DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.025
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1677-03

论著

丁型肝炎病人肝组织HDAg与bcl-2、bax、bak表达关系

顾小红[1],冯爱娟[1],张云东[2],李奇芬[3],王宇明[3] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所消化内科,[2]大坪医院野战外科研究所神经外科,重庆 400042,[3]西南医院全军传染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨bcl-2、bax、bak在丁型肝炎发病机制中的作用。方法 采用免疫组化单、双标记染色技术等,检测77例各型丁肝病人肝组织中HDAg、bcl-2、bax和bak表达。以HDV阴性的67例乙型肝炎作对照。结果 bcl-2、bax和bak均以肝细胞浆表达为主。HDAg以肝细胞核表达为主。HDAg与bax和bak表达及分布有相关性,四成分在各型肝炎中的表达强度有显著性差别($P<0.05$)。结论 HDAg、bax、bak表达强度和阳性细胞分布均与肝组织炎症活动及病理损害程度相关,HDV感染可诱导肝细胞表达bax和bak,增强肝细胞凋亡,这一机制在丁型肝炎发病机制中可能有一定的重要作用。

关键词:丁型肝炎;丁型肝炎病毒抗原;bcl-2;bax;bak
中图法分类号:R329.24;R392.11;R512.640.2 文献标识码:A

Relationship of expressions of bcl-2, bax and bak with HDAg in tissues of hepatitis D patients

GU Xiao-hong[1], FENG Ai-juan[1], ZHANG Yun-dong[2], LI Qi-fen[3], WANG Yu-ming[3]([1]Department of Gastroenterology, [2]Department of Neurosurgery, Daping Hospital, Institute of Surgery Research, Chongqing 400042; [3]Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the roles of apoptosis genes bcl-2, bax, and bak in the pathogenesis of hepatitis D. Methods Expressions of HDAg, bcl-2, bax, and bak in liver specimens of 77 patients with hepatitis D were studied by immunohistochemical method. Meanwhile, the relationship of HDAg expression with the expressions of bcl-2, bax, and bak was studied by double labelling. Results Bcl-2 was mainly expressed in the cytoplasm of hepatocytes, and bax and bak mainly in the cytoplasm of hepatocytes and partly in the nucleus of hepatocytes, and HDAg mainly in the nucleus of hepatocytes. Lots of HDAg and bax/bak positive cells were distributed in infiltrating lymphocytes at the periportal region especially at the advancing edges of areas of piecemeal necrosis. Apoptosis of many hepatocytes was found to locate near the HDAg positive cells. There was positive correlation between the expression of bax/bak and HDAg expression ($P<0.01$, $P<0.05$). Conclusion The distribution and the expressions of bax/bak and HDAg are closely associated with the activity of inflammation and the severity of the liver damage. HDV infection may induce the expressions of bax and bak in the hepatocytes. Apoptosis caused by bcl-2 and bax/bak may play an important role in the liver cell injury caused by HDV infection.

Key words: hepatitis D; hepatitis D virus antigen; bcl-2; bax; bak

Bcl-2蛋白是一重要的抗细胞凋亡物质,bax、bak为bcl-2家族蛋白,可抑制bcl-2蛋白的活性。发生病毒性肝炎时常伴有肝细胞凋亡和坏死。为了解丁型肝炎病毒(HDV)感染后患者病情加重、病程慢性化、病死率增高的机制,拟对丁型肝炎病人肝组织HDAg、bcl-2、bax、bak和肝细胞凋亡表达进行检测,探讨其在丁型肝炎病情变化中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例和标本

本组病例均为我院1990—2001年住院病人,其中丁型肝炎77例,包括急性肝炎(AH)8例,轻度慢性肝炎(Mild-CH)17例,中度慢性肝炎(Mode-CH)23例,重度慢性肝炎(Seri-CH)16例,重型肝炎(SH)13例(急性重型肝炎1例、亚急性重型肝炎6例、慢性重型肝炎6例)。以67例HDV阴性乙型肝炎作对照,包括AH 9例,Mild-CH 13例,Mode-CH 17例,Seri-CH18例,SH 10例(亚急性重型肝炎5例、慢性重型肝炎5例)。所有病例均经皮肝穿获得肝组织,病理检查确诊,诊断标准以2000年《病毒

作者简介:顾小红(1968—),女,四川省绵阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝炎发病机制方面的研究,发表论文27篇。电话:(023)66690688

收稿日期:2003-10-28;修回日期:2004-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性肝炎防治方案》为依据。

1.2 主要试剂来源

兔抗人 bcl-2、bax、bak 多克隆抗体为美国 Zymed 公司产品。丁型肝炎多克隆抗体由西南医院全军传染病研究所自行选定的HDV 合成肽抗原经免疫家兔制备[1]。免疫组化染色的过氧化酶标记的链霉卵白素(S-P)试剂盒，为美国 Maxin Biotech Inc 产品。

1.3 操作及对照

操作步骤按说明书进行。阳性对照为已知 bcl-2、bax 阳性肝癌组织切片，阴性对照选自正常人肝组织，其血清各型肝炎标志物均阴性。此外，分别用鼠血清和 PBS 代替第一抗体作替代实验。每张切片先分别检测 HDAg、bcl-2、bax、bak，再行双标记检测。

1.4 结果判断

免疫组化抗原表达程度判断：低倍镜视野阳性细胞少于 1/3 为(+)，2/3 为(++)，大于 2/3 为(+++)。

1.5 统计学方法

采用非参数 Ridit 分析和双向有序 R×C 表 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HDAg 的表达

HDAg 主以肝细胞核表达，其次是胞浆表达。在坏死灶处肝细胞和气球样变性肝细胞浆内有大量的 HDAg 呈浆型强阳性表达。中、重度慢性肝炎和重型肝炎中 HDAg 阳性细胞呈弥散型、灶型或片簇状分布于肝小叶内，在门脉周围和坏死灶处分布较密集；急性肝炎和轻度慢性肝炎 HDAg 阳性细胞多呈单个或小灶状稀疏分布于小叶内。秩相关分析发现重型肝炎和慢性肝炎中、重度 HDAg 表达强于急性肝炎和轻度慢性肝炎(表 1)。

表 1 丁型肝炎病人肝组织 **HDAg** 表达

Tab 1 Expression of HDAg in the liver tissue of hepatitis D patients

HDAg expression	AH (n=8)	Mild-CH (n=17)	Mode-CH (n=23)	Seri-CH (n=16)	SH (n=13)
+	6	15	7	1	0
++	2	2	10	9	7
+++	0	0	6	6	6

$R_{Mode-CH}=0.5$, $R_{AH}=0.244$, $R_{Mild-ch}=0.195$, $R_{Seri-CH}=0.63$, $R_{SH}=0.683$

2.2 Bcl-2、bax 和 bak 表达

Bcl-2 阳性率为 35.1%(27/77)，以胞浆表达为主，可见核膜表达，但未见核阳性表达。Bcl-2 阳性细胞以散在分布为主，也可有片状分布。肝细胞坏死区少见 bcl-2 阳性细胞，在少数浸润的炎性细胞和胆小管细胞可见阳性表达。结果显示，急性肝炎和轻度慢性肝炎中 bcl-2 的表达明显高于中、重度慢性肝炎和重型肝炎($P<0.05$)。连续切片观察在坏死区及周围有较多凋亡细胞，而 bcl-2 在此区却少有阳性细胞。

Bax 和 bak 阳性率分别为 83.1%(64/77)、65.5%(54/77)，以胞浆表达为主。急性肝炎和轻度慢性肝炎中，阳性细胞较少且分散，表达强度也较弱；中、重度慢性肝炎和重型肝炎中，阳性细胞呈灶状或片簇状分布于肝小叶周边，在门脉周围、碎屑状坏死区 bax、bak 表达尤为明显，其表达较急性肝炎、轻度慢性肝炎组明显增强。乙型肝炎肝组织中，bax 和 bak 阳性率分别为 79.1%(53/67)、50.7%(34/67)，阳性细胞分布基本与丁型肝炎的一致，表达程度稍弱。

2.3 HDAg 表达与 bcl-2、bax 和 bak 表达关系

双标记检测显示，bax、bak 阳性肝细胞多位于 HDAg 阳性部位或其附近，且 HDAg、bax/bak 抗原可同时表达在同一肝细胞，其数量明显多于二抗原单独表达的肝细胞，其间也可见二抗原均阴性的肝细胞。

在坏死区及其周围，有较多的 HDAg 阳性肝细胞，而 bcl-2 在此区则很少有阳性细胞。bcl-2 和 HDAg 阳性细胞分布关系不甚密切，少有共存现象，且 bcl-2 阳性肝细胞明显少于 HDAg 阳性细胞，有时可见众多 HDAg 阳性细胞周围或之中仅少量 bcl-2 阳性细胞。

表 2 丁型肝炎病人肝组织中 **HDAg** 与 **bax** 和 **bak** 表达关系

Tab 2 Relationship of HDAg expression and bax/bak in the liver tissue of hepatitis D patients

HDAg	bak				bax			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++
	(n=23)	(n=22)	(n=19)	(n=13)	(n=13)	(n=28)	(n=22)	(n=14)
+	13	9	6	1	9	15	5	0
++	10	8	7	5	4	9	11	6
+++	0	5	6	7	0	4	6	8

$\chi^2_{bak}=16.80$, $P=0.01$; $\chi^2_{bax}=24.20$, $P=0.00$

3 讨论

研究表明肝细胞凋亡在病毒性肝炎发病机制中有着重要作用。细胞凋亡的强弱与病人病情的轻重直接相关。线粒体功能改变是决定细胞死亡的关键因素[2]，而定位于线粒体膜的 bcl-2、bax 和 bak 等蛋白可通过调节线粒体功能而制约细胞凋亡的发生。

Bcl-2 为重要的凋亡抑制基因，其高度表达可阻断细胞凋亡的发生，延长细胞存活时间，而不影响细胞增殖，并在多种正常细胞的激活和发育过程中表达，而在成熟或走向凋亡的细胞不表达或低表达[3,4]。现已发现病毒编码蛋白与 bcl-2 具有同源性，可阻止细胞凋亡的发生，有利病毒在宿主细胞内的长期潜伏，在不出现细胞溶解坏死的情况下，造成病毒的持续感染。

Bax、bak 为 bcl-2 相关蛋白，与 bcl-2 的作用相反，能加速细胞凋亡。bcl-2 表达水平较高时，可形成 bcl-2 和 bcl-2 同源二聚体，抑制细胞凋亡；bax 表达水平较高时，则形成 bax 和 bax 同源二聚体，加速细胞凋亡。bax 可与 bcl-2 蛋白形成异二聚体并使之失活，加强表达 bax 形成同二聚体，加速细胞凋亡，因此 bcl-2 和 bax 二者间的比率影响凋亡信号刺激后细胞的存活或死亡的比率。bak 可直接抑制 bcl-2 活性以促进细胞凋

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

亡[3,4]。bax、bak 表达占优势，提示肝细胞处于凋亡的活跃状态，直接促使肝细胞死亡。

丁肝病人肝组织有 bcl-2、bax 和 bak 表达，bax 和 bak 表达明显高于 bcl-2 表达，bax、bak 表达在中、重度慢性肝炎和重型肝炎中的表达强于急性肝炎和轻度慢性肝炎。双标记显示 HDAg 与 bax/bak 表达及阳性细胞分布呈一致性，由此提示 HDAg 和 bax/bak 与肝组织炎症活动和病理损害程度相关。结合丁型肝炎病人肝组织中 Fas/FasL 表达的研究等[5]，认为丁型肝炎中除了乙肝病毒抗原可诱导肝细胞表达多种促凋亡因子外，HDAg 也有同样作用。因此慢性乙肝患者或 HBsAg 携带者重叠 HDV 感染后，多种促凋亡因子的表达，可增强宿主的免疫应答，同时肝组织中复制状态的 HDV 对肝细胞的直接细胞毒性作用[6]：一方面导致肝细胞凋亡，被病毒感染的细胞随之被清除；另一方面则导致大量肝细胞坏死，使病情和病理损害加重，因此临床病死率增高，预后明显变差。此提示，在丁型肝炎病毒感染后病情重型化、死亡率增高等机制中，多种凋亡因子介导的肝细胞凋亡可能起了一定的重要作用。

参考文献：

[1] 郑 红，李奇芬，林晓红，等. 人工合成丁型肝炎病毒抗原多肽片段的特征与临床应用[J]. 中华医学杂志，1993，73(2)：273－275.
[2] Kroemer G, Zamzami N, Susin S A. Mitochondrial control of apoptosis[J]. Immunol Today, 1997, 18(1): 44－51.
[3] Chittenden T, Harrington E A, O'Connor R, *et al*. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue, bak[J]. Nature, 1995, 374(6524): 733－735.
[4] Oltvia Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J, *et al*. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74: 609－619.
[5] 顾小红，李奇芬. Fas/FasL 配体在丁型肝炎病毒致病机制中的作用[J]. 中华肝脏病杂志，1999，7(4)：223.
[6] 顾小红，李奇芬，王宇明. 丁型肝炎病人肝组织 HDAg 与 HBsAg/HBcAg 和 HBV DNA 表达及关系[J]. 第三军医大学学报，2000，22(3)：227－230.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2004)18-1679-01

个案与短篇

泌乳性腺瘤伴乳腺脓肿 1 例

A case report of lactating adenoma with breast abscess

谢 冰，张 毅，文 华，付应波 （第三军医大学西南医院普通外科，重庆 400038）

患者，女性，27 岁。发现右乳包块 2 年，产后 1 个月伴右乳红肿、胀痛 6 d，破溃、流脓 3 d。患者于 2 年前发现右乳外上象限直径约 1 cm 包块。自 2003 年 3 月怀孕后，自觉包块呈进行性增大，直径达 2 cm，产后 25 d 出现右乳外侧乳晕处红肿、胀痛，3 d 后右乳 9 点处出现破溃，有淡红色脓性分泌物溢出。

查体：右乳皮肤红肿，乳晕 9 点处可见一破溃口，直径约 1 cm 大小，有脓性液体溢出，皮温较高。入院后行右乳脓肿切开引流术，术中从脓腔内取出一直径约 2.5 cm 游离于脓腔内的肿块，呈灰白色，类圆形，质稍硬。经抗炎及对症治疗，患者住院 8 d 后好转出院。病理检查：灰白色肿物一个，2.5 cm×2.5 cm×2 cm 大小，质中，无包膜。切面呈蜂窝状，内含白色乳汁样液体。镜下可见上皮和肌上皮两层细胞构成的腺管和腺泡明显增生，腺泡密集，腺管扩张，周边以少量疏松结缔组织围绕，胞浆丰富、红染，未见异型性细胞，可见顶浆分泌现象。同时周围可见炎细胞浸润。病理诊断：右乳泌乳性腺瘤伴感染。

讨论

乳腺腺瘤很少见，约占乳腺良性肿瘤的 1.7%～5.5%[1]，多见于年青女性。触诊时可触及乳内肿物略呈圆形与周围组织无粘连，推之可动，质中等硬，乳腺皮肤无改变，区域淋巴结无肿大，临床上与乳腺纤维腺瘤不易区分。1981 年肿瘤组织学分类将其分为管状腺瘤与泌乳性腺瘤两型[2]。后者均发生于妊娠期及哺乳期妇女，因其腺泡上皮组织有明显的分泌现象，而与其余乳腺良性肿瘤区别。该肿瘤边界清楚，瘤细胞由上皮和肌上皮两层细胞构成，未见异型性细胞而与腺癌区别。本例同时合并有乳腺脓肿，腺瘤周围乳腺组织因感染坏死，致使腺瘤脱落游离于脓腔内，这种现象少见报道。

关键词：泌乳性腺瘤；乳腺脓肿
中图法分类号：R737.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 谷振声，姜鸿刚. 现代乳腺疾病诊断治疗学[M]. 北京：人民军医出版社，1997. 111.
[2] 张仁亚. 男性乳腺泌乳性腺瘤 1 例[J]. 临床与实验病理学杂志，1996，12(2)：97.

（编辑 薛国文）

作者简介：谢 冰(1976－)，女，四川省巴中市人，医师，主要从事乳腺方面的研究，现在四川省巴中市中医院乳腺专科。电话：(0827)5240606
通信作者：张 毅，电话：(023)68773075

收稿日期：2003-10-27；修回日期：2004-02-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net