基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0525-04

喉癌动物模型中播散肿瘤细胞与突变型 p53 的研究

左汶奇,胡国华,李忠万,张园园,蒋建国
(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立喉癌裸鼠肿瘤模型,进行外周血播散肿瘤细胞(Disseminated tumor cell,DTC)和肿瘤组织突变型 p53 基因的检测,判断两者之间的相关性及早期预示肿瘤远处转移和预后的价值。方法:从 50 只裸鼠中随机选择 40 只建立裸鼠喉癌肿瘤模型,其余 10 只为对照组,采用套式 PCR 法,以 CK19 mRNA 为标记物于肿瘤种植成功后第 10 周检测肿瘤组及对照组裸鼠外周血中的 DTC;以 RT-PCR 和免疫组化法检测肿瘤组织中突变型 p53 蛋白表达情况。待裸鼠死亡后解剖肝、肺及淋巴结,采用连续病理切片 HE 染色证实是否发生转移。结果:肿瘤组 DTC 阳性率为 50.0%(20/40),对照组为阴性,差异有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤组织中突变型 p53 阳性率为 55.0%(22/40),p53 的表达与 DTC 呈正相关。1 年内 DTC 与突变型 p53 都为阳性组中位生存期为 34 周,阴性组为 43 周,生存差异有统计学意义($P<0.05$);阳性组发生远处器官转移率为 38.9%(7/18),阴性组转移率12.5%(2/16),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:DTC 联合突变型 p53 蛋白阳性表达可以作为早期判断肿瘤转移的指标,是预后不良的一组独立危险因素;DTC 与突变型 p53 蛋白表达存在正相关。

【关键词】喉癌;裸鼠;播散肿瘤细胞;p53 基因;肿瘤转移和预后
【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-06

The study of disseminated tumor cell(DTC) and p53 gene in mouse model of laryngocarcinoma

ZUO Wen-qi, et al
(*Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: We established nude mouse model of laryngocarcinoma and detect the disseminated tumor cell of peripheral blood and mutant p53 in tumour tissue, to research the correlation of DTC with variant p53 gene and their value of predicting cancer metastasis and prognosis in laryngocarcinoma. *Methods*: There are 40 nude mice in the experimental group which accepted hypodermic injection of laryngocarcinoma cell, 10 in control. By the reverse transcription polymerase chain reaction and nested polymerase chain reaction (Nest-PCR), we tested CK19mRNA in nude mouse's peripheral blood, as a marker of disseminated cancer cell at the 10th weeks after tumor-planting. We also tested the expression of p53 gene in tumour tissue by RT-PCR and immunohistology. After the nude dead, we dissect lung, liver and lymph node and use continuous pathological dyeing confirmed whether the transfer. *Results*: The positive rate of DTC was 50.0%(20/40), but negative in the control group, the difference was significant($P<0.05$). In tumor tissue, the positive rate of mutant p53 gene was 55.0%(22/40); The expression of DTC was positive correlation with p53. The mean one-year the mean survival time of DTC and p53 positive group was 34 weeks vs 43 weeks in negative group, the difference was significant ($P<0.05$). The positive of group have distant metastasis(38.9%), but in negative group only(12.5%), the difference was significant($P<0.05$). *Conclusion*: The expression of DTC associated with variant p53 protein could be used as an indicator of tumor metastasis, and it might be an independent risk factor for an unfavourable prognosis; DTC was positive correlation with variant p53 protein.

【Key words】Laryngocarcinoma; Nude mouse; Disseminated tumor cell; p53 gene; Tumour metastasis and prognosis

喉癌是头颈部常见肿瘤之一,手术是目前常用治疗方法,但术后复发和远处转移仍然是患者死亡的主要原因。探索其原因可能是由于在术前患者血液、骨髓及淋巴结中已经有散在的肿瘤细胞存在,这些潜在的肿瘤细胞成为日后肿瘤复发、转移的根源;而目前采用的肿瘤临床分期标准尚未将这些播散细胞包括在内,故往往低估了病情,影响肿瘤患

作者介绍:左汶奇(1980-),男,硕士,
研究方向:头颈部肿瘤的研究。
通讯作者:胡国华,男,教授,E-mail:hghcq@sina.com。
基金项目:重庆市自然科学基金(2006 BB5294);重庆市卫生局重点项目(2008-1-16)。

者的远期生存率[1]。此外,喉鳞癌患者的 p53 突变发生率则高达 95%,突变的 p53 失去监测作用,肿瘤细胞无限制增殖[2]。本试验检测 DTC 和突变型 p53 蛋白,判断两者之间的相关性及早期预示肿瘤远处转移、预后的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及分组 BALB/c-nu 裸鼠 50 只(重庆医科大学实验动物中心提供),6 周龄,全部为雌性。体重 25 g左右。无菌条件饲养,保持一定温度、湿度。随机选择 10 只为对照组,其余 40 只建立喉癌肿瘤模型实验组,两组分开饲养。

1.1.2 试剂及仪器 RT-PCR(TakaRa)试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;p53 兔抗人多克隆抗体和免疫组化试剂盒均购自 Dako 公司产品;TRIZOL(invitrogen 公司);淋巴细胞分离液(FICOS 液)购自杭州百通生物技术有限公司;日立 7600 全自动生化分析仪(日本日立公司);Image-Pro Plus5.0 图像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 喉鳞状细胞癌(简称喉鳞癌)Hep-2 细胞悬液的制备

喉鳞癌 Hep-2 细胞株由重庆医科大学附属第一医院实验室常规保存。取对数生长期 Hep-2 细胞,由胰酶消化成单个细胞,RPMI1640 液洗涤,吹打成细胞悬液,用 PBS 液将细胞数调至 1×10^7 个/L 备用。

1.2.2 动物模型的建立 在裸鼠右颈部皮下接种喉癌 Hep-2 细胞悬液 0.2 ml。观察接种部位液体吸收、肿瘤生长过程及裸鼠状况,1 周后即可确定是否种植成功;40 只裸鼠成功建立为喉癌肿瘤模型,待肿瘤生长 10 周,直径 >2.0 cm 时开始取血及切取肿瘤组织。

1.2.3 采血及切取肿瘤组织 乙醚麻醉后,在裸鼠心前区行 0.5 cm 切口(避免皮肤污染),用 2 ml 无菌注射器自心脏采血约 0.8 ml,注入装有足量抗凝剂的无菌试管中。切开裸鼠皮肤,切取适量肿瘤组织(约 1 g)后缝合皮肤。

1.2.4 肿瘤细胞分离和肿瘤组织匀浆 将混有少量抗凝剂的裸鼠外周血加入装有等量的 1640 液的离心管中震荡混匀后,再加入盛有 2 ml 的淋巴细胞分离液(FICOS 液)的离心管中,水平离心 2 000 r×20 min(室温),分离出淋巴细胞和肿瘤细胞即有核细胞。将肿瘤组织用组织匀浆机匀浆后待用。

1.2.5 套式 RT-PCR 检测裸鼠外周血 CK19 mRNA 及肿瘤组织 p53 mRNA 的表达 再按说明分别向上述二者中加入 1 ml TRIZOL 提取总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳证实 RNA 的完整性,合成 cDNA。PCR 反应体系 25 μl,模板 cDNA4 μl,上下游引物各 1 μl,2 × master Mix 12.5 μl,以去离子水补足25 μl。CK19 引物:上游:5'-GTGACATGCGAAGCCAATAT-3',下游:3'-TCCTCATGGTCGCCGAGT-5',CK19 二次引物:上游:5'-CTTCAGGGTCTTGAGATTGAGC-3',下游:3'-TCCTCATGGTCGCCGAGT-5'。p53 mRNA 引物:上游 5'-TTCCTGATAAA CTCGTCGTA-3',下游:3'-CAGAAACTTGGGAACGAA-5'。p53 mRNA 二次引物上游 5'-GTCTACCTCCCGCCATAA-3',下游:3'-TCCCTACAAACCCTCTAC-5'。内参基因 β-actin 上游引物:5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3' 下游:3'-TCGTCCTCATACTGCTCAGG-5'。CK19 mRNA PCR 第一次循环:94℃ 3 min,94℃30 s,55℃30 s,72℃40 s,30 个循环;72℃5 min。第二次循环:模板为第一次 PCR 产物 cDNA 8 μl,其他条件同上;β-actin 亦同前。p53 mRNA PCR 第一次循环:94℃ 3 min,94℃30 s,55℃30 s,75℃15 s,30 个循环;55℃5 min。第二次循环:模板为第一次 PCR 产物产物 cDNA 8 μl, 其他条件同上。产物电泳后经凝胶成像系统(Bio-Rad)成像。

1.2.6 免疫组化法检测肿瘤组织 p53 蛋白表达 采用免疫组化(SP)法操作步骤严格按照说明书进行。抗体稀释浓度为 1:50,PBS 代替一抗作阴性对照,公司提供的标准阳性片为阳性对照。结果判断,p53 胞核呈棕黄色为阳性,按阳性细胞百分比法:阳性细胞 <10%为阴性;>10%为阳性。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件,进行 χ^2 检验和Pearson 相关性分析,生存时间采 Kaplan-Meier 分析、log-rank 比较。

2 结 果

2.1 CK19 mRNA 在裸鼠外周血中的表达

当接种喉癌细胞 10 周后,肿瘤生长直径>2.0 cm 时,以 CK19mRNA 为标记物检测裸鼠外周血中的 DTC,阳性率为 50.0%(20/40),而对照组为阴性,差异有统计学意义($P<0.05$),说明裸鼠肿瘤模型外周血中存在着 DTC(图 1)。

2.2 肿瘤组织中突变型 p53 蛋白的表达

p53 mRNA 在肿瘤组织中表达率为 55.0%(22/40)(图 2);免疫组化示,肿瘤组织内 p53 蛋白在胞核上阳性表达,呈棕黄色,尤以癌巢周围明显(图 3)。

2.3 早期肿瘤转移淋巴结病理连续切片 HE 染色

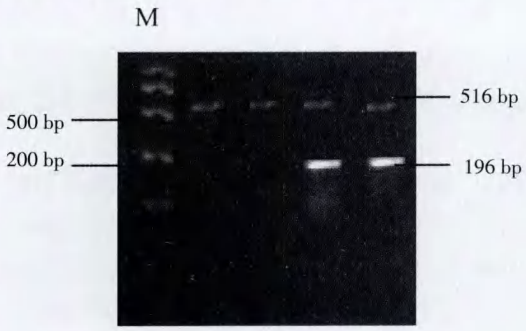
早期转移淋巴结边缘窦上方可见核大深染的喉癌细胞簇即为 DTC,与边缘窦未接触(图 4)。

2.4 阳性组器官转移情况

阳性组发生远处器官转移率为 39.9%(7/18),其中淋巴结转移 4 例,肝脏转移 2 例,肺转移 1 例;DTC 阴性组仅见 2 例淋巴结转移,转移率 12.5%(2/16),差异有统计学意义($P<0.05$)。

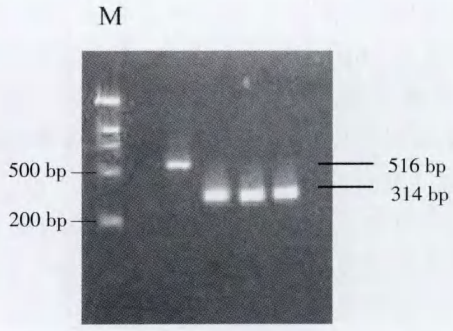
2.5 肿瘤组织中突变型 p53 与 DTC 相关性研究

DTC 阳性组中，p53 也为阳性者为 90.0%（18/20）；而 DTC 阴性组中，p53 蛋白阳性者为 20.0%（4/20）。通过独立性检验 p53 与 DTC 的表达之间存在关联性 $P<0.01$，相关系数 $r=0.57$，$\chi^2=19.8$，$P<0.01$。DTC 和 p53 蛋白在喉癌肿瘤模型的表达存在相关性，且两者的表达呈正相关（表 1）。



（196 bp）M. DL2000Marker；β-actin.516 b p

图 1 CK19 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳



（314 bp）M. DL2000Marker；β-actin. 516 bp

图 2 p53 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳

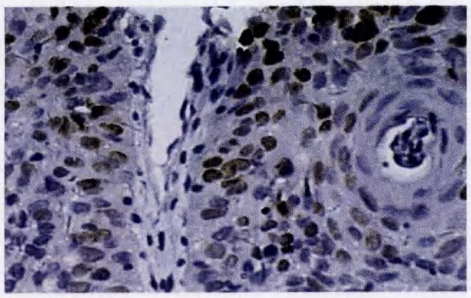


图 3 肿瘤组织内 p53 在胞核表达阳性，呈棕黄色，尤以癌巢周围明显

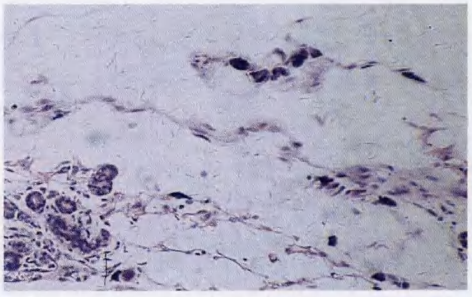


图 4 转移淋巴结边缘窦上方可见核大深染的喉癌 DTC（HE×400）

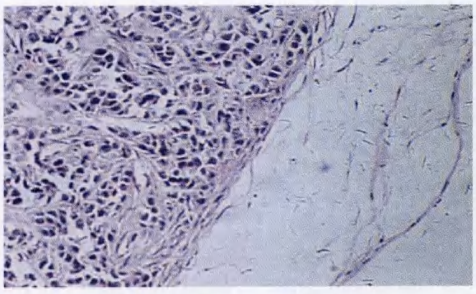


图 5 晚期肿大淋巴结内可见喉癌细胞浸润（HE×400）

表 1 喉鳞癌肿瘤动物模型中 DTC 与突变型 p53 表达的相关性

p53 的表达	DTC		合计
	阴性	阳性	
阴性	16	2	18
阳性	4	18	22
合计	20	20	40

2.6 生存分析

以 1 年（48 周）为观察期，观察 DTC 和 p53 阳性组与阴性组生存期差异情况；DTC 与突变型 p53 阳性组 1 年带瘤生存率 22.2%（4/18），阴性组为 43.8%（7/16），差异有显著统计学意义（$P<0.05$）。生存曲线提示：阳性组中位生存期为 34 周（95%CI：33.0~38.0），阴性组中位生存期为 43 周（95%CI:41.0~45.0），log-rank 检验=4.56，$P=0.032\,7$，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

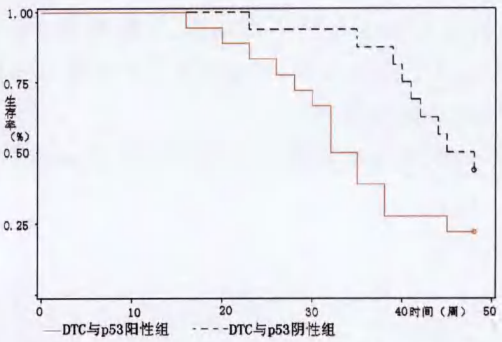


图 6 DTC 和 p53 阳性组与阴性组生存曲线

3 讨 论

近年来,国内外很多学者认为:肿瘤血液、骨髓及淋巴结的微小转移与基因突变存在关联,Holcomb 等[3]认为,基因变异的 DTC 能够增加肿瘤转移潜能,它是通过降低肿瘤细胞间的粘附力和变更机体对肿瘤细胞的监测能力来促进远处播散和继发二次肿瘤。突变基因尤以 p53 最常见约占 35%~45%,并有学者认为这可能是大约 30%的 T_1 期患者术后亦有肿瘤复发、转移的原因[1]。目前喉癌模型中联合 p53 与 DTC 的研究国内外报道尚少。

1999 年国际抗癌联盟对播散肿瘤细胞做出了明确的定义:即单个肿瘤细胞或小的细胞簇[4]。这些潜伏下来的肿瘤细胞进入血管与血小板凝集成团形成不易被机体消灭以及被化疗药物杀灭的癌栓,并粘附在血管内皮细胞表面,通过肿瘤细胞自身的阿米巴运动穿过血管内皮和基底膜,到达机体其他器官,形成新的转移灶[5]。目前病理学尚未正式将 DTC 纳入临床分期,因此漏检率相当高。临床上 T_1N_0 和 T_2N_0 期患者一般仅手术治疗,但手术仅切除实体肿瘤组织,而此时外周血和淋巴结中很可能已经有 DTC 细胞潜伏,当然这些潜伏的肿瘤细胞不一定都形成转移灶,但当机体免疫力下降、环境因素的影响,尤其是患者本身存在 p53 基因突变的情况下,机体对肿瘤细胞失去监测作用,导致肿瘤复发转移的可能性大大增加,因此对突变型 p53 和 DTC 的检测有必要。本试验裸鼠外周血 DTC 的检测采用的是巢式 PCR,它较常规 PCR 更灵敏,其灵敏度为 $1/10^{7}$[6],尤其适合外周血 DTC 的检测;CK19 是国内外公认的、最常见的上皮组织特异性标记物之一,存在于正常上皮组织以及上皮来源的肿瘤组织中,尤其在头颈部鳞状细胞癌组织中高表达,因此 CK19 mRNA 可以作为外周血中播散癌细胞的有效生物标志物[7]。野生型 p53 基因半衰期短,不易检测,突变型 p53 蛋白由于构像改变,半衰期长,在细胞内的稳定性增加能够被检测到[8]。

本试验建立喉癌裸鼠肿瘤模型发现:在喉癌肿瘤模型中 DTC 和 p53 的表达呈正相关,突变的 p53 基因能够增加肿瘤细胞的增值活力;并且能够增加肿瘤细胞微毛细血管和微毛细淋巴管的侵袭力,因此能够促使肿瘤细胞迁徙转移最终形成转移灶。Kaplan Meier 生存曲线,提示 DTC 和 p53 蛋白阳性组中位生存期为 34 周,阴性组中位生存期为43 周,经 log-rank 检验发现阳性组和阴性组生存差异明显。

因此,喉癌裸鼠肿瘤模型中联合外周血 DTC 和肿瘤组织突变型 p53 蛋白的检测,能够有效预测肿瘤远处转移和预后;可能是我们提前洞察到肿瘤转移及复发重要步骤,并能指导临床分期,为临床进一步治疗提供理论依据,使临床治疗更具科学性和合理性。对临床上肿瘤组织突变型 p53 蛋白阳性表达者,尤其是 T_1N_0 和 T_2N_0 期患者应加强外周血及前哨淋巴结 DTC 的检测,而并不是简单的手术治疗,同时应加强临床随访。

参 考 文 献

[1] Gu C D, Osaki, Toshihiro, et al. Detection of micrometastatic tumor cells in pN0 lymph nodes of patients with completely resected nonsmall cell lung cancer: impact on recurrence and survival[J]. Annals of surgery, 2002, 235(1): 133-139.

[2] 方风琴,黄金颖,刘文中,等. 头颈鳞癌 p53、Bcl-2 及 P-gp 表达在治疗中的作用[J]. 实用肿瘤学, 2007, 21(6): 516-518.

[3] Holcomb I N, Grove D I, Kinnunen M, et al. Genomic alterations indicate tumor origin and varied metastatic potential of disseminated cells from prostate cancer patients[J]. Cancer Res, 2008, 68(14): 5599-5608.

[4] 钦伦秀. 肿瘤的分子诊断与预测[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2005.630-657.

[5] 王恩华. 病理学[M]. 第 6 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.91-93.

[6] Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, et al. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptasepolymerase chain reaction assay[J]. Acta Biochim Pol, 2004, 51(3): 747-755.

[7] 王景美,杜 艳,郭 英,等. 食管癌患者外周血 CK19、CK20、CEAmRNA 的表达及临床病理意义[J]. 东南大学学报, 2006, 25(6): 414-418.

[8] Danilova N, Sakamoto K M, Lin S. p53 family in development[J]. Mechanisms of Development, 2008, 125(11-12): 919-931.

(责任编辑:冉明会)