

者因脂肪较少而出现假阳性征像. 本组多数病例未做增强扫描也是导致分期不准的原因之一. 因此, CT判断分期及胃癌淋巴结转移仍存在一定的限度, 尤其对病变表浅、CT诊断病变尚属早期但已发生小淋巴结转移、以及具有潜在转移特性的胃癌, CT尚难准确判断其分期而可能导致治疗方法选择不恰当.

总之, CT扫描可作为胃癌术前诊断及分期的一种有效的检查手段; 分析胃癌组织中 CD44V6 及 PCNA 表达情况并结合其影像表现及常规病理检测结果, 有助于从分子生物学角度解释不同的影像学表现, 同时可补充CT诊断的局限性, 对癌组织浸润、淋巴结转移及预后判断提供更为客观的多参数评价指标, 为胃癌的准确术前分期、早期诊断、肿瘤转移的预测提供新的思路和理论依据.

4 参考文献

- 1 李松年, 唐光健. 《现代全身CT诊断学》. 北京: 中国医药科技出版社, 2001:986
- 2 Kelman Z. PCNA:structure,functions and interactions. *Oncogene* 1997;14:629-640
- 3 Lee KE, Lee HJ, Kim YH, Yu HJ, Yang HK, Kim WH, Cancer Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic significance of p53, nm23,PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:173-179
- 4 Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH, Karpuzoglu T, Keles N. Microvessel count,proliferating cell nuclear antigen and Kiindices in gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 2000;6:59-64
- 5 Tao K, Chen D, Tian Y, Lu X, Wang X. The relationship between apoptosis and the expression of proliferating cell nuclear antigen and the clinical stages in gastric carcinoma. *J Tongji Med Univ* 2000;20:222-224
- 6 Xin Y, Grace A, Gallagher NM, Curran BT, Leader MB, Kay EW. CD44V6 in gastric carcinoma:a marker of tumor progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:138-142
- 7 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin,beta-catenin, CD44s and in gastric adenocarcinoma:relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003;23:1581-1588
- 8 Li Y, Zhang JH, Kuang G, Yang JQ, Zhao Q, Wang XL, Jiao ZK, Zhang ZD, Wang LL. Expression of MUC1, CD44v6, nm23 in gastric carcinomas and regional lymph node tissues and their association with invasion, metastasis, and prognosis of the tumor. *Ai Zheng* 2003;22:985-989
- 9 Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, Ma JP. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004;10:776-782
- 10 毛伟征, 李玉军, 杨金镛, 纪祥瑞, 吴力群, 徐惠绵, 陈峻青. CD44V6表达与胃癌生物学行为相关性研究. *中国肿瘤临床与康复* 2001;8:3-4
- 11 Perez-Oso E, Arilla E. Effect of prenatal dopamine receptor blocking on somatostatin receptor binding in the developing rat brain. *Brain Res Bull* 1993;31:165-169
- 12 Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, Nakane Y, Hioki K. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:256-262
- 13 Nakashiot T, Narita T, Sato M, Akiyama S, Kasai Y, Fujiwara M, Ito K, Takagi H, Kannagi R. The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer. *Anticancer Res* 1997;17:293-299
- 14 Paramo JC, Gomez G. Dynamic CT in the preoperative evaluation of patients with gastric cancer:correlation with surgical findings and pathology(J). *Ann Surg Oncol* 1999;6:379-384
- 15 Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996;23:307-315
- 16 D'Elia F, Zingarelli A, Palli D, Grani M. Hydro-dynamic CT preoperative staging of gastric cancer:correlation with pathological findings.A prospective study of 107 cases. *Eur Radiol* 2000;10:1877-1885
- 17 Cereceda Perez CN, Urbasos Pascual MI, Romero Castellanos C, Carreira Gomez C, Pinto Varela JM. Helical CT of the stomach:differentiation between benign and malignant pathologies, together with the staging of gastric carcinoma. *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94:601-612
- 18 Mani NB, Suri S, Gupta S, Wig JD. Two-phase dynamic contrast enhanced computed tomography with water filling method for staging of gastric carcinoma. *Clin Imaging* 2001;25:38-43

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

大鼠骨髓间充质干细胞原代培养换液频度与细胞增生的关系

张刚庆, 方驰华, 池达智

张刚庆, 方驰华, 池达智, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普外科 广东省广州市 510282

广东省自然科学基金资助课题, No.2001, 010593

项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普外科. zhangggq@hotmail.com

电话: 020-61643211 传真: 020-61643020

收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-21

摘要

目的: 探索成体大鼠的骨髓间充质干细胞 (MSCs) 的分离、体外培养方法, 观察采用不同的换液频度与细胞增生和生

长的关系, 为其应用提供实验依据.

方法: 从大鼠股骨获取骨髓, 采用梯度离心的方法进行分离, 在含 10 mL/L 胎牛血清的 DMEM 中常规培养, 以 MTT 法检测不同的时间换液时细胞的生长曲线, 并用碱性磷酸酶 (AKP) 检测的方法对分离的细胞进行鉴定.

结果: 采用梯度离心方法分离的骨髓间质干细胞的纯度较高, 细胞活性佳, AKP 染色为强阴性. 首次换液后, 每天

更换培养液比每隔3-4 d换液一次更有利于MSCs的增生, 原代长满培养瓶底比每隔 2-3 d换液一次平均提前2 d.

结论:采用梯度离心的方法分离可获得纯度较高的骨髓间质干细胞, 是简单易行的分离方法, 每天更换培养液比每隔 3-4 d换液一次更有利于MSCs的增生和形成形态均一的细胞集落.

张刚庆, 方驰华, 池达智. 大鼠骨髓间充质干细胞原代培养换液频度与细胞增生的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1953-1955
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1953.asp>

0 引言

骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在特定的条件下可以分化为多种组织和细胞^[1-5], 并且外源基因易于导入和表达, 是潜在的基因治疗和干细胞研究的靶细胞. 本研究采用了梯度离心的方法分离间质干细胞, 并观察不同的更换培养液的频度与细胞增生、生长的关系, 以探索成体大鼠的骨髓 MSCs 在体外分离、培养和增生较为简便、有效和实用的方法, 为其应用提供基础实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 培养板、培养瓶(Sigma 公司), SD 大鼠(第一军医大学实验动物中心提供). 高糖 DMEM、胎牛血清(Gibco.BRL公司). Percoll 分离液(Pharmacia 公司).

1.2 方法

1.2.1 实验分组 根据更换细胞培养液时间的不同分为三组: A组: 接种后每 24 h 更换培养液; B组: 接种后每 48 h 更换培养液; C组: 接种后每 72 h 更换培养液.

1.2.2 MSCs 的分离 用比重为 1.073 g/mL 的 percoll, 采用梯度离心的方法获取有核细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 分别接种于 24 孔、96 孔培养板和 25 mL 培养瓶, 每孔或每瓶的细胞数和培养液量相同, 在相同培养条件下进行培养, 按实验设计分组的时间和方方法更换培养液.

1.2.3 生长曲线绘制 自培养 24 h 开始, 每天随机分别取各组细胞 4 孔, 以 MTT 比色法测定生长曲线^[6].

统计学处理 SPSS 软件, 采用方差分析.

2 结果

2.1 MSCs 的形态学观察 倒置显微镜下观察, 采用 Percoll 梯度分离液分离成体大鼠的骨髓, 所获得的细胞绝大部分为球形的 MSCs, 其他细胞少见, 各组细胞进行 AKP 染色, 均呈阴性. 接种后 24 h 内, 单个核细胞贴壁. 48 h 可见部分已贴壁的细胞开始分裂增生, 细胞形态多样: 三角形、梭形、圆形等(图 1). 5-7 d, 贴壁细胞体积增大, 可见多核的成纤维样细胞, 细胞有长杆状、三角形、多边形细胞等(图 2). 在细胞生长增生过程中, A 组细胞增生明显, 生长状态均最好, B 组

次之、C 组细胞增生较慢, 细胞生长状态也较差. 培养第 10-12 d, 细胞开始形成形态较为均一的细胞增生集落, 呈梭形或多角形, A 组细胞生长增生减慢, B、C 组细胞增生相对加快.

2.2 生长曲线 更换培养液的频度不同, 细胞的增生过程和形态变化时间不同, A 组的细胞生长增生较快, 平均比 B、C 组达到的同样细胞数提前 2-3 d. 统计学检验, A 组与 B、C 组之间差异显著 ($P < 0.05$), B 组与 C 组之间的差异不显著 ($P > 0.05$)(3 图). 每日更换培养液的细胞生长状态好于每 3 d 更换培养液的细胞的生长状态.



图 1 梯度离心分离培养 48 h 的 MSCs 细胞(x 40).



图 2 梯度离心分离培养 6 d 的 MSCs 细胞(x 40).

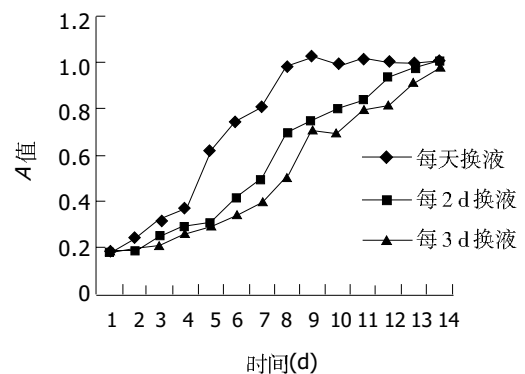


图 3 不同的更换细胞液的频度与细胞的生长增生关系曲线.

3 讨论

骨髓间充质干细胞具有极强的自我复制能力和多向分化潜能, 具有独特的细胞增生分裂模式, 使外源基因易于导入和表达, 而使其成为潜在的基因治疗靶细胞^[2], 是细胞治疗的基础. 但困扰 MSCs 广泛应用的主要原因

是, 较高纯度的 MSCs 的获取方法、培养增生方法和增生时间. 目前对于骨髓中的 MSCs 的分离纯化的方法主要有: 贴附细胞分离法、流式细胞分离、免疫磁珠分离、梯度离心分离^[7-8]. 每种方法各有优缺点: 贴附细胞分离法, 简单, 易操作, 但所得细胞的成分复杂, 骨髓 MSC 的纯度有限; 流式细胞仪、免疫磁珠分离, 获得的 MSCs 纯度较高, 但操作繁杂, 需要昂贵的仪器和试剂, 成本较高, 并且对细胞的活性影响较大; 梯度离心分离, 操作方法简单, 实验结果证明可取得较高纯度的 MSCs. 目前对于骨髓间质干细胞的检测鉴定尚无特定的方法和特异性指标, 应用较多的是采用 AKP 染色法^[9]. 本实验各组培养所得的细胞, 经 AKP 染色, 均呈阴性, 但各组之间尚存在一定差异, 特别是经过加大培养过程中的更换培养液的频度, 每天更换培养液, 可使获得的 MSCs 的纯度进一步得到提高.

本实验采用 Percoll 梯度分离液行离心分离的方法, 成体大鼠的骨髓 MSCs 分离后, 经体外培养能大量增生, 并形成细胞形态较为均一的细胞增生集落. 骨髓 MSCs 的培养生长曲线显示, MSCs 在体外培养条件下生长与其他细胞一样经历了生长缓滞期、对数增生期和生长平稳期. 从生长曲线可以看出, 当细胞增生到一定程度, 当细胞长满培养器皿的整个底部时, 细胞的增生放慢, 可能是细胞间的接触、生长空间缺乏所致. 不同的更换培养液的频度对细胞的生长增生有不同的影响, 每天更换培养液, 细胞增生较快, 生长良好, 比目前国内外所报道的隔日或每 3 d 更换培养液早 2-3 d

达到细胞形态、大小均一和长满瓶底. 其可能原因是, 每日更换培养液, 可尽早清除非贴壁细胞和生长较差贴壁不牢固的细胞, 消除其对贴壁的基质干细胞生长增生的影响; 每日更换培养液, 可清除培养液中的不利于基质干细胞生长增生的某些物质, 其进一步机制和原因有待于深入研究.

4 参考文献

- 1 龚加庆, 方驰华. 成人肝脏干细胞研究现状及展望. 中华外科杂志 2002;40:385-387
- 2 Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-98
- 3 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344-10349
- 4 Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-192
- 5 马俊勋, 方驰华. 卵圆细胞及其与原发肝癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:448-451
- 6 张刚庆, 卿三华, 齐德林. 热疗联合丝裂霉素对大肠癌细胞的影响. 中国胃肠外科杂志 1998;1:85-87
- 7 傅文玉, 路艳蒙, 朴英杰. 人骨髓间充质干细胞的培养及多能性研究. 中华血液学杂志 2002;23:202-204
- 8 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49
- 9 Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406:257

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

国人 P53 基因 CD72 Arg/Pro 多态性与贲门腺癌发病相关

李湘洲, 管立学, 高丽, 胡德宏, 王敬先, 王瑞丽, 杜欣莹, 李海波

李湘洲, 潍坊医学院附属潍坊市人民医院病理科 山东潍坊市 261041
管立学, 王敬先, 王瑞丽, 杜欣莹, 李海波, 潍坊医学院附属潍坊市人民医院医学遗传科 山东潍坊市 261041
胡德宏, 潍坊医学院附属潍坊市人民医院胸外科 山东潍坊市 261041
高丽, 潍坊医学院附属潍坊市人民医院肿瘤内科 山东潍坊市 261041
项目负责人: 李湘洲, 261041, 山东省潍坊市, 潍坊医学院附属潍坊市人民医院病理科.
电话: 0536-8192314
收稿日期: 2004-04-22 接受日期: 2004-05-13

方法: 应用 PCR-RFLP 法对 67 例贲门腺癌患者和 138 名正常对照组人群 P53 基因 CD72 Arg/Pro 多态性进行检测.

结果: 病例组 P53 基因 Pro 等位基因频率 (0.672) 和 Pro/Pro 基因型频率 (47.8%) 都显著高于正常对照组 (0.413 和 13.0%, $\chi^2=24.1$, $P<0.01$ 和 $\chi^2=29.48$, $P<0.01$); 携带 Pro/Pro 基因型者患贲门腺癌的风险比携带 Arg/Arg 基因型者显著升高, P 为 8.30, 95%CI: 3.49-19.77 ($\chi^2=22.49$, $P<0.01$).

结论: P53 基因 Pro/Pro 基因型是贲门腺癌的遗传易患因素.

摘要

目的: 探讨 P53 基因 CD72 Arg/Pro 多态性与潍坊地区汉族人贲门腺癌发病的关系.