

TGF- β 1、Smad2 在胆道闭锁肝纤维化中的作用

丁美云¹, 詹江华^{2△}, 赵丽², 赵林胜², 张爱华²

摘要:目的 研究转化生长因子(TGF)- β 1 与 Smad2 蛋白在胆道闭锁(BA)肝组织中的表达情况及在肝纤维化进程中的作用。**方法** 选取 2010 年 1 月—2014 年 7 月尸检(患儿死于非肝胆疾病,正常对照组)5 例,胆管扩张症肝活检(胆扩组)10 例,BA 肝活检(早期肝纤维化组)19 例,BA 晚期进行肝移植患者自体肝活检(晚期肝硬化组)11 例,采用 HE 染色观察并评价肝标本纤维化程度,免疫组化染色检测 TGF- β 1 与 Smad2 蛋白在肝组织中的表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)方法检测肝组织中 TGF- β 1 与 Smad2 基因表达情况。**结果** (1)HE。正常对照组肝组织无胶原纤维增生,胆扩组有轻度纤维细胞增生,早期肝纤维化组胶原纤维增生、桥接纤维化现象显著,而晚期肝硬化组假小叶显著。(2)免疫组化。TGF- β 1 蛋白平均光密度值在早期肝纤维化组表达最高($P < 0.05$);Smad2 蛋白在 4 组间表达差异无统计学意义。(3)qRT-PCR。胆扩组、早期肝纤维化组和晚期肝硬化组 3 组肝内 TGF- β 1、Smad2 mRNA 含量比较早期肝纤维化组均最高($P < 0.017$)。**结论** BA 肝纤维化早期 TGF- β 1、Smad2 促进纤维化至门管区-门管区(P-P)、门管区-中央静脉(P-C)型桥样结构形成;随着纤维化程度加重,TGF- β 1、Smad2 表达促纤维化作用逐渐减弱。

关键词:胆道闭锁;肝硬化;转化生长因子 β 1;Smad2 蛋白质;肝纤维化

中图分类号:R726.574 **文献标志码:**A **DOI:**10.11958/20150242

The effects of TGF- β 1 and Smad2 on liver fibrosis of biliary atresia

DING Meiyun¹, ZHAN Jianghua^{2△}, ZHAO Li², ZHAO Linsheng², ZHANG Aihua²

1 The Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2 Tianjin Children's Hospital

[△]Corresponding Author E-mail:zhanjianghua@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression and function of transforming growth factor (TGF)- β 1 and Smad2 in liver fibrosis of biliary atresia (BA). **Methods** Liver biopsy specimens were collected from autopsy (normal group, $n=5$), congenital biliary dilatation (CBD group, $n=10$), BA patients underwent Kasai procedure (early hepatic fibrosis group, $n=19$) and liver transplantation (transplantation group, $n=11$). The first three groups were collected from January 2010 to July 2014 in Tianjin Children's Hospital, and the last group was collected from January 2013 to January 2014 in Tianjin First Central Hospital. The hematoxylin and eosin (HE) stain were used to observe the degree of liver fibrosis of four groups. Immunohistochemistry (IHC) was used to observe expressions of TGF- β 1 and Smad2 in liver tissues of these samples. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to test the quantitative mRNA of TGF- β 1 and Smad2 in these samples. **Results** Results of HE showed that no fibrosis in autopsy group, mild fiber cell hyperplasia in CBD group, severe fibrosis in Kasai group and significant pseudolobule in transplantation group. Results of IHC showed that TGF- β 1 was expressed in the cytoplasm of hepatocytes, bile duct cells, lymphocytes and neutrophils. The average optical density of TGF- β 1 was the highest in Kasai group compared with that of other three groups ($P < 0.05$). There was no significant difference in Smad2 expression in cytoplasm of hepatocytes, bile duct cells and lymphocytes between four groups ($P > 0.05$). Results of qRT-PCR showed that both TGF- β 1 mRNA and Smad2 mRNA were the highest in early hepatic fibrosis group than those of CBD group and transplantation group ($P < 0.017$). **Conclusion** In early stage of BA, TGF- β 1 and Smad2 promote liver fibrosis until the formation of P-P, P-C desmosome structure. However, with BA fibrosis becomes more serious, the pro-fibrogenic function of TGF- β 1 and Smad2 becomes less.

Key words: biliary atresia; liver cirrhosis; transforming growth factor beta1; Smad 2 protein; liver fibrosis

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81570471);天津市卫生行业重点攻关项目(14KG129);天津市卫生局科技基金资助项目(2014KR09)

作者单位:1 天津医科大学研究生院(邮编 300070);2 天津市儿童医院

作者简介:丁美云(1988),女,硕士在读,主要从事小儿普通外科、胆道闭锁方面研究

[△]通讯作者 E-mail:zhanjianghua@163.com

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是危及婴幼儿生命的肝胆系统疾病,发病率为 1/8 000~1/5 000,以胆道闭塞、进行性肝纤维化为特征,最终进展为肝硬化、肝衰竭,是婴幼儿时期肝移植的主要指征^[1-2]。转化生长因子(TGF)- β 1 蛋白能够调节机体细胞生长、分化、凋亡,Smad2 蛋白是 TGF- β 1/Smads 促纤维化通路的重要因子,TGF- β 1/Smads 促纤维化通路在 BA 肝纤维化进程中起重要作用^[3]。宋亭亭等^[4]证明 BA 患儿肝内 TGF- β 1 蛋白含量在肝门-空肠吻合术(Kasai 手术)时期高于肝移植期。但这两种蛋白在 BA 肝纤维化进展中的作用尚不明确,本研究通过检测 TGF- β 1、Smad2 蛋白和基因水平的表达,探讨两者在 BA 肝纤维化进展中的作用和临床意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源与分组 肝组织标本来自天津市儿童医院 2010 年 1 月—2014 年 7 月间尸检 5 例,病例死于非肝胆疾病,为正常对照组;胆管扩张患儿 10 例(胆扩组);BA 患儿 19 例,为 Kasai 术时所取肝活检组织,患儿肝内纤维组织增生、门管区增宽最终形成大量门管区-门管区(P-P)、门管区-中央静脉(P-C)型纤维间隔,无明确假小叶出现,将其定为早期肝纤维化组;天津市第一中心医院 2013 年 1 月—2014 年 1 月 BA 晚期肝硬化行肝移植患者自体肝活检组织 11 例,患儿肝内出现假小叶、间质内纤维瘢痕逐渐严重,定为晚期肝硬化组;患儿基本情况见表 1。本研究经天津市儿童医院及天津市第一中心医院伦理委员会审查通过。

Tab. 1 General condition in four groups of patients

表 1 各组患儿一般情况

组别	n	性别(男/女)	出生时间(d)
正常对照组	5	3/2	0~20
胆扩组	10	3/7	365~1 825
早期肝纤维化组	19	11/8	50~78
晚期肝硬化组	11	6/5	365~730

由于疾病发展阶段限制,各组年龄难以匹配

1.2 主要试剂与仪器 兔抗人 TGF- β 1 一抗(1:100),兔抗人 Smad2 一抗(1:200),二抗为辣根酶标记的羊抗兔聚合物,均购自北京博奥生物技术有限公司。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)引物由北京奥科生物技术有限公司设计合成,见表 2。主要仪器:IQ5 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),手持式组织匀浆机(德国 IKA 公司),FastQuant RT Kit (With gDNase)、TRIzol(天根生化公司),SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 术中取各组患儿肝右叶前缘为活检标本,部分置无菌 EP 管中储存在-80℃冰箱,用于 qRT-PCR 检测;部分用 10%福尔马林溶液固定 8~24 h 后经石蜡包埋储存,所有过程均处于同一实验条件。正常对照组没有肝活检

Tab. 2 The base sequences of primers for qRT-PCR about TGF- β 1 and Smad2

表 2 TGF- β 1、Smad2 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
GAPDH	上游:ACAGTCAGCCGCATCTTCTT 下游:TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	252
TGF- β 1	上游:GAGAAGCGGTACCTGAACCC 下游:GGCGAAAGCCCTCAATTTC	234
Smad2	上游:CCGCCAGTTGTGAAGAGACT 下游:CTGCCCATCTCTCTCTCTC	84

组织,未进行 TGF- β 1、Smad2 的 qRT-PCR 检测。

1.3.2 HE 及免疫组化染色 将已包埋肝脏蜡块切成 4 μ m 厚切片分别经 HE、免疫组化染色(采用 S-P 两步法),由经验丰富的病理科医生在 100 倍、400 倍光学显微镜下观察肝组织细胞发育、肝纤维化程度。免疫组化阳性标准^[5]:(1)定性分析,根据染色强度分为无棕黄色(阴性)、淡棕黄色(弱阳性)、棕黄色(阳性)、棕褐色(强阳性)。(2)半定量分析,根据肝组织切片内阳性细胞总光密度值/阳性细胞所占面积求得平均光密度值(AOD)。每张切片内读取任意 5 张视野,用同一计算机成像系统读取相同倍数显微镜下图片,图像分析软件 IPP 6.0 分析每张图片,计算 TGF- β 1、Smad2 蛋白的 AOD。

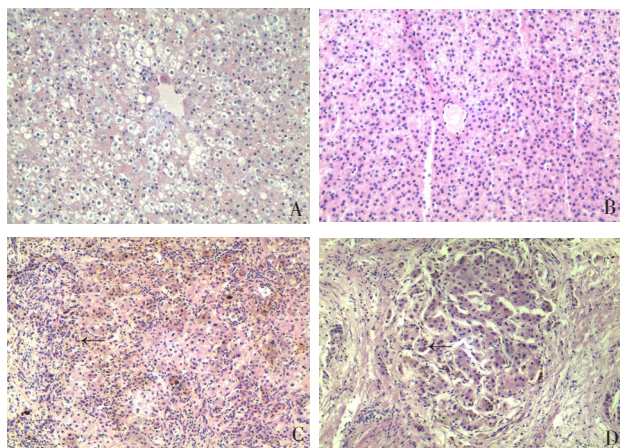
1.3.3 qRT-PCR 取肝组织按照 TRIzol 法研磨提取总 RNA,经反转录后合成 cDNA。PCR 反应体系为 20 μ L,包括 10 μ L 2 $\times$ SuperReal PreMix,上、下游引物各 0.5 μ L,cDNA 模板 1 μ L,无酶水补足到 20 μ L。95℃预变性 15 min,95℃变性 10 s,58℃退火 20 s,72℃延伸 20 s,扩增 40 个循环。分别测定样本内参(GAPDH)、TGF- β 1、Smad2 基因扩增的 Ct 值,重复 3 次,取 3 次结果平均值为最终 Ct 值; Δ Ct=每个基因 Ct 值-内参 Ct;样本基因相对定量=2^{- Δ Ct}。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件包分析,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,多重比较用 Bonferroni 法;非正态分布的计量资料用中位数及四分位数间距[M(Q)]表示,组间比较使用 Kruskal-Wallis H 检验,多重比较用 Bonferroni 法进行显著性水平校正。相关性分析进行 Spearman 秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肝纤维化程度 正常对照组肝组织内细胞胞质清亮、排列紧密,纤维细胞少见,无纤维组织增生。胆扩组肝内细胞胞质微着色,门管区少许纤维组织增粗。早期肝纤维化组肝内细胞变性,胞质着色较重,炎细胞、纤维细胞大量增生,纤维组织大量增粗、桥接纤维化。晚期肝硬化组 HE 染色见肝内细胞坏死、再生,假小叶明显,见图 1。

2.2 肝内 TGF- β 1、Smad2 蛋白表达水平比较 免疫组化染色结果显示 TGF- β 1 蛋白在早期肝纤维化组表达高于其他 3 组($P < 0.05$),4 组 Smad2 蛋白半定量结果比较差异无统计学意义,见表 3。



A: 正常对照组; B: 胆扩组; C: 早期肝纤维化组; D: 晚期肝硬化组; 箭头所指为纤维组织

Fig.1 Comparison of hepatic fibrosis between four groups

图1 各组肝纤维化程度比较(HE, ×100)

Tab. 3 The IHC result showing expressions of TGF-β1 and Smad2 in different groups

表3 各组肝组织 TGF-β1、Smad2 免疫组化染色结果

组别	n	TGF-β1			
		阴性	弱阳性	阳性	AOD
正常对照组	5	4	1	0	0.03±0.02
胆扩组	10	0	8	2	0.05±0.02 ^a
早期肝纤维化组	19	0	0	19	0.07±0.02 ^{ab}
晚期肝硬化组	11	0	0	11	0.04±0.03 ^c
<i>F</i>					6.438*

组别	n	Smad2			
		阴性	弱阳性	阳性	AOD
正常对照组	5	2	0	3	0.03±0.02
胆扩组	10	0	1	9	0.05±0.03
早期肝纤维化组	19	0	0	19	0.05±0.03
晚期肝硬化组	11	0	0	11	0.04±0.01
<i>F</i>					1.975

* $P < 0.05$; ^a与正常对照组比较, ^b与胆扩组比较, ^c与早期肝纤维化组比较, $P < 0.05$

2.3 肝内 TGF-β1、Smad2 mRNA 表达水平比较 早期肝纤维化组 TGF-β1、Smad2 mRNA 相对表达水平高于胆扩组和晚期肝硬化组 ($P < 0.017$), 见表 4。早期肝纤维化组 TGF-β1、Smad2 mRNA 相对表达水平呈正相关($r_s=0.71, P < 0.05$)。

3 讨论

BA 患儿常因肝内各级胆管增生、梗阻伴随进行性肝纤维化最终形成肝硬化而危及生命, Kasai 手术可以解决肝门部胆管暂时性通畅, 但是无法终止肝脏纤维化^[6]。国外研究认为 TGF-β1 促纤维化通路是促进 BA 肝纤维化进展的重要因素, TGF-β1、

Tab. 4 Comparison of expression levels of TGF-β1 mRNA and Smad2 mRNA between three groups

表4 各组 TGF-β1、Smad2 mRNA 相对含量比较

组别	n	TGF-β1 mRNA	Smad2 mRNA
胆扩组	10	0.00(0.01)	6.00(6.01)
早期肝纤维化组	19	0.01(0.04) ^a	31.55(66.06) ^a
晚期肝硬化组	11	0.00(0.001) ^b	5.99(6.17) ^b
<i>H</i>		9.84*	16.63*

* $P < 0.05$; ^a与胆扩组比较, ^b与早期肝纤维化组比较, $P < 0.017$

Smad2 是促纤维化通路蛋白, 在 BA 肝纤维化进展中起到一定的作用, 但其作用机制尚不十分清晰^[7]。本研究通过检测 TGF-β1、Smad2 在 BA 肝内表达情况, 探讨其与 BA 肝纤维化进展的关系。

3.1 TGF-β1、Smad2 促进 BA 早期肝纤维化 本研究 HE 镜下可见 BA 早期肝纤维化组肝内门管区扩大、纤维组织增生形成纤维间隔, 纤维化逐渐加重至 P-P、P-C 型桥接纤维化, 同时早期肝纤维化组 TGF-β1 mRNA 表达水平高于胆扩组和晚期肝硬化组, 高表达的 TGF-β1 mRNA 促进 TGF-β1 蛋白的产生与分泌, 导致 TGF-β1 蛋白表达明显升高, Smad2 mRNA 同样在早期肝纤维化组含量最高, 与 TGF-β1 mRNA 有较高相关性, 然而 Smad2 蛋白表达水平在各组间无明显差异。Gaarenstroom 等^[8-10]研究认为 Smad2 蛋白以单体形式存在于细胞质中, 在 TGF-β1 蛋白激活下发生磷酸化, 磷酸化的 Smad2 形成特定络合物向细胞核移动, 在细胞核内启动细胞外基质(ECM)蛋白等相关基因转录、调节促纤维化基因转录速度, 继而磷酸化的 Smad2 发生去磷酸化作用返回细胞质, 在胞质与胞核之间穿梭传递促纤维化信号, 最终促进细胞外基质蛋白生成, 激活肝星形细胞、活化肌成纤维化细胞, 从而促进肝纤维化。BA 肝内伴随 TGF-β1 蛋白增多, Smad2 蛋白在胞质与胞核之间“磷酸化与非磷酸化”循环效率升高导致转录速度的加快, 可能是 Smad2 蛋白促纤维化的方式。Vrljicak 等^[11]研究 TGF-β1/Smads 在肾纤维化中作用时发现, 肾小球内 Smad2 蛋白表达情况与其 mRNA 含量不一致, Smad2 mRNA 表型特征影响 Smad2 mRNA 翻译为 Smad2 蛋白。这可能也是 BA 肝内 Smad2 mRNA 高表达而 Smad2 蛋白无明显增高现象的一个原因, 需要进一步研究。在 BA 肝纤维化早期, TGF-β1、Smad2 mRNA 共同升高, 升高的 TGF-β1 mRNA 调控 TGF-β1 蛋白含量增多, TGF-β1 蛋白加快 Smad2 蛋白磷酸化从而加快促纤维化信号传递, 促进 ECM 等生成从而加重 BA 肝纤维化。

3.2 TGF- β 1、Smad2 在 BA 晚期肝硬化时表达减弱 本研究 HE 镜下可见 BA 晚期肝硬化时假小叶遍布、肝细胞不断增生,而肝内 TGF- β 1 蛋白平均光密度值及其 mRNA 含量不断下降,这表明 BA 肝硬化期 TGF- β 1 mRNA 的转录受到抑制,其含量减少、促纤维化作用减弱。Smad2 蛋白含量在肝纤维化进程中无变化,在晚期肝硬化时期伴随 TGF- β 1 蛋白减少其磷酸化速率减慢、促纤维化作用减弱。宋亭亭等^[4]认为 BA 患儿肝硬化时期由于肝内纤维组织增生、血运紊乱等导致 TGF- β 1 蛋白大量减少,与本研究结果相符。

综上所述,TGF- β 1、Smad2 协同促进 BA 早期肝纤维化至 P-P、P-C 型桥接结构形成;到了晚期肝硬化时 TGF- β 1、Smad2 mRNA 表达减少导致 TGF- β 1 蛋白表达减弱,两者促纤维化作用减轻。同时,本研究推测 Smad2 蛋白通过“磷酸化-去磷酸化”循环效率影响 BA 肝内 TGF- β 1 通路的促纤维化作用,这需要建立 BA 小鼠模型进行体外抑制实验验证,干扰 Smad2 磷酸化过程可能在 BA 肝纤维化早期阻断 TGF- β 1 促纤维化通路,从而终止肝纤维化进程。

参考文献

- [1] Salzedas-Netto AA, Chinen E, de Oliveira DF, et al. Grade IV fibrosis interferes in biliary drainage after kasai procedure[J]. Transplant Proc, 2014, 46(6): 1781-1783. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.05.045.
- [2] Zhan JH, Chen YJ. How to evaluate the diagnosis and management of biliary atresia in the era of liver transplantation[J]. Chin J Pediatr Surg, 2014, 35(4): 245-247. [詹江华,陈亚军. 肝移植时代如何看待胆道闭锁的诊治[J]. 中华小儿外科杂志, 2014, 35(4): 245-247]. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2014.04.003.
- [3] Iordanskaia T, Hubal MJ, Koeck E, et al. Dysregulation of upstream and downstream transforming growth factor- β transcripts in livers of children with biliary atresia and fibrogenic gene signatures[J]. J Pediatr Surg, 2013, 48(10): 2047-2053. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.03.047.
- [4] Song TT, Zhan JH, Gao W, et al. Expression of CD14, CD34 and transforming growth factor- β 1 in the liver biopsy of biliary atresia[J]. Chin J Pediatr Surg, 2015, 36(1): 24-28. [宋亭亭,詹江华,高伟,等. 胆道闭锁肝组织 CD14、CD34、TGF- β 1 表达研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2015, 36(1): 24-28]. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2015.01.015.
- [5] Jiang Y, Jin XM, Tu K. A primary study using the method of average positive stained area percentage to measure the immunohistochemistry results[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2007, 24(3): 650-653. [姜洋,金小明,屠康. 平均阳性染色面积百分比法分析免疫组化结果初探[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(3): 650-653]. doi: 10.3321/j.issn:1001-5515.2007.03.039.
- [6] Zhan JH. The early screening and counter measures of biliary atresia[J]. Tianjin Med J, 2015, 43(1): 1-3. [詹江华. 胆道闭锁早期筛查现状及对策[J]. 天津医药, 2015, 43(1): 1-3]. doi: 10.3969/j.issn:0253-9896.2015.01.001.
- [7] Kamato D, Burch ML, Piva TJ, et al. Transforming growth factor- β signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation[J]. Cell Signa, 2013, 25(10): 2017-2024. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.06.001.
- [8] Gaarenstroom T, Hill CS. TGF- β signaling to chromatin: how Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 32(1): 107-118. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.01.009.
- [9] Lee JH, Lee H, Joung YK, et al. The use of low molecular weight heparin-pluronic nanogels to impede liver fibrosis by inhibition the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Biomaterials, 2011, 32(5): 1438-1445. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.023.
- [10] Iordanskaia T, Koeck E, Rossi C, et al. Integrin β -8, But Not β -5 or -6, protein expression is increased in livers of children with biliary atresia[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2014, 59(6): 679-683. doi: 10.1097/MPG.0000000000000518.
- [11] Vrljicak P, Myburgh D, Ryan AK, et al. Smad expression during kidney development[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(4): 625-633. (2015-10-19 收稿 2016-01-18 修回)
(本文编辑 李国琪)