

## ·研究简报·

# 大鼠放射性皮肤溃疡组织中 c-Fos 、 Rb 蛋白表达研究 \*

谷庆阳<sup>1</sup> 高亚兵<sup>1</sup> 王德文<sup>1</sup> 杨志祥<sup>2</sup> 赵 坡<sup>1</sup> 杨文峰<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

<sup>2</sup>(解放军 307 医院外科 北京 100850)

**摘要** 为研究大鼠放射性皮肤溃疡组织中 c-Fos 、 Rb 表达。采用 140 只 Wistar 大鼠进行局部照射 ( $\gamma$  射线) 制备放射性皮肤溃疡动物模型, 观察病变 1 年, 然后采用 c-Fos 、 Rb 多克隆抗体及免疫组化方法检测皮肤溃疡组织中 c-Fos 、 Rb 的表达情况。结果表明: c-Fos 、 Rb 的表达阳性率分别为 45.8%(33/72) 、 63.9%(46/72), 两者阳性部位主要见于增生肥大的鳞状上皮细胞胞核、增生的间质成纤维细胞胞质及胞核、小血管内皮细胞中。初步的结论是: c-Fos 、 Rb 蛋白的高表达可能与放射性皮肤溃疡难愈合有关。

**关键词** 大鼠, 放射性皮肤溃疡, 癌基因

**中图分类号** R818.02

放射性皮肤溃疡多见于临床放疗引起的并发症, 其特点为顽固性反复发作、长期不愈, 最后可能发展为癌变。放射性皮肤溃疡的基因病理学改变目前尚不清楚, 国内外尚少见其相关癌基因改变的病理学研究报道<sup>[1]</sup>。c-Fos 、 Rb 基因与皮肤肿瘤密切相关, 也是近年来肿瘤研究的热点。为了解 c-Fos 、 Rb 基因在放射性皮肤损伤中的改变及其意义, 我们制备了放射性皮肤溃疡动物模型, 并检测其基因表达状况。

## 1 材 料 和 方 法

采用 140 只雌性 Wistar 大鼠以  $\gamma$  射线进行局部单次照射, 鼠重  $250 \pm 10\text{g}$ , 照射野为双侧臀部、后腿及尾巴 (约  $8 \times 2\text{cm}^2$ ), 照射吸收剂量为 35(60 只)、45(40 只)、55GGy(40 只), 剂量率为  $4.612\text{Gy}/\text{min}$ 。观察病变 1 年并分阶段取材。标本经福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片后行常规染色。免疫组化染色法: 切片常规脱蜡, 0.3% 过氧化氢 - 甲醇 30min, 按微波炉抗原修复法处理后<sup>[2]</sup>, 兔抗鼠 c-Fos 、 Rb 蛋白抗体 (Santa Cruz 公司产品)1:100,  $4^\circ\text{C}$  过夜。以下方法按 SP 药盒 (Zymed 公司产品) 方法进行, 以 PBS 、正常兔血清代替一抗作空白对照和替代对照, 以大鼠正常伤口皮肤为正常对照, 以胞膜或胞质染成棕黄色作为阳性判定标准。

\* 国家自然科学基金资助 (39470229)

收稿日期: 初稿 1999-08-18, 修回 2000-01-10

## 2 结果

于照射后 12~14d, 所有受照射动物照射野均出现大小不等的溃疡, 并出现糜烂、水肿, 溃疡底部开始为红色, 有渗出液, 未见感染。随着时间的推移, 溃疡逐渐扩大、加深, 多数伴随感染, 水肿则渐减轻。照射后 4 个月, 63% 动物出现肢残(后腿或尾巴因溃疡而折断或脱落), 21% 较浅小溃疡愈合(其中 33% 于照射后 6 个月有复发)。受照射后动物不断死亡, 死亡原因多为衰竭。照射后 1 年将所余 13 只动物全部活杀取材。

光镜观察, 大鼠放射性皮肤溃疡的基本病理改变为: (1) 坏死、出血: 早期(照射后 14d 至 3 月)可见受照射组织中鳞状上皮细胞及成纤维细胞坏死, 出血见于真皮及皮下组织层, 血管壁结构破坏, 内皮细胞脱落。(2) 变性增生: 早期(照射后 14d 至 3 月)见真皮层胶原纤维肿胀、变性、断裂、融解。照射后 5 个月可见溃疡底部有小动脉管壁增生肥厚。(3) 萎缩: 受照射部位表皮细胞及溃疡底部肌层萎缩。(4) 渗出: 溃疡底部各层中出现中性粒细胞、巨噬细胞及少量淋巴细胞。(5) 修复再生: 包括表皮细胞增殖、附属腺体再生; 成纤维细胞迁移、聚集, 其中并可出现少量新生血管, 修复被损坏的组织, 但其特点是修复不彻底, 生机差。(6) 细胞损伤: 出现大型、畸形的放射性成纤维细胞<sup>[3]</sup>。

44 只照射后 1-6 个月和 28 只照射后 6~12 个月大鼠皮肤溃疡组织切片经微波炉抗原修复法处理, 用 c-Fos 蛋白抗体以 SP 法染色后, 其表达阳性者分别为 18 例(40.9%)和 15 例(53.6%), 总阳性率为 45.8%(33/72)。正常伤口皮肤及空白、替代对照均为阴性。c-Fos 蛋白高表达部位主要见于(1)增生肥大的鳞状上皮细胞胞核(见图 1); (2)间质成纤维细胞及血管内皮细胞胞质及胞核(见图 2)。镜下见阳性细胞呈局灶性或弥漫性分布, 阳性细胞及其胞核体积均较大, 提示 c-Fos 蛋白高表达可能与细胞生长或功能活跃有关。照射后 1~6 个月和照射后 6-12 个月组织中 Rb 蛋白高表达阳性率分别为 56.8%(25/44)及 75.0%(21/28), 总阳性率为 63.9%(46/72), 阳性部位分布和定位与 c-Fos 基本相同, 提示其作用可能与抑制细胞增殖或下调 c-Fos 基因有关。对照组均为阴性。

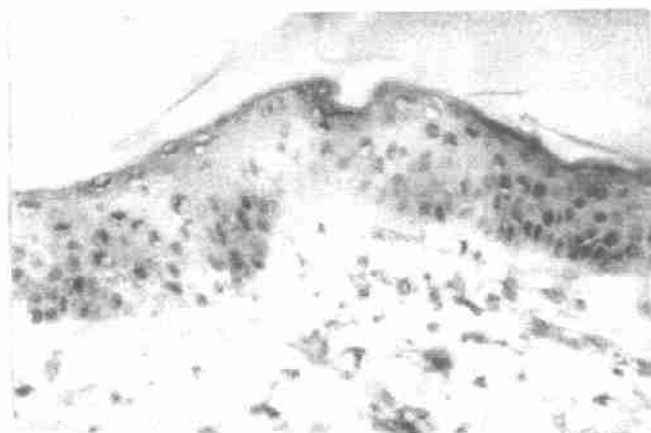


Fig.1 Overexpression of c-Fos in the nucleus of activated squamous epithelial cells  
(by immunohistochemistry,  $\times 400$ )

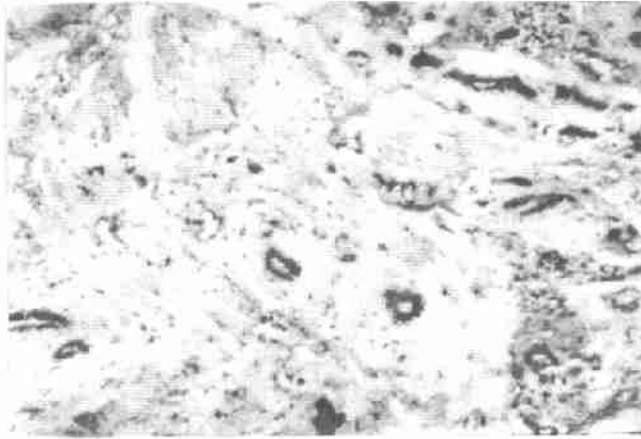


Fig.2 Overexpression of c-Fos protein in the endothelial cells of arterioles in mesenchyme  
(by immunohistochemistry,  $\times 200$ )

### 3 讨论

原癌基因 c-Fos 的产物是一种分子量为 62KD 的磷酸化蛋白质。c-Fos 与 c-jun 形成杂二聚体, 与 DNA 结合作为转录活化因子 AP-1(Activator protein) 参与转录活化机制<sup>[4,5]</sup>。一般情况下, c-Fos 的表达是一过性的, 而且产生的 mRNA 极不稳定。但在异常情况下, c-Fos 蛋白能在细胞内大量聚积, 发挥转化能力。c-Fos 基因作为其它癌基因的转录调节器, 恶性转化有可能是 Fos 基因过度表达, 导致 Fos 调控的细胞基因表达改变的结果<sup>[6]</sup>。抑癌基因 Rb 位于 13 号染色体长臂, 其编码 110-114KD 的核磷酸蛋白。Rb 蛋白的功能缺失在多种人类恶性肿瘤的发生过程中起较普遍的作用。免疫组化方法证实, 体内正常非分裂的  $G_0/G_1$  期的细胞和已知 Rb+ 肿瘤细胞的  $G_1$  期核染色明显缺乏, Rb 阳性细胞核染色在迅速分裂的细胞中呈阳性, 其与细胞周期调节有关, 根据细胞周期和分化状态, 可能包括生长刺激和抑制作用<sup>[7]</sup>。军事医学科学院放射医学研究所杜悦娇等<sup>[1]</sup>曾以 c-Fos 和 Rb 抗体检测部分人体放射性皮肤溃疡标本, 得到其高表达阳性率分别为 84.0% 和 100%。我们采用局部照射 Wistar 大鼠方法, 制备了典型的放射性皮肤溃疡动物模型, 其病变与人体放射性皮肤溃疡病变十分相似。通过检测这些标本中 c-Fos 和 Rb 的表达, 得到的结果较上述人体标本的阳性率低, 且随着溃疡时间的延长, 其高表达阳性率有所增高。本文的结果证实了 c-Fos、Rb 的高表达为放射性皮肤溃疡病变的常发事件, 可能为受照射后 c-Fos、Rb 基因发生相应改变的结果, 本工作将在下一步基因检测工作中予以证实。

### 参 考 文 献

- 1 Du Y J, Wang D W, Gao Y B *et al.* Chin J Radiol Med Prot (in Chinese), 1996, 16(4):220-224
- 2 Shi S R, Key M E, Kalra K L J Histochem Cytochem, 1991, 39(6):741-746
- 3 Gu Q Y, Wang D W, Cui C B *et al.* J Environ Pathol Oncol Toxicol, 1998, 17(2):117-121
- 4 De T P, Niman H, Raymond V *et al.* Mol Cell Biol, 1988, 8:2251-2257

- 5 Chin R, Boyle W J, Meek J *et al.* Cell, 1988, 54:541-546
- 6 Greenhalgh D A, Welty D J, Player A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:643-648
- 7 Xu H J, Hu S X, Rieger M. Oncogen, 1991, 6:1139-1145

## A PATHOLOGICAL STUDY ON EXPRESSION OF c-Fos AND Rb PROTEINS IN RAT RADIATION SKIN ULCER

GU Qingyang<sup>1</sup> GAO Yabing<sup>1</sup> WANG Dewen<sup>1</sup> YANG Zhixiang<sup>2</sup>  
ZHAO Po<sup>1</sup> YANG Wenfeng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

<sup>2</sup>(Department of Surgery, 307 Hospital of the Chinese PLA, Beijing 100850)

**ABSTRACT** To study the expression of c-Fos and Rb in radiation-induced rat skin ulcers. We set up an animal model of radiation skin ulcer with 140 rats which were locally irradiated with 35~55Gy  $\gamma$  rays, and the pathological changes were observed for 1 year. Immunohistochemical studies were performed in 72 rat radiation skin ulcer tissues, and c-Fos, Rb protein polyclonal antibodies were used. The results showed that the positive rate for overexpression of c-Fos was 45.8%, and for that of Rb was 63.9%. The positive position was mainly in the nucleus of activated squamous epithelial cells and in some fibroblasts, endotheliocytes of the arterioles in mesenchyme. It is suggested that the overexpression of c-Fos and Rb proteins might be related to canceration and poor healing in radiation skin ulcers.

**KEYWORDS** Rat, Radiation skin ulcer, Oncogene

**CLC** R818.02