

• 论著 •

胰岛素样生长因子-I 受体在大鼠肝纤维化形成中的动态变化

赵彩霞 申凤俊 唐 瑾

摘要:目的 通过观察大鼠肝纤维化形成过程中胰岛素样生长因子-I 受体(IGF-I R)的动态变化,探讨 IGF-I R 与肝纤维化的关系。方法 制备四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化模型,共 8 周。测定各组门静脉压,对肝组织进行常规苏木精-伊红和马松三色染色,采用免疫组织化学方法测定肝组织 IGF-I R 的表达,通过图像分析系统进行定量分析,并将 IGF-I R 与肝纤维化程度、门静脉压进行相关性分析。结果 与正常对照组比较,模型组随着造模时间的延长,肝纤维化程度加重,门静脉压逐渐增高,IGF-I R 在肝组织中的表达也增加,IGF-I R 的表达与肝纤维化程度及门静脉压呈正相关。结论 在肝纤维化进程中,IGF-I R 表达逐渐增加,提示其可能参与肝纤维化。

关键词:肝纤维化;门静脉压;胰岛素样生长因子-I 受体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2011.06.017

Dynamic alteration of insulin-like growth factor-I receptor of hepatic fibrosis in rats ZHAO Cai-xia, SHEN Feng-jun, TANG Jin. Department of Gastroenterology, the First Teaching Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan (030001), China

Abstract: **Objective** To investigate dynamic alteration of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-I R) during experimental liver fibrosis and study the association between IGF-I R and liver fibrosis. **Methods** Hepatic fibrosis was induced by chronic carbon tetrachloride (CCl₄) subcutaneous injection for 8 weeks. The portal pressure was measured and conventional histological examinations of liver tissue were performed after hematoxylin and eosin staining and Masson staining. Hepatic tissue expression of IGF-I R was detected by immunohistochemistry, and then quantitated by picture-analyzed systems. The correlations among the IGF-I R, the degree of liver fibrosis and the portal pressure were analyzed. **Results** In model group, liver fibrosis degree increased and portal pressure gradually increased as the time was extended. The IGF-I R expression was obviously higher than that in normal group, and it was positively correlated with liver fibrosis degree and the portal pressure. **Conclusion** The expression of IGF-I R in liver tissue increases with the development of hepatic fibrosis, which suggests it might participate in the hepatic fibrosis.

Key words: Hepatic fibrosis; Portal pressure; Insulin-like growth factor-I receptor

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病发展到终末期的必经阶段,正常肝的纤维组织的形成与降解保持平衡,如形成增多而降解减少则可导致肝纤维化。许多细胞因子通过复杂的信号转导途径在肝纤维化形成中发挥着重要的作用^[1]。胰岛素样生长因子-I 受体(IGF-IR)对胰岛素样生长因子-I(IGF-I)起着重要的调节作用,进而对肝纤维化进行调控^[2],因此 IGF-I R 可能在肝纤维化形成中发挥了重要的作用。本研究采用四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠肝纤维化模型作为研究对象,通过观察 IGF-I R 在大鼠肝纤维化形成过程中的动态变化,探讨 IGF-I R 与肝纤维化的关系。

1 材料与方法

1.1 动物与材料

实验动物为健康雄性 Wistar 大鼠,共 36 只,体

重 200 ± 20 g,购自山西医科大学动物室。40%CCl₄油剂购自天津市风船化学试剂科技有限公司,门静脉压测定应用山西医科大学生理实验室提供的 BL410 生物机能实验系统,IGF-I R 免疫组化试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及肝纤维化大鼠模型的制备 将 36 只大鼠随机分为 2 组,正常对照组 6 只,模型组 30 只。除正常对照组外,其余大鼠给予皮下注射 40%CCl₄ 油剂(首次剂量为 5 ml/kg,以后每次 2 ml/kg,每周 2 次)制备肝纤维化大鼠模型。每周称重 1 次,根据体重调整 CCl₄ 剂量。正常对照组给予皮下注射相同剂量的食用油。各组大鼠实验期间均予饮用水和普通饲料喂养。在模型组开始注射 CCl₄ 后的第 2、4、6、8 周末分别处死大鼠 6 只,于第 8 周末处死正常对照组大鼠 6 只,取血和肝组织备用。

1.2.2 病理学检查 肝组织用 10% 中性福尔马林液固定,常规处理切片并经苏木精-伊红(HE)染色及马松(Masson)三色染色后,在光镜($\times 100$)下观察。应用 Leica Q500IW 图象分析系统对 Masson 染色的肝组织进行图像处理,在光镜($\times 100$)下摄取图像,测定标准光栏中胶原纤维(绿色)的面积。每张切片随机选取 3 个视野,每个视野以汇管区为中心,计算胶原纤维面积百分比(胶原纤维面积百分比 = 视野中胶原纤维面积/视野中肝脏面积 $\times 100\%$)。

1.2.3 门静脉压力测定 门静脉压测定采用山西医科大学生理实验室提供的 BL410 生物机能实验系统,由专人操作。在处死大鼠之前,将其腹腔注射麻醉后,打开腹腔暴露门静脉主干,于肠系膜前静脉右侧靠近门静脉处分离出一段回肠肠系膜静脉分支,将远端结扎,用血管剪剪开一适宜长度的缺口,将 PE100 导管自缺口插入后,沿肠系膜前静脉上行,通过脾静脉至门静脉主干,固定导管并接通压力换能器来测量门静脉压力。

1.2.4 免疫组织化学染色 IGF- I R 方法及结果评估 切片常规脱腊至水,置于高压锅($92^{\circ}\text{C} \sim 98^{\circ}\text{C}$) 2 min 进行热诱导的抗原修复,加一抗(IGF- I R 抗体浓度为 1 : 150),置于 37°C 孵育 2 h。然后滴加生物素化二抗工作液,置于 37°C 孵育 15 min,用二氨基联苯胺(DAB)显色,蒸馏水清洗、复染、脱水、透明、封片。应用图象分析系统在光镜($\times 100$)下定量测定每个视野内黄色区域的平均灰度值(黄色区域为 IGF- I R 阳性表达),观察几个视野取平均值,然后进行组间比较。

1.2.5 统计学方法 实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学改变

根据肝组织病理切片 HE 染色和 Masson 染色结果,进行肝脏纤维化分期。参照 2000 年西安学术会议修订的病理组织学诊断标准,根据肝脏胶原纤维增生程度,将肝纤维化分为 $S_0 \sim S_4$ 期:(1)正常肝脏为 S_0 期,无肝纤维化;(2) S_1 期汇管区纤维化扩大,局限于窦周及小叶内纤维化;(3) S_2 期汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留;(4) S_3 期有纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化;(5) S_4 期有早期肝硬化。在光镜($\times 100$)下,每张切片随机选取 3 个视野,分别记录病理分期,取平均值作为该动物肝脏的病理分期。光镜下可见,模型组随着造模时间的延长,其肝纤维化程度逐渐加重,肝细胞水肿加重,出现气球样变,部分肝细胞出现轻度脂肪变;随着汇管区及周围炎症范围扩大,可见不同程度碎屑坏死,炎细胞形成桥样连接;在中央静脉周围及汇管区胶原纤维和网状纤维沉积增多并向外延伸,形成纤维间隔,肝小叶结构紊乱;进而正常肝小叶结构消失、大量纤维间隔包绕形成假小叶,部分到达早期肝硬化阶段。造模后第 2 周末多数大鼠肝纤维化达到 $S_0 \sim S_1$ 期,第 4 周末达到 $S_1 \sim S_2$ 期,第 6 周末达到 $S_2 \sim S_3$ 期,第 8 周末达到 $S_3 \sim S_4$ 期(见图 1)。应用计算

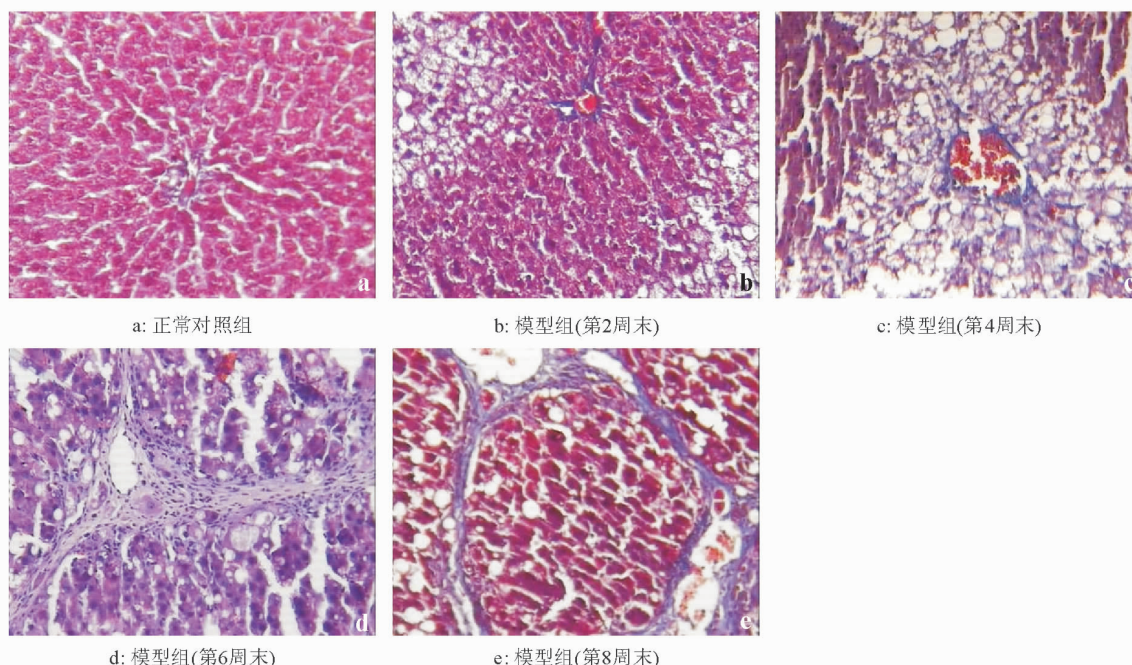


图 1 各组大鼠肝组织经 Masson 染色的光镜结果($\times 100$)

机图像分析系统进行分析,结果显示模型组第 2 周末肝脏总胶原纤维沉积情况与正常对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$);随着造模时间的延长,模型组第 4 周末肝脏总胶原纤维沉积较对照组明显增加,两者差异有统计学意义($P<0.01$);模型组第 6、8 周末肝脏总胶原纤维沉积的增加更为明显,显著高于正常对照组($P<0.01$)(见表 1)。

表 1 各组大鼠肝纤维化分期及肝脏胶原纤维面积百分比

组别	例数	肝纤维化分期	肝脏胶原纤维面积百分比(%)
正常对照组	6	S ₀	0.018 ± 0.014
模型组(第 2 周末)	6	S ₀ ~S ₁	0.024 ± 0.016 ^a
模型组(第 4 周末)	6	S ₁ ~S ₂	0.21 ± 0.031 ^b
模型组(第 6 周末)	6	S ₂ ~S ₃	0.31 ± 0.037 ^b
模型组(第 8 周末)	6	S ₃ ~S ₄	0.39 ± 0.036 ^b

注:模型组(第 2 周末)与正常对照组比较,^a $P>0.05$;模型组(第 4、6、8 周末)与正常对照组比较,^b $P<0.01$

2.2 门静脉压改变

模型组第 2、4 周末的门静脉压较正常对照组高($P<0.05$);随着模型组肝纤维化的进展,第 6、8 周末的门静脉压更高,显著高于正常对照组($P<0.01$);表明随着造模时间的延长,门静脉压逐渐增高。

表 2 各组大鼠门静脉压变化

组别	例数	门静脉(mmHg)
正常对照组	6	4.65 ± 0.55
模型组(第 2 周末)	6	8.43 ± 0.86 ^a
模型组(第 4 周末)	6	12.26 ± 1.31 ^a
模型组(第 6 周末)	6	15.03 ± 2.29 ^b
模型组(第 8 周末)	6	16.22 ± 2.08 ^b

注:模型组(第 2、4 周末)与正常对照组比较,^a $P<0.05$;模型组(第 6、8 周末)与正常对照组比较,^b $P<0.01$

2.3 IGF-ⅠR 水平变化

模型组的 IGF-ⅠR 表达主要见于肝星状细胞(HSC)和库普弗细胞,正常对照组肝细胞的阳性表达很少。与正常对照组相比,模型组第 2 周末仅有小部分 HSC 表达 IGF-ⅠR,第 6、8 周末时表达 IGF-ⅠR 的细胞显著增加。本实验通过定量测定 IGF-ⅠR 在肝组织阳性表达的平均灰度值来分析 IGF-ⅠR 在大鼠肝纤维化进程中的动态变化,该值越高提示 IGF-ⅠR 表达越少。结果显示,随着造模时间的延长,肝纤维化程度加重,模型组各期的 IGF-ⅠR 阳性表达均较正常对照组高,且各组之间差异显著($P<0.01$)(见表 3)。

表 3 各组大鼠肝组织中 IGF-ⅠR 表达的平均灰度值

组别	例数	平均灰度值
正常对照组	6	175.99 ± 2.34
模型组(第 2 周末)	6	161.50 ± 4.75 ^a
模型组(第 4 周末)	6	156.50 ± 5.54 ^a
模型组(第 6 周末)	6	143.42 ± 11.01 ^a
模型组(第 8 周末)	6	140.19 ± 8.68 ^a

注:模型组与正常对照组比较,^a $P<0.01$

2.4 IGF-ⅠR 与肝纤维化程度、门静脉压的相关性

肝纤维化程度可用肝脏胶原纤维面积百分比来定量表示,将模型组肝脏胶原纤维面积百分比与肝组织 IGF-ⅠR 平均灰度值进行直线相关回归分析,得出 $r>-0.8901$,表明肝纤维化程度与 IGF-ⅠR 的表达呈正相关($P<0.001$),且随着肝纤维化程度的加重,肝组织中 IGF-ⅠR 的表达是逐渐增加的。将模型组的门静脉压与肝组织 IGF-ⅠR 平均灰度值进行相关性分析,得出 $r>-0.8803$,表明门静脉压与 IGF-ⅠR 的表达呈正相关($P<0.001$)。

3 讨论

HSC 被视为肝纤维化发生的中心环节,是细胞外基质(ECM)的主要来源^[3]。激活的 HSC 通过自分泌和旁分泌产生多种细胞因子,包括转化生长因子(TGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)及胰岛素样生长因子(IGF)等^[4],这些细胞因子刺激 HSC 进一步释放更多的组织因子,起效应放大的作用,在肝纤维化的形成过程中起着重要的作用。IGF 家族有 IGF-Ⅰ 和胰岛素样生长因子-2(IGF-Ⅱ)2 种肽类激素(或生长因子),是一类具有广泛生物学功能的细胞因子^[5]。IGF-Ⅰ 主要由肝脏分泌,与 IGF-ⅠR 结合后可激活 HSC,活化的 HSC 分泌大量胶原纤维,还可分泌血管内皮生长因子(VEGF)、TGF、内皮素-1(ET-1)等细胞因子,这些因子再与 HSC 相互作用,激活静止的 HSC 转化为肌成纤维样细胞,产生大量胶原纤维,加速肝纤维化的进展^[6,7]。可见,IGF-ⅠR 作为 IGF-Ⅰ 最重要的调节因子,在肝纤维化发生过程中起着重要的作用。

本实验结果显示,IGF-ⅠR 主要在 HSC、库普弗细胞及窦状内皮细胞的胞质和胞膜中表达,与正常对照组相比,模型组 IGF-ⅠR 的表达明显增加,且随着肝纤维化程度的加重,IGF-ⅠR 的表达逐渐增加。进一步对 IGF-ⅠR 与肝纤维化程度、门静脉压进行相关性分析,结果显示肝纤维化程度和门静脉压与 IGF-ⅠR 的表达呈正相关($P<0.001$)。本实验所得结果,随着肝纤维化程度的加重,门脉压力逐渐增高,肝组织 IGF-ⅠR 的表达逐渐增加,与文

(下转第 372 页)