

# 核因子- $\kappa$ B及其调控产物在实验性自身免疫性肝炎中的表达及意义

杨兰兰, 鲍启德, 崔东来, 王彦

## ■背景资料

在世界范围内, 自身免疫性肝炎(AIH)占慢性肝炎的10%-20%, 严重的AIH患者如果不治疗, 3年的生存率为50%, 10年为10%。研究表明NF- $\kappa$ B、ICAM-1等细胞因子在CCl<sub>4</sub>诱导小鼠急性肝损伤发病机制中起着重要作用, 并可能是各种急性肝损伤的共同途径, 调控NF- $\kappa$ B及其产物活性有可能成为防治急性肝损伤的新靶点。

杨兰兰, 王彦, 河北大学护理学院 河北省保定市 071000  
鲍启德, 河南安阳地区医院消化内科 河南省安阳市 455000  
崔东来, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 杨兰兰与鲍启德对此文章所作贡献均等; 此课题由杨兰兰、鲍启德、崔东来及王彦设计; 研究过程由杨兰兰、鲍启德操作完成; 研究所用试剂及分析工具由崔东来提供; 数据分析由杨兰兰完成; 本论文写作由杨兰兰、鲍启德完成。

通讯作者: 杨兰兰, 071000, 河北省保定市裕华东路342号, 河北大学医学部护理学院. lanlan0125@126.com  
电话: 0312-5075626

收稿日期: 2007-11-29 修回日期: 2008-01-30

## Expression of NF- $\kappa$ B and its regulation products in experimental autoimmune hepatitis and its significance

Lan-Lan Yang, Qi-De Bao, Dong-Lai Cui, Yan Wang

Lan-Lan Yang, Yan Wang, Department of Nursing, Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China

Qi-de Bao, Department of Gastroenterology, Anyang Area Hospital, Anyang 455000, Henan Province, China

Dong-Lai Cui, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Lan-Lan Yang, Department of Nursing, Hebei University, 342 Yuhua Eastern Road, Baoding 071000, Hebei Province, China. lanlan0125@126.com

Received: 2007-11-29 Revised: 2008-01-30

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in experimental autoimmune hepatitis (EAH) model and to explore the role of those molecules in liver injury of EAH.

**METHODS:** EAH model was induced by intraperitoneal injection of syngeneic S-100 antigen emulsified in complete Freud's adjuvant into C57BL/6 on days 1, 7, 14 and 21. On the 28 day, animals were killed. Expressions of NF- $\kappa$ B, ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-6 were observed using histoimmunocytochemistry

**RESULTS:** Liver cells in the control group were

radially arranged from the central venous to the all sides. No inflammatory infiltration was observed in the portal area. Histology showed patchy necrosis of liver cells and lymphocyte infiltration in the EAH model. NF- $\kappa$ B, ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-6 were not expressed in the control group but positively expressed in the model group.

**CONCLUSION:** NF- $\kappa$ B and its regulation products play an important role in the process of hepatic cell injury by regulating the expression of ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-6.

**Key Words:** Experimental autoimmune hepatitis; Autoimmune; Nuclear factor kappa B; Mice

Yang LL, Bao QD, Cui DL, Wang Y. Expression of NF- $\kappa$ B and its regulation products in experimental autoimmune hepatitis and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 892-895

## 摘要

**目的:** 观察实验性自身免疫性肝炎(experimental autoimmune hepatitis, EAH)肝组织中核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)及其调控产物细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)在EAH中的表达和在肝损伤中的作用。

**方法:** 采用肝抗原S-100与弗氏完全佐剂充分乳化后, 予d 1、7、14和21 C57BL/6小鼠ip诱导EAH模型, 于d 28处死所有小鼠。免疫组织化学方法观察NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达。

**结果:** 对照组肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状排列, 汇管区无炎症浸润, EAH模型组小鼠肝组织学可见肝细胞片状坏死和淋巴细胞浸润。对照组中未观察到NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达, 而模型组中均有阳性表达。

## ■同行评议者

刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科

**结论:** NF- $\kappa$ B通过调控ICAM-1、TNF- $\alpha$ 和IL-6的基因表达, NF- $\kappa$ B及其调控产物可能在EAH的肝细胞损伤过程中起着重要的作用。

**关键词:** 实验性自身免疫性肝炎; 核因子- $\kappa$ B; 小鼠

杨兰兰, 鲍启德, 崔东来, 王彦. 核因子- $\kappa$ B及其调控产物在实验性自身免疫性肝炎中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 892-895

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/892.asp>

## 0 引言

核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)作为肝脏的重要细胞因子在肝损伤发生发展过程中起着重要的作用. NF- $\kappa$ B能调控免疫应答、炎症反应、细胞黏附、细胞生长分化和凋亡所必需的许多细胞因子和黏附分子等相关基因的转录和表达<sup>[1]</sup>. 近年研究表明, NF- $\kappa$ B及其调控产物在肝脏炎症、肝纤维化的发生及发展中起重要作用<sup>[2]</sup>, 并且广泛参与炎症及免疫性疾病的发病过程<sup>[3]</sup>. 本研究通过肝抗原S-100腹腔免疫小鼠诱导实验性自身免疫性肝炎(experimental autoimmune hepatitis, EAH)模型, 观察肝组织中NF- $\kappa$ B、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素6(interleukin-6, IL-6)的表达, 探讨NF- $\kappa$ B及其调控产物在EAH肝损伤中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级雄性C57BL/6小鼠65只, 周龄4 wk, 体质量 $20.32 \pm 0.86$  g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 自由进食进水. 兔抗ICAM-1多克隆抗体、兔抗TNF- $\alpha$ 多克隆抗体、兔抗IL-6多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 小鼠抗NF- $\kappa$ B mAb, 兔和小鼠SP试剂盒均购自北京中山生物技术公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 肝抗原制备:** 取同种系小鼠25只, 脱颈致死. 取出肝脏置冰上, 将肝组织剪碎, 生理盐水反复冲洗除去血液, 与等量的生理盐水在冰水中进行匀浆, 匀浆后行超声粉碎, 使肝细胞内蛋白质充分释出. 将匀浆以1500 r/min离心10 min, 取上清然后以超速离心机以3400 r/min离心1 h, 取上清液, 即含肝抗原, 称S-100抗原. 此抗原用前新制备较好。

**1.2.2 分组与实验:** 全部小鼠称质量后随机分为

两组, 对照组和模型组, 每组20只. 对照组小鼠于实验d 1、7、14、21分别ip 0.5 mL的生理盐水与等量的弗氏完全佐剂的充分乳化液1 mL, 模型组动物注射0.5 mL的肝抗原(S-100)与等量的弗氏完全佐剂的充分乳化液1 mL. d 28对所有小鼠摘眼球取血, 以备测ALT、AST、A(白蛋白)、G(球蛋白); 取肝左叶40 g/L甲醛固定, 用于HE染色和NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6的免疫组织化学染色. -

**1.2.3 血清和肝组织指标检测:** 血清ALT、AST、A、G的测定采用生化法. 采用HE染色观察肝组织病理损伤. NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6免疫组织化学染色采用SP法, 按试剂盒说明进行操作。

**统计学处理** 所有数据以mean $\pm$ SD表示, 组间比较用 $t$ 检验.  $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般情况** 正常组小鼠运动活跃, 精神进食好, 毛浓密光亮. 模型组小鼠随实验进行变得反应迟缓、少动, 常做萎靡状, 弓背喜卧, 进食欠佳, 毛稀疏干燥, 粗乱蓬松。

**2.2 肝脏肉眼观察** 对照组, 肝脏呈红褐色, 表面光滑, 质地柔软, 边缘锐利; 模型组, 肝脏呈深红色, 表面可见白色斑点, 质地较脆, 边缘变钝。

**2.3 小鼠血清ALT、AST、A和G含量** 模型组血清ALT、AST、G含量显著高于对照组, A含量低于对照组, 两者比较均有显著性差异( $P < 0.01$ , 表1)。

**2.4 肝损伤的病理改变** 正常对照组肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状排列, 肝小叶结构清晰, 肝细胞间联系紧密; 肝细胞核大而圆, 核仁明显, 胞质丰富均匀, 汇管区无炎症浸润, 结构清晰可见(图1A). 模型组肝细胞片状损伤坏死, 主要见于中央静脉和汇管区, 坏死区和血窦中有炎性细胞浸润, 肝血窦充血扩张, 部分细胞有脂肪变性, 部分细胞核呈花瓣样改变, 部分核碎裂(图1B)。

**2.5 肝组织中NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达** 对照组中未观察到NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达, 而模型组中均有阳性表达. NF- $\kappa$ B主要表达于汇管区和中央静脉周围的肝细胞胞核中, 呈棕褐色, 胞质也有表达(图2A). ICAM-1部分表达在中央静脉及汇管区肝细胞坏死周围的肝细胞胞质中, 呈棕褐色颗粒(图2B). TNF- $\alpha$ 以中央静脉及汇管区周围肝细胞阳性表

### ■ 相关报道

近年来研究表明, 在缺血-再灌注、刀豆素A及CCl<sub>4</sub>等所致肝损伤中NF- $\kappa$ B表达均明显上调, 并促进多种炎症介质的转录表达, 加重肝损伤. 俞卫锋 *et al*证实, 抑制肝组织中NF- $\kappa$ B的活性对缺血-再灌注早期供肝损伤有保护作用. Ledebur *et al*研究发现, 活化的NF- $\kappa$ B可诱导细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的基因转录. NeubauerK *et al*研究表明在CCl<sub>4</sub>诱导的急性肝损伤中, ICAM-1的表达明显上调, 48 h后主要表达在肝细胞坏死区域, 且ICAM-1表达强弱与肝细胞坏死程度密切相关, 并认为ICAM-1的上调和炎症细胞的集聚可能是其致肝损伤的关键。



### ■应用要点

本文通过建立小鼠自身免疫性肝炎模型,探讨NF- $\kappa$ B及其调控的炎症因子在AIH发病中的作用及自身免疫性肝炎肝损伤机制,有可能对其治疗开辟新的途径,为自身免疫性肝炎的发病机制研究提供新的思路。

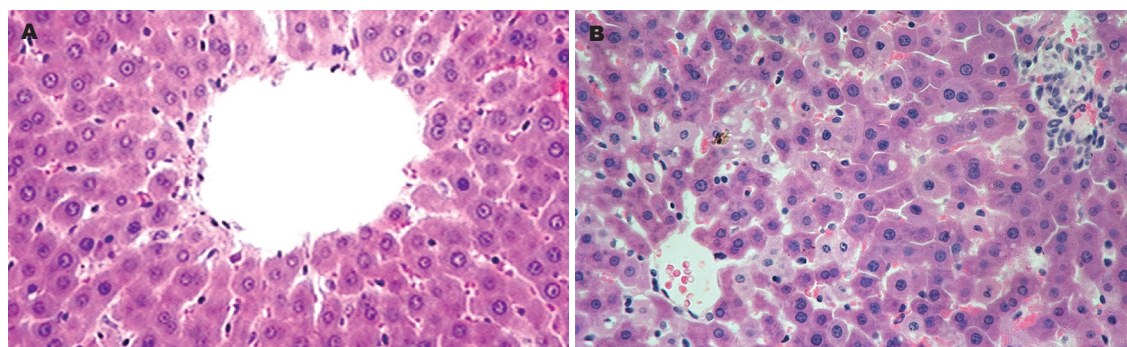


图1 小鼠肝脏HE染色(H&E × 200). A: 对照组; B: 模型组.

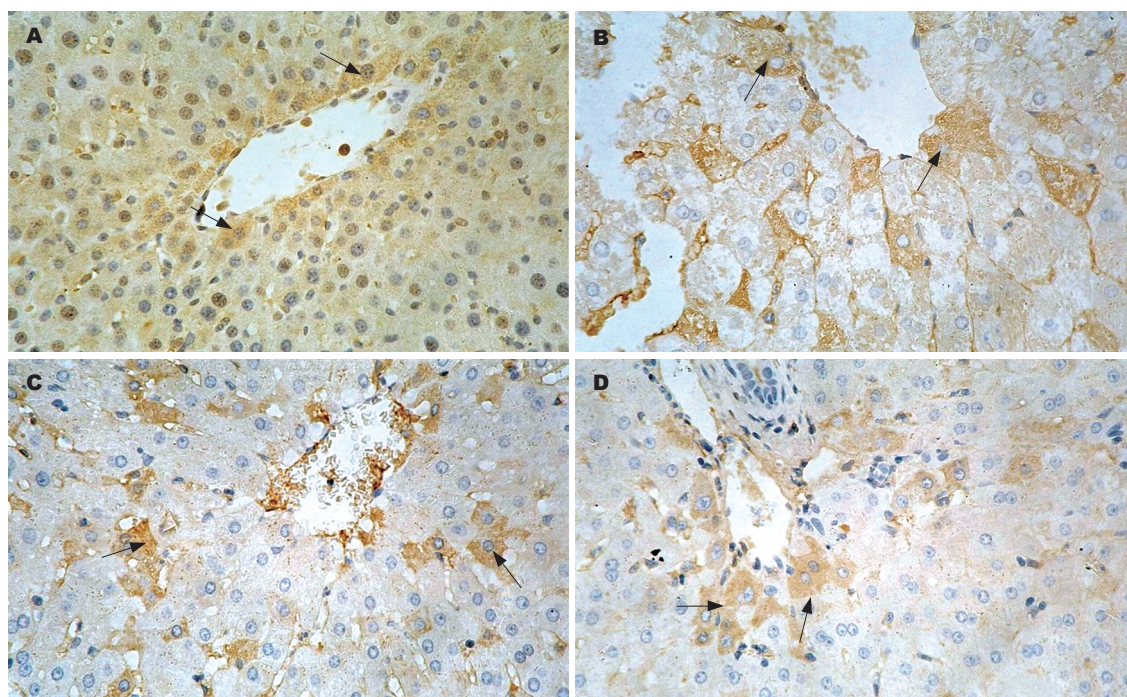


图2 小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B及其调控产物的阳性表达(SP × 200). A: NF- $\kappa$ B; B: ICAM-1; C: TNF- $\alpha$ ; D: IL-6.

表1 小鼠血清ALT、AST、A和G含量(mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	A(g/L)	G(g/L)
对照组	20	42.72 ± 9.59	167.85 ± 9.56	36.83 ± 2.64	22.87 ± 2.76
模型组	19	147.87 ± 12.35 <sup>b</sup>	433.17 ± 10.24 <sup>b</sup>	25.87 ± 2.19 <sup>b</sup>	30.64 ± 2.84 <sup>b</sup>
P值		0.001	0.001	0.001	0.001

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 对照组.

达为主,主要在胞质内,呈棕褐色颗粒,肝窦、部分单核细胞、淋巴细胞和胆管上皮细胞有弱阳性表达(图2C). IL-6部分表达在中央静脉及汇管区周围肝细胞胞质中,呈棕褐色颗粒,肝窦、部分单核细胞也有表达(图2D).

### 3 讨论

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一

种以高丙种球蛋白血症、血清自身抗体阳性、组织学检查汇管区炎症及碎屑样坏死为特征的自身免疫性疾病,早期诊断,适当治疗能延长患者生存率,提高生活质量.目前AIH发病机制尚不十分清楚.现对AIH机制的探讨大多是通过建立EAH动物模型进行.

本实验根据文献报道略加改进,采用易感动物C57BL/6小鼠,以同种系小鼠肝抗原

S-100与弗氏完全佐剂充分乳化后, 4次腹腔免疫即诱导出实验性自身免疫性肝炎。研究表明<sup>[13]</sup>EAH是由T淋巴细胞引起的肝抗原特异性自身免疫反应模型, 并且在发病中T细胞反应先于肝组织学变化和ALT升高, 说明T细胞在介导肝细胞坏死时的重要作用。

NF- $\kappa$ B是真核细胞中普遍存在的一种转录因子, 活化后可激活多种相关基因的转录表达。在正常细胞中, NF- $\kappa$ B与其抑制蛋白I $\kappa$ B结合, 存在于胞质中, 当细胞受到外界刺激时如病毒、细菌感染、紫外线照射、氧化应激等, I $\kappa$ B被迅速磷酸化, 释放NF- $\kappa$ B使之转入胞核内, 结合于特定的 $\kappa$ B序列, 启动和调节众多与免疫、炎症反应有关的基因转录, 其中包括TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ 、粒/巨噬细胞集落刺激因子(GCSF)、IL-6、ICAM-1等。而NF- $\kappa$ B通过调控他们的转录过程, 直接参与肝脏的急性和慢性炎症。

ICAM-1是免疫球蛋白IgG超家族的细胞黏附糖蛋白, 通过与配体淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)结合, 介导白细胞迁移和黏附。大量白细胞聚集造成微循环障碍, 通过呼吸爆发产生大量氧自由基, 破坏生物膜, 引起或加重组织损伤。大量研究表明, 在缺血/再灌注肝损伤<sup>[4]</sup>、酒精性肝病<sup>[5]</sup>、自身免疫性肝病与肝纤维化<sup>[6]</sup>中, ICAM-1在肝细胞及肝窦内皮细胞上的表达均明显上调。

TNF- $\alpha$ 、IL-6均为致炎细胞因子, 是炎症的重要介质, 能刺激T、B细胞、NK细胞、单核细胞等使其功能活性增强, 并与抗原改变了的肝细胞膜成分发生反应, 造成肝细胞坏死, 转氨酶升高。有研究显示<sup>[7]</sup>, 慢性肝病患者血清TNF- $\alpha$ 、IL-6水平显著高于对照组, 其水平随病情加重而升高, 随病情好转而降低, 提示TNF- $\alpha$ 、

IL-6水平可作为肝功能受损的指标, 动态测定血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平有利于监测病情。

本实验在引发小鼠自身免疫性肝损伤时, 肝脏NF- $\kappa$ B活性及ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6含量显著增加, 这表明NF- $\kappa$ B有调控S-100引起的免疫反应和细胞因子表达的作用, 并参与自身免疫性肝炎肝损伤的发病过程。这些细胞因子之间构成复杂的分子网络, 在肝脏疾病的发生与发展过程中和肝功能变化方面可能起着重要的作用。降低NF- $\kappa$ B活性可能减轻免疫反应和细胞因子过度表达引起的肝损伤, 是一种治疗自身免疫性肝炎的方法。

#### 4 参考文献

- 1 Nemeth ZH, Hasko G, Vizi ES. Pyrrolidine dithiocarbamate augments IL-10, inhibits TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , IL-12, and nitric oxide production and protects from the lethal effect of endotoxin. *Shock* 1998; 10: 49-53
- 2 Liu SL, Degli Esposti S, Yao T, Diehl AM, Zern MA. Vitamin E therapy of acute CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. *Hepatology* 1995; 22: 1474-1481
- 3 Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-6
- 4 Weigand MA, Plachky J, Thies JC, Spies-Martin D, Otto G, Martin E, Bardenheuer HJ. N-acetylcysteine attenuates the increase in alpha-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation* 2001; 72: 694-698
- 5 Nanji AA, Griniuvienė B, Yacoub LK, Fogt F, Tahan SR. Intercellular adhesion molecule-1 expression in experimental alcoholic liver disease: relationship to endotoxemia and TNF alpha messenger RNA. *Exp Mol Pathol* 1995; 62: 42-51
- 6 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
- 7 陈军政, 胡波. 病毒性肝炎患者血清TNF- $\alpha$ 、IL-6的水平变化. *检验医学* 2004; 19: 167

编辑 李军亮 电编 何基才

#### ■同行评价

本文创新性较差, 国内外同类研究性文章较多, 文字表达较为简单。