

鼻咽癌

基础与临床

Basic & Clinical
Nasopharyngeal
carcinoma

主 编 赵素萍 副主编 唐瑶云
主 审 肖健云

CS
PUBLISHING & MEDIA
中南出版传媒

湖南科学技术出版社

鼻咽癌

基础与临床

Basic & Clinical
Nasopharyngeal
carcinoma

主 编 赵素萍 副主编 唐瑶云

主 审 肖健云

CIS

PUBLISHING & MEDIA
中南出版传媒

湖南科学技术出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

鼻咽癌基础与临床 / 赵素萍主编. -- 长沙 : 湖南科学技术出版社, 2011.11

ISBN 978-7-5357-6946-6

I. ①鼻… II. ①赵… III. ①鼻咽肿瘤—诊疗 IV. ①R739.63

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 228291 号

鼻咽癌基础与临床

主 编: 赵素萍

副 主 编: 唐瑶云

主 审: 肖健云

责任编辑: 曹 鹂

出版发行: 湖南科学技术出版社

社 址: 长沙市湘雅路 276 号

<http://www.hnstp.com>

邮购联系: 本社直销科 0731-84375808

印 刷: 长沙超峰印刷有限公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址: 长沙市金州新区泉洲北路 100 号

邮 编: 410600

出版日期: 2012 年 1 月第 1 版第 1 次

开 本: 889mm×1194mm 1/16

印 张: 27

字 数: 500000

书 号: ISBN 978-7-5357-6946-6

定 价: 98.00 元

(版权所有 · 翻印必究)

编委会成员

主 编：赵素萍

副 主 编：唐瑶云

主 审：肖健云

编写秘书：吴 平

编 委：（按汉语拼音顺序排列）

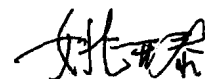
安云芳 陈登明 黄东海 蒋卫红 赖金平 李建璜 廖遇平
刘 佳 邱元正 任彩萍 唐瑶云 王金胜 文 忠 武长魁
吴 平 肖自强 徐 芳 章 华 张 欣 赵长青 赵素萍
钟美佐 周建华 周卫兵 祝和成

序

鼻咽癌是我国南方及东南亚地区常见的恶性肿瘤，其中以广东、广西、福建和湖南等省的发病率最高。鼻咽癌的恶性程度高，早期即可出现颈部淋巴结转移，严重危害人类健康。

长期以来我国肿瘤研究工作者对鼻咽癌进行了大量研究，经过多代人的努力，无论是基础理论还是临床应用方面都取得了显著进展。中南大学湘雅医学院（原湖南医科大学）为全国最早开展鼻咽癌基础和临床研究的单位之一，在基础和临床方面都作出了较大的贡献。近年来，鼻咽癌病人的生存期和生存质量都随着鼻咽癌基础和临床研究的进展不断提高。为了进一步促进鼻咽癌基础研究和规范临床诊治行为，进一步改善患者生存质量、延长生存期，完全有必要将鼻咽癌基础理论和临床新进展系统地介绍给从事鼻咽癌临床及基础研究的专业人员。

湘雅医院博士生导师赵素萍教授，可以说是中南大学湘雅医学院研究鼻咽癌的第三代专家，她在本领域的研究成绩卓著，这次组织和邀请国内、国外该领域的专家学者编写本书，总结迄今为止鼻咽癌基础和临床研究的新进展是一件很有意义的工作。该书还较全面地介绍了国内、外鼻咽癌的基础和临床研究的新方法，是一本具有系统性、前沿性和实用性的专业书籍，也是一本很好的鼻咽癌科研、临床诊疗和教学参考书。相信该书将会在鼻咽癌的医疗、教学和科研上发挥重要的作用。



中国科学院院士

2011年10月

前 言

鼻咽癌发生于鼻咽黏膜上皮，是我国南方地区及东南亚地区常见的一种恶性肿瘤，其中以广东、广西和湖南等省发病率最高，严重危害了人民的生命和健康。近 30 多年来，我国已有许多学者对鼻咽癌做了大量研究，取得了可喜的成绩，积极地推动了鼻咽癌基础和临床研究的发展。中南大学（原湖南医科大学）湘雅医学院是全国最早开展鼻咽癌基础和临床研究的单位之一，经过多年的研究和探索，在该领域取得了大量的研究成果和积累了丰富的临床经验。为了更好地促进鼻咽癌的基础研究及规范鼻咽癌的诊断治疗，特组织了国内外该领域的专家学者编写了本书。

本书的编写宗旨是力求反映鼻咽癌基础和临床的最新进展，介绍国内、国外鼻咽癌的基础和临床研究的新理论、新知识和新经验，力求反映鼻咽癌治疗和基础研究的系统性、前沿性、权威性及实用性，为广大的临床医生和鼻咽癌基础研究人员提供理论和临床治疗方面的参考。

书中主要对鼻咽癌最前沿的基础研究课题，如鼻咽上皮细胞的恶性转化机制、鼻咽癌相关的瘤基因和抑癌基因、细胞周期因子、端粒与端粒酶体系、侵袭及转移的分子机制和蛋白质组学研究等进行了系统阐述；并对临床相关的课题和内容，如流行病学、病因发病学、病理学和应用解剖形态学、症状学、诊断及鉴别诊断和鼻咽癌的治疗等进行了详尽的介绍。同时本书还提供了相关的原始资料及图片，供读者学习和参考。希望这本书的出版对广大的耳、鼻、咽、喉、头颈外科医生以及从事鼻咽癌基础研究的专业人员有所帮助。

本书的编写历时两年，得到了国内外 20 多位专家学者和编写人员的大力支持，在此一并表示感谢。

由于编写者学识有限，书中的不足之处难免，敬请广大读者批评指正。

赵素萍

2011 年 8 月于长沙

目 录

第一章 鼻咽上皮细胞培养及恶性转化研究	1
第一节 人鼻咽上皮细胞体外培养及其生物学特性研究	1
第二节 培养人鼻咽上皮细胞的恶性转化研究	4
第三节 人鼻咽癌细胞系的建立及其生物学特性研究	8
第四节 瘤基因在鼻咽上皮细胞恶性转化过程中的作用	12
第五节 抑癌基因在鼻咽上皮细胞恶性转化过程中的作用	32
第二章 鼻咽癌细胞周期因子及其相互关系研究	76
第一节 鼻咽癌细胞周期及其分子生物学研究	76
第二节 鼻咽癌细胞周期各时相对化疗药物的敏感性	82
第三节 鼻咽癌细胞周期各时相对放疗的敏感性	87
第三章 鼻咽癌侵袭及转移的分子机制研究	92
第一节 鼻咽癌侵袭的特点	92
第二节 鼻咽癌颈部淋巴结转移及远处转移的特点	96
第三节 鼻咽癌侵袭与转移的分子生物学研究	100
第四章 端粒、端粒酶体系在鼻咽癌发病中的机制研究	112
第一节 端粒、端粒酶及其亚单位	112
第二节 端粒、端粒酶与细胞增殖、永生化和衰老	113
第三节 端粒、端粒酶在鼻咽癌和其他头颈肿瘤组织的表达及其意义	115
第四节 端粒、端粒酶与鼻咽癌临床生物学特性的关系	116
第五节 端粒、端粒酶调控因素及其分子机制与鼻咽癌发生的关系	117
第六节 以端粒酶为靶点的鼻咽癌靶向基因治疗研究进展	119
第五章 鼻咽癌的蛋白质组学研究	127
第一节 蛋白质组学的概念及研究方法概述	127
第二节 蛋白质组学在肿瘤研究中的应用	128
第三节 鼻咽癌的蛋白质组学研究	129

第六章 鼻咽癌流行病学研究	161
第一节 鼻咽癌在世界的流行	161
第二节 鼻咽癌在中国的流行	165
第七章 鼻咽癌病因学研究	171
第一节 EBV 与鼻咽癌	171
第二节 化学致癌物与鼻咽癌	186
第三节 遗传易感性与鼻咽癌	192
第四节 微量元素与鼻咽癌	198
第八章 鼻咽癌病理学研究	203
第一节 鼻咽癌组织学类型	203
第二节 鼻咽癌病理学类型及特征	205
第三节 鼻咽上皮癌变过程中细胞形态及细胞核 DNA 的变化	212
第四节 鼻咽部其他肿瘤和增生性病变	216
第九章 鼻咽部应用解剖形态学研究	222
第一节 鼻咽部的解剖学	222
第二节 鼻咽部的组织发生学	228
第三节 鼻咽部的淋巴回流	229
第十章 鼻咽癌症状学研究	232
第一节 鼻部症状	232
第二节 耳部症状	233
第三节 眼部症状	234
第四节 头痛	235
第五节 颅神经受损症状	236
第六节 颈部症状	238
第七节 远处转移症状	240
第八节 其他特殊症状	241
第十一章 鼻咽癌诊断程式及鉴别诊断研究	243
第一节 临床检查	243
第二节 鼻咽镜检查	244
第三节 EBV 血清学检查	246
第四节 影像学检查	249

第五节	分子生物学检查·····	255
第六节	鼻咽癌的鉴别诊断·····	265
第十二章	鼻咽癌的治疗学研究 ·····	269
第一节	鼻咽癌放射治疗的现状及进展·····	269
第二节	鼻咽癌的化疗·····	292
第三节	鼻咽癌放疗后残灶和复发灶的手术治疗·····	299
第四节	鼻咽癌光动力治疗·····	302
第五节	鼻咽癌基因治疗及其临床应用·····	308
参考文献	·····	314

第一章

鼻咽上皮细胞培养及恶性转化研究

第一节 人鼻咽上皮细胞体外培养及其生物学特性研究

肿瘤的发生发展是涉及多因素、多阶段、多机制、多基因参与的病理过程，肿瘤的恶性表型是多种因素相互作用导致正常细胞恶变的结果。已往的许多研究提示，EB 病毒 (Epstein-Barrvirus, EBV)、化学致癌物、遗传易感性、癌基因的过度表达和抑癌基因的缺失等与鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 的发生发展密切相关。流行病学调查显示，鼻咽癌的发生涉及遗传倾向性和环境致癌因素，很可能是遗传易感性个体在致癌因素的作用和多基因的参与下而发生的。过去虽有学者用亚硝胺类化合物成功诱发了大白鼠鼻咽癌，但从动物身上得到的资料移用于人体往往有一定的距离。随着生命科学技术的迅速发展，体外培养人体及动物活细胞已逐渐成为现代医学和生物科学中最广泛应用的实验研究手段。由于体外培养的细胞携带有与体内细胞同等的基因组，是细胞生物学、分子生物学和基因工程学等的最佳研究对象，并可使用摄影和闭路电视等方法直接观察记录活细胞的形态结构和动态过程中生命活动的变化规律。特别是上皮细胞的原代培养一直受到人们的格外青睐，原因在于：①许多器官的上皮细胞具有特定的功能，可作为研究细胞形态、功能、分化、药敏、转化等实验性研究和干细胞动力学的模型。②上皮组织常发生肿瘤，上皮细胞的原代培养为探讨肿瘤的发生、发展机制提供了良好的体外模型。但是，在原代培养过程中难以获得较纯的上皮细胞，这是由于原代培养的上皮细胞在体外生长困难，同时受成纤维细胞等因素的干扰。我们经过多年的实践摸索建立了一套完整的、稳定的人体上皮细胞原代培养和纯化方法，运用该方法已成功地培养了人体各部位的十几种上皮细胞，特别是首次成功培养了人胚鼻咽上皮细胞，并对人胚鼻咽上皮细胞进行了一系列的生物学特性研究，为进一步研究化学致癌物、EBV、遗传易感性等因素对人胚鼻咽上皮细胞恶性转化的作用奠定了基础。

一、人胚鼻咽上皮细胞培养

体外培养人胚鼻咽上皮细胞对于研究人鼻咽上皮细胞的生物学特性、鼻咽癌与 EBV 的关系、化学致癌物、遗传易感性、癌基因、抑癌基因及转化基因等在鼻咽癌发生发展过程中相互作用的机制都有着十分重要的意义。



1. 取材 取水囊引产的人体胚胎,用碘酊(碘酒)和70%乙醇严格消毒面部,用无菌手术剪沿上下颌骨之间剪开暴露咽部,再用T形剪剪开软腭面,充分暴露鼻咽腔,用无菌眼科镊和眼科剪分离鼻咽黏膜组织,再用弯眼科剪将组织剪成 $0.1\sim 0.3\text{ mm}^3$ 小块,Hanks液洗数次,弃上清;立即加入含有小牛血清、青霉素(100 IU/mL)、链霉素($100\text{ }\mu\text{g/mL}$)和卡那霉素($100\text{ }\mu\text{g/mL}$)的DF或RPMI-1640完全培养液中,可置于 4°C 冰箱过夜或立即进行组织培养处理。

2. 消化 Hanks平衡盐溶液洗组织块数次,弃上清,加入 5 mL 0.1% 胰蛋白酶(trypsin)消化液,混匀,消化 $5\sim 10$ 分钟,消化时间可根据组织的多少和硬度灵活掌握。加入 5 mL 含20%小牛血清的完全RPMI-1640培养液终止消化,静置数分钟,弃上清,Hanks液洗2次,再加入 5 mL 完全RPMI-1640培养液,混匀,静置数分钟。

3. 干贴壁 取若干培养瓶或培养皿,用少许小牛血清湿润细胞培养面。将组织块悬液滴入培养瓶或培养皿中,一般每瓶或皿需接种 $20\sim 30$ 个组织块。将组织块均匀分开,加 2 mL 完全培养液于对侧,置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 及饱和湿度培养箱中,干贴壁 $5\sim 8$ 小时,轻轻翻瓶,使培养液均匀覆盖在组织块上;或直接加少量培养液于组织块之间,置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 及饱和湿度的培养箱中48小时后再补充 $2\sim 3\text{ mL}$ 完全培养液。

4. 传代培养 细胞培养5天左右换半量培养液,以后每隔 $3\sim 4$ 天换液1次。如在显微镜下观察到大量的成纤维细胞与上皮细胞混合生长,应及时用机械刮除加差别胰蛋白酶消化除去成纤维细胞。待细胞长至瓶底90%汇合面时作传代培养。每周换培养液2次、传代1次。

上皮细胞的原代培养,特别是正常上皮细胞建系非常困难,主要原因是培养所需的组织标本很难得到纯净的上皮细胞,通常原代培养的组织夹杂有多种细胞成分,而且成纤维细胞常常比上皮细胞生长快,培养一段时期后成纤维细胞可能会迅速包围或淹没上皮细胞,严重影响上皮细胞的生长,须及时除去成纤维细胞或抑制纤维细胞生长。现已明确血清中许多成分有促进成纤维细胞有丝分裂的作用,并易诱导上皮细胞终末分化和衰老。随着细胞培养技术的不断更新,目前采用无血清或低浓度血清和含有促进上皮细胞生长的选择培养基,可抑制纤维细胞的生长和促进上皮细胞的增殖,大大提高了上皮细胞的原代培养和建系成功率。

二、培养人胚鼻咽上皮细胞生物学特性研究

1. 人胚鼻咽上皮细胞形态学研究

(1) 相差显微镜观察人胚鼻咽上皮培养物的生长方式和形态特点:在培养早期,可见大量圆形细胞自组织块边缘移出,圆形细胞具有一定的折光性,向离心方向移动,并能在生长晕附近贴壁生长。接着上皮细胞从组织块移出,形成生长晕。上皮细胞呈多边形,彼此间互相嵌插,细胞核圆,居中,细胞分裂相清楚可见。少数成纤维细胞呈菱形,夹杂在上皮细胞中或分布在生长晕周围。部分培养物的生长早期可观察到少数上皮细胞有纤毛摆动,随着培养时间延长,纤毛逐渐消失。

(2) 用Olympus IMT-2型恒温培养显微缩时电影术对培养增殖的人胚鼻咽上皮细胞作动态观察,可看到细胞运动状况:自上皮细胞开始从组织块移出后的32小时内,生长晕的边缘与组织块的距离为 $230\sim 720\text{ }\mu\text{m}$,相当于以 $0.12\sim 0.37\text{ }\mu\text{m/min}$ 的速度向周围伸展。用显微缩时电影术对生长着的人胚鼻咽上皮细胞作动态观察,可看到上皮细胞从组织块移出

后,相互推挤着继续向离心方向延伸。表明组织块中所存在的细胞,在人胚鼻咽上皮细胞生长早期起重要作用。但当上皮细胞出现分裂后,尤其进入指数分裂状态后,生长晕主要由上皮细胞自身的分裂而扩大。细胞分裂后追踪两个子代细胞在 35 小时内的运动情况,结果发现人胚鼻咽上皮细胞在约 $100\ \mu\text{m}^2$ 范围内不停地上下左右来回移动,并做变形运动。同时整个细胞群体也在持续运动,单个细胞的活动与其周围细胞的活动方向基本上是一致的。

(3) 光镜下观察 Giemsa 染色的人胚鼻咽上皮培养物:可见近组织块处细胞层次较多,生长晕的中间部分呈单层,胞浆淡蓝,核紫红,细胞呈多边形。上皮细胞核仁较大,常有多核仁细胞,细胞分裂相清晰可见。生长晕的外缘处细胞扁平,密集,无分裂相。人胚鼻咽上皮细胞具有胚胎细胞的形态特点,与其旺盛的增殖能力相一致。培养早期见到的部分纤毛在一段时间后消退,究竟是由于体外环境引起的细胞类型的变化,还是反映了胚胎细胞发育过程中纤毛上皮化生为鳞状上皮的过程,尚待阐明。

(4) 扫描电镜下观察培养的人胚鼻咽组织块和细胞:移植组织块表面未见纤毛,其切割缘上皮缺损处已被上皮覆盖,此被覆上皮也未见纤毛。紧靠移植块的生长晕细胞呈多边形,鳞状排列,表面有数量不等的微绒毛。生长晕周边的细胞呈片块状或条索状排列,并互相交错形成网状间隙。片块状排列的细胞表面可见数量不等、粗短的微绒毛或胞浆突起,这些突起与相邻上皮细胞的突起之间有较宽的间隙。偶尔可见圆形或梭形的游离细胞附着于移植块和/或生长晕表面,有的伸出伪足与相邻的上皮细胞的胞浆突起相连接。

(5) 透射电镜下观察培养的人胚鼻咽组织块和细胞:透射电镜下鼻咽移植组织块可见 3 种改变。①细胞呈多层化,表层为变性、坏死的细胞。细胞表面的纤毛已消失,仅有数量不等的微绒毛。胞浆显示电子致密,含有数量不等的内质网池或类粘原颗粒,有的尚留有纤毛柱状细胞的残迹。②移植块发生鳞状化生,细胞呈复层排列。表层细胞呈扁平形,胞浆内张力原纤维突出;中间层细胞呈多形性(椭圆形、梭形或多边形),胞浆内除张力原纤维外还有少量扩张的内质网和类黏原颗粒,底层细胞呈椭圆形,含有胞浆微丝或张力原纤维,可见桥粒连接,核蛋白体较丰富。偶见类黏原颗粒及核分裂。③较厚的移植块中央处细胞层次多,表层细胞呈立方形,游离面具有数量不等的微绒毛;中间层细胞呈柱状,保留了纤柱上皮较多的正常状态。一般基底膜细胞不明显,中间层细胞多为不同分化的中间细胞。细胞中有的细胞胞浆基质透亮和(或)较致密,是含细胞器最少的低分化细胞;也有较分化的细胞,这些细胞往往同时具有鳞状细胞和柱状细胞的特征,与人胚鼻咽黏膜的过渡型上皮相似。

2. 人胚鼻咽上皮细胞生长动力学研究

(1) 细胞生长曲线及倍增时间:人胚鼻咽上皮细胞在体外培养 5 天后隔天记录培养物生长晕的大小,以细胞数为纵坐标,培养天数为横坐标,在半对数坐标纸上绘制生长曲线,根据公式 $DT = (\ln 2) / b$ 求出其对数回归方程和指数方程,并计算出体外培养人胚鼻咽上皮细胞群体倍增时间为 2.43 ± 0.16 天 ($X \pm SE$)。生长曲线显示培养物呈 Gompertz 曲线特征,即生长晕的早中期有一段直线或近似于直线的增长,随着观察时间延长,曲线趋向平段。因此人胚鼻咽上皮细胞只是在一定的时间内符合指数增长的规律,这一点与某些实验性肿瘤的生长规律大致相似。而用显微缩时电影术追踪观察的两个子代细胞,其中一个子代细胞经过 29 小时 41 分钟后再次分裂成两个细胞,另一个子代细胞的周期是 35 小时 27 分钟。根据 18 个细胞分裂过程的观察表明,细胞分裂期平均为 33.0 ± 5.7 ($X \pm SD$) 分钟,其中分裂前期



为 7.8 ± 3.9 分钟, 中期为 11.9 ± 5.0 分钟, 后期为 7.5 ± 3.6 分钟, 末期为 5.8 ± 2.4 分钟。

(2) 核素的分布、定位和定量的方法: 嘌呤和嘧啶碱基是细胞 DNA 合成的前体, 标记有放射线核素的碱基加入培养细胞液中, 可以掺入到细胞 DNA 的合成。人胚鼻咽上皮细胞在体外培养 10 天后, 分别以浓度为 3.7×10^{10} Bq/mL 和 7.4×10^{11} Bq/mL 的 ^3H -TdR 进行体外脉冲双标记, 于 5%CO₂、37℃ 培养箱中继续培养 24 小时。细胞经过洗涤, 固定, 涂乳胶, 干燥后, 于暗室中曝光, 经显影后, 在显微镜下计数标记的细胞数 (核或细胞质有银染颗粒) 占总细胞数的百分率, 作为标记指数。动力学参数实验结果表明人胚鼻咽上皮细胞的生长周期为 68 小时。培养物经放射自显影处理后被标记的细胞具有聚集分布的特点, 浓标记细胞银粒密集如墨, 而浅标记细胞核上的银粒却较稀疏清晰。在生长带处 (Leadingedge) 少见标记。因此所谓生长带很可能是生长晕周围分化成熟的细胞, 是经上皮细胞向外推进挤压而形成的部分, 这一点与相差显微镜下观察及组织化学研究相符。

(3) 软琼脂集落形成率: 取对数生长期的人胚鼻咽上皮细胞, 用 0.25% trypsin / 0.02% EDTA 液充分消化制成单细胞悬液, 以 1×10^4 个细胞/皿接种于上层为 0.33% 琼脂的培养基内, 置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养 14 天, 在倒置显微镜下计数人胚鼻咽上皮细胞的落形成率为 0.38%。

3. 组织化学研究 采用组织化学技术研究酸性酯酶 (ANAE)、乳酸脱氢酶 (LDH) 及 β -葡萄糖醛酸酶 (β -GA), 在原代培养的人胚鼻咽上皮细胞中的活性与分布规律。研究结果显示: ANAE 和 LDH 在上皮细胞中呈强阳性反应, 在纤维细胞中呈弱阳性或阴性反应; 而 β -GA 在上皮细胞和纤维细胞中均呈弱阳性或阴性反应。ANAE 主要在细胞浆中呈弥散性分布、LDH 主要分布于核膜附近的胞浆中。原代培养的鼻咽上皮细胞中 ANAE、LDH 及 β -GA 的反应强度和反应产物分布的特点均符合人鼻咽鳞状上皮特征, 与形态学研究结果较一致。

4. 永生化人鼻咽上皮细胞系的建立 为了进一步阐明鼻咽癌的发病机制, 人们试图建立鼻咽癌发展不同阶段的体外模型, 包括原代培养、永生化、癌前病变、恶性转化等发展不同阶段的细胞模型, 以探讨相关瘤基因、抑瘤基因、EBV 及化学致癌物等在鼻咽癌发生发展过程中的相互影响及协同作用的机制。有学者曾用 EBV 感染人胚鼻咽上皮细胞或用 EBV 瘤基因转染人胚鼻咽上皮细胞, 但均未能使人胚鼻咽上皮细胞永生化或发生恶性转化, 仅诱导人胚鼻咽上皮细胞体外生存期延长及部分生物学特性改变。Sai Wah Tsao 等近来用 SV40 病毒大 T 抗原及 HPV16E6/E7 病毒瘤基因转染人鼻咽上皮细胞, 分别获得了 NP69SV40T 和 NP39E6/E7 两株永生化人鼻咽上皮细胞系, 并对该两株细胞进行了一系列的生物学特性研究, 为鼻咽癌发病机制的研究打下了良好的基础。

第二节 培养人鼻咽上皮细胞的恶性转化研究

细胞转化是指正常细胞发生了不可逆性的遗传改变而引起恒定表型改变的事件, 致使细胞一系列的生物学特性发生改变, 由有限生长繁殖的细胞转变成无限生长繁殖的永生化细胞。体外培养细胞转化可分为自发性转化和人工诱发体外培养细胞转化。自发性转化

(spontaneous transformation) 是指体外培养的细胞在无任何诱变剂存在的条件下, 由于细胞本身基因不稳定, 细胞在传代过程中发生自发性转化而获得永生性, 细胞生长特性发生改变, 失去生长接触抑制, 可无限繁殖传代, 但自发性转化的频率非常低, 一般介于 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 。人工诱发体外培养细胞转化, 是指在人工设计的诱变因素作用下使细胞发生转化。如正常细胞在致癌物或致突变因素作用下发生基因异常, 细胞获得永生性 (immortality) 和致瘤性 (tumorigenicity) 等异常表型。人工诱导方法一般用放射、致突变化学物质、病毒以及外源基因等因素处理细胞, 引起细胞产生遗传改变而发生转化, 所转化的细胞系可分为一般转化和恶性转化。一般转化细胞系可在体外有不正常的生长表型, 且具有无限增殖的能力和“不死性”, 其生长和生物学特性仍近似于正常二倍体细胞, 但在免疫缺陷小鼠体内不能侵袭生长形成肿瘤。而恶性转化 (malignant transformation) 细胞相似于癌细胞, 其主要有 3 个特征: ①由有限分裂的细胞变为无限增殖的细胞, 获得“不死性”, 成为永久化细胞系。②细胞不正常自主性生长, 丧失细胞接触性抑制、过饱和密度、无停泊依赖等正常细胞生长特点, 表现为无控制生长。③致瘤性, 细胞可在免疫缺陷小鼠体内浸润生长形成肿瘤。致瘤性是判断恶性转化或一般转化细胞系最主要的指标, 恶性转化细胞可在免疫缺陷小鼠体内侵袭生长形成肿瘤。

一般细胞系在体外获得永生性后, 可无限传代培养, 但仍视作“正常”细胞模型, 如常用的鼠 NIH3T3 成纤维细胞, Hacat 人永生表皮细胞, L-02 人正常肝细胞, HEK293 人胚肾上皮细胞, HBE 人支气管上皮细胞, HUVEC 人脐静脉内皮细胞等。恶性转化的细胞系已具有恶性表型特征, 是研究恶性细胞特征的有用模型, 对于研究癌变原理和可疑致癌因素的作用有很大的实用价值。一般而言小鼠细胞较人的细胞易于转化, 成纤维细胞较上皮细胞易于转化。转化细胞的诱导因素包括以下数种: ①化学因素, 常用的有亚硝基哌嗪 (DNP)、甲基硝基亚硝基胍 (MNNG)、甲基胆蒎和甲基甲磺醌等。②物理因素, 如放射线照射、温度、电磁波等。③生物因素, 如毒素、黄曲霉毒素、病毒等, 用 EBV 转染淋巴细胞易引起转化, SV40 病毒易将正常细胞转化成为恶性细胞。④用外源基因转染细胞诱发细胞转化, 现已获得较高的转染率, 转化的外源基因包括癌基因如 ras、myc, 病毒瘤基因如 SV40LT 抗原基因, 端粒酶基因等。

本章节主要讨论化学致癌物 (chemical carcinogen) 引起的转化。Percivall Pott 最早发现男性烟筒清扫工患阴囊癌的比率增高; Volkman 和 Bell 观察到长期与液状石蜡和煤焦油接触的工人易患皮肤癌; Rehn 也报道了经常接触苯胺的工人易发生尿道膀胱肿瘤。这些早期的观察结果促使人们开始进行化学诱癌动物实验。1915 年 Yamagiwa 和 Ichikawa 反复用煤焦油涂擦兔耳成功诱发了皮肤癌, 从此科学家们开始致力于研究煤焦油中活化的致癌物, 并证实为多环芳烃。续后 Cook 等多位科学家进一步证实多种化学致癌物与动物肿瘤的关系, 从而为人类认识化学致癌物提供了一系列的有意义的实验证据。常见的化学致癌物主要分为 3 大类: ①多环芳香烃类, 如 3, 4-苯并芘、甲基胆蒎、二甲基苯蒎等。②亚硝胺类, 如甲基亚硝基胍、甲基硝基亚硝基胍、亚硝基哌嗪等。③芳香胺与偶氮染料类, 如 2-萘胺、联苯胺、二甲基偶氮苯、4-氨基偶氮苯等。根据化学致癌物作用的方式可将其分为直接致癌物、间接致癌物、促癌物 3 大类: ①直接致癌物, 是指这类化学致癌物进入机体后能与体内细胞直接作用, 不需要代谢就能诱导正常细胞癌变的化学致癌物。②间接致癌物, 是指这类化学致癌物进入机体后需要经体内微粒体混合功能氧化酶活化, 变成化学性质活泼的形式



方具有致癌作用的化学致癌物。③促癌物，是指这类化学物质单独作用于机体内无致癌作用，但能促进其他致癌物诱发肿瘤形成。化学致癌物能与细胞 DNA、RNA、蛋白质等生物大分子共价结合而导致细胞损伤，其攻击的靶为细胞癌基因和抑癌基因，从而引起癌基因的激活和抑癌基因的灭活。化学致癌物诱发的肿瘤常表现为特定的基因位点改变，即这种特定的基因位点改变与化学致癌物类型有关，或与肿瘤类型有关。如烷化剂引起 G→A 碱基置换，苯并芘引起 G→T 改变；在人肺癌 K-Ras 基因常见 G→T 的改变，而结肠癌中 K-Ras 基因则常呈 G→A 变化；抑癌基因 p53 的突变热点是外显子 5~8，在人结肠癌中 p53 主要的突变类型为 G→A，但是在原发性肝癌中却主要是密码子 249 G→T 转换，这种特定位点的改变主要见于中国或南非肝癌患者，被认为与黄曲霉毒素的暴露有关。随着细胞培养技术的发展和创断，人们得以直接利用培养的人体细胞进行化学诱癌实验和观察转化细胞的生物学特性。自 Kakanaga1978 年首次成功地诱发正常人纤维母细胞恶性转化以来，已有不少人体细胞体外转化的报道。曹亚等曾用甲基硝基亚硝基胍 (MNNG) 多次处理人胚鼻咽上皮细胞，仅诱导细胞生存期延长和部分生长动力学改变及多层生长的非典型上皮灶，但未能使细胞发生恶性转化。而陈主初等用亚硝基哌嗪 (DNP) 处理人胚鼻咽上皮细胞后成功诱发了恶性转化。

一、人胚鼻咽上皮细胞恶性转化诱导

1. 诱发 (Initiation) 阶段 细胞转化是细胞在诱发因素的直接作用下而使 DNA 发生损伤，在诱发实验中，首先要使诱变剂直接接触细胞，但剂量过大、作用时间过长会使细胞死亡而导致转化失败，其剂量和时间应控制在即可使细胞损伤而又不死的范围 (一般为 6~24 小时)。以人胚鼻咽上皮细胞转化为例，按上述方法从水囊引产的人胚中取鼻咽黏膜进行原代培养，并用机械法和差别胰酶消化法多次纯化鼻咽上皮细胞，使之保持旺盛的生长力。当鼻咽上皮细胞长至 50% 左右汇合面，分裂相较多时，吸出生长培养液，加入无血清培养液培养 24 小时，再更换含 DNP (终浓度 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的新生长培养液，37℃ 避光培养 24 小时，弃去含 DNP 的培养液，Hanks 平衡盐溶液洗 2 次，加新生长培养液继续培养。48 小时后用 DNP 重复处理 1 次。此后，实验组和对照组细胞在完全相同的条件下常规换液、传代培养观察。由于细胞体外转化需要增加细胞分裂的次数，为此须将 DNP 处理的细胞作反复多次的原瓶和换瓶传代。

2. DNA 的损伤与修复阶段 在合适的诱变剂存在情况下，体外培养的细胞 DNA 发生损伤，但此时细胞仍存活，细胞为了自身的生存而进行 DNA 的自我修复，因细胞本身就有许多自我修复 DNA 的酶存在，其修复过程是复杂的，但在复杂的 DNA 修复过程中，也难免会发生修复错误，错误的修复可引起 DNA 结构的改变，修复结束后，这种改变了的 DNA 结构就被固定下来而不可逆转。这就标志着细胞 DNA 发生了遗传性改变。在合适的条件下这种细胞就不断生长繁殖。

3. “转化灶 (Fous)” 形成阶段 一般认为人体细胞的恶性转化是一个多因素、多步骤的过程，至少分为激发和促进两个阶段。人胚鼻咽上皮细胞在 DNP 处理早期生长缓慢，体积变小，难以扩增，在经过 “Crisis” 危险期后细胞开始迅速增殖，分裂相增多，呈 “岛状生长”，并可连续传代培养。这一现象可能与 DNP 处理的细胞须经过环境选择有关，而 “Crisis” 期是细胞恶性转化的一个重要转折阶段。在诱变剂处理体外培养的细胞后，并非所

有的细胞都受到损伤和打击而发生启动,进入转化阶段的细胞仅属一小部分(约为5%),这些细胞称癌前细胞(precancerous cell),散在分布于未受损伤的细胞之中,随着细胞的不断生长繁殖,那些未受损伤的正常细胞由于接触抑制的限制而停止运动,细胞分裂消失。但那些散在的癌前细胞由于失去了接触抑制,加上生长繁殖的速度变快,而进行持续不断的分裂增殖,导致在局部癌前细胞的数量增多而堆积,呈厚厚的多层排列,最后形成了明显可见的“转化灶”。将“转化灶”细胞进行克隆分离和纯化后,继续扩大培养,冻存保种,一般在体外传代培养60次以后即可获得稳定转化细胞系。这些细胞在经过“Crisis”期以后逐渐获得不死性,具有无限增殖的能力,并丧失正常细胞生长接触抑制和停泊依赖性生长等特征,在免疫缺陷小鼠体内可浸润生长形成肿瘤。

二、转化人胚鼻咽上皮细胞的生物学特性研究

1. 生长特性改变 取体外生长10个月的转化细胞,消化成单个细胞后以 5×10^4 细胞/瓶接种于21个25 mL培养瓶内,隔天换半量培养液,每天取3瓶细胞计数,将平均细胞数绘制在坐标纸上,然后以细胞数的对数作为时间的函数,求出对数生长期细胞的直线回归方程,根据回归方程的斜率 b ,按公式 $DT = (\ln 2)/b$ 计算其群体倍增时间为48.93小时,比正常人胚鼻咽上皮细胞的DT明显缩短;低血清培养时,正常细胞生长缓慢,10天左右基本脱落死亡,而转化细胞在低血清培养时尚能生长,20天前后消化细胞传代仍可存活;41℃高温条件下,正常与转化细胞都未能生长存活。

2. 细胞形态改变 相差显微镜下观察,正常人胚鼻咽上皮细胞单层培养时,排列紧密,形态一致,细胞呈多边形,彼此相嵌,胞核圆,居中,细胞分裂相可见。而DNP诱发的人胚鼻咽上皮转化细胞呈圆、椭圆、多边形,排列紊乱,但无重叠生长。电镜观察,这些转化细胞形态不规则,有的高度曲折凹陷,核膜弯曲折叠;核仁增多,且形状不规则;胞浆内核糖体丰富;细胞表面出现许多微绒毛;细胞间可见桥粒结构。

3. 软琼脂培养生长 正常人胚鼻咽上皮细胞未见到集落形成,而第30代和第70代的转化细胞在软琼脂培养基中能以集落形式生长,集落形成率分别为20.10%和24.00%。可见转化细胞已获得停泊非依赖性生长特性,但集落形成率并没有随着体外不断传代培养而显著增加。

4. 染色体异常 经常规染色体和G显带分析,转化细胞染色体为非整倍体,数目波动在62~77,其众数为74,并出现结构异常的“标记染色体”。

5. 体内致瘤实验 转化细胞接种裸鼠后10天左右,在接种部位长出肿块,其致瘤率为75%,组织学检查表明,构成肿块的细胞具有恶性特点,形态不规则,多形性,核大,染色深,细胞排列密集,与周围的宿主结缔组织差别明显,符合低分化癌。而对照组细胞在接种后3周仍未见肿块形成。经DNP处理的人胚鼻咽上皮细胞,体外寿命明显延长,形态改变,染色体异常,并表现出停泊非依赖性生长和体内致瘤性,显然具有恶性转化的特征,电镜观察符合分化差的恶性上皮细胞形态,从而证明单纯DNP不仅可在体内诱发大鼠鼻咽癌,而且可诱发体外培养的人胚鼻咽上皮细胞恶性转化。迄今,建立转化细胞系的成功率仍然很低。通常用原代培养的正常细胞或已建成的正常永生化细胞系进行转化,能否建成转化细胞,除要选择合适的细胞系外(遗传性状过于稳定的细胞不易转化),对转化方法的选择也



很关键。转染外源病毒基因,如SV40LT,可大大提高转化率,该方法在国内外已广泛应用。从转基因小鼠组织取材建立转化细胞系在国外已有一些报告,我们用该方法从转LMp1基因小鼠鼻咽上皮组织中建立了一株恶性转化细胞系,该方法的应用不仅提高了细胞建系率,而且可使那些用常规细胞培养方法很难建立的细胞系,通过转基因动物可以建立携带某种特异靶基因的细胞系,为细胞培养和细胞系的建立开创了新的途径。

第三节 人鼻咽癌细胞系的建立及其生物学特性研究

在体外建立系列人癌细胞系,对于探讨癌症的发病机制,研究细胞分化与瘤基因表达的关系,以及EBV等因素在鼻咽癌发病过程中的作用,寻找鼻咽癌新的治疗手段等方面都有着十分重要的意义。由于癌细胞在体内和体外一样具有无限生长和无限分裂能力,因此,癌细胞建系成功率比正常细胞要高。但癌细胞在体外长期培养并不容易,特别是建系成功率很低,一般只有百分之几的成功率。这主要是由于从体内到体外环境的改变。一方面是癌细胞离体后,由于外环境改变,不能从间质吸取营养和不能获得周围环境生长因子的刺激,从而影响癌细胞生长;另一方面,取材培养的肿瘤组织除癌细胞外还含有多种细胞成分,包括血细胞、血管内皮细胞、肌肉细胞、间质细胞等,在体外培养中,这些细胞有一定存活期限,它们摄取和消耗培养基中有限的营养和产生代谢产物,从而影响癌细胞的生长。特别是成纤维细胞生长速度快,存活时间长,对癌细胞生长最为不利。针对癌细胞建系存在的问题国内外研究人员对细胞培养技术进行了多方面的改进,包括:①提高癌细胞原代培养成功率,采用无血清或低血清培养基,可以抑制成纤维细胞生长和降低其对癌细胞生长不利的影响,同时补充癌细胞生长必要的成分,如上皮生长因子、转铁蛋白、胰岛素等。事实上仅少数建立的癌细胞系是采用无血清培养基,这可能与无血清培养需加入其他价格昂贵的成分和制备烦琐有关。②接种癌细胞于成纤维细胞饲养层上,有利于癌细胞的生长。③及时有效地除去成纤维细胞的干扰。随着组织培养技术的不断革新和培养基的改进,国内外癌细胞建系技术也逐渐趋向成熟,促使癌细胞建系的成功率不断提高。

一、鼻咽癌细胞的原代培养

1. 取材 鼻咽癌组织分别取自初诊低分化鼻咽癌患者。组织取出后立即放入含有青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 g/mL)和卡那霉素(100 g/mL)的DF或RPMI-1640完全培养液中,尽快进入组织细胞培养程序。鼻咽癌细胞原代培养的方法和程序与上述正常人胚鼻咽上皮细胞的培养基本相似。

2. 癌细胞的分离与培养 鼻咽癌组织含有一定的间质细胞和血细胞,可将癌组织置于含有Hanks平衡盐溶液的平皿中,用眼科镊尽量除去结缔组织和血污,再用弯眼科剪将组织剪成 0.1 mm^3 左右的小块,Hanks液洗数次,用胰蛋白酶(trypsin)或胶原酶(collagenase)将癌组织消化分散成单细胞悬液接种培养。由于鼻咽癌活检组织取材一般较小,用酶消化法往往难以获得足够有活力的细胞,而采用上述组织块培养法可获得较好的效果。癌细胞在体外培养初期往往生长增殖较慢,同时夹杂有多种细胞成分,须及时排除纤维