DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.025
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
304 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0304-04

DEN诱发大鼠肝癌变的病理形态与细胞增殖活性的定量研究

张新立,史景泉,卞修武 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠肝癌变的形态演变和细胞增殖活性的关系。方法 通过DEN诱发启动模型和肝癌模型,采用图像分析技术,对病变细胞的形态进行测量,以PCNA和BrdU免疫组化结果反映细胞增殖活性。结果 形态测量证实卵圆细胞是一大小仅为正常肝细胞的1/8、核浆比却大6倍、形态不规则的增生小细胞;增生灶/结节嗜碱性肝细胞形态参数与肝癌细胞相似;PCNA和BrdU阳性细胞主要位于癌前增生灶及肝癌组织中;并且病变形态与细胞增殖活性有较好的一致性。结论 大鼠肝癌变的形态演变与细胞增殖活性密切相关。

关键词:肝癌变;增殖活性;增殖细胞核抗原;溴化脱氧尿嘧啶;二乙基亚硝胺
中图法分类号:R730.231.1;R735.702 文献标识码:A

Quantitative study on morphologic features and proliferative activity during DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats

ZHANG Xin-li, SHI Jing-quan, BIAN Xiu-wu (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between morphologic evolution and proliferative activity during hepatocarcinogenesis in rats. Methods Imaging analysis technique was used to detect the morphologic parameters of cells in hepatic lesions in both Solt-Farber model and diethylnitrosamine (DEN)-induced liver cancer model. Immunohistochemistry was employed to detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and bromodeoxyuridine (BrdU). Results The oval cells were identified as irregular small proliferating cells in size of one-eighth of and with a nucleus/cytoplasm ratio of 6 times of the normal hepatocyte by image analysis. The morphometric parameters of basophil hepatocyte in precancerous foci and nodule were similar to those of the liver cancer cell. PCNA and BrdU positive cells were mainly localized within the proliferative foci and hepatocellular carcinoma (HCC) tissues. There was a better consistency between the development of hepatic lesions and cellular proliferative activity. Conclusion The morphologic evolution is closely related to proliferative activity during hepatocarcinogenesis in rats.

Key words: hepatocarcinogenesis; proliferative activity; diethylnitrosamine; proliferating cell nuclear antigen; bromodeoxyuridine

人体肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的分子病理学研究提出了HCC的癌基因谱及HCC发生的分子遗传模式[1,2],采用人体材料难以全面及动态地研究肝癌变多阶段演进的分子改变。化学致癌剂诱发的大鼠肝癌变过程具有多阶段、多步骤的特点,为动态研究肝癌变的分子基础提供了理想的动物模型。本研究以二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine, DEN)诱发大鼠肝癌变组织为研究对象,探讨大鼠肝癌变的形态学演变和细胞增殖活性的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型

实验动物为雄性Wistar大鼠(由第三军医大学实验动物中心提供)。

1.1.1 启动模型 参照文献[3]进行。3~4月龄大鼠125只,体重130~150 g。随机分为:①DEN组(n=55):采用Solt-Farber模型,即于第1天1次性腹腔注射DEN(Sigma)溶液(200 mg/kg体重),第3周开始喂以含0.02% 2-AAF(Sigma)的饲料,饲养1周后,行67%切肝术;②单纯切肝对照组(PH组,n=30);③假手术对照组(SH组,n=20);④生理盐水时照组(SA组,n=20)。实验动物于第1、2、3、4、5、10、15及20周末处理2~10只不等,部分动物于活杀前1 h,腹腔注射BrdU(Sigma)50 mg/kg体重。

1.1.2 肝癌模型 2~3月龄大鼠100只,体重100~130 g,随机分为:①实验组(n=80):经口咽插管灌喂2‰DEN溶液,每天0.9 ml,每周连续灌喂5 d;第13周始每周连续灌喂3 d,至第18周停止给药。②对照组(n=20):以等量生理盐水灌喂,余同实验组。实验组于第1、3、5、7、9、12、15、18、21、23及25周末活杀动物5~9只,对照组1~3只。

1.2 病理形态观察及形态测量

动物在1%戊巴比妥钠麻醉下开腹,观察肝脏大体病变后,取肝组织经4%多聚甲醛固定,分别以常规石蜡包埋和国产916包埋剂包埋、切片,HE染色。按大鼠肝肿瘤国际组织学分类标准进行形态判定[4]。采用真彩色医学图像分析系统进行如下测量:①肝癌变中不同类型细胞形态分析:采用3 μm厚塑料切片,物镜×40,每种细胞选30~50个进行测量,选择测量参数包括:细胞面积、核面积、胞浆面积、核浆比及形状因子;②启动模型癌前嗜碱性肝细胞增生灶/结节及卵圆细胞增生灶的数密度与嗜碱性肝细胞增生灶/结节平均面积:每时相点各取3只动物,于5 μm厚石蜡切片上,物镜×4,每例测5个视野。

1.3 免疫组化染色

于石蜡切片(厚5 μm)上进行PCNA和BrdU免疫组化ABC

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39270303)
作者简介:张新立(1962—),男,天津市人,博士,副教授,主要从事肝癌病理学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68753291
收稿日期:2000-11-15;修回日期:2001-03-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

法染色。抗 PCNA 单克隆抗体(英国 Dundee 大学 Dr DP. Lane 惠赠)1∶10 稀释; 抗 BrdU 单克隆抗体(Dako)1∶20 稀释。参照 ABC 法说明进行。DAB 显色, 苏木素衬染。按常规设立阳性和阴性对照。

肝癌细胞 PCNA 标记指数(LI)以每例切片 5 个高倍视野下 PCNA 阳性细胞占同类细胞百分比表示; 癌前病灶中 PCNA 与 BrdU 标记水平采用上述图像分析系统, 以病灶为单位进行测量, 物镜× 10, 并以数密度(个/mm^2)表示。

1.4　统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行多组样本均数间比较及同一总体多变量均数间的相关分析与方差分析。

2　结果

2.1　病理形态变化

启动模型 DEN 组肝脏大体改变分为 3 种情况: ①1 ~ 3 周(n= 15): 肝脏较饱满, 充血明显。②4 ~ 10 周(n= 25): 肝脏充血, 表面及切面可见针尖至粟粒大小的灰白或灰黄色圆形病灶。以第 4、5 周居多, 至第 10 周明显减少。③15 ~ 20 周(n= 15): 肉眼观察病变不明显。三种对照组中, 除 PH 组动物手术后见肝体积明显增大外, 余未见异常改变。启动模型 DEN 组肝脏光镜下改变可归纳为 3 期: ①肝细胞损伤期(1 ~ 3 周, n= 15): 此期主要见部分肝细胞胞浆疏松、灶性坏死, 枯否细胞、卵圆细胞轻度增生。②选择性增生期(4 ~ 5 周, n= 20): 此期多数肝小叶失去正常结构, 代之以由数十或数百个体积稍小嗜碱性肝细胞增生灶及以卵圆细胞为主的小细胞增生灶, 见图 1、2。两种病灶混杂分布, 其中卵圆细胞增生灶多位于门管区, 其内夹杂有增生的小胆管。5 周时肝细胞增生灶逐渐被增生结节取代, 而卵圆细胞增生仍较明显, 并向小叶内延伸, 包绕或伸入肝细胞增生结节中。③重建期(10 ~ 20 周, n= 20): 肝细胞增生结节明显减少, 肝小叶结构完整, 门管区见少数卵圆细胞聚集。

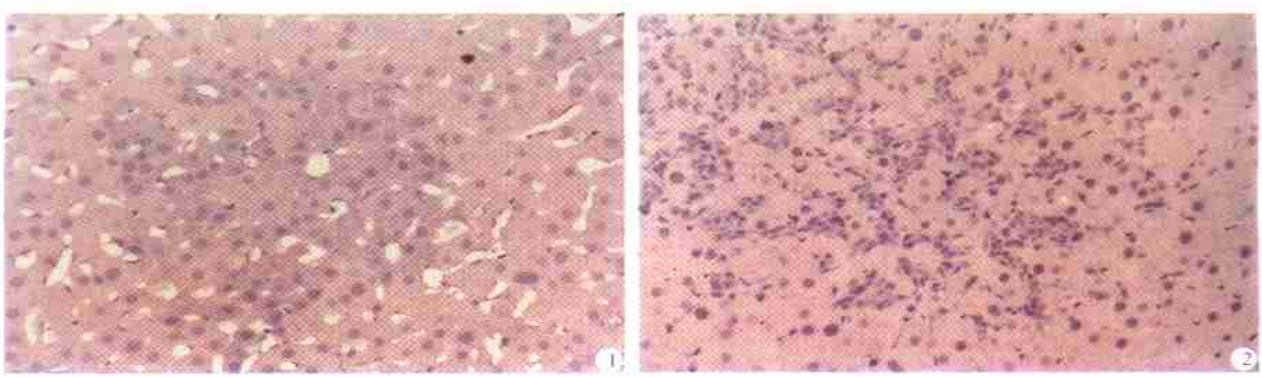


图 1　启动模型 4 周, 大鼠肝内有一嗜碱性肝细胞增生灶　(HE× 200)

Fig 1　A hyperplastic basophlic hepatocyte focus in the liver. Initiation model, 4 weeks after DEN injection　(HE× 200)

图 2　启动模型 5 周, 大鼠肝内可见以卵圆细胞为主的小细胞增生灶　(HE× 200)

Fig 2　A number of hyperplastic small cell foci, chiefly oval cells, could be seen in the liver. Initiation model, 5 weeks after DEN injection　(HE× 200)

肝癌模型实验组动物大体病变可归纳为: ①早期(1 ~ 7 周, n= 25): 仅见肝脏充血及小出血点。②中期(9 ~ 15 周, n= 22): 肝表面出现少数、灰白色圆形病灶, 直径多在 1 mm 以内, 至 12 周病灶数目渐多, 肝脏质地变硬; 至 15 周呈典型的肝硬变表现, 个别结节直径可达 0.3 cm。③晚期(18 ~ 25 周, n= 33): 肝脏表面及切面多呈结节状(直径可大于 0.6 cm), 质地硬, 结节间可见纤维间隔。光镜下病变亦可分为三期: ①肝细胞损伤期(1 ~ 7 周, n= 25): 肝窦充血明显, 多数肝细胞胞浆疏松甚至空化, 可见灶性坏死, 诱癌 3 周即可见卵圆细胞增生。②增生一硬化期(9 ~ 15 周, n= 22): 起始可见肝板中有散在的嗜碱性肝细胞分布, 随后小叶结构破坏, 代之以嗜碱性和(或)透明肝细胞增生灶。肝细胞增生结节也随之逐渐增多。门管区内有不同程度的卵圆细胞增生, 并向小叶内及结节内延伸。从 12 周起见假小叶形成, 至 15 周结节内肝细胞异型性增生明显, 出现"结中结", 核分裂像多见。③癌变期(18 ~ 25 周): 此期 33 只动物中 23 只检出肝癌。组织学类型为肝细胞癌(其中以梁状型和腺样型居多); 癌细胞以Ⅰ ~ Ⅱ级分化为主, 部分为Ⅲ级。

本实验两种动物模型肝癌变中主要病变细胞形态测量结果见表 1。不同类型细胞间各参数均值比较差异均非常显著(P 均< 0.0001)。多重比较显示差异主要源于卵圆细胞及增生胆管上皮细胞与 3 种类型肝细胞和肝癌细胞之间(P< 0.01)。卵圆细胞与增生胆管上皮细胞间各参数差异均不显著(P> 0.05)。3 种类型肝细胞和肝癌细胞间除核面积与核浆比在肝癌细胞与正常肝细胞间差异显著(P< 0.01)外, 余均无统计学意义(P> 0.05)。

癌前增生病灶数密度及平均面积测量结果见表 2。不同时相点间两种增生性病灶数密度的差别均非常显著(P< 0.0001)。第 4 周嗜碱性肝细胞增生病灶的数密度与第 5 周相比差别不显著(P> 0.05), 但与第 10 周的差别非常显著(P< 0.01)。卵圆细胞增生灶数密度在 4 周与 5 周及 4 周与 10 周间差别显著(P< 0.05); 而在 10、15、20 周之间差异不显著(P> 0.05)。嗜碱性肝细胞增生病灶平均面积第 5 周最大, 在 4 周与 5、10 周间差别显著(P< 0.05); 5 周与 10 周间差别非常显著(P< 0.01)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 不同类型病变细胞形态测量参数(μm^2, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Morphometric parameters of various types of lesion cells(μm^2, $\bar{x}\pm s$)

Cell type	Cell area	Nucleus area	Cytoplasm area	Nuc/Cyt	Shape factor
Oval cell	30.21±8.93	16.37±6.47	13.85±5.75	1.39±0.75	0.31±0.27
Proliferating bile duct epi.	29.49±5.67	15.14±3.24	14.35±3.65	1.10±0.30	0.46±0.23
Basophilic hepatocyte	223.86±25.62**	60.84±5.82**	163.04±25.11**	0.38±0.08**	0.64±0.06**
Hyperplastic hepatocytes	228.03±49.52**	59.63±10.51**	168.38±45.01**	0.37±0.12**	0.71±0.09**
HCC cells	281.11±60.84**	82.77±15.34△**	198.30±50.52**	0.43±0.12△**	0.68±0.09**
Normal liver cells	245.39±38.87**	38.70±12.94**	200.03±16.45**	0.22±0.09**	0.79±0.07**

**: $P<0.01$ *vs* oval cell or proliferating bile duct epi; △: $P<0.01$ *vs* normal liver cells

表 2 癌前增生性病灶数密度与平均面积参数值($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Numerical density of preneoplastic foci and parameters of average area($\bar{x}\pm s$)

Time point (Post injection of DEN, week)	Numerical density of lesions (/mm²)		Average area of lesion (mm²)
	Hepatic cell foci and nodule	Oval cell foci	Hepatic cell foci and nodule
4	3.776±1.002	3.888±0.911	0.0542±0.0198
5	4.298±0.808	5.290±1.076△	0.0808±0.0321△
10	1.692±0.319△△	2.424±0.781△	0.0252±0.0073##
15	ND	1.702±0.578	ND
20	ND	1.518±0.664	ND

ND: not detected; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* 4 weeks; ##: $P<0.01$ *vs* 5 weeks

2.2 免疫组化染色检测结果

PCNA 与 BrdU 阳性着色均位于核，二者分布基本一致。在启动模型中，它们主要存在于肝细胞及卵圆细胞增生灶中，PCNA 阳性细胞明显多于 BrdU 阳性细胞，见图 3。在肝癌模型中，PCNA 阳性细胞除见于肝细胞及卵圆细胞增生性病灶外，间质内增生的部分胆管上皮细胞核也见阳性染色。18 例肝癌组织中均见多少不等的 PCNA 阳性细胞，见图 4，其核染色深度与分布，在各细胞或癌巢间存在一定差异。癌前增生病灶 PCNA 与 BrdU 标记图像分析结果见表 3。

对嗜碱性肝细胞增生灶/结节平均面积，与相应时相点的 PCNA 标记数密度，进行相关分析，显示仅 4 周时二者有显著相关($r=0.82526$, $P=0.01212$)，而其余两个时相点二者均无明显相关($P>0.05$)。

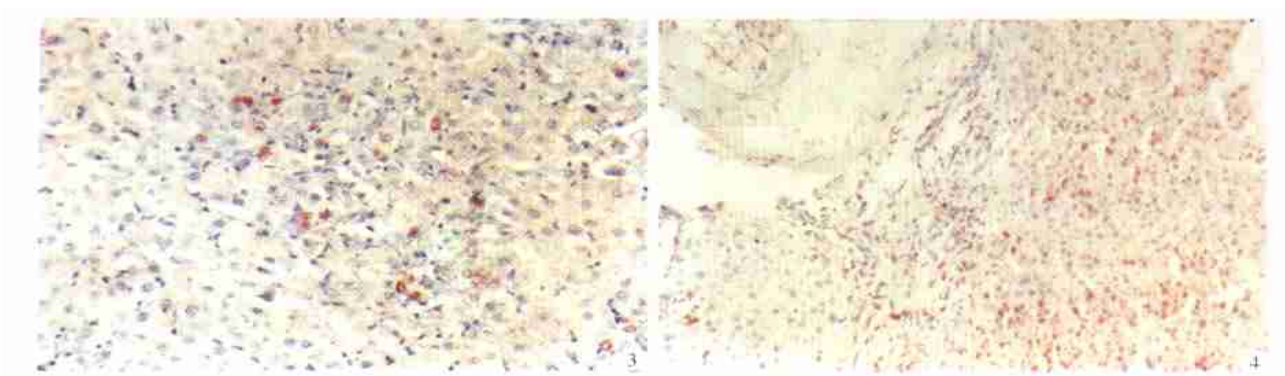


图 3 示卵圆细胞灶中 **BrdU** 阳性细胞 (ABC×200)

Fig 3 BrdU positive cells among oval cells foci (ABC×200)

图 4 大鼠肝细胞癌(实体型)：癌结节内可见大量 **PCNA** 阳性细胞 (ABC×200)

Fig 4 Hepatocellular carcinoma of the rat (solid type): Numerous PCNA positive cells within a cancer nodule (ABC×200)

表 3 癌前增生病灶中细胞 **PCNA** 与 **BrdU** 标记数密度($\times 10^3/mm^2$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 PCNA and BrdU labeling numerical density in preneoplastic lesions ($\times 10^3/mm^2$, $\bar{x}\pm s$)

Time point (postinjection of DEN, week)	Hepatic cell foci and nodule		Oval cell foci	
	PCNA	BrdU	PCNA	BrdU
4	1.338±0.255	0.606±0.383	2.272±0.893	0.554±0.211
5	1.157±0.5.8	0.776±0.271	2.658±0.732	1.128±0.247△△
10	0.2000±0.132△△##	0.118±0.070##	0.518±0.270△△##	0.132±0.056△△##

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* 4 weeks; ##: $P<0.01$ *vs* 5 weeks

3 讨论

3.1 关于本实验肝细胞癌的细胞学起源

病理形态学研究表明，经 DEN 启动、切肝生长刺激与 2-乙酰氨基芴(2-AAF)选择性生长刺激作用，大鼠肝组织出现嗜碱性肝细胞增生灶及以卵圆细胞为主的小细胞增生灶。两种病灶混杂分布，其中卵圆细胞增生灶多位于门管区，其内夹杂一些增生的小胆管。嗜碱性肝细胞增生灶中细胞排列紧密，部分肝细胞胞浆呈空泡变。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本实验以低剂量 DEN 生理盐水灌喂, 成功地诱发了大鼠肝细胞癌。病理形态观察显示, 诱癌早期嗜碱性肝细胞增生灶不如启动模型所见者明显, 卵圆细胞增生也较启动模型少见; 但至诱癌中期大量肝细胞增生结节与"结中结"的出现, 与启动模型形成鲜明对比, 证实了致癌剂累积作用对癌前持续性肝细胞增生结节形成的重要性。

关于化学致癌剂诱发的大鼠肝细胞癌的细胞学起源, Sell 和 Dunsford[4] 综述化学致癌物诱发的大鼠肝癌变过程中有关形态学、放射自显影和细胞免疫表型分析(采用 AFP 和 3 种单克隆抗体, 即 OV-6、T-6 和 H-4, 分别染卵圆细胞、肿瘤细胞和正常肝细胞)的研究结果, 认为: ①DEN 诱发的肝癌变模型中: 在 DEN 连续给药组, AFP 阳性、T-6 阳性肝细胞癌系来自变化了的成熟肝细胞; 在 DEN 间断给药组, T-6 阳性肿瘤来自 T-6 阳性肝细胞样细胞, 后者可由 OV-6 阳性卵圆细胞转变而来。②Solt-Farber 模型: 持续性增生结节中含卵圆细胞和增生的肝细胞, 它们均显示 OV-6 阳性表达, 可视为肝细胞癌的"前驱细胞"。AFP 定位于持续性增生结节更增加癌起源于卵圆细胞的可能性。③卵圆细胞来自肝多潜能干细胞[5], 它既是肝细胞癌的主要起源细胞, 也是胆管细胞癌的起源细胞。依本实验两种肝癌模型的病理形态演变和细胞增殖活性, 结合文献[4, 6]的观点, 本实验 DEN 诱发的大鼠肝细胞癌可能起源于变化了的成熟肝细胞, 也可能由卵圆细胞增殖演进而来。

3.2　肝癌变病理形态定量研究的意义

本研究选择肝癌变中 6 种主要细胞进行形态测量, 结果显示, 卵圆细胞面积的大小仅为正常肝细胞的 1/8, 但核/浆比却为正常肝细胞的 6 倍; 形状因子参数值也表明其圆度低, 形状变异大; 如此, 赋予卵圆细胞形态的量化特征。嗜碱性肝细胞及增生结节中的肝细胞核面积与核浆比更接近于肝癌细胞, 它们似可做为肝癌发生前身的形态学依据。

本研究对启动模型中形态特征明确的嗜碱性肝细胞增生灶及卵圆细胞增生灶的数密度进行动态测定, 显示 DEN 启动后 5 周嗜碱性肝细胞灶与卵圆细胞灶数目最多, 分别达 4.3/ mm^2 与 5.3 mm^2, 前者平均面积也最大(0.08 mm^2)。所得数据符合文献提出的绝大多数肝细胞增生灶及结节经过细胞分化重建的规律。

3.3　实验性肝癌变中细胞增殖活性的特点及其可能意义

本研究采用 PCNA 和 BrdU 两种标记方法, 对大鼠肝癌变中主要病变细胞的增殖活性进行了动态观察。结果显示, 癌前增生的嗜碱性肝细胞及卵圆细胞 PCNA 和 BrdU 标记率明显高于病灶周围的肝细胞, 说明细胞增殖特性与病变形态有较好的一致性。同一病灶中细胞 PCNA 阳性标记率明显高于 BrdU 的标记率, 但两种标记的总体变化趋势一致, 反映了两者用于细胞增殖活性研究时, 既密切相关又有一定的差别。

参考文献:

[1] Gu J R. Molecular aspects of human hepatic carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 1988, 9(5): 697－703.

[2] 阮幼冰. 肝癌研究中当前关注的几个问题[J]. 中华病理学杂志, 1998, 27(2): 85－86.

[3] Solt D B, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis[J]. Nature, 1976, 263(5 580): 701－703.

[4] Sells, Dunsford H A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma[J]. Am J Pathol, 1989, 134(6): 1 347－1 363.

[5] Thorgeirsson S S. Hepatic stem cells[J]. Am J Pathol, 1993, 142(5): 1 331－1 333.

[6] 廖钢陵, 陈晋彦, 丁　濂, 等. 大鼠肝癌前病灶与卵圆细胞的关系[J]. 中华病理学杂志, 1998, 27(2): 87－90.

(编辑　薛国文)

(上接 303 页)

3　讨论

颌下腺位于颌下三角区, 颌下腺的分泌和感觉受下颌下神经节支配, 其感觉根来自三叉神经的分支舌神经[1]。一般情况下, 颌下腺手术大多在局麻下进行。过去常规单纯采用术野局部浸润麻醉, 往往在钳夹、牵拉、分离颌下腺时造成患者疼痛难忍, 口腔分泌物增多, 并伴有恐惧心理[2]。即使在创腔内颌下神经节附近多次追加麻醉仍效果欠佳, 影响手术的顺利进行。有作者认为[3], 颌面外科手术如腮腺、颌下腺及颈部手术等采用颈丛麻醉, 其麻醉效果优于局部浸润麻醉。本组试验结果显示: 颌下腺手术中采用舌神经干阻滞麻醉加局部浸润麻醉, 其麻醉效果显著优于单纯浸润麻醉。A 组麻醉有效率达 86% 以上, 而 B 组仅有 33%。此方法简单易行, 无特殊并发症。减少了局部浸润麻醉用药量, 极大地减轻了患者痛苦。由此可见, 颌下腺手术局麻方法的改进是可行的, 效果满意, 值得推广。

关键词: 颌下腺; 手术; 麻醉
中图法分类号: R614.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郑思竞 主编. 人体解剖学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 324－324.

[2] 李　波. 颌面外科局麻病人恐惧心理分析[J]. 广东牙病防治, 1996, 4(3): 11－12.

[3] 姜卫东, 王安琪, 顾　源. 颈丛麻醉在颌面外科中的应用[J]. 临床口腔医学杂志, 1995, 11(1): 50－51.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net