DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.044
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0597-03

论著

慢性重型乙型肝炎肝内淋巴细胞AICD现象的探测

李 玲[1],顾长海[1],王雅凡[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038;[2]解放军324中心医院传染科,重庆 400020)

提 要:目的 了解肝脏局部浸润淋巴细胞是否存在AICD现象及其意义。方法 采用S-P法检测10例慢性重型乙型肝炎肝组织Fas和FasL表达。结果 10例慢性重型乙型肝炎肝内浸润淋巴细胞和肝细胞皆有不同程度的Fas和FasL的表达,Fas和FasL在淋巴细胞和肝细胞皆以膜浆型表达为主。结论 慢性重型乙型肝炎肝组织内细胞损伤的效靶关系十分复杂,肝组织浸润淋巴细胞存在激活诱导细胞死亡现象,浸润的淋巴细胞可能通过Fas/FasL介导的凋亡途径而下调免疫反应。

关键词:慢性重型乙型肝炎;Fas/FasL;激活诱导细胞死亡
中图法分类号:R329.28;R392.2;R512.62 文献标识码:A

Activation-induced cell death happened in infiltrating lymphocytes in liver of patients with chronic severe hepatitis B

LI Ling, GU Chang-hai, WANG Ya-fan (Research Institute for Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore whether there is activation-induced cell death (AICD) in the infiltrating lymphocytes from the liver of chronic severe hepatitis B patients and its significance. Methods The liver tissue samples from 10 patients with chronic severe hepatitis B were investigated with SP immunohistochemical method for the expressions of Fas and FasL in hepatocytes and infiltrating lymphocytes. Results Expressions of Fas and FasL in varying degrees were identified in the infiltrating lymphocytes and hepatocytes in the samples. Fas and FasL were mainly expressed in the membrane and cytoplasm of lymphocytes and hepatocytes. Conclusion The effect-target relationship is very complex in the cell damage of liver tissue in patients with chronic severe hepatitis B. There is activation-induced cell death (AICD) in the infiltrating lymphocytes of their livers, which may down-regulate immune reaction by Fas-FasL mediated apoptosis pathway.

Key words: chronic severe hepatitis B; Fas/FasL; activation-induced cell death

近年发现外周成熟淋巴细胞发生的激活诱导细胞死亡(Activation-induced cell death,AICD),可能是形成外周免疫耐受的重要原因。现已发现乙型肝炎外周血淋巴细胞存在AICD现象,本实验利用10例慢性重型乙型肝炎肝组织切片作Fas和FasL免疫组化染色,以探讨肝脏局部浸润淋巴细胞是否存在AICD现象及其意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象和标本

10例慢性重型乙型肝炎患者皆为本院感染科1999年收治病人,男9人,女1人,年龄26~63岁。肝组织标本来源于死亡后肝穿刺,诊断符合1995年第5次全国传染病与寄生虫病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准[1]。肝组织标本经10%中性福尔马林固定,石蜡包埋后切片,常规HE染色作病理诊断。

1.2 实验方法

采用链霉素亲生物素蛋白过氧化物酶连接法(S-P法)检测肝组织内Fas和FasL的表达。兔抗人Fas和兔抗人FasL多克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品,购自武汉博士德公司,S-P法试剂盒及3,3-二氨基联苯胺(DAB)试剂盒,为福州迈新公司产品。用PBS代替一抗作阴性对照。染色步骤按S-P试剂盒说明书进行,所有切片用苏木精复染。免疫组化半定量显色标准:细胞染色阳性信号呈棕黄或棕褐色,信号强度以(+)、(++)、(+++)表示,无染色(-);阳性染色细胞占同类细胞<15%(+);15%~50%(++);>50%(+++)。

2 结果

2.1 慢性重型乙型肝炎肝内淋巴细胞、肝细胞Fas表达的检测情况,见表1

表1 慢性重型乙型肝炎肝内淋巴细胞、肝细胞Fas表达的检测情况

Tab 1 Expression of Fas in the infiltrating lymphocytes and hepatocytes in the liver of chronic severe hepatitis B

	Expression of Fas (n=10)			
	-	+	++	+++
Lymphocyte	0	2	3	5
Hepatocyte	0	2	2	6

慢性重型乙型肝炎10例中,可见肝细胞有明显的片状坏死,坏死区有大量的淋巴细胞浸润,10例肝组织浸润的淋巴细胞Fas表达皆阳性,其中Fas表达弱阳性(+)2例,阳性(++)3例,强阳性(+++)5例。淋巴细胞Fas表达主要位于细胞膜和细胞浆上,部分细胞阳性颗粒弥布于细胞膜、浆、核上,呈全细胞型分布,见图1。慢性重型乙型肝炎10例中,肝细胞Fas表达弱阳性(+)2例,阳性(++)2例,强阳性(+++)6例。肝细胞Fas表达以膜浆型为主,部分有核型表达,见图2。

作者简介:李 玲(1963-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事乙型肝炎发病机制的研究,发表论文11篇。电话:(023)68754000-73068
收稿日期:2001-11-12;修回日期:2002-03-12

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

2.2 FasL 在肝内淋巴细胞、肝细胞的检测情况，见表 2

表 2 慢性重型乙型肝炎肝内淋巴细胞、肝细胞 FasL 表达的检测情况

Tab 2 Expression of FasL in the infiltrating lymphocytes and hepatocytes in the liver of chronic severe hepatitis B

	Expression of Fas (n= 10)			
	−	+	++	++
Lymphocyte	0	1	3	6
Hepatocyte	0	2	4	4

慢性重型乙型肝炎 10 例中，浸润的淋巴细胞皆见 FasL 表达，其中 FasL 弱阳性(+)表达 1 例，阳性表达(++)3 例，强阳性表达 6 例。淋巴细胞 FasL 主要呈膜浆型表达，部分细胞阳性颗粒弥布于细胞膜、浆、核上，呈全细胞型分布，见图 3。慢性重型乙型肝炎 10 例中，肝细胞 FasL 弱阳性表达 2 例，阳性 4 例，强阳性 4 例。肝细胞 FasL 表达以膜浆型为主，部分有核型分布，见图 4。淋巴细胞浸润越明显，FasL 表达越强的区域，肝细胞坏死越严重。

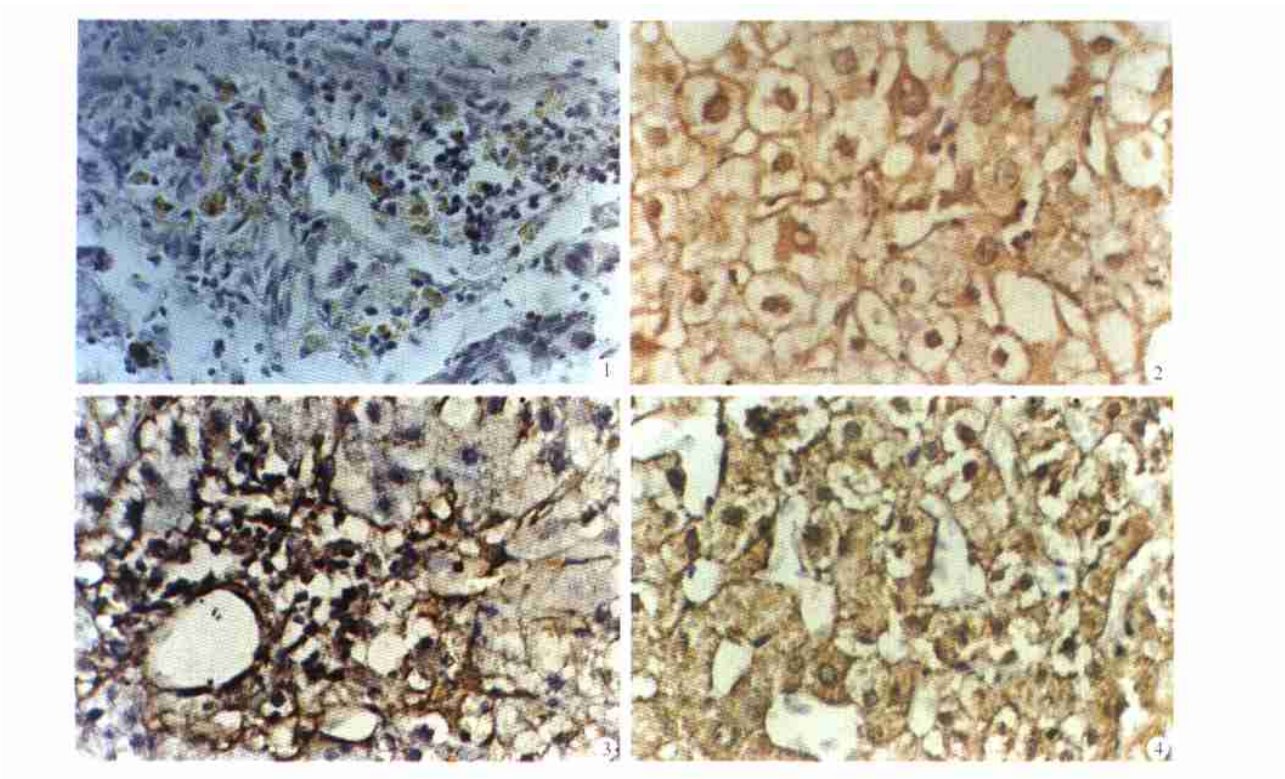


图 1 慢性重型乙型肝炎肝内浸润淋巴细胞 Fas 阳性表达，主要呈膜浆型表达 (S-P× 400)

Fig 1 Expression of Fas in the cytoplasm of infiltrating lymocytes in the liver of chronic severe hepatitis B (S-P× 400)

图 2 慢性重型乙型肝炎肝细胞 Fas 阳性表达，主要呈膜浆型表达 (S-P× 400)

Fig 2 Expression of Fas in the cytoplasm of hepatocytes in the liver of chronic severe hepatitis B (S-P× 400)

图 3 慢性重型乙型肝炎肝内浸润淋巴细胞 FasL 阳性表达，主要呈膜浆型表达 (S-P× 400)

Fig 3 Expression of FasL in the cytoplasa of infiltrating lymocytes in the liver of chronic severe hepatitis B (S-P× 400)

图 4 慢性重型乙型肝炎肝细胞 FasL 阳性表达，主要呈膜浆型表达 (S-P× 400)

Fig 4 Expression of FasL in the cytoplasa of hepatocytes in the liver of chronic severe hepatitis B (S-P× 400)

3 讨论

已知乙型肝炎肝组织病变主要由 T 细胞介导的免疫反应所引起，细胞免疫在乙型肝炎的发病过程中起重要作用。近年发现，外周成熟淋巴细胞在某些病毒、细菌感染等病原体的刺激下可发生激活诱导细胞死亡(AICD)，即淋巴细胞在刺激下先发生活化增殖，然后发生凋亡的现象。这种现象可能是一种正常的生理性免疫反应机制，但也可能是形成外周免疫耐受的重要原因[2~4]。现已发现一些病毒如 HIV，HSV，LCMV 等具有诱导淋巴细胞凋亡的能力[5~7]。已有工作证明乙型肝炎外周血淋巴细胞存在 AICD 现象[8]，但肝脏局部浸润淋巴细胞是否存在 AICD 现象尚不清楚。我们利用 10 例慢性重型乙型肝炎肝组织切片作 Fas 和 FasL 免疫组化染色，以了解乙型肝炎肝脏局部浸润淋巴细胞是否存在 AICD 现象及其意义。

实验结果显示 10 例慢性重型乙型肝炎肝内浸润淋巴细胞和肝细胞皆有不同程度的 Fas 和 FasL 的表达，淋巴细胞 Fas/FasL 表达主要位于细胞膜和细胞浆上，部分细胞阳性颗粒弥布于细胞膜、浆、核上，呈全细胞型分布。肝细胞 Fas/ FasL 表达以膜浆型为主，部分有核型分布。淋巴细胞浸润越明显，FasL 表达越强的

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

区域, 肝细胞坏死越严重。

本实验慢性重型乙型肝炎肝细胞 Fas 的明显表达与有关报道是一致的[9, 10]。显示慢性重型乙型肝炎肝细胞坏死可能由 Fas/FasL 所介导, 淋巴细胞表达的 FasL 与肝细胞表达的 Fas 结合后引起肝细胞凋亡, 大量肝细胞的凋亡造成肝组织的严重损伤, 通过 Fas/FasL 介导的肝细胞凋亡是引起肝细胞损伤的一个重要机制。而另一方面本实验淋巴细胞 Fas 的明显表达则提示肝组织浸润淋巴细胞存在激活诱导细胞死亡现象, 浸润的淋巴细胞可能通过 Fas/FasL 介导的凋亡途径消亡, 淋巴细胞表达的 Fas 与淋巴细胞自身表达的 FasL、肝细胞表达的 FasL 结合后引起淋巴细胞凋亡, 这可能是肝脏炎症时浸润肝组织淋巴细胞发生活化反应后被清除的途径。但同时应考虑在肝脏发生严重坏死性炎症后, 肝组织浸润淋巴细胞经活化后凋亡可能造成肝脏局部淋巴细胞的数量减少和活性下降, 从而导致肝脏局部细胞免疫反应的下调, 从而不利于继续清除 HBV 感染肝细胞。慢性重型乙型肝炎时肝细胞和浸润的淋巴细胞皆见 Fas 和 FasL 表达, 提示肝细胞不仅作为 Fas/ FasL 介导凋亡的靶细胞, 也可充当效应细胞; 浸润的淋巴细胞不仅作为 Fas/FasL 介导凋亡的效应细胞, 也可充当靶细胞。本实验研究提示浸润的淋巴细胞可能通过以下途径发生活化后凋亡: ①通过分别表达 Fas 和 FasL 的相邻淋巴细胞相互交联而使细胞凋亡, 即所谓"兄弟残杀"。②同一淋巴细胞通过自身表达的 Fas 和 FasL 交联即顺式触发(Cis-trigger)机制使细胞自杀。③通过与表达 FasL 的肝细胞交联而发生凋亡。由此看来慢性重型乙型肝炎肝组织内细胞损伤的效-靶关系十分复杂。然而, Fas/ FasL 介导的肝细胞凋亡和淋巴细胞 AICD, 无疑是慢性重型乙型肝炎肝功能持续损害和 HBV 持续感染的重要因素。有关外周淋巴细胞 AICD 现象的研究尚处于初级探索阶段, 肝组织局部淋巴细胞发生的 AICD 现象更值得进一步研究, 这将有助于弄清乙型肝炎的发病机制。

参考文献:

[1] 病毒性肝炎防治方案(试行)[J]. 中华传染病杂志, 1995, 13(4): 241—247.

[2] Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes[J]. Immunol Today, 1998, 14(7): 338—339.

[3] Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation—driven death(apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells[J]. J Immunol, 1993, 150(10): 4 338—4 345.

[4] Zheng L, Fisher G, Miller R E, *et al*. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor[J]. Nature, 1995, 377(6 546): 348—351.

[5] Gougeon M L, Lecoeur H, Dulioust A, *et al*. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons. J Immunol, 1996, 156(9): 3 509—3 520.

[6] Ito M, Watanabe M, Kamiya H, *et al*. Herpes simplex virus type 1 induces apoptosis in peripheral blood T lymphocytes[J]. J Infec Dis, 1997, 75(5): 1 220—1 224.

[7] Kyburz D, Aichele P, Speiser D E, *et al*. T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(8): 1 956—1 962.

[8] Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, *et al*. Apotosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 1996, 111(1): 156—164.

[9] 邵凤珍, 赵桂鸣, 高篷等. Fas 抗原表达与慢性乙型肝炎关系的评价[J]. 中华传染病杂志, 1998, 16(3): 164—165.

[10] Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I, *et al*. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure[J]. Am J Gastroenterol, 2000, 95(8): 2047—205.

(编辑　谢义霞)

(上接 596 页)

3　讨论

保存血用于输血已有很长的历史, 临床实践表明, 它是安全可靠的。但保存血液由于在红细胞的结构、血液流变学及红细胞形状等方面的变化使质量下降[1, 2]。

对如何提高库存血的质量, 延长保存期, 国内外同仁不断进行了多方面的研究, 但总的来讲效果不理想。文献[3]证实, 低能量 He-Ne 激光静脉内照射具有使血液粘度、血浆粘度下降, 红细胞变形性增强, 红细胞聚集性下降, 从而使血液粘度降低等多种作用, 临床应用中也取得较好疗效。

本实验发现: 用低能量 He-Ne 激光对库存血进行照射后的 21 d 保存期内, 高、中、低切全血粘度较保存前的 0 d 均显著下降, 相比而言对照组的全血粘度随着库存时间的延长而显著增加, 二者相差非常显著。虽然照射组全血粘度下降可能是受到溶血使红细胞压积下降的影响, 但根据照射组全血还原粘度与对照组相比也有下降的结果来看, 这种影响不能代表全血粘度的全部改变, 因为全血还原粘度排除了红细胞压积变化的影响。对血浆粘度的测定发现照射后其粘度显著下降, 红细胞聚集指数亦均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$), 红细胞变形指数在观察的保存期内无显著变化, 但和对照组比有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$)。进一步说明全血粘度的下降是血液本身性质的改变所致。这些结果说明低能量 He-Ne 激光照射对库存血的作用同血管内照射相似, 也是通过使红细胞变形性增强, 红细胞聚集性下降、血浆粘度下降, 使库存血的全血粘度不随保存时间延长而升高甚至有所降低。

关键词: 激光; 血液流变学; 血液保存
中图法分类号: R457.12　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 毕　蕾. 血液保存期间红细胞的一些变化[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 1986, 9(3): 166—169.

[2] 李玉明, 李敬兰. 血液高凝状态与微循环的关系[J]. 微循环杂志, 1996, 3: 47—48.

[3] 李慧珍. 低能量 He-Ne 激光血管内照射的血液流变学临床改变[J]. 实用心肺血管病杂志, 1996, 4(4): 52.

[4] Nagaprasad V, Singh M. Sequential analysis of the influence of blood storage on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 1998, 18(4): 273—284.

(编辑　郭建秀)

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net