

# 病毒性肝炎肝组织 TNF- $\alpha$ 和 NF- $\kappa$ BmRNA 的表达与肝细胞凋亡

袁淑芳, 单鑫, 张跃新, 刘存

袁淑芳, 单鑫, 新疆医科大学第五附属医院消化科  
新疆维吾尔自治区 830011

张跃新, 新疆医科大学肝病专科医院 新疆维吾尔自治区 830054

刘存, 新疆医科大学病理教研室 新疆维吾尔自治区 830054

袁淑芳, 女, 1972-06-20 生, 四川省简阳县人, 汉族, 1995 年河北医科大学临床医学系毕业, 2004 年新疆医科大学硕士研究生毕业, 医师, 主要从事肝脏疾病的病理研究。

通讯作者: 袁淑芳, 830011, 新疆维吾尔自治区, 新疆医科大学第五附属医院消化科。

电话: 0991-8273145

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-16

## Expression of TNF- $\alpha$ antigen and NF- $\kappa$ BmRNA in liver tissue and its effect on hepatocyte apoptosis

Shu-Fang Yuan, Xin Shan, Yue-Xin Zhang, Cun Liu

Shu-Fang Yuan, Xin Shan, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yue-Xin Zhang, Hospital for Liver Disease, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Cun Liu, Department of Pathology, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Shu-Fang Yuan, Department of Gastroenterology, the fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China.

Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-16

## Abstract

**AIM:** To explore the expression of TNF- $\alpha$  antigen and NF- $\kappa$ BmRNA in liver tissues of hepatitis patients and its effect on hepatocyte apoptosis.

**METHODS:** Sixty-five paraffin sections from patients with viral hepatitis were studied, while ten cases of normal liver tissues were selected as control. Immunohistochemistry was employed to determine the expression of TNF- $\alpha$  antigen. NF- $\kappa$ BmRNA was measured by *in situ* hybridization. Apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL).

**RESULTS:** The expression of TNF- $\alpha$  antigen and NF- $\kappa$ BmRNA in patients with viral hepatitis were 76.9% and 70.3% respectively, which were significantly increased as compared with those (20.0% and 10.0%) in control ( $P < 0.01$ ). The expression of TNF- $\alpha$  antigen, NF- $\kappa$ BmRNA were significantly correlated with the apoptosis of hepatocytes ( $r_s =$

0.267 and  $r_s = 0.362$ ,  $P < 0.05$ ). There was also a significant relationship between TNF- $\alpha$  antigen and NF- $\kappa$ BmRNA expression in liver tissue of hepatitis ( $r_s = 0.385$ ,  $P < 0.05$ ). With the development of viral hepatitis, the expression of NF- $\kappa$ BmRNA was markedly increased ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** TNF- $\alpha$  antigen and NF- $\kappa$ BmRNA are positively related to the occurrence, development of viral hepatitis as well as hepatocyte apoptosis.

**Key Words:** Viral hepatitis; TNF- $\alpha$ ; NF- $\kappa$ BmRNA; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization; Apoptosis

Yuan SF, Shan X, Zhang YX, Liu C. Expression of TNF- $\alpha$  antigen and NF- $\kappa$ BmRNA in liver tissue and its effect on hepatocyte apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1094-1097

## 摘要

**目的:** 检测 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ BmRNA 在病毒性肝炎中的表达以及与肝细胞凋亡的关系。

**方法:** 采用免疫组织化学方法、原位杂交技术以及原位末端标记技术(TUNEL 实验)检测 65 例病毒性肝炎患者和 10 例非肝病对照者肝组织中 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ BmRNA 的表达和肝细胞凋亡的情况。

**结果:** 病毒性肝炎患者肝组织中 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ BmRNA 阳性表达率分别为 76.9% 和 70.3%, 明显高于对照组的 20.0% 和 10.0% ( $P < 0.01$ ); TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ BmRNA 的表达与肝细胞凋亡密切相关 ( $r_s = 0.267$  和  $r_s = 0.362$ ,  $P < 0.05$ ); 病毒性肝炎患者肝组织中 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ BmRNA 的表达存在明显的相关性 ( $r_s = 0.385$ ,  $P < 0.05$ )。随着慢性肝炎病理损伤的程度的加重, NF- $\kappa$ BmRNA 的阳性表达率增高 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ BmRNA 的表达在病毒性肝炎的发病及肝细胞凋亡的发生中存在相关性。TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ BmRNA 的表达随着病变程度的加重而增高。

**关键词:** 病毒性肝炎; TNF- $\alpha$ ; NF- $\kappa$ BmRNA; 免疫组织化学方法; 原位杂交技术; 凋亡

袁淑芳, 单鑫, 张跃新, 刘存. 病毒性肝炎肝组织 TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ BmRNA 的表达与肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1094-1097  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1094.asp>

## 0 引言

病毒性肝炎是我国肝硬化最常见的病因, 主要为乙型、丙型或乙型加丁型重叠感染。其中 HBV 感染, 不仅可引起急性、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌 (HCC) 的发生、发展密切相关。全世界大约有 20 亿人感染过 HBV, 其中约 4 亿人为 HBV 携带者。全球每年约有 100 万人死于 HBV 感染相关疾病, 占疾病死因的第 9 位<sup>[1-3]</sup>。我国病毒性肝炎的发病居世界首位, 现有 HBV 患者 3 000 万。由于肝炎病毒、细胞分子、凋亡相关基因、自身免疫等多种因素参与, 至今病毒性肝炎的治疗仍是当今世界面临的一个难题。近年来研究证实肝纤维化可以逆转, 但目前尚缺乏高效、无明显副作用的药物。目前的热点和难点是彻底弄清激活肝细胞变化的调控机制, 而凋亡作为一种可能的调控机制日益受到重视。我们研究 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 在病毒性肝炎中的表达与肝组织炎症活动度、肝纤维化、肝细胞凋亡的情况, 来寻找一种抑制肝纤维化向肝硬变转变的新措施, 为临床肝病的诊断及治疗提供理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 乙型肝炎 58 例, 丙型肝炎 7 例。男 34 例, 女 31 例, 年龄 13~59 (平均 34.1) 岁。汉族 45 例, 维族 19 例。血清学证实 HBsAg 或抗-HCV 阳性, 并采用免疫组化检测肝组织中病毒标志物。取非肝脏疾病死亡的正常肝组织 10 例作对照。肝活检标本均常规用 40 g/L 中性甲醛固定, 石蜡包埋。兔抗人多克隆抗体 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 原位杂交检测试剂盒均购自博士德生物工程有限公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

**1.2 方法** 石蜡切片常规脱蜡、水化后, 过氧化物酶阻断、孵育, 加 TNF- $\alpha$  多克隆抗体 (工作浓度分别 1:80), 再加生物素标记的第 2 抗体及链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 室温孵育, 经 DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片。石蜡切片常规脱蜡至水, 过氧化物酶阻断, 加胃蛋白酶消化液暴露核酸片段 30 min, 余按 NF- $\kappa$ B mRNA 原位杂交检测试剂盒说明书逐步进行。石蜡切片常规脱蜡、水化后, PBS 漂

洗, 3 ml/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇封闭内源性过氧化物酶活性, 加通透性液 (1 g/L TritonX-100 溶解于 0.1% 柠檬酸钠) 和 TUNEL 反应混合液、Converter POD, DAB 显色, 显微镜下观察肝细胞凋亡。阳性对照为 1 例已知阳性的重型肝炎肝组织。阴性对照: 用正常肝组织按以上方法分别检测 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 和细胞凋亡。并用缓冲液分别代替 TNF- $\alpha$  多克隆抗体, NF- $\kappa$ B mRNA 探针及 TDT (末端脱氧核糖转移酶) 进行对照检测。TNF- $\alpha$  阳性结果为细胞膜和 (或) 细胞质内出现棕黄色颗粒。NF- $\kappa$ B mRNA 阳性结果为细胞核内出现棕黄色颗粒。原位凋亡的阳性细胞为细胞核内出现棕黄色颗粒。

**统计学处理** 采用 SPSS11.0 统计分析软件进行  $\chi^2$  检验、四格表确切概率法、Spearman 相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 肝组织中 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 检测** 在 10 例正常肝组织中 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 仅有少量的表达, 而在病毒性肝炎组织中的阳性表达率均明显高于正常肝组织 ( $P < 0.01$ , 表 1)。TNF- $\alpha$  在肝细胞核及细胞质均有不同程度的表达, 呈弥漫型、灶型、片簇状分布于肝小叶内, 少部分在胆管上皮细胞内表达, 不少尚伴炎细胞浸润和肝细胞坏死。NF- $\kappa$ B mRNA 活化后在细胞核表达, 阳性细胞主要在肝小叶内、汇管区, 呈点状分布。连续切片发现部分病例 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 在肝细胞同一区域表达, 这些部位的肝细胞损害多较重。但 TNF- $\alpha$  阳性肝细胞分布比 NF- $\kappa$ B mRNA 阳性肝细胞分布更广泛、弥漫、阳性程度稍强 (图 1, 2)。

表 1 病毒性肝炎肝组织中 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 的表达  $n$  (%)

肝组织学	$n$	TNF- $\alpha$ 阳性		NF- $\kappa$ B mRNA 阳性	
		$n$	%	$n$	%
慢性肝炎	65	50	76.9 <sup>b</sup>	46	70.3 <sup>b</sup>
正常肝	10	2	20.0	1	10.0

<sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs 正常肝。

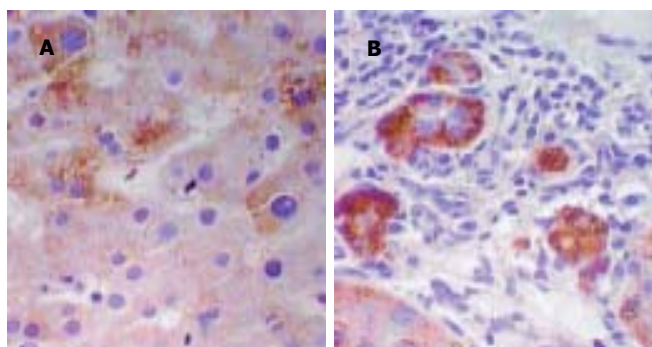


图 1 TNF- $\alpha$  在肝组织中的表达 (SP  $\times 400$ )。A: 正常; B: 慢性肝炎。

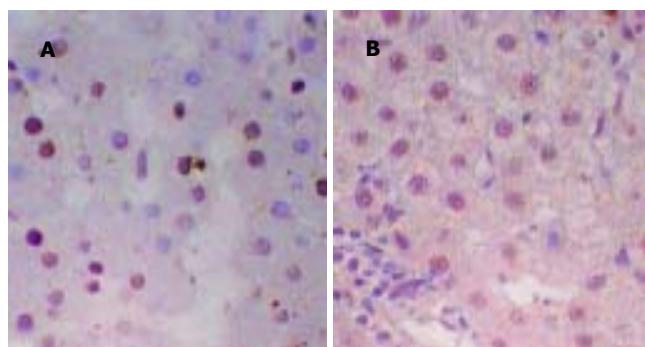


图 2 NF- $\kappa$ B mRNA 在肝组织中的表达 (原位杂交  $\times 400$ )。A: 正常; B: 慢性肝炎。

表2 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 表达与肝细胞凋亡的关系

TUNEL	<i>n</i>	TNF- $\alpha$ 阳性 <sup>1</sup>				NF- $\kappa$ BmRNA 阳性 <sup>2</sup>			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
-	22	9	2	7	4	10	4	2	6
+	15	1	3	5	6	4	4	5	0
++	16	2	1	6	7	5	5	5	4
+++	12	3	0	4	5	0	0	5	7
合计	65	15	6	22	22	19	13	17	17

<sup>1</sup> $r_s = 0.267$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>2</sup> $r_s = 0.362$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ .

2.2 肝细胞凋亡与 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 表达的关系如表 2 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 表达均与肝细胞凋亡密切相关(<sup>a</sup> $P < 0.05$ ). 在 43 例肝细胞凋亡患者中, 同时伴单纯 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 阳性者分别为 37 例(86.0%)、34 例(79.1%). 在正常的肝组织中可见少量发生凋亡的细胞. 各种不同类型肝炎肝细胞均有不同程度凋亡. 凋亡的细胞表现为胞膜完整、核改变, 见核固缩及染色质边聚. 凋亡细胞多位于坏死区周边, 变性坏死区内可见凋亡小体, 凋亡小体也呈阳性着色, 肝小叶内也有散在分布(图 3).

表3 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 的表达与炎症和纤维化的关系(*n*, %)

		<i>n</i>	TNF-α 阳性		NF-κBmRNA 阳性 <sup>a</sup>	
			<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
炎症:	G <sub>1</sub>	42	29	69.0	24	54.8
	G <sub>2</sub>	21	19	90.5	20	95.2
	G <sub>3</sub>	2	2	100	2	100
纤维化:	S <sub>0</sub>	38	25	65.8	20	50.5
	S <sub>1</sub>	16	14	87.5	15	93.4
	S <sub>2</sub>	3	3	100	3	100
	S <sub>3</sub>	4	4	100	4	100
	S <sub>4</sub>	4	4	100	4	100

<sup>a</sup> $P < 0.05$ .

2.3 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 表达程度与炎症、纤维化的关系 如表3所示:TNF- $\alpha$ 的阳性表达程度随着炎症活

动度、肝纤维化程度的加重而增高, 并与炎症坏死区和纤维化分布区域相一致, 但经统计分析无显著差异. NF- $\kappa$ BmRNA 表达程度随炎症活动度、纤维化程度的加重而增高, 经统计分析各组之间有显著差异( $P < 0.05$ ).  
2.4 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 在病毒性肝炎中的表达关系 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 之间均有明显的相关性( $P < 0.05$ , 表 4).

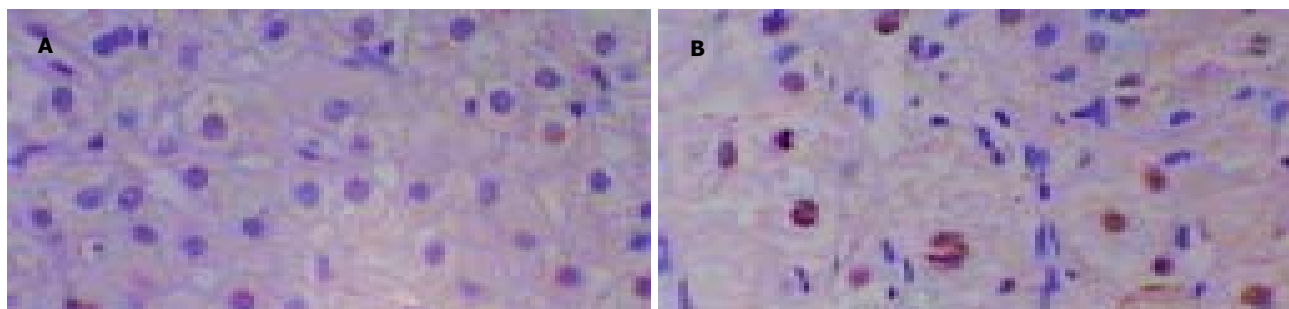
表4 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ BmRNA 在病毒性肝炎中的表达关系

NF- $\kappa$ BmRNA 表达	TNF- $\alpha$ 表达情况		合计
	阳性	阴性	
阳性	39	7	46
阴性	11	8	19
合计	50	15	65

$P < 0.05$ .

### 3 讨论

TNF- $\alpha$ 是由单核巨噬细胞产生的内源性细胞因子, 其生物学效应是通过其受体 TNFR1 而产生<sup>[4]</sup>, 其产生的信号传导途径有 2 条<sup>[5]</sup>: (1) 是 fas 相关蛋白死亡域(FADD)介导的细胞凋亡; (2) 通过 TNF 受体相关死亡域-TNF 受体相关因子(TRAF2)激活核转录因子 NF- $\kappa$ B 抑制凋亡, TNFR2 则通过不同于 TNFR1 但在某些环节可发生交叉反应的信号传导途径激活 NF- $\kappa$ B, 使细胞

图3 肝凋亡细胞 TUNEL  $\times 400$ . A: 正常肝组织; B: 慢性肝炎.

增殖分化<sup>[6]</sup>. 本结果显示, 在病毒性肝炎肝组织中, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 的表达明显高于正常肝组织, 且表达程度随炎症活动度、肝纤维化程度加重而增高, 尤其在汇管区周围、肝小叶内碎屑、桥接、灶状坏死区更明显, 这与张启华 *et al*<sup>[7]</sup> 的发现一致. 我们还发现, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 在组织炎症、坏死区域分布基本一致, 这些部位的肝细胞损害多较重, 并且二者的表达呈显著相关性. 提示慢性肝病中由于多种炎症因子的诱导作用, 使 NF- $\kappa$ B 的活性持续存在, 且在肝炎病毒等因素的诱导下, TNF- $\alpha$  与其相应的配体结合后, 在诱发细胞凋亡的同时激活细胞内 NF- $\kappa$ B, 从而参与肝脏的急慢性炎症或纤维化过程. 本研究显示: TNF- $\alpha$  的表达虽与炎症活动度、纤维化程度无统计学意义, 却反映出了表达的特点, 说明 TNF- $\alpha$  可作为急性期反应因子参与病毒性肝炎免疫病理及炎症过程, 直接造成肝损伤, 在肝纤维化的发生、发展中占重要地位.

在病毒感染所造成的肝损害机制中, 肝细胞的异常凋亡是主要机制之一. 本资料显示, 在肝细胞凋亡较强的部位多有 TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 的表达, 且随肝细胞凋亡表达的增高而增加. 经原位凋亡检测发现, 凋亡细胞多位于坏死区周边, 变性坏死区内可见凋亡小体, 肝小叶内也有散在的分布, 并有大量炎细胞浸润. 并且病变早期以肝细胞凋亡为主, 病程中后期肝细胞凋亡和坏死共存. 说明肝细胞凋亡发生时常伴有肝细胞坏死, 二者均可以引起肝损伤. 正常情况下凋亡细胞的清除不伴随炎症反应. 本资料显示, 在慢性肝炎的肝组织中, 肝细胞炎症活动度越强, 凋亡细胞也越多. 提示炎症反应和凋亡并不是孤立的, 说明如果凋亡足够抗拒被清除的过程, 肝细胞凋亡可激发炎症和/或坏死. Leist *et al*<sup>[8-9]</sup> 认为 TNF- $\alpha$  诱导肝细胞凋亡可能是肝组织损伤的重要启动因素, 当大量凋亡的肝细胞不能为吞噬细胞清除时, 中性粒细胞受到内源性递质 TNF- $\alpha$  的吸引而移动至肝脏, 并受到没有被迅速清除的凋亡细胞的激活, 中性粒细胞的激活可能是引起肝细胞坏死的最后过程. 另一方面可能是由于 TNF- $\alpha$  介导的肝细胞凋亡尚有其他因素影响, 如 NF- $\kappa$ B 因子等. 但 TNF- $\alpha$  如何启动对细胞凋亡的促进或抑制的机制尚不清楚.

在转基因动物模型的研究中发现, TNF- $\alpha$  可抑制 HBV DNA 的复制和核心蛋白的表达, 诱导肝细胞凋亡, 用抗 TNF- $\alpha$  单抗可以阻断其凋亡<sup>[10]</sup>. Lang *et al*<sup>[11-12]</sup> 研究 TNF- $\alpha$  对已激活的 HSC 可产生凋亡诱导, 此作用能被下游效应物 NF- $\kappa$ B 所阻断. 加强 TNF- $\alpha$  介导的 HSC 细胞凋亡机制的研究, 阻断 TNF- $\alpha$  诱导的凋亡信号

的传导, 可防止肝细胞凋亡和坏死, 有助于指导未来抗纤维化的治疗方案.

目前认为 NF- $\kappa$ B 主要通过以下三条途径来抑制细胞凋亡: (1) NF- $\kappa$ B 通过调控 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  这些炎症因子的基因表达而间接抑制自身及其他细胞凋亡; (2) NF- $\kappa$ B<sup>[13]</sup> 通过诱导或上调抗凋亡基因抑制凋亡. Wang *et al*<sup>[14]</sup> 发现 NF- $\kappa$ B 能够激活 Bcl-2 家族中的 A1/Bcl-1 而抑制由 TNF- $\alpha$  引起的细胞凋亡. 其机制主要是 NF- $\kappa$ B 作用于 Caspase-3 和线粒体的上游, 并能阻止细胞色素 C 从线粒体中释放. 细胞色素 C 是 Caspase-3 激活的促发因素, 是凋亡调控中的关键环节; (3) NF- $\kappa$ B 通过诱导 TRAF 和 IAP 抑制凋亡<sup>[15]</sup>. 依据 NF- $\kappa$ B 抑制凋亡的理论并以之作为靶点, 导入其抑制性基因 IKBs, 通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性而增加 HSC 凋亡, 将成为今后病毒性肝炎、肝纤维化治疗的新途径.

#### 4 参考文献

- 1 施红, 王福生. 影响 HBV 感染慢性化的宿主因素及其在乙型肝炎防治中的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:66-69
- 2 McMahon BJ, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, Dunaway E, Williams J. Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: a 16-year population-based study. *Hepatology* 2000;32(4 Pt 1):842-846
- 3 Pisani P, Parkin DM, Bary F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *INT J Cancer* 1999;83:18-29
- 4 赵明才, 唐恩洁, 朱道银. 与病毒感染相关的细胞凋亡分子. 国外医学病毒学分册 2001;8:25-29
- 5 刘小芳, 邹声泉. 丙肝病毒感染与细胞凋亡. 国外医学外科学分册 2001;28:193-194
- 6 梁卫江, 张万岱. 肿瘤坏死因子诱导细胞凋亡的信号传导机制. 世界华人消化杂志 2000;8:329-331
- 7 张启华, 许正锯, 程莉. 病毒性乙型肝炎患者血清 sFAS、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 的检测及临床意义. 细胞与分子免疫学杂志 2001;17:445-446
- 8 Leist M, Gantner F, Bohlinger I. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis liver failure in experimental murine shock models. *Am J pathol* 1995;146:1220-1234
- 9 藏国庆, 周霞秋, 王朝夫, 姚敏, 俞红, 谢青. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  介导凋亡肝细胞内胱天蛋白酶-3 的表达. 中华传染病杂志 2001;19:232-235
- 10 甘华山, 陈友琴. 细胞凋亡与病毒性肝炎. 世界华人消化杂志 2001;9:579-581
- 11 Lang A, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor KAPPA B induced resistance to tumor necrosis factor alpha mediated in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998;28(Pt 2):437A
- 12 李丹, 王小众. 肝纤维化与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-10. 世界华人消化杂志 2001;9:808-810
- 13 朱波, 罗成基. 核转录因子- $\kappa$ B 与细胞凋亡. 国外医学临床生物化学与检验学分册 2001;22:18-19
- 14 Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW. NF-kappa B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bcl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:5923-5929
- 15 Wang CY, Mayo MW, Komeluk RG. NF-kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1999;281:1680-1683