DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.026
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
336 2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)04-0336-03

TGF-β_1 在肺鳞癌细胞中的表达

张晓军[1],路作新[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院急救部,重庆 400038,[2]附属新桥医院胸外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨TGF-β_1在肺鳞癌细胞中的表达。方法 以原代培养的人肺鳞癌细胞为对象,采用ELISA法检测不同分化程度肺鳞癌细胞无血清培养液中TGF-β_1蛋白含量。结果 肺鳞癌各组细胞中TGF-β_1蛋白含量均显著高于正常支气管上皮细胞($P<0.01$),低分化组分别高于中分化组和高分化组($P<0.05$),中分化组虽高于高分化组,但无显著差异($P>0.05$)。结论 TGF-β_1蛋白在人肺鳞癌组织中表达增高,且与其分化程度基本呈正相关,提示TGF-β_1对人肺鳞癌细胞生长的抑制作用丧失或下降。

关键词:转化生长因子β_1;肺鳞癌;原代培养
中图法分类号:R392.2;R730.2;R734.2 文献标识码:A

Expression of TGF-β_1 in human pulmonary squamous cell carcinoma

ZHANG Xiao-jun, LU Zuo-xin (Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of TGF-β_1 in human pulmonary squamous cell carcinoma. Methods TGF-β_1 in serum-free conditioned medium of different differentiated degree primary cells in culture from human pulmonary squamous cell carcinoma were detected by ELISA. Results TGF-β_1 in serum-free conditioned medium from all tumor cell groups is significantly higher than from normal bronchial epithelial cell groups ($P<0.01$), and poorly-differentiated tumor cell group is significantly higher than well or moderately-differentiated tumor cell groups respectively ($P<0.05$), but the difference between well and moderately-differentiated tumor cell groups is not significant ($P>0.05$). Conclusion Inhibition effect by TGF-β_1 on cell growth of human pulmonary squamous cell carcinoma is weakened.

Key words: TGF-β_1; pulmnary squamous cell carcinoma; primary cell culture

近年的研究表明,作为一种具有多种生物学功能的细胞生长因子,转化生长因子β_1(TGF-β_1)在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用。有关TGF-β_1在肺癌中的表达,以往多以细胞株为实验对象,而以癌细胞原代培养进行研究较少。本实验以人肺鳞癌原代培养细胞为研究对象,通过检测不同分化程度肺鳞癌细胞无血清培养液中TGF-β_1蛋白含量,旨在了解人肺鳞癌TGF-β_1蛋白表达状况,初步探求TGF-β_1在人肺鳞癌细胞生长过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 原代培养的肺鳞癌细胞均取自肺鳞癌患者手术切除的癌组织,共18例,男性14例,女性4例。年龄33~71岁,平均为52.4岁。其中低分化鳞癌7例,中分化鳞癌6例,高分化鳞癌5例。原代培养的正常支气管上皮细胞均取自肺良性病变肺叶切除组织中的正常支气管,共6例,男性4例,女性2例,年龄28~69岁,平均为48.6岁。其中炎性假瘤2例,结核球2例,错构瘤1例,肺大泡1例。所有病例均经术后病理组织切片证实。

1.1.2 主要试剂 Ⅳ型胶原酶(Sigma 北京邦定公司分装),胰蛋白酶(北京中山公司 进口分装),RPMI-1640培养基(GIBCO 美国),TGF-β_1ELISA试剂盒(Genzyme公司 美国)。

1.2 方法

1.2.1 肺鳞癌细胞的分离及培养[1~3] 无菌条件下切取新鲜无坏死的肺癌组织块,立即浸入含5%小牛血清的1640培养液,室温下2 h内进行如下处理:将肿瘤组织剪成1 mm×1 mm×1 mm的组织块,加入0.1%Ⅳ胶原酶溶液,置37℃,5% CO_2的培养箱中消化2~4 h。消化后的单细胞悬液经100目钢网过滤、不连接密度梯度离心后,重悬于含20%小牛血清的1640培养液,调整细胞浓度10^5~10^6/ml,移入预先用1%醋酸鼠尾胶原被覆后的无菌培养瓶中,置37℃、5%CO_2的培养箱中培养6~10 d后,将培养细胞制成涂片,MGG(may-Griunwald-Giemsa)染色,显微镜下观察杂细胞<5%时,培养的原代细胞为纯化的肺鳞癌细胞。肺鳞癌培养细胞的鉴定:所培养细胞均送样本HE染色,并与手术标本的病理切片对照进行细胞鉴定及分级。

作者简介:张晓军(1966-),男,四川省南充县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肺癌的免疫治疗方面的研究。电话:(023)68752930

收稿日期:2002-07-15;修回日期:2002-09-27

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

1.2.2　正常支气管上皮细胞分离及培养[4,5]　无菌条件下取肺良性病变切除之肺叶, 选取正常支气管一段(约 2~3 cm)立即浸入含 5%小牛血清的 1640 培养液中, 室温下 2 h 内进行如下处理: 将支气管一端用止血钳夹住, 从另一端注入 0.1%Ⅳ胶原酶溶液并结扎此端, 室温下消化 15~30 min。消化后的单细胞悬液经 100 目钢网过滤、离心, 调整细胞数为 10^5~10^6/ml, 移入另一预先被覆 1%醋酸鼠尾胶原溶液的培养瓶中, 置 37℃、5%CO_2 培养箱中培养 6~10 d 后, 用培养细胞制成细胞涂片, MGG 染色, 显微镜下杂细胞< 5%, 培养的原代细胞则为正常支气管上皮细胞。培养细胞的鉴定: 所有培养细胞均制成涂片 HE 染色后进行鉴定。

1.2.3　无血清培养液的收集与处理[6]　选用贴壁生长良好、细胞纯度> 95%的原代培养细胞, 依次用含 10%、5%小牛血清及无血清 1640 培养液分别培养 48 h。经消化、分离后, 0.2%台盼蓝染色, 镜下观察细胞活力> 90%, 并调整细胞数为 10^5/ml, 然后用无血清 1640 培养液培养 24 h。收集无血清培养液经酸-乙醇抽提、激活、浓缩后, 真空干燥, 样品贮存—20℃备用(保存时间< 2 周)。

1.2.4　无血清培养液中 TGF-β_1 蛋白含量检测　采用 ELISA 法, 根据试剂盒中的步骤进行实验操作。用酶联仪测 A_{492} 值。每份样品或标准品均设三复孔取均值, 每板均设空白孔、阴性对照及标准品对照孔。以空白孔调零, 以所测标准品的 A_{492} 值为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 再将样品 A_{492} 值在标准曲线上找出相应的 TGF-β_1 含量。

1.3　统计学处理

所测数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPLM 软件进行 χ^2 检验。

2　结果

无血清培养液中 TGF-β_1 蛋白含量, 见表 1。肺鳞癌各组细胞中 TGF-β_1 蛋白含量均显著高于正常支气管上皮细胞, 且与其分化程度基本呈正相关。

表 1　无血清培养液中 TGF-β_1 蛋白含量($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　TGF-β_1 in serum-free conditioned medium($\bar{x}\pm s$)

Group	n	TGF-β_1 (ng/ml)
Normal	6	0.458±0.149
Well-differentiated	5	4.361±0.185△
Moderately-differentiated	6	4.461±0.213△
Poorly-differentiated	7	4.722±0.237△*

△: P< 0.01 *vs* Normal; *: P< 0.05 *vs* Well-differentiated and moderately-differentiated

3　讨论

TGF-β_1 是一种多功能细胞因子, 广泛参与胚胎的形成和发育、免疫系统的调节、组织的损伤与修复等多种生理病理过程[7]。近年的研究显示, TGF-β_1 在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用。在许多肿瘤组织和细胞中, TGF-β_1 表达高于正常组织和细胞, 并且与肿瘤的恶性程度和预后相关, 因此也有人认为, TGF-β_1 可以作为判断某些肿瘤恶性程度及预后的指标[8,9]。

我们实验的结果显示: TGF-β_1 蛋白在人肺鳞癌细胞中表达增高, 并且与其分化程度相关, 其机制尚需深入研究。这表明 TGF-β_1 有可能作为判断人肺鳞癌细胞恶性程度的指标之一。

目前研究表明, TGF-β_1 通过以下通路调控细胞的生长与分化[10,11]: TGF-β_1 在胞浆中合成后, 与潜活蛋白结合, 以无生物活性的潜活形式被分泌到细胞外, 当某种因素使 TGF-β_1 与潜活蛋白分离, 被激活的 TGF-β_1 则通过自分泌或旁分泌的形式, 与靶细胞膜上特异的 TGF-β 受体结合形成复合物, 受体因此被激活, 其细胞内 GS 区磷酸化, 结合并激活细胞内 SMAD 族蛋白, 将信号传递至细胞核内, 启动靶基因转录, 调控靶细胞的生长、分化、凋亡等, 发挥其生物学功能。

尽管在体外实验中, 外源性 TGF-β_1 对多种类型上皮细胞及其所发生的肿瘤培养细胞的生长有抑制作用[12], 但 TGF-β_1 在肿瘤细胞中的表达高于正常组织和细胞, 这表明由于生物学特性的改变, 肿瘤细胞对 TGF-β_1 生长抑制作用的反应丧失或减弱。这可能与以下因素有关: ①肿瘤细胞在分泌 TGF-β_1 的同时, 也分泌一些对细胞生长有促进作用的细胞因子(如 TGF-α 等), 以抵消 TGF-β_1 对肿瘤细胞生长的抑制作用。研究发现[13], 在膀胱癌细胞中, TGF-β_1 和 TGF-α 同时表达, 因此肿瘤细胞的生长不受抑制。②潜活的 TGF-β_1 未激活。Sporn 等[14] 发现人肺癌细胞株 A549 分泌大量潜活的 TGF-β_1, 但不能被激活, 肿瘤细胞仍可不受抑制而生长。③肿瘤细胞表面 TGF-β 受体数目或活性改变。有研究发现[15], 胃癌细胞 TGF-β Ⅱ型受体表达缺失, 因而 TGF-β_1 对癌细胞的生长抑制作用消失。④ TGF-β_1 在细胞内的信号转导通路中, 某些控件(如 SMAD 族蛋白)表达异常, 靶基因转录受阻。在对胰腺癌的研究中发现[16], Smad 4 表达缺失, 导致 TGF-β_1 对肿瘤细胞的生长抑制的作用丧失。

肿瘤的发生发展是一个极其复杂的过程, 涉及诸多因素, 但可以看出, TGF-β_1 在其中起着非常重要的作用。虽然 TGF-β_1 在肿瘤细胞中的表达增高, 但肿瘤细胞的生长却没有受到抑制, 更为重要的是, TGF-β_1 仍以旁分泌的形式, 不仅抑制机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和杀伤, 使之能够逃避机体免疫监视[17]; 同时通过促进肿瘤微血管的生长及调节基质性质, 促进肿瘤浸润和转移[18], 为肿瘤细胞的生长提供有利的局部环境。因此, 在肿瘤的生长过程中, TGF-β_1 间接地发挥了促进肿瘤细胞生长的作用。

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

参考文献：

[1] 王蘅文. 实验肿瘤学基础[M]. 北京：人民卫生出版社，1992. 123－160.

[2] Whiteside T L, Miescher S, MacDonald H R, *et al*. Separation of tumor-infiltrating lymphocytes from tumor cells in human solid tumors. A comparison between velocity sedimentation and discontinuous density gradients[J]. J Immunol Med, 1986, 90(2): 221－233.

[3] 大星章一，菅野晴夫. 人癌细胞培养[M]. 北京：科学出版社，1979. 37－69.

[4] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995. 85－132.

[5] Morgan S J, Darling D C. Animal cell culture[J]. BIOS Scientific Publishers Limited, 1993, 36－79.

[6] Danielpour D. Improved sandwich enzyme-linked immunosobent assays for transforming growth factor β_1[J]. J Immunol Med, 1993, 158(1): 17－25.

[7] Sporn M D, Roberts A B. TGF－β_1 recent progress and new challenges[J]. J Cell Biol, 1992, 119(5): 1017－1021.

[8] Shim K S, Kim K H, Han W S, *et al*. Elevanted serum levels of transforming growth factor－β_1 in patients with colorectal carcinoma：its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection[J]. Cancer, 1999, 85(3): 554－561.

[9] Asakura S, Kato H, Fujino S, *et al*. Immunohistochemical study of transforming growth factor-beta and central fibrosis in T1 adenocarcinoma of the lung[J]. Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi, 1995, 43(15): 1924－1928.

[10] Massague J. Receptors for the TGF β family[J]. Cell, 1992, 69(7): 1067－1070.

[11] Massague J. TGF β signal transduction[J]. Annu Rev Boichem, 1998, 67: 753－791.

[12] Briskin K B, Fady C, Miokel R A, *et al*. Inhibition of head and neck squamous cell carcinoma cell lines by transforming growth factor beta[J]. Oto Laryngol Head Neck Surg, 1995, 112(6): 728－734.

[13] 郭德荣，顾方六，周爱儒，等. 转化生长因子和表皮生长因子受体在人膀胱癌中的表达[J]. 中华泌尿外科杂志，1995, 16(2): 80－83.

[14] Sporn M B, Roberts A B, Wakefield L M, *et al*. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta[J]. J Cell Biol, 1987, 105(3): 1039－1045.

[15] De M, Yan W, de Jonge R R, *et al*. Functional characterization of transforming growth factor β type II receptor mutants in human cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(9): 1986－1992.

[16] Dai J L, Tumacioglu K K, Schutte M, *et al*. Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(20): 4592－4597.

[17] Morisaki T, Katano M, Rxiko A, *et al*. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues[J]. J Surg Oncol, 1996, 63(5): 234－239.

[18] Perry K T, Anthony C T, Case T, *et al*. Transforming growth factor-beta as a clinical biomarker for prostatic cancer[J]. Urology, 1997, 49(1): 151－156.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)04-0338-01

线粒体肌病1例

A case of mitochondrial myopathy

冉 鸿[1]，史树贵[2]（[1] 解放军第324医院神经内科，重庆 400020；[2] 第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆 400038）

患者，女，21岁，因双下肢无力2年于2001年5月10日入院。入院前2年无明显诱因出现双下肢轻度无力、酸胀，以爬楼梯及下蹲后明显，休息后减轻。病后怕热，冬天亦穿凉鞋，精神饮食均正常，无肢体麻木，无大小便功能障碍，无复视及视力减退，无吞咽呛咳，无声音嘶哑，无双上肢无力，无眼睑下垂。发病初期，患者在上3楼后才需休息，半年后有所加重，1层后楼即需休息。入院前半年，患者自觉双侧小腿变粗。病后体重共下降2.5、3 kg左右。患者发病前在某鞋厂从事生产劳动1年，接触有苯类物质。病后半年未再工作，回到家乡。过去史，个人史，月经史均无特殊，家族中无类似疾病患者。

神经系统查体：四肢肌肉无萎缩，无肌跳及压痛，双下肢腓肠肌增粗，周长约32 cm，双上肢肌张力、肌力正常，双下肢肌张力稍有减低，肌力Ⅴ－级，12对颅神经、感觉系统、反射系统、共济运动，植物神经无阳性发现。

辅助检查：新斯的明试验为阴性，三大常规、肝功、肾功正常，肌电图提示左股二头肌运动单位时限短，电压正常，提示肌源性改变。肌酶谱示乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶轻度增高。甲状腺功能测试正常。患者于2001年5月15日在局麻下行左腓肠肌活检，标本放入甲醛液及戊二醛中固定，送光镜及电镜检查。光镜检查提示肌纤维肥大，变性，符合肌病改变。电镜结果显示肌膜下大量嵴排列异常及嵴内包涵体增多的线粒体，患者线粒体肌病诊断明确，予三磷酸腺苷，肌苷等治疗，患者病情稳定后出院。

讨论

通过以上的临床资料，我们可得出患者的以下临床特征：①好发于青少年，病情发展缓慢；②临床主要表现为运动后的肌无力加重，肌无力以肢体近端为主，如患者多在爬梯，久蹲等活动后明显，休息后可缓解，伴有一定程度的高代谢征象，该患者表现为发热、体重减轻；③神经系统查体可见受累肌肉的假性肥大，肌张力、肌力轻度减低；④肌电图提示肌源性改变，肌酶谱轻度增高，病理活检提示肌肉肥大变性，电镜检查提示线粒体的改变。可见，线粒体肌病除具有肌病的一般特点，如以近端为主的肌无力，可有肌肉的假性肥大，肌酶谱的增高，肌电

作者简介：冉 鸿（1972－），女，重庆市人，医师，主要从事神经内科专业方面的研究。电话：(023)68752057

收稿日期：2002-10-06；修回日期：2002-12-13

（下转340页）

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