

[文章编号 1000-1182(2005)02-0159-02]

口腔癌相关成纤维细胞的染色体核型分析

郑晓辉¹, 刘 英², 周红梅², 陈谦明², 李秉琦²

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学;

2. 四川大学华西口腔医院 口腔黏膜病科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 通过对口腔癌相关成纤维细胞和口腔黏膜正常成纤维细胞染色体核型的对比分析, 初步了解口腔癌相关成纤维细胞的遗传学基本特征是否发生变化。方法 用秋水仙素、低渗液处理两种细胞, 经冰醋酸膨胀及甲醇固定后, 进行 Gemsa 染色, 在油镜下观察细胞染色体, 并采用 Visus 2.1 软件对细胞染色体核型进行分析。结果 与口腔黏膜正常成纤维细胞比较, 口腔癌相关成纤维细胞的染色体核型未见明显差异。结论 口腔癌相关成纤维细胞仍保留正常细胞的基本遗传特征, 未发生恶性转化。

[关键词] 成纤维细胞; 鳞状细胞癌; 染色体; 核型

[中图分类号] R 739.85 [文献标识码] A

Analysis of Chromosome Karyotype of Oral Carcinoma-associated Fibroblasts ZHENG Xiao-hui¹, LIU Ying², ZHOU Hong-mei², CHEN Qian-ming², LI Bing-qi². (1. Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Mucous Membrane Disease, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective The purpose of this study was to investigate whether the fundamental genetic character of oral carcinoma-associated fibroblasts changes through contrasting and analyzing the oral carcinoma-associated fibroblasts and the normal fibroblasts of oral mucosa. **Methods** The two kinds of cells were treated with colchicine and microsomatic fluid, and then were expanded with cold acetic acid and formalized with methyl alcohol. The cells were observed under the oil microscope after Gemsa staining. The chromosome karyotype of the two kinds of cells was analyzed by Visus 2.1. **Results** There were not obvious differences in the way of chromosome karyotype between the oral carcinoma-associated fibroblasts and the normal fibroblasts of oral mucosa. **Conclusion** The basic genetic characteristics of the normal cells are conserved in the oral carcinoma-associated fibroblasts, which means the cells have no malignant changes.

Key words fibroblast; squamous cell carcinoma; chromosome; karyotype

肿瘤在发生发展的不同阶段均与其周围的宿主产生密切关系, 从而形成肿瘤-宿主界面微环境 (microenvironment of the tumor-host interface), 为肿瘤细胞提供了生存、发展的“土壤”^[1]。癌相关成纤维细胞 (carcinoma-associated fibroblasts, CAFs) 是上述界面微环境中最主要的宿主细胞成分之一, 其生物学特性的改变对肿瘤浸润、转移将产生重要影响^[2]。本课题组的前期研究工作已证实: 与正常的成纤维细胞 (normal fibroblasts, NFs) 相比, 口腔 CAFs 的形态、生长增殖特性、分泌功能等均发生了明显变化^[3,4]。本实验通过对口腔 CAFs 和口腔黏膜正常成纤维细胞染色体核型进行对比分析, 初步了解口腔 CAFs 的遗传学基本特征是否发生变化, 为今后进一步探讨口腔 CAFs 对

口腔肿瘤-宿主微环境的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

基础培养基 DMEM (Gibco 公司, 美国), 合成培养基 (DMEM 中加入 10% 小牛血清、谷氨酰胺 20 mg/L、青霉素 1×10^5 U/L、链霉素 100 mg/L、pH=7.2), 秋水仙素 (Sigma 公司, 美国)。

1.2 实验细胞来源

将前期实验中冻存的第 3 代纯化舌癌相关成纤维细胞及同部位正常成纤维细胞复苏培养^[3], 备用。

1.3 染色体核型分析

取对数生长的细胞, 加入 50 μ l 秋水仙素, 继续培养 4 h; 用吸管轻轻吹打分裂相细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清液; 逐滴加入 0.5 ml 预热至 37 的 KCL (0.075 mol/L) 至 5 ml, 混匀, 用吸管轻轻吹打均匀, 37 孵育 30 min; 新鲜固定液固定; 取 -10 冰冻的载玻片, 距玻片 15 cm 高度处向玻片滴 1~2 滴

[收稿日期 2004-08-26; 修回日期 2004-10-26]

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20030610051); 教育部回国人员启动基金资助项目 (200340606)

[作者简介] 郑晓辉 (1969-), 男, 四川人, 讲师, 博士

[通讯作者] 周红梅, Tel: 028-85503480

细胞悬液,于室温干燥;Gemsa 染色 20 min,流水冲洗玻片背面,乙醇逐级脱水;二甲苯透明 3 次,中性树脂封片;油镜观察两种细胞染色体的数目及形态特征,并用 Visus 2.1 软件进行分析处理。

2 结果

油镜下可见两种细胞的细胞中期染色体由两条染色单体组成,两染色体在着丝粒的部位相互结合。着丝粒是纺锤丝附着部位,染色较其他部位淡,由着丝粒向两端伸出染色体的长臂和短臂。舌 CAFs 与舌部 NFs 均未见染色体的数目、形状、大小和结构的异常。采用 Visus 2.1 软件对两种细胞的染色体进行核型分析,结果发现与舌部 NFs 相比,舌 CAFs 染色体核型未见明显差异(图 1,2)。

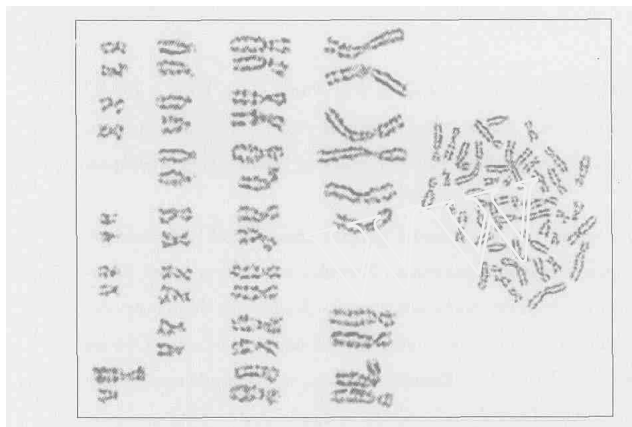


图 1 CAFs 核型分析

Fig 1 Karyotype analysis of CAFs

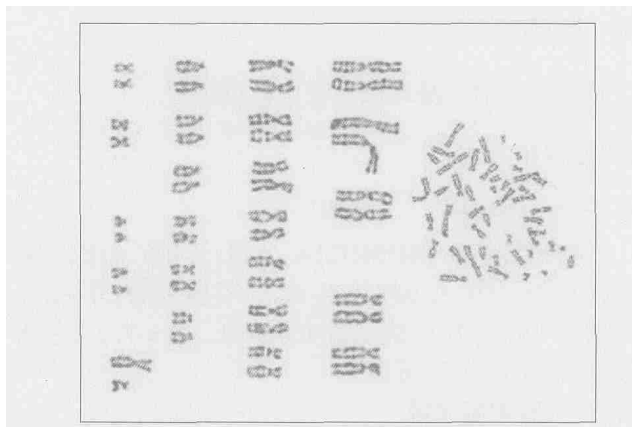


图 2 NFs 核型分析

Fig 2 Karyotype analysis of NFs

3 讨论

染色体是遗传物质的载体。在肿瘤遗传学理论中,有关肿瘤发生的遗传机制的几种假设中,其中有一种染色体不平衡假说,其认为染色体异常是癌变的原始初期变化,各种因素(遗传与环境)造成细胞的不对称分裂而使子细胞内遗传物质的分布不平衡,从而

影响基因的正常功能而形成肿瘤。核型是指单个细胞的染色体组成,它反映细胞中染色体数量与结构的特征。通过一定数量细胞观察,核型可以代表一个细胞系的染色体组成。在细胞的分化过程中,一些外源性因素可使染色体的核型发生变化,特别是当细胞发生恶性转化后,细胞的染色体核型将发生明显变化。因此,染色体核型分析是鉴定正常细胞和恶性细胞的主要方法之一⁵。本实验结果显示,舌部 CAFs 的染色体核型与同部位 NFs 相比无明显差异。这说明 CAFs 仍保留着正常细胞的基本特征,而未发生恶性转化。

肿瘤的发生是遗传与环境两因素共同作用的结果,而肿瘤的生存与发展需要内环境的稳定。肿瘤一旦形成便打破了正常上皮-间质的交互作用,肿瘤上皮将与邻近间质产生异常的交互作用,建立起自己的内环境,即肿瘤-宿主界面微环境。CAFs 是微环境中数目最多,功能活跃的宿主细胞,来自肿瘤细胞异常的信号传导对其生物学特性产生了较大的影响(如形态、生长方式、增殖活性、分泌功能等),这些生物学特性的改变对维持肿瘤-宿主界面微环境的稳定有重要的意义,对促进肿瘤的发展转移起着重要作用。本实验发现,CAFs 的基本遗传特征并未改变,这说明仅仅是环境的改变是不会影响细胞的本质特征,也证明了肿瘤的发生是遗传与环境两因素共同作用的结果,而遗传物质的改变在肿瘤形成中起主导作用。本研究结果也可用于解释单独将 CAFs 接种在裸鼠体内不会致癌的现象。

综上所述,尽管 CAFs 本身没有癌变,但其生物学特性的改变有利于维持肿瘤-宿主微环境平衡,因此,在促进肿瘤的发展、浸润、转移中起着重要的作用⁶。通过本研究可初步了解 CAFs 的遗传本质,也可为肿瘤临床治疗选择新的靶点提供理论依据。

[参考文献]

- 1] Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interfaceJ. Nature, 2001, 411 (6835): 375-379.
- 2] Wang CS, Tetu B. Stromelysin-3 expression by mammary tumor-associated fibroblasts under *in vitro* breast cancer cell inductionJ. Int J Cancer, 2002, 99 (6): 792-799.
- 3] 周红梅,刘英,胡涛,等.口腔癌相关成纤维细胞的分离培养及初步鉴定J. 中华口腔医学杂志, 2004, 39 (2): 122-125.
- 4] 刘英,周红梅,李胜富,等.口腔癌相关成纤维细胞的生长增殖特性研究J. 临床口腔医学杂志, 2004, 20 (4): 244-246.
- 5] 章魁华,于世凤. 实验口腔病理学. 北京:人民卫生出版社, 2002: 215-250.
- 6] Olumi AF, Grossfield GD, Hayward SW, et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epitheliumJ. Cancer Res, 1999, 59 (19): 5002-5011.

(本文编辑 汤亚玲)