

文章编号:1005-6947(2005)02-0108-03

· 实验研究 ·

# 肝硬变门静脉高压症患者肝细胞凋亡与原癌基因表达的研究

阎玉矿<sup>1</sup>, 彭海峰<sup>1</sup>, 刘能银<sup>2</sup>, 李德宁<sup>1</sup>, 段君英<sup>1</sup>, 杨镇<sup>2</sup>

(1. 广东省深圳市龙岗中心医院 普外一科, 广东 深圳 518116; 2. 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 探讨肝细胞凋亡与肝硬变及原癌基因的关系。方法 取正常人及肝硬变门静脉高压症患者的肝组织。行透射电镜检查,并检测其凋亡细胞及原癌基因表达。结果 肝硬变患者肝组织内的凋亡细胞及凋亡指数高于正常人;肝组织原癌基因 c-myc, c-fos 和 bcl-2 均呈过度表达,而正常人肝组织则无表达。结论 肝细胞凋亡在肝硬变的演变过程中发挥一定作用,原癌基因 c-myc, c-fos 和 bcl-2 参与肝细胞凋亡的调控。

**关键词:**肝硬变/并发症;高血压,门静脉/病因学;细胞凋亡;基因表达

**中图分类号:**R575.21; R730.231.3

**文献标识码:**A

## A study of hepatocyte apoptosis and its gene expression in patients with liver cirrhosis and portal hypertension

YAN Yu-kuang<sup>1</sup>, PENG Hai-feng<sup>1</sup>, LIU Neng-ying<sup>2</sup>, LI De-ning<sup>1</sup>, DUAN Jun-ying<sup>1</sup>, YANG Zhen<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China;  
2. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract: Objective** To study the relationship of hepatocyte apoptosis and gene expression of liver cirrhosis and primary hepatic carcinoma. **Methods** Specimens of liver tissue from patients with liver cirrhosis and portal hypertension and normal subjects were examined by transmission electron microscope to detect apoptotic cells and primary cancer gene expression. **Results** The number of apoptotic cells and the apoptotic index of cirrhotic liver tissue was higher than that of normal subjects. Immunostaining of bcl-2, c-myc, c-fos was negative in normal liver tissue, but was over-expressed in cirrhosis. **Conclusions** Hepatocyte apoptosis plays a certain role in the development of hepatic cirrhosis. The oncogenes bcl-2, c-myc, c-fos take part in the regulation of hepatocyte apoptosis.

**Key words:** LIVER CIRRHOSIS/compl; HYPERTENSION, PORTAL/etiolo; APOPTOSIS; GENES EXPRESSION

**CLC number:** R575.21; R730.231.3

**Document code:** A

凋亡在肝脏疾病中的作用正日益受到重视,但其在肝硬变门静脉高压症发病中的作用尚缺乏深入研究。笔者选择2002年1月~2003年12月在外科住院手术治疗的肝硬变门静脉高压症20例患者,对其肝细胞凋亡现象及肝组织中原癌基因的表

达和分布进行了研究,旨在探讨肝细胞凋亡与肝硬变及原癌基因的关系。

### 1 临床资料

#### 1.1 病例分组

1.1.1 肝硬变组 20例。男15例,女5例;年龄21~71(平均43)岁。肝功能Child A级12例, B级8例。均有肝炎病史,HBsAg均为阳性。手术方式为脾切除加贲门周围血管离断术。术中取肝组织。

收稿日期:2004-03-24; 修订日期:2004-06-26。

作者简介:阎玉矿(1965-),男,河南漯河人,广东省深圳市龙岗中心医院副主任医师,硕士,主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者:阎玉矿 电话:13902447077(手机)。

1.1.2 对照组 5例。男3例,女2例;年龄30~54(平均41)岁。5例均为胃大部切除术中所取的正常肝组织分别送检。

## 1.2 检测项目及方法

1.2.1 电镜观察 将肝组织切成 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ ,常规固定、脱水、环氧树脂 Epon812 包埋;切成超薄切片,铅铀双染,德国 Zeiss EM10C 型透射电镜观察。

1.2.2 原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡细胞 肝组织用10%中性福尔马林固定,石蜡包埋后制成 $4\mu\text{m}$ 厚连续切片,常规作病理诊断。采用Oncor公司生产的Apop Tag试剂盒检测凋亡细胞,操作按说明进行。光镜下计算全片阳性视野凋亡细胞数,以平均2000个肝细胞中的凋亡细胞百分比作为凋亡指数<sup>[1]</sup>。

1.2.3 肝组织原癌基因表达的检测 采用PAP免疫组织化学方法。鼠抗c-myc,兔抗c-fos和兔抗bcl-2等均为santa Cruz产品。工作浓度为1:50。按试剂盒要求进行操作。

## 2 结果

### 2.1 电镜观察

正常人肝组织未见凋亡细胞及凋亡小体。肝硬变门静脉高压症患者肝组织电镜显示,早期凋亡细胞染色质浓缩,聚集于核膜下形成颗粒状半月形帽状物,甚至累及整个核而呈环行,之后崩解成一些碎片,但仍有膜包裹并形成凋亡小体,其内含有不完整的DNA和数量不等的细胞器。凋亡小体能被库普弗细胞吞噬降解(图1)。

箭头示凋亡小体,有膜包裹,内含完整的细胞器和崩解的核碎片

图1 肝硬变肝透射电镜观察( $\times 3150$ )

### 2.2 凋亡细胞的原位检测

采用TUNEL法在肝硬变门静脉高压症患者肝组织中检出阳性细胞。阳性细胞分布广,在小叶内多散布于肝索或肝窦内,中央静脉周围可见凋亡细胞环绕,在部分肝细胞坏死灶尤其是碎片坏死处可检出凋亡细胞,体积较小,核固缩甚至破碎,与周围组织的连接松散,呈现凋亡细胞典型的形态改变(图2)。正常肝组织未检出阳性细胞。肝硬变患者肝细胞凋亡指数(18.29%)显著高于正常人(4.96%)( $P < 0.05$ )。

### 2.3 c-myc, c-fos, bcl-2 蛋白表达

正常人肝组织c-myc, c-fos, bcl-2均为阴性反应,肝硬变门静脉高压症患者肝组织均呈阳性或强阳性表达,阳性细胞在小叶内多散布于肝窦或肝索,阳性染色颗粒位于肝细胞胞浆内(图3)。

箭头示阳性染色的凋亡肝细胞,位于肝细胞索和肝窦内,以小叶坏死灶周围及碎屑坏死处多见

图2 肝硬变阳性染色的凋亡肝细胞(TUNEL  $\times 400$ ) (局部再放大)

在小叶内多分布于肝窦或肝索,阳性染色颗粒位于肝细胞浆内

图3 免疫组化染色阳性肝细胞

### 3 讨论

本研究结果显示肝硬变门静脉高压症患者的肝脏除可发生肝细胞坏死外,还有细胞凋亡现象,表明肝细胞凋亡是肝损伤的表现之一,本组病例均为慢性病毒性肝炎所致肝硬变患者,肝炎病毒可能是诱发凋亡的因素之一<sup>[1]</sup>。此外,肝硬变门静脉高压时肝组织血流灌注减少,导致肝细胞缺氧,亦能诱发凋亡<sup>[2]</sup>。细胞凋亡也可能是机体的代偿性保护反应,可防止肝细胞过度增生形成增生结节或假小叶,从而有利于维持肝脏正常的组织结构。

文献报告,原癌基因 *c-fos* 属于“立即早期基因”中的一种,这些原癌基因编码的蛋白在核内起着转录因子的作用。*c-fos* 在凋亡过程中被激活,*c-fos* 编码的蛋白与 *c-jun* 编码的蛋白组成异源二聚体 *jun-fos*,称为 AP-1;后者是一个重要的转录因子,能结合于 DNA 上诱导细胞凋亡或增殖。*c-fos* 和 *c-myc* 的激活是细胞 G<sub>1</sub> 期启动并进入增殖周期前的必要准备,因此 *c-fos* 和 *c-myc* 是细胞凋亡调控中的重要相关基因工程<sup>[3]</sup>。*c-myc* 亦属于立即早期基因,其产物 *c-myc* 蛋白与 Max 组成异源二聚体 *c-myc/max*;后者结合于 p53 启动因子上,进而使细胞生长停止或诱导凋亡。*c-myc* 是细胞凋亡调控中的一个重要相关基因,其作用的发挥决定于其它信号如生长因子等的存在与否<sup>[3]</sup>。

*bcl-2* 基因是一种与细胞器特别是线粒体膜相关联的稳定蛋白,它主要位于线粒体外膜、核被膜和内质网膜。*bcl-2* 是调节凋亡基因家族的基本成员及

最重要的基因。*bcl-2* 相关蛋白是一个分子质量为 25kD 的膜结合蛋白,其过度表达可以通过抑制 PCD 来阻碍或延迟正常细胞分化,从而延长细胞寿命,使细胞数目增多有助于基因突变及肿瘤发生。*bcl-2* 的功能可被结合蛋白所改变,如使 *bag-1*, *bc1-xl* 和 *bc1-xs* 与 *bcl-2* 结合可抑制细胞凋亡,而 *bad* 和 *bax* 与 *bcl-2* 结合可则促进细胞凋亡,此即 *bcl-2* 对凋亡的双向调节功能<sup>[3,4]</sup>。

本研究表明,肝硬变门静脉高压症患者肝组织原癌基因 *c-myc*, *c-fos* 和 *bcl-2* 均呈过度表达,而正常人肝组织则无表达。同时从肝硬变患者肝组织内检测出凋亡细胞,凋亡指数高于正常人,表明肝细胞凋亡可能在肝硬变的演变过程中发挥某种作用。原癌基因 *c-myc*, *c-fos* 和 *bcl-2* 参与了肝细胞凋亡的调控。本研究有助于肝硬变门静脉高压症发病机制的探讨。

#### 参考文献:

[1] 谈景旺,张绍庚,江艺,等. 异种肝移植急性排斥反应中细胞凋亡的研究[J]. 中国普通外科杂志,2002,11(1): 33-36.

[2] 阎玉矿,刘能银,段君英,等. 肝硬变门脉高压症患者肝细胞凋亡的电镜观察[J]. 中华实验外科杂志,1998,15(增刊):13-15.

[3] Smeyne RL, Vendrell MV, Hayward, *et al.* Continuous *c-fos* expression precedes programmed cell death in vivo[J]. Nature, 1993,363(1):166-169.

[4] 刘能银,段君英,阎玉矿,等. CCl<sub>4</sub> 肝损伤细胞凋亡调控基因的变化及意义[J]. 中华实验外科杂志,1998,15(增刊):78-79.

## 本刊 2005 年各期重点内容安排

本刊 2005 年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第 1 期	胆道外科	第 7 期	胆道外科
第 2 期	肝脏外科	第 8 期	甲状腺外科、乳腺外科
第 3 期	胃肠道外科	第 9 期	胃肠道肿瘤
第 4 期	乳腺外科、甲状腺外科	第 10 期	肝脏外科、血管外科
第 5 期	胰腺外科	第 11 期	胰腺外科
第 6 期	血管外科、门静脉高压症外科	第 12 期	内镜及腔镜外科