

碳酸锂对抗黄曲霉素 B₁ 诱导大鼠肝癌前病变过程中 P²¹、Bcl - 2 蛋白的表达

张爱华¹ 洪 峰¹ 黄晓欣²

¹贵阳医学院预防医学系 贵阳 550004 ²解放军第 44 医院 贵阳 550009

摘要 采用肝癌发生的动物模型,观察了碳酸锂(Li₂CO₃)对抗黄曲霉素 B₁(AFB₁)诱发的大鼠肝癌前病变的组织形态学变化及其 P²¹、Bcl - 2 蛋白的表达状况。Wistar 大鼠 144 只随机分为 A、B、C、D 4 组,分别为阴性、阳性对照及 Li₂CO 同时给药和 Li₂CO₃ 先期给药组。于实验第 6、9、10wk 分批断头处死动物,取动物的肝脏进行组织形态学检查及免疫组织化学染色。结果发现:C、D 两组动物健康状况明显改善,肝癌前病变程度明显减轻;P²¹、Bcl - 2 蛋白在诱癌早期(实验第 6wk)即有表达,第 9、10wk 显著提高,呈 B 组 > C 组 > D 组 > A 组的趋势,与各组肝脏组织形态学变化一致。提示:Li₂CO₃ 具有明显地对抗和预防化学诱导肝癌的作用,P²¹、Bcl - 2 蛋白的动态检测有助于肝癌的早期发现及判断预后。

关键词 P²¹;Bcl - 2;碳酸锂;大鼠肝脏;癌前病变

EXPRESSION OF P²¹ AND Bcl - 2 PROTEIN IN AFB₁-INDUCED RAT HEPATIC PUTATIVE PRENEOPLASTIC LESIONS ALLEVIATED BY Li₂CO₃

Zhang Aihua¹, Hong feng¹, Huang Xiaoxin²

¹Department of Prevention Medicine, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, ²44th Hospital of PLA Guiyang 550009

Abstract In order to observe the histopathological change and the expression of P²¹ and Bcl - 2 protein in Aflatoxin B₁(AFB₁)-induced rat hepatic putative preneoplastic lesions alleviated by lithium carbonate(Li₂CO₃). 144 healthy Wistar rats(155g ~ 175g) were divided randomly into four groups(A, normal control group; B, positive control group; C, group treated with Li₂CO₃ simultaneously; D, group pre-treated with Li₂CO₃) and sacrificed in batches in the 6th, 9th or 10th week of the experiment. Histopathological assay and immunohistochemical assay of P²¹ and Bcl - 2 protein was made on hepatic. The result showed that the severity of preneoplasm alleviated in Group C and Group D, and that, coinciding with the histopathological discoveries, a tendency of "Group B > Group C > Group D > Group A" could be found in observation of P²¹ and Bcl - 2 protein expressive, which occurred in the early stage (the 6th week) and significantly increased in the 9th, 10th week. It suggested that Li₂CO₃ has definite anticarcinogenic and preventive effect on hepatoma induced by chemicals and the continual analysis of P²¹ and Bcl - 2 protein may help early discovery and prognostic judgment of hepatoma.

Key words P²¹; Bcl - 2; Li₂CO₃; Rat hepatic; Preneoplastic lesion

近年研究表明,刺激细胞增殖的 ras 癌基因产物 P²¹ 蛋白和细胞程序性死亡(PCD)的 Bcl - 2 蛋白的过量表达与肿瘤的发生发展有关 P^(1,2,3)。我们既往的研究发现,锂有明确的抗突变,抑瘤防癌及抗氧化损伤作用,与抗癌药物联合应用可增效降毒等 P^(4,5,6)。但目前国内外尚未见到有关 P²¹、Bcl - 2 蛋

白在 Li_2CO_3 对抗化学诱导大鼠肝癌前病变过程中表达的研究报道。本研究在既往工作基础上,探讨 AFB_1 诱导大鼠肝癌前病变过程中 P^{21} 、 $\text{Bcl} - 2$ 蛋白的表达情况、从分子毒理学角度探讨 Li_2CO_3 对抗化学诱导肝癌的作用机理,为肝癌的易感性预测,早期发现及预后判断等方面提供理论参考依据。

材料与方法

1 Wistar 大鼠 144 只,体重 155 ~ 175g,雌雄各半,由贵州省药品检验所提供。随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 36 只:A 组:阴性对照组,于模型建立的第 3、4wk 每天腹腔注射二甲亚砜(DMSO) 0.2ml/100g. b. w;B 组:阳性对照组,采用 $\text{AFB}_1 + \text{N} - 2$ 乙酰氨基芬(2AAF) + 肝 2/3 切除(PH)的大鼠肝癌短期实验模型⁽⁷⁾;C 组: Li_2CO_3 同时给药组,模型建立期内,每天饲以 Li_2CO_3 60mg/kg. b. w;D 组: Li_2CO_3 先期给药组,在给予 AFB_1 前预先连续 2wk 饲以 Li_2CO_3 60mg/kg. b. w,其余处理同 C 组。于实验第 6、9、10wk 分批断头处死动物,取肝脏作常规病理检查,以文献标准进行判定⁽⁸⁾。取相同部位组织块固定于 10% 中性福尔马林,石蜡包埋,4 μm 连续切片,进行免疫组化(ABC 法)检测。

2 AFB_1 , 2AAF 为 Sigma 公司产品; Li_2CO_3 、AR、上海试剂二厂产品; P^{21} (F235), $\text{Bcl} - 2$ (N - 19) 单克隆抗体为北京中山生物技术有限公司提供,工作浓度 1:50;ABC 试剂盒由华美生物工程公司提供。免疫组化染色步骤按试剂盒说明书进行,每次染色均用 PBS 代替 P^{21} 、 $\text{Bcl} - 2$ 单克隆抗体作为阴性对照,阳性着色为棕黄色, P^{21} 蛋白阳性染色定位胞膜及胞浆, $\text{Bcl} - 2$ 蛋白阳性染色定位核膜及胞浆。观察各处理组 P^{21} 、 $\text{Bcl} - 2$ 阳性反应病例和着色强度,结合细胞着色率,计算其半定量统计指数。参照 Garcia⁽⁹⁾,王塞枫⁽¹⁰⁾判断方法进行半定量分级: . 细胞无着色为

0,浅棕黄色着色为 1,中等着色为 2,深棕色为 3; . 细胞阳性着色比例 < 5% 为 0, < 20% 为 1, 20 - 50% 为 2, > 50% 为 3;以上两项相加 0 为 (-), 1 ~ 2 为 (+), 3 ~ 4 为 (H), 5 ~ 6 为 (H)。统计学采用 PEMS 软件进行 t 、 χ^2 和秩和检验。

结果

1 一般状况:

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。各组均有个别动物死亡(主要因肝切除失血而死)。

2 肝组织形态学检查:

A 组:各阶段处死动物之肝脏,除个别见轻度充血外,外观正常,表面光滑,无可见结节。组织学检查:第 6wk 无任何异常病理变化,第 9、10wk 仅见部分肝窦充血,少量炎性细胞浸润。

B 组:第 6wk 肝脏外观未见异常,镜下可见肝细胞混浊肿胀,有水样变性及点状坏死,肝窦内卵圆细胞轻度增生,个别区域间质炎性细胞浸润;第 9、10wk 60% 的动物肝脏萎缩,表面密布直径 2 ~ 4mm 大小不一的灰白色结节,腹腔内有大量淡黄色渗出液。镜下可见肝细胞变性坏死加剧,出现嗜酸、嗜碱、透明、混合肝细胞增生灶及大小不一的增生结节,结节外肝细胞索消失,细胞排列紊乱、拥挤,可见大量梭形、圆形、卵圆形细胞增生,汇管区胆小管增生,见少量双核、核深染、巨核细胞。

C、D 两组:第 6wk 肝脏大体检查无异常;第 9、10wk 表面无光泽,但未见肝脏萎缩,表面无结节,腹腔内也未发现渗出液。组织学检查在性质上与 B 组相似,但肝细胞的变性坏死及卵圆细胞增生均显著减轻,嗜酸、嗜碱、透明及混合肝细胞增生灶显著减少,无增生结节出现。

3 P^{21} 、 $\text{Bcl} - 2$ 蛋白的表达(表 1、2、3)

表 1 各处理组 P^{21} 蛋白阳性细胞率(%)

组别	6 WK		9 WK		10 WK	
	动物数(只)	$\bar{x} \pm s$	动物数(只)	$\bar{x} \pm s$	动物数(只)	$\bar{x} \pm s$
A	10	3.11 \pm 2.99	11	3.64 \pm 3.24	11	3.82 \pm 2.87
B	8	13.67 \pm 7.58 **	8	25.50 \pm 13.47 **	8	23.64 \pm 10.24 **
C	8	5.78 \pm 4.12	8	7.43 \pm 5.83	8	9.28 \pm 6.80 *
D	9	3.48 \pm 3.19	10	4.33 \pm 3.92	10	7.08 \pm 6.72

t 检验:各组与阴性组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

C、D 组与阳性组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$

9、10 WK 与第 6 WK 比较: $P < 0.05$

表 2 各处理组 Bcl - 2 蛋白阳性细胞率(%)

组别	6 WK		9 WK		10 WK	
	动物数(只)	$\bar{x} \pm s$	动物数(只)	$\bar{x} \pm s$	动物数(只)	$\bar{x} \pm s$
A	10	3.28 ±2.45	11	3.16 ±3.26	11	3.54 ±3.70
B	8	13.63 ±8.10 **	8	23.70 ±11.61 **	8	29.28 ±11.93 **
C	8	7.41 ±7.56 *	8	7.71 ±6.41 *	8	8.75 ±6.62 *
D	9	2.94 ±2.39	10	5.42 ±4.98	10	6.78 ±6.56

t 检验:各组与阴性组比较: * P<0.05 ** P<0.01

C、D 组与阳性组比较: P<0.05 P<0.01

9、10 WK 与第 6 WK 比较: P<0.05

P²¹ 蛋白的阳性产物定位于胞膜及胞浆,Bcl - 2 蛋白的阳性产物定位于核膜及胞浆,尤以小细胞(卵圆细胞,梭形细胞)明显,反应性高。从表 1、2 可见,A 组在整个实验过程中 P²¹、Bcl - 2 均处于低表达水

平。B 组 P²¹、Bcl - 2 阳性细胞率在第 6、9、10WK 均高于 A、C、D 组,且随时间的动态发展其表达逐渐增高,均有统计学意义。

表 3 各处理组 P²¹、Bcl - 2 阳性病例百分率及半定量统计结果

组别	动物数(只)	半定量统计指数								百分率(%)			
		P ²¹				Bcl - 2				P ²¹		Bcl - 2	
		-	+	##	###	-	+	##	###	阳性数	百分率	阳性数	百分率
A *	32	23	9	0	0	24	8	0	0	9	28.1	8	25.0
B	24	3	10	8	3	4	5	11	4	21	87.5	20	83.3
C *	24	12	8	4	0	14	6	4	0	12	50.0	10	41.7
D *	30	20	8	2	0	20	8	2	0	10	33.3	10	33.3

秩和检验: P²¹ H = 29.00 P < 0.01 各组与阳性组比较: * P < 0.01

Bcl - 2 H = 31.51 P < 0.01 各组与阳性组比较: * P < 0.01

² 检验: P²¹ $\chi^2 = 22.6986$ P < 0.01 各组与阳性组比较: * P < 0.01

Bcl - 2 $\chi^2 = 21.2287$ P < 0.01 各组与阳性组比较: * P < 0.01

表 3 可见,B 组的半定量统计指数和阳性病例百分率与 A、C、D 组比较均具有显著性差异。

讨论

在动物实验性肝癌的阻断试验研究中,肝细胞的增生性病变(包括增生灶,增生结节)被认为是特异性的肝细胞癌前病变。本研究 C、D 两组动物在肝癌的发生发展过程中与 B 组相比肝细胞增生灶(嗜酸、嗜碱、透明及混合肝细胞增生灶)明显减少,无增生结节形成,卵圆细胞增生减少,病变程度显著减轻,说明 Li₂CO₃ 能有效地抑制癌前病变的生成,具有一定地对抗化学诱导肝癌的作用。

实验中观察到 B 组在第 6wk 时病理组织学无明显异常,但 P²¹、Bcl - 2 蛋白均过度表达,并随病变发展(第 9、10wk)而表达增强,而 C、D 两组在实验第 9、

10wk 其 P₂₁、Bcl - 2 表达略高于第 6wk,但均显著低于 B 组。各组两指标表达趋势一致,呈 B 组 > C 组 > D 组 > A 组。提示在肿瘤的始发阶段 P²¹、Bcl - 2 基因即开始失控,使细胞处于活化状态,其促进细胞增殖,抑制细胞凋亡的作用加强,并随病变加重该作用增强。根据 P²¹、Bcl - 2 蛋白的生物学功能,推测 Li₂CO₃ 可使细胞出现 G1 期阻滞,影响癌前病变细胞 DNA 复制,从而抑制细胞增殖,增强细胞凋亡的诱导,在一定程度上对抗及预防了肝癌的发生发展。

综上, Li₂CO₃ 具有明显地对抗和预防化学诱导肝癌的作用; P²¹、Bcl - 2 蛋白在肝癌发生发展中起一定作用; Li₂CO₃ 对抗及预防肝癌的发生发展与其抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用可能有关; P²¹、Bcl - 2 蛋白表达水平的动态检测有助于肝癌的早期发现及判断预后。

中药天宝肿宁散抗肿瘤细胞生物学作用的研究

周俊¹ 刘德祥¹ 张月明² 闫浩² 孙健玲²

¹ 兰州军区乌鲁木齐总医院临床医学研究所 830000 ² 新疆医学院

摘要 采用体外细胞培养法观察“天宝肿宁散”复方对人膀胱癌细胞(EJ)、人喉癌细胞(Hep-2)、人低分化粘液腺胃癌细胞(MGC-803)、人肝癌细胞(Q3)和人肺癌细胞(Spc-A-1)等肿瘤细胞及小鼠成纤维细胞(3T3)的生物学作用,并观察该方剂对正常小鼠和经环磷酰胺(CP)处理小鼠的免疫机能、外周血象、造血功能及生存质量的影响。其结果显示该方剂具有一定杀伤肿瘤细胞的作用,并对环磷酰胺(CP)的毒副作用具有减毒效应。

关键词 中药复方;抗肿瘤;环磷酰胺

THE EXPERIMENTAL STUDY ON THE ANTITUMOR EFFECT OF “TIAN BAO ZHONG NING SAN”

Zhou Jun¹, Liu Dexiang¹, Zhang Yueming², Yan Hao², Sun Jianling²

¹Urumqi General Hospital, Lanzhou Military Command, ²Xinjing Medical College

Abstract The antitumor effects of Chinese herbs “Tian Bao Zhong Ning San” were studied on cells of fibroblast lines of mouse (3T3), bladder carcinoma cell lines (EJ), throat carcinoma cell lines (Hep-2), stomach carcinoma cell lines (MGC-803), hepatic carcinoma cell lines (Q3) and lung carcinoma cell lines (SpC-A-1) with cultured cells in vivo. And the decreasing toxicity effects of the prescription with normal mice and cyclophosphamide (CP) treated mice were also studied. The results showed that “Tian Bao Zhong Ning San” have the effects of antitumor, and could decrease the toxicity of CP.

Key words Chinese herbs; antitumor; cyclophosphamide

参考文献

- 翁毅,林芷英,汪青. Hras 癌基因与肝癌浸润转移相关性的初步探讨. 肿瘤, 1997;17(1):43
- 李健学,李学明. 肺癌及高危人群中的癌基因蛋白和抑癌基因蛋白. 国外医学卫生学分册, 1995;22(3):159
- 姜涛,刘锐. Bcl-2 基因在食管癌组织中的表达与意义. 第四军医大学学报, 1997;18(1):83
- 张爱华,张桥. 碳酸锂抗诱变作用的研究. 卫生毒理学杂志, 1995;9(1):17
- 张爱华,黄晓欣,罗鹏,等. 碳酸锂对荷瘤鼠的抑瘤、防癌及抗氧化作用研究. 卫生研究, 1998;27(2):77
- 黄晓欣,张爱华,罗鹏,等. 碳酸锂对 CP 的抑瘤及毒副作用的影响. 癌变 突变 畸变, 1998;10(2):85
- 陈志英,严瑞琪,覃国忠,等. 建立黄曲霉毒素 B1 致肝癌作用体内短期实验模型的进一步研究. 广西医学院学报, 1985;2(3):17
- 中华病理学杂志编委会. 实验肿瘤病理专题座谈会纪要. 中华病理学杂志, 1988;17(2):84
- Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues: comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol*, 1989; 134:733
- 王塞枫,倪灿荣,郑茂荣,等. P⁵³, ras, c-erbB-2 蛋白在皮肤鳞状细胞中的表达. 中华皮肤科杂志, 1997;30(4):257
(1998-12-08 收稿;1999-03-18 修回)