

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.05.003

ras 癌基因诱导小鼠肝肿瘤发生及脂质代谢紊乱

武艳霞^{1,2},董建一¹,李慧玲¹,汤莉²,王爱国¹,王靖宇¹

Hepatic Tumor and Lipid Metabolism Disorder Induced by ras Oncogene

WU Yanxia^{1,2},DONG Jianyi¹,LI Huiling¹,TANG Li²,WANG Aiguo¹,WANG Jingyu¹

1. Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Medical College, Dalian University

Corresponding Author:WANG Jingyu, E-mail:wangjingyus@163.com; WANG Aiguo, E-mail:wangaiguotl@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the hepatic tumorigenesis and aberration of lipid metabolism induced by expression of H-ras12V in hepatocytes. **Methods** The liver tissue and serum samples of 6-8 month-age H-ras 12V transgenic mice were collected and the histopathological analysis for liver and serum examination for ALT, total cholesterol, and triglyceride levels were performed. **Results** 7-month H-ras12V transgenic mice developed hepatic tumor with 100% incidence. Histopathological and serum examination showed that in the liver, specially the hepatic tumor tissues of H-ras12V transgenic mice developed steatosis significantly compared with that in the wild type mice, and the serum levels of ALT and total cholesterol increased and triglyceride decreased significantly compared with those in the wild type mice. **Conclusion** Ras oncogene expressing specially in hepatocytes induces hepatic tumorigenesis, liver cell injury and steatosis, which influence the lipid metabolism of whole body.

Key words: ras oncogene; Hepatic tumor; Lipid metabolism

摘要:目的 探究 ras 癌基因在肝细胞中特异性表达对肝肿瘤发生及脂质代谢的影响。**方法** 采集 6~8 月龄 H-ras 12V 转基因雄鼠的肝组织和血清,分别进行肝组织病理学检测和血清 ALT、总胆固醇及甘油三酯水平的检测。**结果** 7 月龄雄性转基因小鼠 100% 发生了肝肿瘤。病理学和血清学检测表明,与野生型小鼠相比,转基因小鼠的肝脏,特别是肝肿瘤,发生了显著的脂肪变性;转基因小鼠的 ALT、总胆固醇水平显著升高,甘油三酯水平显著下降。**结论** ras 癌基因在肝细胞中的特异性表达诱导了肝肿瘤发生、肝细胞损伤和脂肪变性,并显著影响机体的脂质代谢。

关键词: ras 癌基因;肝癌;脂质代谢

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A

0 引言

原发性肝细胞癌(以下简称肝癌)占原发性肝癌的 90% 以上,号称“癌中之王”,而脂质沉积是早期肝癌的重要病理学特征。临床研究表明,直径在 2 cm 以下早期肝癌的脂质沉积发生率高达 40%^[1-2]。在无显著炎症和肝纤维化的病理性变化的肝癌患者,脂质沉积已成为诱导肝癌发生的独立性重要危险因素^[3]。因此,脂质代谢紊乱与肝癌发生密切相关。

Ras 信号转导通路在细胞信号转导系统中处于中枢地位,它调控细胞的生长、分化及生存、凋亡、物质代谢等重要生理功能^[4]。ras 原癌基因的突变或 Ras 信号通路(Ras/Erk)的激活是肝癌发生发展的必要途径^[5]。肝脏是人体物质代谢的枢纽,癌变的肝细胞会重新调整其物质代谢功能,以满足肝癌细胞不断分裂增殖的物质、能量和信息需求^[6-7]。其中脂质代谢失调在肿瘤发生过程中具有重要的作用,常表现为脂质合成增加,甚至发展为脂肪变性。本研究对 H-ras12V 转基因肝癌小鼠模型进行病理学和血清学检测,旨在为 ras 癌基因、肝肿瘤发生及脂质代谢紊乱之间的关联分子机制研究提供基础实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

7 月龄雄性 H-ras12V 转基因小鼠及 C57BL/6J

收稿日期:2012-04-03;修回日期:2012-08-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872950)

作者单位:1. 116044 辽宁大连,大连医科大学实验动物中心;2. 大连大学医学院

通信作者:王靖宇, E-mail: wangjingyus@163.com; 王爱国, E-mail: wangaiguotl@hotmail.com

作者简介:武艳霞(1986-),女,硕士在读,主要从事肝肿瘤发生的分子机制研究

野生型小鼠,由大连医科大学实验动物中心 SPF 级鼠场饲养。实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2008-0002;实验动物使用许可证号:SYXK(辽)2008-0002;动物合格证号:0001648。赖氏法谷丙转氨酶(ALT/GPT)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;甘油三脂(TG)测定试剂盒和总胆固醇(TCH)测定试剂盒购自浙江东瓯诊断产品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 血清和组织器官采集

眼球摘除法取血,血液凝固后离心获得血清,-80℃保存。小鼠肝脏等组织经 10%福尔马林固定,进行病理学检测。

1.2.2 HE 染色及病理学分析

小鼠肝脏等组织按常规石蜡制片法固定、洗涤、包埋、切片和 HE 染色,光学显微镜下进行组织和细胞的病理学检测。

1.2.3 血清生化指标的检测

赖氏法谷丙转氨酶(ALT/GPT)测定试剂盒检测血清 ALT 水平;酶偶联比色法 TG 测定试剂盒检测血清甘油三脂水平;酶偶联比色法 TCH 测定试剂盒检测血清总胆固醇水平。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件进行 *t* 检验。数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H-ras12V 转基因小鼠肝组织病理学检测

7 月龄 H-ras12V 转基因小鼠的肝脏呈现多发性肝肿瘤,展现出肝肿瘤的不同发展阶段,见图 1。肝区的病灶有不典型肝细胞聚集,胞质嗜碱性,胞核浓染。肝脏肿瘤损伤相对控制较好,肿瘤周围损伤的肝细胞成扁平状。肝细胞癌:(1)细胞体积大,典型的直径在 5 mm 以上;(2)肝肿瘤细胞呈小梁状生长排列;(3)含有高度未分化细胞并伴有坏死。没有发现肝纤维化和肝硬化的特征和其他器官的病理学改变。

2.2 H-ras12V 转基因小鼠发生肝细胞脂肪变性

对 6~8 月龄小鼠肝组织的病理学检测表明,野生型小鼠、H-ras12V 转基因小鼠及肝肿瘤组织的脂肪变性发生率分别为 15.2% (7/46)、46.3% (37/80)、100% (80/80),三者相互比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。其中肝肿瘤组织的脂肪变性尤为严重,见图 2。

2.3 H-ras12V 转基因肝癌小鼠血清谷丙转氨酶(ALT/GPT)、血清甘油三酯和总胆固醇测定

与野生型小鼠相比,转基因小鼠血清 ALT 水平显著高于野生型小鼠($P < 0.05$);转基因小鼠血清中的总胆固醇水平显著升高($P < 0.05$);甘油三

脂水平显著下降($P < 0.05$),见表 1。

表 1 H-ras 12V 转基因小鼠谷丙转氨酶、甘油三脂和总胆固醇血清学检测($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Serum level of ALT, triglyceride and total cholesterol ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Index	Wild type mice	Transgenic mice
ALT	13.65 ± 8.30	38.98 ± 27.88*
Triglyceride	1.98 ± 0.80	1.22 ± 0.29*
Total cholesterol	2.84 ± 1.21	8.15 ± 3.88**

Note:indicated significant difference compared to wild type mice,* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$

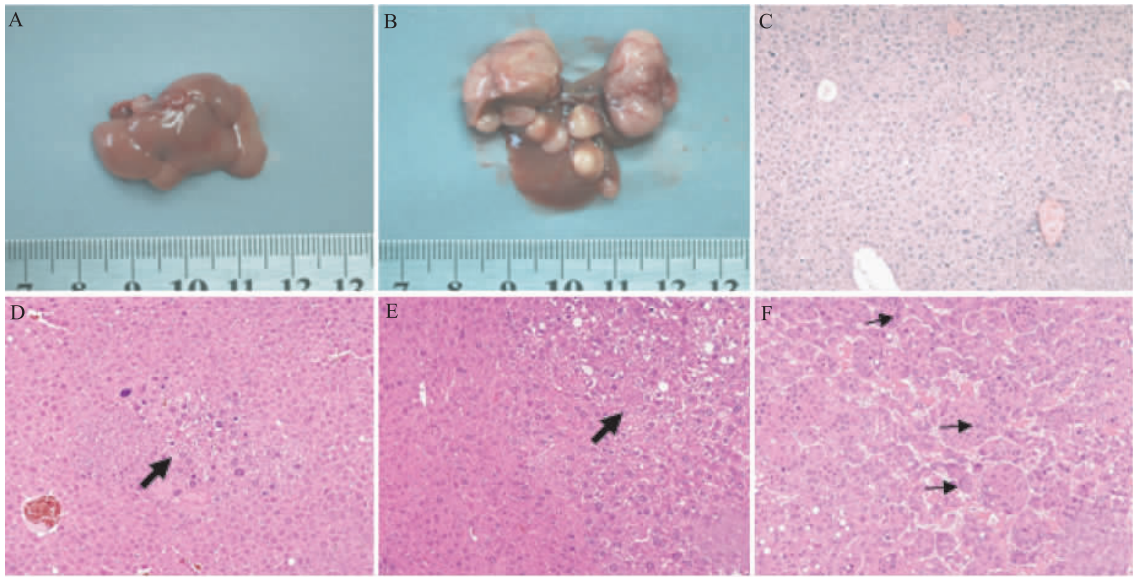
3 讨论

ras 癌基因是人类发现的第一个癌基因,临床治疗试验中应用抑制 Ras 信号通路(Ras/Erk)的药物对肝癌具有显著的治疗效果^[8]。但 Ras 信号通路在肝癌发生的分子作用机制仍有待深入研究。脂质在促进肿瘤细胞增殖过程中,可氧化供能、提供细胞膜的脂质成分,且可协调细胞膜的流动性和信号转导[如:脂筏、滤过泡、侵足(invadopodia)]以及合成促肿瘤生成的脂质信号分子,如磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸肌醇[PI(3,4,5)P3];溶血磷脂酸(LPA);前列腺素(PG)等^[9]。

大量研究表明,肝肿瘤发生会导致脏功能损害,甘油三酯合成障碍,血中甘油三酯降低^[10]。本研究中,转基因小鼠的 ALT 显著升高,表明 ras 癌基因的表达在诱导肝肿瘤发生的过程中导致了肝细胞的损伤,肝细胞功能下降,甘油三酯合成减少。另外,病理学检测表明,转基因小鼠的肝组织,特别是肝肿瘤组织,发生了严重的脂肪变性,提示着甘油三脂在肝细胞中的蓄积增加和输出障碍。这些可能是导致 H-ras12V 转基因小鼠血清甘油三脂显著降低的主要原因。

临床研究表明,肝癌患者会出现血清胆固醇水平下降的病征。但在 H-ras12V 转基因小鼠,血清总胆固醇却显著升高。临床研究的对象肝癌患者常伴有肝纤维化、硬化及肝炎等严重肝功能损伤等病理性变化,而 H-ras12V 转基因小鼠没有发生这些病理变化。另外,H-ras12V 转基因小鼠极少发生肝肿瘤转移,依据肿瘤细胞分化程度及大量脂肪变性等病理性特征诊断,H-ras12V 转基因小鼠的肝肿瘤尚处于肿瘤发生的早期阶段。因此,胆固醇水平的升高可能与 H-ras12V 转基因小鼠的肝功能损伤程度较低、肝肿瘤细胞分化程度较高及胆固醇合成和输出量增多等因素有关。在临床,无显著炎症和肝纤维化的病理性变化的肝癌患者血清的生化指标检测研究还鲜有报道,肝癌发生与胆固醇代谢的相互关系还有待于深入研究。

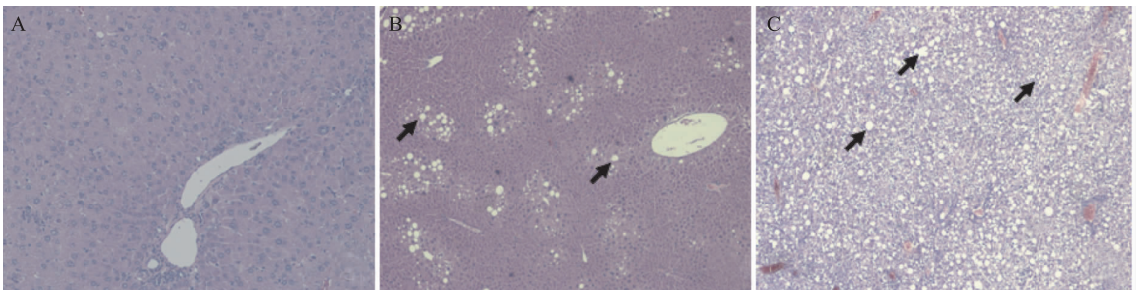
本研究结果为 ras 癌基因诱导的肝肿瘤发生与



A: liver of wild type mouse; B: multiple tumors in the liver of 7 month-age H-ras12V transgenic mice; C: liver of wild type mouse; D: altered foci composed of basophilic cells were found in the center of the liver of 7 months-old H-ras transgenic mouse (arrow head); E: well circumscribed nodule (hepatocellular adenoma, arrow head) was found in the liver of 7 months-old H-ras transgenic mouse; F: microtrabecular patterns and anaplastic cells (arrows) were found in the hepatocellular carcinoma of 7 months-old H-ras transgenic mouse

图 1 H-ras12V 转基因雄鼠的组织病理学检测(C~F: HE ×100)

Figure 1 Histopathological analyses of H-ras12V transgenic male mice(C - F: HE ×100)



A: liver tissue of wild type mice of H-ras12V transgenic male mice; B: liver peri-tumor tissue of H-ras12V transgenic male mice; C: liver tumor tissue of H-ras12V transgenic male mice(Arrows indicates lipid droplets)

图 2 H-ras12V 转基因雄鼠肝细胞脂肪变性病理学分析(HE ×100)

Figure 2 Steatosis histopathological analyses of H-ras12V transgenic male mice(HE ×100)

脂质代谢紊乱的机制研究提供了基础数据,也为 ras 癌基因、肝肿瘤发生及脂质代谢紊乱之间的关联分子机制研究提供了良好的疾病实验动物模型。

参考文献:

[1] Kanematsu M, Kondo H, Goshima S, *et al.* Magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology*, 2008,75(Suppl 1):65-71.
 [2] Kutami R, Nakashima Y, Nakashima O, *et al.* Pathomorphologic study on the mechanism of fatty change in small hepatocellular carcinoma of humans[J]. *J Hepatol*,2000,33(2):282-9.
 [3] Paradisi V, Zalinski S, Chelbi E, *et al.* Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis[J]. *Hepatology*, 2009,49(3):851-9.
 [4] Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth[J]. *Nature*,2006,441(7092):424-30.

[5] Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now[J]. *Oncology*, 2007,72(Suppl 1):30-44.
 [6] Kitamura K, Hatano E, Higashi T, *et al.* Proliferative activity in hepatocellular carcinoma is closely correlated with glucose metabolism but not angiogenesis[J]. *J Hepatol*, 2011,55(4):846-57.
 [7] Martin J, Dufour JF. Abnormal nitrosothiol metabolism in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2011,54(3):579-80.
 [8] Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H. Molecular targets for liver cancer therapy: From screening of target genes to clinical trials[J]. *Hepatol Res*, 2010,40(1):49-60.
 [9] Nomura DK, Long JZ, Niessen S, *et al.* Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis[J]. *Cell*, 2010,140(1):49-61.
 [10] Wu JW, Wang SP, Alvarez F, *et al.* Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis[J]. *Hepatology*, 2011,54(1):122-32.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]