350-351/354

维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2000)04-0350-02

R735.702
R73-37

细胞凋亡在肝癌浸润转移过程中的状况

孔宪炳[1]，梁力建[2]，黄洁夫[2]

（1. 重庆医科大学临床学院普外科 重庆 400016；2. 中山医科大学附属第一医院肝胆外科 广州 510089）

摘 要：**目的** 研究肝细胞癌（HCC)凋亡在浸润转移过程中的重要性。**方法** 采用DNA原位末端标记法（ISEL）、光镜、电镜，并结合计算机图象分析技术定量检测55例HCC的凋亡发生情况。**结果** 低分化HCC凋亡指数低于高分化HCC（$P<0.05$），浸润性和转移性HCC的凋亡指数分别低于非浸润性和无转移HCC（$P<0.05$和$P<0.01$）。**结论** HCC凋亡指数与肿瘤的某些生物学特性有密切的联系，细胞凋亡的异常改变可能在HCC的浸润转移过程中起重要作用。

关键词：肝细胞癌；细胞凋亡；浸润；转移

中国图书分类法分类号：R735.7 **文献标识码**：A **收稿日期**：2000-01-22

The condition of apoptosis in hepatocellular carcinoma infiltration and metastasis

KONG Xian-bing, et al

（Department of Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016）

Abstract: **Objective** To explore the role of apoptosis in hepatocellular carcinoma(HCC) infiltration and intrahepatic metastasis. **Methods** Using the in situ DNA end-labeling, light microscopy,electron microscopy in combination with computer-imaging analytic technique, we tested quantitatively apoptotic cells in 55 HCC tissues. **Results** AI was significantly lower in poorly differentiated HCCs than well differentiated HCCs($P<0.05$). Furthermore, HCCs with infiltration and intrahepatic metastasis had a significantly lower AI than those without infiltration and intrahepatic metastasis, respectively ($P<0.05$ and $P<0.01$). **Conclusion** AI has a close relation to some biological characteristics of HCC. The abnormal change in apoptosis may play an important role in the infiltration and intrahepatic metastasis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Apoptosis; Infiltration; Metastasis

近年来研究发现，肿瘤的生物学特性不仅与癌细胞的增殖而且与其凋亡(apoptosis)密切相关[1]。本研究利用DNA末端标记法（ISEL）、光镜、电镜和计算机图像分析技术对55例肝细胞癌(HCC)组织中的凋亡细胞进行定量测定，并与HCC各生物学参数对比，以探讨细胞凋亡在HCC浸润转移过程中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 标本

近年手术切除且病理证实的HCC标本55例，男46例，女9例，年龄25～74岁。所有患者术前均未接受化疗、放疗和免疫治疗。标本经10%福尔马林固定、脱水，常规石蜡包埋，制备4μm连续切片。其中8例肝癌组织用3%戊二醛液预固定，按常规技术制成超薄切片，电镜观察。HCC各生物学参数包括肿瘤大小，分化程度，浸润性（包膜受侵、门静脉癌栓、癌周卫星结节），肝内转移和AFP等。

1.2 DNA末端标记法（ISEL）

采用改良的末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）介导的脱氧三磷酸尿甙-生物素（dUTP-biotin）切口末端标记原位检验法[2]。标记液、抗体及显色剂为德国Boehringer Mannheim公司产品。主要步骤：（1）切片常规二甲苯脱蜡及乙醇梯度水化；（2）蛋白酶K消化30min；（3）滴加含TdT和dUTP的标记液，37℃孵育60min；（4）滴加AKP连接的抗生物素抗体，37℃孵育30min；（5）滴加BCIP/NBT显色，并用Fast Red复染，封片。以PBS替代标记液作阴性对照。光镜结合电镜观察凋亡细胞形态，其判断标准为：（1）细胞完整，体积明显缩小；（2）胞核高度浓缩；（3）细胞膜突起起泡。

1.3 定量测定

对apoptosis阳性染色切片采用德国Kontron公司的IBAS图像分析系统进行定量测定。每张切片，用图像分析仪随机测试1000个癌细胞，以凋亡阳性细胞的百分率代表凋亡指数

基金项目：美国中华医学基金会（CMB）资助项目（90543）

作者介绍：孔宪炳（1961- ），男，副主任医师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

（apoptosis index，AI）。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用Student' t 检验。

2 结 果

2.1 HCC凋亡细胞的形态学特点

光镜下凋亡细胞核呈紫蓝色，核浓缩，细胞完整，体积缩小（图1）。电镜下凋亡细胞膜完整，染色质于核膜下呈新月状，并可见凋亡小体形成（图2）。

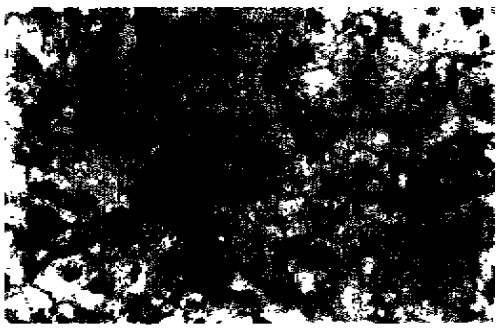


图1 HCC组织，ISEL染色示强阳性凋亡细胞核呈紫蓝色。ISEL，×100



图2 HCC组织，凋亡小体形成。EM，×8000

2.2 HCC凋亡指数与生物学参数的关系

55例HCC的平均凋亡指数为3.99±3.18。统计分析，凋亡指数与肿瘤分化程度，浸润和肝内转移有关（$P<0.05$ 和 $P<0.01$），而与肿瘤大小和AFP高低无关，结果见表。

表 HCC组织凋亡指数与生物学参数的关系

		例数	凋亡指数(AI)
肿瘤大小(cm)	<5	10	4.93±3.44
	>5	45	3.78±2.89
肿瘤浸润	有	19	2.60±2.38*
	无	36	4.72±3.23
肝内转移	有	16	2.11±1.98**
	无	39	4.76±3.28
AFP	(+)	30	4.41±3.16
	(-)	25	3.49±3.20
肿瘤分级	I～II	20	5.29±3.70*
	III～IV	35	3.25±2.63

** $P<0.01$，* $P<0.05$

3 讨 论

随着凋亡分子机制认识的不断深入，细胞凋亡的研究方法也从最初的形态学向分子生物学发展[3]。3-羟基DNA断裂点原位标记法（ISEL）是一种运用生化原理结合形态学特征对凋亡细胞进行检测的较特异而又敏感的手段，定位准确，有利于发现凋亡早期的DNA断裂[4]。我们的研究发现，镜下有的细胞核质聚集于核膜下呈新月状，提示凋亡早期染色质浓聚；一些细胞核内染色质均匀一致或凋亡小体形成，表明凋亡已进一步发展。本研究采用Gavreli首创的ISEL法可特异地原位显示凋亡，克服单纯形态学观察只能定性，DNA降解片段分析和流式细胞术(FCM)只能定量，不能定性的缺点。同时我们结合电镜和图像分析技术，可以发现更多的凋亡细胞，更能准确地反映凋亡发生的程度。

尽管细胞凋亡在HCC发生发展过程中的具体作用和机制尚不明确，但细胞凋亡与HCC明确有关。有人认为肿瘤的发生发展，部分是由于肿瘤细胞增殖和凋亡之间平衡失调的结果[1]。Higaki等[5]应用原位末端标记法研究了肝癌中细胞凋亡的发生情况，发现高分化及早期肝癌细胞凋亡指数显著高于低分化及进展期肝癌。但Hino等[6]却发现低分化及进展期肝癌凋亡指数显著高于高分化及早期肝癌。Hino对此的解释是低分化及进展期肝癌增殖快，恶性程度高，为维持肿瘤细胞增殖和死亡相对平衡，凋亡势必会增加。我们的结果表明，HCC凋亡指数与肿瘤分化、浸润及肝内转移有关。高分化HCC凋亡指数显著高于低分化HCC，提示HCC在去分化过程中，随着肿瘤的不断增殖和生长，细胞凋亡相对减

（下转第354页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

形成交叉连续，使细胞中DNA解聚，抑制DNA复制，还可引起DNA单链断裂。在低浓度时，使G1期细胞减少[7]。这两种抗癌药在体外合用后，它们对人胃癌细胞株（SGc-7901）效应增加，它们的中效浓度及各自用量均比单用药的要小，5-Fu为47.56%，MMC为46.78%。这充分说明联合用药优点只需小剂量而达到高效应，使药物不良反应减少。

从两种抗癌药的量效曲线图可看出，当效应为0.55时，其CI为1，说明两种药在该效应时其相互作用为相加。两药大剂量（大于中效剂量）合用时是协同作用（CI<1），小剂量（小于中效剂量）合用时是拮抗作用（CI>1）。

两药给药时间次序不同不会影响两药的联合效应。因而合用时，无论先用哪种药，其效应无明显差异。

现代肿瘤化疗已迈入“个体化”化疗阶段，以取代以往盲目性化疗，因而可通过体外检测病人肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性，定量分析各种抗癌药间的相互作用及剂量，以指导临床医生合理联合用药，使化疗毒副作用进一步减少，有效率进一步提高。

参 考 文 献

[1] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effects relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors [M]. Adv. enzyme Regul. 1984; 22: 37-55.

[2] Howell SB, Hom D, Sanga R, et al. Comparison of the synergistic potentiation of etoposide, doxorubicin, and vinblastive cytotoxicity by dipyridamloe [J]. Cancer Res. 1989; 49: 3178-3183.

[3] Smith KS, Folz BA. Synergistic and additive combination of several antitumor drugs and other agents with the potent alkylating agent adozelesin [J] Cancer. Chemother. Pharmacol 1995; 35(6): 471-482.

[4] Hayley M, McDaid and Patrick G. Synergistic interaction between paclitaxel and 8-clloro-adenosine 3',5'-monophosphate in human ovavian carcinoma cell lines [J]. Clin. Cancer Res. 1999; 5: 215-220.

[5] 汤为学，骆云鹏，王瑞雪. 人实体瘤抗癌药物敏感试验MTT法的建立[J]. 重庆医科大学学报，1992;17(2):103-108.

[6] 张胜本，张连阳. 肿瘤化学治疗敏感性与抗药性[M]. 四川科学技术出版社，1995;108-112.

[7] 韩芍亭. 新编抗肿瘤药物手册[M]. 山东科学技术出版社，1994;348-349.

(上接第351页)

少。肿瘤的生长优势不但可以从肿瘤细胞强大的增殖力和低分化程度中获得，而且可以从肿瘤细胞凋亡受抑，生存期延长中获得[7]。这也可能是高分化HCC较低分化HCC生长缓慢，预后较好的原因之一。肝癌侵犯门静脉与肝内转移是其重要特征，表明肝癌侵袭能力强，预后差。本研究发现，浸润性与肝内转移HCC凋亡指数明显低于非浸润性与无转移HCC，提示浸润性和转移性HCC可能逃避了调控基因介导的细胞凋亡，凋亡相对不足而增殖旺盛，生长迅速，并易于浸润和转移。

总之，HCC组织中细胞凋亡与肿瘤的某些生物学特性关系密切，细胞凋亡受抑制可能在HCC浸润转移过程中起重要作用。由于化疗，放疗，免疫治疗等均可诱发肿瘤细胞凋亡，有助于打破凋亡和增殖之间的平衡。因此，凋亡在HCC治疗中的作用以及细胞凋亡的生物调控，是值得深入研究的课题。

参 考 文 献

[1] Zhao M, Zimmermann A. Apoptosis in human hepatocellular carcinoma and in liver cell dysplasia is correlated with p53 protein immunoreactivity[J]. J Clin pathol.1997;50:394-400.

[2] Gavrieli Y,Shermen Y,Ben-Sassoo SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992;119(4):493-501.

[3] Sgonc R, Wick G.Methods for the detection of apoptosis[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1994;105:327-338.

[4] Gorczyca W,Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick traslation assays [J]. Cancer Res, 1993;53:1945-1949.

[5] Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues[J]. Am J Pathol.1996;149:429-437.

[6] Hino N, Higashi T, Nouso K, et al. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma[J].Liver,1996;16:123-129.

[7] Arends MJ, Mc Gregor AH, Toft NJ, et al. Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated H-ras oncogenes and is associated with endonuclease availability[J]. Br J Cancer,1993;68(6):1127-1134.