维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)03－0264－04

雄激素受体、雌激素受体在肝细胞型肝癌中的免疫电镜观察

罗 放[1],马绍华[1],唐时森[1],陆有生[1],徐 晨[2],王 红[2]

(1.重庆医科大学临床学院普外科 重庆 400016; 2.重庆医科大学电镜室 重庆 400016)

【摘要】目的:观察雄激素受体(AR)与雌激素受体(ER)在肝癌和非癌肝组织超微结构上的分布。探讨 AR、ER 在肝癌致癌过程中的作用。方法:用免疫胶体金染色法(IGS)标记 13 例肝细胞型肝癌与 5 例非癌肝组织细胞内雄激素受体(AR)及雌激素受体(ER),并用免疫透射电镜观察。结果:发现胶体金颗粒主要分布于线粒体双层膜和脊膜;粗面内质网;结合及游离核蛋白体;核膜及核周间隙、异染色质及常染色质等部位。统计分析表明,肝癌细胞金颗粒明显多于非癌肝细胞内金颗粒($P<0.05$)。肝癌细胞胞质、胞核 AR 金颗粒明显多于 ER 金颗粒($P<0.05$)。而非癌肝细胞胞质、胞核 AR、ER 金颗粒数量无显著差别($P>0.05$)。结论:提示肝癌是一种雄激素依赖肿瘤,为抗性激素治疗肝癌提供了理论依据。

【关键词】肝细胞型肝癌;雄激素受体;雌激素受体;免疫金染色

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2000－11－23

The observation of androgen receptor and estrogen receptor in hepatocellular carcinomas with immunoelectron－microscopy

LUO Fang, et al

(Department of Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To observe distribution on the ultrastructure of androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER) in hepatocellular carcinomea (Hcc) and non－cancerous liver. To make clear the effect of AR and ER in the course that cause cancer in Hcc. ***Methods***: Using the method of immunogold staining androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER) in 13 cases of hepatocellular carcinomas (Hcc) and 5 cases of noncancerous liver and observing with transmission electron microscope. ***Results***: Gold granules were mainly distributed over the double－layered membranes of mitochondria, memebranes of rough endoplasmic reticulum and some smooth endoplasmic reticulum, bound and free ribosomes, nuclear membranes and perinuclear cristerna and heterochromatin and euchromatin, etc. The statistics indicate that the number of gold granules in cancer cells is greater than that in non－cancerous liver cells ($P<0.05$). In plasma and nucleus of cancer cells, the gold granules of AR is more than those of ER($P<0.05$), while no difference exists between plasma and mucleus of non－cancerous liver ($P>0.05$). ***Conclusion***: It indicates that Hcc is a kind of androgen－depenedent tumor, providing the theoretical basis for anti－androgen therapy.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Androgen receptor; Estrogen receptor; Immunogold staining

哺乳动物及人类肝脏均含有雄激素受体(AR)和雌激素受体(ER),且分布于肝细胞浆和细胞核[1,2]。有作者发现肝细胞型肝癌(Hcc)癌细胞也含有两种受体,认为它们在肝癌的发生发展中起重要作用[3,4]。但 AR、ER 在肝癌细胞中超微结构定位及与肝癌致癌作用的关系目前未见报告。本文应用免疫胶体金染色法(IGS)观察肝癌 AR、ER 在细胞中的具体部位、探讨 AR、ER 与肝癌的致癌关系。

1 材料与方法

1.1 标本制备与试剂

作者介绍:罗 放(1966－),男,主治医师,硕士。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 电镜标本制备

肝癌患者13例,其中男性11例,女性2例,年龄54±8.6岁。经手术切除的肝癌组织,病理证实为 Hcc。5 例非癌肝组织来源于胆囊手术肝活检。全部为男性,年龄 48.67±6.21,病理证实为非癌肝组织。组织经 2.5% 戊二醛固定 2h,逐级酒精,丙酮脱水,环氧树酯 618 包埋。35℃、40℃、60℃各聚合 16、12、14h。先制备 1μm 半薄切片,甲苯胺兰染色,光镜定位。再制备 500A°超薄切片,载于镍网上,干燥待免疫金染色和常规电镜染色。

1.1.2 主要试剂

(1)睾酮、雌二醇(上海华美公司);

(2)抗睾酮及抗雌二醇(上海华美公司);

(3)金标Ⅱ抗(羊抗兔完整分子结合 10nm 金颗粒)(Sigma 公司,美国)。

1.1.3 主要设备

日本产 H-600 型透射电镜。

1.2 *方法*

1.2.1 采用 1978 年 Geoghegan 等建立的免疫胶体金染色法(包埋后染色)和常规电镜染色,送 H-600 型透射电镜观察。

1.2.2 统计学方法 采用两样本均数 t 检验,$P<0.05$ 为有显著意义。

2 结 果

2.1 胶体金颗粒超微结构分布

2.1.1 Hcc 胶体金颗粒分布于细胞质与胞核内,以细胞器膜性结构及染色质较丰富。异染色质上金颗粒数量较多,常染色质金颗粒分布少(图 1)。核仁中央无一例发现金颗粒,但核仁与染色质交界区域可见散在金颗粒。核膜上金颗粒沿膜分布或附着于核孔,核周间隙也可见金颗粒。胞质内线粒体是金颗粒主要附着结构,线粒体内外膜,脊膜均见较多数量金颗粒,多沿膜排列(图 2)。粗面内质网,结合核蛋白体也结合较多金颗粒(图 3)。游离核蛋白体结合较多金颗粒散在于胞质。其余胞质内细胞器无金颗粒分布。

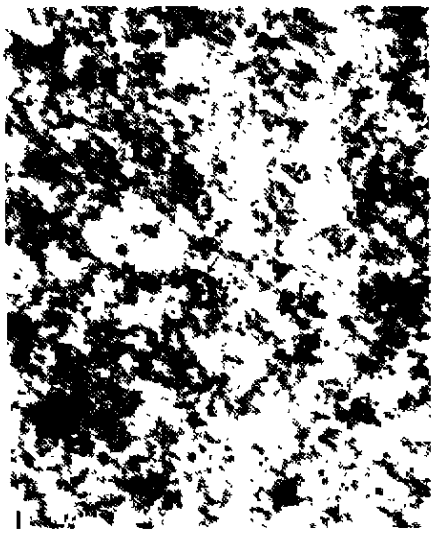


图 1 染色质金颗粒分布情况,免疫金染色,箭头所示为金颗粒×80000

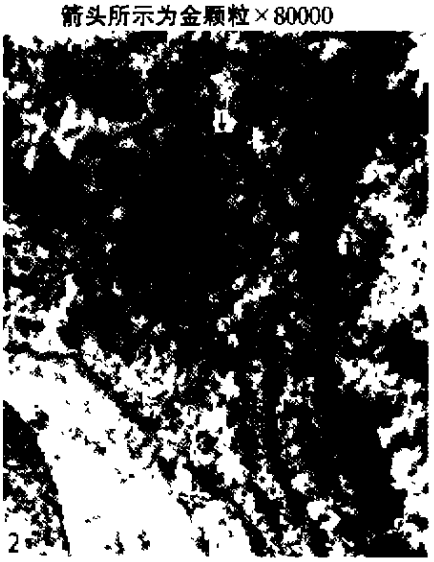


图 2 线粒体金颗粒分布情况,箭头所示为金颗粒×80000



图 3 粗面内质网金颗分布情况,箭头所示为金颗粒×80000

2.1.2 非癌肝金颗粒分布:非癌肝细胞内有数量较

维普资讯 http://www.cqvip.com

少的金颗粒分布,其部位与 Hcc 中金颗粒分布一致。结构正常的细胞器金颗粒分布少。

2.2 Hcc 及非癌肝组织金颗粒计数

对 13 例 Hcc 及 5 例非癌肝细胞胞质,胞核超微结构金颗粒 6 万倍视野随机摄片,平面计数胞质,胞核金颗粒数,相对定量见表 1。

表 1 6 万倍视野 Hcc、非癌肝胞质胞核金粒数

	AR($\bar{x}\pm s$)		ER($\bar{x}\pm s$)	
	胞核	胞质	胞核	胞质
Hcc	205.72 ± 98.85^{a}	197.23 ± 105.06^{a}	117.42 ± 48.48^{b}	127 ± 66.52^{b}
非癌肝	105.83 ± 62.27^{c}	107.16 ± 48.53^{c}	127.16 ± 55.18^{d}	105.66 ± 55.98^{d}

注:a、b、c、d 组胞质、胞核组内比较,$P>0.05$;a 与 b、c 组胞质、胞核分别比较 $P<0.05$;b 组与 d 组胞核、胞质分别比较 $P>0.05$;c 与 d 组胞质、胞核分别比较 $P>0.05$。

2.3 取消Ⅰ抗后空白对照

取消Ⅰ抗后,采用上述实验方法,孵育金标Ⅱ抗 5～6h,电镜观察未见金颗粒。

3 讨 论

3.1 胶体金颗粒与受体数量的关系

免疫金染色法(IGS)是 Faulk 和 Taylor 1971 年首次报道以检测细菌表面抗原[5]。之后免疫金技术发展迅速,并广泛应用于生物医学等领域。采用高电子密度的胶体金颗粒做标志物尤其适用于超微结构水平抗原定位。在金颗粒直径选择上,选用 2～3nm 胶体金,定量分析时,金粒与抗原之间的数量关系是 1:1,大于 3nm 时,金颗粒可结合多个抗原,定量准确。对照实验表明,此法特异性极强,假阳性,假阴性极少出现。

3.2 细胞超微结构受体分布

哺乳动物肝脏,人类肝脏及肝癌细胞胞核胞质均含有 AR、ER[1,2,4],其研究检测手段多采用生化方法和免疫组化法。本实验从免疫电镜角度发现 AR、ER 主要存在于染色质及膜性细胞器,核仁中央无受体分布。滑面内质网,溶酶体,高尔基复合体上受体分布少。提示受体主要作用于细胞生长发育、细胞分裂有关的细胞器,这是细胞畸变的基础。AR、ER 在肝癌和非癌肝细胞胞质、胞核中分布部位一致。结构愈正常受体分布愈少,反之结构异常受体分布多。故肝细胞超微结构畸变可能与受体数量质变有关。但 AR、ER 数量在癌和非癌肝细胞胞核、胞质内自身比较无差别,提示受体对胞核、胞质的作用是同步的。

3.3 细胞超微结构受体数量

Patricia[7]对 9 例 Hcc 和癌周肝组织检测 AR、ER,多数病例癌组织和癌周组织细胞浆含相同 ER,只有 3 例癌细胞胞浆 ER 高于癌周组织。但所有癌细胞核 ER 均低于周围肝细胞核 ER。所有癌细胞胞浆,胞核 AR 均高于周围肝细胞 AR 2 倍以上。多数学者已证实 Hcc 中 AR 含量高于 ER,ER 在癌组织与非癌组织不一定存在差异。本实验发现,癌细胞核、胞质含有较高数量 AR,定量分析表明 AR 数量明显高于胞核、胞质 ER 数量。癌细胞 AR 数量明显高于非癌肝 AR 数量。而非癌肝细胞胞质、胞核 AR、ER 数量不存在差异。这提示 AR 在肝癌致癌中发挥了重要作用。

3.4 受体与致癌机理

多数学者认为性激素在肝脏中通过:1、非特殊药理作用;2、受体介导作用影响肝脏功能[8]。据公认的 Jensen 模式,性激素与靶细胞浆中特殊受体结合,或移至核内与染色质位点结合,从而影响肝细胞功能。作者发现,AR、ER 分布在细胞核染色质上,异染色质含量高,而常染色质含量低。线粒体膜、内质网膜等均含较多数量受体。推测性激素通过一步或二步机制与胞质或胞核受体结合。从而参与其致癌过程。染色质是 DNA 复制,有丝分裂的重要功能单位,特别是常染色质是功能活跃状态的 DNA,其上受体少。提示 AR 或 ER 参与 DNA 复制或基因转录,干扰正常的 DNA 复制与基因转录,导致细胞畸变。这与复制动物肝癌模型过程中发现 AR 减少有一定相似性。线粒体膜含大量 ATP 合成酶,内质网是蛋白质合成场所;游离核蛋白体是合成细胞自身生长所需结构蛋白。外源激素或内源激素通过

维普资讯 http://www.cqvip.com

受体介导作用,从而影响 ATP 合成、蛋白质合成等。核膜具有屏障作用及染色质定向功能,AR 也可能参与了核膜功能活动,导致核膜及染色质等正常功能的破坏。总之,受体全面参与肝细胞功能活动,在致癌过程中发挥重要作用。

在以后复制动物肝癌模型过程中,可使用免疫胶体金技术,动态观察肝癌的发生、发展与 AR、ER 存在部位与数量变化的关系,这对于深入研究受体参与致癌机制是有意义的。

参 考 文 献

[1] Chamness GC, Gostlow ME, McGaire WL. Estrogen receptor in rat liver and its dependence on prolactin[J]. Steroids, 1975;26:363 - 371.

[2] Bannister PC, Meystre MS, Losowsky. Androgen receptor concentrations in needls specimens of haman liver[J]. Liver, 1988;3:281 - 31.

[3] Bannister PC, Parsons MA, Ingleton P, et al. Androgen recptor concentration in the diethylinitrosamine model of hepatic carcinogenesis[J]. Br J Cancer, 1986;54:857 - 859.

[4] Ostrowski JL, Ingleton PM, Underwood, JC, et al. Increased hepatic androgen receptor expression in female rats during diethylitrosamine liver carcinogenesis: a possible correlation with liver tumor development[J]. Gastroenterology, 1988; 94: 1193 - 1200.

[5] Faulk WP, Taylor CM. An immunocollid method for electron - microscop[J]. Immunochemistry, 1971;8:1081.

[6] 倪灿荣. 免疫组织化学实验新技术及应用[M]. 第一版,北京. 北京科技出版社,1993:144.

[7] Patricia K, Mary S, Antonio F, et al. Quantitation of estrogen and androgen receptor in Hcc adjacent normal human liver[J]. Dig Dis Sci, 1991;36(9):1303 - 1308.

[8] Nagasue N, Yukaya Y, Ito H, et al. Androgen receptor in hepatocellular carcinoma and surrounding parenchgma[J]. Gastroenterology, 1985;89:643.

(上接第 263 页)和临床治疗效果的初步观察[J]. 中国人兽共患病杂志,1997;13(1):79 - 80.

[5] 芦殿梅,胡孝素,马 莹,等. 双氢青蒿素治疗杜氏利什曼原虫前鞭毛体作用体外实验研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志,1999;12(1):23 - 26.

[6] 陈雅棠,刘约翰,沈际琨,等. 大鼠肺孢子虫肺炎动物模型建立及病原学病理学观察[J]. 重庆医科大学学报,1989;14(3):181 - 183.

[7] 陈雅棠,马 良,梅 芹. 青甲醚治疗实验大鼠肺孢子虫肺炎的初步观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志,1994;7(4):278 - 280.

[8] 张自宽. 中国药品实用手册[M]. 第 1 版,北京:中国医药科技出版社,1999;79 - 80.

[9] Kim CK, Foy JM, Cushion MT, et al. Comparison of histologic and quantitative techniques in evaluation of therapy for experimental Pneumocystis carinii pneumonia [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1987;31(2):197 - 201.