

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0082 - 02

Cyclin D₁ 蛋白在碳酸锂对抗黄曲霉素 B₁ 诱导大鼠肝癌过程中的表达及意义

杨光红,张爱华,洪峰,陆爽

(贵阳医学院预防医学系,贵州 贵阳 550004)

摘要 目的与方法:应用免疫组化法检测碳酸锂(Li₂CO₃)对抗黄曲霉素 B₁(AFB₁)诱导大鼠肝癌过程中癌基因蛋白 cyclin D₁ 的表达及意义。结果:cyclin D₁ 在诱癌早期(实验第 6 周)即有表达,第 10 周显著增高,差异均有显著性(P < 0.01)。阳性对照组(B)组 cyclin D₁ 蛋白阳性率最高,碳酸锂同时给药组(C组)及先期给药组(D组)阳性率显著降低,C组阳性率略高于 D 组。结论:Li₂CO₃ 可明显对抗 AFB₁ 诱导肝癌过程中 cyclin D₁ 的表达,通过抑制细胞的持续性增殖从而起到抗癌作用。cyclin D₁ 的免疫组化检查有助于肿瘤的早期发现和追踪观察。

关键词:cyclin D₁; 碳酸锂; 黄曲霉毒素; 大鼠肝癌

中图分类号:R730.231 文献标识码:A

THE EXPRESSION OF CYCLIN D₁ PROTEIN OF LITHIUM CARBONATE ON THE DEVELOPMENT OF RAT HEPATIC CARCINOMA INDUCED BY AFLATOXIN B₁ AND ITS SIGNIFICANCE

YANG Guang - hong, ZHANG Ai - hua, HONG Feng, LU Shuang

(Department of Preventive Medicine, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: Purpose and Methods: Using immunohistochemical assay, the expression of cyclin D₁ protein of lithium carbonate on the development of rat hepatic carcinoma induced by aflatoxin B₁ and its significance were studied. **Results:** The expression of cyclin D₁ occurred in the early stage (the 6th week) and significantly increased in the 10th week. The positive rate of positive control group (B) was the highest and that of group treated with Li₂CO₃ simultaneously (C) and group pre-treated with Li₂CO₃. (D) significantly decreased, but group C > group D. **Conclusion:** It suggested that Li₂CO₃ has the effect on anti-expression of cyclin D₁ in aflatoxin B₁ induced rat hepatic carcinoma, and can restrain cell continuous proliferation, so it may be anticarcinogenic; and that the immunohistochemical assay of cyclin D₁ may help early diagnosis and monitoring.

Key words: cyclin D₁; Li₂CO₃; AFB₁; rat hepatic carcinoma

近年,癌症已成为威胁人类生命和健康的首要疾病,且发病年龄日益年轻化。据报道,人类肿瘤的发生 80% 与环境化学因素有关。随着科学技术的进步和工农业生产的发展,人们接触化学物质的机会与日俱增。化学致癌仍是一个严重隐患,对其防治研究不

仅意义重大,亦迫在眉睫。

既往研究已表明碳酸锂具有抗突变、抑瘤作用^{1~3}。本实验研究应用 AFB₁ 诱导的大鼠肝癌模型,以肝组织细胞周期调节蛋白 cyclin D₁ 为观察指标,进一步探讨碳酸锂的抗癌作用及其机理。

收稿日期:1999 - 08 - 03; 修订日期:1999 - 11 - 27

基金项目:贵州省自然科学基金资助项目(D96 - 8)

作者简介:杨光红(1975 -),女,贵州人,在读硕士研究生,卫生毒理学专业。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 健康 Wistar 大鼠 100 只,体重 155-175g,雌雄各半,由贵州省药品检验所提供。

1.2 主要试剂、抗体及来源 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、N-2 乙酰氨基芴(2AAF)、二甲基亚砜(DMSO),美国 Sigma 公司产品。碳酸锂(Li₂CO₃),分析纯(AR),上海试剂二厂。ABC 试剂盒,北京中山生物技术有限公司。单克隆抗体 cyclin D₁,美国 DA KO 公司产品,工作浓度 1:50。

2 方法及步骤

2.1 大鼠肝癌前期病变模型:采用陈志英等建立的“AFB₁+2AAF+肝 2/3 切除(PH)”的大鼠肝癌短期体内实验模型。

2.2 实验动物分组及处理 上述 100 只大鼠,随机分为四组,每组 25 只,单笼饲养。

A 组:阴性对照组,于模型建立的第 3、4 周每天腹腔注射 DMSO 0.2ml/100g. bw,每周 6 次。

B 组:阳性对照组,即肝癌模型组。AFB₁+2AAF+肝 2/3 切除(PH)

C 组:碳酸锂同时给药组,模型建立期内,每天饲以 Li₂CO₃60mg/kg. bw,每周 6 天。

D 组:碳酸锂先期给药组,在给予 AFB₁ 前两周,预先饲以 Li₂CO₃ 60mg/kg. bw/天,每周 6 天,其余处理同 C 组。

2.3 观察方法

于实验第 6、10 周分批断头处死动物,取肝脏组织块固定于 10%中性福尔马林,石蜡包埋,4μm 连续切片,进行 HE 染色和免疫组化染色。

2.4 观察指标及测定方法

2.4.1 一般状况:所有动物每周定期称体重一次,并随时观察进食情况、中毒症状及死亡情况。

2.4.2 肝组织形态学检查:以 1987 年全国实验肿瘤病理专题座谈会纪要所制定标准进行判定²。

2.4.3 肝组织细胞周期素 D₁(cyclin D₁)免疫组化染色

取石蜡切片用 ABC 法进行染色,以 PBS 代替 I 抗作为阴性对照。以细胞核出现棕黄色为阳性着色,用高倍视野(×400)计数,每例计数 1000 个细胞中 cyclin D₁ 阳性的细胞数,并计算其阳性率(%)。统计学处理采用 PEMS 软件作 *t*、*t* 检验。

结果

1 一般状况及肝组织形态学检查

A、C、D 三组动物一般状况良好,活动正常;B 组动物活动减少。各组均有因肝切除失血而死的个别动物。组织学检查 A 组无明显异常;B 组可见肝细胞增生灶、大小不一增生结节、细胞排列紊乱及少量核深染、巨核等典型恶性病变特征;C、D 两组动物肝细胞增生灶明显减少,无增生结节形成,病变程度显著减轻。

2 cyclin D₁ 的表达(见附表)

附表 各处理组 cyclin D₁ 阳性率(%)

组别	6wk		10wk	
	动物数 (只)	$\bar{x} \pm s$	动物数 (只)	$\bar{x} \pm s$
A	8	0.23 ±0.21	9	0.39 ±0.31
B	9	42.00 ±7.24 **	9	72.16 ±18.24 * * ▼▼
C	9	15.28 ±5.17 **	10	32.74 ±9.24 * * ▼▼
D	10	13.87 ±4.91 **	9	30.17 ±7.73 * * ▼▼

注:与阴性组比较: * * $P < 0.01$;与阳性组比较: $P < 0.01$;与 6wk 比较: ▼▼ $P < 0.01$

整个实验期间, B、C、D 各组阳性率均高于 A 组,差异有显著性($P < 0.01$);C、D 组显著低于 B 组($P < 0.01$);C、D 两组间无显著性特异($P > 0.05$);第 10wk 与第 6wk 相比,B、C、D 各组阳性率差异有显著性($P < 0.01$)。

讨论

细胞周期的紊乱将导致肿瘤性增殖⁴。在细胞周期中,G₁ S 的转变关系到整个细胞周期的启动。目前发现 G₁ 期的调节因子与癌变关系最为密切,而 G₁ 期相关的细胞周期素主要是 D 型,即细胞周期素 D(cyclin D)⁵。cyclin D 可分 D₁、D₂ 和 D₃ 亚型,有组织特异性。其中 D₁ 是由定位于 11q13 的 CCND1 基因编码,合成于 G₁ 早期,主要作用于 G₁ S 转换,使细胞进入 S 期,完成 DNA 复制。其过度表达时,可使细胞持续增殖。现已为比较肯定的原癌基因⁶。

本研究中,肝癌模型组(B 组)病理形态学呈现典型的癌变征象,cyclin D₁ 表达阳性率最高;同时给药组(C 组)及先期给药组(D 组)病理形态学显示病变

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0084 - 03

流式细胞术 AV 与 PI 双参数法检测胃癌早期凋亡的定量研究

周宏平¹,王 绪¹,张南征²,黄 健³

(1. 徐州医学院 肿瘤病学教研室,江苏徐州 221002; 2. 解放军第 97 医院 肿瘤科,江苏徐州 221002; 3. 徐州医学院附属医院 中心实验室,江苏徐州 221002)

摘要 目的:应用流式细胞术 AV/PI 法研究胃癌组织的早期凋亡情况。方法:手术标本分离单细胞悬液,经 AV - FITC 与 PI 标记后流式细胞仪测定凋亡率。结果:分离的单细胞经标记检测后可明确区分凋亡细胞、坏死细胞与活细胞的比例;其比例关系在肿瘤组织与对照组之间有显著性差异。结论:AV/PI 双参数法流式细胞仪检测可用于胃癌组织的早期凋亡的检测,为胃癌的临床研究提供可行方法。

关键词:Annexin V; PI; 胃癌; 细胞早期凋亡; 定量分析

中图分类号:R735.204 文献标识码:A

QUANTIFICATION OF EARLY APOPTOSIS OF GASTRIC CARCINOMA WITH AV AND PI BY FLOW CYTOMETER

程度显著减轻,无典型癌结节出现,其 cyclin D₁ 表达阳性率均显著降低;C 组阳性率略高于 D 组,两组间虽无统计学意义 ($P > 0.05$),但 D 组 cyclin D₁ 表达下降趋势优于 C 组,且动物一般状况明显好于 C 组。本研究结果表明 Li₂CO₃ 能明显抑制 AFB₁ 诱导肝癌的作用,其作用机制可能与抑制 cyclin D₁ 和细胞周期依赖性激酶 (CDK) 结合,阻止成视网膜细胞瘤蛋白 (Rb) 与转录因子 (E₂F) 分离, E₂F 失活,从而阻止细胞进入 S 期,抑制细胞持续性增殖有关⁶。另外,本研究在诱癌早期 (第 6 周) 即观察到 cyclin D₁ 异常,随着病情发展, cyclin D₁ 表达逐渐增强,提示该指标较为敏感。因此对其进行动态监测,有助于肿瘤的早期发现、早期诊断和追踪观察。

鉴于多数组织中 cyclin D₁ 蛋白水平较低,免疫组化染色很弱被定为阴性,而 50% 以上肿瘤组织免疫染色呈阳性⁵,并且在癌变早期组织形态学发生明显改变之前, cyclin D₁ 蛋白即已表达,说明其免疫组化染色较单纯的组织学检查更灵敏,因此可作为肿瘤的辅诊指标应用于临床。

碳酸锂作为一种临床用药已有 70 多年历史,主要用于治疗某些精神病、白细胞减少、甲状腺机能亢进等。本实验研究发现锂可抑制 AFB₁ 诱导肝癌过程中的 cyclin D₁ 的表达,提示锂的抗癌作用可能与抑制细胞持续性增殖有关。锂具有广泛的生物学活性,来源容易,成本低廉,口服易吸收,因此可望在抗肿瘤治疗中发挥作用。

参考文献:

- 1 张爱华,张桥. 碳酸锂抗诱变作用的研究 J. 卫生毒理学杂志, 1995, 9(1): 17 - 21.
- 2 张爱华,黄晓欣,罗鹏. 碳酸锂对荷瘤鼠的抑瘤、防癌作用研究 J. 中国药理学通讯, 1996, 13(2): 34 - 36.
- 3 蔡冬坡,吴易元. 锂增强小鼠 LAK 细胞活性及其体内抗肿瘤作用的研究 J. 中华微生物和免疫学杂志, 1994, 14(1): 37 - 40.
- 4 陆劲松,邵志敏,等. 周期蛋白及其在肿瘤研究中的进展 J. 中国癌症杂志, 1998, 8(2): 148 - 151.
- 5 高鹏,王美清. 细胞周期 D 与细胞癌变 J. 国外医学肿瘤学分册, 1998, 25(2): 72 - 75.
- 6 谭立军,沈忠英,汤雪明. 细胞周期调控与肿瘤 J. 肿瘤, 1997, 17(5): 295 - 97.

收稿日期:1999 - 06 - 21; 修订日期:1999 - 11 - 25
基金项目:江苏省科委社会发展基金资助项目(BJ98110)
作者简介:周宏平(1969 -) ,男,江苏泗阳人,主治医师,硕士研究生。