

胆道闭锁肝脏组织 MMP-2、TGF- β_1 的表达及意义

毛永忠 汤绍涛 阮庆兰 童强松 王 勇 李时望

【摘要】 目的 研究胆道闭锁患儿肝脏组织中 MMP-2、TGF- β_1 的表达,探讨其与胆道闭锁患儿肝纤维化的关系。方法 利用免疫组化法(SP 法)检测 33 例胆道闭锁患儿肝脏组织中 MMP-2、TGF- β_1 蛋白的表达,通过图像分析技术进行定量研究。结果 胆道闭锁患儿肝组织中 MMP-2、TGF- β_1 蛋白均有不同程度的表达,以肝细胞胞浆、胞膜表达最为明显。MMP-2、TGF- β_1 蛋白在肝组织中的阳性表达随肝纤维化程度的加重而增强,呈正相关(前者 $r = 0.5063$, $P < 0.05$; 后者 $r = 0.6179$, $P < 0.05$)。MMP-2、TGF- β_1 在胆道闭锁患儿肝组织中的表达强度明显高于对照组($P < 0.01$),MMP-2 与 TGF- β_1 的表达有高度相关性($r = 0.9200$, $P < 0.01$)。结论 MMP-2、TGF- β_1 与胆道闭锁肝纤维化的发生、发展密切相关;抑制 MMP-2、TGF- β_1 的表达有望阻止胆道闭锁患儿肝纤维化进程。

【关键词】 胆道闭锁;金属蛋白酶类 / 分析;转化生长因子 β / 分析

The expression of MMP-2, TGF- β_1 in liver of biliary atresia and their relations with hepatic fibrosis.

MAO Yong-zhong, TANG Shao-tao, Ruan Qing-lan et al. Department of Pediatric Surgery, Xiehe Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】 **Objective** To study the expression of MMP-2, TGF- β_1 in biliary atresia (BA) liver tissue and their relations with hepatic fibrosis. **Methods** The immunohistochemical method (SP) was used to detect expression of the protein of MMP-2, TGF- β_1 in liver tissues of thirty-three biliary atresias. The positive expression was quantitatively analyzed by image analysis technology. **Results** There were different degree expressions of MMP-2, TGF- β_1 protein in hepatic tissue of BA. Subcellular locations of expression of these protein were mainly cytoplasm and membrane. Positive expressions of MMP-2, TGF- β_1 were increased with progress of hepatic fibrosis degree (the former $r = 0.5063$, $p < 0.01$, the latter, $r = 0.6179$, $p < 0.05$). Expression degree of MMP-2 and TGF- β_1 protein in hepatic tissue of children with BA was significant high than that of in control group ($p < 0.01$). The expression of MMP-2 was obviously correlated to expression of TGF- β_1 in liver tissue of children with BA ($r = 0.9200$, $P < 0.01$). **Conclusions** The levels of MMP-2, TGF are closely related to occur and development of hepatic fibrosis in biliary atresia. So inhibiting the expression of MMP-2 and TGF- β_1 could prevent the progress of hepatic fibrosis for children with biliary atresia.

【Key Words】Biliary Atresia; Metalloproteinases/AN; Transforming Growth Factor Beta/AN

胆道闭锁 (biliary atresia, BA) 是新生儿期阻塞性黄疸最为常见的病因, 其发病率约为 1 / 10 000。病变累及肝内外胆管系统, 导致进行性胆管破坏和肝脏纤维化。肝门空肠吻合术 (Kasai 手术) 能使胆汁引流通畅, 是治疗的重要方法, 但由于进行性肝脏纤维化、胆汁淤积性肝硬化和门静脉高压的出现, 多数患儿最终仍需肝移植^[1]。进行性肝纤

维化是制约 Kasai 手术疗效的重要因素, 阻止肝纤维化的发展将显著提高 Kasai 手术的疗效。

肝脏纤维化是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成大于降解的结果。转化生长因子 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1) 是目前公认的强有力的器官纤维化促进因子。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 在细胞外基质的转换中发挥了关键性的作用。本研究运用免疫组化方法 (SP 法) 观察胆道闭锁患儿肝脏组织中 MMP-2、TGF- β_1 的表达规律, 并与对照组进

作者单位: 华中科技大学同济医学院附属协和医院小儿外科 (武汉, 430022), E-mail: maoyz68@yahoo.com.cn.

行比较,以探索胆道闭锁肝组织中MMP-2、TGF- β_1 的表达与肝纤维化的关系。

材料和方法

一、临床资料

收集我院 1999 年 1 月~2005 年 4 月收治的 33 例胆道闭锁患儿临床资料,其中女 20 例,男 13 例,手术时日龄 45~270 d,其中手术时日龄 60 d 以内的患儿 8 例,61~90 d 14 例,91~120 d 5 例,120 d 以上 6 例。临床和病理诊断均为胆道闭锁,选择同年龄段无肝胆系统疾病小儿 12 例作为对照组。

二、肝脏纤维化分级

手术中取肝脏组织标本,予常规石蜡包埋、切片、脱蜡及 HE 染色,于显微镜下观察。根据 Ohkuma's 分级标准将肝脏纤维化程度分为 I~IV 级, I 级为肝门管区轻度纤维化; II 级为邻近门管区轻度桥接纤维化; III 级是指伸向邻近门管区重度桥接纤维化; IV 级指肝硬化、假小叶形成。

三、免疫组织化学染色及结果判断

免疫组织化学染色方法采用 SP 法。MMP-2、TGF- β_1 单克隆抗体均购于北京中山生物技术有限公司,均为鼠抗人单克隆抗体。每组设阴性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照, DAB 显色。以 MMP-2、TGF- β_1 表达位于胞浆内,有明显棕色颗粒状染色为阳性;免疫组化染色阳性反应根据显色强度及阳性细胞百分率分为 3 级:弱阳性反应

(+):胞浆染色呈淡棕黄色,阳性细胞数占 10%~25%;中阳性反应(++):胞浆染色呈棕黄色,阳性细胞数占 25%~50%;强阳性反应(+++):胞浆染色呈深棕黄色,阳性细胞数 > 50%。

四、图像分析及统计学处理

于物镜 20 倍视野下,每张切片随机选取 5 个视野,用 HMIAS-2000 型全自动医学彩色图像分析系统测定细胞内棕黄色颗粒的平均吸光度(A)值,对切片进行扫描,自动测定受检视野的阳性强度均值,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm S$)表示。通过 SAS 8.1 统计软件进行统计学处理,采用 χ^2 检验及 Fisher 精确检验法进行相关分析。

结 果

一、胆道闭锁患儿肝脏组织 HE 染色结果

镜下见肝细胞不同程度变性,呈空泡样改变,肝板结构紊乱,慢性炎症细胞浸润,见增生杂乱的小胆管结构,汇管区纤维组织不同程度增生。根据肝纤维化分级,本组病例中 I 级 9 例, II 级 10 例, III 级 8 例, IV 级 6 例。

二、胆道闭锁患儿肝脏组织中 MMP-2、TGF- β_1 表达与肝纤维化的关系

胆道闭锁组所有病例 MMP-2、TGF- β_1 蛋白均有不同程度阳性表达,阳性表达位于胆道闭锁肝细胞和肝纤维化组织细胞胞浆中,呈棕黄色颗粒,以肝细胞表达最明显(见图 1~6)。

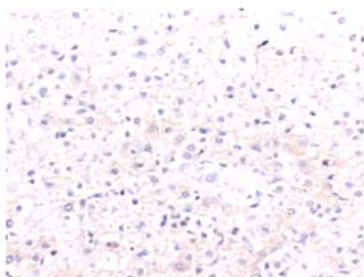


图 1 对照组肝组织 MMP-2 表达阴性 (SP \times 200)。

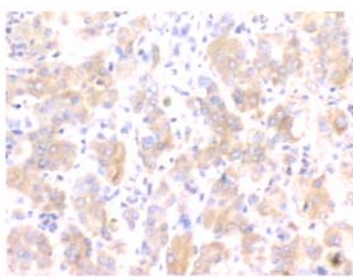


图 2 BA 肝纤维化 I 级, MMP-2 表达 (++) (SP \times 200)。

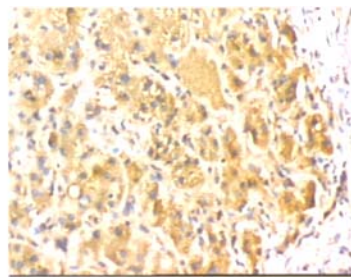


图 3 BA 肝纤维化 III 级, MMP-2 表达 (+++) (SP \times 200)。

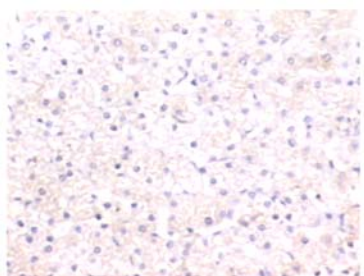


图 4 对照组肝组织 TGF- β_1 表达阴性 (SP \times 200)。

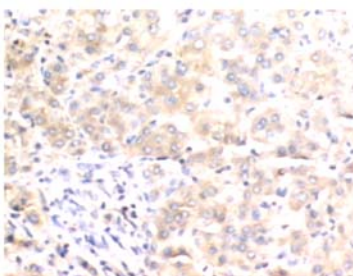


图 5 BA 肝纤维化 I 级, TGF- β_1 表达 (++) (SP \times 200)。

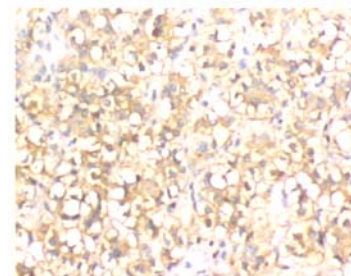


图 6 BA 肝纤维化 III 级, TGF- β_1 表达 (+++) (SP \times 200)。

MMP-2、TGF- β_1 蛋白在胆道闭锁肝组织中的阳性表达随肝纤维化程度的加重而增强，呈正相关性（前者 $r = 0.5063$, $P < 0.05$ ；后者 $r = 0.6179$, $P < 0.05$ ）。TGF- β_1 与 MMP-2 的表达有高度相关性（ $r = 0.9200$, $P < 0.01$ ）。如表 1、2 所示。

表 1 不同程度肝纤维化病例 MMP-2 蛋白的表达

BA 肝纤维化 分级	n	MMP-2 蛋白的表达 (n)		
		+(n)	++(n)	+++ (n)
I 级	9	5	2	2
II 级	10	2	7	1
III 级	8	1	2	5
IV 级	6	0	2	4

注： $r = 0.5063$, $P = 0.0340$ 。

表 2 不同程度肝纤维化病例 TGF- β_1 蛋白的表达（例）

BA 肝纤维化 分级	n	TGF- β_1 蛋白的表达		
		+	++	+++
I 级	9	6	2	1
II 级	10	3	5	2
III 级	8	1	2	5
IV 级	6	0	1	5

注： $r = 0.6179$, $P = 0.0237$ 。

三、胆道闭锁患儿肝组织与对照组 MMP-2、TGF- β_1 的表达

胆道闭锁患儿及对照组肝组织中 MMP-2、TGF- β_1 均有表达。定量分析结果显示：胆道闭锁组均高于对照组，两者比较， $P < 0.01$ ，差异有显著统计学意义（表 3）。

表 3 BA 肝组织与对照组的比较（平均吸光度 A 值）

	TGF- β_1	MMP-2
胆道闭锁组	0.2585±0.0388	0.2844±0.0489
对照组	0.1159±0.0275	0.0982±0.0156
t 值	11.71	12.88
P 值	< 0.01	< 0.01

讨 论

胆道闭锁患儿的预后取决于年龄、闭锁类型、肝脏纤维化的严重程度以及术后并发症等多种因素^[2]。进行性肝纤维化是影响手术效果的重要因素。阻止肝门空肠吻合术后肝纤维化的发展进程对提高手术疗效有重要作用。

肝纤维化是细胞外基质（主要为 I、III 型胶原）合成大于降解的结果。在胆道闭锁的病程中，由于病毒感染或局部免疫反应性炎症异常，释放出

大量的细胞因子，引起胆管上皮细胞凋亡和坏死^[3]；同时在细胞因子的作用下，肝脏 ECM 的质和量发生改变，合成与降解失去平衡。在众多的细胞因子中，TGF- β_1 是公认的肝纤维化促进因子；而基质金属蛋白酶在细胞外基质的转换中亦发挥了关键性的作用。

基质金属蛋白酶（MMPs）是一类依赖金属离子锌并以细胞外基质成份为水解底物的蛋白水解酶，至今已发现数十余种。MMP-2 是一种重要的明胶酶，它主要降解变性间质胶原、完整的 IV 型胶原（基底膜的主要成分）、V 型胶原及非胶原蛋白如弹性蛋白、纤维连接蛋白^[4]。MMP-2 可以降解正常肝窦基底膜，破坏肝脏生存的内环境，有利于肝星状细胞的激活，是诱发和促进肝纤维化的重要病理因素。本研究结果显示：胆道闭锁患儿肝组织中 MMP-2 蛋白的表达明显高于正常儿童（ $P < 0.01$ ），且随着胆道闭锁肝纤维化程度的加重而 MMP-2 蛋白表达增强，统计学处理也显示，二者有明显的相关性（ $r = 0.5063$, $P < 0.05$ ）。说明胆道闭锁患儿肝组织中 MMP-2 的异常表达与肝纤维化有密切联系。

在肝纤维化的病理过程中，一方面基质堆积，病情加重；另一方面基质降解，病情缓解。MMP-2 在肝纤维化过程中的作用存在着相互矛盾的两个方面：一方面，通过降解正常的肝基底膜成份和促进肝星状细胞增生，启动并加重肝纤维化进程；另一方面，MMP-2 又能清除部分变性的过多的 ECM，减缓肝纤维化进程^[5]。Murawaki^[6] 检测肝硬化患者肝组织 MMP-2 的含量显示，肝硬化患者 MMP-2 含量有明显升高，升高程度与肝组织胶原含量呈正相关。我们在实验中也观察到胆道闭锁肝脏组织的内皮细胞、肝细胞胞浆和胞膜上均有 MMP-2 的沉积，表明 MMP-2 也参与了胆道闭锁肝纤维化过程。

胆道闭锁肝组织中 MMP-2 表达升高的机理可能为：① 肝脏 Kupffer 细胞、胆管上皮细胞、肝星状细胞和肝细胞均可分泌 TGF- β_1 ，TGF- β_1 本身是一种强有力的致纤维化促进因子，同时还可能促进 MMP-2 的合成；Overall 等^[7,8] 研究发现，TGF- β_1 能够在转录和转录后水平上调 MMP-2 的表达，同样支持上述观点；② 通过内平衡机制诱导 MMP-2 的表达，即在肝纤维化的过程中，随着 IV 型胶原的过度沉积，反馈性的使 MMP-2 的表达增加。本研

究观察发现,胆道闭锁患儿肝脏 MMP-2 的表达明显高于正常儿童,与肝纤维化程度呈正相关,说明 MMP-2 与胆道闭锁肝纤维化关系密切,可能起促进作用。

在许多疾病中,过多的 TGF- β_1 可直接刺激基质成分如纤维连接蛋白、胶原和基质蛋白多糖的表达,促使组织器官纤维化,因而 TGF- β_1 被认为是导致 ECM 聚积的重要生长因子之一。研究显示,胆道闭锁患儿肝组织内小胆管增殖区可见 I 型、IV 型胶原以及 TGF- β_1 表达增加,胆管缺乏症则仅有极少量的表达,提示 TGF- β_1 表达的增加参与了胆道闭锁进行性肝纤维化的发生。进一步研究^[9, 10]也发现,在胆道闭锁早期, TGF- β_1 在肝组织的表达增加,而在晚期(需接受肝移植)则表达减少,说明 TGF- β_1 在胆道闭锁肝纤维化早期起着更加重要的作用。本研究结果显示, TGF- β_1 蛋白在胆道闭锁肝组织的表达明显增加,且随肝纤维化程度的加重而增强。在胆道闭锁的病程中,由于局部的免疫炎症异常, TGF- β_1 等细胞因子分泌增加,滞留于局部,激活肝星状细胞合成大量的胶原;同时肝星状细胞又可反馈性地分泌大量 TGF- β_1 ,使 TGF- β_1 加强肝星状细胞合成胶原的作用更加明显。这可能是胆道闭锁患儿进行性肝纤维化发展迅速的原因之一。

目前许多体内外实验都证实, TGF- β_1 也是最重要的 MMP 的调节因子, TGF- β_1 对 MMP 的调节作用是促进还是抑制取决于组织来源、病变性质等,详细机制还有待深入探讨。

本研究发现, TGF- β_1 与 MMP-2 表达呈正相关性,提示 TGF- β_1 与 MMP-2 有调控和协调作用,两者在胆道闭锁肝纤维化的发生发展中起重要的作用。由于 TGF- β_1 、MMP-2 与胆道闭锁肝纤维化密切相关,抑制 TGF- β_1 、MMP-2 的表达可有效阻止胆道闭锁术后肝纤维化进程,延长胆道闭锁术后患儿的生存时间,提高胆道闭锁手术的疗效。

参 考 文 献


- 1 Shneider BL, Brown MB, Haber B, et al. A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States 1997 to 2000 [J]. J pediatr, 2006, 148: 467-474.
- 2 Shteyer E, Ramm GA, Xu C, et al. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006, 42:93-99.
- 3 汤绍涛,阮庆兰.胆道闭锁与细胞因子[J].中华小儿外科杂志, 2003, 24: 85-87.
- 4 Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaca M, et al. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation [J]. J Hepatol, 1999, 30: 977-986.
- 5 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279:245-249.
- 6 Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in liver of patients with chronic liver disease [J]. J Hepatol, 1997, 26:1213-1219.
- 7 Kobayashi H, Horikoshi K, Yamataka A, et al. Are stable postoperative biliary atresia patients really stable? [J]. Pediatr Surg Int, 2001, 17:104-107.
- 8 Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-KDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression [M]. J Biol Chem., 1991, 266:14064-14071.
- 9 Lamireau T, Le Bail B, Bollssarie L, et al. Expression of collagens type I and IV, osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGF beta1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy [J]. J Hepatol, 1999, 31: 248-255.
- 10 Ahmed A, Ohtani H, Nio M, et al. In situ expression of fibrogenic growth factors and their receptors in biliary atresia: comparison between early and late stage [J]. J pathol, 2000, 192:73-80.

• 消息 •

第六届全国小儿腹腔镜手术学习班开班通知(基础班)

第六届国家级医学继续教育小儿腹腔镜手术学习班定于 2007 年 11 月 17 日~11 月 22 日在湖南长沙开班。欲参加者请与湖南省儿童医院普外科肖雅玲、蒋璐杏联系, E-mail: luuuu@163.com。

胆道闭锁肝脏组织MMP-2、TGF- β 1的表达及意义

作者: 毛永忠, 汤绍涛, 阮庆兰, 童强松, 王勇, 李时望
作者单位: 华中科技大学同济医学院附属协和医院小儿外科, 武汉, 430022
刊名: 临床小儿外科杂志 
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY
年, 卷(期): 2007, 6(3)
被引用次数: 0次

参考文献(10条)

1. Benyon RC;Hovell CJ;Da Gaca M Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation 1999
2. 汤绍涛;阮庆兰 胆道闭锁与细胞因子[期刊论文]-中华小儿外科杂志 2003(1)
3. Shteyer E;Ramm GA;Xu C Outcome after portoenterostomy in biliary atresia:pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation 2006
4. Lamireau T;Le Bail B;Bollssarie L Expression of collagens type I and IV, osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGF betal) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy 1999(2)
5. Overall CM;Wrana JL;Sodek J Transcriptional and posttranscriptional regulation of 72-KDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta1 in human fibroblasts.Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression 1991
6. Kobayashi H;Horikoshi k;Yamataka A Are stable postoperative biliary atresia patients really stable? 2001
7. Murawaki y;Ikuta Y;Idobe Y Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in liver of patients with chronic liver disease 1997
8. Arthur MJ;Fibrogenesis II Metalloprtoeinases and their inhibitors in liver fibrosis 2000
9. Ahmed A;Ohtani H;Nio M In situ expression of fibrogenic grow factors and their receptors in biliary atresia:comparison between early and late stage 2000
10. Shneider BL;Brown MB;Haber B A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States1997 to 2000 2006

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200703003.aspx

授权使用: 黔南民族师范学院(gnnzsfxy), 授权号: 0954f4bf-f431-460e-884f-9ed4011218aa

下载时间: 2011年4月29日