

论著

文章编号:1000-5404(2014)05-0456-05

慢病毒介导 shRNA 沉默鼠肝星状细胞 TGFβ1 对 α1 I 型胶原表达的影响

张荣华¹, 闫国和², 汪国建¹, 粟永萍² (400038 重庆, 第三军医大学: 西南医院中西医结合科¹, 军事预防医学院全军复合伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室²)

[摘要] **目的** 构建大鼠转化生长因子 β1 (transforming growth factor, TGFβ1) 基因 RNA 干扰慢病毒载体, 并观测其对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 的 TGFβ1 基因沉默效应与对 I 型胶原 α1 (alpha-1 type I collagen, Col1α1) 表达的影响。**方法** 针对大鼠 TGFβ1 基因 CDs 序列, 筛选 3 个干扰靶点, 合成其 3 对小干扰 RNA (siRNA), 将各对 siRNA 分别转入 HSC-T6 细胞, 采用 RT-PCR 法从 3 对 siRNA 中筛选出最佳 siRNA, 设计并合成针对最佳 siRNA 靶序列的 shRNA, 退火形成双链, 与载体 pGreenPuro 连接, 构建 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒载体, 予以酶切与测序鉴定。pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒载体经 293 细胞包装, 将包装产生的高感染力的慢病毒颗粒感染 HSC-T6 细胞, 倒置显微镜观察经感染的 HSC-T6 细胞的 GFP 表达情况, 在 mRNA 与蛋白水平检测重组慢病毒 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 对 HSC-T6 细胞的 TGFβ1 基因的沉默效应及对 Col1α1 表达的影响。**结果** 筛选到 TGFβ1 基因的最佳干扰靶序列。酶切与测序结果证实, 构建 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒载体成功。HSC-T6 细胞经 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒感染 48 h 后, RT-PCR 检测未见 TGFβ1 基因表达, Col1α1 基因较弱表达; Western blot 检测显示 TGFβ1、Col1α1 蛋白表达均非常弱。**结论** 成功构建大鼠 TGFβ1 基因 RNA 干扰慢病毒载体, 该载体能有效沉默 HSC-T6 细胞的 TGFβ1 基因, 并抑制 Col1α1 的表达。

[关键词] 转化生长因子 β1; I 型胶原 α1; RNA 干扰, 小分子; 慢病毒载体

[中图分类号] R322.47; R394-33; R394.3 **[文献标志码]** A

Lentiviral vector-mediated shRNA silencing of TGFβ1 on Col1α1 expression in rat hepatic stellate cells

Zhang Ronghua¹, Yan Guohe², Wang Guojian¹, Su Yongping² (¹Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, ²State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To construct a lentiviral RNA interference (RNAi) vector targeting rat TGFβ1, and determine its effect on silencing TGFβ1 gene and the expression and secretion of alpha-1 type I collagen (Col1α1) in the rat hepatic stellate cell line HSC-T6. **Methods** Three RNAi sites of TGFβ1 gene were chosen according to its mRNA sequence. Three pairs small interference RNA (siRNA) of the 3 RNAi sites were synthesized. Three pair of siRNA were transfected into HSC-T6 cells to identify the optimal siRNA sequence by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the shRNA oligonucleotide targeting the optimal siRNA sequence was designed, synthesized and annealed for double-strand formation. The annealed oligonucleotide fragment was subcloned into pGreenPuro plasmid to form pGreenPuro/TGFβ1 shRNA lentiviral vector. After identified by restriction enzyme digestion and sequencing, the pGreenPuro/TGFβ1 shRNA plasmid was transfected into 293T cells to produce lentiviral particles. The lentiviral vector particles were transfected into HSC-T6 cells, and the expression of green fluorescent protein (GFP), TGFβ1 and Col1α1 in the transfected cells were observed under inverted microscope and assayed by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** The optimal siRNA sequence was confirmed. Digestion and sequencing identified that lentiviral vector pGreenPuro/TGFβ1 shRNA had been constructed successfully. In 48 h after the lentiviral vector transfection, no expression of TGFβ1 and mild expression of Col1α1 was seen in HSC-T6 cells by RT-PCR. Western blotting showed mild expression of the 2 molecule at the same time point. **Conclusion** The

[基金项目] 国家自然科学基金(81273918);重庆市中医药科技项目(2012-2-63);军队中医药科研专项课题(2010ZY2231)

[通信作者] 张荣华, E-mail: zhrhlggg@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1427.001.html>(2014-01-02)

lentiviral RNAi vector targeting rat TGFβ1 is constructed successfully. This vector can effectively silence TGFβ1 and inhibit the expression and secretion of Collα1 in HSC-T6 cells.

[Key words] transforming growth factor beta1; alpha-1 type I collagen; RNA, small interfering; lentiviral vector

Supported by the National Nature Foundation of China (81273918), the Project of Traditional Chinese Medicine Science and Technology of Chongqing (2012-2-63) and the Specific Project of Traditional Chinese Medicine Research of PLA(2010ZY231). Corresponding author: Zhang Ronghua, E-mail: zhrhggg@163.com

肝硬化属临床常见、多发病,严重危害人类健康,其特征是以胶原蛋白为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成和降解失衡,致整个肝脏的代谢紊乱及一系列严重的临床并发症。肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的共同而必经的病理过程。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化、增殖是肝纤维化发生的核心环节^[1]。HSC激活及其激活后ECM异常表达是发生肝纤维化的关键。转化生长因子β1(transforming growth factor beta1, TGFβ1)是激活HSC并促进其表达ECM的关键因子,TGFβ1信号转导在HSC的ECM表达调节中起着重要的作用^[2],因此,TGFβ1是肝纤维化防治的重要靶点之一。

本研究筛选TGFβ1基因的RNA最佳干扰靶点,构建其慢病毒干扰载体pGreenPuro/TGFβ1 shRNA,随后将该干扰载体转入HSC-T6细胞,体外观测慢病毒介导的TGFβ1 shRNA对HSC-T6细胞TGFβ1的沉默效应及其对ECM I型胶原α1(alpha-1 type I collagen, Collα1)表达的影响,为肝纤维化的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HSC-T6细胞株(上海艾研公司);3个干扰靶点寡核苷酸序列及其对照序列的合成(广州瑞博公司);胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒(Roche公司);限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、Taq聚合酶、RT-PCR试剂盒(大连宝生物公司);pGreenPuro慢病毒载体(上海英为信公司);Lipofectamine[®] 2000(Invitrogen公司);TGFβ1抗体、Collα1抗体(上海默克公司);最佳干扰靶点序列的DNA oligo合成、引物合成与测序(上海捷瑞公司)。

1.2 方法

1.2.1 TGFβ1最佳siRNA靶点的设计与筛选 根据大鼠TGFβ1基因CDs序列,设计并筛选出3个干扰靶点(靶点1:5'-GTCAACTGTGGAGCAACAC-3';靶点2:5'-GCACCATCCATGACATGAA-3';靶点3:5'-CCGCAACAACGCAATCTAT-3')。分别合成此3个干扰靶点的相应siRNA(靶点1,正义链:5'-GUCAACUGUGGAGCAACACdTdT-3',反义链:3'-dTdTTCAGUUGACACCUCGUUGUG-5';靶点2,正义链:5'-GCACCAUCCAUGACAUGAAAdTdT-3',反义链:3'-dTdTTCGUGGUAGGUACUGUACUU-5';靶点3,正义链:5'-CCGCAACAACGCAAUCAUdTdT-3',反义链:3'-dTdTTCGCGUUGUUGCGUUAAGUA-5')。将3对siRNA分别转入HSC-T6细胞,具体按3个干扰靶点试剂套装说明书进行。根据大鼠TGFβ1(NM_021578.2)与GAPDH

(AF106860.2)基因序列,分别设计其检测引物。TGFβ1上游:5'-ACTACGCCAAAGAAGTCACCC-3',下游:5'-TGAGCACTGAAGCGAAAGC-3';GAPDH上游:5'-TCTACTGGCGTCTTCA-3',下游:5'-TGAGCCCTTCCACGAT-3'。采用RT-PCR法,分别以各siRNA转入的HSC-T6细胞总RNA为模板,以未转染的HSC-T6细胞的相同检测作对照,从3个siRNA靶点中筛选出最佳的RNA干扰靶点。

1.2.2 TGFβ1 shRNA慢病毒载体的构建与鉴定 设计并合成针对最佳siRNA的shRNA靶序列(正义链:5'-GATCCGTCAACTGTGGAGCAACACCTTCCTGTCAGAGTGTGCTCCACAGTTGACTTTTIG-3',反义链:5'-AATTCAAAAAGTCAACTGTGAGCAACTCTGACAGGAAGGTGTTGCTCCACAGTTGACG-3',其中,正义链引入BamH I酶切位点,反义链引入EcoR I酶切位点),退火形成双链,与载体pGreenPuro连接,构建重组慢病毒载体pGreenPuro/TGFβ1 shRNA,转化感受态细胞,对阳性重组子质粒DNA予以酶切与测序鉴定。

1.2.3 TGFβ1 shRNA慢病毒重组体的包装及其滴度测定 转染前24 h,用胰蛋白酶消化对数生长期的健康293T细胞,以含10%血清的DMEM高糖培养基调整细胞密度为5×10⁵细胞/孔,接种于6孔板中,37℃、5% CO₂饱和湿度下培养,待细胞密度达70%~80%时用Lipofectamine[®] 2000基因转染试剂介导测序正确的pGreenPuro/TGFβ1 shRNA慢病毒质粒DNA转染293T细胞,8 h后更换含10%血清的新鲜培养基,相同条件下继续培养至48 h,倒置荧光显微镜观测绿色荧光蛋白的表达情况,并拍照。

继续培养至72 h,收集转染72 h各细胞的上清液,于4℃、4 000×g离心10 min,除去细胞碎片。以0.45 μm滤器过滤上清液,该上清液经适当浓缩后分装成小管,-70℃保存备用。采用倍比稀释法测定,并按公式计算其滴度。计算公式:病毒滴度=(P×N/100×V)×1/DF,其中P:GFP阳性细胞数;N:10⁵;V:病毒稀释液体积;DF:稀释倍数。

1.2.4 HSC-T6细胞的pGreenPuro/TGFβ1 shRNA慢病毒感染 感染前,胰蛋白酶消化对数生长期的HSC-T6细胞,以含10%血清的DMEM高糖培养基将细胞以5×10⁵/孔的密度接种于6孔板中,37℃、5% CO₂培养,待细胞生长密度达70%~80%时,以病毒液与培养液体积比1:50的比例,用pGreenPuro/TGFβ1 shRNA慢病毒液进行感染,经空病毒感染或未感染的HSC-T6细胞作对照,24~48 h后,荧光显微镜观测绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况,并拍照。

1.2.5 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA慢病毒对HSC-T6细胞TGFβ1与Collα1蛋白表达的影响 采用Western blot将经pGreenPuro/TGFβ1 shRNA病毒感染48 h的HSC-T6细胞总蛋白转移至硝酸纤维素膜,分别浸于含TGFβ1兔多抗(1:600)与Collα1鼠单抗(1:500)的封闭液中,4℃过夜,分别加辣根过氧

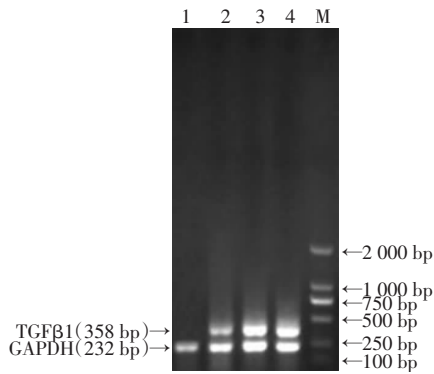
化物酶标记的鼠抗兔二抗(1:400)与兔抗鼠(1:400)二抗,室温孵育1.5 h,25 °C,与化学发光底物结合7 min左右,拍照,GAPDH(相对分子质量为 3.7×10^4)作为内参。

1.2.6 TGFβ1 shRNA 对 HSC-T6 细胞 TGFβ1 及 I 型胶原基因表达的影响 根据大鼠 I 型胶原基因序列(Collα1, NM_053304.1),设计其特异检测引物。上游:5'-TGATGTATGCTT-GATCTGTAT-3',下游:5'-CGGGGACCCATTGGACCTGAA-3'。大鼠 TGFβ1 与 GAPDH 特异检测引物见 1.2.1。以经 TGFβ1 shRNA 感染的 HSC-T6 细胞的总 RNA 为模板,RT-PCR 法分别检测 TGFβ1 与 Collα1 基因的表达情况,空病毒感染相同细胞的同样检测作对照,GAPDH 基因的同检测作为内参。反转录(RT)反应条件:30 °C 反应 10 min 与 42 °C 反应 30 min 合成第 1 链 cDNA;99 °C 反应 5 min 以灭活逆转录酶;5 °C 冷却 5 min,1 个循环。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,57 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 28 个循环,72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物 5 μL 行电泳检测,GoldView™ 染色予以确认。

2 结果

2.1 TGFβ1 最佳 siRNA 靶点筛选

采用 RT-PCR 法从 3 对 siRNA 中筛选出最佳 RNA 干扰靶点(靶点 1,图 1),其序列为 GTCAACTGTGGAGCAACAC。

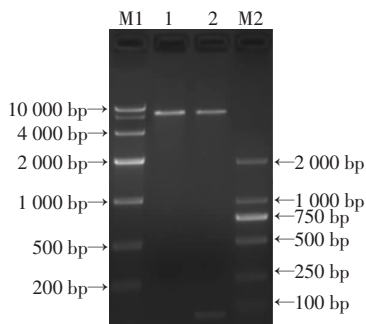


1:靶点1;2:靶点2;3:靶点3;4:对照;M:DNA标准(DL 2 000)

图 1 HSC-T6 细胞 TGFβ1 三靶点 RNA 干扰电泳结果

2.2 TGFβ1 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定

重组慢病毒载体 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 经限制性酶切 BamH I 与 EcoR I 酶切,电泳显示切下 55 bp 的 shRNA 片段(图 2)。测序证实,携带 TGFβ1 shRNA 的重组慢病毒载体 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 得以成功构建。

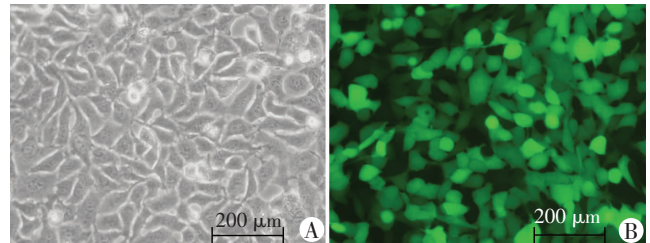


M1、M2: DNA 标准;1: pGreenPuro/TGFβ1 shRNA; 2: BamH I 与 EcoR I 酶切 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA

图 2 重组慢病毒载体 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 的酶切鉴定结果

2.3 TGFβ1 shRNA 慢病毒重组体的包装及其滴度测定

Lipofectamine® 2000 基因转染试剂介导 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒质粒 DNA 转染 293T 细胞,培养 48 h,荧光显微镜观察,可见 GFP 强表达(图 3)。以倍比稀释方法检测到其病毒滴度为: 7×10^7 TU/mL。

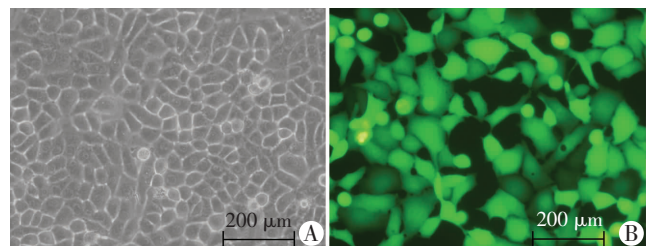


A: 正常 293T 细胞 不表达 GFP; B: 重组慢病毒 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 转染的 293T 细胞 GFP 强表达

图 3 荧光显微镜观察 293T 细胞中 GFP 的表达

2.4 HSC-T6 细胞的 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒感染

未经 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒感染的 HSC-T6 细胞不表达 GFP(图 4A),经 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒感染的 HSC-T6 细胞,荧光显微镜观察可见明显 GFP 的表达(图 4B)。

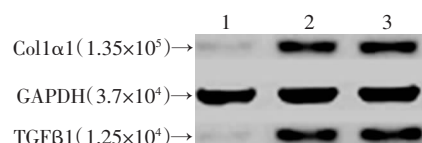


A: 未感染的 HSC-T6 细胞 不表达 GFP; B: 重组慢病毒 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 感染的 HSC-T6 细胞 GFP 强表达

图 4 荧光显微镜观察 HSC-T6 细胞中 GFP 的表达

2.5 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 病毒对 HSC-T6 细胞 TGFβ1 与 Collα1 蛋白表达的影响

Western blot 检测经 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒感染 48 h 的 HSC-T6 细胞,分别在相对分子质量 1.25×10^4 与 1.35×10^5 处出现非常弱的 TGFβ1 与 Collα1 抗原染色条带;而以空病毒感染 48 h 或未感染的 HSC-T6 细胞分别在相对分子质量 1.25×10^4 与 1.35×10^5 处出现的 TGFβ1 与 Collα1 抗原染色条带则较强(图 5)。由此提示,在 RNA 水平沉默 HSC-T6 细胞 TGFβ1 可有效抑制其 Collα1 的表达。

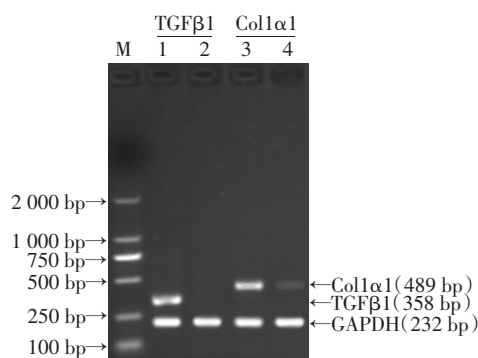


1: TGFβ1 shRNA 感染的 HSC-T6 细胞; 2: 空病毒感染的 HSC-T6 细胞; 3: 未感染的 HSC-T6 细胞

图 5 TGFβ1 shRNA 对 HSC-T6 细胞 TGFβ1、Collα1 蛋白表达的影响

2.6 TGFβ1 shRNA 对 HSC-T6 细胞 TGFβ1 及 Col1α1 基因表达的影响

以经 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒感染 48 h 的 HSC-T6 细胞总 RNA 为模板,在 mRNA 水平未能检测到 TGFβ1 基因的表达,能检测到 Col1α1 基因的较弱表达,以空病毒感染 48 h 或未经感染的 HSC-T6 细胞总 RNA 为模板,在 mRNA 水平,均能检测到 TGFβ1 与 Col1α1 基因的较强表达(图 6)。由此提示,重组慢病毒 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 能在 mRNA 水平有效沉默 HSC-T6 细胞的 TGFβ1,并下调 Col1α1 基因的表达。



M:DNA 标准(DL 2 000);1,3:空病毒感染的 HSC-T6 细胞;2、4:TGFβ1 shRNA 感染的 HSC-T6 细胞

图 6 TGFβ1 shRNA 对 HSC-T6 细胞 TGFβ1、Col1α1 基因表达的影响

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝脏损伤修复过程中,肝内结缔组织异常增生的一病变。其特征是 ECM 的生成与降解失衡,导致以 Col1α1 为主的 ECM 的过度沉积,最终导致肝功能减弱。

HSC 位于 Disse 间隙,紧贴肝窦内皮细胞和肝细胞,正常肝脏中 HSC 的数目较少,占肝细胞总数的 5%~8%,富含 VitA 脂滴,参与 VitA 代谢和合成 ECM^[3],与 ECM 的过度沉积密不可分,是肝病理情况下 ECM 沉积的主要细胞来源,在肝纤维化过程中,活化的 HSC 起主导作用,活化的 HSC 大量增殖,发生表型改变并产生过多的 ECM。

HSC-T6 细胞株由 SV40 的 T 抗原感染大鼠原代肝星状细胞而来,可表达与分泌胶原基质,是活化型的肝星状细胞株,是研究肝纤维化相当理想的模型^[4]。

急性或慢性肝损害时,肌成纤维细胞生成大量胶原纤维,其中以 I、III 型胶原为主,而 I 型胶原(Col1α1)增加最为显著,大量 I、III 型胶原沉积在 Disse 腔,使肝窦内皮细胞间空隙减少,从而促进肝纤维化的发生、发展。Col1α1 是肝纤维化及肝硬化时细胞外基质的主要成分,其表达水平是反映肝纤维化程度强弱的重要指标,Col1α1 的大量合成是肝纤维化发生发展的中心环节。TGFβ 对肝脏的正常及病变起着重要的作用^[5],有 6 种亚型:TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、

TGFβ1β2、TGFβ4、TGFβ5。肝纤维化的形成是多细胞因子共同作用的结果,其中 TGFβ1 是最主要的肝纤维化促进因子^[6-7]。TGFβ1 在肝细胞中不仅调节作为组织损伤正常反应的 ECM 沉积,还调节病理性反应的 ECM 沉积。TGFβ1 在健康人肝脏中主要由肝窦内皮细胞、Kupffer 细胞表达,HSC 表达较少,但当肝脏损伤时,HSC 表达 TGFβ1 明显增多。在肝纤维化过程中,TGFβ1 与 Col1α1 的改变具有明显的一致性,TGFβ1 通过直接或间接作用激活 HSC,增加以 Col1α1 为主的 ECM 的产生,减少以 Col1α1 为主的 ECM 的降解,抑制 TGFβ1 的产生,阻断其分泌放大过程,可减少 ECM,尤其是 Col1α1 的合成。TGFβ1 是肝纤维化的重要始动因子,可见,沉默 TGFβ1 将是防治肝纤维化的重要手段之一。采用反义寡核苷酸、药物等法抑制 TGFβ1 的表达或生物学功能可减少细胞外基质的产生和纤维蛋白的沉积^[8-9]。但效果仍欠佳,而近年来迅猛发展的 RNAi 技术为通过基因的沉默措施以减少细胞外基质的产生和纤维蛋白的沉积提供了新的策略。

RNAi 现象是指内源性或外源性双链 RNA(double strands RNA, dsRNA)与细胞内的同源序列 mRNA 相结合,并使之降解的现象,是一种序列特异性的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing)^[10]。RNAi 技术具有高特异性、高效性与高稳定性的特点^[11],已成为基因功能和信号传递系统上下游分子相互关系研究的有力工具。但此项技术的应用受限于在哺乳动物细胞内转染短链 RNA 仅能持续几天,而慢病毒载体技术则可以实现长时间的基因表达抑制,更适合于体内实验需要^[12]。

因此,我们根据大鼠 TGFβ1 基因 CDs 序列,设计与筛选出 TGFβ1 基因的 3 个干扰靶点。采用 RT-PCR 从 3 个干扰靶点中筛选到 TGFβ1 基因的最佳干扰靶点。设计并合成针对最佳干扰靶点的 shRNA 靶序列,连入 pGreenPuro 载体,成功构建了 pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒载体,实现了该慢病毒载体对 HSC-T6 细胞的有效感染。RT-PCR 与 Western blot 检测证实,pGreenPuro/TGFβ1 shRNA 慢病毒载体能介导 TGFβ1 shRNA 有效沉默 HSC-T6 细胞的 TGFβ1 表达,同时下调 Col1α1 的表达。提示 TGFβ1 shRNA 可能通过下调 HSC 的激活信号,使 HSC 的以 Col1α1 为主的 ECM 的产生减少,以达缓解或抑制肝纤维化之目的。提示 TGFβ1 shRNA 可能是肝纤维化防治的重要新手段之一。

本研究的不足在于干扰 TGF-β 后,仅在 mRNA 与蛋白水平检测了 Col1α1 的表达情况,对其分泌情况及其他 ECM,如 III 型胶原等的变化也应做较为全面的探讨,这是我们下一步将进行的研究内容之一。

参考文献:

[1] Mann D A, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2010, 52(6): 949 - 950.

[2] Xu L, Zheng N, He Q, et al. Puerarin, isolated from Pueraria lobata (Willd.), protects against hepatotoxicity via specific inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling pathway, thereby leading to anti-fibrotic effect [J]. Phytomedicine, 2013, 20(13): 1172 - 1179.

[3] Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(8/9): 1639 - 1642.

[4] Vogel S, Piantedosi R, Frank J, et al. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism *in vitro* [J]. J Lipid Res, 2000, 41(6): 882 - 893.

[5] Baghy K, Iozzo R V, Kovalszky I. Decorin-TGF β axis in hepatic fibrosis and cirrhosis [J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(4): 262 - 268.

[6] Inagaki Y, Higashiyama R, Higashi K. Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(Suppl 2): 85 - 88.

[7] Gressner O A, Rizk M S, Kovalenko E, et al. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(7 Pt 1): 1024 - 1035.

[8] Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, et al. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology [J]. Endokrynol Pol, 2013, 64(5): 384 - 396.

[9] Ieronimakis N, Hays A L, Janebodini K, et al. Coronary adventitial cells are linked to perivascular cardiac fibrosis via TGF β 1 signaling in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 63: 122 - 134.

[10] Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(3): 345 - 360.

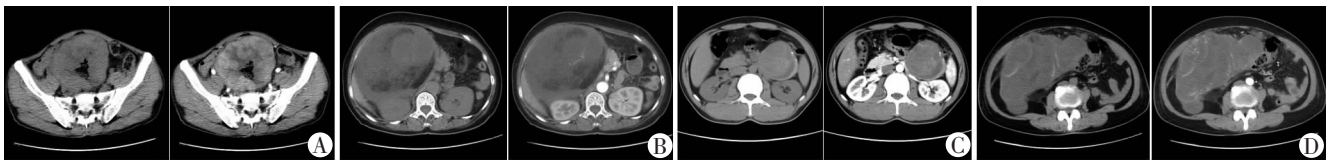
[11] Chen J, Xie J. Progress on RNAi-based molecular medicines [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 3971 - 3980.

[12] Zeng Z, Zhang C, Chen J. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-STAMP expression inhibits the fusion and resorptive activity of human osteoclasts [J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(4): 409 - 416.

(收稿:2013-11-20;修回:2013-12-13)

(编辑 王红)

(上接 455 页)



左:平扫;右:增强扫描;A:病例1;B:病例2;C:病例3;D:病例4

图1 4例腹膜后恶性神经鞘瘤患者CT表现

2 讨论

恶性神经鞘瘤又称神经纤维肉瘤,来源于周围神经少见的软组织肉瘤,常见于四肢和躯干而罕见于腹膜后。腹膜后恶性神经鞘瘤发病年龄为20~50岁^[2],本组4例与此相符。

本组4例腹膜后恶性神经鞘瘤的CT特点与文献报道的异同:①恶性神经鞘瘤平均直径约8.6cm^[3],本组4例中3例肿块都在10cm以上,这可能与本组病例发现晚有关;②由于腹腔空间较大及腹膜后组织的疏松使得肿块生长非常迅速,导致血供不均匀,因此常伴有变性坏死^[4],内部还可见钙化,在CT平扫时肿块内表现为混杂密度。本组1例内部见脂肪成分,目前仅见良性神经鞘瘤含脂肪成分的报道^[5]。这与神经组织内含有脂质成分有关,但这种脂质成分相对于脂肪肉瘤非常少,因此,笔者认为可能由于腹膜后恶性神经鞘瘤迅速变性坏死而掩盖脂质成分而导致不易在其中发现,本例见到脂肪成分也可能是侵犯周围脂肪间隙引起。增强后呈轻中度持续性强化甚至可达到延迟期,呈斑片状、岛屿状、网格状^[6]。本组3例均为不均匀的轻中度强化,但有1例未见明显强化。这可能是由于神经源性肿瘤本身的血供不丰富,而腹膜后恶性神经鞘瘤由于生长迅速,供血不足而引起强化不明显的现象;③周围组织器官均不同程度受压;④本组4例的包膜相对比较清晰完整,与文献^[1,3]报道肿瘤包膜多不完整不相符,这可能与其侵袭性强弱有关;⑤文献^[7]报道少数病例病灶呈现“靶征”,本组4例无此征象。有研究认为靶征是良性神经鞘瘤的特征性表现^[8],但本病同样具有良性神经鞘瘤类似的Antoni A区和

Antoni B区,笔者认为腹膜后恶性神经鞘瘤生长迅速改变了其分布区域而看不到靶征,如早期发现也有可能发现这种征象。

综上,腹膜后恶性神经鞘瘤作为腹膜后罕见的恶性肿瘤,其内成分组杂多变,因此,对于腹膜后肿块在除外脏器来源后因考虑到本病的可能性。

参考文献:

[1] 宋曼,洪楠. 腹膜后恶性外周神经鞘瘤1例[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(8): 1728.

[2] 倪莲芳,赵雅妮,刘新民. 恶性神经鞘瘤25例临床分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(3): 204 - 206.

[3] 吴建明,周建军,马周鹏,等. 原发腹膜后恶性神经鞘瘤的MSCT表现及其病理基础[J]. 放射学实践, 2010, 25(6): 673 - 676.

[4] Hughes M J, Thomas J M, Fisher C, et al. Imaging features of retroperitoneal and pelvic schwannomas [J]. Clin Radiol, 2005, 60(8): 886 - 893.

[5] 王一,李姗姗,尹相媛,等. 周围神经鞘瘤的CT和MRI分析[J]. 医学影像学杂志, 2012, 22(1): 71 - 74.

[6] 刘连锋,赵明曾,焦新强. 胸、腹部恶性神经鞘瘤的CT表现[J]. 实用放射学杂志, 2005, 21(8): 823 - 825.

[7] 周建军,王建华,曾蒙苏,等. 腹膜后恶性神经鞘瘤的影像表现[J]. 中华放射学杂志, 2009, 43(4): 432 - 434.

[8] Bhargava R, Parham D M, Lasater O E, et al. MR imaging differentiation of benign and malignant peripheral nerve sheath tumors: use of the target sign [J]. Pediatr Radiol, 1997, 27(2): 124 - 129.

(收稿:2013-11-27;修回:2013-12-23)

(编辑 汪勤俭)