文章编号:1000-5404(2005)20-2057-03

论著

丁酸钠对甲基硝基亚硝基胍所致胃粘膜上皮细胞非程序DNA合成、脂质过氧化和ras p21表达的影响

刘 卫[1],朱 斌[1],房殿春[2] ([1]解放军第105医院消化科,合肥 230031;[2]第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察丁酸钠(sodium butyrate, SB)对甲基硝基亚硝基胍(N-methyl-N′-nitro-N-nitrocoguanidine, MNNG)所致胃粘膜上皮细胞非程序DNA合成、脂质过氧化和ras p21表达的影响。**方法** 分4组:MNNG、10^{-5} mol/L SB + MNNG、10^{-6} mol/L SB + MNNG、10^{-7} mol/L SB + MNNG,各组测定UDS、LPO和ras p21蛋白。**结果** 胃粘膜细胞先用10^{-5} mol/L、10^{-6} mol/L丁酸钠预处理4 h,再给MNNG,细胞非程序DNA合成水平、脂质过氧化和ras p21蛋白含量均显著低于MNNG组($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 一定剂量丁酸钠对MNNG诱导的胃粘膜细胞损伤有保护作用。

关键词:胃粘膜上皮细胞;甲基硝基亚硝基胍;丁酸钠
中图法分类号:R730.23;R735.2;R977.6 **文献标识码**:A

Preventive effects of sodium butyrate on gastric epithelial cells damaged by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

LIU Wei[1], ZHU Bin[1], FANG Dian-chun[2] ([1]Department of Gastroenterology, No. 105 Hospital of PLA, Hefei 230031; [2]Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of sodium butyrate (SB) on fetal gastric epithelial cells (GECs) *in vitro* damaged by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). **Methods** The fetal gastric epithelial cells were isolated, cultured and identified. Then the cells of the second generation were cocultured with 10^{-5} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-7} mol/L SB for 4 h, then added with 10^{-5} mol/L MNNG culturing for another 24 h. After the treated cells were finally cultured in normal culture medium for 40 d, the unscheduled DNA synthesis (UDS), lipid peroxidation (LPO) and ras p21 were detected. The cells were only cultured with 10^{-5} mol/L MNNG served as negative control and without MNNG or SB as normal control. **Results** The level of UDS, the contents of lipid peroxidation products and the concentrations of ras p21 in GECs treated with 10^{-5} mol/L and 10^{-6} mol/L SB decreased obviously, and had significant differences with that of GECs treated without SB. **Conclusion** SB can effectively prevent the damage of GECs induced from MNNG.

Key words: gastric epithelial cell; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; sodium butyrate

丁酸钠是食物纤维成分在大肠菌群作用下产生的一种四碳短链脂肪酸。体外实验证实,它对多种肿瘤细胞生长有抑制作用[1,2]。本研究观察了丁酸钠(SB)对甲基硝基亚硝基胍(MNNG)所致胎胃粘膜上皮细胞损伤的预防作用。

1 材料与方法

1.1 实验设计

胎胃粘膜上皮细胞的分离、培养和鉴定的方法按文献[3]。实验共分4组,包括MNNG组、3种不同浓度丁酸钠(SB,日本和光纯药工业株式会社)加MNNG组:10^{-5} mol/L SB + MNNG组(SB1组)、10^{-6} mol/L SB + MNNG组(SB2组)、10^{-7} mol/L SB + MNNG组(SB3组)。MNNG用量在培养液中终浓度均为10^{-5} mol/L。取第2代培养24 h后细胞,SB1、SB2、SB3组分别用相应浓度SB预处理4 h,再与MNNG组同时加入MNNG,对照组不用MNNG和SB处理,培养24 h后,更换正常培养液,继续培养40 d,观察实验过程中各组细胞各项指标的变化。

1.2 方法

1.2.1 非程序DNA合成(UDS)测定 各组细胞经不同处理后分别加入羟基脲(5 mmol/L,Sigma公司)和^{3}H-TdR 5 μCi/ml(中国原子能研究所),细胞继续培养4 h,每瓶取少量细胞行台盼蓝染色,以观察细胞成活情况,其余制备样品,按文献[4]方法测定UDS。

1.2.2 脂质过氧化物(LPO)测定 采用硫代巴比妥酸比色法,检测培养第1、5、10、20、30天和40天细胞的LPO含量[5]。

1.2.3 ras p21酶联免疫吸附实验 取各组培养第10、20、30、40天细胞测定ras p21蛋白,检测方法按文献[6]报道方法。

作者简介:刘 卫(1964-),男,安徽省合肥市人,硕士,主治医师,主要从事胃癌基础方面的研究。电话:(0551)5137741

收稿日期:2005-06-16;修回日期:2005-08-25

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件以方差分析法观察各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 SB 对 MNNG 诱导胎胃粘膜上皮细胞 UDS 的影响

经台盼蓝染色观察，各组细胞成活率均在90%以上。SB1组 SB2 组胃粘膜上皮细胞的 UDS 水平[(116.6 ± 15.6)、(156.6 ± 187.7) cpm/10^6 cell]显著低于 MNNG 组[(183.8 ± 20.5) cpm/10^6 cell]($P<0.05$, $P<0.01$)，而 SB3 组 UDS 水平[(169.0 ± 19.1) cpm/10^6 cell]与 MNNG 组相比则无显著差别($P>0.05$)。

2.2 LPO 测定结果

由表1可见，SB3 组细胞 LPO 含量与 MNNG 组同步升降，在各时相两组间无显著差异($P>0.05$)。SB1 组和 SB2 组细胞 LPO 含量缓慢升高，第1、5、10、20 天时显著低于 MNNG 组($P>0.05$, $P>0.01$)。此后，由于 MNNG 组 LPO 下降，30、40 d 时各时相组间 LPO 水平无显著差异($P>0.05$)。

表1 各组胃上皮细胞 LPO 含量(nmol/mg 蛋白, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 LPO contents in different groups of gastric epithelial cells(nmol/mg, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Culture time (d)					
	1	5	10	20	30	40
MNNG	5.40±0.64	5.95±0.65	6.43±0.63	7.42±0.68	5.53±0.69	4.05±0.52
SB3	5.40±0.62	5.86±0.61	6.41±0.59	7.28±0.62	5.72±0.62	4.20±0.52
SB2	4.08±0.54*	4.26±0.60**	4.45±0.54**	4.66±0.57**	4.72±0.61	4.76±0.62
SB1	3.85±0.54**	4.11±0.57**	4.33±0.58**	4.51±0.56**	4.64±0.58	1.67±0.63

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* MNNG

2.3 各组细胞 ras p21 检测结果

由表2可见，在各时相点，SB3 组细胞 ras p21 水平与 MNNG 组均无显著差异($P>0.05$)，而 SB1、SB2 组细胞 ras p21 水平则显著低于 MNNG 组($P<0.05$, $P<0.01$)。

表2 胃上皮细胞 ras p21 表达变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Expression of ras p21 in different groups of gastric epithelial cells($\bar{x}\pm s$)

Groups	Culture time (d)			
	10	20	30	40
MNNG	0.98±0.09	1.08±0.11	1.12±0.11	1.12±0.12
SB3	0.94±0.11	1.05±0.11	1.09±0.12	1.19±0.11
SB2	0.96±0.07*	0.85±0.07*	0.86±0.09**	0.90±0.09**
SB1	0.64±0.08**	0.67±0.08**	0.67±0.09**	0.68±0.08**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* MNNG

3 讨论

许多实验显示，丁酸钠在肿瘤防治中具有重要作用，体外实验显示，SB 可使人肝癌细胞增殖速度明显被抑制，诱导其向正常肝细胞转化，还可抑制卵巢癌细胞、子宫内膜癌细胞、前列腺癌细胞增殖[6,7]，并诱导结肠癌细胞凋亡[7,8]。

本研究观察了 SB 对 MNNG 所致体外培养的胎胃上皮细胞损伤的预防作用。结果显示，人胎胃粘膜上皮细胞能在体外进行较长期培养，由于胎胃粘膜上皮胞未受任何外来刺激，能排除机体免疫监督等多种复杂因素的影响，更适于研究外来物质对胃粘膜的损伤作用及防护作用。

正常情况下，细胞 DNA 合成仅见于 S 期，但当细胞 DNA 受到损伤进行修复时，其 DNA 合成可发生在整个细胞周期。那些发生于 S 期以外的 DNA 合成，谓之非程序 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS)。测定 UDS 是一种检测致突变因子的可靠生物学方法。我们过去的研究发现 MNNG 可损伤细胞 DNA 而致细胞恶性转化[9]。本研究表明，用 10^{-5} mol/L 和 10^{-6} mol/L SB 预处理胃粘膜上皮细胞 4 h，再加入 MNNG，其 UDS 水平显著低于单用 MNNG 组，而用 10^{-7} mol/L SB 预处理，其 UDS 水平与单用 MNNG 组相比则无显著差异，提示一定剂量 SB 可防止 MNNG 对胃粘膜细胞 DNA 的损伤。

LPO 是活性氧与不饱和脂肪酸作用产生的丙二醛等产物，可损伤细胞 DNA，参与肿瘤的启动和促进过程。本研究表明，SB3 组细胞 LPO 含量与 MNNG 同步升降，而 SB1 组和 SB2 组细胞 LPO 含量在培养第1、5、10 天和 20 天时均显著低于 MNNG 组。提示一定剂量 SB 可抑制 MNNG 引起的脂质过氧化，防止其对胃粘膜细胞损伤。30 d 后 MNNG 组 LPO 降低可能由于细胞不饱和脂肪酸减少或细胞发生恶性转化，使脂质过氧化作用降低所致[10]。

p21 蛋白是癌基因 ras 产物，足量的 ras p21 可促进细胞恶性转化。过去研究表明，MNNG 可诱发 ras p21 异常表达[9]，本研究表明，SB1 组和 SB2 组 ras p21 水平显著低于 MNNG 组，而 SB3 组与 MNNG 组相比则无显著差异，提示一定剂量 SB 可抑制胃粘膜上皮细胞 ras p21 的表达，防止细胞癌变。

SB 抗癌机制目前仍不完全清楚，根据研究结果，推测可能与以下因素有关：①抑制癌基因产物的表达；②抑制致癌物引起的脂质过氧化及自由基的产生，达到抗促癌作用；③拮抗化学致癌物对细胞遗传物质的损伤，保护细胞 DNA，并促进受损 DNA 的修复。

参考文献：

[1] Litvak D A, Hwang K O, Evers B M, *et al*. Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate[J]. Anticancer Res, 2000,

20(2A): 779-784.
[2] Finzer P, Kuntzen C, Soto U, *et al*. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression[J]. Oncogene, 2001, 20(35): 4768-4776.
[3] 刘 卫, 房殿春, 梁后杰, 等. 人胃粘膜上皮细胞分离、培养和鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(3): 255-256.
[4] 徐永玲, 张启行, 李益农. MNNG诱导的胃粘膜细胞的非程序DNA合成[J]. 中华肿瘤杂志, 1991, 13(2): 90-91.
[5] 朱文渊, 黄济群. 丁酸钠对人肝癌细胞诱导分化作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(6): 953, 1056.
[6] 荣风年, 胡新生, 汤春生. 丁酸钠对人卵巢癌KK细胞和子宫内膜癌HHUA细胞生长的抑制作用[J]. 中国癌症杂志, 2002, 12(3): 211-214, 276.
[7] 狄 茜, 李 杨, 赵雪俭, 等. 丁酸钠对前列腺癌PC-3M细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2004, 30(5): 710-712.
[8] 杨正兵, 刘小菁. 丁酸钠诱导结肠癌细胞凋亡的实验研究[J]. 华西医学, 2002, 17(4): 535-536.
[9] 刘 卫, 房殿春, 梁后杰, 等. 甲基硝基亚硝基胍诱导人胃粘膜上皮细胞恶性转化的观察[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(4): 330-333.
[10] Takahashi M, Hasegawa T, Furukawa F, *et al*. Enhanced lipid peroxidation in rat gastric mucosa caused by NaCl[J]. Carcinogenesis, 1991, 12(12): 2201-2204.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2005)20-2059-01

个案与短篇

小细胞肺癌化疗并发急性肿瘤溶解综合征1例

Acute tumor lysis syndrome caused by hemotherapy for small cell lung cancer: a case report

邹华兰,周向东,陈永锋,刘晓利,曾锤利,罗继荣,魏朝朗,谢才德 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

患者,女,55岁,反复咳嗽、咳痰10余年,活动后心悸、气促1年,复发加重伴胸部疼痛2个月,于2004年11月2日入院。体检:慢性重病容,消瘦,全身浅表淋巴结无肿大。胸部多处触痛,左上肺叩浊,左上肺呼吸音低。胸部CT提示:左侧胸廓塌陷,左上肺纵隔旁及左肺门见不规则软组织块影,CT值约45 Hu,与纵隔血管分界不清;左下肺支气管受压变窄;纵隔及肺门淋巴结肿大钙化。纤支镜检查发现:左下支气管开口被肿物完全阻塞,肿物呈结节状突起,呈粘膜下浸润性生长,沿管壁向上侵犯至左上叶开口,左上叶开口处粘膜呈小结节状突起;左主支气管亦受侵。病理检查提示小细胞癌。经查血常规、肝肾功、心肌酶谱、心电图正常。于2004年11月4日给予喜典0.8 mg/m^2 + 卡铂,其用量按曲线下面积4 mg/ml Min(具体用量:喜典1.1 mg D_{1-5} + 卡铂500 mg D_1)化疗,2004年11月8日(化疗第4天),患者出现头昏、恶心、胸闷、心悸、呼吸困难,咯鲜红色泡沫痰,尿量明显减少。肾功能检查提示:血尿酸549.2 μmol/L,血尿素14.7 mmol/L,血钾4.34 mmol/L,血钙2.06 mmol/L,血磷1.45 mmol/L,pH 7.0。入院时肾功能提示:血尿酸218.63 μmol/L,血尿素7.29 mmol/L,血钾3.27 mmol/L,血钙2.45 mmol/L,小便常规、尿pH正常。立即停止化疗,给予琥珀酰氢化考的松200 mg、西地兰0.2 mg、速尿20-80 mg/d静推,加大补液量,每天2 000 ml,鼓励患者多饮水及止血对症治疗后,症状逐渐减轻,尿量逐渐增加至1 500 ml/d。因尿常规提示pH 7.0,故未予碱化尿液及服用别嘌呤醇等处理。2004年11月12日患者胸痛减轻,胸闷、心悸、呼吸困难明显缓解,咯血停止,复查肾功能恢复正常出院。

讨论

急性肿瘤溶解综合征(acute tumor lysis syndrome, ATLS),主要表现为高血钾症、高磷血症、高尿酸血症、低血钙症及急性肾功能衰竭。临床上只要具备以下两项即可诊断为ATLS:血尿酸、钾、磷、尿素氮较治疗前增高25%;血清钙降低25%[1]。本例基本符合ATLS的诊断标准。ATLS发生机制:化疗使瘤细胞迅速溶解大量炎症介质释放,导致全身炎性反应,溶解分解出尿酸,尿酸结晶堵塞远端肾小管;化疗药物对肾小管的直接毒性作用。化疗后是否产生ATLS及其严重程度主要取决于溶解肿瘤细胞数目,溶解速度和肿瘤对化疗的敏感度以及肾功能。ATLS多见于血液系统肿瘤以及小细胞肺肿瘤[2],一般发生于化疗后1-7 d,本例化疗后第4天出现,尿量减少有助于本病需及时、早期、准确判断,经保守治疗后,短期内血电解质及肾功能可完全恢复正常。本病主要防治措施:①控制高尿酸血症,口服别嘌呤醇,减少尿酸生成;②碱化尿液及水化利尿,促进尿酸溶解排泄;③监测电解质及肾功能,及时纠正水电解质紊乱;④严重病例应行血液透析。

关键词:肿瘤溶解综合征;小细胞肺癌;化疗
中图法分类号:R730.6;R734.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 狙云芬,张秀英. 急性肿瘤溶解综合征诊断与治疗[J]. 中国肿瘤临床,2004, 31(6): 354-356.
[2] 王冬青,王丽萍,梅其达,等. VIP方案治疗小细胞肺癌38例疗效观察[J]. 郑州大学学报(医学版),2003,38(6):988-989.

(编辑 陈聪连)

作者简介:邹华兰(1972-),女,重庆市人,医师。电话:(023)60659953
通讯作者:周向东,电话:(023)68765679,E-mail:xdzhou@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-04-04;修回日期:2005-07-20