

· 临床论著 ·

自身免疫性肝炎和原发性胆汁性肝硬化患者肝组织和外周血单个核细胞 Fas 及 FasL 的检测

刘妍 闫惠平 张立洁 檀玉芬 冯霞 马冬梅 张欣 李伟华

【摘要】 目的 观察自身免疫性肝炎(AIH)和原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者肝组织和外周血单个核细胞(PBMC)Fas、FasL的表达,探讨细胞凋亡在自身免疫性肝病(AILD)发病机制中的作用。方法 采用免疫组织化学技术对10例AIH、20例PBC患者肝组织和PBMC中Fas、FasL进行检测,正常对照为10例健康献血者。结果 AIH患者PBMC中Fas、FasL检出率分别为100%和90%,Fas、FasL平均阳性细胞率分别为78%和65%;PBC患者PBMC中Fas、FasL检出率均为90%,平均阳性细胞率分别为62%和59%。在肝组织中Fas、FasL表达于肝细胞和淋巴细胞:9例AIH Fas阳性颗粒见于肝细胞浆,其中1例胞膜、胞浆同时阳性;8例FasL阳性颗粒表达于肝细胞浆;Fas、FasL阳性肝细胞多聚集于汇管区周围。同时在汇管区周围浸润的淋巴细胞中也可见Fas或FasL的阳性表达。17例PBC患者Fas阳性颗粒表达于肝细胞浆,其中4例胞膜、胞浆同时阳性;16例PBC FasL阳性,见于肝细胞浆,在肝组织中浸润的淋巴细胞浆中Fas、FasL均有表达。AIH和PBC患者Fas、FasL表达显著高于正常对照。结论 AIH和PBC患者的Fas、FasL表达增加,细胞凋亡可能在AIH和PBC的发病机制中起重要作用。

【关键词】 自身免疫性肝炎;原发性胆汁性肝硬化;Fas;FasL

Detection of Fas and FasL in liver tissues and peripheral blood mononuclear cell of patients with autoimmune hepatitis or primary biliary cirrhosis LIU Yan, YAN Hui-ping, ZHANG Li-jie, TAN Yu-fen, FENG Xia, MA Dong-mei, ZHANG Xin, LI Wei-hua. Central Lab, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: YAN Hui-ping, Email: yhp503@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To explore the role of apoptosis in pathogenesis of autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cirrhosis (PBC) through observing expression of Fas and FasL in liver tissues and peripheral blood mononuclear cell

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571723);北京市自然科学基金资助项目(7062033)

作者单位:100069 北京市,首都医科大学附属北京佑安医院重点实验室

通讯作者:闫惠平 Email: yhp503@vip.sina.com

(PBMC) of patients with AIH or PBC. **Methods** Ten patients with AIH and 20 patients with PBC were enrolled. And 10 healthy people were chosen as normal control. Immunohistochemistry was used to detect Fas and FasL in liver tissues and PBMC. **Results** Ten cases found Fas and 9 cases found FasL in PBMC of 10 patients with AIH, and the average percent of positive cells for Fas and FasL were 78% and 65%, respectively. Nine of 10 PBC cases detected Fas and FasL in their PBMC, the average percent of positive cells of them were 62% and 59%, respectively. Fas and FasL were located in hepatocytes and lymphocytes in liver tissues. In 9/10 AIH cases, Fas was found in cytoplasm, one patient in cytoplasm and cell membrane of hepatocytes. FasL in 8 cases were located in cytoplasm. The distribution of Fas and FasL positive hepatocytes were around port in liver. Most of the infiltrating lymphocytes were aggregated in port. In 17/20 PBC patients Fas were located in cytoplasm and 4 in cytoplasm and cell membrane. FasL in 16 cases were loaded in the cytoplasm of hepatocytes. The expressions of Fas and FasL in AIH and PBC were higher than healthy people. **Conclusions** The expressions of Fas and FasL were higher in AIH and PBC than normal control, and apoptosis may play an important role in the pathogenesis of AIH and PBC.

【Key words】 Autoimmune hepatitis; Primary biliary cirrhosis; Fas; FasL

许多研究表明, Fas 系统介导的细胞凋亡与自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases, AILD)有密切关系。自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)和原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)都是与自身免疫机制有关的自身免疫性肝脏疾病。因此本研究观察 AIH 和 PBC 患者肝组织和外周血单个核细胞(PBMC)的 Fas 和 Fas 配体(FasL)的表达情况, 探讨 Fas、FasL 在 AILD 患者发病机制中的作用。

资料与方法

一、一般资料

1999~2005 年间北京佑安医院收治的 AIH 患者 10 例, PBC 患者 20 例, 正常对照者 10 例。AIH 诊断根据 2002 年国际 AIH 小组制定的诊断标准^[1]并结合评分系统, PBC 诊断根据 2000 年美国肝病学会 PBC 指导建议^[2]。

二、方法

1. AIH 和 PBC 患者 PBMC 涂片的制备: 取静脉血后加入 EDTA 抗凝管, 6 h 以内用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 计数后调整细胞浓度, 用固定液与细胞混合, 4℃ 固定, 滴 1 滴细胞于处理过的玻片上, 室温晾干。

2. AIH 和 PBC 患者肝组织标本的制备: B 超引导下, 进行肝穿, 肝组织经甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 厚切片。兔抗人 Fas、FasL 多克隆抗体、S-P 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。3 例正常肝组织(各型病毒性肝炎指标均阴性)

为阴性对照。

3. AIH 和 PBC 患者 PBMC 涂片和肝组织 Fas、FasL 检测步骤: 每张玻片加 1 滴过氧化酶阻断液, 室温孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。用枸橼酸盐缓冲液微波修复, 自然冷却, 加 1 滴非免疫性动物血清, 室温孵育 15 min, 倾去不洗, 加第一抗体, 4℃ 过夜, PBS 冲洗, 加 1 滴生物素标记的第二抗体, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 加 1 滴链亲和素-过氧化物酶溶液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗, 加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察, 适时终止。苏木素复染、脱水后中性树胶封片。细胞胞质、胞核或胞膜呈棕黄色且背景清晰者为阳性。

结 果

一、Fas、FasL 在 PBMC 中的表达

AIH 患者 10 例, Fas 检出率为 100%, FasL 检出率为 90%, Fas 平均阳性细胞率为 78% (图 1), FasL 平均阳性细胞率为 65%; PBC 患者 20 例, Fas 检出率为 90%, FasL 检出率为 90%, Fas 平均阳性细胞率为 62%, FasL 平均阳性细胞率为 59%, 具体见表 1。

表 1 AIH 和 PBC 患者 PBMC 涂片 Fas 及 FasL 检出率及阳性细胞数

	Fas		FasL	
	检出率[例(%)]	阳性细胞率(%)	检出率[例(%)]	阳性细胞率(%)
AIH(10 例)	10(100)	78 ± 23 *	9(90)	65 ± 18 *
PBC(20 例)	9(90)	62 ± 21 *	9(90)	59 ± 17 *
对照(10 例)	1	偶见	0	0

注: * AIH 和 PBC 分别和正常对照者比较 $P < 0.01$; 每例标本计数 100 个单个核细胞, 阳性细胞所占百分比为阳性细胞率。

二、Fas、FasL 在 AIH 肝组织的表达

10 例 AIH 患者 9 例 Fas 检测阳性(阳性率 90%), 棕黄色阳性颗粒表达于肝细胞胞浆, 1 例胞浆、胞膜同时阳性, Fas 阳性肝细胞多聚集于汇管区周围。FasL 阳性 8 例(阳性率 80%), 棕黄色阳性颗粒仅见于肝细胞胞浆, 而且其聚集于汇管区周围的特点与 Fas 阳性肝细胞相似。肝组织汇管区周围浸润的淋巴细胞中同样可以观察到 Fas 或 FasL 的阳性表达。

三、Fas、FasL 在 PBC 肝组织的表达

20 例 PBC 患者 17 例 Fas 检测阳性(85%), 17 例见于肝细胞胞浆, 其中 3 例胞浆、胞膜同时阳性, 阳性肝细胞同样在汇管区周围呈聚集趋势(图 2)。16 例 FasL 阳性(80%), 棕黄色阳性颗粒均表达于肝细胞胞浆。和 AIH 患者相似, Fas、FasL 不仅在肝细胞表达, 而且在汇管区周围浸润的淋巴细胞胞浆也有表达。20 例中仅有 2 例 PBC 患者同时作了 PBMC 涂片和肝组织的 Fas、FasL 检测, 其中 1 例 PBMC 和肝组织 Fas、FasL 均阳性, 表达一致; 另 1 例 PBMC 中 Fas 阴性、FasL 阳性, 而肝组织 Fas、FasL 均阳性。

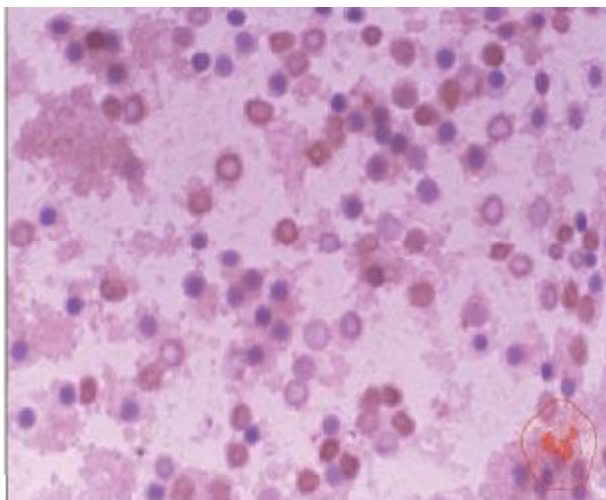


图1 AIH患者单个核细胞涂片Fas检测(免疫组织化学SP法, 200×)

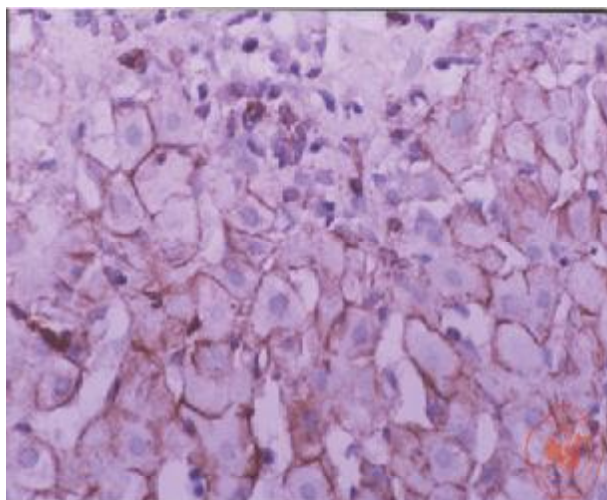


图2 PBC患者肝组织Fas检测(免疫组织化学SP法, 400×)

讨 论

AILD是一组病因和发病机制尚不完全清楚,和自身免疫有关的肝脏疾病,临床常见的主要有3种类型:AIH、PBC及原发性硬化性胆管炎(PSC)。AIH是一种主要病变累及肝实质的肝脏疾病,患者常伴有高滴度自身抗体和ALT、AST、TBil升高,AKP和 γ -GT升高,IgG明显升高。PBC是一种多发生于中年女性的慢性淤胆性炎症性肝病,AKP和 γ -GT升高,IgM升高,95%以上的PBC患者AMA阳性,尤其是AMA-M2亚型的升高具有诊断意义^[3]。

本课题组曾对AIH和PBC患者的自身抗体特征和临床表现等做过报道^[4],又进一步对2种疾病的细胞因子进行过分析,发现这两种疾病患者的Th1型细胞模式占主导,IFN- γ 明显升高^[5],IFN- γ 主要由活化T细胞和NK细胞产生,文献证实IFN- γ 可增强Fas在多种细胞中的表达^[6]。Fas是I型跨膜糖蛋白,成熟蛋白质含319个氨基酸残基,主要表达于活化淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞和成纤维细胞等。FasL是II型跨膜糖蛋白,全长278个氨基酸残基,属于肿瘤坏死因子家族,FasL仅表达于激活的T淋巴细胞^[7]。文献报道Fas和多种自身免疫病如胰岛素依赖性糖尿病、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、类风湿性关节炎、桥本氏甲状腺炎等的发病相关。60%以上系统性红斑狼疮患者血液中可溶性Fas浓度高于正常。桥本氏甲状腺炎IL-1、IFN- γ 上调甲状腺细胞Fas表达^[8,9]。为探讨细胞凋亡在AILD发生、发展中的作用,我们用免疫组织化学技术观察了Fas和FasL在AIH和PBC外周血及肝组织中的表达情况,AIH和PBC患者肝组织和PBMC涂片中均有高于正常对照者的Fas与FasL的表达。郎振为等^[10]研究乙型肝炎患者肝组织中Fas与FasL的分布,发现Fas及FasL的检出率分别为76.7%和70%,低于AIH和PBC患者的阳性率。乙型肝炎患者Fas大部分表达于肝细胞胞浆,这与AIH和PBCFas的分布一致,FasL多在肝组织中浸润的淋巴细胞胞

浆表达,而 AIH 和 PBC FasL 多表达于肝细胞胞浆,这可能与病毒性肝炎和自身免疫性肝病发病机制不同有关。研究 AILD 患者不同病程 Fas、FasL 水平可能更有助于对疾病的理解。AIH 和 PBC 患者的 Th1 型细胞模式占主导, Fas/FasL 调节异常,是 Fas 与 T 细胞作用后启动的免疫反应使 Th1 型细胞模式占主导、促进 IFN- γ 的产生,进一步导致细胞破坏,还是先启动免疫反应产生 IFN- γ 细胞因子占主导,使得 Fas 表达增加,加速细胞的破坏,有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of hepatitis. *Hepatology*, 2002, 36: 479-497.
- 2 Heathcote EJ. The american association for the study of liver diseases practice guidelines. *Hepatology*, 2000, 31: 1005-1013.
- 3 邱德凯, 马雄. 自身免疫性肝病基础与临床. 上海: 上海科学技术出版社. 2006. 20-22.
- 4 闫惠平, 庄辉, 刘燕敏, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者的免疫学特点分析. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13: 12-16.
- 5 刘妍, 闫惠平, 冯霞, 等. 自身免疫性肝炎和原发性胆汁性肝硬化患者六种细胞因子分析. *中华检验医学杂志*, 2006, 29: 1025-1026.
- 6 金伯泉主编. 细胞和分子免疫学. 北京: 科学出版社, 2001. 183-184.
- 7 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995, 267: 1449-1456.
- 8 雒文田. Fas/FasL 介导的凋亡与自身免疫性甲状腺病. *国外医学免疫学分册*, 2000, 20: 57-59.
- 9 胡中波. Fas 在人体的表达及其意义. *国外医学免疫学分册*, 2000, 23: 666-668.
- 10 朗振为, 王海舰, 孟忻, 等. 乙型肝炎患者肝组织中 FasL 的检测. *中华肝脏病杂志*, 1998, 6: 87-88.

(收稿日期: 2007-09-13)

(本文编辑: 王丹静)

刘妍, 闫惠平, 张立洁, 等. 自身免疫性肝炎和原发性胆汁性肝硬化患者肝组织和外周血单个核细胞 Fas 及 FasL 的检测[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2008, 2(2): 39-43.