

文章编号:1005-6947(2004)03-0196-03

· 实验研究 ·

促血管生成素在原位种植肝癌组织中的表达及其意义

刘学强¹, 万恒荣¹, 陈海生¹, 彭林²

(1. 广东省中山市中医院 外科, 广东 中山 528400; 2. 广东省人民医院 肝胆外科, 广东 广州 510080)

摘要:目的 研究促血管生成素基因在大鼠原位种植肝癌模型中的表达及其与肝癌新生血管之间的关系。方法 采用 Walker256 癌肉瘤接种 40 只 Wistar 大鼠制作原位种植肝癌模型, 用微血管计数以标志肿瘤新生血管。采用原位杂交法检测促血管生成素基因的表达。结果 Walker256 癌肉瘤接种后 1, 2, 3 周肿瘤微血管密度分别为 $(15 \pm 4.3)/\text{Hp}$, $(17 \pm 3.6)/\text{Hp}$ 和 $(45 \pm 7.8)/\text{Hp}$ 。接种后 3 周较前 2 周有显著性增加 (均 $P < 0.05$)。无癌肝脏组织和肝癌组织中都有大量促血管生成素-1 (ang-1) mRNA 表达, 且两者差异无显著性 ($T = 3.214$, $P = 0.126$)。无癌肝脏组织中无促血管生成素-2 (ang-2) mRNA 表达, 而肝癌组织中有大量 ang-2 mRNA 表达且与肿瘤微血管密度呈正相关。结论 ang-2 可能对原位接种肝癌中新生血管的形成有一定作用。

关键词: 促血管生长素; 肝肿瘤/病理学; 基因表达; 肝肿瘤/血液供给; 肝肿瘤, 实验性; 疾病模型, 动物

中图分类号: R735.7; Q58

文献标识码: A

Significance of expression of angiopoietin mRNA in the tissue of in-situ implanted hepatoma

LIU Xue-qiang¹, WAN Heng-rong¹, CHEN Hai-sheng¹, PENG Lin²

(1. Department of Surgery, Chinese Traditional Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong 528400, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, 510080, China)

Abstract: Objective To study the relationship of expression of angiopoietin gene and angiogenesis in the in-situ implanted hepatoma in rats. **Methods** Forty Wistar rats were used to establish the in-situ implanted hepatoma model by implanting Walker256 hepatoma cell line. The number of microvessel density (MVD) in hepatoma was calculated. The expression of angiopoietin mRNA was observed by in-situ hybridization method. **Results** The MDV in the implanted hepatoma in the first day of 1, 2 and 3 week postimplantatively were $(15 \pm 4.3)/\text{Hp}$, $(17 \pm 3.6)/\text{Hp}$, $(45 \pm 7.8)/\text{Hp}$ respectively. The amount of MDV and expression of Ang-1 mRNA were increased significantly and correlated with MDV in the hepatoma tissues and non-hepatoma tissues, and no significant difference between the two types of tissues. Expression of Ang-2 mRNA was not seen in non-hepatoma tissues, but in hepatoma tissues, the expression of Ang-2 was obvious. **Conclusions** Angiopoietin-2 mRNA may play a role in the angiogenesis of the in-situ implanted hepatoma.

Key words: ANGIOPOIETIN; LIVERNEOPLASMS/pathol; GENE EXPRESSION; LIVER NEOPLASMS/blood supply; LIVERNEOPLASMS, EXPERIMENTAL; DISEASE MODELS, ANIMAL

CLC number: R735.7; Q58

Document code: A

基金项目: 广东省医学科学基金项目 (A2002042)。

收稿日期: 2003-04-14; 修订日期: 2003-12-10。

作者简介: 刘学强 (1962-), 男, 广东中山人, 广东省中山市中医院主治医师, 主要从事肝胆方面的研究。

最近发现促血管生成素(angiotensinogen)及其酪氨酸受体 Tie2 在机体和肿瘤血管生成中发挥着重要的作用,目前已发现 ang-1, ang-2, ang-3, ang-4 4种配体^[1-2]。但对于 Angiotensin/Tie2 系统在肝癌血管生成中的作用尚缺乏报道。在本实验中,笔者采用原位种植肝癌模型,用原位杂交染色法检测肝癌组织中促血管生成素基因的表达,以探讨其表达和肝癌新生血管形成的关系。

1 材料和方法

1.1 原位种植肝癌模型的建立及标本收集

取 Wistar 大鼠 40 只,体重 160 ~ 180g,平均 172g,雌雄兼用。取生长旺盛的 Walker256 癌肉瘤大鼠(上海医药工业研究院提供),无菌条件下分离出癌组织,切成 1mm × 1mm × 1mm 大小的小块,置于 DMEM 培养液中备用。按照笔者以前的方法建立原位种植肝癌模型^[3]。

随机将大鼠分为 4 组,其中 10 只为正常对照,另 3 组为实验组。分别于接种后 1, 2, 3 周各取 10 只开腹取肝脏及肝癌组织,立即以 10% 福尔马林固定,24h 内石蜡包埋。连续切片 6 μm,分别行 HE 染色和免疫组织化学染色。原位杂交切片以 4% 多聚甲醛固定,24h 内包埋切片,切片厚度 4 μm。

1.2 血管密度测定

HE 染色切片 200 倍光镜下计数 3 个视野微血管数目,取平均值作为微血管密度。另计数免疫组织化学染色切片强阳性、弱阳性及阴性血管的数目,取平均值。

1.3 原位杂交染色步骤

切片常规脱蜡至水,用 0.5% H₂O₂/甲醇室温处理 30min 以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗 3 次。用 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 37℃ 消化 1min, 0.5 MPBS 溶液洗涤 3 次,每次 5min。蒸馏水洗 1 次。在切片组织中加入 20 μl 经变性处理的地高辛标记的 Angiotensin-1 和 Angiotensin-2 杂交探针,盖上预先硅化好的盖玻片。置于湿盒中 39℃ 杂交 16 ~ 18h。杂交反应后,用 37℃ 左右水温的 2 × SSC 溶液洗涤 3 次,每次 5min。滴加杂交后稳定液,37℃, 4 ~ 6h。以 0.5 M PBS 溶液洗涤 5min × 3 次。滴加封闭液,室温 20min, 不洗。滴加兔抗地高辛,20 ~ 37℃ 反应 60min, 0.5 M PBS 洗涤 2min × 3 次。滴加生物素化羊抗兔 IgG 20 ~ 37℃ 反应

20min, 0.5 M PBS 洗涤 2min × 3 次。滴加 SABC, 20 ~ 37℃ 反应 20min, 0.5 M PBS 洗涤 5min × 4 次。DAB 显色,苏木素轻度复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片观察。

1.4 统计学分析

实验结果以 ($\bar{x} \pm s$) 记录,采用 SAS 统计分析软件行 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 大体及组织学观察

肝脏组织中接种 Walker256 癌肉瘤后 1 周即可在接种部位出现大小不等的肝癌肿块,2 周、3 周肿瘤逐渐变大,5 只出现肿瘤周围肝组织的转移和腹水形成。HE 染色证实肝癌形成和大量血管形成。

2.2 微血管密度测定

Walker256 癌肉瘤接种后 1, 2, 3 周肿瘤微血管密度分别为 (15 ± 4.3)/Hp, (17 ± 3.6)/Hp 和 (45 ± 7.8)/Hp, 第 1, 2 周相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 第 3 周和前 2 周相比微血管数目显著增多 ($P < 0.05$)。

2.3 原位杂交检测结果

正常肝组织和肝癌组织中都有大量促血管生成素-1(ang-1)mRNA 表达,肝癌组织 [(56 ± 6)/Hp] 和正常肝脏 [(48 ± 4)/Hp] 之间差异无显著性 ($T = 3.214, P = 0.126$)。正常肝脏组织中无促血管生成素-2(ang-2)mRNA 的表达,而肝癌组织中有大量 ang-2 mRNA [(32 ± 8)/Hp] 表达,主要集中于癌灶边缘与正常肝脏交界处,在血管密集处表达较强,肝脏窦状间隙的内皮细胞胞浆中可有少量表达。肝癌组织中的 ang-2 的表达较正常肝脏组织差异有显著性 ($T = 3.087, P < 0.01$)。

3 讨论

促血管生成素 ang-1 和 ang-2 是近年来发现的 Tie2 受体的配体^[1]。ang-1 和受体的结合后通过调节内皮细胞与周围间质细胞的相互作用而发挥维持血管稳定,促进新生血管成熟化的作用。Angiotensin/Tie2 系统在胚胎时期是血管形成的另一信息通道,其在成熟机体和病理情况下的作用尚有待阐明。

关于 angiotensin 在肝癌血管生成中的作用目前

报道较少。Tanaka^[4]发现 ang-1 在肝癌组织和正常肝脏组织没有显著差别, ang-2 则主要集中在肝癌组织中^[1]。但其所采用的 RT-PCR 无法对肝脏组织中的 angiopoietin 进行定位研究, 因此我们采用原位杂交的方法观察了大鼠原位种植肝癌组织和正常肝脏中的表达, 发现 ang-1 在正常肝脏和肝癌组织中的表达没有明显区别, ang-2 在正常肝组织中无表达, 却在肝癌组织中有较多表达, 二者相比差异有显著性意义。原位种植肝癌是研究原发性肝癌较好的模型, 由于肝脏本身具有很强的免疫性, 大多采用组织移植的方法。接种 1~2 周即能形成明显的肝癌, 第 3 周时可见到肿瘤向周围的转移和腹水形成。从肿瘤微血管密度的检测来看, 肝癌的长大和发展伴有微血管密度的增加, 说明血管形成和肝癌发展有密切关系。本研究结果发现: ang-2 mRNA 在正常肝脏组织中几乎不表达, 但在肝癌组织中却呈强阳性表达, ang-2 的表达主要集中于癌灶边缘与正常肝脏交界处, 在血管密集处表达较强, 肝脏窦状间隙的内皮细胞胞浆中可有少量表达。说明 angiopoietin 在肝癌的转移过程中可能起到一定作用。结合笔者以前的研究^[5], ang-1 在体外对血管内皮细胞具有趋化作用, 而 ang-2 则在体内

血管活跃的地方表达较强, 因此认为 ang-2 可能参与了肝癌新生血管形成的启动环节。进一步研究 Angiopoietin/Tie2 系统在肝癌血管生成及转移中的作用将有助于了解肝癌新生血管形成的机制, 为开发以肝癌新生血管为目标的抗血管生成疗法奠定基础。

参考文献:

- [1] Maisonpierre P, Suri C, Jones F, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 277(5): 55-60.
- [2] Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, *et al.* Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans [J]. *PNAS*, 1999, 96(5): 1904-1909.
- [3] 彭林, 区金锐, 王卫东, 等. 原位种植肝癌新生血管的检测及血管内皮细胞生长因子 mRNA 的表达 [J]. *世界华人消化杂志*, 2002, 10(6): 717-718.
- [4] Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, *et al.* Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(2): 341-345.
- [5] Peng L, Sun J, Wang WD, *et al.* Biological effect of ectopic expression of angiopoietin in hepatocellular carcinoma cell line [J]. *HBPD Int*, 2003, 2(1): 94-97.

胆管损伤的预防和损伤性胆管狭窄的处理专题研讨会

暨中外专家论文报告会 [国家卫生部继续医学教育项目(2003-04-01-008)] 征文

2004年8月12~15日 哈尔滨

《中华肝胆外科杂志》、哈尔滨医科大学附一院普外科联办

主题: 创新求精, 合理、高质量完成 OC、LC、肝脏和上腹手术

内容: 包含(1)胆囊切除术、(2)胆管探查术、(3)肝外伤手术、(4)肝肿瘤切除术、(5)胃十二指肠手术等所致的肝内、肝门、肝外及胆管下段的胆管损伤的预防、诊治经验和教训。

特点: 理论联系实际, 系统的讲演与研讨, 探索预防治疗的对策, 追求 OC、LC 及上腹手术的高质量, 全面降低损伤和并发症发生率。

欢迎参与 欢迎来稿

共同办好首届预防胆道损伤的专题讨论会, 来稿请寄 800 字摘要 (请附软盘或经电子邮件发送到 zhgdwkkz@vip.163.com 信箱), 并注明“研讨会”。正式代表授 I 级继续教育学分。(来不及写稿也欢迎报名参会)

截稿日期: 2004年6月30日 来稿请寄《中华肝胆外科杂志》编辑部 地址: 北京市复兴路28号 邮编: 100853

电话: 010-66936223 **电传:** 010-68177009 **E-mail:** zhgdwkkz@vip.163.com