DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.01.038

论文摘要

维甲酸诱导的促分化基因对人食管癌细胞生长的调节作用

范 黎 朱锡华 吴 旻* (第三军医大学基础部免疫学教研室) 630038

抑癌基因是当前肿瘤分子生物学研究的热点。主要从两方面入手:(1)分离鉴定新的抑癌基因;(2)将分离所得的抑癌基因通过转基因技术引入癌细胞乃至体内以达到用基因治疗手段治疗癌症的目的。本文应用经维甲酸(RA)处理食管癌细胞 EC8712 前后的 cDNA 文库并经递减杂交筛选出来的一种促分化基因(抑癌基因),通过显微注射的方法注入母本 EC8712 细胞,从基因水平、分化标志及恶性程度等方面研究该基因对食管癌细胞生长可能的逆转作用。同时进行了磷酸钙-DNA 共沉淀及电转移两种转基因技术,比较它们与显微注射法在转基因效率方面的差别,并对用磷酸钙-DNA 共沉淀法转移的细胞进行了 RA538 基因瞬时表达的检测。

通过显微注射将 RA538 直接注入 EC8712 细胞后可见癌细胞生长明显受抑,增殖速率减慢。注射后 24 h 单纯注射 TE 缓冲液组及 RA538 组的细胞数均明显减少,尔后细胞数逐渐回升,但两组间细胞数差别也逐渐增加,观察至 15 d 时,可相差 6 倍左右。注射不同浓度的 RA538 对细胞数影响不大,呈现出浓度非依赖性的抑制现象。RA538 注射后可见到细胞形态的变化,主要表现为细胞变大变平,折光性差,分裂相细胞减少,胞质内颗粒增多,易脱落等。注射 RA538 的 EC8712 细胞在软琼脂上的生长能力降低,对裸鼠的致瘤性明显受抑。

利用间接免疫荧光技术检测 Involucrin(被膜素)阳性细胞的数量及染色强度,发现注射组的被膜素阳性细胞数及强度都大于未行注射的阴性对照组,尤其在注射后 3～5 d 较明显,但均不能达到阳性对照组水平。两注射组间在注射后 3～7 d 也有差别,RA538 组于第 3、5、7 及 10 d 荧光染色的阳性细胞数较 TE 注射组明显增多,尔后(观察至第 15d)则与 TE 注射组差别不大。应用微量的逆转录及聚合酶链式反应(RT-PCR)技术及地高辛标记探针进行点杂交检测被膜素的表达水平,也显示注射 RA538 组较 TE 注射组的被膜素表达增强。

显微注射、磷酸钙-DNA 共沉淀及电转移这三种转基因技术中以显微注射的转染效率最高,但对细胞的损伤也最大,在转染效率方面各有其长处及局限性,可用于不同的实验设计,并需探索改进以提高效率。利用磷酸钙-DNA 共沉淀法表明在转染后第 2 天及第 3 天 RA538 的表达量最强。

抑癌基因的分离鉴定需要大量的工作,其用于癌症的基因治疗的尝试更面临许多难题。在基因转移后对癌细胞是否逆转的检测,尤其是癌细胞及相应分化细胞特有的标志物的寻找十分重要。本文选择鳞状上皮细胞终末分化时才大量产生的标志物之一的被膜素作为判断食管癌细胞是否发生逆转的一个指标,利用间接免疫荧光染色和微量 RT-PCR 技术检测了被膜素在少量细胞内的表达水平。

显微注射法是一种有用的转基因技术,其观察较直接准确,转染效率较高,但每次所能注射的细胞有限,细胞所受的机械性损伤较大。因此进行某些改进对于提高注射速度、保证注射质量十分必要,而注射后的观察与分析对于判断基因转移后细胞所受到的影响极为重要。本文在这方面也进行了一些探索和改进,并证实 RA538 可一定程度上抑制癌细胞的恶性增殖、促进细胞分化,为食管癌基因治疗的研究提供了一组较为可靠的数据。

关键词 显微注射;促分化基因;食管癌细胞;被膜素;微量逆转录及聚合酶链式反应

* 中国医学科学院肿瘤研究所

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