

HBV 对肝内 TGF- β_1 蛋白表达和人肝星状细胞系 LX-2 活性的影响

张香梅 乐晓华 徐六妹 苟继周 张明霞 王敏 唐奇远 刘赛云 何清

【摘要】 目的 探讨 HBV 对肝内 TGF- β_1 蛋白表达及人肝星状细胞系 LX-2 细胞活性的影响。**方法** 运用免疫组织化学方法检测对照组(HBV 阴性)和慢性乙型肝炎组肝组织内 TGF- β_1 的表达;采用细胞培养、Western blot、MTT 和 Transwell 实验体外观察 HBV 对 LX-2 细胞形态及活性的影响。**结果** 慢性乙型肝炎组肝组织内 TGF- β_1 的表达水平显著高于对照组($t = 4.2268, P = 0.000$);在慢性乙型肝炎组, TGF- β_1 在肝纤维化处于 S₁ ~ S₂ 期的肝组织内表达较高, 与肝纤维化 S₃ ~ S₄ 期肝组织内的表达比较差异具有显著性($t = 6.9107, P = 0.000$)。HBV 可引起 LX-2 细胞的形态学改变, 并增加其增殖和运动迁移能力。**结论** HBV 主要在慢性乙型肝炎肝纤维化形成的早期阶段发挥作用。HBV 感染可引起肝组织内 TGF- β_1 蛋白表达增加和人肝星状细胞系 LX-2 的形态改变和活性增强。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 转化生长因子 β_1 ; 肝星状细胞系 LX-2; 肝炎, 乙型, 慢性; 肝纤维化

HBV influences the expression of intrahepatic transforming growth factor beta 1 and the activity of human hepatic stellate cell line LX-2 ZHANG Xiang-mei, LE Xiao-hua, XU Liu-mei, GOU Ji-zhou, ZHANG Min-xia, WANG Min, TANG Qi-yuan, LIU Sai-yun, HE Qing. The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518112, China

Corresponding author: HE Qing, Email: heqingjoe@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of HBV on the expression of intrahepatic TGF- β_1 and the activity of human hepatic stellate cell line LX-2 cells. **Methods** The expression of intrahepatic TGF- β_1 in control group and CHB group were detected by immunohistochemical method. The influences of HBV on morphology and activity of LX-2 cells were observed by cell culture, Western blot, MTT and Transwell tests. **Results** There was significantly stronger expression of intrahepatic TGF- β_1 in patients with CHB than that in control group. In CHB group, the level of TGF- β_1 protein in liver tissues with fibrosis S₁-S₂ stages was significantly higher than that with fibrosis S₃-S₄ stages. HBV could change LX-2 cells' morphological and increase the abilities of proliferation and migration. **Conclusions** HBV plays an important role in early stage of fibrosis formation in patients with CHB. HBV infection may induce TGF- β_1 expression in hepatic tissues and change hepatic stellate cell line LX-2 cells' morphological and enhance the activity.

【Key words】 Hepatitis B virus; Transforming growth factor- β_1 ; Hepatic stellate cell line LX-2; Chronic hepatitis B; Hepatic fibrosis

在我国,乙型肝炎病毒具有较高的人群感染率,是肝纤维化病变的主要原因^[1],其形成机制一直是研究的热点。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 为 TGF- β 家族成员之一,是介导肝损伤及纤维化的主要细胞因子,在器官纤维化形成过程中扮演着重要角色^[2]。活化的肝星状细胞

(hepatic stellate cell, HSC) 是肝纤维化形成中的关键细胞,肝纤维化状态下其表型改变,且功能活性也发生变化^[3]。为此,本研究试图探讨 HBV 感染与肝内 TGF- β_1 表达及 HSC 活化的关系,现报道如下。

资料与方法

一、临床资料的收集

随机收集 2008 ~ 2010 年深圳市第三人民医院病理科收治的慢性乙型肝炎患者的肝组织活体石蜡包埋组织标本共 85 例,每例所选标本至少包括 3 ~ 6 个肝小叶结构,除了对以上肝组织进行 HBsAg 和 HBeAg 表达的免疫组化检测外,还聘请了两位经验

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.06.012

基金项目:深圳市科技计划项目(医疗卫生类)(No. 201003133)

作者单位:518112 深圳市,深圳市第三人民医院病理科(张香梅、乐晓华、苟继周),肝病二科(何清、唐奇远),肝病研究所(徐六妹、张明霞、王敏、刘赛云)

通讯作者:何清, Email: heqingjoe@163.com

丰富的病理医生参照 2000 年第 10 次全国肝病西安会议上通过的标准,再次对肝组织进行病理分级和分期。并根据肝组织纤维化程度将上述病例分为 4 组,其中 G_2S_1 患者 18 例, G_2S_2 患者 23 例, G_2S_3 患者 24 例, G_2S_4 患者 20 例;选择无 HBV 及其他病原体感染,无酒精肝、脂肪肝等病变的肝组织为对照组,共 10 例。体外细胞学实验所用 HBV 来自本院 1 例慢性乙型肝炎患者的血清,该血清的使用已得到患者本人知情同意和本院医学伦理部门的许可。血清 HBV DNA 定量值为 1.74×10^8 IU/ml。

2. 主要试剂:实验用兔抗人多克隆抗-TGF- β_1 购自 Santa Cruz 公司;兔抗人多克隆抗-SMA、PV-6000 免疫组织化学检测试剂盒等购自北京中杉金桥生物技术有限公司;MTT 试剂盒购自 Sigma 公司, Tress well 小室购自 Chemicon 公司;PVDF 膜和化学发光液均购自 Pierce 公司。

二、方法

1. 免疫组织化学法检测:TGF- β_1 在慢性乙型肝炎肝组织中的表达:采用免疫组织化学 PV-6000 法检测对照组和慢性乙型肝炎肝组织中 TGF- β_1 的表达(按照试剂盒操作说明书进行)。抗-TGF- β_1 工作浓度为 1:120。DAB 显色后,苏木精复染,中性树脂封固。PBS 液取代一抗作阴性对照。其染色结果参照文献^[4]中方法并加以修改,即以着色强度及阳性细胞数进行综合评分。着色强度:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分;阳性细胞数: $\leq 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分。两项得分相加为其总得分。 ≤ 2 分为阴性, $3 \sim 4$ 分为阳性, > 4 分为强阳性,强阳性判定为高表达。最终结果由两位病理医师采用双盲法观察每例切片得出。

2. HBV 对 LX-2 细胞形态影响的镜下观察:胰酶消化生长状态良好的 LX-2 细胞,调整细胞密度,以每孔 200 个细胞接种于 6 孔培养板。实验分为两组:对照组和 HBV 组。当细胞贴壁后(约 6~8 h)吸弃原培养液,对照组仅加入含 10% FCS-DMEM 培养基;HBV 组在上述培养基内添加 HBV,其 HBV 终浓度为 1.74×10^6 IU/ml。3~5 d 后于倒置显微镜下观察各组细胞的形态学变化。

3. Western blot 法测定各组 LX-2 细胞中 SMA 蛋白的含量:将 1×10^5 个/ml 浓度的 LX-2 细胞接种于 6 孔培养板,每孔 2 ml, 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后,实验分组方法及要求同上。继续培养 48 h 后收集各组 LX-2 细胞,用 RIPA 试剂裂解上述各组细胞,BCA 法测定蛋白质浓度后,将等量蛋白质

的全细胞裂解液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,再将分离出的蛋白电转到 PVDF 膜上。印迹膜在含 5% 奶粉的 TBST 缓冲液内室温封闭 1 h,加入兔抗人多克隆抗-SMA 后 4°C 过夜孵育,洗膜,加入 HRP 标记的抗兔二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 化学发光法检测,以 GAPDH 为内参照。

4. MTT 实验(四甲基偶氮唑盐实验):实验分组方法及要求同上。用含 10% FCS-DMEM 培养基调整上述各组细胞,以每孔约 5×10^3 个 LX-2 细胞接种于 96 孔板,每孔体积 200 μl ,同时设空白对照(仅加培养基)。培养约 36~48 h 后在每孔加 20 μl 5 mg/ml 的 MTT 继续培养 4 h,吸干上清,每孔加二甲基亚砷 150 μl ,酶标仪 492 nm 波长测定吸光度值(A),根据 $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}$ 判定细胞增殖能力。独立实验 2 次,每次每组取 5 个复孔,求平均值。

5. Transwell 小室检测 LX-2 细胞的运动迁移能力:实验分组同上。取生长状态良好的各组细胞,用 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/ml 的单细胞悬液。Transwell 小室下室加入 300 μl 的 10% FCS-DMEM 培养基,上室分别加每组细胞悬液各 200 μl , 5% CO_2 、 37°C 条件下培养 24 h 后取出小室,以苏木素复染,显微镜下计数迁移至滤膜外表面的细胞数,每张滤膜随机取 5 个视野,独立实验 2 次。

三、统计学处理

应用 Excel 软件建立数据库,采用 SAS 软件进行数据分析。完全随机设计的两样本均数比较进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、TGF- β_1 在慢性乙型肝炎肝组织中的表达

免疫组织化学检测结果显示,TGF- β_1 在正常肝组织中不表达或弱表达,而在慢性乙型肝炎肝组织中呈不同程度的黄色或棕黄色表达,主要表达于活化的肝星状细胞,汇管区、纤维间隔内的纤维母细胞及少数炎性细胞胞浆内,见图 1。本研究对 TGF- β_1 在肝组织中的表达评分进行统计学分析,结果显示 TGF- β_1 在 85 例慢性乙型肝炎患者肝组织中的表达评分均值为 3.1765 ± 1.4407 ,其在对照组肝组织中的表达评分均值为 1.2000 ± 0.9189 ,差异具有统计学意义($t = 4.2268, P = 0.000$)。慢性乙型肝炎肝纤维化不同病理分期标本中,肝纤维化 $S_1 \sim S_2$ 期肝组织中 TGF- β_1 的表达(4.0732 ± 1.3302)高于肝纤维化 $S_3 \sim S_4$ 期肝组织中的表达(2.3409 ± 0.9631),差异具有统计学意义($t = 6.9107, P = 0.000$)。

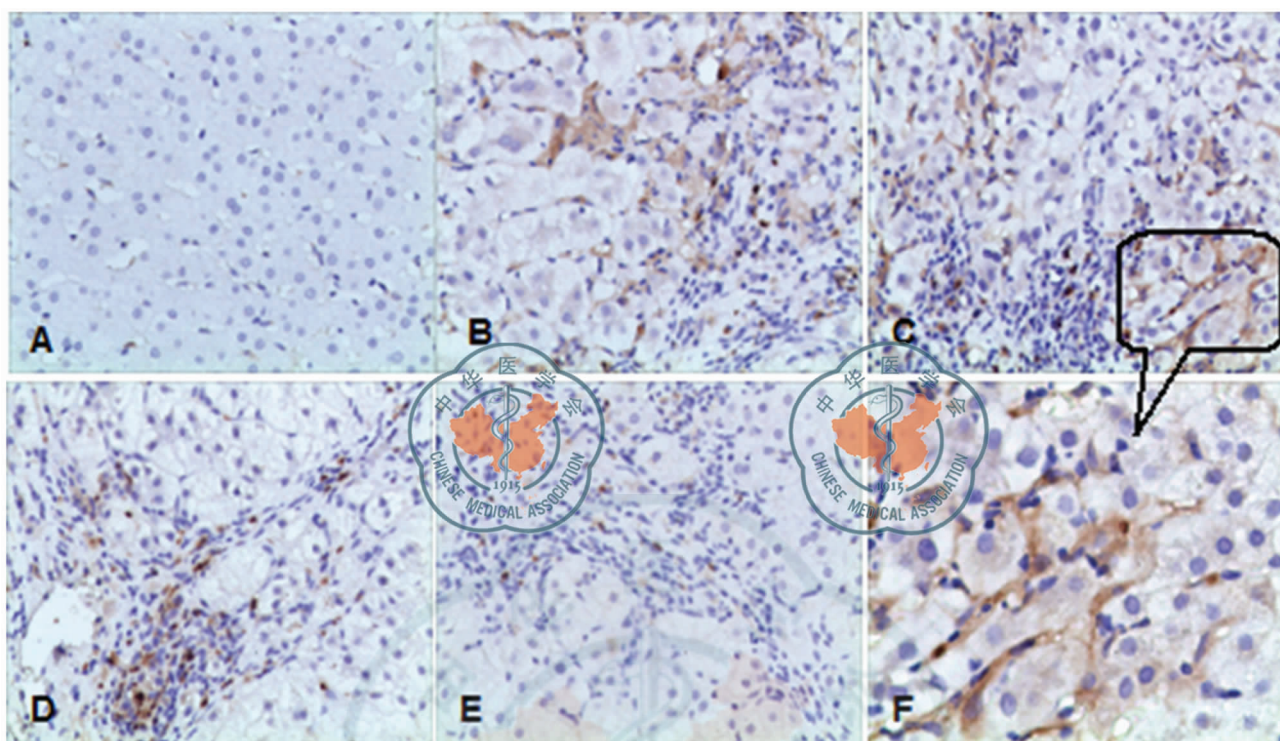


图 1 TGF- β 1 在对照组和慢性乙型肝炎组肝组织内的表达

注:免疫组织化学 PV-6000 法, $\times 200$; A:对照组, B:G2S1, C:G2S2, D:G2S3, E:G2S4, F:图 1C 的局部放大($\times 400$)

二、HBV 对 LX-2 细胞形态的影响

细胞培养第 7 天时,吸弃 6 孔板中的原培养液,用 D-Hanks 液洗涤 2 遍后加入新培养液于倒置显微镜下观察,发现无 HBV 刺激的 LX-2 细胞(Con 组)外形饱满,呈不规则形或星形,群聚性生长;而 HBV 刺激的 LX-2 细胞(HBV 组)外形大多呈短梭形或长梭形,细胞与细胞之间首尾相连,具有明显的极性,见图 2A。

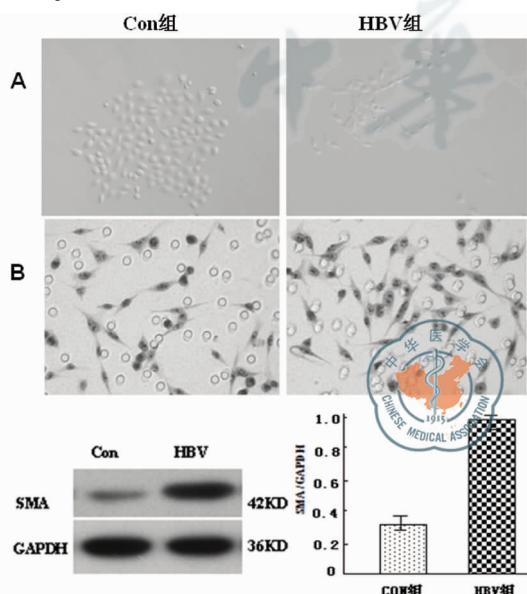


图 2 HBV 对 LX-2 细胞形态及功能的影响

三、HBV 对细胞运动迁移能力的影响

运用 Transwell 小室评价 HBV 对 LX-2 细胞运动和迁移能力的影响,研究发现在 Transwell 上室加入相同数量的两组 LX-2 细胞并培养 24 h 后,HBV (-) 组穿透的 LX-2 细胞平均数为 (29.8000 ± 1.5213) 个,少于 HBV (+) 组穿透的 LX-2 细胞平均数 (60.8000 ± 2.9081) 个,差异具有统计学意义 ($t = 36.5823, P = 0.0000$),见图 2B。

四、HBV 对 LX-2 细胞中 SMA 蛋白含量的影响

SMA 蛋白是 LX-2 细胞活化的标志。本研究运用 Western blot 方法检测各组 LX-2 细胞中 SMA 的表达,结果经灰度分析显示,HBV 组细胞中 SMA 蛋白含量较对照组显著增高 ($t = 35.4125, P = 0.0000$),表明 HBV 可使 LX-2 细胞的活性增强,见图 2C。

五、HBV 对 LX-2 细胞增殖能力的影响

用含 HBV (终浓度为 1.74×10^6 IU/ml) 的培养基培养 LX-2 细胞,2~3 d 后采用 MTT 法测定其增殖能力,结果显示对照组各孔测定的 A 均值为 0.2224 ± 0.0094 ,HBV 组各孔测定的 A 均值为 1.0584 ± 0.0044 ,差异具有统计学意义 ($t = 180.1122, P = 0.0000$)。

讨 论

慢性乙型病毒性肝炎在我国具有较高的发病

率,其中绝大多数患者有程度不同的肝纤维化表现。尽管不同病因可引起相似的肝纤维化和肝硬化病变,但在其致纤维化过程中所参与的细胞因子、细胞含量及活性改变却不完全相同,体现其不同的致纤维化机制^[5-6]。TGF- β_1 为 TGF- β 家族成员,是目前已知较强的致纤维化因子^[7-8]。本研究首先运用免疫组织化学方法检测 TGF- β_1 在肝组织中的表达,发现 TGF- β_1 在对照组肝组织中呈不表达或弱表达,而在慢性乙型肝炎肝组织中则较高表达,主要表达于肝 HSC 胞浆内。另外,在分析 TGF- β_1 表达与慢性乙型肝炎肝纤维化不同病理分期的关系时,为减少肝组织不同炎症程度对实验分析结果的影响,本研究入组的 85 例慢性乙型肝炎肝活检标本均具有相同的炎症病理分级(G₂ 期),通过对以上组织中 TGF- β_1 的表达评分进行统计学分析,结果表明,TGF- β_1 在肝纤维化形成早期的肝组织中表达水平高于在肝纤维化形成晚期的肝组织。提示 TGF- β_1 可能是 HBV 致肝纤维化形成过程中早期发挥作用的细胞因子,而且其作用的发挥与肝内 HSC 相关。

活化 HSC 为肝纤维化形成过程中发挥作用的主要细胞,平滑肌肌动蛋白(SMA)是其主要标志。正常情况下 HSC 处于静止状态。SMA 在儿童及幼年肝组织中 HSC 胞浆内可呈阳性反应,在成人健康状态下为阴性,当肝脏受到炎症等刺激时,HSC 被激活并转化为肌成纤维样细胞,此时 SMA 呈强阳性表达^[9]。有研究认为,慢性乙型肝炎肝纤维化的形成与 HBV 持续感染有关,HBV 的存在及大量复制可造成肝脏组织的持续损害,这种损害可导致 HSC 的持续活化,活化的 HSC 不仅增殖能力增强,变得具有移动性,其收缩功能也增强,产生的细胞外基质和细胞因子随之增多,从而加速肝纤维化的形成及进展^[10]。另有研究证实,HBV 可促进 TGF- β_1 在肝星状细胞中的表达并影响 HSC 的增殖和细胞外基质成分及含量的变化^[11]。为进一步证实 HBV 在肝纤维化形成中的作用,本研究选用人肝星状细胞系 LX-2 细胞进行体外实验,由于 LX-2 细胞是从健康人肝脏中分离的 HSC 转染 SV40T 质粒后,通过低血清(1% 胎牛血清)培养筛选后所获得^[12],因此其能更好的模拟人体肝星状细胞的特性,使实验结果更接近于真实水平。本研究中,当用含 HBV 的血清刺激 LX-2 细胞并培养一定时间后,发现 LX-2 细胞形态不仅由先前的胞质饱满,胞突钝圆变得细长而有极性,且其 SMA 蛋白含量也增加,表明 HBV 可使 LX-2 细胞发生肌成纤维母细胞表型的转化,即活性

增强。另外,本研究还运用 MTT 实验测定 LX-2 细胞的增殖能力,采用 Transwell 小室实验评价其运动、迁移能力,发现当 HBV 浓度达到一定值后,LX-2 细胞的增殖、运动以及迁移能力均增强。上述体外实验结果表明,HBV 不仅使 LX-2 细胞的形态和表型发生改变,也促使其功能活性增强。

总之,HBV 感染可在慢性乙型肝炎纤维化形成早期引起 TGF- β_1 蛋白表达增高,同时可导致人肝星状细胞系 LX-2 的形态和活性发生变化。提示在慢性乙型肝炎抗病毒治疗的同时,早期即可开展针对肝纤维化形成中的主要细胞因子 TGF- β_1 和关键细胞 HSC 的靶向治疗,以阻抑或延缓肝纤维化的发生。

参 考 文 献

- 1 鲁凤民,庄辉. 中国乙型肝炎的管理. 中华医学杂志(英文版),2009,122(1):3-4.
- 2 Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, et al. Inhibition of transforming growth factor Beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. Lab Invest,2004,84(12):1610-1618.
- 3 Henderson NC, Forbes SJ. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. Toxicology,2008,254(3):130-135.
- 4 Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. Cancer,2000,89(12):2637-2645.
- 5 Ishigaki N, Yamamoto N, Jin H, et al. Continuous intravenous infusion of atrial natriuretic peptide (ANP) prevented liver fibrosis in rat. Biochem Biophys Res Commun,2009,378(3):354-359.
- 6 Mulrooney-Cousins PM, Michalak TL. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. World J Gastroenterol,2007,13(43):5682-5686.
- 7 Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. J Biol Chem,2007,282(30):22089-22101.
- 8 Friedman SI. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Gastroenterology,2008,134(6):1655-1669.
- 9 纪辉,迟宝荣,张一宁. 肝纤维化与肝星状细胞. 吉林大学学报(医学版),2008,34(3):538-542.
- 10 Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, et al. Changing the pathogenetic road- map of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? J Gastroenterol Hepatol,2008,23(7 pt 1):1024-1035.
- 11 哈明吴,饶慧英,刘峰,等. 乙型肝炎病毒促进 CTGF 和 TGF- β_1 在肝星状细胞中的表达. 世界华人消化杂志,2008,16(9):924-928.
- 12 Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. Gut,2005,54(1):142-151.

(收稿日期:2012-07-17)

(本文编辑:孙荣华)

张香梅,乐晓华,徐六妹,等. HBV 对肝内 TGF- β_1 蛋白表达和人肝星状细胞系 LX-2 活性的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(6):566-569.