

· 基础研究 ·

Maspin 蛋白在鼻咽癌放射敏感 CNE2 细胞株中的表达分析

何 倩¹, 姜武忠¹, 冯雪萍²

(中南大学湘雅医院 1. 肿瘤科; 2. 医学科学研究中心, 湖南 长沙 410008)

摘要: **目的** 探讨放射敏感鼻咽癌 CNE2 细胞株在放射条件下丝氨酸蛋白酶抑制剂 Maspin 蛋白的反应性变化, 分析鼻咽癌放射作用的分子机制。**方法** 采用 MTT 比色法检测放射线对鼻咽癌 CNE2 细胞株生长的影响, 胎盼蓝染色法检测 CNE2 细胞增殖, 流式细胞术检测 CNE2 细胞放射后的凋亡及周期改变, Western blotting 分析 Maspin 蛋白的表达。**结果** 鼻咽癌 CNE2 细胞株放射后, 细胞周期重新分布, 出现较多的 G2/M 期细胞以及较少的 G0/G1 期细胞; 增殖受到抑制、细胞凋亡明显、Maspin 蛋白表达上调, 且其上调与细胞凋亡率增高呈现一致性改变, 也与细胞周期分布改变相关。**结论** 鼻咽癌 CNE2 细胞对放射线敏感、容易被诱发凋亡; 细胞周期参与了放射诱导的 CNE2 放射反应调节; 放射提高了 CNE2 细胞的 Maspin 蛋白表达, 提示该蛋白参与了 CNE2 细胞的放射反应; Maspin 蛋白表达提高涉及 CNE2 细胞周期和凋亡改变, 是一个值得深入研究的鼻咽癌放射敏感相关分子。

关键词: Maspin 蛋白; 放射; CNE2; 细胞周期; 鼻咽癌

中图分类号: R739.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)05-0339-06

Expression of Maspin in radiosensitive nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell line

HE Qian, JIANG Wu-zhong, FENG Xue-ping

(Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To study the responsive changes of Maspin protein in radiosensitive nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE2 when irradiated, for analyzing the molecular mechanism of radiotherapy for NPC.

Methods MTT method was utilized to test the effect of radioactive rays on the growth of CNE2 cell line, flow cytometry to detect the cell apoptosis and cell cycles of CNE2 cell line, and Western Blot to analyze the expression of Maspin protein.

Results After being irradiated, the cell cycles of CNE2 cell line were redistributed with increase of G2/M stage cells and decrease of G0/G1 stage cells, cell multiplication was inhibited, apoptosis was enhanced, and the expression of Maspin protein was up-regulated. The up-regulation of Maspin expression was consistent with the enhancement of cell apoptosis, and was also related to cell cycle redistribution. **Conclusion** CNE2 cells are radiosensitive and apoptosis is apt to be induced under irradiated situation. Cell cycles participate in the responsive regulation of CNE2 cells induced by radiation. The expression of Maspin protein can be up-regulated by radiation, which suggests that Maspin may participate in the responsive regulation of CNE2 cells. The expression of Maspin is involved in cell cycle and apoptosis, and therefore Maspin is a radiosensitive molecular worthy of further study in NPC.

Key words: Maspin; Radiation; CNE2; Cell cycle

者以低分化鳞癌为主,对放疗相对敏感,因而放疗为其首选治疗方法,但鼻咽癌放疗后约 35% 患者有残存癌灶,容易出现复发、转移^[1]。目前,关于鼻咽癌放疗后癌灶残存的分子机制仍不太清楚,其癌灶残存可能涉及细胞对放射的反应性改变,尤其是蛋白质等生物活性分子放射前后表达水平的变化。因此,寻找鼻咽癌放疗反应敏感的蛋白质分子,不仅有助于揭示鼻咽癌对放疗的分子机制,而且能为鼻咽癌的靶向治疗提供科学依据。

丝氨酸蛋白酶抑制剂 Maspin 蛋白 (mammary serpin, Maspin) 基因于 1994 年 Zou 等^[2]用削减杂交技术对正常乳腺组织和乳腺癌组织进行比较时发现,证实其为丝氨酸蛋白酶抑制因子 (serine proteinase inhibitor, SPI) serpin 超家族成员,命名为 Maspin 蛋白。Maspin 蛋白具有抑制肿瘤血管形成、诱导细胞凋亡、增加细胞黏附、抑制肿瘤转移和生长的特性^[3]。是一种上皮特异性肿瘤抑瘤基因,与癌细胞分化相关,而且是目前唯一被证实的一种内源性多肽组蛋白去乙酰化酶抑制因子 1 (histone deacetylase inhibitors 1, HDI1)^[4]。组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HD) 是一类蛋白酶,对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥着重要的作用。组蛋白去乙酰化酶抑制因子 (histone deacetylase inhibitors, HDI) 则可通过提高染色质特定区域组蛋白乙酰化,从而调控细胞凋亡及分化。组蛋白去乙酰化酶抑制因子因能诱导细胞凋亡和分化而成为一类新的抗肿瘤药物,且对肿瘤细胞具有较高选择性和低毒的优点。Maspin 蛋白则是目前唯一被证实的该类抑制因子之一。Maspin 蛋白也被认为是预测鼻咽癌放疗敏感性的潜在生物标志物^[5]。因此, Maspin 蛋白可能是一种鼻咽癌放疗反应敏感的蛋白质分子。本实验以放疗敏感的鼻咽癌 CNE2 细胞株为样本,分析 Maspin 蛋白放疗后的改变。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人低分化鼻咽癌细胞株 CNE2 为中南大学肿瘤研究所提供,CNE2 是鼻咽癌研究中常用的细胞系,来源于鼻咽部低分化鳞癌组织。小

牛血清、RPMI-1640 培养基购自美国 Gibico BRL 公司;四氮唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司。蛋白质小分子量 Marks、PVDF 膜和 ECL (Enhanced chemiluminescence) 试剂盒为瑞典 Amersham 公司产品。鼠单克隆抗人 Maspin 蛋白抗体为美国 NeoMarkers 公司产品。鼠单克隆抗人 β -actin 抗体为美国 Sigma 公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗为美国 Santa cruz 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 比色法检测细胞增殖 CNE2 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中传代培养。将对数生长期的 CNE2 细胞以每孔 2×10^3 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,每孔均加入 200 μ l 含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 12 h 后,在室温下用直线加速器 6 MV-X 射线 (2100EX, Varian) 满射野照射细胞,照射剂量为 2、4、6、8 和 10 Gy,吸收剂量率为 300 cGy/min,射距 100 cm,培养板下放置一个“水箱”和培养板上覆盖 1.5 cm 厚的组织胶补偿块,经计算机定位确保高能 X 线均匀、使射线准确地照射到细胞;对照组细胞同等条件处理但不进行照射 (0 Gy),每组设 3 个复孔。分别于放射后 24、48、72 和 96 h 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l,继续培养 4 h,小心弃去孔内培养液,加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,空白对照孔调零,酶标仪以波长 490 nm 测定吸光值 (A490)。实验重复 3 次。

1.2.2 胎盼蓝染色法检测细胞增殖 为测定放射线对 CNE2 细胞增殖的影响,CNE2 细胞接种于 24 孔细胞培养板,12 h 后用 6 Gy 的 X 射线照射,然后每天采用胎盼蓝染色法检测细胞生长,共 6 d,绘制细胞生长曲线,以未照射细胞作为对照,实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

将对数生长期 CNE2 细胞接种于 50 ml 培养瓶中,培养 12 h 后,用 6 Gy 的 X 射线满射野照射细胞,对照组细胞同等条件处理但不进行照射 (0 Gy)。分别于照射后 24、48、72 h 收集实验组和对照组细胞,冷 PBS 洗涤 2 次,70% 冷乙醇、4℃ 固定 18 h。调整细胞浓度为 10^6 个细胞/ml,取 1 ml 细胞悬液,PBS 洗 3 次,用含 20 mg/L RNA 酶的 Tris-HCl 缓冲液

37℃ 孵育 30 min,用 50 mg/L 的碘化丙啶 (PI)进行细胞 DNA 染色。样品送北京鼎国生物科技有限公司用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期,实验重复 3 次。

1.2.4 Western blotting 检测 全蛋白提取:将 5×10^6 细胞用冷 PBS 洗 1 次,快速加入 1 ml 细胞抽提液(含 0.1 mol/L NaCl、0.01 mol/L Tris-HCl、0.01 mol/L EDTA 及现用现加 100 μ g/ml 的 PMSF 和 2 μ g/ml 的 Leupeptin),置于冰上反复抽提 0.5 h,4℃ 温度 10 000 r/min 离心 10 min,转移上清至 EP 管制备全细胞蛋白提取液置 -80℃ 冰箱保存。蛋白定量采用 BCA 法。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳:配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶,取 40 mg 样品蛋白质加入等体积的 2×SDS 凝胶加样缓冲液,100℃ 煮沸 5 min 后上样;电泳开始时电压为 75 V,溴酚蓝进入分离胶时提高电压为 100 V,电泳时间约 4 h。

1.2.5 将凝胶中的蛋白质电转至 PVDF 膜 切取 6 张大小相同的滤纸,其大小与转印区域一样。然后,把它们浸泡在电转缓冲液中。切取同样大小的一张 PVDF 膜,甲醇中浸泡 2 min 至半透明,用清水冲洗干净后,放入电转缓冲液中,平衡 20 min。在 PVDF 膜上垫 3 张滤纸,然后将凝胶平铺于 PVDF 膜上,再放上 3 张滤纸,用玻棒在滤纸面上滚动除去各层气泡,然后放入转移槽内,倒入电转移缓冲液,胶面向阴极,膜面向阳极,4℃,100 V 转移 2 h。

把印迹膜转移到含有丽春红 S 使用液的培养皿中染色 10 min。蛋白质带出现后于室温用去离子水漂洗数次。用防水笔标出 marker 蛋白各个分子量区带的位置。把滤膜放入杂交袋中,按 0.1 ml/cm² 加入封闭液(5% 脱脂奶粉,TBST 配制),然后用热合机密封塑料袋口,在室温下孵育 4 h;剪开杂交袋,倾去封闭

液,立即按照 0.1 ml/cm² 加入用封闭液稀释的一抗,37℃ 孵育 1 h,鼠单克隆 Maspin 蛋白一抗稀释比为 1:800。剪开杂交袋,倾去一抗,用 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min;再次将滤膜转移到新的杂交袋中,加入羊抗鼠的第二抗体,同样用封闭液稀释,稀释比为 1:3000,37℃ 孵育 1 h;倾去二抗,用 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min;ECL 检测液显色,X 光胶片显影定影。实验重复 3 次。

经 X 胶片曝光显影的图片扫描保存为电脑文件,并用 Image J(NIH) 分析软件将图片上特异条带显色的密度灰度值数字化,Maspin 蛋白的灰度值除以内参 β -actin 的灰度值以校正误差,所得结果代表样品 Maspin 蛋白目标蛋白的相对含量。显色条带密度通过 Image J(NIH) 软件分析。

1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,用 Excel 软件作图, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两组均数比较采用 t 检验,组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 放射线对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响

MTT 比色法检测结果表明放射线对鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖具有抑制作用,除小剂量 2 Gy 以外,放射剂量越大抑制作用越强(24 ~ 96 h),呈现剂量依赖性($P < 0.05$),见表 1。胎盼蓝染色法检测也显示放射线对 CNE2 细胞的增殖具有抑制作用:细胞放射后生长曲线明显下移,细胞增殖受抑,6 Gy 照射 24 h 后增殖抑制明显、其数量是未照射 CNE2 细胞的 0.2 倍,细胞生长延迟,见图 1。

表 1 MTT 比色法检测放射线对 CNE2 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

剂量(Gy)	OD 值(A490)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.41±0.05	0.76±0.04	1.19±0.06	1.61±0.08	2.11±0.05
2	0.40±0.03	0.74±0.05	0.83±0.04	0.85±0.05	1.12±0.05
4	0.35±0.03	0.47±0.02	0.69±0.03	0.49±0.04	0.39±0.08
6	0.36±0.01	0.42±0.04	0.49±0.03	0.26±0.02	0.31±0.02

续上表

剂量 (Gy)	OD 值 (A490)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
8	0.31 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.28 ± 0.06	0.29 ± 0.03
10	0.27 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.24 ± 0.03

注:4 ~ 10 Gy 组与 0 Gy 组分别相比较, $P < 0.05$

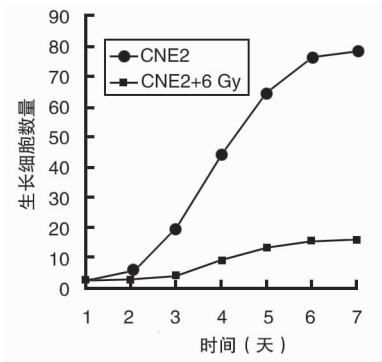


图 1 胎盼蓝染色法检测细胞增殖

2.2 流式细胞术检测放射线对 CNE2 细胞凋亡和周期的影响

6 Gy 放射 CNE2 细胞后,采用流式细胞术分析 CNE2 细胞的凋亡和周期。结果如表 2 和图 2A 及图 2B 所示与未照射(0 h)的 CNE2 细胞比较,除放射 24 h 的细胞凋亡率降低以外,48 h 和 72 h 的凋亡率均增高 5 倍以上,说明 CNE2 放射敏感、容易发生凋亡;放射后 CNE2 的细胞周期重新分布,出现较多的 G2/M 期细胞(24 h、48 h 和 72 h 与 0 h 比较, $P < 0.05$)以及较少的 G0/G1 期细胞(48 h 和 72 h 与 0 h 比较, $P < 0.05$),表现为 G2/M 期与 G0/G1 期分布的逆转(24 h 除外),但 S 期细胞的百分率无明显差异。该结果提示放射诱导的细胞周期调节在放射反应中起重要作用。

表 2 6 Gy 照射 CNE2 细胞的周期分布和凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

时间 (h)	细胞周期			凋亡率
	G0/G1	S	G2/M	
0	67.4 ± 0.5	26.6 ± 0.4	7.9 ± 0.6	5.93 ± 1.3
24	59.3 ± 2.9 *	26.4 ± 1.4	14.3 ± 1.3 *	3.56 ± 1.6
48	13.4 ± 0.1 *	24.1 ± 0.2	62.9 ± 0.5 *	32.4 ± 1.2 *
72	7.6 ± 0.3 *	20.2 ± 0.8	71.2 ± 0.1 *	31.2 ± 1.5 *

注: * $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义

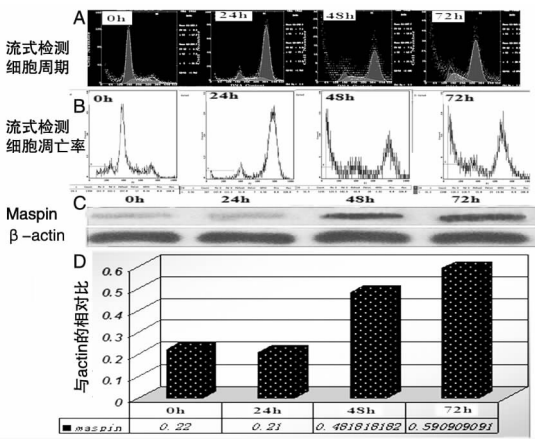


图 2 A:流式细胞仪检测 6 Gy 照射 CNE2 细胞的周期分布图;B:流式细胞仪检测 6 Gy 照射 CNE2 细胞的凋亡率图;C:Western blotting 检测 6 Gy 照射 CNE2 细胞 Maspin 蛋白表达图;D:Western blotting 检测 Maspin 蛋白与内参 β -actin 灰度值相对比的柱形图

2.3 Western blotting 检测 Maspin 蛋白表达

6 Gy 放射 CNE2 细胞后,采用 Western blotting 分析 Maspin 蛋白表达。结果如图 2C、2D 所示:与未照射组(0 h)的 CNE2 细胞比较,48 h 和 72 h 的 Maspin 蛋白表达明显增高,与细胞周期和凋亡率的改变呈现同步性;48 h 和 72 h 的 Maspin 蛋白表达量分别为 0 h 组的 2.2 倍和 2.7 倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

鼻咽癌是一种以放射治疗为主的头颈部恶性肿瘤,CNE2 细胞系来源于人鼻咽部低分化鳞癌组织,对放射敏感。本实验的流式细胞检测结果也显示 CNE2 细胞照射后凋亡百分率增高、对放射敏感。

放射主要使 DNA 发生损伤,可以在分子水平引起细胞发生某些内在变化,比如诱导一些活性蛋白质表达增高或降低而导致细胞凋亡。

Maspin 蛋白基因位于 18q21.3,表达产物具有 375 个氨基酸,与 Serpin 超家族的 Ser 蛋白激酶抑制因子有重要同源性,但与其他蛋白酶抑制因子不同,Maspin 蛋白能诱导细胞凋亡。文献报道 Maspin 蛋白是一种具有抑瘤特性的丝氨酸蛋白质酶抑制因子,能抑制肿瘤生长并能促进瘤细胞凋亡^[6]。Maspin 蛋白为一种重要的凋亡致感因子,能增强肿瘤细胞对药物诱导凋亡的敏感性^[7-8]。已有研究表明^[9-10],Maspin 蛋白在头颈鳞癌中的表达水平与放化疗反应密切相关。本研究结果也显示 Maspin 蛋白在 CNE2 细胞中的表达水平与放疗反应密切相关,在放疗后的 CNE2 细胞中,蛋白质表达水平明显增高。

Maspin 蛋白作为凋亡致感因子诱导细胞凋亡,可能与 Maspin 蛋白的结构、p53 及细胞周期调控相关。在 Maspin 蛋白启动子区域有 Ets、Ap1、HRE 和 p53 几个重要的转录结合因子^[11]。文献报道 Maspin 蛋白是 p53 的一个靶标^[12]。体外研究发现^[11],Maspin 蛋白基因启动子区域有 p53 结合位点,p53 与 Maspin 基因启动子上特定位点结合,激活 Maspin 蛋白基因启动子,增强转录活性,使癌细胞中 Maspin 蛋白 mRNA 含量增加,且转录速率增快^[13]。野生型 p53 结合到基因的结合位点后能刺激组蛋白的乙酰化、增加启动区染色质的可接近性,并通过影响 Maspin 基因的甲基化抑制屏障而激活 Maspin 基因的启动子^[14]。Maspin 蛋白的 C-端有一环状结构,称为反应活性部位环(reaction site loop, RSL),被认为是主要的反应活性部位,N-端上的 P1 残端具有识别靶蛋白的作用。目前研究认为 Maspin 蛋白的 RSL 为扭曲的螺旋结构,对胰蛋白酶及胰蛋白酶样的蛋白水解酶的有限蛋白水解非常敏感,且 RSL 能与另一分子 Maspin 蛋白形成二聚体或多聚体,提示 RSL 可能具有一种“开关”作用,与肿瘤生长和细胞凋亡相关。Zou 等^[15]认为涉及 Maspin 蛋白首要调节机制之一是 p53 信号调节通路,Maspin 蛋白的表达调节相关到 p53 的状态^[16,18]。放射常常产生多种氧化物,文献报道一氧化氮的合成有助于刺激 Maspin 蛋白的合成^[17]。Eitel 等^[18]发现在低氧等条件下,PTEN 和 p53 整合成一条共同通路诱导 Maspin 蛋白表达,构成一个 PTEN/p53/Maspin 网络系统影响细胞的生存。另一方面,研究表明^[15-16,18],

p53 在细胞周期的 G1/S 期、G2/M 期阻滞中起关键的调控作用。因此,p53、细胞周期和 Maspin 蛋白在放射诱导细胞凋亡中相互影响,Maspin 蛋白表达水平影响放化疗反应。本实验结果显示 CNE2 细胞放射后,Maspin 蛋白表达水平越高则细胞凋亡百分率也越高,细胞周期也出现分布改变,放射敏感的 G2/M 期细胞增多。该结果提示 Maspin 蛋白可能通过 p53 和细胞周期阻滞影响放射诱导的细胞凋亡。文献报道^[5] Maspin 蛋白可能是预测鼻咽癌放射敏感性的一个生物标志物,本实验结果也提示 Maspin 蛋白参与了 CNE2 细胞的放射反应,是一种放射反应敏感分子,是一个值得深入研究的放射反应蛋白。

参考文献:

- [1] Yan JH, Qin DX, Hu YH, et al. Management of local residual primary lesion of nasopharyngeal carcinoma (NPC): are higher doses beneficial? [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1989, 16(6): 1465 - 1469.
- [2] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells [J]. *Science*, 1994, 263(5146): 526 - 529.
- [3] Zhang WG, Shi HY, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5(4): 50.
- [4] Bernardo MM, Meng Y, Lockett J, et al. Maspin Reprograms the Gene Expression Profile of Prostate Carcinoma Cells for Differentiation [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(11): 1009 - 1022.
- [5] Feng XP, Yi H, Li MY, et al. Identification of biomarkers for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy by proteomics [J]. *Cancer Research*, 2010, 70(9): 3450 - 3462.
- [6] Sager R, Sheng S, Pemberton P, et al. Maspin. A tumor suppressing serpin [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 425: 77 - 88.
- [7] Sheng S. The promise and challenge toward the clinical application of Maspin in cancer [J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 2733 - 2745.
- [8] Schaefer JS, Zhang M. Targeting Maspin in endothelial cells to induce cell apoptosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, 10(3): 401 - 408.
- [9] Marioni G, Koussis H, Gaio E, et al. Maspin's prognostic role in patients with advanced head and neck carcinoma treated with primary chemotherapy (carboplatin plus vinorelbine) and radiotherapy: preliminary evidence [J]. *Acta Otolaryngol*, 2009, 129(7): 786 - 792.
- [10] Mhawech-Fauceglia P, Dulguerov P, Beck A, et al. Value of

- ezrin, Maspin and nm23-H1 protein expressions in predicting outcome of patients with head and neck squamous-cell carcinoma treated with radical radiotherapy [J]. J Clin Pathol, 2007, 60(2): 185-189.
- [11] Zhang M, Maass N, Magit D, et al. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene Maspin [J]. Cell Growth Differ, 1997, 8(2): 179-186.
- [12] Cho JH, Kim HS, Park CS, et al. Maspin expression in early oral tongue cancer and its relation to expression of mutant-type p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. Oral Oncology, 2007, 43(3): 272-277.
- [13] Latha K, Zhang W, Cella N, et al. Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(5): 1737-1748.
- [14] Surowiak P, Materna V, Drag-Zalesinska M, et al. Maspin expression is characteristic for cisplatin-sensitive ovarian cancer cells and for ovarian cancer cases of longer survival rates [J]. Int J Gynecol Pathol, 2006, 25(2): 131-139.
- [15] Zou Z, Gao C, Nagaich AK, et al. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene Maspin [J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6051-6054.
- [16] Alvarez Secord A, Darcy KM, Hutson A, et al. The regulation of Maspin expression in epithelial ovarian cancer: association with p53 status [J]. Gynecol Oncol, 2011, 123(2): 314-319.
- [17] Ganguly Bhattacharjee K, Bhattacharyya M, Halder UC, et al. The Role of Neutrophil Estrogen Receptor Status on Maspin Synthesis via Nitric Oxide Production in Human Breast Cancer [J]. J Breast Cancer, 2012, 15(2): 181-188.
- [18] Eitel JA, Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzahe MR, et al. PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of Maspin in glioblastoma cells [J]. Cell Cycle, 2009, 8(6): 896-901.

(修回日期:2012-08-09)

(上接第 338 页)

出外伤 1 周时听功能下降与 HO-1 上调表达最为明显,而随着时间延长各指标逐渐恢复,但数值仍明显高于正常对照组。经 Pearson 相关性分析发现,在 DBI 1、2 周时 IHC、OHC、SGC 中 HO-1 的上调表达与低频区的 40 Hz AERP 和 ASSR 0.5、1 kHz 相关性明显, r 值范围为 0.394~0.849,而当 DBI 3、4 周时 IHC、OHC、SGC 中 HO-1 的上调表达则除与 40 Hz AERP 和 ASSR 0.5、1 kHz 相关性明显外,同时与 ASSR 高频的 2、4 kHz 也具有相关性, r 值范围为 0.284~0.905,推测这一变化可能是 DBI 早期 1、2 周时听力损伤主要出现在低频区呈现外周性听力损伤,而后期则外周性与中枢性听力损伤同时存在。听力学检测与扫描电镜观察也支持这一变化,即 DBI 后扫描电镜下 1 周毛细胞纤毛损伤改变明显,中顶转 OHC 纤毛损伤尤为突出,4 周时中顶转、底转 OHC 纤毛损伤较轻。

总之,本研究认为 DBI 可造成脑实质与耳蜗损伤,并引起脑干听觉传导通路受损,最终导致听力下降。DBI 大鼠伤后耳蜗 HO-1 表达上调与 ABR V 波阈值、40 Hz AERP 及 ASSR 听力学变化密切相关, DBI 导致耳蜗损伤的机制可能与 HO-1 的表达有关,并在听功能损伤与

转归过程中发挥重要作用。同时认为综合运用 3 种听力检测方法可以相互印证并评估其 DBI 后听力损伤的程度。

参考文献:

- [1] Scherg M, von Cramon D, Elton M. Brain-stem auditory-evoked potentials in post-comatose patients after severe closed head trauma. J Neurol, 1984, 231(1): 1-5.
- [2] Nölle C, Todt I, Seidl RO, et al. Pathophysiological changes of the central auditory pathway after blunt trauma of the head. J Neurotrauma, 2004, 21(3): 251-258.
- [3] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury 1. Methodology and local effects of contusions in the rat. Brain Res, 1981, 211(1): 67-77.
- [4] 苏振忠. 耳鼻咽喉创伤学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2004: 56-57.
- [5] PATRICI GS. Auditory Functiontests [M]// HARLES W C. Otolaryngology head and neck surgery. Missouri: Cartery, 1993: 2873-2878.
- [6] 韩德民,许时昂. 听力学基础与临床 [M]. 第 1 版. 北京:科学技术文献出版社, 2004: 348-349.
- [7] 陶征,张文,刘树燕,等. 多频稳态诱发电位测试 [J]. 耳鼻咽喉-头颈外科, 2002, 9(3): 131-133.
- [8] 曾国庆,宋江顺. 听觉稳态反应临床应用的现状与展望 [J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2012, 10(3): 193-196.

(修回日期:2012-09-10)