DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.029
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
474 2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)05-0474-03

丁型肝炎病人肝组织中HDAg和肝细胞凋亡双标记表达

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 探讨肝细胞凋亡在丁型肝炎发病机制中的作用。方法 采用免疫组化双重染色和TUNEL技术,检测79例丁肝病人肝组织HDAg和肝细胞凋亡分布及其关系,以54例乙型肝炎病人肝组织作对照。结果 HDAg以肝细胞核表达为主,HDAg、凋亡细胞表达分布与肝组织病理损害程度一致($P<0.01$)。多数凋亡细胞位于HDAg阳性部位或附近,肝细胞凋亡在各型肝炎中的分布强度差别有显著性意义($P<0.01$)。结论 HDAg表达与肝细胞凋亡分布之间有显著的相关性,肝细胞凋亡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;凋亡;免疫组化;TUNEL技术
中图法分类号:R329.25;R329.11;R512.64 文献标识码:A

Expression of HDAg and hepatocytic apoptosis in liver tissues of patients with hepatitis D

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

Abstract: **Objective** To study the role of hepatocytic apoptosis in the pathogenesis of hepatitis D. **Methods** HDAg expression and hepatocytic apoptosis in the samples of liver tissue of 79 patients with hepatitis D were observed with immunohistochemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase-medited dUTP nick end labeling (TUNEL) respectively. In addition, the relationship of the expression of HDAg with the occurrence of hepatocytic apoptosis in the liver tissue was studied with double labeling and serial sectioning. **Results** HDAg was expressed mainly in the nucleus of hepatocytes and the degree of expression, extension of HDAg distribution in hepatocytes and hepatocytic apoptosis were obviously correlated to the severity of pathological damages and necrotic and inflammatory reactions of liver tissues ($P<0.01$). Most of the apoptotic hepatocytes were found in the vicinity of HDAg positive cells. There was a positive correlation of the intensity of hepatocytic apoptosis to HDAg expression ($P<0.01$). **Conclusion** Hepatocytic apoptosis may play an important role in the damages of liver cells after HDV infection and there exists close relationship of HDAg expression and hepatocytic apoptosis.

Key words: hepatitis D; Hepatitis D virus; antigen; apoptosis; immunohistochemistry; TUNEL

丁型肝炎病毒(HDV)是严重危害乙型肝炎患者预后的肝炎病毒,而HBV感染患者合并HDV感染后病情加重及病死率增高的机制尚不十分清楚。近年研究发现肝细胞凋亡与病毒性肝炎的肝细胞损害有密切关系[1]。为了解肝细胞凋亡在丁型肝炎病情重型化机制中的作用,本研究采用免疫组化单、双标记和TUNEL技术,对79例丁型肝炎病人肝组织HDAg、肝细胞凋亡表达进行了研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 病例和标本

本组病例均为我院1990~1998年住院病人,丁型肝炎79例,其中急性肝炎(Acute hepatitis, AH)8例,慢性肝炎轻度(Mild

作者简介:顾小红(1968—),女,四川省绵阳市人,硕士,主治医师,主要从事丁型肝炎发病机制方面的研究,发表论文10篇,现在附属大坪医院野战外科研究所消化内科工作。电话:(023)68757342

收稿日期:1999-11-15;修回日期:2000-03-07

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

chronic hepatitis, Mild-CH) 23 例, 慢性肝炎中度(Moderate chronic hepatitis, Mode-CH) 27 例, 重型肝炎(Severe hepatitis, SH) 21 例(包括慢性重型肝炎 8 例, 亚急性重型肝炎 6 例, 急性重型肝炎 1 例, 慢性肝炎重度 6 例)。以 52 例 HDV 阴性乙型肝炎作对照, 其中 AH 9 例, Mild-CH13 例, Mode-CH 20 例, SH 12 例(慢性重型肝炎 2 例, 亚急性重症肝炎 2 例, 慢性肝炎重度 8 例)。所有病例均经肝组织病理检查确诊, 诊断标准以 1995 年《病毒性肝炎防治方案(试行)》为依据。每例患者经皮肝穿获得肝组织, 标本均固定于 10% 中性福尔马林液, 常规石蜡包埋, 用于免疫组化和 TUNEL 技术检测。

1.2　主要试剂来源和操作方法

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[2], 工作浓度 1∶160。免疫组化双标记(Histostain-DS)试剂盒为美国 Zymed 公司产品, 免疫组化染色的过氧化酶标记选用链霉卵白素(SP)试剂盒, 为美国 Maxin Biotech Inc 产品。TUNEL 试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.3　对照

阳性对照为已知 HDAg 和凋亡细胞阳性的丁型肝炎肝组织切片, 阴性对照选自正常人肝组织, 血清各型肝炎标志物均阴性。此外, 分别用鼠血清和 PBS 代替第一抗体作为替代实验。TUNEL 实验阴性对照用试剂 II 代替试剂 I 和试剂 II 的混合溶液孵育切片, 结果阴性。每张切片先分别检测 HDAg 和肝细胞凋亡, 然后进行双重染色检测。

1.4　结果判断标准

双重染色 HDAg 阳性细胞 NBT 显色为紫黑色, 凋亡阳性细胞 AEC 显色为红棕色。阳性程度判断: 低倍镜视野阳性细胞少于 1/3 为(+), 2/3 为(++), 大于 2/3 为(+++)。

1.5　统计学处理

采用计数资料的 χ^2 检验和秩相关分析。

2　结果

2.1　型肝炎肝组织肝细胞凋亡的检测

凋亡阳性信号位于细胞核, 多数凋亡细胞散在分布于肝小叶, 有时可见较多阳性细胞围绕中央静脉, 也可见小叶内坏死和小叶周边碎屑坏死处凋亡严重, 阳性细胞也可呈灶状分布。凋亡阳性细胞体积变小, 胞浆收缩, 核固缩, 核膜泡, 还可见致密染色质边聚, 核呈月牙形改变, 见图 1。且可不伴有炎性细胞浸润。慢性肝炎中度和重型肝炎肝细胞凋亡较急性肝炎和慢性肝炎轻度多($P<0.01$)。

2.2　型肝炎患者肝组织中 HDAg 表达

HDAg 以肝细胞核表达为主, 其次是胞浆表达。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 阳性标记呈眉弓状分布在有病变的肝细胞膜下。慢性肝炎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 2。在急性肝炎和慢性肝炎轻度肝组织中, 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, 且有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

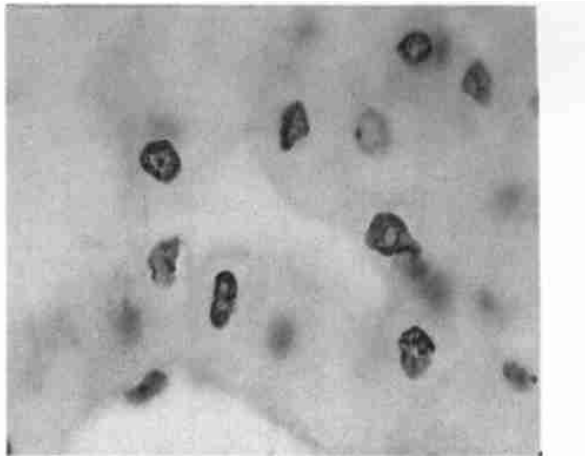


图 1　慢性丁型肝炎患者肝组织中肝细胞凋亡表达 (TUNEL× 1 000)

Fig 1　Expression of hepatocyte apoptosis in liver tissue of the patients with chronic hepatitis D (TUNEL× 1 000)

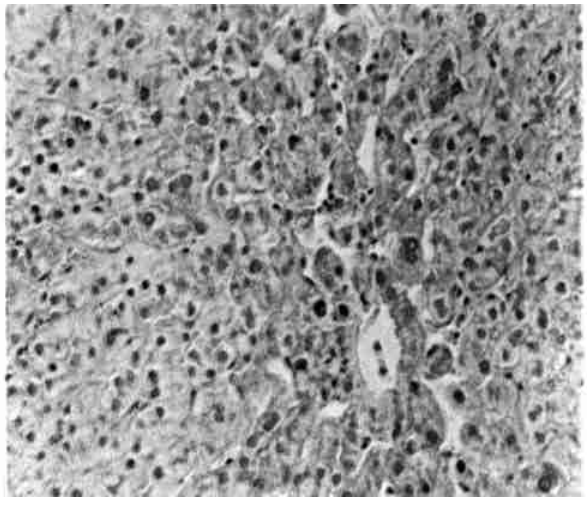


图 2　慢性丁型肝炎患者肝组织 **HDAg** 表达 (S-P× 200)

Fig 2　HDAg expression in liver tissue of the patients with chronic hepatitis D (S-P× 200)

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

表1 各型丁型肝炎患者肝组织 HDAg 表达状况(%)

Tab 1 The expression of hepatocyte apoptosis in different types of 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

*: $P<0.05$ *vs* AH

2.3 HDAg 表达与肝细胞凋亡的关系

多数凋亡细胞位于HDAg 阳性部位或其附近, 少数组织中二者无明显解剖学关系; 凋亡可发生于 HDAg阳性细胞, 亦可发生在抗原阴性细胞。HDAg 强度与肝细胞凋亡关系, 见表2。

表2 丁型肝炎患者肝组织中 HDAg 表达与肝细胞凋亡表达关系

Tab 2 The relationship between HDAg expression and hepatocyte apoptosis expression in liver tissues of the patients with hepatitis D

HDAg expression	Hepatocyte apoptosis expression			
	－	＋	＋＋	＋＋
－	3	7	3	0
＋	0	11	10	1
＋＋	0	4	14	8
＋＋	0	0	9	9

$\chi^2=43.47$, $P<0.01$

3 讨论

细胞死亡是生物界的普遍现象, 凋亡和坏死是细胞死亡的两种形式, 细胞程序性死亡(Programmed cell death)的形态学叫凋亡(Apoptosis)。肝病的临床表现往往是由于各种原因所致肝细胞坏死后所引起的, 研究发现, 在肝病的病理切片上常可发现凋亡的肝细胞, 提示病毒性肝炎患者肝组织中, 肝细胞坏死和凋亡现象均可存在[2]。

近年凋亡研究发现, 细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)通过 Fas/FasL 途径介导的细胞凋亡是肝细胞凋亡的主要途径之一, 在病毒感染所致的肝细胞损害机制中有重要作用。至今国内外有多家报道肝细胞凋亡在乙型肝炎(单独 HBV 感染)和丙型肝炎肝组织中的表达, 提出乙型和丙型肝炎病毒抗原可诱导肝细胞凋亡因子(Fas/FasL)的表达, 从而促进肝细胞凋亡。近年在丁型肝炎发病机制研究中发现, 在丁型肝炎的发病机制中, 除了乙型肝炎病毒抗原可诱生肝细胞表达 Fas 外, HDAg 也可诱导肝细胞大量表达 Fas, 正是 HDV 感染后 HDAg 诱导 Fas 表达的叠加作用, 使感染 HDV 的肝炎患者, 大量或过度表达 Fas, 同时与浸润的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)、肝细胞的 FasL 及血浆中可溶性 FasL 结合, 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[3]。本实验通过TUNEL 技术检测和比较了各类型肝炎患者肝细胞凋亡发生情况, 发现重型肝炎患者肝组织中凋亡阳性细胞最多, 而且阳性细胞在小叶内和小叶周边碎屑坏死处较为密集, 即凋亡表达强度和阳性细胞分布与肝组织病理损害程度有着密切关系, 此与其他学者在乙型肝炎和丙型肝炎肝细胞凋亡研究中报道一致[4~6]。本研究双标记检测发现大多数凋亡细胞位于HDAg 阳性部位或其附近, 而 HDAg 表达与肝组织炎症活动度及病理损害程度也一致。提示肝细胞凋亡在丁型肝炎的发生和发展过程中可能有一定的重要作用。

参考文献:

[1] Patal T, Gores G J. Apoptosis and hepatobiliary disease[J]. Hepatology, 1995, 21(7): 1 725－1 741.

[2] 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, 77(2): 273－275.

[3] 顾小红, 李奇芬. 丁型肝炎病人肝组织 Fas/FasL 和 HDAg 表达[J]. 免疫学杂志, 1999, 15(3): 194－196.

[4] Mochizuki K, Hayashi N, Hiramatsu N, *et al*. Fas antigen expression in liver tissues of patient with chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 1996, 24(1): 1－7.

[5] 秦 波, 张定凤, 马 英, 等. 乙型肝炎患者肝组织 Fas/FasL 表达及其在肝细胞凋亡中的作用[J]. 中华肝脏病杂志, 1997, 5(1): 88－90.

[6] Trauth B C, Klas C, Peters A M, *et al*. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis[J]. Science, 1989, 245(4 915): 301－305.

(编辑 陈聪连)

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