

雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响

许君望, 龚均, 冯新利, 苾新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平

许君望, 冯新利, 苾新明, 贾皓, 徐贵平, 西安交通大学第一医院消化内科 陕西省西安市 710061
龚均, 罗金燕, 董蕾, 西安交通大学第二医院消化内科 陕西省西安市 710031
许君望, 男, 1964-04-20 生, 陕西省兴平市人, 1986 年毕业于西安医科大学, 博士研究生, 副教授, 主要从事慢性肝病的基础与临床研究。
西安交通大学博士学位论文基金资助项目, No.2001-13
项目负责人: 许君望, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学第一医院消化内科。 xujw@pub.xaonline.com
电话: 029-5323507 传真: 029-5263190
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-26

Effects of estradiol on type I, III collagens and TGF β_1 in hepatic fibrosis in rats

Jun-Wang Xu, Jun Gong, Xin-Li Feng, Xin-Ming Chang, Jin-Yan Luo, Lei Dong, Ai Jia, Gui-Ping Xu

Jun-Wang Xu, Xin-Li Feng, Xin-Ming Chang, Ai Jia, Gui-Ping Xu, Department of Gastroenterology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Jun Gong, Jin-Yan Luo, Lei Dong, Department of Gastroenterology, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710031, Shaanxi Province, China
Supported by the Doctorate Foundation of Xi'an Jiaotong University, No.2001-13.
Correspondence to: Dr. Jun-Wang Xu, Department of Gastroenterology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. xujw@pub.xaonline.com
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-03-26

Abstract

AIM: To study the effects of estradiol on the production of collagen I, III and transforming growth factor β_1 (TGF β_1) in experimental fibrosis in rats induced by carbon tetrachloride (CCL₄), and to investigate the suppressive effects of estrogen on liver fibrosis.

METHODS: Rats were randomly allocated into a normal control group, a model control group, a therapy control group and an estradiol group. Liver fibrosis was induced by CCL₄ administration. The estradiol group, apart from the administration of CCL₄, was treated subcutaneously with estradiol (benzoic estradiol) 1 mg/kg twice weekly. At the end of week 8, all the rats were sacrificed. Liver inflammation and collagen deposition were observed with HE and Masson's collagen stains, analyzed with scoring and staging systems. Type I, III collagens and TGF β_1 were observed with immunohistochemical method.

RESULTS: CCL₄ group had the typical liver fibrosis compared with normal control group. The fibrous septa were formed in CCL₄ group rats, and collagens were accumulated and deposited in the sinusoids and liver lobules. The expression of type I, III collagens (0.58±0.26 vs 6.34±2.24, 1.07±0.49 vs 5.28±1.28, $P < 0.001$) and TGF β_1 was significantly increased. Estradiol significantly attenuated collagen ac-

cumulation ($P < 0.05$) in the fibrotic livers, and decreased type I, III collagens (2.47±0.76 vs 6.34±2.24, 3.02±1.20 vs 5.28±1.28, $P < 0.05$) and TGF β_1 expression in the liver.

CONCLUSION: Estradiol treatment reduces the synthesis of hepatic type I, III collagens and TGF β_1 in the fibrotic liver induced by CCL₄ administration, and attenuates hepatic fibrosis.

Xu JW, Gong J, Feng XL, Chang XM, Luo JY, Dong L, Jia A, Xu GP. Effects of estradiol on type I, III collagens and TGF β_1 in hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1185-1188

摘要

目的: 观察雌二醇对肝纤维化大鼠肝脏胶原沉积和转化生长因子 β_1 (TGF β_1) 表达的影响, 研究雌激素对肝纤维化形成的抑制作用, 并探讨其可能的机制。

方法: 设立模型组、治疗对照组、雌二醇组和正常对照组, 以四氯化碳复合因素诱导大鼠肝纤维化动物模型, 雌二醇组在四氯化碳应用的同时皮下注射苯甲酸雌二醇 1 mg/kg, 2 次/wk, 共 8 wk。大鼠肝脏 HE 染色与 Masson 染色, 分级观察肝组织的炎性坏死与胶原纤维沉积变化, 并观察对大鼠肝纤维化形成过程中肝脏表达 I, III 型胶原蛋白及对 TGF β_1 的影响。

结果: 与正常对照组比较, 四氯化碳模型大鼠出现典型的肝纤维化表现, 肝脏胶原纤维间隔广泛形成, 肝小叶与肝窦内胶原增生沉积明显, I, III 型胶原(0.58 ± 0.26 vs 6.34 ± 2.24, 1.07 ± 0.49 vs 5.28 ± 1.28, P 值均 < 0.001)及 TGF β_1 基因表达明显增多; 雌二醇应用可以明显减轻肝脏内胶原纤维增生沉积($P < 0.05$), 抑制肝脏 I、III 型胶原蛋白(2.47 ± 0.76 vs 6.34 ± 2.24, 3.02 ± 1.20 vs 5.28 ± 1.28, P 值均 < 0.05)及 TGF β_1 的合成表达。

结论: 雌二醇可抑制肝纤维化大鼠肝脏 I, III 型胶原蛋白及 TGF β_1 的合成表达, 发挥对肝纤维化的抑制作用。

许君望, 龚均, 冯新利, 苾新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平. 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(8): 1185-1188

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1185.asp>

0 引言

肝纤维化是许多肝脏疾病共同的病理过程, 是肝损伤过程中机体抗损伤修复的一种表现, 以肝脏胶原等细胞外基质的沉积为其主要特征。肝硬化在男性的发病比女性

更普遍,男性和女性的发病率之比为2.3:1-2.6:1^[1, 2]。虽然肝脏并非性激素作用的基本靶器官,但肝脏中存在有雌激素受体,能对雌激素产生反应,从而调节肝脏的功能^[3]。因此,性激素在肝纤维化至肝硬化的发展中可能发挥一定的作用。在肝纤维化的动物模型和人类肝脏疾病的研究发现, TGF β_1 在肝纤维化的过程中具有重要作用^[4, 5]。有研究发现,抗雌激素药物他莫昔芬可使女性患者肺纤维化的危险性明显升高,而他莫昔芬的致肺纤维化是由 TGF β_1 介导的^[6]。因此设想,肝纤维化时雌激素可能在调节 TGF β_1 等一些细胞因子的表达中发挥了作用。本实验通过四氯化碳复合因素诱导大鼠肝纤维化动物模型,结合 I, III 型胶原蛋白及 TGF β_1 的免疫组化,探讨雌二醇的抗肝脏纤维化作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley 大鼠 40 只,清洁级,质量 220 ± 21 g, 10 周龄左右,由陕西省实验动物中心提供。苯甲酸雌二醇由上海第九制药厂生产,批号 00080103;秋水仙碱片为云南昆明植物药厂出品;四氯化碳和胆固醇分析纯由西安化学试剂厂生产;市售猪油、玉米粉;精制花生油(山东鲁华集团出品);I, III 型胶原抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,工作浓度 1:50; TGF β_1 的免疫组化试剂盒购自 Dako 公司,工作浓度 1:1 000; ST 试剂盒购自福建迈新生物技术开发公司。

1.2 方法 试验动物饲养于控温控湿 12 h 光照的环境中,不限饮食。每 10 只 1 组,随机分为 4 组。CCL₄ 组皮下注射 400 mL/L CCL₄ 花生油溶液,剂量为 2 mL/kg, 2 次/wk,首剂加倍。雌二醇(E)组,注射 CCL₄ 的同时皮下注射苯甲酸雌二醇 1 mg/kg, 2 次/wk。秋水仙碱(Col)组注射 CCL₄ 的同时,每日 0.11 mg/kg 秋水仙碱灌胃。以上 3 组动物均给予含 5 g/kg 胆固醇和 200 g/kg 猪油的高脂饮食。对照组给予普通饮食并皮下注射等容量花生油溶剂, 2 次/wk。8 wk 后,全部实验动物禁食 1 晚,经肌肉注射苯巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后行颈椎错位处死,迅速取出肝脏,被切除的大鼠肝脏取右叶,经 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋和 HE、Masson 染色,由半定量的方法^[7]对肝纤维化程度进行评估。胶原增生程度半定量标准:0 分,正常肝脏或无明显胶原纤维增生;1 分,胶原纤维增生,中央静脉和汇管区有少量纤维索放散延伸,但无间隔形成;2 分,胶原纤维明显增生,中央静脉和汇管区结缔组织变厚,由此向四周延出纤维索,形成不完全间隔;3 分,胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成(假小叶),或较厚的不完全间隔,即将形成假小叶;4 分,完全间隔较厚,假小叶大量形成。I, III 型胶原及 TGF β_1 免疫组化采用 PAP 法 DAB 显色。I、III 型胶原表达程度,应用 CMIAS 彩色医学图像分析仪,对各组切片随机选取 10 个视野测量阳性染色面积占肝脏视野面积比进行定量分析,以他们的染色面积在标本中所占百分比表示^[8]。

统计学处理 将数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 进行非配对的秩和检验、t 检验或 F 检验。数据输入计算机采用 SPSS10.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 雌二醇对大鼠实验性肝纤维化的影响 HE 染色显示对照组的肝脏具有正常的肝小叶结构; CCL₄ 组表现出严重的损伤性病理改变,肝小叶失去正常结构,肝板排列紊乱,肝细胞普遍变性,大多数为脂肪变性,少数水样变,炎症及坏死明显,汇管区纤维组织增生,并可见厚薄不一的纤维分隔包绕肝小叶,部分有肝细胞再生及假小叶形成;雌二醇组肝脏损伤性病理改变明显减轻,纤维有部分分割肝小叶,但未见完整的假小叶形成,肝组织有部分再生。Masson 胶原染色(表 1),肝脏胶原纤维增生程度半定量测量,表明雌二醇可明显抑制大鼠实验性肝纤维化的形成。

表 1 雌二醇对大鼠实验性肝纤维化的作用

分组	n	肝纤维化分级(级)				
		-	+	++	+++	++++
Control	10	10	0	0	0	0
CCL ₄	9	0	2	2	3	1
CCL ₄ +E ^a	8	0	4	2	1	0
CCL ₄ +Col ^a	9	0	3	4	2	0

^aP < 0.05, vs CCL₄ 组。

2.2 I, III 型胶原免疫组化染色分析 用免疫组织化学 PAP 法对肝脏组织切片 I, III 型胶原进行观察,正常对照组肝脏 I 型胶原蛋白主要存在于中央静脉、门脉区三联管管周及管间纤维组织, III 型胶原除上述区域外还存在于肝窦四周。CCL₄ 组中 I, III 型胶原阳性细胞染色均明显增多,其分部除汇管区、中央静脉及肝窦四周增多外,在纤维隔内呈弥漫分布。雌二醇组及秋水仙碱组 I 型胶原蛋白主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带,而 III 型胶原蛋白以门脉区及肝细胞坏死区较多。各组 I, III 型胶原蛋白面密度(胶原面积/肝组织视野面积×100%)测量值见表 2。

表 2 雌二醇对大鼠肝纤维化肝脏 I, III 型胶原蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	I 型胶原	III 型胶原
Control	10	0.58 ± 0.26	1.07 ± 0.49
CCL ₄	9	6.34 ± 2.24	5.28 ± 1.28
CCL ₄ +E ^a	8	2.47 ± 0.76	3.02 ± 1.20
CCL ₄ +Col ^a	9	2.63 ± 0.91	3.31 ± 1.43

^aP < 0.05, vs CCL₄ 组。

2.3 TGF β_1 的免疫组化染色分析 CCL₄ 组的 TGF β_1 阳

性细胞主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带及肝纤维间隔中, 主要见于肝星状细胞、类间质细胞和炎症细胞质及其周围. 而雌二醇及秋水仙碱组中阳性染色程度较 CCL₄ 组明显为轻 (图 1、2).

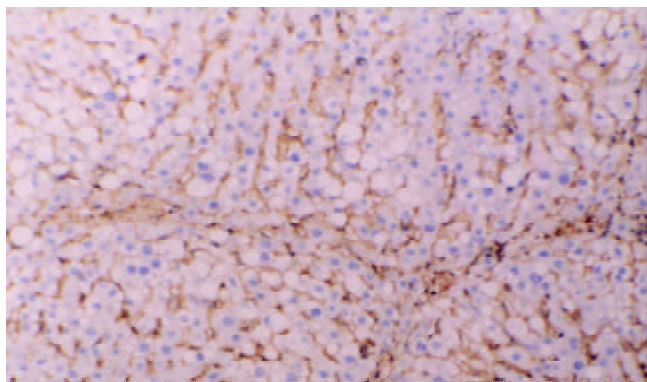


图 1 CCL₄ 组 TGF β_1 的免疫组化染色 PAP 法 $\times 100$

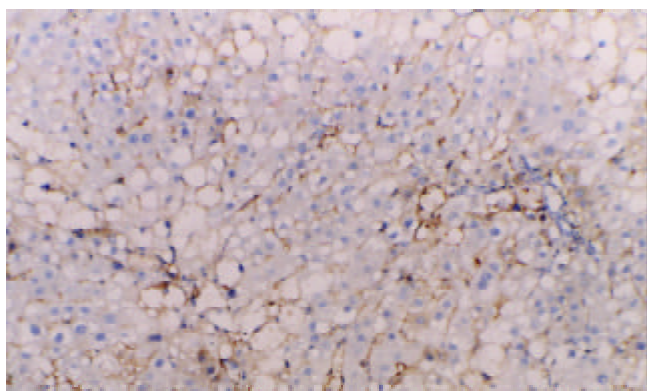


图 2 雌二醇组 TGF β_1 的免疫组化染色 PAP 法 $\times 100$

3 讨论

肝纤维化通常始于肝细胞的破坏, 继而炎症细胞和血小板聚集, 刺激枯否细胞释放细胞因子和生长因子(如 TGF β_1 等), 这些因子通过活化肝星状细胞, 肝星状细胞活化后增生并转化为成纤维母细胞样的细胞, 合成并大量沉积细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 从而将炎症和肝硬化的形成过程联系起来^[9-13]. ECM 包括胶原、非胶原糖蛋白及蛋白多糖, 其中胶原是最重要的 ECM. 肝脏胶原有 I, III, IV, V, VI 型等, 以 I, III 型为主, 约占肝脏胶原总量的 60% 以上^[14-17]. 我们以 CCL₄ 等复合因素诱导大鼠肝纤维化模型, 可见正常对照组肝脏仅有少量 I 型胶原存在于中央静脉、门脉区三联管管周及管间纤维组织, III 型胶原除上述区域外还少量存在于肝窦四周, 而 CCL₄ 组中 I, III 型胶原阳性细胞染色均明显增多, 其分布除汇管区、中央静脉及肝窦四周增多外, 在纤维隔内亦呈弥漫分布, 包绕肝小叶. 雌二醇组的肝纤维化程度明显低于 CCL₄ 组, 且 I, III 型胶原阳性细胞免疫组化染色也弱于 CCL₄ 组, I 型胶原蛋白主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带, 而 III 型胶原蛋白以门脉区及肝细胞坏死区为主. 表明雌二醇能抑制 I, III 型胶原的合成而发挥抗肝

纤维化作用.

肝损害时肝星状细胞被认为是 ECM 的主要来源, 而肝星状细胞的活化是肝细胞、内皮细胞、血小板、枯否细胞、炎症细胞、细胞因子和生长因子间相互作用的结果^[18-22]. 细胞因子在肝纤维化的每个阶段都发挥着重要作用^[23-26]. 在肝纤维化的动物模型和人类肝脏疾病的研究发现, TGF β_1 在肝纤维化的过程中具有重要作用^[27-31], 它是一种多功能生长因子, 能使单个肝星状细胞胶原合成增加 60-80%, 被认为是肝纤维化形成的关键因子. Bentzen et al^[6] 在研究放疗女性肺纤维化时发现, 给予他莫昔芬(tamoxifen, 一种抗雌激素的药物)可使患者肺纤维化的危险性明显升高, 而他莫昔芬的致肺纤维化是由 TGF β_1 介导的. 因此设想, 肝纤维化时雌激素可能在调节 TGF β_1 等一些细胞因子的表达中发挥了作用. 本实验显示, 雌二醇组肝纤维组织中 TGF β_1 的表达量明显弱于 CCL₄ 组, 表明雌二醇可能通过下调 TGF β_1 的表达, 从而间接地发挥对肝纤维化的抑制作用.

肝纤维化时肝星状细胞由静止状态转变为活化细胞, 增加 I, III 型胶原等 ECM 的表达, 激活的肝星状细胞还可通过自分泌途径扩大激活细胞群, TGF β_1 是肝星状细胞自分泌扩增的重要细胞因子, 既增加胶原的合成, 又进一步刺激 TGF β_1 的产生, 使更多静止的肝星状细胞被激活^[32-35]. 本研究雌二醇能抑制 TGF β_1 的产生, 阻断自分泌放大过程, 从而减少 I, III 型胶原等 ECM 的合成, 这一作用可能是肝纤维化及肝硬化的发病率存在性别差异的原因之一.

4 参考文献

- 1 Pinzani M, Romanelli RG, Magli S. Progression of fibrosis in chronic liver diseases: time to tally the score. *J Hepatol* 2001; 34:764-767
- 2 Yan JC, Ma JY, Pan BR, Ma LS. Study of hepatitis B in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:611-616
- 3 Shimizu I, Mizobuchi Y, Yasuda M, Shiba M, Ma YR, Horie T, Liu F, Ito S. Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells *in vivo* and *in vitro*. *Gut* 1999;44:127-136
- 4 Gabriel A, Kuddus RH, Rao AS, Gandhi CR. Down-regulation of endothelin receptor by transforming growth factor β_1 in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30:440-450
- 5 Bai XW, Yan XX, Feng LY. Recent progression of hepatic fibrosis research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1267-1268
- 6 Bentzen SM, Skoczylas JZ, Overgaard M, Overgaard J. Radiotherapy-related lung fibrosis enhanced by tamoxifen. *J Nat Cancer Inst* 1996;88:918-922
- 7 Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, Gallois Y, Cales P. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. *J Hepatol* 1998;28:439-446
- 8 Zhang YT, Chang XM, Li X, Li HL. Effects of spironolactone on expression of type I/III collagen proteins in rat hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1120-1124
- 9 Wu CH. Fibrodynamics-elucidation of the mechanisms and sites of liver fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:388-390
- 10 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 11 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8

- 12 Jiang SL, Yao XX, Shun YF. The treatment of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:684-686
- 13 Jian HQ, Zhang XL. The mechanisms of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:687-689
- 14 Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen-producing cells in carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- 15 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effect of Yigan Decoction on the expression of type I, III collagen proteins in experimental hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:263-267
- 16 George J, Rao KR, Stern R, Chandrakasan G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology* 2001;156:129-138
- 17 Bruck R, Shirin H, Aeed H, Matas Z, Hochman A, Pines M, Avni Y. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. *J Hepatol* 2001;35:457-464
- 18 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 19 Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- 20 Li X, Meng Y, Yang XS, Wu PS, Li SM, Lai WY. CYP11B2 expression in HSCs and its effect on hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2000;6:885-887
- 21 Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang YE, Ling YQ, Gu YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:647-651
- 22 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:115-119
- 23 Xie YM, Nie QH, Zhou YX, Cheng YQ, Kang WZ. Detection of TIMP-1 and TIMP-2 RNA expressions in cirrhotic liver tissue using digoxigenin labelled probe by in situ hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:251-254
- 24 Lu X, Liu CH, Xu GF, Chen WH, Liu P. Successive observation of laminin and collagen IV on hepatic sinusoid during the formation of the liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:260-262
- 25 Huang GC, Zhang JS. Intercellular signal transduction of activated hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1056-1060
- 26 Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Hao ZM, Jia A, Xu GP. Estrogen reduces CCL₄-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:883-887
- 27 Bauer M, Schuppan D. TGF β 1 in liver fibrosis: time to change paradigms. *FEBS Letters* 2001;502:1-3
- 28 Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:196-202
- 29 Wu GH, Huang YX, Fan GR, Zhang GX. Serum transformation growth factor β 1 in patients with hepatitis B. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:505-506
- 30 Liu F, Liu JX, Cao ZC, Li BS, Zhao CY, Kong L, Zhen Z. Relationship between TGF- β 1, serum indexes of liver fibrosis and hepatic tissue pathology in patients with chronic liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:519-521
- 31 Liu F, Liu JX. Role of transforming growth factor beta1 in hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:86-88
- 32 Gao ZL, Li DG, Lu HM, Gu XH. The effect of retinoic acid on Ito cell proliferation and content of DNA and RNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:443-444
- 33 Liu T, Hu JH, Cai Q, Ji YP. Signal conducting molecule in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:805-807
- 34 Li D, Zhang LJ, Chen ZX, Huang YH, Whang XZ. Effects of TNF β IL-6 and IL-10 on the development of experimental rat liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1242-1245
- 35 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514