

文章编号:1005-6947(2007)03-0253-05

· 基础研究 ·

诱生型一氧化氮合酶在阻塞性黄疸肝损害中的调控作用

王剑明, 肖宝来, 李强, 徐立宁, 邹声泉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 通过体内、外实验,探讨诱生型一氧化氮合酶(iNOS)在阻塞性黄疸肝损害中的调控作用。方法 (1)体外实验:采用胶原酶原位肝灌注法分离大鼠肝细胞,行原代培养后,用iNOS抑制剂SMT作用于肝细胞,50 μmol/L甘氨酸鹅脱氧胆酸钠(GCDC)作用后用流式细胞术(FCM)及原位末端标记法(TUNEL)检测肝细胞凋亡情况。(2)体内实验:结扎大鼠胆总管,结扎后3,7,14,21d,分别用TUNEL法及免疫组化SABC法检测大鼠肝组织细胞凋亡状态及iNOS蛋白的表达。结果 (1)随SMT浓度的增加,肝细胞的凋亡明显减少。(2)大鼠胆总管结扎后随结扎时间的延长细胞凋亡指数(AI)升高,结扎14d后AI达高峰。iNOS蛋白表达越强,则AI越高。结论 iNOS参与阻塞性黄疸肝细胞凋亡的调节,并在阻塞性黄疸肝损害的发生和发展中起重要作用。

[中国普通外科杂志,2007,16(3):253-257]

关键词: 黄疸,阻塞性/病理学;一氧化氮合酶;肝/病理学;细胞凋亡

中图分类号:R657.3

文献标识码:A

The regulating mechanism of inducible nitric oxide synthase in the hepatic injury of obstructive jaundice

WANG Jian-ming, XIAO Bao-lai, LI Qiang, XU Li-ning, ZOU Sheng-quan

(Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To explore the regulating mechanism of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in hepatic injury of obstructive jaundice (OJ) in vivo and in vitro experiments. **Methods** (1) Rat hepatocytes were isolated by in situ collagenase perfusion and primary culture. Hepatocytes were pretreated with various concentrations of iNOS inhibitor SMT for 20 min. After pretreatment, 50 μM GCDC was added for an additional 24hr. Cells were next detected by FCM and TUNEL. (2) Experimental obstructive jaundice (BDL) was induced by double ligation of the bile duct in rats. After BDL for 3d, 7d, 14d, and 21d, the apoptotic status in liver of all rats were determined with TUNEL, and iNOS protein in liver of OJ was determined with immunohistochemistry method. **Results** (1) SMT decreased GCDC-induced apoptosis in a concentration-dependent manner. (2) The apoptotic rate of liver was related to length of time of OJ. Apoptosis index (AI) was highest from rats with 14d bile duct ligation. The stronger the iNOS expression, the higher was the number of apoptotic cells that was found in OJ. **Conclusions** iNOS is involved in the regulation and the occurrence and progression of hepatic injury of obstructive jaundice.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(3): 253-257]

Key words: Jaundice, Obstructive / pathol; Nitric-Oxide Synthase; Liver / pathol; Apoptosis

CLC number: R657.3

Document code: A

基金项目:湖北省科技厅攻关计划资助项目(2002AA301C30)。

收稿日期:2006-01-25; **修订日期:**2006-08-19。

作者简介:王剑明,男,湖北黄石人,华中科技大学同济医学院附属同济医院副教授,主要从事胆道胰腺疾病方面的研究。

通讯作者:王剑明 E-mail:wjm18jgm@yahoo.com.cn。

笔者业已研究蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 在阻塞性黄疸 (阻黄) 机体损害中的调控作用^[1]。但阻黄对机体损害, 尤其是肝损害的调控机制目前仍未阐明。而一氧化氮 (nitric oxide, NO) 作为一种生物信使分子和细胞毒性效应分子, 近年来受到极大关注。机体通过控制一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的活性来调节 NO 的产生。巨噬细胞在受到免疫或炎症刺激下可合成诱生型一氧化氮合酶 (iNOS), 引起大量长时间的 NO 释放导致机体的氧化损伤^[2-3]。笔者采用体内、体外实验探讨 iNOS 对阻塞性黄疸肝细胞凋亡的调节作用, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠, 实验组及对照组各 6 只。

1.1.2 主要试剂 IV 型胶原酶, DNase I, 胰蛋白酶, 甘氨酸鹅脱氧胆酸钠 (GCDC), iNOS 抑制剂 SMT, 碘化丙锭 (PI) 染色剂均为美国 Sigma 公司产品; 细胞凋亡原位检测试剂盒 (TUNEL) 为德国宝灵曼公司提供; 兔抗鼠 iNOS 单克隆抗体及生物素标记羊抗鼠 IgG 由北京中山公司提供。

1.1.3 仪器 FACSsort 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 肝细胞的分离与培养 采用胶原酶原位肝灌注法。以氯胺酮 0.2 mL/kg 腹腔注射麻醉动物。剖腹, 显露游离门静脉后距肝门 2 cm 处插入 18 号导管, 用 D-Hanks 液 (含 0.01% EDTA, pH7.4, 37℃) 以 25 mL/min 速度灌入, 然后于肝后下腔静脉插入 16 号导管放出积血积液; 门静脉改用 0.05% IV 型胶原酶及 0.01% 消化酶 I (DNase I) Hank's 液持续灌注 5 min, 取下肝脏, 置入含 4℃ Hank's 液的平皿中; 剪去肝被膜, 加 0.25% 胰蛋白酶继续消化 20 min, 用 100 目尼龙网过滤, 加 RPMI1640 50 mL 制成混合肝细胞悬液, 置入 37℃ 恒温水浴中孵化 10 min, 过滤, 离心, 去上清, 4℃ Hank's 液重悬。用 4% 台盼蓝染色判断肝细胞存活率, 用细胞计数板记数细胞浓度。细胞培养于合成培养基 (含 RPMI1640 80 mL, 新生小牛血清 20 mL, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL, 胰岛素 0.1 U/mL 及肝素 15 mmol)。培养条件为 37℃, 5% CO₂。

1.2.2 阻塞性黄疸大鼠模型的建立 以氯胺酮 0.2 mL/kg 腹腔注射麻醉动物。剖腹, 游离出胆总管; 于肝门部结扎胆总管并切断, 远端再予结扎。进腹后不结扎切断胆总管作为阴性对照。对照组及结扎后 3, 7, 14, 21 d 分别处死大鼠 6 只。从处死大鼠门静脉抽血, 离心后取上层血清行胆红素测定。取动物肝组织标本 HE 染色, 光镜下观察, 证实阻塞性黄疸模型建立成功。诱生型一氧化氮合酶在阻塞性黄疸肝损害中的调控作用

1.2.3 GCDC 致肝细胞凋亡的实验 将肝细胞按 1×10^6 个/mL 分种于内含小飞片的 24 孔培养板中, 培养 36 h, 分别加入终浓度为 25, 50, 100, 150 及 200 μmol/L 的 GCDC 后, 培养 24 h 后取出小飞片, 行 TUNEL 检测; 用 0.25% 胰酶将培养孔内细胞消化, 取细胞悬液行流氏细胞术 (FCM) 检测。同时设正常肝细胞为对照组。

1.2.4 iNOS 抑制剂 SMT 的抑制实验 将肝细胞按 1×10^6 个/mL 分种于内含小飞片的 24 孔培养板中, 培养 36 h; 分别用 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 μmol/L 的 SMT 作用 20 min 后, 加入 50 μmol/L 的 GCDC 培养 24 h, 取出小飞片行 TUNEL 检测; 用 0.25% 胰酶将培养孔内细胞消化, 取细胞悬液行 FCM 检测。

1.2.5 用 TUNEL 法原位检测阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡 在 TdT 介导下, 使生物素化的 dUTP 标记至 DNA 断裂后形成的 3' - OH 末端; 借助生物素与亲合素的特异结合, 使过氧化物酶连接至 DNA 断点; 最后加入底物, 通过 DAB 染色, 显微镜下观察细胞核中棕黄着色的细胞即为凋亡细胞。光镜下每例切片计数 5 个视野, 以平均每 100 个细胞核中含凋亡细胞个数作为凋亡指数 (AI)。

1.2.6 免疫组织化学 (免疫组化) 实验 参照 SABC 法。石蜡切片, DAB 染色, 细胞浆出现棕黄色颗粒为染色阳性细胞。切片内无阳性细胞为表达阴性 (-); 阳性细胞率小于 1/3 为表达弱阳性 (+); 1/3 ~ 2/3 为表达阳性 (++) ; 大于 2/3 为表达强阳性 (+++)。

1.3 统计学处理

所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 所获数据采用本院统计学教研室提供的 SAS 统计软件包行多元方差分析。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 GCDC 致肝细胞凋亡 DNA 含量的流式细胞仪测定结果

GCDC 作用的肝细胞在 G1 峰左侧有一亚二倍体细胞群的峰型(亚 G1 峰),提示发生肝细胞凋亡。且随 GCDC 作用浓度的增加肝细胞凋亡率增加,呈明显剂量依赖性关系;依次为(3.7±0.8)%, (16.6±2.5)%, (23.3±1.7)%, (34.9±2.9)%, (38.2±1.6)%, (33.9±2.4)%, ($F=4.36, P<0.001$) (图 1)。

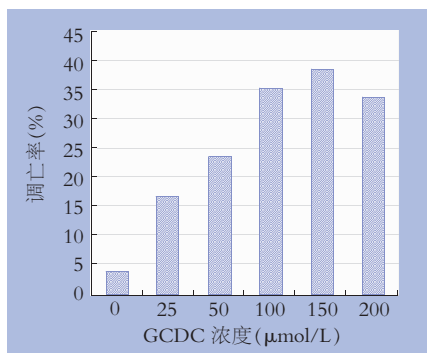


图 1 不同浓度的 GCDC 对大鼠肝细胞凋亡率的影响

2.3 原代培养大鼠肝细胞凋亡 TUNEL 原位检测结果

阳性细胞核着棕黄色(DAB 显色)。正常肝细胞可见少数阳性细胞;GCDC 作用后可见多量阳性细胞弥漫散在,胞浆固缩,与邻周细胞脱离、核染色质浓缩。SMT 作用后,凋亡细胞明显减少。

2.4 光镜下阻塞性黄疸大鼠肝脏组织的病理改变

胆总管结扎 3d 即见肝内胆管扩张,偶见肝细胞结构改变,可见少量细胞凋亡,表现为细胞浆浓

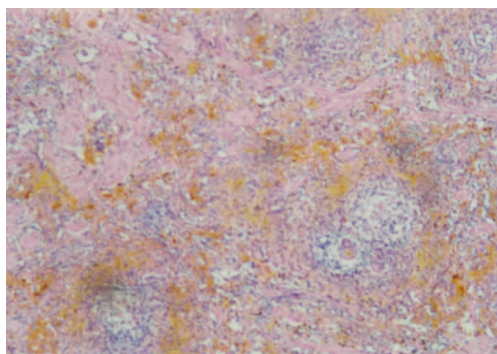


图 3 Wistar 大鼠胆总管结扎 14d,细胞凋亡达到高峰,大范围的汇管区周围肝细胞变性,纤维组织增生向肝小叶内扩展(HE×400)

2.2 iNOS 抑制剂 SMT 对 GCDC 致肝细胞凋亡的影响

经 FCM 检测,用不同浓度的 iNOS 抑制剂 SMT 阻断后的肝细胞,其凋亡率随 SMT 浓度的增大而逐渐减少。2.5 μmol/L SMT 作用后,肝细胞的凋亡率仅(12.7±0.3)%;各组依次为(23.3±1.7)%, (21.6±1.2)%, (19.2±1.5)%, (17.3±0.4)%, (15.3±1.4)% 和 (12.6±0.5)%, 各组间差异有显著性, ($F=4.23, P<0.001$) (图 2)。

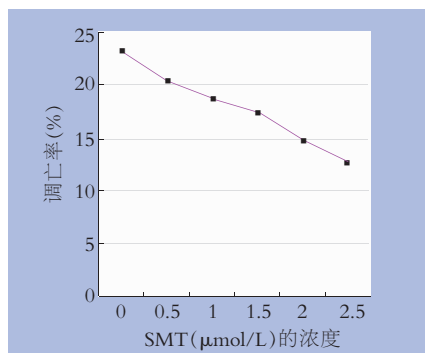


图 2 抑制 iNOS 活性对 GCDC 致肝细胞损害的影响

缩,核染色质向核仁或核周边聚集。结扎 7d,细胞凋亡增加,肝细胞部分变性,肝细胞内或细胞间淤胆,纤维组织增生,胆小管扩张及中度增生,胆栓形成。结扎 14d,细胞凋亡达高峰,大范围的汇管区周围肝细胞变性,纤维组织增生向肝小叶内扩展。结扎 21d,细胞凋亡有所减少,可见成片的肝细胞结构改变及胆湖形成,纤维组织带增宽,肝脏结构广泛改变,肝细胞数目明显减少(图 3-4)。

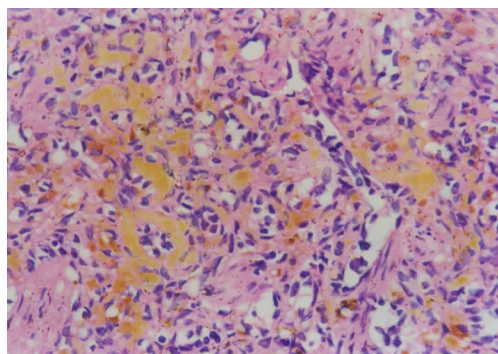


图 4 Wistar 大鼠胆总管结扎 21d,细胞凋亡有所减少,可见成片的肝细胞结构改变及胆湖形成,纤维组织增宽,肝脏结构广泛改变,肝细胞数目明显减少(HE×400)

2.5 阻塞性黄疸大鼠肝组织切片 TUNEL 检测结果

DAB 染色后,凋亡细胞核呈棕黄色,核呈固缩状,或染色质向周边聚集,或呈核碎片状。正常大鼠肝组织偶见细胞凋亡;胆管结扎 3d 即见凋亡细胞增加,结扎 7d 明显增加,14d 后镜下视野见广泛细胞凋亡,21d 细胞凋亡数目明显减少。各组间凋亡率差异有显著性($F = 4.57$, $P < 0.05$) (附表)。

2.6 阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞 iNOS 蛋白的表达及其与 AI 的关系

iNOS 蛋白在正常大鼠未见表达,胆总管结扎 3, 7d 均可见表达,14d 明显表达增多, 21d 表达减少;结扎 14d, iNOS 蛋白表达强阳性(+ + +), AI 达高峰;结扎 21d, iNOS 蛋白表达阳性(+ +), AI 下降。上述结果表明:iNOS 蛋白表达越强, AI 越高;iNOS 蛋白表达越弱, AI 越低($P = 0.0047$) (附表)。

附表 阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞 AI($\bar{x} \pm s$)及 iNOS 的表达

胆总管结扎后	AI	iNOS
对照	3.7 ± 1.6	(-)
3d	17.8 ± 3.5	(+)
7d	35.9 ± 3.8	(+)
14d	58.2 ± 1.6	(+ + +)
21d	33.8 ± 5.5	(+ +)

注:各组间比较, $P < 0.05$

3 讨论

在阻塞性黄疸(阻黄)中,过多的胆盐滞留在肝内造成对肝细胞的损伤^[4-6]。本研究所采用的 GCDC 是胆汁成分中的主要胆盐之一。尽管一直以来都在研究胆盐对肝细胞的细胞毒作用,但至今阻塞性黄疸时胆盐对肝细胞的损伤机制仍不清楚。研究^[7]表明,人类许多疾病和病理生理现象都与细胞凋亡的紊乱有关,其中凋亡异常增加被认为是肝胆疾病的重要发病机制。本研究通过肝细胞的分离获取肝细胞并进行体外短期培养,排除了其他因素后研究胆盐本身对肝细胞的作用,并采用 FCM 进行检测。结果表明,胆盐可诱发肝细胞凋亡,且随胆盐浓度的增加,肝细胞凋亡的比率明显增加。结合 TUNEL 进行细胞凋亡的原位检测,进一步证实了胆盐可诱发肝细胞凋亡。这可能是阻塞性黄疸肝损害的发生机制。

目前认为, NOS 主要有神经型(nNOS)、诱生型(iNOS)、内皮型(eNOS)。eNOS 主要分布在内皮细胞、平滑肌细胞和血小板中,在生理情况下起作用。而 iNOS 主要分布在肝细胞、巨噬细胞、库普弗细胞中;其在刺激因子作用下转录、表

达、合成 NO,发挥生物学作用,参与机体许多病理生理过程^[8-10]。笔者在体外实验中应用不同浓度的 iNOS 拮抗剂,发现它们可减少胆盐诱发肝细胞凋亡,且其效应呈明显剂量依赖性关系。笔者在体内动物模型的实验中,观察到在 iNOS 明显高表达时,阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡明显增多, AI 也就越高;结扎 14d, iNOS 蛋白表达强阳性(+ + +), AI 达高峰。这与体外实验结果相一致。因而认为, iNOS 对胆盐诱发肝细胞凋亡,具有重要的调控作用,并在阻黄肝损害的发生和发展中起重要作用。引起阻黄 iNOS 较高表达的原因可能是与内毒素和肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子的刺激和诱导有关^[11-12]。近来的研究^[13]表明,在内毒素增高引起机体的损害中,蛋白激酶 C(PKC)信息通道对 iNOS 具有重要的调控作用。笔者既往的研究^[1]也表明, PKC 信息通道的激活与黄疸程度有关,且可能参与阻黄 T 淋巴细胞的活化,在阻黄机体的免疫调节及病情评估中可能有重要意义。而 PKC 与 iNOS 之间在阻黄肝损害及机体损害中的调控关系尚待进一步阐明。

通过对 iNOS 基因的深入研究,有望为探讨阻黄肝细胞凋亡的发生机制以及在阻黄肝损害发生和发展中所起的作用提供理论依据,并为发现新的保肝药物及为阻黄的治疗开辟可能的新途径;即通过选择特异性的药物阻滞 iNOS 的作用,减少肝细胞凋亡的发生,以减少阻塞性黄疸肝功能紊乱及肝损害。

参考文献:

- [1] 邹声泉,王剑明. 蛋白激酶 C 信号通道与阻塞性黄疸患者免疫功能评估的关系[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(12): 897-900.
- [2] Nakanishi H, Kaibori M, Teshima S, et al. Pirfenidone inhibits the induction of iNOS stimulated by interleukin-1 beta at a step of NF-kappaB DNA binding in hepatocytes [J]. J Hepatol, 2004, 41(5): 730-736.
- [3] Wang WW, Smith DL, Zucker SD. Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats [J]. Hepatology, 2004, 40(2): 424-433.
- [4] Spirey J, Bronk S, Gores GJ. GCDC induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium [J]. J Clin Invest, 1993, 92(1): 17-24.
- [5] Patel T, Bronk SF, Gores GF. Apoptosis and hepatobiliary disease [J]. Hepatology, 1995, 21(8): 1725-1733.
- [6] 李铎,孙家邦,孙海晨,等. 梗阻性黄疸肝功能受损机制-胆盐诱发肝细胞凋亡[J]. 中华外科杂志, 1998, 36(10): 624-626.
- [7] Yang R, Uchiyama T, Watkins SK, et al. Ethyl pyruvate reduces liver injury in a murine model of extrahepatic cholestasis [J]. Shock, 2004, 22(4): 369-375.

- [8] Harbrecht BG, Perpetua M, Fulmer M, *et al.* Glucagon regulates hepatic inducible nitric oxide synthesis in vivo [J]. *Shock*, 2004, 22(2):157 - 162.
- [9] Kamanaka Y, Kawabata A, Matsuya H, *et al.* Effect of a potent iNOS inhibitor (ONO-1714) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat [J]. *Life Sci*, 2003, 74(6):793 - 802.
- [10] 邱江锋, 吴志勇, 张志奇, 等. iNOS 基因治疗肝硬化门静脉高压症的实验研究 [J]. *中华外科杂志*, 2004, 42(7):428 - 431.
- [11] Kurtovic J, Boyle M, Bihari D, *et al.* Nitric-oxide-lowering effect of terlipressin in decompensated cirrhosis: comparison to the molecular adsorbent recirculating system and correlation with clinical status [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 16(12):1335 - 1338.
- [12] Shin KM, Kim IT, Park YM, *et al.* Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(12):2327 - 2336.
- [13] Small CI, Lyles GA, Breen KC. Lipopolysaccharide stimulates the secretion of the amyloid precursor protein via a protein kinase C-mediated pathway [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 19(3):400 - 406.

文章编号:1005 - 6947(2007)03 - 0257 - 01

· 病案报告 ·

原发性甲状腺鳞状细胞癌 1 例

赵东辉, 黄祥成

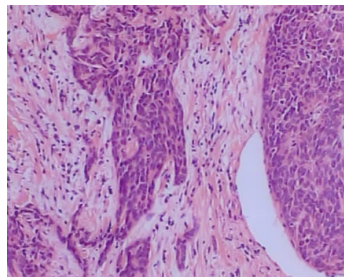
(南方医科大学南方医院 惠侨科, 广东 广州 510515)

关键词: 甲状腺肿瘤; 鳞状细胞癌, 原发性; 病例报告

中图分类号: R 736.1 **文献标识码:** Dli

患者 女, 77 岁。因发现右侧颈部包块 4 个月, 进行性增大, 伴声嘶、呛咳 1 个月入院。体查: 甲状腺Ⅲ度肿大, 于右侧甲状腺中下极可及一约 3.0 cm × 5.0 cm 包块, 其质硬、表面欠光滑、无压痛, 随吞咽上下活动的肿物, 右侧颈部可及多个 1.5 ~ 3 cm 肿大的淋巴结。B 超检查示甲状腺左叶混合性肿物, 以实性为主, 右侧甲状腺实性占位性病变, 颈部淋巴结大, 以右侧明显。甲状腺、全身 I 扫描示: (1) 甲状腺右叶“冷结节”, 左叶正常显影; (2) 颈部淋巴结及全身其它部位未见明显异常浓聚灶。CT 扫描示右侧甲状腺占位性病变, 考虑肿瘤性病变, 并右颈部多个淋巴结肿大。喉镜检查右侧声带麻痹。临床诊断: 右侧甲状腺癌并颈部淋巴结转移、喉返神经浸润。术中见右侧甲状腺中下部有一约 3.0 cm × 5.5 cm 肿物、质硬、与局部肌肉有浸润性粘连, 行右侧甲状腺全叶切除、左侧甲状腺次全切除、右侧颈部

淋巴结清扫。术后病理报告示: (1) 低分化鳞状细胞癌(右侧甲状腺)(附图), 免疫组化: CK(+), Syn(-), CgA(-), TG(-)。 (2) 淋巴结癌转移(右颈)(5/6)。术后给予服用甲乐, 前纵隔及颈部局部放射治疗。



附图 术后病理切片(HE × 200)

讨论 原发性甲状腺鳞状细胞癌在临床上罕见, 其发病率占全部甲状腺癌的 0.9% ~ 4%, 多发于 55 岁以上年龄, 其中以女性居多, 但有资料认为男女的发病率基本一致, 它具有高度恶性、广泛浸润的特。

临床患者多以压迫、浸润所至的声嘶、气促、气喘、吞咽不适等症状就诊。在诊断中应注意与继发性甲状腺鳞状细胞癌区别, 转移性甲状腺鳞状细胞癌常见来源于鳞状细胞肺癌, 喉、食道、气管的鳞状细胞癌均可能直接浸润甲状腺, 另外尚要注意与亚急

性甲状腺炎加以区别。如遇甲状腺不对称性肿大、坚硬、局部疼痛, 血沉增快且经激素治疗无效、症状加重需要考虑本病, 以防漏诊及延误最佳时机。

因甲状腺鳞状细胞癌具有较强的抗放射线和对药物的不敏感性, 目前尚缺乏规范化的治疗方案。手术切除是最有效的手段。由于甲状腺鳞癌其癌细胞浸润能力强, 常发生周围组织的较广泛浸润。笔者认为, 进行患侧叶、峡部、对侧叶次全或全叶切除是有必要的, 如果发现肿瘤有浸润或颈部淋巴结的转移, 需尽可能切除受侵犯的组织及行颈廓清术。术后的治疗目前仍存在争异, 尽管放射治疗对甲状腺鳞状细胞癌效果差, 而且目前缺乏大宗病例统计资料, 但不少学者认为术后辅助放疗是有必要的。

本病的病程较短, 进展快, 且肿瘤呈弥漫浸润性生长, 早期即有周围器官的侵犯, 单纯从肿瘤大小或是否肉眼全切难以决定其预后, 该病的死亡原因主要是局部病灶难以控制, 往往在未发现远处转移时患者已经死于局部病灶复发, 因而有否转移并非决定预后的独立因素, 而是在治疗上尽可能做到早发现、早切除、早放疗。

收稿日期: 2007 - 01 - 25。

作者简介: 赵东辉, 男, 四川成都市人, 南方医科大学医院副主任医师, 从事大肠癌综合治疗的研究。

通讯作者: 赵东辉