

各型乙型肝炎 HLA-I、II类 抗原免疫组织化学研究

刘建平 彭文伟

(传染病学教研室)

李梦东 李奇芬

(第三军医大学附一院传染科)

提 要 用免疫组织化学桥联酶标 APAAP法和 PAP 法对各型乙型肝炎113例检测了肝内的HLA-I、II类抗原、T细胞亚群、HBsAg和HBcAg,同时测定血清HBV DNA(斑点杂交)和 β_2 微球蛋白(RIA)。结果表明:急性肝炎、慢性活动性肝炎、重症肝炎患者的肝细胞HLA-I、II类抗原表达增强,尤以II类抗原明显,慢性迁延性肝炎则几乎无表达。肝细胞HLA-I类抗原表达与肝内炎症反应、肝细胞膜型HBsAg和浆膜型HBcAg关系密切,肝内活动性病变主要浸润细胞为CD₄⁺细胞,CD₄⁺细胞构成主要的细胞亚群。认为抗原依赖的、HLA限制的细胞毒性T细胞效应是构成乙型肝炎免疫损害的主要机制。

关键词 乙型肝炎; HLA-I、II类抗原; T细胞亚群; 免疫组织化学

中图分类号 R 512.62; R446.8

HLA 抗原是由位于人类第6号染色体短臂上的 HLA 基因所编码的一组跨膜糖蛋白。分为3类:①HLA-I类(A、B、C)抗原,在细胞免疫反应尤其是抗病毒免疫中具有重要作用;②HLA-II类(DP、DQ、DR)抗原,参与免疫活性细胞间相互作用和免疫调控;③HLA-III类抗原,即补体C₂、Bf和C₃等。近年来研究表明,乙型肝炎病毒(HBV)感染时,肝细胞坏死的机理中细胞毒性的T细胞(CTL)起重要作用;CTL对受染肝细胞的攻击可能取决于膜病毒抗原和HLA抗原的共同识别。HBV感染的临床表现形式多样,从无症状HBsAg携带者到致死性的重症肝炎(重肝)。本文对各型乙型肝炎(乙肝)肝组织HLA-I和II类抗原进行免疫组织化学研究,借以探讨HLA抗原在乙肝发病机理和病毒感染持续中的作用。

对象与方法

对 象 为1990年11月至1991年4月期间住院的各型乙肝患者113例,包括急性肝炎(急肝)8例、慢性迁延性肝炎(慢迁肝)12例、慢性活动性肝炎(慢活肝)81例、重肝

12例(其中亚急性5例、慢性7例)。全部病例均经肝活检病理诊断确定。诊断标准按第6届全国病毒性肝炎会议修订的《病毒性肝炎防治方案》^[2]。按该方案慢活肝根据病理组织学分为轻、中、重3型。6名肝功能正常、HBV标志物阴性的胆系结石患者作为对照组。各组病例临床资料见表1。

方 法 肝穿同时或1周内采血检测血清HBV标志物。HBsAg,抗-HBs、HBcAg、抗-HBe、抗-HBc、抗-HBc、IgM均用ELISA测定。试剂购自北京302医院免疫室;HBV DNA用³²P标记斑点杂交检测,试剂由华西医科大学肝炎研究室提供。血清 β_2 微球蛋白测定用RIA双抗PEG法,试剂购自中国原子能研究院。

肝穿刺获取的肝组织,部分用10%福尔马林固定,常规石蜡包埋切片(厚度5 μ m)待检。部分立即置入液氮中冷藏,冷冻保存的肝组织用恒冷切片机作连续切片(厚度6 μ m),室温干燥过夜,置于-20℃冰箱待检。

肝组织内HBsAg和HBcAg用PAP法在石蜡切片上进行检测,试剂盒系美国Dako公司的产品。

表 1 临床病例资料

组别	例数	男/女	年龄	ALT*	SB**
急肝	8	5/3	34±2	2 131±1 910	66±35
慢迁肝	12	11/1	30±1	1 159±1 350	20±19
慢活肝(轻)	47	33/14	30±8	2 011±2 400	31±23
慢活肝(中)	24	14/10	29±1	3 241±4 207	31±30
慢活肝(重)	10	9/1	34±1	1 398±1 126	84±58
亚、慢重肝	12	10/2	32±9	1 370±1 335	123±51
肝胆道结石	6	1/5	44±2	<500	<13.7

* ALT 正常值<500 nmol·S⁻¹/L ** SB 正常值<13.7μmol/L

肝组织 HLA-I、II 类抗原及 CD₂⁺、CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 细胞的免疫组织化学检测用桥联酶标碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶 (APAAP) 法, 试剂盒亦购自美国 Dako 公司, 其中抗-HLA-A、B、C 和抗-HLA-DR 抗体的工作浓度为 1:50 和 1:100。按试剂盒说明操作, 冰冻切片丙酮固定后顺序加入单克隆抗体、兔抗鼠抗体、APAAP 复合物及底物, 衬染后封片镜检。以正常成人扁桃体冰冻切片作为阳性对照, 正常小鼠血清、TBS 代替第一抗体, 正常兔血清代替第二抗体作为阴性对照。当镜下出现阳性对照呈阳性、阴性对照呈阴性染色时, 由两人分别判读结果, 相符率均在 90% 以上。

染色切片在光镜下判断结果, HLA 抗原参照 Nagafuchi 等^[3]制订的标准: 肝细胞膜未显示 HLA-I、II 类抗原阳性染色者 (-); 少数肝细胞的部分细胞膜染色阳性 (+); 肝细胞的整个细胞膜阳性 (++). T 细胞亚群用 5×5 mm 网格测微尺在 APAAP 法染色的连续切片上分别计出同一部位的单个核细胞总数, CD₂⁺、CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 细胞数, 并计算其各占单个核细胞数的百分率, 以及 CD₄⁺/CD₈⁺ 细胞的比值。另按不同类型分区计算细胞比值: 重肝计算大片或亚大片坏死区, 慢活肝计算碎屑样或桥状坏死区, 急肝计算灶性坏死区, 慢迁肝和对照组计算汇管区。

统计学方法: 根据资料结果相应地作秩和检验、方差分析和 χ^2 检验。

结 果

各型乙肝肝组织内 HLA-I 类和 II 类抗原的分布及肝细胞表达

正常肝组织中血管内皮细胞、肝窦内衬细胞、胆管上皮细胞 HLA-I、II 类抗原均呈阳性染色, 其中部分内衬细胞胞浆内也见阳性染色, 而肝细胞未见染色。乙肝肝内炎症区浸润的单个核细胞两类 HLA 抗原可见阳性染色。各型乙肝肝细胞膜 I、II 类抗原的检出见表 2。

表 2 各型乙肝肝细胞 HLA-I、II 类抗原

组别	例数	HLA-I 类抗原			HLA-II 类抗原		
		-	+	++	-	+	++
急性肝炎	8	1	5	2**	4	1	3
慢迁肝	12	11	1	0	11	1	0
慢活肝(轻)	47	14	25	8**	27	10	10
慢活肝(中)	24	0	15	9***	13	7	4
慢活肝(重)	10	0	5	5***	4	2	4*
亚、慢重肝	12	3	2	7***	5	5	2*
肝胆道结石	6	6	0	0	6	0	0

*、**、*** 表示与肝胆道结石组比较本组 P 值分别 <0.05、<0.01、<0.001

急肝、慢活肝和重肝的肝细胞表面 HLA-I 类抗原染色明显增加, 其中, 中、重型慢活肝均阳性, 急肝多呈弱阳性, 且集中于小叶内灶性坏死区及附近肝细胞, 与浸润的炎性细胞分布大约一致; 慢迁肝仅 1 例在汇管区周围有少数肝细胞染色阳性; 中、重型慢活肝碎屑样坏死

区及周围几乎所有肝细胞均呈阳性染色, 构成所谓“蜂巢样”结构(图1); 约3/4重肝于坏死区周围肝细胞也可见到类似现象, 另外1/4的重肝虽也见大片或亚大片坏死及大量炎症细胞浸润, 肝细胞I类抗原染色却呈阴性。乙肝中除慢迁肝外, 肝细胞表面II类抗原表达增加, 但检出率较I类抗原为低, 多呈灶性分布, 于肝细胞的近窦侧多见, 少见I类抗原的“蜂巢样”强表达; 血窦内衬细胞和门脉区多数淋巴细胞呈II类抗原的阳性染色。

肝组织T细胞亚群分布与HLA抗原的关系

各型乙肝肝组织内炎症浸润区T细胞亚群的检出率, 见表3。急肝、慢活肝、重肝炎坏死区以CD₂⁺细胞浸润为主, 其中重肝最显著; T细胞亚群中又以CD₈⁺细胞为主, CD₄⁺/CD₈⁺比值三组均<1。慢迁肝浸润细胞以非T细胞为主, 亚群中CD₄⁺细胞多于CD₈⁺

细胞, 比值为2.48, 与其他各型肝炎相差非常显著(P<0.001)。

CD₂⁺细胞主要分布在小叶内和汇管区周围, 在汇管区偶见大量CD₂⁺细胞聚集, 构成“滤泡”样结构。肝实质坏死区, 可见数个CD₄⁺细胞围绕单个或几个变性肝细胞, 有的甚至进入肝细胞内(图2)。多数CD₄⁺细胞位于汇管区、血窦, 少数位于Disse腔内, 与肝细胞接触。

连续切片CD₂⁺细胞相应的部位可见浸润的淋巴细胞和肝细胞(尤其是门脉周围和坏死灶旁的肝细胞)HLA-I类抗原的强表达, 淋巴细胞与HLA-I类抗原染色的肝细胞有接触现象(图3)。

肝组织HBsAg、HBcAg与HLA-I类抗原表达的关系

用PAP法对各型乙肝肝组织中HBsAg和HBcAg进行检测(表4)。各型乙肝HBsAg

表3 各型乙型肝炎患者肝内T细胞亚群(% $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD ₂ ⁺	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
急肝	8	64.2±8.8	21.8±4.8**	42.3±8.5	0.52±0.2
慢迁肝	12	41.8±6.8**	24.9±6.1**	11.7±8.2***	2.48±0.8***
慢活肝(轻)	47	53.8±9.8*	23.1±5.9**	40.3±10.5	0.85±0.5***
慢活肝(中)	24	66.5±11.4	22.4±6.2**	42.9±12.2	0.60±0.3**
慢活肝(重)	10	72.2±9.5	20.6±9.7	46.9±9.5	0.54±0.3
亚、慢重肝	12	75.8±11.9	13.8±4.4	58.6±10.4	0.25±0.2
肝胆道结石	6	59.1±4.4	35.8±8.1	23.4±6.8	1.57±0.6

*、**、*** 表示该组与重肝组比较P值分别<0.05、<0.01、0.001

表4 各型乙型肝炎患者肝内HBAg检出

组别	例数	HBsAg		HBcAg	
		+(%)	膜型+(%)	+(%)	浆膜型+(%)
急肝	8	6(75)	3(38)	5(63)	3(38)
慢迁肝	12	10(83)	3(25)	8(67)	2(17)
慢活肝(轻)	47	35(74)	19(40)	32(68)	7(15)
慢活肝(中)	24	20(83)	11(46)	13(54.2)	3(13)
慢活肝(重)	10	8(80)	7(70)	7(70)	2(20)
亚慢重肝	12	9(75)	6(50)	10(83.3)	3(25)
总计	113	88(78)	49(43)	75(66)	20(18)

总检出率为78%，各组之间检出率未见明显差异($P < 0.05$)。HBsAg在肝细胞内的形态可呈包涵体型、周边型、膜型及弥漫型，两种类型可同时出现，如膜型与弥漫型，与肝内病变活动有关(图4)。可见到淋巴细胞与含有HBsAg肝细胞相接触的现象。

各型乙肝HBcAg总检出率为66%。HBcAg在肝细胞内的形态有核型、浆型和膜型，浆、膜型常伴随出现。核型多见于病变相对静止的肝组织，而浆膜型者肝内活动性病变多见。膜型HBsAg、浆膜型HBcAg阳性者其肝细胞HLA-I类抗原表达明显强于阴性者(表5)。

表5 HBsAg与HLA-I类抗原表达

HBsAg	n	HLA-I 抗原			P 值
		-	+	++	
HBsAg膜型(+)	49	7	18	24	
HBsAg(-)	25	12	7	6	<0.01
HBcAg浆膜型(+)	20	4	6	10	
HBcAg(-)	38	22	9	7	<0.01

血清HBV DNA状态与HLA-I类抗原表达

本文各型乙肝血清HBV DNA总检出率为49%。HBV DNA阳性组I类抗原表达(19/36)低于HBV DNA阴性组(31/38)。($P < 0.05$)。

肝细胞HLA-I类抗原与血清 β_2 微球蛋白关系

将肝细胞HLA-I类抗原表达强度与同期检测的血清 β_2 微球蛋白含量比较(表6)，各组间相差非常显著。

讨 论

乙肝患者肝内HLA抗原表达的检出及其意义

本文及文献报道^[4]表明，正常肝细胞不表达HLA-I、II类抗原。郝氏报道^[5]20例急性乙肝，其肝细胞I类抗原均表达，II类抗原

表6 肝细胞HLA-I类抗原与血清 β_2 MG比较

	n	β_2 MG(mg/L, $\bar{X} \pm S$)	P 值
HLA-I(-)	14	1.97 \pm 0.52	<0.001
HLA-I(+)	18	3.68 \pm 0.82	<0.001
HLA-I(++)	16	4.86 \pm 1.00	

仅4例表达。本文8例中7例I类抗原，1例II类抗原有肝细胞表达。其检出的差异可能与肝活检所处病期不同有关。结果表明，急性乙肝肝细胞膜HLA-I类抗原的表达在肝细胞的免疫损伤过程中具有重要作用，其表达的启动因素可能是HBV感染和/或IFN的作用。II类抗原表达在发病过程中的作用尚不清楚，推测可能参与辅助免疫活性细胞间的作用。

本文研究了大样本、多例数的(93例)慢性乙肝，并按病型和病理组织学分型分别观察，发现HLA-I类抗原的肝细胞膜表达各型之间差异较大，慢迁肝极少有表达，慢活肝随病理损害程度加重而表达增强，表明慢性乙肝肝细胞膜I类抗原表达与肝组织病理损害的严重程度有关，与以往的报道^[6,7]一致。本文12例慢迁肝中，肝细胞II类抗原很少有表达，轻、中、重型慢活肝半数左右患者有表达，但无显著性差异；II类抗原表达呈灶性分布。提示肝细胞II类抗原的表达并不直接参与肝细胞的免疫损伤过程。

本文首次报告重症乙肝肝细胞HLA抗原表达的检测，75%重肝有I类抗原肝细胞膜表达，58%有II类抗原表达，约1/4~1/3的重肝虽然也有严重的肝组织病理损害和大量淋巴细胞浸润，却未见HLA抗原的表达。提示重肝的发病机理较为复杂，除HLA限制的细胞介导免疫外，可能还有不同的发病机理起主导作用。

乙肝肝细胞损害的效应细胞与靶抗原的关系

本文对各型乙肝肝内T细胞亚群检测的结果与国内外报道^[8~10]相符。重肝的大片及亚大片坏死区，慢活肝的碎屑样或桥状坏死区，急

肝的灶性坏死区均以 CD_2^+ 细胞为主要炎症浸润细胞, 进一步证实T细胞作为主要的免疫活性细胞参与乙肝的发病过程; 上述各组中, CD_4^+/CD_8^+ 细胞比值均小于1, 表明 CD_8^+ 细胞是参与乙肝肝细胞免疫病理损害的主要效应细胞。

连续切片对肝内 T 细胞亚群、HBsAg 和 HBeAg 与肝细胞 HLA-I 类抗原相互关系的分析发现, 浸润的淋巴细胞与肝细胞 I 类抗原表达的分布基本一致; 膜型 HBsAg 和浆膜型 HBeAg 表达者肝细胞膜 I 类抗原表达明显增强, 而上述病毒抗原的膜表达常见于肝组织活动性病变。因此, 认为乙肝肝细胞 HLA-I 类抗原与 HBsAg 和 HBeAg 膜表达有明显的关系, 从组织形态学上进一步证实了效应细胞 (CD_8^+ 细胞) 与靶抗原 (HLA-I 类抗原、HBsAg 和 HBeAg) 在感染肝细胞损害中的作用机制 (即双识别机制), 提示两种靶抗原的共同存在是 CTL 识别和杀伤受染肝细胞的前提和必要条件。另外, 当 HBV 复制减低或停止 (HBV DNA 阴转时), 肝细胞 HLA-I 类抗原表达增加也为这一论点提供了佐证。慢活肝时, 由于 I 类抗原表达和病毒抗原的分布不尽一致, 可能是造成 HBV 不能彻底清除而持续存在的原因之一。只有当肝细胞充分、同步地表达 HLA 抗原和病毒抗原时, CTL 才能有效地将受染肝细胞清除。

肝细胞 HLA-I 类抗原表达与血清 β_2 微球蛋白呈一致性变化, 符合血清 β_2 微球蛋白在患乙肝时增高是肝内合成及释放增多所致。因此, 在乙肝时, 动态测定血中 β_2 微球蛋白水平可在一定程度上反映肝内 HLA-I 类抗原肝细胞表达的情况。

(本文图见封3)

参 考 文 献

1. Thomas HC, et al. Virus-host interaction in chronic hepatitis B virus infections. *Seminars in Liver Diseases* 1988;8:342.
2. 第六届全国病毒性肝炎专题学术会议. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 1991;9(1):52
3. Nagafuchi Y, et al. Expression of β_2 -microglobulin on hepatocytes in acute and chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1986;6:20
4. Lautenschlager I, et al. Distribution of the major histocompatibility complex antigens on different cellular components of human liver. *Cellular Immunology* 1984;85:191
5. 郝连杰, 等. 急性乙肝患者肝内淋巴细胞亚群和人类白细胞抗原的研究. *同济医科大学学报* 1989;4:219
6. Chu CM, et al. HLA class I antigen display on hepatocyte membrane in chronic hepatitis B virus infection: its role in the pathogenesis of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1988;8:712
7. 候金林, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者肝细胞膜 HLA-I 类抗原表达及其意义. *中华内科杂志* 1990;29(1):29
8. 王慧芬, 等. 重型乙型病毒性肝炎肝组织内 T 淋巴细胞亚群的观察. *免疫学杂志* 1989 5(2):43~46
9. Paronetto F, et al. Lymphocytes in liver diseases. In: Popper H, eds. *Progress in Liver Diseases. Vol VII*. Orlando, Florida: Grune & Stratton 1986:191
10. Dienes HP, et al. Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non-B. *Hepatology* 1987;7:1317
(1991-11-22收稿 1992-06-06修回)

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF HLA- CLASS I AND II ANTIGENS IN VARIOUS TYPES OF HEPATITIS B

Liu Jianping Peng Wenwei

(Department of Infectious Diseases)

Li Mengdong Li Qifen

(Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital,
Third Military Medical College)

HLA-class I and II antigens, T cell subsets, HBsAg, HBeAg of the liver were studied by the APAAP and PAP methods of immunohistochemical technique in 113 cases of acute, chronic and severe types of hepatitis B. Serum HBV DNA and β_2 -microglobulin were simultaneously assayed by dot blot hybridization and radial immunoassay respectively. The expressions of HLA-class I and II antigens on the hepatocyte membrane were increased in acute, chronic active and severe hepatitis B, especially for the HLA-class I antigens. Whereas there was almost no expression in chronic persistent hepatitis B. There existed close relationship between the hepatocyte expression of HLA-class I antigens and the inflammatory activity as well as the membrane expressions of HBsAg and HBeAg. It was found that the major infiltrating cells in the hepatic damage area were CD₄⁺ lymphocytes, of which CD₈⁺ cells constituted the major subpopulations. The attack and lysis of hepatocytes by the antigen-dependent, HLA-restricted cytotoxic T lymphocyte is considered as the main mechanism of the immunopathologic damage in hepatitis B.

Key words viral hepatitis B; HLA-class I and II antigens; T cell subsets; immunohistochemical technique

小儿股骨头无菌性坏死机理的研究

课题负责 刘尚礼 何天骥 (附属孙逸仙纪念医院外科)

孙逸仙纪念医院骨科刘尚礼、何天骥等应用 TC-MDP 动态骨显像测定了临床32例 LPD 双侧 股骨头的血供, 并对其髋关节进行了骨髓静脉造影, 股骨颈测定骨内压, 髋关节内压测定和造影观察, 以及在 20只幼狗建立了静脉回流障碍和骨内压升高所导致的股骨头坏死模型, 全面、深入地阐述了静脉回流障碍和骨内压增高是 LPD 股骨头坏死机理的关键。这一学说改变了单纯动脉缺血的概念, 从而提高了治疗效果, 为我国优生优育政策提供一项医疗上的保证。该研究有创新性, 经 5 位专家书评一致给予较高的评价, 达国际先进水平。

(科 学)

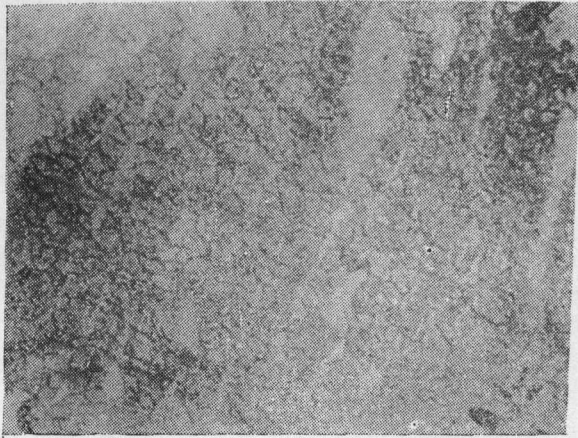


图1 慢活肝肝细胞 HLA-I 类抗原的“蜂巢样”表达 ($\times 132$)

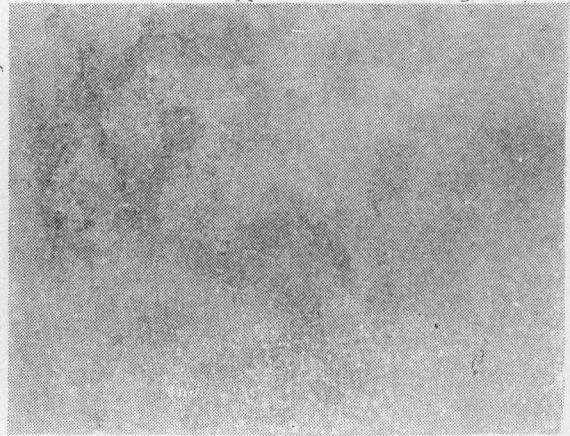


图2 CD_8^+ 细胞包绕肝细胞 ($\times 330$)

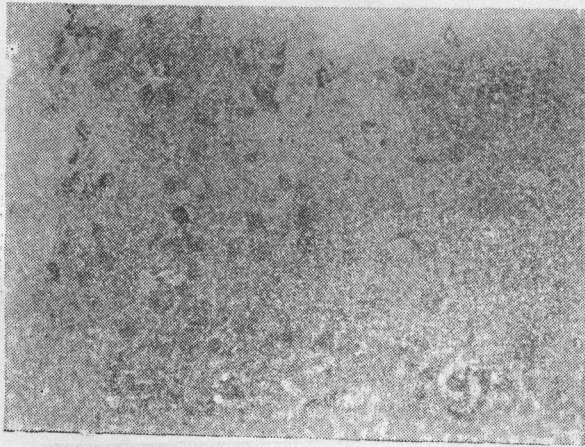


图3 CD^+ 胞与 HLA-I 类抗原染色的肝细胞接触 ($\times 132$)

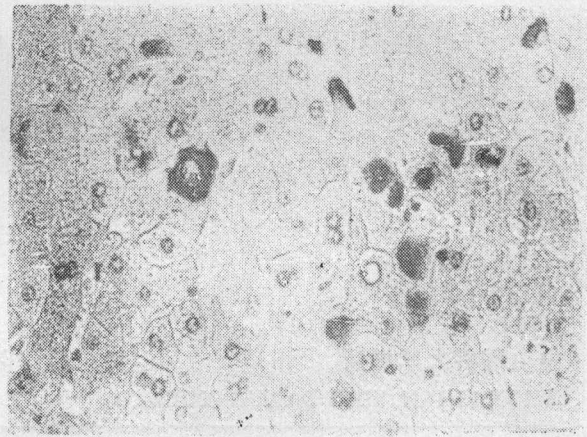


图4 弥漫型及膜型HBsAg ($\times 132$)