DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.015
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
1718 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1718-04

肺癌病人痰细胞中 *p16* 基因高甲基化分析

刘晋[1],安 倩[2],孙文越[2],黄进丰[2],潘秦镜[2],曹 佳[1],程书钧[2],高燕宁[2] ([1]第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038;[2]中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤研究所,北京 100021)

提 要:目的 分析肺癌病人痰标本中 *p16* 基因启动子区域异常高甲基化的改变情况,评价该指标作为肺癌辅助诊断分子标记物的价值。方法 运用半巢式甲基化特异性PCR技术,检测94例原发性肺癌病人痰标本和部分对应肿瘤组织,以及10例慢性炎病例痰标本中 *p16* 基因启动子区域的甲基化改变。结果 74%的肺癌病人痰标本中检测到了 *p16* 基因异常高甲基化,与传统细胞学相比(46.8%),痰标本中 *p16* 基因异常高甲基化对肿瘤的检出率灵敏度更高($P<0.01$);痰细胞中 *p16* 甲基化检测和细胞学相结合,对肿瘤的检出率可达86.17%(81/94)。如果痰标本中 *p16* 基因启动子区域发生高甲基化,其对应的肿瘤组织中 *p16* 基因亦为高甲基化。10例慢性炎病人痰标本中仅3例检测出 *p16* 基因甲基化。结论 痰标本中 *p16* 基因甲基化是临床肺癌辅助诊断的有效分子生物标记物之一。

关键词:肺癌;*p16* 基因;DNA 甲基化;痰
中图法分类号:R734.2;R394.2;R446.19 文献标识码:A

Analysis of *p16* hypermethylation in sputum samples from lung cancer patients

LIU Jin-yi, AN Qian, SUN Wen-yue, HUANG Jin-feng, PAN Qin-jing, CAO Jia, CHENG Shu-jun, GAO Yan-ning (Department of Hygiene Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To analyze the aberrant methylation of *p16* promoter in sputum samples from lung cancer patients and to evaluate *p16* hypermethylation as an effective biomarker for the early auxilliary diagnosis of lung cancer. **Methods** A modified semi-nested methylation-specific PCR (MSP) was performed for the detection of *p16* hypermethylation in sputum and corresponding partial tumor tissue samples from 94 cases of lung cancer patients and 10 cases of chronic inflammation. **Results** The hypermethylation of *p16* promoter was detected in 74% of the sputum specimens. Compared with conventional cytological analysis, detection of *p16* hypermethylation in sputum samples could be a more sensitive and specific approach for the diagnosis of lung cancer. Combination of cytological analysis and detection of *p16* hypermethylation in sputum could identify 86.17% (81/94) lung cancer. The patients whose sputum cells had hypermethylated *p16* gene also exhibited aberrant methylation in their tumor cells. In 10 cases of chronic inflammation, *p16* hypermethylation was only detected in 3 cases. **Conclusion** Detection of *p16* hypermethylation in sputum of the lung cancer patients might offer an effective means for the earlier auxillary diagnosis of this malignancy.

Key words: lung cancer; *p16* gene; DNA methylation; sputum

肺癌是全球性的恶性肿瘤,其死亡率和发病率在世界范围的肿瘤性疾病中均为第一位[1]。在我国,肺癌的发病率和死亡率一直呈上升趋势,严重危害人民的健康和生命[2]。降低肺癌死亡率的策略主要在于早发现、早期诊断断和早治疗,其中早期诊断发现肿瘤又是提高治疗效果的关键[3~5]。

传统的细胞学、影像学技术在肺癌的诊断中起着重要作用,但在高危人群的筛查和肺癌早期诊断方面灵敏度和/或特异性相对较差[4,5]。近年来,随着对肺癌发生、发展过程中分子遗传学机制的认识,人们开始注意利用有效的分子生物标记进行肺癌辅助诊断的研究[5,6]。

DNA 异常甲基化是人类肿瘤中常见的改变,且广泛参与了肿瘤的发生、发展过程。DNA 异常的低甲基化可造成染色体不稳定,促进染色体的断裂、易位和丢失、以及原癌基因的激活;而 DNA 异常高甲基化主要发生在抑癌基因的启动子区域,是造成基因表达失活

基金项目:国家"九五"攻关项目(96-906-01-14);国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1998051207)
作者简介:刘晋(1970-),男,四川省苍溪县人,博士,讲师,主要从事分子毒理学方面的研究。电话:(023)68752296
通信作者:高燕宁,电话:(010)67799328
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-06-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的重要机制之一，因而分析 DNA 异常甲基化并作为分子生物标志物，在肿瘤的诊断、治疗和预后中均显示出广阔的应用前景[7]。我们曾运用甲基化特异性 PCR (Methylation specific PCR，MSP)技术，曾分析了 137 例中国肺癌病人血浆和对应肿瘤标本中 *p*16 基因启动子区域的异常甲基化情况，结果表明在血浆和肿瘤组织中的 *p*16 基因甲基化检出率均较高[75.2%(103/137)；80.4%(90/112)]；而且，只有肿瘤组织中存在 *p*16 甲基化的病例其对应的血浆标本能检测出这一改变，提示 *p*16 基因异常甲基化可能是辅助肺癌诊断的有效生物标志物之一[8]。

然而，相对于血浆标本，痰标本的采集具有取材更为方便、无创性和病人易于接受等优点，是进行高危人群大规模筛选和肺癌辅助临床诊断更好的取材方式。为此，我们进一步分析了我国肺癌病人痰标本中 *p*16 基因异常甲基化情况及其作为辅助肺癌临床诊断的分子生物标记的应用价值。

1　材料和方法

1.1　临床标本收集

94 例原发性肺癌痰标本取自中国医学科学院肿瘤医院胸外科收治病人，其中鳞癌(Squamous cell carcinoma，SCC)42 例、腺癌(Adenocarcinoma，ADC)31 例、小细胞肺癌(Small cell lung cancer，SCLC)12 例、腺鳞癌(Adenosquamous carcinoma，ASC)7 例、大细胞肺癌(Large cell lung cancer，LCLC)2 例；部分对应的肿瘤组织 53 例；10 例慢性炎病人痰标本取自门诊病人。所有标本均为有确切的组织病理学诊断。痰标本由肿瘤医院临床细胞学室提供，经 ThinPrep 系统的 CytoLyt 溶液(CYTYC，美国)处理 15 min，1 000 r/min 离心收集细胞；PBS 洗两次，细胞置－20 ℃保存。病人的痰标本均取自术前，在术后收集相应的肿瘤组织标本，置－80 ℃保存。

1.2　DNA 提取

肿瘤组织微切割以及 DNA 的提取参照文献[8]进行。痰细胞 DNA 提取根据细胞量的多少加入消化液(10 mmol/L Tris-HCl，50 mmol/L KCl，0.1% Triton-X，0.2 mg/ml 蛋白酶 K)200～500 μl，55 ℃水浴 3 h 或 37 ℃水浴 24 h，95 ℃变性蛋白酶 K 10 min，冷却后 12 000× *g* 离心 10 min，取上清液置－20 ℃保存。

1.3　*p*16 基因异常甲基化检测

1.3.1　基因组 DNA 亚硫酸氢钠处理以及 PCR 体系　按照文献[9]进行。

1.3.2　半巢式甲基化特异性 PCR　PCR 引物序列见表 1[9]。第 1 次 PCR 引物为 *p*16MS/*p*16MAS2，PCR 反应退火温度为 64 ℃；取第 1 次 PCR 反应产物 5 μl，以 *p*16MS 和 *p*16MAS1 为引物，进行第 2 次扩增，PCR 反应退火温度为 67 ℃。

所有样品均进行了 *p*16 基因非甲基化检测，第 1 次 PCR 反应引物为 *p*16US/*p*16UAS2，第 2 次 PCR 反应引物为 *p*16US/*p*16UAS1。PCR 反应体系同前，反应退火温度分别为 58 ℃和 62 ℃。

表 1　半巢式 MSP 引物序列

Tab 1　Primer sequence of simi-nested MSP

Primer	DNA sequence 5′ → 3′
*p*16MS	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC
*p*16MAS1	GACCCCGAACCGCGACCGTAA
*p*16MAS2	CCACCTAAATCGACCTCCGACCG
*p*16US	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT
*p*16UAS1	CAACCCCAAACCACAACCATAA
*p*16UAS2	CCACCTAAATCAACCTCCAACCA

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析系统记录数据。每一样品 PCR 扩增至少重复 1 次。前列腺癌细胞株 TSU-PR1 基因组 DNA 作为 *p*16 基因甲基化检测的阳性对照[9]。

1.4　统计学分析

*p*16 基因甲基化改变与肺癌病人不同临床标本之间的相关性，以及痰标本的 *p*16 基因甲基化检测与传统细胞学的比较分析，均利用 SPSS 软件进行 χ^2 检验。

2　结果

在 94 例肿瘤病人痰标本，*p*16 基因高甲基化总体检出率为 74.5%，如果以此作为肿瘤诊断的标志，与传统细胞学相比(46.8%)，差异极为显著($P<0.01$)，说明 *p*16 基因甲基化作为分子诊断的标志物具有较高的灵敏度，见表 2。除 SCLC 外，在 SCC、ADC 和 ASC 痰标本中 *p*16 基因甲基化检出率均显著高于传统的细胞学诊断率($P<0.01$)，见表 2。在 10 例病理学诊断为慢性炎症病人中，仅 3 例痰标本中检出 *p*16 基因的甲基化改变。

表 2　肺癌病人痰标本中 *p*16 基因甲基化检测及细胞学诊断结果

Tab 2　Results of hypermethylation of *p*16 gene and cytological analysis of sputum samples from lung cancer patients

Histology	Methylation of *p*16 gene			Cytology		
	M	U	Total (%)	Positive	Negative	Total (%)
SCC (42)	34	8	34/42(81.0)	23	19	23/42(54.8)
ADC (31)	21	10	21/31(67.7)	9	22	9/31(29.0)
SCLC (12)	7	5	7/12(58.3)	9	3	9/12(75)
ASC (7)	6	1	6/7(85.7)	2	5	2/7(28.6)
LCLC (2)	2	0	2/2(100)	1	1	1/2(50)
Total(94)	70	24	70/94(74.5)	44	50	44/94(46.8)#

M：Hypermethelation of *p*16 gene；U：Unmethylation of *p*16 gene；#：$P<0.01$ *vs* methylation of *p*16 gene

在不同类型的肿瘤中，痰标本中 *p*16 基因甲基化异常检出率均较高，说明肺癌病人痰细胞中 *p*16 基因的异常改变是一个普遍的现象，见表 2。在 SSC 和 ADC 痰标本中，*p*16 基因甲基化在前者中较高，但差异不显著(80.5% *vs* 66.7%)。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ/Ⅳ期 SCC 病人痰标本中 *p*16 基因检出率很接近(77.8% *vs* 81.0% *vs* 81.8%)，而细胞学对肿瘤的检出率在晚期 SCC 病人中较高(55.6% *vs* 42.9% *vs* 81.8%)，见表 3；Ⅰ期 ADC 病人痰标本中 *p*16 基因检出率比细胞学对Ⅰ期 ADC 肿瘤的检出率明显高(100% *vs* 22.2%，$P<0.01$)，见表 4，这表明在标本中异常细胞数目极少的情况下，分子诊断具有更高的灵敏度。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 肺鳞癌病人痰标本和肿瘤组织中 *p16* 基因甲基化检测及细胞学诊断结果

Tab 3 Results of hypermethylation of *p16* gene detection and cytology observation of sputum and tumor tissue from squamous cell cancinoma patients

Stage(*n*)	1st PCR			2nd PCR			Cytology			Tumor		
	M	U	Total (%)	M	U	Total (%)	+	−	Total (%)	M	U	Total (%)
Ⅰ (9)	7	2	77.8	7	2	77.8	5	4	55.6	5	0	100
Ⅱ (21)	12	9	57.1	17	4	81.0	9	12	42.9	10	4	71.4
Ⅲ/Ⅳ (11)	8	3	72.7	9	2	81.8	9	2	81.8	5	0	100
Total (41)	27	14	65.9	33	8	80.5	23	18	56.1#20	4		83.3

M: Hypermethelation of *p16* gene; U: Unmethylation of *p16* gene; #: $P<0.01$ *vs* methylation of *p16* gene(2nd PCR)

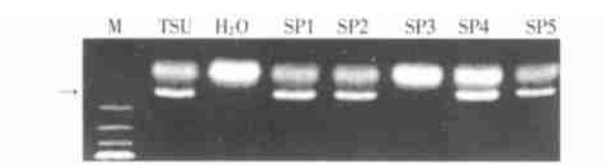
表 4 肺腺癌病人痰标本和肿瘤组织中 *p16* 基因甲基化检测及细胞学诊断结果

Tab 4 Results of hypermethylation of *p16* gene and cytology in sputum and tumor tissue from patients with adenocarcinoma

Stage(n)	1st PCR			2nd PCR			Cytology			Tumor		
	M	U	Total (%)	M	U	Total (%)	+	−	Total (%)	M	U	Total (%)
Ⅰ (9)	6	3	66.7	9	0	100.0	2	7	22.2	5	0	100.0
Ⅱ(14)	5	9	35.7	7	7	50.0	6	8	42.9	6	3	66.7
Ⅲ/Ⅳ(7)	2	5	28.6	4	3	57.1	2	5	28.6	1	2	33.3
Total(30) *	13	17	43.3	20	10	66.7	10	20	33.3#12	5		70.6

M: Hypermethylation of *p16* gene; U: Unmethylation of *p16* gene; +: Positive; −: Negative; #: $P<0.01$ *vs* methylation of *p16* gene(2nd PCR)

我们分析了 53 例对应肿瘤组织 *p16* 基因甲基化发生情况，总体上看，痰标本中 *p16* 甲基化呈阳性的病例其对应的肿瘤组织中 *p16* 基因也发生高甲基化。此外，通过对所有转化后的 DNA 样品进行 *p16* 非甲基化分析，发现全部样品均有非甲基化 PCR 产物，表明 DNA 的亚硫酸氢钠修饰是成功的。痰标本中 *p16* 基因甲葵化电泳图见图 1。



→: Products of second PCR (150 bp); M: DNA marker; TSU: TSU-PR1, a prostate cancer cell line with methylated *p16* alleles only; SP: Sputum specimen

图 1 半巢式 **MSP** 分析肺癌病人痰标本中 ***p16*** 基因甲基化电泳图

Fig 1 Representative electrophoretic picture of aberrant methylation of the *p16* gene promoter in corresponding sputum and brushing samples

3 讨论

肺癌病人或者高危人群的支气管上皮脱落细胞中经常含有肿瘤细胞或处于癌变早期的细胞群体，它们常带有遗传/遗传外的异常改变，为分子诊断提供了可能性[6,10]。已有报道表明，在肺癌病人的痰细胞、支气管灌洗液、支气管镜刷取细胞中，均可以检测出 p53，K-ras 基因的突变，而且 p53 基因的突变在吸烟非肺癌病人痰细胞中就能检测出来[11~13]；微卫星不稳定性改变也是肺癌病人痰细胞中常见的遗传学改变，在临床出现肿瘤之前就可检测到[11,14]。Lacroix 等[15] 利用 RT-PCR 技术分析了肺癌病人痰和血液中 7 种不同的神经内分泌因子的转录情况，发现这些主要在肿瘤细胞中高表达的细胞因子在痰细胞中也处于高表达状态。上述研究表明，痰细胞中出现的分子细胞学异常在对应的肿瘤组织中均可检测到。同时，在少数前瞻性的研究中，具有痰细胞分子细胞学异常改变的非肺癌病人，一般均可能发展成为肺癌[13~17]，这无疑为利用痰细胞进行肺癌分子诊断奠定了基础。

p16 基因是细胞周期的负调控因子，通过与细胞周期蛋白竞争性结合 CDK4 和 CDK6，阻止 Rb 磷酸化失活，从而参与细胞周期负调控。大量研究表明，*p16* 基因的异常改变参与了多种肿瘤的发生[18]。我们前期的研究表明，在肺癌组织中 *p16* 基因的失活主要以一条等位基因丢失，另一条等位基因甲基化为主[19]。在本研究中发现肿瘤组织中 *p16* 基因异常甲基化检出率很高，说明 *p16* 基因异常甲基化是中国人肺癌中常见的分子生物学改变，是该基因失活的重要方式之一。

p16 基因甲基化在肺癌病人痰标本中具有较高的检出率，痰标本中 *p16* 基因甲基化的病例，其对应的肿瘤组织中 *p16* 基因也处于甲基化状态，表明痰细胞中 *p16* 甲基化改变源于肿瘤细胞。在 10 例慢性炎病人的痰标本中，仅 3 例发现有 *p16* 基因甲基化改变。Palmisao 等研究表明，*p16* 基因在慢性吸烟者支气管上皮细胞和肺癌癌前病变中就已经存在高甲基化；甚至在临床发现肿瘤 5~35 个月之前，患者的痰细胞中就能检测出 *p16* 基因异常甲基化[7]。因此我们实验中 3 例发现有 *p16* 基因甲基化的病人发展成为肺癌的可能性极大，我们也将进一步定期监测。如果将 *p16* 基因甲基化在痰标本中的检出率作为肺癌诊断的分子指标，与传统的细胞学指标相比，其灵敏度有显著增加，见表 2。如果将痰细胞中 *p16* 甲基化检测和细胞学诊断相结合，对肿瘤的检出率可达 86.17%(81/94)；进一步结合血浆 *p16* 甲基化检测数据，则可发现 92.15%(47/51)的肿瘤病人，因此 *p16* 基因甲基化检测是辅助肺癌诊断的有力手段。Palmisao 等[6] 利用 *p16*/MGMT 甲基化组合在肺癌病人痰标本中的阳性率为 100%；我国吴小军等[20] 也发现 p53、K-ras 等多基因联合突变分析，可以大为提高肺癌的诊断。这提示我们可以通过以下途径来提高诊断灵敏度：一是分析不同来源的材料中个别标志物的改变情况，如同时分析病人血浆、痰细胞等；二是增加标志物数量，分析痰标本中多个标志物联合的改变情况，以便提高诊断的灵敏度和特异性。我们

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

认为后者的可行性和操作性更佳。

本研究表明, $p16$ 基因甲基化在肺癌病人的痰、血浆中有很高的阳性率, 是肺癌辅助诊断的候选标志物之一。但是, $p16$ 基因在慢性吸烟者和健康人的痰标本及血浆标本中甲基化的情况还不清楚, 我们将在这一方面进行更深入的研究, 从而全面评价 $p16$ 基因甲基化在肺癌发生中的作用及其用于辅助诊断标志物的可行性。

参考文献:

[1] Parkin D M, Pisani P. Ferlay J. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 1999, 49(1): 33—64.

[2] 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 等. 中国恶性肿瘤死亡率 20 年变化趋势和近期预测分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(1): 3—9.

[3] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, *et al*. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(1): 69—70.

[4] Kersting M, Friedl C, Kraus A, *et al*. Differential frequencies of $p16$-INK4a promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(18): 3221—3229.

[5] Gazdar A F, Minna J D. Molecular detection of early lung cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(4): 299—301.

[6] Palmisano W A, Divine K K, Saccomanno G, *et al*. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res, 2000, 60(21): 5954—5958.

[7] Costello J F, Plass C. Methylation matters[J]. J Med Genet, 2001, 38(5): 285—303.

[8] An Q, Liu Y, Gao Y, *et al*. Detection of $p16$ hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Lett, 2002, 188(1-2): 109—114.

[9] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al*. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9821—9826.

[10] Mao L, Hruban R H, Boyle J O, *et al*. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer[J]. Cancer Res, 1994, 54(7): 1634—1637.

[11] Tockman M S. Advances in sputum analysis for screening and early detection of lung cancer[J]. Cancer Control, 2000, 7(1): 19—24.

[12] Minamoto T, Mai M, Ronai Z. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers—a review[J]. Cancer Detect Prev, 2000, 24(1): 1—12.

[13] Ahrendt S A, Chow J T, Xu L H, *et al*. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(4): 332—339.

[14] Mao L, Lee D J, Tockman M S, *et al*. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(21): 9871—9875.

[15] Iacroix J, Becker H D, Woerner S M, *et al*. Sensitive detection of rare cancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preproGRP-specific RT-PCR[J]. Int J Cancer, 2001, 92(1): 1—8.

[16] Ronai Z, Yabubovskaya M S, Zhang E, *et al*. K-ras mutation in sputum of patients with or without lung cancer[J]. J Cell Biochem Suppl, 1996, 25(Suppl): 172—176.

[17] Belinsky S A, Nikula K J, Palmisano W A, *et al*. Aberrant methylation of $p16$(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(20): 11891—11896.

[18] Rocco J W, Sidransky D. $p16$(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression[J]. Exp Cell Res, 2001, 264(1): 42—55.

[19] 安　倩, 董向阳, 张建军, 等. 非小细胞肺癌 $p16$/CDKN2 基因失活的研究[J]. 癌症, 2001, 20(6): 591—594.

[20] 吴小军, 李清泉, 陈雪芹, 等. 肺癌患者组织和痰液中 p53 基因、K-ras 基因突变[J]. 肿瘤防治研究, 2000, 27(1): 33—35.

(编辑　汪勤俭)

(上接 1717 页)

3　讨论

细胞 DNA 合成期和分裂期, 既 G_2+M 期是细胞增殖的两个重要指标, 两者之合称为增殖指数, 而增殖指数的大小则反映细胞增殖水平的高低。通过实验发现, 缺氧 12、24、48 h 均可促进 ASMC 细胞的增殖。且明显高于常氧组说明 DNA 合成加快, 细胞增加大。实验我们发现缺氧到一定时间后, 细胞的增殖达到高峰并随着缺氧时间的延长呈逐渐下降趋势, 见表 1。造成这种现象的原因可能是缺氧对细胞除了促增生效应外, 尚有其它的损害作用, 尚待深入探讨。此外, 培养液积聚了大量细胞代谢有害成分, 也影响细胞的生长。

细胞凋亡是细胞内程序活化而致的细胞自杀, 与细胞坏死不同, 也有别与细胞碎片。正常情况下也有少量的细胞凋亡发生。而缺氧条件下则可以明显诱导细胞凋亡的发生。在本实验条件下, 缺氧后凋亡细胞数明显高于常氧组。而且随着缺氧时间的增加凋亡细胞数也呈增加的趋势。从整个情况看短期缺氧(12 h)时细胞的增殖指数和细胞凋亡数均明显增高, 可当缺氧时间增加时, 细胞凋亡数继续增加而细胞的增殖却反尔有所下降。可能的原因是当细胞缺氧时由于自身的代偿作用刺激细胞的合成和有丝分裂加速, 使得细胞的增殖指数明显增高。而细胞凋亡则随着缺氧时间的增加凋亡数也随着增加, 这可能是缺氧时间越长细胞内细胞凋亡因子活化程度越高, 细胞凋亡数越多。

鉴于上述的实验结果, 我们推测对重症 COPD 患者进行氧疗和吸入 NO 可能都是有价值的。氧疗可以补充氧气, 减轻缺氧以及对 PSMC 损害程度和反应, 缓解病情; 吸入 NO 除了可以直接使肺血管舒张, 还可以抑制 PSMC 的增殖, 缓解缺氧引起的症状。

(致谢: 对新桥医院呼吸研究所的大力协助在此表示衷心的感谢!)

关键词: 流式细胞仪; 缺氧; 肌; 平滑; 增殖; 细胞凋亡

中图法分类号: R446　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王关嵩, 钱桂生, 黄春基. 两种酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞的生长特性的比较[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(10): 711.

[2] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992. 3.

[3] 罗　兰, 蔡英年, 李世强, 等. 缺氧对新生小牛肺血管平滑肌细胞增值的影响及 764-3 的抑制作用[J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 9(3): 205.

(编辑　冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net