

- PPD exerts anti-endometriosis effects by suppressing estrogen receptor-mediated inhibition of endometrial stromal cell autophagy and NK cell cytotoxicity[J]. Cell Death Disease, 2018, 9(5): 574-586.
- [11] VAN LOEVEZIJN A A, BARTELS S A L, VAN DUINJHOVEN F H, et al. Internal mammary chain sentinel nodes in early-stage breast cancer patients: toward selective removal[J]. Ann Surg Oncol, 2019, 26(4): 945-953.
- [12] MASOOD S. Prediction and assessment of response to neo-adjuvant chemotherapy in breast cancer: the responsibilities of breast pathologists[J]. Breast J, 2021, 27(8): 629-630.
- [13] 朱巧俐. 血清维生素 B₁₂、叶酸和同型半胱氨酸水平与乳腺癌发病风险的关系[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(16): 3230-3232.
- [14] 周宁, 王虎明, 张萱, 等. 血清同型半胱氨酸在乳腺癌靶向治疗中的临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(12): 1336-1339.
- [15] 高海翟, 包金, 黄晶. 叶酸和维生素 B₁₂ 与肿瘤关系的研究进展[J]. 广东医学, 2014, 35(10): 1620-1621.
- [16] CHOUDHURY H, PANDEY M, WEN L P, et al. Folic acid conjugated nanocarriers for efficient targetability and promising anticancer efficacy for treatment of breast cancer: a review of recent updates[J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(42): 5365-5379.
- [17] LO-BISGAARD T, ESPELUND U, FRYSTYK J, et al. Vitamin B₁₂ and its binding proteins in patients with non-small cell lung cancer referred to fast-track diagnostic work-up for lung cancer[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2020, 80(1): 14-19.
- [18] LOHMANN A E, LIEBMAN M F, BRIEN W, et al. Effects of metformin versus placebo on vitamin B₁₂ metabolism in nondiabetic breast cancer patients in CCTG MA. 32[J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 164(2): 371-378.
- [19] SUKIENNICKI G M, MARCINIAK W, MUSZYNSKA M, et al. Iron levels, genes involved in iron metabolism and antioxidative processes and lung cancer incidence[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0208610.
- [20] 朱丽, 黎莉. 乳腺癌患者血清糖类抗原 153、癌胚抗原、铁蛋白及降钙素水平变化的价值[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(5): 1069-1071.
- (收稿日期: 2022-09-06 修回日期: 2022-12-02)

• 短篇论著 •

原发性硬化性胆管炎小鼠 NK1R/TGF- β 1/miR-31 轴对胆汁瘀积及肝纤维化的影响

武云飞, 张卫彬, 杨 成, 李 博
锦州市中心医院普外二科, 辽宁锦州 121000

摘 要:目的 探讨原发性硬化性胆管炎小鼠神经激肽 1 受体(NK1R)/转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/微小 RNA-31(miR-31)轴对胆汁瘀积及肝纤维化的影响。方法 将 120 只雌性 SPF 级新生小鼠随机分为模型组、对照组及空白组, 每组 40 只, 比较 3 组实验小鼠及不同纤维化程度、不同胆汁淤积情况实验小鼠的 NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平差异。研究 NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平与肝脏的纤维化及胆汁淤积情况的相关性。结果 3 组实验小鼠 NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平比较, 差异均有统计学意义($P < 0.001$), 两两比较结果显示, NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平从高到低依次为模型组、对照组、空白组; 不同肝脏纤维化情况 NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平差异有统计学意义($P < 0.001$), 两两比较结果显示, NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平从高到低依次为早期肝硬化组、明显纤维化组、无明显纤维化组; 非胆汁淤积组实验小鼠的 NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平低于胆汁淤积组, 差异均有统计学意义($P < 0.001$); 实验小鼠 NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平与肝脏的纤维化($r = 0.741, 0.694, 0.587$, 均 $P < 0.001$)及胆汁淤积情况($r = 0.556, 0.559, 0.785$, 均 $P < 0.001$)均呈正相关。结论 原发性硬化性胆管炎小鼠 NK1R、TGF- β 1、miR-31 水平与胆汁瘀积、肝纤维化程度呈正相关, 可为临床诊断提供一定依据。

关键词:原发性硬化性胆管炎; 神经激肽 1 受体; 转化生长因子- β 1; 微小 RNA-31; 胆汁瘀积; 肝纤维化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.09.027

文章编号: 1673-4130(2023)09-1149-04

中图法分类号: R575.7

文献标志码: A

原发性硬化性胆管炎是临床较为常见的进行性非化脓性胆管疾病^[1]。流行病学调查显示, 原发性硬

化性胆管以女性多发, 临床主要以种肝内外胆管损伤、肝内胆汁淤积作为主要特征, 同时合并其他自身

免疫性疾病^[2]。在病理学研究中,原发性硬化性胆管主要表现为肝内胆管的进行性破坏^[3],进一步造成局部病灶部位的炎症反应及纤维化,而随着疾病的发展,最终会造成门脉高压及肝硬化,严重影响患者的生命质量^[4]。有研究报道指出,随着疾病的进展,门脉高压呈进行性进展,肝纤维化程度升高,肝功能下降^[5]。神经激肽 1 受体(NK1R)对炎症反应水平有一定指导意义^[6]。转化生长因子-β1(TGF-β1)是肝脏细胞病变及纤维化的重要指标。血清微小 RNA-31(miR-31)最早被认为是肿瘤细胞迁移的重要指征,但是近年研究认为,miR-31 对肝纤维化的不断浸染具有积极意义^[7]。本研究主要通过原发性硬化性胆管炎小鼠 NK1R/TGF-β1/miR-31 轴对胆汁淤积及肝纤维化的影响,为临床诊断及治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 120 只雌性 SPF 级新生小鼠由中科院提供;体重 180~217 g,平均(25.33±2.39)g;饲养条件:温度(21±2)℃,湿度 30%~70%,光照每昼夜 12 h。

1.2 仪器与试剂 仪器:酶标仪(DNM-9602,北京普朗新技术有限公司);台式高速冷冻离心机(TGL20M, JTLIANGYOU);恒温水浴箱(HH-W420/W600);PCR 仪[中科瑞泰(北京)生物科技有限公司]。试剂:Trizol 试剂(上海联硕生物科技有限公司);试剂盒(上海罗氏)。

1.3 方法

1.3.1 模型构建 将 120 只实验小鼠随机分为模型组、对照组、空白组 3 组,每组 40 只。模型组:腹腔注射聚肌胞苷酸(1%)建模,注射剂量 5 mg/kg,每周注射 2 次,对实验小鼠进行随机病理学检测。对照组:腹腔注射等量的生理盐水,注射剂量同模型组。空白

组:不采取任何处理措施。

1.3.2 标本处理 取肝组织放入 4%多聚甲醛固定中,后经乙醇脱水、石蜡包埋等步骤后,行连续切片后封闭。根据常规步骤进行 Masson 染色^[1],镜下观察肝组织病理形态。

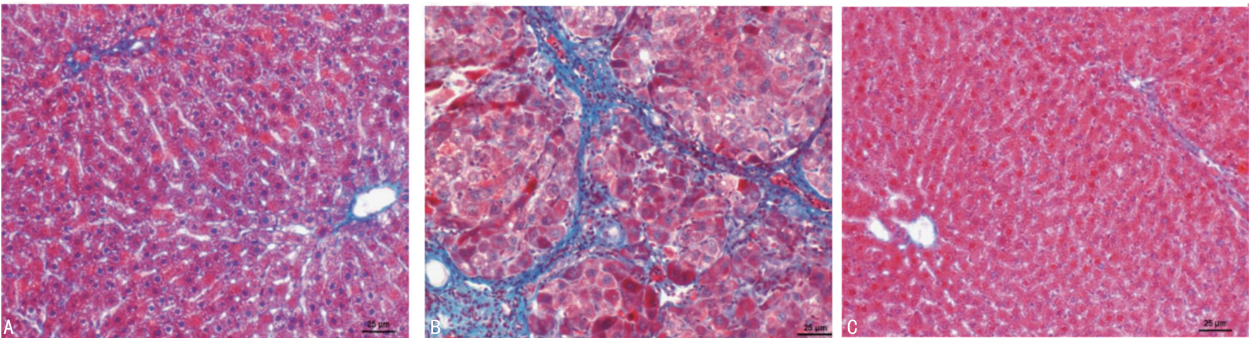
1.3.3 研究方法 分别对实验小鼠进行眼眶采血 4 mL,3 000 r/min 离心 10 min 取上清。采用酶联免疫试验检测实验小鼠血清 TGF-β1、TGF-β1 水平,采用荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 miR-31 水平。操作流程严格按照说明书进行。

1.3.4 观察指标 比较 3 组实验小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平,比较无明显纤维化组、明显纤维化组及早期肝硬化组实验小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平,比较胆汁淤积组及非胆汁淤积组小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 软件进行统计学分析,所有计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验,两组比较采用独立样本 *t* 检验,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Spearman 相关分析 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平与肝脏的纤维化及胆汁淤积情况的相关性。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠肝脏纤维化情况比较 取的样本后通过 Masson 染色观察 3 组小鼠肝组织结果变化,结果发现,空白组、对照组肝组织结构清晰,肝小叶完整,肝细胞索排列整齐,以中央静脉为中心呈放射状排列,汇管区仅有极少量的纤维组织。肝纤维化模型组小鼠部分肝小叶结构紊乱,有脂肪空泡、有大量炎症细胞浸润,并有假小叶形成,肝细胞普遍坏死,胶原纤维大量增生并形成纤维间隔。见图 1。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为空白组。

图 1 3 组小鼠肝脏纤维化情况比较(×200)

2.2 3 组小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平比较 3 组小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),两两比较结果显示,模型组 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平高于对照组、空白组,差

异均统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

2.3 不同肝脏纤维化情况小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平比较 无明显纤维化组、明显纤维化组、早期肝硬化组小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平差有

在统计学意义,两两比较结果显示,NK1R、TGF-β1、miR-31 水平从高到低依次为早期肝硬化组、明显纤维化组、无明显纤维化组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 3 组小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	NK1R(ng/L)	TGF-β1(ng/L)	miR-31
模型组	40	109.15±2.20 ^{ab}	1.45±0.26 ^{ab}	6.61±2.72 ^{ab}
对照组	40	89.21±2.53	0.77±2.25	1.23±0.43
空白组	40	69.71±1.81	0.41±0.11	1.06±0.21

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与空白组相比,^b $P < 0.05$ 。

表 2 不同肝脏纤维化情况小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	NK1R(ng/L)	TGF-β1(ng/L)	miR-31
无明显纤维化组	12	100.73±2.93	1.15±0.44	5.71±1.25
明显纤维化组	18	110.85±1.67 ^a	1.49±0.51 ^a	6.85±1.17 ^a
早期肝硬化组	10	116.19±2.76 ^{ab}	1.74±0.78 ^{ab}	7.25±1.12 ^{ab}

注:与无明显纤维化组相比,^a $P < 0.05$;与明显纤维化组相比,^b $P < 0.05$ 。

2.4 不同胆汁淤积情况小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平比较 非胆汁淤积组 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平低于胆汁淤积组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同胆汁淤积情况小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	NK1R(ng/L)	TGF-β1(ng/L)	miR-31
非胆汁淤积组	15	99.33±1.33	1.05±0.45	5.21±1.77
胆汁淤积组	25	115.04±1.57	1.69±0.33	7.45±1.55
<i>t</i>		33.762	4.789	4.056
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.5 相关性分析 Spearman 相关性分析显示,实验小鼠的 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平与肝脏纤维化情况($r = 0.741、0.694、0.587$,均 $P < 0.001$)及胆汁淤积情况($r = 0.556、0.559、0.785$,均 $P < 0.001$)均呈正相关。

3 讨 论

肝纤维化是肝硬化前期的一种病理变化,多数造成慢性肝损害的因素均可能导致肝纤维化。在病毒感染、酒精及遗传等各种致病因素影响下,肝细胞被破坏^[8],反复性肝细胞损伤、修复,以及细胞外基质在肝脏内的沉积^[9],从而引起肝脏结构和功能发生改变,进而引起肝纤维化。目前研究认为肝纤维化及早期肝硬化通过适当的治疗可以得到控制和逆转^[10]。

肝纤维化的诊断多采取肝脏穿刺活检,但是肝脏活检存在依从性不高、易受取材部位影响的局限性,而血清学指标检测简便、快捷,并可有效避免由于取材造成的误差,对于患者的预后评价更加直观^[11]。

本研究结果显示,随着实验小鼠肝脏纤维化程度升高,实验小鼠 NK1R、TGF-β1、miR-31 水平呈上升趋势。有研究显示,NK1R 主要反映了机体免疫细胞的活性,随着 NK1R 水平升高,进一步调控局部病灶部位的 SP 水平,提升炎症反应水平^[12]。而在肝硬化疾病的进展中,自身免疫性细胞对于局部病灶部位的肝细胞及病毒造成损伤的肝细胞进行吞噬,加剧疾病的进展^[13]。这提示在肝脏纤维病变过程中,NK1R 可通过对自身免疫系统的上调作用,进一步刺激机体的自身免疫细胞的激活,对于疾病的进展具有主要意义。TGF-β1 在肝细胞纤维化转变过程中发挥着重要的作用。有研究显示,TGF-β1 是调节细胞生长及分化的重要蛋白^[14]。而在本研究中,随着肝脏细胞的不断纤维化病变,抑制 IL-3、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)所诱导小鼠造血前体细胞和长期骨髓液体培养(LTB-MC)的集落形成^[15],并降低巨核细胞对 IL-3 和 CSF 的反应性,进一步造成病变细胞自身吞噬,而在不同胆汁淤积情况的分析中,随着胆汁在肝细胞内的不断淤积,自身免疫细胞对于局部病灶部位的吞噬细胞对于损伤细胞的修复不断增强,而在此过程中造成的肝细胞的损伤也在升高,局部炎症反应呈现级联反应,进一步促进 TGF-β1 水平升高。miR-31 最早在肿瘤细胞中发现,在肝脏细胞的纤维化的发展中主要通过 NK1R、TGF-β 的协同作用,进而导致肝细胞的坏死^[16]。本研究结果显示,NK1R、TGF-β、miR-31 与肝细胞内的胆汁淤积及肝脏纤维化的疾病进程呈正相关。但是,本研究还存在一定的局限性,由于纳入的样本量较小,有待进行大样本研究进一步验证。

原发性硬化性胆管炎小鼠的 NK1R、TGF-β1、miR-31 和胆汁瘀积、肝纤维化程度均升高,且 NK1R、TGF-β1、miR-31 升高与胆汁瘀积及肝纤维化升高呈正相关,可为临床诊断提供一定的依据。

参考文献

[1] 孙鑫,黄恺,张满,等. HBV-Tg 复合四氯化碳模型小鼠肝内淋巴细胞亚群变化特点及其与 HBV 病毒学和肝纤维化的相关性分析[J]. 中华肝脏病杂志,2020,28(7):580-585.

[2] 余海燕,韦进香,付海艳,等. 原发性胆汁性胆管炎患者肝组织中自然杀伤细胞活化性受体及其配体的表达及意义[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(11):2456-2461.

[3] 陈萍,高琴,王智,等. 二甲双胍通过调节成纤维细胞生长

因子 21 抑制肥胖小鼠脂肪肝及改善白色/棕色脂肪平衡[J]. 解剖学研究, 2021, 43(5):7.

[4] KLIONSKY D J, ABDEL-AZIZ A K, ABDELATAH S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1[J]. Autophagy, 2021, 17(1):1-382.

[5] LI Y, LI S, XIA Y, et al. Alteration of liver immunity by increasing inflammatory response during co-administration of methamphetamine and atazanavir[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2020, 42(3):237-245.

[6] KEFAYAT A, GHAHREMANI F, SAFAVI A, et al. Spirulina extract enriched for Braun-type lipoprotein (Immulina®) for inhibition of 4T1 breast tumors' growth and metastasis[J]. Phytother Res, 2020, 34(2):368-378.

[7] TRIOZZI P L, SCHOENFIELD L, PLESEC T, et al. Molecular profiling of primary uveal melanomas with tumor-infiltrating lymphocytes[J]. Oncoimmunology, 2019, 8(10):e947169.

[8] GOODALL K J, NGUYEN A, MATSUMOTO A, et al. Multiple receptors converge on H2-Q10 to regulate NK and $\gamma\delta$ T-cell development[J]. Immunol Cell Biol, 2019, 97(3):326-339.

[9] GROTH C, VAN GRONINGEN LFJ, MATOS TR, et al. Phase I / II trial of a combination of anti-CD3/CD7 immunotoxins for steroid-refractory acute graft-versus-host disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2019, 25(4):712-719.

[10] LUNDGREN L, MUSZYNSKA C, ROS A, et al. Management of incidental gallbladder cancer in a national cohort[J]. Br J Surg, 2019, 106(9):1216-1227.

[11] MCDANIEL MIMS B, GRISHAM M B, GRISHAM. Humanizing the mouse immune system to study splanchnic organ inflammation[J]. J Physiol, 2018, 596(17):3915-3927.

[12] ADOTEVI O, GODET Y, GALAINE J, et al. In situ delivery of allogeneic natural killer cell (NK) combined with Cetuximab in liver metastases of gastrointestinal carcinoma: a phase I clinical trial[J]. Oncoimmunology, 2018, 7(5):e1424673.

[13] FOERSTER F, BOEGEL S, HECK R, et al. Enhanced protection of C57 BL/6 vs Balb/c mice to melanoma liver metastasis is mediated by NK cells[J]. Oncoimmunology, 2018, 7(4):e1409929.

[14] DOMOUCHTSIDOU A, BARSEGHIAN V, MUELLER S P, et al. Impaired lymphocyte function in patients with hepatic malignancies after selective internal radiotherapy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2018, 67(5):843-853.

[15] BONI C, VECCHI A, ROSSI M, et al. TLR7 agonist increases responses of hepatitis B virus-specific T cells and natural killer cells in patients with chronic hepatitis B treated with nucleos(t)ide analogues[J]. Gastroenterology, 2018, 154(6):1764-1777.

[16] LI H, ZHAI N, WANG Z, et al. Regulatory NK cells mediated between immunosuppressive monocytes and dysfunctional T cells in chronic HBV infection[J]. Gut, 2018, 67(11):2035-2044.

(收稿日期:2022-07-20 修回日期:2022-12-02)

(上接第 1139 页)

[15] PARK Y, KIM J. Regulation of IL-6 signaling by miR-125a and let-7e in endothelial cells controls vasculogenic mimicry formation of breast cancer cells[J]. BMB Rep, 2019, 52(3):214-219.

[16] TURAL D, SERDENGECTI S, DEMIRELLI F, et al. Clinical significance of p95HER2 overexpression, PTEN loss and PI3K expression in p185HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies[J]. Br J Cancer, 2014, 110(12):2996.

[17] TEKESIN K, EMIN GUNES M, BAYRAK S, et al. PTEN loss is a predictive marker for HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies[J]. J BUON, 2019, 24(5):1920-1926.

[18] WEI H, CUI R, BAHR J, et al. miR-130a deregulates pten and stimulates tumor growth[J]. Cancer Res, 2017, 77(22):6168-6178.

[19] PADEGIMAS A, CLASEN S, KY B. Cardioprotective strategies to prevent breast cancer therapy-induced cardiotoxicity[J]. Trends Cardiovasc Med, 2020, 30(1):22-28.

[20] NICOLAZZI M A, CARNICELLI A, FUORLO M, et al. Anthracycline and trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(7):2175-2185.

[21] HENRY M L, NIU J, ZHANG N, et al. Cardiotoxicity and cardiac monitoring among chemotherapy-treated breast cancer patients[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2018, 11(8):1084-1093.

[22] PAKRAVAN G, FOROUGHMAND A M, PEYMANI M, et al. Downregulation of miR-130a, antagonized doxorubicin-induced cardiotoxicity via increasing the PPAR γ expression in mESCs-derived cardiac cells[J]. Cell Death Dis, 2018, 9:758.

(收稿日期:2022-07-06 修回日期:2023-01-09)