论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0410-03

低剂量甲基汞促进鼠胚肠上皮细胞凋亡及相关机制的体内实验

林雪梅,张海英,姜 蓉,汪维伟 (重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨低剂量氯化甲基汞(methyl-mercury chloride, MMC)对小鼠胚胎肠上皮细胞凋亡的影响及相关机制。**方法** 给E12.5d、E13.5d孕鼠一次性腹腔注射MMC液(0、1、2、4 mg/kg),48 h后取十二指肠、结肠。所获标本均制成石蜡切片,部分经HE染色,体视学法计数肠上皮凋亡小体;其余切片用于免疫组化染色,半定量分析凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax及即刻早期基因c-fos的表达。**结果** ①各实验组凋亡小体数均高于对照组($P<0.05$),与MMC剂量呈正相关($P<0.01$)。②Bcl-2在各组上皮中的表达均低于对照组($P<0.05$),与MMC的剂量呈负相关($P<0.01$);而Bax及c-fos的表达均强于对照组($P<0.05$),与MMC的剂量呈正相关($P<0.01$)。**结论** 低剂量MMC在体内可促进胎鼠肠上皮细胞凋亡,可能是一种通过下调Bcl-2表达,上调Bax及c-fos表达的机制。

关键词: 氯化甲基汞;胎鼠;肠上皮;凋亡

中图法分类号: R321.5;R322.45;R995 **文献标识码:** A

Effects and related mechanism of low-dosed methyl-mercury chloride in promoting apoptosis of intestine epithelial cells of fetal mice

LIN Xue-mei, ZHANG Hai-ying, JIANG Rong, WANG Wei-wei (Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effects and related mechanism of low-dosed methyl-mercury chloride (MMC) on the epithelial apoptosis of fetal mice intestine. **Methods** Pregnant mice on E12.5 d and E13.5 d were injected with different doses of MMC (0, 1, 2, 4 mg/kg) intraperitoneally. After 48 h, their duodenum and colon were dissected out and sliced into the paraffin sections. Some sections were stained with HE to count the numbers of apoptotic bodies (NAB) with stereological method. The others were stained with the immunohistochemical method to observe the expression of apoptosis-associated proteins Bcl-2, Bax and immediate early gene c-fos. **Results** ①In all experimental groups, the NAB in the epithelium were higher than that of control groups ($P<0.05$), and there was a positive correlation between the doses of MMC and the NAB ($P<0.01$). ②In all experimental groups, the expression of Bcl-2 in the epithelium was lower than that of control groups ($P<0.05$), and there was a negative correlation between the doses of MMC and the expression of Bcl-2 ($P<0.01$). However the expression of Bax and c-fos were higher than that of in control groups ($P<0.05$). There was a positive correlation between the doses of MMC and the expression of these proteins ($P<0.01$). **Conclusion** *In vivo*, MMC can increase the epithelial apoptosis in fetal mouse intestine, by the mechanism of restraining the expression of Bcl-2 and promoting the expression of Bax and c-fos.

Key words: methyl-mercury chloride; fetal mouse; intestinal epithelium; apoptosis

环境中无机汞经微生物作用转化为甲基汞,可通过食物链进入人体,已被列为国际化学物质安全性程序中6种最危险的物质之一[1]。部分实验证实,甲基汞在未引起母体任何改变的情况下,就可透过胎盘,引起生长发育障碍,产生强烈的神经毒性[2]。但尚少见到低剂量甲基汞影响胚胎消化管发育的报道。

上皮细胞凋亡是维持胚胎消化管正常形态发生的基础。汪维伟等[3]用体视学方法观察到小鼠胚胎十

基金项目: 重庆市教委课题(渝教科9916)
Supported by the Project of Education Committee of Chongqing (9916)

作者简介: 林雪梅(1969-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事组织工程与药理学方面的研究。电话:(023)68485087

通讯作者: 汪维伟,电话:(023)68485087

收稿日期: 2006-04-28;**修回日期:** 2006-12-22

二指肠及结肠上皮细胞凋亡的峰值为 E14 ~ E15 d 及 E15 ~ 16 d，凋亡相关蛋白在消化管各段的表达也具有时空差异。为此，本实验采用体内实验方法，观察低剂量氯化甲基汞（methyl-mercury chloride，MMC）对胎鼠肠上皮细胞凋亡以及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、即刻早期基因 c-fos 表达的影响，为深入探讨甲基汞发育毒性作用及相关分子机制提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

健康成年昆明小鼠共 40 只（由重庆医科大学实验动物中心提供），雌雄 2∶1 于晚 22∶00 合笼，次晨 7∶30 检查有阴栓者于当日中午 12∶00 定为 E0.5d，随机分配到 3 个实验组（1、2、4 mg/kg MMC）和对照组，每组 10 例。

1.2　主要试剂

MMC 纯度 95⁺%（美国 Alfa 公司）。Bcl-2、Bax 兔抗鼠即用型多抗，c-fos 兔抗鼠浓缩型多抗（1∶100），SABC 试剂盒（博士德公司），表皮生长因子（晶美公司），牛垂体提取物等（Sigma 公司）。

1.3　方法

取 E12.5d、E13.5d 孕鼠，分别一次性腹腔注射 MMC 液（1、2、4 mg/kg），对照组注射等量生理盐水。48 h 后处死孕鼠，取胎鼠十二指肠近幽门段（D 段）及结肠近端段（C 段）备用。

1.3.1　切片制备　　各组标本均制成连续石蜡切片（4 ~ 5 μm），间断连续贴片后经 HE 染色，镜下定位 D、C 段，选择 D、C 段的切片以免疫组化 SABC 法（按试剂说明操作，阴性对照以 PBS 代替第一抗体）显示 Bcl-2、Bax、c-fos 在上皮中的表达。

1.3.2　结果分析　　参照 Hall 等[4] 体视学法，置测微网格于目镜中，在 HE 染色间断连续切片中测定肠上皮的面积，高倍镜下计数上皮内的凋亡小体数，获得凋亡小体密度（density of apoptotic bodies，DAB）即凋亡小体数/μm^2。本实验以 TUNEL 法标记凋亡细胞，证实其与凋亡小体分布一致[3]，故光镜下计数消化管上皮内的凋亡小体，可一定程度反映上皮内细胞凋亡的情况。免疫组化染色切片用 GD-8 型图像分析系统定量分析，表达强度为面积积分光密度（area integral optical density，AIOD），即积分光密度/μm^2。

1.4　统计学处理

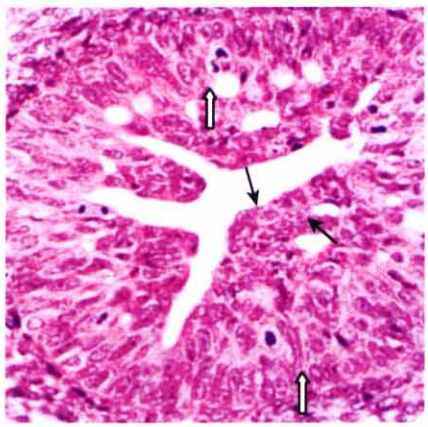
采用 SPSS 10.0 统计软件进行 q 检验及等级相关法分析。

2　结果

2.1　胎鼠肠上皮细胞凋亡小体计数

2.1.1　形态学观察　　各实验组 D、C 段上皮内可见典型凋亡小体，内含 1 至多个深染核碎片和/或强嗜酸性胞质，外有清楚晕环（图 1）。

2.1.2　定量分析　　结果见表 1。各实验组 DAB 值均高于对照组（$P<0.05$）。各组间差异均有统计学意义（$P<0.01$）。各组 DAB 值与 MMC 的剂量呈正相关，D、C 段 r 值分别为 0.814、0.824（$P<0.01$）。



↑：凋亡小体；⇧：分裂像

图 1　C 段上皮形态学观察　（HE ×400）

表 1　体内给药 48 h 后的 DAB 值［$n=10$，$(\bar{x}\pm s)\times10^{-4}$］

组别	E14.5d D 段	E15.5d C 段
生理盐水组	2.775 ±0.397	2.219 ±0.328
1 mg/kg MMC	4.207 ±0.308[a]	3.431 ±0.483[a]
2 mg/kg MMC	5.454 ±0.335[ab]	4.470 ±0.272[ab]
4 mg/kg MMC	6.447 ±0.234[abc]	5.431 ±0.181[abc]

a：$P<0.05$，与生理盐水组比较；b：$P<0.01$，与 1 mg/kg MMC 比较；c：$P<0.01$，与 2 mg/kg MMC 比较

2.2　凋亡相关蛋白的表达

凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及即刻早期基因 c-fos 的阳性产物均以细胞质有棕黄色物质沉淀为主，颜色深浅不一，主要位于上皮细胞胞质，也有部分细胞膜及核膜着色。

定量分析结果：体内各实验组 Bcl-2 的表达均较对照组低（$P<0.01$），与 MMC 剂量均呈负相关。D、C 段 r 值分别为 −0.841、−0.889（$P<0.01$）。Bax、c-fos 在实验各组的表达均高于对照组（$P<0.01$），与 MMC 剂量均呈正相关。Bax 在 D、C 段 r 值为 0.889、0.891（$P<0.01$）；c-fos 在 D、C 段的 r 值分别 0.867、0.890（$P<0.01$）。

3　讨论

目前国内外对环境中污染物效应的评价已由大剂量、急性暴露研究发展到更接近实际环境的长期暴露和低剂量水平的研究。甲基汞可干预胚胎细胞增殖和凋亡，导致神经系统畸形，但尚少见低剂量甲基汞影响胚胎消化管上皮细胞凋亡的报道。本研究观察到：各实验组经 MMC 作用后的胎鼠肠上皮细胞凋亡增加，有明显的剂量相关性，表明 MMC 在体内有促进胎鼠肠上皮凋亡的作用。

近年研究表明，Bax 和 Bcl-2 调节细胞凋亡，不仅取决于自身表达的高低，还与 Bax/Bcl-2 的比率有关[5]。Bcl-2 过度表达与 Bax 形成异源二聚体，抑制细胞凋亡；若 Bax 过度表达，则形成同源二聚体，促进细胞凋亡。本实验中，胎鼠肠上皮在体内经 MMC 作用后，Bax 表达增加，Bcl-2 表达降低，提示下调 Bcl-2 表

达,上调 Bax 表达可能是 MMC 促进胎鼠肠上皮细胞凋亡的机制之一。

即刻早期基因(immediate-early gene,IEG)属原癌基因家族,其表达受胞内第二信使的直接调节,能对外界刺激在几分钟内作出反应。c-fos 即为其中一种。近年来发现在 MMC 促胚胎神经细胞凋亡实验中有 c-fos的过度表达[6],因而常作为甲基汞毒性检测和评价的效应指标。本研究中各实验组 c-fos 表达增强,且与甲基汞间存在一定剂量效应关系,提示 c-fos 可能参与 MMC 促胚胎肠上皮细胞凋亡的调控。

参考文献:

[1] Ekino S, Ninomiya T, Susa M. More on mercury content in fish[J]. Science, 2004, 303(5659): 763-766.

[2] Sakaue M, Okazaki M, Hara S. Very low levels of methylmercury induce cell death of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation [J]. Toxicology, 2005, 213(1-2): 97-106.

[3] 汪维伟, 曾小川. 小鼠胚胎食管和肠上皮的体视学研究[J]. 解剖学报, 2000, 31(1): 73-76.

[4] Hall P A, Coates R J, Ansari B, *et al*. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis [J]. J Cell Sci, 1994, 107(Pt 12): 3569-3577.

[5] Russell H R, Lee Y, Miller H L, *et al*. Murine ovarian development is not affected by inactivation of the Bcl-2 family member diva[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(19): 6866-6870.

[6] 郭 丽, 毕晓颖, 张兴国, 等. 氯化甲基汞对大鼠脑神经细胞 c-fos 表达的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(5): 309-311.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)05-0412-01

前列腺肉瘤5例临床分析

陈 刚,唐 伟 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

前列腺肉瘤临床很少见,早期诊断较困难,病程进展迅速,预后差。我院于1990-2003年共收治5例前列腺肉瘤患者,结合文献资料,现报告如下。

1 临床资料

本组共5例前列腺肉瘤患者,年龄26-69岁,平均39岁。5例均以进行性排尿困难、尿频为主要临床表现。其中2例伴尿痛、尿急,2例伴排大便困难、便秘,2例伴下腹部及会阴部坠胀不适,1例发病后明显消瘦。直肠指检:5例前列腺均明显增大,中央沟消失,质地软,明显突向直肠腔内,表面光滑,无压痛,未扪及明确的结节,指套无血染。5例血 PSA 均正常。B超均提示前列腺明显增大,包膜不完整,内部组织回声不均,可见低回声或无回声区。CT示:前列腺增大,密度不均,且呈不均匀强化。其中1例CT提示:右侧精囊腺及肛提肌受累。术前前列腺穿刺活检,4例确诊为前列腺肉瘤,另1例术后才确诊。其中平滑肌肉瘤3例,横纹肌肉瘤1例,梭形细胞肉瘤1例。1例行根治性前列腺切除回肠膀胱术,1例行根治性前列腺切除乙状结肠膀胱术,术后均辅以化疗及免疫治疗。1例行根治性前列腺切除术加直肠切除术及乙状结肠造瘘术,术后接受放疗及化疗。另2例仅行经尿道前列腺电切术,其中1例术后辅以免疫治疗。

术后随访5例患者。2例行根治性前列腺切除+回肠膀胱术或乙状结肠膀胱术的患者,分别于术后11个月和17个月死于肿瘤转移全身衰竭。1例行根治性前列腺切除加直肠切除及乙状结肠造瘘术的患者,至今存活33个月。2例行经尿道前列腺切除术,1例于术后5个月死于肿瘤远处转移,1例失访。

2 讨论

前列腺肉瘤占前列腺恶性肿瘤的5.5%,常发生于幼儿,10岁以下患儿约占50%,成人中则以青年人居多[1]。Loughey 将前列腺肉瘤分为3类:(1)肌肉瘤:平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤;(2)梭形细胞肉瘤;纤维肉瘤和梭形细胞肉瘤;(3)其他:黏液肉瘤、脂肪肉瘤、骨肉瘤、神经源性肉瘤等。前列腺肉瘤多在局部浸润或转移之后才出现临床症状,患者就诊时往往已有膀胱颈部梗阻,出现排尿困难、尿频,甚至尿潴留。可伴有血尿或血精。侵犯会阴或直肠时可出现排便困难,甚至出现肠梗阻。直肠指检前列腺均明显增大,边缘多不能触及,表面光滑无触痛,质地柔软有囊性或波动感。这有助于与前列腺癌相鉴别。

前列腺特异抗原也有助于与前列腺癌的鉴别。绝大多数前列腺肉瘤患者前列腺特异抗原正常,仅极少数(4.8%,1/21)轻度增高(4.3 ng/ml)[2]。B超、CT及MRI对前列腺肉瘤的诊断及鉴别诊断有一定帮助。前列腺肉瘤确诊需穿刺活检,但有一定的假阴性率。本组5例患者术前均行前列腺穿刺活检,但仅4例获得确诊。多次穿刺将提高诊断的正确率,但也可能造成出血、感染及肿瘤扩散等并发症。Ghavimi 将前列腺肉瘤分为4期:Ⅰ期:肿瘤局限,能完全切除,区域淋巴结阴性。Ⅱ期:肿瘤浸润到邻近组织,不能完全切除,而区域淋巴结阴性。Ⅲ期:肿瘤扩散到邻近组织,不能完全切除,区域淋巴结阳性。Ⅳ期:远处转移。Ⅰ、Ⅱ期者可行根治性手术,Ⅲ、Ⅳ期者可行TURP等姑息性手术。术前或术后可配合放疗。平滑肌肉瘤对放疗中度敏感,而横纹肌肉瘤则不宜行放疗。介入化疗可增强

(下转415页)

作者简介:陈 刚(1975-),男,四川省蓬昌县人,硕士,医师,主要从事泌尿及男性生殖系肿瘤方面的研究。电话:(023)89011009

收稿日期:2006-04-14;修回日期:2006-12-01