

α -2a干扰素对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响及意义

席文娜, 孙水林, 李方春, 罗杰, 肖影群, 章萍, 张伟

席文娜, 孙水林, 张伟, 南昌大学第二附属医院感染科 江西省南昌市 330006

李方春, 江西省丰城市人民医院感染科 江西省丰城市 331100

罗杰, 江西中医学院科技学院 江西省南昌市 330006

肖影群, 章萍, 南昌大学附属感染病医院病理科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本课题由孙水林与罗杰设计; 研究过程由席文娜、肖影群、章萍、李方春及张伟共同操作完成; 数据分析由席文娜完成; 论文写作由席文娜与孙水林共同完成。

通讯作者: 孙水林, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院感染科. sunshuilin2280@126.com

电话: 0791-6291817

收稿日期: 2009-08-07 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Effects of IFN α -2a on *bcl-2* expression in the fibrotic liver of rats

Wen-Na Xi, Shui-Lin Sun, Fang-Chun Li,
Ying-Qun Xiao, Ping Zhang, Wei Zhang

Wen-Na Xi, Shui-Lin Sun, Wei Zhang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Fang-Chun Li, Department of Infectious Diseases, the People's Hospital of Fengcheng, Fengcheng 331100, Jiangxi Province, China

Jie Luo, College of Science and Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Ying-Qun Xiao, Ping Zhang, Department of Pathology, Nanchang Infectious Disease Hospital, Affiliated to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Shui-Lin Sun, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. sunshuilin2280@126.com

Received: 2009-08-07 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of interferon α -2a (IFN α -2a) on *bcl-2* gene expression in the fibrotic liver of rats and explore potential mechanisms involved.

METHODS: Hepatic fibrosis was induced in rats by subcutaneous injection of carbon tetrachloride (CCl₄). Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, fibrosis mod-

el group and IFN α -2a intervention group. The expression of *bcl-2* gene in the liver was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Liver tissue samples were taken for conventional hematoxylin and eosin (HE) staining and reticular fiber staining to observe histological changes.

RESULTS: A rat model of liver fibrosis was successfully established. IFN α -2a treatment significantly ameliorated liver fibrosis and fatty degeneration, but showed no impact on hepatic inflammation in fibrotic rats. The expression level of *bcl-2* mRNA in the IFN α -2a intervention group was significantly lower than that in the fibrosis model group ($P < 0.01$), but higher than that in the normal control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: IFN α -2a can effectively ameliorate CCl₄-induced hepatic fibrosis and liver fatty degeneration possibly via a mechanism associated with downregulating *bcl-2* gene expression and controlling apoptosis of HSC.

Key Words: Hepatic fibrosis; Interferon α -2a; *bcl-2* gene

Xi WN, Sun SL, Li FC, Luo J, Xiao YQ, Zhang P, Zhang W. Effects of IFN α -2a on *bcl-2* expression in the fibrotic liver of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3237-3240

摘要

目的: 探讨 α -2a干扰素(IFN α -2a)对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响和对肝纤维化的作用及其机制。

方法: 将SD大鼠随机分成纤维化模型组(A组, CCl₄诱导形成大鼠肝纤维化模型), 对照组(B组)及IFN α -2a干预组(C组)。用RT-PCR法检测各组大鼠肝脏*bcl-2*的表达, 常规HE和网状纤维染色检测肝组织标本。

结果: C组纤维化程度及肝细胞脂肪变性较A组显著减轻, 但肝组织炎症改变无显著差异性。C组*bcl-2*基因蛋白表达显著低于A组($P < 0.01$), 但显著高于B组*bcl-2*基因蛋白表达

背景资料

肝纤维化是一切慢性肝病的共同病理基础, HSC是参与肝纤维化过程的重要细胞, 其活化增殖是肝纤维化发生机制的中心环节, 抑制HSC增殖, 诱导其凋亡是抗纤维化的重要策略。

同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

相关报道

Watanabe *et al*报道 IFN α 可提高MMP活性,促进ECM降解. Ninomiya *et al*认为IFN α 可以直接影响MMP及TIMP的比率,从而促进胶原的降解,使肝纤维化改善.

的量($P<0.01$).

结论: IFN α -2a能够阻断CCl₄诱导的肝纤维化和减少肝脂肪变性. 其机制与*bcl-2*基因表达有关,可能通过调节*bcl-2*基因表达与HSC凋亡,从而阻断肝纤维化和减少肝脂肪变性.

关键词: 肝纤维化; α -2a干扰素; *bcl-2*基因

席文娜, 孙水林, 李方春, 罗杰, 肖影群, 章萍, 张伟. α -2a干扰素对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3237-3240
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3237.asp>

0 引言

肝纤维化是一切慢性肝病的共同病理基础,其实质是组织发生修复反应时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成、降解与沉积不平衡而引起的病理过程^[1]. 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是参与肝纤维化过程的重要细胞,他的活化增殖是肝纤维化发生机制的中心环节,抑制HSC增殖,诱导其凋亡是抗纤维化的重要策略^[2-3].

α -干扰素(interferon α , IFN α)能直接抑制ECM形成,对已经形成的肝纤维化,使ECM降解是抗肝纤维化的重要策略^[4-6]. IFN α 可提高基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)活性,促进ECM降解^[7]. IFN α 可以直接影响MMP及组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)的比率,从而促进胶原的降解,使肝纤维化改善^[8]. 但IFN α 是否能通过细胞凋亡通路阻断肝纤维化,目前报道少见.

本研究旨在观察IFN α -2a对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响,以探讨IFN α -2a对肝纤维化的作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠, δ , 体质量 250 ± 20 g,由南昌大学医学院动物科学部提供. 总RNA提取试剂盒(北京天根公司), 逆转录酶, PCR试剂(上海Promega公司), 引物设计参考文献[9], 借助Pubmed Nucleotide获取目的基因全序列, 验证参考文献引物. PCR引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成. IFN α -2a由长春长生基因药业股份有限公司生产.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 实验大鼠随机分为3组. 纤维化模型组(A组, $n=15$): 按0.3 mL/100 g皮下注射

50% CCl₄(用花生油稀释), 每周2次, 共8 wk; 对照组(B组, $n=10$): 以等量生理盐水皮下注射, 每周2次, 共8 wk; IFN α -2a组(C组, $n=15$): 在用CCl₄建立肝纤维化模型的同时隔日肌肉注射IFN α -2a 6×10^4 U/(kg \cdot d), 共8 wk. 在实验结束时, 总共8只大鼠死亡, 其中A组5只, C组3只. 其余大鼠处死前12 h禁食禁水, 用10%戊巴比妥麻醉大鼠.

1.2.2 取材及染色: 在无茵条件下迅速剪切50-100 g肝脏尾状叶组织, 放入无茵弯盘, 剪成碎块, 用无茵PBS液冲洗2-3次, 再放入RNAstore液, -20 $^{\circ}$ C冷藏提取RNA用. 剩余肝脏组织用100 g/L甲醛固定, 石蜡切片用于检测项目. HE染色: 经100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋切片处理后制成4 μ m厚连续切片6张, 切片面积约1 cm \times 1 cm, 常规HE染色. 特殊染色: 网状纤维染色.

1.2.3 *bcl-2* mRNA检测: 采用RT-PCR技术, 设置 β -actin为内对照, 引物序列: β -actin: 上游: 5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3', 下游: 5'-AAAGAAAGGGTGTA AAA CGCA-3'(扩增产物为462 bp); *bcl-2*: 上游 5'-CGGGAGAACAGGGTATGA-3'; 下游5'-CA GGCTGGAAGGAGAAGAT-3'(扩增产物为149 bp). PCR反应参数: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性35 s, 52 $^{\circ}$ C退火35 s, 72 $^{\circ}$ C延伸35 s, 30循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min.

1.2.4 结果判定: 将RT-PCR产物在15 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳, 用BANDLEAD系统测量扩增条带辉度值, 以*bcl-2*/ β -actin的比值分别表示*bcl-2*的相对水平, 并进行统计学处理.

统计学处理 所有指标均用mean \pm SD表示, 采用SPSS16.0统计软件进行方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 病理学改变 纤维化模型组肝组织纤维化程度明显, 表现为肝细胞结构紊乱, 广泛肝细胞脂肪变性, 坏死及弥漫的纤维间隔形成, 但肝组织炎症轻度(图1A, 图2A); IFN α -2a干预组肝细胞脂肪变性及肝纤维化程度较模型对照组显著减轻, 肝组织炎症也为轻度, 较纤维化模型组无显著差异性(图1B, 图2B); 对照组可见炎症不明显, 极少数芒状纤维形成(图1C, 图2C).

2.2 Bcl-2蛋白表达 纤维化模型组、对照组、IFN α -2a干预组*bcl-2*/ β -actin相对吸光度比值分别为 0.98 ± 0.03 、 0.86 ± 0.03 、 0.96 ± 0.02 . IFN α -2a干预组*bcl-2*基因蛋白表达显著低于纤

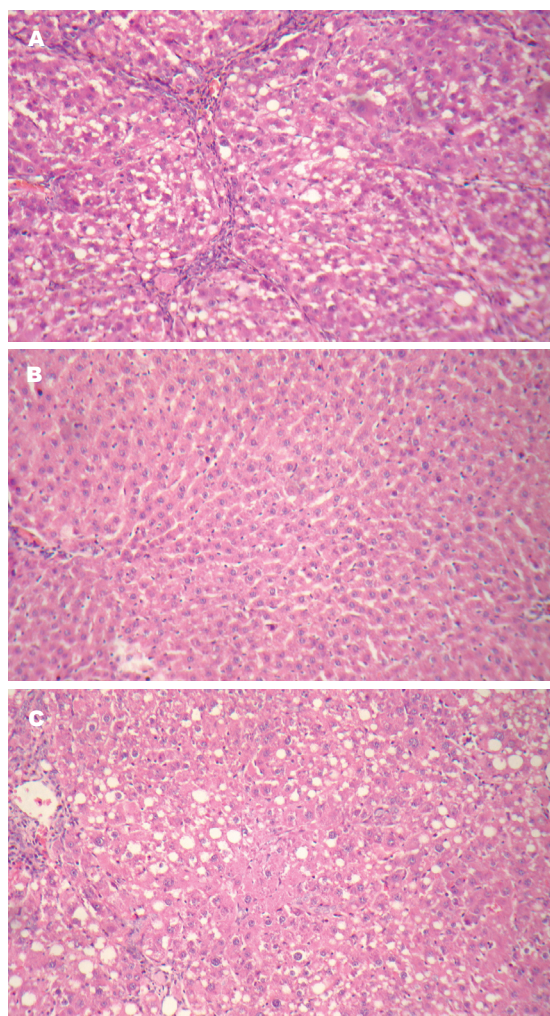


图 1 肝组织病理学改变(HE × 100). A: 纤维化模型组; B: 对照组; C: IFN α -2a干预组.

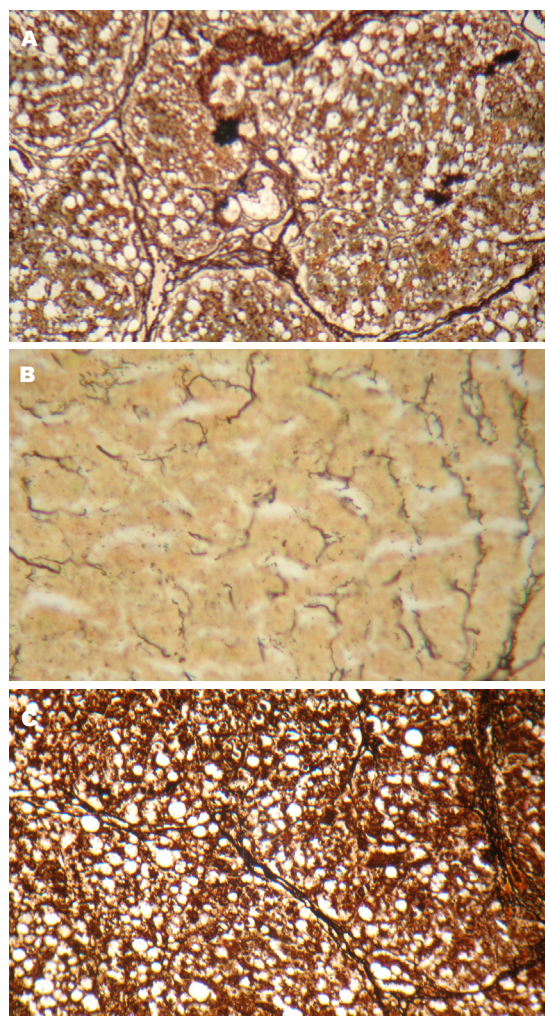


图 2 肝组织病理学改变(网状纤维染色 × 100). A: 纤维化模型组; B: 对照组; C: IFN α -2a干预组.

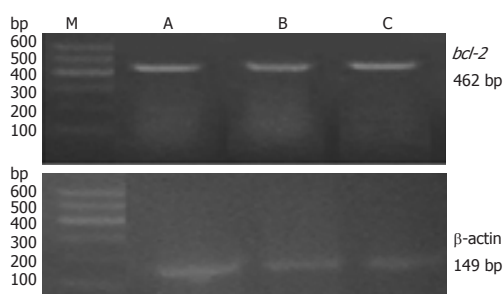


图 3 各实验组肝组织 β -actin和**bcl-2**基因蛋白表达. M: 100 bp DNA Marker; A: 纤维化模型组; B: 对照组; C: IFN α -2a干预组.

纤维化模型组($P < 0.01$); 对照组**bcl-2**基因蛋白表达显著低于纤维化模型组和IFN α -2a干预组(均 $P < 0.01$, 图3).

3 讨论

目前国内外研究表明肝纤维化的发病机制和HSC凋亡密切相关, 研究HSC与肝纤维化的内在

创新点
IFN α 是否能够通过细胞凋亡通路阻断肝纤维化, 目前报道少见. 本研究旨在观察IFN α -2a对大鼠肝组织**bcl-2**基因表达的影响, 以探讨IFN α -2a对肝纤维化的作用及其机制.

联系, 对预防肝纤维化有着重要的临床意义. 近年发现, **bcl-2**为一种细胞凋亡抑制基因. HSC是否发生凋亡主要受**bcl-2**家族的调控. 其中**bcl-2**是最重要的抗凋亡因子. 在慢性肝病的研究中发现**bcl-2**过表达^[10]; 在肝纤维化时, HSC凋亡障碍与**bcl-2**表达上调导致细胞对CD95等凋亡信号敏感性降低有关^[11]; **bcl-2**在人肝纤维化过程中呈过表达, 导致HSC持续活化, 这也是慢性肝病迁延难愈的原因之一^[10-11].

IFN α 抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用已人所共知, 国内外学者也逐渐公认IFN α 有预防肝纤维化形成的作用^[5]. IFN α 抗纤维化的机制是通过抗病毒、抗炎作用减少对肝纤维化形成细胞的刺激^[12], 还是通过促进肝内ECM降解^[7], 或者通过细胞凋亡途径具有抗肝纤维化作用. 目前具体机制尚不十分透彻. 该研究旨在观察IFN α -2a对大鼠肝组织**bcl-2**基因表达的影响, 以探讨IFN α -2a对肝纤维化的作用及其机制.

同行评价
本研究设计合理,
可为干扰素 α -2a
抗肝纤维化作用
机制提供参考,具
有一定可读性。

本实验结果表明对照组仅见极少数芒状纤维形成, IFN α -2a干预组和纤维化模型组纤维化明显, 但IFN α -2a干预组纤维化程度较纤维化模型组显著减轻, 提示IFN α -2a能够阻断CCl₄诱导的肝纤维化。对照组肝组织炎症不明显, IFN α -2a干预组和纤维化模型组炎症均为轻度, 并无显著差异性。提示IFN α -2a阻断由CCl₄引起的肝纤维化并不是直接通过抗炎作用实现, 可能存在其他途径。细胞凋亡途径也许起了至关重要的作用, 因为实验中发现, 纤维化模型组肝组织中**bcl-2**基因表达最强, 对照组**bcl-2**基因表达最弱, 而IFN α -2a干预组肝组织中**bcl-2**基因的表达介于两者之间, 有显著差异性($P<0.01$)。IFN α -2a干预组显著抑制了肝纤维化肝组织中**bcl-2**基因的表达。由此可见, 随着肝纤维化程度加重, **bcl-2**基因的表达也增强。有研究认为**bax/bcl-2**基因表达比值与肝纤维化程度正相关^[13]。Novo *et al*^[11]认为激活的人HSC对大多数预凋亡刺激抵抗都归咎于**bcl-2**的过度表达。这种特征在肝脏疾病纤维化进程中也起着至关重要的作用。可见, **bcl-2**基因的表达在肝纤维化发生发展中起了重要的作用。因此, 我们认为IFN α -2a可能通过调节**bcl-2**基因表达, 从而阻断CCl₄诱导的肝纤维化, 但IFN α -2a又是如何通过调节**bcl-2**基因表达阻断肝纤维化的呢? 有报道IFN α 通过抑制HSC和胶原的激活来阻断由猪血清诱导的大鼠肝纤维化^[14]; IFN α 能够抑制转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)的表达, 减少HSC的激活和刺激他的凋亡^[15]。这些资料均提示IFN α 抗纤维化的作用与HSC凋亡密切相关。因此, 我们认为IFN α -2a可能通过调节**bcl-2**基因表达, 调控HSC凋亡, 阻断CCl₄诱导的肝纤维化。研究中还发现, IFN α -2a干预组肝细胞脂肪变性减少, 提示IFN α -2a能够减少由CCl₄的肝脂肪变性, 其机制尚未见报道, 可能也与**bcl-2**基因密切相关, 具体机制还有待于进一步研究。

总之, IFN α -2a能够阻断CCl₄诱导的肝纤维化和减少肝脂肪变性。其机制与**bcl-2**基因表达有关, 可能通过调节**bcl-2**基因表达, 调控HSC凋亡, 从而阻断肝纤维化和减少肝脂肪变性。

参考文献

- 1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 2 李石. 肝纤维化发生机制. 中华消化杂志 1999; 19: 48-50
- 3 王丽辉, 童坦君. 神经生长因子. 生物化学与生物物理进展 1992; 19: 29
- 4 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 5 Okazaki I, Watanabe T, Inagaki Y. [Recent advance in understanding mechanisms of fibrogenesis and fibrolysis in hepatic fibrosis] *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2002; 99: 353-364
- 6 Brenard R. Practical management of patients treated with alpha interferon. *Acta Gastroenterol Belg* 1997; 60: 211-213
- 7 Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001; 35: 465-473
- 8 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakaji M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon-alfa in chronic hepatitis C patients. *Intervirology* 2001; 44: 227-231
- 9 Cheng Y, Ping J, Xu LM. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 794-801
- 10 Mutluay R, Ozenirler S, Poyraz A. The expression of bcl-2 in chronic liver diseases. *Saudi Med J* 2005; 26: 1245-1249
- 11 Novo E, Marra F, Zamara E, Valfrà di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RS, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006; 55: 1174-1182
- 12 Maria Elzbieta SL, Marek LD. Histological outcome of chronic hepatitis B in children treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7179-7182
- 13 李继强, 柳恽, 刘文忠, 马雄, 朱红音, 陈晓宇, 彭延申. 依那普利对肝组织bax和bcl-2基因表达的影响. 中华消化杂志 2006; 26: 539-543
- 14 Wu CS, Piao XX, Piao DM, Jin YR, Li CH. Treatment of pig serum-induced rat liver fibrosis with Boschniakia rossica, oxymatrine and interferon-alpha. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 122-126
- 15 Chang XM, Chang Y, Jia A. Effects of interferon-alpha on expression of hepatic stellate cell and transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2634-2636

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕