

大鼠肝癌变的启动、促进、发展和癌形成 多阶段中癌基因原位表达的动态观察*

In Situ Expression of Oncogenes during Multiple Stages in Hepatocarcinogenesis in Rats

罗 丹 刘启福 苏建家 覃国忠

Luo Dan Liu Qifu Su Jianjia Qin Guozhong

段小娟 覃柳亮 李 媛 黄定瑞

Duan Xiaojuan Qin Liuliang Li Yuan Huang Dingrui

(广西肿瘤研究所 南宁市滨湖路 6号 530021)

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

摘要 用原位分子杂交方法动态观察 Solt-Farber模型实验大鼠肝癌发生的启动、促进、发展, 癌形成各阶段 *c-myc*, *N-ras* 的表达及其与病理改变及 γ -GT 酶表达的关系。结果, 这两种癌基因在促癌阶段出现高表达, 继而略下降, 诱癌中期以后随增生结节的发展和癌的形成呈增加的趋势, 与 γ -GT 酶的表达有一定的吻合性。诱癌中晚期 *c-myc*, *N-ras* 的表达增高与癌变关系密切。结果表明, *c-myc* 和 *N-ras* 在肝癌的发生中有协同作用, 从分子水平进一步证实肝细胞增生结节与肝细胞癌变关系密切。

关键词 实验性肝细胞癌 原位杂交 *c-myc* *N-ras* 动物实验

Abstract The relationship among the expression of *c-myc*, *N-ras*, histologic alterations and the expression of γ -GT was investigated during the stages of initiation, promotion, development and neoplasia of chemical hepatocarcinogenesis in rats using in situ hybridization and histochemistry. Hepatocarcinogenesis was induced according to the model of Solt and Farber. The results showed that the expression of these two oncogenes were increased started at promotion stage, follow a little decreasing, then increased again. From the middle stage of hepatocarcinogenesis, the expression of *c-myc*, *N-ras* was increased and correlated with the expression of γ -GT, the progression of neoplastic nodules and the formation of hepatocellular carcinoma. A close relation between increased expression of *c-myc*, *N-ras* and the was found in middle and late stages of hepatocarcinogenesis. The present data suggest that there might be a synergism between *c-myc* and *N-ras* in hepatocarcinogenesis. It is further confirmed that there is a close correlation between hepatocytic nodules and the by molecular biologic technique.

Key words experimental hepatocellular carcinoma, in situ hybridization, *c-myc*, *N-ras*, animal experiment

中图法分类号 Q 342.3; R-332

肝细胞的癌变是一个多因素参与, 多阶段发展的过程。癌基因是一类具有转化正常细胞潜能的 DNA 序列。 *c-myc*, *N-ras* 基因在化学诱发肝癌的发生过程中常呈激活状态或表达水平提高^[1-3], 提示它们在实

验肝癌的发生中可能起着某种直接的作用。为探讨这两种癌基因在肝癌发生的启动、促进、发展及癌形成各阶段的表达特点及其与病理形态学改变的关系, 我们用原位分子杂交和组织化学技术, 动态观察了化学诱发大鼠肝癌变过程不同阶段细胞癌基因表达与异常形态学及异常组化表型的关系。

1997-08-25收稿

* 国家自然科学基金资助项目 (编号: 39060032)

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

6周龄雄性 Wistar 大鼠 40只, 体重 150 g~170 g, 随机分实验组 (A组, 28只) 与对照组 (B组, 12只)。实验组依据 Solt-Farber模型^[4], 步骤为: 腹腔单剂量注射二乙基亚硝胺 (DEN) 作为启动剂, 剂量为 200 mg/kg 体重; 2周 (W) 后给含 0.015% 二乙酰氨基苄 (2-AAF) 的饲料, 实验第 3周末行肝 2/3大部分切除术 (PH), 继续喂含 0.015% 2-AAF 的饲料至第 4周末, 此为选择性促癌程序; 换正常饲料观察至第 50周 对照组单剂量腹腔注射生理盐水, 喂正常饲料 各组分别于第 2 4 25 50周末处死动物, 每组 3~5只 取肝每叶最大径处最大切面组织, 厚 3 mm, 放入 4°C 丙酮: 95% 酒精 (1: 1/v: v) 液固定, 低温石蜡包埋, 切片 4 μ m~5 μ m

1.2 病理形态学观察及组化染色

肝脏病理形态学观察及 r-谷氨酰转肽酶 (r-GT) 组化染色按文献报道方法进行 用电脑化图形扫描分析系统检测 r-GT 灶的个/cm², mm²/cm², 等平面及立体量化指标

1.3 原位分子杂交

生物素标记 c-myc cDNA 探针 (美国 ENZO 公司及北京中山生物技术公司), 生物素标记 N-ras cDNA 探针 (北京中山生物技术公司), 原位分子杂交试剂盒 (美国 ENZO 公司)。染色过程: (1) 常规脱蜡, 水化; (2) 0.2 mol HCl 20 min; (3) 洋地黄液 5 min; (4) 40 μ g/mL 蛋白酶 K 37°C 15 min; (5) 4% 多聚甲醛 10 min; (6) 1% H₂O₂ 甲醇液 10 min; (7) 预杂交 40°C 4 h; (8) 加生物素标记探针杂交液 42°C 36 h; (9) 按试剂盒说明书操作, AEC 显色, 苏木素复染, AEC 封片剂封片。每次染色均设有阳性对照 (已知阳性片)、空白对照 (已知阳性片加预杂交液代

表 2 DEN 长期诱癌过程中各时期 r-GT 灶发生情况

Table 2 Detection of r-GT positive foci in liver tissues in different stages of DEN induced hepatocarcinogenesis in rats

组别 Group	动物数 No. of animals	No. /cm ² $\bar{x} \pm s$	mm ² /cm ² $\bar{x} \pm s$	mm ² /No. $\bar{x} \pm s$	No. /cm ³ $\bar{x} \pm s$	mm ³ /No. $\bar{x} \pm s$
A1	5	0	0	0	0	0
A2	5	27.0 \pm 15.0	4.25 \pm 2.20	0.15 \pm 0.07	550.8 \pm 364.5	0.08 \pm 0.06
A3	5	39.6 \pm 9.7	29.63 \pm 11.88	0.85 \pm 0.49	548.8 \pm 377.1	0.84 \pm 0.62
A4	8	21.0 \pm 6.4	42.47 \pm 9.19	2.27 \pm 1.10	190.7 \pm 101.9	2.93 \pm 2.08
B1	3	0	0	0	0	0
B2	3	0.3 \pm 0.7	0.04 \pm 0.08	0.13 \pm 0.04	5.0 \pm 11.3	0.01 \pm 0.03
B3	3	0.1 \pm 0.2	0.01 \pm 0.02	0.08 \pm 0.00	2.1 \pm 4.7	0.01 \pm 0.02
B4	3	0.1 \pm 0.1	0.01 \pm 0.01	0.08 \pm 0.04	2.3 \pm 2.7	0.02 \pm 0.03

* : 与相应 B 组比较 Compared with matching group B. P < 0.01

替杂交液) 和阴性对照 (已知阴性片)。原位杂交阳性结果半定量标准见表 1

表 1 原位分子杂交半定量标准

Table 1 Semi-quantity standard for in situ hybridization

	评分 Score					
	1	2	3	4	5	6
染色范围 Staining range	<10%	~ 30%	~ 50%	~ 70%	~ 90%	> 90%
染色强度 Signal intensity	浅红色 Light red	红色 Red	深红色 Brick red			

2 结果

2.1 病理形态学改变

实验组: 1) 诱癌阶段 (A1组, 予 DEN 2W 后), 肝脏眼观和镜观均无特殊改变; 2) 促癌阶段 (A2组, 予 PH 及 0.015% 2-AAF 2W 后), 肝表面及切面密布针尖至粟粒大小灰白或透明结节 镜下: 多个变异肝细胞灶和结节, 以嗜碱性细胞结节为多, 并见卵圆细胞、间质细胞增生, 多灶肝细胞坏死; 3) 诱癌发展中期 (A3组, 实验 25W), 肝表面数个芝麻大小灰白或透明结节 镜下以嗜酸性细胞+ 结节为主, 偶见透明细胞结节, 出现早期大结节肝硬变; 4) 癌形成阶段 (A4组, 实验 50W, 结束), 肝表面粗糙, 多个大小不一灰白结节, 最大者 4 cm \times 3.5 cm \times 3 cm 镜下 45% 大鼠有肝癌形成, 主要为肝细胞癌, 癌细胞呈团块状分布, 较多较大的肝细胞增生灶 (嗜酸或嗜碱或透明细胞组成)。

对照组: 无特殊改变

2.2 γ -GT 改变

各组在长期诱癌过程中各时期 r-GT 发生情况见表 2 实验组 r-GT 灶出现于实验第 4周末, 即促癌程序结束后, 随病变发展, r-GT 灶不断增大 (平面和立体指标), 而灶的数目略减少。

表 3 c-myc, N-ras mRNA原位分子杂交半定量结果

Table 3 The results of c-myc, N-ras mRNA in situ hybridization with semi-quantity scores

组别 Group	诱癌时间 Experiment time (周 Week)	n	c-myc mRNA		N-ras mRNA	
			肝组织 (平均得分) Liver tissue (Average score)	结节和/或 HCC (平均得分) Nodule and/or HCC (Average score)	肝组织 (平均得分) Liver tissue (Average score)	结节和/或 HCC (平均得分) Nodule and/or HCC (Average score)
A1	2	5	0	NA	3	NA
A2	4	5	5*	0*	3.6	1
A3	25	5	1	2	2.8	2.8
A4	50	8	3.4	4	3.2	3.7

NA: 无此项改变 Not available; +: 与 A3相比 Compared with A3, $P < 0.05$; *: 与 A4相比 Compared with A4, $P < 0.05$.

2.3 原位分子杂交

原位分子杂交的对照各组实验结果均符合实验要求,对照各组仅见肝小叶中央静脉旁少许肝细胞有 c-myc, N-ras 表达。实验组各时期 c-myc mRNA, N-ras mRNA 检出情况见表 3。实验组在癌启动阶段 (A1) 仅有 N-ras mRNA 位于肝小叶中央静脉及小叶周边区及汇管区旁肝细胞内。促癌阶段 (A2), 出现较多染色强的 c-myc 和 N-ras 阳性表达细胞, 主要位于变异肝细胞灶, 多呈胞浆型 (图), 极少核型; 而嗜碱性结节中仅有少量 N-ras mRNA 检出, 未能检测到 c-myc mRNA。诱癌中期 (A3, 实验 25 W) 嗜碱性细胞结节内出现 c-myc 癌基因的表达, N-ras 阳性细胞较前一时期增多, 结节外 c-myc 和 N-ras 阳性细胞较前一时期明显减少; 癌形成期 (A4), 两种癌基因的表达明显增加, 以癌细胞灶及增生结节为主, 其染色强度也明显高于病灶外肝细胞。

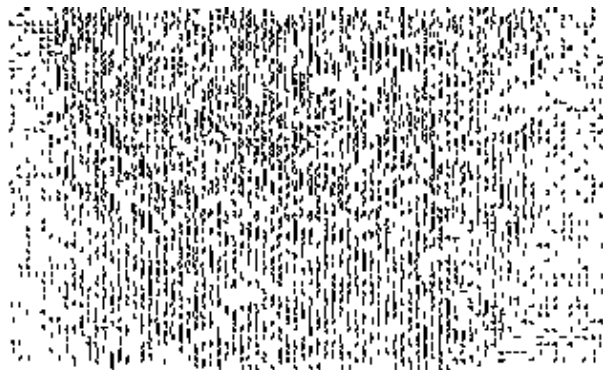


图 1 Fig. 1

3 讨论

实验性肝癌的发生, 是在化学致癌物作用下, 肝细胞被启动, 继而出现肝细胞增生灶, 增生结节 (细胞群 1 → 细胞群 2...), 至肝细胞癌。本模型实验条

件下, DEN 单剂量给予作为启动剂, 使一定数量肝细胞被致癌物启动, 继而施与选择性促进程序。所用的 2-AAF 抑制正常肝细胞的增生, 而被启动了的肝细胞不被 2-AAF 抑制, 在肝切后迅速增生形成大量肝细胞增生性病变 (包括增生灶和增生结节), 此模型将肝癌形成的启动和促进过程分开, 有利于研究启动和促进的机理及影响因素。所诱发的肝细胞增生性病变是启动肝细胞的直接后裔, 且为同时发生, 同步生长, 有利于研究其在癌形成不同阶段的特性, 及其向癌演变的规律。这些增生性病灶被认为是癌前病变, 其绝大多数病灶可停滞或改建成类似正常的肝细胞, 最终仅个别病灶演变为癌。

已知 N-ras 基因表达蛋白属于 G 蛋白家族, 与跨膜信号的传递有关; c-myc 具有与核 DNA 结合的磷蛋白基因密码, 与 DNA 复制有关。在肝细胞再生过程中, 有这两种癌基因短暂的表达增加^[2,5], 在化学致癌物诱发大鼠肝癌变过程中 c-myc, N-ras 的异常表达已有不少报道^[2,3], 涉及癌基因表达与肝细胞形态学改变及组化表型变化关系的报道不多^[6,7]。本实验观察了大鼠肝癌变整个过程不同阶段 c-myc, N-ras 癌基因的改变, 发现在肝变异细胞, 肝细胞增生性病变 (包括灶和结节) 以及肝细胞癌中, 均检测到表达增加的上述两种癌基因, 而且两者的表达随病变进展呈增加的趋势。表明这些癌基因直接参与肝细胞的癌变, 它们的高表达对维持肝癌细胞的恶性表型具有重要意义。

研究表明, 癌发生需要两种或更多种癌基因的协同作用和连续作用才能导致癌的形成。Land H 用小鼠前列腺为模型作用研究^[8], 发现单独导入 ras 或 myc 只诱发癌前损伤, 而 ras 与 myc 共转染的表达则有明显的癌生长。本实验从促癌阶段至癌形成过程中, c-myc, N-ras 呈相伴存在, 表达平行增高, 提示二者具有协同作用。

关于 N-ras 和 c-myc 的协同作用, 认为由于

N-ras表达异常,致使跨膜信号传递改变,进而启动c-myc核癌基因,使细胞DNA合成加强,细胞分裂增加,最终导致细胞增殖失控而形成肝癌^[9]。我们注意到,在启动阶段,部分肝细胞内即有N-ras mRNA,而c-myc mRNA在促癌阶段才出现,晚于N-ras癌基因的表达。肝细胞增生结节中,c-myc在诱癌发展阶段出现,也迟于N-ras的表达,与上述观点相符合。

γ -GT是胚胎肝细胞合成的酶,成熟肝细胞则不表达。当肝细胞损伤后新生的和癌变的肝细胞 γ -GT水平则会重新升高。在实验性肝癌发生过程中, γ -GT的出现被认为是肝癌前病变的特征和标志^[10]。根据我们的实验结果,启动阶段N-ras已有表达,早于 γ -GT的表达;促癌阶段,肝细胞增生结节内 γ -GT明显阳性,所检测的癌基因仅N-ras有少量表达;相反,结节外肝组织中两种癌基因的表达均较高,而 γ -GT却呈阴性;诱癌中后期, γ -GT灶和c-myc、N-ras癌基因表达在病变分布上有一定的吻合,癌基因表达的范围较 γ -GT灶要大。表明癌基因表达与 γ -GT的再现在实验性肝癌变过程中有各自的规律和特点。 γ -GT的表达主要集中在肝细胞增生性病变及癌变部位,即与肝细胞异型性变的关系比较密切,异型性大者 γ -GT的表达程度高;c-myc、N-ras在形态异常不明显的肝细胞中也有表达,它们从诱癌中期才较明显地分布于增生结节及后期的癌灶中,因为2-AAF又是一种弱的肝致癌物,加上肝大部分切除的刺激,这些可能是促癌阶段增生结节外肝细胞中c-myc、N-ras表达明显增高形成一高峰的原因。这种表达反映的很可能是细胞的复制活跃程度。与Corral^[2]、Sinha^[3]报道相似,我们观察到在诱癌中晚期c-myc、N-ras表达的增高与肝细胞癌变关系密切,并从分子水

平进一步证实了肝细胞增生结节(嗜碱,嗜酸或透明细胞结节)与癌变关系密切。

参考文献

- 1 顾健人,陈渊卿,蒋惠秋等.原发性肝癌的癌基因谱.肿瘤,1988,8(6):289-291.
- 2 Corral M, Paris B, Guguen G C et al. Increased expression of the N-myc gene during normal and neoplastic rat liver growth. Exp-Cell Res, 1988, 174(1):107-115.
- 3 Sinha S, Webber C, Marshall C J et al. Activation of ras oncogene in aflatoxin-induced rat liver carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(11):3673-3677.
- 4 Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature, 1976, 263(5579):701-703.
- 5 许凯黎,关赛芬,屠华成等.大鼠肝细胞再生过程中G-GT酶及ras-P21的表达.肿瘤,1990,10(2):62-63.
- 6 Nagy P, Everts R P, Marsden E et al. Cellular distribution of c-myc transcripts during chemical hepatocarcinogenesis in rats. Cancer Res, 1988, 48(19):5522-5527.
- 7 林月珍,丁灏,陈晋彦.癌前变异肝细胞c-myc、N-ras mRNA的表达及其与分化的关系.中华肿瘤杂志,1993,15(2):97-100.
- 8 刘培南.癌基因研究的新发现与进展(二).国外医学—分子生物学分册,1989,11(5):223-226.
- 9 徐秉栋.原发性肝细胞癌的分子病理学研究进展.中华病理学杂志,1991,20(2):150-152.
- 10 Peraino C, Staffeldt E F, Carnes B A et al. Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or benzopyrene within one day after birth. Cancer Res, 1984, 44(8):3340-3347.

(责任编辑:蒋汉明)