

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0105-05

常规化疗药物连续刺激对人肺腺癌细胞株表达 erbB-2, p53 和 MDR1 的影响

迟志宏¹, 张积仁¹, 李 鹏¹, 刘端祺²(1. 第一军医大学珠江医院肿瘤科, 广州 510282; 2. 北京军区总医院肿瘤科, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 分析常规化疗药物连续刺激对肿瘤细胞株表达 erbB-2, p53 和 MDR1 的影响, 为联合应用生物治疗提供实验基础。**方法:** 人肺癌细胞株经 ADM, VP-16, DDP 单药及联合用药连续刺激, 每种药物分 2 个剂量梯度。应用流式细胞术分别检测 erbB-2, p53 和 MDR1 的阳性细胞数及平均荧光强度, 以此推算出不同药物在不同浓度下连续 2~3 次作用后细胞株以上各蛋白表达的细胞数、平均表达量、总表达量, 同时设对照组。**结果:** 随着培养时间的延长各项检测指标其阳性细胞的百分数、平均荧光强度及总荧光强度均呈下降趋势。高剂量各组 erbB-2 和 MDR1 以上各项指标基本上均随刺激次数的增加呈下降趋势, 而低剂量各组的检测指标则有升有降; p53 的表达无一定规律, 但第三次刺激后药物组的表达均高于对照组。**结论:** 化疗药物连续刺激后, 特别是小剂量化疗后, erbB-2, p53 和 MDR1 的表达可不同程度增高, 提示临床上针对这些分子对病人实施生物治疗时应考虑化疗药物的影响。

[关键词] 人肺癌细胞株; 流式细胞术; 化疗; 生物治疗; erbB-2; p53; MDR1

[中图分类号] R734.2; R730.5 [文献标识码] A

Effects of Repeated Treatment by Anticancer Drugs on Expression of erbB-2, p53 and MDR1 in Human Lung Cancer Cell Line

CHI Zhi-hong, ZHANG Ji-ren, LI Peng, LIU Duan-qi (1. Department of Oncology, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; 2. Department of Oncology, Beijing Army General Hospital Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the variation of the proteins of erbB-2, p53 and MDR1 in repeated treatment by anticancer drugs and the effects on biotherapy. **Methods:** The human lung cancer cell line (LPET-a-1) was repeatedly treated by anticancer drugs—doxorubicin, etoposide, cisplatin and combination of the three drugs, and every drug was given in two concentrations. erbB-2, p53 and MDR1 were tested by flow cytometry. The percentage of cells expressing these proteins and the mean quantity of them were acquired. We could calculate the number of cells expressing each protein, the mean quantity of each protein and the total one after each treatment by different drugs in different concentration. **Results:** The levels of every protein decreased along with the time of cell culture. In high-dose groups, almost every item of erbB-2 and MDR1 was downregulated along with the times of treatment. In low-dose groups, there was not a rule of the item's variation and some of them increased. There was not a rule of p53 variation, and the expression of it in drug groups was higher than that in control at the third drug treatment. **Conclusion:** After treated by anticancer drugs, especially in low-dose, the expressions of erbB-2, p53 and MDR1 increased at different level. These data suggested that the patients suffering from cancer should be given adequate biotherapy after chemotherapy in clinical practice.

[Key words] human lung cancer cell line; flow cytometry; chemotherapy; biotherapy; erbB-2; p53; MDR1

* 肿瘤的生物治疗作为恶性肿瘤治疗的四大手段之一正在被越来越广泛地应用于临床, 其中基因治疗的进展也显示了一些可喜的苗头, 目前已认为有治疗价

[作者简介] 迟志宏(1966-), 女, 吉林省长春市人, 主治医师, 主要从事肿瘤内科治疗方面的研究

值可能的基因数量在迅速增加^[1]。然而癌基因及抑癌基因的表达情况对于基因治疗的具体实施以及效果均有着重要影响,由于接受基因治疗的肿瘤患者常常已接受过其它手段的治疗,特别是化疗,因此化疗药物对这些基因表达有哪些作用就显得尤为重要。临床上通常采用的同一种化疗方案连续进行4~6个周期的治疗,对于癌基因及抑癌基因表达的影响,目前尚无文献报道。本文通过对人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 进行连续的化疗药物刺激,包括高剂量、低剂量及单一用药、联合用药,观察癌基因 erbB-2、抑癌基因 p53 以及多药耐药基因 MDR1 的变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料来源

人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 购自中国医学科学院上海生化研究所细胞库。细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Hyclone 公司。抗 erbB-2, p53, MDR1 的一抗及荧光标记的抗小鼠二抗购自北京中山公司。化疗药物阿霉素(adriamycin, ADM)、足叶乙甙(etoposide cisplatin, VP-16)、顺铂(cisplatin, DDP)分别购自浙江海正药业股份有限公司、北京双鹤现代医药技术有限责任公司、山东齐鲁药业股份有限公司。二氧化碳细胞培养箱及倒置显微镜为日本三洋公司产品。流式细胞仪为美国库尔特公司产品。

1.2 人肺腺癌细胞株体外常规化疗模型的建立

LTEP-a-2 在 96 孔板中培养,将 ADM, VP-16, DDP 稀释成不同浓度,分别加入其中,用 MTT 法测定,分别求出这 3 种药物的 IC₅₀, IC₄₀, IC₃₀, IC₂₀, IC₁₀ 的浓度。以每种单药及联合用药(这 3 种药物联合时剂量减半)所求得的不同浓度分组。同时设对照组,加药后 3 d 换培养基,并按各药物的半衰期计算余药量加入相应的化疗药物。过夜后留下 1 瓶细胞继续培养、传代,其余细胞消化、处理后上机检测。药物的加入方法为:ADM, DDP 均为第 1 天一次性加入培养基中,VP-16 的剂量分为 3 d 分次加入,联合组为第 1 天加入 ADM, DDP 的全量及 VP-16 的 1/3 量,第 2,3 天再各加 VP-16 的 1/3 量。药物浓度高的组加药后细胞死亡,无法进行下一周期的药物刺激,最后剩下可以连续化疗的组为 ADM 的 IC₂₀, IC₃₀ 组, DDP 的 IC₅, IC₁₀ 组, VP-16 的 IC₂₀, IC₃₀ 组,以及联合药物的 IC₁₀, IC₂₀ 组。

1.3 人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 不同浓度化疗药物刺激周期的确定

每组 10 瓶细胞,当细胞从化疗药物刺激中逐步恢复,又增殖为 10 瓶时即可实施下一次药物刺激。不同药物及不同浓度细胞增殖的速度不同,所以周期也代

表着药物对细胞增殖的影响。

1.4 流式细胞仪检测 erbB-2, p53, MDR1 的表达

消化的细胞经 PBS 洗 2 遍后,加入 0.5% 多聚甲醛固定 30 min;分 2 管,一管加 0.1% Triton 细胞打孔 45 min, PBS 漂洗,然后加抗 p53 的一抗,另一管直接加抗 erbB-2, MDR1 的一抗 37℃ 60 min;洗去未结合的一抗,加入荧光标记的抗小鼠的二抗 37℃ 孵育 30 min;洗去多余的二抗,加鞘液 500 μl,细胞重悬后上机检测。每管测 3 000 个细胞,记录阳性细胞的百分数和平均荧光强度(以此代表与细胞结合的平均抗体量),二者乘积为每管细胞所结合的抗体总量,也相当于细胞所表达的 erbB-2, P53, MDR1 的蛋白的总量。

1.5 统计学处理

MTT 分析和流式细胞仪检测分别重复 3 次和 2 次,结果表示为平均数。

2 结果

对照组随着培养时间的延长各项检测指标其阳性细胞的百分数、平均荧光强度及总荧光强度均呈下降趋势。

2.1 人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 连续化疗药物刺激 3 个周期 erbB-2 的表达情况

因为 VP-16 组和联合化疗的 IC₂₀ 组细胞增殖较慢,所以仅完成 2 个周期; DDP 组其浓度高于 IC₂₀ 组的细胞在第 1 次化疗药物刺激后全部死亡,故又补做 IC₅ 组。随刺激次数的增加,对照组及高剂量各组 erbB-2 的阳性细胞数和表达量均呈下降趋势;但是,在低剂量 DDP 和联合用药组中 erbB-2 的表达呈现先降后升趋势,且在第 3 次给药后其总量明显高于对照组(表 1)。

2.2 人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 连续化疗药物刺激 3 个周期 p53 的表达情况

对照组以及 ADM, DDP 的高剂量组、ADM、联合用药的低剂量组均随刺激次数的增加 p53 的表达量呈先升后降趋势;而 VP-16 的高剂量组呈上升趋势;其余各组呈下降趋势。总之,在化疗药物连续刺激后, p53 表达的变化无一定规律,但第 3 次药物刺激后,所有药物组的表达量均高于对照组(表 2)。

2.3 人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 连续化疗药物刺激 3 个周期 MDR1 的表达情况

从结果中可以看到高剂量 ADM 和 VP-16 刺激后表达 MDR1 的细胞数明显增多,而且高剂量各组随刺激次数的增加 MDR1 阳性细胞数逐渐下降, MDR1 的表达量也呈下降趋势;低剂量组 MDR1 阳性细胞数及 MDR1 的表达量随刺激次数的增加有升有降,无一定规律,但以表达增加居多(表 3)。

表 1 LTEP-a-2 各组连续化疗药物刺激 3 个周期 erbB-2 的表达

Tab. 1 The Expression of erbB-2 in LTEP-a-2 cell line

| Treating times | | ADM | | DDP | | VP-16 | | Comminrf | | Control |
|----------------|---------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| | | IC ₂₀ | IC ₃₀ | IC ₅ | IC ₁₀ | IC ₂₀ | IC ₃₀ | IC ₁₀ | IC ₂₀ | |
| 1 | Positive cell number(%) | 99.0 | 99.9 | 59.9 | 60.8 | 89.7 | 98.6 | 45.2 | 93.7 | 100 |
| | Mean quantity | 5.8 | 17.1 | 1.8 | 1.6 | 3.3 | 16.1 | 1.6 | 3.0 | 7.2 |
| | Total quantity | 570.2 | 1708.3 | 108.4 | 94.8 | 296.9 | 1587.5 | 71.9 | 277.4 | 720 |
| 2 | Positive cell number(%) | 43.1 | 92.0 | 57.2 | 59.2 | 57.2 | 12.5 | 12.0 | 3.6 | 77.0 |
| | Mean quantity | 1.6 | 2.8 | 1.5 | 1.5 | 1.7 | 1.4 | 1.7 | 1.4 | 1.6 |
| | Total quantity | 70.7 | 253.0 | 83.7 | 88.7 | 97.7 | 17.5 | 20.3 | 5.3 | 122.0 |
| 3 | Positive cell number(%) | 9.2 | 55.3 | 88.4 | 6.8 | | | 93.2 | | 51.6 |
| | Mean quantity | 1.4 | 1.5 | 1.8 | 1.6 | | | 2.1 | | 1.4 |
| | Total quantity | 13.2 | 81.3 | 162.2 | 10.9 | | | 199.4 | | 72.0 |

表 2 LTEP-a-2 各组连续化疗药物刺激 3 个周期 p53 的表达

Tab. 2 The expression of p53 in LTEP-a-2 cell line

| Treating times | | ADM | | DDP | | VP-16 | | Comminrf | | Control |
|----------------|---------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| | | IC ₂₀ | IC ₃₀ | IC ₅ | IC ₁₀ | IC ₂₀ | IC ₃₀ | IC ₁₀ | IC ₂₀ | |
| 1 | Positive cell number(%) | 46.9 | 78.5 | 44.3 | 0.5 | 93.2 | 96.8 | 29.7 | 77.6 | 93.6 |
| | Mean quantity | 1.6 | 2.0 | 1.8 | 2.0 | 3.8 | 3.2 | 2.1 | 2.4 | 2.9 |
| | Total quantity | 76.0 | 157.0 | 78.0 | 1.0 | 352.3 | 311.7 | 63.0 | 183.9 | 273.2 |
| 2 | Positive cell number(%) | 99.3 | 93.3 | 2.6 | 85.3 | 9.4 | 99.9 | 91.8 | 2.0 | 96.7 |
| | Mean quantity | 11.0 | 3.1 | 1.8 | 7.3 | 1.6 | 1.7.0 | 2.4 | 1.4 | 1.6 |
| | Total quantity | 1092.3 | 287.2 | 4.7 | 622.8 | 14.9 | 1698.3 | 216.6 | 2.8 | 521.9 |
| 3 | Positive cell number(%) | 5.4 | 9.6 | 2.5 | 1.9 | | | 4.9 | | 0.4 |
| | Mean quantity | 1.9 | 1.6 | 1.8 | 1.4 | | | 1.5 | | 1.8 |
| | Total quantity | 10.3 | 15.4 | 4.3 | 2.8 | | | 7.4 | | 0.7 |

表 3 LTEP-a-2 各组连续化疗药物刺激 3 个周期 MDR1 的表达

Tab. 3 The expression of MDR1 in LTEP-a-2 cell line

| Treating times | | ADM | | DDP | | VP-16 | | Comminrf | | Control |
|----------------|---------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| | | IC ₂₀ | IC ₃₀ | IC ₅ | IC ₁₀ | IC ₂₀ | IC ₃₀ | IC ₁₀ | IC ₂₀ | |
| 1 | Positive cell number(%) | 84.4 | 96.3 | 12.8 | 28.8 | 15.3 | 93.8 | 7.8 | 42.1 | 67.4 |
| | Mean quantity | 6.0 | 9.8 | 2.0 | 2.4 | 2.4 | 13.5 | 2.0 | 2.1 | 2.7 |
| | Total quantity | 508.1 | 943.7 | 25.0 | 69.0 | 37.3 | 1266.3 | 15.3 | 89.7 | 182.7 |
| 2 | Positive cell number(%) | 7.6 | 47.1 | 19.0 | 12.8 | 68.5 | 7.7 | 10.8 | 1.5 | 44.9 |
| | Mean quantity | 2.4 | 2.0 | 2.3 | 1.6 | 2.1 | 2.2 | 1.4 | 2.5 | 1.7 |
| | Total quantity | 17.9 | 93.5 | 43.2 | 20.9 | 144.1 | 17.1 | 15.1 | 3.7 | 77.2 |
| 3 | Positive cell number(%) | 53.0 | 2.7 | 11.1 | 1.7 | | | 48.2 | | 5.9 |
| | Mean quantity | 1.5 | 1.6 | 1.4 | 2.2 | | | 3.7 | | 1.8 |
| | Total quantity | 79.4 | 4.3 | 16.0 | 3.7 | | | 177.6 | | 10.4 |

3 讨论

根据世界卫生组织报告,2000年全球新发癌症病人1 010万人,无论从发病(120万)还是死亡(110万)来看,肺癌均为全球最主要的癌症^[2]。在每年确诊的恶性肿瘤病人中,2/3为中晚期,已失去根治机会,即使接受手术、化疗、放疗为主的综合治疗,有效率依然非常低下。而生物治疗以及基因治疗的开展无疑为中晚期肿瘤患者带来了一线希望。目前用于治疗 erbB-2/HER2 过表达的单克隆抗体 Herceptin 已应用于临床,与化疗合用在一部分乳腺癌病人中提高了疗效,延长了生存期;将抑癌基因 p53 的野生型导入肿瘤细胞的临床试验正在进行中,已看到临床有效和生存期延长的病例;MDR1 的反义 RNA 导入肿瘤细胞可以阻断多药耐药蛋白的表达,提高化疗的有效率。

流式细胞仪采用单克隆抗体、荧光标记结合激光计算机技术的检测手段,检验结果快速、客观、精确,用流式细胞术检测肿瘤细胞连续化疗药物刺激过程中有关蛋白的变化规律是一种简便、准确的方法。检测的主要原理仍然是抗原-抗体反应。加入抗这些蛋白的小鼠一抗后,抗体与细胞内的相应抗原结合,抗原表达量越高,则结合上的抗体越多,将未结合的抗体洗去后,再加入用荧光标记的抗小鼠的二抗,这时二抗再与细胞内的一抗结合,去除未结合的二抗,当单个细胞通过流式细胞仪时,测得的荧光量即可代表该细胞所表达的相应抗原量。因此用阳性细胞的百分数与平均荧光强度的乘积即可表达各化疗周期这些蛋白的总量,可将检测指标定量化。人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 是一种贴壁细胞,加入化疗药物后死亡的细胞会悬浮在培养液中,检测前将培养液倒出,并用 D-Hanks 液洗一遍,不仅有利于细胞的消化,而且可保证消化下来进行检测的细胞均为化疗药物刺激后存活的细胞,这些残存的相关蛋白的动态变化规律即可反映出连续化疗刺激对这些基因表达的影响。

erbB-2 属于酪氨酸激酶类癌基因,是表皮生长因子受体家族中的成员,正常细胞不表达。它与表皮生长因子受体有相似的结构,但缺少配体结合区,因此在不结合表皮生长因子的情况下,就会发出与表皮生长因子相似的刺激细胞持续增生的信号,导致细胞转化^[3]。erbB-2 蛋白的功能包括参与细胞增殖、细胞分化等,其过表达往往提示肿瘤细胞的增殖能力强,恶性程度高,预后差,并且常常与易发生转移及化疗耐药有关^[4]。有文献报道阻断 erbB-2 的传导途径或应用抗 erbB-2 的单克隆抗体可以明显抑制 erbB-2 表达阳性的细胞增殖,并增加细胞的凋亡^[5,6]。从本实验可以看出

人肺腺癌细胞株 LTEP-a-2 在体外随刺激次数的增加,对照组及高剂量各组 erbB-2 的阳性细胞数和表达量均呈下降趋势;但是,在低剂量 DDP 和联合用药组中 erbB-2 的表达呈现先降后升,且在第三次给药后其总量不仅高于对照组,而且也大大高于第一、二次刺激后 erbB-2 的表达量,说明连续低剂量化疗有增加 erbB-2 表达、刺激细胞增殖的趋势。而高剂量组,如 ADM 的 IC₃₀组和 VP-16 的 IC₃₀组,虽然第一次化疗后 erbB-2 的表达明显增高,但是随着化疗次数的增加其表达又大幅度下降,提示给予肿瘤细胞足量化疗时,其增殖能力随着化疗周期而逐渐下降。因此,在对化疗后的病人,特别是在化疗剂量不足时,进行 Herceptin 这类生物治疗时,往往需加大用药剂量,才能达到一定的疗效。

抑癌基因 p53 的突变在肿瘤的发生以及对治疗的反应方面均起着关键作用。将野生型 p53 通过载体导入表达发生 p53 基因突变的肿瘤细胞内,可诱导细胞的凋亡,抑制肿瘤的生长^[7]。本实验发现化疗药物连续刺激后,p53 表达的变化无一定规律,但第三次药物刺激后,所有药物组的表达量均高于对照组。因此,对化疗后病人实施基因治疗时,用药剂量也应略大于初治病人。

多药耐药基因 1 (MDR1) 的编码产物 P-糖蛋白是一种跨膜蛋白,具有将其作用底物(如萘环类及鬼臼碱类药物)从细胞内泵出的功能,从而使细胞免受这些细胞毒药物的损害^[8]。本研究发现随着细胞传代次数的增多,各种蛋白的表达均呈下降趋势,但高、低剂量组的下降趋势略有不同。在高剂量组随着化疗药物刺激次数的增加表达 MDR1 的细胞数及 MDR1 的总表达量均下降,而每个细胞 MDR1 的平均表达量在作为 P-糖蛋白底物的 ADM 和 VP-16 组也呈下降趋势,另二组则无此趋势。此外在高剂量 ADM 和 VP-16 初次刺激时,表达 MDR1 的细胞数较对照组及其它各组明显升高,之后则显著下降。在低剂量各组 MDR1 的阳性细胞数、MDR1 的平均表达量及总量几乎均有升高趋势。末次刺激后,MDR1 的表达总量高剂量组均低于对照组,而低剂量组均高于对照组。提示小剂量化疗有可能诱导耐药蛋白的表达而导致耐药,高剂量化疗出现多药耐药的可能性会降低。目前,针对 MDR1 的基因治疗主要是将 MDR1 导入造血干细胞,从而减轻化疗所造成的骨髓抑制^[9],将 MDR1 的反义 RNA 导入肿瘤细胞以降低耐药性的产生尚未见文献报道。

综上所述,肿瘤细胞接受化疗药物连续刺激时,会对 erbB-2, p53, MDR1 的表达产生或多或少的影 响。因此,在对肿瘤病人实施生物治疗时,应充分考虑病人所进行的先期治疗及各种基因的表达情况,根据具体情

况决定治疗方案,这样才可以达到最佳的治疗效果。

[参 考 文 献]

- [1] Minton NP. Clostridia in cancer therapy[J]. Nat Rev Microbio, 2003, 1(3): 237-242.
- [2] Kim KB, Lotan R, Yue P, *et al.* Identification of a novel synthetic triterpenoid, methyl-2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oate, that potently induces caspase-mediated apoptosis in human lung cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(3): 177-184.
- [3] 汤钊猷 著.《现代肿瘤学》[M]. 第 2 版. 上海医科大学出版社, 2000, 129.
- [4] Ma C, Lin H, Leonard SS, *et al.* Overexpression of ErbB2 enhances ethanol-stimulated intracellular signaling and invasion of human mammary epithelial and breast cancer cells *in vitro* [J]. Oncogene, 2003, 22(34): 5281-5290.
- [5] Alaoui-Jamali MA, Paterson J, Al Moustafa AE, *et al.* The role of ErbB-2 tyrosine kinase receptor in cellular intrinsic chemoresis-

tance: Mechanisms and implications[J]. Biochem Cell Biol, 1997, 75(4): 315-325.

- [6] Lu Y, Zi X, Zhao Y, *et al.* Insulin-like growth factor- I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(24): 1852-1857.
- [7] Shinoura N, Sakurai S, Shibasaki F, *et al.* Co-transduction of Apaf-1 and caspase-9 highly enhances p53-mediated apoptosis in gliomas[J]. Br J Cancer, 2002, 86(4): 587-595.
- [8] Rittierodt M, Harada K. Repetitive doxorubicin treatment of glioblastoma enhances the PGP expression-a special role for endothelial cells[J]. Exp Toxicol Pathol, 2003, 55(1): 39-44.
- [9] Sugimoto Y, Tsukahara S, Sato S, *et al.* Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 *in vivo* from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91[J]. J Gene Med, 2003, 5(5): 366-376

[收稿日期] 2004 - 01 - 10

[修回日期] 2004 - 02 - 15

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0109-01

nm23-H₁ 基因缺失人肺癌细胞株的筛选与鉴定

车国卫, 周清华, 王艳萍(四川省重点实验室四川大学肺癌分子实验室, 成都 610041)

nm23-H₁ 基因已被证明是肿瘤转移抑制基因, 它的结构和功能的异常与癌细胞的侵袭和转移能力密切相关。研究证明 nm23-H₁ 基因的低表达和杂合性缺失与肺癌的高转移性和预后不良有密切关系。周清华等推测 nm23-H₁ 基因可能是“肺癌转移抑制级联”中的关键基因和上游基因, 为了进一步探讨 nm23-H₁ 基因在“肺癌转移抑制级联”中的地位和作用。我们应用 Southern blot, RT-PCR 和 Western blot 检测 9 株人肺癌细胞株中 nm23-H₁ 基因的存在状态。结果表明人大细胞肺癌细胞株 L9981 中存在 nm23-H₁ 等位基因的杂合性缺失, 与其同源的人大细胞肺癌细胞株 NL9980 及其它 7 株细胞株中 nm23-H₁ 基因均以杂合子的形式存在。

自 Ferish 建立了第一个人肺癌细胞系以来, 国内外已先后建立起人肺癌主要组织学类型的细胞系。但各个癌系的生物学特性有很大不同, 尤其是侵袭和转移能力。癌细胞的侵袭和转移能力与肿瘤细胞的异质性及与癌基因活化、过度表达及抑癌基因的突变, 缺失有关。本研究应用 Southern 印记杂交技术对 9 种人肺癌细胞株(其中人大细胞肺癌 3 株、肺鳞癌 1 株、肺腺癌 3 株、小细胞肺癌 2 株) 中 nm23-H₁ 等位基因进行检测, 结果具高转移潜能的人肺大细胞癌 L9981 中存在 nm23-H₁ 等位基因的杂合性缺失, 而其它 8 株人肺癌细胞株中 nm23-H₁ 等位基因均以杂合子存在; 同时应用 RT-

PCR 检测 9 个细胞株中 nm23-H₁ 基因的 mRNA 表达水平, L9981 细胞中 nm23-H₁ 基因 mRNA 的表达缺失, 而其余 8 株细胞中均有不同程度的表达。Western blot 杂交检测 L9981 和 NL9980 细胞中 nm23-H₁ 蛋白表达, 观察到 L9981 细胞株中无 nm23-H₁ 蛋白表达, 而其同源的 NL9980 细胞株中 nm23-H₁ 蛋白表达正常。因此, 本研究从 DNA、RNA、蛋白质三个水平上均证明 nm23-H₁ 基因在人肺大细胞癌株 L9981 中是缺失的, 而来自于同一母系的 NL9980 细胞株中 nm23-H₁ 基因是以杂合子的形式存在的, 其 nm23-H₁ 基因中的结构和功能均是正常的。L9981 和 NL9980 是具有相同的遗传学背景的共源细胞株, 具有高度可比性。这一结果不但支持了肿瘤细胞的异质性理论, 也为研究肺癌转移的分子基础提供了良好模型。L9981 细胞中 nm23-H₁ 基因的缺失与其高转移的恶生表型密切相关。

[关键词] nm23-H₁ 基因; L9981 细胞株

[中图分类号] R734.2; Q786

[文献标识码] D

[收稿日期] 2003 - 09 - 26

[修回日期] 2003 - 11 - 15

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30070333 和 30100075)