

· 基础研究 ·

全反式维甲酸逆转家兔颊黏膜癌前病变实验研究*

徐志彬¹, 赵鹏², 高扬¹, 王士杰¹, 吴明利^{1△}

(1. 河北医科大学第四医院内镜科, 河北石家庄 050011; 2. 河北联合大学附属医院普外科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 评价全反式维甲酸逆转兔颊黏膜鳞状上皮癌前病变的效果。方法 在已制备的兔鳞状上皮癌前病变模型上, 贴附全反式维甲酸(ATRA)药膜, 分别采用病理组织学、免疫组织化学及流式细胞术观察病理变化、癌基因及抑癌基因蛋白的表达, 以及细胞的凋亡及增殖情况。结果 12 周后, 对照组 16 只家兔中 2 只逆转, 6 只病情稳定, 8 只恶化; ATRA 组 16 只家兔中 7 只逆转, 7 只稳定, 2 只恶化; 免疫组织化学显示, 随 ATRA 逆转实验进行, 增殖细胞核抗原(PCNA)、Bcl-2 蛋白表达下降, P53 蛋白表达上升, 凋亡率上升, 增殖指数降低。结论 ATRA 有望成为有效的颊黏膜鳞状上皮癌前病变阻断药物。

关键词:口腔黏膜; 癌前病变; 全反式维甲酸; 增殖细胞核抗原; P53; Bcl-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1493-02

Experimental study on reversion of precancerous lesion in rabbit buccal mucosa by ATRA*

Xu Zhibin¹, Zhao Peng², Gao Yang¹, Wang Shijie¹, Wu Mingli^{1△}

(1. Department of Endoscopy, Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, 050011, China;

2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of all-trans-retinoic acid(ATRA) in the reversion of rabbit buccal mucosa precancerous lesion. Methods The established model of rabbit buccal mucosa precancerous lesions was exposed to the membrane containing ATRA. The pathological changes of buccal mucosa exposed to ATRA were observed by histopathology, immunohistochemistry and flow cytometry. Results Twelve weeks later, only 2 rabbits of 16 rabbits in the blank control group were reversed, 6 rabbits stabilized and 8 rabbits progressed. Among 16 rabbits in the ATRA group, 7 rabbits were reversed, 7 rabbits were stable and 2 rabbits were worsened. The immunohistochemistry results showed that the positive rates of PCNA and bcl-2 protein expression were decreased as precancerous lesion reversing. P53 protein expression was increased, the apoptosis rate risen and the proliferation index was decreased. Conclusion ATRA is hopeful to become an effective blocking drug for buccal mucosa squamous epithelium precancerous lesion.

Key words: mouth mucosa; precancerous lesion; all-trans-retinoic acid; proliferating cell nuclear antigen; P53; Bcl-2

以往研究发现, 人鳞状细胞癌的发生、发展是一个多步骤、多阶段、多基因参与的复杂过程, 鳞状上皮细胞由异型增生到癌变需要较长的时间。目前, 干预治疗异型增生(癌前病变)方法较多, 包括口服药物的防治、微创手术治疗等。但已有的药物预防及治疗鳞状上皮癌前病变收效甚微, 多在一段时间后还需再次微创甚至手术治疗。全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)不仅能够在细胞水平上诱导多种实体肿瘤细胞的分化^[1-2], 抑制肿瘤细胞的增殖^[3-5], 还可以调控细胞凋亡相关基因诱导肿瘤细胞凋亡。然而, 关于此类报道多建立在癌细胞株的研究上^[6-8]。本实验应用 ATRA 对家兔颊黏膜癌前病变进行逆转研究, 探讨其对活体动物癌前病变的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验动物: 实验家兔 32 只, 8~12 周龄, 体质量(4.00±0.25)kg, 由河北省实验动物中心提供。实验试剂: 二甲基苯并蒽(9, 10-dimethyl, 2-benzanthracene, DMBA)购自瑞士 Fluka 公司; ATRA 购自重庆华邦制药有限公司; Bcl-2 兔抗兔多克隆抗体、P53 兔抗兔多克隆抗体、增殖细胞核抗原(PCNA)鼠抗兔多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 实验分组和方法 将 DMBA 诱癌实验家兔 32 只分为对照组 16 只, 贴敷空白膜; ATRA 组 16 只, ATRA 药膜每 0.5

cm² 含 0.5 mg ATRA, 每次贴 1 片, 隔天 1 次, 3 次/周, 共 12 周, 第 12 周实验结束时处死所有动物获取两侧颊黏膜做组织病理检查、免疫组织化学染色及流式细胞分析。

1.2.2 观察指标 病理诊断按 1987 年 12 月全国实验肿瘤专题座谈会标准: 根据细胞的异型程度及所累及上皮层的深度将不典型增生分成 3 个级别, 轻度不典型增生(mild dysplasia, mD)为受累范围不超过上皮 1/3 层, 中度不典型增生(moderate dysplasia, MD)为不超过上皮 2/3 层, 重度不典型增生(severe dysplasia, SD)为超过 2/3 层受累, 甚至全层, 但未突破基底膜。免疫组织化学标准: 阳性对照为阳性乳腺癌组织, 阴性对照采用 PBS 代替一抗。随机选取 10 个高倍视野, 至少计数约 1 000 个细胞, P53 蛋白表达主要位于细胞核, Bcl-2 蛋白表达位于细胞质和(或)细胞核膜上, PCNA 蛋白的表达定位于细胞核。染色棕黄, 可见明显颗粒, 阳性细胞数 25%~50% 视为表达弱阳性(+), 51%~75% 为表达中度阳性(++), >75% 为表达强阳性(+++); 染色较淡, 未见明显颗粒, 或阳性细胞数小于 25% 视为表达阴性。用流式细胞仪碘化丙啶(PI)染色法计算细胞增殖: 应用 DNA 细胞周期计算软件, 计算出 DNA 组方图各时相分布的百分比, 以增殖指数(proliferating index, PI)表示细胞的增殖活性, 计算公式为:

$$PI = (S + G_2M) / (G_0/G_1 + S + G_2M) \times 100\% \quad (1)$$

细胞凋亡计算方法:凋亡率(apoptosis rate, AR)以亚 G₀/G₁ 期峰作为细胞凋亡峰估计凋亡情况,计算公式为:

$$AR\% = (\text{凋亡细胞总数} / \text{检测细胞总数}) \times 100\% \quad (2)$$

1.2.3 逆转判定标准 (1)不典型增生等级降低为好转,不变为稳定,升高为进展;(2)蛋白检出阳性率减小 1 个或 1 个以上等级为降低,等级无变化为不变,增加 1 个或 1 个以上等级为升高。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行分析,计数资料用 Fisher 确切概率法或 χ^2 检验,计量资料采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织病理学 ATRA 组 12 周后,病变黏膜光泽和弹性有所恢复,组织学结果为好转 7 只(43.75%)、稳定 7 只(43.75%)、进展 2 只(12.5%),其中,好转 7 只中 4 只不典型增生消失,转为正常或接近正常,与对照组比较,效果明显($P < 0.05$),见表 1。

2.2 免疫组织化学结果 ATRA 组 12 周后,11 只家兔 PCNA 蛋白出现明显降低,4 只无变化,1 只上升,与对照组比较

差异有统计学意义($P < 0.05$);而 P53 蛋白、Bcl-2 蛋白两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、图 1。

表 1 两组家兔颊黏膜癌前病变 12 周后病理结果比较

组别	n	好转	稳定	进展
对照组	16	2(12.50)	6(37.50)	8(50.00)
ATRA 组	16	7(43.75)*	7(43.75)*	2(12.50)*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 2 两组家兔颊黏膜癌前病变 12 周后免疫组织化学结果比较

组别	n	PCNA			P53			Bcl-2		
		下降	稳定	上升	下降	稳定	上升	下降	稳定	上升
对照组	16	2	11	3	3	11	2	2	8	6
ATRA 组	16	11	4	1	1	10	5	6	7	3
P		<0.05			>0.05			>0.05		

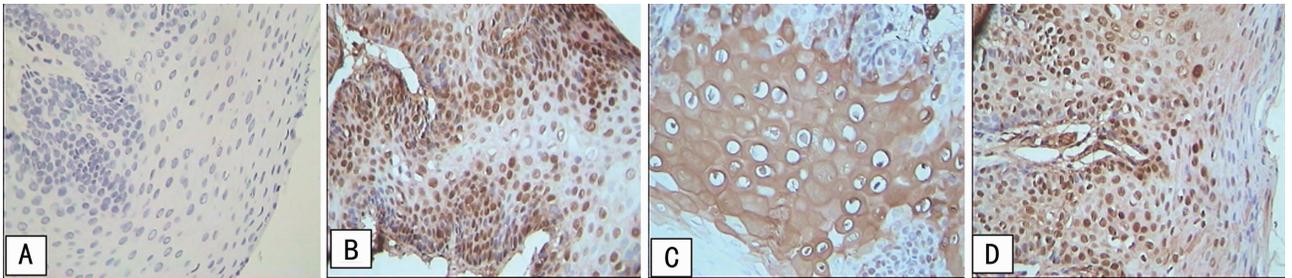


图 1 家兔口腔颊黏膜 P53、Bcl-2、PCNA 蛋白表达(免疫组织化学×200)

2.3 流式细胞检测结果比较 逆转实验前、后细胞增殖指数之差, ATRA 组与对照组比较,明显降低($P < 0.01$);凋亡率之差与对照组比较,明显增加($P < 0.01$),见表 3。

表 3 两组家兔颊黏膜癌前病变 12 周后流式细胞检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI ₁₂ -PI ₀ (%)	AR ₁₂ -AR ₀ (%)
对照组	16	8.874 ± 5.041	2.227 ± 1.416
ATRA 组	16	-11.338 ± 5.382*	7.633 ± 3.421*

AR₁₂:第 12 周时凋亡率;AR₀:实验初始时的凋亡率;PI₁₂:第 12 周时增殖指数;PI₀:实验初始增殖指数;*: $P < 0.01$,与对照组比较。

3 讨 论

国内外多位作者报道 ATRA 对多种肿瘤细胞均有诱导分化、抑制生长的作用。人们一直在探讨 ATRA 的作用机制, Yu 等^[9]应用流式细胞术检测发现, ATRA 能使髓性白血病细胞(ML-1)C0/G1 期细胞比例上升, S 期比例下降, 细胞增殖受到抑制。肿瘤细胞去分化的一个重要特征就是 G₁→S 控制点失常, 进入 S 期的细胞异常增多。实验表明 ATRA 在诱导肿瘤细胞分化过程中均出现细胞周期的 G₁ 期停滞, 因此, 这种 G₁ 期停滞可以作为 ATRA 诱导分化的判断指标。崔建华等^[10]通过流式细胞仪测定结果发现, ATRA 可明显改变视黄酸受体(Retinoic Acid Receptor β , RAR β)高表达的胃癌细胞株 MKN-45 细胞的细胞周期分布状况, 停滞于 G₀/G₁ 期的细胞明显增多, S 期和 M 期的细胞相应减少, 说明 ATRA 可通过高表达的 RAR β 受体使 MKN-45 细胞发生 G₁ 期停滞, 阻止细胞

进入 DNA 合成的 S 期和有丝分裂 M 期, 从而抑制细胞增殖和诱导细胞分化, 增殖细胞核抗原(PCNA)是一种稳定的细胞周期相关核蛋白, 可作为 DNA 聚合酶 s 的辅因子, 直接参加 DNA 合成, 在 DNA 合成和细胞增殖调控中起重要作用。本组实验结果表明, 实验前后 ATRA 可有效抑制细胞的增殖, PCNA 蛋白表达率明显下降, 增殖指数随之明显下降, 与对照组比较, 差异有统计学意义。

恶性肿瘤的发生是一个长期的、多阶段的、多基因改变累积的过程, 细胞凋亡相关基因的改变也参与了这一过程, 基因水平上诱导凋亡基因(如 p53, bax 等)的失活以及抑制凋亡基因(如 bcl-2, survivin 等)的过度表达是恶性肿瘤发生的一个重要原因。ATRA 诱导肿瘤细胞凋亡机制可能是通过对细胞凋亡有关基因的调控实现。p53 基因是调节细胞凋亡的一个重要基因, 野生型 p53 能促进细胞凋亡, 诱导细胞周期停止在 G₀ 期, 还能上调 bax 和(或)下调 bcl-2 水平。杨成梁等^[11]应用 ATRA 对食管癌细胞系 EC109 研究中发现, ATRA 具有抑制食管癌细胞株 EC109 生长作用, 经流式细胞检测, ATRA 处理组 p53 基因表达上调, bcl-2 基因表达下调。孙正等^[12]报道应用 DMBA 诱发的金黄地鼠口腔颊黏膜癌前病变模型, 再采用维胺酸逆转治疗, 有明显阻断效果。崔儒涛等^[13]用 ATRA 治疗 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)建立的大鼠胃黏膜异型增生模型, 治疗组癌变发生率明显降低, 凋亡指数明显高于造模组, 同时检测到 Bcl-2 蛋白表达治疗组明显低于造模组。本组采用 ATRA 对已诱导出的家兔口腔颊黏膜鳞状上皮癌前病变进行阻断逆转治疗, 其治疗效果明显, II(下转第 1498 页)

3 讨 论

本研究采用 LC/MS/MS 法测定家兔血浆样品中洛索洛芬钠浓度及其在肌肉样品中的浓度,采用电喷雾离子源(ESI),以质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描方式进行定量分析,血浆中的内源性物质不干扰待测物的测定。在文献[7-9]的基础上,采用乙腈对血浆样品进行蛋白沉淀处理,并同时采用了冰醋酸对样品溶液进行酸化,提高了目标化合物和内标的溶解度,简化了样品前处理过程,方法学考察结果表明实验中的体内药物分析方法具有快速、准确、灵敏度高的特点。

目前,国外上市的洛索洛芬钠经皮给药系统包括巴布剂和凝胶制剂^[10-11]。有文献报道采用¹⁴C 标记的方法并应用大鼠模型对洛索洛芬钠巴布剂进行了药动学考察,未见对洛索洛芬钠凝胶制剂的相关在体动物的药动学研究^[12]。在易得的实验条件下,本文成功地采用家兔模型首次对洛索洛芬钠凝胶制剂进行了初步的经皮系统吸收和局部肌肉蓄积研究,获得了完整的血浆药时曲线。通过对两种来源制剂的系统 and 局部暴露进行的差异性比较,证明了在研的洛索洛芬钠凝胶与相应上市产品在动物模型上表现出一致的内在质量,从药物安全性和有效性两方面为在研制剂的进一步临床研究提供了有益参考。

参考文献:

- [1] 周淑琴. 新型非甾体抗炎药洛索洛芬钠的研究进展[J]. 上海医药, 2008, 29(10): 468-469.
- [2] 冀满丰. HPLC 法测定洛索洛芬钠缓释片中主药的含量[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(12): 8-9.

- [3] 杨甜, 王成永. HPLC 法测定洛索洛芬钠渗透泵型控释片的含量[J]. 安徽医药, 2010, 14(3): 293-294.
- [4] 陈尧, 谭志荣, 周淦, 等. 洛索洛芬钠分散片在健康人体的相对生物利用度研究[J]. 中南药学, 2011, 9(10): 742-744.
- [5] 王慧, 赵亮, 张国庆, 等. 洛索洛芬钠胶囊在健康人体内的药动学和相对生物利用度研究[J]. 药学服务与研究, 2007, 7(3): 194-197.
- [6] 张爱琴. 洛索洛芬钠速释双层片药动学及其体内外相关性研究[J]. 海峡医学, 2011, 23(7): 42-44.
- [7] 李昊, 孙建国, 王广基, 等. HPLC-MS 法快速测定人血浆中洛索洛芬钠的浓度及其药代动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(2): 211-214.
- [8] 余玲. 洛索洛芬钠片在健康志愿者体内的生物等效性[J]. 内蒙古中医药, 2008, 17(9): 12-14.
- [9] 邓滢, 郭利民, 钟世华, 等. 紫外分光光度法测定洛索洛芬钠片的含量[J]. 中国当代医药, 2010, 17(14): 40-42.
- [10] 罗静, 张涛, 黄华, 等. 洛索洛芬钠巴布剂的制备及质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(2): 107-111.
- [11] 秦荣新, 韦曦. 洛索洛芬钠凝胶剂的制备与质量控制[J]. 山西医药杂志: 下半月, 2008, 37(11): 1038-1039.
- [12] 王秀萍, 陈斌. 洛索洛芬钠缓释片体外释放特性研究[J]. 医药导报, 2007, 26(5): 490-492.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-12-22)

(上接第 1494 页)

级不典型增生部分可逆转至 I 级不典型增生, III 级不典型增生部分可逆转至 II 级不典型增生, 与对照组比较差异有统计学意义, 病变组织细胞凋亡增加, 增殖减弱, 免疫组化及流式细胞检测结果均显示 p53 基因及 bcl-2 基因表达蛋白的相应变化, 提示 ATRA 逆转治疗食管癌前病变可能是通过凋亡基因的调控而实现, 其对于鳞状上皮癌前病变的治疗作用较为明确。

总之, ATRA 不仅对肿瘤细胞有明显的抑制作用, 而且对鳞状上皮癌前病变也有一定的逆转作用, 局部应用 ATRA 也是一种较理想的给药途径, 有望成为鳞状上皮癌前病变局部治疗的新型有效药物。

参考文献:

- [1] Parisotto M, Brodeur H, Bhat PV, et al. Retinoid metabolism and Cancer[J]. Med Sci(Paris), 2006, 22(12): 1101-1106.
- [2] 许培权, 龚建平. 全反式维甲酸对 HL-60 细胞分化和凋亡的影响[J]. 癌症, 2004, 23(2): 118-123.
- [3] 赵纯全, 沈太敏. 全反式维甲酸对人卵巢癌细胞株 HO8910 增殖, 侵袭能力的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(12): 1666-1669.
- [4] 刘子文, 刘长征, 刘卫, 等. 全反式维甲酸抑制肝癌细胞增殖的作用机制研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2012, 18(5): 386-388.
- [5] 高金波, 田元, 张景辉, 等. 全反式维甲酸对人胃癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2011, 40(3): 301-303, 319.

- [6] 王安训, 曾融生, 丁学强, 等. 全反式维甲酸对舌癌细胞株抗增殖作用的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2000, 16(5): 372-374.
- [7] 路太英, 樊青霞, 王留兴, 等. 全反式维甲酸诱导食管癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(11): 822-825.
- [8] 师广勇. 全反式维甲酸对胃癌 BGC-823 细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究[J]. 中国实用医药, 2010, 5(5): 22-23.
- [9] Yu KH, Weng LJ, Fu S, et al. Augmentation of phenylbutyrate-induced differentiation of myeloid leukemia cells using all-trans retinoic acid[J]. Leukemia, 1999, 13(8): 1258-1265.
- [10] 崔建华, 李华, 范钰, 等. ATRA 对胃癌细胞株 MKN-45 的诱导分化及其相关酶活性的影响[J]. 复旦学报: 医学版, 2002, 29(5): 347-351.
- [11] 杨成梁, 樊青霞, 路太英, 等. 全反式维甲酸对食管癌细胞系 EC109 作用的研究[J]. 肿瘤基础与临床, 2007, 93(3): 190-192.
- [12] 孙正, 沈胜利, 刘晓勇, 等. 维胺酸治疗口腔白斑的临床和实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(3): 185-187.
- [13] 崔儒涛, 蔡淦. 全反式维甲酸对大鼠胃黏膜上皮异型增生细胞凋亡及调控基因(Bcl-2, Fas, ICE)蛋白表达的影响[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(2): 82-84.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-12-21)