

二乙基亚硝胺诱导的肝癌小鼠 TGF- β III 型受体的表达

张 森 孙妩弋 谷元婧 魏 伟

摘要 目的 观察转化生长因子(TGF- β) III 型受体(T β R III)在二乙基亚硝胺(DEN)诱导的肝细胞癌(HCC)模型小鼠中的表达及其信号通路的变化。方法 C57BL/6J 小鼠腹腔注射 DEN 建立 HCC 小鼠模型;HE 染色法观察小鼠肝脏病理变化;ELISA 法检测小鼠肝脏组织中 TGF- β 1 的水平;Western blot 法检测肝脏组织 T β R III、p-Smad2 及 Smad2 蛋白的表达变化。结果 HE 染色结果显示,对照组小鼠肝细胞大小形态正常,肝小叶结构完整,随着造模时间的延长,模型组小鼠肝小叶逐渐被破坏,肝细胞异常增生,出现病理核分裂,HCC 结节形成。在 DEN 诱导的 HCC 模型小鼠中,随着造模时间的延长,肝脏 TGF- β 1 的水平明显升高,T β R III 蛋白的表达降低,p-Smad2 蛋白的表达升高,而 Smad2 蛋白的表达没有明显变化。结论 T β R III 表达的降低可能与 HCC 的发生发展有关。

关键词 T β R III;TGF- β 1;肝细胞癌;二乙基亚硝胺

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)07-0912-05

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床上常见的恶性程度高、预后较差且死亡率高的肿瘤之一^[1]。外科 HCC 切除术、射频消融治疗和肝脏移植术虽然提高了患者的生存率,但是由于 HCC 的肝内播散和远处转移,导致其预后较其它恶性肿瘤差^[2-3]。转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 是由结构相近、功能类似的多肽组成的细胞因子,主要包括 TGF- β 、激活素、抑制素等。目前研究^[4]表明,TGF- β /Smad 信号通路不仅在胚胎发育、细胞增殖和分化等过程中发挥重要作用,也与肿

瘤的发生发展有密切关系。TGF- β III 型受体(type III TGF- β receptor, T β R III)是 TGF- β 家族中的辅助性受体,调控 TGF- β 与受体的结合以及信号通路的激活。研究^[5-8]显示,在乳腺癌、前列腺癌和非小细胞肺癌等肿瘤的发展进程中,T β R III 表达降低甚至缺失。在 HCC 发展过程中,T β R III 表达是否发生变化,TGF- β 信号通路又是否受到影响尚不清楚。该研究通过建立二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱导的 HCC 小鼠模型^[9],观察 T β R III 在 HCC 中的表达以及 TGF- β 信号的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J 小鼠 48 只,雄性,2 周龄,清洁级,购自安徽医科大学实验动物中心。在恒温 22℃、光照周期 12 h 环境中饲养,造模过程中死亡 4 只。

1.1.2 主要试剂 抗 T β R III 抗体(英国 Abcam 公司);抗 Smad2、p-Smad2 和 β -actin 抗体(美国 Bioworld 公司);ELISA 试剂盒(深圳达科为生物技术有限公司);DEN(美国 Sigma 公司);PVDF 微孔转移膜(美国 Millipore 公司);5×电泳加样缓冲液、RIPA 蛋白裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)(江苏碧云天公司)。

1.1.3 主要仪器与设备 LAS400Mini 型化学发光成像分析仪(美国 GE 公司);IX-70 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);ELx50 型洗板机、ELx808 型酶标仪(美国 BioTek 公司);3-30K 低温高速离心机(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DEN 诱导的 C57BL/6J 小鼠 HCC 模型的制备、分组及处理 出生后 14 d 的 C57BL/6J 小鼠,随机分为对照组和模型组,每组 8 只,腹腔注射 DEN 20 μ g/g 体重,以诱导小鼠肝脏肿瘤的发生。分别于注射 DEN 后 8、16、24、32、40 周处死小鼠,摘取部分肝脏组织放入 EP 管中,-80℃保存待测,另取一小块肝脏组织经 10% 甲醛溶液固定,做病理检测。

2015-03-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81300332,81330081);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20113420120002);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012A153)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,合肥 230032

作者简介:张 森,男,硕士研究生;

孙妩弋,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: sun-wuyi51@hotmail.com;

魏 伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

1.2.2 肝脏组织病理学检查 取出肝脏,用冷生理盐水洗去浮血,取肝组织小块,厚度不超过 0.5 cm,立即用 10% 甲醛溶液固定 24 h。70%、80%、90%、100% 乙醇溶液脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,Leica 石蜡切片机切片,常规脱蜡,HE 染色,中性树脂封片后,OLYMPUS 显微镜下观察。

1.2.3 ELISA 法检测小鼠肝脏组织中 TGF- β 1 的表达 每 50 mg 肝脏组织加入 500 μ l 生理盐水,匀浆器中充分研磨,离心提取上清液。加样前将待测样品活化,待测样品孔及各浓度标准品孔中,每孔加入 100 μ l,空白对照孔中加入 100 μ l 稀释缓冲液(1 $\times$),37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,充分洗涤,加入 100 μ l 生物素标记一抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,充分洗涤,加入亲和素一辣根过氧化物酶标记二抗 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,充分洗涤后,加入四甲基联苯胺显色液 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后,每孔加入终止液 100 μ l,终止反应,使用酶标仪检测各孔 450 nm 处吸光度。

1.2.4 肝组织蛋白的提取 裂解液配制:RIPA 和蛋白酶抑制剂 PMSF 的比例为 100:1。肝组织放入匀浆器中按 500 μ l/50 mg 组织加入裂解液研磨,转入离心管中 4 $^{\circ}$ C 离心,14 000 r/min 离心 20 min 后吸取上清液,得到总蛋白。

1.2.5 Western blot 法检测肝脏组织中 T β R III、p-Smad2 以及 Smad2 的表达 肝脏组织裂解液处理后提取总蛋白,经 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,每泳道上等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,在转移液中,以 200 mA 电流转移至 PVDF 膜上。封闭 2 h 后,加入

抗 T β R III、p-Smad2 及 Smad2 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤后,继以辣根过氧化物酶结合的二抗室温孵育 2 h,ECL 试剂盒显色。用 ImageJ 图像处理软件分析计算蛋白印迹值,将 β -actin 作为内参,用目的条带与 β -actin 条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较各组间差异。

2 结果

2.1 DEN 诱导的 HCC 小鼠肝脏病理变化 HE 染色显示,对照组小鼠肝脏组织无明显变化,肝细胞大小形态正常,肝小叶结构完整;随着造模时间的延长,肝小叶结构逐渐被破坏,肝细胞异常增生,细胞形态、大小不一,并且细胞的分化程度不均一,出现病理核分裂,HCC 结节形成,40 周后出现坏死。以上结果提示本实验中小鼠 HCC 模型造模成功。见图 1。

2.2 DEN 诱导的 HCC 小鼠肝脏组织中 TGF- β 1 水平的变化 ELISA 结果显示,与对照组比较,随着造模时间的延长,模型组小鼠肝脏组织中 TGF- β 1 水平不断升高,差异有统计学意义($F = 6.65$, $P < 0.01$)。见图 2。

2.3 DEN 诱导的 HCC 小鼠肝脏组织中 T β R III 蛋白表达变化 半定量分析以对照组为基数 1,计算各组比值的相对比例。Western blot 法检测造模不

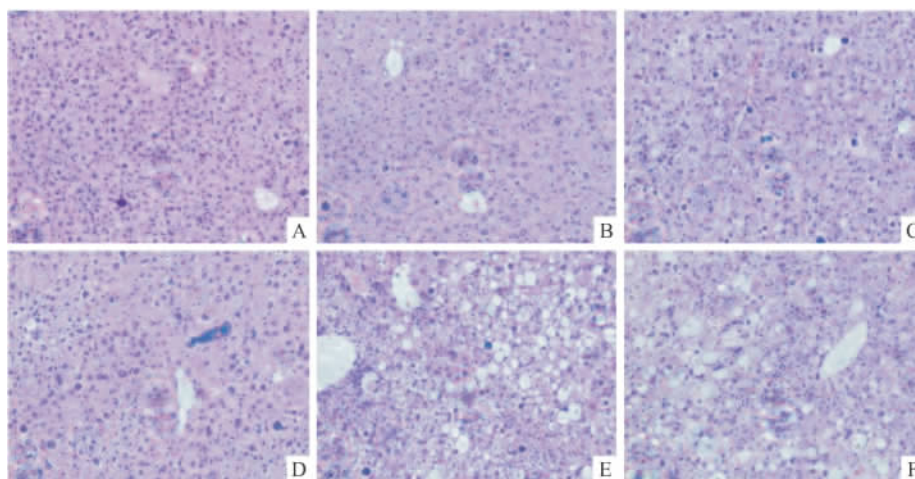


图 1 DEN 诱导的小鼠 HCC 模型中不同时间点肝脏组织病理学观察 HE $\times 100$

A: 对照组; B: 8 周组; C: 16 周组; D: 24 周组; E: 32 周组; F: 40 周组

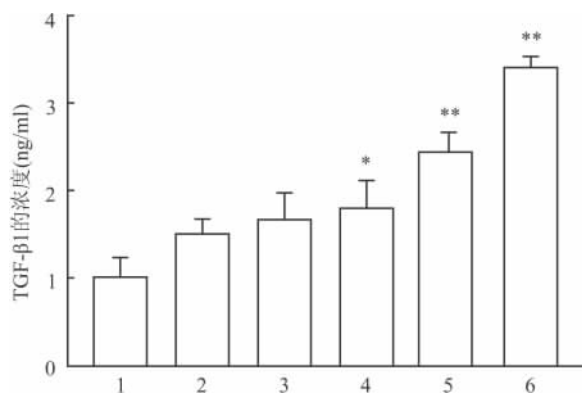


图2 不同造模时间点小鼠肝脏组织中 TGF-β1 的水平

1: 对照组; 2: 8 周组; 3: 16 周组; 4: 24 周组; 5: 32 周组; 6: 40 周组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

同时时间点小鼠肝脏中 TβR III 蛋白的表达情况,结果显示,DEN 注射 8 周后,肝脏 TβR III 的表达明显低于对照组,随着造模时间的延长,TβR III 表达明显降低,40 周时 TβR III 表达最低,差异有统计学意义($F = 148.87$, $P < 0.01$)。见图 3。

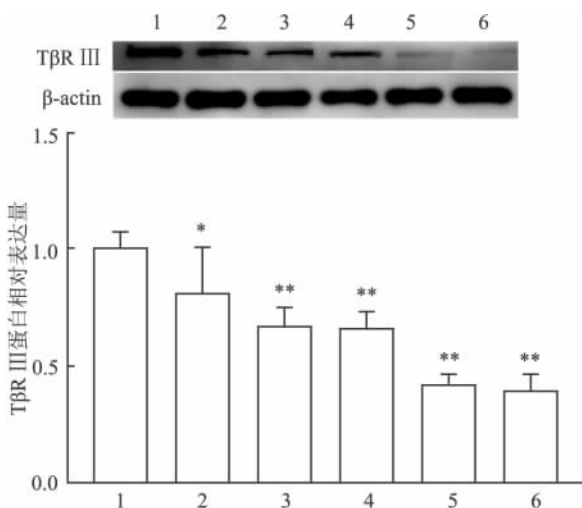


图3 Western blot 法检测不同造模时间点小鼠肝脏组织中 TβR III 蛋白表达量的变化

1: 对照组; 2: 8 周组; 3: 16 周组; 4: 24 周组; 5: 32 周组; 6: 40 周组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 DEN 诱导的 HCC 小鼠肝脏组织中 p-Smad2、Smad2 蛋白表达变化 半定量分析以对照组为基数 1, 计算各组比值的相对比例。Western blot 法检测造模不同时间点小鼠肝脏中 p-Smad2、Smad2 蛋白的表达情况,结果显示,随着造模时间的延长,p-Smad2 蛋白的表达升高,而 Smad2 蛋白的表达无明显变化,差异有统计学意义($F = 118.09$, $P < 0.01$)。

见图 4。

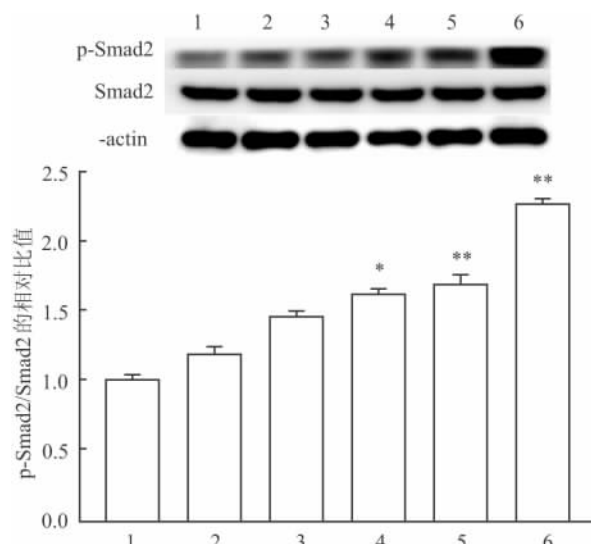


图4 Western blot 法检测不同造模时间点小鼠肝脏组织 p-Smad2 及 Smad2 蛋白表达量的变化

1: 对照组; 2: 8 周组; 3: 16 周组; 4: 24 周组; 5: 32 周组; 6: 40 周组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

HCC 是一类发病机制较为复杂的常见肿瘤,目前 HCC 已成为全世界第 5 大恶性肿瘤,致死率高居第 3 位^[1-2]。近年来,HCC 发病率持续上升,可能与感染肝炎病毒而导致肝硬化,以及慢性酒精性肝病增多有关。肝脏中相关分子的异常表达以及信号通路的过度激活在 HCC 发生发展中可能扮演着重要角色。本研究进一步探讨 HCC 进程中的分子机制,明确相关分子的作用,对 HCC 的诊断和预后判断提供帮助。

TGF-β 能诱导上皮细胞和内皮细胞发生上皮间质转化,促进细胞的迁移和侵袭能力,从而促进肿瘤的发展^[10]。对非小细胞肺癌患者的研究^[11]显示,HCC 组织中 TGF-β1 的表达明显升高,且与患者的不良预后有关。此外,TGF-β1 在卵巢上皮癌患者细胞外基质中的表达升高,与肿瘤的侵袭转移密切相关^[12]。本研究显示,在 DEN 诱导的小鼠 HCC 模型中,与对照组比较,模型组肝脏组织中 TGF-β1 的表达水平明显升高。提示 HCC 的不断恶化可能与 TGF-β1 的高水平表达有关。

TβR III 是 TGF-β 家族的辅助性受体。研究^[13]表明,在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和卵巢癌

Ovca420 细胞中, TGF- β 1 能够降低 T β R III mRNA 和蛋白的表达, 而对 T β R I 和 T β R II 的表达没有明显影响。研究^[6]显示, T β R III 在乳腺癌中表达缺失, 恢复 T β R III 的表达能够抑制乳腺癌细胞的迁移、侵袭以及血管生成。在胰腺癌和卵巢癌中, T β R III 的表达也出现降低甚至缺失的现象^[14-15]。但 T β R III 在 HCC 中表达情况尚不清楚。本研究结果显示, 随着造模时间的延长, 模型组中 T β R III 的表达逐渐降低。以上结果提示, 低表达的 T β R III 与肝脏病理恶性程度有关, 而自分泌型 TGF- β 1 的高表达可能是 T β R III 表达降低的原因。

Smad 蛋白作为细胞内的 TGF- β 受体激酶的底物, 在胞外信号经由膜受体转导进入细胞核内的过程中发挥重要作用。其中, Smad2 是 TGF- β 受体激活后传递信号的下游分子。在对乳腺癌的体内外研究^[6]中均显示, T β R III 的表达能够抑制 Smad2 的磷酸化水平。本研究结果显示, 在 HCC 的发展过程中, p-Smad2 蛋白表达逐渐升高, 而 Smad2 蛋白表达无明显变化, 提示 TGF- β 信号通路过度激活, 可能与肝脏组织中 TGF- β 1 的表达升高有关, 也可能是由于高表达的 TGF- β 1 抑制了 T β R III 的表达, 导致 Smad2 的磷酸化水平升高。

参考文献

- [1] Block T, Mehta A S, London W T. Hepatocellular carcinoma of the liver[J]. *Cancer Biomark*, 2010, 9(1-6): 375-83.
- [2] Washburn K, Halff G. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2011, 16(3): 297-300.
- [3] Lencioni R, Crocetti L. Local-regional treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Radiology*, 2012, 262(1): 43-58.
- [4] Akhurst R J, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(10): 790-811.
- [5] Gatz C E, Oh S Y, Blobe G C. Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer[J]. *Cell Signal*, 2010, 22(8): 1163-74.
- [6] Dong M, How T, Kirkbride K C, et al. The type III TGF- β receptor suppresses breast cancer progression[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 206-17.
- [7] Finger E C, Turley R S, Dong M, et al. T β R III suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(3): 528-35.
- [8] Turley R S, Finger E C, Hempel N, et al. The type III transforming growth factor- β receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1090-8.
- [9] 马金良, 许戈良, 英卫东, 等. 诱导性大鼠肝癌模型中 HIF-1 α -VEGF 的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(4): 455-8.
- [10] Derynck R, Akhurst R J. Differentiation plasticity regulated by TGF- β family proteins in development and disease[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(9): 1000-4.
- [11] Huang A L, Liu S G, Qi W J, et al. TGF- β 1 protein expression in non-small cell lung cancers is correlated with prognosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(19): 8143-7.
- [12] Chen K, Wei H, Ling S, et al. Expression and significance of transforming growth factor- β 1 in epithelial ovarian cancer and its extracellular matrix[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(5): 2171-4.
- [13] Hempel N, How T, Cooper S J, et al. Expression of the type III TGF- β receptor is negatively regulated by TGF- β [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(5): 905-12.
- [14] Gordon K J, Dong M, Chislock E M, et al. Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(2): 252-62.
- [15] Hempel N, How T, Dong M, et al. Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(11): 5231-8.

The expression of type III TGF- β receptor in diethylnitrosamine-induced liver cancer model

Zhang Sen, Sun Wuyi, Gu Yuanjing, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University; Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Hefei 230032*)

Abstract Objective To detect the expression of type III TGF- β receptor (T β R III) in diethylnitrosamine (DEN)-induced liver cancer model. **Methods** C57BL/6J mice were intraperitoneally injected with DEN in a 20 μ g/g dosage to establish liver cancer model. The pathological change of mice liver was observed by HE staining. The TGF-

白芍总苷对糖尿病大鼠 肾组织 Txnip、Trx 与 ASK1 表达的调节作用

王 喆 吴永贵 章超群 武晓旭 徐兴欣 王 坤

摘要 目的 了解白芍总苷(TGP)对糖尿病大鼠肾组织硫氧还蛋白相互作用蛋白(Txnip)、硫氧还蛋白(Trx)与凋亡信号激酶1(ASK1)表达的影响,探讨TGP对糖尿病肾组织Trx系统调节作用。方法 将链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠随机分为模型组、TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组,另取正常大鼠为对照组。8周后测定大鼠尿白蛋白排泄率(UAER)。应用免疫组化、Western blot法及实时定量PCR法检测大鼠肾组织Txnip、Trx与ASK1表达。结果 实验8周后TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组及对照组大鼠UAER水平均低于模型组($P < 0.01$);免疫组化和(或)Western blot法显示TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组及对照组大鼠肾组织Txnip、ASK1表达低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$),而Trx高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$);实时定量PCR显示TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组及对照组Txnip mRNA低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$),Trx mRNA高于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 糖尿病肾病大鼠肾组织存在Trx系统异常,TGP对糖尿病大鼠肾组织保护作用可能与抑制Txnip表达、提高Trx表达有关。

关键词 糖尿病肾病;硫氧还蛋白;ASK1;白芍总苷

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)07-0916-06

研究^[1]表明氧化应激参与糖尿病肾病的发生及发展。硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)系统是机体一种对抗氧化应激、维持氧化还原反应的平衡系统。Trx是细胞内主要的抗氧化剂,其作用在于减少活性氧生成,另外其还原形式可抑制凋亡信号激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)的活性,从而抑制ASK1依赖性的凋亡。Trx相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, Txnip)作为Trx功能和表达的负性调节因子,下调Trx表达,其平衡紊乱可导致氧化还原体系的失调,进而加剧氧化应激^[2]。白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)是一种从白芍干燥根中提取的有效物质,主要作用有抗氧化、免疫调节与抗炎^[3]。研究^[4]表明TGP对糖尿病肾病有明显保护作用,其机制部分与抗氧化应激有关,但其对于Trx系统的作用尚不明确,该研究进一步观察TGP对糖尿病大鼠肾组织Trx、Txnip及ASK1表达的影响,旨在探讨TGP对糖尿病肾组织Trx系统的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Munich-Wistar大鼠50只,由安徽医科大学实验动物中心提供,昆明种,体重180~200 g。

1.1.2 药品与试剂 TGP由安徽医科大学临床药理研究所魏教授赠予,使用前先将TGP溶于1%的羧甲基纤维素钠溶液中;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);尿白蛋白测定试剂盒(法

2015-03-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270813、81374034);安徽省自然科学基金(编号:1208085MH149)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾内科,合肥 230022

作者简介:王 喆,女,硕士研究生;

吴永贵,男,博士生导师,责任作者,E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

$\beta 1$ level in liver tissue was measured by ELISA assay. The expressions of T β R III, p-Smad2 and Smad2 were detected by Western blot. **Results** The mice liver cell of the control group formed normal size with the complete hepatic lobule structure. With the time passing, hepatic lobule in model group mice was destroyed gradually with liver cell dysplasia, pathology of fission, tumor nodule formation. In DEN-induced liver cancer model, the TGF- $\beta 1$ level was elevated compared with the control group and the T β R III protein expression was significantly decreased. The expression of p-Smad2 protein was elevated, while Smad2 protein expression showed no obvious change. **Conclusion** The low expression of T β R III may play an essential role in the progression of hepatocellular carcinoma.

Key words T β R III; TGF- $\beta 1$; hepatocellular carcinoma; DEN