

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.008

香加皮三萜类化合物对大鼠食管癌增殖细胞核抗原表达的影响

王丽芳¹, 孟凡茹¹, 周艳¹, 曹青¹, 单保恩² (1. 河北医科大学第二医院检验科, 河北石家庄 050000; 2. 河北医科大学第四医院科研中心, 河北石家庄 050011)

[摘要] **目的:**探讨中药香加皮提取物三萜类化合物(triterpenes compound of cortex periplocae, TCCP)对甲基苄基亚硝胺(N-nitrosomethylbenzylamine, NMBA)诱导的大鼠食管癌组织中增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的影响。**方法:**雄性F344大鼠120只,随机分为NMBA模型组、TCCP干预组、大豆油对照组和正常对照组。模型组大鼠皮下注射NMBA, TCCP干预组大鼠同时给予皮下注射NMBA及肌注TCCP,大豆油对照组大鼠肌注大豆油,正常对照组大鼠常规饲养。分别在给药后第9、15和25周, H-E染色检测大鼠食管上皮组织病理变化,免疫组织化学SP法检测大鼠食管组织中PCNA的表达。**结果:**正常对照组及大豆油对照组大鼠食管未发现异常变化, NMBA模型组大鼠9周时,食管癌前病变发生率为20.0%, 15周时为46.7%, 25周时达93.3%。与NMBA模型组相比,第9、15周时TCCP干预组癌前病变大鼠的比例明显降低(0.0 vs 20.0%, 46.7%, $P < 0.05$)。NMBA模型组第9、15和25周时,大鼠食管上皮组织PCNA表达水平显著高于正常对照组(213.17 ± 29.74 vs 167.96 ± 20.16, 268.35 ± 39.56 vs 170.76 ± 14.79, 327.24 ± 28.19 vs 172.49 ± 17.49; $P < 0.05$);与NMBA模型组相比, TCCP干预组大鼠食管上皮组织中PCNA表达水平显著降低($P < 0.05$)。**结论:**TCCP可抑制NMBA诱导的大鼠食管癌前病变,该作用可能与其抑制PCNA的表达有关。

[关键词] 食管癌; 甲基苄基亚硝胺; 香加皮三萜类化合物; 增殖细胞核抗原(PCNA)

[中图分类号] R735.1; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0508-05

Effect of triterpenes compound of cortex periplocae on PCNA expression in rat esophageal carcinoma

WANG Li-fang¹, MENG Fan-ru¹, ZHOU Yan¹, CAO Qing¹, SHAN Bao-en² (1. Department of Laboratory, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of triterpenes compound of cortex periplocae (TCCP) on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced rat esophageal carcinoma. **Methods:** 120 male F344 rats were randomly divided into four groups: a model group treated with NMBA only and a TCCP treatment group receiving NMBA plus TCCP, a soya oil control group treated with soya oil and a normal control group. At 9, 15 and 25 weeks after treatment, the pathological changes of esophageal tissues were detected by H-E staining, while the expression of PCNA was measured by immunohistochemistry. **Results:** There were no abnormal changes in the normal and soya oil groups. At 9, 15 and 25 weeks after treatment, the incidence of preneoplastic lesion in the NMBA group was 20.0%, 46.7% and 93.3%, respectively. At 9 and 15 weeks, the rate of rat esophageal preneoplastic lesion significantly decreased in TCCP treatment group compared with NMBA group (0, 0 vs 20.0%, 46.7%, $P < 0.05$). There was a significant increase in the expression of PCNA in the NMBA group (week 9: 213.17 ± 29.74; week 15: 268.35 ± 39.56; week 25: 327.24 ± 28.19), compared with that in the normal control group ([167.96 ± 20.16], [170.76 ± 14.79], [172.49 ± 17.49], $P < 0.05$). TCCP significantly decreased the expression of PCNA compared with that in the NMBA group ($P < 0.05$). **Conclusion:** TCCP inhibits NMBA-induced rat esophageal carcinoma probably via suppression

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30772752),河北省自然科学基金资助项目(No. C2008000952)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30772752), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2008000952)

[作者简介] 王丽芳(1971-),女,博士,副主任检验师,主要从事肿瘤免疫研究。E-mail: wanglf2h@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail: baoenshan@hotmail.com

of PCNA expression.

[**Key words**] esophageal carcinoma; N-nitrosomethylbenzylamine; triterpenes compound of cortex periplocae; proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 508-512]

食管鳞癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤,全球食管鳞癌发病数有一半在中国,其高发区居民达 9 000 万。阻断癌前病变的发展是降低肿瘤发病率和病死率的主要措施^[1-2]。食管癌前病变的早期发现、早期诊断、早期治疗是降低食管癌发生率的重要举措^[3-4]。研制对食管癌前病变有效的逆转分化药物是降低高发区食管癌发生率的理想方法。前期研究^[5-7]发现,中药香加皮提取物三萜类化合物(triterpenes compound of cortex periplocae, TCCP)在体内对食管癌细胞生长有明显的抑制作用,为探讨其对食管癌前病变的防治作用,本研究选用甲基苄基亚硝胺(N-nitrosomethylbenzylamine, NMBA)诱发 F344 大鼠,成功构建了大鼠食管癌前病变模型,观察 TCCP 对诱癌大鼠食管上皮的病理形态学变化及增殖细胞核抗原(proliferating cellular nuclear antigen, PCNA)表达的影响,明确 TCCP 对大鼠食管癌前病变的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

NMBA(纯度 >98%)购自日本 NARD 公司,临用前将 NMBA 溶于 0.9% 生理盐水中,应用剂量为 0.5 mg/kg,皮下注射。TCCP 由华北制药集团新药研究开发中心分离纯化,由羽扇豆烷乙酸酯(lupeol acetate of cortex periplocae, CPLA)及其类似物组成, CPLA 纯度为 85% 以上,临用前用注射用大豆油(江西金海棠公司)溶解,给药剂量为 20 mg/kg,肌肉注射。兔抗鼠 PCNA 多克隆抗体购自北京中杉金桥有限公司,免疫组织化学染色用 SP 试剂盒及 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物有限公司。

1.2 动物模型的建立及分组

120 只健康雄性 F344 大鼠,5~6 周龄,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号: SCXX(沪)20070005。大鼠适应环境饲养 2 周,随机分为 NMBA 模型组($n = 45$)、TCCP 干预组($n = 45$)、大豆油对照组($n = 15$)和正常对照组($n = 15$)。NMBA 模型组大鼠皮下注射 0.5 mg/kg NMBA, TCCP 干预组大鼠同时给予 0.5 mg/kg NMBA 皮下注射及 TCCP 20 mg/kg 肌肉注射,大豆油对照组大鼠肌注大豆油 1 ml/kg,正常对照组大鼠常规饲养。给

药方案参照文献[8],每周 3 次,连续给药 5 周。分别在给药后第 9、15 和 25 周时取正常对照和大豆油对照组大鼠各 5 只、NMBA 模型组和 TCCP 干预组各 15 只大鼠,麻醉后解剖大鼠,留取食管组织。

1.3 食管上皮病理组织学检测

取大鼠咽至胃的食管切成纵条组织,用 10% 甲醛固定,常规石蜡制片, H-E 染色,光镜下观察食管组织病理学变化。癌前病变病理分级^[9-10]为: 0 级,正常食管鳞状上皮,无变化; I 级,增生型病变分为基底细胞增生、单纯性增生和乳头状增生; II 级,癌前病变分为上皮细胞不典型增生、上皮细胞早期浸润、乳头状瘤; III 级,癌分为原位癌、浸润型癌和乳头状癌。

1.4 免疫组织化学 SP 法检测大鼠食管上皮组织 PCNA 蛋白的表达

上述各组大鼠食管标本行石蜡切片,常规脱蜡至水,经过过氧化氢液封闭内源性过氧化物酶,然后以 SP 法染色,即切片经抗 PCNA 单克隆抗体(1:50 稀释)处理过夜后,依次经生物素化二抗、碱性磷酸酶-链霉亲和素工作液处理 30 min,常规 DAB 棕色显色液显色 3 min,苏木精轻度衬染,脱水透明,封片。镜下观察组织中出现明确的棕色反应时即判断为阳性。阴性对照采用 PBS 代替一抗体。结果判定标准: PCNA 阳性着色定位于细胞核,细胞核被染成棕黄色或褐色,呈颗粒型或弥漫型。阳性表达计算方法: 每个高倍视野计算阳性细胞,然后计算单位面积的阳性细胞数,任选 10 个视野。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数的比较采用单因素方差分析,方差齐时用 SNK-q 检验作两两比较,方差不齐时采用 Tamhance T2 作两两比较。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 模型大鼠食管上皮组织的病理学变化

在诱癌开始后的 9、15、25 周,正常对照组及大豆油对照组大鼠食管黏膜除上皮细胞层内间或存在少量炎性细胞外,无其他异常表现;鳞状上皮薄厚均匀;基底细胞层规整,单层整齐排列,核梭形,整齐排列; NMBA 模型组大鼠随诱癌时间的延长,食管上皮

明显增厚, 至 25 周时达正常的 4~5 倍, 部分区域乳头状增生明显, 乳头状瘤形成。与同期 NMBA 模型

组相比, TCCP 干预组大鼠在诱癌开始后 9、15、25 周, 大鼠食管鳞状上皮增生程度均有所改善(图 1)。

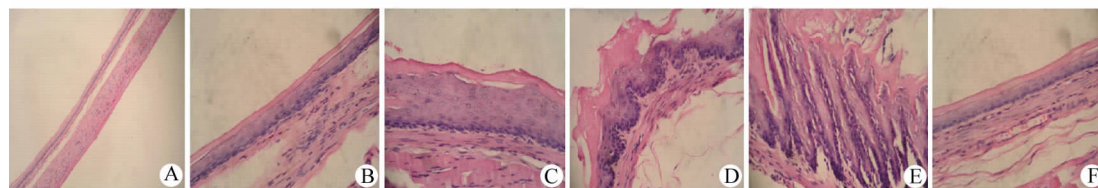


图 1 TCCP 对 NMBA 模型大鼠食管上皮组织病理变化的影响 (H-E)

Fig. 1 Effect of TCCP on pathological changes of esophageal epithelium tissues in NMBA model rats (H-E)

A: Normal esophageal epithelium group (×100); B: Soya oil control group (×100); C, D and E: NMBA group (×400); F: TCCP group (×400)

2.2 TCCP 抑制 NMBA 模型组大鼠癌前病变发生率
NMBA 模型组大鼠于诱导食管癌开始后第 9 周时癌前病变发生率为 20.0%, 15 周时为 46.7%, 至 25 周时达 93.3%。TCCP 对 NMBA 诱导的大鼠食管癌前病变的抑制作用(表 1)。与 NMBA 模型组大

鼠相比, 诱食管癌开始后 9、15 周时, TCCP 干预组大鼠食管上皮癌前病变大鼠比例明显降低 ($P < 0.05$); 25 周时, TCCP 对诱癌大鼠癌前病变的抑制率达 64.3%, 与 NMBA 模型组相比有明显差异 ($P < 0.05$)。

表 1 TCCP 对 NMBA 诱导大鼠食管癌前病变形成的影响

Tab. 1 Effect of TCCP on rat preneoplastic esophageal lesion formation induced by NMBA

Time after treatment (t/week)	Group	N	Pathological change				
			Normal	Grade I (dysplasia)		Grade II (preneoplastic lesion)	
				n	n	Incidence	n
9	Control	5	5	0	0	0	0
	Soya oil	5	5	0	0	0	0
	NMBA	15	3	9	9/15	3	3/15
	TCCP + NMBA	15	9*	6	6/15	0	0
15	Control	5	5	0	0	0	0
	Soya oil	5	5	0	0	0	0
	NMBA	15	0	8	8/15	7	7/15
	TCCP + NMBA	15	8*	7	7/15	0	0*
25	Control	5	5	0	0	0	0
	Soya oil	5	5	0	0	0	0
	NMBA	15	0	1	1/15	14	14/15
	TCCP + NMBA	15	0	10	10/15	5	5/15*

* $P < 0.05$ vs NMBA group

2.3 TCCP 抑制 NMBA 模型组大鼠食管上皮组织 PCNA 的表达

各组大鼠食管上皮组织均出现不同程度的 PCNA 表达, 正常对照组阳性表达细胞主要位于基底细

胞层的第1~2层(图2A)。NMBA模型组大鼠食管上皮PCNA表达随诱癌时间的延长而表达增强,阳性细胞数增多(图2B、C、D);诱癌开始后9、15和25周时食管上皮PCNA表达水平分别为(213.17 ±

29.74)、(268.35 ± 39.56)、(327.24 ± 28.19),均显著高于同时期正常对照组($P < 0.05$);与NMBA模型组相比,TCCP干预组大鼠食管上皮组织中PCNA表达水平均显著降低($P < 0.05$,表2,图2E、F)。

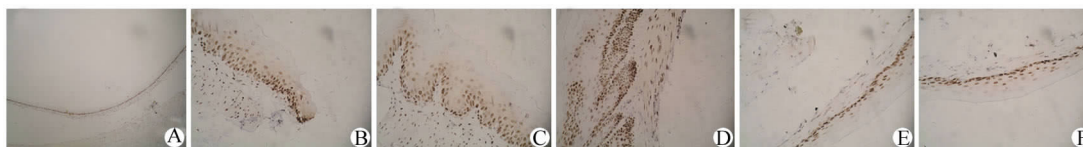


图2 TCCP抑制NMBA模型组大鼠食管上皮组织PCNA的表达(SP)

Fig. 2 TCCP inhibited PCNA expression in esophageal epithelium tissues in NMBA model rats (SP)

- A: Low-level PCNA staining in normal esophageal epithelium ($\times 100$);
 B, C: Increased PCNA expression in dysplastic esophageal epithelium ($\times 400$);
 D: Increased PCNA expression in a NMBA-induced papilloma at week 25 ($\times 400$);
 E, F: Low-level PCNA expression in TCCP treatment group ($\times 400$)

表2 TCCP对NMBA诱导大鼠食管癌PCNA表达的影响

Tab. 2 Effect of TCCP on PCNA expression in NMBA-induced rat esophageal carcinoma

Group	9 week	15 week	25 week
Control	167.96 ± 20.16	170.76 ± 14.79	172.49 ± 17.49
Soya oil	162.75 ± 22.25	172.29 ± 13.95	175.10 ± 22.48
NMBA	213.17 ± 29.74*	268.35 ± 39.56*	327.24 ± 28.19*
TCCP + NMBA	185.28 ± 22.98 [△]	200.56 ± 28.19 [△]	282.23 ± 37.43 [△]

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs NMBA group

3 讨论

为探讨TCCP对食管癌前病变的影响,本研究建立了大鼠食管癌前病变模型。将NMBA(0.5 mg/kg)皮下注射于F344大鼠,每周3次,共给药5周,在实验的特定阶段,对食管上皮组织行病理学检测。结果显示,NMBA模型组大鼠食管上皮组织的病变遵循一定的发展规律,从上皮的基底细胞活跃增生开始,演变为上皮单纯增生与乳头状增生,然后进一步形成了多种乳头状瘤(即癌前病变)。实验期间未发现大鼠有早期食管癌的发生,NMBA模型组大鼠在诱癌9周时食管上皮组织多数出现单纯性增生,有2/15大鼠食管上皮出现不典型增生,15周时有46.7%、25周时有93.3%的大鼠出现癌前病变的表型,25周以内未发现有早期癌变产生。因此可见,本研究成功构建了食管癌前病变模型。

肿瘤是由多种致癌因素经过多阶段所导致的恶性病变。细胞的恶性病变多数经历启动阶段、促进阶段和演进阶段。启动阶段属于癌前病变,而癌前

病变是肿瘤发生的前兆变化,癌前期细胞具有可逆性,可向原位癌发展,经过治疗也可逆转为正常细胞,因此,此期的防治具有重大意义。在肿瘤的形成过程中,若施加某些有效的干预因子,可阻断肿瘤的发生、发展^[11-12]。众所周知,食管癌的发生、发展要经过基底细胞增生→不典型增生→癌,在这一过程的早期阶段,病变是可以逆转的,并不是所有的癌前病变都注定要发展成癌,即具有双向分化性^[13]。本研究在诱癌的初期给予TCCP进行药物干预,目的在于观察TCCP对病变的预防及早期的逆转作用。本研究结果显示,与NMBA模型组相比,诱癌开始后9、15周时,经TCCP干预的大鼠中,食管上皮癌前病变的比例明显降低。诱癌25周时,与NMBA模型组相比,TCCP对大鼠癌前病变的抑制率达64.3%,表明TCCP对食管癌前病变的发生有一定的抑制作用。

PCNA是一种相对分子质量为36 000 Da的酸性核蛋白,是DNA多聚酶的辅助蛋白,可调节DNA多聚酶 δ 的活性。PCNA随细胞增殖周期的不同而

变化, G_1 后期开始增加, S 期达高峰。PCNA 参与 DNA 合成, 而 DNA 合成又是细胞分裂增殖的必要条件, 因此, PCNA 与细胞增殖关系密切, 可作为评价肿瘤细胞增殖状态的重要指标, 也在某种程度上反映了肿瘤的恶性程度^[14-16]。陶仪声等^[17]用免疫组化方法检测了 189 例食管鳞癌癌旁上皮及原位癌组织中 PCNA 的表达, 发现在正常组织及基底细胞增生组织中 PCNA 多表达在基底层和副基底层, 呈单层排列; 在不典型增生的组织中, PCNA 的阳性细胞带上移, 达 2~5 层不等, 达到上皮的中层; 原位癌时 PCNA 阳性细胞更多, 弥漫排列, 杂乱无章, 三者之间有显著差异。这说明正常上皮基底细胞有一定的增殖, 但不典型增生及原位癌中细胞增殖活性明显提高。增殖活性的提高可能与癌变过程相关, 亦可作为判断食管上皮癌变的指标之一。许多研究^[18-21]也证明, PCNA 表达在食管癌前病变过程中具有重要作用, PCNA 的临床随访监测对食管癌前病变患者的疗效和预后估价具有重要意义。本研究结果显示, 在正常食管上皮中主要是基底层细胞 PCNA 表达阳性, 在不典型增生组织中上皮全层均可表达 PCNA, 食管癌前病变组织中 PCNA 表达水平显著增高, 提示细胞处于增殖活跃状态。经 TCCP 干预可显著降低食管癌前病变大鼠食管组织 PCNA 的表达水平。由此可见, 早期应用 TCCP 干预对模型大鼠食管癌前病变有明显的抑制作用, 这可能与抑制 PCNA 的表达有关。

本研究用 NMBA 成功诱导了大鼠食管癌前病变模型, TCCP 的干预可抑制食管癌前病变的发展, 该作用可能通过下调食管上皮组织 PCNA 表达, 调节细胞周期的进程, 从而影响食管上皮细胞的增殖, 延缓食管癌前病变的发生, 但详细作用机制还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 陈正言. 我国食管鳞癌前病变研究回顾与思考 [J]. 中国肿瘤, 2006, 15(10): 653-658.

[2] Wei WQ, Yang J, Zhang SW, et al. Esophageal cancer mortality trends during the last 30 years in high risk areas in China: Comparison of results from national death surveys conducted in the 1970's, 1990's and 2004-2005 [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(7): 1821-1826.

[3] Yang J, Wei WQ, Niu J, et al. Estimating the costs of esophageal cancer screening, early diagnosis and treatment in three high risk areas in China [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(5): 1245-1250.

[4] 张思维, 张敏, 李光琳. 2003-2007 年中国食管癌发病与死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2012, 21(4): 241-247.

[5] 王丽芳, 刘丽华, 马毓梅, 等. TCCP 抑制食管癌 Eca109 细胞裸鼠成瘤及其机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(6): 611-615.

[6] 王丽芳, 卢安, 孟凡茹, 等. 香加皮三萜类化合物对实验性大鼠食管癌的阻断作用及机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(1): 23-27.

[7] Wang LF, Lu A, Meng FR, et al. Inhibitory effects of lupeol acetate of cortex periplocae on N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis [J]. Oncol Lett, 2012, 4(2): 231-236.

[8] Reen RK, Dombkowski AA, Kresty LA, et al. Effects of phenylethyl isothiocyanate on early molecular events in N-nitrosomethylbenzylamine-induced cytotoxicity in rat esophagus [J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6484-6492.

[9] 林培中, 杨简, 赵三妹. 亚硝酸诱发大鼠食管癌的一些特性以及癌变的病理学及组织发生学的观察 [J]. 肿瘤学: 附刊, 1979, 6(2): 88-93.

[10] 汤钊猷, 主编. 现代肿瘤学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 257-261.

[11] Li Y, Wo JM, Liu Q, et al. Chemoprotective effects of curcuma aromatica on esophageal carcinogenesis [J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(2): 515-523.

[12] Stoner GD, Chen T, Kresty LA, et al. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: Potential mechanisms [J]. Nutr Cancer, 2006, 54(1): 33-46.

[13] 陈正言. 食管黏膜癌变过程中组织细胞增殖、凋亡和 p53 表达的变化 [J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(8): 918-920.

[14] Scovassi AI, Prosperi E. Analysis of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) associated with DNA [J]. Methods Mol Biol, 2006, 314(11): 457-475.

[15] Otsuka S, Aoyama T, Furu M, et al. PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(4): 529-538.

[16] 熊晖, 孙宁, 姚运红, 等. CK、Tubulin- β 和 PCNA 在鼻咽癌放疗后复发组织中的表达及意义 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(2): 161-165.

[17] 陶仪声, 宗永生. P53 及 PCNA 的异常表达在食管上皮增生和癌变过程中的意义 [J]. 癌变·畸变·突变, 2002, 14(2): 87-90.

[18] 李卉, 王洪江, 陈艳, 等. c-Myc 与 PCNA 在哈萨克族食管癌组织中的表达及其临床相关性研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(6): 433-435.

[19] 符宝敏, 谭红文, 张庆远. PCNA 和 C-erbB-2 在食管癌的表达及临床意义 [J]. 中国实用医药, 2007, 2(33): 61-62.

[20] 邹继彬, 黄广恩, 陈鸿莲. 食管癌 survivin 和 PCNA 的表达及其临床意义 [J]. 中国医师杂志, 2005, 7(7): 898-900.

[21] 蔡宜玲, 袁马驰, 陈瑾, 等. P16/MIS1 蛋白及 PCNA 在食管癌组织中的表达及相互关系 [J]. 肿瘤基础与临床, 2008, 20(5): 382-384.

[收稿日期] 2012-05-11

[修回日期] 2012-07-16

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳