

· 论 著 ·

转移相关基因干扰对肝癌转移潜能的影响

黄楚恒¹, 李天然², 黄晓斌¹, 蔡立杰¹, 卢光明³, 李延军³

[摘要] 目的 通过干扰高转移潜能肝癌细胞(MHCC97-H)中的骨桥蛋白(OPN)、肿瘤增殖性因子肿瘤生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)基因,使之减少 OPN、TGF $\beta 1$ 表达,观察 MHCC97-H 转移能力的变化情况。方法 对 MHCC97-H 细胞行 OPN、TGF $\beta 1$ 基因干扰,qPCR 法检测干扰效果。MHCC97-H 细胞迁移细胞学实验采用 transwells 法。肺转移动物模型制作方法:裸鼠尾静脉注射各组细胞,含细胞数 5×10^6 个/只,隔天连续注射 3 次,2 周后观察肺脏组织。离体肺脏组织标本制作,DAPI 染核处理 10 min,甘油 PBS 封片,置于荧光显微镜下观察。免疫荧光法检测裸鼠动物模型整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达。结果 经基因干扰后 MHCC97-H 表达 OPN 和 TGF $\beta 1$ 明显降低($P < 0.05$)。细胞学实验显示与对照组比较,经 OPN 和 TGF $\beta 1$ 干扰组 MHCC97-H 细胞迁移数量明显减少($P < 0.01$)。动物模型实验显示与对照组比较,OPN 和 TGF $\beta 1$ 干扰组肺组织中肝癌细胞较少,定量分析显示 OPN 和 TGF $\beta 1$ 干扰组肺脏组织中肝癌细胞 IOD 值明显低于对照组($P < 0.05$)。OPN 和 TGF $\beta 1$ 干扰组与对照组比较整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达 IOD 值差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 经 OPN 和 TGF $\beta 1$ 基因干扰的 MHCC97-H 细胞肺转移能力有明显的下降,尤其是 TGF $\beta 1$ 基因干扰组下降更加明显,但经 OPN 和 TGF $\beta 1$ 基因干扰的 MHCC97-H 细胞表达整合素 $\alpha v \beta 3$ 能力无变化,整合素 $\alpha v \beta 3$ 介导参与了 OPN 和 TGF $\beta 1$ 共同作用肝癌转移行为的变化。

[关键词] 肝癌;转移;骨桥蛋白;肿瘤生长转化因子;整合素

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.03.001

Effect of silence of associated metastasis gene on hepatocellular carcinoma metastasis

HUANG Chu-heng¹, LI Tian-ran², HUANG Xiao-bin¹, CAI Li-jie¹, LU Guang-ming³, LI Yan-jun³. 1. Department of Radiology, 95 Hospital of PLA, Putian, Fujian 351100, China; 2. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing, 100048, China; 3. Department Radiology, Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To observe the change of metastasis ability of hepatocellular carcinoma by inhibiting OPN, TGF $\beta 1$ gene expression of the high metastatic potential of hepatocellular carcinoma cells (MHCC97-H). **Methods** OPN and TGF $\beta 1$ gene silencing were made in the MHCC97-H cells and qPCR was used to test the expression of MHCC97-H cells. MHCC97-H cells migration experiment used transwells assay. Lung metastasis animal model making method: MHCC97-H cells were injected into the tail vein of nude mice three times every two days, and 0.2 mL cells suspension contained 5×10^6 cells, and the lung tissue was observed after 2 weeks. Lung tissue samples: DAPI nuclear stained for 10 min, glycerol PBS mounted, and observed under fluorescent microscope. Nude mice animal model of integrin $\alpha v \beta 3$ expression was detected by immunofluorescence. **Results** OPN and TGF $\beta 1$ expression of MHCC97-H by genes silencing significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the cells migration of MHCC97-H OPN and TGF $\beta 1$ genes silencing groups significantly decreased ($P < 0.01$). Animal model experiments showed that there were less tumor cells in the lung tissue of the OPN and the TGF $\beta 1$ gene silence group compared with the control group. The results of quantitative analysis showed that the IOD value of the blank control group and the negative control group was greater than the two experimental groups, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the IOD of integrin $\alpha v \beta 3$ expression in two genes silencing groups wasn't significantly different. **Conclusion** From the level of cytology and animal model results, there was significant decrease in the metastatic ability of MHCC97-H cell by genes silencing, especially in the TGF $\beta 1$ gene silencing group. The expression ability of related metastasis factor integrin $\alpha v \beta 3$ had no change, and it suggests that integrin $\alpha v \beta 3$ mediates the role of OPN and TGF $\beta 1$ in HCC metastasis.

[Key words] HCC, metastasis; OPN; TGF $\beta 1$; integrin

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271607); 南京军区医药卫生重点资助项目(11Z035); 国家博士后基金(2015M572810)

作者单位: 1. 351100 福建莆田,解放军 95 医院放射科; 2. 100048 北京,解放军总医院第一附属医院放射科; 3. 210002 江苏南京,南京总医院医学影像科

通讯作者: 李天然, E-mail: lizhaoruixin@sina.com

引用格式: 黄楚恒,李天然,黄晓斌,等.转移相关基因干扰对肝癌转移潜能的影响[J].东南国防医药,2016,18(3):225-229,236.

肝癌的转移行为是影响肝癌预后的关键因素之一,多种生物学因子参与到了肝癌的转移过程中。复旦大学肝癌研究所构建的具有不同转移潜能的肝癌模型成为研究肝癌转移行为的有效手段,具有高转移潜能肝癌细胞(MHCC97-H)肺

转移率 100%^[1]。本课题组主要关注对肝癌转移潜能的生物干预,为寻找合适的生物治疗靶点提供依据。前期通过基因工程技术对自体骨髓间充质干细胞 (autologous bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 进行改造,使其增加转移性相关因子骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 基因表达、肿瘤增殖性因子肿瘤生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor β , TGF $\beta 1$) 基因的表达,观察经基因改造的 BMSC 对具有不同转移潜能肝癌的影响情况,研究结果显示外源性生物活性因子可以促进肝癌细胞的增殖和转移^[2-3]。因此,减少生物活性因子的表达,可能起到抑制肿瘤转移和增殖的作用。本研究通过抑制 MHCC97-H 中的 OPN、TGF $\beta 1$ 基因,使之减少 OPN、TGF $\beta 1$ 表达,观察肝癌细胞转移能力的变化情况。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及试剂 冰冻切片机 (HM525 NX 型, Thermo 公司), 正置荧光显微镜 (BX43 型, OLYMPUS 公司), 冰箱 (BCD-211KD3 型, TCL 公司), 轮转式切片机 (RM2235 型, LEICA 公司), 病理组织漂烘仪 (tec 2500 型, 常州市郝思琳仪器设备有限公司), 转盘式扫描共聚焦显微镜 (OLYMPUS 公司 DSU), 冰箱 (BCD-211KD3 型, TCL 公司), 电热恒温鼓风干燥箱 (101-3 型, 上海锦屏仪器有限公司), 隔水式恒温培养箱 (PYX-DHS500BS-II 型, 上海跃进医疗器械有限公司)。鼠多克隆整合素 $\alpha v \beta 3$ 抗体 (santa, 批号: L2206), 工作浓度为 1:50; 驴抗兔荧光二抗 (Life, 批号: 1531671, 激发/发射波长: 490/520 nm), 工作浓度为 1:800; 柠檬酸抗原修复液 (pH6.0, 福州迈新生物技术有限公司); 二甲苯 (成都市科龙化工试剂厂); 无水乙醇 (成都市科龙化工试剂厂); DAPI (sigma, 吸收波长/发射波长: 358/461 nm)。DMEM 培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (FBS, BI 公司), 青 (p)-链霉素 (s) (100×P.S. 双抗菌素, 杭州昊天生物技术有限公司), 胰蛋白酶 (trypsin, gibco 公司), 磷酸盐缓冲液 (PBS, 国药化学试剂有限公司)。

1.2 实验动物及饲养条件 实验用 BALB/c 雄性裸小鼠均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2012-0002, SPF 级, 动物质量合格证号为 0205939, 购入时动物体重为 20 g 左右。饮用水为灭菌二级超纯水, 饮用水质量符合中华人民共和国国家标准《生活饮用水卫生标准》(GB5749-2006) 的规定。实验

动物房使用许可证号为 SYXK (浙) 2015-0008, 饲养环境: 温度范围 20~25℃, 相对湿度范围 40%~70%。裸小鼠试验前在动物房环境中适应 6 d。维持饲料由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 执行标准 GB14924.3-2010《实验动物配合饲料营养成分》。

1.3 实验方法

1.3.1 MHCC97-H 基因干扰方法 本课题组前期结果显示 MHCC97-H 高表达转移相关基因 OPN 和增殖相关基因 TGF $\beta 1$ ^[4], 因此, 本研究对两种基因分别进行干扰。实验方法: 腺病毒载体的构建, TGF $\beta 1$ siRNA1 序列: GTGGAGCTGTACCAGAAA-T; OPN siRNA1 序列: GAGGAGTTGAATGGTG-CATAC, 合成 PAGE 胶纯化的 oligo 序列, 载体用 BamH I, EcoR I 双酶切, 切胶回收, 退火获得目的片段 shRNA3' 和 5' 的单链, 目的片段 shRNA 与载体连接反应, 转化后的 TGF $\beta 1$ 及 OPN shRNA 平板挑菌, 测序。重组腺病毒 TGF $\beta 1$ & SPP1 shRNA 腺病毒: 制备重组质粒, 重组腺病毒载体的包装, 收毒及扩增, TGF $\beta 1$ 及 OPN shRNA 腺病毒检验。病毒感染 MHCC97-H 细胞。qPCR 检测基因干扰前后 TGF $\beta 1$ 及 OPN 表达情况, 步骤包括: ① Trizol-离心柱法提取细胞总 RNA: 收集约 10^6 个细胞, 裂解, 离心。② RNA 纯度的测定和 RNA 的定量: 以相应溶剂为对照, 取 2 μ L RNA 溶液于 Merinton SMA4000 检测, 观察 A260/A280、A260/A230 比值及连续波长吸收峰, 并计算 RNA 溶液浓度, 判断 RNA 提取质量。③ 逆转录。④ 荧光定量 PCR 扩增。

1.3.2 MHCC97-H 细胞迁移实验 设 MHCC97-H 空白对照组、MHCC97-H 基因干扰阴性对照组 (native contrast, NC)、MHCC97H TGF $\beta 1$ 基因干扰组、MHCC97-H OPN 基因干扰组, 用 10% FBS 1×P.S. DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂ 培养箱孵育培养。取生长对数期各组 MHCC97-H 细胞, 0.25% Trypsin + 0.02% EDTA 消化离心, 计数后, 以 5×10^4 /well 密度分组铺 24 孔板上室, 下室加入 DMEM 培养基, 继续培养, 48 h 后, PBS 清洗 1 次, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 取出, 用棉签擦去上室非迁移细胞, 移去 transwells, 倒置, 风干, 在 24 孔板中加入 200 μ L 0.1% 结晶紫, 把小室放入其中, 室温孵育 10 min, 取出, PBS 清洗 3 次, 随机取 3 个视野, 照相, 计数, 统计结果。

1.3.3 动物模型分组 ① 肝癌肺转移模型动物模型共 32 个样本, 具体分组为: GFP 基因阴性

对照组、OPN 基因干扰组、TGFβ1 基因干扰组和空白对照组,每组均 8 个样本。②裸鼠整合素(integrin)αvβ3 表达实验共 15 个样本,具体分组为:基因阴性对照(native contrast, NC)组、OPN 基因干扰和 TGFβ1 基因干扰组,每组均 5 个样本。

1.3.4 肝癌肺转移动物模型制作方法 参考文献[5]方法进行。收集处于对数生长期的 MHCC97-H 空白对照细胞株、MHCC97-H 阴性对照细胞株、MHCC97-H OPN 干扰细胞株,1000 rpm 离心 5 min,调整细胞浓度至 2.5×10^7 个/mL,制备单细胞悬液。32 只裸鼠分别自尾静脉注射 0.2 mL,含细胞数 5×10^6 个/只,注射后按压 30 s,防止细胞悬液从针孔流出,隔天连续注射 3 次,2 周后观察肺脏组织,复制肺转移移植瘤模型。

1.3.5 肝癌肺转移肿瘤标本制作切片方法 步骤包括 4%甲醛固定 3~5 d,修块,脱水,透明处理,浸蜡,石蜡包埋,6 μm 切片,DAPI 染核 10 min,甘油 PBS 封片,置于荧光显微镜下观察。

1.3.6 免疫荧光法检测裸鼠动物模型整合素(integrin)αvβ3 表达 ①二甲苯脱蜡,梯度酒精分步复水:二甲苯 I 20 min、二甲苯 II 20 min、100%乙醇 I 5 min、100%乙醇 II 5 min、95%乙醇 5 min、80%乙醇 5 min、PBS 洗 3×3 min。②抗原修复:置 0.01M 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中微波修复,自然冷却至室温,PBS 冲洗 3×3 min。③滴加一抗,4 ℃孵育过夜,PBS 水洗 3×3 min。④滴加二抗,37 ℃孵育 60 min,PBS 冲洗 3×5 min。⑤DAPI 染核,室温 10 min。⑥甘油 PBS 封片,共聚焦显微镜观察。免疫荧光呈绿色为阳性表达。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS 16.0 统计软件处理,细胞计数定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 One-Way ANOVA 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MHCC97-H 细胞基因干扰前后 TGFβ1 及 OPN 表达结果 以 β-Action 作为内参照基因,以空白对照组(基因干扰前)作为对照基因进行标准化后相对定量,结果见表 1。

表 1 TGFβ1 及 OPN 基因干扰前后 MHCC97-H 细胞表达($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖相关基因 TGFβ1	转移相关基因 OPN
基因干扰前 MHCC97-H	1.000±0.026	1.000±0.135
基因干扰后 MHCC97-H	0.557±0.062 *	0.473±0.095 *

注:与对照组(基因干扰前)比较, * $P < 0.05$

2.2 transwells 法迁移 MHCC97-H 细胞计数结果 实验组中 MHCC97-H NC 组迁移细胞数为(129.29±12.32)个,MHCC97-H OPN 组迁移细胞数为(72.39±11.32)个,MHCC97-H TGFβ-1 组迁移细胞数为(39.12±9.65)个,空白对照组 MHCC97-H 迁移细胞数为(225.45±17.46)个。结果显示,与对照组 MHCC97-H 比较,经 OPN、TGFβ-1 基因干扰 MHCC97-H 细胞组及阴性对照组,细胞迁移数量组间比较差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明经基因干扰后细胞迁移数量明显减少,尤其是 MHCC97-H OPN 和 MHCC97-H TGFβ1 干扰组细胞迁移数量减少为著($P < 0.01$)。

2.3 高转移肝癌(MHCC97-H)动物模型肺转移情况荧光成像结果(图 1) 结果显示,空白对照组和阴性对照组肺脏组织中肿瘤细胞较多,OPN 干扰组和 TGFβ1 对照组肺组织中肿瘤细胞与空白对照组比较较少,表明经基因干扰 MHCC97-H 肿瘤肺转移潜能下降。为进一步定量观察肺组织细胞中肝癌细胞的转移情况,利用 Image J 软件对病理切片中肝癌细胞的荧光强度进行定量分析,以细胞积分光密度(integrated option density, IOD)作为定量指标,见图 2。

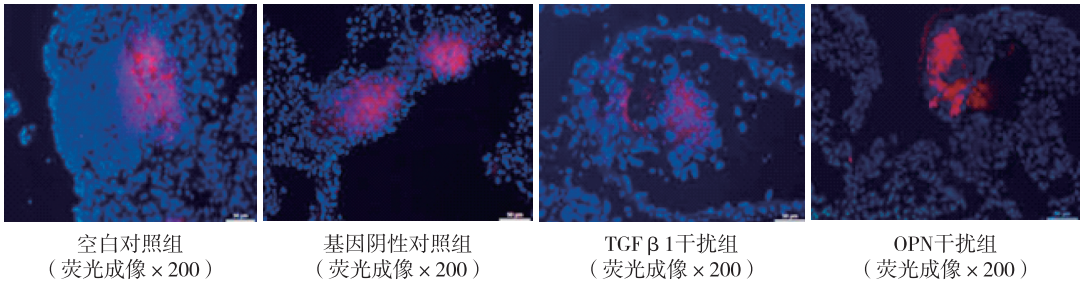
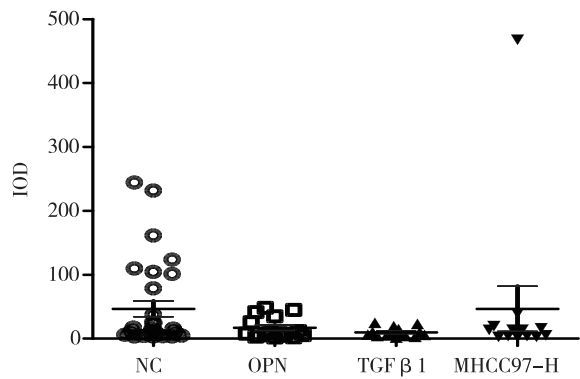


图 1 MHCC97-H 肿瘤动物模型肺组织转移情况荧光成像(肿瘤细胞呈红色,肺组织细胞核呈蓝色)

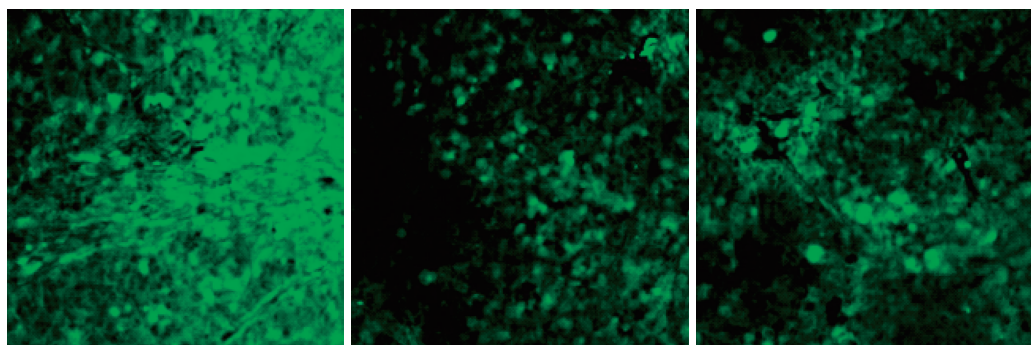


NC: 阴性对照组; OPN: OPN 基因干扰组; TGFβ1: TGFβ1 基因干扰组; MHCC97-H 空白对照组

图 2 肺脏组织中转移性肝癌细胞荧光成像定量分析

利用 Image J 软件对肺脏中肝癌细胞的荧光强度进行定量分析,结果显示,两组实验组(OPN 干扰组和 TGFβ1 基因干扰组)与空白对照组和阴性基因对照组比较肝癌细胞 IOD 值较低($P<0.05$),表明经 OPN 和 TGFβ1 基因干扰后转移能力相减弱,与镜下观察结果一致。

2.4 经基因修饰的 MHCC97-H 动物模型病理切片转移相关因子整合素 $\alpha_v\beta_3$ 荧光成像表达 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 免疫荧光阳性显色绿色为阳性(图 3)。



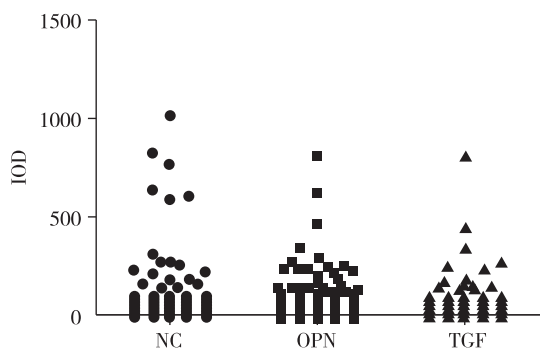
阴性对照组肝癌组织细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达(荧光成像 $\times 200$)

OPN 干扰组肝癌组织细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达(荧光成像 $\times 200$)

TGFβ1 干扰组肝癌组织细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达(荧光成像 $\times 200$)

图 3 经基因修饰的 MHCC97-H 动物模型转移相关因子整合素 $\alpha_v\beta_3$ 荧光成像表达

由镜下可见,两组基因干扰组与对照组比较表达绿色荧光肝癌细胞密度明显减少。利用 Image J 软件对肺脏中肝癌细胞表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的荧光强度进行定量分析,结果显示,细胞 IOD 值在三组之间差异无统计学意义($P>0.05$),表明经 OPN 和 TGFβ1 基因干扰的肝癌细胞表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 能力无变化(图 4)。



OPN: OPN 基因干扰组; TGFβ1: TGFβ1 基因干扰组; NC: 阴性对照组

图 4 肺脏组织中肝癌细胞表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 荧光成像定量分析

3 讨论

肝癌是我国常见的恶性肿瘤,死亡率占恶性肿瘤的第 3 位,转移和复发是肝癌预后差的主要原因^[6-7]。人肝癌细胞株 MHCC97-H 是具有高转移潜能的肝癌细胞株,其肺转移能力达到 100%^[8],该细胞株是研究肝癌肺转移的最佳模型。肝癌的转移行为与多种因素有关,肝癌侵袭转移是一个多基因、多步骤、多因素参与的复杂过程,涉及癌细胞间以及癌细胞与宿主微环境间复杂的相互作用。

本课题组注意到 OPN 是一种分泌型磷酸化糖蛋白,其分子结构中含有 RGD(Arg-Gly-Asp) 多肽序列。OPN 通过与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 或 CD44 结合,参与细胞粘附、信号传导、运动等重要的生物学过程,但具体的机制仍在研究之中。研究发现^[9], OPN 在伴转移的肝癌组织中显著高表达,提示 OPN 参与了肝癌的转移行为,通过阻断 OPN 的表达可以延缓肝癌的转移。另外, TGFβ1 是参与肿瘤的增殖、侵袭转移重要生物因子,在肝癌的增殖和转移中转化生长因子与肝癌的发生、进展有关^[10]。因此,本研究在前期研究的基础

上,通过基因工程技术干扰 MHCC97-H 中 OPN 和 TGF β 1 基因,减少两种生物活性因子表达,观察对 MHCC97-H 细胞及肝癌模型转移能的影响。

细胞学水平观察采用 transwells 法进行,模拟组织的基底膜结构。肿瘤实现转移突破基底膜是最为关键的一步,突破基底膜的能力代表肿瘤的转移能力。动物模型水平主要是复制高转移潜能肝癌细胞的肺转移模型,通过尾静脉注射经基因干扰前后的 MHCC97-H 细胞,40 d 后观察肝癌的肺转移情况^[5]。本实验细胞学实验结果和动物模型实验结果均提示经基因干扰的 MHCC97-H 细胞迁移能力明显下降,尤其是 TGF β 1 干扰的 MHCC97-H 细胞,表明与 OPN 相比 TGF β 1 因子更多地参与了肝癌的转移行为。有研究认为^[11-12],TGF β 1 过度表达可导致对免疫细胞包括 T、B 淋巴细胞过度抑制,使机体的免疫监督功能大大降低,对外来病原体免疫应答、免疫清除能力下降,对肿瘤细胞的清除作用降低,导致肿瘤的发生和转移。为进一步探究经基因干扰的 MHCC97-H 细胞转移潜能变化的生物学机制,本实验对肝癌转移中的关键生物学分子整合素 α v β 3 表达情况进行分析,对病理切片预处理后进行荧光成像观察,结果显示经基因干扰的实验组(OPN 和 TGF β 1 基因干扰组)肺脏中转移性肝癌病理组织整合素 α v β 3 的表达能力无明显变化,这可能与整合素 α v β 3 表达不仅仅在转移性肝癌中表达,肿瘤组织中血管内皮也有整合素 α v β 3 表达有关。整合素 α v β 3 介导了肝癌转移行为的变化,周建平^[13]研究结果表明整合素 α v 表达变化,代表了肝癌的肝癌转移能力的变化。有研究证实^[14],TGF β 1 因子与整合素 α v β 3 受体在肿瘤转移相关信号通路上具有联系,即整合素与 TGF β 受体介导的两条信号传导通路不仅共用某些信号分子,而且共同作用于多种生物效应并相互促进。OPN 分子结构中含有 RGD 多肽序列,主要通过与其受体整合素 α v β 3 和 CD44 相互作用,参与肿瘤转移过程^[15]。TGF β 1、OPN 与整合素 α v β 3 之间的关系中,主要 OPN 介导整合素与细胞外基质(ECM)黏附,成为肿瘤转移的关键步骤,而 TGF β 1 通过上调整合素关联蛋白激酶(integrin-linked kinase, IKL)的表达而激活蛋白激酶 B 和 TGF β 1 提高黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)酪氨酸的磷酸化水平,激活下游的信号分子直接或间接地参与整合素与 ECM 黏附,促进肝癌侵袭和转移。也有学者认为,OPN 通过介导 TGF β 1 依赖性骨髓间充质干细胞向纤维细胞转化机制,而促进肿瘤的增殖和转移^[16]。另有学者也

进行了 TGF β 与 MHCC97-H 转移的关系的研究,结果表明,TGF β 家族中 TGF β R II 的高表达能抑制 MHCC97-H 的增殖和迁移侵袭,认为其机制可能与 TGF β R II 高表达后激活 TGF β 信号转导通路,改变细胞的生长、运动能力有关^[17]。因此,本研究中经 OPN、TGF β 1 基因干扰的 MHCC97-H 细胞转移潜能的下降主要与 OPN 和 TGF β 1 表达减少有关,而与转移性肝癌组织整合素 α v β 3 表达无关。

通过基因干扰方法抑制肝癌细胞或组织的 OPN 和 TGF β 1 表达,无论从细胞学水平和动物模型水平,肝癌的转移能力均有明显的下降,尤其是 TGF β 1 基因干扰组下降更加明显,转移相关因子整合素 α v β 3 表达无明显变化,本研究中经 OPN、TGF β 1 基因干扰的 MHCC97-H 细胞转移潜能的下降主要与 OPN 和 TGF β 1 表达减少有关,而与转移性肝癌组织整合素 α v β 3 表达无关。

【参考文献】

- [1] Li Y, Tang Y, Ye L, et al. Establishment of a hepatocellular carcinoma cell line with unique metastatic characteristics through in vivo selection and screening for metastasis related genes through cDNA microarray [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(1): 43-51.
- [2] 李天然,蔡立杰,赵绍宏,等.OPN 转染 BMSCs 对高转移潜能肝癌细胞的影响[J]. 胃肠病学与肝病学杂志, 2015, 24(9): 1057-1061.
- [3] 李天然,杜湘珂,宋 斌,等.TGF β 1 转染 hMSC 对 MHCC97-H 影响的实验研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(7): 615-619.
- [4] 李天然,卢光明,宋 斌,等.骨髓间充质干细胞对高低转移潜能肝癌细胞影响的实验研究[J]. 胃肠病学与肝病学杂志, 2014, 23(9): 1056-1060.
- [5] Kang Y. Imaging TGF β signaling in mouse models of cancer metastasis[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1344(1): 219-232.
- [6] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in china[J]. Jpn J Clin Oncol, 2010, 40(4): 281-285.
- [7] 倪 晶,华海清.索拉非尼联合中药治疗原发性肝癌的研究进展[J]. 东南国防医药, 2015, 17(2): 175-178.
- [8] Li Y, Tang ZY, Ye SL, et al. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(5): 630-636.
- [9] Ye QH, Qin LX, Forgues M, et al. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning[J]. Nat Med, 2003, 9(4): 416-423.
- [10] Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma[J]. J Leukocyte Biol, 2006, 80(6): 1197-1213.
- [11] Li MO, Wan YY, Sanjabi S, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses [J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 99-146.

(下转第 236 页)

方面,严格无菌操作规程,做好医院感染控制和预防工作尤其重要。

鲍曼不动杆菌是近些年广谱抗生素滥用后医院感染中最常见的菌株,虽然其致病性没有金黄色葡萄球菌等细菌强,但由于多重耐药菌株在医院重症监护室流行,一旦感染后可选择治疗药物极少,对监护室重症患者是严重威胁^[8-9]。本次调查结果显示,74 例脑脊液标本中检出鲍曼不动杆菌 43 例,其他种属细菌 31 例,鲍曼不动杆菌单独占比达到 58.1%,表明鲍曼不动杆菌已经成为神经外科术后颅内感染的重要和常见病原菌,与国内相关研究相符^[10]。进一步统计分析结果证明,鲍曼不动杆菌引起的颅内感染,脑室引流和多重耐药菌株感染是导致患者死亡的危险因素;颅内感染鲍曼不动杆菌引起的死亡率显著高于其他细菌引起的颅内感染,这与文献报道相符^[11]。

综上所述,神经外科手术后颅内感染以多重耐药鲍曼不动杆菌为主,严重影响患者预后,针对危险因素制定有效的感染防控措施,减少鲍曼不动杆菌引起的颅内感染是当务之急^[12]。

【参考文献】

- [1] Srinivas D, Veena Kumari HB, Somanns S, et al. The incidence of postoperative meningitis in neurosurgery: an institutional experience [J]. Neurol India, 2011, 59(2):195-198.
 - [2] 靳桂明,董玉梅,余爱荣,等. 开颅术后颅内感染流行病学调查的荟萃分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2007, 12(3): 149-151.
 - [3] Michalopoulos A, Falagas ME. Treatment of Acinetobacter infections [J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(5): 779-788.
 - [4] Kim BN, Peleg AY, Lodise TP, et al. Management of meningitis due to antibiotic-resistant *Acinetobacter* species [J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(4): 245-255.
 - [5] Gbaguidi-Haore H, Dumartin C, L'Heriteau F, et al. Antibiotics involved in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria: a nationwide multilevel study suggests differences within antibiotic classes [J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(2): 461-470.
 - [6] Vernaz N, Huttner B, Musciconico D, et al. Modelling the impact of antibiotic use on antibiotic-resistant *Escherichia coli* using population-based data from a large hospital and its surrounding community [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(4): 928-935.
 - [7] Liu Q, Li W, Du X, et al. Risk and prognostic factors for multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia: a retrospective study in a tertiary hospital of west China [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130701.
 - [8] 石晓卉,刘 琪,于湘友. 外科重症监护室临床细菌分布及耐药性监测[J]. 东南国防医药, 2014, 16(4): 349-352.
 - [9] 毛 璞,李建春,邱桂霞,等. 重症监护病房耐碳氢霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(3): 253-256.
 - [10] 罗孝全,赵贯建,程 远,等. 神经外科术后颅内感染脑脊液病原菌及其药敏变迁分析[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(4): 478-482.
 - [11] Yang M, Hu Z, Hu F. Nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*: risk factors and their impact on patient outcomes and treatments [J]. Future Microbiol, 2012, 7(6): 787-793.
 - [12] Sneh-Arbib O, Shiferstein A, Dagan N, et al. Surgical site infections following craniotomy focusing on possible post-operative acquisition of infection: prospective cohort study [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32(12): 1511-1516.
- (收稿日期:2016-03-11;修回日期:2016-04-06)
(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)
-
- (上接第 229 页)
- [12] Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, et al. Association of TGFβ1, TNFα, CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians [J]. BMC Med Genet, 2007, 8:20.
 - [13] 周建平,周伟平. 大肝癌 TACE 后肿瘤组织 VEGF、αv 整合素表达及 MVD 变化 [J]. 东南国防医药, 2010, 12(3): 206-208.
 - [14] Hayashida T, Jones JC, Lee CK, et al. Loss of beta1-integrin enhances TGF-beta1-induced collagen expression in epithelial cells via increased alpha5beta3-integrin and Rac1 activity [J]. J Biol Chem, 2010, 285(40): 30741-30751.
 - [15] Zhang R, Pan X, Huang Z, et al. Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23831.
 - [16] Weber CE, Kothari AN, Wai PY, et al. Osteopontin mediates an MZF1-TGF-β1-dependent transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer [J]. Oncogene, 2015, 34(9): 4821-4833.
 - [17] 于 琨,蒋小峰,邓武坚,等. TGFβR II 基因对肝癌细胞 MHCC97H 体外增殖和侵袭能力的影响 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(5): 719-722.
- (收稿日期:2016-02-20;修回日期:2016-04-16)
(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)