

乙型肝炎肝硬化基础上慢加急性肝衰竭及失代偿终末期患者肝内细胆管反应特点对比研究

董晓君¹, 陈萦晖¹, 周婷婷¹, 李淑婷¹, 栗雅杰^{2,3}, 杨淑殷¹, 薛峰⁴, 李海¹, 王泰龄⁵ (1.上海交通大学医学院附属仁济医院 消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海 200001; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 3.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015; 4.上海交通大学医学院附属仁济医院 肝移植科, 上海 200127; 5.北京中日友好医院 病理科, 北京 100029)

摘要: 目的 比较乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)及乙型肝炎肝硬化终末期患者肝组织内胆管增生的特点。方法 选择20例HBV-ACLF和25例乙型肝炎肝硬化终末期患者移植前肝脏的病理标本, 制成石蜡切片后进行HE染色和细胞角蛋白-7(CK-7)单克隆抗体免疫组织化学染色, 显微镜下观察肝组织病理形态并作对比分析。结果 HBV-ACLF组在大块或亚大块坏死带四周的汇管区有大量CK-7阳性的细胆管增生并向坏死带中心扩延, 在增生的细胆管中可见较多已分化的中间型肝细胞。乙型肝炎肝硬化终末期组的肝组织内可见少量细胆管环绕在肝硬化结节表面, 在灶状炎症坏死区域可见局部轻度的细胆管增生, 中间型肝细胞则罕见或少见。结论 HBV-ACLF组和乙型肝炎肝硬化终末期组患者肝组织胆管增生的表现形式截然不同, 进一步阐明了二者肝组织病理学改变的差异。

关键词: 肝炎, 乙型; 肝硬化; 肝功能衰竭, 急性; 胆管增生; 角蛋白7

Comparative studies on intrahepatic ductular proliferation between patients with HBV-ACLF and end-stage of HBV-associated liver cirrhosis

DONG Xiao-jun¹, CHEN Ying-xuan¹, ZHOU Ting-ting¹, LI Shu-ting¹, LI Ya-jie^{2,3}, YANG Shu-yin¹, XUE Feng⁴, LI Hai¹, WANG Tai-ling⁵ (1.Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China; 2.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China; 4.Department of Liver Transplantation, Renji Hospital, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 5.Department of Pathology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective To compare the characteristics of intrahepatic ductular proliferation in patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF) and end-stage of HBV-associated liver cirrhosis. **Methods** Select liver pathological specimens from 20 cases of HBV-ACLF and 25 cases of hepatitis B liver cirrhosis patients with end-stage before liver transplantation were obtained and made into paraffin slides. Then HE staining and anti-cytokeratin-7 (CK-7) immunohistochemistry staining were carried out, followed by morphological observation and comparative analysis. **Results** In liver samples from HBV-ACLF group, we observed a large number of CK-7 positive proliferating ductules, extruding into the center of necrotic zone around portal tracts in the peripheral of massive or submassive necrotic zone. And we clearly recognized differentiated intermediate hepatocytes; while in end-stage of HBV-associated liver cirrhosis

group, we found a small amount of proliferating ductules encircling the surface of cirrhotic nodules and focal ductular reaction around focal inflammatory necrotic area, and intermediate hepatocytes were rarely found.

Conclusions Ductular proliferation of HBV-ACLF and end-stage of HBV-associated liver cirrhosis patients displayed disparate patterns, which furtherly clarifies the distinction in liver pathology between the two groups.

Key words: Hepatitis B; Liver cirrhosis; Liver failure, acute; Ductular proliferation; Keratin-7

我国是乙型肝炎病毒感染的高发国家^[1], 因此大多数肝硬化均在乙型肝炎基础上发展而至。乙型肝炎肝硬化(hepatitis B virus-associated cirrhosis)继续发展可至肝硬化终末期(end-stage of liver cirrhosis), 也称为慢性肝衰竭(chronic liver failure), 其可在某种诱因触发下发生急性肝衰竭, 即为乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭(hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure, HBV-ACLF), 大大增加了患者病死率。

HBV-ACLF和乙型肝炎肝硬化终末期患者的临床表现非常相似, 通常仅根据临床表现和实验室检查很难将两者鉴别, 需结合病理综合进行判断。然而临床肝组织活检常较局限, 因此本研究收集HBV-ACLF和乙型肝炎肝硬化终末期患者肝移植术后病肝标本进行组织学观察, 特别在胆管增生方面进行对比分析以期进一步区别二者, 目前尚缺乏此类研究, 现报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择2010年4月至2011年12月上海市仁济医院肝移植科行肝移植术45例患者的肝脏病理标本, 疾病诊断参照中国2010年《慢性乙型肝炎防治指南》^[1]和2006年《肝衰竭诊疗指南》^[2]标准, 入组患者的临床资料均为肝移植术前一天收集, 根据病史资料结合病理切片观察肝内有无大块坏死(坏死范围超过肝实质的2/3)或亚大块坏死(约占肝实质的1/2~2/3), 分为HBV-ACLF组(有大块或亚大块坏死)20例和乙型肝炎肝硬化终末期组(无大块或亚大块坏死)25例。HBV-ACLF组包括男性18例, 女性2例, 平均年龄(44.1 ± 2.0)岁。乙型肝炎肝硬化终末期组包括男性24例, 女性1例, 平均年龄(44.7 ± 1.7)岁。两组患者性别、年龄等一般资料比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 具有

可比性。

1.2 方法 从肝移植术中切除的病肝右叶取新鲜组织块2.5 cm × 2.5 cm, 固定于10%福尔马林液, 经过脱水透明、浸蜡包埋等步骤制成石蜡切片(3~4 μm); 再分别进行脱蜡、HE染色和抗CK-7免疫组织化学染色。回顾性观察全部肝组织切片, 认真读片, 观察肝组织总体病理形态和CK-7阳性细胆管增生情况, 并同一名高年资病理学专家共同重复阅片以进一步验证。记录患者丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、白蛋白(ALB)、白细胞(WBC)、凝血酶原活动度(PTA)、国际标准化比值(INR)、甲胎蛋白(AFP)、肝性脑病分级、MELD评分等相关资料。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件对数据进行统计分析。计量资料采用非参数检验中Man-Whitney检验进行两两比较, 计数资料(率)的两两比较采用四格表 χ^2 检验中Fisher's确切概率算法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象分组和临床参数的比较 两组患者ALT、AST中位水平基本在正常范围内, 但HBV-ACLF组TBil中位水平(约为正常上限的4倍)显著高于乙型肝炎肝硬化终末期组(约为正常上限的2倍); 前者PTA < 40%, 显著低于后者(> 40%), 而前者INR(> 1.5)显著高于后者(< 1.5); 前者AFP中位水平(约为正常上限的3.5倍)显著高于后者(在正常范围); 两组间II°以上肝性脑病发生率无明显差异; 前者终末期肝病模型(MELD)评分显著高于后者, 见表1。

2.2 两组患者肝组织活检病理标本总体形态比较 回顾病史资料, 观察两组患者肝组织活检HE染色病理标本的总体形态。低倍镜视野(40 ×)

下, HBV-ACLF组病肝发生大块或亚大块坏死(图1A), 常有部分肝硬化结节残留, 坏死带常较广泛, 沿中央静脉分布, 其中原硬化结节结构消失, 犹如急性重型肝炎的全小叶大块坏死, 坏死带周围可见较完好的汇管区。乙型肝炎肝硬化终末期组患肝形成大小结节或混合结节(图1B), 无大块或亚大块坏死, 结节为宽窄不一的纤维间隔围绕, 结节中心常有程度不等的肝实质消失, 使部分大结节再分割, 周围纤维间隔增宽。

2.3 HBV-ACLF组和乙型肝炎肝硬化终末期组肝脏细胆管反应特点 抗细胞角蛋白-7 (CK-7) 免疫组织化学染色(棕色)显示肝内胆管增生。低倍显微镜下(40×), HBV-ACLF组(图2A)在大块或亚大块坏死带四周的汇管区周围可见大量CK-7阳性的细胆管增生, 呈分支条索状或管状排列; 回顾病史资料, 病程较短者增生的细胆管基本围绕汇管区周围, 病程长者可往坏死带中心扩延, 有的甚至可达坏死带面积的1/2~2/3; 而在残留的结节周边也可

见明显细胆管增生。乙型肝炎肝硬化终末期组(图2B)大部分结节处于炎症静止期, 可见CK-7阳性细胆管环绕在肝硬化结节表面, 仅有少数细胞伸向结节内; 而处于炎症活动期的结节在灶状炎症坏死区域可见局部轻度的细胆管增生; 另外, 在某些结节中心也可见散在细胆管增生。

2.4 两组患者肝内胆管增生过程中的分化 高倍镜视野(400×)下观察两组患者肝内细胆管增生情况, 可见部分细胆管细胞体积增大、胞浆增多, CK-7阳性反应减弱或仅见于胞膜, 此为中间型肝细胞(intermediate hepatocytes)(图3中箭头所示, 来自HBV-ACLF组)。HBV-ACLF组大块坏死带四周的汇管区周围增生的细胆管中明显可见分化的中间型肝细胞, 很多呈串珠样; 而乙型肝炎肝硬化终末期组静止的肝硬化结节周边增生的细胆管细胞中罕见分化的中间型肝细胞, 在结节炎症坏死严重部位局部增生的细胆管中可见少量的中间型肝细胞, 多散在分布。

表 1 两组患者一般资料比较[中位数(极值)]

	HBV-ACLF组 (n = 20)	乙型肝炎肝硬化终末期组 (n = 25)	U	P
ALT (U/L)	37.5 (13~683)	24 (6~114)	140.0	0.0123
AST (U/L)	67 (34~339)	34 (8~158)	95.0	0.0004
TBil ($\mu\text{mol/L}$)	421.9 (57.4~949.7)	37.6 (9.5~81.5)	10.0	< 0.0001
ALB (g/L)	31.9 (25.9~38.4)	31.9 (28.5~37.6)	201.5	0.2728
PTA (%)	21.2 (5.6~44.4)	60.6 (44.0~95.2)	1.0	< 0.0001
INR	2.50 (1.50~7.70)	1.26 (1.02~1.51)	1.0	< 0.0001
AFP ($\mu\text{g/L}$)	20.7 (1.5~220.2)	4.5 (1.2~82.6)	59.0	0.0011
肝性脑病 \geq II° [n (%)]	3 (15)	2 (8)	-	0.6423 ^a
MELD评分	24.8 (11.46~51.54)	4.28 (-2.96~11.74)	1.0	< 0.0001

注: ^aP值采用卡方检验中Fisher's 确切概率算法得出; 两组间其他参数的比较采用Man-Whitney检验得出U值和P值。MELD: model of end-stage liver disease, 终末期肝病模型

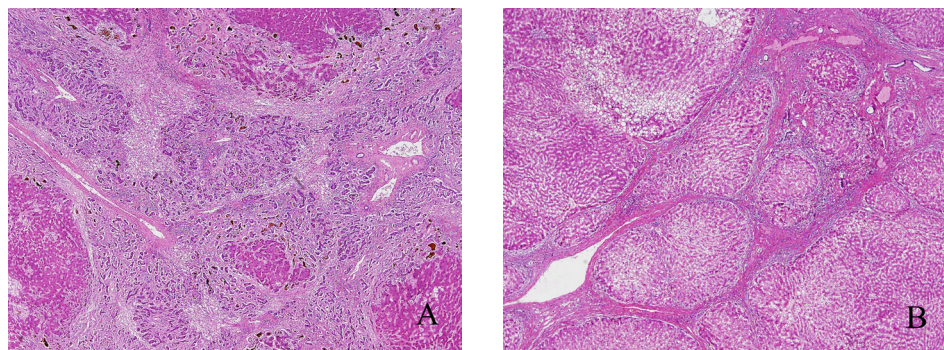


图 1 HBV-ACLF组(A)和乙型肝炎肝硬化终末期组(B)肝组织(HE染色, 40×)

注: A: 广泛的大块坏死带, 沿中央静脉分布, 坏死带周围可见较完好的汇管区, 有结节残留; B: 多个由纤维间隔包绕形成大小不等的硬化结节, 有的结节再分割, 周围纤维间隔增宽

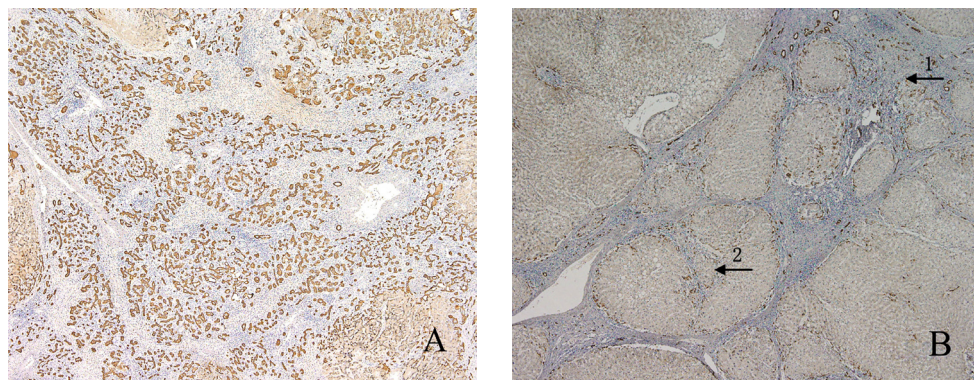


图 2 HBV-ACLF组(A)和乙型肝炎肝硬化终末期组(B)肝组织(CK-7免疫组织化学染色, 40×)

注: A: 大块坏死带四周的汇管区周围可见大量CK7阳性细胆管增生, 已达坏死带面积的2/3; B: CK-7阳性细胆管环绕在肝硬化结节表面, 结节炎症坏死区可见局部轻度的细胆管增生(箭头1所示), 有的结节内部也可见散在细胆管增生(箭头2所示)

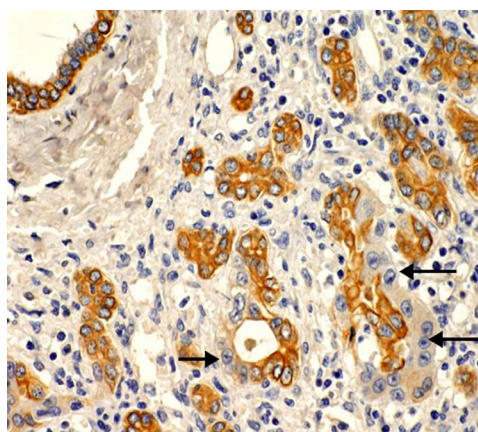


图 3 肝组织内中间型肝细胞病理形态(CK-7免疫组织化学染色, 400 ×)

注: HBV-ACLF组汇管区周围增生的细胆管细胞体积增大、胞浆增多, CK-7阳性反应减弱甚至仅见于胞膜, 即中间型肝细胞, 呈串珠样(如箭头所示)

3 讨论

在正常肝脏内, 肝细胞合成、分泌的胆汁首先进入毛细胆管(bile canaliculi), 然后经Hering管(the canals of Hering)、细胆管(bile ductules)引流至汇管区的小叶间胆管(interlobular bile ducts), 最终汇流到肝外胆道而排出。Hering管^[3,4]是与毛细胆管相邻的终末支胆管, 管壁由肝细胞和胆管细胞共同形成, 与之相连的细胆管则完全由胆管上皮细胞组成。

正常情况下, 在肝组织汇管区仅可见少量的细胆管, 但发生肝胆疾病(如慢性肝炎、肝硬化、原发性胆汁性肝硬化、大胆管阻塞等)^[5-8]时, 肝组织内常可见明显的胆管增生。“细胆管反应(bile ductular reaction)”一词最初是由Popper等^[9]定义,

用来描述病变肝组织汇管边缘区胆管上皮细胞的增生, 其被认为是对肝损伤的一种应答, 也称为细胆管增生。近年来肝内祖细胞(liver progenitor cells)的存在倍受关注^[3,7,10-12], 研究认为其位于Hering管或其附近^[13,14], 激活后可向细胆管分化; 增生的细胆管上皮细胞在大鼠中称为肝卵圆细胞(liver oval cells)^[15], 细胞体积较小, 胞核较大、呈椭圆形, 而细胞质较少, 表达细胞角蛋白CK-7、CK-8和CK-19等。然而, 并非增生的细胆管均来自肝祖细胞的激活, 其来源还可能为原有胆管、肝细胞的胆管化生(ductular metaplasia)或成熟肝细胞的去分化(dedifferentiation)^[16]。后来Popper等将细胆管增生分为3型^[17,18]: 1型见于大胆管阻塞, 为汇管区周围原有的典型细胆管增生形成边缘胆管, 导致现存胆管伸长和弯曲; 2型见于慢性淤胆, 胆管的增生激活肌成纤维细胞而发生纤维化, 因此1型和2型胆管增生主要向胆管分化; 3型见于肝细胞发生大块坏死的情况下, 肝祖细胞被激活增生形成细胆管, 可向肝细胞和胆管细胞两个方向分化。

本研究显示, HBV-ACLF组患者肝内发生大块或亚大块坏死, 坏死带周围出现明显细胆管增生, 属于3型细胆管增生, 且增生的细胆管中明显可见分化的中间型肝细胞(intermediate hepatocytes), 即发生肝细胞的分化。肝细胞再生是肝损伤恢复的关键, 有研究^[13,19]发现, 肝细胞的再生主要通过两种机制, 一是肝细胞的自身增殖, 二是肝内祖细胞激活并增生形成细胆管, 再分化为中间型肝细胞,

最后成为成熟肝细胞。正常生理情况下,第二种机制并不参与肝细胞的再生,因为肝细胞和胆管细胞在人类出生后保持一定的增殖潜能^[13],仅在肝损伤如发生大块或亚大块坏死后,肝细胞自身复制能力受损或不足时祖细胞才被激活^[20]。

与HBV-ACLF患者相比,乙型肝炎肝硬化终末期患者肝内细胆管增生和向肝细胞分化的程度较轻,仅可见少量细胆管围绕在静止期的硬化结节表面,通常不向结节中心延伸;在活动期的结节灶状炎症坏死区域可见局部细胆管轻度增生,破坏严重区域可见散在分化的中间型肝细胞。另外,在某些结节中心、肝实质消失(parenchymal extinction)区域也可仅见散在的少量细胆管增生。

综上所述,HBV-ACLF患者和乙型肝炎肝硬化终末期患者肝组织表现出截然不同的病理形态和胆管增生特点,进一步为其鉴别提供了依据。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中国肝脏病杂志(电子版),2011,3:40-56.
- [2] 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组, 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012年版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志,2012,5:321-327.
- [3] Theise ND, Saxena R, Portmann BC, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans[J]. Hepatology,1999,30:1425-1433.
- [4] Saxena R, Theise N. Canals of Hering: recent insights and current knowledge[J]. Semin Liver Dis,2004,24:43-48.
- [5] Fujiwara K, Nakano M, Yasui S, et al. Advanced histology and impaired liver regeneration are associated with disease severity in acute-onset autoimmune hepatitis[J]. Histopathology,2011,58:693-704.
- [6] Eleazar JA, Memeo L, Jhang JS, et al. Progenitor cell expansion: an important source of hepatocyte regeneration in chronic hepatitis[J]. J Hepatol,2004,41:983-991.
- [7] Zhou H, Rogler LE, Teperman L, et al. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver[J]. Hepatology,2007,45:716-724.
- [8] 刘旭华, 郑素军, 祖可佳, 等. 91例慢性乙型重型肝炎肝衰竭患者的临床病理分析[J]. 中华肝脏病杂志,2010,18(10):721-725.
- [9] Popper H, Kent G, Stein R. Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury[J]. J Mt Sinai Hosp NY, 1957,24:551-556.
- [10] Darwiche H, Petersen BE. Biology of the adult hepatic progenitor cell: "ghosts in the machine"[J]. Prog Mol Biol Transl Sci,2010,97:229-249.
- [11] Menthena A, Deb N, Oertel M, et al. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver[J]. Stem Cells,2004,22:1049-1061.
- [12] 杨志云, 王宪波, 殷飞. 肝卵圆细胞——肝干细胞研究进展[J]. 中国肝脏病杂志(电子版),2010,2:52-55.
- [13] Rubin EM, Martin AA, Thung SN, et al. Morphometric and immunohistochemical characterization of human liver regeneration[J]. Am J Pathol,1995,147:397-404.
- [14] Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells[J]. Hepatology,2001,33:738-750.
- [15] 李影, 赵丽娟, 李艳香, 等. 大鼠肝卵圆细胞干细胞特性的研究[J]. 上海交通大学学报(医学版),2011,31:561-566.
- [16] Steiner JW, Carruthers JS, Kalifat SR. The ductular cell reaction of rat liver in extrahepatic cholestasis. I. Proliferated biliary epithelial cells[J]. Exp Mol Pathol,1962,1:162-185.
- [17] Popper H. The relation of mesenchymal cell products to hepatic epithelial systems[J]. Prog Liver Dis,1990,9:27-38.
- [18] Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications I Types of ductular reaction reconsidered[J]. Virchows Arch,2011,458:251-259.
- [19] Craig CE, Quaglia A, Selden C, et al. The histopathology of regeneration in massive hepatic necrosis[J]. Semin Liver Dis,2004,24:49-64.
- [20] Bralet MP, Branchereau S, Brechot C, et al. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver[J]. Am J Pathol,1994,144:896-905.

收稿日期: 2013-01-23

· 消息 ·

与本刊编辑部互动方式

尊敬的作者、尊敬的读者, 有关投稿、稿件查询、杂志订阅、地坛国际感染病学术会议消息、肝脏病和感染病诊疗指南等有关咨询或学术疑难问题, 您可以登陆本刊网站<http://www.j-ditan.com>、发送邮件至Email: editordt@163.com; 或拨打电话010-84322058/84322059与编辑部联系。

本刊编辑部