

HIF-1 α 和 VEGF 在胆道闭锁患儿肝组织中的表达及意义



卫园园 丁美云 高 婷 胡晓丽 詹江华

【摘要】 目的 研究胆道闭锁(biliary atresia, BA)患儿肝组织中缺氧诱导因子(HIF-1 α)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达及与血管生成和纤维化的关系,探讨其在 BA 发病中可能的作用机制。**方法** 选取胆道闭锁患儿(BA 组)肝组织 15 例、胆管扩张症患者(CBD 组)肝组织 10 例、BA 发展为肝硬化接受肝移植患儿(LT 组)肝组织 10 例。HE、Vimentin 染色观察各标本的组织学改变并判定纤维化程度,CD34 染色标记血管计数微血管密度(MVD),免疫组化法检测 HIF-1 α 和 VEGF 在各组肝组织中的表达。**结果** CBD 组、BA 组、LT 组微血管密度分别为 16.8 ± 1.9 、 23.2 ± 3.8 、 25.9 ± 2.1 。HIF-1 α 在肝细胞胞浆和部分胞核中表达,BA 组 HIF-1 α 的光密度(0.1607 ± 0.0297)高于 CBD 组(0.1504 ± 0.1463)和 LT 组(0.1513 ± 0.0059), $P < 0.05$ 。VEGF 在肝细胞、胆管、动脉壁的表达,BA 组 VEGF 的光密度(0.1629 ± 0.0129)高于 CBD 组(0.1322 ± 0.0257)和 LT 组(0.1462 ± 0.0152), $P < 0.05$ 。**结论** HIF-1 α 、VEGF 可能通过参与 BA 中的血管生成过程,促进肝纤维化。

【关键词】 胆道闭锁; 血管生成; HIF-1 α ; VEGF; 纤维化

The expression of HIF-1 α and VEGF in the patients with biliary atresia. WEI Yuan-yuan, DING Meiyun, GAO Ting, et al. The Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

【Abstract】 Objective To detect the expression of HIF-1 α and VEGF in the liver of patients with biliary atresia (BA) and their relationship with angiogenesis and fibrosis and to explore their function in the pathogenesis of BA. **Methods** Liver tissue of fifteen BA patients, ten congenital biliary dilatation patients, ten liver transplantation patients were collected. HE, Vimentin staining were used to observe the histological changes and detect the degree of fibrosis. CD34 staining mark vessel to count microvascular density (MVD). The immunohistochemistry were used to detect HIF-1 α and VEGF in the liver of each group. **Results** MVD in CBD group, BA group, LT group respectively was 16.8 ± 1.9 , 23.2 ± 3.8 , 25.9 ± 2.1 . HIF-1 α express in cytoplasm of liver cells and some expressed in nucleus, BA group express HIF-1 α more than CBD group, LT group, $P < 0.05$. VEGF express in liver cells, bile duct, the arterial wall, the optical density of VEGF of BA group more than CBD group, LT group, $P < 0.05$. **Conclusions** The expression of HIF-1 α induced by hypoxia may play a role in the process of BA angiogenesis through regulating the expression of VEGF.

【Key words】 Biliary atresia; angiogenesis; HIF-1 α ; VEGF; fibrosis

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是以肝内外胆道闭塞为特征,导致进行性肝纤维化的一种严重肝胆系统疾病,至今病因未明。异常血管生成可能参与发病^[1]。缺氧诱导因子-1(Hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是广泛存在于动物及人体多种肿瘤细胞中调节缺氧时细胞变化的转录因子,能激活 VEGF、

Ang-2 等血管生长因子的基因转录表达,促进纤维化和血管新生,其中 HIF-1 α 亚基决定 HIF 的活性^[2]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最早发现的缺氧诱生的促血管生成因子,参与生理性和病理性血管新生中的重要限速过程,有特异性用于血管内皮细胞,使之增殖、迁移、分化以及促进血管管腔形成等作用^[3]。缺氧诱导的 HIF-1 α 、VEGF 信号通路基因和蛋白表达上调参与诸多肝脏疾病的血管生成。CD34 是常用的血管标记物,本实验拟初步探讨 HIF-1 α 和 VEGF 表达情况与 BA 血管改变及肝纤维化的关系。

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2016.01.010

基金项目:1,天津市卫计委重点攻关项目(项目号:14KG129); 2,天津市卫生局重点项目(项目号:2014KR09); 3,国家自然科学基金(项目号:81570471)

作者单位:天津医科大学研究生院(天津市,300070), E-mail:ba_liver2013@163.com

材料与方法

结果

一、临床资料

①BA 组：为天津市儿童医院 2014 年 6 月至 2015 年 6 月收治的胆道闭锁患儿 15 例，其中男 6 例，女 9 例；②CBD 组：天津市儿童医院 2014 年 6 月至 2015 年 6 月收治的胆道扩张症患儿 10 例，其中男 4 例，女 6 例；③LT 组：天津市第一中心医院 2013 年 1 月至 2014 年 1 月由于 BA 肝硬化接受肝移植患儿 10 例，其中男 7 例，女 3 例。均于术中留取肝右叶前缘组织，10% 甲醛固定，用于免疫组化实验。本实验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。

二、实验方法

鼠抗人 HIF-1 α 单克隆抗体为北京博奥森生物技术有限公司产品，兔抗人 VEGF 单克隆抗体为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。兔抗人 CD34 为北京博奥森生物技术有限公司产品。

将固定好的肝组织标本脱水，石蜡包埋，常规病理切片 4 μ m 厚。HE 观察肝标本组织学改变，Vimentin 染色判定肝纤维化程度。按 Ohkuma 肝脏纤维化评定标准进行半定量评价，将肝脏纤维化程度分为 5 级。具体如下：0 级为无纤维化；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。

CD34 染色标记血管计数微血管密度 (Microvessel density, MVD)。参照 Weidner 等方法，在低倍镜 (100 倍) 视野中寻找新生血管最密集区，在高倍镜 (400 倍) 视野下每张切片随机选取 5 个热点视野，计数血管取平均值。免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC) 染色检测 HIF-1 α 和 VEGF 在各组肝组织中的表达，应用计算机成像系统留取相同倍数显微镜下图片，Image-Pro Plus 图像分析软件测定 HIF-1 α 和 VEGF 的平均光密度，代表相对表达量。

三、统计学处理

所有数据均应用 SPSS18.0 统计软件进行分析。CD34、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达多组间比较采用 ANOVA 方差分析，组间两两比较应用 SNK-q 检验；VEGF 和纤维化程度相关性分析采用 Spearman 秩次相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

一、不同肝组织中 MVD 值和 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达

HE 染色见 CBD 组肝细胞结构接近正常，汇管区稍宽，炎症细胞浸润，纤维轻度增生，胆管稍增生。BA 组肝细胞浊肿淤胆，汇管区增宽、胆管增生，部分可见胆栓，纤维组织增生，部分已形成假小叶。LT 组见肝组织被纤维组织替代，假小叶形成。

CD34 着色于血管内皮细胞。CBD 组、BA 组、LT 组微血管密度分别为 16.8 ± 1.9 、 23.2 ± 3.8 、 25.9 ± 2.1 ($P < 0.05$)，见表 1。多重比较结果显示 BA 组、LT 组之间总体均数差别无统计学意义，其余任两组间总体均数差异均具有统计学意义。

表 1 不同组织中 MVD 和 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	MVD	VEGF	HIF-1 α
CBD 组	16.8 ± 1.9	0.132 ± 0.025	0.150 ± 0.146
BA 组	23.2 ± 3.8^a	0.162 ± 0.012	0.160 ± 0.029
LT 组	25.9 ± 2.1^a	0.146 ± 0.015	0.151 ± 0.005
F 值	24.884 **	4.078 **	0.611

注：**， $P < 0.05$ ；a，与 CBD 组比较；b，与 BA 组比较， $P < 0.05$ 。

VEGF 阳性表达主要定位在肝细胞胞浆，CBD 组织中 VEGF 不表达或仅在小部分肝细胞染色较浅着色。BA 组肝细胞表达 VEGF，汇管区小动脉、胆管亦可见 VEGF 着色。LT 组胆管也偶见 VEGF 着色，见图 2。

HIF-1 α 阳性表达主要分布于细胞浆，小部分细胞核中也有表达，在 CBD 肝组织中着色较浅或不表达，BA 组与 LT 组 HIF 表达于肝细胞及部分细胞核，见图 3。

二、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达及其与 MVD 的相关分析

HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.832$, $P = 0.035$)。MVD 和 VEGF 的表达呈正相关 ($r = 0.504$, $P = 0.024$)。MVD 和 HIF 的表达无相关性 ($r = 0.765$, $P = 0.875$)。

三、HIF-1 α 和 VEGF 与肝纤维化程度的相关分析

BA 中 HIF-1 α 和纤维化程度在 BA 肝组织标本中的表达呈正相关 ($r = 0.597$, $P = 0.009$)。VEGF 和肝纤维化程度在 BA 肝组织标本中的表达无相关 ($r = 0.136$, $P = 0.569$)，见表 2。

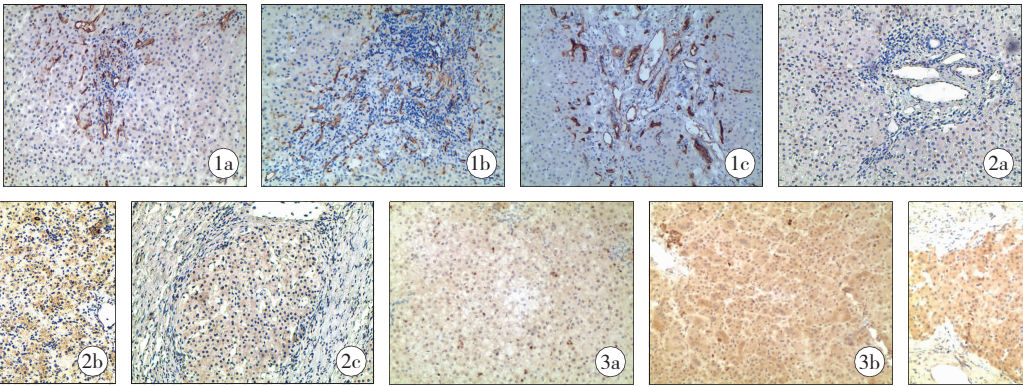


图 1 CD34 在各组肝组织中表达情况(IHC, ×100); 图 2 VEGF 在各组肝组织中表达情况(IHC, ×100); 图 3 HIF-1α 在各组肝组织中表达情况(IHC, ×100);图中 a 为 CBD 组, B 为 BA 组, c 为 LT 组。

表 2 HIF-1α 和 VEGF 与肝纤维化程度相关性分析($\bar{x} \pm s$)

肝纤维化程度	1 级	2 级	3 级	4 级	R 值
HIF	0.119 7 ± 0.065 2	0.130 4 ± 0.048 7	0.148 9 ± 0.085 2	0.166 2 ± 0.085 4	0.597 *
VEGF	0.142 0 ± 0.015 2	0.123 9 ± 0.023 7	0.152 4 ± 0.038 9	0.167 1 ± 0.025 3	0.136

注: *, $P < 0.05$ 。

讨 论

BA 患儿肝脏血管存在异常^[4,5]。血管造影结果显示肝动脉外周分支轮廓不规则,存在“簇样”包绕的血管周围动脉丛^[6]。超声、CT 证实 BA 患儿存在肝动脉扩张、血流增强的情况,且这一表现可用于辅助诊断^[7,8]。Dos 等^[9]通过免疫组化发现 BA 肝门小动脉有管壁歪曲,中层增厚等改变。以上提示 BA 存在血管重塑过程,但确切机制仍不清楚^[10]。

本实验通过 CD34 染色计数血管密度发现 BA 组中微血管密度较 CBD 组明显增高,提示存在明显的血管增生现象。血管增生是一个由低氧刺激、依赖于生长因子的生物学过程,在慢性炎症、损伤修复、肿瘤发生发展、纤维化和门脉高压等病理生理过程都有参与^[11]。血管增生主要取决于缺氧的程度及细胞对缺氧诱导因子的反应。缺氧时,细胞内缺氧反应基因(VEGF、红细胞生成素、酪氨酸羟化酶及参与糖酵解的酶类)的转录和表达发生改变,从而使细胞产生一系列适应性变化^[12]。LT 组肝脏假小叶形成,肝组织被间质取代,亦可见大量血管增生,与 BA 组不成熟的血管相比,增生血管多可见管腔结构,可能是根据功能需求已发生结构改建,有待进一步探究。CBD 组个别病程较长患儿肝组织存在严重血管增生,HE 显示汇管区炎症细胞浸润明显,可能是炎症过程释放促血管生成因子所致。

本研究发现 HIF-1α 在 BA 组高表达,提示 BA

中的缺氧改变,缺氧的原因可能在于汇管区 ECM 堆积,机械扩张变形影响血管结构导致缺氧/缺血。大多数新生血管基本属于无功能血管,血窦和肝细胞物质交换障碍,不能建立正常的门脉分支,故无法改善局部组织缺氧,可进一步加重肝纤维化^[13]。Frat-ta 等^[14]发现在年龄较大,CK19 减少的 BA 患儿存在一种高 HIF-1α、高 HIF-2α、低 VEGFA、低 VEGFR2 的基因表型,可能代表一种缺氧/缺血 BA 表型(hypoxic/ischemic BA phenotype, HIBA),认为随着时间发展,胆管细胞减少,缺血缺氧病变可能与胆管消失有关,肝内小动脉的病变与胆管缺氧性损伤相互作用,推进疾病进展。

本实验结果发现 BA 中 VEGF 表达高于对照组。低氧可以通过缺氧诱导因子 HIF 促进 HSCs 活化、增加 VEGF 和血管生成素的表达,促进血管增生。VEGF 是最早发现的缺氧诱导的促血管生成因子。已发现 BA 患儿 VEGF 基因 +936 C/T 存在多态性,尤其是 C 等位基因与 BA 具有显著相关性,可增加 BA 的易感性^[15]。正常情况下,VEGFA 的表达主要在小叶中央肝细胞,BA 患儿 Kasai 术时 VEGFA 还可表达于门脉区,尤其是动脉壁上^[16]。Edom 等^[16]发现,BA 患儿 VEGFA 表达与胆管增生和动脉内膜中层增厚有关,VEGFA 在动脉壁、胆管、肝细胞的表达由胆管增生程度决定。Gaudio 等^[17]发现,胆总管结扎小鼠(bile duct-ligated, BDL)周围血管丛增生,过表达 VEGF 和 VEGFR2,但当肝动脉也被结扎(hepatic artery-ligated, HAL)时,就没有类似血管增

生反应, VEGFA 和 VEGFR2 减少, 导致胆管细胞凋亡。动物实验发现给予 BDL 和 HAL 双重结扎小鼠重组 r-VEGFA 可阻止胆管的缺血损伤, 进一步证实 VEGF 在胆管发病中的作用^[18]。胆管周围血管丛(peribiliary plexus, PBP 是供应胆管的唯一血管, 对胆管的营养和调节起到重要作用^[19]。BA 中存在的胆管增生可使门管区 VEGF 表达增加, 因为胆管可以产生 VEGF 促进血管增生, 反过来, VEGF 也可营养新生的胆管细胞^[20]。另外, 胆管增生可通过 EMT 机制促进肝纤维化, 造成缺氧缺血, 也促进 VEGFA 的表达。

本实验没有发现 BA 患儿肝纤维化程度与 VEGF 的相关性, 可能是由于 VEGFA 受到缺氧、纤维化、炎症、胆管等多重因素的影响。但近年来许多研究表明, 肝脏病变时肝内血管新生与肝纤维化密切相关。Corpechot 等^[21]发现, DEN 诱导的肝纤维化模型小鼠肝组织 VEGF、VEGF-R 水平升高, 并有新生血管形成, 与肝纤维化的发生发展有一定相关性。Yoshiji 等^[22]认为 VEGFmRAN 高表达是肝纤维化形成的重要条件之一。活化的 HSC 可表达多种促血管生成因子, 作用于内皮细胞使其发生增殖与迁移, 促进血管新生并加速肝纤维化进程。

参考文献

- Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia[J]. Lancet, 2009, 374(9702): 1704-1713.
- Troeger JS, Schwabe RF. Hypoxia and hypoxia-inducible factor 1alpha: potential links between angiogenesis and fibrogenesis in hepatic stellate cells[J]. Liver Int, 2011, 31(2): 143-145.
- Yang L, Kwon J, Popov Y, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice[J]. Gastroenterology, 2014, 146(5): 1339-1350.
- Nakamura K, Tanoue A. Etiology of biliary atresia as a developmental anomaly: recent advances[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2013, 20(5): 459-464.
- 彭飞, 段翔飞. 胆道闭锁发病机制研究进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2015(1): 62-64.
- Uflacker R, Pariente DM. Angiographic findings in biliary atresia[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2004, 27(5): 486-490.
- Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia[J]. Radiology, 2007, 245(2): 549-555.
- Caruso S, Miraglia R, Milazzo M, et al. Multidetector computed tomography hepatic findings in children with end-stage

- biliary atresia[J]. Eur Radiol, 2010, 20(6): 1468-1475.
- Dos SJ, Da ST, Da SV, et al. Medial thickening of hepatic artery branches in biliary atresia. A morphometric study[J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(4): 637-642.
- 刘丹丹, 詹江华, 高伟, 等. 胆道闭锁患者肝门的病理解剖学研究[J]. 临床小儿外科杂志, 2015, 14(1): 20-24.
- Elpek GO. Angiogenesis and liver fibrosis[J]. World J Hepatol, 2015, 7(3): 377-391.
- Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases[J]. Hepatology, 2012, 55(2): 622-633.
- Kaur S, Anita K. Angiogenesis in liver regeneration and fibrosis: "a double-edged sword"[J]. Hepatol Int, 2013, 7(4): 959-968.
- Fratta LX, Hoss GR, Longo L, et al. Hypoxic-ischemic gene expression profile in the isolated variant of biliary atresia[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 17(10): 361-364.
- Lee HC, Chang TY, Yeung CY, et al. Genetic variation in the vascular endothelial growth factor gene is associated with biliary atresia[J]. J Clin Gastroenterol, 2010, 44(2): 135-139.
- Edom PT, Meurer L, Da ST, et al. Immunolocalization of VEGF A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the liver from patients with biliary atresia[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011, 19(4): 360-368.
- Gaudio E, Onori P, Franchitto A, et al. Hepatic microcirculation and cholangiocyte physiopathology[J]. Ital J Anat Embryol, 2005, 110(2 Suppl 1): 71-75.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(2): G307-G317.
- Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, et al. Cholangiocytes and blood supply[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(22): 3546-3552.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism[J]. Gastroenterology, 2006, 130(4): 1270-1282.
- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis[J]. Hepatology, 2002, 35(5): 1010-1021.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis[J]. Gut, 2003, 52(9): 1347-1354.