DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.023

慢性 HBV感染时肝细胞膜肿瘤坏死因子受体表达的观察

顾长海 闵伟琪 (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆, 630038

提 要 探讨了 HBV 感染者 (n = 9)及非 HBV 感染者 (n = 8)体外培养肝细胞膜肿瘤坏死因子 α受体 (mTNFαR)的表达状况,并通过肝细胞与 LPS激活的 Kupffer细胞共同培养以间接观察 TNFα的细胞毒效应。结果显示: 与活化 Kupffer细胞共孵的 HBV感染者肝细胞培养上清 LDH水平明显升高,当 mTNFαR被上调 2~ 3倍时升高更显著;而在 HBV 标志阴性者,即使 mTNFαR上调,肝细胞培养上清 LDH水平也无明显变化。因此认为,在 HBV感染时 TNFα可通过高表达 mTNFαR而强化对肝细胞的毒性作用,这也许是慢性 HBV感染肝细胞损伤的机理之一。

关键词 受体,病毒;乙型肝炎病毒;肝细胞膜;肿瘤坏死因子
中图法分类号 R512.62

大量研究证明,肝 Kupffer细胞被激活后,释放众多细胞因子,如肿瘤坏死因子-α (Tumor necrosis factor-α, TNFα)、白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)和白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)等,这些因子协同作用是导致乙型肝炎肝细胞损伤的重要机理之一,其中 TNFα起着核心作用。Han等[1]曾在大鼠肝细胞膜上发现两种 TNFα受体,即膜型 TNFα受体-p55 (Membrane TNFα receptor-p55, mTNFα-p55, mTNFαR1)和膜型 TNFα受体-p75(Membrane TNFα receptor-p75, mTNFαR2)。TNFα通过与肝细胞膜 mTNFαR特异结合而发挥生物效应和细胞毒性。因此,研究 HBV感染时肝细胞膜 mTNFαR表达状况,有助于阐明 TNFα介导乙型肝炎肝细胞损伤的机理。

1 材料与方法

1.1 标本来源

为了获取足够大的肝组织标本,选血清 HBV标志阳性成人原发性肝癌 9例,肝切除时在肝动脉阻断 10 min内获取癌周肝组织块,作为 HBV已攻击的肝组织;选血清 HBV标志阴性成人原发性肝内胆管结石症 8例,在同样条件下获取正常肝组织块,作为对照。冰浴贮运 10 min内行细胞分离培养。

1.2 研究内容和技术

1.2.1 成人肝细胞及 Kupffer细胞分离培养 新鲜肝组织块先以无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 缓冲液及含 Ca^{2+} 的 0.05% 胶原酶溶液灌注 30 min至组织发白,剪成 1 mm× 1 mm× 1 mm大小,胶原酶 37℃消化 15 min,纱布过滤, 50× g 离心 2 min, 3次获取肝细胞,调整至 2× 10^6个 /ml用于实验。上清液 500× g 离心 5 min, 3次,接种于 12孔培养板 (2× 10^6个 /ml), 2 h后弃培养液,收集 Kupffer细胞用于实验。台盼蓝染色、计数表明细胞存活率及纯度均大于 80%。

1.2.2 重组人 TNF(rhTNF)放射性 ^{125}I标记 参照文献[2]采用氯胺 T标记法实施,标记率为 82.4%,比活度为 2.69 GBq/μg(72.8 μCi/μg)。

1.2.3 肝细胞 mTNFαR结合容量测定 结合容量代表每个细胞上的 TNFα结合位点,即 mTNFαR数。

1.2.3.1 结合反应最适条件探讨 见文献[3]。

1.2.3.2 放射配体结合分析 (Radioligand bind assay, RBA)法测定 mTNFαR结合容量[3]: 取肝细胞悬液 (8× 10^5个 /ml) 0.2 ml加入 ^{125}I-rhTNF 0.2 ml(用含 0.1 g BSA的 0.05 mol/L Tris-HCl稀释至 80 ng/ml), 4℃反应 2 h,以冷缓冲液终止反应,离心 3次后沉淀物置 ^{125}I放免仪上测定放射性强度, ^{125}I-rhTNF结合浓度设 3个复管。非特异性结合在上法基础上再加入非标记 rhTNF使其终浓度为 ^{125}I-rhTNF的 1000倍,最终计算结合容量。另取肝细胞悬液 0.2 ml,加入重组人 γ干扰素 (rhIFN$_\gamma$) 100 U/ml 37℃作用 8 h后,仍按上法测定并计算 mTNFαR结合容量。

1.2.3.3 分组测定肝细胞培养上清液乳酸脱氢酶 (LDH) 另取肝细胞悬液置 12孔培养板,待细胞贴壁后弃培养液,分组实验: 对照组: rhIFN$_\gamma$ 处理和未处理的肝细胞分别加入等量 Kupffer悬液 (LC+ KC);内毒素组: 肝细胞中加入脂多糖 (LPS) 500 ng/ml(LC+ LPS); Kupffer细胞激活组: 用 LPS (500 ng/ml)预刺激 Kupffer细胞 4 h,再与肝细胞共孵 (LC+ LPS+ KC)。再培养 2 h,测定上清液 LDH活性。

2 结果

2.1 肝细胞 mTNFαR结合容量见表 1

表 1 肝细胞 mTNFαR结合容量 (结合位点 /细胞) ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Binding volume of mTNFαR on hepatocytes (binding sites/cell) ($\bar{x}\pm s$)

	HBV marker(+) group (n = 9)	HBV marker(-) group (n = 8)
rhIFN$_\gamma$(-)	3155± 237	2946± 381
(+)	7843± 598△	6494± 770

△: P < 0.01 *vs* hepatocytes without rhIFN$_\gamma$ treatment

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

从表 1可见,血清 HBV标志阳性与否对肝细胞 mTNFαR表达影响差异不显著,经 rhIFNγ处理后受体表达均上升 2~ 3倍($P>0.05$),提示 HBV感染对肝细胞 mTNFαR表达上调效应的影响也不显著。

2.2 分组测定肝细胞培养上清液 LDH水平见表 2

表 2 肝细胞培养上清液 LDH水平(u/ml)($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 LDH level in supernatant of hepatocyte culture (u/ml) ($\bar{x}\pm s$)

Group	rhIFNγ	HBV marker(+) ($n=9$)	HBV marker(-) ($n=8$)
Control (LG+ KC)	-	1.498± 0.411	1.463± 0.368
	+	1.322± 0.258	1.514± 0.414
Endotoxin (LPS+ LC)	-	1.531± 0.324	1.588± 0.272
	+	1.391± 0.292	1.463± 0.361
Activiting Kupffer cell	-	2.443± 0.105*	1.617± 0.069
(LPS+ KC+ LC)	+	4.502± 0.931△	1.598± 0.802

*: $P<0.01$ *vs* control group and endotoxin group; △: $P<0.01$ *vs* hepatocytes without rhIFNγ treatment in HBV marker(-) group

从表 2可见,HBV标志阴性组肝细胞与激活的 Kupffer细胞共孵,其培养上清液 LDH水平与内毒素组及对照组相比差异不显著($P>0.05$),经 rhIFNγ预处理后再与激活的 Kupffer细胞共孵,上清液 LDH水平也无显著升高($P>0.05$);HBV标志阳性组肝细胞与激活的 Kupffer细胞共孵,其培养上清液 LDH水平非常显著地高于内毒素组及对照组,而且经 rhIFNγ预处理后更加升高。LDH水平升高是肝细胞损害的生化标志。

3 讨论

本研究利用 ^{125}I-rhTNF建立了检测成人肝细胞 mTNFαR的 RBA法。国外学者以 RBA法分析了各种正常细胞及肿瘤细胞 mTNFαR,认为同一细胞表面可表达两型 mTNFαR,即 mTNFαR$_1$和 mTNFαR$_2$。TNFα细胞毒作用主要由 mTNFαR$_1$介导[4,5],但两型受体在介导 TNFα细胞毒性中发挥协同作用[6,7],受体表达量为数百~数千结合位点/每细胞。本研究在肝细胞膜测得的 mTNFαR参数与上述结果相似。

由于内毒素激活的单核巨噬细胞(包括 Kupffer细胞)可释放大量 TNFα等细胞因子,我们利用肝细胞与 LPS激活的 Kupffer细胞混合培养以间接观察 TNFα对肝细胞的损伤作用,结果发现:HBV感染者肝细胞与正常 Kupffer细胞共孵,或正常肝细胞与激活的 Kupffer细胞共孵,均未见明显肝细胞损害;HBV感染者肝细胞与激活的 Kupffer细胞共孵则见明显肝细胞损害。推测 HBV感染可能以某些目前尚不明了的机理或方式,增强了肝细胞对 TNFα毒性效应的敏感性,这与 TNFα能选择性攻击鸭 HBV感染肝细胞的研究[6]结果相似。

RBA法检测肝细胞膜 mTNFαR表达状况提示,HBV感染对肝细胞 mTNFαR表达量似影响不大。但 HBV感染时体内 IFNγ产生增多,IFNγ可促进 mTNFαR的 mRNA转录,从而增强 mTNFαR表达。经 rhIFNγ处理后的肝细胞再与激活的 Kupffer细胞共孵,发现 HBV感染者肝细胞损害程度明显加重,说明 mTNFαR表达量增加可使 TNFα对 HBV感染者肝细胞的毒性效应强化。

Volpes[9]用免疫组化技术原位研究 mTNFαR在肝组织的表达规律,发现正常肝细胞只有 mTNFαR-p75弱表达;慢性乙型肝炎患者肝细胞 mTNFαR-p55和-p75表达均增多;在 HBV感染肝细胞区,TNFα可在其它辅助因子协同下通过高表达的 mTNFαR介导,引起肝细胞坏死;而在非 HBV感染区,虽有辅助因子及高表达的 mTNFαR,但 TNFα对肝细胞不造成明显损伤,说明 HBV感染对 TNFα毒性的发挥有重要影响,我们的实验结果与此观点一致。

深入研究 HBV感染、TNFα、mTNFαR及肝细胞损害的关系,对探讨乙型肝炎免疫病理有重要意义。

参考文献

1 Han H M, Kolhatkar A A, Marino M W *et al*. Identification, characterization, and homologous up-regulation of latent(cryptic) receptor for tumor necrosis factor-α in rat liver plasma membranes. J Biol Chem, 1990; 265(30): 18590

2 闵伟琪,顾长海.放射配体结合分析测定肝细胞膜肿瘤坏死因子受体.中华医学检验杂志,1995; 18(1): 11

3 闵伟琪,顾长海.成人肝细胞膜肿瘤坏死因子受体放射配体

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

分析法的建立.中国免疫学杂志,1995;11(2):84
4 Tartaglia L A, Rothe M, Hu Y F *et al*. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55-TNF receptor. Cell, 1993; 73(2): 203
5 Ostade X V, Vandenabee P, Everaerdt B *et al*. Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. Nature, 1993; 361(6409): 266
6 Tartaglia L A, Pennica D, Goeddel D N. Ligand passing: The 75 KDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55 KDa TNF receptor. J Biol Chem, 1993; 268(25): 18542
7 Espevik T, Brockhous M, Loetscher H *et al*. Characterization of binding and biological effects of monoclonal antibodies against a human tumor necrosis factor receptor. J Exp Med, 1990; 171(2): 415
8 李彪如,童善庆,陆德源等.DHBV诱发鸭急性肝坏死动物模型的建立.上海第二医科大学学报,1990;10(3):189
9 Volpes R, Van den Oord J J, De Vos R *et al*. Hepatic expression of type A and type B receptors for tumor necrosis factor. J Hepatol, 1992; 14(2~3): 361

(收稿:1995-12-20;修回:1996-08-25)
(编辑 汪勤俭)

Observation on expression of tumor necrosis factor-α receptor in hepatocytic membrane of patients with chronic hepatitis B virus infection *in vitro*

Gu Changhai, Ming Weiqi (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The expression of tumor necrosis factor-α receptor (mTNFαR) on the membrane of cultured hepatocytes was observed in 9 patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection and 8 individuals without and the hepatocytes were incubated with lipopolysaccharide (LPS)-activated Kupffer cells to observe the cytocidal effect of TNFα indirectly. It was found that lactic acid dehydrogenase (LDH) level in the supernatant of the hepatocytes from patients with chronic HBV infection incubated with the activated Kupffer cells was remarkably increased and it became much higher when mTNFαR was up-regulated by 2 to 3 fold. But no significant change of LDH level was found in the supernatant of coincubated cells including the hepatocytes from patients without HBV infection and it remained unchanged even when mTNFαR was up-regulated by 2 to 3 fold. Our findings suggest that TNFα can strengthen its toxicity to hepatocytes through high expression of mTNFαR in HBV infection, which is perhaps one of mechanisms of hepatocytic injury in chronic HBV infection.

Key words chronic hepatitis B virus infection; hepatocytic membrane; tumor necrosis factor-α receptor (TNFαR)

(上接 392页)

3 讨论

二组病人治疗前疼痛发生率差异无显著性,治疗后 8 24 48 h差异均有显著性。实验组治疗后无重度疼痛发生,而对照组治疗后8 h有3例、24 h有2例重度疼痛病例。提示:地塞米松能有效减少病人根管治疗期间疼痛的发生并减轻其疼痛程度。EIP的发生主要是根管治疗过程中器械、冲洗液、根管内封药等刺激根尖组织,引发急性炎症所致[3]。其发病率与牙髓是否有活力有关[4]。地塞米松是一种有较强抗炎能力的皮质类固醇激素,它能减少炎性介质的蓄积而达到止痛效果,为临床控制EIP发生提供了一种有效方法。本实验仅能提示地塞米松对控制活髓牙 EIP有效,对死髓牙是否有效,尚待进一步研究。对禁用或慎用地塞米松的病人,控制 EIP的方法也需进一步探讨。

关键词 地塞米松;根管疗法;疼痛
中图法分类号 R781.3

参考文献

1 Kleir D J, Mullaney T P. Effects of formocresol on post-treatment pain of endodontic origin in vital molars. J Endodon, 1980; 6 566
2 Rimmer A. The flare-up index: a quantitative method to describe the phenomenon. J Endodon, 1993; 19(5): 255
3 Abbott P V. Factors associated with continuing pain in endodontics. Aust Dent J, 1994; 39(3): 157
4 Waiton R, Fouad A. Endodontic interappointment flare-ups: a prospective study of incidence and related factors. J Endodon, 1992; 18(4): 172

(收稿:1995-12-25;修回:1996-09-13)
(编辑 冯崇英)

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