

维生素 D 及维生素 D 受体在慢性乙型肝炎患者体内表达水平及抗病毒相关机制的研究

汪玲妹, 管世鹤, 张浩, 杨凯, 汪静, 严荣荣, 李太平, 李姣

摘要 目的 研究维生素 D (Vit D)、肝脏维生素 D 受体 (VDR) 在慢性乙型肝炎 (CHB) 患者体内表达水平及其与肝功能、乙型肝炎病毒 (HBV) 血清学指标相关性, 并进一步探讨 Vit D 体外能否发挥抗病毒作用。方法 检测 81 例初治 CHB 患者和 40 例健康体检者血清 Vit D 含量; 采用免疫组化技术分析肝组织 VDR 表达情况; Vit D 单独及联合 IFN- α 处理 HepG 2. 2. 15 细胞, 检测处理后细胞培养上清液 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 含量, 分析各组细胞 VDR、IRF-9、MxA 蛋白表达水平。结果 CHB 组血清 Vit D 含量低于健康对照 (HC) 组 ($P < 0.05$); CHB 组血清 Vit D 与白蛋白 (ALB) 呈正相关性 ($r = 0.339, P = 0.002$), 与 HBV DNA 载量呈负相关性 ($r = -0.274, P = 0.013$), 与 e 抗原状态有关 ($P < 0.05$), 与丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、碱性磷酸酶 (ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶 (GGT)、HBsAg、HBeAg 等无相关性; Vit D、VDR 表达与 CHB 严重程度相关, 重度 CHB 患者血清 Vit D、肝组织中 VDR 表达水平低于轻、中度 CHB 患者; Vit D + IFN- α 联合组较空白组、单独处理组 HepG 2. 2. 15 细胞 VDR、JAK-STAT 途径分子 IRF-9 及下游抗病毒蛋白 MxA 的表达增强, HBV 相关抗原分泌下降。结论 慢乙肝患者体内可能存在 Vit D/VDR 信号通路的功能下降, Vit D 可能通过上调 VDR 表达进而增强 IFN-JAK-STAT 信号途径发挥协同 IFN- α 抗病毒效应。

关键词 慢性乙型肝炎; 维生素 D; 维生素 D 受体

中图分类号 R 446.62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)06-0882-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.012

维生素 D (vitamin D, Vit D) 是一种常见的维生素, 既往认为其主要参与机体骨钙磷代谢, 最新研究^[1]表明 Vit D 具有调节先天性免疫和适应性免疫的重要作用, 且 Vit D 缺乏与各种自身免疫性疾病、

病原体感染等风险增加相关。Vit D 的基线水平与 VDR 基因多态性影响病毒性肝炎的自然病程以及聚乙二醇化干扰素 (pegylated interferon, Peg-IFN) 治疗的反应^[2-3]。进一步研究^[4]发现, Vit D 能够通过增强 IFN- α 诱导的基因表达, 增强 IFN- α 对丙型肝炎病毒复制的抑制作用, 而非活性维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 能够结合 STAT1 进而抑制 JAK-STAT 信号转导途径。目前, 关于 Vit D、VDR 在 CHB 中作用尚未完全清楚, 为此该研究分析了 CHB 患者 Vit D、VDR 表达与乙型肝炎相关指标关系, 同时通过体外细胞系研究 Vit D 和 IFN- α 单独及联合处理对 HBV 复制水平的影响及其可能存在的机制, 从而为临床抗 HBV 治疗提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 MEM 培养液购自美国 HyClone 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自杭州四季青公司; 细胞培养双抗购自上海碧云天生物科技有限公司; IFN- α 购自合肥安科生物公司; Vit D 试剂购自上海阿拉丁公司; 抗干扰素调节因子 9 (IFN regulatory factor-9, IRF-9) 抗体、抗粘病毒 A 蛋白 (Mx GTPase A, MxA) 抗体、抗-VDR 抗体均购自英国 Abcam 公司; 抗- β -actin 抗体购自美国 Affinity 公司; 山羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 底物发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.1.2 病例资料 选取 2018 年 1~12 月在安徽医科大学第二附属医院感染科收治的 CHB 患者共计 81 例, 男 63 例, 女 18 例。CHB 的诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南 (2015 年版)》。排除标准: ① 存在其他肝脏疾病如丙型肝炎、脂肪肝、酒精性肝病、药物性肝病、自身免疫性肝病、肝硬化等; ② 曾接受干扰素和或核苷 (酸) 类药物抗病毒治疗; ③ 癌症或其他严重的慢性疾病; ④ 近 3 个月服用 Vit D 制剂。选择同期体检人群健康者 40 例作为健康对照 (health control, HC) 组。

2020-03-11 接收

基金项目: 安徽省科技厅重点研究与开发计划项目 (编号: 1804h08020236); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (编号: KJ2019A0276)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601

作者简介: 汪玲妹, 女, 硕士研究生;

管世鹤, 男, 教授, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shihguan@126.com

1.2 方法

1.2.1 肝功能指标、Vit D 及 HBV 相关指标定量检测 肝功能指标如: 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、白蛋白 (albumin, ALB)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶 (gamma-glutamyl transferase, GGT) 由德国西门子全自动生化分析仪 Dimension EXL TM with LM 检测, Vit D 及 HBV 血清学指标分别由瑞士罗氏全自动电化学发光分析仪 Cobas e602 和雅培全自动化学发光分析仪 i4000 SR 检测。HBV DNA 定量检测按照检测试剂盒 (上海复星长征医学科学有限公司) 说明书步骤操作。

1.2.2 免疫组织化学染色检测 CHB 患者肝组织中 VDR 表达 肝穿标本经超声引导下穿刺取得, 采用 Power Vision TM 二步法对肝组织标本进行染色, 操作严格按照产品说明书进行, 染色结果由光学显微镜下观察得到。

1.2.3 细胞培养及处理 HepG 2.2.15 细胞以 MEM 培养液添加 10% FBS、 10^5 IU/L 青霉素、 10^5 IU/L 链霉素, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。细胞计数后, 按 5×10^5 /孔接种于 12 孔板, 待 HepG 2.2.15 细胞生长到 70% ~ 80% 融合时进行处理, 分为空白组、IFN- α (10^5 IU/L) 处理组、Vit D ($1 \mu\text{mol/L}$) 处理组和联合处理组。加药处理后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.2.4 Western blot 技术分析 细胞 PBS 冲洗 3 次, 各孔加含 PMSF (体积比 1:100) 的 RIPA 裂解液 100 μl , 冰上裂解 30 min 后刮取细胞至 EP 管, 离心 (15 000 r/min、30 min 4 °C) 后收集上清液, BCA 法进行蛋白定量, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 沸水中煮 10 min, 冷却, 配胶 (10% 分离胶 + 5% 浓缩胶) 电泳分离, 半干转法转移到 PVDF 膜上, 室温下用封闭液 (5% 的牛奶) 封闭 1 h, TBST 清洗 3 次, 加入一抗 (抗-IRF-9 抗体: 1:2 000; 抗-MxA 抗体: 1:1 000; 抗-VDR 抗体: 1:1 00) 中 4 °C 震荡过夜, 第 2 天清洗后于室温下二抗 (山羊抗兔 IgG 抗体: 1:5 000) 中孵育 1 h, 清洗待用。吸取等量的 ECL 2 种试剂, 混合均匀后均匀涂抹在 PVDF 膜表面, 在自动显影仪上曝光, β -actin 作为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验对计量资料进行正态分布检验, 正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态

分布数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。两组结果比较采用两独立样本 t 检验或 Mann-Whitney U 检验, 多组结果比较采用方差分析, 构成比比较采用卡方检验, 相关性采用 Pearson 和 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人口学资料及实验室指标 本研究纳入 CHB 组 81 例, 健康对照组 (health control, HC) 40 例, 两组年龄及性别特征无统计学差异。与 HC 组比较, CHB 组患者肝功能指标 ALT、AST、ALB、ALP、GGT 差异有统计学意义 ($P \leq 0.001$) (表 1)。

表 1 研究对象基本资料 [$\bar{x} \pm s$, $M(P_{25}, P_{75})$]

参数	CHB ($n=81$)	HC ($n=40$)	统计量值	P 值
年龄 (岁)	35 (29, 45)	36 (33, 38)	0.409	0.522
性别 (n 男/女)	63/18	29/11	-0.088	0.930
ALT (U/L)	135.0 (77.0, 268.0)	19.0 (14.0, 26.0)	-8.560	<0.001
AST (U/L)	65.0 (42.0, 112.0)	20.0 (16.0, 23.0)	-8.516	<0.001
ALB (g/L)	39.1 $\pm$ 4.4	43.3 $\pm$ 2.7	-9.630	0.001
TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	14.9 (10.7, 21.6)	15.1 (11.5, 20.1)	-0.430	0.667
ALP (U/L)	92.0 (75.3, 114.0)	77.0 (59.5, 85.8)	-3.961	<0.001
GGT (U/L)	49.5 (29.0, 115.8)	23.0 (14.5, 31.0)	-4.881	<0.001
HBsAg (log ₁₀ IU/ml)	3.7 $\pm$ 0.7	阴性		
HBcAb (S/CO)	9.8 $\pm$ 1.4	阴性		
HBV DNA (Log ₁₀ IU/ml)	5.85 $\pm$ 1.4	阴性		
HBeAg (n 阳/阴)	42/39	0/0		

2.2 CHB 患者血清 Vit D 含量及分布 血清 Vit D 含量在 CHB 组和 HC 组分别为 (25.04 ± 7.50) ng/ml 和 (27.71 ± 5.55) ng/ml, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。目前广泛接受的 Vit D 含量定义为正常 (>30 ng/ml)、不足 ($20 \sim 30$ ng/ml)、缺乏 (<20 ng/ml) [5]。CHB 组中患者血清 Vit D 含量正常、不足、缺乏比例分别为 24.69% (20/81)、45.68% (37/81)、29.63% (24/81); HC 组中 Vit D 含量正常、不足、缺乏比例分别为 30% (12/40)、65% (26/40)、5% (2/40), CHB 患者不同含量 Vit D 构成与 HC 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 1)。

2.3 CHB 患者血清 Vit D 水平与肝功能、HBV 血清学指标相关性 ALT、AST、ALB 和 TBIL 是评估 CHB 严重程度常用的生化指标, 尤其 ALT 和 AST 在 CHB 临床分期和治疗中具有重要意义。通过 Pearson 和 Spearman 相关分析, CHB 组血清 Vit D 水平与 ALB 呈正相关性 ($r = 0.339$, $P = 0.002$), 而与其它肝功生化指标 ALT、AST、TBIL、ALP、GGT 间无

相关性; CHB 患者血清 Vit D 水平与 HBV DNA 呈负相关性($r = -0.274$, $P = 0.013$), 与 HBsAg、HBeAg 无相关性。HBeAg 阳性患者血清 Vit D 水平(23.43 ± 7.86) ng/ml 与 HBeAg 阴性患者 Vit D 水平(26.77 ± 6.78) ng/ml 相比差异有统计学意义($P < 0.05$) (图 2)。

2.4 CHB 分期与血清 Vit D、肝组织中 VDR 表达关系 据 ALT、AST、TBIL、ALB 等指标将 CHB 患者分为轻度($n = 19$)、中度($n = 49$)、重度($n = 13$)。血清 Vit D 水平与 CHB 严重程度相关, 中度 CHB 患者血清 Vit D 水平(25.46 ± 6.53) ng/ml 及重度 CHB 患者血清 Vit D 水平(17.19 ± 3.04) ng/ml 低于轻度 CHB 患者血清 Vit D(29.98 ± 7.77) ng/ml, 且重度 CHB 患者血清 Vit D 水平低于中度 CHB 患者血清 Vit D (图 3A)。免疫组化染色显示, CHB 患

者肝组织 VDR 表达较健康人群降低, 且随肝炎严重程度加重而表达下降(图 3B)。

2.5 Vit D 和 IFN- α 单独及联合处理 HepG2. 2. 15 细胞后 HBV 血清学指标及 VDR、MxA、IRF-9 蛋白表达水平分析 经 Vit D 单独及联合 IFN- α 处理 HepG2. 2. 15 细胞后, 与空白组相比, IFN- α + Vit D 联合处理组对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制作用大于 IFN- α 组和 Vit D 组; 与 IFN- α 组相比, IFN- α + Vit D 联合处理组上清液中 HBsAg、HBeAg 分泌下降, 其中 HBsAg 差异有统计学意义($P < 0.05$)。运用实时荧光定量 PCR 分析细胞上清液 HBV DNA, 各处理组未见明显抑制作用(表 2)。经 Vit D 单独及联合 IFN- α 处理后, HepG2. 2. 15 内 VDR、IRF-9 和 MxA 蛋白的表达量增高(图 4)。

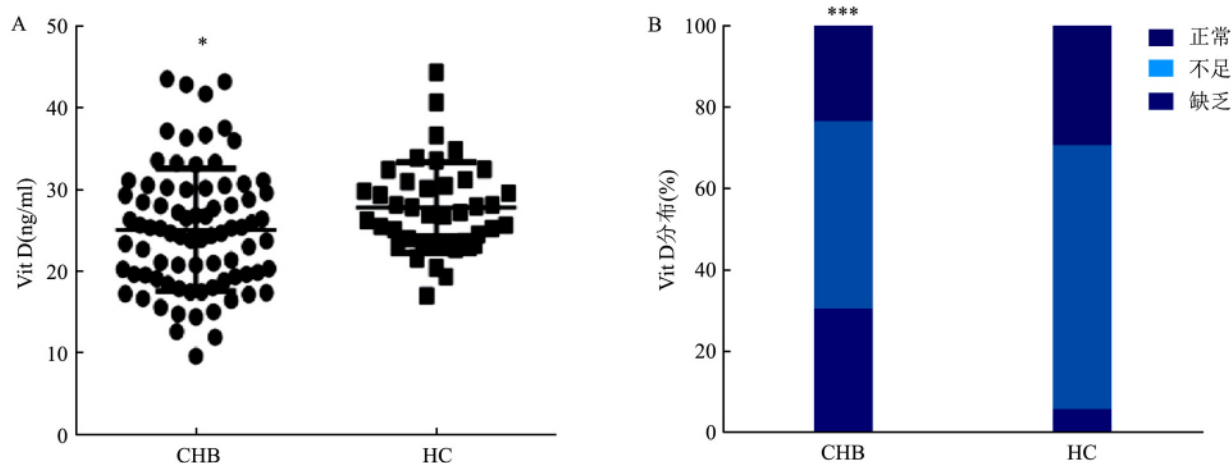


图1 CHB 组和 HC 组血清 Vit D 含量及分布
与 HC 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

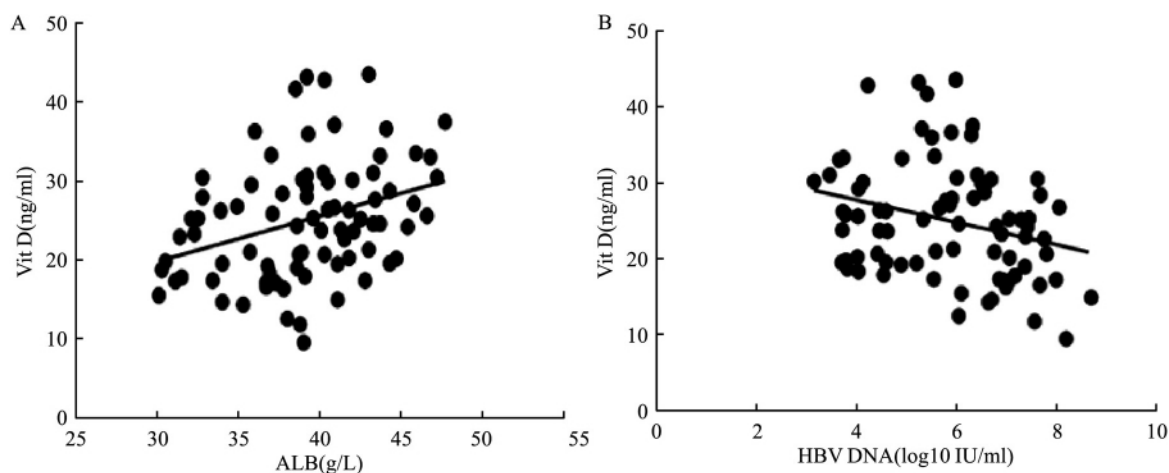


图2 CHB 患者血清 Vit D 水平与 ALB、HBV DNA 关系

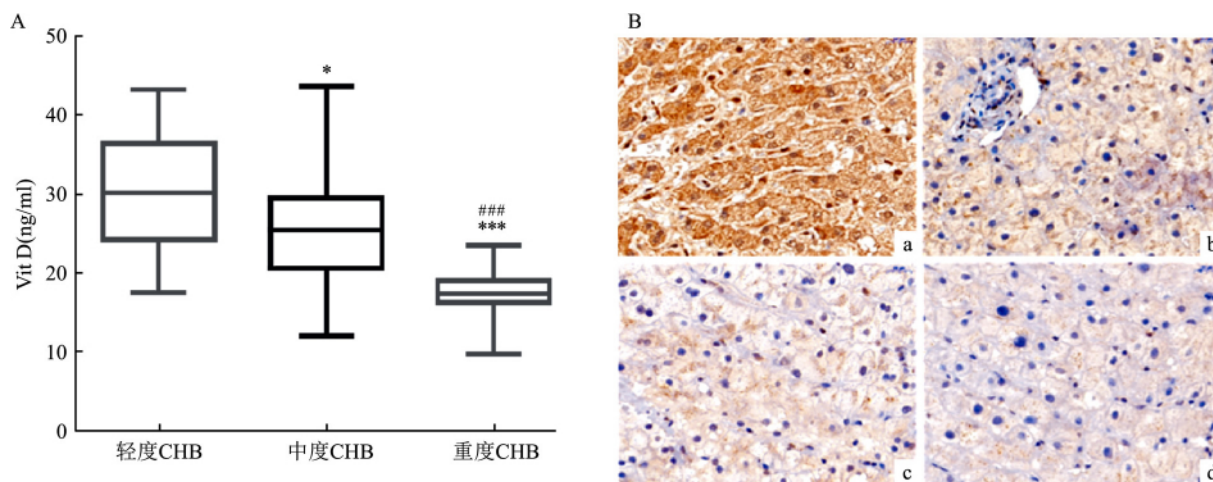
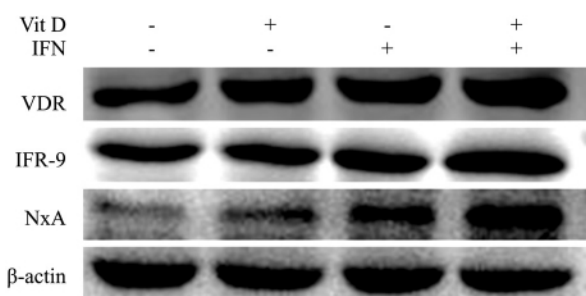


图3 CHB分期与血清Vit D、肝组织中VDR表达水平关系 ×200

A: 不同程度CHB患者血清Vit D水平; B: VDR在CHB患者及正常肝组织中的表达; a: 正常; b: 轻度; c: 中度; d: 重度; 与轻度CHB比较:

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与中度CHB比较: ### $P < 0.001$ 表2 Vit D和IFN- α 单独及联合处理后细胞培养上清液HBV血清学指标($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	HBsAg (IU/ml)	HBeAg (S/CO)	HBV DNA (Log10 IU/ml)
空白	69.44 ± 8.96	64.64 ± 6.14	4.95 ± 0.04
Vit D	56.00 ± 8.04	58.81 ± 6.13	4.90 ± 0.05
IFN- α	50.98 ± 3.29*	48.15 ± 4.78*	4.89 ± 0.75
IFN- α + Vit D	43.39 ± 2.74***	45.72 ± 4.86*	4.87 ± 0.04
F值	8.830	7.845	1.249
P值	0.006	0.009	0.355

与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与IFN- α 组比较: # $P < 0.05$ 图4 Vit D和IFN- α 单独及联合处理后细胞VDR、MxA、IRF-9蛋白表达水平

3 讨论

Vit D 活性形式为 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 一般认为经食物或光照来源的 Vit D 前体首先在肝脏中被羟化成 $25(\text{OH})\text{D}_3$, 随后在肾脏中被羟化成 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 。近来研究^[6]发现, Vit D 代谢酶也存在于多种组织中, 如胎盘、皮肤和免疫细胞, 同时, 某些信号如 IFN 或 Toll 样受体可刺激相关酶表达, 使巨噬细胞产生具有生物活性的代谢物 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 。

Chen et al^[7] 长期随访 128 例初治 CHB 患者发现, CHB 患者基线 Vit D 水平明显低于健康人群, 与血清 HBV DNA 载量呈负相关, 经过核苷(酸)类似物治疗后, 整体 Vit D 水平有所上升, 且发生 e 抗原转换 CHB 患者血清 Vit D 水平高于 e 抗原持续阳性患者, 提示 CHB 患者体内 Vit D 水平对抗病毒疗效有一定的预测价值。本研究通过分析健康体检者、初治 CHB 患者血清 Vit D 水平与实验室参数间关系, 表明 CHB 患者血清 Vit D 水平低于健康体检者, 与 HBV DNA 载量、e 抗原状态相关, 这也与 Chen et al^[7] 研究一致。

VDR 是一种 48 ku 大小的可溶性蛋白, 属于核受体超家族成员, 几乎所有组织中都有表达, 与 Vit D 通过配体-受体模式激活, 作用于靶基因上的特定 DNA 序列, 进而调节结构基因的表达^[8]。研究^[9]表明慢性丙型肝炎患者肝脏 VDR 表达显著低于健康人群, 与肝脏损伤严重程度密切相关, 并且在获得完全病毒学应答的患者中肝脏 VDR 表达高于未获得患者, 提示慢性丙型肝炎患者体内可能存在 Vit D/VDR 信号通路的功能下降, 进而影响抗病毒效果乃至疾病进程。同样, 有体外实验^[10]发现 VDR 在 HBV 转染细胞中表达下调, 相应减少了 CAMP、TNF- α 等因子表达, 不利于 Vit D 发挥对 HBV 转录和翻译的抑制作用。此外, 有研究^[11]报道 Vit D 可通过 VDR 抑制 TGF- β /SMAD3 信号通路, 从而抑制肝星状细胞激活以此减轻肝纤维化, 通过长期随访提出 Vit D 基因多态性与丙型肝炎进展有关。本研究显示 CHB 患者血清 Vit D、肝组织中

VDR 表达与 CHB 严重程度负相关,提示 CHB 患者体内可能也存在 Vit D/VDR 信号通路的功能下降,这可能不利于药物发挥抗病毒作用,甚至加速 CHB 转变为肝纤维化乃至肝硬化的进程。

有研究^[12]表明,Vit D 可诱导 IFN 介导的信号通路的表达,进而发挥抗丙型肝炎病毒效应。本研究显示 Vit D 处理后 HepG2. 2. 15 细胞内抗病毒蛋白 MxA 表达升高,同时细胞分泌的 HBV 相关抗原出现下降趋势,提示 Vit D 可能通过作用于 IFN- α JAK-STAT 通路,上调抗病毒蛋白 MxA 表达,进而影响病毒复制。另有研究^[6]发现,Vit D 与 IFN- α 发挥协同效应,增强 IFN- α 抗病毒活性。本研究进一步采用 Vit D 与 IFN- α 联合处理 HepG2. 2. 15 细胞,显示 IRF-9 和 MxA 蛋白的表达及对 HBV 抗原抑制作用较 IFN- α 单独处理增强,与其研究一致,表明 Vit D 可能通过增强 HepG2. 2. 15 细胞 JAK-STAT 途径分子 IRF-9 及下游抗病毒蛋白 MxA 的表达,抑制 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 抗原分泌,增强 IFN- α 的药效。同时,Bi et al^[13]发现较 IFN- α 单独处理,Vit D 与 IFN- α 联合处理乙型肝炎模型小鼠病毒复制及抗原分泌显著降低,有较好的预后,这可能是加强了药物疗效带来的良好反应。因此,定期监测及维持 CHB 患者体内一定的 Vit D 水平可能有助于 CHB 患者的病情评估以及疾病控制。

参考文献

- [1] Zhang Z, Chen F, Li J, et al. 1,25(OH)₂D₃ suppresses proinflammatory responses by inhibiting Th1 cell differentiation and cytokine production through the JAK/STAT pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(8): 2737–46.
- [2] Chan H L, Elkhatab M, Trinh H, et al. Association of baseline vitamin D levels with clinical parameters and treatment outcomes in chronic hepatitis B [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(5): 1086–92.
- [3] Mostafa-Hedeab G, Sabry D, Abdelaziz G M, et al. Influence of

- vitamin D receptor gene polymorphisms on response to pegylated interferon in chronic hepatitis B egyptian patients [J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2018, 6(2): 186–96.
- [4] Lange C M, Gouttenoire J, Duong F H, et al. Vitamin D receptor and Jak-STAT signaling crosstalk results in calcitriol-mediated increase of hepatocellular response to IFN- α [J]. *J Immunol*, 2014, 192(12): 6037–44.
- [5] Xuan H N, Van T H, Huu S L, et al. Vitamin D deficiency and hepatitis viruses-associated liver diseases: a literature review [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(4): 445–60.
- [6] Trochoutsou A I, Kloukina V, Samitas K, et al. Vitamin-D in the immune system: genomic and non-genomic actions [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2015, 15(11): 953–63.
- [7] Chen E Q, Bai L, Zhou T Y, et al. Sustained suppression of viral replication in improving vitamin D serum concentrations in patients with chronic hepatitis B [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15441.
- [8] Takada I, Makishima M. Therapeutic application of vitamin D receptor ligands: an updated patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25(12): 1373–83.
- [9] Petta S, Grimaudo S, Tripodo C, et al. The hepatic expression of vitamin D receptor is inversely associated with the severity of liver damage in genotype 1 chronic hepatitis patients [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(1): 193–200.
- [10] Gotlieb N, Tachlytski I, Lapidot Y, et al. Hepatitis B virus down-regulates vitamin D receptor levels in hepatoma cell lines, thereby preventing vitamin D-dependent inhibition of viral transcription and production [J]. *Mol Med*, 2018, 24(1): 53–60.
- [11] de Azevedo L A, Matte U, Da S T, et al. Genetic variants underlying vitamin D metabolism and VDR-TGF- β -SMAD3 interaction may impact on HCV progression: a study based on dbGaP data from the HALT-C study [J]. *J Hum Genet* 2017 62(11): 969–77.
- [12] Gal Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, et al. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1570–9.
- [13] Bi Y, Zhang W, Sun J, et al. Therapeutic and immune function improvement of vitamin D combined with IFN- α on mouse with hepatitis B infection [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2018, 32: 2058738418775250.

Study on the expression levels and the related antiviral mechanisms of vitamin D and vitamin D receptor in patients with chronic hepatitis B

Wang Lingmei, Guan Shihe, Zhang Hao, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To analyze the expression levels of vitamin D (Vit D), liver vitamin D receptor (VDR) in patients with chronic hepatitis B (CHB) and its correlations with liver function and hepatitis B virus (HBV) serological indicators, and further explore whether Vit D can exert antiviral effects *in vitro*. **Methods** The serum levels of Vit D were measured in 81 untreated CHB patients and 40 healthy subjects. The expression of VDR in liver tissue was analyzed by immunohistochemistry. HBV-related parameters (HBsAg, HBeAg, HBV DNA) in cell culture supernatants and the protein expressions (VDR, IRF-9, MxA) in cells were detected after HepG2. 2. 15 cells

网络出版时间: 2020/5/29 13:03 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.013.html>

过表达 miR-34a 脂肪干细胞外泌体调控增生性瘢痕成纤维细胞增殖及凋亡的研究

肖向阳 郑德义 王宝云 李自力

摘要 目的 探讨脂肪干细胞(ADSCs)过表达 miR-34a 后释放的外泌体对人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)增殖及凋亡的影响。方法 从人脂肪组织中分离原代 ADSCs,流式细胞术鉴定其表面标记分子,茜素红和碱性磷酸酶染色观察其成骨分化能力;采用 miR-34a 过表达慢病毒感染 ADSCs,获得 miR-34a 过表达的 ADSCs(ADSCs/miR-34a)和阴性对照的 ADSCs(ADSCs/miR-NC),然后提取各组细胞上清液中的外泌体,获得 ADSCs 外泌体($\text{Exo}^{\text{ADSCs}}$)、miR-34a 过表达的 ADSCs 外泌体($\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-34a}}$)和阴性对照的 ADSCs 外泌体($\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-NC}}$)。利用透射电镜观察外泌体形态,Western blot 检测外泌体表面标志蛋白 CD81 和 CD63;再将得到的外泌体分别与 HSF 共培养,分为对照组(HSF + PBS)、 $\text{Exo}^{\text{ADSCs}}$ 处理组(HSF + $\text{Exo}^{\text{ADSCs}}$)、 $\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-NC}}$ 处理组(HSF + $\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-NC}}$)和 $\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-34a}}$ 处理组(HSF + $\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-34a}}$)。采用 qRT-PCR 法检测各组 ADSCs 及外泌体中 miR-34a 的表达水平;MTT 法检测各组 HSF 细胞的增殖能力;流式细胞术检测各组 HSF 细胞的凋亡水平。Western blot 法检测各组 HSF 细胞凋亡相关蛋白(cleaved-Caspase-3、

Bax 和 Bcl-2)、纤维化相关蛋白(COL I、COL III)及 TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白(TGF- β 1、p-Smad2 和 p-Smad3)的表达水平。结果 成功分离得到 ADSCs,并具有成骨分化能力;透射电镜可见直径在 50 ~ 100 nm 呈双层膜结构的圆形或椭圆形囊泡状小体,Western blot 显示外泌体标志蛋白 CD81 和 CD63 阳性表达;miR-34a 过表达可增加 ADSCs 及其外泌体中 miR-34a 表达水平;与 $\text{Exo}^{\text{ADSCs}}$ 处理组和 $\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-NC}}$ 处理组比较, $\text{Exo}^{\text{ADSCs/miR-34a}}$ 干预可抑制 HSF 增殖($P < 0.05$),提高其凋亡率($P < 0.05$),并上调 cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平($P < 0.05$),并下调 Bcl-2、COL I、COL III、p-Smad2、p-Smad3 和 TGF- β 1 等蛋白表达水平($P < 0.05$)。结论 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体可能通过下调 TGF- β /Smad 信号通路抑制 HSF 细胞增殖,促进其凋亡。

关键词 脂肪干细胞;外泌体;miR-34a;人增生性瘢痕成纤维细胞;增殖凋亡

中图分类号 R 62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0887-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.013

2020-03-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760021);贵州省人民医院青年基金(编号:GZSYQN[2015]12号)

作者单位:贵州省人民医院烧伤整形科 贵阳 550002

作者简介:肖向阳 男 硕士研究生;

郑德义 男 博士 主任医师 硕士生导师 责任作者 E-mail: zhongliying1014@163.com

长期愈合的软组织伤口容易形成瘢痕,这不利于伤口愈合质量^[1]。因此,缩短软组织创伤愈合时间,减少瘢痕形成,是临床急需解决的问题。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)能分泌多种可溶性因子,如生长因子、细胞因子、胞外体等^[2]。

were treated with Vit D alone or in combination with IFN- α . **Results** The serum Vit D level in CHB group was lower than that in healthy controls (HC) group ($P < 0.05$). The serum Vit D level was positively correlated with albumin (ALB) ($r = 0.339$, $P = 0.002$), negatively correlated with HBV DNA viral load ($r = -0.274$, $P = 0.013$), correlated with e antigen status ($P < 0.05$), no correlation with alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT), HBsAg and HBeAb. Also, the expression levels of Vit D and VDR were related to the severity of CHB. The expression levels of Vit D in serum and VDR in liver tissue of severe CHB patients were lower than those of mild and moderate CHB patients. The expression of VDR, JAK-STAT signal transduction molecules IRF-9 and downstream antiviral protein MxA in the Vit D combination with IFN- α group were higher and the secretion of HBV-related antigens was lower than those in the blank group and the single treatment group. **Conclusion** There may be a decline in the function of the Vit D/VDR signaling pathway in patients with CHB. Vit D may play a synergistic IFN- α antiviral effect by increasing the VDR expression and thereby enhancing the IFN-JAK-STAT signaling pathway.

Key words chronic hepatitis B; vitamin D; vitamin D receptor