

化学诱导性大鼠肝癌形成过程中 β -catenin表达的实验研究

陈海军¹, 孙梓程¹, 刘岩¹, 由广玉², 胡嘉航³

1. 牡丹江市第一人民医院普外科, 黑龙江 牡丹江 157001;
2. 牡丹江市第一人民医院病理科, 黑龙江 牡丹江 157001;
3. 牡丹江市红旗医院影像科, 黑龙江 牡丹江 157001

[摘要] **背景与目的:** 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的消化系统恶性肿瘤, 其病死率较高, 对HCC发生、发展及其机制的研究及治疗途径的探索是当前HCC研究的首要问题。本研究通过检测SD大鼠化学诱导HCC过程中 β -catenin的表达, 旨在探讨其与HCC发生、发展的关系。**方法:** 采用复合化学诱导法诱发48只SD雄性大鼠HCC, 对照组为48只SD雄性大鼠。观察大鼠生长状态, 每隔3周随机处死6只大鼠, 观察肝脏变化情况, 取材行HE染色观察形态学改变, 并采用免疫组化和蛋白印迹(Western blot法)检测 β -catenin蛋白的表达情况。**结果:** 复合化学法诱导21周后, 能成功诱发大鼠HCC, 免疫组化观察自第3周起大鼠肝组织中 β -catenin蛋白的表达(0.27 ± 0.01)高于正常对照组(0.21 ± 0.02), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 随着化学诱导时间的增加, β -catenin蛋白的表达量呈上升趋势, 在第18周(0.30 ± 0.02)和21周(0.32 ± 0.02)时诱癌组 β -catenin的表达明显增高, 与前面各时间段取材组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), Western blot法结果与免疫组化结果一致。**结论:** 在正常肝脏组织、肝硬化、肝癌的动态病变过程中 β -catenin蛋白表达均不相同, 表明 β -catenin与HCC的发生、发展有密切关系, 其可能参与HCC基因的激活。

[关键词] 肝癌细胞; 肝细胞癌模型; β -catenin

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.04.010

中图分类号: R73-3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)04-0300-05

The experimental study on the expression of beta-catenin in the process of rats liver cancer formation chemically CHEN Haijun¹, SUN Zicheng¹, LIU Yan¹, YOU Guangyu², HU Jiahang³ (1. Department of General Surgery, First People's Hospital of Mudanjiang, Mudanjiang Heilongjiang 157001, China; 2. Department of Pathology, First People's Hospital of Mu danjiang, Mudanjiang Heilongjiang 157001, China; 3. Department of Imaging, Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical, Mudanjiang Heilongjiang 157001, China)

Correspondence to: CHEN Haijun E-mail: 417652161@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common malignant tumor of the digestive system in our country, with high fatality, development of HCC and the machine system research and treatment is a primary issue in current study of HCC. To explore the expression of β -catenin at different stages in the process of hepatocellular carcinoma carcinogenesis for SD rats induced by chemicals. **Methods:** The experimental group included 48 male SD rats mice with primary liver cancer induced by diethylnirtosamine/carbon tetrachloride/Ethanol, while 48 normal male SD rats mice were used as the control group. The rats were killed every 3 weeks to collect the specimens and observe the pathological changes by HE staining. The changes of β -catenin protein expressions were detected by immunohistochemistry and Western blot respectively. **Results:** SD rats liver cancer was confirmed by HE staining after 21 weeks DEN/CCl4/Ethanol induction. Immunohistochemistry showed that β -catenin expression level was obviously higher in the experimental group(0.27 ± 0.01) than that of the control group(0.21 ± 0.02) after 3 weeks induction($P < 0.05$). As time progresses, the expression levels of β -catenin kept on rising, and at the 18th(0.30 ± 0.02) and 21th weeks(0.32 ± 0.02), it was significantly higher than that of the earlier liver tissues of the experimental group($P < 0.05$), Western blot consistent with immunohistochemical results. **Conclusion:** β -catenin protein expression is

different in the normal liver tissue, cirrhosis, liver cancer, β -catenin and the occurrence of liver carcinoma development had close relationship. β -catenin protein in the cell with further accumulation, may active a series of target gene, leading to the formation of liver cancer.

[**Key words**] Liver cancer; Liver cancer model; β -catenin

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)目前已经成为第三大常见肿瘤,其高发病率、高死亡率一直是肿瘤研究的重点^[1]。研究已证实HCC的发生是由多种因素、多种基因和多步骤共同作用的结果。在肿瘤分化增殖的分子机制中,Wnt/ β -catenin通路具有重要的生物学意义, β -catenin是Wnt信号通路的关键调控点。目前研究比较清楚的转录因子如淋巴样增强因子(LEF)/T细胞因子(TCF)能与进入细胞核的 β -catenin结合,并与其他转录因子共同作用解除LEF/TCF的被抑制状态并能激活下游靶基因的转录^[2]。大量研究证实化学联合诱导大鼠HCC模型与人体HCC发生、发展过程比较类似,经历了从肝脏炎性改变、肝脏纤维化、肝细胞不典型增生直至癌变的病理过程,因而化学联合诱导大鼠肝癌模型对于开展人体HCC研究有着重要的意义^[3]。本研究采用复合化学法诱导大鼠HCC模型,对 β -catenin在大鼠HCC形成过程中的蛋白表达进行检测,分析其与HCC发生、发展的关系,为HCC的临床诊治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料

化学诱导用四氯化碳(CCl₄)和乙醇购自天津化学试剂研究所,二乙基亚硝胺(DEN)购自美国Sigma公司,全蛋白提取试剂盒和BCA蛋白定量试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、SDS蛋白上样缓冲液购自北京康为世纪生物科技有限公司,ECL发光试剂盒购自美国Thermo公司,兔抗大鼠 β -catenin、内参GADPH抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,羊抗兔二抗SP免疫组化试剂盒和DAB显色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 大鼠HCC模型的建立及分组、取材

SPF级Wistar大鼠,96只,雄性,6~8周龄,体质量180~220 g,购自宁夏医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(宁)2005-0001。自由饮食和饮水,室温(26±1)℃,湿度50%~55%,适应环境1周后开始实验。全部大鼠随机分为化学诱癌组(48只)及对照组(48只)。化学诱癌组大鼠按每公斤体质量100 mg DEN一次性腹腔注射,3 d后开始给予CCl₄与橄榄油混合液(体积比1:4)腹部皮下注射,5 μ L/g,每周3次,同时自由饮用8%乙醇水溶液。正常对照组大鼠不做任何处理,自由饮食及普通水。大体观察大鼠的精神食欲状态改变、背毛及体质量改变等。于实验开始后的第3、6、9、12、15、18和21周,分别从化学诱癌组及对照组随机各抽取6只大鼠,开腹观察肝脏大体形态及质地、颜色并取材进行后续实验。

1.3 组织病理学观察

分别取化学诱癌组及对照组各时间点肝组织,4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色,镜下观察肝组织病理形态变化。

1.4 免疫组织化学检测 β -catenin表达

石蜡切片常规脱蜡复水,抗原修复,山羊血清封闭,滴加1:200稀释兔抗大鼠 β -catenin抗体,阴性对照一抗用PBS取代,4℃冰箱过夜温育一抗,次日用PBS冲洗,加入生物素标记山羊抗兔二抗温育20 min,PBS冲洗后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素温育20 min,PBS冲洗DAB显色,苏木精复染,阳性细胞显色为棕色或棕黄色,阳性颗粒定位于细胞胞核及胞质。利用Image-Pro Plus (IPP)图像分析软件,每张切片显微镜下随机选择3个高倍视野(\times 400),测量其平均光密度(积分光密度/面积),对染色程度进行半定量分析。

1.5 蛋白印迹(Western blot法)检测蛋白表达

活体取材肝组织, 经蛋白提取、定量后将各组大鼠肝组织匀浆稀释成 $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度, 加上样缓冲液混匀煮沸 5 min。上样, SDS-PAGE 胶电泳, 切取目的蛋白胶条, 转至 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭, 分别加兔抗大鼠 β -catenin 抗体 (1:400) 及兔抗大鼠 GAPDH 抗体 (1:400) 4 °C 冰箱过夜温育, TPBS 洗膜, 分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:5000) 室温温育 60 min 后, TPBS 充分洗膜, ECL 发光, 暗室胶片曝光。每组实验均重复 3 次, 采用 Quantity One 凝胶成像分析软件, 拍摄蛋白电泳条带, 分析并记录其相对光密度值 (即 β -catenin/GAPDH 光密度值)。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。统计结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析进行组间比较并行方差齐性检验和正态性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般状态及肝脏病理形态学改变

48 只化学诱导组大鼠在第 3 周时出现食欲减退、背毛粗糙、反应减慢, 并逐渐加重, 在第 9、19 和 21 周时分别死亡 1、2 和 2 只, 对照组 48 只正常无死亡, 总死亡率为 5.2% (5/96)。化学诱

癌组大鼠在诱癌 6 周时肝脏肿大, 质地略硬, 15 周时取材时肉眼可见肝脏表面出现硬化结节, 灰白色, 数量不等, 大小为 2~4 mm; 18 周时肝脏表面结节明显增大, 直径在 5~20 mm 不等, 与周围组织分界不清。对照组小鼠肝脏大体观察未见异常。HE 染色观察正常对照组肝组织结构未见异常, 具有典型的肝小叶结构, 肝细胞围绕小叶中央静脉呈放射状条索样排列, 肝细胞无肿胀、变性, 细胞核未见异常分裂相, 核浆比例正常 (图 1A); 化学诱癌组小鼠在第 3~9 周肝脏病理表现为充血水肿, 可见部分肝细胞变性坏死及增生, 白细胞浸润 (图 1B~E); 第 15 周以后可见肝小叶结构明显破坏, 肝细胞出现不典型增生结节, 异型性明显, 纤维组织增生, 部分肝细胞可见重度不典型增生改变 (图 1F~G); 21 周时可见肝细胞癌变, 癌细胞异型性明显, 核大深染, 核质比例增大, 并可见瘤巨细胞和病理性核分裂相 (图 1H)。

2.2 肝组织 β -catenin 的表达

2.2.1 免疫组织化学法检测结果

对照组大鼠肝组织 β -catenin 表达可见阳性细胞呈棕黄色染色, 阳性颗粒定位于细胞膜及细胞质上, 细胞核未见明显表达 (图 2A); 诱癌组自第 3 周起可见肝组织细胞核 β -catenin 表达增加, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 细胞膜及细胞质表达同对照组 (图

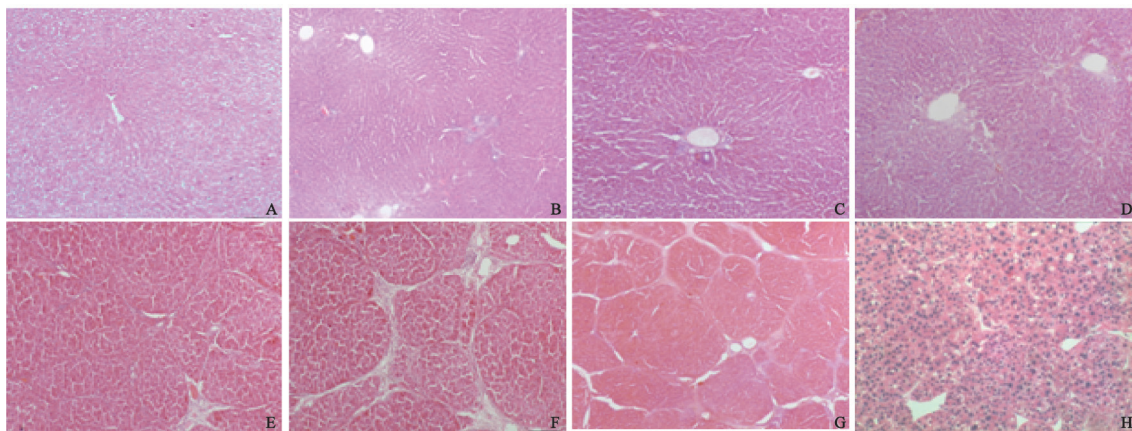


图 1 HE 染色观察化学性诱导 HCC 过程中肝组织结构变化

Fig. 1 HE staining observed liver tissue structure during chemically induced liver cancer

A: The normal liver tissue (HE, $\times 100$); B-E: The liver tissue at the 3rd week after induction, showed swollen and degeneration and necrosis and hyperplasia (HE, $\times 100$); F-G: The liver tissue at the 15th week after induction, showed atypical hyperplasia and cell derangement and structure disorder, fibrosis and pseudolobule proliferation (HE, $\times 100$); H: The liver tissue at the 21th week after induction, showed liver carcinogenesis, well differentiation and pathological mitotic visible (HE, $\times 200$).

2B); 诱癌组第6~15周组间细胞核β-catenin表达差异无统计学意义(图2C-F); 诱癌组18周组大鼠HCC组织可见胞核和细胞浆β-catenin大量表达, 明显高于诱癌组第15周($P<0.05$, 图2G); 诱癌组21周组大鼠HCC组织出现明显的β-catenin胞核表达, 较诱癌组第18周表达增多($P<0.05$), 胞质无明显变化($P>0.05$, 图2H)。

2.2.2 Western blot法检测结果

与正常对照组比较, 化学诱癌组从第3周起肝组织β-catenin蛋白的表达明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$); 从第6~15周组间差异无统计学意义($P>0.05$); 随着诱癌时间的推移, 诱癌组第18周的表达明显高于诱癌组第15周($P<0.05$), 而诱癌组第21周的表达明显高于诱癌组第18周($P<0.05$, 图3)。

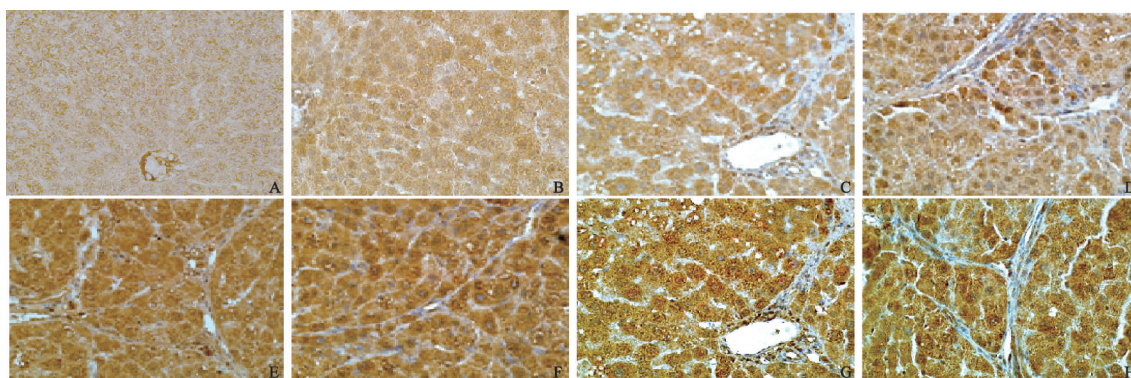


图2 免疫组化观察β-catenin在化学性诱导HCC过程中的表达(SP, ×400)

Fig. 2 Expressions of β-catenin protein in liver tissues during chemically induced liver cancer by Immunohistochemistry

A: The expression of β-catenin in the normal liver tissues; B-H: The expression of β-catenin in induced cancer group during chemically induced HCC at the 3th, 6th, 9th, 12th, 15th, 18th, 21th week.

3 讨论

β-catenin由位于染色体3p21~22的Ctnn1编码, 是构成细胞骨架蛋白之一, 其一级结构主要包括N末端, 中间连接臂重复序列, C末端这3个重要的功能性区域, 它参与多种细胞的增殖、分化、运动、衰老及形态发生^[4-8]。β-catenin的N端有β-catenin的结合位点和糖原合酶激酶(GSK-3β)磷酸化位点, arm重复序列主要与多种配体结合发生相互作用, 如T细胞因子(TCF)/淋巴增强子因子(LEF)、结肠腺瘤性息肉病基因蛋白(APC), 钙粘蛋白(cadherin, cad),

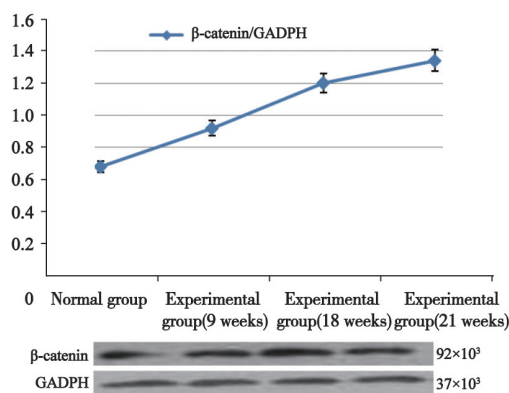


图3 Western blot法检测β-catenin在大鼠化学性诱导HCC过程中的表达

Fig. 3 Western blot assay on β-catenin expressions in rats tissues during chemically induced HCC

A: The expression of β-catenin in the normal liver tissues; B-D: The expression of β-catenin in induced cancer group during chemically induced liver cancer at the 9th, 18th, 21th week.

轴蛋白(axin)等, C端则是与arm区域共同参与TCF/LEF活化必不可少的区域^[9-14]。有研究表明β-catenin表达水平与胃癌的T分期及淋巴结浸润有关^[15], 参与肝脏肿瘤发生、发展的多个环节, 如调节炎症递质、肝细胞再生和HCC基因的启动等方面^[16-17]。β-catenin也是Wnt/β-catenin信号通路中重要的成员, β-catenin的过表达提示其在原发性HCC的发生、发展过程中起着促癌的作用^[18], 参与调控肿瘤干细胞自我更新及增殖, 并且β-catenin作用靶点可能是HCC早期诊断和治疗的关键^[19]。

本实验通过免疫组化和Western blot法观察发现β-catenin蛋白在肝细胞膜、胞质和细胞核中

的分布在HCC发展的各个过程中均不相同。诱癌组第3周起细胞核内 β -catenin 有表达, 细胞质内的表达也较正常对照组多, 诱癌组第6~15周组间细胞核 β -catenin 表达基本稳定, 但随着诱癌时间的进一步增长, 细胞核内 β -catenin 表达明显升高。 β -catenin 表达的动态变化与这段时期肝脏病理变化有高度的一致性, 自第3周细胞核内 β -catenin 有表达起, 肝脏病理主要表现为局部肝细胞变性坏死和组织充血, 部分肝细胞出现增生性改变、轻度的肝细胞非典型增生, 间质中有纤维组织增生, 该结果表明 β -catenin 的表达在肝细胞炎性反应初期和增生阶段就已经被激活, 随着诱癌时间的进一步增长, 到诱癌18周时发现细胞核内 β -catenin 表达明显升高, 而此时肝脏病理表现为肝细胞的重度不典型增生, 可见肝细胞癌变, 癌细胞异型性明显, 核大深染, 核质比例增大, 并可见瘤巨细胞和病理性核分裂相, 这表明高表达的 β -catenin 参与激活的炎性反应环境可能与HCC的形成有关。

Wnt/ β -catenin 信号通路的下游靶基因如原癌基因 *c-myc*、细胞周期蛋白 D1 和金属蛋白酶等在肿瘤的发生和转移中起重要作用, 而 β -catenin 与这些基因之间构成了一个错综复杂的网络, 我们只有进一步深入探讨和研究这一通路及其对肿瘤干细胞的调节作用, 才能更有利于今后在临床工作中指导HCC的早期诊断和治疗。

[参 考 文 献]

- [1] EL-SERAG H B, RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (7): 2557-2576.
- [2] LIU F, VAN DEN BROEK O, DESEREE O, et al. Distinct roles for *Xenopus Tcf/Lef* genes in mediating specific responses to Wnt/ β -catenin signalling in mesoderm development [J]. *Development*, 2005, 132 (24): 5375-5385.
- [3] 匡志鹏, 谢裕安, 杨帆, 等. C57BL/6J 小鼠肝癌动物模型的建立 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(7): 657-660.
- [4] KOHIER E M, CHANDRA S H, BEHRENS J, et al. Beta-catenin degradation mediated by the CID domain of APC provides a model for the selection of APC mutations in colorectal, desmoid and duodenal tumours [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(2): 213-226.
- [5] LEE W, SWARUP S, CHEN J, et al. Homeodomain-interacting protein kinases(Hipks) promote Wnt/Wg signaling through stabilization of beta-catenin/Arm and stimulation of target gene expression [J]. *Development*, 2009, 136(2): 241-251.
- [6] WU Q, ZHU M, ROSIER R N, et al. Beta-catenin, cartilage and osteoarthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192(1): 344-350.
- [7] HWANG I, SEO E Y, HA H. Wnt/ β -catenin signaling: a novel target for therapeutic intervention of fibrotic kidney disease [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(12): 1653-1662.
- [8] STAAL F J, LUIS T C. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(5): 844-849.
- [9] DAUGHERTY R L, GOTTARDI C J. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions [J]. *Physiology(Bethesda)*, 2007, 22: 303-309.
- [10] MO R, CHEW T L, MAHER M T, et al. The terminal region of beta-catenin promotes stability by shielding the Armadillo repeats from the axin-scaffold destruction complex [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(41): 28222-28231.
- [11] JAMAL B T, NITA-LAZAR M, GAO Z, et al. N-glycosylation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct beta-catenin and gamma-catenin-containing AJs [J]. *Cell Health Cytoskeleton*, 2009, 2009(1): 67-80.
- [12] ZENG Y A, RAHNAMA M, WANG S, et al. Inhibition of Drosophila Wg signaling involves competition between Mad and Armadillo/ β -catenin for dTcf binding [J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3893.
- [13] MACDONALD B T, TAMAI K, HE X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [14] HUANG H, HE X. Wnt/ β -catenin signaling: new(and old) players and new insights [J]. *Cur Opin Cell Biol*, 2008, 20(2): 119-125.
- [15] 张燕平, 李宁, 邓文英, 等. 干细胞标志物SOX-2、 β -catenin表达与胃癌术后复发转移关系 [J]. *中国癌症杂志*, 2014, 24(9): 684-689.
- [16] RAJAE D, PIERRE-ALEXANDRE J, CHRISTINE P. The Wnt/ β -catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011, 35: 709-713.
- [17] KARI N N, SATDARSHAN P S M. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: Sorting the good from the bad [J]. *Sem Cancer Biol*, 2011, 21: 44-58.
- [18] 王敏, 谭小军, 朴金松, 等. β -catenin 在肝癌中的表达和意义 [J]. *四川医学*, 2013, 34(6): 743-745.
- [19] REYA T, CLEVERS H. Wnt signalling in stem cells and cancer [J]. *Nature*, 2005, 434: 843-850.

(收稿日期: 2014-07-09 修回日期: 2014-11-14)