

Expression of MDA and 4-HNE in AFB₁-Induced Rat Hepatic Putative Preneoplastic Lesions Alleviated by Li₂CO₃ and Their Significance

碳酸锂对抗 AFB₁ 诱导大鼠肝癌过程中 MDA、4-HNE 的表达及意义

黄晓欣¹/张爱华^{2,*}/洪峰²/陆爽²/岑笃才¹

(1. 中国人民解放军第44医院, 贵州 贵阳 550009; 2. 贵阳医学院公共卫生学院, 贵州 贵阳 550004)

HUANG Xiao-xin¹, ZHANG Ai-hua^{2,*}, HONG Feng²
LU Shuang², CEN Du-cai¹
(1. 44th Hospital of PLA, Guiyang 550009, Guizhou, China;
2. School of Public Health, Guiyang Medical College,
Guiyang 550004, Guizhou, China)

【摘要】背景与目的: 采用免疫组化法检测碳酸锂(Li₂CO₃)对抗黄曲霉素B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)诱导大鼠肝癌过程中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、4-羟壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)的表达情况, 探讨Li₂CO₃的抗癌作用及其机制。材料与方法: 144只Wistar大鼠随机分为A、B、C、D 4组, 分别为阴性、阳性对照及Li₂CO₃同时给药和Li₂CO₃先期给药组。于实验第6、9、10周分批断头处死动物, 取动物的肝脏进行肝组织形态学检查及免疫组织化学染色。结果: 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; MDA、4-HNE在诱癌早期(实验第6周)即有表达, 第10周显著增高, 并呈B组>C组>D组>A组的趋势。结论: Li₂CO₃具有明显地对抗和抑制化学诱导肝癌过程中的脂质过氧化(Lipid peroxidation, LPO)作用; 免疫组化法检测MDA、4-HNE可敏感而特异的反映机体氧化损伤程度, 有助于肝癌的早期发现及病变进展的动态观察。

【关键词】丙二醛; 4-羟壬烯醛; 碳酸锂; 大鼠肝脏; 癌前病变

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2005)03-0133-03

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: In order to observe the anti-carcinoma use of lithium carbonate(Li₂CO₃) and its mechanism, the histopathological change and the expression of malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal(4-HNE) protein in Aflatoxin B₁ (AFB₁)-induced rat hepatic putative preneoplastic lesions alleviated by lithium carbonate(Li₂CO₃). MATERIAL AND METHODS: One hundred and forty-four healthy Wistar rats (155~175 g) were divided randomly into four groups: normal control group (group A), positive control group (group B), group treated with Li₂CO₃ simultaneously (group C), group pre-treated with Li₂CO₃ (group D). The rats were killed in batches in the 6th, 9th or 10th week of the experiment. Histopathological and immunohistochemical assay of MDA and 4-HNE protein was made on hepatic. RESULTS: The condition of rats was significantly improved in Group C and Group D, so do the severity of preneoplasm. Coinciding with the histopathological discoveries, a tendency of "Group B > Group C > Group D > Group A" could be found in observation of MDA and 4-HNE protein expressive, which occurred in the early stage (the 6th week) and significantly increased in the 10th week. CONCLUSION: It suggested that Li₂CO₃ has obvious against or restrain lipid peroxidation effect on hepatoma induced by chemicals. The immunohistochemistry assay of MDA and 4-HNE can be used as a sensitive and specialize method to reflect oxidative damage, and it may help early finding and monitoring of hepatoma.

【KEY WORDS】 malondialdehyde; 4-hydroxynonenal; Li₂CO₃; rat hepatic; preneoplastic lesion

众所周知, 癌症的发生发展与脂质过氧化(Lipid peroxidation, LPO)密切相关。研究表明, 锂能提高荷瘤小

收稿日期: 2004-10-25; 修订日期: 2004-12-05

基金项目: 贵州省自然科学基金及卫生厅资助项目

作者简介: 黄晓欣(1955-), 男, 贵州省遵义市人, 主任医师, 研究方向: 临床毒理学

* Correspondence to: ZHANG Ai-hua Tel: 86-851-6908908, E-mail: aihuaguy@yahoo.com.cn

鼠血细胞超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutases, SOD) 活性、降低丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量^[1]。但由于血液标志物其敏感性、特异性的不足限制了对疾病的早期诊断及治疗,因此研究具有早期、敏感、特异的生物标记物已成为迫切需要。我们在既往研究工作基础上,采用免疫组化 (Immunohistochemistry avidin-biotin complex, ABC) 法动态检测黄曲霉素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 诱导大鼠肝癌过程中 MDA、4-羟壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) 的表达,探讨 LPO 在 Li₂CO₃ 诱导肝癌的发生发展中的作用以及免疫组化法测定肝组织两指标的灵敏性和特异性,为肝癌的早期发现、早期干预提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 标本 采用本室既往建立的化学诱导大鼠肝癌模型^[2]肝组织:即 144 只 Wistar 大鼠随机分为 A、B、C、D 4 组,分别为阴性、阳性对照及 Li₂CO₃ 同时给药和 Li₂CO₃ 先期给药组。A 组于模型建立的第 3、4 周每天腹腔注射二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 2 ml/kg; B 组采用 AFB₁ + N-2-乙酰氨基苄 (2-Acetylaminofluorene, 2-AAF) + 肝 2/3 切除的大鼠肝癌短期实验模型; C 组于模型建立期内每天喂饲 Li₂CO₃ 60 mg/kg; D 组在给予 AFB₁ 前预先连续两周喂饲 Li₂CO₃ 60 mg/kg, 其余处理同 C 组。于实验第 6、10 周分批断头处死动物,取肝脏固定于 10% 中性福尔马林,石蜡包埋,4 μm 连续切片,

进行苏木精和伊红染剂 (Hematoxylin and eosin, HE) 及 ABC 法检测。

1.2 方法 AFB₁、2AAF 为 Sigma 公司产品, Li₂CO₃、AR、上海试剂二厂产品;丙二醛、4-羟壬烯醛抗体为美国堪萨斯医学研究中心刘杰博士馈赠,工作浓度 1:50; ABC 试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。免疫组化染色步骤按试剂盒说明书进行,每次染色均以 PBS 缓冲液作空白对照,以正常兔血清为替代对照。

1.3 结果判断 细胞胞浆阳性着色为棕黄色, MDA 和 4-HNE 阳性染色定位于胞膜及胞浆,随机选择 5 个视野,每例计数 500 个肝细胞和出现的阳性细胞数并计算细胞阳性率。

1.4 统计学方法 实验结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析和 *t* 检验, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 肝组织形态病理学检查 B 组肝组织损伤程度明显大于其它组,呈典型的肝癌发生发展过程中病理学改变,以第 10 周损伤最为严重,肝表面密布灰白色结节,镜下见多个增生结节和增生灶;而 C、D 两组动物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。

2.2 免疫组化结果 表 1、2 可见, A 组 MDA、4-HNE 在整个实验过程中均处于低表达水平。B 组 MDA、

表 1 Li₂CO₃ 不同处理方式对大鼠肝细胞 MDA 阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Li₂CO₃ on the MDA positive rate in live cells of rats ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Sixth week			Tenth week		
	<i>n</i>	Number of cell analyse	MDA positive rate ($\times 10^{-2}$)	<i>n</i>	Number of cell analyse	MDA positive rate ($\times 10^{-2}$)
A	10	5 000	2.92 ± 3.20	10	5 000	5.20 ± 4.32
B	9	4 500	16.67 ± 7.84 ^{△△}	10	5 000	38.60 ± 24.83 ^{△△★}
C	10	5 000	6.44 ± 4.18 ^{△△}	10	5 000	10.94 ± 5.84 ^{△△★}
D	10	5 000	4.50 ± 3.14 ^{▲●}	11	5 500	6.55 ± 4.13 ^{▲●}

Compared with A: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; compared with B: [▲] $P < 0.05$; compared with C: [●] $P < 0.05$; compared with sixth week: [★] $P < 0.05$.

表 2 Li₂CO₃ 不同处理方式对大鼠肝细胞 4-HNE 阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Li₂CO₃ on the 4HNE positive rate in live cells of rats ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Sixth week			Tenth week		
	<i>n</i>	Number of cell analyse	4HNE positive rate ($\times 10^{-2}$)	<i>n</i>	Number of cell analyse	4HNE positive rate ($\times 10^{-2}$)
A	10	5 000	4.50 ± 6.78	10	5 000	5.86 ± 4.67
B	9	4 500	14.55 ± 10.36 ^{△△}	10	5 000	47.50 ± 38.17 ^{△△★}
C	10	5 000	6.30 ± 5.79 ^{△△}	10	5 000	16.36 ± 8.72 ^{△△★}
D	10	5 000	5.78 ± 7.84 ^{▲●}	11	5 500	7.91 ± 4.28 ^{▲●}

Compared with A: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; compared with B: [▲] $P < 0.05$; compared with C: [●] $P < 0.05$; compared with sixth week: [★] $P < 0.05$.

4-HNE 阳性细胞率在第 6、10 周均高于 A、C、D 组,且随时间的动态发展其表达随之增高,均有统计学意义。

子自由基、单线态氧、氮氧自由基等)能被体内的酶系统 (超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等) 和非酶系统 (维生素 E、维生素 C、牛磺酸等) 清除,维持体内氧化和抗氧化系统的动态平衡。当机体处于病理状态时,平衡破坏,过多的自由基堆积并夺取细胞膜

3 讨论

机体在正常代谢过程中产生的自由基 (如超氧阴离

不饱和脂肪酸侧链上的氢原子而启动 LPO 链式反应,产生过多的 MDA、4-HNE 等醛类代谢产物而损伤细胞结构,引起蛋白质交联变性、DNA 损伤而促进肿瘤的形成^[3]。MDA、4-HNE 为 LPO 过程具有代表性的代谢产物,目前常用硫代巴比妥酸法(Thiobabutaric acid reacting substance, TBARS)检测血清中 MDA 含量来评估机体 LPO 程度,但 TBARS 受许多与 LPO 反应无关物质如胆红素、糖、DNA 等干扰而一直受到质疑^[4]。因此,我们选择特异性强、灵敏性高的免疫组化法对肝组织中 LPO 代谢产物 MDA、4-HNE 进行检测。本实验中我们观察到 B 组在第 6 周病理组织学无明显异常时过氧化产物 MDA、4-HNE 均过度表达,并随病变发展而表达增强;C、D 两组在实验第 10 周其 MDA、4-HNE 表达高于第 6 周,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:LPO 的启动与肝癌的发生密切相关,故在肿瘤的始发阶段就有较多的 MDA、4-HNE 等醛类代谢产物产生,随着肝脏病变的发展,肝细胞的损伤加重,促进了肿瘤发展;根据本室既往在移植性肿瘤中观察到 Li₂CO₃ 具有抗肝癌 H22 和肉瘤 S180 小鼠氧化损伤作用以及增强抗氧化酶活性作用,结合本

研究结果,我们认为 Li₂CO₃ 通过参与机体抗氧化系统的调节,增强酶促防御系统清除自由基的能力,从而减轻 LPO 程度而对抗和抑制了肝癌的发生发展。

综上, Li₂CO₃ 具有明显地对抗和抑制化学诱导肝癌过程中的 LPO 作用; LPO 在化学诱导肝癌的发生发展中起重要作用;免疫组化法检测 MDA、4-HNE 可敏感而特异的反映机体氧化损伤程度,有助于肝癌的早期发现及病变进展的动态观察。

参考文献:

- [1] 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[J]. 卫生研究, 1998, 27(2): 77.
- [2] 张爱华, 洪 峰, 黄晓欣. 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[J]. 癌变·突变·畸变, 1999, 11(4): 176.
- [3] 陈 瑗, 周 玫. 自由基医学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1991. 30.
- [4] Chait A. Methods for assessing lipid and lipoprotein oxidation [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1992, 3(2): 389.

《医学综述》专题征文

创刊 10 年收到了巨大的社会效益。首先感谢广大作者辛勤写作和几十万读者的支持。

《医学综述》杂志是由卫生部主管的国家级医学专业期刊。《医学综述》已被《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》、《中文科技期刊数据库》、《中文生物学期刊文献库(CMCC)》全文收录;是中国学术期刊综合评价数据库统计源和中国期刊全文数据库全文收录期刊。为了进一步满足广大读者和作者的要求,更好地为临床和科研人员服务,缩短文章的刊载周期。《医学综述》自 2005 年扩增页码加大载文量,增加临床研究的论著文章,欢迎作者踊跃投稿。

1. 科研基金论著及综述

科学研究及研究生毕业论著与综述,都是科学研究中的宝贵资料,将其及时快速的发表,对社会具有深远的影响,是知识向财富的一个转换。对各种基金资助的课题论文及综述优先发表。对研究生的毕业论著及综述快速优惠发表。

2. 炎症专题征文

炎症是万病之源。从临床实践、实验研究均证实炎症是万病之源的科学结论。探讨炎症发生机制可能解决具体疾病的发生、发展及防治的对策。急性炎症是人类生存的重要祸根。一旦炎症发生,祸福难卜,轻者局限、康复,与命无碍;倘若很重可直接威胁生命。比如:炎症→ALI→SIRS→ARDS→MODS→MOF!

慢性炎症更是难缠的疾病,当严重时“生不如死”的感觉都有。常见有:类风湿病、桥本甲状腺炎、多种胶原病、周身脉管疾病等。

炎症专题,体裁不限,论著、研究、临床观察、综述均可。

3. 综合征专题征文

在临床工作中经常遇到综合征这一疾病诊断名称。有关这类正式出版的中西文专著不少,但多是将有“综合征”字样疾病诊断收集起来,多没有给“综合征”的概念定义明确,发病机制,如何判断是否为综合征,能否给一个科学的分类与方法。

以上专题征文体裁不限、论著、研究、临床观察、综述均可。文章格式请参见《医学综述》杂志稿约。投稿请寄打印稿一份和介绍信,同时附寄磁盘或 E-mail 及审稿费 30 元。注明联系电话、手机号和电子信箱。

投稿地址:天津医科大学第二医院《医学综述》(300211)

北京通州区北苑西关大街 116-3-164(101100)

联系电话:022-24397446 010-69514263 13920554371

E-mail: sunhf@public.tpt.tj.cn yxzs@chinajournal.net.cn

