论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1076-03

Kupffer细胞在原发性肝细胞癌患者肝脏中的分布及意义

丁 雄,王梦远,刘作金,李生伟,龚建平 (重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

提 要:目的 观察人原发性肝细胞肝癌患者肝脏Kupffer细胞(KCs)的分布并探讨其意义。**方法** 采用免疫组织化学方法,通过CD68定位KCs,运用ImageTool 3.0软件进行细胞计数,了解KCs在正常人肝组织、不同分化程度肝癌组织、癌旁肝组织和远癌肝组织的分布,并在电子显微镜下观察KCs的超微结构改变。**结果** KCs呈卵圆形、星形或纺锤形,在肝癌组织、癌旁肝组织、远癌肝组织和正常肝组织中分布数量分别为(21.6±7.8)、(68.8±9.1)、(62.0±1.9)和(36.2±4.1)($P<0.01$),癌组织分化程度越低,其内KCs数量越少($P<0.05$)。细胞超微结构观察结果显示,肝癌患者癌旁肝组织肝血窦中KCs数量明显增多,可见中性粒细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润,细胞质吞噬体和溶酶体增多。**结论** 原发性肝癌患者肝组织内KCs明显激活,但KCs在癌组织内分布数量明显减少,而且癌组织分化程度越低其内KCs数量越少,而在癌旁肝组织和远癌肝组织内较癌组织和正常肝组织显著增多,提示KCs可能通过复杂的途径参与对肝癌的防御作用。

关键词:肝肿瘤;Kupffer细胞
中图法分类号:R392-33;R730.23;R735.7 **文献标识码**:A

Distribution of Kupffer cells and its significance in primary hepatocellular carcinoma

DING Xiong, WANG Meng-yuan, LIU Zuo-jin, LI Sheng-wei, GONG Jian-ping (Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Clinical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To observe the distribution of KCs in liver in human primary hepatocellular carcinoma and investigate the significance. **Methods** KCs were confirmed by immunochemistry of CD68. Image Tool 3.0 software and JEM 2000 electron microscope were employed to define the distribution of KCs in normal human liver tissues, cancer tissues, tissues around and apart from cancer, as well as the number of KCs in different differentiated cancer tissues. **Results** The KCs revealed orbicular-ovate, astroid or fusiform, the number was (21.6±7.8), (68.8±9.1), (62.0±1.9) and (36.2±4.1) respectively in liver cancer tissues, tissues around cancer, tissues apart from cancer, and normal human liver tissues ($P<0.01$), and the number decreased with the degradation of differentiation degree ($P<0.05$). Electron microscopy found infiltrations of neutrophils, lymphocytes and eosinophile granulocytes, increased number of KCs in hepatic sinusoid in the tissues around cancer, and increased phagosomes and lysosomes in KCs. **Conclusion** KCs are confirmed greatly activated in liver cancer tissues. The number of KCs declines in liver cancer tissues but increases in tissues around cancer and apart from cancer compared to normal human tissues. This indicates that KCs may participate in the defense to liver cancer by intricate means.

Key words: liver tumor; Kupffer cells

巨噬细胞的免疫应答诱导与调节功能在对肝癌的防御中起重要作用,肝脏Kupffer细胞(KCs)是机体最大的巨噬细胞群体[1,2],激活的KCs通过多种途径参与对肝细胞肝癌的杀伤作用。本研究通过免疫组织化学法细胞计数,观察人原发性肝癌患者KCs在肝脏的分布规律。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病例选择 选择病例分为原发性肝细胞肝癌组和正常对照组。原发性肝细胞肝癌组为我院2003年12月至2005年11月因原发性肝细胞肝癌行肝叶切除术或肝脏移植术的标本共计36例。男性29例,女性7例。年龄33~77岁,平均54.8岁。病理学分类参照Edmondson标准,高分化肝癌(Ⅰ级)13例,中分化肝癌(Ⅱ~Ⅲ级)9例,低分化肝癌(Ⅳ级)14例。正常对照组为同期因肝脏外伤行肝部分切除后的肝脏组织11例,男性9例,女性2例,年龄19~68岁,平均47.9岁。

作者简介:丁 雄(1972-),男,重庆市忠县人,博士,副主任医师,主要从事肝癌发病及免疫方面的研究。电话:13320208649,E-mail:dxiong@yeah.net
通讯作者:龚建平,E-mail:gongjianping11@hotmail.com
收稿日期:2006-12-04;修回日期:2007-01-23

1.1.2　试剂　　鼠抗人 CD68 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司，羊抗鼠二抗购自福州迈新生物技术开发公司。

1.2　实验方法

1.2.1　肝组织标本的选择　　所有肝癌的诊断经病理确诊。肝组织的选取标准：癌组织边缘至 3 cm 为癌旁组织，3 cm 以外为远癌组织。

1.2.2　透射电镜观察 Kupffer 细胞超微结构　　切除标本即刻取材，用 3% 戊二醛固定，常规电镜制样，于 JEM 2000 型透射电镜下观察肝脏 KCs 超微结构改变。

1.2.3　免疫组织化学　　光镜标本用 10% 甲醛固定，石蜡包埋，4 μm 厚连续切片并进行苏木精-伊红（HE）染色，作组织病理学观察。采用二步法 CD68 免疫组织化学染色观察 KCs 分布（试剂盒由武汉博士德提供）[3]，主要步骤如下：石蜡切片脱蜡和水化，用 PBS 冲洗 5 min × 3 次；加热 15 min；3% H_2O_2 室温孵育 10 min，蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min；封闭剂室温孵育 5 min，勿洗；一抗 4 ℃过夜，PBS 冲洗 5 min × 3 次；生物素标记二抗 37 ℃孵育 20 min，PBS 冲洗 5 min × 3 次；DAB 显色剂显色，37 ℃孵育 10 min；冲洗，苏木精复染，中性树胶封片，显微镜下观察。用 PBS 代替一抗做阴性对照。结果判断：细胞膜表面有棕黄色标记的为阳性细胞即 KCs，无该标记的为阴性细胞。

1.2.4　图像分析系统　　免疫组织化学切片光镜下恒定倍数（×200），选取视野照片，图片输入计算机，应用 ImageTool 3.0 软件对免疫组织化学染色图像进行等视野阳性细胞点击计数。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，组间比较采用配对 t 检验。

2　结果

2.1　Kupffer 细胞超微结构改变

电镜下可见，肝癌旁肝组织肝血窦中 KCs 数量较多，可见淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润，KCs 核浆比例增大，细胞质细胞器丰富，可见较多吞噬体（图 1）。

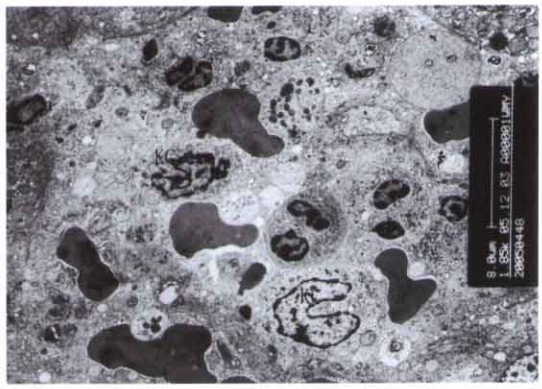
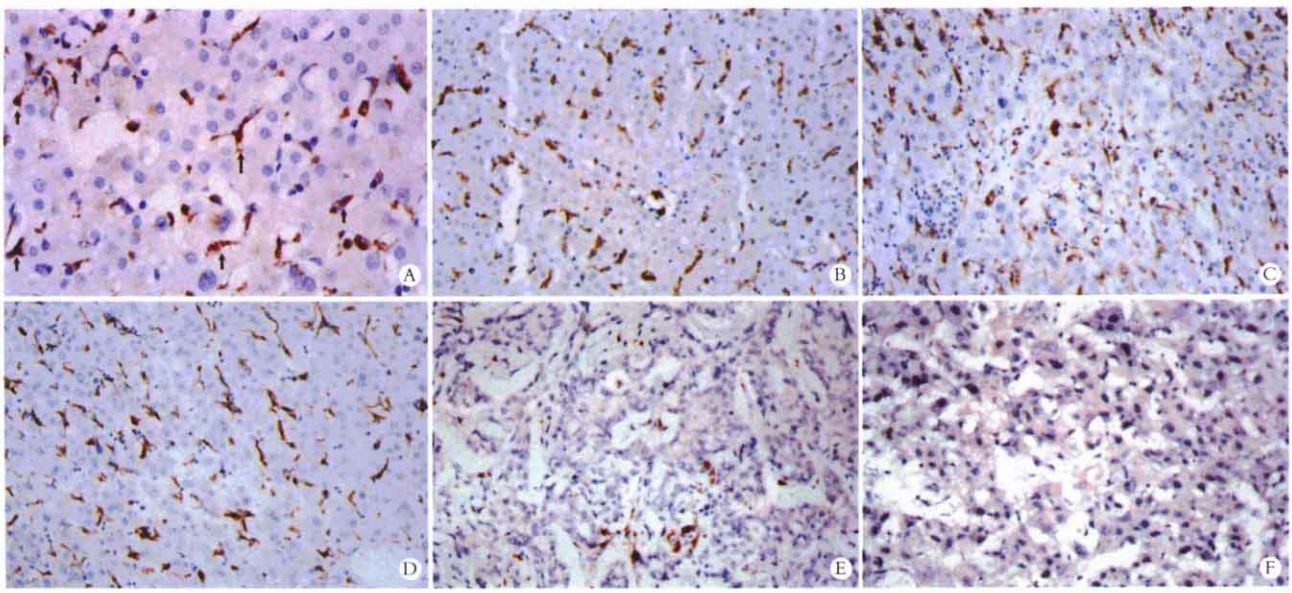


图 1　原发性肝癌组肝脏癌旁肝组织肝血窦　（TEM × 1 850）

2.2　Kupffer 细胞的分布

两组 47 例均有 KCs 存在，阳性细胞为棕黄染色，分布于肝血窦区，呈卵圆形、星形或纺锤形（图 2A）。正常肝脏组织（图 2B）KCs 分布均匀，而癌旁及远癌肝组织（图 2C、D）虽然分布也很均匀，但数量明显增多。肝癌组织（图 2E）虽然也有 KCs 存在，但其数量明显减少，尤其在部分低分化肝癌组织（图 2F）中几乎不见阳性细胞表达。图像分析表明，肝癌组织中的 KCs 数量（21.6 ± 7.8）明显少于癌旁肝组织、远癌肝组织和正常肝组织［分别为（68.8 ± 9.1）、（62.0 ± 1.9）、（36.2 ± 4.1），$P < 0.01$］，癌旁肝组织和远癌肝组织中 KCs 虽然多于正常肝组织（$P < 0.01$），但二者之间并无明显差异（$P > 0.05$）。

高分化、中分化、低分化肝细胞肝癌组织中 KCs 数量分别为（31.3 ± 2.5）、（25.3 ± 1.5）和（14.8 ± 2.2），两两间比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）。



A：原发性肝癌组织中 KCs 形态（×400）；B：正常肝组织 KCs 分布（×200）；C：癌旁组织 KCs 分布（×200）；D：远癌组织 KCs 分布（×200）；E：癌组织 KCs 分布（×200）；F：低分化肝癌组织几乎没有 KCs 分布（×200）

图 2　KCs 免疫组织化学染色结果　（二步法）

3 讨论

肝细胞肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，其治疗效果不好，预后极差。近年来，肝细胞肝癌的免疫及其在治疗中的作用受到大家的广泛关注并取得一定的效果。Kupffer 细胞是肝脏重要的防御细胞，具有吞噬、代谢、产生细胞因子及抗肿瘤免疫等多种功能，在宿主防御机制及维持机体内环境平衡方面有重要作用。肝脏发生病变时，KCs 的数量和功能也会发生明显改变，对环境改变做出适应性反应[1,2,4-7]。

CD68 抗原是单核细胞、巨噬细胞（包括 KCs）的特异性表面标志，对 CD68 的检测是确认 KCs 的方法之一[3]。本实验采用免疫组织化学染色方法，用抗 CD68 单克隆抗体检测肝脏组织 KCs 分布，结果表明，KCs 为棕黄染色，分布于肝血窦区，呈卵圆形、星形或纺锤形，肝癌组织中 KCs 数量明显少于癌旁肝组织及远癌肝组织，可能与组织结构异型导致肝小叶结构破坏，不能维持 KCs 赖以存在的正常肝窦环境有关[3,8,9]，这也很好地解释了在分化程度低的癌组织中 KCs 分布更少甚至无 KCs 存在的现象：癌组织分化程度越低，组织异型越明显，正常肝窦环境破坏就越严重。以上结果提示，肝癌组织结构异型程度的高低是影响 KCs 在肝脏组织分布的重要因素。

巨噬细胞是机体重要的保护细胞，具有免疫反应性[7]，当肝细胞发生癌变时，可能出现肝外巨噬细胞向肝内移动、KCs 分裂以及复杂的功能变化[4,5]。而本实验结果提示，肝癌患者其癌旁和远癌肝组织中 KCs 数量较正常人肝组织明显增多，这是用组织结构异型性所无法解释的。KCs 在不同分化程度的肝癌组织及其癌旁和远癌组织的数量分布差异证实了其在对肝癌防御中的重要意义，而这种分布差异的机制有待进一步探索。

（致谢：本研究在重庆市肝胆外科重点实验室完成，并得到第三军医大学高原军事医学系中心实验室可金星教授、重庆医科大学附属第二医院病理科冷志副教授、赵红等同志的帮助，特此致谢！）

参考文献：

[1] Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, *et al*. Differentiation and function of Kupffer cells[J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(1): 16-28.

[2] Arii S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2000, 7(1): 40-48.

[3] Sharifi S, Hayek J, Khettry U, *et al*. Immunocytochemical staining of Kupffer and endothelial cells in fine needle aspiration cytology of hepatocellular carcinoma[J]. Acta Cytol, 2000, 44(1): 7-12.

[4] Tsujimoto T, Kuriyama S, Yamazaki M, *et al*. Augmented hepatocellular carcinoma progression and depressed Kupffer cell activity in rat cirrhotic livers[J]. Int J Oncol, 2001, 18(1): 41-47.

[5] Koo D J, Chaudry I H, Wang P. Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis[J]. J Surg Res, 1999, 83(2): 151-157.

[6] Su G L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(2): G256-G265.

[7] Seki S, Habu Y, Kawamura T, *et al*. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses [J]. Immunol Rev, 2000, 174(4): 35-46.

[8] Liu K, He X, Lei X Z, *et al*. Pathomorphological study on location and distribution of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(9): 1946-1949.

[9] 邹兵兵，汪 宏，耿小平，等. 巨噬细胞在肝细胞肝癌中的分布及意义[J]. 消化外科，2005，4(2)：135-138.

（编辑 龙 亮）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母"A"；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母"Z"。

对于数据库（database）、计算机程序（computer program）及电子公告（electronic bulletin board）等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部