

· 临床论著 ·

慢性乙型肝炎患者肝组织中黑色素瘤缺乏因子 2 表达与病变程度的相关性

庞秀青¹ 李新华¹ 莫志硕¹ 冯智英² 潘宇航² 雷姿颖¹ 郑杏容¹ 高志良¹ 谢冬英¹

【摘要】目的 初步探讨DNA识别受体之一黑色素瘤缺乏因子2(AIM-2)在慢性乙型肝炎患者肝组织中表达分布及其与肝组织病变程度的相关性。**方法** 利用免疫组织化学方法对54例CHB患者肝组织活检标本、19例慢加急性肝功能衰竭(HBV-ACLF)肝移植术后病肝组织标本及20例健康供体肝组织标本进行AIM-2检测,利用Image-Pro-Plus 6.0软件测定AIM-2积分吸光度值。肝组织炎症程度分为G1~4和纤维化程度分为S0~4,并进行HAI评分。两组间比较采用独立样本的秩和检验,多组间比较用Kruskal-Wallis检验分析,各组数据间相关性分析采用Spearman相关分析。**结果** AIM-2表达定位于肝实质细胞的胞质内。正常肝组织中极少表达,HBV相关患肝组织中表达显著增多。患者肝组织AIM-2积分吸光度值中位数在HBV-ACLF组为19 772.48,显著高于CHB组的4 996.88($Z = 5.008, P < 0.001$);CHB组显著高于健康对照组的2 296.49($Z = -3.028, P = 0.002$);患肝组织AIM-2表达水平与肝脏炎症HAI评分正相关($r = 0.707, P < 0.0001$)。**结论** AIM-2在正常肝组织极少表达;但在慢性乙型肝炎患者肝组织表达显著增加,且随肝脏炎症的加重而表达增强,提示AIM-2可能在慢性乙型肝炎肝脏损伤机制中发挥重要作用。

【关键词】 黑色素瘤缺乏因子 2; 病毒性肝炎, 乙型, 慢性; 肝组织; 炎症反应

Expression of absent in melanoma 2 in the liver and correlation with the degrees of liver damage in patients with chronic hepatitis B Pang Xiuqing¹, Li Xinhua¹, Mo Zhishuo¹, Feng Zhiying², Pan Yuhang², Lei Ziyang¹, Zheng Xingrong¹, Gao Zhiliang¹, Xie Dongying¹. ¹Department of Infectious Diseases, The Key Laboratory of Infection Prevention and Control of Tropical Diseases of Ministry of Education, The Key Laboratories on Liver Disease Research of Guangdong; ²The Pathology Department, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China
Corresponding author: Xie Dongying, Email: xdy_gz@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of absent in melanoma 2 (AIM-2) in liver of patients with chronic hepatitis B, and to evaluate the correlation between the expression level of AIM-2 and the degree of liver damage. **Methods** AIM2 were detected in 73 liver specimens including 54 from common CHB patients, 19 from patients with acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF), and 20 from healthy controls by immunohistochemical staining. Semi-quantitative of the integral absorbance were conducted by the software Image-Pro-Plus 6.0. The correlation between the AIM-2 levels and the degree of liver damage were analyzed, respectively. **Results** AIM-2 expression was exclusive to the hepatic cellular cytoplasm in the liver tissue of patients with HBV. The median integral absorbance of AIM-2 in CHB patients was 4 996.88, which was significantly higher than that in healthy controls of 2296.49 ($Z = -3.028, P = 0.002$), but was less than that in HBV-ACLF patients with 19 772.48 ($Z = -5.008, P < 0.001$). The integral absorbance of AIM-2 in CHB patients was also positive correlated with the score of histological activity index (HAI) in liver ($r = 0.707, P < 0.0001$). **Conclusions** AIM-2 rarely expressed in healthy liver, but significantly up-regulation were found in patients with chronic hepatitis B especially in patients with acute-on-chronic liver failure, indicating that AIM-2 may contribute to the pathogenesis of liver damage in chronic hepatitis B and liver failure.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.03.007

基金项目: “十二五”国家科技重大专项 (No. 2012ZX09303001; No. 2012ZX10002007; No. 2012ZX10002004)

作者单位: 510630 广州市, 中山大学附属第三医院感染科、热带病防治研究教育部重点实验室、广东省肝脏疾病研究重点实验室¹, 病理科²

通讯作者: 谢冬英, Email: xdy_gz@163.com

【Key words】 Absent in melanoma 2; Chronic hepatitis B; Liver tissue; Inflammation response

目前,认为慢性乙型肝炎的发病机制不是HBV复制直接破坏肝细胞所致,主要是通过触发机体免疫反应而引起^[1]。但对HBV如何触发机体免疫反应导致肝脏损伤的机制认识尚不清楚。近来,研究发现的DNA识别受体可能在HBV致机体免疫激活反应中发挥重要作用^[2]。黑色素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2, AIM-2)可作为胞质双链DNA识别受体之一,通过胱冬肽酶-1途径参与炎症反应过程^[3-4]。已经证实其与自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮等密切相关^[5-7];在多种肿瘤发生发展中发挥作用^[8-10];并参与细菌、病毒等微生物感染致机体炎症的过程^[11-13]。AIM-2在正常健康肝细胞不表达^[14-15],而AIM-2是否在慢性乙型肝炎肝组织中表达,是否参与HBV相关慢性肝炎的发生发展,目前尚不清楚。本研究着重观察AIM-2是否在慢性乙型肝炎患者肝脏组织中有表达,并进一步评价其表达水平与肝脏病变程度的相关性。

资料与方法

一、研究对象

本文回顾性分析2013年1月至2014年6月在本院住院并确诊为慢性乙型肝炎的73例患者的病理组织学资料。其中慢性乙型肝炎患者(CHB) 54例,于2014年2月至6月在本院感染科就诊并进行肝脏组织活检,诊断均符合2010年版慢性乙型肝炎防治指南^[16],均已签署肝组织活检术知情同意书。慢加急性肝功能衰竭(HBV-ACLF)病肝标本19例,来自2013年1月至2014年6月于本院实行肝移植手术患者的病肝组织,ACLF诊断标准参考2009年的APASL《肝衰竭诊治指南》^[17]。排除孕妇及哺乳期妇女,重叠HAV、HCV、HDV、HEV和HIV感染,合并自身免疫性疾病(如甲状腺功能亢进、糖尿病)和恶性肿瘤,合并酒精性、药物性和脂肪性等因素引起的肝损伤,合并严重的全身性疾病和精神病;近6个月接受抗病毒药物以及免疫调节或免疫抑制药物

治疗者。取20例肝移植手术中健康供体肝脏组织标本作为对照,各组基本资料特征见表1。

二、方法

1. 肝组织病理检查:超声引导下肝组织穿刺,4%的甲醛溶液浸泡,经过脱水、透明、浸蜡、包埋,最后制成石蜡蜡块。常规石蜡切片,HE染色,观察肝组织。由资深病理医师盲法阅片,按照2000年由中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案中组织病理学诊断标准^[18],将炎症活动度及纤维化程度分别分为1~4级(G)和1~4期(S),同时按照Ishak分级系统评估肝组织活动指数(HAI)^[19],并依据汇管区周围界面炎(0~4分)、融合性或桥样坏死(0~6分)、小叶内点状坏死和灶性炎症反应(0~4分)和汇管区炎症反应(0~4分)等4项标准,量化肝组织炎症活动(inflammation activity, IA),积分为0(无)~18分(最重)。

2. 肝组织中AIM-2检测:取石蜡块以厚度3.5 mm切片、烘干、脱蜡,梯度乙醇(100%、95%、85%和75%)逐步洗去二甲苯,3%双氧水室温10 min处理,EDTA(pH8)高压抗原修复4 min,冷却20 min。应用免疫组织化学pAP笔圈定肝活检组织,将第一抗体兔抗人多克隆抗体AIM-2(sc-137970购于美国Santa Cruz Biotechnology Inc公司)以1:2000稀释后滴加在圆圈内肝组织上,4℃冰箱孵育24 h。PBS缓冲液冲洗,二抗37℃孵育15 min, PBS缓冲液冲洗,三抗37℃孵育15 min, DAB染色,三步法免疫组织化学试剂盒(NovoLink Polymer Detection System RE7140-CN)购自英国Novocastra Laboratories公司。苏木素染核,盐酸乙醇分化,氨水返蓝,中性树脂封片。免疫组织化学结果判读由2名资深病理科医生进行,并采用Image-Pro-Plus 6.0软件测定积分吸光度值。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,非正态分布计量资料用中位数表示,两组间比较用Mann-

表1 CHB和ACLF组患者临床指标基本资料

组别	例数	年龄 ^a (岁)	男性 [例(%)]	ALT ^a (U/L)	AST ^a (U/L)	HBsAg ^a (IU/ml)	HBeAg		HBV DNA ^a (lg IU/ml)
							阳性	阴性	
CHB	54	36(23~60)	46(85)	53	42	5 709	29	25	5
ACLF	19	40(29~61)	18(95)	35	59	416	2	17	2
统计量		Z = -2.83		Z = -1.95	Z = -3.02	Z = -3.96	$\chi^2 = 9.03$		Z = -5.64
P		0.005	0.058 ^b	0.051	0.003	<0.001	0.003		<0.001

注:^a数值以中位数(范围)表示,^bFisher精确检验法

表2 不同炎症程度分组 AIM-2 表达

分组	例数	AIM-2 积分吸光度 (M)
HC	20	2 296
G1	17	2 297
G2	20	5 424
G3	15	8 904
G4	21	19 770
χ^2		50.36
P		< 0.0001

表3 不同纤维化分期分组 AIM-2 表达

分组	例数	AIM-2 积分吸光度 (M)
S0	25	1 893
S1	16	4 993
S2	17	4 981
S3	14	5 662
S4	21	19 770
χ^2		47.35
P		< 0.0001

Whitney U检验；多组间比较用Kruskal-Wallis检验，组间两两比较用Dunns检验。计数资料以率表示，比较采用卡方及Fisher确切概率法检验。AIM-2表达量与各临床指标的相关性采用Spearman等级相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。统计图采用GraphPad Prism 5.01软件制作。

结 果

一、AIM-2在肝组织中的表达分布及定位

AIM-2在健康肝脏组织的实质细胞及非实质细胞中几乎不表达（图1a），但在慢性HBV感染者肝脏组织的肝细胞的胞质内可见表达，呈区域性分布，在炎症区域边缘表达明显高于其他区域，在非肝细胞中几乎不表达，且AIM-2肝细胞表达量与肝脏病理损伤的严重程度相关，ACLF组显著高于CHB组及健康对照组，详见图1。

二、CHB患者和ACLF患者肝组织AIM2表达水平半定量分析

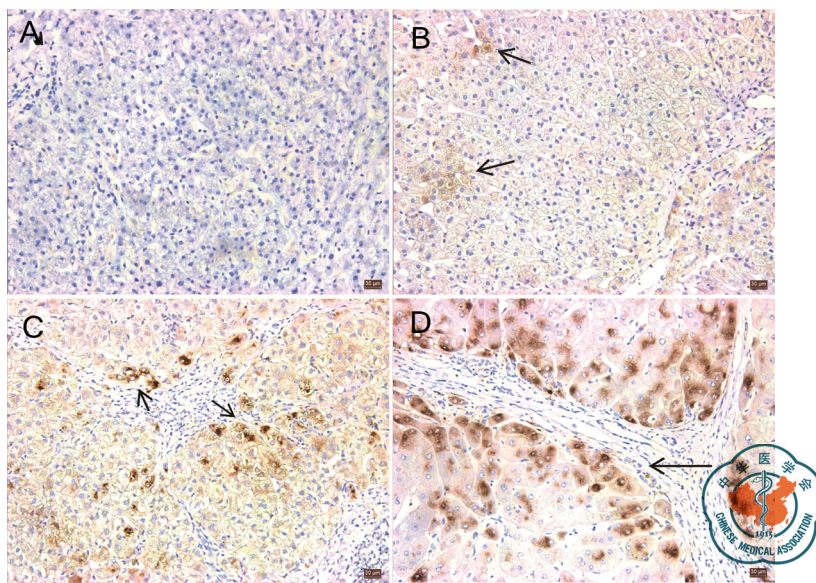
CHB组、ACLF组和健康对照组3组肝脏组织AIM-2积分吸光度值中位数差异具有统计学意义

($\chi^2 = 38.58$, $P < 0.001$)；HBV-ACLF组为19 772.48，显著高于CHB组的4 996.88 ($Z = -5.008$, $P < 0.001$)，CHB组高于健康对照组的2 296.49 ($Z = -3.028$, $P = 0.002$)，见图2。

三、肝组织中AIM-2表达与肝脏炎症及纤维化程度的关系

1. 不同炎症分级患者AIM-2表达水平分析：根据肝组织病理炎症水平将HBV相关的患者分为G1~4组，并和健康组比较，5组间AIM-2表达水平不同，差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 50.36$, $P < 0.001$)，见表2；组间两两比较，G4组AIM-2表达水平显著高于HC、G1和G2组 (χ^2 分别为-49.39、-48.66和-29.29, P 均 < 0.01)；G3组AIM-2表达水平显著高于HC、G1组 (χ^2 分别为-32.07和-31.33, P 均 < 0.01)，见图3。CHB患者肝组织AIM-2积分吸光度值与肝脏炎症活动IA评分呈正相关关系 ($r = 0.707$, $P < 0.0001$)，见图4。

2. 不同纤维化组间AIM-2表达变化：根据病理纤维化分期分为S0-4共5组，组间AIM2表达水平比较有统计学差异 ($\chi^2 = 47.35$, $P < 0.0001$)，见表3，两两比较显示S4组AIM-2表达水平显著高于



注：A：健康肝组织；B：CHB G1-2；C：CHB G3-4；D：ACLF

图1 不同炎症程度肝组织中 AIM-2 表达免疫组织化学结果 (200 ×)

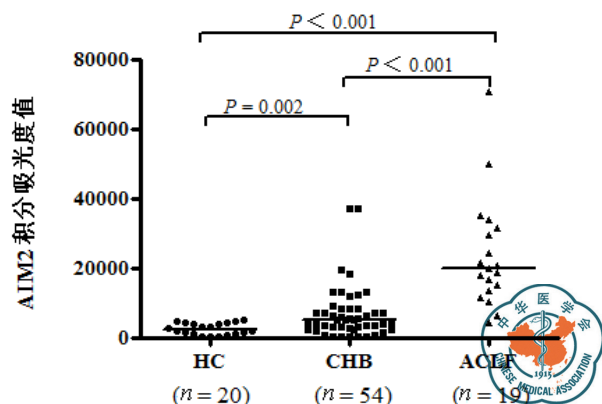


图2 AIM-2在健康组、慢性乙型肝炎组和慢加急性肝功
衰竭组的表达比较

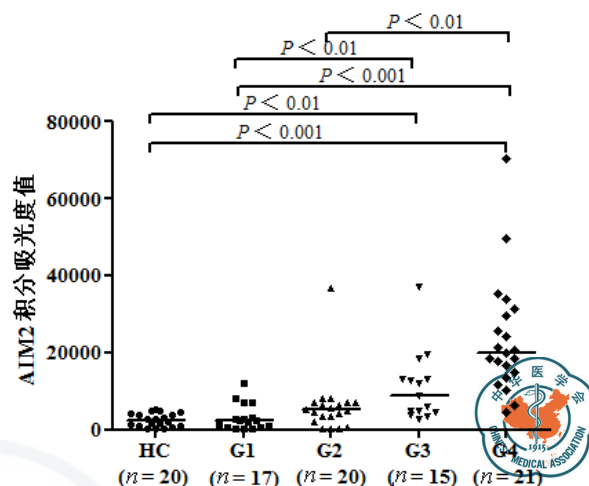


图3 不同炎症程度组间 AIM-2 积分吸光度值比较

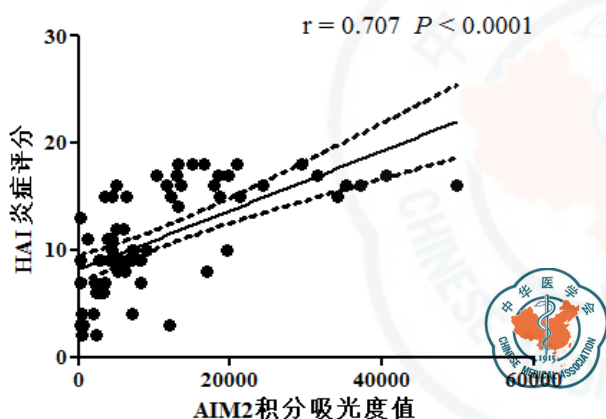


图4 肝组织 AIM-2 积分光密度值与 HAI 评分的相关性

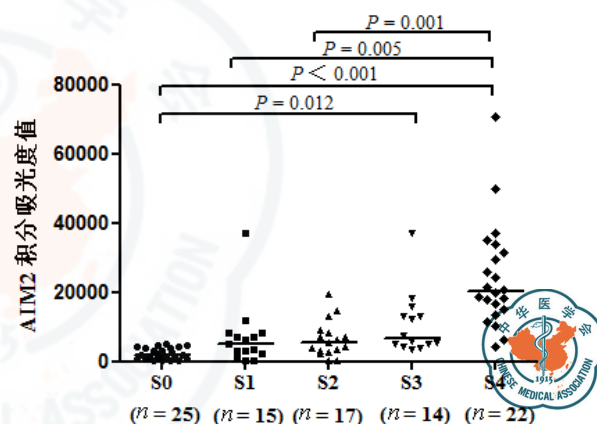


图5 不同纤维化分期组间 AIM-2 积分吸光度值的比较

S0、S1和S2组 ($\chi^2 = -51.32$ 、 -42.79 和 -31.60 , P 均 < 0.01)；S3高于S0组 ($\chi^2 = -32.97$, $P < 0.05$)，见图5。

讨 论

AIM-2最早于1997年使用消减cDNA筛选法从黑色素瘤细胞株中鉴定成功，由于其在黑色素瘤中缺失，故得名；Northern blot分析表明，AIM-2主要在脾脏、小肠、外周血液白细胞及睾丸中表达，在健康肝脏组织中表达量极少^[15]。而细胞组分的分级分离实验显示，AIM-2主要定位于转染小鼠细胞株的细胞质中^[20]。本研究利用免疫组织化学法检测肝组织中AIM-2的表达发现，AIM-2在健康肝组织中极少量表达，主要定位于肝细胞的胞质，与上述研究结果一致^[15]。Wu等^[21]发现AIM-2在CHB及急性乙型肝炎（AHB）患者外周血中亦随炎症反应而增强。然而

肝脏炎症与肝组织AIM-2表达量的关系尚不明确，本研究首次分析了AIM-2在CHB及ACLF患者肝组织中的表达，发现AIM-2在肝组织中的表达水平随肝脏炎症程度而增加，慢性乙型肝炎患者肝组织中的表达较健康组显著增多，在靠近炎症区域最明显，在ACLF患者表达水平最高。本研究结果提示，AIM-2参与HBV相关肝脏炎症的发生发展。

既往研究发现，AIM-2可在干扰素诱导下分泌增加^[15]；胞质中异常DNA可诱导AIM-2表达增加，并与其结合激活机体免疫^[3]。AIM-2由HIN200结构域和PYD结构域组成，通过HIN200结构域可以与双链DNA结合，PYD结构域则介导了与接头蛋白ASC的结合，形成炎性复合体，从而激活蛋白酶胱冬肽酶-1诱导细胞凋亡，继而引起成熟的IL-1 β 、IL-18的分泌，胞质异常DNA、牛痘病毒DNA证实可被AIM-2识别，激活胱冬肽酶-1，分泌IL-1 β 、IL-18^[4]。AIM-2在牛分枝杆菌和土拉热杆菌感染

中,可识别巨噬细胞胞质中相应细菌的DNA,从而引起炎症应答^[11, 13]。在病毒感染方面,HPV属于双链DNA病毒,HPV16可以通过激活正常人角质细胞中AIM-2表达而引起炎症反应^[12]。IL-1 β 和IL-18等炎症因子在慢性肝脏炎症发生过程中发挥作用^[22]。本研究结果显示,AIM-2在肝组织的表达量与肝脏炎症损伤相关,提示AIM2-IL-1 β 信号通路参与肝脏炎症及病理损伤。具体机制不明,按照目前研究结果推测可能如下:①HBV属于双链DNA病毒,可能直接激活AIM-2信号通路导致IL-1 β 、IL-18等炎症因子的表达增加参与肝脏病理损伤。②在肝脏炎症启动后,肝组织细胞坏死后受损的DNA激活AIM-2信号通路,加重肝脏炎症。究竟是HBV-DNA还是受损后肝细胞DNA抑或两种DNA共同作用仍需进一步的研究。

总之,AIM-2作为DNA识别受体之一,可能参与了HBV致肝脏炎症损伤的过程,但具体机制有待进一步研究。

参考文献

- Pungpapong S, Kim WR. In the eye of the B-holder: natural history of chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*,2013,58(1):6-8.
- Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection[J]. *Gut*,2012,61(12):1754-1764.
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA[J]. *Nature*,2009,458(7237):509-513.
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC[J]. *Nature*,2009,458(7237):514-518.
- Choubey D. Interferon-inducible Ifi200-family genes as modifiers of lupus susceptibility[J]. *Immunol Lett*,2012,147(1-2):10-17.
- Panchanathan R, Duan X, Arumugam M, et al. Cell type and gender-dependent differential regulation of the p202 and aim2 proteins: implications for the regulation of innate immune responses in SLE[J]. *Mol Immunol*,2011,49(1-2):273-280.
- Choubey D, Panchanathan R. Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus[J]. *Immunol Lett*,2008,119(1-2):32-41.
- Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, et al. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation[J]. *Cancer Sci*,2012,103(4):782-790.
- Lee J, Li L, Gretz N, et al. Absent in melanoma 2 (AIM2) is an important mediator of interferon-dependent and -independent HLA-DRA and HLA-DRB gene expression in colorectal cancers[J]. *Oncogene*,2012,31(10):1242-1253.
- Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, et al. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation[J]. *Cancer Sci*,2012,103(4):782-790.
- Yang Y, Zhou X, Kouadir M, et al. The AIM2 Inflammasome is involved in macrophage activation during infection with virulent *Mycobacterium bovis* strain[J]. *J Infect Dis*,2013,208(11):1849-1858.
- Reinholz M, Kawakami Y, Salzer S, et al. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes[J]. *Arch Dermatol Res*,2013,305(8):723-732.
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*[J]. *Nat Immunol*,2010,11(5):385-393.
- Cridland JA, Curley EZ, Wykes MN, et al. The mammalian PYHIN gene family: phylogeny, evolution and expression[J]. *BMC Evol Biol*,2012,12:140.
- DeYoung KL, Ray ME, Su YA, et al. Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma[J]. *Oncogene*,1997,15(4):453-457.
- 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. *中华传染病杂志*,2011,29(2):65-80.
- 刘青,王泰龄. 慢加急性肝衰竭(ACLF)共识纪要: 亚太肝病学会推荐(APASL)[J]. *临床肝胆病杂志*,2010,26(1):13-18.
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,中华医学会肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华传染病杂志*,2001,19(1):56-62.
- Schaff Z. The value of liver biopsy in chronic hepatitis[J]. *Orv Hetil*,2011,152(22):856-858.
- Choubey D, Walter S, Geng Y, et al. Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family[J]. *Febs Lett*,2000,474(1):38-42.
- Wu DL, Xu GH, Lu SM, et al. Correlation of AIM2 expression in peripheral blood mononuclear cells from humans with acute and chronic hepatitis B[J]. *Hum Immunol*,2013,74(5):514-521.
- Bieghs V, Trautwein C. The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease[J]. *Trends Immunol*,2013,34(9):446-452.

(收稿日期: 2014-09-27)

(本文编辑: 孙荣华)

庞秀青, 李新华, 莫志硕, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织中黑色素瘤缺乏因子2表达与病变程度的相关性[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(3): 326-330.