

肝切除與高脂肪飼料對動物動肝癌 誘發之影響

戴瑄

一、研究理由

飲食中脂肪所占所例及種類可影響肝臟微粒的脂肪酸組成、肝細胞膜上接受器的功能及與膜相關的酶之活性(1)、高脂肪飲食可能經由改變肝細胞膜的磷脂性質而活化蛋白質激酶-C (protein kinase C, PKC)，進而誘發肝癌的產生(2)。

Aflatoxin B₁(AFB₁)具極強的致癌性，也是導致人類罹患肝癌的重要病因之一(3)。AFB₁的致癌作用受到其代謝過程、營養狀況、血液中長鏈脂肪酸的濃度(4)和肝再生……等因素之影響，而其中飲食的脂肪含量在AFB₁誘發肝癌過程中所扮演的角色正是我們所想探討的課題。

因分裂中的肝細胞易成爲致癌物攻擊的目標，故施予致癌劑前，先切除部分肝，可較快見到癌變現象(5)。

本實驗藉由測定大白鼠肝臟的PKC及鳥胺酸脫羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)活性及脂肪酸的含量並觀察其組織上的變化來探討飲食中脂肪對AFB₁及部分肝切除手術誘發肝癌的影響。

二、研究方法

1. 實驗動物

購自陽明醫學院動物中心的雄性 Sprague-Dawley種系大白鼠，體重約 65-84 g，1月左右大。飼養於光照12小時、溫度24±1℃、濕度50%的環境下，飲食使用配方飲食，食量、飲水量不設限。

2. 實驗設計

首先，大白鼠施以切肝手術，繼而由腹腔注射 A F B₁ (0.25mg/kg 體重) (6)，然後分為兩大組，一予高脂飲食（脂肪占20%），一予低脂飲食（脂肪占 0.5%）。飼養一月後犧牲部分大白鼠，取出肝臟進行 O D C 測定，及組織切片。而其餘者飼養 6 月後犧牲，進行肝臟的 P K C 活性、脂肪酸 (fatty acid, F A) 測定及組織切片。

三、研究步驟

A. F A 之檢測法 (7)

取出冰凍的肝臟，稱重，加入冷的 heptane-isopropanol (3:7，含 heptadecanoic acid 200 μg/ml，每 100mg 組織加入 1 ml 該溶劑)，予以均質化、靜置 2 小時後離心 (2000rpm，5 分，4 °C 下)，收集上層液於 N₂ 下蒸乾。將 4.7ml 95% 酒精，0.3ml 33% K O H 加入蒸乾物中，於 60 °C 下反應 30 分，以冰浴終止反應，再加入 5 ml 水、0.5ml 5.7N H C l 酸化之，爾後用 2 ml hexane 萃取二次，於 N₂ 下蒸乾。將 2 ml 14% B F₃ (in methanol) 加入蒸乾物中，反應 10 分後加入 5 ml 水，再以 2 ml hexane 萃取二次，於 N₂ 下蒸乾。終產物以氣相層析法分析 F A 的種類及含量。

B. P K C 活性測法 (8)

製備細胞懸浮液：4 °C 下，3 × 10⁷ cells/5 ml 緩衝液含 Tris-H C l, E D T A, 2-mercaptoethanol, glycerol。以 2 × 10⁵ s 低速超音波振盪之，離心 50000 g / 1h，收集上層液（可溶部分）。沈澱物以 5 ml 緩衝液沖洗，加入緩衝液（含 0.3% triton X-100）4 °C 下培養 1 小時，再低速超音波振盪之、離心、收集上層液。將所有可溶部分置入 D E A E - cellulose column (1 cm × 10 cm)，用緩衝液洗過，以 30ml 0-0.3M K C l 溶液（溶於緩衝液）洗出

含PKC之成分，收集液中取 $50\mu\text{l}$ 測PKC之活性。PKC萃取液 $50\mu\text{l}$ ，加上培養液（含Tri-HCl、 MgCl_2 、Lysine-rich histone, phosphatidylserine, CaCl_2 或EGTA, $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP： 3.5×10^5 cpm/ μmol ）共 0.2ml ，於 30°C 下反應3分鐘，用20%（W/V）trichloroacetic acid使 phosphorylated histone 沈澱，洗過後，測放射性。PKC活性表示：

$\text{nmol } \gamma\text{-}^{32}\text{P ATP} / \text{mg protein} / 3 \text{ 分}$ 。蛋白質之測定採用 Bio-Rad protein assay。

C. ODC 活性測法(9)

取得肝組織，加入 1ml 均質液(sodium phosphate 10mM , pyridoxal 5'-phosphate 0.1mM , dithiothreitol 5mM , EDTA 0.1mM , Sucrose 0.25M)研磨之，離心($15300\text{g} \times 60\text{s}$, 4°C)，收集上層液。取 0.25ml 上層液置於 15ml 錐形試管內，再加入 0.75ml 培養液，混合液各成分濃度：sodium phosphate 30mM , pyridoxal 5'-phosphate 0.1mM , dithiothreitol 5mM , L-ornithine 1.8mM , L- ^{14}C ornithine $1\mu\text{Ci/ml}$ 。center well(Kontes)中加入 0.1ml 1M NaOH ，套入瓶塞，再封蓋。於 37°C ，振盪下培養60分。將 Center well置入閃爍瓶中，加入 8ml 閃爍液，即測其放射性。ODC活性表示： $\text{pmol } ^{14}\text{CO}_2 \text{ release} / \text{mg protein} / \text{小時}$ 。

D. 組織切片(10)

將肝組織以中性5% formaldehyde 固定，經酒精脫水、xylene 清洗、paraffin($\text{mp}: 56\sim 58^\circ\text{C}$) 浸潤、包埋，然後製作切片，以 hematoxylin、eosin 染色，于光學顯微鏡下觀察組織變化並照相。

E. 以 Western blot analysis 檢驗肝細胞的 P K C 含量(11)

處理過的細胞萃取液溶於 sodium dodecyl sulfate sample buffer 於 10% polyacrylamide gel 行電泳反應，而後轉移至 nitrocellulose (N C) membrane。N C membrane 在 37°C 下，於 Tris/NaCl/NP-40 buffer [20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP-40, 3% bovine serum albumin (BSA)] 中培養 3 小時，其後此膜在 40°C 下，Tris/NaCl/NP-40 buffer [含 P K C antiserum (1:500), 1% BSA] 中培養整晚，然後用 Tris/NaCl/NP-40 buffer 洗過，最後用 substrate solution 使之產生藍色產物，由顏色深淺來判定 P K C 含量的多寡。

F. 結果分析——採用 Paired Student's t-test, $P < 0.05$ 為差異顯著。

四、研究結果

1. rat 體重變化，肝重（圖 1）

高、低脂兩組間無明顯差異。

2. rat 肝中 F A 含量比較（圖 2）

高脂組 rat 肝中 stearic acid、oleic acid、linoleic acid、linolenic acid、arachidonic acid 之含量明顯高於低脂組（均 $P < 0.05$ ）。

3. rat 肝中 P K C 活性比較（表 1）

高脂組在 cytosol、particulate 中 P K C 的活性分別較低脂組高出 43% 與 15%。P K C 在 particulate 及 cytosol 中的活性均是前者大於後者，高低脂兩組增加率分別是 55%、93%。以 Western blot assay 亦發現在 particulate 部分，P K C-A b 之 band 染色較深。

4. rat 肝中 O D C 活性比較

餵養 1 月後，高低脂兩組間無明顯差異。

5. 脂肪肝現象（圖 3）

高脂組有較明顯的脂肪肝現象。

以往的報告曾指出 T P A (tetradecanoyl phorbol acetate) 能促使肝細胞的 P K C 發生轉移現象 (19, 20) , 本實驗亦發現此種轉移現象 , 由此我們推論 A F B₁ 引發肝癌的過程中 , P K C 的轉移乃必要的機制之一。

我們將朝下列方向 , 繼續探討致癌機轉 :

1. 增加 A F B₁ 的劑量 , 或以低劑量連續或間歇地追加 , 以期在短時間內觀察到較明顯的肝癌病變。
2. 改變飲食配方 , 如食用油種類、營養成分比例……等 , 以便探討能加強 A F B₁ 致癌作用的飲食因子。
3. 研究脂肝的脂肪小球中之 F A 是否有活化 P K C 的作用。
4. 分析細胞膜、質、核等不同部分的 F A 、 D A G 、 P K C 的變化情形 , 並找尋影響因子 , 以進一步探討癌化過程中 P K C 的活化機制。

五、討論

我們觀察到低脂組 rat，其飲食中脂肪所占比率雖然較少，但總攝食量卻大於高脂組 rat，由兩組相近的體重變化，可推知兩組熱量攝取量亦相當。

高脂組 rat雖然脂肝情況較嚴重，但對肝重的影響不大，故兩組肝重相近。

不飽和脂肪酸：oleic、linoleic、linoleinic、arachidonic acid等能提高PKC的活性，且DAG(diacylglycerol)活化PKC的作用，亦因FA的參與而加強(12, 13)。本實驗中高脂組肝的FA含量明顯高於低脂組，但PKC的活性未相對地提高（與低脂組間無統計上的差異），而脂肝現象又較嚴重。我們推測其增高的FA可能來自脂肝的脂肪小球，而該處之FA無法對PKC產生明顯的激活作用。

細胞受到某些刺激，如致癌劑——phorbol esters……等之作用後，其PKC會由細胞質轉移至細胞膜，並表現出較高的活性(14)。PKC的高度活化乃細胞分裂的關鍵步驟，尤其在癌化過程中，PKC可能長期處於激活狀態(15)。以往的研究發現AFB₁誘發肝癌的過程與c-myc，c-Ha-ras等致癌基因的表現有關(16)，且H-ras、Ki-ras等致癌基因可促使DAG的含量升高，進而增高PKC的活性(17)。予rat單次AFB₁(1 mg/kgBW)注射後3週發現其有明顯的肝病變(18)。曾施予部分切除手術的肝臟其細胞約在15小時後即開始合成DNA，此時即細胞分裂時期對致癌劑的攻擊較為敏感(5)。本實驗將rat切除部分肝臟後，隔天即注射AFB₁，於餵養6月後發現其肝細胞的PKC有明顯的轉移現象，由此推測其致癌基因業已活躍至足以提升DAG的含量及PKC的活性。

六、誌謝

本研究由於國科會的經費(N S C 80-0114-C-002-22 a)支持及台大醫學院提供研究設施，並承蒙台大生化研究所所長林仁混教授與博士班劉哲育學長的指導，得以順利完成，特此深致謝意。

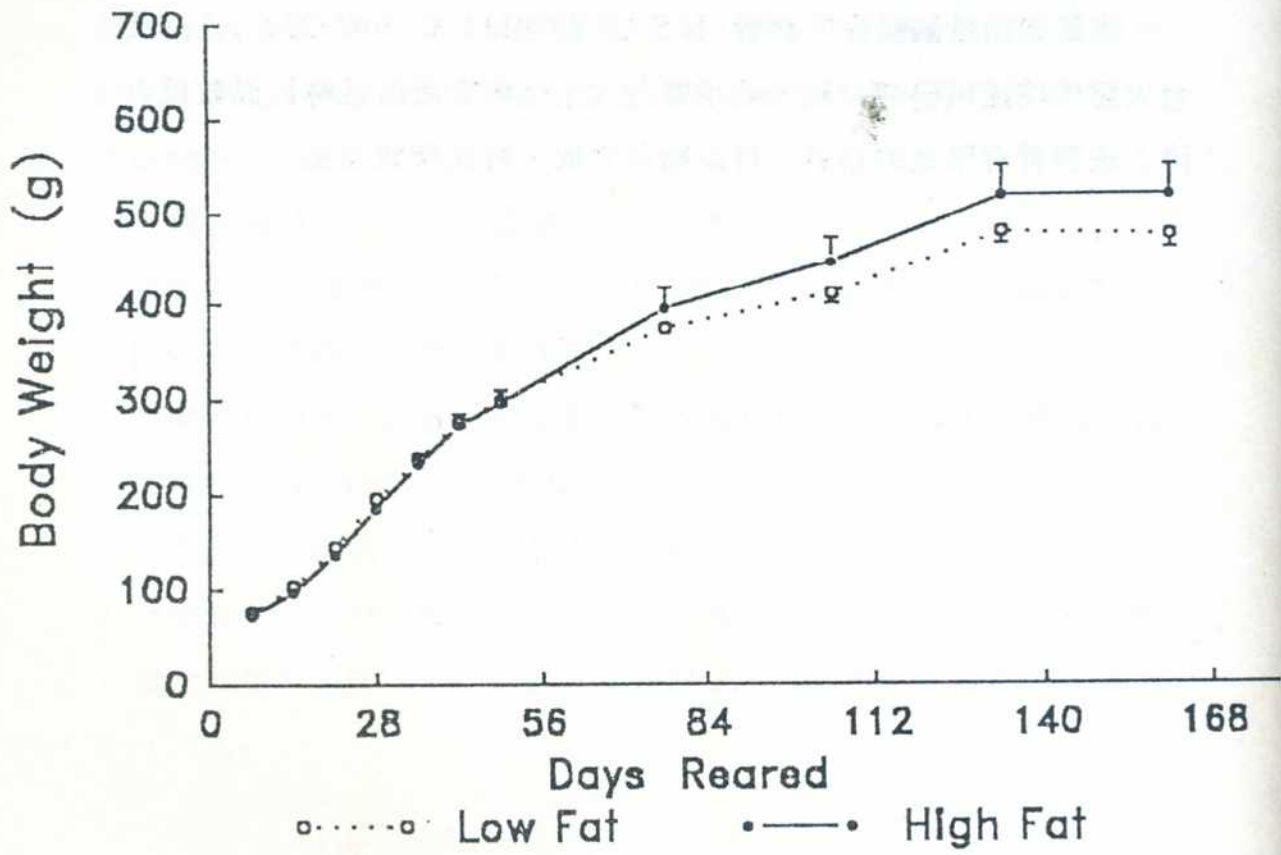


圖 1

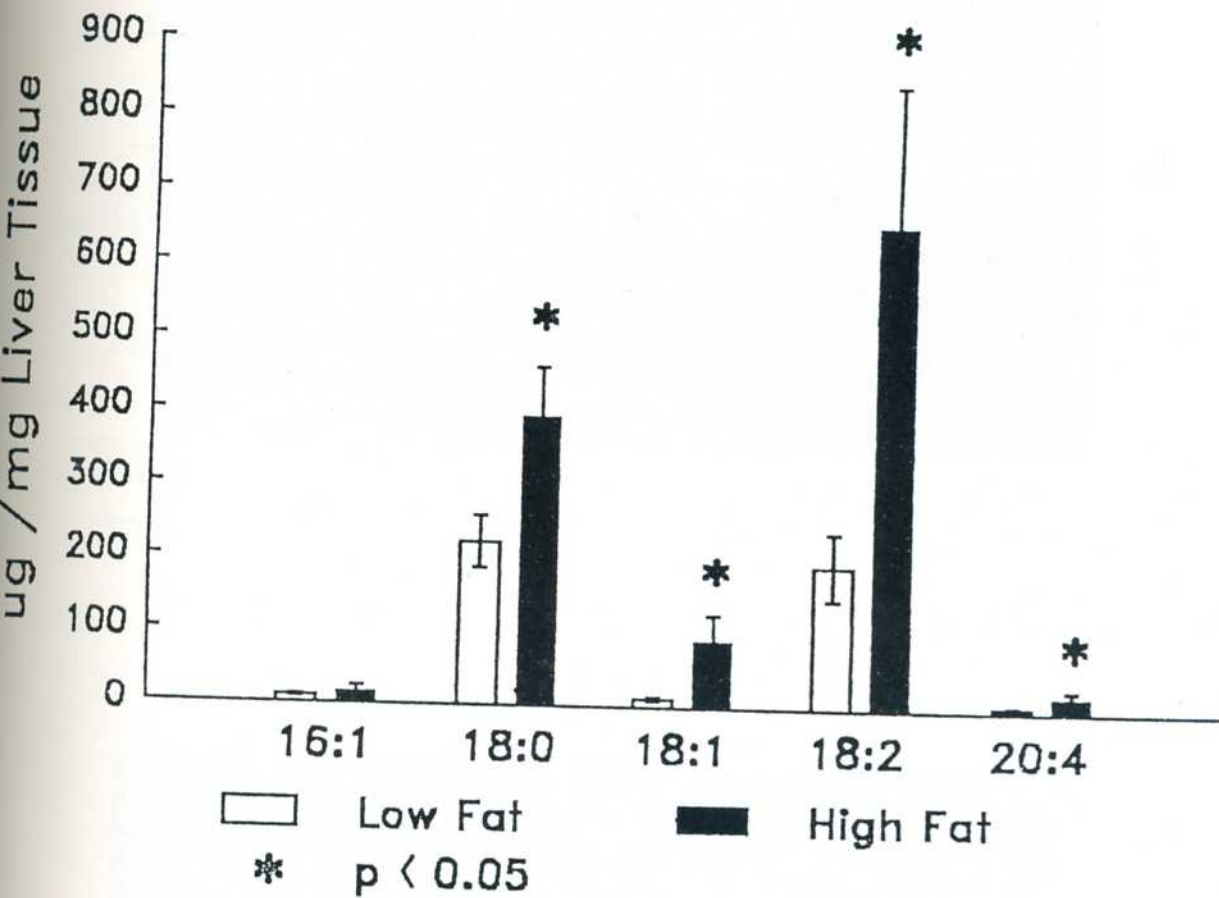
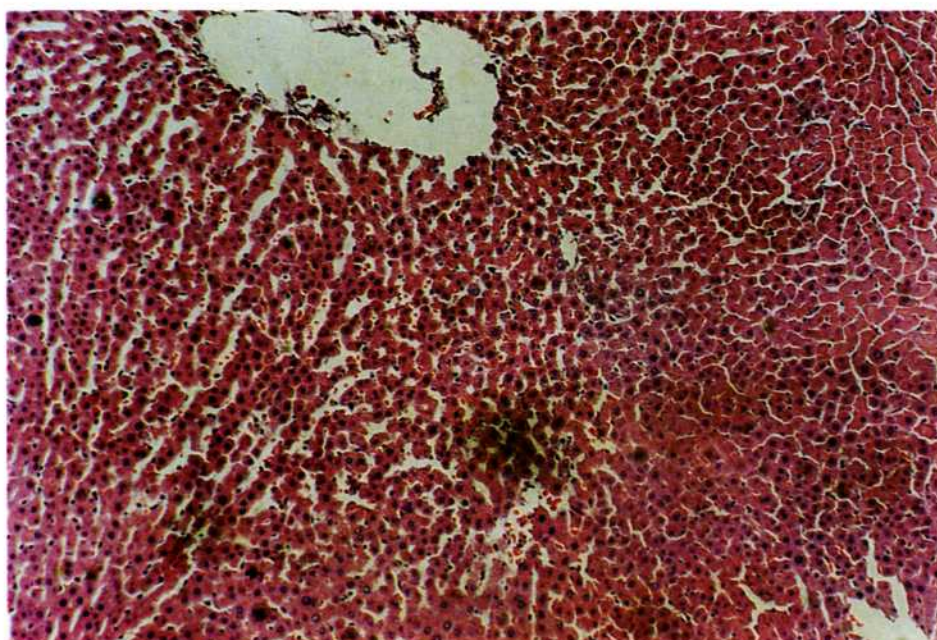


圖 2

3-1 脂肪組



3-1 高脂肪組

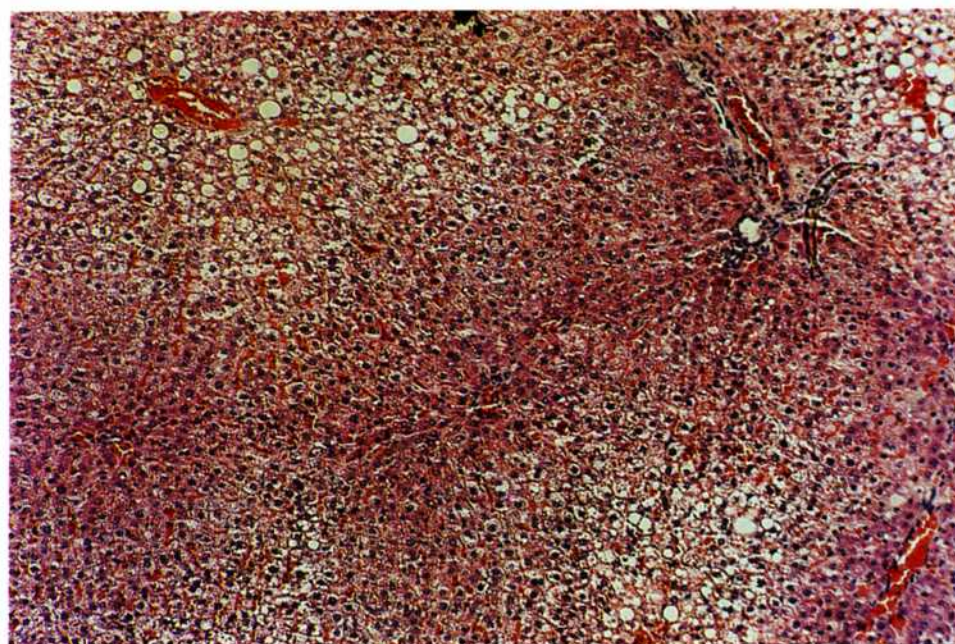


圖 3

Table 1. Translocation of protein kinase C induced by aflatoxin B₁ in rat liver

PKC Activity n Mole ³² P - A T P /mg protein		
	Low Fat	High Fat
Cytosolic	0.14±0.03 (37%)	0.20±0.08 (35%)
Particulate	0.27±0.07 (63%)	0.31±0.02 (65%)
Total	0.41±0.08	0.52±0.09

REFERENCES

1. Margreaves K.M., Pehowich D.J. and Chandinid M.T. Effect of dietary lipid composition on rat liver microsomal phosphatidylcholine synthesis. *J. Nutr.* 199: 344-348, 1989.
2. Donnely T.E., Jr. Birt D.F., Sittler R., Anderson C.L., Choe M. and Julius A. Dietary fat regulation at the association of protien kinase C activity with epidermal cell membranes. *Carcinogenesis* 8(12) : 1867-1870, 1987.
3. Newberne P.M., Weigert J. and Kula N. Effects of dietary fat on hepatic mixed-function oxidases and hepatocellular carcinoma induced by aflatoxin B₁ in rats. *Cancer Res.* 39:3986-3991, 1979.
4. Oirr H.W. Effects of hydrogen ion and fatty acid concentration on the binding of aflatoxin B₁ to human albumin. *Biochem. International.* 14(4): 727-733, 1987.
5. Rabes H.M., Hartmann M.A., Kerler R. and Schuster C. Cell cycle-dependent initiation of adenosine triphosphatase-deficient populations in adult rat liver by a single dose of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res.* 46: 645-650, 1986.

6. Monroe D.H. and Eaton D.L. Comparative effects of butylated hydroxyanisole on hepatic in vivo DNA binding and in vitro biotransformation of aflatoxin B₁ in the rat and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90: 401-409, 1987.
7. Ontko J.K. and Wang C.S. Elevation of liver diacylglycerols and molecular species of diacylglycerols in rats fed a lipogenic diet. *J. Lipid Res.* 30: 691-699, 1989.
8. Wise B.C., Raynor, R.L. and Kuo J.F. Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase from heart. I. Purification and general properties. *J. Biol. Chem.* 257: 8481-8488, 1982.
9. Inoue H. and Takeda Y. Ornithine decarboxylase methods in biogenic amine research (Parvez S., Nagatsu T., Nagatsu I., Parvez H. ed.), Chapter 33, pp.777-781. Elsevier Science Publishers, New York, 1983.
10. Hultcrantz F. and Eriksson L.C. The source of serum alkaline phosphatases in liver-tumor-bearing rats. *Liver* 9:216-222, 1989.

11. Thomas T.P., Talwar H.S., Anderson W.B. Phorbol ester-mediated association of protein kinase C to the nuclear fraction in NIH 3T3 cells. *Cancer Res.* 48: 1910-1919, 1988.
12. Seifert R., Schachtele C., Rosenthal W. and Schultz G. Activation of protein kinase C by cis- and trans-fatty acids and its potentiation by diacylglycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 20-26, 1988.
13. Verkest V., McArtjur M. and Hamilton S. Fatty acid activation of protein kinase C: dependence on diacylglycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 825-829, 1988.
14. Ito M., Tanabe F., Sato A., Ishida E., Takami Y. and Shigeta S. Possible involvement of microfilaments in protein kinase C translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 :1344-1349, 1989.
15. Wolfman A., Wingrove T.G., Blackshear P.J. and Macara I. G. Down-regulation of protein kinase C and of an endogenous 80-kDa substrate in transformed fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262(34):16546-16552, 1987.

16. Tashiri F., Morimura S., Hayashi K., Makino R., Kawamura H., Horikoshi N., Nemoto K., Ohtsubo K., Sugimura T. and Ueno Y. Expression of the c-Ha-ras and c-myc genes in aflatoxin B₁-induced hepatocellular carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 858-864, 1986.
17. Wolfman A., and Macara I.G. Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras-transformed fibroblasts. *Nature* 325:359-361, 1987.
18. Moore M.A., Nakagawa K. and Ishikawa T. Selection pressure and altered hepatocellular islands after a single injection of aflatoxin B₁. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 187-194, 1988.
19. Masmoudi A., Labourdette G., Mersel M., Huang F.L., Huang K.P., Vincendon G. and Malviya A.N. Protein kinase C located in rat liver nuclei partial purification and biochemical and immunochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 264: 1172-1179, 1989.
20. Kass G.E.N., Duddy S.K. and Orrenius S. Activation of hepatocyte protein kinase C by redox-cycling quinones. *Biochem. J.* 260: 499-507, 1989.