

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.009

FasL 及 FasL ASODN 在舌鳞癌细胞免疫逃逸中的作用*

何志良¹,陈乔尔²,王承阳¹,曹雷¹,贺成功¹

(1. 河北省承德市中心医院承德医学院第二附属医院 067000;

2. 安徽医科大学附属医院口腔医院口腔颌面外科,合肥 230032)

摘要:目的 研究 Fas 配体(FasL)及 FasL 反义寡脱氧核苷酸(ASODN)在舌鳞癌细胞免疫逃逸中的作用。方法 对人舌鳞癌细胞中 FasL 表达及功能进行检测,设计合成特异 FasL ASODN,转染舌鳞癌细胞,封闭舌鳞癌细胞的 FasL 表达。通过流式细胞术、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和四唑盐(MTT)等方法,观察基因-蛋白-细胞效应。结果 通过 RT-PCR 检测提示在脂质体的量一定的情况下,在一定范围内,ASO 的浓度越高,转染效率越高。MTT/FCM 结果显示 ASO 对 SCC-9 细胞的增殖有明显的抑制作用($P<0.05$)。FCM 对细胞凋亡的检测结果显示反义链组与正义链组、空白对照组及脂质体组相比,总凋亡率有明显差异($P<0.05$)。结论 Fas/FasL 途径是口腔鳞癌细胞免疫逃逸的重要机制之一,可作为免疫治疗的新靶点。

关键词: Fas 配体蛋白质;寡核苷酸类,反义;肿瘤逃逸;舌鳞癌

中图分类号:R730.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)01-0027-04

Effects of FasL and FasL ASODN in immune escape of squamous lingual carcinoma cells*

He Zhiliang¹, Chen Qiaoer², Wang Chengyang¹, Cao Lei¹, He Chenggong¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China;

2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)

Abstract: Objective To research the effects of FasL and FasL ASODN in the immune escape of squamous lingual carcinoma cells. Methods This experiment was planned to conduct the test through the expression and functions of FasL in squamous lingual carcinoma cells, and designed and compounded the specific FasL ASODN to transfect squamous lingual carcinoma cells and block the expression of FasL in squamous lingual carcinoma cells. Such methods as RT-PCR, flow cytometry and MTT had been adopted to conduct the observation from three levels, gene, protein and cell effects. Results The FasL ASO inhibited cell proliferation in a dose- and time-dependent manner within limits ($P<0.05$). The total apoptosis rate was apparently increased ($P<0.05$) in antisense group compared with the control group, the lipofectamine group and the sense group. Conclusion Fas/FasL approach is one of the important mechanisms of the immune escape of oral squamous cell carcinoma cells, and can be the new target for immunotherapy.

Key words: fas ligand protein; oligonucleotides, antisense; tumor escape; tongue squamous carcinoma

舌癌是口腔癌中第一大癌。目前仍不能准确的早期诊断和早期有效治疗。对它的发病机制有学者提出了免疫监视学说,认为免疫系统起了监视机体,识别和杀伤肿瘤细胞作用,而肿瘤细胞能逃避机体的免疫监视系统而无限地生长下去。本实验通过检测 Fas 配体(FasL)反义寡核苷酸(ASODN)转染舌鳞癌细胞前后,FasL 蛋白表达及 mRNA 水平的变化。从基因-蛋白-细胞效应 3 个水平进行观察,旨在进一步证实和探索舌鳞癌细胞通过 Fas/FasL 途径的免疫抑制机制及探讨反义寡核苷酸能否通过有效封闭细胞表面 FasL 表达,使舌鳞癌细胞诱导 T 细胞凋亡的能力减弱,为寻找免疫治疗的新的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及材料 Jurkat 细胞株为中国典型培养物保藏中心产品;SCC-9 细胞株来自美国 ATCC 产品,RPMI-1640 培养液、DMEM/F12 培养液为美国 HyClone 公司产品,PE 标记的小鼠抗人 Fas 抗体,PE 标记的小鼠抗人 FasL 抗体为美国 eBioscience 公司产品,小鼠抗人 FasL 中和性抗体 NOK-2 为美

国 BD 公司产品,流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品,荧光定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品,紫外分光光度仪为尤尼柯仪器有限公司产品,荧光倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 寡核苷酸链的序列合成 参考文献[1]完成,合成 FasL ASODN 5'-CTC TCG GAG TTC TGC CAG CT-3';正义寡脱氧核苷酸(SODN)5'-AGC TGG CAG AAC TCC GAG AG-3';对每条序列两端的各 3 个碱基进行硫代磷酸化修饰,对 5'端进行 FAM 绿色荧光标记。

1.2.2 细胞培养 SCC-9 细胞应用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,在 37℃、5% CO₂ 的条件下进行培养^[2],含有 0.02% 乙二胺四乙酸的 0.25% 胰蛋白酶消化传代;人急性 T 细胞白血病细胞系 Jurkat 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养,1~2 d 换液 1 次,相差显微镜下观察细胞聚集成团时将细胞悬液按 1:4 传代培养。待细胞生长至对数生长期开始实验。

1.2.3 Jurkat 细胞 Fas 蛋白表达量检测 采用 FCM 检测 Jurkat 细胞 Fas 蛋白表达量,取对数生长期的 Jurkat 细胞,阴性对照(同型对照)和实验组;每组 3 个复孔,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,倒掉培养基,PBS 洗 1 次,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。分别加入同型抗体、Fas-PE 抗体,4 ℃ 下避光反应达 30 min;PBS 清洗 1 次,再加入 PBS 500 μ L 作流式细胞仪检测^[3]。以 FSC/SSC 设门,获取门内细胞 10^4 个,以对数放大荧光强度,并将光散射数据存盘,使用 WinMDI 软件进行分析。每个指标重复检测 3 次。

1.2.4 舌鳞癌细胞 FasL 功能检测 调 SCC-9 细胞为 1×10^6 个/mL,每孔取 1 mL 接种至 6 孔培养板,当孔底有 80% 以上被单层细胞覆盖时,则将培养液去除,并冲洗板孔,分组检测。实验 1 组(A 组):SCC-9 细胞每孔加 1×10^6 个/mL Jurkat 细胞 400 μ L;实验 2 组(B 组):SCC-9 细胞每孔加 400 μ L FasL 中和抗体 NOK-2,浓度为 10 μ g/mL,孵育 1 h 后加 400 μ L Jurkat 细胞^[2];对照 1 组(C 组):单独培养 Jurkat 细胞;对照 2 组(D 组):Jurkat 细胞加 400 μ L NOK-2。每组设置 3 个复孔,各补充培养液至 2 mL,培养 24 h 后收集悬浮的 Jurkat 细胞,再以 PBS 清洗 2 次,将细胞以 1×10^6 个/mL 重悬于 $1 \times$ Annexin V Binding Buffer 中。另取试管 1 支,将其中 100 μ L 移至其中,分别加入 PI 10 μ L,Annexin V-FITC 5 μ L,轻轻混匀,在常温下避光孵育 15 min,再加入 400 μ L $1 \times$ Annexin V Binding Buffer,进行 FCM 检测,定量分析细胞凋亡^[4]。以 FSC/SSC 设门,获取门内细胞 2×10^4 个,以对数放大荧光强度,并将光散射数据存盘,使用 WinMDI 软件进行分析。

1.2.5 SCC-9 细胞转染效率检测 采用流式细胞术检测 SCC-9 细胞转染效率,当细胞转染 12 h,以 PBS 冲洗 6 孔培养板板孔,2 次/孔,而后每孔加入 0.25% 胰蛋白酶 1 mL,在显微镜下观察,待细胞间隙增大,加入含血清的培养基,收集细胞,并将其置于流式细胞管中,以 PBS 洗 2 次,细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL,以 PBS 500 μ L 重悬细胞^[5],进行流式细胞术检测。通过检测选出 ASODN 和 Lipo-fectamine™ 2000 的最佳转染比例^[6],为后续试验提供依据。

1.2.6 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 FasL ASODN/SODN 作用前后 FasL mRNA 水平的变化 (1)抽提总 RNA:收集 FasL ASODN/SODN 转染浓度为 0.4 μ mol/L,作用 24 h 的处理组及对照组细胞,抽提总 RNA^[2]。①细胞 ($>1 \times 10^6$) 用 PBS 清洗 2 次,移入 eppendorf 管中。②于细胞沉淀中加入 1 mL Trizol Reagent 吹打均匀,置于室温环境 5 min,使其充分裂解。放入离心机,12 000 \times g,离心 5 min,弃沉淀。③加入氯仿 200 μ L,轻微震荡摇振 15 s,冰上放置 5 min。④4 ℃,12 000 \times g,离心 15 min,另取 1 支 eppendorf 管,取上层水相置入。⑤加入异丙醇 500 μ L,混匀后于室温下放置 10 min。⑥4 ℃,12 000 \times g,离心 10 min,上清液弃之,沉淀为 RNA。⑦用焦碳酸二乙酯(DEPC)水配置 75% 乙醇 1 mL,摇振后充分洗涤、沉淀,4 ℃,8 000 \times g,5 min,上清液弃之,重复洗涤 1 次。⑧上清液弃之,置于无菌干燥环境 10 min,加入 100 μ L 无核糖核酸酶(Rnase)的水,沉淀重悬^[7],-80 ℃ 保存备用。(2)RNA 定量:取上述样品,用 DEPC 水将样品稀释 100 倍,并以 DEPC 水作空白管调零;用紫外分光光度计检测 260 nm 和 280 nm 吸光度(A),计算 RNA 浓度,公式为 RNA 浓度(μ g/ μ L) = $A_{260} \times 40 \times$ 稀释倍数/1 000^[8]。(3)逆转录过

程(反应体系为 20 μ L):①将 1 μ g 总 RNA 加入微量离心管中,并于 70 ℃ 温育 10 min,短暂离心后置于冰上备用。②依照所列顺序加入以下试剂,建立一个 20 μ L 的反应体系。(4)荧光定量 PCR 结果定量分析:目的基因的表达量采用相对定量法计算结果:相对含量(%) = $2^{-\Delta\Delta Ct} - \Delta\Delta Ct = (\text{目的基因 Ct} - \text{内参基因 Ct}) / (\text{对照组} - (\text{目的基因 Ct} - \text{内参基因 Ct}))$ 实验组。

1.2.7 流式细胞术检测 FasL ASODN/SODN 作用前后 FasL 蛋白表达量的变化 消化并收集 0.4 μ mol/L 的 FasL-ASODN/SODN 转染并作用 24 h 的 SCC-9 细胞。实验分为 4 组:脂质体组(转染时仅加脂质体)、正义链组(以脂质体转染 SODN)、反义链组(以脂质体转染 ASODN)、空白对照组(细胞不进行转染),每组各 3 个复管, 1×10^6 个细胞/管;以 PBS 清洗 2 次,细胞沉淀加入 100 μ L PBS,吹打混匀,PE 标记的 FasL 抗体 5 μ L,轻轻吹打,混匀。阴性对照组采用同型对照代替一抗,将其置于 4 ℃ 避光环境 30 min^[9];以 PBS 清洗 1 次,加 500 μ L PBS,采取流式细胞仪进行检测。以 FSC/SSC 设门,获取门内细胞 10^4 个,以对数放大荧光强度,并将光散射数据存盘,使用 WinMDI 软件进行分析。

1.2.8 FCM 检测 FasL ASODN/SODN 作用后 SCC-9 细胞与 Jurkat 细胞共同培养后 Jurkat 细胞凋亡率的变化 胰酶消化收集细胞,PBS 清洗 2 次,调细胞浓度 1×10^6 个/mL;以每孔 2 mL 接种于六孔板中,24 h 后,用 0.4 μ mol/L 的 FasL ASODN/SODN 转染液转染六孔板中的 SCC-9 细胞,并设空白对照组及脂质体对照组,分别作用 48 h 后,以含 10% 胎牛血清的 PMRI-1640 调整 Jurkat 细胞浓度为 2×10^5 个/mL,加入不同处理组和对照组 SCC-9 细胞中,每孔 2 mL^[5],培养 24 h 后收集悬浮 Jurkat 细胞,以 PBS 清洗 2 次,将细胞重悬于 500 μ L \times Annexin V Binding Buffer 之中,与 Annexin V-FITC 5 μ L 混匀后,加入浓度为 250 μ g/mL 的碘化丙啶(PI)5 μ L,混匀,置于室温避光环境 10 min。随后上机分析,光源为 448 nm 氩离子激光器,FITC 受激发后现绿色荧光,PI 现红色荧光,每份标本收集细胞 10^4 个^[10]。结果判断标准见参考文献^[11]:(1)FITC-/PI-为活细胞;(2)FITC+/PI-为早期凋亡细胞;(3)FITC+/PI+为晚期凋亡细胞;(4)FITC-/PI+为坏死细胞。实验重复 3 次。

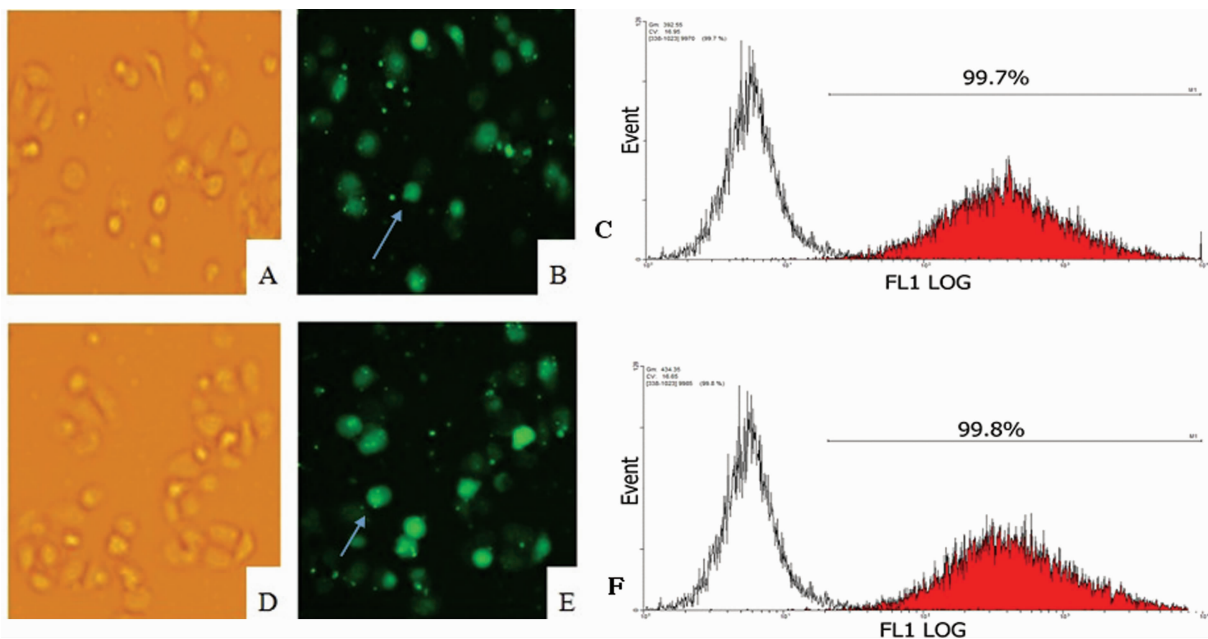
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用方差分析及 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 荧光显微镜下观察细胞的转染情况及流式细胞术检测的转染效率 转染 6 h 后,通过荧光倒置显微镜下观察转染的情况,并在转染 12 h 后用流式细胞术检测细胞效率,0.1、0.2、0.4、0.8 μ mol/L ASODN 的转染效率分别为 66.5%、72.6%、99.7%、99.8%。研究结果表明,将脂质体定量,通过流式细胞术检测及倒置显微镜观察发现,随着 FasL ASODN 的浓度在一定范围内增加,其转染效率也随之增加。当浓度为 0.4 μ mol/L 和 0.8 μ mol/L 时,转染效率均为 100% 左右。图 1A、图 1D 分别为 0.4 μ mol/L ASODN 与 0.8 μ mol/L ASODN 转染后的明视野图;图 1B、图 1E 中箭头标注为荧光显微镜下绿色荧光的细胞即为转染成功的细胞。

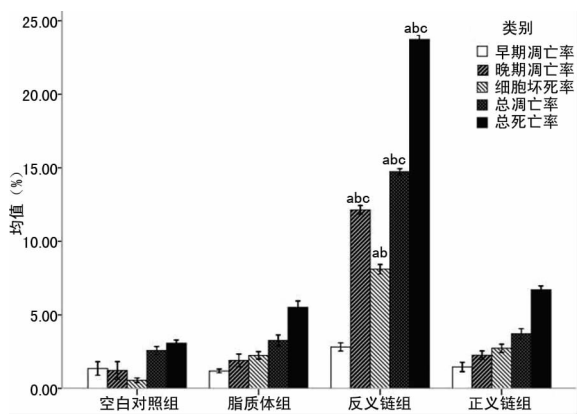
2.2 MTT 法检测 FasL ASODN 转染前后对肿瘤细胞增殖的影响 FasL ASODN 的浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol/L}$ ，采用 MTT 法检测不同时间段对 SCC-9 细胞的增殖的影响。与空白对照组比较，除 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ASODN 外，各反义链组 24 h

的抑制率均有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)；各反义链组 48 h 抑制率与空白对照组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，且随着 ASODN 浓度的升高，抑制作用不断增加，见表 1。



A, B: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ASODN; C: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ASODN 流式检测转染效率结果; D, E: 0.8 $\mu\text{mol/L}$ ASODN; F: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ASODN 流式检测转染效率结果。

图 1 FAM 绿色荧光标记的 FasL ASODN 转染结果示意图 ($\times 200$)



^a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与脂质体组比较; ^c: $P < 0.05$, 与正义链组比较。其中, 正义链组为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 SODN, 反义链组为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 ASODN。

图 2 FasL ASODN 对 SCC-9 细胞凋亡的影响

表 1 FasL ASODN 对 SCC-9 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	抑制率 (%)	
	24 h	48 h
空白对照组	0	0
脂质体组	-2.091 ± 1.112	1.214 ± 1.531
反义链组 ($\mu\text{mol/L}$)		
0.1	2.319 ± 1.520	10.058 ± 0.899^a
0.2	10.518 ± 1.019^a	12.022 ± 1.251^a
0.4	13.779 ± 1.318^a	36.109 ± 1.781^a
0.8	24.370 ± 1.138^a	52.169 ± 1.253^a
正义链组 ($\mu\text{mol/L}$)		
0.4	0.170 ± 1.758	5.854 ± 1.060

^a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

2.3 FasL ASODN 诱导 SCC-9 细胞的凋亡率的变化 转染 6 h 后, 通过倒置显微镜进行观察发现反义链组细胞产生凋亡作用, 且与空白对照组相比明显增高。转染 FasL ASODN 24 h 后, 流式细胞术检测舌鳞癌细胞的凋亡发现各组间凋亡率无明显的差异。而转染 48 h 后, 与空白对照组比较的结果, 同与脂质体组比较的结果相一致, 即反义链组除早期凋亡率外, 其余各项指标差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 反义链组与正义链组比较, 其晚期凋亡率、总凋亡率、总病死率差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

3 讨论

研究表明, 肿瘤的发生和发展与细胞的过度增殖^[12] 和凋亡的减少有关^[13], 1989 年, Yonehara 等^[14] 发现了 Fas 系统及其诱导多种人细胞系发生凋亡的特性, 使其成为重要的凋亡基因之一。肿瘤细胞存在多种免疫逃逸机制, 而 Fas/FasL 系统则在肿瘤免疫逃逸中发挥着极其重要的作用。肿瘤细胞既可以通过 Fas/FasL 系统反击免疫细胞促进 T 细胞凋亡, 从而使肿瘤细胞逃避效应细胞的杀伤和攻击, 实现免疫逃逸; 还能够通过基因突变、异常转录等方式低表达及不表达 Fas 分子, 或者表达无功能的 Fas, 抵抗细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 的杀伤机制, 参与免疫逃逸^[15]。研究表明, 肿瘤细胞对于 FasL 触发信号凋亡的敏感性, 主要依赖于自身表面正常 Fas 蛋白的表达水平, 同时也依赖于自然杀伤细胞 (NK) 和 CTL 细胞表面正常 FasL 蛋白的表达^[16]。以往有研究认为, FasL 表达的升高与肿瘤的生长和转移有着密切的关系, 很多恶性肿瘤中都存在 FasL 表达升高的现象, 如结肠癌、胰腺癌、胃癌等, 其肿瘤细胞表面均存在 FasL 表达, 它能够使周围正常表达 Fas 的细胞凋

亡,或者使浸润到肿瘤内的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)凋亡,FasL 通过与激活的 T 细胞表面 Fas 相结合来诱导 T 细胞凋亡^[17],反击宿主免疫系统,从而实现肿瘤细胞逃避免疫活性细胞的监视,促进肿瘤的发生、发展。口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,目前口腔癌患者中有 45.9% 得的是舌癌,是口腔癌中第一大癌^[18]。目前手术治疗是治疗舌癌的主要手段。但术后会引起进食、吞咽或言语困难等。而由于放疗化疗没有辨别能力,所以需要重复放、化疗,多次放、化疗以后,患者免疫功能下降,抵抗力降低,容易转移,因此免疫治疗、基因治疗等新兴治疗手段应运而生。陈乔尔等^[19]的研究显示,健康人口腔黏膜的 FasL 为阴性表达,鳞癌组织的 FasL 阳性表达率则高达 60.5%,而鳞癌组织中 TIL 的 Fas 阳性表达率可高达 81.6%,表明口腔鳞癌中存在着 Fas/FasL 的表达异常。经过进一步的研究发现并证实,从健康人口腔黏膜→异常增生→口腔鳞癌的发展过程中,FasL 表达表现为逐渐增高^[20]。此外,这一研究结果提示 Fas 系统介导的凋亡异常对于口腔鳞癌的发生、发展具有重要作用,说明 Fas 系统介导的肿瘤逃逸存在于口腔肿瘤中,那么,通过下调 FasL 的表达,则可有效地降低肿瘤细胞的抗凋亡能力,免疫逃逸也有望得以逆转,这一结论无疑为后续研究提供了重要理论依据。

本研究中,将脂质体定量,通过流式细胞术检测及倒置显微镜观察发现,随着 FasL ASODN 的浓度在一定范围内增加,其转染效率也随之增加。结果显示,浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 时,转染效率均接近 100%,因此选用 0.4 $\mu\text{mol/L}$ FasL ASODN 进行后续试验的检测。研究结果显示,脂质体组和 SODN 对 SCC-9 细胞的增殖并未发生抑制作用,不同浓度的 FasL ASODN 对 SCC-9 的增殖存在不同程度的抑制作用,且 FasL ASODN 对 SCC-9 增殖的抑制作用有一定的浓度依赖性和时间依赖性,即随着时间的延长和 ASODN 浓度的增加,FasL ASODN 对 SCC-9 细胞的抑制作用也增加。流式细胞仪的检测显示,反义组与脂质体组、正义组、空白组比较,晚期凋亡率、总凋亡率及总病死率差异有统计学意义($P < 0.05$);而早期凋亡率之间虽有变化,但差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能因为检测凋亡时间为转染后 48 h,造成作用时间相对过长,致使早期凋亡多已发展为晚期凋亡。笔者认为,FasL ASODN 可以促进舌鳞癌细胞 SCC-9 的凋亡,究其原因,是与其逃避免疫系统杀伤的途径有关,研究表明,肿瘤细胞不仅可以通过上调 FasL 表达主动杀伤侵入肿瘤内的 T 细胞凋亡,且能够通过产生可溶性的 sFasL 与自身 Fas 结合,从而封闭 Fas 的结合位点,实现降低肿瘤细胞自身的凋亡^[21],同时使肿瘤周围正常的细胞产生凋亡;这就是肿瘤细胞逃避免疫细胞 Fas 途径攻击并形成肿瘤侵袭的机制之一,且 Fas/FasL 相互作用不但能引起细胞凋亡,也能引起细胞坏死。此即为本研究中 FasL ASODN 能够对 SCC-9 的增殖活性产生抑制以及诱导其凋亡的原因之一,然而由于 Fas 系统介导的凋亡及非凋亡机制较广泛且复杂,具体的机制尚需要进一步研究。

综上所述,本研究从宏观效应方面证明了 FasL ASODN 对于舌鳞癌细胞 SCC-9 的增殖具有明显的抑制作用,体现了其对于舌癌治疗方法探索的重要价值,为后续研究提供了方向。从理论方面分析,通过减低 FasL 的表达,能够减少舌鳞癌细胞对免疫细胞及周围正常细胞的杀伤作用,从而降低其转移与浸润作用。FasL ASODN 具体的作用机制及其作用效应

有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Ji J, Wernli M, Buechner S, et al. Fas ligand downregulation with antisense oligonucleotides in cells and in cultured tissues of normal skin epidermis and basal cell carcinoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(6): 1094-1099.
- [2] 张娇, 刘倩, 王杰, 等. FasL 反义寡核苷酸逆转肝癌细胞免疫逃逸的实验研究[J]. *中国现代普通外科进展*, 2006, 9(3): 147-150.
- [3] 康敏, 钟德君, 李鹏, 等. Fas/FasL 信号传导通路对 NAFLD 大鼠肝细胞凋亡的影响[J]. *重庆医学*, 2011, 40(7): 633-635.
- [4] 方丽, 陈乔尔. FasL 的反义基因在肿瘤治疗中的作用[J]. *安徽医药*, 2013, 17(3): 370-372.
- [5] 方丽, 陈乔尔, 任翠平, 等. FasL 反义寡核苷酸对舌鳞癌细胞 Tca8113 增殖和凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(11): 1300-1303.
- [6] 路秀英, 王垚, 李晓明. 低氧条件下 Stat3 反义寡核苷酸对喉癌细胞 Hep-2 的化疗增敏作用[J]. *中国癌症防治杂志*, 2013, 5(4): 308-311.
- [7] Zheng J, Fu R, Li J, et al. CpG oligonucleotides suppress HepG2 cells-induced Jurkat cell apoptosis via the Fas-FasL-mediated pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(1): 48-54.
- [8] 李广章, 刘长剑, 汤欣. PKC- δ 在 TRAIL 与阿霉素联合诱导骨肉瘤细胞株 MG-63 凋亡中的作用[J]. *中国骨肿瘤骨病*, 2011, 10(3): 281-284, 310.
- [9] 祖谷, 陈乔尔, 胡芳芳, 等. Fas 基因转染联合应用顺铂对舌鳞癌细胞的杀伤作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(9): 890-892, 896.
- [10] 刘海威, 程乐, 吴非, 等. 脂质体转染 survivin 反义寡核苷酸对人胰腺癌细胞凋亡的影响[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2010(10): 1056-1061.
- [11] 郭唐猛, 杨群芳, 刘承云, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤 SOCS-1/3 mRNA 的表达和意义[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(4): 89-92.
- [12] 张薇. 口腔鳞癌细胞 Fas/FasL 的表达及对癌细胞凋亡的影响[J]. *皖南医学院学报*, 2010, 29(2): 92-95.
- [13] Shatnyeva OM, Kubarenko AV, Weber CE, et al. Modulation of the CD95-induced apoptosis; the role of CD95 N-glycosylation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19927.
- [14] Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor [J]. *J Exp Med*, 1989, 169(5): 1747-1756.
- [15] Southwell AL, Skotte NH, Bennett CF, et al. Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(11): 634-643.
- [16] 江磊, 林泓磊, 张长源, 等. 口腔临床常用烤瓷合金对小鼠肺成纤维细胞体外毒性研究[J]. *中国实(下转第 33 页)*

良好,可以继续输液治疗^[11]。液体复苏的反应性指标达标后,采用血管活性药物滴定 MAP 是改善组织灌注的重要方法,Rivers 等^[2]将 65 mm Hg 作为 MAP 达标的最低水平,但更高的 MAP 水平可能有更好的组织灌注。因此有学者建议在实施 EGDT 时将 MAP 水平提高到 75~85 mm Hg 应该作为滴定 MAP 的最佳水平,而 MAP 不低于 65 mm Hg 是达标后血管活性药物撤离试验时的最低需要水平^[5]。

Rivers 等^[2]研究中共约有 65% 的就诊患者 ScvO₂ 低于 70%,平均值约 49%。但在其他脓毒症的相关研究中发现 ScvO₂ 平均值约为 70% 甚至偏高^[12-13],说明很多脓毒症患者常常存在氧供不足合并 ScvO₂ 高水平的情况。因此 ScvO₂ 作为脓毒症患者复苏目标并不一定合适。目前已有大量研究证实,在感染性休克复苏过程中,P(cv-a)CO₂ 可以评估患者组织灌注及氧代谢状态^[14]。Futier 等^[15]研究证实,单纯 ScvO₂ 指导休克复苏的容量管理是不够的,尤其当 ScvO₂ ≥ 70% 时,必须联合 P(cv-a)CO₂ 才能更精确地指导临床,判断复苏成功与否,并提示预后的变化。本研究也证实了这一点。

综上所述,本研究通过改良式 EGDT 治疗感染性休克患者明显提高了患者的生存率,但是仍存在一些不足之处。本研究是回顾性研究,可能存在选择偏倚,所观察的样本量较小,对研究结果可能产生影响。本研究的结论仍需大样本多中心随机对照研究进一步证实。

参考文献:

- [1] 邱海波. 应强化和落实严重感染的早期加强治疗策略[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(2): 1368-1377.
- [2] Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock[J]. N Engl J Med, 2001, 345: 1368-1377.
- [3] Dellinger R, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock[J]. Crit Care Med, 2004, 32(3): 858-873.
- [4] 王蔚, 周愚, 赵灵. 脓毒血症救治中早期目标指导治疗的争议[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(2): 501-504.
- [5] 刘大为, 邱海波. 重症医学: 2010[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 44-48.
- [6] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ES-ICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definition Conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.

- [7] Levinson AT, Casserly BP, Levy MM. Reducing mortality in severe sepsis and septic shock[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2011, 32(2): 195-205.
- [8] Puskarich MA, Marchick MR, Kline JA, et al. One year mortality of patients treated with an emergency department based early goal directed therapy protocol for severe sepsis and septic shock: a before and after study[J]. Crit Care, 2009, 13(5): R167.
- [9] Focht A, Jones AE, Low TJ. Early goal-directed therapy: improving mortality and morbidity of sepsis in emergency department[J]. Jt Comm J Qual Patient Saf, 2009, 35(4): 186-191.
- [10] Nguyen HB, Corbett SW, Steele R, et al. Implementation of a bundle of quality indicators for the early management of severe sepsis and septic shock is associated with decreased mortality[J]. Crit Care Med, 2007, 35(4): 1105-1112.
- [11] Marik PE, Baram M, Vallid B. Does the central venous pressure predict fluid responsiveness? A systematic review of the literature and the tale of seven mares[J]. Chest, 2008, 134(1): 172-178.
- [12] van-Beest PA, Hofstra JJ, Schultz MJ, et al. The incidence of low venous Oxygen saturation on admission to the intensive care unit: a multi-center observational study in the Netherlands[J]. Crit Care, 2008, 12(2): 33.
- [13] Bracht H, Hangi M, Jeker B, et al. Incidence of low central venous oxygen saturation during unplanned admissions in a multidisciplinary intensive care unit: an observational study[J]. Crit Care, 2007, 11(1): R2.
- [14] Vallée F, Vallet B, Mathe O, et al. Central venous-to-arterial carbon dioxide difference: an additional target for goal-directed therapy in septic shock? [J]. Intensive Care Med, 2008, 34(12): 2218-2225.
- [15] Futier E, Robin E, Jabaudon M, et al. Central venous O₂ saturation and venous-to-arterial CO₂ difference as complementary tools for goal-directed therapy during high-risk surgery[J]. Crit Care, 2010, 14(5): R193.

(收稿日期: 2014-08-30 修回日期: 2014-10-16)

(上接第 30 页)

- 用口腔医学, 2012, 5(10): 600-609.
- [17] 王红梅, 张国强, 戴纪纲, 等. 人淋巴瘤细胞 Jurkat 通过 Fas/FasL 途径抑制人肺癌细胞 A549 的免疫逃逸[J]. 中国肺癌杂志, 2010(7): 681-685.
 - [18] 金成日, 金彬, 玄云泽. Ki-67 和 Bcl-2 在延边地区口腔鳞状细胞癌患者中的表达及其意义[J]. 重庆医学, 2012, 41(31): 3316-3318.
 - [19] 陈乔尔, 王元银, 李倩, 等. 口腔黏膜癌前病变和口腔鳞癌组织 Fas/ FasL 的表达及其意义[J]. 临床口腔医学杂志, 2006, 22(7): 413-416.

- [20] 李俊玫, 杨宁, 王行天, 等. 野黄芩苷对人舌鳞癌 Tca8113 细胞周期及 Fas 蛋白表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2013, 29(2): 250-252.
- [21] Fang L, Sun L, Hu FF, et al. Effect of FasL expression in oral squamous cell cancer[J]. Asian Pacific J Cancer Prev, 2013, 14(1): 281-285.

(收稿日期: 2014-09-26 修回日期: 2014-10-31)