

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.03.001

❖ 基础研究 ❖

肝纤维化病理过程中肝组织蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP1 的动态表达

靳丽敏¹, 郝礼森¹, 刘玉龄², 杨小师¹, 展宗媛¹, 陈盼盼¹, 苗笑佳¹, 何宇¹

(1. 华北理工大学附属医院消化内科, 河北 唐山 063000; 2. 邢台医学高等专科学校第二附属医院消化内科, 河北 邢台 054000)

【摘要】目的: 探讨肝纤维化病理过程中肝组织蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP1 的动态表达。**方法:** 50 只 SD 大鼠随机分为对照组 ($n=10$) 和模型组 ($n=40$), 大鼠肝纤维化模型采用腹腔注射四氯化碳法构建, Masson 三色及 HE 染色测定大鼠肝脏组织的病理学改变, Western blot、免疫组织化学染色和 Real-time PCR 测定大鼠肝组织的 SHP1 表达。**结果:** 免疫组织化学染色显示, 正常大鼠肝组织表达少量 SHP1, 主要位于细胞浆, 且随大鼠肝纤维化的加重, 肝组织 SHP1 表达逐渐增加 ($P<0.05$), 主要分布于纤维化区域及汇管区。Western blot 及 Real-time PC 检测显示, 造模不同时间 (2、4、6、8 周) 大鼠肝组织中 SHP1 蛋白表达 (相对积分光密度值分别为 0.53 ± 0.04 、 0.73 ± 0.04 、 0.87 ± 0.03 、 1.10 ± 0.07) 及 mRNA 表达 (分别为对照组的 1.14、1.36、1.49 及 1.61 倍) 均高于对照组 (相对积分光密度值为 0.35 ± 0.07 , mRNA 表达为 1, $P<0.05$), 并随肝纤维化的加重逐渐增加 ($P<0.05$)。**结论:** 大鼠肝纤维化病理过程中肝组织的 SHP1 蛋白及 mRNA 表达均逐渐升高, 且升高程度与肝纤维化程度一致。

【关键词】 肝纤维化; SHP1; 基因表达

【中图分类号】 R575.2 **【文献标志码】** A

Dynamic expressions of protein tyrosine phosphatase SHP1 in liver tissues during the pathologic processes of hepatic fibrosis

JIN Li-min¹, HAO Li-sen¹, LIU Yu-ling², YANG Xiao-shi¹, ZHAN Zong-yuan¹, CHEN Pan-pan, MIAO Xiao-jia¹, HE Yu¹

(Department of Gastroenterology, 1. North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan 063000; 2. The Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai 054000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To investigate the dynamic expression of protein tyrosine phosphatase SHP1 in liver tissue during the pathological process of liver fibrosis. **Methods:** 50 male healthy SD rats were randomly divided into model group ($n=40$) and control group ($n=10$). Through using intraperitoneal injection of carbon tetrachloride, rats model of hepatic fibrosis was constructed. Hematoxylin and eosin (HE) and Masson's trichrome staining were used to observe the histological changes of rats liver tissues. SHP1 expression of liver tissues in rats was analyzed through Western blot, immunohistochemical staining, Real-time fluorescent quantitative PCR assay. **Results:** Immunohistochemical staining showed that there were a small amount of SHP1 expressions in normal rats liver tissues, and mainly located in the cytoplasm. In fibrotic rats liver tissues, SHP1 mainly distributed in fibrosis areas and portal areas, with the aggravation of hepatic fibrosis the expressions of SHP1 gradually increased ($P<0.05$). Western blot and real time PC showed that the expression of SHP1 (relative integrated optical density 0.53 ± 0.04 , 0.73 ± 0.04 , 0.87 ± 0.03 , 1.10 ± 0.07) protein and mRNA (1.14, 1.36, 1.49 and 1.61 times) in liver tissue of rats at different times (2, 4, 6, 8 weeks) of modeling were higher than those in the control group (relative integrated optical density 0.35 ± 0.07 , mRNA expression 1, $P<0.05$), and gradually increased with the aggravation of liver fibrosis ($P<0.05$). **Conclusion:** During the pathological process of hepatic fibrosis in rats, the expression of SHP1 protein and mRNA in liver tissue gradually increased with hepatic fibrosis degree, and the degree of increase is according with severity of liver fibrosis.

【Key words】 Hepatic fibrosis; SHP1; Gene expression

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2018209366)

作者简介: 靳丽敏 (1983 -), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: 18332971278@163.com

通讯作者: 郝礼森, 博士。E-mail: haolislen25@163.com

含 SH2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1, SHP1) 是酪氨酸磷酸酶家族的重要成员,主要表达于造血细胞,可负性调控其下游的信号转导,是造血系统的抑癌因子^[1-3]。研究^[4-6]显示,SHP1 不仅表达于造血细胞,也表达于一些非造血细胞如上皮细胞、脊髓神经元、肝细胞等,其表达缺失或低表达不仅参与了造血系统肿瘤及一些实体肿瘤的形成及发展,也在某些非肿瘤性疾病的发病机制中发挥重要作用。研究^[6-7]发现,肝细胞 SHP1 在调节肝脏炎症反应中发挥重要作用,过表达可通过抑制转化生长因子 β 、白细胞介素 6 及肿瘤坏死因子 α 等炎症因子减轻小鼠脂肪性肝炎;另有研究^[8]发现,在小鼠肝纤维化模型及慢性乙型病毒性肝炎患者的纤维化肝组织中 SHP1 蛋白均主要分布于纤维化区域,提示在肝纤维化病理过程中肝组织中 SHP1 的分布发生了变化,但有关肝纤维化病理过程中肝组织的 SHP1 蛋白及 mRNA 的动态表达仍不清楚。本研究采用腹腔注射四氯化碳法建立大鼠肝纤维化模型,检测了大鼠肝纤维化过程中肝组织 SHP1 蛋白及 mRNA 表达的动态变化。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及主要试剂

50 只健康雄性 SD 大鼠(清洁级,体重 350 ~ 400 g)购于北京华阜康生物科技股份有限公司。小鼠抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体购自 arigo 公司(台湾);兔抗 SHP1 单克隆抗体购于 BioWorld 公司(美国)。本研究所涉及的动物实验操作经华北理工大学实验动物伦理委员会审批。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠肝纤维化模型的建立 随机将 50 只 SD 大鼠分为对照组 ($n = 10$) 和模型组 ($n = 40$)。模型组大鼠腹腔注射 50% 的四氯化碳橄榄油混合液, 1 mL/kg, 2 次/周,共 8 周^[9-10],并于造模 2、4、6、8 周分别取 10 只大鼠,无菌条件下麻醉后取适量肝组织用 4% 多聚甲醛固定,用于免疫组织化学、Masson 三色及 HE 染色,另取适量大鼠肝组织保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, Western blot 及实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测;对照组大鼠按模型组方法注射,肝组织标本按上述方法同 8 周模型组大鼠一同留取。

1.2.2 大鼠肝组织病理学及免疫组织化学染色 取出多聚甲醛固定的大鼠肝组织,用石蜡常规包埋后,做成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的连续切片, Masson 三色及 HE 染色检测大鼠肝组织病理学变化。应用 SP 法进行 SHP1 免疫组织化学染色,用 PBS 代替一抗进行阴性对照

染色,棕褐色为 SHP 阳性表达,免疫组织化学染色图像应用 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析,平均光密度值 (mean optical density, MOD) 被用于表示 SHP1 阳性表达水平。

1.2.3 Western blot 分析 取适量于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的大鼠肝组织提取蛋白,考马斯亮蓝比色法测定蛋白含量后应用 Western blot 技术分析大鼠肝组织的 SHP1 蛋白表达,一抗为兔抗 SHP1 单克隆抗体 (1:100 稀释)、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 (1:5 000 稀释),二抗为山羊抗兔 IgG 及山羊抗小鼠 IgG (均 1:5 000 稀释),检测结果用 Image J 图像软件分析,SHPI 蛋白与 GAPDH 蛋白的积分光密度值比值(相对积分光密度值)表示 SHPI 蛋白表达量。

1.2.4 Real-time PCR 用 Trizoi 试剂提取肝组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,引物由 invitrogen 有限公司合成。内参基因 GAPDH 引物:上游 5'-GGC AAG TTC AAC GGC ACA G-3',下游 5'-CGC CAG TAG ACT CCA CGA CAT-3',扩增产物 122 bp;SHPI 引物:上游 5'-ATC AAC CAG CGG CAG GAA AGT TTG-3',下游 5'-ATC AAT GAT GAT GAT GGT GCC CGT-3',扩增产物 96 bp。在 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪上实时定量扩增。各组大鼠肝组织的 SHPI mRNA 表达差异应用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较^[11]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠肝组织病理组织学变化比较

对照组大鼠肝脏质地柔软,表面光滑细腻;模型组大鼠随着造模时间的延长,其肝脏质地逐渐变硬,肝脏表面出现细颗粒状并逐渐出现坚硬小结节,结节周围被灰白色结缔组织间隔包绕。Masson 三色及 HE 染色显示四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化模型成功构建;在造模过程中,大鼠肝纤维化逐渐加重,正常肝细胞因出现变性坏死而逐渐减少。见图 1 及图 2。

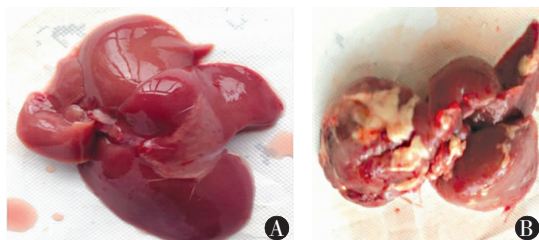


图 1 大鼠肝脏大体病理形态

A.对照组大鼠肝脏;B.造模 8 周模型组大鼠肝脏。

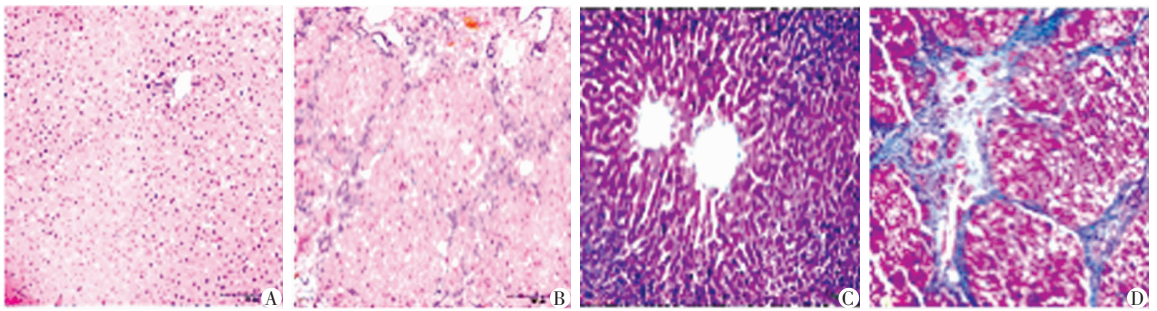


图2 HE及Masson三色染色显示大鼠肝组织的病理学变化(200×)

A. 对照组 HE 染色;B. 造模 8 周 HE 染色;C. 对照组 Masson 染色;D. 造模 8 周 Masson 染色。

2.2 各组大鼠肝组织 SHP1 定位及分布比较

免疫组织化学染色显示,对照组大鼠肝组织表达少量 SHP1,主要位于细胞浆;模型组大鼠肝组织,随着造模时间延长其 SHP1 表达逐渐增多,主要分布于纤维化区域、汇管区,但其亚细胞分布没有变

化。模型组大鼠肝组织在 2、4、6、8 周的 SHP1 阳性表达 MOD(0.11 ± 0.01 、 0.14 ± 0.01 、 0.16 ± 0.01 、 0.19 ± 0.01) 均较对照组(0.08 ± 0.01) 升高($P < 0.05$),且随着造模时间延长逐渐增加($P < 0.05$)。见图 3。

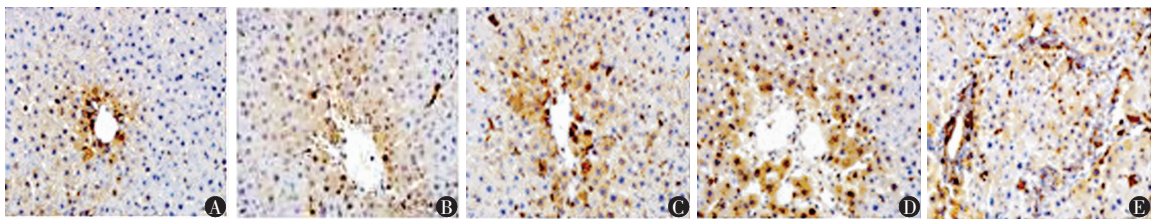


图3 各组大鼠肝组织 SHP1 定位及分布(400×)

A. 对照组;B. 造模 2 周;C. 造模 4 周;D. 造模 6 周;E. 造模 8 周。

2.3 各组大鼠肝组织 SHP1 蛋白表达比较

Western blot 分析显示,模型组大鼠肝组织在 2、4、6、8 周的 SHP1 蛋白表达(0.53 ± 0.04 、 0.73 ± 0.04 、 0.87 ± 0.03 、 1.10 ± 0.07) 均较对照组(0.35 ± 0.07) 升高($P < 0.05$),且随着肝纤维化的加重逐渐上调($P < 0.05$)。见图 4。

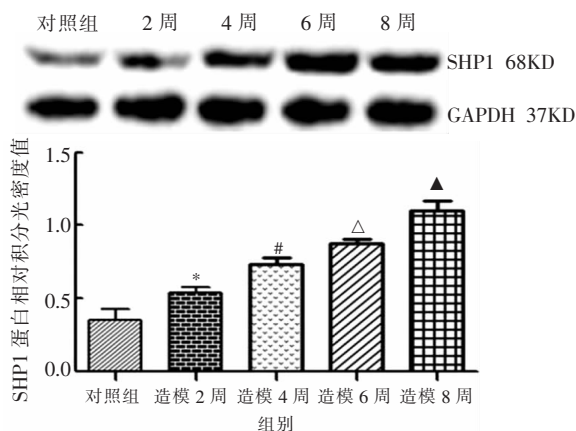


图4 各组大鼠肝组织 SHP1 蛋白表达

* $P < 0.05$,与对照组及造模 4、6、8 周相比;# $P < 0.05$,与对照组及造模 2、6、8 周相比;△ $P < 0.05$,与对照组及造模 2、4、8 周相比;▲ $P < 0.05$,与对照组及造模 2、4、6 周相比。

2.4 各组大鼠肝组织 SHP1 mRNA 表达比较

Real-time PCR 检测显示,造模组大鼠造模不同

时间(2、4、6、8 周)肝组织 SHP1 mRNA 表达均较对照组升高($P < 0.05$),且随造模时间延长逐渐上调($P < 0.05$)。见图 5。

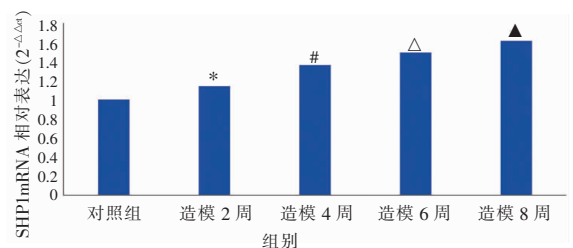


图5 各组大鼠肝组织 SHP1 mRNA 表达

* $P < 0.05$,与对照组及造模 4、6、8 周相比;# $P < 0.05$,与对照组及造模 2、6 及 8 周相比;△ $P < 0.05$,与对照组及造模 2、4 及 8 周相比;▲ $P < 0.05$,与对照组及造模 2、4 及 6 周相比。

3 讨论

肝纤维化是肝脏的损伤修复反应,长期进展可演变为肝硬化^[12-13]。当肝脏受到损伤时,静止的肝星状细胞活化,产生大量细胞外间质,进而引起肝纤维化^[14-16]。SHP1 可负性调节其下游的信号通路,其表达缺失或低表达除在一些实体肿瘤及造血系统肿瘤的形成及发展中发挥重要作用外,也参与了某些非肿瘤性疾病的发病机制^[4-6]。研究^[8]发现,在

四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化及慢性乙型病毒性肝炎患者的纤维化肝组织中 SHP1 蛋白均主要分布于纤维化区域,提示 SHP1 在纤维化肝组织中的分布出现了改变。

本研究显示,大鼠纤维化肝组织 SHP1 蛋白主要分布于纤维化区域及汇管区,与上述研究结果一致。但进一步从 mRNA 及蛋白水平检测发现,大鼠纤维化肝组织的 SHP1 mRNA 及蛋白表达均随着肝纤维化加重逐渐升高 ($P < 0.05$),提示大鼠纤维化肝组织的 SHP1 不仅分布出现了改变,其表达在 mRNA 及蛋白水平上均出现与肝纤维化程度一致的升高。研究^[12,17]发现,体外活化肝星状细胞的 SHP1 过表达可抑制其增殖,而在肝纤维化病理过程中在体 HSC 的增殖随着肝纤维化的加重逐渐加快,以此推断肝纤维化过程中肝组织的 SHP1 表达应逐渐下降而不是逐渐升高。研究^[6]证实,作为肝脏主要细胞的肝细胞存在 SHP1 表达,本研究也显示在大鼠肝纤维化病理过程中,肝细胞随着肝纤维化加重逐渐减少,与肝组织 SHP1 表达升高也相矛盾。

大鼠肝纤维化过程中肝组织 SHP1 逐渐升高,一方面可能与肝脏炎症反应有关,研究证实肝细胞的 SHP1 参与了肝脏的炎症反应调节^[6],而肝纤维化过程中肝脏一直存在炎症反应,可能是肝纤维化过程中肝脏的炎症反应导致了其 SHP1 表达升高;另一方面也可能与表达 SHP1 的在体活化肝星状细胞增多有关,如果表达 SHP1 的在体活化肝星状细胞增多也可导致肝组织的 SHP1 表达增高。已有研究^[18-19]发现,SHP1 磷酸酶活性的发挥受其分子构象调控,在无配体结合时处于自我抑制状态,当酪氨酸磷酸化多肽与其结合后,其构象发生改变,抑制状态被解除才具有磷酸酶活性;并且有学者发现^[8,20],SHP1 的激动剂如索拉非尼及其衍生物 SC-1 和 SC-43 可通过激活 SHP1 的磷酸酶活性而抑制体外活化肝星状细胞的增殖。

综上,肝组织中 SHP1 表达虽然升高,但可能处于无活性状态或活性低而对在体肝星状细胞的增殖没有明显影响,具体原因及机制还需进一步研究。

参考文献

[1] Varone A, Spano D, Corda D. Shp1 in Solid Cancers and Their Therapy[J]. Front Oncol, 2020, 10:935.
[2] 谢旭磊,杨圣俊,郝洪岭,等. SOCS1、SHP1 在 JAK2V617F 突变阳性骨髓增殖性肿瘤中的表达及鲁索替尼的调控作用[J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(2):74-80.
[3] 刘学东,刘晓,郭秀芬,等. K562 细胞中 DNMT1 与 SHP-1 启动

子 2 甲基化关系的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(2):401-406.
[4] 梁倩,房静远,洪洁,等. 泛素连接酶 TRIM46 促进人结肠癌细胞增殖和侵袭[J]. 肿瘤, 2017, 37(4):334-339.
[5] Yang L, Bai HH, Zhang ZY, et al. Disruption of SHP1/NMDA receptor signaling in spinal cord dorsal horn alleviated inflammatory pain[J]. Neuropharmacology, 2018, 137:104-113.
[6] Adhikari A, Martel C, Marette A, et al. Hepatocyte SHP-1 is a Critical Modulator of Inflammation During Endotoxemia [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):2218.
[7] Lin L, Jian J, Song CY, et al. SHP-1 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting proinflammatory cytokine production [J]. FEBS Lett, 2020, 594(18):2965-2974.
[8] Su TH, Shiau CW, Jao P, et al. Src-homology protein tyrosine phosphatase-1 agonist, SC-43, reduces liver fibrosis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):1728.
[9] Nakamura T, Akiyoshi H, Saito I, et al. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers [J]. J Hepatol, 1999, 30(1):101-106.
[10] 李扬,周大臣,谢海深,等. 七叶皂苷钠通过抑制 4EBP1 的磷酸化进而减缓 CCL4 诱导的大鼠肝纤维化[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(4):577-582.
[11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
[12] Cai X, Wang J, Wang J, et al. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy [J]. Pharmacol Res, 2020, 155(C):104720.
[13] 程小丽,赵余珠,王志旺,等. 七味育肝颗粒对肝纤维化大鼠的防治作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(5):499-502.
[14] 陈靖,郑琦,陈薇,等. 大鼠肝纤维化与 microRNA-181a 调控肝星状细胞自噬的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(1):98-105.
[15] 郝玉梅,谢安,李鹤,等. 活化肝星状细胞生物标志物与靶向递送系统研究进展[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(7):517-525.
[16] 阮建佳,杜岩. 神经酰胺酶-神经酰胺通路在青蒿琥酯抑制肝纤维化中的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(3):279-282.
[17] Tibaldi E, Zonta F, Bordin L, et al. The tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits proliferation of activated hepatic stellate cells by impairing PDGF receptor signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(2):288-298.
[18] Yang J, Liu L, He D, et al. Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1 [J]. J Biol Chem, 2003, 278(8):6516-6520.
[19] Wang W, Liu L, Song X, et al. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(8):2062-2071.
[20] Su TH, Shiau CW, Jao P, et al. Sorafenib and its derivative SC-1 exhibit antifibrotic effects through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(23):7243-7248.

(收稿日期:2021-08-17

修回日期:2021-10-19)