

大鼠肝再生过程中增殖细胞核抗原的表达

刘 铜¹, 王冬梅²

[摘要] 目的: 探讨大鼠肝再生过程中肝细胞增殖细胞核抗原(PCNA)表达的变化。方法: 建立肝切除动物模型, 用免疫组织化学法、图像分析仪检测肝细胞 PCNA 的表达。结果: PCNA 强阳性肝细胞数及其总灰度值在肝大部切除后 24 h 明显增高, 肝细胞阳性表达率在 48 h 达到峰值, 至 120 h 趋于正常水平。结论: PCNA 强阳性肝细胞呈规律性变化, 提示残余肝可再生。

[关键词] 肝再生; 免疫组织化学; 增殖细胞核抗原; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 333.4 [文献标识码] A

Expression of proliferating cell nuclear antigen during liver regeneration process after partial-hepatectomy in rats

LIU Tong¹, WANG Dong-mei²

(1. Department of Histology and Embryology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003; 2. Suzhou Municipal Health School of Anhui Province, Suzhou 234000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) during liver regeneration process after partial-hepatectomy in rats. **Methods:** ABC immunohistochemistry methods and anti-PCNA monoclonal antibody were used to reveal the expression of PCNA in the rat liver slice. **Results:** The number of PCNA positive cells and the grey degree numerical value increased remarkably 24 h after hepatectomy, and the expression rate of hepatocytes increased to peak value 48 h after hepatectomy.

Conclusions: The PCNA strong positive cells show regular change after hepatectomy, which suggests that the remained liver cells can regenerate.

[Key words] hepatic regeneration; immunohistochemistry; proliferating cell nuclear antigen; rats

成年哺乳动物和人的正常肝脏是一种稳定性组织, 极少见肝细胞的分裂相, 但当肝脏受损伤尤其是大部分切除后, 肝细胞具有很强的再生能力^[1]。有学者曾用肝细胞摄取氚化脱氧胸苷(³H-dT)的核标记指数和分裂指数进行肝大部切除后肝再生的研究表明^[2], 肝大部切除后肝细胞分裂增生的反应很快, 核标记指数和分裂指数分别于术后 24 h 和 36 h 达高峰, 高峰后 24 h 内下降较快, 随后缓慢下降。增殖细胞核抗原(PCNA)是 DNA 合成所必需的一种 36 kDa 的多肽核蛋白, 是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, 可作为细胞增殖的标记^[3]。本实验采用免疫组织化学(免疫组化)法, 探讨大鼠肝大部切除后, 肝再生过程中 PCNA 的表达与细胞增殖的关系。

1 材料与方法

1.1 大鼠肝大部切除和组织切片制作 正常雄性 SD 大鼠(由上海医科大学实验动物中心提供) 18 只, 体重 140 ~ 180 g。3 只为正常对照, 其余 15 只在乙醚麻醉下, 行标准肝大部切除术^[4]。分别于术后第 24、48、72、96、120h, 各取 3 只大鼠, 取其残余

肝组织。中性福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋切片, 切片厚约 5 μ m。

1.2 PCNA 免疫组化染色和测定 采用 ABC 免疫组化染色法。鼠抗人 PCNA(工作浓度为 1:100)单克隆抗体购自丹麦 Dako 公司。生物素化的马抗鼠 IgG 及 ABC 试剂均为 Vector Laboratories Inc 产品。每只大鼠 3 个肝组织块, 每个组织块任选 3 张不连续切片, 每张切片随机选 5 个视野, Leica Q500IW 图像分析仪, 测量框为 8 395.5 μ m², 40 \times 物镜下测量 PCNA 阳性肝细胞数、强阳性肝细胞数及单位面积(8 395.5 μ m²)强阳性肝细胞总灰度值, 测量时 135 像素以下未计入肝细胞核数。

1.3 PCNA 阳性判断标准 以肝细胞核呈界限清楚的棕褐色反应为阳性, 呈淡棕褐色反应的为弱阳性; 呈深棕褐色反应的为强阳性, 设置后图像分析仪自动测量。按以下公式计算 PCNA 阳性肝细胞表达率:

$$\text{PCNA 阳性肝细胞表达率} = \frac{\text{每测量框阳性表达数}}{\text{每测量框肝细胞数}} \times 100\%$$

1.4 统计学方法 采用 Poisson 分布资料的 u 检验。

2 结果

2.1 正常大鼠肝细胞 PCNA 的表达 肝细胞核 PCNA 阳性呈棕褐色, 可见部分细胞呈深棕褐色强阳性反应, 部分细胞呈淡棕褐色弱阳性反应。正常

[收稿日期] 2004-11-05

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 组织胚胎学教研室, 安徽 蚌埠 233003;

2. 安徽省宿州市卫生学校, 234000

[作者简介] 刘 铜(1960-), 男, 安徽蚌埠人, 讲师。

大鼠仅见少数 PCNA 阳性肝细胞,表达也较弱。

2.2 大鼠再生肝细胞 PCNA 的表达 肝大部切除后肝再生过程中,随肝再生的进展,大鼠肝组织中肝细胞 PCNA 表达呈一定的规律性。术后 24 h PCNA 阳性肝细胞数量多,表达也最强,以后 PCNA 表达迅速减弱,至术后 120 h PCNA 表达与正常肝组织相近(见图 1~3)。肝大部切除后肝再生过程中,肝细胞 PCNA 强阳性表达、阳性表达率及强阳性表达的总灰度值呈规律性变化。正常肝组织 PCNA 强阳性肝细胞数为 (0.13 ± 0.34) 个/测量框,PCNA 阳性表达率为 22.52%,单位面积 $(8\ 395.5\ \mu\text{m}^2)$ 强阳性表达的总灰度值为 3.98 ± 11.20 。术后 24 h,PCNA 强阳性肝细胞数量多,高达 (24.20 ± 5.27) 个/测量框,单位面积 $(8\ 395.5\ \mu\text{m}^2)$ 强阳性表达的总灰度值最大,为 $1\ 266.76 \pm 291.60$ 。术后 48 h,PCNA 阳性表达率最高,为 86.72%。以后,上述指标逐渐下降,至术后 120 h,趋于正常水平(见图 4~6)。术后不同时间 PCNA 阳性表达率均高于正常对照组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 大鼠肝大部切除后肝再生过程中不同时间 PCNA 阳性表达率比较($p \pm s_p$)

| 术后时间 (h) | 观察细胞 总数(个) | PCNA 阳性 细胞数(个) | 阳性表达率(%) | <i>u</i> | <i>P</i> |
|-------------|---------------|-------------------|------------|----------|----------|
| 正常对照 | 5 040 | 1 135 | 22.52±0.59 | — | — |
| 24 | 3 243 | 1 918 | 59.14±0.86 | 4.05 | < 0.01 |
| 48 | 2 725 | 2 363 | 86.72±0.65 | 6.14 | < 0.01 |
| 72 | 3 227 | 1 890 | 58.85±0.87 | 4.03 | < 0.01 |
| 96 | 3 637 | 1 802 | 49.55±0.83 | 3.18 | < 0.01 |
| 120 | 3 825 | 1 571 | 41.07±0.80 | 2.33 | < 0.05 |

3 讨论

PCNA 是一种仅在增殖细胞中合成和表达的 36 kDa 的多肽核蛋白,是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,合成于 G₁ 期、S 期,为 DNA 合成所必需^[5]。PCNA 半衰期较长,可持续存在到 M 期^[6]。肝内、外产生的肝细胞生长因子(HGF)和肝细胞再生刺激因子(HSS)等均可诱导 PCNA 的阳性表达^[7]。有学者用免疫组化法,光镜下计数,用肝细胞 PCNA 阳性表达率对肝再生进行研究^[8]。本实验采用免疫组化法和图像分析技术对大鼠肝再生过程中 PCNA 的表达进行动态观察。除细胞计数量大、客观性强、误差小外,同时对 PCNA 强阳性表达的肝细胞及其单位面积总灰度值进行测定,可评价肝细胞增殖状态。

本实验中我们观察到,肝大部切除后肝再生过

程中,PCNA 强阳性肝细胞数及总灰度值、PCNA 阳性表达率均呈规律性变化。正常肝组织中 PCNA 表达较弱,术后 24 h,PCNA 强阳性肝细胞数及总灰度值均达高峰,而 PCNA 阳性表达率术后 48 h 达到高峰。我们认为:(1)PCNA 强阳性肝细胞可能是处于细胞增殖周期 S 期的细胞。正常肝组织中,仅有极少数肝细胞复制 DNA,形成多倍体和双核肝细胞,因此,PCNA 强阳性肝细胞极少;肝再生过程中,成年和老年大鼠分别有 95%和 75%的肝细胞至少分裂一次^[7]。术后 24 h,肝细胞摄取³H-dT 的核标记指数达高峰^[2],而此时,PCNA 强阳性肝细胞数也达高峰,说明进入 S 期的细胞数达到高峰。肝再生过程中,PCNA 强阳性肝细胞数变化规律与肝细胞摄取³H-dT 的核标记曲线一致^[2],且此变化规律与总灰度值变化规律一致,因此,可用 PCNA 免疫组化染色替代³H-TdR 掺入法,研究肝再生动态。(2)PCNA 弱阳性表达可能为肝细胞增殖周期的 G₁ 期或 G₂ 期。正常肝组织中,肝细胞阳性表达率为 22.5%,说明正常肝组织中约 1/4 肝细胞处于 G₁ 期或 G₂ 期,而 3/4 的肝细胞处于 G₀ 期。(3)肝大部切除后,受肝内、外产生 HGF、HSS 等诱导,肝细胞分裂增殖的反应很快,迅速从 G₀ 期或 G₁ 期进入 S 期^[7],由于 PCNA 为 DNA 合成所必需的多肽核蛋白,故术后 24 h,形成 PCNA 强阳性表达高峰。

(本文图 1~6 见 297 页)

[参 考 文 献]

- [1] 成令忠主编.组织学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1994:1183.
- [2] 付国鑫,成令忠.大鼠肝大部切除后肝细胞的增殖及其有关体液因素的探讨[J].上海第一医学院学报,1983,10(5):365~386.
- [3] 白成勇,成令忠,顾云娣,等.大鼠肝癌发生过程中增殖细胞核抗原(PCNA/Cyclin)的表达[J].中国组织化学与细胞化学杂志,1996,5(3):255~258.
- [4] 成令忠.肝大部切除后的再生研究[A].见:汤钊猷主编.原发性肝癌的研究与进展[M].上海:上海医科大学出版社,1990:86~94.
- [5] Galand P, Degraef C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues[J].Cell Tissue Kinet,1989,22(5):383~392.
- [6] Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms[J].J Pathol,1990,162(4):285~294.
- [7] Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration [J]. Science,1997,276(5309):60~66.
- [8] 牛兆建,杨金铺,吴力群,等.C-met 和 PCNA 在肝再生动物模型肝脏细胞中的表达及其意义[J].青岛大学医学院学报,2003,39(3):239~241.

迫的诊断需综合分析,慎重考虑,从而减少剖宫产的可能性。

3.3.2 正确处理难产 提高产科医师的技术水平,产前正确预测胎儿大小,内测量骨盆各径线,估计胎儿与母亲头盆相称程度。明显头盆不称者采取剖宫产,相对头盆不称者在严密观察下试产,且试产应充分,试产过程中胎先露下降不明显,宫口开大小于每小时 1 cm 可考虑剖宫产结束分娩。及时发现,及早处理异常产程,可提高阴道分娩率。

3.3.3 正确认识自然分娩,减少社会因素剖宫产 向孕妇及家属做好宣传工作,让她(他)们正确认识自然分娩的过程、特点,避免不必要的担心,分析剖宫产的利弊;提倡导乐陪伴分娩,实行责任制助产,即由一名受过岗前培训的在职助产士对临产妇实行一对一全程陪护分娩,消除孕妇对阴道分娩的紧张、恐惧心理,增强对自然分娩的信心,并为她们提供舒适、温馨、清洁、安全的待产及分娩环境,并使她们知道剖宫产虽然安全,但仍有一定的并发症及意外情况发生,没有手术指征时尽量阴道分娩,从而得到产妇及家属的理解和配合,减少社会因素及不必要的剖宫产。

3.3.4 对 B 超诊断胎盘钙化、羊水过少者处理 有条件最好做 E3 值测定或 E/C 比值测定并动态观

察,确有胎盘功能减退者,可考虑结束分娩,并行 OCT(缩宫素激惹试验)检查,阳性者行剖宫产。对于胎膜早破、胎儿情况尚好的孕妇以及 B 超提示脐带绕颈者,也应解除孕妇的思想顾虑,在严密观察下试产,以降低剖宫产率。提高产前检查质量,减少因妊娠并发症、并发症行剖宫产者。及时发现并积极纠正臀位。

3.3.5 提高阴道助产技术 对于宫口开全后出现胎心减慢或羊水污染,而胎头双顶径已达坐骨棘水平以下者,可行胎吸或产钳术助产;对于臀位,估计胎儿不大,骨盆正常者,可行臀位助产,从而避免不必要的剖宫产。

[参 考 文 献]

- [1] 霍 霆,周珍真.全国妇产科第 11 届专题学术会会议纪要[J].实用妇产科杂志,2001,17(1):1~2.
- [2] 黄维新,郑九生,汤一贞.剖宫产术后几种特殊并发症[J].中国实用妇科与产科杂志,2003,19(7):399~400.
- [3] 黄 旭,王梦龙,静 进.剖宫产对儿童神经精神发育的影响[J].国外医学·妇幼保健分册,2004,15(1):4~6.
- [4] Smith GC, Pell JP, Dobbie R. Caesarean section and risk of unexplained stillbirth in subsequent pregnancy[J]. *Lancet*, 2003, 362(9 398): 1 774~1 775.
- [5] 王怡芳,顾建逸.剖腹产率增高的原因分析[J].中国优生与遗传杂志,2001,9(2):71.

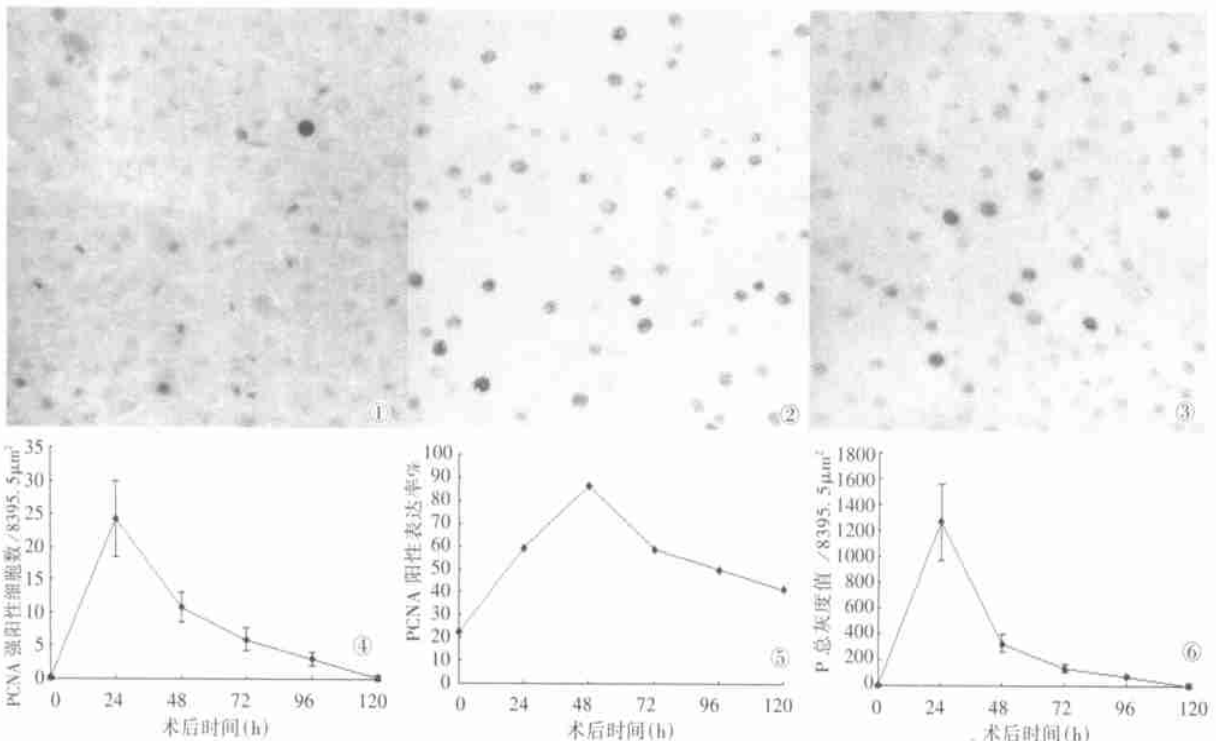


图 1 正常大鼠肝增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组织化学染色×400 图 2 肝大部切除后 24 h 再生肝 PCNA 免疫组织化学染色×400
图 3 肝大部切除后 48 h 再生肝 PCNA 免疫组织化学染色×400 图 4 大鼠肝再生过程中不同时相的 PCNA 强阳性表达规律 图 5 大鼠肝再生过程中不同时相的 PCNA 阳性表达率 图 6 大鼠肝再生过程中 PCNA 强阳性表达的总灰度值动态曲线