



人膜联蛋白在胎儿不同组织中的表达

相关研究表明, HBV也同其他病毒一样, 首先通过病毒外膜蛋白识别肝脏细胞质膜上的受体, 与靶细胞上的受体结合, 附着于细胞表面, 在病毒受体的介导下, 进入细胞进行复制。与HBV相关的受体较多, 如多聚人血清白蛋白受体(PSAR)等, 但大部分均为肝细胞所特有。近年研究发现人膜联蛋白(Human Annexin-V, HA-V)是肝细胞膜上与HBV感染有关的因子, 而且有学者证实HA-V存在于胎盘组织, 并认为这种表达与HBV的经胎盘传播相关[1][2]。本研究拟采用SP免疫组织化学方法检测HA-V在引产胎儿各组织的表达、分布, 并探讨其临床意义。

1 资料和方法

1.1 对象和试剂

12例母亲为2003年3月至2004年3月在西安交通大学第一医院妇产科患者, HBV血清标志物阴性。研究对象为这些母亲引产或流产胎儿的卵巢、脾脏、肝脏、肾脏、胸腺、心脏、输卵管。获得胎儿组织时均得到医院伦理委员会及患者的同意。山羊抗人HA-V多克隆抗体(一抗)购于Santa Cruz 生物技术公司, 兔抗山羊二抗购于中杉试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 胎儿组织的获取 获得胎儿家属的同意后在胎儿自然无呼吸及心跳后解剖获得卵巢、脾脏、肝脏、肾脏、胸腺、心脏、输卵管, 大小2.0 cm×1.0 cm×0.5 cm。用生理盐水洗去沾染的血液, 泡于新鲜配制的40 g/L多聚甲醛溶液固定24 h。常规石蜡包埋, 制备4 μm厚切片, 60 °C烘烤12 h, 编号备用。

1.2.2 HA-V的检测 (1)切片常规脱蜡至水; (2)滴加1:100稀释的山羊抗人HA-V多克隆抗体, 4 °C冰箱过夜; (3)滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊IgG, 37 °C孵育30 min; (4)滴加HRP, 37 °C孵育30 min; (5)以上各步之后PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)冲洗, 5 min×3次; (6)DAB显色; (7)苏木素复染; (8)二甲苯及乙醇透明; (9)中性树胶封片后, 在显微镜下观察并拍照。不加山羊抗人HA-V多克隆抗体, 代之以PBS, 设为空白对照。不加山羊抗人HA-V多克隆抗体, 代之以正常山羊血清, 设为替代对照。

1.3 统计学处理

400倍光镜下各时点, 每个组织免疫组化切片随机选取5个视野, 利用Photoshop7.0软件测量总体灰度, 采用组间样本均数比较t检验。

2 结果

胎儿的卵巢、脾脏、肝脏、肾脏、胸腺、心脏、输卵管中均有HA-V表达。卵巢组织中分布于卵巢的卵细胞、颗粒细胞及间质细胞(图1); 肝脏组织中分布于肝细胞、汇管区的胆管上皮细胞(图2); 胸腺组织可见部

分淋巴细胞为阳性，少数为强阳性(图3)；心肌纤维细胞也呈阳性(图4)；脾脏的皮质和髓质均为阳性(图5)；肾脏见于肾小管系统(图6)；输卵管组织的粘膜上皮为阳性(图7)。阴性对照(图8)及替代对照均未显示阳性信号，排除了假阳性。



图1 卵细胞及其周围颗粒细胞和间质细胞HA-V阳性

Fig.1 Expression of HA-V in the cytoplasm of the ova, granular cells and interstitial cells (SP, original magnification: 10×20)

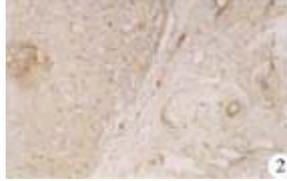


图2 肝细胞HA-V阳性

Fig.2 Expression of HA-V in the cytoplasm of the liver cells and intrahepatic bile duct cells (SP, original magnification: 10×20)

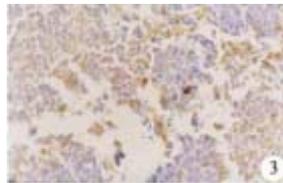


图3 胸腺组织内的部分淋巴细胞HA-V强阳性

Fig.3 Expression of HA-V in the cytoplasm of lymphocytic cells in the thymus gland (SP, original magnification: 10×10)

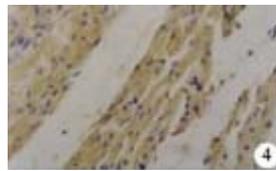


图4 心肌纤维细胞HA-V阳性

Fig.4 Expression of HA-V in the plasma of the myocardial cells (SP, original magnification: 10×40)

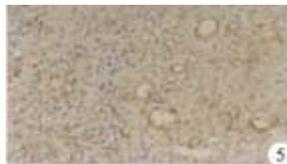


图5 脾脏皮质和髓质细胞HA-V阳性

Fig.5 Expression of HA-V in the cytoplasm of the cortical and medullary cells of the spleen (SP, original magnification: 10×10)



图6 肾脏组织的小管系统上皮细胞HA-V阳性

Fig.6 Expression of HA-V in the cytoplasm of the renal tubular epithelial cells (SP, original magnification: 10×10)

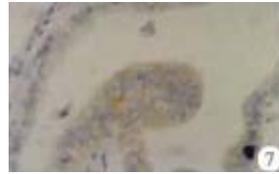


图7 输卵管粘膜上皮细胞HA-V阳性

Fig.7 Expression of HA-V in the cytoplasm of the epithelial cells of the fallopian (SP, original magnification: 10×40)

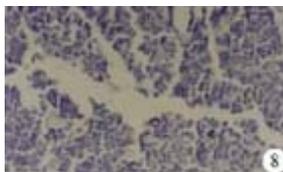


图8 阴性对照

Fig.8 Negative control (SP, original magnification: 10×40)

免疫组化图像分析系统显示：胎儿肝脏组织的灰度值为 155.81 ± 7.09 ，明显高于其他组织 ($P < 0.05$)。脾脏组织为 85.63 ± 8.76 、胸腺组织为 78.36 ± 8.91 、肾脏组织为 84.52 ± 9.01 、心脏组织为 77.62 ± 5.65 、输卵管组织 78.65 ± 8.32 、卵巢组织为 92.75 ± 6.96 ，这些非肝组织的灰度值之间无显著差别 ($P > 0.05$)。

3 讨论

HBV为嗜肝病毒，主要引起肝细胞的炎症、坏死，临床表现为急慢性肝炎、肝硬化，甚至肝癌。但众多研究证实乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎核心抗原(HBcAg)及乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBVDNA)、乙型肝炎病毒核糖核酸(HBV RNA)，甚至乙型肝炎病毒颗粒也存在于人体的其他组织和器官。有学者在慢性乙型肝炎患者的脑、胸腺、心脏、肺、肝、脾、肾脏、脐带、胎盘组织中检测到了HBsAg、HBcAg、HBVDNA和HBV RNA[4][5]；也有学者从乙型肝炎患者的皮肤、肌肉、睾丸组织中检出HBV DNA[6]。转基因研究发现，HBV可以在转基因鼠的多个脏器内存在并复制。因此，HBV可以感染肝外组织并在其内复制已成为共识[7]。但是关于HBV感染这些组织的机制尚未明确。目前已证实HBV与细胞膜上相应受体结合是其感染细胞的关键。HA-V是近年被作为HBV感染相关因子研究的热点之一。研究认为，HA-V可能作为HBV的细胞受体与病毒内吞及摄入直接相关[8]。并且多项研究显示HBV感染和复制仅发生于含HA-V的组织 and 细胞中，如有学者在体外实验中发现表达HA-V的鼠肝细胞可特异性结合S-HBsAg，并产生HBV复制性感染[9]；还有学者证实不表达HA-V的大鼠肝癌细胞FTO2B由于种特异性的限制，不能被HBV感染，但导入HA-V基因后，该细胞能够在细胞表面表达HA-V而被HBV感染，复制并表达HBsAg和HBcAg，且分泌HBV DNA至培养细胞上清中，使上清具有再感染能力[8][10]。以上研究结果均说明HA-V与HBV感染组织有明确的相关性。因此我们推测HBV能够感染多脏器可能也与HA-V的存在相关。

本实验研究结果证实胎儿卵巢、脾脏、肝脏、肾脏、胸腺、心脏、输卵管的实质及间质细胞上均有HA-V

的表达,即证明HA-V可能是胎儿不同组织中所共有的蛋白,该机制可能参与了HBV的泛嗜性感染。免疫组化图像分析系统显示胎儿肝脏组织HA-V表达较其他组织明显增多,其余组织之间无明显差别,该结果说明HA-V作为与HBV感染相关的因子在肝细胞上表达较多,可能是肝脏为HBV主要靶器官的原因之一,也可能是HBV感染后肝脏损伤最重且持久的因素。虽然该图像分析系统是目前较先进的一种免疫组化染色图像比较系统,但考虑到不同组织间细胞密度的不同,以及不同组织间细胞大小的不同,比较结果有待于进一步应用分子生物学的方法验证。

HA-V可能参与了HBV与各脏器组织细胞的粘附、内化等过程,特别是肝细胞,并且在多种因素的参与下完成了病毒对组织的感染。但是HBV的感染过程非常复杂,可能涉及多种病毒吸附蛋白及多种细胞受体,并且还受到多种细胞内外因子的调节,因此,对HBV感染的确切机制还有待于更进一步的研究。

参考文献:

[1]曹宝花, 门可, 徐德忠, 等. 人胎盘组织和滋养层细胞膜联素V的检测[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(4): 388-90.

Cao BH, Men K, Xu DZ, et al. Detection of annexin V in human placenta and cultured trophoblast cells[J]. Chin J Public Health, 2004, 20(4): 388-90.

[2]岳亚飞, 姜翔, 石磊, 等. 乙型肝炎病毒宫内感染机理的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(4): 224-6.

Yue YF, Jiang H, Shi L, et al. Study on the mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2004, 39(4): 224-6.

[3]Bhimma R, Coovadia HM. Hepatitis B virus-associated nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2004, 24: 198-211.

[4]Lhotta K. Beyond hepatorenal syndrome: glomerulonephritis in patients with liver disease[J]. Semin Nephrol, 2002, 22: 302-8.

[5]Huang JM, Huang TH, Qiu HY. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes[J]. Asian J Androl, 2002, 4: 209-12.

[6]Aragona E, Burk RD, Ott M, et al. Cell type-specific mechanisms regulate hepatitis B virus transgene expression in liver and other organs[J]. J Pathol, 1996, 180(4): 441-9.

[7]Choo KB, Liew LN, Chong KY, et al. Transgenome transcription and replication in the liver and extrahepatic tissues of a human hepatitis B virus transgenic mouse[J]. Virology, 1991, 182(2): 785-92.

[8]de Meyer S, Gong Z J, Hertogs K, et al. Influence of the administration of human annexin V on in vitro binding of small hepatitis B surface antigen to human and to rat hepatocytes and on in vitro hepatitis B virus infection[J]. J Viral Hepatol, 2000, 7(2): 104-14.

[9]de Meyer S. Hepatitis B virus receptor: the role of human annexin V[J]. Acta Gastroenterol Belg, 2000, 63(2): 180-1.

[10]de Meyer S. Involvement of phosphatidylserine and non-phospholipid components of the hepatitis B virus envelope in human annexin V[J]. J Hepatol, 2000, 33(3): 515-9.