

# 日本血吸虫感染对1,2—二甲基胍 诱发小鼠大肠癌的影响

浙江医科大学 生化教研室: 厉朝龙、李英、张鼎武\*  
病解教研室: 石秋念、许敬尧、朱善济

近年来,国内外不少学者从临床观察、组织形态学检查及流行病学调查等不同方面,提出日本血吸虫感染与大肠癌发病率间存在正相关。但也持有否定意见者。为了进一步阐明血吸虫病与大肠癌的关系,我们通过动物实验,用<sup>3</sup>H—胸腺嘧啶核苷参入试验检测大肠粘膜上皮细胞DNA合成速度,同时配合病理形态学观察,研究了日本血吸虫感染对1,2—二甲基胍诱发小鼠大肠癌的影响。

## 材料与方法

### 一、动物

鼠龄40天,体重17~20克雌性昆明种小白鼠200只,分四组:正常对照组(N组)、致癌组(C组)、血吸虫感染对照组(S组)以及血吸虫感染合并致癌组(SC组)。各组小鼠喂以相同饲料。每月称体重一次。

S组及SC组经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴10条,在实验处死时作肝和大肠粘膜组织压片镜检,有血吸虫虫卵沉着者为感染阳性。血吸虫感染后75天,C组及SC组开始背部皮下注射二甲基胍(溶于0.001M的EDTA溶液中,剂量为20毫克/公斤体重,每周一次,共用22周。N组及S组注射相应量的0.001M的EDTA溶液作对照。

### 二、试剂

1. 盐酸1,2—二甲基胍(DMH):根据Hatt法<sup>(5)</sup>略加改良后合成,产品m.p 165~167℃<sup>(6)</sup>。使用时以0.001M的EDTA配制成浓度为1毫克/毫升的溶液,用1M NaHCO<sub>3</sub>调整pH至6.5。

2. [<sup>3</sup>H—甲基]—胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H—TdR):放射比活性27.2居里/毫克分子,

\*南京铁道医学院进修生

放射性浓度1毫居里/1毫升,放化纯度>95%。中国科学院上海原子核研究所产品。

3. 闪烁液: PPO 5克, POPOP 0.5克, 二甲苯700毫升, 乙二醇乙醚300毫升。

4. 高氯酸: 分析纯, 含量70~72%。分别配制成2N、1N、0.2N及0.1N的溶液。

### 三、方法

在DMH注射后第4、8、10、14、22周,四组小鼠各随机取3~5只,作<sup>3</sup>H—TdR参入试验。在第8、12、14周各取3只,作病理学检查。到第28周,将所余全部动物处死,统计各组动物的癌变率。

1. 小鼠大肠粘膜上皮细胞<sup>3</sup>H—TdR参入试验: 每只小鼠腹腔注射<sup>3</sup>H—TdR 20微居里(用生理盐水将<sup>3</sup>H—TdR稀释成100微居里/毫升的溶液后使用。)2小时后,断颈处死小鼠,剖腹取出大肠远端7公分肠段。用载玻片刮取粘膜层组织,置于6毫升冰冷双蒸馏水中匀浆化,然后加入0.6N的HClO<sub>4</sub> 3毫升,3,000rpm离心15分钟,得蛋白质和DNA沉淀混合物。沉淀用0.2N的HClO<sub>4</sub> 3毫升洗涤5次,充分沥干,置冰箱中过夜。翌日加1N的KOH 1.5毫升于沉淀内,37℃水浴保温60分钟。后向保温液加入2N的HClO<sub>4</sub> 1毫升,3,000rpm离心20分钟,沉淀用1.5毫升0.1N的HClO<sub>4</sub>洗涤2次,离心弃去上清液。于沉淀中加入1N的HClO<sub>4</sub> 1毫升,在70℃水浴保温30分钟,离心收集上清液,再用同等量1N的HClO<sub>4</sub>抽提2次,合并3次抽提液,作DNA磷定量及液体闪烁计数。

DNA磷按Kayser法定量<sup>(7)</sup>,以每毫升抽提液含DNA磷的微克数表示。同时取抽提液0.1毫升,加闪烁液5毫升,于液体

闪烁仪上计数,得cpm数。最后换算成<sup>3</sup>H—TdR参入率,即每微克DNA磷参入的cpm数(cpm/μgDNA—P)。

2. 病理学检查:被检小鼠取其全部大肠以及胃、小肠、肝和肾脏,以10%福尔马林液固定。每例大肠均分成3~4段,作好标记,石蜡切片,H. E. 染色,显微镜观察。

**结 果**

一、小鼠血吸虫感染阳性率86%,感染后体重明显下降,在感染后第45~70天间,S和SC组动物死亡1/3。经病检发现,死亡小鼠远端结肠及直肠粘膜呈弥漫性出血、坏死和水肿,系死于急性血吸虫病。N和C组动物在整个实验期间,健康状况良好,两

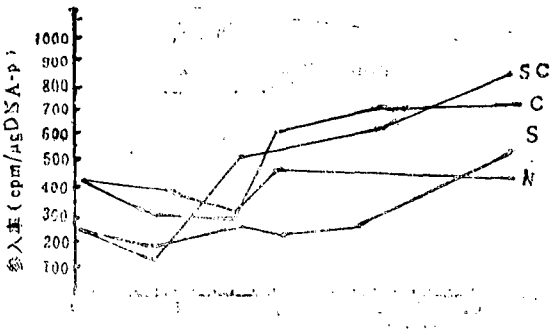
组体重及其增加速度无明显差异,没有发生死亡。

二、大肠粘膜细胞<sup>3</sup>H—TdR参入率变化

在整个实验期间,N组小鼠<sup>3</sup>H—TdR参入率在324~449cpm/μgDNA—P之间。S组的参入率持续低于N组,直至第22周时才开始升高并超过N组,其值为520±14cpm/μgDNA—P。C组参入率在用药后第10周开始增加,为594±15cpm/μgDNA—P,随后持续升高,到第22周时达712±24cpm/μgDNA—P。SC组的参入率在用药后第8周即行上升,其值为493±18cpm/μgDNA—P,以后继续上升,几与DMH注射周数呈直线关系,到第22周时,参入率为841±16cpm/μgDNA—P。致癌过程中各组小鼠<sup>3</sup>H—TdR参入率变化如表1及图1。

**表1 致癌过程中各组小鼠<sup>3</sup>H—TdR参入率( $\bar{X} \pm SD$ )**

组别	DMH 注 射 周 数					
	注射前	4	8	10	14	22
N	422±16	400±46	324±22	449±39	433±23	424±23
C		319±37	298±21	594±15	688±13	712±24
S	264±22	200±32	276±26	237±27	270±16	520±14
SC		141±13	493±18	524±20	584±18	841±16



**图1 致癌过程中各组小鼠<sup>3</sup>H—TdR参入率变化曲线**

上述资料表明,C及SC组小鼠大肠粘膜细胞DNA合成速度因注射DMH而明显加快;如果注射DMH合并血吸虫感染,则比单纯使用DMH者更快,而且其DNA合成速度增加比C组早两周。

小鼠感染血吸虫后第11~30周间,<sup>3</sup>H—TdR参入率均明显地低于N组,在相当于C组注射DMH后的第20周,参入率开始上升并超过N组,这与小鼠血吸虫病后阶段大肠粘膜组织发生增生性变化相一致(见表2)。

**表2 致癌过程中C组及SC组<sup>3</sup>H—TdR参入率增加的百分数( $\bar{X} \pm SE$ )**

组别	DMH 注 射 周 数				
	4	8	10	14	22
C	-20.3±5.3	-8.1±3.8	32.4±1.9	59.0±2.1	67.9±2.9
SC	-29.6±6.5	78.6±3.8	119.8±4.9	116.3±3.8	61.8±1.8
t	-1.372	14.948	16.460	13.233	-1.622
P	>0.2	<0.001	<0.001	<0.001	>0.1

以不同参入时间观察参入率的变化,发现N组明显地高于S组,进一步证明血吸虫感染可引起大肠粘膜细胞DNA合成速度降低。并且,这种变化并非由于参入途径即 $^3\text{H}$ -TdR注射方式不同所造成。

### 三、病理变化

C组和SC组动物在注射DMH后第8周大肠粘膜腺管出现不典型增生,其程度C组的3只小鼠有2只为I级,SC组的3只有2只为I~II级。第12周时,检查的3只C组动物有2只大肠粘膜腺管普遍呈现不典型增生0~I级,局部I~II级,而SC组的3只全部呈现I~II级。第14周,被检查的3只SC组小鼠有1只出现大肠腺癌;至22周时,该组被检查的3只全部出现大肠癌,而此时3只C组出现大肠癌者有2只。第28周,处死全部动物,检查其癌发生率,C组为66%,SC组为63%,两者无显著差异。所有患大肠癌的动物除1只为鳞癌外,其余均为腺癌。未见有大肠息肉,也未发现其它脏器发生肿瘤。DMH诱发的大肠癌的形态和镜下观察见图2。



图2 使用DMH第22周,SC组小鼠发生的大肠腺癌。  
癌细胞呈腺管状排列,腺管浸润于粘膜下层

### 讨 论

我们的研究借助 $^3\text{H}$ -TdR参入率判断大肠粘膜上皮细胞DNA的合成速度,并配合病理学观察,以比较感染日本血吸虫小鼠和正常小鼠在接受致癌剂DMH注射后,诱发大肠癌的早期变化。感染血吸虫的小鼠在DMH作用下,大肠粘膜细胞DNA合成速度的加快,比单纯用DMH处理的动物早

两周,并且在一个相当长的时期内其增加值比后者高。病理学检查也看到,SC组在用药后8周,结直肠粘膜组织出现不典型增生,并在第14周出现第1例大肠癌,当第22周时,被检查的全部小鼠均出现大肠癌。C组在用药早期虽也有不典型增生,但程度较轻,到22周时检查的动物发生大肠癌占2/3。可见血吸虫感染对DMH诱发小鼠大肠癌有明显的促进作用。一般认为,血吸虫病并发大肠癌主要由于虫卵沉着所致。一方面可能由于局部虫卵的机械性刺激,引起肠粘膜的损伤,经反复糜烂和修复过程,发生上皮组织的增生,形成结直肠息肉,后者在环境因子作用下恶变成癌;另一方面,沉着于组织中的活虫卵的分泌物可能含有致癌物质,这类物质对周围组织产生刺激作用,尤其对处于增生状态的粘膜细胞特别敏感<sup>(8)</sup>。

我们的实验发现,SC组与癌变相关的生物化学和病理学变化均出现在S组所产生的类似变化之前,所有致癌动物未见有息肉形成。有人认为,人类血吸虫病合并大肠癌是经过虫卵沉着,组织增生,息肉形成,最后恶变成癌的<sup>(12,18)</sup>。这一观点在我们的动物实验中未能得到证实。可以说,上述过程不是血吸虫病引起大肠癌的唯一途径。在整个实验观察期间,S组动物除在后阶段出现肠粘膜组织的不典型增生和DNA合成速度加快外,未见有肿瘤形成。说明血吸虫感染本身对小鼠没有致大肠癌作用,它可能是作为一种促癌因子,加强和加速致癌剂对大肠粘膜组织的损伤和致癌过程。

DMH是一种前致癌物,当摄入体内后,需通过代谢转化过程,形成致癌活性产物,才能发挥作用。一般认为,肝脏是DMH代谢转变的主要部位,DMH在其中(也可在结肠粘膜)经酶促和非酶促氧化,先后生成偶氮甲烷(AM)、氧化偶氮甲烷(AOM)及甲基氧化偶氮甲烷(MAM),后者与葡萄糖醛酸或硫酸结合,形成葡萄糖醛酸苷或硫酸酯,随胆汁或血液至结肠或其它敏感的靶组织。在这些部位,上述复合物裂解重新生成MAM,产生对组织的致癌作用<sup>(9)</sup>。DMH的致癌活性产物是强烈的烷化剂,可核DNA及RNA分子中的鸟嘌呤甲基化,形成7-甲基鸟嘌呤和Q<sup>8</sup>-甲基鸟嘌呤<sup>(10)</sup>,从而改变DNA和RNA的分子结构。

(下转65页)

本组口腔炎发生率为9.85%。ADR可使组织对放疗增敏<sup>③</sup>。本组2例淋巴瘤治前曾行纵膈放疗,每次用ADR后,都引起胸骨后剧烈疼痛,食后疼痛加重,似放射性食道炎表现,可能为ADR引起之“记忆”反应<sup>④</sup>。ADR在肝脏中代谢,从胆汁中排泄,肝功能不全者应酌情减量或停药。本组治疗9例(12.16%)有肝功能轻度改变,主要表现为SGPT, V-GT、AKP轻度升高,除1例证实为肝转移外,其余病人停药后很快恢复。本组1例淋巴瘤曾用环磷铂引起肾功能衰竭(肾活检为肾小管非特异性炎), Bun 80mg%, CV16mg%, 停药继用AOP方案后肾功能也逐渐恢复。说明ADP对肾脏毒性极小,故肾功能不全又急需化疗者,也可考虑选用ADR。

ADR的心脏毒性很可能系ADR抑制心肌Na-K-ATP酶的活力和抑制K离子的运转引起<sup>⑤</sup>。ADR的心肌毒性亦有报导与心肌的类脂质过度氧化有关<sup>⑥</sup>。严重心肌毒性表现为充血性心力衰竭,女性多于男性。急性型可引起突然死亡。迟发型心力衰竭除与ADR累积量有关,还与心脏原来的病变、高血压病、心电图异常、ADR合并VCR、BLM、Ara-c等药物治疗有关。纵膈及心前区放疗等都可增加ADR对心脏的毒性<sup>⑦⑧</sup>。此外还有报导与ADR注射速度有关,大剂量快速注射时2%的病人可出现心力衰竭,可能系短时间内血浆ADR浓度高心肌摄取ADR的量有关。心肌的毒性还可表现为心肌梗塞、心源性休克、心脏停搏、心脏扩大和症状性心律不齐<sup>⑨</sup>。本组用ADR治疗总量均未达到最高累积量,无一例心力衰竭发生。心电图有改变17人(34%)主要表现为低电压、窦性心动过速、心室肥大、房性早博等,临床均无明显心功能不全表现。9例治前已有低电压、窦性心动过速或过缓、预激症候

群及心肌劳损,治后心电图亦无恶化。说明轻度心电图改变只要严密观察仍可使用。

为防止ADR对心脏毒性、控制ADR的累积量是十分重要的,一般认为ADR的剂量不宜超过550mg/M<sup>2</sup>,对既往纵膈或心前区行过放疗以及用过烷化剂和有关药物者,ADR的剂量应限制在4:0mg之内<sup>⑩</sup>。心电图监护对预测充血性心力衰竭意义不大,部分病人发病前心电图可完全正常,也可能由于心电图监测次数太少。有报导若每次用药都检查心电图可发现29%的病人有异常改变,若只在治前治后检查,有改变者仅14%<sup>⑪</sup>。上海肿瘤医院对行ADR治疗病人随访心电图,也发现16%的病人出现异常改变<sup>⑫</sup>。初步看来心电图监测对ADR的心肌毒性仍有一定的价值。

### 参考文献

1. Hugh, L. D. et al; Cancer Treatment Rep. 63; 809—815, 1979.
2. 张覃谕: 萘环类抗肿瘤抗菌素的进展。河南医学情报 5: 1—6 1981
3. Monfardini, S. et al; Mnual of cancer chemotherapy. Third Edition Geneva, P105—115, 1981.
4. Trenum, B. L. et al; Cancer, 49; 835—839, 1981.
5. Martin Cline, M. D.; Cancer chemotherapy. third edition P44—46, 1980.
6. Hiroshi Takita et al; Cis-Dichlorodiamminoplatinum (I I), Adriamycin, Cyclophosmide, C. C. N. U. and Vincristine in non-small cell lung carcinoma. Cancer Treatment Report, 63; 29—33, 1979.
7. Nathan W Peelman et al; Cancer Treatment Rep. 67; 375—376, 1983.
8. Robert s. B. et al; Cancer, 33; 1—2, 1974.
9. Praga C. et al; Cancer Treatment Rep, 63; 827—834, 1979.
10. 赵体平等: 以阿霉素为主的各种方案治疗恶性肿瘤的初步报告。肿瘤 第2卷6期 20—22页 1982

### (上接59页)

DMH为烷基胍类化合物,这类物质是化学工业上广泛应用的原料,目前已发现有近40种胍的衍生物对动物有致癌作用<sup>〔1〕</sup>。因此,在化工生产过程中减少工人对这类物质的接触,杜绝对环境的污染,是肿瘤防治中不可忽视的问题。

DMH的致癌作用具有较高的器官专一性,主要影响结直肠,造成的大肠癌模型在

肿瘤分布部位及形态特征上均与人结直肠癌相似,因此它是制造大肠癌动物模型的一种比较理想的人工致癌剂。

关于小鼠在血吸虫感染后前阶段所表现的<sup>3</sup>H—TdR参入率降低,据我们的发现,可能是由于成熟虫卵引起组织坏死、渗出性炎症及嗜酸性脓肿所致细胞DNA合成速度减慢,并由于大量白细胞的浸润,使组织抽

(下转第94页)

## 讨 论

一、本组12例肺癌用液氮冷冻手术治疗后随访时间已超过12个月。其中9例晚期肺癌(例1—7例11.11)尚有4例健在,这疗效对晚期肺癌已是难能可贵。其余3例较早期肺癌均健在,近期疗效正在随诊观察中。

二、冷冻手术方法,本院有所革新:开始,我们引进外地经验,用特制“环形钳”夹紧病灶,安放特制“塑料杯形器”将拟切肺组织之一面套于“杯形器”内,然后取液氮倾入使之冻结成“球”,然后以电刀切除。我们体会这种方法有三个缺欠:①拟切肺每次冷冻只是单面;②切肺后由于“环形钳”所致保留肋边缘有2个“死角”需再做楔形切除;③冷冻部分均已切除,为免疫所需尚须做补充冷冻。如此,增加了重复操作。

为避免上述三个缺欠,我们在反复实践中摸索出一套我们自己的手术方法。其特点就是:①不用特制器材,比其它切肺多备4把肾钳一块扇形塑料布就可以了(即取普通塑料布剪成 $10 \times 10$ cm扇形即可);②操作简便,冷冻更确切安全;③拟切肺始终包绕在塑料布内操作,减少种植机会。具体方法是:开胸后探查病灶,若在肺之边缘则用2把肾钳将肿物连同周围部分肺组织(距肿物0.5cm)呈楔形夹紧,阻断血气流。然后,用扇形塑料布绕其外,再用2把肾钳与第一次钳夹相距0.5cm处钳夹将塑料布夹呈“漏斗”形,如此,拟切肺已在“漏斗”内,于是保

留肺借后2把肾钳与塑料布而和拟切肺膈开。取液氮20~30ml倾入“漏斗”内,使拟切肺完全浸泡于液氮内迅速冻结成块,待自然融解后再重复冷冻2~3次,然后用电刀在两次肾钳钳夹之间切割,去拟切肺后保留肺之边缘(刀口切割缘实为冻融之肺组织—抗原刺激物)缝合以防漏气出血。

三、肺癌之冷冻手术乃新课题,对我们来说更是刚开始,不论是手术方法或是选择适应症以及效果观察,有待今后实践中去研究解决。冷冻治疗之机理迄今尚未完全搞清。不过有两点是被公认的:一、冷冻可杀死瘤细胞;二、冷冻可提高机体免疫力。

在冷冻杀死瘤细胞方面。实验研究表明,温度越低、冷冻时间越长、降温越快、复温越慢、冻—融次数越多对细胞杀伤力越大。

在“低温免疫”方面,实验研究也发现:组织的冷冻损伤可做为抗原刺激物激发一种抗体形成其免疫反应与细胞转化有一定关系,和其它免疫法一样产生自身抗体。因而,这是特异性细胞免疫反应<sup>(2)</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Cooper I.S, New Engl J. Med 268: 743 1963
- [2] 谢大业、裘家骥等, 肺肿瘤冷冻及手术综合治疗的初步研究(附10例临床报告) 上海医药 2(1), 16—18, 1979
- [3] 浙江中医院冷冻小组《冷冻治疗肿瘤免疫反应探讨》 2, 42 1977

### (上接第95页)

提液DNA含量增高,而<sup>3</sup>H—TdR参入量并不相应增加,从而导致参入率的降低。当动物血吸虫病进入后阶段,则由于组织出现增生性变化,参入率随之上升,甚而超过正常对照组。

## 参 考 文 献

1. 黄甫健等:上海市青浦县肠癌初步调查, 肿瘤, 3: 82, 1983
2. 天野皓昭: 山梨县の消化管手术材料に見られた日本住血吸虫症の研究, 寄生虫病杂志, 30: 135, 1981
3. Dimmette, R. M. et al. Relationship of schistosomiasis to polyposis and adenocarcinoma of large intestine. Amer. J. Clin. Path. 26: 266, 1956.
4. 沈康年: 广西血吸虫病与大肠癌, 全国大肠癌学术交流资料, 1980
5. Hatt, H. H. Sym. dimethylhydrazine dihydrochloride. Organic syntheses. Collective Vol. 2, P. 208, 1943.
6. 厉朝龙: 1, 2—二甲基胍有机合成, 浙江省化学学会1982年年会论文集汇编 1982.
7. Chandral 和 Appel: 在大鼠肝的DNA上胸腺嘧啶核苷的参入, 分子生物学方法, P. 162, 科学出版社, 1979.
8. Bowden, J. P. et al. Mutagenic activity of tryptophan metabolites produced by rat intestinal microflora. J. Natl. Cancer Inst. 57: 921, 1976.
9. Fiala, E. S. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1, 2—dimethylhydrazine. Cancer. 36: 2407, 1975.
10. Shank, R.C. et al. Similarities between the biochemical actions of cycasin and dimethylnitrosamine. Biochem. J. 105: 321, 1967.
11. Toth, B. et al. Tumorigenic effect of 4-methylphenylhydrazine hydrochloride in Swiss mice. Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. 89: 245, 1977.
12. Lane N. Observations on the origin of adenomatous epithelium of the colon. Cancer, 16: 751, 1963.
13. Hill, M. J. Carcinogenesis of gastrointestinal cancer. Front. Gastrointest. Res. 4: 1, 1979.