

编者按: 2012年, 济宁医学院迎来了建校60华诞。为此, 本刊自第1期开辟“杰出校友学术论坛”专栏, 特邀有突出贡献的校友撰文, 以展现他们博学至善, 求索进取, 在医学研究领域取得的骄人成绩和丰硕成果, 作为献给学校60周年庆典的礼物, 以飨读者。

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.04.001

· 杰出校友医学学术论坛 ·

HIV 感染肝星状细胞促进肝纤维化实验研究^{*}

——HIV/HCV 合并感染快速肝纤维化机制探讨

洪 丰^{1,2△} 司传平² 石 军³ 曾晓立⁴

(¹ 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011; ² 济宁医学院教务处, 济宁 272067;

³ 山东省立医院, 山东 济南 250021; ⁴ 济宁医学院科研处, 济宁 272067)



洪丰, 1977级校友。山东医科大学93届硕士研究生。1993年至1998年, 先后任济宁市第一人民医院内科副主任, 消化内科主任。1999年后, 在美国国家卫生研究院(NIH 5年)和纽约蒙西奈医院/医学院肝病中心工作。在 Bin Gao 教授和 Scott L. Friedman(美国肝病学会轮值主席)教授的研究团队, 先后任研究员和助理教授, 从事肝病研究并负责抗肝纤维化/肝硬化新药开发, 完成多项课题, 发表SCI收录论著28篇, 累计影响因子(IF)191, 其中多篇第一作者论文发表在 JCI、FASEB、Hepatology 等杂志。2003年荣获美国国家医学科学院杰出研究者奖。

2006年被济宁医学院聘为免疫教研室兼职教授。

摘要 目的 HIV/HCV 合并感染较单纯 HCV 感染患者肝纤维化发展迅速, 肝病死亡率高。肝纤维化进程与 HIV RNA 水平相关, 提示 HIV 在肝纤维化形成中起重要作用。然而, HIV 通过 HSC 促进肝纤维化作用知之甚少。本文就 HIV ⅢB 能否感染 HSC、HIV/HIVgp¹²⁰ 促进 HSC 活化和 I 型胶原蛋白表达及其相关细胞信号通路进行了检测。**方法** 以 HIV ⅢB 感染和 gp¹²⁰ 刺激原代人 HSCs 后, 采用 ELISA、qRT-PCR 和 Western Blot 对感染结果和纤维化发生有关标志物进行分析, 并以 shRNA 和 u0126 预处理 HSC 封闭 CXCR₄ 及其下游因子 ERK, 进一步评估 CXCR₄-ERK 细胞信号系统在 HIV 诱导肝纤维化中的作用。**结果** HIV ⅢB 能感染培养的人 HSCs 并促其表达 I 型胶原蛋白。gp¹²⁰ 同样可刺激 HSC 表达 I 型胶原蛋白和肌动蛋白。当 CXCR₄ 及/或 ERK 被抑制后, HIV 和 gp¹²⁰ 的上述作用明显降低。**结论** 本研究表明, HIV/HIVgp¹²⁰ 通过诱导 HSC 生物学功能促进肝纤维化, CXCR₄-ERK 细胞转导通路是主要机制之一。

关键词 HIV/HCV 合并感染; 肝纤维化; 肝星状细胞; CXCR₄ 受体

中图分类号: R575 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)08-230-06

* [基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81170395)

△ [通信作者] 洪丰, E-mail: fenghong99@gmail.com

Study on liver fibrosis promoted by HIV-infected human hepatic stellate cells —Mechanism of accelerated fibrosis in HIV/HCV coinfecting patients

HONG Feng, SI Chuan-ping, SHI Jun, et al

(Jining First People's Hospital & The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272111, China)

Abstract; Objective HIV/HCV coinfection develop more rapid hepatic fibrosis and liver death than those infected with HCV only. In HIV/HCV-coinfecting patients, fibrosis progression correlates with HIV RNA levels, suggesting an important role of HIV in liver fibrogenesis. While activated hepatic stellate cells (HSCs) express CXCR₄, one of major HIV chemokine coreceptors. However, little is known about the profibrogenic role of HIV on hepatic stellate cells. We therefore examined the impact of HIV/HIV gp120 on HSC activation, collagen I expression, and underlying signaling pathways in vitro. **Methods** Primary human HSCs were infected with HIV II-IB and treated with X4 gp120 and expression of fibrogenic markers assessed by ELISA, qRT-PCR and Western blot. CXCR₄ and its downstream intracellular signaling pathways were evaluated with Western blot and pre-treatment with CXCR₄-targeted shRNA or ERK inhibitor. **Results** HIV-IIIB (CXCR₄-tropic) could infect primary human HSCs and promote HSC collagen I expression. Gp120 significantly also increased expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen I in HSCs which was blocked by pre-incubation with CXCR₄-targeted shRNA. Furthermore, Gp120 promoted extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 phosphorylation and pretreatment with an ERK inhibitor attenuated HSC activation and collagen I expression. **Conclusion** Our data indicate a potential role of HIV/HIV gp120 in liver fibrosis mediated the effects on HSCs and the regulation occurs in a CXCR₄-dependent fashion.

Key words: HIV/HCV-coinfection; liver fibrosis; hepatic stellate cell; CXCR₄ receptor

目前,全球 HIV 感染者超过 0.4 亿,因 HIV 和 HCV 感染途径相同,约 30% 的 HIV 感染者同时合并 HCV 感染^[1]。合并感染者病情严重,肝硬化发生率高^[2],发展为肝硬化的平均时间较单纯 HCV 感染者缩短 2/3^[3-4]。自 1996 年应用高效抗逆转录病毒治疗(HAART)后,“艾滋病”患者预期寿命已达 30~50a。然而,HCV 相关性肝病已成为合并感染者死亡的主要原因,在 HAART 广泛应用的发达国家,40%~50% 的合并感染者死于严重肝病^[5]。

近年研究表明,合并感染时 HIV 可降低急性 HCV 感染者病毒清除率和抗 HCV 治疗作用,增加体内 HCV RNA 载量,导致 HCV 慢性感染^[6-7]。一旦慢性化,合并感染患者肝组织活动性炎症,坏死明显增加,肝纤维化进展迅速^[8-10]。但是,合并感染致快速肝纤维化/肝硬化机制尚不清楚。我们前期研究发现,肝星状细胞(HSC)(在肝纤维化发生、发展中起关键作用的细胞)活化后表达 HIV 协同受体 CXCR₄^[10],HIVgp¹²⁰通过该受体影响 HSC 多种生物学功能。本研究进一步探讨了 HIV 感染并调节 HSC 功能,直接参与肝纤维化形成的机制。

1 材料和方法

1.1 人原代肝星状细胞(HSC)的分离

将切除的人肝组织块(20~100g)用 DMEM 培养液清洗 2 次,用 37℃ 预温的 EGTA 液,从肝切面能发现的静脉断端进行循环灌注,流速为 60ml/min,10min。换用 0.05% 胶原蛋白酶 B(Roche 公司产品)和 0.02% pronase(Roche 公司产品)消化液灌注 30~40min。以 35%、50% 和 52% percoll 不连续密度离心,900g 30min。将分离的原代 HSC 用含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素 DMEM 常规培养(方法步骤参见参考文献^[12])。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 制备

提取 RNA 和逆转录制备 cDNA 分别应用 QIAGEN RNeasy Mini 和 ABI applied biosystems RNA to cDNA Master Mix 试剂盒进行。测定 RNA 和 cDNA 浓度后,存放于 -80℃ 冰箱备用。

1.3 qRT-PCR 检测

以 RNA 反转录获取的 cDNA 为模板,应用 Roche 公司 supermix 混合物进行定量 PCR 扩增。基因引物自行设计或源于文献,见表 1,以 GAPDH 为内参照物。

表1 基因引物

	Forward	Reverse
Coll	ggcttccctggcttctctgg	ccaggggttccagccaat
SMA- α	aggcaccctgaaccccaa	cagcaccgctgagatagcc
TGF-b1	cccagcatctgcaaagctc	gtcaatgtacagctgcccga
TGF-b1-R	tgctgcctgtgtgactttgg	gccatgtatcttgagttccca
PDGFRB-R	ccagaagccatcagcagcaaag	aggccctgagagatctgtgg
CXCR ₄	ccaactgttctgtaaccccatc	cacctcgttctcttggagag
GAPDH	caatgacccttcattgacc	gatctcgtctctggaagatg

1.4 免疫印迹法检测

胶原蛋白 I、 α -SMA(平滑肌肌动蛋白)及 ERK 蛋白表达,主要抗体分别购自 Affinity Bioreagents, Sigma 和 Rockand 等公司。以 β -actin 为内对照。

提取培养人 HSC 蛋白,定量,与 SDS 上样缓冲液混合,70 °C 变性 10 min;上样,电泳,转膜器恒流 40 mA 转 PVDF 膜过夜;1 \times TPBS 洗膜 5 min \times 3 次,以 5% 脱脂奶粉 TPBS 封闭,室温震荡 1 h;一抗(CXCR₄: 1:1000; α -SMA: 1:1000; PP ERK: 1:1000; β -actin: 1:3000)中,4 °C 轻摇过夜;1 \times TPBS 洗膜 5 min \times 3 次,置于经 1 \times TPBS 稀释 1:2000 二抗中,室温震荡 2~3 h,TPBS 洗 5 min \times 3 次,除去未结合的二抗。应用复日 FR-200 生物电泳图像分析系统分析结果,以 β -actin 为内对照。

1.5 3H-胸腺嘧啶核苷(3H-TdR)掺入法

将 Lx-2 细胞和人原代 HSC 以 2 \times 10⁴/孔浓度接种于 24 孔细胞培养板,12h 后,换含 0.2% BSA 无血清 DMEM 培养 24h,用 HIV 及/或 gp¹²⁰ 刺激,培养结束前 4h,加入 3H-TdR 1 Ci/ml。培养结束后,以预冷的 PBS 洗 3 次,丙酮固定 20min;PBS 洗后,每孔加入 500 μ L 裂解液(0.25% 氢氧化钠/0.25% SDS),置冰上 10min,加 1N 盐酸 100 μ L/孔,吸入检查瓶,加 5ml/瓶闪烁液,混匀,上机检测(方法见参考文献^[11])。

1.6 细胞培养/shRNA 转染,HIV III B 感染和基因水平表达测定

研究将采用人原代 HSC,细胞培养基采用 DMEM,加 10% 胎牛血清,100IU/ml 青霉素和 100IU/ml 链霉素,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养。细胞转染采用 TransIT-LT1 试剂(Mirus 公司),按说明书进行操作。将细胞接种于 6 孔板,

24h,当达到 70% 汇合时,应用 shRNA 2 μ g/ml 进行转染。在转染后 72h,收取细胞并抽提 RNA 和蛋白,以 qRT-PCR 和蛋白印迹法测定靶基因表达水平。

HIV III B 感染 HSC,细胞接种于 6 孔板,当达到 70%~80% 汇合时,以 HIV III B 感染之;4h 后以 PBS 洗 3 遍,去除上清中病毒,换含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液,收集 1~7d 培养上清,以 ELISA 方法检测 HIV p24 蛋白在上清中的表达水平。

1.7 ELISA 检测

将人原代 HSC 接种于 6 孔培养板(以 1 \times 10⁵~1.5 \times 10⁵/孔),常规培养。以 HIV III B 感染后分别收集 1~7d 的培养上清,用 15ml Amicon Ultra Filter Device 管离心浓缩靶抗原蛋白后,存放于-80 °C 冰箱备用。ELISA 试剂盒购自 RD Systems 公司,按操作说明进行检测。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 程序进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

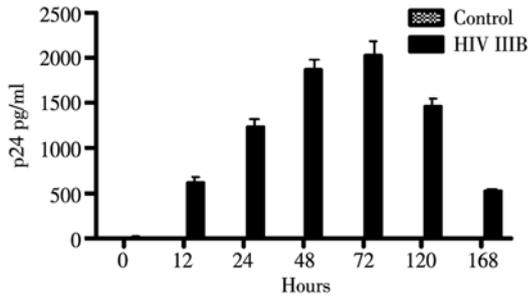
2.1 HIV III B 感染培养的人 HSC 并诱导 I 型胶原蛋白表达

以 HIV III B 感染培养的第 3 代人肝星状细胞,检测感染后不同时间 HIV 蛋白 P24 在培养上清中的表达量。结果显示,感染组 P24 表达量迅速增加,3d 达高峰,持续 7d(图 1A)。表明 HIV 能感染体外培养的人 HSC。为进一步证实 HIV 对 HSC 生物学功能的影响,收取感染组及对照组细胞,采用 Western Blot 方法,对比分析 I 型胶原蛋白表达情况。HIV 感染后 24h, I 型胶原蛋白表达明显高于对照组(图 1B)。

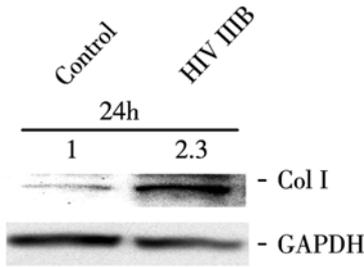
HIV gp¹²⁰ 刺激 HSC 表达 I 型胶原蛋白和 α -SMA,促进 HSC 增殖。

以 500ng/ml HIV gp¹²⁰ 刺激培养的人 HSC 2h 后, I 型胶原蛋白和 α -SMA mRNA 表达明显高于对照组($P < 0.005$ 和 $P < 0.05$,图 2A),蛋白表达量 6h 明显增加(图 2B)。

HSC 增殖是肝纤维化形成的重要机制,我们以 H3 掺入法对 HIV gp¹²⁰ 是否增强 HSC 增殖进行了检测。如图 2C 所示,48h 和 72h HIV gp¹²⁰ 刺激组,HSC 增殖显著高于对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.005$),表明 HIV gp¹²⁰ 具有促进 HSC 增殖的作用。

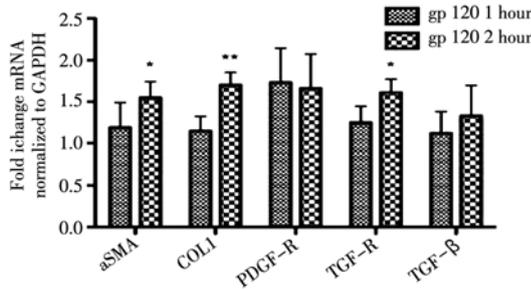


A. HIV III B 感染和人原代 HSC

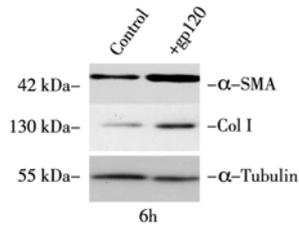


B. HIV III B 诱导 HSC I 型胶原蛋白表达

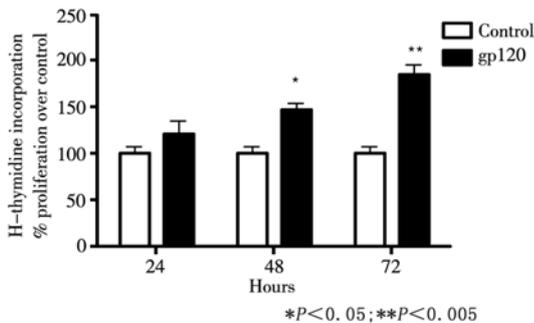
图 1 HIV III B 感染 HSC 并诱导胶原蛋白的表达



A. HIV gp¹²⁰ 诱导 HSC I 型胶原蛋白和 α-SMA mRNA 表达



B. HIV gp¹²⁰ 诱导 HSC I 型胶原蛋白和 α-SMA 蛋白表达



C. gp¹²⁰ 促进人原代 HSC 增殖

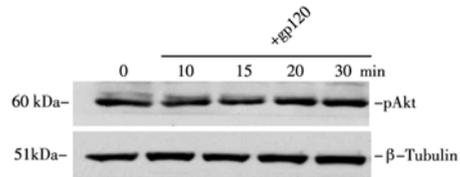
图 2 HIV gp¹²⁰ 刺激 HSC 表达 I 型胶原蛋白

和 α-SMA 并促进 HSC 增殖

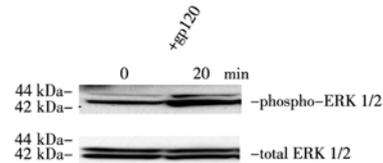
2.2 CXCR₄/ERK 细胞信号通路为 HIV gp¹²⁰ 调节 HSC 重要机制

为探讨 HIV gp¹²⁰ 致肝纤维化分子机制,我们首先检测 HIV gp¹²⁰ 能否激活 CXCR₄ 下游与纤维化相关的细胞转导通路分子 ERK 和 Akt。如图 3A、B 所示 gp¹²⁰ 刺激 20min 后,ERK 被激活,但未影响 pAkt 表达量。随后,分别用 shRNA 和 UO126 抑制及/或封闭 CXCR₄ 和 ERK,检测 gp¹²⁰ 影响 HSC 生物学功能机制。结果显示,当 CXCR₄ 及/或 ERK 表达被抑制后,HIV gp¹²⁰ 诱导 I 型胶原蛋白表达作用明显降低(图 3C、D)。

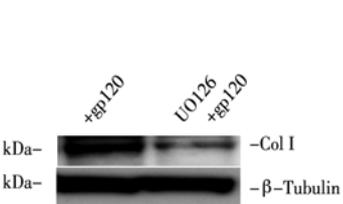
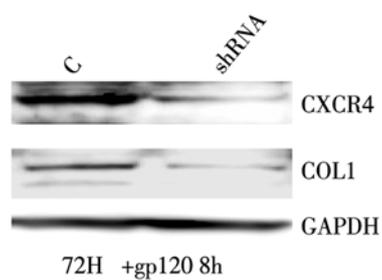
表明 CXCR₄/ERK 细胞信号转导通路为 HIV gp¹²⁰ 调节 HSC 致肝纤维化主要机制之一。



A. gp¹²⁰ 不影响 pAkt 表达量



B. gp¹²⁰ 快速诱导 ERK 活化



C、D. CXCR₄/ERK 是 gp¹²⁰ 诱导

HSC I 型胶原蛋白表达的重要机制

图 3 CXCR₄/ERK 细胞信号转导通路为 HIV gp¹²⁰ 调节 HSC 致肝纤维化的重要机制

3 讨论

人类免疫缺陷病毒合并丙型肝炎病毒(HCV)感染的患者肝硬化发生率高,进展快,其肝纤维化进程与 HIV RNA 水平相关,表明 HIV 在合并感染肝纤维化形成中起重要作用。多项研究显示, HIV/HCV 合并感染时 HCV 复制增加和快速肝纤维化的机制可能是:1)CD4 阳性淋巴细胞减少致免疫抑制;2)CD8 阳性 T 淋巴细胞介导的病毒清除作用减弱;3)HIV、HCV 两种病毒或产物在肝内的相互作用,以及 4)高效抗反转录病毒治疗(HAART)加重肝损伤等^[13-16]。

我们前期工作发现,活化的肝星状细胞表达 HIV 协同受体。在此基础上,本研究进一步证实 HIV III B 可以感染培养的人肝星状细胞,并上调 α -SMA 表达,进一步增强 HSC 活化程度,同时刺激 HSC 合成胶原蛋白原 I,从而导致肝纤维化。我们的发现提示, HIV 通过对肝星状细胞的调节直接参与肝纤维化形成。

本研究进一步发现, HIV 包膜蛋白 gp¹²⁰ 同样可通过与 CXCR₄ 结合介导 HSC 多种生物学功能。HSC 在 gp¹²⁰ 刺激下,产生过多胶原蛋白 I 和 α -SMA,并促进 HSC 增殖,促进肝硬化发展。Raffaele Bruno 等^[17]证实 CCR5 HIV gp¹²⁰ 可诱导 HSC 分泌炎症细胞因子-单核细胞趋化蛋白 I (MCP-1)和金属蛋白酶组织抑制因子- I (TIMP-1),明显增强 HSC 的迁移能力,促进肝纤维化形成^[17]。该研究与我们的结果相似。

为探讨 HIV gp¹²⁰ 是否通过 CXCR₄ 及其下游与肝纤维化发生相关的细胞信号转导系统改变 HSC 生物学功能,我们以 shRNA 和 ERK 抑制物 uo126,检测在敲减 CXCR₄ 及/或阻断 ERK 表达情况下,对比分析 HIV gp¹²⁰ 调节 HSC 生物学功能的变化。结果显示,在 CXCR₄ 及其下游 ERK 被抑制后,显著降低 HIV gp¹²⁰ 诱导的 HSC 胶原蛋白 I 表达和 HSC 增殖,表明 CXCR₄-ERK 细胞信号转导系统为 HIV 致肝纤维化重要机制。

我们在以前的实验中证实,静态 HSC 不表达 CXCR₄ 受体,只有活化状态 HSC 才表达该受体,其表达量随 HSC 活化程度增强而增加^[11]。正常肝内 HSC 处于静止状态,在各致病因素造成肝损伤后被活化。根据研究结果,我们认为在 HIV/HCV 合并感染快速肝硬化发生、发展中,先由 HCV 造成肝损伤,HSC 活化并表达 CXCR₄ 受体,

HIV 随即与其结合并介导 HSC 多种生物学功能,加速 HCV 诱导的肝纤维化/肝硬化进程。HIV、HCV 通过相互关联的不同机制导致了合并感染者肝硬化的快速发展。

本研究不仅有助于加深对 HIV/HCV 合并感染快速肝硬化发病机制的理解,拓展和进一步完善肝硬化形成的基础理论,而且,提示 CXCR₄ 受体可能为潜在抗肝纤维化新靶点。

参考文献:

- [1] Weinbaum CM, Sabin KM, Santibanez SS. Hepatitis B, hepatitis C, and HIV in correctional populations: a review of epidemiology and prevention[J]. AIDS, 2005, 19(Suppl 3): S41-S46.
- [2] Singal AK, Anand BS. Management of hepatitis C virus infection in HIV/HCV co-infected patients: clinical review[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15: 3713-3724.
- [3] Sherman KE, Rouster SD, Chung RT, et al. Hepatitis C virus prevalence among patients infected with human immunodeficiency virus: a cross-sectional analysis of the US adult AIDS clinical trials group[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(6): 831-837.
- [4] Luz Martin-Carbonero, Vincent Soriano, Eulalia Valencia, et al. Increasing impact of chronic viral hepatitis on hospital admissions and mortality among HIV-infected patients AIDS research and human retroviruses[J]. November, 2001, 17(16): 1467-1471.
- [5] Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection[J]. J Hepatol, 2006, 44: S6-S9.
- [6] Shire NJ, Welge JA, Sherman KE. Response rates to pegylated interferon and ribavirin in HCV/HIV coinfection: a research synthesis[J]. J Viral Hepat, 2007, 14(4): 239-248.
- [7] Thomas D, Astemborski J, Rai R, et al. The natural history of hepatitis C infection: host, viral, and environmental factors[J]. JAMA, 2000, 284: 450-456.
- [8] Bonacini M, Govindarajan S, Blatt L, et al. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA[J]. J Viral Hepatitis, 1999, 6: 203-208.
- [9] Macias J, Berenguer J, Japon M, et al. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus[J]. Hepatology, 2009, 50: 1056-1063.
- [10] Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group[J]. Hepatology, 1999, 30: 1054-1058.
- [11] Hong F, Ana Tuyama, Tee Ting Fang, et al. Hepatic stellate cells express functional ESCR4: role in stromal cell-derived factor-1a-mediated stellate cell activation[J]. Hepatology, 2009, 49: 2055-2067.

(下转第 250 页)