DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.027
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0683-03

论著

芳维A酸乙酯对小鼠皮肤乳头状瘤形成过程中ODC、PCNA的影响

王儒鹏,张国威,何云志,黄 海 (第三军医大学附属新桥医院皮肤科,重庆 400037)

提 要:目的 通过测定小鼠二阶段皮肤乳头状瘤模型中鸟氨酸脱羧酶(ODC)、增殖细胞核抗原(PCNA)的变化,探讨芳维A酸乙酯的癌化学预防作用机制。方法 ODC作用于^{14}C标记的鸟氨酸底物后释放$^{14}CO_2$,通过测定$^{14}CO_2$生成量反映标本中ODC活性;用免疫组化方法检测样本中PCNA表达情况。结果 芳维A酸乙酯对肿瘤标志物ODC、PCNA有明显的抑制作用。结论 芳维A酸乙酯对ODC、PCNA的抑制作用是其预防小鼠乳头状瘤发生的重要机制,它具有肯定的癌化学预防作用。

关键词:芳维A酸乙酯;乳头状瘤;鸟氨酸脱羧酶;增殖细胞核抗原
中图法分类号:R329.26;R739.502;R986 文献标识码:A

Influence of arotinoid ethylester on ODC and PCNA in the course of producing mouse skin papilloma formation

WANG Ru-peng, ZHANG Guo-wei, HE Yun-zhi, HUANG Hai (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the mechanism of arotinoid ethylester on cancer chemoprevention by assaying ornithine decarboxylase (ODC) activity and proliferative cell nuclear antigen (PCNA) index of mouse skin in the process of mouse papilloma formation. **Methods** The ODC activity was detected by O'Brien's methods. The epidermis extract reacted upon ^{14}C labelled ornithine, and the $^{14}CO_2$ produced indicated the ODC activity. The expression of PCNA was detected by the immunohistochemical staining technique. The skin specimens were obtained from the promotion stage, so the dynamic process of PCNA expression could be observed. **Results** Arotinoid ethylester could distinctly inhibit the tumour marks ODC and PCNA. **Conclusion** Arotinoid ethylester has an inhibitory effect on ODC and PCNA by which it inhibits skin papilloma in mouse. Arotinoid ethylester possesses the effect of cancer chemoprevention.

Key words: arotinoid ethylester; papilloma; ornithine decarboxylase; proliferative cell nuclear antigen

目前研究发现维甲酸类化合物对多种肿瘤及癌前期病变有防治作用[1],芳维A酸乙酯(Arotinoid ethylester, AE, Ro13-6298)能诱导细胞正常分化,抑制增殖,诱导凋亡。研究表明,鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase, ODC)在生长迅速的细胞及肿瘤细胞内含量远高于生长缓慢的细胞或静止细胞,当用促癌物刺激细胞时,ODC活性急剧升高,因此ODC可作为癌生长的标志物[2]。增殖细胞核抗原(Proliferative cell nuclear antigen, PCNA)分布与肿瘤细胞或其它增殖活跃细胞的分布密切相关,也是近年发现的细胞增殖活性标记之一[3]。ODC、PCNA在肿瘤的发生发展过程中起重要作用,本实验通过检测在巴豆油/DMBA诱发小鼠乳头状瘤形成的过程中,芳维A酸乙酯对ODC、PCNA的影响,探讨芳维A酸乙酯的癌化学预防作用机制。

1 材料与方法

1.1 鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性测定材料与方法

1.1.1 实验动物 昆明种雌性小白鼠,体重20~30 g,购于第三军医大学实验动物中心,实验前用脱毛剂脱去背部皮毛,范围约2 cm×3 cm大小。

1.1.2 主要试剂 芳维A酸乙酯由重庆必扬生物工程公司提供。动物口服芳维A酸乙酯用植物油溶解。巴豆油由四川省中药研究所提供,用丙酮配制。7,12-二甲基苯蒽(DMBA)为Fluck公司产品,磷酸吡哆醛为Sigma公司产品,DL-(1-^{14}C)鸟氨酸(2.07 GBq/mmol)为Amersham公司产品。

1.1.3 鸟氨酸脱羧酶活性测定方法[4] 根据实验设计按时取背部脱毛区皮肤,除去真皮部分,剪碎表皮,加入适量的提取液,然后参照O'Brien等的方法测定ODC活性。

1.1.4 实验内容及分组 测定小鼠皮肤乳头状瘤二阶段模型过程中ODC的动态变化。将100只小鼠随机分为实验组(Croton oil+AE)和对照组(Croton oil),每组50只。第一步:癌变启动阶段,于实验第1、7、14天用DMBA丙酮液0.2 ml(含DMBA 150 μg)涂于所有小鼠背部脱毛区皮肤;第二步:促进乳头状瘤形成阶段,从第3周起,所有小鼠背部脱毛区涂0.5%巴豆油丙酮液0.2 ml,每周2次(周二、周五),5 h后各组处死6只小鼠测ODC酶活性。其中实验组小鼠每周给予芳维A酸乙酯(0.05 mg/kg)2次(周一、周四)。不用芳维A酸乙酯处理组为对照组。实验至对照组小鼠有乳头状瘤出现为止。

1.2 PCNA指数检测材料与方法

1.2.1 标本来源 取癌变促进阶段小鼠背部皮肤,经固定、包埋的石蜡块切片所得,巴豆油刺激前以及第2、4、6、8次涂巴豆油后(即开始涂巴豆油后第1、2、3、4周末),所取实验组和对照组标本的石蜡切片。各组每个时相点3个标本。

1.2.2 材料 PCNA免疫组化染色试剂盒:正常山羊血清,用于组织切片的封闭。小鼠抗增殖细胞核抗原,克隆编号:

作者简介:王儒鹏(1971—),男,重庆市人,硕士,医师,主要从事芳维A酸乙酯的癌化学预防作用机制方面的研究。电话:(023)68755000-74640
收稿日期:2000-03-10;修回日期:2000-08-10

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

PC10, 美国 CALBIOCHEM 公司产品。生物素化山羊抗小鼠 IgG, SABC, 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物, 抗原修复液。

1.2.3 方法 常规石蜡切片免疫组化染色。

1.2.4 结果评定标准 将免疫组化染色处理后的切片放在光学显微镜下观察, PCNA 定位于核内, 呈棕黄色、褐色为阳性表达细胞, 在高倍镜下计数, 每个时相点 3 个标本, 每个标本选 5 个典型视野计数。记每 100 个细胞核中阳性标记核数量, 取平均值, 计算 PCNA 表达指数。即 PCNA 指数= 阳性细胞数÷总细胞数×100%。

1.3 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2 结果

2.1 芳维 A 酸乙酯对小鼠皮肤乳头状瘤二阶段模型过程中 ODC 动态变化的影响

ODC 检测实验以小鼠有乳头状瘤出现为止。因对照组有部分小鼠于第 5 周出现了乳头状瘤, 所以第 5 周停止实验。芳维 A 酸乙酯组小鼠未出现明显的维甲酸过多综合征, 见表 1。

表 1 巴豆油促癌阶段 ODC 活性动态变化
($pmol\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 ODC activity at cancer-promoting stage
($pmol\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Frequency	Croton oil(n=3)	Croton oil+AE(n=3)
1	10.10±0.45 *	5.34±1.09
2	11.35±3.25 *	6.35±1.86
3	14.40±2.79 *	5.16±0.39
4	12.23±1.21 *	7.14±2.00
5	19.07±2.45 *	8.02±0.87
6	22.54±3.80 *	5.72±1.58
7	20.85±5.43 *	6.94±2.60
8	22.91±3.12 *	6.67±3.45

*: $P<0.01$ vs croton oil+AE

2.2 芳维 A 酸乙酯对癌变促进阶段小鼠表皮 PCNA 表达的影响

2.2.1 免疫组化染色观察 所有切片均可见到呈棕黄色的 PC10 阳性表达细胞, 阳性表达物质主要定位于细胞核内, 呈块状或颗粒状分布, 或两者兼而有之, 见图 1, 2。



图 1 对照组第 2 次涂巴豆油后(1 周末)小鼠表皮 PCNA 表达轻度增加, 基底层和基底上层都有表达 (PCNA× 200)

Fig 1 PCNA slightly increased in both basal layer and upper layer PCNA staining of control group after applying croton oil two times (PCNA×200)



图 2 实验组第 2 次涂巴豆油后(1 周末)小鼠表皮 PCNA 表达基本上局限于基底层 (PCNA× 200)

Fig 2 PCNA staining limited in basal layer PCNA staining of test group after applying croton oil two times (PCNA× 200)

2.2.2 PCNA 表达指数见表 2。

表 2 各阶段 PCNA 表达指数(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 PCNA expression index(%, $\bar{x}\pm s$)

Weeks	Normal control	Croton oil(n=15)	Croton oil+AE(n=15)
0	9.06±0.42	8.93±0.31	9.60±0.92
1	9.06±0.42	14.50±0.5 ※	11.47±1.01△
2	9.06±0.42	22.06±1.33 ※	15.13±0.90△△
3	9.06±0.42	28.46±2.66 ※	16.23±1.24△△
4	9.06±0.42	41.47±4.39 ※	19.33±1.94△△

※: $P<0.01$ vs normal control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ vs croton oil

3 讨论

芳维 A 酸乙酯是第 3 代维甲酸类化合物的重要代表物, 具有明显的抗角化、抗过度增殖作用。小鼠二阶段皮肤乳头状瘤模型是目前常用的评价化合物癌化学预防作用的动物模型, 它是一种癌前期病变, 我们先前的实验表明芳维 A 酸乙酯对二甲基苯蒽/巴豆油诱发小鼠皮肤乳头状瘤的发生有较强抑制作用, 降低乳头状瘤发生率, 对已发生的乳头状瘤有消退作用, 具有肯定的癌化学预防作用。

ODC 是聚胺生物合成的第一个限速酶, 当用促癌物刺激细胞时, ODC 活性急剧升高, 在二甲基苯蒽/巴豆油诱发小鼠皮肤乳头状瘤模型中, 巴豆油的主要成份弗波酯促癌剂促进皮肤乳头状瘤的能力与它们诱导的 ODC 的能力有密切相关[5]。在二甲基苯蒽/巴豆油诱发小鼠皮肤乳头状瘤模型中, 第一阶段为启动阶段, 即 DMBA 作用期, 遗传物质 DNA 受到损害, 这个过程作用时间较短, 第二阶段为促癌阶段, 在致癌因素(巴豆油、TPA 等)刺激下, 正常细胞开始向异型增生转变, 因此这个阶段应是细胞内发生各种变化较明显的时期, 实验表明 ODC 活性在这个时期呈逐渐升高的趋势, 在巴豆油促癌阶段, 第 3 周开始(也即第 5 次给予巴豆油后)ODC 值迅速升高, ODC 活性的升高先于乳头状瘤出现, 表明 ODC 含量的升高可以预示乳头状瘤的出现。但在给予芳维 A 酸乙酯的实验组, ODC 活性

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

并没有随着实验时间的延长而出现明显的升高，且至实验结束时，实验组小鼠未出现乳头状瘤，这种动态性变化更能说明 ODC 在正常皮肤向癌前期病变、癌症演变过程中所起作用，以及芳维 A 酸乙酯对 ODC 活性的抑制，是它对二甲基苯蒽/巴豆油诱发小鼠皮肤乳头状瘤的抑制作用的重要作用机制。

PCNA 分布与肿瘤细胞或其它增殖活跃细胞的分布密切相关，是近年发现的细胞增殖活性标记之一，因此在判断正常及肿瘤细胞周期，检测细胞增殖程度及鉴别诊断上有很大意义[6]。实验结果显示，在正常的成年小鼠表皮中，PCNA 表达呈弱阳性，而且只限于在表皮基底层表达，一般不出现在棘层及其以上位置。说明在正常情况下，小鼠表皮保持着一定的生长速度，维持皮肤的正常新陈代谢，但是这种增殖分裂强度不高。在用巴豆油不断刺激的对照组中，随着刺激次数的增加，PCNA 表达呈不断上升的趋势，且对照组部分小鼠已开始出现乳头状瘤，结果显示随着巴豆油刺激次数的增加，PCNA 表达呈上升趋势，增加的趋势也越明显。在开始出现乳头状增生的皮肤周围，PCNA 表达急剧升高，并伴随皮肤结构的改变。在出现乳头状瘤的对照组小鼠皮肤，可见 PCNA 表达呈团状、巢状，遍布整个瘤体组织。然而在同时用芳维 A 酸乙酯处理的实验组中，总体上升趋势缓慢，说明芳维 A 酸乙酯能够抑制小鼠表皮细胞 PCNA 表达，反映出它能抑制小鼠表皮细胞的增殖，抑制促癌物诱导的乳头状瘤的出现，这个结果与其它实验结果一致，即芳维 A 酸乙酯对 DMBA/巴豆油诱发的小鼠表皮乳头状瘤有明显的化学预防作用，能明显延长乳头状瘤发生潜伏期。

以上结果表明芳维 A 酸乙酯抑制增殖的标志物 ODC、PCNA 的表达，证实了它在癌变促进期的抗增殖、抗肿瘤作用，因此可以推测它在对癌前期病变和多种肿瘤的防治等方面具有一定的作用。

参考文献：

[1] Lee H Y, Dohi D F, Kim Y H, *et al*. All-trans retinoic acid converts E2F into a transcriptional suppressor and inhibits the growth of normal human bronchial epithelial cells through a retinoic acid receptor-dependent signaling pathway[J]. J Clin Invest, 1998, 101(5): 1 012—1 019.
[2] Rowland H D. Sequestered and products and enzyme regulation: The case of Ornithine decarboxylase[J]. Microbiol Rev, 1992, 56(2): 280—290.
[3] Tsuji T, Kitajima S, Koashi Y. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis related antigen (LeY) in epithelial skin tumors[J]. Am J Dermatopathol, 1998, 20(2): 164—169.
[4] Bauske R, Milovic V, Turchanowa L, *et al*. EGF-stimulated polyamine accumulation in the colon carcinoma cell line, Caco-2[J]. Digestion, 2000, 61(4): 230—236.
[5] Rui H. Research and development of cancer chemopreventive agents in China[J]. J Cell Biochem, 1997, 27(Suppl 1): 7—11.
[6] Carlson J A, Ambros R, Malfetano J, *et al*. Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective, implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia[J]. Hum Pathol, 1998, 29(9): 932—948.

（编辑 潘式文）

文章编号：1000-5404(2001)06-0685-01

个案与短篇

中药药浴治疗类风湿关节炎的护理

Nursing care of treating rheumatoid arthritis by medicated bath with Chinese traditional herbs

李祯英 （第三军医大学附属西南医院中医科，重庆 400038）

中药药浴是古代的一种治疗方法，中医古代认为类风湿关节炎属痹症范畴，以中药药液浸泡患者全身或肢体，能祛风除湿、祛寒，以疏通经络，运行气血[1]，从而产生消炎，消肿，减轻筋脉关节拘挛，恢复关节功能的治疗效果。

1 临床资料

本科从 1997 年 2 月至 2000 年 6 月间，按美国风湿病协会 1987 年诊断标准收治类风湿关节炎病例 330 例，分为中药药浴加常规抗风湿药物治疗组和单纯常规抗风湿药物治疗组两组。药浴组 165 例。男：41 例，女：124 例，年龄最大 76 岁，最小 17 岁，病程为 3 月至 8 年；常规组 165 例。男：63 例，女：102 例，年龄最大 81 岁，最小 8 岁，病程 5 月至 8 年。两组在抗风湿药物的使用均相同。药浴组加上中药药浴（具体方法见后），两组治疗时间为 30～45 d。结果：关节炎症，肿胀，疼痛，关节运动障碍等均有不同程度的缓解或减轻，药浴组有效率为 91.2%，常规组为 70.8%，$P<0.05$。故对关节的肿胀，疼痛的缓解与减轻，关节功能障碍的恢复方面药浴组优于常规组，其它指标，如血沉及类风湿因子的改善方面两组无显著性差异。

2 护理

由于本病病变部位主要累及骨与关节，致使关节滑膜异常增殖，覆盖软骨表面，使关节韧带松驰，关节偏斜、脱位、软组织填充空隙而形成粘连，患者为了减轻疼痛，不愿伸直肢体，长期采取屈曲姿势，致使病变关节粘连、机化、形成畸形，最后关节

作者简介：李祯英(1965—)，女，重庆市人，主管护师，主要从事临床护理方面的研究。电话：(023)65321368

收稿日期：2000-12-15；修回日期：2001-05-15

（下转 688 页）

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