DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.015

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0910-03

三苯氧胺联合全反式维甲酸对大鼠乳腺癌的预防作用

张 毅,姜 军,韩晓蓉,原莉莉 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨联合应用三苯氧胺及全反式维甲酸对实验性大鼠乳腺癌发生促进期的化学预防作用。**方法** 利用二甲基苯蒽(DMBA)诱导大鼠乳腺癌发生,在给药后第8周应用三苯氧胺(TAM)和全反式维甲酸(RA),在第24周观察大鼠乳腺肿瘤发生情况及乳腺发育情况。**结果** 对照组大鼠乳癌发生率为70.58%;TAM组与RA组发生率分别为22.02%和15.79%,明显低于对照组($P<0.05$);TAM+RA组无乳腺肿瘤发生($P<0.01$)。组织学及电镜观察发现,TAM组和RA组乳腺上皮均有不同程度增生或不典型增生,联合用药组乳腺上皮发育良好。**结论** 联合应用三苯氧胺和维甲酸,二者在阻止乳癌发生过程中有显著的协同作用。

关键词: 三苯氧胺;全反式维甲酸;乳腺癌;癌前病变

中图法分类号: R737.9;R979.1 **文献标识码:** A

Preventive effect of tamoxifen combined with all-trans retinoic acid on breast carcinogenesis in Wistar rats

ZHANG Yi, JIANG Jun, HAN Xiao-rong, YUAN Li-li (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the possible roles of chemical preventing promotion phase of breast carcinogenesis by tamoxifen combined all-trans retinoic acid in Wistar rats. **Methods** A total of 80 rats were randomly divided into 4 groups: control group (A), tamoxifen group (B), retinoic acid group (C) and tamoxifen combined with all-trans retinoic acid group (D). DMBA(7,12-dimethylbenz(a)anthracence) was used to induce carcinogenesis in all female Wistar rats. At 8th week after DMBA administration, tamoxifen and all-trans retinoic were given. At 24th week, all rats were killed to be observed the incidence of breast carcinoma and development of mammary gland. **Results** The incidence of breast carcinoma in group B(22.02%) and group C(15.79%) were significant lower than that in control(70.58%) ($P<0.05$). In group D, no breast carcinoma was found ($P<0.01$). Histological and electron-microscopic observation showed proliferation of glandular epithelial cell or atypical hyperplasia in varying degree both in group B and C. No abnormal finding was found in the development of mammary gland epithelia in group D. **Conclusion** Tamoxifen combined with all-trans retinoic acid are synergistical in inhibiting the breast carcinogenesis.

Key words: tamoxifen; all-trans retinoic acid; breast carcinoma; precancerous lesion

在乳腺癌的预防上可通过3个阶段:消除或避免致癌因素、干预致癌物在体内代谢及治疗癌前病变。目前公认治疗癌前病变是乳腺癌预防的主要手段[1,2]。本研究利用化学致癌剂复制乳腺癌动物模型,在肿瘤发生的促进期联合应用三苯氧胺及维甲酸,观察两种药物联合应用对乳腺癌的化学预防作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雌性Wistar大鼠80只,50~60 d龄,体重90~110 g,购自第三军医大学实验动物中心。随机分为对照组(A)、三苯氧胺(Tamoxifen,TAM)组(B)、维甲酸(Retinoic acid,RA)组(C)和TAM+RA组(D),每组20只。

1.2 药品

致癌剂二甲基苯蒽(DMBA)购自美国Sigma公司。

1.3 模型制作

以二甲基苯蒽20 mg/100 g灌胃复制乳腺癌动物模型[3]。对照组单用致癌剂,观察组给致癌剂后8周:B组饮用水中加用三苯氧胺(按标准饮水量60 ml/100 g,约三苯氧胺4 mg/kg),普通饲料喂养;C组饲料中加用全反式维甲酸(按标准进食量约30 g/100 g,约维甲酸30 mg/kg),饮用清水;D组饮用水中加用三苯氧胺,饲料中加用全反式维甲酸,给药方式分别与B、C组相同。24周后活杀大鼠观察肿瘤发生情况。

1.4 病理组织学观察

大鼠活杀后取乳腺及肿瘤10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片,HE染色,组织学观察乳腺腺体变化及肿瘤病理学特征。

1.5 电镜观察

将新鲜标本切取1 cm^3 小块,2.5%戊二醛固定,磷酸缓冲液冲洗,1%锇酸固定,逐级酒精脱水后环氧树脂包埋,1KB超薄切片机切成1 μm 半薄切片,组织定位后切成超薄切片,JEX-2000EX透射电镜观察。

1.6 统计学处理

采用 χ^2 检验,t 检验。

2 结果

2.1 肿瘤发生情况

第24周,A组存活17只,有12只有乳腺肿瘤发生,共检出肿瘤21个(其中7只大鼠为双原发肿瘤,1只为3个原发肿瘤),肿瘤直径0.5~3.5 cm,平均直径1.767 cm。B组存活18

基金项目:重庆市中青年专家基金资助项目

作者简介:张 毅(1969-),男,河南省新乡市人,硕士,医师,主要从事胃肠、乳腺、甲状腺方面的研究。电话:(023)65387389

收稿日期:2000-12-20;修回日期:2001-03-19

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

只，有 4 只有乳腺肿瘤发生，共检出肿瘤 4 个，肿瘤直径 0.6～1.3 cm，平均直径 1.0 cm。C 组存活 19 只，有 3 只有乳腺肿瘤发生，共检出肿瘤 3 个，肿瘤平均直径 0.8 cm。D 组存活 18 只，无肿瘤发生，见表 1。

表 1　DMBA 诱导大鼠乳腺癌的结果

Tab 1　Result of DMBA-induced breast carcinoma in rats

Group	Numbers of rats survived	Numbers tumors in survived rats	Size of tumors(cm, $\bar{x} \pm s$)
A	17	12	1.767 ± 0.867
B	18	4*	1.0 ± 0.231*
C	19	3*	0.65 ± 0.212*
D	18	0**	0**

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$ *vs* A

2.2　组织学观察结果

给药前 50～60 d 龄大鼠乳腺刚开始发育，组织学上无乳腺增生。给药 24 周后，经组织学观察，A 组大鼠乳腺肿瘤均为乳腺癌，B 组乳腺肿块 1 例为乳腺癌，3 例为不典型增生癌变，其余大部分无明显增生，小部分乳腺导管上皮增生、不典型增生；C 组乳腺肿块 1 例为乳腺癌，2 例为不典型增生癌变，其余乳腺组织突出表现为部分乳腺小叶增生、导管上皮增生和不典型增生；D 组乳腺均发育良好，未见明显增生。

2.3　超微结构观察

A 组癌组织具有典型乳腺癌超微结构特点，主要表现为细胞微绒毛减少、紊乱，胞质内线粒体、内质网、高尔基复合体发达，胞核可见不规则核，异染色质增多，见图 1。B 组乳腺上皮呈立方状，单层排列，增生细胞可多层排列，大小较一致；肿瘤细胞一般结构同 A 组，可见到少数凋亡细胞，核膜皱缩，异染色质聚集成块状，细胞器大部分崩解，线粒体结构基本正常，见图 2。C 组上皮细胞明显增生、层次增多，细胞大小不一，表面微绒毛减少、紊乱，部分细胞线粒体、核糖体丰富；肿瘤细胞分化更趋向良性，主要表现为胞核大小较一致，核分裂像少，见到较多的凋亡细胞，见图 3。D 组乳腺上皮基本同正常乳腺上皮，细胞大小一致，微绒毛密集，胞质内细胞器形态正常，胞核大小一致，异染色质少。

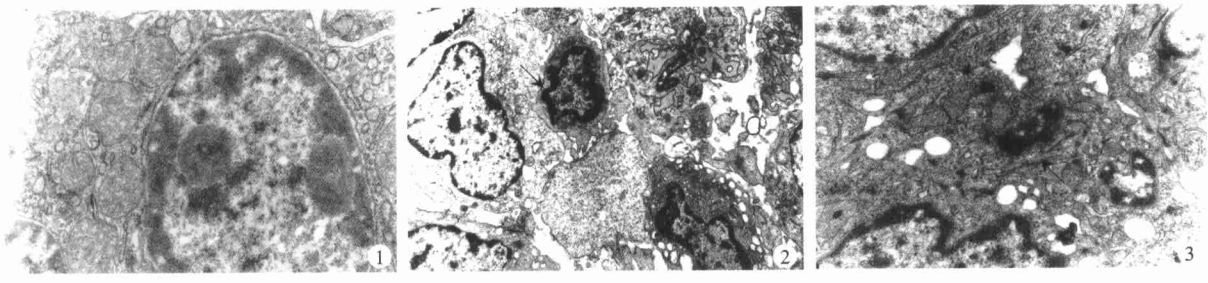


图 1　A 组乳腺癌细胞，胞质内线粒体、内质网、高尔基复合体及多聚核糖体明显增多　（TEM × 15 000）

Fig 1　Mitochodria, endoplasmic reticulum, Golgi body and polyribosome were significant increased in cytoplasm of cancer cell in group A　（TEM × 15 000）

图 2　B 组乳癌细胞，核膜皱缩，细胞器不丰富，细胞间排列紧密，可见凋亡细胞　（TEM × 4 000）

Fig 2　With nuclear membrane shrunken and organelles not abundant, cells tightly or ranged tightly and apoptotic tumor cells could be found in group B　（TEM × 4 000）

图 3　C 组乳癌细胞，分化程度较高，细胞器不丰富，可见凋亡细胞　（TEM × 10 000）

Fig 3　Cancer cells highly differentiated, organelles not abundant and apoptotic tumor cells could be found in group C　（TEM × 10 000）

3　讨论

三苯氧胺是一种雌激素拮抗剂，可阻断雌激素与受体的结合而使其不能发挥生物效应，目前已广泛应用于绝经期前后各期雌激素受体阳性乳癌患者。肿瘤诱导分化是肿瘤治疗的新途径，在体外培养细胞实验发现维甲酸对多种肿瘤细胞具有诱导向成熟分化的作用。全反式维甲酸在急性早幼粒白血病治疗中也获得巨大成功[4]，表明维甲酸具有强烈诱导分化的作用。三苯氧胺与全反式维甲酸联合应用在乳腺癌预防与治疗研究中尚处于探索阶段[5]。

本实验中利用三苯氧胺预防乳腺癌发生有较好效果，通过组织学及超微结构观察可发现，三苯氧胺阻止乳腺癌发生可能通过抑制上皮细胞增殖而实现。在乳癌发生促进期应用维甲酸，与对照组相比可有效预防乳腺癌的发生（$P < 0.05$）。病理学及超微结构特征显示其机制可能为维甲酸能阻止或逆转癌变过程早期乳腺上皮细胞增生和不典型增生的变化以及诱导凋亡。同时本组实验研究中发现，单独应用三苯氧胺或维甲酸，虽然实验期乳腺癌发生率明显低于致癌组（$P < 0.05$），但均有部分乳腺发生不典型增生甚至发生乳腺癌，但在联合用药组，基本上未发现上皮增生现象或乳腺癌，与 A 组及 B、C 组相比相差均较显著（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。提示这两种药物在 DMBA 诱导大鼠乳腺癌促进期预防中有协同作用，不但能阻止乳腺癌前病变的发展，而且能逆转癌前不典型增生，使其向正常细胞分化。为临床上联合应用雌激素受体阻滞剂与分化诱导剂治疗乳腺癌癌前病变提供重要实验依据。

参考文献：

[1] Engstrom P E. Cancer prevention and control prospect for the year 2000

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

[J]. Cancer, 1994, 74(4): 1 433 - 1 437.
[2] Budd G T, Adamson P C, Gapta M, *et al*. Phase Ⅰ/Ⅱ trial of all-trans retinoic acid and tamoxifen in patients with advanced breast cancer[J]. Clin Cancer Research, 1998, 4(3): 635 - 642.
[3] Labrie F, Li S, Labrie C, *et al*. Inhibitory effect of a steroidal antiestrogen on estrone-stimulated growth of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in the rat[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 33(3): 237 - 244.
[4] Huang M A. Use of all-trans retinoic acid in treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1988, 72(2): 567 - 572.
[5] Byrne I M, Flanagan L, Tenniswood M P, *et al*. Identification of a hormone-responsive promoter immediately upstream of exon 1c in the human vitamin D receptor gene[J]. Endocrinology, 2000, 141(8): 2 829 - 2 836.

(编辑 潘式文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)08-0912-01

骨肉瘤中肥大细胞计数与预后的关系

Relationship of mast cell counting and prognosis in osteosarcoma

郭乔楠, 陈意生 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所, 重庆 400038)

我们在骨肉瘤的病理研究过程中发现, 许多骨肉瘤标本中有肥大细胞浸润。而肥大细胞浸润与骨肉瘤患者预后间有何关系尚不清楚, 本研究对此进行了初步探讨。

1 材料与方法

取自我校第一、二附属医院及重庆市肿瘤医院病理科有完整随访资料的1978 - 1994年的骨肉瘤存档蜡块共96例。

染色试剂配置: 甲苯胺蓝0.5 g, 50%酒精100 ml。

染色方法: 切片厚0.5 μm, 常规脱蜡至蒸馏水; 用0.5%甲苯胺蓝酒精溶液染色3 ~ 5 min; 蒸馏水速洗; 经0.01%伊红水溶液1 min; 以95%酒精分色, 两次各1 ~ 2 min; 入100%酒精脱水, 二甲苯透明; 中性树胶封片。

判断标准: 肥大细胞颗粒呈深蓝紫色, 细胞核蓝色。

统计学处理: 用log rank时序检验作预后分析。

2 结果

肥大细胞可分布于肿瘤周围的结缔组织内或肿瘤细胞之间, 多散在分布。其与预后的关系见图1。

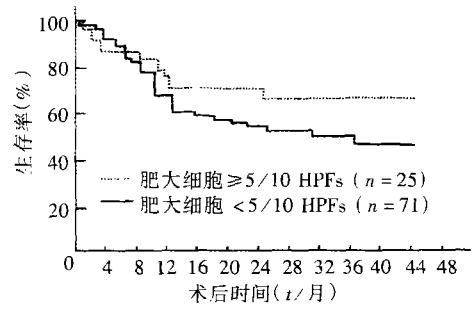


图1 肥大细胞计数与骨肉瘤患者预后间的关系

经统计学处理, 两者的总生存率有非常显著的统计学差异($P < 0.01$)。即肥大细胞计数大于5者(每10个高倍视野)的患者的总生存率(68.00%)明显高于小于5者(42.11%)。

3 讨论

Ehrlich最先提出肥大细胞参与抑制肿瘤生长的作用, 肥大细胞越多, 预后越好[1]。这在软组织肉瘤、乳腺癌及宫颈癌中都有报道[2,3]。肥大细胞脱颗粒(组胺、5-羟色胺及肝素)可抑制肿瘤生长。Lynch提示肥大细胞参与宿主对肿瘤细胞的变应性反应。肥大细胞对肿瘤生长的防御性作用可能与T细胞介导的细胞毒作用有关, 这在实验肿瘤中已得到证实。另外, 有人报道肿瘤周围的肥大细胞不同于正常组织中的肥大细胞, 它们不含肝素, 存在着脱颗粒现象, 与肿瘤细胞、淋巴细胞和巨噬细胞密切接触, 共同参与对肿瘤的防御作用[4], 但是, 最近亦有报道肥大细胞的另一个作用, 即肥大细胞参与了肺腺癌及喉鳞癌的血管生成, 肥大细胞可释放血管内皮生长因子(VEGF)[5]。所以, 有关肥大细胞在肿瘤中(包括骨肉瘤)作用的确切机制还有待继续研究。本结果与上述文献结果相一致, 即肥大细胞越多, 预后越好。肥大细胞检测技术简单, 甲苯胺蓝或HE染色下都可见, 可作为一项预后判断的参考指标。

关键词: 骨肉瘤; 肥大细胞; 预后
中图法分类号: R738.1 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Graham R M, Grahar J B. Mast cell and cancer of cervix[J]. Surg Gynecol Obstet, 1996, 123(1): 3 - 9.
[2] 杨美林, 张秀清, 何安泰, 等. 唇癌与肥大细胞关系的组织化学与电镜观察[J]. 中华口腔医学杂志, 1997, 32(1): 13 - 15.
[3] Tomita M, Matsuzaki Y, Onitsuka T. Effect of mast cells on tumor angiogenesis in lung cancer[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69(6): 1 686 - 1 690.
[4] Takanami I, Takeuchi K, Naruke M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma[J]. Cancer, 2000, 88(12): 2 686 - 2 692.
[5] Sawatsubashi M, Yamada T, Fukushima N, *et al*. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Virchows Arch, 2000, 436(3): 243 - 248.

(编辑 潘式文)

作者简介: 郭乔楠(1964 -), 女, 湖南省桃源县人, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤病理学方面的研究, 发表论文20篇。电话: (023)68753291

收稿日期: 2000-12-01; 修回日期: 2001-03-26

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