

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0079-05

## ehCG $\beta$ 肿瘤基因疫苗诱生的效应脾细胞过继免疫抗肿瘤作用的研究

关庆东, 王立新, 张进平, 徐薇, 储以微, 王纓, 熊思东(复旦大学上海医学院免疫学系教育部分子医学重点实验室, 上海基因免疫与疫苗研究中心, 上海 200032)

[摘要] 目的: 探讨 ehCG $\beta$  肿瘤基因疫苗诱生的效应脾细胞过继免疫在抗肿瘤中的作用。方法: 通过转染建立稳定表达 ehCG $\beta$  和 HBV-preS2/S 的细胞株 Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S。以 TR421-hCG $\beta$  质粒实施基因免疫, 免疫后检测小鼠脾细胞, 特异性细胞毒活性; 同期将脾细胞过继免疫给正常小鼠, 以过继 TR421-hCG $\beta$  质粒免疫小鼠脾细胞为实验组, 过继 TR421 质粒免疫小鼠脾细胞为对照组, 检测脾细胞杀伤效应。结果: 效应脾细胞对 Sp2/0-ehCG $\beta$  的杀伤率明显高于 Sp2/0-preS2/S ( $P < 0.05$ )。Sp2/0-ehCG $\beta$  在实验组小鼠仅 2 只形成实体瘤, TR421-hCG $\beta$  质粒基因免疫抗肿瘤任有肿瘤特异性, 两组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而在对照组小鼠均形成实体瘤。Sp2/0-preS2/S 在所有的小鼠均形成了实体瘤, 其瘤重无显著性差异。结论: ehCG $\beta$  肿瘤基因疫苗诱生的效应细胞可特异性杀伤肿瘤, 过继免疫效应细胞能使正常小鼠获得明显的特异性抗肿瘤能力。

[关键词] 异位人绒毛膜促性腺激素; 效应脾细胞; 肿瘤; 基因疫苗; 过继免疫

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

## Anti-Tumor Effects of Adoptively Transferred Splenocytes Induced by ehCG $\beta$ Gene Immunization

GUAN Qing-dong, Wang Li-xin, ZHANG Jin-ping, XU Wei, CHU Yi-wei, WANG Ying, XIONG Si-dong( Department of Immunology and Key Laboratory of Molecular Medicine of Ministry of Education, Fudan University; Center for Gene Immunization and Vaccine Research, Shanghai 200032, China )

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor effects of adoptively transferred splenocytes induced by gene immunization with ehCG $\beta$  tumor vaccine. **Methods:** Sp2/0 cells were transfected with the plasmids containing ehCG $\beta$  or HBV-preS2/S and the positive clones were screened by G418. BALB/c mice were immunized with plasmid TR421-hCG $\beta$  or mock DNA three times. Two weeks after immunization, spleen cells from the immunized mice were harvested, and then analyze the CTL activity against Sp2/0-ehCG $\beta$  cells. The splenocytes derived from the immunized mice were adoptively transferred to the normal mice, which were subsequently given injections i. p. of Sp2/0-ehCG $\beta$  and  $\beta$  Sp2/0-preS2/S respectively. **Results:** Splenocytes derived from the mice immunized with TR421-hCG $\beta$  exhibited a strong specific cytotoxic activity against Sp2/0-ehCG $\beta$  cells, The average tumor weight between test and control group is statistically significant ( $P < 0.05$ ). Only two mice out of six had tumors in Sp2/0-ehCG $\beta$  adoptively transferred group, while all mice had tumors in control group. However, all mice challenged with Sp2/0-preS2/S formed tumors, and the average tumor weight was not obviously varied between the two groups. **Conclusion:** ehCG $\beta$  gene vaccine could induce specific cytotoxic splenocytes against ehCG $\beta$  and adoptive transfer of the splenocytes showed the anti-tumor activity.

[Key words] ectopic human chorionic gonadotrophin( ehCG ); effect splenocytes; tumor; gene vaccine; adoptive immunization

\* 自 Gailani 等<sup>[1]</sup>报道非滋养层肿瘤细胞异位表达人绒毛膜促性腺激素( human chorionic gonadotrophin, hCG)以来, 肿瘤细胞表达的异位 hCG( ectopic hCG, ehCG)受到了人们关注。根据文献报道及我们前期的研究结果证实, 许多不同类别和组织来源的肿瘤细胞都能不同程度地表达 ehCG, 因而恶性肿瘤细胞产生的

[基金资助] 上海市科技攻关重点项目( 03dz19229 )和国家杰出青年科学基金研究计划( 39925031 )

[作者简介] 关庆东( 1978- ), 男, 山东青州人, 硕士, 主要从事基因免疫的研究; 王立新( 1965- ), 男, 江苏丹阳人, 博士, 主要从事抗肿瘤基因免疫研究, 现工作单位东南大学基础医学院病原生物学与免疫学系。两者共为第一作者

[通讯作者] 熊思东, E-mail: sdxiong@shmu.edu.cn

ehCG 成为肿瘤早期诊断以及评价肿瘤治疗效果的指标之一。并且近来文献报道,分泌型 ehCG 具有生长因子功能、与恶性肿瘤自我生长的调控有关;富含负电荷糖链的膜结合型 ehCG $\beta$  链与恶性肿瘤转移特性和恶性化程度、以及肿瘤微环境和免疫耐受的形成等有一定的关系<sup>[2-5]</sup>,因而,ehCG 与肿瘤的发生、发展存在着相关性,以 ehCG 为靶抗原的抗肿瘤疫苗也成为肿瘤生物治疗新的热点<sup>[6-7]</sup>。在以往的研究中我们构建了基于 ehCG $\beta$  的抗肿瘤基因疫苗,免疫小鼠后产生了特异性免疫应答,并对 hCG<sup>+</sup> 的 Sp2/0 细胞的攻击具有明显的保护作用<sup>[8]</sup>;同时发现基因免疫诱导的抗 hCG $\beta$  抗体可以抑制 hCG<sup>+</sup> 肿瘤细胞的增殖活性,该抑制作用与肿瘤细胞 ehCG $\beta$  的表达水平有一定的相关性<sup>[9]</sup>。细胞免疫在抗肿瘤免疫中发挥主导作用,为此,本研究采用过继免疫的方法,将基因疫苗免疫小鼠诱导的效应细胞过继免疫同系小鼠,以进一步探讨效应细胞在抗肿瘤中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、细胞株、试剂及实验动物

真核表达质粒 pcDNA3 由本室保存,重组质粒 pcDNA3-hCG $\beta$  和 pcDNA3-preS2/S 由本室构建。真核表达载体 TR421 质粒由美国东卡罗米纳大学 Ross TM 博士惠赠。Sp2/0 细胞为 BALB/c 小鼠(H-2<sup>d</sup>)同基因的肿瘤细胞系,购自中科院上海生化细胞研究所。Lipofectamine2000 脂质体转染试剂购自 Invitrogen 公司。试验动物为 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(H-2<sup>d</sup>) (购自复旦大学实验动物科学部,SPF 级),体重 16~18 g,随机分组后清洁级饲养。

### 1.2 稳定表达 ehCG $\beta$ 和 HBV-preS2/S 的 Sp2/0 细胞克隆建立、鉴定及其致瘤性

依照 Lipofectamine2000 真核转染试剂盒说明分别将 pcDNA3-hCG $\beta$  和 pcDNA3-preS2/S 质粒转染 Sp2/0 细胞,经 G418 选择培养出现抗性集落细胞,经有限稀释法筛选获得单克隆细胞株。采用 FACS 分别检测 Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S $\beta$  细胞表面相应抗原的表达,选择高表达 ehCG $\beta$  的单克隆细胞株作为抗原特异性肿瘤细胞,Sp2/0-preS2/S 细胞作为无关抗原(HB-sAg<sup>+</sup>)的对照肿瘤细胞。为观察其致瘤性,收获对数生长期的 Sp2/0-ehCG $\beta$  或 Sp2/0-preS2/S 肿瘤细胞,以一定浓度皮下接种,观察成瘤情况及成瘤大小。

### 1.3 重组质粒构建及基因免疫

将 hCG $\beta$  链编码基因 cDNA 片段定向插入 TR421 质粒,构建 TR421-hCG $\beta$  质粒,PCR 法初筛后进行 DNA 测序鉴定。采用 QIAGEN 试剂盒大量纯化质粒 DNA。

微量紫外分光光度仪检测 DNA 浓度,并用生理盐水调整至 1 g/L。基因免疫前 24 h,于每只小鼠左后腿胫骨前肌中部注射 100  $\mu$ l 0.25% 丁哌卡因,致使局部肌肉坏死并促进再生肌肉对质粒 DNA 的摄取,24 h 后在同一部位分别注射各种质粒 DNA(每只小鼠 100  $\mu$ l)实施基因免疫共 3 次,间隔 3 周。

### 1.4 <sup>3</sup>H-TdR 释放法检测免疫小鼠脾细胞的特异性 CTL 活性

效应细胞为 hCG $\beta$  抗原刺激 5 d 的 TR421-hCG $\beta$  质粒免疫小鼠脾细胞,靶细胞为<sup>3</sup>H-TdR 标记的 Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S 细胞,按一定效靶比加入 96 孔 U 型细胞培养板,设 3 复孔。孵育 5.5 h,加入 50  $\mu$ l 双酶溶液(DNase I 0.1 g/L,胰蛋白酶 1.2%)继续孵育 0.5 h,收集各孔细胞并测量 cpm 值,效应细胞杀伤活性计算公式如下:杀伤率(%)=(1-实验孔 cpm 均值/靶细胞自然释放 cpm 均值) $\times$ 100%。

### 1.5 效应脾细胞过继免疫与肿瘤细胞攻击

末次免疫后 2 周无菌取免疫小鼠脾脏,放入尼龙指套中以玻璃针芯研磨后制成细胞悬液,加入 3 ml Tris-NH<sub>4</sub>Cl/pH7.2 室温置 3 min,去除红细胞,PBS 洗涤 2 次,计数,调整浓度为 1 $\times$ 10<sup>11</sup>/L。采用尾静脉注射法将效应脾细胞过继免疫给正常小鼠,每组 6 只小鼠,接种剂量为每只 200  $\mu$ l,以过继 TR421-hCG $\beta$  质粒免疫小鼠脾细胞为实验组、过继 TR421 质粒免疫小鼠脾细胞为对照组。次日,收获对数生长期 Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S 细胞,PBS 洗 3 次,计数并调整细胞浓度为 1 $\times$ 10<sup>9</sup>/L,采用皮下接种方法分别注射腹部两侧,接种剂量为每只 100  $\mu$ l。1 周后以相同的剂量、方法再次过继免疫脾细胞。

### 1.6 统计学处理

本实验所涉及的 2 组数据比较采用 *t* 检验或  $\chi^2$  检验。

## 2 结 果

### 2.1 稳定表达 ehCG $\beta$ 和 HBV-preS2/S 的 Sp2/0 细胞克隆建立、鉴定及其致瘤性

用脂质体转染技术将 ehCG $\beta$  和 HBV-preS2/S 编码基因导入 Sp2/0 细胞,构建了稳定表达 ehCG $\beta$  和 HBV-preS2/S 抗原的小鼠肿瘤细胞。采用 FACS 分别检测 Sp2/0,Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S 细胞表面相应抗原的表达,结果发现(图 1),Sp2/0-ehCG $\beta$  细胞表达 ehCG $\beta$  的比例高达 84.75%、平均荧光强度达 22.12;作为对照,Sp2/0-preS2/S 细胞表达 ehCG $\beta$  的比例仅为 8.95%、平均荧光强度为 2.14(与转染空质粒的 Sp2/0 相比,无显著性差异),但表达 HBV-preS2/S 的比例达 72.60%、平均荧光强度达 16.80。提示,经过细胞克隆筛选获得的 Sp2/0-ehCG $\beta$  细

胞克隆高水平地表达 ehCG $\beta$ ,可作为 ehCG $\beta$  抗原特异性肿瘤细胞;Sp2/0-preS2/S 细胞可作为无关抗原( HBsAg<sup>+</sup> )的对照肿瘤细胞。随后,将一定数量的高表达细胞株 Sp2/0-ehCG $\beta$ ,Sp2/0-preS2/S 皮下接种 BALB/c 小鼠;结果发现这些细胞株均可在小鼠体内形成实体肿瘤。为观

察细胞数量与细胞致瘤性的关系,我们继续以不同数量的 Sp2/0-ehCG $\beta$ ,Sp2/0-preS2/S 细胞接种 BALB/c 小鼠。结果显示,接种  $1 \times 10^5$  以上 Sp2/0-ehCG $\beta$  或 Sp2/0-preS2/S 细胞才能在小鼠体内形成实体瘤,并且实体瘤的大小与接种的细胞数量呈正相关。

图 1 Sp2/0,Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S 细胞相应抗原的表达

Fig. 1 Expression of ehCG $\beta$  and HBV-preS2/S on the cell membrane of Sp2/0,Sp2/0-ehCG $\beta$  and Sp2/0-preS2/S cells

A, D: SP2/0; B, E: Sp2/0-ehCG $\beta$ ; C, F: SP2/0-preS2/S

## 2.2 含 ehCG $\beta$ 编码基因重组质粒的构建及鉴定

含 ehCG $\beta$  编码基因的重组质粒 TR421-hCG $\beta$  的构建(如图 2)所示,PCR 鉴定插入方向正确,阳性克隆经 DNA 测序表明 ehCG $\beta$  已插入 TR421,编码基因序列正确,读码框架准确。

## 2.3 TR421-hCG $\beta$ 基因免疫小鼠可诱导 hCG $\beta$ 特异性 CTL 应答

TR421-hCG $\beta$  重组质粒免疫小鼠脾细胞经 hCG $\beta$  纯化蛋白共同刺激 5 d 后作为效应细胞,采用<sup>3</sup>H-TdR 释放法检测其对 Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S 细胞的细胞毒活性。结果如图 3 所示:特异抗原刺激的脾细胞对 Sp2/0-ehCG $\beta$  细胞具有较强的杀伤活性( E: T 为 80:1 时,杀伤率为  $24.71\% \pm 5.58\%$  ),其杀伤率与靶比呈现良好的线形关系;而对 Sp2/0-preS2/S 细胞的杀伤活性很低( E: T 为 80:1 时,杀伤率为  $12.67\% \pm 3.19\%$  ),两者相比有显著差异(  $P < 0.05$  )。提示 TR421-ehCG $\beta$  基因免疫诱导产生了较强的 hCG $\beta$  特异性 CTL 应答。

## 2.4 过继免疫效应细胞的抗瘤效应

为进一步探讨 ehCG $\beta$  肿瘤基因疫苗诱生的效应细胞在抗肿瘤中的作用,我们将 TR421 质粒基因免疫小鼠的脾细胞(下称对照脾细胞)和 TR421-hCG $\beta$  质粒基因免疫小鼠的脾细胞(下称效应脾细胞)分别过继给正常小鼠,然后在小鼠腹部左右两侧皮下分别接种 Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S 细胞,并观察其致瘤性。结果发现:2 周后,在 6 只效应脾细胞过继小鼠中,Sp2/0-ehCG $\beta$  细胞仅在 2 只小鼠形成实体瘤,而 Sp2/0-preS2/S 细胞均形成了实体瘤;在所有对照脾细胞过继小鼠中,Sp2/0-ehCG $\beta$  和 Sp2/0-preS2/S 细胞都形成了实体瘤(图 4)。继续观察小鼠瘤体大小,并剥取实体瘤称重,结果发现:Sp2/0-ehCG $\beta$  细胞在效应脾细胞过继小鼠和对照脾细胞过继小鼠中形成的实体瘤平均重量分别为(  $0.17 \pm 0.14$  )g, (  $0.84 \pm 0.48$  )g,两者比较有显著性差异(  $P < 0.05$  )。其中,2 只效应脾细胞过继小鼠所形成的 Sp2/0-ehCG $\beta$  细胞实体瘤的平均重量为 0.50 g,与对照脾细胞过继小鼠 Sp2/0-ehCG $\beta$  细胞实体瘤比较( 0.84 g ),瘤重下降了 38.52%。Sp2/0-preS2/S 细胞在 2 组小鼠中形成实体瘤的平均重量分

别为(0.81 ± 0.33)g,(0.86 ± 0.52)g,两者比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。

图2 TR421-hCGβ 构建示意图  
Fig.2 The construction of recombinant plasmid TR421-hCGβ

图3 TR421-hCGβ 基因免疫小鼠诱生 hCGβ 特异性 CTL 应答的检测  
Fig.3 Detection of the hCGβ specific cytolytic activities of splenocytes from TR421-hCGβ immunized mice

图4 过继免疫小鼠的抗癌反应  
Fig.4 The anti-tumor effect of adoptively immunized mice

### 3 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类健康的恶性疾病之一，

肿瘤的生物治疗 - 特别是基因免疫,不仅能诱导体液免疫应答,且能诱导产生特异性 CTL,因此,具有潜在的应用价值<sup>[10]</sup>。近来文献报道<sup>[11-12]</sup>几乎所有的恶性肿瘤细胞都能表达 ehCG;分泌型 ehCG 具生长因子功能,与肿瘤的形成和发展有关;而膜结合型 hCG(特别是富含负电荷糖链的自由 hCGβ 链及其片段)与肿瘤的转移特性及免疫耐受的形成有一定关系,因而,ehCG 成为肿瘤生物治疗的热点靶抗原。由于 hCG 与 LH,FSH 等糖蛋白激素具有相同的 α 链,为避免交叉反应,我们以往的研究选择了 hCGβ 链作为靶抗原,构建了重组质粒 TR421-hCGβ,对小鼠实施基因免疫后发现,TR421-hCGβ 质粒诱导了高水平的特异性免疫应答;并对转 ehCGβ 基因的 SP2/0-ehCGβ 细胞的攻击具有明显的保护作用,重组质粒免疫小鼠的成瘤率和平均瘤重均明显低于对照质粒免疫小鼠;并且疫苗诱生的特异性抗 hCGβ 抗体具有一定的抑瘤效应,此效应不依赖于补体,这些研究表明了 TR421-hCGβ 重组质粒基因免疫诱导的 ehCGβ 特异性免疫应答具有抗肿瘤作用<sup>[8-9]</sup>。

为进一步探讨 ehCGβ 肿瘤基因疫苗诱生的细胞免疫应答在其抗肿瘤效应中的作用,在本研究中我们首先在体外研究了 ehCGβ 肿瘤基因疫苗诱导的特异性 CTL 杀伤活性。结果表明其诱导的效应细胞可特异性杀伤表达 ehCGβ 的靶细胞 Sp2/0-ehCGβ,杀伤率明显高于对照靶细胞 Sp2/0-preS2/S。在此研究基础上我们将 TR421 质粒基因免疫小鼠的脾细胞和 TR421-hCGβ 质粒基因免疫小鼠的脾细胞分别过继给正常小鼠,然后在小鼠腹部分别接种 Sp2/0-ehCGβ 和 Sp2/0-preS2/S 细胞。

研究结果显示,在效应脾细胞过继小鼠中,Sp2/0-preS2/S 细胞均形成了实体瘤,而 Sp2/0-ehCGβ 细胞仅在 2 只小鼠形成实体瘤,其形成的瘤重明显低于 Sp2/0-preS2/S 细胞形成的肿瘤,与对照脾细胞过继小鼠 Sp2/0-ehCGβ 细胞实体瘤比较,瘤重也下降了 38.52%;在对照脾细胞过继小鼠中,Sp2/0-ehCGβ 和 Sp2/0-preS2/S 细胞都形成了实体瘤,两者形成的实体瘤重没有明显差异。提示,ehCGβ 肿瘤基因疫苗诱生的效应细胞在抗肿瘤效应中发挥重要作用,该细胞的过继免疫使正常小鼠获得了特异性的抗肿瘤能力。此结果进一步证明了 ehCGβ 肿瘤基因疫苗诱导的细胞免疫应答在抗 ehCG<sup>+</sup> 肿瘤方面发挥非常重要的作用。

在本研究中我们证明了 ehCGβ 肿瘤基因疫苗诱生的效应细胞可特异性杀伤肿瘤细胞,将效应细胞过继给正常小鼠,可使后者获得特异性的抗肿瘤效应,这一研究结果为进一步了解 ehCGβ 肿瘤基因疫苗诱导

的细胞免疫在抗肿瘤中的作用提供了新的实验依据,为该疫苗的应用提供了实验基础,并且提示此肿瘤疫苗可能有很好的临床应用前景。

## 【参考文献】

- [1] Gailani S, Chu TM, Nussbaum A, *et al.* Human chorionic gonadotrophin (HCG) in nontrophoblastic neoplasms [J]. *Cancer*, 1976, 38(4): 1684-1686.
- [2] Moulton HM, Yoshihara PH, Mason DH, *et al.* Active specific immunotherapy with a beta-human chorionic gonadotropin peptide vaccine in patients with metastatic colorectal cancer: Antibody response is associated with improved survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2044-2051.
- [3] Higashida T, Koizumi T, Yamaguchi S, *et al.* Ovarian malignant mixed mesodermal tumor producing the free form of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin [J]. *Int J Clin Oncol*, 2001, 6(2): 97-100.
- [4] Dangles V, Halberstam I, Scardino A, *et al.* Tumor-associated antigen human chorionic gonadotropin beta contains numerous antigenic determinants recognized by *in vitro* induced CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 50(12): 673-681.
- [5] Acevedo HF, Hartssock RJ, Maroom JC. Detection of membrane-associated human chorionic gonadotropin and its subunits on hu-

man cultured cancer cells of the nervour system [J]. *Cancer Detect Prev*, 1997, 21(4): 295-303.

- [6] 王立新, 熊思东. 异位 hCG 与恶性肿瘤关系的研究进展 [J]. *中国癌症杂志*, 2001, 11(3): 270-272.
- [7] 王立新, 熊思东. 基于异位 hCG 的肿瘤免疫生物治疗 [J]. *生命的化学*, 2001, 21(3): 240-242.
- [8] 王立新, 吴瑾, 关庆东, 等. 异位 hCG  $\beta$  基因免疫诱导的特异性抗肿瘤免疫应答 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25(4): 316-319.
- [9] 王立新, 徐薇, 关庆东, 等. ehCG $\beta$  肿瘤基因疫苗诱导抗体的抗肿瘤作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(4): 239-242.
- [10] Tang D, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune responses [J]. *Nature*, 1992, 356: 152-154.
- [11] Acevedo HF, Tong JY, Hartssock RJ. Human chorionic gonadotropin beta subunit gene expression in cultured human fetal and cancer of different types and origins [J]. *Cancer*, 1995, 76(8): 1467-1475.
- [12] Acevedo HF, Hartssock RJ. Metastatic phenotype correlates with high expression of membrane-associated complete  $\beta$ -human chorionic gonadotropin *in vivo* [J]. *Cancer*, 1996, 78(11): 2388-2399.

[收稿日期] 2003-11-27

[修回日期] 2004-02-10

## · 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0083-01

## 胃腺癌细胞三磷酸肌醇受体 3 的表达

王建国<sup>1</sup>, 刘晓云<sup>1</sup>, 汤燕平<sup>2</sup> (1. 青海省人民医院病理科, 西宁 810007; 2. 青海医学院生理室, 西宁 810001)

1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)在功能上是许多激素、生长因子和神经递质的第二信使,IP3受体(IP3-R)通常局限于内质网,但也被证实存在于核和质膜上。我们采用免疫组织化学染色 SP 方法检测 IP3 的 III 型受体(IP3-R3)在胃腺癌细胞的表达。操作按说明书进行,用 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性反应细胞呈黄色到棕黄色颗粒。用多功能真彩色病理图像分析系统(北京麦克奥迪图像技术有限公司产品)分析图像,计算阳性细胞百分率,进行 IP3-R3 定量分析。所有数据均以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,方差分析,胃腺癌细胞与正常胃黏膜上皮细胞间的比较用 *t* 检验处理。

结果发现,与正常胃黏膜上皮细胞比较,胃腺癌细胞质中 IP3-R3 呈强阳性表达,细胞阳性率显著增加( $P < 0.05$ )。胃腺癌细胞 IP3-R3 的数量值、面密度和数密度平均值分别为 75.7, 0.00805 和 0.00403,正常胃黏膜上皮细胞则分别为 32.6, 0.02088 和 0.0017,两者间差异显著( $P < 0.01$ )。

有资料表明,某些鸟苷酸结合蛋白(G蛋白)偶联受体活化促进细胞增值的机制与磷酸肌醇(phosphoinositide, PI)水解和蛋白激酶 C 活性有关。DNA 合成在 PI 水解作用强的情

况下明显增加,反之,DNA 合成减少,这些过程可能有 IP3 的参与。我们观察到胃腺癌细胞内 IP3-R3 的数目大大高于正常胃黏膜上皮细胞,表明 IP3 增加的同时,其受体数目也相应增加,两者共同作用,调节细胞的增值、分化。正常胃黏膜上皮细胞 IP3-R3 的面密度大于胃腺癌细胞,说明正常细胞内 IP3-R3 的分布区域广泛。胃腺癌细胞 IP3-R3 的分布区域集中,局部作用增强,提示癌细胞信息转导通路特征改变,使信息物质集中作用于某些部位,引起特定的生物学效应。胃腺癌细胞数密度大于正常细胞,表明癌细胞单位面积上受体数目增多,介导的信息传递作用增强。其原因可能与胞内受体的合成增加、分解减少、受体下调作用受抑制有关。由于受体可持续发挥作用,有利于刺激细胞生长。

[关键词] 胃腺癌细胞; 三磷酸肌醇受体 3; 免疫组织化学  
[中国分类号] R735.2 [文献标识码] D

[收稿日期] 2003-07-02

[修回日期] 2003-09-10

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(00253)