维普资讯 http://www.cqvip.com

99,24(3)
225-227
第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

外周血淋巴细胞双微体(DM)的分子细胞遗传学研究

Q343
Q75

基础医学院生物教研室 段昌柱* 蒲淑萍
建设厂医院外科 郑学军 陈健康

提 要 采用PHA刺激淋巴细胞培养法,在150例标本中观察到了32例具有DM表达,占21.4%,细胞中DM数目1~130对不等,平均10.4对,DM往往出现在有染色体结构和数目改变的细胞中,这种改变包括双着丝粒染色体、内复制、多倍体、亚二倍体等。DM检测与实体组织病理检查相符率93.7%,有6例DM先于病检提示肿瘤存在。本研究提示DM的出现可作为肿瘤的早期分子细胞遗传学信号,赞成DM可作为肿瘤发生的早期指标。本文还对DM形成机制和DM与肿瘤的多药抗药性进行了探讨。

关键词 淋巴细胞; 双微体; 细胞培养 DM 分子细胞遗传学
中图分类号 Q343

分子细胞遗传学研究表明,肿瘤组织、癌细胞株不仅存在着细胞学水平的染色体结构非随机重排,也存在着分子水平的细胞癌基因扩增[1~5]。细胞癌基因扩增在细胞学上表现为双微体 (Double Munite DM)的形成。1982年Cowell[2]报道在神经母细胞瘤患者骨髓细胞中有成对的小体,并证实是由N-myc基因扩增表达的结果之后,DM的研究被广泛受到重视。现在不仅发现有癌基因的扩增,正常的结构基因大量扩增也被证实。为了探讨DM与恶性肿瘤形成的内在联系,寻找癌变早期的分子遗传学信号,我们对肿瘤患者或可疑肿瘤患者外周血淋巴细胞进行了分子细胞遗传学检测,观察到了外周血淋巴细胞癌基因扩增表达。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料

150例标本取自1992~1994年门诊患者;其中男性96人,女性54人;年龄最大76岁,最小1.0岁,平均47.2岁,除一例系手术后放射治疗外,其余均未接受放射治疗和化学治疗。20例对照标本取自正常人群。

1.2 方法

用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂产品)将患者外周血2.0ml悬浮,分离有核细胞加入到PRMI-1640(美国Gibico产品)培养基中,调整细胞浓度至1.0×10^6/ml。培养基内含PHA(本室自制)100μg/ml, 20%小牛血清(Sigma产品),立即置37℃、5.0%CO2孵箱中培养72h,收获前3h加入终浓度为0.125μg/ml秋水仙素溶液(Fluka产品)。淋巴细胞的收获方法按常规进行,具体步骤是:1000r.p.m.离心10min后弃上清,加入预热至37℃的0.075mol/LKCl 8ml轻轻混匀,37℃下保温25min;用Carros'固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)进行预固定, 1000r.p.m.离心10min后沉淀再用上述固定液6.0ml混匀并固定静置过夜;次日按上述方法离心进行第二次固定,离心制成细胞悬液后滴片、Giemsa染色、镜检。每个标本计数200个分裂相,DM判断标准按Cowell[2]描述进行。DM须由三人共同确认。

2 结果

20例对照标本均无DM表达。150例患者中32



920608标本内含5对DM 930403标本内含4对DM,伴有双着丝粒染色体

图 细胞中DM表达

* 男,1965-12出生,讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

例有DM表达,表达率21.4%,与李桂信[6]结果相似,按照标准应为DM(见图)。32例DM阳性标本中,DM阳性细胞总数38个,DM总数396对,每个细胞DM数1～130对不等,平均10.4对,中一例6月后复查时仍有DM,DM较少在正常核型细胞中出现,DM出现往往伴随有染色体数目和结构改变,例如双着丝粒染色体、断裂、多倍体、内复制、亚二倍体等。32例DM阳性中,男性19例,女性13例。

3 讨论

在中期染色体分裂相中,DM是一种小的成对的通常呈圆球状的染色体结构,其数目变化很大,本次研究也证实了这一点。其原因可能与实验室培养有关,有人曾观察到SEWA肿瘤细胞在体内生长时,DM才表达,如若把这些细胞进行体外培养,DM从这些细胞中消失,当把这些细胞再移植到动物体内时,DM又重新出现。电镜下DM完全由折叠成团的染色质组成,两个球形体大小相似,通过染色质丝相联系,就象中期未分开的姐妹染色单体一样[7]。Schawb[8]用原位杂交技术证明了8个神经细胞瘤细胞系中DM是N－myc数量不等的扩增顺序之后,N－ras,N－myc,C－abl,C－myb,C－erbB2,CAD,PALA,二氢叶酸还原酶等基因相继被发现可以构成一些细胞系或实体组织的DM[5,6,8～13]。Smith等[13]在研究金黄地鼠BHK细胞B9染色体上的CAD基因扩增时,发现已扩增为的多拷贝基因的细胞往往具双着丝粒染色体,扩增了的CAD基因一定位于双着丝粒染色体上,Trask等[10]在研究产生多药抗药性的中国仓鼠细胞时,基因的大量扩增也伴随染色体不稳定性增加,本研究结果也证实了这一点。基于上述研究,Smith等还认为,DM的产生是体细胞内发生了姐妹染色单体不均等互换形成。我们的结果也支持他们的观点。业已研究表明,细胞形成双着丝粒染色体后,随着细胞增殖的进行,双着丝粒染色体将进入桥一断一融一桥循环,细胞将遗传物质不均等地分配给子细胞,这更加速了细胞遗传物质的不稳定性。

哺乳动物细胞与细胞毒性药物共培养后会对细胞毒性药物产生抗药性,多药抗药性的产生基于质膜的变化引起胞内细胞毒性药物量的减少,这种现象在临床中常常影响的化疗效果。Roninson等克隆了中国仓鼠抗秋水仙碱亚系细胞的抗药性DNA片断[12],该片断在细胞内扩增时,DM表达,形态学上不仅遗传物质表现不稳定,而且导致质膜变化,细胞能将胞内毒物泵到胞外。当该片断在胞内扩增倍数逐步减少时,细胞的多药抗药性逐渐丢失。后来,Trask等人也证实二氢叶酸还原酶基因的大量扩增是引起中国仓鼠细胞对氨甲喋呤产生抗药性的原因[10]。

1982年Cowell[2]报道在神经母细胞瘤患者骨髓细胞中有成对的小体,并证实是由N－myc基因扩增表达引起的结果,此时对骨髓的病理检查并没有发现异常。有趣的是,8个月后,临床证实该患者出现神经母细胞瘤骨髓转移。Cowell提出:DM可能不仅是恶性肿瘤的表现,而且可能是恶性肿瘤的原因,DM的出现在肿瘤的转移上具有预见价值。食管癌、鼻咽癌患者外周血DM表达时,放疗、化疗均无效,且愈治愈重,生存期明显低于无DM者,提示DM可作为肿瘤的一项独立的预后指标[8,9]。通常认为癌细胞中高水平的癌基因扩增与肿瘤发展、预后相关。例如在神经母细胞瘤患者中其癌组织DM数目越多,病人更易进入进展期;即使同一临床期的肿瘤,含有DM的患者比不含有DM的患者更易进入进展期,这可能N－myc基因扩增授与了细胞的增殖优势[3]。本研14究中一标本因尾骶部溃疡就诊,发现DM后建议临床复查,复查发现患者双侧腹股沟淋巴结肿大,后经病理证实为鳞癌腹股沟转移,象这种情况共有6例。这与Cowell[2]的结果类似。但我们也注意到淋巴细胞DM平均表达率较低(0.59%),必须增加细胞计数以克服假阴性。值得注意的是,我们发现4例乙型肝炎患者有DM表达,业已研究表明乙型肝炎与肝硬化、肝癌有着直接的联系,对这4例患者我们将作更进一步的研究。

参考文献

1.李桂源,等.国外医学 分子生物学分册1986;8(1).1
2.Cowell J. K. .Ann.Rev.Genet.1982; 16 : 21
3.Sanit R. C.,et al.Chrom.Cancer.1990: 2 (1) : 18

维普资讯 http://www.cqvip.com

4.Jack E. M.,et al.Cytogenet Cell Genet .1987; 44:49
5.Wong A.J. , et al.Science 1986; 223 : 461
6.李桂信.等.中华医学遗传学杂志 1997;14(1): 57
7.Konhl N.E.,et al.Science 1984;226:1335
8.Schawb M.,et al.Nature 1984; 308 : 288
9.郭文斌,等.中华医学遗传学杂志 1996 ;13(6): 344
10. Trask, B. J. ,et al.Genes Dev.1989; 1913
11. Schimke R. T.,Cancer Res.1984;44:1735
12. Roninson I. B. ,et al.Nature 1984 , 309 :626
13. Smith K. A .,et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1992; 89:5427

(收稿日期 1998－11－12)

Molecular cytogenetic studies on double munite(DM) of peripheral blood lymphocyte

Duan Changzhu , et al
Department of biology, college of basic medical sciences

Peripheral lymphocyte double munite (DM) expresses of samples from 150 patients have been studied by the method of PHA stimulated cell culture. The results showed that 32 cases (21.4%) had DM expresses.The number of DM per cell ranged from one to 130 with an average of 10.4.DM was always accompanied by chromosome aberrations, e.g. dicentmere chromosomes, endoreplicate, polyploid,hypodiploid.The coincidence between DM and pathology was 93.7%.We suggested that DM could be an early molecular cytogenetic signal for tumor.We also discussed the mechanisme of DM expresses and its relationship to multi－drug resistance.

KEY WORDS lymphocyte; Double munite(DM); Cell culture

227-229

临床分离的马红球菌质粒提取及药物敏感性分析

R378.1
R978.1

微生物学教研室 杨晓燕* 杨致邦

提 要 从我市某职工医院院内感染的病人体内分离到非细胞免疫缺陷者罕见的19株马红球菌。对这些细菌进行抗生素敏感性试验和质粒图谱分析。结果显示这些细菌对多种抗生素有明显的耐药性。未发现毒力质粒,但所有细菌均带有未见报道的9.4kb质粒,其生物学意义有待进一步探讨。

关键词 马红球菌; 抗生素敏感性; 质粒
中图分类号 R965.1

马红球菌是引起马驹支气管肺炎、淋巴结炎和肠炎等疾病的重要病原体[1],其致病与此菌所携带的毒力质粒编码产生毒性蛋白密切相关[2] [6]。近年来发现它还可以引起其他动物包括人的机会性感染,在人类主要发生于严重的细胞免疫功能低下的患者,以AIDS患者和HIV感染者多见[3]·[4]。1996年1～7月,从我市某职工医院因注射感染而引起的局部脓肿和肿大的淋巴结中分离到马红球菌。我们对其做了抗生素敏感性试验和质粒图谱分析,现将结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 标本来源

* 女,1963－01出生,讲师