

世界华人消化杂志®

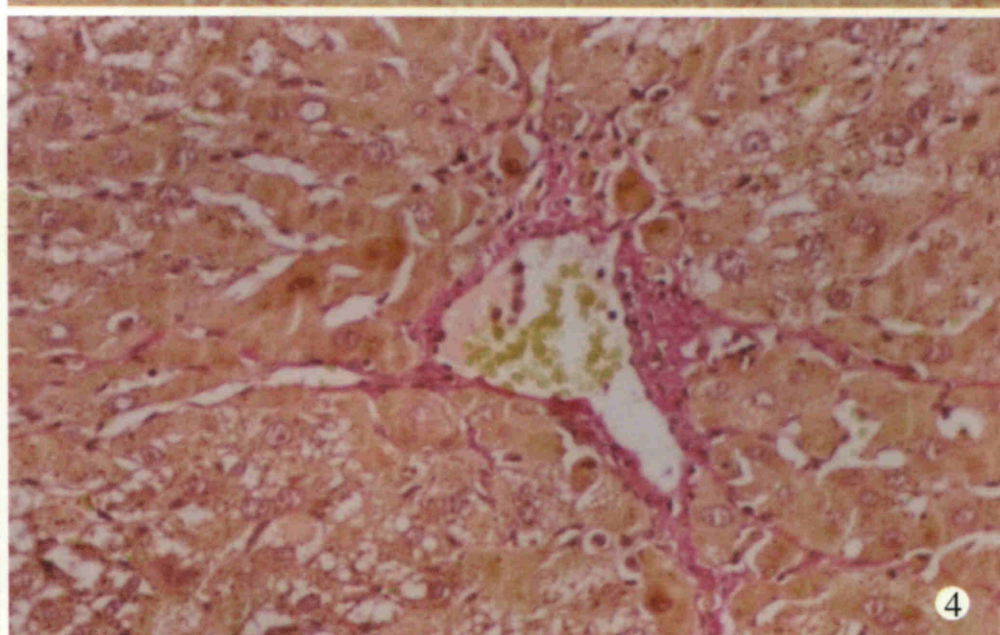
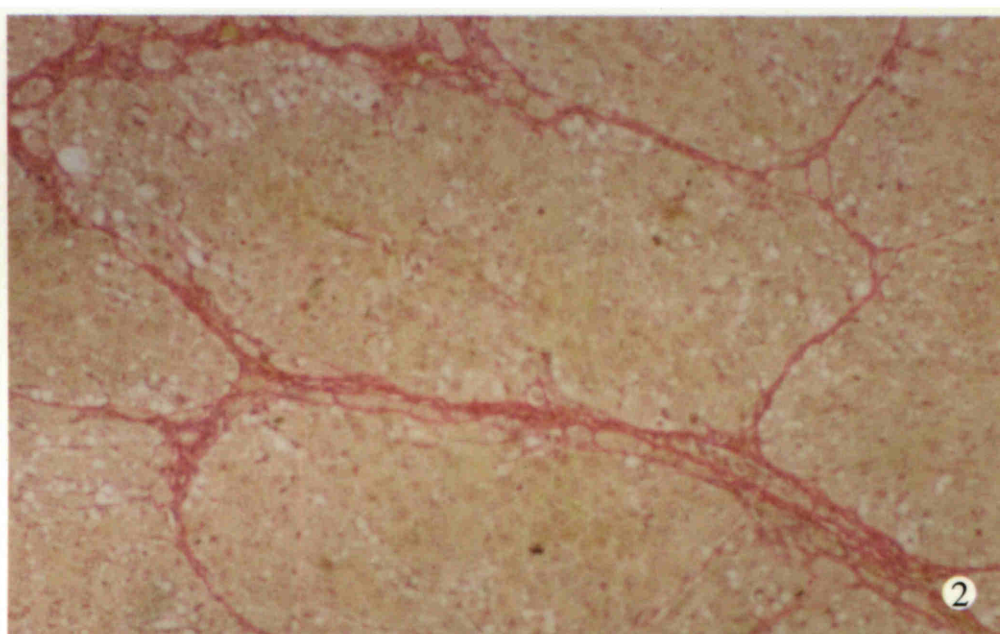
WORLD CHINESE

JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年7月15日 第11卷 第7期

(Volume 11 Number 7)



7/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 7 月 15 日 第 11 卷 第 7 期 (总第 111 期)

述 评

- 881 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征 聂青和, 罗新栋, 惠武利
888 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制 成军
897 老年消化系疾病的中西医结合治疗 张万岱

肝 癌

- 900 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强
904 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡
908 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎
912 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉
916 TDI-FP 法分析肝细胞癌组织中 HBV 核心启动子双突变 吕贯廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君

病毒性肝炎

- 920 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
925 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
930 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
935 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
939 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
943 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
947 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
951 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
955 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林
959 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林
963 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平 柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖菁, 李建国
966 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在 HepG₂ 细胞的 HLA-I 表达 陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴

基础 研究

- 970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明
975 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉
979 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE₂ 和血管内皮因子表达的影响 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大
982 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究 彭毅志, 袁志强, 肖光夏
986 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力
990 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭
994 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用 李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭
997 p⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 李庆明, 余谦, 闵存云

焦 点 论 坛

- 1001 乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展 成军
1002 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟
1004 乙肝病毒表面抗原基因启动子 II 的结构及调节研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮
1006 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军
1008 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究 王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰
1011 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

焦点论坛	1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军 1018 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰 1020 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林 1023 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 成军 1027 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林
课堂讨论	1031 北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要 吕有勇, 许小青
文献综述	1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海 1037 ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控 蒋明德, 马洪德, 解方为 1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植 1043 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎 高志强, 陆付耳 1046 KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究 任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义 1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华 1054 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书 1059 NO 和 VIP 与胃肠电 - 机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶 1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超 1068 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎
消 息	907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 993 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 1030 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 1053 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 附 1 Journal Citation Reports 2002-China 附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY 附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊 附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊
封面故事	970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)
创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2003-07-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 张建中
危北海	排 版 李少华
吴孟超	校 对 李天华
吴咸中	

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail:wcjd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达

王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

王志荣, 陈锡美, 同济大学附属同济医院消化内科 上海市 200065
李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092

王志荣, 男, 1962-09 生, 安徽省凤阳县人, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 1986 年安徽中医学院本科毕业, 1991 年山西医科大学硕士毕业, 2001 年于上海第二医科大学博士毕业, 主要从事慢性肝病和慢性胃黏膜疾病的基础与临床研究, 发表论文 20 篇。

项目负责人: 王志荣, 200065, 上海市新村路 389 号, 同济大学附属同济医院消化内科。wzrg@sohu.com

电话: 021-56501080-1075

收稿日期: 2001-12-20 接受日期: 2002-10-03

Suppression of expression extracellular matrix in hepatic fibrosis rat with tetrandrine and glycyrrhizinic acid

Zhi-Rong Wang, Xi-Mei Chen, Ding-Guo Li, Hong-Shan Wei, Xin Huang, Yu-Tao Zhan, Han-Ming Lu

Zhi-Rong Wang, Xi-Mei Chen, Ding-Guo Li, Hong-Shan Wei, Xin Huang, Yu-Tao Zhan, Han-Ming Lu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, 389 Xincun Rd. Shanghai 200065, China
Correspondence to: Zhi-Rong Wang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, 389 Xincun Rd. Shanghai 200065, China. wzrg@sohu.com

Received: 2001-12-20 Accepted: 2002-10-03

Abstract

AIM: To investigate effects and mechanism of tetrandrine (Tet) and glycyrrhizinic acid (Glz) in combination on metabolism of extracellular matrix in hepatic fibrotic rats induced by carbon tetrachloride.

METHODS: The hepatic fibrosis model rats induced with carbon tetrachloride were grouped randomly into 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg Tet, 5 mg/kg Tet+50 mg/kg Glz, 10 mg/kg Tet+50 mg/kg Glz, 20 mg/kg Tet+50 mg/kg Glz and 50 mg/kg Glz groups. Rats in experimental groups were administered with Tet and/or Glz by gavage or peritoneal injection every day. Serum levels of HA, LN, and PIIIP were detected with radioimmunoassay. Histopathological change was examined with VG staining and observed under light-microscope. mRNA of collagen type I and III were evaluated by RT-PCR.

RESULTS: In comparison with model group, Tet and Glz in combination could markedly decrease serum levels of HA, LN and PIIIP (121.8 ± 9.5 vs 58.4 ± 7.6 , 85.7 ± 12.1 vs 46.2 ± 7.3 , 35.9 ± 3.5 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$), and suppress the expressions of type I, III procollagen mRNA (0.53 ± 0.07 vs 0.26 ± 0.09 , 0.47 ± 0.05 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$), and reduce deposition of extracellular matrix. Compared with Tet (10mg/kg) only group, Tet with Glz in combination could markedly reduced the serum levels of HA, LN and PIIIP (69.2 ± 11.1 vs 58.4 ± 7.6 ;

52.3 ± 6.7 vs 46.2 ± 7.3 ; 29.9 ± 3.2 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$), and inhibit the expression of type I, III procollagen mRNA (0.33 ± 0.06 vs 0.26 ± 0.09 , 0.29 ± 0.04 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$).

CONCLUSION: Tet and Glz in combination could inhibit expression and deposition of extracellular matrix in fibrotic rats more significantly than either Tet or Glz.

Wang ZR, Chen XM, Li DG, Wei HS, Huang X, Zhan YT, Lu HM. Suppression of expression extracellular matrix in hepatic fibrosis rat with tetrandrine and glycyrrhizinic acid. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):970-974

摘要

目的: 观察联合应用粉防己碱(Tet)与甘草酸(Glz)对实验性肝纤维化大鼠细胞外基质代谢的影响, 并探讨其作用机制。

方法: 将四氯化碳诱导的Sprague-Dawley大鼠肝纤维化动物模型随机分为模型对照组、5 mg/kg 体重 Tet 组、10 mg/kg 体重 Tet 组、20 mg/kg 体重 Tet 组、5 mg Tet+50 mg Glz 组、10 mg Tet+50 mg Glz 组、20 mg Tet+50 mg Glz 组及 50 mg/kg 体重 Glz 组。分别给予不同剂量 Tet 剂量和/或 Glz 灌胃和/或腹腔注射, 对照组给予相应溶媒等干预。用放射免疫法、VG 染色法和 RT-PCR 法检测血清透明质酸、层粘连蛋白和 III 型前胶原肽含量及组织病理学变化和 I、III 型前胶原 mRNA 表达。

结果: 与模型组比较, 联合应用 Tet 与 Glz 能够降低血清 HA、LN 及 PIIIP 水平 (121.8 ± 9.5 vs 58.4 ± 7.6 , 85.7 ± 12.1 vs 46.2 ± 7.3 , 35.9 ± 3.5 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$); 减轻肝组织细胞外基质沉积 ($P < 0.05$); 较单独应用 Tet 效果更显著 (69.2 ± 11.1 vs 58.4 ± 7.6 ; 52.3 ± 6.7 vs 46.2 ± 7.3 ; 29.9 ± 3.2 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$)。与模型组比较, 联合应用 Tet 与 Glz 能够显著抑制纤维化大鼠肝组织 I、III 型前胶原 mRNA 表达 (0.53 ± 0.07 vs 0.26 ± 0.09 , 0.47 ± 0.05 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$); 较单独应用 Tet 效果更显著 (0.33 ± 0.06 vs 0.26 ± 0.09 , 0.29 ± 0.04 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$)。

结论: 联合应用 Tet 与 Glz 较单独用药更显著的抑制肝纤维化细胞外基质合成, 有望将二种药物制成复方以提高抗肝纤维化疗效。

王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明. 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达. 世界华人消化杂志 2003;11(7): 970-974

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/970.asp>

0 引言

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成过多、降解减少而沉积于组织间隙是肝纤维化发生发展的基本病理过程, 调节ECM代谢是防治肝纤维化的关键。迄今为止尚无特效药物能够完全阻断慢性肝病肝脏ECM过多表达与沉积^[1,2]。既往研究资料表明粉防己碱(tetrandrine, Tet)具有保护肝细胞、抗炎、抗氧化、阻断Ca²⁺通道及抗肝纤维化作用^[3];但由于Tet的中毒剂量与有效剂量较为接近而影响其临床推广应用。甘草酸(glycyrrhizinic acid, Glz)具有保护细胞膜、清除自由基、调节免疫及抗肝纤维化功能^[4,5]。为了达到提高疗效, 减少毒副作用的目的, 本研究探讨了联合应用Tet与Gly对实验性肝纤维化大鼠肝脏ECM代谢的影响, 并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物♂ Sprague-Dawley大鼠, 体重为200 ± 10 g, 清洁级, 购自中国科学院上海实验动物中心。普通饲料喂养, 自由饮水及进食。四氯化碳为上海长江化工厂产品。Tet粉剂为浙江金华第三制药厂产品。Gly(由江苏正大天晴制药有限公司产品提供)。透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)及III型前胶原肽(procollagen type III peptide, PIIIP)测定试剂盒购自海军上海医学研究所产品。RNA抽提试剂盒(TRIZOL Reagent)和DNA Marker(7zf(+)/DNA/HaeIII): 华舜生物工程公司产品。逆转录试剂盒(AccuPower™ RTPreMix): 赛百盛公司公司产品。Taq DNA聚合酶、随机引物、dNTP及10× Reaction Buffer: 上海生工生物工程有限公司产品。I型、III型前胶原及磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因引物序列为I型前胶原: Sense 5' -CCTGGCAAGAACGGAGATGA T-3', Antisense 5' -ACCGAC AGCACCATCGTTACC-3', III型前胶原: Sense 5' TGGCCAACCAGGAG AGAA GG3', Antisense 5' ATCCGTCTCGACGTGGCTGA3', GAPDH: Sense 5' CATG GTCTACACGTTCCAGT3', Antisense 5' GGCTAAGCAGTTGG TGGTGC 3', 由生工公司合成。

1.2 方法 动物模型的建立: 按照0.3 ml/100 g体重剂量, 于大鼠腹股沟或背部皮下注射40 % CCl₄溶液, 首次剂量加倍, 以后每3 d给药1次, 共6 wk。动物分组及处理: 81只♂ Sprague-Dawley大鼠随机分为9组: I组: 模型组; II组: 5 mg/kg体重Tet组; III组: 10 mg/kg体重Tet; IV组: 20 mg/kg体重Tet组; V组: 5 mg/kg体重Tet +50 mg/kg体重Gly组; VI组: 10 mg/kg体重Tet +50 mg/kg体重Gly组; VII组: 20 mg/kg体重Tet +50 mg/kg体Gly组; VIII组: 50 mg/kg体重Gly组; IX组: 正常组。模型对照组给予相应剂量CCl₄皮下注射, 各剂量Tet干预组及各联合干预组同时给予相应剂量的Tet混悬液灌胃, 1次/d; Gly干预组及各联合干预组给予相应剂量Gly注射液腹腔注射, 1次/d; 其余各组给予相同体积溶媒皮下或腹腔注射和/或灌

胃, 共42 d。最后1次给药24 h后处死动物, 取血清和肝组织标本, 置-80℃冰箱中保存待测。并取部分肝组织用10 %中性甲醛固定, 用于组织病理学检测。采用放射免疫法检测血清HA、LN及PIIIP含量, 具体步骤分别按试剂盒说明书进行。

用van Gieson苦味酸酸性复红染色法检测肝纤维化组织病理学, 参照有关文献[6], 进行肝纤维化程度计分。

RT-PCR法检测I型和III型前胶原mRNA表达, 采用异硫氰酸胍一步法, 按试剂盒说明书操作, 提取大鼠肝组织总RNA后, 按逆转录试剂盒说明逆转录成cDNA。采用体积为25 ml的PCR反应体系进行扩增, 在0.5 ml薄壁反应管内依次加入: (1) H₂O 14 μl; (2) 10×Reaction Buffer 2.5 μl; (3) dNTP(2 mM) 1 μl; (4) MgCl₂(25 mM) 1 μl; (5) Sense primer (10 pmol) 2 μl; (6) Antisense primer (10 pmol) 2 μl; (7) TaqDNA polymerase (2.5 u) 0.5 μl; (8) 逆转录产物2 μl。置PCR仪中进行扩增。I型前胶原mRNA扩增条件: 94℃3 min; 94℃30 s, 51.5℃30 s, 72℃1 min, 共30个循环; 72℃5 min。扩增片段长度为698 bp。III型前胶原mRNA扩增条件: 94℃3 min; 94℃30 s, 55℃30 s, 72℃1 min, 共30个循环; 72℃5 min。扩增片段长度为487 bp。GAPDH mRNA扩增条件: 94℃3 min; 94℃30 s, 51.5℃30 s, 72℃1 min, 共30个循环; 72℃5 min。扩增片段长度为349 bp。PCR产物经2 %琼脂糖凝胶, 25 mV, 50 mA条件下电泳。电泳结果经Fluors-Multimager扫描仪扫描成像。用Multi-Analyst software package进行PCR产物半定量。I型、III型前胶原mRNA相对含量用I型、III型前胶原mRNA相对含量用I型、III型前胶原吸光度×面积与GAPDH吸光度×面积之比值表示。

统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经SAS统计分析软件包进行ANOVA及Ridit分析。

2 结果

2.1 各组动物血清HA、LN及PIIIP含量变化 各组动物血清HA、LN及PIIIP水平见表1, I组动物血清HA、LN及PIIIP浓度均显著高于IX组(P < 0.001)。III组、IV组、VI组及VII组血清LN含量显著低于I组(P < 0.05), VI组及VII组最为明显; II组、V组及VIII组动物血清LN无明显降低(P > 0.05)。III组、V、VI、VII组及VIII组动物血清PIIIP含量均低于I组(P < 0.05), VI组效果最优; II组和IV组动物血清PIIIP含量与II组无差异(P > 0.05)。III组、IV组、V组、VI组、VII组及VIII组动物血清HA含量均显著低于I组(P < 0.05), VI组和VII组血清HA浓度最低, 两组间无差异(P > 0.05); II组与I组比较无显著降低(P > 0.05)。结果提示除5 mg/kg体重组外, 各药物干预组均能不同程度地降低肝纤维化大鼠血清HA、LN及PIIIP含量, 10 mg/kg体重或20 mg/kg体重Tet与Gly联合应用效果更好。

2.2 肝组织病理学变化 各组动物肝组织病理学变化见表2及组织学照片(图1-9)。结果显示I组大鼠肝组织中可见明显的肝细胞脂肪变性、坏死及炎性细胞浸润; 汇管区胶原

纤维沉积,纤维结缔组织自汇管区呈放射状扩展、向小叶周围延伸;部分中央静脉区纤维结缔组织沉积增多;有典型的假小叶形成;肝纤维化积分显著高于IX组(图1,2)。III组、IV组、V组、VI组、VII组及VIII组大鼠肝组织中肝细胞变性坏死明显减轻,纤维结缔组织沉积减少,纤维间隔及假小叶形成率明显低于I组,VI组疗效最为显著(图4-9);II组与I组差异不显著(图2,3)。提示10 mg/kg体重Tet、20mg/kg体重Tet、50 mg/kg体重Glz单独运用,或不同剂量Tet与Glz联合应用能够显著减轻肝纤维化组织病理学变化。

2.3 各组动物肝组织I型和III型前胶原mRNA表达

各组动物肝组织I型及III型前胶原mRNA相对含量见表3及(图10,11)。I组大鼠肝组织I型及III型前胶原mRNA相对含量显著高于IX组($P < 0.001$);III组、IV、V组、VI组、VII组及VIII组动物肝组织I型和III型胶原mRNA含量显著低于I组($P < 0.05$);VI组动物肝组织I型和III型胶原mRNA含量低于Tet及Glz单独用药组。II组与I组比较无显著差异($P > 0.05$)。

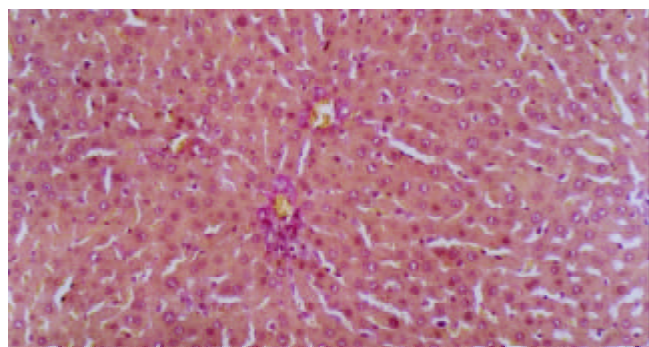


图1 IX组肝组织,VG染色 $\times 200$.

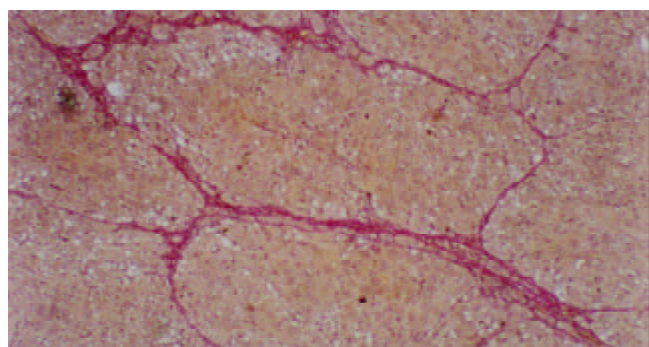


图2 I组肝组织,VG染色 $\times 100$.

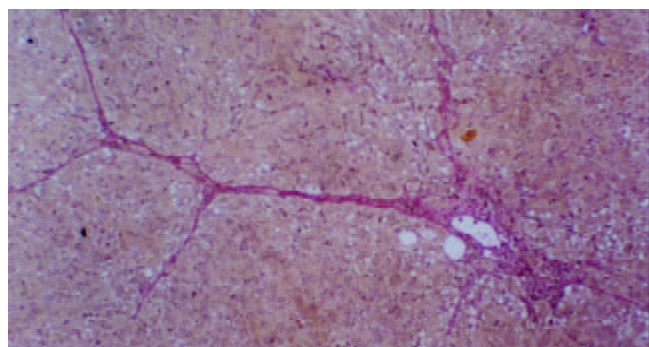


图3 II组肝组织,VG染色 $\times 100$.

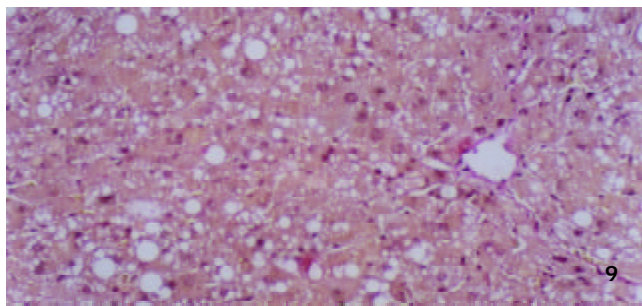
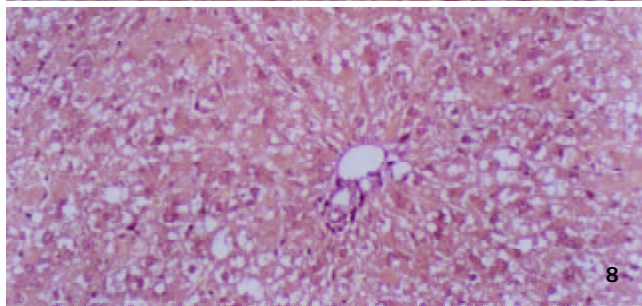
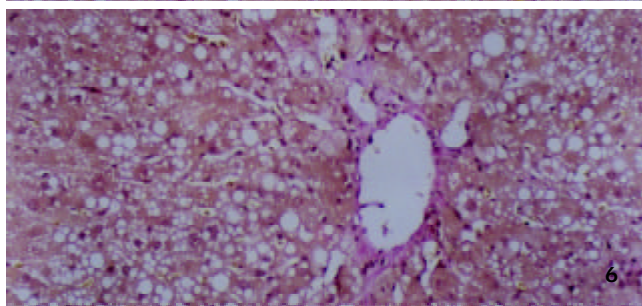
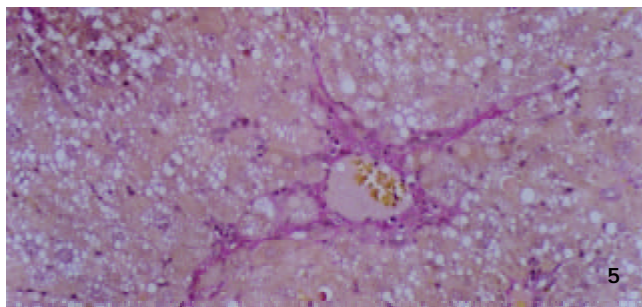
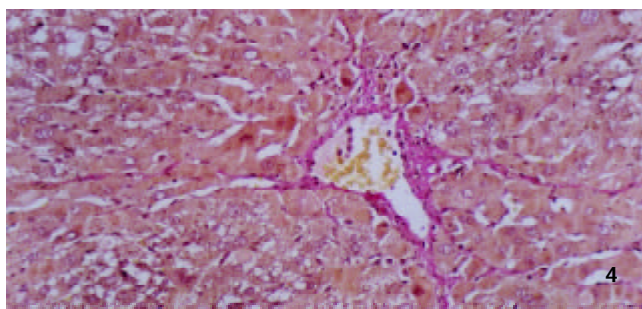


图4 III组肝组织,VG染色 $\times 200$. 图5 IV组肝组织,VG染色 $\times 100$.
图6 VI组肝组织,VG染色 $\times 200$. 图7 V组肝组织,VG染色 $\times 200$.
图8 VII组肝组织,VG染色 $\times 200$. 图9 VIII组肝组织,VG染色 $\times 200$.

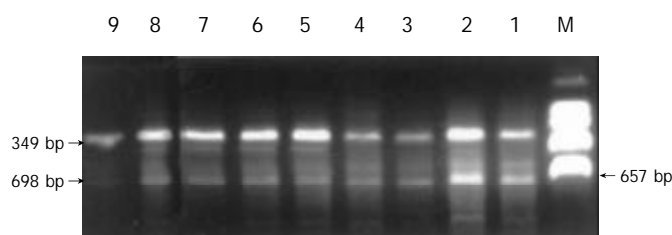


图 10 各组动物肝组织 I 型前胶原 mRNA 电泳条带.

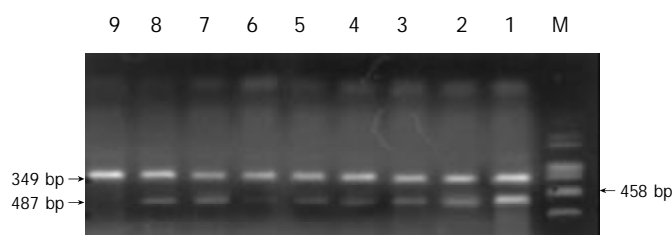


图 11 各组动物肝组织 III 型前胶原 mRNA 电泳条带.

表 1 各组动物血清 LN、PIIIP 及 HA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	Ln($\mu\text{g/L}$)	PIIIP(ng/L)	HA(ng/L)
I 组	8	85.7 ± 12.1^a	35.9 ± 3.5^a	121.8 ± 9.5^a
II 组	9	78.2 ± 7.9	33.7 ± 2.6	110.3 ± 13.4
III 组	8	52.3 ± 6.7^b	29.9 ± 3.2^b	69.2 ± 11.1^b
IV 组	9	61.3 ± 8.4^b	32.3 ± 3.3	78.5 ± 8.6^b
V 组	8	69.3 ± 7.5	31.0 ± 3.3^b	94.7 ± 18.4^b
VI 组	8	46.2 ± 7.3^{bc}	23.5 ± 2.9^{bc}	58.4 ± 7.6^{bc}
VII 组	9	48.1 ± 3.4^b	30.8 ± 3.4^b	65.8 ± 7.2^b
VIII 组	8	71.7 ± 6.5	30.4 ± 3.4^b	89.1 ± 16.8^b
IX 组	9	37.1 ± 6.3	15.6 ± 2.8	33.1 ± 3.7

^a $P < 0.001$ vs IX 组比较, ^b $P < 0.05$ or 0.01 vs I 组比较, ^c $P < 0.05$ vs III 组比较.

表 2 各组动物肝组织纤维化病理分级比较

	<i>n</i>	病理分级				
		0	1	2	3	4
I 组 a	8	0	0	1	3	4
II 组	9	0	1	2	3	3
III 组 b	8	1	2	3	1	1
IV 组 b	9	1	3	2	2	1
V 组 b	8	0	3	3	1	1
VI 组 b	8	1	4	2	1	0
VII 组 b	9	1	2	3	2	1
VIII 组 b	8	0	2	3	2	1
IX 组	9	8	0	0	0	0

^a $P < 0.001$ vs IX 组比较, ^b $P < 0.05$ or 0.01 vs I 组比较.表 3 各组动物肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	I 型前胶原	III 型前胶原
I 组	8	0.53 ± 0.07^a	0.47 ± 0.05^a
II 组	9	0.51 ± 0.07	0.48 ± 0.09
III 组	8	0.33 ± 0.06^b	0.29 ± 0.04^b
IV 组	9	0.39 ± 0.04^b	0.37 ± 0.3^b
V 组	8	0.35 ± 0.07^b	0.31 ± 0.07^b
VI 组	8	0.26 ± 0.09^b	0.21 ± 0.07^b
VII 组	9	0.31 ± 0.09^b	0.28 ± 0.08^b
VIII 组	8	0.36 ± 0.08^b	0.32 ± 0.05^b
IX 组	9	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.05

^a $P < 0.001$ vs IX 组比较, ^b $P < 0.05$ or 0.01 vs I 组比较.

3 讨论

肝脏 ECM 由胶原、糖蛋白及蛋白聚糖成分组成, 主要包括 HA、LN 和 I、III、IV 型胶原等. 生理状况下, 肝组织 ECM 含量相对较少, 具有维持组织正常生理结构和内环境稳定的作用^[6,7]. 肝纤维化时, HSC 分泌 I 型、III 型及 IV 型胶原、HA、LN 及纤维连接素等增加; 同时由于窦周毛细血管化、内皮细胞功能障碍等因素使得 ECM 降解减少, 血循环中 HA、LN 及 PIIIP 含量升高. I 型及 III 型胶原、HA 及 LN 合成增多、降解相对减少而沉积于细胞间隙^[8-10]. 组织病理学检查可见肝细胞变性坏死的同时小叶间、汇管区扩大, 汇管区胶原纤维沉积, 纤维结缔组织增生明显并自汇管区呈放射状扩展、向小叶周围延伸; 部分中央静脉区纤维结缔组织沉积增多; 典型的假小叶形成时即可诊断为肝硬化. 本研究表明模型组动物肝组织病理改变与上述文献^[11,12]报道一致. 我们发现单独应用 10 mg/kg 体重、20 mg/kg 体重 Tet 或 50 mg/kg 体重 Glz, 或不同剂量 Tet 与 Glz 联合应用均能不同程度地降低纤维化大鼠血清 HA、LN 及 PIIIP 水平, 以 10 mg/kg、20 mg/kg 体重 Tet 联合 Glz 治疗组效果最为显著. 给予 10 mg/kg 体重、20 mg/kg 体重 Tet 可显著降低实验性肝纤维化大鼠肝组织汇管区及中央静脉区结缔组织沉积, 与有关资料报道^[13]相似. 给予 50 mg/kg 体重 Glz 可显著减轻肝纤维化程度. 我们还发现各剂量 Tet 联合 Glz 应用可显著减少 ECM 的沉积, 肝纤维化组织病理学积分较各单独用组显著降低, 以 10 mg/kg 体重 Tet 联合 Glz 组效果最为显著. 表明 Tet 与 Glz 在抑制 HSC 激活、增生转化及 ECM 合成, 促进 ECM 降解等方面有协同效应.

从基因转录水平检测肝组织或 HSC I 型和 III 型前胶原表达调控是研究肝纤维化发生机制、探讨抗肝纤维化药物作用机制的重要手段. 研究资料^[14]表明连续给予皮下注射 CCl₄ 或胆管结扎诱导大鼠肝纤维化, 肝组织 I 型及 III 型胶原 mRNA 表达水平上调 5-10 倍. 本实验结果显示正常组动物肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达很弱, 而模型组肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达显

著增强; 10 mg/kg 体重和 20 mg/kg 体重 Tet 及 50 mg/kg 体重 Glz 能够显著抑制 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达, 表明二种药物可在转录水平抑制胶原蛋白合成, 联合应用 Tet 与 Glz 能够更加显著地抑制肝纤维化大鼠肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 的表达, 10 mg/kg 体重 Tet 与 Glz 联合组效果最为显著, 与病理组织学结果相吻合. 其诱导 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达下调的机制为 (1) Tet 和 Glz 分别能够抑制 HSC 增生, HSC 细胞总数目及转化为肌成纤维样母细胞数目减少^[15,16], 故组织 mRNA 含量下降; (2) Tet 和 Glz 还能通过抑制脂质过氧化反应、廓清自由基, 减少 TGF β_1 、PDGF、TNF α 等细胞因子及其受体表达, 阻断 Ca²⁺、PKC 及 IP-3K、MAPK、JNKs 等细胞内信号传导通路, 下调 NF κ B 结合活性^[17-19], 从而在转录水平或转录上游水平减少 I 型和 III 型前胶原 mRNA 生成.

本研究结果提示联合应用 Tet 和 Glz 单独应用均能有效抑制 ECM 表达与沉积, 两种药物联合应用疗效显著优于单独应用 Tet 及 Glz. 这种协同效应可能与 Glz 保护肝细胞、降低 Tet 的细胞毒等作用有关. 联合用药可为防治肝纤维化提供新的途径

4 参考文献

- 1 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenter Hepatol J* 1999;14:618-633
- 2 Liu HL, Li XH, Wang DY, Yang SP. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* 2000;6:881-884
- 3 王志荣, 李定国, 陆汉民. 粉防己碱药理作用研究进展. *中国药理学通报* 2000;16:488-492
- 4 van Rossum TG, Vulto AG, de Man RA, Brouwer JT, Schalm SW. Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther J* 1998;12:199-205
- 5 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:115-119
- 6 王泰龄, 王宝恩, 刘霞, 贾继东, 赵静波, 李新民, 张晶, 李宁章. 慢性病毒性肝炎纤维化分期与血清学指标的关系. *中华病理学杂志* 1998;27:185-190
- 7 Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- 8 Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen producing cells in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- 9 Ma L, Zhao LS, Li CH, Lu Q, Li RK, Deng SS. A study on the dynamic alterations of serum HA in rats with carbon tetrachloride induced liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):60
- 10 Wang YD, Jia LW, Li CM. Hepatic content of collagens and laminin in rat model of experimental liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):73
- 11 McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol J* 2000;15:1159-1168
- 12 Jung SA, Chung YH, Park NH, Lee SS, Kim JA, Yang SH, Song IH, Lee YS, Suh DJ, Moon IH. Experimental model of hepatic fibrosis following repeated periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:969-975
- 13 李定国, 夏维新, 陆汉明. 检测血清 III 型胶原肽在钙离子阻滞剂治疗肝纤维化中的意义. *中华内科杂志* 1990;29:453-456
- 14 Bueno MR, Daneri A, Armendariz-Borunda J. Cholestasis-induced fibrosis is reduced by interferon alpha-2a and is associated with elevated liver metalloprotease activity. *J Hepatol* 2000;33:915-925
- 15 田子彬, 刘思良, 李定国, 陆汉明. 汉防己甲素对血小板衍生生长因子促细胞增生效应的阻断作用. *中华医学杂志* 1997;77:50-53
- 16 Matsushima Y, Baba T. An antigranulomatous effect of glycyrrhizin. *J Exp Pathol* 1992;6:25-30
- 17 Ho LJ, Chang DM, Lee TC, Chang ML, Lai JH. Plant alkaloid tetrandrine downregulates protein kinase C-dependent signaling pathway in T cells. *Eur J Pharmacol* 1999;367:389-398
- 18 O' Brian CA, Ward NE, Vogel VG. Inhibition of protein kinase C by the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate antagonist glycyrrhetic acid. *Cancer Lett* 1990;49:9-12
- 19 Chen F, Lu Y, Demers LM, Rojanasakul Y, Shi X, Vallyathan V, Castranova V. Role of hydroxyl radical in silica-induced NF-kappa B activation in macrophages. *Ann Clin Lab Sci* 1998;8:1-13



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

