

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)19-1772-03

缺氧再氧合过程中 CD147 基因在卵巢癌细胞系中的表达

韩风华¹, 辛晓燕², 侯向华², 杨红², 邹伟² (第四军医大学西京医院:¹实验外科,²妇产科, 陕西西安 710033)

Hypoxia-reoxygenation-mediated expression of CD147 gene in human ovarian carcinoma cell lines

HAN Feng-Hua¹, XIN Xiao-Yan², HOU Xiang-Hua², YANG Hong², ZOU Wei²

¹Department of Experimental Surgery, ²Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the expression of CD147 gene in human ovarian carcinoma cell lines during hypoxia-reoxygenation. **METHODS:** Ovarian cancer cell lines 3-AO and HO-8910PM, highly expressed CD147, were incubated in hypoxia incubator and incubated with 50 mL/L CO₂ and 950 mL/L N₂. After 30-min exposure to hypoxia, all of the cells were reoxygenated 4 h and 8 h respectively. Reoxygenation was achieved by replenishing the fresh medium and returning the cell cultures to a normoxic environment. Expression and location of CD147 were assessed by confocal laser scanning microscope (CLSM). **RESULTS:** CD147 was located at cytoplasm. Hypoxia upregulated the CD147 expression, but reoxygenation decreased the CD147 expression. With reoxygenation for 4 h to 8 h, the levels of CD147 expression dropped to the lowest. **CONCLUSION:** Hypoxia upregulates the expression of CD147 in human ovarian carcinoma cell lines and reoxygenation downregulates CD147 expression. The upregulated expression of CD147 during hypoxia is reversible.

【Keywords】 ovarian cancer; hypoxia; reoxygenation; CD147; CLSM

【摘要】目的 探讨缺氧再氧合过程中 CD147 基因在卵巢癌细胞系中的表达。方法: 卵巢癌细胞系 3-AO, HO-8910PM 分别在混合气体缺氧仓中缺氧 30 min 后更换新鲜培养液, 给予再氧合, 常氧下继续培养 0, 4, 8 h。激光共聚焦显微镜定位, 定量检测 CD147 的表达。结果: CD147 定位于细胞质。急性缺氧 30 min 后两种卵巢癌细胞系中 CD147 表达量明显高于对照组, 再氧合 4, 8 h 时 CD147 的表达量明显降低。两种细胞株均表现为再氧合 4 h 时 CD147 的表达与对照相比无明显差

异 ($P > 0.05$)。再氧合 8 h 时降为最低。结论: 缺氧上调卵巢癌细胞系中 CD147 的表达, 再氧合可使高表达回降。

【关键词】 卵巢肿瘤; CD147; 缺氧; 再氧合; 激光共聚焦显微镜

【中图分类号】 R737.31 **【文献标识码】** A

0 引言

CD147 属免疫超家族成员, 与肿瘤浸润转移相关。我们先前的研究^[1]表明 CD147 在卵巢癌组织中有不同程度表达, 它与卵巢癌的浸润转移有密切关系^[2], 但其作用机制尚未明了。缺氧是实体肿瘤普遍存在的特征^[3], CD147 的 3' 末端有两个缺氧反应元件结合位点, 可能与缺氧有关。我们探讨缺氧参与卵巢肿瘤 CD147 表达的调控如下。

1 材料和方法

1.1 材料 CD147 mAb 由第四军医大学细胞工程中心提供。FITC 由本校电镜中心提供。卵巢癌细胞系 3-AO, HO-8910PM 由本实验室提供。混合气体缺氧仓由西京医院神经内科提供。Avlometri Measurement 血气分析仪由西京医院 ICU 提供。Bio-Rad MRC-1024 型激光共聚焦显微镜和软件分析系统由第四军医大学电镜中心提供。胰蛋白酶购自北京生物技术有限公司。

1.2 方法 取 3-AO, HO-8910PM 对数生长期细胞, 2.5 g/L 胰蛋白酶液消化制成单细胞悬液, 将细胞接种到预先消毒并放置了载玻片的培养皿中, CO₂ 孵育箱培养过夜 (8 h) 至细胞贴壁, 贴壁细胞放入缺氧仓 (950 mL/L N₂, 50 mL/L CO₂) 中 30 min 致急性缺氧。缺氧后的细胞分别再氧合 4, 8 h。再氧合即更换新的细胞培养液继续在 37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养。取对照组贴壁细胞和在混合气体培养仓中急性缺氧 30 min 的贴壁培养细胞瓶送血气分析。取出盖玻片 0.01 mmol/L pH 7.4 的 PBS 冲洗 2 次, 丙酮固定液固定 10 min 后放入盖片染色缸中, PBS 振洗 5 min 取出吹干, 滴加 1:10 CD147 mAb 20 μL 置湿盒内 37℃ 保湿 30 ~ 60 min, PBS 振洗 3 次, 5 min/次, 吹干, 滴加 FITC 羊抗小鼠 IgG 20 μL 置湿盒内 37℃ 保湿 30 ~ 60 min, PBS 振洗 2 次, 5 min/次, 蒸馏水振洗

收稿日期 2004-04-12; 修回日期 2004-08-07

作者简介: 韩风华 (1950-), 男, 汉族, 河北省丰润县人, 硕士, 主任, 副教授。Tel: (029) 83375331 Email: sywk@fmmu.edu.cn

1次 500 mL/L 缓冲甘油封片. 激光共聚焦显微镜(CLSM)下观察并拍照, 软件定量分析. 用于 FITC 的激发波长为 488 nm, 共聚焦系统由 Bio-Rad 公司提供的软件控制, 在 Pentium90 计算机中运行, 显微镜聚焦旋钮由步进马达控制, 用于图像采集的物镜为 Plan-Neofluar40×油镜. 图像存为 512×512 像素类型. 利用软件在镜下随机选取 5 个细胞, 对其进行 CLSM 检测定量分析, 读取均数和标准差.

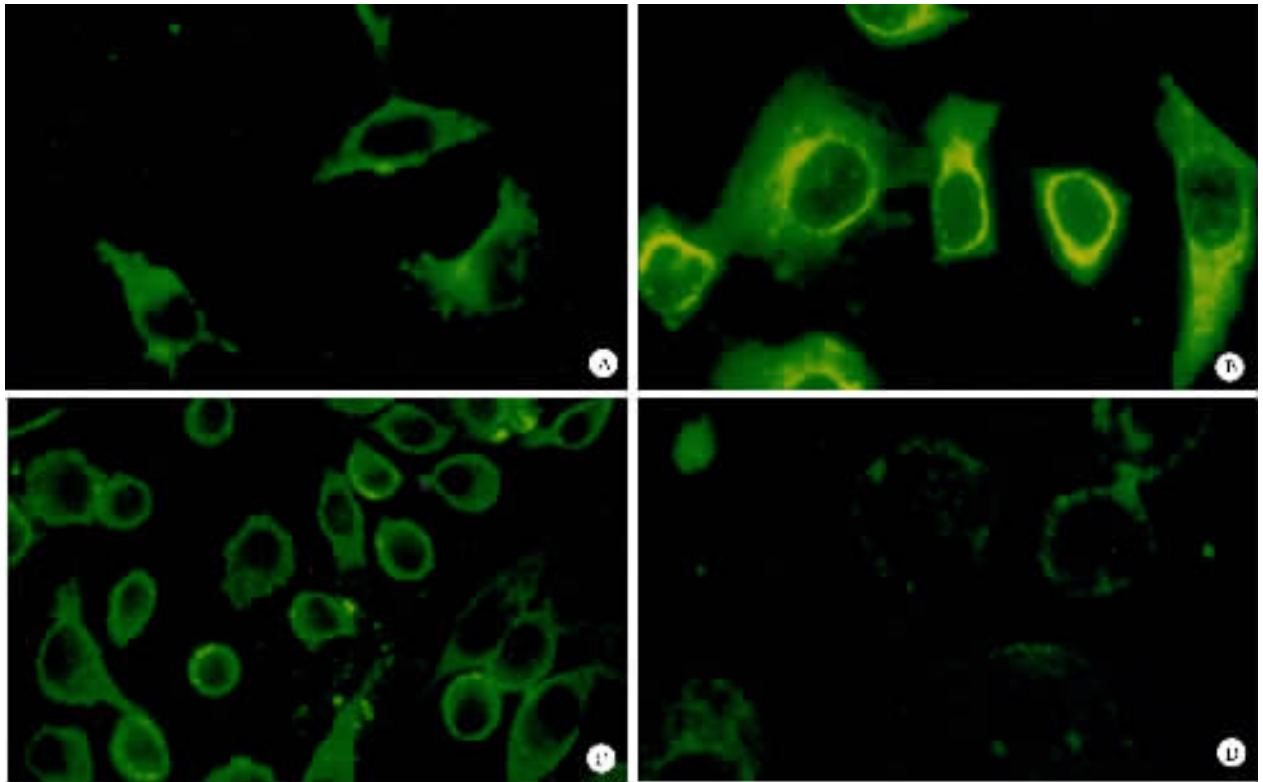
统计学方法 利用 SPSS 软件进行单因素方差分析及 LSD-*t* 检验.

2 结果

2.1 细胞终极培养液血气分析 急性缺氧后细胞培养液 pH 7.16. PO₂ 为 7.4 kPa, 对照组 pH 为 7.4,

PO₂ 为 17.3 kPa. 缺氧仓中 pH 值试纸显示 pH 5~6, 说明仓中真实的环境 PO₂ 远低于 7.4 kPa. PO₂ 与氧浓度(FO₂)的关系: PO₂ = (吸入气压力 - 6.27) × FO₂. 当 PO₂ = 18.6 kPa 时, FO₂ = 20%; 且氧分压与氧浓度成正比关系. 本实验中 FO₂ < 8%, 符合缺氧条件(<10%).

2.2 CLSM 检测 CD147 定位于细胞质中(Fig 1). 3-AO, HO-8910PM 细胞均在为急性缺氧 30 min 后 CD147 表达量较对照组明显增加, 再氧合 4, 8 h 后 CD147 表达量明显降低(*P* = 0.000). 采用 LSD-*t* 进行均数多重比较, HO-8910PM 组在再氧合 4, 8 h 和对照组比较均无明显差异(*P* > 0.05), 余各组两两比较均有显著统计学差异(*P* < 0.05); 3-AO 组中各组比较均有显著统计学差异(*P* < 0.05, Tab 1).



A : Nomoxia ; B : Hypoxia for 30 min ; C : Hypoxia -reoxygenation 4 h ; D : Hypoxia -reoxygenation 8 h .

Fig 1 CD147 gene expression in 3-AO cell line FITC IF ×400 图1 3-AO 细胞 CD147 表达

表1 缺氧再氧合过程中卵巢癌细胞系中 CD147 的表达

Tab 1 CD147 gene expression in ovarian cancer cell lines during hypoxia -reoxygenation (*n* = 5, $\bar{x} \pm s$, CLSM)

Group	3-AO	HO-8910PM
Control	40.4 ± 9.6	32.2 ± 4.1
Hypoxia	75.0 ± 10.6 ^a	94.7 ± 6.9 ^a
Reoxy 4 h	55.5 ± 12.0 ^{ac}	35.0 ± 12.1 ^c
Reoxy 8 h	12.2 ± 2.5 ^{ac}	25.4 ± 4.6 ^c

^a*P* < 0.05 vs control ; ^c*P* < 0.05 vs hypoxia ; ^{ac}*P* < 0.05 vs reoxy 4 h.

3 讨论

CLSM 是在荧光显微镜成像的基础上加装激光扫描装置, 使用紫外光或可见光激发荧光探针, 利用计算机进行图像处理, 从而得到细胞或组织内部微结构的荧光图, 并能对抗原在细胞中的定位和定量作出精确的分析, 较传统的免疫组化方法更为先进.

缺氧是肿瘤微环境的一种病理生理特征. 在实体肿瘤中, 由于肿瘤细胞增生迅速, 往往造成肿瘤

局部的缺氧坏死。同时,缺氧作为一种应激反应还可诱导肿瘤相关显型基因表达增加,促进肿瘤的进展^[4-6]。我们先前的研究结果表明 CD147 在卵巢癌的发生、发展、浸润转移中起重要作用,可能是卵巢肿瘤的一个药靶分子。本结果显示急性缺氧 30 min 后,卵巢癌细胞系 8910PM 和 3-AO 中 CD147 的表达上调,而再氧合后卵巢癌细胞中 CD147 的表达下降,再氧合 4~8 h 时 CD147 的表达接近对照组表达量,且随着缺氧时间的延长 CD147 的表达逐渐降低,低于对照组。可见缺氧所致卵巢癌细胞系中 CD147 的表达上调是可逆的,缺氧和再氧合可有效调控卵巢癌中 CD147 的表达,缺氧可能通过调控 CD147 的表达促进卵巢癌的发生、发展。

【参考文献】

[1] 贺书云,辛晓燕,王健. 基质金属蛋白酶 2 及 CD147 在卵巢

上皮性肿瘤中的表达[J]. 第四军医大学学报,2001,22(5): 435-438.
 He SY, Xin XY, Wang J. The expression of matrix metalloproteinase 2 and CD147 in ovarian cancer[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2001 22(5):435-438.
 [2] 杨红,郑维国,辛晓燕,等. CD147 反义核酸对卵巢癌细胞生物学行为的影响[J]. 第四军医大学学报,2002,23(18): 1657-1660.
 Yang H, Zhen WG, Xin XY, et al. The influence of CD147 antisense ribonic acid on ovarian cancer cell biological action[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002 23(18):1657-1660.
 [3] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: Pathophysiology and therapeutics[J]. *Trends Mol Med*, 2002 8:62-67.
 [4] Knowles HJ, Harris AL. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Hypoxia and tumorigenesis[J]. *Breast Cancer Res*, 2001; 3(5) 318-322.
 [5] Pugh CW, Ratcliffe PJ. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2003 13(1) 83-89.
 [6] Binley K, Askham Z, Martin L, et al. Hypoxia-mediated tumour targeting[J]. *Gene Ther*, 2003;10(7) 540-549.

编辑 王睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)19-1774-01

老年人支原体肺炎 18 例临床分析

成涌 毕四锐

(延安大学附属医院干部病房,陕西延安 716000)

【关键词】支原体肺炎 老年人 内科治疗
 【中图分类号】R563 【文献标识码】B

0 引言 支原体(mycoplasma)是引起老年肺炎的病因之一,近年来发病率呈上升趋势。一些支原体肺炎病情重或病程迁延,并发症和合并症多,易发生混合性感染或对抗生素耐药,给临床诊断和治疗带来一定困难^[1-3]。

1 临床资料 2001-01/2003-12 收治支原体肺炎 18(男 10,女 8)例,年龄 62~73 岁,病程 2~14 wk。患者均发病缓慢,均有咳嗽、咳少量白痰,发热和胸痛各 12 例(66.7%)。18 例患者均行胸片检查,显示两下肺渗出斑片影 14 例,右下肺渗出斑片影 4 例,左下肺渗出斑片影 2 例,肺门阴影增大模糊 1 例。化验血常规白细胞总数增高 6 例,以淋巴细胞为主,血常规正常 9 例,血常规白细胞总数正常且中性粒细胞增高 3 例。全部患者符合肺炎的诊断标准,且用金标免疫斑点法测定血清肺炎支原体 IgM 抗体阳性。

治疗应用抗生素应遵循早期、足量、针对致病菌选药的原则,重症可联合用药,支持治疗也很必要。我们治疗的 18 例患者明确诊断后均给予大环内酯类抗生素,15 例常规静滴红霉素 0.9 g 2 次/d,8 例给予口服罗红霉素 150 mg 2 次/d,另外 6 例病情较重,给予口服罗红霉素 150 mg 2 次/d,静滴左氧氟沙星 0.12 g 2 次/d,疗程 1~3 wk,平均 12 d。结果治疗全部有效,治愈出院,平均住院 16 d。治疗期间未见不良反应。

收稿日期 2004-09-03; 修回日期 2004-09-15
 作者简介:成涌(1964-),男(汉族),陕西省铜川市人。主治医师。
 Tel.(0911)2113522 Ext.2275 Email.xuct2004@163.com

2 讨论 我们临床观察表明老年人支原体肺炎应早期、足量、针对致病菌选用抗生素类药物是有效且安全治疗的关键。支原体肺炎一般起病慢,可有发热,热型不定,持续时间长,个别患者有持久地剧烈咳嗽突出。一些难治性支原体肺炎则表现为病情重或病程迁延,肺内外并发症及合并症多且复杂,易发生混合感染,或有红霉素耐药^[1-3]。我们观察的有 2 例患者以长期低热,阵发性咳嗽为主要表现,胸部拍片示双侧肺门淋巴结肿大,血沉轻度升高,曾在外院长期以肺门淋巴结结核治疗无效而致病程迁延,使病情复杂,这与支原体肺炎与原发综合征有时十分相似有关。对这类患者必要时可检测病原体或给予诊断性治疗。

研究表明,支原体肺炎可诱发病道高反应性引起哮喘及毛细支气管炎样的临床表现,故单用平喘治疗效果不佳,易于反复或难以缓解。因此,应及时选用大环内酯类抗生素进行病原治疗,从而使哮喘缓解成为可能^[2-4]。在支原体检测时,由于老年人免疫系统不全可导致缺乏血清抗体反应,抗菌素及激素的广泛应用导致假阴性结果以及缺乏动态观察,在感染不同时期,可能存在抗体水平滴度不同,使支原体抗体不易被检出。对一些老年人,特别是临床表现不典型,肺部体征少,而一般抗感染治疗效果不佳或久咳不愈的肺部感染患者,应严格做病原学检查。此外,必须掌握检测支原体感染的最佳窗口期,一般在支原体感染后 7~10 d 可获得较高阳性结果。

【参考文献】

[1] 曾显专,冯泽萍,敖晓风. 静脉滴注阿奇霉素治疗老年人支原体肺炎 30 例疗效观察[J]. 右江医学 2003 31(2) 109-110.
 [2] Dunbar LM, Khashab MM, Kahn JB, et al. Efficacy of 750-mg, 5-day levofloxacin in the treatment of community-acquired pneumonia caused by atypical pathogens[J]. *Curr Med Res Opin*, 2004; 20(4) 555-563.
 [3] Dunn JJ, Malan AK, Evans J, et al. Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae IgM antibodies in pediatric patients using ImmunoCard Mycoplasma compared to conventional enzyme immunoassays[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004 23(5) #12-414.
 [4] Andronikou S, Eimany A, Robinson PJ, et al. Mycoplasma pneumoniae[J]. *S Afr Med J*, 2004 94(3) 166-167.

编辑 许昌泰