

文章编号:1000-5404(2012)24-2479-05

论著

## 早老素增强子-2 在 APP/PS1 双转基因小鼠脑内的分布及表达

楚亚楠<sup>1</sup>, 宋冲<sup>1</sup>, 贺桂琼<sup>1,2</sup>, 刘刚<sup>1</sup>, 王凌晔<sup>1</sup>, 周泽芬<sup>1</sup> (400016 重庆, 重庆医科大学: 神经科学研究中心<sup>1</sup>, 基础医学院人体解剖学教研室<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 研究  $\gamma$ -分泌酶组件早老素增强子-2(presenilin enhancer-2, Pen-2)在 APP/PS1 双转基因小鼠脑内的表达及分布,以进一步明确 Pen-2 与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的关系。方法 对 APP/PS1 双转基因小鼠交配后产下的子代进行基因分型,用免疫组化方法检测 Pen-2 和老年斑在 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠和同窝野生型正常小鼠脑内的分布和表达情况。结果 Pen-2 广泛分布于 APP/PS1 双转基因小鼠脑内各区域,包括大脑皮质、海马、基底核、小脑、嗅脑、脑室脉络丛等,而老年斑则选择性地出现在大脑皮质、海马、嗅脑等区域,并且 Pen-2 的分布范围广于老年斑的分布。AD 模型小鼠大脑新皮质内 Pen-2 阳性神经元的着色程度( $2.09 \pm 0.33$ )显著高于正常小鼠( $1.29 \pm 0.31$ ,  $P < 0.05$ ),且 AD 模型小鼠大脑新皮质内 Pen-2 免疫阳性物质主要分布于细胞膜和细胞质,而正常小鼠大脑新皮质内的 Pen-2 阳性神经元仅细胞膜周围染色较深,而细胞质染色极浅甚至不着色。结论 Pen-2 在 AD 模型小鼠和正常小鼠脑内的表达存在差异,这种差异可能与老年斑的形成和 AD 的发生相关。

**[关键词]** Pen-2;  $\gamma$ -分泌酶;  $\beta$  淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病

**[中图分类号]** R-332; R394.3; R745.7

**[文献标志码]** A

## Expression and distribution of presenilin enhancer-2 in brain of APP/PS1 double transgenic mice

Chu Yanan<sup>1</sup>, Song Chong<sup>1</sup>, He Guiqiong<sup>1,2</sup>, Liu Gang<sup>1</sup>, Wang Lingxi<sup>1</sup>, Zhou Zefen<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Neuroscience, <sup>2</sup>Department of Anatomy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To examine the expression and distribution of presenilin enhancer-2 (Pen-2), an essential component of  $\gamma$ -secretase complex, in the brain of APP/PS1 double transgenic mice, so as to clarify the relationship between Pen-2 and Alzheimer's disease (AD). **Methods** Offspring which were bred by APP/PS1 double transgenic AD mice were genotyped. Immunohistochemical staining was used to check the distribution and expression of Pen-2 in the brain of 8-month-old APP/PS1 double transgenic AD model mice and its age-matched wild-type littermates. **Results** Pen-2 was widely expressed throughout almost all the regions of brain in APP/PS1 double transgenic mice, including the cerebral cortex, hippocampus, basal nuclei, rhinencephalon, cerebellum, brainstem, and so on. While senile plaques (SP) were selectively distributed in the cerebral cortex, hippocampus, and rhinencephalon. The distribution of Pen-2 was much more extensive than that of SP in the brain of AD model mice. Meanwhile, Pen-2-positive neurons in AD model mice ( $2.09 \pm 0.33$ ) was more dark-stained than that in wildtype controls ( $1.29 \pm 0.31$ ); Furthermore, both the cell membrane and cytoplasm of Pen-2-positive neurons were heavily stained in the AD mice, while in the wildtype littermates, only membrane and its surrounding of Pen-2-positive neurons were relatively dark-stained, and the cytoplasm was mildly or not stained. **Conclusion** Distribution and expression of Pen-2 in the brain of APP/PS1 double transgenic mouse model is different from its wildtype littermates. These differences may indicate that Pen-2 is tightly related to SP formation and AD pathogenesis.

**[Key words]** presenilin enhancer-2;  $\gamma$ -secretase;  $A\beta$ ; Alzheimer's disease

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700885), the "New Century Excellent Talent" Supporting Program of Ministry of Education (NCET-11-1084), the First Batch Supporting Project for Excellent Talents of Chongqing (2009-2), and the Preferred Technology Activity Support Projects for Overseas Personnels (2011-235). Corresponding Author: He Guiqiong, E-mail: guiqionghe@hotmail.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30700885);教育部“新世纪优秀人才”支持计划(NCET-11-1084);重庆市首届优秀人才资助计划[渝教人(2009)2号];留学人员科技活动项目择优资助[渝人社办(2011)235号]

**[通信作者]** 贺桂琼, E-mail: guiqionghe@hotmail.com

$\beta$  淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$  peptide, A $\beta$ )沉积形成的老年斑(senile plaques, SP)是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病的中心环节和共同途径。A $\beta$ 是淀粉蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 $\beta$ -和 $\gamma$ -分泌酶相继作用产生<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明, $\gamma$ -分泌酶与AD的关系非常密切,已成为AD的潜在性治疗靶点。 $\gamma$ -分泌酶是一种大分子量的多蛋白复合体,包括早老素(presenilin, PS)、前咽缺陷蛋白-1(anterior pharynx-defective-1, APH-1)、单过性跨膜蛋白(nicas-trin, NCT)和早老素增强子-2(presenilin enhancer-2, Pen-2),其中PS是 $\gamma$ -分泌酶的活性中心,而PS/ $\gamma$ -分泌酶的活性受其他组件(NCT、APH-1和Pen-2)的调控。目前对 $\gamma$ -分泌酶4个组件蛋白在分子水平的研究已取得一定进展<sup>[3]</sup>,对PS1、NCT和APH-1在AD脑内的分布和表达等也有报道<sup>[4-5]</sup>,但关于Pen-2在AD患者或模型小鼠脑内的分布及表达情况尚不清楚。鉴于此,本研究以APP/PS1双重转基因AD模型小鼠和同窝野生型正常小鼠为研究对象,结合形态学方法,探讨Pen-2在AD模型小鼠脑内的分布及表达,以期进一步明确Pen-2与AD的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

B6C3-Tg(携带突变基因APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>de9</sup>)APP/PS1双转基因小鼠购自美国Jackson实验室,DNA提取试剂盒购自中国Tiangen Biotech公司,引物 $\beta$ -actin、APP、PS1购自美国Invitrogen公司,多克隆抗体兔抗Pen-2购自美国Santa Cruz公司,小鼠抗A $\beta$ 单克隆抗体:靶向A $\beta$ 17-24的4G8购自Sigma公司,二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥,DAB试剂盒购自美国Pierce公司,其他均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 建立APP/PS1双转基因传代小鼠 将B6C3-Tg(携带突变基因APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>de9</sup>)APP/PS1种鼠合笼,交配繁殖。对APP/PS1双转基因小鼠进行鉴定,方法如下:剪取3周龄子代小鼠尾约0.5 cm,应用DNA提取试剂盒提取DNA,核酸蛋白测定仪测定浓度后进行PCR扩增,1.5%Agrosegel电泳检测,紫外分析仪下,观察同时出现APP、PS1条带的即为APP/PS1双转基因小鼠。PCR扩增:根据美国Invitrogen公司提供的引物扩增APP和PS1,以 $\beta$ -actin为内参对照。APP引物上游:5'-CACCACAGAATCCAAGTCGG-3',下游:5'-CTTGACGTCTGGCCTCTTCC-3',引物长度350 bp;PS1引物上游:5'-CAGGTGC-TATAAGGTCAT-3',下游:5'-ATCACAGCCAAGATGAGC-3',引物长度608 bp; $\beta$ -actin引物上游:5'-GACAGGATGCAGAAG-GAGAT-3',下游:5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3',引物长度446 bp。操作步骤参见文献<sup>[4-5]</sup>。

1.2.2 动物分组 根据基因分型结果,AD模型组为APP/PS1基因阳性小鼠,同窝野生型为对照组。取出生后8个月小

鼠进行实验(每组5只)。

1.2.3 标本制备 参见文献<sup>[6]</sup>,2%水合氯醛腹腔注射进行麻醉,开胸后,将管插入左心室升主动脉,用生理盐水冲洗血液后,再用4%多聚甲醛灌注预固定。灌注完毕,在冰上取出脑组织放入4%多聚甲醛8 h,常规脱水、石蜡包埋后用石蜡切片机进行冠状切片(4  $\mu$ m)。

1.2.4 免疫组织化学染色 参见文献<sup>[6]</sup>,切片经二甲苯脱蜡、PBS冲洗、枸橼酸钠微波煮沸抗原修复,再经3%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)处理15 min,PBS冲洗,加入I抗(1:100,4  $^{\circ}$ C过夜),PBS冲洗,加入II抗于37  $^{\circ}$ C孵育30 min,PBS冲洗;最后用二氨基联苯胺(DAB)显色;常规脱水透明封片、光镜下观察。

阴性对照:免疫组化染色时,小鼠脑组织切片用正常血清代替I抗孵育,上述免疫组织化学染色结果显示:未见明显的特异性免疫阳性反应产物。

每只小鼠随机测量5张切片,采用Image Pro Plus软件对Pen-2免疫阳性细胞进行光密度分析。

### 1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件进行t检验。

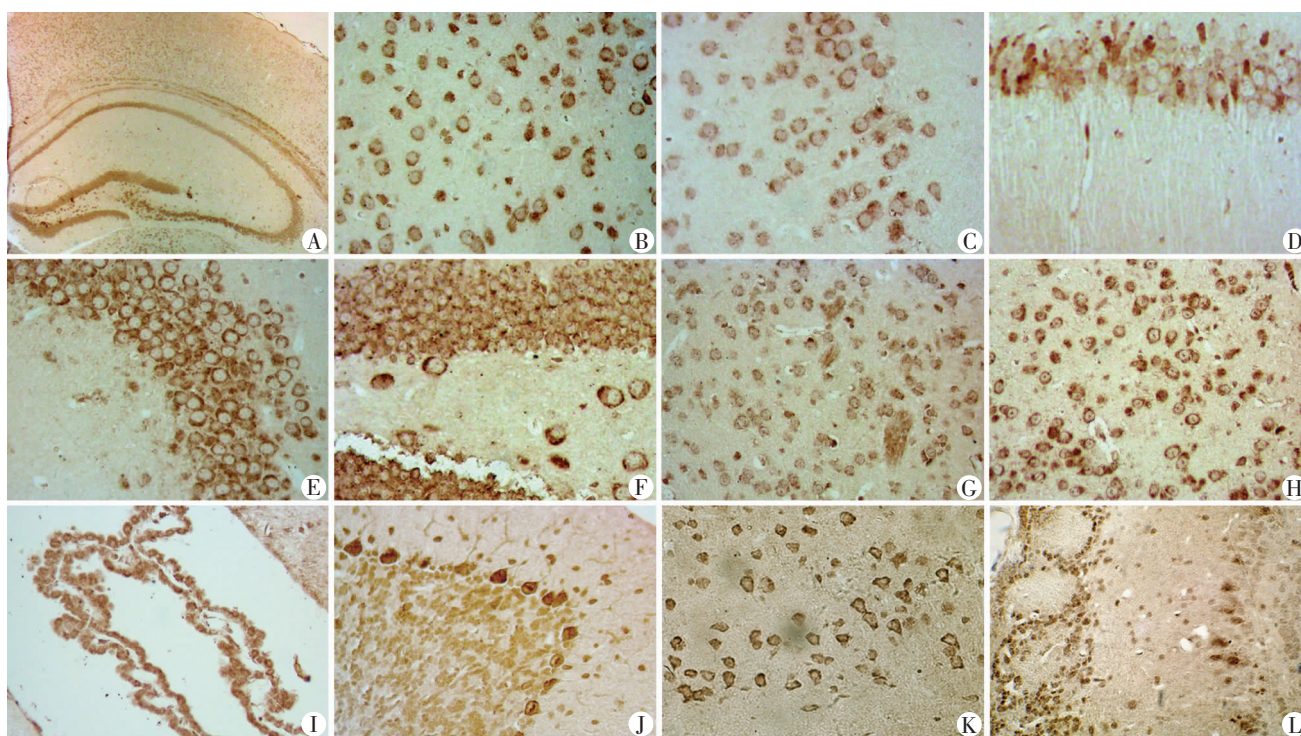
## 2 结果

### 2.1 Pen-2在APP/PS1双转基因小鼠部分脑区的分布及表达

免疫组化结果显示:Pen-2阳性神经元广泛分布于APP/PS1双重转基因AD模型小鼠脑内各区域,包括大脑皮质、海马、基底核、丘脑、小脑、脑干、嗅脑等,但非均匀分布。其中Pen-2免疫阳性物质主要出现在神经元,而未出现在神经胶质细胞。大脑皮质的Pen-2阳性细胞主要出现在II、III层的颗粒细胞层和IV、V层的锥体细胞层,而分子层(I层)内的Pen-2阳性细胞极少;海马各亚区(CA1、CA2、CA3、齿状回等)均可见Pen-2阳性细胞。基底核、丘脑、脑干神经核团内有Pen-2强阳性表达;脑室脉络丛、内嗅皮质和嗅脑出现中等强度的Pen-2阳性表达;小脑内的Pen-2阳性细胞主要出现在小脑核团以及皮质的颗粒细胞层和浦肯野细胞层,而分子层表达极少(图1)。

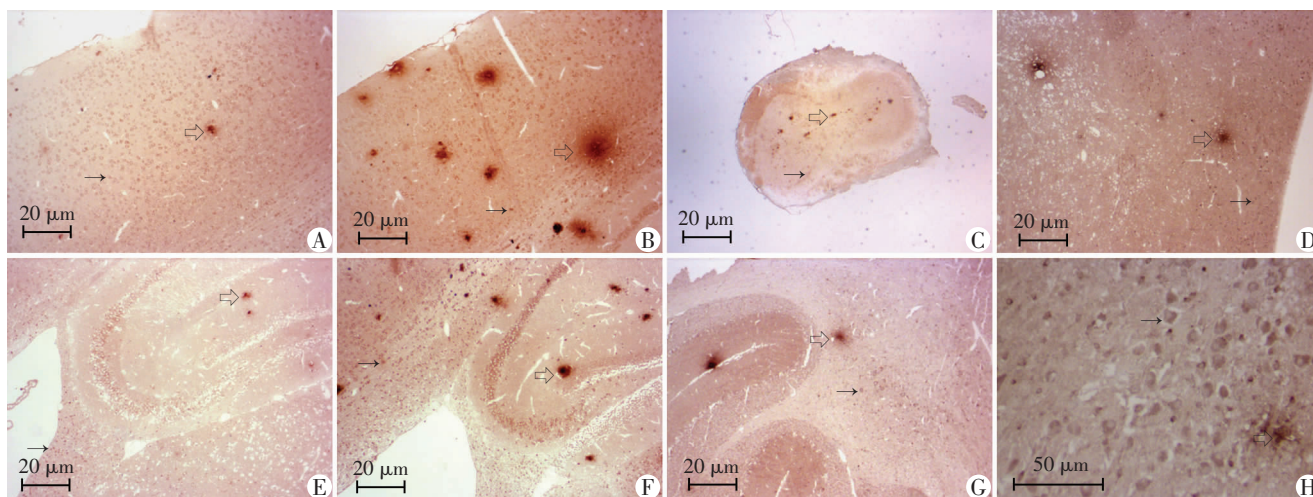
### 2.2 Pen-2与SP在AD模型小鼠及同窝野生型小鼠脑内的分布比较

利用兔抗Pen-2抗体和鼠抗4G8抗体进行免疫组化双标染色,结果显示:出生后8月的AD模型小鼠脑内的大量染色深的SP分布在大脑皮质、海马、嗅脑等Pen-2强表达的区域,斑块的中央部较致密,而周边区的密度较低,在斑块的外围可见一些细胞,这些细胞可能是神经元。斑块较大、个数较多的SP主要分布在皮质的颗粒细胞层和锥体细胞层以及海马的多形细胞层。在嗅脑的内、外丛层,僧帽细胞层,颗粒细胞层也有大量稍小的斑块出现,而丘脑、小脑、脑干等区域SP极少。Pen-2阳性细胞强表达的海马颗粒细胞层却没有SP分布。SP在正常小鼠脑内表达较AD模型小鼠数量少、斑块小。Pen-2阳性细胞不仅见于上述SP密集分布的脑区,同时也见于无SP分布的区域;Pen-2阳性细胞既见于SP内,又见于SP外周。Pen-2阳性细胞的分布范围远远广于SP的分布(图2)。



A: 大脑皮质和海马 ( $\times 40$ ); B: 皮质 ( $\times 400$ ); C: 嗅皮质 ( $\times 400$ ); D: 海马 CA1 ( $\times 400$ ); E: 海马 CA3 ( $\times 400$ ); F: 海马齿状回 ( $\times 400$ ); G: 基底核 ( $\times 400$ ); H: 丘脑 ( $\times 400$ ); I: 脉络丛 ( $\times 400$ ); J: 小脑 ( $\times 400$ ); K: 脑干神经核 ( $\times 400$ ); L: 嗅脑 ( $\times 400$ )

图1 Pen-2 免疫阳性产物在 APP/PS1 双转基因小鼠部分脑区的分布 (S-P)



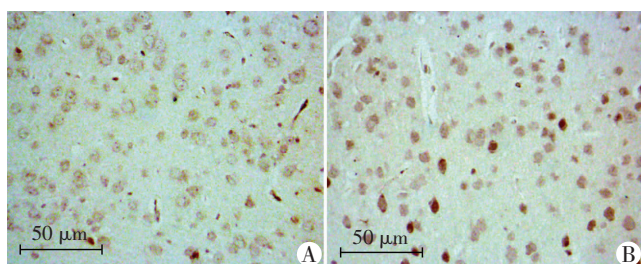
A、B: 皮质; C: 嗅脑; D: 丘脑; E、F: 海马; G: 小脑; H: 脑干腹侧面; A、E: 同窝野生型小鼠; B、C、D、F、G、H: AD 模型小鼠;  $\uparrow$ : Pen-2 阳性细胞;  $\blacktriangledown$ : 老年斑

图2 Pen-2 与老年斑在 AD 模型小鼠及同窝野生型小鼠脑内的分布比较 (S-P)

### 2.3 Pen-2 在 AD 模型小鼠及同窝野生型小鼠大脑新皮质的表达差异

免疫组化结果显示: 生后 8 个月的 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠及其同窝野生型小鼠脑内 Pen-2 的表达模式相似, 即最强表达在新皮质 II ~ V 层、齿状回、下丘脑、嗅脑。两种小鼠新皮质内的 Pen-2 阳性细胞数量: 正常小鼠为  $(104.4 \pm 11.1) / 40$  倍视野, AD 小鼠为  $(112.8 \pm 13.0) / 40$  倍视野, 经统计学分

析, 两者差异无显著性 ( $n=5, t=0.95, P>0.05$ )。Pen-2 免疫阳性物质在两种小鼠脑组织神经元内的分布和染色深浅不同: 在正常小鼠新皮质内主要分布于近细胞膜, 而在 AD 模型小鼠新皮质内绝大多数分布于细胞核。采用 Image Pro Plus 软件测定 Pen-2 阳性细胞的光密度发现, 与正常小鼠  $(1.29 \pm 0.31)$  相比, AD 模型小鼠新皮质内的 Pen-2 阳性细胞染色强度显著增强  $(2.09 \pm 0.33, n=5, t=3.34, P=0.028)$ 。见图 3。



A: 同窝野生型小鼠; B: AD 模型小鼠

图3 Pen-2 阳性细胞在 AD 模型小鼠和同窝野生型小鼠大脑新皮质的表达比较 (S-P)

### 3 讨论

Pen-2 是 2002 年 Francis 等<sup>[7]</sup> 通过基因筛选技术在线虫中发现的。近期研究发现, Pen-2 不仅是具有活性  $\gamma$ -分泌酶的必需组件, 同时在 PS 介导  $\gamma$ -分泌酶对底物的裂解过程中起促进作用, 且对  $\gamma$ -分泌酶活性起正向调控作用, 与另一组件 APH-1 对  $\gamma$ -分泌酶活性的负向调控作用相平衡<sup>[8-9]</sup>。Pen-2 的过表达或基因突变可影响 PS/ $\gamma$ -分泌酶活性及  $A\beta$  的产生, 进而影响 AD 的发生、发展过程<sup>[10]</sup>。

AD 患者的病理改变主要发生在基底前脑、海马和大脑皮层。细胞外的 SP 是其病理特征之一。本实验所用小鼠同时携带“瑞典家族”突变的 APP (APP<sup>swe</sup>) 和 PS1 (PS  $\Delta$ E9) 基因。APP<sup>swe</sup> 基因中, 在 APP 编码序列的末端的 670、671 位点发生突变, 分别由 Asn 与 Leu 取代 Lys 与 Met; 在家族性 AD 中发现的第 9 个外显子缺失突变的是 PS  $\Delta$ E9。这类小鼠具有认知功能障碍、SP 沉积、神经元丢失等 AD 患者的特征性改变, 且随小鼠年龄进行性加重, 被认为是 AD 的理想动物模型。

Pen-2 在组织中广泛表达, Hebert 等<sup>[11]</sup> 发现小鼠 Pen-2 mRNA 的表达水平在不同组织中是不同的。Pen-2 在小鼠脑中表达水平一般, 而在肝脏、心脏、肾脏和睾丸中表达最高, 表达最少的是骨骼肌, 但目前尚不知 Pen-2 在小鼠大脑各区域的分布及表达情况。在细胞水平, 主要分布于内质网、高尔基体等。本实验取 8 月龄 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠作为实验对象, 经对其脑组织进行免疫组化染色结果显示: Pen-2 广泛分布于 AD 模型小鼠脑内各区域, 但在不同脑区 Pen-2 阳性细胞的数量及染色深浅不尽相同, 其中, 密集浓染的 Pen-2 阳性细胞主要见于海马各区的锥体细胞和颗粒细胞层、大脑皮质 II ~ V 层、嗅脑的颗粒层、内嗅皮质等; 中等强度的 Pen-2 阳性细胞主要分布于侧脑室、小脑皮质的颗粒细胞层、基底核、丘脑和脑干的神经核团。Pen-2 在 AD 模型小鼠脑内的分布模式与  $\gamma$ -分泌酶组件 APH-1 和 NCT 的分布有相似之处,

但仍存在差异<sup>[4-5]</sup>; 如嗅脑中无 NCT 表达, 但 Pen-2 和 APH-1 呈强表达; NCT 仅表达于小脑浦肯野细胞层, APH-1 表达于小脑颗粒细胞层和浦肯野细胞层, 而 Pen-2 则见于小脑颗粒细胞层和小脑白质。各组件在脑内分布的异同提示其功能也可能存在异同。

本实验还发现, 8 月龄 AD 模型小鼠脑内的 SP 分布较局限, 选择性的出现在与学习记忆相关的区域 (大脑皮质、海马和嗅脑), 而 Pen-2 的强表达不仅出现在 SP 形成区, 也出现在非 SP 形成区, 推测部分 Pen-2 阳性细胞与  $\gamma$ -分泌酶活性及  $A\beta$  的生成有关, 而另一部分 Pen-2 阳性细胞具有其他非  $\gamma$ -分泌酶的功能。

Pen-2 在 AD 模型小鼠及正常小鼠脑组织中的分布及表达是否存在差异呢? 实验中比较了 Pen-2 免疫阳性细胞在两类小鼠大脑新皮质的分布、染色深浅、数量及细胞内分布情况, 结果发现, 同窝野生型正常小鼠脑神经元内的 Pen-2 免疫阳性物主要分布于细胞膜周围, 故细胞膜周围染色较深, 而细胞质染色极浅甚至不着色, 而 AD 模型小鼠脑神经元内的 Pen-2 免疫阳性物主要分布在细胞核。经统计学分析, 两种小鼠大脑新皮质内 Pen-2 阳性细胞染色程度具有显著差异。该现象提示, Pen-2 蛋白在 AD 模型小鼠和正常小鼠大脑新皮质内的表达存在差异。Pen-2 在 AD 模型鼠的异常表达增加可能参与了  $A\beta$  的形成, 而且有研究表明<sup>[12]</sup>, Pen-2 蛋白水平的表达变化直接影响  $\gamma$ -分泌酶活性乃至 AD 中  $A\beta$  的产生, 而细胞内 Pen-2 的表达水平直接取决于其自身的更新及降解。本实验也从形态学水平反映出 Pen-2 的表达变化与  $A\beta$  的关联, 在 Pen-2 强表达的区域, 例如大脑皮质、海马, 出现了斑块较大、个数较多的 SP, 而嗅脑的内、外丛层, 僧帽细胞层, 颗粒细胞层也有大量稍小的斑块出现, SP 主要分布在大脑皮质的颗粒细胞层、锥体细胞层, 这可能与不同皮质区域有其不同的功能有关。越来越多的证据表明, 泛素蛋白酶体系统功能失调在 AD 发病机制中起着非常重要的作用<sup>[13]</sup>, Bergman 等<sup>[14]</sup> 在细胞水平发现 Pen-2 的蛋白降解与泛素蛋白酶体系统有关。那么, 本实验观察到的 Pen-2 在两种小鼠大脑新皮质内的表达差异, 是 Pen-2 在合成过程中出现了错误折叠、转运障碍还是 Pen-2 的蛋白降解出现了障碍导致的呢? 这些问题尚不清楚需进一步探讨。

综上所述, 本研究结果显示: Pen-2 在 8 月龄 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠脑内各区域广泛分布, 但分布最密集的区域是大脑皮质和海马; 就分布范围而言, Pen-2 要远远广于  $A\beta$  沉积; 在 AD 模型小鼠和同窝野生型小鼠的脑内 Pen-2 的表达具有差异, 这种差异可能与  $A\beta$  的生成及 AD 的发生有关。

参考文献:

[1] Vagnoni A, Perkinton M S, Gray E H, *et al.* Calsyntenin-1 mediates axonal transport of the amyloid precursor protein and regulates A $\beta$  production[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(13): 2845-2854.

[2] St-George-Hyslop P, Fraser P E. Assembly of the presenilin  $\gamma$ - $\epsilon$ -secretase complex[J]. *J Neurochem*, 2012, 120(Suppl 1): 84-88.

[3] Zhang H, Ma Q, Zhang Y W, *et al.* Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein[J]. *J Neurochem*, 2012, 120(Suppl 1): 9-21.

[4] 赵蕾, 龙志敏, 贺桂琼, 等. 前咽缺陷蛋白-1 在 APP/PS1 转基因阿尔茨海默病小鼠模型中神经系统的分布及表达[J]. *中华老年医学杂志*, 2011, 34(12): 1038-1042.

[5] 龙志敏, 赵蕾, 贺桂琼, 等.  $\gamma$ -分泌酶组件 NCT 在痴呆小鼠中枢神经系统的分布及表达[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(11): 1999-2003.

[6] 赵蕾, 龙志敏, 贺桂琼, 等. 丙戊酸钠对 APP/PS1 双重转基因小鼠脑组织 Tau 蛋白的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(12): 1167-1170.

[7] Francis R, McGrath G, Zhang J, *et al.* *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation[J]. *Dev Cell*, 2002, 3(1): 85-97.

[8] Luo W J, Wang H, Li H, *et al.* PEN-2 and APH-1 coordinately

regulate proteolytic processing of presenilin 1[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(10): 7850-7854.

[9] Shiraishi H, Sai X, Wang H Q, *et al.* PEN-2 enhances gamma-cleavage after presenilin heterodimer formation[J]. *J Neurochem*, 2004, 90(6): 1402-1413.

[10] Andreoli V, Trecroci F, La-Russa A, *et al.* Presenilin enhancer-2 gene: identification of a novel promoter mutation in a patient with early-onset familial Alzheimer's disease. [J] *Alzheimer's Dement*, 2011, 7(6): 574-578.

[11] Hebert S S, Serneels L, DeJaegere T, *et al.* Coordinated and widespread expression of gamma-secretase *in vivo*: evidence for size and molecular heterogeneity[J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(2): 260-272.

[12] Seo S J, Hwang D Y, Cho J S, *et al.* PEN-2 overexpression induces gamma-secretase protein and its activity with amyloid beta-42 production[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(6): 1016-1023.

[13] Riederer B M, Leuba G, Vernay A, *et al.* The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(3): 268-276.

[14] Bergman A, Hansson E M, Pursglove S E, *et al.* Pen-2 is sequestered in the endoplasmic reticulum and subjected to ubiquitylation and proteasome-mediated degradation in the absence of presenilin[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 16744-16753.

(收稿:2012-07-07;修回:2012-09-14)

(编辑 王小寒)

(上接 2473 页)

2.2 疗效评价结果

治疗结束后随访 6 个月,通过食管 CT 及胃镜检查评价疗效,治疗组 CR 26 例,PR 2 例,SD 0 例,PD 2 例。对照组 CR 23 例,PR 3 例,SD 1 例,PD 3 例。两组比较,差异无统计学意义( $\chi^2=0.741, P=0.389$ )。

2.3 副作用评价

两组患者毒副作用主要为放射性食管炎和骨髓抑制,后期放射反应主要是放射性肺炎。A 组的 3~4 度骨髓抑制数量少于 B 组( $P<0.05$ )。两组放射性食管炎和放射性肺炎的发生情况,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

3 讨论

放射治疗是治疗局部食管癌的重要手段。RTOG-8501 临床试验<sup>[2]</sup>的结果推动了同期放、化疗应用于食管癌的综合治疗。其结果显示同期化放疗组较单纯放疗组中位生存期明显延长(12.5 个月 vs 8.9 个月),2 年生存率也显著提高(38% vs 10%)。多西紫杉醇是半合成紫杉类抗肿瘤药物,它能够促进微管蛋白聚合成稳定的微管并且抑制微管解聚,导致细胞有丝分裂阻滞,将增殖期的肿瘤细胞阻滞在 G 和 M 期,从而达到放射增敏的作用。Font 等<sup>[3]</sup>采用周剂量多西紫杉醇加同期放疗治疗非手术适应证的晚期食管癌,多西紫杉醇 20 mg/(m<sup>2</sup>·周),同期常规分割放疗 66 Gy,总体有效率达 50%,1 年生存率为 35%。van-Hagen 等<sup>[4]</sup>对 366 例食管癌患者术前进行卡铂 2 mg/(m<sup>2</sup>·周)与紫杉醇 50 mg/(m<sup>2</sup>·周)每周给药,并同期放疗 41.4 Gy 后再行手术治疗,总生存期明显提高。说明同期放、化疗可以通过增加放疗的敏感性而提高疗效,提高总生存期。

回生口服液由益母草、鳖甲、水蛭(制)等 33 味中药组成,具有活血化痰、疏畅气机、补虚扶正、化痰通络的作用。刘黎<sup>[5]</sup>用回生口服液联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌患者发现其

可以提高机体的免疫功能,降低化疗引起的骨髓抑制,改善患者的生活质量。薛峰等<sup>[6]</sup>用回生口服液联合同步放、化疗治疗中晚期食管癌患者可获得较好的近期疗效,白细胞及血小板下降率显著低于对照组( $P<0.05$ )。本研究发现,食管癌同期放、化疗在提高疗效的同时,副作用也相应增加。在治疗中配合服用回生口服液,虽然通过 6 个月随访,没有提高治疗效果,但是在免疫功能方面,通过监测治疗前后 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、NK 细胞,发现服用回生口服液组免疫功能无明显下降,和对照组比较有显著差异( $P<0.05$ )。

回生口服液用于食管癌同期放、化疗,可以减少治疗导致的免疫功能下降的发生率,并减少 3~4 度骨髓抑制的发生率,具有较好的辅助治疗作用。

参考文献:

[1] 王道梅, 燕平, 莫正英, 等. 回生口服液对非小细胞肺癌化疗患者血象及免疫功能的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(10): 67, 78.

[2] Lin C C, Hsu C H, Cheng J C, *et al.* Concurrent chemoradiotherapy with twice weekly paclitaxel and cisplatin followed by esophagectomy for locally advanced esophageal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(1): 93-98.

[3] Font A, Arellano A, Fernandez-Llamazares J, *et al.* Weekly docetaxel with concomitant radiotherapy in patients with inoperable oesophageal cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2007, 9(3): 177-182.

[4] van-Hagen P, Hulshof M C, van-Lanschoot J J, *et al.* Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(22): 2074-2084.

[5] 刘黎. 回生口服液用于中晚期肺癌化疗患者效果观察[J]. *山东医药*, 2010, 50(27): 53-54.

[6] 薛峰, 苏进, 许新华. 回生口服液联合同步放化疗治疗中晚期食管癌效果观察[J]. *山东医药*, 2011, 51(19): 73-74.

(收稿:2012-10-14;修回:2012-11-12)

(编辑 汪勤俭)