维普资讯 http://www.cqvip.com

288-290 肝细胞凋亡，肝炎，病因

第21卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.3
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

肝细胞凋亡在暴发性肝炎发病中的作用

病毒性肝炎研究所 周卫平 张定凤 综述

中图分类号R361.3 R 512.602

(2)

导致肝脏坏死的原因较为复杂，但在病毒性肝炎(尤其乙、丙型肝炎)，造成肝损害的原因主要有两方面：一是针对病毒抗原的特异免疫引起的炎症反应；二是特异免疫反应释放的细胞因子引起肝细胞非特异性死亡，加重或造成肝损害，甚至导致肝脏大块性或亚大块性坏死，诱导暴发性肝炎发生。与其它多细胞生物一样，肝细胞死亡有两种不同形式，即坏死(necrosis或accident cell death)与凋亡(Apoptosis, APO)。与坏死不同，细胞凋亡是一个主动的信号依赖性细胞死亡过程，形态学变化主要在细胞核；细胞可在某些因素刺激后，遵循自身遗传程序"自杀性"死亡。在APO发生整个过程中细胞膜完整，台盼蓝染色拒染，且不引起炎症反应。微绒毛消失，细胞表面呈泡状，染色质凝缩成新月状，核内DNA裂解(为180～200bp寡核苷酸碎片，凝胶电泳呈梯状分带)及凋亡小体(膜内隐将细胞分割成多个内涵物不外溢 的细胞小体)形成是APO的主要特征[2]。细胞膜上某些受体的激活，生长因子撤出，病毒感染，毒素(如酒精、β－淀粉状多肽)，化疗及抗代谢药物，射线(如γ射线、UV射线)均可诱导APO。

目前认为TNF主要引起肝细胞坏死，Fas－FasL(TNF家族的另一成员)则是造成肝细胞凋亡的重要系统[1]。Ogasawara等采用杂交瘤技术获得抗－Fas单克隆抗体，对Fas有免疫沉淀作用，对表达Fas的细胞系有细胞毒作用。将抗－Fas注入小鼠腹腔，注射后2h血清GPT和GOT明显升高，达基础水平的200～1000倍，表现与暴发型肝炎非常相似，动物很快死亡。组织学显示整个肝脏都有块状出血性坏死，电镜观察受累肝细胞核凝缩、碎裂。提示Fas－FasL介导肝细胞凋亡在肝细胞损伤机制中占有重要地位，可能参与了暴发性肝炎或其它类型肝炎的发病机制[3]。

1 Fas的结构属于TNF/NGF受体家族[1]。人类Fas蛋白质一级结构有325个氨基酸，N－端有信号序列，中间部分是蛋白质跨膜区，属I型膜蛋白。用抗人Fas作为刺激物处理表达Fas的变种小鼠细胞系，5h内细胞发生凋亡。表明Fas能够向细胞内传递凋亡信号[4]。作为受体，Fas与$TNFR_1$、$TNFR_2$、NGFR、CD_{40}、OX_{40}、CD_{27}、CD_{30}等受体一样，在膜的胞外区域有3～6个部位富含胱氨酸，且此区氨基酸序列相对保守。与胞外区相反，胞内区氨基酸序列变异较大，Fas此区仅与$TNFR_1$同源。Fas和$TNFR_1$的胞内区有约70个氨基酸区段专司APO信号的传递，故被称为"死亡区"。Fas和$TNFR_1$具有高度同源"死亡区"，理应有相同的胞内信号传导机制，但事实并非如此。某些因素(如MnSOD、纤维蛋白溶酶原活化因子Ⅱ，线粒体抑制因子等)可阻抑$TNFR_1$转导APO信号，而不能阻断Fas的转导，只有酪氨酸蛋白激酶抑制因子和环胞素A能抑制Fas的转导[5]。此

维普资讯 http://www.cqvip.com

外，Fas转导APO速度亦明显快于$TNFR_1$。估计系此类受体基因组"死亡区"的死亡主信号受到其它部分不同控制信号调节，才表现出不同的受控机制。

人类Fas基因组位于第10对染色体的长臂(小鼠在第19对)[6]，长约26kb。因其含9个外显子，故Fas表达模板在不同的组织和细胞系各不相同。在小鼠胸腺(除$CD_4^-CD_8^-$双阴性胸腺细胞外)、肝、心、肺，肾及卵巢有丰富的Fas表达。活化的成熟淋巴细胞和感染人类T细胞淋巴瘤病毒(HTLV－1)、HIV或EBV的淋巴细胞有很高的表达。在多数细胞系Fas表达较微弱，γ－干扰素能上调Fas的表达，但诱导Fas表达的确切机制和始动因素尚有待进一步阐明。

2　用Fas亲和层析纯化的FasL(Fas配体)为分子量近40 000蛋白质，对表达Fas细胞(Fas＋细胞)有强烈的细胞毒性。FasL N端无信号序列，但分子中部有一段疏水氨基酸序列，属C端在胞外的Ⅱ型膜蛋白。人、鼠FasL76.9%氨基酸序列相同，功能无种属特异性[7]。FasL胞外区域约50个连续氨基酸与TNF家族的TNF、LT、$CD_{40}L$、$OX_{40}L$等的反应区同源。

FasL基因位于人、鼠第一对染色体，紧邻TNF家族另一成员$OXS_{40}L$基因。FasL有5个外显子，结构相似于TNF_α和LT_β，FasL仅在活化的T细胞、NK细胞表达，B细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞及胸腺基质细胞系均未探及FasL的mRNA。FasL在T细胞的表达能迅速被PMA(Phorbol 12－myristate 13－acetate)诱导，或被T细胞受体激活诱导，5,7,4三羟异黄酮能抑制FasL表达。酪氨酸激酶和Ca^{2+}通过T细胞受体激活调节FasL基因诱导Fas表达。一个源于小鼠CTL细胞和小鼠淋巴瘤的细胞毒性T细胞杂交瘤的亚细胞系，PC_{60}－d10S(简称d10S)能杀死Fas^+的靶细胞，但不能杀死Fas^-靶细胞。可溶性Fas成分(Fas－FC)能抑制d10S细胞的细胞毒活性，提示d10S细胞表达了FasL，转导Fas^+靶细胞凋亡[8]；经由FasL转导细胞凋亡的机制为：①抗Fas抗体，②纯化的FasL及③细胞表达的FasL对Fas的交联[9]；Fas转导的细胞凋亡不依赖胞外游离Ca^{2+}，不需要核及DNA片段存在，不需要生物大分子合成。正常细胞调节基因bcl_2可部分或完全抑制Fas传导APO[10]。IL－1β转换酶(TCE)和Cdc_2激酶可能参与了Fas转导APO，如何作用尚待阐明。

3　细胞毒性T细胞(CTL)是免疫系统的主要杀手，它能特异识别并溶解靶细胞。穿孔素——溶解颗粒机制是CTL杀死靶细胞的重要手段，但仅此机制不能准确完美地解释所有的过程。d10s细胞(CTL杂交瘤)经PMA和ionomycin诱导后，能溶解Fas^+细胞，但不能溶解Fas^-细胞。抗－Fas能引起d10s细胞类似的溶细胞现象，可溶性Fas(Fas－Fc)能阻断抗－Fas这个作用。用FasL cDNA转染成纤维细胞样受体细胞后，该细胞也能杀死靶细胞，表现出没有淋巴细胞参与的细胞毒性。此外，源于穿孔素knock out小鼠(去掉穿孔素基因的小鼠)的CTL细胞和不表达穿孔素的CTL细胞均可经由Fas途径溶解靶细胞。

前述现象表明T细胞介导的细胞毒有两个主要机制——Fas依赖性和穿孔素依赖性杀灭靶细胞(图1)[11]。与穿孔素依赖细胞毒不同，Fas依赖性细胞毒不需要Ca^{2+}参与，这也是区别两种溶细胞机制的重要依据。Fas依赖CTL介导细胞毒作用分两步产生：首先由CTL识别靶细胞，并被诱导表达FasL，然后CTL　FasL与靶细胞Fas结合，激发靶细胞内在的自杀程序，导致APO。一般情况下CD_8^+T细胞具备Fas及穿孔素细胞毒两种机制，CD＋T细胞多数只具备后者。CD_4^+　Th_1细胞能表达FasL，故溶细胞作用较CD_4^+ Th_2

维普资讯 http://www.cqvip.com

(不表达FasL)迅捷。

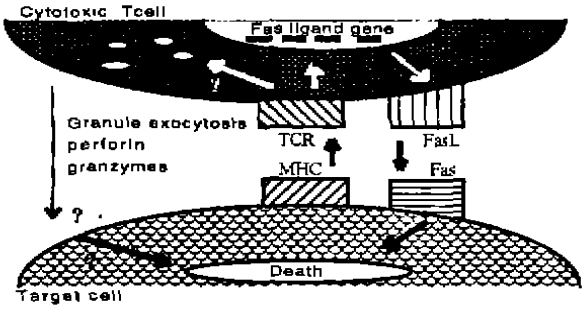


图1 T细胞介导的细胞毒的两个主要机制

4 清除病毒感染细胞是CTL的重要功能。当肝细胞感染HBV或/和HCV后，会发生什么事件呢?

采用RT－PCR技术检测丙型肝炎病人肝组织，肝细胞内几乎没有FasL阳性信号，而肝组织内浸润的单个核细胞却显示有FasL表达[12]。用免疫组织化学方法对40例慢性丙型肝炎病人肝穿活检组织染色，同时检测Fas和HCV抗原，发现Fas抗原主要在肝细胞浆中表达。特别有意义的是，这些Fas^+肝细胞是在进展中肝碎屑样坏死区边缘的浸润淋巴细胞中，组织学活性指数显示Fas^+组织汇管区及汇管区周围炎症较Fas^-组织重。半定量显示活动性炎症肝组织Fas表达较无活动炎症肝组织多。流行病学分析HCV抗原阳性组Fas表达较阴性组强。将HBV基因拼接在白蛋白调节启动子上，转染大鼠建立携带HBV的转基因小鼠。给小鼠注射HBV特异CTLs后，诱导肝细胞发生APO，导致小鼠暴发性肝炎。推测肝细胞感染HBV(或者HCV)后，在细胞表面表达病毒抗原，与MHC一起作为复合抗原激活CTL受体(TCR)诱导FasL基因编码表达FasL。CTL膜FasL交联肝细胞Fas导致靶细胞凋亡(图2)[14]。这种机制正常时有利于病毒感染细胞的清除，若不适当(过强)则导致暴发性肝炎。

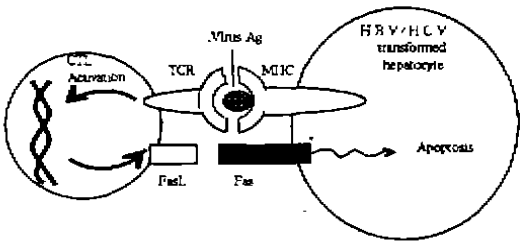


图2 Fas－FasL介导的暴发性肝炎发病机制

由于Fas－FasL转导凋亡是一个复杂调控过程，涉及免疫、遗传诸多领域，对它的认识尚有待进一步深化。但我们可以说，有关细胞凋亡的研究蕴涵着当代分子生物学、生化学、免疫学及遗传学理论与技术的结晶，对临床医学具有重大意义。

参 考 文 献

1.Cosman D.Stem Cells Dayt 1994;12:440
2.Strasser A.Nature 1995;373:438
3.Ogasawara J,et al.Nature 1993,364:806
4.Nagata S and Golstein P.Science 1995;267:1449
5.Anel A,et al.Eur J Immunol 1994;24:2469
6.Watanabe－Fukunaga R,et al.J Immunol 1992;148:1274
7.Suda T,et al.Cell 1993;75:1169
8.Luciani MF and Golstein P.Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1994,345:303
9.Alderson MR,et al.J Exp Med,1995;181:71
10.Itoh N.J Immunol 1993;151:621
11.Henkart PA and Sitkovsky MV.Curr Biol 1994;4:923
12.Mita E,et al.Biochem Biophys Res Commun 1994;4:923
12.Mita E,et al.Biochem Biophys Res Commun 1994;204:468
13.Hiramatru N.et al.Hepatology 1994;19:1354
14.Nagata S and Suda T.Immunol Today 1995;16:39

(收稿日期 1996－01－03)