

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.008

血清转化生长因子 $\beta 1$ 在大鼠放射性肝纤维化中的动态表达及其相关性研究*

王云莲 艾尼瓦尔·艾木都拉 肖 蕾 艾力江·吐尔逊 张 华 吴 戈
程 伟 包永星[△]

(新疆医科大学第一附属医院 肿瘤中心 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:肝癌的放射治疗可导致放射性肝损伤(RILD)、甚至肝纤维化及肝硬化等并发症的发生,因此寻找较佳的血清标记物对放射性肝纤维化的无创诊断及监测具有重要意义。本文通过建立放射性肝纤维化大鼠模型,检测血清转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的动态表达,从而探讨其与放射性肝纤维化严重程度的相关性及其作为血清标记物的诊断价值。**方法:**雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为模型组(30 只)和对照组(10 只)。除对照组外,模型组大鼠右半肝均接受单次 6MV X 线 25Gy 照射,于照射 2 月、4 月、6 月后,随机抽取 10 只,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 TGF- $\beta 1$ 的表达,同时将大鼠肝组织进行 HE 染色,观察肝组织病理变化及大鼠肝纤维化程度,将后者与血清 TGF- $\beta 1$ 值进行相关性分析。**结果:**在照射第 2 月、4 月、6 月后,模型组大鼠血清 TGF- $\beta 1$ 值(分别为 551.03 ± 69.00 ng/L、 645.31 ± 109.29 ng/L、 737.89 ± 118.11 ng/L)逐渐升高,均明显高于对照组(451.71 ± 51.12 ng/L, $P < 0.05$)。通过相关性分析表明,大鼠血清 TGF- $\beta 1$ 值与肝纤维化程度正相关($r=0.82, P < 0.01$)。**结论:**在放射性肝纤维化发生发展中,TGF- $\beta 1$ 随着肝纤维化严重程度增加,其表达亦升高。本研究为放射性肝纤维化严重程度的监测提供了一种新的无创、操作简单的手段,为后续 TGF- $\beta 1$ 作为血清标记物应用于放射性肝纤维化的临床研究奠定了理论基础。

关键词:放射性肝纤维化;转化生长因子 $\beta 1$;大鼠

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5829-04

Study on Dynamic Changes and Correlation of Serum Levels of Transforming Growth Factor $\beta 1$ and Radiation-induced Hepatic Fibrosis in Rat*

WANG Yun-lian, Ainiwaer·Aimudula, XIAO Lei, Ailijiang·tuerxun, ZHANG Hua, WU Ge, CHENG Wei,
BAO Yong-xing[△]

(Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: Radiation therapy of liver carcinoma may lead to the complication of radiation-induced liver disease (RILD), hepatic fibrosis, even hepatic cirrhosis. So it is of great significance to look for better serum markers for noninvasively diagnosing and monitoring radiation-induced hepatic fibrosis. In this study, we established the rats model of radiation-induced hepatic fibrosis, detected the dynamic changes of serum levels of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta 1$), explored the correlation of TGF- $\beta 1$ and the severity of radiation-induced hepatic fibrosis, and discovered the diagnosis value of TGF- $\beta 1$. **Methods:** Forty healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into model group (30 rats) and control group (10 rats). The right-half of rat liver in model group was irradiated with a single dose of 25 Gy to establish radiation-induced hepatic fibrosis model. Liver tissues from the irradiated liver, and blood sample were collected at different time points (2 months, 4 months, 6 months) after irradiation. Expression of TGF- $\beta 1$ by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed. Pathomorphological change in the liver was observed with hematoxylin-eosin staining by optical microscope. **Results:** The expression of serum TGF- $\beta 1$ of model group at different time points [2 months, (551.03 ± 69.00) ng/L; 4 months, (645.31 ± 109.29) ng/L; 6 months, (737.89 ± 118.11) ng/L] was significantly higher than that of the control group (451.71 ± 51.12 ng/L, $P < 0.05$). There were distinctly positive correlation between the serum of TGF- $\beta 1$ value and severity of hepatic fibrosis ($r=0.82, P < 0.01$). **Conclusion:** In the development of radiation-induced fibrosis, TGF- $\beta 1$ rises with the severity of hepatic fibrosis. We provide a new noninvasive and convenient means for monitoring the severity of hepatic fibrosis, and lay a theoretical foundation for subsequent TGF- $\beta 1$ as a serum marker applied to clinical research of radiation-induced hepatic fibrosis.

Key words: Radiation-induced hepatic fibrosis; Transforming growth factor $\beta 1$; Rat

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5829-04

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2012211A077)

作者简介:王云莲(1988-),女,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:肿瘤的放射治疗研究,

电话:0991-4366374, E-mail: fengliu.rencai@163.com

[△] 通讯作者:包永星, E-mail: baoyx@vip.sina.com

(收稿日期:2014-04-06 接受日期:2014-04-30)

前言

随着放疗技术日益成熟, 肝癌的放疗地位逐渐得到了肯定。但是肝癌的放射治疗可导致放射性肝损伤(RILD)、甚至肝纤维化及肝硬化等并发症的发生, 严重的放射性肝损伤(Radiation-induced liver disease, RILD)已成为制约肝脏放射治疗疗效的瓶颈。一旦发生严重的 RILD, 死亡率高达 76%^[1]。因此, 寻找较佳的血清标记物对放射性肝纤维化的无创诊断及监测具有重要意义。然而目前国内外关于 RILD 的作用机制尚不明确, 探寻较好的血清标记物仍有较大困难。既往有报道^[2]称, 血清透明质酸、III 型前胶原、IV 型胶原、层粘连蛋白等四项指标是目前临床应用较广泛的肝纤维化血清标记物, 但灵敏度欠佳。有研究^[3]表明, TGF- β 1 是肝纤维化发展过程中最重要且研究最多的因子之一, 其主要作用是激活肝星状细胞, 促进细胞外基质的合成分泌, 同时抑制其降解。但是目前关于血清 TGF- β 1 在监测 RILD 严重程度的研究鲜有报道。为此, 本研究通过建立放射性肝纤维化大鼠模型, 观察放射性肝纤维化大鼠不同时期血清 TGF- β 1 的表达特点, 从而探讨其与放射性肝纤维化严重程度的相关性及其作为血清标记物的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

瓦里安 XIM-CX 型模拟定位机、瓦里安 2300C/D 直线加速器(美国瓦里安医疗器械公司); TGF- β 1 ELISA 试剂盒(武汉

博士德生物公司)。

1.2 动物及分组

清洁级雄性 SD 大鼠 40 只, 6 周龄, 体重(220 $\pm$ 10) g。购自新疆医科大学动物饲养中心, 许可证号 XJZZQ(XK)200301。大鼠适应喂养 1 周后, 随机数字表法将大鼠分为模型组和对照组, 模型组 30 只, 对照组 10 只。

1.3 大鼠右腹局部照射方法

照射方式参照包永星^[4]等方法, 并加以改进。雄性 SD 大鼠经将氯胺酮注射液 2 mL, 地西洋 1 mL, 阿托品 2 mL 混合, 以生理盐水稀释至 10 mL, 稀释液按照 0.75 mL/100g 进行腹腔注射麻醉, 麻醉生效后, 取仰卧位, 将大鼠用胶布固定在鼠板上, 瓦里安 XIM-CX 型模拟定位机进行模拟定位, 然后瓦里安 2300C/D 直线加速器下行肝右叶照射, 照射野^[5]的长宽各为 2 cm, 具体为: 脊柱右侧缘为内侧界, 外界开放, 膈顶为上界, 上界以下 2 cm 为下界。采用 6MV-X 线源皮照射技术, 源皮距(SSD)80 cm, 照射深度在皮下 2 cm, 吸收剂量率为 300 cGy/min, 单次照射总量为 25 GY。

1.4 各项指标的检测

照射 2 月、4 月、6 月后, 每次随机抽取模型组大鼠 10 只, 对照组大鼠 3-4 只, 麻醉后腹主动脉采血, 离心后取上清液, 放 -80℃ 冰箱保存。取大鼠右肝同一部位组织, 清洗后置于 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 3 μ m 厚切片贴于防脱载玻片上。观察以下指标: (1) 采用苏木素-伊红(HE)染色, 电镜下观察大鼠肝组织病理形态学变化, 同时, 按照肝纤维化半定量计分系统

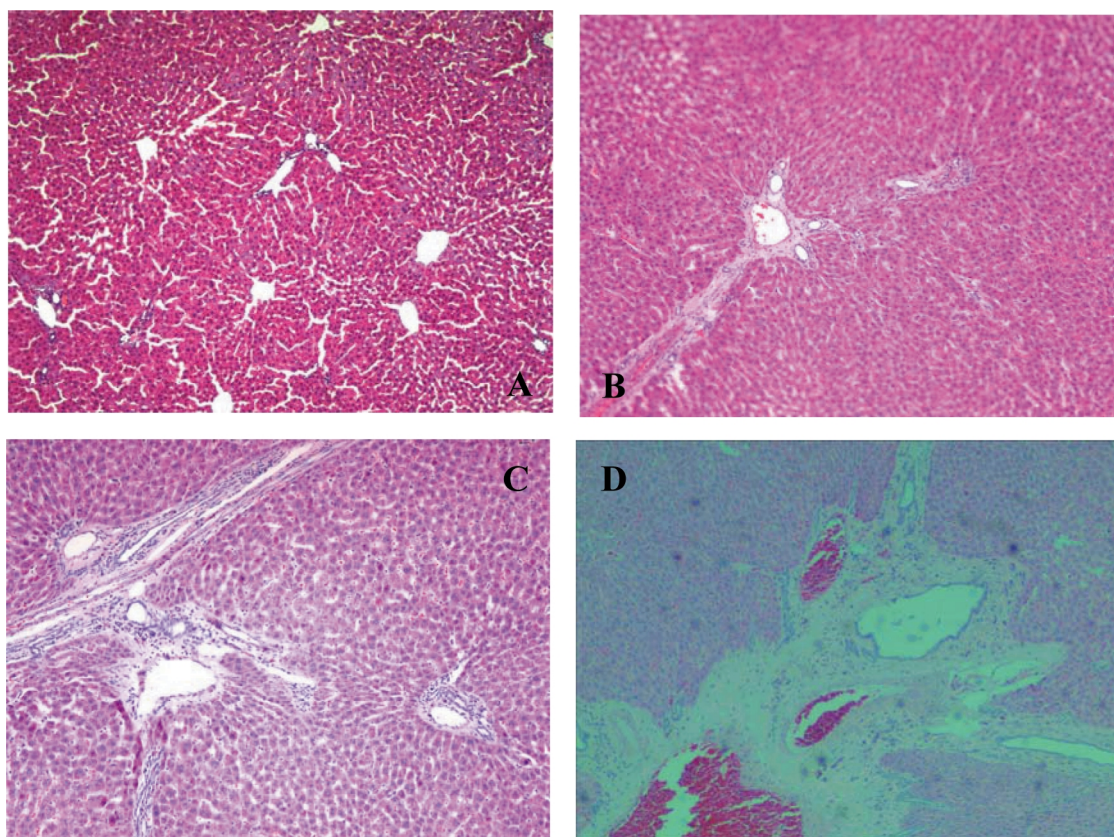


图 1 两组不同时期肝组织病理形态变化(HE 染色, $\times$ 100)

Fig.1 The liver tissue pathological changes of two groups in different periods (HE staining, $\times$ 100)

A: 正常组 B: 模型组(2 月) C: 模型组(4 月) D: 模型组(6 月)

A: control group B: model group(2 months) C: model group(4 months) D: model group(6 months)

表 1 血清 TGF- β 1 值及肝组织纤维化程度的检测结果及其相关性分析 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 The results of serum TGF- β 1 levels and hepatic fibrosis degree and their correlation analysis ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Serum TGF- β 1 levels	Semiquantitative fibrosis score
Control group	10	451.71 $\pm$ 51.12	0.34 $\pm$ 1.13
Model group			
2 months	10	551.03 $\pm$ 69.00 ^a	5.41 $\pm$ 2.31 ^a
4 months	10	645.31 $\pm$ 109.29 ^{ab}	8.72 $\pm$ 2.92 ^{ab}
6 months	10	737.89 $\pm$ 118.11 ^{abc}	12.18 $\pm$ 3.90 ^{abc}

注:a 与对照组相比, $P < 0.05$; b 与 2 月模型组相比, $P < 0.05$; c 与 4 月模型组相比, $P < 0.05$ 。

Note: a Compared with the control group, $P < 0.05$; b Compared with the model group in 2 months, $P < 0.05$;

c Compared with the model group in 4 months, $P < 0.05$.

(SSS)方法^[9],进行单人单盲读片,对各组大鼠肝纤维化程度评分,得分越高,表示纤维化程度越重。(2)采用 ELISA 法检测血清 TGF- β 1,实验步骤按照试剂盒说明书执行。

1.5 统计学处理

利用 SPSS17.0、Excel2003 等软件统计分析。定量资料符合方差分析条件(符合正态分布以及方差齐)时,以表示,多组样本均数之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法;否则采用 Tamhane's T2 检验。两组计量资料之间的相关性采用直线相关分析法,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 两组大鼠肝脏病理的变化

对照组大鼠肝组织 HE 染色后,镜下肝小叶结构完整,放射状肝细胞索及中央静脉清晰可见,细胞排列整齐。模型组大鼠在照射 2 月时汇管区炎性细胞、坏死细胞增多,细胞索排列较紊乱,纤维结缔组织少量增生,尚未形成假小叶。在照射 4 月时,汇管区坏死物质增多,肝细胞索消失,纤维结缔组织在汇管区及中央静脉间增生,有少许假小叶形成。在照射 6 月时,上述变化进一步恶化,纤维结缔组织大量增生,汇管区可见纤维性桥,胶原和网状纤维明显增多,假小叶形成增多,逐渐向肝硬化进展(详见图 1)。评分结果显示,随着照射后时间的延长,肝纤维化积分越高(见表 1, $P < 0.05$)。

2.2 两组大鼠血清 TGF- β 1 值的比较

在照射第 2 月、4 月、6 月后,模型组血清 TGF- β 1 值逐渐升高,均明显高于对照组(见表 1, $P < 0.05$)。

2.3 大鼠血清 TGF- β 1 值与肝纤维化程度的相关性分析

通过对血清 TGF- β 1 值与肝纤维化程度积分进行相关性分析,结果显示大鼠血清 TGF- β 1 值与肝纤维化程度存在高度正相关($r = 0.82$, $P < 0.01$)。

3 讨论

目前关于 RILD 的机制不明,部分放射性肝纤维化甚至肝硬化可能被逆转^[9],因此寻找较佳的血清标记物对放射性肝纤维化的早期诊断具有重要意义。多位学者^[7-11]报道,血清谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和大鼠肝纤维化的严重程度密切相关。另外, Hou 等^[12]、Ding 等^[13]报道的血小板衍生生长因子 BB (Platelet derived

growth factor-BB, PDGF-BB)、Timo Rath 等^[12]报道的人软骨糖蛋白-39 均是较好的血清标记物。Wang 等^[14]建立的 CCL4 肝纤维化大鼠模型证实了 TGF- β 1、金属蛋白酶组织抑制因子-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-1) 也和肝纤维化程度密切相关。但 TGF- β 1 在放射性肝纤维化模型的血清诊断价值目前鲜有报道。

本研究通过观察大鼠肝脏病理变化,模型组大鼠随着照射后时间的延长,肝细胞索结构逐渐消失,汇管区纤维结缔组织逐渐增多,假小叶渐渐形成,提示大鼠放射性肝纤维化模型已成功建立。同时,本研究发现在正常大鼠血清中, TGF- β 1 表达极少,而在照射后的第 2 月、4 月、6 月, TGF- β 1 表达明显增加,第 6 月时表达最多。本研究也发现 TGF- β 1 表达水平与肝纤维化程度呈高度正相关,即血清 TGF- β 1 值越高,大鼠肝纤维化程度越严重。上述结果与 Wang 等^[14]、丁宁等^[15]建立的四氯化碳所致肝纤维化模型的研究结果一致,从而提示 TGF- β 1 表达水平上调促进了肝纤维化的发生发展,进一步证实了 TGF- β 1 在放射性肝纤维化中的血清诊断价值。在 RILD 的过程中,肝星状细胞、枯否细胞等被激活,分泌和释放一些细胞因子(包括 TGF- β 、血小板源性生长因子、肿瘤坏死因子^[16]等),从而引起细胞外基质分泌增多,最终导致肝纤维化。在众多细胞因子中, TGF- β 1 是 RILD 发生过程中最重要的细胞因子之一^[17]。TGF- β 1 与活化的肝星状细胞上的 TGF- β II 型受体(TGF- β II receptor, TGF- β II R)结合后,主要通过 Ras/ERK 途径和 STATs 途径发生磷酸化,并使肝星状细胞胞质内的下游信号转导分子得到激活,形成受体型 Smad 和辅助型 Smad 异源复合体,并由胞质转入胞核内,刺激和调节相关基因转录,产生大量细胞外基质沉积;上调的 TGF- β 1 通过 TGF- β /smad^[13,18]、PI3K/Akt^[19]等多条信号通路^[20],以最大程度介导肝星状细胞的活化增殖、调节胶原纤维的代谢,从而促进放射性肝纤维化的进展。

如上所述,在放射性肝纤维化发生发展中,血清 TGF- β 1 随着肝纤维化严重程度增加,其值亦升高,提示血清 TGF- β 1 值一定程度上与肝纤维化程度相一致,又因其具备无创、操作方便等优点,为监测放射性肝纤维化严重程度提供了一种新的诊断手法,亦为其作为血清标记物应用于放射性肝纤维化的临床研究奠定了理论基础。因本研究仅用动物实验证实了 TGF- β 1 在放射肝纤维化的血清诊断中有一定价值,故仍需大量的临床实验验证。因此,本研究计划下一步开展将 TGF- β 1

作为血清标记物监测放射性肝纤维化严重程度的临床研究。同时,本研究仅探讨了 TGF- β 1 单一血清标记物,我们可进一步将其与目前临床应用较多的几种标记物(如血清透明质酸、III 型前胶原、IV 型胶原、层粘连蛋白等)进行逐一比较,以寻找出相关性更高、操作简单的血清标记物。

参考文献(References)

- [1] Liang SX, Huang XB, Zhu XD, et al. Dosimetric predictor identification for radiation-induced liver disease after hypofractionated conformal radiotherapy for primary liver carcinoma patients with Child-Pugh Grade A cirrhosis[J]. *Radiother Oncol*, 2011, 98(2): 265-269
- [2] Hou XY, Ellis MK, McManus DP, et al. Diagnostic value of non-invasive bio-markers for stage-specific diagnosis of hepatic fibrosis in patients with advanced schistosomiasis japonica [J]. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41(34): 325-332
- [3] Mann J, Mann DA. Transcriptional regulation of hepatic stellate cells [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(6-7): 497-512
- [4] 包永星, 姜繁, 赵化荣, 等. 骨髓间充质干细胞对大鼠急性放射性肝损伤修复的研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2010, 30(1): 22-25
Bao Yong-xing, Lou Fan, Zhao Hua-rong, et al. Study on bone marrow mesenchymal stem cells in repairing of radiation induced acute liver injury of rats [J]. *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2010, 30(1): 22-25
- [5] 中华医学会肝病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10: 327-323
Hepatology liver fiber chemical group of the Chinese Medical Association. Consensus on evaluation of the diagnosis and efficacy of hepatic fibrosis[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2002, 10: 327-323
- [6] Westbury CB, Yarnold JR. Radiation fibrosis-current clinical and therapeutic perspectives[J]. *Clin Oncol-UK*, 2012, 10(24): 657-672
- [7] Yang Rui-yue, Wang Jun-bo, Liu Zhi-gang, et al. Antioxidant Effect of a marine oligopeptide preparation from chum salmon(*Oncorhynchus keta*)by enzymatic hydrolysis in radiation injured mice [J]. *Mar Drugs*, 2011, 9(11): 2304-2315
- [8] Wang Xin-hui, Gong Guo-qing, Yang Wen-hui, et al. Antifibrotic activity of galangin, a novel function evaluated in animal liver fibrosis model[J]. *Environ Toxicol Phar*, 2013, 36(2): 288-295
- [9] Zhao Hai-tian, Wang Zhen-yu, Ma Feng-ming, et al. Protective Effect of anthocyanin from *Lonicera caerulea* var. *edulis* on radiation-induced damage in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11773-11782
- [10] Devi SL, Viswanathan P, Anuradha CV. Regression of liver fibrosis by taurine in rats fed alcohol: Effects on collagen accumulation, selected cytokines and stellate cell activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 647(13): 161-170
- [11] Meydan D, Gursel B, Bilgici B, et al. Protective Effect of Lycopene against Radiation-induced Hepatic Toxicity in Rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 39(4): 1239-1252
- [12] Ding XC, Ma LN, Li YF, et al. Association between serum platelet-derived growth factor BB and degree of liver damage, fibrosis and hepatitis B e antigen(HBeAg)status in CHB patients[J]. *Hepato-Gastroenterology*, 2012, 59(120): 2357-2360
- [13] Timo R, Martin R, Can G, et al. YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis [J]. *Scand J Gastroentero*, 2011, 46(11): 1369-1380
- [14] Wang Jia-jia, Li Jun, Shi Lei, et al. Preventive effects of a fractioned polysaccharide from a traditional Chinese herbal medical formula(Yu Ping Feng San)on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(7): 935-942
- [15] 丁宁, 易征, 周凯, 等. 脾切除对肝纤维化大鼠肝脏 TGF β 1 的表达和血清 TGF β 1 水平的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(8): 1458-1460
Ding Ning, Yi Zheng, Zhou Kai, et al. Effects of splenectomy on the expression of TGF- β 1 in the liver and the serum level of TGF- β 1 of the rats with hepatic fibrosis [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11 (8): 1458-1460
- [16] Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(3): 513-528
- [17] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta smad signal in hepatic fibrogenesis [J]. *Gut*, 2007, 56(2): 284-292
- [18] Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, et al. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver[J]. *Z Gastroenterol*, 2006, 44(1): 57-66
- [19] Zhou Y, Jia X, Wang G, et al. PI-3K/AKT and ERK signaling pathways mediate leptin-induced inhibition of PPAR gamma gene expression in primary rat hepatic stellate cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 325(1-2): 131-139
- [20] Kluwe J, Pradere JP, Gwak GY, et al. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 347-359

(上接第 5817 页)

- [14] Nishimura EK1, Jordan SA, Oshima H, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination [J]. *Nature*, 2002, 416(6883): 854-860
- [15] Greg Barsh and George Cotsarelis. How Hair Gets Its Pigment [R]. *Cell*, 2007, 130: 779-781
- [16] Masatake Osawa, G.E., Siu-Shan Mak, Mariko Moriyama, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche [R]. *Development*, 2005, 132(24): 5589-5599
- [17] Botchkareva, N.V., V.A. Botchkarev, B.A. Gilchrist. Fate of melanocytes during development of the hair follicle pigmentary unit [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2003, 8(1): 76-79
- [18] Lin, J.Y, D.E. Fisher. Melanocyte biology and skin pigmentation [R]. *Nature*, 2007, 445(7130): 843-850