

- 12 Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *J Neurosci Methods* 1995;57:93-99
- 13 Smith S, Sharp T. Measurement of GABA in rat brain microdialysates using o-phthalaldehyde-sulphite derivatization and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1994;652:228-233
- 14 Naini AB, Vontzalidou E, Cote LJ. Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1993;39:247-250
- 15 Bourdelais A, Kalivas PW. High sensitivity HPLC assay for GABA in brain dialysis studies. *J Neurosci Methods* 1991;39:115-121

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科北京市 100036
项目负责人: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路 30 号, 中国人民解放军空军总医院. bai_li@hotmail.com
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

摘要

目的: 进一步探讨促凋亡蛋白 Bid 在肝癌发生、发展过程中的作用。

方法: 应用基因毒性化学剂二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)制备肝癌动物模型, 通过阻断肝细胞凋亡信号传导途径, 观察肝癌发生过程中肝细胞的增生指数(BrdU LI)与凋亡比率(AI)及与肿瘤发生的关系。

结果: (1)在 DEN 用药后的第 3 d 和第 10 d, 野生型小鼠肝细胞 BrdU 标记指数和凋亡细胞百分比分别明显高于 Bid 缺陷小鼠($P < 0.05$)。 (2)在 DEN 用药后的第 4 mo, 野生型小鼠肝内损伤性结节的数量和表面积明显多于 Bid 缺陷小鼠, 二者间具有统计学意义($P < 0.001$)。

结论: Bid 缺陷小鼠对 DEN 诱导的肝癌具有明显的抵抗作用, 这一作用可能与早期肝细胞凋亡有关。

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平. 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1213-1215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1213.asp>

0 引言

细胞增生和凋亡之间的失平衡是肿瘤发生最根本的原因。细胞对任何包括化学、物理和生物的有害刺激的反应是通过自身修复、死亡、再增生等方式使机体恢复自身平衡, 细胞在损伤修复过程中的错义修复导致基因的突变使细胞获得了异常增生能力, 便发生了肿瘤。实际上, 肿瘤组织内细胞增生和凋亡比率均较正常状态的组织有明显增加, 而增生比率高于凋亡。Bid 是 Bcl-

2 家族成员中一个促凋亡蛋白, 通过死亡受体激活细胞凋亡, 尤其是肝细胞的凋亡过程。我们应用化学致癌模型和 Bid 缺陷小鼠研究细胞凋亡在肝癌发生的早期作用, 设想是早期凋亡刺激细胞增生, 发生基因变异的细胞较正常细胞具有明显的增生优势, 通过比较野生型和 Bid 缺陷鼠对 DEN 诱导致癌损伤的反应和观察细胞增生和凋亡的比率进一步探讨肝癌发生的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ C57BL/6 小鼠, 野生型和 Bid 缺陷型各 14 只 (由美国匹兹堡大学病理系荫博士提供), 分别分为 DEN 组 and 对照组。DEN 组小鼠出生后第 14 d 腹腔内注射 DEN 15 $\mu\text{g/g}$, 对照组注射同体积的生理盐水, 饲养 3、10 d 和 4 及 8 mo 分别杀鼠, 在杀鼠前 2 h 腹腔注射 30 mg/kg BrdU (Sigma, 美国), 收集肝组织标本分别放置液氮中或制备石蜡切片。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞凋亡和增生的检测 采用 TUNEL 试剂盒 (Roche, 美国) 检测肝细胞的凋亡, 操作按照说明。细胞增生的检测应用抗 BrdU 单克隆抗体 (Dako 公司, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.2 特殊酶学染色 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 染色: 冰冻肝组织切片戊二醛固定后用 2 g/L 硝酸银和 0.53 g/L G-6-Pase 共同孵育 45 min, 然后用 75 g/L 硫酸铵孵育 2 min, 水洗后用戊二醛和冰醋酸按一定比例混合固定, HE 染色封片。GST-pi 染色: 采用兔抗鼠 GST-pi 多克隆抗体 (StressGen, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.3 肝细胞损伤结节或肝肿瘤 HE 染色的肝组织切片在显微镜下观察和计数肝损伤或肝肿瘤结节的数量, 应用 SPOT 软件计量结节的面积, 求结节面积与全肝面积的比值。

统计学处理 细胞增生及凋亡指数和肝损伤结节的数量及平均面积采用 Student t 检验, P 值小于 0.05 为

有显著差异。

2 结果

2.1 肝损伤结节的形态学及酶学特点 在DEN暴露第4 mo时显微镜下有4种不同改变: (1)嗜碱性结节, 细胞体积小于正常, 核大, 核/浆比率增加, 糖原减少, 核糖体丰富. (2)空泡细胞, 细胞肿胀, 空泡变性, 体积稍大, 有脂肪积累和糖原丢失. (3)嗜酸细胞, 细胞内富含糖原, 浆内大量的嗜伊红染色. (4)储脂细胞, 胞质内较多脂滴. 此外, 可在癌变前结节发现较多卵圆细胞. 除嗜伊红结节外, 绝大部分结节呈GST-pi染色阴性, 所有结节G-6-Pase染色呈阴性. 在DEN处理8 mo后, 大部分结节周边有明显边界, 结节明显增大, 形成腺瘤样结构, 部分结节内肝细胞核深染, 可见有丝分裂征象, 细胞排列为多层结构, 具备了肝癌的形态学特征. 在对照动物未发现肝损伤结节或肿瘤.

2.2 肝损伤结节面积及数量的测定 肝内结节的面积单位为 μ^2 , 全肝面积单位为 mm^2 , 分别将结节的数量及所占全肝面积比率在相同处理时间不同基因表型间进行统计学比较(表1). 在DEN处理4 mo后, 肝内结节数量及面积在野生鼠明显多于Bid缺陷鼠($P < 0.05$), 但8 mo后, 肝结节在基因表型间的差异消失.

表1 DEN体内诱导肝损伤结节的效果

基因表型	<i>n</i>	DEN 暴露时间	平均结节面积 / 全肝面积(μ^2/mm^2)	平均结节数
野生型	10	4 mo	572 570.4±63 242.6 ^a	3.6±2.065 ^b
Bid 缺陷型	12	4 mo	79 723.6±10 771.1	1.0±0.577
野生型	11	8 mo	6.29e+07±1.33e+0	10.27±7.52
Bid 缺陷型	13	8 mo	2.14e+07±2.14e+07	9.02±4.23

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Bid 缺陷型动物.

2.3 肝细胞增生及凋亡测定 DEN处理后第3、10 d和第4、8 mo, 肝组织标本分别进行BrdU和TUNEL染色, 显微镜下计数每1 000个细胞中的阳性细胞数, 得出细胞增生标记指数(BrdU LI)和凋亡比率(AI). 结果显示, DEN暴露后3 d, 野生鼠细胞凋亡数明显高于Bid基因缺陷鼠; 但BrdU标记指数在两组间无显著差异, 均接近于对照组; 10 d后细胞凋亡在野生鼠仍明显高于Bid基因缺陷鼠, 但与第3 d水平比较无明显改变, 而在Bid基因缺陷鼠则有显著下降, 接近对照组; 此时BrdU标记指数在野生鼠显著升高, 而Bid基因缺陷鼠仍接近对照组, 组间差异明显. 提示DEN暴露后, 肝脏对损伤的反应是发生细胞凋亡, 肝细胞数量的减少继发细胞大量增生. 在DEN处理后4和8 mo再次检测BrdU标记指数发现, 野生鼠肝结节外BrdU标记指数仍显著高于Bid缺陷型, 而在8 mo肝结节内比较, 两组则无明显差异(表2).

表2 DEN肝细胞增生及凋亡指数的测定(mean±SD)

表型	<i>n</i>	DEN 暴露时间	AI	LI
Bid 缺陷型	3	3 d	11.04±2.97	33.5±8.89
野生型	3	3 d	19.83±3.21 ^a	34±6.66
Bid 缺陷型	3	10 d	7.71±3.21	24.5±5.47
野生型	3	10 d	16.21±3.24 ^a	54.06±11.99 ^a
Bid 缺陷型	11	4 mo	n.d.	1.42±0.55
野生型	7	4 mo	n.d.	3.07±1.77 ^a
Bid 缺陷型	8	8 mo	n.d.	1.05±0.50(OF)
野生型	8	8 mo	n.d.	1.97±0.47(OF) ^a
Bid 缺陷型	8	8 mo	n.d.	10.12±5.60(IF)
野生型	8	8 mo	n.d.	11.61±4.77(IF)

^a $P < 0.01$ vs Bid 缺陷型动物; n.d., 未测定; OF, 肝外结节; IF, 肝内结节.

3 讨论

普遍认为: 肿瘤的发生是异常细胞失去了对凋亡信号的反应, 使这部分细胞获得不死性或生存期明显延长, 细胞增生比例大于细胞死亡, 二者之间失去平衡. Schult-Hermann et al 少数人^[1-3]近年提出了一些不同的观点, 癌前病变的细胞对细胞凋亡信号刺激是有反应的, 细胞增生和凋亡相互间有联系, 二者在肝肿瘤发生过程中均有增高, 二者间的比率调节着细胞向恶性变发展. Grasl-Kraupp et al^[3]报道肿瘤细胞较周围正常细胞的增生和凋亡率分别高出24倍和7.5倍, 在肿瘤发生过程中伴有选择性细胞增生和死亡. 本文结果显示, 在DEN暴露的较早期, 野生小鼠肝细胞凋亡指数和增生率均高出Bid缺陷小鼠2倍; 在DEN暴露后4 mo, 野生小鼠肝内癌前损伤结节的平均数量和面积也较Bid缺陷小鼠明显增多, 从DEN暴露后4和8 mo的标本中可以观察到癌前结节向癌变进展的质变过程. 对于DEN暴露8 mo后, 野生和Bid缺陷型小鼠在肝内癌前结节和肿瘤数量及面积之间差异不再有明显区别的解釋, 目前尚无一个客观明确的认识. 根据肝细胞凋亡特点分析, 在DEN刺激下, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体首先被激活, 导致Caspase 8的活化, 后者水解Bid使之活化后诱导一系列参与凋亡的酶学反应, 最后发生肝细胞凋亡. 细胞的凋亡诱导了细胞增生, 而发生DNA损伤的肝细胞较正常肝细胞具有更大的增生潜力, 形成有遗传物质改变的、生长力旺盛的细胞克隆, 也就是癌前结节. 这一解釋受到Knight et al^[4]研究结果的支持, 他们发现在TNF受体1缺乏的鼠暴露于肝脏的致癌剂后, 肝脏卵圆细胞, 有人认为是具有增生潜力或癌变前的细胞受到损伤, 其致瘤性明显减弱. 因此他们认为TNF受体途径参与肝癌发生过程中癌前卵圆细胞的增生. TNF受体的作用是通过诱导凋亡还是其他机制有待于进一步证实. 然而, 在肝癌发生过程中由于细胞凋亡和增生均有增加, 因此他们之间的关系是十分复杂的, 在癌发生

的不同阶段他们之间的关系也可能会发生不同的改变. 我们的结果提示细胞凋亡对增生的刺激也许仅发生在肝癌发生的早期, 在肿瘤发展过程中其他因素参与, 或同一种蛋白还有其他功能, 如 Bid 是否还参与细胞周期的调节等, 有可能使其在肿瘤发生过程中的作用发生改变, 需进一步进行研究.

4 参考文献

- 1 Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Mullauer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schult-Hermann R. Inherent increase of

- apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology* 1997;25:906-912
- 2 Fausto N. Mouse Liver Tumorigenesis: Models, Mechanisms and relevance to human disease. *Seminars Liver Dis* 1999;19: 243-252
- 3 Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecky B, Mullauer L, Kammerer B, Bursch W, Schult-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998;28:717-726
- 4 Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Fausto N. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knock-out mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000

于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430000

项目负责人: 陈滋华, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科. pollex001163@com

电话: 0719-8801431 传真: 0719-8883809

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

摘要

目的: 探讨硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 增生的影响.

方法: 通过 MTT 比色法、细胞生长曲线描绘研究硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 增生的影响, 采用流式细胞仪观察硒蛋氨酸诱导 EC9706 细胞凋亡的作用及对细胞周期的影响.

结果: 硒蛋氨酸呈时间、剂量依赖性方式抑制 EC9706 细胞增生, 改变细胞周期分布, 增加 G₀/G₁ 期细胞比例, 诱导细胞凋亡.

结论: 硒蛋氨酸可能通过影响细胞周期分布和诱导细胞凋亡, 来抑制 EC9706 细胞增生. 硒蛋氨酸可能是预防和治疗食管癌的一种新方法.

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平. 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1215-1217

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1215.asp>

0 引言

食管癌在我国是常见病, 严重威胁着人类的生命健康, 其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化, 目前无论是传统手术还是化疗及放疗都未能取得满意的疗

效^[1-13]. 因此, 有必要寻找新的防治方法. 大量流行病学和临床研究发现, 微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关性. 硒是人体所必需的微量元素, 在生命过程中发挥着重要作用, 本研究的目的在于观察硒蛋氨酸对体外培养食管癌细胞系 EC9706 生长的影响, 为探讨其对食管癌防治作用提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂: RPMI-1640 培养基, 小牛血清, 胰蛋白酶、蛋氨酸为 Gibco 公司产品; MTT、DMSO、硒蛋氨酸(selenomethionine)为 sigma 公司产品. 仪器设备: 恒温 CO₂ 培养箱(SanyD 日本), 倒置显微镜(Olympus IX-70)、酶联免疫检测仪(Σ 960 美国), 流式细胞仪(Epics XL, Beckman coulter 公司). 细胞系: 人食管癌细胞系 EC9706 由中国医学科学院王明荣教授惠赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 食管癌细胞 EC9706 常规培养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养.

1.2.2 硒蛋氨酸对食管癌细胞 EC9706 生长的影响 取对数生长期的食管癌细胞 EC9706 按每孔 1 × 10⁴ 个细胞/mL 接种于 96 孔培养板中, 24 h 后换液, 加入不同浓度硒蛋氨酸 100、200、300、400、500 μmol/mL 设不接种细胞的空白对照组和只加入等体积溶剂 DMSO 的对照组. 每组浓度每个时间点设 8 个复孔, 继续培养, 于第 24、48、72、96 h 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)10 μL, 37 °C 孵育 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 轻轻振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在 490 nm 波