

学检查可减少误诊率,降低母婴的高病死率。

3. 妊娠合并脑出血的治疗:妊娠合并颅内出血是产科领域的一种严重合并症,在疾病的诊断治疗过程中,既要考虑到疾病对母体的威胁,又要顾及胎儿的安全,再加孕期各系统的复杂化,与非孕妇相比,治疗更加困难。预后更差。对于脑动脉瘤所至脑出血及脑血管畸形所致脑出血,多发生于孕中晚期,这与孕妇血容量进一步升高,或合并妊娠高血压疾病或分娩期腹压升高,从而引起血压,颅压升高紧密相关。本文中 2 例多发性脑动脉瘤,于孕早期即出现破裂出血,较少见。而出现于孕中晚期者易被误诊为子痫而延误治疗,故本病无法找到一种合理的预防措施,对于脑动脉瘤患者,由于妊娠高雌孕激素水平对瘤体的促进作用,一般情况下,不宜妊娠,一旦确诊,应于患者病情较轻,早孕期及时终止妊娠,并于之后坚持避孕。对于孕中晚期患者,根据患者颅内出血情况决定是否施行开颅手术。分娩方式中晚期者以剖宫产为宜^[4]。剖宫产术前,如颅压较高,可予 75% 甘露醇 250~300ml 静脉滴注,20min,可起到很好降颅压作用,根据患者一般状况及出血情况决定同时行开颅术

或等待患者恢复之后再行开颅术。麻醉一般选择全麻。蛛网膜下腔出血是颅内动脉瘤常见临床表现^[2]。只要有第 1 次出血几乎都要发生多次出血,而且病死率随出血次数增加而明显升高,故一旦发现出血应尽早处理,对预后至关重要。目前普遍认为,颅内出血达到或超过 30ml,即应行开颅术^[1]。本文中 1 例脑出血量达 50ml,予降颅内压,控制血压并监测生命体征,后经 CT 证实右基底节血肿吸收期,予剖宫产结束分娩,术后恢复良好,妊娠期因脑出血量较多,保守治疗成功病例较少,因此死亡患者的比率亦有待于更多病例的积累。

参考文献

- 1 刘玉凤,王惠玲. 头 CT 扫描在妊娠合并脑出血的临床应用[J]. 哈尔滨医科大学学报,1996,30(1):74-75
- 2 王忠诚主编. 神经外科学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998:367
- 3 曹泽毅. 中华妇产科学(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:592-593
- 4 张建,赖坚佳. 妊娠合并颅内出血[J]. 广东医学,2000,21(2):145
(收稿日期:2013-02-21)
(修回日期:2013-03-07)

miR-193b 对子宫内癌侵袭的影响

刘 颖 朱月华 曹 卉

摘 要 **目的** 探讨 miR-193b 对人子宫内癌细胞侵袭的影响及其机制。**方法** 人子宫内癌细胞 HEC-1A 细胞转染 miR-193b 抑制剂(miR-193b inhibitor)24h 后,利用 Transwell 小室评价分析其侵袭能力的变化。进一步,我们利用 Western blot 验证侵袭相关基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9 蛋白的表达。**结果** miR-193b inhibitor 有效抑制 HEC-1A 细胞细胞内 miR-193b 表达,并且其侵袭能力较对照组明显下降($P < 0.05$)。Western blot 验证 miR-193b inhibitor 可有效抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白表达。**结论** miR-193b 通过可调节侵袭相关 MMP-2、MMP-9 蛋白表达有效调控 HEC-1A 细胞细胞侵袭能力。

关键词 miR-193b 子宫内癌 侵袭

Effects of miR-193b on Endometrial Carcinoma Cell Invasion Potential. Liu Ying, Zhu Yuehua, Cao Hui. Department of Obstetrics and Gynecology, The 97th Hospital of PLA, Jiangsu 221004, China

Abstract Objective To investigate the effect of miR-193b on endometrial carcinoma cell invasion potential, and explore its possible targets and mechanism. **Methods** Human endometrial carcinoma HEC-1A cells were transfected with miR-193b inhibitor. The change of invasion ability in HEC-1A cells was measured by Transwell assay. Then the expressing levels of cell invasion related matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were identified by Western blot. **Results** miR-193b inhibitor could effectively inhibit the expression of miR-193b in HEC-1A cells. And the invasive ability of cells transfected with miR-193b inhibitor was obviously

作者单位:221004 徐州,中国人民解放军第九七医院妇产科

通讯作者:曹卉,电子信箱:sl1012002322@126.com

reduced. Western blot identified miR-193b inhibitor could effectively inhibit the expression of MMP-2 and MMP-9. **Conclusion** miR-193b could effectively regulate the HEC-1A cell invasion by regulating the expression of MMP-2 and MMP-9.

Key words miR-193b; Endometrial carcinoma; Invasion

子宫内膜癌在中国的发生率呈现逐年上升的趋势,严重威胁妇女的健康。今年研究发现 miRNA 与子宫内膜癌的调控密切相关。miRNA 是一类大小为20~25个核苷酸的非编码小RNA,参与调节细胞的分化、侵袭、增殖和凋亡等。本研究选择子宫内膜癌侵袭性较高的 HEC-1A 细胞为研究对象,通过降低 HEC-1A 细胞细胞内 miR-193b 表达水平,探讨 miR-193b 表达对 HEC-1A 细胞细胞侵袭能力的影响。

材料与方法

1. 细胞系:人子宫内膜癌细胞系 HEC-1A 细胞购自上海中科院细胞库。

2. 主要试剂与耗材:RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,Fugene HD6 购自罗氏公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司,基质胶购自美国 BD 公司,miR-193b inhibitor 及其对照组 miR-125b scramble 购自上海吉玛公司。

3. 实验分组:HEC-1A 细胞置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中,取对数生长期细胞实验。实验分为 miR-193b inhibitor 组和 miR-193b scramble 组(阴性对照组)。

4. 细胞转染:HEC-1A 细胞(1×10^5 /ml)混悬后放入 12 孔培养板中培养 24h,当细胞融合 80% 左右时进行转染。采用罗氏 Fugene HD 转染试剂,按照和寡聚核苷酸 3:1 混合,37℃ 孵育 15min 后,加入到 12 孔板中继续培养,孵育 6h 后更换培养基,继续培养 24h。

5. Real-time RT-PCR 检测 miR-193b 表达:采用 miRNAout 试剂盒直接提取 HEC-1A 细胞总 miRNA,利用分光光度计检测 miRNA 的质量和浓度,OD260/OD280 需控制在 1.7~2.0 区间。按照说明书要求进行反转录和 PCR 扩增,利用 ABI 7300 System SDS Software 软件进行数据分析,得出数据后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量。

6. Transwell 试验观测细胞侵袭性改变:各组细胞利用无血清培养基进行洗 3 次后,消化重悬于含 0.1% 小牛血清 DMEM 中,取 1×10^4 /ml 细胞加入至已铺好 Matrigel 胶的 Transwell 小室的内底面,20% 小牛血清 DMEM 加入下室。在 37℃、5% CO₂ 条件下进行孵育 24h,取出 Transwell 小室,进行洗涤,固定,染色。用棉球擦去内表面染色的细胞,在 $\times 200$ 显微镜下观察计数。细胞穿过率(%) = 穿过细胞数量/(穿过细胞数量 + 未穿过细胞数量) $\times 100\%$ 。

7. Western blot 鉴定:各组细胞采用罗氏 Fugene HD 转染试剂转染 48h 后提取总蛋白,进行电泳,转膜,抗体孵育后,用 Pierce ECL 发光液显影,凝胶成像仪扫描成像。

8. 生物信息学分析:采用 TargetScan、PicTar 和 miRanda 4 个数据库预测 miR-193b 靶基因,并利用 Gene Ontology 进行

功能分类。

结 果

1. 子宫内膜癌 HEC-1A 细胞和绝经期内膜 miR-193b 表达:实时荧光定量 PCR 分析显示子宫内膜癌 HEC-1A 细胞中 miR-193b 表达显著高于绝经期内膜,约为后者 13.7 倍,见图 1。

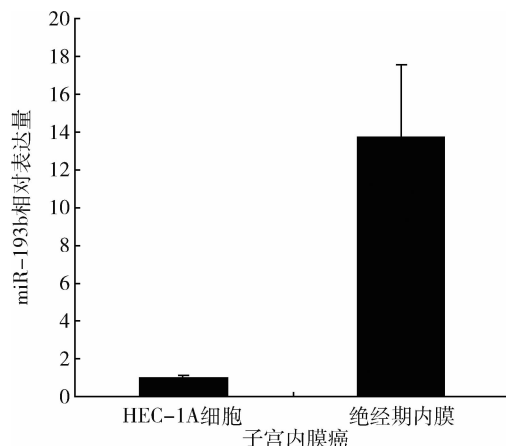


图 1 子宫内膜癌 HEC-1A 细胞和绝经期内膜 miR-193b 表达水平

2. 转染前后 HEC-1A 细胞 miR-193b 表达:如图 2,实时荧光定量 PCR 分析显示转染 miR-193b inhibitor 后 HEC-1A 细胞中 miR-193b 表达量显著下降。

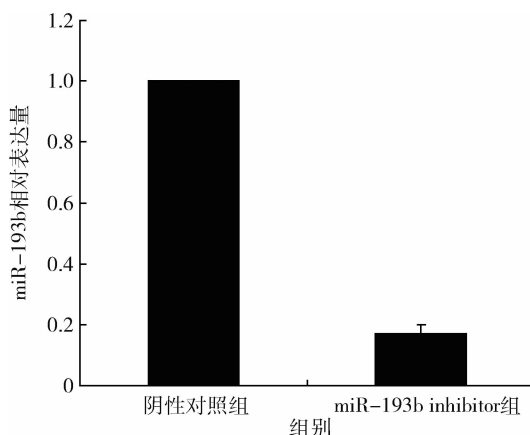


图 2 miR-193b inhibitor 对子宫内膜癌 HEC-1A 细胞表达的 miR-193b 抑制能力

3. miR-193b inhibitor 有效抑制 HEC-1A 细胞

侵袭能力:于转染后 24h,Transwell 法检测 HEC-1A 细胞的侵袭能力。miR-193b inhibitor 转染 24h 后,HEC-1A 细胞穿过滤膜细胞率较对照组显著减少。统计学单因素方差分析提示,miR-193b inhibitor 转染组与阴性对照组存在统计学差异性($P=0.003$),见图 3。

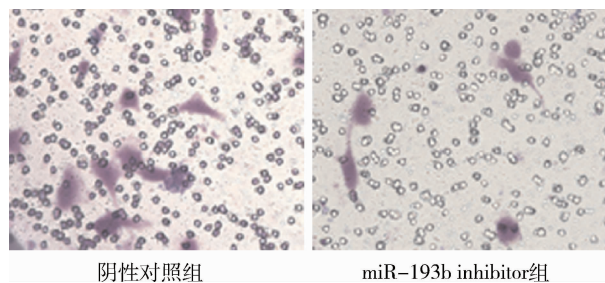


图 3 miR-193b inhibitor 对子宫内膜癌 HEC-1A 细胞的侵袭能力影响

4. miR-193b inhibitor 抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达:MMP-2 和 MMP-9 为子宫内膜癌细胞侵袭相关特异性表达蛋白,MMP-2 和 MMP-9 高表达可以明显促进子宫内膜癌细胞侵袭能力。我们进一步利用 Western blot 分析 miR-193b inhibitor 转染的子宫内膜癌细胞中侵袭相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 表达的作用。Western blot 分析显示 miR-193b inhibitor 转染后子宫内膜癌 HEC-1A 细胞表达的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白明显下降,详见图 4。

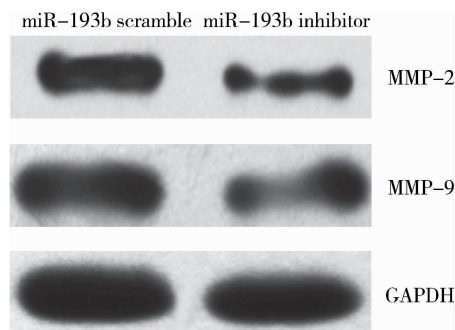


图 4 miR-193b inhibitor 抑制子宫内膜癌 HEC-1A 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 表达

讨 论

子宫内膜癌是女性生殖系统中最常见的恶性肿瘤,在我国发生率仅次于宫颈癌。目前认为其发生发展的机制可能与雌激素、肥胖、高血压、糖尿病等有关,但其确切机制至今仍然不是十分清楚。近年的研

究发现其发生发展过程中有 miRNA 参与。miRNA 是一类长约 22~25 单个核苷酸的非编码小 RNA,通过与靶基因互补结合后,抑制靶基因的转录,参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭等多个方面^[1]。我们研究发现 miR-193b 在子宫内膜癌 HEC-1A 细胞中表达明显增高,表明 miR-193b 可能在子宫内膜癌中发挥中调节癌基因的作用。为了证实这种结论,本课题组研究合成 miR-193b 抑制剂,转染子宫内膜癌细胞,明确其与子宫内膜癌细胞侵袭能力的相关性。结果抑制 miR-193b 表达后,子宫内膜癌细胞侵袭能力明显下降,表明 miR-193b 对子宫内膜癌细胞侵袭能力具有负性调控。

大量实验研究表明,在子宫内膜癌细胞侵袭过程中,基质金属蛋白酶 MMPs 介导的细胞外基质降解是肿瘤侵袭关键步骤,其中肿瘤细胞分泌的基质金属蛋白酶破坏基膜完整性是导致肿瘤侵袭的重要条件^[2-4]。子宫内膜癌细胞侵袭的潜能与其产生或者诱导产生的 MMPs 能力有着密切的关系^[5]。研究表明高水平表达的 MMPs,特别是 MMP-2 和 MMP-9,可明显增加子宫内膜癌细胞侵袭和转移能力^[6]。MMP-2、MMP-9 蛋白在内膜癌中的表达随病理分级的升高、肌层浸润程度的加深及有淋巴结转移而增加。子宫内膜癌细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的强阳性率均显著高于绝经期内膜,且 MMP-2 蛋白的活性较 MMP-9 蛋白强,且主要以活性形式存在^[7]。我们利用 Western blot 分析表明子宫内膜癌细胞 miR-193b 的表达水平影响 MMP-2 和 MMP-9 的基因表达水平,抑制 miR-193b 表达后,MMP-2 和 MMP-9 表达明显下降。我们推测下调 miR-193b 后子宫内膜癌细胞侵袭能力下降与抑制 miR-193b 表达后,MMP-2 和 MMP-9 表达水平下调有关。

综上所述,我们认为 miR-125b 表达水平与子宫内膜癌细胞的侵袭特性明显相关,miR-193b 可通过调节下调 MMP-2 和 MMP-9 基因表达调节子宫内膜癌细胞侵袭能力。

参考文献

- 1 Cohn DE, Fabbri M, Valeri N, *et al.* Comprehensive miRNA profiling of surgically staged endometrial cancer [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 202(6): 656
- 2 Jedryka M, Chrobak A, Chelmonska-Soyta A, *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 expression in tumor infiltrating CD3 lymphocytes from women with endometrial cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012, 22(8): 1303-1309
- 3 Liu WH, Chen YL, Chang LS. CIL-102 induces matrix metallopro-

- teinase - 2 (MMP - 2)/MMP - 9 down - regulation via simultaneous suppression of genetic transcription and mRNA stability [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(12): 2212 - 2222
- 4 Weigel MT, Kramer J, Schem C, *et al.* Differential expression of MMP - 2, MMP - 9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 160(1): 74 - 78
- 5 Markova I, Duskova M, Lubusky M, *et al.* Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(4): 576 - 582
- 6 Jo YH, Choi YJ, Kim HO, *et al.* Corticotropin - releasing hormone enhances the invasiveness and migration of ishikawa cells, possibly by increasing matrix metalloproteinase - 2 and matrix metalloproteinase - 9 [J]. *Journal of International Medical Research*, 2011, 39: 2067 - 2075
- 7 郭文萍, 陈贵安, 祝成, 等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制因子在子宫内膜癌中的表达及其意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(10): 1 - 4

(收稿日期: 2013 - 01 - 29)

(修回日期: 2013 - 03 - 20)

一进行性肌营养不良中国家系相关基因 Dystrophin 的突变的检测

田 莉 张 凌 杜 戎 朱元州 柯琴梅 祝建芳

摘 要 **目的** 对进行性肌营养不良 (duchenne muscular dystrophy, DMD) 中国家系致病基因 Dystrophin 基因多态位点及突变位点的研究。**方法** 收集进行性肌营养不良家系临床资料, 采用聚合酶链反应及直接测序法对此家系进行 Dystrophin 基因突变检测, 同时对 150 名家系外健康对照者的该位点进行限制性核酸内切酶 (restriction endonuclease) 分析。**结果** 在进行性肌营养不良家系中发现了一个纯合变异, 即 Dystrophin 基因 21 号外显子上发现一个错义变异 (A2851G), 导致代表天冬氨酸的 882 位密码子变化为甘氨酸 (D882G), 通过测序及限制性核酸内切酶 (RELP) 等方法, 其家系中有 6 名 (包括先证者) 均有此位点的改变。**结论** 在中国人进行性肌营养不良患者的 Dystrophin 基因上发现了一个尚未报道的错义多态位点。

关键词 进行性肌营养不良 Dystrophy 基因 基因多态

Mutation Detection of Dystrophin Gene in A Chinese Family with One Member Affected with Duchenne Muscular Dystrophy. Tian Li, Zhang Ling, Du Rong, Zhu Yuanzhou, Ke Qinmei, Zhu Jianfang. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430022, China

Abstract Objective To identify the genetic causes of Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a Chinese consanguineous family with one individual affected with DMD. **Methods** We collected clinical information from a DMD pedigree. Subsequently, polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequence analysis were used to detect the dystrophin gene mutations. Meanwhile, we carried out the polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (RELP) analysis to determine if the mutation was present in 150 normal controls. **Results** A missense mutation (A2851G), were identified in dystrophin gene of DMD patients. **Conclusion** The results revealed a unreported polymorphism (A2851G) of the dystrophin gene in Chinese DMD patients.

Key words Duchenne muscular dystrophy; Dystrophin gene; Polymorphism

肌营养不良 (duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种遗传性, 进行性加重的肌肉疾病, 其特征为进行性近端肌肉无力, 伴肌纤维的破坏与再生, 以及为结缔组织所取代, 其在活产男婴中发生率约 1/6000 ~ 1/3500^[1]。根据目前的研究, DMD 发病多与遗传因素有关, 而目前较为肯定的致病基因是抗肌

萎缩蛋白基因 (Dystrophin 基因)。根据国外报道, 其主要碱基变异类型为基因部分缺失, 约占全部突变类型的 60% ~ 65%^[2-4]。鉴于人种的差异, 本研究以 Dystrophy 基因为候选基因, 对一个中国肌营养不良家系进行基因的检测, 以期了解此中国家系肌营养不良 Dystrophin 基因碱基变异情况。

对象与方法

1. 对象: (1) 患者: 来自中国中原地区, 对此家系的所有成员进行临床调查, 并做全面肌酶检测。阳性患者符合以下诊断

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院
通讯作者: 祝建芳, 电子信箱: ZJF1662003@yahoo.com.cn