DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.018

文章编号:1000-5404(1999)10-0738-04

丁型肝炎重型化机制中 Fas/FasL 的作用

顾小红* 李奇芬 张云东** (第三军医大学附属西南医院全军传染病专科中心) 重庆,400038

提 要 **目的**:探讨 Fas/FasL 途径介导的肝细胞凋亡在丁型肝炎重型化机制中的作用。**方法**:采用免疫组化双重染色和连续切片技术,检测 48 例丁型肝炎病人肝组织丁型肝炎病毒抗原 HDAg、Fas/FasL 表达,以 54 例乙型肝炎作疾病对照。**结果**:Fas 以肝细胞浆表达为主,HDAg 以核浆型表达为主,两抗原表达及分布有相关性。FasL 主要表达在浸润淋巴细胞浆、肝细胞核,与 HDAg 表达及分布不全一致,丁型肝炎 Fas、FasL 检出率及表达强度较对照组高,HDAg、Fas、FasL 3 成分在各型肝炎中的表达强度有显著性差异。**结论**:HDV 感染可诱导肝细胞表达 Fas,细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)通过 Fas/FasL 途径介导的肝细胞凋亡在丁型肝炎病情重型化机制中可能有重要作用。

关键词 丁型肝炎;丁型肝炎病毒抗原;Fas;Fas 配体;免疫组化

中图法分类号 R512.6+4 **文献标识码**:A

丁型肝炎病毒(HDV)感染比单独 HBV 感染的病情及病理改变严重,其机制不十分清楚。在病毒性肝炎的组织病理研究中发现由细胞毒 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocytes,CTL)介导的肝细胞凋亡起重要作用,而肝细胞凋亡机制中:Fas/FasL(Fas ligand)是其主要途径之一[1]。为了解细胞凋亡相关分子 Fas/FasL 在丁型肝炎发病机制中的作用,我们采用了免疫组化双重染色技术,对 48 例丁型肝炎病人肝组织 Fas/FasL 和丁型肝炎病毒抗原(Hepatitis D virus antigen,HDAg)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

病例均为我院住院病人,丁型肝炎 48 例,其中急性肝炎(Acute hepatitis D,AHD)5 例,慢性肝炎轻度(Chronic hepatitis D mild,CHD-Mild)5 例,慢性肝炎中度(Chronic hepatitis D moderate,CHD-Mode)22 例,重型肝炎(Severe hepatitis D,SHD)16 例(含慢性肝炎重度 9 例,亚急性重型肝炎 7 例)。乙型肝炎组 54 例,其中 AHB 8 例,CHB-Mild 13 例,CHB-Mode 29 例,SHB 4 例(慢性肝炎重度 2 例,亚急性重症肝炎 2 例),所有病例均经肝组织病理检查确诊。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,常规石蜡包埋,用于免疫组化检测。

1.2 主要试剂来源

兔抗人 Fas、FasL 多克隆抗体和免疫组化双标记(Histostain-DS)试剂盒为美国 Zymed 公司产品,购自北京中山生物技术公司,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。免疫组化染色的过氧化酶标记选用链霉卵白素(S-P)试剂盒,为美国 Maxin Biotech Inc 产品,购自福州迈新生物技术开发公司。操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.3 对照

阳性对照为已知 Fas、FasL 和 HDAg 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,包括肝组织 Fas、FasL、HDAg、HBsAg、HBeAg、HBcAg 及 HCVNS3 抗原免疫组化检测为阴性。此外,分别用鼠血清和 PBS 代替第一抗体作为替代实验,每张切片先分别检测 Fas、FasL 和 HDAg,然后进行双重染色检测。

1.4 结果判断标准

免疫组化:有棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性,无色者为阴性。双重染色:Fas、FasL 阳性颗粒 NBT 显色为紫黑色,HDAg 阳性颗粒 AEC 显色为红棕色。结果半定量分析参照 Kiyoshi[3]法:未见阳性颗粒为(-),阳性颗粒占肝小叶全部肝细胞的 1/3 以下为(+),1/3~2/3 为(++),2/3 以上为(+++)。

1.5 统计学处理

采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 丁型肝炎 HDAg、Fas 和 FasL 表达

HDAg 阳性物呈细颗粒状弥漫分布于肝细胞内,以胞核表达最多,其次是胞浆。在坏死灶边缘肝细胞和气球样变肝细胞浆内有大量的 HDAg 呈浆型强阳性表达,还发现 HDAg 阳性标记呈眉弓状分布在有病变的肝细胞膜下。各型肝炎 HDAg 阳

* 顾小红,女,31 岁,主治医师,硕士,现在附属大坪医院野战外科研究所消化内科 重庆,400042

** 附属大坪医院野战外科研究所神经外科 重庆,400042

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

性细胞分布各有特点：CHD-Mode 和 SHD 中 HDAg 阳性细胞呈弥散型、灶型、片簇状分布于肝小叶内，在门脉周围、坏死灶处较密集，见图 1。在 AHD 和 CHD-Mild，HDAg 阳性细胞多呈单个或小灶状稀疏分布于小叶内。HDAg 阳性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相关（$P<0.01$），见表 1。

Fas 主要表达于肝细胞浆内，在 CHD-Mode 和 SHD 中，阳性细胞呈小灶状或片簇状分布于肝小叶周边，主要在门脉周围、碎屑状坏死区尤其明显，见图 2，在 CHD-Milde 和 AHD 中，阳性细胞较少且分散，表达强度也较弱；乙型肝炎肝组织中，Fas 表达及阳性细胞分布基本与丁型肝炎的一致，但片簇状较少见，表达程度稍弱。

FasL 主要表达在浸润的淋巴细胞浆或肝细胞核内，阳性细胞主要在肝小叶碎屑状、桥样及灶状坏死区较为密集，见图 3。各型肝炎中 FasL 表达强度、阳性细胞分布在 CHD-Mode 和 SHD 中较在 AHD 和 CHD-Mild 强、密集；乙型肝炎中 Fas、FasL 表达及阳性细胞分布与丁型肝炎基本一致。2 组比较，丁型肝炎 Fas 阳性检测率和表达强度较乙型肝炎高，见表 2。

2.2　丁型肝炎病人肝组织 HDAg 和 Fas/FasL 关系

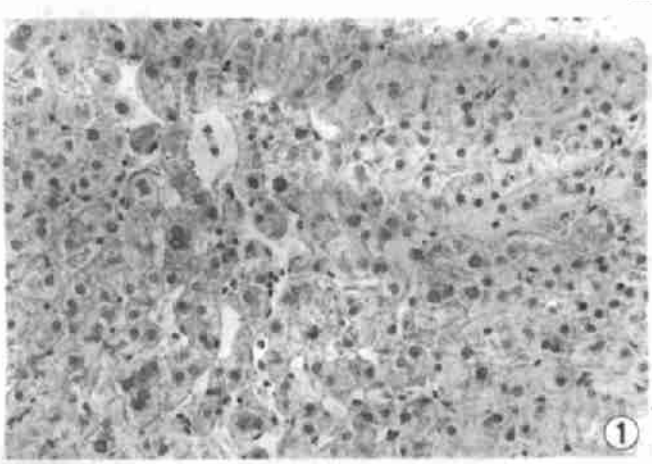
双标记检测发现 HDAg、Fas/FasL 结果与单标记检测基本一致。Fas、HDAg 多同时表达在同一肝细胞，单独表达的细胞也有，但数量较少，阳性细胞分布比较一致，HDAg 和 FasL 亦可同时表达于同一肝细胞，但数目较少，较多见的是 2 种抗原各自表达于不同的肝细胞，可见汇管区浸润的淋巴细胞大量表达 FasL，HDAg 阳性细胞明显多于 FasL 阳性细胞，FasL、HDAg 阳性细胞分布也不全一致。另外发现 Fas 和 FasL 在肝细胞内，多数为同时表达，少数肝细胞可 Fas 强 FasL 弱或 Fas 弱 FasL 强表达。

表 1　各型丁型肝炎 Fas、FasL 表达

Tab 1　Expression of Fas and FasL in different hepatitis D types

Type	n	Hepatitis D										n	Hepatitis B								
		Fas					FasL						Fas					FasL			
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
AHD	5	2	2	1	0	3(60%)	2	2	1	0	3(60%)	8	4	2	2	0	4(50%)	3	4	1	0	5(63%)
CHD-Mild	5	1	3	1	0	4(80%)	3	1	1	0	2(40%)	13	5	7	1	0	8(62%)	5	5	3	0	8(62%)
CHD-Mode	22	1	8	10	3	21(95%)	2	5	13	2	20(91%)	29	7	11	7	4	22(75%)	6	9	12	2	23(79%)
SHD	16	0	0	9	7	16(100%)	0	1	6	9	16(100%)	4	0	0	2	2	4(100%)	0	0	2	2	4(100%)
Total	48	4	13	21	10	44(92%)△	7	9	21	11	41(85%)	54	16	20	12	6	38(70%)	14	18	18	4	40(74%)

△：$P<0.01$ *vs* Fas expression of hepatitis B



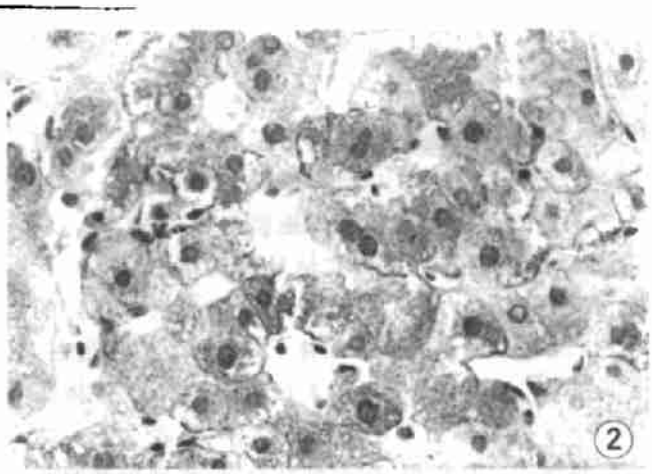


图 1　慢性丁型肝炎中度病人肝组织 HDAg 表达　(S-P×200)

Fig 1　Expression of HDAg in liver tissue of patients with moderate chronic hepatitis D　(S-P×200)

图 2　慢性丁型肝炎中度病人肝组织 Fas 表达　(S-P×400)

Fig 2　Expression of Fas in liver tissue of patients with moderate chronic hepatitis D　(S-P×400)

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

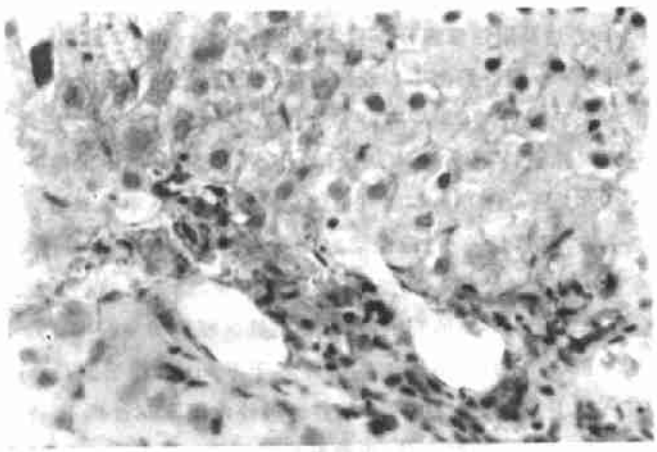


图3 慢性丁型肝炎中度病人肝组织中浸润淋巴细胞和肝细胞FasL表达 (S-P×400)

Fig 3 Expression of FasL in infiltrating lymphocytes and hepatocytes in liver tissue of patients with moderate chronic hepatitis D (S-P×400)

表2 各型丁型肝炎HDAg表达状况

Tab 2 Degree of HDAg-Positivity in different hrpatitis D types

Type	n	+	++	+++
AHD	5	3	2	0
CHD-Mild	5	4	1	0
CHD-Mode	22	3	12	7
SHD	16	0	8	8
Total	48	10(21%)	23(48%)	15(31%)

3 讨论

Fas是介导细胞凋亡的I型膜蛋白，含325个氨基酸，分子量为45×10^3u，属肿瘤坏死因子α受体(TNF-α)家族，Fas蛋白位于细胞膜内的C端，有一段80个氨基酸序列与细胞凋亡信号传递相关，称为"死亡信号传递区"[4]，是凋亡因子受体，起凋亡"按钮"的作用；作为死亡因子的Fas配体FasL是I型膜蛋白，分子量约40×10^3u，是Fas的天然配体，当Fas配体或抗体与Fas结合即启动细胞死亡程序，对表达Fas的细胞有很强的杀伤作用。病毒性肝炎时，感染病毒的肝细胞膜上有大量病毒抗原存在，可诱生Fas表达[5]，Fas和FasL相互作用是介导肝细胞凋亡的主要途径之一[1]。

实验可见Fas强FasL弱或Fas弱FasL强表达，但二者阳性强度均随组织炎症坏死程度加重而增强，推测其意义可能为：同一肝细胞自身的Fas和FasL交联，通过顺式触发使肝细胞发生"自杀(Suicide)"或分别表达Fas或FasL相邻肝细胞相互交联，导致"同胞残杀(Fratricide)"[5]。另外发现不是所有病毒抗原和Fas抗原表达的区域都有淋巴细胞浸润，因此推测除了表达FasL的CTL与靶细胞Fas结合介导细胞凋亡外，有可能存在其它方式，如自分泌性杀伤及旁分泌死亡等途径[6]，即表达FasL的CTL等细胞分泌可溶性FasL(SFasL)，通过血循环到达靶肝细胞，从而介导肝细胞凋亡。另外由于CTL通过Fas/FasL路径引起的细胞凋亡缺乏抗原特异性，凡是Fas阳性的细胞都有可能被激活的FasL阳性CTL诱导而凋亡，与细胞是否携带病毒抗原无关，就是所谓的"旁观者溶解(Bystander Lysis)"[7]。在研究发现FasL表达及阳性细胞分布与Fas、HDAg表达及阳性细胞分布不全一致，却与肝组织炎症及病理损害一致，提示也可能存在旁观者效应。

丁型肝炎病人肝组织有Fas/FasL表达，对HDAg、Fas、FasL在各型肝炎的表达强度分析发现：Fas、FasL、HDAg均与肝组织炎症活动度和病理损害程度正相关，且丁型肝炎Fas、FasL检出率较乙型肝炎高，提示：Fas/FasL与HDV致病可能有关。丁型肝炎中除了乙肝病毒抗原可诱导肝细胞表达Fas外，HDAg也可诱生肝细胞表达Fas，正是HDV感染后HDAg诱导Fas表达的叠加作用，使感染HDV的病人大量或过度表达Fas，同时与浸润的淋巴细胞(CTL)、肝细胞的FasL及血浆中SFasL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。因此，在丁型肝炎病情重型化机制中，CTL通过Fas/FasL途径介导的肝细胞凋亡可能有重要作用。

参考文献

1 Kaga D, Vignaux F, Ledermann B, *et al*. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. Science, 1994, 265(3): 528

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. 中华医学杂志, 1993, 77(5): 273

3 Kiyoshi M, Norio H, Naoki H, *et al*. Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. J of Hepatol. 1996. 24(1): 1

4 Trauth B C, Klas C, Peters A M, *et al*. Monoclone antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science. 1989. 245(7): 301

5 Galle P R, Hofmann W J, Walczak H, *et al*. Involvement

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

of the CD95 (APO-/Fas) receptor and ligand in liver damage. J Eep Med,1995,182(5):1223
6 Smolarek C, Strand S, Krammer P H, *et al*. The Apo-1/Fas(C95) system is involved in bile-acid induced apoptosis in human hepatocytes. Hepatology,1996,24(4):956
7 Badley A D, McElhinny J A, Leibson P J, *et al*. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocgtes. J Virol,1996,70(1):199

(收稿:1999-04-15;修回:1999-07-20)
(编辑　汪勤俭)

The role of Fas and FasL in pathogenetic mechanisms of severe hepatitis D

Gu Xiaohong, Li Qifen, Zhang Yundong (Center of Infections Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing,400038)

Abstract **Objective**: To study the pathogenetic role and expression of Fas antigen (Fas) and Fas ligand (FasL) in severe cases of hepatitis D. **Methods**: Immunohistochemistry, double staining and serial section techniques were employed to study the expression of Fas, FasL and hepatitis D virus antigen (HDAg) in liver biopsy specimens of 48 cases of hepatitis D. **Results**: Fas was mainly expressed in the cytoplasm of hepatocytes, HDAg in the nucleus of hepatocytes and FasL in the cytoplasm of infiltrating lymphocytes and the nucleus of hepatocytes. Most of the positive hepatocytes were distributed in the spaces between infiltrating lymphocytes especially along the advancing edge of "piecemeal necrosis". The distribution and expression of Fas and HDAg were quite closely correlated in hepatitis D. The expression intensity of Fas, FasL and HDAg in hepatocytes was quite different in various types of hepatitis ($P<0.01$). The detection rate and Kiyoshi's score of Fas and FasL were higher in HDV infection than in HBV infection. **Conclusion**: In HDV infection, the distribution and expression of Fas, FasL and HDAg are significantly correlated to the inflammation intensity and the severity of liver damage. HDV infection induces the expression of Fas in the hepatocytes and apoptosis caused by cytotoxic T cells through Fas-FasL interaction may play an important role in hepatocyte damage in HDV infection.

Key words hepatitis D; hepatitis D virus antigen; Fas; Fas ligand; immunohistochemistry

(上接 737 页)

肌力稍弱(Ⅳ级)。经颅多普勒检查:左侧大脑中动脉血流速度明显减慢。术后 4 周患者痊愈出院。

病例 2:男,25 岁,车祸致右颌下区挫裂伤 1 h。就诊时神志清楚,血压 10.5/6 kPa,由陪送者用敷料紧压左颈部伤区止血。立即输血、补液,同时送手术室,气管切开全麻下清创。术中先阻断颈总动脉近心端,寻得动脉损伤处,见甲状软骨上缘平面颈动脉有一长 1.5 cm 的纵形裂口,颈内静脉断裂。结扎颈内静脉,缝合颈总动脉裂口(颈动脉断血时间约 5 min),术后患者清醒,5 d 后拔除气管导管,7 d 后痊愈出院,无任何后遗症。

2　讨论

颈动脉损伤的诊断并不困难[1],患者有明确的外伤史,伤口呈喷射状出血,循环血量大量丢失,如初期不能有效的压迫止血或不能及时就诊,患者常因大量失血而死亡。初期救治的首要问题是在压迫止血保持呼吸道通畅的同时,快速补充血容量,并同时准备手术探查。由于颈部加压止血,渗出的血液很快在颈部组织间隙中形成血肿,不同程度影响呼吸,也妨碍麻醉插管,往往需作紧急气管切开。手术探查时应有良好的切口暴露,先寻得颈总动脉的近心端暂时阻断血流后才可能寻得血管损伤处。静脉可作结扎,而颈总和颈内动脉结扎的死亡率可达 33%,神经系统并发症发生率在 50%以上[2],应尽可能吻合或修补,万不得已时才可结扎。本文第一例患者因颈内动脉断裂处靠近颅底,无法吻合,才行结扎处理,患者术后虽获良好恢复,但只是偶然情况,不可作为颈动脉结扎的依据。

关键词　颈部;损伤;血管伤
中图法分类号　R826.61　　**文献标识码**:B

参考文献

1 白　涛　主编. 现代创伤治疗学. 北京:人民军医出版社,1996. 207～208
2 郑家伟,张志愿. 颈动脉切除-重建术研究进展. 国外医学:口腔医学分册,1998,25(3):148

(收稿:1999-01-30;修回:1999-07-15)
(编辑　汪勤俭)

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