DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.010

文章编号:1000-5404(2000)03-0227-04

论著

丁型肝炎病人肝组织HDAg与HBsAg/HBcAg和HBV DNA表达及关系

顾小红,李奇芬,王宇明 (第三军医大学附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038)

提 要 目的:探讨丁型肝炎病人肝组织中HDAg与HBsAg/HBcAg和HBV DNA表达及关系。方法:应用免疫组化双重染色和原位杂交,检测79例丁型肝炎病人肝组织HDAg、HBsAg、HBcAg和HBV DNA表达,以52例乙型肝炎作对照。结果:丁型肝炎HBsAg、HBcAg检出率(81%、71%)较乙型肝炎(94%、92%)低($P<0.05$或0.01)。HDAg以肝细胞核表达为主,HBsAg以肝细胞浆表达为主,HDAg和HBsAg表达强度及阳性细胞分布呈一致性,且与肝组织的炎症活动和病理损害程度相关($P<0.01$)。HBcAg以肝细胞核表达为主,阳性细胞主要呈单个细胞或点状分布,且HBcAg阳性细胞明显少于HDAg阳性细胞。HDAg表达强度与HBV DNA表达呈负相关($P<0.05$)。结论:HDV感染会抑制HBV DNA复制或病毒抗原表达;在HDV致病机制中既有HDV的直接细胞毒性作用,也有HBV和HDV的协同作用。

关键词 丁型肝炎;丁肝病毒抗原;乙肝病毒表面抗原;乙肝病毒核心抗原;乙肝病毒脱氧核糖酸
中图法分类号 R512.64 文献标识码 A

Relationship among expressions of HDAg, HBsAg/HBcAg and HBV DNA in liver in patients with hepatitis D

GU Xiao-hong, LI Qi-fen, WANG Yu-ming (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective: To investigate the relationship among expressions of HDAg, HBs/HBcAg and HBV DNA in the liver in patients with hepatitis D. Methods: HDAg, HBsAg, HBcAg and HBV DNA in paraffin-embedded liver tissue from 79 patients with hepatitis D were detected with immunohistochemical double labeling and *in situ* hybridization. Meanwhile, they were compared with the expressions of HBsAg and HBcAg in the liver tissues from patients with hepatitis B. Results: The detecting rates of HBsAg, HBcAg and HBV DNA in liver specimens from patients with hepatitis D were significantly lower than those in patients with hepatitis B ($P<0.05$ or 0.01). HDAg was mainly expressed in nuclei of hepatocytes. Much of positive cells were obviously aggregated in periportal region, especially at the advancing edges of areas of piecemeal necrosis. Moreover, strong expression of HDAg was seen in the bollooning degenerated hepatocytes and those near piecemeal necrosis region. HBsAg was mainly expressed in cytoplasm of hepatocytes and positive cell distribution was similar to that of HDAg positive cells. HBcAg was mainly expressed in nuclei of hepatocytes and positive cell distribution was alone for focal type. Double labeling showed that both HDAg and HBsAg might be mostly expressed in the same hepatocytes and positive cells were mostly found to locate in the same area of the liver tissue. Conclusion: HDV infection can inhibit replication of HBV or expression of HBV antigen. Both the interaction between HBV and HDV and the direct cytotoxicity of HDV may play important roles in pathogenesis of hepatitis D.

Key words hepatitis D; HDV antigen hepatitis B virus surface antigen; HBV core antigen; HBV DNA

作者简介:顾小红(1968.6),女,四川省绵阳市人,硕士,主治医师,现附属大坪医院野战外科研究所消化内科工作,主要从事病毒性肝炎发病机制方面的研究,发表论文6篇。
电话:(023)68757342

收稿日期:1999-07-12;修回日期:1999-12-22

自1977年Rizzetto等[1]发现Delta抗原(δ-Ag)以来,有关HDV的分子生物学特性等研究取得了很大成就,但丁型肝炎的发病机理并不十分肯定。本研究应用免疫组化双重染色和原位杂交技术,分析了79例

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

丁型肝炎病人肝组织 HDAg 表达与 HBsAg/HBcAg 和 HBVDNA 表达及关系，以期了解 HDV 和 HBV 在丁型肝炎发病机制中作用和意义，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

79 病例均为西南医院感染病专科中心 1990～1998 年住院的血清 HDV 阳性乙型肝炎患者，其中急性肝炎（Acute hepatitis, AH）8 例，慢性肝炎轻度（Mild-chronic hepatitis, mild-CH）23 例，慢性肝炎中度（Moderate-chroonic, mode-CH）27 例，重型肝炎（Severe hepatitis, SH）21 例（包括慢性肝炎重度 6 例）。以 52 例乙型肝炎作对照，其中 AH 8 例，Mild-CH 12 例，Mode-CH 27 例，SH 5 例（包括 2 例重度慢性肝炎）所有病例均经肝组织病理学检查确诊，诊断标准以 1995 年《病毒性肝炎防治方案（试行）》为依据[2]。

1.2 主要试剂及来源

免疫组化 SP 试剂盒和鼠抗 HBsAg、HBcAg 试剂盒购自福州迈新公司（Maxim biotech, inc 产品）。双重染色试剂盒购自北京中山生物技术公司（美国 Zymed 公司产品）。丁型肝炎多克隆抗体由本科自行选定的 HDV 合成肽抗原经免疫家兔制备[3]，工作浓度 1∶160。HBV DNA 试剂盒购置华西医科大学附一院肝病研究室。

1.3 操作步骤

操作步骤均按试剂盒说明书进行。

1.4 对照

阳性对照为预试中 HBsAg、HBcAg 和 HBV DNA 阳性乙型肝炎肝组织切片和 HDAg 阳性丁型肝炎肝组织切片。阴性对照选自正常人肝组织。此外，分别用鼠血清和 PBS 代替第一抗体作为替代实验，每例切片先分别检测 HBsAg、HBcAg 和 HDAg，然后进行双重染色。

1.5 结果判断标准

双重染色 HBsAg、HBcAg 阳性颗粒 NBT 显色为紫黑色，HDAg 阳性颗粒 AEC 显色为深红色。免疫组化半定量判断：未见阳性细胞（－），阳性细胞占肝小叶全部肝细胞的 1/3 以下（＋），1/3～2/3 为（＋＋），2/3 以上为（＋＋）。

1.6 统计学处理

采用计数资料的 χ^2 检验和秩相关分析。

2 结果

2.1 丁型肝炎患者肝组织中 HDAg 表达

HDAg 以肝细胞核型表达为主，其次是胞浆型表达。阳性细胞呈弥散型、灶状或片簇状分布于肝小叶内，尤其在门脉周围、坏死灶处较密集。在坏死灶边缘和气球样变性的肝细胞浆内有大量的 HDAg 表达，还观察到 HDAg 呈眉弓状分布在有病变的肝细胞膜下。慢肝中度和重型肝炎肝组织中，HDAg 阳性细胞主要呈弥散型、片簇状分布于肝小叶内，在坏死灶处及其周围较多，有时可见 HDAg 阳性细胞以门脉为中心沿肝索分布整个肝小叶，见图 1。在急性肝炎和慢肝轻度肝组织中，HDAg 阳性细胞多呈单个或小灶状稀疏分布。秩相关分析发现重型肝炎和慢性肝炎中度 HDAg 表达强于急性肝炎和慢性肝炎轻度，且有显著差异（$P<0.05$），见表 1。

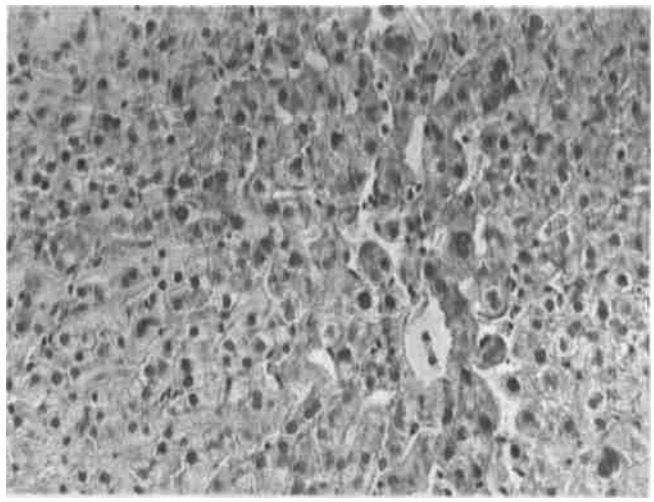


图 1 慢性中度丁型肝炎患者肝组织 **HDAg** 表达 （S-P× 200）

Fig 1 Expression of HDAg in liver tissue of the patient with chronic moderate HD （S-P× 200）

表 1 丁型肝炎患者肝组织 HDAg 表达

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

HDAg expression	AH	Mild-CH	Mode-CH*	SH*
－	2	5	4	2
＋	4	13	4	1
＋＋	2	5	11	8
＋＋	0	0	8	10
Total	8	23	27	21

Ridit analysis; *: $P<0.05$ *vs* AH

2.2 乙型肝炎患者肝组织中 HBsAg、HBcAg 表达

HBsAg 阳性率为 81%（64/79），HBsAg 主要表达于肝细胞浆，有的呈包涵体型。在慢肝中度和重型肝炎，阳性细胞呈灶状或片簇状分布于肝小叶周边，在门脉周围及碎屑状坏死区较密集，还可见 HBsAg 呈岛屿状分布。在慢肝轻度和急性肝炎，阳性细胞较少且分散，表达强度也较弱；乙型肝炎 HBsAg 阳性率为 94%（49/52），HBsAg 表达及阳性细胞分布基本与丁型肝炎一致，但片簇状分布更多见，表达程度也较强，两组比较差异显著（$P<0.05$）。HBsAg 表达强度和阳性细胞分布均与肝组织炎症活动度和病理损害相关（$P<0.01$），见表 2。HBcAg 阳性率为 71%（56/79），HBcAg 以肝细胞核表达为主。阳性细胞分布主要呈单个细胞或点状（3～5 个细胞）分布，见图 2；乙型肝炎 HBcAg 阳性率为 94%（49/52），阳性细胞分布主要在门脉周围、碎屑状坏死区较明显，HBcAg 表达程度较强，两组比较有

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

显著差异($P<0.01$), 见表 2。

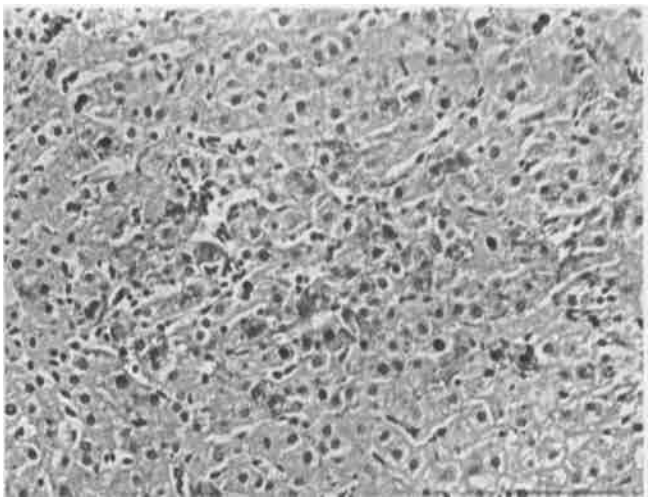


图 2　慢性丁型肝炎患者肝组织 **HBcAg** 表达　(S-P× 200)

Fig 2　The expression of HBcAg in liver tissue of the patient with HD　(S-P× 200)

2.3　HDAg 与 HBsAg、HBcAg 表达关系

双标记检测发现 HBsAg、HDAg 两抗原多同时表达在同一肝细胞, 单独表达的细胞也有, 但数量明显少于双抗原表达的肝细胞, 且二抗原阳性细胞分布比较一致, 其间也可见二抗原均阴性的肝细胞。HBcAg 和 HDAg 阳性细胞分布关系不密切, HBcAg 阳性细胞明显少于 HDAg 阳性细胞, 有时可见众多 HDAg 阳性细胞周围或之中仅一个或 3～5 个 HBcAg 阳性细胞。

2.4　HBV DNA 在　型肝炎患者肝组织表达

丁型肝炎患者肝组织 HBV DNA 阳性率为 27%(21/79), HBV DNA 阳性颗粒呈稀疏散在分布在肝细胞浆或核内以细胞核内分布为主, 着色浅淡。秩相关分析发现 HBV DNA 阴性组 HDAg 表达明显强于 HBV DNA 阳性组, 两者有统计学差异, 即 HBV DNA 表达与 HDAg 表达强度呈负相关, 见表 3; 而对照组 HBV DNA 阳性率为 44%(23/52), 阳性颗粒主要密集分布于肝细胞浆内, 有时可集中在细胞核周围, 个别细胞核内亦可见少数浅染的阳性颗粒, 着色较深, 表明乙型肝炎组 HBV 复制活跃而且 HBV DNA 的基因拷贝数较多, 两者比较差异显著($P<0.05$)。

表 2　丁型肝炎及乙型肝炎病人肝组织 HBsAg、HBcAg 表达(%)

Tab 2　Expression of HBsAg/HBcAg in liver tissue of the patients with hepatitis D and hepatitis B (%)

Clinical type	Hepatitis D													Hepatitis B										
	n	HBsAg(%)*					HBcAg(%)#						n	HBsAg(%)					HBcAg(%)					
		−	+	++	+++	Total positive		−	+	++	+++	Total positive			−	+	++	+++	Total positive		−	+	++	+++	Total positive	
AH	8	3	4	1	0	5	(63)	5	2	1	0	3	(38)	8	2	4	2	0	6	(75)	1	5	2	0	7	(86)
Mild-CH	23	6	10	7	0	17	(74)	7	13	3	0	16	(70)	12	1	8	3	0	11	(92)	1	8	3	0	11	(92)
Mode-CH	27	3	5	12	7	24	(89)	6	8	10	3	21	(78)	27	0	5	19	3	27	(100)	2	2	18	5	25	(93)
SH	21	3	0	9	9	18	(86)	5	6	7	3	16	(76)	5	0	0	2	3	5	(100)	0	0	2	3	5	(100)
total	79	15	19	29	16	64	(81)	23	29	21	6	56	(71)	52	3	17	26	6	49	(94)	4	15	25	8	48	(92)

χ^2 test; *: $P<0.05$ *vs* HBsAg expression of hepatitis B; #: $P<0.01$ *vs* HBcAg expression of hepatitis B

表 3　79 例丁型肝炎患者肝组织 HDAg 表达与 HBV DNA 表达关系

Tab 3　Relationship between the expressions of HDAg and HBV DNA in liver tissues of 79 patients with hepatitis D

HDAg expression	n	HBV DNA expression		
		+	−	Positive rate(%)
−	13	7	6	54
+	22	9	13	41
++	26	5	21	19
+++	18	0	18	0
Total	79	21(27)	58(73)	

Ridit analysis; $P<0.05$ *vs* HB DNA (−)

3　讨论

HDV 感染对 HBV 存在依赖关系, 但慢性乙型肝炎重叠感染 HDV 后, HDV 会抑制 HBV DNA 复制或 HBcAg 表达[4], 不少学者检测了 HDV 感染者血清 HBV 标记物的变化, 甚至观察了血清和肝组织 HBV DNA 含量(Southern blot 法)[5], 得出类似的结果。本研究发现丁型肝炎肝组织 HBsAg、HBcAg 和 HBV DNA 阳性率及表达强度均低于单纯 HBV 感染者, 且 HBcAg 主要呈核型表达, 表达强度也较弱, 表明 HBV DNA 基因呈低水平复制, 而且 HDAg 表达强度与 HBV DNA 表达呈负性相关, 这一结果表明 HDV 感染有抑制 HBV 基因复制或病毒抗原表达的作用, 特别是在 HDV 复制活跃的阶段, 即 HDAg 大量表达时, HBV 复制受到的抑制最为明显。当抗 HD 阳性时, HDAg 表达受抑制, HBV 复制受到的抑制就减少, 因此仍有 HBV DNA 被检出。此表明 HBV 复制的受抑制可能是一过性的, 一旦 HDAg 转阴, HBV 复制又可重新开始, 即 HDV 感染时 HBV 的抑制状况, 因 HDV 感染的不同阶段而异, 这与 Rizzetto 等[6] 动物实验结果亦相一致。本实验也发现 HBsAg 和 HDAg 表达及

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

分布有一致关系，提示HDV对HBsAg的依赖，HDV和HBV可共同存在；同时，丁型肝炎有较高率的HBcAg检出，呈浆型或混合型表达，这些提示有HBV呈活动性复制状态，为HDV复制提供HBsAg创造有利条件，这与HDV感染时HBV的抑制状况，因HDV感染的不同阶段而异不相矛盾。

丁型肝炎发病机制中，有的认为是HDAg或HDV RNA对肝细胞的直接细胞毒性作用，有的认为是CTL为主的免疫调节机制在肝损害中起主导作用，也有的认为是HDV和HBV之间相互作用的结果。实验观察到HDAg阳性细胞呈弥散型、灶状和片簇状分布于肝小叶内，尤其是在门脉周围和坏死灶处，HDAg表达强度及阳性细胞分布均与肝组织炎症活动度及病理损害程度正有关。在坏死灶边缘肝细胞和气球样变性肝细胞浆内有大量的HDAg强阳性表达，证实有大量HDV堆积在病变肝细胞内，可以直接损害肝细胞，还观察到HDAg呈眉弓状分布在病变肝细胞膜下，这可能预示有大量HDV从该细胞释放而感染邻近细胞；有学者认为丁型肝炎病理学致变和临床表现可因原来感染的HBV或伴随的HBV感染而不同，通过对肝移植病人的研究，此观点也得到证实，因为移植肝脏原来的HDV感染常常不引起任何可见病理学改变或临床表现，只有发生HBV重叠感染时，才出现肝组织大块性炎症活动。有研究证实具有HBV活动性复制的丁型肝炎比没有HBV活动复制的病人有更严重的肝脏疾病和临床结果。也有可能HBV复制帮助了HDV的扩散，或HBV和HDV的协同作用加速了肝脏损害，因此认为HBV感染的本质在与已经加深了HDV致病效能。

参考文献

[1] Rizztto M, Canese M G, Arico O, *et al*. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to the hepatitis B virus in the liver and the serum of HBsAg carriers[J]. Gut, 1977, 18(11): 997－1 003.

[2] 病毒性肝炎防治方案(试行)[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(11): 788－791.

[3] 郑 红, 李奇芬, 林小红, 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, 77(5): 273－275.

[4] Rizzetto M. The delta agent[J]. Hepatology, 1983, 3(5): 729－937.

[5] Hadziyannis S J, Sherman M, Lieberman H M, *et al*. Liver disease activity and hepatitis B virus replication in chronic Delta antigen positive hepatitis B virus carriers[J]. Hepatology, 1985, 5(4): 544－547.

[6] Rizzetto M, Rosina F, Saracco G, *et al*. Treat of chronic Delta hepatitis with alpha-2-recombiant interferon[J]. J Hepatol, 1986, 3(Suppl 2): 5 229－5 233.

(编辑 薛国文)

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)03-0230-01

丽珠环明与皮质类固醇激素合用治疗红斑狼疮7例

Combination of cyclosporin A and adrenocortical steroid for the treatment of 7 patients with lupus erythematosus

周春丽，叶庆俏 （第三军医大学附属西南医院皮肤科，重庆 400038）

丽珠环明，即环孢素软胶囊(Cyclosporin Gelatin Capsule)，有效成分为环孢素A。作为新型强免疫抑制剂，目前应用于器官移植后免疫抑制和抗排斥治疗以及某些自身免疫性疾病的治疗。我科于1997年11月开始使用丽珠环明合并皮质类固醇激素(以下简称激素)治疗7例红斑狼疮(LE)，取得较好疗效，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

7例均为住院患者，男性1例，女性6例，年龄24～45岁，病程2月至10年，除男性患者诊断为亚急性皮肤型红斑狼疮(SCLE)外，其余6例均根据美国风湿病学会(ARA)1982年修订的标准[1]确诊为系统性红斑狼疮(SLE)。面部红斑7例，关节痛7例，尿蛋白++～++2例，抗核抗体(ANA)阳性6例。

所有患者都曾口服强的松1～2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$间断或持续治疗，和/或使用环磷酰胺冲击治疗而效果欠佳，并在激素治疗过程中出现类柯兴综合征及高血压等副作用。

1.2 治疗方法

丽珠环明初始剂量4～5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，分3次口服；合用强的松0.3～0.5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，每日晨服。临床症状基本平稳、各种检验指标基本正常后，逐渐缓慢减量丽珠环明至2～3 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$维持，总治疗时间在3个月以上。

(下转234页)

作者简介：周春丽(1971.5)，女，河南省郑州市人，硕士，住院医师。电话：(023)68755126

收稿日期：1999-01-18；修回日期：1999-03-31

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