DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.014

胎盘型谷胱甘肽 S转移酶 mRNA在大鼠肝癌癌前病变组织中的原位表达

朱焕章 张新立 陈意生 (第三军医大学基础部病理学教研室) 重庆,630038

提 要 应用原位杂交技术,观察了二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌前病变组织中胎盘型谷胱甘肽 S转移酶(GST-P) mRNA的表达。结果显示,GST-P mRNA主要在癌前病变肝组织中的变异灶及灶外卵圆形细胞内表达,且在变异灶间或和同一灶内阳性细胞间表达程度不尽一致,而正常肝、再生肝组织中未见其表达。提示在分子水平上变异灶细胞及卵圆型细胞可能成为实验性肝癌的癌前期细胞。

关键词 肝肿瘤;癌前状态;谷胱甘肽转移酶;原位杂交
中图法分类号 R730.21

谷胱甘肽 S转移酶(Glutathione S-transferase, GSTs)是一组多基因家族的同功酶。它主要存在于肝脏,在细胞解毒中起重要作用。鼠胎盘型谷胱甘肽 S转移酶(Glutathione S-transferase placental, GST-P)是从大鼠胎盘中分离出来的一种 GSTs同功酶,它仅少量存在于鼠的胎盘、肾脏。近来有许多文献报道,运用 Northern blot和 Dot blot方法显示 GST-P mRNA主要在实验性肝癌癌前病变及肝癌组织中表达[1],但在癌前病变肝组织中何类细胞有表达,尚不清楚。为此,本研究中应用原位杂交技术对二乙基亚硝胺(Diethyl-nitro samine, DEN)诱发大鼠肝癌癌前病变组织中 GST-P mRNA的表达进行了研究,并初步探讨了其表达的意义与机理。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

雄性 Wistar大鼠 70只,体重 100 g~150 g,随机分实验组与对照组(Ⅰ,Ⅱ)。实验组依据 Solt-Farbar模型[2]。步骤为于实验第 1天腹腔注射 1次 DEN(Sigma产品),剂量为 200 mg/kg体重,2周后开始喂以含 0.02% AAF(Sigma产品)的饲料,连续喂 2周,调换正常饲料。第 3周末行 2/3肝切除术。对照组Ⅰ于实验第 1天腹腔注射一次生理盐水,第 3周末行 2/3肝切除术,喂以正常饲料。对照组Ⅱ仅于实验第 1天腹腔注射一次生理盐水后,喂以正常饲料。各组分别在第 1 2 3 4 5周末处死动物。实验组每次 6只动物(由于死亡 1只第 5周末仅 5只),对照组每次 4只动物。取一块组织做恒冷连续切片,用于原位杂交,其余组织用 4% 多聚甲醛固定,按常规石蜡制片,HE染色。

1.2 肝脏病理形态学观察及γ-GT组化染色

按文献[3]报道方法进行。

1.3 原位杂交

GST-P cDNA探针制备及标记:GST-P cDNA探针 PGP5重组于 PUC18质粒中,含有此质粒的菌种由日本 Dr. Sugioka惠赠。酶切位点 EcoRI-SaI,插入片段长度 0.75 kb。采用文献[4]方法进行核酸探针制备。探针标记按 BM公司地高辛标记及检测试剂盒进行。

原位杂交流程及结果判定:采用冰冻组织切片。杂交按文献[4]方法略加修改,杂交液中含标记探针的浓度为 110 ng/ml 杂交前用 RNase消化和不加杂交液切片做阴性对照。杂交阳性细胞为胞浆呈紫色或紫兰色。

2 结果

2.1 肝脏病理形态学和酶组化反应的变化

术后 1周即可见肉眼小结节。实验组肝组织切片中见有较多大小不一的变异肝细胞灶和结节,以嗜碱性肝细胞灶为多。并见卵圆细胞的增生。卵圆细胞增生与变异肝细胞灶的大小呈负相关,即若变异灶较小时,灶外卵圆细胞增生较多,若变异灶较大时,灶外卵圆细胞增生较少,见图 1。变异肝细胞灶大多数呈γ-GT阳性,见图 2。对照组肝组织未见异常。

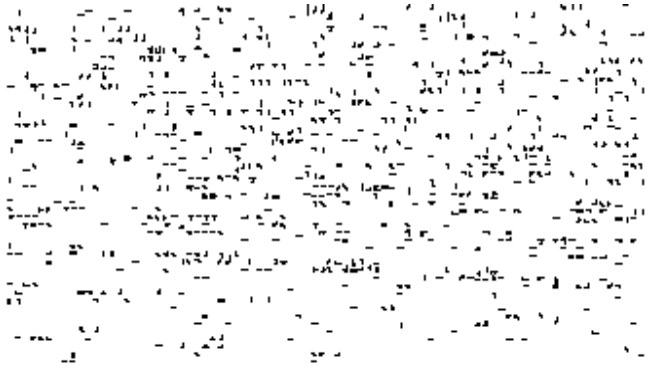


图 1 实验组 5周时变异肝细胞灶 (HE×150)

Fig 1 Altered hepatic foci at the 5th week (HE×150)

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39270303

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

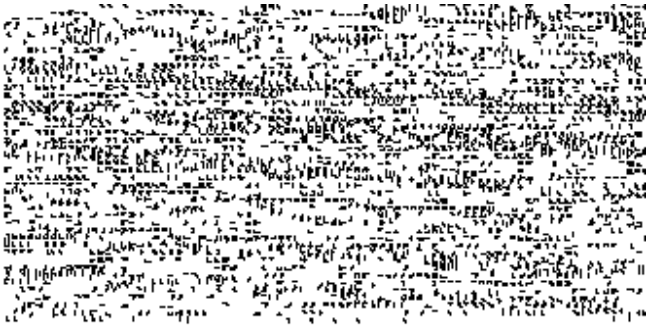


图 2　实验组 5周时肝细胞 γ-GT染色阳性灶
(酶组化× 200)

Fig 2　γ-GT positive foci of liver cells at the 5th week
(Histochemistry× 200)

2.2　原位杂交

第 3周时,癌前病变肝组织内见有几个成簇的肝细胞、卵圆细胞 GST-P mRNA呈阳性表达。第 4、5周时,GST-P mRNA表达主要位于癌前病变肝组织内的变异肝细胞灶及灶外部位卵圆细胞中。杂交颗粒,主要见于变异肝细胞胞浆或胞核周围,见图 3,且杂交颗粒的密度在不同病灶间或同一病灶内的不同细胞之间有一定差异。杂交前用 RNase消化或杂交液未加地高辛标记的 GST-P cDNA探针的对照切片,仅见本底水平颗粒,说明上述的杂交是特异的。对照组未见杂交异常的肝细胞。

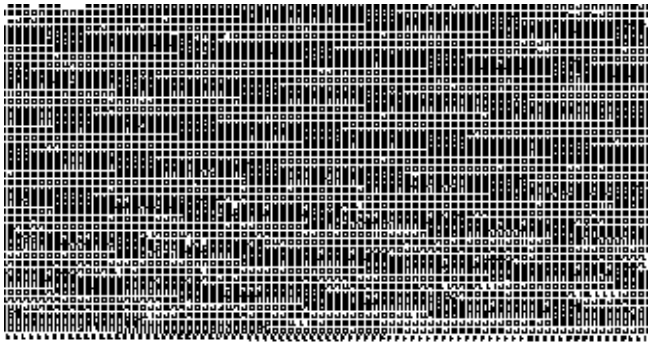


图 3　实验组 5周时肝组织 GST-P mRNA阳性灶
(原位杂交× 400)

Fig 3　GST-P mRNA positive foci of liver cells at the 5th week　(*In situ*× 400)

3　讨论

GSTs是一组很早以前就被熟知的酶,它在细胞解毒中起重要作用。胎盘型 GST同功酶包括大鼠和人胎盘型两种,分别称为 GST-P和 GSTπ。GSTπ在人肝癌变过程中表达情况较复杂,结果不甚一致。多数学者认为不宜把 GSTπ 做为肝癌的癌前标记酶[5]。Northern blot和 Dot blot方法显示 GST-P mRNA主要在由基因毒性致癌物诱发动物实验性肝癌前病变组织及肝癌中高表达,由此认为 GST-P可作为实验性肝癌的癌前标记酶[1,6]。肝组织中有许多类型细胞。Northern blot和 dot blot方法仅反映群体细胞基因表达的整体水平,不能反映单一的某类细胞基因表达,更不能反映其表达的特点。本研究应用原位杂交的方法,进一步在分子水平证实了 GST-P mRNA主要在癌前病变肝组织中的变异灶及灶外卵圆细胞内表达,且在变异灶间或和同一灶内阳性细胞间表达程度不尽一致,可能反映了转录水平的异质性,而正常肝、再生肝组织未见其表达。由此提示变异灶肝细胞和灶外卵圆细胞可能为实验性肝癌的癌前期细胞。

在癌变过程中,细胞基因表型的异常不是直接由致癌物引起的,可能是通过一系列调控蛋白、特别是癌基因产物通过信号传递途径介导的细胞增殖基因的激活,以及抑癌基因产物丢失和失活使细胞失去正常生长和分化的调控,而引起细胞癌变。在大鼠实验性肝癌的癌变过程中,人们已发现多种癌基因被激活,如: ras家族、c-fos、c-myc、c-Jun等,其中 p21 ras可激活 γ-GT、GST-P等基因的表达[7],c-myc与 GST-P的表达密切相关[8]; c-Jun, c-fos可能与肝癌变后期阶段 GST-P高水平维持相关[9]。作者推测 GST-P mRNA在癌变过程中高表达与癌基因在其过程中相继不断激活引起基因表型异常变化有关。GST-P在肝癌细胞中高表达,不仅可做为肝癌癌前标记酶,而且也是癌变细胞对细胞毒物产生耐药性的分子基础。

化学诱癌早期卵圆细胞的发现及其与肝癌发生的关系,也是值得讨论的问题之一。卵圆细胞首先由 Farbar命名,此后在大鼠及其它动物诱癌过程中,以及人肝癌旁组织,慢性活动性肝炎病变中均曾见到。卵圆细胞具有抵抗致癌剂细胞毒性作用,并能在同系动

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

物肝原位及异位移植后稳定生长,卵圆细胞显示未分化的形态特征,并能表达某些胚胎时的酶类。目前多数作者认为卵圆细胞代表肝组织的原始干细胞,具有向肝细胞及胆管上皮等多向分化能力[10]。本实验结果显示,肝细胞变异灶大时,其灶外卵圆细胞增生较少;若肝细胞变异灶小时,其灶外卵圆细胞增生较多。由此提示,肝细胞变异灶有可能由卵圆细胞演化而来。

参考文献

1 Wile M C. Structure and function of GST. Biochim Biophys Acta, 1994; 16(1): 1

2 Solt D B, Farbar L. Rapid emergence of carcinogen induced hyperplastic lesion in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. Am J Path, 1977; 88(4): 595

3 Rutenberg A M. Histochemical and ultrastructural demonstration of γ-GT activity. J Histochem Cytochem, 1969; 17(4): 517

4 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南.第2版.北京:科学出版社 1995 495~533

5 Murray I. The expression of cytochrome P-450 epoxide hydrolase and GST in hepatocellular carcinoma. Cancer, 1993; 71(1): 43

6 Jang J, Henneman J R, Kurata Y *et al*. Alterations in populations of GST-P immunoreactive single hepatocytes and hepatocellular foci after a single injection of N-nitrosodiethlyamine with or without phenobarbital promotion in male F344 rats. Cancer lett, 1994; 71(1): 89

7 李士谔.细胞分化在致癌和抑癌中的作用.中国医学科学院学报, 1993; 15(5): 385

8 Deguchi T, Pitoc H C. Expression of C-myc in altered hepatic foci induced in rats by various single doses of DEN and promotion by 0.05% phenobarbital. Mol Carcinog, 1995; 14(3): 152

9 Suzuki S, Satok K, Nakano H *et al*. Lack of correlated expression between the GST-P form and the oncogene products C-Jun and c-fos in rat tissues and preneoplastic hepatic foci. Carcinogenesis, 1995; 16(3): 567

10 Valeneina M F, Svetlana A R and Snorris T. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. Am J of Pathol, 1994; 145(2): 41

(收稿: 1996-01-05;修回: 1996-09-01)

(编辑 冷怀明)

Expression of glutathione S-tranferase placental mRNA in hepatic preneoplastic lesions in rats*

Zhu Huanzhang, Zhang Xinli, Chen Yisheng (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The expression of glutathione S-transferase placental (GST-P) mRNA was observed in hepatic preneoplastic lesions induced with diethylnitrosamine (DEN) with *in situ* hybridization in rats. It was found that GST-P mRNA mainly expressed in altered foci and some of oval cells in hepatic preneoplastic lesions and the extent of its expression was different among foci or/and positive cells in the same foci whereas no expression was observed in normal and regenerating hepatic tissue. Our findings indicate that cells in altered foci and oval cells may be preneoplastic cells in the experimental hepatocellular carcinoma at the molecular level.

Key words hepatic preneoplastic lesion; glutathione S-transferase placental; *in situ* hybridization

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39270303

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