

生物素标记的 6 种 cDNA 探针检测 H22、EAC 及其克隆细胞株 mRNA 的表达

吕占军¹, 李秀霞², 刘秋燕¹, 王秀芳¹

摘要:目的 检测 H22、EAC 瘤细胞及其克隆细胞株 mRNA 的表达。方法 用生物素标记的 6 种 cDNA 探针, 细胞玻片原位杂交的方法。结果 H22 与生物素标记的 4 种探针杂交阳性, 其克隆细胞株 H2D8、H2G4 分别与 3 及 1 种探针杂交阳性; EAC 细胞株与 4 种探针杂交阳性, 克隆细胞株 E2G8 与 2 种探针杂交阳性, E2C6 克隆细胞株与 6 种探针杂交均阴性。结论 这些均有肿瘤特性的细胞株中 mRNA 的表达不同。

关键词:瘤细胞株; 克隆细胞; 原位杂交; 分子探针

中图分类号: R73-35 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2002)04-0261-03

The difference of mRNA expression in H22 and EAC and their cloned cells

LVZHan -jun, LIXiu -xia, LIUQiu -yan, et al

Department of Laboratory Animal, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To examine the difference of mRNA expression in H22 and EAC strains and their cloned cells. **Methods** The probes labeled with biotin were used in situ hybridization to detect the expression of 6 kinds of mRNA. **Results** 4 kinds of mRNA were found to exist in H22 cells, 3 and 1 kind of mRNA in H2D8 and H2G4 cloned cells, respectively; 4 kinds of mRNA were found to exist in EAC cells, 2 kinds of mRNA in E2G8 cloned cell; No mRNA in E2C6 cloned cell. **Conclusion** The expression of mRNA was different in H22, EAC and their cloned cell strains.

Keywords: Tumor cell strains; Cloned cell; In situ hybridization; Molecular probes

为了获得可进行质量控制的、遗传特性稳定的肿瘤细胞株, 本研究室对武汉大学保种中心保存的 H22 及北京市肿瘤研究所保存的 EAC 瘤细胞株, 分别进行了克隆, 分别获得 12 及 5 株克隆细胞, 并对这些克隆细胞的某些细胞学及生物学特性进行了研究, 证明它们各具特点, 根据它们生物学特性的差异, 从这些克隆细胞中进一步选择了 H2D8、H2G4 (克隆自 H22), E2G8、E2C6 (克隆自 EAC) 克隆及其各自的原瘤株, 用原位杂交方法, 检测这 4 株克隆细胞及其各自的原瘤株表达 p16、c-fos、c-myc、p21、c-jun 及 p53 基因 mRNA 的情况, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 瘤株 H22 瘤细胞株引自武汉大学保种中心, H2D8、H2G4 为从武汉大学保种中心 H22 中获得的

克隆细胞株; EAC 瘤细胞株引自北京市肿瘤所, E2G8 及 E2C6 为从北京市肿瘤所 EAC 中获得的克隆细胞株。

1.2 原位杂交检测试剂盒 生物素标记的 6 种 cDNA 探针分别为 p16、c-fos、c-myc、p21、c-jun 及 p53, 其探针长度分别为 800bp、1.2kb、1.4kb、2.1kb、0.9kb 及 1.8kb, 购自北京医科大学病理室。

1.3 ZL-2000 型细胞分析系统 由河北医科大学与华行医疗器械厂联合研制。

1.4 细胞原位杂交 培养细胞经涂片, 干燥, 4% 多聚甲醛固定, 0.3% H₂O₂ 处理 40min, 0.1mol/L HCl 室温处理 10min, 蛋白酶 K 在 37℃ 消化 10~20min, 4% 多聚甲醛后固定, 然后滴加杂交液, 放 42℃ 保温杂交 22h, 含 50% 甲酰胺的 2×SSC 在 37℃ 洗 30min, 2×SSC 37℃ 洗 15min 2 次, PBS 冲洗后, 马血清室温封闭 60min, avidin-biotin-HRP 在 37℃ 保温孵育 1h, PBS 冲洗后, 经 DAB-H₂O₂ 显色, DDW 冲洗终止反应^[1,2]。

1.5 杂交结果观察和计数 用 ZL-2000 型细胞分析

收稿日期: 2001-06-18; 修回日期: 2001-10-22

基金项目: 国家“九五”攻关课题 (96-A23-06-03)

作者单位: 1.050017 石家庄, 河北医科大学实验动物学部;

2. 河北省免疫学会

系统,画测量随机视野计数 100 个以上的肿瘤细胞,统计平均吸光度和标准差,计算吸光度比值。

1.5.1 吸光度 单个细胞的吸光度和平均吸光度、标准差由细胞分析系统自动给出。

1.5.2 探针杂交阳、阴性的判断 待测单个细胞的吸光度 阴性对照平均吸光度 + 阴性对照吸光度标准差 $\times 2$ 判为阳性,阳性细胞在标本片中的比例大于 10% 判为该标本片探针杂交阳性^[3,4]。

1.5.3 吸光度比值 指待测细胞平均吸光度与阴性对照平均吸光度之比。

2 结果

细胞玻片原位杂交后,经 DAB 显色,用 ZL-2000 型细胞分析系统画测量,判断探针杂交的阳、阴性,结果见表 1、表 2。武汉 H22 与生物素标记的 p16、c-fos、c-myc 及 c-jun 探针杂交阳性,其克隆细胞株

H2D8 与 p16、c-fos 及 c-jun 探针杂交阳性,克隆细胞株 H2G4 仅与 p16 探针杂交阳性;肿瘤所 EAC 细胞株与 p21、p53、c-fos 及 c-myc 4 种探针杂交阳性,克隆细胞株 E2G8 与 c-fos 及 p21 探针杂交阳性,E2C6 克隆细胞株与这 6 种探针杂交均阴性。

3 讨论

肿瘤细胞的生物学特性与肿瘤细胞的蛋白质组成有关,蛋白质由 mRNA 翻译合成,蛋白质表达的调节涉及转录、翻译、化学修饰及降解等多个环节。使用多克隆抗体和单克隆抗体,采用 ELISA、免疫组化等不同免疫学技术,检测蛋白质区分不同肿瘤细胞,已经在临床及科研实验室得到广泛应用。由于蛋白质表达受多个环节影响,在蛋白质检测的基础上,如果能够进一步测定基因表达,对于全面认识肿瘤细胞会起到积极作用。

表 16 种探针与 H22 细胞株及其克隆细胞株原位杂交结果

探针	H22			H2D8			H2G4		
	A 均值	A 比值	判断*	A 均值	A 比值	判断*	A 均值	A 比值	判断*
p16	0.020 ±0.01	1.73	+	0.030 ±0.02	1.69	+	0.019 ±0.009	1.55	+
c-fos	0.036 ±0.03	2.40	++	0.026 ±0.01	1.89	+	0.015 ±0.01	1.06	-
c-myc	0.018 ±0.01	1.53	+	0.014 ±0.001	0.98	-	0.013 ±0.001	0.95	-
p21	0.015 ±0.01	1.05	-	0.014 ±0.02	1.03	-	0.015 ±0.02	1.06	-
c-jun	0.017 ±0.01	1.50	+	0.030 ±0.01	2.24	++	0.013 ±0.02	0.97	-
p53	0.016 ±0.01	1.25	-	0.014 ±0.001	1.02	-	0.013 ±0.03	0.98	-

* 标本片探针杂交阴、阳性判断,根据材料方法 1.5.2 的标准

表 26 种探针与 EAC 细胞株及其克隆细胞株原位杂交结果

探针	EAC			E2C6			E2G8		
	A 均值	A 比值	判断*	A 均值	A 比值	判断*	A 均值	A 比值	判断*
p16	0.014 ±0.01	1.01	-	0.013 ±0.01	0.97	-	0.014 ±0.002	1.01	-
c-fos	0.028 ±0.03	2.27	++	0.014 ±0.01	1.01	-	0.023 ±0.01	1.75	+
c-myc	0.019 ±0.02	1.32	+	0.013 ±0.03	0.98	-	0.014 ±0.01	1.01	-
p21	0.03 ±0.01	2.40	++	0.012 ±0.02	0.97	-	0.021 ±0.03	2.10	+
c-jun	0.012 ±0.01	0.92	-	0.13 ±0.01	0.97	-	0.013 ±0.01	0.97	-
p53	0.018 ±0.01	1.27	+	0.14 ±0.005	1.00	-	0.014 ±0.01	1.01	-

* 标本片探针杂交阴、阳性判断,根据材料方法 1.5.2 的标准

从武汉大学保种中心 H22 获得的克隆细胞株 H2D8、H2G4 的生物学特性研究证明,这 2 株克隆细胞的染色体条数分别为 44 及 45 条,DNA 含量分别为 66.68 pg、68.96 pg,致瘤性也有所不同,H2D8 克隆细胞的致瘤性比 H2G4 的致瘤性高。本文原位杂交结果证实克隆细胞 H2D8 与 p16、c-fos 及 c-jun 探针杂交阳性,H2G4 克隆细胞仅与 p16 探针杂交阳性;对北京市肿瘤所 EAC 获得的克隆细胞株 E2C6、E2G8 的生物学特性研究证明,这 2 株克隆细胞的染色体条数、DNA 含量、致瘤性方面也有所不同,E2G8 克隆细胞

的致瘤性比 E2C6 的致瘤性高。本文原位杂交结果表明克隆细胞 E2G8 与 c-fos 及 p21 探针杂交阳性,E2C6 与 6 株探针杂交均阴性。

已知 p53、p16、p21 为抑癌基因,c-fos、c-myc、c-jun 为癌基因^[5],这 3 个抑癌基因除 p16 与 H22 细胞杂交阳性外,其余均为阴性,可见在 H22 瘤细胞株中,癌基因的表达高于抑癌基因;在克隆细胞 H2D8 中癌基因的表达高于 H2G4 克隆细胞,这与 H2D8 克隆细胞的致瘤性高于 H2G4 的结果相一致,可见癌基因 c-fos 及 c-jun 的表达与否可以把 H2D8 及 H2G4

克隆细胞区别开;在 E2G8 克隆细胞中有癌基因 *c-fos* 的表达,而 E2C6 克隆细胞中未查到该癌基因的表达,这与 E2G8 克隆细胞的致瘤性高于 E2C6 的结果相一致,癌基因 *c-fos* 的表达与否可以把 E2G8 及 E2C6 克隆细胞区别开。H22、EAC 及其克隆的细胞株均表现致瘤性(强度可以不同),但是这些细胞的增殖调控基因表达却显示较大的差异,这些细胞株可以作为研究致瘤性与增殖调控基因关系的模型。

本研究的目的在于对瘤细胞株的特性进行质量控制,即建立可进行质控的瘤细胞株。本文仅用了 6 株已知的癌基因类 cDNA 探针来比较武汉 H22、北京市肿瘤所 EAC 及其克隆细胞中表达相应 mRNA 的差异,关于瘤细胞株中其他基因的 mRNA 表达情况待进一步研究。肿瘤细胞的变异涉及多个环节和多种成分,可以控制的项目越多,越可以维持细胞株的稳定性,本文中所使用的探针可以作为识别及控制肿瘤细胞株的试剂。

参考文献:

[1] CarlileMJ,HarrisonVT,LumsdenAG,etal.Developmentand cellfateinterspecific (Musmusculus/Muscaroli) orthotopic transplantsofmousemolartooth germsdetectedby insitu hybridization[J].ArchOralBiol,1998,43 (5):395-406.
 [2] LopezVelazquezG,SeguraValdezML,AlcantaraOrtizgozaMA,etal.LocalizationofintracuclearRNAbylelectronmicroscopyinsitu hybridizationusingagenomicDNA probe[J].ArchMedRes, 1998,29 (2):185-190.
 [3] NicholsGE,PhdMD,FriersonHF,etal.Automatedimmunohistochemicalassayforestrogenreceptorstatusinbreastcancerusing monoclonalantibodyCC4-5ontheventanaES[J].Anatomic Pathology,1996,106 (3):332-338.
 [4] GrandisJR,MelhemMF,BamesEL,etal.Quantitativeimmunohistochemicalanalysisoftransforming growthfactor- α andepidermal growthfactorreceptorin patientswithsquamouscellcarcinoma oftheheadandneck[J].Cancer,1996,78 (6):1284-1292.
 [5] 李宣海,巫向前,倪语星.肿瘤标志物的检测与临床[M].北京:人民卫生出版社,1997.41-67.

(刘红武校对)

泰索帝 Weekly 方案配合放疗治疗 局部晚期非小细胞肺癌近期疗效评价

刘宏,王庆伟,乔乃安,程玉峰,刘惠中

关键词:非小细胞肺癌;泰索帝;放射治疗
 中图分类号:R734.2;R730.53 文献标识码:D
 文章编号:1000-8578(2002)04-0263-01

单纯放射治疗非小细胞肺癌疗效有限。而同时放化疗治疗不能切除的晚期非小细胞肺癌正得以探讨。自 1998 年 10 月~2000 年 4 月应用泰索帝 Weekly 化疗方案同时配合放射治疗 IIIa~IIIb 期非小细胞肺癌患者 31 例,疗效满意。现报告如下:

1 资料与方法

本组引例均为不能手术的 IIIa~II-b 期非小细胞肺癌患者。男 19 例,女 12 例;年龄 35~72 岁,中位年龄 55 岁。均经纤维支气管镜、穿刺活检病理或细胞学证实,其中鳞癌 17 例,腺癌 14 例。(1)化疗用药:放疗同时每周给予泰索帝 25~30mg/m²,连续用药 5 周(分别为第 1、8、15、22 和 29d 静脉给药,用药时间 >1h)。(2)放疗:均采用 SL-

18Philips15MV-X 直线加速器外照射。常规分割,200cGy/f,5 次/周。设野部位依据病变部位而定。首先行大野照射,靶区包括原发病灶和纵隔淋巴结引流区,放疗至 40Gy/20f 时,改野针对原发病灶及转移淋巴结追加剂量 20Gy/10f。治疗过程中每周观察患者血常规、尿常规及心电图,详细记录患者的毒副反应。由 CT 客观判断疗效。

2 结果

在本组中,所有病例经联合治疗后,症状有不同程度的缓解。14 例腺癌患者中,CR2 例,PR6 例,NC6 例,CR+PR 达 57.14%;17 例鳞癌患者中,CR4 例,PR9 例,NC4 例,CR+PR 达 76.47%;二者有显著性差异,($P<0.005$)。总 CR+PR76.47%。其中按计划完成治疗的病人中,CR

性显著,($P<0.005$)。

3 讨论

泰索帝是紫杉类药物,其具有独特的抗微管作用,该类药物可促进小管聚合形成稳定的微管,妨碍有丝分裂,限制重要微管重组,是治疗晚期非小细胞肺癌的药物。由于泰索帝可诱导细胞抑制在细胞周期 G₂/M, 该期放疗敏感性是 G₁/S 期的 2.5 倍。近来研究发现在抗凋亡蛋白 bcl-2 的磷酸化中发挥重要作用。通过破坏抗凋亡蛋白的稳定功能,泰索帝可以提高放射细胞的细胞毒作用,致凋亡细胞死亡活跃。

为了提高局控率,缩短放射治疗时间,减少食管炎等副作用,放射治疗同时给予泰索帝 25~30mg/m²,连续 5 周。全部病人总的有效率(CR+PR)达 67.74%。其中鳞状细胞癌的有效率为 76.47%,腺癌的治疗有效率为 57.14%,二者有显著性差异($P<0.005$)。主要副作用为放射性食管炎,同时有持续性乏力。较以往治疗大大提高了局控率。泰索帝以其独特的作用机制及其对 NSCLC 的显著疗效,在临床上受到广泛关注。有待行长期和更多数量的病例观察,以选择出更为优化的治疗方案。

(周永红校对)

收稿日期:2000-11-17;修回日期:2001-07-12
 作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院

+PR 达 77.23%;延缓治疗 7d 以上,CR+PR 为 55.56%,二者差异