DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.007
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1146 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1146-03

胆管癌细胞中氧自由基对 P53 蛋白过度表达的影响

王立明[1],何振平[2],马宽生[2],王曙光[2],郑 灵[3] (第三军医大学:[1]附属新桥医院普通外科,重庆 400037;[2]附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038;[3]解放军324中心医院,重庆 400020)

提 要:目的 观察胆管癌细胞内氧自由基对P53蛋白过度表达的影响,探索胆管癌细胞内氧自由基与肿瘤病因学的关系。方法 通过细胞培养,采用紫外可见分光光度仪等先进设备检测体外培养胆管癌细胞QB中氧自由基中间产物MDA含量,应用免疫组化技术,检测不同浓度的氧自由基对QB细胞P53蛋白过度表达的影响。结果 胆管癌细胞中P53蛋白过度表达呈阳性。高浓度的氧自由基可明显增加胆管癌细胞中P53蛋白的表达。结论 胆管癌细胞内氧自由基的水平可影响胆管癌细胞P53蛋白表达。

关键词:胆管癌;氧自由基;P53蛋白
中图法分类号:R394.2;R730.231.1;R735.8 文献标识码:A

Effect of oxygen free radical on P53 protein over expression of cholangiocarcinoma cell

WANG Li-ming, HE Zheng-ping, MA Kuan-sheng, WANG Shu-guang, ZHENG Ling (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To examine the effect of oxygen free radical on P53 protein overexpression in cholangiocarcinoma cell and study on the relationship between oxygen free radical and tumor pathogenesis. Methods Content of oxygen free radical in cholangiocarcinoma cell were measured with ultraviolet visible light spectrometer and the effect of different concentration oxygen free radical on P53 protein overexpression were detected by immuno histochemical method. Results P53 protein overexpression was seen in cholangiocarcinoma cell. High level of oxygen free radical in the cholangiocarcinoma cell promoted obviously P53 protein overexpression. Conclusion The level of oxygen free radical may play a role on the tumor p53 gene expression.

Key words: cholangiocarcinoma; oxygen free radical; P53 protein

为探索胆管癌细胞内氧自由基浓度与p53突变的关系,本研究利用体外培养的胆管癌细胞QB株,检测不同浓度的氧自由基对p53基因存在状态的影响,试图为临床利用胆管癌细胞自身生物学特性防治肿瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 MDA试剂盒购自南京生物工程研究所;S-P试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供;DMEM培养基及新生牛血清购自Serva公司;超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢(H_2O_2)均为Sigma公司产品;注射用胰岛素、青霉素和链霉素为临床应用药品。

1.1.2 主要仪器 紫外分光光度仪(瑞典LKB公司);高速低温离心机(美国杜邦公司);倒置显微镜(重庆光学仪器厂XYJ-D型);超静工作台(苏州净化设备公司YT-875型);24孔细胞培养板(美国Costar公司产品)等。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理 体外培养胆管癌细胞QB株由西南医院全军肝胆外科研究所建株。患者为男性,51岁。材料取之其低分具有较多化肝门部胆管腺癌肝内转移灶。QB组织学上与源癌组织相似,的微绒毛、微管、微丝及细胞连接,细胞质和细胞膜存在角蛋白和桥粒蛋白等上皮来源特征,生长速度快,群体活力高,独立生存能力强,具有较强的致瘤性[1]。本实验所用为第25~30代细胞。将细胞悬液接种于盛有含10%小牛血清的DMEM培养基的培养瓶中,于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养,细胞贴壁生长良好。细胞每3 d传代一次,传代后接种于24孔细胞培养板,按实验要求时间加样0.1 ml/孔,待细胞生长汇合80%时,用0.25%胰蛋白酶消化后,立即检测或用DMEM培养液制成细胞悬液(10^6/ml)置-4 ℃冰箱或液氮保存待用。

1.2.2 实验分组及治疗 NQB组:正常培养胆管癌QB细胞,未加其它治疗试剂,作为对照;SQB组:体外培养胆管癌QB细胞,传代当天按5 mmol/L的剂量加入SOD,3 d后取样检测;HQB组:体外培养胆管癌QB细胞,传代当天按5 mg/L的剂量加入H_2O_2,3 d后取样检测。

1.2.3 MDA含量测定 参照文献[2],按试剂盒说明书进行。

1.2.4 免疫组化检测 ①标本准备:体外培养的胆管癌细胞QB于24孔培养板内贴壁后,换无血清培养液培养24 h,弃上清,0.1 mol/L PBS冲洗两次,4%多聚甲醛4 ℃固定过夜;载玻片先用HCl浸泡,三蒸水反复冲洗,高温(260 ℃,3 h)灭活RNA酶,在含100 μg/ml的多聚赖氨酸DEPC三蒸水中浸泡45 min,三蒸水(0.1%DEPC)冲洗两次,室温晾干。②测定步骤:参照文献[3],采用S-P免疫组化试剂盒,按试剂盒操作说明书进行。实验所用的单克隆抗体为抗p53单抗,其识别抗原为p53

作者简介:王立明(1965-),男,湖北省武汉市人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的发病机制方面的研究。电话(023)68755114-74605
收稿日期:2000-11-20;修回日期:2001-03-25

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

基因, 工作浓度为 1∶100。③结果判断: 在排除非特异性染色的情况下, 以细胞内出现明显黄棕色为阳性, P53 蛋白阳性分级按下述标准记录: (－)无黄棕色显色; (±)阳性细胞数< 10%; (＋)阳性细胞数介于 10% ~ 50%; (＋＋): 阳性细胞数> 50%。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Office 软件包中 Excel 程序对实验数据进行统计学处理。

2　结果

在体外培养的胆管癌细胞 QB 中, 存在着一定浓度的氧自由基, 加入 SOD 后其水平明显降低($P< 0.05$), 而使用 H_2O_2 时氧自由基浓度明显增高($P< 0.01$)。这种结果清楚地表明胆管癌细胞中存在着活跃的氧自由基, 其水平可受外源性氧自由基诱导剂和抑制剂的调节, 见表 1。

表 1　体外培养胆管癌细胞 QB MDA 测定结果($nmol/ml, \bar{x} \pm s$)

Tab 1　Contents of MDA in cholangiocarcinoma cell QB *in vitro* ($nmol/ml, \bar{x} \pm s$)

Group	*n*	MDA
NQB	10	4.74±0.09
SQB	10	2.45±0.21 *
HQB	10	10.58±0.10 **

NQB: Control; SQB: Chlangiocarcinoma cells＋SOD; HQB: Chlangiocarcinoma cells＋H_2O_2; *: $P< 0.05$, **: $P< 0.01$ *vs* NQB

免疫组化显示, p53 单抗在胆管癌细胞 QB 中显示阳性表达见图 1A, 当使用 SOD 时, 胆管癌细胞内 p53 基因的表达明显减弱($P< 0.01$), 呈阴性, 见图 1B; 而使用 H_2O_2 后, 细胞内 p53 基因的表达显著增强($P< 0.05$)。此结果提示在胆管癌细胞中存在 P53 蛋白的异常表达, 氧自由基可明显促进这种表达, 外源性的氧自由基抑制剂可以抑制胆管癌细胞内 p53 基因的表达。

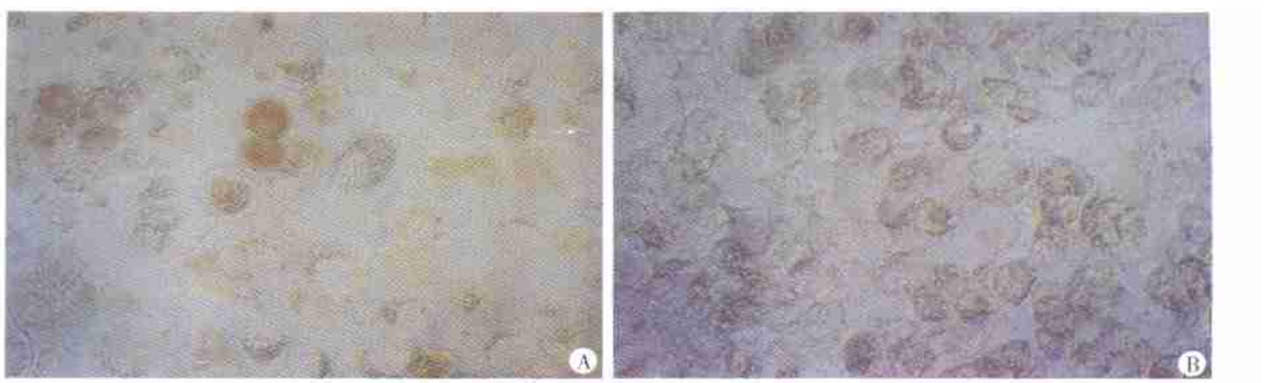


图 1　体外培养胆管癌细胞 QB 免疫细胞化学染色　(S-P× 400)

Fig 1　Immunocytochemical staining of cultured cholangiocarcinoma QB cells　(S-P× 400)

A: NQB group, positive reaction; B: SQB group, negative reaction

3　讨论

90 年代以后, 随着自由基生物化学和自由基生物学的发展, 氧自由基与恶性肿瘤的关系日益明朗[4]。氧自由基是细胞内正常生化途径如氧化还原与电子转移途径的中间产物, 在传统观念中, 其一直被认为是一种毒性物质, 与多种病理过程有关[5], 因受研究方法和手段的局限, 氧自自基在肿瘤发病学中的作用一直未被人们认识。最近有人在原癌基因 ras 致癌的成纤维细胞中发现, 癌细胞中的氧自由基水平明显增高, 这些氧自由基是 ras 生长信号传导途径的重要环节, 可刺激细胞分裂、增殖[6]。这一新发现除了进一步证实自由基是一种对组织造成损伤的有害毒素的传统理论外, 同时还揭示了氧自自基参与正常组织增殖及癌变过程。本研究结果提示, 胆管癌细胞内也存在较高浓度的氧自由基, 亦表明其与胆管癌发病学的关系密切。

目前已明确 p53 基因异常是多种恶性肿瘤和癌前病变的一个常见分子生物学改变[7]。研究表明, p53 基因可分为野生型(wp53)和突变型(mp53)两种, 前者为抑癌基因, 后者为致癌基因; 前者的缺失突变或后者的过量表达均可促进肿瘤的发生[8]。由于 wP53 蛋白产物半衰期短, 导致其组织含量低, 因此用免疫组化方法检测出的是存积而稳定的 mP53 蛋白, 所以 p53 阳性细胞中的 P53 蛋白具有致癌作用而不具备抑癌效应[9]。本实验发现胆管癌细胞中存在明显的 P53 蛋白阳性表达, 说明 p53 基因突变是胆管癌的频发事件, 在胆管癌的恶变过程中发挥重要作用。同时本实验还发现氧自由基能明显增加胆管癌细胞内 P53 蛋白的表达, 表明胆管癌细胞内氧自由基与 p53 基因突变有着内在的密切联系。我们认为, 胆管癌细胞内高浓度的氧自由基可能通过损伤 DNA 或直接造成碱基缺失等途径, 导致抑癌基因 p53 突变为致癌基因, 致癌基因表达增加, 使细胞处于活跃增殖状态, 既促进肿瘤细胞生长, 细胞内高水平的氧自由基和高致癌基因的环境又进一步增加了基因突变的机率[10], 形成恶性循环。

参考文献:

[1] 王曙光. 肝外胆管癌细胞系的建立[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(2): 67－68.

[2] 李家林. 紫外分光光度法测定血浆过氧化脂质[J]. 中国循环杂志, 1989, 4(1): 57－58.

[3] 鄂　征 主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995. 144－147.

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

[4] Wang G, Godinger D, Aronovitch J, *et al*. Opposing effects of nitroxide free radicals in Escherichia coli mutants deficient in DNA repair[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1 305(1—2): 71—78.
[5] Durusoy M, Diril N, Bozcuk A N. Age-relativity of catalase in different genotypes of Drosophila melanogaster[J]. Exp Gerontol, 1995, 30(1): 77—86.
[6] Irani K, Xia Y, Iweier J L, *et al*. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts[J]. Science, 1997, 275(5 306): 1 649—1 652.
[7] Grand R J, Lecane P S, Owen D, *et al*. The high levels of P53 present in adenovirus early region 1-transformed human cells do not cause up-regulation of MDM2 expression[J]. Virology, 1995, 210(2): 323—334.
[8] Costa A, Marasca R, Valentinis B, *et al*. p53 gene point mutation in relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers[J]. J Pathol, 1995, 176(1): 45—53.
[9] Della Torre G. TP53 mutations and mdm2 protein overexpression in cholangiocarcinomas[J]. Diagn Mol Pathol, 2000, 9(1): 41—46.
[10] Wolff J M, Stephenson R N, Valentinis B, *et al*. Retinoblastoma and P53 gene as prognostic indicators in urological oncology[J]. Urol Int, 1994, 53(1): 1—5.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)10-1148-01

乙酰胆碱对大鼠胃窦肌间神经丛氮能神经的影响

Effects of acetylcholine on nitrergic nerves in the myenteric phexus of rat gastric antrum

龙庆林，王振华 （第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038）

胃肠道主要的兴奋性神经递质是乙酰胆碱，而主要的抑制性递质是一氧化氮。形态学研究表明胆碱能神经和氮能神经之间存在大量的突触连接，提示二者互相影响对方的释放[1]。本试验拟通过观察正常大鼠注射乙酰胆碱后胃窦肌间神经丛内氮能神经变化，间接了解乙酰胆碱对一氧化氮合成的影响。

1 材料与方法

健康成年 Wistar 大鼠 24 只，随机分为 3 组，每组 8 只，正常喂养。①正常对照组；②阿托品组，每天腹腔注射阿托品 0.75 mg/kg，2/d；③氯化氨甲酰胆碱组，每天腹腔注射氯化氨甲酰胆碱 1 μg/kg，1/d，4 周后全麻下取大鼠胃固定。

将胃窦剪成 0.4 cm×0.8 cm 大小的组织块，用钟表镊轻轻刮去粘膜及粘膜下层，根据肌纤维走向辨别出斜肌和环肌并撕去，得到附于纵肌之上的肌间神经丛。用还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶组化法显示氮能神经，采用 MD20 型真彩色图像分析仪进行图像分析，计算阳性神经平均面密度（目标面积占统计面积的百分比）。

采用单因素方差分析进行统计学处理。

2 结果

光镜：正常大鼠胃窦肌间神经丛中的氮能神经纤维呈“网状”分布，神经节较粗大，其中可见较多的深浅不一、大小不等的深蓝色神经元和突起，神经元着色深浅不一，胞核不着色，部分神经元胞体相互融合；节间束有少许阳性神经元散在分布；神经元之间彼此形成回路。阿托品组氮能神经分布类似于正常组，CCH 组氮能神经纤维及神经节增粗增大，神经元胞体融合较多见。

图像分析：CCH 组大鼠胃窦肌间神经丛氮能神经平均面密度[（17.5±4.4）%]较正常对照组[（13.8±5.8）%]虽有增加，但并无统计学意义，阿托品组氮能神经含量[（12.1±3.3）%]与正常组无显著性差异。

3 讨论

乙酰胆碱促进血管内皮释放一氧化氮早已得到肯定。1980 年 Furchgott 等[2]就发现乙酰胆碱能刺激血管释放一种能使血管扩张的物质，此物质后来被证实为一氧化氮。Moncoda 也认为乙酰胆碱致血管扩张作用至少部分是由一氧化氮介导的。在胃肠道，兔胃体肌肉离体实验表明乙酰胆碱与蛋白激酶 C 抑制剂合用可促进 L-胍氨酸的合成[3]，但也有许多学者认为乙酰胆碱对 L-胍氨酸的合成及一氧化氮合酶的活性几乎或完全没有影响。本实验以大鼠为研究对象，采用组化法使氮能神经显色，通过观察胃窦肌间神经丛氮能神经变化间接反映一氧化氮的含量变化。通过实验，我们发现注射阿托品的大鼠胃窦肌间神经丛氮能神经分布与正常组类似，图像分析也提示二者含量相近，提示内源性乙酰胆碱对一氧化氮的释放无作用；光镜下虽然 CCH 组氮能神经纤维和神经节较粗大，融合的神经元也较多见，但图像分析显示胃窦肌间神经丛氮能神经含量与正常组无显著性差异，提示外源性乙酰胆碱对一氧化氮的合成也无作用。

本实验通过观察大鼠注射阿托品和 CCH 后胃窦肌间神经丛氮能神经含量的变化，发现乙酰胆碱对胃窦肌间神经丛一氧化氮的合成无明显作用。

关键词：乙酰胆碱；一氧化氮；胃；神经
中图法分类号：R971.91 文献标识码：B

参考文献：

[1] Schemann M, Schaaaf C. Different projection of cholinergic and nitroxidergic neurons in the myenteric plexus of guinea pig stomach[J]. Am J Physiol, 1995, 269(2 Pt 1): G186—195.
[2] Furchgott R F, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. Nature, 1980, 288(5 789): 373—376.
[3] Murthy K S, Jin J G, Makhlouf G M. Inhibition of nitric oxide synthase activity in dispersed gastric muscle cells by protein kinase C[J]. Am J Physiol, 1994, 266(1 Pt 1): G161—165.

（编辑 陈聪连）

作者简介：龙庆林(1970—)，男，湖南省茶陵县人，硕士，主治医师，讲师，主要从事胃肠动力学方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)65428751
收稿日期：2001-01-12；修回日期：2001-05-20

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