

文章编号:1000-5404(2012)05-0391-05

论著

## 人 HAS3 基因核心启动子区域的初步鉴定与分析

吉颖<sup>1,2</sup>, 刘竹<sup>1,2</sup>, 艾青<sup>1,2</sup>, 朱江<sup>3</sup>, 谢濛宇<sup>1,2</sup>, 翁华莉<sup>1,2</sup>, 刘革力<sup>1,2</sup>, 宋方洲<sup>1,2</sup>, 卜友泉<sup>1,2</sup> (400016 重庆, 重庆医科大学: 生物化学与分子生物学教研室<sup>1</sup>, 分子医学与肿瘤研究中心<sup>2</sup>, 附属第一医院耳鼻喉科<sup>3</sup>)

**[摘要]** **目的** 对人 HAS3 基因的核心启动子区域进行初步鉴定和分析, 为深入研究 HAS3 基因的转录调控奠定基础。**方法** 以前期构建的人 HAS3 基因启动子荧光素酶报告基因重组体 P(-761/-305) 为模板, 采用 PCR 介导的基因定点突变技术构建 4 个不同的系列删除体, 并对 HAS3 启动子区域中的 Sp1 结合位点和核心启动子元件进行定点突变, 构建相应的定点突变重组体; 采用荧光素酶双报告基因分析技术检测各重组体的启动子活性。**结果** 构建了 P(-761/-569)、P(-563/-305)、P(-490/-305) 和 P(-433/-305) 4 个系列删除体和 5 个定点突变体; 启动子活性分析结果表明, P(-761/-569) 无启动子活性, P(-563/-305)、P(-490/-305) 和 P(-433/-305) 均具有较强的启动子活性, Sp1 结合位点和核心启动子元件的定点突变可导致 HAS3 启动子活性的降低。**结论** HAS3 基因的核心启动子区域主要位于其转录起始位点上游附近 -433 ~ -305 bp 内, Sp1 可能在 HAS3 的转录调控中起重要作用。

**[关键词]** 透明质酸合成酶 3; 启动子; 转录调控

**[中图分类号]** R394.33; R394.3

**[文献标志码]** A

## Preliminary identification and characterization of human hyaluronan synthase 3 core promoter region

Ji Ying<sup>1,2</sup>, Liu Zhu<sup>1,2</sup>, Ai Qing<sup>1,2</sup>, Zhu Jiang<sup>3</sup>, Xie Mengyu<sup>1,2</sup>, Weng Huali<sup>1,2</sup>, Liu Geli<sup>1,2</sup>, Song Fangzhou<sup>1,2</sup>, Bu Youquan<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, <sup>2</sup>Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, <sup>3</sup>Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To preliminarily identify and characterize the core promoter region for human hyaluronan synthase 3 (HAS3) gene. **Methods** The previous constructed HAS3 promoter reporter, P(-761/-305), was used as template to make four different deletion mutants and site-directed mutants by using PCR based site-directed mutagenesis. Dual luciferase reporter assay was used to determine promoter reporter activity. **Results** Four deletion mutants were constructed, including P(-761/-569), P(-563/-305), P(-490/-305) and P(-433/-305). Among the four deletion mutants, P(-761/-569) had no promoter activity whereas P(-563/-305), P(-490/-305) and P(-433/-305) showed significant promoter activity. Site-directed mutagenesis of Sp1-binding site and core promoter element resulted in a decrease in HAS3 promoter activity. **Conclusion** The core promoter region of HAS3 gene is mainly located in a 129-bp region (-433 bp to -305 bp) nearby the major transcriptional start site. Sp1 might play an important role in the transcriptional regulation of HAS3 gene.

**[Key words]** hyaluronan synthase 3; promoter; transcriptional regulation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30801356, 81171879), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5388, CSTC2010BB5357), and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Municipal Education Committee (KJ090305). Corresponding author: Bu Youquan, Tel: 86-23-68485096, E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

透明质酸合成酶(hyaluronan synthase, HAS)是参与透明质酸合成的一类酶, 主要包括 HAS1、HAS2 和 HAS3。这 3 种透明质酸合成酶均可以直接催化合成

透明质酸, 从而参与调节创伤愈合、上皮形成、肿瘤细胞的侵袭与增殖等多种生物学过程<sup>[1-5]</sup>。其中, HAS1 和 HAS2 往往呈现组成性表达的特点, 但是 HAS3 的表达水平往往会因为受到各种细胞内外因素的影响而发生<sup>[2,6-8]</sup>。更为重要的是, 研究结果还表明, HAS3 的表达上调与上皮形成、肿瘤转移等生物学过程密切相关。因此, 研究并阐明 HAS3 基因的表达调

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30801356, 81171879); 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5388, CSTC2010BB5357); 重庆市教委科学技术研究(KJ090305)

**[通信作者]** 卜友泉, 电话: (023)68485096, E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

控机制对于阐明其生物学功能和分子行为机制有着重要的理论意义<sup>[1,6,9-14]</sup>。

然而,对于 HAS3 基因的表达调控研究国内外鲜有报道。我们在前期研究中,对人 HAS3 基因的启动子区域进行了初步的鉴定和分析,将 HAS3 基因启动子初步定位于转录起始位点附近约 450 bp 的区域内<sup>[5]</sup>。本研究则在此基础上,拟进一步对人 HAS3 基因的核心启动子进行鉴定和分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人宫颈癌细胞系 HeLa 为本实验室保存,培养时采用 DMEM 培养基,培养基添加 10% FBS 和青霉素(1 × 10<sup>5</sup> U/L)/链霉素(100 mg/L),培养在含 5% 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中。DMEM、胎牛血清购自 GIBCO 公司;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;KOD-Plus-Mutagenesis Kit 购自 TOYOBO 公司;反转录试剂和 DNA 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司;高保真酶购自 Invitrogen 公司;Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 和 pGL3-basic vector 购自 Promega 公司;质粒小抽纯化回收试剂盒购自 Omega 公司;普通 PCR 产物纯化回收试剂盒和普通琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购自 TIANGEN 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从 GenBank 等国际基因数据库获得 HAS3 基因的启动子序列,用 TFsearch、TRANSFAC 等多种软件对启动子区域进行转录因子结合位点分析。

1.2.2 HAS3 基因启动子报告基因重组删除体的构建 以前期构建的 P(-761/-305)为模板,采用单酶切和 PCR 介导的基因突变技术构建 4 个长度不同的系列删除体,分别命名为 P(-761/-569)、P(-563/-305)、P(-490/-305)和 P(-433/-305)。其中 P(-761/-569)的构建方法为:首先经 Sma I 单酶切处理(-569 bp 处和载体 Nhe I 处各含有 1 个 Sma I 位点),然后回收大片段直接连接即可。P(-563/

-305)、P(-490/-305)和 P(-433/-305)的构建主要采用 KOD-Plus-Mutagenesis Kit 进行,具体操作参照试剂盒说明书进行,稍有改动,具体操作如下。

1.2.2.1 引物设计 采用 Primer Premier 5.0 等引物设计软件设计引物,引物的具体名称和序列参见表 1。

1.2.2.2 反向 PCR 反应 PCR 扩增反应体系组成为:5 μl 10 × PCR 缓冲液、5 μl 2 mmol/L dNTPs、DNA 模板 1 ~ 2 μl (50 ng)、1 μl KOD plus DNA 聚合酶(5 U/μl)、10 μmol/L 上下游引物各 1.5 μl,灭菌双蒸水补足至 50 μl。扩增程序为:94 °C 变性 2 min,然后用逐步程序 98 °C 10 s、68 °C 1 min/1 kb DNA 完成 5 个循环。反应完成后取 2 μl PCR 反应液经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物(130 V,35 min),EB 染色 5 min,在凝胶成像仪下观察。

1.2.2.3 Dpn I 酶切 往 PCR 反应液中加入 2 μl Dpn I 酶,在 37 °C 水浴温育 1 h。酶切完成后取 2 μl 反应液电泳鉴定。

1.2.2.4 转化 取 2 μl Dpn I 处理液,使用 DNA 连接试剂盒进行连接,然后使用 DH5α 感受态细胞进行转化。转化后涂氨苄抗性琼脂平板,倒置过夜培养。

1.2.2.5 阳性克隆鉴定 从倒置过夜培养的平板上随机挑取多个克隆,小量抽提质粒后首先采用琼脂糖凝胶电泳法初步快速鉴定,最后均经 DNA 测序验证。

### 1.2.3 HAS3 基因启动子报告基因重组定点突变体的构建

采用 KOD-Plus-Mutagenesis Kit 试剂盒,具体操作和 1.2.2 基本一致,但各定点突变体构建采用的模板和引物不同,具体参见表 1。其中,将 -367 bp 处原有的 GGAGC 序列被突变为 TTCTA 序列,将 -467 bp 处原有的 CCGG 序列被突变为 AATT 序列。

1.2.4 瞬时转染 质粒瞬时转染采用 Lipofectamine 2000 试剂进行,具体操作参见文献[1,15-17]。

1.2.5 荧光素酶报告基因活性检测 采用 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 进行荧光素酶报告基因活性检测,具体操作参见文献[1,15-17]。

表 1 HAS3 基因启动子报告基因重组删除体和定点突变体构建用引物

重组体名称	引物序列	模板
P(-563/-305)	HAS3-PF2507: TAGGCGTCCCGCCGAGCGCTGGCT pGL3b-MutationR: GGTACCTATCGATAGAGAAATGTTCTGGC	P(-761/-305)
P(-490/-305)	HAS3-PF2580: CCCTCCCACTCTGGTCAACTTTC pGL3b-MutationR: GGTACCTATCGATAGAGAAATGTTCTGGC	P(-761/-305)
P(-433/-305)	HAS3-PF2637: CGGGCACGCGCCGGTACTTAAG pGL3b-MutationR: GGTACCTATCGATAGAGAAATGTTCTGGC	P(-761/-305)
P(-761/-305)M2	HAS3P-M1F: GCGCGCGCGCGTCTTCTAGGAGCGGGAGGAG HAS3P-M1R: CTCCTCCCGCTCTAGAAAGCGCGCCGCGC	P(-761/-305)
P(-761/-305)M1	HAS3P-M2F: AATTCCCCAGGGCCGGGGAGGCGCCTCT HAS3P-M2R: GAAAGTTGACCAGAGTGGGAGGGCC	P(-761/-305)
P(-490/-305)M2	HAS3-PF2580: CCCTCCCACTCTGGTCAACTTTC pGL3b-MutationR: GGTACCTATCGATAGAGAAATGTTCTGGC	P(-761/-305)M2
P(-490/-305)M1	HAS3-PF2580: CCCTCCCACTCTGGTCAACTTTC pGL3b-MutationR: GGTACCTATCGATAGAGAAATGTTCTGGC	P(-761/-305)M1
P(-433/-305)M2	HAS3-PF2637: CGGGCACGCGCCGGTACTTAAG pGL3b-MutationR: GGTACCTATCGATAGAGAAATGTTCTGGC	P(-761/-305)M2

下划线序列为突变序列

### 1.3 数据处理与统计分析

首先采用 EXCEL 软件对数据进行初步处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,进一步采用 SPSS 软件对数据进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 HAS3 基因启动子报告基因重组系列删除体的构建

根据 HAS3 基因启动子区域生物信息学分析结果,我们以前期构建的 HAS3 基因启动子报告基因重组体 P(-761/-305)为模板,分别采用单酶切处理和 PCR 介导的定点突变方法,共计构建了 4 个长度不同但相互重叠的系列删除体,分别命名为 P(-761/-569)、P(-563/-305)、P(-490/-305)和 P(-433/-305),构建示意图参见图 1。重组质粒经琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定,质粒大小符合预期(图 2)。各阳性重组体最后均经测序确认正确无误。

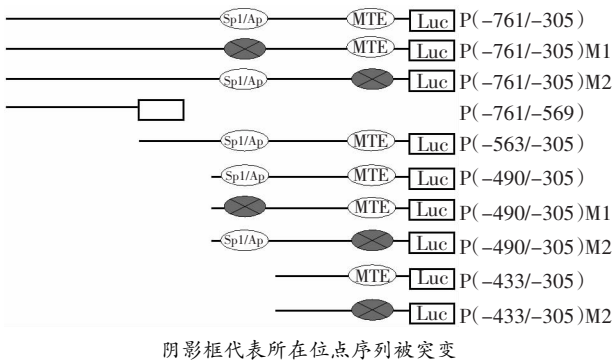


图 1 HAS3 基因启动子报告基因重组系列删除体和定点突变体构建示意图

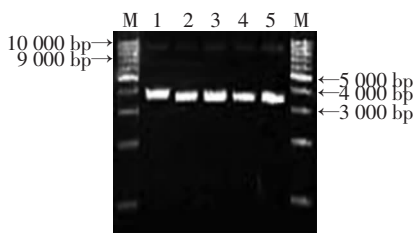


图 2 HAS3 基因启动子报告基因重组系列删除体鉴定结果

### 2.2 定点突变重组体的构建

在前期对 HAS3 基因启动子进行初步定位的基础上,我们又采用 TRANSFAC 等多种软件对 HAS3 基因启动子区(-761 ~ -305 bp)进行了更为细致的预测和分析。结果表明,在该区域存在多个保守的转录因子结合位点或顺式作用元件,其中在 -367 bp 处,存在一个保守的核心启动子元件 MTE (Core promoter motif ten elements);而在 -467 bp 处,存在一个保守的 Sp1/AP2 结合位点<sup>[1]</sup>。

为了进一步探讨上述生物信息学分析发现的 Sp1 结合位点和 MTE 元件在 HAS3 转录调控中的作用,我们采用基因定点突变技术对其进行定点突变,构建相应的定点突变重组体。在设计 PCR 引物时,将 -367 bp 处 MTE 元件包含的核心序列

GGAGC 定点突变为 TTCTA 序列,将 -467 bp 处 Sp1 结合位点包含的核心序列 CCGG 定点突变为 AATT 序列。重组质粒经琼脂糖凝胶电泳方法进行初步快速鉴定,各质粒大小符合预期(图 3)。对初步鉴定的阳性克隆再进行 DNA 测序,结果表明,各定点突变体均构建成功。

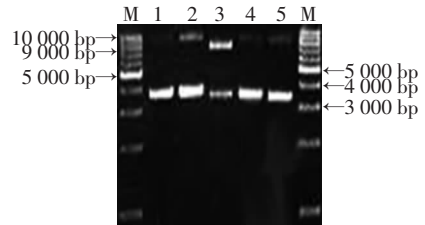


图 3 HAS3 启动子报告基因重组定点突变体鉴定结果

### 2.3 系列删除体和定点突变体的启动子活性分析

将上述构建的 4 个 HAS3 基因启动子报告基因重组系列删除体和 5 个定点突变重组体质粒转染 HeLa 细胞,同时共转染内参对照 pRL-TK 质粒。通过检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值,来表示不同重组体的启动子活性。结果表明:与不含任何启动子的空载体 pGL3-basic 载体相比,P(-761/-569)无启动子活性,而 P(-761/-305)、P(-563/-305)、P(-490/-305)和 P(-433/-305)均具有较高的启动子活性,其中最短的删除体 P(-433/-305)仍具有启动子活性,提示 HAS3 基因的核心启动子主要包含于 P(-433/-305)中,即位于其转录起始位点上游附近 -433 ~ -305 bp 内(图 4)。

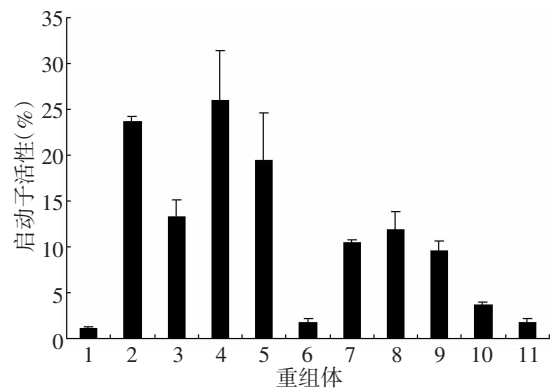


图 4 HAS3 基因重组体启动子活性分析结果

另外,与野生型重组体 P(-761/-305)相比,Sp1 结合位点突变的重组体 P(-761/-305)M1 的启动子活性下降明显,而 MTE 元件突变的重组体 P(-761/-305)M2 的启动子活性无明显变化。与野生型重组体 P(-490/-305)相比,Sp1 结合位点突变的重组体 P(-490/-305)M1 和 MTE 元件突变的重组体 P(-490/-305)M2 的启动子活性无明显变化。与野生型重组体 P(-433/-305)相比,MTE 元件突变的重组体 P(-433/-305)M2 的启动子活性明显降低(图 4)。

处的 Sp1 结合位点突变后可导致较长删除体 P(-761/-305) 的启动子活性显著下降 ( $P < 0.01$ ), 而对较短删除体 P(-490/-305) 的启动子活性影响不大, 这一令人费解而又有趣的现象恰恰提示, Sp1 结合位点很可能通过与 -490 ~ -761 bp 区域其他转录因子结合位点协调相互作用而参与 HAS3 较高启动子活性的维持。而 -367 bp 处的 MTE 元件对于 HAS3 基因核心启动子的基本活性的维持是必需的, 故将其进行定点突变后可导致最短删除体 P(-433/-305) 基本活性的丧失 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

HAS3 基因是近年来新克隆的一个透明质酸合成酶基因, 目前的研究结果表明其在上皮形成以及肿瘤的发生、发展过程中均起着非常重要的作用<sup>[1-3]</sup>。该酶主要催化合成低分子量的透明质酸, 其活性高于以前发现的 HAS1 和 HAS2, 且其表达也呈现出较强的非组成性表达特点<sup>[1-3]</sup>。如在角朊细胞的增殖与分化、正常上皮形成与创伤愈合过程中, 以及高转移癌细胞中, HAS3 的表达均呈现显著上调<sup>[5-6, 8-13]</sup>。因此, 明确 HAS3 基因的表达调控机制必将有助于揭示其在上皮形成和肿瘤发生与发展过程中的分子行为机制。然而, 该基因表达调控的详细分子机制目前仍不清楚, 鉴于此, 我们前期对 HAS3 基因的转录起始位点和启动子区域进行了初步鉴定与分析, 初步将其启动子区域定位于转录起始位点区域附近约 450 bp 的区域内, 并发现 HAS3 启动子区域缺乏典型的 TATA 盒, 但含有典型的 GC 盒以及潜在的 C/EBP、MZF1 等转录因子结合位点<sup>[18-20]</sup>。在本研究中, 我们进一步将 HAS3 的核心启动子区域定位于其转录起始位点上游附近 -433 ~ -305 bp (129 bp) 的范围内。

另外, 我们还对 HAS3 启动子区域包含的一个保守的 Sp1 结合位点的作用进行了分析, 发现将该位点进行定点突变后, 可导致 HAS3 启动子报告基因较长删除体 P(-761/-305) 启动子活性的显著降低。已经有大量研究表明, Sp1 也参与角朊细胞增殖与分化以及癌变过程的基因表达调控<sup>[1, 19-25]</sup>。许多角朊细胞分化相关基因和肿瘤相关基因的启动子区域也均包含有典型的 Sp1 结合位点, 多项研究结果也分别从不同的角度证实了 Sp1 可作为基本转录因子直接调控这些靶基因的组成性表达<sup>[1, 19-26]</sup>。这也就提示, Sp1 可能同样通过类似的方式调节 HAS3 基因的表达而在上皮形成和肿瘤发生、发展等生物学过程中发挥作用。因此, 在下一步的研究工作中, 很有必要通过凝胶阻滞迁移率分析、染色质免疫共沉淀和 RNA 干扰等实验确认 Sp1 在 HAS3 基因转录调控以及其在上皮形成和肿瘤发生、发展中的作用。

总之, 本研究在前期研究基础上进一步对 HAS3 基因的核心启动子区域进行了初步鉴定和分析, 为进

一步详细研究 HAS3 基因的表达调控机制并阐明其在上皮形成和肿瘤发生、发展中的分子行为机制奠定了坚实的基础。

### 参考文献:

- [1] 镇磊, 卜友泉, 杜刚, 等. 人 HAS3 启动子的结构与功能初步分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(6): 534-541.
- [2] Adamia S, Maxwell C A, Pilarski L M. Hyaluronan and hyaluronan synthases; potential therapeutic targets in cancer[J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2005, 5(1): 3-14.
- [3] 郑雪凌, 王凤山, 凌沛学. 透明质酸合成酶的研究进展[J]. 药物生物技术, 2004, 11(6): 413-416.
- [4] Spicer A P, Olson J S, McDonald J A. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase[J]. J Biol Chem, 1997, 272(14): 8957-8961.
- [5] Twarock S, Freudenberg T, Poscher E, et al. Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by *in vivo* targeting of hyaluronan synthesis[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 30.
- [6] Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, et al. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(1): 43-48.
- [7] Jacobson A, Brinck J, Briskin M J, et al. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli[J]. Biochem J, 2000, 348(Pt 1): 29-35.
- [8] Bullard K M, Kim H R, Wheeler M A, et al. Hyaluronan synthase-3 is upregulated in metastatic colon carcinoma cells and manipulation of expression alters matrix retention and cellular growth[J]. Int J Cancer, 2003, 107(5): 739-746.
- [9] Lai E, Singh R, Teng B, et al. Inhibition of hyaluronan synthase-3 decreases subcutaneous colon cancer growth in mice[J]. Dis Colon Rectum, 2010, 53(4): 475-482.
- [10] Tammi R, Pasonen-Seppanen S, Kolehmainen E, et al. Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury[J]. J Invest Dermatol, 2005, 124(5): 898-905.
- [11] Bourguignon L Y, Gilad E, Peyrollier K. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration[J]. J Biol Chem, 2007, 282(27): 19426-19441.
- [12] Paiva P, Van-Damme M P, Tellbach M, et al. Expression patterns of hyaluronan, hyaluronan synthases and hyaluronidases indicate a role for hyaluronan in the progression of endometrial cancer[J]. Gynecol Oncol, 2005, 98(2): 193-202.
- [13] Simpson M A, Wilson C M, Furcht L T, et al. Manipulation of hyaluronan synthase expression in prostate adenocarcinoma cells alters pericellular matrix retention and adhesion to bone marrow endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(12): 10050-10057.
- [14] Kuroda K, Utani A, Hamasaki Y, et al. Up-regulation of putative hyaluronan synthase mRNA by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-1 in human skin fibroblasts[J]. J Dermatol Sci, 2001, 26(2): 156-160.
- [15] 艾青, 卜友泉, 刘竹, 等. 人 PRR11 启动子的结构与功能初步分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(4): 256-263.

- [16] 卜友泉, 宋方洲, 易发平, 等. 人 NFBD1 启动子的鉴定与初步分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(8): 631-637.
- [17] Bu Y, Suenaga Y, Ono S, *et al.* Sp1-mediated transcriptional regulation of NFBD1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway[J]. *Genes Cells*, 2008, 13(1): 53-66.
- [18] Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences[J]. *J Mol Biol*, 1990, 212(4): 563-578.
- [19] Black A R, Black J D, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2001, 188(2): 143-160.
- [20] Eckert R L, Crish J F, Banks E B, *et al.* The epidermis: genes on-genes off[J]. *J Invest Dermatol*, 1997, 109(4): 501-509.
- [21] Eckert R L, Crish J F, Robinson N A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation[J]. *Physiol Rev*, 1997, 77(2): 397-424.
- [22] Adhikary G, Crish J F, Gopalakrishnan R, *et al.* Involucrin expression in the corneal epithelium; an essential role for Sp1 transcription factors[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(9): 3109-3120.
- [23] Nakamura Y, Kawachi Y, Xu X, *et al.* The combination of ubiquitous transcription factors AP-1 and Sp1 directs keratinocyte-specific and differentiation-specific gene expression *in vitro*[J]. *Exp Dermatol*, 2007, 16(2): 143-150.
- [24] Jang S I, Steinert P M. Loricrin expression in cultured human keratinocytes is controlled by a complex interplay between transcription factors of the Sp1, CREB, AP1, and AP2 families[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 42268-42279.
- [25] Dong S, Ying S, Kojima T, *et al.* Crucial roles of MZF1 and Sp1 in the transcriptional regulation of the peptidylarginine deiminase type I gene (PADI1) in human keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(3): 549-557.
- [26] You H L, Eng H L, Hsu S F, *et al.* A PKC-Sp1 signaling pathway induces early differentiation of human keratinocytes through upregulation of TSG101[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(6): 1201-1211.
- (收稿:2011-11-10;修回:2011-12-19)  
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2012)05-0395-01

## 个案与短篇

### 来氟米特联合双醋瑞因治疗类风湿关节炎 36 例

闫永龙<sup>1</sup>, 班爱军<sup>2</sup>, 郑桂敏<sup>1</sup>, 宁晓然<sup>1</sup> (050051 石家庄, 河北省石家庄市省人民医院风湿免疫科<sup>1</sup>; 056300 河北 武安, 河北省武安市医院肾病风湿科<sup>2</sup>)

[关键词] 来氟米特联合双醋瑞因; 类风湿关节炎; IL-1

[中图分类号] R593.220.5 [文献标志码] B

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性关节滑膜炎、关节损伤及骨破坏变为特征的系统性自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。IL-1(interleukin 1)在RA的发病机制中是滑膜炎反应的关键性细胞因子<sup>[2]</sup>。近年来,应用重组人型的IL-1受体拮抗剂应用于本病的治疗,取得显著效果<sup>[2]</sup>,但由于生物制剂价格昂贵,在临床上限制了其应用。双醋瑞因是一种治疗骨关节炎的药物,其作用机理为抑制白介素-1 $\beta$ 的生成,同时还能抑制软骨细胞IL-1受体的表达<sup>[3]</sup>。来氟米特是一种改善类风湿关节炎病情药物,单药应用即可减缓RA影像学进展<sup>[4]</sup>。因此,本研究应用来氟米特+双醋瑞因治疗RA患者,观察双醋瑞因对类风湿关节炎的治疗效果。

#### 1 资料与方法

##### 1.1 临床资料

选取在武安市人民医院2010年11月至2011年3月门诊及住院初治的RA患者36例,其中男性10例,女性26例,诊断符合2009年美国风湿病学会(ACR)修订的分类标准<sup>[5]</sup>。实验前签署知情同意书,均无应用慢性抗风湿药物以及长期应用糖皮质激素及TNF- $\alpha$ 抑制剂等药物,随访8周。36例患者分为2组,研究组:应用来氟米特(20 mg, 1次/d)+双醋瑞因(50 mg, 2次/d)治疗。对照组:单用来氟米特(20 mg, 1次/d)治疗,2

组均加用非甾体抗炎药作为基础用药。分别记录患者治疗前以及治疗后2、4、8周的炎症指标血沉、C-反应蛋白(C reactive protein CRP)以及关节肿胀、压痛数目,计算DAS评分,并予患者定期复查血常规和肝功能。排除试验期间出现药物过敏或不良反应患者。

由于药物不良反应排除6例[其中不能耐受腹泻2例,肝功能损伤3例,白细胞减低( $3.0 \times 10^9/L$ )1例]。研究组完成试验者15例,其中男性5例,女性10例,年龄40~65( $56 \pm 7.2$ )岁,病程为( $11.2 \pm 4.2$ )个月;对照组为15例,其中男性4例,女性11例,年龄45~69( $50 \pm 6.8$ )岁,病程( $7.6 \pm 4.5$ )个月。2组的年龄、性别、病程差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

##### 1.2 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用成组 $t$ 检验。

#### 2 结果

2组患者血沉、CRP及DAS评分等指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。分别于2、4、8周随访,计算治疗组及对照组血沉、CRP、DAS评分下降值及其平均数。统计学结果显示:治疗2周后,研究组血沉与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但2组CRP下降值、DAS评分下降值有统计学意义( $P < 0.05$ ),4、8周,研究组与对照组血沉与CRP以及DAS评分下降值均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

(下转400页)