论著

文章编号:1000-5404(2005)04-0306-03

反义 annexin Ⅱ对人肺腺癌细胞系 SPC-A-1 裸鼠移植瘤生长的抑制作用

贾晋伟,钱桂生,黄桂君 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 分析 annexinⅡ基因反义表达载体对裸鼠移植瘤生长的影响。**方法** 在裸鼠皮下分别接种 SPC-A-1(亲代组)和 SPC-A-1-annexinⅡ(反义组)细胞,测定成瘤时间、肿瘤体积及重量,显微镜下观察肿瘤细胞及其对周围组织的影响。**结果** 成瘤时间反义组明显晚于亲代组。反义组接种后形成的肿瘤体积、重量均显著低于亲代组,且无一例出现局部侵犯,而亲代组则有2例侵犯周围组织。**结论** annexinⅡ基因在促进肿瘤细胞生长及对周围组织的侵袭方面具有重要作用。

关键词: annexinⅡ;肺癌;裸鼠

中图法分类号: R73-354; R735.9; R977.6 **文献标识码**: A

Effects of annexin Ⅱ antisense vector on the growth of transplanted tumor in nude mice

JIA Jin-wei, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To analyze the effects of annexin Ⅱ antisense expression vector on the growth of the transplanted tumor in nude mice. **Methods** The SPC-A-1 cells (parental group) and SPC-A-1-annexin Ⅱ cells (antisense group) were inoculated subcutaneously in nude mice respectively. The forming time, volume, and weight of tumor were measured. The tumor cells and the surrounding tissues were observed microscopically. **Results** The forming time of tumor in the antisense group was later than that in the parental group. The volume and weight of tumor in the antisense group were lower than those in the parental group. Furthermore, invasion of tumor in the surrounding tissues was found in 2 cases in the parental group, but not in the antisense group. **Conclusion** The annexin Ⅱ gene may be important in promoting tumor cell growth and invading the surrounding tissues.

Key words: annexin Ⅱ; lung cancer; nude mouse

Annexin Ⅱ是钙依赖性的磷脂结合蛋白 annexins 家族成员之一,其在 DNA 合成及细胞增殖等方面起重要作用,并且在多种不同的肿瘤组织中表达明显升高。我们在前期工作中构建了 annexin Ⅱ的反义表达载体并成功转染人肺腺癌细胞系 SPC-A-1,在细胞水平证实 annexinⅡ具有促进 SPC-A-1 细胞生长和增殖,并提高其生存能力的作用[1]。本研究以裸鼠为模型,分别接种亲代组和反义组细胞,测定成瘤时间、肿瘤体积及重量,显微镜下观察肿瘤组织,以进一步探讨反义表达载体在整体水平对肿瘤细胞生长及其对周围组织的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肺腺癌细胞系 SPC-A-1 及 SPC-A-1-annexin Ⅱ为我所保存[1],按常规方法,即用含 10%新生牛血清(成都哈里公司)的 RPMI1640 培养基(Hyclone),添加抗生素(青霉素及链霉素各 100 U/ml),置于 37 ℃、5%CO_2 孵箱中进行培养。

1.2 裸鼠准备

BALB/c nude 裸小鼠 10 只(由四川省实验动物中心提供),雌雄不拘,随机数字表法将其分为 2 组,每组各 5 只,平均体质量分别为亲代组(Parental group)(11.62 ± 1.14)g、反义组(Antisense group)(10.80 ± 0.83)g($P > 0.05$)。裸小鼠饲养地点位于重庆医科大学实验动物中心,属无特殊病原体饲养室。

1.3 细胞收集

取对数生长中晚期的亲代组和反义组细胞,分别用 0.25%胰蛋白酶消化,将细胞收集于离心管内,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用无血清 RPMI1640 培养基洗涤 2 次,计数活细胞数,调整细胞密度为 5×10^7/ml,将细胞悬浮于 PBS 中备用。

1.4 细胞接种

将裸鼠用乙醚麻醉后,用带 6 号针头的注射器抽取细胞悬液分别接种到亲代组和反义组裸鼠的腋下区皮下,每个点接种的细胞数为 1×10^7。接种瘤细胞后,将裸小鼠送回无特殊病原体饲养室饲养。

1.5 肿瘤观察与测量

自接种之日起,每 2~3 天观察一次瘤结节生长情况,实验结束时用游标卡尺测量记录瘤结节的长度(a)、宽度(b)和高度

作者简介:贾晋伟(1972-),女,山西省朔州市人,博士,主治医师,主要从事肺癌方面的研究。电话:(023)68774603,E-mail:jinweijia2000@sina.com

通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755603

收稿日期:2004-10-08;修回日期:2004-12-25

(c)，按公式计算肿瘤近似体积(V)，$V = abc \times \pi/6$，单位 cm^3。于接种后 40 d 处死动物，取下肿瘤，称取重量，甲醛固定，送病理科切片观察。自接种至出现肉眼可见的瘤结节的时间为潜伏期[2]。

1.6　统计学分析

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　裸鼠体内成瘤情况

接种后两组共 10 只裸鼠均有肿瘤长出，亲代组的潜伏期明显低于反义组；亲代组瘤结节的体积和重量均明显高于反义组(表 1)。

表 1　裸鼠成瘤实验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Results of experiment on the transplanted tumor in nude mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	Number of cell	Growth of nude mouse and transplanted tumor				
		Tumor ratio	Dence (d)	Tumor volume (cm^3)	Tumor weight (g)	Mouse weight (g)
Parental	1×10^7	5/5	6.4±0.89	2.16±0.62	1.37±0.40	17.21±2.16
Antisense	1×10^7	5/5	7.6±0.54	1.28±0.32	0.74±0.25	20.60±2.89
t			−2.558	2.806	3.035	−2.100
P			0.034	0.023	0.016	0.069

2　病理学结果

2.2.1　大体标本　　接种部位皮下形成瘤性结节，呈圆形或卵圆形，有分叶。反义组瘤结节表面光滑，覆有完整的白色薄层包膜，与周围组织分界清楚；亲代组瘤结节有 2 例可见侵犯周围组织，表面包膜结构破坏。两组切面均呈灰白色、质脆、部分区域有坏死。

2.2.2　镜检　　两组肿瘤细胞形态大致相同。细胞体积中等偏小，大小不一，异形性明显，多数细胞胞浆较少，嗜碱性，核间变明显，易见肿瘤性分裂象。瘤细胞呈广泛浸润性生长，可见片状坏死。亲代组可见部分瘤结节周缘不完整，无明确包膜，有周缘侵犯致结构破坏，反义组未见明确瘤细胞周缘侵犯现象，见图 1、2。

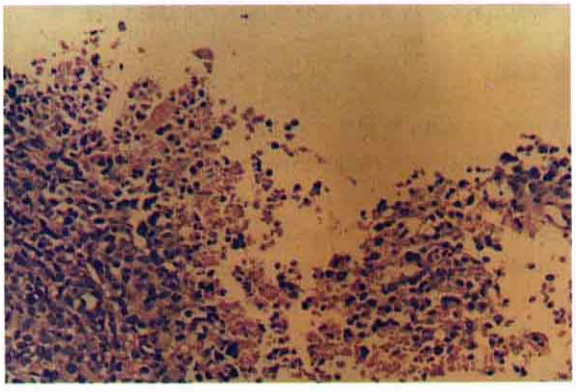


图 1　新代组移植瘤　(HE × 200)

Fig 1　The transplanted tumor in the parental group　(HE × 200)

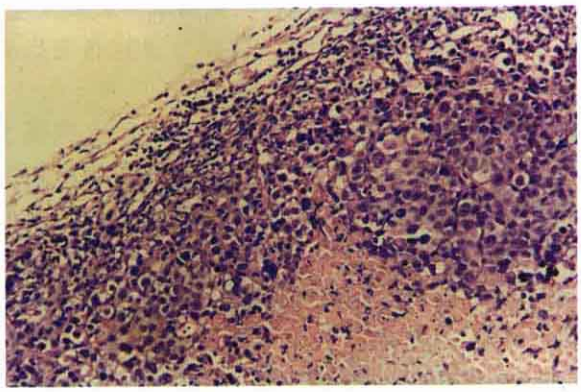


图 2　反义组移植瘤　(HE × 200)

Fig 2　The transplanted tumor in the antisense group　(HE × 200)

3　讨论

本研究将亲代组和反义组细胞分别接种 5 只 BALB/c nude 裸小鼠，所有小鼠在接种 6 ~ 8 d 均可见肿瘤长出，其中亲代组成瘤时间明显低于反义组；亲代组的肿瘤体积和重量均显著高于反义组，说明反义表达载体显著抑制了裸鼠移植瘤的生长，证实反义表达载体不仅在细胞水平可显著抑制肿瘤细胞 DNA 合成及增殖[1]，在整体水平同样具备抑制作用。

有研究表明 annexin Ⅱ 在肿瘤局部侵袭中也起着重要作用。Tressler 等[3] 以单层微血管内皮细胞为模型、使用亲和分离技术研究鼠淋巴瘤肝转移细胞株 RAW117 与鼠肝微血管内皮细胞粘附过程中的相关分子，结果表明 RAW117 表面表达的 annexin Ⅱ 部分介导了钙离子依赖性的 RAW117 与肝微血管内皮细胞之间的粘附，且 annexin Ⅱ 抗体可以抑制 RAW117 与内皮细胞粘附能力的 40% ~ 50%。

annexin Ⅱ 可分布于胞核、胞浆及细胞表面，胞外的 annexin Ⅱ 有两种存在形式：可溶型及膜结合型[4]。研究表明，胞外的 annexin Ⅱ 是组织型纤溶酶原激活物、纤溶酶原及细胞粘合素 C 的受体[5]，除此而外它尚可与一些细胞外基质(如：Ⅰ型胶原)相互作用。有研究人员观察到半胱氨酸蛋白酶——组织蛋白酶 B 在多种肿瘤，尤其是在瘤组织侵犯正常组织的边缘部位表达上调，且在肿瘤细胞表面已证实有组织蛋白酶 B 与 annexin Ⅱ 四聚体相互作用。组织蛋白酶 B 可以降解多种细胞外基质蛋白如：Ⅳ型胶原、层粘连蛋白等，可以激活尿激酶型纤溶酶原激活物的前体。值得注意的是，组织蛋白酶 B、纤溶酶原/纤溶酶、组织型纤溶酶原激活物及细胞粘合素 C 等均与肿瘤的发展及转移关系密切，由此推测：通过 annexin Ⅱ 使以上多种蛋白酶及其底物在肿瘤细胞表面共区域化(colocalization)，可

能促进:①激活蛋白酶前体启动蛋白水解级联反应;②选择性降解细胞外基质蛋白,从而导致肿瘤细胞从原发肿瘤脱离并迁移、侵犯局部组织[6]。

我们在切取移植瘤时注意到,亲代组5只裸小鼠中有2只瘤组织已侵犯到周围组织,移植瘤包膜消失并与周围组织粘连明显,组织切片表明两组肿瘤细胞形态大致相同,但亲代组可见部分瘤结节周缘不完整,无明确包膜,有周缘侵犯致结构破坏,而反义组无一例出现此种情况,推测反义表达载体可能通过抑制annexinⅡ的表达削弱了肺癌细胞表面一系列的蛋白水解过程,因而显著降低了肺癌细胞对其周围组织的侵袭作用。

结合以上文献报道及本研究结果,我们认为annexinⅡ不但在细胞水平具有促进肺癌细胞生长和增殖的作用,在整体水平也具有上述作用,并且在促进癌细胞对周围组织侵袭方面具有重要作用,从而促进肺癌的发生和发展,因此有必要进一步探讨其在肺癌诊断与治疗中的作用。

参考文献:

[1] 贾晋伟,钱桂生,黄桂君. Annexin Ⅱ基因反义表达载体对肺癌细胞生长的影响[J]. 第三军医大学学报,2004,26(18):1627-1630.

[2] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社西安分公司,1996. 144-146.

[3] Tressler R J, Updyke T V, Yeatman T, *et al*. Extracellular annexin Ⅱ is associated with divalent cation-dependent tumor cell-endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large-cell lymphoma cells[J]. J Cell Biochem, 1993, 53(3): 265-276.

[4] Gerke V and Moss S E. Annexins: from structure to function[J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 331-371.

[5] Kim J, Hajjar K A. Annexin Ⅱ: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor[J]. Front Biosci, 2002, 7(2): d341-348.

[6] Chung C Y, Murphy-Ullrich J E, Erickson H P. Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesion induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin Ⅱ[J]. Mol Biol Cell, 1996, 7(6): 883-892.

(编辑 栾 嘉)

(上接305页)

保守治疗条件,7例不符合保守治疗条件,治疗成功率为77.0%。不符合保守治疗条件有36例,其中7例改手术治疗,保守治疗成功率为80.6%。

出院前了解患者对治疗的满意程度,全部患者都对治疗表示满意。

3 讨论

3.1 关于异位妊娠的整体治疗

随着现代诊断技术水平的提高,异位妊娠的患者人数明显增多,其治疗方法逐渐多样化。而随着生活水平的提高,人们健康保健意识的增强,对医疗知识的了解增多,患者对疾病治疗的自主意识也逐渐增强。我们的问卷调查表明,患者对于不同的治疗方法,会有自己的看法。并且会自己提出要求,确定治疗方式。以往的医疗工作,是由医生根据患者的躯体状况决定治疗方式,而不考虑患者的心理状态和社会经济状态。我院采取了整体治疗的模式,在确定患者的治疗方法时注重与患者的沟通。因而有部分病例不符合保守治疗条件,在患者的强烈要求下,在与她们进行了交流和沟通后,满足了她们的要求,采取了保守治疗,保守治疗的成功率约为80%。与符合保守治疗条件患者的治疗成功率一致。在保守治疗的过程中,部分患者会出现腹痛,我们考虑与药物作用于异位妊娠的病灶有关,进行B超检查可以鉴别是内出血还是药物性的。如果是药物性的腹痛,这部分患者还需要加用止痛药治疗,并且需要用B超检查监测腹腔内出血情况。由于我们在治疗患者身体症状的同时,满足了她们的心理需求,因此她们在出院时对我们进行的治疗都非常满意。

3.2 异位妊娠患者治疗方案的确定需要知情选择

对于异位妊娠治疗方案的确定,以往主要是只根据患者的病情,也就是患者的身体情况,很少考虑患者的心理情况,包括患者对疾病的认知和患者患病阶段的情绪情况。我们对住院治疗的100余例异位妊娠患者进行了疾病相关的认知调查,发现对于各种治疗方案,有约50%的患者会有她们自己的看法和要求,而且她们提出的要求与医疗原则相背,在不影响患者生命安全的前提下,我们在告知了患者相关的治疗知识后,与患者共同确定了让她们满意的治疗方案。在进行保守治疗的过程中,我们每周都和患者进行治疗方案的交流和沟通,需要改变治疗方案者随时进行调整,结果患者对治疗方案都非常满意。随着社会-心理-生物医学模式的发展,心理咨询和知情选择在躯体疾病的治疗中越来越重要,在治疗过程中注重心理治疗,达到身心同治。特别针对有自己固定认知的患者,在确定治疗方案时采取知情选择的方式,有利于患者在治疗过程中的情绪调节和对治疗的积极配合,有利于患者身心健康的恢复,提高整体治疗水平。

关键词:异位妊娠;整体治疗

中图法分类号:R714.220.5 文献标识码:B

参考文献:

[1] 卢焕霞,罗丽莉. 腹腔镜手术治疗异位妊娠236例临床分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2003,19(8):493-494.

[2] Graczykowske J W, Mishell DR Jr. Methotrexate prophylaxis for persistent ectopic pregnancy after conservative treatment by salpingostomy[J]. Obstet Gynecol, 1997, 89(1): 118-112.

[3] Tay J I, Moore J, Walker J J. Ectopic pregnancy[J]. BMJ, 2000, 320(7239): 916-919.

[4] Job Spira N, Boumjer J, Pouly J L, *et al*. Fertility after ectopic pregnancy: first results of apopulation-based cohort study in France[J]. Hum Reprod, 1996, 11(1): 99-104.

(编辑 陈聪连)