DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.035
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
952 2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)08-0952-03

人膀胱癌T24细胞及其SCID小鼠移植瘤组织中KDR的表达

王 源,程绍钧 (第三军医大学附属西南医院核医学中心,重庆 400038)

提 要:目的 检测KDR在人膀胱癌T24细胞及其SCID小鼠移植瘤组织中的表达。方法 常规培养T24细胞,建立荷人膀胱癌移植瘤SCID小鼠动物模型,使用抗KDR单克隆抗体,通过免疫荧光、免疫组化检测KDR在T24细胞及瘤体组织上的表达;结果 KDR在T24细胞及瘤体组织上均呈阳性表达。结论 本研究结果为进一步研究抗KDR单抗在荷T24细胞移植瘤动物体内分布及对瘤体生长的抑制效应奠定了实验基础。

关键词:血管生成;T24细胞;抗KDR单克隆抗体;免疫组化
中图法分类号:R392.12;R394.2;R737.14 文献标识码:A

Expression of KDR in human bladder cancer cell T24 and in transplanted tumor tissue of SCID mice

WANG Yuan, CHENG Shao-jun (Center of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of kinase insert domain-containing receptor (KDR) in human bladder cancer cell T24 and transplanted tumor tissue of SCID mice. Methods T24 cells were cultivated with conventional method. SCID mice were implanted with T24 cells to establish bladder cancer model. Anti-KDR monoclonal antibody (MAb) was used to measure the expression of KDR in T24 cells and tumor tissues from the mouse model with immunofluorescence and immunohistochemical methods. Results KDR expression was observed in the T24 cells and tumor tissues of bladder cancer mice. Conclusion The results provide a basis for further study on the distribution of Anti-KDR MAb in the host bearing transplanted tumor and the effects of Anti-KDR MAb on the growth of the transplanted tumor.

Key words: angiogenesis; T24 cells; anti-KDR monoclonal antibody; immunohistochemistry

血管内皮细胞生长因子受体(KDR)在介导VEGF刺激血管内皮细胞增殖中起重要作用[1]。据文献[2,3]报道VEGF受体KDR不仅表达于肿瘤血管内皮细胞,而且表达于肿瘤细胞,正常组织中KDR表达很弱。但是对于一些常见的肿瘤细胞株,以及由这些细胞株建立的移植瘤动物模型瘤体组织是否表达KDR尚未见报道,作者使用抗KDR单克隆抗体(3G9),通过免疫荧光、免疫组化检测KDR在人膀胱癌T24细胞及和人膀胱癌移植瘤SCID动物模型瘤体组织上的表达。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 双免疫缺陷SCID小鼠2只,雌雄不拘,6~7周,体重15~20 g;由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 细胞和抗体 人膀胱癌细胞(T24):由重庆医科大学超声研究所惠赠;抗KDR单克隆抗体1 mg/ml(3G9 McAb):购自北京肿瘤防治研究所;羊抗鼠IgG荧光抗体:购自北京中山生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂 DMEM培养粉:美国Gibco公司;小牛血清:Hyclone公司进口分装;胰蛋白酶:美国Sigma公司进口分装;免疫组化S-P法试剂盒:购自北京中山生物技术有限公司;0.01 mol/L,pH 7.4 PBS:购自北京中山生物技术有限公司。

1.1.4 主要仪器 CO_2培养箱:日本三洋公司产品;倒置显微镜:重庆光学仪器厂生产;超净工作台:北京长城净化设备公司生产;低温离心机:日本日立公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人膀胱癌T24细胞以DMEM完全培养液(10%小牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 U/ml)培养,传代培养的T24细胞,移入50 ml螺口培养瓶内,置37 ℃,5%CO_2孵箱培养,隔天更换培养液,待细胞长至80%或接近完全融合成片时,以0.25%胰蛋白酶37 ℃消化3~5 min,细胞皱缩变圆后弃去胰蛋白酶液,加入完全培养液,制备细胞悬液,细胞分装接种于50 ml螺口培养瓶或6孔培养板中。

1.2.2 免疫荧光及免疫组化检测T24细胞KDR的表达 将无菌盖玻片放入六孔板中,接种T24细胞,置37 ℃,5%CO_2孵箱培养,待细胞贴壁生长后,取出盖玻片,95%乙醇固定15 min,0.01 mol/L,pH 7.4 PBS漂洗5 min,滴加1∶200倍稀释的3G9 McAb,置37 ℃湿盒孵育30 min(以PBS代替3G9 McAb作为阴性对照);PBS漂洗5 min,滴加1∶10倍稀释(伊文思蓝溶液稀释)荧光标记羊抗小鼠IgG,置37 ℃湿盒孵育30 min;PBS漂洗5 min,蒸馏水漂洗5 min,缓冲甘油封固,石蜡封片,荧光显微镜下观察。

将无菌盖玻片放入六孔板中,接种T24细胞,置37 ℃,5%CO_2孵箱培养,待细胞贴壁生长后,取出盖玻片,75%、85%、95%、100%梯度浓度乙醇脱水1 min,0.01 mol/L、pH 7.4 PBS漂洗5 min,使用1∶200倍稀释3G9 McAb(以PBS代替3G9 McAb作为阴性对照),按照常规S-P法免疫组化染色,DAB显色,苏木精染液复染,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并摄像。

1.2.3 荷人膀胱癌SCID小鼠移植瘤动物模型建立 常规培养T24细胞,制备细胞悬液,调整细胞浓度至1×10^7/ml,Typan

作者简介:王 源(1973—),男,四川省南溪县人,硕士研究生,实验师,主要从事肿瘤血管生成方面的研究。电话:(023)68754422

收稿日期:2002-01-23;修回日期:2002-06-19

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

Blue 染色检测活细胞比率> 95%; 取 4 ~ 6 周龄 SCID 小鼠 2 只, 无菌条件下消毒局部, 背部皮下注射细胞悬液 0.2 ml/ 只; SCID 小鼠接种后置 SPF 条件下饲养, 定期观察。

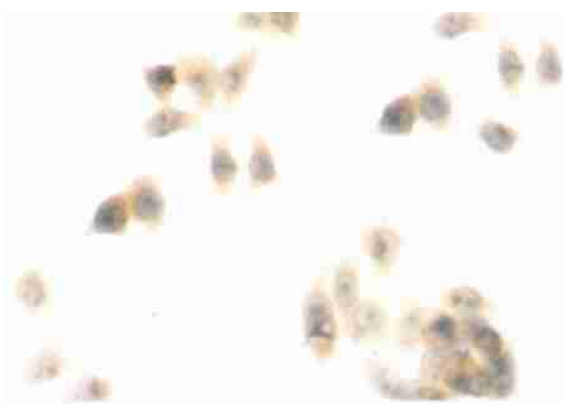
1.2.4　荷人膀胱癌 SCID 小鼠瘤体及正常组织 KDR 表达的检测　SCID 小鼠瘤体达 1 ~ 2 cm^3 时, 以 1% 戊巴比妥钠 0.2 ml 腹腔注射麻醉动物, 完整剥离肿瘤包块, 取肝、肾、脾、肌肉、膀胱、心脏、肺等组织, 标本经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片。常规 HE 染色观察, 免疫组化(S-P 法)染色检测瘤体及正常组织 KDR 的表达, 结合光镜观察并摄像。

2　结果

2.1　免疫荧光及免疫组化染色检测 T24 细胞 KDR 的表达

荧光显微镜下可见: 阳性结果背景为黑色, 细胞中心为较暗的淡绿色荧光, 细胞周围有一圈较亮的荧光; 阴性对照背景为黑色, 细胞为均匀的淡绿色荧光, 细胞中心与周围荧光强度无明显差异, T24 细胞 KDR 的表达经免疫荧光染色检测为阳性。

免疫组化染色: T24 细胞 KDR 的表达呈胞膜棕黄色着染阳性, 见图 1。



Cell membrane brown-stained

图 1　T24 细胞 KDR 的表达呈胞膜棕黄色着染阳性　(S-P× 400)

Fig 1　Positive expression of KDR in the cellular membrane of T24 cells　(S-P× 400)

2.2　荷人膀胱癌 SCID 小鼠移植瘤动物模型建立及相关生物学特性

SCID 小鼠皮下接种 T24 细胞后, 种植部位在接种后的第 3 天即可皮下触及小结节。移植 3 周后瘤体体积即可达 2 cm^3 左右; 解剖观察可见, 肿瘤包块为分叶结节状, 瘤体胞膜完整, 包膜下血管分布较为丰富, 瘤体与皮肤、肌肉有轻度粘连, 但未见有明显浸润生长; 瘤体病理切片可见肿瘤细胞丰富, 细胞呈团块状, 结构混乱, 存在一定程度坏死。肝、肾、肺、心等脏器大体检查及病理切片均未见明显转移灶形成

2.3　免疫组化(S-P 法)染色检测瘤体及正常组织 KDR 的表达

免疫组化结果显示, 人膀胱癌 SCID 小鼠移植瘤瘤体表现为细胞表现为 KDR 胞膜型阳性, 见图 2。其余正常组织 KDR 表达均为阴性。

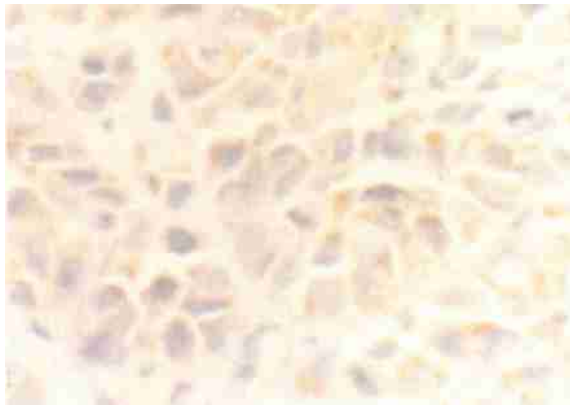


图 2 移植瘤组织 **KDR** 阳性　(S-P× 400)

Fig 2　KDR positively expressed in tumor xenografts　(S-P× 400)

3　讨论

新生血管生成是实体瘤生长的必要条件[4], 也是肿瘤生长和转移的形态学基础, 它不仅向肿瘤提供充足的营养, 同时也向机体输出肿瘤细胞, 导致肿瘤细胞的恶性生长和转移[5]。血管生成受内皮细胞增殖、迁移、分化、生存的调控, 调节内皮细胞生长和分化主要靠一些多肽生长因子和它们的跨膜受体调节。VEGF 是近年来新发现的一种重要的多肽类细胞因子。VEGF 不仅能够增加血管, 尤其是微血管的通透性, 促进血浆蛋白外渗, 而且具有较高的细胞丝裂原作用和诱导血管形成的功能。在多种肿瘤中, VEGF 均呈高水平表达。VEGF 有两种高亲和力的特异性受体, 即 flt-1 和 KDR/ flk-1。血管内皮细胞生长因子(VEGF)与 KDR 的相互作用是调控肿瘤血管形成的关键[1]。KDR 属细胞表面的酪氨酸激酶受体, 通常只特异表达于肿瘤血管内皮细胞[6]。但 Boocock 等[2] 的研究表明, KDR 不仅表达于肿瘤的血管内皮细胞, 而且也表达于肿瘤细胞。文献[7] 报道, KDR 的表达存在异质性, 恶性程度较高的肿瘤组织, 以及增殖较旺盛的肿瘤细胞 KDR 的表达较强, 而且 VEGF 能刺激 KDR 的表达。

目前国内外对于 KDR 表达的研究主要是通过对临床肿瘤组织切片进行免疫组化检测。本实验使用抗 KDR 单克隆抗体 3G9[8], 以人膀胱癌 T24 细胞建立荷人膀胱癌 SCID 小鼠移植瘤动物模型。通过免疫荧光、免疫组化检测 KDR 在 T24 细胞及瘤体组织上的表达, 从结果可以看出, KDR 在 T24 细胞及瘤体组织细胞均呈胞膜阳性型表达, 而且 KDR 在瘤体组织中的表达出现明显的异质性, 即瘤体组织中靠近微血管附近的肿瘤细胞 KDR 表达较强, 这与文献[7] 报道较为吻合。本实验研究证明 KDR 在人膀胱癌 T24 细胞株以及由该细胞株建立的移植瘤动物模型的瘤体组织上呈阳性表达, 这为将抗 KDR 单克隆抗体进一步应用于膀胱肿瘤的放射免疫显像以及抑制瘤体生长的实验研究提供

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

了实验依据。

参考文献：

[1] Davis Smyth T, Chen H, Park J, *et al*. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade[J]. EMBO J, 1996, 15(18): 4 919—4 927.

[2] Boocock C A, CharnockJones P S, Sharkey A M, *et al*. Expression of VEGF and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(7): 506—516.

[3] 宋述梅，曾 莉，吴 健. VEGF 受体 KDR 胞外 V ~ Ⅶ区的克隆、单抗制备及 KDR 在不同来源肿瘤组织中的表达[J]. 中华肿瘤杂志，1999, 21(2): 96—98.

[4] Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor[J]. Nat Med, 1996, 2(2): 167—168.

[5] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27—31.

[6] Brown L F, Berse B, Jackman R W, *et al*. Expression of vascular permeability factor and its receptors in breast cancer[J]. Human Pathol, 1995, 26(1): 86—89.

[7] 郝亚荣，李庚山. 血管内皮生长因子(VEGF)对培养内皮细胞 VEGF 受体表达的影响[J]. 微循环血杂志，2001, 11(2): 9—11.

[8] 宋述梅，吴 健，寿成超. 血管内皮细胞生长因子受体 KDR 胞外配基结合区单抗对内皮细胞增殖及血管形成的抑制[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2000, 20(4): 327—330.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)08-0954-01

肥厚型心肌病合并冠状动脉“肌桥”酷似心肌梗死 1 例

A case of the hypertrophic cardiomyopathy with myocardial bridge and with signs similar to myocardial infarction

杨 柳 （第三军医大学附属西南医院心血管内科心电图室，重庆 400038）

患者，男性，35 岁，因反复胸闷、心前区压榨性疼痛，每次持续约 5 ~ 6 min，伴心慌、气促加重 3 d 来我院就诊。急诊心电图示：窦性心律，心率 62 次/min，P-R 间期 0.14 s，QRS 时限 0.08 s，Q-T 间期 0.40 s。Ⅱ、Ⅲ、aVF 呈 qRs 型，q 为异常 Q 波；V_1 呈 RS，R/S > 1，V5 呈 qRs 型，R_{V5} 等于 4.6 mV，S-T 段：Ⅲ水平上抬 0.2 mV，Ⅱ、aVF 斜型上抬 0.1 mV。V_1 水平上抬 0.15 mV。T 波：Ⅰ、aVL、V_2、V_3、V_4 倒置，V_5 平坦，V_6 低平，Ⅱ、Ⅲ、aVF 出现高大直立 T 波。心电图诊断：①窦性心律，②急性下壁心肌梗死，③左室大伴劳损。患者以急性心肌梗死急诊入院治疗。查体：生命体征平稳，心律齐，各瓣膜区未闻及杂音；心肌酶谱正常。心脏超声：室间隔厚 13，左室后壁厚 9.8，提示室间隔增厚，见图 1。入院后 3 d 内心电图显示Ⅱ、Ⅲ、aVF 导联 S-T 段上抬逐步减轻，T 波变低。1 周后行冠状动脉造影检查见左前降支中段心肌桥，收缩期明显狭窄，狭窄程度约 90%。最后诊断：①冠状动脉心肌桥，②原发性肥厚型心肌病(非梗阻型)。

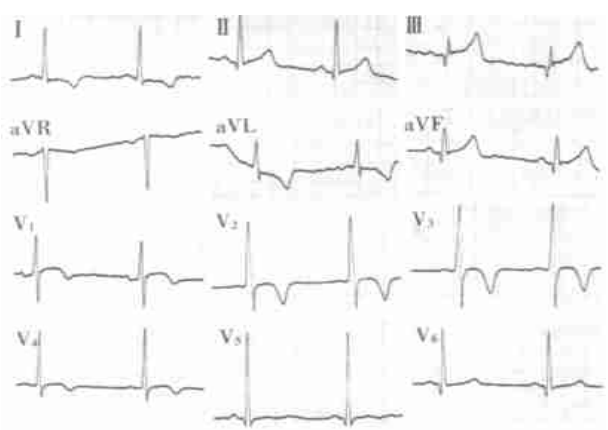


图 1 肥厚型心肌病合并冠状动脉桥心电图(V_5, V_6 为减半电压)

讨论

在心肌收缩期，“肌桥”可压迫冠状动脉管腔致其狭窄，在舒张期管腔可完全恢复正常，近来有学者研究表明，“肌桥”与心肌缺血、心肌梗死、心室纤颤和猝死有关[1]。肥厚型心肌病的心电图最常见表现是左心室肥厚及 ST-T 改变，深而倒置的“冠状 T 波”，房室传导阻滞和束支阻滞也较常见，异常 Q 波发生率 30% ~ 50%，异常 Q 波可出现在左胸导联，也可出现在任何肢导联上[2]。本例患者由于肥厚型心肌病，故在Ⅱ、Ⅲ、aVF 导联上出现异常 Q 波；“肌桥”压迫冠状动脉引起 S-T 段上抬，并可致使患者出现胸痛等临床表现，以致诊断为急性下壁心肌梗死。但急性心肌梗死病人心肌酶谱应增高，疼痛发作后经安静休息不能消失，疼痛持续时间长，临床上再根据冠状动脉造影、心脏超声检查等指标综合判断可以确诊，但在初诊时应注意鉴别诊断。

关键词：肥厚型心肌病；肌桥；心肌梗死
中图法分类号：R540.41 文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄 宛. 临床心电图学[M]，第 5 版. 北京：人民卫生出版社，1998. 110—113.

[2] 侯庆田，安培然，宇 华. 现代冠心病诊断学[M]. 北京：人民军医出版社，1996. 4.

（编辑 陈聪连）

作者简介：杨 柳(1966—)，女，重庆市人，主管技师，主要从事心脏电生理方面的研究，发表论文 7 篇。电话：(023)68754000-73051

收稿日期：2002-03-15；修回日期：2002-06-25

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