论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1664-06

E2-2基因腺病毒载体的构建及其对EPCs生长、增殖及ID1表达的影响

刘晓丽,杨海捷,苏 勇,谭志胜,朱 琴,王 红 (650032 昆明,成都军区昆明总医院干部病房)

[摘要] **目的** 构建转录因子E2-2基因腺病毒载体,观测内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)过表达E2-2基因对DNA结合抑制因子-1(inhibitor of DNA binding/differentiation, ID1)表达的影响。**方法** 分离、培养并鉴定小鼠骨髓EPCs。RT-PCR法扩增E2-2基因CDs全长DNA,克隆入载体pTG19-T后,亚克隆入腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV中,构建pAdTrack/E2-2重组载体,与pAdEasy-1骨架质粒同源重组形成重组病毒pAd/E2-2,经293细胞包装,获具高效感染力的重组pAd/E2-2病毒。将该病毒感染EPCs,倒置显微镜观测经感染的EPCs的GFP表达情况。CCK-8(cell count kit-8)法检测病毒pAd/E2-2对EPCs生长、增殖的影响。RT-PCR、Western blot分别检测经感染的EPCs中E2-2与ID1基因及其编码蛋白的表达情况,并予以定量分析。**结果** 分离、培养并鉴定到小鼠骨髓EPCs。克隆到2013 bp的E2-2基因,并获得高效感染力的重组pAd/E2-2病毒。CCK-8法检测表明,与对照比较,过表达E2-2的EPCs的生长、增殖速度减慢,48 h开始变得尤为明显($P<0.01$);RT-PCR、Western blot及定量分析结果显示,E2-2能下调ID1的表达,与对照比较,差异具统计学意义($P<0.01$)。**结论** 分离、培养并鉴定小鼠骨髓EPCs,克隆出E2-2基因,证实E2-2能明显抑制EPCs的生长、增殖,并能下调ID1基因的表达。

[关键词] EPCs;E2-2基因;ID1基因;腺病毒

[中图法分类号] R322.12;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

Construction of adenovirus vector of E2-2 and its effects on expression of ID1, and growth and proliferation in endothelial progenitor cells

Liu Xiaoli, Yang Haijie, Su Yong, Tan Zhisheng, Zhu Qin, Wang Hong (Cadres' Wards, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan Province, 650032, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct an adenovirus vector of transcription factor E2-2 gene and investigate whether the adenovirus vector carrying E2-2 gene affects the expression of inhibitor of DNA binding/differentiation (ID1) in endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** Murine EPCs of bone marrow were isolated, cultured and identified. cDNA fragment encoding murine E2-2 gene was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR amplified fragment was first cloned into pTG19-T vector, and then sub-cloned into the shuttle vector pAdTrack-CMV in order to construct the recombinant plasmid pAdTrack/E2-2, which homologously recombined with the adenoviral backbone vectors Adeasy-1 to generate recombinant adenoviral plasmid Ad/E2-2. The recombinant adenoviruses Ad/E2-2 were generated by transfecting the recombinant adenoviral DNA into 293 cells, and then employed to infect EPCs. The expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the transfected EPCs were observed by invert microscopy. The growth and proliferation of transfected EPCs were tested *via* Cell Count Kit-8 (CCK-8), and the expression of E2-2 and ID1 in transfected EPCs were examined by RT-PCR and Western blotting respectively, and the expression of ID1 was semi-quantitated. **Results** Murine EPCs of bone marrow were isolated, cultured and identified. Murine E2-2 gene was successfully cloned. Adenoviral virus particle which possesses infectious competent was produced from Ad/E2-2. The results of CCK-8 demonstrated that the growth and proliferation of EPCs, which over-expressed E2-2, were slower than the control cells, especially from 48 h after transfection ($P<0.01$). The results of RT-PCR, Western blotting and quantitative analysis revealed that E2-2 down-regulated the expression of ID1 in EPCs when compared with control cells ($P<0.01$). **Conclusion** The recombinant adenoviral vector of E2-2 is constructed successfully. The vector containing E2-2 gene prevents the

[基金项目] 国家自然科学基金(81270224);国家自然科学基金青年基金(81000070)

[通信作者] 王 红,E-mail:wangh43@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140225.0923.005.html(2014-02-25)

EPCs from growth and proliferation and down-regulates the expression of ID1 in the cells.

[**Key words**] endothelial progenitor cells; E2-2 gene; inhibitor of DNA binding/differentiation gene; adenoviral vector

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81270224) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81000070). Corresponding author: Wang Hong, E-mail: wangh43@126.com

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管再生修复的主要细胞来源,移植EPCs促进血管再生修复是当今心血管研究领域的重要突破之一[1]。然而,EPCs在体外扩增十分困难,其有限的增殖能力已成为制约EPCs移植治疗的一大瓶颈[2]。因此,进一步促进EPCs体内外增殖潜能,对EPCs移植治疗血管损伤性疾病具有重要意义。EPCs的增殖分化在很大程度上受外界环境因素的影响,但最终是基因选择性表达的结果,可见,深入探讨EPCs的内在增殖调控机制具重要意义。

DNA结合抑制因子-1(inhibitor of DNA binding/differentiation, ID1)又名分化抑制因子-1,参与调控神经、血液等多个系统的增殖分化,是一类重要的增殖分化"开关"因子[3],能促进EPCs的增殖,是调控EPCs介导血管再生修复的关键因子之一[4-5],但其促进EPCs增殖的机制尚不清楚。

转录因子E2-2是促进干细胞分化的关键转录调控因子之一,能抑制成熟内皮细胞的增殖与迁移,能与血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2 ,VEGFR2)启动子特异性结合,抑制成熟内皮细胞中VEGFR2的表达。而VEGFR2又是调控EPCs增殖的VEGF的受体。因此,E2-2是促进,还是抑制EPCs的增殖? E2-2与ID1又存在怎样的作用关系,这些均不清楚。

因此,我们首先分离、培养与鉴定EPCs,构建E2-2基因的重组腺病毒载体,随后让该重组腺病毒载体携带E2-2基因转染EPCs,CCK-8法检测经转染的EPCs的生长、增殖情况,在mRNA与蛋白水平检测E2-2的表达变化,探讨其对EPCs的ID1表达的影响,以期为深入研究EPCs的内在增殖调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

EGM-2培养基套装(CC-3162,Clonetics™公司),红色荧光标记的DiI-Ac-LDL(BT-902, Biomedical Technologies Inc),绿色荧光标记的Lectin(Lectin from Ulex europaeus FITC Conjugate, L9006,SIGMA),F液、内皮祖细胞分离试剂盒(天津灏洋生物公司),RT-PCR试剂盒、限制性内切酶、*Taq*聚合酶、T_4 DNA连接酶、克隆载体pTG19-T(大连宝生物公司),X-tremeGENE 9基因转染试剂盒、胶回收试剂盒及质粒抽提试剂盒(Roche公司),载体腺病毒系统(Invitrogen公司),ID1(Millipore公司),E2-2鼠单抗(Santa Cruz公司),测序(上海捷瑞公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠EPCs的分离、培养与鉴定 参照文献[6-7]进行小鼠EPCs的分离培养。无菌条件下用F液冲洗获取的小鼠双下肢股骨和胫骨全骨髓细胞,反复轻柔混匀以制作单细胞悬液。用内皮祖细胞分离试剂盒从单细胞悬液中分离单个核细胞,操作按试剂盒说明书进行。

将分离得到的单个核细胞以1.5×10^6个细胞/mL接种于一次性塑料培养瓶,培养于EGM-2培养基(内含2%的FBS、rhEGF、氢化可的松、庆大霉素、两性霉素、VEGF、rhFGF-β、R3-IGF-1、抗坏血酸、肝素),于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度下培养,每2天换新鲜培养基1次。培养第8天传代后,同时用红色荧光标记的DiI-Ac-LDL与绿色荧光标记的Lectin染色予以鉴定。

1.2.2 E2-2基因的克隆、克隆载体pTG19-T/E2-2的构建与鉴定 设计E2-2基因的扩增引物,上游:5′-ATGCATCACCAACAGCGAAT-3′,下游:5′- TCACATCTGTCCCATGTGAT-3′。以小鼠胸腺组织总RNA为模板,RT-PCR法扩增E2-2基因的全长cDNA序列,反转录(RT)条件:30℃反应10 min与42 ℃反应30 min合成第1链cDNA;99 ℃反应5 min以灭活逆转录酶;5 ℃冷却5 min,1个循环。PCR反应条件:95 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s,58 ℃退火40 s,72 ℃延伸2 min 30 s,共32个循环,72 ℃延伸10 min。取PCR产物5 μL行0.7%琼脂糖凝胶电泳,确认PCR产物。将该PCR产物连入pTG19-T载体,行限制性内切酶*Bam*HⅠ酶切与测序鉴定,正确者命名为pTG19-T/E2-2载体。

1.2.3 E2-2基因腺病毒pAdTrack-CMV穿梭载体的亚克隆及鉴定 腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV[8]与pTG19-T/E2-2经限制性内切酶*Hind*Ⅲ、*Kpn*Ⅰ切割后,回收含pAdTrack骨架与E2-2片段,纯化后连接,用平板转化,挑取抗性克隆,培养并提取其质粒,行酶切(*Hind*Ⅲ、*Kpn*Ⅰ)与测序鉴定,正确者,命名为pAdTrack/E2-2。

1.2.4 腺病毒质粒pAdTrack/E2-2的同源重组、包装与滴度测定 pAdTrack/E2-2穿梭载体DNA经*Pme*Ⅰ酶线性化后、转入含超螺旋结构病毒骨架pAdeasy-1质粒的BJ5183感受态细胞中行同源重组,挑取抗性菌落,命名为pAd/E2-2,用*Pac*Ⅰ酶切割pAd/E2-2病毒质粒,并进行电泳检测。

以基因转染试剂X-tremeGENE 9介导纯化的pAd/E2-2质粒转染293T细胞进行病毒包装,荧光倒置显微镜下观察包装细胞的变化及绿色荧光蛋白(GFP)的表达等情况。

包装成功的pAd/E2-2病毒细胞,经5轮(第2轮开始,包装细胞经病毒上清感染,-80℃反复冻融)传代扩增,以提高病毒滴度,随后大量扩增,以倍比稀释法测定病毒滴度。

1.2.5 EPCs的重组腺病毒pAd/E2-2感染 按病毒液与培养液体积比1∶50感染接种于6孔板中的原代或第1代EPCs,37 ℃、5% CO_2及饱和湿度条件培养48~72 h,未感染的EPCs

作对照,荧光倒置显微镜观测 GFP 的表达情况,并拍照。

1.2.6 病毒 pAd/E2-2 对 EPCs 生长的影响 将原代分离的 EPCs 种植于 96 孔板(3 000 个细胞/150 μL/孔),5% CO_2,37 ℃与饱和湿度条件下培养 7 d 后,按病毒液与培养液体积比 1∶50 加入 pAd/E2-2 病毒液;分别以经空病毒感染及未感染的细胞作对照,单纯培养基为空白对照。分别于加病毒液后 24、48 h 与 72 h 取出 96 孔板,每孔更换新鲜培养液并加入 CCK-8(10 μL/孔),相同条件下再培养 3 h 后,振荡 30 s,混匀,酶标仪检测其 450 nm 波长处光密度,以其光密度值为 Y 轴,培养时间为 X 轴绘制各组细胞增殖曲线。此实验重复 3 次。

1.2.7 EPCs 中 E2-2 基因在 mRNA 水平对 ID1 基因表达的影响 分别设计 E2-2、ID1 与 β-actin 基因检测引物,E2-2 基因的上游引物:5′-ATGGCTGCCTTAGGGACGGACA-3′,下游引物:5′-AGGACCCTGAGCTACTTCTG-3′ 产物:157 bp;ID1 基因的上游引物:5′-CGAGGTGGTACTTGGTCTGTC-3′,下游引物:5′-GGTCCCTGATGTAGTCGAT-3′产物:218 bp;β-actin 基因的上游引物:5′-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3′,下游引物:5′-CCACAGGATTCCATACCCAA -3′ 产物 477 bp。以感染 pAd/E2-2 病毒 48 h 的 EPCs 总 RNA 为模板,RT-PCR 法在 mRNA 水平检测 E2-2 与 ID1 基因的表达情况,以空病毒感染 48 h 的 EPCs 总 RNA 为模板的同样检测作对照。以 β-actin 作内参。

1.2.8 EPCs 中 E2-2 在蛋白水平对 ID1 表达的影响 采用 Western blot 技术,将 1.2.6 中各组细胞总蛋白转移至硝酸纤维膜,分别浸于含 E2-3 鼠单抗(1∶500)与 ID1 鼠单抗(1∶800)封闭液中,4 ℃过夜,加辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔二抗(1∶300),室温孵育 1 h,25 ℃,与化学发光底物结合 8 min,拍照,β-actin(相对分子质量为 4.3×10^4)作为内参。

1.2.9 E2-2 影响 ID1 表达的定量分析 采用 Image-Pro Plus 专业图像分析软件(Media Cybernetics Inc, USA)对 1.2.6 中 mRNA 水平检测结果中的 ID1 表达情况进行灰度级(gray level, GL)定量分析,对 1.2.7 中蛋白水平检测结果中的 ID1 表达情况进行光密度值定量分析,以此量化 E2-2 对 ID1 表达的影响。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异行方差分析。

2 结果

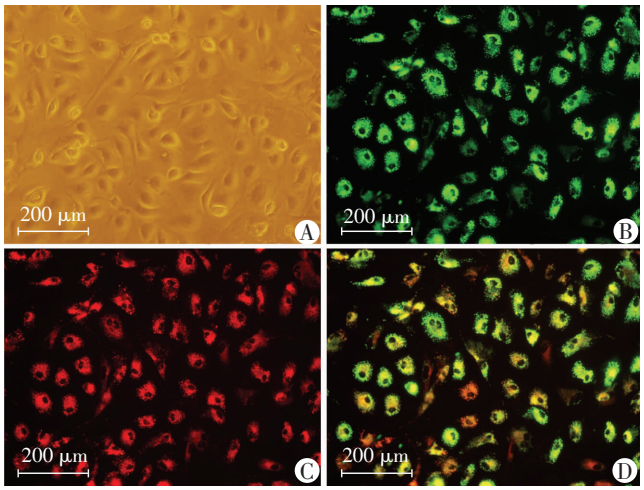
2.1 小鼠 EPCs 的分离、培养与鉴定

经内皮祖细胞分离液分离的骨髓单个核细胞,用内皮祖细胞培养基 EGM-2 培养 3 ~ 5 d,细胞呈“克隆”样生长。原代培养 6 ~ 9 d 及第 1 代培养 24 ~ 48 h 的细胞呈圆形、椭圆形、三角形、多边形,少部分细胞呈梭形(图 1A)。

倒置荧光显微镜观察显示,细胞摄入 Lectin 后,细胞质呈亮绿色(图 1B);摄入 DiI-Ac-LDL 后,细胞质呈红色(图 1C);两者同时摄入者,细胞质呈橙黄色或橙绿色(图 1D)。

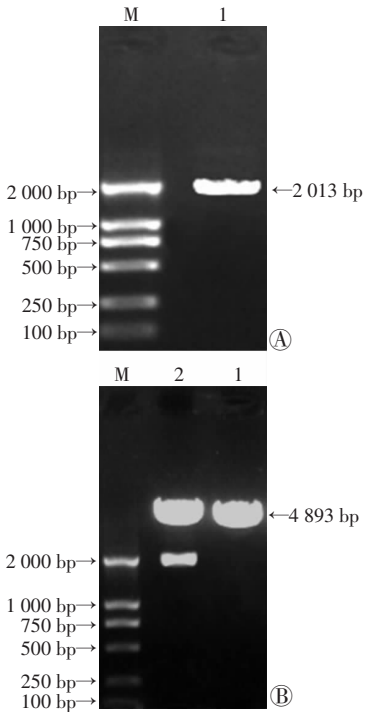
2.2 E2-2 基因的克隆及克隆载体 pTG19-T/E2-2 的构建与鉴定

采用 RT-PCR 法,以小鼠胸腺组织总 RNA 为模板扩增到 2 013 bp 的小鼠 E2-2 基因 CDs 全长 DNA 片段(图 2A)。*Bam*HⅠ酶切克隆载体 pTG19-T/E2-2,电泳可见切下 2 031 bp 含 E2-2 的目的片段(图 2B)。测序证实,克隆到的 E2-2 基因与 GenBank 发布的完全一致。



A:EPCs;B:EPCs + DiI-Ac-LDL;C:EPCs + Lectin;D:融合图

图 1 内皮祖细胞的荧光标记染色鉴定



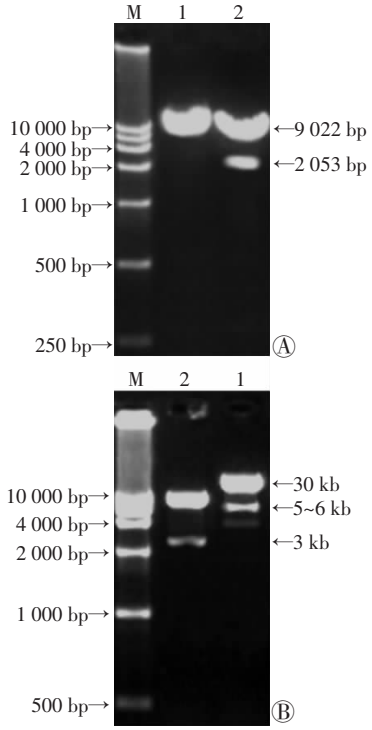
A:小鼠 E2-2 基因 PCE 产物的电泳鉴定 M:DNA 标准(DL2000),1:E2-2;B:重组原核质粒 pTG19-T/E2-2 的酶切鉴定 M:DNA 标准(DL2000) 1:pTG19-T/E2-2 质粒 DNA;2:*Bam*HⅠ酶切 pTG19-T/E2-2 质粒 DNA

图 2 小鼠 E2-2 基因的克隆及其原核质粒构建

2.3 E2-2 基因向腺病毒 pAdTrack-CMV 穿梭载体的亚克隆、鉴定及同源重组

克隆载体 pTG19-T/E2-2 经 *Kpn*Ⅰ、*Hind*Ⅲ酶切下的 E2-2 片段被亚克隆入腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 后形成 pAdTrack/E2-2 重组子,该重组子再经 *Kpn*Ⅰ、*Hind*Ⅲ酶切鉴定,电泳显示切下 2 053 bp 的目的片段(图 3A)。测序表明,重组腺病毒 pAdTrack/E2-2 穿梭载体得以成功构建。

病毒穿梭载体 pAdTrack/E2-2 经 *Pme* Ⅰ酶线性化、转入含 pAdeasy-1 病毒骨架载体的感受态菌 BJ5183 中行同源重组，挑取阳性克隆（命名 pAd/E2-2），*Pac* Ⅰ酶切 pAd/ E2-2，电泳见约 30 000 bp 与 5 000 ~ 6 000bp 的片段，*Pac* Ⅰ酶切假阳性克隆 DNA，电泳见约 3 000 bp 的片段（图 3B），说明同源重组成功。



A：重组腺病毒穿梭载体 pAdTrack/E2-2 的酶切鉴定　M：DNA 标准（DL10000），1：pAdTrack/E2-2 质粒 DNA；2：*Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切 pAdTrack/E2-2 质粒 DNA；B：重组腺病毒载体 pAd/E2-2 的酶切鉴定　1：*Pac* Ⅰ酶切 pAd/E2-2 DNA；2：*Pac* Ⅰ酶切假阳性克隆 DNA；M：DNA 标准（DL2000）

图 3　重组腺病毒载体的构建

2.4　腺病毒质粒 pAd/E2-2 的包装与滴度测定

重组腺病毒 pAd/E2-2 经 293 细胞（图 4A）包装后 48 h，倒置荧光显微镜观察见明显的 GFP 表达（图 4B），包装后 7 d，胞体呈变圆、肿胀、脱离壁，核增大等改变。病毒细胞经 5 轮传代与扩增以提高其滴度，随后大量扩增，以倍比稀释方法检测到病毒滴度为 6×10^7 TU/mL。

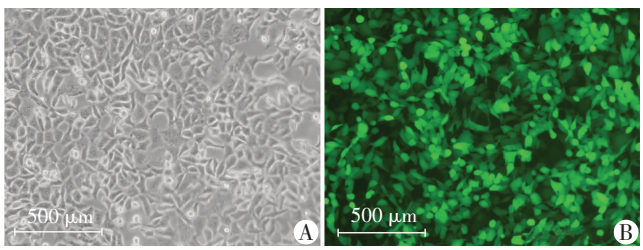


图 4　倒置显微镜下正常 293 细胞（A）与包装有 pAd/E2-2 病毒的 293 细胞（B）GFP 表达

2.5　EPCs 的 pAd/E2-2 病毒感染

未感染 pAd/E2-2 病毒的 EPCs 不表达 GFP（图 5A），经 pAd/E2-2 病毒感染的第 1 代 EPCs，倒置荧光显微镜观测到 GFP 的明显表达（图 5B）。

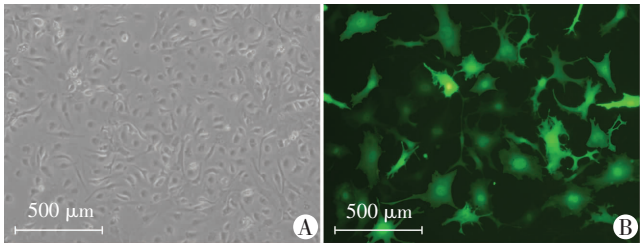
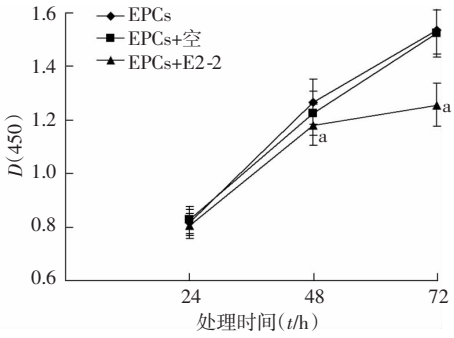


图 5　倒置显微镜下未感染的 EPCs（A）与 pAd/E2-2 感染的 EPCs（B）GFP 表达

2.6　病毒 pAd/E2-2 对 EPCs 生长的影响

CCK-8 法检测显示，经 pAd/E2-2 病毒液感染的 EPCs 的生长、增殖慢于未感染或经空病毒感染的 EPCs，48 h 开始变得尤为明显（$P<0.01$，图 6）。

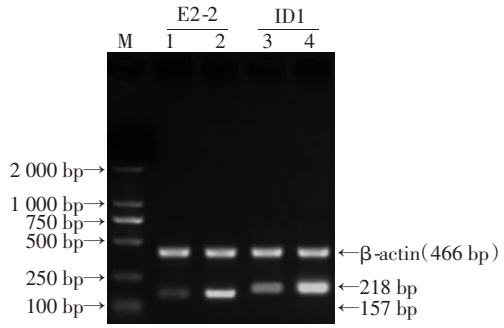


a：$P<0.01$，与各对照组比较

图 6　CCK-8 法检测 E2-2 对 EPCs 生长、增殖的影响

2.7　EPCs 中 E2-2 基因在 mRNA 水平对 ID1 基因表达的影响

以感染 pAd/E2-2 病毒 48 h 的 EPCs 总 RNA 为模板，在 mRNA 水平检测到 E2-2 基因的较强表达与 ID1 基因的较弱表达，以空病毒感染 48 h 的 EPCs 总 RNA 为模板的相同检测结果则相反（图 7）。提示，EPCs 中 E2-2 基因在 mRNA 水平能下调 ID1 基因的表达。

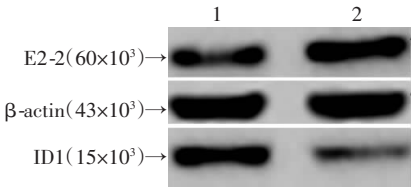


M：DNA 标准（DL2000）；1、4：空病毒感染的 EPCs；2、3：Ad/E2-2 病毒感染的 EPCs

图 7　EPCs 细胞中 E2-2 基因在 mRNA 水平对 ID1 基因表达的影响

2.8　EPCs 中 E2-2 在蛋白水平对 ID1 表达的影响

Western blot 检测感染 pAd/E2-2 病毒 48 h 的 EPCs，在相对分子质量 6.0×10^4 处出现较强的 E2-2 抗原染色条带；而在相对分子质量 1.5×10^4 处出现的 ID1 抗原染色条带则较弱。以空病毒感染 48 h 的 EPCs 相同检测结果则相反（图 8）。由此提示，EPCs 中，E2-2 在蛋白水平能下调 ID1 的表达。



1:空病毒感染的EPCs;2:Ad/E2-2病毒感染EPCs

图8 Western blot检测EPCs中E2-2在蛋白水平对ID1表达的影响

2.9 E2-2影响ID1表达的定量分析

被感染的EPCs中,E2-2能在mRNA水平与蛋白水平明显下调ID1的表达(表1)。

表1 被感染的EPCs中ID1表达的定量分析($\bar{x} \pm s$)

组别	mRNA水平	蛋白水平
空病毒感染的EPCs	210.404±9.315	1.003±0.043
Ad/E2-2病毒感染的EPCs	153.614±6.425[a]	0.268±0.010[a]
β-actin	194.218±8.034	1.086±0.066

a:$P<0.01$,与空病毒感染的EPCs及β-actin比较

3 讨论

血管发生(vasculogenesis)和血管生成(angiogenesis)是心血管形成的两基本过程,依赖于完全分化的内皮细胞的增殖、迁移和重塑。EPCs是成熟血管内皮细胞的前体细胞,包括从成血管母细胞到成熟内皮细胞之间的多个阶段的细胞,有旺盛的增殖分化能力,可向血管新生部位趋化并分化成为成熟内皮细胞[9]。EPCs与血管生成密切相关,在临床各种缺血性疾病、血管损伤及动脉粥样硬化等方面有着广阔的应用前景。

EPCs存在于骨髓、脐血、胚胎组织和外周血中,特别是在骨髓中。我们用EPCs分离试剂从小鼠骨髓分离到的EPCs,经特制培养基EGM-2培养3~5 d,大多细胞呈"克隆"样生长。原代培养6~9 d及第1代培养24~48 h的细胞呈圆形、椭圆形、三角形、多边形,少部分细胞呈梭形。荧光染色剂鉴定显示,细胞摄入Lectin后,细胞质呈亮绿色,摄入DiI-Ac-LDL后,细胞质呈亮红色,两者同时摄入者,细胞质呈橙黄色或橙绿色。然而,EPCs的体外扩增相当不易,其增殖能力有限,严重制约了其在临床中的广泛应用。EPCs的增殖受多种蛋白的共同作用,其调控基因种类繁多,ID1、E2-2是其中较重要者。

ID1是HLH转录因子家族成员,因缺乏HLH二聚体功能区外碱性DNA结合域,通过形成无功能异二聚体而发挥负性转录调控作用。ID1参与调控表皮、肌肉、神经、血液、淋巴等多个系统的增殖分化,是一类重要的增殖分化"开关"因子[3]。ID1与血管系统发育密切相关[10-12]。ID1基因敲除小鼠表现明显的血管畸形和分叉障碍,导致胚胎死亡;血管生长因子VEGF和TGF-β诱导ID1在EPCs和成熟内皮细胞表达;敲除ID1基因后外周血EPCs的数量明显减少,EPCs介导的血管新生也被显著抑制,但ID1怎样作用于EPCs增殖的调控,目前尚不清楚。

E2-2又名TCF4,属HLH转录因子家族成员之一,在人体及大、小鼠体内的表达极为普遍[13]。通常以二聚体形式识别并结合到特异的DNA片段——E盒子(CANNTG)序列。既往研究认为,转录因子E2-2在淋巴细胞、神经系统发育中发挥关键调控作用,是促进干细胞分化的关键转录调控因子。新近研究[14]发现,E2-2能抑制成熟内皮细胞的增殖、迁移和管样形成,抑制内皮细胞介导的血管新生,敲除E2-2后内皮细胞增殖、血管新生明显增强。E2-2还能与VEGFR2启动子特异性结合,抑制成熟内皮细胞中VEGFR2的表达。VEGFR2是EPCs的特异性分子表面标记,同时也是调控EPCs增殖以及内皮细胞多种生物学功能的关键生长刺激因子VEGF的受体。E2-2是促进,还是抑制EPCs的增殖?在EPCs中,E2-2与ID1又存在怎样的作用关系?这些均不清楚。因此,我们分离、培养并鉴定了EPCs。随后克隆了E2-2基因,并证实腺病毒能介导该基因转染EPCs。CCK-8法检测表明,与对照比较,E2-2能明显抑制EPCs的生长、增殖。mRNA与蛋白水平检测及其定量分析结果显示,EPCs过表达E2-2 48 h,ID1的表达受到下调。因ID1能促进EPCs增殖,下调的ID1将抑制EPCs的生长、增殖,提示,E2-2通过下调ID1的表达可能在抑制EPCs增殖的过程中发挥一定作用,可能为深入探讨EPCs的内在增殖调控机制奠定了一定的基础。

参考文献:

[1] Wassmann S, Werner N, Czech T, *et al*. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells[J]. Circ Res, 2006, 99(8): e74-e83.

[2] Wohrle J, Birkemeyer R, Markovic S, *et al*. Prospective randomised trial evaluating a paclitaxel-coated balloon in patients treated with endothelial progenitor cell capturing stents for de novo coronary artery disease [J]. Heart, 2011, 97(16): 1338-1342.

[3] Edwards L A, Fine H A. The Ids have it[J]. Cancer Cell, 2010, 18(6): 543-545.

[4] Lyden D, Hattori K, Dias S, *et al*. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth[J]. Nat Med, 2001, 7(11): 1194-1201.

[5] Wang H, Yu Y, Guo R W, *et al*. Inhibitor of DNA binding-1 promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells *in vitro* [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 335(1/2): 19-27.

[6] Sekiguchi H, Ii M, Jujo K, *et al*. Improved culture-based isolation of differentiating endothelial progenitor cells from mouse bone marrow mononuclear cells[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28639.

[7] Ii M, Nishimura H, Iwakura A, *et al*. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity[J].

Circulation, 2005, 111(9): 1114 – 1120.
[8] 李莹, 刘淑丹, 杨彦春, 等. 去甲基化酶腺病毒载体构建及其在人颌下腺细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(22): 2349 – 2352.
[9] Morris L M, Klanke C A, Lang S A, *et al*. Characterization of endothelial progenitor cells mobilization following cutaneous wounding[J]. Wound Repair Regen, 2010, 18(4): 383 – 390.
[10] Gao D, Nolan D J, Mellick A S, *et al*. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis[J]. Science, 2008, 319 (5860): 195 – 198.
[11] Gao D, Nolan D, McDonnell K, *et al*. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796 (1): 33 – 40.
[12] Nishiyama K, Takaji K, Kataoka K, *et al*. Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis[J]. Circulation, 2005, 112 (18): 2840 – 2850.
[13] Lazorchak A, Jones M E, Zhuang Y. New insights into E-protein function in lymphocyte development[J]. Trends Immunol, 2005, 26 (6): 334 – 338.
[14] Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, *et al*. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis [J]. Blood, 2010, 115(20): 4138 – 4147.

(**收稿**:2013-12-25;**修回**:2014-01-27)
(编辑　王　红)

文章编号:1000-5404(2014)16-1699-01

个案与短篇

达芬奇机器人辅助的腔镜甲状腺瘤切除 1 例

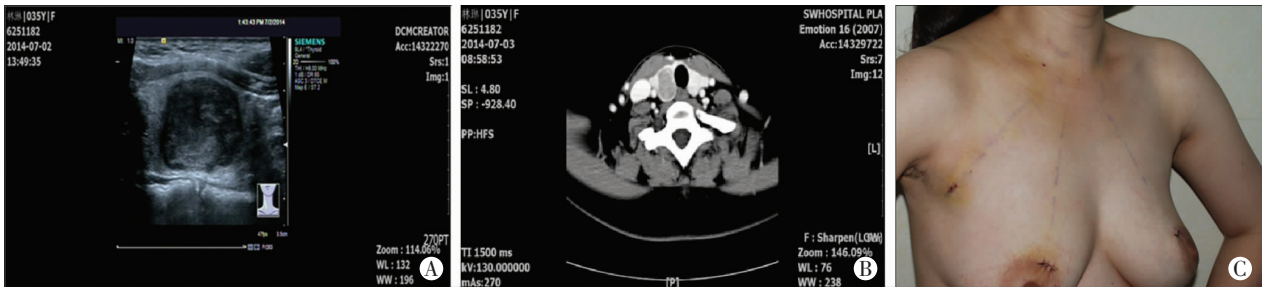
范林军,姜　军,马银斌,崔　翔　　(400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心)

[**关键词**]　达芬奇机器人辅助手术;甲状腺瘤
[**中图法分类号**]　R653　　[**文献标志码**]　B

达芬奇机器人手术于 2000 年开始被美国 FDA 批准用于临床后,机器人辅助下的腔镜手术在发达国家已广泛开展。第 1 例机器人辅助的甲状腺腔镜手术于 2005 年由美国的 Lobe[1] 首先报道,之后在甲状腺外科机器人辅助手术已用于治疗多种甲状腺疾病[2]。我国引进的机器人设备尚不多,且应用机器人操作的手术以胸腔和腹腔手术为主,而在甲状腺手术仍应用较少。本科于 2014 年 7 月 8 日开展了达芬奇机器人辅助的腔镜甲状腺瘤切除术 1 例,现报告如下。

1　临床资料

患者,女性,35 岁,2014 年 7 月 5 日因发现右侧甲状腺肿物 7 d 入院。查体发现右侧甲状腺中上极可触及一大小约 2 cm×2 cm× 2 cm 大小的肿物,质地中等,边界清楚,表面光滑,活动度可,可随吞咽动作上下活动。辅助检查:彩超和 CT 均提示右侧甲状腺实性占位,良性可能性大(图 1A、B)。初步诊断:右侧甲状腺瘤。术前检查未发现手术禁忌证,经充分术前准备后于 2014 年 7 月 8 日在全麻下采用腋窝和乳晕联合入路完成达芬奇机器人辅助下的腔镜右侧甲状腺瘤切除术。术前标记手术径路、肿瘤位置以及颈部皮瓣游离范围。常规消毒铺巾后于手术径路局部注射肾上腺素盐水(1∶20 万),经标记的切口置入 Trocar 沿皮下建立隧道至胸骨上窝会师,将机械臂与Trocar 相连接,安装专用的抓钳和超声刀。助手穿无菌手术衣在手术床旁协助操作。术者在操作台远程控制机械臂进行手术操作。术中在腔镜下游离颈部皮瓣范围与常规腔镜手术一致,切开颈白线后于体外置入专用拉钩牵开右侧带状肌,显露右侧甲状腺,探查见肿瘤位于右侧甲状腺中下极。游离甲状腺表面的被膜后用超声刀完整切除甲状腺肿瘤及周围部分甲状腺组织。术中冰冻切片检查及术后病理均诊断为甲状腺瘤。手术时间约 120 min,术中出血约 80 mL,术后无声音嘶哑、口唇及手足麻木。术后第 2 天可下床并恢复颈部正常活动。术后第 5 天拔除引流管出院。患者对术后颈部外观很满意(图 1C)。



A:术前彩超示甲状腺右侧叶中下份探及范围 26 mm×18 mm×18 mm 的低回声,边界清,有声晕,CDFI:其内可见较丰富的血流信号,考虑:甲状腺右侧叶低回声,腺瘤? B:CT 示右侧甲状腺体积稍大,其内可见结节状稍低密度影,最大截面测得约 2.1 cm×1.6 cm,增强后可见不均匀异常强化。提示:右侧甲状腺内结节状稍低密度影;C:术后第 5 天观胸前及颈部无明显肿胀

图 1　达芬奇机器人辅助的腔镜甲状腺瘤切除术前与术后观察

[**通信作者**]　姜　军,E-mail:jcbd@ medmail. com. cn
[**优先出版**]　http://www. cnki. net/kcms/detail/51. 1095. R. 20140807. 1616. 017. html(2014-08-07)

(下转 1673 页)