

文章编号:1000-5404(2014)12-1249-06

论著

LATS1 基因去甲基化对人肾癌细胞生物学功能及其 Hippo-YAP 信号通路的影响

陈柯宏¹, 李兴森³, 何江², 黄彪³, 曹建佳¹, 盛夏¹, 李文宾¹, 李美材¹, 王德林¹, 曾强锋¹, 黄亮亮¹ (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院: 泌尿外科¹; 401331 重庆, 重庆医科大学附属大学城医院消化神经中心²; 401420 重庆, 重庆市綦江区人民医院泌尿外科³)

[摘要] 目的 探讨 LATS1 基因去甲基化对人肾癌细胞生物学功能及其 Hippo-YAP 信号通路的影响。方法 利用 RT-PCR 检测人肾透明细胞癌细胞系 786-O 和人胚肾细胞系 HEK-293 中 Hippo-YAP 信号通路大肿瘤抑制基因 1 (large tumor suppressor gene 1, LATS1) mRNA 和下游癌基因 Yes-相关蛋白 (yes-associated protein, YAP) mRNA 的表达水平, 用亚硫酸氢盐测序法 (bisulfite sequence-PCR, BSP) 对 LATS1 低表达细胞 786-O 进行甲基化分析, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, DAC) 处理 786-O 和 HEK-293 后, 用 RT-PCR、Western blot 检测各组细胞 LATS1 和 YAP 的 mRNA 和蛋白表达水平, 流式细胞术检测各组细胞凋亡和周期, CCK-8 检测各组细胞增殖抑制情况。结果 786-O 较 HEK-293 LATS1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), YAP mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), BSP 显示 LATS1 在人肾癌细胞系 786-O 中高度甲基化; DAC 处理 786-O 后, LATS1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), YAP mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 周期停滞在 G_0/G_1 期 ($P < 0.05$)、细胞增殖受到明显抑制 ($P < 0.05$)、细胞凋亡显著增加 ($P < 0.05$), 而 HEK-293 组均无明显变化 ($P > 0.05$)。结论 LATS1 基因去甲基化后下调 YAP 基因表达, 抑制 786-O 细胞增殖并诱导其凋亡。LATS1 基因甲基化在肾癌发生中起重要作用。

[关键词] 肾细胞癌; 去甲基化; Hippo-YAP; 大肿瘤抑制基因 1; Yes-相关蛋白

[中图分类号] R394.3; R730.23; R737.11

[文献标志码] A

Effects of LATS1 gene demethylation on biological function and Hippo-YAP signaling pathway in human renal cell carcinoma cell line

Chen Kehong¹, Li Xinsen³, He Jiang², Huang Biao³, Cao Jianjia¹, Sheng Xia¹, Li Wenbin¹, Li Meicai¹, Wang Delin¹, Zeng Qiangfeng¹, Huang Liangliang¹ (¹Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; ²Gastroenterology and Neurology Center, University-Town Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 401331; ³Department of Urology, Chongqing Qijiang People's Hospital, Chongqing, 401420, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of large tumor suppressor gene 1 (LATS1) demethylation on the biological function and Hippo-YAP signaling pathway in human renal cell carcinoma (RCC) cells. **Methods** The mRNA expression levels of LATS1 and downstream gene YAP of Hippo-YAP signaling pathway were detected by RT-PCR in human clear cell RCC cell line 786-O and human embryonic kidney cell line HEK-293. The methylation of 786-O cells with low LATS1 expression was analyzed by bisulfite sequence-PCR (BSP). After 786-O and HEK-293 cells were treated by 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC), the mRNA and protein levels of LATS1 and YAP were detected by RT-PCR and Western blotting in each group. Cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry (FCM). The cell proliferation inhibition was detected by cell proliferation and toxicity detection reagent (CCK-8). **Results** Compared with the HEK-293 cells, the mRNA expression level of LATS1 was significantly decreased ($P < 0.05$), while that of YAP was markedly increased ($P < 0.05$) in the 786-O cells. LATS1 was highly methylated in the 786-O cells as proven by BSP. After DAC treatment in the 786-O cells, the mRNA and protein expression levels of LATS1 were dramatically increased ($P < 0.05$), but those of YAP were significantly decreased ($P < 0.05$). Cell cycle was arrested in G_0/G_1 phase ($P < 0.05$) and cell proliferation was obviously inhibited ($P < 0.05$). Cell apoptosis was increased significantly ($P < 0.05$). In the HEK-293 cells, however, those above-mentioned changes were insignificant

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30972999); 重庆市自然科学基金(cqpc2012jja1698); 重庆市卫生局基金(2013-2-082)

[通信作者] 王德林, E-mail: dlwangws@sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140115.1518.014.html> (2014-01-15)

($P > 0.05$). **Conclusion** The demethylation of LATS1 gene down-regulates the expression of YAP gene, inhibits the cell proliferation of 786-O cells and induces apoptosis. The methylation of LATS1 gene may contribute greatly to the occurrence of RCC.

[**Key words**] renal cell carcinoma; demethylation; Hippo-YAP; large tumor suppressor gene 1; YAP

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30972999), the Natural Science Foundation of Chongqing (cqpc2012jjal698) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau(2013-2-082). Corresponding author: Wang Delin, E-mail: dlwangws@sina.com

肾癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系常见恶性肿瘤之一,肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)为其主要类型,每年全世界大约有102 000例患者因此死亡,发病率和病死率占全部肿瘤的2%~3%,其分子特性复杂,发生机制迄今不甚清楚^[1-2]。新发现Hippo-YAP信号通路异常调控与肿瘤细胞增殖有关,通过一系列激酶级联反应调控转录共激活因子Yes-相关蛋白(Yes-associated protein, YAP),促进细胞增殖和抑制凋亡,达到细胞和组织的异常扩增,导致肿瘤发生^[3]。抑癌基因大肿瘤抑制基因1(large tumor suppressor gene 1, LATS1)在Hippo-YAP信号通路中位于YAP上游,在体内外结合并磷酸化转录调节因子YAP,通过抑制细胞基因的转录调节使YAP致癌功能失活^[4-7]。研究发现LATS1抑癌基因在结直肠癌^[8]中发生甲基化而表达降低,提示LATS1甲基化与肿瘤发生有着密切联系。5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, DAC)是一种甲基化转移酶抑制剂,能明显减少基因CpG岛甲基化,使抑癌基因重新表达并抑制肿瘤的生长和发展^[9]。本实验利用BSP对低表达LATS1的肾癌786-O细胞系进行甲基化分析,探讨DAC去甲基化后LATS1表达及其细胞生物学行为和Hippo-YAP信号通路的影响,并初步研究LATS1基因甲基化在肾癌发生中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人肾癌细胞系786-O、人胚肾细胞系HEK-293购自ATCC, DMEM高糖培养基、RPMI1640培养基、胎牛血清购自Gibco公司,胰蛋白酶、DAC购自Sigma公司,总RNA提取试剂RNAiso、逆转录试剂盒及Tag酶购自TaKaRa大连宝生物工程有限公司,兔抗人LATS1、YAP抗体购自Santa Cruz公司,兔抗人 β -actin抗体、HRP标记羊抗兔IgG、RIPA蛋白裂解液等试剂均购自上海碧云天公司,DNA提取试剂盒TIANamp Genomic DNA Kit购自北京天根生化公司,甲基化修饰试剂盒、T-载体克隆试剂盒、菌落筛选试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,CCK-8试剂购自广州奕源生物公司。

1.2 细胞培养

HEK-293用含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,786-O用含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基,在5% CO₂、

37℃、饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 LATS1基因启动子区的甲基化检测

DNA提取与扩增:LATS1启动子区位于染色体6q24-25^[10],据此设计并合成1对BSP引物(S1294-上游:5'-AGAA-GAAAGTTTTGGATTATTAAT-3', S1294-下游:5'-CATTTAT-AAATTAACCTCTAAAATAC-3',由北京康为世纪生物科技有限公司设计合成)。按TIANamp Genomic DNA Kit试剂盒提取细胞DNA,用甲基化修饰试剂盒对基因组DNA进行重亚硫酸盐修饰,用BSP引物对处理过样本DNA进行PCR扩增,产物片段大小为381 bp。PCR产物甲基化测序与分析:将回收PCR产物与pUC-T连接。取10 μ L连接产物转化DH5 α 感受态细胞,放入含有X-gal/IPTG和Amp的琼脂(LB)平板,37℃培养过夜。通过蓝白斑筛选,挑选10个白色阳性克隆接种于1 mL LB液体培养基中,37℃培养过夜。用质粒提取试剂盒提取质粒并测序。

1.4 DAC处理细胞

实验前1 d将细胞传代,密度为30%左右,分为786-O对照组、786-O处理组(1 μ mol/L DAC)、HEK-293对照组及HEK-293处理组(1 μ mol/L DAC),DAC浓度参考文献^[11],每24小时换1次培养基和等量DAC药物,96 h后收集细胞进行实验。

1.5 RT-PCR检测

用RNAiso按RNA提取试剂盒提取各组约10⁶个细胞的总RNA,用紫外线分光光度计检测RNA浓度及纯度后,将各组RNA浓度调成一致并取等量RNA模板,按逆转录试剂盒反转录RNA为cDNA,反应体系10 μ L,37℃孵育15 min,85℃加热30 s。PCR扩增基因(LATS1、YAP、GAPDH mRNA引物由TaKaRa大连宝生物工程有限公司合成)条件为95℃ 5 min,之后95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共30个循环,最后72℃ 5 min。RT-PCR产物经3%琼脂糖凝胶电泳,以LATS1或YAP与GAPDH条带密度比值表示LATS1或YAP mRNA的相对表达水平,实验重复3次。

1.6 Western blot检测LATS1和YAP蛋白表达

细胞用PBS洗3次,用一次性无菌细胞刮收集各组细胞,800 r/min,5 min,加入1 mL PBS吹打均匀后转入EP管中,12 000 r/min,5 min,倒掉上清液,加入RIPA裂解液,冰上裂解30 min,12 000 r/min,15 min,BCA法测定上清液蛋白浓度。加上1/4体积的蛋白上样缓冲液Loading buffer,100℃变性5 min。配制SDS-聚丙烯酰胺分离胶和积层胶,加Tris甘氨酸电泳缓冲液,每孔加等量变性蛋白约50 μ g,SDS-PAGE电泳后转于PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h。加入一抗4℃过夜,TBST洗膜,3次/10 min,再加入辣根过氧化物酶标记二抗,37℃ 2 h,TBST洗膜,3次/10 min,ECL显影,暗室下凝胶成像仪曝光,以LATS1或YAP与 β -actin条带密度比值表示LATS1或

YAP蛋白相对表达水平,实验重复3次。

1.7 流式细胞术检测凋亡及其周期

取对数生长期786-O细胞和HEK-293细胞经0.25%胰酶消化后,重新接种 5×10^4 /mL个细胞于培养瓶,分为HEK-293对照组、HEK-293药物处理组(1 μ mol/L DAC)、786-O对照组及786-O药物处理组(1 μ mol/L DAC)。作用96 h后,消化细胞并调整细胞密度为 1×10^6 /mL。PBS冲洗2次,离心后加入1 mL PBS吹打均匀,分别加入AnnexinV和PI,室温避光孵育15 min,测定细胞凋亡率。按前述方法将细胞离心后,加入1 mL 70%预冷无水乙醇,4 $^{\circ}$ C固定过夜,PBS清洗后在浓度为1% RNase水浴10 min,加入碘化丙啶(PI)室温避光染色30 min,3 000 r/min,8 min,以生理盐水重悬后,检测细胞周期,实验重复3次。

1.8 CCK-8 检测增殖

将生长良好的786-O细胞和HEK-293细胞接种于96孔平底培养板,每孔100 μ L培养液种植 2×10^3 个细胞,培养过夜后弃掉培养液,分为HEK-293对照组、HEK-293药物处理组(1 μ mol/L DAC)、786-O对照组及786-O药物处理组(1 μ mol/L DAC)。每组设3个复孔。每24、48、72、96小时加入CCK-8溶液10 μ L,继续孵育2 h。用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度值(OD),并计算细胞增殖抑制率(IR): $IR = [1 - \text{实验组} D(450) / \text{对照组} D(450)] \times 100\%$,实验重复3次。

1.9 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件。实验数据为计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用独立样本t检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 LATS1、YAP mRNA 在不同细胞系中的表达水平

琼脂糖凝胶电泳显示786-O细胞中LATS1 mRNA表达灰度比(0.51 \pm 0.02)较HEK-293细胞(0.73 \pm 0.02)显著降低($P <$

0.05),YAP mRNA表达灰度比(0.69 \pm 0.02)较HEK-293细胞系(0.50 \pm 0.02)显著增高($P <$ 0.05,图1),表明786-O细胞中LATS1 mRNA表达水平明显低于HEK-293细胞,而YAP mRNA表达水平明显高于HEK-293细胞。

2.2 LATS1 甲基化测序分析

LATS1基因启动子区位于染色体6q24-25中5' UTR^[12],我们选取低表达LATS1的肾癌786-O细胞并对LATS1启动子-600 bp到500 bp区域进行甲基化测序发现LATS1在该序列中高度甲基化,甲基化比例(甲基化的CpG岛位点占总CpG岛位点的比例)为97.5%(图2)。

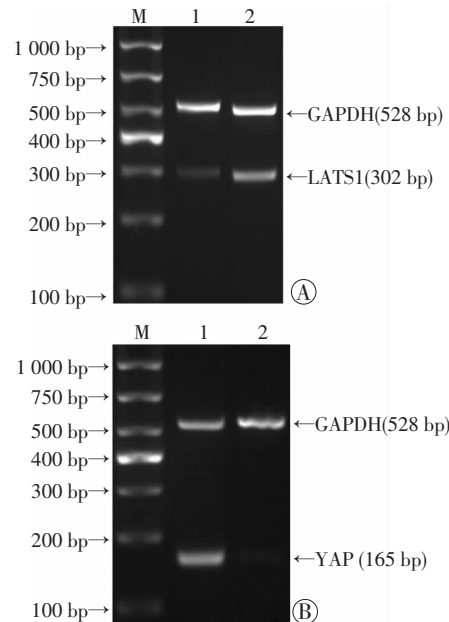


图1 RT-PCR检测各细胞系LATS1(A)、YAP(B)mRNA的表达

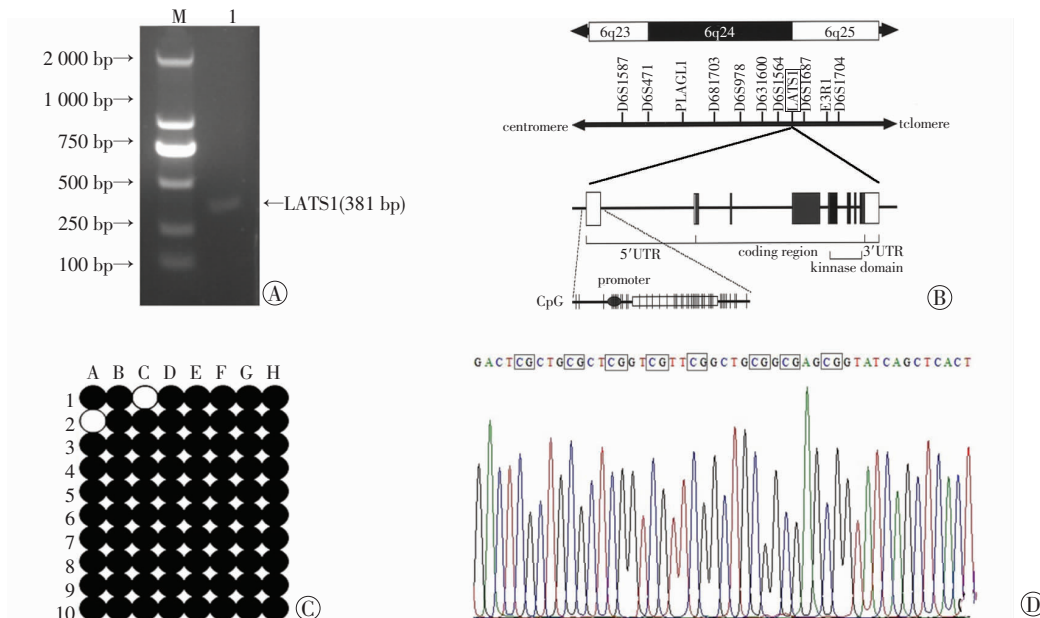
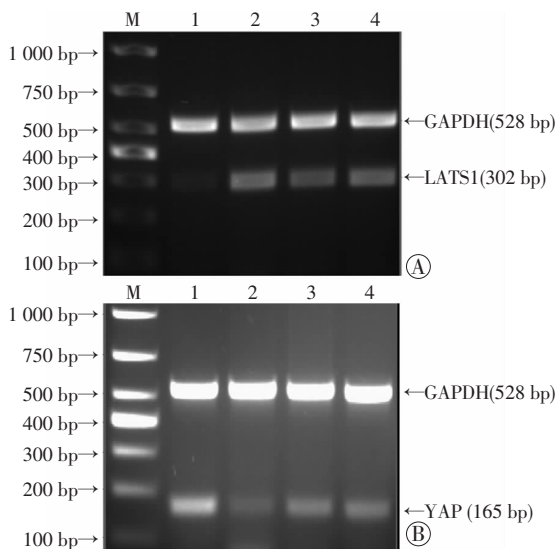


图2 BSP检测LATS1基因启动子甲基化状态

2.3 DAC去甲基化后对LATS1、YAP mRNA表达水平的影响

786-O处理组LATS1 mRNA表达灰度比(0.79 ± 0.02)较其对照组(0.47 ± 0.01)显著升高($P < 0.05$),而YAP mRNA表达灰度比(0.44 ± 0.01)较其对照组(0.62 ± 0.01)显著降低($P < 0.05$),而HEK-293处理组与其对照组LATS1 mRNA及YAP mRNA表达灰度比较无明显差异($P > 0.05$,图3)。结果显示786-O细胞LATS1基因去甲基化后恢复LATS1 mRNA表达并抑制YAP mRNA表达。

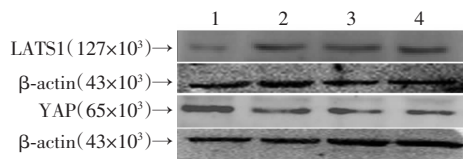


M:标准;1:786-O对照组;2:786-O 1 μmol/L DAC组;3:HEK-293对照组;4:HEK-293 1 μmol/L DAC

图3 RT-PCR检测DAC处理各组细胞后LATS1(A)和YAP(B) mRNA的表达

2.4 DAC去甲基化后对LATS1、YAP蛋白表达水平的影响

786-O处理组LATS1蛋白表达灰度比(0.55 ± 0.04)较其对照组(0.23 ± 0.02)显著升高($P < 0.05$),而YAP蛋白表达灰度比(0.32 ± 0.02)较其对照组(0.57 ± 0.03)显著降低($P < 0.05$)。而HEK-293处理组与其对照组LATS1蛋白及YAP蛋白表达灰度比无明显差异($P > 0.05$,图4)。结果显示786-O细胞LATS1基因去甲基化后恢复LATS1蛋白表达并降低YAP蛋白表达。



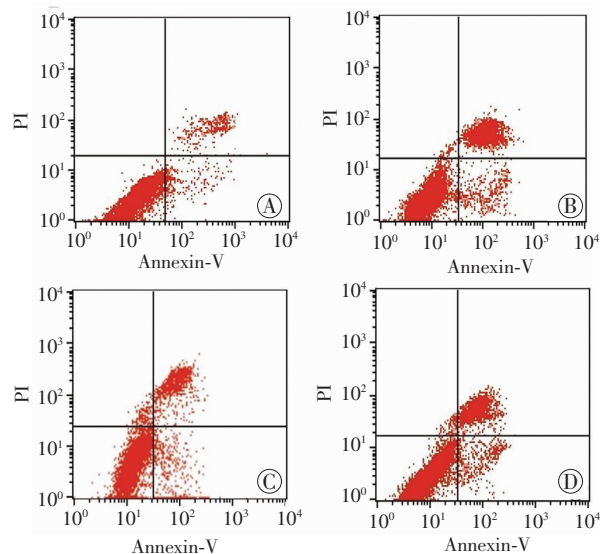
1:786-O对照组;2:786-O 1 μmol/L DAC组;3:HEK-293对照组;4:HEK-293 1 μmol/L DAC组

图4 Western blot检测DAC处理各组细胞后LATS1和YAP蛋白的表达

2.5 DAC去甲基化后对细胞凋亡及周期的影响

786-O处理组细胞凋亡率(27.73 ± 2.85)%显著高于其对照组(7.54 ± 1.71)% ($P < 0.05$),而HEK-293处理组($16.16 \pm$

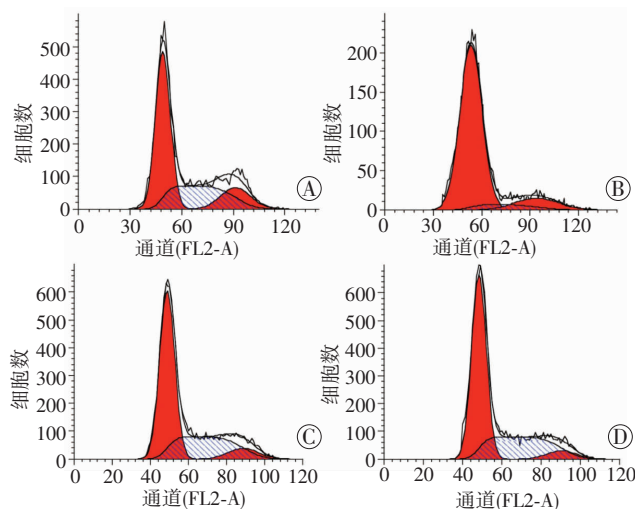
0.94)%凋亡率与其对照组(15.77 ± 0.98)%相比无明显差异($P > 0.05$,图5)。FCM结果显示786-O细胞LATS1基因去甲基化后诱导细胞凋亡。



A:786-O对照组;B:786-O 1 μmol/L DAC组;C:HEK-293对照组;D:HEK-293 1 μmol/L DAC组

图5 流式细胞术检测DAC处理各组细胞后凋亡情况

786-O处理组细胞周期停滞于G₀/G₁期比例(82.12 ± 3.01)%显著高于其对照组(57.43 ± 1.13)% ($P < 0.05$),而HEK-293处理组细胞周期停滞于G₀/G₁期比例(61.14 ± 1.05)%与其对照组(60.35 ± 0.94)%相比无明显差异($P > 0.05$,图6)。流式细胞术检测结果显示786-O细胞LATS1基因去甲基化后诱导细胞周期停滞于G₀/G₁期。



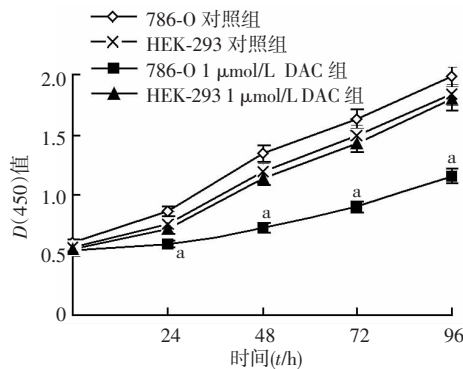
A:786-O对照组;B:786-O 1 μmol/L DAC组;C:HEK-293对照组;D:HEK-293 1 μmol/L DAC组

图6 流式细胞术检测各组细胞周期变化

2.6 DAC去甲基化后细胞增殖能力的变化

CCK-8结果显示1 μmol/L DAC处理细胞4 d后(图7)786-O处理组D(450) (1.16 ± 0.01)明显低于其未加药对照组(1.98 ± 0.01) ($P < 0.05$),而HEK-293处理组D(450) ($1.79 \pm$

0.02) 与其对照组(1.833 ± 0.02) 相比无明显差异($P > 0.05$)。DAC 处理 24、48、72、96 h 后,786-O 处理组细胞增殖抑制率分别为 32%、46%、45%、41%,而 HEK-293 处理组未受到明显抑制,显示 LATS1 基因去甲基化对 786-O 细胞有明显增殖抑制作用,而对 HEK-293 没有明显影响。



a: $P < 0.05$, 与 786-O 对照组比较
图7 CCK-8 检测各组细胞的增殖能力

3 讨论

研究发现 Hippo-YAP 信号通路中关键因子之一,抑癌基因 LATS1 在多种肿瘤中表达降低或缺失^[13],我们前期研究发现该基因在 RCC 组织中表达明显降低^[14]。抑癌基因失活常常导致肿瘤发生,其机制主要有基因突变,杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)和基因甲基化。近年认为甲基化是抑癌基因失活的主要机制,通过使位于启动子和第 1 外显子区域的 CpG 岛发生高甲基化,抑制抑癌基因转录,使基因表达沉默,但这种甲基化并不是基因序列发生改变,而只是部分碱基对发生甲基化修饰,是一种表观遗传学上的改变^[15]。最近研究发现 RCC 发生与抑癌基因甲基化有关^[16],我们推测 LATS1 基因可能因甲基化而导致 LATS1 表达降低,诱导肾癌发生。

本研究首先用 RT-PCR 检测发现 LATS1 在肾癌 786-O 细胞中表达水平明显低于人胚肾细胞系 HEK-293,提示 LATS1 基因在肾癌 786-O 细胞中也起着抑癌基因的作用,进一步用 BSP 对 786-O 进行甲基化分析,发现 LATS1 在启动子区域 -600 ~ 500 bp 高度甲基化,甲基化率达到 97.5%。这跟国内外学者报道 LATS1 基因在结直肠癌(57%)、头颈部鳞状细胞癌(24%)、软组织肉瘤(7%)、星型细胞瘤(63.5%)、乳腺癌(56.7%)等^[8,17]肿瘤组织中均存在着甲基化而使其表达降低相一致。研究发现 DAC 可通过抑制 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)的甲基转移活性从而达到去甲基化,使多种含有 CpG 岛的高甲基化抑癌基因重新表达或增强,从而恢复抑癌功能,并被成功运用于骨髓增生异常综合征、急性髓细胞性白血病^[18-19]等多

种肿瘤研究和治疗。国外学者 Paiva^[11]在去甲基化实验中发现用 1 ~ 5 μmol/L DAC 处理肾癌细胞系 Caki-1、Caki-2、769-P、A-498 后能够使抑癌基因 KRT19 去甲基化并恢复其表达。国内学者发现用 10 μmol/L DAC 联合 100 ng/mL 曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)在乳腺癌细胞系中能够使抑癌基因 PLCD1 发生去甲基化并恢复其表达^[20]。本研究发现 1 μmol/L DAC 处理 786-O 细胞 4d 后能够使 LATS1 基因去甲基化且效果最佳,用 RT-PCR 和 Western blot 检测发现 786-O 细胞中 LATS1 mRNA 和蛋白表达水平较其对照组显著升高,而 YAP mRNA 和蛋白表达水平较其对照组显著降低,FCM 检测发现 786-O 细胞周期停滞于 G₀/G₁期、细胞凋亡显著增加,CCK-8 结果显示细胞增殖受到明显抑制,增殖抑制随药物处理时间延长抑制效果越明显,而 DAC 对正常表达抑癌基因 LATS1 的 HEK-293 细胞没有明显影响,本研究进一步揭示 LATS1 基因在肾癌中低表达的机制为 LATS1 基因启动子异常甲基化所致。

总之,本实验结果表明抑癌基因 LATS1 在肾癌 786-O 细胞中发生了广泛甲基化而导致其表达降低,DAC 对其去甲基化后恢复 LATS1 mRNA 和蛋白表达水平,下调癌基因 YAP 表达,阻滞细胞周期于 G₀/G₁期,抑制肾癌细胞增殖并诱导其凋亡。抑癌基因 LATS1 甲基化在肾癌发生、发展中可能起关键作用,很可能成为肾癌研究的新思路和治疗肾癌的新靶点。

参考文献:

- [1] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma[J]. Nature, 2013, 499(7456): 43-49.
- [2] Junker K, Ficarra V, Kwon E D, et al. Potential role of genetic markers in the management of kidney cancer[J]. Eur Urol, 2013, 63(2): 333-340.
- [3] Hilman D, Gat U. The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway[J]. Mol Biol Evo, 2011, 28(8): 2403-2417.
- [4] Huang J, Wu S, Barrera J, et al. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP[J]. Cell, 2005, 122(3): 421-434.
- [5] Vigneron A M, Ludwig R L, Vousden K H. Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP[J]. Genes Dev, 2010, 24(21): 2430-2439.
- [6] Yu F X, Zhao B, Panupinhu N, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling[J]. Cell, 2012, 155(4): 780-791.
- [7] Hao Y, Chun A, Cheung K, et al. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP[J]. J Biol Chem, 2008, 283(9): 5496-5509.
- [8] Wierzbicki P M, Adrych K, Kartanowicz D, et al. Underexpression of LATS1 TSG in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(27): 4363-4373.
- [9] Kondratov A G, Kvasha S M, Stoliar L A, et al. Alterations of the WNT7A gene in clear cell renal cell carcinomas [J]. PLoS One,

- 2012, 7(10): e47012.
- [10] Chan E H, Nousiainen M, Chalamalasetty R B, et al. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1 [J]. *Oncogene*, 2005, 24(12): 2076–2086.
- [11] Paiva F, Duarte-Pereira S, Costa V L, et al. Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms[J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(2): 85–90.
- [12] Hisaoka M, Tanaka A, Hashimoto H. Molecular alterations of h-warts/LATS1 tumor suppressor in human soft tissue sarcoma[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(10): 1427–1435.
- [13] Zhao B, Li L, Lei Q, et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(9): 862–874.
- [14] 赵修民, 王德林, 马强. Yes-相关蛋白和大肿瘤抑制基因1在肾透明细胞癌中的表达及意义[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2012, 33(3): 171–175.
- [15] Liu S Y, Lin J Q, Wu H L, et al. Bisulfite sequencing reveals that *Aspergillus flavus* holds a hollow in DNA methylation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30349.
- [16] Ricketts C J, Morris M R, Gentle D, et al. Genome-wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(3): 278–290.
- [17] Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, et al. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(6): 1519–1526.
- [18] Garcia-Manero G, Jabbour E, Borthakur G, et al. Randomized open-label phase II study of decitabine in patients with low- or intermediate-risk myelodysplastic syndromes[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(20): 2548–2553.
- [19] Klcio J M, Spencer D H, Lamprecht T L, et al. Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cells [J]. *Blood*, 2013, 121(9): 1633–1643.
- [20] Xiang T, Li L, Fan Y, et al. PLCD1 is a functional tumor suppressor inducing G(2)/M arrest and frequently methylated in breast cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(5): 520–527.
- (收稿:2013-11-12;修回:2013-12-16)
(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)12-1254-01

雷诺病致术中氧饱和度监测异常1例

田国平, 赖静, 易斌, 鲁开智 (400038 重庆, 第三军医大学西南医院麻醉科)

[关键词] 雷诺病; 氧饱和度; 监测

[中图分类号] R747.3 [文献标志码] B

雷诺病即雷诺综合征, 又称肢端动脉痉挛症, 一般以上肢较重, 偶见于下肢^[1]。我院2012年4月进行了1例雷诺病患者的手术, 报告如下。

1 临床资料

患者, 女性, 51岁, 体质量60 kg, 因直肠癌入院拟行腹腔镜下直肠癌根治术。术前检查血常规、肝肾功能、凝血功能及心肌酶、心电图、胸片均无明显异常。平素体健。入室无创血压133/65 mmHg, 心率(HR)76/min, 脉搏血氧饱和度(SpO₂)98%, 体温36.1℃。行腰硬联合穿刺, 成功后注入0.375%布比卡因葡萄糖液3 mL, 并在硬膜外置管留置术后镇痛。以咪唑啉仑2 mg、枸橼酸舒芬芬尼0.2 mg、依托咪酯20 mg、维库溴铵6 mg诱导后明视下顺利插入气管导管。麻醉维持: 靶控输注瑞芬芬尼1~2 ng/mL, 丙泊酚0.5~1 μg/mL。每40~50分钟间断推注顺势阿曲库铵5 mg。手术4.5 h, 术中一直维持血压在100/60 mmHg, HR在60/min左右, 总入量3 200 mL, 其中代血浆(聚明胶肽)1 000 mL, 乳酸林格液2 200 mL, 没有输血, 失血量约200 mL, 尿量500 mL, 手术室室温24℃, 前4 h SpO₂100%, 最后30 min突现SpO₂无法测出。当时BP 92/58 mmHg, HR 64/min, PET CO₂ 34 mmHg, 体温35.1℃, 心电图正常。更换SpO₂探头后依然测不出, 更换监测对象(健康人手指)发现

正常。当时触摸患者桡动脉搏动正常, 腕部皮温较暖和。更换SpO₂监护部位, 在耳缘或鼻端上能够测出92%~96%, 但显示信号较弱, 波形不规则。血气分析:pH=7.358, p(CO₂)38 mmHg, p(O₂)402 mmHg (FiO₂=1.0), Hb 8.5 g/dL, HCT 26.3%, K⁺ 2.5 mmol/L, Na⁺ 133 mmol/L, Ca²⁺ 0.51 mmol/L, GLU 4.5 mmol/L LAC 0.4 mmol/L。立刻10%氯化钾注射液1 g静脉滴注, 10%葡萄糖酸钙注射液2 g静脉缓慢推注。并备急救。手术30min后结束, 又过5 min后患者自主呼吸恢复、意识清醒。使用肌松监测仪行肌松药残余作用监测, 其中4个成串刺激(train-of-four stimulation, TOF)(++++), 给予拮抗剂甲硫酸新斯的明注射液2 mg、硫酸阿托品注射液1 mg的混合液, 氟马西尼注射液0.3 mg拮抗后拔管, 患者生命体征除SpO₂仍然测不出外其余监护指标均平稳。进一步检查发现患者前臂皮肤呈紫绀和潮红样改变, 胸壁及双上肢皮肤呈鸡皮样改变。进行病史追问, 患者自诉3年前诊断为雷诺病。遂用温毯机体外加温治疗, 根据血气分析结果继续给予10%氯化钾注射液1 g静脉滴注, 10%葡萄糖酸钙注射液4 g分两次静脉缓慢推注。当体温升至37.4℃时, 患者胸壁的皮肤逐渐恢复正常, 双手的肤色也逐渐恢复, 血气分析显示电解质也逐渐恢复。20 min后体温38℃, 双手肤色基本恢复正常, SpO₂已能测出96%~98%, 信号、波形显示正常。血气提示电解质恢复正常。1 h后安全返回病房。

2 讨论

本例患者担心延期手术且不知其严重性而隐瞒病史, 致使术前访视中手术医生和麻醉医生均忽略了雷诺病, 而术中突现

(下转 1263 页)

[通信作者] 鲁开智, E-mail: Lukaizhi@163.net

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140528.1542.005.html> (2014-05-28)