

4-NQO 饮水法不同给药时间诱发小鼠舌癌模型的比较

黎明武, 李 晶, 于大海, 卿海云, 闭似嫦

基金项目: 广西教育厅科研项目(编号:桂教科研 2003)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属口腔医院口腔颌面外科(黎明武, 李 晶, 于大海, 闭似嫦), 病理科(卿海云)

作者简介: 黎明武(1986-), 男, 在读研究生, 研究方向: 口腔癌淋巴道转移模型。E-mail: limingwu0726@yahoo.cn

通讯作者: 于大海(1968-), 男, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 口腔癌淋巴道转移机制。E-mail: yudahai813@yahoo.com.cn

[摘要] **目的** 比较 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 4-NQO) 饮水法在不同给药时间诱发小鼠舌癌模型过程中口腔黏膜病变程度的差异。**方法** 70 只 balb/c 小鼠, 随机分为两组: 实验组 60 只, 给予 200 mg/L 4-NQO 饮水喂养 8、14、20 W(各 20 只), 停药改用普通自来水喂养到 45 W; 对照组 10 只小鼠, 单纯饮用自来水。45 W 时通过肉眼和组织学观察各组的病变情况并比较小鼠体重的变化情况。**结果** 随着给药时间的延长, 实验组小鼠舌背黏膜相继出现白色斑块、溃疡、乳头状增生等改变, 小鼠舌背产生轻度异常增生-中度异常增生-重度异常增生-原位癌-鳞癌的典型病理变化。给药 8 W 组 70.6% 小鼠舌背黏膜表现为单纯性增生, 29.4% 为轻中重度异常增生, 舌癌发生率为 0%; 给药 14 W 组 88.2% 为轻中重度异常增生, 11.8% 为原位癌; 给药 20 W 组 100% 为鳞癌, 并且 100% 转移颈部淋巴结; 三组未见远处转移。14、20 W 组小鼠体重较给药前明显减轻($P < 0.05$), 8 W 组和对照组小鼠体重较给药前无明显变化($P > 0.05$)。**结论** 在相同剂量下, 随着给药时间延长, 舌癌前病变以及舌癌发生率越高, 但是体重减轻越明显。

[关键词] 4-硝基喹啉-1-氧化物; 舌癌; 小鼠; 动物模型

[中图分类号] R 739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)07-0581-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.07.01

Comparison of mouse tongue epithelial carcinoma model induced by 4-NQO in drinking water in different dosing schedules Li Ming-wu, Li Jing, Yu Da-hai, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To compare the degree of oral mucosal lesions of mouse tongue epithelial carcinoma model induced by four-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) in drinking water in different dosing schedules. **Methods** Seventy balb/c mice were randomly assigned into two groups: the experimental group ($n = 60$) and the control group ($n = 10$). The experimental groups were given 200 mg/L 4-NQO in drinking water for 8, 14, 20 weeks ($n = 20$), respectively, and then given ordinary water to 45 weeks. The control group was given ordinary tap water. All the mice were killed in 45 weeks, then their tongues and submandibular lymph nodes were removed for histologic study. **Results** With the time prolonged, the changes including leukoplakia, ulcer appearances, papillary hyperplasia were gradually occurred on the mucosa of the experimental groups. Their corresponding histopathological results ranged from hyperplasia, mild dysplasia (MiDP), moderate dysplasia (MoDP), severe dysplasia (SDP), In situ carcinoma (ISC) to invasive carcinoma (IC) along with the increasing administration time. The tongue of mice which were given 4-NQO for 8 weeks showed hyperplasia (70.6%), MiDP/MoDP and SDP (29.4%); The tongue of mice which were given 4-NQO for 14 weeks showed MiDP/MoDP and SDP (88.2%), ISC (11.8%); The tongue of mice which were given 4-NQO for 20 weeks showed IC (100%) and 100% submandibular lymph nodes metastasis were found. Compared with before administration, the body weight of mice of 14, 20-week groupss significantly reduced ($P < 0.05$), while there were no significantly changes of the body weight of mice of 8 weeks and control groups ($P > 0.05$). **Conclusion** 4-NQO could be given in drinking water to induce tongue epithelial carcinoma model at the same dose in different do-

sing schedules. With the increasing administration time, the higher rate of tongue precancerous lesions and the tongue epithelial carcinoma occurred, but the body weight of mice significantly reduce.

[Key words] 4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQO); Tongue epithelial carcinoma; Mouse; Animal model

应用动物模型研究口腔癌一直是口腔癌研究中最普遍、最有效的方法^[1]。在应用化学药物 4-NQO 致癌建立口腔癌动物模型的过程中,很多学者发现,小鼠黏膜癌变过程中类似于人类舌黏膜的癌变过程^[2-4]。我们试用 4-NQO 饮水法给药 20 W 诱发小鼠舌黏膜癌及癌前病变,并成功地建立了动物舌癌模型,但是在诱癌的过程中出现了体重下降明显,部分动物死亡及一部分诱导出胃癌、食管癌的现象^[5]。为此,我们试图通过在相同剂量下,用减少给药时间方法来降低较高的动物死亡率和减少胃癌、食管癌的现象发生。

1 材料与方法

1.1 动物 6 W 龄雄性清洁级 balb/c 近交系健康小鼠 70 只(广西医科大学实验动物中心提供),体重 20~25 g。实验条件:室温 17~25 ℃,湿度 40%~60%,以标准固体饲料喂养,24 h 自然光暗循环。药品为 4-NQO(美国 sigma 公司)。

1.2 实验分组 balb/c 小鼠 70 只,随机分为两组:实验组 60 只,给药 8、14、20 W 组各 20 只;对照组 10 只小鼠,自由饮用普通自来水 45 W。

1.3 给药方式 4-NQO 用蒸馏水配置成 1% 浓度,置 4 ℃ 冰箱避光保存。使用时以普通自来水稀释成 0.02% (200 mg/L) 浓度,置避光瓶内自由饮用。每周更换实验组和对照组饮水 2 次。

1.4 观察指标 实验全过程中,每周观察记录一次小鼠的饮水量及体重。在水合氯醛微麻醉状态下,每 2 周观察记录一次小鼠的舌黏膜变化。大体及组织病理学观察:45 W 时,水合氯醛麻醉小鼠,颈椎拉脱位处死后立即解剖,取全舌、颊、腭、食道、前胃、肝、肺等组织标本进行观察,标记测量标本的大体,置于 10% 中性福尔马林液中固定 24 h 后,乙醇梯度脱水,常规石蜡包埋,4 μm 切片。每个样本切取舌前、中、后各 3 张切片进行 HE 染色,光镜下观察病理改变。病理诊断与分级参照 WHO(1978) 标准。

1.5 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体情况 实验过程中实验组小鼠无明显毒

副反应。给药 8 W 组实际可评价动物数 17 只,3 只小鼠在实验完成前死亡(水合氯醛麻醉过量死亡 2 只,因为组织分解不能进行尸检 1 只),小鼠体重较给药前无明显变化(*P* > 0.05)。给药 14 W 组实际可评价动物数 17 只,3 只小鼠在实验完成前死亡(经过尸检证实死于肺炎 1 只,水合氯醛麻醉过量死亡 1 只,因为组织分解不能进行尸检 1 只),小鼠体重较给药前明显减轻(*P* < 0.05)。给药 20 W 组实际可评价动物数 15 只,5 只小鼠在实验完成前死亡(经过尸检证实死于肺炎 1 只,因食管癌死亡 2 只,胃癌死亡 2 只),小鼠体重较给药前明显减轻(*P* < 0.05)。对照组小鼠体重无明显变化(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 各组小鼠平均体重变化情况[($\bar{x} \pm s$), g]						
组 别	给药前		45 W 处死时		<i>t</i>	<i>P</i>
	只	体重	只	体重		
8 W 组	20	23.0 ± 1.36	17	23.1 ± 1.36	0.51	0.62
14 W 组	20	23.8 ± 1.02	17	20.7 ± 2.54	-4.93	0.00
20 W 组	20	23.7 ± 1.12	15	19.5 ± 1.66	-9.77	0.00
对照组	10	23.1 ± 1.49	10	23.1 ± 1.43	-0.04	0.97

2.2 肉眼观察 饮用 4-NQO 前所有实验小鼠为正常小鼠,舌背黏膜外观正常。饮用 4-NQO 8 W 后,新生物形成,舌背后部舌乳头区域性消失,黏膜呈大小不等的片状、均匀浅白色或瓷白色样改变,未突出黏膜表面;饮用 14 W 后,舌背后部黏膜呈大面积白色斑块状改变,稍高出黏膜,表面粗糙程度加重,呈“颗粒样”外观,尤以“人字沟”附近的黏膜为明显;饮用 20 W 后,舌背后部白色斑块中夹杂数个大小不等凹陷的红色斑块,触之较硬,个别出现直径为 1 mm 的白色外生性肿物,表面光滑,活动度好,未见溃疡和坏死。停药观察至 45 W 时,正常对照组小鼠舌背黏膜呈粉红色富有弹性,舌乳头分布均匀,舌体柔软,无白色样变和新生物形成。8 W 组有 5 只小鼠舌背后部舌乳头区域性消失,黏膜呈大小不等的片状,舌背后部黏膜呈大面积白色和红色斑块状改变,稍高出黏膜,表面粗糙程度加重,呈“颗粒样”。14 W 组有 9 只小鼠舌腹或舌背中处出现“一”字形排列的外生性肿物,大小不等,直径约 2 mm,这些肿物色泽略白,表面光滑,质地坚韧,活

动度良好。7 只小鼠舌背或舌腹黏膜出现乳头状新生物,其中 5 只小鼠的新生物位于舌背中 1/3 处,直径为 1~2 mm;另 2 只小鼠的新生物位于舌覆后侧缘处,直径约为 2~3 mm,表面粗糙,略呈分叶状,触之易出血,未见溃疡和坏死。20 W 组有 12 只舌背或舌覆中后 1/3 侧缘处出现菜花状或疣状外生性肿物,直径约为 3~4 mm,表面粗糙,略呈分叶状,活动度差,质地中度偏硬;3 只在舌根部分别见溃疡和坏死灶,直径约 2~3 mm,边缘不整,显火山口状,基底硬,活动度差,所有小鼠均触及肿大下颌淋巴结。

2.3 组织病理学观察 随作用时间延长,小鼠舌背产生轻度异常增生→中度异常增生→重度异常增生→原位癌→鳞癌的典型病理变化。在 20 W 组 17~22 W 时,发现少量小鼠精神萎靡,无食欲,处死取组织器官病理检查发现 2 例小鼠食管和 2 例小鼠前胃发生癌变,而舌部黏膜仅是中度异常增生。对照组在 45 W 处死时,舌背黏膜鳞状上皮层次清楚,钉突均匀,细胞形态正常,仅有 1 例(1/10)黏膜上皮出现单纯性增生;8 W 组病变以单纯性增生为主(12/17),一小部分为轻中重度异常增生(5/17);14 W 组舌背和舌腹的病变程度以轻中重度异常增生为主

(15/17),2 例小鼠病变程度为原位癌(2/17);20 W 组舌背或舌腹的病变程度全部为鳞状细胞癌(15/15),并均在双侧或单侧下颌淋巴结发现鳞状细胞癌的转移灶。单纯性增生表现为棘细胞层数和基底细胞层数增加,基底细胞排列整齐,角化层局部有增厚现象。轻度异常增生表现为棘层增厚,钉突伸长、变宽。中度异常增生表现为鳞状上皮明显增生,基底细胞层数增加,核浓染,棘层以上局部上皮可见明显增厚。重度异常增生表现为鳞状上皮显著增生,基底细胞呈多层样,核浓染增多,细胞及核异型性,滴状钉突相互融合。原位癌主要表现为上皮钉突增大、变宽,基底细胞增生明显,极性消失,细胞核浓染,核仁增大,核分裂象增加,细胞异型性明显,上皮层出现多个裂隙,基底膜完整,间质中有少数淋巴细胞浸润。浸润性鳞状细胞癌表现为癌细胞突破基底膜侵入黏膜下层及肌层,癌细胞核分裂明显,细胞及细胞核多形性明显。其他组织器官如颊、腭、食道、前胃、肝、肺等组织器官大体和镜下组织病理学检查未发现异常。各组小鼠舌黏膜病变诊断结果见表 2。

表 2 各组小鼠舌黏膜病变诊断结果(n,%)

组 别	正常黏膜		单纯性增生		轻中重度异常增生		原位癌		鳞癌		合计
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
8 W 组	-	-	12	70.6	5	29.4	-	-	-	-	17
14 W 组	-	-	-	-	15	88.2	2	11.8	-	-	17
20 W 组	-	-	-	-	-	-	-	-	15	100.0	15
对照组	9	90.0	1	10.0	-	-	-	-	-	-	10

3 讨论

肿瘤发生是一个多步骤过程,人们普遍认为口腔癌是由癌前病变发展而来。我们诱发小鼠舌癌模型经历了上皮异常增生-原位癌-浸润性鳞癌-局部淋巴结转移的过程,说明实验小鼠舌黏膜的病变过程和病理结果与人口腔癌相似,而且病变严重程度随饮用时间和观察时间的延长而逐渐加重。虽然给药 20 W 组致癌率最高,为 100%,但在研究中发现 17~22 W 时分别出现了 2 例食管癌,2 例胃癌,而舌黏膜仅仅出现中度异常增生和小鼠体重明显减轻。因此我们试图缩短给药时间阻止食管癌、胃癌的发生和减少小鼠体重的下降,同时成功构建舌癌模型。当给药 14 W 时仅有 10% 成功诱导出舌癌,虽然未见有食管癌、胃癌的出现,但舌癌成功率比较

低,这可能跟观察时间过短有关。此外,给药 8 W 组并未成功地诱导出舌癌模型且未发现其他器官病变,这与 Chang 等^[6]使用相同浓度给药 8 W 停药,改饮用自来水观察 28 W 诱导出舌癌模型不符。可以推断给药 8 W 药物作用时间相对过短,并不能成功有效地构建舌癌模型。对照组和给药 8 W 组跟给药前小鼠体重无明显改变,而给药 14 W 组和 20 W 组小鼠体重较给药前明显减轻。14 W 组和 20 W 组小鼠体重减轻的原因可能一方面与给药时间超出了小鼠耐药能力而影响食欲有关,另一方面与小鼠舌外生性肿物和舌癌诱导成功后期引起进食困难和导致小鼠恶病质有关^[7]。本研究认为,在相同剂量下,给药时间越长,舌癌前病变发生率及舌癌发生率越高。0.02% 4-NQO 饮水法构建舌癌动物模型比

较理想的给药时间应该是 14 ~ 20 W,并相应地延长观察时间。欲准确探讨出诱导舌癌和淋巴道转移模型更高成功率和更加理想时间,仍有待进一步研究。

参考文献

1 李武伟,马国武. 4-NQO 饮水法诱发小鼠舌癌前病变模型建立的研究[J]. 口腔医学研究,2005,21(3):283-285.
2 Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, et al. 4-NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma[J]. Head Neck, 1994, 16(5): 424-432.
3 Tang XH, Knudsen B, Bemis D, et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. Clln CancerRes, 2004, 10(1 Pt 1): 301-313.

4 Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, et al. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the wistar rat palatal mucosa; 4-NQO model[J]. Head Neck, 1996, 18(5): 441-449.
5 李 晶, 于大海, 卿海云, 等. 4-硝基喹啉-1-氧化物饮水法构建 BALB/C 小鼠胃癌及食管癌模型[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(9):1411.
6 Chang NW, Pei RJ, Tseng HC, et al. Co-treating with arecoline and 4-nitroquinoline1-oxide to establish a mouse model mimic king oral tumorigenesis[J]. Chem Biol Interact, 2010, 183(1): 231-237.
7 Jiang C, Ye D, Qiu W, et al. Response of lymphocyte subsets and cytokines to Shenyang prescription in Sprague-Dawley rats with tongue squamous cell carcinomas induced by 4-NQO[J]. BMC Cancer, 2007, 7(): 40.

[收稿日期 2012-04-10][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

课题研究 · 论著

他汀类药物预处理对不稳定性心绞痛 斑块破裂发生的影响

王 虹, 林英忠, 刘 伶, 龚国平

基金项目: 广西卫生厅重点课题(编号:桂卫重 200801); 广西自然科学基金课题(编号:桂科青 200728038)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院心内科

作者简介: 王 虹(1975-),女,大学本科,医学硕士,副主任医师,研究方向:心血管疾病的临床诊治及相关基础研究。E-mail: iriswh@163.com

[摘要] **目的** 观察冠心病患者在使用他汀类药物后对斑块破裂及不稳定性心绞痛(UAP)发生的影响。**方法** 采用回顾性病例对照研究方法,分析 62 例冠心病患者的血脂异常率、他汀类药物治疗率以及治疗后低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)达标率;比较各组冠心病他汀类药物治疗患者的 UAP 发生率;应用血管内超声(IVUS)测量、分析责任血管狭窄病变处、近端参考血管、远端参考血管外弹力膜截面积、斑块破裂、钙化斑块比例及冠状动脉重构情况。**结果** 非他汀组患者 LDL-C 未达标率为 96.4%(27/28),应获得而未得到他汀类药物治疗率为 46.4%(13/28);他汀组患者 LDL-C 达标率为 26.5%(9/34)。他汀组 UAP 发生率显著低于非他汀组($\chi^2 = 34.491, P = 0.001$),他汀组 LDL-C 达标者与未达标者 UAP 发生率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.002, P = 0.968$)。他汀组 LDL-C 显著低于非他汀组(2.457 ± 0.802 vs $3.218 \pm 1.130, Z = -9.760, P = 0.001$);他汀组未达标患者 LDL-C 水平显著低于非他汀组未达标患者(2.816 ± 0.640 vs $3.370 \pm 0.963, F = -3.613, P = 0.001$)。他汀组斑块破裂的发生率低于非他汀组(38.2% vs $60.7\%, \chi^2 = 3.107, P = 0.078 > 0.05$),正性重构率亦明显低于非他汀组(29.4% vs $46.4\%, \chi^2 = 1.905, P = 0.167 > 0.05$)。**结论** 他汀类药物治疗冠心病患者 UAP 发生率显著降低。使用他汀治疗可使斑块破裂减少,其独立于冠脉重构之外。他汀类药物治疗的最主要效果在于预防动脉粥样硬化斑块的破裂。

[关键词] 他汀类药物; 不稳定性心绞痛; 血管内超声; 斑块破裂

[中图分类号] R 541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)07-0584-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.07.02