

骨形态发生蛋白7在慢性HBV感染者肝组织中的表达

丁芹^{1,2}, 马会慧¹, 崇雨田¹, 杨绍基¹

(1. 中山大学附属第三医院感染科, 广东 广州 510630; 2. 徐州医学院附属医院感染科, 江苏 徐州 221002)

摘要: 【目的】通过对不同慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者肝组织中骨形态发生蛋白7(BMP-7)表达的分析, 初步探讨BMP-7在肝脏炎症和肝细胞再生过程中可能发挥的作用。【方法】对56例慢性HBV感染者及5例正常对照肝组织进行常规组织学观察, 按病理诊断分组。其中病毒性肝炎乙型慢性轻度12例, 中度12例, 重度6例, 重型8例, 乙肝肝硬化10例, 肝癌8例。进行BMP-7的免疫组织化学染色, 观察光镜下分布特点, 取部分标本进行图像分析。取8例肝癌患者癌结节及3例癌旁组织进行实时荧光定量RT-PCR, 检测BMP-7 mRNA的表达。【结果】BMP-7阳性单位在正常人肝脏(7.27 ± 2.88)、病毒性肝炎(乙型)慢性轻度(8.50 ± 3.22)、中度(10.96 ± 2.88)、重度(13.11 ± 1.26)有逐渐增加趋势, 重型肝炎(7.50 ± 1.21)、肝硬化(8.24 ± 1.79)较中度、重度低; 进一步比较BMP-7阳性区灰度有相似结果(P值均小于0.01)。BMP-7在肝脏既有胞浆型表达, 也有胞膜型表达。在慢性中度、重度患者及肝硬化结节内为弥漫性表达; 但在重型肝炎患者, 仅呈灶状表达; 在癌周组织有弥漫或灶状表达, 在癌结节表达极少。【结论】在慢性乙型肝炎患者肝组织中BMP-7表达增多, 但是在重型肝炎肝组织及肝癌结节中表达减少, 值得进一步研究。

关键词: 骨形态发生蛋白7; 肝炎; 肝硬化; 肝癌

中图分类号: R512.6*2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)03-0279-05

Expression of BMP-7 in Liver Tissue of Patients with Chronic HBV Infection

DING Qin^{1,2}, MA Hui-hui¹, CHONG Yu-tian¹, YANG Shao-ji¹(1. Department of Infectious Disease, Third Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the possible effects of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) on liver inflammation and hepatocyte regeneration by analysis of its expression in the liver of patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. 【Methods】Liver tissues of 56 patients were overviewed in histology among which there were 12 mild chronic hepatitis B, 12 moderate hepatitis B, 6 severe chronic hepatitis B, 10 hepatic cirrhosis, 8 chronic hepatic failure and 8 hepatic carcinoma according to their pathologic diagnosis. Liver tissues of 5 normal liver donors were enrolled in this study as normal control. The feature of BMP-7 expression was studied by histochemical stain and quantitated BMP-7 expression of some specimen by image analysis. BMP-7 mRNA expression in 8 liver cancer tissues and 3 peri-neoplasma tissues were quantitated by real-time RT-PCR. 【Results】BMP-7 expression positive units (PU) in normal control (7.27 ± 2.88), mild chronic hepatitis B (8.50 ± 3.22), moderate hepatitis B (10.96 ± 2.88) and severe chronic hepatitis B (13.11 ± 1.26) was noticed to increase gradually. The PU in hepatic cirrhosis (8.24 ± 1.79) or chronic hepatic failure (7.50 ± 1.21) was lower than in moderate or severe chronic hepatitis B. Similar consequences were seen after further comparison of the gray scale of BMP-7 positive domain. Investigation of the expression pattern showed that BMP-7 expressed both in the cytoplasm and cell membrane. The pattern in moderate and severe hepatitis or nodus of hepatic cirrhosis was diffused, while in chronic hepatic-failure, there were only some limited expression. Surprisingly, little positive expression could be found in

收稿日期: 2007-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571665)

作者简介: 丁芹(1971-), 女, 广东梅州人, 博士生, 主治医师; 马会慧, 博士, 副研究员, 通讯作者, 主要从事肝纤维化研究, E-mail: huihui2006@yahoo.com

carcinoma nodus, but was dramatically in peri-neoplasma tissues. 【Conclusion】 BMP-7 expression in the liver of chronic hepatitis B patients increased, but decreased in chronic hepatic failure or liver cancer. It deserves further investigation.

Key words: bone morphogenetic protein 7; hepatitis B; liver cirrhosis; hepatoma

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):279-283]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可导致慢性肝炎、肝硬化、肝功能衰竭及肝癌。除对症治疗外,抗病毒治疗已被越来越多的医生及患者接受。然而,无论干扰素还是核苷类似物,疗效都不令人满意,且存在不良反应,并有可能在停药后复发甚至发生肝功能衰竭^[1,2]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs) TGF- β 超家族成员中最大的一族,具有广泛生物学作用,如影响多种细胞的增殖、分化和凋亡,参与组织的再生和修复。BMP-7 又称骨蛋白-1 (osteogenic protein-1, OP-1),主要在骨、肾组织中表达。研究表明 BMP-7 具有显著的抗炎及抗纤维化作用,其作用可能与 BMP-7 能够拮抗 TGF- β 1/Smads 信号通路有关^[3-9]。有研究显示肝脏发育所必需的同源基因 Hex 活性必需 BMP 信号的自分泌和旁分泌^[10,11], BMP-7 在肝脏器官发生发展中是一种关键的蛋白质,有利于肝细胞的健康^[12]。本研究旨在通过对不同慢性 HBV 感染者肝组织中 BMP-7 表达量及表达模式的研究,发现 BMP-7 在在肝脏炎症损伤、肝细胞再生、肝癌细胞异常增生中的表达规律,为进一步研究其作用机制及探讨其用于慢性肝病治疗的前景打下基础。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

56 例慢性乙型肝炎病毒感染者,男 49 例,女 7 例,标本均来源于中山大学附属第三医院 2002 至 2006 年门诊及住院病人,按病理诊断分组,诊断符合 2000 年全国病毒性肝炎会议病毒性肝炎防治方案^[1]。其中病毒性肝炎乙型慢性轻度 12 例;中度 12 例;重度 6 例;重型 8 例;乙肝肝硬化 10 例;肝癌 8 例。组织标本为肝穿刺活检或肝移植手术离体后即刻取得。正常对照 5 例,来源于中山大学附属第三医院病理科保存的肝移植供肝组织。所有组织经 4%多聚甲醛固定后,常规脱水,石蜡包埋,切 5 μ m 切片,58 $^{\circ}$ C 烤片两小时备用。取 8 例肝癌患者的癌组织及 3 例癌旁组织, TRI-

reagent 处理后-70 $^{\circ}$ C 冻存储备用。

1.2 试剂及操作

1.2.1 试剂与仪器 BMP-7 单克隆抗体、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、PBS 缓冲液、枸橼酸盐缓冲液(博士德生物工程有限公司); TRI-reagent (Invitrogen 生物技术有限公司); 一步法 SYBR RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 生物工程公司)。仪器设备为德国 ZEISS(蔡司) Axiotron 研究型显微镜、日本 JVC ky-F30B 3-CCD 彩色图像摄录输入仪、德国 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统、ABI PRISM 7000 实时荧光定量 PCR 仪。

1.2.2 免疫组化步骤 基本按试剂盒说明书进行。一抗 BMP-7 抗体用 PBS 1:100 稀释后使用。阴性对照以 PBS 代替 BMP-7 抗体。二抗 1:4 稀释后使用。

1.2.3 图像分析 取正常对照 5 例,轻度 8 例,中度 8 例,重度 5 例,重型 7 例,肝硬化 7 例,肝癌 3 例,进行全自动图像分析。每个病例分析 3-4 个视野取平均值。观察倍数 10 \times 20,图像面积使用单位 μ m²。令灰度设定 0 级为白,最大灰度级(G_{max}) 256 为黑;测试区总面积为 m+n,灰度为 G_A ;阳性区面积为 n,灰度为 G;阳性反应产物在测试区的面积密度 $A_A = n/(m+n)$ 。阳性单位(positive unit, PU)按公式: $PU = 100 \times |G - G_A| / [(1 - A_A) \times G_{max}]$ 计算得到^[13]。

1.2.4 RNA 提取及实时 RT-PCR 取 8 例癌组织,3 例癌旁组织进行 RNA 提取,按 TRI-reagent 说明书进行。实时荧光定量 RT-PCR 按试剂盒说明书进行。用质粒按 10ⁿ 倍比稀释后作为样本绘制标准曲线。BMP-7 上游引物 5'-GGGAACGCTTC GACAATGA-3',下游引物 5'-GCTGGTGGCTG TGATGTCAA-3',扩增范围第 667-818 碱基,目的片段长度 152 碱基。-actin 上游引物 5'-CAT TGCCGACAGGATGCA-3',下游引物 5'-GCTGAT CCACATCTGCTGGAA-3',扩增范围第 997-1147 碱基,目的片段长度 151 碱基。根据标准曲线分别得到 BMP-7 及 -actin 浓度,比较各样本 BMP-7/

- actin 的比值。

1.2.5 统计方法 使用 SPSS 12.0 统计软件, 两组均数的比较采用独立样本 t 检验。多组均数间的比较采用单因素方差分析, 根据方差齐性选用最小显著差值法 (least-significant difference, LSD 法) 或 Tamhane 法进行各组均数间的多重比较。

2 结 果

2.1 BMP-7 在不同慢性 HBV 感染者定量图像分析

BMP-7 表达阳性单位是 BMP-7 在每个标本

表达量的指标。图像分析结果显示: BMP-7 阳性单位在正常人肝脏、病毒性肝炎(乙型)慢性轻度、中度、重度有逐渐增加趋势, 但正常肝脏与轻度、肝硬化、肝癌患者无显著差别。重型肝炎患者较轻度、中度、重度低, 但与轻度的差别无显著性。肝硬化患者较中度、重度低。BMP-7 表达阳性区灰度是阳性区域灰度的平均值, 反应单位面积阳性细胞阳性反应产物的表达量。分析结果显示: BMP-7 阳性区灰度在正常人肝脏、病毒性肝炎(乙型)慢性轻度、中度、重度有逐渐增加趋势, 但其差别无显著性, 重型肝炎患者明显低于他各组肝炎及肝硬化患者(表 1)。

表 1 BMP-7 在慢性 HBV 感染者肝脏的表达

Table 1 BMP-7 expression in the liver of the patients with chronic HBV infection

| Number | Groups | n | BMP-7 expression (PU) | Gray scale |
|--------|----------------------------|---|------------------------|-------------------------|
| 1 | Normal control | 5 | 7.3±2.9 | 96.4±1.9 |
| 2 | Mild chronic hepatitis B | 8 | 8.5±3.2 | 103.1±18.6 |
| 3 | Moderate hepatitis B | 8 | 11.0±2.9 ¹⁾ | 108.9±14.3 |
| 4 | Severe chronic hepatitis B | 5 | 13.1±1.3 ²⁾ | 113.3±14.4 |
| 5 | Hepatic cirrhosis | 7 | 8.2±1.8 | 109.1±8.3 |
| 6 | Chronic hepatic failure | 7 | 7.5±1.2 | 82.0±15.1 ³⁾ |
| 7 | Hepatic carcinoma | 3 | 9.2±4.7 | 93.8±13.0 |
| F | | | 3.709 | 3.991 |
| P | | | 0.006 | 0.004 |

1) compared with group 1, group 5, and group 6, P 0.05; 2) compared with group 1, group 5, and group 6, P 0.01; 3) compared with group 2 and 5, P 0.01

2.2 BMP-7 mRNA 在肝癌组织及癌旁组织表达的实时荧光定量 RT-PCR 分析

BMP-7/ - actin 在肝癌组织(0.25 ±0.21, n=8)的表达低于癌旁组织(1.1 ±0.5, n=3, t=- 4.182, P=0.002)。

2.3 BMP-7 在不同慢性 HBV 感染者表达模式的差别

BMP-7 在正常对照肝组织与慢性肝炎、肝硬化及癌旁肝组织中均有表达, 既有胞浆型表达, 也有胞膜型表达, 未见胞核型表达。在正常对照者, BMP-7 的表达较弥漫, 可见汇管区相对较弱。在病毒性肝炎(乙型)慢性轻度、中度、重度、肝硬化结节内多为弥漫性表达, 部分轻度患者可见汇管区强、中央静脉区弱。在重型肝炎患者, BMP-7 仅呈灶状表达, 可见到大量形态正常但不表达 BMP-7 的肝细胞。在肝癌患者, BMP-7 在癌周组织有弥漫

或灶状表达, 在癌结节中极少表达(图 2)。

3 讨 论

本研究结果显示 BMP-7 在正常对照及各型慢性 HBV 感染者肝组织中均有表达, 且在正常人、病毒性肝炎(乙型)慢性轻度、中度、重度有逐渐增加趋势, 在肝硬化结节中也有弥漫性表达, 但是在重型肝炎患者 BMP-7 表达阳性单位及阳性区灰度均低于其他各组肝炎及肝硬化患者, 并可见到大量形态正常而不表达 BMP-7 的肝细胞。在癌周组织 BMP-7 有弥漫或灶状表达, 但是在癌结节中表达极少。在表达模式上, BMP-7 在肝组织中既有胞浆型表达, 也有胞膜型表达, 未见胞核表达。在正常对照组中央静脉区表达较强, 在部分慢性轻度患者 BMP-7 的表达在汇管区更强。

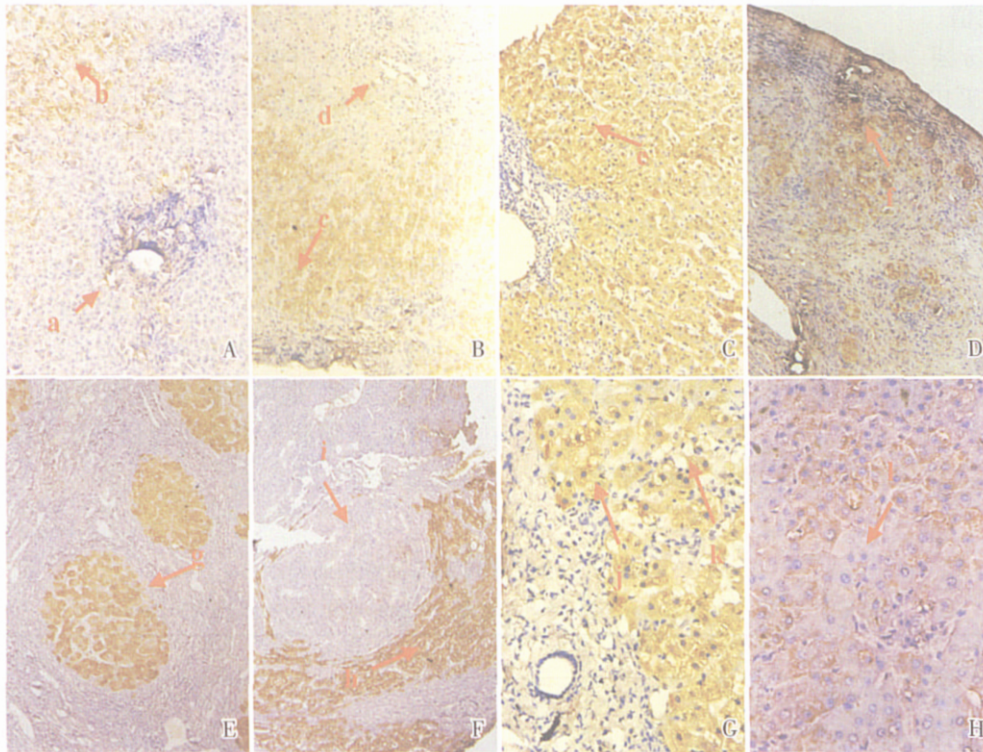


图 1 BMP-7 在慢性 HBV 感染者肝脏中的表达模式图

Fig. 1 BMP-7 expression pattern in the liver of the patients with chronic HBV infection

A: normal control; B: mild chronic hepatitis B; C, G: moderate hepatitis B; D, H: chronic hepatic failure. E: hepatic cirrhosis; F: hepatic carcinoma. A-D (200 \times); E-F(100 \times); G-H (400 \times). a, c: near the biliary ductuli; b, d: near the central veins; e: diffused expression; f: limited expression; g: the nodus of hepatic cirrhosis; h: peri-neoplasma tissues; i: neoplasma; j: positive in the cytoplasm; k: positive in cell membrane; l: negative in some eumorphism hepatocytes.

已有多项研究发现 BMP-7 有显著的抗炎症、抗纤维化作用,如:促进损伤角膜的表面重建^[3];减轻炎症性肠病大鼠结肠组织损伤严重程度并加速愈合^[4];抑制肾小管上皮细胞凋亡,改善小管间质性炎症、抑制纤维化、改善肾功能、组织学和生存率^[5,6];通过诱导 ID1 和 ID2 而抗动脉粥样硬化形成^[7];通过 Smad 依赖途径逆转 TGF- β 诱导的乳房导管上皮细胞向间充质细胞转变 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)^[8];通过诱导 ID2 和 ID3 拮抗小鼠肺肌成纤维细胞株(PM) TGF- β 1 依赖的纤维生成活性^[9]。

肝细胞损伤后再生过程的启动受到细胞因子如 IL-6 和 TNF- α 的调节。在此过程 TGF- β 1 可诱导肝细胞的凋亡,并控制生长,和 activins 相互作用,中止肝细胞再生^[14]。本研究显示在正常人肝脏、病毒性肝炎(乙型)慢性轻度、中度、重度 BMP-7 有逐渐增加趋势,在肝硬化结节中也有弥漫性表达,提示在肝脏炎症损伤后 BMP-7 表达增加可能通过拮抗 TGF- β 1/Smads 信号通路而有利于肝细胞

再生与功能恢复。

重型肝炎的发生机制不清,可能与免疫紊乱有关。Nozato E 等^[15]的研究显示在急性肝衰竭模型 IL-6、TGF- β 1 及 HGF 增加,肝细胞再生显著受损;在暴发性肝衰竭强制性给予 TGF- β 1 可使 HGF 产生增加,并抑制肝脏的再生。本研究显示在重型肝炎患者 BMP-7 表达阳性单位及阳性区灰度均低于其他各组肝炎及肝硬化患者,并可见到大量形态正常而不表达 BMP-7 的肝细胞。上述结果提示 BMP-7 表达的减少,不能拮抗 TGF- β 1 对肝细胞再生的抑制作用,可能是重型肝炎患者肝细胞再生不良的原因之一。

TGF- β 1 可抑制多种上皮细胞和免疫细胞的增殖,诱导 EMT,而肝癌的发生与肝细胞可塑性改变和 EMT 有关。BMP-7 在癌结节中表达极少,提示 BMP-7/TGF- β 1 信号通路的失衡可能是肝癌细胞增殖失控及功能失活的原因之一。

BMP-7 在胞浆、胞膜均有表达与其是可溶性、局部分泌性蛋白有关。在正常对照组中央静脉区

表达较强可能与该区域细胞血供相对较好, 细胞再生能力强、活性好有关。在部分慢性轻度肝炎患者 BMP-7 的表达在汇管区更强, 可能与炎症反应相对集中于该区有关。中、重度肝炎患者及肝硬化者肝细胞坏死与增生范围相对广泛, 故而 BMP-7 表达多且弥漫。

本研究发现在慢性乙型肝炎患者肝组织中 BMP-7 表达增多, 但是在重型肝炎肝组织及肝癌结节中表达减少, 提示 BMP-7 可能与肝细胞炎症损伤后的再生与修复有关, 还可能在肝细胞癌的发生过程中有一定的意义。BMP-7 是否象在其他脏器中一样也有显著的抗肝纤维化作用还值得进一步研究。BMP-7 在肝脏疾病的治疗中可能有广阔前景。

参考文献:

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56- 62.
- [2] 张晓红, 马会慧, 崇雨田, 等. 慢性乙肝患者停用拉米夫定后出现肝功能衰竭的危险因素[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(3): 329- 332.
- [3] SAIKA S, IKEDA K, YAMANAKA O, et al. Therapeutic effects of adenoviral gene transfer of bone morphogenetic protein-7 on a corneal alkali injury model in mice[J]. Lab Invest, 2005, 85(4): 474- 486.
- [4] MARIC I, POLJAK L, ZORICIC S, et al. Bone morphogenetic protein-7 reduces the severity of colon tissue damage and accelerates the healing of inflammatory bowel disease in rats [J]. J Cell Physiol, 2003, 196(2): 258- 264.
- [5] HRUSKA K A, GUO G, WOZNIAC M, et al. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 279(1): F130- 143.
- [6] ZEISBERG M, BOTTIGLIO C, KUMAR N, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(6): F1060- 1067.
- [7] DORAI H, SMAMPATH T K. Bone morphogenetic protein-7 modulates genes that maintain the vascular smooth muscle cell phenotype in culture [J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83- A Suppl 1(Pt 1): S70- 78.
- [8] ZEISBERG M, HANAI J, SUGIMOTO H, et al. BMP-7 counteracts TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury [J]. Nat Med, 2003, 9(7): 964- 968.
- [9] IZUMI N, MIZUGUCHI S, INAGAKI Y, et al. BMP-7 opposes TGF- β 1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290: L120- 126.
- [10] ZHANG W, YATSKIEVYCH T A, CAO X, et al. Regulation of Hex gene expression by a Smads-dependent signaling pathway [J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45435- 45441.
- [11] ZHANG W, YATSKIEVYCH T A, BAKER R K, et al. Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling [J]. Dev Biol, 2004, 268(2): 312- 326.
- [12] SUGIMOTO H, YANG C, LEBLEU V S, et al. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration [J]. FASEB J, 2007, 21(1): 256- 264.
- [13] 申 洪. 免疫组织化学染色定量方法研究() [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1): 89- 92.
- [14] ZIMMERMANN A. Regulation of liver regeneration [J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19: iv6- 10.
- [15] NOZATO E, SHIRAIISHI M, NISHIMAKI T. Up-regulation of hepatocyte growth factor caused by an over-expression of transforming growth factor β , in the rat model of fulminant hepatic failure [J]. J Surg Res, 2003, 115: 226- 234.

(编辑 孙慧兰)