DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.026
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
308 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0308-04

大鼠肝癌变过程中几种癌基因的原位表达及c-Ha-ras1点突变的研究

张新立,史景泉,卞修武 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠肝癌变过程中几种癌基因的表达和c-Ha-ras 1点突变。方法 通过DEN诱发癌变启动模型和肝癌模型,应用免疫组化、原位杂交和MDT-PCR-SSCP分别观测癌基因的表达和c-Ha-ras1点突变。结果 c-Ha-ras和c-myc基因的过表达参与了肝癌变的全过程,其中c-Ha-ras的过表达与癌前嗜碱性肝细胞灶、c-myc基因的过表达与卵圆细胞增殖关系密切。IGF-Ⅱ基因的过表达对癌前肝细胞增生灶/结节向肝细胞癌的演进起重要作用。fms基因过表达仅与个别大鼠肝细胞癌有关。结论 大鼠肝癌变过程与c-Ha-ras、c-myc、IGF-Ⅱ和fms基因的过表达及c-Ha-ras1点突变有关,并与形态演变相联系。

关键词:肝癌变;癌基因;单链构像多态性
中图法分类号:R394.3;R735.702 文献标识码:A

Expression of some oncogenes and point mutation of c-Ha-ras1 during hepatocarcinogenesis in rats

ZHANG Xin-li, SHI Jing-quan, BIAN Xiu-wu (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expressions of oncogenes c-Ha-ras, c-ki-ras, pan-ras and c-myc and point mutation of c-Ha-ras1 during hepatocarcinogenesis in rats. Methods Immunohistochemistry, *in situ* hybridization and microdissection of tissue (MDT)-PCR-SSCP were used to detect the oncogene expressions and point mutation of c-Ha-ras1 in both Solt-Farber model and DEN-induced liver cancer model. Results The overexpression of c-Ha-ras was closely associated with the formation and proliferation of the precancerous basophilic hepatocyte foci, while that of c-myc with the growth of the oval cell foci. The abnormalities of IGF-Ⅱ played an important role in the evolution of precancerous foci/nodules towards hepatocellular carcinoma (HCC). The overexpression of fms was only associated with HCC of some rats. Conclusion Hepatocarcinogenesis in rats was related with the overexpression of c-Ha-ras, c-myc, IGF-Ⅱ and fms and the point mutation of c-Ha-ras1, and overexpression of these oncogenes was associated with morphological evolution.

Key words: hepatocarcinogenesis; oncogenes; single strand conformation polymorphism

本实验采用免疫组化和原位杂交等技术,对大鼠肝癌变过程中几种癌基因的表达[1]和c-Ha-ras 1点突变进行分析,旨在将肝癌变过程中癌基因的改变与形态演变相联系。

1 材料与方法

1.1 动物模型

采用Solt-Farber模型[2],并进一步制备肝癌模型:给Wistar大鼠灌喂0.2%二乙基亚硝胺(DEN)生理盐水溶液,每天0.9 ml。自第1周起,每周灌喂5 d,第13周始每周灌喂3 d,至第18周停止给药。用4%多聚甲醛PBS灌注固定取材,用于石蜡切片的组织于4%多聚甲醛缓冲液4 ℃固定12~24 h;用于冰冻切片的组织以OCT包埋,-70 ℃冰箱保存;其余组织-70 ℃封存备用。

1.2 免疫组化染色

石蜡包埋组织5 μm厚连续切片6张,分别进行抗c-Ha-ras(1∶10)、C-Ki-ras(1∶20)、pan-ras(1∶10)和c-myc蛋白(1∶20)免疫组化ABC法染色。所有一抗均为单抗(Santa Cruz公司)。DAB显色。细胞胞浆和/或核淡黄色定为弱阳性,棕黄色为中度阳性,棕褐色为强阳性,不着色为阴性。

按常规设阳性和阴性对照。

1.3 原位杂交

c-Ha-ras、c-myc及fms探针DNA均重组于pBR322质粒中;IGF-Ⅱ为cDNA片段(0.9 kb)。

质粒DNA的提取、酶切、片段回收和地高辛标记及原位杂交方法参照文献[3]方法。

1.4 组织微切除(Microdissection of tissue, MDT)PCR与微量DNA模板的制备[4]

5 μm厚石蜡切片,脱蜡至水,伊红淡染;光镜下低倍放大确定微切除视野,采用自制玻璃刀将靶组织细胞刮离切片。回收切下的组织细胞置于0.5 ml离心管中,以10 μl裂解缓冲液(含100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 4 mmol/L EDTA, 4 mg/ml蛋白酶K)55 ℃孵育2~4 h抽提DNA,煮沸灭活酶活性,10%抽提液用作PCR扩增模板。

采用PCR技术扩增大鼠c-Ha-ras1第1外显子片段。PCR引物依据文献[5]报道的序列进行合成(中科院上海细胞化学所),扩增片段为96 bp。引物P3为大鼠c-Ha-ras1第12位密码子正链上游1~18 bp,引物P4为自第12位密码子起负链下游57~78 bp,引物序列分别为:

P3(18mer) 5′-CTTGTGGTGGTGGGCCCT-3′;

P4(22mer) 5′-CTCTATAGTGGGATCATACTCG-3′

PCR条件:25 μl反应体系中,各组分终浓度分别为1× PCR缓冲液(含10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$),dNTP(华美产品)200 μmol/L,引物10 pmol,Taq酶(Promega产品)2.5 U及模板DNA 1 μl。扩增反应在核酸自动扩增仪(Amplitron Ⅰ)上进行。反应程序为:95 ℃变性10 min后,94 ℃ 1 min→50 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s, 45个循环后72 ℃延伸10 min。扩增产物经2.5%琼脂糖凝胶电泳确定扩增效果。分别设超纯水替代DNA模板或引物做为阴性对照。PCR扩增产物经电泳、镀银染色后进行单链构象多态性(SSCP)分析[5]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39270303)
作者简介:张新立(1962-),男,天津市人,博士,副教授,主要从事肝癌病理学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68753291
收稿日期:2000-11-15;修回日期:2001-03-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果

2.1　c-Ha-ras、c-ki-ras、pan-ras 及 c-myc 癌基因蛋白检测

ras 基因蛋白阳性反应物呈棕黄色, 定位于细胞胞浆; c-myc 癌基因阳性反应物作棕黄色, 呈核或核浆着色。在启动模型第 3 周肝切片中可见少数肝腺泡Ⅰ带肝细胞胞浆呈 pan-ras 蛋白染色阳性, 此时 c-Ha-ras 蛋白阳性反应较弱, c-ki-ras 蛋白则为阴性。切肝术后 2 周内, pan-ras 与 c-Ha-ras 蛋白阳性细胞明显增多, 阳性染色强度也增加; 主要定位于嗜碱性肝细胞灶及结节中。增生的卵圆细胞阳性染色较嗜碱性肝细胞少见。10 周后, 阳性细胞明显减少。在肝癌模型的早期, pan-ras 与 c-Ha-ras 蛋白染色特征与启动模型基本一致。至诱癌 12~15 周时, 两种蛋白阳性细胞主要分布于增生肝细胞结节或已形成的假小叶内, 阳性强度也有增加。18 例肝细胞癌均有不同程度的 pan-ras 与 c-Ha-ras 蛋白检出, 见图 1。启动模型 3 周时即可见门管区增生的卵圆细胞核呈 c-myc 蛋白阳性染色, 随后在增生的卵圆细胞灶中 c-myc 阳性细胞明显增多, 见图 2。嗜碱性肝细胞灶中 c-myc 蛋白阳性染色相对较少见。在肝癌模型的早期病变中, c-myc 蛋白阳性染色仍以卵圆细胞为主, 中期肝硬化结节中出现核浆定位的 c-myc 蛋白阳性细胞。18 例肝癌组织中均有数量不等的 c-myc 蛋白阳性染色细胞, 核及核浆型定位均可见。

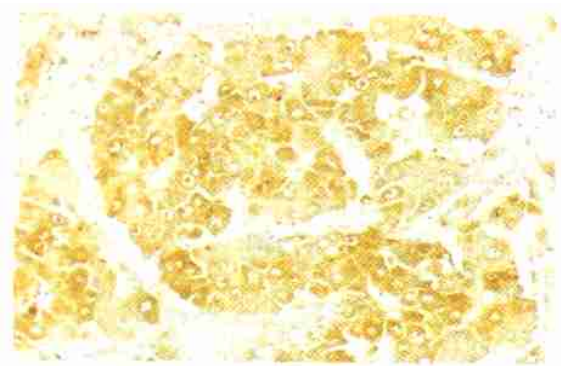


图 1　大鼠肝细胞癌: 癌细胞均有不同程度的 **c-Ha-ras** 蛋白表达　(ABC× 200)

Fig 1　Rat HCC: cancer cells exhibiting expression of c-Ha-ras protein in various degrees　(ABC× 200)

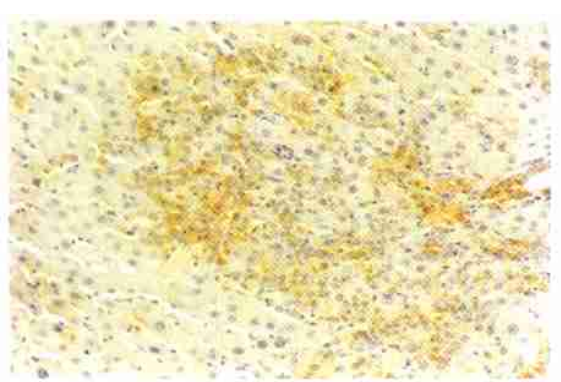


图 2　卵圆细胞增生灶中可见许多 **c-myc** 阳性细胞　(ABC× 200)

Fig 2　A lot of c-myc positive cells within the hyperplastic oval cell foci　(ABC× 200)

2.2　原位杂交结果

杂交染色阳性反应表现为细胞胞浆内有紫蓝色物质沉着, c-myc mRNA 在两种动物模型的增生卵圆细胞中呈明确的阳性表达, 嗜碱性肝细胞灶则仅见较弱的杂交信号。启动模型 10 周后, 极少检出 c-myc mRNA 阳性细胞。在肝癌模型中期, 阳性细胞主要散布于肝硬化结节中。18 例肝癌组织中均见到数量不等的阳性细胞, 染色反应强度亦不尽一致。

c-Ha-ras mRNA 阳性杂交细胞主要定位于癌前嗜碱性肝细胞灶及结节中。至诱癌中期, 增生结节或硬化结节中的肝细胞呈现 c-Ha-ras mRNA 较强的杂交信号。与癌前肝细胞增生灶相比, 肝细胞癌 c-Ha-ras mRNA 阳性细胞明显增多, 见图 3, 与癌周肝细胞形成鲜明的对照。



图 3　大鼠肝细胞癌: 癌巢内可见 **c-Ha-ras mRNA** 阳性细胞　(ISH× 200)

Fig 3　Rat HCC: c-Ha-ras mRNA positive cells scattered in cancer cell nest　(ISH× 200)

在癌前肝病变中, IGF-Ⅱ mRNA 杂交染色结果与 c-Ha-ras mRNA 相似, 以嗜碱性肝细胞阳性居多, 但阳性细胞数较少。肝癌组织中 IGF-Ⅱ mRNA 阳性癌细胞也以结节周边居多, 阳性细胞的染色强度也存在明显的差异。

fms mRNA 阳性杂交信号仅在 3 例肝细胞癌中检出。

2.3　大鼠 c-Ha-ras1 基因第 1 外显子片段点突变分析

在微切除的 52 个病灶(不包括生理盐水对照组肝)中, 45 个(86.54%)病灶被成功地扩增出大鼠 c-Ha-ras1 基因第 1 外显子 96 bp 片段。

SSCP 阳性表现为聚丙烯酰胺凝胶电泳中单链 DNA 带的泳动变位, 见图 4。本实验 SSCP 两阳性标本中, 1 例为Ⅱ级分化的梁状型肝细胞癌; 另 1 例为Ⅲ级分化的实体型肝细胞癌, 均未见癌转移。

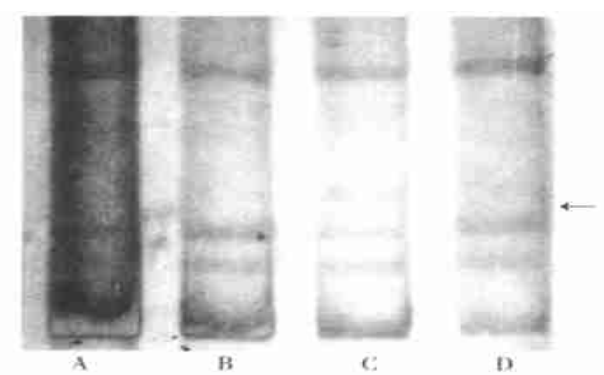


图 4　大鼠 **c-Ha-ras1** 基因点突变 **SSCP** 图

Fig 4　Point mutation of c-Ha-ras1 gene in rats by PCR-SSCP

A: Normal control; B: Para-tumorous liver tissue; C, D: HCC showing abnormal band (arrow)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

3.1 癌基因的过度表达与肝癌变病理形态改变

本实验结果显示,c-Ha-ras与c-myc是肝癌变中首先被激活的癌基因。随诱癌时间的延长,c-Ha-ras与c-myc癌基因的过度表达主要见于增生细胞灶中,而病灶周围肝细胞则无癌基因的高表达。此结果除与Nagy[6]及Galand[7]的研究结果相似外,尚观察到不同类型的增生细胞中占优势表达的癌基因不尽相同,其中增生的嗜碱性肝细胞以c-Ha-ras基因过度表达为主,而卵圆细胞中c-myc为其优势表达的癌基因。此外,尚观察到IGF-Ⅱ mRNA在嗜碱性肝细胞中表达增高,灶内细胞间表达程度则有差异,提示灶内肝细胞在癌基因表达上存在着异质性。至诱癌中期,c-Ha-ras、c-myc及IGF-Ⅱ均呈过度表达状态,而且在增生结节内肝细胞间癌基因的激活或表达状态差异更加显著,反映了结节内细胞构成的复杂性。

已有文献表明,c-myc和IGF基因功能状态参与调控细胞的增殖和分化,但有关大鼠实验性肝癌晚期癌基因变化与病理形态改变的研究报道较少。本实验结果也提示这些癌基因的过度表达与肝细胞增生及恶性转化关系密切,即c-myc和IGF-Ⅱ的表达上调促进了细胞的增殖和转化。本实验结果显示癌细胞的癌基因表达水平有明显差别,反映出癌巢内癌细胞所处的增生与分化状态不尽一致,印证了细胞的分子遗传学改变和恶性表型的出现不等于癌变过程结束的观点。

3.2 肝癌变中ras、c-myc、IGF-Ⅱ、fms异常激活的意义

ras基因是迄今证实的与肿瘤发生发展关系最密切的癌基因,本实验证实了c-Ha-ras基因在DEN诱发的大鼠肝癌变全过程中发生了异常激活,并以基因的过度表达为主要激活方式,点突变仅发生于个别肝癌中。ras基因的的异常激活,可促使ras-GTP复合物的形成,进而通过ras、raf、MAPK信号转导途径,激活转录因子,促进细胞增殖[8]。

c-myc基因编码蛋白定位于胞核。它是一种DNA结合蛋白,具有转录调节作用。新近研究资料表明[9],在人肝细胞癌,c-myc基因扩增与细胞增殖活性(Ag-NOR, Ki-67)和p53过表达呈正相关。c-myc扩增预示着HCC具更高的恶性潜能和不良预后。Suchy等[10]通过化学致癌物所诱发的大鼠肝癌变的研究,提出c-myc基因改变(扩增和/或重排)和c-myc蛋白高表达为肝肿瘤的进展期事件,因为这些改变不见于肝肿瘤早期。本实验观察到c-myc蛋白的高表达不仅见于肝癌组织中,且见于癌前增生灶及增殖的卵圆细胞中,这点与Suchy等的见解有所不同。

本实验证实IGF-Ⅱ mRNA在癌前肝细胞增生灶、增生结节及肝癌均呈高表达状态。在已有的其它遗传性损伤基础上,IGF-Ⅱ的过度表达加速了癌变的克隆选择过程,促进肝癌变的进展。

目前认为fms是人体肝细胞癌癌基因谱成员之一。它与大鼠实验性肝癌变的关系尚未见诸报道。本实验显示fms仅在个别肝癌中过度表达,癌前增生病变及多数肝癌中均未见其变化,表明fms癌基因与大鼠实验性肝癌变无密切关系。

3.3 关于MDT-PCR方法

从组织标本中,提取DNA作为模板,进行PCR扩增,其扩增产物的性质和质量直接受其模板DNA性质的影响。对肿瘤组织而言,由于瘤组织含实质和间质两种成份,如上皮性肿瘤除上皮性瘤细胞外,尚含多少不等的结缔组织和血管性间质。采用常规的组织块匀浆或多张连续切片抽提获得的DNA,用作PCR模板扩增检测某一基因改变,难以获得准确的遗传信息。再则,多数癌前病变往往病灶较小且肉眼与正常组织难以辨别,常规PCR模板制备方法,无法用于癌前病变的研究。本实验大鼠肝癌变的主要病变均较小,肝癌组织与非癌硬化结节常混杂存在,用常规PCR模板制备方法难以获取样本。有鉴于此,本研究参照Zhuang等报道的微切除方法并加以改进,成功地用于大鼠肝癌变各病灶细胞c-Ha-ras 1基因第1外显子片段点突变的研究。

本实验使用的MDT-PCR方法与目前常用于肿瘤分子遗传改变研究的PCR方法相比,有如下优点:①实现了微小病变组织的PCR分析。本实验运用此法从小于一个高倍视野(约0.15 mm^2)的嗜碱性肝细胞灶中扩增成功c-Ha-ras 1基因第1外显子96 bp片段。②由于本法降低了肿瘤组织用量,且在显微镜监视下获取目的组织,提高了肿瘤组织PCR模板的"纯度"。③建立了更精确的组织学表型与基因型改变关系的研究方法。

本实验所改进的MDT-PCR较Shibata[11]和Zhuang等[4]报道的方法,操作更简便,用于PCR更经济和安全。

参考文献:

[1] 顾健人, 陈渊卿, 蒋惠秋, 等. 人原发性肝癌癌基因谱[J]. 肿瘤, 1988, 8(6): 289—291.

[2] Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis [J]. Nature, 1976, 263(5 580): 701—703.

[3] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 19—28.

[4] Zhuang Z, Bertheau P, Emmert-Buck M R, *et al*. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell population in lesions< 1mm in size[J]. Am J Pathol, 1995, 146(3): 620—625.

[5] 王 东, 史景泉, 罗元辉, 等. 银染单链构象多态性分析——一种快速检测基因点突变的新方法[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(2): 150—151.

[6] Nagy P, Evarts R P, Marsden E, *et al*. Cellular distribution of c-myc transcripts during chemical hepatocarcinogenesis[J]. Cancer Res, 1988, 48(19): 5 522—5 527.

[7] Galand P, Jacobovitz D, Alexandre K. Immunohistochemical detection of c-Ha-ras oncogene p21 product in pre-neoplastic and neoplastic lesions during

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

hepatocarcinogenesis in rat[J]. Int J Cancer, 1988, 41(1): 155—161.
[8] Benn J, Schneider R J. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAPKinase signaling cascade[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(22): 10 350—10 354.
[9] Kawate S, FuKusato T, Ohwada S, *et al*. Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma, correlation with clinico-pathologic features, proliferative activity and p53 overexpression[J]. Oncology, 1999, 57(2): 157—163.
[10] Suchy B K, Sarafoff M, Kerler R, *et al*. Amplification, rearrangement, and enhanced expression of c-myc in chemically induced rat liver tumors *in vivo* and *in vitro*[J]. Cancer Res, 1989, 49(23): 6 781—6 787.
[11] Shibata D, Hawes D, Li Z, *et al*. Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction[J]. Am J Pathol, 1992, 141(3): 539—543.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2001)03-0311-01

经验与短篇

肾结核的影像学诊断

Imaging diagnosis of renal tuberculosis

李　锐，王文献，彭泽学　（第三军医大学附属新桥医院放射科，重庆 400037）

我院自 1992～1999 年间 12 例经手术、病理和临床及实验室证实的肾结核，分析其影像学表现，旨在提高对该病的诊断水平，现报告如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料

本组 12 例，男 4 例，女 8 例，年龄 33～59 岁，平均年龄 45 岁。其中手术病理证实 9 例，临床及实验室检查证实 3 例。临床表现为尿频、尿急、血尿、浊尿、腰部胀痛等。

1.2　影像资料与方法

采用美国 GE 公司 Sytec 3000 型全身 CT 扫描机。病人空腹，扫描前 30 min 服白开水 500～800 ml，然后病人取仰卧位，双肾区常规扫描，厚 10 mm，层距 10 mm。7 例做 CT 增强扫描，造影剂选用优维显 1 例、显影葡胺 2 例，60％泛影葡胺 4 例，均用 50 ml，静脉以 2.5～3.0 ml/s 的速度注入。

2　结果

本组 8 例行 B 超检查：肾积水 5 例、肾体积增大 1 例、肾囊性包块 1 例、多发性结石伴积液 1 例。

10 例行 IVU 检查：肾积水 4 例、一侧未显影 5 例、浅淡显影 1 例。

CT 表现：双肾改变 8 例，单肾改变 4 例。肾脏外形不规则增大 5 例、萎缩 6 例、无明显改变 1 例，有明显脓肿形成 6 例，肾盂、肾盏梗阻积水 11 例，钙化 10 例，肾表面凹凸不平伴周围粘连 9 例，肾盂输尿管壁增厚 3 例。

3　讨论

肾结核多为血行感染。结核杆菌随血流进肾脏后，多停留在肾小球周围的毛细血管内繁殖，形成结核脓肿。肾表面的结核脓肿会刺激肾包膜炎性渗出，并与周围组织形成条索样的粘连。肾乳头处的结核脓肿破溃，干酪样坏死物液化后排入肾盂，形成空洞，结核杆菌随尿路向下播散，形成输尿管膀胱结核性炎症。细菌随尿液返流导致对侧输尿管肾脏受感染。肾内纤维化使肾盂肾盏乃至整个肾脏外形的不规则改变。钙化常发生于坏死空洞壁，表现多种多样。全肾的钙化，即“肾自截”或“自家肾切除”[1]。

超声对肾结核诊断价值不大。本组 8 例中仅 3 例提示肾结核。IVU 表现：①肾盏边缘呈“虫咬状”改变，当与之相连的空洞显影时，可见其边缘亦呈“虫咬状”，且时相上落后于肾盏的显影。当肾功能破坏较重，肾盂肾盏显影不好时，诊断较困难，②IVU 的优势在于了解肾分泌功能及全程观察膀胱和双侧尿路情况，如有无积水、积水的程度、膀胱炎等[2,3]。

CT 由于密度分辨率高，平扫时可见肾脏外形及大小的改变，肾盂肾盏扩张积水，肾盂输尿管壁的增厚，以及不规则的钙化。增强后能更清楚地显示结核脓肿；在肾实质内可见不规则的密度减低区，边缘呈“虫咬状”，并有轻到中度的强化。这是空洞壁上肉芽组织增生的缘故。结合增强延迟扫描可以观察肾功能的改变和积水的程度等情况。本组发现 10 例单侧肾结核中，其中有 6 例对侧肾脏或多或少地出现上述表现，只是病变程度要较患侧轻，因此我们认为 CT 的应用会提高肾结核的检出率。但 CT 对于肾结核仍缺乏特异性的表现，而且扫描所包括的范围往往受限，不可能全面显示尿路受累情况，所以对于肾结核的诊断，尤其是早期的肾结核，应结合平片和 IVU 进行全面观察；还必须要结合临床及其它的实验室检查资料才能得出进一步的诊断。

综上所述，对于肾结核的影像学诊断中，CT 是最佳的方法，其敏感性和准确性均高于 IVU 和 B 超。IVU 可用于肾功能的评价，而 B 超则具有筛选的价值。

关键词：肾结核；CT；B 超；诊断
中图法分类号：R527.104　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈燕萍 综述，张雪林 审校. 泌尿系统结核的病理与 CT 表现[J]. 中国医学影像技术，1998，14(10)：779—781.
[2] 蔡　磊，朱　力，金国宏. 肾结核的 CT 诊断(附 33 例报告)[J]. 宁夏医学院学报，1999，21(3)：217—218.
[3] 于坤银，虞春堂，曾　盛. IVP、CT 对肾结核的影像对照(附 16 例分析)[J]. 实用放射学杂志，1999，15(5)：293—294.

（编辑　汪勤俭）

作者简介：李　锐(1976—)，男，重庆市人，医师，现在巴南区人民医院放射科，重庆 400000。电话：(023)66233484

收稿日期：2000-05-20；修回日期：2000-12-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net