

70(2):291-297

- 3 Huang BY, Hseuh C, Chao TC, *et al.* Well-differentiated thyroid carcinoma with concomitant Hashimoto's thyroiditis present with less aggressive clinical stage and low recurrence [J]. *Endocr Pathol*, 2011, 22(3):144-149
- 4 Del Rio P, Cataldo S, Sommaruga L, *et al.* The association between papillary carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis: does it modify the prognosis of cancer? [J]. *Minerva Endocrinol*, 2008, 33(1):1-5
- 5 王家耀, 廖松林, 程秀英, 等. 乔本甲状腺炎合并甲状腺乳头状癌 [J]. *中华病理学杂志*, 1997, 26:171
- 6 Singh B, Shaha AR, Trivedi H, *et al.* Coexistent Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: impact on presentation, management, and outcome [J]. *Surgery*, 1999, 126(6):1070-1076
- 7 Kim KW, Park YJ, Kim EH, *et al.* Elevated risk of papillary thyroid cancer in Korean patients with Hashimoto's thyroiditis [J]. *Head Neck*, 2011, 33(5):691-695
- 8 Yoon YH, Kim HJ, Lee JW, *et al.* The clinicopathologic differences in papillary thyroid carcinoma with or without co-existing chronic lymphocytic thyroiditis [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269(3):1013-1017
- 9 Ohmori N, Miyakawa M, Ohmori K, *et al.* Ultrasonographic findings of papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis [J]. *Intern Med*, 2007, 46(9):547-550
- 10 Gul K, Dirikoc A, Kiyak G, *et al.* The association between thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis: the ultrasonographic and histopathologic characteristics of malignant nodules [J]. *Thyroid*, 2010, 20(8):873-878
- 11 Kim HS, Choi YJ, Yun JS. Features of papillary thyroid microcarcinoma in the presence and absence of lymphocytic thyroiditis [J]. *Endocr Pathol*, 2010, 21(3):149-153
- 12 Kim SS, Lee BJ, Lee JC, *et al.* Coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: the influence of lymph node metastasis [J]. *Head Neck*, 2011, 33(9):1272-1277
- 13 Kashima K, Yokoyama S, Noguchi S, *et al.* Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma [J]. *Thyroid*, 1998, 8(3):197-202
- 14 Giordano C, Stassi G, De Maria R, *et al.* Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis [J]. *Science*, 1997, 275(5302):960-963
- 15 Kimura H, Yamashita S, Namba H, *et al.* Interleukin-1 inhibits human thyroid carcinoma cell growth [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75(2):596-602 (收稿日期:2012-04-20)
- (修回日期:2012-06-07)

ZEB-1 因子在大鼠肝纤维化体内外 TGF- β 通路中的研究

沈宇娟 陈永平 刘真真

摘 要 **目的** 探讨 ZEB1 在大鼠肝纤维化模型和肝星状细胞中的动态变化和意义。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 30 只,分为健康对照组和模型组,模型组按造模后不同时间点分为 2、4、6、8 周 4 个亚组,每组 6 只。模型组腹腔注射二甲基亚硝胺(DMN)诱导形成大鼠肝纤维化模型,测定不同时间点 ALT、AST 的变化,肝组织经 HE、Masson 染色,光学显微镜下观察;采用 RT-PCR 检测不同时间点肝脏 ZEB-1 mRNA 的表达。大鼠 HSCT-6 细胞用不同浓度 TGF- β 1 因子刺激 48h 后提取 RNA,检测不同 TGF- β 1 浓度下 ZEB-1 mRNA 的表达。各组间均数比较采用单因素分析。**结果** DMN 腹腔注射成功诱导大鼠肝纤维化,4、6 周纤维化明显。模型组血清 ALT、AST 在 2 周开始升高,4 周达到最高峰,并明显高于健康对照组。ZEB-1 mRNA 在正常肝组织中少量表达,模型组表达逐渐升高,4 周表达最高,随后又逐渐降低,相关性分析显示与 TGF- β 1 呈正相关。HSC-T6 细胞中,不同浓度 TGF- β 1 刺激后,ZEB-1 mRNA 呈浓度梯度变化,随着 TGF- β 1 浓度的升高,ZEB-1 表达量增加。**结论** ZEB-1 可能参与肝纤维化的发生,并与肝纤维化的发展密切相关。

关键词 肝纤维化 ZEB-1 转化生长因子 β 1 SD 大鼠 HSC-T6

Research of ZEB-1 Factor in TGF- β Pathway in Rat Liver Fibrosis in Vivo and in Vitro. Shen Yujuan, Chen Yongping, Liu Zhenzhen. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the dynamic expression of ZEB-1 in rat model of hepatic fibrosis and hepatic stellate cells induced by TGF- β 1. **Methods** A total of 30 healthy male SD rats were randomly divided into normal control group and model group, and the model group was further divided into four subgroups according to different time points: subgroups of 2, 4, 6 and 8 weeks with six rats in

each group. The rat model of hepatic fibrosis was induced by dimethylnitrosamine (DMN). The serum of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were detected dynamically after 2, 4, 6, 8 weeks of infection. The liver tissues were observed under optical microscope after HE and Masson staining. ZEB-1 mRNA was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Rat HSC T-6 cell was stimulated with different concentrations of TGF- β 1 factor, then the RNA was extracted to detect the expression of ZEB-1 mRNA of different concentration of stimulus. **Results** The hepatic fibrosis model was successfully induced by DMN infection and the level of hepatic fibrosis were the most obvious at 4 and 6 weeks. The serum levels of ALT and AST were all increased after 2 week of infection and peaked at week 4 which were all significantly higher than those in control group. The expression of ZEB-1 mRNA was significantly increased than that in control group. And the expression of ZEB-1 was closely correlated with the TGF- β 1 expression. In HSC-T6 cells, the ZEB-1 mRNA gradually increased follow with the increased TGF- β 1 concentration. **Conclusion** The ZEB-1 may participate in the development of hepatic fibrosis, which is closely correlated with the progression and severity of liver fibrosis.

Key words Liver fibrosis; ZEB-1; Transforming growth factor β 1; Sprague-Dawley rats; HSC-T6

肝纤维化是继发于各种原因导致的慢性肝损伤后的代偿反应,是慢性肝病发展为肝硬化必经的病理过程^[1]。目前认为在各种损伤因素中,肝星状细胞(HSC)的激活是肝纤维化发生发展的关键环节,而TGF- β 1被认为是激活肝星状细胞的关键细胞因子^[2]。研究发现二锌指蛋白家族成员 ZEB-1 通过与 smad 蛋白结合参与转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 通路的信号传递,调节 TGF- β 1 的活化转录^[3],由此推测 ZEB-1 极有可能与肝纤维化有关。本研究旨在观察 ZEB-1 在大鼠肝纤维化中的动态表达及其与 TGF- β 1 的关系,以及大鼠肝星状细胞 HSC-T6 经 TGF- β 1 刺激该因子的变化来初步探讨该因子是否参与肝纤维化的发生发展。

材料与方法

1. 实验动物:健康雄性 SD 大鼠 30 只,体重 200~250 克,清洁级喂养,由中国科学院上海实验动物中心提供。

2. 主要试剂:二甲基亚硝胺(DMN)购自日本东京成化工业株式会社,RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司,HSC-T6 细胞株由温州医学院附属第一医院感染科董培红老师馈赠;重组人 TGF- β 1 购自美国 R&D 公司;HE 和 Masson 染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

3. 实验方法:30 只 SD 大鼠实验前禁食 12h,饮水不限。随机分为对照组 6 只,腹腔注射 0.9% NaCl 溶液 0.4ml;模型组 24 只,按造模后不同的观察时间分为 2、4、6、8 周 4 个亚组,每组 6 只,按 0.2ml/100g 每周前 3 天每天腹腔注射 DMN,连续 4 周,继续常规喂养至 8 周末。分别以上面观察时间点结束时以 10% 水合氯醛 0.3ml/kg 麻醉,经门静脉采血,1500r/min 离心 5min,取上清,另取肝组织液氮冻存,RT-PCR 备用。

4. 肝脏组织病理学检查:肝组织石蜡包埋,4 μ m 切片,HE 染色和 Masson 染色后在普通光学显微镜下观察。

5. HSC-T6 细胞培养及 TGF- β 1 刺激:HSC-T6 细胞在 37℃ 水浴箱中快速复苏后,1000r/min 离心 5min,留取细胞团,加入含 10% 胎牛血清的 DEME 的高糖培养基 5ml,转入培养

瓶中于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。当细胞生长至 85% 左右融合度时消化传代。传至 3 代左右细胞活力最佳时接种至 6 孔培养板,细胞计数密度为 1.8×10^5 ,设正常组,TGF- β 1 干预组,后者又分为 3 个加药浓度,分别加 TGF- β 1 5、10、15ng/ml,干预 48h,一共 4 个亚组,每组 3 个复孔,至相应时间点提取 RNA 做 RT-PCR 用。

6. 血清学检测:采用全自动生化分析仪检测不同时间点大鼠血清 ALT、AST 水平。

7. RT-PCR 检测肝组织 ZEB1 和 TGF- β 1 mRNA 的表达水平:采用日本 TaKaRa 公司的 RNA 提取试剂盒,按说明操作提取肝组织和 HSC-T6 的 RNA,紫外分光光度计测吸光度 OD,以 OD₂₆₀:OD₂₈₀ 检测 RNA 纯度。反转录按 RNA PCR Ver 3.0 (日本 TaKaRa) 试剂盒说明书操作。由 Gen Bank 提供核苷酸序列,实验室林镭老师设计引物序列,北京基诺莱普生物技术有限公司合成。ZEB-1 基因(207bp)扩增引物对,上游引物为 5'-GGCACAACCAAAATCATCATCAA-3',下游引物为 5'-GCAGTCCTCACACAAAAGGCAAG-3',PCR 反应条件 95℃ 5min;95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s,30 个循环;72℃ 5min。TGF- β 1 上游序列为 5'-TACCAACTACTGCTTCAGCTCCAC-3',下游序列 5'-GTTGTGTTGTTGTAGAGGGCA-3',反应条件为 94℃ 5min;94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 45s,25 个循环;72℃ 10min。 β -actin 上游序列 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游序列 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3',反应条件为 94℃ 2min;94℃ 30s, 61℃ 30s,72℃ 30s, 25 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳,置凝胶电泳处理系统成像,用图像分析软件 Gel-Pro3.1 分别测量 ZEB-1, TGF- β 1 与 β -action 的比值分别表示 ZEB-1, TGF- β 1 mRNA 的相对表达量。

9. 统计学方法:数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。模型各亚组与对照组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验,相关性分析采用 Spearman 分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠肝组织病理检测和 Masson 染色:正常对

照组大鼠肝脏表面光滑,边缘整齐,光镜下肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐呈放射状,未见炎症、变形和坏死;Masson 染色仅在汇管区或血管周围见少量蓝色阳性沉着。造模 2 周后可见肝小叶结构破坏,肝脏内有出血坏死表现伴随炎细胞浸润。汇管区成纤维细胞增多,纤维间隔开始形成;Masson 染色可见除血管和胆管周围着色外,有较细的蓝色胶原纤维从汇管区和中央静脉管壁向肝实质细胞延伸,形成不完全纤维间隔。4、6 周出现广泛肝细胞脂肪变,肝内出血减轻,肝小叶结构破坏或消失,肝细胞索排列紊乱。Masson 染色可见汇管区较粗蓝色胶原纤维向外切割肝小叶包裹形成假小叶。建模 8 周可见炎细胞浸润明显减少,肝内出血坏死基本消失,纤维条索变细;Masson 染色仍可见假小叶,但蓝色胶原纤维变细(图 1、图 2)。

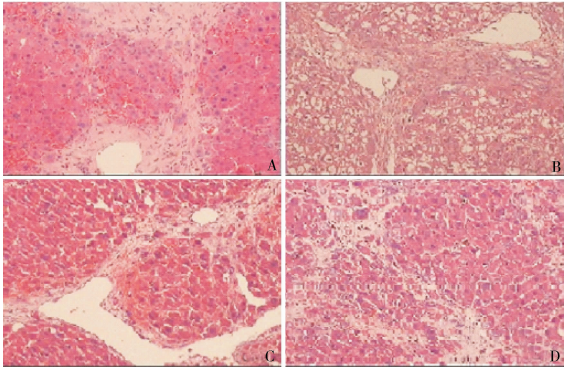


图 1 大鼠肝组织(HE, ×100)

A、B、C、D 分别为造模 2、4、6、8 周,可见肝纤维化程度进行性加重

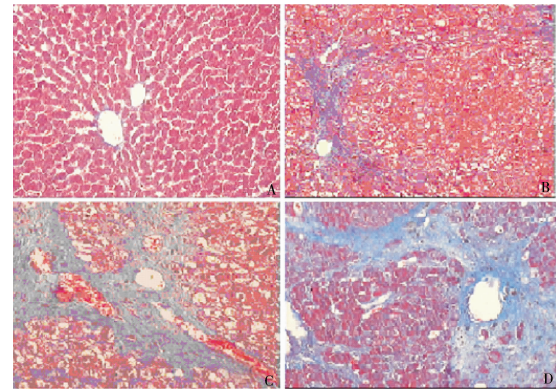


图 2 大鼠肝组织病理学表现(Masson, ×100)

A、B、C、D 分别为造模 2、4、6、8 周,可见肝纤维化程度逐渐加重

2. 大鼠血清 ALT, AST 的变化:大鼠血清 ALT, AST 在建模 2 周后升高,4 周达到高峰,6、8 周依次逐渐降低,每组与正常对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 不同时间点大鼠血生化指标的表达式

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)
对照组	6	29.2 ± 4.7	42.7 ± 6.3
模型组 2 周	6	80.8 ± 5.1 *	112.2 ± 9.2 *
模型组 4 周	6	169.2 ± 16.2 *	193.3 ± 31.1 *
模型组 6 周	6	115.2 ± 20.0 *	134.7 ± 25.0 *
模型组 8 周	6	103.8 ± 28.4 *	127.8 ± 15.3 *

ALT. 丙氨酸转氨酶;AST. 天冬氨酸转氨酶;与对照组比较, $P < 0.05$

3. 大鼠肝组织 TGF - $\beta 1$ 和 ZEB - 1 mRNA 表达变化:RT - PCR 结果显示,TGF - $\beta 1$ 和 ZEB - 1 在正常对照组均有少量表达,建模 2 周模型组逐渐升高,4 周达到高峰,随后又逐渐降低,各组与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相关性分析结果显示 ZEB - 1 mRNA 表达量与 TGF - $\beta 1$ 呈正相关($r = 0.833, P < 0.05$,图 3,表 2)。

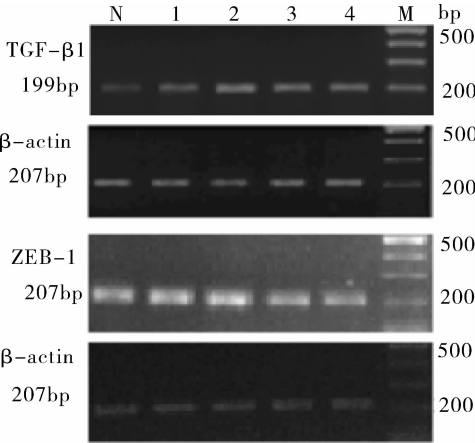


图 3 RT - PCR 检测大鼠肝组织中 ZEB1、TGF - $\beta 1$ mRNA 的表达

N. 正常对照组;1. 模型组 2 周;2. 模型组 4 周;3. 模型组 6 周;4. 模型组 8 周;M. DNA 分子质量标志物

表 2 对照组与肝纤维化模型组 ZEB1、TGF - $\beta 1$ 的 mRNA 表达

组别	n	ZEB - 1/ β - actin	TGF - β / β - actin
对照组	6	1.777 ± 0.062	0.876 ± 0.025
2 周	6	2.363 ± 0.066 *	1.639 ± 0.034 *
4 周	6	3.177 ± 0.046 *	2.729 ± 0.039 *
6 周	6	2.300 ± 0.060 *	2.240 ± 0.050 *
8 周	6	2.182 ± 0.075 *	2.211 ± 0.709 *

与对照组比较,* $P < 0.05$;ZEB - 1 与 TGF - $\beta 1$ mRNA 水平呈正相关, $r = 0.833, P < 0.05$

4. TGF - $\beta 1$ 刺激大鼠 HSC - T6 细胞后 ZEB1 mRNA 的表达变化:在 HSC - T6 中,正常组,TGF - $\beta 1$ 5、10、15 ng/ml 刺激 48 h 后 ZEB - 1 mRNA 的表达变化如图所示,随着 TGF - $\beta 1$ 浓度的升高,

ZEB-1 mRNA 表达量逐渐增加(图 4,表 3)。

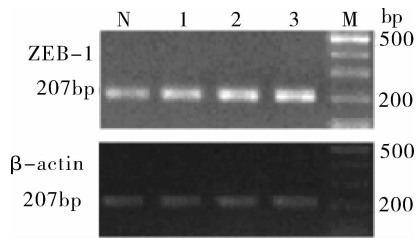


图 4 RT-PCR 检测不同 TGF-β 浓度刺激下,大鼠肝星状细胞中 ZEB1 mRNA 的表达

N. 正常对照组;1. 加 TGF-β1 5ng/ml;2. 加 TGF-β1 10ng/ml;3. 加 TGF-β1 15ng/ml;M. DNA 分子质量标志物

表 3 细胞中 ZEB1 的 mRNA 的表达

组别	孔数	ZEB-1/β-actin
正常组	3	3.479 ± 0.039
5ng/ml	3	4.271 ± 0.116 *
10ng/ml	3	4.737 ± 0.107 *
15ng/ml	3	5.440 ± 0.053 *

与对照组比较, * P < 0.05

讨 论

ZEB-1 是二锌指蛋白家族的一个成员,含有两个锌指集群,N-端集群和 C-端集群,通过与相关 DNA 序列结合,产生转录作用,是重要的细胞核转录因子^[3]。目前,对于 ZEB 基因国内外学者主要致力于其在促进上皮间质转换方面的研究,特别是肿瘤方面,通过抑制抑癌基因促进癌症发生,通过 EMT 控制肿瘤细胞的播散^[5-10]。Kato 等^[4]研究报道下调 ZEB 蛋白与肾纤维化发病机制有关,在肝纤维化方面还未见 ZEB 的相关报道。学者研究表明 ZEB 是 TGF-β1 信号通路的重要调节因子,ZEB-1 通过与 R-smad 蛋白结合,或者由 TGF-β 调节的基因本身携带 ZEB 结合位点从而两者进行结合从而参与 TGF-β 通路,促进 TGF-β1 的转录活化,又 TGF-β/SMAD 是肝纤维化中的重要信号通路,据此我们初步探索 ZEB-1 在肝纤维化中所扮演的角色。

本实验结果表明,在 DMN 大鼠纤维化模型中,ZEB-1 mRNA 在造模 2 周开始升高,4 周达到最高峰,6、8 周又依次逐渐降低。表明 ZEB-1 mRNA 的表达呈一个动态的变化,2 周肝脏出血严重,肝组织以炎性细胞浸润为主,4 周纤维化最明显,成纤维细胞表达活跃,6~8 周表达下调可能是大鼠自身修复的结果。对比 TGF-β1 的表达,我们发现 ZEB-1 mRNA 的表达与其呈直线相关。随着造模的延续,肝纤维化的加重,其表达量逐渐增高;随着造模的停

止,肝脏自身的修复,其表达量降低。

在 HSC-T6 中,用不同浓度的 TGF-β1 刺激后,ZEB-1 的表达量逐渐升高,呈浓度依赖性,表明 ZEB-1 与 TGF-β1、HSC 间必定存在着某种联系,或许也是通过与 smad 结合促进下游因子的活化从而激活 HSC,或许是直接与 HSC 联系着。众所周知,HSC 是肝纤维化中最关键的细胞,不同的体内外因素与因子尤其是 TGF-β1 激活 HSC 后,大量细胞外基质合成与沉积,最终导致肝纤维化。我们的研究通过组织与细胞两个层面初步表明在肝纤维化中 ZEB-1 与 TGF-β1 和 HSC 的紧密联系,由此猜想 ZEB-1 极有可能参与了肝纤维化的发生发展,或许通过阻断它的表达,减轻 TGF-β1 的活化程度,从而可以减轻或者延缓肝纤维化的进展,相信对其进一步的研究,,能对肝纤维化治疗提供又一新的靶点。

参考文献

1 Wells RG. Liver fibrosis: challenges of the new era[J]. Gastroenterology,2009,136(2):387-388

2 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest,2005,115:209-218

3 Antonio A,Postigo. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF-β/BMP signaling pathway [J]. EMBO Joural,2003,22(10):2443-2452

4 Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(9):3432-3437

5 Putta S, Lanting L, Sun G, et al. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. J Am Socnephrol, 2012,23(23):458-469

6 Zhang P,Cai Y,Soofi A,et al. Activation of Wnt11 by TGF-β drives mesenchymal gene expression through non-canonical Wnt signaling in renal Epithelial cells[J]. J Biol Chem,2012[epub ahead of print]

7 Ono H, Imoto I, Kozaki K, et al. SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation [J]. Oncogene,2012[epub ahead of print]

8 Xiong M, Jiang L, Zhou Y, et al. The miR-200 family regulates TGF-β1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression[J]. Am Jphysiol Renal Physiol,2012,302(3):f369-f379

9 Cufi S, Vazquez-Martin A. Metformin against TGFβ-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging-associated fibrosis [J]. Cell Cycle,2010,9(22):4461-4468

10 Lindley LE, Briegel KJ. Molecular characterization of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,399(4):659-664

(收稿日期:2012-06-04)

(修回日期:2012-06-13)