

丙型肝炎病毒感染及其抗原表达与细胞凋亡的关系^①

彭晓谋 彭文伟 姚春澜 陈雪娟 顾琳

(中山医科大学附属第三医院病毒性肝炎研究室, 广州 510630)

摘要 目的: 细胞模型上研究表明, HCV 抗原能抑制细胞凋亡。本研究在体内研究水平进一步探讨 HCV 抗原表达对细胞凋亡的影响。方法: 采用原位细胞凋亡、免疫组织化学及其双染色等技术, 对 70 例肝细胞癌(HCC)和 10 例慢性肝炎的组织标本进行研究。结果: HCV 感染或组织 HCV 抗原表达阳性的患者中, 细胞凋亡指数与阴性患者无显著性差异。而仅有纤维化的慢性肝炎组织较伴有肝硬变的癌周组织的凋亡指数显著升高(20.27 ± 2.41 vs 8.47 ± 3.24 , $P < 0.01$)。在分布上, 慢性肝炎组织中细胞凋亡与抗原分布一致, 与炎症反应密切相关, 而癌周组织中两者常不一致。结论: 在组织水平上 HCV 抗原表达对细胞凋亡的影响相对复杂。感染早期, HCV 抗原主要通过炎症反应而促进细胞凋亡。感染后期则主要表现为抑制细胞凋亡。

关键词 肝炎, 丙型/免疫学; 肝炎病毒组, 丙型/免疫学; 凋亡; 免疫组织化学

中图分类号 R 512.63

The Relationships Between HCV Infection, Expression of HCV Antigens in Tissues and Apoptosis

Peng Xiaomou Peng Wenwei Yao Chunlan Chen Xuejuan Gu Lin

(Department of Viral Hepatitis Research, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Abstract Objective: HCV antigens can inhibit apoptosis in vitro on cell model. The impact of expression of HCV antigens on apoptosis in tissue level was probed into in the research. **Methods:** Expression of HCV antigens and apoptosis were demonstrated using IHC and in situ cell death detecting in samples from 70 HCC and 10 chronic hepatitis. **Results:** Apoptotic index of the group with HCV infection or expression of HCV antigens in liver tissues was not significantly higher than that of the control group. Apoptotic index of chronic hepatitis, however, was significantly higher than that of HCC patients with cirrhosis in pericancerous tissues (20.27 ± 2.41 vs 8.47 ± 3.24 , $P < 0.01$). The distribution of apoptotic cell and expression of HCV antigens was consistent, was both strongly related to inflammation. The distribution, however, in pericancerous tissues was irrelevant. **Conclusions:** These results suggested that HCV antigens had more complex affections on apoptosis in tissue level than in vitro. HCV antigens mainly increased apoptosis through inflammation in the early stage of infection and inhibited apoptosis in the later stage.

Subject headings hepatitis C/immunology; hepatitis C viruses/immunology; apoptosis; immunohistochemistry

细胞凋亡(Apoptosis)是近年生物医学研究的热点, 与肿瘤学和感染性疾病有密切关系^[1]。细胞凋亡减少是肿瘤发生的重要机理^[2]。细胞模型上的体外试验表明, HCV、HIV(艾滋病)的某些抗原能抑制细胞凋亡^[3-4]。这表明细胞凋亡可能是研究 HCV 感染与肿瘤关系的理想指标。然而, 目前对病毒抗原在体内与细胞凋亡的关系研究较少。为此, 本研究

采用原位细胞凋亡和免疫组织化学等检测技术研究了肝细胞癌组织和非癌肝组织中细胞凋亡与 HCV 抗原表达的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 组织标本 6例慢性乙肝和4例慢性丙肝的组织标本为本科的肝穿标本。70例HCC标本收集和血清、组织HCV感染标志检测同彭晓谋等文献报道^[5]一致。9例血清抗-HCV和组织HCV RNA均阳性,2例单纯血清抗-HCV阳性,2例单纯组织HCV RNA阳性,HCV总感染率为18.6%(13/70)。组织标本常规进行石蜡包埋切片。HCC标本的癌组织和癌周组织分开包埋。

1.1.2 主要试剂 原位细胞凋亡试剂盒(in situ cell death detection kit, AP)系德国BM公司产品。标记链霉亲和素生物素(LSAB)检测试剂盒为DAKO公司产品。抗-HCV是采用饱和硫酸氨法从10份高滴度抗-HCV阳性血清中提取的混合IgG,稀释度为1:125,采用小牛血清和健康体检血清(抗-HCV阴性)作为阴性对照,以确定抗体特异性。

1.2 方法

1.2.1 原位细胞凋亡检测 石蜡组织切片常规脱蜡至水,经 $\varphi=20$ mg/L蛋白酶K于37℃消化30 min, PBS洗涤2次后,参照试剂盒加50 μ L TUNEL反应液于37℃孵育60 min; PBS洗涤3次,加50 μ L 转换-AP液于37℃孵育30 min; PBS洗涤3次后,加50 μ L NBT/BCIP底物于室温下显色10 min;清洗后常规封片。镜检:观察10个不同高倍视野,据细胞总数和阳性细胞数计算出凋亡指数。

1.2.2 免疫组织化学(IHC)检测HCV抗原 脱蜡组织切片先用1%胰蛋白酶消化20 min,再经封闭液封闭30 min,于3% H_2O_2 中作用5 min去除内源性过氧化物酶,加抗-HCV或阴性对照于37℃孵育30 min; TBS洗涤3次后,参照LSAB试剂盒进行操作,最后加入DAB- H_2O_2 底物显色。着色细胞数大于1%者判断为阳性。

1.2.3 细胞凋亡和免疫组化双标记染色 先进行HCV抗原的免疫组化检测至DAB显色,再行蛋白酶K消化和原位细胞凋亡检测,最后采用Mayer's苏木素对比染色。镜检:观察凋亡细胞本身及周围细胞表达HCV抗原的情况。

1.2.4 统计方法 采用 χ^2 和t检验进行统计分析。

2 结果

2.1 细胞凋亡检测

凋亡细胞核被染成紫蓝色、致密。典型的结果

见图1。癌组织中,凋亡细胞散在分布,个别表现为大片状。癌周组织中,凋亡细胞分布广泛,呈单个散在分布于小叶内和汇管区周围,以汇管区周围的肝细胞为主。在慢性肝炎组织中,细胞凋亡主要分布在汇管区周围,呈散在或小片状分布。细胞凋亡与HCV感染的关系见表1。

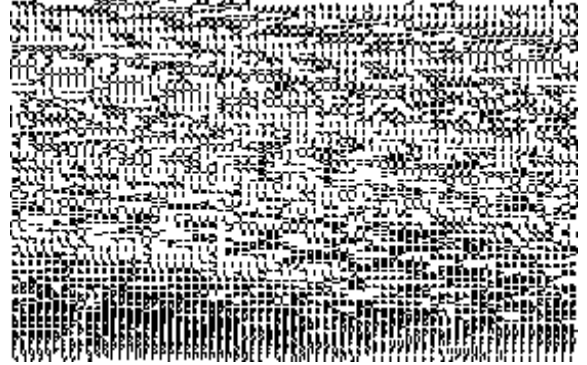


图1 HCC癌周组织中的细胞凋亡情况($\times 200$)

Fig. 1 Apoptosis in the pericancerous tissue

表1 HCV感染与细胞凋亡的关系

Table 1 The relationship between HCV infection and apoptosis

	n	Apoptotic index ($\bar{x} \pm s$)	
		CT	PCT/NCT
HCC			
Without HCV infection	57	3.68 \pm 2.02	11.05 \pm 3.86
With HCV infection	13	3.41 \pm 1.90	8.77 \pm 45.3 ¹⁾
Chronic hepatitis			
Without HCV infection	6		16.90 \pm 4.25
With HCV infection	4		18.25 \pm 4.49 ^{2), 3)}

1)、2) There was no significant difference when compared with that of HCV group without HCV infection and chronic hepatitis group without HCV infection respectively, $P > 0.05$; 3) Highly significant difference was shown when compared with that of pericancerous tissues of HCV, $P < 0.01$. CT stands for cancerous tissues, PCT stands for pericancerous tissues, NCT stands for non-cancerous tissues

2.2 免疫组织化学检测

在HCV组织中,HCC抗原的阳性信号主要分布在癌周肝细胞的胞浆中,呈深褐色。癌细胞中也可见阳性信号。阳性细胞呈散在或小片状分布。在慢性肝炎组织中,阳性细胞主要为小片状,分布于汇管区周围,伴汇管区炎性细胞浸润。HCV抗原表达与细胞凋亡的关系见表2。

表2 HCV 抗原表达与细胞凋亡的关系

Table 2 The relationship between Expression of HCV antigen and apoptosis in liver tissues ($\bar{x} \pm s$)

	n	Expression of HCV antigen(+)		Expression of HCV antigen(-)	
		n	Apoptotic index	n	Apoptotic index
Cancerous tissue	70	5	4.16 ± 2.31	65	3.59 ± 1.88
Pericancerous tissue	70	8	8.47 ± 3.24	62	10.91 ± 4.23 ¹⁾
Chronic hepatitis	10	3	20.27 ± 2.41 ²⁾	7	15.33 ± 3.52

1) There was no significant difference when compared with that of HCV antigen positive group, $P > 0.05$; 2) Highly significant difference was shown when compared with that of HCV antigen positive cancerous tissues of HCC, $P < 0.01$

2.3 细胞凋亡和免疫组化双标记染色

典型的双标记染色显示, 凋亡信号为紫蓝, 表达在细胞核, IHC 信号为很褐色, 表达在细胞浆。在 HCV 癌周组织中, 同一份标本中可见凋亡与 HCV 抗原表达。但凋亡细胞均不表达 HCV 抗原, 见图 2。在慢性肝炎组织中, 细胞凋亡与抗原分布常一致, 主要分布在汇管区周围, 伴汇管区炎性细胞浸润。

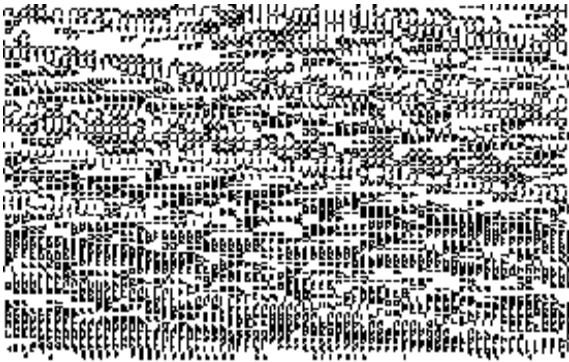


图2 原位细胞凋亡与免疫组化双染色研究细胞凋亡与 HCV 抗原表达的关系($\times 400$)

Fig. 2 The relationship between Expression of HCV antigen and apoptosis in liver tissues revealed by in situ apoptosis and IHC double staining

Apoptotic signal was purple in nuclei. IHC signal was dark brown in the cytoplasm. Counterstained by Mayer's hematoxylin

本研究采用原位细胞凋亡和免疫组化方法在组织水平研究表明, HCV 在体内对细胞凋亡的影响可能较体外复杂。

HCV 感染或组织 HCV 抗原表达阳性的患者中, 细胞凋亡指数与阴性患者无显著性差异。而仅有纤维化的慢性肝炎组织的凋亡指数较常伴有肝硬变的癌周组织显著升高 (20.27 ± 2.41 vs. 8.47 ± 3.24 , $P < 0.01$)。从抗原表达与凋亡细胞分布上分析, 慢性肝炎组织中细胞凋亡与抗原分布一致, 主要分布在汇管区周围, 伴汇管区炎性细胞浸润。而在常具有肝硬变的癌周组织中两者常不一致。以上结果表明, HCV 抗原表达可能一方面具有诱导机体产生免疫应答和淋巴细胞浸润而增加细胞凋亡的作用。另一方面又具有直接或间接地抑制细胞凋亡的作用。在慢性肝炎患者中主要表现为增加细胞凋亡。而在长期感染或肝硬变患者中则主要表现为抑制细胞凋亡。

在无 HCV 感染或 HCV 抗原表达阴性的患者中也有类似现象。由于这些患者 90% 有 HBV 感染背景, 因此, HBV 感染或其抗原表达对细胞凋亡也具有直接或间接的双向调节作用。

炎症反应促进细胞凋亡的机理目前尚不十分清楚。炎症反应中的淋巴细胞浸润所分泌的细胞因子, 包括肿瘤坏死因子 (TNF) 等, 以及组织中 Fas 抗原表达增加可能是重要机制^[10]。

3 讨论

许多流行病学和实验资料表明, HCV 感染与 HCC 发生密切相关^[7,8]。但其机理目前尚不清楚。凋亡 (Apoptosis) 在肿瘤中出现减弱, 因而认为凋亡减弱是肿瘤发生的重要机制^[2,9]。体外实验显示, HCV 的核心抗原和 NS3 区的产物能抑制细胞凋亡, 从而可能有利于感染的慢性化和肿瘤的发生^[3,4]。

参 考 文 献

- 1 Ameisen J C. Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation; relevance to Aids and cancer. AIDS, 1994, 8(6): 1197
- 2 Bardeesy N, Beckwith J B, Pelletier J. Clonal expansion and attenuated in Wilms' tumours are associated with p53 gene mutation. Cancer Res 1995, 55(1): 215

- 3 Fujita T, Isohido S, Muramatsu S, *et al.* Suppression of actinomycin D-induced apoptosis by the NS3 protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225(3): 825
- 4 Ray R B, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology*, 1995, 226(2): 176
- 5 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁. HCC 癌组织和癌旁组织中 HCV RNA 检测及半定量分析. *中山医科大学学报*, 1996, 17(4): 251
- 6 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 肝细胞癌患者中丙型、乙型肝炎病毒感染与 p53 基因变化的关系. *中华肝脏病杂志*, 1997, 5(2): 128
- 7 Saito K, Sullivan D, Hanuna Y, *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA sequences in hepatocellular carcinoma and its precursors by microdissection polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med*, 1997, 121(4): 400
- 8 Herr W, Gerken G, Potfolio T, *et al.* Hepatitis C virus associated primary hepatocellular carcinoma in a noncirrhotic liver. *Clin Invest*, 1993, 71(1): 49
- 9 Wang X W, Gibson M K, Vermeulen W, *et al.* Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res*, 1995, 55(24): 6012
- 10 Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues. *Am J Pathol*, 1996, 149(2): 429

(1998 - 05 - 14 收稿 1999 - 03 - 20 修回)

· 简 讯 ·

陈家祺教授获全国优秀医生光荣称号

据今年 2 月 27 日《健康报》上公布的信息, 所列全国百名优秀医生名单中, 我校眼科中心陈家祺教授榜上有名。此外, 我省同时获得该项殊荣的医生还有广东省人民医院陈纪言、广州医学院钟南山和深圳市人民医院李小军 3 位大夫。

(学 讯)

杨培增教授荣获第五届丁颖科技奖 张清炯教授荣获第一届广东省青年科技奖

广东省科学技术协会第五届第三次会议于 1999 年 2 月 22 日在广东省科学馆召开。此大会上, 我校杨培增教授荣获第五届丁颖科技奖, 张清炯教授荣获第一届广东省青年科技奖, 广东省副省长卢钟鹤、省人大、省委组织部、省人事厅、省科协领导及部分广东省两院院士为获奖者颁奖。此外, 杨培增教授还获得“广东省自然科学优秀论文二等奖”。

(学 讯)