

促肝细胞生长素对急性肝功能衰竭大鼠肝组织Ki-67表达的影响

王晓东, 朱碧红, 潘陈为, 陈永平

王晓东, 朱碧红, 潘陈为, 陈永平, 温州医学院附属第一医院感染科 浙江省温州市 325027

通讯作者: 陈永平, 325027, 浙江省温州市府学巷2号, 温州医学院附属第一医院. beerfoam@sina.com

电话: 0577-88078232

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-02-02

摘要

目的: 观察促肝细胞生长素(hepatocyte growth-promoting factors, pHGF)对急性肝功能衰竭大鼠肝组织 Ki-67 表达的影响, 探讨肝细胞再生的规律。

方法: SD 大鼠随机分为正常对照组、D-氨基半乳糖(D-Galactosamine, D-GalN)组和 D-GalN+pHGF 组, 以 D-GalN 1.2 g/kg 腹腔注射制备大鼠急性肝功能衰竭模型, 2 h 后 D-GalN+pHGF 组大鼠每 24 h 腹腔注射 pHGF 2 mg/kg, 并分别于第 1、3、5、7、9、11、13、15 d 处死各组大鼠 6 只。如果该时间点前每组有濒死大鼠则提前处死, 使每组各时间点处死大鼠总数为 6 只。采用 S-P 免疫组织化学法检测肝组织中 Ki-67 的表达。

结果: D-GalN 组大鼠肝组织 Ki-67 标记指数(Ki-67 labeling index, Ki-67-LI)在模型建立成功后第 5 d 达峰值, 以后急剧下降, 在第 15 d 时达到正常对照组水平, 但 D-GalN+pHGF 组大鼠 Ki-67-LI 峰值于第 3 d 出现, 比 D-GalN 组早, 持续时间长, 且各时间点的 Ki-67-LI 均明显高于 D-GalN 组, 在第 15 d 时仍未降至正常对照组水平, 与之相比, 明显升高($P<0.01$)。D-GalN 组及 D-GalN+pHGF 组肝细胞数量逐渐增多, 但除第 1 d 外, D-GalN+pHGF 组各时间点肝细胞数量明显高于 D-GalN 组($P<0.01$)。

结论: 急性肝功能衰竭时, 残存的肝细胞仍有再生能力, 但其再生过程受到抑制。pHGF 可以提高急性肝功能衰竭大鼠肝组织 Ki-67 的表达, 从而促进肝细胞的再生, 但其再生程度同样受到一定程度的抑制。

王晓东, 朱碧红, 潘陈为, 陈永平. 促肝细胞生长素对急性肝功能衰竭大鼠肝组织 Ki-67 表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(6):784-786

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/784.asp>

0 引言

传统的病理学观点认为肝功能衰竭是一种以变质为主的炎症, 肝实质细胞坏死广泛而严重, 小叶周边残留少量变性的肝细胞, 残余肝细胞的再生现象不明显。Ki-67 是一种与细胞增生密切相关的核内蛋白, 因其只表达于增生细胞中, 静止期的细胞阴性, 且其含量的多寡反映了细胞的增生活性, 是调节细胞周期不可缺少的蛋白, 被认为是评价细胞增生活性的一种可靠指标。我们用

pHGF 处理 D-GalN 诱发的急性肝功能衰竭大鼠模型, 观察 pHGF 对急性肝功能衰竭大鼠肝组织 Ki-67 表达的影响并探讨肝细胞再生的规律。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ SD 大鼠 102 只, 体重 460-520 g, 平均 490 ± 25 g, 由浙江医学科学院实验动物中心提供, 浙医动字第 2203001 号。D-GalN 购自重庆医科大学化学教研室, 批号: 20010328。用前将 D-GalN 溶于无菌生理盐水中, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 使最终浓度为 10%。pHGF 由南京南大药业有限公司生产, 批号: (97)X-212-2。Ki-67 多克隆抗体购自美国 NeoMarkers 公司。链霉卵蛋白-过氧化物酶(S-P)免疫组化试剂盒购自美国 LabVision 公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验过程 102 只大鼠随机分为 3 组, 正常对照组: 6 只; D-GalN 组: 48 只; D-GalN+pHGF 组: 48 只。所有大鼠均在室温恒定(15-20℃)及灯光昼夜节律控制(8:00-20:00)下普通喂养, 实验前 12 h 禁食。以 D-GalN 1.2 g/kg 作为最佳中毒剂量, 腹腔注射一次成模。正常对照组同时注射等体积生理盐水。2 h 后, D-GalN+pHGF 组大鼠每 24 h 腹腔注射 pHGF 2 mg/kg, 正常对照组和 D-GalN 组大鼠同时注射等体积生理盐水。模型建立成功后第 1、3、5、7、9、11、13、15 d 股动脉放血分别处死各组大鼠 6 只。如果该时间点前每组有濒死大鼠则提前处死, 使每组各时间点处死大鼠总数为 6 只。剖腹取出肝组织, 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 切片, 免疫组化染色。每次染色时用已知 Ki-67 阳性肝细胞癌切片做阳性对照, PBS 代替第一抗体作为阴性对照。

1.2.2 结果判定标准 Ki-67 阳性染色定位于细胞核, 呈棕黄色或深黄色。阳性细胞计数按如下方法进行: 每张切片于高倍镜($\times 400$)下任选 10 数个视野借助于网格计数器计数 1000 个细胞, 计算 Ki-67-LI。Ki-67-LI=Ki-67 阳性肝细胞数 / 肝细胞总数 $\times 100\%$ 。

统计学处理 数据以 mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 11.5 中的 NAOVA 程序作单因素方差分析, 并用 LSD 程序进行两两比较。 $P<0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点肝组织中 Ki-67 的表达情况 如表 1 所示, 正常对照组大鼠肝组织 Ki-67 的表达水平较低, 与 D-GalN 和 D-GalN+pHGF 组大鼠第 1 d 相比, 差异十分显著($P<0.01$)。肝功能衰竭模型建立成功后,

D-GaIN 组大鼠肝组织 Ki-67-LI 逐渐升高并于第 5 d 达高峰, 与第 1 d 相比, 明显升高 ($P<0.01$), 以后逐渐下降, 每天的 Ki-67-LI 都较前 1 d 明显下降 ($P<0.01$), 于第 15 d 时降至正常对照组水平. 2 wk 内各时间点 Ki-67-LI 明显高于正常对照组 ($P<0.01$). D-GaIN+pHGF 组大鼠肝组织 Ki-67-LI 变化曲线类似于 D-GaIN 组, 但 Ki-67-LI 峰值于第 3d 时出现, 与第 1d 比较也明显升高 ($P<0.01$), 以后同样也表现为 Ki-67-LI 的逐渐下降, 下降幅度差异显著 ($P<0.01$), 第 15 d 时 D-GaIN+pHGF 组大鼠的 Ki-67-LI 尚未降至正常对照组的水平, 与之相比明显升高 ($P<0.01$), 且各时间点 Ki-67-LI 较 D-GaIN 组相应时间点的 Ki-67-LI 均明显升高 ($P<0.01$).

2.2 急性肝功能衰竭大鼠肝细胞的再生情况 如表 2 所示, D-GaIN 组大鼠随着肝细胞的增生, 每高倍镜视野下肝细胞的数量不断增加, 但至第 15 d 时肝细胞数量尚未接近正常对照组水平 ($P<0.05$). 类似情况也出现于 D-GaIN+pHGF 组大鼠, 但该组大鼠高倍镜视野下肝细胞的数量在第 15 d 时已经接近正常对照组的水平. 除第 1 d 外, D-GaIN+pHGF 组大鼠各时间点每高倍镜视野下的肝细胞数量明显多于 D-GaIN 组 ($P<0.01$). 另外, D-GaIN 和 D-GaIN+pHGF 两组大鼠各时间点肝细胞数量增加的幅度呈现先快后慢的趋势.

表1 各组大鼠不同时间点 Ki-67-LI 值(%)

时刻	n	正常对照组	D-GaIN组	D-GaIN+pHGF组
第1 d	6	8.5 ± 2.4	25.5 ± 3.7 ^b	44.1 ± 4.5 ^{bd}
第3 d	6		33.8 ± 4.6 ^{bf}	70.1 ± 5.8 ^{df}
第5 d	6		54.3 ± 6.5 ^{bf}	62.9 ± 4.5 ^{df}
第7 d	6		39.9 ± 5.1 ^{bf}	53.2 ± 5.1 ^{df}
第9 d	6		29.9 ± 4.2 ^{bf}	45.1 ± 4.7 ^{df}
第11 d	6		20.8 ± 4.1 ^{bf}	39.3 ± 4.3 ^{de}
第13 d	6		15.7 ± 3.2 ^{be}	34.0 ± 3.5 ^{de}
第15 d	6		9.3 ± 1.7 ^e	28.4 ± 3.7 ^{bde}

^b $P<0.01$ vs 正常对照组; ^d $P<0.01$ vs D-GaIN 组; ^e $P<0.05$; ^f $P<0.01$ vs 同组前 1 d.

表2 各组大鼠不同时间点每高倍镜视野下肝细胞数($\times 400$, 个)

时刻	n	正常对照组	D-GaIN组	D-GaIN+pHGF组
第1 d	6	992 ± 53	278 ± 35 ^b	295 ± 33 ^b
第3 d	6		347 ± 46 ^{bf}	386 ± 38 ^{bdf}
第5 d	6		472 ± 41 ^{bf}	563 ± 42 ^{bdf}
第7 d	6		633 ± 45 ^{bf}	771 ± 49 ^{bdf}
第9 d	6		701 ± 52 ^{bf}	850 ± 41 ^{bdf}
第11 d	6		757 ± 46 ^{bf}	915 ± 52 ^{adf}
第13 d	6		803 ± 48 ^{df}	959 ± 47 ^{de}
第15 d	6		842 ± 47 ^{df}	986 ± 49 ^d

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常对照组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs D-GaIN 组; ^e $P<0.05$,

^f $P<0.01$ vs 同组前 1 d.

3 讨论

注射 D-GaIN 后 24 h, 大鼠表现为极度虚弱、高度乏力、精神萎靡等. 病理学表现为肝细胞弥漫性大片坏死, 肝索解离, 小叶结构模糊不清, 肝窦明显扩张充血并出血, 小叶内及汇管区有淋巴细胞和巨噬细胞为主的炎细胞浸润, 残存肝细胞水肿变性, 符合肝功能衰竭的病理特点, 表明急性肝功能衰竭动物模型成功建立. 本试验大鼠死亡率以第 3 d 最高, 但没有出现一个时间点超过 6 只的情况. Ki-67 抗原 (Kiel 67 antigen, Ki-67) 是在细胞 G₁、S、G₂、M 期出现的一种耐酸的核抗原, 半衰期短, 约 60-90 min, 细胞脱离增生期后迅速被降解, 其检测结果的可靠性明显高于半衰期长的增生细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA). Ki-67 由相对分子质量分别为 $M_r 395\ 000$ 和 $M_r 345\ 000$ 的双链多肽组成, 属核内非组蛋白. 在细胞周期中 Ki-67 的表达受到高度精确的调控, 其快速降解可能与一种蛋白酶复合体有关^[1-4].

大量实验研究证实 Ki-67 在 DNA 合成过程中发挥重要作用, 与细胞增生密切相关, 是调节细胞周期必不可少的组成部分^[5]. 研究表明 Ki-67 可作为一项独立判断肿瘤患者预后的指标, 在肿瘤研究领域有着广泛的应用^[6]. Alexandrakis *et al*^[7]报道 Ki-67 表达水平较好地反映了多发性骨髓瘤的增生活性, 同时也与骨髓血管生成和肿瘤负荷有关. Wolfsberger *et al*^[8]认为 Ki-67 免疫标记指数是室鼓膜瘤的较为精确的预后因子. 此外, Ki-67 还用于恶性黑色素瘤^[9]及溃疡性结肠炎上皮发育不良^[10]等的诊断或鉴别诊断. 关于 Ki-67 在急性肝功能衰竭大鼠肝组织中的表达情况报道不多.

传统的病理学认为肝功能衰竭是一种以变质为主的炎症, 肝实质细胞坏死广泛而严重, 小叶周边残留少量变性的肝细胞, 其肝细胞再生现象不明显. 然而本试验表明, 急性肝功能衰竭时, 肝组织中 Ki-67 仍有一定程度的阳性表达, 甚至在为数不多的残留肝细胞中, Ki-67 阳性细胞仍占有很高的比例, 表明在急性肝功能衰竭这样以变质为主的炎症中, 仍存有肝细胞的再生, 为肝功能衰竭的救治提供理论依据.

本实验中 D-GaIN 组及 D-GaIN+pHGF 组 Ki-67-LI 在达到峰值后又急剧下降, 提示急性肝功能衰竭大鼠肝细胞在增生过程中存在不同程度的受抑制的现象, 分析原因可能与下列因素有关: (1) 免疫因素: 关于免疫因素在肝再生中的作用尚不十分清楚, 范荣山 *et al*^[11]报道暴发性肝衰竭大鼠肝脏 NK 细胞对肝再生可能有抑制作用. (2) 体内存在的某些抑制因素: 如 TGF- β 1、u-PA (urokinase-type plasminogen activator)^[12-14]、肝抑素 (hepatic chalone) 等. 其中 TGF- β 1 是目前已知的最强的肝细胞再生抑制因子. (3) 肝细胞大片坏死导致小叶结构模糊不清, 肝索断裂, 纤维组织大量增生, 肝脏供血减少, 因而肝细胞再生能力受到损伤. (4) 毒物的持续吸收, 使肝细胞代谢持续严重紊乱, 导致肝细胞增生缓慢. (5) 肠

源性内毒素血症加重肝细胞的损害。

本实验发现D-GaIN+pHGF组大鼠各时间点的Ki-67-LI明显高于D-GaIN组,表明pHGF可以提高大鼠肝细胞Ki-67的表达,从而有效的促进肝细胞的增生。关于pHGF提高Ki-67表达的机制可能是pHGF降低了某些抑制因素对肝细胞再生的抑制作用,有待于试验的进一步证实。另外,因为pHGF可以促进肝细胞DNA的合成而使肝细胞周期变短,故D-GaIN+pHGF组大鼠Ki-67-LI达峰值的时间较D-GaIN组相对较早。

肝细胞再生是一个复杂的过程,确切的机制和规律尚未阐明。许多细胞因子和细胞周期蛋白参与了肝再生的调节,如肝再生增强因子^[15]、白介素-6^[16]等。残存肝细胞能够再生是肝功能衰竭恢复的基本条件,因此,我们推测适当提高肝细胞的增生活性,增加Ki-67的表达可以提高肝功能衰竭患者的存活率。但是,不适当的肝再生有可能导致肿瘤的发生,目前尚无直接证据表明增生活跃的细胞可以直接转化为肝癌。肝细胞再生的确切规律尚待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322
- 2 Wu Y, Luo H, Kannaan N, Wu J. The proteasome controls the expression of a proliferation associated nuclear antigen Ki-67. *J Cell Biochem* 2000;76:596-604
- 3 MacCallum DE, Hall PA. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol* 2000;190:537-544
- 4 MacCallum DE, Hall PA. Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res* 1999;252:186-198
- 5 MacCallum DE, Hall PA. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol* 2000;191:286-298
- 6 Huuhtanen RL, Blomqvist CP, Wiklund TA, Bohling TO, Virolainen MJ, Tukiainen EJ, Tribukait B, Andersson LC. Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. *Br J Cancer* 1999;79:945-951
- 7 Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, Dambaki K, Niniraki M, Stathopoulos E. Ki-67 proliferation index: correlation with prognostic parameters and outcome in multiple myeloma. *Am J Clin Oncol* 2004;27:8-13
- 8 Wolfsberger S, Fischer I, Hoftberger R, Birner P, Slavc I, Diekmann K, Czech T, Budka H, Hainfellner J. Ki-67 immunolabeling index is an accurate predictor of outcome in patients with intracranial ependymoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:914-920
- 9 Korabiowska M, Brinck U, Middel P, Brinkmann U, Berger H, Radzun HJ, Ruschenburg I, Droese M. Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. *Anticancer Res* 2000;20:1781-1785
- 10 Wong NA, Mayer NJ, Mackell S, Gilmour HM, Harrison DJ. Immunohistochemical assessment of Ki-67 and p53 expression assists the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. *Histopathology* 2000;37:108-114
- 11 范荣山, 石理兰, 冯国和, 赵桂珍, 刘沛. 实验性暴发性肝衰竭大鼠肝脏NK细胞与肝再生的关系. *中国医科大学学报* 2003;32:321-323
- 12 Nomura K, Miyagawa S, Ayukawa K, Soeda J, Taniguchi S, Kawasaki S. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator delays expression of c-jun, activated transforming growth factor beta 1, and matrix metalloproteinase 2 during post-hepatectomy liver regeneration in mice. *J Hepatol* 2002;36:637-644
- 13 Nozato E, Shiraishi M, Nishimaki T. Up-regulation of hepatocyte growth factor caused by an over-expression of transforming growth factor beta, in the rat model of fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 2003;115:226-234
- 14 Enami Y, Kato H, Murakami M, Fujioka T, Aoki T, Niiya T, Murai N, Ohtsuka K, Kusano M. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody transiently enhances DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:250-258
- 15 Polimeno L, Capuano F, Marangi LC, Margiotta M, Lisowsky T, Ierardi E, Francavilla R, Francavilla A. The augmenter of liver regeneration induces mitochondrial gene expression in rat liver and enhances oxidative phosphorylation capacity of liver mitochondria. *Dig Liver Dis* 2000;32:510-517
- 16 Kaido T, Oe H, Imamura M. Interleukin-6 augments hepatocyte growth factor-induced liver regeneration; involvement of STAT3 activation. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1667-1670

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》、《世界胃肠病学杂志(英文版)》 变更刊期获得批复

本刊讯 山西省新闻出版局于2005-02-18及2005-02-25发布文件,分别批准《世界胃肠病学杂志(英文版)》、《世界华人消化杂志》变更刊期。

根据晋新出报刊发[2005]5号文件,《世界胃肠病学杂志(英文版)》自2005-01-01起改为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。

根据晋新出报刊发[2005]15号文件,《世界华人消化杂志》自2005-01-01起改为半月刊发行,每月1、15日出版。