

肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67的表达

权春姬, 金仁顺, 朴东明

权春姬, 金仁顺, 朴东明, 延边大学附属医院病理科 吉林省延吉市 133000
通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街1327号, 延边大学附属医院病理科. pdm1117@hotmail.com
电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610
收稿日期: 2006-08-30 接受日期: 2006-09-20

Expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients

Chun-Ji Quan, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao

Chun-Ji Quan, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Correspondence to: Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, 1327 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. pdm1117@hotmail.com
Received: 2006-08-30 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To investigate the expression and significances of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients.

METHODS: SP immunohistochemical technique was performed to detect the expression of PCNA and Ki-67 in 58 liver specimens from patients with cirrhosis from hepatitis B ($n = 24$) and hepatitis C ($n = 22$), and chronic hepatitis ($n = 12$), and the labeling index (LI) of the positive cells was also determined. Sirius red staining was used to determine the area density of collagen in liver tissues.

RESULTS: The expression of PCNA and Ki-67 LI was significantly higher in chronic hepatitis than that in cirrhosis ($34.67\% \pm 8.6\%$ vs $10.38\% \pm 3.76\%$, $P < 0.001$; $2.81\% \pm 0.51\%$ vs $1.69\% \pm 1.03\%$, $P < 0.001$), and moreover, they were markedly higher in hepatitis C-induced cirrhosis than those in hepatitis B-induced one ($13.12\% \pm 1.42\%$ vs $6.32\% \pm 2.18\%$, $P < 0.001$; $2.48\% \pm 0.54\%$ vs $0.95\% \pm 0.77\%$, $P < 0.001$). The area density of

collagenous fiber was significantly increased in cirrhosis than that in chronic hepatitis (12.0 ± 3.1 vs 1.40 ± 1.0 , $P < 0.001$), but there was no difference between the two types of cirrhosis ($P > 0.05$). The area density of collagenous fiber had no significant correlation with the LI values of PCNA and Ki-6 in cirrhosis ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The proliferation rate of liver cells is lower in cirrhosis than that in chronic hepatitis, but it is higher in cirrhosis from hepatitis C than that in the one from hepatitis B. There is no significant correlation between the area density of collagenous fiber and the expression of PCNA and Ki-67.

Key Words: Liver cirrhosis; Chronic hepatitis; Proliferating cell nuclear antigen; Ki-67

Quan CJ, Jin RS, Piao DM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3151-3154

摘要

目的: 探讨乙型肝炎和丙型肝炎肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67抗原的表达及意义。

方法: 选择58例(乙型肝炎肝硬化24例、丙型肝炎肝硬化22例、慢性肝炎12例)肝脏标本, 做H-E染色观察肝组织的病理改变; 利用天狼红染色切片检测肝组织内胶原纤维的面密度; 采用免疫组织化学SP法观察肝组织中PCNA和Ki-67抗原的表达, 并检测阳性细胞的标记指数(labeling index, LI)。

结果: 肝硬化胶原纤维的面密度百分比与慢性肝炎比较($12.2\% \pm 3.1\%$ vs $1.40\% \pm 1.0\%$, $P < 0.001$)明显增高, 乙型与丙型肝炎肝硬化胶原纤维的面密度百分比无明显差异($P > 0.05$); 慢性肝炎与肝硬化比较PCNA和Ki-67 LI ($34.67\% \pm 8.6\%$ vs $10.38\% \pm 3.76\%$, $2.81\% \pm 0.51\%$ vs $1.69\% \pm 1.03\%$, 均 $P < 0.001$)明显增高; 丙型肝炎肝硬化与乙型肝炎肝硬化比较PCNA和

■背景资料

PCNA和Ki67是用于显示细胞增殖状态的比较成熟的标记物, 目前多用于肿瘤的研究中。研究表明, 肝癌和癌旁肝硬化组织中PCNA表达高于单纯肝硬化组织, 认为PCNA是肝细胞癌发生的最强独立危险因素, 但在单纯肝硬化组织中PCNA的表达水平不一致, 因此深入研究肝硬化组织中肝细胞增殖活性, 对进一步阐明肝细胞癌的发生有重要意义。

■创新盘点

利用PCNA和Ki67抗原研究乙型和丙型肝炎肝硬化的研究尚少,本研究结果表明,单纯肝硬化组织中肝细胞增殖指数比慢性肝炎低,但丙型肝炎肝硬化的肝细胞增殖指数比乙型肝炎肝硬化高,肝硬化胶原纤维的面密度与PCNA和Ki-6 LI之间无相关性。

Ki-67 LI(13.12%±1.42% vs 6.32%±2.18%, 2.48%±0.54% vs 0.95%±0.77%, 均 $P<0.001$)均明显增高;肝硬化胶原纤维的面密度与PCNA和Ki-6 LI之间无相关性($P>0.05$)。

结论:肝硬化组织中肝细胞增殖指数比慢性肝炎低,但丙型肝炎肝硬化的肝细胞增殖指数比乙型肝炎肝硬化高;PCNA和Ki-67 LI与肝硬化胶原纤维面密度无相关性。

关键词:肝硬化;慢性肝炎;增殖细胞核抗原;Ki-67抗原

权春姬,金口顺,朴东明.肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67的表达.世界华人消化杂志 2006;14(32):3151-3154
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3151.asp>

0 引言

增殖细胞核抗原(PCNA)和Ki-67抗原在肝癌和肝硬化有较多的研究报道,但在不同类型肝硬化中的研究较少.本实验采用免疫组织化学方法观察46例肝硬化和12例慢性肝炎患者肝组织中PCNA和Ki-67抗原的表达,并检测两种抗原的标记指数(labeling index, LI),探讨两种抗原在乙型和丙型肝炎肝硬化中的表达及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择我科存档的手术切除肝病标本共58例,其中男22例,女36例,平均发病年龄40岁,平均病史10.5 a,全部病例经血清肝炎病毒学检查证实,其中乙肝肝硬化24例、丙肝肝硬化22例、慢性肝炎12例(乙肝、丙肝各6例),复习全部病例的病历档案.鼠抗人PCNA mAb、兔抗人Ki-67 mAb及SP试剂盒均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.2 方法 全部标本均经40 g/L中性甲醛固定,常规石蜡包埋,4-5 μm厚的连续切片,行HE染色观察肝组织的病理改变。

1.2.1 天狼猩红染色 切片常规脱蜡至水,天狼猩红-苦味酸饱和溶液(5 g/L天狼猩红溶液 10 mL,苦味酸饱和溶液90 mL)染30 min,无水乙醇分化脱水,中性树胶封片.胶原纤维的面密度:采用彩色病理图象分析系统(北京航空航天大学CMIAS),利用天狼猩红染色的切片检测胶原纤维的面密度,用10倍物镜,每张切片随机选择5个视野,采集图象、分割处理、统计参数,计算胶原纤维面密度百分比。

1.2.2 免疫组织化学染色 采用SP法进行PCNA和

Ki-67的染色, DAB显色,以乳腺癌组织作PCNA, Ki-67的阳性对照;以PBS代替一抗作阴性对照. PCNA与Ki-67抗原阳性细胞LI: 每例选择染色均匀的视野,在40倍物镜下计数500个细胞中的阳性细胞,取平均值。

统计学处理 计量数据均用mean±SD表示,两样本均数的比较用 t 检验法。

2 结果

乙型肝炎肝硬化以水样变性多见,仅少数病例(20%)出现轻度脂肪变,丙型肝炎肝硬化大多数(75%)出现以大泡为主的脂肪变性。

2.1 胶原纤维的面密度 肝硬化胶原纤维的面密度百分比明显高于慢性肝炎($P<0.001$),乙型与丙型肝炎肝硬化肝组织胶原纤维的面密度百分比无明显差异(表1)。

2.2 免疫组化染色结果 慢性肝炎PCNA阳性细胞多位于坏死灶周围,肝硬化在假小叶周边单个散在分布.乙型肝炎肝硬化可见少量Ki-67阳性细胞单个散在分布,丙型肝炎肝硬化阳性细胞多位于脂肪变性的肝细胞周围(图1).慢性肝炎PCNA与Ki-67 LI均高于肝硬化,丙型肝炎肝硬化PCNA与Ki-67 LI均高于乙型肝炎肝硬化(表1)。

3 讨论

PCNA和Ki-67抗原是近年来发展的显示细胞增殖状态的比较成熟的标记物,目前两种抗原多用于各种恶性肿瘤的研究中^[1-4]. PCNA的高表达提示细胞内进行旺盛的DNA合成反应,是S期细胞的良好标记物. Ki-67作为增殖细胞核抗原,除G₀期外各细胞周期都表达,其中G₂和M期表达最强. Donato *et al*^[5-6]利用PCNA研究了慢性肝炎和肝硬化病人的肝脏标本,发现PCNA能反应慢性病毒性肝炎病人的肝细胞增殖率,与肝病的严重性相关,并提出PCNA是肝细胞癌发生的最强独立危险因素. PCNA在肝癌和癌旁肝硬化的研究也有较多报道,大多数研究结果表明,PCNA在肝癌和癌旁肝硬化表达高于单纯肝硬化,但国内外的研究表明单纯肝硬化组织中肝细胞PCNA的表达水平不尽一致,郎振为 *et al*^[7]采用免疫组化法观察了肝硬化肝组织中PCNA的表达,结果表明,肝硬化时肝细胞的增殖能力相当低下;牛兆山 *et al*^[8]的研究结果表明,肝硬化组织中只有少量PCNA阳性细胞,呈单个散在分布,而癌旁增生性结节中PCNA阳性表达与肝硬化比较有显著性差异,认为是癌前病变,而肝硬化中的细胞大多处于静止状态,是一种

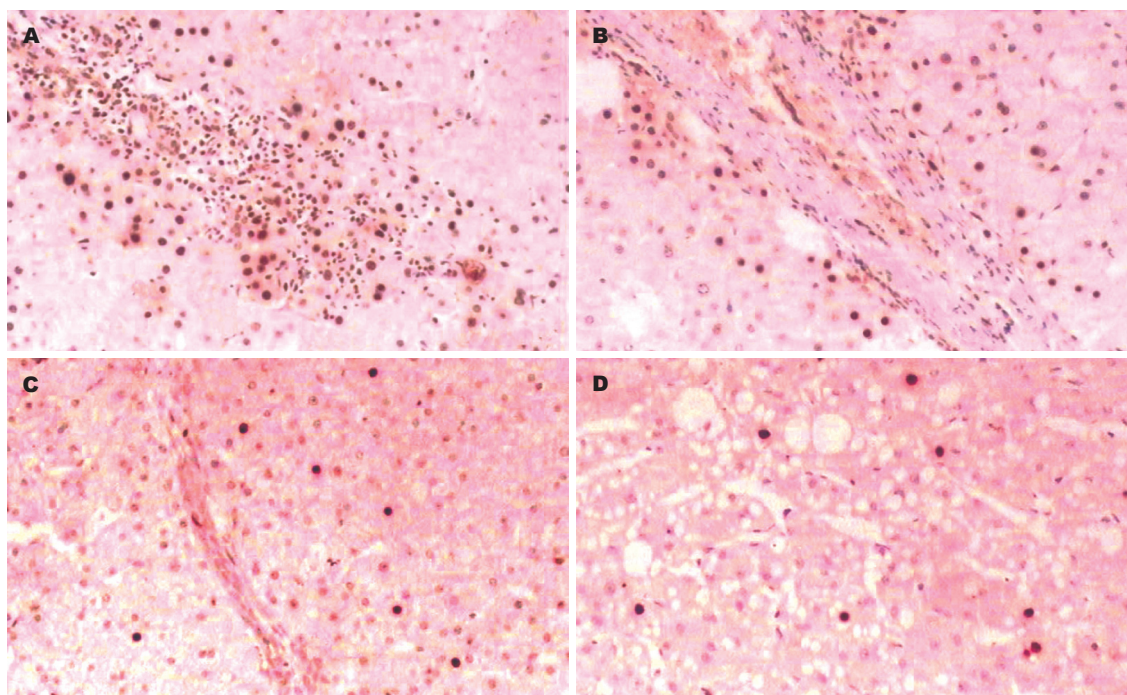


图 1 免疫组化染色结果(SP×100)。A: 慢性肝炎PCNA的表达; B: 肝硬化PCNA的表达; C: 乙肝肝硬化Ki67的表达; D: 丙肝肝硬化Ki67的表达。

表 1 肝硬化组织中PCNA, Ki-67 LI与胶原纤维面密度检测结果(mean ± SD)

分组	n	PCNA LI	Ki-67 LI	胶原纤维面密度(%)
慢性肝炎	12	34.67 ± 8.6 ^b	2.81 ± 0.51 ^b	1.40 ± 1.0
肝硬化	46	10.38 ± 3.76	1.69 ± 1.03	12.0 ± 3.1 [†]
乙型肝炎肝硬化	24	6.32 ± 2.18	0.95 ± 0.77	11.8 ± 2.4
丙型肝炎肝硬化	22	13.12 ± 1.42 ^d	2.48 ± 0.54 ^d	12.2 ± 3.8

^bP<0.001 vs 肝硬化, ^dP<0.001 vs 乙型肝炎肝硬化[†]P<0.001 vs 慢性肝炎。

高度成熟细胞, 与肝细胞癌的发生没有直接关系, Kawakita *et al*^[9-10]的研究结果也相似, 而付晓梅 *et al*^[11-12]的研究则表明肝硬化时肝细胞PCNA的阳性表达率高于慢性肝炎组。

联合应用两种增殖细胞核抗原研究肝癌和肝硬化的研究报道较少^[13-14], 本组结果表明肝硬化肝细胞的PCNA和Ki-67指数明显低于慢性肝炎组, 二者有显著差异, 表明慢性肝炎时肝细胞增殖较肝硬化活跃。在病毒性肝炎后期成熟的肝细胞广泛地被病毒感染, 而且被病毒感染的肝细胞常常失去增殖能力, 但仍在持续发生的肝细胞死亡要求肝组织持续地代偿性再生, 此时再生细胞的主要来源可能是干细胞-卵圆型细胞的增殖, Sun *et al*^[15]报道HCV+和HBV+的肝硬化中存在卵圆型细胞。

肝硬化的肝细胞增殖能力与肝纤维化程度

之间关系尚不清楚, 贾克东 *et al*^[16]对11例肝硬化组织进行纤维化程度SSS评分, 并与PCNA的结果进行相关性分析, 结果表明, 肝硬化的肝细胞增生与肝组织内纤维化程度之间无明显相关性。本组检测了46例肝硬化胶原纤维面密度, 结果发现, PCNA和Ki-67LI与肝硬化胶原纤维面密度之间也无相关性, 与上述结果相似。

成军 *et al*^[17]报道慢性丙型肝炎中82.39%合并不同程度的肝脏脂肪变性, 本组两种类型肝硬化的形态学观察表明, 乙型肝炎肝硬化以水样变性为主, 而大多数丙型肝炎肝硬化肝细胞中出现了以大泡为主的脂肪变性。本组丙型肝炎肝硬化PCNA与Ki-67 LI高于乙型肝炎肝硬化, PCNA与Ki-67阳性细胞多位于脂肪变性的肝细胞周围, 表明丙型肝炎肝硬化肝细胞增殖可能与脂肪变性有关。研究表明, 肝组织中脂肪变的

存在除了影响抗病毒治疗效果以外,加速了肝脏病理损伤及纤维化的进程^[18],因此丙型肝炎病毒感染更易转为慢性过程,肝硬化的发生率(8%-46%)高于慢性乙肝(10%-20%)^[19],脂肪变还能促进肝细胞癌的发生^[20]。尽管肝硬化组织中肝细胞PCNA的表达水平不一致,但PCNA是肝细胞癌发生的最强独立危险因素,因此PCNA与Ki-67阳性率高的乙型和丙型肝炎肝硬化患者,应视为肝细胞癌的高危人群,需进行密切随访观察。

4 参考文献

- 1 Lyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1184-1191
- 2 Yamashita H, Toyama T, Nishio M, Ando Y, Hamaguchi M, Zhang Z, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H. p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R48
- 3 葛云浩, 吴淳, 纪霞. 肺癌组织中Fhit蛋白和PCNA蛋白表达及意义. *中国医刊* 2003; 38: 30-32
- 4 邹继彬, 黄广恩, 陈鸿莲. 食管癌Survivin和PCNA的表达及其临床意义. *中国医师杂志* 2005; 7: 898-899
- 5 Donato MF, Arosio E, Monti V, Fasani P, Prati D, Sangiovanni A, Ronchi G, Colombo M. Proliferating cell nuclear antigen assessed by a computer-assisted image analysis system in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 197-203
- 6 Donato MF, Arosio E, Del Ninno E, Ronchi G, Lampertico P, Morabito A, Balestrieri MR, Colombo M. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. *Hepatology* 2001; 34: 523-528
- 7 郎振为, 金荣华, 孟忻, 李俊强, 张士杰. 肝硬化患者肝组织中增殖细胞核抗原的检测. *临床肝胆病杂志* 1996; 12: 141-143
- 8 牛兆山, 张昭成. AgNORs计数DNA含量及PCNA与肝硬化增生结节和肝癌的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 555-558
- 9 Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, Yanai A, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T. Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde. *Am J Pathol* 1992; 140: 513-520
- 10 Ojanguren I, Ariza A, Llatjos M, Castella E, Mate JL, Navas-Palacios JJ. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, regenerative, and neoplastic liver: a fine-needle aspiration cytology and biopsy study. *Hum Pathol* 1993; 24: 905-908
- 11 付晓梅, 杨清绪, 邵春奎, 冯智英. 肝癌癌变过程中端粒酶逆转录酶、c-myc、PCNA表达和细胞凋亡观察. *南方医科大学学报* 2006; 26: 821-823
- 12 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST- π in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 459-462
- 13 刘军, 彭志海, 裘国强. 肝细胞癌和肝硬化组织中增殖细胞核抗原及Ki-67抗原的表达及意义. *山东医药* 2003; 43: 3-4
- 14 Gramantieri L, Trere D, Chieco P, Lacchini M, Giovannini C, Piscaglia F, Cavallari A, Bolondi L. In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair. *J Hepatol* 2003; 39: 997-1003
- 15 Sun C, Jin XL, Xiao JC. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study. *Histopathology* 2006; 48: 546-555
- 16 贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 肝硬化和肝癌肝组织Survivin基因表达与增生的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 550-554
- 17 成军. 丙型病毒性肝炎与肝脏脂肪变. *辽宁医学杂志* 2004; 18: 63-64
- 18 Fernandez-Rodriguez CM, Gutierrez ML, Serrano PL, Lledo JL, Santander C, Fernandez TP, Tomas E, Cacho G, Nevado M, Casas ML. Factors influencing the rate of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1971-1976
- 19 郎振为. 病理学检查在慢性丙型肝炎诊断和治疗中的重要地位. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2377-2379
- 20 Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, Abiru S, Nakagawa Y, Shigeno M, Miyazoe S, Ichikawa T, Ishikawa H, Nakao K, Eguchi K. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 2003; 97: 3036-3043

电编 李琪 编辑 张焕兰