

15 Harris L W, Anderson D R, Lennox W J *et al.* *Biochem Pharmacol*, 1990; **40** (12): 2677

Evidences of Conformational Difference in the Active Centre of Phosphorylated Acetylcholinesterases. Luo Chunyuan, Li Zhixiu, Xia Shuquan, Sun Manji, Yang Jinsheng (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The striking distinctions of oximes, such as 2-PAM, LüH6, TMB₄ and HI-6, in reactivating sarin-, soman-, tabun- and VX- phosphorylated acetylcholinesterase (AChE) imply that there are factors which hinder phosphorylated enzymes from being re-activated by some oximes before aging. To investigate this problem, a comparison of *in vitro* reactivation of these phosphorylated enzymes by H series oximes, HI-6, HGG-42 and their 4-oxime isomers, was made. Results showed that, in tabun experiments, although there was no reactivation by the two 2-oximes (HI-6 and HGG-42), 28%—45% reactivations were observed by their 4-oxime isomers.

In soman case the results were opposite. HI-6 and HGG-42 showed remarkable reactivation, but their 4-oxime isomers were ineffective. For sarin- and VX- phosphorylated AChE, all oximes showed high effectiveness. These results indicated that there are conformational differences among the active centre of the above phosphorylated enzymes. The influences of AChE allosteric agents showed that C₁₀ significantly increased the effects of TMB₄ in sarin, soman and VX experiments, however, it reduced the effect of TMB₄ significantly in the tabun case. Propidium has no influence on the reactivation of sarin, soman- and VX- phosphorylated AChE, but it significantly reduced the effect of TMB₄ on reactivating tabun-phosphorylated enzyme. These results confirmed that the conformation in the active centre of tabun-phosphorylated enzyme is obviously different from that of sarin-, soman- and VX- phosphorylated enzymes.

Key words AChE, conformation, organophosphate agent, reactivation, allosteric agent

胃癌和非癌病变 ras P²¹表达的定量研究*

左连富 胡俊兰 刘江惠 郭建文 高国栋

(河北省肿瘤医院, 石家庄 050011)

齐凤英

(河北医学院病理解剖组, 石家庄 050017)

摘要 应用流式细胞术对胃癌和胃粘膜的非癌病变组织细胞 ras 癌基因蛋白产物 P²¹表达进行了定量研究, 并探讨了 ras P²¹表达与 DNA 倍体与增殖指数的关系。结果表明, 胃癌 P²¹表达量明显高于非癌病变组织的表达量。胃粘膜非癌病变组织中, 胃癌前病变组织 P²¹表达量明显高于慢性萎缩性胃炎组织的表达量, 并发现 P²¹蛋白的表达量与胃癌和癌前病变组织学分级、DNA 倍体、增殖指数密切相关。

关键词 胃, 癌和癌前病变, ras P²¹, 流式细胞术

人类肿瘤中常见的癌基因之一是 ras 基因簇, ras 基因蛋白产物 P^{21} 是其共同的蛋白产物. 研究证明, ras 基因的突变、激活与细胞恶变有关, 已发现许多恶性肿瘤中具有 P^{21} 蛋白的过量表达, 推测 ras 基因蛋白产物 P^{21} 在人类正常细胞向恶性转化过程中起着十分重要的作用. 本文用流式细胞术对 ras P^{21} 在胃癌和胃粘膜非癌病变的表达进行定量分析, 以探讨 ras 癌基因在肿瘤发生发展过程中所起的作用, 在胃癌早期诊断中的意义及其与 DNA 含量关系.

1 材料和方法

1.1 标本来源 采自胃镜活检, 经病理学证实为慢性萎缩性胃炎 25 例, 胃癌前期病变 (不典型增生) 的石蜡包埋组织 25 例 (I 级 8 例, II 级 10 例, III 级 7 例). 取胃癌手术后石蜡包埋组织 40 例 (分化 I 级 6 例, II 级 22 例, III 级 12 例). 取 8 例正常胃粘膜组织作对照标本.

1.2 流式免疫荧光染色方法 a. 将石蜡包埋组织在切片机上切取 $40\mu\text{m}$ 厚的组织片, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 用网筛方法备单细胞悬液样品. b. ras 癌基因产物 P^{21} 单抗标记采用间接免疫荧光染色方法, 将 1×10^9 个/L 细胞用 PBS 离心洗涤 2 次, $1000\text{r}/\text{min}$, 每次 2min, 弃去上清, 加入 1:400 稀释的鼠抗 ras P^{21} 单抗 (ras-F325-17.1, Oncogene Science Inc., U. S.) $100\mu\text{l}$, 在 37°C 恒温水浴中温育 30min, PBS 洗 2 次, 然后加入 1:20 稀释的羊抗鼠 FITC-IgG (军事医学科学院微生物研究所生产, 批号 9109) $100\mu\text{l}$, 在 37°C 水浴中温育 30min, PBS 洗 2 次, 离心弃上清, 去掉未结合的多余荧光抗体. 上机前加入 1.0ml PBS 液, 经 400 目滤网过滤, 上机分析, 同时设阳性和阴性对照标本. 经免疫荧光染色的细胞, 涂片在荧光显微镜下观察, 可见黄绿色荧光主要分布于胞浆与核内.

1.3 DNA 含量检测的样品制备 参照文献 [1] 中的方法程序.

1.4 流式免疫荧光检测和 DNA 含量检测 采用美国 B. D 公司生产的 FACS 420 型流式

细胞仪, 光源为 2W 氩离子激光器, 工作功率为 300mW, 分别进行单参数检测, 测量数据输入 HP-300 Consort 30 计算机, 应用相应的软件进行资料处理. 测定前以鸡红细胞标准样品调整仪器的 CV 值在 5.0% 以内.

1.5 测量资料分析方法

1.5.1 DNA 含量的表示方法 以 DNA 指数 (DI 值) 表示相对含量, 依据 DI 值判定 DNA 倍体, 二倍体 $DI = 1.0 \pm 2CV$, $DI \neq 1.0 \pm 2CV$ 为异倍体肿瘤.

1.5.2 DNA 细胞周期各时相分布的计算 应用 B. D 公司提供的细胞周期分析软件, 计算出各时相的百分比, 以增殖指数 (PI) 表示增殖活性.

1.5.3 ras 癌基因产物 P^{21} 表达的定量分析方法 参照 Morkve 等 [2] 提出的荧光指数 (FI) 表示 P^{21} 表达的相对量.

$$FI = \frac{\text{样品细胞 } P^{21} \text{ 表达的平均荧光强度 (道数)} - \text{对照样品的平均荧光强度}}{\text{正常对照样品细胞 } P^{21} \text{ 表达的平均荧光强度}}$$

如 $FI > 1.0$ 示 P^{21} 表达阳性, $FI \leq 1.0$ 为阴性, 所有资料统计学方法采用 t 检验.

2 结 果

2.1 胃癌和非癌病变细胞 P^{21} 表达结果

表 1 P^{21} 在胃癌和非癌病变表达 FI 值

病变	组织分级	例数	FI 值 ($\bar{x} \pm s$)	P 值
胃癌 (40 例)	分化 I 级	6	1.86 ± 0.31	>0.05
	II 级	22	2.06 ± 0.84	
	III 级	12	2.56 ± 1.18	
胃癌前病变 (25 例)	不典型增生			
	I 级	8	1.12 ± 0.26	>0.05
	II 级	10	1.28 ± 0.39	
	III 级	7	1.71 ± 0.55	
慢性萎缩性 胃炎		25	0.96 ± 0.11	

按照荧光指数判定, 8 例正常胃粘膜细胞 P^{21} 表达均为阴性, 胃癌和癌前病变、慢性萎缩

性胃炎细胞 P^{21} 表达的 FI 值结果见表 1. 40 例胃癌细胞 P^{21} 表达量 ($FI=2.08\pm0.99$) 明显高于胃癌前病变表达量 ($FI=1.35\pm0.43$), 慢性萎缩性胃炎 P^{21} 表达量 ($FI=0.96\pm0.11$) 明显低于胃癌前病变的表达, 各病变之间的 P^{21} 表达量相比, 统计学上均有显著性差异 ($P<0.01$). 如图 1 所示.

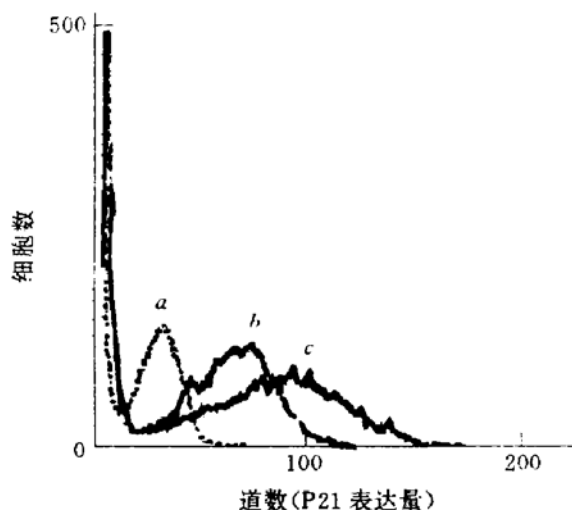


图 1 胃癌和非癌病变细胞 P^{21} 表达组方图

a 峰: 正常胃粘膜细胞; b 峰: 胃癌前病;
c 峰: 胃癌.

表 1 显示, 胃癌各组织学分级之间的 P^{21} 表达 FI 值在统计学上没有差异, 但 FI 值随分级增高而逐渐增高, 说明 P^{21} 表达与肿瘤恶性程度有关. 在胃癌前病变中, 不典型增生 I、II 级的 FI 值与 III 级相比, 有显著性差异 ($P<0.05$).

2.2 胃癌和癌前病变 DNA 倍体与 P^{21} 表达的关系

40 例胃癌中, 二倍体肿瘤 15 例, 平均 $FI=1.56\pm0.67$. 异倍体肿瘤 25 例, P^{21} 表达的平均 $FI=2.54\pm0.95$, 两组 FI 值相比, 在统计学上有非常显著的差异 ($P<0.005$).

在 25 例胃癌前病变中, 二倍体 20 例, 其 P^{21} 表达的平均 FI 值 $=1.21\pm0.31$, 异倍体 5 例, $FI=1.96\pm0.56$, 两者相比, 差异非常显著 ($P<0.01$).

25 例慢性萎缩性胃炎细胞 DNA 含量均为二倍体, P^{21} 表达的 $FI=0.96\pm0.11$, 其中仅有 4 例表达为弱阳性, 平均 FI 值 $=1.17\pm0.09$ (范围在 1.12—1.21).

2.3 各类病变 ras P^{21} 表达与增殖活性 (PI 值) 的关系 见表 2.

表 2 各病变 P^{21} 表达与增殖活性 (PI) 的关系

病变类型	P^{21+}			P^{21-}		
	例数	PI 值 ($\bar{x}\pm s$)	P 值	例数	PI 值 ($\bar{x}\pm s$)	P 值
慢性萎缩性胃炎	4	15.2 ± 7.6	<0.05	21	10.4 ± 2.1	<0.05
胃癌前病变	11	18.2 ± 2.9		14	14.8 ± 1.6	<0.05
胃 癌	28	23.8 ± 6.3	<0.01	12	19.8 ± 4.3	<0.05

3 讨 论

研究证明, 人类正常细胞中 ras 癌基因对细胞的代谢、生长分裂具有重要作用^[3], ras 基因的激活能启动和加速细胞的增殖, 以致引起细胞的恶性转化. 研究发现 ras 基因的点突变常见于人类肿瘤和癌前病变^[4-6], ras 基因蛋白产物 P^{21} 在大部分恶性肿瘤有过量表达. 本研究资料表明, 胃癌前病变 P^{21} 表达量明显高

于慢性萎缩性胃炎, 并随胃癌前病变不典型增生程度的加重, P^{21} 表达量亦增加, 说明 ras P^{21} 在癌变发生过程中起十分重要作用. Viola^[5] 和 Pandidos^[6] 等在膀胱癌前病变和直肠癌前病变的研究中发现, P^{21} 的表达随病变程度而变化, 认为 ras P^{21} 的表达有希望作为癌早期诊断的一个标志物.

从表 1 结果看出, ras P^{21} 的表达量与胃癌的恶性分化程度无关. P^{21} 表达与 DNA 倍体的

关系分析结果发现, DNA 倍体与 P^{21} 表达量密切相关, 异倍体肿瘤 P^{21} 表达量 (2.54 ± 0.95) 明显高于二倍体肿瘤 P^{21} 表达量 ($FI = 1.56 \pm 0.67$), 说明 P^{21} 表达明显调控肿瘤 DNA 合成的改变. 从表 2 结果来看, P^{21} 表达阳性其细胞增殖活性 (PI) 值明显增强, 也说明 DNA 合成速率加快. 在各病变中, P^{21} 表达阳性者, 其 PI 值明显高于 P^{21} 表达阴性者, 而且各病变之间的 PI 值也逐渐增高.

本研究资料的结果说明, $ras P^{21}$ 表达量的变化, 从慢性萎缩性胃炎、癌前病变、胃癌细胞的表达是逐渐增加, 证明 $ras P^{21}$ 在癌变的过程中参与了重要的致癌作用. 但 ras 基因的激活不是唯一的导致肿瘤发生的因素, 可能还有其他癌基因的参与, P^{21} 表达量的改变, 能否作为癌变早期诊断的一分子生物学标志物, 有待进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 左连富主编. 流式细胞术样品制备技术. 北京: 华夏出版社, 1991: 14
- 2 Morkve O, Laerum O D. Cytometry, 1991; 12: 438
- 3 Feramisco J R, Gross M, Rosenberg M *et al.* Cell, 1984; 38: 109
- 4 Hand P H, Thor A, Wunderlich D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 5227
- 5 Viola M V, Fronowitz F, Oravez S *et al.* J Exp Med,

1985; 161: 1213

6 Pandidos D A, Kerr I B. Br J Cancer, 1984; 49: 681

Quantitatively Study of Oncogene $ras P^{21}$ Expression in Carcinomas and Non-cancer Lesion of the Stomach. Zuo Lianfu, Hu Junlan, Liu Jianghui, Guo Jianwen, Gao Guodong (Hebei Provincial Tumor Hospital, Shijiazhuang 050011, China); Qi Fengying (Hebei Medical College, Shijiazhuang 050017, China).

Abstract The $ras P^{21}$ expression in non-cancer lesion and carcinomas of the stomach was quantitatively studied by flow cytometry, and relation of $ras P^{21}$ expression to DNA ploid and cellular proliferation index were inquired. The results showed that $ras P^{21}$ expression was higher in carcinomas than in non-cancer lesion one's of the stomach. In non-cancer lesions, $ras P^{21}$ expression in precancer lesion was higher than in chronic atrophic gastritis, and the raiser of fluorescence index in $ras P^{21}$ expression was found with raiser of histological grade. DNA ploid was associated with $ras P^{21}$ expression.

Key words stomach, carcinoma and precancer lesion $ras P^{21}$, flow cytometry

携带 EB 病毒潜伏膜蛋白基因 转基因小鼠的制备*

肖志强 姚开泰

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

刘 薇 卢光琇

(湖南医科大学生殖工程研究室, 长沙 410078)

摘要 EB 病毒潜伏膜蛋白 (LMP) 具有致癌活性, 构建含金属硫蛋白基因-1 (MT-1) 调控区和 LMP 基因的 pBR322-MT-LMP 质粒, 用显微注射法将 MT-LMP 转基因接种于小鼠受精卵内制备转基因小

* 国家“八五”攻关和美国中华医学基金会 (CMB) 资助项目.

收稿日期: 1994-01-25, 修回日期: 1994-05-04