

• 综述 •

重症肝炎中肝细胞损伤机制研究进展

朱国勇, 张银辉, 张有忠, 郑伟, 谌晓燕 综述, 都青 审校
(湖北省襄阳市中医院检验科 441000)

关键词: 重症肝炎; 肝损伤; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.029

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)05-0574-02

重症肝炎又称暴发型肝炎, 是由于肝细胞大量凋亡和坏死而出现肝功能严重损害的临床综合征, 多见于病毒性肝炎, 偶见于药物性肝炎、中毒性肝炎及脂肪肝等; 临床表现凶险而复杂, 黄疸急剧加深、肝脏迅速缩小, 并伴有肝性脑病、肝肾综合征等并发症, 病死率很高。本文将从细胞(线粒体, 内质网)、分子(死亡受体)及免疫系统层面进行简要阐述。

1 肝细胞凋亡和坏死

肝细胞凋亡的调控紊乱是导致晚期肝脏疾病的重要原因之一; 持续性肝细胞凋亡是慢性肝脏疾病的重要特征, 短期内大量肝细胞凋亡是急性肝脏疾病的重要特征。在病毒、药物中毒、妊娠等引起的重症肝炎中, 肝细胞凋亡最为明显。受损肝细胞的凋亡设计 2 个途径: 外部途径和内部途径。外部途径又包括死亡受体途径和细胞应激途径。不管通过哪途径, 最终都汇总于线粒体。线粒体功能失活是肝细胞凋亡的先决条件。在慢性肝病中, 肝纤维化也与肝细胞长期凋亡有关。

细胞凋亡(cell apoptosis)又称“程序性细胞死亡”, 是细胞生理性、主动性的“自觉自杀行为”, 形态学表现为细胞皱缩、细胞浆减少、染色质凝聚、细胞核碎裂等。细胞坏死(cell necrosis)形态学表现主要为细胞膨胀(因细胞内外离子梯度失衡)导致的细胞膜破裂。细胞凋亡不同于细胞坏死, 细胞坏死是细胞的病理性死亡, 而凋亡是有规律的、按编好了的“程序”发生的细胞死亡。然而, 对于肝脏疾病而言, 上述 2 种定义通常涵盖了很广的范畴, 往往同一肝脏疾病包含了 2 种不同的细胞死亡方式。认识两者致病机制的细微差异, 比将某一肝脏疾病归于哪一类死亡更为重要。同一刺激信号能够引起 2 种不同的细胞死亡途径, 形态学上将之分为细胞凋亡或细胞坏死都可以, 有些凋亡和坏死细胞甚至存在于同一肝组织中^[1]。可以推测, 大量不规律性细胞凋亡是肝细胞坏死的重要原因。例如, 经凋亡信号级联放大诱导的线粒体失活可导致细胞内三磷腺苷的释放和细胞形态学上坏死。肝细胞是肝组织中含量最多的细胞, 肝细胞的凋亡是肝损伤的最重要原因^[2]。有研究表明, 所有肝损伤疾病都存在肝细胞凋亡^[3]。肝脏中其他类型的细胞凋亡也具有重要作用。例如, 缺血再灌注致肝损伤中, 胆管内皮细胞凋亡和活化肝星状细胞凋亡的失效均可导致肝纤维化。位于细胞膜上的 M30 抗原的表位是在被 caspase3 剪切的细胞因子 18 上的 Asp396 位点, 慢性肝脏疾病患者外周血中 M30 含量升高, 且与肝脏的炎性反应水平呈正相关^[4]。因此, 作为监测肝脏病患者治疗效果的标记物, 这种反应细胞凋亡水平的分子有着很好的临床应用前景^[5]。

2 细胞器与肝细胞损伤

2.1 线粒体 肝细胞死亡依赖于线粒体, 线粒体失活是肝细胞死亡的关键阶段。与通常理解的线粒体氧化呼吸供能功能

不同, 线粒体内、外膜及线粒体浆中存在一定数量的凋亡蛋白^[6]。线粒体外膜渗透压的改变导致凋亡信号因子的释放, 如细胞色素 c、第二线粒体 caspase 激活剂、IAP 绑定蛋白(SMAC/DIABLO)、HtrA2/Omi、endonuclease G 等。随着下游 caspase 激活信号的级联发生, 最终导致形态学上细胞凋亡的发生^[7]。线粒体外膜在活化的 Bax 和 Bak 作用下发生渗透压转变, 线粒体外膜会形成 1 个微小的空洞, 从而导致胞浆中的离子和溶质流入, 线粒体膨胀, 线粒体外膜破裂, 最终导致线粒体内凋亡蛋白释放到胞浆中。在组成线粒体渗透空洞的 3 个蛋白中, 亲环蛋白 D 是最为重要。

线粒体外膜膜电位的转变发生在死亡级联反应的下游, 如死亡受体信号、溶酶体膜改变、内质网应激以及 JNK 途径。Bcl-2 家族蛋白与线粒体失活的关系最为密切, 可分为促凋亡蛋白和抑凋亡蛋白。促凋亡蛋白按其结构可分为具有多功能结构域的 Bax、Bak 和仅含有 BH-3 的 Bid、Noxa、Puma、Bim、Bmf、Bik、Hrk 和 Bad。抑凋亡蛋白有 Bcl-2、Bcl-xL、A1 和 Mcl-1 等。Bax 位于细胞质, 而 Bak 位于线粒体膜, 当 Bax 被激活后移至线粒体上。这 2 个多功能结构域蛋白被激活后可在线粒体外膜形成渗透空洞。而 Bax 和 Bak 都能直接或间接被仅含有 BH-3 的蛋白激活。例如, 胞浆蛋白 Bid 被 caspase-8 剪切后激活, 进而激活 Bax/Bak。同时, 抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-x 也可作用于 Bax 和 Bak, 抑制细胞凋亡。当细胞中的抗凋亡蛋白不能抑制过量的 BH-3 蛋白分子时, 细胞中的凋亡信号就强于抑制信号, 释放 Bax 和 Bak, 从而导致细胞凋亡的发生。

2.2 内质网 内质网应激会引起细胞内未折叠蛋白和成熟蛋白的失衡, 从而导致一系列的代偿和失代偿反应, 这些反应称为未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)^[8]。钙离子释放、糖基化抑制、紫外线照射和胰岛素抵抗均诱导内质网应激。在内质网应激时, 蛋白质合成显著减少, 内质网中的包膜蛋白也同时降低, 并且选择性地诱导一系列 UPR 靶基因。研究证明, 有 3 个内质网膜蛋白参与内质网应激信号的传导, 分别是 IRE1、ATF6 和 PERK。活化的 IRE1 可剪切 XBP1 mRNA 中内含子寡核苷酸, 未剪切的 XBP1 能抑制一系列基因转录, 而经过 IRE1 加工后的 XBP1 可以作为相同基因的转录激活物^[9]。IRE1 同样能经过与胰岛素抵抗有关的 JNK 途径传递信号。ATF6 通过激活 UPR 靶基因引起内质网应激。活化的 PERK 则通过使 eIF2 α 磷酸化, 从而抑制细胞内大量蛋白合成, 同时选择性翻译 ATF4 和转录 CHOP, 并激活 NF- κ B。内质网应激可以通过 CHOP 激活 Bim 基因, 导致 Bim 蛋白的表达增高^[10]。CHOP 还可以增加死亡受体在细胞膜上的表达。上述研究成果说明由内质网应激导致的细胞死亡可能

是调节细胞固有和非固有途径的机制之一,相信内质网应激将成为肝损伤研究的又一热点。

3 肝细胞膜上的死亡受体

肝细胞膜上的死亡受体肿瘤坏死因子(TNF)- α 、FasL 和 TRAIL 通过绑定在其死亡作用域上的同源结构域传递信号。死亡受体属于 TNF 和神经生长因子超家族,是介导细胞死亡的重要途径^[11]。在肝脏损伤中,TNF- α 、FasL 和 TRAIL 具有调控细胞死亡的重要作用。上述死亡受体的胞外部分捕获与之互补的蛋白,并将信号传递到胞内激活 caspase8,后者进而剪切 Bid 成 TBid。TBid 称为截断型 Bid,能转移至线粒体外膜从而导致线粒体渗透压的改变。细胞死亡还可通过 TNF- α 与 Bid 及 TRAIL 与 Bax 途径诱导溶酶体膜电位的改变。然而,有文献指出,死亡受体并不引起内质网应激反应,而 TRAIL 则可介导内质网应激反应^[12]。

3.1 Fas 肝细胞、胆管细胞、胆管内皮细胞、星状细胞和 Kupffer 细胞均表达 Fas(CD95/Apo-1)可被 FasL 激活。FasL 分为胞膜型和胞浆型,表达于细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和 NK 细胞。在健康者和肝病患者肝组织中,Fas 均有重要作用。Fas 基因缺失的老鼠可抑制 FasL 诱导的肝细胞凋亡^[12]。Fas 通过 NK 细胞和 T 淋巴细胞诱导细胞死亡,进而清除受损的肝细胞,例如受病毒感染的肝细胞和癌细胞。老鼠体内试验证明,对 Fas 的调控可以引起重症肝炎的发生。一系列更为深入的试验表明,Fas 的毒理作用受 Bcl-2 家族蛋白调节,可被 Bcl-2 抑制。Fas 的死亡信号传递依赖于 Bid 蛋白的参与。在重症肝炎患者中,可溶性 FasL 水平显著升高,例如药物和病毒引起的急性肝衰竭。FasL 和 Fas 受体的水平在很多慢性肝病患者中也有上升。

3.2 TNF- α TNF 受体 1 和 TNF 受体 2 均表达于肝细胞表面,但仅有 TNF 受体 1 具有死亡作用域,并执行凋亡程序。TNF 受体 1 可激活促凋亡信号,也可激活促生存信号。TNF- α /TNF 受体 1 通过 2 步产生信号:TNFR1 受体与 TNF 受体结合蛋白(TRAF2)结合并相互作用,再通过信号传导,激活 NF- κ B,转录激活促凋亡基因 Bcl-XL、A1、XIAP 和 cFLIP^[13]。TNF- α 介导的凋亡信号随着配体蛋白与 TNF 受体死亡作用域(TRADD)结合,通过 caspase 8 和 FADD 传递下去。在这 2 种信号传递过程中,生存信号占主角。试验模型证实,使用蛋白合成抑制剂可暴露细胞凋亡信号,通过氧簇元素可介导 caspase 独立的细胞死亡。进一步的研究需要阐明该途径在肝脏疾病中的角色。然而,人工培养的原代肝细胞对 TNF- α 毒性具有耐受性,病态的肝细胞对 TNF- α 毒性则相对敏感^[14]。在肝癌细胞内,凋亡蛋白抑制剂 1、2 的缺失对 TNF- α 细胞毒作用具有敏感性。因此,在肝脏疾病中,对细胞内凋亡蛋白抑制剂 1、2 的研究将是非常有意义的^[15]。

4 天然免疫系统

炎性反应在急性和慢性肝损伤中是不可分割的,因此,肝脏中的天然免疫系统具有重要作用^[16-18]。存在于正常肝组织中的 Kupffer 细胞、NK 细胞和 T 淋巴细胞聚集在免疫细胞和非免疫细胞/组织的周围,发挥“免疫器官”的作用。在肝脏炎性反应中,天然免疫系统不仅是 TNF- α 的发源地,同时也是 FasL 和 TRAIL 的起始点。天然免疫细胞也参与死亡受体介导的肝损伤。Chen 等^[19]报道了很有趣的现象:受损的肝细胞通常会“邀请”肝脏中表达应激作用域受体 NKG2D 的 NK 细

胞和 T 淋巴细胞一起“毁灭”。

重症肝炎在中国多由乙型肝炎病毒(HBV)引起,而在国外多由药物(如对乙酰氨基酚)引起^[20]。目前,国内学者主要认为,HBV 在一定条件下引起宿主免疫反应异常是重症肝炎发病机制中的主要环节,其病理基础是肝细胞大量凋亡和严重坏死,从而导致肝细胞功能衰竭,由此引起的内毒素血症进一步加重肝细胞损害,使肝衰竭更为严重,成为后阶段的重要致病因素。血清 Fas 和肝细胞 TNFR1、TNF- α 的表达在 HBV 感染的肝细胞中上升。在 HBV 所致重症肝炎患者中,表达 Fas 的淋巴细胞存在于凋亡肝细胞所在区域^[21]。HBV 感染具有周期性,NK 细胞膜上 TRAIL 表达增加与患者肝组织 HBV 数量有关,而肝细胞中 Bax 蛋白及 mRNA 与凋亡细胞数量呈正相关。模型试验证实,HBx 蛋白可上调 TRAIL 受体 1 的表达,并导致 TRAIL 介导的凋亡。重症乙型肝炎是常见的慢性乙型肝炎致命转归之一,病死率高达 70%,严重威胁人们身体健康,其发病机制还有待更多的基础领域研究。

参考文献

- [1] Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, et al. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling[J]. J Cell Biol, 2009, 151(13): 1247-1256.
- [2] 商红艳, 欧启水. 乙型肝炎病毒基因诊断进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 345-347.
- [3] 赵钢德, 谢青. 对免疫反应介导的肝细胞损伤机制的新认识[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 73-75.
- [4] Hetz H, Hoetzenegger K, Hacker S, et al. Caspase-cleaved cytokeratin 18 and 20S proteasome in liver degeneration[J]. J Clin Lab Anal, 2007, 21(2): 277-281.
- [5] Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, et al. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition[J]. Cell Cycle, 2008, 7(22): 3112-3118.
- [6] 卞君成, 赵昕, 王文昕. 肝抗原自身抗体检测对自身免疫性肝病的诊断价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 451-454.
- [7] Kitani A, Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17[J]. Mucosal Immunol, 2008, 1(Suppl 1): 43-46.
- [8] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 8(7): 519-529.
- [9] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27(5): 485-517.
- [10] Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim[J]. Cell, 2007, 129(11): 1337-1349.
- [11] 刘克宇, 张重梅, 王琪, 等. 血清 TNF- α 和 S100B 检测在新生儿缺氧缺血性脑病中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(8): 875-876.
- [12] 白雪帆, 南雪萍. 重型肝炎的分子发病机制研究进展[J]. 临床内科杂志, 2008, 25(5): 293-295.
- [13] 魏新素, 张平安. MXA 启动子和 eIF-2a 调节区 2 基因多肽性 HBV 感染自然转归的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 536-538.
- [14] 谢青, 赵钢德. 肝细胞损伤的分子生物学机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(9): 708-710.
- [15] Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage[J]. J Exp Med, 2007, 204(8): 667-680.
- [16] Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al. Associations (下转第 588 页)

1.3 统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行数据分析;两种方法检测结果的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

噬菌体生物扩增法阳性率为20.00%(6/30);改良罗氏培养法阳性率为13.33%(4/30)。2种方法检测结果阳性符合率为75.00%(3/4),阴性符合率为88.46%(23/26);总符合率为86.67%(26/30)。2种方法检测结果比较差异无统计学意义($\chi^2=0.25, P>0.05$)。详见表1。

表1 噬菌体生物扩增法和改良罗氏培养法
检测结果比较(n)

改良罗氏培养法	噬菌体生物扩增法		合计
	阳性	阴性	
阳性	3	1	4
阴性	3	23	26
合计	6	24	30

3 讨 论

女性生殖器结核是由结核分枝杆菌引起的生殖器炎症,是全身性结核病的一种表现,常继发于其他部位的结核,如肺结核、肠结核、腹膜结核、肠系膜结核等,约10%肺结核患者伴有生殖器结核^[9-10]。多数女性生殖器结核患者缺乏明显临床症状和阳性体征,少数患者有发热、盗汗、乏力、消瘦、月经失调、下腹坠痛和白带增多等症状,但都缺乏特异性,易被误诊为生殖器肿瘤或其他妇科炎症。诊断女性生殖器结核的常见辅助检查包括病理学检查、影像学检查、内窥镜检查及实验室检查,但现有的各种方法在适用性、敏感性、特异性和准确性方面都存在一定程度缺陷,而噬菌体生物扩增法作为结核分枝杆菌检测新方法为女性生殖器结核的诊断提供了新的思路。噬菌体生物扩增法基本原理是:结核分枝杆菌噬菌体只能感染活的结核分枝杆菌,当结核分枝杆菌与噬菌体混合孵育时,噬菌体感染结核分枝杆菌,再加入强效杀毒剂杀死培养基内所有游离噬菌体,而菌体内的噬菌体不受影响。进入靶菌体内的噬菌体繁殖并裂解菌体释放子代噬菌体,这些子代噬菌体又感染和裂解随后加入的指示菌(耻垢分枝杆菌),在琼脂培养基上形成清晰可见的噬菌斑,而噬菌斑数量与标本中活的结核分枝杆菌的数量呈正比,由此可判断标本中是否存在活的结核分枝杆菌,若标本中没有活的结核分枝杆菌,则噬菌体全部被杀死,培养基上不会出现噬菌斑。本研究应用噬菌体生物扩增法和改良罗氏培养法共同检测了30例白带标本,噬菌体生物扩增法检测

阳性率为20.00%(6/30),改良罗氏培养法阳性率为13.33%(4/30),显示噬菌体生物扩增法阳性率略高于改良罗氏培养法。此外,两种方法检测阳性符合率为75.00%(3/4),阴性符合率为88.46%(23/26),总符合率为86.67%(26/30),两种方法检测结果比较差异无统计学意义($\chi^2=0.25, P>0.05$)。以改良罗氏培养法为参考方法,噬菌体生物扩增法检测白带标本结核分枝杆菌的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确度分别为75.00%(3/4)、88.46%(23/26)、50.00%(3/6)、95.83%(23/24)、86.67%(26/30)。3例标本噬菌体生物扩增法阳性而改良罗氏培养法阴性,其所形成的噬菌斑数量均较少,说明噬菌体生物扩增法的检测下限低于改良罗氏培养法。噬菌体生物扩增法阴性而改良罗氏培养法阳性1例,说明存在导致前者假阴性结果的影响因素,有待进一步研究以明确。以上结果说明噬菌体生物扩增法检测白带中结核分枝杆菌有着较高的特异度和准确度,其检测极限也低于培养法,可作为常规方法应用于临床检测。

参考文献

- 余艳红,陈雷宁.女性生殖器结核与不孕[J].实用妇产科杂志,2006,22(11):647-650.
- 魏丽惠.子宫内膜结核及宫颈结核[J].实用妇产科杂志,2006,22(11):644-645.
- 范雪梅,唐小丽,熊丁.女性生殖器结核的临床诊断分析[J].西南军医,2007,9(6):107-108.
- 张辉,孔北华.女性生殖器结核的诊断方法[J].实用妇产科杂志,2006,22(11):642-643.
- Dinnes J, Deeks Kunst H, Gibson A, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection [J]. Health Technol Assess, 2007, 11(3):1-196.
- McNerney R, Kambashi BS, Kinkese J, et al. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5):2115-2120.
- Alcaide F, Galí N, Domínguez J, et al. Usefulness of a new myco-bacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7):2867-2871.
- 中国防痨协会基础专业委员会.结核病诊断实验室检验规程[M].北京:中国教育文化出版社,2006:52-68.
- 朱兰,俞梅.输卵管卵巢结核[J].实用妇产科杂志,2006,22(11):645-647.
- 王文学.女性生殖器结核的诊治进展[J].职业与健康,2008,24(10):982-984.

(收稿日期:2011-11-23)

(上接第575页)

between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(16): 1134-1143.

[17] Paik YH, Kim JK, Kim DY, et al. Clinical efficacy of a 24-month course of lamivudine therapy in patients with HBeAg negative chronic hepatitis B: a long-term prospective study[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(6):882-887.

[18] Ntziora F, Paraskevis D, Haida C, et al. Quantitative detection of the M204V hepatitis B virus minor variants by amplification refractory mutation system real-time PCR combined with molecular

beacon technology[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8):2544-2550.

[19] Chen Y, Wei H, Sun R, et al. Increased susceptibility to liver injury in hepatitis B virus transgenic mice involves NKG2D-ligand interaction and natural killer cells[J]. Hepatology, 2007, 46(3): 706-715.

[20] 杨凯,徐元宏,管世鹤.乙型肝炎病毒抵抗α-干扰素治疗研究进程[J].国际检验医学杂志,2010,31(3):142-143.

[21] 孙慧,吴金明.乙型病毒性肝炎肝细胞损伤机制的研究进展[J].医学综述,2008,14(21):3296-3300.

(收稿日期:2011-12-09)