

人鼻咽癌DNA对Rat-I细胞 株的转化活性及其基因表达的研究

陈小君 焦晓蓉

(肿瘤研究所)

陈系古

(病理学教研室)

提 要 为了解EB病毒基因组阳性人鼻咽癌DNA在转染正常细胞后可能发生的生物学作用,作者将人鼻咽癌活检组织的DNA(EB病毒基因组阳性),用磷酸钙方法转染正常Rat-I细胞,使其恶转;用软琼脂培养的转化细胞能贴壁生长,并形成克隆;转化细胞易与PHA发生凝集;克隆接种裸鼠形成纤维肉瘤;转化细胞和裸鼠肿瘤组织用抗C₃补体免疫荧光法检测EBNA呈阳性;染色体原位杂交显示在某些细胞中期染色体上有银粒出现。

关键词 鼻咽癌 EB病毒 基因 大鼠纤维细胞 植物凝集素

已有较多的报道表明人鼻咽癌的发生与EB病毒密切相关,但人们尚未清楚EB病毒引起细胞恶性转化的分子机理。作者从人鼻咽癌活检组织中提取DNA,并对大鼠纤维细胞(rat fibroblast cell line, Rat-I细胞)转染,拟了解人鼻咽癌DNA在转染正常细胞后可能发生的生物学作用。

材 料 和 方 法

人鼻咽癌活检组织来自病理证实的门诊病人,其DNA经与EBV-W(YH)(BamH I)片段探针杂交后,证明为EBV基因组阳性^[1]。³²P-dCTP为Amershan(400μCi/mmol)公司产品。EBV-W(YH)(BamH I)片段质粒(PBR₃₂₂)由联邦德国Wolf教授赠送。植物凝集素(Phytohemagglutinin, PHA)为广州市医药工业研究所提供,Rat-I来自美国Cornell大学Rooker实验室。接种裸鼠(NCZ裸小鼠)为中山医科大学病理教研室裸鼠实验室提供,实验用鼠的鼠龄为离乳后1~2周。

1. DNA制备 用酚-氯仿抽提法提取转化细胞及鼻咽癌活检组织的DNA。

2. 体外细胞转染 用磷酸钙法将鼻咽癌DNA转染大鼠纤维细胞(Rat-I),其基本方法用Murray^[2,9]法稍作修改。

3. 软琼脂培养 用直径33mm培养皿中加入2ml 0.5%琼脂培养基(DMEM配制)作底层,然后在上面铺以1ml内含 1×10^5 单个转化细胞的0.3%琼脂培养基。培养至7~10天时,加入1ml培养液于固体培养基上。

4. 转化细胞的凝集试验 用DMEM培养液洗涤后的转化细胞,使在0.1ml内含 1×10^6 细胞数,然后加入PHA(100μg/ml培液),温育30分钟,在显微镜下观察凝集现象。

5. EB病毒核抗原(EBNA) 用抗C₃补体免疫荧光法。

6. 核酸原位杂交 应用缺口翻译法制备³H-标记EBV-W(BamH I)片段探针,原位分子杂交基本参照Harper方法^[3,9],转化细胞经处理后制备中期相染色体,先经RNase(100μg/ml)纯化于37℃温育60分钟,去除内源性RNA,然后用70%甲酰胺2×SSC于70℃温育2分钟进行DNA变性,然后将含有探针的杂交液50μl滴加于玻片,42℃温育17小

时,杂交液组成为 50%甲酰胺/10%葡聚糖/1×SSC/2mg牛血清白蛋白/40μg/ml鱼精 DNA,探针为 ^3H -EBV-V(YH)(BamH I)6 000cpm,杂交后用 50%甲酰胺/2×SSC,39℃洗 5 分钟,然后依次用 2×SSC,70%乙醇,80%乙醇,90%乙醇洗一干燥一涂乳胶(天津感光厂)在 4℃中曝光 3 周。

7. 裸鼠成瘤性 用 2×10^6 细胞数的正常细胞和转化细胞分别接种裸鼠(NCZ 裸小鼠)皮下,接种后饲养于 25℃恒温室,相对湿度 50~70%,定期观察及测量瘤结节大小。瘤组织进行病理切片和电镜观察照相。

结 果

1. 转化细胞灶形成 人鼻咽癌 DNA 转染 Rat-I 细胞约 18 天出现折光明显,细胞多层重叠生长的细胞转化灶(图 1),对照组无此现象。

2. 软琼脂培养 上述转化细胞在软琼脂培养至第 5 天时,由单个细胞繁殖形成透亮团聚状的新转化灶,至第 12 天已十分明显。当转移至液体培养基培养时,能贴在培养瓶壁迅速生长,而正常 Rat-I 细胞在软琼脂培养中却不能形成转化灶,细胞逐渐衰退。

3. 凝集现象 当 PHA 与转化细胞温育时,细胞互相紧密连接出现高度凝集现象(图 2),而正常细胞的凝集作用弱或不凝集。

4. 染色体原位杂交 用 ^3H 标记的 EBV-W(YH) 探针与转化细胞染色体原位杂交时,在中期相染色体上有银粒(silver granules)出现(图 3)。

5. EB 病毒核抗原(EBNA)检测 转化细胞及裸移植瘤回复培养的细胞,用抗 C_3 补体免疫荧光法检测 EBNA 均为阳性。

6. 转化细胞的成瘤 接种 2×10^6 转化细胞数种于裸鼠后,在第 8 天时可见接种处局部隆起,逐渐增大,30 天时形成明显的肿块(图 4)而对照组一直未有肿瘤长出。实验组瘤组织经病理和电镜检查证实(图 4)为纤维母细胞样肉瘤,瘤组织经组织培养后的细胞再接种

裸鼠可再长出肿瘤。

讨 论

从本文实验结果中转化;细胞软琼脂培养转化灶的形成,转化细胞能与 PHA 发生高度凝集现象,接种裸鼠后成瘤并能继续传代,提示人鼻咽癌 DNA 转化基因可能已转移至 Rat-I 细胞并使之发生恶性变。细胞染色体原位杂交中,转细胞中期相染色体有银粒出现,提示转化细胞染色体有 EB 病毒基因组存在^[1,3],转化细胞 EBNA 阳性,说明转化细胞有 EB 病毒基因产物的表达。曾有用鼻咽癌 DNA 转染 NIH/3T3 细胞使其发生恶性变的报道^[6]但未对 EB 病毒基因产物的表达以及基因定位(染色体原位杂交)等方面研究的报道,本文对此进行了深入研究,其结果为 EB 病毒与鼻咽癌的致癌作用的关系提供了有意义的证据。

(本文图见插图 2)

参 考 文 献

- [1] Anvert MA, et al. Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological. *Int. J. Cancer* 1977;20(4):486.
- [2] Murray MJ, et al. Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell* 1981;25(2):355.
- [3] Harper M, et al. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosome* 1981;83(1):431.
- [4] Yates JL, et al. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature(London)* 1985, 313(6005):812.
- [5] Rawlins DR, et al. Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen(EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 1985, 42(3):859.
- [6] 胡利富,等. 人鼻咽癌 DNA 的转化活性研究. *肿瘤* 1986, 6(1):1.

- [7] 蒋金荃, 等. EB病毒在人鼻咽组织中的存在状态. 肿瘤防治研究 1986, 13(1):1.
- [8] 陈剑经, 等. EB病毒基因片段的生物学活性——I. 基因片段转染、细胞转化与裸鼠成瘤的研究. 癌症 1989(1):9.
- [9] 胡利富, 等. EB 病毒基因片段生物学活性——I. 转染后的复制和表达研究. 癌症 1989; 8(5):338.

STUDY OF TRANSFORMATION ACTIVITIES ON RAT-1 AND EXPRESSION OF HUMAN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA DNA

Chen Xiaojun Jiao Xiarong
(Cancer Institute)

Chen Xigu
(Department of Pathology)

Rat-1 cell (rat fibroblast cell line) were transfected with the DNA from biopsy of human nasopharyngeal carcinoma (NPC, EBV genome positive) by calcium phosphate precipitate method. The malignant, transformed foci of Rat-1 cell have been cloned, When we use soft agar culture, the transformed cell can grow and form cell colonies. Following passage, the foci were able to adhere to glass wall and grow. These cell were easily agglutinated by PHA. The cloned transformants have been inoculated into nude mice with the formation of fibrosarcoma. The transforming cells and transplanting tumor cells from nude mice were cultured, positive EBV nuclear antigen (EBNA) was detected by anticomplement (C3) immunofluorescent method. In situ hybridization of the chromosome from transformed cells with EBV-W(YH) (BamH I) probe ³H-labeled showed silver granules in some metaphase cells.

Further study of these transforming cells is helpful to explain the mechanisms of carcinogenesis of human NPC.

Key words Nasopharyngeal carcinoma Epstein-Barr virus Gene Rat-fibroblast cell line Phytohemagglutinin

人鼻咽癌DNA对Rat- I 细胞株的转化活性及其基因表达的研究

(正文见第21页)

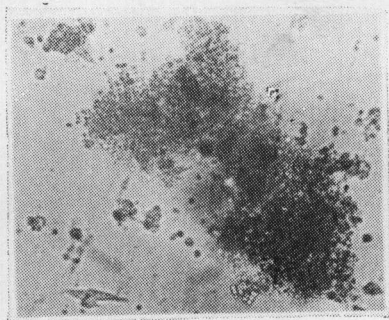


图 1 鼻咽癌 DNA 转染细胞形成的转化灶

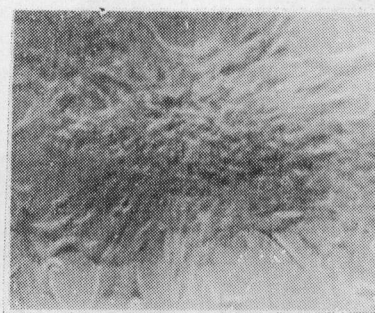


图 2 转化细胞的凝集现象

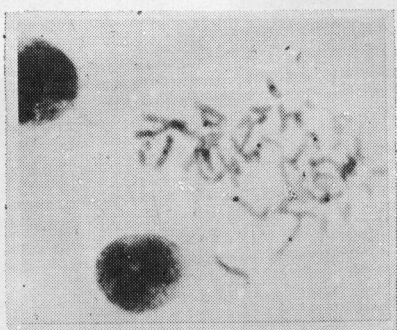


图 3 原位杂交染色体中期相上的银粒

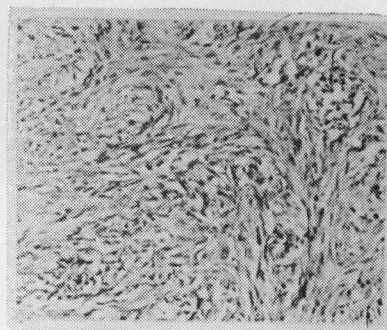


图 4 裸鼠瘤组织的病理组织图象
(低倍镜)