论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0250-04

慢性乙型肝炎患者肝组织 CXCR3 及其配体 IP 10 表达与肝脏炎症程度、纤维化的相关性研究

杨 华[1],罗亚文[2],刘华庆[1],侯 文[1],李 佳[2] (563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院:病理科[1],感染科[2])

[摘要] **目的** 检测 CXC 趋化因子 3(CXC chemokine receptor 3, CXCR3)及配体干扰素-γ 诱导蛋白-10(inducing protein-10, IP 10)在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B,CHB)患者肝组织中的表达,探讨其与肝脏炎症及纤维化程度的关系。**方法** 对 60 例 CHB 患者及 20 例健康者肝穿病理检查进行炎症分级(G)及纤维化分期(S),其中 G2 以上定为重度炎症组;免疫组织化学方法检测肝组织 CXCR3、IP 10 蛋白的表达,并与肝脏炎症分级及纤维化分期进行统计学分析。**结果** 60 例 CHB 患者肝组织中 CXCR3(2.55±0.90)及 IP 10(2.73±0.76)的表达均高于正常对照组(0.70±0.57, 0.60±0.50;$P<0.01$)。随着肝组织炎症及纤维化程度的加重 CXCR3、IP 10 水平逐渐上升,但在肝纤维化组仅 S1、S2 组间有显著性差异($P<0.05$); CXCR3、IP 10 与 CHB 炎症及纤维化程度呈正相关(r 分别为 0.707, 0.788, 0.624, 0.737, $P<0.01$)。重度炎症组(G3、G4):在炎症程度相同情况下,不同肝纤维化组间 CXCR3、IP 10 水平差异不明显。肝组织 CXCR3、IP 10 水平呈正相关($r=0.675$; $P<0.01$)。**结论** 肝组织 CXCR3 及配体 IP 10 的表达参与 CHB 患者肝脏炎症及纤维化形成,但与炎症程度的关系更密切。

[关键词] 慢性乙型肝炎;CXC 趋化因子受体 3;干扰素-γ 诱导蛋白-10;肝炎症;肝纤维化
[中图法分类号] R512.62; R392.11; R392.3 [文献标志码] A

CXCR3 and IP 10 expression in patients with chronic hepatitis B and their correlation with degree of liver inflammation and hepatic fibrosis

Yang Hua[1], Luo Yawen[2], Liu Huaqing[1], Hou Wen[1], Li Jia[2] ([1]Department of Pathology, [2]Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

[**Abstract**] **Objective** To study expressions of CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) and interferon-γ inducing protein-10 (IP 10) in liver tissues of chronic hepatitis B (CHB) patients and to elucidate their correlation with liver inflammation and degree of hepatic fibrosis. **Methods** Sixty CHB patients and twenty healthy volunteers were given liver puncture biopsy. The subjects were classified according to biopsy results of the degree of inflammation (G) and fibrosis staging (S). Inflammation degree that was more than G2 was identified as severe inflammation. Protein expressions of CXCR3 and IP 10 were detected by immunohistochemistry, and their correlation with liver inflammation grade and fibrosis stage was statistically analyzed. **Results** Expressions of CXCR3 (2.55±0.90) and IP 10 (2.73±0.76) in liver tissues of 60 CHB patients were significantly higher than those of the healthy controls (0.70±0.57, 0.60±0.50; $P<0.01$). As the degree of liver inflammation and fibrosis aggravated, the levels of CXCR3 and IP 10 increased gradually. In liver fibrosis group, however, significant difference only existed between group S1 and S2 ($P<0.05$). Expressions of CXCR3 and IP 10 were positively correlated with degree of inflammation and fibrosis in CHB ($r=0.707$, 0.788, 0.624, 0.737, respectively; $P<0.01$). In severe inflammation groups (G3 and G4), expressions of CXCR3 and IP 10 showed no significant difference among varying degrees of hepatic fibrosis. There was a positive correlation between expression of CXCR3 and IP 10 in liver tissues ($r=0.675$, $P<0.01$). **Conclusion** CXCR3 and IP 10 play an important role in the course of liver inflammation and fibrosis in CHB patients, but their correlation with degree of liver inflammation is closer.

[**Key words**] chronic hepatitis B; CXCR3; IP 10; liver inflammation; liver fibrosis

Supported by the Starting Foundation for Scientific Research of Masters of Zunyi Medical College [(2007)58]. Corresponding author: Luo Yawen, E-mail: luoyw719@163.com

[基金项目] 遵义医学院硕士科研启动基金(院字(2007)58 号)
[通信作者] 罗亚文,E-mail:luoyw719@163.com

研究表明,淋巴细胞等通过表达特定受体分子,在被相应的趋化性细胞因子吸引、招募后,可定向迁移至感染部位产生免疫应答或炎症反应[1]。近年的研究发现 CXC 趋化因子 3(CXC chemokine receptor 3, CXCR3)及配体干扰素-γ 诱导蛋白-10(inducing protein-10, IP 10)的相互作用与多种疾病有关[2-3]。目前认为针对乙型肝炎病毒的免疫应答是造成慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)肝脏炎症损伤的主要原因,肝脏局部呈现以淋巴细胞等浸润为主的病理特征。肝活检组织免疫组化染色是反映局部病变的直接证据,本研究通过免疫组织化学法检测 CXCR3 及其配体 IP 10 在 CHB 患者肝组织中的表达,探讨肝组织 CXCR3 及 IP 10 水平与肝脏炎症、纤维化程度的关系,进一步为 CHB 的免疫学治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

山羊抗人 IP 10 单克隆抗体、小鼠抗人 CXCR3 单克隆抗体购自美国 R&D 公司(成都基因公司代理),IP 10 的工作浓度 1∶20,CXCR3 的工作浓度 1∶200;二步法抗山羊试剂盒购自北京中杉生物技术公司,二步法抗小鼠试剂盒购自成都基因公司;DAB 显色试剂盒购自成都基因公司。

1.2 研究对象

遵义医学院附属医院 2008 年 1 月至 2010 年 10 月收治的 CHB 患者 60 例,其中男性 45 例,女性 15 例,年龄 17 ~ 74 岁(平均 41.31 岁);20 例正常对照肝组织取自肝脾外伤(无肝病,乙型肝炎表面抗原阴性)者。

1.3 肝脏组织病理学检查

60 例患者在第 1 次就诊后均采用 B 超引导下,以直径 0.2 cm 穿刺针经皮穿刺肝脏右叶获取活体组织检查,肝穿刺标本长度不短于 1.5 cm,以 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,HE 染色,评价标本的组织病理学特点,评价炎症分级和纤维化分期标准参照 2000 年 9 月修订的《病毒性肝炎防治方案》[4]。

1.4 免疫组织化学染色

采用 EnVision 二步法做 CXCR3 和 IP 10 免疫组织化学染色,DAB 溶液显色,苏木精复染,镜检,正常肝组织为对照。染色结果采用半定量方法,光学显微镜下随机计测 5 个独立高倍视野(×200)中阳性细胞数;将染色强度分为 4 级:无色 0 分,细胞和(或)细胞间质染色浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分。阳性细胞百分率:<5% 为 0 分,5% ~25% 为 1 分,26% ~75% 为 2 分,>75% 为 3 分。所有标本由病理科 3 名高级职称人员分别对着色强度分级进行判断及打分,如 3 人判断同一标本着色强度均相同则纳入研究对象。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析和 t 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析。

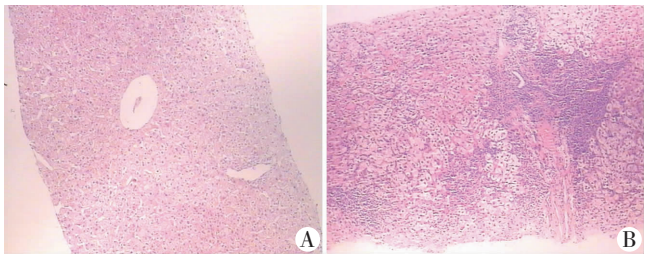
2 结果

2.1 肝脏穿刺组织病理学结果

60 例 CHB 患者肝穿刺炎症分级(G)及纤维化分期(S)结果见表 1。将 G2 以上定为重度炎症组:其中 G3S2 7 例(11.7%),G3S3 13 例(21.7%),G4S3 2 例(3.3%),G4S4 6 例(10.0%)。镜下观察炎症程度从门管区炎症、轻度汇管区周围炎到重度汇管区周围炎不同表现,小叶出现炎症伴无肝细胞坏死到较大灶状坏死、桥接坏死不等;纤维化程度从无纤维化、轻度纤维化到纤维间隔形成,最后可有一定肝硬化表现(图 1)。

表 1 60 例 CHB 患者肝穿刺组织炎症分级及纤维化分期结果

炎症分级	纤维化分期					合计
	S0	S1	S2	S3	S4	
G0	0	0	0	0	0	0
G1	10	4	0	0	0	14
G2	3	9	6	0	0	18
G3	0	0	7	13	0	20
G4	0	0	0	2	6	8
合计	13	13	13	15	6	60



A:G2S1;B:G4S3

图 1 肝穿刺组织炎症分级和纤维化分期表现 (HE ×100)

2.2 肝脏穿刺组织 CXCR3、IP 10 表达

60 例 CHB 患者肝穿刺组织中均检测到 CXCR3 及 IP 10 的表达,均显著高于正常对照组[(2.55 ±0.90) *vs* (0.70 ±0.57) 和(2.73 ±0.76) *vs* (0.60 ±0.50), $P < 0.001$];且随肝脏炎症及纤维化程度的加重其水平逐渐上升,见表 2、3。IP 10 水平在不同炎症分级组间比较均有显著性差异($P < 0.05$),CXCR3 水平除 G1、G2 间外,其余组间差异均有显著性($P < 0.05$);IP 10、CXCR3 水平在不同纤维化分期组间比较仅 S1、S2 间差异有显著性($P < 0.05$)。重度炎症组(G3、G4):在 G3S2 与 G3S3 间及 G4S3 与 G4S4 间 CXCR3、IP 10 水平比较均无显著性差异($P > 0.05$)。

IP 10 的阳性反应位于肝细胞、胆管上皮细胞、窦内皮细胞、Kupffer 细胞、浸润的炎细胞,在正常对照肝组织中呈弱阳性表达,在 CHB 肝组织不同炎症分级和纤维化分期中的表达见图 2;CXCR3 的阳性反应位于汇管区及小叶内的淋巴细胞、肝细胞,在正常对照肝组织中为阴性或仅呈弱阳性,CXCR3 在 CHB 肝组织不同炎症分级和纤维化分期中的表达见图 3。

表 2 不同炎症分级 CHB 患者 CXCR3、IP 10 水平比较($\bar{x} \pm s$)

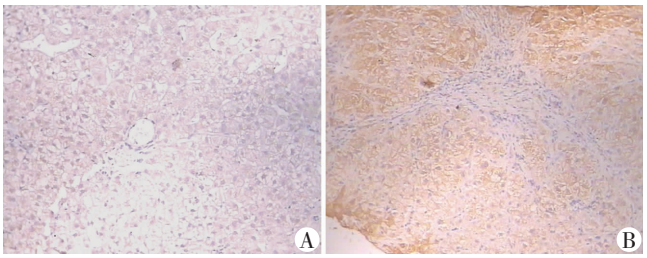
炎症分级	n	IP 10	CXCR3
G1	14	1.96 ±0.13	1.89 ±0.48
G2	18	2.41 ±0.54[a]	2.02 ±0.55
G3	20	3.15 ±0.58[b]	3.00 ±0.72[b]
G4	8	3.75 ±0.37[d]	3.75 ±0.70[c]
F 值		31.57	22.68
P 值		<0.01	<0.01

a: $P < 0.05$, 与 G1 比较; b: $P < 0.01$, 与 G2 比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与 G3 比较

表3 不同纤维化分期CHB患者CXCR3、IP 10水平比较($\bar{x} \pm s$)

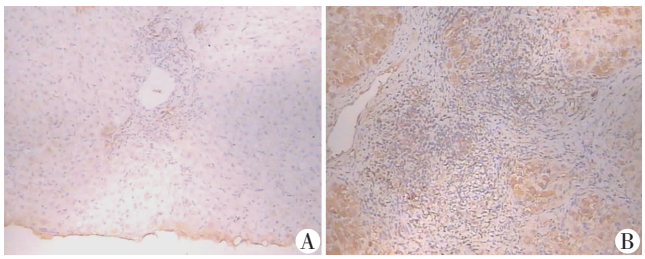
纤维化分期	n	IP 10	CXCR3
S0	13	2.03 ±0.32	1.73 ±0.59
S1	13	2.26 ±0.52	1.96 ±0.43
S2	13	2.92 ±0.49[a]	2.84 ±0.55[a]
S3	15	3.26 ±0.70	2.80 ±0.86
S4	6	3.66 ±0.40	3.33 ±0.81
F值		17.17	10.54
P值		<0.01	<0.01

a:$P<0.05$,与S1比较



A:在G1中弱表达;B:在G4中强表达

图2 免疫组化观察不同炎症分级肝穿刺组织中IP 10的表达 (EnVision ×200)



A:在S2中弱表达;B:在S4中强表达

图3 免疫组化观察不同纤维化分期肝穿刺组织中CXCR3的表达 (EnVision ×200)

2.3 相关性分析

肝组织CXCR3、IP 10水平与CHB炎症及纤维化程度呈正相关,r分别为0.707、0.788、0.624、0.737;$P<0.01$。肝组织CXCR3、IP 10水平呈正相关($r=0.675$, $P<0.01$)。

3 讨论

乙型肝炎病毒感染引起肝脏炎症主要因淋巴细胞大量浸润所致,这个过程对疾病的结局有重要的影响。趋化因子是反映炎症活动的新型敏感指标,趋化因子受体通过与相应配体结合对表达该受体的多种淋巴细胞趋化和激活,在机体防御、抗感染等多种炎症性疾病中起重要作用;IP 10是新近发现的属于CXC类的趋化因子,CXCR3是目前发现的IP 10的唯一受体。近年研究发现:在自身免疫性肝病、慢性丙型肝炎、乙型肝炎病毒感染动物模型IP 10、CXCR3的分泌增加[5-7];CHB患者血清IP 10水平升高,肝组织表达IP 10及IP 10 mRNA,肝组织中浸润的炎性细胞高表达CXCR3,且与疾病进展密切相关[6,8-12]。

既往的研究多根据血清ALT、TB等指标对CHB患者进行病情判断及临床分型,但其价值较为有限,吴赤红等[13]对90例临床诊断慢性HBV携带者进行肝穿病理检查发现,多数患者肝组织有轻度炎症,伴有或不伴有轻度肝纤维化充分说明了这一点,目前对肝脏纤维化的判断尚无较肯定的生化指标。

本研究均采用B超引导下,以直径0.2 cm穿刺针经皮穿刺60例CHB患者及20例对照肝脏右叶获取活体组织,进行炎症分级及纤维化分期,免疫组化结果显示:IP 10的阳性反应位于肝细胞、胆管上皮细胞、窦内皮细胞、Kupffer细胞、浸润的炎细胞,CXCR3的阳性反应位于汇管区及小叶内的淋巴细胞、肝细胞;所有CHB患者肝穿刺组织中均检测到CXCR3及IP 10的表达,并明显高于正常对照组,提示CXCR3及IP 10参与CHB的免疫发病机制;且随着肝脏炎症及纤维化程度的加重,CXCR3及IP 10水平逐渐上升,其表达与肝脏炎症及纤维化程度呈正相关,研究还发现肝组织CXCR3及IP 10间表达呈正相关,提示两者的同时增强与肝组织内炎症细胞的浸润有关,对肝组织的损伤与修复有重要影响,已知CHB是以淋巴单核细胞浸润和Kupffer细胞增生为特征,有研究表明,CXCL10基因启动子多态性G-210A的异常调控对于CHB病毒感染的疾病进展可能是一个潜在的部分遗传变异的易感性因素[14],病毒感染可刺激Th1细胞分泌IFN-γ[15],INF-γ可增强肝窦状内皮细胞表达IP 10[16],因此,CHB患者肝组织高表达的IP 10可通过趋化、激活表达其受体CXCR3的单核细胞、淋巴细胞等向肝脏组织定向迁移,在感染局部发挥辅助CTL及活化其他免疫细胞作用,同时活化细胞又分泌更多趋化因子,进一步介导淋巴细胞在肝脏内聚集,通过分泌损害肝脏的炎症递质造成组织损伤,参与肝脏炎性反应及慢性化,提示两者的相互作用在CHB免疫病理损伤的发生、发展中起重要作用。本研究还发现在肝纤维化组CXCR3、IP 10的表达仅S1、S2组间有统计学意义,且在肝脏炎症程度相同情况下不同肝纤维化组间CXCR3、IP 10水平无显著性差异,可能与肝脏炎症损害及修复时细胞外基质增生常合并肝纤维化有关。

参考文献:

[1] Missale G, Ferrari C, Fiaccadori F. Cytokine mediators in acute inflammation and chronic course of viral hepatitis[J]. Ann Ital Med Int, 1995, 10(6): 14-18.

[2] Ng P C, Lam C W, Li A M, *et al*. Chemokine response in children with SARS[J]. Arch Dis Child, 2005, 90 (4): 422-423.

[3] Silva T A, Garlet G P, Lara V S, *et al*. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases [J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20 (5): 310-316.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324 - 329.
[5] Zhai Y, Shen X D, Hancock W W, *et al*. CXCR3 + CD4 + T cells mediate innate immune function in the pathophysiology of liver ischemia/ reperfusion injury [J]. J Immunol, 2006, 176(10): 6313 - 6322.
[6] Wang J, Wang P P, Xiang G J, *et al*. Relationship between the expression of IP-10 and IP-10 mRNA in peripheral blood and HBV DNA level in patients with cirrhosis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9(3): 280 - 286.
[7] Diago M, Castellano G, Garcia-Samaniego J, *et al*. Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C [J]. Gut, 2006, 55(3): 374 - 379.
[8] 罗亚文, 林世德, 罗军敏, 等. 重型乙型肝炎患者血清干扰素诱导蛋白-10、干扰素 γ 的检测及临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2008, 26(4): 244 - 247.
[9] 王健, 王平平, 项桂菊, 等. 肝硬化患者肝活检组织 IP-10 及其 mRNA 表达[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(5): 467 - 470.
[10] 赵金红, 王健, 王平平. 趋化因子受体 CXCR3 在慢性乙肝患者肝脏组织中的表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(5): 449.
[11] 蒲春文, 姜春萌, 丛树荣, 等. 细胞趋化因子受体 CXCR3 及 CCR5 在乙型肝炎患者肝组织中的表达[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(9): 708 - 709.
[12] 冉燕, 李佳, 易学东, 等. 病毒性乙型肝炎患者血清干扰素诱导蛋白 10 与肝功能的相关性研究[J]. 临床荟萃, 2008, 23(21): 1543 - 1545.
[13] 吴赤红, 斯崇文, 田庚善, 等. 慢性乙型肝炎病毒携带者的病理与临床及预后分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(8): 577 - 581.
[14] Deng G, Zhou G, Zhang R, *et al*. Regulatory polymorphisms in the promoter of CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers[J]. Gastroenterology, 2008, 134(3): 716 - 726.
[15] Boisvert J, Kunkel E J, Campbell J J, *et al*. Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes[J]. J Hepatol, 2003, 38(1): 67 - 75.
[16] Zeremski M, Petrovic L M, Chiriboga L, *et al*. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C[J]. Hepatology, 2008, 48(5): 1440 - 1450.

(**收稿**:2011-08-24;**修回**:2011-09-21)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2012)03-0253-01

个案与短篇

核磁共振成像诊断阴道斜隔综合征 1 例

屈云飞,令狐华,梅耀宇 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院妇产科)

[**关键词**] 阴道斜隔综合征;核磁共振成像(MRI);诊断;治疗
[**中图法分类号**] R711.1 [**文献标志码**] B

阴道斜隔综合征(oblique vaginal septum syndrome, OVSS)是先天性阴道发育的畸形之一,其基本特点是隔膜起源于两宫颈之间,斜行附着于一侧阴道壁,阻挡了该侧宫颈的通路。除双阴道畸形外,多数伴有双宫颈、双子宫及阴道闭锁侧的先天性肾缺如[1]。我们报道 1 例核磁共振成像 MRI 成功诊断阴道斜隔的案例,探讨 MRI 在该类生殖道畸形诊治中的应用价值。

1 临床资料

患者,女性,17 岁。因"阴道脓性分泌物 20$^+$ d,宫颈后壁脓肿切开引流术后 5 d"于 2011 年 7 月 25 日入院。患者月经初潮 14 岁,15 岁后月经规律,量中,有中-重度痛经,经期伴有阴道胀痛,每次月经净后 7 d 内自阴道少量脓血性分泌物。20$^+$ d 前,月经净后出现阴道流大量脓血性分泌物,恶臭,伴阴道胀痛,无畏寒、发热等症状。入院前 11 d 曾在当地医院就诊,考虑诊断为:宫颈后壁脓肿,遂在该院行"宫颈后壁脓肿"切开引流术。术后予以抗感染等对症治疗 5 d,仍有多量脓性分泌物流出,考虑治疗效果欠佳,遂转入我院治疗。妇科检查:外阴未婚式,发育正常,处女膜未闭锁;肛诊:阴道内扪及囊性块物约 4.5 cm × 3.5 cm,挤压之见脓血性分泌物自阴道流出;子宫正常大小,质中,活动好,无压痛;双附件区未扪及增厚压痛。患者否认性生活史。既往史:无手术史,有头孢类药物过敏,余无特殊。发育正常,营养中等,心肺腹检查无异常发现。妇科 B 超示:阴道及宫颈管内异常回声。泌尿系 B 超示:右肾区未探及右肾图像,左肾轻度积液伴左输尿管扩张。静脉肾盂造影示:右肾未显影,左肾、输尿管正常,但肾影较大,提示独肾可能,膀胱未见异常(图 1A)。盆腔 MRI 提示:①子宫、阴道、卵巢发育异常(双子宫、双宫颈、阴道斜隔);②"宫颈脓肿"术后,宫颈未见异常信号影(图 1B)。完善各项术前检查,无手术禁忌证,征求其父母意见于 2011 年 7 月 29 日在全麻下行经阴道斜隔切除术。术中见宫颈光滑,阴道右侧壁略膨出,空针穿刺阴道右侧壁有落空感后,抽出黏稠脓血约 10 ml,沿穿刺点剪开阴道右侧壁,见黏稠脓血流出约 50 ml,用稀碘伏反复冲洗切开之阴道隔后腔,行阴道斜隔切除,暴露出隔后的右侧宫颈。完整切除阴道斜隔后用 0/2 薇乔线连续锁边缝合切缘止血,以碘伏纱布填塞阴道,压迫止血,术后 48 h 拔出碘伏纱布。术后病检示:阴道壁两侧均被覆复层鳞状上皮结构,含有丰富的血管及少量平滑肌,符合阴道斜隔。术后随访患者已经历月经 1 次,此前痛经及经净后脓血性分泌物等症状消失。

[**通信作者**] 令狐华,E-mail:linghu-hua@163.com

(下转 267 页)