

# 转化生长因子 $\beta_1$ 在人肝纤维化组织中的表达及作用的探讨

李清华,秦成勇,劳 萍

李清华,青岛市立医院消化内科 山东省青岛市 266011  
秦成勇,劳萍,山东省立医院 山东省济南市 250021  
项目负责人:李清华,266011,山东省青岛市,青岛市立医院消化内科.  
收稿日期:2002-04-08 接受日期:2002-07-10

## 摘要

目的:探讨转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )在人肝纤维化组织中的分布和作用.

方法:采用放射免疫方法检测36例慢性乙型肝炎患者血清中PCIII、IV-C、HA、LN水平,同时采用原位杂交和免疫组化的方法检测其肝组织中TGF- $\beta_1$  mRNA及蛋白表达情况,并对蛋白表达结果进行半定量分析.

结果:TGF- $\beta_1$  mRNA 和蛋白表达于肝纤维化活跃的汇管区、纤维间隔、Disse 间隙及肝细胞变性坏死处,随肝纤维化程度的加重,TGF- $\beta_1$  蛋白表达着色积分增加( $S_0$ 期 $1.4 \pm 0.8$ , $S_1$ 期 $1.7 \pm 0.9$ , $S_2$ 期 $2.9 \pm 1.0$ , $S_3$ 期 $4.8 \pm 1.5$ , $S_4$ 期 $6.8 \pm 1.5$ );并且与血清PCIII, IV-C, HA及LN水平呈明显的正相关( $r = 0.39, P < 0.05$ ;  $r = 0.436, P < 0.05$ ;  $r = 0.63, P < 0.01$ ;  $r = 0.40, P < 0.05$ ).

结论:TGF- $\beta_1$ 与胶原蛋白沉积密切相关,在人肝纤维化的形成和发展中起关键性的作用.

李清华,秦成勇,劳萍.转化生长因子 $\beta_1$ 在人肝纤维化组织中的表达及作用的探讨.世界华人消化杂志 2003;11(11):103-105  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/103.htm>

## 0 引言

转化生长因子 $\beta_1$ (transforming growth factor-beta 1,TGF- $\beta_1$ )是一种具有同源双链的多肽细胞因子,具有调节细胞生长和分化的作用,是组织修复过程的重要因素<sup>[1, 2]</sup>.近来研究认为TGF- $\beta_1$ 是最重要的肝纤维化递质,细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的合成和降解主要由TGF- $\beta_1$ 调控<sup>[1-4]</sup>.我们采用原位杂交、免疫组化技术检测慢性乙型病毒性肝炎患者肝组织中TGF- $\beta_1$ 的存在、定位,并同时检测其血清中PCIII、IV-C、HA及LN的水平,以期探讨TGF- $\beta_1$ 与肝纤维化的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 住院和门诊的慢性乙型病毒性肝炎患者36例,男20例,女16例,年龄21-65岁.所有病例均经肝活检病理学证实.诊断依据1995年全国传染病寄生虫病会议修订的标准.正常组织对照4例,男3例,女

1例,年龄32-50岁.正常血清标本对照取自健康献血员15名,年龄17-52岁,男9名,女6名.所有对照者HAV-HEV的血清学标志均为阴性,并且肝功能、肾功能检查均在正常范围.静脉空腹取血3 mL,分离血清,抽血后3 d内进行肝穿刺和外科手术获得肝组织标本,1份入甲醛液固定;另一份用OTC包埋后置液氮冻存.

1.2 方法 检测血清PCIII、IV-C、HA及LN水平,采用放射免疫法,试剂盒为重庆肿瘤研究所和上海海军医学研究所提供,操作按说明书严格进行.免疫组化按常规ABC方法进行,检测用试剂盒为武汉博士德公司提供,用PBS代替一抗作阴性对照.半定量积分判定方法参照文献[5]方法,略加以修改,将门静脉及小叶着色面积积分5个等级,分别赋予0-4分,选取一张片子上5个显微镜下视野计算着色总积分为两者着色面积积分之和.原位杂交采用武汉博士德公司提供的TGF- $\beta_1$ 原位杂交检测试剂盒,操作按说明书严格进行,最后DAB显色,苏木素复染,中性树脂封片.所有标本均进行Mallory三色染色,胶原纤维呈蓝色染色.

统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和直线相关分析的方法.

## 2 结果

2.1 血清PCIII、IV-C、HA、LN的水平,随 $S_0$ - $S_3$ 期肝纤维化加重,4个指标依次升高,除 $S_1$ 期PCIII,IV-C及LN水平,各期指标与 $S_0$ 期比较均显著升高, $S_2$ - $S_4$ 期PCIII、IV-C及HA水平还显著高于 $S_1$ 期,且 $S_3$ 期和 $S_4$ 期HA水平亦明显高于 $S_2$ 期,见表1.

表1 不同肝纤维化分期慢乙肝患者血清PCIII、IV-C、HA及LN水平

肝纤维化分期	n	PCIII( $\mu$ g/L)	IV-C( $\mu$ g/L)	HA(ng/L)	LN(ng/L)
$S_0$	7	$102 \pm 8$	$42 \pm 7$	$77 \pm 41$	$116 \pm 38$
$S_1$	11	$132 \pm 19$	$69 \pm 40$	$158 \pm 68.82^a$	$174 \pm 60$
$S_2$	8	$179 \pm 46^d$	$141 \pm 67^c$	$407 \pm 197^d$	$180 \pm 40^b$
$S_3$	6	$239 \pm 67^d$	$185 \pm 98^d$	$681 \pm 151^e$	$221 \pm 77^a$
$S_4$	4	$226 \pm 60^d$	$146 \pm 89^c$	$753 \pm 236^f$	$192 \pm 97^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs  $S_0$ 期; <sup>b</sup> $P < 0.05$  <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs  $S_1$ 期; <sup>d</sup> $P < 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.01$  vs  $S_2$ 期.

2.2 免疫组化结果 正常肝组织中活性TGF- $\beta_1$ 免疫组化染色表明在中央静脉、肝动脉、门静脉及胆管管壁均见阳性染色.Mallory染色示,胶原纤维尚未见明显增加的慢肝病组织中的小叶内和汇管区的炎症细胞浸润、灶性坏死区的多量炎细胞、成纤维细胞及

窦旁细胞却已见 TGF-β<sub>1</sub> 阳性染色.随着肝病的发展, Mallory 染色发现 ECM 的明显沉积增加,慢性肝病变肝组织的炎症坏死区、中央静脉周围、门管区见图 1, 及肝窦周 Disse 间隙的 ECM 沉积处见图 2, 亦见明显的 TGF-β<sub>1</sub> 阳性染色.肝硬化及慢性肝炎病变肝组织的纤维间隔及硬化结节边缘可见强阳性的 TGF-β<sub>1</sub> 染色, 与 Mallory 染色示胶原纤维沉积部位相一致.在各种病变肝组织尤其是毗邻以上部位亦可见极少数肝细胞质有 TGF-β<sub>1</sub> 阳性染色.活性 TGF-β<sub>1</sub> 着色积分随肝纤维化加重明显增加.活性 TGF-β<sub>1</sub> 着色积分除 S<sub>0</sub> 期 (1.4 ± 0.8) 和 S<sub>1</sub> 期 (1.7 ± 0.9)、S<sub>3</sub> 期 (4.8 ± 1.5) 和 S<sub>4</sub> 期 (6.8 ± 1.5) 之间, 各期之间均有显著差异 (P < 0.01).且组织活性 TGF-β<sub>1</sub> 着色积分与血清 PCIII、IV-C、HA 及 LN 水平亦呈明显的正相关 (r = 0.39, P < 0.05; r = 0.436, P < 0.05; r = 0.630, P < 0.01; r = 0.40; P < 0.05).

2.3 原位杂交结果 反映 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 分布, TGF<sub>1</sub> 杂交结果表明:正常肝组织在背景染色基础上,见少数肝细胞及中央静脉、门静脉、肝动脉、胆管的管壁处可探及较多的杂交信号, 分布均匀.肝硬化及慢肝患者肝组织的假小叶周边、纤维间隔见图 3、汇管区及间质与实质交界处炎性活动病变区及周围的成纤维细胞、炎细胞见图 4, 增生胆管壁基底膜见图 3, 及 ECM 沉积处见图 4, 有明显的杂交信号, 毗邻以上部位处肝细胞亦见明显杂交信号, 分布不均匀, 呈灶状; 但肝硬化肝组织的肝细胞中极少.另外肝小叶的肝 Disse 间隙及 Disse 腔内的窦旁细胞见图 3、图 5、图 6, 亦见明显阳性杂交信号.

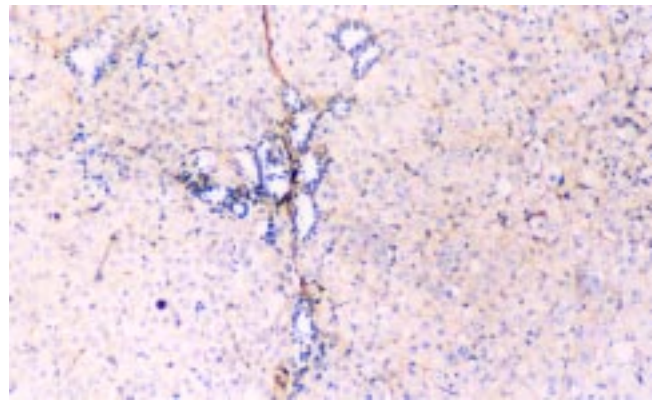


图3 肝硬化组织:小叶内纤维间隔内成纤维细胞、小叶内窦旁细胞、增生的胆管基底膜均见棕黄色明显增多的阳性 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 杂交信号, 肝细胞质内未见明显的杂交信号 (原位杂交 DAB 法 10 × 10)

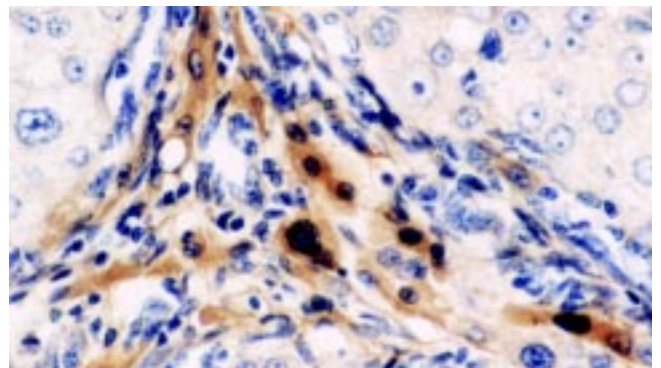


图4 肝硬化组织:汇管区内成纤维细胞、炎性细胞及 ECM 沉积处可见棕黄色明显增多的阳性 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 杂交信号(原位杂交 DAB 法 40 × 10)

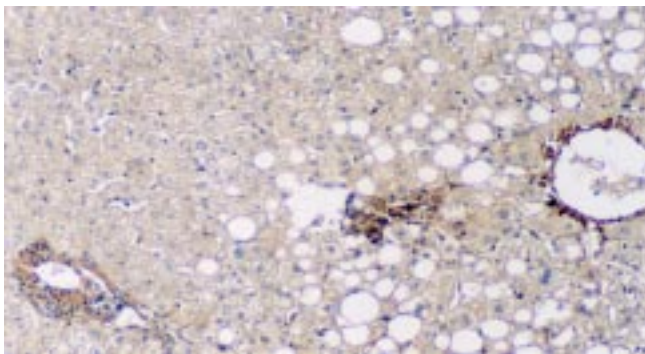


图1 慢性乙肝组织:中央静脉管壁及周围细胞、汇管区、肝细胞变性坏死区 ECM 沉积处见棕黄色的 TGF-β<sub>1</sub> 阳性染色增多(免疫组化 DAB 法 10 × 10)

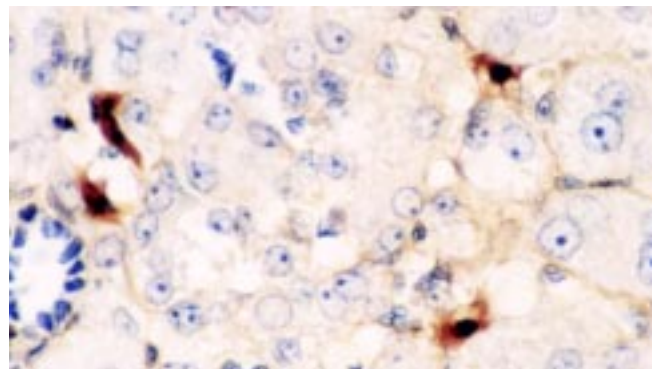


图5 肝硬化组织:小叶内星状或梭形的窦旁细胞见棕黄色的阳性 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 杂交信号(原位杂交 DAB 法 40 × 10)

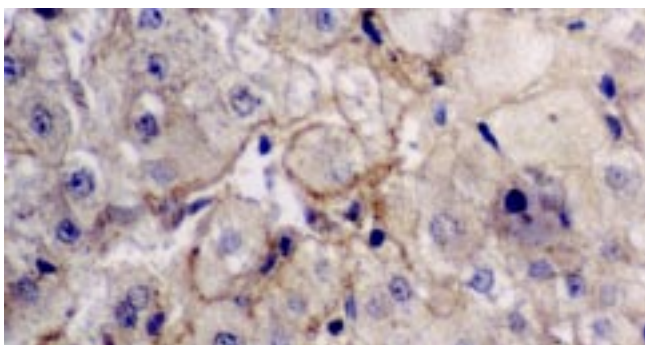


图2 慢性乙肝组织:肝血窦周间隙见棕黄色的 TGF-β<sub>1</sub> 阳性染色增多(免疫组化 DAB 法 40 × 10)

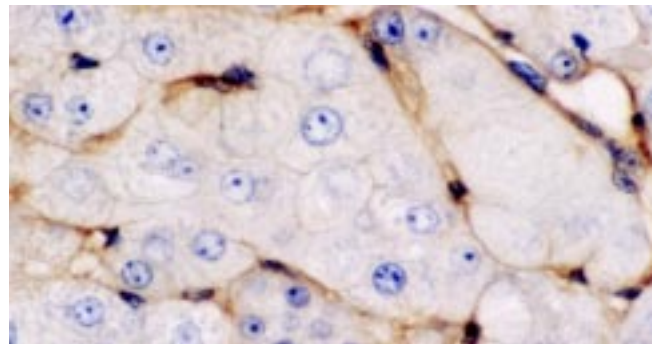


图6 肝硬化组织:小叶内肝窦周细胞见棕黄色的阳性 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 杂交信号(原位杂交 DAB 法 40 × 10)

### 3 讨论

TGF- $\beta_1$  能促进各种 ECM 成分及受体的产生,抑制基质降解蛋白酶的合成及促进基质降解蛋白酶抑制剂(PAI, TIMP 等)合成<sup>[1-4]</sup>.本实验研究了正常人、慢性乙肝及肝硬化患者肝组织中TGF- $\beta_1$ 的表达.以前大多数研究为单独进行原位杂交或免疫组化,但是单原位杂交检测 mRNA,不能反映蛋白质表达或转录后激活过程,而且激活过程是 TGF- $\beta_1$  起作用的关键;而单进行免疫组化的研究,TGF- $\beta_1$  阳性亦可能是由于肝细胞摄入引起.我们的结果表明:不论 TGF- $\beta_1$  mRNA 还是活性 TGF- $\beta_1$  蛋白于 ECM 沉积处,如汇管区、纤维间隔、假小叶周边、肝窦 Disse 间隙、中央静脉管壁及炎症坏死区均见明显的阳性染色.与胶原纤维沉积部位相一致.另外肝纤维化早期,主要是炎症坏死处及肝纤维化中、晚期,主要为纤维间隔内的炎细胞、成纤维细胞、窦旁细胞及毗邻以上部位的极少数肝细胞亦见阳性染色.TGF- $\beta_1$  阳性染色分布不均匀,呈灶状.并且免疫组化示活性 TGF- $\beta_1$  染色积分随肝纤维化加重亦明显增加.Ito 细胞是合成 ECM 最主要的间质细胞,他主要位于肝窦周 Disse 间隙和纤维间隔<sup>[6]</sup>.活动性肝病肝组织的 Disse 间隙、汇管区、炎细胞浸润变性坏死处、纤维间隔及肝硬化结节周边均为肝纤维化活动最活跃的地方.表明活性 TGF- $\beta_1$  同肝纤维化密切相关,且发生在分子水平,同以往的报道相一致<sup>[5, 7-9]</sup>,证明这些地方是肝纤维化时增多的 TGF- $\beta_1$  的来源之处.肝纤维化早期,肝损因子(如病毒)导致炎细胞及其他间质细胞浸润增多,分泌适量的 TGF- $\beta_1$ ,其通过自分泌和旁分泌机制又作用于间质细胞,增加基质成分的合成<sup>[2-4, 6, 10]</sup>,由于 TGF- $\beta_1$  对炎细胞及成纤维细胞均有趋化作用,从而使肝纤维化程度不断加重.同时证明了临床上用各种方法保护慢性肝炎患者肝细胞不受损害,抑制炎症反应,是防治肝纤维化的重要措施.

肝纤维化时异常沉积的 ECM,包括胶原蛋白(I, II, IV, V, VI),糖蛋白(FN, LN, VN 等),蛋白多糖(HA 等)众多研究已表明血清中 PCIII, IV-C, HA, LN 水平可反映肝内其含量及肝纤维化程度和活性<sup>[11-15]</sup>.我们的实验亦表明这 4 个指标的水平随着病情和肝纤维

化程度的加重明显增加.而且肝活性 TGF- $\beta_1$  着色积分同血清中 4 个指标的水平呈明显的正相关.进一步证明了 TGF- $\beta_1$  与 ECM 的合成、代谢、胶原蛋白的沉积密切相关,肝中活性 TGF- $\beta_1$  染色可反映肝纤维化程度及活动情况,提示亦可作为肝纤维化的诊断指标.

### 4 参考文献

- 1 李谦,吴梧桐.转化生长因子 $\beta_1$ .药物生物技术 2001;8:227-229
- 2 陈修熙,来茂德.转化生长因子TGF- $\beta$ 研究进展.世界华人消化杂志 2000;8:1405-1409
- 3 刘芳,刘金星.转化生长因子 $\beta_1$ 在肝纤维化中的作用.世界华人消化杂志 2000; 8:86-88
- 4 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Role of TGF- $\beta$  in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807
- 5 Inuzuka S, Ueno T, Torimura T. The significance of colocalization of plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin in hepatic fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1052-1060
- 6 Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, Ramm GA. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol* 2002;160:1705-1715
- 7 严家春,陈文笔,马勇,田瑞霞,丁体龙,徐长江.转化生长因子 $\beta_1$ 与乙型肝炎肝血管病变的关系.世界华人消化杂志 2001;9:751-754
- 8 Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nakayama H, Hara T. High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in blast cells from patients with Down Syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis. *Br J Haematol* 2001;115:472-475
- 9 Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2001;158:1239-1244
- 10 向德栋,魏永利,李奇芬.转化生长因子 $\beta_1$ 对 Ito 细胞作用的分子机制.世界华人消化杂志 1999;7:980-981
- 11 Luo RH, Yang S, Xie J, Zhao Z, He Y, Yao J. Diagnostic value of five serum markers for liver fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:148-150
- 12 常克宏,程书权,张自富,钱梅艳.血清 HA, PLD, PCIII, LN, IV-C 联合检测对慢性肝病诊断价值的探讨.世界华人消化杂志 2000; 8(特刊 8):45-46
- 13 张春兰,石亚玲,易俊卿.肝纤维化指标与疾病程度、病毒含量及病理的关系.世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):14
- 14 刘芳,刘金星,曹治宸,李兵顺,赵采彦,孔丽,甄真.慢性肝病患者血清 TGF- $\beta_1$ 与肝纤维化指标和肝组织病理的关系.世界华人消化杂志 1999;7:519-521
- 15 Stickele F, Urbaschek R, Schuppan D, Poeschl G, Oesterling C, Conradt C, McCuskey RS, Simanowski UA, Seitz HK. Serum collagen type IV and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001;46:2025-2032