

## 慢性乙型肝炎患者肝组织Notch-1受体表达与肝纤维化相关性

王 变, 沈美龙, 李 阳, 杨秀珍, 肖 丽

### 背景资料

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病特别是发展到肝硬化的早期阶段,但其发病机制未得到完全明确。

王变, 沈美龙, 李阳, 杨秀珍, 肖丽, 泰州市人民医院肝病科 江苏省泰州市 225300

作者贡献分布: 此课题由沈美龙、李阳及杨秀珍设计; 研究过程由李阳、杨秀珍、肖丽及王变操作完成; 数据分析由沈美龙与王变完成; 本论文写作由沈美龙、李阳及王变完成。

通讯作者: 沈美龙, 主任医师, 225300, 江苏省泰州市海陵南路399号, 泰州市人民医院肝病科.  
shenml9326@126.com  
电话: 0523-86606252

收稿日期: 2017-07-31  
修回日期: 2017-09-04  
接受日期: 2017-09-10  
在线出版日期: 2017-10-08

### Correlation of Notch1 receptor expression in liver tissue with degree of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B

Bian Wang, Mei-Long Shen, Yang Li, Xiu-Zhen Yang, Li Xiao

Bian Wang, Mei-Long Shen, Yang Li, Xiu-Zhen Yang, Li Xiao, Department of Hepatology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Mei-Long Shen, Chief Physician, Department of Hepatology, Taizhou People's Hospital, 399 Hailing South Road, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China. shenml9326@126.com

Received: 2017-07-31  
Revised: 2017-09-04  
Accepted: 2017-09-10  
Published online: 2017-10-08

### Abstract

#### AIM

To investigate the expression of Notch 1 receptor in liver tissues with the degree of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B (CHB).

#### METHODS

A total of 50 patients with CHB confirmed by liver biopsy were enrolled in the study. The degree of hepatic fibrosis was evaluated by Masson's trichromatic staining. The expression of Notch1 receptor in liver tissue was detected by immunohistochemistry. The association between Notch1 receptor expression and the degree of hepatic fibrosis was analyzed.

#### RESULTS

Masson's trichromatic staining showed that the percentage of liver collagen fiber area was  $3.46\% \pm 0.41\%$  in group S0,  $6.95\% \pm 0.96\%$  in group S1,  $9.88\% \pm 1.12\%$  in group S2,  $15.86 \pm 1.82$  in group S3, and  $23.13\% \pm 2.17\%$  in group S4; there was a significant difference among different groups ( $P < 0.05$ ). The positive score of Notch1 receptor expression was 0 in group S0,  $1.53 \pm 0.28$  in group S1,  $2.01 \pm 0.79$  in group S2,  $2.86 \pm 1.13$  in group S3,  $3.81 \pm 1.76$  in group S4; there was a significant difference among different groups ( $P < 0.05$ ). There was a positive correlation between liver collagen fiber area and the intensity of Notch1 receptor ( $r = 0.486$ ,  $P = 0.001$ ).

#### CONCLUSION

Notch1 receptor expression increases in liver tissue of chronic hepatitis B patients, and

### 同行评议者

顾生旺, 研究生, 主任医师, 解放军第八二医院感染内科; 梁跃东, 博士, 副教授, 主任医师, 贵阳市第五人民医院感染病学教研室; 杨晴, 辽宁省沈阳市第六人民医院感染科

abnormal expression of Notch1 receptor might be involved in the progression of hepatic fibrosis.

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Chronic hepatitis B; Notch-1 receptor; Hepatic fibrosis

Wang B, Shen ML, Li Y, Yang XZ, Xiao L. Correlation of Notch1 receptor expression in liver tissue with degree of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2017; 25(28): 2540-2543 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i28/2540.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v25.i28.2540>

## 摘要

### 目的

探讨慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者肝组织Notch-1受体表达与肝纤维化程度相关性研究。

### 方法

收集符合条件的CHB患者S0-S4期肝活检组织标本50例, 分为5组, 每组10例。分别Masson三色染色检测纤维化程度; 免疫组织化学Notch-1受体在纤维化肝组织中的定位, 计算其阳性积分; 并探讨其相关性。

### 结果

Masson三色胶原面积密度值分别为S0组( $3.46\% \pm 0.41\%$ )、S1组( $6.95\% \pm 0.96\%$ )、S2组( $9.88\% \pm 1.12\%$ )、S3组( $15.86\% \pm 1.82\%$ )、S4组( $23.13\% \pm 2.17\%$ )。Notch-1受体阳性积分分别为S0组(0分)、S1组( $1.53 \pm 0.28$ )、S2组( $2.01 \pm 0.79$ )、S3组( $2.86 \pm 1.13$ )、S4组( $3.81 \pm 1.76$ )。各组比较均有统计学差异( $P < 0.05$ )。Spearman等级相关检验分析表明, 二者具有显著相关性( $r = 0.486, P = 0.001$ )。

### 结论

CHB患者肝组织Notch-1受体的表达增强, 与胶原纤维密切相关; Notch-1受体表达异常可能参与肝纤维化病理的进展。

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 慢性乙型肝炎; Notch-1受体; 肝纤维化

核心提要: 慢性乙型肝炎患者肝组织Notch-1受体的表达增强, 与胶原纤维密切相关; Notch-1受体表达异常可能参与肝纤维化病理的进展。

王变, 沈美龙, 李阳, 杨秀珍, 肖丽. 慢性乙型肝炎患者肝组织Notch-1受体表达与肝纤维化相关性. 世界华人消化杂志 2017; 25(28): 2540-2543 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i28/2540.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v25.i28.2540>

## 研究前沿

Notch-1受体表达异常在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者中报道较少, 多见于动物模型。

## 0 引言

Notch-1受体作为Notch信号通路的一个重要组成部分, 是广泛存于细胞表面介导细胞间信号转导的一类高度保守受体蛋白。肝纤维化涉及多条信号转导通路, 其中Notch信号通路可能在肝纤维化发展过程中起重要的调控作用<sup>[1]</sup>, 从而导致纤维化形成和疾病进展。本文对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者肝组织Notch-1受体表达与肝纤维化相关性进行探讨, 现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选取2010-2015年泰州市人民医院CHB患者留取的肝脏标本50例, 入选病例诊断符合《慢性乙型肝炎防治方案》制定的CHB诊断标准<sup>[2]</sup>, 并满足: CHB病毒DNA阳性至少24 wk; 入选前半年内, 未用过抗病毒药物或免疫调节剂; 年龄18-65岁。所有入选病例均签署知情同意书。病例排除标准: 失代偿性肝硬化患者; 合并感染人类免疫缺陷病毒和/或丙型肝炎病毒者; 原发性肝癌患者; 合并自身免疫性肝病患者。收集符合条件<sup>[3]</sup>的CHB患者S0-S4期肝活检组织标本, 分为5组, 每组10例。

### 1.2 方法

1.2.1 Masson三色染色检测纤维化程度: 石蜡切片常规脱蜡至水, 苏木素染核, 95%乙醇溶液冲洗2次; 苦味酸乙醇分色5 min, 蒸馏水冲洗; 丽春红酸性品红液染色5 min, 蒸馏水冲洗; 1%磷钼酸水溶液处理约5 min, 醋酸苯胺蓝液复染5 min, 1%冰醋酸处理1 min, 95%乙醇溶液、无水乙醇脱水各5 min; 二甲苯透明5 min; 中性树脂封片。染色结果胶原纤维呈蓝色, 胞质、肌纤维和红细胞呈红色, 胞核呈蓝褐色。

1.2.2 Notch-1受体在纤维化肝组织中的定位: 免疫荧光双染色法检测Notch-1受体在 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白标记的活化肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)中表达。标本取材后即刻以4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 保存待测。所有标本经5  $\mu$ m系列切片后, 分别应用不同的一抗进行标记, 4  $^{\circ}$ C过夜, GPC3、Notch-1

## 相关报道

一些研究表明Notch信号通路可阻断病毒非特异性CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞分泌白介素(interleukin, IL)-22, 提示Notch-IL-22信号通路在CHB病毒感染中可能发挥促进非特异性炎症应答的作用。

### 创新点

有关Notch受体与肝纤维化的研究多见于动物实验, 对CHB患者的研究较少. 本文应用免疫组织化学方法证实CHB患者肝组织Notch-1受体表达与肝纤维化程度具有相关性, 为肝纤维化治疗提供新的理论依据.

表 1 各组年龄、性别、身高、体质量比较

分组	年龄(岁)	性别(女/男)	身高(m)	体质量(kg)
S0	37.7 ± 16.8	1/9	1.67 ± 0.15	63.8 ± 8.9
S1	38.3 ± 13.7	2/8	1.66 ± 0.14	62.9 ± 9.2
S2	37.2 ± 14.5	1/9	1.63 ± 0.16	64.1 ± 9.5
S3	38.9 ± 14.6	2/8	1.66 ± 0.17	63.7 ± 9.0
S4	37.8 ± 16.3	2/8	1.67 ± 0.16	63.5 ± 8.8

的一抗分别1:100、1:300稀释, 4℃孵育过夜, 37℃二抗孵育, DAB显色, 苏木素复染后常规脱水, 透明, 封片, 光镜下观察, 照相. 阳性信号为棕黄色颗粒. 随机选取20个视野, 记录阳性细胞数并计算阳性细胞率. 阳性积分参照文献[4]的判定标准: (1)阳性细胞≤5%为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分; (2)阳性强度: 无色为0分, 淡黄色为1分, 黄色为2分, 棕黄色为3分. 将(1)、(2)二者积分相乘, 即该例阳性积分.

**统计学处理** 用SPSS19.0统计软件处理数据, 数据以mean±SD表示, 对符合正态分布和方差齐的资料, 采用两样本均数 $t$ 检验. 相关性用Spearman等级相关检验. 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 入选病例一般情况比较** 各组年龄、性别、身高、体质量无统计学差异( $P>0.05$ , 表1).

**2.2 Masson三色染色法观察肝纤维化** Masson三色染色使肝组织中的胶原纤维呈蓝色胞质染成红色. Masson三色染色法观察各组肝组织纤维化中胶原面积密度值分别为S0组(3.46%±0.41%)、S1组(6.95%±0.96%)、S2组(9.88%±1.12%)、S3组(15.86%±1.82%)、S4组(23.13%±2.17%), 各组比较均有统计学差异( $P<0.05$ ).

**2.3 Notch-1受体在纤维化肝组织中的阳性积分** 各组阳性积分分别为S0组(0%)、S1组(1.53%±0.28%)、S2组(2.01%±0.79%)、S3组(2.86%±1.13%)、S4组(3.81%±1.76%), 各组比较均有统计学差异( $P<0.05$ ).

**2.4 Masson三色染色纤维化与Notch-1受体在纤维化肝组织中的定位相关性** 经比较, 肝纤维化程度越高, Notch-1受体阳性积分越高, Spearman等级相关检验分析表明, 二者具有显著相关性( $r=0.486$ ,  $P=0.001$ ).

## 3 讨论

肝纤维化是机体对各种病因引起慢性肝脏损伤后的一种自我修复反应, 是由大量细胞外基质蛋白在肝脏内弥漫性沉积所致, 是各种慢性肝脏疾病特别是发展到肝硬化的早期阶段<sup>[5]</sup>. 肝纤维化发病机制、诊断、治疗仍然是目前的研究热点. 肝活检是诊断肝纤维化的金标准, 能准确及时地判断肝纤维化的程度<sup>[6]</sup>. 我们采用Masson三色染色对肝纤维化的胶原进行检测, 结果显示各组肝组织纤维化中胶原面积密度值分别为S0组(3.46%±0.41%)、S1组(6.95%±0.96%)、S2组(9.88%±1.12%)、S3组(15.86%±1.82%)、S4组(23.13%±2.17%), 各组比较均有统计学差异( $P<0.05$ ).

近年来, 细胞通路途径对肝纤维化的作用受到重视, 其中之一是Notch-1受体途径<sup>[7]</sup>. Notch-1受体作为Notch信号通路的一个重要组成部分, 是广泛存于细胞表面介导细胞间信号转导的一类高度保守受体蛋白<sup>[8]</sup>. Notch-1信号是生物进化中存在的非常保守的信号途径之一, 其活化后影响很多下游基因的转录<sup>[9]</sup>. 有研究<sup>[10]</sup>发现, 静止期HSCs表达Notch-1受体, 随着HSCs活化Notch-1受体表达量逐渐增加. 我们的研究表明, Notch-1受体阳性积分分别为S0组(0分)、S1组(1.53分±0.28分)、S2组(2.01分±0.79分)、S3组(2.86分±1.13分)、S4组(3.81分±1.76分), 各组比较均有统计学差异( $P<0.05$ ). Spearman等级相关检验分析表明, 二者具有显著相关性( $r=0.486$ ,  $P=0.001$ ), 与文献[11]报道相符.

总之, 本研究表明, CHB患者肝组织Notch-1受体的表达增强, 与胶原纤维密切相关; Notch-1受体表达异常可能参与肝纤维化病理的进展. 但本研究只是对胶原纤维与Notch-1在CHB关系作了免疫组织水平的初步验证, 具体关系及相关机制特别是其与肝纤维化抑制药物如激动素等的相互作用机制还有待进一步研究.

### 应用要点

本文通过探讨CHB患者肝组织Notch-1受体表达与肝纤维化程度相关性, 为肝纤维化治疗提供新的理论依据.

## 4 参考文献

- 1 Zhang K, Zhang YQ, Ai WB, Hu QT, Zhang QJ, Wan LY, Wang XL, Liu CB, Wu JF. Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF- $\beta$ /BMP signaling. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 878-887 [PMID: 25624721 DOI: 10.3748/wjg.v21.i3.878]
- 2 中华医学会传染病学与寄生虫学分会、肝病学会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015最新版). 中华肝脏病杂志 2015; 23: 888-905
- 3 中华医学会感染病学分会肝脏炎症及其防治专家共识专家委员会. 肝脏炎症及其防治专家共识. 中华传染病杂志 2014; 32: 65-75
- 4 Katafuchi R, Ninomiya T, Mizumasa T, Ikeda K, Kumagai H, Nagata M, Hirakata H. The improvement of renal survival with steroid pulse therapy in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 3915-3920 [PMID: 18644797 DOI: 10.1093/ndt/gfn394]
- 5 Ye L, Kan F, Yan T, Cao J, Zhang L, Wu Z, Li W. Enhanced antiviral and antifibrotic effects of short hairpin RNAs targeting HBV and TGF- $\beta$  in HBV-persistent mice. *Sci Rep* 2017; 7: 3860 [PMID: 28634402 DOI: 10.1038/s41598-017-04170-1]
- 6 Chen C, Zhang SY, Zhang DD, Li XY, Zhang YL, Li WX, Yan JJ, Wang M, Xun JN, Lu C, Ling Y, Huang YX, Chen L. Clinical features of acute hepatitis E super-infections on chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 10388-10397 [PMID: 28058019 DOI: 10.3748/wjg.v22.i47.10388]
- 7 Trehanpati N, Shrivastav S, Shivakumar B, Khosla R, Bhardwaj S, Chaturvedi J, Sukriti, Kumar B, Bose S, Mani Tripathi D, Das T, Sakhuja P, Rastogi A, Bhihari C, Singh S, Gupta S, Kottail S, Sarin SK. Analysis of Notch and TGF- $\beta$  Signaling Expression in Different Stages of Disease Progression During Hepatitis B Virus Infection. *Clin Transl Gastroenterol* 2012; 3: e23 [PMID: 23238065 DOI: 10.1038/ctg.2012.17]
- 8 Lee SJ, Kim KH, Pak SC, Kang YN, Yoon GS, Park KK. Notch signaling affects biliary fibrosis via transcriptional regulation of RBP-jk in an animal model of chronic liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 12688-12697 [PMID: 26722458]
- 9 Chen S, Xu L, Lin N, Pan W, Hu K, Xu R. Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells. *Life Sci* 2011; 89: 975-981 [PMID: 22056375 DOI: 10.1016/j.lfs.2011.10.012]
- 10 Dill MT, Rothweiler S, Djonov V, Hluschuk R, Tornillo L, Terracciano L, Meili-Butz S, Radtke F, Heim MH, Semela D. Disruption of Notch1 induces vascular remodeling, intussusceptive angiogenesis, and angiosarcomas in livers of mice. *Gastroenterology* 2012; 142: 967-977.e2 [PMID: 22245843 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.12.052]
- 11 Yang JJ, Tao H, Liu LP, Hu W, Deng ZY, Li J. miR-200a controls hepatic stellate cell activation and fibrosis via SIRT1/Notch1 signal pathway. *Inflamm Res* 2017; 66: 341-352 [PMID: 28025657 DOI: 10.1007/s00011-016-1020-4]

## □ 同行评价

本文研究的内容重要, 对研究肝纤维化的发生机制提供了有意义的信息, 有一定的临床价值。

编辑: 马亚娟 电编: 杜冉冉





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

