

IGF-II 和 HBxAg 及 ras 基因在树鼯实验性肝癌组织中的表达*

Expressions of IGF-II, HBxAg and ras Gene in the Experimental Hepatocellular Carcinomas in Tree Shrews

苏建家 覃国忠 杨春 严瑞琪** P. D. Lotlikar***
 Su Jianjia Qin Guozhong Yang Chun Yan Reiqi

(广西肿瘤防治研究所 南宁市滨湖路6号 530021)

(Guangxi Cancer Institute, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 用免疫组化方法观察胰岛素样生长因子II (IGF-II) HBxAg 及 ras 基因的表达蛋白 p²¹ 在乙肝病毒 (HBV) 和黄曲霉素 B₁ (AFB₁) 致树鼯肝癌过程中的表达。发现这三种基因蛋白的表达与肝癌发生呈正相关关系。即接受 HBV 和 AFB₁ 双因素的树鼯的肝癌发生率与 IGF-II、HBxAg 及 p²¹ 的表达阳性率均显著高于只暴露于单一因素 HBV 或 AFB₁ 的动物。同时, 在带瘤树鼯中, 这三种基因的表达又显著高于无瘤者。提示: HBV 与 AFB₁ 能协同激发这些基因的异常表达; 这些基因的过量表达在肝细胞的癌变过程中起了重要的作用。

关键词 IGF-II HBxAg ras 树鼯 肝癌

Abstract The expressions of IGF-II (insulin-like growth factor II), HBxAg (hepatitis B virus) and p²¹ were detected in the courses of hepatocarcinogenesis induced by HBV (hepatitis B virus) and/or AFB₁ (aflatoxin B₁) with immunohistochemical method. The parallel relations in the incidence of HCC (hepatocellular carcinoma) and the expressions of these genes have appeared in each group. They were higher in the tree shrews received both HBV and AFB₁ than that exposed to HBV or AFB₁ alone. On the other hand, the expressions of these genes in tumor-carried tree shrews were significantly higher than that in non-tumor animals. Our results suggested that there was a synergistic effect of HBV and AFB₁ in activation of these genes in tree shrews. Over expressions of these genes may take an important role in the courses of hepatocarcinogenesis in tree shrews.

Key words IGF-II, HBxAg, ras, tupaia, liver cancer

中图法分类号 R 373.21; Q 95-33.

流行病学及实验病理学的研究提示: 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 及慢性乙肝病毒 (HBV) 感染, 是人类肝细胞癌 (HCC) 发生的主要危险因素。动物实验研究已证实 HBV 和 AFB₁ 有协同致肝癌作用^[1,2]。但这种作用的机理目前仍不很明确。本文用免疫组织化学方法, 对 IGF-II 和 HBxAg 及 ras 基因的表达蛋白 p²¹ 在树鼯实验性肝癌及非癌肝组织的表达的研究, 探讨 HBV 和 AFB₁ 协同致肝癌作用的机理。

1 材料与方法

1.1 动物及实验经过

树鼯 53 只, 有 26 只接种了人 HBV 后, 经免疫酶联法、原位分子杂交、斑点杂交及免疫组化等检测, 证实已感染上人 HBV。取其中 9 只作为 B 组; 17 只加喂饲 AFB₁ 作为 A 组。未接种及未感染 HBV 的 27 只动物中, 19 只给予 AFB₁ 作为 C 组; 余下 8 只作空白对照 (D 组)。实验时间 83 周~ 158 周。A 和 C 组动物接受 AFB₁ 的时间及途径相同。接受 AFB₁ 的总量为 10.3 mg/只~ 16.4 mg/只。死亡或处死的动物肝及肿瘤组织固定于 10% 中性福尔马林液中。经病理检查, 共发生 HCC 13 例。其中 A 组 9 例; B 组 1 例; C 组 3 例; D 组

1997-04-2 收稿

* 自治区卫生厅重点课题

** 中山医科大学肿瘤研究所;

*** 美国费城 Temple 大学医学院肿瘤研究所。

无 HCC 发生 本研究在 53 例肝及肝癌切片上同时检测 IGF-II、HBx Ag 及 p²¹ 的表达

1.2 试剂

(1) IGF-II 为鼠抗人 IGF-II (单抗) 美国 Bio Source International 公司产品 工作稀释度为 1:200

(2) p²¹ 为鼠抗 Pan-Tas 癌基因蛋白 (单抗) 美国 Oncogene Science 公司产品 工作稀释度为 1:100

(3) HBx Ag 为免抗人 HBx Ag (多抗) 由美国费城 Jefferson 大学 Feitelson M. A. 教授馈赠

(4) ABC 试剂盒为美国 Vector 公司产品, 按说明书稀释抗体

1.3 方法

采用免疫组化 ABC 法 切片经脱蜡至水, 用含 0.3% H₂O₂ 的甲醇去除内源性过氧化物酶; 0.01 M PBS 液洗, 加正常 5% 羊或马血清封闭非特异性抗原后, 用 PBS 洗, 加一抗在室温下孵育过夜 PBS 洗后, 滴二抗, 室温下孵育 50 min 后用 PBS 洗, 滴三抗, 室温下 50 min 后用 PBS 洗, DAB 显色, 光镜观察

每批染色均设阴、阳性片作对照

2 结果

所有的检测项目, 阴性对照呈阴性, 阳性对照片呈阳性表达

(1) IGF-II: 53 例标本中, 有 21 例表达 IGF-II。其中 A 组 14 例; B 组 2 例; C 组 3 例; D 组无 1 例阳性表达。A 组树_鼠不仅肝癌发生率显著高于 B、C 及 D 组, 而且肝细胞 IGF-II 的阳性表达率也显著高于这三组 (表 1)。13 例 HCC 中, 12 例检测了 IGF-II, 癌内外均有 IGF-II 的过量表达 带瘤的动物肝 IGF-II 的阳性率非常显著地高于无瘤者 IGF-II 阳性的细胞及组织分布以及亚细胞定位: 21 例阳性中, 有 8 例出现于细胞核; 1 例同时见于胞浆及胞核; 2 例定位于胞浆

表 2 各组带瘤与非带瘤动物 IGF-II, p²¹ 及 HBx Ag 表达率比较

Table 2 Expressions of IGF-II, p²¹ and HBx Ag in the animals with and without tumor in each group

组别 Group	动物 No. animals	IGF-II 阳性数 IGF-II positiveness		p ²¹ 阳性数 p ²¹ positiveness		HBx Ag 阳性数 HBx Ag positiveness	
		无瘤动物 No. animals without tumor	带瘤动物 No. animals with tumor	无瘤动物 No. animals without tumor	带瘤动物 No. animals with tumor	无瘤动物 No. animals without tumor	带瘤动物 No. animals with tumor
A	17	5/8(65.5)	9/9(100.0)	0/8 ¹	5/9(55.5) ¹	2/8(25.0)	7/9(77.7)
B	9	2/8(25.0)	0/1	1/8(12.5)	0/1	1/8(12.5)	0/1
C	19	2/16(12.5) ¹	3/3(100.0)	1/16(6.3)	2/3(66.7)		
D	8	0	0	0			
合计 Total	53	9/32(28.1) ²	12/13(92.3) ²	2/32(6.3) ²	7/13(53.8) ²	3/16(18.7) ¹	7/10(70.0) ¹

括号内的数字为百分率 The values in the brackets are percentages

在 12 例肝癌组织中, 4 例的阳性细胞呈簇状分布于肿瘤结节及邻近的肝细胞增生灶内。

表 1 各组 IGF-II, p²¹ 及 HBx Ag 表达率比较

Table 1 Expressions of IGF-II, p²¹ and HBx Ag in each group of animals

组别 Group	动物数 No. animals	阳性数 Positive animals			
		HCC 数	IGF-II	p ²¹	HBx Ag
A	17	9(52.9)*	14(82.4)*	5(29.4)	9(52.9)*
B	9	1(11.1)*	2(22.2)*	1(11.1)	1(11.1)*
C	19	3(15.8)*	5(26.3)*	3(15.8)	N
D	8	0	0	0	N
合计 Total	53	13(24.5)	21(39.6)	9(17.0)	10(18.9)

括号内的数字为百分率 The values in the brackets are percentages.

(2) p²¹: 肝细胞内阳性表达率较低, 仅出现 9 例 A、B 和 C 组分别有 5 和 3 例 D 组无阳性表达 在同一组, 带瘤动物 p²¹ 阳性率显著高于无瘤者。但在 A 和 C 两组间, 带瘤动物 p²¹ 表达率无显著性差异 (表 1 和表 2)。9 例 p²¹ 阳性细胞均见于肿瘤结节或增生细胞灶内 7 例 p²¹ 的阳性物质定位于肝细胞浆; 2 例同时位于肝细胞核和胞浆 8 例 p²¹ 阳性的肝切片同时出现 IGF-II 的过量表达

(3) HBx Ag: 26 只感染了人 HBV 的树_鼠, 有 10 例在肝细胞检出了 HBx Ag 带瘤动物 HBx Ag 检出率显著高于无瘤者 (表 1 表 2)。阳性细胞呈簇状分布于癌内或癌周; 在无癌肝则见于增生细胞灶内 阳性物质多见于胞浆, 少数同时出现于细胞核

3 讨论

在阴性对照片上, 未出现 IGF-II、HBx Ag 及 p²¹ 的阳性表达 表明在免疫组化染色中, 无非特异性阳性反应产生

本文是在能感染人 HBV 的树鼯动物模型进行人 HBV 与 AFB₁致肝癌作用的实验研究基础上^[1],从分子水平去探讨 HBV 与 AFB₁协同致癌作用机理

本研究对照组无 IGF-II 表达, A 组的表达率显著高于 B C 两组,表明 HBV 和 AFB₁都能激发肝细胞 IGF-II 过量表达;两种因素共同作用,能明显增强这种作用。有报道:当发生胚胎性肿瘤,如肝母细胞瘤时,血循环中 IGF-II 浓度提高^[3]。另外,将转基因小鼠的循环 IGF-II 浓度提高 20~30 倍,18 个月后,这些小鼠出现了各种各样的肿瘤^[4]。本文带瘤树鼯肝 IGF-II 的表达率显著高于无瘤者,提示 IGF-II 的过量表达在树鼯肝癌发生中有重要作用。另外,在癌旁肝细胞及无癌肝的增生细胞灶或结节内也检出 IGF-II 阳性细胞。提示,在致癌因子作用下,IGF-II 较早被激活。肝细胞内 IGF-II 的过量表达,是肝癌及癌前病变的信号之一。

ras 基因的表达蛋白 p²¹能调控 GTP 酶的活性,参与控制细胞的增殖。本文各组 p²¹表达率与肝癌发生呈正相关性。其中 A 组带瘤动物 p²¹表达又明显高于无瘤者。提示 p²¹表达与树鼯 HCC 发生关系密切。这与在人肝癌的研究结果相似^[5]。

HBx 基因属于 HBV 的非结构蛋白。最近的研究显示 HBx 蛋白有反式激活各种不同的病毒和细胞基因的作用^[6]。本文 A B 组 IGF-II 与 HBx Ag 表达呈平行关系,也反映了这种作用。另外,实验树鼯肝癌中 HBx Ag 的阳性率显著高于无癌肝,也提示 HBx 基因在 HCC 形成中起重要作用。HBx 的过量表达可能是与 HBV 有关的致肝癌作用过程决定性的一步^[7]。因此,在慢性 HBV 感染者,肝细胞出现 HBx Ag,可能是 HCC 发生的重要的前瞻性的标志物^[8]。

本文各组 IGF-II、p²¹及 HBx 三种基因蛋白的表达与该组 HCC 发生率呈正相关性,即暴露于 HBV 和 AFB₁两因素的 A 组,不仅 HCC 发生率显著高于只暴露于单一因素(HBV 或 AFB₁)的 B 或 C 组,而且 p²¹、IGF-II 及 HBx Ag 也同样高于 B 或 C 组。展示出这三种基因蛋白的表达与 HCC 之间的密切关系。

我们以前的实验已证实 HBV 有致 HCC 及 AFB₁有协同致 HCC 作用^[1]。通过 HBx 基因的反式激活作用,使癌基因激活,抑癌基因 p⁵³的突变^[9],可能是 HBV 致 HCC 的机理之一。另一方面,HBV 感染又将影响 AFB₁的代谢,增加了 AFB₁-DNA 加合物的含量^[10]。整合了 HBV DNA 的肝细胞更易蓄积

AFB₁,然后通过修饰结构,形成 AFB₁-DNA 加合物,启动细胞转化。再者,AFB₁能引起病毒复制的增加^[11]或介导扩增病毒 DNA 序列。这可能是 HBV 与 AFB₁协同致肝癌作用的机理之一。IGF-II 及 HBx 基因的过量表达,可能作为癌变的早期信号引起重视。该实验为更深入地研究人肝癌发生的分子机理,提供了较好的动物模型。

参考文献

- 1 严瑞琪,苏建家,黄定瑞等.人乙型肝炎病毒和黄曲霉毒素 B₁对树鼯原发性肝癌的研究.中华病理学杂志,1989,18(1):19.
- 2 Buennasch P, Khoshkhon Hacker HJ et al. Synergistic hepatocarcinoma effect of hepadnaviral infection and dietary aflatoxin B₁ in woodchucks.
- 3 Kankatsu Yun. A new marker for rhabdomyosarcoma: insulin-like growth factor II. Lab. Invest. 1992, 67: 653.
- 4 Roglev CE, Yang D, Rossetti L et al. Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor II transgenic mice. J Bio Chem, 1994, 269: 13779.
- 5 Leon M, Kew MC. Analysis of ras gene mutations in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. Anti-cancer Research, 1995, 15: 859.
- 6 Kekule AS, Larure U, Weiss L et al. Hepatitis B virus transactivator HBx used a tumor promoter signalling partway. Nature(London), 1993, 361: 742.
- 7 Su Q, Liu YF, Zhang JF et al. Expression of insulin-like growth factor II in hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma its relationship with hepatitis B virus anti-gene expression. Hepatology, 1994, 20(4): 786.
- 8 Zhu MH, London WT, Duan LX et al. The value of hepatitis B virus Bx antigen as prognostic marker in the development of hepatocellular carcinoma. Int J Cancer, 1993, 55: 571.
- 9 Wang XW, Forrester, Yeh H et al. Hepatitis B virus x protein inhibits p⁵³ sequence-specific DNA binding, transcription activity, and association with transcription factor ERCCs. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 2230.
- 10 Wild CP, Shrestha SM, Anwar WA et al. Field studies of aflatoxin exposure, metabolism and induction of genetic alteration in relation to HBV infection and hepatocellular carcinoma in the Gambia and Thailand. Toxicol Lett, 1992, 64: 455.
- 11 Heilbronn R, Schlehofer JR, Yalkinoglu AO et al. Selective DNA-amplification induced by carcinogens (initiators): evidence for a role of protease and DNA polymerase.

(责任编辑:蒋汉明)