心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000823

慢性缺氧及野百合碱诱导大鼠肺动脉高压对钙敏感受体表达的影响

夏世辉，杜明成，秦廷江，刘盈贝，王朝辉，安　永

（重庆医科大学附属儿童医院心胸外科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地，重庆　400014）

[摘　要]目的：探讨慢性缺氧（chronic hypoxia，CH）及野百合碱（monocrotaline，MCT）诱导大鼠建立肺动脉高压（pulmonary hypertension，PH）形成差异及对肺动脉钙敏感受体（Ca^{2+}-sensing receptor，CaSR）表达影响。方法：分别通过 CH 及 MCT 诱导大鼠 PH 模型后检测实验组（缺氧 3、7、14、21 d，MCT 诱导 3、7、14、21 d 共 8 组）及对照（control，CON）组大鼠下列指标：右心导管法测大鼠肺动脉平均压力（mean pulmonary arterial pressure，mPAP），右心室肥大指数（right ventricular hypertrophy index，RVHI），取大鼠肺动脉以 QPCR 及 Western blot 方法检测 CaSR 在肺动脉的表达情况情况。结果：CH 组（CH 3、7、14、21 d）和 MCT（3、7、14、21 d）大鼠 mPAP、RVHI 与 CON 组大鼠相比随干预时间延长（3、7、14、21 d）而升高，其中以 CH 21d 组和 MCT 21 d 组明显，而 CH 21 d 大鼠 mPAP、RVHI 均比 MCT 21 d 组低（$P=0.000$）；CaSR mRNA 表达在 CH 组和 MCT 组随着干预时间延长而逐渐升高，其中在 CH 21 d 和 MCT 21 d 的时候最高，均高于 CON 组（$P=0.000$，$P=0.000$），而 CH 21 d 和 MCT 21 d 两者相比，MCT 21 d 高于 CH 21 d 组，两者间有差异（$P=0.000$）；在 CON 组大鼠，CH 各组及 MCT 各组大鼠肺动脉中均检测到 CaSR 蛋白的表达，并随着干预时间延长，CaSR 蛋白趋势逐渐升高，以 CH 21 d 和 MCT 21 d 明显，而 MCT 21 d 组高于 CH 21 d 组。结论：相同时间内 MCT 诱导大鼠的肺动脉压高于 CH 建立 PH 模型，CaSR mRNA 及蛋白表达水平与肺动脉压力呈正相关，CaSR 参与了 PH 的形成及发展。

[关键词]慢性缺氧；野百合碱；肺动脉高压；钙敏感受体

[中图分类号]R845.22；R543.2　　[文献标志码]A　　[收稿日期]2015-04-19

Effects of chronic hypoxia and monocrotaline induced pulmonary hypertension on the expression of Ca^{2+}-sensing receptor in rats

Xia Shihui, Du Mingcheng, Qin Tingjiang, Liu Yingbei, Wang Chaohui, An Yong

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorder; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

[Abstract] ***Objective*** To discuss the discrepancy of using chronic hypoxia (CH) and monocrotaline (MCT) to induce pulmonary hypertension (PH) and to explore their effects on Ca^{2+}-sensing receptor (CaSR). ***Methods*** The male SD rats were randomly divided into control group (CON), CH and MCT establishing pulmonary hypertension group. The rats in CON group were normally bred; the rats in CH group were placed in the glass box continued with 10% self-made oxygen for 21 d; the rats in MCT group were injected with 60 mg/kg (BW) and were feed in SPF grade for 21 d. Mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) were monitored by right heart catheterization. Expression of CaSR mRNA and protein was detected by qPCR and Western blot. ***Results*** Compared with that of CON group, mPAP and RVHI increased in CH and MCT group with the extending of intervening time, CH 21 d and MCT 21 d being the highest groups; mPAP and RVHI rats were significantly higher in MCT group than in CH group. Expressions of CaSR mRNA in experimental 21 d group (CH and MCT) were significantly higher than that of CON group, higher in MCT 21 d group than in CH 21 d group. Expression of CaSR protein increased in experimental group with the extending of intervening time, MCT 21d being the highest group. ***Conclusion*** Pulmonary artery pressure is higher in MCT group than in CH group in pulmonary hypertension rat model at the same time. Expressions of CaSR mRNA and protein are positively correlated with the pulmonary artery pressure. CaSR participates in the occurrence and development of PH.

[Key words] chronic hypoxia; monocrotaline; pulmonary hypertension; Ca^{2+}-sensing receptor

作者介绍：夏世辉，Email：xsh7000@163.com，研究方向：心胸外科方向。

通信作者：安　永，Email：253680484@qq.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81370432）；国家临床重点专科经费建设资助项目（编号：国卫办医函[2013]544）；重庆市教委科学基金资助项目（编号：KJ1500238）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151215.1653.008.html（2015-12-15）

肺动脉高压（pulmonary hypertension，PH）是临床上常见的一种疾病，是一组由多种病因和发病机制引起的肺血管病变致肺循环阻力增加、右心负荷增大以及右心功能衰竭为主要特征的临床综合征，其病因目前尚不完全明了，可能与遗传变异、环境、疾病相关性等因素有关，目前 PH 的发病机制也尚未完全阐明，已知骨形成蛋白Ⅱ受体、五羟色胺及其转运体，前列环素及其受体、一氧化氮、内皮素-1，内皮素受体等与 PH 的形成及发生密切相关[1]，近年国内外对 PH 的研究也成为热点。

钙敏感受体（Ca^{2+}-sensing receptor，CaSR）是 G 蛋白偶联受体中的一种，它广泛分布于哺乳动物甲状腺、肾、骨骼、小肠、心肌等组织细胞中[2]。CaSR 被激活后通过磷脂酶 C 途径促使细胞内钙离子浓度增高来调节机体生理功能，它是参与胞内外 Ca^{2+} 浓度变化的主要受体之一[3]。大量研究表明 CaSR 参与了甲状旁腺功能亢进、骨质疏松、心肌缺血再灌注、乳腺癌、家族性低钙尿性高钙血症等多种疾病的发生发展，并已作为靶点应用于临床部分疾病的治疗[4-5]。而近期随着 CaSR 在心脏缺血再灌注中的作用的明确后，多项研究也表明 CaSR 与 PH 的形成关系密切。

本实验通过慢性缺氧（chronic hypoxia，CH）及野百合碱（monocrotaline，MCT）诱导 SD 大鼠形成肺动模型后，探讨不同实验模型建立 PH 后肺动脉压力的差异及不同 PH 模型 CaSR 表达的差异性，以期为 PH 的研究提供一种简洁的建模方法及为 CaSR 和 PH 的研究奠定一定的基础，为 PH 的治疗提新的方向。

1 材料和方法

1.1 主要材料

SD 大鼠，雄性，SPF 级，140~220 g，由重庆医科大学动物实验中心提供。野百合碱（美国 Sigma 公司），全蛋白提取试剂盒（上海贝博生物有限公司），ECL 化学发光试剂（美国 Thermo 公司），BCA 蛋白定量试剂盒（上海碧云天），牛血清白蛋白（BSA）（ROCHE 公司），多导生理机能仪器（BL420-F）及压力转换器（成都泰盟科技有限公司），缺氧饲养箱（自制），电泳仪（美国 bio-rad 公司），荧光定量 PCR 仪（上海枫岭生物技术有限公司），精密电子天平（德国 Sartorius）。

1.2 方法

1.2.1 PH 模型制备 健康雄性 SD 大鼠 54 只，体质量（180±20）g，随机分组为：①正常对照（control，CON）组 6 只放置在 SPF 级房间正常饲养；②CH 建立 PH 模型组（CH 组根据缺氧时间分为 3、7、14、21 d 组，共 4 组，每组各 6 只）置于自制的缺氧饲养箱内，持续给箱内通以氮气、氧气混合气体，维持箱内氧气浓度（10.0±0.2）%，分别在饲养 3、7、14、21 d 时用于实验，21 d 时可形成稳定的缺氧性 PH 模型；③MCT 诱导大鼠 PH 模型组（MCT 组根据时间分为 MCT 3 d、MCT 7 d、MCT 14 d、MCT 21 d 组，共 4 组，每组各 6 只），按 60 mg/kg 体质量给予 MCT 一次性腹腔注射，于 SPF 房间分别饲养 3、7、14、21 d，用于实验，21 d 时可形成稳定的药物诱导 PH 模型。

1.2.2 肺动脉平均压力（mean pulmonary arterial pressure，mPAP）测定 取各组大鼠称重后，用 10%水合氯醛按 3 ml/kg 体质量腹腔注射麻醉后，游离颈外静脉自颈外静脉近心端做"V"型切口（或者直接用大号注射器针头斜行刺入静脉），将肝素化的聚乙烯导管沿颈外静脉缓慢经右心室插入肺动脉，导管另一端通过压力换能器与多导生理机能实仪器连接，检测大鼠 mPAP 变化，并记录。

1.2.3 右心室肥大指数（right ventricular hypertrophy index，RVHI）测定 游离心肺血管、组织等，完整取下大鼠心脏，PBS 冲洗后放置于中性福尔马林溶液中固定 48 h 后测定 RVHI，RVHI=右心室游离壁重量/（室间隔+左心室重量）×100%。

1.2.4 qRT-PCR 方法检测 CaSR 在肺动脉的 mRNA 表达 PH 模型建立后，分别取各组大鼠的肺动脉，以 Trizol 试剂说明方法提取各个分组肺动脉组织中的总 RNA 并鉴定样品，然后按照说明书用荧光定量 PCR 仪进行 QPCR 操作，测定 CaSR mRNA 的表达。

1.2.5 Western blot 方法检测 CaSR 蛋白表达 分别取各组大鼠的肺动脉提取蛋白并鉴定，常规灌胶、电泳、转膜，一抗 1:500，4 ℃孵育过夜，二抗 1:1 000 室温环境孵育 2 h 后发光显色，测定各条带灰度，采用所测目的蛋白与内参 GAPDH 灰度的比值表示 CaSR 的表达强度。

1.3 统计学方法

本实验所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析，分析结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；多组数据之间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-q 法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 大鼠一般情况

CH 组大鼠 24 只经连续缺氧饲养 21 d 后无死亡，但在饲养过程中表现为体质量增长缓慢、进食差、活动量小，随着饲养时间延长，表现更加明显。MCT 组大鼠 24 只经腹腔注射 MCT 60 mg/kg 体质量在 SPF 级房间饲养 21 d 后均存活，无死亡，但在实验中取材过程中发现，模型大鼠有腹水及胸水生成，特别是以 21 d 显著。

2.2 mPAP 测定

CH 组及 MCT 组大鼠 mPAP 都较 CON 组大鼠增高，并且随饲养时间延长，mPAP 增高更加明显，以 CH 21 d 组和 MCT

21 d 组显著（CH21 d 组：（36.9±0.95）mmHg，MCT 21 d 组：（41.52±1.51）mmHg，分别与 CON 组（16.29±1.01）mmHg 比较，P=0.000，P=0.000），说明 2 种建模方法已经使 PH 形成。

CH 和 MCT 诱导均能成功建立 PH 模型，但 CH 21 d 大鼠 mPAP 比 MCT 21 d 组低[CH21 d 组（36.9±0.95）mmHg，MCT 21 d 组（41.52±1.51）mmHg，P=0.000]，说明相同时间内 MCT 诱导建立 PH 模型 mPAP 升高明显（表 1）。

2.3 RVHI 测定

CH 组及 MCT 组大鼠 RVHI 较 CON 组大鼠增高，并且随饲养时间延长，RVHI 增高更加明显，以 CH 21 d 组和 MCT 21 d 组显著[CH 21 d 组：（46.7±0.7）%，MCT 21 d 组：（51.6±3.4）%，分别与 CON 组：（19.7±0.8）% 比较，P=0.000，P=0.000]，说明 2 种方法建模后大鼠右心室肥厚明显。

CH 和 MCT 诱导成功建立 PH 模型后，均使右心室肥厚，但 CH 21 d 大鼠 RVHI 比 MCT 21 d 组低[CH 21 d 组：（46.7±0.7）%，MCT 21 d 组：（51.6±3.4）%，P=0.000]，说明相同时间内 MCT 对大鼠右心室影响更大（表 1）。

表 1 mPAP 和 RVHI 结果（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Tab.1 Results of mPAP and RVHI（n=6，$\bar{x}\pm s$）

分组	mPAP（mmHg）	RVHI（%）
CON 组	16.29±1.01	19.71±0.83
CH 3 d 组	16.33±0.82	20.00±1.10
CH 7 d 组	22.19±0.85	28.05±1.18
CH 14 d 组	29.22±0.69	37.71±1.16
CH 21 d 组	36.90±0.95[a]	46.68±0.70[b]
MCT 3 d 组	16.52±1.40	20.06±0.58
MCT 7 d 组	24.46±0.83	28.90±1.03
MCT 14 d 组	33.96±0.93	40.99±0.90
MCT 21 d 组	41.52±1.51[c]	51.57±1.15[d]
F 值	768.936	2 128.219
P 值	0.000	0.000

注：a，CH 21 d 组与 CON 组 mPAP 比较，P=0.000；b：CH 21 d 组与 CON 组 RVHI 比较，P=0.000；c：MCT 21 d 组与 CON 组 mPAP 比较，P=0.000；d：MCT 21 d 组与 CON 组 RVHI 比较，P=0.000

2.4 CaSR mRNA 时序性表达

CH 组和 MCT 组大鼠 PH 形成过程中，CaSR mRNA 表达水平如表 2 所示（CON 组为：1.000 0±0.109 9），其表达在 CH 21 d 和 MCT 21 d 的时候最高，分别为：3.921 9±0.047 7、4.512 3±0.091 0，均高于正常大鼠，差异有统计学意义（F=2 810.637，P=0.000），而 CH 21 d 和 MCT 21 d 两者相比，MCT 21 d 高于 CH 21 d 组，两者间有统计学差异（P=0.000）。

2.5 CaSR 蛋白表达

在 CON 组大鼠、CH 及 MCT 组大鼠肺动脉中均检测到 CaSR 蛋白的表达，而在 CH 组及 MCT 组大鼠中，CaSR 蛋白表达均高于 CON 组，并随着干预时间（缺氧及 MCT 药物诱导时间）延长，CaSR 蛋白趋势逐渐升高，其中以 CH 21 d 和 MCT 21 d 最为明显，如图 1 所示。

表 2 CaSR RNA 表达情况（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Tab.2 Expression of CaSR mRNA（n=6，$\bar{x}\pm s$）

处理时间（d）	CH	MCT
3	1.497 8±0.047 8	1.606 2±0.070 9
7	2.461 5±0.040 7	2.284 5±0.073 6
14	3.038 4±0.110 2	3.231 9±0.044 9
21	3.921 9±0.047 7	4.512 3±0.091 0

注：F=2 810.637，P=0.000

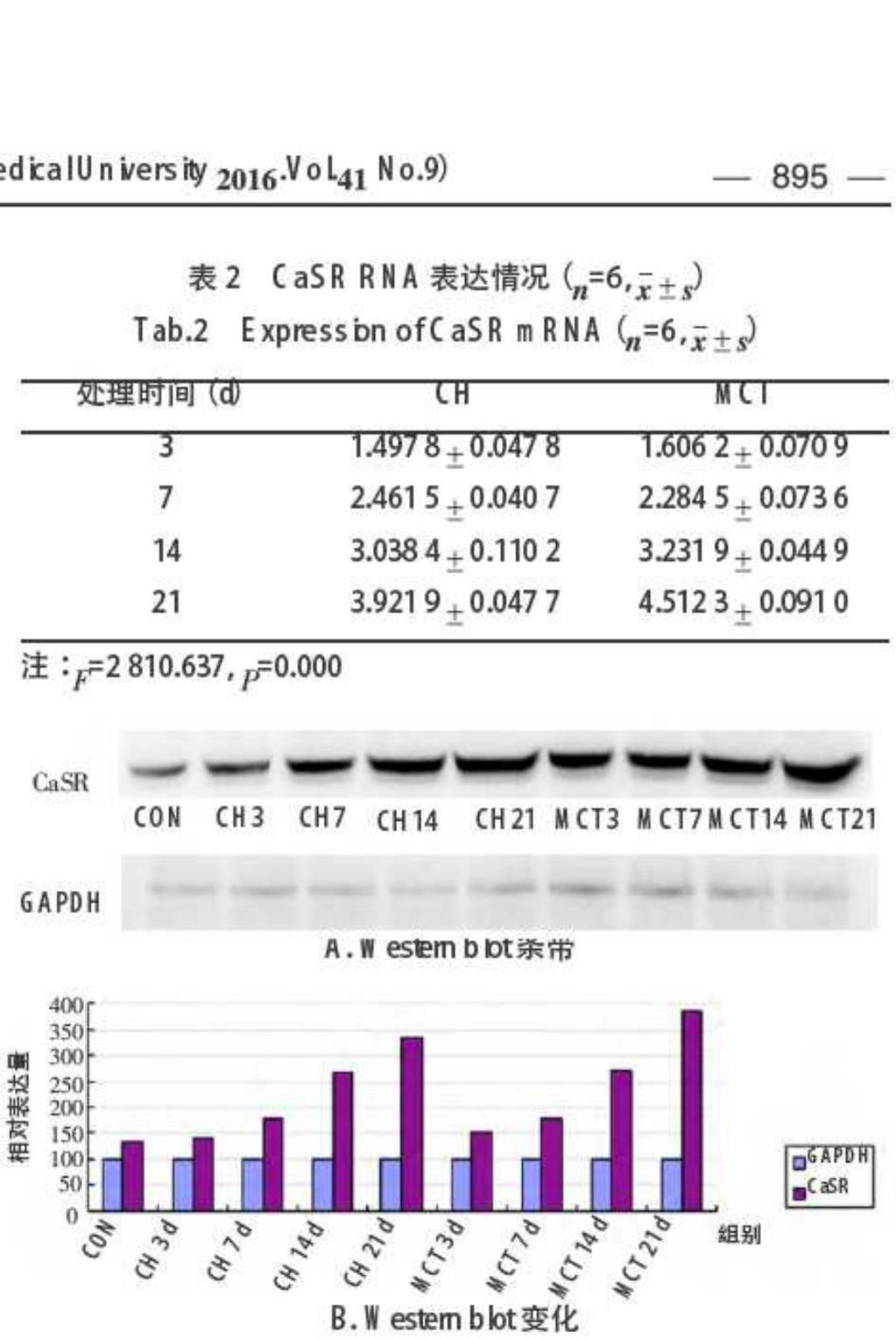


图 1 Western blot CaSR 蛋白表达

Fig.1 Expression of CaSR protein tested by Western blot

3 讨 论

PH 是临床上常见的一种病因复杂、治疗困难、预后极差的疾病，多种疾病或病因都会导致 PH 的产生，如先天性心脏病、心肌疾病、结缔组织病、完全性阻塞性肺气肿、肺栓塞、肿瘤、药物、膈疝及多种未知因素等。目前 PH 病因及发病机制仍没有明确统一的阐明，而对于 PH 的治疗也缺乏直接有效的手段和方法，现有手段和药物治疗均无法从根本上逆转 PH，未能从根本上解决 PH。因此，对于 PH 病因及机制的研究显得尤为重要。

CaSR 是 G 蛋白偶联受体的一种，它是由内、外结构域、7 次跨膜结构域组成。自其 1993 年被首次克隆出来后[3]，对于该受体功能的研究也越来越深入，现已经证实 CaSR 能够维持机体内细胞内 Ca^{2+} 稳态的作用并参与了机体细胞增值、分化、凋亡等过程。2003 年 CaSR 被报道在大鼠心肌组织中有表达[6]，随后并证实它参与了心肌缺血再灌注损伤[7]。随后有研究发现 CaSR 在大鼠肺动脉平滑肌细胞中有功能性表达，且 CaSR 激动剂和拮抗剂会对其表达产生影响[8]。Yamamura 等[9-10]证实特发性 PH（idiopathic pulmonary hypertension，IPH）患者肺动脉平

滑肌细胞 CaSR 表达比正常人高，且 CaSR 能够促使正常肺动脉平滑肌细胞的增殖，其拮抗剂 NPS-2143 能够抑制 CaSR 的表达及血管的重构。

在 PH 的基础研究中，建立 PH 模型主要有低氧、药物诱导、手术分流等方式，而低氧及药物诱导是最为常用的安全可靠的手段建立 PH 模型。缺氧可直接或者间接导致血管内皮细胞损伤，引发肺血管重塑，最终导致 PH。利用缺氧建立 PH 模型方法也较多，有常压低氧型、低压低氧性、低氧高二氧化碳等，缺氧的时间也各不相同。常压低氧连续慢性缺氧可导致大鼠肺血管重构、平滑肌细胞发生增生或增殖，能够可靠的复制 PH 模型[11-12]。

MCT 为双稠吡咯啶生物碱属，腹腔或者皮下注射后 MCT 可经细胞色素 P450 单氧化酶激活为具有生物活性的 MCT 吡咯[13]，作用于肺动脉血管上内皮细胞靶点，损伤血管内皮，促使血管活性物质、炎症因子释放，引发血管收缩、平滑肌细胞异常增生、细小动脉阻塞或者闭塞、血管重构，肺动脉压力持续上升，最终形成 PH[14]。利用 MCT 诱导 PH 已经是一种稳定成熟的药物建立 PH 模型手段。

本实验利用 CH 和 MCT 诱导的方法建立 PH 模型，比较常用 2 种模型相同时间建立 PH 的效果及比较不同模型大鼠肺动脉中 CaSR 表达的差异性。结果显示 CH 组和 MCT 组大鼠 mPAP、RVHI 与正常组相比均随着干预时间延长而加重，趋势相同，在实验 21 d 表现显著，这提示 2 种 PH 模型都成功建立。

通过对比发现，在相同干预时间内 MCT 组大鼠 mPAP、RVHI 都较 CH 组大鼠增高更加明显，这说明相同时间内 MCT 诱导大鼠形成 PH 的程度比 CH 要重，如需得到某一程度（中度或者重度）的 PH 模型，MCT 诱导需要的时间更短。而依照在实验中的经验，CH 建立 PH 模型稍复杂，需要控制较为准确的氧气浓度[本实验控制在 (10.0±0.2)%，同时缺氧箱内温度及湿度也必须合适，而 MCT 建立 PH 模型相对简单，便于管理，但是在实验中发现，MCT 组大鼠建模中有大量胸腹水形成，其他脏器的损害较 CH 组程度重。由此可见利用 MCT 诱导 PH 模型比建立缺氧模型更加简单、易于管理及操作，但是如果继续延长干预时间，随着 PH 程度的加重及 MCT 会引发的其他器官、脏器并发症的出现，实验大鼠的存活率会逐渐下降[15-16]。

由研究结果可以看出 CH 组和 MCT 组大鼠随着干预时间延长，肺动脉压力逐渐升高，而 CaSR mRNA 及蛋白的表达水平也逐渐升高，两者趋势一致，即 CaSR 的表达水平与大鼠肺动脉压力的升高程度呈正相关。在机体内 CaSR 是通过感受细胞外 Ca^{2+} 浓度的变化来调节细胞内外 Ca^{2+} 稳态，而 CaSR 的表达变化也会直接影响机体 Ca^{2+} 浓度，引发血管收缩反应，通过本实验证实 CaSR 表达随着肺动脉压力的升高而增高，从而间接说明了 CaSR 可能参与了 PH 的发生及发展过程。

PH 是一种病因、机制、治疗都非常复杂的疾病，关于它以及它与 CaSR 的基础研究也不断的在进行，而 CH 和 MCT 诱导 PH 模型是目前研究 PH 较为经典的模型之一，本研究发现 MCT 建模方法优于 CH 建立 PH 模型，CaSR 在两种经典 PH 模型中均呈现高表达，其表达水平与肺动脉压力的升高呈正相关，提示 CaSR 参与 PH 的形成等。在后续实验中将会对 CaSR 能否延缓 PH 进程及其信号传导通路等方面进行研究，以期为 PH 的发病机制及治疗的研究奠定一点的基础。

参 考 文 献

[1] Ghofrani HA, Barst RJ, Benza RL, et al. Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1 Suppl): 108-117.

[2] Berra RR, Raqeeb A, Laforenza U, et al. Cardiac microvascular endothelial cells express a functional Ca^{2+}-sensing receptor[J]. J Vasc Res, 2009, 46(1): 73-82.

[3] Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+}-sensing receptor from bovine parathyroid [J]. Nature, 1993, 366(6455): 575-580.

[4] Cohen A, Silverberg SJ. Calcimimetics: therapeutic potential in hyperparathyroidism[J]. Curr Opin Pharmacol, 2002, 2(6): 734-739.

[5] Wada M, Nagano N. Control of parathyroid cell growth by calcimimetics[J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(Suppl 3): 13-17.

[6] Wang R, Xu C, Zhao W, et al. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(12): 2680-2688.

[7] 孙轶华，张 力，徐长庆，等. 不同鼠龄大鼠心肌组织中钙敏感受体的表达及其在心肌缺血再灌注损伤中的改变[J]. 中国病理生理杂志，2006，22(8)：1506-1509

[8] 李光伟，邢文婧，郝静辉，等. 钙敏感受体在缺氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 中国病理生理杂志，2010，26(12)：2433-2437.

心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001006

Rce1在膀胱癌的表达及其对T24细胞凋亡的影响

曾强锋[1]，黄亮亮[1]，王德林[1]，何　江[2]，吴文强[3]，何云锋[1]，李　英[4]，麦　力[5]，李建君[1]，刘俊男[1]

（1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆 400016；2. 重庆医科大学附属大学城医院消化神经中心，重庆 401331；
3. 重庆市綦江区人民医院泌尿外科，重庆 401420；4. 重庆医科大学生命科学院，重庆 400016；
5. 重庆医科大学生物化学与分子生物学肿瘤研究中心，重庆 400016）

[摘　要] 目的：探讨Rce 1（Ras and a-factor converting enzyme 1）在膀胱癌组织及对应癌旁组织中的表达差异及其意义，探究慢病毒介导shRNA沉默Rce1基因对人膀胱癌细胞株T24细胞凋亡的影响。方法：采用qRT-PCR和Western blot技术检测Rce1在12例膀胱癌组织及对应癌旁组织中mRNA和蛋白表达情况，采用免疫组化技术检测76例膀胱癌组织及对应癌旁组织中Rce1表达情况，结合临床病理资料，分析Rce1表达与临床病理特征的关系。设计针对Rce1基因的shRNA慢病毒干扰载体感染T24细胞，经嘌呤霉素筛选后建立稳定感染细胞系，实时荧光定量PCR、Western blot分别检测感染后各组细胞Rce1 mRNA和蛋白表达水平，应用流式细胞仪检测T24细胞凋亡改变情况。结果：qRT-PCR和Western blot显示在12对癌及癌旁组织中Rce1差异性表达，差异有统计学意义（$P=0.00$）；78例癌组织中Rce1阳性表达率为70.5%（55/78），癌旁组织中阳性率为19.0%（4/21），组间差异有统计学意义（$P=0.000$）；统计学分析表明，Rce1表达量与肿瘤组织学分级、T分期和肿瘤是否远处转移存在相关关系（$P<0.05$）；Kaplan-Meier生存分析显示，Rce1阳性表达与病人术后生存时间呈负相关关系（$P=0.016$）。与空白对照组和阴性对照组相比，感染shRNA慢病毒干扰载体细胞组Rce1 mRNA和蛋白表达水平明显下调（$P=0.000$），细胞凋亡明显增加。结论：Rce1在膀胱癌组织中表达高于癌旁组织，Rce1在膀胱癌的发生发展中可能发挥重要作用，慢病毒介导shRNA沉默Rce1基因能有效下调Rce1在T24细胞中表达，并诱导细胞凋亡；Rce1有望成为膀胱癌临床诊治和预后的一个新指标。

[关键词] 膀胱癌；Rce1；免疫组化；生存分析

[中图分类号] R737.14　　[文献标志码] A　　[收稿日期] 2015-11-02

作者介绍：曾强锋，Email：1293831449@qq.com，
研究方向：泌尿系肿瘤的基因治疗。

通信作者：王德林，Email：dlwangws@sina.com。

基金项目：重庆市基础科学与前沿技术研究专项资助项目（编号：cstc2015jcyjB0228）；重庆市渝中区科技计划资助项目（编号：20150111）；重庆市卫生和计划生育委员会基金资助项目（编号：20143061）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160623.1549.018.html（2016-06-23）

[9] Yamamura A，Guo Q，Yamamura H，et al. Enhanced Ca^{2+}-sensing receptor function in idiopathic pulmonary arterial hypertension[J]. Circ Res，2012，111（4）：469-481.

[10] Yamamura A，Yamamura H，Yuan JX. Enhanced Ca^{2+}-sensing receptor function in pulmonary hypertension[J]. Yakugaku Zasshi，2013，133（12）：1351-1359.

[11] Wang J，Weigand L，Lu W，et al. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca^{2+} in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. Circ Res，2006，98（12）：1528-1537.

[12] 彭公永，胡国平，周玉民，等. 常压慢性持续缺氧大鼠肺动脉高压模型的建立[J]. 广东医学，2011，32（5）：573-574.

[13] Bal E，Ilgin S，Atli O，et al. The effects of gender difference on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Hum Exp Toxicol，2013，32（7）：766-774.

[14] Campian ME，Hardziyenka M，Michel MC，et al. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension?[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2006，373（6）：391-400.

[15] Tofovic SP，Jones T，Petrusevska G. Dose-dependent therapeutic effects of 2-Methoxyestradiol on Monocrotaline-Induced pulmonary hypertension and vascular remodeling[J]. Prilozi，2010，31（1）：279-295.

[16] 马　凯，邢泉生，邢介龙，等. 不同剂量野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的实验研究[J]. 现代生物医学进展，2013，13（21）：4005-4009.

责任编辑：张辉洁）