

# 白介素-10对大鼠肝星状细胞核因子- $\kappa$ B、细胞因子及细胞间黏附分子-1表达的影响

颜吉丽, 范 钰, 李 华, 张锦生, 黄富春

颜吉丽, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210029  
范钰, 浙江大学肿瘤研究所、浙江新和成股份有限公司  
浙江省杭州市 310009  
李华, 张锦生, 复旦大学基础医学院病理教研室 上海市 200032  
黄富春, 河南漯河市第二人民医院消化科 河南省漯河市 450000  
项目负责人: 范钰, 310009, 浙江省杭州市, 浙江大学肿瘤研究所、浙江新和成股份有限公司. jiliyananita@yahoo.com.cn  
电话: 0571-87784527  
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2003-03-28

## 摘要

**目的:** 探讨白介素-10对大鼠肝星状细胞的干预作用和作用机制。

**方法:** 分离大鼠肝星状细胞(HSC), 采用不同浓度的白介素-10处理后, 分别应用ELISA法和Northern blot检测大鼠HSC中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和白介素-1 $\beta$ 蛋白和mRNA的表达, 采用凝胶迁移率法检测核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活性。

**结果:** 白介素-10可明显下调大鼠HSC ICAM-1、TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ 表达, 并且抑制NF- $\kappa$ B活性, 其效应呈浓度依赖性。

**结论:** 白介素-10可能通过下调HSC ICAM-1、TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ 表达和抑制NF- $\kappa$ B活性来发挥其抗炎和抗纤维化作用的。

颜吉丽, 范钰, 李华, 张锦生, 黄富春. 白介素-10对大鼠肝星状细胞核因子- $\kappa$ B、细胞因子及细胞间黏附分子-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(8):1947-1949

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1947.asp>

## 0 引言

近年发现, 细胞间黏附分子-1与许多肝脏疾病的发生、发展密切相关<sup>[1-8]</sup>。肝损伤时, 被激活的肝星状细胞不仅分泌细胞外基质, 直接导致肝纤维化的形成, 同时细胞表面表达细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)。ICAM-1表达增多促进白细胞向肝实质浸润, 使肝脏炎症加剧、损伤加重<sup>[9-10]</sup>。核内转录因子(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是一个多功能的核转录因子, 具有广泛的生物学活性, 能够促进多种细胞因子、黏附因子和趋化因子的基因转录, 在炎症反应中起重要作用。研究发现, 肝损伤及肝纤维化与NF- $\kappa$ B密切相关<sup>[11-16]</sup>。白介素-10(interleukin-10, IL-10)是一种多功能的炎症抑制因子, 有抑制炎症反应、减轻纤维化的作用<sup>[17-23]</sup>, 但是其细胞内的作用机制不清。为此,

我们采用IL-10处理大鼠HSC, 观察其对NF- $\kappa$ B和细胞因子(TNF- $\alpha$ )、(IL-1 $\beta$ )影响, 旨在进一步揭示其抗肝纤维化的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\delta$  Wistar大鼠, 体质量450-500 g, 购自中国科学院上海实验动物中心。鼠抗人结蛋白(Desmin)多克隆抗体, 羊抗鼠ICAM-1多克隆抗体, 购自Dako公司。辣根过氧化物酶标记兔抗羊IgG、链霉素生物素-过氧化物酶(ABC)法免疫组化试剂盒, 购自武汉博士德公司。大鼠TNF- $\alpha$ , 购自PeproTech公司。总RNA提取试剂盒(TRIzol)、逆转录试剂盒、NF- $\kappa$ B探针, 购自Promega公司。四甲基联苯胺盐酸盐(TMB)、Taq聚合酶、dNTP均购自华美公司。ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ELISA试剂盒购于北京邦定公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 HSC分离** 分离培养HSC: 按文献[24]方法。HSC活率和纯度鉴定: 用常规台盼蓝染色法鉴定细胞活率; 采用Desmin和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)染色对细胞进行免疫组化鉴定。鉴定成功后进行如下试验。

**1.2.3 HSC NF- $\kappa$ B活性** 采用凝胶迁移率法。参照文献[25]加以改进。定量后取核蛋白5  $\mu$ g、DNA结合缓冲液17  $\mu$ L、标记探针1  $\mu$ L。总体积21  $\mu$ L, 置37  $^{\circ}$ C孵育30 min, 然后加上样缓冲液4  $\mu$ L。反应产物经50 mL/L的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(0.25 $\times$ TBE, pH8.3, 电压110 V)。电泳完毕, 凝胶置-70  $^{\circ}$ C放射自显影。

**1.2.4 HSC ICAM-1、TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ 表达** (1)蛋白水平采用ELISA方法。按照试剂盒说明书操作。测定490 nm波长下的吸光度。(2)mRNA水平采用Northern blot方法<sup>[26]</sup>检测。以TRIzol提取细胞总RNA, 以GAPDH为内参照。利用Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software测定Northern Blot条带净灰度值, 并与内参照GAPDH的测定结果相比较, 计算其比值。

**统计学处理** 采用计算机SPSS10.0软件系统进行F检验和t检验。

## 2 结果

**2.1 IL-10对HSC NF- $\kappa$ B活性的影响** 大鼠HSC有较高的NF- $\kappa$ B表达, 以IL-10处理后, NF- $\kappa$ B活性被抑制, 且呈剂量依赖性(见图1)。

**2.2 IL-10对HSC细胞ICAM-1和细胞因子表达的影响** 采用IL-10处理大鼠HSC后, 分别采用ELISA、

Northern blot 方法检测 HSC 中 ICAM-1 蛋白和 mRNA 水平的表达. 发现在 HSC 中 ICAM-1、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  均高表达, 经 IL-10 处理后, 三者均下降, 且呈浓度依赖性(见图 2, 图 3).

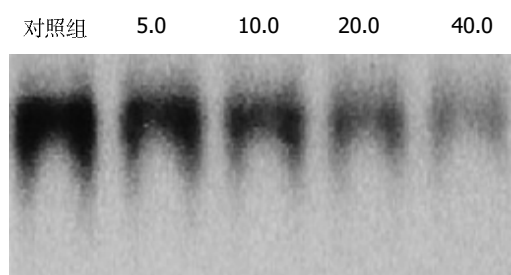


图1 大鼠 HSC NF- $\kappa$ B 活性(ng, 48 h).

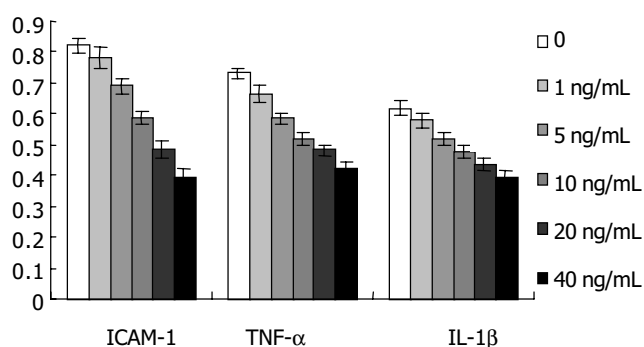


图2 IL-10对HSC ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响(mean $\pm$ SD,  $n=5$ , 48 h).

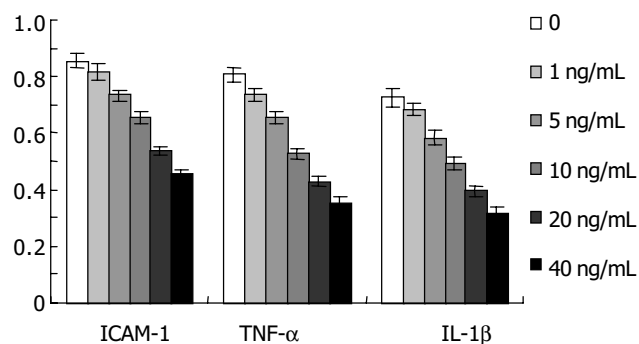


图3 IL-10对HSC ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ mRNA表达的影响(mean $\pm$ SD,  $n=5$ , 48 h)

### 3 讨论

IL-10是一种主要由Th2细胞产生的炎症抑制因子. 近年发现, 肝脏 Kupffer 细胞、肝细胞、肝星状细胞(HSC)等也可产生 IL-10. 在多种实验性肝损伤模型中, 内源性 IL-10 有明显抑制肝脏炎症, 减轻肝损伤的作用<sup>[17-23, 27]</sup>. 提示 IL-10 对于慢性肝炎和肝纤维化的治疗具有重要的作用. 但是其减轻肝纤维化的机制尚不清楚. 本研究采用 IL-10 处理大鼠 HSC, 探讨了 IL-10 对其 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 活性及细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 的影响.

肝细胞的退行性病变, 不论是可逆的还是不可逆的, 均可通过局部各种递质的释放引起炎症反应, 后者通过旁分泌和(或)自分泌途径刺激 HSC 的激活, 最

终促进肝纤维化的发生、发展. 在此过程中, 黏附分子起着重要的作用. 抗黏附治疗可以减轻肝损伤. 目前已发现的黏附分子主要分五类: 免疫球蛋白超家族、整合素家族、选择素家族、Cadherin 家族及其他未分类的黏附分子. 其中研究最多的是免疫球蛋白超家族, 包括细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM-1, 2, 3)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、血小板内皮细胞黏附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)以及神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)等. 在这些黏附分子中, ICAM-1 引人重视. 静息的 HSC 不表达 ICAM-1, 而在 HSC 被激活后, ICAM-1 基因及其产物均增加, 并且 ICAM-1 能够趋化炎症细胞, 促使炎症细胞从肝血窦直接浸润到肝实质<sup>[9-10]</sup>. 这表明 ICAM-1 的表达与 HSC 的活化有关, 并在肝纤维化的形成中起着重要作用. 在酒精性肝病<sup>[28]</sup>, 病毒性肝炎<sup>[29]</sup>, 自身免疫性肝病及肝纤维化肝硬变等<sup>[30]</sup>病变时, 不管其病因如何, 肝细胞, 窦周细胞及胆管上皮细胞 ICAM-1 表达均明显增加. 我们采用 ELISA 和 Northern blot 检测 ICAM-1 在大鼠 HSC 中的蛋白和 mRNA 表达, 发现, HSC 高表达 ICAM-1. 采用 IL-10 处理后, HSC 中 ICAM-1 蛋白及 mRNA 均明显下调, 且呈剂量依赖性. 本研究提示, IL-10 抑制大鼠 HSC 的激活途径之一, 可能是通过其下调 ICAM-1 表达来实现的.

近来发现, 核转录因子 NF- $\kappa$ B 在 HSC 的激活中起着重要作用<sup>[31]</sup>. NF- $\kappa$ B 位于 ICAM-1 基因的启动子内, 是由 p50 和 p65 构成的二聚体复合物, 为 DNA 结合蛋白. 在正常情况下, NF- $\kappa$ B 与抑制因子 I $\kappa$ B 结合形成三聚体复合物存在于细胞质内, 处于无活性状态. 多种细胞外刺激信号能够诱导 NF- $\kappa$ B 进入细胞核而被活化<sup>[32]</sup>. 目前研究表明, NF- $\kappa$ B 参与调节免疫反应及炎症过程, 促进前炎症因子(IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6)、趋化因子(IL-8, 巨噬细胞炎症蛋白-1)等炎症基因及 TGF- $\beta$  基因的转录, 而这些细胞因子在肝纤维化发生发展中起重要作用. 他们可引起中性粒细胞及巨噬细胞活化, 增强中性粒细胞及单核细胞向损伤的肝实质浸润, 刺激成纤维细胞增生等<sup>[33]</sup>. 因此, TNF- $\alpha$ 、IL-1 与 NF- $\kappa$ B 之间造成细胞因子网络中的恶性循环. 而 TNF- $\alpha$ 、IL-1 作为细胞外刺激信号, 又可激活 NF- $\kappa$ B, 进一步放大炎症反应<sup>[34]</sup>. 因此, TNF- $\alpha$ 、IL-1 与 NF- $\kappa$ B 之间造成细胞因子网络中的恶性循环. 研究发现, 用亲脂性铁螯合剂阻断 Kupffer 内核因子 NF- $\kappa$ B 的激活后, 可以阻止细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达的上调, 从而减轻肝脏的损伤<sup>[35]</sup>. 提示 NF- $\kappa$ B 的激活是诱导肝损伤的重要因素. 因此, NF- $\kappa$ B 在炎症细胞向肝实质浸润过程中起重要作用. 采用药物或技术手段下调 HSC 表面 NF- $\kappa$ B 表达, 可望减轻炎症性肝损伤和肝纤维化.

本研究发现, IL-10 处理大鼠 HSC 后, 凝胶迁移率法显示, NF- $\kappa$ B 活性下降, 并且呈浓度和时间依

赖性. 由此说明, IL-10 可明显地抑制 HSC NF- $\kappa$ B 活性. 与此同时, 我们发现, 大鼠 HSC 的增生受到抑制, 说明 NF- $\kappa$ B 与 HSC 增生有密切的关系. 提示通过阻抑 NF- $\kappa$ B 活化可以抑制 HSC 增生. 我们应用 ELISA 方法检测 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1 蛋白在 HSC 中的表达, 结果显示, IL-10 能明显下调大鼠 HSC IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1 蛋白的表达, 并呈量效依赖性. 进一步应用 Northern blot 法在 mRNA 水平检测 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1 在大鼠 HSC 中的表达, 结果与 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1 蛋白表达下调趋势一致, 说明 IL-10 在转录水平即对 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1 的表达起抑制作用. 本研究提示, IL-10 能够抑制大鼠 HSC 的激活, 可能是通过其抑制 NF- $\kappa$ B 活性, 阻断了 NF- $\kappa$ B 与 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  形成的恶性循环, 从而在减轻肝脏炎症性损伤、抑制肝纤维化中发挥重要的作用.

#### 4 参考文献

- Hellerbrand, Wang SC, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996;24:670-676
- Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 1997;17:35-47
- Neubauer K, Eichhorst ST, Wilfling T, Buchenau M, Xia L, Ramadori G. Sinusoidal intercellular adhesion molecule-1 up-regulation precedes the accumulation of leukocyte function antigen-1-positive cells and tissue necrosis in a model of carbon tetrachloride-induced acute rat liver injury. *Lab Invest* 1998;78:185-94
- Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepato-gastroenterology* 1999;46(Suppl 2):1452-1457
- Nakanuma Y, Tsuneyama K, Sasaki M, Harada K. Destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:549-570
- Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 2002;80:52-64
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Adhesion molecules and CX chemokines in endotoxin-induced liver injury. *Fukushima J Med Sci* 2003;49:1-13
- Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, Ramadori G. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1999;154:153-167
- Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, Hagedorn CH, Brenner D. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology* 2003;37:653-664
- Mirza A, Liu SL, Frizell E, Zhu J, Maddukuri S, Martinez J, Davies P, Schwarting R, Norton P, Zern MA. A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 1):G281-G288
- Hellerbrand C, Jobin C, Iimuro Y, Licato L, Sartor RB, Brenner DA. Inhibition of NF-kappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor. *Hepatology* 1998;27:1285-1295
- Hellerbrand C, Jobin C, Licato LL, Sartor RB, Brenner DA. Cytokines induce NF-kappaB in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 1998;275(2 Pt 1):G269-G278
- Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A, Lotersztajn S. Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1998;273:23183-23189
- Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, Arthur MJ, Hughes T, Bahr MJ, Degitz K, Mann DA. Persistent activation of nuclear factor-kappaB in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IkappaB family proteins. *Hepatology* 1999;30:761-769
- Kweon YO, Paik YH, Schnabl B, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003;39:38-46
- Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hiemy S, Caspar P, Kuhn R, Muller W, Sher A. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J Immunol* 1998;160:4473-4480
- Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998;28:1597-1606
- Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998;28:1607-1615
- Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-530
- Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000;118:655-660
- Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1287-1291
- Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, Cabrera R, Liu C, Davis GL. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003;38:859-868
- 袁桃霞, 张锦生, 张月娥. 大鼠肝 Ito 细胞的体外培养及肝素对其抑制作用的研究. *上海医科大学学报* 1996;23:90-93
- Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T, Hedlund G, Kalland T, Dohlsten M. In vivo anergized CD4+ T cells express perturbed AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:979-984
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 第2版. 北京: 科学出版社, 1989:363-375
- Louis H, Le Moine O, Goldman M, Deviere J. Modulation of liver injury by interleukin-10. *Acta Gastroenterol Belg* 2003;66:7-14
- Nanji AA, Griniuvienė B, Yacoub LK, Fogt F, Tahan SR. Intercellular adhesion molecule-1 expression in experimental alcoholic liver diseases: relationship to endotoxemia and TNF $\alpha$  messenger RNA. *Exp Mol Pathol* 1995;62:42-51
- Horiike N, Onji M, Kumon I, Kanaoka M, Michitaka K, Ohta Y. Intercellular adhesion molecule-1 expression on the hepatocyte membrane of patients with chronic hepatitis B and C. *Liver* 1993;13:10-14
- Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 1997;17:35-47
- Wu J, Zern MA. NF-kappa B, liposomes and pathogenesis of hepatic injury and fibrosis. *Front Biosci* 1999;4:D520-D527
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683
- Peterson TC. Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet-derived growth factor-driven proliferation of fibroblasts. *Hepatology* 1993;17:486-493
- Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:3-9
- Lin M, Rippe RA, Niemela O, Brittenham G, Tsukamoto H. Role of iron in NF-kappa B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages. *Am J Physiol* 1997;272:G1355-G1364