

成纤维细胞激活蛋白在肝纤维化模型大鼠肝组织中的动态表达

梁小兵¹, 张 姝¹, 禰彩云¹, 许 文¹, 张 杰^{2*}

1. 暨南大学附属珠海医院/珠海市人民医院 检验科, 广东 珠海 519000

2. 上海中医药大学, 上海 201203

摘 要: **目的:** 观察大鼠肝纤维化形成过程中成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)的动态表达变化特点。**方法:** Wistar 雄性大鼠分为正常对照组和模型组。模型组 ip 0.5%二甲基亚硝胺复制肝纤维化模型, 于造模 1、2、3 周分别收集肝组织标本, 造模 4 周后处死大鼠, 收集血清和肝组织标本。全自动生化仪测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、谷氨酰转肽酶(GGT)和白蛋白(ALB), HE、天狼猩红染色观察病理形态, 试剂盒测定肝组织羟脯氨酸; real-time PCR 和 western blotting 法检测肝组织 FAP 基因和蛋白表达。**结果:** 模型组肝功能较正常组明显下降, 组织病理形态学和羟脯氨酸测定显示模型组肝损伤明显, 纤维化形成。real-time PCR 和 western blotting 显示 FAP 基因和蛋白随造模时间延长表达逐渐增高。**结论:** FAP 伴随大鼠肝纤维化模型形成逐渐增加, 与肝纤维化形成密切相关。

关键词: 成纤维细胞激活蛋白; 二甲基亚硝胺; 肝纤维化

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)03-0284-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.03.011

Fibroblast activation protein expression is closely related with liver fibrosis degree in rats

LIANG Xiao-bing¹, ZHANG Shu¹, XUAN Cai-yun¹, XU Wen¹, ZHANG Jie²

1. Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Hospital of Jinan University and People's Hospital of Zhuhai, Zhuhai 519000, China

2. Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective: To observe the dynamic changes in fibroblast activation protein (FAP) level during the formation of liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. **Methods:** Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into normal control group and model group. Rats in the model group were intraperitoneally injected with 0.5% dimethylnitrosamine for 4 weeks. During fibrosis processing, liver sample was collected from selected rats at 1, 2 and 3 weeks. Other rats were sacrificed after collecting serum and liver sample. Liver function, including ALT, AST, GGT, TBiL, and Alb in serum was measured using the biochemical analyzer. Meanwhile, liver tissues were stained with HE and Sirius red and observed under a light microscope for indentifying the pathological changes. Fap expression in both protein and RNA levels was detected using Western blotting or real-time PCR method respectively. **Results:** Rats in the model group were underwent impaired liver functions, which were showed in evaluated ALT, AST, GGT and TBiL levels and declined Alb content. In comparison with the normal control group, liver tissue of the model group showed typical pathological changes of fibrosis as well as an obviously increased hydroxyproline content. FAP protein and RNA expression was increased, with a time-dependent manner. **Conclusion:** FAP expression level is closely related with liver fibrosis degree, which is confirmed by the result of progressive rising FAP expression level in the fibrosis process.

Key Words: fibroblast activation protein; dimethylnitrosamine; liver fibrosis

纤维化是各种慢性肝病的共同病理过程, 是肝脏组织对各种病因所导致的病理损伤的一种修复反应, 持续或者反复的肝实质炎症坏死可引起肝脏内肝星状细胞、间充质干细胞等多种细胞转分化为肌成纤维细胞, 该细胞增殖并大量合成和分泌细胞外

基质, 从而导致纤维化的发生, 是肝纤维化发生发展的核心细胞^[1]。成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)可表达于成纤维细胞, 与成纤维细胞生长以及胚胎发育、组织修复和上皮肿瘤的演进过程密切相关^[2], 已有研究显示, 该蛋白

收稿日期: 2015-05-10

*通信作者 张 杰, 研究方向为药理学。Tel: (021)62375707-245 E-mail: guide.zhang@163.com

参与肝纤维化的形成^[3], 本文观察大鼠肝纤维化形成过程中 FAP 的动态表达变化, 从而进一步阐释该蛋白与肝纤维化的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 雄性大鼠 24 只, 体质量 (190 ± 9) g, SPF 级, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 合格证号为 SCXK (沪) 2007-0005, 饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房饲养、造模与观察, 自由饮水。

1.2 主要试剂和仪器

二甲基亚硝胺 (dimethylnitrosamine, DMN), Cat.No.MAL05, 为东京化成工业株式会社产品。生化检测试剂盒, 上海科华生物产品; 预染蛋白标准为 Fermentas 公司产品; cDNA 合成试剂盒购自 Fermentas 公司; PCR 特异性引物由上海生工公司合成; Realtime PCR Master Mix 试剂盒为 TAKARA 公司产品; 小鼠抗 FAP 单克隆抗体为美国 ABGENT 公司产品; 单克隆小鼠抗 GAPDH 抗体购自康成公司; 驴抗小鼠红外荧光二抗为 Li-Cor 公司产品。BCA 蛋白定量试剂盒, 碧云天生物技术公司产品。二甲苯、甲醛、无水乙醇 (分析纯) 和中性树胶均购自中国医药集团上海化学试剂公司。苏木素伊红染料、羟脯氨酸测定试剂盒均购自南京建成生物制品研究所。

全自动生化仪 AU2700, 为 Beckman Coulter 公司产品。轮转切片机、冰冻切片机、自动脱水机、石蜡包埋机, 购自德国 Leica 公司。Olympus BX40 光学显微镜, 日本 Olympus 公司产品; 连续波长酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司产品; 实时定量 PCR 仪, Eppendorf 公司产品; 蛋白电泳系统, Bio-Rad 公司产品, Odyssey 红外扫描系统, 为 Licor 公司产品。

1.3 造模及标本采集

大鼠适应性饲养 1 周后, 采用分层随机方法分为正常组 8 只, 模型组 16 只。模型组 ip 0.5% DMN 2 mL/kg, 首次注射全剂量的 2/3, 每天 1 次, 连续注射 3 d 后休息 4 d, 共 4 周。对照组大鼠于相同的时间和部位 ip 等剂量的生理盐水注射液。于造模 1、2、3 周末, 每次处死 3 只大鼠, 留取肝组织标本, 保存于 -80°C 冰箱备用。至 4 周末, 大鼠禁食 12 h 后, 以 20% 乌拉坦麻醉, 下腔静脉采血, 4°C 下静置 2 h 后, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清分装于 1.5 mL 离心管, -70°C 低温保存用于生化检测。动

物取血处死后, 取下肝脏和脾脏称质量, 然后取约 $1.0\text{ cm} \times 0.8\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ 大小肝组织 2 块, 于 10% 中性甲醛溶液中固定, 用于组织形态学观察。 -80°C 保留 2 管肝组织用于羟脯氨酸测定和肝组织 FAP 基因和蛋白表达检测。

1.4 肝纤维化相关指标检测

全自动生化仪检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、谷氨酰转肽酶 (GGT) 和白蛋白 (ALB)。羟脯氨酸含量测定采用南京建成生物技术公司试剂盒测定, 操作步骤参照说明书进行。

中性甲醛溶液固定的肝脏组织修整后于脱水机中逐级脱水, 后于自动石蜡包埋机中石蜡包埋, 4°C 保存。切片厚度为 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。进行常规 HE 染色和天狼猩红染色, 观察肝组织病理和胶原沉积情况。参考文献《胶原纤维增生程度的半定量标准》评判纤维化分级。

1.5 Western blotting 检测肝组织 FAP 蛋白表达

取湿肝 100 mg 在预冷生理盐水中洗净, RIPA 裂解液抽提组织总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒, 在 562 nm 波长处测定细胞总蛋白浓度。40 μg 蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将凝胶中蛋白电转移至硝酸纤维素膜上, 以 LICOR 公司封闭液封闭后, 加入 I 抗 [GAPDH 抗体 (1:10 000)、FAP 抗体 (1:1 000)] 4°C 孵育过夜, 洗涤后加入荧光标记 II 抗, 室温孵育 1 h 后, 回收 II 抗, 膜洗涤后, 于 Odyssey 扫描蛋白条带。目标条带使用图像分析软件进行分析, 目标蛋白表达量使用 GAPDH 进行校正。

1.6 real-time PCR 检测肝组织 FAP 基因表达

试剂盒抽提细胞总 RNA。在使用紫外分光光度计在 260/280 nm 处检测总 RNA 的质量和纯度之后, 使用 cDNA 合成试剂盒逆转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板, FAP (126bp) 上游引物为 5'-TGTCCTGAAATCCAGTTTGG-3', 下游引物为 5'-GTGCATTGTCTTACGCCCTT-3'; GAPDH (70 bp) 上游引物为 5'-GGCAAATTCAACGGCACA GT-3', 下游引物为 5'-AGATGG TGATGG GCTTCCC-3'。进行 PCR 扩增, PCR 扩增反应条件为 95°C 预变性 5 min, 95°C 30 s、 60°C 60 s, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法分析目的基因相对表达量。

1.7 统计方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计, 组间比较采用 t 检验 ANOVA, 等级资料采用 Ridit 检验。

2 结果

2.1 大体情况

随着造模时间延长, 模型组大鼠体重增加明显低于对照组, 模型组大鼠毛色枯黄, 运动减少, 精神较差。4 周结束时无大鼠死亡, 部分模型组大

鼠明显可见腹部膨大, 有腹水形成, 肝脏缩小, 质地变硬。表 1 可见, 与对照组比较, 模型组大鼠体重、肝质量及肝体比明显下降, 脾质量和脾体比有所增加。

2.2 各组大鼠血清生化指标

经 DMN 干预后, 模型组大鼠血清 TBIL、ALT、AST、GGT 水平明显升高 ($P<0.05$), ALB 水平明显下降 ($P<0.05$)。(见表 2)。

表 1 两组大鼠体重、肝质量、脾质量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on body mass, liver quality, and spleen quality of rats in two groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	体质量/g	肝质量/g	脾质量/g	肝体比	脾体比
对照	8	345.71±16.89	11.14±0.73	0.61±0.04	0.032±0.001	0.001 7±0.000 0
模型	7	232.13±12.69*	4.61±0.70*	0.97±0.14*	0.019±0.003*	0.004 2±0.000 5*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

表 2 两组大鼠血清生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison on serum biochemical index of rats in two groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TBIL	ALT	AST	GGT	ALB
对照	8	2.02±0.21	61.95±10.24	112.26±31.18	0.52±0.46	29.25±1.36
模型	7	12.50±7.22*	241.3±215.86*	503.97±230.29*	2.32±1.07*	18.68±4.69*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

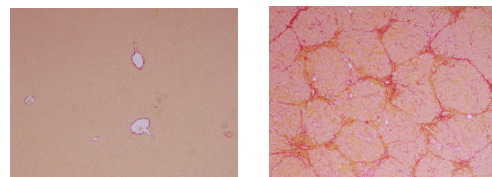
2.3 各组大鼠肝组织病理学变化

HE 染色可见, 正常对照组肝小叶结构清晰, 肝细胞由中央静脉向四周呈放射状排列, 无变性坏死, 肝窦未见狭窄或扩张; 模型组大鼠肝脏内有大量炎性细胞浸润, 肝窦狭窄, 汇管区扩大, 肝细胞排列紊乱, 出现肿胀、变性坏死, 肝组织内有明显出血现象 (图 1)。

2.4 肝组织胶原沉积情况

肝组织天狼猩红染色可见对照组仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维; 模型组大鼠肝脏胶原增生明显, 大量的纤维间隔, 向肝小叶伸展, 分割

包绕肝组织, 形成假小叶 (图 2)。肝纤维化分级、肝组织羟脯氨酸含量测定均显示模型组较对照组大鼠胶原沉积明显升高 (表 3)。



对照

模型

图 2 两组大鼠肝组织天狼猩红染色

Fig. 2 Sirius red staining of liver tissue of rats in two groups

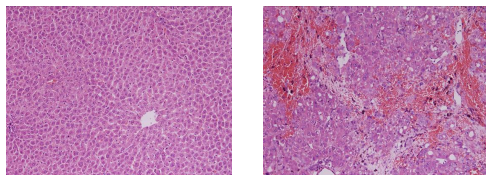
表 3 两组肝纤维化分级和羟脯氨酸含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Liver fibrosis and hydroxyproline content in two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝纤维化分级					Hyp/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
		0	I	II	III	IV	
对照	8	8	0	0	0	0	510.20±64.57
模型	7	0	0	1	3	3	1453.42±357.58*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group



对照

模型

图 1 两组大鼠肝组织 HE 染色

Fig. 1 HE Staining of liver tissue of rats in two groups

2.5 肝组织 FAP 基因和蛋白的动态表达

收集造模 1~4 周的大鼠肝组织, 抽提总 RNA 和总蛋白, 采用实时定量 PCR 和 western blotting 分别检测 FAP 基因和蛋白表达水平, 结果见图 3, 随造模时间的延长, FAP mRNA 和蛋白表达水平逐渐增加, 提示 FAP 参与了大鼠肝纤维化的形成过程。

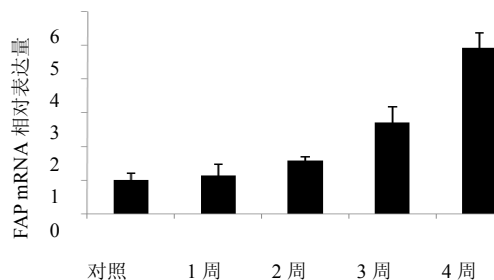


Fig.2 FAP mRNA expression changes in liver tissues

3 讨论

FAP 是一种膜结合糖蛋白, 属于丝氨酸蛋白酶类, 由 FAP α 和 β 两个亚单位组成相对分子质量为 170 000 的二聚体^[2], 具有肽链内切酶活性和较弱的二肽酶活性, 能够降解许多二肽和 I 型胶原, 研究表明, FAP 可表达于胚胎细胞、损伤组织以及 90% 以上恶性上皮肿瘤的基质成纤维细胞, 而很少表达于良性肿瘤和正常组织, 与细胞外基质重构, 肿瘤增生和新陈代谢密切相关^[4-5]。

FAP 作为一个增生性成纤维细胞的表面标志物, 在控制成纤维细胞生长及胚胎发育、组织修复起一定的作用^[6]。肝纤维化的核心环节是成纤维细胞的大量活化和增殖, 因此, FAP 与肝纤维化的形成引起了研究者的兴趣。Levy 等^[7]的研究发现, FAP 特异基因可在肝硬化患者肝脏中检测到, 而不表达于正常人肝组织, 其免疫活性主要集中于肝硬化肝组织的新生结节内的窦周细胞, 通过细胞形态学和体外研究显示, FAP 蛋白主要表达于肝星状细胞。田华等^[8]复制四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型, 发现 FAP 主要表达于门管区内脉管周围及小叶周围纤维间隔成纤维细胞中。并且随着肝纤维化加重, 纤维间隔加宽, 表达 FAP 的细胞也增加, 即 FAP 与小鼠肝纤维化程度呈正相关, 并且其表达水平和肝组织转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 表达水平呈正相关, 提示 FAP 和 TGF- $\beta 1$ 可能在肝纤维化形成过程中起协同作用。

DMN 是具有肝毒性、基因毒性、免疫毒性的化学物质, 早在 20 世纪 80 年代末、90 年代初即被

广泛应用于抗肝纤维化的实验研究, 本研究以 DMN 为诱导剂, 经组织形态学和羟脯氨酸检测鉴定, 成功复制了大鼠肝纤维化模型, 收集了造模 1~4 周的肝组织, 经实时定量 PCR 和 western blotting 检测, 发现 FAP 的基因和蛋白均随着造模时间的延长表达逐渐增加, 与肝纤维化的发展进程一致。在大鼠肝纤维化模型上再一次验证了 FAP 和肝纤维化发生发展的关系。提示 FAP 有望作为肝纤维化的新的治疗靶点, 有必要进行更为深入的研究。

参考文献

- [1] Friedman S L. Liver fibrosis: from mechanisms to treatment [J]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2007, 31(10): 812-814.
- [2] Chung K M, Hsu S C, Chu Y R, *et al.* Fibroblast activation protein (FAP) is essential for the migration of bone marrow mesenchymal stem cells through RhoA activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88772.
- [3] Wang X M, Yao T W, Nadvi N A, *et al.* Fibroblast activation protein and chronic liver disease [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 3168-3180.
- [4] Aertgeerts K, Levin I, Shi L, *et al.* Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19441-19444.
- [5] Huber M A, Kraut N, Park J E, *et al.* Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(2): 182-188.
- [6] Lessard J, Pelletier M, Biertho L, *et al.* Characterization of dedifferentiating human mature adipocytes from the visceral and subcutaneous fat compartments: fibroblast-activation protein alpha and dipeptidyl peptidase 4 as major components of matrix remodeling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122065.
- [7] Levy M T, McCaughan G W, Abbott C A, *et al.* Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis [J]. *Hepatology*, 1999, 29(6): 1768-1778.
- [8] 田华, 黄仁鹏, 靳占峰, 等. 成纤维细胞激活蛋白和转化生长因子- $\beta 1$ 在小鼠肝纤维化组织中的表达及相关性 [J]. *肝脏*, 2009, (06): 454-457.
- [9] 金树根, 王灵台, 任家滩, 等. 二甲基亚硝胺致大鼠肝纤维化的造模研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 1994, 4(1): 28-30.