论著

文章编号:1000-5404(2013)07-0644-05

整合素 αvβ6 在移植肝胆管纤维化中的作用

陈 耿[1],程 龙[2],张雷达[1],王槐志[1],张玉君[1],别 平[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所[1];610083 成都,成都军区总医院全军普通外科中心[2])

[摘要] **目的** 探讨整合素 αvβ6 在移植肝胆管纤维化中的作用,为探索新的移植物胆管病(graft cholangiopathy, GC)防治策略提供理论基础。**方法** 小鼠被随机分为假手术组、单纯移植组和药物干预组。假手术组不行肝移植,仅行开关腹;单纯移植组和药物干预组均采用非动脉化的小鼠原位肝移植模型,供肝冷保存时间均为12 h。术后按2、4、6周3个时相点采集血液及组织标本。采用荧光实时定量PCR法测定整合素 αvβ6 及基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、转化生长因子-1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、转化生长因子-2(transforming growth factor-β2, TGF-β2)和Ⅰ型前胶原(procollagen α1)等纤维化相关基因的mRNA表达,同时测定血清ALT、GGT、ALP以及肝组织羟脯氨酸(Hyp)的含量,并采用Masson三色染色法评估肝内胆管的纤维化情况。计量资料多组均数间的比较采用双因素方差分析,两总体均值的比较采用 t 检验,相关性分析采用直线回归分析。**结果** 严重的冷保存再灌注损伤(cold preservation/reperfusion injury, CPRI)合并动脉血供障碍可以迅速地诱发移植肝胆管纤维化。在术后第4、6周,整合素 αvβ6 mRNA表达分别上调至假手术组的13.2、32.5倍,肝组织Hyp含量较假手术组分别上升87.5%、124.4%。通过特异性抑制整合素 αvβ6 可以明显缓解移植肝胆管纤维化,同时在一定程度上改善肝功能。**结论** 缺血再灌注损伤是造成移植肝胆管纤维化的重要原因之一,整合素 αvβ6 在这一过程中可能扮演着关键性的角色,针对整合素 αvβ6 的干预策略可能为GC的治疗提供新的思路。

[关键词] 整合素 αvβ6;肝移植;胆管纤维化
[中图法分类号] R363.25; R617; R657.3 [文献标志码] A

Role of integrin αvβ6 in pathogenesis of biliary fibrosis following liver transplantation in mice

Chen Geng[1], Cheng Long[2], Zhang Leida[1], Wang Huaizhi[1], Zhang Yujun[1], Bie Ping[1] (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; Department of General Surgery, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of integrin αvβ6 in the pathogenesis of biliary fibrosis following orthotopic liver transplantation (OLT), and to explore the new therapeutic strategies for graft cholangiopathy (GC). **Methods** A total of 45 male FVB/N mice were randomly divided into 3 groups, that is, sham-operation group (control group), OLT group, and OLT with integrin αvβ6 antagonist EMD527040 group. The non-arterialized mouse OLT model with 12 hours' cold-preservation was used in the later 2 groups. The expression of αvβ6 and fibrosis-related transcriptors were determined by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and serum levels of alanine aminotransferase (ALT), γ-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP) and liver hydroxyproline (Hyp) content were measured. Masson Trichrome staining were performed to determine the morphological changes of intrahepatic bile ducts. **Results** Cold preservation/reperfusion injury (CPRI) combined with hepatic artery occlusion induced biliary fibrosis of liver allograft in the mice. During the pathogenesis of biliary fibrosis, the mRNA expression of integrin αvβ6 was up-regulated to 13.2-fold and 32.5-fold higher than control in 4 and 6 weeks after transplantation, respectively. The relative hepatic Hyp content was increased by 87.5% and 124.4% at the same time points when compared with control. Inhibition of integrin αvβ6 significantly retarded biliary fibrosis progression and improved hepatic function following OLT. **Conclusion** Ischemia-reperfusion injury is the major cause of bile

[基金项目] 国家自然科学基金(30901466);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5331);第三军医大学青年创新基金(2009XQN22)
[通信作者] 陈 耿,E-mail:chengeng@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130116.1613.001.html(2013-01-16)

duct injury after OLT. Integrin αvβ6 plays a key role in the pathogenesis of bile duct injury and repair, which might be a novel marker of biliary fibrosis and an attractive target for anti-fibrotic therapies in the treatment of GC following OLT.

[**Key words**] integrin αvβ6; liver transplantation; biliary fibrosis

Supported by the National Natural Science Foundation (30901466), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5331) and the Innovation Foundation for Young Scholars of Third Military Medical University (2009XQN22). Corresponding author: Cheng Geng, E-mail: chengeng@medmail.com.cn

移植物胆管病(graft cholangiopathy, GC)是肝移植术后影响受者预后的主要因素之一,每年有8%~20%的肝移植受者因此移植物功能丧失或导致死亡。一般认为冷保存再灌注损伤(cold preservation/reperfusion injury, CPRI)及胆管动脉血供障碍是诱发GC最主要的原因。GC本质上是胆管树在遭受损伤后异常修复的结果,局灶或弥漫性的胆管树纤维化是其关键步骤,也是胆管狭窄、扩张、毁损及管型结石形成的病理基础[1-3]。新近梗阻性黄疸和硬化性胆管炎研究发现:整合素αvβ6是胆管纤维化过程中的关键分子[4-6]。本研究通过建立小鼠肝移植模型,观察经历CPRI后移植肝中整合素αvβ6与胆管纤维化进程的内在联系,系统探讨整合素αvβ6在肝移植术后胆管纤维化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

6~7周龄雄性FVB/N小鼠,二级动物,体质量25~30 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,供受体体质量差异≤1 g。小鼠饲养于恒温、清洁环境,喂饲标准饲料,维持12 h昼夜节律。遵守实验动物使用及管理原则。

整合素αvβ6特异性抑制剂EMD527040为Yury Popov博士赠予。小鼠β6整合素单克隆抗体购自Biogen Idec公司,抗小鼠荧光抗体购自BD公司。胆管纤维化相关基因基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、转化生长因子-1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、转化生长因子-2(transforming growth factor-β2, TGF-β2)和Ⅰ型前胶原(procollagen α1)引物及探针序列由上海吉凯基因化学有限公司设计合成。Trizol购自Invitrogen公司,M-MLV逆转录酶、dNTPs、RNA酶抑制剂购自美国Promega公司,Oligo dT购自上海生工生物工程公司,SYBR Master Mixture购自美国TaKaRa公司。小鼠羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)试剂盒购自日本和光纯药公司。ALT、GGT及ALP检测试剂盒购自上海复兴长征医学科技有限公司。

1.2 动物分组与处理

小鼠按随机数字表法分为3组。假手术组(15只):不行肝移植,仅行开关腹。术后按2、4、6周3个时相点分别处死小鼠(每一时相点5只),留取血液及肝脏标本。单纯移植组(15只):供肝获取后UW液4 ℃保存12 h,按照已经建立的方法[1]行不重建肝动脉血供的原位肝移植术,支架法重建胆总管,术后时相点设置及标本采集同假手术组;药物干预组(15只):同样接受原位肝移植术,供肝冷保存时间及手术方式同单纯移植组,从术后第1天开始每天腹腔内注射整合素αvβ6特异性抑制剂EMD527040(60 mg/kg)1次[5-6],术后时相点设置及标本采集同假手术组。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 实时定量RT-PCR检测整合素β6亚单位及胆管纤维化相关基因的表达 整合素αvβ6是由αv和β6两个亚单位按照1∶1的比例形成的异二聚体,而αv亚单位还可以与β1、β3、β5和β8等亚单位形成二聚体,本研究通过测定β6亚单位的mRNA表达来反映整个αvβ6二聚体的表达水平;测定胆管纤维化相关基因MMP-2、TGF-β1、TGF-β2和procollagen α1。引物及探针序列见表1。mRNA表达采用与假手术组表达量的比值表示。

表1 实时定量RT-PCR的引物与探针序列

目标基因	类别	引物/探针序列(5′→3′)
β6	上游引物	AGAACTCTAAGCAA
	TaqMan探针	TGAAACGGGAACCAATCCTCTGT
	下游引物	AAAGTTGGTGGAACCTCG
TGF-β1	上游引物	AGAGGTCACCCGTTAA
	TaqMan探针	ACCAACAACCATCTATGAGAAAACCA
	下游引物	TCCCGAATGTCTGACGTATTGA
TGF-β2	上游引物	GTCCACGGGAA
	TaqMan探针	CTTTGGATTCTACTTTTAGAAAT
	下游引物	GAAGAAATTATCCT
procollagen α1	上游引物	TCCGTCCTTCCTCTTA
	TaqMan探针	TTCTTGCATGTCAGGAGGG
	下游引物	GTATATGACTTCAGGGATGT

1.3.2 荧光免疫组织化学检测整合素αvβ6表达 将在速冻状态下包埋的小鼠肝组织切成厚度约6 μm的冰冻切片,入丙酮固定10 min。加入1∶50稀释的β6整合素单抗4 ℃孵育1 h,然后加入1∶100稀释的抗小鼠绿色荧光抗体,37 ℃孵育1 h。封片后,荧光显微镜观察结果并拍照。

1.3.3 肝组织Hyp的含量的检测 精确称取福尔马林固定的小鼠肝组织0.5 g,经无水乙醇脱水和丙酮脱脂后,研成细粉末,加入16 mL 6 mol/L HCl,置于温度为120 ℃烤箱中水解过夜。肝组织水解液采用15 mol/L NaOH中和酸,并调节pH值至6左右。最后加入0.05 mol/L氯胺-T溶液氧化,冰浴冷却后于560 nm处测定吸光度值,与标准管比对计算即得Hyp含量。

1.3.4 血清ALT、GGT和ALP水平检测 各时点处死动物后采集静脉血,分离血清。按照试剂盒说明分别向样品管、校准管和质控管中加入试剂及样品,混匀、37 ℃水浴待其充分反应后,波长405 nm处连续监测各管吸光度值[$D(405)$],根据公式计算出样品浓度。

1.3.5 Masson三色染色法检测胆管的组织形态[7] 取小鼠

肝组织标本,常规石蜡包埋切片。梯度脱蜡及水化,苏木精染色5~10 min,盐酸酒精分化。流水蓝化,蒸馏水冲洗。丽春红酸性品红液染色5~8 min,蒸馏水冲洗,1%磷钼酸染色1~3 min,苯胺蓝溶液中浸泡5 min,蒸馏水冲洗,烘干,二甲苯透明、封片。采用Image-pro软件测定胶原总面积,并计算所占视野总面积的百分比。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间的比较采用双因素方差分析,两总体均值的比较采用 t 检验,相关性分析采用直线回归分析。

2 结果

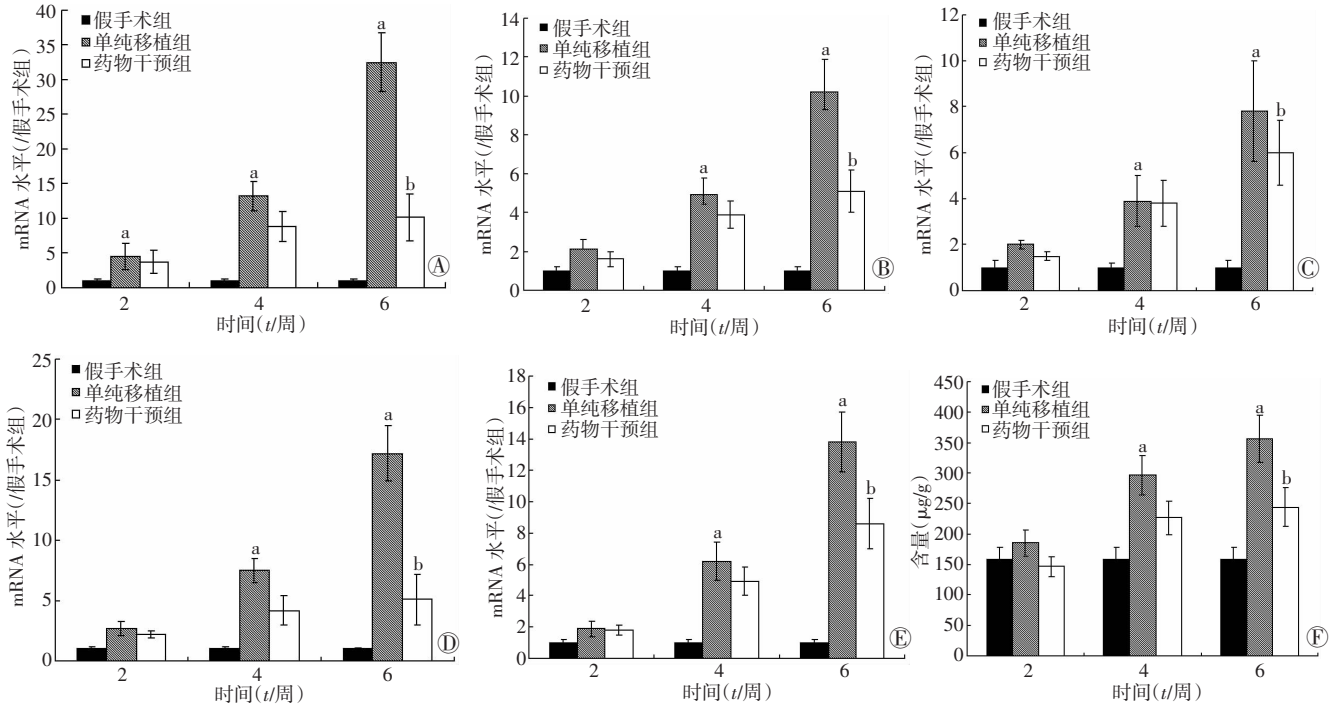
2.1 整合素αvβ6及相关基因的表达随着移植肝纤维化的进展而显著上调

单纯移植组小鼠肝移植术后从第2周开始整合素αvβ6 mRNA表达量持续上调,在术后第2、4、6周与假手术组比较,差异有统计学意义(t=5.208,6.311,8.610,P<0.05,图1),荧光免疫组化提示整合素αvβ6主要表达于增生的肝内胆管上皮细胞(图2)。纤维化相关基因的mRNA表达亦随着术后时间的延长而逐渐上升,其中MMP-2和TGF-β1的表达量从术后第4周开始出现显著上调,在术后第6周分别与假手术组比较,差异有统计学意义(t=9.312,5.207, P<0.05)。TGF-β2的mRNA表达量在术后第2、4、6周持续上升,与假手术组比较,差异有统计学意义(t=3.983,7.174,6.010,P<0.05)。procollagen α1 mRNA的表达量在术后第4、6周分别与假手术组比较,差异有统计学意义(t=4.774,5.951,P<0.05)。肝组织Hyp的含量从术后第4周开始显著升高,术后第4、6周分别比假手术组上升87.5%、124.4%,两组比较,差异有统计学意义(t=3.252,4.781,P<0.05)。见图1。

2.2 抑制整合素αvβ6改善移植肝胆管纤维化程度

术后通过持续给予整合素αvβ6特异性抑制剂EMD527040,整合素αvβ6 mRNA的表达显著下调,术后第6周药物干预组整合素αvβ6 mRNA表达水平仅为单纯移植组的31.1%(图1),两组比较,差异有统计学意义(t=-4.524,P<0.05),荧光免疫组化的结果与此类似(图2);纤维化相关基因MMP-2、TGF-β1、TGFβ2、procollagen α1的mRNA表达量较单纯移植组均有不同程度的下降,差异有统计学意义(t=-3.624,-2.412,-5.208,t=-2.381,P<0.05)。肝组织Hyp含量亦较单纯移植组下降了31.4%,差异有统计学意义(t=-3.182,P<0.05)。见图1。

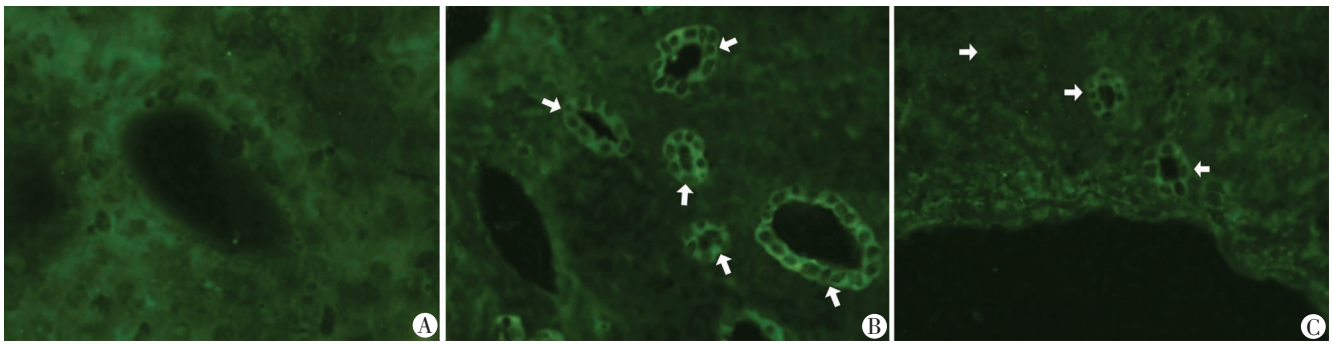
Masson染色显示:术后第6周,假手术组小鼠肝内胆管上皮细胞形态正常,胆管周围仅可见极少量胶原沉积。单纯移植组小鼠胆管增生明显,胆管周围大量胶原沉积,胆管上皮细胞受损严重,细胞形态失去正常,大量中性粒细胞浸润。药物干预组小鼠胆管增生依然比较明显,较多中性粒细胞浸润,胆管上皮细胞可见点状及灶性坏死,但胆管周围胶原的沉积较单纯移植组显著减少。胶原含量半定量分析的结果亦显示,术后第6周,单纯移植组胶原含量急剧上升(0.36±0.11),与假手术组(0.09±0.03)比较,差异具有统计学意义(t=6.812,P<0.05);而药物干预组的胶原含量(0.19±0.07)则较单纯移植组出现了明显的下降,两组比较,差异具有统计学意义(t=4.154,P<0.05)。见图3。



A:实时定量RT-PCR检测β6亚单位表达;B:实时定量RT-PCR检测MMP-2 mRNA表达;C:实时定量RT-PCR检测TGF-β1 mRNA表达;D:实时定量RT-PCR检测TGF-β2 mRNA表达;E:实时定量RT-PCR检测procollagen α1 mRNA表达;F:ELISA法检测肝组织中Hyp的含量

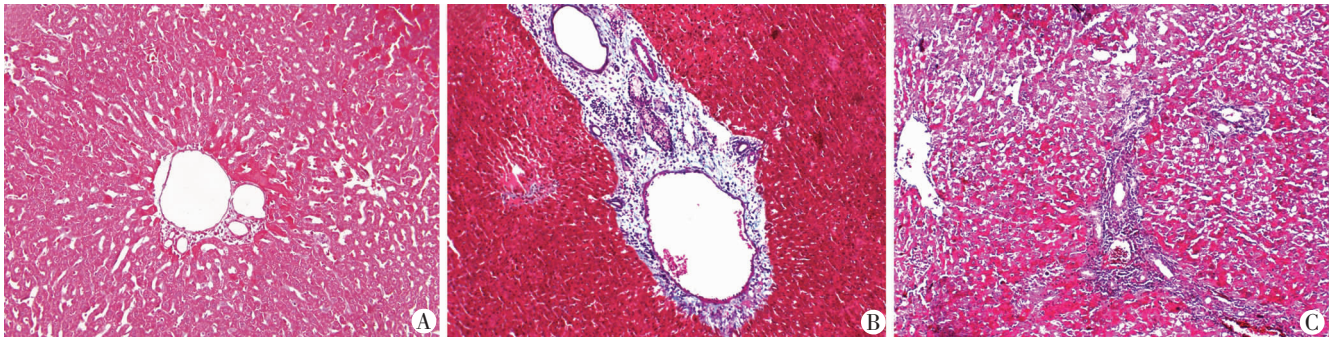
a:P<0.05,与假手术组比较;b:P<0.05,与单纯移植组比较

图1 各组小鼠β6亚单位、胆管纤维化相关基因表达及肝组织Hyp含量的变化



A:假手术组　小鼠肝内胆管未见明确整合素 αvβ6 表达; B:单纯移植组　小鼠肝内小胆管显著增生,增生的胆管上皮细胞上可见整合素 αvβ6 高表达(↑示肝内胆管); C:药物干预组　小鼠肝内胆管上皮细胞整合素 αvβ6 的表达明显下调(↑示肝内胆管)

图 2　各组小鼠术后第 6 周整合素 αvβ6 的表达　(免疫荧光　×400)



A:假手术组; B: 单纯移植组; C: 药物干预组

图 3　各组小鼠术后第 6 周肝内胆管的病理变化　(Masson 染色　×200)

2.3　抑制整合素 αvβ6 改善部分肝功能

单纯移植组术后血清 ALT 水平显著升高,与假手术组比较,差异有统计学意义($F = 72.5$, $P < 0.05$)。药物干预组小鼠第 4、6 周的血清 ALT 水平较单纯移植组有所下降,但下降幅度不大,与假手术组相比差异无统计学意义($F = 72.5$, $P > 0.05$)。反映胆管上皮细胞受损程度的血清 GGT 和 ALP 水平下降非常显著。术后第 4 周和第 6 周 药物干预组的血清 GGT 水平仅分别相当于单纯移植组的 48.9% 和 45.4%($F = 13.6$, 62.9; $P < 0.05$),血清 ALP 水平则分别较单纯移植组下降了 50.2% 和 47.5%,两者比较,差异有统计学意义($F = 382.6$, 296.5; $P < 0.05$)。见表 2。

表 2　各组小鼠术后不同时间肝功能指标比较(U/L, $n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT		GGT		ALP	
	4 周	6 周	4 周	6 周	4 周	6 周
假手术组	53 ± 11	41 ± 14	10 ± 6	9 ± 5	34 ± 15	41 ± 17
单纯移植组	168 ± 21[a]	172 ± 27[a]	48 ± 15[a]	69 ± 18[a]	305 ± 96[a]	451 ± 128[a]
药物干预组	133 ± 15	158 ± 16	24 ± 10[b]	31 ± 10[c]	152 ± 35[c]	237 ± 64[c]

a: $P < 0.01$,与假手术组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$,与单纯移植组比较

3　讨论

GC 是对作用于移植肝胆管树,以胆管上皮细胞为首要攻击靶点的疾病的统称,是当前移植肝胆系并发症的主要类型[1]。尤其是近年来边缘供体和无心跳供体的使用,使得移植物胆管病的发生率显著上升,严重影响肝移植受者长期生存及生活质量[2-3]。CPRI 及胆管血供障碍是最主要的病因,而局灶性或弥漫性的胆管树纤维化正是 GC 发展的关键步骤,也是胆管狭窄的病理基础[5-7]。然而对于这一过程的具体分子机制目前仍然知之甚少。

新近研究表明,整合素 αvβ6 在胆管纤维化的过程中可能扮演着重要角色。整合素 αvβ6 属于糖蛋白受体粘附分子家族,由 αv 和 β6 两个亚单位按 1∶1 比例以非共价键聚合形成异二聚体。整合素 αvβ6 通常表达于上皮组织,在绝大多数分化良好的组织内无法检出,只有在胚胎发育、肿瘤发生和组织修复的过程中才会表达[4]。一项来自 Mdr2 基因敲除小鼠(该小鼠是经典的自发性胆管纤维化的动物模型)的研究发现,整合素 αvβ6 的表达随着胆管纤维化的发展而急剧上调,而特异性抑制整合素 αvβ6 对胆管纤维化及肝功能有明显的改善作用。来自梗阻性黄疸小鼠的研究结果也与此类似[5-6]。Mdr2 基因敲除小鼠的胆管

纤维化与疏水性胆盐(hydrophobic bile salts, HBS)对胆管树的损伤有密切关系,而早期研究已经证实移植肝在术后也会产生富含HBS的"毒性胆汁"[8]。因此整合素αvβ6是否有可能也在移植肝的胆管纤维化中扮演着某种角色呢?

早期有关移植肝胆管并发症的研究多采用重建肝动脉血供的大鼠或小鼠肝移植模型。但我们发现,在重建肝动脉血供的情况下,即使延长冷保存时间,血清GGT和ALP浓度通常在术后2~3周可基本恢复至正常水平,胆管系统也不会出现明显的纤维化改变。本研究采用了不重建肝动脉血供的小鼠原位肝移植模型,结果发现在供肝冷保存12 h的情况下,随着术后时间的推移,移植肝胆管损伤逐渐加重,表现为血清GGT和ALP水平的进行性升高。在术后第2周即可观察到小胆管大量增生,胆管周围胶原沉积,Ⅰ型前胶原mRNA表达上调,提示胆管纤维化亦在进行性加重。同时,移植肝纤维化相关基因MMP-2、TGF-β1和TGF-β2的表达亦全面上调,肝组织Hyp的含量也明显增加,充分说明在CPRI基础上的动脉血供缺乏是导致移植肝胆管损伤及纤维化的重要原因,该模型是研究GC的良好模型。

本研究注意到整合素αvβ6 mRNA表达的上调非常显著,从术后第2周开始表达量即上升至假手术组的4.5倍,到术后第6周更是高达32.5倍。这种变化与来自梗阻性黄疸及Mdr2基因敲除小鼠的研究结果基本一致。为了进一步明确整合素αvβ6在移植肝胆管纤维化中的意义,我们给予受鼠整合素αvβ6特异性抑制剂EMD527040,结果发现整合素αvβ6表达下降非常显著,在术后第6周甚至不到单纯移植组表达水平的1/3。同时纤维化相关基因mRNA的表达有不同程度的下调,肝组织Hyp水平也有所下降。病理结果提示尽管小胆管增生和炎性细胞的浸润并无明确改善,但胆管周围胶原的沉积确实明显减少。上述结果有力地提示整合素αvβ6在移植肝胆管纤维化过程中可能扮演着一个关键性的角色,通过抑制其表达可以有效地改善胆管损伤并延缓胆管纤维化的进展。

那么整合素αvβ6是通过何种机制来调控胆管纤维化呢?一般认为可能与TGF-β1的活化有关。TGF-β1是一种强大的致纤维化细胞因子,其可以通过多种途径作用于胆管上皮细胞进而诱导胆管纤维化。正常分泌的TGF-β1是一种不能结合受体的、无活性的"潜在TGF-β"(latent TGF-β),是由成熟的TGF-β1二聚体、两个潜在相关多肽(LAP)和一个潜在TGF-β结合蛋白(LTBP)组成的非共价结合物。整合素αvβ6可以通过RGD三肽序列与潜在TGF-β复合体的LAP结合,二者的相互作用能促进TGF-β复合体释放成熟的TGF-β1而发挥其生物效应。这一机制也被称为"整合素-TGF-β轴"(integrin-TGF-β axis),已被来自多种动物模型的体内外研究证实[4-6]。

综上所述,本研究采用小鼠肝移植模型,发现术后随着移植肝胆管纤维化程度的加重,整合素αvβ6的表达显著上调。通过体内特异性抑制整合素αvβ6可以明显缓解移植肝胆管纤维化,同时改善肝功能,提示整合素αvβ6在移植肝移植物胆管病的发病中可能扮演着重要角色,可能作为一个潜在的靶点为移植物胆管病的治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Alavro D, Mancino M G. New insights on the molecular and cell biology of human cholangiopathies[J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1/2): 50-57.

[2] Chan E Y, Olson L C, Kisthard J A, *et al*. Ischemic cholangiopathy following liver transplantation from donation after cardiac death donors[J]. Liver Transpl, 2008, 14(5): 604-610.

[3] 霍枫, 汪邵平, 李鹏, 等. 公民心死亡器官捐献肝移植[J]. 中华消化外科杂志, 2012, 11(1): 69-72.

[4] Wang B, Dolinski B M, Kikuchi N, *et al*. Role of alphavbeta6 integrin in acute biliary fibrosis[J]. Hepatology, 2007, 46(5): 1404-1412.

[5] Popov Y, Patsenker E, Stickel F, *et al*. Integrin alphavbeta6 is a marker of the progression of biliary and portal liver fibrosis and a novel target for antifibrotic therapies[J]. J Hepatology, 2008, 48(3): 453-464.

[6] Patsenker E, Popov Y, Stickel F, *et al*. Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression[J]. Gastroenterology, 2008, 135(2): 660-670.

[7] 李文岗, 陈圣, 瞿磊, 等. 人与大鼠肝门部胆管壁胶原纤维构筑形态的研究[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(4): 303-306.

[8] Chen G, Wang S G, Bie P, *et al*. Endogenous bile salts are associated with bile duct injury in the rat liver transplantation model[J]. Transplantation, 2009, 87(3): 330-339.

(**收稿**:2012-12-03;**修回**:2013-01-03)

(编辑 邓强庭)