

· 论 著 ·

肝硬化患者胃黏膜上皮细胞增殖及其影响因素的临床研究

宣 俊, 王 峰, 宗光全, 王 伟, 张宇飞, 徐 琳, 栾 洋, 刘仁民
解放军 81 医院普外科, 江苏 南京 210002

摘要: **目的** 观察胃黏膜上皮细胞中增殖细胞核抗原 Ki-67 表达情况, 评价肝硬化患者胃黏膜上皮细胞增殖情况及其影响因素。 **方法** 选择 2012 年 6 月至 2013 年 5 月确诊为肝硬化的患者 36 例为观察组, 其中无门脉高压性胃病 (PHG) 11 例, 轻度 PHG 13 例, 重度 PHG 12 例。随机选择 18 例功能性消化不良的非肝硬化患者作为对照组。采用免疫组化方法检测所有患者胃黏膜上皮细胞 Ki-67 表达情况, 并计算增殖指数 (PI)。 **结果** 肝硬化组 PI 为 $(34.7 \pm 16.6)\%$, 对照组为 $(28.7 \pm 17.5)\%$, 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肝硬化组幽门螺杆菌 (Hp) 阳性者的 PI 高于 Hp 阴性者 [$(42.3 \pm 16.1)\%$ vs $(26.7 \pm 13.5)\%$], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。随着 PHG 程度加重, 胃黏膜上皮细胞的 PI 递增, 呈现重度 PHG > 轻度 PHG > 无 PHG ($P < 0.01$)。重度 PHG 的 PI 与对照组比较, 无论在 Hp 阳性者 [$(55.6 \pm 7.7)\%$ vs $(35.2 \pm 17.9)\%$] 或 Hp 阴性者 [$(40.8 \pm 3.3)\%$ vs $(20.6 \pm 13.9)\%$] 中, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。 **结论** PHG、Hp 感染显著影响肝硬化患者胃黏膜上皮细胞增殖, 这两种因素可能是肝硬化患者胃癌风险增加的主要因素。

关键词: 增殖细胞核抗原 Ki-67; 细胞增殖; 门脉高压性胃病; 肝硬化; 胃黏膜; 幽门螺杆菌

中图分类号: R 575.2⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)01-0001-03

Proliferation of gastric mucosal epithelial cells and its influencing factors in patients with liver cirrhosis

XUAN Ji, WANG Feng, ZONG Guang-quan, WANG Wei, ZHANG Yu-fei, XU Lin, LUAN Yang, LIU Ren-min
Department of General Surgery, 81 Hospital of PLA, Nanjing Jiangsu 210002, China
Corresponding author: WANG Feng, E-mail: wf4025136@sina.com

Abstract: Objective To observe the expression of cell proliferation-associated nuclear antigen Ki-67 in gastric mucosal epithelial cells for assessing the proliferation of gastric mucosal epithelial cells and its influencing factors in patients with liver cirrhosis. **Methods** Thirty-six patients with liver cirrhosis confirmed between June 2012 and May 2013 including 11 cases of non-portal hypertensive gastropathy (PHG), 13 cases mild PHG and 12 cases of severe PHG were selected as observation group, and 18 cases of no-liver cirrhosis with functional dyspepsia were randomly selected as control group. In all participants, the expression of Ki-67 in gastric mucosal epithelial cells was detected by immunohistochemical method, and the proliferation index (PI) was calculated. **Results** There was no significant difference in PI between observation group and control group [$(34.7 \pm 16.6)\%$ vs $(28.7 \pm 17.5)\%$, $P > 0.05$]. In observation group, the PI in patients with helicobacter pylori (HP) infection was significantly higher than that without HP infection [$(42.3 \pm 16.1)\%$ vs $(26.7 \pm 13.5)\%$, $P < 0.01$]. The PI progressively increased in proportion to the aggravation of PHG degree with the order of no-, mild- and sever-PHG ($P < 0.01$). Compared with control group, the PI of sever PHG patients increased significantly either in HP-positive patients [$(55.6 \pm 7.7)\%$ vs $(35.2 \pm 17.9)\%$, $P < 0.01$] or in HP-negative patients [$(40.8 \pm 3.3)\%$ vs $(20.6 \pm 13.9)\%$, $P < 0.01$]. **Conclusions** PHG and Hp infection significantly affect the proliferation of gastric mucosal epithelial cells in patients with liver cirrhosis, and they might be the principal factors of leading to the increase of gastric cancer risk in patients with liver cirrhosis.

Key words: Cell proliferation-associated nuclear antigen Ki-67; Cell proliferation; Portal hypertensive gastropathy; Liver cirrhosis; Gastric mucosa; Helicobacter pylori

流行病学研究发现肝硬化患者发生胃癌的风险升高^[1],另一项回顾性研究也发现胃癌和肝硬化之间存在密切关联^[2]。肝硬化患者胃黏膜损害的病理改变主要为黏膜及黏膜下血管扩张,而不是炎症性损害,其与门静脉高压有密切关系。门脉高压所致胃黏膜病变高达 94%~98%^[3],门脉高压性胃病(PHG)是肝硬化患者发生明显慢性胃黏膜出血的重要风险指标。PHG 患者的胃黏膜对酒精、胆汁酸或阿司匹林等的刺激更敏感^[4-7]。关于 PHG 患者的胃黏膜上皮细胞增殖的研究很少,但是在黏膜病变和胃癌的发生过程中上皮细胞增殖都起着重要的作用。在非肝硬化患者中,幽门螺杆菌(Hp)感染导致显著胃黏膜上皮细胞增殖,而根除 Hp 后增殖减轻已被广泛报道^[8-10]。然而,肝硬化患者中 Hp 感染对于胃黏膜上皮细胞增殖所起的作用却鲜有报道。本研究通过检测胃黏膜上皮细胞增殖细胞核抗原 Ki-67 表达情况,观察肝硬化患者胃黏膜上皮细胞增殖情况,评价胃黏膜上皮细胞增殖过程中 PHG 和 Hp 感染所起的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 6 月至 2013 年 5 月确诊为肝硬化的患者 36 例为肝硬化组,男 17 例,女 19 例;年龄 33~77 岁,平均 64 岁。其中无 PHG 11 例,轻度 PHG 13 例,重度 PHG 12 例。随机选择 18 例功能性消化不良的非肝硬化患者作为对照组,男 9 例,女 9 例;年龄 30~76 岁,平均 63 岁。两组年龄、性别、Hp 感染率、合并症等比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。见表 1。

1.2 排除标准 (1)长期服用 β -受体阻滞剂或硝酸盐类药物;(2)曾接受食管硬化剂治疗;(3)血小板计数 $<45 \times 10^9/L$;(4)活化部分凝血活酶时间(APTT) >50 s。

1.3 免疫组化检测 Ki-67 两组患者在接受胃镜检查时,检查医师用活检钳钳取胃窦黏膜组织,2%多聚甲醛固定后,石蜡包埋并分别隔 100 μm 深度的层面上连续 4 μm 切片。按照 SABC 试剂盒要求进行操作,脱蜡至水,枸橼酸缓冲液高压修复抗原 3.5 min,待切片晾至室温后滴加 3% H_2O_2 ,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 15 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加胰酶消化 15 min, PBS 洗片 3 次,每次 5 min。滴加 Ki-67 一抗工作液(工作液浓度分别为 1:100、1:50,用 PBS 稀释),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。次日取出切片, PBS 洗片 3 次,每次 5 min;滴加二抗工作液,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 40 min。蒸馏水洗 2 次,每次 5 min,用现配制的 DAB 溶液显色 10 min,苏木精

衬染 2 min,分化、返蓝各 30 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。检测标本中 Ki-67 的表达情况。阳性表达主要表现为细胞核呈棕色及黄褐色;偶尔在细胞质呈黄褐色。采用双盲法,由两名有经验的病理诊断医师同时进行判定。应用 Image Pro Plus 6.0 图像处理与分析系统,统计切片视野中阳性细胞和总细胞数, Ki-67 增殖指数(PI) = Ki-67 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。其中, Rabbit polyclonal to Ki67 (货号: ab66154, 购于 Abcam), 免疫组织化学 SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验;计数资料以构成比表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者胃黏膜上皮细胞增殖情况比较 肝硬化组总体 PI、有 Hp 感染者 PI、无 Hp 感染者 PI 与对照组比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05);无论是肝硬化组[(42.3 \pm 16.1)% vs (26.7 \pm 13.5)% , $P = 0.003$],还是对照组[(35.2 \pm 17.9)% vs (20.6 \pm 13.9)% , $P = 0.006$],HP 感染者胃黏膜上皮细胞 PI 均较无 HP 感染者高。见表 2。

2.2 肝硬化组不同程度 PHG 胃黏膜细胞 PI 及与 Hp 感染的关系 随着 PHG 程度加重,胃黏膜上皮细胞 PI 递增,呈现 PI 重度 PHG $>$ 轻度 PHG $>$ 无 PHG ($P < 0.01$)。轻度及重度 PHG 合并 Hp 阳性者的 PI 均明显高于 Hp 阴性者(P 均 <0.01)。在 Hp 阴性者中,重度 PHG 的 PI 较轻度 PHG、无 PHG 患者更高(P 均 <0.01),而轻度 PHG、无 PHG 患者之间则相近($P > 0.05$)。重度 PHG 的 PI 与对照组比较,无论在阳性者或 Hp 阴性者中,差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。见表 2。

表 1 肝硬化患者和对照组的临床资料 例(%)

临床特征	肝硬化组($n=36$)	对照组($n=18$)
平均年龄(岁)	64 (36~77)	63 (30~76)
男性/女性(例)	17/19	9/9
HP 感染	19 (52.8)	10 (55.6)
十二指肠溃疡	5 (13.9)	2 (11.1)
胃溃疡	8 (22.2)	2 (11.1)
无溃疡性消化不良	23 (63.9)	14 (77.8)
慢性活动性胃炎	30 (83.3)	13 (72.2)
肠上皮化生	8 (22.2)	3 (16.7)
正常黏膜	6 (16.7)	5 (27.8)

表 2 肝硬化组不同程度 PHG 及对对照组胃黏膜细胞 Ki-67 的表达与 HP 感染的关系 (% , $\bar{x} \pm s$)

Hp 检测	肝硬化组								对照组	
	无 PHG		轻度 PHG		重度 PHG		总体		例数	PI
	例数	PI	例数	PI	例数	PI	例数	PI		
总体	11	21.4 ± 12.1	13	32.2 ± 14.6 ^a	12	49.4 ± 9.7 ^{abc}	36	34.7 ± 16.6	18	28.7 ± 17.5
Hp 阴性	6	20.2 ± 14.4	6	21.5 ± 9.4	5	40.8 ± 3.3 ^{abbc}	17	26.7 ± 13.5	8	20.6 ± 13.9
Hp 阳性	5	23.1 ± 10.2	7	42.8 ± 11.6 ^a	7	55.6 ± 7.7 ^{abc}	19	42.3 ± 16.1	10	35.2 ± 17.9
P 值	>0.05		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01	

注:与无 PHG 比较,^a $P < 0.05$,^{ab} $P < 0.01$;与轻度 PHG 比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$;与对照组比较,^c $P < 0.01$ 。

3 讨论

Ki-67 是一种与细胞周期密切相关的核抗原,存在于所有增殖的细胞中,可作为判断细胞增殖活性的指标^[11]。本文检测肝硬化组与非肝硬化的对照组胃黏膜上皮细胞 PI,结果显示:肝硬化组与对照组患者的胃黏膜上皮细胞 PI 无显著差别,提示肝硬化本身不会影响胃黏膜上皮细胞增生。但肝硬化合并 PHG 显著影响胃黏膜的细胞增殖,胃黏膜上皮细胞 PI 随着 PHG 的严重程度而递增,表明 PHG 尤其是重度 PHG 促进了胃黏膜上皮细胞的增殖。

已有报道, Hp 感染会导致胃黏膜上皮细胞的过度增殖。本文结果显示, Hp 感染增加了肝硬化患者的胃黏膜上皮细胞增殖;特别是重度 PHG 伴 Hp 感染的肝硬化患者的胃黏膜细胞 PI 最高,表明这两种因素可能起协同作用。上皮细胞过度增生增殖被认为是涉及到胃癌变的一个重要过程,本文结果与肝硬化患者患胃癌风险较高的流行病学研究结论一致,与胃癌和肝硬化之间关系的观察结果一致^[1-2]。

肝硬化合并 PHG 患者胃黏膜上皮细胞过度增殖原因尚不清楚。可以推测肝硬化患者的一些功能改变,如高胃泌素血症、高胃酸、前列腺素 E₂ 水平降低^[12]、胃黏膜电位差降低、一氧化氮合成酶活性增高、胃黏膜分泌改变等^[13-17],可能起一定作用。所有这些变化,加上胃黏膜血流的改变,可能致使胃黏膜对其他有害物质更加敏感,从而促进了涉及黏膜修复的胃上皮细胞的增殖过程。另一方面, PHG 患者胃黏膜灌注的改变可以改变细胞凋亡过程,从而促进上皮细胞增殖^[4-6]。这有待进一步深入研究。总之,本研究初步显示, PHG 和 Hp 感染显著影响肝硬化患者胃黏膜上皮细胞增殖,这两种因素可能是肝硬化患者胃癌风险增加的主要因素^[1]。

参考文献

[1] Zullo A, Romiti A, Tomaso S, et al. Gastric cancer prevalence in patients with liver cirrhosis [J]. Eur J Cancer Prev, 2003, 12(3): 179.
 [2] Sonnenberg A, Wasserman IH. Association of peptic ulcer and gastric cancer with other diseases in US veterans [J]. Am J Public Health,

1995, 85(9): 1252 - 1255.
 [3] Cubillas R, Rokey DC. Portal hypertensive gastropathy: a review [J]. Liver Int, 2010, 30(8): 1094 - 1102.
 [4] Mesihovic R, Prohic D, Gribajcevic M, et al. Portal hypertensive gastropathy (PHG) [J]. Med Arh, 2004, 58(6): 377 - 379.
 [5] Merli M, Nicolini G, Angeloni S, et al. The natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis and mild portal hypertension [J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(10): 1959 - 1965.
 [6] Garcia-Tsao G. Portal hypertension [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2006, 22(3): 254 - 262.
 [7] Mikami K, Otaka M, Watanabe D, et al. Zinc L-carnosine protects against mucosal injury in portal hypertensive gastropathy through induction of heat shock protein 72 [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(11): 1669 - 1674.
 [8] 白云, 姜慧卿, 路新卿, 等. 血管内皮生长因子在门脉高压患者胃黏膜的表达 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2007, 16(1): 63 - 65.
 [9] 陶小红. 门静脉高压性胃病 [J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(4): 254 - 256.
 [10] Gao W, Li HY, Wang LX, et al. Protective effect of omeprazole on gastric mucosal of cirrhotic portal hypertension rats [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(5): 402 - 406.
 [11] 李佳, 胡荣, 廖爱军, 等. 非霍奇金淋巴瘤中增殖指数 Ki-67 及其临床价值 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(4): 935 - 939.
 [12] Arroyo V, Moreau R. Tying up PGE2 with albumin to relieve immunosuppression in cirrhosis [J]. Nat Med, 2014, 20(5): 467 - 469.
 [13] Tache DE, Stănculescu CE, Banită IM, et al. Inducible nitric oxide synthase expression (iNOS) in chronic viral hepatitis and its correlation with liver fibrosis [J]. Rom J Morphol Embryol, 2014, 55(2 Suppl): 539 - 543.
 [14] Rafailidis S, Demertzidis C, Ballas K, et al. Effect of early propranolol administration on portal hypertensive gastropathy in cirrhotic rats [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(34): 4284 - 4289.
 [15] Kiga K, Mimuro H, Suzuki M, et al. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic Helicobacter pylori infection [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4497.
 [16] Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, et al. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(36): 12767 - 12780.
 [17] Wang JY, Hsieh JS, Chen FM, et al. Influence of portal hypertension on secretion of gastric mucus in rats [J]. Eur J Surg, 2000, 166(2): 170 - 174.