

数与肝纤维化分期的相关性不如 ARFI 技术。本研究利用 ROC 曲线下面积评估丙肝患者不同肝纤维化程度,发现在 $\geq S_2$ 、 $\geq S_3$ 及 $= S_4$ 中 ARFI 测量值均大于对应的 APRI 指数。通常认为当曲线下面积 $>0.8$ 时,该诊断方法具有更高的可信度。本研究中仅 ARFI 测量值在 $\geq S_3$ 时曲线下面积 $>0.8$ ,这表明 ARFI 测量值较 APRI 无创模型具有更高的准确性。这与报道的 $\geq S_2$ 时曲线下面积 $>0.8$ 的研究结果有一定的差异<sup>[12]</sup>。考虑其原因可能是由于样本量或者病理检测标准不同有关,虽然存在差异性,但均表明 ARFI 技术对慢性丙型肝炎肝纤维化分期具有较高的诊断效能。

综上所述,ARFI 技术和 APRI 指数均可较客观地评估肝纤维化程度,且 ARFI 具有更高的准确性。这两种技术作为无创性诊断慢性丙型肝炎肝纤维化的手段,具有安全、简单、无创等优点,从而为慢性丙型肝炎患者的临床治疗提供重要的参考依据。

#### 参考文献

- 1 Yamagishi M, Shuntho K, Matsushita T. Halfturned truncal switch operation for complete transposition of the great arteries with ventricular septal defect and pulmonary stenosis [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010, 12(4): 966 - 968
- 2 Ratzu V, Charlotte F, Heurtier A. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2012, 128(11): 898 - 1906
- 3 Lewin M, Poujol-Robert A, Boëlle PY, et al. Diffusion - weighted magnetic resonance imaging for the assessment of the fibrosis in chronic hepatitis [J]. Hepatology, 2007, 46(3): 658 - 665
- 4 Grigorescu M, Rusu M, Neculoiu D. The Fibro Test value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients The Romanian experience [J]. J Gastrointest Liver Dis. 2011, 16(3): 31 - 37
- 5 Boursier J, Bacq Y, Halfon P. Improved diagnostic accuracy of blood tests for severe fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis C [J]. Eur J Gast roenterol Hepatol, 2009, 21(5): 28 - 38
- 6 Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis [J]. Hepatology, 2009, 38(6): 518 - 520
- 7 Schiavon I, Sobavon, Filho RJ. Simple blood tests as noninvasive markers of liver fibrosis in hemodialysis patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. Hepatology, 2009, 46(1): 317 - 314
- 8 Nightingale K, Soo MS, Nightingale R. Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility [J]. Ultrasound Med Biot, 2012, 28(2): 227 - 235
- 9 Friedrich RU, Wunder K, Kriener S. Liver fibrosis in viral hepatitis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography [J]. Radiology, 2009, 25(2): 59 - 62
- 10 Rifai K, Cornberg J, Mederacke I. Clinical feasibility of liver elastography by acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) [J]. Digestive and Liver Disease, 2011, 43(6): 491 - 497
- 11 Goertz RS, Amann K, Heide R. An abdominal and thyroid status with acoustic radiation force impulse elastometry - a feasibility study: acoustic radiation force impulse elastometry of human organs [J]. Eur J Radiol, 2011, 80(3): 226 - 230
- 12 Bota S, Sporea I, Sirlu R. The usefulness of spleen stiffness evaluated by acoustic radiation force impulse elastography for the diagnosis of liver cirrhosis [J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 2011, 37(8): 55 - 57
- 13 Zhai L, Madden J, Foo WC. Acoustic radiation force impulse imaging of human prostates ex vivo [J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 2010, 36(4): 576 - 588

(收稿日期:2015-11-11)

(修回日期:2015-12-02)

## 巨噬细胞通过分泌抗菌肽 LL-37/hCAP-18 调控卵巢癌细胞的增殖

朱小丹 许文娟 严 晓 毕艳丽

**摘 要 目的** 研究巨噬细胞是否通过分泌抗菌肽 LL-37/hCAP-18 对卵巢癌细胞的生长增殖进行调控。**方法** 采用 Millicell 插入式细胞培养皿共培养人巨噬细胞和卵巢癌细胞株 SKOV3;通过细胞计数法检测巨噬细胞对卵巢癌细胞增殖能力的影响;流式细胞术检测共培养上清中的相关细胞因子及 LL-37 的水平;实时定量反转录聚合酶链反应在 mRNA 水平检测巨噬细胞和 SKOV3 细胞中 LL-37 mRNA 的表达水平;应用 LL-37 中和抗体抑制 LL-37 的功能及活性,进而通过 MMT 细胞增殖实验

基金项目:上海市普陀区中心医院院内基金资助项目(2013ZD188 1)

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院妇产科

探讨 LL-37 对巨噬细胞对卵巢癌细胞增殖的调控。结果 细胞计数法检测结果显示,巨噬细胞与卵巢癌细胞 SKOV3 共培养后,可促进其增殖;共培养的上清中,LL-37 及 IL-6 水平明显升高;实时定量 RT-PCR 在 mRNA 水平共培养中的巨噬细胞其 LL-37 基因表达升高,且其表达水平随着时间的延长而增加;应用 LL-37 的中和抗体,可明显抑制巨噬细胞对 SKOV3 细胞的增殖促进作用。结论 在与卵巢癌细胞共培养的环境中,巨噬细胞通过增强抗菌肽 LL-37 的表达和分泌水平促进卵巢癌细胞的增殖,LL-37 在巨噬细胞促进卵巢癌的发展中扮演重要角色。

**关键词** 巨噬细胞 LL-37 IL-6 卵巢癌 细胞增殖

**中图分类号** R711

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.030

**Proliferation Regulation of Macrophages on Ovarian Cancer Cells by the Secretion of Antimicrobial Peptide LL-37/hCAP-18.** Zhu Xiaodan, Xu Wenjuan, Yan Xiao, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

**Abstract Objective** To investigate the proliferation regulation role of antimicrobial peptide LL-37/hCAP-18 secreted by macrophages on ovarian cancer cells. **Methods** Millicell system was applied to develop a co-culture system for human macrophages and ovarian cancer cell line SKOV3A. The proliferation effect being exerted by macrophages on ovarian cancer cells was detected by cell counting method. The related cytokines and LL-37 from the co-cultured supernatants were analyzed by flow cytometry. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was applied to detect the mRNA level of LL-37 from macrophages and SKOV3 cells. By applying the LL-37 antibody to neutralize the function and activity of LL-37, the proliferation role of macrophages on ovarian cancer cell was then further verified by the MMT cell proliferation assay. **Results** Cell counting test results showed that macrophages and SKOV3 cells co-cultured can promote the proliferation. In co-culture supernatant, LL-37 and IL-6 levels were significantly increased. For real-time quantitative RT-PCR in mRNA levels of co-culture of macrophages, LL-37 gene expression was increased, and the expression levels increased with time. Application of LL-37 neutralizing antibody can inhibit macrophage cells and promote proliferation of SKOV3 effect. **Conclusion** Under the co-culture environment, macrophages could promote the proliferation of ovarian cancer cells by enhancing the expression and secretion of antimicrobial peptide LL-37, therefore, LL-37 may play a vital role in macrophage-induced tumor progression.

**Key words** Macrophages; LL-37; IL-6; Ovarian cancer; Cell proliferation

人源阳离子内源性抗菌肽 hCAP-18 和 LL-37 属于迄今为止发现的唯一的组织蛋白酶抑制素 (cathelicidin) 家族,其中 LL-37 是 hCAP-18 前体具有活性的成熟形式。LL-37 作为固有免疫防御屏障的重要组成部分,主要分布在人体易受到微生物侵袭的皮肤、呼吸道和消化道等黏膜组织中<sup>[1]</sup>。此外,研究发现,LL-37 还具有促进细胞增殖和血管生成等功能。研究发现,肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 可促进肿瘤细胞的增殖、抑制 T 细胞和自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 的抗肿瘤活性<sup>[2-4]</sup>。虽然 TAM 在脑肿瘤、肺癌及前列腺癌中的作用尚存在一定争议,但是许多研究结果证实 TAM 的广泛浸润与乳腺癌、宫颈癌及膀胱癌的不良预后相关<sup>[4-7]</sup>。卵巢癌作为女性生殖器官最常见的恶性肿瘤之一,其增生是否与其肿瘤微环境中的巨噬细胞促增殖有关以及该增殖机制是否涉及巨噬细胞高表达 LL-37,至今尚不清楚。本研究通过体外建立卵巢癌细胞与巨噬细胞共培养体系,在细胞系水平研究巨噬细胞在卵巢癌细胞增殖方面的效应和机制,

并通过进一步探讨 LL-37 在卵巢癌细胞增殖中的作用,以期能为卵巢癌的临床治疗提供一个潜在的研究方向及治疗靶标。

## 材料与方法

1. 材料:人卵巢上皮浆液性癌细胞系 SKOV-3 购自 ATCC (American Type Culture Collection, 美国),该细胞株来源于卵巢癌患者腹腔积液,为美国 G. Trempe 于 1973 年建立。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), RPMI1640 与 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 培养基,青霉素-链霉素溶液 (P/S),胰蛋白酶-EDTA 溶液 (Trypsin-EDTA solution, 含 0.25% trypsin 和 0.02% EDTA), L-谷氨酰胺 (200mM) 及磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 均购自美国 Gibco 公司;重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant human Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rhGM-CSF) 及 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;鼠抗人 LL-37 抗体和中和抗体均购自荷兰 Hycult Biotech 公司;细胞因子检测试剂盒购自美国 BD 公司;总 RNA 提取试剂盒 Total RNA Kit I

购自美国 Omega Bio - Tek 公司;反转录试剂盒 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和荧光定量 PCR 试剂 SYBR<sup>®</sup> PremixEx TaqTM 购自日本 TaKaRa 公司;MTT 细胞增殖检测试剂盒及支原体染色检测试剂盒购自中国碧云天公司;其余试剂均为国产分析纯;Millicell 插入式细胞培养皿购自美国 Millipore 公司。

## 2. 方法

(1) 细胞分离和培养: SKOV3 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素的 DMEM 完全培养基中, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 以及合适湿度的培养箱中培养。细胞贴壁生长, 在细胞状态良好且细胞长满 80% ~ 90% 左右根据需要按照 1:3 ~ 1:5 的比例传代。细胞系通过支原体检测试剂盒检测没有支原体污染。按照文献所述采用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)<sup>[8]</sup>。具体方法: 抽取健康志愿者静脉血 3 ~ 5ml, 用肝素抗凝, Ficoll 密度梯度离心后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞数至  $3 \times 10^6$ /ml 接种于 6 孔板中置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 以及饱和湿度的培养箱中培养 3h。然后用预温的 PBS 洗去未黏附细胞后, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基 2ml 及 rhGM-CSF 至终浓度为 1000U/ml 继续培养 7 天, 每隔 2 天半量换液, 用未加 rhGM-CSF 的细胞作为空白对照。贴壁细胞经形态学观察, 流式细胞术检测巨噬细胞表面标志分子 CD14 和 CD68 鉴定及鸡红细胞吞噬实验后用于后续实验。卵巢癌细胞和单核 - 吞噬细胞的共培养则使用孔径为 0.4μm 的 Millicell 插入式细胞培养皿, 将对数生长期的卵巢癌细胞 SKOV3 与巨噬细胞按照不同细胞比例及不同的处理条件共培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养 1 ~ 5 天。

(2) 细胞计数法检测: 共培养后卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖将  $1.0 \times 10^5$  个 SKOV3 与巨噬细胞分别按照 2:1、1:1、1:2 的比例分别接种在 24 孔的 Millicell 上层小室及下层孔板中, 同时, 将 SKOV3 细胞单独接种与 24 孔板中作为平行对照。分别在与单核 - 吞噬细胞共培养第 2 天, 第 4 天, 将位于 24 孔 Millicell 小室上层的卵巢癌细胞 SKOV3 用 PBS 清洗, 胰蛋白酶消化后, 用细胞计数板在倒置相差显微镜下进行细胞计数。计算公式: 细胞密度 = (4 个大格细胞总数/4) × 10<sup>4</sup> 个/毫升。

(3) 单核 - 吞噬细胞分泌的相关细胞因子的流

式细胞术检测: 分别在卵巢癌细胞 SKOV3 与单核 - 吞噬细胞共培养第 2 天, 第 4 天, 收集细胞培养液, 离心去除可能混杂的细胞, 按照 BD 细胞因子 (cytometric bead array, CBA) 检测试剂盒说明, 通过流式细胞术分析白细胞介素 - 2 (Interleukin - 2, IL - 2)、IL6、IL - 8、IL - 17、TNF - α、INF - γ 及 LL - 37 的表达水平。

(4) 荧光实时定量反转录聚合酶链反应 (realtime RT - PCR) 检测巨噬细胞和 SKOV3 细胞中 LL - 37 mRNA 的表达分别收集共培养 0、24、36、48、72、96、120h 的巨噬细胞和 SKOV3 细胞, 用 Trizol 提取细胞总 RNA, RNA 沉淀经干燥后, 溶解于适量焦碳酸二乙酯水, 然后用 Nanodrop 检测其纯度, 放 -80℃ 保存备用。设计 LL - 37 及 β - actin 的引物序列。其中, LL - 37 的上游引物序列为 5' - CCACCATGGGCCTG-GTGATGCCTCTGGCCATC - 3'; 下游引物序列为 5' - TGTACACTAGGACTCTGTCTGGGTACAAG - 3'。β - actin 的上游引物序列为 5' - CATCCTCACCCCT-GAAGTACCCC - 3'; 下游引物序列为 5' - AGCCTG-GAT GCAACGTACATG - 3'。使用反转录酶 M - MLVRTase 反转录合成 cDNA, 标准 DNA 用实时 PCR 反应体系扩增。反应条件: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 60℃ 退火 45s, 70℃ 延伸 50s, 27 个循环; 70℃ 延伸 10min。应用 ABI prism 7000 SDS software 绘制 LL - 37 及 β - actin 的标准曲线, 计算曲线的斜率和相关系数, 然后通过斜率计算扩增效率。

(5) MTT 比色实验检测: 巨噬细胞培养基上清处理前后 SKOV3 细胞的增殖取生长状态良好且处于对数生长期的 SKOV3 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基将细胞制备成浓度为  $2 \times 10^4$ /ml 的细胞悬液, 每孔 200μl, 接种于 96 孔细胞培养板内, 待细胞贴壁后进行实验。实验设阴性对照组和两组处理组: 第 1 组为卵巢癌细胞 SKOV3 单独培养作为阴性对照组; 第 2 组为巨噬细胞上清培养组; 第 3 组为在巨噬细胞上清培养组的基础上, 加入不同浓度的 LL - 37 中和抗体 (1 ~ 10μg/ml), 每组设 3 ~ 6 个复孔。分别在培养的第 0、24、36、48、72、96、120h, 每孔加 MTT 溶液 (5mg/ml) 20μl, 继续孵育 4h 后终止培养。弃掉孔内培养液上清, 每孔加入 150μl DMSO, 振荡 10min, 使结晶物充分融解。在 490nm 波长处, 在酶联免疫监测仪上测定各孔的吸光度值, 记录结果, 绘制生长曲线。

3. 统计学方法: 采用 Graphpad Prism 5.0 软件进

行绘图及统计分析,实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间数据比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

巨噬细胞可促进卵巢癌细胞的增殖细胞计数法检测结果显示,SKOV3 与巨噬细胞以 1:2 的比例共培养 2 天后,SKOV3 细胞的数量从  $(1.0 \pm 0.2) \times 10^5$  个增加为  $(3.3 \pm 0.2) \times 10^5$  个,与单独的 SKOV3 细胞培养两天其细胞数增加为  $(2.1 \pm 0.3) \times 10^5$  个相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表 1,并且随着共培养的巨噬细胞比例的增加,培养时间的延长(至本研究中的第 4 天),共培养中 SKOV3 细胞其数量增加程度相较于 SKOV3 单独培养的增殖也随之升高( $P < 0.05$ ,表 1)。该结果提示巨噬细胞可以促进卵巢癌细胞的增殖,且随着巨噬细胞比例的增加,卵巢癌细胞的增殖数量也有一定程度的增加。

表 1 细胞计数法检测与不同比例的巨噬细胞共培养后卵巢癌细胞 SKOV3 细胞的增殖数量 (  $\times 10^4, \bar{x} \pm s$  )

| 培养时间<br>(天) | SKOV3<br>单独培养 | SKOV3:巨噬细胞  |              |               |
|-------------|---------------|-------------|--------------|---------------|
|             |               | 2:1         | 1:1          | 1:2           |
| 2           | 2.1 ± 0.3     | 2.5 ± 0.2 * | 2.9 ± 0.3 *# | 3.3 ± 0.2 *#Δ |
| 4           | 3.9 ± 0.4     | 4.8 ± 0.5 * | 5.6 ± 0.6 *# | 6.8 ± 0.5 *#Δ |

与 SKOV3 单独培养组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 2:1 共培养组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 1:1 共培养组比较, Δ  $P < 0.05$

与卵巢癌细胞共培养可增加巨噬细胞中 IL-6 及 LL-37 的表达通过收集 SKOV3 细胞与巨噬细胞共培养的上清,进行相关细胞因子蛋白的流式分析,笔者发现,共培养上清中,IL-6 及 LL-37 的浓度均有不同程度的升高,与 SKOV3 单独培养的上清中该两种因子的含量相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见图 1,而该实验中检测的别的细胞因子如 IL-2、IL-8、IL-17、TNF-α 及 INF-γ 只呈现出一种基础水平的表达,其表达水平在是否共培养之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 1)。

与卵巢癌细胞共培养可在 mRNA 水平增加巨噬细胞 LL-37 的表达实时定量 RT-PCR 检测结果表明,在与卵巢癌 SKOV3 细胞共培养后,巨噬细胞中 LL-37mRNA 的表达上调,且随着时间的延长其表达增加(图 2),一定程度上也与流式细胞术检测结果相吻合。此外,本检测结果显示,SKOV3 细胞自身也表达一定量的 LL-37,但是在本研究的共培养体系中,

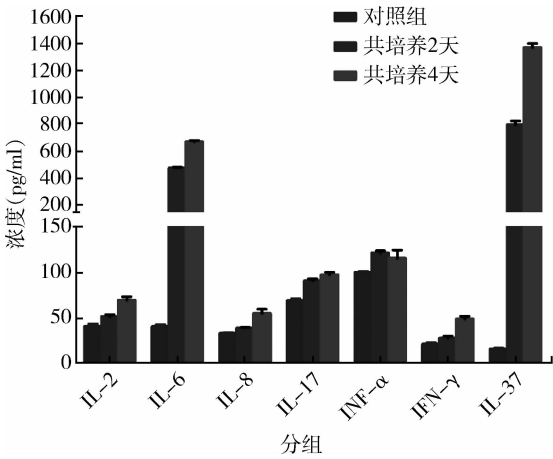


图 1 巨噬细胞与卵巢癌 SKOV3 细胞共培养上清相关细胞因子及 LL-37 的表达水平

巨噬细胞并没有增强 SKOV3 细胞中 LL-37 mRNA 的表达(结果未给出)。

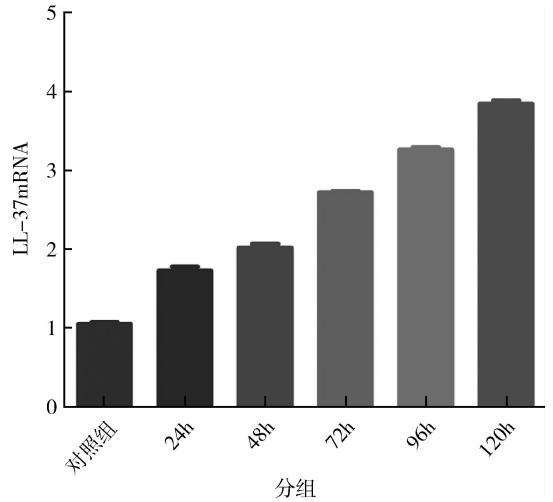


图 2 在与卵巢癌 SKOV3 细胞共培养的不同时间点巨噬细胞中 LL-37 基因表达量

LL-37 中和抗体可抑制巨噬细胞对 SKOV3 细胞增殖的调控 MTT 细胞增殖实验结果表明,在培养的 24、48、72、96、120h,与巨噬细胞以 1:2 的比例共培养的 SKOV3 细胞,其增殖细胞数量相较 SKOV3 单独培养明显升高(图 3);而这种增殖趋势可被 LL-37 的中和抗体所抑制,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3)。

讨 论

卵巢癌是女性生殖器官最常见的肿瘤之一,其发生率在妇科恶性肿瘤中仅次于宫颈癌和子宫体癌,但病死率却占各类妇科肿瘤的首位<sup>[9]</sup>。目前,临床上卵巢癌的治疗主要以手术和化疗为主,这些治疗手

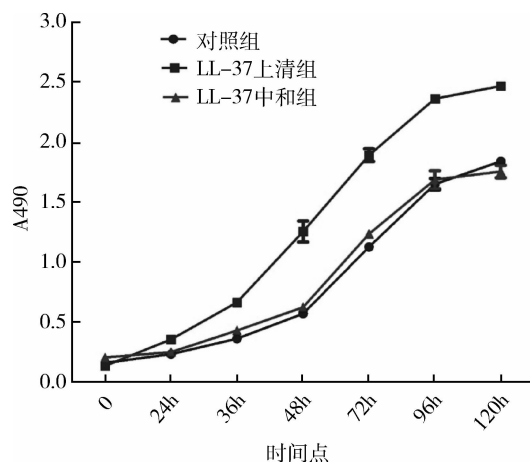


图3 LL-37中和抗体可抑制巨噬细胞对共培养卵巢癌SKOV3细胞的增殖作用

段的基本思路是把肿瘤看作是一个均质性整体,通过减少肿瘤细胞的数量,达到最大限度清除肿瘤病灶的目的。因此,探索卵巢癌增生机制,可更好地为临床寻找治疗的新途径,为进一步提高卵巢癌患者生存率服务。巨噬细胞是机体防御系统中的重要组成部分,其表型具有很大的异质性,可根据其所在器官的微环境和生理病理条件的不同而具有多样化功能。研究发现,肿瘤组织中巨噬细胞的高度浸润与肿瘤患者的不良预后相关,肿瘤相关巨噬细胞可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及新生血管形成。

LL-37是迄今为止在人体内发现的唯一的cathelicidins家族抗菌肽,主要表达于某些髓源性细胞(如淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等)、组织上皮细胞、角质形成细胞及某些腺体等易于与微生物发生直接接触的部位<sup>[10-12]</sup>。作为固有免疫的重要组成部分,LL-37在机体遭受外来微生物侵袭时可与其他抗菌肽一起提供迅速有效的第1线防御。但是越来越多的证据表明,LL-37还参与肿瘤的发生、发展过程。根据对肿瘤细胞的作用及效果,抗菌肽可分为两大类。第1类可抑制肿瘤细胞生长,如合成抗菌肽ceeropin A和B对膀胱癌细胞具有选择性毒性及抑制增殖作用<sup>[13]</sup>。第2类可促进肿瘤细胞生长,如多种乳腺癌细胞中强烈表达的hCAP18/LL37对乳腺癌的生长就可能有促进作用<sup>[14]</sup>。最新研究发现,LL-37通过干扰上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及成纤维细胞支持的结肠癌细胞的增殖抑制结肠癌的发展<sup>[15]</sup>。此外,还有研究者发现LL-37作为一个新发现的胰脏管腺癌微环境因子在胰脏肿瘤干细胞介导的肿瘤发生中起了至关重要

的作用<sup>[16]</sup>。

本研究以SKOV3卵巢癌细胞系为研究对象,通过在体外细胞系水平建立卵巢癌细胞与巨噬细胞的共培养模型,探讨LL-37是否参与巨噬细胞对卵巢癌细胞增殖的调控。笔者研究发现,共培养体系中,巨噬细胞可促进卵巢癌细胞系SKOV3的增殖,其增殖速度随培养时间的延长增加(表1)。为了进一步证实巨噬细胞对卵巢癌的调控是与其LL-37的分泌有关还是与巨噬细胞分泌的炎症因子有关,笔者对共培养的上清进行了相关因子的流式细胞分析。笔者研究结果表明,巨噬细胞在肿瘤发生、发展方面的相关炎症因子如IL-2、IL-8、IL-17、TNF- $\alpha$ 及INF- $\gamma$ 其表达属于正常基础水平表达,而对肿瘤有促进作用的LL-37则高表达(图1)。其LL-37的mRNA水平也通过实时定量RT-PCR得到了进一步的验证。此外,共培养上清中,IL-6也呈现高表达状态,这与文献报道一致。因为,编码LL-37的结构基因-cathelicidin抗菌肽,包含N端保守的cathelin序列和C端的抗菌结构域LL-37。该结构基因启动子区域含有一个IL-6表达核因子(NF-IL-6)的识别位点,IL-6可通过蛋白酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子信号通路或者大鼠肉瘤病毒蛋白/促丝裂原激活蛋白激酶两种途径级联活化NF-IL-6,从而调节LL-37基因的表达<sup>[17]</sup>。为了进一步证实LL-37在卵巢癌细胞增殖中的作用,笔者通过应用LL-37的中和抗体,发现巨噬细胞对卵巢癌细胞SKOV3的增殖作用被完全抑制,该结果进一步证实了LL-37在卵巢癌增殖中的重要作用(图3)。

综上所述,通过与卵巢癌细胞的体外共培养,巨噬细胞中LL-37表达升高,升高的LL-37通过促进卵巢癌的增殖在卵巢癌的发展中发挥了重要的作用。但是LL-37在卵巢癌发展中的关键作用还需在动物实验中通过特异性敲除荷瘤小鼠肿瘤微环境中巨噬细胞的LL-37来进一步的加以验证。此外,IL-6调控LL-37表达的具体机制及涉及的信号通路也需要在今后的研究中进行验证。

#### 参考文献

- Malm J, Sorensen O, Persson T, *et al.* The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(7): 4297-302
- Elgert KD, Allea DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection[J]. *Journal of Leukocyte Biol*

- gy, 1998, 64(3): 275 – 290
- 3 Milas L, Wike J, Hunter N, *et al.* Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: associations with tumor growth parameters and tumor radiocurability[J]. *Cancer Research*, 1987, 47(4): 1069 – 1075
- 4 Pollard JW. Tumour – educated macrophages promote tumour progression and metastasis[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4(1): 71 – 78
- 5 Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(2): 605 – 612
- 6 Meyer – Siegler KL, Vera PL, Iczkowski KA, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence[J]. *Genes and Immunity*, 2007, 8(8): 646 – 652
- 7 Zhou N, Zhang Y, Zhang X, *et al.* Exposure of tumor – associated macrophages to apoptotic mcf – 7 cells promotes breast cancer growth and metastasis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 11966 – 11982
- 8 Celluzzi CM, Welbon C. Dendritic cell culture: a simple closed culture system using ficoll, monocytes, and a table – top centrifuge[J]. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 2003, 12(5): 575 – 585
- 9 Boone JD, Dobbin ZC, Michael Straughn J, *et al.* Ovarian and cervical cancer patient derived xenografts: the past, present, and future [J]. *Gynecologic Oncology*, 2015, 138(2): 486 – 491
- 10 Wan M, Soehnlein O, Tang X, *et al.* Cathelicidin LL – 37 induces time – resolved release of LTB4 and TXA2 by human macrophages and triggers eicosanoid generation in vivo[J]. *FASEB Journal*, 2014, 28(8): 3456 – 3467
- 11 Neumann A, Berends ET, Nerlich A, *et al.* The antimicrobial peptide LL – 37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps [J]. *Biochemical Journal*, 2014, 464(1): 3 – 11
- 12 Montreekachon P, Nongpan S, Sastraruji T, *et al.* Favorable interleukin – 8 induction in human gingival epithelial cells by the antimicrobial peptide LL – 37[J]. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2014, 32(3): 251 – 260
- 13 Suttman H, Retz M, Paulsen F, *et al.* Antimicrobial peptides of the Cecropin – family show potent antitumor activity against bladder cancer cells[J]. *BMC Urology*, 2008, 8: 5
- 14 Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, *et al.* Antimicrobial protein hCAP18/LL – 37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2005, 114(5): 713 – 719
- 15 Cheng M, Ho S, Yoo JH, *et al.* Cathelicidin suppresses colon cancer development by inhibition of cancer associated fibroblasts[J]. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2015, 8: 13 – 29
- 16 Sainz B Jr, Alcala S, Garcia E, *et al.* Microenvironmental hCAP – 18/LL – 37 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma by activating its cancer stem cell compartment[J]. *Gut*, 2015, 64(12): 1921 – 1935
- 17 Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75(1): 39 – 48

(收稿日期: 2015 – 06 – 16)

(修回日期: 2015 – 06 – 16)

## 七氟醚和异丙酚复合氯胺酮用于 小儿短小手术的临床观察

方正春 夏中元 赵 博 吴 洋 侯家保

**摘 要** **目的** 评价七氟醚和异丙酚复合氯胺酮在小儿短小手术的临床效果。**方法** 选取笔者医院择期小儿手术 70 例, 随机分为两组(S 组: 七氟醚复合氯胺酮; P 组: 异丙酚复合氯胺酮), 每组 35 例。比较两组患儿麻醉过程中平均动脉压 (MAP)、心率 (HR)、血氧饱和度 (SpO<sub>2</sub>) 等生命体征变化情况, 比较两组患儿麻醉诱导时间、苏醒时间、苏醒质量等麻醉效果及术中、术后不良反应发生情况。**结果** 两组患儿麻醉过程中生命体征差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); S 组的麻醉诱导时间、苏醒时间均明显短于 P 组 ( $P < 0.05$ ), 苏醒质量 S 组明显高于 P 组 ( $P < 0.05$ ); 两组的不良反应差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** 两种方法均可以很好地用于小儿短小手术的麻醉, 但七氟醚复合氯胺酮麻醉是更为有效的麻醉方式。

**关键词** 小儿短小手术 七氟醚 异丙酚 氯胺酮

**中图分类号** R614

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.031

**Sevoflurane and Propofol Combined with Ketamine in Application of Children' Anesthesia in Small Operations.** Fang Zhengchun, Xia

作者单位: 430000 武汉大学人民医院麻醉科

通讯作者: 夏中元, 教授, 博士生导师, 电子信箱: xiazywh@163.com