基础研究 文章编号：0253-3626(2010)07-1018-03

DMBA 诱导金黄地鼠颊囊癌变的组织学动态变化研究

梅 杰，张国栋，杨 凯

（重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科 重庆 400016）

【摘 要】目的：观察分析金黄地鼠在致癌剂二甲基苯并蒽（9，10-Dimethyl-1，2 Benzanthracene，DMBA）作用下颊囊粘膜癌变不同时期在肉眼和光镜下的组织学动态变化过程。方法：用 DMBA 涂抹金黄地鼠颊囊粘膜，每周 3 次。在肉眼下动态观察颊囊粘膜的癌变过程；分别在第 2、4、6、8、10、12、14 周时处死动物，在光镜下动态观察颊囊粘膜癌变过程的显微组织学改变。结果：DMBA 涂抹金黄地鼠颊囊粘膜 2 周时出现单纯增生改变，4 周时出现轻度上皮异常增生，6 周时出现中度异常增生，8 周时出现重度异常增生，部分出现原位癌改变，10 周时已发生癌变，实验中得到的癌症模型均为高分化鳞状细胞癌。结论：DMBA 诱导的金黄地鼠颊囊粘膜癌和人类口腔鳞状细胞癌（Oral squamous cell carcinoma，OSCC）相似，是研究口腔鳞癌多阶段、多步骤动态发展的理想模型。

【关键词】二甲基苯并蒽；金黄地鼠；颊囊；鳞状细胞；癌

【中国图书分类法分类号】R739.86 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-21

Tissue dynamic change in the carcinogenesis of the cheek pouch in golden hamster induced by DMBA

MEI Jie，et al

（*Department of Oral and Maxillofacial Surgery，the First Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*: To observe and analyze the dynamic changes of hamster's cheek pouch mucosa in different stages of the carcinogenesis under naked eye and light microscope with the carcinogenic agent dimethyl-benzanthracene (DMBA). *Methods*: DMBA was painted on hamster's cheek pouch mucosa, 3 times a week. Dynamic observation of the carcinogenesis of cheek pouch mucous membrane was carried out under naked eye; histological dynamic changes in the microstructure of cheek pouch mucosa in the carcinogenesis were observed under light microscope after the animals were killed respectively in the 2nd week, the 4th week, the 6th week, the 10th week, the 12th week and the 14th week. *Results*: For the cheek pouch mucosa of hamster painted with DMBA, the simple hyperplasia appeared in the 2nd week, the mild epithelial dysplasia in the 4th week, the moderate dysplasia in the 6th week, the severe dysplasia the partial changes of carcinoma in situ in the 8th week and cancer in the 10th week. All cancer models appearing in the experiment belonged to the well-differentiated squamous cell carcinoma. *Conclusion*: The carcinoma of hamster cheek pouch mucosa induced by DMBA is similar to the human oral squamous cell carcinoma so it is an ideal model for studying the oral squamous cell carcinoma in multi-stage and multi-step dynamic development.

【Key words】Dimethyl-benzanthrancene; Golden hamster; Cheek pouch; Squamous cell; Carcinoma

口腔黏膜上皮癌变所导致的口腔鳞状细胞癌（Oral squamous cell carcinoma，OSCC）占口腔颌面部恶性肿瘤的 90%。目前公认：癌症的发生发展是一个多阶段、多步骤的连续动态过程。目前人们通过临床和相关研究已证实[1-4]：口腔黏膜癌变初步过程是由正常口腔黏膜上皮→黏膜上皮异常增生→口腔鳞癌的连续动态变化过程，但目前还缺乏对这一癌变过程更为细致的多阶段、多步骤的连续动态观察。本研究采用 0.5%二甲基苯并蒽（9，10-Dimethyl-1，2 Benzanthracene，DMBA）涂擦金黄地鼠颊囊黏膜建立口腔颊鳞癌模型作为研究对象，从肉眼和光镜下显微组织学改变两方面对这一癌变过程进行多阶段、多步骤的连续动态观察分析，为阐明口腔黏膜癌变的发病机制、早期诊断和治疗提供有效的方法和思路，同时也为进一步多阶段、多步骤从分子水平改变与组织学对应改变之间的相互关系的深入研究提供基础。

作者介绍：梅 杰（1982- ），男，硕士，研究方向：口腔颌面-头颈肿瘤的防治。

通讯作者：杨 凯，男，教授，E-mail：cqfyyk@yahoo.com.cn。

基金项目：重庆市卫生局科研项目（编号：03-2-073）；重庆市自然科学基金项目（编号：渝科发计字〔2003〕43 号）。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

1.1.1 实验动物 叙利亚金黄地鼠 69 只（购于卫生部成都生物制品研究所），体重 90～120 g，6～8 周龄，雌雄各半，在干燥、空气流通、24 h 光暗交替的条件下分笼饲养，每笼 2 只，由我校动物实验室提供实验场所。

1.1.2 主要实验试剂 DMBA（美国 SIGMA 公司），5%丙酮液（上海博蕴公司）置于棕色瓶中避光保存。

1.2 动物分组

1.2.1 实验组 金黄地鼠共 42 只，分为Ⅰ～Ⅶ组，每组均为 6 只。所有金黄地鼠于每周一，三，五双侧颊囊涂擦 0.5% DMBA 丙酮液，其中Ⅰ组、Ⅱ组、Ⅲ组、Ⅳ组、Ⅴ组和Ⅵ组分别于 2、4、6、8、10、12 周时处死，Ⅶ组双颊囊涂 0.5%DMBA 丙酮液 12 周后停止，留观到 14 周时处死。

1.2.2 丙酮对照组（单涂丙酮液） 金黄地鼠 18 只，第 2、4、6、8、10、12 周时各处死 3 只。

1.2.3 阴性对照组（不做任何处理） 金黄地鼠 9 只，分别于实验前、实验 6 周和 12 周时各处死 3 只。

1.3 实验方法

将金黄地鼠固定于自制鼠架上，拉开上下牙及颊囊，用棉签沾 0.9%生理盐水擦净双侧颊囊，用洗耳球吹干，实验组依次用 1 号油画笔在双侧颊囊涂 0.5%DMBA 丙酮液 3 次，每次涂完后用洗耳球吹干。对照组只涂布丙酮溶液，涂法与实验组相同，每周一、三、五涂擦，所有动物涂擦后禁食禁水 2 h。根据上述动物分组的相应时间处死动物，将实验组、对照组和阴性对照组各时间点处死的动物取颊囊组织于 10%福尔马林液中常规固定、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片。

1.4 实验观测

1.4.1 肉眼观察 观察记录各组动物癌变各时间段颊囊黏膜的水肿、充血、黏膜增厚、粗糙度、糜烂、白斑、新生物、邻近组织反应、颌下淋巴结肿大及全身情况。

1.4.2 光镜观察 在高、低倍镜下观察，每例 3 个视野，将镜下的上皮病理特征改变经双人复核无误后，按 WHO 标准的 12 项分项记录[1]。即：①基底细胞极性消失；②基底细胞复层样改变；③核浆比值增加；④水滴状上皮钉突；⑤上皮分层紊乱；⑥核分裂象增多及出现异常核分裂象；⑦有丝分裂水平增加（上皮 1/2 出现丝分）；⑧细胞多形性；⑨核浓染；⑩核仁增大；⑪细胞间附着减弱或消失；⑫错角化。按上述项目出现数诊断分级，≤2 项——轻度上皮异常增生；3～4 项——中度上皮异常增生；≥5 项——重度上皮异常增生或原位癌改变。

2 结 果

2.1 肉眼下观察金黄地鼠颊囊组织学的改变

2.1.1 实验组 1～2 周时颊囊黏膜出现轻度充血水肿；3～4 周时出现不规则糜烂面和溃疡（图 1），有少许白色斑块病损，涂擦时容易出血，黏膜弹性较好，动物精神状况好；5～6 周时有大量粗糙突出的白色斑块（图 2），颊囊黏膜弹性降低，黏膜增厚；7～8 周时糜烂面进一步增大，有少许乳突状新生物突起，颈部淋巴结未见肿大，动物活动良好；9～10 周时溃烂和新生物进一步增大，表面粗糙失去光泽，极易出血（图 3）；11～12 周时新生物呈菜花状突起并伴有坏死，基底变硬，颈部可扪及肿大淋巴结，动物精神状态较差，活动明显减少；13～14 周时颊部新生物质地变硬，与周围组织分界不清，周围部分组织出现坏死，可自发出血（图 4），颈部可扪及明显肿大的淋巴结，动物精神状态差，活动少，进食受限。

2.1.2 丙酮对照组和阴性对照组 从 0～12 周颊黏膜未见溃烂和新生物，黏膜完整，颜色红润，质地光滑，与邻近组织无差异。

2.2 光镜下金黄地鼠颊囊显微组织学改变

2.2.1 阴性对照组 正常地鼠颊囊黏膜为 4～6 层细胞组成的复层角化上皮，上皮和肌层之间为薄层结缔组织，少量散

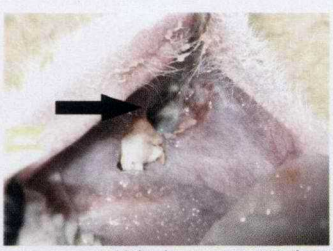


图 1 DMBA 涂擦颊囊 3~4 周时的肉眼改变



图 2 DMBA 涂擦颊囊 5~6 周时的肉眼改变



图 3 DMBA 涂擦颊囊 9~10 周时的肉眼改变



图 4 DMBA 涂擦颊囊 13~14 周时的肉眼改变

在的纤维细胞和血管（图 5）。

2.2.2　丙酮对照组　第 2、4、6、8、10、12 周时颊囊黏膜呈复层鳞状上皮，各层细胞排列规则，类似正常颊囊黏膜，各时间点无明显差异。

2.2.3　实验组　2 周时颊黏膜上皮细胞排列整齐，棘层和角化层增厚，结缔组织内纤维细胞增多，散在炎性细胞浸润，以中性粒细胞为主，血管轻微扩张充血，呈单纯增生改变（图 6）；4 周时上皮出现基底细胞增生呈复层样改变，角化层增厚，炎性细胞浸润，上皮钉突形成，呈轻度异常增生改变；6 周时颊黏膜上皮粒层和棘层细胞增厚，基底细胞呈明显的复层样改变，细胞极性消失，但基底膜清楚，偶可见核浓染及错角化，黏膜下淋巴细胞浸润（图 7），呈中度异常增生改变；8 周时上皮分层紊乱，出现错角化，粒层细胞增生，棘层变厚，基底细胞增生明显呈复层样改变，细胞极向消失紊乱，上皮细胞形态大小不一，核浆比倒置，上皮钉突肥大延伸呈水滴状，基底膜完整，固有层大量淋巴细胞存在，呈重度异常增生改变，部分可见癌细胞已累及上皮的全层，但尚未侵及基底膜向下浸润生长，呈现为原位癌的表现；10 周时各层细胞明显增生，细胞排列极向紊乱，形态不规则，丝分水平增加，见核分裂象，细胞间附着减弱或消失，上皮钉突伸长变粗呈水滴状，基底膜欠完整，可见癌细胞侵入黏膜下组织（图 8）；12 周和 14 周时镜下改变基本相同，表现为：细胞排列紊乱，层次不清，细胞间桥消失，核仁增大，核分裂象增加，多核细胞增多，细胞呈多形性，鳞状上皮细胞增殖并侵入结缔组织内，见癌细胞呈团块状或条索状分布，呈高分化鳞状细胞癌和接近肌层的浸润癌表现（图 9）。



图 5　正常地鼠颊囊粘膜（HE×200）



图 6　DMBA 涂擦颊囊 2 周时的镜下改变（HE×400）



图 7　DMBA 涂擦颊囊 6 周时的镜下改变（HE×200）

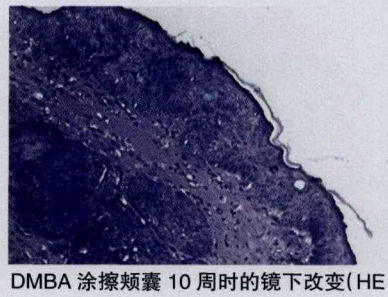


图 8　DMBA 涂擦颊囊 10 周时的镜下改变（HE×200）



图 9　DMBA 涂擦颊囊 14 周时的镜下改变（HE×200）

3　讨　论

口腔颌面部癌在全身恶性肿瘤中排名第 6 位，且有逐年上升趋势，在口腔颌面部癌中 90% 为 OSCC，虽然目前人们对 OSCC 的诊疗有了长足的进步，但由于对病变发生发展过程中的机制仍未充分认识，使得临床治疗效果仍未取得明显改变[5,6]。

DMBA 诱导的金黄地鼠口腔鳞癌模型由于该动物模型稳定、重复性好、而且肿瘤位置表浅，易于观察和切取，同时与人类口腔鳞癌具有相似的生长特性和生物学行为，因而该模型目前被认为是研究口腔黏膜癌变较为理想的动物模型[7,8]。目前国内外学者利用该模型已初步证实了口腔黏膜癌变过程是由正常口腔黏膜上皮→黏膜上皮异常增生→口腔鳞癌的连续动态变化过程[8,9]，但目前还缺乏对这一癌变过程更为细致的多阶段、多步骤的连续动态观察。本研究用 DMBA 涂擦金黄地鼠颊囊黏膜建立口腔颊鳞癌模型作为研究对象，以每 2 周作为一个观察时间点，从肉眼下组织学改变和光镜下显微组织学改变两方面对这一癌变过程进行多阶段、多步骤的连续动态观察分析。

本实验结果表明：在肉眼下金黄地鼠颊囊黏膜癌变的组织学改变过程为：1～2 周时颊囊黏膜出现轻度充血水肿，3～4 周时出现不规则糜烂面和溃疡，有少许白色斑块病损出现，5～6 周时有大量粗糙突出的白色斑块，黏膜增厚，弹性降低，7～8 周时糜烂面增大，有突起乳突状新生物出现，9～10 周时溃烂和新生物进一步增大，表面粗糙，11～12 周时新生物呈菜花状突起并伴有坏死，基底变硬，13～14 周时颊部新生物质地变硬，与周围组织分界不清，并出现坏死。在光学显微镜下金黄地鼠颊囊黏膜癌变的显微组织学改变过程为：2 周时颊黏膜出现单纯增生性改变，4 周时上皮呈轻度

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1021-05

Darbufelone 对胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移能力的影响

石建华,刘纯伦,罗 访,潘 敏,徐晓萌
(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察环氧合酶-2/5-脂氧合酶(COX-2/5-LOX)双重抑制剂 Darbufelone 对人胃癌 SGC-7901 细胞异质粘附、侵袭、迁移、血管形成能力的影响,并初步探讨其可能机制。方法:用 Darbufelone 处理 SGC-7901 细胞,MTT 法检测其粘附能力的变化;Transwell Chamber 膜侵袭系统观察其侵袭和迁移能力的改变;观察 SGC-7901 细胞条件培养基诱导内皮细胞形成血管管腔能力;RT-PCR 和免疫细胞化学分析 SGC-7901 细胞中骨桥蛋白(Osteopontin,OPN)和基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinases-2,MMP-2)的 mRNA 与蛋白表达变化。结果:经 1.5×10^{-5} mol/L 的 Darbufelone 处理后,SGC-7901 细胞粘贴率明显降低($P<0.05$),游走穿膜细胞数(93.00±6.56)、侵袭穿膜细胞数(50.00±3.67)均显著低于对照组(143.00±9.82,82.00±7.14,$P<0.01$);诱导内皮细胞形成血管管腔数(82.70±4.58)与管腔长度[(172.20±6.41)μm]均较对照组[142.00±5.86,(214.60±9.44)μm]显著减少($P<0.01$);OPN 和 MMP-2 的 mRNA 表达(0.34±0.03、0.33±0.04)与蛋白表达(0.18±0.01、0.26±0.02)分别较对照组的 mRNA 表达(0.54±0.01、0.57±0.09)和蛋白表达(0.26±0.03、0.33±0.03)明显降低($P<0.05$)。结论:COX-2/5-LOX 双重抑制剂 Darbufelone 能有效抑制 SGC-7901 细胞的侵袭转移,其作用机制可能与抑制 OPN 和 MMP-2 的表达有关。

【关键词】SGC-7901 细胞;环氧合酶-2;5-脂氧合酶;侵袭;转移
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-25

Inhibition of gastric cancer cells invasion and metastasis by Darbufelone in vitro

SHI Jian-hua, et al
(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of Darbufelone on the invasion and metastasis of human gastric cancer cells SGC-7901 in vitro. *Methods*: The adhesion ability was determined by MTT. Invasion and metastasis was observed in Transwell Chamber membrane invasion culture system. The capability of SGC-7901 cell condition medium in inducing endothelial cell to form blood vessel in 24 well plate was detected.RT-PCR and cell-immunohistochemistry were used to observe the expressions of OPN and MMP-2. *Results*: In the membrane invasion culture system, the numbers of invading and migrating SGC-7901 cells were significantly lower in Darbufelone

作者介绍:石建华(1982-),女,硕士,研究方向:消化道肿瘤。
通讯作者:刘纯伦,男,副教授,E-mail:lcl728@medmail.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局课题(编号:05-2-155)。

异常增生,6 周时呈中度异常增生,8 周时呈重度异常增生,部分出现原位癌的表现,10 周时上皮已发生癌变,且基底膜欠完整,癌细胞侵入黏膜下组织,12 周时表现为浸润接近肌层的高分化鳞状细胞癌。该研究从肉眼下组织学改变和光镜下显微组织学改变两方面对金黄地鼠颊囊黏膜癌变过程多阶段、多步骤的连续动态观察分析,为临床医师在临床上对 OSCC 的早期诊断提供指导,为阐明口腔黏膜癌变的发病机制和治疗提供有效的方法和思路,同时也为进一步从基因组学和蛋白质组学进行多阶段、多步骤的深入研究提供时间分期基础。

参 考 文 献

[1] Smith.WHO collaborating centre of oral precancerous lesion[J].Oral Surg, 1978,46(3):518.
[2] Ragin C R,Modugno F,Gollin S M. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer:a focus on human papillomavirus[J].J Dent Res,2007,86(2):104-114.
[3] Choi S,Myers J N.Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy[J].J Dent Res,2008,87(1):14-32.
[4] Reshmi S C,Gollin S M. Chromosomal instability in oral cancer cells [J].J ent Res,2005,84(2):107-117.
[5] Ziober B L,Mauk M G,Falls E M,et al. Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis[J].Head Neck,2008,30(1):111-121.
[6] Mauk M G,Ziober B L,Chen Z,et al. Lab-on-a-chip technologies for oral-based cancer screening and diagnostics: capabilities, issues, and prospects[J].Ann N Y Acad Sci,2007,1098(1):467-475.
[7] Gimenez I B,Slaga T J.The hamster cheek pouch carcinogenesis model[J].J Cell Biochem,1993,9(1):83-90.
[8] 高 静,译.癌的生物学基础[M].北京:清华大学出版社,2003.27.
[9] 刘以训,主译.癌生物学[M].第 2 版.北京:科学出版社,2002.8-9.

(责任编辑:关蕴良)