.1613.008.html(2013-11-07)

前列腺癌是常见的恶性肿瘤,已成为威胁西方男性生命健康的第 2 位肿瘤性疾病,近年来,我国前列腺癌发病率也逐年增高[1]。除传统的手术和放化疗外,治疗新措施已成为研究热点。研究证明炎症贯穿肿瘤发生、发展的始终,是肿瘤微环境的重要组成部分, NF-κB 作为细胞重要的转录因子是连接炎症与肿瘤的关键分子,并被公认为是极具潜力的新型抗瘤靶点[2-3]。

A20 是炎症和免疫的调节中枢,其通过双重的泛素化酶活性在 NF-κB 信号通路发挥调节炎症因子的表达、控制 NF-κB 信号强度和持续时间从而关闭炎症信号的负调控作用[4-7]。因此,本实验设计了以天然 A20 蛋白上最小 NF-κB 活性抑制结构域为基础,以 4 分子半胱氨酸(Cys)结合一个 Zn 为特征结构的、含有 4 分子 C_2C_2 锌指的 NF-κB 抑制肽,构建 pEGFP-C1 表达载体,研究 A20 突变体对前列腺癌 PC-3M 细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

PC-3M 细胞株购自美国 ATCC 公司,大肠埃希菌菌株 DH5α,高纯度质粒小提试剂盒购自北京天根生化公司,脂多糖(LPS)购自 Sigma 公司,转染试剂购自 Invitrogen,RPMI1640 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司,限制性内切酶购自 NEB 公司。TNF-α、IL-6、NF-κB ELISA 检测试剂盒,鼠抗人 A20、IκB-α、pERK1(T202/Y201)/ERK2(T185/Y187)、pJNK(T183/Y815)抗体购自 R&D 公司,标记二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司。Bcl-2 购于南京凯基生物技术有限公司。Model 550 酶联分析仪,蛋白定量仪,半干转印仪,Gel Doc 2000 凝胶分析仪:美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 A20 突变体质粒构建与鉴定 根据人 A20 基因的序列,设计出以天然 A20 蛋白上最小 NF-κB 活性抑制结构域为基础,以 4 分子半胱氨酸(Cys)结合一个 Zn 为特征结构的、含有 4 分子 C_2C_2 锌指的 NF-κB 抑制肽,利用引物设计软件 Primer 5.0 设计带酶切位点的引物,上游引物为 5′-TCTAGATGCTGTACAAGTCCGGACTC -3′(*Xba* Ⅰ酶切位点),下游引物为 5′-ACCGGATCTAGATAACTGATATCGGATCC-3′(*Bam*H Ⅰ 的酶切位点)。通过 PCR 进行扩增,反应条件为:94 ℃预变性 10 min,然后 93 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 105 s,循环 35 次后 72 ℃延伸 10 min。4 ℃保存 PCR 产物。取 1 μL 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并进行结果分析。

PCR 产物与 pUC57 载体连接 载体序列:M13F/pUC 上游引物 5′-GTAAAACGACGGCCAG-3′;下游引物 5′-CAGGAAACAGCTATG-3′,将目的基因与 pUC57 载体 16 ℃过夜连接,将连接产物 pUC57-A20 mutant 转化大肠杆菌 DH5α,于选择性 LB 固体平板(含 50 μg/mL 氨苄青霉素)上生长,37 ℃过夜培养,第 2 天随机选取 5 个单菌落进行 PCR 反应检菌,根据电泳结果选取相应菌落进行植菌,菌株扩大培养后利用高纯度质粒小提试剂盒提取质粒,并送金瑞斯公司测序。

重组质粒 pEGFP-C1-hA20 mutant 构建与鉴定:将 pUC57-hA20 mutant 质粒用 *Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切后获取 hA20 突变体基因片段。将其与 *Bam*H Ⅰ/*Bgl* Ⅱ双酶切的真核表达质粒 pEGFP-C1 16 ℃过夜连接(载体序列为 PEGFP-C-5:CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG),连接液转化大肠杆菌 DH5α 于选择性 LB(含 50 μg/mL 氨苄青霉素)固体平板上筛选阳性菌落,扩增后抽提质粒,并取少量重组质粒 pEGFP-C1-hA20 mutant 进行 *Bam*H Ⅰ/*Bgl* Ⅱ双酶切鉴定。菌液送南京金瑞斯生物公司测序。

1.2.2 A20 突变体重组质粒转染 COS7 细胞 培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 液,培养 COS7 细胞,至细胞融合 80% 左右时进行转染。实验分 3 组:①空白组:空白对照加入 PBS 液;②空载体组:pEGFR-C1 空载体;③A20 突变体组:A20 突变体重组质粒。采用脂质体 2000 转染方法将 A20 突变体重组质粒转染 COS7,6 h 后弃去转染液,RPMI1640 液培养液进行培养,收集 72 h 细胞上清备用。

1.2.3 Western blot 法检测 PC-3M 细胞 A20 的表达 收集空白组、空载体组、A20 突变体组转染 72 h 上清,加入 6 孔板中生长良好的 PC-3M 细胞中,24 h 后蛋白裂解液进行蛋白抽提,BCA 法行蛋白浓度测定。样品电泳,经转膜、封闭后,一抗 4 ℃过夜孵育(A20 抗体和内参 β-actin 抗体),洗膜后用二抗在室温下杂交 1 h,洗膜 3 次 10 min/次,ECL 化学发光检测。

1.2.4 A20 突变体抑制 LPS 诱导的 PC-3M 细胞炎症反应因子的表达 取对数生长期 PC-3M 细胞,实验分为 6 组:空白组、空载体组、A20 突变体组、LPS 组、LPS + 空载体组、LPS + A20 突变体组。先弃去培养基,再更换为含 10% FCS 的新鲜培养基,加入空载体,A20 突变体真核表达载体转染 COS7 细胞收集的细胞上清,并加入 LPS 以 100 ng/mL 终浓度刺激培养细胞 24 h 后收集培养上清,用 ELISA 法检测 NF-κB、TNF-α、IL-6 的水平。

1.2.5 Western blot 法检测 PC-3M 细胞 IκB、凋亡抑制基因 Bcl-2 和细胞周期素 D_1 的表达 收集空白组、LPS 组、A20 组、A20 突变体组细胞经蛋白抽提,BCA 法行蛋白浓度测定。样品电泳,经转膜、封闭后,一抗 4 ℃过夜孵育,洗膜后用二抗在室温下杂交 1 h,洗膜 3 次 10 min/次,ECL 化学发光检测。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,组内比较采用 t 检验。

2 结果

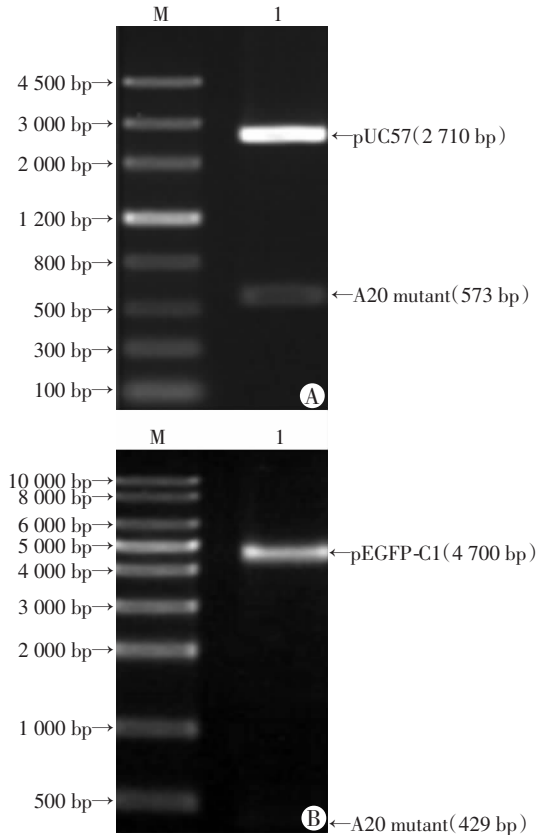
2.1 重组真核表达载体 pEGFP-C1-hA20 mutant 载体构建及鉴定

目的基因的 PCR 产物与 pUC57 进行连接,获得 pUC57-hA20 mutant 质粒。重组质粒经 *Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切后,除 pUV57 载体带(2 710 bp)外,得到 1 条大约 573 bp 的插入片段,与设计片段大小相符,见图 1A。A20 突变体结构域目的片段与 pEGFP-C1 载体进行连接,构建重组真核表达载体 pEGFP-C1-hA20 mutant 质粒。pEGFP-C1-hA20 mutant 重组质粒载体双酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳,发现 429 bp 左右的目的条带与 4 700 bp 左右的 pEGFP-C1 载体片段(图 1B),表明目的片段已成功插 pEGFP-C1 质粒中。DNA 序列分析,结果显示插入真核表达载体的基因片段与 A20 突变体目的基因序列完全符合

(图2),提示 pEGFP-C1-hA20 mutant 真核表达载体构建成功。

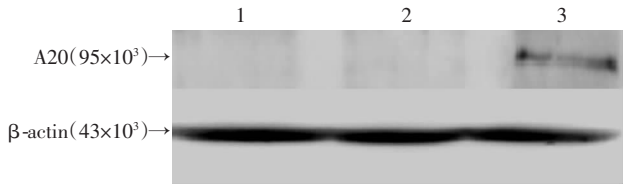
2.2 Western blot 法检测 PC-3M 细胞 A20 的表达

如图2所示,在 A20 突变体组检测到相对分子质量约 95×10^3 的蛋白条带。说明 A20 突变体转染后能启动 PC-3M 细胞 A20 蛋白的高表达,A20 突变体构建成功。



A:pUC57 质粒双酶切 M:标准;1:*Xba* Ⅰ/ *Bam*H Ⅰ 双酶切;
B:pEGFP-C1 质粒双酶切 M:标准;1:*Bam*H Ⅰ/*Bgl* Ⅱ 双酶切

图1 A20 突变体真核表达载体的双酶切鉴定



1:空白组;2:空载体组;3:A20 突变体组

图2 Western blot 检测 PC-3M 细胞 A20 的表达

2.3 A20 突变体抑制 NF-κB 及炎症反应因子 TNF-α、IL-6 的作用

用 100 ng/mL LPS 诱导 PC-3M 细胞,24 h 后检测 NF-κB 的表达及其炎症因子 TNF-α、IL-6 的分泌情况。PC-3M 细胞在未给予 LPS 刺激时,空白组,空载体组及 A20 突变体组 NF-κB 的表达量较低,LPS 100 ng/mL 持续作用 24 h,空载体组 NF-κB 的表达量较单纯 LPS 刺激组无显著差异($P>0.05$),A20 突变体组 NF-κB 的表达量较单纯 LPS 刺激组有显著的降低($P<0.01$),见表1。PC-3M 细胞中炎症因子 TNF-α、IL-6,在未给予 LPS 刺激时,各组表达量均很低,LPS 100 ng/mL 持续作用 24 h,空载体组 TNF-α、IL-6 释放量较单纯 LPS 刺激组无显著差异($P>0.05$),A20 突变体组 TNF-α、IL-6 释放量较单纯 LPS 刺激组有显著的降低($P<0.01$,$P<0.05$),见表1。这表明 A20 突变体能阻断 NF-κB 通路,抑制了炎症因子的表达。

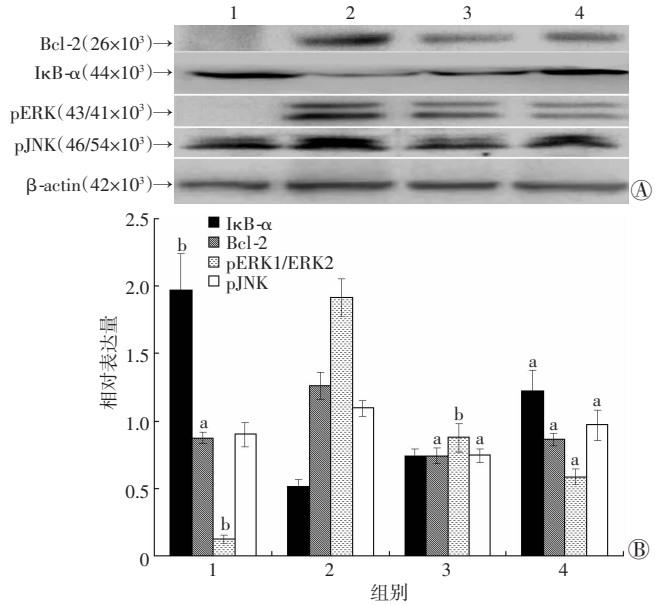
表1 A20 突变体对 LPS 刺激 PC-3M 细胞 24 h NF-κB 及 TNF-α、IL-6 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	NF-κB	TNF-α	IL-6
空白组	$1\,065.9\pm30.0^b$	11.89 ± 0.9^b	459.2 ± 24.8^b
空载体组	$1\,066.6\pm48.8^b$	12.23 ± 0.3^b	482.5 ± 11.6^b
A20 突变体组	$1\,043.7\pm43.4^b$	11.90 ± 0.4^b	472.5 ± 15.7^b
LPS 组	$1\,815.4\pm118.3$	28.64 ± 2.1	909.4 ± 89.8
空载体+LPS 组	$1\,735.5\pm80.0$	28.72 ± 1.9	842.6 ± 32.1
A20 突变体+LPS 组	$1\,575.35\pm59.3^b$	17.37 ± 1.8^b	703.6 ± 30.4^a

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 LPS 组比较

2.4 A20 突变体对 IκB-α 降解的抑制作用

PC-3M 细胞表达一定量的 IκB-α,经 LPS 刺激后,IκB-α 表达量显著下降,而 A20 组和 A20 突变组较空白组有不同程度下降,但 A20 突变体组较 LPS 组有显著差异($P<0.05$,图3)。



1:空白组;2:LPS 组;3:A20 组;4:A20 突变体组

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 LPS 组比较

图3 A20 突变体对 IκB- a 降解、EPK、JNK 磷酸化的抑制作用

2.5 A20 突变体对 Bcl-2 的抑制作用

PC-3M 细胞在未给予 LPS 刺激时,空白组 Bcl-2 少量表达,LPS 刺激后,Bcl-2 表达显著增高,而 A20 组和 A20 突变体组 LPS 刺激后,表达均下降($P<0.05$,图3)。

2.6 A20 突变体对 EPK、JNK 磷酸化的抑制作用

PC-3M 细胞在 LPS 刺激后,EPK、JNK 磷酸化表达显著增高,而 A20 组和 A20 突变组 EPK、JNK 磷酸化水平较 LPS 组表达有统计学意义($P<0.05$,图3)。

3 讨论

A20 是体内 NF-κB 异常活化时天然表达的一种调节蛋白,其在结构上包含羧基端的多锌指区(ZnF)

和氨基端的卵巢肿瘤(OTU)域,因而具有双重的泛素编辑酶活性。A20 对 NF-κB 信号通路蛋白群的调节,具有快速、多层次,多靶位等特点,可使过度炎症反应得以迅速平息。前期我们的研究也证实在脓毒症动物模型中 A20 对体内过度活化的 NF-κB 具有抑制效果,并对动物肝肺炎症损伤的保护作用[8-10]。在对 A20 的研究中 Klinkenberg 等[11]构建了一系列 A20 突变体表达质粒转染炎症细胞模型,发现 A20 对 NF-κB 的抑制功能主要取决于 C 末端的锌指结构,而且只含 A20 4 个锌指的突变体就可以起到与野生型 A20 相同的抑制作用。因此,本研究在前期研究的基础上采用计算机辅助药物分子设计方法,以天然 A20 蛋白上最小 NF-κB 活性抑制结构域为基础,删除了其中多余的氨基酸残基,并在关键位点上添加了一个有助于稳定锌指结构的氨基酸残基,利用柔性连接肽将 4 个改构的 C_2C_2 型锌指串联起来,并在其 N 端融合有跨膜引导序列,最终形成穿膜肽-以 4 分子半胱氨酸(Cys)结合一个 Zn 为特征结构的 NF-κB 抑制肽。为了提高重组载体构建的效率,我们先构建 pUC57-A20 mutant 真核表达载体,通过蓝白斑筛选、双酶切鉴定和 DNA 测序检测插入片段的基因序列,再将序列完全正确的插入片段回收并与真核表达载体 pEGFP-C1 连接,由于 TA 克隆的连接效率较高,在真核表达载体连接之前通过 TA 克隆可提高重组载体构建的成功率和准确性。经细胞转染、测序鉴定,成功获得了 A20 突变体。为后续研究 A20 突变体的功能提供依据。

慢性炎症可以促进癌症的发生和发展,并参与癌症的各个病理过程[12]。NF-κB 和 STAT3 可能是调控肿瘤细胞与炎性细胞交互作用的核心分子,是多条信号通路的枢纽分子,调控一系列细胞因子(TNF-α、IL-6、IL-1β) 的表达,从而维持炎性微环境,炎性细胞因子又可进一步诱导 NF-κB 和 STAT3 持续性活化[13]。

在 NF-κB 信号通路中,IκB(inhibitor of NF-κB)是核因子 κB(NF-κB)的抑制蛋白。当上游信号激活 IKK(IκB kinase)后,活化的 IKK 会泛素化、磷酸化并降解 IκB-α,使得 NF-κB 两个亚单位从失活状态活化,并从细胞质转移到细胞核内,与相应的炎症相关基因结合,启动炎性细胞因子转录,诱发炎症。我们实验中选取 IκB-α 作为研究指标,结果提示 A20 突变体能显著抑制 IκB-α 的降解,使得 NF-κB 的活化受抑制,不能启动炎性细胞因子转录。

ERKs、JNK 信号转导通路是 MAPK 通路的重要分支,ERKs 调节着细胞的增殖、分化和存活,ERK 和其信号途径在肿瘤侵袭和转移过程中起中介和放大信号的作用,一方面接受大量来自生长因子、丝裂原、环境刺激等的信号,另一方面通过 ERK 信号级联反应作用于核转录因子如 AP-1、NF-κB 等,调控基因表达;JNK 在细胞周期、生产、凋亡和细胞应激等多种生理和病理过程中起重要作用。本研究显示,A20 突变体能显著抑制 ERKs、JNK 的磷酸化,提示 A20 突变体在调节 NF-κB 信号通路,细胞增殖、凋亡方面发挥抑制作用。

TNF-α 是重要的炎性细胞因子,TNF-α 的慢性刺激可促进肿瘤细胞的生长及转移. 以卵巢癌为模型的研究[14]揭示,TNF-α 自分泌可刺激由细胞因子、促血管生成因子及趋化因子组成的“自分泌细胞因子网络”,从而诱导血管形成、髓系细胞浸润及 Notch 信号通路激活。白细胞介素是另一类存在于肿瘤微环境中的重要炎性细胞因子。研究发现,IL-6/STAT3 信号通路可协同 NF-κB 依赖的炎症信号,进一步诱导包括 IL-6 在内的一系列细胞因子的表达,促进肿瘤干细胞的形成[15]。Furukawa 等[16]研究胰腺癌发现,NF-κB 活性受抑,在体内外均可显著下调血管生成因子 VEGF 和 IL-6,减少肿瘤血管形成,从而限制肿瘤的生长和转移。我们选取 TNF-α、IL-6 作为研究指标,实验结果显示,LPS 刺激前列腺癌 PC-3M 细胞后,NF-κB 显著增高,细胞因子 TNF-α、IL-6 分泌显著增加,应用 A20 突变体能显著抑制 NF-κB 的表达,炎症因子 TNF-α、IL-6 的表达也被抑制($P<0.05$,$P<0.01$)。结果提示,A20 突变体通过抑制 NF-κB 信号通路,减少包括 TNF-α、IL-6 等细胞因子的释放,从而限制肿瘤的生长。

NF-κB 通路与肿瘤细胞凋亡密切相关,该通路的异常激活可导致一系列与肿瘤相关基因的异常表达,从而抑制肿瘤细胞凋亡,促进正常细胞转化以及肿瘤血管形成和转移等,直接影响肿瘤的发生和发展。Bcl-2 家族是在细胞凋亡中有重要作用的一类蛋白质。Bcl-2 家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一,在细胞凋亡信号转导途径中发挥重要作用。Lu 等[17]的研究证实在对 TNF-α 敏感的前列腺癌细胞系 PC-3 中,NF-κB 持续性激活可导致抗凋亡因子的分泌。我们实验结果显示,LPS 刺激前列腺癌 PC-3M 细胞后,NF-κB 显著增高,且凋亡抑制基因 Bcl-2 表达增强;应用 A20 突变体抑制 NF-κB 表达后,凋亡抑制基因 Bcl-2 表达同样受到抑制。提示 A20 突变体通过抑制 NF-κB 的表达下调了 Bcl-2 的分泌。

综上所述,我们构建的 A20 突变体可显著抑制肿瘤细胞 PC-3M 细胞 NF-κB 信号通路,减少细胞因子的释放,并可抑制凋亡抑制基因 Bcl-2 的分泌,从而达到抑制肿瘤的目的。这将为我们进一步研究 A20 抑制 NF-κB 对肿瘤的作用及调控机制奠定基础,并将为抗肿瘤药物的研发提供新靶点。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA

Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
[2] Lin Y, Bai L, Chen W, *et al*. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(1): 45-55.
[3] Zubair A, Frieri M. Role of nuclear factor-κB in breast and colorectal cancer[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2013, 13(1): 44-49.
[4] Gerlach B, Cordier S M, Schmukle A C, *et al*. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signaling[J]. Nature, 2011, 471(7340): 591-596.
[5] Shembade N, Ma A, Harhaj E W. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes[J]. Science, 2010, 327(5969): 1135-1139.
[6] Shembade N, Harhaj E W. Regulation of NF-κB signaling by the A20 deubiquitinase[J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9(2): 123-130.
[7] Sriskantharajah S, Ley S C. Cell biology. Turning off inflammation signaling[J]. Science, 2010, 327(5969): 1093-1094.
[8] 吴丽娟, 张雪莹, 陈伟, 等. 锌指蛋白A20对小鼠内毒素性肝损伤的保护作用研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 232-233, 240.
[9] 吴丽娟, 毕玉田, 李增鹏, 等. 锌指蛋白A20转基因预处理对小鼠内毒素血症肺组织炎症损伤的影响[J]. 中华创伤杂志, 2009, 25(2): 182-184.
[10] 吴丽娟, 陈潇, 冯建男, 等. 锌指蛋白A20突变体转基因小鼠脓毒症肺损伤研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(5): 435-438.
[11] Klinkenberg M, Van-Huffel S, Heyninck K, *et al*. Functional redundancy of the zinc fingers of A20 for inhibition of NF-kappaB activation and protein-protein interactions[J]. FEBS Lett, 2001, 498(1): 93-97.
[12] Kisielewski R, Tolwinska A, Mazurek A, *et al*. Inflammation and ovarian cancer--current views[J]. Ginekol Pol, 2013, 84(4): 293-297.
[13] 郭靓, 钱露, 郭宁. 炎症——肿瘤恶性演进的推手[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(3): 259-265.
[14] Kulbe H, Chakravarty P, Leinster D A, *et al*. A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment[J]. Cancer Res, 2012, 72(1): 66-75.
[15] Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, *et al*. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(30): 12425-12430.
[16] Furukawa K, Uwagawa T, Haruki K, *et al*. Nuclear factor κB activity correlates with the progression and prognosis of pancreatic cancer in a mouse model[J]. Surg Today, 2013, 43(2): 171-177.
[17] Lu T, Burdelya L G, Swiatkowski S M, *et al*. Secreted transforming growth factor beta2 activates NF-kappaB, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(18): 7112-7117.

(**收稿**:2013-08-07;**修回**:2013-10-19)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)01-0054-01

复方红豆杉胶囊治疗高龄肺癌1例

杨远游,程海民,穆晓峰,宁 健 (100039 北京,武警总医院肿瘤放疗中心)

[**关键词**] 复方红豆杉胶囊;高龄肺癌
[**中图法分类号**] R734.2 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,女性,75岁,以"胸闷、胸痛3个月,发现左肺鳞癌右肺门淋巴结转移1周"于2012年3月21日就诊我院。外院检查:2012年3月12日PET-CT示:左上肺高代谢肿块,考虑肺癌;右肺门淋巴结肿大伴代谢增高,考虑转移;3月14日左肺肿块穿刺活检病理示:鳞状细胞癌。入院时一般情况好,KPS评分80分,查体:左肺呼吸音粗,余无异常体征。2012年3月22日化验肿瘤标志物CY21-1升高,为5.09 ng/mL(参考值0~3.3 ng/mL),血常规、肝肾功能、凝血均正常。入院诊断:左肺鳞癌右肺门淋巴结转移,按UICC于2009年第7版肺癌分期[1],临床分期为$T_1N_3M_0$ⅢB期。2012年3月22日至4月5日行左肺上叶及右肺门淋巴结病灶局部立体定向放射治疗1疗程:DT 44 Gy/11f,5次/周,1次/d,4 Gy/次。治疗后1个月症状消失,6月7日复查CT示病灶完全消失;9月11日胸部CT示:右肺门淋巴结复发。给予复方红豆杉胶囊口服0.6 g 3/d,21 d为1疗程,连续每月1疗程给药。12月11日胸部CT示:右肺门淋巴结明显缩小,左肺放疗后纤维化瘢痕。此后患者自行将红豆杉胶囊减量至0.6 g 1/d,21 d为1疗程。2013年3月11日胸部CT示:右肺门淋巴结较2012年12月11日的稍增大,左肺放疗后纤维化瘢痕。2013年4月出现咳嗽、胸痛,4月12日胸部CT示:右肺门淋巴结较3月11日的明显增大,局部肿瘤复发,左肺放疗后纤维化瘢痕。随即恢复红豆杉胶囊正常剂量0.6 g 3/d,21 d为1疗程,每月连续用药。此后1个月症状明显好转,3个月症状消失。因患者感觉良好,2013年7月拒绝按期复查。10月16日胸部CT示:右肺门淋巴结再次缩小,化验CY21-1:2.68 ng/mL。其他部位影像学检查未见新发转移。右肺门区淋巴结放疗后复发行复方红豆杉胶囊治疗前后变化见图1。全治疗过程未出现药物相关毒性反应。患者从就诊我科至2013年10月末次复查只行1次放射治疗及口服复方红豆杉胶囊治疗,存活19个月,生活质量良好,KPS评分100分,查体无异常体征。

(下转72页)

[**通信作者**] 宁 健,电话:(010)57976644,E-mail:beijing-wj-2006@hotmail.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131225.1601.001.html(2013-12-25)