

瘦素和转化生长因子 β_1 在大鼠肝纤维化过程中的作用

宋维芳¹, 徐军全¹, 马丽英², 连小娟², 王明亮¹, 郭明清²

(1. 山西医科大学汾阳学院病理生理学教研室, 汾阳 032200; 2. 山西省汾阳医院感染科肝病区, 汾阳 032200)

【摘要】 目的 探讨瘦素和转化生长因子 β_1 (transforming growth β_1 , TGF- β_1) 在肝纤维化发生、发展过程中的作用。方法 雌性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组和纤维化模型 1 周组、2 周组、4 周组、6 周组。纤维化模型各组以 CCl₄ 造成化学性肝损伤。常规 HE 染色观察肝脏病变; 检测血浆和肝组织瘦素及 TGF- β_1 水平; 天狼猩红胶原染色和肝组织羟脯氨酸 (Hyp) 含量测定观察肝纤维化程度, 并对肝组织瘦素水平、TGF- β_1 水平及肝纤维化指数 (FI) 进行相关性分析; 赖氏法测定血浆丙氨酸氨基转移酶 (ALT)。结果 与正常对照组比较, 纤维化模型各组血清和肝组织瘦素和 TGF- β_1 水平显著升高 ($P < 0.05$), 且纤维化模型各组肝组织瘦素水平、TGF- β_1 水平及 FI 之间两两均呈显著正相关。结论 肝组织瘦素在肝纤维化发病过程中具有独立的致病作用, 并可能通过激活 TGF- β_1 通路导致肝纤维化的形成。

【关键词】 瘦素; 转化生长因子 β_1 ; 肝纤维化

【中图分类号】 R363; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)07-0055-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.012

Effect of Leptin and Transforming Growth β_1 during Experimental Hepatic Fibrosis

SONG Wei-fang¹, XU Jun-quan¹, MA li-ying², LIAN Xiao-juan², WANG Ming-liang¹, GUO Ming-qing²

(1. Dep of Pathophysiology, Fengyang College of Shanxi Medical University, Fengyang 032200, China;

2. Dep Of Infection Disease, Fengyang Hospital of Shanxi Province, Fengyang 032200, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of leptin and transforming growth β_1 in fibrosis liver. **Methods** The female Wistar rats were randomly divided into normal control group and four model groups (1 week, 2 week, 4 week, 6 week). Carboan tetrachloride was injected for establishing hepatic fibrosis model in model groups. The levels of leptin and transforming growth β_1 were determined. The pathological hepatic changes were observed by HE. The degree of liver fibrosis was observed by stained of sirius red of collagen and the content of hydroxyproline in liver tissues, and the relationship with leptin and transforming growth β_1 and FI were analyzed. The ALT of serum was mensurated with laishi method. **Results** Compared with control group, the expression of leptin and transforming growth β_1 increased significantly in liver fibrosis group ($P < 0.05$). The expression of leptin and transforming growth β_1 in liver tissue were correlated positively with FI in liver fibrosis group. **Conclusions** The results of the study demonstrate increased leptin and transforming growth β_1 levels of liver tissue in liver fibrosis model groups, and activating leptin may up-regulate the expression of transforming growth β_1 during experimental hepatic fibrosis.

【Key words】 Leptin; Transforming growth β_1 ; Hepatic fibrosis

肝纤维化是一种损伤愈合反应,是慢性肝病发展成为肝硬化的必经过程,是多种因素参与的、复

杂的、并且在一定程度上可逆的病理过程。瘦素是由 *ob* 基因编码的蛋白类激素,对机体能量代谢的调节具有重要的作用。近年来的研究发现瘦素与肥胖、氧化应激和脂质代谢异常有关^[1]。最新的研究显示活化的星状细胞瘦素 mRNA 表达和蛋白质合成均增加^[2],提示瘦素可能与肝纤维化有关,而转化生长因子 β_1 (transforming growth β_1 , TGF- β_1) 是目前已知的最强的促纤维化因子之一,其在肝纤维化过程中主要的作用是促进细胞外基质的合成并抑制其降解,也有间接促星状细胞增殖活化作用^[3]。为了进一步明确肝组织瘦素和 TGF- β_1 在肝纤维化发生、发展过程中的作用,我们设计了本研究。

1 材料和方法

1.1 动物及材料

健康清洁级雌性 Wistar 大鼠,体重(220 ± 20) g,购自山西医科大学实验动物中心 [SCXK(晋)2010-0001]。四氯化碳为中国中邦化工分析纯;瘦素放射免疫测定试剂盒购于美国 Linco 公司;TGF- β_1 ELISA 试剂盒购于晶美生物工程有限公司;天狼猩红和羟脯氨酸标准品购于美国 Sigma 公司。

1.2 动物的分组及处理措施

44 只雌性 Wistar 大鼠,常规在控光鼠房中分笼普食普水饲养,温度 18℃ ~ 25℃,湿度 45%,1 周后,确定所用实验大鼠健康后,开始实验。将 44 只大鼠随机分为 5 组,正常对照组、模型组 1 周、模型组 2 周、模型组 4 周、模型组 6 周。正常对照组给予皮下注射生理盐水,每周 2 次(周一和周五注射),其余各组给予首剂 5 mL/kg 体重 CCl₄ 分析纯,之后按 3 mL/kg 体重皮下注射 40% CCl₄ 植物油(V/V)混合液,时间和次数与正常对照组同步,各组动物按实验设计分别于给药后 1 周、2 周、4 周和 6 周末模型形成后(正常对照组每次至少相应处理 3 只大鼠),在乙醚麻醉,无菌无热源条件下,从大鼠腹主动脉采血,注入加有肝素(15 U/mL)的无热源玻璃

试管中,4℃ 离心 20 min(3000 r/min),吸出血浆置于玻璃试管中封口,于-80℃ 低温保存。取肝左叶一部分立即固定于 4% 多聚甲醛,24 h 内石蜡包埋,5 μ m 切片;一部分于-80℃ 低温保存。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 肝纤维化程度的判定 常规 HE 染色和天狼猩红胶原染色、显微镜观察并摄像和李文才等^[4]报道的方法测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量以判定肝纤维化的程度。胶原纤维呈红色,运用 Image-pro plus5.0 图象分析软件半定量计数肝组织胶原面积,每组织随机取 5 个视野,通过比较各组肝组织的纤维化指数(FI)值评价肝纤维化程度^[5]。FI = 纤维染色区面积/整个视野面积 × 100%。

1.3.2 赖氏法测定血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)。

1.3.3 放射免疫法测定肝组织和血浆瘦素水平。

1.3.4 双抗夹心酶联免疫吸附实验(ELISA)法测定肝组织组织和血浆 TGF- β_1 含量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件分析,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析, *q* 检验进行两两比较, spearman 相关分析。

2 结果

2.1 一般情况及造模效果

实验过程,正常对照组大鼠健康状态良好,体重增加(100 ± 30) g,肝脏表面光滑,色泽红润;模型组大鼠实验前期出现烦躁、易激惹,约 1 周后趋于平静,随着给 CCl₄ 时间延长活动慢慢减少,精神萎靡,毛发杂乱无光,食量减少,体重明显下降,肝脏表面欠光滑,色泽灰暗,体积变大,边缘圆钝。模型组病理切片观察有较多纤维形成(彩插 3 图 1B、D);从 2 周起模型组肝组织 Hyp 含量开始显著升高,后呈递增趋势,6 周时达最高(表 1),提示肝纤维化模型形成。

表 1 各组大鼠血浆 ALT、肝组织 Hyp 和 FI 的变化
Tab. 1 Changes of plasma ALT, liver Hyp, FI in each group

组别 Group	N	丙氨酸氨基转移酶 ALT(U/L)	羟脯氨酸 Hyp(mg/g)	纤维化指数 FI(%)
对照组 Control group	12	28.90 ± 7.32	0.18 ± 0.06	0.25 ± 0.16
模型组 Model group				
1 周 1 week	7	120.29 ± 10.52*	0.29 ± 0.05*	0.37 ± 0.24
2 周 2 week	8	182.17 ± 8.80*	0.33 ± 0.04*	0.41 ± 0.18
4 周 4 week	8	164.31 ± 9.83**	0.40 ± 0.05*	0.47 ± 0.18
6 周 6 week	8	147.10 ± 8.90**	0.53 ± 0.07*	2.17 ± 0.25*

注: * $P < 0.05$ 与对照组比较; # $P < 0.05$ 与 2 周组比较

Note: * $P < 0.05$ compared with normal control group; # $P < 0.05$ compared with 2 weeks

表 2 血浆和肝组织瘦素、TGF- β_1 的变化
 Tab. 2 Changes of leptin and TGF- β_1 in plasma and liver homogenate

组别 Group	N	血浆瘦素 Plasma leptin ($\mu\text{g/L}$)	肝组织瘦素 Liver leptin ($\mu\text{g/L}$)	血浆 TGF- β_1 Plasma TGF- β_1 ($\mu\text{g/L}$)	肝组织 TGF- β_1 Liver TGF- β_1 ($\mu\text{g/L}$)
对照组 Control group	12	1.80 \pm 0.32	30.71 \pm 3.55	6.54 \pm 0.60	58.33 \pm 2.11
模型组 Model group					
1 周 1 week	7	2.50 \pm 0.19*	63.03 \pm 2.98*	6.64 \pm 0.44	59.87 \pm 0.93
2 周 2 week	8	3.79 \pm 0.66*	100.20 \pm 2.04*	7.12 \pm 0.19	69.50 \pm 1.17
4 周 4 week	8	5.30 \pm 0.41*	165.88 \pm 9.37*	31.10 \pm 8.14*	123.76 \pm 27.29*
6 周 6 week	8	6.54 \pm 0.41*	210.75 \pm 6.85*	61.95 \pm 2.54*	239.30 \pm 32.06*

注: * $P < 0.05$ 与正常对照组比较

Note: * $P < 0.05$ compared with normal control group

2.2 肝组织病理学变化

HE 和胶原染色显示: 光镜下正常对照组大鼠肝细胞核多为单个, 以中央静脉为中心呈放射状排列, 小叶结构正常, 肝细胞索排列规则有序, 未见变性坏死, 肝窦与汇管区有少量胶原纤维(彩插 3 图 1A、C); 模型组从 1 周末就有肝细胞出现脂肪变性, 2 周可现肝细胞脂肪变性加重, 有轻度的坏死及纤维结缔组织增生, 4 周末表现为坏死区及汇管区纤维结缔组织增生较明显并成细小条索, 6 周末可见汇管区有大量炎症细胞浸润, 纤维增生明显加重, 呈星芒状向肝小叶内延伸, 有假小叶形成(彩插 3 图 1B、D)。Image-proplus 5.0 图像分析结果: FI 变化显示模型组 6 周时肝组织中胶原纤维含量比正常对照组明显增多($P < 0.05$) (如表 1)。

2.3 血浆 ALT 和肝组织 Hyp 含量变化

从第 1 周末起模型组 ALT 和 Hyp 含量比正常对照组有显著升高, 模型组 ALT 第 2 周末达高峰, 第 4 至 6 周又逐渐回降(与 2 周组比较($P < 0.05$), 但与正常对照组相比仍显著升高($P < 0.05$) (表 1); Hyp 则呈逐渐升高的趋势(表 1)。

2.4 血浆和肝组织瘦素、TGF- β_1 的变化

模型组各时期血浆和肝组织瘦素均高于正常对照组, 且随着 CCl_4 作用时间的延长呈梯度上升(表 2), 与正常对照组比较, 模型组血浆和肝组织 TGF- β_1 含量从 4 周开始显著升高, 6 周达最高(表 2)。

2.5 相关性分析

肝纤维化过程中: 肝组织瘦素含量与 TGF- β_1 含量呈显著正相关关系($r = 0.887, P < 0.01$); 肝组织瘦素含量与 FI 呈显著正相关关系($r = 0.754, P < 0.01$); 肝组织 TGF- β_1 含量与 FI 呈显著正相关关系($r = 0.899, P < 0.01$)。

3 讨论

肝纤维化是大多数慢性肝病共有的病理过程, 是继慢性损伤后肝组织修复过程中的代偿反应, 是慢性肝病发展为肝硬化的必经病理过程, 目前认为其发病机制是由于各种原因, 使肝细胞外基质(ECM)的沉积和降解的动态平衡打破而造成肝脏基质成分改变和数量的增加, 其在一定程度上是一个可逆的过程。研究发现各种慢性损害因素引起肝损伤的病理过程中, 损害因素可直接或间接介导免疫病理损伤, 从而导致肝星状细胞、肝窦内皮细胞、枯否细胞以及纤维化附近的炎症细胞等分泌大量的 TGF- β_1 , 同时 TGF- β_1 又可活化星状细胞, 进一步促进 ECM 成分的合成, 同时抑制 ECM 的分解, 导致 ECM 的大量沉积, 从而引发肝纤维化的形成^[6-7]。也有报道 TGF- β_1 在肝纤维化过程中可活化肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC), 还可促进胶原基因的表达, 从而促进细胞外基质的合成与沉积, 是肝纤维化过程中最重的始动因子之一, TGF- β_1 作用涉及面广, 具有双向作用, 即其正常表达时可抑制炎症反应、抑制细胞增殖, 异常表达时可诱导细胞增殖、纤维蛋白的形成, 从而促进纤维化的发生和发展^[8]。

瘦素是由 ob 基因编码的蛋白类激素, 由 167 个氨基酸残基组成, 分子量为 16×10^3 ^[9], 通常认为瘦素主要是由脂肪细胞表达, 但近年来的研究发现胎盘、肝脏组织和胃组织内可产生瘦素, 且瘦素的表达与肝纤维化有着密不可分的关系^[10], 也有研究发现, 肝硬化患者血清瘦素水平明显高于慢性肝炎组, 但令研究者困惑的是, 该两组患者瘦素水平却均低于正常对照组, 并发现女性患者的血清瘦素水平明显高于男性, 也有研究发现血清瘦素水平无论男女, 均与身体脂肪百分比(BFP)及身体脂肪量

(BFM) 有显著相关性,由此可见影响血清瘦素水平的因素更多是非肝脏来源的,故肝纤维化瘦素血清学研究存在很大的障碍和局限性。最近有研究者发现肝组织在纤维化病程中有大量瘦素表达,由此提示肝组织原位瘦素与肝纤维关系可能更为直接,故我们通过动态观察肝纤维化过程中肝组织瘦素、TGF- β_1 和 Hyp 含量变化的同时辅以血浆相应指标的对照研究,并对肝组织瘦素、TGF- β_1 和肝纤维化指数(FI)进行了相关性分析。

在我们的实验中,首先 HE 和胶原染色显示模型组有较多纤维形成,证明造模成功;其次我们发现,在肝纤维化过程中血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)从模型组 1 周开始显著升高,第 2 周达最高,后又回降,提示化学因素 CCl₄ 在导致肝纤维化的同时,可损伤肝功能,且在首次受到打击时,可对肝功能形成强烈的应激性损害,后随着机体的调节,可逐渐适应慢性损害,从而显示出肝功能回降的趋势;实验结果显示在肝纤维化过程中肝组织 Hyp 含量呈递增趋势,表明在肝损害过程中肝脏的纤维化修复一旦激活,将会持续进行,直至发生肝损伤的不可逆病变—肝硬化病理过程;最后我们在研究的过程中,为了排除其它因互对瘦素和 TGF- β_1 的影响,直接对模型组各时期肝组织瘦素表达和 TGF- β_1 水平以及 FI 进行了相关性分析,发现瘦素表达和 TGF- β_1 水平以及 FI 两两成显著正相关,另不论血浆还是肝组织,瘦素均先于 TGF- β_1 表达升高,由此我们初步推断,肝组织原位瘦素水平的是肝纤维化发生发展过程的一个重要始动环节,并且肝组织原位瘦素水平的升高可能是通过上调 TGF- β_1 表达,从而促进肝纤维化的发生和发展。

然而,瘦素在肝纤维化发生、发展过程中的作用有多大,是肝纤维化发生、发展的关键因素,还是一种辅助因素,目前仍然不清,我们今后的实验将进一步研究;还有肝组织原位瘦素在人类慢性肝损

伤过程中的作用机制如何,也是我们今后研究的目标。

参考文献:

- [1] Berthou F, Rouch C, Gertler A, et al. Chronic central leptin infusion differently modulates brain and liver insulin signaling [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 337(1-2): 89-95.
- [2] 卢建华, 刘勇钢, 郎振为, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织瘦素的表达 [J]. *中华传染病杂志* 2007, 25: 177-178.
- [3] Kanzler S, Lohse AW, Keil A, et al. TGF- β 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(4): 1059-1068.
- [4] 李文才, 张锦生, 李华, 等. 肝组织羟脯氨酸含量测定方法的优化 [J]. *上海医科大学学报* 2000, 27(4): 295-297.
- [5] Tanano H, Hasegawa T, Kimura T, et al. Proposal of fibrosis index using image analyzer as a quantitative histological evaluation of liver fibrosis in biliary atresia [J]. *Pediatr Surg Int*, 2003, 19(1-2): 52-56.
- [6] Kothary PC, Badhwar J, Weng C, et al. Impaired Intracellular Signaling May Allow Up-Regulation of CTGF-Synthesis and Secondary Peri-Retinal Fibrosis in Human Retinal Pigment Epithelial Cells from Patients with Age-Related Macular Degeneration [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 664: 419-428.
- [7] Sobrevalls L, Rodriguez C, Romero-Trejejo JL, et al. Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats [J]. *Hepatology* 2010, 51(3): 912-921.
- [8] Ruddell RG, Hoang-Le D, Barwood JM, et al. Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C zeta/nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells [J]. *Hepatology* 2009, 49(3): 887-900.
- [9] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372: 425-432.
- [10] 卢建华, 刘勇钢, 郎振为, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织瘦素的表达 [J]. *中华传染病杂志* 2007, 25: 177-178.

(修回日期) 2011-05-05

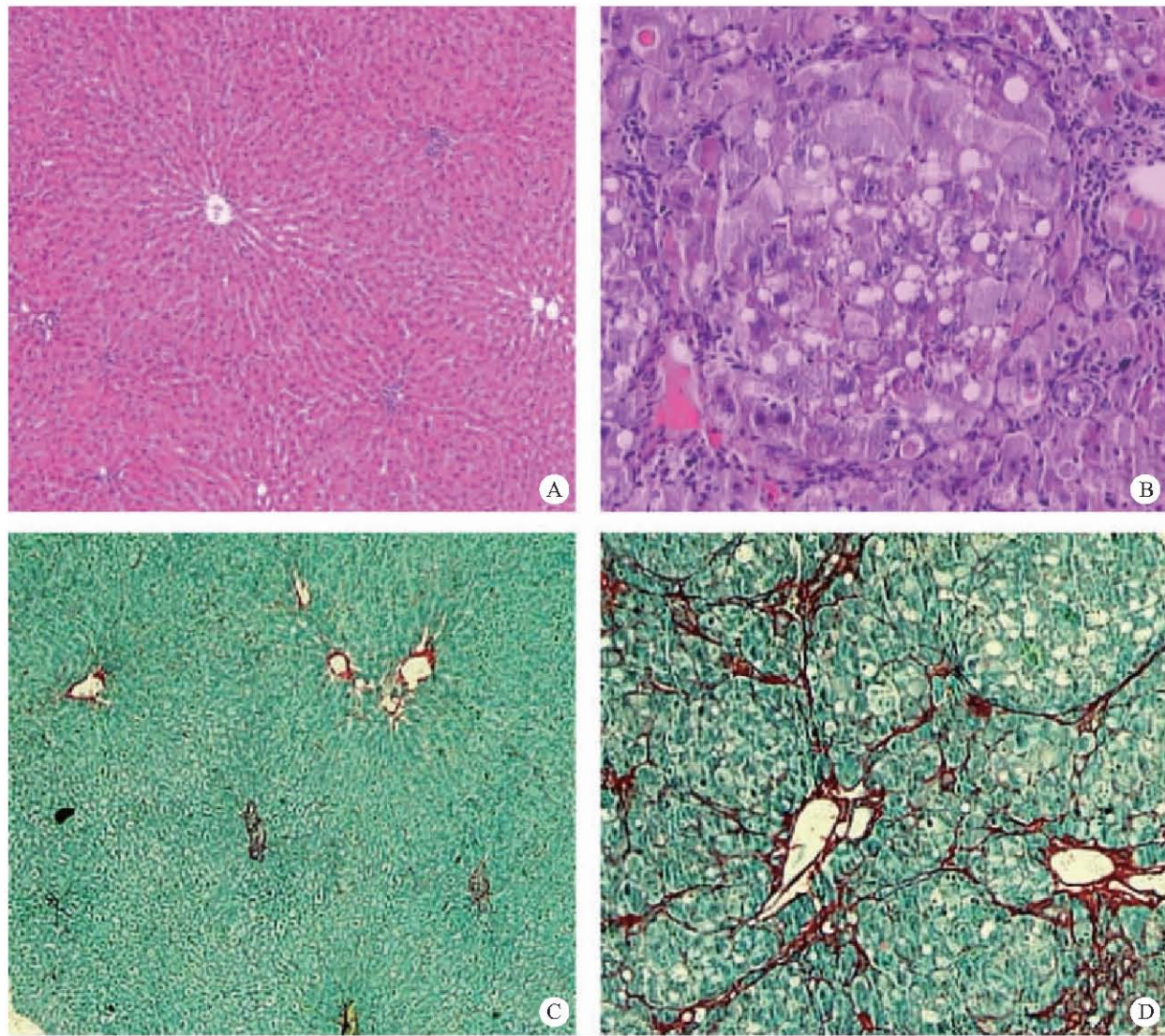


图 1 6 周末肝脏组织学改变(A、B HE; C、D 胶原染色)

Fig. 1 Histological changes of liver at end of week 6 (A,B HE; C,D sirius red of collagen staining)

注: A 和 C 正常对照组, 肝小叶结构未见异常, 中央静脉和汇管区有少量胶原纤维; B 和 D 模型组, 肝小叶结构破坏, 汇管区有大量炎症细胞浸润, 胶原纤维明显增多

Note: A and C: Normal control group, hepatic lobule structure was normal, a small amount of collagen fibers could be seen next to portal septa and central veins; B and D: Model group: hepatic lobule structure was destroyed, a large number of inflammatory cells could be seen next to portal septa, collagen fibers increased significantly