DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.034

博士生论文摘要

金属蛋白酶(MMP$_2$和 MMP$_9$)对膀胱癌转移的影响及其在预后和转移防治中的作用研究

Effects of MMP$_2$ and MMP$_9$ on the metastasis of transitional cell carcinoma of bladder and their values in the metastatic prognosing and prevention

宋 波* 金锡御 (第三军医大学附属西南医院泌尿外科)重庆,400038

侵袭是肿瘤转移形成的重要环节之一。在侵袭的过程中,肿瘤必须具有水解细胞外基质的能力才能穿过细胞外基质进入新的定植区。MMP$_2$和 MMP$_9$是水解Ⅳ型胶原最重要的酶系统。MMP$_2$和 MMP$_9$的酶解活性不仅与其产生量有关,还与其特异性的抑制物(TiMP$_2$和 TiMP$_1$)及酶的活化物(MT-MMP$_1$)的产生有关。

本研究首先对有随访资料的人膀胱移行细胞癌(TccB)石蜡组织标本行原位杂交和免疫组化研究,结果显示 MMP$_2$和 MMP$_9$表达增加和 TiPM$_1$和 TiMP$_2$表达下降与预后有一定关系,其中 MMP$_2$表达具有较高的预后价值。通过对阳性表达强度及其分布的分析提出与文献报道不一致的推论,即肿瘤细胞上 MMP$_2$和 MMP$_9$表达状况才是决定肿瘤是否具有侵袭转移能力的主要决定因素。

为探索肿瘤细胞水解基底膜能力与 TccB侵袭和转移的关系,本研究以侵袭穿透人工基底膜(Matrigel)能力为依据,用特制的体外模型,从3株膀胱癌细胞系中筛选并建立了3株细胞亚系,这3株子代细胞体外侵袭力均显著高于其母代细胞,其中有2株细胞具有裸鼠体内淋巴转移能力,另一株细胞虽也有较高的体外侵袭力但却不能形成体内转移。研究结果证实水解基底膜能力增加是导致侵袭力增加的原因,而侵袭力增加又与体内转移形成有密切关系。通过对母代和子代细胞体内、外多项生物学行为的分析提出下述推论:在肿瘤细胞系中也存在着侵袭转移能力的异质性;侵袭转移与肿瘤细胞的其它生物学特性如增殖速度等是由不同的因素控制的。

为证实人 TccB标本研究和体外筛选前后瘤细胞侵袭转移变化研究提出的推论,本研究对比分析了子代和母代体外培养细胞、裸鼠肿瘤及转移淋巴结 MMP$_2$、MMP$_9$、MT-MMP$_1$蛋白和 mRNA表达以及 TiMP$_1$和 TiMP$_2$的 mRNA表达。研究结果显示:① 母代和子代体外培养细胞在上述检测指标表达上只有量的差异而无质的差异。子代细胞 MMP$_2$、MMP$_9$及 MT-MMP$_1$和 mRNA表达均为强阳性,而母代细胞为弱阳性,且母代细胞中既有阳性表达的细胞也有阴性表达的细胞。这一结果充分证实了:1)肿瘤细胞系中存在着侵袭转移异质性。2)侵袭转移能否发生取决于是否存在着具有侵袭转移能力的细胞,而侵袭转移能力的大小则取决于具有侵袭转移能力的细胞的数量。3)肿瘤细胞产生细胞外基质降解酶的能力是决定该肿瘤侵袭转移能力的主要因素。② 在具有转移能力的子代细胞裸鼠肿瘤及淋巴结中,瘤细胞 MMP$_2$和 MT-MMP$_1$表达均高于其相应的母代细胞,证实 MMP$_2$是造成膀胱癌侵袭转移的主要原因,具有较高的预后价值。③ MMPs的拮抗剂(BB-94)能显著降低膀胱癌细胞体外侵袭力和体内转移能力,提示拮抗 MMPs治疗在预防 TccB转移中有潜在的运用价值。

关键词 膀胱移行细胞癌;预后;基底膜;Ⅳ型胶原;金属蛋白酶;金属蛋白酶组织抑制物;膜型金属蛋白酶

中图法分类号 R737.14

(收稿:1997-12-10;修回:1998-01-06)

(编辑 王 红)

放射损伤小肠上皮内淋巴细胞的变化及其对肠上皮细胞影响的实验研究**

Effects of ionizing radiation on murine small intestinal intraepithelial lymphocytes and its influence on intestinal epithelial cells

徐 辉*** 程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室 全军复合伤研究所)重庆,400038

肠粘膜屏障是机体抵抗消化道内微生物和抗原入侵的第一道防线,它包括肠上皮细胞组成的机械屏障及肠壁各种淋巴

* 宋 波,男,40岁,主任医师,教授,博士研究生

** 全军"九五"指令性攻关项目

*** 徐 辉,女,33岁,讲师,博士研究生

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

细胞组成的免疫屏障. 机械屏障的完整和免疫屏障功能的正常发挥及两方面作用的相互协调是维持粘膜屏障有效性的基础. 放射及其它各种创伤以及粘膜疾病都会影响屏障功能的正常发挥,导致肠源性感染的发生. 如何维持粘膜免疫功能的正常发挥,并促进肠上皮细胞的修复,成为防治肠源性感染的关键问题. 上皮内淋巴细胞(Intraepithelial lymphocyte, IEL)在粘膜免疫中具有独特的作用,其所在位置是整个免疫系统中与肠腔抗原最接近的免疫细胞,同时 IEL和上及细胞毗邻,与粘膜免疫状态及肠上皮再生修复之间存在密不可分的关系. 近来发现 IEL与肠上皮细胞间存在双向的免疫生理调节. 由此本研究希望通过了解射线对 IEL的结构和功能造成怎样的损伤,进一步研究其对肠上皮细胞的影响,探寻改善粘膜免疫促进损伤肠上皮细胞修复的途径.

实验采用昆明种小鼠,^{60}Co γ射线一次性全身照射 3、8、12 Gy为模型,时相点选择受照后 8、24、48、72 h以及 7和 15 d,采用病理学、免疫学和分子生物学方法,进行了 4个部分的研究:① 全身照射后小肠粘膜上皮细胞及 IEL的数量和病理形态变化特点;② 全身照射后小肠粘膜 IEL功能变化的动态观察;③ 射线对影响上皮生长的相关基因 TNF-α和 TNF-β$_2$ mRNA表达的影响;④ IEL培养上清对小肠上皮细胞株生长的影响. 主要结果和结论如下:① 全身照射使 IEL数量减少,3种剂量均呈现出伤后 8 h下降,48~ 72 h达最低值,7 d回升,至 15 d至正常的变化过程. 各剂量组无显著组间差异,但 8 Gy组较 3 Gy组恢复慢,12 Gy组未待回升动物死亡;② 肠上皮发生符合于骨髓型和轻型肠型放射病的病理变化,电镜观察发现 IEL与肠上皮细胞相互紧贴,有些部位呈"犬牙交错"状,IEL可以"芽突"伸入肠上皮细胞内,这是两种细胞密切关联的超微结构基础;12 Gy照射后 IEL在受损以至坏死的过程中可能损害与之相紧贴的肠上皮细胞(溶解胞膜使胞浆融接);③ 全身照射后 IEL功能受抑,表现为增殖活力和细胞毒力下降,其变化过程和数量减少一致. 正常小鼠分离的 IEL受 1~ 10 Gy离体照射后也发生增殖活力的明显抑制,1 Gy照射后即显著下降,3~ 8 Gy间呈相对低值平台区;④ 全身照射后 IEL分泌 TNF-α和 TGF-β增多,也呈现为 8 h升高,48~ 72 h达高峰,15 d仍未下降至正常值的过程. 以斑点杂交图像分析扫描研究发现,这两种因子在蛋白质 mRNA转录水平上增高,这是 IEL分泌 TNF-α和 TNF-β增多的分子基础. ⑤ 受照小鼠 IEL培养上清能抑制体外培养的正常肠上皮细胞的生长,对受照肠上皮细胞的抑制更为加重,产生抑制作用最强的时间于 3 Gy和 8 Gy组为伤后 72 h,12 Gy组提前为 48 h,这与 IEL功能受抑的最低点时间相吻合.

综上所述,放射损伤引致 IEL数量减少,结构破坏,功能降低,从而造成肠粘膜免疫功能的下降,受损 IEL并能抑制肠上皮细胞的生长,从而共同导致肠道屏障功能的削弱. TNF-α和 TGF-β基因可能参与其中. 可见深入研究粘膜免疫和上皮再生修复的关系,将有助于揭示粘膜免疫对肠上皮细胞的免疫生理调节,对多种肠道损伤(放射、放射复合伤、腹部放疗等)疾病状态下促进肠上皮细胞修复,防治肠源性感染,均具有重要的理论和实践意义.

关键词 放射损伤;肠上皮细胞;肠源性感染;粘膜免疫;细胞因子;上皮内淋巴细胞;细胞增殖;细胞毒力;基因表达;IEC-6;TNF-α;TGF-β

中图法分类号 R818.02

(收稿: 1997-12-05;修回: 1997-12-15)

(编辑 冷怀明)

癌细胞 mtDNA一级结构及 mtDNA片段核内自发整合效应的研究*

Studies of the primary structure of mitochondrial DNA from carcinoma cells and the effects of mitochondrial DNA fragments auto-integrated into nuclear genome

胡义德** 钱桂生 陈维中 李淑平 王关嵩 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,400037

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)缺乏组蛋白保护,其损伤修复系统也不完善,因此,它是各种致癌物作用的特异性靶分子. 关于癌细胞 mtDNA形态、数量及功能变化的研究已有报道. 但至今还没有发现 mtDNA与细胞癌变直接相关的有力证据. 为了进一步了解 mtDNA损伤与突变在细胞癌变中的地位和作用机制,本实验采用限制片段长度多态性(RFLP)分析、聚合酶链反应-RFLP(PCR-RFLP)分析及 PCR产物直接序列分析方法,对癌细胞 mtDNA一级结构的变化规律进行了探讨;同时,采用荧光原位杂交(FISH)和基因转染方法,探讨了 mtDNA片段转染后诱发小鼠胚胎纤维母细胞 NIH3T3(NIH3T3)恶性转化的效应和作用机制. 研究结果如下:

(1)建立了简便、快速制备各种单细胞及组织 mtDNA的方法(称为一步法). 用该方法所得 mtDNA样品的限制酶切图谱与人 mtDNA剑桥序列各相应酶切图谱相一致,而且 mtDNA的产量高,无核 DNA污染,可以满足酶切、PCR测序及转染等工作的需要.

(2)用 HindⅢ、EcoRⅠ、XhoⅠ、BstEⅡ、PvuⅡ、BclⅠ、Pst

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39500173

** 胡义德,男,32岁,主治医师,讲师,博士研究生

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