文章编号:1000-5404(2014)04-0369-06

论著

舒林酸下调 COX-2 和乙酰肝素酶对内皮祖细胞迁移趋化能力的影响

张龙辉[1],赵 玲[2],杨 鹰[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院妇产科[1];844200 新疆 疏勒,解放军第12医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨舒林酸抑制卵巢癌 SKOV-3 细胞环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达影响共培养体系中内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)迁移趋化能力的可能机制。**方法** 分离鉴定 EPCs;半定量 RT-PCR 检测不同浓度舒林酸分别作用不同时间后卵巢癌 SKOV-3 细胞中 COX-2 基因表达变化及 Western blot 检测 SKOV-3 细胞中 COX-2 蛋白表达变化;处理后 SKOV-3 细胞与 EPCs 共培养,观察 EPCs 迁移趋化能力;Western blot 和 ELISA 检测 SKOV-3 细胞中乙酰肝素酶(heparanase,HPA)含量。**结果** 半定量 RT-PCR 检测显示舒林酸对卵巢癌 SKOV-3 细胞 COX-2 基因抑制作用存在剂量-时间依赖性($P<0.05$);Western blot 结果显示 2 mmol/L 舒林酸作用 48 h 后卵巢癌 SKOV-3 细胞中 COX-2 蛋白水平显著降低($P<0.05$);共培养后实验组 EPCs 迁移趋化能力明显降低($P<0.05$);Western blot 结果分析显示 COX-2 与 HPA 表达呈显著正相关($r=0.977$,$P<0.01$)且迁移趋化能力与 SKOV-3 细胞表达 HPA 水平呈显著正相关($r=0.870$,$P<0.05$)。**结论** 舒林酸可能通过抑制卵巢癌 SKOV-3 细胞 COX-2 表达并下调 HPA 水平,降低 EPCs 的迁移趋化能力。

[关键词] 舒林酸;环氧化酶2;内皮祖细胞;乙酰肝素酶;迁移
[中图法分类号] R73-361;R737.31;R971.1 [文献标志码] A

Effects of sulindac on endothelial progenitor cell migration in ovarian cancer through regulating cyclooxygenase 2 and heparanase

Zhang Longhui[1], Zhao Ling[2], Yang Ying[1] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Gynecology and Obstetrics, No. 12 Hospital of PLA, Shule County, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 844200, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects of sulindac on endothelial progenitor cells (EPCs) migration by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression in ovarian cancer cell line SKOV-3. **Methods** EPCs were isolated and identified. SKOV-3 cells were treated with various concentrations of sulindac for different time periods. COX-2 mRNA level was detected by semi-quantitative RT-PCR. COX-2 protein level in SKOV-3 cells was detected by Western blotting. The migration of EPCs co-cultured with SKOV-3 cells were analyzed. Heparanase (HPA) protein level was detected by Western blotting and ELISA. **Results** Semi-quantitative RT-PCR demonstrated that COX-2 expression decreased in a dose- and time-dependent manner in SKOV-3 cells after treatment of sulindac ($P<0.05$). Western blotting demonstrated that the levels of COX-2 protein in SKOV-3 cells were reduced obviously 48 h after sulindac 2 mmol/L treatment ($P<0.01$). The migration of EPCs co-cultured with ovarian cancer cells which were treated with sulindac 2 mmol/L for 48 h was significantly lowered ($P<0.05$). Western blotting results indicated that COX-2 expression level had a positive correlation with HPA expression level ($r=0.977$, $P<0.01$), while cell migration also had a significant positive correlation with HPA protein level in SKOV-3 cells ($r=0.870$, $P<0.05$). **Conclusion** Sulindac may reduce the migration ability of EPCs by suppression of COX-2 and HPA expression.

[**Key words**] sulindac; cyclooxygenase 2; endothelial progenitor cells; heparanase; migration

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2008BB122). Corresponding author: Yang Ying, E-mail: yy630917@126.com

卵巢癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一,病死率高居生殖系统恶性肿瘤首位。其复发和转移是致死率居高不下的主要原因。研究表明,介导这些特性的关键因素是肿瘤血管生成[1]。肿瘤血管起源论认为肿瘤血管生成与内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)相关,EPCs 起源于骨髓或外周血,迁移定位至肿瘤组织,定向增殖分化、迁移形成毛细血管芽。肿瘤血管生成受多种因素调控,环氧化酶-

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB122)
[通信作者] 杨 鹰,E-mail:yy630917@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131129.1808.001.html(2013-11-29)

2(cyclooxygenase-2, COX-2)被认为是因素之一[2],在很多肿瘤组织中表达上调,与肿瘤的发生、发展、复发关系密切。研究表明,COX-2 在卵巢癌中呈高表达[3]。乙酰肝素酶(heparanase,HPA)作为人体唯一能降解硫酸乙酰肝素蛋白多糖的内源性酶,释放活性物质产生链式反应,可降解细胞外基质和基底膜,是肿瘤的侵袭、转移及肿瘤血管生成过程中的关键酶。如果能明确卵巢癌细胞 COX-2 表达受到抑制后 HPA 表达及 EPCs 的迁移能力受到何种影响,探讨舒林酸抑制 COX-2 表达是否可能通过 HPA 途径影响 EPCs 迁移趋化能力,为进一步研究环氧化酶抑制剂治疗卵巢癌血管生成提供帮助。因此本实验拟从人脐血中分离鉴定 EPCs,同时抑制卵巢癌细胞 SKOV-3 中 COX-2 表达及体外共培养技术探讨卵巢癌中 COX-2 受抑时对 EPCs 迁移趋化能力的影响,并关联分析 COX-2 表达、HPA 表达和迁移趋化能力之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜脐血标本来自新桥医院妇产科产房收住的健康足月妊娠产妇,采集前均经产妇或其家属知情同意。卵巢癌细胞(SKOV-3)为课题组在我院中心实验室冻存,EBM-2 培养液、EGM-2 Single Quots (Lonza 公司),RPMI1640 培养基、M199 培养基、0.25% 胰酶、青链霉素双抗、胎牛血清(Hyclone 公司)舒林酸(Sigma 公司),淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司),DiI-Ac-LDL、FITC-UEA-1、Matrigel matrix 基质胶、Transwell 共培养小室、鼠抗人单克隆 FITC-CD34、鼠抗人单克隆 FITC-CD133、鼠 FITC-lgG2a(BD 公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),COX-2 兔抗人抗体、TRITC 标记羊抗兔 IgG(Santa Cruz 公司),总蛋白提取试剂盒(SBS Genetech 公司),人 HPA ELISA 试剂盒(Bio-Swamp公司)等。

1.2 从脐血中分离 EPCs

取 50 mL 新鲜脐血(保存时间 2 h 内)与等量 HES-TBD550 液混合再与 1 份生理盐水混匀,静置 30 min,上清离心 1 100 r/min 20 min,向沉淀中加入 20 mL 全血及组织匀浆稀释液混匀,将混合液小心叠加于细胞分离液面上(混合液∶分离液 = 2∶1),2 500 r/min 15 min 后吸取白膜层至另一含 20 mL 细胞洗涤液的离心管内,重悬离心 1 800 r/min 20 min,重复 2 次;最后用 EGM-2MV 重悬并计数细胞,按 1×10^6 接种于培养瓶内,常规培养箱内培养;第 3 天换液,取未贴壁细胞于新培养瓶内培养。每 3 天换液 1 次。

1.3 鉴定 EPCs

1.3.1 不同培养时段细胞形态分析 于第 3、7、14 天行倒置相差显微镜观察体外培养的 EPCs 形态变化。

1.3.2 EPCs 功能分析 取早期细胞爬片,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;加入 10 μg/mL DiI-Ac-LDL,37 ℃避光孵育 1 h 后经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;4% 多聚甲醛固定 10 min;加入 10 μg/mL FITC-UEA-1, 37 ℃避光孵育 1 h 后经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;50% 甘油封片后激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.3.3 EPCs 表面标志物检测 取早期爬片细胞,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。依次加入阻断剂 20 μL、平衡液 80 μL,再分别加入 FITC-CD34、FITC-CD133 抗体,4 ℃避光孵育 30 min,后经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。最后在荧光显微镜下观察结果。

1.4 RT-PCR 检测舒林酸处理后 SKOV-3 细胞 COX-2 mRNA 表达

Trizol 法提取细胞总 RNA,首先逆转录成 cDNA 再进行聚合酶链反应。内参 β-actin 上游引物 5′-CAGGGCGTGATGGTGGGCA-3′,下游引物 5′-CAAACATCATCTGGGTCATCTTCTC-3′,产物大小 253 bp;COX-2 上游引物 5′-TCACAGGCTTCCATTGACCAG-3′,下游引物 5′-CCGAGGCTTTTCTACCAGA-3′,产物大小 198 bp。条件为:94 ℃预变形 1 min,94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,循环 30 次,72 ℃延伸 2 min。产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,成像后计算 COX-2 和内参 β-actin 的灰度值,以 COX-2/β-actin 的值表示目的基因相对表达量。

1.5 Western blot 检测舒林酸处理后 SKOV-3 细胞 COX-2 蛋白表达

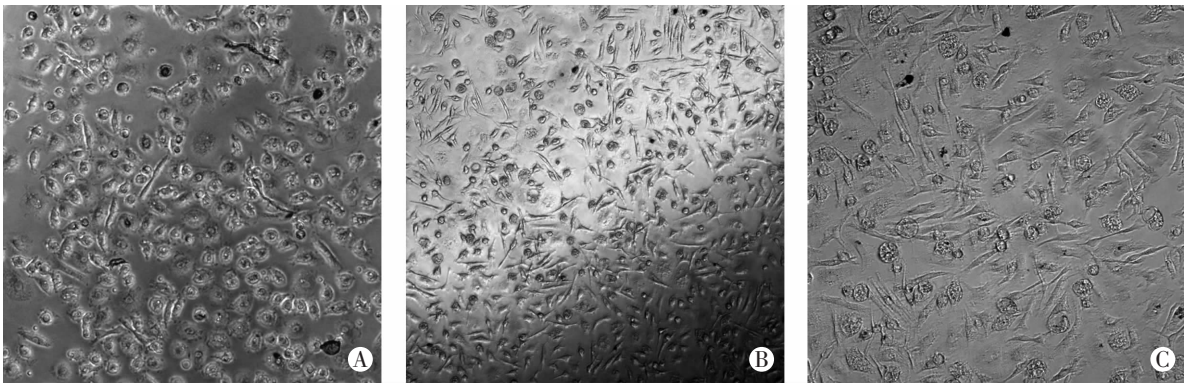
分别收集 1 mmol/L 舒林酸处理 48 h、2 mmol/L 舒林酸处理 36 h 和 48 h 后的卵巢癌 SKOV-3 细胞,裂解细胞,收集上清,测定蛋白浓度。调节蛋白样品上样量 50 μg 电泳,结束后湿法转至 PVDF 膜。37 ℃封闭 2 h 后一抗(1∶2 000 稀释)4 ℃孵育过夜,洗膜后加二抗(1∶2 000 稀释),孵育 37 ℃ 2 h,洗膜后加入显色剂显影 10 min,光密度值分析仪记录实验结果,分别计算目的蛋白 COX-2 和内参 GAPDH 的灰度值,以 COX-2/GAPDH 的值表示目的蛋白的相对表达量。

1.6 体外 SKOV-3 与 EPCs 共培养 EPCs 迁移趋化能力检测

取生长至第 7 天的 EPCs 经消化离心后 M199 重悬,4×10^4 个/孔接种于上室(孔径 8 μm)加 M199 培养基定容至 200 μL;下室分别加对数生长期卵巢癌 SKOV-3 细胞、舒林酸 2 mmol/L 作用 48 h 消化离心后 M199 重悬的卵巢癌 SKOV-3 细胞、仅加培养液 M199,加入细胞的量为 1×10^5,液体总量定容至600 μL。每组设 3 个复孔。37 ℃、5% CO_2 恒温箱孵育 24 h,棉签擦去上室未迁移过膜的细胞,4% 多聚甲醛固定 0.5 h,苏木精染色后倒置显微镜观察,每孔随机取 3 个视野计数迁移过膜的细胞数量,比较各组间迁移能力的变化。

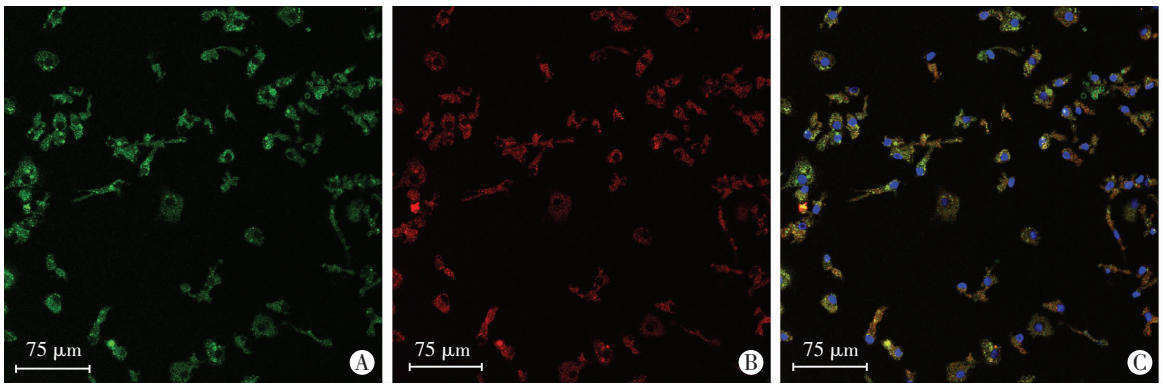
1.7 Western blot 检测 Transwell 实验中 SKOV-3 细胞 HPA 蛋白表达

分别收集对数生长期 SKOV-3 细胞、2 mmol/L 舒林酸处理 48 h 后的 SKOV-3 细胞,裂解细胞,收集上清,测定蛋白浓度。调节蛋白样品上样量 50 μg 电泳,结束后湿法转至 PVDF 膜。37 ℃封闭 2 h 后一抗(1∶2 000 稀释)4 ℃孵育过夜,洗膜后加二抗(1∶2 000 稀释),孵育 37 ℃ 2 h,洗膜后加入显色剂显影 10 min,光密度值分析仪记录实验结果,分别计算目的蛋白 HPA 和内参 GAPDH 的灰度值,以 HPA/GAPDH 的值表示目的蛋白的相对表达量。



A:第 3 天(×100);B:第 7 天(×100);C:第 14 天(×200)

图 1　光镜下不同时间点内皮祖细胞形态变化



A :摄取 FITC-UEA-1;B: 摄取 DiI-Ac-LDL;C:合成图像

图 2　共聚焦显微镜观察内皮祖细胞双染结果

1.8　ELISA 检测 Transwell 实验中 SKOV-3 细胞上清液中 HPA 含量

2 000 r/min 离心 20 min 收集细胞上清液后尽快实验(2 h 内)。每次实验中标准曲线的每个浓度均设置 2 个平行孔。加样孔分别设空白孔和待测样品孔,在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL,然后再加待测样品 10 μL,37 ℃温育 30 min,加满洗涤液静置 30 s 共 5 次,每孔加入酶标试剂 50 μL,空白孔除外,37 ℃温育 30 min,加满洗涤液静置 30 s 共 5 次,经显色、终止后以空白管调零,450 nm 波长依序测量各孔的光密度值[D(450)]。

1.9　统计学分析

采用 Quantity One 4.6.2 计算灰度值、IBM SPSS Statistics (Version 21)做统计分析,所有统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,RT-PCR 结果采用等重复多因素方差分析,其他组间比较应用 t 检验,COX-2 表达量、HPA 表达量与 EPCs 迁移数量采用 Pearson 相关分析。

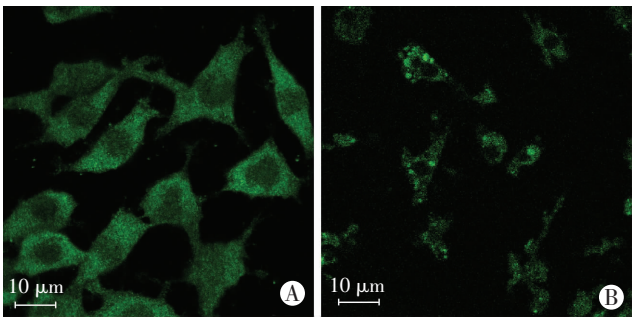
2　结果

2.1　EPCs 分离鉴定

2.1.1　EPCs 形态特性　　光镜观察 EPCs 形态,初期以圆形细胞为主,含有少量梭形细胞,且大多漂浮生长。3 d 后开始贴壁生长,一端突出,呈梭形(图 1A)。第 7 天开始形成集落,可见较多细胞团生长,中间是圆形细胞,外周贴壁梭形细胞包绕(图 1B)。第 14 天呈现铺路石形态,细胞团中央细胞仍呈圆形,外周梭形细胞逐渐转化为圆形生长(图 1C)。

2.1.2　EPCs 功能特性　　EPCs 具有摄取 FITC-UEA-1 和 DiI-Ac-LDL 的功能,摄取 FITC-UEA-1 能力呈阳性的细胞胞质呈绿色(图 2A),摄取 DiI-Ac-LDL 能力呈阳性的细胞胞质呈红色(图 2B),合成为双吞实验阳性细胞胞质呈橘黄色(图 2C)。双吞实验阳性为内皮祖细胞的功能特性,其阳性率(80.2 ± 4.3)%。

2.1.3　EPCs 表面标志物检测　　免疫荧光检测 EPCs 表面标志物 CD34、CD133 表达情况,经荧光显微镜观察 CD34、CD133 均呈阳性反应(图 3A、3B)。

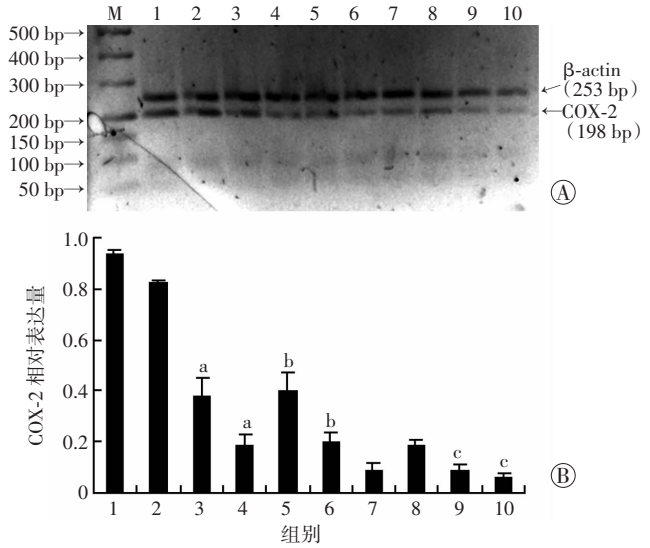


A:FITC-CD34 阳性;B:FITC-CD133 阳性

图 3　免疫荧光观察内皮祖细胞表面标志物表达

2.2 RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 表达

与对照组比较，舒林酸在此浓度和时间范围内可显著降低细胞中 COX-2 mRNA 水平（$P<0.05$），且存在明显的剂量-时间依赖性，24 h 组内 1、2 mmol/L 分别较 0.5 mmol/L 下调 59%、77%（$P<0.05$）；36 h 组内 1、2 mmol/L 分别较 0.5 mmol/L 下调 50%、78%（$P<0.05$）；48 h 组内 1、2 mmol/L 分别较 0.5 mmol/L下调52%、68%（$P<0.05$）。与对照组比较2 mmol/L-36 h 组、1 mmol/L-48 h 组和 2 mmol/L-48h 组抑制作用最显著（0.09±0.02）、（0.09±0.03）、（0.06±0.02）*vs*（0.94±0.01），$P<0.01$）。见图 4。

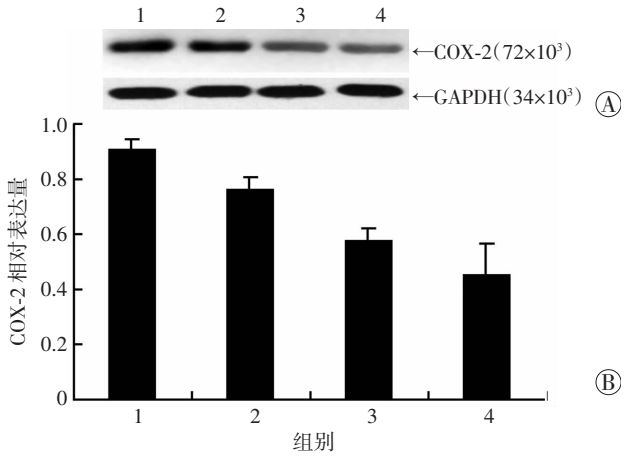


A：RT-PCR 检测结果；B：半定量分析结果　M：DNA 标准；1：对照组；2：0.5 mmol/L-24 h 组；3：1 mmol/L-24 h 组；4：2 mmol/L-24 h 组；5：0.5 mmol/L-36 h 组；6：1 mmol/L-36 h 组；7：2 mmol/L-36 h 组；8：0.5 mmol/L-48 h 组；9：1 mmol/L-48 h 组；10：2 mmol/L-48 h 组；a：$P<0.05$，与 0.5 mmol/L-24 h 组比较；b：$P<0.05$，与 0.5 mmol/L-36 h 组比较；c：$P<0.05$，与 0.5 mmol/L -48 h 组比较

图 4　RT-PCR 检测舒林酸处理后各组 SKOV-3 细胞 COX-2 mRNA 表达

2.3 Western blot 检测 COX-2 蛋白表达

采用 RT-PCR 结果中抑制作用最强的 3 个组合处理 SKOV-3 细胞，Western blot 结果显示：COX-2 表达较对照组显著降低（$P<0.05$）舒林酸 2 mmol/L 处理 48 h 后表达下降最显著（图 5）。



A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果　1：对照组；2：1 mmol/L-48 h 组；3：2 mmol/L-36 h 组；4：2 mmol/L-48 h 组

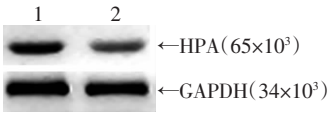
图 5　Western blot 检测舒林酸处理后各组 SKOV-3 细胞 COX-2 蛋白表达

2.4 共培养后 EPCs 迁移能力观察

Transwell 小室结果显示，各组 EPCs 能迁移过膜（图 6）。正常对照组（图 6A）较空白对照组（图 6C）中 EPCs 迁移能力强［（64±9）*vs*（21±6），$P<0.01$］，说明正常表达 COX-2 的 SKOV-3 细胞能增强内皮祖细胞的迁移能力；实验组（图 6B）较正常对照组（图 6A）中 EPCs 迁移能力弱［（31±7）*vs*（64±9），$P<0.01$］，说明 SKOV-3 细胞 COX-2 表达受抑制后降低内皮祖细胞的迁移能力；实验组（图 6B）和空白对照组（图 6C）比较有差异［（31±7）*vs*（21±6），$P<0.05$］，实验组内皮祖细胞迁移能力稍强。

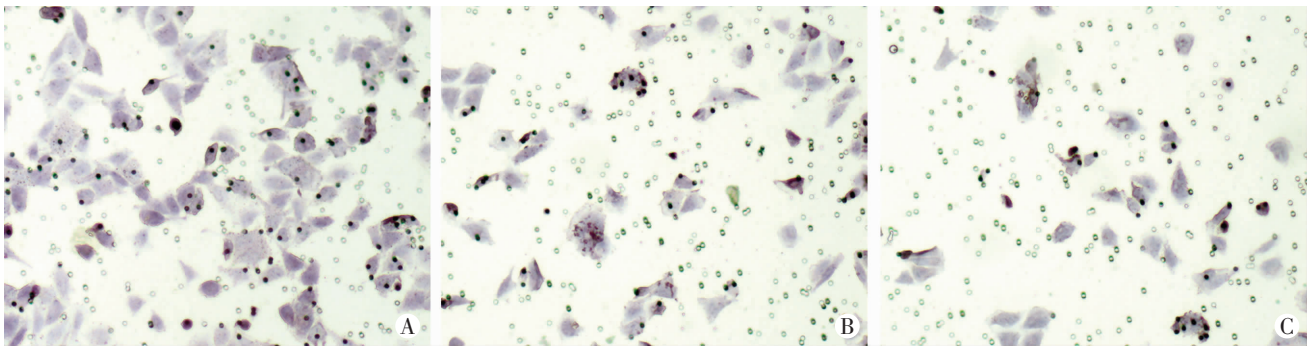
2.5 Western blot 检测 HPA 表达

收集 Transwell 小室实验条件下的 SKOV-3 细胞，行 Western blot 检测，结果显示：HPA 表达较对照组显著降低［（0.57±0.02）*vs*（0.24±0.04），$P<0.05$］。见图 7。



1：对照组；2：2 mmol/L-48 h 组

图 7　Western blot 检测 SKOV-3 细胞 HPA 蛋白表达



A：EPCs + 正常 SKOV-3；B：EPCs + 受抑 SKOV-3；C：EPCs + 等量培养基

图 6　Transwell 实验检测各组内皮祖细胞迁移能力（×400）

2.6 ELISA检测细胞上清液HPA含量

收集Transwell小室实验条件下的SKOV-3细胞上清液,行ELISA检测,结果显示:HPA含量较对照组显著降低[(49.12±3.49) *vs* (28.74±3.86) ng/mL,$P<0.05$]。

2.7 COX-2与HPA间及其HPA与迁移细胞数量间的Pearson相关分析

对相同条件下SKOV-3细胞所做的COX-2与HPA相对表达量Western blot结果进行Pearson相关分析,结果显示:[(0.83±0.03)、(0.47±0.04) *vs* (0.57±0.02)、(0.24±0.04),$r=0.977$,$P=0.001$],说明COX-2与HPA相对表达量显著相关($P<0.01$),具有一致性。Western blot检测HPA相对表达量与EPCs迁移数量用Pearson相关分析后显示:[(0.57±0.02)、(0.24±0.04) *vs* (64±9)、(31±7),$r=0.870$,$P=0.024$],说明HPA表达量与EPCs迁移数量呈显著正相关($P<0.05$)。

3 讨论

Asahara等[4]最早从外周血中分离得到EPCs。EPCs可来源于骨髓、脐血和外周血,脐血因其取材方便、EPCs含量高为较理想的内皮祖细胞的来源。因为EPCs没有发现较为稳定表达的特异性表面标记,其鉴定也有很大的差异。多数研究借助其多表面标记(CD133、CD34、VEGFR-2等)和双吞实验阳性(FITC-UEA-1 $^{+}$和DiI-Ac-LDL^{+})来完成鉴定。本实验也采用此法,结果与国内外已有文献[5-6]报道相一致。

近年来研究表明,COX-2不仅与病理生理有关,同时与肿瘤的发生、发展、复发也存在密切联系。对多种肿瘤的研究显示COX-2在其内高表达,其表达的强度与肿瘤的分期分级明显相关[7-8]。进一步研究显示,COX-2抑制剂不仅可抑制肿瘤细胞黏附侵袭[9],还可以明显抑制新生血管的生成[10]。Baek等[11]的研究也发现COX-2抑制剂NS-398通过抑制肿瘤血管生成来抑制老鼠肝癌移植瘤的生长。以上研究表明,COX-2在肿瘤发生、发展、复发中起重要作用,且其抑制剂在抗瘤血管生成方面也起重要作用。本实验采用环氧化酶抑制剂舒林酸处理卵巢癌SKOV-3细胞,舒林酸1999年在美国上市,作为非甾体抗炎药的一种,其作用为细胞环氧化酶抑制,通过COX-2等途径起作用。经处理的SKOV-3细胞与EPCs共培养以观察COX-2抑制后对内皮祖细胞在血管生成方面的功能影响。实验中,我们对卵巢癌细胞的舒林酸处理采用浓度时间阶梯状的分组方式,结果行"等重复多因素方差分析"得出药物与抑制率存在量效-时效关系。并找出抑制作用最强的3个浓度时间组合,用于进一步行Western blot检测其蛋白水平变化。结果发现,与对照组比较COX-2蛋白表达显著降低,舒林酸2 mmol/L处理48 h后表达下降最显著,与RT-PCR结果一致。进一步说明舒林酸处理卵巢癌SKOV-3细胞后COX-2在基因水平和蛋白水平都受到抑制,且COX-2抑制效果明显确切。Transwell小室共培养观察到卵巢癌细胞COX-2受抑后EPCs迁移能力明显减弱,且该趋势与卵巢癌细胞HPA表达量显著相关。综上所述,舒林酸可能通过抑制卵巢癌SKOV-3细胞COX-2表达从而下调HPA水平,降低EPCs的迁移能力。然而本实验未能明确舒林酸是通过何种途径(分子机制)影响HPA表达,同时还需要进一步证明舒林酸处理后COX-2与HPA相关关系,且应同时证明舒林酸处理后的SKOV-3细胞对EPCs其他生物学功能的影响。后续实验可从基因抑制与增强层面研究该影响的可能途径。

目前认为:血管生成因子与血管生成抑制因子之间平衡的破坏导致了肿瘤组织中新血管的生成[12]。我们推测在肿瘤组织的局部环境(肿瘤微环境)中,高表达COX-2打破此种平衡,可能会促进下游血管内皮生长因子等基因表达增加,募集骨髓来源的EPCs,定居于血管床;同时EPCs要迁移进入肿瘤组织,毛细血管基底膜和细胞外基质的降解是一个重要的过程[13]。研究发现,HPA是人体内唯一能够降解硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)的内切酶,在肿瘤细胞的侵袭、转移及肿瘤血管生成等过程中起着极其重要的作用[14]。实验中,我们也发现HPA表达量降低与EPCs迁移数量减少显著相关。

综上所述,COX-2在肿瘤的血管生成方面起重要作用。基于这一观点,本实验采用上市药物舒林酸抑制卵巢癌细胞COX-2表达,降低EPCs的迁移能力,且该作用可能与HPA有关,为卵巢肿瘤的临床预防和治疗提供新思路。

参考文献:

[1] Ma J X, Sun Y L, Wang Y Q, *et al*. Triptolide induces apoptosis and inhibits the growth and angiogenesis of human pancreatic cancer cells by downregulating COX-2 and VEGF[J]. Oncol Res, 2013, 20(8): 359-368.

[2] Rizzo M T. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(9/10): 671-687.

[3] Lee J Y, Myung S K, Song Y S. Prognostic role of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies[J]. Gynecol Oncol, 2013, 129(3): 613-619.

[4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[5] 王博, 王舒楠, 张伟国, 等. 人脐血内皮祖细胞体外扩增、鉴定和生物学活性[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1744-1748.

[6] Ong L L, Li W, Oldigs J K, *et al*. Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133^{+} cells[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(5): 1069-1081.

[7] Kuipers G K, Slotman B J, Wedekind L E, *et al*. Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2(COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration[J]. Int J Radiat Biol, 2007, 83(10): 677-685.

[8] Al-Maghrabi J, Buhmeida A, Emam E, *et al*. Cyclooxygenase-2 expression as a predictor of outcome in colorectal carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(15): 1793 - 1799.
[9] Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, *et al*. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is associated with lymph node metastasis[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 241 - 247.
[10] Zhu Y M, Azahri N S, Yu D C, *et al*. Effects of COX-2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 218.
[11] Baek J Y, Hur W, Wang J S, *et al*. Selective COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation in human hepatocellular carcinoma cell lines via cell cycle arrest[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8): 1175 - 1181.
[12] Ping Y F, Bian X W. Consice review: Contribution of cancer stem cells to neovascularization[J]. Stem Cells, 2011, 29(6): 888 - 894.
[13] Malinowski M, Pietraszek K, Perreau C, *et al*. Effect of lumican on the migration of human mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells: involvement of matrix metalloproteinase-14 [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50709.
[14] Ricci- Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, *et al*. Tumour vascularization *via* endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells [J]. Nature, 2010, 468(7325): 824 - 828.

(**收稿**:2013-10-06;**修回**:2013-10-29)
(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)04-0374-01

γδT细胞淋巴瘤/白血病1例

何蓉会,刘 林 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血液科)

[**关键词**] 淋巴瘤;T细胞;γδT细胞淋巴瘤;白血病
[**中图法分类号**] R733.7 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,23岁,因反复发热半个月,加重3 d于2012年9月22日入我科。入院前半月患者出现发热、畏寒、发热多在午后及夜间,伴盗汗,不伴皮肤瘙痒、无咳嗽、咳痰。入院前3 d类似症状再发,体温达40 ℃,在我科门诊查血常规:WBC 7.6×10^9,RBC 2.44×10^{12},Hb 85g/L,PLT 93×10^9,异形细胞13%,单核细胞18%,以炎琥宁、依替米星治疗,症状无缓解收入院。查体:体温37.5 ℃,血压96/68 mmHg,皮肤黏膜稍苍白,无皮疹及出血点,巩膜无黄染,颈部、锁骨上、腋窝、腹股沟未触及肿大淋巴结,腹软,肝脾肋缘下未扪及。实验室检查:血常规:WBC 6.47×10^9,Hb 79g/L,PLT 84×10^9,异常细胞12%,网织红细胞6.4%;生化:白蛋白27 g/L,总胆红素43.5 μmol/L,间接胆红素33.9 μmol/L,LDH 2069 U/L,钾3.1 mmol/L;降钙素原1.42 ng/mL,血沉100 mm/h,ASO 113 IU/mL(-),CRP 127 ng/mL,EBV-IgM(+),EBV-IgG(+);结核抗体阳性。超声:双侧腹股沟、颈部、左侧腋窝小的肿大淋巴结,肝稍大,脾大(长径129 mm,厚59 mm)。骨髓涂片:淋巴瘤细胞25%,提示淋巴瘤细胞白血病可能。骨髓流式分型:异常T淋巴细胞增殖,主要表达CD2、CD3、CD7、CD11b、CD11c、CD16、CD38、$TCR_{\gamma/\delta}$(dim),综合判断γ/δ-T淋巴瘤等相关T系淋巴瘤/白血病。诊断为γδT细胞淋巴瘤,淋巴瘤细胞白血病。

确诊后于9月25日起予ECHOP方案化疗(依托泊苷100 mg第1~3天,环磷酰胺1 000 mg第1天,表柔比星100 mg第1天,长春地辛3 mg第1天,地塞米松20 mg第1~5天),化疗期间体温正常,但化疗结束后体温迅速上升,10月10日复查骨髓涂片淋巴瘤细胞占5%,提示未达完全缓解。10月15起行VDLP方案诱导缓解(长春地辛4 mg第1、8、15、22天,依达比星10 mg第1~3天,培门冬酶3 750 IU第14、28天,地塞米松20 mg第1~7天,10 mg第8~21天,5 mg第22~28天),11月2日复查骨髓提示原幼淋巴细胞占10%,仍未达完全缓解。于11月20日予DHAP方案再次诱导缓解(顺铂120 mg第1天,阿糖胞苷1 500 mg每12小时1次,地塞米松40 mg第1~4天),化疗后复查骨穿示淋巴瘤细胞>80%,血涂片见10%异常细胞。多次诱导无缓解,瘤负荷高,全科多次讨论后考虑为难治性淋巴瘤细胞白血病,预后极差。与其姐姐配型亲缘全相合,经与家属沟通后要求行挽救性异基因造血干细胞移植。患者于12月19日进入层流病房,以FABCC方案预处理(氟达拉滨+阿糖胞苷+白舒菲+洛莫司汀+环磷酰胺),12月29-30日回输异体造血干细胞,予环孢素+短程甲氨蝶呤+丙种球蛋白+骁悉预防移植物抗宿主病。移植后造血重建顺利,移植第15天白细胞>0.5×10^9/L,第14天开始血小板>20×10^9/L持续3 d。移植后第22天并发出血性膀胱炎,给予水化、碱化尿液、膀胱冲洗等治疗好转。目前移植后随访近6个月,血象示轻度贫血,维持稳定,骨髓仍处于完全缓解。

2 讨论

根据T细胞受体不同,将T细胞分为两类:αβT细胞和γδT细胞。正常时仅少数T淋巴细胞为γδT细胞,分布于脾红髓、肝脏、骨髓和淋巴结的血窦和窦周隙中。γδT细胞淋巴瘤是一类少见的外周T细胞淋巴瘤,主要分为肝脾γδT细胞淋巴瘤(hepatosplenicγδT cell lymphoma,$HS_{\gamma\delta}$TCL)、皮肤γδT淋巴瘤、肠道γδT淋巴瘤、鼻腔γδT淋巴瘤,其中大部分为$HS_{\gamma\delta}$TCL[1-5]。$HS_{\gamma\delta}$T的临床特征:肝脾δT细胞淋巴瘤多见于青年男性,临床表现主要为发热,肝脾肿大,肝功能异常,外周血细胞减少(贫血、血小板减少多见),有并发Evans综合征的报道[6];骨髓早期受累,但淋巴结往往不受累。骨髓累及时可白细胞可升高,多伴盗汗及体质量减轻等B症状。

(下转380页)

[**通信作者**] 刘 林,E-mail:Liu17776@yahoo.com.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1458.015.html(2013-09-14)