

丁型肝炎肝组织 Bcl-2/Bax、Bak 表达与细胞凋亡表达

顾小红, 张云东, 李奇芬, 王宇明

顾小红, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化科 重庆市 400042

张云东, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科 重庆市 400042

李奇芬, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病专科医院, 全军传染病研究中心 重庆市 400042

顾小红, 女, 1968-06-10 生, 四川省绵阳市人, 汉族. 2003 年第三军医大学博士, 现任副主任医师, 副教授, 发表论文 27 篇, 获首届全军优秀研究生论文奖, 军队科技进步二等奖一项, 参编专著 6 部, 主要从事病毒性肝炎发病机制研究.

项目负责人: 顾小红, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化科. zhanggxh@cta.cq.cn

电话: 023-66690688

收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2004-02-01

Expression of Bcl-2/Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in tissues of patients with hepatitis D

Xiao-Hong Gu, Yun-Dong Zhang, Qi-Feng Li, Yu-Ming Wang

Xiao-Hong Gu, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China.

Yun-Dong Zhang, Department of Neurosurgery, Daping Hospital Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Qi-Feng Li, Yu-Ming Wang, Infectious Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Xiao-Hong Gu, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. zhanggxh@cta.cq.cn

Received: 2003-08-08 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To study the expression of Bcl-2, Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in pathogenesis of hepatitis D.

METHODS: Expression of HDAg, Bcl-2, Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in liver tissues of 77 patients with hepatitis D were studied by immunohistochemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) technique. Meanwhile, the relationship between expression of HDAg, Bcl-2/Bax and hepatocytic apoptosis were studied by double labeling and serial sections.

RESULTS: Bcl-2 was mainly expressed in the cytoplasm of hepatocytes, Bax and Bak mainly in the cytoplasm of hepatocytes and partly in the nucleus of hepatocytes, and HDAg mainly in the nucleus of hepatocytes. Many HDAg and Bax or Bak positive cells were distributed among infiltrating lymphocytes at the periportal region especially at the advancing edges in the areas of piecemeal necrosis. Many apoptotic hepatocytes were found to locate near to positive cells of HDAg. There were positive correlations between degrees of HDAg expression, Bax or Bak expression, and hepatocytic apoptosis ($t=27.89$, $P<0.01$, $P<0.05$ $t=19.16$, $P<0.05$ $t=18.22$).

CONCLUSION: The distribution and expression of Bax, Bak, HDAg and hepatocytic apoptosis are significantly correlated with the activity of inflammation and the severity of the liver damage.

Gu XH, Zhang YD, Li QF, Wang YM. Expression of Bcl-2/Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in tissues of patients with hepatitis D. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1578-1581

摘要

目的: 探讨 Bcl-2, Bax, Bak 及肝细胞凋亡在丁型肝炎发病机制中的意义.

方法: 采用 TUNEL 技术和免疫组化单、双标记染色, 检测 77 例丁肝患者肝组织中 HDAg, Bcl-2, Bax 和 Bak 表达, 以及肝细胞凋亡表达. 同时以 HDV 阴性的 67 例乙型肝炎患者作对照.

结果: Bcl-2, Bax 和 Bak 均以肝细胞质表达为主, HDAg 以肝细胞核表达为主. HDAg, Bax 和 Bak 与肝细胞凋亡表达及分布有相关性 ($t=27.89$, $P<0.01$, $P<0.05$ $t=19.16$, $P<0.05$ $t=18.22$), 四成分在各型肝炎中的表达强度有显著性差别意义 ($P<0.05$).

结论: HDAg, Bax, Bak 和肝细胞凋亡表达强度及阳性细胞分布均与肝组织炎症和病理损害程度相关, HDV 感染可诱导肝细胞表达 Bax 和 Bak, 增强肝细胞凋亡.

顾小红, 张云东, 李奇芬, 王宇明. 丁型肝炎肝组织 Bcl-2/Bax、Bak 表达与细胞凋亡表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1578-1581

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1578.asp>

0 引言

HBV 感染者重叠感染丁型肝炎病毒 (Hepatitis D virus, HDV) 后, 其病情加重、病程慢性化和死亡率增高的机制尚不十分清楚. 病毒性肝炎时常伴有肝细胞凋亡和坏死. 为了解细胞凋亡因子 Bcl-2/Bax, Bak 及其介导的肝细胞凋亡在丁型肝炎病情重型化机制中的作用, 我们对丁型肝炎患者肝组织 HDAg, Bcl-2/Bax, Bak 及细胞凋亡表达进行了研究如下.

1 材料和方法

1.1 材料 西南医院 1990-2002 院丁型肝炎患者 77 例, 其中急性肝炎 (AH) 8 例, 轻度慢性肝炎 (Mild-CH) 17 例, 中度慢性肝炎 (Mode-CH) 23 例, 重度慢性肝炎 (Seri-CH) 16 例, 重型肝炎 (SH) 13 例 (急性重型肝炎 1

例、亚急性重型肝炎 6 例、慢性重型肝炎 6 例). 以 67 例 HDV 阴性乙型肝炎作对照, 其中 AH 9 例, Mild-CH 13 例, Mode-CH 17 例, Seri-CH 18 例, SH 10 例(亚急性重型肝炎 5 例、慢性重型肝炎 5 例). 所有病例均经皮肝穿获得肝组织, 病理检查确诊, 诊断标准以 2000 年《病毒性肝炎防治方案》为依据. 兔抗人 Bcl-2, Bax, Bak 多克隆抗体为美国 Zymed 公司产品. 丁型肝炎多克隆抗体由本科自行选定的 HDV 合成肽抗原免疫家兔制备. 免疫组化染色的过氧化酶标记的链霉卵白素(S-P)试剂盒, 为美国 Maxin Biotech Inc 产品. TUNEL 试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品.

1.2 方法 操作步骤按说明书进行. 阳性对照为已知 Bcl-2, Bax 阳性肝癌组织切片, 阴性对照选自正常人肝组织, 其血清各型肝炎标志物均阴性. 此外, 分别用鼠血清和 PBS 代替第一抗体作替代实验. 每张切片先分别检测 HDAg, Bcl-2, Bax, Bak 和肝细胞凋亡. 免疫组化和细胞凋亡程度判断: 低倍镜视野阳性细胞少于 1/3 为(+), 2/3 为(++), 大于 2/3 为(+++).

统计学处理 采用计数资料的 χ^2 检验和秩相关分析.

2 结果

2.1 肝细胞凋亡 凋亡肝细胞体积变小, 胞质收缩, 核固缩, 核呈月牙型, 或形成核膜泡, 致密染色质边聚(图 1 A), 且可不伴有炎性细胞浸润. 各类丁型肝炎患者的肝细胞均有不同程度的凋亡, 凋亡细胞呈点或片簇状分布于肝小叶, 在门脉周围及坏死灶处较为密集, 科伴有炎症细胞浸润. 急性肝炎和轻度慢性肝炎组比较, 凋亡细胞的阳性程度无显著差异. 中、重度慢性肝炎和重型肝炎肝细胞凋亡表达明显强于前二者($P < 0.05$, 表 1). 丁型肝炎肝细胞凋亡表达强度及阳性率(96% ,74/77)略强于乙型肝炎(93% , 64/67), 但无统计学差异.

2.2 HDAg 表达 HDAg 主以肝细胞核表达, 其次是胞质表达. 在坏死灶边缘肝细胞和气球样变性肝细胞质内有大量的 HDAg 呈浆型强阳性表达. 中、重度慢性肝炎和重型肝炎中 HDAg 阳性细胞呈弥散型、灶型或片簇状分布于肝小叶内, 在门脉周围和坏死灶处较密集(图 1 B); 急性肝炎和轻度慢性肝炎 HDAg 阳性细胞多呈单个或小灶状稀疏分布于小叶内. 秩相关分析发现重型肝炎和慢性肝炎中、重度 HDAg 表达强于急性肝炎和轻度慢性肝

炎($P < 0.05$, 表 1).

表 1 丁型肝炎肝细胞凋亡和 HDAg 表达

type	TUNLE				HDAg		
	-	+	++	+++	+	++	+++
AH	1	6	1	0	6	2	0
Mild-CH	2	11	4	0	15	2	0
Mode-CH	0	4	16	3	7	10	6
Seri-CH	0	2	10	4	1	9	6
SH	0	1	5	7	0	7	6

Ridit 分析, 以轻度慢性肝炎为标准组, 中、重度慢性肝炎和重型肝炎的 R 值(0.82、0.86 和 0.91)均大于 0.5, $P < 0.05$.

2.3 Bcl-2, Bax 和 Bak 表达 Bcl-2 阳性率为 35.1%(27/77), 以胞质表达为主, 可见核膜表达, 但未见核阳性表达. Bcl-2 阳性细胞以散在分布为主, 也可有片状分布(图 1 C). 肝细胞坏死区少见 Bcl-2 阳性细胞, 在少数浸润的炎性细胞和胆小管细胞可见阳性表达. 结果显示, 急性肝炎和轻度慢性肝炎中 Bcl-2 的表达明显高于中、重度慢性肝炎和重型肝炎($P < 0.05$). 连续切片观察在坏死区及周围有较多凋亡细胞, 而 Bcl-2 在此区却少有阳性细胞. Bax 和 Bak 阳性率分别为 83.1%(64/77)、65.5%(54/77), 以胞质表达为主. 急性肝炎和轻度慢性肝炎中, 阳性细胞较少且分散, 表达强度也较弱; 中、重度慢性肝炎和重型肝炎中, 阳性细胞呈灶状或片簇状分布于肝小叶周边, 在门脉周围、碎屑状坏死区 Bax, Bak 表达尤为明显, 其表达较急性肝炎、轻度慢性肝炎组明显增强. 乙型肝炎肝组织中, Bax, Bak 表达及阳性细胞分布基本与丁型肝炎的一致, 但片簇状较少见, 表达程度稍弱.

2.4 HDAg, Bcl-2, Bax 和 Bak 表达与肝细胞凋亡的关系 双标记发现, 多数凋亡细胞位于 HDAg 阳性部位或其附近, 少数组织中二者无明显解剖学关系; 凋亡可发生于 HDAg 阳性细胞, 亦可发生在 HDAg 阴性细胞. 坏死区及其周围有较多凋亡细胞, 而 Bcl-2 在此区则很少有阳性信号. 但在 TUNEL 阳性的其他区域也可见 Bcl-2 阳性细胞. 与 Bcl-2 分布相反, Bax 表达阳性区域与肝细胞凋亡表达和程度密切相关(图 2, 表 2).

表 2 肝细胞 HDAg, Bax, Bak 表达与肝细胞凋亡的关系(n, χ test)

TUNEL	HDAg ^b			Bax ^a				Bak			
	+(n=29)	++(n=30)	+++ (n=18)	-(n=13)	+(n=28)	++(n=22)	+++ (n=14)	-(n=23)	+(n=22)	++(n=19)	+++ (n=13)
-	2	1	0	2	0	1	0	2	1	0	0
+	14	6	4	7	10	4	3	12	7	3	2
++	11	18	7	4	14	13	5	8	10	13	5
+++	2	5	7	0	4	4	6	1	4	3	6

^a $P < 0.05$, $t = 19.16$, ^b $P < 0.01$, $t = 27.89$, ^c $P < 0.05$, $t = 18.22$.

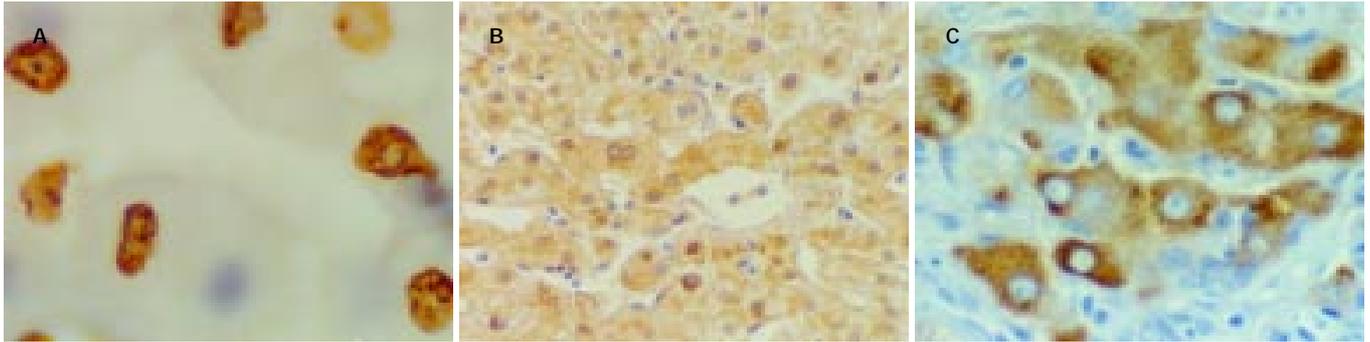


图1 丁型肝炎患者肝组织细胞凋亡和免疫组化检测. A: 肝细胞凋亡表达, TUNEL×1 000. B: 肝细胞HDAg表达, SP×200. C: 肝细胞 bcl-2 表达, SP×400.

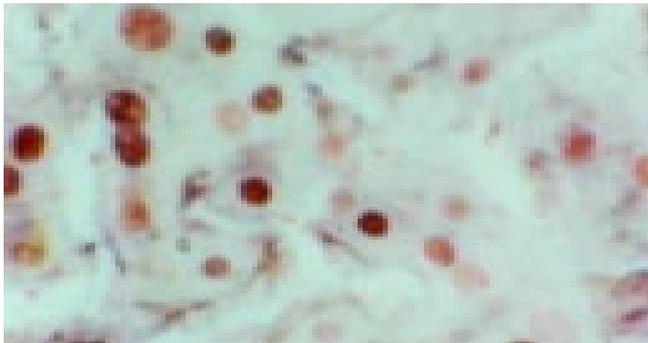


图2 丁型肝炎患者肝细胞凋亡(红色)和 bax(紫黑色)双标记表达, DS×400.

3 讨论

细胞凋亡是机体在生长发育和受到外来刺激时清除多余、衰老和受损伤的细胞以保持体内环境平衡的自我调节机制. 细胞凋亡过程受到一系列相关基因的调节和控制. 这种调节机制发生障碍和紊乱与多种疾病的发生、发展密切相关. 近年研究发现肝细胞凋亡在病毒性肝炎发病机制中有着重要作用. 细胞凋亡的强弱与患者病情的轻重直接相关. 线粒体功能改变是决定细胞死亡的关键因素, 而定位于线粒体膜的 Bcl-2, Bax 和 Bak 等蛋白可通过调节线粒体功能而制约细胞凋亡的发生^[1-3].

无能在生理或病理条件下, Bcl-2 为细胞凋亡过程中的一类重要的抑制基因, Bcl-2 的高度表达可阻断细胞凋亡的发生, 延长细胞存活时间, 而不影响细胞增生, 并在多种正常细胞的激活和发育过程中表达, 而在成熟或走向凋亡的细胞不表达或低表达^[4-6]. 已发现病毒编码蛋白与 Bcl-2 具有同源性, 可阻止细胞凋亡的发生, 有利病毒在宿主细胞内的长期潜伏, 在不出现细胞溶解坏死的情况下, 造成病毒的持续感染^[7-8].

Bax, Bak 为 Bcl-2 相关蛋白, 与 Bcl-2 的作用相反, 能加速细胞凋亡, Bcl-2 表达水平较高时, 可形成 Bcl-2 和 Bcl-2 同源二聚体, 抑制细胞凋亡; Bax 表达水平较高时, 则形成 Bax 和 Bax 同源二聚体, 加速细胞凋亡. Bax 可与 Bcl-2 蛋白形成异二聚体并使之失活, 加强表达 Bax 形成同二聚体, 加速细胞凋亡, 因此 Bcl-2 和 Bax 二者间的比率影响着细胞的凋亡状况. Bak 可直接抑

制 Bcl-2 活性以促进细胞凋亡^[4-5, 7-9].

Bcl-2 蛋白在丁型肝炎的表达与乙型肝炎和正常人肝组织中的表达无统计学差别意义. 而 Bax、Bak 表达明显高于 Bcl-2 蛋白的表达, 中、重度慢性肝炎和重型肝炎中的表达强于急性肝炎和轻度慢性肝炎, 重型丁型肝炎中 Bax, Bak 表达强于重型乙型肝炎(P < 0.05). 双标记检测发现 HDAg 与 Bax, Bak 表达及阳性细胞分布呈一致性. 对各型肝炎 HDAg, Bcl-2 和 Bax, Bak 表达强度分析发现, HDAg 和 Bax 及肝细胞凋亡均与肝组织炎症活动和病理损害相关, 提示了丁型肝炎发病机制中 HDAg, Bax, Bak 和细胞凋亡的作用.

乙肝病毒对 Bax 蛋白表达可能有诱导作用, 对 Bcl-2 表达无明显影响, Bax 参与了肝细胞损害过程^[11, 16]. 认为丁型肝炎中除了乙肝病毒抗原可诱导肝细胞表达多种促凋亡因子外, HDAg 也有同样作用, 不仅可诱导 Fas/FasL 表达^[10, 16], 也可促进 Bcl-2、Bax、Bak 表达. 因此慢性乙肝患者或 HBsAg 携带者重叠 HDV 感染后, 乙肝病毒抗原和丁肝病毒抗原可同时促进多种促凋亡因子的表达, 增强宿主的免疫应答, 及肝组织中复制状态的 HDV 对肝细胞的直接细胞毒性作用^[11-16], 一方面导致肝细胞凋亡, 被病毒感染的细胞随之被清除; 另一方面则导致大量肝细胞坏死, 加重病理损害, 病情恶化, 临床死亡率增高, 预后明显变差. 提示, 在丁型肝炎病情重型化机制中, 多种促凋亡因子介导的肝细胞凋亡可能起了一定的重要作用.

4 参考文献

- 1 Tsamandas AC, Thomopoulos K, Zolota V, Kourelis T, Karatzas T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas T, Karavias D, Karatza C, Bonikos DS, Gogos C. Potential role of bcl-2 and bax mRNA and protein expression in chronic hepatitis type B and C: a clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2003;16:1273-1288
- 2 Kobayashi M, Tsujitani S, Kurisu Y, Kaibara N. Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. *HepatoGastroenterology* 2002;49:1602-1606
- 3 Upadhyay G, Singh R, Kumar A, Kumar S, Kapoor A, Godbole MM. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology* 2004;39:1120-1130
- 4 Zhang H, Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Liu HF, Luo YH. Effect of *Helicobacter pylori* infection on expression of Bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:227-230

- 5 Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF- κ B, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
- 6 Akcali KC, Dalgic A, Ucar A, Haj KB, Guvenc D. Expression of bcl-2 gene family during resection induced liver regeneration: comparison between hepatectomized and sham groups. *World J Gastroenterol* 2004;10:279-283
- 7 Wang SS, Zhang T, Wang XL, Hong L, Qi QH. Effect of arsenic trioxide on rat hepatocellular carcinoma and its renal cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 2003;9:930-935
- 8 Zhou HB, Yan Y, Sun YN, Zhu JR. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:408-411
- 9 Li SM, Yao SK, Yamamura N, Nakamura T. Expression of Bcl-2 and Bax in extrahepatic biliary tract carcinoma and dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2579-2582
- 10 顾小红, 李奇芬, 王宇明. 丁型肝炎患者肝组织中 Fas/FasL 和肝细胞凋亡表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:35-38
- 11 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-1062
- 12 顾小红, 李奇芬, 王宇明. 伴 HDV 感染的乙型肝炎患者的临床特征. *中华肝脏病杂志* 2001;7:34-36
- 13 顾小红, 李奇芬, 王宇明. 丁型肝炎患者肝组织 HDAg 与 HBsAg/HBcAg 和 HBVDNA 相关性研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:31-34
- 14 杨柳明, 吴志荣, 赵延龙, 陈杜芳, 伍桂荣. 青年乙型肝炎患者肝组织 Bcl-2, Bax 蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:966-967
- 15 王剑明, 邹倩, 邹声泉. 阻塞性黄疸大鼠肝组织 Bcl-2 及 Bax 的表达与细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2001;9:911-914
- 16 蒋业贵, 李奇芬, 王宇明, 顾长海. HDV/HBV 感染树鼯肝组织中 Bcl2/Bax 表达和肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2000;8:625-628

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库。该库收录自1995-2004年,国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条,其中国家基金资助的论文为 70167 条 (45.23%),其他基金资助的论文为 84948 条 (54.76%)。

1 本系统的功能

电子杂志:关键词搜索,高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助),期刊搜索(A-Z排序)。论文排序:期刊论文数,点击论文数。

2 网址

中国生物医学基金论文摘要 (<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. **鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定**. *癌症* 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287,30000188)

背景与目的:研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点。本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag,EST),为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础。方法:充分利用网上的生物信息资源,采用定位查找 ESTs,对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR,RT-PCR)方法,检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用 Northern blot 杂交方法,检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况。结果:在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985),在 60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985)表达下调,与正常鼻咽上皮组织相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:染色体 3p21 区域 EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调,提示其可能参与鼻咽癌癌变过程。(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)