

# 终末期肝病患者乙型肝炎病毒感染与肝祖细胞激活的关系

武楠, 刘峰, 马慧, 刘志达, 费然, 陈红松, 王豪, 魏来 (北京大学人民医院, 北京 100044)

**摘要:** 目的 探讨终末期肝病患者乙型肝炎病毒感染与祖细胞激活和扩增的关系。方法 16例终末期慢性乙型肝炎患者的肝活检标本, 以细胞角蛋白 (CK7) 为标记做免疫组织化学, 定量分析祖细胞数目和胆管反应面积的相关性。结果 全部患者均从组织学证实为肝硬化, 并且炎症反应严重 (炎症活动度评分12~17分)。祖细胞数目和胆管反应面积呈显著正相关。血清HBV DNA水平与祖细胞数目和胆管反应面积均显著相关。结论 在终末期慢性乙型肝炎患者中, 祖细胞的激活和扩增明显, HBV感染可能参与肝祖细胞的激活和扩增。

**关键词:** 终末期肝病; 乙型肝炎病毒; 肝祖细胞

## Study of HBV infection and hepatic progenitor cell activation in end-stage liver disease

WU Nan, LIU Feng, MA Hui, LIU Zhi-da, FEI Ran, CHEN Hong-song, WANG Hao, WEI Lai. (*Hepatology Institute, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China*)

**Abstract: Objective** To study the activation of hepatic progenitor cells (HPCs) and its relationship with HBV infection in patients with end-stage chronic hepatitis B. **Methods** Sixteen cases of liver cirrhosis caused by chronic hepatitis B were studied. The numbers of HPCs and area of ductular reactions were quantitatively analyzed on the cytokeratin 7 (CK7)-stained sections. **Results** All of the sections showed liver cirrhosis and severe inflammation (HAI ranged from 12 to 17). The number of HPCs were correlated with the area of ductular reactions positively. Serum HBV DNA level was independently associated with HPCs activation and ductular reactions. **Conclusions** In end-stage of chronic hepatitis B, HBV infection may be involved in the activation of progenitor cells in certain environments.

**Key words:** End-stage of chronic hepatitis; Hepatitis B virus; Hepatic progenitor cell

据估计, 全世界乙型肝炎病毒 (HBV) 慢性感染者约有3.5亿<sup>[1]</sup>。在慢性乙型肝炎中, 肝细胞功能和再生均受到抑制, 易致肝硬化。近来研究表明, 慢性肝病中肝细胞再生受到抑制, 肝祖细胞是 (hepatic progenitor cells, HPCs) 激活和扩增肝脏再生的重要来源<sup>[2-7]</sup>。在肝组织中, 祖细胞激活和扩增主要出现在门脉周围区, 同时伴随胆管反应<sup>[3,8]</sup>, 祖细胞扩增和胆管反应的程度与炎症分级和纤维化分期呈正相关<sup>[3-5]</sup>。

有结果提示祖细胞激活可能参与慢性病毒性肝炎的致病过程<sup>[5]</sup>, 免疫组织化学结果表明肝损

伤时乙型肝炎病毒可以感染肝祖细胞<sup>[9]</sup>。但是, 乙型肝炎病毒感染和祖细胞激活的关系尚不明确。本研究拟探讨终末期慢性乙型肝炎患者肝组织中肝祖细胞激活的特征及其与乙型肝炎病毒感染的关系。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料及组织学检查

16例患者均通过组织学诊断为肝硬化, 均为乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 阳性, 抗-HCV和抗-HIV阴性, 并检测了其中13例患者血清HBV DNA定量。实验室检查包括丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBil)、直接胆红素 (DBil)、凝血酶原活动

通讯作者: 魏来 Email: weilai@163.com

度(PTA)。HE染色后,据Knodell和Ishak的评分系统评价肝组织炎症活动度(HAI)<sup>[10,11]</sup>。HAI评分为0~18分。

### 1.2 免疫组织化学和定量分析

连续石蜡切片经脱蜡至水后,置于pH 6.0的柠檬酸盐缓冲液中用微波92~98℃抗原修复20分钟,自然冷却30分钟。3%过氧化氢孵育10分钟封闭内源性过氧化物酶。滴加5% BSA,37℃封闭30分钟。弃去封闭液,滴加一抗,4℃孵过夜。加生物素标记的二抗37℃孵育30分钟,用新鲜配置的DAB显色。所用一抗为丹麦Dako公司产品细胞角蛋白7(CK7)的抗体。所有的切片均用苏木精衬染。

肝祖细胞定义为门脉周围和小叶内单个小细胞,直径6~10微米,卵圆核,胞质极少,且CK7染色呈强阳性<sup>[2]</sup>。在200倍镜下选10个不重复视野计数祖细胞个数,取其平均值作为该标本的计数结果。胆管反应定义为无明确管腔的管样或腺样结构,由核浆比较高、CK7强阳性的细胞构成<sup>[2]</sup>。在200倍镜下选10个不重复视野,以图像分析软件(Leika QWIN,德国)定量分析胆管反应面积所占视野面积的百分比,取其平均值作统计分析。

### 1.3 统计方法

连续正态分布变量用平均值±标准差表示。比较两组间差异用 $t$ 检验。正态和非正态资料的相关性判断分别用Pearson和Spearman相关分析。多因素分析中的变量包括年龄、病程、ALT、AST、TBil、DBil、PTA和血清HBV DNA。以SPSS 12.0进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 终末期慢性乙型肝炎患者的临床和组织学特征

患者的临床资料总结见表1。所有的患者均为男性,年龄在22~58岁(平均43.5岁)。检测13例患者血清HBV DNA的水平(9例阳性,4例阴性)。HE染色均为终末期肝硬化表现,可见肝细胞坏死、淋巴细胞浸润、纤维间隔增宽。HAI评分在12~17分。

### 2.2 肝祖细胞和胆管反应的特征

CK7阳性的肝脏祖细胞主要出现在门脉周围

表1 16例终末期慢乙型肝炎患者的临床资料和HAI评分

	平均数/中位数	范围
年龄(岁)	43.5	22~58
病程(年)	13	2~30
ALT(U/L)	84	14~299
AST(U/L)	123	35~593
TBil( $\mu\text{mol/L}$ )	353	60~833
DBil( $\mu\text{mol/L}$ )	201	32~490
PTA(%)	34	15~61
HBV DNA(拷贝/ml)*	233 000 <sup>#</sup>	500~3 420 000
HAI	15±1.50	12~17

注: \*检测13例患者的血清HBV DNA水平, <sup>#</sup>中位数

区,向肝小叶内浸润,且在肝小叶内的分布与炎细胞有关。胆管反应主要出现在门脉周围和增宽的纤维间隔内,而且胆管反应的分布也与炎细胞相关。可见中间型肝胆细胞,即直径10~40  $\mu\text{m}$ ,核浆比减少,胞浆CK7淡染的细胞,分布在胆管反应和祖细胞邻近的区域。祖细胞的个数为3.5~12.5个/视野,平均 $8.0 \pm 2.73$ 个/视野。胆管反应的面积为5.01%~24.5%,平均 $14.80\% \pm 5.10\%$ 。统计分析表明祖细胞数目与胆管反应面积呈正相关( $r=0.517, P<0.05$ ) (图1)。

### 2.3 乙型肝炎病毒感染与祖细胞激活和胆管反应呈独立相关

据血清HBV DNA水平将患者分HBV DNA阳性和阴性两组。HBV DNA阳性组的祖细胞个数为 $(9.30 \pm 2.23)$ 个/视野,HBV DNA阴性组为 $(6.20 \pm 2.67)$ 个/视野,两者之间有显著性差异( $P<0.05$ )。胆管反应面积定量结果与祖细胞计数相似,HBV DNA阳性患者胆管反应面积 $(17.36 \pm 3.96)\%$ 较HBV DNA阴性患者 $(9.04 \pm 4.89)\%$ 明显增加, $P<0.05$ 。多因素分析表明,血清HBV DNA定量为祖细胞个数( $\beta=0.663, P=0.007$ )和胆管反应面积( $\beta=0.765, P=0.006$ )的独立相关变量。

## 3 讨论

肝祖细胞为可以向肝细胞和胆管细胞分化的双极细胞,正常肝组织中,祖细胞主要存在于

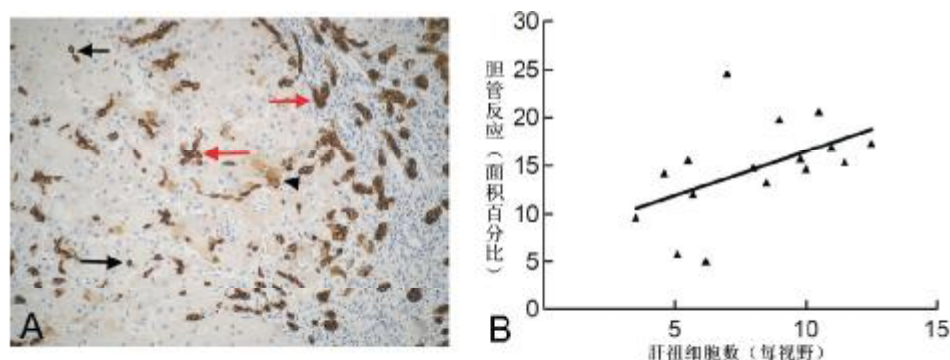


图1 肝祖细胞与胆管反应特征

A: 终末期慢性乙型肝炎患者肝组织中祖细胞、胆管反应、中间型肝胆细胞的分布(CK7染色)  
 黑色箭头: 肝祖细胞; 红色箭头: 胆管反应; 黑色短箭头: 中间型肝胆细胞 (200倍镜下)  
 B: 肝祖细胞个数和胆管反应面积的相关性 ( $r = 0.517$ ,  $P < 0.05$ )

Hering小管, 相当于啮齿类动物肝组织中的卵圆细胞<sup>[2]</sup>。在慢性肝病中, 固有肝细胞增生受到抑制, 祖细胞可以向肝细胞分化, 参与肝脏再生, 同时伴有胆管反应<sup>[2,12]</sup>。免疫组织化学是检测祖细胞和胆管反应的有效方法。最常用的免疫标记是细胞角蛋白7 (CK7) 和19 (CK19), 有报道, CK19在祖细胞分化的早期即消失, 为了同时观察中间型肝胆细胞和胆管反应、祖细胞, 本研究选取CK7作为免疫学标记物。

本研究表明, 终末期肝硬化组织中祖细胞的激活和扩增程度高, 并且祖细胞个数与胆管反应面积相关, 提示胆管反应来源于祖细胞激活和扩增<sup>[2]</sup>。另外, 既往研究提示祖细胞的激活和扩增随炎症分级和纤维化分期的增加而增加<sup>[3-5]</sup>。笔者发现, HBV DNA阳性患者的祖细胞个数和胆管反应面积均高于HBV DNA阴性患者。多因素分析也表明血清HBV DNA定量是祖细胞个数和胆管反应面积的独立相关变量。由于患者组织学检查均表现为严重的炎症和肝硬化, 所以本研究结果提示对于终末期的慢性乙型肝炎患者, 具有相似的组织学背景的情况下, 乙型肝炎病毒感染可能对祖细胞的激活的扩增起促进作用。但是乙型肝炎病毒感染影响祖细胞激活的机制仍需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] World Health Organization. Hepatitis B[S]. WHO Web site 2000, <http://who.int/inf-fs/en/fact204.html>.
- [2] Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human liver disease[J]. *Hepatology*, 2004, 39:1739-1745.
- [3] Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, et al. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate[J]? *J Pathol*, 2000, 192:373-378.
- [4] Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, et al. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154:537-541.
- [5] Fotiadu A, Tzioufa V, Vrettou E, et al. Progenitor cell activation in chronic viral hepatitis[J]. *Liver Int*, 2004, 24:268-274.
- [6] Roskams T, Yang SQ, Koteish A, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163:1301-1311.
- [7] 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.
- [8] Tan J, Hytioglou P, Wiczorek R, et al. Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases[J]. *Liver*, 2002, 22:365-373.
- [9] Hsia CC, Thorgeirsson SS, Tabor E. Expression of hepatitis B surface and core antigens and transforming growth factor- $\alpha$  in "oval cells" of the liver in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Med Virol*, 1994, 43:216-221.
- [10] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis[J]. *J Hepatol*, 1995, 22:696-699.
- [11] Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis[J]. *Hepatology*, 1981, 1:431-435.
- [12] Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13:389-396.

收稿日期: 2008-01-02