

慢性乙型肝炎和肝硬化组织中变异肝细胞结节的克隆性

初霞, 苏勤, 巩丽, 张伟, 王淑芳, 朱少君, 李爱宁, 冯英明

初霞, 苏勤, 巩丽, 张伟, 王淑芳, 朱少君, 李爱宁, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038
苏勤, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科 北京市 100021
冯英明, 第四军医大学唐都医院肿瘤科 陕西省西安市 710038
初霞, 女, 1979-10-20 生, 河南省洛阳市人, 汉族, 2002 年第四军医大学唐都医院病理科硕士生。
国家自然科学基金资助项目, No. 30171052
通讯作者: 苏勤, 100021, 北京市潘家园南里 17 号, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科. q.su@wjgnet.com
电话: 010-80691052 传真: 010-67713359
收稿日期: 2005-02-17 接受日期: 2005-03-10

Clonality of nodules of altered hepatocytes in livers with chronic hepatitis B and cirrhosis

Xia Chu, Qin Su, Li Gong, Wei Zhang, Shu-Fang Wang, Shao-Jun Zhu, Ai-Ning Li, Ying-Ming Feng

Xia Chu, Qin Su, Li Gong, Wei Zhang, Shu-Fang Wang, Shao-Jun Zhu, Ai-Ning Li, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Ying-Ming Feng, Department of Oncology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171052

Correspondence to: Dr. Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 17 Panjiayuan Nanli, Beijing 100021, China. q.su@wjgnet.com
Received: 2005-02-17 Accepted: 2005-03-10

Abstract

AIM: To elucidate the clonality status of the preneoplastic nodules of altered hepatocytes (NAHs) in cirrhotic liver by clonality assays at the phosphoglycerate kinase and androgen receptor loci based on X chromosomal inactivation mosaicism in female somatic tissues.

METHODS: Female liver tissues with hepatitis B virus (HBV)-associated cirrhosis were collected. The nodular lesions were microdissected on hematoxylin and eosin-stained paraffin sections. Genomic DNA was isolated and pretreated with the methylation-sensitive enzyme *Hpa* II or *Hha* I, and amplified via nested PCR. The products were resolved on agarose gels and denaturing polyacrylamide gels. Hepatocellular carcinoma (HCC) and adenoma (HA) tissues were used as references.

RESULTS: Monoclonality was demonstrated in all of the

five cases of HCC and one case of HA. Totally 6 regular regenerative nodules and 29 NAHs including clear-cell (glycogen-storing) and mixed-cell types were microdissected from 4 cirrhotic liver specimens. Loss of X chromosomal inactivation mosaicism was demonstrated in all of the 5 mixed-cell NAHs with small-cell change (SCC), indicating their neoplastic nature. One of the lesions exhibited similar X chromosomal inactivation pattern as the neighboring HCC nodules, reflecting their common clonal origin. Among the 20 mixed-cell lesions without SCC, 7 (35%) were shown to be monoclonal, while all of the 4 clear-cell lesions and 6 regular regenerative nodules examined were found to be polyclonal.

CONCLUSION: Some NAH lesions in the HBV-associated cirrhosis, particularly those with SCC, are already neoplastic lesions. Occurrence of SCC is a late event during NAH progression, a premalignant morphologic phenotype.

Key Words: Clonality; Nodules of altered hepatocytes; Hepatitis B; Hepatic cirrhosis; Hepatocellular carcinoma; Premalignant lesions

Chu X, Su Q, Gong L, Zhang W, Wang SF, Zhu SJ, Li AN, Feng YM. Clonality of nodules of altered hepatocytes in livers with chronic hepatitis B and cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):945-952

摘要

目的: 利用基于女性体细胞构成组织内 X 染色体失活嵌合性的磷酸甘油酸激酶和雄激素受体位点克隆性检测技术, 探讨肝硬化组织中变异肝细胞结节 (NAH) 的克隆性。

方法: 女性乙型肝炎病毒 (HBV) 相关肝硬化标本石蜡切片, HE 染色后通过显微切割获取肝细胞结节, 提取基因组 DNA, 经甲基化敏感的 *Hpa* II 或 *Hha* I 消化, 巢式 PCR 扩增, 凝胶电泳显示结果。应用肝细胞癌 (HCC) 和肝细胞腺瘤组织作为参照病变。

结果: HCC 5 例和肝细胞腺瘤组织 1 例均为单克隆性。在 4 例可分析的肝硬化组织中共分离出普通再生结节 6 个和 NAH 29 个, 后者包括混合细胞性病变 25 个, 透明细胞性 (糖原储积) 病变 4 个。伴有小细胞性改变 (SCC) 的 5 个混合细胞性 NAH 均显示 X 染色体失活嵌合性丢失, 提示为肿瘤性病变; 其中 1 个取自癌旁的病变与癌组织的灭活带型一致, 证明与 HCC 具有相同的克隆

起源; 20个不伴SCC的混合细胞性NAH中, 7个(35%)为单克隆性病变; 检测的4个透明细胞性NAH和6个普通再生结节均未显示出X染色体失活嵌合性丢失, 提示为多克隆性病变。

结论: HBV相关的肝硬化组织中的部分NAH, 尤其是伴有SCC的病变, 是单克隆性的, 已经属于肿瘤性病变; SCC是NAH病变进展过程中的较晚期改变, 是一种癌前病变。

关键词: 克隆性; 变异肝细胞结节; 乙型肝炎; 肝硬化; 肝细胞癌; 癌前病变

初霞, 苏勤, 巩丽, 张伟, 王淑芳, 朱少君, 李爱宁, 冯英明. 慢性乙型肝炎和肝硬化组织中变异肝细胞结节的克隆性. 世界华人消化杂志 2005;13(8):945-952
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/945.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)常见^[1], 在中国居于男性恶性肿瘤的前3位^[2], 主要为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染及其引起的肝硬化^[2], 但对于其发生的分子机制仍所知甚少. 已提出的HCC前期病变包括肝实质的大细胞性改变(large-cell change, LCC)^[3]、小细胞性改变(small-cell change, SCC)^[4]和巨大再生结节^[5]. 多数学者认为肝硬化组织中的再生结节也是HCC的前期病变^[6-7], 但是这一提法并不准确^[8-9]. 近年来的观察表明, 变异肝细胞病灶(foci of altered hepatocytes, FAH)广泛存在于人类慢性肝炎和肝硬化组织中^[10], 并与动物HCC前期病变相似, 与肝癌发生有关^[11]. 具有生长优势的FAH占据一个再生结节的全部或大部分, 并呈膨胀性生长, 这种病变称为变异肝细胞结节(nodules of altered hepatocytes, NAH)^[10]. 伴有SCC的FAH和NAH可能是较晚期的癌前病变^[2, 9-11]. 然而, 还不知道他们的确切性质. 克隆性增生是肿瘤的一个基本特性^[12], 肝细胞肿瘤也是克隆性病变^[13-19], 但对于HCC前期病变的克隆性研究不多, 文献中未见有关人肝脏中NAH或FAH克隆性的报道. 此研究应用基于女性体细胞构成组织内X染色体失活嵌合性和磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)及雄激素受体(androgen receptor, AR)基因多态性的克隆性检测技术, 结合显微切割技术探讨NAH的克隆组成。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2004-06第四军医大学唐都医院和西京医院以及中国医学科学院肿瘤医院病理科女性肝组织9例. 由两位病理医师确定诊断, 按Edmondson分级^[20]和多数认可的肝硬化^[21]、肝细胞腺瘤的形态学标准^[22]诊断. 根据以前的观察^[10]检测FAH和NAH, 后

一种病变体积较大, 多数直径1-5 mm, 常占据肝小叶或再生结节的大部分或全部, 并挤压周围肝实质, 病变内肝板厚度增加至2层. 部分病变主要由透明(糖原储积)肝细胞组成, 称为透明细胞性病变; 较晚期的病变由透明肝细胞和嗜双色肝细胞(amphophilic cell)构成, 称为混合细胞性病变. 根据Anthony *et al*^[3]的标准检测LCC病变; 根据Watanabe *et al*^[4]的描述检测SCC病变. 依据肝细胞的密度、肝板厚度和结构以及核异型, 结合以前的观察^[2, 10, 23]把SCC分为低度和高度病变. SCC低度病变较小, 肝板由2-3层细胞构成, 核密度增加至周围肝实质的1.5-2倍; 高度病变较大, 肝板厚度达3层, 细胞核密度增加至2倍, 其构成的小肝细胞有核异型及结构异常, 但尚不足以诊断恶性病变. 肝细胞不典型增生达到以下程度时即诊断为高分化HCC(Edmondson I级): 细胞核密度增加至其周围肝组织的2倍, 肝板排列紊乱, 厚度超过3层细胞, 可以呈膨胀性或浸润性生长(表1). 显微切割和DNA提取参照朱少君 *et al*^[24]的方法进行. 每例标本制备10 μ m厚切片10张, 经HE染色后, 用甘油覆盖组织, 在显微镜10倍物镜下用4.5号注射器针头将所需的组织剔出(图1), 再用针头收集剔出的组织于装有无水乙醇的1.5 mL Eppendorff管内. 在每个病变的分离过程中, 同时分离病变旁相同面积的增生纤维组织或结构正常的肝组织, 作为以下检测的参照. 经2次无水乙醇洗涤后, 放置37℃烤箱30 min左右, 待组织干燥后, 应用QIAamp DNA提取试剂盒(QIAGEN GmbH, Germany)按照说明书提取基因组DNA.

1.2 方法

1.2.1 AFP和HBV抗原 应用酶联免疫技术测定血清AFP, HBsAg及其抗体, e抗原及其抗体, HBcAg抗体以及HCV抗体. 此外, 还应用免疫组织化学检测了组织AFP和HBV抗原的表达. 切片4 μ m脱蜡入水后分别滴加HBsAg的mAb(M3506, Dako)以及HBcAg(B0586, Dako)和IAFP(A0008, Dako)的多克隆抗体. 参照以前的方法^[10], 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶反应显示抗原-抗体结合, 二氨基联苯胺/过氧化氢溶液显色, 苏木素衬染. 应用已知有相应抗原表达的标本作为阳性对照; 应用相同稀释度的免疫前小鼠或家兔IgG进行阴性对照反应.

1.2.2 克隆性分析 AR和PGK位点的克隆性检测是基于女性体细胞组织的X染色体失活嵌合性, 即所有女性体细胞的2条X染色体中的1条在胚胎发育早期必须通过永久甲基化而随机灭活, 另1条保持遗传活性^[25]. AR基因多态性表现为其第1外显子的CAG串联短重复序列(short-tandem repeat, STR)的长度不同, 即(CAG)*n*的重复次数有差别(*n* = 11-31), 可以通过变性聚丙烯

表1 女性肝细胞肿瘤和肝硬化患者9例的血清学和组织病理学表现, 克隆性分析结果以及单克隆病变的X染色体失活带型

编号	年龄	血清AFP(μg/L)	血清HBsAg	组织HBsAg	病理学诊断及HCC分级	病变编号	病变数	单克隆病变酶切后带型		
								单克隆数	保留上带	保留下带
1	67	300	+	+	HCC II / III 级, 肝硬化	1T01 ¹	1	1	1	0
						1N01 ²	1	1	1	0
2	66	<20 ³	+	+	HCC I / II 级, 肝硬化	2T01	1	1	1	0
						2N01-18 ⁴	18	5	0	5 ⁵
3	23	775.8	+	+	HCC III 级, 肝硬化	3T01	1	1	0	1
4	50	400	+	+	HCC II 级, 肝硬化	4T01	1	1	1	0
5	56	9.2	+	+	HCC IV 级, 肝硬化	5T01	1	1	0	1
6	33	<20	-	-	肝细胞腺瘤	6T01-03	3	3	0	3
7	50	124	+	+	HCC I 级, 肝硬化	7N01, 02	2	2	2 ^{5,6}	0
8	53	48.3	+	+	肝硬化	8N01-06 ⁷	6	1	0	1
9	50	35	+	-	肝硬化	9N01-08	8	3	1	2 ^{5,8}

¹例1之肿瘤标本01;²例1之结节01;³癌组织AFP免疫染色反应也为阴性;⁴混合细胞性NAH 11个, 透明细胞性NAH 2个, 普通再生结节5个;⁵病变来自同一张切片, 且位置相邻(图6A);⁶2个病变均伴有高度SCC;⁷混合细胞性NAH 4个, 透明细胞性NAH和普通再生结节各1个;⁸2个病变均伴有低度SCC.

烯酰胺凝胶电泳显示出来^[26]. PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被 *Bst* XI 识别的单核苷酸多态性位点, 可经琼脂糖凝胶电泳显示出来^[27]. 具有多态性位点的女性个体中正常和多克隆增生的组织显示2条带, 而肿瘤性病变仅显示1条带或以1条带为主^[12]. AR位点克隆性检测参照以前的方法^[28]进行. 所用引物序列如下: AR1A, 5' -GAG GAG CTT TCC AGA ATC TG -3'; AR1B, 5' -CAT GGG CTT GGG GAG A -3'; AR2A, 5' -TCC AGA ATC TGT TCC AGA GC -3'; AR2B, 5'-TGG GGA GAA CCA TCC TCA CC -3'. DNA样品经 *Hha* I 消化后, 通过巢式PCR进行扩增反应. 第1轮反应含有引物对 AR1A/AR1B, 97℃ 7 min 预变性后 94℃变性 40 s, 56℃淬火 50 s, 72℃延长 1 min, 共 25 个循环, 72℃延长 15 min. 反应产物 1:100 稀释后, 取 5 μL 加入第2轮反应体系, 其中含有引物对 AR2A/AR2B, 以相同条件扩增, 琼

脂糖凝胶(20 g/L)电泳评价扩增效果. 将4 μL产物和等体积的上样缓冲液混匀后, 加到厚度为 0.8 mm 的变性聚丙烯酰胺凝胶(100 g/L, 含尿素 8 mol/L), 应用 minivE 电泳系统(Amersham-Pharmacia Biotech, USA) 80 V 泳动 8 h, 取出凝胶后银染. PGK位点克隆性检测参照以前的方法^[29]进行. 所用引物序列如下: PGK1A, 5' -CTG TTC CTG CCC GCG CGG TGT TCC GCA TTC -3'; PGK1B, 5' -ACG CCT GTT ACG TAA GCT CTG CAG GCC TCC -3'; PGK2A, 5' -AGC TGG ACG TTA AAG GGA AGC GGG TCG TTA -3'; PGK2B, 5' -TAC TCC TGA AGT TAA ATC AAC ATC CTC TTG -3'. DNA样品经 *Hpa* II 酶切后, 巢式PCR扩增. 第1轮反应和第2轮反应的引物对分别为 PGK1A/PGK1B和PGK2A/PGK2B, 淬火温度分别为 58℃和为 56℃, 35个循环, 其余反应参数同AR位点的扩增反应. 产物经 *Bst* XI 处理后, 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化

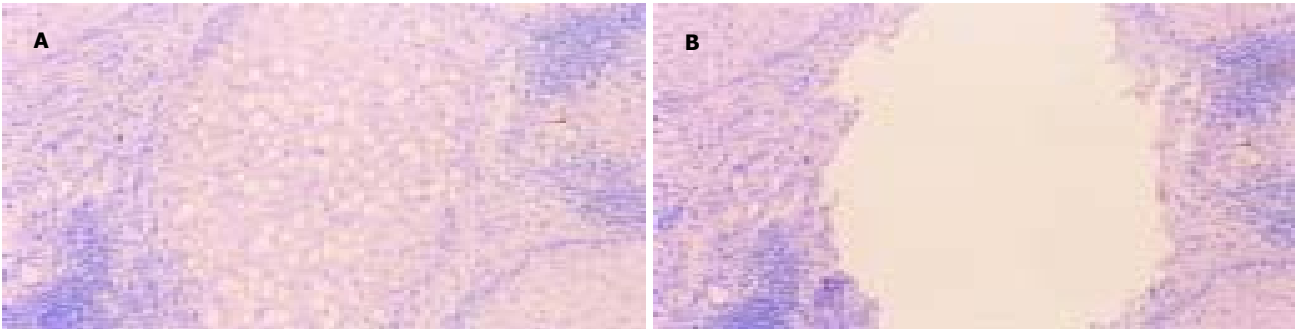


图1 肝硬化组织中一个NAH病变(8N02)经显微切割取出, HE 100. A:前; B:后.

乙锭染色显示结果. 电泳结果观察分别用 UVP 凝胶分析系统(UVP, Cambridge, UK) 和光学照相记录数据, 用相应软件(LabWorks™, UVP) 比较 *Hha* I 或 *Hpa* II 消化前后一对等位基因扩增产物的强度差异, 有明显改变(其中一条带可比强度减弱达 50%)时才被认为有意义(即 X 染色体失活嵌合性丢失).

统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件包进行统计计算. 应用两样本均数的秩和检验比较普通再生结节与 NAH 以及单克隆结节与多克隆结节的大小, $P < 0.05$ 被认为显著性差异.

2 结果

在带有 HCC 的肝组织标本 8 例中, 6 例有 AR 基因 STR 长度多态性, 其中 1 例 AR, PGK 位点均有多态性, 但 PGK 位点未扩增成功, 另外 1 例(例 7)标本因癌组织过少扩增失败, 但癌周肝硬化组织可供 PGK 位点分析. 对这 5 例 HCC 组织进行 AR 位点克隆性分析, *Hha* I 酶切前在 200 bp 与 300 bp DNA 泳动位置间显示 2 条带, 酶切后 1 条带完全消失或明显减弱; 应用癌旁纤维组织作参照, 比较酶切前后 2 条带的强度, 均未显示明显改变(图 2, 3; 表 1). 这些数据证明, HCC 是单克隆

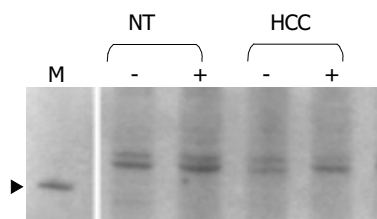


图 2 3 号标本中 HCC 组织 AR 位点检测结果. 参照标本(NT) *Hha* I 酶切前(-)后(+)两条带无明显差别, 而癌组织标本(HCC)酶切后扩增产物上带强度, 减少了 67%. M: 100-bp DNA 分子质量标志, 箭头所指为 200 bp DNA 的泳动位置.

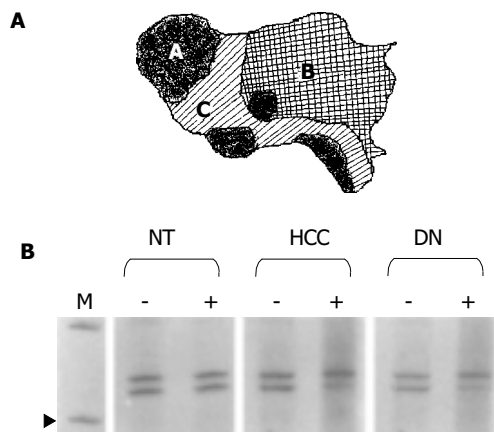


图 3 例 1 肝组织切除标本. A: 示意 HE 切片中 HCC (A) 和伴有 SCC 的 NAH (B) 的位置关系. C 表示纤维组织, 作为检测参照物. B: 纤维组织标本酶切前(-)后(+)两条带强度无明显差别; HCC 和伴有 SCC 的 NAH 标本(DN)酶切后都是下带明显减弱, 可比强度分别减少了 63.0% 和 56.4%. M: DNA 分子质量标志, 箭头所指为 200 bp DNA 的泳动位置.

细胞构成的. 6 号标本是 1 例肝细胞腺瘤, 显微镜下解剖 3 个不同部位瘤组织及相同面积的瘤周肝实质, AR 位点分析发现瘤组织均为上带明显减弱或消失(图 4), 表明肝细胞腺瘤也是单克隆性病变. 这证实了其他作者的研究结果^[13-19]. 自 4 例结节性肝硬化组织中进行显微切割, 每例标本成功检测 1-18 个结节, 共 35 个结节, 其中 6 个为普通再生结节, 29 个为 NAH, 后者包括 25 个混合细胞性病变(图 5A-D) 和 4 个透明细胞性病变. 从分析的病变截面积上比较, NAH (7.7 ± 5.0) mm^2 大于普通再生结节 (4.8 ± 3.9) mm^2 , 但尚未达到统计学上显著差别 ($P = 0.187$). 共检出 SCC 病变 5 个(3 个为高度, 2 个为低度病变), 全部位于混合细胞性 NAH 中(图 5C-D); 6 个普通再生结节中, 3 个有散在 LCC 肝细胞或小灶性 LCC 病变, 3 个有大量 HBsAg 阳性的毛玻璃样肝细胞, 其中 1 个主要由毛玻璃样肝细胞构成, 免疫组织化学检测显示出 HBsAg (图 5E) 和 HBcAg 阳性广泛表达(图 5F), 2 个结节中有小的透明细胞性 FAH (病灶肝细胞数 < 结节内肝细胞总数的 15%); 所有 NAH 中均未查见 LCC 病变, 仅在 5 个结节 (17.2%) 中查见散在的 HBsAg 阳性毛玻璃样肝细胞. AR 和 PGK 位点的检测表明, 12 个 (12/29, 41%) NAH 显示出 X 染色体失活嵌合性丢失, 提示为单克隆性, 而 6 个普通再生结节全为多克隆性(表 1; 图 3, 6). 在 29 个 NAH 中, 伴有 SCC 的病变 (5/5) 全部为单克隆性, 7 个 (7/20, 35%) 不伴 SCC 的混合性细胞性病变显示为单克隆性, 4 个透明肝细胞病变全部显示为多克隆性(图 7). 单克隆性和多克隆性 NAH 病变的截面积分别是 (8.2 ± 5.5) mm^2 和 (7.3 ± 4.8) mm^2 , 二者没有显著差别 ($P = 0.744$).

为了探讨 HCC 与其前期病变之间的关系, 我们分别检查了病例 1 中 HCC (1T01) 及其相邻 NAH (1N01) 的 X 染色体失活类型(图 3A). 该结节伴有高度 SCC, AR 位点检测结果表明此 NAH 已经是肿瘤性病变, 并且与 HCC 病变 *Hha* I 酶切带型相同, 均保留上带(图 3B), 提示他们具有相同的克隆起源. 为了探讨不同 NAH 之间的关系, 我们分析了病例 2 中 5 个单克隆结节

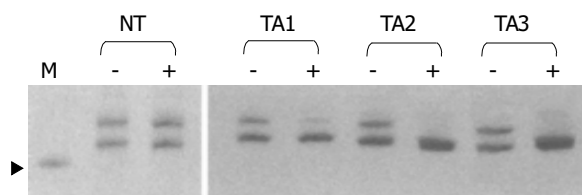


图 4 例 6 的 AR 位点克隆性检测结果. 瘤旁正常肝组织(NT) *Hha* I 酶切前(-)后(+)两条带无明显差别, 肝细胞腺瘤组织酶切后上带明显减弱(TA1, TA3)或消失(TA2). M: DNA 分子质量标志, 箭头所指为 200 bp DNA 的泳动位置.

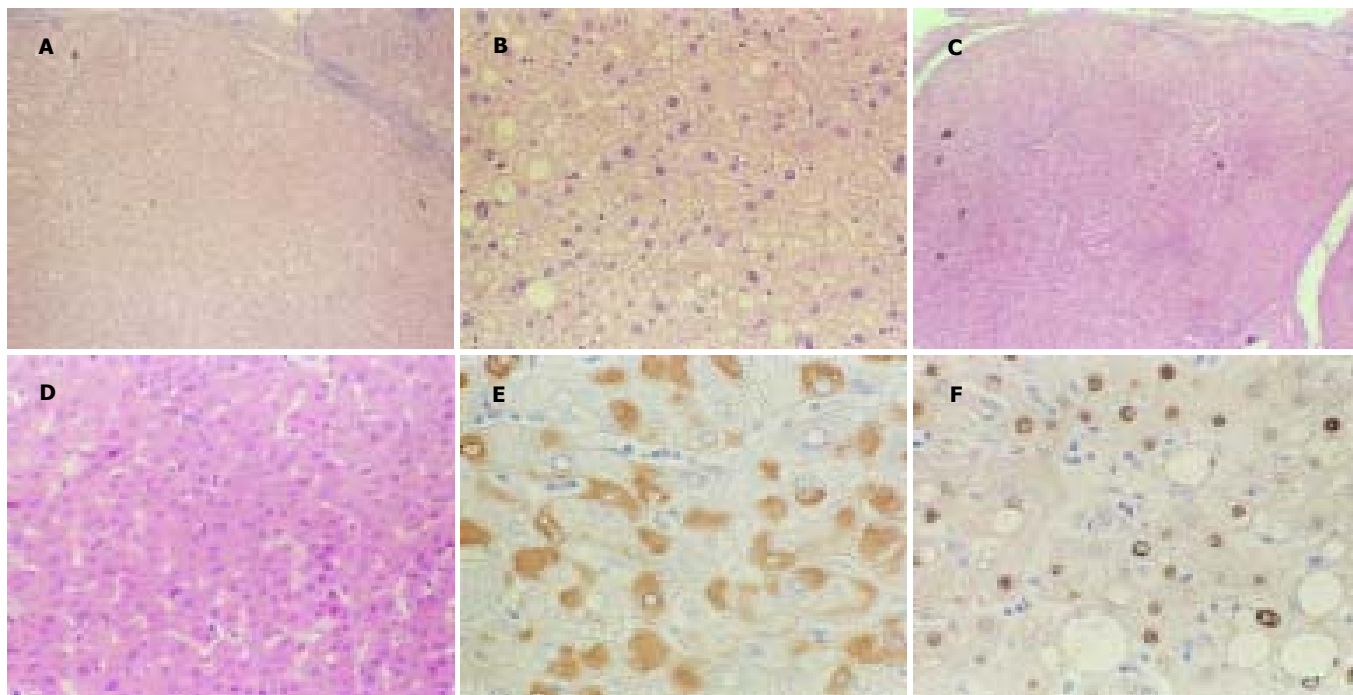


图5 A, B: 混合细胞性结节(2N08), HE 染色; C, D: 混合细胞性结节伴高度 SCC (7N01), HE 染色; E, F: 普通肝细胞结节(8N05), HBsAg (E)和 HBcAg (F)免疫染色反应阳性. A, C $\times 40$; B, D $\times 200$; E, F $\times 400$.

(2N01, 2N04, 2N07, 2N08 和 2N09) 的 X 染色体失活类型. 这 5 个单克隆性病变远离 HCC (距离 >1 cm), 他们都来自同一张切片, 而且位置相邻 (图 6A). PGK 位点检测显示出相同的 X 染色体失活带型, *Hpa* II 酶切后剩下 433 bp 条带 (图 6B), 表明他们具有相同的克隆起源. 此外, 病例 7 中伴有高度 SCC 的 2 个 NAH (7N01 和 7N02) 及病例 9 中伴有低度 SCC 的 2 个 NAH 病变 (9N01 和 9N02) 分别来自同一张切片上的相邻位置, PGK 位点检测显示, 这些相邻的结节也具有相同的 X

染色体失活类型 (表 1), 提示他们分别来源于同一个变异肝细胞克隆.

3 讨论

HCC 前期病变一直是人类肝癌研究的热点之一, 虽然已经提出了几种 HCC 相关病变, 但他们确切性质还远未被搞清. 肝实质的 LCC 在 1973 年由 Anthony *et al*^[3] 描述, 当时称之为肝细胞异性增生 (liver cell dysplasia), 曾长期被认为是癌前病变^[3, 30-36], 但近年研究表明, 他与 HCC 发生关系并不密切, 而是对某些致病因子的反应^[4-5, 9-10, 23, 37-41], 可能是有丝分裂障碍的一种表现^[2, 10, 42]. 此研究仅在部分普通再生结节中观察到 LCC, 在 FAH 和 NAH 中并未发现这种改变, 支持上述结论. 肝实质的小细胞性改变 (SCC) 又称小细胞性异型增生 (small-cell dysplasia), 是

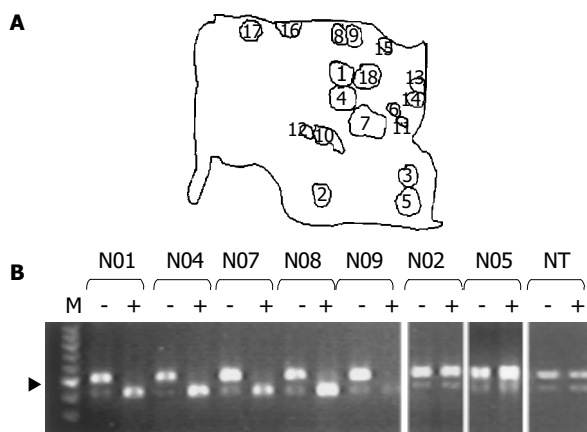


图6 例2肝组织内不同结节 PGK 位点克隆性检测的代表性数据. A: HE 切片示意图, 显示分析过的 18 个不同结节之间的位置关系. 5 个相邻结节均为 NAH 病变 (N01, N04, N07, N08 和 N09), 2 个普通再生结节 (N02 和 N05) 位于切片的下方; B: 克隆性检测结果. 参照组织 (NT) *Hpa* II 酶切前 (-) 后 (+) 两条带强度无明显差别, 5 个相邻的 NAH (N01, N04, N07, N08 和 N09) 酶切后仅剩 433 bp 条带, 而 2 个普通再生结节 (N02 和 N05) 酶切后仍是两条带, 与酶切前相比, 强度无明显改变. M: 100-bp DNA 分子质量标志, 箭头所指为 500 bp DNA 的泳动位置.

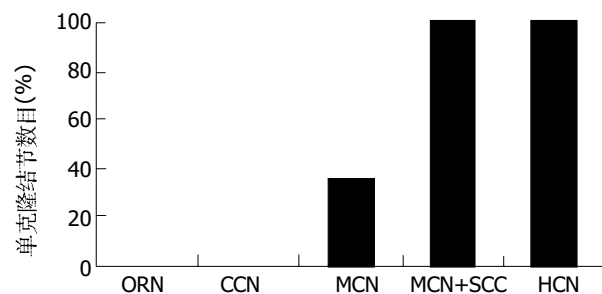


图7 HBV 相关的肝硬化组织中不同结节性病变的克隆性组成. ORN, 普通再生结节; CCN, 透明细胞性 NAH; MCN, 不伴 SCC 的混合细胞性 NAH; MCN+SCC, 伴有 SCC 的 NAH 病变; HCN, 肝细胞肿瘤, 包括 HCC 和肝细胞腺瘤.

Watanabe *et al*^[4] 1983年在HBV相关的肝硬化实质中观察到的一种病变。SCC常见于一部分其他类型的癌前病变内,后者包括FAH, NAH^[10-11]和巨大再生结节病变^[13, 18, 40, 43-49],这种SCC病变是一种真性不典型增生^[10-11]。最近研究显示,伴有SCC的巨大再生结节已经是肿瘤性病变^[45, 48-49],而普通型病变都是为多克隆性^[48],反映了其再生结节本质。此研究显示,发生于NAH内的SCC病变全为克隆性增生,表明他们也已经都是肿瘤性病变。这些数据为我们以前的设想提供了强有力的证据,那就是,发生于肿瘤前期病变内的SCC,尤其是其高度病变,是一种恶性前期的形态学表型^[2, 11]。

FAH是指由细胞学和细胞化学表型明显变异的成熟肝细胞组成的局部病灶,最初发现于接受亚硝胺类致癌剂的大鼠肝实质内^[50-51],后来在化学致癌物、放射线及致癌病毒诱发的肝癌模型早期也发现大量FAH^[52]。Bannasch *et al*^[53]近20 a来应用多种动物模型进行了形态学和组织化学观察,表明肝实质中FAH的出现和进展标志着HCC的发生过程(早期FAH→晚期FAH→肝细胞腺瘤→HCC)。我们对人肝组织的观察表明,FAH也见于人肝硬化及其他慢性肝脏病变的活检组织中,这包括透明细胞性、混合细胞性、嗜碱细胞性病灶(basophilic cell foci)以及嗜双色细胞性和嗜酸细胞性病变(oncocytic lesion)。上述病变中前3种属于肿瘤前期病变,部分伴有SCC的病变增生活跃,可能通过形成NAH或者直接进展为HCC。透明细胞性和混合细胞性FAH的结节性转化的发生率分别为8.5%(26/306)和39.3%(178/453),SCC发生率分别为14.4%(44/306)和28.7%(130/453)^[10]。这些数据说明,与透明细胞性FAH相比,混合细胞性病灶是较晚期、较不稳定的病变。FAH和NAH的性质尚未被阐明。利用嵌合大鼠进行的HCC发生研究提示FAH为克隆性病变^[54]。由于嵌合大鼠技术本身有一定缺陷,这一点尚待更多的证据。此研究应用显微切割和克隆性分析技术对35个肝细胞增生结节进行了分析。结果表明,伴有SCC的所有NAH病变(5/5)和35%(7/20)的不伴SCC的混合性细胞性病变显示出X染色体失活嵌合性丢失,表明为单克隆性;4个透明肝细胞病变和6个普通再生结节全为多克隆性;作为参照标本的5例HCC和1例肝细胞腺瘤全部显示为单克隆性。这些数据表明,所有伴SCC的NAH以及部分不伴SCC的NAH已经成为肿瘤性病变,属于微小肝细胞腺瘤(hepatocytic microadenoma)。这提示,NAH病变的发生和进展伴随着少数病变细胞的寡克隆性乃至单克隆性增生,这一改变早于SCC的发生;后者的出现,尤其是高度病变的出现,预示腺瘤不稳定性增加。此外,我们还分析了1个癌旁NAH病变(伴有高度SCC)的X染

色体灭活带型,发现他与HCC病变Hha I酶切带型相同,均保留上带(图3),表明他们可能具有相同的克隆起源。这一结果提示,伴有SCC的NAH是部分HCC病变的直接前体。

在不伴有肝硬化的动物模型肝脏中,当FAH较大并对周围的肝实质有明显压迫时,即诊断为肝细胞腺瘤^[55]。然而,目前还没有能够在人肝硬化组织中区别微小肝细胞腺瘤和普通再生结节的可靠指标。可能是基于这种技术上的原因,目前肝脏外科病理学的主流观点对于HBV感染引起的肝硬变组织中是否存在肝细胞腺瘤这一问题基本持否定态度^[22]。Aoki *et al*^[56]和Yasui *et al*^[57]通过分析HBV整合位点分析显示,在HBV相关的肝硬化组织中,约31%的所谓“肝硬化结节”(cirrhotic liver nodule)是单克隆性病变。Aihara *et al*^[44]和Ochiai *et al*^[58]应用PGK, AR位点克隆性检测技术对HCV相关肝硬化进行的观察得出了相似的结果,所谓“再生结节”中克隆性增生发生率分别为43%和59%。他们还指出,在形态学上不能区分单克隆与多克隆结节。此研究中,我们借助以前的组织学标准^[10, 59],能够很方便地在HBV相关的肝硬化组织中检出不同类型的FAH和NAH病变,并显示伴有和不伴SCC的混合细胞性NAH以及普通再生结节生物学性质不同,克隆性增生发生率分别为100%, 35%和0(图7)。这些数据显示,HBV和HCV相关的肝硬化组织中存在许多NAH病变,部分已经进展为微小肝细胞腺瘤。以前作者检测到的具有克隆性细胞组成的所谓“肝硬化结节”^[56-57]以及“再生结节”^[44, 58]可能相当于混合细胞性NAH。我们认为,NAH,尤其是伴有SCC的病变,可以作为一种癌前病变而用于HCC发生的监测以及肝癌的二期预防。通过分析X染色体失活带型观察了肝硬化组织中不同的肿瘤性肝细胞结节之间的关系。我们还发现,位于在同一张切片上相邻位置的不同肿瘤性结节可以具有相似的X染色体失活类型,提示他们具有相同的克隆起源。这与我们最近在同源性多结节性子宫平滑肌瘤观察到的情况^[60-61]相似。至于这种腺瘤性结节呈簇状存在是由于一个肿瘤沿联结不同再生结节之间的肝实质^[62]局部侵袭所致,抑或是由于一个病变被纤维组织分隔成两个或多个结节造成,有待于今后的观察。

致谢:付勇大夫协助收集标本,深表谢意!

4 参考文献

- 1 Parkin DM. The global burden of cancer. *Semin Cancer Biol* 1998;8:219-235
- 2 苏勤. 人肝细胞癌的癌前期病变. *诊断病理学杂志* 2003;10:112-115
- 3 Anthony PP, Vogel CL, Barker LF. Liver cell dysplasia: a pre-malignant condition. *J Clin Pathol* 1973;26:217-223
- 4 Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y,

- Takemoto T, Takahashi T. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer* 1983;51:2197-2205
- 5 Nakashima T, Okuda K, Kojiro M, Jimi A, Yamaguchi R, Sakamoto K, Ikari T. Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan, 232 consecutive cases autopsied in ten years. *Cancer* 1983;51:863-877
- 6 Deugnier Y, Turlin B. Other causes of hepatocellular carcinomas. In:Okuda K, Tabor E (eds). *Liver Cancer. New York:Churchill Livingstone* 1997:97-110
- 7 Thung SN, Gerber MA. Cirrhosis and Hepatocellular carcinoma. In:Okuda K, Tabor E (eds). *Liver Cancer. New York:Churchill Livingstone* 1997:155-163
- 8 Theise ND. Cirrhosis and hepatocellular neoplasia:more like cousins than like parent and child. *Gastroenterology* 1996;111:526-528
- 9 苏勤. 病毒性肝炎致癌机制. 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 北京: 人民军医出版社, 2001:221-262
- 10 Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia:phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch* 1997;431:391-406
- 11 Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2003;31:126-133
- 12 苏勤, 刘茜, 王淑芳. 基于 X 染色体基因多态性的克隆性分析技术及其应用. *中华病理学杂志* 2002;31:162-164
- 13 Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Terada M, Hasegawa H. Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1988;95:1664-1666
- 14 Hsu HC, Chiou TJ, Chen JY, Lee CS, Lee PH, Peng SY. Clonality and clonal evolution of hepatocellular carcinoma with multiple nodules. *Hepatology* 1991;13:923-928
- 15 Kawai S, Imazeki F, Yokosuka O, Ohto M, Shiina S, Kato N, Omata M. Clonality in hepatocellular carcinoma:analysis of methylation pattern of polymorphic X-chromosome-linked phosphoglycerate kinase gene in females. *Hepatology* 1995;22:112-117
- 16 Ochiai T, Ueda K, Urata Y, Yamano T, Konishi E, Ogino A, Kawai K, Itoi H, Sonoyama T, Yamagishi H, Oka T, Ashihara T. Clonal analysis of hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1996;23(Suppl 2):182-188
- 17 Sheu JC, Huang GT, Chou HC, Lee PH, Wang JT, Lee HS, Chen DS. Multiple hepatocellular carcinomas at the early stage have different clonality. *Gastroenterology* 1993;105:1471-1476
- 18 Okuda T, Wakasa K, Kubo S, Hamada T, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Hirohashi K, Kinoshita H. Clonal analysis of hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule by methylation pattern of X-chromosome-linked human androgen receptor gene. *Cancer Lett* 2001;164:91-96
- 19 Paradis V, Benzekri A, Dargere D, Bieche I, Laurendeau I, Vilgrain V, Belghiti J, Vidaud M, Degott C, Bedossa P. Telangiectatic focal nodular hyperplasia:a variant of hepatocellular adenoma. *Gastroenterology* 2004;126:1323-1329
- 20 Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver:a study of 100 cases among 48900 necropsies. *Cancer* 1954;7:462-503
- 21 Crawford JM. Liver cirrhosis. In:MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP(eds). *Pathology of the liver. London: Churchill Livingstone* 2002:575-619
- 22 Anthony PP. Tumors and tumor-like lesions of the liver and biliary tract:etiology, epidemiology and pathology. In:MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP(eds). *Pathology of the liver. London:Churchill Livingstone* 2002:711-775
- 23 苏勤, 张遂祥, 杨淑杰, 刘杰, 刘彦仿. 乙型肝炎、肝硬化中癌前病变的形态学及免疫组织化学观察. *第四军医大学学报* 1995;16:85-88
- 24 朱少君, 苏勤, 王淑芳, 刁小莉, 巩丽, 刘节. 女性外阴尖锐湿疣的克隆性. *诊断病理学杂志* 2003;10:81-84
- 25 Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental pattern in mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972;47:1-35
- 26 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of *Hpa* II and *Hha* I sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;51:1229-1239
- 27 Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders:analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6848-6852
- 28 刁小莉, 苏勤, 王淑芳, 冯英明, 刘节. 非放标 AR 基因多态性分析探讨子宫平滑肌瘤的克隆性. *第四军医大学学报* 2002;23:1969-1973
- 29 Wang SF, Liu Q, Zhang W, Liu J, Su Q. Clonality of uterine leiomyomas, an assay using X chromosome polymorphism at the phosphoglycerate kinase locus. *J Fourth Mil Med Univ* 2001;22:1576-1582
- 30 Anthony PP. Precursor lesions for liver cancer in humans. *Cancer Res* 1976;36(7 Pt 2):2579-2583
- 31 Paterson AC, Kew MC, Duskeiko GM, Isaacson C. Liver cell dysplasia accompanying hepatocellular carcinoma in Southern Africa. Differences between urban and rural populations. *J Hepatol* 1989;8:241-248
- 32 李志尚, 王学春, 罗殿中. 异型增生肝细胞及肝癌细胞核 DNA 含量分析. *中华病理学杂志* 1990;19:215-217
- 33 Borzio M, Bruno S, Roncalli M, Mels GC, Ramella G, Borzio F, Leandro G, Servida E, Podda M. Liver cell dysplasia is a major risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis:a prospective study. *Gastroenterology* 1995;108:812-817
- 34 Ganne-Carrie N, Chastang C, Chapel F, Munz C, Pateron D, Sibony M, Deny P, Trinchet JC, Callard P, Guettier C, Beaugrand M. Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis. *Hepatology* 1996;23:1112-1118
- 35 Le Bail B, Bernard PH, Carles J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Prevalence of liver cell dysplasia and association with HCC in a series of 100 cirrhotic liver explants. *J Hepatol* 1997;27:835-842
- 36 Libbrecht L, Craninx M, Nevens F, Desmet V, Roskams T. Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with non-cirrhotic and cirrhotic chronic viral hepatitis. *Histopathol* 2001;39:66-73
- 37 Henmi A, Uchida T, Shikata T. Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. Evidence against precancerous nature of liver cell dysplasia. *Cancer* 1985;55:2594-2599
- 38 Cohen C, Berson SD. Liver cell dysplasia in normal, cirrhotic, and hepatocellular carcinoma patients. *Cancer* 1986;57:1535-1538
- 39 Karhunen PJ, Penttil A. Preneoplastic lesions of human liver. *Hepatogastroenterology* 1987;34:10-15
- 40 Hytiroglou P, Theise ND, Schwartz M, Mor E, Miller C, Thung SN. Macroregenerative nodules in a series of adult cirrhotic liver explants: issues of classification and nomenclature. *Hepatology* 1995;21:703-708
- 41 Natarajan S, Theise ND, Thung SW, Antonio L, Paronetto F, Hytiroglou P. Large-cell change of hepatocytes in cirrhosis may represent a reaction to prolonged cholestasis. *Am J Surg Pathol* 1997;21:312-318
- 42 Altmann HW. Pathology of human liver tumors. In:Remmer H, Bolt HM, Bannasch P, Popper H. *Primary Liver Tumors. Lancaster: MTP Press* 1978:53-71
- 43 Ferrel LD, Crawford JM, Dhillon AP, Scheuer PJ, Nakanuma Y. Proposal for standardized criteria for the diagnosis of benign, borderline, and malignant hepatocellular lesions arising in chronic advanced liver disease. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1113-1123
- 44 Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Imaoka S. Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:1805-1811

- 45 International Working Party. Terminology of nodular hepato-cellular lesions. *Hepatology* 1995;22:983-993
- 46 Le Bail B, Belleannée G, Bernard PH, Saric J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Adenomatous hyperplasia in cirrhotic livers: histological evaluation, cellular density, and proliferative activity of 35 macronodular lesions in the cirrhotic explants of 10 adult French patients. *Hum Pathol* 1995;26:897-906
- 47 Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Monden M, Imaoka S. Clonal analysis of precancerous lesion of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1996;111:455-461
- 48 Piao Z, Park Y N, Kim H, Park C. Clonality of large regenerative nodules in liver cirrhosis. *Liver* 1997;17:251-256
- 49 Paradis V, Laurendeau I, Vidaud M, Bedossa P. Clonal analysis of macronodules in cirrhosis. *Hepatology* 1998;28:953-958
- 50 Bannasch P, Müller HA. Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus. *Arzneimittel Forsch* 1964;14:805-814
- 51 Gössner W, Friedrich-Freksa K. Histochemische Untersuchungen über die glucose-6-phosphatase in der ratteleber während der kanzerisierung durch nitrosamine. *Z Naturforsch* 1964;19b:862-863
- 52 Bannasch P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. II. Preneoplasia in various non-hepatic tissues. *Carcinogenesis* 1986;7:849-852
- 53 Bannasch P, Schröder CH. Tumors and tumor-like lesions of the liver and biliary tract: pathogenesis of primary liver tumors. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP(eds). *Pathology of the liver*. London: Churchill Livingstone 2002:777-825
- 54 Weinberg WC, Ng YK, Iannaccone PM. Clonal analysis of hepatic neoplasms by mosaic pattern. In: Sirica AE(eds). *The role of cell types in hepatocarcinogenesis*. Boca Raton Ann Arbor London Tokyo: CRC Press 1992:29-53
- 55 Goodman DG, Maronpot RR, Newberne PM, Popp JA, Squire RA. Proliferative and selected other lesions of the liver in rats. In: *Guides for toxicologic pathology*. Washington, DC:STP/ARP/AFIP 1994:1-24
- 56 Aoki N, Robinson WS. State of hepatitis B viral genomes in cirrhotic and hepatocellular carcinoma nodules. *Mol Biol Med* 1989;6:395-408
- 57 Yasui H, Hino O, Ohtake K, Machinami R, Kitagawa T. Clonal growth of hepatitis B virus-integrated hepatocytes in cirrhotic liver nodules. *Cancer Res* 1992;52:6810-6814
- 58 Ochiai T, Urata Y, Yamano T, Yamagishi H, Ashihara T. Clonal expansion in evolution of chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma as seen at an X-chromosome locus. *Hepatology* 2000;31:615-621
- 59 Su Q, Zerban H, Otto G, Bannasch P. Cytokeratin expression is reduced in glycogenotic clear hepatocytes but increased in ground glass cells in chronic human and woodchuck hepadnaviral infection. *Hepatology* 1998;28:347-359
- 60 王淑芳, 苏勤, 朱少君, 刘节, 胡灵芝, 李东红. 多发性子宫平滑肌瘤的克隆性. *中华病理学杂志* 2002;31:107-111
- 61 刁小莉, 苏勤, 王淑芳, 张伟, 巩丽, 刘节, 冯英明. 子宫平滑肌瘤不同结节X染色体失活类型的研究. *中华病理学杂志* 2003;32:308-313
- 62 Takayashi T. Three-dimensional morphology of the liver in cirrhosis and related disorders. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978;377:97-110

编辑 潘伯荣 审读 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 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次).
编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇. 出版: 科学出版社.
定价: 28 元 + 2 元(邮费). 邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号. 联系人: 刘俐, 程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921. 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)