

• 研究简报 •

自发性肝癌的 LEC 大鼠的 GST-P 异常表达和 p53 基因突变

p53 gene mutations and unusual expression of GST-P in spontaneous hepatocellular carcinoma of Long Evans Cinnamon rats

李兴华¹, 徐云虹², 许爱芳¹, 龚燕芳¹, 屠振兴¹, 李兆申¹

(1. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433; 2. 吉林大学第二医院, 长春 130041)

[关键词] LEC 大鼠; 肝肿瘤; GST-P; p53 基因; 突变

[中图分类号] R 735.7

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2005)01-0113-03

原发性肝癌的发病原因及机制尚未完全清楚, 可能与多种因素的综合作用有关。一般采用肝癌的手术标本或化学致癌的动物进行研究, 但标本成分复杂, 同质性差, 影响因素多。从遗传学角度看, 人体基因的高度杂合性, 个体暴露于致癌物质的种类和量也不同, 结果缺乏客观的评价。本实验采用自发性发生癌的实验动物 LEC(Long Evans Cinnamon)鼠, 利用激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)技术, 获得同质性的癌细胞, 为结果的客观评价奠定了基础^[1], 同时, 利用 PCR-SSCP 以及 DNA 测序的方法, 对 p53 基因进行研究, 旨在揭示原发性肝癌发病的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和器材 15 个月龄和 6 个月龄的 LEC 大鼠为实验组, SD 大鼠为对照组。实验动物由日本秋田大学实验动物中心提供。

1.2 GST-P 免疫组化染色 将 3 只 15 个月龄 LEC 鼠的肝脏组织作冰冻切片, 在肿瘤结节的部位取材, 参照与其连续的切片的 H-E 染色, 选择在病理组织学上确认的肝细胞癌切片 32 张。另外, 6 个月龄的 LEC 鼠的肝脏切片 32 张作为对照, SD 大鼠的肝脏切片 32 张作为阴性对照。免疫组化试剂盒及 GST-P 抗体由日本和光纯药公司(东京)提供。具体方法按说明书进行。GST-P 表达阳性为细胞质呈棕褐色。

1.3 LCM 技术捕获癌细胞 LCM 仪器(日本 Olympus 公司生产的 LM200 型)应用条件: Repeat 0.2 s, Target 0.385 V, Current 4.6 mA, Spotsize 30 μ m, Temp Rd 24.9 $^{\circ}$ C, power 40 mW, Duration 44~66 ms。取 5~10 μ m 厚的连续的冰冻切片, 第 1 张用于 H-E 染色, 观察癌细胞的部位。其余各张用于癌细胞的捕获, 将冰冻的白片放于 LCM 的物镜台上, 针对癌细胞发射激光, 使癌细胞黏附于塑料转移膜上, 连续收集癌细胞 500~1 000 个, 放于有 50 μ l 的 DNA 消化液的 EP 管中, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中摇动过夜。

1.4 DNA 微量提取 试剂盒由日本三光纯药株式会社提供, 具体方法按说明书进行。

1.5 p53 基因的 PCR-SSCP 分析 p53 引物序列: 外显子 5 第 1 条 GAC CTT TGA TTC TTT CTC CTC TCC, 第 2 条 GGG AGA CCC TGG CAA CCA G。外显子 6 第 1 条 GCC TCT GAC TTA TTC TTG CTC, 第 2 条 CCC AAC CTG GCA CAC AGC TTC。外显子 7 第 1 条 CTG TGC CTC

CTC TTG TCC CG, 第 2 条 TTC TTT GTC CTG CCT GCC ACC。采用由日本三光纯药公司提供的 PCR 试剂盒, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环, 最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6 PCR-SSCP 分析 将 PCR 产物 9 μ l 95 $^{\circ}$ C 变性后, 与 1 μ l 上样液混合后, 进行聚丙烯酰胺电泳, 电流 10 mA, 时间 80 min, 然后进行银染, 银染按说明书要求进行。

1.7 DNA 测序 将经纯化的 PCR 产物, 经调整浓度后备作单引物 PCR 反应。总体积 20 μ l, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 4 min, 共计 25 个循环。单引物 PCR 产物, 放于 1.5 ml EP 管中, 其中加入 3 mol 醋酸钠(pH 4.6) 2 μ l, 95% 乙醇 50 μ l, 置冰上 10 min, 15 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 干燥, 30 μ l TSR 溶解, 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 放入 ABI PRISM 310 DNA 测序仪进行测序。

2 结果

2.1 LEC 鼠肝脏病理组织学变化 6 个月龄 LEC 鼠黄疸消退, 肝小叶周边可见增生胆管上皮细胞和小型再生的肝细胞。15 个月龄的 LEC 鼠肝脏病理改变可见肝脏形成红色和白色的肿瘤结节, 结节镜下所见为肝细胞癌和胆管纤维化。肝细胞呈条索状, 可见轻度结构紊乱和细胞异型性, 小叶周边大量假胆管增生(图 1)。

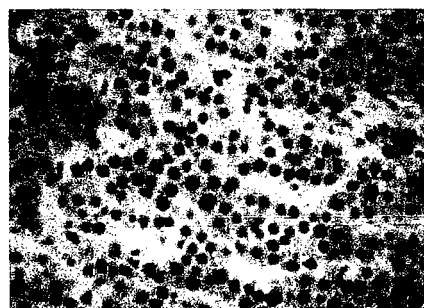


图 1 LEC 鼠高分化型肝细胞癌($\times 200$)

2.2 LEC 鼠肝脏 GST-P 的免疫组化染色结果 GST-P 表达阳性为细胞质呈棕褐色颗粒(图 2)。15 个月龄 LEC 鼠即

[作者简介] 李兴华(1964-), 男(汉族), 博士, 副教授。
E-mail: lixinghua6@hotmail.com

肝癌组的 GST-P 的表达为 96.97% (31/32), 6 个月 LEC 鼠即肝炎组为 37.50% (12/32), SD 大鼠组即对照组为 9.38% (2/32)。肝癌组高于其他 2 组, 具有非常显著意义 (χ^2 检验, $P < 0.01$)。肝炎组的表达高于对照组的表达, 具有显著意义 (χ^2 检验, $P < 0.05$)。

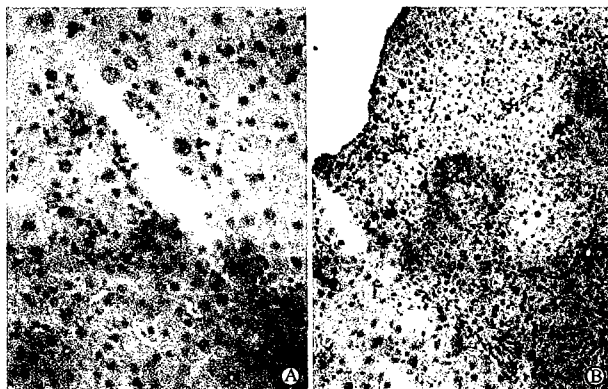


图 2 LEC 鼠肝脏(冰冻切片)GST-P 免疫组化结果

A: ×200; B: ×100

2.3 p53 基因的 PCR-SSCP 分析 琼脂糖电泳结果: 外显子 5 于 260 bp 左右可见目的带, 外显子 6 于 280 bp 左右可见目的带, 外显子 7 于 200 bp 左右可见目的带。PCR-SSCP 结果: 外显子 5 于 260 bp 左右可见 2 条非常相近的目的带, 而外显子 6、7 仅可见 1 条目的带。

2.4 测序结果 外显子 6、7 全序列未发现变异点。外显子 5 全序列发现 2 处变异点, 第 42 位的 ATT → ATG (Ile → Met) 和第 186 位的 TGG → TGC (Trp → Cys), 即异亮氨酸变成蛋氨酸和色氨酸变成半胱氨酸。

3 讨论

LEC 鼠是日本北海道大学于 1975 年培育出的自然发生肝癌的实验动物。从非近交系的 Long Evans 鼠中, 根据毛色不同分为桂皮色的 LEC 鼠和野生色的 LEA (Long Evans Agouti) 鼠。LEC 鼠兄妹近亲交配第 24 代开始, 出现急性肝炎的症状, 50% 以上出现重症肝炎, 2 周以内死亡, 与人的重症肝炎的临床及病理组织学改变非常相似。6 个月龄的 LEC 鼠与人的慢性肝炎病变非常相似, 但肉眼及组织学未发现与人类相同的典型的肝硬化。15 个月龄的 LEC 鼠肝脏全部肿大, 未见黄疸、贫血、体质量减轻等急性期症状, 生化学检查血清转氨酶轻度升高。生存 1 年以上的 LEC 鼠几乎全部发生肝细胞癌或胆管细胞癌, 具有遗传背景一致的优点。肉眼可见肝脏肿大, 形成红色或白色结节, 镜下为肝细胞癌或胆管细胞癌并伴有胆管纤维化。虽然没有从肝炎到肝硬化的最后发展成肝癌的逐渐演变的过程, 但与人类原发性肝癌的病理形态学上具有相似性。因此, LEC 鼠已经成为理想的研究自然发生肝癌的动物模型, 还广泛应用于急性肝炎的动物模型^[2~5]。

GST-P 在正常肝细胞中不表达, 而在肝癌前病变及原发性肝癌中高度表达。目前认为 GST- π (鼠为 P) 是一种实验性肝癌新的肿瘤标志物, 其特异性不强, 但敏感性高^[6,7]。邓

居有等^[8]应用双抗体夹心 ELISA 法检测人类血清中 GST- π 的含量, 结果显示原发性肝癌阳性率达 90.6%, 在 AFP < 25 $\mu\text{g/L}$ 的肝癌中为 84.6%, 而肝良性占位病变患者血清含量显著低于肝癌组。本实验肝癌组的 GST-P 表达明显高于肝炎组和普通的 SD 大鼠组, 而肝炎组的表达也高于 SD 大鼠组, 肝癌的表达率高达 97%, 说明 GST-P 作为原发性肝癌的高敏感性肿瘤标志物具有重要意义。6 个月的 LEC 鼠发生肝炎的时候也有较高的表达率, 说明 GST-P 的表达对肝细胞癌的特异性差。与癌变后肝细胞损伤程度有关, 对判断肝脏损伤有重要意义^[9,10]。与 AFP 相比, GST-P 灵敏度较高, 但由于它是一种具有解毒功能的酶, 凡是由化学物质、毒物引起的肝脏损伤和癌变均可表达增高, 所以特异性不及 AFP, 但两者联合应用可以提高肝癌阳性检出率^[11,12]。

采用 LCM 技术可以获得同质性较强的标本。研究癌细胞内的 DNA 的变异情况, 一般通过组织块匀浆法, 即便使用的标本是肿瘤组织, 提取的 DNA 也并非全都是癌细胞的 DNA, 其中包括癌细胞、癌前病变细胞、正常细胞以及间质细胞等, 缺乏同质性。LCM 能够从冰冻切片上直接准确地捕获癌细胞, 同质性强, 所获得的 DNA 为癌细胞的 DNA。抑癌基因 p53 在许多肿瘤中都有突变或异常表达^[13,14]。本实验结果显示 LEC 鼠 p53 基因外显子 6、7 未发现突变, 外显子 5 有 2 处变异, 即第 42 位的 ATT → ATG (Ile → Met) 和第 186 位的 TGG → TGC (Trp → Cys), 异亮氨酸变成蛋氨酸, 色氨酸变成半胱氨酸。在恶性细胞中大多数的碱基突变是错义突变, 从而导致相应氨基酸的改变, 当第 2 个等位基因缺失, 这个突变的基因就变成了纯合体, 诱导细胞恶变。改变 p53 功能的突变发生在这个基因的很大的区域内, 尤其是高度保守区。已有报道^[15]相当数量的 p53 突变, 其中大多位于 175、249、273 和 282 的密码子。突变分析已经鉴定了 173、235 和 239 位的半胱氨酸参与了 DNA 的结合, 也是转录激活和抑制细胞转化的关键因素。本实验发现的一个变异点是色氨酸变成半胱氨酸, 它含有一个 -SH 基, 该处的变异涉及到氢键的形成和断裂, 由于一级结构的变化, 使得 p53 基因的空间结构和功能发生改变, 可能减弱了对致癌基因的调控能力, 使癌基因易于暴露和表达。生存 1 年以上的 LEC 鼠均发生肝癌, 我们推测 p53 基因此处的点突变, 可能是 LEC 鼠发生肝癌的始动因素。

[参考文献]

- [1] Lin L, Salunga RC, Guo H, et al. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes[J]. *Nat Med*, 1999, 5 (1): 117-122.
- [2] Kita Y, Masaki T, Funakoshi F, et al. Expression of G₁ phase-related cell cycle molecules in naturally developing hepatocellular carcinoma of Long-Evans Cinnamon rats[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(5): 1205-1211.
- [3] Klein D, Arora U, Lichtmannegger J, et al. Tetrathiomolybdate in the treatment of acute hepatitis in an animal model for Wilson disease[J]. *J Hepatol*, 2004, 40(3): 409-416.
- [4] Choudhury S, Zhang R, Frenkel K, et al. Evidence of alterations

- in base excision repair of oxidative DNA damage during spontaneous hepatocarcinogenesis in Long Evans Cinnamon rats[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7704-7707.
- [5] Fuentealba IC, Aburto EM. Animal models of copper-associated liver disease[J]. *Comp Hepatol*, 2003, 2(1): 5.
- [6] Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, et al. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine [J]. *Genet Mol Res*, 2003, 2(3): 295-308.
- [7] Fu Y, Deng W, Kawarada Y, et al. Mutation and expression of the p53 gene during chemical hepatocarcinogenesis in F344 rats [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1628(1): 40-49.
- [8] 邓居有, 郭萍, 文国义, 等. 血清 GST- π , sIgA, Ferr 含量在肝占位病变鉴别诊断的作用[J]. *新消化病学杂志*, 1995, 3(2): 87-88.
- [9] Bralet MP, Pichard V, Ferry N. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats[J]. *Hepatology*, 2002, 36(3): 623-630.
- [10] Gelderblom WC, Marasas WF, Lebepe-Mazur S, et al. Interaction of fumonisin B(1) and aflatoxin B(1) in a short-term carcinogenesis model in rat liver[J]. *Toxicology*, 2002, 171(2-3): 161-173.
- [11] Chen SY, Wang LY, Lunn RM, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(1): 14-21.
- [12] Whysner J, Wang CX. Hepatocellular iron accumulation and increased cell proliferation in polychlorinated biphenyl-exposed Sprague-Dawley rats and the development of hepatocarcinogenesis[J]. *Toxicol Sci*, 2001, 62(1): 36-45.
- [13] Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez-Estevéz C, et al. Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(2): 194-200.
- [14] Reszec J, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, et al. Evaluation of apoptosis markers in conjunctival and eyelid benign and malignant tumors[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 748-751.
- [15] Kamata Y, Watanabe J, Hata H, et al. Quantitative study on the correlation between p53 gene mutation and its expression in endometrial carcinoma cell lines[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2004, 25(1): 55-60.
- [收稿日期] 2004-04-13 [修回日期] 2004-09-13
[本文编辑] 曹静

• 研究简报 •

成骨细胞(Hos8603)与强韧化纳米人工骨支架的联合培养

Combined culture of osteoblast-like cells (Hos8603) and nm zirconium dioxide reinforced hyper-porosity tri-calcium phosphate bone cells scaffold

陈岗¹, 李家顺¹, 贾连顺¹, 吕宏¹, 叶晓健¹, 戴伯军¹, 蔡舒², 张立德³

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 天津大学材料学院, 天津 300072; 3. 中国科学院固体物理研究所, 合肥 230031)

[关键词] 成骨细胞; 人工骨; 纳米氧化锆; 组织工程

[中图分类号] R 318.08

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2005)01-0115-02

骨组织工程是利用组织工程学方法将一定数量的成骨细胞接种到具有空间三维结构的支架材料上, 在体外或植入体内联合培养, 获得具有一定结构和功能的骨组织^[1]。本实验观察自制强韧化纳米人工骨支架与建株成骨细胞(Hos8603)联合培养后细胞生长情况和结合数量, 以评价该支架生物相容性及细胞复合能力, 为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 强韧化纳米人工骨支架的制备 我科与天津大学材料学院及中科院固体物理研究所合作研制, 材料由纳米氧化锆颗粒与羟基磷灰石粉末在一定复合添加剂条件下烧结制成, 孔径 200~300 μm , 孔隙率 85%~95%。

1.2 主要仪器及试剂 DMEM 培养液(Gibco); 小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所); 胰蛋白酶(Gibco); 成骨细胞(Hos8603, 中科院上海细胞所); CO₂ 培养箱(Sanyo); 倒置显微镜(Olympus); 扫描电镜(东芝公司)。

1.3 成骨细胞与支架材料联合培养 成骨细胞(Hos8603)光镜下为圆形, 接种 4 h 贴壁, 贴壁细胞呈条索状生长, 为多边形、梭形, 有较多突起, 胞质淡, 单核, 较大, 1~2 个核仁, 具有典型成骨细胞形态特征。镜下观察细胞长满瓶底 80%~90%, 常规传代培养。取 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 单细胞悬液, 负压条件下接种于 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 4 mm 细胞支架上, 细胞培养箱中作用 4 h 后取出复合支架置于 6 孔培养板中, 加入培养液联合培养。

1.4 支架复合培养体的细胞计数及光镜观察 取联合培养 4 d 的支架材料, PBS 液反复冲洗, 加入 5% 胰蛋白酶消化液消化 10 min, 吸取消化液冲洗支架材料, 使成骨细胞完全脱落, 收集冲洗液中中止消化, 进行细胞计数并在光镜下观察细胞形态。将冲洗所得细胞洗涤离心后接种于 25 mm $\times$ 10

[基金项目] 国家自然科学基金(30170954)。

[作者简介] 陈岗(1972-), 男(汉族), 硕士, 主治医师。

E-mail: chengang365@sina.com