

摘要

采用体外侵袭小室的方法,以 Matrigel 模拟基底膜,NIH3T3 细胞条件培养液作为趋化因子进行卵巢癌细胞亚系的分离,建立了亚系 M951,其体外和皮下生长速度与母系相似,但腹腔播散率高于母系,表明 M951 细胞具有较高的恶性潜能。

关键词: 卵巢癌 细胞系 播散

参考文献

[1] Kleinman HK, et al. 1986, *Biochemistry*, 25:

312.

[2] Nabeshima K, et al. 1993, *Int J Cancer.*, 55:947.

[3] Zhang L, et al. 1995, *Cancer Res.*, 55:428.

[4] Danen EH, et al. 1993, *Int J Cancer.*, 54:315.

[5] 李学农等, 1991, *癌症*, 10:299.

[6] Bullert RE, et al. 1995, *Gynecol Oncol.*, 56:39.

[7] Fuchtnner C, et al. 1993, *Gynecol Oncol.*, 48:203.

[8] Fu X, et al. 1993, *Anticancer Res.*, 13:283.

[9] 李文锦等, 1993, *中华妇产科杂志*, 28:38.

[10] Hamiton TC, et al. 1983, *Cancer Res.*, 43:5379.

[11] 徐丛剑等, 1997, *现代妇产科进展*, 6:111.

ESTABLISHMENT OF HUMAN OVARIAN CARCINOMA SUBLINE M951 AND ITS PRIMARY BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

CHENG Xiang CHENG Tian Min

(Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University. 400038)

ABSTRACT

An ovarian carcinoma subline M951 was successfully established from cell line 3AO in vitro by Matrigel mimicing basement membrane and NIH3T3 cell culture fluid being inclining factor. In vitro growth curve exhibited the similar growth ability. When inoculated into nude mice subcutaneously, the tumor-forming latency and growth speed of the two lines was similar. After inoculated into abdominal cavity of nude mice, the ratio of abdominal dissemination was 8/8 in M951 cells and 3/6 in 3AO cells. This means that M951 cell is more malignant.

Key words: Ovarian carcinoma Cell line Dissemination

体外培养恶性滋养细胞 P53 蛋白表达 与细胞生物学特性的研究*

郑伟 石一复 谢幸 徐建云

(浙江大学医学院附属妇产科医院 杭州 310006)

滋养细胞是参与胚胎发育过程中的营养、代谢、内分泌和免疫等功能的重要细胞,滋养细胞肿瘤则是一组具有高度侵袭和转移特性的恶性疾病,癌基因和抑癌基因不仅与滋养细胞肿

瘤的发生、发展和转归有关,而且与早期滋养细胞增殖有关^[1,2]。我们观察了恶性滋养细胞肿瘤

本文 1999 年 8 月 27 日收到,11 月 1 日接受。

* 国家自然科学基金资助项目(39470723)。

细胞体外生长特性与超微结构的变化、P53 蛋白表达、 β -亚单位绒毛膜促性腺激素(β -hCG) mRNA 的表达、 β -hCG、胎盘生乳素(hPL)、白介素-6(IL-6)含量的变化。以探讨体外生长的滋养细胞肿瘤 P53 蛋白表达及细胞生物学特征,为进一步研究人滋养细胞肿瘤的发病机制和肿瘤监测提供科学依据。

材料与方 法

1. 细胞培养

体外原代培养恶性滋养细胞 23 例,其中 18 例为侵蚀性葡萄胎,5 例为绒癌,均取自子宫切除或肿瘤病灶组织,并经本院病理组织学证实。体外培养正常早孕绒毛滋养细胞 19 例,均取自孕周为 8—10 周人流的组织标本。取新鲜组织 5—10g,置于 Hank 氏培养液中漂洗并剪碎至 1—3mm³,按 1:5 体积比加入体积比为 1:10.25%胰蛋白酶和 0.1%胶原酶 A(均为 Sigma 产品)混合液,置于 37℃ 恒温振荡水浴箱中温育并消化 30 分钟。再用吸管轻轻吹打组织,加入 Hank 氏液洗细胞 2 次,离心(1000rpm)10—15 分钟,弃去上清液,采用 RPMI1640 培养液(GIBCO 产品)含 10%胎牛血清(GIBCO 产品),将细胞悬液调整至 1—5×10⁴ 细胞/ml,置于预先加入盖玻片的 6 孔培养皿中(Nunc 产品),在 37℃,5%CO₂ 培养箱(Forma 产品)中进行原代培养,在培养 72 小时后,收集细胞培养上清液并置于-80℃ 低温冰箱,以备检测。在倒置相差显微镜(Nikon 产品)下观察细胞生长情况。培养第 5 天收集细胞,经 0.4%台盼蓝染色,活细胞计数。

2. 细胞超微结构电镜检查

细胞经 2.5%戊二醛和 1%锇酸固定,环氧树脂 618 包埋,采用 H500 透射电镜观察细胞超微结构。

3. p53 免疫组化染色

p53 免疫组化 S-P 法主要步骤如下:(1)细胞涂片或盖玻片经微波处理 3 分钟,经 PBS(pH7.4)漂洗。(2)加入过氧化酶阻断溶液,以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 10 分钟。(3)加入非免疫性动物血清,室温下孵育 10 分钟。(4)加入一抗,即 P53 单克隆抗体 DO-7(迈新公司产品)室温下温育 60 分钟。(5)加入生物素标记的二抗,室温下孵育 10 分钟。(6)加入链霉菌抗生物素蛋白过氧化物酶溶液,室温下孵育 10 分钟。(7)DAB 染色,中性树胶封固并在显微镜下摄片。

>25%细胞核呈现棕黄色颗粒则为阳性。

4. β -hCGmRNA 的表达

β -hCGmRNA 基因 RT-PCR 扩增:(1)细胞总 RNA 抽提:采用 Tri Regent 试剂(GIBCO 产品)一步法抽提细胞总 RNA,经紫外分光光度测定 RNA 的含量。(2)反转录 PCR 扩增: β -hCGmRNA 引物分别为 5'-TCGGGTCACGGCCTCCT-3' 和 5'-TCGGGGTGTCCGAGGGC-3'。以 RNA 为模板进行反转录,合成 cDNA,在 PE480 型 PCR 扩增仪上进行扩增,94℃ 60s,55℃ 60s,72℃ 60s,35 个循环。(3)电泳:PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,1 小时后在紫外灯下观察摄片。

5. β -hCG、hPL 和 IL-6 的定量测定

将培养了 72 小时后的细胞培养上清液离心(1000rpm)10 分钟,置于-20℃ 冰箱中待测。 β -hCG、hPL 采用放射免疫定量分析法(RIA)测定(试剂为德普(DPC)公司产品)。IL-6 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定(试剂为 INNOGENETICS 公司产品)。上述测定均按试剂盒说明书操作,质控均符合要求。

结 果

1. 细胞生长与超微结构特点

原代培养滋养细胞种植后 10—12 小时即已贴壁,24 小时之后开始生长,正常早孕绒毛滋养细胞呈多边形,伸展较好。可见单细胞核的细胞滋养细胞和多核的合体滋养细胞。恶性滋养细胞呈明显的异型性,即细胞形态不规则,核大,核胞浆比例增大,均为幼稚的细胞滋养细胞。恶性滋养细胞增殖速度快,呈密集型生长。大多细胞呈低分化(图版图 1)。超微结构电子显微镜观察显示:体外培养恶性滋养细胞呈多边形,核大,核内常染色质明显,少量异染色质呈小块状散在分布并常聚集在核膜附近。核内可见多个核仁,且大而致密(图版图 2)。胞质中高尔基体、粗面内质网及线粒体较丰富,并有大量糖原颗粒呈散在分布(图版图 3)。

2. P53 免疫组化结果

14 例恶性滋养细胞肿瘤原代培养细胞(10 例为侵蚀性葡萄胎,4 例为绒癌)及绒癌细胞株 P53 蛋白呈阳性表达。P53 蛋白的表达定位于细胞核内,即细胞核呈现棕黄(褐)色颗粒(图版

图4),正常绒毛滋养细胞呈阴性或弱阳性表达(表1)。

3. β -hCGmRNA 的表达

β -hCGmRNA 基因 RT-PCR 扩增结果:结果表明,正常早孕绒毛滋养细胞、体外培养的恶性滋养细胞(侵蚀性葡萄胎和绒癌)及绒癌细胞株(JAR 和 BeWo 细胞)中 β -hCGmRNA 均呈阳性(562bp)(图5)。

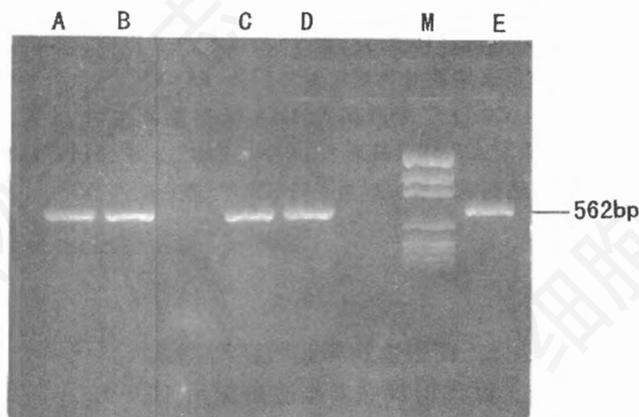


图1 细胞 β -hCGmRNA 的表达

A: 侵蚀性葡萄胎细胞 B: 绒癌细胞 C: JAR 细胞株
D: BeWo 细胞株 M: λ -PGEM DNA 标准分子量 E: 正常对照组(早孕绒毛细胞)

表1 体外培养滋养细胞 P53 免疫组化结果

类型	例数	P53 免疫组化结果			
		(-)	(+)	(++)	(+++)
侵葡	18	2	8	5	8
绒癌	5	1	1	1	2
绒癌细胞株	3	0	0	1	2
正常早孕	19	14	4	1	0

(-): 阳性细胞 < 25%; (+): 阳性细胞 25% - 50%; (++) : 阳性细胞 50% - 80%; (+++) : 阳性细胞 > 80%; 恶性(侵葡和绒癌)组与正常早孕组比较, $P < 0.01$ 。

4. β -hCG、hPL 和 IL-6 的测定结果

定量分析结果表明,除 hPL 外,恶性滋养细胞分泌的 β -hCG 和 IL-6 含量均显著高于正常滋养细胞 ($P < 0.01$)(表2)。

讨 论

近年来,随着细胞生物学研究的深入,人们对于滋养细胞的生物学特性有了更进一步的了解。人滋养细胞起源于正常胎盘,胎盘滋养层细胞参与胚胎发育过程中的营养、代谢、内分泌和免疫功能。由于其增殖和侵入母体子宫蜕膜和血管,故被认为是“假恶性”细胞,妊娠滋养细胞肿瘤是一种继发于妊娠的特殊肿瘤,具有高度

表2 体外培养滋养细胞 β -hCG、hPL 和 IL-6 的含量

分 组	例数	β -hCG	hPL	IL-6
		(U/L)	(μ g/ml)	(pg/ml)
正常滋养细胞	19	138.65 \pm 28.94	14.10 \pm 1.38	10.98 \pm 1.22
恶性滋养细胞	23	2372.39 \pm 86.54*	15.32 \pm 3.04	63.99 \pm 5.27**
绒癌细胞株	3	1201.65 \pm 89.45*	15.34 \pm 4.41	61.10 \pm 4.98**

* 与正常滋养细胞组比较, $P < 0.01$ 。

** 与正常滋养细胞组比较, $P < 0.05$ 。

恶变倾向,而且其发病机制至今仍不清楚。本文对人恶性滋养细胞肿瘤进行了体外细胞培养,观察体外培养滋养细胞肿瘤 P53 蛋白和 β -hCGmRNA 的表达以及 β -hCG、hPL 和 IL-6

含量的变化,进一步了解滋养细胞肿瘤细胞的生长特点及超微结构改变。

p53 基因定位于人染色体带 17p13,是人类恶性肿瘤中最常涉及的一种抑癌基因。已有研

究表明,多数人体肿瘤 p53 基因出现等位基因错义突变^[3,4],p53 功能丧失将会降低恶性肿瘤的疗效^[5]。恶性滋养细胞肿瘤对化疗药物十分敏感,治愈率可达 85%。因此,p53 抑癌基因在妊娠滋养细胞疾病中的作用如何已引起不少学者的重视。Chen 等^[6]应用 PCR-SSCP 和测序方法对 24 例葡萄胎和 2 株绒癌细胞株进行 p53 基因突变的检测,结果发现 1 例葡萄胎在 295 位点上存在错义突变。Cheung 等^[7]应用 Northern Blot 分析显示 p53mRNA 浓度在葡萄胎妊娠中增加,但也未能发现葡萄胎 p53 突变。Landers 等^[8]在绒癌细胞株中检测到 p53mRNA 含量增高,但 p53 基因以野生型序列存在。Fulop 等^[9]认为葡萄胎和绒癌组织中 P53 蛋白的过度表达为野生型 p53,其过度表达可能与滋养细胞肿瘤的发展有关。肿瘤细胞的核大,核内常染色质多、核仁大,数目多,是肿瘤细胞蛋白质合成机能旺盛的表现。体外培养的恶性滋养细胞肿瘤细胞以及绒癌 JAR 细胞株均存在 P53 蛋白的过度表达,但 p53 基因参与和调控恶性滋养细胞的增殖与分化,尚待进一步的研究。

体外培养的恶性滋养细胞肿瘤细胞细胞类型性明显,其中以核的变化最为显著,大多细胞呈低分化。 β -hCG、hPL 是由滋养细胞合成与分泌的特异性激素,虽然体外培养的恶性滋养细胞肿瘤与正常绒毛滋养细胞均存在 β -hCGmRNA 的表达,但恶性滋养细胞肿瘤 β -hCG 的分泌量较正常绒毛滋养细胞明显增加。IL-6 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,其分子量为 26KD。一般认为,IL-6 的合成与分泌与肿瘤细胞的增殖、转移、恶性程度及肿瘤细胞凋亡有关,IL-6 以“自分泌”方式促进肿瘤细胞的生长^[10]。本文结果表明,体外培养恶性滋养细胞具有合成与分泌 IL-6 的特性,恶性滋养细胞肿瘤 IL-6 的分泌量也较正常绒毛滋养细胞明显增加。恶性滋养细胞原代培养以及永生性绒癌细胞 P53 蛋白的过度表达可能与细胞异常增

殖和低分化有关,并且是恶性滋养细胞肿瘤的重要细胞生物学特性之一。

摘 要

本文对 23 例恶性滋养细胞和 19 例正常早孕绒毛滋养细胞进行了原代培养。分别采用免疫组化、反转录 PCR、放免法和酶联免疫吸附法,检测了体外培养滋养细胞 P53 蛋白和 β -hCGmRNA 的表达、 β -hCG、hPL 和 IL-6 含量的变化。体外培养的恶性滋养细胞中,细胞滋养细胞增生异常活跃,细胞核呈明显异型。恶性滋养细胞 P53 蛋白阳性表达,且阳性强度与正常早孕绒毛滋养细胞比较均有显著差异($P < 0.01$)。体外分泌 β -hCG 和 IL-6 的含量均显著高于正常滋养细胞($P < 0.05$)。P53 蛋白的表达以及 IL-6 的分泌可能与恶性滋养细胞的异常增殖和低分化有关。

关键词: 滋养细胞肿瘤 体外 P53 蛋白

参 考 文 献

- [1] Robert, D. J., 1994, *J Reproductive Med.*, 39: 201-208.
- [2] Park, J. S., et al., 1992, *Asia Ocean J. Obstet Gynecol.*, 18: 57-64.
- [3] Berchuck, A., et al., 1994, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 170: 246-252.
- [4] Greenblatt, M. S., et al., 1994, *Cancer Res.*, 54: 4855-4858.
- [5] Harris, C. C., 1993, *N. Engl. J. Med.*, 329: 1318-1327.
- [6] Chen, C. A., et al., 1994, *Carcinogenesis*, 15: 2221-2223.
- [7] Cheung, A. N. Y., et al., 1994, *J. Repro. Med.*, 39: 223-227.
- [8] Lander, J. E., 1994, *Oncogene*, 9: 2745-2750.
- [9] Fulop, V., et al., 1998, *J. Reprod. Med.*, 43: 119-27.
- [10] Eustace, D., et al., 1993, *Gynecol. Oncol.*, 50: 15-19.

EXPRESSION OF P53 PROTEIN AND CYTOBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MALIGNANT TROPHOBLASTIC CELLS IN VITRO

ZHENG Wei SHI Yi-fu XIE Xing et al.

(Women's Hospital, Zhejiang University Medical School, Hangzhou 310006)

ABSTRACT

Primary cell culture was made from 23 malignant trophoblastic tumors and 19 normal early pregnant villi. Immunohistochemical staining, RT-PCR, RIA and ELISA for P53 protein, β -hCGmRNA, β -hCG, hPL and IL-6 were employed. In the cell culture of malignant trophoblastic tumors, the cytotrophoblastic cells with abnormal proliferation and low differentiation were main type of cells in vitro. The P53 protein expression in 20 primary cultured malignant trophoblastic cells were significantly higher than that in normal early pregnant villi ($P < 0.01$). The amounts of β -hCG and IL-6 were significantly higher than that in normal early pregnant villi ($P < 0.05$). Expression of p53 protein and secretion of IL-6 may be involved in the abnormal proliferation and low differentiation of malignant trophoblastic cells.

Key words: Trophoblast tumor In vitro P53 protein

Epstein-Barr 病毒感染对 CNE-2Z 不同细胞组分中 PKC 和 TPK 活性的影响*

李岩松 陈小毅* 孙宁* 沈淑静*

(广东医学院附属医院病理科 湛江 524001 *广东医学院病理教研室 湛江 524023)

鼻咽癌在中国大陆南方各省、台湾和香港等地发病率较高。许多研究证实 Epstein-Barr Virus (EBV) 与鼻咽癌的发生密切相关。但 EBV 是通过什么机制来影响细胞生长, 目前仍不清楚。我们以低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 为模型, 探讨 EBV 感染后不同细胞组分中 PKC(蛋白激酶 C) 和 TPK(酪氨酸蛋白激酶) 活性变化与细胞生长的关系, 从细胞生物学变化的角度研究鼻咽癌的发生发展。

材料和方法

1. 试剂及来源

CNE-2Z 和 B95-8(EBV 转化的绒猴淋巴细胞系) 细胞株由广东医学院病理教研室提供。RPMI-1640 培养基(Gibco 公司), 小牛血清(杭州四季青生物材料工程公司), MTT、TPA 及谷氨酰胺(Sigma 公司), 聚 Glu. Tyr(4:1), leupeptin、磷脂酰氨基酸(PS)和二酯酰

甘油类似物(Diolein)为 Sigma 产品。PIPES[piperazine-N, N-bis(2-ethanesulfonic acid)]、MOPS[3-(N-Morpholino)propane-Sulfonic acid]和 TritonX-100 为 Farco 产品。DTT 为 Serva 产品。其他试剂购自东风试剂厂或市售产品。EBV DNA-W 片段特异引物(北京医科大学病理教研室合成), 小鼠抗 EB 病毒早期抗原和 SP 免疫组织化学试剂盒购自迈新公司。

2. EBV 的制备

按 Nemerow 等^[1]报道的方法, 用 RPMI-1640 培养液将 B95-8 细胞浓度调至 10^6 个/ml, 置 33℃ 下不换液培养 12 天, 细胞悬液以 $1500 \times G$, 20℃ 离心 15 分钟, 经 0.8μ Millipore 膜过滤的上清液超速离心 ($15000 \times G$, 4℃ 离心 120min) 浓缩 100 倍, 置 -80℃ 保存备用。以 CBL 转化实验检测 EBV 的存在。

3. EBV 感染 CNE-2Z 细胞实验

参照 Hedrick 等^[2]相关的方法。实验分三组。EBV

本文 1999 年 1 月 1 日收到, 6 月 28 日接受。

* 卫生部科学研究基金课题(批准号: 94-2-293)。