

蟾酥对大鼠气管体外诱癌与鸡胚皮肤接触培养的抑癌作用观察*

湖北医学院病理解剖教研室 祝银梅 田鸿生 王典义 高文琴

内容提要 本研究用 Sprague-Dawley 大鼠气管体外诱癌与鸡胚皮肤接触培养的方法, 通过倒置显微镜、光镜和扫描电镜观察了蟾酥的抑癌作用。结果表明: (1) 诱发性大鼠气管癌变细胞, 具有向鸡胚皮肤侵袭性生长的生物学行为。同时证明蟾酥对大鼠气管体外诱癌过程具有抑制作用。(2) 蟾酥具有逆转大鼠气管上皮的异型性鳞状化生, 促进气管受损粘膜的修复和保护气管上皮正常分化的作用。(3) 在 MCA 作用下可见纤毛细胞增生和化生。

我们用大鼠气管体外化学诱癌过程与鸡胚皮肤接触培养的方法, 观察了蟾酥的抑癌作用。

材料和方法

一、气管环及药物: (1) Sprague-Dawley 近交系大鼠 16 只 (本室繁育), 体重 100~120 g, 雌雄兼有, 用腹主动脉放血法处死后, 立即无菌取出气管制成厚 1 mm 的气管环。每个气管可剪成气管环 10~12 个。(2) 3-甲基胆蒎 (MCA) 2 mg 加入 2 ml 吐温 80 制成混悬液。(3) 蟾酥注射液: 新鲜蟾酥除去动物性蛋白质及脂溶性部分的灭菌水溶液 (江苏盱眙制药厂出品)。

二、分组: 随机将上述气管环分为以下五组进行培养: N 组 (正常对照组), 培养液 (见后)。M 组 (诱癌组), 培养液加 MCA 0.5 μg/ml。S 组 (抑癌组), 培养液加 MCA 0.5 μg/ml, 蟾酥注射液 50 μg/ml。MS 组 (逆转组): 气管环用 M 组培养液培养 2 周后, 换用仅含蟾酥 50 μg/ml 的培养液继续培养 2 周。观察蟾酥对 MCA 诱发气管上皮异型鳞状化生的逆转作用。MN 组 (逆转对照组): 气管环用 M 组培养 2 周后, 换用 N 组培养液继续培养 2 周, 作为 MS 组的对照。

三、鸡胚皮肤浸润实验: 来航鸡种蛋 (购于武汉大学养鸡场) 在温度 37.5~38.5°C, 湿度 40~60% 的条件下孵育 9~10 天。实验操作按 Noguchi 的方法⁽¹⁾加以改进, 分为下述四个步骤:

1. 高压灭菌的 1% 琼脂于 60°C 左右倒入 6 cm 平皿内 5 ml。约 40°C 时将不锈钢网 (1.5×1 cm) 轻植入半固体琼脂表面。然后在钢网上面加一薄层半固体培

养基 (琼脂、小牛血清、鸡胚浸出液以 10:4:4 的比例配制)。

2. 无菌法剥取孵育 10 天的鸡胚背部皮肤, 置于上述半固体培养基上, 使鸡胚皮肤 (CES) 真皮面朝上。

3. 将培养第 3、4 周的 M 组、S 组、N 组的气管环纵剪成气管片, 放在 CES 真皮面, 使气管粘膜面与 CES 真皮面接触培养。

4. 把玻璃环 (0.4×0.2 cm) 嵌在载有气管片的 CES 上。最后在玻璃环内滴加适量含 20% 小牛血清的 Eagle MEM, 置于 CO₂ 孵箱内培养 3 天, 于第 4 天取出培养物固定于 Bouin 氏液中, 常规石蜡切片。

四、培养条件及观察方法

培养液为日本的 Eagle MEM 加入 L-谷酰胺 2 mM、青霉素 100 u/ml、链霉素 100 μg/ml, 不加血清。pH 7.2~7.4。CO₂ 孵箱培养, 温度 36.8~37°C, 湿度 98%, 5% CO₂, 95% 空气, 隔天换液一次, 每周在倒置显微镜下观察纤毛运动及细胞脱落情况。共培养 4 周。

每组每周取材一次, 每次取 4 环, 其中 2 环用 Bouin 氏液固定, 石蜡切片, HE 染色, 光镜观察; 2 环按常规制作扫描样品, 用日立 S-450 型扫描电镜观察。

结 果

一、N 组 (正常对照组): 第 1~2 周在倒置显微镜下见气管上皮纤毛运动呈麦浪样, 第 3~4 周纤毛运动明显, 但其运动程度变弱, 广度缩小。细胞脱落较少, 粘膜面可见细小突起。1~4 周的光镜观察, 见气管上皮为低柱状纤毛细胞, 单层扁平或单层立方

* 本课题由湖北省科委资助

细胞。鸡胚皮肤未见浸润。扫描电镜观察, 1~4周气管上皮分为纤毛细胞区和非纤毛细胞区。

二、M组(诱癌组)和S组(抑癌组)

倒置显微镜观察: M组气管纤毛运动由第1周活动减弱到第2周完全消失。上皮细胞脱落现象第1周较多, 第2周达高峰, 以后逐渐减少。在细胞脱落过程中伴有细胞增生, 使粘膜呈现粗糙和凸凹不平的图象。S组纤毛运动维持了3周, 细胞脱落比M组明显减少, 粘膜面基本光滑仅见少数细小突起。光镜观察: M组第1周气管上皮为单层立方, 仅灶性轻度增生。第2周出现局部鳞状化生, 细胞3~4层, 极向性消失, 具有一定异型性, 可见核分裂相。第3~4周细胞增生达7~8层, 见广泛鳞状化生及早期癌变。细胞核浆比例增大, 核异染色质增多, 核仁增大增多, 有的可见3个核仁。核分裂相增多并见病理性核分裂。而S组培养1~2周由于有少部分细胞脱落使气管上皮呈间断性分布, 3~4周又能维持整齐连续的单层扁平细胞和单层立方细胞, 少数为低柱状纤毛细胞, 没有出现M组的癌变表现。

鸡胚皮肤浸润实验: M组第3周的气管片与鸡胚皮肤接触培养, 见有异型细胞向鸡胚真皮层浸润的趋势。第4周观察到气管片段的病变程度不一致, 有的细胞分化较低, 异型性明显, 表现为巨核细胞, 细胞体积大, 核大浓染, 胞浆极少, 有的甚至呈“裸核”样, 这些细胞散在分布, 向鸡胚真皮靠近, 有的正向鸡胚真皮浸润, 有的完全侵入鸡胚真皮较深处; 而S组未见浸润。

扫描电镜观察: M组于诱癌早期(1~2周)气管粘膜细胞增生, 表面呈现隆起和泡状突起, 且有些仍具有束状短纤毛。到诱癌后期呈现大小不等的象鹅卵石铺路样的细胞突向腔面, 有的细胞似桑椹样, 有的细胞表面小泡甚多。S组细胞表面超微结构与N组相似。

三、MS组(逆转组)与MN组(逆转对照组): M组、MN组和MS组气管上皮组织结构比较, 见附表。

附表 M、MN和MS三组气管上皮组织结构比较

		培 养 时 间 (周)		
		2	3	4
M组	异型性鳞状化生	早期癌变	异型性明显, 细胞向鸡胚皮肤真皮浸润性生长	
MN组	异型性鳞状化生	规则性鳞状化生	规则性鳞状化生	
MS组	异型性鳞状化生	局部轻度增生	未见增生灶, 全部为整齐的单层扁平细胞	

讨 论

根据上述实验结果中M组与S组的比较, 表明蟾酥对大鼠气管体外化学诱癌过程具有抑制作用, 并促进气管受损粘膜的修复和保护气管上皮的正常分化。

分析附表MN组可知当除去致癌质后, 呼吸道上皮对该致癌质引起的细胞损害, 具有一定的修复能力, 但并未达到完全修复的程度, 尚存留鳞状化生病变。而MS组当去掉MCA改用含蟾酥的培养液培养后, 异型性鳞状化生逆转为正常的气管上皮, 说明蟾酥对异型性鳞状化生具有逆转作用, 这在预防肺癌方面具有重要意义。

人和动物呼吸道粘膜上皮的羟化酶具有激活多环芳烃(PAH)的代谢作用从而引起癌变。这一过程需要氧和NADPH。文献报道蟾酥能抑制体外白血病细胞的糖酵解和呼吸过程。因此, 我们推测本实验的蟾酥抑癌机理, 可能与蟾酥抑制细胞呼吸从而发挥抗氧化剂的作用有关。

值得提出的是, 本实验M组可见少数纤毛细胞增生活跃, 向腔面突出, 细胞表面有许多泡状隆起和突起, 其超微结构形态与异型增生细胞或肿瘤细胞相似。这说明在MCA作用下纤毛细胞并非全部脱失, 而有一部分可发生逆向分化, 形成非典型增生灶, 并可能成为支气管癌的起源细胞。关于肺癌组织发生问题, 人们的传统观点是, 表皮样癌来源于基底细胞及粘液细胞, 认为这两种细胞具有潜在性增生、化生和肿瘤性转化能力; 而认为纤毛细胞不能分裂, 属终末期细胞⁽²⁾。但是, 根据本实验结果, 结合近来Uriel⁽³⁾等提出的癌变逆分化学说, 我们认为纤毛细胞也具有增生、化生和癌变的可能。

(本实验得到本室邹祖玉、刘晓翌、夏东、陈道平、王敏等同志的帮助, 特致谢意)

参 考 文 献

1. Noguchi PD, et al. Chick embryonic skin as a rapid organ culture assay for cellular neoplasia. *Science* 1978; 199(3):980.
2. Turmp BF, et al. The respiratory epithelium III. Histogenesis of epidermoid metaplasia and carcinoma *situ* in the human. *JNCI* 1978; 61:563.
3. Uriel J. Retrodifferentiation and the fetal-patterns gene expression in cancer. *Adv. Cancer Res.* 1979; 29:12.

Genetic Characteristics in Yang(阳)Deficiency Patients

Feng Dongnian(冯栋年), Liu Yanling(刘燕玲)

Fourth People's Hospital, Xuzhou

With regard to genetic aspects, the authors determined the HLA typing in 50 cases of Yang deficiency(YD)-syndrome and 230 healthy controls. Rohrer index and costae arcuaria angle were also measured in 50 cases of YD syndrome and 60 healthy controls. The results showed that the distributional frequencies of HLA-B₈ ($P < 0.05$), CW₂ ($P < 0.01$), and A₉ ($P < 0.05$) in YD were significantly lower than those in normal controls. It reflected the genetic characteristics of YD syndrome indirectly. The YD patients had higher Rohrer index (more than 1.50) than normal controls. The costae arcuaria angle of YD group was 80 ± 14.35 degree (mean $\pm$ SD), and that of normal controls was 69.5 ± 11.83 degree. These indicated that fattiness was more often seen in the YD group.

(Original article on page 24)

Inhibitory Effects of New-Breviscapine on Thrombosis in Vivo

Wang Zhaoyue(王兆悦), et al

Suzhou Medical College, Suzhou

New-Breviscapine is an anti-platelet compound with some kinds of salts extracted from a Chinese herb *Erigeron breviscapus*. In aortic thrombus formation in rabbits, the platelet 5-HT release reaction and platelet destruction could be reduced by the compound, meanwhile aortic thrombosis was inhibited with a clear correlation between drug dosage and its efficacy. It was shown that new-breviscapine could inhibit the production of TXB₂ and 6-keto-PGF₁ α by platelets and endothelial cells respectively. The data suggest that new-breviscapine has a significant inhibitory effect on thrombus formation in vivo through suppression of platelet functions.

(Original article on page 26)

Inhibitory Effects of Secretio Bufonis on the Carcinogenesis of Rat Trachea Contacted with Chick Embryonic Skin in Culture

Zhu Yinmei(祝银梅), Tian Hongsheng(田鸿生), et al

Dept. of Pathology, Hubei Medical College, Wuhan

The present investigation evaluated the inhibitory effects of Secretio Bufonis on the carcinogenesis of rat trachea contacted with chick embryonic skin (CES) in culture under inverted microscopy, light microscopy and scanning electron microscopy. The experimental results showed that the malignant cells of tracheal rings revealed an invasion into the CES in the group M but the group N and group S did not. It suggested that Secretio Bufonis might inhibit the carcinogenesis induced by MCA, reverse the atypical squamous metaplasia, promote the repair of tracheal mucosa and maintain normal differentiation of the rat tracheal epithelia. In addition, group M indicated the hyperplasia and metaplasia of some ciliated cells exposed to MCA.

The mechanism of Secretio Bufonis against lung cancer and the possibility of canceration of ciliated cells have been discussed.

(Original article on page 29)