

肺癌异质性的分子病理学研究

张伟综述,林宜先,熊永炎审校

关键词:肺癌;异质性;分子病理学

中图分类号:R734.2

文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2001)06-0487-03

肿瘤异质性(heterogeneity)是指肿瘤性质上的多样性。异质性对于解释肿瘤基础研究及临床研究中出现的许多疑问具有重要意义。有关肿瘤异质性的研究,已经从肿瘤病理学深入到细胞生物学,分子生物学,分子遗传学,分子病理学等方面。肺癌异质性较为明显,一直是讨论肿瘤异质性的主要对象。大量研究表明肺癌的形态学表现、核型、生长速率、DNA含量、转移潜能、对化疗药物的耐药性等各方面都表现出不同程度的异质性。

1 肺癌异质性的表现

肺癌往往不是以单一的组织学类型出现,表现出异质性的可达到66%。这种异质性主要包括组织结构和细胞形态两方面,表现为同一病例甚至同一张切片中可以出现两种或两种以上的组织学类型的混合。混合形式以腺癌/小细胞癌、小细胞癌/大细胞癌最为常见,但几种主要组织类型的各种形式的混合都可出现。如果采用电镜和免疫组化检测方法,这种异质性的表现则更为突出。

不同的细胞亚群中,肺癌细胞可产生不同质的抗原物质。Fargion等采用免疫组化和免疫荧光染色方法在新鲜肺癌标本和肺癌细胞株中检测7种不同的表面抗原,观察到抗原物质的异质性表达,而且发现阳性细胞的分布以及抗原的密度并不一致。另外,抗原表达阳性的细胞株被克隆出来后,抗原表达的异质性继续存在于细胞株中,这说明产生抗原表达异质性是肿瘤细胞的内在特征^[1]。

原发肿瘤及其转移灶在基因含量、形式、功能以及成分上存在相当大的异质性。Selypes等研究发现,肺癌脑转移病例原发灶和转移灶癌细胞染色体数目及DNA含量存在明显的异质性^[2]。肿瘤细胞群中各种癌细胞的增殖能力与转移能力并不一致,增值旺盛的肿瘤细胞不一定有很强的转移力,说明组成肿瘤的细胞群存在着转移性上的异质性。转移是一个多阶段复杂的过程,涉及多种分子与基因的激活及抑制。另外转移瘤并不是原发灶简单的克

隆,转移瘤的形成与宿主免疫力、激素水平、血管密度等体内环境因素有关。这些因素的不确定性也使得肿瘤转移具有异质性。

肺癌中可以检测到神经内分泌表型。肺癌的神经内分泌分化常表现出明显的异质性,除小细胞肺癌(SCLC)和类癌有神经内分泌表型外,其他非小细胞肺癌(NSCLC)也具有较明显的神经内分泌分化。Linnola等研究神经内分泌分化在肺癌中的表现,发现近一半的NSCLC可以表达神经内分泌标记物,并且NSCLC表达神经内分泌的形式有别于SCLC^[3]。

2 肺癌异质性的基因基础

虽然已证实肺癌是单克隆起源,但在肿瘤演进过程中由于其遗传不稳定性及环境因素而获得异质性素质,而生物学特性的异质性又正反映了这种遗传不稳定性。肿瘤遗传不稳定性是肿瘤发展和肿瘤异质性的始动因素。遗传不稳定性表现在核苷酸水平上的不稳定和染色体不稳定性(chromosomal instability)两个方面^[4]。

2.1 染色体异常 肺癌细胞经常呈现复杂的染色体变异。肺癌患者中经常可检测到明显的染色体不稳定性和遗传异质性(genetic heterogeneity)。Girard等研究36个肺癌细胞株发现,在染色体1p、3p、4p、4q、5q、8p、9p、9q、10p、10q、13q、15q、17p、18q、19p、Xp、Xq上均可检测到杂合性丢失(loss of heterozygosity,LOH)。另外,在2p23、8q24、18q11和Xq22上可检测到纯合性缺失(homozygous deletion)。在这些染色体上常存在一些抑癌基因,如p53抑癌基因位于17p13.1位点;Rb抑癌基因位于染色体13q14;FHIT抑癌基因于3p14-23。这些抑癌基因随之发生的丢失或异常,在肺癌的发生及发展过程中发挥重要作用。

肿瘤演进过程中也可发生较为明显的染色体变异,而且在各个阶段这种变异也并不相同。Petersen等用比较基因组杂交(CGH)方法明确地发现没有转移的和已有转移的肺鳞癌之间基因型存在的差异,这种差异确切地说明了与转移表型相关的染色体失调(chromosomal imbalance)^[6]。Anami等用AP-PCR分析肺癌的基因改变时,在一些染色体上

收稿日期:2001-03-07;修回日期:2001-07-04

作者单位:430071 武汉大学中南医院病理科

检测到等位基因紊乱 (allelim imbalance)。并且得出结论,肿瘤早期比进展期发生等位基因紊乱的频率要高,提示在肿瘤进展的早期遗传异质性更为明显^[7]。

2.2 原癌基因及抑癌基因异常 染色体异常可以使原癌基因和抑癌基因随之发生异常。单个基因的突变或异常也常常表现出异质性。在不同组织学类型的肺癌中,原癌基因的突变位点及突变率不同。同一原癌基因不同位点的突变对功能的改变并不相同,于是会表现出不同的生物学功能。

肺癌细胞的基因型及表型均有众多改变,涉及到的主要癌基因有 ran 家族、myc 家族、jun 及 fos 家族、erb 家族等,抑癌基因有 p53、p16、Rb、p15、p18、FHIT 等。这些癌基因和抑癌基因虽然与肺癌高度相关,但它们的表达并不具有明显的特异性。例如 ras 基因突变的发生率存在很大差别,一般报道为 20% ~ 50%,但最高有 79.07% 的报道^[8]。另外,这些基因激活的机制也有多种方式,K-ras 以点突变最为常见,但也能以基因插入、转位或基因扩增而导致 K-ras 基因活化。而且即使是同一位点的点突变,突变结果也并不一致。Sagawa 等研究发生在 K-ras 第 12 位密码子点突变时发现 14 例中有 6 例突变为 TGT(半胱氨酸),5 例为 GTT(缬氨酸),2 例为 GCT(丙氨酸),1 例为 TTT(苯丙氨酸)^[9]。p53 点突变也可以表现出相当大的突变异质性,已发现在 p53 基因中存在至少 2000 个不同的点突变。这些点突变中约 83% 是能引起蛋白质改变的错义突变。

肺癌细胞染色体的多个区域均可发现有丢失。Kohno 等研究丢失图谱发现在 21 条不同的染色体上有 30 个区域丢失。一些区域发生的高频丢失强烈支持该区有存在抑癌基因的可能。这些区域中包括一些 DNA 过度甲基化的染色体区域和一些染色体脆性位点,这些基因位点都可能存在一些尚未被发现的与肺癌有关的抑癌基因^[10]。

2.3 微卫星不稳定性 微卫星 (microsatellite) 是广泛分布于人类基因组中的一些高度多态性的短串联重复序列,是由 1~6 个核苷酸组成的重复单位串联排列而成的 DNA 序列。它们可能与基因重排及变异、基因表达调控、维持基因组稳定等多种重要生命活动有关。肿瘤细胞中的微卫星异常主要表现为微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 和微卫星 LOH。肺癌尤其是 NSCLC 患者中常常可以检测 MSI。Sozzi 等研究 87 例 NSCLC 病例发现 MSI 的检出率为 56%。另外其血清样本中可以检测到 40% 的 MSI^[11]。MSI 会导致细胞生命活动的紊乱而可能导致肿瘤发生。微卫星与一些重要基因紧密

连锁,MSI 会导致这些基因的异常。Fong 等发现 MSI 与 DNA 分子异常密切相关,这些异常包括 K-ras 基因和 p53 基因突变以及在染色体 5q、8p、9p、11p 和 17p 区域发生的高频杂合性丢失^[12]。

一般认为,肺癌起源于一个单独的细胞。但在肿瘤演进的过程中,正是由于基因水平的不稳定而导致肿瘤失去单克隆性,获得异质性素质。起源克隆的遗传不稳定性是导致肿瘤异质性的主要因素。这些分子水平上的不稳定性一方面来自环境因素或病毒感染,一方面来自肿瘤细胞的肿瘤遗传易感性 (geneticsusceptibility)。遗传易感性常表现出染色体畸变率和突变率明显高于正常,基因水平上可表现为 DNA 修复及合成上的固有缺陷或染色体特殊部位的固有脆性。反之,肿瘤的遗传异质性又导致了肿瘤易感的多基因遗传 (polygenic inheritance), 多基因遗传正是由导致肿瘤易感或耐受的等位基因的改变而引起的,因此肿瘤易感性也是一种基因决定事件,而遗传异质性正是导致这种基因事件的原因^[13]。也就是说起源克隆的遗传不稳定性导致个体对肿瘤的易感性增加,反之肿瘤易感的多基因遗传又影响基因的不稳定性,这使得肿瘤异质性变得更为复杂。

3 小结

肺癌的异质性不容忽视,需要进行全面的研究,以对其进行合理的解释。对于肺癌的分子致癌机制,应进行多方面的探讨,研究各个方面的协同作用和影响因素。从分子水平解释肺癌异质性并从分子角度研究克服异质性的影响是肺癌异质性研究的关键,随着对肺癌的分子机制的深入研究及对肿瘤异质性的深入认识,肺癌的防治将会有根本性的突破。

参考文献:

- [1] Fargion S,Carne yD,Mulshine J,etal.Heterogeneity of cell surface antigens expression of human small cell lung cancer detected by monoclonal antibodies[J].Cancer Res,1986;46 (5):2633-2641.
- [2] Selypes A,Laszlo A.Chromosome mechanism in brain metastasis of a lung cancer cell line[J].Cancer Genet Cytogenet,1989;39 (2):181-184.
- [3] Linnola RI,Piantadosi S,Ruckdeschel JC.Im pact of neuroendocrine differentiation on non-small cell lung cancer[J].Chest,1994;106 (6Suppl):367S-371S.
- [4] Lengauer C,Kinzler KW,Vogelstein B.Genetic instabilities in human cancers[J].Nature,1998;396 (6712):643-649.
- [5] Girard L,Zochbauer-Muller S,Virmani AK,etal.Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and locus clusterin [J].Cancer Res,2000;60 (17):4894-4906.
- [6] Petersen S,Aninat -Meyer M,Schluns K,etal.Chromosomal alterations in

- terationsintheclonalevolutiontothemetastaticstageofscattered,cellcarcinomsofthelung[J].BrJCancer,2000;82(1):65-73.
- [7] AnamiY,Takeuchit,MaseK,etal.Amorphousmethanol-fixedlungcancerinmab-yarbitrarilyprimedpolymerasechainreaction[J].IntJCancer,2000;89(1):19-25.
- [8] GreatenTM,NiehansGA,RubinsJB,etal.Domolecularmarkerspredictsurvivalinnon-smallcelllungcancer[J].AmJRespirCritCareMed,1998;157:1093-1097.
- [9] SagawaM,SaitoY,FujimuraS,etal.K-raspointmutationoccursintheearlystageofcarcinogenesisinlungcancer[J].BrJ Cancer,1998;77(5):720-723.
- [10] KohnoT,YokotaJ,Howmanytumorsuppressorgenesareinvolvedinlungcancer[J].AmJRespirCritCareMed,1998;157:1093-1097.
- [11] SozziG,MussoK,RatcliffeC,etal.DetectionofmicrosatellitealterationsinplasmaDNAofnon-smallcelllungcancerpatients:a prospectforearlydiagnosis[J].ClinCancerRes,1999;5(10):2689-2692.
- [12] FongKM,ZimmermanPV,SmithPJ.Microsatelliteinstabilityandthermolecularabnormalitiesinnonsmallcelllungcancer[J].CancerRes,1995;55(1):28-30.
- [13] DragainTA,CanzianF,PierottiMA.Apolygenicmodelofinheritedpredispositiontocancer[J].FASEBJ,1996;(10):8:865-870.

(周永红校对)

HAB18G 在肝癌细胞中免疫组化和原位杂交的研究

段旭东¹,石梅¹,陈志南²

关键词:肿瘤相关性抗原;肝癌细胞;免疫组织化学;核酸原位杂交

中图分类号:R735.7 文献标识码:D

文章编号:1000-8578(2001)06-0489-01

抗人肝癌单抗 HAB18 早已证实与肝癌组织有很好的亲和力,以其为载体的导向药物治疗肝癌目前已进入临床实验。为了更好的了解其相应抗原在肝癌表达的意义,我们对四种肝癌细胞与正常肝细胞 HAB18G mRNA 及相应蛋白的表达进行了细胞内定位及半定量分析,试图探索 HAB18G 基因蛋白产物的表达规律。

1 材料和方法

1.1 细胞与 HAB18 单抗 人肝癌细胞系(HHCC),肝癌细胞株 SMMC-7721,BEL-7402,正常人肝细胞系(QZG)均来自中国科学院上海细胞所。HHCC-9204 及鼠抗人肝癌单抗 HAB18 由我校 863 组提供。

1.2 HAB18cDNA 探针的制备 探针标记试剂盒购置德国宝灵曼公司。将 HAB18GcDNA 片段用 EcoRI 及 XhoI 从

pBluescriptsk 重组质粒中切出,回收,纯化,定量后按试剂盒说明标记。

1.3 方法

1.3.1 核酸原位杂交 细胞用 RPMI-1640 完全培养基培养,取对数生长期的细胞用 2.5% 胰酶消化,制成浓度为 1×10^7 个/ml 的细胞悬液,接种于盖片上,加完全培养基 48h,4%PFA 固定 10min,25ug/ml 蛋白酶 K 消化 10min,脱水,探针于沸水浴中变性,杂交,过夜,加地高辛抗体 37.2h。NBT/BCIP 显色系统显色。设未含探针的预杂交液代替杂交液为空白对照,用 RNase 处理玻片为阴性对照,转染 pcDNA3/HAb18G 的 CHO 细胞为阳性对照。

1.3.2 免疫组织化学 免疫组化试剂盒 SP-9000 为北京中山生物技术有限公司。将细胞用 PBS 漂洗后,固定,0.3% 甲醇封闭。按 S-Pkit 进行,用 PBS 及无关抗体代替一抗为阴性对照。

2 结果

2.1 肝癌细胞

HAB18mRNA 的表达 肝癌细胞 HHCC,HHCC-9204,SMMC-7721 均见有阳性信号,蓝色,定位于胞浆,其中 HHCC 为表达最多,BEL-7402 及正常肝细胞未见表达。

2.2 免疫组化检测 四种肝癌细胞蛋白反应阳性,HHCC 蛋白表达最多,棕黄色,定位于胞膜及胞浆,其中 BEL-7402 为弱阳性,正常肝细胞未见特殊性染色。

3 讨论

BEL-7402 细胞中 HAb18G 蛋白含量较低,其 mRNA 未检测到,可能因为含量较少未能检测出来。但少量的 mRNA 可翻译出足够的蛋白,使免疫组化的结果呈现阳性反应。

四种肝癌细胞中 HAB18G 蛋白的表达均高于正常肝细胞的表达,以前研究证实,HAB18G 基因编码与 CD147 分子相同,CD147 分子主要作用之一是作为基质金属蛋白酶诱导因子,诱导产生基质金属蛋白酶(MMPs),MMPs 在肿瘤的侵袭中占有非常重要的地位,参与基底膜和细胞外基质的降解,促进肿瘤的浸润和转移。在本文的几种肝癌细胞中,由于 HHCC 具有低分化和转移倾向,而其 HAB18G 的表达无论在 mRNA 水平还是蛋白水平都明显高于其他细胞的表达。这表明 HAB18G 在肝癌中的表达量与肿瘤的分化程度密切相关。

肝癌单抗 HAB18G 目前无论在基础及临床显像和治疗中,都显示其潜在的利用价值。对于其相应抗原意义和功能的更加明确认识,尚需进行进一步的探索。

(安凤校对)

收稿日期:2001-02-06;修回日期:2001-05-07

作者单位:1.7100323 西安,第四军医大学西京医院放疗科;2.第四军医大学细胞工程研究中心