文章编号:1000-5404(2005)09-0871-03

论著

大鼠非酒精性脂肪肝形成过程中肝细胞增殖的变化

代雪枫,陈东风 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨大鼠非酒精性脂肪肝形成过程中肝细胞增殖的变化。**方法** 通过高脂饮食建立Wistar大鼠非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)模型,同时设立正常饮食组作为对照,在实验第4、8、12周时分批收集肝脏标本。应用流式细胞术检测细胞周期,测定S期细胞比例(SPF)和增殖指数(PI),用免疫组织化学法检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达。**结果** 高脂4周组和高脂8周组与对照组各项指标均无差异。高脂12周时SPF和PI明显高于对照组($P<0.01$),PCNA阳性率也明显升高($P<0.01$)。**结论** 大鼠NAFLD形成过程中肝细胞增生,主要发生在非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)形成后,这可能是肝脏对NASH引起的炎症、坏死的代偿反应,但是否为肝癌发生的早期事件值得重视。

关键词: 非酒精性脂肪肝;肝细胞;增殖;流式细胞术;PCNA
中图法分类号: R322.47; R329.28; R575.5 **文献标识码:** A

Hepatocyte proliferation in the progression of nonalcoholic fatty liver in rats

DAI Xue-feng, CHEN Dong-feng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the changes of hepatocyte proliferation in rats during the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Rat models of NAFLD were established by giving a fat-rich diet. The rats fed with normal diet were taken as normal control at the same stage during the study. These rats were sacrificed at week 4, 8, and 12 respectively and collected the liver tissues. The cell cycle and the changes of the S-phase cell fraction (SPF), proliferation index (PI) was measured by flow cytometry. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected by immunohistochemistry. **Results** There was no significant difference between NAFLD group and the control group at week 4, 8. But as compared with the control group, SPF and PI of 12-week group were significantly increased and PCNA labeling index were also higher. **Conclusion** Hepatic hyperplasia occurred after the nonalcoholic steatohepatitis was established in the rat models of NAFLD. Hepatic hyperplasia probably was the reaction of inflammation and necrosis, but whether it was the early incident of hepatocarcinoma should be paid attention.

Key words: nonalcoholic fatty liver; hepatocyte; proliferation; flow cytometry; proliferating cell nuclear antigen

正常成年哺乳动物肝细胞多数均处于静止期,一旦出现手术、创伤、中毒、感染时,可快速增殖,恢复肝脏正常的体积和功能[1]。非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)特别是进展至非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),由胰岛素抵抗引起的慢性氧应激,脂质过氧化损伤,细胞因子活化,以及继之的肝细胞炎症、坏死,均为刺激肝细胞增殖的重要因素。我们采用高脂饲料喂养的大鼠NAFLD模型观察肝细胞增殖情况。旨在进一步明确NAFLD对肝细胞增殖状态的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

健康成年Wistar大鼠60只,由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,雄性,体质量180~210 g,平均192 g。将实验动物按照随机数字表分组方法分为2组正常饮食组(normal group, N)与高脂饮食组(fat-rich diet group, F),每组各30只,同时各组又随机分为4、8、12周3个组,每组各10只。正常饮食组给予基础饲料(实验动物中心提供),高脂饮食组给予高脂饲

作者简介:代雪枫(1974-),女,四川省渠县人,硕士研究生,主要从事非酒精性脂肪肝发病机制方面的研究。电话:(023)68719640
通讯作者:陈东风,电话:(023)68757362
收稿日期:2004-12-27;修回日期:2005-03-18

料(基础饲料88%,猪油10%,胆固醇2%),分别于喂养4、8、12周时收集肝脏标本,取肝组织块,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μm厚连续切片及HE染色。

1.2 病理学

取1 cm×0.5 cm×0.4 cm大小肝组织,常规石蜡包埋切片,HE染色,在Olympus显微镜下观察肝脏病理学改变。

1.3 流式细胞术分析(FCM)

处死动物后取肝,切下1 cm^3 大小肝组织,剪去包膜,用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)洗净后反复剪碎,再用PBS洗涤2次。加入消化液消化,置入4 ℃冰箱过夜后加入培养基中止消化。离心,弃上清,70%冰乙醇固定,置-20 ℃冰箱过夜。固定细胞后用PBS洗涤2次,冰上孵育30 min,PBS洗涤细胞,加10 mg/L的碘化丙锭(PI) 100 μl和0.1%RNA酶(RnaseA) 50 μl。室温下DNA染色20 min,荧光标记成功后应用FACSort流式细胞仪(美国Beton Dickson公司)进行检测。应用ModFitLT V2.0软件,对所测细胞的荧光强度、细胞群体的平均荧光强度进行分析并计算:S期细胞比例(SPF):$SPF = S/(S + G_1/G_0 + G_2/M) \times 100\%$;增殖指数(PI):$PI = (S + G_2/M)/(S + G_1/G_0 + G_2/M) \times 100\%$。

1.4 增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化染色

采用SABC法检测肝组织石蜡切片中PCNA的表达,PCNA免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司,操作按说明书进行,以PBS代替一抗为阴性对照。结果判定标准:PCNA以细胞核呈界限清楚的棕色反应为阳性。阳性结果按以下标准记录:在5个高倍视野中,每个视野记数100个肝细胞,然后计算其平均阳性率。

1.5 统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 10.0软件行 t 检验。

2 结果

2.1 光镜下病理组织学改变

正常组大鼠肝组织切片HE染色未见异常。高脂4周时,肝小叶形态正常,肝组织中央静脉周围见少量肝细胞脂肪变,细胞内见小泡形脂肪滴,无明显炎性细胞浸润。高脂8周肝组织切片可见弥漫性肝细胞脂肪变性,以小泡性脂肪变为主,无明显炎性细胞浸润及纤维化。高脂12周大鼠肝脏均外形饱满,光镜下呈中-重度脂肪变,为大泡性为主的混合脂肪变形,小叶内见炎症细胞浸润,呈点状和小灶性分布,部分融合呈片,汇管区炎症较重。

2.2 流式细胞术检测S期细胞比例(SPF)和增殖指数(PI)

流式细胞术检测细胞周期的S期细胞比例(SPF)和增殖指数(PI)显示,高脂组4、8周与正常组均无差异,而高脂12周与正常组存在显著性差异($P<0.01$),见表1。

2.3 增殖细胞核抗原(PCNA)的表达

用免疫组织化学化检测PCNA的表达显示高脂4、8周与正常组均无差异,而高脂12周组与对照组存在显著性差异($P<0.01$),见表2。

表1 高脂组与正常组大鼠肝脏S期细胞比例和增殖指数(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Ratio of SPF and PI in fat-rich diet group and the control group(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	4 week		8 week		12 week	
	SPF	PI	SPF	PI	SPF	PI
Normal diet group	0.82±0.13	11.45±1.01	0.79±0.14	11.05±1.02	0.81±0.14	11.82±0.47
Fat-riched diet group	0.79±0.99	10.69±1.29	0.78±0.10	12.03±1.03	2.61±0.21**	16.85±0.63**

**: $P<0.01$, *vs* normal diet group

表2 高脂组与正常组大鼠肝组织PCNA的表达(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Expression of PCNA positive cells in fat-rich diet group and the control group(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	4 week	8 week	12 week
Normal diet group	1.54±0.28	1.66±0.63	1.69±0.12
Fat-riched diet group	1.56±0.11	1.72±0.19	10.82±1.09**

**: $P<0.01$, *vs* normal diet group

3 讨论

哺乳动物的肝细胞绝大多数处于静止期,生理状态下肝细胞的增殖弥补凋亡的缺少或丢失,病理状况下则是为了恢复与维持肝脏的生理功能[2]。在NAFLD形成过程中肝细胞的增殖情况又是怎样的呢?目前国内尚少有报道。我们采用流式细胞术分析细胞周期、免疫组织化学染色法检测PCNA的表达来评估肝细胞的增殖程度。PCNA是DNA聚合酶δ的一个亚基,S期合成量最大,PCNA的蛋白表达是反映增殖细胞DNA合成的敏感指标[3]。流式细胞术检测S期细胞比例(SPF)、增殖指数(PI)可以直观的反映处于增殖周期中DNA合成和分裂期的肝细胞比例。

流式细胞术检测细胞周期显示4周时正常组和高脂组的各项指标没有明显差异,8周时高脂组的PI、SPF、PCNA标记指数有所增加,但无统计学意义。到12周时高脂组PI、SPF明显高于正常组($P<0.01$),PCNA标记指数也明显增强($P<0.01$)。从病理组织学观察显示高脂喂养12周时已经具有NASH改变,而PCNA阳性表达主要发生在这一阶段,说明高脂喂养的NAFLD大鼠模型在进展到NASH阶段时肝细胞处于增生状态。

NASH大鼠肝细胞增生可能有如下几个原因:①NAFLD特别是进展到NASH时,肝内脂质过氧化损伤,小肠细菌过度生长,肠源性内毒素血症均导致库普弗细胞被激活,释放TNF、IL-6等炎症介质和细胞因子,吸引噬中性粒细胞,出现内毒素性肝损伤,引起肝细胞的炎症、坏死[3]。炎症、坏死是刺激肝细胞增殖的一个重要原因[4]。②被激活的TNF和IL-6是肝细胞增殖

起始阶段的关键启动因子，它们可以通过激活核转录因子 NF-KB 和 STAT3 调节立即早期基因（IEG）的表达，促使静止的肝细胞从 G_0 期进入 G_1 期，对生长因子的刺激产生应答[5]。③生长因子表达增高：在对作为 NAFLD 动物模型的 ob/ob 小鼠和胆碱-蛋氨酸缺乏饮食喂养的大鼠研究中已经发现作为促进肝再生的主要生长因子如肝细胞生长因子、转化生长因子、表皮生长因子等表达明显增强[6,7]，它们可能通过诱导肝细胞内多条信号转导途径，促进肝细胞增殖。④NASH 由于反应性氧化代谢产物增加，脂质过氧化损伤，处于一种慢性氧应激状态[8]。氧应激作为一种应激因素，可激活各类蛋白激酶，促进肝细胞增殖。同时氧应激也是肝脏再生过程的一个中间环节，也是一个必经的途径。NAFLD 长期处于慢性氧应激状态一方面说明慢性氧应激促进了 NAFLD 肝细胞的增殖，另一方面也说明 NAFLD 肝细胞可能长期处于增殖状态。

NASH 的肝细胞增生可能只是肝脏对炎症、坏死及慢性氧应激等损伤的一个修复反应，但在对肝炎后肝癌的大量研究中已经发现肝细胞增生与肝癌的发生密切相关，并且认为肝细胞高度增生是肝炎、肝硬化后肝癌一个重要的独立预测因素[9]。目前对 NAFLD 疾病谱的认识已经发展到了原发性肝癌[10,11]。同时在对与肥胖相关的结肠癌及乳腺癌的研究中已经发现由 IR、高胰岛素血症引起的细胞增生在癌变中起了重要作用。NAFLD 同样是一个以 IR 为核心的肥胖相关性疾病，NASH 的这种细胞增生是否也具有相同意义呢？国外学者发现作为非酒精性脂肪肝模型的 ob/ob 小鼠几乎不会自主发生肝硬化，但其肝癌的发病率明显上升，同时肝细胞增殖活跃，与肝癌的发生存在明显相关性[12]，NASH 在发生肝硬变前的这种细胞增生是否也是一个癌前病变，甚至是癌变的一个早期事件呢？目前尚缺乏大规模临床研究及动物实验的支持。但随着对 NAFLD 研究的深入及越来越多 NASH 后肝癌病例的报道，肝细胞增生的意义及其与 NASH 后肝癌的关系值得大家重视，并有待于深入研究。

参考文献：

[1] 陈　平，韩本立. 肝部分切除术后肝细胞再生机制的探讨[J]. 第三军医大学学报，2003，25(12)：1115－1118.

[2] Selzner M，Clavien P A. Failure of regeneration of the steatotic rat liver：disruption at two different levels in the regeneration pathway[J]. Hepatology，2000，31(1)：35－42.

[3] Muskhelishvili L，Latendresse J R，Kodell R L，*et al*. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU，PCNA Ki-67（MIB-5）immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA[J]. J Histochem Cytochem，2003，51(12)：1681－1688.

[4] 范建高. 重视非酒精性脂肪性肝病发病机制的研究[J]. 国外医学. 消化系疾病分册，2003，23(6)：323－326.

[5] Onaga M，Ido A，Hasuike S，*et al*. Enhanced expression of growth factors and imbalance between hepatocyte proliferation and apoptosis in the livers of rats fed a choline-deficient，L-amino acid-defined diet[J]. Hepatology Research，2004，28(2)：94－101.

[6] Yang S Q，Lin H Z，Mandal A K，*et al*. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers：implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology[J]. Hepatology，2001，34(4 Pt 1)：694－706.

[7] Chitturi S，Farrell G C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Semin Liver Dis，2001，21(1)：27－41.

[8] Donato M F，Arosio E，Del Ninno E，*et al*. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity[J]. Hepatology，2001，34(3)：523－528.

[9] Caldwell S H，Crespo D M. The spectrum expanded：cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol，2004，40(4)：578－584.

[10] Marrero J A，Fontana R J，Su G L，*et al*. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States[J]. Hepatology，2002，36(6)：1349－1354.

[11] Moore M A，Park C B，Tsuda H. Implications of the hyperinsulinaemia-diabetes-cancer link for preventive efforts[J]. Eur J Cancer Prev，1998，7(2)：89－107.

[12] Schoen R E，Tangen C M，Kuller L H，*et al*. Increased blood glucose and insulin，body size，and incident colorectal cancer[J]. J Natl Cancer Inst，1999，91(13)：1147－1154.

（编辑　陈聪连）

（上接 870 页）

病隐匿，尤其周围型肺癌常缺乏典型的呼吸道症状，而常被延误诊断，有时皮下转移灶可能是肺癌的惟一特征。本例以疼痛、发热、咳嗽、皮下结节就诊，X 线胸片及胸部 CT 发现肺部占位性病变，经病理学检查而确诊。因此，临床上若遇不明原因的皮下结节，尤其是生长迅速出现的，应及时行皮下结节病理切片，如为癌性病灶，应及时行胸部 X 线或 CT 检查，以确定原发灶是否为肺脏[3]。一时不能明确诊断的，应该密切随访观察，定期复查胸部 X 线或 CT 检查，尽早发现病灶，以采取相应治疗措施。

关键词：肺癌；皮下转移；多处转移
中图法分类号：R734.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 马淑萍. 肺癌皮肤转移[J]. 医师进修杂志，2003，26(1)：4－5.

[2] Terashim T，Kamazawa M. Lung cancer with skin metastasis[J]. Chest，1994，106(5)：1448－1450.

[3] 程敬亮，任翠萍，王声鼎，等. MRI 诊断肺癌 85 例[J]. 河南医科大学学报，1998，33(2)：82－84.

（编辑　汪勤俭）