文章编号:1000-5404(2006)22-2237-03

论著

急性肝损伤中肝细胞胀亡与肿瘤坏死因子-α 的关系

李荣萍,任成山,李宜辉　　(第三军医大学新桥医院消化内科,重庆 400037)

提　要: 目的　探讨急性肝损伤中肝细胞胀亡与肝组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的关系。**方法**　应用 D-氨基半乳糖(D-GalN)诱导大鼠急性肝损伤模型,同时设立正常对照组,于不同时相检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)含量,肝组织中 TNF-α mRNA 表达,观察肝细胞胀亡情况,计算胀亡指数(oncosis index, OI)。**结果**　与正常对照组比较,致伤后大鼠血清 ALT、AST 明显升高($P<0.05$),肝组织中 TNF-α mRNA 表达增强,细胞胀亡增多,OI 值增高。**结论**　急性肝损伤中存在细胞胀亡,其发生与 TNF-α 的表达有一定关系。

关键词: D - 氨基半乳糖;肝损伤,急性;肿瘤坏死因子-α;胀亡,肝细胞
中图法分类号: R329.24;R341;R575.02　　**文献标识码**: A

Relationship between oncosis and TNF-α in acute hepatic injury

LI Rong-ping, REN Cheng-shan, LI Yi-hui (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective　To investigate the correlation of oncosis and TNF-α in D-galactosamine (D-GalN) induced acute hepatic injury. **Methods**　Acute hepatic injury model was induced by D-GalN in 24 SD rats, and 12 rats served as control. At 4, 8, 12, 16, 20, 24 h after intraperitoneal injection of D-GalN, the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, and the tumor necrosis factor-α (TNF-α) in liver tissue were measured. The pathological changes of liver and the oncosis of hepatocytes were observed by TEM. **Results**　In acute hepatic injury, the levels of ALT, AST, TNF-α mRNA, OI were higher than that of control group ($P<0.05$), and OI increased with the severity and course of acute hepatic injury. **Conclusion**　Oncosis occurs in acute hepatic injury in rats and its mechanism might be related to the TNF-α expression.

Key words: D-galactosamine; acute hepatic injury; tumor necrosis factor-α; oncosis, hepatocyte

细胞胀亡是一种有别于凋亡的细胞死亡方式,这种死亡方式可能存在于一种或多种生理或病理过程中[1],在多种疾病的发生发展过程中起重要作用[2,3]。本实验通过 D-GalN 建立大鼠急性肝损伤模型,观察在急性肝损伤中肝细胞胀亡的发生情况,检测肝组织中 TNF-α mRNA 含量,探讨在急性肝损伤中细胞胀亡与 TNF-α 的关系。

基金项目:重庆市科委攻关项目(2005AC5127)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2005AC5127)

作者简介:李荣萍(1974 -),女,云南省陆良县人,硕士研究生,主治医师,主要从事急性肝损伤方面的研究。电话:(023)66186417, E-mail: LRP74@126.com
通讯作者:任成山,电话:(023)65214609, E-mail: Renchenshan@sina.com

收稿日期:2006-09-12;**修回日期**:2006-10-09

1　材料与方法

1.1　主要试剂

D - GalN 购自重庆医科大学化学教研室(批号:940404),实验前用生理盐水配成 10% 溶液,用 1 mol/L NaOH 调整 pH 7.2 ~ 7.4;半定量逆转录聚酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自 Promega 公司,Tripure 购自 Roche 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　实验动物模型的制备　　36 只健康 SD 大鼠(购于第三军医大学实验动物中心),体质量 200 ~ 300 g,2 月龄,雌雄各半,分成 2 组:对照组 12 只、模型组 24 只。适应性喂养 1 周,模型组给予 D-GalN 1 100 mg/kg 腹腔注射,对照组予等体积生理盐水腹腔注射。

1.2.2　血清 ALT、AST 的检测　　于腹腔注射 D-GalN 4、8、12、16、20、24 h 后取对照组 2 只、模型组 4 只大鼠以复合氯醛麻醉,摘除眼球取血 2 ~ 3 ml,4 ℃离心(1 000 r/min)取血清,日立-7110 型全自动生化分析仪(本院检验科提供)检测血清 ALT、AST 水平。

1.2.3 肝组织标本的留取 断头处死大鼠，立即留取新鲜肝组织液氮冻存，进行 RT-PCR 试验；另取新鲜肝组织约 1 mm^3，迅速放入 2.5% 的戊二醛固定液中。在透射电镜下观察肝细胞胀亡情况并计算胀亡指数(OI)。

1.2.4 RT-PCR 按照 Tripure 试剂盒说明书，参照文献[4]的方法抽提液氮冻存肝组织总 RNA。TNF-α 上游引物 5′-TCATCTTCTCAAAACTCGAGT-3′，下游引物 5′-CAATGACTCCAAAGTAGACCT-3′，扩增片段长度 454 bp；以 β-actin 为内参照，上游引物 5′-GCCACCACGCTCTTCTGTC-3′，下游引物 5′-GGCTACGGGCTTGTCACTC-3′，扩增片段长 254 bp(引物均由北京天为时代公司合成)。按以下条件进行：45 ℃ 45 min，95 ℃ 2 min，进行逆转录；95 ℃ 30 s，52 ℃ 1 min，68 ℃ 2 min，40 个循环；68 ℃ 7 min，4 ℃ 4 min。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析，以 DNA 标准Ⅰ确定 PCR 扩增产物大小，应用 Imageproplus 图像分析软件进行灰度分析，以 TNF-α 与 β-actin 的灰度比值定量。

1.2.5 细胞胀亡的检测 利用透射电镜技术观察胀亡细胞，计数 1 000 个肝细胞中的胀亡细胞数，即 OI 值[5]。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 12.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况比较

注射 D-GalN 20 h 后模型组有 2 只大鼠死亡，死亡率为 8.3%，对照组未见大鼠死亡。模型组大鼠较对照组大鼠毛发失去光泽，食欲不振、精神萎靡、嗜睡、易激惹，质量无明显改变。

2.2 血清 ALT、AST 检测

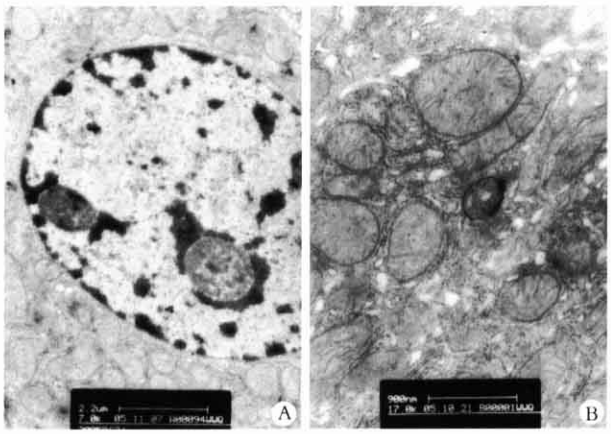
注射 D-GalN 4 h 后，模型组大鼠血清 ALT、AST 较对照组明显升高 ($P<0.05$)，随时相改变，ALT、AST 水平逐渐上升，20 h达到高峰。

2.3 组织学特征及细胞胀亡的检测

肉眼观察，对照组大鼠肝脏色泽红润，形态大小正常，未见淤血、坏死；模型组大鼠肝脏不同时相均有不同程度的淤血、坏死，其损伤程度随致伤时间延长而加重，以 20～24 h 损伤最为严重，表现为肝脏弥漫性大片状淤血、坏死。电镜下，正常对照组肝细胞核膜结构清晰、完整，核内常染色质多，异染色质少，位于核周，其粗面内质网丰富，呈层状排列，许多核糖核蛋白体附着于膜上，线粒体数量较多，呈圆形或长圆形，结构完整，嵴丰富，基质均匀，呈中等电子密度，细胞质内有大量 α 糖原颗粒；模型组致伤后 4 h 肝细胞开始出现变化，早期变化为肝细胞肿胀，线粒体、内质网、核肿胀染色质边集，基质电子密度增高，α 糖原颗粒明显减少(图 1)，后期细胞质空泡化，线粒体嵴断裂，数量减少，内质网空泡化，部分细胞膜起泡，结构崩解，细胞质外溢，核溶解性空斑，核膜完整性破坏，即细胞胀亡样改变。随时间延长，病变逐渐加重，OI 值升高，24 h 时最高达 8.02% ($P<0.05$)。

2.4 TNF-α mRNA 的表达

正常对照组 TNF-α mRNA 表达痕量，模型组各时相点均有不同程度的表达，致伤 4 h 为表达高峰($P<0.05$)，随后逐渐下降，24 h 时接近正常组。



A：胀亡样肝细胞早期细胞核改变(×10 000)；B：胀亡样肝细胞早期细胞质改变(×17 000)

图 1 模型组大鼠肝组织超微结构的改变(TEM)

3 讨论

自 1988 年 Keppler 等首次用 D-GalN 制成实验性肝炎模型以来，D-GalN 肝损害模型已成为目前公认的比较好的研究病毒性肝炎的发病机制及其有效的治疗药物的实验动物模型。近年研究表明，D-GalN 引起肝细胞内 Ca^{2+} 增多，Mg^{2+} 减少。钙增多会抑制线粒体的呼吸功能，激活磷脂酶，分解膜磷脂，破坏溶酶体膜，使蛋白水解酶释放，并使黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶，加速氧自由基的产生，从而使肝细胞的损伤进一步加剧。而 Mg^{2+} 是 ATP 合成、利用的必须辅助因子，是 Na^+-K^+-ATP 酶的重要组成部分。因此，Mg^{2+}/Ca^{2+} 的比例失调可能是 D-GalN 导致肝细胞不可逆损害的重要因素之一。Cummings 等[6]证实钙离子依赖性的胞浆磷脂酶 A_2 (Ca^{2+}-dependent and cytosolic PLA_2, $cPLA_2$) 是细胞氧化损伤的一个重要介质。亦有研究报道，给予 D-GalN 后，Kupffer 细胞被激活，引起 TNF-α 大量释放，提示 TNF-α 表达过度与其致伤机制有关。

细胞胀亡是一种不同于凋亡的细胞死亡方式，其主要形态学特点为细胞肿胀，体积增大，细胞质空泡化，细胞质内出现致密颗粒，内质网肿胀，线粒体早期可出现致密化，后期肿胀，絮状改变或出现高致密颗粒，嵴破坏[7]；细胞肿胀波及细胞核，核内染色质分散，凝集在核膜、核仁周围，有时聚集成团块。细胞膜起泡是胀亡早期事件，随之细胞膜通透性增加，细胞膜崩解，细胞内容物外溢，引起明显炎症反应[7]。目前研究认为，胀亡的发生是一种细胞膜性事件，膜通透性变化是决定胀亡的关键[8]。在本研究中，在透射电镜下正常肝组织罕见胀亡细胞，模型组在致伤 4 h 后即出现胀亡样改变，并随时间延长不断增多，OI 值最高

达 8.02%。分析其原因可能是在 D-GalN 诱导下，肝细胞内 Mg^{2+}/Ca^{2+} 比例失调，钙离子依赖性的胞浆磷脂酶 A_2（Ca^{2+}-dependent and cytosolic PLA_2，$cPLA_2$）活化，氧自由基增加，导致细胞膜的通透性增加，外水内流，使细胞肿胀。同时，线粒体的渗透性改变，细胞浆膜破坏，引起细胞质及内容物肿胀，最终导致细胞胀亡的发生，这与有关研究相一致[9]。

TNF-α 是一种促炎性细胞因子，在肝脏主要由激活的 Kupffer 细胞产生，并作为一个关键因子参与各种肝脏疾病的发生与发展。TNF-α 既能直接损伤肝细胞，又能参与肝脏炎症、肝细胞再生等病理生理过程[10]，通过诱生炎症介质、活化中性粒细胞等产生间接毒性作用。正常情况下肝细胞对 TNF-α 耐受，但在 D-GalN 等外部因素作用下，肝细胞对 TNF-α 敏感[11]。在本研究中，D-GalN 致伤后，大鼠肝细胞胀亡明显增加，OI 比值与正常对照组有显著差异（$P<0.05$），与肝脏损伤程度相一致，而 TNF-α mRNA 表达亦显著增强（$P<0.05$），结合多个研究均表明 TNF-α 水平与肝脏疾病的严重程度呈正相关的结论[12,13]，可以推测肝细胞胀亡与 TNF-α 表达存在一定的关系，但为何 TNF-α mRNA 在致伤早期即出现增长高峰，而 OI 比值却是随着致伤时间延长逐渐升高，其确切机制尚不清楚，还有待进一步的研究探索。

参考文献：

[1] MOORE M A. What's in a name? Necrosis - apoptosis and oncosis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2000, 1(4): 259 - 260.

[2] 吴人亮，李娜萍. 细胞凋亡、胀亡和坏死——关于细胞死亡的新认识[J]. 中华病理学杂志，2002，31(5)：455 - 456.

[3] LEPPO J. Imaging cell injury and death[J]. Curr Cardiol Rep, 2003, 5(1): 40 - 46.

[4] 曹廷兵，彭家和，巩　燕，等. 一种用 Tripure 试剂从冻存组织分离纯化 RNA 的方法[J]. 第三军医大学学报，2003，25(9)：822 - 823.

[5] 李向阳，赵高蜂，僧静靖，等. 结直肠腺癌组织中细胞胀亡与血管内皮生长因子的关系[J]. 实用癌症杂志，2004，19(3)：262 - 264.

[6] CUMMINGS B S, MCHOWAT J, SCHNELLMANN R G. Phospholipase A_2s in cell injury and death[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(3): 793 - 799.

[7] 任成山，钱桂生. 细胞凋亡和胀亡及其与多器官功能障碍综合征关系的研究进展[J]. 中国危重病急救医学，2005，17(4)：247 - 250.

[8] HEIN S, ARNON E, KOSTIN S, *et al*. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms[J]. Circulation, 2003, 107(7): 984 - 991.

[9] GUJRAL J S, FARHOOD A, JAESCHKE H. Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 190(1): 37 - 46.

[10] WATANABE T, JONO H, HAN J, *et al*. Synergistic activation of NF-kappaB by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor alpha[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(10): 3563 - 3568.

[11] 姚　鹏，詹铁群，许望翔，等. 放线菌素 D/TNF-α 诱导大鼠肝干细胞凋亡及 HGF 的拮抗作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2003，23(5)：350 - 354.

[12] NAGAKI M, IWAI H, NAIKI T, *et al*. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis[J]. J Infect Dis, 2000, 182(4): 1103 - 1108.

[13] WANG J Y, LIU P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(9): 2009 - 2011.

（编辑　王小寒）

（上接 2233 页）

3.1.2　与穿刺角度和穿刺针的关系　穿刺针与胸壁切线的角度越小发生气胸的几率越大，因为小角度进针会使针尖在胸壁层胸膜上的垂直分力变小、难于穿破胸膜；穿刺针的型号越大，针尖变钝，穿刺针在肺内停留的时间越长，破坏肺组织的几率增加。因此尽量选择与病灶匹配的穿刺针，病灶小或者离胸壁远就选小号穿刺针，病灶大或者离胸壁近也不要一味追求大号穿刺针。

3.1.3　与肺部基本情况的关系　慢性支气管炎并肺气肿、间质性肺病变，肺大泡等因素也会增加穿刺过程中气胸的发生。本组病例有慢性支气管炎并发肺气肿 4 例在穿刺后出现气胸。因考虑肺大泡、肺气肿或肺纤维化的病例在穿刺过程中极易发生气胸[3]，所以本组病例中没有肺大泡的病例进行穿刺。

3.2　漏穿

漏穿的主要原因有病灶太小、容积效应、穿刺前定位不准、病灶的位置较深等。避免漏穿最有效的方法就是嘱患者平静呼吸、定位准确、薄层扫描、二次扫描确定穿刺针是否到达病灶。

3.3　穿刺活检组织假阴性

实体病灶周边的组织和空腔（空洞）病灶的腔内组织阳性率不高。如果是肿瘤，实体组织周围可能是炎性病灶，空腔（空洞）内的组织是坏死的组织。所以实体病灶尽量在病灶的中心取材，如果是空腔（空洞）病灶尽量在病灶壁取材。

总之，为了能成功地一次性完成经皮肺穿刺活检术，需要对病灶进行全面的分析，掌握操作技巧，避免并发症的发生。

关键词：皮肺穿刺活检；螺旋 CT；并发症；成功率

中图法分类号：R443　　文献标识码：B

参考文献：

1] 姜敏纲，郑伟良，胡红杰，等. CT 引导下肺穿刺活检的安全性分析[J]. 中国结核和呼吸杂志，2002，25(2)：86 - 88.

2] 王文祥，田锦林，郭卿林，等. CT 引导下经皮肺穿刺的临床应用价值(附 32 例报告)[J]. 中国临床医学影像杂志，2001，12(2)：98 - 100.

3] 赵兴圣，周茂义，李全光. 如何提高 CT 导引下经皮穿刺胸部活检的安全性和准确性[J]. 实用放射学杂志，2004，20(1)：81 - 82.

（编辑　周　芳）