

• 论著 •

p38MAPK 介导的 TGF- β 1 与 BMP-7 在泡型肝包虫病纤维化中的表达^{*}

李栋^{1,2} 朱海宏² 陈敏^{1,2} 杨效²

(1. 成都京东方医院, 四川 成都 610200; 2. 青海省人民医院, 青海 西宁 810000)

【摘要】 目的 探讨 p38、TGF- β 1、BMP-7 在泡型肝包虫病患者中不同纤维化程度肝组织中的基因表达差异及意义。方法 收集 2017 年 9 月~2018 年 11 月青海省人民医院包虫病区确诊的 40 位泡型肝包虫病患者术后切除肝组织, 采集部位为距病灶边缘、距病灶 2 cm 内、距病灶 > 2 cm 的肝脏组织。根据 HE 染色及 Masson 染色结果, 按照 knodell 肝纤维化评分标准, 将不同部位的标本纤维化分级, 通过 RT-PCR 检测 p38、TGF- β 1 和 BMP-7 在各级纤维化组中的表达。结果 TGF- β 1 在 S1、S2 及 S3 组中相对表达量比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。p38 在 S1、S2 及 S3 组中相对表达量比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。BMP-7 在 S、S2 及 S3 组中相对表达量比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。p38 与 TGF- β 1 的相对表达量呈正相关 ($r = 0.566, P < 0.01$)。BMP-7 与 TGF- β 1 的相对表达量呈负相关 ($r = -0.349, P < 0.05$)。结论 TGF- β 1 可通过 p38MAPK 介导通路转导 TGF- β 1 生物信号而发挥促纤维化生物效应; BMP-7 在泡型肝包虫纤维化肝组织中异常表达与 TGF- β 1 之间可能存在某种动态平衡关系, 表达失衡可能加剧泡肝纤维化的演化发展。

【关键词】 泡型肝包虫病; 肝纤维化; 转化生长因子 β 1; 人骨形态发生蛋白 7

【中图分类号】 R532.32; R575 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.04.011

Expression of P38 MAPK-mediated TGF- β 1 and BMP-7 in fibrosis of vesicular liver echinococcosis

LI Dong^{1,2}, ZHU Haihong², CHEN Min^{1,2}, YANG Xiao²

(1. Chengdu BOE Hospital, Chengdu 610200, China; 2. Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the gene expression of P38, TGF- β 1 and BMP-7 in liver tissues of patients with vesicular liver echinococcosis and their significance. **Methods** From September 2017 to November 2018, 40 patients with vesicular hepatic echinococcosis diagnosed in the echinococcosis area of Qinghai Provincial People's Hospital were collected for postoperative liver tissue resection. The collection sites were liver tissue from the edge of the lesion, within 2 cm from the lesion, and > 2 cm from the lesion. According to HE staining and Masson staining results, according to Knodell liver fibrosis scoring standard, the fibrosis of samples in different parts were graded, and the expressions of P38, TGF- β 1 and BMP-7 in different fibrosis groups were determined by RT-PCR. **Results** The relative expression levels of TGF- β 1 in S1, S2 and S3 groups were (6.74 ± 2.36), (8.97 ± 2.60) and (11.57 ± 2.22), respectively, with statistical significance ($P < 0.05$). The relative expression levels of P38 in S1, S2 and S3 groups were (3.92 ± 1.80), (6.51 ± 3.16) and (9.26 ± 2.84), respectively, with statistical significance ($P < 0.05$). The relative expression levels of BMP-7 in S, S2 and S3 groups were (5.58 ± 1.52), (8.79 ± 2.41) and (3.91 ± 1.59), respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression level of TGF- β 1 was positively correlated with P38 ($r = 0.566, P < 0.01$). The relative expression level of TGF- β 1 was negatively correlated with BMP-7 ($r = -0.349, P < 0.05$). **Conclusion** TGF- β 1 can promote liver fibrosis by transduction of TGF- β 1 biological signal through p38MAPK

基金项目: 青海省卫计委重点课题项目基金资助(2018-wjzd-01)

通信作者: 朱海宏, E-mail: zhuhaiahong1214@126.com

引用本文: 李栋, 朱海宏, 陈敏, 等. p38MAPK 介导的 TGF- β 1 与 BMP-7 在泡型肝包虫病纤维化中的表达[J]. 西部医学, 2022, 34(4): 525-529.

DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.04.011

mediated pathway. There may be a dynamic equilibrium relationship between the abnormal expression of BMP-7 and TGF- β 1 in the liver tissue of vesicular liver hydatid fibrosis, and the imbalance of expression may aggravate the evolution and development of vesicular liver fibrosis.

【Key words】 Vesicular liver hydatid; Liver fibrosis; TGF- β 1; BMP-7

泡型肝包虫病是一种慢性的寄生虫感染性肝脏疾病,大多数患者分布于西北牧区,主要是因为食用生食而导致多房棘球蚴感染^[1-3],在我国其发病率受地域影响较重。在临床工作中可见部分患者病灶周边肝脏发生纤维化,影响肝脏术后代偿功能,降低预后效果。目前国内外对肝纤维化的研究主要集中在炎性刺激因子^[4-6]如肿瘤坏死因子、白细胞介素等,其中转化生长因子 β 1 (Transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 的致肝纤维化作用也基本达成共识,其可启动肝星状细胞的活化,促使肝星状细胞转化为成纤维细胞,进而分泌大量细胞外基质,细胞外基质的病态积累引发肝纤维化形成^[7-8]。有相关研究^[9-11]显示,在乙肝病毒、酒精性肝炎导致的肝纤维化中,丝裂原活化蛋白激酶所属的 p38MAPK 信号通路发挥了明显的促肝纤维化功效,其可将真核细胞胞外分子信号转至胞内引起细胞反应,在细胞生长、增殖、分化和凋亡等细胞反应的传导中起重要作用,另外可通过传递 TGF- β 1 的生物学信号而发挥功能。人骨形态发生蛋白 7 (Bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 属转化因子超家族成员,其具有较强的成骨作用外^[12]。有研究^[13-15]显示 BMP-7 在心肌及肾脏纤维化中发挥了重要的抗纤维化作用,其可影响 TGF- β 1 的致纤维化作用。因此本课题组将目标锁定在 p38MAPK、TGF- β 1、BMP-7 的研究上,通过完善基础机制研究进一步反馈临床应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入 2017 年 9 月~2018 年 11 月在青海省人民医院诊疗的 40 位患有泡型肝包虫病患者。病例均为病检明确诊断患者,排除其他理化因素导致的肝脏纤维化患者及不同类型肝炎患者。收集术后切除下的肝脏标本。标本厚度一般超过 0.5 cm,一份行经行染色,另一份液氮中迅速冷冻后转移至 -80℃ 冰箱予以保存。样本采集经过患者知情同意,并经过医院伦理委员会批准。

1.2 仪器 台式常温/低温离心机、移液枪、超净工作台、-80℃ 低温冰箱 (美国 Thermo Forma 公司),快速混匀器、液氮罐 10 L、高压灭菌锅、研磨碗/研磨杵 (常州申光仪器有限公司),恒温箱 (华电公司),PCR 仪、Nanodrop2000 浓度检测仪、热循环仪 (Roche 公司),超纯净水器、切片机、显微镜、载玻片。

1.3 试剂 液氮 (西宁液氮公司),细胞裂解液 Trizol、DEPC 水、逆转录试剂盒、无水乙醇、4% 甲醛、石蜡、氯仿、异丙醇、二甲苯、PCR 引物 (生信),HE 及 Masson 染色剂盒 (莱宝生物公司)。

1.4 实验分组 根据采集部位分为病灶组 (病灶边缘)、距病灶边缘 ≤ 2 cm 组 (距病灶边缘 ≤ 2 cm) 和距病灶边缘 > 2 cm 组 (距病灶边缘 > 2 cm)。按照 HE 及 Masson 染色结果,对上述三组标本进行纤维化分级,分级标准 knodell^[16] (表 1)。将纤维化分级标本进一步分为 S0 纤维化组、S1 纤维化组、S2 纤维化组、S3 纤维化组。其中 S0 组既无明显纤维化组设为实验对照组, S1、S2、S3 三组分别设为目标组。

表 1 knodell 分级标准
Table1 Knodell grading standard

评分 (分)	分组	Knodell
0	S0 纤维化组	肝脏组织无明显纤维化发生
1	S1 纤维化组	汇管区较正常肝组织增大
2	S2 纤维化组	多数汇管区有纤维化发生偶有短纤维间隔
3	S3 纤维化组	桥样纤维化 (P-P 和/或 P-C) 显著,偶有小结节形成
4	S4 纤维化组	肝硬化

1.5 HE 染色及 Masson 染色 根据 HE 染色及 Masson 染色试剂盒说明书操作步骤,按照顺序逐步完成染色,随后显微镜观察各组标本染色情况。

1.6 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平 将在液氮中冷冻标本研磨成细粉状后,加入细胞裂解液然后放置 10 min;在 4℃ 低温环境下经 12000 转离心 10 min,将上清转移到无酶离心管中,在离心管中加入 200 μ L 氯仿,密封完毕后,混合均匀,室温静置 5 min,再次 12000 r, 15 min, 4℃ 离心处理,离心完毕后,目标 RNA 大部分溶解在水相层中,小心吸取 500 uL 无色水相层移入 1.5 mL 无酶离心管,加入相同体积异丙醇,放置 20 min,再次离心处理,弃除上清液,保留沉淀,加入 75% 乙醇,洗涤杂质。RNA 质量及浓度检测:利用分光光度计检验 RNA 浓度及纯度是否合格。总体积:20 μ L (RNA 6.0 μ L、5 $\times$ Fastking-RT Super-Mix 4.0 μ L、ddH₂O 10.0 μ L)。42℃ 15 min 去除基因组及反转录反应、95℃ 3 min 酶灭活。扩增反应及条件:2 $\times$ SuperReal Color PreMix 10.0 μ L、正向引物 0.6 μ L、反向引物 0.6 μ L、cDNA 模板 1.0 uL、

ddH₂O 7.8 μ L。引物序列(TGF- β 1: 正向 5'-ttggcct-gccaaacgacttcgg-3', 反向 r5'-cgcgcgggatagcgtcct-3'; P38: 正向 5'-tccaaaggctactccgaatc-3', 反向 5'-tggttcaggtaaaggtgagc-3'; BMP-7: 正向 5'-GTGGT-CAACCCTCGGCACA-3', 反向 5'-GGCGTCTTG-GAGCGATTCTG-3') miRNA 扩增(预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 min; 变性, 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 退火 62 $^{\circ}$ C 30 s)。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

1.7 统计学分析 应用软件 SPSS 22.0 进行统计分

析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, 群组间采用 Dunnett's t 检验, Welch 修正。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色及 Masson 染色结果 根据 HE 染色及 Masson 染色结果, 病灶边缘大部分为 S2 度纤维化, 距病灶边缘 < 2 cm 范围内大部分为 S1 度纤维化, 距病灶边缘 > 2 cm 肝组织主要为 S0 度纤维化既无明显纤维化的正常肝组织, 见图 1、表 2。

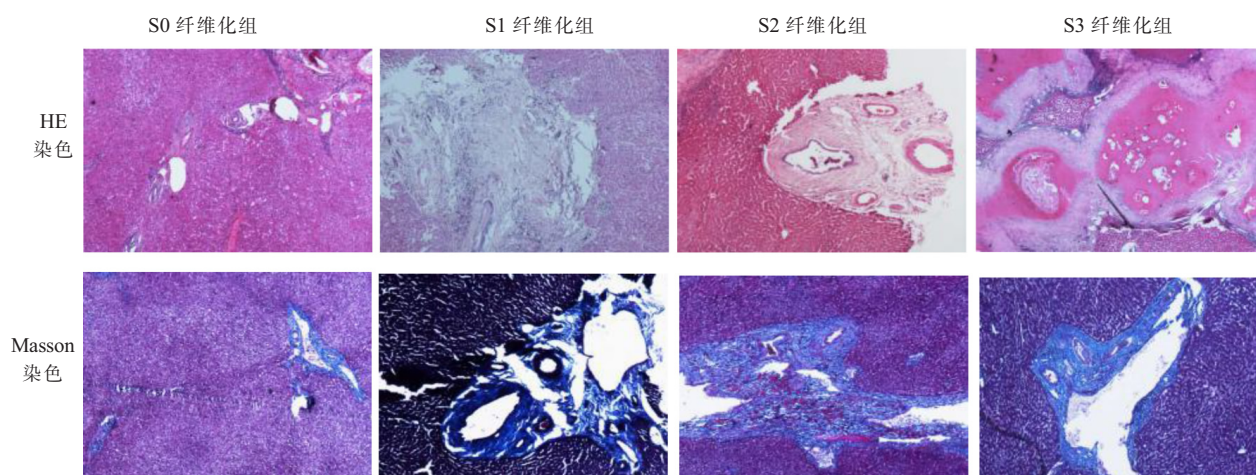


图 1 HE 染色及 Masson 染色结果(40 $\times$)

Figure 1 HE staining and Masson staining results

2.2 距病灶边缘不同距离肝组织纤维化分级 根据 HE 染色及 Masson 染色结果, 将各部位肝组织按照 knodell 标准进行肝纤维化分级, 病灶边缘大部分为 S2 度纤维化, 距病灶边缘 < 2 cm 范围内大部分为 S1 度纤维化, 距病灶边缘 > 2 cm 肝组织主要为 S0 度纤维化既无明显纤维化的正常肝组织, 见表 2。

表 2 不同部位肝组织纤维化分级(n)

Table 2 Fibrosis grading of liver tissue at different distances from the edge of lesion

取材部位	S0 纤维化组	S1 纤维化组	S2 纤维化组	S3 纤维化组
病灶边缘	0	0	32	8
距病灶边缘 < 2 cm	5	28	7	0
距病灶边缘 > 2 cm	35	5	0	0

2.3 在泡型肝包虫病纤维化肝组织中 TGF- β 1、p38、BMP-7 的相对表达情况 与 S0 纤维化组, S1、S2 及 S3 纤维化组肝组织中 TGF- β 1 的相对表达量表达升高, 随着纤维化的不断加重, 表达量逐渐显著, 在 S3 纤维化组中表达最高, 各组间表达水平比较差异具有统计学意义(P < 0.05)。p38 在 S1、S2 及 S3 纤维化

组的异常表达倾向, 与 TGF- β 1 在泡肝纤维化中的走势高度相似, 均较 S0 组表达明显, 纤维化程度越重表达量越高, 在 S3 纤维化组中表达最高, 组间差异具有统计学意义(P < 0.05)。在 S1、S2 和 S3 纤维化组中 BMP-7 的相对表达走向与 p38 及 TGF- β 1 明显不同, 表达最高为 S2 纤维化组, 在 S3 纤维化组中的表达有下降趋势, 各组间异常表达情况具有统计学意义(P < 0.05), 见表 3。

表 3 TGF- β 1、p38、BMP-7 的相对表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Relative expression of TGF- β 1, p38 and BMP-7

组别	n	TGF- β 1	p38	BMP-7
S0 纤维化组	40	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.05
S1 纤维化组	33	6.74 $\pm$ 2.36	3.92 $\pm$ 1.31	5.58 $\pm$ 1.52
S2 纤维化组	39	8.96 $\pm$ 2.60	6.51 $\pm$ 2.16	8.79 $\pm$ 2.41
S3 纤维化组	8	11.57 $\pm$ 2.22	9.26 $\pm$ 2.82	3.91 $\pm$ 1.59

2.4 TGF- β 1 与 p38 及 BMP-7 相对表达量的相关分析 通过综合分析 TGF- β 1、P38、BMP-7 在各组中相对表达量的潜在关联, 发现 TGF- β 1 与 p38 在的异常表达情况呈正性相关(r = 0.566 P < 0.01), 见图 2。

通过综合三组实验组中 TGF- β 1 与 BMP-7 的相对表达情况,发现 TGF- β 1 与 BMP-7 的异常表达量呈负性相关($r=-0.349, P<0.01$),见图 3。在泡肝纤维化

中,p38 与 BMP-7 的相对表达无相关性($r=-0.17, P>0.05$),见图 4。

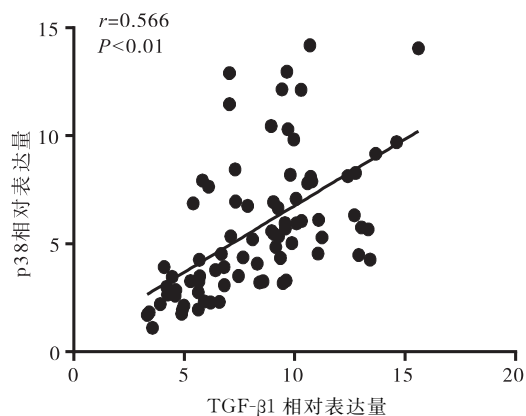


图 2 TGF- β 1 与 p38 相关性分析

Figure 2 Correlation analysis between TGF- β 1 and p38

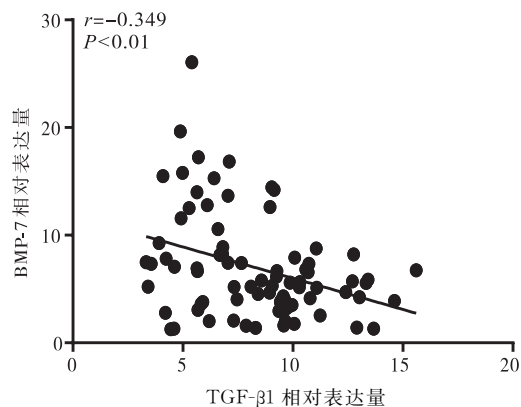


图 3 TGF- β 1 与 BMP-7 相关性分析

Figure 3 Correlation analysis between TGF- β 1 and BMP-7

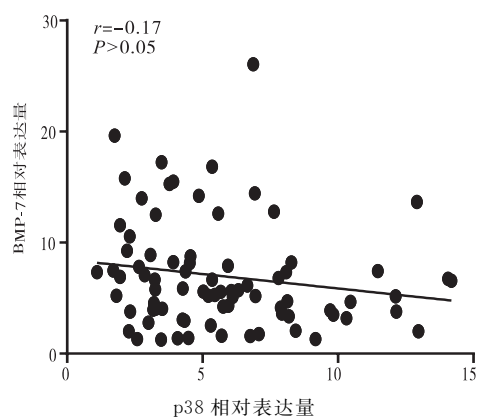


图 4 p38 与 BMP-7 相关性分析

Figure 4 Correlation analysis between p38 and BMP-7

3 讨论

目前,关于肝泡型包虫病的研究表明病灶周围肝组织存在不同程度的纤维化,有研究学者采用 HE 染色证实,在泡肝所致的纤维化中,距病灶 5 cm 范围内大部分染色结果为 S2 度纤维化,超过 5 cm 范围外的染色结果基本均为 S0 度纤维化^[17]。本课题进一步通过 HE 染色结合 Masson 染色证实发现纤维化的显著程度与病灶距离有明显的相关性,在 2 cm 范围内肝组织纤维化比较明显,大多为 S2 度纤维化。研究结果与大部分其他学者泡肝纤维化的研究类似。

本课题进一步通过检测 BMP-7、p38、TGF- β 1 在不同纤维化级别中的异常表达趋势,发现其中 p38 与 TGF- β 1 的表达走向较为类似,在各级纤维化组中均异常表达,在 S3 纤维化组中表达最为活跃,其次为 S2、S1 度纤维化组,从表达曲线上可发现,p38 与

TGF- β 1 的表达活跃度与纤维化严重程度呈正相关性。另通过进一步处理实验数据发现,p38 与 TGF- β 1 的相对表达情况成中度正相关性。通过上述实验及其他学者研究结果可推测,p38 与 TGF- β 1 在泡肝纤维化的演变中发挥了重要的促纤维化效力,TGF- β 1 生物信号的传递与 p38MAPK 介导通路息息相关^[18-19]。但进一步查找相关研究报道显示,泡球蚴分泌的囊液未展现出足够的生物效应可促进激活肝星状细胞增加 TGF- β 1 的表达及活化^[20],从而进一步推测,泡肝纤维化可能与其他类型肝纤维化有类似的发展机制,主要还是因长期理化刺激破坏肝细胞所致。BMP-7 在泡肝纤维化中较其他两个细胞因子具有明显的特征,其并非一味地随着纤维化的加重而大量表达,反而在 S2 度级纤维中表达最为突出,在 S3 及纤维化中有表达水平降低的趋势。另综合分析 BMP-7 与 TGF- β 1 的异常表达结果发现,二者间有一定程度的负相关,二者之间可能存在互相拮抗效应,BMP-7 与 TGF- β 1 之间可能存在某种相互作用的机制,一旦某种外来因素导致 TGF- β 1 的表达占优时,打破二者间的平衡变化,参与泡肝纤维化的演化。本实验通过分子维度探索泡型肝包虫纤维化的演化机制,为后续研究提供了一定潜在方向与思路。BMP-7 的生物潜力还需进一步激发探索,为肝纤维化的逆转提供可能。

4 结论

本研究显示,TGF- β 1 的促肝纤维化信号可通过 p38MAPK 介导通路可转导 TGF- β 1 生物信号而发挥促纤维化生物效应;BMP-7 在泡型肝包虫纤维化肝组

织中异常表达与 TGF- β 1 之间可能存在某种动态平衡关系,表达失衡可能加剧泡肝纤维化的演化发展。

【参考文献】

- [1] 沈舒. 泡型肝包虫病诊疗专家共识(2020 版)[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2020, 27(1): 32-37.
- [2] LIN C, CHEN Z, ZHANG L, *et al.* Deciphering the metabolic perturbation in hepatic alveolar echinococcosis: a ¹H NMR-based metabolomics study[J]. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1): 136-141.
- [3] 龙爽, 朱鹏, 宋旭彤, 等. 泡型肝包虫病的治疗进展[J]. 实用医院临床杂志, 2019, 11(1): 132-134.
- [4] SHARKAWY R E, BAYOUMI A, METWALLY M, *et al.* A variant in the MICA gene is associated with liver fibrosis progression in chronic hepatitis C through TGF- β 1 dependent mechanisms[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 14-39.
- [5] Beringer A, Miossec P. IL-17 and TNF- α co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019, 198(1): 111-120.
- [6] XIANG D M, SUN W, NING B F, *et al.* The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis[J]. *Gut*, 2017, 31(33): 92-98.
- [7] XU F, LIU C, ZHOU D, *et al.* TGF/SMAD Pathways and Its Regulation in Hepatic Fibrosis[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry Official Journal of the Histochemistry Society*, 2016, 64(3): 157-161.
- [8] 普彦淞, 都庆国, 王建华, 等. 内质网应激调节在小鼠肝纤维化中的机制[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(10): 1830-1837.
- [9] FREUND A, PATIL C K, CAMPISI J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype[J]. *Embo Journal*, 2011, 30(8): 1536-1548.
- [10] RODRIGUES N R, BATISTA J E D S, DE SOUZA L R, *et al.* Activation of p38MAPK and NRF2 signaling pathways in the toxicity induced by chlorpyrifos in *Drosophila melanogaster*: Protective effects of *Psidium guajava* pom{ifer}a L. (Myrtaceae) hydroalcoholic extract[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2019, 12(8): 490-502.
- [11] BATLLE R, ANDRÉS E, GONZALEZ L, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal-endothelial transition by p38 α through TGF- β and JNK signaling[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 30-37.
- [12] 程瑜, 施琼, 安利钦, 等. BMP7 基因沉默抑制钙盐诱导猪主动脉瓣膜间质细胞成骨分化[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 7(5): 211-216.
- [13] 谢赛阳, 邓伟, 唐其柱. 骨形态发生蛋白在心肌重构中的作用[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 77(6): 504-507.
- [14] JIN Y, CHENG X, LU J, *et al.* Exogenous BMP-7 Facilitates the Recovery of Cardiac Function after Acute Myocardial Infarction through Counteracting TGF- β 1 Signaling Pathway[J]. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2017, 244(1): 102-107.
- [15] LIU W, GU R, LOU Y, *et al.* Emodin-induced autophagic cell death hinders epithelial-mesenchymal transition via regulation of BMP-7/TGF- β 1 in renal fibrosis[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2021, 254(1): 163-170.
- [16] 秦敏. 慢性乙型肝炎肝硬化 FibroScan 测量结果与肝穿刺病理的关系[J]. 肝脏, 2019, 24(6): 674-678.
- [17] 阳丹才让, 宋戈, 张灵强, 等. I、III 型胶原蛋白在肝泡型包虫病患者肝组织中 A 的表达及意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2016, 23(10): 1209-1213.
- [18] WARDHANI B, SUNDARI N, TJANDRAWINATA R R, *et al.* Antifibrotic Activity of *Phaleria macrocarpa* Extract in Rat Liver-fibrosis Model: Focus on Oxidative Stress Markers, TGF- β 1 and MMP-13[J]. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2020, 8(A): 555-562.
- [19] 谭洁, 田霞, 韩峥, 等. miR-29b 介导的 TGF- β /Smad 信号通路对大鼠肝纤维化进程的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(1): 168-173.
- [20] 张传山, 杨舒婷, 毕晓娟, 等. 泡型包虫病患者肝脏组织 TGF- β 1 和 Gadd45 γ 基因的表达及其在肝损伤中的作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 12(9): 908-915.

(收稿日期: 2021-04-15; 修回日期: 2022-03-09; 编辑: 黎仕娟)