doi:10.11659/jjssx.03E016005

·基础研究·

COMMD7 基因活化 PI3K/AKT 信号通路促进 HepG2 细胞增殖转移的分子机制研究

顾勋鑫,郑 璐,尤 楠,谭 晔,邓昌林,李 靖 (第三军医大学新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探索肝癌相关基因 COMMD7 促进 HepG2 细胞增殖转移的分子机制。**方法** 设计针对 COMMD7 基因的特异性 siRNA(small interference RNA)转染人类肝癌细胞株 HepG2,作为干扰组(Si-HepG2);并设置 PTEN 抑制剂处理组(Si + BpV-HepG2);空白对照组(HepG2);空载体对照组(N-HepG2)。qRT-PCR 检测转染后各组 COMMD7、PTEN 基因 mRNA 的表达变化;Western blot 检测各组 COMMD7、PTEN、p-AKT 和 AKT 蛋白的表达变化;MSP 法检测 PTEN 基因甲基化水平;CKK8 法检测细胞增殖能力;Transwell 实验检测细胞在转染前后转移及侵袭能力的改变。**结果** siRNA-COMMD7 转染 HepG2 细胞后,qRT-PCR 检测结果显示,与空白对照组及空载体对照组相比较干扰组 COMMD7 基因的表达量降低 89.9% 倍,PTEN 基因的表达量升高 2.841 倍,差异均有统计学意义($P<0.05$);Western blot 检测结果显示:siRNA 干扰组 COMMD7 表达明显降低,PTEN 表达升高;下游 p-AKT 表达受到显著抑制;PTEN 抑制剂处理组 PTEN 表达受到显著抑制,下游 p-AKT 的表达明显增强;MSP 法检测结果显示,干扰组与空白对照组及空载体对照组相比较,PTEN 发生明显的去甲基化,表明抑制 COMMD7 表达可诱导 PTEN 去甲基化。CKK8 实验结果显示,干扰组细胞较空白对照组及空载体对照组和 PTEN 抑制剂处理组增殖速度明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);Transwell 实验实验结果显示,干扰组穿膜细胞数(17.4 ± 2.7),较空载体对照组(36.2 ± 3.2)、空白对照组(41.6 ± 4.5)及 PTEN 抑制剂处理组(47.6 ± 1.8)明显减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** siRNA 干扰下调 COMMD7 基因的表达,可诱导 HepG2 细胞内抑癌基因 PTEN 的去甲基化,增加 PTEN 蛋白的表达而抑制 PI3K/AKT 信号通路,以降低 HepG2 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

[关键词] 肝细胞癌;COMMD7;PI3K/AKT 信号通路;PTEN;去甲基化

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-03-03

COMMD7 gene promotes HepG2 proliferation and migration by activiating the PI3K/Akt signal pathway

GU Xun-xin, ZHENG Lu, YOU Nan, TAN Ye, DENG Chang-Lin, LI Jing (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of COMMD7, a hepatocellular carcinoma gene, promoting human hepatocellular carcinoma cell line (HePG2 cells) proliferation and migration. **Methods** The specific siRNA (small interference RNA) was designed for COMMD7 gene, siRNA transfected HepG2 cells was set as Si-HePG2 group, and the PTEN inhibitor treating group (Si + BpV-HePG2), the control group (HePG2), the empty vector group (HePG2 was infected empty vector, N-HePG2 group) were also set up. qRT-PCR was performed to evaluate the mRNA expression changes of COMMD7 and PTEN, and Western blot was performed to test the expression changes of COMMD7, PTEN, p-AKT, and AKT. MSP method was performed to detect methylation level; CCK8 was performed to test cell proliferation ability; Transwell was performed to detect the invasion of cells. **Results** The results of qRT-PCR showed that the expression of COMMD7 gene in Si-HePG2 group was lower (0.101 times) than the control group and the N-HePG2 group, and the expression of PTEN gene was higher (2.841 times) than the control group and the N-HePG2 group, and all the results above were of statistically singificant difference ($P<0.05$). The results of Western blot showed that in Si-HePG2 group, the expression of COMMD7 reduced obviously, the expression of PTEN increased and the expression of p-AKT was significantly inhibited. In Si + Bpv-HePG2 group, the expression of PTEN was significantly inhibited and the expression of p-AKT was increased. The result of MSP showed that compared with the control group and the N-HePG2 group, Si-HePG2 group was more obviously demethylated, which indecated that the expression of COMMD7 gene could induce PTEN demethylation. The results of CCK8 showed that the proliferation in Si-HePG2 group was decreased compared with the control group, N-HePG2 group and Si + BpV-HePG2 group, and the difference was singificant ($P<0.05$). The results of Transwell showed that the numbers of cell permeating septum in Si-HePG2 group, N-HePG2 group, control group and PTEN group were (17.4 ± 2.7), (36.2 ± 3.2), (41.6 ± 4.5) and (47.6 ± 1.8) respectively, which were obviously decreased with a significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** SiRNA interference decreased the expression of COMMD7. It can induced the demethylation of PTEN gene in HePG2 and increase the expression of PTEN gene to inhibit PI3K/AKT signaling pathway, thus decreasing the proliferation, migration and invasion ability of HePG2 cells.

[基金项目] 国家自然科学基金(81372561);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10079)

[通信作者] 李 靖,E-maill:xqyyliling@tom.com

Keywords: hepatocellular carcinoma; COMMD7; PI3k/AKT signaling pathway; PTEN; demethylation

COMMD7(COMM domain containing 7)是本科室前期工作中筛选出的肝癌相关基因,定位于20号染色体20q11.22,是COMMD基因家族成员之一[1],研究发现其编码的蛋白与MAPK及NF-κB信号通路的异常活化相关[2-4];RT-PCR证实该基因在人肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织,且表达量与肿瘤直径的大小、有无门静脉转移呈显著正相关[5]。磷酸肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)家族广泛分布于多种组织,既具有Ser/Thr激酶活性,也具有磷脂酰肌醇激酶活性[6],可与AKT,又称蛋白激酶B(protein kinase B,PKB)组成PI3K/AKT信号通路,在包含肝细胞癌的多种肿瘤中发挥抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、肿瘤形成的重要作用,并参与调控肿瘤侵袭和转移。作为MAPK及NF-κB信号通路的上游信号通路[7-8],下调HepG2细胞中COMMD7的表达是否会抑制PI3K/AKT信号通路的异常活化,为本实验研究的内容。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人肝癌细胞株Hep G2(中科院上海细胞库),siRNA-COMMD7重组慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司(ShangHai GenePharma Co,Ltd)制备。MEM培养基、胎牛血清(GIBCO美国),0.25%胰蛋白酶溶液(HyClone公司),二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司)。引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。逆转录及PCR试剂盒(TaKaRa公司)。质粒DNA提取试剂盒(Qiagen公司),甲基化修饰检测试剂盒(ZYMO公司美国)。细胞核蛋白提取试剂盒(Pierce公司美国),BCA蛋白浓度测定试剂盒,PTEN蛋白抑制剂bpV(phen),抗COMMD7、PTEN、AKT、p-AKT抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗均购自美国Abcam公司。

1.2 细胞培养及慢病毒转染

人肝癌细胞HepG2细胞系置于MEM培养基(GIBCO,$NaHCO_3$ 1.5 g/L,Sodium Pyruvate 0.11 g/L 90%;胎牛血清,10%)中,于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度的培养箱中培养传代。转染前1 d取对数生长期的细胞1×10^5/mL接种于24孔板上,分为4组:HepG2组(空白对照组),Si-HepG2组(干扰组),N-HepG2组(空载体对照组),Si+BpV-HepG2组(PTEN抑制剂处理组),均培养于含有10 μg/μl Polybrene无血清及抗生素的EME培养基中。次日观察细胞生长状况,当达到80%细胞生长融合度时开始转染。MEM培养液稀释病毒液后加入培养孔中,摇匀后置于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度的培养箱中培养,12 h后吸去含有病毒的培养液,加入EME培养基(10%血清),Si+BpV-HepG2组使用含有5μMol/L Bpv(pen)培养液培养[9],继续培养48 h后置于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白显色情况,估计病毒转染效率。

1.3 RT-PCR检测慢病毒转染后HepG2细胞COMMD7、PTEN基因mRNA表达

转染后48 h,收集筛选稳定转染的各组细胞,使用Trizol法提取总RNA,并参照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA。COMMD7、PTEN基因及β-actin引物序列采用Primer Premier 5.0软件设计(引物序列见表1),由上海生工合成。PCR总反应体系为20 μl,反应条件:95 ℃ 10 min,1个循环。94℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s。COMMD7基因32个循环,PTEN基因40个循环,β-actin基因23个循环,最后72 ℃延伸3 min。每组设3个复孔。

表1 COMMD7/PTEN引物序列

基因	序列	扩增长度(bp)
COMMD7	上游引物:5'-GACATCTGGGAGCAGCGAAT-3' 下游引物:5'-TCTGACTCGCTCCATCTCGT-3'	151
PTEN	上游引物:5'-TGCAGAAAGACTTGAAGGCGTA-3' 下游引物:5'-GCTGTGGTGGGTTATGGTCTT-3'	179
β-actin	上游引物:5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3' 下游引物:5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'	268

1.4 Western blot检测慢病毒干扰后蛋白表达

收集慢病毒稳定转染后的4组细胞各1×10^7个,配制含有磷酸酶抑制剂的裂解缓冲体系Tris 1 Mol/L 5 mL;EDTA 0.5 Mol/L 0.2 mL;NaCl 5 Mol/L 3mL;NP40 10% 10 mL;NaVO3 200 mMol/L 1 mL;NaF 500 mMol/L 1 mL;Na deoxycholate 2.5% 10 mL;Complete 7x 14 mL;超纯水定容至100 mL。裂解细胞后提取细胞总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度,经沸水浴5 min变性后,取等量蛋白上样。经凝胶蛋白电泳后(SDS-PAGE)转至PVD膜上。室温封闭1 h后,分别使用COMMD7(1∶1 500)、PTEN(1∶5 000)、AKT(1∶1 000)、p-AKT(1∶500)一抗4 ℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗1∶2 500稀释,室温孵育1 h后,洗膜后ECL化学发光试剂显色,暗室显影,用Molecular Imager ChemiDocTM XRS分析系统进行曝光、摄像。

1.5 甲基化特异性PCR(MS-PCR)检测PTEN基因甲基化水平

按照DNA提取试剂盒步骤说明,分别提取HepG2组、Si-HepG2组、N- HepG2细胞基因组DNA。每组取2 μg基因组DNA,使用亚硫酸氢钠进行转化,在经过2次加热变性反应之后,未甲基化的胞嘧啶CpG发生脱氨基反应转化为尿嘧啶U,甲基化的胞嘧啶则不发生上述转化,经柱状层析完成脱硫脱盐及DNA纯化。根据PTEN基因修饰前后的改变,使用Primer Premier 5.0软件设计甲基化M和非甲基化U特异性引物(引物序列见表2)。配制PCR反应体系:模板DNA 1.5 μl,上下游引物各1.5 μl,Tap酶Mix 12.5 μl,水8 μl。PCR反应参数:94 ℃ 5 min,90 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35个循环,72 ℃延伸5 min。反应结束后取5 μl反应产物、1μl 16x上样缓冲液和0.5 μl染料于2%琼脂糖凝胶中电泳后进行摄像。

表2 甲基化特异性引物序列

基因	序列	扩增长度(bp)
PTEN-M	上游:5'-GTTTGGGGATTTTTTTTTCGC-3'	178
	下游:5'-AACCCTTCCTACGCCGCG-3'	
PTEN-U	上游:5'-ATTAGTTTGGGGATTTTTTTTTTGT-3'	186
	下游:5'-CCCAACCCTTCCTACACCACA-3'	

1.6 CCK8比色法检测细胞增殖

取对数生长期的细胞,消化制悬,调整细胞密度为1×10^4/mL,接种于5块96孔板上,每孔90 μl,每组设5个复孔。Si+BpV-HepG2组使用含有5 μMol/L Bpv(pen)培养液培养。每隔24 h取出1块培养板,每孔加入10 μl CCK8试剂轻敲培养板混匀,继续培养3 h,取出测定其在450 nm波长处的吸光度[D(450)]。

1.7 Transwell小室检测细胞迁移、侵袭能力

1.7.1 细胞迁移实验 采用孔径为5 μm的6孔小室(Corning公司),各组细胞使用无血清培养基消化制悬,调整细胞密度为1×10^6/mL,取200 μl加入小室。下室中加入500 μl含2.5% FBS的无血清培养基(下室中不能含有气泡)。培养24 h后弃孔中培养基,将上室中细胞擦拭干净,90%酒精常温固定30 min,0.1%结晶紫常温染色10 min,冲洗后200倍光镜下随机选取10个视野,计算穿膜细胞数目,评定细胞迁移能力。

1.7.2 细胞侵袭实验 50 mg/L Matrigel -2 ℃预冷,1∶8稀释后包被Transwell小室底膜,4 ℃风干,无血清培养基制悬,细胞浓度1×10^5/mL,取200 μl加入小室。下室中加入500 μl含5% FBS的无血清培养基。其余步骤同细胞迁移实验。

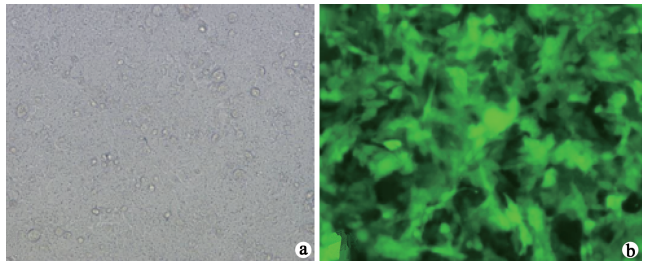
1.7 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间数据比较采用t检验。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Si-RNA慢病毒转染HepG2细胞

转染72 h后,倒置荧光显微镜下观察HepG2细胞(图1),选择5个不同的视野计算荧光细胞数目,计算平均转染效率为93.6%,达到后续试验条件。

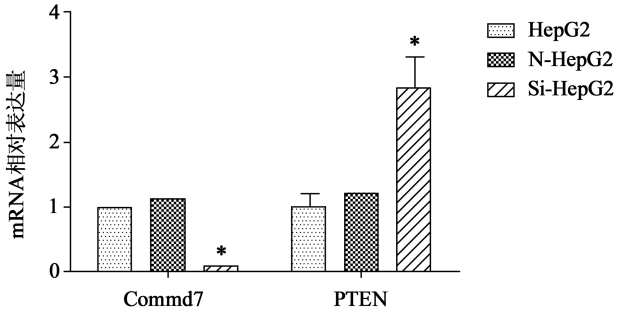


a:慢病毒转染前;b:同一视野慢病毒转染后

图1 倒置荧光显微镜观察慢病毒转染效率(×200)

2.2 RT-PCR检测COMMD7、PTEN基因mRNA表达

空白对照组(HepG2)设值为1,与空载体对照组(N-HepG2)的COMMD7、PTEN基因的mRNA表达量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。干扰组(Si-HepG2)COMMD7基因的mRNA表达量降低了89.9%(0.095~0.108),PTEN基因的mRNA表达量升高2.841倍(2.416~3.341)。Si-HepG2与其余2组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见图2。结果表明siRNA对COMMD7基因的干扰效果确切,且伴随COMMD7基因的下调,抑癌基因PTEN的表达显著上调。



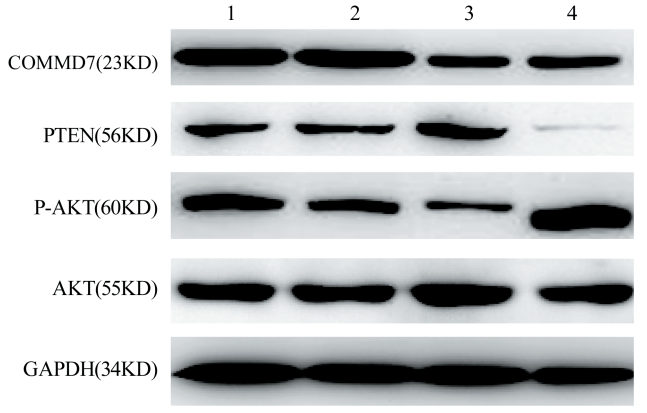
*:$P<0.05$,与其余2组分别比较

图2 RT-PCR检测COMMD7、PTEN基因mRNA表达

2.3 Western blot检测慢病毒干扰后蛋白表达

提取各组细胞蛋白进行免疫印迹实验,结果显示慢病毒干扰下调COMMD7蛋白的表达后,干扰组PI3K/AKT信号通路抑制蛋白PTEN表达上调;下游激活蛋白p-AKT表达受到显著抑制;PTEN抑制剂处理组PI3K/AKT信号通路抑制蛋白PTEN表达受到显著

抑制,通路下游激活蛋白 p-AKT 的表达明显增强。各组细胞 GAPDH 内参表达恒定,与 qRT-PCR 结果一致(图 3),说明下调 COMMD7 可增加 PTEN 的表达而抑制 PI3K/AKT 信号通路的活化。

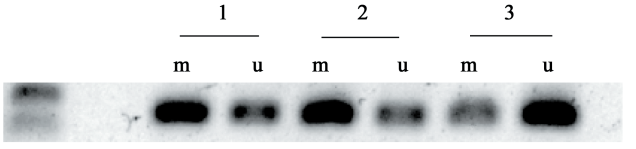


1:空白对照组;2:空载体对照组;3:干扰组;4:PTEN 抑制剂处理组

图 3 Western blot 检测慢病毒干扰后蛋白表达

2.4 MSP 法 PTEN 基因甲基化水平

甲基化特异性 PCR(MS-PCR)检测 PTEN 基因的甲基化水平,结果见图 4。空白对照组(HepG2)及空载体对照组(N-HepG2)经 PCR 扩增后凝胶电泳后可见颜色较深的甲基化条带(m),而非甲基化条带(u)颜色较浅;提示 HepG2 细胞的 PTEN 基因有一定程度的甲基化。干扰组(Si-HepG2)下调 COMMD7 的表达后,PTEN 基因甲基化条带(m)变浅,非甲基化条带(u)颜色加深。结果表明下调 COMMD7 的表达后,可显著诱导 HepG2 细胞 PTEN 基因的去甲基化。



1:空白对照组;2:空载体对照组;3:干扰组;m:PTEN 基因甲基化条带(178 bp);u:PTEN 基因非甲基化条带(186 bp)

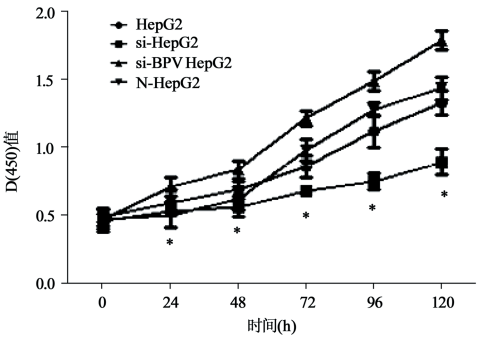
图 4 MS-PCR 检测 PTEN 基因甲基化水平

2.5 CCK8 比色法检测细胞增殖

干扰组细胞增殖能力与空白对照组、空载体对照组及 PTEN 抑制剂处理组相比均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);而空白对照组(HepG2)和空载体对照组(N-HepG2)之间差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5。

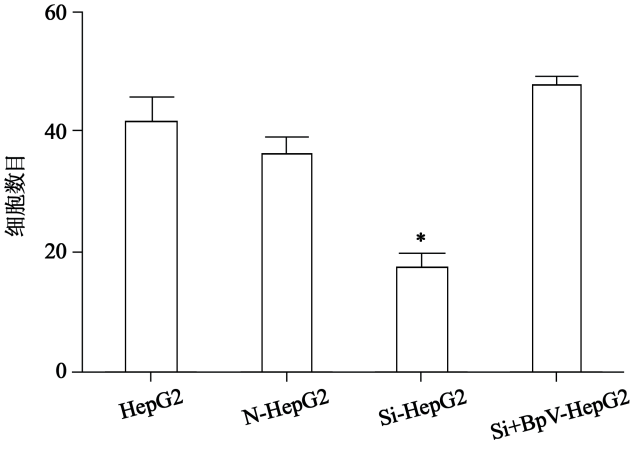
2.6 Transwell 小室检测细胞迁移、侵袭能力

干扰组穿膜细胞数(17.4±2.7)/mL,较空载体对照组(36.2±3.2)/mL、空白对照组(41.6±4.5)/mL 及 PTEN 抑制剂处理组(47.6±1.8)/mL 明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 6。



*:与其余 3 组同期比较,$P<0.05$

图 5 CCK8 比色法检测细胞增殖



*:与其余 3 组比较,$P<0.05$

图 6 Transwell 小室检测细胞迁移、侵袭能力

3 讨论

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一。根据 2014 年世界卫生组织全球癌症报告显示,在我国的恶性肿瘤中肝癌发病率居第 4 位,死亡率排名第 2 位,有发现晚、死亡率高的临床特点。越来越多的研究表明,原发性肝癌的发生、发展是不同基因在各个阶段相互作用的复杂过程,癌基因、抑癌基因和细胞内信号传导通路的异常活化或异常失活是肝癌发生的分子基础[10-12]。肝癌发生的分子调控机制至今仍未完全阐明,寻找与肝癌发生、发展相关的基因,阐明其功能及其作用机制,对肝癌临床治疗具有重要意义。

COMMD7 基因是我科室在前期工作中发现的肝癌相关基因,定位于 20 号染色体 20q(11;22)。Prosite 分析显示该基因可能存在 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个酪蛋白激酶 2 磷酸化位点、2 个肉豆蔻基位点(MYRISTYL)、1 个天冬酰胺酶糖基化位点。RT-PCR 证实该基因在人肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织,且表达量与肿瘤直径的大小、有无门静脉转移呈显著的正相关[13]。后续的体外研究也显示,COMMD7 的高表达

使 MAPK/ERK 及 NF-κB 信号通路的异常活化[7-8],促进肝癌细胞的增殖,但具体机制尚不明确。

PI3K/AKT 信号通路已被证实在多种肿瘤中被异常活化,促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移,并与肿瘤细胞的化学耐药和放射抗拒密切相关。目前将该通路作为治疗靶点的药物开发成为备受关注的热点[14]。AKT,是 PI3K/AKT 信号转导通路的核心蛋白,最初作为一种原癌基因被发现,因其对多种细胞的代谢、生长、增殖及蛋白合成具有关键性的调节作用而成被关注焦点。PI3K(磷脂酰肌醇 3-激酶)p85 亚基可与多种生长因子和跨膜信号传导复合物结合而启始 PI3K 的激活[15],p110 亚基在质膜上产生第二信使 3-磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidy-linositol 3,4,5-triphosphate,PIP3),PIP3 通过 PH 结构域与 AKT 结合,在 PDK1、PDK2 的参与下磷酸化 AKT 的 Ser473 和 Thr308 位点,p-AKT 通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、Caspase9、NF-κB、Fork-head、mTOR 等调节细胞的增殖、凋亡以及迁移等[16]。PI3K/AKT 信号通路的活性受抑癌基因类脂磷酸酶 PTEN(Phosphatase and tensin homologue deleted on chromo-some ten)的负调节,PTEN 是一个 PIP3-磷酸酶,与 PI3K 的功能相反,它可以通过去磷酸化将 PIP3 转变为 PI-4,5-P2 而降解,从而阻断 AKT 及其下游效应分子的有效活化[17]。PTEN 在减弱 PIP3 信号传导而增加 PIP2 水平的过程中,发挥着重要的作用,影响着细胞的多种功能途径,其自身活性主要调节形式有甲基化和泛素化[18-19]。但是 COMMD7 是否会促进 PI3K/AKT 信号通路的异常活化,这一过程是否与 PTEN 相关目前尚不清楚。

本研究通过慢病毒稳定转染 siRNA 下调 COMMD7 基因后观察其对肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭和转移的影响。慢病毒转染后 qRT-PCR 和 Westen blot 的结果表明,COMMD7 基因的表达被成功抑制;并且随着 COMMD7 表达量的降低,PI3K/AKT 信号通路中关键蛋白 P-AKT 明显减少,通路的异常活化受到抑制。为进一步阐述 COMMD7 调控 PI3K/AKT 信号通路活性的具体机制,在下调 COMMD7 后对 PI3K/AKT 信号通路中主要的负性调控蛋白 PTEN 进行检测,qRT-PCR 和 Westen blot 的结果表明:随着 COMMD7 表达量的降低,PTEN 基因的 mRNA 和蛋白的表达量均有明显的升高。那么是否可以推测 COMMD7 是通过对 PTEN 基因的调控而影响 PI3K/AKT 信号通路的活化? 为明确这一点本实验加入了 PTEN 抑制剂处理组,通过在培养基中加入 Bpv(pen)促使细胞中的 PTEN 蛋白变性水解丧失活性,再对上述指标进行 Westen blot 检测,结果显示:在 PTEN 蛋白受到抑制之后,COMMD7 的下调没有造成 P-AKT 的减少,甚至出现了增多的趋势。CK8 实验与 Transwell 实验的结果也与上述结果一致。为揭示 COMMD7 调控 PTEN 的具体作用机制,本研究检测了在转染前后 PTEN 基因甲基化及泛素化的改变,发现:在下调 COMMD7 的表达之后,PTEN 基因发生了明显去甲基化,与 qRT-PCR 检测到 mRNA 表达显著增强的结果相一致。结合本研究和前期研究结果,我们认为 SiRNA 干扰下调 COMMD7 基因的表达,可诱导 HepG2 细胞内抑癌基因 PTEN 的去甲基化,增加 PTEN 蛋白的表达而抑制 PI3K/AKT 信号通路,以降低 HepG2 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

综上所述,COMMD7 在肝癌的发生、发展中具有重要的作用。COMMD7 的高表达与 PI3K/AKT 信号通路的异常活化密切相关。此外 COMMD7/PTEN/PI3K 途径是否可以成为一个潜在的肝癌药物治疗靶点及 COMMD7 诱导 PTEN 基因甲基化的具体机制仍需进一步的研究。

参考文献

[1] 刘世呈,李 靖,黄小兵,等. BC047440_siRNA 对肝_省略_胞增殖抑制及其分子机制的初步探讨[J]. 第三军医大学学报,2007,29(23):2207-2211. doi:10.3321/j.issn:1000-5404.2007.23.001.

[2] 黄小兵,梁 平,李 靖,等. BC047440 基因通过 NF-κB 调节 HepG2 细胞增殖的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(22):2090-2092. doi:10.3321/j.issn:1000-5404.2008.22.009.

[3] 商阳阳,郑 璐,尤 楠,等. COMMD7 基因通过细胞外调节蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶信号通路促进肝癌细胞 HepG2 增殖的研究[J]. 中华消化外科杂志,2015,14(4):316-320. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.04.012.

[4] Esposito E,Napolitano G,Pescatore A,et al. COMMD7 as a novel NEMO interacting protein involved in the termination of NF-κB signaling[J]. J Cell Physiol,2016,231(1):152-161. doi:10.1002/jcp.25066.

[5] 郑 璐,李 靖,杨彤翰,等. BC047440 基因在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. 中华普通外科杂志,2006,15(8):582-585. doi:10.3969/j.issn.1005-6947.2006.08.007.

[6] 朱志立,米 娜,李 靖,等. PI3K、p-AKT 及 AFP 在肝细胞癌组织中表达及意义[J]. 局解手术学杂志,2011,20(3):246-248. doi:10.3969/j.issn.1672-5042.2011.03.008.

[7] Yuan ZQ,Feldman RI,Sussman GE,et al. AKT2 Inhibition of Cisplatin-induced JNK/p38 and Bax Activation by Phosphorylation of ASK1:IMPLICATION OF AKT2 IN CHEMORESISTANCE[J]. J Biol Chem,2003,78(26):23432-23440. doi:10.1074/jbc.M302674200.

[8] Yokoi K,Fidler IJ. Hypoxia Increases Resistance of Human Pancreatic Cancer Cells to Apoptosis Induced by Gemcitabine[J]. Clin cancer Res,2004,10(7):2299-2306. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0488.

[9] Lai JP,Dalton JT,Knoell DL. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair[J]. Br J Pharmacol,2007,152(8):1172-1184. doi:10.1038/sj.bjp.0707501.

doi:10.11659/jjssx.03E016015

幼兔重度肺冲击伤动物模型的建立

梁 毅[1,2],代 维[1],麻 超[1],张潇俊[1],游 昕[3],周继红[1] (1.第三军医大学大坪医院野战外科研究所四室,重庆 400042;2.成都军区总医院急诊科,四川 成都 610038;3.南京军区 454 医院心胸外科,江苏 南京 210000)

[摘 要] **目的** 建立稳定的幼兔重度肺冲击伤实验动物模型,为未成熟肺冲击伤机制和肺损伤救治研究提供理想的动物模型。**方法** 致伤驱动压初筛:选取 4 周龄新西兰白兔 16 只,随机分为驱动压 4.0 MPa 组和 4.5 MPa 组,采用 BST-Ⅰ型生物激波管,以相应的驱动压力致伤,对比 2 组肺冲击伤伤情。肺冲击伤伤情特点观察:选取 4 周龄新西兰白兔 48 只,随机分为正常对照组(8 只)和冲击伤组(40 只),依前面研究结果,冲击伤组采用 4.5 MPa 驱动压进行致伤;分别于伤即刻(0 h)、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 观测动物生命体征和生理指标、肺大体解剖和光镜病理、测定肺组织含水量等。**结果** 致伤驱动压初筛:2 组动物均存活,4.0 MPa 组冲击波超压为(328.16±4.78)kPa,重度肺冲击伤率为 12.5%,AIS 评分(3.38±0.52)分;4.5 MPa 组冲击波超压为(395.04±11.74)kPa,重度肺冲击伤率为 87.5 %,AIS 评分(4.13±0.64)分。肺冲击伤伤情特点观察:致伤动物均存活,伤后即刻出现持续约 0.5 h 的精神萎靡等情况,随后动物呼吸和心率等加快,肺出现广泛片状出血和水肿,肺含水量显著增加,多为重度冲击伤,AIS 评分(3.98±0.55)分,肺光镜病理以肺组织断裂、出血、水肿,伴炎细胞浸润为主。**结论** 利用 BST-Ⅰ型生物激波管,采用 4.5 MPa 驱动压可建立稳定的 4 周龄新西兰白兔重度冲击伤模型,此模型伤情稳定,可用于未成熟肺冲击伤机制和肺损伤救治的实验研究模型。

[关键词] 肺冲击伤;幼兔;动物模型;生物激波管

[中图分类号] R563 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-03-03

Study on severe blast lung injury model of baby rabbits

Liang Yi[1,2], Dai Wei[1], Ma Chao[1], Zhang Xiao-jun[1], You Xin[3], Zhou Ji-hong[1] (1. Fourth Department, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Emergency Department, Chengdu General Hospital of Chengdu Military Command of PLA, Chengdu Sichuan 610038, China; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, 454th Hospital of Nanjing Military Command of PLA, Nanjing Jiangsu 210000, China)

Abstract: Objective To establish an animal model of severe blast lung injury in baby rabbits, and to provide a way to study the characteristic and treatment of blast lung injury in minors. **Methods** Randomly selected sixteen 4 - weeks old New Zealand white rabbits, and the blast lung injuries were made by BST-Ⅰ biological shock tube with different drive pressure (4.0Mpa and 4.5MPa) respectively. Then

[基金项目] 国家自然科学基金(81471865);南京军区重点科研课题(ZX14 2014)

[通信作者] 周继红,E-mail:traumazjh@126.com

[10] Osada S, Naganawa A, Misonou M, et al. Altered gene expression of transcriptional regulatory factors in tumor marker-positive cells during chemically induced hepatocarcinogenesis [J]. Toxicology Letters, 2006,167(2):106 - 113. doi:10.1016/j.toxlet.2006.08.014.

[11] Ohta K, Ohigashi M, Naganawa A, et al. Histone acetyltransferase MOZ acts as a co-activator of Nrf2-MafK and induces tumour marker gene expression during hepatocarcinogenesis[J]. Biochem J, 2007, 402(3):559 - 566.

[12] Yeh SH, Chiu CM, Chen CL, et al. Somatic mutations at the trinucleotide repeats of androgen receptor gene in male hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2007, 120(8):1610 - 1617.

[13] 郑 璐,梁 平,李 靖,等.重组 BC047440 蛋白的表达及其对人肝癌细胞系 HepG2 增殖的影响[J].第三军医大学学报,2010,32(19):2049 - 2052.

[14] Porta C, Figlin RA. Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT Signaling Pathway and Kidney Cancer, and the Therapeutic Potential of Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT Inhibitors [J]. J Urol, 2009, 182 (6): 2569 - 2577. doi:10.1016/j.juro.2009.08.085.

[15] Bozulic L, Hemmings BA. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21 (2): 256 - 261. doi:10.1016/j.ceb.2009.02.002.

[16] 牛国梁,张树友. PI3K1AKT 信号传导通路与肿瘤[J].现代生物医学进展,2010,10(20):3994 - 3996.

[17] Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN Tumor Suppression [J]. Cell, 2008, 133(3):403 - 414. doi:10.1016/j.cell.2008.04.013.

[18] Sharrard RM, Maitland NJ. Regulation of Protein Kinase B activity by PTEN and SHIP2 in human prostate-derived cell lines[J]. Cellular Signalling, 2007, 19(1):129 - 138.

[19] Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, et al. The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications [J]. Current Cancer Drug Targets, 2008, 8(3):187 - 198.

(编辑:周小林)