

技术与方法

藻毒素MC-LR促二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌模型建立的方法

孙韩艳 徐昌志 汪宇 李玉成 黄蓓*

(安徽大学生命科学学院, 合肥 230039)

摘要 肝癌动物模型有助于肝癌发病过程中分子机制的研究。二乙基亚硝胺(DEN)是一种众所周知的化学致癌剂,已被广泛用于动物肝癌模型的建立。藻毒素MC-LR是一种由蓝藻产生的环状七肽毒素,其低浓度的慢性毒性具有潜在的促癌作用。该实验以DEN联合不同浓度的藻毒素MC-LR通过腹腔注射共同诱发大鼠肝癌模型。从形态学、病理学角度分别观察大鼠肝脏外观和肝细胞的变化;从蛋白质水平运用免疫印迹法检测谷胱甘肽-S-转移酶(GST-Pi)的表达情况。结果表明,模型组中大鼠肝癌癌变过程大致经过肝细胞损伤期、肝细胞增生-硬化期和肝细胞癌变期三个阶段。其中, DEN联合终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的藻毒素MC-LR处理时促癌效果最佳。该方法可作为一种新型的大鼠肝癌模型建立方法为今后的研究奠定基础。

关键词 微囊藻毒素MC-LR; 肝癌模型; 促癌作用

近年来,蓝藻水华现象越来越严重。虽然蓝藻本身无危害性,但它产生的次级代谢产物藻毒素会严重威胁到人类和动物的健康。伴随着蓝藻水华的频频发生,很多湖泊中都富含大量的藻毒素。类似的现象不仅发生在中国,非洲和欧洲等许多国家都深受其害。研究发现,藻毒素至少有60多种异构体,其中微囊藻毒素-LR(MC-LR)是一种研究最多、危害最严重的藻毒素^[1]。这类藻毒素不仅具有强烈的急性毒性,在低浓度的情况下还可以通过慢性效应诱发肿瘤的发生^[2]。研究显示,MC-LR是一种环状七肽毒素,其主要靶器官是肝脏,可从血液转移到肝脏,主要表现为使肝脏充血肿大甚至肝出血和坏死,因而日益受到人们的关注^[3]。藻毒素本身不能直接诱发肝癌,而是需要在有启动剂的情况下促进肝癌的发生。二乙基亚硝胺(DEN)是国际肿瘤研究中心机构确定的致癌物质,它可以启动肝癌的发生,利用DEN建立的大鼠肝癌模型可以模拟人体肝癌病变的过程^[4]。

赵金明等^[5]曾用水华蓝藻粗提物联合DEN建立大鼠肝癌模型,结果显示实验组动物肝脏产生结节性增生灶,藻毒素单独作用不能诱导谷胱甘肽硫转移酶(GST-Pi)蛋白质和GST-Pi mRNA表达,但能够促进DEN诱导产生的GST-Pi mRNA及蛋白质的表达,提示藻毒素具有促癌活性。但其实验所用的藻毒素为从

水华水体藻样中抽提的初提物,并没有藻毒素纯度及类别鉴定的数据,而藻毒素有60多种,不同时间、地点所收集的水体藻样品中藻毒素的含量及类别是有差异的,这些都增加了实验结果的不确定性。

目前,诱发大鼠肝癌的给药途径较多,主要有经口给药法和注射给药法。经口给药法一般又分为口服和灌胃两种。前者操作简单,但受大鼠饮水量的影响,使得诱癌剂的剂量不能准确控制;而后者则可准确控制诱癌剂的剂量,不过长期灌胃对大鼠机体有一定的损害。注射法也是一种常用的方法,可经各种途径注入不同的部位,其中以腹腔注射最为常用^[6]。有文献报道^[7]指出,体内诱癌实验中藻毒素的低浓度范围不大于20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此,本实验利用DEN分别联合1, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的藻毒素MC-LR,通过腹腔注射的方法建立大鼠肝癌模型,找出了MC-LR促癌的最佳浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

Microcystin-LR(Taiwan Algal Science公司);

收稿日期: 2011-12-20 接受日期: 2012-01-19

安徽省自然科学基金(No.090413077)资助项目

*通讯作者。Tel: 0551-5107341, E-mail: bei Huang@163.com

DEN(上海梯希爱化成工业发展有限公司); GST-Pi抗体(武汉博士德生物工程有限公司); 辣根酶标记山羊抗兔IgG(中山金桥公司); ECL化学发光检测试剂盒(BestBio公司)。

1.2 实验动物

SPF级雄性SD大鼠, 体重(150±5) g, 购自安徽省实验动物中心。

1.3 大鼠肝癌促进模型的构建

购买的雄性SD大鼠给予一周的适应时间后随机分为8组, 每组15只: (1)DEN处理组: 腹腔注射0.25% DEN溶液(终浓度为10 mg/kg); (2)MC-LR处理组: 腹腔注射不同浓度(1, 10, 20 μg/kg)的藻毒素MC-LR; (3)DEN+MC-LR处理组: 腹腔注射0.25% DEN溶液(终浓度为10 mg/kg)和不同浓度(1, 10, 20 μg/kg)的藻毒素MC-LR; (4)正常对照组: 腹腔注射等量生理盐水。

以上实验每5天处理一次, 共处理16周。在不同时期, 注意观察大鼠的食欲、饮水、精神等情况。

1.4 HE病理学检测

分别于第4, 8, 12, 16周末处死大鼠, 解剖取肝, 记录体重、肝重, 并观察肝脏的颜色和质地, 取部分组

织经10%中性甲醛固定24 h, HE染色后光镜观察。其他组织冻存于-80 °C冰箱有待于后续蛋白质的检测。

1.5 GST-Pi蛋白免疫印迹(Western blot)检测

取冻存组织超声裂解, 4 °C条件下12 000 r/min离心10 min后取上清进行Western blot, 检测GST-Pi蛋白质的表达量。

1.6 数据处理与分析

图片均用Photoshop软件进行处理; 统计学数据采用Excel软件进行分析, $P<0.05$ 为显著性差异, $P<0.01$ 为极显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠肝体重比值(liver body index, LBI)的变化

由表1可以看出, 正常对照组和不同浓度藻毒素单独处理组LBI在不同时间段变化不大, 而DEN单独处理组和DEN联合藻毒素处理组大鼠LBI均出现不同程度的增长趋势, 其中DEN联合藻毒素MC-LR(终浓度为10 μg/kg)处理组LBI较其他组增长明显, 在不同时期与处理早期相比, 经统计学检验均有极显著性差异($P<0.01$), 表明藻毒素具有明显的促进肝细胞增殖的作用(表1)。

表1 不同处理组在不同时间的大鼠LBI值

Table 1 LBI of rats after different treatments at different time

组别 Groups	LBI(%)			
	4周 4 weeks	8周 8 weeks	12周 12 weeks	16周 16 weeks
Control	4.07±0.03	4.07±0.08	4.03±0.09	4.05±0.05
DEN(10 mg/kg)	4.35±0.09	5.55±0.10	6.49±0.24*	7.51±0.10**
DEN+MC-LR(1 μg/kg)	4.33±0.24	5.57±0.26	6.72±0.20	8.19±0.29**
DEN+MC-LR(10 μg/kg)	4.35±0.01	5.84±0.21**	7.21±0.13**	9.09±0.19**
DEN+MC-LR(20 μg/kg)	4.31±0.05	5.34±0.19*	6.49±0.03**	7.71±0.08**
MC-LR(1 μg/kg)	4.08±0.06	4.12±0.08	4.18±0.12	4.25±0.04
MC-LR(10 μg/kg)	4.09±0.10	4.14±0.03	4.16±0.07	4.33±0.10
MC-LR(20 μg/kg)	4.08±0.15	4.10±0.08	4.12±0.04	4.23±0.07

* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.2 大鼠肝脏表观图

不同处理组大鼠16周后肝脏表观差别明显, 其中对照组大鼠肝脏呈鲜红色、表面光滑、边缘锐利、质地较软, 未见异常; 而DEN处理组大鼠肝表面粗糙且无血色, 肝脏质地坚硬; 不同浓度藻毒素单独处理组肝脏颜色均呈暗红色, 其中终浓度为10 μg/kg的MC-LR处理时肝脏出现严重肿大现象; DEN联合

MC-LR处理组均出现了大小不一的灰白色圆形小结节; 其中DEN联合MC-LR(终浓度为10 μg/kg)处理组最早成癌, 结节数目多, 直径多在5 mm左右(图1)。

DEN联合MC-LR(终浓度为10 μg/kg)处理组在诱癌至4周时, 肝脏未见明显异常, 但无血色; 诱癌至8周时, 肝脏质地由软变硬, 表面逐渐粗糙; 至12周时, 肝脏质地较硬, 出现典型的肝硬化现象, 开始出

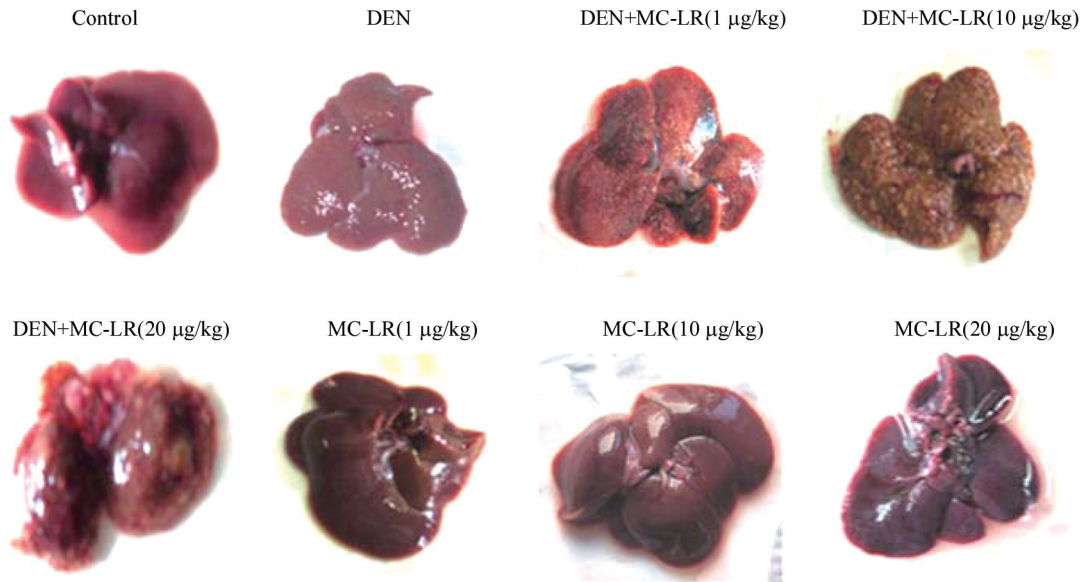


图1 不同处理组大鼠16周时肝脏外观形态变化

Fig.1 Morphological changes of liver in rats treated with DEN and MC-LR at 16th week

现数量不等、大小不一的灰白色圆形病灶, 直径大多在1 mm以下; 至16周时, 肝脏表面粗糙, 出现多个大小不一的灰白色癌结节, 可见出血和坏死, 解剖时腹水现象严重(图2)。

2.3 肝脏HE病理形态学观察

光镜下观察 16周时大鼠肝脏的组织细胞学变化(图3), 发现正常对照组肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝小叶结构正常, 无变性和坏死等现象; DEN组肝小叶组织结构破坏, 肝细胞索排列紊乱, 炎症细胞浸润现象严重, 并伴有门脉性肝硬化小胆管增生现象; DEN联合MC-LR(终浓度为1 µg/kg)处理组大鼠肝损伤严重, 大量炎症细胞浸润, 由增生的纤维组织包裹形成大小相仿的假小叶结构; DEN联合MC-LR(终浓度为10 µg/kg)处理组炎症细胞浸润严重, 可

见细胞核肿大现象, 胞核比例增大, 核分裂相增多, 结节内的肝细胞异型增生明显, 并出现多核细胞和巨核细胞, 具有明显的再生作用; DEN联合MC-LR(终浓度为20 µg/kg)处理组肝细胞内可见大小不等的脂质空泡, 肝脂肪变性严重; MC-LR单独处理组肝细胞变化不明显, 血细胞分散在肝脏内, 但MC-LR(终浓度为10 µg/kg)处理组肝细胞体积增大, 胞浆透明、淡染、疏松, 并有轻微水肿现象。

DEN联合MC-LR(终浓度为10 µg/kg)处理组大鼠肝脏病理学改变大致分为三期: (1)诱癌至4周时为肝细胞损伤期, 肝小叶结构尚完整, 但细胞排列紊乱, 胞浆疏松, 炎症细胞散在性分布于小叶中; (2)诱癌8周至12周时为肝细胞增生-硬化期, 其中, 8周末肝细胞开始变性水肿、体积明显变大、小叶内可



图2 DEN联合MC-LR(10 µg/kg)处理组大鼠肝脏外观形态变化

Fig.2 Morphological changes of liver in rats treated with DEN and 10 µg/kg MC-LR

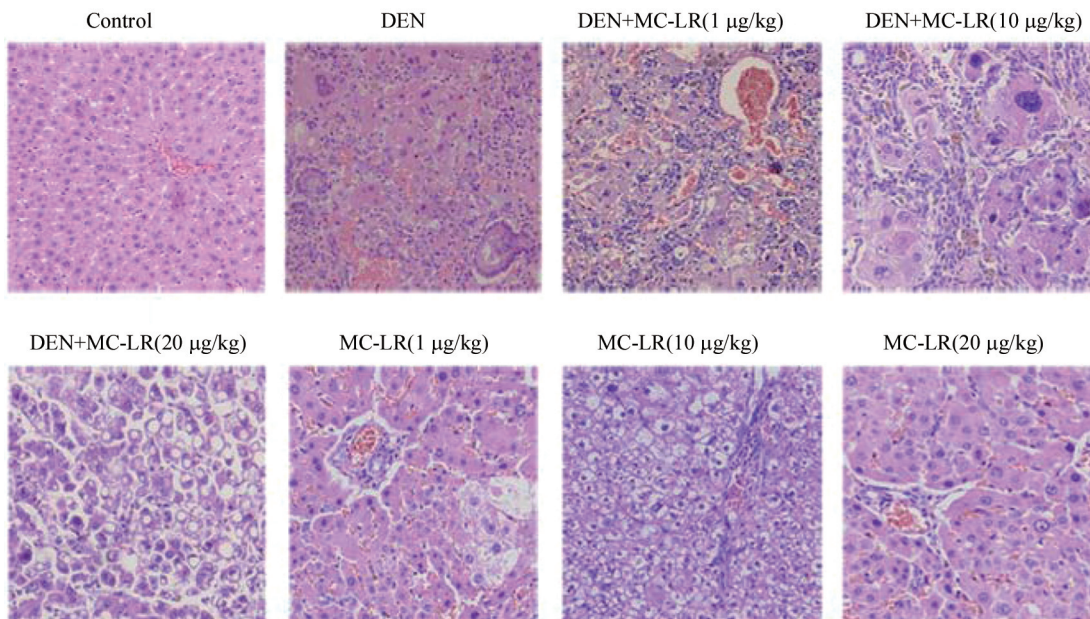


图3 16周时DEN与不同浓度的藻毒素处理的大鼠肝脏病理学变化(200×)

Fig.3 Pathological changes of livers treated with DEN and MC-LR in rats at 16th week(200×)

见炎症细胞浸润严重, 12周末时肝组织肝硬化小胆管增生现象严重, 由纤维组织包绕形成假小叶结构并出现癌细胞增生现象; (3)16周时为肝细胞癌变期, 细胞核明显增大, 胞核比例增大, 核分裂相增多, 尚

可见多核细胞和巨核细胞(图4)。

2.4 GST-Pi蛋白质表达量检测

GST-Pi是目前公认的反映肝细胞癌前病变的生物标志物。利用免疫印迹法检测DEN单独处理组和

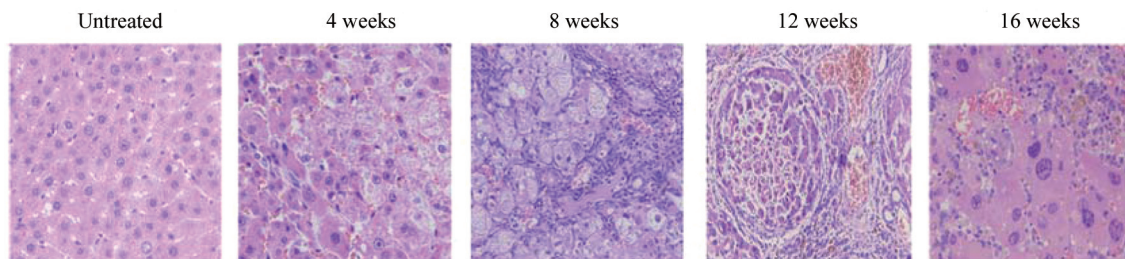


图4 DEN与藻毒素MC-LR(终浓度为10 µg/kg)处理不同时期的大鼠肝脏病理学变化(200×)

Fig.4 Pathological changes of livers treated with DEN and 10 µg/kg MC-LR at different time(200×)

DEN联合MC-LR(终浓度为10 µg/kg)处理组不同时期大鼠肝脏中GST-Pi的表达水平, 发现处理前大鼠肝组织中GST-Pi不表达, 而DEN联合MC-LR(终浓度为10 µg/kg)处理组GST-Pi在肝细胞损伤期开始表达; 在肝细胞增生期-肝硬化期GST-Pi表达明显增强, 且随着时间的延长呈递增趋势; 肝细胞癌变期GST-Pi表达水平与处理前相比增强最多(图5)。DEN单独处理组GST-Pi表达水平递增趋势变化不明显, 同一时间段的GST-Pi表达水平相对于DEN联合MC-LR(终浓度为10 µg/kg)处理组低(图6)。

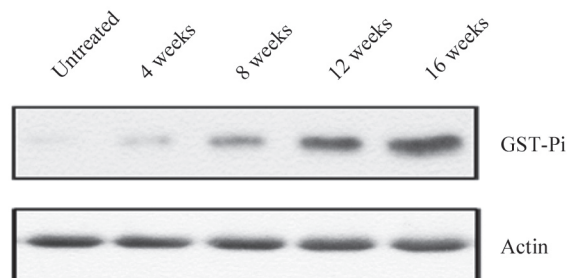


图5 DEN联合10 µg/kg MC-LR处理不同时间GST-Pi蛋白质的表达变化情况

Fig.5 Expression of GST-Pi protein after treatment with DEN and 10 µg/kg MC-LR at different time

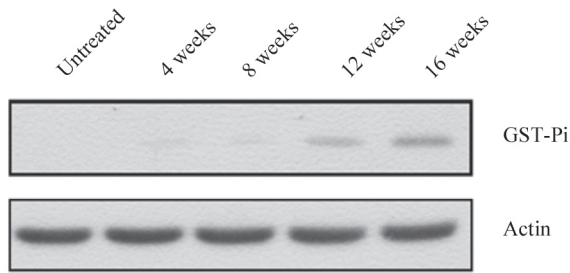


图6 DEN处理不同时间GST-Pi蛋白质的表达变化

Fig.6 Expression of GST-Pi protein after treatment with DEN at different time

3 讨论

大鼠肝癌模型对于研究人类原发性肝癌的发生机理是十分有用的, 实验大鼠依然是一个研究体内肝癌发生最理想的模式动物。目前, 有很多化学物质都可以诱发大鼠原发性肝癌^[8]。其中, 二乙基亚硝胺是一种强烈的化学致癌物, 对肝脏具有特异的亲和性, 它诱发的动物原发性肝癌的发生过程与人类肝癌发生过程相似度很高, 因此DEN诱发的大鼠肝癌模型被广泛用于科学研究。科学研究已经证实藻毒素是一种肝毒素, 并且是一种潜在的促癌剂, 高浓度时可以诱导细胞凋亡或死亡, 而低浓度藻毒素的慢性毒性能够促进细胞增殖和肝癌的发生。目前, 很多大鼠肝癌模型的建立是采用DEN作为首次启动剂并使用一次性腹腔注射或是慢性饮水的方法, 也有采用DEN联合初提藻毒素的方法共同建立模型的, 但这些方法成模周期较长且充满了不确定性。

本实验不仅将DEN作为一种启动剂, 还用DEN联合藻毒素进行腹腔注射建立肝癌模型, 从形态学、病理学以及蛋白质水平来研究藻毒素对大鼠的促癌作用, 发现藻毒素的促癌效果具有明显的剂量-效应关系, 并且找出了藻毒素促癌的最佳剂量。实验结果显示, 16周时正常组和MC-LR单独处理组大鼠无死亡现象, DEN单独处理组及DEN联合藻毒素处理组大鼠死亡率为2.5%, 其中存活大鼠的诱癌成功率为96%。正常对照组和不同浓度藻毒素单独处理组大鼠精神和食欲较正常, 肝重体重比值在不同时间段变化不大; 而DEN单独处理组和DEN联合藻毒素处理组大鼠在诱癌后期精神萎靡, 食欲不振, 尿液偏黄, 流鼻血现象严重, 体重增长较慢, 肝重体重比值均出现不同程度的增长趋势, 其中DEN联合藻毒素MC-LR(终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)处理组大鼠腹水现象严重, 肝重体重比值较其他组增长明显。同时病理学结果显示DEN联

合藻毒素MC-LR(终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)处理组相对DEN单独处理组和DEN联合其它浓度藻毒素处理组在同一时间段的促癌效果更明显。有文献^[9]报道, DEN单独促癌7周时出现肝损伤现象, 到25周时为肝硬化期, 30周时才形成肝癌。而本实验中肝癌发生的不同阶段均缩短了时间, 在12周时就进入了肝硬化期, 16周时癌症形成。而藻毒素单独处理组大鼠肝脏较正常对照组颜色较深, 血管丰富, 只出现轻微水肿现象, 并不能诱发肝癌, 说明藻毒素单独作用不能启动肝癌的发生, 但是在低浓度的情况下能促进启动后的肝癌发生。有趣的是, DEN联合20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR处理组与DEN联合10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR处理组相比, 后者促癌效果更明显, 这可能是由于20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR处于促细胞生长和促细胞凋亡的过渡阶段, 其具体机制有待进一步的研究。

谷胱甘肽硫转移酶是反映肝癌前期病变的一个标志物, 在正常大鼠肝组织中几乎不表达, 但在化学物质诱导肝癌发生发展的早期可被迅速激活出现持续性高表达。本实验的免疫印迹检测结果显示, GST-Pi的表达随处理时间延长呈递增趋势。正常组织中GST-Pi不表达, 而DEN联合藻毒素MC-LR(终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)处理组GST-Pi在4周时开始表达, 但表达量很少; 此后, GST-Pi的表达随时间明显增强; 至16周时GST-Pi表达量与处理前相比最高, 这与形态学和病理学上的三个阶段结果一致。可以看出, 与使用DEN单独造模相比, DEN联合10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR处理组在同一时间段的GST-Pi的表达增幅较快。

因此, DEN联合藻毒素MC-LR(终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)诱发肝癌模型的时间比DEN单独诱发肝癌的时间更短且效果更显著, 是一种研究人体肝癌的理想模型。

参考文献 (References)

- 1 Qin W, Xu L, Zhang X, Wang Y, Meng X, Miao A, *et al.* Endoplasmic reticulum stress in murine liver and kidney exposed to microcystin-LR. *Toxicol* 2010; 56(8): 1334-41.
- 2 Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, *et al.* Detection of microcystin, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996; 17(6): 1317-21.
- 3 闫海, 潘纲, 张明明. 微囊藻毒素研究进展. *生态学报* 2002; 22(11): 1968-75.
- 4 李笑岩, 白成勇, 刘同慎, 韩玉贞, 刘利德. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌模型的建立及病理学改变. *滨州医学院学报* 2007;

- 30(6): 401-6.
- 5 赵金明, 蒋颂辉, 朱惠刚. 藻毒素对实验性大鼠肝癌的促进作用. 中国公共卫生 2003; 19(6): 695-7.
- 6 张海波. 诱发性大鼠肝癌模型的研究现状与评价. 医学综述 2002; 8(6): 320-2.
- 7 Gehringer MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. FEBS Lett 2004; 557(1/2/3): 1-8.
- 8 Leenders MW, Nijkamp MW, Borel Rinkes IH. Mouse models in liver cancer research: A review of current literature. World J Gastroenterol 2008; 14(45): 6915-23.
- 9 周峥珍, 章宗籍, 钱忠义, 张华献, 申丽娟, 谢桂先. DEN诱发大鼠肝癌模型的实验病理研究. 昆明医学院学报 2005; 26(3): 15-9.

An Established Method of Diethylnitrosamine-induced Hepatocellular Carcinomas Rats Model Promoted by Microcystins-LR

Sun Hanyan, Xu Changzhi, Wang Yu, Li Yucheng, Huang Bei*

(School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

Abstract Animal models of hepatocellular carcinomas can be helpful to understand the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of hepatocellular carcinomas. Diethylnitrosamine (DEN) is a well known potent hepatocarcinogenic agent and is usually used to induce liver cancer in animal models. Microcystin-LR (MC-LR) is a cyclic heptapeptide toxin produced by cyanobacteria. MC-LR has the proficiency of cancer promotion by its chronic efficiency on human at low concentrations. In our study, hepatocellular carcinomas model of rats were induced by DEN and different concentrations of MC-LR through intraperitoneal injection. A series of changes in rat livers were observed with morphological and pathological techniques. At the same time, the expression levels of GST-Pi were detected by Western blot. The results showed that the procession of hepato-carcinogenesis in these models included three stages-hepatic toxic lesion: hepatic proliferation, hepatic cirrhosis and hepatic carcinogenesis. Particularly, the efficiency of tumor promotion with DEN and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR was better than other groups. We have found a new way to establish hepatocellular carcinomas model in rats.

Key words microcystins-LR; hepatocellular carcinomas models; tumor promotion

Received: December 20, 2011 Accepted: January 19, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (No.090413077)

*Corresponding author. Tel: 86-551-5107341, E-mail: beihuang@163.com