DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.026

大鼠肝癌变的形态学演变与某些癌基因、抑癌基因改变关系的研究*

An experimental study on the relationship between morphologic evolution and the aberrations of oncogenes and tumor suppressor gene during hepatocarcinogenesis in rats

张新立 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室) 重庆, 630038

本课题以 DEN诱发大鼠肝癌变为研究对象,采用定量病理学与分子生物学技术方法,对肝癌变的形态演变与某些癌基因、抑癌基因的关系进行了研究,旨在① 量化各主要病变组织与细胞形态特征,探讨肝癌变中细胞增殖活性与病变形态学的关系;② 阐明癌基因 ras、c-myc、fms及 IGF-II 过度表达及 c-Ha-ras1基因突变与肝癌变形态演变的关系及意义;③ 探讨实验性肝癌变中 P53基因突变的特点及意义,从癌基因、抑癌基因变化角度揭示肝癌变形态演变的分子基础,为临床肝癌的诊治提供新的实验依据及可行的技术方法。主要结果如下:

(1)采用图像分析技术测定了肝癌变中主要病变细胞形态参数,证实卵圆细胞是一种大小仅为正常肝细胞 1/8、核浆比却大 6倍、形态不规则的增生小细胞;增生灶及结节中嗜碱性肝细胞形态参数与肝癌细胞相似。结合病变观察,认为卵圆细胞与嗜碱性肝细胞均为实验性肝细胞癌的重要组织起源。病灶数密度测量显示,DEN启动后 5周嗜碱性肝细胞增生灶与卵圆细胞增生灶数目最多,分别达 4.3个 /mm^2 与 5.3个 /mm^2,前者平均面积也达最大(0.08 mm^2),10周后病灶明显减少以至消失,客观地反映了癌前病变重建的演变规律。

(2)采用免疫组织化学染色方法,选择 PCNA与 BrdU两种反映细胞增殖活性的指标,对肝癌变中细胞增殖活性进行了动态研究,证实 PCNA与 BrdU阳性细胞主要位于癌前增生细胞灶及肝癌组织中。阳性细胞标记数密度于 DEN启动后 5周达峰值,卵圆细胞灶稍高于嗜碱性肝细胞灶,前者 PCNA 2.66 × 10^3个 /mm^{2}及 BrdU 1.13× 10^3个 /mm^2,后者 PCNA 1.57× 10^3个 /mm^{2}及 BrdU 0.78× 10^3个 /mm^2。PCNA标记数密度与嗜碱性肝细胞灶平均面积在启动后 4周时呈显著的正相关,反映出细胞增殖特性与病变形态学变化的一致性。PCNA标记指数在低分化III级(33.81%± 26.71%)及实体型(49.79%± 29.39%)肝细胞癌明显高于高分化(I ~ II 级,12.64%± 6.90%)及梁-腺型(13.49%± 6.95%)肝细胞癌,此结果符合癌细胞分化程度与细胞增殖活性关系的一般规律。两种标记方法的结果显示,PCNA标记率明显高于同病变 BrdU标记率,但二者的变化趋势相同,认为尽管它们反映的增殖细胞群体不尽一致,视研究目的不同,均可成为反映细胞增殖特性的良好指示。

(3)应用免疫组织化学、原位杂交与 MDT-PCR-SSCP技术,对大鼠肝癌变形态演变与 ras、c-myc、fms及 IGF-II 基因过度表达关系及 c-Ha-ras1第 1外显子片段突变的研究表明,c-Ha-ras及 c-myc癌基因的过度表达参与了肝癌变的启动至恶性表型形成的全过程,其中 c-Ha-ras的过度表达与癌前嗜碱性肝细胞灶的形成及细胞增殖活性的改变关系密切,而 c-myc癌基因过度表达主要参与了卵圆细胞的增殖。IGF-II 基因的过度表达,可能通过改变细胞生长调节的自泌机理,对癌前肝细胞增生灶及结节向肝细胞癌的演进起重要作用。fms癌基因过度表达仅与个别大鼠肝细胞癌有关。c-Ki-ras癌基因在大鼠肝癌变中未见增高表达。MDT-PCR-SSCP分析证实,c-Ha-ras1第 1外显子片段点突变仅见于个别肝癌中,发生率较低(2/18, 11.1%),认为 c-Ha-ras癌基因的过度表达是其参与大鼠肝癌变的主要激活方式。

(4)采用免疫组织化学、MDT-PCR-SSCP及直接测序技术,对大鼠肝癌变中突变型 p53蛋白(mp53)与 p53基因第 6外显子点突变进行了检测,证实 mp53阳性细胞仅见于癌前个别肝细胞增生结节中,8/18例(44.44%)肝细胞癌呈 mp53阳性;mp53阳性肝癌的细胞增殖活性(PCNA LI: 32.00%± 25.22%)显著高于 mp53阴性肝癌(PCNA LI: 11.98%± 6.98%),但癌基因 c-Ha-ras与 c-myc蛋白的过度表达在二者间无显著差别。MDT-PCR-SSCP及直接测序证实,仅 1/8例(12.50%)mp53阳性肝癌检出第 6外显子突变,突变位点为第 208位密码子第 1碱基 C→ G颠换,导致编码氨基酸由谷氨酸(Glu)替代谷氨酰胺(Gln),提示 p53基因突变可发生于癌前与肝癌形成阶段,突变无特异性位点及热点。癌细胞的增殖活性与 p53基因突变密切相关,但突变与癌基因的过度表达无密切关系。认为目前实验性肝癌变中 p53基因突变阳性检出率差异较大,可能主要与检测方法及致癌剂性质有关。

(5)本研究建立了组织微切除 PCR(MDT-PCR)方法,并成功地应用于本课题微小病灶的基因突变研究中,为表型与基因型关系的研究提供了技术保证。该方法与肿瘤基因研究中常规 PCR方法相比,具有快速、经济、简便、精确的特点,它与

* 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

SSCP,特别是直接测序技术相结合,将成为肿瘤分子病理研究的重要手段,在分子病理诊断中具有潜在的临床应用价值。此外,本研究尚建立了塑料切片 γ-GT与 ANAE染色方法,提出 ANAE含量减少及分布极性消失,可能也是癌前肝细胞增生灶酶组化特性之一的观点。

关键词 肝肿瘤,实验性;癌基因;p53;增殖活性;图像分析;原位杂交;多聚酶链反应

中图法分类号 R735.7

(收稿: 1996-12-01;修回: 1997-01-10)

(编辑 王 红、沈锡庚)

大鼠烟雾吸入性损伤中性粒细胞损害作用的机理研究

Studies of the effects of neutrophils recruitment of the ingury of lung after smoke inhalation

罗奇志 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,630038

以往我所的研究已经证明肺水肿是吸入性损伤后呼吸功能衰竭的主要病理基础,除烟雾直接作用外,炎症反应特别是中性粒细胞对加速加重肺实质损伤具有十分重要的作用,例如抗中性粒细胞的血清或减少血中性粒细胞的量可减轻肺的炎症,抑制血管通透性增加。但是中性粒细胞在吸入性损伤后对肺损伤的病理生理具体过程尚不清楚。

粘附因子具有调节浸润白细胞的种类和量的作用,但在吸入性损伤后的作用如何尚未见报道,本实验通过分子杂交和组织化学方法观察了吸入伤动物肺组织粘附因子 ICAM-1和 ELAM-1的变化与中性粒细胞浸润和肺损伤的关系,通过中性粒细胞对内皮细胞粘附及其迁移的研究,探讨了粘附因子 ICAM-1 ELAM-1 CD11a和 CD11b对中性粒细胞的招募的作用;进一步观察了中性粒细胞对培养的内皮细胞和肺II型细胞的损伤作用。目的在于探讨吸入伤后中性粒细胞招募(Recruitment)的分子和细胞基础,以及中性粒细胞在继发性损伤中的作用。

主要实验结果和结论如下:

(1)烟雾吸入伤后血清中诱导内皮细胞粘附因子表达的细胞因子 TNFα和 IFNγ伤后增高,并伴有 IL-8合成分泌增加。

(2)原位和斑点杂交及免疫组化显示,伤后肺血管内皮和平滑肌细胞表达 ICAM-1逐渐增加,伤后 24 h mRNA表达最强,而肺上皮细胞和气管上皮细胞未见表达;正常时肺血管内皮表达量极低的 E选择素 ELAM-1,伤后迅速增加,伤后 3 h达最大值,伤后 24 h恢复到正常水平。体外吸入伤血清也能诱导内皮细胞粘附因子细胞间粘附因子-1(ICAM-1)和 E选择素表达增加,中性粒细胞(PMN)上 ICAM-1的配体 CD11a和 CD11b 1 h~ 24 h表达增强。伤后粘附因子表达的增加为白细胞的粘附和迁移创造了物质基础。

(3)吸入伤血清使中性粒细胞与内皮细胞粘附率和透内皮的迁移量逐渐增高,12 h~ 24 h达到高峰,二者显著正相关(r= 0.97, P < 0.01)。血清既能刺激肺内皮细胞也能刺激全身内皮细胞,因此可能参与和加重了吸入性损伤后全身失控性炎症反应的机理。

(4)体外实验表明,CD11a抗 CD11b和抗 ICAM-1的抗体各自能阻断中性粒细胞与激活内皮细胞粘附率分别达 44%、55%和 51%,减少中性粒细胞迁移量达 39%、65%和 58%。提示粘附因子 CD11a CD11b和 ICAM-1在烟雾吸入性损伤中性粒细胞粘附浸润中起重要作用。

(5)体外实验还表明吸入性损伤血清能激活 PMN释放 H_2O_2和髓过氧化物酶(MPO),导致培养内皮细胞和肺II型细胞脂质过氧化损害,乳酸脱氢酶(LDH)释放增多;激活的内皮细胞与中性粒细胞又能相互激活,促使 H_2O_2、MPO、IL-6和 IL-8的产量进一步增高。

(6)伤后继发性的炎症,肺中性粒细胞的大量浸润和呼吸爆发,H_2O_2的释放导致肺组织脂质过氧化损伤,丙二醛(MDA)的产量明显增高;多脏器的毛细血管通透性增加,心、肝、脾和肾组织中 ^{131}I白蛋白渗出量伤后均有增高,提示有多脏器内皮细胞的损伤。

(7)烟雾吸入性损伤后肺内皮细胞和肺II型细胞损伤,导致 ^{131}I白蛋白渗出量、肺湿/干重比和红细胞出量增加,表明肺毛细血管通透性增加、肺水肿和肺出血,造成 PaO_2持继性降低及肺泡动脉血氧差和呼吸指数持继升高,说明有以换气功能变化为主的呼吸功能障碍。

关键词 灼伤,吸入性;中性粒细胞;内皮;细胞粘附因子;炎症;肺水肿;肺出血

中图法分类号 R644

(收稿: 1996-12-05;修回: 1997-01-07)

(编辑 王 红、沈锡庚)

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