

溴脱氧尿嘧啶核苷体外掺入舌癌的初步研究

李新明 赵 强 何荣根 周晓健 陈万涛

摘要 目的:观察溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记在肿瘤增殖研究中的价值。方法:用80 μg/ml的BrdU或碘脱氧尿嘧啶核苷(IdU)体外掺入Tca8113细胞或舌癌组织,标本连续切片与增殖细胞核抗原(PCNA)表达比较;相同孵育时间的细胞与流式细胞术(FCM)定量S期细胞数比较。结果:BrdU标记细胞核大浑圆,呈散在或姊妹细胞分布,子代细胞染色稍淡。BrdU或IdU掺入和PCNA表达之间无显著性差异($P > 0.05$)。FCM测定的S期细胞数显著多于BrdU掺入的细胞数($P < 0.001$)。结论:BrdU标记可用于细胞增殖研究,其应用潜力较大。

关键词 溴脱氧尿嘧啶核苷 舌癌 肿瘤 体外标记

A Study on Tongue Cancer Cell Labeling Using Bromodeoxyuridine (BrdU) Incorporation in vitro

Li Xinming

Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Henan Medical University

Zhao Qiang

Department of Stomatology, Fourth Affiliated Hospital of Henan Medical University

He Ronggen, Zhou Xiaojian, Chen Wantao

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, the Ninth Hospital, Shanghai Second Medical University

Abstract

Objective: The aim of this study is to evaluate of Bromodeoxyuridine (BrdU) label in the proliferation of the tongue cancer. **Methods:** The authors used 80 μg/ml BrdU or iododeoxyuridine (IdU) to label three cases of fresh tissue of tongue cancer and four bottles of Tca8113 cells in logarithmic growth period in vitro. They were fixed and embedded in the routine procedure, and then in serial sections. These specimens were labeled with BrdU polyclonal antibody (1:200), and PCNA monoclonal antibody (1:100), stained using immunohistochemical ABC method. The authors observed the shapes and sizes of those positive cells, counted their label indexes (LI) of BrdU- or IdU-positive cells and PCNA- positive cells respectively. Four bottles of Tca8113 cells were cultured for 1~4 days. One bottle of the cells was every day used in the experimental study about comparing the cells labeled BrdU with those of the S phase of FCM in same cultural time. **Results:** The positive cells generally owned a larger round nucleus, sometimes in company with sister cells. There was no difference of positive cells in these two kinds of labeling methods between the incorporation of BrdU or IdU and the expression of proliferating cell nuclear antigen ($P > 0.05$). The cells of S phase with FCM method were much more than that method with BrdU incorporation ($P < 0.001$). **Conclusion:** The method of BrdU labeling could be used in tumor cellular proliferation studies.

Key words: bromodeoxyuridine tongue cancer tumor label in vitro

标记肿瘤细胞核,揭示细胞增殖特性的研究指标包括氘胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入、BrdU掺入、增殖细胞核抗原(PCNA)表达、ki67抗原表达、核仁组成区观察及细胞核有丝分裂计数等。非放射性

标记物溴脱氧尿嘧啶核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)掺入S期细胞的机制同³H-TdR,能与内源性胸腺嘧啶竞争掺入新合成的DNA。80年代以来,国外对BrdU标记方法进行了大量研究,已证明与³H-TdR标记的结果有良好相关性^{1,2}。用BrdU替代³H-TdR可避免放射性污染问题,且检测方便迅速。本文在BrdU抗原制备及抗体制备的前期研究基础上,用BrdU体外标记Tca8113细胞及舌癌组

作者单位:450052 河南医科大学第一附属医院口腔科(李新明),河南医科大学第四附属医院(赵 强),上海第二医科大学口腔医学院(何荣根,周晓健,陈万涛)

织,并与 PCNA 抗原表达、流式细胞术 (FCM) 定量 S 期细胞的检测结果进行比较,探讨 BrdU 标记在肿瘤增殖研究中的价值。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

碘脱氧尿嘧啶核苷 (IdU)、BrdU (由中国科学院上海生物化学所提供);抗 BrdU 多抗 (1:200)、Tca8113 细胞 (由上海第九人民医院提供);抗 PCNA 单抗 (1:100,由上海第二医科大学细胞生物实验室提供);ABC Kit (Vector 公司,美国);电子天平 (Sartorius 公司,德国);细胞培养恒温器 (东方池本理化工业株式会社,日本);流式细胞仪 (BD 公司,美国)。

1.2 体外组织标记

取 3 例新鲜舌癌组织,在含 20% 小牛血清的 1640 培养液内剪碎至 1~3 mm³ 大小,加入 80 μg/ml 含 BrdU (2 例) 或 IdU (1 例) 的培养液,在 5% CO₂ 培养箱 37 °C 孵育 3 h,70% 冷乙醇 4 °C 固定 12 h 以上,常规脱水、石蜡包埋。4 μm 连续切片 4 张,分别做 BrdU 或 IdU、PCNA、阴性对照和 HE 染色实验。BrdU 或 IdU 加一抗前用 2 mol/L HCl 37 °C 孵育 30 min,余步骤同免疫组化 ABC 法。完成以上步骤后用光镜观察。

1.3 体外细胞标记

盖玻片置 30 mm² 平皿中或准备无菌载玻片,将对数增长期 Tca8113 细胞加含 BrdU 80 μg/ml 的培养液,调细胞为 1 × 10⁴/ml。每只平皿加 2 ml BrdU 培养液,或滴注培养液 0.5 ml 于载玻片上,然后密闭于无菌盒,移至细胞培养箱孵育 48 h,吸干,加 Clark s 液或丙酮固定,吹干平皿及玻片,存 4 °C 冰箱备用,免疫细胞化学步骤及光镜观察同前。

1.4 BrdU 标记和 FCM 的标本制备

将 Tca8113 细胞调整密度为 1 × 10⁵/ml,加 BrdU 使终浓度为 80 μg/ml,分 4 瓶密闭培养,培养条件同前,从第 2 天逐日取 1 瓶,调细胞为 5 × 10⁵/ml,载玻片上涂片,火焰干燥,4 °C 丙酮固定,吹干备用,免疫细胞化学步骤同前。每瓶涂片后剩余细胞离心沉淀,70% 冷乙醇固定,4 °C 备用。将各管细胞用 RNase 100 μl 37 °C 消化 20 min,再加 50% 碘化丙啶 (PI) 200 μl 30 min,用 150 目滤网过滤后上机检测,每例标本测定 > 5 × 10³ 个细胞。统计用配对 *t* 检验。阳性胞核标记指数 (LI) = 阳性细胞数 / 观察细胞总数 × 100%。

2 结果

2.1 Tca8113 细胞和舌癌组织块的标记

Tca8113 细胞阳性胞核呈黄褐色、核大浑圆、呈散在或姊妹细胞分布。LI 指数约 10%,同一个高倍视野内可见 BrdU 标记阳性的亲代和子代细胞共存,子代细胞显色稍淡,见图 1。Clark s 液或冷丙酮固定细胞对 BrdU 标记显色结果未见有差异。1~3

mm³ 大小舌癌组织块的边缘及中心部分均有阳性标记细胞,着色深浅无差别。



图1 掺入 BrdU 的亲代细胞和子代细胞共存 ABC ×400

2.2 BrdU 标记和 PCNA 表达的比较

比较两张连续切片相同组织形态区域的 BrdU (IdU) 和 PCNA 标记情况。BrdU、IdU 和 PCNA 染色阳性细胞均较大,圆或椭圆,其形态、染色不易区别。阴性对照片无显色。分别计数 BrdU (IdU) 阳性与 PCNA 阳性细胞的 LI,两组之间无显著性差异 (*P* > 0.05),见图 2。

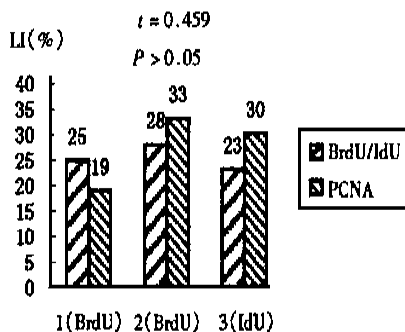


图2 BrdU/IdU 掺入和 PCNA 表达的比较

2.3 BrdU 标记和 FCM 的比较

BrdU 标记与 FCM 定量测定 S 期细胞的情况见图 3。两者经配对比较,FCM 所测定 S 期细胞数显著多于 BrdU 掺入的细胞数 (*P* < 0.001)。

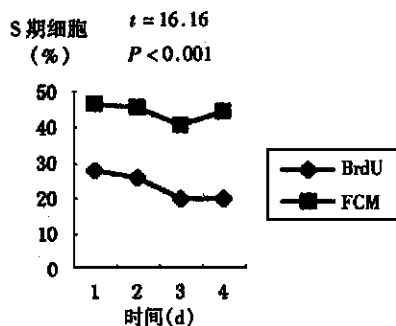


图3 FCM 定量和 BrdU 标记的比较

3 讨 论

Tca8113 细胞的倍增时间为 38 h,本组经 BrdU 标记后连续培养 48 h 即可见姊妹细胞出现,说明在 BrdU 有效掺入时间内,正处于 DNA 合成阶段的亲代细胞,约有 10% 被 BrdU 竞争掺入,成功替代了内源性胸腺嘧啶,随着时间推移,亲代细胞经过有丝分裂,DNA 掺入 BrdU 的子代细胞出现。由于 BrdU 的掺入半衰期不足 3 h,因此本文 3 例舌癌组织标记均用 BrdU 或 IdU 培养液孵育 3 h,使尽可能多的 S 期细胞获得标记,显色浅的阳性细胞出现,可能属 S 期早期细胞。BrdU 体外掺入多将组织切至 1 mm³ 大小。笔者阅片时注意到 3 mm³ 大小的组织块边缘及中央均有标记细胞,阳性着色深浅也无差别,说明 3 mm³ 与 1 mm³ 大小组织块同样可使 BrdU 掺入,从而简化标本制备方法。

BrdU 作为 DNA 前体类似物替代掺入 S 期细胞,掺入定位准确,阳性结果表达了 S 期细胞新合成 DNA 的水平,而且受细胞内外环境影响小,标记不会丢失。PCNA 作为多聚酶的一种辅酶蛋白,主要存在于细胞核中,其阳性表达是研究细胞增殖的常用指标之一,然而有人认为 PCNA 可以在细胞周期的 G1 末期提前出现³,因此不少学者认为 BrdU 标记的结果较之更确切,应用范围更广⁴⁻⁶,如用 BrdU 连续标记可动态观察 DNA 合成。本文 BrdU 和 PCNA 阳性细胞核多数较大,形态上符合 S 期细胞处于增殖合成、遗传物质聚合储备的阶段。

FCM 是 80 年代以来迅速发展起来的一种检测技术,可迅速、大量检测新鲜或石蜡包埋的组织细胞标本,进行 DNA 定量、细胞周期分析及图像处理,然而 FCM 在细胞筛选方面有不少问题,如不能识别细胞形态和类型,尤其对死亡细胞和重叠的细胞不能分辨,而将其归入 S 期细胞⁶⁻⁸。许多研究证明 FCM 检测的 S 期细胞数高于 BrdU 标记、PCNA

标记和 ki67 标记^{7,8}。本文结果与这些研究相一致。

作为非放射性标记物,BrdU 标记的用途十分广泛,几乎包括生物学和医学各个领域,尤其在分子生物学方面的成就更令人瞩目。笔者相信随着研究和探索的深入,BrdU 很有希望成为最终能取代³H-TdR 的标记物之一。

参考文献

- 1 Lin P, Allison DC. Measurement of DNA content of tritiated thymidine and bromodeoxyuridine incorporation by the same cells. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41(9):1435 ~ 1439
- 2 Meyer JS, Koehn SL, Hughes JM, et al. Bromodeoxyuridine labelling for s-phase measurement in breast carcinoma. *Cancer*, 1993, 71(11):3531 ~ 3540
- 3 Connolly KM, Bogdanffy MS. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: A dual stain comparison with 5-bromo-2-deoxyuridine. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41(1): 1 ~ 7
- 4 Dolbear F. Bromodeoxyuridine: A diagnostic tool in biology and medicine, Part 2: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis. *Histochem J*, 1995, 27(7): 923 ~ 964
- 5 Dolbear F. Bromodeoxyuridine: A diagnostic tool in biology and medicine, Part 3: Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. *Histochem J*, 1996, 28(4): 531 ~ 575
- 6 Tinnemans MMF, Lenders GPM, ten Velde SS, et al. Evaluation of proliferation parameters in vivo bromodeoxyuridine labelled lung cancers. *Virchows Arch*, 1995, 427(2): 295 ~ 301
- 7 Lloveras B, Garin-Chesa P, Myc A, et al. In vitro bromodeoxyuridine labelling of malignant neoplasms: A comparative study with flow cytometry cell-cycle analysis. *Am J Clin Pathol*, 1994, 101(6): 703 ~ 710
- 8 deFazio A, Leary JA, Hedley DW, et al. Immunohistochemical detection of proliferating cell in vivo. *J Histochem Cytochem*, 1987, 35(5): 571 ~ 577

(2000-11-21 收稿,2001-05-20 修回)

(本文编辑 王 晴)

《中华口腔医学》出版发行

由著名专家王翰章主编,全国 200 多位专家共同编写的《中华口腔医学》将于 2001 年 10 月出版发行,本书共 3 册,700 多万字,在总结我国几代专家宝贵经验的同时,囊括全部国外最新口腔医学成果。全书共 43 篇,2800 余幅插图,全面系统阐述了口腔医学的基础与专业理论,详细介绍了各种口腔医疗技术,是口腔医生必备工具书。邮购价 525 元。另有《口腔颌面外科理论与实践》(邱蔚六主编),邮购价 209 元。邮购地址:北京 55 信箱清平书店 金 莉收,邮编:100053。开户行:招商银行展览路支行,帐号:0981106810001,户名:北京清平书店有限公司。电话:010-83154081。