[20] 卢秀兰, 左超, 仇君, 等. 重症手足口病患儿死亡风险评估模型的建立[J]. 中国循证儿科杂志, 2015, 10(4): 250-254.
[21] KRUSE O, GRUNNET N, BARFOD C. Blood lactate as a predictor forin-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review [J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2011, 19: 74. doi: 10.1186/1757-7241-19-74.
[22] 卢秀兰, 吴琼, 肖政辉, 等. 连续性血液滤过治疗重症手足口病心肺衰竭患儿的临床研究[J]. 中国小儿急救医学, 2015, 22(3): 145-149.
[23] 王美芬, 杜曾庆, 陈韬, 等. 不同危重程度手足口病患儿儿茶酚胺、S-100蛋白和D-乳酸水平变化的研究[J]. 中华传染病杂志, 2016, 34(5): 302-303.
[24] CHANG L Y, HSIA S H, WU C T, et al. Outcome of EV71 infections with or without stage-based management [J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(4): 327-332.

(编辑:邓境)
(收稿日期:2019-09-18　修回日期:2019-12-13)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.05.002

·论著·

神经母细胞瘤中八聚体结合转录因子4的表达及与瘤细胞侵袭转移的关系初探

李晓英[1],叶向梅[2],张瑛[1],柯海燕[1],范俊杰[1](1.杭州市临安区人民医院,浙江杭州　311300;2.哈尔滨医科大学附属第一医院,黑龙江哈尔滨　150001)

[摘要]**目的**:观察八聚体结合转录因子4(Oct4)在神经母细胞瘤中的表达情况,并探讨其与神经母细胞瘤转移和侵袭的关系。**方法**:采用免疫组织化学方法和RT-PCR方法检测神经母细胞瘤组织及癌旁组织中Oct4的表达情况。收集患者临床病理参数,分析Oct4表达与神经母细胞瘤临床病理参数之间的关系。采用电穿孔转染法,将Oct4 siRNA转入神经母细胞瘤SK-N-MC细胞中,通过伤口愈合实验和Boyden小室检测Oct4对神经母细胞瘤SK-N-MC细胞转移和侵袭能力的影响。**结果**:神经母细胞瘤组织中Oct4的表达水平高于癌旁组织($P<0.05$)。Oct4的阳性表达率与患者有无淋巴结转移和分化程度密切相关($P<0.01$),但与患者性别、年龄、肿瘤大小和临床病理分期均无明显关系($P>0.05$);转染Oct4 siRNA可显著抑制神经母细胞瘤SK-N-MC细胞的转移和侵袭能力($P<0.01$)。**结论**:Oct4具有促进神经母细胞瘤转移和侵袭的作用,其高表达可能与神经母细胞瘤的发生和发展密切相关。

[关键词]八聚体结合转录因子4;神经母细胞瘤;转移;侵袭
[中图分类号]R726.5　　[文献标识码]A　　[文章编号]1672-108X(2020)05-0004-04

Expression of Octamer-Binding Transcription Factor 4 in Neuroblastoma and Its Correlation with Invasion and Metastasis of Tumor Cells

Li Xiaoying[1], Ye Xiangmei[2], Zhang Ying[1], Ke Haiyan[1], Fan Junjie[1](1. *Hangzhou Lin'an District People's Hospital, Zhejiang Hangzhou* 311300, *China*; 2. *The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang Harbin* 150001, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the expression of octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) in neuroblastoma, and probe into its correlation with metastasis and invasion of neuroblastoma. **Methods**: The expression of Oct4 in neuroblastoma tissues and paracancerous tissues was detected by immunohistochemistry and real-time PCR (RT-PCR). The clinicopathological parameters of the patients were collected, and the correlation between expression of Oct4 and clinicopathological parameters of neuroblastoma was analyzed. The electroporation transfection method was used to transfer Oct4 siRNA into neuroblastoma SK-N-MC cells. Effects of Oct4 on metastasis and invasion of neuroblastoma SK-N-MC cells were detected by wound healing assay and Boyden chamber. **Results**: The expression level of Oct4 in neuroblastoma tissues was higher than that in paracancerous tissues ($P<0.05$). The positive expression rate of Oct4 was closely related to the presence or absence of lymph node metastasis and differentiation ($P<0.01$), but it is not significantly related to patient's gender, age, tumor size and clinical pathological stage ($P>0.05$). Transfection of Oct4 siRNA can significantly inhibit the metastasis and invasion of neuroblastoma SK-N-MC cells ($P<0.01$). **Conclusion**: Oct4 can promote the metastasis and invasion of neuroblastoma, and its high expression may be closely related to the occurrence and development of neuroblastoma.

[**Keywords**] octamer-binding transcription factor 4; neuroblastoma; metastasis; invasion

基金项目:黑龙江省卫生计生委科研课题,编号2014-275。
作者简介:李晓英(1979.10-),女,硕士,主管技师,主要从事免疫诊断技术研究,E-mail: lixiaoying-1979@163.com。
通讯作者:叶向梅(1979.08-),女,硕士,助理研究员,主要从事免疫诊断技术研究,E-mail: 190015711@qq.com。

神经母细胞瘤是小儿常见的颅脑外恶性实体肿瘤，占小儿恶性肿瘤的 10%[1-2]。对于患有高危型神经母细胞瘤的患者，尽管采用如手术治疗、放(化)疗、造血干细胞移植和免疫治疗等多种治疗方法，但预后仍不理想[3]。因此，深入探讨神经母细胞瘤的发病机制对寻找新的治疗方法和提高患儿的生存率具有重要的意义。八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor 4, Oct4)是一种重要的转录因子，在维持胚胎干细胞的自我更新和多能性方面具有重要的作用，已被证实可以增加肿瘤的发病率[4-6]。目前关于 Oct4 分子在神经母细胞瘤组织中的表达情况及其与神经母细胞瘤发生发展的关系还少有文献报道。本研究初步探讨 Oct4 分子在神经母细胞瘤发生发展中的作用，以期为神经母细胞瘤诊断寻找一个新的有效的肿瘤分子标志物。

1 材料和方法

1.1 临床资料

50 例神经母细胞瘤组织及癌旁组织标本均来自 2013-2018 年住院的神经母细胞瘤患者，均经病理学确诊，且术前均未行放射治疗、化学治疗。其中，男 24 例，女 26 例；年龄 1 个月 ~13 岁，平均 4.04 岁；高分化 21 例，中分化 15 例，低分化 14 例；伴有淋巴结转移 28 例。

1.2 细胞及主要试剂

神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞(中国医学科学院基础医学研究所细胞中心)，培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司)中。转染试剂(Lonza 公司)；SYBR Green PCR 试剂盒及 Oct4 siRNA(Ambion 公司)；侵袭实验用 Boyden 小室(美国 Millipore 公司)；Oct4 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.3 免疫组化实验

组织标本经 HE 染色和 Oct4(1 ∶ 200 稀释)染色。抗原修复采用微波修复法，免疫组化 SP 法具体操作步骤参照试剂说明书。

1.4 RT-PCR 实验

Oct4 引物：上游 5'-GTTAATGGAGTCAACCCAGC-3'；下游 5'-GGGTGACGACTTCTTGTTC-3'。反应条件：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 30 s，57 ℃ 40 s，72 ℃ 40 s，共 40 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。采取 GAPDH 片段作为内参对照。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计数 Oct4 的相对表达量。

1.5 转移和侵袭能力检测

采用伤口愈合实验方法检测细胞转移能力，Boyden 小室分析检测细胞侵袭能力[7-8]。

1.6 统计学方法

应用 SPSS16.0 软件，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Oct4 在神经母细胞瘤组织中的表达情况

Oct4 主要表达于细胞质和细胞核，且表达水平随神经母细胞瘤病理分期的升高而升高($P<0.05$)。50 例患儿中，31 例(62.0%)神经母细胞瘤组织中 Oct4 表达阳性，而在癌旁组织中未检测到 Oct4 的表达。见图 1。

2.2 Oct4 mRNA 在神经母细胞瘤组织中的表达情况

神经母细胞瘤组织中 Oct4 mRNA 表达水平高于癌旁组织，且随着病理分期的升高而升高($P<0.05$)。见图 2。

2.3 Oct4 表达与神经母细胞瘤临床病理参数之间的关系

有淋巴结转移组 Oct4 表达率高于无转移组，高分化组 Oct4 表达率低于中低分化组(P 均<0.01)。见表 1。

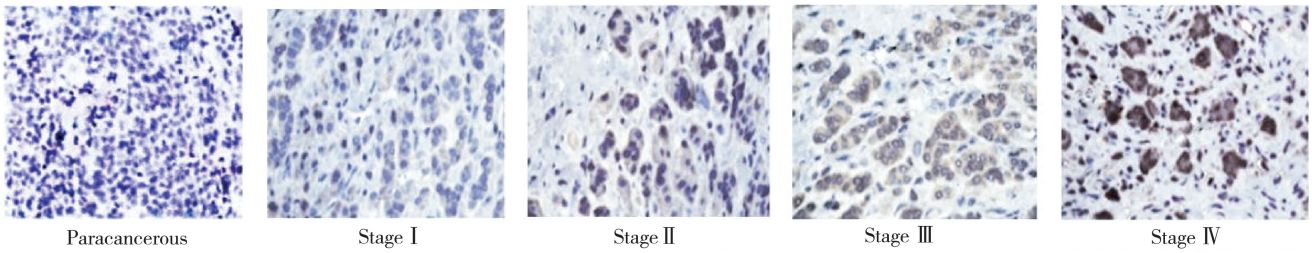


图 1 免疫组织化学方法检测 Oct4 在神经母细胞瘤组织中的表达

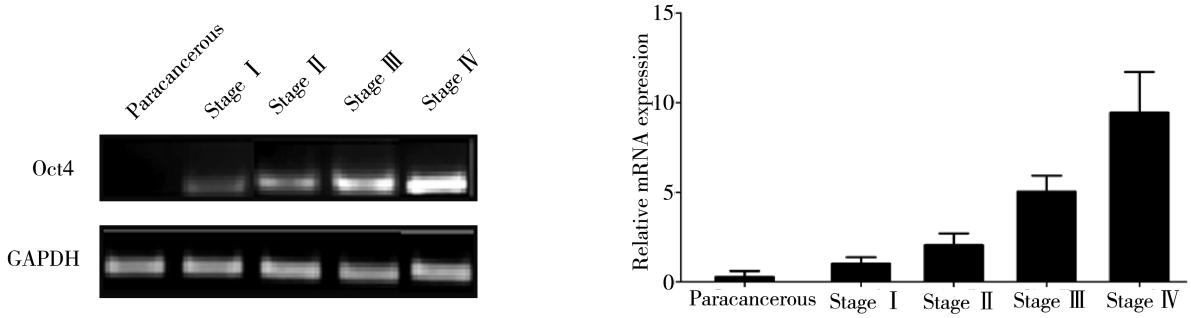


图 2 RT-PCR 方法检测 Oct4 mRNA 在神经母细胞瘤组织中的表达

表 1　Oct4 表达与神经母细胞瘤临床病理参数之间的关系

临床病理参数		例数	Oct4 阳性例数	Oct4 表达率/%	χ^2	P
性别	男/女	24/26	16/15	66.7/57.7	0.427	>0.05
年龄	≥5 岁/<5 岁	25/25	15/16	60.0/64.0	0.085	>0.05
肿瘤大小	≥7 cm/<7 cm	28/22	18/13	64.3/59.1	2.059	>0.05
淋巴结转移	无/有	22/28	7/24	31.8/85.7	15.19	<0.01
病理分期	Ⅰ~Ⅲ/Ⅳ~S	18/32	14/17	77.8/53.1	2.972	>0.05
组织学分型	高分化/中低分化	21/29	8/23	69.0/90.5	8.782	<0.01

2.4　转染 Oct4 siRNA 对神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞转移侵袭能力的影响

对照组和转染 Oct4 siRNA 组的神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞伤口宽度百分比分别为 17%±4% 和 63%±14%，转染 Oct4 siRNA 的神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞转移的能力显著降低（P<0.01）。对照组和转染 Oct4 siRNA 组神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞发生侵袭的细胞数分别为 189.08±21.84 和 81.23±13.74，转染 Oct4 siRNA 的神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞侵袭能力显著降低（P<0.01）。见图 3。

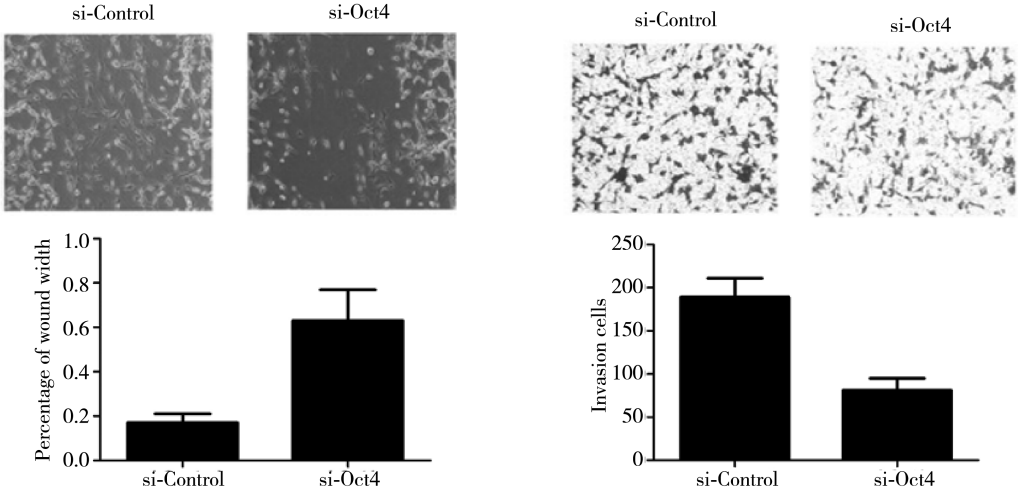


图 3　转染 Oct4 siRNA 对神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞转移侵袭能力的影响

3　讨论

越来越多的证据表明，多能干细胞相关基因的异常表达与多种实体肿瘤的发生和发展密切相关[9]。在这些异常表达的多能干细胞相关基因中，Oct4 是一种在维持胚胎干细胞自我更新和多能性方面具有重要作用的关键转录因子[10-11]。研究证实，在某些肿瘤中，Oct4 的高表达与肿瘤分化程度、肿瘤淋巴结转移、TNM 分期和肿瘤复发密切相关，且是一种很有应用前景的癌症诊断和预后评估生物标志物[12-13]。此外，Oct4 在肿瘤干细胞中具有很高的表达率，且和患者化疗耐药密切相关[14-15]。有 Oct4 表达的癌细胞的致瘤性显著升高，且化学治疗耐药性也显著升高[16]。因此，Oct4 在癌症的发生发展中具有重要作用，是癌细胞获得药物抗性表型的可能机制之一。然而，目前关于 Oct4 分子在神经母细胞瘤组织中的表达情况及其与神经母细胞瘤发生发展的关系还少有文献报道。

本研究观察了 Oct4 在神经母细胞瘤组织及癌旁组织中的表达情况，结果显示，同癌旁组织相比，神经母细胞瘤组织中 Oct4 的表达显著升高。50 例神经母细胞瘤组织中 Oct4 表达阳性为 31 例（62.0%），而在癌旁组织中未检测到 Oct4 的表达。Oct4 表达率与患者有无淋巴结转移和分化程度密切相关（P<0.01），但与患者性别、年龄、肿瘤大小和病理分期均无明显关系（P>0.05）。这一结果初步提示，神经母细胞瘤组织中 Oct4 的高表达与神经母细胞瘤的发生发展密切相关。本研究采用 RNA 干扰的方法进一步观察结果显示，当敲低神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞中 Oct4 分子的表达后，神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞的转移和侵袭能力均显著降低（P<0.01）。有研究[17]证实，Oct4 分子在肺癌中存在过表达的情况，过表达的 Oct4 可通过调节 Egr1 与肺癌预后密切相关。Fujino S 等[18]研究表明，Oct4 在结直肠癌存在过表达情况，Oct4 过表达细胞与肿瘤干细胞一样具有自我更新和分化能力，且可促进结直肠癌肝转移的发生。Zhao Q W 等[19]研究证实，AKT 介导的 Oct4 磷酸化与干细胞样癌细胞的增殖密切相关。然而，目前关于 Oct4 促进神经母细胞瘤细胞转移和侵袭能力的机制还不是很清楚，这也是本研究未来的重点研究方向。

参考文献：

[1] JIANG P, HUANG M, QI W, et al. FUBP1 promotes neuroblastoma proliferation via enhancing glycolysis--a new possible marker of malignancy for neuroblastoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 400.

[2] 王景, 李勇刚. 儿童神经母细胞瘤的治疗进展[J]. 儿科药学杂志, 2018, 24(10): 58-61.

[3] LOUIS C U, SHOHET J M. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy [J]. Annu Rev Med, 2015, 66: 49-63. doi: 10.1146/annurev-med-011514-023121.

[4] 赵扬, 王军, 孙岩峰, 等. 儿童神经母细胞瘤侵犯肾脏 1 例[J]. 儿科药学杂志, 2017, 23(12): 63-64.

[5] VAN SCHAIJIK B, DAVIS P F, WICKREMESEKERA A C, et al. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review [J]. J Clin Pathol, 2018, 71(1): 88-91.
[6] VILLODRE E S, KIPPER F C, PEREIRA M B, et al. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis [J]. Cancer Treat Rev, 2016, 51(10): 1-9.
[7] TIAN Q, WANG L, SUN X, et al. Scopoletin exerts anticancer effects on human cervical cancer cell lines by triggering apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell invasion and PI3K/AKT signalling pathway [J]. J BUON, 2019, 24(3): 997-1002.
[8] LIU R, WANG L, GAN T, et al. Long noncoding RNA LINC00511 promotes cell growth and invasion in triple-negative breast cancer by interacting with snail [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 5691-5699. doi: 10.2147/CMAR.S203455.
[9] YIN X, LI Y W, JIN J J, et al. The clinical and prognostic implications of pluripotent stem cell gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1155-1162.
[10] VADDI P K, STAMNES M A, CAO H, et al. Elimination of SOX2/OCT4-associated prostate cancer stem cells blocks tumor development and enhances therapeutic response [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(9): e1331.
[11] CHEN B, ZHU Z, LI L, et al. Effect of overexpression of Oct4 and Sox2 genes on the biological and oncological characteristics of gastric cancer cells [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 4667-4682. doi: 10.2147/OTT.S209734.
[12] MONFERRER E, BURGOS-PANADERO R, BLANQUER-MACEIRAS M, et al. High Oct4 expression: implications in the pathogenesis of neuroblastic tumours [J]. BMC Cancer, 2019. DOI: 10.1186/s12885-018-5219-3.
[13] CHEN H Y, HAN X L, WANG R G, et al. The expression of Oct4 and its clinical significance in laryngeal squamous carcinoma tissues [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20): 4591-4594.
[14] ZHANG X, ZHANG Y, XU J, et al. Antigen presentation of the Oct4 and Sox2 peptides by CD154-activated B lymphocytes enhances the killing effect of cytotoxic T lymphocytes on tumor stem-like cells derived from cisplatin-resistant lung cancer cells [J]. J Cancer, 2018, 9(2): 367-374.
[15] LU C S, SHIEH G S, WANG C T, et al. Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 30844-30858.
[16] KOBAYASHI I, TAKAHASHI F, NURWIDYA F, et al. Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(1): 125-132.
[17] FENG Y H, SU Y C, LIN S F, et al. Oct4 upregulates osteopontin via Egr1 and is associated with poor outcome in human lung cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 791.
[18] FUJINO S, MIYOSHI N. Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis [J]. Stem Cells Int, 2019: 7896524. doi: 10.1155/2019/7896524.
[19] ZHAO Q W, ZHOU Y W, LI W X, et al. Akt-mediated phosphorylation of Oct4 is associated with the proliferation of stem-like cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 1621-1629.

（编辑：刘雄志）
（收稿日期：2019-09-17　修回日期：2019-10-23）

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.05.003

· 论著 ·

泼尼松对支气管上皮细胞黏蛋白 5AC、细胞间黏附分子-1、白细胞介素-6 分泌的影响

王笑秋[1]，张平波[1]，陆烨[1]，方凤[1]，鲍一笑[1,2]（1. 上海浦滨儿童医院，上海　200120；2. 国家儿童医学中心，上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心，上海　200127）

[摘要] **目的**：探讨泼尼松对脂多糖（LPS）诱导的支气管上皮细胞黏蛋白 5AC（MUC5AC）、细胞间黏附分子-1（ICAM-1）、白细胞介素-6（IL-6）分泌的影响。**方法**：体外分离鉴定原代支气管上皮细胞，LPS 以 1 μg/mL 剂量诱导细胞炎症反应，泼尼松 5、10、20、40、50、100 μmol/L 干预治疗，酶联免疫法（ELISA）检测细胞上清液 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 水平变化，采用定量逆转录 PCR（RT-PCR）、免疫印迹（Western-blot）检测 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 和蛋白表达情况，免疫荧光法检测核因子 κB（NF-κB）核定位，Western-blot 检测泼尼松干预治疗前后表皮生长因子受体（EGFR）、细胞外调节蛋白激酶 1/2（ERK1/2）活化情况。**结果**：泼尼松以剂量依赖性降低 LPS 诱导的支气管上皮细胞内 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 水平和蛋白水平，抑制 NF-κB、EGFR、ERK1/2 活化。**结论**：泼尼松在体外能抑制 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 的产生，其机制可能与抑制 NF-κB、EGFR、ERK1/2 的激活有关。

[关键词] 支气管上皮细胞；泼尼松；黏蛋白 5AC；细胞间黏附分子-1；白细胞介素-6
[中图分类号] R725.6　　[文献标识码] A　　[文章编号] 1672-108X(2020)05-0007-05

作者简介：王笑秋（1975.10-），女，博士，主治医师，主要从事儿童呼吸系统疾病研究，E-mail：zylwxq0451@163.com。
通讯作者：鲍一笑（1964.12-），男，博士，教授，主要从事儿童哮喘相关研究，E-mail：drsmilebao@163.com。