DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.040
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0841-03

论著

乙型肝炎肝内 ICAM-1 和 HLA-A, B, C 表达的研究

张绪清,张 瑞,顾长海,王宇明 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究乙型病毒性肝炎肝内 ICAM-1 和 HLA-A, B, C 表达间的关系及其在乙型肝炎免疫发病机制中的作用。方法 用免疫组化单种染色检测 11 例正常人和 70 例 HBV 感染者肝内 ICAM-1、HLA-A, B, C 表达水平,并用免疫组化双重染色检测其肝内 ICAM-1和 HLA-A, B, C 复合表达。结果 乙型肝炎患者肝细胞 ICAM-1 表达水平与 HLA-A, B, C 表达水平之间呈显著正相关($P<0.05$);在炎症坏死区,表达 ICAM-1 的肝细胞多数也同时表达 HLA-A, B, C。结论 ICAM-1 和 HLA-A, B, C 共同参与介导乙型肝炎肝细胞的免疫损伤过程;ICAM-1/HLA-A, B, C 双阳性肝细胞可能是 CTL 发挥有效细胞毒作用的靶细胞。

关键词:细胞间粘附分子-1;人白细胞抗原;乙型肝炎
中图法分类号:R392.11;R392.13;R512.62 文献标识码:A

Study on the expression of ICAM-1 and HLA-A, B, C in the liver of viral hepatitis B

ZHANG Xu-qing, ZHANG Rui, GU Chang-hai, WANG Yu-ming (Institute of Infectious Diseases of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the relationship between intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and HLA-A, B, C expression in the liver tissue of viral hepatitis B, and their role in the immunopathogenesis of viral hepatitis B. Methods The expression of ICAM-1 and HLA-A, B, C in the livers of 11 healthy subjects and 70 HBV patients were detected by immunhistochemical single-staining technique. The complex expression of ICAM-1 and HLA-A, B, C was detected by immunhistochemical double-staining technique. Results There were significant positive relation between the levels of ICAM-1 expression and the levels of HLA-A, B, C expression in hepatocytes of the patients with viral hepatitis B ($P<0.05$). In the areas of inflammation and necrosis, most hepatocytes expressed ICAM-1 and HLA-A, B, C simultaneously. Conclusion ICAM-1 is involved in mediating immune damage of hepatocytes together with HLA-A, B, C in viral hepatitis B. ICAM-1/HLA-A, B, C double positive hepatocytes may be the target cells attacked by the cytotoxic T lymphocyte(CTL).

Key words: intercellular adhesion molecule-1; human leukocyte antigen; viral hepatitis B

在 HBV 感染时,细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)介导的细胞毒作用是病毒感染肝细胞发生坏死的主要免疫机理。细胞间粘附分子-1(ICAM-1)与其配体淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)参与介导淋巴细胞与靶细胞及淋巴细胞间的粘附[1]。人白细胞抗原(HLA)I类分子在乙型肝炎免疫发病机制中也起重要作用。本实验通过研究病毒性乙型肝炎患者肝内 ICAM-1 和 HLA-A, B, C 表达间的关系,拟进一步探讨乙型肝炎免疫发病机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

70 例 HBV 感染者均为 1995 年 11 月至 1998 年 2 月在我科住院的患者,男 60 例、女 10 例,年龄 34.8 岁。慢性无症状 HBsAg携带者(Asymptomatic carrier, AsC)5 例,轻度慢性乙型肝炎(Chrouic hepatitis B slight, CHB-Sl)、中度慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B moderate, CHB-Mo)、重度慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B severe, CHB-Se)各 15 例,重型乙型肝炎(Severe hepatitis B, SH)20 例,诊断均符合《病毒性肝炎防治方案(1995 年北京)》修订的标准。对照组 11 例均为意外死亡者,血清 HBsAg、抗-HCV、HCV RNA、HBV DNA 均阴性,常规病理检查显示均为正常肝组织。

作者简介:张绪清(1965—),男,湖北省鄂州市人,博士,副教授,主要从事肝炎发病机制与临床治疗方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68754141

收稿日期:2000-09-30;修回日期:2001-03-01

1.2 主要试剂

鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体(McAb)为丹麦 DAKO 公司产品;鼠抗人 HLA-A, B, C McAb 为北京邦定公司产品。免疫组织化学 S-P 试剂盒、双重染色试剂盒和 DAB 与 ABC 显色剂均由福州迈新公司提供。

1.3 方法

肝组织标本保存及切片制备参照我们原先介绍的方法[2]。

1.3.1 肝内单种抗原的免疫组织化学染色 用免疫组化S-P方法对 11 例正常人和 70 例 HBV 感染者的肝组织切片都分别进行 ICAM-1、HLA-A, B, C 染色。主要步骤参照我们原先介绍的方法[2]。肝细胞 ICAM-1、HLA-A, B, C 抗原染色强度分级参照 Chu 等[3]提出的标准:无肝细胞着色为−;小于 10% 的肝细胞着色为+;10% ~ 50% 的肝细胞着色为 ++;大于 50% 的肝细胞着色为 +++。

1.3.2 肝内 ICAM-1 和 HLA-A, B, C 双重染色 参照试剂盒说明书进行,主要步骤如下:①切片自然风干后加 3% H_2O_2 作用 10 min;②10% 非免疫血清阻断 10 min;③抗-ICAM-1(1∶400),4 ℃过夜;④生物素标记的第二抗体,37 ℃ 1 h;⑤链霉菌抗生物素蛋白-碱性磷酸酶溶液,37 ℃ 30 min;⑥NBT/BCIP 显色,光镜下见紫色颗粒为阳性,蒸馏水漂洗;⑦双重染色增强剂,37 ℃ 30 min;⑧10% 非免疫血清阻断 10 min;⑨抗-HLA-A, B, C McAb,4 ℃过夜;⑩生物素标记的第二抗体,37 ℃ 1 h;⑪链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液,37 ℃ 30 min;⑫AEC 显色,光镜下见红色颗粒为阳性。苏木素复染,封片。对照设置:①两种第一抗体均不加;②只加一种第一抗体。

1.4 统计学分析

用秩和检验、等级相关分析。

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

2 结果

2.1 乙型病毒性肝炎患者肝细胞 ICAM-1 表达

正常人和慢性无症状 HBsAg 携带者肝细胞无 ICAM-1 表达。慢性乙型肝炎和重型乙型肝炎患者肝细胞出现不同程度 ICAM-1 表达。重型肝炎和重度慢性肝炎患者肝细胞 ICAM-1 表达水平显著高于中度慢性肝炎($P<0.05$)；中度慢性肝炎患者肝细胞 ICAM-1 表达水平也显著高于轻度慢性肝炎($P<0.05$)。重型肝炎与重度慢性肝炎患者之间的肝细胞 ICAM-1 表达水平相差不显著($P>0.05$)，见表 1。

表 1 乙型肝炎患者肝细胞 **ICAM-1** 表达水平

Tab 1 The levels of ICAM-1 expression in hepatocytes of patients with hepatitis B

	n	ICAM-1			
		−	+	++	++
Healthy	11	11	0	0	0
AsC	5	5	0	0	0
CHB-Sl	15	0	9	6	0
CHB-Mo	15	0	0	9	6
CHB-Se	15	0	0	2	13
SH	20	0	0	0	20
Total	81	16	9	17	39

2.2 乙型肝炎患者肝内 HLA-A, B, C 表达状况

11 例正常人和 4 例慢性无症状 HBsAg 携带者肝窦内皮、汇管区及肝窦内的单个核与多核白细胞有少量 HLA-A, B, C 表达，肝细胞无 HLA-A, B, C 表达，1 例慢性无症状 HBsAg 携带者肝细胞有少量 HLA-A, B, C 表达。43 例慢性肝炎和 20 例重型肝炎患者肝细胞均有不同程度 HLA-A, B, C 表达，且肝窦内皮 HLA-A, B, C 表达明显增强，另 2 例轻度慢性肝炎患者肝细胞缺乏 HLA-A, B, C 表达。HLA-A, B, C 主要表达在细胞膜上，部分细胞胞浆同时也有染色。在严重坏死区域附近的肝细胞，HLA-A, B, C 呈灶性蜂窝状较强表达和带状蜂窝状较强表达；而肝实质内非坏死区，HLA-A, B, C 多为散在表达，见图 1。不同临床类型患者之间的肝细胞 HLA-A, B, C 表达水平相差显著($P<0.05$)。重型肝炎和重度慢性肝炎患者肝细胞 HLA-A, B, C 表达水平显著高于中度慢性肝炎($P<0.05$)，中度慢性肝炎显著高于轻度慢性肝炎($P<0.05$)，轻度慢性肝炎也显著高于正常人和慢性无症状 HBsAg 携带者($P<0.05$)，见表 2。

表 2 乙型肝炎肝细胞 **HLA-A, B, C** 表达

Tab 2 HLA-A, B, C expression in hepatocytes of patients with hepatitis B

	n	HLA-A, B, C			
		−	+	++	++
Healthy	11	11	0	0	0
AsC	5	4	1	0	0
CHB-Sl	15	2	11	2	0
CHB-Mo	15	0	1	12	2
CHB-Se	15	0	1	4	10
SH	20	0	3	5	12
Total	81	17	17	23	24

2.3 乙型肝炎患者肝细胞 ICAM-1 和 HLA-A, B, C 表达间的关系

乙型肝炎患者肝细胞 ICAM-1 表达水平与 HLA-A, B, C 表达水平之间呈显著正相关，$P<0.05$。肝细胞 ICAM-1 表达水平越高的患者，其肝细胞 HLA-A, B, C 表达水平也越高，反之亦然，见表 3。

表 3 乙型肝炎肝细胞 **ICAM-1** 表达与 **HLA-A, B, C** 表达的关系

Tab 3 ICAM-1 and HLA-A, B, C expression in hepatocytes of patients with hepatitis B

ICAM-1	HLA-A, B, C				
	−	+	++	++	Total
−	15	1	0	0	16
+	2	6	1	0	9
++	0	6	9	2	17
++	0	4	13	22	39
Total	17	17	23	24	81

免疫组化双重染色显示：慢性乙型肝炎和重型肝炎患者肝组织内存在 ICAM-1/HLA-A, B, C 双阳性，ICAM-1 阳性/HLA-A, B, C 阴性及 HLA-A, B, C 阳性/ICAM-1 阴性等 3 种类型肝细胞，以 ICAM-1/HLA-A, B, C 双阳性肝细胞为主要细胞类型。ICAM-1/HLA-A, B, C 双阳性肝细胞多集中分布在炎症坏死区，ICAM-1 或 HLA-A, B, C 单阳性肝细胞多散在分布于非炎症区。在炎症坏死区，表达 ICAM-1 的肝细胞多数也同时表达 HLA-A, B, C，见图 2。

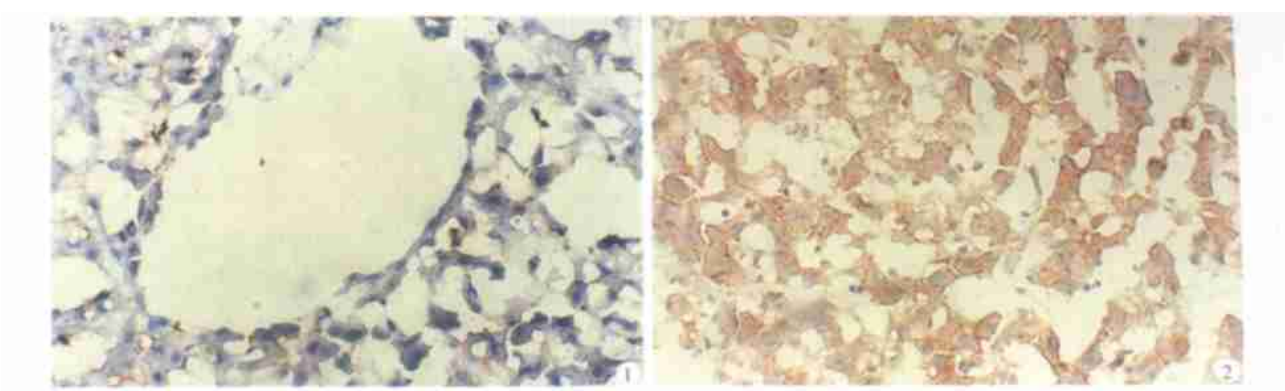


图 1 慢性无症状 **HBsAg** 携带者，肝窦内皮、肝窦内白细胞及个别肝细胞有少量 **HLA-A, B, C** 表达 (AEC×200)

Fig 1 Weak expression of HLA-A, B, C in hepatic sinusoid endothelium, leukocytes of hepatic sinus and individual hepatocytes in AsC (AEC×200)

图 2 中度慢性乙型肝炎，许多肝细胞同时表达 **ICAM-1** 和 **HLA-A, B, C** (免疫组化双重染色，ICAM-1 用 NBT/BCIP 显示呈紫色，HLA-A, B, C 用 AEC 显示呈红色×200)

Fig 2 A lot of hepatocytes expressed ICAM-1 and HLA-A, B, C simultaneonsly in CHB-Mo (Immunohistochemical double staining, ICAM-1 stained purple with NBT/BCIP, HLA-A, B, C stained red with AEC×200)

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

3　讨论

HBV 感染者体内活化的单核/巨噬细胞可释放 TNFα 等炎性介质, TNFα 能刺激肝血管内皮细胞和肝窦内皮增强表达 ICAM-1, ICAM-1 的增强表达又可以促进炎细胞向肝组织内浸润。肝内浸润炎细胞释放的 TNFα、IL-1、IFN-γ 能增强肝细胞表达 HLA 和 ICAM-1[4,5]。HBV 能直接诱导 $HepG_2$ 细胞增强表达 ICAM-1 和 HLA-DR[6,7], 推测 HBV 也能直接诱导人肝细胞增强表达 ICAM-1 和 HLA。

本研究显示, 正常人和慢性无症状 HBsAg 携带者肝细胞基本不表达 HLA-A, B, C; 慢性乙型肝炎和重型乙型肝炎患者肝细胞存在不同程度 HLA-A, B, C 表达; 肝损害越重者, 其肝细胞 HLA-A, B, C 表达也越强; 炎症坏死区域的肝细胞 HLA-A, B, C 表达水平明显高于非炎症区域的肝细胞。说明乙型肝炎肝细胞损伤与其肝细胞增强表达 HLA-A, B, C 有关, HLA-A, B, C 在 CD8 阳性 CTL 介导的肝细胞坏死中起重要作用, 与以往的研究结论相一致[3]。免疫反应是由两种信号介导的[8]: ①T 细胞受体(TCR)识别抗原-主要组织相溶性复合物(Ag-MHC)信号; ②ICAM-1/LFA-1 相互作用介导的细胞粘附信号。这两种信号对识别抗原的 T 细胞亚群的激活与克隆性增殖都是必需的。在慢性和重型乙型肝炎, 肝细胞 HLA-A, B, C 表达与 ICAM-1 表达一致性较好。免疫组化双重染色显示, 在炎症坏死区, 表达 ICAM-1 的肝细胞多数也同时表达 HLA-A, B, C。肝细胞 ICAM-1 和 HLA-A, B, C 的表达对 CTL 发挥细胞毒作用都是必需的, 说明 ICAM-1和 HLA-A, B, C 共同参与介导乙型肝炎肝细胞的免疫损伤过程。ICAM-1/HLA-A, B, C 双阳性肝细胞可能是 CTL 发挥有效细胞毒作用的靶细胞。肝细胞缺乏 ICAM-1 或 HLA-A, B, C 表达均不利于 CTL 识别, CTL 也就不能攻击这一类型的肝细胞。

参考文献:

[1] 张绪清, 顾长海. 细胞间粘附分子-1 与肝病[J]. 中华肝脏病杂志, 1997, 5(2): 110—112.

[2] 张绪清, 顾长海. 乙型肝炎肝组织细胞间粘附分子-1 表达[J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(4): 206—207.

[3] Chu C M, Liaw Y F. Coexpression of intercellular adhesion molecule-1 and class I major histocompatibility complex antigen on hepatocyte membrane in chronic viral hepatitis[J]. J Clin Pathol, 1993, 46(11): 1 004—1 008.

[4] Sano K, Nagaki M, Sugiyama A, *et al*. Effects of cytokines on the binding of leukocytes to cultured rat hepatocytes and on the expression of ICAM-1 by hepatocytes[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(4): 796—805.

[5] Hsu H Y, Chang M H, Ni Y H, *et al*. Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells in children with chronic hepatitis B virus infection[J]. J Pediatr Gastroenterol Nuts, 1999, 29(5): 540—545.

[6] Hu K Q, Yu C H, Vierling J M. Up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 transcription by hepatitis B virus X protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(23): 11 441—11 445.

[7] Hu K Q, Vierling J M, Siddiqui A. Trans-activation of HLA-DR gene by hepatitis B virus X gene product[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(18): 7 140—7 144.

[8] Gursoy R N, Jois D S S, Siahaan T J. Structure recognition of an ICAM-1 peptide by its receptor on the surface of T cells: conformational studies of cyclo(1, 12)-Pen-Pro-Arg-Gly-Gly-Ser-Val-Leu-Val-Thr-Gly-Cys-OH[K]. J Peptide Res, 1999, 53(4): 422—431.

(编辑　薛国文)

(上接 840 页)

的血小板反复输注后血小板增值减少, 有时甚至下降, 即血小板输注无效和非溶血性输血反应。机器单采血小板与手工法制备血小板相比, 由于接触同种异体血小板抗原及 HLA 抗原频率减少, 使抗血小板抗体产生的机会减少, 从而降低了血小板输注无效率[3]。

3.2　输注血小板有利于改善病人出血状况

影响血小板输注效果的因素很多, 除免疫因素外, 还有一些非免疫因素, 如高热、感染、采用其他治疗而诱导血小板减少; 部分特殊病人, 如白血病、骨髓移植的病人造血功能差, 本身血小板少, 因而输后血小板计数上升不明显, 或是输注血小板量不足, 浓度达不到治疗效果。临床观察发现, 虽然输注血小板后外周血血小板数升高不理想, 但仍有止血效果, 其紫癜、鼻衄、消化道出血等出血征象均有不同程度的改善。

3.3　对免疫性血小板输注无效者, 提倡进行血小板配型

据研究, 临床上出现血小板输注无效时, 应先检查有无非免疫因素[4], 据报道血小板输注无效者非免疫因素占 67%, 在排除了非免疫因素后应做血小板抗体检测, 因为随着血小板输注量的增加和输注次数的增多, 血小板抗体阳性率明显增高[5], 所以选用血小板血型配合的单一供体的血小板制剂, 有利于减少同种免疫反应, 提高血小板输注效果。

与手工法制备的血小板制剂相比, 机采血小板的血小板纯度高, 供体单一, 白细胞和红细胞污染率低, 降低了输血不良反应和经输血传播疾病的发生率, 对提高输注有效率, 减少同种免疫反应, 提高临床输血水平等均有意义, 尤其是对于需要长期输注血小板制剂的各类血液病, 放、化疗病人更具有优势。

关键词: 血小板; 配型; 应用
中图法分类号: R457.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Stehling L C, Doherty D C, Faust R J, *et al*. Practice guidelines for blood component therapy: a report by the American Society of Anesthesiologists task force on blood component therapy[J]. Anesthesiology, 1996, 84(3): 732—747.

[2] Eernisse J G, Brand A. Prevention of platelet refractoriness due to HLA antibodies by administration of leakocyte-poor blood components[J]. Exp Hematol, 1981, 9: 77—91.

[3] 邵新华, 汤静燕, 王耀平, 等. 单采血小板临床应用探讨: 附 21 例报告[J]. 临床儿科杂志, 1996, 14(5): 306—307.

[4] Muephy M F. State of the art in platelet transfusion therapy[J]. Transfusion Sci, 1996, 17: 575—586.

[5] 沈溪英, 孙德英, 李　华, 等. 输注血小板后血小板抗体检出率与输注反应的关系[J]. 上海医学检验杂志, 1997, 12(1): 17—18.

(编辑　薛国文)

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