DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.005

文章编号:1000-5404(2000)03-0213-03

论著

呼吸道合胞病毒对人肺腺癌细胞系PAa的影响

陈杭薇[1],钱桂生[1],邬光惠[2],李继成[2] ([1]第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]北京军区总医院,北京 100700)

提 要 目的:探讨呼吸道合胞病毒(RSV)感染对体外培养人肺腺癌细胞系PAa的影响。方法:应用RSV体外感染PAa细胞,观察PAa细胞的变化;聚合酶链反应(PCR)结合单链构象多态性分析(SSCP)检测PAa细胞p53基因突变情况。结果:RSV感染PAa细胞24 h后,细胞出现融合病变,形成巨融合细胞;病变细胞p53第5、6、7、8、9外显子突变热点区域未见单链多态性变化。结论:RSV对PAa细胞形态影响明显,对PAa细胞基因水平的改变有待深入研究。

关键词 呼吸道合胞病毒;肿瘤细胞;p53基因;聚合酶链反应;单链构象多态性分析
中图法分类号 R373.1;R730.261 文献标识码 A

Effects of respiratory syncytial virus on human lung adenocarcinoma cell line PAa and p53 gene mutation

CHEN Hang-wei, QIAN Gui-sheng, WU Guang-hui, LI Ji-cheng (Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective: To study the effects of respiratory syncytial virus (RSV) on the morphology of human lung adenocarcinoma cell line PAa and the mutation of p53. Methods: PAa cells were infected with RSV and the mutation of p53 in PAa cells was observed with polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Results: 24 hours after RSV infection, huge fused PAa cells were formed. PCR-SSCP revealed no change of exon 5, 6, 7, 8 and 9 of p53 gene in the fused PAa cells. Conclusion: RSV infection affects significantly the morphology of PAa cells but its effects on the changes of genes in PAa cells needs further investigation.

Key words respiratory syncytial virus; tumor cell; p53 gene; PCR; SSCP

呼吸道合胞病毒(RSV)是有包膜的单股负链RNA病毒,属副粘病毒科肺炎病毒属[1]。它广泛流行于世界各地人群中,不仅是婴幼儿急性下呼吸道感染的重要病因[2],也是引起成人许多严重疾病的重要感染原[3~5]。本研究于体外应用RSV感染人肺腺癌细胞系PAa,观察培养过程中细胞形态变化,并应用聚合酶链反应(PCR)结合单链构象多态性分析(SSCP),从基因水平观察被感染的PAa细胞抑癌基因p53是否突变,探讨RSV感染对PAa细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

PAa细胞为人肺腺癌细胞系[6],由北京医科大学病理学系购入。培养液为RPMI1640,含10%热灭活小牛血清。于37°C、5%CO_2孵育箱内培养。

1.2 RSV感染

收获对数生长期PAa细胞,接种于96孔细胞培养板,培养24 h,待其贴壁后加入实验培育的RSV Long株病毒液(毒力$TCID_{50}$,10^{-5}/ml)0.15 ml/孔,33°C吸附2 h后,转入37°C、5%CO_2孵育箱内培养,分别于24、48、72、96 h和120 h观察细胞改变。设不加病毒的PAa细胞作对照。RSV标准Long株由首都儿科研究所病毒室提供。

1.3 提取PAa细胞DNA

胰酶消化收获PAa细胞,用生理盐水洗涤3次,重新悬浮后,常规酚/氯仿抽提DNA。

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金重点资助项目(98Z061)
作者简介:陈杭薇(1952.4),女,江苏省扬中市人,博士,主任医师,主要从事呼吸道感染方面的研究,发表论文15篇,现在北京军区总医院呼吸内科。电话:(0201)721629-8044
收稿日期:1999-09-05;修回日期:2000-01-12

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

1.4 PCR扩增p53基因第5、6、7、8和9外显子

试剂盒由北京师范大学京师生物工程公司提供。第5外显子(181 bp)，引物1：5′TACTCCCCTGCCCTCAACAAGA3′；引物2：5′CGCTACCTGAGCAGCGCTCAT 3′；第6外显子(201 bp)，引物1：5′ACGACAGGGCTGGTTGCCCA3′；引物2：5′CTCCCAGAGACCCCAGTTGC3′；第7外显子(171 bp)，引物1：5′GGCCTCATCTTGGGCCTGTG3′；引物2：5′CAGTGTGCAGGGTGGCAAGT3′；第8外显子(204 bp)，引物1：5′CTGCCTCTTGCTTCTCTTTT3′；引物2：5′TCTCCTCCACCGCTTCTTGT3′；第9外显子(185 bp)，引物1：5′GCAGTTATGCCTCAGATTCA3′；引物2：5′CTGGCATTTTGAGTGTTAGA3′。扩增采用常规标准反应体系，模板(变性DNA)5 μl，10× Taq酶缓冲液2.5 μl，4 mmol/L dNTP 1 μl，引物1，2各1 μl，Taq酶2 U，补双蒸水至25 μl混匀，石蜡油封液面。94℃ 45 s，50℃ 45 s，72℃ 45 s，35次循环。72℃再延伸5 min，反应完毕后取10 μl扩增产物进行琼脂糖电泳，确认目标DNA区带。

1.5 SSCP电泳

取5 μl PCR产物，加等量变性上样缓冲液，95℃变性5 min后上样于制备好的10%聚丙烯酰胺凝胶上，40 V 8℃条件下电泳15 h。取下凝胶固定：30%乙醇10%乙酸液30 min×2，蒸馏水10 min×2。银染色：0.1% $AgNO_3$避光浸泡30 min，蒸馏水冲洗。显色：2.5% Na_2CO_3加0.02%甲醛液浸泡至条带清晰，1%乙酸终止反应，判断结果。同时设置未突变型作对照。

2 结果

2.1 RSV感染PAa细胞

PAa细胞接种96孔培养板，细胞浓度4× 10^5/ml，每孔50~100 μl，贴壁后加入RSV病毒液，24 h后即可观察到细胞发生融合病变，见图1，逐渐形成巨融合细胞，见图2，而未加病毒液的PAa细胞对照组则无此改变，见图3。

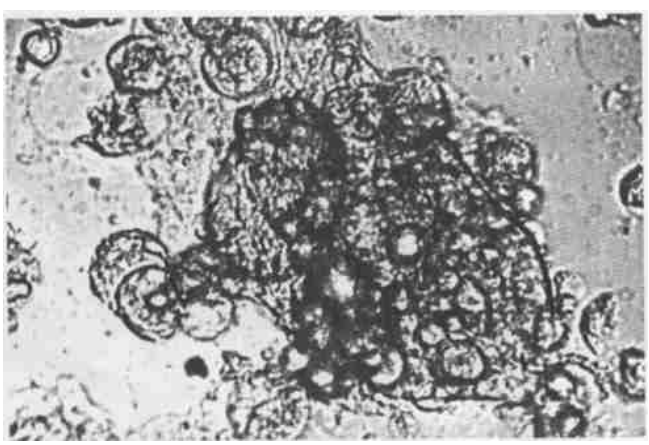


图1 RSV液(毒力 $TCID_{50}$ 10^{-5})感染24 h PAa腺癌细胞出现融合病变(× 250)

Fig 1 24 hours after RSV treatment the PAa cells were fused ($TCID_{50}$ 10^{-5}× 250)

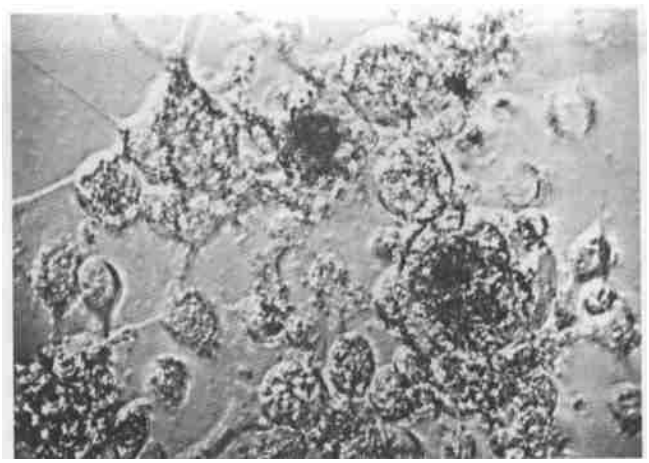


图2 RSV液(毒力 $TCID_{50}$ 10^{-5})感染120 h PAa腺癌细胞出现融合病变，形成巨融合细胞(× 250)

Fig 2 120 hours after RSV treatment, the PAa cells were fused and formed a huge fusion cell ($TCID_{50}$ 10^{-5}× 250)

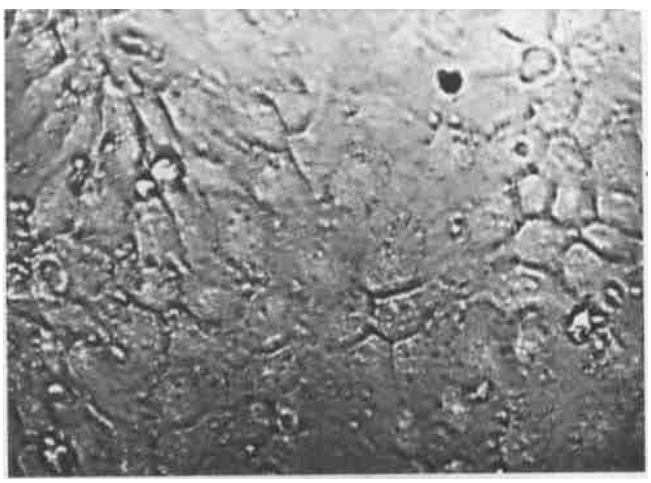


图3 人肺腺癌细胞(PAa)传代后培养24 h，细胞无融合现象(对照组) (× 250)

Fig 3 24 hours after generational culture, the PAa cells were not fused (Control) (× 250)

2.2 PAa细胞p53基因PCR-SSCP检测

收获RSV感染120 hPAa细胞提取DNA，进行p53第5、6、7、8和9外显子突变热点区域PCR扩增，分别得到了与预计相同的DNA片断(171~204 bp)。经SSCP电泳分析，其单链迁移率与未经RSV感染的PAa细胞比较，未见变化。

3 讨论

RSV适合在Hela及Hep-2传代细胞上生长，对KB细胞和A549(人肺癌细胞株)也比较敏感[7,8]。本实验应用的是人肺腺癌细胞系PAa，既往虽然没有RSV在此细胞系上生长的报道，但从本实验结果看，病毒感染

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

PAa 细胞仅 24 h, 即可观察到细胞融合现象, 并逐渐形成巨融合细胞, 说明 RSV 对 PAa 细胞是敏感的。

从另一个意义上说, 一种动物病毒只能在一定范围的宿主细胞内复制。这种细胞应具备病毒吸附的受体或病毒基因表达必须的某种因素。病毒吸附之后浸入细胞才能很好增殖。PAa 细胞可能具备以上条件, 它可以作为 RSV 的一种感染细胞, 供 RSV 研究之用。

抑癌基因 p53 定位于 17 号染色体短臂 3.1 带[9]。人乳头瘤病毒(HPV)可经插入等方式整合到人染色体某一位点, 致 p53 突变。

RSV 感染 PAa 细胞后, PAa 细胞形态上出现了融合病变, 检测其 p53 基因第 5、6、7、8 和 9 外显子突变热点区域, 未发现有变化。高浓度病毒颗粒或病毒外壳蛋白的毒性作用可以诱导细胞形态改变。RSV 如果尚未整合到细胞染色体上, 对 p53 基因就不会有影响。从基因水平改变考虑, 今后仍需要深入研究。

肺癌患者鼻咽部分泌物的 RSV 检出阳性率较高, 可能与肺癌患者免疫力下降, 继发病毒感染有关。RSV 感染对肺癌细胞有何影响? 从本研究看值得进一步探讨, 可能为肺癌的病因和治疗提供新思路。

参考文献

[1] 陈杭薇, 邬光惠, 李继成, 等. 反转录-聚合酶链反应在呼吸道合胞病毒感染检测的应用[J]. 军医进修学院学报, 1997, 18(2): 114—117.

[2] Haoqiang Z, Teresa C T P, Valerie B R, *et al*. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus[J]. J Clin Microbi, 1996, 34(2): 334—337.

[3] 陈杭薇, 李继成, 付丽萍, 等. 呼吸道合胞病毒在成人呼吸道感染患者中的分布[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1990, 13(6): 348.

[4] 陈杭薇, 陈佩兰, 李继成, 等. 成人呼吸道合胞病毒的电镜和免疫电镜研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1993, 16(5): 281—283.

[5] Montagne J R L. RSV pneumonia, a community-acquired infection in adults[J]. Lancet, 1997, 349(9046): 149—150.

[6] 吴秉铨, 孙毓恺, 郑　杰, 等. 裸鼠体内建立的人类高转移癌系[J]. 中华肿瘤杂志, 1985, 7(5): 324—328.

[7] 杜　平, 朱关福, 刘湘云主编. 现代临床病毒学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1991. 311—321.

[8] 赖建平. 病毒病的实验诊断[A]. 见: 向近敏, 郑志明, 赵利淦主编. 医学病毒学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 233—247.

[9] 笪冀平, 胡益云, 陈乐真, 等. 肺癌人乳头瘤病毒感染与 p53 基因突变的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1996, 18(1): 27—29.

(编辑　刘　鹏)

(上接 212 页)

位, 须引起高度重视。另外, 有的女性病人化妆时易压迫角膜和眼球。因此, 术前健康教育是预防角膜瓣移位的主要措施。

3　预防措施

3.1　加强术前健康教育

术前应向患者及家属详细介绍手术原理、手术方法及术后注意事项, 并发放健康教育书面资料一份。详细介绍预防角膜瓣移位的方法及复诊要求, 严格遵守医嘱, 不得擅自院外处理或延误处理。

3.2　半年内严防眼部外力伤害

LASIK 术后立即用眼罩遮盖术眼, 次日复诊前不得自行拆开, 经检查确定角膜瓣情况良好后, 半年内眼罩睡眠时戴白天不戴。减少外出, 禁止游泳, 避免碰撞或发生感染。1 周内绝对禁止用力挤眼、揉眼、翻眼睑检查。洗脸时禁忌用力揉搓眼部, 女性病人禁用睫毛夹夹睫毛, 不能化妆。1 周内禁止洗头, 因洗发液进入结膜囊产生刺激, 必将增加揉眼动作。如果出现结膜囊异物须及时来院处理。禁止与小孩打闹嬉戏。本组病例中, 1 例因儿子不慎挫伤眼部致角膜瓣移位。对睑内翻患者可用胶布牵拉皮肤暂时矫正, 常有较好的效果。

3.3　术后复诊方法

手术次日、1 周、1 月、3 月、半年、1 年, 须按医嘱来院复诊, 发现问题及时处理。

4　心理护理[3]

发生角膜瓣移位后, 多数患者因突然视力模糊而紧张不安, 有的甚至无法配合医生的处理。此时应热情接诊, 耐心询问, 并告诉患者经及时处理后不会留下后遗症, 消除紧张情绪, 增强病人的安全感。最后再次交待注意事项, 应按医嘱用药, 按时复诊。

(承蒙贺翔鸽教授的指导, 谨此致谢!)

关键词　准分子激光原位角膜磨镶术; 角膜移位; 角膜移位预防; 护理

中图法分类号　R772.2　　文献标识码　B

参考文献

[1] 于雅范, 皇甫晓瑾, 周慧瑶, 等. LASIK 后角膜瓣脱落临床报告[J]. 中国实用眼科杂志, 1998, 16(2): 111—112.

[2] 王　铮, 陈家祺, 杨　斌, 等. 准分子激光角膜屈光手术后的对比敏感度变化[J]. 中国实用眼科杂志, 1998, 16(8): 478—480.

[3] 杜文东, 陈　力. 医学心理学[M]. 修订版. 重庆: 重庆大学出版社, 1998. 214—215.

(编辑　陈聪连)

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