

食管上皮永生细胞系研究进展

李 健, 齐义军, 王立东

李健, 齐义军, 王立东, 郑州大学医学院癌症实验室
河南省郑州市 450052
李健, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450003
通讯作者: 王立东, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学医学院癌症研究室.
ldwang@zzu.edu.cn
电话: 0371-66658335
收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2005-02-26

摘要

建立合适的模型系统是研究食管癌癌变过程的重要课题. 食管永生细胞株较难建立, 他既具有正常细胞的特征, 而且已经处于持续增生状态, 易于转化, 对研究食管癌变过程是一种良好工具模型. 本文就近年来有关食管上皮永生细胞的研究进展作一综述.

李健, 齐义军, 王立东. 食管上皮永生细胞系研究进展. 世界华人消化杂志
2005;13(11):1317-1321
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1317.asp>

0 引言

建立合适的模型系统是研究食管癌癌变过程的重要课题. 人们针对食管癌的不同病因和发病机制, 建立了多种不同致病因素所致的动物模型(如亚硝胺诱变的鼠食管癌模型), 同时也建立了许多食管癌细胞株(如Eca-109、Eca-56等), 这对研究食管癌病因学、分子生物学和防治方面提供了大量的理论依据. 取自动物并置于体外培养中的细胞在其传代之前称其为原代细胞(primary Cell), 原代细胞一经传代便称为细胞系(cell line), 一般正常细胞的这种细胞系的寿命只能维持一定的时间期限, 经过一定代数传代后衰退而死亡, 称为有限细胞系(finited cell line). 一些细胞自发地或经人工诱导等方法而转化, 细胞获得持久性增殖能力, 这样的细胞群体称无限细胞系(infinited cell line), 也称连续细胞系(continuous cell line). 细胞只具有持久增殖能力而无成瘤性的细胞系称为永生细胞系(immortalized cell line). 目前, 已经建立的永生细胞系有乳腺上皮细胞、口腔细胞、涎腺上皮细胞、食管上皮细胞^[1-3]、前列腺细胞^[4]、胰腺细胞^[5]等. 食管永生细胞株较难建立, 他既具有正常细胞的特征, 而且已经处于持续增生状态, 易于转化, 对研究食管癌变过程是一种良好工具模型. 本文就近年来有关食管上皮永生细胞的研究进展作一综述.

1 细胞永生化的概念

研究表明, 细胞永生化(immortalizations)是体外培

养细胞经过自发的或受外界因素的影响而从增殖危机中逃逸, 细胞获得持续生长增殖能力的特性. 永生化的细胞具有无限增殖生长性, 可长期传代, 并多伴有核型改变^[6]. 目前认为, 被普遍接受的永生化机理是Wright提出的人类细胞永生二阶段假说^[7], 即M1、M2理论: 细胞经多次分裂后, 在肿瘤抑制因子p53和Rb作用下, 正常细胞经过有限次数分裂进入死亡1期(mortality stage1, M1), 此时端粒DNA还较长, 开始衰老, 但不一定死亡. 在此期细胞失去了对有丝分裂原的反应, 并已经产生抑制DNA合成的蛋白质, 细胞静止在G1期. 而病毒、原癌基因和抑癌基因突变体(Rb或p53等)则可以抑制M1期机制, 细胞绕过M1期继续生长. 细胞经过20-30群体倍增次数(population doublings, PDs)后, 进入死亡2期(mortality stage2, M2), 这时端粒DNA缩短到“极限”, 细胞死亡率、染色体异常率会随之增加, 大部分细胞死亡, 只有极少数细胞(大约 1×10^{-7} 个)逃脱了这种潜在的肿瘤抑制途径, 细胞出现退化, 绝大多数细胞发生凋亡, 只有极少数细胞能够使M2期机制失活而获得永生性. 这些罕见细胞在一些因素影响下, 端粒酶被重新激活, 端粒长度得以维持, 以他自身RNA为模板不断合成端粒DNA来补充和延长端粒有限长度(telomere restriction fragments, TRFs), 以维持端粒长度, 恢复染色体的稳定性使细胞得以逾越M2期, 获得无限分裂和增殖的能力, 细胞发生永生化^[7].

2 永生细胞的分子学机制

增殖潜力的不同是正常哺乳动物细胞与肿瘤细胞的最大区别. 很多肿瘤细胞可以无限增殖达到永生, 说明永生是细胞恶变过程中的关键. 近年来的研究表明, 端粒酶的作用或其他原因导致的端粒长度的维持与细胞永生紧密相关, 而且在细胞永生过程中存在着原癌基因和抑癌基因的变化(如p53、Rb、c-myc、ras等)^[6]. 目前对永生细胞转化前后基因变化以及蛋白质表达变化进行了大量的研究, 发现p53-Rb系统与细胞永生最为密切.

p53是一种核转录因子, 当机体受到周围环境因素如DNA损伤、缺氧, 氧化还原紊乱和原癌基因激活等刺激时, 可通过磷酸化和乙酰化作用而被激活. 激活的p53诱导增生抑制, 保证损伤的DNA在再次进入细胞周期前进行修复或当修复不能进行时诱导细胞凋亡以清除变异的细胞. 这样p53可以作为基因组的保护者以防止基因过度扩增, 保持细胞基因组的完整性. p53功能的丧失同细胞逃

离危机期有直接的关系^[8]. 化学试剂或经放射性照射所得到的永生化细胞株中, 都能发现 p53 的突变或功能抑制现象. p53 产生的衰老抑制, 部分是由其下游效应分子所引起的. p21 能结合 CDK 复合物, 抑制其活性, 从而抑制磷酸化的发生, 使细胞在 G1 (S) 期停止. p21 的表达在细胞接近衰老时上升, 衰老细胞中 p21 和 E2F 的复合物明显增加, 这一事实进一步确定了其促进衰老的作用. 但是 p21 不是维持衰老所必需的, 高水平表达的 p21 在衰老细胞中并不能维持太长时间. 一旦进入衰老期, p53 有可能激活其他维持衰老的蛋白. 目前, 引起衰老细胞中 p53 表达的原因还不清楚, 推测可能是端粒酶缩短所引起的. 很多资料显示, p53 功能的抑制可使细胞越过衰老, 但不能避免危机期的产生^[8].

Vaziri *et al*^[9]还证实由端粒酶永生化的人原代成纤维细胞系 (BJ-TIEL) 有功能性的 p53 表达, 且对 DNA 损伤有完整的 p53 依赖性 G1 期检验点, 能对紫外线和电离辐射做出反应, 上调 p53 蛋白. Fraumeni 综合征患者的成纤维细胞含有杂合的野生 p53, 通过突变或丢失保留的野生 p53 等位基因使细胞克服了衰老, 抑制 p53 蛋白或 p21 都可使细胞寿命增加, 但这些细胞不会成为永生化细胞. 这都说明通过端粒酶延长细胞寿命与 p53/Rb 路径失活导致的细胞时限增加有本质的不同. 另有研究表明^[9], p53 的 C 末端可直接结合 hTERT 的 N 末端, 提示 p53 可下调端粒酶活性, 表明 p53 的灭活可能有助于端粒酶活性表达并进一步诱导细胞永生化^[10].

抑癌基因 Rb 在整个细胞周期调控中起着重要的作用. 在细胞周期的 G1 期, 他处于去磷酸化状态, 结合 E2F 家族成员形成稳定的复合物, 抑制 E2F 的转录活性, 使细胞不能进入 S 期. 在人类肿瘤中, pRb, CDK4, cyclinD 和 p16 常常有突变和失调, 这些分子间的生化联系, 导出 pRb/cyclinD/CDK4/p16 途径的概念. 这种途径的失调是肿瘤形成的先决条件. Kiyono *et al*^[11]将 p16^{INK4a}/pRb 灭活, 并同时激活端粒酶活性, 可诱导乳腺上皮细胞永生化, 提示抑癌基因 p16^{INK4a}/pRb 下调与端粒酶活性表达在细胞永生化过程中具有协同作用.

3 食管上皮永生生化细胞的建立

食管上皮细胞永生化涉及到病毒 DNA 的整合、端粒酶的活化等多方面的因素. 因此, 学者们通过基因转染等技术将外源性永生化基因, 如病毒、原癌基因和抑癌基因突变体等, 导入目的细胞内, 以增加永生化的发生机率. 主要有以下几种方法.

3.1 SV40 基因 SV40T 基因位于 SV40 基因组的早期转录区, 其表达的产物是 SV40T 抗原蛋白. SV40 是 20 世纪 60 年代初发现分离的猴肾细胞病毒, 人为其自然宿主, 他由结构蛋白 (VP1, VP2, VP3) 和两种抗原 (LT 和 ST) 组成. SV40 病毒早期转录区转化基因 (A 基因) 编码 LT 和 ST 抗

原. LT 抗原具有 ATP 酶和 DNA 解旋酶活性, 使蛋白质丝氨酸 / 苏氨酸残基磷酸化、ADP 核糖基化和乙酰基化. ST 抗原能反式激活 RNA 多聚酶 II 和 III 基因的启动子, 以及 c-myc 和 c-fos 癌基因转录, 使细胞质肌动蛋白缺失和细胞黏附性下降. LT 抗原为转化启动所必需的, 对转化起决定作用, 是非造血细胞永生化最常用的成分. ST 抗原对细胞的转化是非必需的, 但可起加强作用. 二者共同维持转化表型^[1-5].

SV40 已经广泛用于哺乳动物细胞复制和基因表达研究的实验模型 (如骨髓、涎腺、乳腺、前列腺、食管等), 同时也作为高效细胞功能“探针”, 与细胞增殖和多种与肿瘤相关的转化表型的出现相关, 是研究生长、转化和肿瘤发生的极好实验工具^[2-3]. Stoner *et al*^[12]用人食管尸检组织移植到无血清培养基中. 食管上皮传代培养生长, 然后用含有 RSV-LTR 促进子和编码 SV40LT 抗原序列的 pRSV-T 质粒与磷酸铯共沉淀而转染成无血清食管永生化细胞. 转染的细胞 HE-451 和 HE-457 在 3-4 wk 内形成多层克隆, 8-10 wk 内呈指数生长, 之后衰老. 6-8 mo 危机期之后, 分离克隆重新生长. 来自 HE-457 的 HET-1A 细胞系仍然保留上皮的形态, 细胞角蛋白染色阳性, 免疫荧光染色 SV40-T 抗原阳性, 无胸腺小鼠生长 12 mo 以上仍保持其无成瘤性. G-带核型分析显示 HET-1A 为亚二倍 (34-40 染色体). 该细胞系生长需要 Ca^{2+} 刺激, 胎牛血清、TGF- β 1、TGF- β 2 可以抑制.

3.2 端粒 (telomere) 端粒是真核细胞线性染色体末端的一种特异序列, 由重复排列的六核苷酸 5'-TTAGGG-3' 组成, 是每次细胞分裂后从 DNA 链的 3' 端伸出折叠成的特殊结构, 在稳定染色体及防止染色体末端融合等方面具有重要的作用. 端粒酶是一种能将真核生物染色体末端 DNA 端粒 DNA 加以延伸的酶. 自从端粒酶被发现之后, “端粒—端粒酶”学说已经被越来越多的研究结果证实^[7].

随着细胞分裂次数的增加, 端粒进行性缩短, 当缩短到一定的限度即不能维持染色体的稳定时, 细胞失去分裂增殖的能力, 进而衰老死亡. 端粒酶则是催化合成并维持端粒一定序列的核糖核蛋白, 由 RNA 和蛋白组成, 具有逆转录酶的活性. 目前, 已鉴定出了端粒酶的 3 个亚单位, 他们分别是端粒酶催化亚单位 (亦称端粒酶反转录酶, hTERT)、端粒酶 RNA 成分 (hTR)、端粒酶相关蛋白 (hTP1). hTR 为端粒重复片段单位的合成提供了模板; hTERT 与端粒酶活性呈明显的正相关, 在端粒 DNA 的聚合中起催化作用; 而 hTP1 究竟起何种作用还不清楚. 1996 年 Wight *et al* 首次发现端粒酶的缩短会导致细胞的增殖危机. 1998 年 Homayoun *et al* 在正常的缺乏端粒酶活性的人二倍体成纤维细胞中转入端粒酶催化亚单位, 结果表明由病毒介导的 hTERT 的表达激活了正常细胞端粒酶的表达, 进而导致端粒 DNA 的增长和细胞生命周期的延伸. 这一研究为端粒酶假说提供了直接的依据, 为细胞的

永生化开辟了一条新的思路^[13]。

虽然食管癌的发生发展已经被发现在不同时期有不同癌基因的激活和(或)抑癌基因的失活,但最终的结果都表现为肿瘤细胞的无限增殖,而端粒酶的激活可能是食管癌细胞得以无限增殖的必不可少的步骤。

3.3 人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV) 人乳头瘤病毒(HPV),是一种体积较小、高度螺旋的环状双链DNA病毒,含有7 900 bp,属乳头瘤病毒科。HPV通过病毒编码蛋白与宿主细胞的调节蛋白形成复合物,破坏细胞的有丝分裂和DNA修复过程,从而引起细胞转化。HPV感染与人类的各种良性或恶性病变密切相关,如宫颈癌、口腔乳头瘤、食管癌、非黑色素皮肤癌等。近年来,为进一步认识HPV基因在细胞增生和癌变中所起的作用,HPV基因被广泛用于永生各种上皮细胞的研究^[14]。

自1982年Syrjanen首先发现食管鳞癌约40%有HPV感染的组织学改变后,研究人员采用组织学和分子生物学方法对食管癌中的HPV进行检测,结果表明,不同实验组检测阳性率相差较大,从0-67%不等。尽管相差较大,但大多数资料表明,HPV作为一个引起食管癌的重要因素受到广泛重视和研究^[13]。

HPV16的E6蛋白含151个氨基酸,具有2个锌指结构,他与E7蛋白协同作用使人类上皮细胞永生。E6蛋白是一种多功能蛋白,可通过激活端粒酶而使正常细胞永生,并且实验证实E6激活端粒酶的关键部位与其降解p53的关键区相互独立。E6单独也可使某些细胞永生, E6与ras协同可转化原代鼠细胞。高危型HPV表达的E6可有效地抑制p53活性^[14-15]。E6蛋白一方面通过泛素-蛋白酶系统促进p53蛋白的降解,另一方面与p53蛋白紧密结合,抑制其进入胞核发挥作用。通过对HPV16、HPV18基因的一系列突变研究,表明HPV18E6比HPV16E6有更广泛的与p53蛋白结合位点,这也解释了临床上所见整合有HPV18的食管癌比HPV16型预后更差。p53功能丧失,导致G1/S期限制点功能丧失,引起染色体不稳定性,使细胞无法纠正DNA损伤^[16-17]。

除了主要由高危型HPV 16起恶化作用外,p53基因突变的存在对患者预后也是一个不利的因素。Furihata *et al*^[18]进行了三组试验, HPV阳性组(16型或18型), p53蛋白阳性组, HPV及p53均阴性组。结果全阴性组的生存率明显优于前两组,说明 HPV16型的存在和 p53突变都是预后不良的因子。

4 食管上皮永生细胞的变化

4.1 细胞形态的变化 Shen *et al*^[19-20]应用HPV18型 E₆E₇基因腺病毒伴随病毒(AAV)构件诱导人胚食管上皮永生。感染HPV18 E₆E₇的食管组织HFEE973长出上皮细胞,继续传代,定名为SHEE细胞株。SHEE细胞在盖玻片上生长,呈单层,胞质丰富,细胞核椭圆,核仁小。透射

电镜可见SHEE上皮细胞有张力原纤维,核椭圆形,核仁小,证实上皮细胞分化较好。SHEE传代至31代(SHEE31)时,贴壁后培养10 d,部份细胞胞体大,虽多角形,细胞核椭圆形,呈分化的鳞状上皮细胞形态;部分细胞的胞体小,胞质较少,核小圆形,生长拥挤,呈现未分化基底细胞样。继续培养,前者胞质中出现空泡,细颗粒增多,或凋亡脱落,细胞巢内呈网格状,后者仍拥挤生长,接触抑制差。此双相分化一直持续至50代以后。SHEE传代至61代(SHEE61)时,细胞大小和形态不一,并有细胞重叠,说明细胞有一定异形性,其锚锭生长和接触抑制等性状也减弱。透射电镜检查见到细胞核大,胞质较少,核膜皱折多,核仁大,显示生长活跃和分化较差;部份细胞形态和分化接近于永生细胞。SHEE传代至85代(SHEE85)时, SHEE85细胞大小相差大,胞质较少,胞质内有小颗粒,胞核大,不整形,核仁较大。透射电镜观查见细胞呈椭圆形或多角形,胞质较少,可见线粒体和较多内质网,有的细胞可见少量张力原纤维。核大,核膜皱褶多,有较大核仁,表明SHEE85细胞系已经完全恶化。多数学者认为HPV致使细胞遗传学性状发生改变(如染色体的不稳定性)是促使癌变的原因。SHEE细胞株在不同阶段、染色体改变的不断增加及某些癌基因和抑癌基因的改变引起的遗传不稳定性,可促使HPV诱导的细胞恶性转化。

4.2 细胞的生长曲线 Shen *et al*^[21-22]对食管上皮永生细胞生长情况的研究表明, SHEE细胞株传代1-10代时,细胞繁殖速度慢,平均每代10-15 d;10-20代细胞生长速度加快,每代约8-12 d;至20代以后,培养细胞生长更快,约6-8 d长满培养瓶。SHEE传代至20代(SHEE20)细胞接种后,其生长规律为第2 d细胞数略减,第3-8 d细胞增殖期,第9-10 d维持高峰为平顶期,第10 d以后逐渐减少,细胞核分裂指数(MI)在增殖期为1.20-4.80%,平均2.47%。SHEE传代至85代(SHEE85)细胞接种后其生长规律为:第1-2 d未见明显增殖,为潜伏期;第3-5 d细胞增殖加快,为增殖期;第6-7 d以后细胞逐渐减少,为退化期。

4.3 成瘤性 SHEE细胞经过 5×10^9 /L在裸小鼠腋下皮下接种,接种处有小结节,20 d以后逐渐缩小、消失。60 d后取接种处皮肤和皮下周围组织切片,见残存少数SHEE细胞呈退化变性,无浸润周围组织现象。在永生细胞早代(5-15代),给予促癌物12 姜黄(TPA)促使细胞恶性转化。此永生细胞系培养至61代有少数细胞恶性转化,可用克隆法选出并发现细胞系染色体的不稳定性。此细胞系传至85代(SHEE85),怀疑有恶性转化。SHEE85细胞移植入腹腔,细胞多附着在脏器表面,以隔下、肠系膜、腹膜后和盆腔脏器表面为常见,有的形成小瘤结,并可从脏器外膜侵入其下。最初多侵袭较疏松的组织,如侵袭肠系膜和胰腺间质;40 d后可侵袭胃壁肌层,但未见远处转移。SHEE85接种在羊膜上,经培养可见细胞贴在羊膜表

面生长,呈多层重叠细胞.经7-10 d培养,可见部分羊膜(4/8)SHEE85细胞侵袭至基底膜下结缔组织中.研究结果表明,SHEE85已经完全恶性转化,并已有较强侵袭力.此细胞系可作为研究食管癌癌变细胞和分子机制可靠的模型^[20-21].

4.4 细胞周期蛋白的变化 Wang *et al*^[8]的研究表明,应用SV40 T转染的食管上皮永生化细胞系HET-1A检测周期素和周期素依赖激酶抑制剂在G1的作用.食管上皮永生化细胞系HET-1A和食管上皮细胞危机前期转换过程中cyclin D1和p21^{Waf1}的变化结果,与危机前期细胞相比,cyclin D1和p21^{Waf1}在永生化细胞早期和晚期的表达下降.此外,永生化细胞的持续传代导致cyclin D1和p21^{Waf1}的表达增加.与危机前期细胞相比,cyclin E或p53在永生化细胞早期和晚期无显著性变化.表明,cyclin D1和p21^{Waf1},而不是cyclin E,在人食管上皮细胞的永生化和持续增殖起重要作用,这些变化不依赖p53的调节.

4.5 细胞遗传学的改变 HPV可以干扰有丝分裂纺锤体的功能和胞质分裂.E6、E7蛋白通过干扰抑癌基因p53、pRb的功能,发挥HPV诱变原活性和非整倍化活性.研究表明,HPV18型E₆E₇基因诱导人胚食管上皮永生化细胞(SHEE细胞)第10、20代细胞染色体众数分别为58-63、57-64,第61代为双众数58-60、63-65.FISH结果显示,1号3体和7号4体伴随传代数增加而明显增加.8号2体保持相对恒定.还有研究表明,SHEE和LTPA(SHEE培养至第13代后加入12 癉豆寇-TPA诱导其恶性转化而建立的瘤细胞株)细胞株主要是以亚三倍体为主,并且伴随传代次数增加,SHEE细胞众数右移.12、14、17、20号染色体的增加和Y染色体的丢失常见.两株细胞均存在复杂的染色体结构异常,主要涉及1、4、5、6、7、8、9、10、13、14、19、21号染色体.SHEE第20代、第85代和LTPA第74代细胞虽均有HPV18E₆、HPV18E₇蛋白表达,但以恶性转化的SHEE第85代表达最强.上述研究表明,SHEE细胞伴随传代数增加,染色体众数有双众数分布倾向,染色体极其不稳定,表现出复杂的数目和结构异常,提示细胞的永生化和是一个由多染色体参与的多阶段过程,食管上皮细胞由永生化和向恶性转化时,HPV18E₆、HPV18E₇蛋白表达的增强似乎更为明显^[20].

4.6 端粒与端粒酶活性的改变 Shen *et al*^[21]对HPV18E₆E₇基因诱发的人胎儿食管上皮永生化细胞系(SHEE)和恶性转化细胞系(SHEEC)中的端粒长度、端粒酶活性以及hTERT的表达进行了比较研究.正常食管黏膜上皮组织端粒平均长度约为30.0 kb,而食管癌组织、SHEEC细胞和SHEE细胞的端粒长度明显缩短,在6.6-2.0 kb之间.SHEE细胞从10余代到80余代的传代过程中,端粒长度有增长趋势,约增长1.0 kb.SHEEC细胞与EC109细胞

和食管癌组织的端粒长度相近,约为6.0 kb.端粒酶活性及其端粒酶hTERT和hTR的表达分析表明,SHEEC细胞和SHEE细胞均具有端粒酶活性,且SHEE细胞从10余代就已开始具有了端粒酶活性,在60余代、80余代依然保持着.端粒酶的hTERT(mRNA)及hTR在SHEEC细胞和SHEE细胞中也有表达,SHEE细胞从10余代到70余代的传代过程中,hTERT(mRNA)及hTR一直持续稳定表达.结果:SHEE和SHEEC细胞的端粒平均长度比正常食管上皮细胞的明显缩短,但稳定维持在一定长度范围内.SHEE细胞和SHEEC细胞均具有端粒酶活性,并均有hTERT和hTR表达.端粒酶表达活化使端粒维持在一定长度是永生化食管上皮细胞SHEE和恶性转化细胞SHEEC能够稳定分裂增殖的重要因素之一.

4.7 肿瘤抑制基因和癌基因的改变 Shen *et al*^[22]用PCR方法检测几个有关基因,如c-myc、H-ras、K-ras、p53和bcl-2等.p53突变在10代、31代和60代呈阳性,c-myc突变出现在31代和60代,K-ras突变仅出现在晚期.c-myc和p53(突变型)是促增殖基因,bcl-2预防细胞凋亡,这三者在SHEE31皆呈阳性,并有上调趋势.皆可促使细胞增殖.c-myc有促进细胞增殖、抑制分化和使细胞永生化和活化ras作用,可促使细胞转化.这些基因的变化是食管上皮细胞永生化和过程中重要的分子学事件.

5 食管上皮永生化细胞系的应用及意义

HPV作为引起食管癌的一个重要因素而逐渐得到认识和重视.采用HPV全基因或HPV E₆、E₇基因永生化和各类上皮细胞建立永生化细胞株,是体外研究相应肿瘤发生、发展的理想模型.对HPV永生化和细胞株的深入研究表明,细胞的永生化和也是一个多因素参与的多阶段过程.细胞生长增殖失控与凋亡异常促进了细胞的永生化和,端粒酶的激活与细胞遗传特性的改变也在其中发挥重要作用.

Sashiyama *et al*^[23]对无血清培养基中生长的人HPV16型E6/E7诱导食管永生化细胞CHEK-1进行了研究.CHEK-1细胞克隆具有多种细胞形态.慢速增殖的细胞克隆呈现立方体型,具有紧密的细胞连接,高度表达整合素 $\alpha 2$ 和整合素 $\alpha 6\beta 4$.中速增殖的细胞克隆显示较松弛的细胞连接且整合素 $\alpha 2$ 表达下降.快速增殖的细胞克隆呈纺锤型,明显的肌动蛋白压力纤维表明整合素 $\alpha 6$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 2$ 表达下降,并且贴壁生长.CHEK-1永生化和细胞中观察到50-100群体倍增长度中整合素 $\alpha 2$ 表达下降.结果表明,在细胞永生化和细胞恶性进展中可以见到整合素 $\alpha 2$ 和整合素 $\alpha 6\beta 4$ 的降低变化.

利用永生化细胞系不仅可以研究由永生化和向恶性转化的条件及过程,还可以探索由肿瘤细胞发生逆转并恢复其分化功能的条件,为研究食管癌的发生、发展及治疗提供模型.永生化和在体内可多次传代,具有相对稳定的增殖特性和功能状态,将其作为细胞工程和组织工程等研究领

域的标准细胞,有助于体外实验的标准化.永生生化细胞也可作为体内治疗的载体,长期而稳定地发挥我们所要求的疗效,而不会引起不良反应.目前已经有学者将永生生化细胞应用于临床研究.总之,永生生化细胞的运用前景非常广阔,有可能为医学界带来巨大的突破^[24-25].

6 参考文献

- Bocchetta M, Carbone M. Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation. *Oncogene* 2004;23:6484-6491
- Stampfer MR, Yaswen P. Human epithelial cell immortalization as a step in carcinogenesis. *Cancer Lett* 2003;194:199-208
- Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:705-709
- Gil J, Kerai P, Lleonart M, Bernard D, Cigudosa JC, Peters G, Carnero A, Beach D. Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Res* 2005;65:2179-2185
- Lawson T, Ouellette M, Kolar C, Hollingsworth M. Culture and immortalization of pancreatic ductal epithelial cells. *Methods Mol Med* 2004;103:113-122
- Kroll J. Molecular chaperones and the process of cellular immortalization in vitro. *Biogerontology* 2002;3:183-185
- Newbold RF. The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis* 2002;17:539-550
- Wang H, Spillare EA, Wang QS, Sabourin CLK, Stoner GD. p53-independent down-regulation of cyclin D1 and p21Waf1 in the process of immortalization of human esophageal epithelial cells. *Int J Oncol* 1998;12:325-328
- Vaziri H, Benchimol S. Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. *Oncogene* 1999;18:7676-7680
- Li H, Cao Y, Berndt MC, Funder JW, Liu JP. Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene* 1999;18:6785-6794
- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998;396:84-88
- Stoner GD, Kaighn ME, Reddel RR, Resau JH, Bowman D, Naito Z, Matsukura N, You M, Galati AJ, Harris CC. Establishment and characterization of SV40 T-antigen immortalized human esophageal epithelial cells. *Cancer Res* 1991;51:365-371
- Meeker AK, De Marzo AM. Recent advances in telomere biology: implications for human cancer. *Curr Opin Oncol* 2004;16:32-38
- Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89:213-228
- Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005;32(Suppl):25-33
- Si HX, Tsao SW, Poon CS, Wang LD, Wong YC, Cheung AL. Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003;103:496-500
- Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, Baba K, Matsuda H, Sugimachi K, Mori R. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer* 1992;70:2234-2238
- Furihata M, Ohtsuki Y, Ogoshi S, Takahashi A, Tamiya T, Ogata T. Prognostic significance of human papillomavirus genomes (type-16, -18) and aberrant expression of p53 protein in human esophageal cancer. *Int J Cancer* 1993;54:226-230
- Shen ZY, Cen S, Shen J, Cai W, Xu J, Teng Z, Hu Z, Zeng Y. Study of immortalization and malignant transformation of human embryonic esophageal epithelial cells induced by HPV18E6E7. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:589-594
- Shen ZY, Xu LY, Chen XH, Cai WJ, Shen J, Chen JY, Huang TH, Zeng Y. The genetic events of HPV-immortalized esophageal epithelium cells. *Int J Mol Med* 2001;8:537-542
- Shen ZY, Xu LY, Li EM, Cai WJ, Chen MH, Shen J, Zeng Y. Telomere and telomerase in the initial stage of immortalization of esophageal epithelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:357-362
- Shen ZY, Xu LY, Li EM, Cai WJ, Shen J, Chen MH, Cen S, Tsao SW, Zeng Y. The multistage process of carcinogenesis in human esophageal epithelial cells induced by human papillomavirus. *Oncol Rep* 2004;11:647-654
- Sashiyama H, Shino Y, Sakao S, Shimada H, Kobayashi S, Ochiai T, Shirasawa H. Alteration of integrin expression relates to malignant progression of human papillomavirus-immortalized esophageal keratinocytes. *Cancer Lett* 2002;177:21-28
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dettin L, Johnson E, Dym M. Immortalization of mouse germ line stem cells. *Stem Cells* 2005;23:200-210
- Rahman NA, Huhtaniemi IT. Testicular cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2004;228:53-65

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议

本刊讯 全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议定于 2005-10 在深圳召开, 现将征稿通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要(800-1000 字)一份, 电脑打印(附软盘), 2005-08-31 截稿。

2 联系方式

北京市东城区美术馆后街 23 号北京市中医研究所 郭培元 收(邮编: 100010), 电话: 010-84023593。