and the risk of gastric and colorectal cancers[J]. Cancer Lett, 2001, 169(1):21—26.
[4] Lee S J, Cho S H, Park S K, *et al*. Combined effect of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on bladder cancer risk[J]. Cancer Lett, 2002, 177(2):173—179.
[5] Stewart V N, Vaughan T L, Stapleton P, *et al*. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer[J]. Lung Cancer, 2003, 40(3): 247—258.
[6] 钮菊英, 沈洪兵. 从血凝块中提取染色体DNA的方法及其应用[J]. 南京医科大学学报, 2000, 20(5):389—390.
[7] Wilson M H, Grant P J, Hardie L J, *et al*. Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction[J]. FASEB J, 2000, 14(5):791—796.
[8] Potter J D. Colorectal cancer: molecules and populations[J]. J Nat Cancer Inst, 1999, 11(91):916—930.
[9] Parkin D M. Global cancer statistics in the year 2000[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(9):533—543.
[10] 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 等. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(1):3—9.
[11] Cotton S C, Sharp L, Little J, *et al*. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: A HuGE review[J]. Am J Epidemiol, 2000, 151(1):7—32.
[12] 周建农, 许发培, 李忠佑, 等. 谷胱甘肽转硫酶T1和M1多态性与大肠癌易患性关系研究[J]. 江苏临床医学杂志, 2000, 4(2):90—91.
[13] Shen J, Lin G, Yuan W, *et al*. Glutathione transferase T1 and M1 genotype polymorphism in the normal population of Shanghai[J]. Arch Toxicol, 1998, 72(7):456—458.
[14] 冷曙光, 宋文佳, 王雅文, 等. 中国汉族人口三种谷胱甘肽S转移酶基因多态性分析[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(3):159—162.
[15] 黄 萍. 结直肠癌相关基因改变的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30(1):44—48.
[16] Zhong S, Wyllie A H, Barnes D, *et al*. Relationship between GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer[J]. Carcinogenesis, 1993, 14(9):1821—1824.
[17] Inoue H, Kiyoharaa C, Marugame T, *et al*. Cigarette smoking, CYP1A1 MSP I and GSTM1 genotypes, and colorectal adenomas[J]. Cancer Res, 2000, 60(14):3749—3752.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2003)19-1717-01

个案与短篇

流式细胞仪对缺氧条件下大鼠肺动脉平滑肌细胞周期和细胞凋亡的测定

Determination of cell cycle and apoptosis of rat pulmonary arterial smooth muscle cells in hypoxia by flow cytometry

陈兆珍, 傅晓岚 (第三军医大学高原军事医学系中心实验室, 重庆 400038)

慢性阻塞肺病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)发展的一个重要病理进程就是肺血管结构改造, 表现为动脉平滑肌细胞异常的增生肥大, 导致血管中膜增厚血管肌化, 成纤维细胞增殖等变化。各种病因作用于机体最终导致缺氧。本实验通过培养大鼠肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)来进行缺氧处理, 可以从细胞水平上探明缺氧在COPD中的作用。本实验是利用流式细胞技术对通过缺氧处理的培养ASMC细胞进行细胞周期和细胞凋亡可以方便快捷地检测各种细胞参数。

1 材料和方法

ASMC细胞由新桥医院呼吸内科研究所提供。

细胞周期和细胞凋亡测定分常氧组, 低氧12、24、48 h组, 用流式细胞仪(FACsata, Decton dickinson公司, USA), 用碘化丙啶PI(Propidium iodielg)测定细胞周期DNA含量, PI是一种插入性荧光染料, 能嵌入双链核酸(DNA、RNA)的碱基上。经RNA酶的消化处理后, PI可以对DNA进行特异性染色。在488 nm的激发下, 发出603~610 nm的红光。结果采用总体率假设检验。

样品制备:将培养细胞用0.25%胰酶消化3~7 min, 弃去消化液, 加PBS液用吸管反复吹打, 使其成为单细胞悬液。并移入离心管中。1 000~1 500 r/min离心5 min, 去上清液, 留沉淀物0.5 ml, 用振荡器使细胞分散。用吸液器或注射器将细胞注入70%冷乙醇中固, 至少固定18 h, 最长可固定数月之久。有条件的可将细胞计数为1×10^6细胞/样品。测试前取用70%乙醇固定的细胞悬液。1 500 r/min离心, 去固定液, 用PBS洗1~2次。加RNA酶100 μl(50 μg/ml) 37 ℃恒温水浴消化30 min, 立即放入冰浴中终止RNA酶的作用。加1 ml PI染液(50 μg/ml) 4 ℃避光。30 min后上机测定。

统计学方法:采用χ^2检验。

2 结果

缺氧对ASMC细胞周期及细胞凋亡的作用见表1。流式细胞仪检测显示, 缺氧12 h细胞增殖指数明显增加, 缺氧24 h和48 h增殖指数虽保持在一个高水平上, 并且呈逐渐下降的趋势。细胞凋亡缺氧可使ASMC的细胞凋亡逐渐增加($P<0.01$)。

表1 缺氧对ASMC细胞周期和细胞凋亡的影响

组别	细胞增殖指数(S+G_2/M)	细胞凋亡数
常氧组	32.65	3.7
缺氧12 h	57.87	5.6
缺氧24 h	56.67	7.67
缺氧48 h	54.98	10.1

(下转1721页)

作者简介:陈兆珍(1957—), 男, 山东省章丘市人, 实验师, 主要从事仪器分析方面的研究, 发表论文10余篇。电话:(023)68752330

收稿日期:2002-01-14;修回日期:2002-06-12

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

认为后者的可行性和操作性更佳。

本研究表明, $p16$ 基因甲基化在肺癌病人的痰、血浆中有很高的阳性率, 是肺癌辅助诊断的候选标志物之一。但是, $p16$ 基因在慢性吸烟者和健康人的痰标本及血浆标本中甲基化的情况还不清楚, 我们将在这一方面进行更深入的研究, 从而全面评价 $p16$ 基因甲基化在肺癌发生中的作用及其用于辅助诊断标志物的可行性。

参考文献:

[1] Parkin D M, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 1999, 49(1): 33—64.

[2] 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 等. 中国恶性肿瘤死亡率 20 年变化趋势和近期预测分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(1): 3—9.

[3] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, *et al*. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(1): 69—70.

[4] Kersting M, Friedl C, Kraus A, *et al*. Differential frequencies of $p16$-INK4a promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(18): 3221—3229.

[5] Gazdar A F, Minna J D. Molecular detection of early lung cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(4): 299—301.

[6] Palmisano W A, Divine K K, Saccomanno G, *et al*. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res, 2000, 60(21): 5954—5958.

[7] Costello J F, Plass C. Methylation matters[J]. J Med Genet, 2001, 38(5): 285—303.

[8] An Q, Liu Y, Gao Y, *et al*. Detection of $p16$ hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Lett, 2002, 188(1-2): 109—114.

[9] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al*. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9821—9826.

[10] Mao L, Hruban R H, Boyle J O, *et al*. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer[J]. Cancer Res, 1994, 54(7): 1634—1637.

[11] Tockman M S. Advances in sputum analysis for screening and early detection of lung cancer[J]. Cancer Control, 2000, 7(1): 19—24.

[12] Minamoto T, Mai M, Ronai Z. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers—a review[J]. Cancer Detect Prev, 2000, 24(1): 1—12.

[13] Ahrendt S A, Chow J T, Xu L H, *et al*. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(4): 332—339.

[14] Mao L, Lee D J, Tockman M S, *et al*. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(21): 9871—9875.

[15] Iacroix J, Becker H D, Woerner S M, *et al*. Sensitive detection of rare cancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preproGRP-specific RT-PCR[J]. Int J Cancer, 2001, 92(1): 1—8.

[16] Ronai Z, Yabubovskaya M S, Zhang E, *et al*. K-ras mutation in sputum of patients with or without lung cancer[J]. J Cell Biochem Suppl, 1996, 25(Suppl): 172—176.

[17] Belinsky S A, Nikula K J, Palmisano W A, *et al*. Aberrant methylation of $p16$(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(20): 11891—11896.

[18] Rocco J W, Sidransky D. $p16$(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression[J]. Exp Cell Res, 2001, 264(1): 42—55.

[19] 安　倩, 董向阳, 张建军, 等. 非小细胞肺癌 $p16$/CDKN2 基因失活的研究[J]. 癌症, 2001, 20(6): 591—594.

[20] 吴小军, 李清泉, 陈雪芹, 等. 肺癌患者组织和痰液中 p53 基因、K-ras 基因突变[J]. 肿瘤防治研究, 2000, 27(1): 33—35.

(编辑　汪勤俭)

(上接 1717 页)

3　讨论

细胞 DNA 合成期和分裂期, 既 G_2+M 期是细胞增殖的两个重要指标, 两者之合称为增殖指数, 而增殖指数的大小则反映细胞增殖水平的高低。通过实验发现, 缺氧 12、24、48 h 均可促进 ASMC 细胞的增殖。且明显高于常氧组说明 DNA 合成加快, 细胞增加大。实验我们发现缺氧到一定时间后, 细胞的增殖达到高峰并随着缺氧时间的延长呈逐渐下降趋势, 见表 1。造成这种现象的原因可能是缺氧对细胞除了促增生效应外, 尚有其它的损害作用, 尚待深入探讨。此外, 培养液积聚了大量细胞代谢有害成分, 也影响细胞的生长。

细胞凋亡是细胞内程序活化而致的细胞自杀, 与细胞坏死不同, 也有别与细胞碎片。正常情况下也有少量的细胞凋亡发生。而缺氧条件下则可以明显诱导细胞凋亡的发生。在本实验条件下, 缺氧后凋亡细胞数明显高于常氧组。而且随着缺氧时间的增加凋亡细胞数也呈增加的趋势。从整个情况看短期缺氧(12 h)时细胞的增殖指数和细胞凋亡数均明显增高, 可当缺氧时间增加时, 细胞凋亡数继续增加而细胞的增殖却反尔有所下降。可能的原因是当细胞缺氧时由于自身的代偿作用刺激细胞的合成和有丝分裂加速, 使得细胞的增殖指数明显增高。而细胞凋亡则随着缺氧时间的增加凋亡数也随着增加, 这可能是缺氧时间越长细胞内细胞凋亡因子活化程度越高, 细胞凋亡数越多。

鉴于上述的实验结果, 我们推测对重症 COPD 患者进行氧疗和吸入 NO 可能都是有价值的。氧疗可以补充氧气, 减轻缺氧以及对 PSMC 损害程度和反应, 缓解病情; 吸入 NO 除了可以直接使肺血管舒张, 还可以抑制 PSMC 的增殖, 缓解缺氧引起的症状。

(致谢: 对新桥医院呼吸研究所的大力协助在此表示衷心的感谢!)

关键词: 流式细胞仪; 缺氧; 肌; 平滑; 增殖; 细胞凋亡

中图法分类号: R446　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王关嵩, 钱桂生, 黄春基. 两种酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞的生长特性的比较[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(10): 711.

[2] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992. 3.

[3] 罗　兰, 蔡英年, 李世强, 等. 缺氧对新生小牛肺血管平滑肌细胞增值的影响及 764-3 的抑制作用[J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 9(3): 205.

(编辑　冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net