维普资讯 http://www.cqvip.com

Retroviral vector－mediated expression of human interleukin—4 gene in human tumor cells

Zhao Xiaodong, et al
Department of Immunology, College of Pediatrics

Human interleukin－4 complementory DNA (hIL－cDNA) was amplified from a hIL－4 cDNA－positive plasmid .PCD－hIL－4 by PCR. Sequence analysis showed no mutation occured and the open reading frame was included in the fragment. Human hIL－4 cDNA was inserted into polylinker site of retroviral vector, LXSN to construct recombinant retroviral vector LXSN／hIL－4, in which the transcription of hIL－4 cDNA drived by 5′LTR promoter. The recombinant retrovirus was pakaged in PA317 cell line and used to infect human HL－60, k 562 and Raji cell line in presence of 4μg/ml polybrene. retrotranscriptimal PCR analysis showed hIL－4 cDNA was trancripted in modified tumor cells and the maxmium of IL－4 level secreted by modified tumor cells obtained 300pg/10^6cell－24h.The results suggested that hIL－4 cDNA could be expressed efficiently under the control of vector′s promoter.

KEY WORDS Interleukin－4; Gene transfer; Gene expression

膀胱肿瘤，移行细胞癌，nm23－H1基因 基因表达

4－8

nm23－H_1、C－erbB$_2$蛋白质在膀胱移行细胞癌中的表达*

癌基因，抑癌基因 ②

R737.1402

成都市第一人民医院 秦 方**
基础医学院病理生理教研室 段积华

提 要 采用免疫组织化学S－P法，对61例膀胱移行细胞癌中的肿瘤转移抑制基因nm23－H_1、癌基因C－erbB$_2$蛋白质表达情况进行观察，发现nm23－H_1蛋白阳性率与肿瘤级别及肌层侵袭之间具有良好的负相关($P<0.05$)。C－erbB$_2$蛋白阳性率与肿瘤级别及肌层侵袭之间具有良好的正相关($P<0.05$)。nm23－H_1的阴性表达以及C－erbB$_2$阳性表达与预后不良有关。

关键词 免疫组织化学S－P法；肿瘤转移抑制基因；nm23－H_1；癌基因；C－erbB$_2$；膀胱移行细胞癌
中图分类号 R737.14

自1988年发现nm23基因以来，大量实验证实nm23基因与人类肿瘤转移浸润有关。在乳腺癌[1]、肝癌[2]、结肠癌[3]、胃癌[4]、进展期卵巢癌[5]均发现了肿瘤远处转移或预后不良与nm23低表达有关。

本研究对膀胱移行细胞癌(Transitional Cell Carcinoma,TCC)中nm23－H_1蛋白质以及癌基因C－erbB$_2$蛋白的表达进行观察，探讨其与膀胱TCC恶性程度及预后之间的关系。

1 材料和方法

1.1 组织来源 重庆医科大学附一院1994－1996年间手术切除的膀胱TCC标本，均经HE染色确证为膀胱TCC，选

* 四川省卫生厅重点科研课题
** 女，1968－06出生，住院医师，硕士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

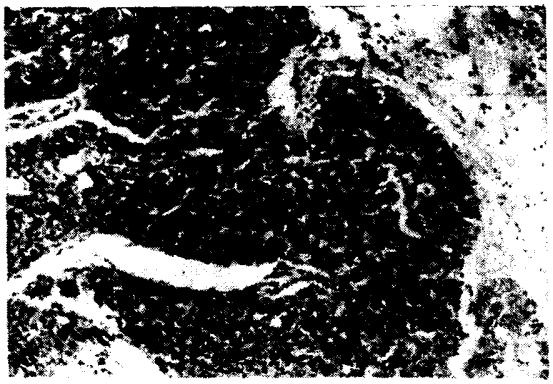


图1 nm23－H_1多抗染色，可见癌组织浆着色，S－P法×100



图2 C－erbB_2多抗染色，可见癌细胞膜着色，S－P法×400

取61例未经抗肿瘤治疗的初发病例，其中GⅠ20例;GⅡ23例;GⅢ18例。以6例膀胱炎性标本及9例癌旁正常粘膜作对照。阳性对照片由迈新公司提供。每一标本均用PBS代替一抗作阴性对照。

1.2 **试剂来源** 抗nm23－H1多克隆抗体和抗C－erbB_2多克隆抗体均为即用型工作液，第二抗体和S－P试剂盒均购自迈新公司。

1.3 **实验方法** 按S－P操作程序，依次加入A:过氧化物酶阻断液;B:非免疫动物羊血清;C:生物素化二抗;D:链霉菌抗生物素蛋白－过氧化物酶溶液，然后DAB染色，苏木素复染胞核，封固，观察。

1.4 **判断标准** 参照张声[6]的标准对nm23－H_1结果进行判定。参照王江[7]的标准对C－erbB_2结果进行判定。本文中仅记"＋"、"－"二个级别。

1.5 **统计学方法** 用x^2分析法。

2 实验结果

2.1 61例膀胱TCC中nm23－H_1蛋白阳性例数23例，阳性率37.7%，阳性染色位于胞浆，呈弥散分布。6例膀胱炎性标本及9例肿瘤旁正常组织呈不同程度阳性染色，经x^2分析发现nm23－H_1蛋白阳性率与膀胱TCC病理级别呈负相关。浅表性膀胱TCC(T_A－T_1)与浸润性膀胱TCC(T_2－T_4)之间阳性率也有显著性差异。本研究未发现nm23－H_1蛋

表1 nm23－H_1蛋白质在膀胱移行细胞癌中的表达

项目	阳性数	阴性数	合计	阳性率	x^2	P
级别						
GⅠ	12	8	20	60%	1.865[A]	>0.05
GⅡ	9	14	23	39.13%	4.038[B]	<0.05
GⅢ	2	16	18	11.11%	9.730[C]	<0.05
合计	23	38	61	37.70%		
肌层浸润						
有	4	17	21	19.05%		
无	19	21	40	47.50%	4.74	<0.05
合计	23	38	61	37.70%		
淋巴结转移						
有	1	4	5	20.00%		
无	22	34	56	39.29%	0.138	>0.05
合计	23	38	61	37.70%		

A GⅠ/GⅡ B GⅡ/GⅢ C GⅠ/GⅢ

表2 C－erbB_2蛋白质在膀胱移行细胞癌中的表达

项目	阳性数	阴性数	合计	阳性率	x^2	P
级别						
GⅠ	3	17	20	15.00%	3.098[A]	>0.05
GⅡ	9	14	23	39.13%	1.952[B]	>0.05
GⅢ	11	7	18	61.11%	8.660[C]	<0.05
合计	23	38	61	37.70%		
肌层浸润						
有	12	9	21	57.14%		
无	11	29	40	27.50%	5.15	<0.025
合计	23	38	61	37.70%		

A GⅠ/GⅡ B GⅡ/GⅢ C GⅠ/GⅢ

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 C－erbB$_2$和nm23－H$_1$蛋白质在线表性和浸润性膀胱TCC中表达情况

	C+n+[A]	C+n−[B]	C−n+[C]	C−n−[D]	合计	x^2	P
线表性肿瘤							
T_A－T_1	3	8	16	13	40	8.15	<0.05
浸润性肿瘤							
T_2－T_4	2	10	2	7	21		
合 计	5	18	18	20	61		

A:C－erbB$_2$阳性 nm23－H$_1$阳性 B:C－erbB$_2$阳性 nm23－H$_1$阴性
C:C－erbB$_2$阴性 nm23－H$_1$阳性 D:C－erbB$_2$阴性 nm23－H$_1$阴性

白的表达与膀胱TCC淋巴结转移之间的关系。(见表1)

2.2 C－erbB$_2$蛋白阳性染色位于癌细胞膜，平均阳性率37.7%。6例非肿瘤标本及9例癌旁正常组织均为阴性。C－erbB$_2$的表达与肿瘤病理级别及肌层浸润情况的关系见表2。

2.3 对nm23－H$_1$及C－erbB$_2$在膀胱TCC中联合表达情况进行分析。

2.3.1 由表3可见，在浅表性膀胱TCC中，以nm23－H$_1$阳性伴C－erbB$_2$阴性出现频率高，占40%(16/40)，而在浸润性膀胱TCC中以nm23－H$_1$阴性率伴C－erbB$_2$阳性出现频率高，占47.6%(10/21)，与其它三种组合情况比较有显著性差异(P<0.05)。

2.3.2 对nm23－H$_1$和C－erbB$_2$二指标在总的61例膀胱TCC中表达情况进行观察，发现二指标交叉阳性，即:nm23－H$_1$阳性、C－erbB$_2$阴性和nm23－H$_1$阴性、C－erbB$_2$阳性出现频率为59.02%(36/61)，较其它二种方式，即:nm23－H$_1$阳性、C－erbB$_2$阳性和nm23－H$_1$阴性、C－erbB$_2$阴性出现频率40.98%(25/61)有显著性差异(P<0.05)见表4。

表4 nm23－H$_1$和C－erbB$_2$在61例膀胱TCC中表达情况

C－erbB$_2$	nm23－H$_1$		合计
	阳性数	阴性数	
阴性数	18	20	38
阳性数	5	18	23
合 计	23	38	61

x^2=4.0068 P<0.05

3 讨论

本研究通过免疫组织化学S－P法清楚地显示出nm23－H$_1$蛋白质在膀胱移行上皮中的定位呈弥散的胞浆分布。在非肿瘤性膀胱移行上皮及癌旁正常上皮中nm23－H$_1$蛋白质都有不同程度的表达，而在肿瘤组织中其阳性率降低，说明nm23－H$_1$可能与维持膀胱移行上皮正常的形态功能有关。

nm23－H$_1$与果蝇的AWd基因具有高度同源性[8]，AWd蛋白对果蝇胚胎以后的发育起着重要的调节作用。AWd基因突变或表达降低将导致果蝇许多器官畸形分化[9,10,11]。因此nm23蛋白可能是正常组织发育所必须的。如果nm23蛋白失活或减少可导致畸形分化和肿瘤发展的紊乱状态。

本研究发现nm23－H$_1$蛋白质在分化良好的低级别肿瘤以及非浸润性膀胱TCC中阳性率明显高于分化不良的高级别肿瘤和浸润性肿瘤，表明nm23蛋白对于维持肿瘤细胞的分化，抑制肿瘤的恶性行为，限制肿瘤发展起着一定的作用。nm23蛋白减少将有利于膀胱TCC癌细胞向更加恶性的方向发展。该结果与Steeg等人发现的在原位乳腺癌中nm23蛋白比浸润性乳腺癌中多见的结果一致。

nm23－H$_1$抑制肿瘤发展可能与以下几种机制有关:①参与G蛋白介导的信号传递[12];②参与微管的聚合和解聚;③影响细胞骨架引起细胞运

维普资讯 http://www.cqvip.com

动。最近Ranjit[13]提出nm23基因可通过抑制可溶性ICAM－1产生，增强肿瘤细胞对LAK细胞的敏感性而参与抑制肿瘤浸润转移和发展。nm23－H_2基因与C－myc的转录因子PuF (Purine－binding transcription factor)完全相同[14]，提示nm23基因与癌基因之间也存在着相互作用。

本研究未发现nm23－H_1蛋白表达与膀胱TCC淋巴结转移之间的关系，可能与有淋巴结转移病例太少有关。值得进一步扩大病例数进行深入研究。

尽管有不少学者认为许多肿瘤，包括膀胱TCC在未发生浸润时已有了淋巴结转移或已有了目前尚无法检出的微小转移灶。但更多的人却认为肿瘤的浸润转移是一个完整的过程中不同的阶段，抑制肿瘤浸润也就抑制了肿瘤的转移[15]。我们的研究虽未发现nm23－H_1与膀胱TCC淋巴结转移之间的关系，但发现了nm23－H_1与传统的代表高转移能力的病理指标:分化程度、肌层浸润之间具有良好的相关性。

在膀胱TCC中，与预后关系最为密切的依次是肿瘤的病理级别和是否具有肌层浸润[15]，尽管我们没有随访资料，但本研究明确显示出nm23－H_1蛋白阳性率与膀胱TCC病理学级别、肌层浸润之间的相关性，表明nm23－H_1蛋白的阳性表达与良好的预后有关。目前虽不能确定其为一个独立的预后指标，但至少是一个与预后有关的指标。

膀胱TCC是继乳腺癌、结肠癌之后第三个C－$erbB_2$表达较高的肿瘤。有八位作者对C－$erbB_2$ P_{185}蛋白在膀胱TCC中表达情况进行研究，发现其阳性率平均29.5%，中位值31.5%。Satak[16]通过随访研究提出C－$erbB_2$是膀胱癌一个独立的预后标记物。我们的研究发现P_{185}蛋白在膀胱TCC中平均阳性率37.7%，略高于上述平均值，可能与采用最新高灵敏的S－P法有关。同多数作者一样，我们也发现了C－$erbB_2$蛋白与膀胱TCC病理学级别肌层浸润之间具有良好的相关性，说明C－$erbB_2$基因的确与膀胱移行上皮癌的恶性表型、肿瘤的恶性行为及预后有关。

我们的研究从蛋白质水平发现在膀胱TCC中，nm23—H_1和C－$erbB_2$二指标交叉阳性出现频率与二指标同时阳性或同时阴性出现频率相比较有显著性差异($P<0.05$)，说明nm23－H_1和C－$erbB_2$在膀胱TCC的发生、发展中可能存在着相互作用，即癌基因C－$erbB_2$蛋白质阳性表达可能会导致nm23－H_1蛋白水平降低。最近Slamon[17]用HER－2/neu基因转染人乳腺癌细胞和人卵巢癌细胞后，发现癌细胞中nm23mRNA水平降低。因而从mRNA水平说明了C－$erbB_2$基因与nm23基因之间存在着相互作用，但其作用的具体机制不清。

免疫组织化学在没有严格对照的条件下，假阳性很少，而假阴性是可能的[18]。将多个指标联合应用就能互相补充，更准确地获取有关肿瘤的信息。本研究发现，在GⅠ期、浅表性膀胱TCC中($T_A－T_1$)，nm23－H_1蛋白阳性率为60%、47.5%，而C－$erbB_2$阳性率分别为15%、27.9%。在GⅢ、浸润性肿瘤($T_2－T_4$)中，nm23－H_1阳性率为11.11%和19.25%，而C－$erbB_2$阳性率高达61.11%和57.14%。因此，在GⅠ期、浅表性肿瘤中用C－erbB2蛋白阳性来判断预后是非常有限的，而且缺乏准确性。同样，在GⅢ、浸润性肿瘤中用nm23－H_1来推测预后其价值也是有限的。将二指标联合应用，可以互相补充，更准确地反映肿瘤的恶性程度，有利于对预后作出正确判定。

参考文献

1.Bevilacqua G,et al.Cancer Res 1989;49:5185
2.Nakayanc T,et al.Clin Exp Metastasis 1993;11:151
3.Yamaguchi A,et al.Br J Cancer 1993;68:1020
4.Kodera Y,et al.Cancer(phila) 1994;73:259
5.Yiel A,et al.Cancer Res 1995;55:2654
6.王 江,等.中华病理学杂志 1994;23:97
7.张 声,等.中华肿瘤杂志 1995;17:418
8.Ariella M,et al.Nature 1989;342:177
9.Biggs J,et al.Genes Dev 1988;2:1333
10.Dearolf C,et al.Dev Biol 1988;129:159
11.Dearolf CR,et al.Dev Biol 1988;129:169
12.Teng DHF,et al.Nature 1991;353:437
13.Ranjit S,et al.Int J Cancer 1995;60:204
14.Postel EH,et al.Science 1993;261:478
15.Jorodan AM,et al.Cancer 1987:60:2766
16.Satak,et al.JPN－cancer 1992;70:2493
17.Slamon DJ,et al.J Nat Cancer Inst 1991;83:229
18.Moriyama M,et al.J urol 1992;145:423

(收稿日期 1997－06－03)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Expression of nm23－H_1、C－erbB$_2$ products in transitional cell carcinoma of uronary bladder

Qin Fang. et al
Chengdu First People's Hospital

Through the immunohistochemical procedure(S－P),expression of nm23－H_1,C－erbB$_2$,produces in 61 cases of human bladder transitional cell carcinoma(TCC) was studied. There was decreased expression of nm23－H_1 protein as the cancer grade increased.Among three grades and between superficial and invasive bladder TCC,nm23－H_1 expressed in distinct positive rate.No relation was found between the nm23－H_1 expression and lymph－node metastasis.

23 of 61 cases of bladder TCC were found to be immunohistologically positive with anti－C－erbB$_2$ protein antibody.C－erbB$_2$ gene products were more commonly detected in high－grade invasive tumors. 40 percent of superficial bladder TCC(T_A－T_1) showed nm23－H_1 proteins positive and C－erbB$_2$ negative,while 47.6 percent of invasive bladder(T_2－T_4) TCC expressed C－erbB$_2$ protein,meanwhile nm23－H_1 was negative.The significance and possible mechanisms of both nm23－H_1 protein and C－erbB$_2$ protein change in human bladder TCC were discussed.

KEY WORDS S－P Procedure;nm23－H_1;C－erbB$_2$; Bladder Transitional cell Carcinoma

8-11 (3)

大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点

R541.4
R540.41

临床学院内科 覃 敏* 陈运贞 王志华

提 要 通过较大数量的动物实验，在制作大白鼠心肌缺血再灌注模型方面进行尝试，除对目前流行制作方法有所改进外，提出大鼠心肌缺血再灌注的心电图表现特点，这对于制作动物在体模型时判断缺血再灌注成功与否具有价值。

关键词 大白鼠；缺血再灌注模型；心电图
中图分类号 R311

心肌缺血，再灌注损伤，动物模型

以大白鼠为实验模型，研究缺血再灌注损伤与保护，目前应用日益广泛。其主要优点是:①大白鼠冠脉侧支循环少，容易复制出稳定的缺血再灌注损伤模型[1,2];②所需仪器简单，资料可靠;③动物小，经济实惠，应用方便。

结扎冠脉形成梗塞是国内外公认制备模型的标准方法，然而，其手术方法，冠脉阻断与再通控制装置的设计有待完善。制备模型后，冠脉是否准确结扎的判断指标，以体表心电图最为简捷，一般以ST段抬高为准，但是其判断价值无明确证实。

本实验评价大白鼠缺血再灌注模型的制备方法，提出冠脉阻断与再通时心电图特征。

1 材料与方法

1.1 **实验动物** 大白鼠(Wistar种，本校实验动物中心提供)100只，体重200－300g，雌雄不拘。

* 男，1957－10出生，主治医师