

胰腺癌大鼠 RAD51 和 MAX 的表达

杨乐平, 谭兴国, 杨竹林, 李清龙, 苗雄鹰

(中南大学湘雅二医院肝胆疾病研究室, 长沙 410011)

[摘要] 目的:研究 SD 大鼠胰腺癌和非癌胰腺组织中 DNA 双链断裂修复蛋白(RAD51)和 C-Myc 相关因子 X(MAX)表达水平及其意义。方法:将 90 只 SD 大鼠随机分为模型组、干预组和对照组,将二甲苯并蒽(DMBA)直接置入胰腺实质内(模型组+干预组),干预组每周腹腔注射曲古霉素 A(TSA) 1 μg ,模型组和干预组于第 3~5 个月处死,对照组于第 5 个月处死;肉眼检查和镜下观察胰腺癌发生情况;RAD51 和 MAX 染色方法均为 EnVisionTM 免疫组织化学法。结果:模型组 3~5 个月癌发生率为 48.7% (18/37),其中 17 例为胰腺导管腺癌,1 例为纤维肉瘤;干预组 3~5 个月癌发生率为 33.3% (12/36),其中 11 例为胰腺导管腺癌,1 例为纤维肉瘤;模型组肿块最大径均值大于干预组 ($P < 0.05$);对照组胰腺和模型组、干预组 2 组胰腺外肝、胆、胃、肠、肾及肺等主要脏器均无明显病理改变。模型组+干预组及模型组或干预组胰腺导管腺癌 RAD51 表达阳性率明显高于其相应组别的非癌胰腺组织 ($P < 0.01$);但 MAX 表达阳性率则相反 ($P < 0.01$);RAD51 阳性表达和(或)MAX 阴性表达的非癌胰腺组织导管上皮均呈不典型增生;对照组胰腺 RAD51 均阴性表达而 MAX 均阳性表达,2 例纤维肉瘤 RAD51 和 MAX 均阴性表达;RAD51 和 MAX 表达水平与胰腺导管癌分化程度和肿块大小均无明显关系 ($P > 0.05$)。结论:较大剂量 DMBA 置入胰实质内可在短期获得较高胰腺癌发生率,TSA 能抑制胰腺癌的发生和生长;RAD51 过表达和(或)MAX 失表达可能在 DMBA 诱导胰腺癌发生发展过程中起重要作用。

[关键词] 胰腺肿瘤; Sprague-Dawley 大鼠; 动物模型; DNA 双链断裂修复蛋白; C-Myc 相关因子 X

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.02.010

Expression of RAD51 and MAX in pancreatic cancer rats

YANG Leping, TAN Xingguo, YANG Zhulin, LI Qinglong, MIAO Xiongying

(Research Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Second Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To establish a model of pancreatic cancer induced by 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) in SD rats, and to detect the expression levels of RAD51 and Myc-associated factor X (MAX) and their effect on carcinogenesis of rat pancreas. **Methods** Ninety SD rats were randomly divided into 3 groups: a model group, an intervention group, and a control group. DMBA was directly implanted into the parenchyma of rat pancreas (the model group and the intervention group). Rats in the intervention group were treated with 1 mL trichostatin A (TSA) saline solution (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) via ip weekly. Rats within 3~5 months in the model group and the intervention

收稿日期 (Date of reception) 2009-04-14

作者简介 (Biography) 杨乐平, 博士, 副教授, 主要从事肝胆胰外科疾病的基础与临床研究。

通信作者 (Corresponding author) 杨竹林, E-mail: yangzhulin8@sina.com

group were executed and observed by macrograph and under microscope. Meanwhile, the rats in the control group were executed at 5th month. The EnVisionTM immunohistochemistry to assay the expression levels of RAD51 and MAX was used in conventional paraffin-embedded sections from the above pancreatic specimens. **Results** The incidence of pancreatic cancer in the model group within 3 – 5 months was 48.7% (18/37), including 17 ductal adenocarcinomas and 1 fibrosarcoma. The incidence of pancreatic cancer in the intervention group within 3 – 5 months was 33.3% (12/36), including 11 ductal adenocarcinomas and 1 fibrosarcoma. The maximal diameter of mass in the model group was significantly higher than that in the intervention group ($P < 0.05$). No pathological changes were found in pancreas of the control group and other extra-pancreatic main organs of the model group and the intervention group (such as the liver, biliary tract, gastrointestinal tract, kidney, and lung). The positive rate of RAD51 was significantly higher in ductal adenocarcinoma in the model group, the intervention group, and the model group + the intervention group than those in corresponding groups of non-cancerous pancreatic tissues ($P < 0.01$), but the positive rate of MAX expression was opposite to RAD51 expression ($P < 0.01$). The positive tissues of RAD51 expression and/or negative tissues of MAX expression in non-cancerous tissues showed atypical-hyperplasia of ductal epitheli. Pancreas of the control group showed the negative expression of RAD51 and positive expression of MAX. Two cases of fibrosarcoma showed the negative expression of RAD51 and MAX. **Conclusion** DMBA directly implanted into the parenchyma of pancreas can obtain an ideal pancreatic cancer model with high incidence in a short time. The TSA might have an inhibitive effect on carcinogenesis and growth of rat pancreas. The over-expression of RAD51 and/or lose-expression might have important effect on carcinogenesis induced DMBA in rat pancreas.

Key words: pancreatic neoplasm; Sprague-Dawely rat; animal model; RAD51; Myc-associated factor X

DNA 双链断裂修复蛋白 RAD51 是一种高度保守的主要在同源重组中发挥作用的 DNA 修复蛋白。RAD51 表达能增强细胞对放疗和化疗药物的抵抗力;恶性肿瘤 RAD51 表达水平明显高于正常组织及其良性病变,且与恶性肿瘤发生、发展、生物学行为和预后密切相关^[1-6]。近年研究^[7-10]表明: *Myc* 基因家族蛋白及其相关蛋白 (Myc-associated factor X, MAX) 组成网络来调控细胞周期,当这些调控因子发生异常时将导致细胞增殖分化失控而形成肿瘤。一些研究^[11-14]显示:多数恶性肿瘤 *Myc* 过表达,而 MAX 失表达。国内外尚未见大鼠胰腺癌及非癌胰腺组织 RAD51 和 MAX 表达的文献报道。笔者应用 7,12 二甲基苯并蒽 (7,12-dimethylbenzanthracene, DMBA) 直接置入 SD 大鼠胰腺实质内建立胰腺癌模型,应用曲古霉素

A (trichostatin, TSA) 腹腔注射设立干预组,在此基础上应用 EnVisionTM 免疫组织化学法研究 SD 大鼠胰腺癌和非癌胰腺组织中 RAD51 和 MAX 表达水平,探讨两者在 DMBA 诱导胰腺癌发生过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与动物

兔抗大鼠 RAD51 和 MAX 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, EnVisionTM 染色试剂盒购自上海基因技术有限公司。实验动物为湘雅二医院实验动物中心普通环境中喂养的 90 只 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 150 ~ 200 (163.0 ± 23.6) g。

1.2 动物模型

SD 大鼠随机分成 3 组:胰腺癌模型组 40 只,

TSA 干预组(干预组)40只和对照组10只。术前禁食24 h,不禁水,2%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉,经上腹正中切口(2 cm)进腹,暴露胰腺后于体尾部切开胰腺被膜及部分胰实质(深1 mm)。模型组和干预组置入9 mg DMBA,缝合胰腺被膜,关腹后在普通环境中喂养。干预组术后腹腔注射1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TSA 1 mL,每周1次。除自然死亡外,分别于第3,4,5月随机处死模型组(7,10和20只)和干预组(6,10和20只)大鼠。对照组除未置入DMBA外,余同模型组,第5月处死。

1.3 肉眼及组织病理形态观察

处死鼠肉眼观察胰腺及肝、胆囊、胆总管、胃、肠、肺、肾等主要脏器的病理改变,然后取全胰腺组织及部分肝、胆囊、胆总管、胃、肠、肺、肾组织置入4%甲醛固定16~18 h,常规制作石蜡包埋切片,HE染色后光镜下观察各脏器病理组织学变化。

1.4 免疫组织化学染色

RAD51和MAX染色方法均为EnVision™二步法,主要染色步骤如下:切片脱蜡至水;3% H_2O_2 甲醇浸泡10 min,流水冲洗5 min;0.05%胰酶消化20 min,流水冲洗3 min,蒸馏水洗2 min,0.01 mol/L PBS(pH7.4)洗3 min \times 2次;滴加一抗37 $^\circ\text{C}$ 孵育60 min,0.01 mol/L PBS洗3 min \times 3次;滴加A液37 $^\circ\text{C}$ 孵育30 min,0.01 mol/L PBS洗3 min \times 3次;显色液显色15 min(显色液配制:1 mL B液加20 μL C液,混匀后即用),流水冲洗;苏木素染色1 min,自来水冲洗返蓝15 min;脱水,透明,中性树胶封固。细胞浆内含棕黄色颗粒者为RAD51和MAX阳性表达细胞,随机观察切片中5个高倍视野内阳性细胞率,其均值 $\geq 25\%$ 为阳性病例, $< 25\%$ 者为阴性病例。以北京中杉金桥生物技术公司提供的阳性切片作为阳性对照,以0.01 mol/L PBS液(pH7.4)替代一抗作为阴性对照。

1.5 统计学处理

将所得数据输入SPSS 13.0统计软件包中行 χ^2 检验、秩和检验及Fisher's精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察

模型组有2只大鼠在术后1月内死亡,1只在术后2月内死亡;干预组有3只大鼠在术后1月死亡,1只在术后2月内死亡。这些死亡鼠不列入统计,故模型组为37只大鼠,干预组为36只大鼠。术后3~5月,模型组有18只胰腺形成肿块(18/37,48.7%),其中3个月有2只(2/7,28.6%),4个月4只(4/10,40.0%),5个月12只(12/20,60.0%),且1只发生肝转移;干预组大鼠有12只胰腺形成肿块(12/36,33.3%),3个月有1只(1/6,16.7%),4个月3只(3/10,30.0%)和5个月8只(8/20,40.0%)。模型组发病率高于干预组($P > 0.05$)。模型组肿块最大径7例为0.5~1.0 cm,10例为1.0~2.0 cm和1例 > 2.0 cm;干预组12例肿块中最大径9例为0.5~1.0 cm,2例为1.0~2.0 cm和1例 > 2.0 cm,模型组肿块最大径明显高于干预组($P < 0.05$)。对照组胰腺及3组肝、胆囊、胆总管、胃、十二指肠、肺及肾等主要脏器均未见肿块及肉眼病理学改变。

2.2 病理组织学观察

对照组胰腺HE染色后镜下表现为正常胰腺组织结构(图1)。模型组18例胰腺肿瘤中17例为胰腺导管癌,1例为胰腺纤维肉瘤,其中胰腺导管癌中高分化6例、中分化7例、低分化4例(图2,3)。干预组12例胰腺肿瘤中11例为胰腺导管癌,1例为胰腺纤维肉瘤,其中胰腺导管癌中高分化6例、中分化4例、低分化1例(图4)。模型组和干预组纤维肉瘤分别发生肝转移和网膜脂肪组织转移。模型组和干预组未形成胰腺肿块大鼠及形成肿块大鼠癌旁胰腺组织导管上皮及小叶间导管上皮呈增生及不典型增生等病理组织学改变,其中模型组非癌胰腺中导管上皮轻度不典型增生5例(5/19,26.3%)、中至重度不典型增生10例(10/19,52.6%,图5),干预组非癌胰腺组织导管上皮轻度不典型增生10例(10/24,41.6%)、中至重度不典型增生8例(8/24,33.3%,图6),2组差异无统计学意义($P >$

0.05)。模型组和干预组胰腺外主要脏器及对照组胰腺均未见明显镜下病理学改变。

2.3 RAD51 和 MAX 在胰腺癌和非癌胰腺组织中表达情况

RAD51 和 MAX 免疫组织化学反应阳性产物定位于细胞质,偶见细胞核着色(图 7,8)。模型组 + 干预组和模型组或干预组胰腺导管腺癌 RAD51 表达阳性率明显地高于其相应组别的非癌胰腺组织 ($P < 0.01$);但 MAX 表达阳性率则相反 ($P < 0.01$, 表 1);RAD51 表达阳性和(或)MAX 表达阴性的非癌胰腺组织导管上皮均呈不典型增生;对照组胰腺 RAD51 表达均阴性而 MAX 表达均阳性;2 例纤维肉瘤 RAD51 和 MAX 表达均阴性。RAD51 和 MAX 表达与胰腺导管癌分化程度及肿块大小均无明显关系 ($P > 0.05$)。

表 1 RAD51 和 MAX 在胰腺导管癌和非癌胰腺组织中的表达情况

Tab. 1 Expressions of RAD51 and MAX in pancreatic ductal adenocarcinoma and non-cancerous pancreatic tissues

组别	例数	RAD51 阳性数/%	MAX 阳性数/%
胰腺导管癌			
模型组 + 干预组	28	19(67.9)	9(32.1)
模型组	17	12(70.6)	5(29.4)
干预组	11	7(63.6)	4(36.4)
非癌胰腺组织			
模型组 + 干预组	43	8(18.6)**	36(83.7)*
模型组	19	4(21.1)**	15(78.9)**
干预组	24	4(16.6)**	21(87.5)**

与相应组别比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

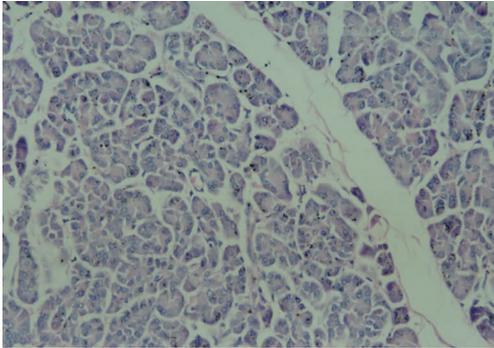


图 1 对照组正常胰腺组织(HE, ×200)。

Fig. 1 Normal pancreatic tissue in the control group (HE, ×200).

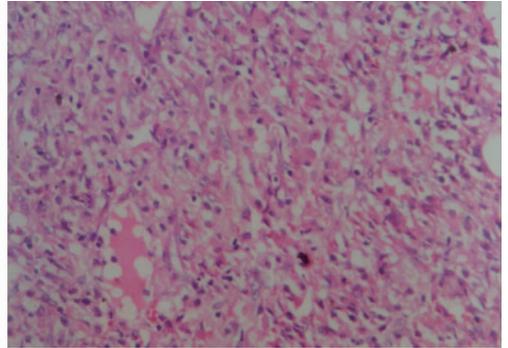


图 2 模型组低分化导管癌(HE, ×200)。

Fig. 2 Poorly-differentiated ductal adenocarcinoma in the model group(HE, ×200).

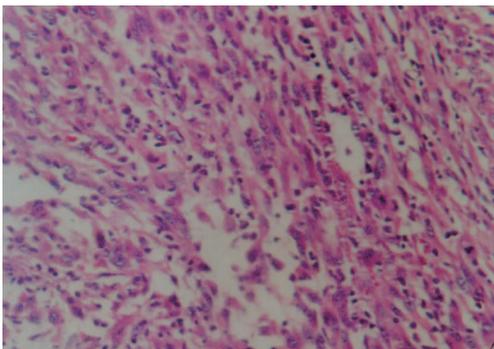


图 3 模型组纤维肉瘤(HE, ×200)。

Fig. 3 Fibroma sarcomatousum in the model group (HE, ×200).

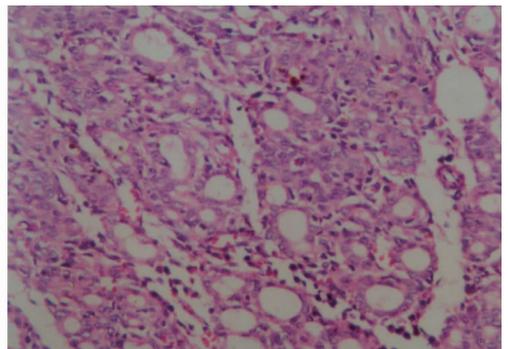


图 4 干预组高分化导管癌(HE, ×200)。

Fig. 4 Well-differentiated ductal adenocarcinoma in the intervention group(HE, ×200).

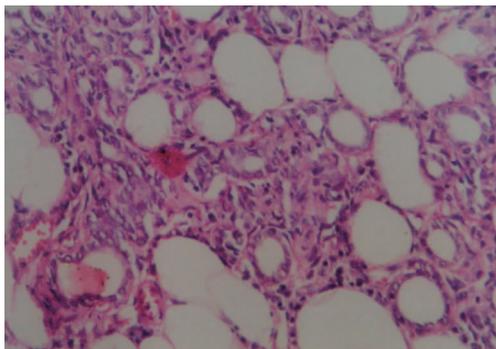


图5 模型组导管上皮重度不典型增生(HE, ×200)。

Fig. 5 Severely-atypical hyperplasia in ductual epithelia in the model group (HE, ×200).

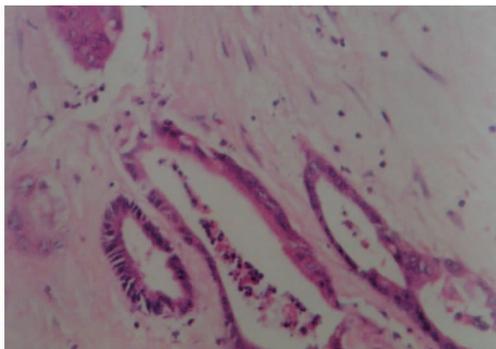


图6 干预组导管上皮中度不典型增生(HE, ×200)。

Fig. 6 Moderately-atypical hyperplasia in ductual epithelia in the intervention group (HE, ×200).

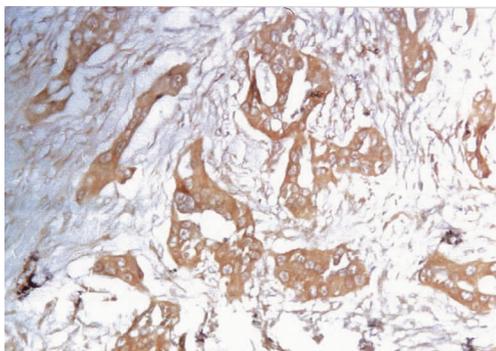


图7 模型组中分化腺癌 RAD51 阳性表达(EnVision™免疫组织化学法, ×200)。

Fig. 7 Positive expression of RAD51, of moderately-differentiated ductal adenocarcinoma in the model group (EnVision™ immunohistochemical method, ×200).

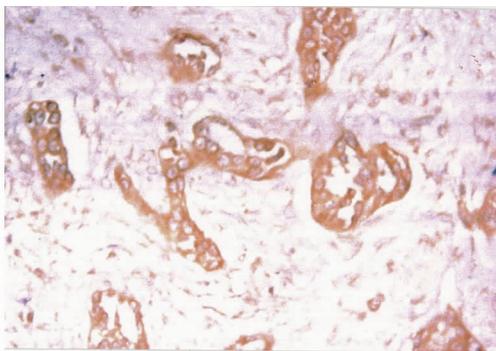


图8 干预组高分化腺癌 MAX 阳性表达(EnVision™免疫组织化学法, ×200)。

Fig. 8 Positive expression of MAX, well-differentiated ductal adenocarcinoma in the intervention group (EnVision™ immunohistochemical method, ×200).

3 讨 论

笔者在通用胰腺癌模型制作方法^[15-20]基础上应用 TSA 进行干预(干预组),建立了较理想的胰腺癌模型,具有以下优点:(1)成瘤周期短,致癌率高;(2)能在短期内观察到胰腺癌发生发展的病理过程;(3)组织学特征更接近人类胰腺导管癌;(4)胰腺外其他脏器均未有恶性肿瘤出现;(5)TSA 抑制胰腺癌生长作用较明显;(6)制作成本低廉。

RAD51 基因是细胞 DNA 修复系统中的重要一员,许多环境和体内因素都能导致 DNA 损伤,其中最严重的是 DNA 双链断裂。目前已知有重组修复和非同源末端连接 2 种机制参与 DNA 双链断裂的修复。同源配对是重组修复的关键步骤,而 RAD51 蛋白是催化同源配对的关键酶,它

通过介导链配对和链交换发挥作用。RAD51 通过修复可以保护细胞免受 DNA 损伤,其次它过度刺激同源重组和姐妹染色体的交换,导致基因不稳定和遗传差异。因此,RAD51 表达与肿瘤发生关系密切,尤与恶性肿瘤放化疗效果关系密切,高表达的恶性肿瘤可能更易对放疗抵抗和化疗耐药^[1-6,21]。一些研究^[1-6]表明:多数恶性肿瘤 RAD51 表达水平明显高于其来源的正常组织及其良性病变,且其表达水平与一些恶性肿瘤进展、生物学行为及预后密切相关,高表达者多预后不良和放化疗效果差。本组资料显示,模型组+干预组及模型组或干预组胰腺导管癌 RAD51 表达阳性率明显高于其相应组别非癌胰腺组织,RAD51 表达阳性的非癌胰腺组织导管上皮均呈不同程度的不典型增生,对照组胰腺和 2 例纤维肉瘤 RAD51 均阴性表达。结果提示,在 DMBA 诱导胰腺癌发生过程中 RAD51 可能有重

要作用,可能通过过度刺激同源重组和姐妹染色体的交换导致基因不稳定性,从而促进胰腺癌的形成。

Myc 基因家族蛋白 (C-Myc, N-Myc, I-Myc 等) 的表达与细胞增殖、凋亡及分化密切相关,其通过调节转录活性来促进细胞增殖和抑制细胞凋亡。近年研究^[7-10]发现:C-Myc 蛋白必须与同类转录因子 MAX 蛋白结合形成 C-Myc/MAX 异二聚体后才能作为反式作用因子与靶基因启动子顺式调控元件中的结合位点结合起作用。生理情况下,它作为第三信号介导细胞外信号向细胞核内转导,参与细胞增殖和凋亡的调控。这些作用的发挥是通过它调节细胞由 G₁ 期向 S 期作用完成的。因此,MAX 蛋白在 Myc 蛋白调节转录的网络中起中心作用。C-Myc/MAX 异二聚体激活增殖基因,引起细胞增殖。近年研究发现大多数肿瘤 C-Myc 呈过表达,且与恶性肿瘤进展、生物学行为及预后密切相关,但 MAX 在一些恶性肿瘤常失表达,其表达水平明显低于其来源的正常组织及良性病变,且与分化程度密切相关,高分化者阳性表达率明显高于低分化和未分化者。这可能与恶性肿瘤发生过程中 C-Myc 和 MAX 相互作用的平衡网络被破坏有关。本组资料显示,模型组 + 干预组及模型组或干预组胰腺导管腺癌 MAX 表达阳性率明显低于其相应组别的非癌胰腺组织,对照组胰腺 MAX 均阳性表达,2 例纤维肉瘤 MAX 均阴性表达。上述结果提示,在 DMBA 诱导胰腺癌发生过程中 MAX 通过 C-Myc/MAX 调节网络的作用具有抑制胰腺癌的发生,其确切机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Richardson C. RAD51, genomic stability, and tumorigenesis [J]. *Cancer Lett*, 2005, 218(1):127-139.
- [2] Klein H L. The consequences of Rad51 over-expression for normal and tumor cells [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2008, 7(5):686-693.
- [3] Bahassi E M, Ovesen J L, Riesenber A L, et al. The checkpoint kinase chk1 and chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad 51 in response to DNA damage [J]. *Oncogene*, 2008, 27(28):3977-3985.
- [4] Adimoolam S, Sirisawad W, Chen J, et al. HDAC inhibitor PC1-24781 decrease RAD51 expression and inhibits homologous recombination [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49):19484-19487.
- [5] Maacke H, Jost H, Opitz S, et al. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2000, 19(21):2791-2795.
- [6] Webb P M, Hopper J L, Newman B, et al. Double-strand break repair gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 2005, 14(2):319-323.
- [7] Kretzner L, Blackwood E M, Eisenman R N. Myc and max proteins possess distinct transcriptional activities [J]. *Nature*, 1992, 359(6394):426-429.
- [8] Mac Partlin M, Homer E, Robinson H, et al. Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with C-Myc and MAX [J]. *Oncogene*, 2003, 22(6):819-825.
- [9] Hurlin P J, Huang J. The MAX-interacting transcription factor network [J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(14):265-274.
- [10] Hurlin P J, Dezfouli S. Functions of Myc: max in the control of cell proliferation and tumorigenesis [J]. *Int Rev Cytol*, 2004, 238(2):183-226.
- [11] Smith A G, Popov N, Imreh M, et al. Expression and DNA-binding activity of MyCN/max and Mnt/max during induced differentiation of human neuroblastoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(6):1282-1295.
- [12] Hirvonen H E, Salonen R, Sandberg M M, et al. Differential expression of myc, max and RB1 genes in human gliomas and glioma cell lines [J]. *Br J Cancer*, 1994, 69(1):16-25.
- [13] Wagner A J, LeBeau M M, Diaz M O, et al. Expression, regulation, and chromosomal localization of the max gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(7):3111-3115.
- [14] Rivera J A, Graemeckock F, Werner J, et al. Rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma. Targeting chemical carcinogen [J]. *Surgery*, 1997, 122(1):82-90.
- [15] Bochaman D F, Guo J, Buchler P, et al. Origin and development of the precursor lesions in experimental pancreatic cancer in rat [J]. *Lab Invest*, 2003, 83(6):853-859.
- [16] Wendt L R, Osvalt A B, Bersch V P, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice effects of alcohol and caffeeino [J]. *Acta Cir Bras*, 2007, 22(3):202-209.
- [17] Kimura K, Satoh K, Kanno A, et al. Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(2):155-162.
- [18] 秦仁义, 爱德, 邹声泉, 等. 一种新型大鼠胰腺癌模型的制备 [J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(5):462-463.
QIN Renyi, AI De, ZOU Shengquan, et al. Development of a new rat model of pancreatic cancer [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2000, 17(5):462-463.
- [19] Monnert C. Histone deacetylase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2005, 40(1):1-13.
- [20] Maacke H, Hundertmark C, Miska S, et al. Autoantibodies in sear of pancreatic cancer patients identify recombination factor Rad 51 as a tumour-associated antigen [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(4):219-222.