论著

文章编号:1000-5404(2009)11-1060-03

Gankyrin 蛋白在大鼠肝细胞癌变过程中的异常表达及意义

韩克强[1],吴娅利[2],黄小兵[1],李 靖[1],梁 平[1],郑 璐[1] (第三军医大学:[1]新桥医院肝胆外科,重庆 400037,[2]训练部临床管理处,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨肝细胞癌变过程中 Gankyrin 蛋白的异常表达及其意义。**方法** 127 只雄性 Wistar 大鼠分为对照组(20 只)和实验组(107 只),实验组大鼠用 0.2% 二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine,DEN)诱导建立肝癌动物模型,应用免疫组化法检测大鼠肝脏在癌变及转移过程中 Gankyrin 蛋白的表达。**结果** 对照组中未见 Gankyrin 蛋白表达;实验组中,21 例肝硬化中有 3 例 Gankyrin 蛋白过表达,68 例未转移肝癌中有 46 例 Gankyrin 蛋白过表达,18 例伴转移肝癌中有 17 例 Gankyrin 蛋白过表达。**结论** Gankyrin 蛋白的阳性表达率随病变程度的加重而逐渐升高,这提示 Gankyrin 蛋白在肝细胞癌形成过程中可能发挥重要的促癌作用,并可能促进了肝癌的转移和高侵袭性发展,其有可能成为肝细胞癌转移早期监测的参考指标。

关键词: 肝细胞癌;Gankyrin 蛋白;免疫组化;大鼠

中图法分类号: R394.3; R730.23; R735.7 **文献标识码:** A

Abnormal expression and clinical significance of Gankyrin during hepatocarcinogenesis in rats

HAN Ke-qiang[1], WU Ya-li[2], HUANG Xiao-bing[1], LI Jing[1], LIANG Ping[1], ZHENG Lu[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Office of Clinical Management, Division of Educational Affairs, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the abnormal expression of Gankyrin protein during hepatocarcinogenesis in rats and its clinical significance. **Methods** DEN was administered to Wistar rats to induce hepatocellular carcinoma(HCC). Then the expression of Gankyrin protein was detected by immunohistochemistry during hepatocarcinogenesis. **Results** Gankyrin protein overexpression was found in 3 out of 21 cases of liver cirrhosis, 46 out of 68 cases of HCC without metastasis and 17 out of 18 cases of HCC with metastasis. Whereas, no expression of Gankyrin protein was found in the 20 cases of the control group. **Conclusion** Gankyrin protein expression is increased with the progression of hepatocarcinogenesis, indicating that Gankyrin protein could promote hepatocarcinogenesis, and it also plays a major role in the invasion and metastasis of HCC. Gankyrin protein may be a good marker for monitoring for metastasis of HCC at an early stage.

Key words: hepatocelluar carcinoma; Gankyrin protein; immunohistochemistry; rat

肝癌发生的主要外因是肝炎病毒感染和肝特异性致癌物,同时肝癌和其他恶性肿瘤一样,其发生、发展、转移是由体内多基因参与、多步骤协同的复杂过程[1-3]。目前尽管已经鉴定了一些肝癌的抑癌基因,如 p53 和 p16 等,并明确了它们在肝癌中的特异性失活[4,5],但是在肝癌发生中特异性激活的癌基因却少见报道。gankyrin 基因是 Higashitsuji 等[6]应用消减杂交法筛选出的癌基因,其致癌性可能与其表达产物 Gankyrin 蛋白通过高磷酸化并降解抑癌蛋白 Rb,致使 Rb 蛋白失活,进而促使细胞由 G_1 期向 S 期转化有关[7,8]。本实验通过研究肝细胞癌变到转移这个动态过程中 Gankyrin 蛋白的表达变化,来验证 Gankyrin 蛋白与肿瘤的关系,从而为研究肿瘤的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用清洁级雄性 Wistar 大鼠 127 只,

作者简介:韩克强,男,天津市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肝癌转移等方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)68774606,E-mail:hank8175@medmail.com.cn

通信作者:梁 平,E-mail:liangp303@medmail.com.cn

收稿日期:2009-02-17;修回日期:2009-03-23

9 ~ 10 周龄,体质量(150 ± 20)g,购自第三军医大学野战外科研究所实验动物中心。

1.1.2　试剂和仪器　二乙基亚硝胺(DEN)购自美国 Sigma 公司,兔抗鼠免疫 IgG(Gankyrin 蛋白)多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,S-P 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、抗体稀释液购自北京中山生物技术有限公司。IX70 型相差倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2　方法

1.2.1　大鼠肝细胞癌模型的制备　实验大鼠分为对照组和实验组,实验组 107 只,对照组 20 只。实验组参考文献[9 - 11],并改进方法诱导肝细胞癌模型,经口咽插管至胃灌喂 0.2% DEN 溶液,1 ml/d,每周连续灌喂 5 d,其余 2 d 自由饮水,至第 19 周完后停止给药;对照组以同样方法灌喂等量生理盐水。于诱导第 16、18、20、22、25 周分批行 MRI 扫描后处死,并解剖观察肝脏成瘤情况及有无转移,对照组同时处死 4 只。取部分漂洗后肝脏放于 10% 中性福尔马林固定,留做病理学检查及免疫组化检测,光镜观察肝脏病理变化,按大鼠肝肿瘤国际组织学分类标准进行形态判定[12],并按分化程度分级。其余肝脏投入液氮备用。

1.2.2　免疫组织化学检测　石蜡切片按 S-P 试剂盒要求操作,经脱蜡、脱水,消除内源性过氧化物酶活性后,进行微波抗原修复。依次滴加正常山羊血清、一抗(1∶100 稀释)、二抗、辣根酶标记的链霉卵白素工作液,DAB 显色后常规复染、脱水、透明、封片,光镜观察、拍照。以 0.02 mol/L PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.3　免疫组化结果判定　细胞染色阳性以细胞核或细胞质着棕黄色或棕褐色为准,染色结果参照 Mark Kelley 实验室标准[13]进行肿瘤细胞阳性计分。首先在高倍镜下计数 1 000 个肿瘤细胞,避开肿瘤边缘及坏死区域,根据阳性肿瘤细胞数目所占百分比得出细胞核或细胞质标记指数(labeling index, LI),即细胞核或细胞质 LI = 阳性瘤细胞数/1 000 个肿瘤细胞 ×100%。分为以下 4 级计分:< 10% 记为 0 分,10% ~ 25% 记为 1 分,25% ~ 50% 记为 2 分,> 50% 记为 3 分;染色强度按大多数肿瘤细胞着色的深浅计分:阴性记为 0 分,显色为黄色(弱阳性)记为 1 分,显色为棕黄色(中等阳性)记为 2 分,显色为棕褐色(强阳性)记为 3 分。这 2 项分值相加的总积分即为免疫组化的阳性分度:0 分为阴性,记为(-);1 ~ 2 分为弱阳性,记为(+);3 ~ 4 分为阳性,记为(++);5 ~ 6 分为强阳性,记为(+++)。

1.3　统计学方法

应用 SPSS 11.0 统计软件对免疫组化结果进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　肝细胞癌形成、发展过程中的病理变化

Wistar 大鼠在诱导 16 周以前病理主要以肝硬化为主,并出现 4 例肝细胞癌(高分化肝癌为主)。诱导第 17 ~ 22 周以肝细胞癌为主,第 23 周及以后多出现转移,腹腔内可见肿大的淋巴结,可见肝内、门脉、肺脏及腹腔等处转移,部分有血性腹水。对照组未发现异常病理改变。见表 1。

表 1　肝细胞癌形成过程中的病变统计(例)

病　变	0 ~ 16 周	17 ~ 18 周	19 ~ 20 周	21 ~ 22 周	23 ~ 25 周	总计
肝硬化	15	3	2	1	0	21
肝细胞癌(未转移)	4	14	23	15	12	68
肝细胞癌(伴转移)	0	0	2	5	11	18

2.2　Gankyrin 蛋白在不同病变肝组织中的表达

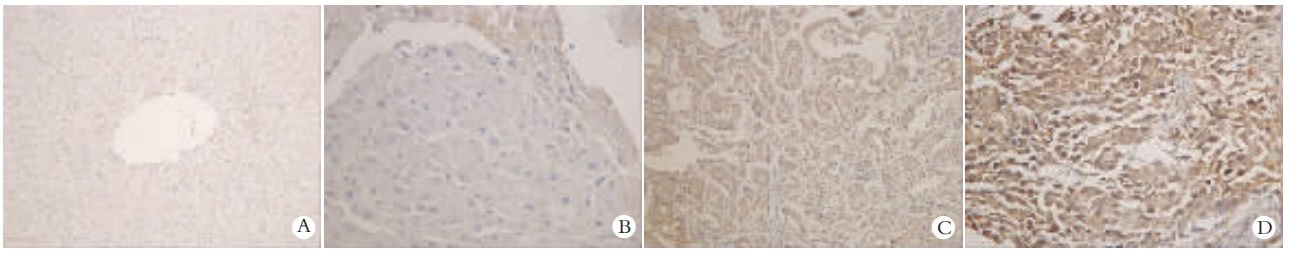
20 例对照组均未有 Gankyrin 蛋白表达。107 例实验组中,21 例肝硬化中有 3 例 Gankyrin 蛋白过表达,阳性率为 14.3%;68 例未转移肝癌中有 46 例 Gankyrin 蛋白过表达,阳性率为 67.6%;18 例伴转移肝癌中有 17 例 Gankyrin 蛋白过表达,阳性率为 94.4%。

正常的肝细胞未见 Gankyrin 蛋白表达,也不表达于胆管细胞、血管内皮细胞、Kupffer 细胞及肝间质细胞等,而在肝硬化及肿瘤组织中 Gankyrin 蛋白均有不同程度的表达。在诱癌过程中,Gankyrin 蛋白的阳性表达率随病变程度的加重而逐渐升高。其中肝硬化表达低,而未转移肝细胞癌与肝硬化比较差异有统计学意义($P < 0.01$),伴转移肝细胞癌中的表达最高,与未转移肝细胞癌相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表 2　Gankyrin 蛋白在不同病变肝组织中的表达

病　变	例数	密度				阳性率(%)	强阳性率(%)
		-	+	++	+++		
肝硬化	21	18	2	1	0	14.3[a]	0.0
肝细胞癌(未转移)	68	22	18	16	12	67.6	26.1
肝细胞癌(伴转移)	18	1	2	4	11	94.4[b]	61.1

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$,与未转移肝细胞癌比较



A:正常肝组织(×200);B:肝硬化(×400);C:肝细胞癌(未转移,×200);D:肝细胞癌(伴转移,×200)

图 1　Gankyrin 蛋白在不同病变肝组织中的表达情况　(S-P)

3 讨论

肝细胞癌的发生、发展与基因及其蛋白产物的异常改变密切相关。至今,已有超过20种基因被鉴定出在肝癌内表达异常,如ras、c-myc、c-fos等。这些基因的突变、杂合性缺失、甲基化状态的改变或表达量的异常使它们的蛋白产物参与的肿瘤细胞内信号转导和细胞周期进展发生异常改变,进而逐渐导致肿瘤细胞的恶性增殖。然而,这些基因及其蛋白产物的改变也常见于其他肿瘤[14]。因此一些对于肝癌特异性的基因及其表达产物的发现及功能研究尤显重要。

2000年日本科学家Fujita等应用消减杂交法从人肝细胞癌组织高表达基因中筛选出一条编码重复ankyrin序列的新基因,并在人前列腺癌cDNA文库中克隆出它的全长cDNA序列(GenBank登录号:D83197)[6]。gankyrin基因cDNA全长约1.5 kb,开放阅读框编码一个由226个氨基酸组成的25×10^3大小的蛋白质,其中含有6个重复的ankyrin序列,加上向N端延伸的38个氨基酸(Rb蛋白结合域)[7]。基于此基因是在肝癌高表达基因中筛选得到的,因此被命名为gankyrin(gann ankyrin-repeat)。gankyrin基因序列与1998年Hori等[15]从26S蛋白酶体PA700复合物中发现的一个非ATP酶亚单位(P28蛋白)的基因序列完全一致。Gankyrin蛋白作为促癌蛋白在肝癌中呈阳性表达,Fu等[16]实验证实Gankyrin蛋白随肝癌的进展其表达越来越强,并在出现转移的肝癌中异常增高,提示Gankyrin蛋白可能与肝癌的侵袭、转移有关。

肝癌的高侵袭性和高转移性的特点,使它的发展进程变得难以控制,并给临床治疗带来了很大困难。因此,深入研究肝癌的这一生物学行为变得至关重要。本研究在构建大鼠肝细胞癌模型的基础上,应用免疫组化方法检测Gankyrin蛋白,结合肝癌病理学特点,发现Gankyrin蛋白在正常的肝细胞未见表达,也不表达于胆管细胞、血管内皮细胞、Kupffer细胞及肝间质细胞等,而在肝硬化及肿瘤组织中Gankyrin蛋白均有不同程度的表达,说明Gankyrin蛋白的表达在肝癌中有组织特异性。Gankyrin蛋白在68例未转移肝癌标本中46例阳性表达,阳性率为67.6%,而肝硬化阳性率为14.3%(3/21),差异有统计学意义($P<0.01$),这提示Gankyrin蛋白是肝癌中显著升高的促癌蛋白,在肝细胞癌形成过程中可能发挥重要的促癌作用。其在正常肝组织不表达而在肝硬化组织低量表达,印证了Gankyrin蛋白可能在正常肝脏内呈沉默状态,并可能参与了由肝硬化向肝癌的转变过程[16]。在大鼠肝癌发生、发展的整个过程中,Gankyrin蛋白的阳性表达率随病变程度的加重而逐渐升高,值得注意的是,Gankyrin蛋白在伴转移肝癌中的表达率高达94.4%(17/18),与未转移肝癌相比,差异有统计学意义($P<0.05$),这也证实了其可能促进了肝癌的转移和高侵袭性发展,Gankyrin蛋白有可能成为肝细胞癌转移早期监测的参考指标,而且它也有望成为肿瘤生物治疗的又一新的靶点。至于Gankyrin蛋白参与肝癌转移的具体机制有待于深入研究。

参考文献:

[1] Hui A M, Makuuchi M. Molecular basis of multistep hepatocarcinogenesis: genetic and epigenetic events[J]. Scand J Gastroenterol, 1999, 34(8): 737-742.

[2] Macdonald G A. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Liver Dis, 2001, 5(1): 69-85.

[3] Grisham J W. Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implications for cancer risk assessment[J]. Carcinogenesis, 1997, 18(1): 59-81.

[4] Hsu I C, Metcalf R A, Sun T, *et al*. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas[J]. Nature, 1991, 350(6317): 427-428.

[5] Liew C T, Li H M, Lo K W, *et al*. High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 1999, 18(3): 789-795.

[6] Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, *et al*. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas[J]. Nat Med, 2000, 6(1): 96-99.

[7] Michaely P, Bennett V. The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition[J]. Trends Cell Biol, 1992, 2(5): 127-129.

[8] Nevins J R. The Rb/E2F pathway and cancer[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(7): 699-703.

[9] Solt D, Farber E. New priciples for the analysis of chemical carcinogenesis[J]. Nature, 1976, 263(5580): 701-703.

[10] Williams G M, Gebhardt R, Sirma H, *et al*. Non-linearity of neoplastic conversion induced in rat liver by low exposures to diethylnitrosamine[J]. Carcinogenesis, 1993, 14(10): 2149-2156.

[11] 张志敏,王 阁,陈 川,等. 改装性DEN诱发大鼠肝癌模型的建立与病理形态学研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1164-1167.

[12] Sell S, Dunsford H A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma[J]. Am J Pathol, 1989, 134(6): 1347-1363.

[13] Wang D, Luo M, Kelley M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679-686.

[14] 杨 波,脱朝伟,张 宁,等. 靶向端粒酶催化亚单位基因hEST2反义寡核苷酸对人肝癌细胞生长的抑制作用[J]. 中华消化外科杂志,2007,6(5):369-372.

[15] Hori T, Kato S, Saeki M, *et al*. cDNA cloning and functional analysis of p28 (Nas6p) and p40.5 (Nas7p), two novel regulatory subunits of the 26S proteasome[J]. Gene, 1998, 216(1): 113-122.

[16] Fu X Y, Wang H Y, Tan L, *et al*. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(4): 638-643.

(编辑 栾 嘉)