DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.006
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
12 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0012-05

人胰岛素样生长因子Ⅱ型受体反义基因对肝癌细胞恶性表型的影响

陈文生[1],刘为纹[1],顾健人[2],周筱梅[2],周子成[1],房殿春[1],杨建民[1] ([1]第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038;[2]上海市肿瘤研究所癌基因国家重点实验室,上海 200032)

提 要:目的 研究人胰岛素样生长因子Ⅱ型受体(IGF-ⅡR)反义基因对SMMC-7721人肝癌细胞恶性表型的逆转作用。方法 构建IGF-ⅡR正、反义基因真核表达质粒,用磷酸钙-DNA共沉淀的方法,导入SMMC-7721人肝癌细胞株,经G418培养基筛选稳定的抗性细胞。采用Northern杂交检测对转染细胞内源性IGF-ⅡR基因转录的抑制,观察转染细胞克隆形成率,细胞生长曲线,软琼脂生长及裸鼠致瘤能力的变化。结果 IGF-ⅡR反义基因转染肝癌细胞的内源性IGF-ⅡR基因转录受到有效抑制,转染细胞克隆形成率明显降低,并失去在软琼脂上生长的能力,裸鼠致瘤性明显降低,但细胞生长曲线无明显变化。结论 IGF-ⅡR反义基因可以有效阻断IGF-Ⅱ至IGF-ⅡR的自泌/旁泌生长刺激信号环路,一定程度地抑制肝癌细胞的恶性表型。

关键词:胰岛素样生长因子Ⅱ型受体;反义基因;肝癌细胞;恶性表型
中图法分类号:R735.7;R394 文献标识码:A

Effect of antisense gene of type Ⅱ insulin-like growth factor receptor on malignant phenotype of human hepatoma cells *in vitro*

CHEN Wen-sheng, LIU Wei-wen, GU Jian-ren, ZHOU Xiao-mei, ZHOU Zi-cheng, FANG Dian-chun, YANG Jian-min (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the reverse effect on the malignant phenotype of human hepatoma cells transfected with type Ⅱ insulin-like growth factor receptor (IGF-ⅡR) antisense gene. **Methods** After the recombinant plasmids containing IGF-ⅡR sense and antisense genes which could be expressed in eukaryotic cells were constructed, they were transferred into human hepatoma cell line SMMC-7721 with calcium phosphate co-precipitation, and selected in DMEM supplemented with 500 μg/ml G418 (Geneticin) for 2~3 weeks and the total number of formed colonies was counted. The effect of IGF-ⅡR antisense gene transfection on endogenous IGF-ⅡR mRNA levels was examined with Northern blot, and the effects on the cell growth rate, the colony formation of the transfected cells in soft agar medium and the tumorigenic capacity in nude mice were also examined. **Results** The hepatoma cells transfected with IGF-ⅡR antisense gene exhibited a significant reduction in endogenous IGF-ⅡR mRNA levels and a loss of their ability for anchorage-independent growth in soft agar. Their tumorigenicity in nude mice was also decreased. The IGF-ⅡR antisense gene suppressed the colony formation of 7721 cells resistant to G418 without alteration on cell growth curve. **Conclusion** The IGF-ⅡR antisense gene effectively blocks the autocrine and/or paracrine signal transduction pathway of IGF-Ⅱ to IGF-ⅡR and inhibit the cell malignant phenotype to some extent.

Key words: IGF-ⅡR; antisense gene; hepatoma cell; malignant phenotype

原发性肝细胞性肝癌是一种高度恶性且预后不良的肿瘤,其发病率在我国仅次于胃癌、食管癌而居第三位。肝癌与其它癌肿一样,其发生具有多病因性,发展过程又具多阶段性,肝癌的发生涉及一系列原癌基因(包括生长因子及其受体基因)的激活和抑癌基因的失活[1]。我们先前的研究发现,人胰岛素样生长因子-Ⅱ(IGF-Ⅱ)及其受体(IGF-ⅡR)基因在人原发性肝癌及癌旁肝组织高表达,在不典型增生细胞中尤为明显,提示这些基因的激活可能是一个较早期改变[2]。IGF-Ⅱ是肝癌细胞自分泌生长因子之一,能与IGF-ⅡR发生特异性结合,在肝癌发生、发展中起着"自产自销"的调节作用。IGF-Ⅱ及IGF-ⅡR的过量表达成为肝癌独特的自分泌(Autocrine)及旁分泌(Paracrine)系统。我们应用反义技术,抑制肝癌细胞内源性IGF-ⅡR的高表达,切断肝癌细胞自泌、旁泌系统的作用途径,观察对肝癌细胞恶性表型可能产生的逆转作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

限制性内切酶、连接酶(Promega公司、Boehringer公司)、十二烷基肌酸钠、DEPC、3-(N-琥泊代)丙磺酸(MOPS)、G418(Sigma公司)、β-巯基乙醇(Koch-light Lab.公司)、蛋白胨及酵母提取物(Difco)、Sephadex-G50(Pharmacia公司)、异硫氰酸胍、琼脂糖及低熔点琼脂糖、磷酸钙转染试剂盒(GIBCO BRL公司)、α-^{32}PdCTP、MegaprimeTM DNA随机引物标记试剂盒(Amersham公司)。

1.2 质粒、菌株及细胞株

质粒pCMVneo、IGF-ⅡR、β-Actin(上海市肿瘤研究所),宿主

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670346)
作者简介:陈文生(1966-),男,安徽省怀宁县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝癌分子生物学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68753758
收稿日期:2000-10-11;修回日期:2000-12-08

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

菌 XL1-Blue(Stratagene 公司), SMMC-7221 人肝癌细胞株(中科院上海细胞所)。

1.3　IGF-ⅡR 正义、反义真核表达重组体的构建

将 IGF-ⅡR 基因 cDNA 编码区 *BamH*Ⅰ/*BamH*Ⅰ片段长 3.577 kb(3335~6911), 亚克隆入经去磷酸化处理的真核表达载体 pCMVneo 的克隆位点 *BamH*Ⅰ, 得到含有 IGF-ⅡR 基因的真核表达质粒。以限制性内切酶图谱分析其插入片段正反向。

1.4　IGF-ⅡR 正义、反义基因的肝癌细胞转染

按磷酸钙转染试剂盒说明书进行。

1.5　细胞总 RNA 的抽提及 Northern 杂交

肝癌细胞总 RNA 提取采用异硫氰酸胍-酚-氯仿"一步法"抽提。紫外定量, 甲醛琼脂糖变性凝胶电泳鉴定 RNA 质量。Northern 杂交按文献[3]的方法进行。膜片经洗脱探针后再用 β-Actin cDNA 探针再杂交, 作为内参照以校正 RNA 上样量。

1.6　细胞转染克隆形成数

在 3 只培养瓶中同时各接种 5×10^5 的 SMMC-7721 细胞, 3 种质粒(pCMVneo、ⅡR-S、ⅡR-AS)用量均为 10 μg, 一次操作转染细胞, 共重复转染 3 次。经含 G418 500 μg/ml 的选择性培养基培养筛选 2~3 周, 计算各组细胞抗性克隆数。

1.7　细胞生长曲线

在 24 孔板中每孔接种 1×10^4 细胞, 以后每日消化 3 孔细胞, 苔盼蓝染色后分别计数, 取平均值, 共计 8 d。

1.8　双层软琼脂培养

在无菌条件下, 按 1∶1 混合 1.2%的低熔点琼脂糖(40 ℃)和含有 2 倍抗生素和 20%小牛血清的 2× DMEM(37 ℃), 取3 ml 注入直径 6 cm 平皿中制备底层琼脂, 令冷却凝固, 置 CO_2 温箱备用。消化细胞, 用培养液制成细胞悬液, 计数后调整至1×10^4 个细胞/ml, 在相同条件下按 1∶1 比例让 0.7% 低熔点琼脂糖和 2× DMEM 在无菌试管中相混, 再向管中加入 0.2 ml 细胞悬液, 并充分混均后注入含 0.6%底层琼脂糖平皿中(直径 6 cm 平皿加3 ml), 遂形成双琼脂层。待上层琼脂凝固后, 置入 37 ℃ CO_2 温箱中, 培养 10~14 d。观察细胞集落, 摄影并计数。

1.9　裸鼠体内致瘤性

Balb/c 系无胸腺裸鼠, 饲养于 SPF (Spectic-pathogen free) 条件下。约 4~5 周龄鼠, 雌雄兼用。第 1 次接种细胞 2×10^5/50 μl 分为 3 组, 每组裸鼠 3 只, 各组裸鼠右侧腹背部皮下分别接种 IGF-ⅡR 反义、正义基因及 pCMVneo 转染细胞, 每只裸鼠左侧均接种 7721 细胞。第 2 次接种另取 9 只裸鼠, 接种细胞数为 2×10^6/100 μl, 其余同上。此后每周观察 2 次, 用卡尺准确测量肿瘤结节长度(a)、宽度(b), 按公式: $ab^2/2$ 计算肿瘤体积。共观察 42 d。

2　结果

2.1　IGF-ⅡR 正义、反义真核表达重组体的构建

本实验用 IGF-ⅡR 基因 cDNA 编码区 *Bam*HⅠ/*Bam*HⅠ片段长 3.577 kb(3 335~6 911 bp), 亚克隆入经去磷酸化处理的真核表达载体 pCMVneo, 得到 IGF-ⅡR-pCMVneo 真核表达重组体。由于 IGF-ⅡR 插入片段 5′ 端 602 bp 处有一 *Hind*Ⅲ位点, 而载体上亦有一 *Hind*Ⅲ位点和 *Xba*Ⅰ位点, 通过 *Hind*Ⅲ、*Xba*Ⅰ双酶切, 正义重组体(ⅡR-S)应为: 1.9 kb、1.992 kb、6.234 kb 三段, 而反义重组体(ⅡR-AS)为 1.9 kb、3.862 kb、4.364 kb 三段。如图 1 显示我们成功地构建得到了 IGF-ⅡR-pCMVneo 正义(ⅡR-S)、反义(ⅡR-AS)真核表达重组体。

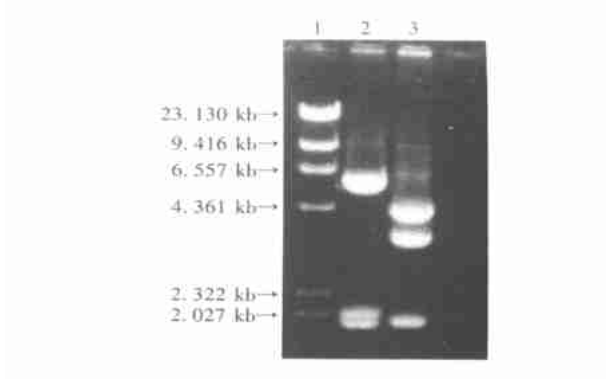


图 1　IGF-ⅡR cDNA 正、反义重组体的内切酶解(*Hind*Ⅲ、*Xba*Ⅰ)鉴定

Fig 1　Analysis of restriction enzyme (*Hind*Ⅲ、*Xba*Ⅰ) digestion with recombinant sense and antisense IGF-ⅡR cDNA

1: λ/*Hind*Ⅲ Marker; 2: ⅡR-S; 3: ⅡR-AS

2.2　基因转染后细胞内源性 IGF-ⅡR mRNA 转录的变化

各组细胞总 RNA 在甲醛变性凝胶电泳转膜后, 分别与 α-^{32}P dCTP 标记的 IGF-ⅡR 探针(4.4 kb)和 β-Actin 探针(2.0 kb)行 Northern 杂交, 结果如图 2 显示ⅡR-S 组表达较对照组 7721、pCMVneo 组明显增加, 而ⅡR-AS 组表达明显减弱。说明 IGF-ⅡR 反义基因转染后, 对细胞内源性 IGF-ⅡR mRNA 转录产生了有效的抑制。

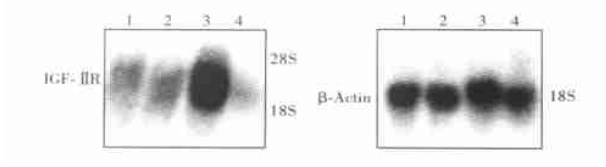


图 2　IGF-ⅡR、β-Actin cDNA 探针与各组细胞总 RNA 的 Northern 杂交

Fig 2　Northern blot analysis of RNA from parental SMMC-7721 cells (7721), pCMVneo, ⅡRS, and ⅡRAS transfected cells with (A) human IGF-ⅡR cDNA and (B) β-actin cDNA as probes

1: SMMC-7721 cell; 2: pCMVneo; 3: ⅡR-S; 4: ⅡR-AS

2.3　细胞转染克隆形成数

在三只培养瓶中同时各接种 5×10^5 的 7721 细胞, 三种质粒(pCMVneo、ⅡR-S、ⅡR-AS)用量均为 10 μg, 一次操作转染细胞, 共重复转染三次。经含 G418 500 μg/ml 的选择性培养基培养筛选 2~3 周, 各组细胞得到的阳性克隆数见表 1。ⅡR-AS 组转染后 G418 抗性细胞克隆数明显较ⅡR-S 和 pCMVneo 组少, 提示 IGF-ⅡR 反义基因可能抑制细胞转染克隆的形成。

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

表 1 IGF-ⅡR 正、反义 cDNA 及空载体 pCMVneo 转染组细胞 G418 培养基筛选的抗性细胞克隆数

Tab 1 Average numbers of G418 resistant colonies after IGF-ⅡR sense, antisense cDNA and vector alone transfections

Transfected cells	Plasmid quality (μg)	Numbers of seeded cells	G418 resistant colonies			
			1	2	3	($\bar{x}\pm s$)
ⅡR-AS	10	5×10^5	6	2	5	4.3±2.1
ⅡR-S	10	5×10^5	15	14	11	13.3±2.1
pCMVneo	10	5×10^5	23	18	25	22.0±3.6

2.4 细胞生长曲线

7721 细胞在转染 IGF-ⅡR 正、反义基因及空载体 pCMVneo 后，细胞生长速度无明显变化，说明 IGF-ⅡR 反义基因可能对具有稳定 G418 抗性的细胞生长无影响。

2.5 软琼脂集落形成数

在双层软琼脂培养基中，未转染的 7721 细胞和空载体 pCMVneo 转染细胞生长旺盛，一般在 7～10 d 形成明显簇状细胞集落，且细胞集落大，数量多。IGF-ⅡR 正义基因转染细胞生长速度较慢，集落小且形成数较少。IGF-ⅡR 反义基因转染的细胞不能在软琼脂中生长形成集落，呈单个散在的细胞，见图 3、表 2。说明 IGF-ⅡR 反义基因转染后，7721 细胞不依赖于锚着生长能力的丧失，细胞恶性程度明显降低。

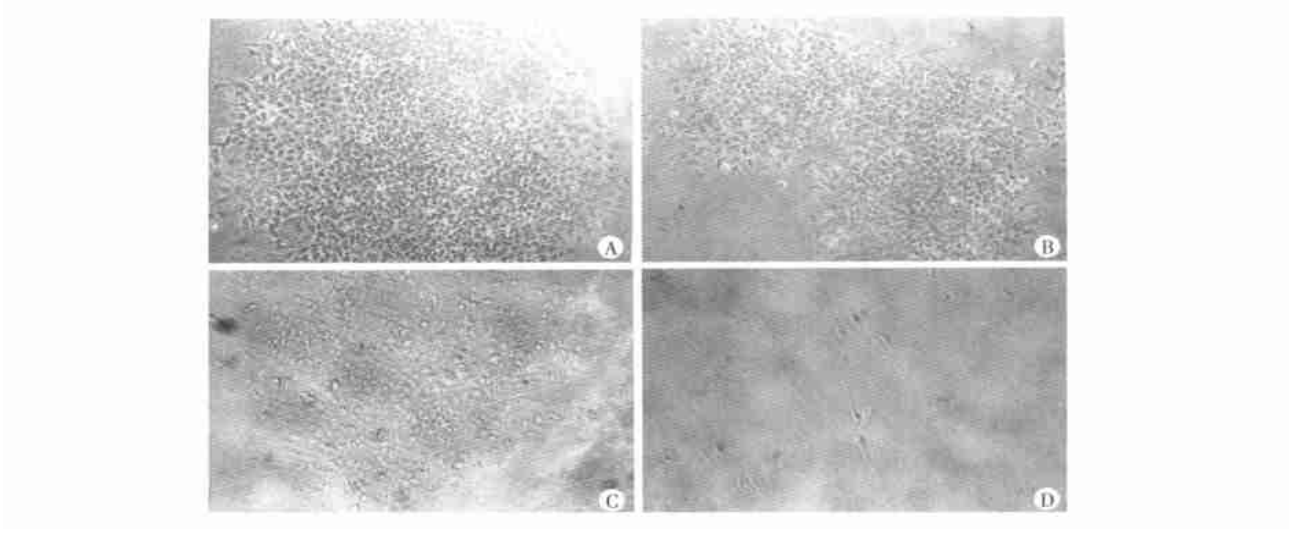


图 3 SMMC-7721 及 pCMVneo、ⅡR-S、ⅡR-AS 三组转染细胞在软琼脂培养基中的生长特征

Fig 3 *In vitro* growth characteristics of 7721 parental and transfected cells in soft agar medium

A: 7721; B: pCMVneo; C: ⅡR-S; D: ⅡR-AS

表 2 IGF-ⅡR 正、反义基因、pCMneo 对 7721 细胞在软琼脂中集落形成的影响

Tab 2 Number of colonie formed in soft agar by parental and transfected cells

Cell	Number of colonies formed in soft agar					$\bar{x}\pm s$
	1	2	3	4	5	
7721	235	244	268	254	273	254.8±15.9
pCMVneo	156	231	217	202	176	196.4±30.4
IIRS	63	102	95	114	123	99.4±23.0
IIRAS	0	0	0	0	0	0.0±0.0

Cells were seeded in soft agar at a density of 10^3 cells per 60 mm dish, and the number of colonies with a diameter of at least 125 μm were counted at the indicated days. All incubation were in 10% calf serum

2.6 裸鼠体内致瘤能力

以 2×10^5 细胞数接种裸鼠皮下后，12 d 左右即可见肿瘤出现。但 IGF-ⅡR 反义基因转染细胞未成瘤，共观察 42 d 仍未长出肿瘤，其对照侧接种的 7721 能成瘤。IGF-ⅡR 正义基因和 pCMVneo 转染细胞均成瘤，见表 3。当以 2×10^6 细胞数接种时，IGF-ⅡR 反义基因转染细胞也能成瘤，但出现肿瘤的时间延长，且肿瘤体积明显小于对照侧和 IGF-ⅡR 正义、pCMVneo 转染细胞，见表 3。

表 3 SMMC-7721 及各组转染细胞在裸鼠体内致瘤能力

Tab 3 Tumorigenicity of parental and transfected SMMC-7721 cell lines in nude mice

	Cell Line	Tumor growth		
		Tumor formation	Days of tumor appearance	Volume of tumor
2×10^5 cells injected	1. IIRAS	0/3	0.0±0.0	0.0±0.0
	7721	3/3	12.0±2.0	289.5±81.0
	2. IIRS	3/3	15.0±1.0	159.3±35.1
	7721	3/3	12.0±2.6	223.8±25.2
	3. pCMVneo	3/3	14.0±1.0	169.5±47.7
	7721	3/3	12.0±1.0	226.7±82.8
2×10^6 cells injected	4. IIRAS	3/3	15.7±3.0	25.3±12.7
	7721	3/3	8.0±3.0	769.3±424.3
	5. IIRS	3/3	10.0±1.0	240.2±72.0
	7721	3/3	7.3±0.6	558.8±37.5
	6. pCMVneo	3/3	9.7±0.6	424.5±117.0
	7721	3/3	7.7±0.6	552.0±95.1

3 讨论

目前对于 IGF-ⅡR 在肿瘤发生、发展中的作用尚未完全明了，有研究发现其在肿瘤组织中有突变或缺

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

失[4], 故认为它可能是起抑癌基因的作用; 也有实验提示它介导了肿瘤细胞的恶性增生[5]和侵润、转移[6,7]。我们先前的研究[2], 应用 mRNA 杂交以及合成相应的多肽制备抗体, 从 mRNA 转录水平、Western 印迹反应和细胞免疫化学证明: 在人原发性肝癌的癌及癌旁肝组织 IGF-Ⅱ、IGF-ⅡR 均过量表达, 在不典型增生的细胞中尤为明显。IGF-Ⅱ、IGF-ⅡR 有一共同特点, 在正常肝细胞中均无明显表达, 但可在胆管细胞中有表达, 在胎肝中有明显表达。IGF-Ⅱ和 IGF-ⅡR 的激活在肝癌可能是一个较早期的改变, 它们的异常表达将使癌细胞分泌的生长因子, 不仅作用于它本身的受体, 而且将作用它邻近的细胞, 可能是肝癌自泌、旁泌的分子基础, 造成细胞的持续增殖, 而导致癌变。本实验研究在此基础上, 构建 IGF-ⅡR 反义基因真核表达载体, 导入 SMMC-7721 人肝癌细胞株, 抑制肝癌细胞 IGF-ⅡR 的表达, 切断癌细胞自泌和旁泌系统的作用途径, 观察其对癌细胞恶性表型可能产生的影响。

反义技术是通过导入与靶 mRNA 互补的 RNA 序列, 阻断信息由 DNA→RNA→蛋白质的流动, 即 RNA-RNA 通过碱基互补原则结合而影响、调节靶 mRNA 的活性。许多研究提示[8], 反义 RNA 几乎可以在真核生物基因表达的各个水平发挥作用, 影响 RNA 转录、加工、由核内到胞浆的转运、RNA 的稳定性和抑制翻译等。IGF-ⅡR 基因 cDNA 全长为 9 090 bp, 1～147 bp 为 5' UTR(Untranslated region, UTR), 7 621～9 090 bp 为 3' UTR。利用其部分编码区序列 3 335～6 911 bp(3 577 bp, *Bam*HⅠ-*Bam*HⅠ)片段, 构建了以 pCMVneo 为真核表达载体的 IGF-ⅡR 反义 RNA 表达系统, 将其导入人肝癌细胞株 SMMC-7721。Northern 杂交显示, 反义基因转染细胞的内源性 IGF-ⅡR mRNA 转录受到明显抑制, 说明该反义基因在肝癌细胞中发挥了有效的阻断 IGF-Ⅱ→IGF-ⅡR 信号环路的作用。

在人原发性肝癌及癌旁肝组织中, IGF-Ⅱ及其受体 IGF-ⅡR 同时过量表达, 形成了一个自我促进增殖的自泌及旁泌系统[2,9]。细胞表面 IGF-ⅡR 数目与细胞生长有关, IGF-Ⅱ作用于 IGF-ⅡR 可以刺激细胞增殖, IGF-ⅡR 可通过影响离子或基质的转运、增加 RNA、蛋白质、糖原合成而参与细胞分裂[5,10]。

应用 IGF-ⅡR 多肽片段制备抗体, 在体外观察到抗 IGF-ⅡR 抗体对人肝癌细胞有抑制生长的作用(许秀兰, 顾健人, 等未发表资料)。我们用 IGF-ⅡR 反义基因转染 7721 肝癌细胞株, 其形成稳定的 G418 抗性克隆数明显低于空载体及正义基因转染组, 但细胞生长曲线却无明显变化。在研究 P53[11]和其它抑癌基因对肿瘤细胞生长作用的研究中也发现, 转染细胞克隆形成数明显较对照组少, 但细胞生长曲线无变化。在筛选得到的 G418 阳性转染克隆中没有完整的外源性野生型 P53 表达, 甚至没有其 cDNA 的存在或其发生了重排, 其原因是表达外源性野生型 P53 的细胞不能生长, 故在 G418 筛选时不能形成细胞克隆。在瞬时表达研究中发现 P53 抑制了细胞 DNA 的合成。IGF-ⅡR 反义基因转染肝癌细胞时, 转染细胞克隆的形成受到了抑制, 这揭示它可能抑制了细胞生长。但稳定筛选的 G418 阳性细胞生长曲线无明显变化, 其原因是否为这些细胞内部分子机制发生了某些代偿性变化尚有待进一步研究。

IGF-ⅡR 反义基因转染组细胞不能在软琼脂中生长, 以 2×10^5 细胞数接种裸鼠皮下时反义基因转染细胞不能成瘤, 而以 2×10^6 细胞接种时能成瘤, 但肿瘤出现的时间较对照组延长, 且瘤体小。说明 IGF-ⅡR 反义基因转染细胞不依赖于锚着生长的特性丧失, 裸鼠致瘤性下降, 细胞恶性程度明显降低。这提示 IGF-ⅡR 基因可能是 SMMC-7721 人肝癌细胞株维持其恶性表型的必须基因之一。IGF-ⅡR 在肿瘤细胞的恶性浸润性方面具有重要作用[6,7,12]。有研究发现 IGF-ⅡR 特异性抗体能阻断 IGF-Ⅱ诱导的高转移的横纹肌肉瘤细胞株的运动能力[6], 导致其浸润性和转移性的下降。以 2×10^5 细胞接种时不能在裸鼠皮下局部成瘤, 是细胞内源性 IGF-ⅡR 表达阻断, 使其接受生长刺激信号的优势丧失; 但在高浓度 2×10^6 细胞接种时能在裸鼠皮下成瘤。因此, IGF-ⅡR 对肝癌细胞在裸鼠皮下存活和增殖可能仍是一个有限因素, 反义基因转染细胞可以低水平表达 IGF-ⅡR。在裸鼠皮下组织微环境中, 高密度肝癌细胞群体可以使其表达生长所需阈值水平的 IGF-ⅡR, 故最终在裸鼠皮下增殖成瘤, 但成瘤时间延长, 且瘤体较对照小。

大量研究表明肿瘤细胞恶性表型的获得, 是由于生长因子受体表达的变化, 和/或生长因子诱导的信号转导机制调节的变化, 从而引起细胞对各种生长因子的反应发生改变所致。应用反义技术、单克隆抗体、受体激酶抑制剂等降低受体活性, 干预生长因子受体信号转导的各个环节, 是治疗恶性肿瘤很有前途的方法。我们研究说明 IGF-ⅡR 基因在肝癌细胞增殖、维持其恶性表型中充担重要作用, 可能作为肝癌基因治疗的候选者。

参考文献:

[1] Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis[J]. Semin Liver Dis, 1999, 19(3): 235－242.

[2] 杨冬华, 刘为纹, 顾健人, 等. IGF-Ⅱ、IGF-Ⅱ受体和 CSF-1 受体/C-fms 癌基因产物在肝癌、癌旁肝组织转录水平的表达[J]. 中华消化杂志, 1993, 13: 259－262.

[3] Sambrook, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1995. 371.

[4] Oates A J, Schumaker L M, Jenkins S B, *et al*. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene[J]. Breast Cancer Res Treat, 1998, 47(3): 269－281.

[5] Takigawa M, Okawa T, Pan H, Aoki C, *et al*. Insulin-like growth factors Ⅰ and Ⅱ are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective recep-

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

tors on a clonal human chondrosarcoma-derived chondrocyte cell line, HCS-2/8[J]. Endocrinology, 1997, 138(10): 4 390—4 400.

[6] Minniti C P, Kohn E C, Grubb J H, *et al*. The insulin-like growth factor Ⅱ (IGF-Ⅱ)/mannose 6-phosphate receptor mediates IGF-Ⅱ-induced motility in human rhabdomyosarcoma cells[J]. J Biol Chem, 1992, 267(13): 9 000—9 004.

[7] Nishiura T, Karasuno T, Yoshida H, *et al*. Functional role of cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor Ⅱ receptor in cell adhesion and proliferation of a human myeloma cell line OPM-2[J]. Blood, 1996, 88(9): 3 546—3 554.

[8] Ogawa S, Pfaff D W. Current status of antisense DNA methods in behavioral studies[J]. Chem Senses, 1998, 23(2): 249—255.

[9] Liu P, Terradillos O, Renard C A, *et al*. Hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus/c-myc mice: sustained cell proliferation and biphasic activation of insulin-like growth factor Ⅱ[J]. Hepatology, 1997, 25(4): 874—883.

[10] Hari J, Pierce S B, Morgan D O, *et al*. The receptor for insulin-like growth factor Ⅱ mediates an insulin-like response[J]. EMBO J, 1987, 6(11): 3 367—3 371.

[11] Cajot J F, Anderson M J, Lehman T A, *et al*. Growth suppression mediated by transfection of P53 in Hut292 DM human lung cancer cells expressing endogenous wild-type P53 protein[J]. Cancer Res, 1992, 52(15): 6 950—6 960.

[12] Confort C, Rochefort H, Vignon F. Insulin-like growth factors (IGFs) stimulate the release of alpha 1-antichymotrypsin and soluble IGF-Ⅱ/mannose 6-phosphate receptor from MCF7 breast cancer cells[J]. Endocrinology, 1995, 136(9): 3 759—3 766.

(编辑 郭建秀)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)01-0016-01

VARIAN-2300C直线加速器枪灯丝板故障检修

Examination and repair of hot deck board in VARIAN-2300C accelerator

陈维平, 黄晓庆 (第三军医大学附属西南医院设备科, 重庆 400038)

VARIAN直线加速器是90年代末的产品, 其控制电路较为复杂, 对维修人员检修设备带来一定的困难, 由于直线加速器的枪灯丝控制电路上附加高压, 所以电路板容易损坏。向VARIAN公司订购每块电路板需15万元, 一年下来要用去几十万元的维修费。为了节省开支, 笔者针对枪灯丝控制电源板(HOT DECK FILAMENT POWER SUPPLY、GUN DRIVER PULSER)出现的故障解决方法如下。

故障现象: 当电源开关和高压开关闭合, 高压升至固定值后, 在主监视器上会出现"GFIL"连锁闪烁, 加速器不能正常工作。

分析与检修: 枪灯丝控制电路见维修手册(图号882231)所示。根据VARIAN维修手册可知, "GFIL"脉冲信号从主微处理器通过光纤传递到J12, 经J12光—电转换加到运放U1(TL074BCN)的X1上。同时交流120 VAC经R31、CR1、CR2加到U7(TCA758)的5脚上, U7的19脚为振荡的锯齿波, Q1或Q2输出一幅度为+15 V的脉冲。它直接触发可控硅脉动导通, 控制T1振荡输出(AC FIL V MON)到U5、U9的控制端, 其输出经运放到U2(TCL1541N), 正常时"GFIL"不会闪烁。

当出现"GFIL"闪烁时, 关掉高压开关, 用万用表查U7(TCA758)的输出端为高电平, 电压为+4.5 V(正常为0 V)。用示波器测U7的14脚波形发现脉冲宽度无规律变化。查U7各输入脚静态值均正常, 再查C12电容(150 pF)两端的波形与正常波形完全不同。说明U7(TCA758)产生自激, 电容C19漏电。用一只100 pF电容代换后, 结果U7的14脚输出正常。另外, 模数转换器U2(TLC1541)的19脚为时钟输入, U2与晶振之间有一短路跳线, 长时间的运转会使插针簧片弹性变差、腐蚀、造成阻值变大或接触不良, 结果会使时钟输入到U2时时有时无, 短路跳线后加上高压, "GFIL"不再闪烁, 连锁故障排除。

故障现象: 电源开关和高压开关同时闭合, 高压升降不受控制, 超出或低于正常值。

分析与检修: 信号脉冲(HD A/D CS)和(HD I/O CLOCK)分别经J11、J14通过光纤加到光敏器件(HFBR2531)上, 经转换通过U11的两个与非门, 控制信号加到U7的输入端, U7输出信号经U5、U6(74HC164)分别进入数模转换器(AD7538)其输出经过比较、放大加在Q2上。实现高压上、下自动调整。线路图见维修手册(图号882233)。当枪灯丝高压不可自动调节时, 先检查U11的两个与非门逻辑关系是否正常, 当J13输入端为低电平时J13发出红光, J10在光照时为低电平, 相反为高电平。Q2在静态时栅极D、源极S和控制极G之间, D-S之间阻值几乎为零。说明Q2击穿, 可用IFR730代换。加电测试时, Q2栅极对地分别有+500 V和+90 V电压。说明控制信号不对, 查光耦合器U7发光二极管两个有不同程度的击穿, 或光耦合器内部与非门开路, 它直接造成没有控制信号输入或调节信号不正常, 使Q2输出电压大于或小于正常值。光耦合器可用HCL2630、Dual 6N137代替。更换后高压正常。

特别提示: 枪灯丝电源控制板结构复杂, 在焊接时特别注意中间电源与地焊接孔。通常运放、A/D、D/A不容易损坏, 枪灯丝电压不稳是由于线路板长时间工作, 阻容元件老化程度不一所至。

关键词: 直线加速器, 枪灯丝板故障
中图法分类号: R197.39 文献标识码: B

参考文献:

[1] J. 马库斯[美]. 电子电路大全[M]. 北京: 计量出版社, 1985. 79—81.

[2] 陈清山, 陈科燕. 世界集成运算放大器互换手册[M]. 武汉: 中南工业大学出版社, 1988. 282—283.

[3] 吴承梅, 徐达山. 新编世界集成电路大全[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1987. 981.

(编辑 潘式文)

作者简介: 陈维平(1965—), 男, 安徽省怀宁县人, 工程师, 主要从事医疗设备维修方面的研究, 发表论文9篇。电话: (023)68754455

收稿日期: 2000-09-11; 修回日期: 2000-11-02

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