DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.018
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
790 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0790-03

PCNA和bcl-2在金仓鼠胆管癌和胆管细胞增生中的表达

梁 平,陈 海,庄大勇,王细文,李洪艳 (第三军医大学附属新桥医院肝胆外科,重庆 400038)

提 要:目的 建立肝内胆管癌(ICC)动物模型,观察增殖细胞核抗原(PCNA)和bcl-2在肝内胆管癌发生发展的病理过程中的表达。方法 60只6周龄雄性金仓鼠,随机分为正常对照组、单纯结扎胆总管组和二异丙醇亚硝胺(DIPN)组,分别在实验的5、10及15周分批处死动物,观察其形态学变化。免疫组化SABC法检测胆管癌组织和胆管上皮细胞增生中PCNA和bcl-2的表达。结果 PCNA标记指数(PCNA LI)在胆管腺癌中最高(78.5%),不典型增生(51.6%)、腺瘤样增生(50.3%)、胆管肠上皮化生(40.3%)、小胆管囊性增生(25.5%)和小胆管增生(23.6%)次之,正常胆管上皮(3.1%)最低($P<0.01$)。bcl-2在胆管组织癌变过程中的阳性表达率分别是:正常胆管上皮30%(3/10)、小胆管增生20%(2/10)、肠上皮化生20%(2/10)、腺瘤样增生40%(4/10)、不典型增生40%(4/10)、腺癌最高,为80%(8/10)($P<0.05$)。结论 PCNA标记指数在肝内胆管癌和胆管上皮细胞增生中明显高于正常胆管组织,提示胆管癌的发生可能是从正常胆管组织到间变,再发展为胆管癌;抑制细胞凋亡的bcl-2的过表达可能是DIPN诱发的肝内胆管癌发生的重要机制。

关键词:肝内胆管癌;金仓鼠;二异丙醇亚硝胺;核增殖抗原;bcl-2
中图法分类号:R364.31;R394.2;R735.8 文献标识码:A

PCNA and bcl-2 expressions in DIPN induced cholangiocarcinoma and biliary duct cell hyperplasia in Syrian golden hamsters

LIANG Ping, CHEN Hai, ZHUANG Da-yong, WANG Xi-wen, LI Hong-yan (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objecitve** To identify the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and bcl-2 in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) in Syrian golden hamsters induced by Diisopropanolnitrosoamine (DIPN). **Methods** Six-week-old male Syrian golden hamsters were randomly divided into 3 groups: control, simple common bile duct occlusion (S-CBDO) and CBDO-DIPN groups. CBDO-DIPN group received weekly subcutaneous injection of DIPN at a dose of 500 mg/kg body weight after S-CBDO. The animals were killed at the 5th, 10th and 15th week after the initation of DIPN treatment. The morphological changes were observed. The expressions of PCNA and bcl-2 were studied with sABC technique by using their monoclonal antibodies in the cholangiocarcinoma and biliary duct cells. **Results** PCNA labeling index (LI) was found to be highest in cholangiocarcinoma (78.5%) followed by atypical hyperplasia (51.6%), adenomatous hyperplasia (3%), intestinal metaplasia (40.3%), cyctic proliferation (25.5%) and bile ductule hyperplasia (23.6%), but was only 3.1% in normal bile ductule ($P<0.01$). The bcl-2-postive rate in cholangiocarcinoma was 80%, which was significantly higher than that of atypical hyperplasia (40%), adenomatous hyperplasia (40%), intestinal metaplasia (20%), bile-duct hyperplasia (20%) and normal bile ductule (30%) ($P<0.05$). **Conclusion** The elevation of PCNA LI in cholangiocarcinoma and biliary duct cell hyperplasia supported the proposed development sequence of cholangiocarcinomas developing from normal bile duct to dysplasia, and finally to cholangiocarcinoma. The overexpression of bcl-2 protein, one of apoptosis-suppressing oncoprotein, might play an important role in the development of cholangiocarcinoma induced by DIPN.

Key words: intrahepatic cholangiocarcinoma; Syrian golden hamster; diisopropanolnitroamine; proliferating cell nuclear antigen; bcl-2

目前对肝内胆管癌的生物学特性的研究较少。细胞周期活动及细胞动力学是研究人类各种肿瘤生物行为的重要指标。研究肿瘤增殖的方法很多,包括核分裂相计数、^{3}H-TdR标记法、BrdU摄入法、细胞核DNA定量术、增殖抗原检测及核仁组成区嗜银染色技术。用免疫组化检测组织切片增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigene, PCNA)是评估细胞增殖性活动的可靠方法之一[1~3]。本研究用二异丙醇亚硝胺(Diisopropanolnitrosoamine, DIPN)诱发金仓鼠肝内胆管癌的动物模型,探讨PCNA和bcl-2在肝内胆管癌演变过程中的表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

金仓鼠60只,全部为雄性,6周龄,体重70~90 g,购自卫

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670713)
作者简介:梁 平(1962-),男,四川省叙永县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胆管癌的诊断和治疗、胰肾联合移植方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68755606
收稿日期:2001-03-05;修回日期:2001-05-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生部成都生物制品研究所。由第三军医大学新桥医院动物实验室饲养, 每笼 5～8 只, 喂硬饲料, 随意饮水, 每天日照及夜暗时间各约为 12 h。平均温度(22±4)℃, 平均湿度(60±20)%。诱癌剂二异丙醇亚硝胺(DIPN), 为 Sigma 公司产品。

1.2　诱发方法及实验分组

按梁平等[4]的方法随机将动物分为正常对照组(12 只)和实验组(48 只)。术后 1 周去除死亡动物, 再将实验组分为: ①胆总管单纯结扎组(18 只), 喂养方法同正常对照组; ②DIPN 处理组(26 只), 皮下注射 DIPN, 剂量 500 mg/kg, 每周 1 次, 分 5、10、15 周 3 个时相点, 每个时相点动物只数分别为 6、5、15 只。分别在第 5、10、15 周时处死各组所有的动物。

1.3　PCNA 和 bcl-2 的检测

组织病理观察: 杀死动物后取肝脏组织置 10%福尔马林溶液中固定 16～18 h, 石蜡包埋, 连续切片, HE 染色或 PAS 染色, 光镜观察形态学改变。采用免疫组化 sABC 法, 检测石蜡切片中胆管上皮细胞 PCNA 和 bcl-2, 标本来源与组织病理同, 石蜡切片厚度为 5μm。阴性对照: 一抗以相当量的 PBS 代替, 其它步骤不变。

PCNA 结果评定标准: 经过染色的切片, 在显微镜下观察。选择胆管上皮细胞染色最明显的高倍视野, 计算 PCNA 标记指数(LI)。PCNA LI= 阳性细胞数/总计算的细胞数×100%。一般计算 200 个胆管上皮细胞, 只要细胞核呈棕黄色, 不论染色强弱即计算为 PCNA 染色阳性细胞。

bcl-2 阳性评定标准: 胞浆或胞膜呈棕黄色为阳性细胞, 阳性细胞数小于 10%阴性(－), 10%～40%为阳性(＋), 大于 40%为强阳性(＋＋)。计算阳性表达率。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法。

2　结果

2.1　肝内胆管癌发生情况

全部发生在 DIPN 组, 共有 11 只动物发生肝内胆管癌, 最早 1 例在第 10 周时出现, 10 例在第 15 周时出现, 发生率分别是 20%(1/5)和 67%(10/15)。共发现 45 个肿瘤, 全部为高分化腺癌, 其中管状腺癌 33 个(73.3%)、乳头状腺癌 12 个(26.7%)。同时出现其它表现: 小胆管增生(96%)、囊性增生(80%)、胆管上皮杯状细胞化生(80%)、胆管上皮乳头状增生(96%)及腺瘤样增生或腺瘤(60%)。肝内胆管癌有时与小胆管增生及胆管上皮不典型增生同时存在, 两者往往有混杂或移行现象。

2.2　PCNA 免疫组化染色检测结果

15 周发生肝内胆管癌的 10 例肝脏组织 PCNA 免疫组化染色结果显示, PCNA 表达定位于细胞核, 呈棕黄色。同一组织切片中阳性细胞数量和分布呈异质性。PCNA 在腺癌中表达最高, 不典型增生、腺瘤样增生、胆管肠上皮化生、小胆管囊性增生和小胆管增生次之, 正常胆管上皮表达率(PCNA LI)最低。腺癌 PCNA LI 与正常胆管上皮比较相差非常显著($P<0.01$), 与各种胆管增生组织比较差异亦显著($P<0.05$); 各种胆管增生组织与正常胆管上皮比较差异非常显著($P<0.01$), 与胆管肠上皮化生比较差异亦显著($P<0.05$), 见表 1。

表 1　PCNA 在肝内胆管组织中的表达

Tab 1　PCNA expression in biliary duct tissues

Tissues	n	PCNA LI
Normal bile duct	10	3.1±1.6
Bile duct proliferation	10	23.6±7.2 **△#
Cystic proliferation	10	25.5±5.5 **△#
Intestinal metaplasia	10	40.3±10.9 **△
Adenomatous proliferation	10	50.3±8.2 **△#
Atypical proliferation	10	51.6±12.4 **△#
Cholangiocarcinoma	10	78.5±15.6 **

**: $P<0.01$ *vs* normal bile duct; △: $P<0.05$ *vs* cholangiocarcinoma; #: $P<0.05$ *vs* intestinal metaplasis

2.3　bcl-2 蛋白免疫组化染色检测结果

15 周发生肝内胆管癌的 10 例肝脏组织 bcl-2 蛋白免疫组化染色结果显示, bcl-2 蛋白阳性染色定位于胞浆和/或胞膜。bcl-2 在胆管组织癌变过程中的阳性表达率分别是: 正常胆管上皮 30%(3/10)、小胆管增生 20%(2/10)、肠上皮化生 20%(2/10)、腺瘤样增生 40%(4/10)、不典型增生 40%(4/10)、腺癌 80%(8/10)。其在腺癌中的表达不仅是染色强度或阳性表达率均较其它肝胆管组织差异显著(确切概率法, $P<0.05$)。在腺瘤样增生及不典型增生组织中的表达呈增加的趋势, 但在肠上皮化生和小胆管增生中的表达与正常肝内胆管上皮无差异(确切概率法, $P>0.05$), 见表 2。

表 2　bcl-2 在肝内胆管组织中的表达

Tab 2　bcl-2 expression in biliary duct tissues

Tissues	n	－	＋	＋＋	Positive rate (%)
Normal bile duct	10	7	3	0	30*
Bile duct proliferation	10	8	2	0	20*
Intestinal metaplasia	10	8	2	0	20*
Adenomatous proliferation	10	6	3	1	40*
Atypical proliferation	10	6	2	2	40*
Cholangiocarcinoma	10	2	3	5	80

*: $P<0.05$ *vs* cholangiocarcinoma

3　讨论

免疫组化检测组织 PCNA 是评估细胞增殖性活动的可靠方法之一。PCNA 是分子量为 36×10^3 的酸性核蛋白, 作为 DNA 聚合酶 δ的辅助蛋白, 参与 DNA 的合成、修复及复制。PCNA 的表达受转录及转录后水平调节, 原癌基因也参与调节 PCNA mRNA 的水平, 原癌基因的改变会影响 PCNA 的表达水平。PCNA 存在于整个细胞周期, 在 G_1 期开始增加, 在 G_1 后期及 S 期达到高峰, 能特异地反映 S 期细胞活跃的程度。已有大量的文献报道 PCNA 在人各种肿瘤组织中呈高表达状态, 与肿瘤的分化、预后有关, 而在良性病变组织中表达相对较低, 具有高度增殖活性的良性病变组织有潜化为恶性病变的可能[5～8]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本模型我们检测了正常胆管、小胆管增生、小胆管囊性增生、胆管肠上皮化生、胆管腺瘤样增生或腺瘤及肝内胆管癌等组织中 PCNA 的表达，并比较他们的增殖性活动，发现肝内胆管癌的增殖性活动明显高于非肿瘤组织，即使是良性的病变组织胆管上皮细胞的增殖性活动也是不一致的，其规律是：腺瘤＞化生＞小胆管增生或小胆管囊性增生＞正常胆管上皮。

随着时间的延长，肝内胆管癌、腺瘤、小胆管增生或小胆管囊性增生等病变的发生率均升高，可以认为在致癌因素作用下，胆管上皮细胞的增殖性活动是渐次升高的，提示肝内胆管癌的延变符合肿瘤的一般延变规律，即由正常胆管上皮→上皮异常增生→癌的序列变化，说明我们此模型有良好的稳定性和重复性。

bcl-2 是抑制细凋亡的核心分子，异常表达有促进肿瘤形成的作用。其作用是抑制细胞死亡，而不是刺激细胞增殖。当 bcl-2 过度表达时，这种抑制作用增强，从而促进细胞的累积，导致肿瘤的形成。已有许多报道表明，bcl-2 在人肝内胆管癌中过表达，其在正常肝内胆管上皮细胞中也有表达，但癌细胞中 bcl-2 表达水平可达正常胆管上皮细胞的 15 倍[9]。我们用免疫组化方法检测 DIPN 加胆总管不完全性梗阻诱发金仓鼠肝内胆管病变组织中 bcl-2 的表达。与正常肝内胆管上皮细胞比较，bcl-2 在胆管上皮腺瘤样增生和不典型增生已有升高的趋势，在腺癌组织中染色强度和阳性表达率明显升高，阳性表达率达 80%，但在小胆管增生和肠上皮化生中的表达没有变化。这种现象可能是因为在 DIPN 诱癌的早期以增生和凋亡为主，机体通过凋亡的调节，试图维持细胞群体相对稳定的状态，而在肝内胆管癌形成阶段，细胞除了增殖活动增加外，还过度表达 bcl-2，阻遏细胞死亡，从而促进肿瘤的形成。

参考文献：

[1] Tajima Y, Eto T, Tsunoda T, *et al*. Induction of extrahepatic biliary carcinoma by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in hamsters given cholecystoduodenostomy with dissection of the common duct[J]. Jpn J Cancer Res, 1994, 85(6): 780－788.

[2] Tengchaisri T, Prempacha T, Thamavit W. Establishment and characterization of cell lines from liver fluke-associated cholangiocarcinoma induced in a hamster[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1995, 26(2): 231－239.

[3] Tengchaisri T, Chawengkirttikul R, Rachaphaew N, *et al*. Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth *in vitro* and in hamsters [J]. Cancer letters, 1998, 133(1): 169－175.

[4] 梁 平，陈 海，庄大勇，等. DIPN 诱发金仓鼠肝内胆管癌动物模型. 第三军医大学学报，2001，23(6)：674－676.

[5] Tsutsumi M, Murakami Y, Kondoh S, *et al*. Comparion of k-ras oncogene activation in hamsters by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine[J]. Jpn J Cancer Res, 1993, 84(7): 956－960.

[6] Fukahori T, Tomioka T, Inoue K. Establishment of a transplantable carcinoma arising from the intrahepatic bile duct in Syrian golden hamsters[J]. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993, 422(3): 233－238.

[7] Sirica A E, Radaeva S, Caran N. Neu overexpression in the furan rat model of cholangiogenesis compared with biliary ductal cell hyperplasia[J]. Am J Pathol, 1997, 151(6): 1 685－1 694.

[8] Majima T, Tsujiuchi T, Tsutsumi M, *et al*. Mutation of k-ras but not p53 genes in biliary duct and pancreatic duct carcinomas induced in hamsters by cholecystoduodenostomy with dissection of the common duct followed by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine[J]. Cancer Letters, 1997, 118(1): 47－53.

[9] Fiorentino M, D' Errico A, Altimari A, *et al*. High levels of BCL－2 messenger RNA detected by *in situ* hybridization in human hepatocellular and cholangiocellular carcinomas[J]. Diagn Mol Pathol, 1999, 8(4): 189－194.

（编辑 薛国文）

（上接 789 页）

3 讨论

自 1975 年 H_2 受体拮抗剂问世以来，消化性溃疡的治疗发生了革命性的变化，继西咪替丁之后，有雷尼替丁和法莫替丁，而尼扎替丁则又是一个新的 H_2 受体拮抗剂。尼扎替丁既可选择性地作用于胃壁细胞上的 H_2 受体，使胃酸分泌下降；同时还部分抑制胃泌素和乙酰胆碱的产生。国外自 1987 年上市以来，在美国、加拿大及欧洲进行的多中心、随机、双盲研究表明，对消化性溃疡的治疗尼扎替丁是一种安全、有效的药物。Simon 等[3] 对 388 例 DU 的一个随机对照的多中心研究中，每晚口服 300 mg 尼扎替丁，4 周的溃疡愈合率为 81.2%，与对照组雷尼替丁比较无明显差异。国内胡伏莲等[2] 对 37 例 DU 患者，每晚给予尼扎替丁 300 mg 口服，疗程 4 周，溃疡愈合率 97.3%，与雷尼替丁组无明显差异。

本研究对 104 例 DU 患者的治疗，尼扎替丁组 4 周溃疡愈合率 78.8%，高于对照组西咪替丁(71.1%)，但两组相比无明显差异($P>0.05$)。本研究尼扎替丁组 4 周溃疡愈合率与国外 Simon 等[3] 的报道相似，低于国内胡伏莲等[2] 的报道，其原因尚不清楚，可能与国内报道的病例数少有关。

关键词：尼扎替丁；十二指肠溃疡
中图法分类号：R573.105 文献标识码：B

参考文献：

[1] Battaglia G, Di-Mario F, Vigneri S, *et al*. Peptic ulcer in the elderly-a double-blind, short-term study comparing nizatidine 300 mg with ranitidine 300 mg[J]. Aliment Pharmacol Ther, 1993, 7(6): 643－648.

[2] 胡伏莲，谢鹏雁，刘建湘，等. 一个新的 H_2 受体阻断药——尼扎替丁治疗十二指肠溃疡病的疗效及安全性[J]. 中国临床药理学杂志，1995，11(3)：129－133.

[3] Simon B, Cremer M, Dammann H G, *et al*. 300 mg nizatidine at night versus 300 mg ranitidine at night in patients with duodenal ulcer. A multicenter trial in Europe[J]. Scand J Gastroenterol, 1987, 22(Suppl 136): 61－70.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net