

丹酚酸B对肝纤维化大鼠TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2表达的影响

卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平

卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平, 温州医学院附属第一医院
浙江省温州市 325000
通讯作者: 卢明芹, 325000, 浙江省温州市, 温州医学院附属第一
医院感染内科. lmq0906@163.com
电话: 0577-88078232
收稿日期: 2007-08-31 修回日期: 2007-11-08

Effect of salvianolic acid B on levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in rats with liver fibrosis

Ming-Qin Lu, Chen-Wei Pan, Ji Li, Yong-Ping Chen

Ming-Qin Lu, Chen-Wei Pan, Ji Li, Yong-Ping Chen, Department of Infection Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Ming-Qin Lu, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. lmq0906@163.com
Received: 2007-08-31 Revised: 2007-11-08

Abstract

AIM: To observe the levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in the livers of rats with hepatic fibrosis, and the effects of salvianolic acid B (SA-B) on it.

METHODS: An animal model of hepatic fibrosis was established by injecting DMN (dimethyl nitroxide) solution into the abdominal cavity for four continuous weeks. Levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in liver tissue were assessed by S-P immunohistochemical staining using polyclonal antibodies against TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2. Pathological characteristics of liver tissue were observed by microscopy after hematoxylin-eosin and Masson staining. Levels of ALT, AST and Alb were detected using an auto-biochemical analytical tool in the laboratory test department of our hospital. Serum levels of HA, LN were detected by radioimmunoassay (RIA).

RESULTS: Compared with rats in the liver fibrosis group, the pathologic manifestations of those in the SA-B-treated group improved

significantly. The levels of ALT, AST, HA and LN in the treated group were significantly lower than those in the liver fibrosis group (87.0 ± 28.7 U/L vs 190.4 ± 27.4 U/L, 85.6 ± 25.3 U/L vs 178.2 ± 15.9 U/L, 179.7 ± 32.8 mg/L vs 433.3 ± 86.1 mg/L, 135.6 ± 21.1 mg/L vs 224.7 ± 29.2 mg/L, $P < 0.01$). Expression levels of TGF- β 1 and TIMP-2 in the SA-B-treated group were significantly lower than those in the liver fibrosis group (18.53 ± 2.54 vs 12.78 ± 2.65 , 21.88 ± 3.83 vs 14.69 ± 4.51 , $P < 0.01$), and there was no difference in the expression of MMP-2 between the treated group and the hepatic fibrosis group.

CONCLUSION: SA-B is efficient for the treatment of hepatic fibrosis; the mechanisms possibly involve the inhibition of TGF- β 1 and TIMP-2.

Key Words: Salvianolic acid B; Liver fibrosis; Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitors of metalloproteinase; Transforming growth factor-beta 1; Radioimmunoassay

Lu MQ, Pan CW, Li J, Chen YP. Effect of salvianolic acid B on levels of TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-2 in rats with liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(36): 3847-3851

摘要

目的: 观察丹酚酸B盐(salvianolic acid B, SA-B)对肝纤维化大鼠肝组织转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)表达的影响, 并探讨SA-B抗肝纤维化的可能机制。

方法: δ SD大鼠30只随机分为正常对照组、模型组和丹酚酸B治疗组, 以5 mL/L的二甲基亚硝胺(DMN)建立肝纤维化模型, 治疗组在造模4 wk后给予SA-B治疗4 wk。应用HE、Masson染色观察肝组织病理纤维化分级, 全自动生化分析仪检测ALT、AST和Alb, 放免法检测HA和LN, S-P免疫组织化学方法检测TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2蛋白质的表达。

结果: 与模型组相比, SA-B能改善肝纤维化大

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变, 其本质为ECM在肝内的过度沉积。我国为乙型病毒性肝炎高发区, 肝炎肝硬化发生率高。因此, 对肝纤维化防治的研究受到越来越多的关注, 探讨肝纤维化的发病机制, 寻求肝纤维化的防治方法已成为肝纤维化研究的热点。

■ 研发前沿

转化生长因子 β 1是肝纤维化的启动、进展乃至肝硬化形成中发挥核心作用的细胞因子。肝纤维化的过程与基质金属蛋白酶及其抑制因子的表达密切相关。在肝纤维化治疗的实验中,有很多针对TGF- β 1、MMPs、TIMPs的研究。

鼠肝脏病理组织学结构, 治疗组血清ALT、AST、HA和LN水平明显减低(87.0 ± 28.7 U/L vs 190.4 ± 27.4 U/L, 85.6 ± 25.3 U/L vs 178.2 ± 15.9 U/L, 179.7 ± 32.8 mg/L vs 433.3 ± 86.1 mg/L, 135.6 ± 21.1 mg/L vs 224.7 ± 29.2 mg/L, 均 $P < 0.01$), 经SA-B干预后TGF- β 1和TIMP-2表达明显下降, 与模型组相比有显著性差异(18.53 ± 2.54 vs 12.78 ± 2.65 , 21.88 ± 3.83 vs 14.69 ± 4.51 , 均 $P < 0.01$), 而MMP-2表达水平无明显变化。

结论: SA-B能改善肝纤维化大鼠肝脏病理组织学结构, 可能通过抑制TGF- β 1和TIMP-2表达而促进肝纤维化的逆转。

关键词: 丹酚酸B盐; 肝纤维化; 转化生长因子 β 1; 基质金属蛋白酶-2; 金属蛋白酶组织抑制因子-2; 放射免疫法

卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平. 丹酚酸B对肝纤维化大鼠TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(36): 3847-3851
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3847.asp>

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 其发生和发展与细胞外基质(ECM)在肝内过度沉积有关^[1]. 这种过度沉积不仅由ECM合成增多引起, 更大程度是降解减少的原因. 转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是肝纤维化发生、进展乃至肝硬化形成中发挥核心作用的细胞因子, 是激活肝星状细胞(HSC)并促进其表达ECM的关键因素^[2]. 丹酚酸B盐(salvianolic acid B, SA-B)是自唇形科植物丹参的干燥根和根茎中提取的有效成分. 国内外的研究发现, SA-B有显著的抗大鼠肝纤维化作用, 本研究旨在探讨观察SA-B对实验性肝纤维化大鼠肝组织TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2表达的影响, 以探讨其抗肝纤维化的可能机制, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 δ SD大鼠30只, 体质量120-140 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供. DMN购自Sigma公司, 免疫组化一抗、二抗试剂购自Santa Cruz公司, 免疫组化DAB显色试剂盒购自福建迈新公司. SA-B购自中国药品生物制品检定所, 应用时用蒸馏水配制成浓度为1.25 g/L的溶液。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和造模: δ SD大鼠30只随机分

为3组: 正常对照组10只, 肝纤维化模型组10只, SA-B治疗组10只. 正常对照组ip生理盐水, 剂量2 mL/kg, 模型组ip 5mL/L DMN建立肝纤维化模型, 1次/d, 每周连续3 d, 共4 wk. 模型组和SA-B治疗组造模4 wk结束后分别以蒸馏水和SA-B溶液按照10 mL/kg进行ig, 1次/d, 每周连续3 d, 共4 wk. 第8周末处死各组大鼠。

1.2.2 免疫组织化学检查: 取出新鲜肝组织用40 g/L甲醛固定12 h, 之后脱水透明石蜡包埋. 采用热修复抗原SABC染色程序, 切片浸入0.01 mol/L枸橼酸缓冲液, 微波炉加热沸腾15 min热修复, 冷却后0.01 mol/L PBS洗涤2次, 滴加二抗及血清封闭液, 室温20 min, 滴加稀释一抗, 4℃冰箱保存过夜, 滴加SABC试剂, DAB显色, 蒸馏水清洗, 苏木素轻度复染, 脱水、透明、封片, 显微镜观察. 每次染色时用试剂公司提供的TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2阳性片作阳性对照, PBS代替第一抗体作为阴性对照. TGF- β 1、MMP-2和TIMP-2免疫组化结果均使用美国IPP5.0专业图像分析软件测定平均光密度值, 用背景的光密度值减去阳性部位的光密度值即为阳性部位的吸光度值。

1.2.3 肝脏组织病理检查: 以40 g/L甲醛溶液固定, 常规经HE染色和Masson三色染色, 普通光学显微镜下观察. 肝组织病理学检查, 肝组织HE染色, 按2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订《病毒性肝炎防治方案》中慢性肝炎分期标准, 进行纤维化程度(S)分级, 判定肝纤维化程度^[3]。

1.2.4 血清学检测 采用全自动生化分析仪检测ALT、AST和Alb水平, 放射免疫测定血清HA和LN的水平。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件分析, 计数资料用mean \pm SD表示. 多组样本均数比较进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

肝纤维化模型组大鼠毛色暗淡、精神萎靡, 进食进水减少, 易受惊, 体质量增长缓慢. 处死后取肝组织可见模型组肝脏表面粗糙有结节, 颜色灰暗, 用手触摸感觉发硬, 治疗组大鼠毛色较好, 食欲尚可, 肝组织损害较模型组轻, 肝脏质地软, 表面较光滑。

2.1 肝功能检测结果 与正常对照组比较, 肝纤维化模型组血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸

表 1 各实验组大鼠血清学检测结果(mean ± SD, n = 10)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	Alb(g/L)	HA(mg/L)	LN(mg/L)
对照组	31.6 ± 8.5	29.9 ± 10.7	32.9 ± 3.3	108.3 ± 22.7	82.0 ± 11.8
模型组	190.4 ± 27.4 ^b	178.2 ± 15.9 ^b	31.7 ± 2.3	433.3 ± 86.1 ^b	224.7 ± 29.2 ^b
治疗组	87.0 ± 28.7 ^{bd}	85.6 ± 25.3 ^{bd}	33.5 ± 2.9	179.7 ± 32.8 ^{bd}	135.6 ± 21.1 ^{bd}

^bP<0.01 vs 对照组; ^dP<0.01 vs 模型组.

表 2 各实验组大鼠肝脏病理分级 (n = 10)

分组	肝纤维化分级				
	0	I	II	III	IV
对照组	10	0	0	0	0
模型组	0	0	0	3	7
治疗组 ^b	0	7	2	1	0

^bP<0.05 vs 模型组.

转氨酶(AST)明显升高, 与模型组比较, 经SA-B治疗后, 血清ALT和AST明显下降.

2.2 血清透明质酸(HA)和层黏蛋白(LN)的变化与正常组比较, 模型组血清HA和LN的水平明显升高(P<0.01), 与模型组比较, 经SA-B治疗后, 血清HA和LN水平明显下降(P<0.01, 表1).

2.3 肝脏组织病理学检查 显微镜下模型组可见灶性坏死, 伴炎性细胞浸润, 小叶结构紊乱, 由汇管区和中央静脉伸出粗大胶原纤维条索分割、包绕肝小叶, 肝细胞索排列紊乱, 肝细胞浊肿明显. 与模型组相比, 治疗组肝细胞坏死、纤维组织增生减少, 肝小叶结构破坏减轻, 纤维条索疏松变窄, 肝细胞水肿好转, 肝内炎症细胞浸润减少. 各实验组大鼠肝脏病理纤维化分级情况见表2.

2.4 肝脏组织免疫组织化学检查 与对照组比较, 模型组MMP-2、TIMP-2和TGF-β1免疫组化表达均明显增强, 与模型组比较, 治疗组TIMP-2、TGF-β1免疫组化表达显著减轻, 有显著性差异(P<0.01), 治疗前后MMP-2表达无显著变化(表3)

2.5 肝组织TGF-β1表达与病理肝纤维化分级、MMP-2和TIMP-2表达的关系 用等级相关分析, 显示大鼠肝组织TGF-β1平均光密度与病理分级呈正相关(r = 0.697, P<0.01), 大鼠肝组织TGF-β1平均光密度与TIMP-2平均光密度呈正相关(r = 0.699, P<0.01), 大鼠肝组织TGFβ1与MMP-2平均光密度呈正相关(r = 0.399, P<0.05).

3 讨论

TGF-β1是目前研究最深入的与肝脏疾病密切相

■ 相关报道

目前国内外有关肝纤维化与TGF-β1、MMPs、TIMPs表达关系的报道较多, 但肝纤维化是一个复杂的过程, 如能进行动态观察, 研究将更真实可靠.

关的细胞因子, 是调控肝纤维化发生发展的核心物质^[4]. HSC活化后产生多种细胞因子, 其中TGF-β1是促肝纤维化主要的细胞因子之一, 该物质主要由活化的HSC分泌并激活, 而TGF-β1又可促进、维持HSC的活化. 研究发现, 在MMPs的活化过程中, TGF-β1发挥重要调节作用. TGF-β1通过调节基质金属酶的产生和活性来干扰细胞外基质的代谢^[5]. TGF-β1能在转录水平上促进α2巨球蛋白表达, 而金属蛋白酶与后者结合后功能即受到抑制, TGF-β1还能增加蛋白酶抑制剂的表达, 如纤维蛋白溶解酶原抑制物-1、组织特异性金属蛋白酶抑制物等^[6], 从而拮抗细胞外基质水解酶的作用, 引起细胞外基质分解减少和沉积增加, 加速肝纤维化的发展. 本研究结果显示TGF-β1在正常对照组表达见于汇管区、肝细胞、肝窦内皮细胞, 着色较浅, 范围窄, 而在肝纤维化模型组主要表达见于纤维间隔内、HSC细胞、肝细胞、肝窦内皮细胞, 呈棕黄色颗粒, 范围广. 本研究TGF-β1抗原免疫组化染色半定量分析结果显示: 平均光密度值与对照组之间有显著差异(P<0.01), 说明TGF-β1是促进胶原纤维合成因子之一, 是肝纤维化发生发展微观调节的重要细胞因子. 通过消除纤维化过程中病变组织产生过多的TGFβ1来预防或阻断纤维化的发展已成为纤维化防治研究的热点^[7], 国内王海南 *et al*^[8]报道认为SA-B能明显抑制HSC的增殖, 既能减少TGF-β1分泌的总量, 又能减少活性型TGF-β1的含量, 并可不同程度地抑制Smad2/3蛋白的表达, 抑制Smad2蛋白在细胞内的磷酸化与核转位, 从而拮抗TGF-β1, 我们的体内实验研究结果显示, 经SA-B治疗后, 肝组织TGF-β1的表达有显著降低, 说明可能是其发挥抗肝纤维化作用的机制之一.

正常情况下ECM生成与降解处于动态平衡, ECM合成与降解的失衡是引起肝内ECM积聚并导致肝纤维化的重要机制. 目前认为后者是由于基质金属蛋白酶(MMPs)表达下调或由于TIMPs的表达增加, 抑制了MMPs的活性, 使

同行评价

本文具有一定的新颖性, 结构完整, 立题思路清晰, 采用的研究方法可靠, 具有较高的理论水平。

表 3 各实验组大鼠免疫组化检测结果(光密度值, $n=10$)

分组	MMP-2	TIMP-2	TGF- β 1
对照组	8.94 \pm 0.89	8.20 \pm 1.14	8.62 \pm 1.07
模型组	12.40 \pm 1.95 ^b	21.88 \pm 3.83 ^b	18.53 \pm 2.54 ^b
治疗组 ^b	12.58 \pm 2.97 ^b	14.69 \pm 4.51 ^{bd}	12.78 \pm 2.65 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

胶原降解受到抑制^[9], 肝细胞与多种间质细胞均能不同程度合成MMPs与TIMPs, 并通过复杂的调节机制, 在维持正常肝脏纤维组织中ECM的合成与降解的动态平衡中起关键作用。肝纤维化时, MMP-2为ECM降解过程中起关键作用的MMPs之一, 在大鼠肝纤维化模型中MMP-2的表达随肝纤维化发展逐渐增加, 尤其进展期增加更明显^[10], 而TIMP-2是一种21 kDa的非糖基化蛋白, 与MMP-2亲和性较强, 抑制其活性, 他还抑制其他所有激活MMPs的蛋白水解活性。TIMP-2通过对MMP-2等金属蛋白酶活性的抑制促进ECM的沉积, 因此TIMP-2的表达程度反映了对MMPs抑制的程度, 也反映了肝纤维化的严重程度^[11]。我们的免疫组化研究表明MMP-2主要位于窦内皮细胞、血管内皮细胞及肝窦细胞, MMP-2免疫组化阳性表达肝纤维化组明显高于对照组, 说明MMP-2与肝纤维化关系密切。本实验在蛋白质水平反映TIMP-2在肝纤维化大鼠中的表达情况, 免疫组化观察发现, 肝纤维化大鼠肝脏中肌成纤维细胞、成纤维细胞有TIMP-2蛋白的高表达, 阳性信号呈现为棕黄色颗粒状, 分布在肝细胞胞质中, 未见细胞核表达, 提示在肝纤维化中, 肌成纤维细胞和成纤维细胞是TIMP-2表达的主要细胞。本实验结果表明, 肝纤维化时TIMP-2表达增强且与正常组比较有显著性差异, 说明TIMP-2表达增强, 抑制了胶原酶的活性, TIMP-2通过对MMP-2、MMP-9等金属蛋白酶活性的抑制促进ECM的沉积。

本实验发现经SA-B干预后, 与模型组相比, 血清学研究结果显示: 肝功能指标有明显的改善, 病理组织学改变显示肝纤维化程度明显减轻。经SA-B治疗后, 大鼠肝组织TIMP-2的表达较肝纤维化模型组明显降低, 有显著性意义($P < 0.01$), 但治疗组MMP-2表达与肝纤维化模型组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 表明治疗实验性肝纤维化大鼠可能不是通过调节MMP-2表达来实现的, 而是下调TIMP-2的表达, 在一定程度上解除对MMPs的抑制作用, 有助于ECM

的降解。我们通过实验证明SA-B可能通过下调TGF- β 1表达抑制胶原的合成, 同时下调TIMP-2表达而使胶原分解加强, 从而减轻肝纤维化的程度。而TGF- β 1本身也具有调控MMPs和TIMPs的功能, 其调控的机制非常复杂, 可以通过不同的下游事件来完成对MMPs和TIMPs家族成员的基因表达调控作用, 这些下游事件主要包括Smad通路、促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路以及刺激激活蛋白-1转录因子的生成等。我们的研究显示TGF- β 1与TIMP-2存在显著正相关, MMPs/TIMPs成员受TGF- β 1调控的具体机制, 以及各条信号通路之间的调控关系, 尚有待进一步的探讨。同时, 寻找一种调节ECM降解酶系的药物, 干预细胞外某些细胞因子的表达, 可能会在防治肝纤维化的进展中起重要作用。本研究表明, 经丹酚酸B治疗后的肝纤维化大鼠血清中HA和LN含量明显低于模型组($P < 0.01$), 同时下调纤维化大鼠TGF- β 1和TIMP-2的水平, 从而减少ECM积聚, 对肝纤维化的形成具有明显抑制作用。

4 参考文献

- 1 Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 877-880
- 2 Ray S, Broor SL, Vaishnav Y, Sarkar C, Girish R, Dar L, Seth P, Broor S. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 393-403
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 4 Kinnman N, Andersson U, Hulcrantz R. In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1294-1300
- 5 Sato M, Shegogue D, Gore EA, Smith EA, McDermott PJ, Trojanowska M. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002; 118:

- 704-711
- 6 Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999; 18: 1345-1356
- 7 陈永平, 潘陈为, 王晓东, 巩跃文, 冀宏. 转化生长因子 β 1与乙型肝炎病毒核心抗原融合基因的表达和鉴定. *中华传染病杂志* 2005; 23: 328-330
- 8 王海南, 胡义扬, 洪嘉禾, 刘平, 朱大元. 丹酚酸B盐对肝星状细胞增殖和TGF β 1信号转导的影响. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 382-384
- 9 Zhang LJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Yu JP, Wang XZ. Effect of interleukin-10 and platelet-derived growth factor on expressions of matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rat fibrotic liver and cultured hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2574-2579
- 10 Zhou X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon RC. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004; 24: 492-501
- 11 Di Sario A, Bendia E, Macarri G, Candelaresi C, Taffetani S, Marzioni M, Omenetti A, De Minicis S, Trozzi L, Benedetti A. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 744-751

编辑 李军亮 电编 李海寅

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号:ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R;类目名称:医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611,影响因子为0.460,5年影响因子为0.482,即年指标为0.148,他引总引比为0.80,被引期刊数为585,被引半衰期为4.6,2006载文量为696,基金论文比为0.44,Web即年下载率为17.7.[中国学术期刊(光盘版)电子杂志社;中国科学文献计量评价研究中心].