

OX40 在急性肝衰竭大鼠肝组织中的表达及意义

王柯尹 洪 巧 董进中 施春玮 卢明芹 陈永平

摘 要 目的 观察共刺激分子(costimulatory molecule)OX40 在急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)大鼠肝组织中表达的变化,探讨 OX40 在急性肝衰竭发病机制中的作用。**方法** 雄性 SD 大鼠,随机分为正常对照组、急性肝衰竭(ALF)模型组。急性肝衰竭组:腹腔同时注射 D-氨基半乳糖(D-GalN)800mg/kg 和脂多糖(LPS)8 微克/只,在 D-GalN 和 LPS 注射后 6、12、24、48h 4 个时间点留取大鼠血及肝脏标本。全自动生化仪检测血清 ALT、AST 水平。苏木素-伊红(HE)染色下观察肝组织变化。RT-PCR 法检测大鼠肝组织 OX40mRNA 表达。Western blot 法检测肝组织 OX40 蛋白表达。**结果** 肝衰竭组血清 ALT 和 AST 水平在 12h 升高最明显,24h 开始下降。肝衰竭组肝组织 OX40mRNA 水平至 12h 达峰值,之后逐渐下降,与对照组比较,各时间点差异具有统计学意义($F=29.970, 162.975, 62.476, 25.124, P<0.05$)。肝衰竭组 OX40 蛋白的表达于 12h 达到最大值,与对照组相比,差异有统计学意义($F=17.240, 169.298, 88.289, 74.984, P<0.05$)。**结论** OX40 在急性肝衰竭过程中呈上升趋势,于 12h 达高峰,提示 OX40 可能在急性肝衰竭过程中发挥重要作用。

关键词 肝衰竭 急性 共刺激分子 OX40

Expression of OX40 in Rats with Acute Liver Failure and Its Significance. Wang Keyin, Hong Qiao, Dong Jinzhong, Shi Chunwei, Lu Mingqin, Chen Yongping. Department of Infection Disease, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To observe the expression of costimulatory molecule OX40mRNA in liver tissues of rats with acute liver failure (ALF), and discusses for the mechanisms of OX40 in ALF. **Methods** The male SD rats were divided into two groups randomly. ALF model of SD rats was injected with D-GalN 800mg/kg and LPS 8 μ g/rat. Liver tissue and blood were collected on 6, 12, 24, 48 hours after the injection of D-GalN/LPS. Liver histopathology and fine structure of each group were observed by HE staining and electron microscope. OX40mRNA of liver tissues were determined by RT-PCR and Western blot was used to detect protein expressions of OX40. **Results** The level of ALT and AST in model group peaked at 12 hours, decreased at 24 hours. The level of OX40 peaked at 12 hours and decreased gradually. Compared with the normal group, there was significant different at different time points ($F=29.970, 162.975, 62.476, 25.124, P<0.05$). The tendency of OX40 protein expression in the model group peaked at 12 hours and the discrepancy between model group and normal group had statistical significance ($F=17.240, 169.298, 88.289, 74.984, P<0.05$). **Conclusion** The level of OX40 in ALF group tended to increase and peaked at 12 hours, which suggested that OX40 played an important role in the process of acute liver failure.

Key words Liver failure; Acute; Costimulatory molecule; OX40

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是肝细胞大面积坏死引起肝功能严重障碍所导致的综合征,并发症多,病死率高,严重危害人类健康。急性肝衰竭发病机制十分复杂,包括免疫损伤、缺血缺氧和内毒素血症等,其中免疫损伤是重要环节,一方面由 T 细胞造成的肝细胞凋亡起主要作用,另一方面免疫损伤介导局部炎症反应,产生多种炎症介质,可进一步加重肝细胞损伤^[1]。OX40 是 T 细胞-抗原递呈细胞(APC)应答过程中重要的共刺激分子,主要表达在炎

症浸润部位的 CD4⁺ T 细胞中,促进 CD4⁺ T 细胞活化、增殖、迁移,释放多种炎症因子,增强炎症效应^[2]。近年研究表明,共刺激分子表达上调可能促进并维持了肝细胞损伤的炎症过程。本实验通过观察 OX40 在急性肝衰竭大鼠肝组织中表达水平的动态变化,以探讨 OX40 与急性肝衰竭发病机制之间可能的关系。

材料与方法

1. 材料:清洁级雄性 SD 大鼠,体重 200~220g,购自中国科学院上海实验动物中心。

2. 主要药品与试剂:D-GalN 购自南通吕生物制品有限公司;脂多糖购自上海闪晶生物技术有限公司;RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒由大连宝生物公司提供;小鼠抗大鼠 OX40 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;GAPDH 抗体、二抗购

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY12H3002);温州市科技计划基金资助项目(Y20090277)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院感染科

通讯作者:卢明芹,电子信箱:LMQ0906@163.com

自北京中杉金桥公司。

3. 方法: (1) 模型建立与分组: 清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 实验前一日下午禁食, 饮水不限, 随机分为: 正常对照组 ($n = 6$); 急性肝衰竭模型组 (ALF 组, $n = 24$); D-GalN 溶于无菌生理盐水, 配成 10% 的溶液, 用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 7.0, 将 D-GalN 800mg/kg 和 LPS8 微克/只同时腹腔注射, 于注射后 6、12、24、48h 4 个时间点以 10% 水合氯醛麻醉, 门静脉采血、开腹取肝脏, 供检测使用。 (2) 肝组织病理检查: 肝组织标本用 100ml/L 甲醛固定, 逐级乙醇脱水, 石蜡包埋、切片, 经 HE 染色后普通光学显微镜下观察肝组织结构变化情况。 (3) 血清学检查: 采用全自动生化分析仪检测 ALT、AST。 (4) RT-PCR 法测定肝组织 OX40mRNA 表达: 细胞总 RNA 按照 Trizol 试剂说明书步骤提取, 用紫外线分析仪测定吸光度,

A260/A280 位于 1.8 ~ 2.0 的样本用于反转录, 取各样本 PCR 产物 5 μ l 和溴酚蓝载样缓冲液 1 μ l 混匀, 加至 1.5% 琼脂糖凝胶样品孔中, 取 Marker 2.5 μ l 作相对分子质量标准, 稳压电泳 (100V 27min), 在凝胶成像系统上成像, 用 Gel-Pro3.1 软件分析电泳条带, 以目的基因 mRNA 密度/ β -actin mRNA 密度值作为目的基因 mRNA 的相对含量, PCR 引物由上海捷瑞公司合成, 其序列及反应条件见表 1。 (5) Western blot 法检测肝组织 OX40 蛋白表达: 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜 (200mA 1h), 封闭 1h, 加入 OX40 抗体 (1: 200) 和内参照 GAPDH 抗体 (1: 500), 一抗孵育过夜 (4 $^{\circ}$ C), 加入二抗作用 1h, 加入发光试剂, 凝胶成像系统曝光, 用 BioSens SC810 软件测定各条带灰度值, 经 GAPDH 校正, 得到蛋白相对表达量。

表 1 PCR 引物序列及反应条件

引物	序列	扩增片段长度 (bp)	反应条件 (30 个循环)
OX40	5' - GGCTTCAGCAGCCACAGCA - 3'	127	94 $^{\circ}$ C 30s
	5' - CCATGGCCTGGCTGGCACTC - 3'		67 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 10s
β -actin	5' - AAATCGTGCGTGACATTAAGAG - 3'	181	94 $^{\circ}$ C 30s
	5' - AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC - 3'		61 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s

4. 统计学方法: 实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 多组样本均数比较进行方差齐性检验, 组间差异采用单因素方差分析, 方差齐性者两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 肝功能改变: 肝衰竭组 ALT 和 AST 水平在造模后 6h 开始升高, 12h 达高峰, 24h 开始下降, 与正常对照组同一时间点比较, 差异具有统计学意义 (ALT: $F = 146.228, 502.635, 743.425, 253.64, P < 0.05$; AST: $F = 1035.660, 438.113, 389.077, 254.390, P < 0.05$, 表 2)。

灶性出血, 坏死区及汇管区有大量中性粒细胞及淋巴细胞浸润。24h 后显示大量肝细胞大片坏死, 肝小叶结构模糊不清, 肝窦明显扩张充血, 残存肝细胞水肿变性 (图 1)。

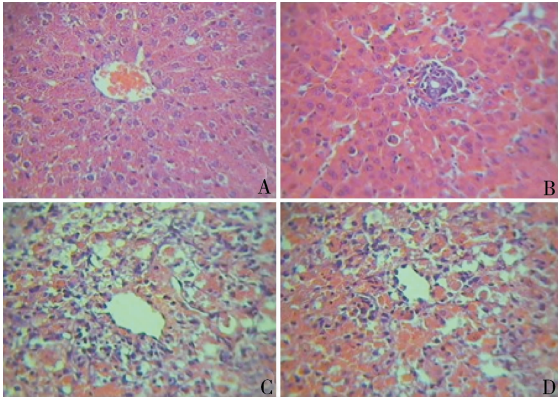


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色 ($\times 100$)

A. 正常对照组; B. 肝衰竭组 6h; C. 肝衰竭组 12h; D. 肝衰竭组 24h

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST 检测结果 ($\bar{x} \pm s, U/L$)

组别	ALT	AST
正常对照组	31.0 $\pm$ 5.6	37.2 $\pm$ 6.0
急性肝衰竭组		
6h	766.4 $\pm$ 148.9	904.5 $\pm$ 65.7
12h	3152.2 $\pm$ 341.0	3232.8 $\pm$ 372.0
24h	1741.5 $\pm$ 153.6	1784.8 $\pm$ 230.9
48h	1217.4 $\pm$ 182.4	1521.9 $\pm$ 163.9

2. 肝组织病理学变化: 正常对照组显示肝小叶结构完整, 肝索排列规则有序, 无肝细胞变性、坏死和炎性细胞浸润。肝衰竭组在 6h 时有轻度肝细胞水肿, 少量炎细胞浸润。12h 时可见大量肝细胞坏死, 肝小叶结构紊乱, 肝索断裂, 肝窦或间质内见小

3. 肝组织 OX40mRNA 表达: 正常对照大鼠肝组织中 OX40mRNA 表达较少, 肝衰竭组 OX40mRNA 在造模后 6h 开始升高 (1.667 ± 0.279), 12h 达高峰 (3.118 ± 0.391), 然后逐渐下降, 与正常对照组 (0.990 ± 0.119) 比较, 各时间点差异有统计学意义 ($F = 29.970, 162.975, 62.476, 25.124, P < 0.05$, 图 2 及表 3)。

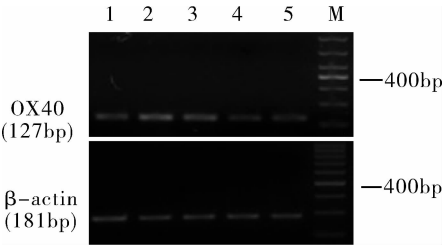


图 2 RT-PCR 法检测肝组织 OX40mRNA 表达水平
1. 正常对照组;2. 6h;3. 12h;4. 24h;5. 48h;M. 相对分子质量标准; β -actin. β -肌动蛋白;OX40. 共刺激因子

表 3 各组肝组织 OX40mRNA 表达
(与 β -actin 灰度比值, $\bar{x} \pm s$)

分组	OX40mRNA
正常对照组	0.990 $\pm$ 0.119
急性肝衰竭组	
6h	1.667 $\pm$ 0.279
12h	3.118 $\pm$ 0.391
24h	1.977 $\pm$ 0.282
48h	1.328 $\pm$ 0.115

4. 肝组织 OX40 蛋白表达:正常肝组织有 OX40 低表达,肝衰竭组 OX40 蛋白表达量逐渐增加,于 12h (0.804 $\pm$ 0.067) 达到高峰,24h (0.661 $\pm$ 0.057) 开始下降,与正常对照组 (0.412 $\pm$ 0.0293) 相比,差异有统计学意义 ($F = 17.240, 169.298, 88.289, 74.984, P < 0.05$, 图 3 及表 4)。

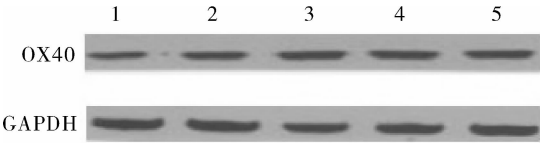


图 3 Western blot 法检测肝组织 OX40 蛋白表达
1. 正常对照组;2. 6h;3. 12h;4. 24h;5. 48h

表 4 各组肝组织 OX40 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

分组	OX40
正常对照组	0.412 $\pm$ 0.0293
急性肝衰竭组	
6h	0.524 $\pm$ 0.059
12h	0.804 $\pm$ 0.067
24h	0.661 $\pm$ 0.057
48h	0.600 $\pm$ 0.142

讨 论

急性肝衰竭发病机制复杂,目前认为细胞免疫功能紊乱与其密切相关,严重肝损伤时机体 CD4⁺T 细胞数显著降低^[3]。活化的 T 细胞分化成效应 T 细胞首先要通过 T 细胞抗原受体(TCR)/主要组织相容性

抗原复合体(MHC)-抗原肽(Ag)提供第一信号,再由共刺激分子提供第二信号,若缺乏共刺激信号,T 细胞反应无能,甚至发生程序性死亡。OX40(又称 CD134,TNFRSF4),为 I 型跨膜糖蛋白,相对分子质量约为 (48~50)kDa,是 T 细胞增殖、分化、存活并最终形成效应 T 细胞的关键共刺激信号^[4,5]。So 等^[6]也证实 OX40 的刺激能强烈对抗初始 CD4⁺T 淋巴细胞转变为起免疫抑制作用的调节 T 细胞(Treg),可见 OX40 可促进 CD4⁺T 细胞数量的增加,在免疫应答中发挥重要作用。还有研究发现肝癌患者 OX40 的配体(OX40L)mRNA 表达水平明显降低,表明病变的肝组织不能为 T 淋巴细胞提供充分的共刺激信号,抑制机体抗肿瘤免疫,提示共刺激信号可能通过激活 T 细胞特异性免疫,在肝脏病变过程中发挥重要作用。

急性肝衰竭时,炎症介质介导局部炎症反应和由此产生的细胞因子级联反应可引发多种化学介质释放,导致肝组织损伤。近年来不断有学者报道多种细胞因子在肝衰竭患者血中明显升高^[7]。Lv 等^[8]应用 TNF- α 中和性抗体后急性肝衰竭动物模型病死率降低,且肝脏病理组织学显著改善,表明肝衰竭时炎症反应介质诱发的肝细胞凋亡是急性肝衰竭的重要病理机制。OX40 属 TNF 受体家族成员,可以部分逆转大鼠 T 细胞数量减少的趋势,并促使 CD4⁺T 细胞等炎症细胞进入外周血中,再移行到炎症部位,刺激 T 细胞释放如 IL-10、IL-12 等多种炎症因子,进一步放大机体对炎症刺激的反应能力,进而诱导肝细胞损伤或凋亡^[9,10]。近年来,OX40 的研究逐渐成为热点,各国学者对 OX40 在致肝损伤中作用的研究也取得了一定的进展。夏仁品等^[11]通过转染 OX40 小干扰 RNA,发现实验组大鼠肝组织炎细胞浸润、肝组织坏死、间质水肿较未转染组减轻,推测 OX40 可能通过激活 T 细胞促进炎症细胞因子分泌水平增加,创建一个促炎症的周围环境加重肝衰竭的发展。

本实验采用 RT-PCR、Western blot 法检测大鼠肝组织中 OX40mRNA 及 OX40 蛋白的表达,探讨 OX40 与急性肝衰竭发生、发展关系。实验结果显示,血清 ALT、AST 水平在造模后 6h 即升高,12h 达高峰,之后逐渐下降。肝衰竭组 OX40mRNA 和 OX40 蛋白表达均于造模 6h 即明显高于对照组,12h 达峰值,24h 开始下降,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且其表达与血清 ALT、AST 水平变化趋势基本一致,考虑为机体发性肝衰竭时,大量肝细胞严重破坏,炎细胞浸润,OX40 表达水平上升;随后,肝

脏进入修复再生阶段,新生的肝细胞发挥功能,OX40 表达水平逐渐降低,但仍高于正常对照组,提示 OX40 的高表达参与体内炎症反应和组织损伤,且与机体的免疫状态密切相关,在急性肝衰竭发病过程中起关键作用。

不仅如此,研究表明 OX40 通过与 OX40L 特异性结合,形成的 OX40/OX40L 信号通路是细胞因子信号转导的重要通路之一,是诱导产生炎症反应介质生成的一个重要途径。业已证实 OX40 广泛参与了细胞应激、生长、增殖、分化、凋亡等多种生物学效应,在介导抗感染免疫、自身免疫性和肿瘤免疫等疾病中均发挥重要作用。我们在采用 D - Gal 联合 LPS 腹腔注射成功制备 SD 大鼠急性肝衰竭模型基础上,观察到 OX40 在急性肝衰竭早期开始上升,并随着肝损伤程度加重增加,肝功能损害越明显,OX40 表达越多,对揭示肝脏坏死、急性肝衰竭的发生发展具有重要意义。但 OX40 在急性肝衰竭发病机制中具体影响及 OX40 对体内炎症反应的特异性调控作用尚缺乏了解。因此,有关 OX40 与急性肝衰竭发病机制的关系还有待进一步深入研究,通过阻断体内 OX40 的作用抑制 T 细胞总数下降,减少炎症因子释放,可能将为治疗急性肝衰竭提供一个新策略。

参考文献

- 1 Nguyen NT, Banskota AH, Tezuka Y, *et al.* Hepatoprotective effect of taxiresinol and (7'R) - 7' - hydroxylariciresinol on D - galactosamine and lipopolysaccharide - induced liver injury in mice [J]. *Planta Med* 2004, 70: 29 - 33

- 2 Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T - cell costimulatory molecule OX40 [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(6): 420 - 431
- 3 谢知兵, 李年丰. 重型肝炎 CD4⁺ 及 CD8⁺ 淋巴细胞亚群的检测和意义 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(6): 587 - 588
- 4 Croft M, So T, Duan W, *et al.* The significance of OX40 and OX40L to T - cell biology and immune disease [J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 173 - 191
- 5 Soroosh P, Ine S, Sugamura K, *et al.* Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 2007, 179(8): 5014 - 5023
- 6 So T, Croft M. Cutting edge: OX40 inhibits TGF - beta - and anti-gendriven conversion of naive CD4 - T cells into CD25⁺ Foxp3⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1427 - 1430
- 7 Rutherford AE, Hynan LS, Borges CB, *et al.* Serum apoptosis markers in acute liver failure: a pilot study [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007, 5(12): 1477 - 1483
- 8 Lv S, Song HL, Zhou Y, *et al.* Tumour necrosis factor - alpha affects blood - brain barrier permeability and tight junction - associated occluding in acute liver failure [J]. *Liver Int*, 2010, 30(8): 1198 - 1210
- 9 Ruby CE, Weinberg AD. OX40 - enhanced tumor rejection and effector T cell differentiation decreases with age [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1481 - 1489
- 10 Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, *et al.* OX40 - OX40 ligand interaction in T - cell - mediated immunity and immunopathology [J]. *Advances in Immunology*, 2010, 105: 63 - 98
- 11 夏仁品, 卢立春, 赖威, 等. 针对 OX40 小于扰 RNA 供体转染抗大鼠肝移植排斥反应 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(7): 860 - 862

(收稿日期: 2012 - 05 - 26)

(修回日期: 2012 - 06 - 11)

NBI - ME 对病变表面微血管分型在 诊断结直肠早期肿瘤中的意义

刘宇虎 陈桂权 钟 东 傅利萍 陈晓春 李志坚 陈荣国 张志坚 柳 娟

摘 要 目的 通过窄带成像放大内镜技术 (NBI - ME) 对结直肠病变表面微血管形态进行观察分型, 研究 NBI - ME 对检出早期结直肠肿瘤性病变的价值。**方法** 肠镜检查发现新生性病变后, 用 NBI - ME 模式观察病变表面微血管形态并进行分型, 所有病变均在内镜下切除或手术切除, 将 NBI - ME 判断病变的性质与病理诊断结果比较。**结果** NBI - ME 在 2115 例患者中发现新生性病变 2778 个, MP - 0 型诊断为炎性息肉的准确率为 97.4%, MP - I 型诊断为增生性息肉的准确率为 93.3%, MP - II

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金资助项目 (B2005089); 东莞市科技计划项目 (2008105150018)

作者单位: 523059 广东省东莞市人民医院消化科 (刘宇虎、陈桂权、陈晓春、李志坚、陈荣国、张志坚、柳娟); 南方医科大学中西医结合医院 (钟东); 广东省东莞市人民医院病理科 (傅利萍)

通讯作者: 刘宇虎, 电子信箱: liuyuhu@126.com