

文章编号:1004 - 616X(2002)04 - 0229 - 02

论著 ·

抗肿瘤药物体外诱导新鲜癌组织及其外周血淋巴细胞 *mdr-1* 基因表达的相关性研究

何琳¹, 张巧², 胡杰英¹

(1. 河南省肿瘤研究所分子生物学研究室 河南 郑州 450003; 2. 郑州大学公共卫生学院 河南 郑州 450052)

【摘要】目的: 通过对恶性肿瘤患者的癌组织细胞及其外周血淋巴细胞进行抗肿瘤药物的体外诱导, 用 RT-PCR 法检测其 *mdr-1* 基因表达状况, 从而找出两者之间的相关性, 从基因水平解决非手术癌患者化疗用药个体化。方法: 在采集手术标本的同时抽取该患者外周血, 用 8 种抗肿瘤药物进行体外诱导, RT-PCR 法检测 32 例恶性肿瘤患者癌组织细胞及其外周血淋巴细胞的 *mdr-1* 基因表达状况。利用 SAS 软件计算两者之间的相关关系。结果: 32 例恶性肿瘤患者的新鲜癌组织细胞与其外周血淋巴细胞的抗肿瘤药物体外诱导 *mdr-1* 基因表达呈正相关关系。结论: 对于失去手术机会或病灶很小不能取材的患者可以用外周血淋巴细胞替代癌细胞做 RT-PCR 体外药敏检测。这将从基因水平为肿瘤患者个体化用药提供一个新途径。

【关键词】 肿瘤细胞; 淋巴细胞; RT-PCR; *mdr-1*

中图分类号: R737-36 文献标识码: A

STUDY ON THE RELATIVITY OF *mdr-1* EXPRESSION INDUCED BY DRUG BETWEEN FRESH TUMOUR CELLS AND THE PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN VITRO

HE Lin¹, ZHANG Qiao², HU Jie-ying¹

(1. Department of Molecular Biology, Henan Tumour Institute, Zhengzhou 450003, China; 2. School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

【Abstract】 **Purpose:** To investigate the relativity of *mdr-1* expression between the fresh tumour cells and the peripheral lymphocytes of 32 patients with malignant tumours. **Methods:** Using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, *mdr-1* expression induced by 8 anti-cancer drugs in the fresh tumour cells and the peripheral lymphocytes of 32 patients with malignant tumours was detected. **Results:** There was a positive relativity of *mdr-1* expression between the fresh tumour cells and the lymphocytes. **Conclusion:** The lymphocytes of peripheral blood can replace tumour cells in selecting sensitive drugs with RT-PCR assay *in vitro*. It can provide a new way of using drug individually for patients with malignant tumours.

【Key words】 tumour cell; lymphocyte; RT-PCR; *mdr-1*

虽然多药耐药现象是肿瘤化疗失败的重要原因之一, 但目前恶性肿瘤的化学药物治疗仍在以手术为主的综合治疗中占有重要地位。为此, 国内外专家做出了很多努力, 现多采用 RT-PCR 方法检测多药耐药。它是从基因水平通过检测 *mdr-1* 基因的表达状

况判断病人预后, 以及通过药敏检测为临床个体化疗提供帮助。此方法较难推广的原因是它需用手术标本检测, 而失去手术机会的晚期癌症患者, 病灶很小取材困难的患者, 无原发灶标本的术后化疗患者等, 则只能凭借临床医师的经验及主观意向用药。本研

收稿日期: 2002-03-14; 修订日期: 2002-05-21

基金项目: 河南省科技攻关项目资助课题 (9712003000-4)

作者简介: 何琳 (1967-), 女, 山东菏泽人, 学士, 助理研究员, 主要从事细胞分子生物学方面的研究。

究旨在探讨一种较易获得的替代标本,对癌症患者进行药敏检测。由于 *mdr-1* 基因在许多肿瘤外组织如外周血淋巴细胞中也有表达,我们用 8 种抗肿瘤药物以体外诱导方式,对 32 例不同癌种的新鲜癌组织及其相应外周血淋巴细胞同时用 RT-PCR 法进行了 *mdr-1* 基因表达的检测,探讨了二者之间的相关性。

1 材料与方 法

1.1 癌组织标本及外周血淋巴细胞 采用同一手术患者的癌组织和外周血。32 例患者均经病理证实为恶性肿瘤患者。其中胃癌 3 例,贲门癌 5 例,直肠癌 9 例,肺癌 12 例,卵巢癌 2 例,胆囊癌 1 例。

1.2 抗癌药物 顺铂(进口 DDP)、氟脲嘧啶脱氧核苷(Fu-R)、表阿霉素(EADM)、长春瑞宾(NVB)、异环磷酰胺(IFO)、足叶乙甙(VP-16)、艾得新(VPS)、紫杉醇(TESU)。各抗癌药物皆用灭菌生理盐水配制,-20 保存。药物试验剂量均按公式计算¹。

$$\text{剂量}(\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{\text{药重}(\text{mg}) \times \text{平均体表面积}}{\text{平均体重}} \times \frac{100}{60}$$

1.3 主要试剂 Gibco 血清为美国 Gibco 公司产品,RPMI1640 为日本株式会社产品,Taq 酶、M-MLV 酶购自上海 promaga 生物工程公司,淋巴细胞分离液购自天津血研所,盐酸胍、*mdr-1* 引物、2-MG 引物购自宝生物工程大连有限公司。引物序列:*mdr-1* 引物:5'GTA CCC ATC ATT GCA ATA GC 3';5'CAA ACT TCT GCT CCT GAG TC3'。2-MG 引物:5'CCA CTG AAA AAG ATG AGT AT3';5'CTT CAA CCT CCA TGA TGC TG3'。

1.4 方 法

1.4.1 新鲜标本的处理 首先在无菌室超净工作台上用淋巴细胞分离液从新鲜外周血分离淋巴细胞:1 500 r/min 离心 20 min 后吸取中间灰白层,再次离心(1 500 r/min 10 min)后收集淋巴细胞,用含 15% Gibco 血清的 RPMI1640 培养液调至细胞浓度为 10⁶/ml,用 1.5 ml 离心管分装,每管 200 μl(含淋巴细胞约 2 × 10⁵ 个)备用。再将新鲜癌组织用机械法剪碎分装于 1.5 ml 离心管中,每管约 3 mg,加含 15% Gibco 血清的 RPMI1640 200 μl 备用。

1.4.2 药物诱导 将以上两种标本各分成 8 组,每组 2 管,分别为癌组织细胞和外周血淋巴细胞,依次加入 8 种抗癌药物,混匀后置 37 5% CO₂ 培养箱孵育 1 h。

1.4.3 RT-PCR 按参考文献 2 并加以修改。

总 RNA 的提取 标本从培养箱中取出后立即放 4 MR-1822 离心机 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清后,向每个样品管中加入 100 μl 裂解液,充分振荡、溶解;再加 20 μl 氯仿充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min;小心吸取上层水相加 3 倍体积无水乙醇,-20 放置 20 min,取出后 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,室温晾干,约 20 min 即可得标本的总 RNA。

RNA-cDNA 反转录 向处理好的样品管中加水 5 μl,RT 液 10 μl,M-MLV 酶 1 μl,20 μl 石蜡油,离心约 20 s,置 42 水浴 30 min。PCR 扩增 取 0.5 ml 离心管 1 支,加入 20 μl PCRmix(含 dNTP、MgCL₂ 和引物),5 μl 反转录产物,Taq 酶 1 μl 混匀后加 20 μl 石蜡油,离心约 20 s,循环参数:94 预变性 60 s,94 50 s,61 50 s,共 40 个循环。

1.4.4 电泳鉴定 采用含 EB 的 2% Agarose 凝胶电泳,恒压 5 V/cm 40 min,在 GDS800 凝胶成像系统中定量分析。阳性结果为两条带,*mdr-1* 为 167 bp、2-MG 为 114 bp,以两条带之积分光密度比值反映 *mdr-1* 基因的相对表达,其标准为:*mdr-1*/2-MG < 0.2 时为阴性表达,0.2 *mdr-1*/2-MG < 0.6 时为低阳性表达,*mdr-1*/2-MG 0.6 时为高阳性表达³。

1.4.5 统计学处理 采用 SAS 软件处理。

2 结 果

经 8 种抗肿瘤药物体外诱导,32 例肿瘤患者的癌组织细胞和外周血淋巴细胞的 *mdr-1* 基因表达有正相关关系(表 1)。

表 1. 不同细胞 *mdr-1* 基因体外诱导表达结果

Table 1. Results of *mdr-1* expression induced in different cells in vitro

inducing drugs	strongly positive		weakly positive		negative	
	T	L	T	L	T	L
EADM	9	8	9	8	4	6
DDP	2	2	3	3	27	27
Fu-R	10	9	14	12	8	11
VP-16	9	9	3	3	20	20
NVB	11	11	1	0	20	21
TESU	0	0	5	4	27	28
IFO	2	1	10	10	20	21
VDS	3	3	6	6	13	13
	<i>r</i> = 0.993		<i>r</i> = 0.995		<i>r</i> = 0.994	

note: T: Tumor cells, L: Peripheral Lymphocytes, P < 0.01

3 讨 论

化疗药物的多药耐药现象多表达于癌组织细胞

文章编号:1004-616X(2002)04-0231-03

论著·

蛇床子素对肺腺癌、肺鳞癌生长抑制作用的实验研究

周俊,程维兴,许永华,张东辉,王冬梅

(兰州军区乌鲁木齐总医院,新疆乌鲁木齐 830000)

【摘要】目的:观察蛇床子素对人肺鳞癌和肺腺癌的抑制作用。方法:建立 BALB/C 裸鼠的人肺腺癌和肺鳞癌模型,给予蛇床子素,剂量为 1.5 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$,观察瘤体的大小、重量和动物血清中肺癌标志物 DR-70 的水平,以此评价蛇床子素的抑癌作用。结果:蛇床子素对肺鳞癌的抑癌率为 69.5%,对肺腺癌的抑癌率为 50.0%,对 DR-70 也有显著降低作用。结论:蛇床子素对肺鳞癌和肺腺癌的瘤体生长有一定的抑制作用,尤其是肺鳞癌。

【关键词】蛇床子素;肺癌;裸鼠

中图分类号:R979.13 文献标识码:A

INHIBITION OF OSTHOL ON ADENOCARCINOMA AND SQUAMACARCINOMA OF LUNG

ZHOU Jun, CHENG We i-xing, XU Yong-hua, *et al*

(Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 Purpose: To observed the inhibition effect of osthol on human lung adenocarcinoma and squamacarcinoma. **Methods:** Set up models of human lung adenocarcinoma and squamacarcinoma on the bodies of BALB/C, one kind of nude mice, then osthol was given to the mice in the dose of 1.5 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$. Antitumor effect of osthol were valued by weighing the tumor and deterring DR-70, the mark of lung cancer in BALB/C serum.

中,但某些肿瘤外组织如肺、外周血淋巴细胞、肌肉、肾、脑、肝脏等组织中均发现有 *mdr-1* 基因的表达⁴。用 RT-PCR 方法检测 *mdr-1* 基因表达国内外已有大量研究,然而正常组织如外周血淋巴细胞中 *mdr-1* 基因与癌组织细胞中的表达是否有相关性,则未见报道。由于此方法常规需采用癌组织标本检测,有很大一部分晚期癌症患者首诊时已失去手术机会不能提供癌组织标本,因此只能凭经验判定化疗方法。由此可见,寻找一种较易获得的替代标本是非常必要的。外周血淋巴细胞易于获取,从理论上讲外周血淋巴细胞替代癌组织细胞进行此项检测是可行的。我们的研究结果表明,同一抗肿瘤药物体外诱导癌组织细胞和相应外周血淋巴细胞的 *mdr-1* 基因表达存在高度的正相关关系。由此可见,外周血淋巴细胞可以替代

癌组织细胞进行此项检测。本研究为临床肿瘤患者个体化用药提供了又一个新的途径。

参考文献:

- 1 司徒贞,吴军正.细胞培养 M. 第二版.西安:兴界图书出版公司,1999.134~135.
- 2 殷丽明,陈克能,李殿发,等.常见恶性肿瘤新鲜组织中原发性多药耐药基因表达的初步研究 J. 中华肿瘤杂志,1997,19(6):420~422.
- 3 刘晓晴,宋三泰,石成华,等. RT-PCR 方法检测乳癌组织 *mdr-1* 基因表达标准的建立 J. 中华肿瘤杂志,1997,19(1):38~41.
- 4 Zaman GR, Versantvoort CHM, Smit JJM, *et al.*. Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines J. *Cancer Res*, 1993, 53(8):1747~1750.

收稿日期:2002-01-24; 修订日期:2002-06-10

作者简介:周俊(1967-),女,四川省人,主治医师,硕士,研究方向:肿瘤与免疫。