

瘦素与肝纤维化关系及研究方法

刘勇钢, 卢建华

刘勇钢, 天津市传染病医院; 天津市肝病研究所病理科 天津市 300192

卢建华, 石家庄市第五医院检验科 河北省石家庄市 050021
刘勇钢, 副主任医师, 主要从事肝纤维化方面的研究.

作者贡献分布: 刘勇钢与卢建华对此文所作贡献均等.

通讯作者: 刘勇钢, 300192, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市传染病医院; 天津市肝病研究所病理科. lyg13602168512@yahoo.com.cn
电话: 022-27468193

收稿日期: 2008-04-21 修回日期: 2008-06-02

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-08

Relationship between leptin and hepatic fibrosis and its research methodology

Yong-Gang Liu, Jian-Hua Lu

Yong-Gang Liu, Department of Laboratory Pathology, Tianjin Liver Disease Institute, Tianjin Infection Disease Hospital, Tianjin 300192, China

Jian-Hua Lu, Department of Laboratory, Shijiazhuang Fifth Hospital, Shijiazhuang 050021, Hebei Province, China

Correspondence to: Dr. Yong-Gang Liu, Department of Laboratory Pathology, Tianjin Liver Disease Institute, Tianjin Infection Disease Hospital, 75 Sudi Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. lyg13602168512@yahoo.com.cn
Received: 2008-04-21 Revised: 2008-06-02

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-08

Abstract

Leptin protein is closely related to hepatic fibrosis. Combining previous animal experiments and our study of leptin in liver tissues *in situ*, we hypothesized that leptin appearance in liver tissues *in situ* should be one of the important step in hepatic fibrosis process. Research methodology of leptin within hepatic fibrosis was also analyzed.

Key Words: Hepatic fibrosis; Leptin

Liu YG, Lu JH. Relationship between leptin and hepatic fibrosis and its research methodology. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(19): 2077-2079

摘要

瘦素与肝纤维化关系密切. 本文结合既往的动物实验以及作者对肝组织原位瘦素的研究, 推测肝脏原位瘦素的出现可能意味着肝纤维化进程启动的一个重要步骤, 并对瘦素研究方法进行分析.

关键词: 肝纤维化; 瘦素

刘勇钢, 卢建华. 瘦素与肝纤维化关系及研究方法. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2077-2079

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2077.asp>

0 引言

越来越多的证据表明, 瘦素与肝纤维化关系密切, 而肝纤维化是继发于各种形式慢性肝损伤之后组织修复过程中的代偿反应, 他也是慢性肝病发展为肝硬化必经的病理过程. 据世界卫生组织报道, HBV感染呈世界性流行, 全球约3.5亿人为慢性HBV感染者^[1]; 而全球HCV的平均感染率约为3%, 约1.7-2.0亿人感染HCV^[2]. 大量慢性HBV及HCV感染者经肝纤维化逐渐加重最终进展为肝硬化并导致死亡^[3]. 故深入研究瘦素与肝纤维化并确立合适的研究方法意义重大.

1 瘦素概述

瘦素是由ob基因编码的蛋白质类激素, 由167个氨基酸残基组成, 分子质量为16 kDa^[4]. 通常认为瘦素主要由脂肪细胞表达, 后有研究发现胎盘和胃组织内可产生瘦素^[5-6], 近年卢建华 *et al*发现慢性乙型肝炎患者肝组织可有瘦素表达, 且与肝组织脂肪变性未见相关性^[7]. 而肝内非脂肪细胞产生的瘦素与肝纤维化的关系密不可分.

2 瘦素与肝纤维化相关的动物实验证据

Potter *et al*^[8]对大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)体外培养达14 d以上时, 应用RT-PCR及激光共聚焦技术分析, 发现有瘦素mRNA和蛋白表达, 而HSC对于肝脏细胞外基质合成及肝纤维化发生起着重要作用. 在对正常大鼠、ob/ob小鼠(由于编码瘦素基因第105位氨基酸-精氨酸的密码子变成终止密码子, 故出现瘦素合成障碍)和Zucker大鼠(瘦素受体ob-R缺乏)的动物实验研究表明瘦素与肝纤维化过程密切相关. Otte *et al*^[9]以苯巴比妥和递增CCl₄剂量来诱导大鼠肝纤维化、肝硬化模型. 用半定量RT-PCR检测瘦素及其受体的mRNA, 其蛋白的表达以Western

■背景资料

HBV、HCV感染呈世界性流行并部分导致肝病慢性化, 大量慢性肝病患者经肝纤维化逐渐加重最终进展为肝硬化并导致死亡, 故深入研究肝纤维化并确立合适的研究方法意义重大.

■同行评议者

余宏宇, 教授, 中国人民解放军第二军医大学第二附属医院长征医院病理科; 范建高, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

■创新盘点

本文结合既往的动物实验以及作者对肝组织原位瘦素的研究,推测肝脏原位瘦素的出现可能意味着肝纤维化进程启动的一个重要步骤。慢性乙型肝炎患者肝纤维化的发生可能存在“n+瘦素”的机制。

blot蛋白印迹分析测定,瘦素及其受体的定位用免疫组化检测。结果表明正常的肝组织不表达瘦素,但有其受体的mRNA表达;在纤维化、硬化的肝脏中,随肝纤维化程度的增加,瘦素mRNA及瘦素蛋白水平不断升高,而瘦素受体mRNA及蛋白的表达未显著改变。Honda *et al*^[10]针对ob/ob小鼠给予硫代乙酰胺(TAA),结果8 wk后几乎没有发生肝纤维化,肝组织中的 $\alpha 1(I)$ 前胶原mRNA以及TGF $\beta 1$ mRNA的表达亦明显受到抑制。Potter *et al*^[11]发现瘦素缺乏的ob/ob鼠注射CCl₄时肝纤维化程度轻微,其后外源性给予瘦素时则发生纤维化。但对C57BL/6小鼠实验^[12]表明,单独给予瘦素时肝组织无明显病理改变,而同时注射瘦素比较单独注射CCl₄时,明显增强了前者肝星状细胞活化和细胞外基质的合成。Ikejima *et al*^[13]以ob-R缺乏Zucker大鼠建立TAA肝纤维化模型,正常大鼠为对照组,发现正常肝脏不产生瘦素,但在TAA诱导的肝纤维化期间活化的HSC产生瘦素;在Zucker大鼠, TAA诱导的肝纤维化几乎完全被阻止; I型前胶原、TGF- $\beta 1$ mRNA水平较低, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达显著减少。Sakaida *et al*^[14]应用猪血清诱导Zucker大鼠肝纤维化,结果发现对照组在注射猪血清8 wk后出现肝纤维化, Zucker大鼠纤维化程度极其轻微;与正常对照组比较, Zucker大鼠 $\alpha 1(I)$ 胶原mRNA和 α -SMA表达显著减少。

3 肝病临床的瘦素血清学研究

在这方面成功的血清学肝纤维化研究是很有限的。Lin *et al*^[15]观察了26例男性肝硬化患者和25例健康对照者,肝硬化组体脂量和血清白蛋白均低于对照组,但肝硬化组血清瘦素(酶免法)显著升高高于对照组(均值6.0对3.4 g/L, $P<0.01$)。García-Suárez *et al*^[16]用RIA法检测30例原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者及29名年龄、体质量配对的正常人的血清瘦素水平,发现随PBC组织学分期的加重,瘦素水平显著增加。

4 大多数血清瘦素方面的研究困惑

Testa *et al*^[17]分析了40例慢性病毒性肝炎与52例肝硬化患者血清瘦素水平,发现虽然肝硬化组血清瘦素水平明显高于慢性肝炎组($P<0.05$),但令人困惑的是,上述两组瘦素水平却均低于对照组($P<0.01$),仅女性肝硬化患者血清瘦素高于对照组($P<0.05$)。Piche *et al*^[18]观察了77例慢性丙型肝炎(CHC)患者与22例健康对照者血清瘦素水平,发现无论是CHC组还是对照组,女性血清瘦素水平

均较高。

由于影响血清瘦素的因素更多是非肝脏来源的,故肝纤维化瘦素血清学研究存在很大的障碍和局限性。Giannini *et al*^[19]对16例腹水为漏出液的失代偿性肝硬化患者测定腹水、血清瘦素水平,发现腹水及血清瘦素均与患者体质量指数(BMI)及体脂肪(BF)有相关性,而与肿瘤坏死因子 α (TNF- α)无相关性,提示肝硬化患者血清瘦素与腹水瘦素水平是由机体的代谢状况所决定的。而Comlekci *et al*^[20]认为血清瘦素水平无论男女,均仅与身体脂肪百分比(BFP)及身体脂肪量(BFM)有显著相关。

5 病毒性肝炎患者肝组织原位瘦素及血清学

卢建华 *et al*^[7,21]通过肝组织原位瘦素检测,发现慢性乙型肝炎患者肝组织多数有瘦素表达(42/72),而非活动性HBsAg携带者肝组织很少有瘦素表达(2/34),两组间瘦素表达差异有统计学意义($P<0.01$),且肝脏瘦素表达与肝脏脂肪变性未见相关性;在慢性乙型肝炎患者肝组织中,可见活化的肝星状细胞表达瘦素(经免疫组化双重染色证实)。在对54例进行了人体测量学指标收集的慢性乙型肝炎患者(其中男性患者中,低体质指数组2例,正常体质指数组28例,高体质指数组14例,超高体质指数组2例;女性患者中,正常体质指数组8例),同时进行了血清瘦素(ELISA法)和肝组织原位瘦素检测,发现健康体质量组女性血清瘦素显著高于男性低体质指数组、正常体质指数组或高体质指数组的血清瘦素水平($P<0.05$);而在男性低体质指数组、正常体质指数组(BMI<25)、高体质指数组、超高体质指数组,血清瘦素水平逐渐升高,且这三组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。同时为避免性别与体脂量对血清瘦素检测值的影响,对上述54例慢性乙型肝炎患者中的30例BMI<25男性患者血清与肝组织瘦素检测结果进行比较,发现肝组织瘦素阳性17例血清瘦素水平为 7.38 ± 6.46 pg/L,阴性13例血清瘦素水平为 5.14 ± 4.77 pg/L($P>0.05$)。

6 瘦素研究方法中可能出现的误区

很多证据已表明,血清瘦素主要受性别和体脂量影响,而且性别可能是同等体质指数下决定体脂量的重要因素,故没有人体测量学记录的血清瘦素研究中,统计数据分类将处于混乱状态。从目前的经验来看,单纯的血清瘦素研究是评判患者体脂量多少及变化情况的较好指标,但若研究肝纤维化时,建议结合肝组织原位瘦

素研究以便达到研究目的. 在卢建华 *et al* 的研究中, 未见到慢性乙型肝炎患者肝脏瘦素表达与肝脏脂肪变性之间的相关性, 而肝组织瘦素原位表达部位可见活化的肝星状细胞表达瘦素(经免疫组化双重染色证实), 在卢等的研究经验中认为, 简单地把肝组织脂肪变性与肝组织原位瘦素联系起来, 尤其是在研究的初始阶段, 会把研究者带入思路陷阱.

7 结论

肝组织原位瘦素与肝纤维化关系密切, 推测肝组织原位瘦素可能是肝纤维化形成中的一个重要环节. 在肝纤维化研究方面, 瘦素是一个非常重要的研究指标之一, 且研究方法应侧重于肝组织原位瘦素研究, 也可辅以血清对照研究; 单纯的血清瘦素研究不适于肝纤维化研究; 而没有人体测量学的血清瘦素研究是不可取的. 在结合既往的动物实验以及现有的肝组织原位瘦素研究, 卢建华 *et al* 推测肝脏原位瘦素的出现可能意味着肝纤维化进程启动的一个重要步骤, 慢性乙型肝炎患者肝纤维化的发生可能存在“n+瘦素”的机制. 即当仅有外源性瘦素而无“n”条件时, 不能启动肝纤维化(如非活动性HBsAg携带者); 当具备“n”条件时, 肝组织会有原位瘦素产生并在局部发挥作用可推进肝纤维化进程(如慢性乙型肝炎患者), 此时外源性瘦素可以恢复(如ob/ob鼠)或增强(如C57BL/6小鼠)纤维化进程.

8 参考文献

- World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204 dex, 2000-10, cited 2008-04; 1(1): 24 screens. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/in.html>
- Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004; 24 Suppl 2: 3-8
- Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-538
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3: 1029-1033
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394: 790-793
- 卢建华, 刘勇钢, 郎振为, 刘玉珍, 侯军良, 段毅力, 梅志勤, 叶立红. 慢性乙型肝炎患者肝组织瘦素的表达. *中华传染病杂志* 2007; 25: 177-178
- Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 178-182
- Otte C, Otte JM, Strodthoff D, Bornstein SR, Fölsch UR, Mönig H, Kloehn S. Expression of leptin and leptin receptor during the development of liver fibrosis and cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112: 10-17
- Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002; 36: 12-21
- Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003; 38: 281-288
- Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001; 34: 288-297
- Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1399-1410
- Sakaida I, Jinhua S, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin receptor-deficient Zucker (fa/fa) rat retards the development of pig serum-induced liver fibrosis with Kupffer cell dysfunction. *Life Sci* 2003; 73: 2491-2501
- Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Increased serum leptin concentrations correlate with soluble tumour necrosis factor receptor levels in patients with cirrhosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57: 805-811
- García-Suárez C, Crespo J, Fernández-Gil PL, Amado JA, García-Unzueta MT, Pons Romero F. [Plasma leptin levels in patients with primary biliary cirrhosis and their relationship with degree of fibrosis] *Gastroenterol Hepatol* 2004; 27: 47-50
- Testa R, Franceschini R, Giannini E, Cataldi A, Botta F, Fasoli A, Tenerelli P, Rolandi E, Barreca T. Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 33-37
- Piche T, Vandenbos F, Abakar-Mahamat A, Vanbiervliet G, Barjoan EM, Calle G, Giudicelli J, Ferrua B, Laffont C, Benzaken S, Tran A. The severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11: 91-96
- Giannini E, Romagnoli P, Tenconi GL, Botta F, Malfatti F, Chiarbonello B, Mamone M, Barreca T, Testa R. High ascitic fluid leptin levels in patients with decompensated liver cirrhosis and sterile ascites: relationship with TNF-alpha levels. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 275-280
- Comlekci A, Akpınar H, Yesil S, Okan I, Ellidokuz E, Okan A, Ersoz G, Tankurt E, Batur Y. Serum leptin levels in patients with liver cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 779-786
- 卢建华, 赵文伟, 段毅力, 刘勇钢, 钱静. 病毒性肝炎合并肝组织脂肪变性患者肝组织瘦素表达研究. *河北医药* 2007; 29: 676-677

■同行评价

本文文献收集全面新颖, 分析总结客观, 文笔和归纳较好, 具有较好的学术价值.