

· 专题 · 胆道闭锁 ·

PDGF-BB 在胆道闭锁患儿肝脏中的表达
及其与上皮间质转化的相关性研究

全文二维码

周辉 李索林 时保军 仲智勇 方燕斌 杨晓锋

河北医科大学第二医院小儿外科, 石家庄 050000

通信作者: 李索林, Email: lisuolin@263.net

【摘要】 目的 探讨胆道闭锁(biliary atresia, BA)患儿肝脏中血小板源性生长因子-BB(platelet-derived growth factor, PDGF-BB)、锌指转录因子(Snail 1)和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的表达情况以及三者之间的关系。**方法** 回顾性分析2018年1月至2019年12月河北医科大学第二医院小儿外科收治的BA患儿25例(BA组)、胆总管囊肿患儿15例(CCC组)以及肝脏肿瘤患儿10例(NL组)的临床资料;收集患儿活检组织,分别应用免疫组织化学法、实时荧光定量PCR检测PDGF-BB、Snail 1、E钙黏素(E-cadherin)和N钙黏素(N-cadherin)的表达情况,并对上述指标进行相关性分析。**结果** BA组患儿肝脏中PDGF-BB、Snail 1和N-cadherin的mRNA和蛋白表达均显著高于CCC组和NL组,差异有统计学意义($P < 0.05$),E-cadherin的mRNA和蛋白表达均显著低于CCC组和NL组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中PDGF-BB与Snail 1 mRNA和蛋白的表达呈正相关($r = 0.772, P < 0.05$; $r = 0.780, P < 0.05$);PDGF-BB与N-cadherin mRNA和蛋白表达呈正相关性($r = 0.835, P < 0.05$; $r = 0.702, P < 0.05$);PDGF-BB与E-cadherin mRNA和蛋白表达呈负相关($r = -0.756, P < 0.05$; $r = -0.696, P < 0.05$);Snail 1与N-cadherin mRNA和蛋白表达呈正相关($r = 0.723, P < 0.05$; $r = 0.702, P < 0.05$);Snail 1与E-cadherin mRNA和蛋白表达呈负相关($r = -0.720, P < 0.05$; $r = -0.636, P < 0.05$)。肝纤维化程度与PDGF-BB的表达呈正相关($r = 0.977, P < 0.05$);肝纤维化程度与E-cadherin蛋白表达呈负相关($r = -0.722, P < 0.05$);肝纤维化程度与N-cadherin蛋白表达呈正相关($r = 0.711, P < 0.05$);肝纤维化程度与Snail 1表达呈正相关($r = -0.810, P < 0.05$)。**结论** PDGF-BB可能通过增强转录因子Snail 1的转录活性,促进BA患儿发生EMT,这为BA患儿的诊治提供了新的理论依据。

【关键词】 胆道闭锁;血小板源性生长因子;上皮-间质转化;蛋白质生物合成

基金项目: 河北省政府资助临床医学优秀人才培养计划项目(2019008)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202012064-007

Hepatic expression of PDGF-BB in infants with biliary atresia and its correlation with epithelial mesenchymal transition

Zhou Hui, Li Suolin, Shi Baojun, Zhong Zhiyong, Fang Yanbin, Yang Xiaofeng

Department of Pediatric Surgery, Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Li Suolin, Email: lisuolin@263.net

【Abstract】 Objective To explore the hepatic expression of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), Snail 1 and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in children of biliary atresia (BA) and examine the relationship among three parameters. **Methods** From January 2018 to December 2019, there were BA ($n = 25$), choledochal cysts (CCC, $n = 15$) and liver tumors (NL, $n = 10$). After collecting biopsy tissues, immunohistochemistry and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) were employed for detecting the expression of PDGF-BB, Snail 1, E-cadherin and N-cadherin and analyzing their correlations. **Results** mRNA and protein expressions of PDGF-BB, Snail 1 and N-cadherin were significantly higher in liver of BA group than those of CCC/NL group ($P < 0.05$); mRNA and protein expressions of E-cadherin were significantly lower than that of CCC/NL group ($P < 0.05$). PDGF-BB was correlated positively with Snail 1 mRNA and protein expressions ($r = 0.772, P < 0.05$; $r = 0.780, P < 0.05$); PDGF-BB was correlated positively with

N-cadherin mRNA and protein expressions ($r=0.835, P<0.05$; $r=0.702, P<0.05$); PDGF-BB and E-cadherin mRNA and protein expressions were correlated negatively ($r=-0.756, P<0.05$; $r=-0.696, P<0.05$); Snail 1 and N-cadherin mRNA and protein expression were correlated positively ($r=0.723, P<0.05$; $r=0.702, P<0.05$); Snail 1 was correlated negatively with E-cadherin mRNA and protein expressions ($r=-0.720, P<0.05$; $r=-0.636, P<0.05$). **Conclusion** In BA children, PDGF-BB may promote EMT through enhancing the transcription activity of transcription factor Snail 1. Thus it may provide new theoretical rationales for diagnosing and treating BA children.

【Key words】 Biliary Atresia; Platelet-Derived Growth Factor; Epithelial-Mesenchymal Transition; Protein Biosynthesis

Fund program: Clinical Medical Talent Training Project of Hebei Provincial Government (2019008)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202012064-007

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是一种进行性纤维化梗阻性胆管疾病,主要涉及肝脏和肝内胆管系统^[1]。如未经治疗,患者肝脏会迅速纤维化,导致门脉高压症和终末期肝病,病死率极高。因此,了解 BA 所致肝纤维化的病理机制尤为重要。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的分子基础是细胞失去正常的上皮特征,如细胞间黏附分子缺如,并获得间充质表型^[2]。近年来研究发现,胆管上皮细胞的 EMT 可能与某些慢性肝胆疾病的导管周围纤维化和门静脉纤维化有关^[3-6]。血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是包括成纤维细胞和平滑肌细胞等间充质来源细胞的主要有丝分裂原(诱发有丝分裂或细胞分裂过程的任何物质)^[5,7]。肿瘤上皮细胞或内皮细胞高表达 PDGF-BB,通过向新生血管招募外膜细胞促进血管生成,并促进其分化为成纤维细胞样表型^[8-9]。Snail 1 是一种锌指转录因子,在 EMT 的启动中起关键作用^[10]。而在 BA 的肝组织中 PDGF-BB 的表达及其与 EMT 的关系尚不清楚。本文通过免疫组织化学法和实时荧光定量 PCR 法检测 BA 患儿肝脏中 PDGF-BB、Snail 1、E 钙黏素(E-cadherin)和 N 钙黏素(N-cadherin)在蛋白和 mRNA 水平上的表达,并分析他们之间的关系,以期 BA 的诊断和治疗提供新的科研依据。

资料与方法

一、研究对象

选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月河北医科大学第二医院小儿外科收治的 50 例患儿,男 28 例,女 22 例,年龄(67 ± 8)d。其中 BA 25 例(BA 组),胆总管囊肿 15 例(choledochal cyst, CCC 组)、正常对照 10 例(NL 组)。BA 组入选标准:①月龄 < 6 个

月,临床资料完整;②均接受 Kasai 手术治疗与肝活检手术(取肝尾叶约 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小组织为活检组织,术后留取组织标本),手术期间均确诊为 BA。CCC 组入选标准:①月龄 < 6 个月,临床资料完整;②术前均无肝功能受损或者胆道梗阻现象;③均接受胆总管囊肿根治手术与肝活检手术(取肝尾叶约 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小组织为活检组织,术后留取组织标本),手术期间确诊为先天性胆总管囊肿。NL 组入选标准:①月龄 < 6 个月,为同期手术的肝脏错构瘤、肝母细胞瘤患儿,临床资料完整;②术前均无肝功能受损或者胆道梗阻现象;③术前肝功能检查结果均显示正常;④均接受手术治疗(术后取肿物旁正常肝组织为组织标本)。排除标准:①凝血功能差或伴其他疾病不能耐受手术及麻醉的患儿;②术后 2 个月内接受肝移植患儿。BA 组、CCC 组分别于全身麻醉下实施肝门-空肠吻合术(Kasai 术式)、胆道探查或重建术,收集患儿肝组织。

手术前收集患儿的临床病理数据包括年龄、性别、白蛋白、总胆红素、直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶和 γ -谷氨酰转氨酶。上述标本的获取均取得患儿监护人的知情同意,并经河北医科大学第二医院伦理委员会批准(2021-R381)。

二、主要试剂

免疫组化染色试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,PDGF-BB 兔多克隆抗体(bs-1316R)和 Snail 1 兔多克隆抗体(bs-1371R)购自北京博奥森公司,E-cadherin 兔多克隆抗体(PB0583)和 N-cadherin 兔多克隆抗体(BA0673)购自武汉博士德生物工程有限公司,抗原修复液购自基因科技上海有限公司。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,Platinum SYBR SuperMix 试剂,逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司,PCR 引物购自

锐博公司。

三、实时荧光定量 PCR 检测三组患儿肝组织 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取 BA 组、CCC 组、NL 组肝组织的总 RNA,按照反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书提供的方法进行反转录,并利用实时荧光定量 PCR 方法检测 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 的表达量,GAPDH 为内参。表 1 列出了 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin、N-cadherin 和 GAPDH 的引物序列。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 15 s、60℃ 1 min,共 40 个循环;72℃ 5 min。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算三组肝组织中 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin mRNA 的相对表达水平。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Sequences of real-time PCR primers

指标		Primer sequences(5'-3')
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	F	CGCTGAGTACGTCGTGGAGTC
	R	GTGATGATCTTGAGGCTGTTGTC
血小板源性生长因子-BB	F	ATATTCGAACCCAGCCACGA
	R	TGAACAGTGCTCCCTGCATA
锌指转录因子-1	F	AATCGGAAGCCTAACTACAGCGAG
	R	CCTTGGCCTCAGAGAGCTGG
N 钙黏素	F	ATGAAAGACCCATCCACGC
	R	CCTGCTCACCACCACTAC
E 钙黏素	F	GAGAAACAGGATGGCTGAAGG
	R	TGAGGATGGTGAAGCGATGG

注 F:正向引物;R:反向引物

四、免疫组织化学法检测三组患儿肝组织 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的表达

将石蜡病理切片按照试剂盒说明书方法检测 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的表达情况。PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 抗体分别以 1:200、1:200、1:200 和 1:100 稀释,二抗和辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素均为试剂盒中的原液,加入 DAB 试剂显色后,用苏木精对比染色,中性树胶封片后于显微镜下观察染色情况。

免疫组化染色以细胞质或细胞核或细胞膜内出现棕黄色颗粒定义为阳性细胞,采用双盲法观察切片全部视野,采用半定量积分法判断结果,标准如下:①阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>76%为

4 分;②染色阳性强度,无着色为 0 分;黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;深棕色为 3 分。将①和②两者积分相乘所得数值 ≤ 2 分定义为阴性表达,>2 分定义为阳性表达^[11]。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

肝脏纤维化分级:标本采用 Masson 染色。参照 Ohkuma's 分级标准对肝脏纤维化程度进行划分: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 级为伸向邻近门管区重度桥接纤维化,IV 级为假小叶及肝硬化形成。

Masson 的三色染色是根据制造商的规程(GENMED SCIENTIFICS INC,USA)进行的。胶原纤维被染成蓝色,细胞核被染成黑色,背景被染成红色。肝纤维化根据 Metavir 分级系统 16 评估如下:F0 代表无纤维化,F1 代表门脉区域轻度纤维化,F2 代表邻近门脉区域轻度桥接纤维化,F3 代表邻近门脉区域严重桥接纤维化,F4 代表肝硬化和环形纤维化伴结节形成。

五、统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行数据分析。计数资料用频数、构成比表示,各免疫组化指标阳性率比较采用 χ^2 检验;服从正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 F 检验,两两比较采用 LSD 检验;各指标相关性分析采用 Spearman 等级相关; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、BA 组、CCC 组和 NL 组患儿临床病理参数对比

所有患儿的临床病理参数特征如表 1 所示。BA 组、CCC 组及 NL 组白蛋白、碱性磷酸酶水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。BA 组、CCC 组及 NL 组总胆红素、直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、 γ -谷氨酰转移酶水平差异有统计学意义($P < 0.05$);其中 BA 组与 CCC 组总胆红素、直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、 γ -谷氨酰转移酶水平差异有统计学意义($P < 0.05$),BA 组与 NL 组总胆红素、直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、 γ -谷氨酰转移酶水平差异有统计学意义($P < 0.05$),CCC 组及 NL 组总胆红素、直接胆红素、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、 γ -谷氨酰转移酶水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

二、BA 组、CCC 组和 NL 组患儿肝组织 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin mRNA 的表达

BA 组、CCC 组及 NL 组患儿肝组织中 PDGF-BB mRNA、Snail 1 mRNA、E-cadherin mRNA、N-cadherin mRNA 的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。BA 组中 PDGF-BB mRNA、Snail 1 mRNA、N-cadherin mRNA 的相对表达量显著高于 CCC 组和 NL 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),BA 组中 E-cadherin mRNA 的相对表达量显著低于 CCC 组和 NL 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 CCC 组和 NL 组中 PDGF-BB mRNA、Snail 1 mRNA、E-cadherin mRNA、N-cadherin mRNA 的相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

三、BA 组、CCC 组和 NL 组中肝组织 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的表达

PDGF-BB 阳性产物主要定位于细胞质和细胞核(图 1A 至图 1C);Snail 1 阳性产物主要定位于细

胞质和细胞核(图 1D 至图 1F);E-cadherin 阳性产物主要定位于细胞膜和细胞质(图 1G 至图 1I);N-cadherin 阳性产物主要定位于细胞质,部分表达于细胞膜中(图 1J 至图 1L)。BA 组、CCC 组及 NL 组患儿肝组织 PDGF-BB 蛋白、Snail 1 蛋白、E-cadherin 蛋白、N-cadherin 蛋白的阳性表达率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。BA 组 PDGF-BB 蛋白、Snail 1 蛋白、N-cadherin 蛋白的表达率显著高于 CCC 组和 NL 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),BA 组 E-cadherin 蛋白的表达率显著低于 CCC 组和 NL 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 CCC 组和 NL 组 PDGF-BB 蛋白的表达率差异无统计学意义 ($P = 1.00$)。

四、PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin mRNA 表达的相关性

PDGF-BB 与 Snail 1 mRNA 的表达呈正相关

表 2 胆道闭锁组、胆总管囊肿组和对照组患儿临床病理参数($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Clinicopathological parameters of three groups($\bar{x} \pm s$)

分组特征	白蛋白 (g/dL)	总胆红素 (mg/dL)	直接胆红素 (mg/dL)	丙氨酸转氨酶 (IU/L)	天冬氨酸转氨酶 (IU/L)	碱性磷酸酶 (IU/L)	γ -谷氨酰转氨酶 (IU/L)
BA 组($n=25$)	4.13 \pm 0.23	4.22 \pm 0.61 ^b	3.65 \pm 1.41 ^b	151.96 \pm 18.52 ^b	141.51 \pm 17.22 ^b	571.64 \pm 52.33 ^b	555.03 \pm 26.15 ^b
CCC 组($n=15$)	4.32 \pm 0.28	0.71 \pm 0.37 ^a	0.45 \pm 0.16 ^a	74.19 \pm 23.13 ^a	78.27 \pm 14.47 ^a	344.19 \pm 82.36 ^a	24.28 \pm 8.96 ^a
NL 组($n=10$)	4.24 \pm 0.31	0.69 \pm 0.27 ^a	0.43 \pm 0.18 ^a	78.26 \pm 19.53 ^a	80.12 \pm 15.34 ^a	351.23 \pm 79.47 ^a	23.22 \pm 9.52 ^a
F 值	0.560	9 968.036	160 104.900	90.067	76.458	4 992.580	6 176.661
P 值	0.577	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

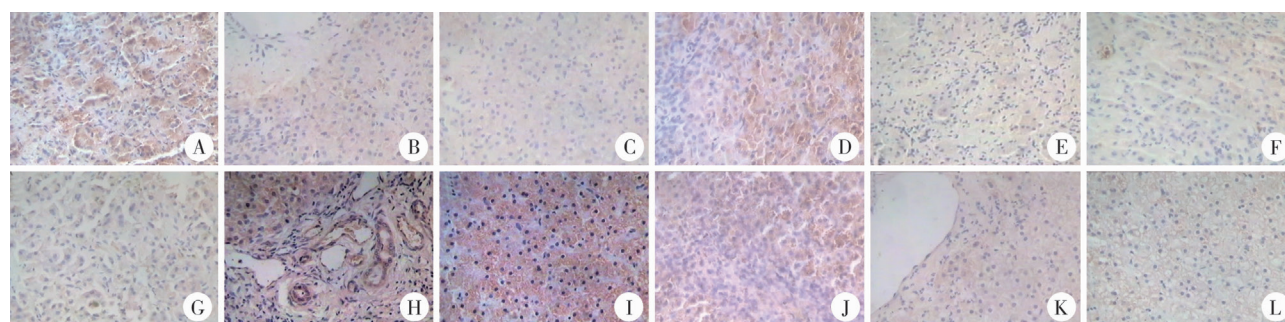
注 BA:胆道闭锁;CCC:胆道发育不良;NL:正常组织;^a代表与 BA 组相比差异有统计学意义;^b代表与 CCC 组相比差异有统计学意义

表 3 胆道闭锁组、胆总管囊肿组和对照组患儿肝组织中 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin mRNA 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression of PDGF-BB,Snail 1,E-cadherin and N-cadherin mRNA in liver tissues of three groups($\bar{x} \pm s$)

分组相对表达量	PDGF-BB mRNA	Snail 1 mRNA	E-cadherin mRNA	N-cadherin mRNA
BA 组($n=25$)	3.21 \pm 0.39 ^b	2.98 \pm 0.35 ^b	0.52 \pm 0.21 ^b	2.98 \pm 0.31 ^b
CCC 组($n=15$)	1.37 \pm 0.22 ^a	1.16 \pm 0.21 ^a	1.26 \pm 0.28 ^a	1.42 \pm 0.16 ^a
NL 组($n=10$)	1.28 \pm 0.24 ^a	1.13 \pm 0.12 ^a	1.21 \pm 0.24 ^a	1.37 \pm 0.13 ^a
F 值	1 623.759	619.557	226.799	529.132
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注 BA:胆道闭锁;CCC:胆道发育不良;NL:正常组织;^a代表与 BA 组相比差异有统计学意义;^b代表与 CCC 组相比差异有统计学意义



注 A:PDGF-BB 在 BA 组肝组织中强表达;B:PDGF-BB 在 CCC 组肝组织中弱表达;C:PDGF-BB 在 NL 组肝组织中弱表达;D:Snail 1 在 BA 组肝组织中强表达;E:Snail 1 在 CCC 组肝组织中弱表达;F:Snail 1 在 NL 组肝组织中弱表达;G:E-cadherin 在 BA 组肝组织中弱表达;H:E-cadherin 在 CCC 组肝组织中强表达;I:E-cadherin 在 NL 组肝组织中强表达;J:N-cadherin 在 BA 组肝组织中强表达;K:N-cadherin 在 CCC 组肝组织中弱表达;L:N-cadherin 在 NL 组肝组织中弱表达;BA:胆道闭锁;CCC:胆总管囊肿

图 1 胆道闭锁组患儿肝组织中 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的表达情况(SP 染色, $\times 400$)

Fig. 1 Immunohistochemical expressions of PDGF-BB,Snail 1,E-cadherin and N-cadherin in liver tissues (SP, $\times 400$)

($r=0.772, P<0.05$); PDGF-BB 与 E-cadherin mRNA 表达呈负相关($r=-0.756, P<0.05$); PDGF-BB 与 N-cadherin mRNA 表达呈正相关($r=0.835, P<0.05$); Snail 1 与 E-cadherin mRNA 表达呈负相关($r=-0.720, P<0.05$); Snail 1 与 N-cadherin mRNA 表达呈正相关($r=0.723, P<0.05$)。

五、PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的相关性

PDGF-BB 与 Snail 1 蛋白的表达呈正相关($r=0.780, P<0.05$); PDGF-BB 与 E-cadherin 蛋白表达呈负相关($r=-0.696, P<0.05$); PDGF-BB 与 N-cadherin 蛋白表达呈正相关($r=0.702, P<0.05$); Snail 1 与 E-cadherin 蛋白表达呈负相关($r=-0.636, P<0.05$); Snail 1 与 N-cadherin 蛋白表达呈正相关($r=0.702, P<0.05$)。

六、PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 表达与肝纤维化程度的相关性

肝纤维化程度与 PDGF-BB 表达呈正相关($r=0.977, P<0.05$); 肝纤维化程度与 E-cadherin 蛋白表达呈负相关($r=-0.722, P<0.05$); 肝纤维化程度与 N-cadherin 蛋白表达呈正相关($r=0.711, P<0.05$); 肝纤维化程度与 Snail 1 表达呈正相关($r=-0.810, P<0.05$)。

讨 论

BA 是以肝内胆管大量增生、胆道炎性和纤维化性闭塞为病理特点的疾病,即便早期给予 Kasai 手术,大多数患儿仍会出现进行性肝纤维化,预后极差。近年来研究发现 EMT 是增加纤维细胞数量的重要病理途径,被认为是肝纤维化中产生肌成纤维细胞的机制之一。最新研究显示,过度活化的 Hedgehog 信号通路和肝内胆管的 EMT 是 BA 的显著特征,这可能与胆道畸形和纤维化有关^[11]。因此,我们力求寻找 EMT 形成的相关机制,阻止纤维化进展,为患儿的临床治疗提供理论依据。目前,BA 患儿肝脏组织中 PDGF-BB、Snail 1、E-cadherin 和 N-cadherin 的关系,尚不明确。

一、EMT 相关蛋白在 BA 患儿中的表达情况

在上皮细胞获得间充质表型的过程中,E-钙黏蛋白表达降低^[12]。波形蛋白的出现、E-钙黏蛋白表达降低以及 N-钙黏蛋白表达增高被认为是 EMT 的特征^[13]。本研究显示,与非 BA 组患儿相比,BA 组患儿肝组织中 N-cadherin、Snail 1 高表达,且与肝纤

维化程度呈正相关;E-cadherin 低表达,且与肝纤维化程度呈负相关。近年来,有关肝细胞、胆管细胞、肝星状细胞的体外研究发现,这些细胞在刺激因子的作用下,同时表达上皮和间质细胞的蛋白标志物,并具有间质细胞的表型和移动性,即发生 EMT^[14]。E-cadherin 参与同型细胞间的黏附连接且维持细胞极性,在维持上皮细胞形态及组织结构完整中发挥极其重要的作用。N-cadherin 作用相反,结果提示 BA 患儿肝脏中 EMT 形成,并参与了肝纤维化过程。

锌指转录调控因子 Snail 1 作为 EMT 相关转录因子之一,调控 E-cadherin 的表达水平,同时也是 EMT 发生过程中的一个关键因子^[15]。最新研究表明,Hedgehog 通路参与 EMT 导致的肝纤维化过程。Hedgehog(Hh)蛋白是一种由上皮细胞分泌的信号蛋白,具有调节组织损伤后重建和再生的功能。可溶性 Hh 配体(SonicHh、Indian Hh 和 Desert Hh)与 Hh 反应性细胞上的 Patched(Ptc)受体相互作用,这种配体-受体相互作用可防止 Ptc 抑制其共受体 Smo。激活的 Smo 反过来会引发一系列细胞内反应,最终导致胶质母细胞瘤家族转录因子的激活和核定位,从而促进了 Snail 和 Twist 的表达,诱导 EMT 的发生^[16]。结合本研究结果,Snail 可通过调控 E-cadherin 促进 EMT 的过程。

二、PDGF-BB 在 BA 患儿肝组织中的表达

近期研究发现,PDGF-BB 可诱导肿瘤相关内皮细胞中 NF- κ B 介导的 Snail 1 表达^[17]。在此前提下,我们研究了 PDGF-BB 在三组中的表达情况,BA 患儿肝脏中 PDGF-BB mRNA 水平和蛋白水平的表达均高于 CCC 组和 NL 组($P<0.05$),且与 Snail 的表达呈正相关,同时 PDGF-BB 的表达与肝纤维化程度呈正相关。

肝纤维化中肌成纤维细胞的主要来源是活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)。PDGF-BB 已被证实在刺激 HSC 生长和相关细胞间信号传递方面具有重要意义^[17]。HSC 可通过 EMT 促进肝纤维化^[14]。研究表明,PDGF-BB 可诱导肿瘤相关内皮细胞中 NF- κ B 介导的 Snail 1,提示 PDGF-BB 可通过激活 HSC 或调节 Snail 1,参与 EMT 促进肝纤维化^[18]。

由于临床标本获得较为困难,本研究样本量有限,可能会影响统计结果,后续本课题组将扩大样本量或进行多中心研究,进一步深入研究其具体机制,以期对 BA 患儿的诊疗提供新的理论依据。总

之,BA 患儿肝内外胆管中 PDGF-BB 可能通过增强转录因子 Snail 1 的转录活性,降低 E-cadherin 蛋白及增强 N-cadherin 蛋白的表达,促进其发生 EMT。进而推测,如若减少 BA 患儿 PDGF-BB 的表达,或封闭其相应受体,可延缓 EMT 的发生;而这可能成为 BA 患儿诊疗的新方向。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李索林、仲智勇、周辉负责研究的设计、实施和起草文章;方燕斌、杨晓锋、进行病例数据收集及分析;李索林、时保军负责研究设计与酝酿,并对文章知识性内容进行审阅

参 考 文 献

- [1] Safwan M, Ramachandran P, Vij M, et al. Impact of ductal plate malformation on survival with native liver in children with biliary atresia[J]. *Pediatr Surg Int*, 2015, 31(9): 837-843. DOI: 10.1007/s00383-015-3728-6.
- [2] Thierry JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- [3] 孙雪,任红霞.胆道闭锁发生与肝纤维化的分子机制研究进展[J]. *临床小儿外科杂志*, 2019, 18(5): 432-436. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.05.019.
Sun X, Ren HX. Research advances in molecular mechanisms of biliary atresia and hepatic fibrosis[J]. *J Clin Ped Sur*, 2019, 18(5): 432-436. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.05.019.
- [4] Zhang CY, Yuan WG, He P, et al. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(48): 10512-10522. DOI: 10.3748/wjg.v22.i48.10512.
- [5] Ying HZ, Chen Q, Zhang WY, et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 7879-7889. DOI: 10.3892/mmr.2017.7641.
- [6] Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: molecular signals, cellular mechanisms and translational implications[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 2-15. DOI: 10.1016/j.mam.2018.06.003.
- [7] Jain MK, Adams-Huet B, Terekhova D, et al. Acute and chronic immune biomarker changes during interferon/ribavirin treatment in HIV/HCV co-infected patients[J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22(1): 25-36. DOI: 10.1111/jvh.12226.
- [8] Wu X, Liu GZ, Mu M, et al. Augmenter of liver regeneration gene therapy using a novel minicircle DNA vector alleviates liver fibrosis in rats[J]. *Hum Gene Ther*, 2016, 27(11): 880-891. DOI: 10.1089/hum.2016.006.
- [9] Shah R, Reyes-Gordillo K, Rojkind M. Thymosin β_4 inhibits PDGF-BB induced activation, proliferation, and migration of human hepatic stellate cells via its actin-binding domain[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18(sup1): 177-184. DOI: 10.1080/14712598.2018.1478961.
- [10] Maturi V, Morén A, Enroth S, et al. Genomewide binding of transcription factor Snail1 in triple-negative breast cancer cells[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(7): 1153-1174. DOI: 10.1002/1878-0261.12317.
- [11] Cheng JC, Auersperg N, Leung PCK. TGF-beta induces serous borderline ovarian tumor cell invasion by activating EMT but triggers apoptosis in low-grade serous ovarian carcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42436. DOI: 10.1371/journal.pone.0042436.
- [12] Diaz R, Kim JW, Hui JJ, et al. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis[J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(1): 102-115. DOI: 10.1016/j.humpath.2007.05.021.
- [13] Canesin G, Cuevas EP, Santos V, et al. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and E47 EMT factor: novel partners in E-cadherin repression and early metastasis colonization[J]. *Oncogene*, 2015, 34(8): 951-964. DOI: 10.1038/onc.2014.23.
- [14] Xie GH, Diehl AM. Evidence for and against epithelial-to-mesenchymal transition in the liver[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305(12): G881-G900. DOI: 10.1152/ajpgi.00289.2013.
- [15] Doble BW, Woodgett JR. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1/3): 73-84. DOI: 10.1159/000101306.
- [16] Syn WK, Choi SS, Liaskou E, et al. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 106-115. DOI: 10.1002/hep.23998.
- [17] 彭龙希,高思楠,王媛,等.青蒿琥酯在大鼠体内抗肝纤维化的作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(5): 658-663. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.05.013.
Peng LX, Gao SN, Wang Y, et al. Effect of artesunate on rat liver fibrogenesis in vitro and in vivo[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(5): 658-663. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.05.013.
- [18] Chang KK, Yoon C, Yi BC, et al. Platelet-derived growth factor receptor- α and - β promote cancer stem cell phenotypes in sarcomas[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(6): 47. DOI: 10.1038/s41389-018-0059-1.

(收稿日期:2020-12-30)

本文引用格式:周辉,李索林,时保军,等. PDGF-BB 在胆道闭锁患儿肝脏中的表达及其与上皮间质转化的相关性研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2023, 22(3): 238-243. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202012064-007.

Citing this article as: Zhou H, Li SL, Shi BJ, et al. Hepatic expression of PDGF-BB in infants with biliary atresia and its correlation with epithelial mesenchymal transition[J]. *J Clin Ped Sur*, 2023, 22(3): 238-243. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202012064-007.