

原癌基因 c-erbB-2 在胆管癌细胞中的表达

郑 军¹, 朱耀明¹, 邹声泉², 吴高松²

关键词:胆管肿瘤;c-erbB-2;基因表达

中图分类号:R735.8 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)06-0462-02

0 引言

在人类肿瘤细胞中,c-erbB-2 蛋白的表达水平可达正常细胞的 100 倍之多,特别是在乳腺癌、卵巢癌以及胃腺癌等细胞中 c-erbB-2 原癌基因的表达水平升高更为显著^[1-2]。应用免疫细胞化学 SABC 法检测人胆管癌细胞、原代培养人胆管癌细胞中 c-erbB-2 蛋白的表达,目前国内尚无报告。为此我们做了相关实验,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 胆管癌细胞系 QBC939 由第三军医大学西南医院王曙光教授建系;人胆管癌细胞系 SK-Char-1 由德国法兰克福 Knuth 教授建系;人胆管癌组织取自宜昌市中心人民医院和同济医院外科手术患者,均经病理学证实;人正常胆管组织取自胆道外伤及器官移植供体。

1.2 免疫细胞化学

1.2.1 细胞培养与固定 人胆管癌细胞系 QBC939 和 SK-Char-1 的培养液均为 RPMI1640 培养基,在 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养。待细胞生长至 70%~80%时,用 2.5 g/L EDTA 消化,制成单细胞悬液,接种在载玻片上,置孵育箱中培养,待细胞贴壁后取出,用 PBS 清洗 2 次,4℃ 冷丙酮固定 10 min 取出自然干燥,-20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 免疫细胞化学 SABC 染色 (1) 飞片 PBS 清洗 3 次后滴加正常山羊血清室温封闭 20 min;(2) 加抗原修复液,室温 10 min,PBS 振洗 5 min ×3 次;(3) 滴加一抗(工作浓度 1:40),4℃ 湿盒过夜;(4) 滴加二抗 37℃,10 min,PBS 振洗 5 min ×3 次。(5) 加 SABC 20 min,PBS 充分振洗;(6) DAB 显色:按比例配制 DAB 显色液,显微镜下控制时间,流水冲洗终止反应;(7) 苏木素复染,脱水,透明,

封片。

每次实验均设阴性和阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照,用已知阳性白片人结肠癌作阳性对照。

1.2.3 原代培养:(1) 人胆管癌或正常胆管组织标本取出后,立即用 4℃ 含青链霉素的 D-Hanks (pH 7.2) 液漂洗 2 次,在显微镜下用眼科剪剪成 1mm × 1mm × 1mm 小块;(2) 按 1:1 比例加入胰蛋白酶(0.25%)和 Ⅱ型胶原酶(0.125%),置 37℃ 下消化,显微镜下控制消化时间;(3) 在细胞游出高峰期加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化;(4) 将收集到的含消化酶的细胞悬液离心,800 r/min × 10 min;(5) 取沉淀,加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基吹打沉淀 10 ml,离心,800 r/min × 5 min;(6) 弃上清,加入含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,调节细胞密度至 5 × 10⁴ 个/ml;(7) 接种到 6 孔培养板上,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养;(8) 培养 3~5 d 后,待细胞贴壁,更换培养基,继续培养 3 d 收集细胞。

2 结果

c-erbB-2 主要为胞浆、胞膜着色,表现为棕黄色颗粒。c-erbB-2 在 QBC-939 细胞和 SK-Char-1 细胞中表达均为阳性;21 例原代培养人胆管癌细胞中有 18 例(86%)表达阳性,3 例表达阴性,6 例原代培养人正常胆管细胞中 c-erbB-2 蛋白的表达均为阴性。

3 讨论

原癌基因 c-erbB-2 又称为 neu 基因或 HER-2 基因,是人类肿瘤中发生改变频率最高的癌基因之一,定位在 17q21 染色体上,编码一种相对分子量为 185 KD 的跨膜糖蛋白,称 P185^[3]。该基因是受体类基因,与表皮生长因子受体(EGFR)有高度同源性,功能与 EGFR 相似,具有酪氨酸激酶的活性,起调节上皮细胞生长分化的信号转换通道作用。c-erbB-2 扩增后 P185 过表达,产生大量的生长因子受体,可以激活信使系统将外界信号传递到细胞内

收稿日期:2006-05-15;修回日期:2006-07-25

作者单位:1. 443003 湖北宜昌,三峡大学第一临床医学院 湖北省宜昌市中心人民医院普外科;2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科

作者简介:郑军(1965-),男,硕士,副教授,主要从事肝胆外科研究

部,促进细胞的有丝分裂,导致细胞增殖失控,其过表达与多种肿瘤的预后相关^[4]。

本研究结果显示 c-erbB-2 在 QBC-939 细胞和 SK-Cha-1 细胞中表达均为阳性;21 例原代培养人胆管癌细胞中有 18 例(86%)表达阳性,3 例表达阴性,6 例原代培养人正常胆管细胞中 c-erbB-2 蛋白的表达均为阴性。提示 c-erbB-2 在肝外胆管癌细胞中高表达,与肝外胆管癌的发生、发展有关,为胆管癌的防治提供了新的靶位。

参考文献:

- [1] Guastalla JP, Bachelot T, Ray-Coquard I, et al. Cyclooxygenase 2 and breast cancer. From biological concepts to clinical trials[J]. Bull Cancer, 2004, 91 (Suppl 2): S99-108.
- [2] Grunt TW, Puckmair K, Tomek K, et al. An EGF receptor inhibitor induces RAR-beta expression in breast and ovarian cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329(4): 1253-1259.
- [3] Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, et al. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers[J]. J Pathol, 2005, 206(3): 356-365.
- [4] Richter M, Zhang H. Receptor-targeted cancer therapy[J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(5): 271-282.

[编辑:安凤;校对:贺文]

(上接第 424 页)

其作用机制可能是由于 FHIT 的丢失或突变,正常细胞失去了负调控作用,促进肿瘤细胞无限制生长,而导致胶质瘤发生。

PTEN 基因定位于 10q 23.3,全长 200kb,是 1997 年由 3 个美国研究小组几乎同时发现的一种具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因^[5]。PTEN 基因异常可存在于胶质母细胞瘤、前列腺癌、子宫内膜癌等多种肿瘤。在胶质母细胞瘤中 PTEN 基因的突变率可高达 30%~40%,而在恶性程度低的其他类型的胶质瘤 PTEN 突变十分罕见,PTEN 表达的下降和缺失在由低度恶性胶质瘤向多形性胶质母细胞瘤转化过程中起着十分重要的作用^[6]。本研究显示,胶质瘤 PTEN 表达率为 55.0%,正常脑组织 PTEN 表达率为 80%,两者 PTEN 表达有显著差异 ($P < 0.01$),PTEN 的表达缺失使其抑癌功能丧失。推测 PTEN 的抑癌作用机制如下:PTEN 的表达产物具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性,而 PTEN 抑制肿瘤的作用有赖于这两种磷酸酶的活性。蛋白磷酸酶活性能负性调节细胞的粘附、转移和浸润。脂质磷酸酶活性,能负性调节 PIK(phosphatidylinositol kinase, 磷脂酰肌醇激酶)途径,促使细胞凋亡和(或)抑制细胞周期进程并诱导其停止于 G₁ 期,从而抑制细胞生长和增殖。当 PTEN 表达减少或缺失时,这种负性调节机制削弱,导致肿瘤的发生和发展。

本研究显示, FHIT 和 PTEN 表达都与胶质瘤的 WHO 分级有关, FHIT 和 PTEN 表达率的下降与肿瘤病理分级呈负相关 ($r = -0.4620, P < 0.05$;

$r = -0.5456, P < 0.05$),随着胶质瘤级别的升高, FHIT 和 PTEN 表达下降,因此 FHIT 和 PTEN 可作为胶质瘤恶性程度的指标。FHIT 和 PTEN 表达呈正相关 ($P < 0.01$),这说明两种抑癌基因在胶质瘤的发生发展中有协同作用。本研究显示,在弥漫性星形细胞瘤(Ⅱ级)主要以两种抑癌基因表达为主,而多形性胶质母细胞瘤多不表达 FHIT 和 PTEN,抑癌基因的分布与胶质瘤分级有显著差异 ($P < 0.05$),提示不同位点基因突变的越多,抑癌基因缺失越多,肿瘤的恶性程度越高。

(本文图见插页 4)

参考文献:

- [1] Pekarsky Y, Palamarchuk A, Huevner K, et al. FHIT as tumor suppressor: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Cancer Biology and Therapy, 2002, 1(3): 232-236.
- [2] Matthews CP, Shera K, Kiviat N, et al. Expression of truncated FHIT transcripts in cervical cancers and in normal human cells[J]. Oncogene, 2001, 20(34): 4665-4680.
- [3] Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, et al. Loss of Fhit expression in non-small-cell lung cancer: correlation with molecular genetic abnormalities and clinicopathological features[J]. Br J Cancer, 2000, 82(7): 1191-1197.
- [4] Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, et al. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: review of the pre-clinical studies[J]. JAMA, 2001, 286(19): 1441-1449.
- [5] Raftopoulos M, Etienne-Mannerville S, Self A, et al. Regulation of cell migration by the c2 domain of the tumor suppressor PTEN[J]. Science, 2004, 303(5661): 1179-1181.
- [6] Gomez-Manzano C, Fueyo J, Jiang H, et al. Mechanisms underlying PTEN regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J]. Ann Neurol, 2003, 53(1): 109-117.

[编辑:安凤;校对:贺文]