

• 短篇论著 •

大鼠肝细胞癌发生发展过程中转化生长因子-β1/2 及其受体 mRNA 的表达

mRNA expression of transforming growth factor-β 1/2 and their receptors during rat hepatocellular carcinogenesis

王 冰¹, 满晓波², 王 烈¹, 唐 亮²

(1. 南京军区福州总医院普外科, 福州 350025; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院信号转导研究中心, 上海 200438)

[摘要] **目的:** 定量检测大鼠肝细胞癌发生发展过程中转化生长因子(TGF)-β1/2 及其受体 TβR I / II mRNA 的表达水平。**方法:** 成年 SD 雄性大鼠随机分为实验组和对照组, 实验组利用二乙基亚硝胺诱导建立大鼠肝细胞癌模型, 分别于第 1~18 周分批处死动物(肝癌组 3 只, 对照组 1 只)。取肝组织标本作组织切片和病理检查; 抽提肝组织 RNA 并逆转录, 实时荧光定量 PCR 技术分析 TGF-β1/2、TβR I / II mRNA 表达水平, 以 β-actin 为内参照。**结果:** 相对于 β-actin, 正常大鼠肝脏 TGF-β1 和 TGF-β2 的 mRNA 含量分别为 0.007 6±0.002 8 和 0.001 6±0.001 1; TβR I 和 TβR II 分别为 0.003 4±0.001 4 和 0.061 2±0.043 3。在大鼠肝癌发生发展过程中 TGF-β1 和 TGF-β2 的表达逐渐升高, TβR I 和 TβR II 基因的表达则逐渐下降。**结论:** 肝癌细胞中 TGF-β1 和 TGF-β2 及 TβR I 和 TβR II 基因表达水平的变化可能使 TGF-β 对肝癌细胞的抑制作用减弱, TGF-β 及其受体介导的信号转导通路在肝癌发生发展过程具有重要作用。

[关键词] 癌, 肝细胞; 转化生长因子 β; 受体, 转化生长因子 β; 基因表达

[中图分类号] R 735.7 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0792-03

转化生长因子(TGF)-β 是一种具有控制增殖和分化等生物过程的自分泌或旁分泌生长因子^[1]。TGF-β 及其受体、细胞内下游信号转导分子的突变在脏器纤维化和肿瘤等疾病的发病中发挥重要作用^[2], TGF-β 在肝脏的正常生理功能、肝纤维化和肝癌的发生发展中都非常重要, 准确地分析 TGF-β 及其受体在肝细胞癌发生发展中的表达有助于了解它们在肝癌发生发展中的作用, 为研究肝癌诊断和潜在的治疗靶点提供帮助。为此, 我们制备了二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DENA)诱导大鼠肝细胞癌模型, 通过逆转录荧光实时 PCR 技术定量分析了 TGF-β1/2 及其受体 TβR I / II 基因在肝癌发生发展过程中表达水平的动态变化。

1 材料和方法

1.1 试剂及主要仪器 成年 SD 雄性大鼠购自上海实验动物中心。TRIzol 和 SuperScript II 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, DENA 购自 Sigma 公司, PCR 引物及 TaqMan 荧光探针由上海中科开瑞公司合成, PCR 试剂购自上海申能博彩公司, 其他试剂均为国产分析纯。石蜡切片机为德国 Leica RM2135 型, BIO-RAD iCycler iQ 荧光定量 PCR 仪检测和分析。

1.2 大鼠肝癌模型制备^[3]和病理检测 DENA 按照 1 : 10 000 的比例溶解于大鼠饮用水后供肝癌诱导组大鼠自由饮用, 每天新鲜配置, 共 14 周。对照组大鼠饮用未添加 DENA 的饮用水。每周断颈处死 3 只实验组大鼠和 1 只对照组大鼠, 分别取新鲜肝脏组织立即冻存于液氮和中性甲醛。次日将中性甲醛固定标本石蜡包埋并作组织切片和病理检查。实验共进行了 18 周。

1.3 大鼠肝癌组织总 RNA 和 cDNA 第一链制备 100 mg 肝脏组织中加入 TRIzol Reagent 1 ml 制备总 RNA, 5 μg 总 RNA 样品用 SuperScript II-RTase 1 μl 逆转录 cDNA 第一链。

1.4 引物设计 TGF-β1、TGF-β2、TβRI、TβRII 和 β-actin 基因 PCR 引物和 TaqMan 探针序列如下: TGF-β1-F: 5'-AAC TAC

TGC TTC AGC TCC AC-3', TGF-β1-R: 5'-TGT GTC CAG GCT CCA AAT GTA-3', TGF-β1-TM: FAM 5'-CAG AAG TTG GCA TGG TAG CCC TTG GG-3' TAMRA, TGF-β2-F: 5'-ATG TGC AGG ATA ATT GCT GCC-3', TGF-β2-R: 5'-TGG TGT TGT ACA GGC TGA GG-3', TGF-β2-TM: FAM 5'-TGT TGT GTG TCT GAA CTC CAC AGA T-3' TAMRA, TβRI-F: 5'-ACC TTC TGA TCC ATC CGT T-3', TβRI-R: 5'-CGC AAA GCT GTC AGC CTA G-3', TβRI-TM: FAM 5'-CAG AGC TGT GAG GCC TTG AGA GTG-3' TAMRA, TβRII-F: 5'-CCC TAC TCT GTC TGT GGA TGA-3', TβRII-R: 5'-GAC GTC ATT TCC CAG AGT AC-3', TβRII-TM: FAM 5'-CAG GTG GGA ACA GCG AGA TAC ATG G-3' TAMRA, β-actin-F: 5'-GCC AAC ACA GTG CTG TCT G-3', β-actin-R: 5'-CAC ATC TGC TGG AAG GTG G-3', β-actin-TM: FAM 5'-AGG AGC AAT GAT CTT GAT CTT CA-3' TAMRA。

1.5 定量 PCR 反应和分析 依照文献^[4], 同一组织中各基因与 β-actin 的初始模板量的比值为 $2^{Ct(\beta-actin) - Ct(genes)}$, 代表组织中各基因相对表达水平。双侧 t 检验。

2 结果

2.1 DENA 诱导大鼠肝细胞癌 第 1 周至第 3 周的诱导组大鼠的肝脏大体观同对照组大鼠没有明显区别, 但镜检可以观察到肝脏组织的炎性浸润, 第 4 周之后可以发现诱导组大鼠肝脏肝缘不再锐利, 肝脏表面色泽较之对照组暗淡, 肝脏表面触之不光滑, 第 5 周镜检可见的肝硬化表现, 第 7 周肉眼可见肝硬化结节, 第 9 周诱导组大鼠中 1 只肝脏可以在镜下观察到微小的癌巢, 第 10 周所有 3 只诱导组大鼠具有癌灶, 随着病程进展, 以后各周的肿瘤结节明显增大, 镜下可见典型的粗梁型肝癌, 第 11 周后肿瘤结节肉眼可见。

[作者简介] 王 冰, 博士, 主治医师。

2.2 大鼠正常肝脏组织中 TGF- β 1、TGF- β 2、T β R I 和 T β R II 基因表达 定量 PCR 的复孔实时荧光值曲线拟合良好, 实验体系稳定, 利用荧光值曲线和 C_t 值就可以计算靶基因和 β -actin 的比值, 也可以进行的 TGF- β 1 和 TGF- β 2 以及 T β R I 和 T β R II 之间表达水平的比较。在大鼠正常肝脏组织中 TGF- β 1 相对于 β -actin 的 mRNA 含量是 0.0076 ± 0.0028 , TGF- β 2 为 0.0016 ± 0.0011 , T β R I 的 mRNA 含量是 0.0034 ± 0.0014 , T β R II 则相对较高为 0.0612 ± 0.0433 。

2.3 TGF- β 1、TGF- β 2、T β R I 和 T β R II 在肝癌发生发展过程中的表达 见图 1。在大鼠肝脏经过诱导后逐渐从炎性改变到肝硬化到肝癌逐渐恶化的过程中 TGF- β 1 和 TGF- β 2 表达逐渐升高, 在使用 DENA 诱导后直到肝癌发生前的肝脏损伤和肝硬化时期的肝脏组织中 TGF- β 1 相对正常组织明显升高

($P < 0.05$), 而出现肝癌之后的大鼠肝脏的 TGF- β 1 表达则相对于正常肝脏和肝癌前期的肝脏组织都有非常明显的表达升高 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), TGF- β 2 表达水平在大鼠肝癌发生后则同正常肝脏和肝癌前期肝脏相比均有明显升高 (两者均 $P < 0.01$), 但是在肝癌发生前同正常组比较没有明显差异。受体 T β R I 和 T β R II 在这一模型中和其相应的配体 TGF- β 1 和 TGF- β 2 的变化正好相反, T β R I 和 T β R II 随着肝癌的发生发展逐渐下降, T β R I 虽然在肝癌前期阶段同正常肝脏相比没有统计学的差异, 但是其下降趋势是存在的, 直到肝癌阶段则其表达同正常肝脏和肝癌前期组织均有明显差异 ($P < 0.05$), 而 T β R II 则在诱导早期到肝硬化阶段即有明显下降, 同正常肝脏相比具有明显差异 ($P < 0.05$), 这种降低水平在已发生肝癌的大鼠肝脏中同样具有明显差异 ($P < 0.05$)。

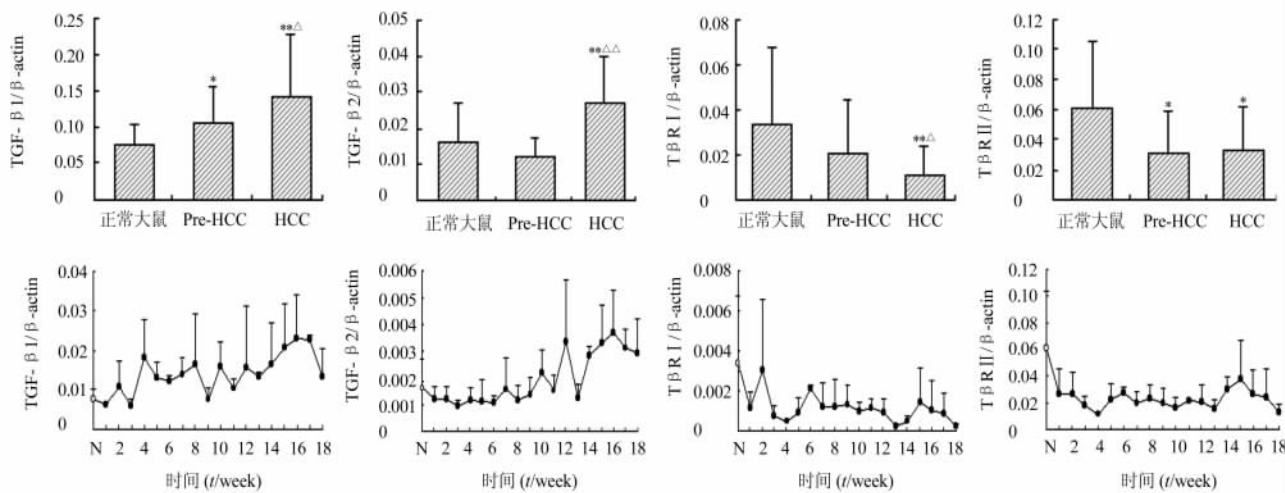


图 1 大鼠肝细胞癌发生发展过程中 TGF- β 1/2、T β R I / II mRNA 相对于 β -actin 的表达水平

上图为不同肝组织的平均表达水平。Pre-HCC 为 DENA 诱导组大鼠在未发生肝癌的前 9 周的肝组织, HCC 为 9 周以后发生肝癌的大鼠肝组织。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与正常大鼠比较; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 与 Pre-HCC 组比较; 下图为每周大鼠肝组织中相应基因表达水平的动态变化。N 为正常大鼠肝组织的平均值 ($n=18$), 其他为 DENA 诱导组大鼠肝组织的平均值 ($n=3$)

3 讨论

我们利用实时荧光定量 PCR 技术在大鼠肝癌模型上观察了肝癌发生发展过程中的 2 种主要 TGF- β 和 2 种主要受体的基因表达变化。结果发现, 从炎性变化到肝硬化到肝癌逐渐进展过程中, TGF- β 及其受体表达水平的变化正好相反, TGF- β 1 和 TGF- β 2 随着肝癌的进展逐渐上升, 这种升高的趋势 TGF- β 1 和 TGF- β 2 是一致的, 说明其中可能存在的负反馈机制使 TGF- β 表达升高, 然而肝癌细胞本身的 TGF- β 受体的减少可能又在一定程度上降低了细胞对这一细胞因子抑制作用的敏感性, 而这一系列的变化可能造成了肝癌的进一步发展。所有上述变化一方面可以作为观察指标, 检测 TGF- β 及其受体的含量可以用于诊断和监测肝硬化和肝癌的不同阶段, 同时这些变化又可以为我们寻找分子水平治疗肝癌的靶点提供线索。TGF- β 基因的表达水平在相当大的程度上决定肝脏的纤维化程度^[5, 6], 了解 TGF- β 及其受体的表达分布对进一步的肝硬化的研究十分重要, 在我们的模型中肝硬化阶段 TGF- β 1 和 T β R II 的表达水平就有明显升高和降低, 提

示它们在肝硬化中也发生变化, 并值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Gerard CB, William PS, Harvey FL. Role of TGF- β in human disease[J]. New Eng J Med, 2000, 342: 1350-1358.
- [2] Massagué J. TGF- β signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 753-791.
- [3] Bilbao R, Bustos M, Alzuguren P, et al. A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer; the effect of vasoactive compounds[J]. Gene Ther, 2000, 7: 1824-1832.
- [4] Benson JR. Role of transforming growth factor beta in breast carcinogenesis[J]. Lancet Oncol, 2004, 5: 229-239.
- [5] Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis[J]. New Eng J Med, 1994, 331: 1286-1292.
- [6] Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and lipodystrophy-like PEPCK-TGF-beta-1 transgenic mice[J]. J Clin Invest, 1997, 100: 2697-2713.

[收稿日期] 2006-05-22

[修回日期] 2006-07-07

[本文编辑] 曹 静