

# 二甲基亚硝胺所致大鼠肝硬化形成与逆转过程中 Thy1.1 与 OV6 阳性染色细胞比较

朱英, 刘平, 龙爱华, 吴云林, 肖家诚

朱英, 刘平, 龙爱华, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 201203  
吴云林, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 上海市 200025  
肖家诚, 上海第二医科大学附属瑞金医院病理科 上海市 200025  
朱英, 女, 1965-05-02 生, 江苏无锡人, 汉族. 1989 年锦州医学院本科毕业, 2001 年大连医科大学硕士研究生毕业, 副主任医师. 现于上海中医药大学肝病研究所攻读博士学位, 主要研究肝脏纤维化的中西医结合治疗.  
国家杰出青年科学基金资助项目, NO. 39825128  
通讯作者: 刘平, 201203, 上海市张江蔡伦路 1200 号, 上海中医药大学肝病研究所. liuliver@online.sh.cn  
电话: 021-51322059  
收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-02-16

## Comparison of Thy1.1 with OV6 in hepatic oval cell marking during formation and reversion of rat cirrhosis induced by dimethylnitrosamine

Ying Zhu, Ping Liu, Ai-Huan Long, Yun-Lin Wu, Jia-Cheng Xiao

Ying Zhu, Ping Liu, Ai-Huan Long, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China  
Yun-Lin Wu, Department of Digestion, Ruijin Hospital, the Second Medical University of Shanghai, Shanghai 200025, China  
Jia-Cheng Xiao, Department of Pathology, Ruijin Hospital, the Second Medical University of Shanghai, Shanghai 200025, China  
Supported by National Excellent Youth Science Foundation of China, No. 39825128  
Correspondence to: Dr. Ping Liu, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Zhangjiang, Shanghai 201203, China. liuliver@online.sh.cn  
Received: 2004-12-17 Accepted: 2005-02-16

### Abstract

**AIM:** To screen the best marker for hepatic oval cells (HOC) by comparing the dynamic changes of Thy1.1 and OV6 expression in the hepatic tissue during the formation and reversion of dimethylnitrosamine (DMN)-induced cirrhosis in rats.

**METHODS:** Rat cirrhosis model was induced by DMN treatment (12 times in 4 weeks). The degree of liver fibrosis was determined by collagen staining. The expression of OV6 and Thy1.1 in various hepatic cells were examined by immunohistochemistry. Thy1.1 positive cells were enumerated under light microscope, and the cell protein was quantified by Western blot.

**RESULTS:** The most typical cirrhosis in the model was observed at the 4th week after DMN injection, which was combined with large area of hemorrhage and putrescence.

These changes started to alleviate at the 6th week with a few incomplete fiber septa. The inflammation was lessened distinctly at the 8th week, mainly manifested as incomplete fiber septa. OV6 positive cells were presented in both HOC and normal cholangial epithelia. There were no Thy1.1 positively stained cells in the normal tissues. Very few Thy1.1 positive cells started to appear on the 3rd day, dispersed at the 2<sup>nd</sup> week, increased significantly at the 4th week around the fiber septa, reached the peak at the 6<sup>th</sup> week (i.e. 2 week after stopping DMN injection) which was distributed mainly in the periportal district, and decreased at the 8<sup>th</sup> week. The results of Western blot and the number of HOC were consistent with each other.

**CONCLUSION:** During the formation and reversion of the rat cirrhosis, Thy1.1 is superior to OV6 in marking HOC with better specificity and sensitivity.

**Key Words:** Thy1.1; OV6; Hepatic oval cell; Rats, Liver cirrhosis; Dimethylnitrosamine

Zhu Y, Liu P, Long AH, Wu YL, Xiao JC. Comparison of Thy1.1 with OV6 in hepatic oval cell marking during formation and reversion of rat cirrhosis induced by dimethylnitrosamine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):953-957

### 摘要

**目的:** 在二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)致大鼠肝硬化形成与消减过程中, 比较 Thy1.1 与 OV6 标记肝脏卵圆细胞(hepatic oval cells, HOC)的不同变化, 从而选择最佳的 HOC 标记物。

**方法:** 应用 DMN 腹腔注射(4 wk 12 次)制备大鼠肝硬化模型, 进行胶原组织染色动态观察肝纤维化程度, 免疫组化检测 Thy1.1 和 OV6 的不同阳性染色细胞表达, 光镜下进行 Thy1.1 标记的 HOC 计数, western blot 进行该标记细胞的蛋白定量测定。

**结果:** DMN 造模 4 wk 大鼠已形成典型的肝硬化;终止造模后 2 wk、即 6 wk 时肝组织病变较 4 wk 时有所减轻出现不完全纤维间隔, 8 wk 时炎症明显减轻并以不完全纤维间隔为主。OV6 在各时间点除了卵圆细胞表达外, 也于正常胆管上皮细胞表达。正常大鼠肝组织未见 Thy1.1 阳性染色的细胞, 3 d 时可见卵圆细胞微量

表达, 2 wk 时呈散在分布, 4 wk 时明显增多, 见于纤维间隔周围, 终止造模后 2 wk、即第 6 wk 时阳性染色显著强于 4 wk, 大量出现于汇管区, 8 wk 时较 6 wk 有所减少, 表达量基本与 4 wk 时相等. Thy1.1 标记的 HOC Western blot 结果与细胞计数一致.

**结论:** 在 DMN 大鼠肝硬化形成与消减过程中, Thy1.1 标记肝脏卵圆细胞优于 OV6, 具有特异性和敏感性.

**关键词:** Thy1.1; OV6; 肝脏卵圆细胞; 大鼠; 肝硬化; 二甲基亚硝胺

朱英, 刘平, 龙爱华, 吴云林, 肖家诚. 二甲基亚硝胺所致大鼠肝硬化形成与逆转过程中 Thy1.1 与 OV6 阳性染色细胞比较. 世界华人消化杂志 2005;13(8):953-957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/953.asp>

## 0 引言

在肝硬化形成过程中, 干细胞在肝脏损伤的修复过程中具有重要的作用<sup>[1]</sup>. 位于胆小管内的肝脏卵圆细胞(HOC)从汇管区向外迁移, 伸入肝小叶并分化形成肝细胞或胆管上皮细胞<sup>[2]</sup>. 因此对肝脏干细胞的标记在肝纤维化干细胞机制研究中具有重要的作用. OV6 是该干细胞的特异标记物, 但 Thy1.1 是骨髓造血干细胞标志物, 肝脏卵圆细胞在表达自身特有标志物外, 还表达骨髓造血干细胞标志物. 我们采用 DMN 制备的大鼠肝硬化模型, 动态观察该模型形成与消减过程中 Thy1.1 与 OV6 阳性表达 HOC 的不同变化, 从而选择 HOC 的特异性标记物.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级 Wister 大鼠由中科院上海实验动物中心提供. 小鼠抗人 OV6mAb 由瑞金医院感染科谢青教授惠赠. 小鼠抗大鼠 Thy1.1mAb 购自 Serotec 公司, 羊抗小鼠 IgGmAb 及 DAB 底物显色系统试剂盒购自长岛试剂公司. 二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN) 为东京化成工业株式会社产品. Wister 大鼠 45 只, 雄性, 体重为  $180 \pm 20$ g. 随机取 15 只作为正常对照组, 30 只用于模型的制备. 参照 Jenkins *et al*<sup>[3]</sup> 的方法制备 DMN 肝硬化模型. 按 DMN 10 mg/kg (用生理盐水稀释) 处理动物 ip, 每周连续 3 d, 每日 1 次, 共 4 wk; 正常对照大鼠 ip 同等量生理盐水; 分别于 DMN ip 造模后 3 d, 2, 4, 6 及 8 wk 随机取模型大鼠 6 只, 正常大鼠 3 只进行动态观察. 大鼠予戊巴比妥钠 40 mg/kg ip 麻醉后, 仰卧位固定, 打开腹腔, 取 0.3-0.4 cm 厚肝组织, OTC 液包埋, 液氮迅速冷冻, 用恒冷切片在  $-20^{\circ}\text{C}$  下进行 6  $\mu\text{m}$  厚连续冰冻切片, 用于免疫组化染色. 取 1.0 cm  $\times$  0.8 cm  $\times$  0.3 cm 大小肝组织, 40 g/L 中性甲醛液固定, 24 h 后逐级酒精脱水, 二甲苯透

明,  $56^{\circ}\text{C}$  石蜡包埋, 4  $\mu\text{m}$  厚切片, 用于胶原染色. 取 0.5 g 大小肝组织, 投入液氮中用于抽提总蛋白.

### 1.2 方法

**1.2.1 天狼星红染色** 石蜡切片常规脱蜡至水; 加天狼星红后置湿盒 30 min, 纯酒精分化 2 s, 脱水、透明, 中性树胶封片. 胶原纤维增生程度图像分析: 应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统 (HPIAS-1000 型, 同济医大干屏影像工程公司), 在  $20 \times 10$  放大倍数下, 每个时间点各取 3 只大鼠的肝组织切片, 每张切片随机选 5 个不同视野, 对阳性染色区域进行图像半定量分析, 以 5 个不同视野面积百分比的平均值为每张切片半定量数值.

**1.2.2 免疫组织化学** 免疫组织化学样本制备采用两步法: 取冰冻肝组织切片, 丙酮固定 10 min, 3 mL/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温 30 min,  $37^{\circ}\text{C}$  温育的小牛血清封闭 30 min, 加抗大鼠 OV6 及 Thy1.1 抗体 (1:50 稀释) 孵育, 盖好湿盒, 置  $37^{\circ}\text{C}$  1 h; 加 Two-Step<sup>TM</sup> Anti-mouse Detection Reagent (HRP), 盖上湿盒,  $37^{\circ}\text{C}$  30 min. 加 DAB 显色 3-5 min. 苏木精液衬染细胞核 10 s. 中性树胶封片. PBS 替代 I 抗作为空白对照染色. 光镜下 ( $10 \times 10$ ) 观察 Thy1.1 免疫组化染色细胞的分布, 并且每个时间点各取 6 只大鼠的肝组织切片, 每张切片随机选择 5 个不同视野, 在  $20 \times 10$  放大倍数下, 应用计数器对阳性染色细胞进行计数, 以 5 个不同视野计数的平均值为每张切片阳性细胞的计数值.

**1.2.3 Western blot 检测** 总蛋白提取: 取 100 mg 湿肝用预冷生理盐水中洗净, 置预先加入 0.9 mL 匀浆液试管中 ( $4^{\circ}\text{C}$  预冷), 于冰浴中以 5 000 r/min 匀浆 20 s, 将肝组织匀浆液立即移至预先加入 0.1 mL SPMF ( $10 \times$ ) 的 1.5 mL 离心管中, 低温高速离心机 12 000 g, 离心 10 min, 取其上清液按 Bio-Rad 试剂测总蛋白量. 蛋白质电泳: 制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 150 g/L 分离胶、50 g/L 积层胶, 将蛋白样品及标准蛋白与 4 倍样品缓冲液混合后沸水煮 5 min 变性, 每孔上样定量 50  $\mu\text{g}$  蛋白质. 电泳条件: 电压 80V, 时间 150 min. 蛋白质的电转移与膜的封闭: 电泳后将凝胶取出, 上覆与凝胶同样大小硝酸纤维素膜, 两侧铺垫滤纸及纤维垫, 置于转膜槽中, 凝胶朝向负极. 转膜条件: 电压 100V, 时间 60 min, 温度  $4^{\circ}\text{C}$ . 转移结束后, 取出硝酸纤维素膜, 丽春红染色, 用铅笔标出标准蛋白位置, 水洗脱色后, 以 5% 脱脂奶粉封闭, 室温振荡 1-2 h. 抗原抗体反应: 封闭结束后, 将膜放入塑料皿中, 加入溶有 I 抗 Thy1.1 的封闭液 (1:200 稀释),  $4^{\circ}\text{C}$  过夜. 取出膜, TTBS 洗 4 次, 约 30 min, 除去过量的 I 抗, 然后放入含 II 抗 (1:5000) 的 50 g/L 脱脂奶粉中, 室温振荡 30-60 min, TTBS 洗 5 次, 约 40 min, 洗去未

结合的II抗. ECL显影和曝光:取等量ECL(1、2)ECL试剂,混匀,将膜浸入,静置5 min,取出后以保鲜膜包好放置约10 min,移入暗室曝光3-5 min,将X光胶片显影2 min,定影5 min,水洗、干燥.

**统计学处理** 上述胶原纤维半定量及细胞计数数据应用计算机统计软件SPSS10.0中的ANOVA程序进行单因素方差分析,并用LSD程序进行两两比较, $P<0.05$ 表示具有显著性差异.

## 2 结果

### 2.1 肝组织胶原纤维增生 肝组织切片天狼星红染色镜

下所见,正常组在汇管区只见极少量胶原纤维;造模3 d时于汇管区及中央静脉壁见少量胶原纤维;随着时间的延续,肝纤维化的程度不断加深,于造模2 wk出现不完全纤维间隔;于造模4 wk肝纤维化显著,可见较粗的纤维隔包绕肝组织形成假小叶;终止造模后,纤维化程度有所减轻,6 wk时仍以致密较细的完全纤维间隔为主;8 wk时肝组织内的完全纤维隔明显减少,以不完全纤维间隔为主(图1A-E及图5).

**2.2 Thy1.1免疫组织化学检测及染色观察** 正常大鼠肝脏组织中未见到阳性染色,造模3 d时见微量表达,2 wk时出现散在的阳性染色细胞,为胞质染色;4 wk

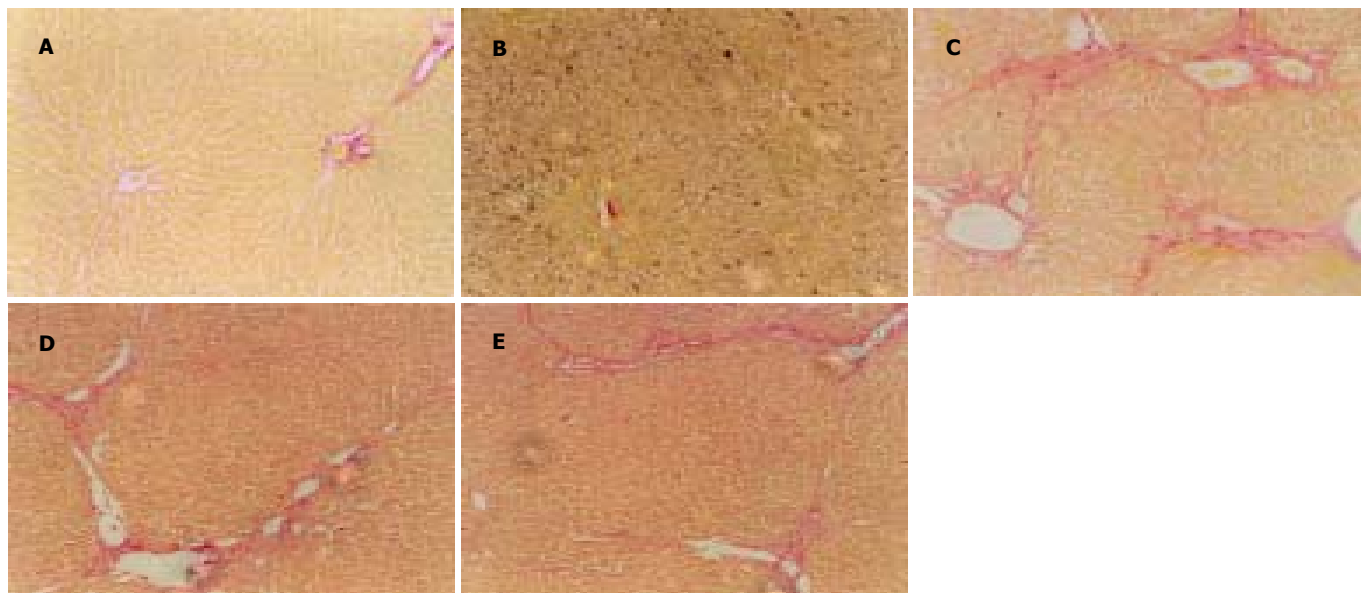


图1 DMN肝硬化大鼠肝组织胶原纤维增生的动态变化( $\times 100$ ). A: 正常大鼠,肝组织汇管区见少量胶原纤维; B: DMN造模3 d,可见出现出血坏死灶,仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维; C: DMN模型4 wk,胶原纤维大量沉积,成完全间隔包绕肝组织形较多的假小叶; D: 模型6 wk、即终止DMN造模后2 wk,肝纤维化略有减轻,但仍有较多的完全纤维间隔; E: 模型8 wk,肝纤维化明显减轻,呈不完全纤维间隔.

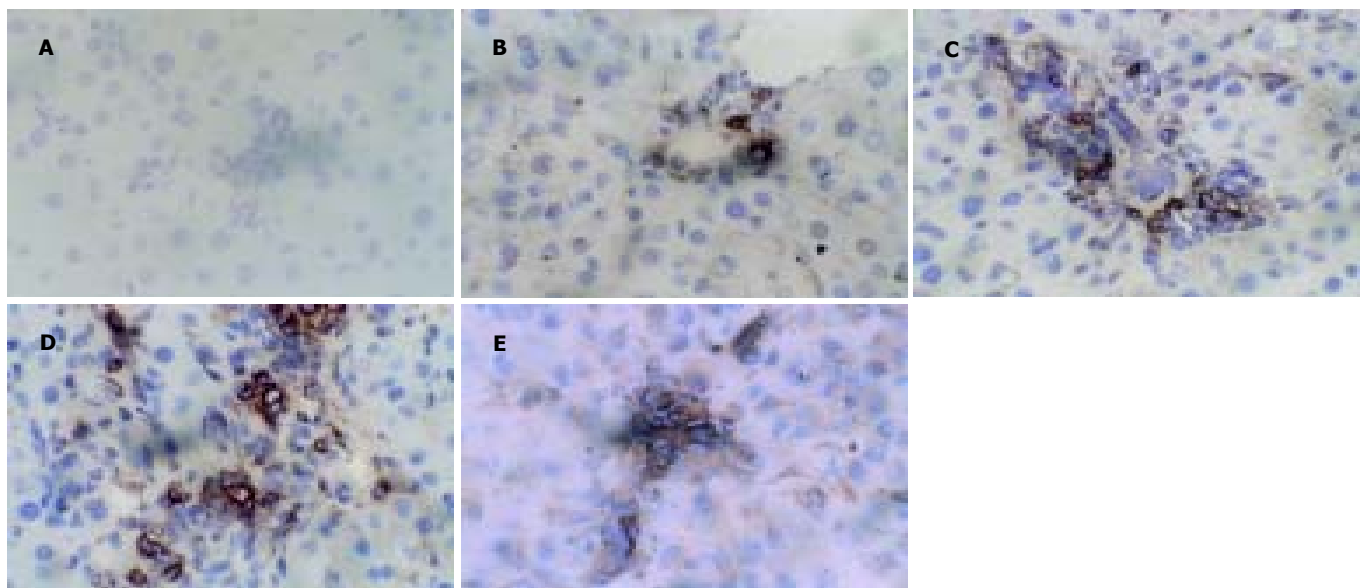


图2 DMN肝硬化大鼠肝Thy1.1免疫组织化学阳性染色的动态变化( $\times 400$ ). A: 正常大鼠,未见阳性染色; B: DMN造模3 d,微量阳性细胞染色; C: DMN造模4 wk,阳性细胞染色显著增多,主要出现于纤维间隔周围,所形成的胆管上皮细胞也有染色; D: 6 wk、即终止DMN造模后2 wk,汇管区出现大量阳性染色细胞,形成团簇样并形成胆小管; E: 模型8 wk,阳性染色细胞较6 wk时减少,散在分布.

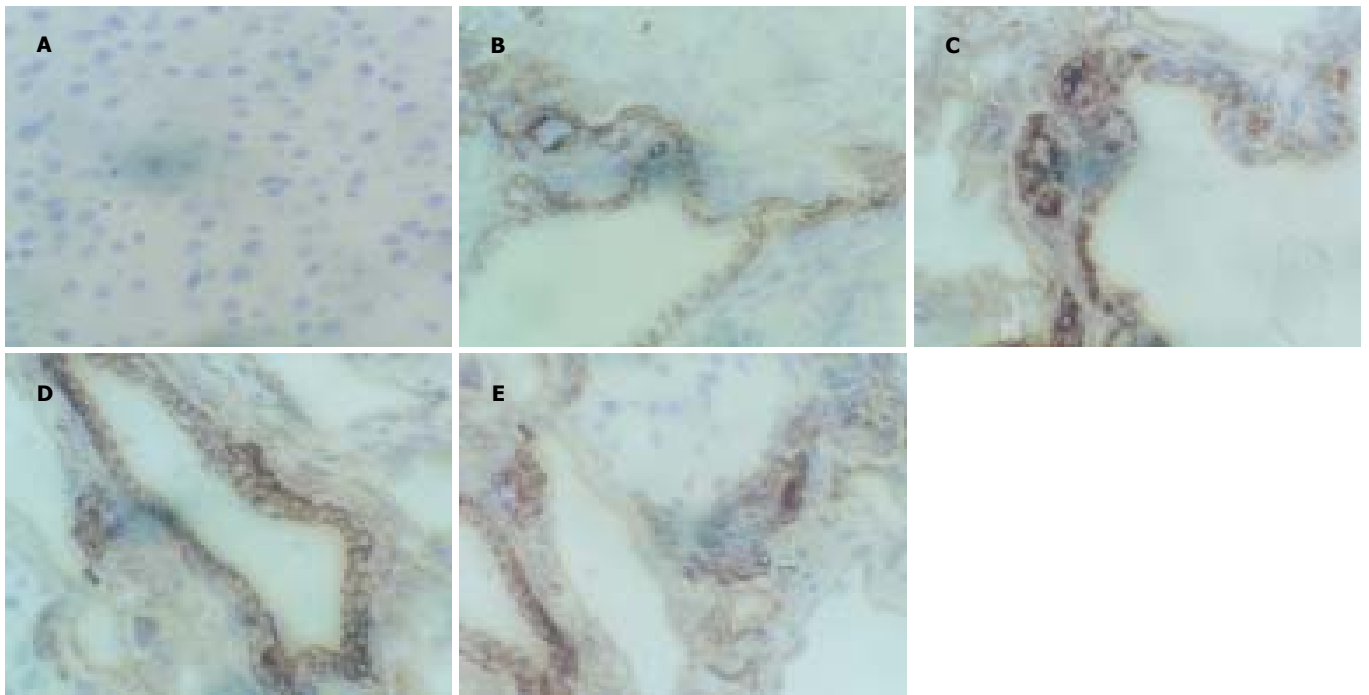


图3 DMN肝硬化大鼠肝OV6免疫组织化学阳性染色的动态变化( $\times 400$ )。A: 阴性对照大鼠, 未见阳性染色; B: DMN造模3 d, 可见正常胆管上皮细胞及少许阳性细胞染色; C: DMN造模4 wk, 除了正常胆管上皮细胞染色之外, 阳性细胞染色显著增多, 主要出现于纤维间隔周围; D: 终止DMN造模后2 wk, 出现大量散在的阳性染色细胞; E: 终止DMN造模后4 wk, 阳性染色细胞减少。

时阳性染色细胞增多, 主要出现于纤维间隔周围, 新生成的胆管上皮细胞也有染色; 终止造模后2 wk, 即6 wk时于汇管区可见大量阳性染色细胞, 呈簇团样, 并且染色的新生成胆管上皮细胞数量明显增多, 8 wk阳性染色细胞较6 wk明显减少, 呈散在分布(图2A-E)。光镜下( $10\times 10$ )观察免疫组化染色阳性的分布, 并且每个时间点各取6只大鼠的肝组织切片, 每张切片随机选择5个不同视野, 在 $20\times 10$ 放大倍数下, 应用计数器对阳性染色细胞进行计数, 以5个不同视野计数的平均值为每张切片阳性细胞的计数值阳性染色细胞计数(图6)。

**2.3 OV6免疫组织化学** 正常大鼠可见正常胆管上皮细胞染色, 其他时间点除了胆管上皮细胞染色外, 其余染色同Thy1.1(图3A-E)。

**2.4 Thy1.1 Western blot分析** 与免疫组化计数基本一致, 正常组无表达, 造模3 d开始出现微量表达, 造模2 wk表达量有所增加, 造模4 wk明显增加, 于6 wk达高峰, 8 wk开始下降相当于4 wk水平(图4)。

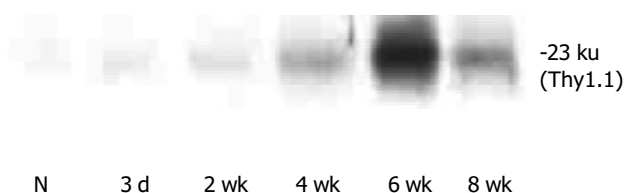


图4 Western blot: 正常组无表达, 3 d微弱表达, 2 wk有所增加, 4 wk明显增加, 6 wk达高峰, 8 wk开始下降至4 wk水平。

### 3 讨论

DMN制备的肝硬化大鼠模型, 肝脏组织学动态观察结果显示, 在造模4 wk时已形成典型的肝硬化, 在终止DMN造模后其肝组织病理改变有所缓解, 终止造模后2 wk, 肝组织纤维间隔变细, 部分呈现为不完全纤维间隔, 8 wk肝组织纤维化程度已见明显减轻, 以不完全纤维间隔为多见; 这一动态的变化过程为我们提供了分析探讨肝硬化消减的病理生理反应的良好模型。OV-6可识别正常大鼠肝脏的胆管细胞和结节中肝细胞, 但主要识别致癌物处理肝脏中的卵圆细胞, 在人类肝脏由OV-6识别的抗原决定簇的细胞分布比大鼠复杂得多。在观察人类肝脏生长、分化和损伤中, 他能够鉴别所公认的祖代细胞和所产生的亚群(OC. 2、OC. 3)。并且在即往的很多动物实验研究中也应用该指标作为HOC的鉴别标准。

Thy-1是用来鉴别造血干细胞的种系特异性标志物。Thy-1在CD34阳性细胞中表达最高, 并且当造血干细胞开始表达其分化细胞类型(如CD45RA, CD38, 和CD71)时, 他的表达开始下降<sup>[3]</sup>。Thy-1在大鼠造血干细胞的表达强于小鼠和人, 除了造血系统外, 还在大脑、乳房等的上皮细胞表达Thy-1抗体能够刺激细胞内的 $Ca^{2+}$ 释放和胞质蛋白质磷酸化, 参与细胞的识别、黏附和T细胞的激活。Thy-1不在成年肝脏正常表达, 但在胎肝中表达, 而且在被损害肝脏的表达仅限于肝脏中被激活的卵圆细胞。大鼠实验表明卵圆细胞表达高水平的Thy-1, 同时也表达AFP、GGT、CK-19、

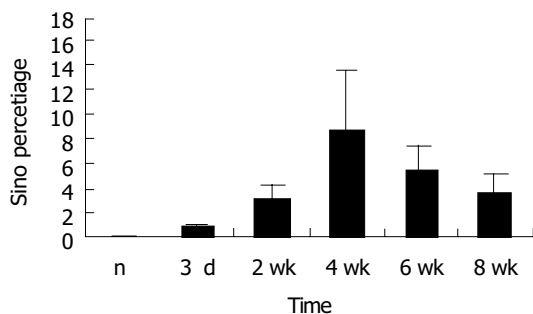


图5 胶原纤维半定量分析: 正常组无胶原存在, 3 d开始胶原量逐渐增加, 于4 wk达高峰, 之后于6 wk和8 wk逐渐下降。

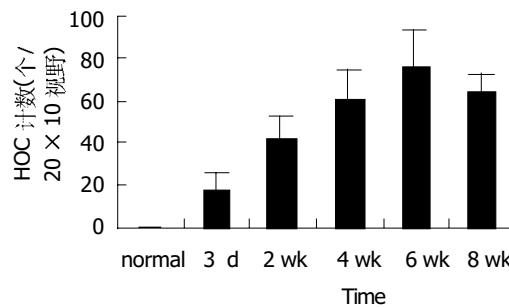


图6 HOC记数: 正常组无该细胞, 3 d时出现少量该细胞, 于2 wk和4 wk逐渐增加, 于6 wk达高峰, 8 wk下降相当于4 wk和6 wk水平。

OC. 2 和 OV-6 等所有已知鉴别卵圆细胞的标志物<sup>[4-5]</sup>。

我们应用 OV6 和 Thy1.1 作为 HOC 的标志物进行酶免疫组化的观测结果显示, OV6 在各时间点除了在 HOC 表达外, 在正常胆管上皮细胞也表达。而 Thy1.1 阳性细胞表达量在 DMN 大鼠肝硬化形成与消减的动态演变过程中呈现出随着肝硬化形成而逐渐增加, 肝硬化消减早期表达量剧增的特征性变化。在正常对照大鼠的肝组织内未见到阳性表达, DMN 腹腔注射 3 d 后, 大鼠肝组织内即可见到阳性表达, 其后随着造模时间的延长, 阳性表达逐渐增强, 终止造模因子 DMN 刺激后 2 wk, 其表达量达到高峰, 在终止造模后 4 wk, 又恢复到造模 4 wk 时的水平。这一变化特征不仅在肝组织内阳性染色与阳性细胞计数呈现一致性, 且在 Western blot 分析结果中得到进一步证实。Thy1.1 阳性细胞在肝组织内表达部位, 造模 3 d 时主要位于汇管区, 造模 2 wk 时出现散在的阳性染色细胞, 为胞质染色; 造模 4 wk 时阳性染色细胞增多, 已出现于纤维间隔周围; 6 wk 时于汇管区出现大量阳性染色细胞, 并形成团簇样并形成新的胆小管, 纤维间隔周围染色显著增强; 于 8 wk 时阳性染色细胞开始减少, 呈散

在分布。实验表明应用 Thy-1 抗体作为一种鉴别卵圆细胞新的标志物, 能够获得大量的卵圆细胞, 为 HOC 特异性的标志物时也已有研究表明, 应用流式细胞计数法可以分离到 95-97% 的纯 Thy-1 卵圆细胞种群。因此, Thy-1 在将来的体内和体外肝卵圆细胞研究中, 在细胞分类方面将成为有力的工具。

#### 4 参考文献

- 1 Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *PNAS* 2003;100(Suppl 1):11881-11888
- 2 Xiao JC, Jin XL, Ruck P, Adam A, Kaiserling E. Hepatic progenitor cells in human liver cirrhosis: Immunohistochemical, electron microscopic and immunofluorescence confocal microscopic findings. *World J Gastroenterol* 2004;10:1208-1211
- 3 Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martínez-Marín JA, de Andrés B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MAR. A population of c-Kit<sup>low</sup>(CD45/TER119)-hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003;112:1152-1163
- 4 Yang LJ, Li SW, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *PNAS* 2002;99:8078-8083
- 5 杨明智, 闵军, 陈积圣, 陈汝福, 彭志海. 体外诱导大鼠骨髓干细胞向肝细胞横向分化. *中华医学杂志* 2003;83:603-604

编辑 潘伯荣 审读 张海宁