DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.012

文章编号:1000-5404(2000)03-0231-04

论著

ICAM-1蛋白和mRNA在慢性乙型肝炎肝组织中的表达

张绪清,顾长海 (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:探讨肝组织细胞间粘附分子-1(ICAM-1)表达在慢性乙型肝炎(CHB)发病机制中的作用。方法:用原位杂交和免疫组织化学技术检测11例正常人和50例慢性HBV感染者肝内ICAM-1 mRNA和蛋白表达情况。结果:正常人和慢性无症状HBsAg携带者肝细胞无ICAM-1 mRNA和ICAM-1表达,CHB患者肝细胞ICAM-1 mRNA和ICAM-1表达增强,阳性肝细胞多分布在汇管区周围和腺泡内炎症坏死区域;重度CHB患者肝细胞ICAM-1 mRNA和ICAM-1表达显著强于中、轻度CHB患者($P<0.05$);肝细胞ICAM-1表达强度与肝组织炎症活动度呈显著正相关($P<0.01$);肝细胞ICAM-1表达强的患者肝功能显著差于ICAM-1表达弱者($P<0.05$)。结论:肝细胞ICAM-1表达在慢性乙型肝炎肝细胞坏死中起重要作用,肝细胞ICAM-1表达水平能较好反映其肝损害程度和肝功能状况。

关键词 乙型病毒性肝炎;细胞间粘附分子-1
中图法分类号 R36;R512.62 文献标识码 A

Expression of ICAM-1 protein and mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis B

ZHANG Xu-qing, GU Chang-hai (Department of Infections Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective: To study the role of hepatic expression of ICAM-1 in the pathogenesis of chronic hepatitis B (CHB). Methods: The expression of ICAM-1 protein and mRNA in the liver of 11 healthy persons and 50 patients with HBV infection were observed with *in situ* hybridization and immunohistochemical assay. Results: In healthy persons and chronic asymptomatic HBsAg carriers, no expression of ICAM-1 in the hepatocytes was found. And in the patients with CHB, ICAM-1 protein and mRNA were strongly expressed in hepatocytes. The hepatocytes with positive expression were mostly located in the periportal and intra-acinar areas of inflammation and necrosis. Positive expression of ICAM-1 protein and mRNA was significantly stronger in cases with severe CHB than in those with moderate and mild CHB ($P<0.05$). The level of ICAM-1 expression in hepatocytes was positively correlated with the severity of inflammation in the liver ($P<0.01$). Liver functions was more severely impaired in the patients with strong expression of ICAM-1 than in those with weak expression ($P<0.05$). Conclusion: In patients with CHB, the expression of ICAM-1 in the liver plays an important role in the pathogenesis of hepatocellular necrosis and the severity of ICAM-1 expression can reflect the degree of liver damage and the condition of liver funotions.

Key words viral hepatitis B; ICAM-1

细胞粘附分子-1(Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)属免疫球蛋白超家族成员,其配体是淋巴细胞功能相关抗原-1(Lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)[1]。ICAM-1/LFA-1相互作用能介导淋巴细胞与血管内皮细胞粘附,促进淋巴细胞向组织中浸润[1,2]。本研究拟在探讨肝组织ICAM-1表达在慢性乙型肝炎免疫发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 对象

50例慢性HBV感染者,男42例,女8例,平均年龄33.4岁,其中慢性无症状HBsAg携带者(AsC)5例,慢性肝炎45例。正常人11例均为意外事故死亡者,HBsAg、抗-HCV、HBVD-

作者简介:张绪清(1965.10),男,湖北省鄂州市人,博士,主治医师,讲师,主要从事乙型肝炎发病机制方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754217

收稿日期:1999-06-06;修回日期:2000-01-11

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

NA、HCVRNA 均阴性。

1.2 试剂

鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体为丹麦 Dako 公司产品，SP 法试剂盒和 DAB 显色试剂盒均为福州迈新公司产品；反义寡核苷酸(AS)由上海生化所合成，其序列为 5′-GGGACCCATAGC-GAGGCTGAGGTTGCAA-3′，与 ICAM-1 mRNA 5′末端翻译起始位点序列(nt63-81)互补；寡核苷酸 3′末端地高辛(DIG)标记试剂盒和碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(抗-DIG-AP)由德国宝灵曼公司提供。

1.3 方法

1.3.1 肝组织标本保存及切片制备 每例肝组织分成两部分，一部分用 10%甲醛溶液固定送病理制成石蜡切片作常规病理检查；另一部分用 PLP 溶液固定、8.5%蔗糖/PBS 溶液漂洗后置液氮中保存，并制成 5 μm 厚的冰冻切片。

1.3.2 制备 DIG 标记的寡核苷酸探针 按试剂盒提供的方法对 AS 进行 3′末端标记。

1.3.3 肝内抗原表达 用免疫组化 SP 法对肝组织冰冻切片进行染色，DAB 显色，苏木素复染、封片。对照设置：①实验阳性片为阳性对照；②不加抗体为阴性对照。在排除非特异性着色的情况下，光镜见棕黄色颗粒为阳性。染色强度分级参照 Chu 等提出的标准。无肝细胞着色为－，＜10%的肝细胞着色为＋，10%～50%为＋＋，＞50%为＋＋。

1.3.4 原位杂交检测肝组织 ICAM-1 mRNA 用 DIG 标记的寡核苷酸探针按照《非放射性杂交技术》介绍的方法[3]对肝组织冰冻切片进行原位杂交，并用抗 DIG-AP 和 NBT/BCIP 进行染色和显色。光镜下见紫色颗粒为阳性，肝细胞 ICAM-1 mRNA 表达强度分级与 ICAM-1 表达强度分级相同，对照设置：不加探针为阴性对照。

1.3.5 血清总胆红素(TB)、丙氨酸转氨酶(ALT)、门冬氨酸转氨酶(AST)和凝血酶原时间由检验科检测，根据凝血酶原时间推算凝血酶原活动度(PTa)。血清 HBVDNA 用 PCR 法检测，血清 HBsAg、抗 HBs、HBeAg、抗 HBe、抗 HBc 用 ELISA 法检测。

1.3.6 统计学处理 用秩和检验，等级相关分析和 t 检验。

2 结果

2.1 肝组织 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达

正常人和慢性无症状 HBsAg 携带者肝组织内，肝窦内皮、Kupffer 细胞和血管内皮细胞有少量 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达，肝细胞无 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达。慢性乙型肝炎患者肝细胞出现不同程度 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达，且肝窦内皮、血管内皮细胞 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达增强。肝细胞 ICAM-1 mRNA 表达多呈胞浆型，少数伴有核着色，见图 1。在中、重度慢性肝炎，阳性肝细胞多呈局灶性分布；在轻度慢性肝炎，阳性肝细胞多呈散在分布。肝细胞 ICAM-1 表达多呈膜型，有的伴有胞浆着色，未见核型，见图 2。在中、重度慢性乙型肝炎，ICAM-1 阳性肝细胞多呈局灶性分布、呈蜂窝状，阳性肝细胞多分布在汇管区周围和腺泡炎症坏死区域。在轻微炎细胞浸润部位，ICAM-1 表达局限在肝窦内皮和肝细胞肝窦侧，但在有严重炎细胞浸润的碎片状坏死和灶性死区域，ICAM-1 表达分布在整个肝细胞表面。重度慢性肝炎患者肝组织 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达明显强于中度慢性肝炎($P<0.05$)，中度慢性肝炎患者肝组织 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达也明显强于轻度慢性肝炎($P<0.05$)，见表 1。肝细胞 ICAM-1 mRNA 表达水平与 ICAM-1 表达水平的一致性较好，两者间相关非常显著($P<0.01$)。

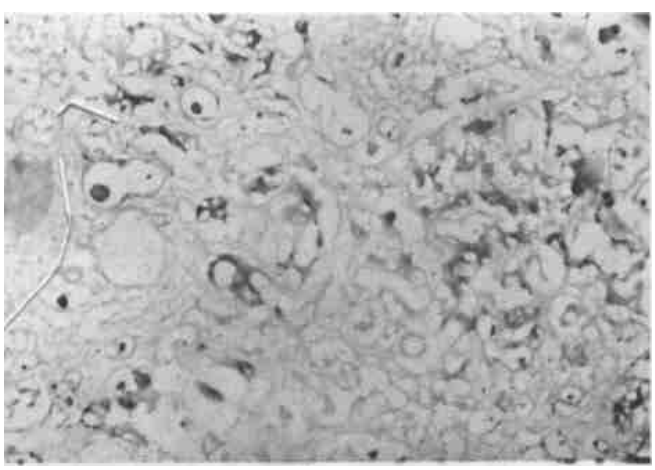


图 1 重度慢性乙型肝炎肝细胞 **ICAM-1 mRNA** 表达 原位杂交，肝细胞、肝窦内皮和血管内皮细胞大量表达 **ICAM-1 mRNA** (NBT/BCIP× 100)

Fig 1 ICAM-1 mRNA expression in liver tissue with severe chronic hepatitis B with *in situ* hybridization. Stronger expression of ICAM-1 mRNA in hepatocytes, hepatic sinusoidal lining cells and vessel endothelial cells (NBT/BCIP× 100)

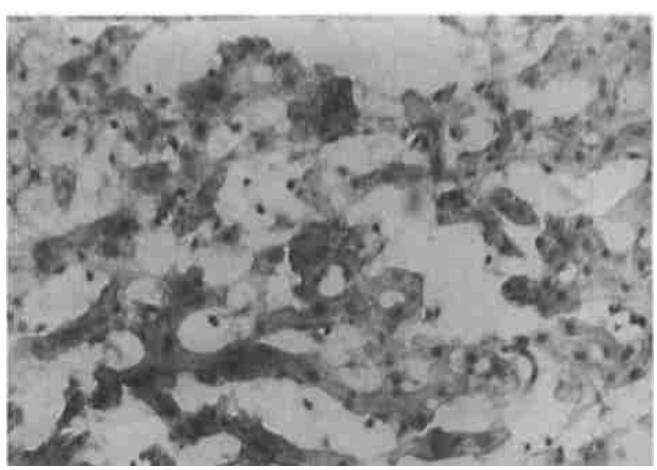


图 2 中度慢性乙型肝炎肝组织 **ICAM-1** 表达，碎片状坏死区，许多肝细胞增强表达 **ICAM-1**，部分呈蜂窝状，阳性表达分布在整个肝细胞表面，伴许多炎细胞浸润 (S-P× 200)

Fig 2 ICAM-1 expression in liver tissue with moderate chronic hepatitis B. In the area of piecemeal necrosis, enhanced ICAM-1 expression in many hepatocytes, partly with a local honey comb pattern, infiltrated by numerous inflammatory cells (S-P× 200)

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

表 1　乙型肝炎患者肝细胞 ICAM-1 和 ICAM-1 mRNA 表达

Tab 1　ICAM-1 and ICAM-1 mRNA expression on hepatocytes of patients with viral hepatitis B

	n	ICAM-1				ICAM-1 mRNA				HBeAg(+)	HBVDNA(+)
		-	+	++	+++	-	+	++	+++		
Healthy	11	11	0	0	0	11	0	0	0	0	0
AsC	5	5	0	0	0	5	0	0	0	4(80%)	5(100%)
CHB(Mi)	15	0	9	6	0	0	9	6	0	9(60%)	10(67%)
CHB(Mo)	15	0	1	9	5	0	0	9	6	4(27%)	5(33%)
CHB(S)	15	0	2	2	11	0	0	2	13	3(20%)	4(27%)

CHB(Mi): Mild CHB; CMB(Mo): Moderate CHB; CHB(S): Severe CHB

表 2　肝细胞 ICAM-1 表达与炎症活动度

Tab 2　The levels of ICAM-1 expression in hepatocytes and inflammatory activities in liver

Grade of liver inflammation(G)	n	ICAM-1			
		-	+	++	+++
0	16	16	0	0	0
1	10	0	8	2	0
2	5	0	1	4	0
3	15	0	0	11	4
4	15	0	0	0	15

2.2　肝细胞 ICAM-1 表达与肝组织炎症，见表 2

慢性乙型肝炎患者肝组织炎症越明显，其肝细胞膜 ICAM-1 表达则越强，两者之间呈显著正相关，$P<0.01$。

2.3　肝细胞 ICAM-1 表达与肝功能，见表 3

肝细胞 ICAM-1 表达强的患者血清 ALT、AST、TB 水平显著高于 ICAM-1 表达弱者；ICAM-1 表达强的患者凝血酶原活动度显著低于 ICAM-1 表达弱者。

表 3　肝细胞 ICAM-1 表达与肝功能

Tab 3　The levels of ICAM-1 expression in hepatocytes and the liver functions

ICAM-1	n	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TB(μmol/L)(%)	PTa
+	9	43±17	54±29	14.9±4.0	90.6±9.5
++	17	139±105*	137±123*	29.8±10.6#	85.2±11.1
+++	19	194±82*	226±76*	114.0±35.5*	56.4±10.2

*: $P<0.01$ *vs* ICAM-1(+) group;

#: $P<0.05$ *vs* ICAM-1(+) and (++) groups

2.4　肝细胞 ICAM-1 表达与 HBV 复制标志

HBV 感染者肝细胞 ICAM-1 表达水平越高，其血清 HBeAg、HBVDNA 阳性率则越低，两者间呈显著负相关，见表 4。

表 4　HBV 感染者肝细胞 ICAM-1 表达与 HBV 复制标志

Tab 4　The levels of ICAM-1 expression in hepatocytes and HBV replication markers

ICAM-1	n	HBeAg(+)	HBVDNA(+)
-	5	4(80%)	5(100%)
+	9	8(89%)	8(89%)
++	17	5(29%)	7(41%)
+++	19	3(16%)	44(21%)
Total	50	20(40%)	24(48%)

3　讨论

正常人肝细胞不表达 ICAM-1，但存在 ICAM-1 基因。本结果显示 HBV 感染者肝内 ICAM-1 表达水平与 ICAM-1 mRNA 表达水平的一致性较好，提示 HBV 感染是通过促进肝细胞 ICAM-1 基因转录而诱导ICAM-1 的表达增强。HBV 能直接或通过 IL-1、IFNγ、TNF-α等细胞因子间接诱导肝细胞增强表达 ICAM-1[3,4]。

Del Pozo 等[5] 报告在淋巴细胞-内皮细胞相互作用中趋化因子诱导 T 细胞极化、形成胞浆突起；ICAM-1/LFA-1 在胞浆突起介导的淋巴细胞募集过程中起重要作用，并促进 T 细胞的跨内皮迁移运动。慢性乙型肝炎肝血管内皮和肝窦内皮 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 增强表达有利于淋巴细胞通过上述类似机制向肝组织中浸润，为 CTL 攻击靶细胞创造必要的条件。本研究发现，肝组织无炎症损伤者肝细胞缺乏 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达，而慢性乙型肝炎患者肝细胞出现不同程度 ICAM-1 mRNA 和 ICAM-1 表达，而且其表达程度随着组织炎症损害的加重而增强，提示肝组织炎症存在和严重程度与肝细胞表达 ICAM-1 及水平有关。

在轻微炎细胞浸润部位，ICAM-1 表达局限在肝窦内皮和肝细胞肝窦侧，但在有严重炎细胞浸润的碎

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

片状坏死和灶性坏死区域，ICAM-1 表达分布在整个肝细胞表面。说明肝细胞坏死与肝细胞膜 ICAM-1 表达有关，ICAM-1 在慢性乙型肝炎肝细胞坏死中起重要作用，CTL 细胞借助 ICAM-1/LFA-1 与肝细胞粘附、发挥细胞毒作用，导致肝细胞坏死[6]。血清 HBeAg、HBV DNA 是反映 HBV 感染者体内病毒复制活跃的重要指标。HBV 感染者肝细胞 ICAM-1 表达越强，其血清 HBeAg、HBV DNA 阳性率则越低，提示肝细胞 ICAM-1 增强表达有利于机体清除病毒，说明肝细胞缺乏或低水平表达 ICAM-1 可能是慢性 HBV 感染持续存在的重要原因。

CHB 患者肝损害越重，其肝细胞 ICAM-1 表达越强；肝细胞 ICAM-1 表达越强的患者肝功能也越差。说明肝细胞 ICAM-1 表达水平能较好反映 CHB 患者肝损害程度和肝功能状况。

Essani 等[7] 报道抗 ICAM-1 和抗 LFA-1 的单克隆抗体能阻断内毒素血症所致鼠急性炎症性肝损伤。Stepkowski 等[8] 报道针对鼠 ICAM-1 mRNA 的反义核酸阻断心脏移植排斥反应的发生。我们推测用针对人 ICAM-1 mRNA 的反义核酸抑制肝细胞 ICAM-1 表达，或者用抗 ICAM-1 和抗 LFA-1 的单克隆抗体对预防乙型肝炎肝组织炎症坏死应有一定的帮助。

参考文献

[1] Wawryk S O, Novotny J R, Wick I P, *et al*. The role of the FA-1/interaction in human leukocyte homing and adhesion[J]. Immunol Rev, 1989, 108(1): 135—161.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Del Pozo M A, Cabanas C, Montoya M C, *et al*. ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes[J]. J Cell Bio, 1997, 137(2): 493—508.

[6] Stewart M P, Cabanas C, Hogg N, *et al*. T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1[J]. J Immunology, 1996, 156(13): 1 810—1 817.

[7] Essani N A, Fisher M A, Farhood A, *et al*. Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure[J]. Hepatology, 1995, 21(5): 1 632—1 639.

[8] Stepkowski S M, Tu Y, Condon T P, *et al*. Induction of transplantation tolerance by treatement with oligonucleodtides and anti-LFA-1 monoclonal antibodies [J]. Transplantation Proceedings, 1995, 27(1): 113.

（编辑 陈聪连）

（上接230页）

2 结果

2.1 疗效观察

7例患者治疗1个月后出现明显疗效，2～3个月后基本达到临床痊愈。关节痛于5～7 d后消失，面部红斑2～3周后消退，血沉(ESR)2周内恢复正常，ANA于3～4周后恢复正常，尿蛋白于1月后显著降低。

2.2 副作用

2例患者于治疗中出现谷丙转氨酶(ALT)轻度增高。2例出现多毛症。

3 讨论

本科应用丽珠环明近一年，体会到：①早期联合应用小剂量激素和丽珠环明能明显缩短疾病恢复的时间，治疗1个月即有明显疗效，此时开始减少激素与环孢素A剂量，治疗2～3个月后减为强的松15～20 mg/d、丽珠环明2～3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$维持，从而既减少激素的用量和副作用，又降低治疗费用。②环孢素A的疗程应在3个月以上。文献[2]报道使用孢素A不足3个月易引起病情复发，复发后重新使用仍有效。若在3个月的治疗中因故不能坚持使用环孢素A，应口服环磷酰胺或硫唑嘌呤替代。③丽珠环明的副作用相对较轻。Grossman 等[3] 指出长期应用环孢素A的危险性有肾毒性、高血压、恶性肿瘤发生率增加和感染时有发生。本组7例中出现轻度肝功能损害和多毛症各2例，停药后均恢复。④注意掌握适应症。建议主要用于对长期大剂量激素治疗无效或效差或不能耐受的病例。

关键词 丽珠环明；环孢素A；皮质类固醇激素；红斑狼疮
中图法分类号 R593.24 文献标识码 B

参考文献

[1] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 南京：江苏科学技术出版社，1996. 580.

[2] 卢植生. 丽珠环明与皮质类固醇激素合用治疗红斑狼疮和皮肌炎7例[J]. 临床皮肤科杂志，1997, 26(2): 103—105.

[3] Grossman R M, Chevret S, Abi-Rached J, *et al*. Long-term safety of cyclosporine in the treatment of psoriasis[J]. Arch Dermatol, 1996, 132(6): 623—629.

（编辑 陈聪连）

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