

· 基础论著 ·

人免疫缺陷病毒感染胃黏膜上皮细胞凋亡特点及凋亡途径分析

李冰 崔丹 金瑞 吴昊 刘妍

【摘要】 目的 探讨伴有消化道症状的 HIV 感染者胃黏膜上皮细胞凋亡的特点并分析可能的凋亡途径。**方法** 对 30 名伴有消化道症状的 HIV 感染者和 20 名普通人群患者进行胃镜检查,取活检标本进行普通病理诊断、采用原位细胞凋亡和免疫组织化学检测 Fas 抗原。**结果** HIV 感染组慢性胃炎检出率为 100%,其胃黏膜上皮细胞凋亡指数为 $(24.83 \pm 10.30)\%$,高于对照组 $(16.50 \pm 7.63)\%$ ($P < 0.01$),胃黏膜上皮细胞 Fas 阳性表达率为 53.3% (16/30),对照组胃黏膜上皮细胞 Fas 阳性表达率为 25.0% (5/20) ($P < 0.05$)。**结论** 细胞凋亡可能在 HIV 患者消化道疾病的发病机制中发挥重要的作用,Fas/FasL 可能为其凋亡的途径之一。

【关键词】 人免疫缺陷病毒;细胞凋亡;Fas 途径

Analysis of features and pathways of apoptosis in gastric mucous epithelial cells in HIV-infected patients LI Bing, CUI Dan, JIN Rui, WU Hao, LIU Yan. Beijing Youan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: LI Bing, Email: libingyayy@163.com

【Abstract】 Objective To study the features of apoptosis and analyze potential pathway in gastric mucous cells in HIV-infected patients. **Methods** Fifty patients (including 30 HIV-infected patients and 20 control patients) with gastrointestinal symptoms were enrolled with gastric mucous samples obtained via endoscopy. Samples were studied with pathologic diagnosis and TUNEL test to study apoptosis index in the gastric mucous epithelial cells. Fas expression of gastric mucous epithelial cells was detected by immunohistochemistry method. **Results** The detection rate of chronic gastritis in HIV-infected group was 100%. The apoptosis index in gastric mucous epithelial cells was $(24.83 \pm 10.30)\%$ in HIV-infected patients, significantly higher than that of $(16.50 \pm 7.63)\%$ in control group ($P < 0.01$). Fas expression rate in HIV-infected group (53.3%) was higher than 25.0% in control group ($P < 0.05$) significantly. **Conclusions** Apoptosis may play an important role in the pathogenesis of disease of digestive tract in HIV-infected patients. One of the apoptosis pathways

作者单位:100069 北京,首都医科大学附属北京佑安医院消化科(李冰、金瑞);重点实验室(崔丹、刘妍);感染科(吴昊)

通讯作者:李冰 Email:libingyayy@163.com

may be Fas/FasL.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Apoptosis; Fas pathway

正常胃黏膜上皮细胞存在细胞凋亡,籍以清除衰老的细胞,维持黏膜细胞的生理平衡。胃黏膜上皮细胞凋亡异常会导致胃黏膜病变的发生。近年来,越来越多的研究证明消化道黏膜由于其自身的解剖和免疫特点使其成为人免疫缺陷病毒(HIV)主要的攻击目标之一。高达 90% 以上的 HIV 阳性患者在病程中可表现有消化道症状。对于消化道黏膜的免疫研究正逐渐成为 HIV 研究中的热点、难点问题。那么 HIV 感染者胃肠道高发病率是否与黏膜上皮细胞的凋亡有关及其凋亡途径如何尚不清楚。我们对北京佑安医院住院的 30 例 HIV 感染患者行胃镜检查,对活检的胃黏膜组织进行细胞凋亡检测及 Fas 途径的检测,初步探讨 HIV 感染者胃黏膜上皮细胞凋亡的特点和原因。

资料与方法

一、研究对象

选取北京佑安医院感染科 2004 ~ 2005 年住院伴有消化道症状的 HIV 感染患者 30 例,所有病例经免疫印迹试验确定为 HIV 感染。其中男性 11 例,女性 19 例;年龄 26 ~ 50 岁,平均年龄(37.6 ± 7.3)岁。全部病例均来自河南省,通过血液途径感染,均未进行抗病毒治疗。入选者近 1 个月内未接受质子泵抑制剂及抗生素治疗。另抽取因消化道症状而在本院行胃镜检查的门诊普通人群患者 20 例,其中男性 9 例,女性 11 例;年龄 33 ~ 63 岁,平均年龄(48.8 ± 9.3)岁。两组临床资料具有可比性。

二、研究方法

1. 胃黏膜活检标本:每例患者进行胃镜检查,胃镜下取 3 块胃黏膜标本,其中胃窦 2 块分别取自距幽门 2 ~ 3 cm 的大弯和小弯处;胃体小弯处 1 块。对可能存在病变的病灶另外再取活检。对活检标本进行常规病理诊断、原位细胞凋亡检测和免疫组织化学 Fas 检测。并利用流式细胞计数检测 HIV 感染患者外周血 CD4⁺、CD8⁺ 及 CD3⁺ T 淋巴细胞绝对计数及相应比值。原位细胞凋亡检测采用 Roche 公司生产的原位细胞凋亡检测试剂盒进行末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)标记 DNA 链断端的原位酶标方法(TUNEL)检测。免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司生产的 PV 二步法检测试剂盒,一抗小鼠抗人 Fas (CD95)单克隆抗体购自美国 NeoMarkers 公司。

2. TUNEL 检测:切片常规脱蜡至水,每张切片加 50 μ l 3% H₂O₂ 甲醛,室温孵育 10 min;蛋白酶 K 室温孵育 20 min,PBS 震荡洗涤;滴加 50 μ l TUNEL 反应液,湿盒中 37℃ 孵育 60 min;滴加 50 μ l 转化剂-POD,湿盒中 37℃ 孵育 30 min;二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水、透明,中性树胶封片;PBS 代替一抗作阴性对照,用已知的阳性对照片作阳性对照。结果判定:光镜下观察切片的显色反应,胞核中有棕黄色颗粒或核质呈均匀的棕黄色者为凋亡细胞。每张切片至

少观察 5 个以上有代表性的高倍视野,计数 500 个以上完整胃小凹上皮细胞,阳性细胞数以百分数表示,作为凋亡细胞指数(AI %)。

3. Fas(CD95) 的检测:石蜡切片常规脱蜡和水化后,滴加 50 μ l 过氧化酶阻断剂,室温下孵育 10 min,枸橼酸盐缓冲液抗原热修复;每张切片加 50 μ l 的一抗(稀释度 1:25),湿盒内 4℃ 冰箱过夜;滴加 50 μ l 二抗(山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体),室温下孵育 30 min;DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明,中性树胶封片。用 PBS 代替一抗工作液作阴性对照,用已知阳性对照片做阳性对照。结果判定:光镜下观察切片的显色反应。Fas 阳性反应细胞为棕黄色,主要定位于胞膜。选择 5 个以上有代表性高倍视野,计数不少于 500 个胃黏膜上皮细胞中的阳性细胞。阳性细胞数 $\geq 5\%$ 定为阳性,少于 5% 或背景同阴性对照者判为阴性。

三、统计学方法

应用 SPSS 11.5 统计软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 t 检验;计数资料应用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 判定有统计学意义。

结 果

一、慢性胃炎诊断结果

常规病理检查发现 HIV 感染组 30 例患者均检测出慢性胃炎(100%)。慢性浅表性胃炎(CSG)检出率 66.7% (20/30),CSG 伴肠上皮化生 2 例,CSG 伴上皮不典型增生 1 例。慢性萎缩性胃炎(CAG)检出率为 33.3% (10/30),CAG 伴肠上皮化生 1 例,CAG 伴上皮不典型增生 1 例。对照组 20 例中 19 例病理证实为慢性胃炎(95.0%),1 例正常。CSG 检出率为 90.0% (18/20),CSG 伴肠上皮化生 1 例。CAG 检出率为 5% (1/20)。

二、胃黏膜上皮细胞凋亡检测结果

胃黏膜全层均可见到凋亡阳性细胞,主要分布于胃黏膜上皮细胞及腺体细胞,呈单个散在分布或呈簇状分布。HIV 感染组固有层内可见单核细胞凋亡信号阳性。对照组少见(图 1)。

HIV 感染组胃黏膜上皮细胞凋亡指数为 $(24.83 \pm 10.30)\%$,对照组胃黏膜上皮细胞凋亡指数为 $(16.50 \pm 7.63)\%$,两组差异具有统计学意义($t = 3.094$, $P = 0.003$)。CD4 $\geq 200/L$ 的 HIV 感染患者(16 例)胃黏膜凋亡指数为 $(26.56 \pm 12.48)\%$,高于 CD4 $< 200/L$ 的 HIV 感染组(14 例)凋亡指数为 $(22.86 \pm 6.99)\%$,两者相比差异无统计学意义($P = 0.334$)。

三、胃黏膜细胞 Fas 表达

经免疫组织化学显示,Fas 表达阳性的细胞主要分布于胃黏膜上皮细胞及腺体的颈部,HIV 感染组胃黏膜全层均有 Fas 阳性表达,还可见固有层中单核细胞 Fas 抗体表达阳性,对照组少见(图 2)。

HIV 感染组胃黏膜上皮细胞 Fas 阳性表达率为 53.3% (16/30),对照组胃黏膜上皮细胞 Fas 阳性 25.0% (5/20),两组差异具有统计学意义($\chi^2 = 3.955$, $P = 0.047$)。其中,CD4 $\geq 200/L$ 的 HIV 感染患者 Fas 阳性表达率为 50.0% (8/16),

低于 $CD4 < 200/L$ 的 HIV 感染组 Fas 阳性表达率为 57.1% (8/14), 两者相比差异无统计学意义 ($P = 0.730$)。

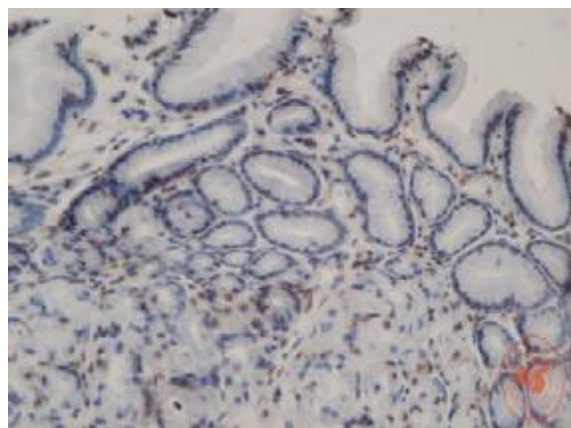


图 1 胃黏膜上皮细胞、腺体细胞及固有层中单个核细胞凋亡细胞核 TUNEL 染色阳性, 呈棕黄色(400 ×)

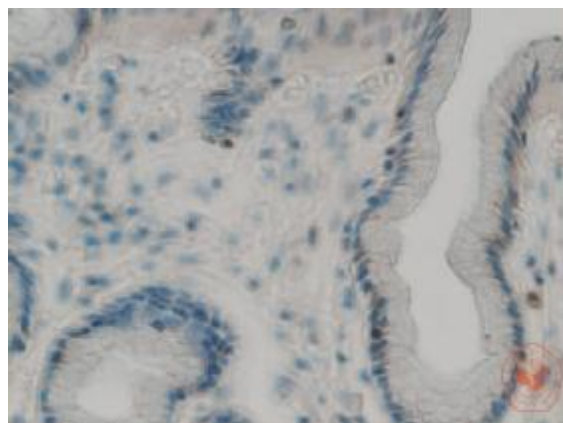


图 2 胃黏膜上皮细胞、腺体细胞和单个核细胞 Fas 阳性, 胞膜呈棕黄色(400 ×)

讨 论

细胞凋亡 (apoptosis) 是在某些生理或病理条件下, 细胞受到某种信号的触发后主动参与并遵循一定程序的死亡过程。正常情况下, 细胞凋亡与增殖共同维持着组织中细胞的动态平衡。胃黏膜上皮细胞凋亡异常和细胞的过度增殖可导致胃黏膜病变的发生。

HIV 感染组 $CD4 \geq 200/L$ 的 HIV 感染患者 CAG 检出率低, 提示随着 $CD4$ 阳性 T 淋巴细胞计数的下降, 胃黏膜中慢性萎缩性胃炎的发病率有增加的趋势。胃黏膜萎缩会导致黏膜的分泌功能受损, 从而出现临床上的各种症状; 萎缩并伴有肠上皮化生和不典型增生时易导致肿瘤的发生。在慢性萎缩性胃炎的形成机制中, 细胞凋亡可能导致了最初的胃黏膜萎缩和组织减少。我们推测 HIV 感染者消化道并发症的形成机制中, 黏膜细胞的凋亡可能起到重要的作用。

可能的原因有: 第一, HIV 具有在肠道上皮细胞内复制的能力^[1], 研究证明, HIV-1 不仅能够感染体外培养的肠上皮细胞^[2], 而且 HIV-1 即使不进入肠上皮细胞, 也能够影响肠上皮细胞的功能, 如发生萎缩^[3]。对 HIV 感染者肠道黏膜的凋亡研究显示, 凋亡的细胞比 HIV 感染的细胞数量多, 提示未受到感染的细胞也受到牵连, 这与外周淋巴结内发生的情况相似^[4]。近年发现 HIV-1 感染者黏膜病毒载量 (mucosal viral load, MVL) 与肠道黏膜细胞因子的变化有关^[5]。而黏膜组织内细胞因子的增加可能不会只是仅仅导致黏膜固有层淋巴细胞的减少, 可能会涉及其它无辜的细胞, 如上皮细胞等。研究发现, HIV 能够通过细胞因子上调肠道黏膜的离子流, 离子流增加的结果之一就是会导致上皮细胞的凋亡^[6]。还有研究发现 HIV 感染在某些方面会导致上皮细胞细胞支架的改变^[7]。第二,

Boirivant 等^[8]将分离自正常肠道黏膜固有层的淋巴细胞与 HIV-1 的 gp120 进行预孵化后给予刺激后发现凋亡细胞增加。这个过程由 Fas/Fas 配体介导,与 gp120 诱导产生 Fas 配体的信使 RNA 有关。也有研究证明 HIV-1 产物 Tat 蛋白能够影响人结肠黏膜分泌的活动并抑制肠细胞分裂^[9]。还有研究将肠道细胞株、HT-29 和 gp120 共同培养后,在肠道细胞的基底侧发现细胞质内的钙增加,而钙的增加与微管蛋白解聚和上皮细胞电阻下降都有关^[10],这两种情况都可能导致细胞凋亡。因此,有学者认为 HIV 肠病是肠道黏膜暴露于 gp120 后的病理生理学反应,并不依赖上皮细胞的 HIV 感染^[11]。

由于胃黏膜的结构与肠道黏膜的结构具有相似性,且解剖位置相近,推测在胃黏膜上皮细胞内可能发生了类似的反应,导致细胞凋亡指数增高。

我们的研究提示 Fas/FasL 途径可能参与了 HIV 感染者胃黏膜上皮细胞凋亡的过程。在 HIV-1 感染的病人中,表达 Fas 的 T 细胞是随着疾病进展而逐渐增多的, Fas 表达阳性的 CD4⁺T 细胞百分数的提高也与 CD4⁺T 细胞计数下降呈正相关^[12],且凋亡的细胞中大部分是 Fas 阳性的细胞,只有很少一部分为 Fas 阴性或弱阳性的细胞^[13]。至于 Fas/FasL 途径是如何参与 HIV 感染者胃黏膜上皮细胞的凋亡过程仍需进一步的研究。

本研究发现,在 HIV 感染者胃黏膜上皮细胞的凋亡指数中,不同 CD4 阳性细胞计数组之间的凋亡指数和 Fas 阳性表达率没有显著统计学差异,该结果可能与 HIV 感染者的胃黏膜上皮细胞自身的免疫学特点有关,且不同于外周血的免疫特点。研究表明,人免疫缺陷病毒的血液感染和黏膜感染之间存在着区室化,即血液感染和黏膜感染过程是相互分离,互不平行的。有研究证实^[14]由 R5 病毒克隆引起的感染,在伴随外周 CD4⁺T 淋巴细胞逐渐耗竭的同时,肠道内的 CD4⁺T 淋巴细胞明显减少;而由 X4 克隆引起的感染,外周 CD4⁺T 淋巴细胞的损耗过程与肠道并不平行。因此,利用外周血的 CD4⁺T 淋巴细胞计数进行分组分析是否适用于 HIV 黏膜免疫的研究仍需进一步的探讨,可能需要新的分组标准。

参 考 文 献

- 1 Fantini J, Yahi N, Delezay O, et al. GalCer, CD26 and HIV infection of intestinal epithelial cells. *AIDS*, 1994,8:1347-1348.
- 2 Asmuth DM, Hammer SM, Wanke CA. Physiological effects of HIV infection on human intestinal epithelial cells; an in vitro model for HIV enteropathy. *AIDS*, 1994,8:205-211.
- 3 Yahi N, Spitalnik SL, Stefano KA, et al. Interferon- α decreases cell surface expression of galactosyl ceramide, the receptor for HIV-1 GP120 on human colonic epithelial cells. *Virology*, 1994,204:550-557.
- 4 Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med*, 1995,1:129-134.
- 5 McGowan I, Elliott J, Fuerst M, et al. Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004,37:1228-1236.
- 6 Schmitz H, Rokos K, Florian P, et al. Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *AIDS*, 2002,16:983-991.
- 7 Clayton F, Kapetanovic S, Kotler DP. Enteric microtubule depolymerization in HIV infection; a possible cause of HIV-associated enteropathy. *AIDS*, 2001,15:123-124.

- 8 Boirivant M, Viora M, Giordani L, et al. HIV-1 gp120 accelerates Fas-mediated activation-induced human lamina propria T cell apoptosis. *J Clin Immunol*, 1998,18:39-47.
- 9 Canani RB, Cirillo P, Mallardo G, et al. Effects of HIV-1 Tat protein on ion secretion and on cell proliferation in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 2003,124:368-376.
- 10 Maresca M, Mahfoud R, Garmy N, et al. The virotoxin model of HIV-1 enteropathy: involvement of GPR15/Bob and galactosylceramide in the cytopathic effects induced by HIV-1 gp120 in the HT-29-D4 intestinal cell line. *J Biomed Sci*, 2003,10:156-166.
- 11 Clayton F, Kotler DP, Kuwada SK, et al. Gp120-induced Bob/GPR15 activation: a possible cause of human immunodeficiency virus enteropathy. *Am J Pathol*, 2001,159:1933-1939.
- 12 McCloskey TW, Oyaizu N, Kaplan M, et al. Expression of the Fas antigen in patients with HIV-1. *Cytometry*, 1995, 22: 111-114.
- 13 Oyaizu N, Pahwa S. Role of apoptosis in HIV disease pathogenesis. *J Clin Immunol*, 1995, 15: 217-231.
- 14 Harouse JM, Gettie A, Tan RC, et al. Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science*, 1999, 284: 816-819.

(收稿日期:2007-07-10)

(本文编辑:韩俊燕)