

卵圆细胞在实验性肝癌发生中的作用^①

薛玲 赵国强 吴惠茜 董郡

(中山医科大学病理学教研室: 广州, 510089)

摘要 目的: 观察诱癌过程中 c-Ha-ras、p21 蛋白、AFP 及 PCNA 在肝细胞及肝卵圆细胞中的表达变化。方法: 用化学致癌剂 3'-甲基-4-二甲基氨基偶氮苯(3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, 3'-Me-DAB) 诱发 SD 大鼠肝癌, 通过免疫组化、原位杂交等方法检测各相关因子在肝细胞及肝卵圆细胞内的表达。结果: 诱癌 4 周, 大鼠肝内出现大量的卵圆细胞, 呈 PCNA 强阳性。6~8 周, 部分增生的卵圆细胞 p21^{ras} 及 AFP 阳性反应。原位杂交显示, 诱癌的第 4~8 周, c-Ha-ras 的阳性表达细胞呈逐渐增多趋势; 14 周时, c-Ha-ras mRNA 阳性表达细胞减少; 至 17 周, 所有癌组织内显示 c-Ha-ras 基因表达阴性, 而癌旁组织内则可见 ras 基因的大量表达。结论: 卵圆细胞是宿主受化学致癌剂作用后发生肝癌的始动细胞, 与肝癌的发生有着密切的联系。

关键词 肝肿瘤, 实验性; 癌基因; 大鼠, Sprague-Dawley

中图分类号 R 735.7

Study on the Role of Oval Cells in Experimental Hepatocellular Carcinogenesis

Xue Ling Zhao Guoqiang Wu Huixi Dong Jun

(Department of Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To observe the expression of c-Ha-ras, p21, AFP and PCNA in oval cells and liver cells in the process of hepatocarcinogenesis. **Methods:** Male SD rats are used as experimental animals and the animal model of experimental hepatocarcinoma is established by means of 3'-me-DAB administration. The expression of c-Ha-ras, p21, AFP and PCNA are detected by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Results:** Large amount of PCNA positive oval cells appeared in the 4th week of cancer induction. In 6th and 8th week, positive reaction of p21^{ras} and AFP appeared in some hyperplastic oval cells. The results of in situ hybridization showed, from 4th to 8th week the number of c-Ha-ras positive cells increased gradually. In 14th week the number of c-Ha-ras positive cells decreased. In 17th week the positive signal of ras gene expression could be seen only in paraneoplastic tissue, and in neoplastic tissue no positive signal could be detected. **Conclusion:** The oval cells might be the initiated cells of liver carcinoma of host rats fed by chemical carcinogen and have a close relationship with histogenesis of liver carcinoma.

Subject headings liver neoplasms, experimental; oncogene; rats, Sprague-Dawley

卵圆细胞在肝癌发生中的作用是肝癌发生学研究中的重要课题。本实验通过化学致癌剂诱发大鼠肝癌, 动态观察 c-Ha-ras、p21 蛋白、AFP 及 PCNA 在卵圆细胞及肝细胞中的表达变化情况, 探讨卵圆细胞与实验性肝癌发生的关系, 以期对肝癌

的癌变机理及其发生学提供进一步的实验依据。

1 材料与方法

1.1 大鼠肝癌模型的构建

^① 卫生部回国人员启动基金及国家自然科学基金资助课题

本校实验动物中心提供标准动物,选择健康雄性SD大鼠50只,体质量100~120g,稳定饲养1周后40只作为实验组,用含3'-me-DAB(600mg/kg)的饲料喂养14周后停药,之后以正常饲料喂养至17周;另外10只作为对照组,以标准饲料喂养。

1.2 标本的收集与处理

自投以致癌剂之日起,分别在第4、6、8、14和17周随机处死5只大鼠,取肝脏,100mL/L中性福尔马林固定,石蜡包埋。所有蜡块均作5 μ m厚的连续切片,用于HE染色、免疫组化及原位杂交。

1.3 免疫组化

选取上述组织切片,用LSAB法进行AFP, p21^{ras}及PCNA(PC10)的免疫组化检测,抗体的使用浓度分别为1:300, 1:100和1:200,所用试剂均为DAKO公司产品。

1.4 原位杂交

癌基因探针质粒(c-Ha-ras PBR322 6.6 kb BamHI)由北京中国医学科学院肿瘤研究所提供,用非放射性标记物地高辛标记,标记方法为随机引物法(标记试剂盒为德国宝灵曼公司产品)。

原位杂交主要步骤:石蜡包埋切片5 μ m,蛋白酶K 0.04g/L, 37 $^{\circ}$ C, 30min, 预杂交, 42 $^{\circ}$ C, 1h, 杂交过夜42 $^{\circ}$ C。1/500辣根过氧化物酶标记的抗DIG抗体1h。DAB显色, TE终止显色, 中性树脂封片, 光镜镜检。

2 结果

2.1 大鼠肝癌变过程中的病理形态改变

诱癌4周,镜下见大片肝细胞坏死,门管区及坏死区内均见大量的卵圆细胞。诱癌第6周,肝内仍有大量卵圆细胞,其中可看到一些碱性细胞和小肝细胞以及体积和形态介于二者之间的过渡型细胞(transitional cell)。诱癌第8周,镜下见典型假小叶形成,假小叶周围为增生的纤维组织及较多的卵圆细胞,其间仍可见过渡型细胞和胆管上皮细胞。诱癌第14周,在假小叶内已出现嗜碱性的肝细胞灶。诱癌第17周,大鼠肝除呈肝硬化改变外,还有癌结节形成。所形成的5例肿瘤中,1例为胆管上皮癌,其余4例为混合细胞癌。在混合细胞癌中,可见胆管上皮癌和肝细胞癌混合存在同一结节中,

也可见肝细胞癌小灶独立存在。癌旁的肝组织均呈肝硬化改变,部分肝细胞呈明显的不典型增生。

2.2 癌形成过程中 p21^{ras}、AFP 及 PCNA 的表达

结果判断:rasP21及AFP的阳性结果均为棕黄色颗粒分布于胞浆内;PCNA阳性则为细胞核染成棕黄色。

大鼠在诱癌4周时,PCNA阳性细胞大多为卵圆细胞,而肝细胞很少(图1A)。至诱癌6~8周,部分增生的卵圆细胞出现p21^{ras}及AFP阳性反应,二者的分布区域基本一致(图1B、C)。同时肝细胞结节边缘一些体积较小的肝细胞亦呈阳性反应。PCNA阳性细胞仍以卵圆细胞为主,但小肝细胞和过渡型细胞的阳性反应细胞较诱癌4周时增多。诱癌第14周,仍可见少量呈p21^{ras}阳性反应的卵圆细胞,或散在分布,或三五成群形成阳性反应小灶。AFP阳性反应细胞此时明显减少,除见少数卵圆细胞阳性外,仅于假小叶边缘可见少数小肝细胞阳性。呈p21^{ras}的阳性反应的肝细胞分布和数量变化不明显。PCNA阳性细胞此时更多,分布更广,卵圆细胞继续保持高的阳性率,而且新增生的胆管、小肝细胞、嗜碱性细胞、嗜酸性细胞均存在较多的阳性细胞。诱癌第17周,此期已形成癌,无论是胆管上皮癌还是肝细胞癌均呈PCNA强阳性,阳性率为50%~70%。p21^{ras}在胆管上皮癌中呈弱阳性,肝细胞癌中仅见个别小癌灶呈弱阳性反应,而癌旁肝组织则见较多阳性细胞。此外,我们观察到癌旁肝细胞结节内p21^{ras}阳性反应亦呈异质性表达。

2.3 癌发生发展中 c-Ha-ras mRNA 原位杂交结果

凡细胞胞浆内见有均匀一致分布的棕黄色颗粒者即为阳性反应细胞。在诱癌的第4~8周,c-Ha-ras的阳性表达细胞呈逐渐增多趋势。阳性表达细胞多为肝细胞坏死区周围或假小叶外周的小肝细胞;而门管区卵圆细胞和过渡型细胞亦可见少量阳性反应(图1D)。诱癌14周时,c-Ha-ras mRNA阳性表达细胞减少,但仍可见部分小肝细胞和嗜碱性肝细胞阳性。至第17周,所有癌组织内均显示c-Ha-ras癌基因表达阴性,或仅见个别小癌巢内少数癌细胞呈弱阳性。而癌旁肝组织内却可见ras癌基因的大量表达,无论是在HE切片中显示形态完全正常的肝细胞,亦或是具有一定异型性,甚至不典型增生之肝细胞均可见阳性表达。但在

一些肝结节内这种阳性表达分布呈明显的异质性。

3 讨论

3.1 c-Ha-ras 基因 mRNA 表达及 p21 蛋白与 AFP 的关系

本实验的原位杂交及免疫组化结果显示: c-Ha-ras 的 mRNA 表达、p21^{ras} 与 AFP 阳性反应细胞在整个诱癌过程中呈基本一致的分布, 提示 ras 和 AFP 二者之间可能存在某种特定的调节关系。这种现象在个体的正常发育中也存在, 正常胚胎肝 p21^{ras} 呈高表达, 此时 AFP 亦保持高水平; 出生后 p21^{ras} 和 AFP 均不再表达; 而当肝癌发生时, 二者又可同时再升高^[1]。本实验暂未能提供更多更直接的证据来证明二者的相关关系, 故不能对 ras 基因对 AFP 产生的调节机制作进一步的阐述。

3.2 肝癌细胞起源的探讨

关于癌变的发生主要有两种观点: 其一为癌变由于干细胞的异常分化引起, 其二为成熟细胞的去分化而致。而一种组织或一个器官究竟有无干细胞的存在, 是揭示癌变的组织来源及癌变机理的关键所在。目前多数人认为卵圆细胞是肝内的干细胞^[3~6], 在致癌剂的作用下成为癌前细胞, 是癌变的始动细胞^[7~9], 因此研究卵圆细胞的性质, 追踪它的发生发展及其归宿具有重要意义^[4]。我们的实验支持癌变是由于干细胞的异常分化而引起的观点, 其证据有: ①诱癌早期 PCNA 阳性细胞主要为卵圆细胞, 表明这是一种增生活跃的新的细胞群体; 以后 PCNA 阳性细胞逐渐在过渡细胞、小肝细胞、嗜碱性肝细胞及胆管上皮细胞中呈增多趋势, 提示上述细胞均由卵圆细胞分化而来。②卵圆细胞在形态上与过渡细胞、小肝细胞、嗜碱性细胞、胆管上皮细胞有过渡。③在所诱发的 5 例大鼠肝癌中, 除 1 例为肝细胞肝癌外均为混合细胞癌, 提示肝细胞癌和胆管上皮癌均来源于卵圆细胞。另外, 早在诱癌第 4 周的大鼠肝切片内, 我们便可见到少量卵圆细胞表现为 AFP 阳性和 p21^{ras} 阳性; 诱癌中期, 这种阳性细胞由少到多, 数量有所增加。这种现象, 一方面反映卵圆细胞可表明某些肝细胞的标

志物(如 AFP); 另一方面, 卵圆细胞在诱癌早期即有 ras 基因表达产物的检出(p21^{ras} 阳性), 表明卵圆细胞在动物受致癌物作用后的增生可能是由于某种(些)癌基因被激活而引起。在致癌过程中出现的 p21^{ras} 表达阳性的卵圆细胞, 可能是癌变的始动细胞, 而以后 p21^{ras} 阳性细胞多为小肝细胞和嗜碱性细胞, 推测这些细胞可能来自卵圆细胞。持续表达 p21^{ras} 的小肝细胞为癌前细胞, 这些细胞在癌基因及其产物的作用下持续存在并不断增生, 最后经不典型增生转变为癌。

(本文图见插页 1 背面)

参 考 文 献

- 1 Nakao K. c-Ha-ras down regulates the α -fetoprotein gene but not the albumin gene in human hepatoma cells. *Mol Cellular Biol*, 1990, 10(4): 1461
- 2 Seel S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res*, 1990, 50(13): 3811
- 3 Steinberg P, Steinbrencher R, Radaeva S, *et al*. Oval cell O/C/CDE 22 give rise to cholangiocellular and undifferentiated carcinoma after transformation. *Lab Invest*, 1994, 71(5): 700
- 4 Factor V M, Radaeva S A, Thorgeirsson S S. Origin and fate of oval cell in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol*, 1994, 145(2): 409
- 5 He X Y, Smith G J, Enno A, *et al*. Short-term diethylnitrosamine induced oval cell responses in three strain of mice. *Pathol*, 1994, 26(2): 154
- 6 Factor V M, Radaeva S A. Oval cells-hepacytes relationships in dipin-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Exp Toxicol Pathol*, 1993, 45(4): 239
- 7 Tsao M S, Grisham J M. Hepatocarcinomas cholangiocarcinomas and hepatoblastomas produced by chemically transformed culture rat liver epithelia cells. *Am J Pathol*, 1987, 127(1): 168
- 8 张曼聪, 徐元鼎. 大鼠肝组织中卵圆细胞移植裸鼠后的形态观察. *上海医科大学学报*, 1992, 19(3): 183
- 9 徐元鼎, 应越英, 吴爱娟. 肝癌癌变机理的实验病理研究. *肿瘤*, 1982, 2(1): 1

(1998-01-04 收稿 1998-09-30 修回)