

同的研究结果无重复性可能与人群不均、种族不同、研究设计不同以及基因与环境的相互作用不同有关。

参考文献:

- [1] Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, et al. Assignment of the human nuclear hormone receptor NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2 [J]. *Genomics* 1996, 35(3): 637-638.
- [2] Wu B, Gao J, Wang MW. Development of a complex scintillation proximity assay for high throughput screening of PPARgamma modulators [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2005, 26(3): 339-344.
- [3] Wang YX, Lee CH, Tiep S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity [J]. *Cell* 2003, 113(2): 159-170.
- [4] Vosper H, Patel L, Graham TL, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages [J]. *J Biol Chem* 2001, 276(47): 44258-44265.
- [5] Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(9): 5306-5311.
- [6] Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100(26): 15924-15929.
- [7] Lee CH, Olson P, Hevener A, et al. PPAR δ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103(9): 3444-3449.
- [8] Wang YX, Zhang CL, Yu RT, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta [J]. *PLoS Biol* 2004, 2(10): e294.
- [9] Skogsberg J, Kannisto K, Cassel TN, et al. Evidence that peroxi-

some proliferator-activated receptor delta influences cholesterol metabolism in men [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23(4): 637-643.

- [10] Skogsberg J, McMahon AD, Karpe F, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta genotype in relation to cardiovascular risk factors and risk of coronary heart disease in hypercholesterolaemic men [J]. *J Intern Med* 2003, 254(6): 597-604.
- [11] Gouni-Berthold I, Giannakidou E, Faust M, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor delta +294T/C polymorphism in relation to lipoprotein metabolism in patients with diabetes mellitus type 2 and in non-diabetic controls [J]. *Arteriosclerosis* 2005, 183(2): 336-341.
- [12] Aberle J, Hopfer I, Beil FU, et al. Association of peroxisome proliferator-activated receptor delta +294T/C with body mass index and interaction with peroxisome proliferator-activated receptor alpha L162V [J]. *Int J Obes* 2006, 30(12): 1709-1713.
- [13] Aberle J, Hopfer I, Beil FU, et al. Association of the T+294C polymorphism in PPAR δ with low HDL cholesterol and coronary heart disease risk in women [J]. *Int J Med Sci* 2006, 3(3): 108-111.
- [14] 中华医学会糖尿病分会代谢综合征研究协作组. 中华医学会糖尿病分会关于代谢综合征的建议 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2004, 12(3): 156-161.
- [15] Hiji AK, Michalik L, Wahli W. PPAR δ transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives [J]. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59(5): 790-798.
- [16] André P, Grimaldi regulatory role of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) in muscle metabolism: A new target for metabolic syndrome treatment [J]. *Biochimie* 2005, 87: 5-8.

收稿日期: 2008-05-16 修回日期: 2008-09-25

本文编辑: 李 昕

硼替佐米对混合淋巴细胞培养体系细胞因子的影响

吴圣豪, 李振宇*, 徐开林, 潘秀英, 曾令宇

(徐州医学院附属医院血液科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (bortezomib)对混合淋巴细胞培养体系中细胞凋亡、细胞因子水平的影响。方法 体外建立单向混合淋巴细胞培养 (MLC)体系, 分别用 2、4、8 nmol/L的硼替佐米干预反应体系, 在不同的时间点收集细胞, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, ELISA法检测培养上清液中白细胞介素 2 (IL-2)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的含量。结果 硼替佐米作用于细胞 12、24、36 h后细胞凋亡率逐渐增加, 8 nmol/L硼替佐米作用 36 h细胞凋亡率为 (61.67 \pm 3.21)%; 硼替佐米作用 24 h后上清液中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 浓度减小, 8 nmol/L组的 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 浓度分别为 (88.27 \pm 2.76) ng/L、(57.36 \pm 2.08) ng/L、(22.19 \pm 0.88) ng/L。结论 硼替佐米能诱导细胞凋亡, 使混合淋巴细胞培养体系细胞分泌的 Th₁型细胞因子减少。

基金项目: 江苏省卫生厅科研项目 (H200722)

*通信作者, E-mail: lizhenyu@163.com

关键词:混合淋巴细胞培养;细胞因子;细胞凋亡;硼替佐米;小鼠

中图分类号: Q2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2008)10-0655-04

Cytokine levels of the mixed lymphocyte culture system induced by bortezomib

WU Shenghao LI Zhenyu*, XU Kailin PAN Xinying ZENG Lingyu

(Department of Hematology Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College Xuzhou Jiangsu 221002 China)

Abstract **Objective** To investigate the effect of bortezomib on the apoptosis and the cytokine levels of the mixed lymphocyte culture system. **Methods** One-way mixed lymphocyte culture (MLC) system was established in vitro and bortezomib was employed at the concentrations of 2, 4 and 8 nmol/L, respectively, to intervene MLC; the cells were harvested at different time points and flow cytometry was used to detect apoptosis rate. The supernatants were harvested and analyzed for IL-2, IFN- γ , TNF- α secretion using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. **Results** Bortezomib could effectively induce apoptosis of MLC system. 12, 24 and 36 hours after treatment with bortezomib, the apoptosis rate increased gradually. 36 hours after treatment with 8 nmol/L bortezomib, the apoptosis rate was $61.67 \pm 3.21\%$, and the level of IL-2, IFN- γ , TNF- α in culture supernatants decreased. 24 hours after treatment with 8 nmol/L bortezomib, the level of IL-2, IFN- γ and TNF- α were 88.27 ± 2.76 ng/L, 57.36 ± 2.08 ng/L, 22.19 ± 0.88 ng/L, respectively. **Conclusion** Bortezomib could induce apoptosis of MLC system, with a decrease in the production of Th₁ cytokines.

Key words: mixed lymphocyte culture; cytokines; apoptosis; bortezomib; mouse

核因子 κ B (NF- κ B)广泛地参与细胞生长、分化、免疫和炎症反应,具有抗凋亡、促增殖的作用,是细胞重要的信号传递通路,可通过调节一系列基因转录、表达而发挥作用。NF- κ B的激活在 T 细胞活化、分泌细胞因子及发挥免疫效应过程中起重要作用^[1]。硼替佐米(bortezomib)是一种合成的二肽硼酸衍生物,已经证实硼替佐米是 NF- κ B 强有力的抑制剂^[2]。本研究体外建立单向混合淋巴细胞培养(MLC)体系并给予硼替佐米,观察其对 MLC 体系中细胞凋亡及部分细胞因子的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 受体鼠为 BALB/c 小鼠,雌性;供体鼠为 C57BL/6 小鼠,雄性;均为清洁级近交系小鼠,鼠龄 8~12 周,体重 18~22 g 由徐州医学院实验动物中心提供。在动物层流架内带盖鼠笼中饲养,鼠笼经 1:10 000 高氯净浸泡消毒。

1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品,新生小牛血清为杭州四季青公司产品,丝裂霉素为浙江海正药业公司产品,白细胞介素 2 (IL-2)试剂盒为 ADL 公司产品, γ 干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 试剂盒为上海西唐生物公司产品, Annexin V-FITC 凋亡试剂盒为美国 Bipeck 公司产品,硼替佐米为美国 Millennium 公司产品。

1.3 单向 MLC 体系的建立 将供体鼠 (C57BL/6 小鼠)颈椎脱臼处死, 75% 乙醇浸泡 10 min, 在超净台内无菌取出小鼠脾脏置于 200 目金属过滤网上,匀浆器芯轻轻研磨,制成脾细胞悬液,用 RPMI-1640 液洗 2 次,调整细胞含量为 1×10^9 /L。经台盼蓝染色后计算细胞存活率 (>95%)。计数板计数并将 C57BL/6 小鼠脾细胞含量调至 2×10^9 /L 作为反应细胞。受体鼠 (BALB/c 小鼠)的脾细胞取法同上,将 BALB/c 小鼠脾细胞含量调至 1×10^9 /L 加入丝裂霉素至终浓度 25 mg/L 于 37°C 水浴 30 min, 用无血清 RPMI-1640 培养基洗涤 2 次,除去残余的丝裂霉素,调整细胞含量至 2×10^9 /L 作为刺激细胞。将已制备好的供、受体鼠脾细胞按如下分组加入 12 孔板,每孔加入反应细胞和刺激细胞各 0.1 ml 硼替佐米、RPMI-1640,使 MLC 体系总体积为 1 ml。实验分组:对照组,不加任何处理; B 组,加入硼替佐米使其终浓度为 2 nmol/L; C 组,加入硼替佐米使其终浓度为 4 nmol/L; D 组,加入硼替佐米使其终浓度为 8 nmol/L; 每组设 3 个复孔,各组均置于 37°C、5% CO₂ 孵育箱培养 5 天。

1.4 流式细胞仪 (FCM) 检测 MLC 体系中细胞凋亡率 在培养的第 12、24、36 h 收集各实验孔的细胞,将培养的悬浮细胞用 PBS 洗 2 次,加入 100 μ l Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin V (20 mg/L) 10 μ l 室温避光 30 min,再加入 PI (50 mg/L) 5 μ l 避光

反应 5 min 后, 加入 400 μ l Binding Buffer 立即用 FCM 进行定量检测, 同时以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。单纯 FITC 阳性 (FITC⁺/PI⁻) 细胞为早期凋亡细胞。

1.5 细胞因子检测 在培养第 24 h ELISA 法分别检测培养上清中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 含量, 按试剂盒说明书进行操作, 每孔加样量为 100 μ l 终止反应后用酶标仪在 450 nm 处测光密度 (D) 值。RPMI-1640 作为空白对照。所有 D 值均减除空白值后再进行计算, 分别计算各细胞因子浓度。

1.6 统计学处理 所有实验重复 3 次, 应用统计分析软件包 SPSS 13.0 进行统计学分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 检验水准: $\alpha=0.05$ 。

士 s 表示, 采用 t 检验, 检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 硼替佐米诱导 MLC 体系细胞凋亡结果 测定对照组及 2、4、8 nmol/L 硼替佐米分别作用于 MLC 体系 12、24、36 h 的细胞凋亡率, 结果表明硼替佐米能有效地诱导细胞凋亡, 各处理组 (B、C、D 组) 细胞凋亡率与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同一药物浓度组作用 12、24、36 h 的细胞凋亡率逐渐增加; 不同浓度组硼替佐米处理 36 h 时以 8 nmol/L 凋亡率最高, 为 (61.67 \pm 3.21)%, 而对照组的凋亡率为 (4.15 \pm 0.78)% (表 1)。

表 1 硼替佐米作用不同时间 MLC 体系细胞凋亡率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率 (%)		
	12 h	24 h	36 h
对照组	3.51 \pm 0.22	3.83 \pm 0.42	4.15 \pm 0.78
B 组 (2 nmol/L)	12.20 \pm 2.63*	21.60 \pm 2.99*	24.21 \pm 2.55*
C 组 (4 nmol/L)	20.11 \pm 4.46*	32.21 \pm 2.65*	43.50 \pm 3.05*
D 组 (8 nmol/L)	27.50 \pm 3.36*	41.30 \pm 3.15*	61.67 \pm 3.21*

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 硼替佐米对 MLC 体系细胞因子的影响 各处理组细胞因子浓度随硼替佐米浓度增加而明显减小 (表 2)。各处理组细胞因子浓度与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 8 nmol/L 组的 IL-2、IFN-

γ 、TNF- α 浓度分别为 (88.27 \pm 2.76)、(57.36 \pm 2.08)、(22.19 \pm 0.88) ng/L。结果表明, 硼替佐米能使 MLC 体系中细胞分泌 IL-2、IFN- α 减少。

表 2 硼替佐米作用 24 h 对 MLC 体系细胞因子的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$ ng/L)

组别	IL-2	IFN- γ	TNF- α
对照组	276.03 \pm 5.79	245.15 \pm 2.16	97.06 \pm 2.03
B 组 (2 nmol/L)	203.14 \pm 3.01*	135.43 \pm 2.02*	76.02 \pm 1.86*
C 组 (4 nmol/L)	158.08 \pm 4.63*	79.12 \pm 1.33*	42.37 \pm 2.11*
D 组 (8 nmol/L)	88.27 \pm 2.76*	57.36 \pm 2.08*	22.19 \pm 0.88*

与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

硼替佐米能通过抑制真核细胞 26S 蛋白酶体对蛋白质的降解, 促使多种与细胞增殖、分化、存活、凋亡密切相关的蛋白代谢发生紊乱, 诱导细胞凋亡。研究表明, 硼替佐米能有效抑制放、化疗引起的 NF- κ B 激活, 阻止多种抗凋亡蛋白和细胞因子的转录, 增加细胞对放、化疗的敏感性; 同时通过稳定多种细胞周期蛋白 (P53、P21、P27) 的表达, 促使细胞发生周期阻滞, 诱导细胞凋亡^[3]。

Blanco 等^[4]发现经植物血凝素 (PHA) 刺激、树突状细胞 (DC) 共培养或混合淋巴细胞培养而活化

的 T 细胞中 NF- κ B 的活性高于静息的 T 细胞, 并且活化的 T 细胞较静息时的 T 细胞对硼替佐米敏感, 在培养体系中加入硼替佐米 6 h 后细胞中促凋亡蛋白 caspase-9、caspase-3 含量即增加, 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 降解增加。我们的实验结果显示硼替佐米能有效地诱导细胞凋亡; 硼替佐米作用 36 h 后凋亡细胞比例显著高于其他时间, 细胞凋亡率与作用时间有正相关趋势; MLC 体系细胞凋亡率随硼替佐米浓度的升高而增大。因此硼替佐米能选择性地诱导活化的同种反应性细胞的凋亡。Blanco 等^[4]还发现经硼替佐米作用后同种反应性 T 细胞分泌的 Th₁ 型细胞因子 (IL-2、IFN- γ) 显著减少, 而 Th₂

型细胞因子在移植物抗宿主病 (GVHD) 的发生中起重要作用。本实验中观察到硼替佐米作用 24 h 后各处理组 IL-2、IFN- γ 浓度随硼替佐米剂量增加而明显减少, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TNF- α 是导致炎症反应发生的重要因素, 并能放大炎症反应, 因此抑制 TNF- α 的合成、分泌, 能有效地抑制局部炎症反应, 实验显示与对照组相比各处理组 MLC 体系上清中 TNF- α 的水平明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明硼替佐米能抑制 MLC 体系分泌 TNF- α , 减轻炎症反应。IL-2 基因表达受 NF- κ B、核因子 AT(NF-AT) 和活化蛋白-1(AP-1) 等共同调控, NF- κ B、NF-AT 对靶基因有竞争性、相互平衡的结合作用^[5], 硼替佐米的作用可能打破了这种平衡而导致活化的 T 细胞分泌细胞因子的质和量发生改变。

综上所述, 本研究提示硼替佐米诱导 MLC 体系细胞凋亡, 同时 Th₁ 细胞分泌的细胞因子 IL-2、IFN- γ 分泌减少, 这有可能为异基因造血干细胞移植中预防 GVHD 提供一种新的药物。

参考文献:

[1] Matsumoto M, Yamada T, Yoshinaga SK, et al. Essential role of NF- κ B-inducing kinase in T cell activation through the TCR/CD3 pathway [J]. J Immunol 2002, 169(3): 1151-1158.

[2] Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, et al. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor- κ B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res 2001, 7(5): 1419-1428.

[3] Orlowski RZ, Voohees PM, Garcia RA, et al. Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies [J]. Blood 2005, 105(8): 3058-3065.

[4] Blanco B, Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarea LI et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines [J]. Blood 2006, 107(9): 3575-3583.

[5] Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function [J]. Annu Rev Immunol 1997, 15: 707-747.

收稿日期: 2008-08-22 修回日期: 2008-10-15

本文编辑: 孙立杰

经穹窿间中间帆入路解剖研究与临床应用*

朱玉辐¹, 兰青², 李中林¹, 刘勇¹, 虞正权^{1*}

(1. 徐州医学院附属医院神经外科, 江苏 徐州 221002; 2. 苏州大学附属第二医院神经外科, 江苏 苏州 215004)

摘要:目的 研究经穹窿间中间帆入路的手术显露, 并探索临床应用疗效。方法 导航辅助下在 16 具尸体头颅标本上模拟经穹窿间中间帆入路手术, 显微镜下观察分析第三脑室、松果体区的显露。选择 6 例松果体区、第三脑室肿瘤患者行经穹窿间中间帆入路手术治疗。结果 导航辅助下经穹窿间中间帆入路手术能在标本头颅上顺利完成, 可清晰显露第三脑室后部及松果体区。6 例松果体区、第三脑室肿瘤全切 5 例、次全切除 1 例, 无新神经功能损害及死亡发生。结论 经穹窿间中间帆入路手术治疗松果体区、第三脑室肿瘤技术上可行, 临床应用效果良好。

关键词: 松果体区; 第三脑室; 肿瘤; 中间帆; 手术入路

中图分类号: R651.1⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2008)10-0658-04

Anatomical studies of interformiceal interpositum approach and its clinical application

ZHU Yufu¹, LAN Qing², LI Zhonglin¹, LIU Yong¹, YU Zhengquan^{1*}

(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China;

2. Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215004)

Abstract: Objective To probe into the feasibility and clinical application of interformiceal interpositum approach.

* 基金项目: 江苏省重点医学人才项目 (200728)

* 通信作者, E-mail: yuzquar@hotmail.com