

# JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 在胆道闭锁肝纤维化中的作用研究

高 婷<sup>1</sup> 詹江华<sup>2</sup> 陈 扬<sup>1</sup> 张爱华<sup>2</sup> 卫园园<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 研究 c-Jun 氨基末端激酶 2(c-Jun N-terminal kinase, JNK2)、金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1)及 Collagen Ⅲ 在胆道闭锁(BA)肝组织中的表达情况及在肝纤维化进程中的作用。 **方法** 选取胆管扩张症肝活检病例 10 例,为胆扩组;BA 肝活检病例 15 例,为 BA 组;BA 晚期因肝功能衰竭而行肝移植患者自体肝活检 10 例,为肝移植组。采用 HE 染色观察并评价肝标本纤维化程度;免疫组化染色检测 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 在肝组织中的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测肝组织中 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 基因表达情况。 **结果** ①HE 染色:胆扩组偶可见少许纤维细胞增生;BA 组汇管区增宽,纤维组织增生、桥接纤维化现象普遍,可见假小叶形成;肝移植组汇管区明显增宽,纤维组织增生较重,广泛桥接纤维组织形成,假小叶显著。②免疫组化:胆扩组 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 表达为弱阳性,BA 组及肝移植组 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 蛋白均在肝细胞、汇管区胆管上皮细胞及血管内皮细胞胞质中阳性表达。③半定量分析:三组 JNK2( $0.122 \pm 0.008$ 、 $0.182 \pm 0.017$  和  $0.198 \pm 0.033$ ),TIMP-1( $0.123 \pm 0.009$ 、 $0.185 \pm 0.012$  和  $0.201 \pm 0.017$ )和 Collagen Ⅲ( $0.126 \pm 0.012$ 、 $0.194 \pm 0.008$  和  $0.208 \pm 0.033$ )表达比较,差异有显著统计学意义( $P < 0.001$ );三组中,BA 组及肝移植组 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 表达明显高于胆扩组( $P < 0.05$ );肝移植组 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 蛋白含量与 BA 组比较,差异无统计学意义( $P$  值均  $> 0.05$ )。④qRT-PCR:三组 JNK2、TIMP-1 和 Collagen Ⅲ mRNA 表达水平比较,差异有统计学意义( $0.221(0.17)$  vs  $1.395(1.22)$  vs  $1.095(1.21)$ ,  $H = 17.686$ ,  $P = 0.003$ ;  $0.439(0.31)$  vs  $1.404(0.85)$  vs  $1.571(0.66)$ ,  $H = 20.648$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.917(0.09)$  vs  $1.802(1.35)$  vs  $1.957(1.30)$ ,  $H = 15.555$ ,  $P = 0.007$ ),BA 组及肝移植组肝内 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ mRNA 表达含量比胆扩组高( $P$  值均小于 0.017)。 **结论** JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ 在 BA 患儿随着肝纤维化加重而表达升高,表明其可能参与并促进 BA 肝纤维化进程。

**【关键词】** 胆道闭锁;肝硬化;转化生长因子  $\beta$ 1;免疫组织化学

**Effects of JNK2, TIMP-1 and collagen Ⅲ on liver fibrosis in patients with biliary atresia.** Gao Ting<sup>1</sup>, Zhan Jianghua<sup>2</sup>, Chen Yang<sup>1</sup>, Zhang Aihua<sup>2</sup>, Wei Yuanyuan<sup>1</sup>. 1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Municipal Pediatric Research Institute, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China. Corresponding author: Zhan Jianghua, E-mail: zhanjianghuatj@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the expressions of c-Jun N-terminal kinase (JNK2), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and collagen Ⅲ in liver tissues and elucidate their functions in the process of liver fibrosis of biliary atresia (BA). **Methods** Liver biopsy specimens were collected from congenital biliary dilatation (CBD group,  $n = 10$ ), BA liver biopsy (BA group,  $n = 15$ ), BA children undergoing liver transplantation due to liver failure (liver transplantation group,  $n = 10$ ). Hematoxylin and eosin (HE) staining was used for evaluating the degree of liver fibrosis. And the expressions of JNK2, TIMP-1 and collagen Ⅲ in liver tissue were detected by immunohistochemical staining. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to test the gene expressions of JNK2, TIMP-1 and collagen Ⅲ. **Results** ①HE staining:

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2017.02.006

基金项目:1,国家自然科学基金资助项目(项目号:81570471);  
2,天津市卫生行业重点攻关项目(14KG129)

作者单位:1,天津医科大学研究生院(天津市,300070);2,天津市儿童医院,天津市儿科研究所(天津市,300134)

通信作者:詹江华,E-mail:zhanjianghuatj@163.com

Fiber cell hyperplasia in CBD group; Portal area expansion, fibrous tissue proliferation, bridging fibrosis and little few pseudo lobules in Kasai group; Portal area became widened obviously, fibrous tissue proliferation was heavier, bridging fibrosis generally formed, pseudo-lobular was remarkable in liver transplantation group. ② Immunohistochemistry: The expressions of JNK2, TIMP-1 and collagen III were weakly positive in CBD group. The positive expression of JNK2, TIMP-1 and collagen III protein in hepatocytic cytoplasm, portal area of bile duct epithelial cells and vascular endothelial cells in BA and transplantation groups. Semi-quantitative analysis: The expression levels of JNK2, TIMP-1 and collagen III protein had significant differences among three groups ( $0.122 \pm 0.008$  vs  $0.182 \pm 0.017$  vs  $0.198 \pm 0.033$ ,  $F = 75.687$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.123 \pm 0.009$  vs  $0.185 \pm 0.012$  vs  $0.201 \pm 0.017$ ,  $F = 99.418$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.126 \pm 0.012$  vs  $0.194 \pm 0.008$  vs  $0.208 \pm 0.033$ ,  $F = 54.001$ ,  $P = 0.000$ ); BA and liver transplantation groups were significantly higher than that in CBD group ( $P < 0.05$ ). No significant differences existed in protein level between BA and transplantation groups ( $P > 0.05$ ); qRT-PCR: The mRNA expression levels of JNK2, TIMP-1 and collagen III had significant differences among three groups ( $0.221(0.17)$  vs  $1.395(1.22)$  vs  $1.095(1.21)$ ,  $H = 17.686$ ,  $p = 0.003$ ;  $0.439(0.31)$  vs  $1.404(0.85)$  vs  $1.571(0.66)$ ,  $H = 20.648$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.917(0.09)$  vs  $1.802(1.35)$  vs  $1.957(1.30)$ ,  $H = 15.555$ ,  $P = 0.007$ ); The mRNA expression of JNK2, TIMP-1 and collagen III were higher in BA group and liver transplantation group than those of CBD group ( $P < 0.017$ ).

**Conclusions** The expressions of JNK2, TIMP-1 and Collagen III increased in liver of BA during fibrosis. It hints that the expressions of JNK2, TIMP-1 and collagen III may promote the process of liver fibrosis in BA.

**【Key words】** Biliary Atresia; Liver Cirrhosis; Transforming Growth Factor beta1; Immunohistochemistry

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是危及婴幼儿生命的肝胆系统疾病之一,以肝内外胆管进行性炎症、纤维性梗阻及胆汁淤积为特点,导致进行性肝纤维化和肝硬化,是婴幼儿时期肝移植的主要指征<sup>[1-2]</sup>。BA 患儿早期行 Kasai 手术虽能缓解胆汁淤积症状,但仍有 2/3 的患儿肝纤维化继续进展,最终发展成为肝硬化<sup>[3]</sup>。有研究证实转化生长因子- $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 蛋白能够调节机体细胞生长、分化、凋亡, TGF- $\beta 1$ /Smads 促纤维化通路在 BA 肝纤维化进程中起重要作用<sup>[4]</sup>; 而 c-Jun 氨基末端激酶 2 (c-Jun N-terminal kinase, JNK2) 对 Smad 2/3 蛋白磷酸化等起重要作用<sup>[5]</sup>; 有研究证实基质金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue inhibitors of metalloproteinase-1, TIMP-1) 参与肝纤维化过程中的组织重塑,与肝纤维化程度密切相关<sup>[6]</sup>; 而 Collagen III 作为 TGF- $\beta 1$  信号通路产物,已被证实动物模型肝纤维化中表达增多<sup>[7]</sup>。但以上三种蛋白在 BA 肝组织中不同纤维化时期表达情况尚不十分清晰,本研究旨在检测 JNK2、TIMP-1 及 Collagen III 三种蛋白在 BA 患儿肝组织中的表达情况,并探讨其在 BA 患儿肝纤维化发展过程中的作用机制。

## 材料与方法

### 一、标本来源与分组

本研究收集 2014 年 1 月至 2016 年 10 月入住

天津市儿童医院且确诊为胆管扩张症的患儿 10 例(为胆扩组),其中男性 4 例,女性 6 例,日龄 248 ~ 2 123 d,平均( $1\ 032 \pm 595$ )d; BA 患儿 15 例(为 BA 组),其中男性 7 例,女性 8 例,日龄 19 ~ 95 d,平均( $54 \pm 18$ )d。另外收集 2013 年 1 月至 2016 年 10 月在天津市第一中心医院行肝移植的患儿(均已行 Kasai 手术,后因肝功能衰竭行肝移植) 10 例(为肝移植组),其中男性 6 例,女性 4 例,日龄 219 ~ 2 176 d,平均( $1\ 033 \pm 516$ )d。本实验均通过天津市儿童医院及天津市第一中心医院伦理委员会审查,且患儿监护人均签署了知情同意书。

### 二、主要试剂与仪器

TIMP-1 一抗工作液,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔聚合物)、3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒,均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。JNK2 一抗(1:200), Collagen III 一抗(1:400)购自北京博奥生物技术有限公司。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)引物由北京奥科生物技术有限公司设计及合成,引物序列见表 2。主要仪器: IQ5 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),手持式组织匀浆机(德国 IKA 公司)。Fast Quant RT Kit(With gDNase)、TRIzol(天根生化公司), Super Real PreMix Plus (SYBR Green)。定量分析所用的 ImagePro Plus 5.0 自动分析系统购自美国 Media Cybernetics 公司。

### 三、实验方法

1. 组织学检测:将蜡块标本连续 4  $\mu\text{m}$  切片,分别进行 HE 染色及免疫组化染色。①HE 染色。病理切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水洗,浸染苏木素 5 min,经酸化伊红乙醇液浸染 2 min,梯度乙醇脱水,透明剂浸泡至透明,中性树胶封片等一系列操作,在光学显微镜下观察肝组织细胞形态、肝纤维化程度。②免疫组化染色。病理切片脱蜡至水,枸橼酸盐缓冲液进行抗原修复 15 min,冷却至室温,PBS 缓冲液冲洗 5 min  $\times$  3 次,于 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  37  $^{\circ}\text{C}$  中孵育 10 min,再用 PBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次,滴加一抗(JNK2、TIMP-1 及 Collagen III),于冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,次日取出置于室温,PBS 洗 5 min  $\times$  3 次,加二抗于 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min,PBS 洗 5 min  $\times$  3 次,经 DAB 显色 5 ~ 10 min,镜下观察染色情况,充分水洗,苏木素液染核,脱水、透明、中性树胶封片,于低倍镜( $\times 100$ )下观察染色(棕色)区域,高倍镜( $\times 400$ )下辨别阳性细胞种类及表达情况。③qRT-PCR。术中取各组患儿肝右叶前缘为实验标本,置无菌 EP 管中储存在 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱,依照 TRIzol 法研磨并提取总 RNA,经反转录后,合成 cDNA。PCR 反应体系共 20  $\mu\text{L}$ ,其中包括上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模版 1  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{L}$  2  $\times$  SuperReal PreMix,无酶水补足到 20  $\mu\text{L}$ 。95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,58  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 32 s,扩增 40 个循环。分别测定样本内参(GAPDH)、JNK2、TIMP-1 及 Collagen III 的基因扩增的 Ct 值,每个样本重复 3 次,取 3 次结果平均值为最终 Ct 值; $\Delta\text{Ct}$  = 每个基 Ct 值-内参 Ct;样本基因相对定量 =  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 。

表 1 JNK2、TIMP-1 及 Collagen III 引物序列  
Table 1 Base sequences of primers for qRT-PCR for JNK2, TIMP-1 and collagen III

基因名称	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
GAPDH	上游: ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	252
	下游: TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	
JNK2	上游: GCCAACTGTGAGGAATTATGTCG	246
	下游: GGTGGTGGGGCTTCTGCTT	
TIMP-1	上游: CACCAGAGAACCCACCATGGC	509
	下游: CACTCTGCAGTTTGCAGG	
Collagen III	上游: TTGAAGGAGGATGTTCCCATCT	83
	下游: ACAGACACATATTTGGCATGGTT	

四、免疫组化结果判断免疫组化阳性标准<sup>[8]</sup>  
1. 定性分析:根据染色强度分为无棕黄色(阴性)、淡棕黄色(弱阳性)、棕黄色(阳性)、棕褐色(强阳性)。

2. 半定量分析:每张切片于阳性部位处取 5 个不同视野 100 倍显微镜下图片,经 IPP(Image pro-plus)5.0 分析图片计算 JNK2、TIMP-1 及 Collagen III 蛋白的平均光密度值(AOD),AOD = 肝组织阳性细胞光密度总和/阳性面积。

五、统计学处理  
采用 SPSS 15.0 统计软件分析,正态分布的计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,多重比较方差齐性用 Bonferroni 法,非齐性用 Tamhane 法;非正态分布的计量资料用中位数及四分位数间距[M(IQR)]表示,多组间比较使用 Kruskal-Wallis H 检验,多重比较用 Bonferroni 法进行显著性水平校正。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

一、HE 染色结果  
胆扩组肝组织标本中可见少许纤维细胞增生、少量炎症细胞;BA 组肝组织标本中可见肝细胞变性,偶有坏死,炎细胞大量增生,汇管区增宽,纤维组织增生、桥接纤维化普遍,有假小叶形成;肝移植组肝组织标本中肝细胞严重变形、坏死,汇管区增宽显著,纤维组织增生较重,广泛桥接纤维化,假小叶明显(见图 1)。

二、免疫组化定性分析结果  
JNK2 蛋白:在三组肝组织标本的肝细胞、血管内皮细胞及汇管区胆管上皮细胞胞质中均有表达,在胆扩组表达呈弱阳性,在 BA 组和肝移植组表达呈阳性(图 2A ~ C);TIMP-1 蛋白:在胆扩组肝组织标本的肝细胞、汇管区胆管上皮细胞及血管内皮细胞胞质中呈弱阳性表达;在 BA 组及肝移植组肝组织标本的肝细胞、汇管区胆管上皮细胞及血管内皮细胞胞质中呈阳性表达(图 3A ~ C);Collagen III 蛋白:在胆扩组肝组织标本中,仅在血管内皮细胞、胆管上皮细胞及肝细胞胞质中有弱阳性表达,而 BA 组及肝移植组在以上细胞胞质中呈阳性表达(图 3D ~ F)。

三、三种蛋白免疫组化半定量分析结果  
JNK2、TIMP-1 和 Collagen III 蛋白在三组间的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两两比较发现 BA 组和肝移植组肝组织标本中 JNK2、TIMP-1 和 Collagen III 蛋白表达水平均高于胆扩组( $P < 0.05$ ),但 BA 组与肝移植组比较差异无统计学意义( $P >$

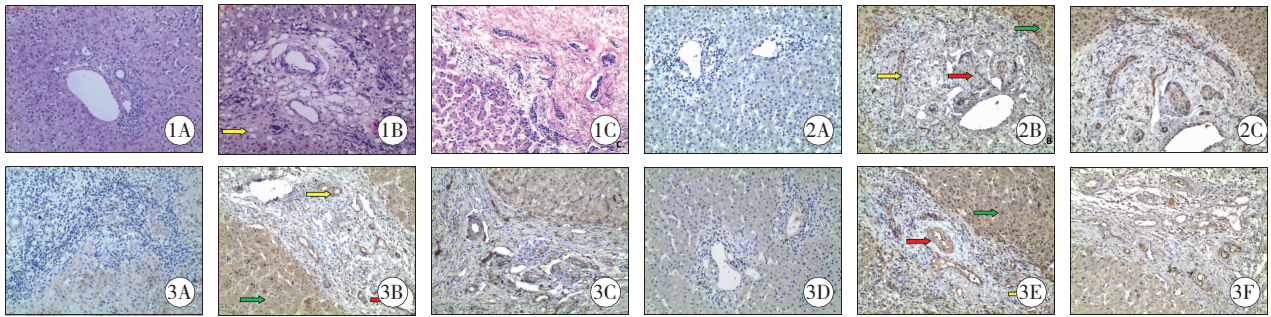


图 1 各组肝组织标本肝纤维化程度比较 (HE, ×100), A:胆扩组;B:BA 组;C:肝移植组。黄色箭头表示肝细胞空泡样变; 图 2 JNK2 在三组肝组织标本中的表达情况 (IHC, ×100), A:JNK2 在胆扩组的表达;B:JNK2 在 BA 组的表达;C:JNK2 在肝移植组的表达。黄色箭头为胆管上皮细胞、红色箭头为血管内皮细胞、绿色箭头为肝细胞; 图 3 TIMP-1 及 Collagen Ⅲ在三组肝组织标本中的表达情况 (IHC, ×100), A:TIMP-1 在胆扩组中的表达;B:TIMP-1 在 BA 组的表达;C:TIMP-1 在肝移植组的表达;D:Collagen Ⅲ在胆扩组的表达;E:Collagen Ⅲ在 BA 组的表达;F:Collagen Ⅲ在肝移植组的表达。黄色箭头为胆管上皮细胞、红色箭头为血管内皮细胞、绿色箭头为肝细胞

Fig. 1 Comparison of fibrosis extent of hepatic tissue specimens among three groups (HE, ×100); Fig. 2 Expression patterns of JNK2 in hepatic tissue specimens of three groups (IHC, ×100); Fig. 3 The expressions of TIMP-1 and Collagen Ⅲ in the liver of three groups (IHC, ×100)

0.05),见表 2。

表 2 三组患儿肝内 JNK2、TIMP-1、Collagen Ⅲ蛋白半定量表达

Table 2	Semi-quantitative intra-hepatic expressions of JNK2, TIMP-1 and collagen Ⅲ in three groups			
分组	JNK2	TIMP-1	Collagen Ⅲ	
胆扩组(n=10)	0.122±0.008	0.123±0.009	0.126±0.012	
BA 组(n=15)	0.182±0.017 <sup>a</sup>	0.185±0.012 <sup>a</sup>	0.194±0.008 <sup>a</sup>	
移植组(n=10)	0.195±0.033 <sup>a</sup>	0.201±0.017 <sup>a</sup>	0.208±0.033 <sup>a</sup>	
F 值	75.687	99.418	54.001	
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	

注:a,与胆扩组比较,P<0.05

#### 四、肝脏组织标本中 JNK2、TIMP-1 和 Collagen Ⅲ mRNA 表达水平比较

JNK2、TIMP-1 和 Collagen Ⅲ在三组间比较差异有统计学意义(P<0.05),两两比较发现 BA 组及肝移植组肝组织标本中表达水平高于胆扩组(P<0.017),见表 3。

表 3 三组患儿中 JNK2、TIMP-1、Collagen Ⅲ mRNA 相对含量比较[M(IQR)]

Table 3	Comparison of expression levels of JNK2 etc. mRNA between three groups M[(IQR)]			
分组	n	JNK2mRNA	TIMP-1mRNA	Collagen Ⅲ mRNA
胆扩组	10	0.221(0.17)	0.439(0.31)	0.917(0.09)
BA 组	15	1.395(1.22) <sup>a</sup>	1.404(0.85) <sup>a</sup>	1.802(1.35) <sup>a</sup>
移植组	10	1.095(1.21) <sup>a</sup>	1.571(0.66) <sup>a</sup>	1.957(1.30) <sup>a</sup>
H 值		17.686	20.648	15.555
P 值		0.003	<0.001	0.007

注:a,与胆扩组比较,P<0.017

#### 讨 论

BA 患儿以肝内外胆管梗阻,肝脏进行性炎症及纤维化为主要病理特征,早期行 Kasai 手术可改善胆汁淤积,但不能终止其纤维化进程<sup>[9]</sup>。已有实验研究证实 TGF-β1 信号通路在 BA 肝纤维化过程中起促进作用。在 BA 肝纤维化进程中,肝脏内 TGF-β1 信号通路经各种因子刺激下被激活,进而诱导肝细胞细胞质内的 Smad 2/3 磷酸化,生成磷酸化-Smad 2/3(p-Smad2/3),p-Smad 2/3 与 Smad 4 形成络合物,并向细胞核内移动,启动细胞外基质蛋白基因转录,促进肝纤维化进程<sup>[2,10-11]</sup>。JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ作为 TGF-β1 信号通路的调节蛋白及产物,在肝纤维化中的作用已有研究<sup>[5-7]</sup>。但其在 BA 患儿肝脏中的表达情况尚未见报道。本研究通过从蛋白水平及基因水平检测 JNK2、TIMP-1 及 Collagen Ⅲ在 BA 肝内表达情况,探讨这几种因子在 BA 肝纤维化进展的作用。

一、JNK2 主要参与 TGF-β1 信号通路相关蛋白磷酸化及核易位过程,进而促进肝纤维化进程。

JNK2 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号通路中的不同亚型,Jiang Y 等研究结果显示 MAPK 信号蛋白抑制剂通过阻断 Smad 2/3 磷酸化及 p-Smad 2/3 与 Smad 4 核易位,阻断 Smad 2/3/4 复合物形成,进而导致血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1(Plasma plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)蛋白及 mRNA 表达降低,提示 JNK2 信号蛋白参与并促进肝纤维化进程<sup>[12]</sup>。p38、

ERK1/2 蛋白在 BA 肝纤维化中的作用,已在前期研究中得到证实<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,JNK2 在 BA 患儿肝脏组织中肝细胞、汇管区血管内皮细胞及胆管上皮细胞胞质等中阳性表达,其表达水平较对照组明显增高,BA 组 JNK2 免疫组化半定量及 mRNA 表达量均较对照组高,提示其可能在 BA 肝纤维化进程中起促进作用。

## 二、TIMP-1 参与 BA 肝纤维化过程中的组织重塑过程

TIMP-1 由活化的肝星状细胞产生,其通过抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和通过抗细胞凋亡和增殖来影响 MMP 之间的相互作用,具体通过促进可溶性 MMP 与膜结合位点之间的相互作用,使可溶性 MMP 在细胞-基质界面活化,进而使细胞通过基质迁移,活化的 MMP 通过降解正常肝脏基质和抑制积累的纤维状胶原蛋白降解,来促进肝纤维化<sup>[6,14]</sup>。已有研究证实,在终末期肝硬化患者中,TIMP-1 基因表达和血清水平上调<sup>[15]</sup>。而其在 BA 肝组织中的表达及与 Kasai 术后肝纤维化进展的关系则有不同观点。本研究结果证实,其在 BA 患儿肝脏组织标本中肝细胞胞质、汇管区血管内皮细胞胞质及胆管上皮细胞等呈阳性表达,其表达水平较对照组明显增高,TIMP-1 mRNA 表达量也较对照组高。这些实验结果表明 TIMP-1 可能通过抑制 MMP-9 等及影响 MMP 之间相互作用,进而有助于肝脏组织肝纤维化过程中组织重塑过程,并加速 BA 肝纤维化进程。

## 三、Collagen III 作为 TGF- $\beta$ 1 信号通路产物,与 BA 肝纤维化形成直接相关

在 BA 肝纤维化进展中,肝星状细胞具有关键作用,当肝组织受损后,在各种细胞因子及炎症因子作用下,激活 TGF- $\beta$ 1 信号通路,最终使肝星形细胞转换成肌成纤维细胞,使富含胶原蛋白的细胞外基质过量沉积如 Collagen,发生肝纤维化<sup>[16]</sup>。Sferra R 通过动物模型证实在肝纤维化过程中, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白、Collagen I-III 和结缔组织生长因子的表达增加,同时伴随着  $\alpha$ 6、TGF $\beta$ 1、Smad 3 等表达上调<sup>[7]</sup>。Suominen JS 等研究证实 Collagen I 在 BA 肝组织中表达较对照组高,且 Kasai 手术时表达量少的自体肝生存率较表达高者预后好<sup>[17]</sup>。而对于 Collagen III 在 BA 的作用目前未见文献报道。本实验结果显示,在胆扩组肝组织标本中仅在血管内皮细胞、胆管上皮细胞及肝细胞胞质中有弱阳性表达;在 BA 组及肝移植组肝组织标本中,以上细胞胞质

中呈阳性表达,且 Collagen III 在 BA 组及肝移植组无论在蛋白水平还是基因水平表达均高于胆扩组。由此表明 Collagen III 作为 TGF- $\beta$ 1 信号通路产物,在肝纤维化进程中,可能随着肝纤维化严重程度增加而持续增多,说明其在肝纤维化后期加速肝硬化进程。

综上所述,TGF- $\beta$ 1 在 BA 患儿肝纤维化中起促进作用,在肝纤维化早期阶段其促进作用大于晚期肝硬化阶段。另外,JNK2、TIMP-1 及 Collagen III 在肝纤维化过程中表达明显增高,JNK2 可通过影响 TGF- $\beta$ 1 信号通路蛋白磷酸化及核易位进而促进肝纤维化进程;而 TIMP-1 则有利于肝脏组织肝纤维化过程中组织重塑,促进肝纤维化进展;Collagen III 作为 TGF- $\beta$ 1 信号通路产物细胞外基质的组成部分之一,尤其是在肝硬化时期,对肝纤维化进程起直接作用。以上几种蛋白对 BA 肝纤维化不同时期都有相应的促进作用,在将来的研究中,是否可以通过相关抑制实验来终止或是延缓肝纤维化进程,还有待更进一步通过建立 BA 小鼠慢性纤维化模型行体外抑制实验来进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 詹江华,陈亚军. 肝移植时代如何看待胆道闭锁的诊治[J]. 中华小儿外科杂志, 2014, 35(4): 245-247. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2014.04.003.  
Zhan JH, Chen YJ. How to evaluate the diagnosis and management of biliary atresia in the era of liver transplantation[J]. Chin J Pediatr Surg, 2014, 35(4): 245-247. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2014.04.003.
- 2 Lampela H, Kosola S, Heikkilä P, et al. Native liver histology after successful portoenterostomy in biliary atresia[J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48(8): 721-728. DOI: 10.1097/MCG.000000000000013.
- 3 孙颖华,郑珊,钱蕾英,等. 胆道闭锁 Kasai 术后超声随访的应用价值[J]. 临床小儿外科杂志, 2016, 15(2): 144-149. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2016.02.013.  
Sun YH, Zheng S, Qian QY, et al. Ultrasonographic follow-up on the children with biliary atresia after Kasai hepatoporoenterostomy[J]. J Clin Pediatr Surg, 2016, 15(2): 144-149. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2016.02.013.
- 4 丁美云,詹江华,赵丽,等. TGF- $\beta$ 1、Smad2 在胆道闭锁肝纤维化中的作用[J]. 天津医药, 2016, 44(7): 810-813. DOI: 10.11958/20150242.  
Ding MY, Zhan JH, Zhao L, et al. The function of TGF- $\beta$ 1 and Smad2 in liver fibrosis of biliary atresia [J]. Tianjin Med J, 2016, 44(7): 810-813. DOI: 10.11958/20150242.

- 5 Jafri M, Donnelly B, McNeal M, et al. MAPK signaling contributes to rotaviral-induced cholangiocyte injury and viral replication [J]. *Surgery*, 2007, 142(2):192–201. DOI:10.1016/j.surg.2007.03.008.
- 6 Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis[J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(2):193–203. DOI:10.1242/dmm.012062.
- 7 Sferra R, Vetusch A, Pompili S, et al. Expression of pro-fibrotic and anti-fibrotic molecules in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis[J]. *Pathol Res Pract*, 2016, S0344–0338(16)30641–0. DOI:10.1016/j.prp.2016.11.004.
- 8 姜洋, 金小明, 屠康. 平均阳性染色面积百分比法分析免疫组化结果初探[J]. *生物医学工程学报*, 2007, 24(3):650–653. DOI:10.3321/j.issn:1001–5515.2007.03.039.  
Jiang Y, Jin XM, Tu K. A primary study using the method of average positive stained area percentage to measure the immunohistochemistry results [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2007, 24(3):650–653. DOI:10.3321/j.issn:1001–5515.2007.03.039.
- 9 詹江华. 胆道闭锁早期筛查现状及对策[J]. *天津医药*, 2015, 43(1):1–3. DOI:10.3969/j.issn.0253–9896.2015.01.001.  
Zhan JH. The early screening and countermeasures of biliary atresia [J]. *Tianjin Med J*, 2015, 43(1):1–3. DOI:10.3969/j.issn.0253–9896.2015.01.001.
- 10 Kamato D, Burch ML, Piva TJ, et al. Transforming growth factor- $\beta$  signaling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10):2017–2024. DOI:10.1016/j.cellsig.2013.06.001.
- 11 丁美云, 高婷, 卫园园, 等. p-smad3 在胆道闭锁肝纤维化中的作用机制研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2016, 15(1):29–33. DOI:10.3969/j.issn.1671–6353.2016.01.009.  
Ding MY, Gao T, Wei YY, et al. The study on mechanism of p-smad3 in hepatic fibrosis of biliary atresia[J]. *J Clin Ped Sur*, 2016, 15(1):29–33. DOI:10.3969/j.issn.1671–6353.2016.01.009.
- 12 Jiang Y, Wu C, Boye A, et al. MAPK inhibitors modulate Smad2/3/4 complex cyto-nuclear translocation in myofibroblasts via Imp7/8 mediation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1–2):255–262. DOI:10.1007/s11010-015-2443-x.
- 13 高婷, 詹江华, 丁美云, 等. 整合素  $\alpha\text{v}\beta 8$ 、p38 及 ERK1/2 在胆道闭锁患儿肝脏中的表达及意义[J]. *天津医药*, 2016, 44(7):821–824. DOI:10.11958/20150242.  
Gao T, Zhan JH, Ding MY, et al. The expression and significance of integrin  $\alpha\text{v}\beta 8$ , p38 and ERK1/2 in the liver of children with biliary atresia [J]. *Tianjin Med J*, 2016, 44(7):821–824. DOI:10.11958/20150242.
- 14 Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2009, 24:143–152. DOI:10.3892/ijmm.00000217.
- 15 Kerola A, Lampela H, Lohi J, et al. Increased MMP-7 expression in biliary epithelium and serum underpins native liver fibrosis after successful portoenterostomy in biliary atresia [J]. *J Pathol Clin Res*, 2016, 2(3):187–198. DOI:10.1002/cjp2.50.
- 16 Ramm GA, Nair VG, Bridle KR, et al. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(2):527–535. DOI:10.1016/S0002-9440(10)65595-2.
- 17 Suominen JS, Lampela H, Heikkil P, et al. Myofibroblastic cell activation and neovascularization predict native liver survival and development of esophageal varices in biliary atresia [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(12):3312–3319. DOI:10.3748/wjg.v20.i12.3312.

(收稿日期:2016-02-02)

(本文编辑:王爱莲 仇 君)

**本刊引文格式:** 高婷, 詹江华, 陈扬, 等. JNK2、TIMP-1 及 Collagen III 在胆道闭锁肝纤维化中的作用 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2017, 16(2):127–132. DOI: 10.3969/j.issn.1671–6353.2017.02.006

**Citing this article as:** Gao T, Zhan JH, Chen Y, et al. The effects of JNK2、TIMP-1 and Collagen III on liver fibrosis in patients with biliary atresia[J]. *J Clin Ped Sur*, 2017, 16(2):127–132. DOI: 10.3969/j.issn.1671–6353.2017.02.006