维普资讯 http://www.cqvip.com




## 参 考 文 献

1、Frizzera G,etal.Lancet 1974;1:1070
2、陆雪林,等.中华内科杂志 1985;8:4723、LuppiM,etal.Haematologica 1996;3:265
4、Daibata M,etal.Leukemia1997;6:882
5、李 挺,等.中华病理学杂志 1996;2:99
6、Yamamura M,etal.Leukemia 1996;9:1504
7、陈 新,等.中华血液学杂志 1987;10:577
8、吴谨绪,等.四川医学 1990;4:199
9、Hodges E,et al.Mol Pathol1997;1:15
10、RhoR,et al.AunHematol1996;5 333
11、SchmuthM,et al.J Am Acad1997;2Pt2.290Dermatol
12、尹方龙,等.四川医学 1992;5:313
13、Horneff G,etal.Neuropediatrics 1996;4:219
14、张沪生,等.中华内科杂志 1994;3:188
15、蒋国成.中华血液学杂志 1987;7:405
16、UparaS,etal.AsianPacJ 1997;1:15ALLERGYIMMUNOL
17、SallahAs,etal.AunHematol1996;6:295
18、SchlegelbergerB,etal.J1996;2:598ClinOncol
19、DeyP,etal,DiagnCytopthol 1996;5:412


(收稿日期 1998－05－05)

肝纤维化、胶原蛋白、生物学作用

330-339

# 胶原蛋白与肝纤维化

R575.202

(43)

第二临床学院内科 何 松* 综述 沈鼎明 审校

中图分类号 R575.2

肝纤维化是肝细胞发生坏死及炎症刺激时,肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过程,是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段。多年来,人们一直致力于肝纤维化发生发展机制的研究,试图找出逆转肝纤维化的方法。研究表明,肝纤维化的发生与肝细胞外间质(Extracellular Matrix ECM)成份的代谢(合成与降解)、细胞因子的调节及以贮脂细胞(Ito细胞)为主导的许多细胞的参与有关。胶原蛋白作为ECM的主要成份,与肝纤维化的形成关系密切,愈来愈受到人们的关注。

## 1 胶原蛋白的一般特性及来源

目前已发现的胶原蛋白有16种[1]。胶原蛋白占人体蛋白总量的1/3,在肝脏内约占蛋白总量的5%～10%。肝组织中胶原主要是Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型,其中以Ⅰ、Ⅲ型为主[2]。按结构和功能特点可分为以下三类:间质胶原(包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型)、基膜胶原Ⅳ型和细胞外周胶原Ⅴ型。胶原蛋白在正常肝和肝硬化中的分布如表所示。

| 胶原蛋白 | 正常肝(%) | 硬化肝(%) |
|---|---|---|
| Ⅰ | 40～50 | 60～70 |
| Ⅲ | 40～50 | 20～30 |
| Ⅳ | 1 | 1～2 |
| Ⅴ | 2～5 | 5～10 |
| Ⅵ | 0.1 | 0.2 |

胶原蛋白是细胞外间质的结构性大分子,分子量约30万,在其结构中包含一至数个具有特异性的由三股多肽链交织形成的α螺旋。三股螺旋区氨基酸序列的特点是Gly－Xaa－Yaa的多次重复(X和Y代表任意一种氨基酸)。胶原蛋白是根据其所形成同型或异型三聚体的独特的多链组来分型。每条多肽链均称α链。肝脏细胞外间质胶原成份分子结构如表所示。

为了从分子水平了解Ⅳ型胶原三螺旋结构形成的机制,Fukuda等利用中国仓鼠卵巢细胞进行了重组α1(Ⅳ)和α2(Ⅳ)的表达。研究发现,在只能表达α1链的细胞株裂解产物中,可以发现高表达的α1(Ⅳ)链单体,但未见由α1链组成的同型三聚体,而

* 男,1965—06出生,主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com



在同时能表达α1(Ⅳ)链和α2(Ⅳ)链的细胞株裂产物中可见α1(Ⅳ)、α2(Ⅳ)及大分子Ⅳ型胶原分子。这种异构三聚体形成的Ⅳ型胶原分子不会被胃蛋白酶降解,因而是稳定的三螺旋结构[3]。

| 构成成份 | 分子结构 | 分子量 |
|---|---|---|
| 纤维样胶原 | | |
| Ⅰ型 | $[\alpha_1(\mathrm{I})]2\alpha_2(\alpha)$ | 450KDa |
| Ⅲ型 | $[\alpha_1(\mathrm{III})]_3$ | 450KDa |
| Ⅴ型 | $\alpha_1(\mathrm{V})\alpha_2(\mathrm{V})\alpha_3(\mathrm{V})$ | 600KDa |
| 细纤维性胶原 | | |
| Ⅵ型 | $\alpha_1(\mathrm{VI})\alpha_2(\mathrm{VI})\alpha_3(\mathrm{VI})$ | 510KDa |
| 基底膜胶原 | | |
| Ⅳ型 | $[\alpha_1(\mathrm{IV})]_2\alpha_2(\mathrm{IV})$ | 540KDa |

胶原蛋白作为肝纤维化增生结缔组织的主要成份,其细胞来源一直是肝纤维化的研究重点。研究表明,胶原蛋白可由多种细胞产生,如贮脂细胞、肝细胞、内皮细胞等,而贮脂细胞是ECM,尤其是胶原蛋白的主要细胞来源[4]。贮脂细胞在炎症刺激下,转化为能表达α-平滑肌肌动蛋白的肌纤维母细胞,合成许多ECM成份如胶原蛋白、蛋白多糖、纤维连接蛋白,层粘连蛋白、内动蛋白、腱蛋白和透明质酸。细胞培养和免疫组化均证实贮脂细胞能产生Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ型胶原[5]。用Northern杂交检测分离的贮脂细胞中胶原mRNA,发现有Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原的mRNA存在[6]。

有资料[7]认为肝纤维化时肝细胞能合成胶原蛋白或其它一些ECM分子,而有人在正常人和纤维化肝细胞中不能测出前胶原mRNA[8]。因此,对肝细胞是否具备合成胶原或其它ECM分子的能力仍存在争议。其它一些非实质肝细胞如枯否氏细胞、内皮细胞、纤维母细胞、胆管细胞亦能合成少量胶原蛋白。

胶原蛋白的生物合成经细胞内、外两阶段:①细胞核内遗传信息被转录成mRNA;②mRNA到粗面内质网经翻释合成前α肽链;③羟化肽链的脯氨酸、赖氨酸;④羟赖氨酰半乳糖转移酶对羟赖氨酰残基进行糖化;⑤α肽链进行三链结合,三股螺旋形成;⑥新生前胶原分泌至胞外基质;⑦通过前胶原氨肽酶和羧肽酶裂解,前胶原转变为原胶原;⑧原胶原聚合成胶原纤维;⑨在单胺氧化酶作用下胶原纤维共价交联成为稳定的不溶性胶原[9]。迄今为止所发现的16种胶原蛋白的生物合成的主要过程基本一致[10]。

## 2 胶原蛋白在肝组织中的分布及其生物学作用

胶原蛋白在正常肝结缔组织中,Ⅰ型分布在门脉管道及肝静脉壁,Ⅲ型在门静脉区及肝窦,Ⅳ型在胆管及基底膜、多与层粘连蛋白伴存,Ⅴ型在汇管区及窦周,而Ⅵ型在汇管区间的非纤维成份。Ⅰ、Ⅲ型胶原是纤维隔的重要成份均参与肝内网状支架的构成;Ⅳ型与层粘连蛋白一起构成内皮细胞与肝细胞之间的功能性基底膜;Ⅵ型胶原在正常人肝脏中含量很少,其组成微纤维细丝,形成弹性网,使血管、神经和胶原纤维固定于环绕的结缔组织中,或使大的胶原纤维相互连接在邻近细胞表面的整合素受体上。

在正常情况下,贮脂细胞、肝细胞、内皮细胞等产生胶原的作用是被阻遏的,并且纤维母细胞也极少。这是因为正常肝内存在细胞-细胞和细胞-间质的相互平衡机制。即各种细胞产生的代谢物或激素样物质控制着其它细胞的生长,枯否氏细胞释放抑制纤维母细胞增生的物质,而且各种细胞都分泌物质加入间质的组成。肝细胞和纤维母细胞都可产生胶原酶,枯否氏细胞可产生纤维连接蛋白,也可产生胶原酶,它们之间的生物基质具有维持各种细胞类型和数量稳定的作用。

## 3 细胞因子对胶原蛋白的调控

肝纤维化形成不仅以结缔组织增生为特征,而且是由一些可溶性的介质如细胞因子调控介导的。细胞因子可以影响产生ECM的细胞数量,特别是能使贮脂细胞转化为肌纤维母细胞。最重要的细胞因子有TGFβ,TGFα及TNF。TGF-β是目前研究最多,对肝纤维化最具意义的细胞因子之一,主要通过刺激ECM表达合成而促进肝纤维化。体外实验发现[11],TGFβ处理肝细胞24小时后,Ⅰ型前胶原mRNA水平增加13倍,这是通过转录后调节机制起作用。同时,在血吸虫性肝纤维化和

维普资讯 http://www.cqvip.com



四氯化碳肝纤维化模型中,于胶原合成增加之前TGF－β1基因表达水平也增加,提示TGF－β1具有放大胶原合成的效应。很多实验结果均表明TGF－β是一种强有力的致纤维化因子。

TNFα对胶原的合成和降解起着重要的调控作用,在体外实验中,Weiner等用TNFα处理培养的贮脂细胞24小时,发现总胶原量增加3倍多,进一步用Northern杂交技术分析这些细胞总RNA量,发现胶原含量的增加不伴胶原mRNA的增加。由此表明TNFα对贮脂细胞的作用发生于翻译过程中或翻译后水平。国内高春芳等[12]亦认为TNFα对肝细胞、贮脂细胞的增殖、DNA合成有不同程度的促进作用。值得注意的是,不少实验结果揭示TNFα有抗纤维化作用。因此,TNFα对ECM 调控机理及与肝纤维化的关系仍为今后的研究重点之一。

## 4 胶原蛋白在肝纤维化中的作用

在肝纤维化过程中,Ⅰ、Ⅲ型胶原是肝纤维间隔的重要来源。成熟的Ⅰ、Ⅲ型胶原,由于细胞变性坏死所致的网状纤维支架的塌陷,加重肝纤维化。

Ⅳ型和Ⅵ型胶原只占肝脏胶原的一小部分,但它们分别作为所有基膜的骨架区和相互结合的间质微丝而具有重要的结构和功能上的作用。Ⅳ型胶原在肝纤维化中的作用主要是参与肝血窦的毛细血管化。在正常肝窦壁上仅见不连续的Ⅳ型胶原、无层粘连蛋白。肝纤维化时,肝窦壁上的Ⅳ型胶原转变为连续性,同时出现层粘连蛋白,使Ⅳ型胶原的功能性基底膜破坏,形成毛细血管化的基础。肝窦毛细血管化是肝硬化的特征性病理改变。Dubuisson等应用免疫光镜和免疫电镜观察了肝纤维化毛细血管化形成过程中Ⅳ型胶原、层粘连蛋白及纤维连接蛋白的变化。在硒中毒2周后,鼠肝中Ⅲ型胶原和连接蛋白含量稳定,但层粘连蛋白和Ⅳ型胶原含量增加,并通过电镜证实层粘连蛋白和Ⅳ型胶原参与了毛细血管化及新血管生成,而纤维连接蛋白无此作用[13]。

Ⅴ型胶原在肝纤维化中的作用,系与Ⅳ型胶原共同构成基膜、在各种间质胶原与基膜之间起联络作用。

Ⅵ型胶原在细胞联系中起着重要作用[14],在肝纤维化的纤维间隔中有一定的作用。

## 5 胶原蛋白在肝纤维化血清学诊断中的作用

肝纤维化血清学诊断是建立在ECM成份及其降解产物和参与代谢酶检测的基础上。肝纤维化血清学诊断的不断完善,将有助于提高早期诊断水平和动态观察慢性肝病的血清酶学变化,以弥补肝病理组织检查的局限性。

5.1 Ⅰ型胶原 正常肝组织中,Ⅰ、Ⅲ型胶原各约占胶原总量的40%,Ⅰ/Ⅲ比例约为1。肝纤维化时可见Ⅰ型胶原升高5～8倍,且随着纤维化的发展,Ⅰ/Ⅲ型胶原比例增加。由于Ⅰ型胶原往往形成粗密纤维束、对胶原酶的敏感性差,故Ⅰ型胶原增加,预示着纤维化可逆性差。Hartman等从健康人皮肤中提取Ⅰ型胶原建立了RIA法[15]。Trinchet测定肝病患者血清中Ⅰ型胶原水平,认为Ⅰ型胶原与肝纤维化程度有关[16]。Lin氏等发现PICP/-PⅢNP比值对于进展期纤维化形成的提示作用较单一PICP、PⅢNP价值高,推荐比值12可作为肝硬化的诊断临界值[17]。

5.2 PⅢP和PCⅢ (1)PⅢP:即血清Ⅲ型前胶原氨基末端肽,来源于PCⅢ;PCⅢ由细胞内合成后分泌于血中,经内肽酶水解切下的氨基端肽。1979年,Rohde等首先报道了血清PⅢP放免测定法,并证实对肝纤维化具有临床意义[18]。更多的研究表明血清PⅢP含量与肝纤维化有关,能较好地反映肝纤维组织生成的活动性。Grimbert等用放免法检测93名酒精性肝纤维化患者血清PⅢP水平,同时作肝组织活检,发现PⅢP水平与肝纤维化的严重程度呈正相关,特别是伴窦周纤维化的患者血清PⅢP水平显著增高[19],尽管对PⅢP在肝纤维化中诊断价值存在争议[20],但PⅢP在判断肝纤维化的程度和早期诊断及指导临床治疗中的价值,已得到国内外学者的广泛承认。

(2)PCⅢ:PCⅢ由细胞内合成后分泌至血中,研究[21]表明PCⅢ与肝纤维化程度正相关,并与肝细胞炎症的相关性大致相等,因此PCⅢ升高与Ⅲ

维普资讯 http://www.cqvip.com



型胶原合成增加有关[22],在肝纤维化早期PCⅢ合成较活跃,但纤维化晚期PCⅢ合成减慢,故PCⅢ水平下降,因而PCⅢ作为纤维化程度的指标尚不够敏感,只能作为活动性肝纤维化的指标。

5.3 Ⅳ型胶原(CⅣ) 迄今已建立了多种血清Ⅳ型胶原的免疫学检测方法,包括放免法[23](RIA)与酶联免疫吸附试验法(ELISA),分别应用相应的抗体测定血清中Ⅳ型胶原7S区、NC1区及主三螺旋区。Marawaki[24]用放免法测定151例慢性病毒性肝炎所致肝纤维化患者血清CⅣ7S片段(7S—Ⅳ)及用一步夹心法测定CⅣ胶原主螺旋区(TH－Ⅳ)水平,发现7S－Ⅳ及TH－Ⅳ水平与肝纤维化程度密切相关,敏感性、特异性分别为88%和80%,81%。认为7S－Ⅳ及TH－Ⅳ均可作为肝纤维化的诊断指标,且前者略优于后者。Takase[25]等分别用PⅢP、CⅣ、LN、脯氨酰羟化酶、金属蛋白酶组织受体(TIMP)等血清学指标对酒精性肝病及非酒精性肝病患者进行检测,认为血清TH－Ⅳ最能够反映评价酒精性肝纤维化的组织学特点,除TIMP外,其它指标亦能反映肝纤维化的程度。Ikuta等[26]分析了132例慢性病毒性肝炎患者血清PCⅢ、7S－Ⅳ、TH－Ⅳ水平与肝组织学特征之间的关系,发现随着肝纤维化的发展,上述四项指标水平亦增高,同时与肝纤维化程度密切相关,认为最有价值的诊断指标是7S－Ⅳ,其次是PCⅢ。

## 6 结语

在过去的十多年中,有关肝纤维化发生机制的研究取得了长足的进展,大大加深了对肝纤维化的认识。同时,对胶原蛋白的研究也得到了极大的重视和加强。利用现代免疫学、细胞生物学和分子生物学技术,探讨胶原蛋白与肝纤维化的发生、发展机制之间的关系,已成为目前胶原蛋白研究的重点之一。近年来对胶原分子水平的研究主要集中在阐明胶原基因的调控,尤其是对胶原蛋白家族中最为丰富的成员—Ⅰ型胶原基因的表达调控研究更是一个热门课题。随着研究的逐步深入,将会取得更为丰富的成果。

## 参考文献

1.Bornstein P,et al.Ann Rev Biochem,1980;49:957
2.Schuppan D.et al.Sem Liver Dis,1990;10:1
3.Fukuda K,et al.Biochem Biophys Res Commun,1997;231(1):178
4.高春芳,等.临床肝胆病杂志 1994;10:125
5.Weiner FR,et al.Hepatology,1990,11:111
6.何玉先,等.国外医学流行传染病分册 1994;21:177
7.Yamada H,et al.Acta Pathol Jap,1989;39:719
8.Milani S,et al.Am J pathol,1990;137:59
9.Chojkier M,et al.Hepatology,1988;8:176
10.Hogemann B,et al.Gastroenterol Jpn,1993;28:570
11.Czaja MJ,et al.J Cell Biol 1989;108:2477
12.高春芳,等.中国免疫学杂志 1994;10:114
13.Dubuisson L,et al.Hepatology,1995;21:805
14.Bonaldo P,et al.J Biol Chem,1990;264:20235
15.Trimchet JC,et al. J Hepatol,1991;12:139
16.Hayasaka A,et al. J Hepatol,1990;10:17
17.Lin－DY,et al.Dig Dis Sei,1995;40:21
18.Rohde H, et al.Eur J Clin Invest,1979;9:451
19.Grimbert S,et al.Gastroenterol Clin Biol,1993;17:570
20.Colombo N,et al. Hepatology,1985;5:475
21.白石山,等.中华肝脏病杂志 1997;5:72
22.叶红军,等.临床肝胆病杂志 1993;9:90
23.刘 预,等.中华肝脏病杂志 1997;5:75
24.Murawaki Y,et al.J Hepatol ,1996;24:148
25.Takase S,et al.Alcohol Clin Exp Res,1996;20:1512
26.Muranaki Y,et al. Hepatology,1994,20:780

(收稿日期 1998－05－27)