

由此看来,破骨细胞的功能活动是复杂的,还受着全身和局部因素的影响,而且与其他细胞如成骨细胞等存在着相互作用^[9],这些均需做进一步的研究。

通过分离、培养人破骨细胞的实验,我们体会人破骨细胞培养成活较动物更难,对培养条件要求高,我们认为DMEM培养液,pH 7.0更利于破骨细胞生长。将其与骨片共同培养,出现骨吸收比兔破骨细胞晚2—3天。原因之一可能是从取材到培养经时比较长,破骨细胞的活性受到影响,如将分离的人破骨细胞先培养3天,再做噬骨实验效果更好。在本实验中,培养了17天的人破骨细胞仍有骨吸收功能。说明此方法分离培养的人破骨细胞,可供骨吸收机理的体外研究。

参 考 文 献

- [1] Turksen, K. et al., 1988, *J Bone Miner Res.*, 3(4): 389—396.
- [2] Anderson, R. E. et al., 1986, *Calc Tiss Int.*, 39(4): 252—261.
- [3] Miller, S. C. et al., 1984, *Anat Rec.*, 208(2): 223—232.
- [4] Chambers, T. J. et al., 1982, *J Pathol.*, 136: 27—34.
- [5] Boyde, A. and Jones, S. T., 1984, *Br Dent J.*, 156: 216—224.
- [6] Marks, S. C., 1983, *J Pathol.*, 12: 226—237.
- [7] Patricia, J. F. et al., 1980, *Nature.*, 283(14): 669—681.
- [8] Takeyoshi, Y. et al., 1990, *J Cell Phys.*, 145: 587—598.
- [9] Raisz, Z. G. et al., 1990, *Calc Tiss Int.*, 46: 233—241.

涎腺腺样囊性癌多种癌基因 mRNA 的表达

赵文川* 章魁华 马大权 王洪君 马大龙**
(北京医科大学口腔医学院 100081)

Barbacid 等从人膀胱癌细胞株成功地克隆分离出 C-ha-ras 癌基因的开创性工作使分子生物学和遗传工程学技术开始应用于人类肿瘤研究^[1]。细胞癌基因激活和异常表达的研究加深了对细胞癌变的根本原因的认识。有关人癌基因异常表达的报道日渐增多,人们企望从中发现人癌基因异常表达的规律,以指导肿瘤的预防、诊断和治疗。涎腺腺样囊性癌(Salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤,虽生长缓慢,但有较强的浸润性和转移力。为了揭示其特殊生物学行为的来源,我们选择了已有文献报道的与肿瘤浸润、生长和转移表型有关的癌基因 H-ras、K-ras、V-erbB 1、C-myc、V-sis 进行了 SACC 细胞、口腔鳞癌细胞和胃腺癌细胞的

原位杂交。

· 材 料 与 方 法

癌细胞取自本院外科实验室 1983 年从小涎腺 SACC 和舌鳞癌组织选育的 SACC-83、TC-83 细胞株(分别为 109 代和 98 代)及北京肿瘤研究所王乃勤研究员惠赠的胃腺癌细胞株 MGC 803。癌基因 H-ras、K-ras、V-erbB 1、C-myc、V-sis DNA 探针购于华美公司,碱性磷酸酶原位杂交显示盒和过氧化物酶显示盒分别购于 Gibco 公司和 Vector 公司,Levamisol 由桂林制药厂惠赠,其他均为核酸研究和一般试验室试剂。

1. 细胞片制备 将对数生长期癌细胞消化并轻吹打成的细胞悬液接种于放有盖片的六孔板或宽口培养

* 现在天津市肿瘤医院工作,邮编 300060。

** 北京医科大学免疫学教研室。

瓶内, 常规培养 48 小时或 81 小时后收获。依次进行以下处理: 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 冲洗 10 分钟 × 3, 4% 多聚甲醛 20 分钟, 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 冲洗 5 分钟, 梯度乙醇脱水各 5 分钟, 气干收盒, -20℃ 保存。

2. 探针标记 用酶促生物素二步缺口平移法标记探针后, 分离纯化, 检测标记率。

3. 杂交前处理和杂交 细胞片恢复至室温后进行如下处理: 0.2 N HCl 20 分钟, 1—1.5 μg/ml 蛋白酶 K 37℃ 10 分钟, 4% 多聚甲醛 5 分钟, 0.25% 醋酸酐三乙醇胺(新配制) 10 分钟, 2×SSC 70℃ 30 分钟, 2×SSC 10 分钟, 晾干待杂交。RNase 对照片再经 100 μ/ml RNase A 2×SSC 37℃ 60 分钟, 2×SSC 10 分钟, 晾干待杂交。每片滴加杂交液 50—70 μl, 使成为一个大液滴复盖于细胞上, 放入含有 SSC 湿盒 42℃ 杂交 18—20 小时。杂交液成分: 4×SSC, 10 mmol/L DTT, 100 μg/ml ssDNA, 10% 硫酸葡聚糖, 1×Denhardt's, 50% 去离子甲酰胺, 生物素化 DNA 探

针 0.3—0.4 μg/ml, ssDNA 和探针加入前经变性处理。除固定剂外, 所用水均经 DEPC 处理。Ep 管和吸头及水均高压灭菌。

4. 杂交后显色 杂交后细胞片依次经 2×SSC、1×SSC、0.2×SSC 各洗 10 分钟 × 2, 分别用碱性磷酸酶和过氧化物酶显色。显色过程中, 随时镜下观察, 信号满意后中止显色, 然后苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 甘油明胶封片。设靶 mRNA 对照, 探针对照和杂交方法对照。

实验结果

为了便于分析, 根据光镜下杂交颗粒的多少, 将表达水平分为高表达(卅), 中表达(卅)和低表达(+)及未表达(-)。每片随机计数 200 个细胞, 计算出每种癌细胞各种癌基因的表达水平, 见附表。

三种癌细胞的癌基因 mRNA 表达结果如下:

三种癌细胞多种癌基因 mRNA 表达

癌基因	SACC-83					TC-83					MGC-803				
	卅	卅	+	-	总表达率 (%)	卅	卅	+	-	总表达率 (%)	卅	卅	+	-	总表达率 (%)
K-ras	129	143	73	55	86.25	136	134	57	67	81.75	4	28	94	74	63.08**
H-ras	133	144	92	31	92.25	80	80	32	8	96.00					
C-myc	17	28	86	69	32.75						24	36	88	52	74.00**
V-erbB ₁	7	32	206	155	61.25						10	20	114	56	72.00*
V-sis	0	0	0	400	0.00	8	15	177	11.50		0	0	0	400	0.00

注: 高表达(卅): 杂交颗粒弥漫分布于整个细胞胞浆内或大于胞浆面积的 2/3。

中表达(卅): 杂交颗粒分布于胞浆面积的 1/3 以上。

低表达(+): 杂交颗粒分布于胞浆面积的 1/3 以下。

未表达(-): 胞浆内不见杂交颗粒。

** P<0.01

* P<0.05

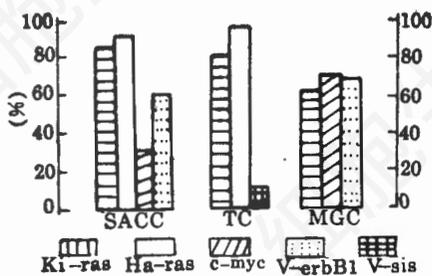


图 1 SACC、TC、MGC 细胞不同癌基因 mRNA 的表达

(1) SACC 细胞、TC 细胞和 MGC 细胞的五种癌基因 mRNA 表达不同, 见图 1。(2) SACC 细胞的 H-ras 和 K-ras 癌基因 mRNA 表达有明显的一致性, 其高、中水平表达率分别为 68% 和 69%, 与 TC 细胞的表达水平相近。(3) SACC 细胞有 C-myc mRNA 低表达, 其未表达率达 67.25%, 其表达水平远远低于 MGC 细胞(p<0.01), 见图 2。(4) SACC 细胞 VerbB1 癌基因 mRNA 表达率虽为 61.5%

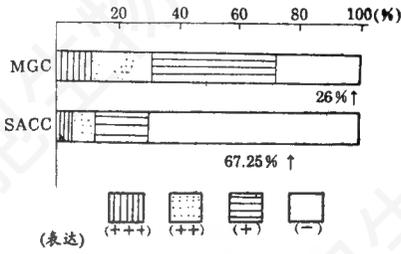


图2 SACC、MGC细胞c-myc癌基因 mRNA 表达水平

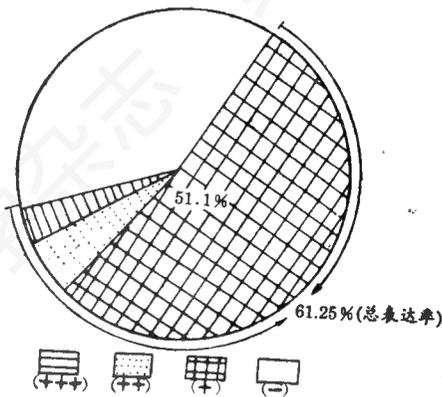


图3 SACC细胞V-erbB₁癌基因 mRNA 表达特点

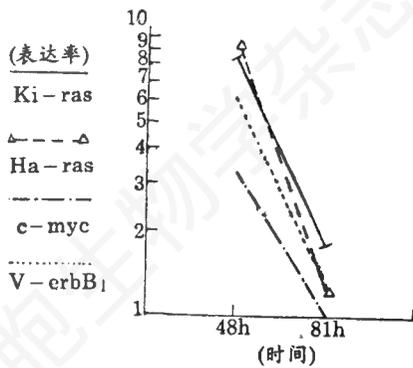


图4 不同培养时间SACC细胞四种癌基因 mRNA 的表达

(见图1), 但以低水平表达为主(51.5%)。见图3。(5) 培养48小时和81小时的SACC细胞的癌基因 mRNA 表达水平有明显不同。(仍然以两种不同培养时间的细胞载片随机计数200个细胞, 计算其细胞不同增殖状态下癌

细胞各种癌基因的表达水平)结果表明培养81小时的细胞H-ras、K-ras、erbB1癌基因 mRNA 表达水平远低于48小时细胞的表达水平, 并且培养81小时的SACC细胞未见C-myc癌基因的表达, 见图4。3种对照片均未见癌基因表达。

讨 论

涎腺腺样囊性癌是一种特殊的涎腺上皮低恶性肿瘤, 多无症状地缓慢生长, 术后多能顺利愈合, 镜下癌细胞多分化较好, 一度曾被认为良性肿瘤。但约半数以上的患者术后局部复发和肺、骨、肝、脑等远处器官转移, 终死于本瘤。多年来, 国内外学者一直研究其特殊生物学行为的来源, 但受研究手段的限制, 对这一特点的解释只限于形态学和定量细胞学阐述, 认识各异, 难以统一^[3-4]。因此, 我们利用先进的核酸杂交技术, 从基因水平对此进行了探讨, 用分子肿瘤学理论解释了这个问题。在实验中改进了玻片细胞原位杂交技术, 使其更便于在肿瘤基础研究中推广应用。我们也同期进行了人正常腮腺组织切片原位杂交(结果见另文), 结果显示上述癌基因中, 只有ras和sis癌基因在部分小导管细胞有微弱表达, 腺泡细胞未见癌基因 mRNA 表达。SACC细胞中这几种癌基因的转录水平与正常腮腺有很大不同, 提示在SACC形成和发展过程中, ras、myc、erbB1癌基因在正常涎腺细胞中的激活和异常表达有可能导致了SACC的发生和发展。

用活化ras癌基因转染无浸润性的小鼠BW 5147 T淋巴细胞, 使其获得了浸润性和转移力, 其浸润性和转移力的大小与转染的ras癌基因表达有关^[5]。Johnson报道正常甲状腺组织有ras癌基因微弱表达, 甲状腺肿瘤有ras癌基因的增强表达^[6]。口腔鳞癌组织中H-ras、K-ras癌基因表达水平明显高于相应的正常组织, 分别是正常组织的3—13倍和2—16倍^[7]。本实验结果显示SACC细胞有ras癌基因的高

水平表达,其表达水平接近于TC细胞,据此推测SACC细胞中ras癌基因的高水平表达使其获得了一般低恶性肿瘤所不具有的较强的浸润性和转移力。

C-myc癌基因是一种可使细胞获得“永生性(immortalization)”的基因,其表达的调节在转录后水平,表皮生长因子(EGF)诱导其转录。Spondidos通过RNA斑点杂交发现口腔鳞癌有C-myc高水平表达,其表达水平与肿瘤恶性程度有一致性^[8]。本文结果显示SACC细胞有C-myc癌基因低水平表达,而MGC细胞的C-myc表达水平明显高于SACC细胞。

V-erbB 1癌基因的异常表达可以产生类似于EGF与受体结合后所发出的生长信号,刺激细胞增殖^[9]。本实验结果显示SACC细胞的erbB 1癌基因表达水平也明显低于MGC细胞。

sis癌基因的激活和异常表达使转化细胞获得自行分泌血小板衍生生长因子(PDGF)样物质刺激自身生长的能力^[10]。本实验结果显示SACC细胞未见sis癌基因表达,TC细胞有sis癌基因的低水平表达。

C-myc、erbB 1和sis癌基因的激活和异常表达均能通过各自不同的途径刺激癌细胞增殖,促进肿瘤生长。推测SACC细胞中C-myc、erbB 1癌基因的较低水平表达和sis癌基因的不表达可能与SACC无症状地缓慢生长有关。

本实验结果还显示了不同培养时间的

SACC细胞中癌基因表达有明显不同,这表明肿瘤细胞中癌基因的活化和异常表达状态不是恒定的,与瘤细胞的生命过程有密切的关系,这也是除瘤细胞异源性之外的又一个使肿瘤基因研究复杂化的主要因素。一个肿瘤内多种癌基因活化和异常表达的报道和多种癌基因协同作用的假说的提出给肿瘤基因研究提出了新的课题^[11]。SACC细胞中上述多种癌基因异常表达之间的关系和其对SACC形成和发展的影响,尚需深入研究。

参 考 文 献

- [1] 蒋金荃, 1986, 国外医学肿瘤分册, 2:71—75.
- [2] Lawrence SE. et al., 1972, *Cancer*, 29 (5): 1160—1165.
- [3] Caselitz J. et al., 1986, *J. Oral Pathol.* 15: 308—315.
- [4] Greineer TC. et al., 1989, *Am. J. Clin. Pathol.*, 92: 711—720.
- [5] Collard JG. et al, 1987, *Cancer Res.* 47 (3): 754—759.
- [6] Johnson TL. et al, 1987, *Am. J. Pathol.* 127(1): 60—65.
- [7] 刘学锋等, 1990, 国外医学口腔分册, 6: 332—335.
- [8] Yokota J. et al., 1986, *Science*, 231: 332—335.
- [9] Ullrich A. et al., 1984, *Nature*, 309: 418—425.
- [10] Rose R. et al., 1974, *PNSA USA*, 71: 1207—1212.
- [11] Land H. et al., 1983, *Nature*, 304:596—601.

(上接第32页)

当选理事名单。最后由庄孝德教授宣读学会第二届青年优秀论文奖得奖者名单并颁奖。

这届大会的学术活动主要包括22日下午的三个大会报告以及23日、24日两天的分组报告会。大会报告包括程中和的“染色体端粒与核骨架的关系,植物中间纤维的证实”、薛绍白的“活细胞研究方法进展”及郝水的“染色体骨架研究的进展”。此外,宋今丹、徐永华、卫志明、仝允桐、张小云、白永延等教授也分别在分组报告会上作了专题报告。分组报告会共作了20场,包括细胞核与染色体、细胞器结构、真核基因组与基因表达、动物细胞生理、细胞骨架、植物细胞培养与细胞工程、生殖细胞生物学、细胞免疫、癌细胞生物学、细胞粘附与细胞基质、动物细胞培养与细胞工程、细胞生物学教学、细胞分化、细胞周期及细胞分裂、膜与受体、细胞生物学技术等专题。

(下转第48页)