

PRELIMINARY INVESTIGATION ON THE MECHANISM OF ANTICANCER BY BERBAMINE DERIVATIVE(EBB) IN VITRO

ZHANG Jin Hong XU Nai Han XU Chang CHEN Jia Tong LIU Hui Jun

(*Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin, 300071*)

DUAN Jiang Yan

(*Department Biology, Shanxi Normal University, Linfen, 041004*)

ABSTRACT

In this paper, the inhibitory mechanism of tumor cell proliferation by a derivative berbamine (o-4-ethoxl-butyl-berbamine, EBB) has been studied.

Experimental results showed that EBB as a new and strong CaM antagonist, inhibited proliferation of human lung cancer cells(PG) and had no significant toxic effect on normal lung cells(HEL). EBB inhibited the expression of CaM gene on the transcription and translation level. It can also inhibit the expression of oncogene(c-myc and c-H-ras) in PG cells, and reverse proliferation of the malignant lung cancer cells(PG) due to high mutation frequency of p53 and Rb genes.

Key words: Derivative berbamine Anticancer Gene experssion

小鼠皮肤癌变过程中 GST- π 免疫组化染色观察

刘音^{*,***} 林敬连^{****} 金周永^{*} 成彦起^{*} 欧阳喈^{**} 李隆昌^{*}

(* 韩国岭南大学医学院解剖学教室 大邱 705-717 ** 白求恩医科大学口腔医学院病理科 长春 130042

*** 大连大学生物工程学院 大连 116622 **** 大连大学学生处 大连 116622)

谷胱甘肽 s-转移酶(GSTs)在 1961 年首次被鉴定^[1],是一种多功能的解毒酶,其主要功能是水解有毒物质中谷胱甘肽的亲电子结构,以破坏谷胱甘肽,从而保护细胞不受有毒物质的侵害。这些有毒物质包括致癌因子和具有细胞毒作用抗癌药物^[2]。在人类,GSTs 根据其砵基和结构不同被分为三类: α 、 μ 和 π ,其中 α 呈硷性(pH>8.0), μ 为中性(pH=7.0-8.0), π 为酸性(pH<7.0)。这三类蛋白起源于各自不同的基因,每一种蛋白都为整个机体的存活提供重要作用。研究表明,从鼠类胎盘和从人类胎盘提取的 GST- π 具有 70% 以上相同的氨基酸顺序^[3]。GST- π 在大鼠的肝癌和癌前病变中表达明显增高^[4],因此,GST- π 被认为是肝癌细胞的早期标志之一。在人类肺癌,卵巢癌和胃癌等细胞,经 GST- π 免疫组化染色呈阳性反应^[5]。

皮肤癌是最常见肿瘤之一,通过皮肤,环境

中的大量的化学成份,药物和其它物质进入体内,引起局部毒性或致癌作用。皮肤癌变被认为是一种多步骤的过程,即从良性增生,异常增生,原位癌到浸润癌。因此,研究皮肤对致癌因子,药物和化学物质等解毒能力,成为评估皮肤癌发生的重要依据之一。

材料与方 法

1. 试剂、试剂盒和实验动物

GST- π 多克隆抗体(NCL-GSTpi)购自于 Novocastra 公司,DMBA 和 PAP 免疫试剂盒均购自 Sigma 公司。BALB/c 小鼠由本校动物实验室提供。

2. 实验过程

(1) 小鼠皮肤癌模型试验 20 只雄性 BALB/c 小鼠,2-3 周龄,在无菌室温下喂养。动物分为两组:①实验组:在 15 只实验组小鼠皮肤上,每周一次涂含 1%DMBA 的矿物油,直至 10 周。②对照组:在 5 只对

本文2000年7月3日收到,2001年3月19日接受。

照组小鼠皮肤上,只涂矿物油。两组动物在10周末处死,经大体检查后切取皮肤。

(2) 小鼠皮肤标本制备 所有的皮肤标本用10%中性福尔马林固定,石蜡标本制备,组织切片厚为5 μ m,进行常规苏木素和伊红染色,在光学显微镜下读片。诊断由两位作者互盲下进行,互相符合的组织学诊断如下:正常皮肤(n=6),良性增生(n=8),异常增生(n=12),鳞状细胞癌(n=9)。

(3) GST- π 免疫组织化学染色 运用PAP免疫组织化学染色方法,对不同病变标本的石蜡切片进行染色。首先石蜡切片先在二甲苯中去蜡,然后在100%、90%、80%、70%酒精中水化。为封闭内源性氧化酶活性,在室温下用3% H₂O₂处理10分钟,然后用1:5正常牛血清在室温下处理30分钟,以封闭第二抗体所造成的假阳性反应。再与GST- π 兔抗人抗体(1:50)在37 $^{\circ}$ C下反应2小时,然后用抗兔IgG(1:200),兔PAP(1:500)37 $^{\circ}$ C各反应1小时。抗体结合过程中用PBS室温下洗去未结合的抗体。PAP显色采用AEC试剂盒,核复染用Mayer's苏木素。阴性对照,采用正常牛血清代替兔抗人GST- π 抗体。阳性对照是人正常肝组织切片。染色强度分为(-)阴性;非特异性淡红色,即与阴性对照反应一致。(+/-)部分细胞为特异性淡红色。(+)阳性,即为特异性红色。(++)强阳性,即为特异性深红色。同时采用analysis-auto-system(SIS softimaging Software GmbH)软件分析程序对结果进行分析,染色强度与电脑屏幕显示密度强度为标准,所得数据规定如下:(-):>160,(+/-):150-159,(+):100-149,(++):50-99。

(4) 统计学处理 采用Paired t-test,分别对正常皮肤与良性增生,异常增生,鳞状细胞癌的GST- π 染色之间的差异进行统计学处理,当p<0.05时,认为差异有统计学意义。

结 果

GST- π 染色结果如表1,2和图a-d所示,统计学结果如表3所示。

1. 正常皮肤上皮层,GST- π 染色为阴性,除了个别基底层细胞(stratum basale)显示阳性反应。所有上皮下纤维结缔组织GST- π 染色为阴性,即与阴性对照反应一致,如个别细胞反应为假阳性反应(如图a所示)。在对照组中,6例标本中,1例GST- π 为细胞质阳性反应,百分

比是16.7%。核周阳性反应百分比是0%(如表1,2所示)。

2. 良性增生病例为8例,其中4例细胞质染色为阳性(+)或强阳性(++),百分比是50%,1例细胞核周染色为阳性(+),其百分比是12.5%,并且基底层和棘细胞层(stratum spinosum)近基底层2/3染色为阳性(+)或强阳性(++),粒层(stratum granulosum)及角化层(stratum corneum)为阴性(-)(如图b,表1,2所示)。

3. 恶性增生病例为12例,其中10例细胞质染色为阳性(+)或强阳性(++),其百分比是83.3%,9例细胞核周染色为阳性(+),其百分比是75%,并且基底层、棘细胞层和粒层染色为阳性(+)或强阳性(++),角化层为阴性(-)(如图c,表1,2所示)。

4. 鳞状细胞癌病例为9例,其中9例细胞质染色为阳性(+)或强阳性(++),其百分比是100%,8例细胞核周染色为阳性(+),其百分比是88.9%,并且基底层、棘细胞层、粒层和角化层染色为阳性(+)或强阳性(++)(如图d,表1,2所示)。

GST- π 阳性反应与正常皮肤对照的统计学结果显示,良性增生与正常皮肤对照没有统计学意义,即p>0.05,恶性增生和鳞状细胞癌与正常皮肤对照有统计学意义,即p<0.05(如表3所示)。GST- π 表达在小鼠皮肤病变的不同组织学分类中没有显著差异(p>0.05,结果没有显示)。阳性对照反应为阳性,阴性对照反应为阴性。

实验结果显示从小鼠正常皮肤,经过良性增生,异常增生,到鳞状细胞癌,GST- π 阳性反应率逐渐增高。从反应部位看,GST- π 阳性反应从基底层、棘细胞层、粒层到角化层逐渐扩大。

采用analysis auto system(SIS Soft-imaging Software GmbH)软件分析程序对结果进行分析,染色强度与屏幕灰色强度为标准,所得数据规定如下:

表1 GST- π 在小鼠正常皮肤和病变皮肤中染色强度

| 诊 断 | 基底层 | 棘细胞层 | | 颗粒层 | 角化层 |
|-------|------------|----------|------------|--------|-----|
| | | 近基底层 1/2 | 远离基底层 1/2 | | |
| 正常皮肤 | + / - (-) | - (-) | - (-) | - (-) | - |
| 良性增生 | ++ (+ / -) | + (-) | - (-) | - (-) | - |
| 恶性增生 | ++ (+) | ++ (+) | ++ (+ / -) | ++ (+) | - |
| 鳞状细胞癌 | ++ (+) | ++ (+) | ++ (+) | ++ (+) | + |

- : >160, 或阴性染色

+ / - : 150 - 159, 或少数细胞阳性染色

+ : 100 - 149, 或阳性染色

++ : 50 - 99, 或强阳性染色。

括号内为细胞核周染色。

表2 GST- π 在小鼠正常皮肤和病变皮肤标本中阳性的百分比

| 诊 断 | GST- π | |
|-------|------------|----------|
| | 细胞质阳性染色 | 细胞核周阳性染色 |
| 正常皮肤 | 16.7% | 0% |
| 良性增生 | 50% | 12.5% |
| 恶性增生 | 83.3% | 75% |
| 鳞状细胞癌 | 100% | 88.9% |

阳性百分比 = 阳性反应标本数目 / 总标本数目 \times 100%

表3 GST- π 阳性反应在病变皮肤与在正常皮肤对照的统计学结果(Paired t Test)

| 诊 断 | p 值 |
|-------|-------|
| 良性增生 | >0.05 |
| 恶性增生 | <0.05 |
| 鳞状细胞癌 | <0.05 |

讨 论

GSTs 是一类细胞质内酶, 对其进行的大量免疫组化定位研究表明, GSTs 阳性反应存在于肿瘤细胞或正常细胞的细胞质中^[7]。但是, 也有些研究提出 GSTs 阳性反应存在于细胞核内^[8], 这提示 GSTs 对细胞核内过氧化 DNA 的解毒功能。本实验通过对小鼠皮肤癌变过程中 GST- π 免疫组化染色观察, 进一步对 GSTs 的功能加以探讨。

实验结果显示从小鼠正常皮肤, 经过良性增生, 异常增生, 到鳞状细胞癌, GST- π 阳性反

应率逐渐增高, 说明 GSTs 在小鼠皮肤癌变过程中是一种动态过程, 即逐渐被诱导。从反应部位看, GST- π 阳性反应从皮肤基底层、棘层、颗粒层到角化层逐渐扩大, 这说明基底层是抗癌“第一防线”, 这与许多学者认为基底层是皮肤癌突变的关键相符合^[9]。GST- π 在细胞核周阳性反应, 尽管目前本实验不能正确定位核内染色, 但根据 Bennett 等人 GSTs 在细胞核内定位研究, 我们可以推测 GST- π 在细胞核反应的可能性^[9]。以上, GST- π 阳性反应在小鼠皮肤癌变过程中反应程度加深和反应部位加大, 提示当小鼠皮肤置于致癌环境下, GSTs 酶活性逐渐升高, 从而为机体提供保护作用。而当这种保护作用不能与外界致癌因素相抗衡, 则会发展成为癌。

本实验结果与许多研究结果相符合, 如 GST- π 在鼠类和人类的大肠、宫颈和胃等组织的肿瘤中免疫化学反应性都有明显提高^[10]。Mannervik 等人发现在人恶性色素细胞株中, GST- π 在细胞内含量和培养液含量较非恶性色素瘤为高^[13]。Soma 等人报道 GST- π 在人肝细胞的免疫学表达升高可以作为肝细胞癌的标记^[11]。Tsuchida 等人进一步研究表明 GST- π 在低分化食道癌比在高分化食道癌有明显高水平表达^[12]。这些研究提示 GST- π 不仅可以作为一些肿瘤的肿瘤标记, 同时其表达还与肿瘤的进一步分化有关, 进而可以预测愈后。综上所述, 本实验对观察 GST- π 在皮肤癌变过程中的表达提供一种安全方法, 无疑会促进对这一解毒酶理解和应用。

摘 要

为探讨谷胱甘肽 s-转移酶(GSTs)在小鼠

皮肤癌变中的作用,本实验利用 GST- π 抗体和免疫组织化学方法,观察 GST- π 在小鼠正常皮肤(n=6)、良性增生(n=8)、异性增生(n=12)、鳞状细胞癌(n=9)中的表达和作用部位。结果表明,在正常皮肤标本中 GST- π 几乎没有表达;在良性增生中,细胞质染色为 50%,细胞核周染色为 12.5%;在异性增生中细胞质染色为 83.3%,细胞核周染色为 75%;在鳞状细胞癌细胞质染色为 100%,细胞核周染色为 88.9%。GST- π 在小鼠皮肤癌变过程中含量明显增高,尤其 GST- π 在皮肤角质层和核周的表达,可以作为诊断癌症的一种标志。

关键词: GST- π 良性增生 异性增生 鳞状细胞癌 肿瘤标志

参 考 文 献

[1] Booth J, et al. ,1961, *Biochem J* ,79:516 - 524.

[2] Boyer TD,1989, *Hepatology* ,9:489 - 496.

[3] Hayes JD, et al. ,1987, *Biochem Soc Trans* ,15:721 - 728.

[4] Sato K, et al. ,1985, *Proc Natl Acad Sci (USA)* ,82:3964 - 3968.

[5] Siegers CP, et al. ,1984, *J. Cancer Res Clin Oncol* ,254:255 - 259.

[6] Pour PM,1988, *Am J Pathol* ,130:335 - 344.

[7] Kodate C, et al. ,1986, *Gann* ,77:226 - 229.

[8] Bennett CF, et al. ,1986, *J Cell Biol* ,102:600 - 609.

[9] Boutwell RK,1964, *Prog. Esp Tumor Res* ,4:207 - 250.

[10] Mannervik B, et al. ,1981, *Meth enzymol* ,77:231 - 235.

[11] Soma Y, et al. ,1986, *Biochem Biophys Acta* ,869:247 - 288.

[12] Tsuchida S, et al. ,1989, *Cancer Res* ,49:5225 - 5229.

[13] Mannervik B, et al. ,1987, *Carcinogenesis* ,8:1929 - 1933.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE- π DURING MOUSE SKIN CARCINOGENESIS

LIU Yin, Joo-Young Kim, Eon-Gi Sung, Ou-Yang Jie*, Yungchang Lee

(Dept of Anatomy, College of Medicine, Yeungnam University, South Korea, 705-717; * :

Dept of Oral Pathology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130041)

ABSTRACT

The expression and localization of glutathione s-transferase π isoenzyme in mouse normal skin(n=6), hyperplasia(n=8), dysplasia(n=12), and squamous cell carcinoma(n=9) of mouse skin lesions were examined immunohistochemically using polyclonal antibody raised against GST- π with the standard peroxidase anti-peroxidase(PAP) method. GST- π was almost absent in the epithelium of normal mouse skin and overlying benign fibrous tissues. GST- π was expressed in 50% cytoplasmic staining and 12.5% peri-nuclear staining in hyperplasia, 83.3% cytoplasmic staining and 75% peri-nuclear staining in dysplasia, 100% cytoplasmic staining and 88.9% perinuclear staining in squamous cell carcinoma. Since GST- π was significantly over-expressed in permalignant and malignant skin lesions compared with normal skin, it is suggested GST- π was induced during mouse skin malignant processing, specially GST- π in upper-layer staining and perinuclear staining can be considered as a tumor marker in skin carcinogenesis.

Key words: GST- π , Hyperplasia Dysplasia Squamous cell carcinoma Tumor marker

《细胞生物学杂志》明年改出双月刊

经中华人民共和国新闻出版署新报刊(2001)059号批准,本刊自2002年起由季刊改为双月刊(逢双月月中15日出版,大16开本,页码64页。每本定价6元,全年36元整。

欢迎订阅(邮发代号4-296)或邮购;欢迎来稿。欢迎在本刊投放广告。