

丙型肝炎病毒抗原的免疫组化 检测及方法学探讨^①

张立伐^② 彭文伟 姚集鲁 江元森

(中山医科大学附属第三医院传染病学科;广州,510630)

提 要 采用丙型肝炎病毒(HCV)E区、C区、NS₃区单克隆及多克隆抗体以及丙型肝炎患者血清及血清中IgG抗体作为特异性第一抗体,分别应用LSAB、改良PAP及直接酶标法对65例丙型肝炎患者肝组织冰冻及石蜡包埋标本进行HCV抗原检测,其中以NS₃区抗体、LSAB法的检测结果较为理想(检出率27.7%~29.2%)。HCV抗原呈肝细胞胞浆弥漫型、胞核型及胞浆类包涵体型表达。阳性肝细胞多呈单个散在分布。急性丙型肝炎比慢性丙型肝炎的HCV抗原检出率更高且抗原颗粒的分布与病理损伤呈正相关,炎症区浸润的淋巴细胞中可见阳性颗粒,而慢性丙型肝炎肝组织中HCV抗原与病理损伤无明显关联;支持急性丙型肝炎的肝细胞损伤由病毒的直接作用及免疫攻击协同所致,而慢性丙型肝炎则以免疫反应引起肝细胞持续损伤为主。胞浆弥漫型HCV抗原表达是急性或活动性病变时的主要表达形式,而胞核型HCV抗原表达多见于病变静止期。

主题词 丙型肝炎病毒;抗原,病毒/分析;免疫组织化学

中图分类号 R512.63

丙型病毒性肝炎因其较高的发病率以及慢性化倾向,正日益受到各国学者的重视并对其进行开展了多方面的研究。但是,有关组织中HCV抗原检测的研究报道甚少,较早的研究认为,HCV抗原在肝细胞中含量很低,一般不易检出^[1]。此外,不易获得特异敏感的HCV抗体也是免疫组化检测较难得到HCV抗原理想显示的重要原因。近年的一些研究报道大多使用感染动物或患者的血清以及多克隆抗体,其特异性受到局限。HCV抗原在肝内的分布状况以及与病理损伤的关系尚未充分阐明。本文使用包括单克隆抗体在内的多种HCV抗体,应用不同的免疫组化检测技术,分别检测65例丙型肝炎患者的冰冻及石蜡包埋双份肝组织标本,以期阐明肝组织中HCV抗原的表达状况,探讨较为理想的HCV抗原免疫组化检测方法。

1 材料和方法

1.1 病例及标本

全部肝组织标本采自中山医科大学附属第三医院传染病学科1991年10月至1994年4月丙型肝炎住院患者,共65例。其中急性丙型肝炎11例,慢性丙型肝炎54例。临床及病原学诊断均参照1990年上海全国肝炎会议修订标准。全部病例均曾接受输血液或血制品治疗,且血液抗-HCV及HCV-RNA均阳性。经皮穿刺取得肝组织后,同一标本一部分不做任何固定,立即以冰冻组织包埋剂包埋后置液氮中保存,检测前取出做5 μ m厚冰冻切片,余肝组织以10%甲醛固定、常规石蜡包埋、切片。

1.2 抗体及试剂

特异性第一抗体包括:①高效价抗-HCV-IgG患者血清;该例患者经仔细筛选、排除其他各型肝炎病毒、Epstein-Barr病毒及巨细胞病毒感染。②上述病例患者血清经盐析及DEAE-sephadex A-50层析后获得的

① 美国中华医学基金会(CMB)资助课题;

② 第一作者,1961年出生,男,博士研究生,主治医师

IgG;部分产物以辣根过氧化物酶(HRP)标记,供直接酶标及改良 PAP 法检测时使用。由本科病毒性肝炎研究室制备。③HCV C 区单克隆抗体;④HCV E 区抗体;由丙型肝炎患者血清经亲和层析后获得。⑤HCV NS₃ 区多克隆抗体;由 NS₃ 区重组抗原免疫小鼠后获得。⑥HCV NS₃ 区单克隆抗体;美国 Bionikes 公司产品。以上③、④、⑤、⑥4 种抗体均由中国预防医学科学院病毒学研究所惠赠。

PAP 试剂盒及单克隆抗-HB_s 购自同济医科大学临床免疫研究室,LSAB(标记链亲和素-生物素)试剂盒购自 DAKO 公司。

1.3 免疫组化检测方法

1.3.1 直接酶标法 石蜡切片常规脱蜡入水,0.3% H_2O_2 甲醇液阻断 20min,水洗,0.1%胰酶液 37℃消化 20min,PBS 洗,正常人血清(1:20 稀释)37℃作用 20min,倾去多余血清,加入抗-HCV-IgG-HRP4℃过夜,DAB 显色。冰冻标本切片后空气干燥 2h,冷丙酮固定 5~10S,3% H_2O_2 水溶液阻断 20min,水洗,正常人血清作用 20min 后同上述石蜡标本检测步骤。

1.3.2 改良 PAP 法 参照郝连杰等^[2]报道的染色步骤,同前述直接酶标法至加正常人血清孵育后,加 HRP 标记的人抗-HCV-IgG,4℃过夜,PBS 洗,兔抗 HRP37℃孵育

1h,PBS 洗,羊抗兔 IgG37℃孵育 1h,PBS 洗,兔 PAP37℃孵育 1h,PBS 洗后 DAB 显色。

1.3.4 LSAB 法 同前述直接酶标法至胰酶液消化后(冰冻切片仅需 3% H_2O_2 水溶液阻断内源性过氧化物酶),分别加前述 6 种特异性 HCV 抗体,4℃过夜。若为人血清或其制备物,续以兔或小鼠抗人 IgG 搭桥(LSAB 试剂盒要求第一抗体为兔或鼠抗体),其余步骤按 DAKO LSAB 试剂盒说明进行,DAB 或 AEC 显色。

上述各检测方法中,为得到各抗体的最佳稀释度,特异性第一抗体均作 3~4 次梯度稀释,需使用第二或/及第三抗体时,作方阵滴定。

阴性对照:采用①无关抗体(抗-HB_s、羊抗人 IgG)或 PBS 替代第一抗体;②略去第一抗体孵育步骤;③阻滞试验(直接酶标法时);④正常肝组织对照。

2 结 果

2.1 肝组织内 HCV 抗原检出情况

应用各种不同 HCV 抗体、检测方法及标本制作所得到的组织中 HCV 抗原检出率见附表。

附表 65 例丙型肝炎患者肝组织中 HCV 抗原的检出率 例数(%)

第一抗体种类	冰 冻 标 本			石 蜡 标 本		
	DE	PAP	LSAB	DE	PAP	LSAB
PS			11(16.9)			10(15.4)
PS IgG			10(15.4)			10(15.4)
ELPS IgG	4(6.2)	10(15.4)		3(4.6)	12(18.5)	
HCV-E			7(10.8)			8(12.3)
HCV-C-M			5(7.7)			4(6.2)
HCV-NS ₃ -P			19(29.2)			18(27.7)
HCV-NS ₃ -M			18(27.7)			18(27.7)

DE:直接酶标法;PS:丙型肝炎患者血清;PS IgG:患者血清提取的 IgG;ELPS IgG:酶标 IgG;HCV-E:HCV E 区抗体;HCV-C-M:HCV C 区单克隆抗体;HCV-NS₃-P:HCV NS₃ 区多克隆抗体;HCV-NS₃-M:HCV NS₃ 区单克隆抗体

使用病人血清及血清提取的 IgG,虽有一定的检出率,但显色结果背景较深,各 HCV 抗体中以单克隆抗体的显色较为干净清晰。3 种检测方法中,LSAB 法所需时间较短,工作效率优于其他检测方法,且非特异性染色较其他方法更少。阴性对照中,以抗-HBs 替代抗-HCV,65 例中 3 例检出阳性,但在连续切片上观察,此种阳性显色与 HCV 抗原不在同一细胞内,且 HBsAg 不在胞核中表达。其余阴性对照均未见阳性显色。

2.2 HCV 抗原的表达类型及分布状况

HCV 抗原呈肝细胞胞浆弥漫型(图 1)、胞核型(图 2)及胞浆类包涵体型分布,抗原阳性肝细胞多呈单个散在分布,偶见呈带状或巢状集聚分布。肝内浸润的淋巴细胞中也可见到抗原显示,但枯否细胞及胆管上皮细胞中未发现阳性颗粒。

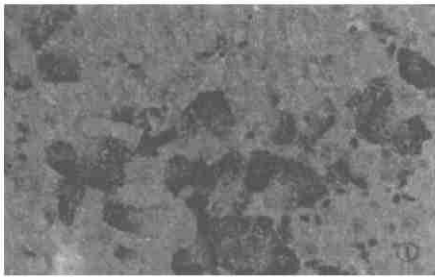


图 1 HCV 抗原的胞浆弥漫型表达 ×200

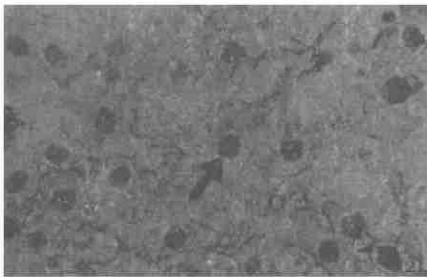


图 2 HCV 抗原的核型表达 ×400

2.3 肝内 HCV 抗原检出与临床类型及病理损伤的关系

以 NS₃ 区单克隆抗体,LSAB 法在 65 例

丙型肝炎患者标本中共检测到 18 例 HCV 抗原阳性(冰冻及石蜡标本检出例数相同,均为 18 例),其中急性丙型肝炎 11 例中检出 9 例阳性(81.8%),抗原多呈胞浆弥漫型表达,仅在 1 例见到 HCV 抗原核型分布。抗原颗粒多较粗大,在炎性浸润、变性坏死部位及其周围,阳性细胞相对较多而且集中,坏死脱落的肝细胞中偶见 HCV 抗原颗粒。慢性丙型肝炎 54 例中检出 9 例(16.7%)阳性,其中 6 例可见 HCV 抗原的核型表达。阳性细胞多呈单个散在分布,与病变区域无明显关联。

比较 HCV 抗原阳性组与阴性组丙型肝炎患者的肝组织病理检查结果,发现 HCV 抗原阳性组在肝细胞变性坏死及炎性细胞浸润、纤维增生多个方面均较阴性组显著。

同时检测的 8 例原发性肝癌石蜡标本,其中 1 例在癌周肝细胞中检测到 HCV 抗原。

3 讨论

丙型肝炎抗原的免疫组化检测虽已有初步报道,但无论检出率或抗原分布状况的结论均有较大差异,使用的检测方法及 HCV 抗体的来源与种类也各有异同,以使用感染动物或患者的血清较多。目前对肝组织内 HCV 抗原的阐释尚较模糊,缺乏共识。Hiramatsu 等以 HCV 多个基因区段单克隆抗体均在相同肝细胞内检测到 HCV 抗原^[3],而 Sansonno 所做研究却发现仅针对 HCVc100 蛋白的抗体有较好的 HCV 抗原显示^[4]。国外学者多使用免疫荧光法检测 HCV 抗原,仅在肝细胞浆中见到抗原表达^[1,4,5]。但国内师明霞^[6]、孙毅等使用丙型肝炎患者血清,发现胞核中也有 HCV 抗原存在。引起这种不同检出结果的原因可能与抗体的亲和力、组织中抗原表达水平以及组织处理过程中抗原决定簇的脆弱与不稳定性等有关。此外,组织标本太小以及制备抗体的 HCV 亚株与被检亚株的差异也是引起这种结论不一的主要影

响因素。本文先后使用多种不同来源、不同基因区域的抗-HCV 单克隆或多克隆抗体、应用目前新一代的免疫组化检测方法-LSAB 法,同时比较性应用其他数种免疫组化检测技术,对不同处理(冰冻或石蜡包埋)的肝组织标本进行了 HCV 抗原检测的多方面尝试,获得了较为理想的检测结果。抗原显示的特异性经阴性对照得以确认。使用 NS₃ 区单克隆或多克隆抗体、LSAB 法得到较使用 C 区或 E 区抗体更高的检出率(χ^2 检验, $P < 0.05$)。单克隆抗体染色背景更为干净清晰。NS₃ 区抗体较高的检出率与该区结构较为保守稳定有关。本文这一结果与 Blight 等的研究结论类似^[5]。Infantolino 等^[7]认为,冰冻标准的固定剂可能破坏 HCV 抗原,因此甲醛固定、石蜡包埋的肝组织标本更适于做 HCV 抗原检测。我们分别对冰冻及石蜡标本的检测,未发现两组间检出率存在显著差异。

HCV 抗原不仅见于胞浆也见于肝细胞核中,与国内研究者的报道类似,但与国外类似研究仅见胞浆表达的结论不同,这种差异是否由于 HCV 亚株间生物学特性不同所引起,有待进一步研究探讨。

病毒直接作用引起肝细胞损伤时,抗原分布部位多在细胞变性坏死区域及其周围,而以免疫损伤为主时,则并无此种关联。我们在被检急性丙型肝炎患者肝组织中发现有较高的 HCV 抗原检出率,且 HCV 抗原多呈胞浆型表达、分布区域与病理损伤正相关,坏死脱落的肝细胞及浸润的淋巴细胞中可见阳性颗粒;慢性丙型肝炎患者中 HCV 抗原检出率相对较低、阳性细胞分布与病理损伤无明显关联、多见 HCV 抗原核型表达;两者间的这些差异支持急性丙型肝炎的肝细胞损伤与 HCV 的直接作用及免疫攻击有关,而慢性丙型肝炎的持续性肝细胞损伤主要与免疫反应

相关。胞浆型 HCV 抗原表达多见于急性或活动性病变,而核型表达为主是病变相对静止期的标志。

肝细胞癌的癌周肝细胞中发现 HCV 的抗原的存在,但例数太少,HCV 感染与肝细胞癌的关系尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Yohko K, Shimizu M, Amy J, et al. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 6441
- 2 郝连杰, 张永源, 李方和. 改良的过氧化物酶-抗过氧化物酶法检查肝组织内 HBcAg. *同济医科大学学报*, 1986, (1): 63
- 3 Naoki H, Norio H, Yoshimichi H, et al. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS₃ regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology*, 1992, 16(2): 306
- 4 Domenico S, Franco D. Hepatitis C virus c100 antigen in liver tissue from patients with acute and chronic infection. *Hepatology*, 1993, 18(2): 240
- 5 Keril B, Ricard L, Justin L, et al. Localization of hepatitis C virus proteins in infected liver tissue by immunofluorescence. *Gastroenterologia Japonica*, 1993, 28: 55
- 6 师明霞, 朱世能, 陆世伦, 等. 人肝病肝组织中丙型肝炎病毒抗原的显示. *上海医科大学学报*, 1992, 19(2): 94
- 7 Infantolino D, Bonino F, Manetti A, et al. Localization of hepatitis C virus (HCV) antigen by immunohistochemistry on fixed-embeded liver tissue. *Ital J Gastroenterol*, 1990, 22: 198

(1994-09-14 收稿 1995-03-15 修回)

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF HCV ANTIGEN AND STUDY ON METHODOLOGY

Zhang Lifa Peng Wenwei Yao Jilu Jiang Yuansen

(Department of Infectious Diseases, The 3rd Affiliated Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Hepatitis C virus antigen(HCV Ag) was detected in frozen and paraffin-embedded liver biopsy specimens from patients with acute and chronic hepatitis C using labelled streptavidin-biotin (LSAB), improved PAP and direct immunoperoxidase staining methods with monoclonal antibodies to core and NS₃ regions of the HCV genome, as well as polyclonal antibodies to NS₃ and envelope regions crude serum and its IgG fraction from a patient with HCV infection alone. The staining of HCV Ag was most satisfactory when using LSAB method with monoclonal antibody to NS₃ region (positive rate 27.7%, 18/65). HCV Ag was most often found in the cytoplasm of hepatocytes in a diffuse pattern or inclusion body-like, and less often in the nuclei. HCV Ag positive hepatocytes were generally scattered throughout the specimen. the positive rate was higher in acute than chronic hepatitis cases. In the former positively stained hepatocytes showed aggregations in areas where the liver damage was severe, and HCV Ag was also found in the infiltrating lymphocytes. While in cases of chronic hepatitis C the distribution of positively stained hepatocytes showed no relations to the liver damage. These phenomena suggest that in cases of acute hepatitis C liver damage may be the result of both direct effect of HCV as well as immune response, while in cases of chronic hepatitis C immune response may be more important in causing liver damages. The diffuse distribution of HCV Ag in cytoplasm of hepatocytes was closely related to acute stage or active liver damage, while HCV Ag expression in nuclei of hepatocytes was more often seen in quiescent stage of the disease.

Subject headings hepatitis C virus; antigens, viral/analysis; immunohistochemistry

· 题 录 ·

陈铁宏, 黄迪. 牛蒡子对 Epstein-Barr 病毒抗原表达的抑制作用. 中华实验及临床病毒学杂志, 1994, 8(4): 323

黄迪, 陈海峰, 成占玲, 等. Epstein-Barr 病毒特异性 DNA 酶抗体血清学及其在鼻咽癌早期发现中的意义. 中华实验及临床病毒学杂志, 1994, 8(增): 5

黄迪, 张锦明, 梁小曼. 与六甲基磷酰胺有长期接触史的鼻咽癌 2 例. 肿瘤杂志, 1995, 17(1): 46