

A20 在胆管结扎所致肝纤维化小鼠中的表达及作用机制研究

王晓晗 韩 丰 沈 亮 陈云清 沈月玉 高 晨 侯震涛 冀子中 范竹萍

【摘要】 目的 研究胆管结扎(BDL)所致肝纤维化模型小鼠肝脏中 A20 及炎症因子的表达情况,在细胞水平探讨 A20 的作用机制。方法 建立 BDL 所致小鼠肝纤维化模型,BDL 组结扎胆管后关腹,对照组不结扎胆管直接关腹,10 d 后处死小鼠,留取肝脏行 H-E 染色并观察。应用蛋白质印迹法(Western blotting)检测两组小鼠肝脏中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及 A20 蛋白的表达。应用实时荧光 PCR 法(Real-time PCR)检测两组小鼠肝脏中炎症反应相关指标 mRNA 的表达。在体外使用脂多糖(LPS)处理人肝星状细胞(HSC) LX-2 细胞,观察 A20 及炎症反应信号通路因子的变化。结果 BDL 组小鼠肝脏组织 H-E 染色显示肝细胞片状坏死,大胆管增生,肝纤维化明显。BDL 组小鼠肝脏中 α -SMA 蛋白表达为对照组的 2.11 倍($P < 0.05$),A20 蛋白表达为对照组的 2.47 倍($P < 0.01$)。BDL 组小鼠肝脏中转化生长因子- β (TGF- β)、IL-6、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、Toll 样受体 4(TLR4)的 mRNA 相对表达量较对照组明显升高,分别为对照组的 1.94 倍、5.50 倍、2.47 倍、37.59 倍、4.50 倍($P = 0.0328$ 、 $P = 0.0010$ 、 $P = 0.0046$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P = 0.0146$)。使用 LPS(0.1 μ g/L)处理 LX-2 细胞(0、5、10、15、30、60 min),NF- κ B 抑制因子 α (I κ B α)、磷酸化 I κ B α 蛋白的表达水平在处理 15 min 时到达高峰,随后开始下降;A20 蛋白的表达水平在处理 30 min 时开始逐渐上升。结论 A20 可能参与了 BDL 所致肝纤维化模型小鼠的炎症反应,在 LX-2 细胞内的炎症反应通路中发挥负向调节作用,但 A20 在炎症反应通路中的具体作用机制有待进一步研究。

【关键词】 A20;胆管结扎;肝纤维化;炎症反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2021.04.016

肝纤维化是影响肝脏疾病转归和肝细胞癌(HCC)风险的关键因素,与肝脏疾病的进展相关^[1]。尽管肝纤维化的病因不同,但其进展遵循的模式是类似的。肝星状细胞(HSC)在肝损伤后被激活,产生大量细胞外基质和促炎介质,在纤维生成中发挥着关键作用^[2]。

目前已知 A20 是一种有效的抗炎蛋白。本课题组的既往研究发现,A20 参与了肝纤维化的过程,但具体作用机制尚不清楚^[3]。本研究主要探讨

A20 及炎症因子在胆管结扎(BDL)所致肝纤维化模型小鼠肝脏中的表达情况,并在细胞水平探讨 A20 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 BDL 所致肝纤维化小鼠模型的构建

采用 6~8 周龄的 C57/B6 雄性小鼠,BDL 组小鼠(5 只)用 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,开腹,结扎胆管后关腹。对照组小鼠(5 只)不结扎胆管,直接关腹。10 d 后处死小鼠,留取肝脏备用。取肝脏组织,浸于 4% 多聚甲醛中固定,脱水透明,石蜡包埋,0.5 μ m 切片,脱蜡后行 H-E 染色,显微镜观察并作图像采集。

1.2 细胞培养

LX-2 细胞是永生化的人 HSC(购自 ATCC),置于含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY798);嘉兴市第一医院优秀青年基金(2018-GG-10);嘉兴市第一医院市级医学重点学科(2019-zc-08)

作者单位:314001 嘉兴学院附属医院消化内科(王晓晗、韩丰、高晨、侯震涛、冀子中),心血管内科(沈亮),感染科(陈云清、沈月玉);200001 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科(范竹萍)

100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。使用 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖 (LPS)处理 LX-2 细胞 0、5、10、15、30、60 min,收获后冷冻保存备用,检测细胞中 A20 及炎症反应通路因子的蛋白表达水平变化。

1.3 蛋白质印迹法检测

使用蛋白裂解缓冲液从细胞中提取总蛋白,检测蛋白水平。将不同样品中等量的蛋白质经 SDS-PAGE 电泳后电转至硝酸纤维素滤膜中。在室温下用 5%脱脂牛奶阻断非特异性蛋白结合 120 min,将特异性单克隆抗体涂于膜上,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 TBST 冲洗后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 15 000)室温孵育 1 h,TBST 洗涤后显影成像,以 GAPDH 作为内参标准。

1.4 肝脏 RNA 提取

取小块肝组织置入 1 mL TRIzol 试剂中充分研磨。裂解后样品于室温下放置,加入氯仿后剧烈振荡,室温孵育后离心。取上层水相加入异丙醇,混匀后室温孵育、离心。乙醇清洗 RNA 后溶解于 DEPC 水中,RNA 溶液置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 实时荧光 PCR 法检测

使用 PrimerScriptTM RT 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),按照说明书进行 cDNA 合成,反应条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,84 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。应用两步法 PCR 扩增程序,总反应体系 10 μL ,第 1 步 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;第 2 步 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。所有 RT-PCR 重复 3 次。RT-PCR 引物由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。转化生长因子- β (TGF- β)、IL-6、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、Toll 样受体 4 (TLR4)的 mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算,以 β -actin 作为内参。

表 1 引物序列	
引物名称	序列
TGF- β	正向:5'-AGGGCTACCATGCCAACTTC-3'
	反向:5'-CCACGTAGTAGACGATGGGC-3'
IL-6	正向:5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'
	反向:5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3'
IL-1 β	正向:5'-TGCTGGTGTGTGACGTTCCC-3'
	反向:5'-TGAGGCCCAAGGCCACAGGTA-3'
MCP-1	正向:5'-TCAGCCAGATGCAGTTAACGC-3'
	反向:5'-TGATCCTCTGTAGCTCTCCAGC-3'
TLR4	正向:5'-TCTGCCTTCACTACAGAGACT-3'
	反向:5'-AGTCTTCTCCAGAAGATGTGC-3'
β -actin	正向:5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'
	反向:5'-CTGGGTCATCTTTTCACGGT-3'

1.6 统计学处理

使用 Graphpad Prism 5 软件进行统计学分析,计量数据以均数 \pm 标准差表示,各组均数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝纤维化模型小鼠的肝脏病理验证

本研究应用 BDL 术(术后 10 天)构建肝纤维化小鼠模型,小鼠肝脏经 H-E 染色,高倍镜下显示,对照组小鼠肝细胞呈多边形,大小正常,核圆、居中,细胞质丰富,小叶结构清晰,未见纤维组织增生;BDL 组小鼠肝细胞片状坏死,大胆管增生,肝纤维化明显。见图 1。

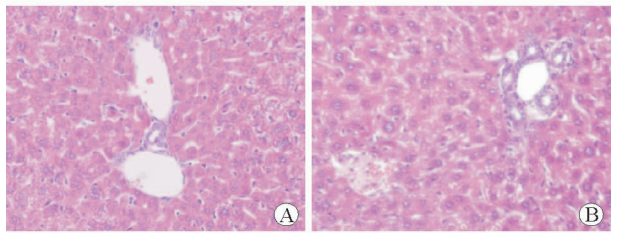


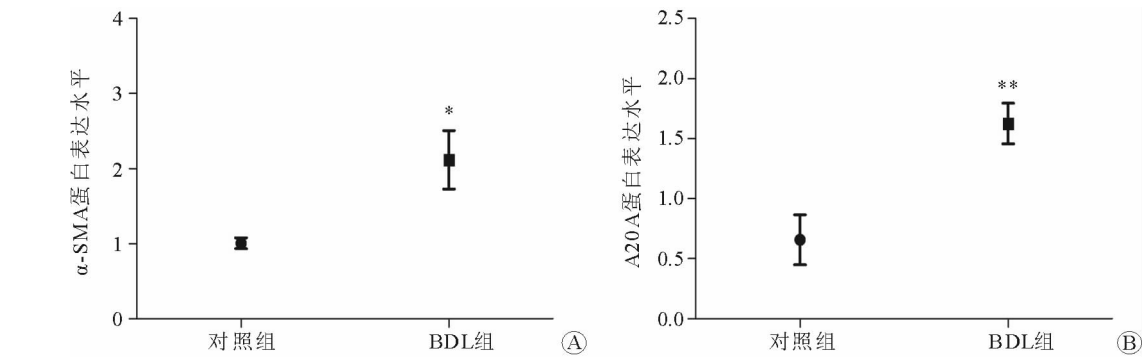
图 1 两组小鼠肝脏病理图 H-E 染色 $\times 400$ A 对照组 B BDL 组

2.2 两组小鼠肝脏中 α -平滑肌肌动蛋白和 A20 蛋白的表达水平比较

应用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测两组小鼠的肝脏组织中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、A20 蛋白的表达水平,结果显示 BDL 组小鼠的 α -SMA 蛋白表达水平 (2.12 \pm 0.87) 为对照组 (1.01 \pm 0.16) 的 2.11 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);BDL 组小鼠的 A20 蛋白表达水平 (1.63 \pm 0.38) 为对照组 (0.66 \pm 0.47) 的 2.47 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2。

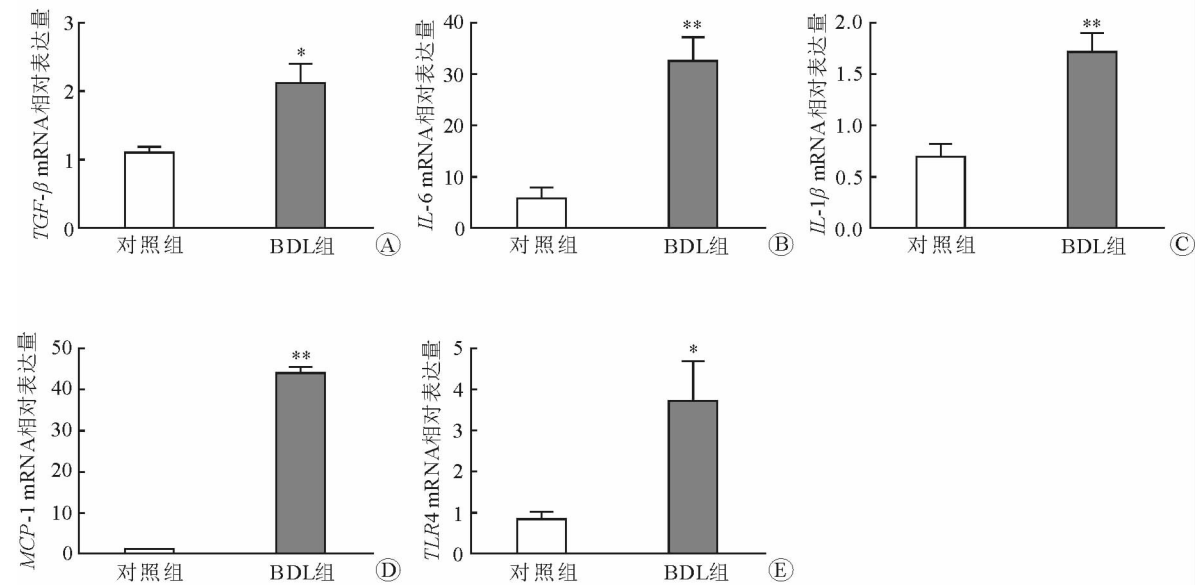
2.3 两组小鼠肝脏中炎症因子的 mRNA 相对表达量比较

应用实时荧光 PCR 法 (Real-time PCR) 检测两组小鼠肝脏中炎症因子的 mRNA 相对表达量,结果显示 BDL 组小鼠肝脏内 TGF- β 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1、TLR4 的 mRNA 相对表达量 (2.12 \pm 0.63, 32.39 \pm 10.81, 1.71 \pm 0.32, 43.76 \pm 2.58, 3.76 \pm 1.99) 分别为对照组 (1.09 \pm 0.22, 5.89 \pm 4.64, 0.69 \pm 0.31, 1.16 \pm 0.22, 0.84 \pm 0.48) 的 1.94 倍、5.50 倍、2.47 倍、37.59 倍、4.50 倍,差异均有统计学意义 ($P = 0.0328$ 、 $P = 0.0010$ 、 $P = 0.0046$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P = 0.0146$)。见图 3。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图2 两组小鼠肝脏中 α -SMA 及 A20 蛋白的表达水平比较 A α -SMA 蛋白 B A20 蛋白



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图3 两组小鼠肝脏中炎症因子的 mRNA 相对表达量比较 A $TGF-\beta$ mRNA B $IL-6$ mRNA C $IL-1\beta$ mRNA D $MCP-1$ mRNA E $TLR4$ mRNA

2.4 LX-2 细胞中 A20 及炎症反应通路因子的蛋白表达水平变化

使用 0.1 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 处理 LX-2 细胞 0、5、10、15、30、60 min,通过 Western blotting 检测发现 $I\kappa\text{B}\alpha$ 、磷酸化 $I\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白的表达水平在处理 15 min 时到达高峰,随后开始下降;A20 蛋白表达水平先下降,随后在处理 30 min 时逐渐上升。见图 4。

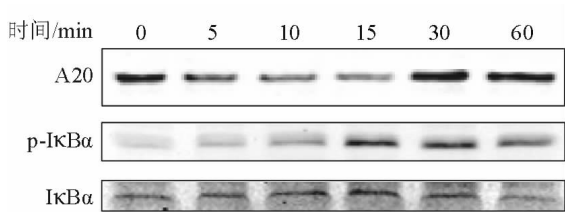


图4 LX-2 细胞中 A20 及炎症反应通路因子的蛋白表达水平变化

3 讨论

目前利用 BDL 术造成肝外胆道梗阻,引起梗阻部位以上的胆管扩张是构建小鼠肝纤维化模型的有效方法^[4]。在胆管阻塞早期,门脉系统发生炎性细胞浸润,胆管增生和小胆管内胆汁淤积;如梗阻持续,纤维组织向胆管延伸,包绕肝小叶,则形成肝纤维化。本研究中,BDL 组小鼠的病理图像显示肝细胞片状坏死,大胆管增生,肝纤维化明显。

A20 是一种有效的抗炎分子,与人类和小鼠的多种炎性反应病理有关^[5]。既往的动物模型实验结果显示,肝脏中过表达 A20 是急性暴发性病毒性肝炎、高危性肝切除术和严重的肝脏缺血再灌注损伤的保护因素^[6]。Ramsey 等^[7]的研究建立了小鼠缺血再灌注损伤模型,在小鼠尾静脉注入高表达 A20

的腺病毒,发现 A20 过表达组的存活率为 67%,而对照组仅为 10%~25%,并且 A20 过表达组的总胆红素(TBil)、ALT 水平下降,肝脏出血坏死、脂肪变性减轻,肝功能改善。Man 等^[8]分别利用正常大鼠和肝硬化大鼠制备肝脏缺血模型,发现 A20 表达上调后,两组的肝脏缺血再灌注损伤均得到改善。另有研究在蛋白质组学方面探讨原代肝细胞对缺血再灌注的反应,发现损伤后的肝细胞内 A20 表达明显升高^[9]。有研究用 LPS 刺激急性肝炎模型小鼠,结果显示 A20 转染组小鼠的存活率达 85%,而对照组仅为 15%~20%,提示 A20 对肝细胞有保护作用^[10]。Longo 等^[11]的研究发现小鼠肝脏被切除 78%后 24 h,对照组小鼠肝细胞内 A20 mRNA 水平较切除前高 13 倍,而 A20 转染过表达组小鼠肝细胞内 A20 mRNA 水平较切除前高 50~60 倍;术后 36 h A20 转染过表达组小鼠肝细胞内的肝细胞脂肪变、肝窦充血较对照组小鼠明显减轻,出血发生率明显下降。SD 大鼠、LEW 大鼠肝脏移植研究发现,肝脏内 A20 高表达有利于提高大鼠存活率,并且存活率与 A20 表达水平呈正相关,A20 表达下调可导致小体积肝移植损伤,而高表达 A20 能增强小体积肝移植后的肝再生能力并提高存活率,可抵抗排异反应^[12-14]。本研究发现肝纤维化模型小鼠肝脏中 A20 和 α -SMA 蛋白表达水平均升高,炎症因子 $TGF-\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $MCP-1$ 、 $TLR4$ 的 mRNA 相对表达量也均升高,提示 A20 可能参与了肝纤维化进程中的炎症反应。

NF- κ B 是一个关键的转录因子,通过诱导炎症反应基因的表达,可调节炎症反应级联反应的多个步骤。研究表明,抑制 NF- κ B/I κ B α 信号通路可改善肝纤维化的严重程度^[15]。NF- κ B 调节炎症反应信号引起肝脏内促炎因子的表达,如 $TGF-\beta$ 、TNF- α 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 等,这些促炎因子在肝纤维化的发展中发挥着重要的作用,抑制 NF- κ B /I κ B α 通路可能是肝纤维化的一个治疗方法^[16]。本研究发现,经过 LPS 处理的 LX-2 细胞中,随着 I κ B α 及磷酸化 I κ B α 蛋白的表达水平升高,A20 蛋白的表达水平降低;当 I κ B α 及磷酸化 I κ B α 蛋白的表达水平达到峰值后下降时,A20 蛋白的表达水平开始逐步升高。可见,A20 在炎症反应通路中发挥着负向调节作用,具体机制有待进一步研究。

综上所述,A20 可能参与了 BDL 所致肝纤维化

模型小鼠的炎症反应;在人 HSC 中,A20 在炎症反应通路中发挥着负向调节作用。今后本课题组将通过过表达或沉默 A20,进一步研究其在原代 HSC 炎症反应通路中的作用机制。

参 考 文 献

- 1 Roehlen N, Crouch E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. Cells, 2020, 9(4): 875.
- 2 Dewidar B, Meyer C, Dooley S, et al. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019[J]. Cells, 2019, 8(11): 1419.
- 3 Wang X, Ai L, Xu Q, et al. A20 Attenuates liver fibrosis in NAFLD and inhibits inflammation responses[J]. Inflammation, 2017, 40(3): 840-848.
- 4 Yang S, Wu Y, Wang D, et al. Establishment of an experimental method for detecting circulating miRNAs in BDL mice[J]. Clin Exp Med, 2012, 12(4): 273-277.
- 5 Priem D, van Loo G, Bertrand MJM. A20 and cell death-driven inflammation[J]. Trends Immunol, 2020, 41(5): 421-435.
- 6 Da Silva CG, Cervantes JR, Studer P, et al. A20—an omnipotent protein in the liver: Prometheus myth resolved?[J]. Adv Exp Med Bio, 2014, 809: 117-139.
- 7 Ramsey HE, Da Silva CG, Longo CR, et al. A20 protects mice from lethal liver ischemia/reperfusion injury by increasing peroxisome proliferator-activated receptor- α expression[J]. Liver Transpl, 2009, 15(11): 1613-1621.
- 8 Man K, Ng KT, Lee TK, et al. Fty720 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic livers[J]. Am J Transplant, 2005, 5(1): 40-49.
- 9 Sun J, Sun L, Zhang N, et al. A20 is up-regulated in primary mouse hepatocytes subjected to hypoxia and reperfusion[J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30(8): 683-686.
- 10 Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, et al. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis [J]. Hepatology, 2002, 35(3): 535-543.
- 11 Longo CR, Patel VI, Shrikhande GV, et al. A20 protects mice from lethal radical hepatectomy by promoting hepatocyte proliferation via a P21waf1-dependent mechanism [J]. Hepatology, 2005, 42(1): 156-164.
- 12 Xu MQ, Wang W, Xue L, et al. NF-Kappab activation and zinc finger protein A20 expression in mature dendritic cells derived from liver allografts undergoing acute rejection [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1296-1301.
- 13 Xu MQ, Yan LN, Gou XH, et al. Zinc finger protein A20 promotes regeneration of small-for-size liver allograft and suppresses rejection and results in a longer survival in recipient rats[J]. J Surg Res, 2009, 152(1): 35-45.
- 14 Yang J, Xu MQ, Yan LN, et al. Zinc finger protein A20

- protects rats against chronic liver allograft dysfunction [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(27): 3537-3550.
- 15 Fan J, Chen Q, Wei L, et al. Asiatic acid ameliorates CCL₄-induced liver fibrosis in rats: involvement of Nrf2/ARE, NF- κ B/I κ B α , and JAK1/STAT3 signaling pathways[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 3595-3605.
- 16 Wang R, Wang J, Song F, et al. Tanshinol ameliorates CCL₄-

induced liver fibrosis in rats through the regulation of Nrf2/HO-1 and NF- κ B/I κ B α signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 1281-1292.

(收稿日期:2020-07-13)

(本文编辑:林磊)

(上接第 302 页)

- 7 McElroy SJ, Castle SL, Bernard JK, et al. The ErbB4 ligand neuregulin-4 protects against experimental necrotizing enterocolitis[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(10): 2768-2778.
- 8 Bernard JK, McCann SP, Bhardwaj V, et al. Neuregulin-4 is a survival factor for colon epithelial cells both in culture and in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(47): 39850-39858.
- 9 中华医学会病理学分会消化病理学组筹备组, 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 中国炎症性肠病组织病理诊断共识意见[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(4): 268-274.
- 10 Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD[J]. *Gastrointest Endosc*, 2004, 60(4): 505-512.
- 11 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018 年, 北京)[J]. *中华消化杂志*, 2018, 38(5): 292-311.
- 12 Zheng S, Chen Y, Zheng S, et al. Inhibition of Mastermind-like 1 alleviates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(14): 1099-1108.
- 13 黄超群, 王德欣. 结肠型与非结肠型克罗恩病的预后及预后不良相关危险因素分析[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2018, 27(5): 518-522.
- 14 杨荣萍, 高翔, 何瑶, 等. 克罗恩病预后不良预测因素的研究 [J]. *胃肠病学*, 2012, 17(3): 151-155.
- 15 陈金敏, 周经委, 邓飞鸿, 等. 非侵入性分子标志物评估临床缓解期炎症性肠病内镜活动度价值研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2016, 36(11): 971-974.
- 16 Pfeifer A. NRG4: an endocrine link between brown adipose

tissue and liver[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(1): 13-14.

- 17 Ebi M, Kataoka H, Shimura T, et al. The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma[J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(6): 1151-1155.
- 18 Feng Y, Teitelbaum DH. Epidermal growth factor/TNF- α transactivation modulates epithelial cell proliferation and apoptosis in a mouse model of parenteral nutrition[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(2): G236-G249.
- 19 Ma Y, Gao M, Liu D. Preventing high fat diet-induced obesity and improving insulin sensitivity through neuregulin 4 gene transfer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26242.
- 20 Af Björkesten CG, Jussila A, Kemppainen H, et al. Relationship of faecal calprotectin and long-term outcomes in Finnish patients with Crohn's disease: retrospective multi-centre chart review study[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2019, 54(10): 1226-1232.
- 21 Jørgensen AR, Thomsen SF, Karmisholt KE, et al. Clinical, microbiological, immunological and imaging characteristics of tunnels and fistulas in hidradenitis suppurativa and Crohn's disease[J]. *Exp Dermatol*, 2020, 29(2): 118-123.
- 22 Fennern E, Williamson J, Plietz M, et al. Surgical techniques and differences in postoperative outcomes for patients with Crohn's disease with ileosigmoid fistulas: A single-institution experience, 2010-2016[J]. *Dis Colon Rectum*, 2019, 62(10): 1222-1230.

(收稿日期:2020-05-11)

(本文编辑:周骏)