

# 长链非编码 RNA MEG3 抑制食管癌细胞增殖和侵袭作用研究\*

冯晓倩, 向代军, 王海<sup>△</sup>(解放军总医院临床检验科, 北京 100853)

**【摘要】** 目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)MEG3 对食管癌细胞增殖和侵袭等生物学行为的调控作用。方法 收集食管癌手术患者的肿瘤组织 42 例(肿瘤组)及与其配对的肿瘤旁正常食管组织 42 例(对照组), 通过实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 MEG3 的表达水平并比较其在肿瘤和正常组织中的表达差异; 采用聚乙烯亚胺(PEI)和脂质体分别进行 MEG3 过表达或干扰消除实验; 采用噻唑蓝(MTT)、Transwell 小室来对各组的 KYSE30 细胞的增殖活性和侵袭活性进行检测。结果 RT-PCR 的结果显示, 与正常组织相比, lncRNA MEG3 在食管癌组织中呈现低表达。过表达 MEG3 抑制食管癌细胞系 KYSE30 细胞增殖, 敲除 MEG3 之后, 能够增加食管癌细胞的增殖和侵袭作用。结论 lncRNA MEG3 参与食管癌的发生和发展, 在食管癌中作为一个肿瘤抑制基因发挥着关键作用。

**【关键词】** MEG3; 长链非编码 RNA; 食管癌; 增殖; 侵袭

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0153-04

Study on effect of long non-coding RNA MEG3 for inhibiting proliferation and invasion of esophageal carcinoma cells\*

FENG Xiao-qian, XIANG Dai-jun, WANG Hai<sup>△</sup> (Department of Clinical Laboratory, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the regulating effect of long non-coding RNAs (lncRNAs) MEG3 on the biological behaviors of proliferation and invasion in esophageal cancer cells. **Methods** 42 samples of tumor tissue (tumor group) in the operative patients with esophageal cancer and 42 samples of paracancerous normal esophageal tissue (control group) were collected and the expression level of MEG3 was detected by using real-time quantitative PCR (RT-PCR). The expression differences of MEG3 were compared between the tumor tissue and the normal tissue. Polymine (PEI) and liposome were adopted to conduct the over-expression or the interference elimination tests of MEG3; MTT assay and Transwell chamber were performed to detect the proliferation and invasion activities of KYSE30 cell in each group. **Results** The RT-PCR results revealed that compared with the normal tissue, lncRNA MEG3 showed the low expression in esophageal cancer tissue. Moreover, over-expression of MEG3 inhibited KYSE30 cell proliferation, however, after eliminating MEG3, the proliferation and invasion of esophageal cancer cells were increased. **Conclusion** lncRNA MEG3 participates in the development and progression of esophageal cancer and plays a key role as a tumor inhibiting gene in esophageal cancer.

**【Key words】** MEG3; long non-coding RNA; esophageal cancer; proliferation; invasive

食管癌在世界范围内广泛分布, 它在肿瘤发生率上排于疾病的第 9 位, 在肿瘤相关死亡中排在第 6 位, 其中男性患者多于女性患者<sup>[1-2]</sup>。近年来的研究表明, 长链非编码 RNA (lncRNA) 的表达紊乱参与多种疾病的发生、发展, 尤其在肿瘤的发生中扮演着重要的作用<sup>[3-6]</sup>。因此, 确定肿瘤相关的 lncRNA 并且深度解析其分子与生物学功能对阐明肿瘤的发生、发展起到至关重要的作用。MEG3 定位在 14 号染色体的 q32 区域, 编码一个肿瘤抑制的 lncRNA, 近年研究表明 MEG3 参与多种肿瘤的发生、发展<sup>[7-8]</sup>。MEG3 在许多正常组织中表达, 但是在一些人类肿瘤中是表达缺失的, 包括胶质瘤、肝癌、脑膜瘤及膀胱癌<sup>[9-11]</sup>。研究发现 MEG3 启动子去甲基化及基因上游差异甲基化区域改变是 MEG3 在肿瘤中表达缺失的主要原因。在人的角质细胞瘤细胞系中, MEG3 基因的过表达可以诱导细胞生长阻滞、促进细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。然而, 关于 MEG3 在食管癌的表达水平与食管癌的发生、发展仍不清楚。本文通过应用实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR)、噻唑蓝 (MTT)、Tran-

swell 小室检测其对食管癌细胞的增殖和侵袭活性, 对该 lncRNA 在食管癌中的作用进行初步的研究, 为将来开发新的食管癌临床诊断试剂盒提供一定的实验基础, 并且为研发新的治疗食管癌的药物提供新的治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 选择 2010~2014 年本院病理科收集的通过手术切除食管癌患者的肿瘤组织 42 例(肿瘤组)及患者自身肿瘤旁正常食管组织 42 例(对照组), 其中男 28 例, 女 14 例, 平均年龄 63 岁。所有患者均未接受过其他治疗手段(包括放疗、化疗和细胞治疗), 手术切除食管癌变组织后, 立即放到液氮里面冻存, 以便后续提取 RNA 使用。

**1.2 试剂及材料** 食管癌细胞系 KYSE30 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库, 并在本科室进行传代保存。Transwell 小室购自 Corning 公司; Matrigel 基质胶购自 BD Biosciences 公司。各种细胞培养基、青链霉素、MTT 试剂、二甲亚砜 (DMSO) 均购自北京索莱宝公司; 各种引物在北京华大

\* 基金项目: 国家科技基础条件资助项目(2005DKA32403-31)。

作者简介: 冯晓倩, 女, 本科, 技师, 主要从事临床检验工作。 △ 通讯作者, E-mail: wanghai301@126.com。

基因公司合成;转染试剂 Lipofectine2000、TRIzol 均购自 Invitrogen;反转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 抽提、反转录及 RT-PCR 反应 细胞总 RNA 提取使用 TRIzol 方法,然后用 Nanodrop 微量定量仪测定其纯度及浓度。根据 TAKARA 试剂盒的操作说明进行反转录反应,合成 cDNA,再以 cDNA 为模版进行 RT-PCR 检测 MEG3 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因的表达水平,其中 GAPDH 作为内参。其中,聚合酶链反应(PCR)反应体系为 20  $\mu$ L,反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min,95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 33 个循环。然后根据 MEG3 产物的荧光强度比上 GAPDH 扩增产物的荧光强度的相对量计算 MEG3 的相对表达情况,其中每个实验进行 3 次重复实验。以 ddH<sub>2</sub>O 为模版扩增的反应作为 PCR 扩增的阴性对照,实验中使用的 PCR 引物如下:MEG3 上游,5'-CTG CCC ATC TAC ACC TCA CG-3'和 MEG3 下游,5'-CTC TCC GCC GTC TGC GCT AGG GGC T-3';GAPDH 上游,5'-GTC AAC GGA TTT GGT CTG TAT T-3'和 GAPDH 下游,5'-AGT CTT CTG GGT GGC AGT GAT-3'。

1.3.2 通过特异的小干扰 RNA (siRNA) 来抑制 lncRNA MEG3 的表达 使用脂质体 Lipofectine2000 进行 siRNA 干扰实验,具体操作步骤如下:将 6  $\mu$ L Lipofectine2000 加入 500  $\mu$ L 的 Opti-MEM 中室温放置 5 min,然后再将 5  $\mu$ L MEG3 的 siRNA(5'-UUA GGU AAG AGG GAC AGC UGG CUG G-3')加入 500  $\mu$ L Opti-MEM 中混匀,然后将 Lipofectine2000 和 siRNA 混合物在室温放置 20 min 后,将其分别滴入培养有 KYSE30 细胞的培养皿中,混匀培养。转染 48 h 后使用 RT-PCR 检测 siRNA 靶向 MEG3 的干扰效率。

1.3.3 使用聚乙烯亚胺(PEI)转染 pcDNA3-MEG3 过表达质粒 在 1.5 mL 的 EP 管中加入 200  $\mu$ L 无血清、无抗菌药物的 RPMI1640 培养基,然后加入 6  $\mu$ L PEI 和 2  $\mu$ g pcDNA3-MEG3 质粒,涡旋震荡 10 s 后,在室温放置 15 min 加入到各组的细胞中,在转染后 12 h 后换液,转染 48 h 后使用 RT-PCR 检测其过表达情况和转染效率。

1.3.4 细胞体外侵袭实验 使用无血清 RPMI1640 培养基稀释 Matrigel,每孔使用 100  $\mu$ L Matrigel 包被 Transwell 小室。使用胰酶和乙二胺四乙酸(EDTA)消化 MEG3 过表达的 KYSE30 细胞制备单细胞悬液然后再用无血清培养基调整细胞浓度为 2.0 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL,将 200  $\mu$ L 各组细胞悬液移入 Transwell 小室内,再将 Transwell 小室植入 6 孔板内,然后在 Transwell 小室下层孔中加入 1 mL 含 20% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 的完全培养基,培养箱孵育 36 h,取出小室,用干净棉签擦去上室面细胞及 Matrigel,使用甲醛固定,再用结晶紫染色,在显微镜下计数至少 5 个高倍镜视野穿膜的细胞,计算每个视野平均穿膜细胞数,作为评价其侵袭能力的指标。

1.3.5 BD Matrigel 基质胶克隆形成实验 在进行实验前,将 BD Matrigel 基质胶放置在 4  $^{\circ}$ C 冰箱解冻过夜,将 1 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL 细胞与 1 mL 的 BD Matrigel 基质胶均匀混合后铺在 6 孔板中,在 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,在每个孔中补加入 2 mL 的含有 10% FBS 的培养基,将细胞放在培养箱里面培养,每隔 3 d 更换新鲜培养液,连续培养观察 2 周左右,然后在普通显微镜下观察拍照。

1.3.6 细胞增殖检测实验 分别将敲除 MEG3 或过表达 MEG3 的 KYSE30 细胞进行胰酶和 EDTA 消化后,制备成单

细胞悬液,按照 2 $\times$ 10<sup>3</sup> 个/孔的密度接种于 96 孔板,每孔加入 10%FBS 的 RPMI1640 培养基,培养于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养,贴壁后无血清培养基饥饿 24 h,然后正常培养基培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/mL)20  $\mu$ L,放置于 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后弃上清液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO 用于溶解形成的结晶紫,并于酶标仪上检测吸光度值,然后计算出相对的细胞增殖活性。每个实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MEG3 在正常组织和食管癌组织中的表达差异 lncRNA MEG3 在食管癌组织的表达水平明显低于食管正常组织的表达(*P*<0.05),提示 MEG3 的表达下调可能与食管癌的发生、发展有关系,其可能作为一个肿瘤抑制基因的角色参与食管癌的发生。见图 1。

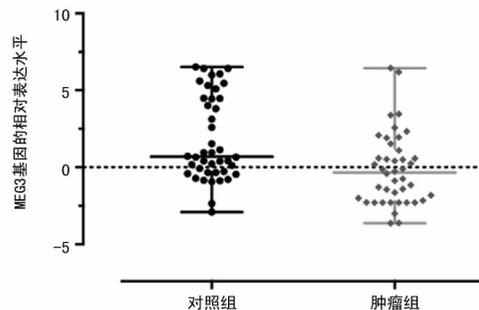


图 1 lncRNA MEG3 在正常食管和食管癌组织中的表达

2.2 建立 MEG3 高表达和抑制的食管癌细胞 建立 MEG3 过表达细胞株,将食管癌细胞分为空白组(不做任何转染处理)、转染了对照的空载体组和 MEG3 过表达载体组,RT-PCR 结果发现 MEG3 过表达载体组与空白组及空载体组相比能够明显上调 MEG3 的表达水平(*P*<0.05),见图 2。这一结果表明构建的 pcDNA3-MEG3 质粒能够有效地增加 MEG3 的表达,为后续的功能实验的研究奠定了基础。除了构建 MEG3 高表达的细胞株之外,另设计针对 MEG3 的 siRNA,从而建立 MEG3 低表达的细胞株,通过 RT-PCR 的方法鉴定其干扰效率,结果表明 MEG3 抑制组与空白组相比,能够明显降低 MEG3 的表达水平(*P*<0.05),见图 3。结果表明该特异性作用于 MEG3 的 siRNA 能够有效地干扰其靶基因的表达。

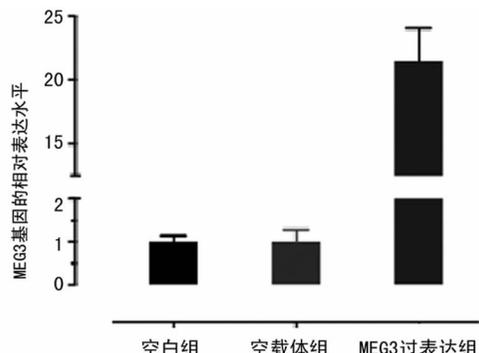


图 2 转染 pcDNA3-MEG3 能够上调 MEG3 的表达

2.3 lncRNA MEG3 的过表达抑制 KYSE30 细胞增殖活性 在 MEG3 高表达的食管癌细胞中通过 MTT 方法进行细胞增殖活性的检测。过表达 MEG3 后,KYSE30 细胞的增殖活性

明显降低 ( $P < 0.05$ ), 这一结果表明了 MEG3 在食管癌发生中作为一个参与肿瘤抑制的 lncRNA, 参与食管癌的发生、发展。见图 4。

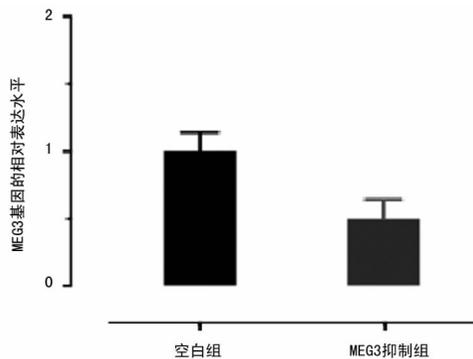
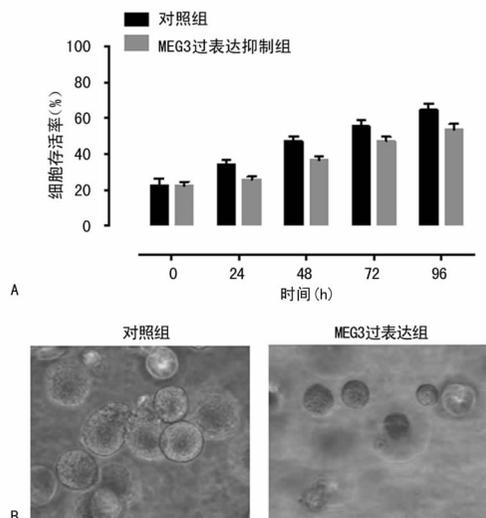


图 3 siMEG3 特异地干扰 lncRNA MEG3 的表达



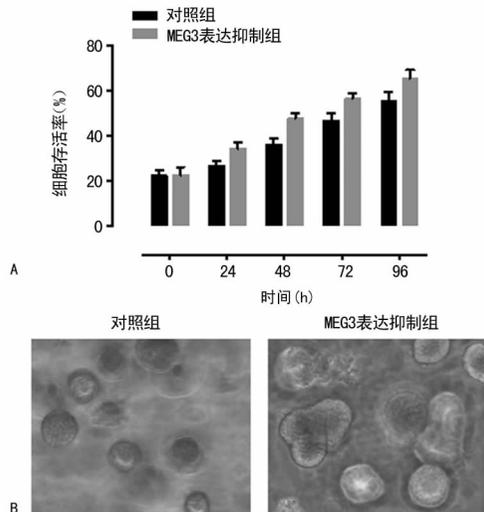
注: A 为 MTT 实验检测过表达 MEG3 对细胞增殖影响, 与对照组相比, 过表达 MEG3 显著下调 KYSE30 细胞的增殖活性; B 为 BD Matrigel 基质胶克隆形成实验, 与对照组相比, 过表达 MEG3 能够抑制食管癌细胞的克隆大小。

图 4 过表达 MEG3 抑制 KYSE30 细胞增殖

**2.4 抑制 MEG3 的表达促进 KYSE30 细胞的增殖活性** 为了进一步地证实 MEG3 在食管癌细胞增殖活性中的作用, 通过转染 siRNA 的方法干扰 MEG3 的表达, 构建 MEG3 低表达的食管癌细胞株, MTT 实验结果显示敲除 MEG3 后, KYSE30 细胞的增殖活性明显增加 ( $P < 0.05$ ), 说明了 lncRNA MEG3 具有肿瘤抑制基因活性, 能够抑制肿瘤细胞的增殖。见图 5。

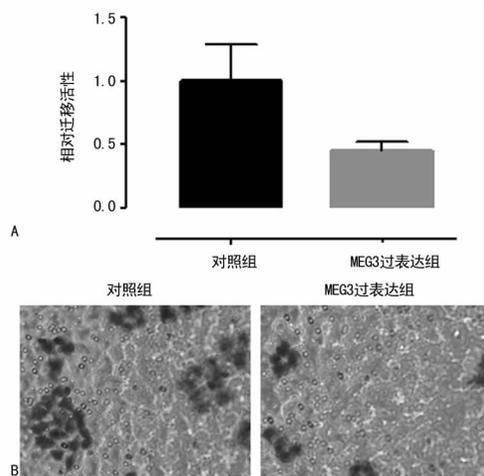
**2.5 MEG3 影响 KYSE30 细胞侵袭迁移能力** 应用 Transwell 小室实验来分别研究过表达或抑制 MEG3 表达对食管癌细胞的侵袭迁移的影响, 实验结果表明过表达 MEG3 后, 食管癌细胞的侵袭活性降低 1.5 倍左右, 两组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。同时, 为了进一步地确认 MEG3 在食管癌细胞增殖活性中的作用, 通过转染 siRNA 的方法干扰掉 MEG3 的表达, 设计 MEG3 特异的 siRNA 转染食管癌细胞从而来抑制 MEG3 的表达水平观察食管癌细胞的侵袭能力, 结果表明敲除 MEG3 后, 食管癌细胞的侵袭活性增加 2 倍左右, 对照组与 MEG3 表达抑制组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 7。综上所述表明了 MEG3 作为一个肿瘤抑制的 lncRNA 参与食管癌的侵袭和转移能力的调控, 参与食管癌的

发生、发展过程。



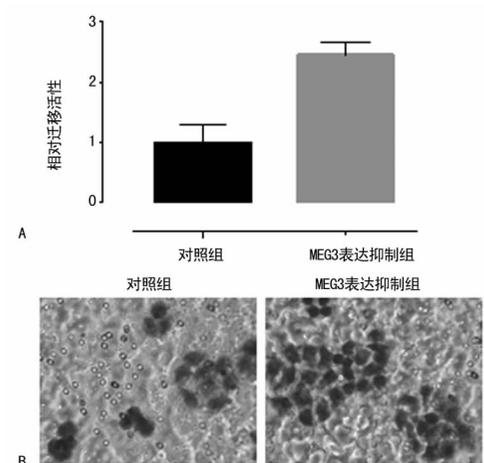
注: A 为 MTT 实验检测抑制 MEG3 对细胞增殖影响; B 为 BD Matrigel 基质胶克隆形成实验, 抑制 MEG3 表达促进食管癌细胞的克隆增殖能力。

图 5 抑制 MEG3 表达促进 KYSE30 细胞增殖



注: A 为 Transwell 小室结果; B 为显微镜下直观图。过表达 MEG3 能够显著抑制食管癌细胞的侵袭活性。

图 6 MEG3 参与调控 KYSE30 细胞的侵袭活性



注: A 为 Transwell 小室结果; B 为显微镜下直观图。抑制 MEG3 的表达能够显著上调食管癌细胞的侵袭能力。

图 7 抑制 MEG3 表达促进 KYSE30 细胞的侵袭能力

### 3 讨 论

食管癌是人类最常见的恶性肿瘤之一<sup>[2]</sup>。虽然近年来采用了手术、新辅助化疗、放射性及生物治疗等多种手段治疗结合的方法来治疗食管癌,但食管癌患者的预后仍然较差,5 年的总体生存率仍很低<sup>[1]</sup>。食管癌病理类型中 90% 为鳞状细胞癌,鳞状细胞癌由于对放化疗不敏感等原因,其预后较腺癌更差<sup>[12]</sup>。到目前为止,影响食管癌的发病机制及发展预后的因素依然不清楚,因此寻找影响食管癌形成发展及评价患者预后的指标将有很大意义。

在本研究中发现,lncRNA MEG3 在食管癌组织的表达与食管正常组织相比明显下调。为了验证 MEG3 表达的改变在食管癌发生中的作用,作者在食管癌细胞中进行了 MEG3 过表达和抑制的功能学实验,结果表明在食管癌细胞中过表达 MEG3 抑制细胞的增殖和侵袭活性,然而下调 MEG3 的表达促进食管癌细胞的增殖和侵袭能力。这些发现表明 lncRNA MEG3 作为一个肿瘤抑制基因在食管癌中发挥作用,它的缺失或低表达参与食管癌的发生、发展。因此,MEG3 在食管癌的发生上起着关键的作用,可作为未来的食管癌治疗的靶点。

最近,很多 lncRNA 被发现,研究发现 lncRNA 通过多种方式调控参与多种生物学过程的基因的表达,例如调控 mRNA 的剪切、参与影响 RNA 的降解、调控 mRNA 的翻译<sup>[3,6]</sup>。并且,这些 lncRNA 的表达紊乱还影响细胞内的表观调控信息,提供进展性和不可控性的细胞增殖优势<sup>[4]</sup>。表观修饰主要包括 DNA 区域的修饰(如 DNA 甲基化和去甲基化修饰)、在特定氨基酸区域的组蛋白修饰(如乙酰化、甲基化和磷酸化修饰)及染色质重塑;这些修饰普遍认为参与基因的表达调控。除了遗传因素的改变,肿瘤抑制基因启动子区的甲基化变化在肿瘤的起始和发展过程中具有重要的作用,因此,肿瘤抑制基因的甲基化改变可以作为潜在的肿瘤标记。目前,一些基因的表观遗传学改变在食管癌的发生、发展中参与重要的功能作用,例如一些基因涉及细胞周期调控(p16)、细胞凋亡(DAPK)、DNA 损伤修复(BRCA1 和 GSTP1)。随着研究的深入,除了蛋白编码基因之外,非编码 RNA 同样受到甲基化的调控,并参与食管癌的发生、发展,因此,lncRNA 的发现为填补以前的肿瘤基因与抑癌基因网络提供依据。

最近的研究开始慢慢解开 lncRNA 的神秘面纱,包括 lncRNA 在肿瘤发生的重要性。一个比较知名的 lncRNA HOTAIR 参与多种肿瘤的发生,它可以在多种肿瘤里组成性的高表达并可以作为多种肿瘤患者预后和转移的标志<sup>[4,13-14]</sup>。关于 HOTAIR 参与调控的机制研究表明它可以通过其 5' 和 3' 结构域分别结合 PRC2 和 LSD1 复合体参与肿瘤相关基因的表达<sup>[14-15]</sup>。越来越多的证据表明 lncRNA 能够在不同层面上参与基因的表达调控,包括转录水平、转录后修饰水平等。值得注意的是人类 20% 的 lncRNA 能够与 PRC2 复合体相互作用从而介导染色质的表观修饰参与基因表达调控。在食管癌中,lncRNA HULC 在食管癌组织中表达显著上调,并在食管癌发生、发展中具有重要作用,关于其机制研究显示 HULC 与 miR-372 的靶基因同源,并能够与靶基因竞争结合 miR-372,从而导致相应 miRNA 的靶基因表达紊乱<sup>[16]</sup>。另外,相似的研究发现 lncRNA SPRY4-IT1 在人黑色素瘤发生中也起着重要作用,关于 SPRY4-IT1 功能研究表明抑制该 lncRNA 的表达导致细胞生长分化缺失,并且增加黑色素瘤细胞的凋亡率<sup>[17]</sup>。

然而,到目前为止 lncRNA 在食管癌中的功能仍不完全清楚,本研究发现与正常食管组织相比,食管癌组织中 lncRNA MEG3 的表达显著下调,并且进行了多种细胞功能实验发现,lncRNA MEG3 可以抑制食管癌的增殖和迁移能力。

综上所述,MEG3 作为一个肿瘤抑制作用的 lncRNA 参与食管癌的发生、发展,提示 MEG3 可以作为食管癌早起诊断的标志之一。

### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349(23): 2241-2252.
- [3] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nature Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- [4] Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease[J]. Trends Cell Biol, 2011, 21(6): 354-361.
- [5] Ponjavic J, Ponting CP, Lunter G. Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long non-coding RNAs [J]. Genome Res, 2007, 17(5): 556-565.
- [6] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.
- [7] Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis [J]. Int J Cancer, 2011, 129(4): 773-779.
- [8] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor[J]. J Mol Endocrinol, 2012, 48(3): 45-53.
- [9] Anwar SL, Krech T, Hasemeier B, et al. Loss of imprinting and allelic switching at the DLK1-MEG3 locus in human hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49462.
- [10] Balik V, Srovnal J, Sulla I, et al. A novel long noncoding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas[J]. J Neurooncol, 2013, 112(1): 1-8.
- [11] Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(6): 1868-1874.
- [12] Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Group. Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2002, 359(9319): 1727-1733.
- [13] Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(28): 11667-11672.
- [14] Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. Science, 2010, 329(5992): 689-693.
- [15] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin (下转第 159 页)

### 3 讨 论

支气管哮喘是具有反复发作、胸闷、气喘、咳嗽等特点的慢性气道疾病<sup>[3]</sup>。其中典型的支气管哮喘,其发作前的先兆症状有打喷嚏、流涕、咳嗽、胸闷等,如不及时处理,可能出现因支气管阻塞而加重的哮喘。同时,在临床上也存在非典型的哮喘,譬如咳嗽变异型哮喘,气道反应性的测定存在高反应性<sup>[4]</sup>,而且一般的抗菌药物、镇咳药、化痰药都治疗无效,当排除咳嗽的其他因素,只有使用支气管解痉剂或糖皮质激素才能有效治疗非典型的哮喘。本文 120 例哮喘患者在治疗前 BPT 有 85 例 AHR 阳性,阳性率为 70.8%,经药物治疗后阳性率大幅降低,说明对患者给予糖皮质激素和扩张支气管治疗取得良好效果。

从表 2 可以看出经过长期的糖皮质激素治疗,支气管哮喘患者的治疗效果出现明显的分级现象,即乙酰胆碱浓度在 49~3 125 μg/mL 和 6 250~25 000 μg/mL 两个阶段。处于 49~3 125 μg/mL 阶段的 AHR 平均阳性例数(22.00 例)大于 6 250~25 000 μg/mL 的 5.25 例;而且在 49~3 125 μg/mL 阶段,患者经治疗后 3、6、12、24 个月的阳性率均高于 6 250~25 000 μg/mL,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );经 Cox 回归模型分析,进一步印证了表 2 中的分级现象,49~3 125 μg/mL 阶段风险比为 0.89,大于 6 250~25 000 μg/mL 阶段风险比(0.73),提示 49~3 125 μg/mL 预后效果低于 6 250~25 000 μg/mL 阶段。进一步说明 BPT 试验可以根据患者预后情况将患者吸入乙酰胆碱浓度分为两个阶段,在 49~3 125 μg/mL 是高度复发阶段,在 6 250~25 000 μg/mL 是低度复发阶段。

本研究结果发现,治疗时随着乙酰胆碱浓度的增加,支气管哮喘患者的 AHR 阳性率有所降低;但随着 3~24 个月时间的增加,其阳性率依次逐渐增高。分析原因,可能由于过敏原的介入,导致 AHR 阈值的改变<sup>[5]</sup>。由于吸入式糖皮质激素的局部抗炎作用具有良好的选择性,所以在即刻及迟发过敏反应中能够及时缓解支气管阻塞。多项临床研究也证明吸入式糖皮质激素在哮喘治疗中是最有效的抗炎药物<sup>[6-8]</sup>。由于吸入式糖皮质激素在改善肺功能,降低 AHR,缓解症状,降低疾病恶化频率及提高生活质量方面均有明显疗效,所以吸入式疗法被有效地用于运动性哮喘发作的预防中。对于非激素依赖性和激素依赖性的哮喘患者,通过吸入式糖皮质激素的应用可以有效地减少口服糖皮质激素的用量<sup>[9]</sup>,甚至停用,从而减少全身用药的不良反

应。BPT 能够协助哮喘的诊断,作为哮喘治疗的依据,也能够进一步研究哮喘的作用机制。由于 AHR 是哮喘的特征<sup>[10]</sup>,也能阐明高反应性的形成原因,即哮喘的发病机制,因此在支气管哮喘的研究工作中,经常需要在各种条件下,测定支气管的反应性。BPT 在临床上多用于慢性咳嗽、哮喘、变异性咳嗽等的诊断<sup>[11]</sup>,至于 BPT 在哮喘患者的激素治疗预后分级方面,仍未有太多研究。在哮喘患者的治疗中,应加强患者及家

属沟通,帮助患者寻找到明确的过敏原并避免与其接触,如室内尘埃或螨虫;注意患者的体格锻炼,进行皮肤锻炼,以使肺、气管、支气管的迷走神经的紧张状态得到缓和;加强患者的营养,避免精神刺激,避免感冒和过度疲劳等对预防哮喘的发作也有着重要的作用。

综上所述,BPT 在经过糖皮质激素长期治疗后,可以对哮喘患者的治疗效果进行分级,吸入乙酰胆碱浓度在 49~3 125 μg/mL 是高度复发阶段,在 6 250~25 000 μg/mL 是低度复发阶段。

### 参考文献

- [1] Mochizuki H, Arakawa H, Tokuyama K, et al. Bronchial sensitivity and bronchial reactivity in children with cough variant asthma[J]. Chest, 2005, 128(4): 2427-2434.
- [2] 汪秀芹. 支气管激发试验对不典型哮喘的诊断价值[J]. 山东医药, 2010, 50(45): 45-46.
- [3] 屈蕾蕾, 达春和, 刘丽君, 等. 支气管激发试验预测支气管哮喘患者治疗的远期预后分级[J]. 中国全科医学, 2015, 18(8): 960-962.
- [4] Gerbeaux P, Gannier M, Arnal JM, et al. Effects of helium-oxygen mixtures on endotracheal tubes: an in vitro study[J]. J Biomech, 2005, 38(1): 33-37.
- [5] 邹俊, 杨阳, 刘跃建. 哮喘控制测试与支气管激发试验在哮喘管理中的应用[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(5): 70-71.
- [6] French CT, Fletcher KE, Irwin RS. Gender differences in health related quality of life in patients complaining of chronic cough[J]. Chest, 2004, 125(2): 482-488.
- [7] 张皓, 邹宇芬, 黄剑峰, 等. 儿童肺功能检测及评估专家共识[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(2): 104-114.
- [8] 张铁栓, 邵润霞, 徐照珉, 等. 慢性阻塞性肺疾病气道反应性测定的意义[J]. 临床医学, 2001, 21(8): 2-3.
- [9] 方年新, 黄俊伟, 何小兵, 等. 支气管反应活性指数在气道高反应者哮喘的诊断价值[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2010, 31(3): 428-431.
- [10] 欧阳修河, 手立萍, 郑丈涛, 等. 医学教育对哮喘患者治疗依从性的影响[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2004, 1(1): 37-39.
- [11] 李建华, 季云瑞, 张力燕, 等. 支气管激发试验前后小气道功能测定对慢性咳嗽病因诊断的价值[J]. 国际呼吸杂志, 2015, 35(5): 130-132.

(收稿日期: 2015-08-25 修回日期: 2015-10-15)

(上接第 156 页)

state to promote cancer metastasis[J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071-1076.

[16] Wang J, Liu X, Wu H, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(16): 5366-5383.

[17] Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, et al. The melanoma-up-regulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion[J]. Cancer Res, 2011, 71(11): 3852-3862.

(收稿日期: 2015-04-04 修回日期: 2015-10-06)