

复方红景天对大鼠肝纤维化肝脏中TIMP-1表达的影响

刘东璞, 卢凤美, 张春斌

刘东璞, 卢凤美, 张春斌, 黑龙江省佳木斯大学基础医学院病理教研室, 黑龙江省佳木斯市 154007
黑龙江省科技厅科技攻关资助项目, No. 2006-337
黑龙江省科技厅科技攻关资助项目, No. PC06S15
作者贡献分布: 刘东璞与卢凤美对此文所作贡献均等; 此课题由刘东璞, 卢凤美及张春斌共同设计; 研究过程由刘东璞, 卢凤美及张春斌操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张春斌提供; 数据分析由刘东璞与卢凤美完成; 本论文写作由刘东璞与卢凤美完成。
通讯作者: 张春斌, 154007, 黑龙江省佳木斯市, 黑龙江省佳木斯大学基础医学院病理教研室, lufengmei200520136@163.com
电话: 0454-8618518
收稿日期: 2008-09-25 修回日期: 2008-10-16
接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-08

Effect of Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis* on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in fibrotic liver in rats

Dong-Pu Liu, Feng-Mei Lu, Chun-Bin Zhang

Dong-Pu Liu, Feng-Mei Lu, Chun-Bin Zhang, Department of Pathology, Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China
Supported by: the Scientific Research Foundation from Health Department of Heilongjiang Province, No. 2006-337, and the Key Science and Technology Program of Heilongjiang Province, No. PC06S15
Correspondence to: Chun-Bin Zhang, Department of Pathology, Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China. lufengmei200520136@163.com
Received: 2008-09-25 Revised: 2008-10-16
Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To observe the change of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) expression in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats after treatment with Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis* (CHCRS).

METHODS: Eighty healthy male SD rats were randomly divided into 5 groups ($n = 16$, for each group): normal group, fibrosis group, CHCRS-treated groups (using high-, middle- and low-dose CHCRS, respectively). Liver fibrosis was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (for 8 wk). CHCRS was given intraga-

strically twice a week while fibrosis was induced. Animals were sacrificed at the end of experiment. Histological examinations were performed after hematoxylin and eosin staining, and the fibrosis was classified into stage 0 to 4. The level of hepatic TIMP-1 mRNA was determined by semi-quantitative RT-PCR, and the expression of TIMP-1 protein was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The extent of liver fibrosis was above the 3rd stage in most model animals, but in CHCRS-treated rats, it was obviously degraded as compared with that in the model group. The level of hepatic TIMP-1 mRNA was significantly higher in the model group than that in the normal group (0.858 ± 0.052 vs 0.615 ± 0.067 , $P < 0.05$), but it was markedly lower in the CHCRS-treated groups than that in the model group (0.740 ± 0.081 , 0.704 ± 0.032 , 0.695 ± 0.030 ; all $P < 0.05$). Immunohistochemistry showed a significant increase of TIMP-1 in the model group as compared with that in the normal group (0.356 ± 0.052 vs 0.121 ± 0.067 , $P < 0.05$), but a notable decrease in the CHCRS-treated groups as compared with that in the model group (all $P < 0.05$). Meanwhile, the positive expression of TIMP-1 in liver tissues of CHCRS-treated groups was still stronger than that in the normal group (0.298 ± 0.08 , 0.256 ± 0.032 , 0.213 ± 0.030 ; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: CHCRS can effectively inhibit the expression of TIMP-1 in CCl₄-induced fibrotic liver in rats.

Key Words: Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis*; Liver fibrosis; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Immunohistochemistry; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Liu DP, Lu FM, Zhang CB. Effect of Chinese herbs compound *Rhodiola sachalinensis* on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in fibrotic liver in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3543-3546

摘要

目的: 探讨复方红景天对四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠肝纤维化肝组织TIMP-1基因表达的影响。

■背景资料

中药复方红景天通过多年的基础与临床研究被证实具有抗慢性肝炎肝纤维化作用。本实验旨在观察复方红景天对CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型胶原代谢的影响。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■ 研发前沿

中药复方红景天有多层次、多靶位抗肝纤维化作用的特点,但该中药复方红景天对于纤维化肝组织中TIMP-1的表达如何影响,尚无深入的报道。

方法:健康♂SD大鼠80只随机分组:(1)正常对照组;(2)肝纤维化模型组;(3)复方红景天高剂量组(H组);(4)复方红景天中剂量组(M组);(5)复方红景天低剂量组(S组),每组16只。以CCl₄ ip法诱导大鼠肝纤维化,复方红景天干预组大鼠在造模的同时给予复方红景天灌胃,正常对照组给予橄榄油sc和生理盐水ip, 8 wk实验结束时处死动物,留取的肝脏组织做HE按0-4期标准判定肝纤维化程度,应用半定量RT-PCR检测肝组织中TIMP-1 mRNA的表达情况,用免疫组化检测肝组织中TIMP-1的表达。

结果:模型组大鼠肝纤维化程度处于2-4期,其中大部分达3期以上,复方红景天干预组大鼠肝纤维化程度明显减轻,只有少部分达3期。模型组大鼠肝组织中TIMP-1 mRNA水平高于正常对照组(0.858 ± 0.052 vs 0.615 ± 0.067 , $P < 0.05$),而复方红景天干预组大鼠肝组织中TIMP-1 mRNA水平(0.740 ± 0.081 , 0.704 ± 0.032 , 0.695 ± 0.030)显著低于模型组(均 $P < 0.05$);模型组大鼠肝组织TIMP-1的阳性表达显著强于正常对照组(0.356 ± 0.052 vs 0.121 ± 0.067 , $P < 0.05$),复方红景天干预组肝组织中TIMP-1的阳性表达(0.298 ± 0.081 , 0.256 ± 0.032 , 0.213 ± 0.030)明显强于正常对照组(均 $P < 0.05$),但较模型组显著减弱($P < 0.05$)。

结论:中药复方红景天能有效抑制CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝脏中TIMP-1的表达。

关键词: 复方红景天; 肝纤维化; TIMP-1; 免疫组化; 逆转录-聚合酶链反应

刘东璞, 卢凤美, 张春斌. 复方红景天对大鼠肝纤维化肝脏中TIMP-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3543-3546

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3543.asp>

0 引言

基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)是肝纤维化过程中的关键因子,具有抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)活性的功能,他可与MMPs非共价结合而抑制其活性,也可与酶原结合阻止其活化。MMPs活性受抑,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解减少,在肝内过度沉积,形成肝纤维化,因而TIMPs在肝组织中的表达水平可以反映肝组织学纤维化程度^[1-2],本文以CCl₄中毒性大鼠肝纤维化为模型,我们应用反义寡核苷酸技术及免疫组化技术,以金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)为靶基因,检测

TIMP-1表达水平,观察复方红景天对CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型胶原代谢的影响,以进一步揭示复方红景天的抗肝纤维化机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠80只,体质量180-220 g,由佳木斯大学实验动物中心提供。四氯化碳(CCl₄)购自天津石英钼厂霸州市化工厂分厂。复方红景天胶囊购自福州恒丰量子生物科技有限公司。组织RNA提取试剂盒及逆转录试剂盒为立陶宛MBI公司产品。TIMP-1上下游引物及兔抗大鼠TIMP-1的一抗由上海生物工程公司生产。辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫组化通用型羊抗兔的二抗工作液由北京中山生物技术有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组:健康♂SD大鼠80只随机分为5组:(1)正常对照组;(2)肝纤维化模型组;(3)复方红景天高剂量组(H组);(4)复方红景天中剂量组(M组);(5)复方红景天低剂量组(S组)。每组16只,各组间暴露因素无差别($P > 0.05$)。用CCl₄ ip法诱导大鼠肝纤维化模型,即用100 mL/L CCl₄(橄榄油稀释)1 mL/kg,每周1次,共8 wk。复方红景天干预组在造模的同时给予复方红景天ig(浓度60 g/L、40 g/L、20 g/L,剂量10 mL/kg,每周2次,共8 wk),肝纤维化模型组造模同时予生理盐水ig,正常对照组予等量橄榄油和生理盐水ig处理。各组大鼠在最后一次CCl₄注射后48 h处死,部分肝脏用40 g/L甲醛固定,留做病理检查,其余标本迅速放到-80℃冰箱保存。

1.2.2 常规病理学检查:病理学切片用HE染色,按2000年在西安会议上由中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学会联合修订的慢性肝炎分级分期标准判定肝纤维化程度^[3]。

1.2.3 RT-PCR检测肝组织中TIMP-1 mRNA: TRIzol一步法提取组织总RNA,总RNA反转录成cDNA,PCR反应。取10 μL PCR扩增产物加入25 g/L溴乙锭琼脂糖凝胶中,以80 V/cm电压电泳50 min,在紫外线下可见相应的长度的目的基因和内参的扩增条带,将电泳结果直接置于凝胶分析系统中对条带进行分析。根据GenBank数据库,应用Primer-3软件设计目的基因的扩增引物:TIMP-1:上游:5'-CTT CCA CAG GTC CCA CAA-3',下游:5'-CAG CCC TGG CTC CCG AGG-3',长度238 bp; GAPDH:上游:5'-CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA-3',下游:5'-AGG

表 1 肝组织TIMP-1 mRNA的变化 (mean \pm SD, $n = 16$)

分组	干预前	干预后
正常对照组	0.587 \pm 0.058	0.615 \pm 0.067 ^a
模型组	0.586 \pm 0.042	0.858 \pm 0.052 ^a
S组	0.587 \pm 0.031	0.740 \pm 0.081 ^c
M组	0.588 \pm 0.042	0.704 \pm 0.032 ^c
H组	0.590 \pm 0.032	0.695 \pm 0.030 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组。表 2 肝组织TIMP-1表达的变化 (mean \pm SD, $n = 16$)

分组	干预前	干预末
正常对照组	0.093 \pm 0.058	0.121 \pm 0.067 ^c
模型组	0.099 \pm 0.042	0.356 \pm 0.052 ^a
S组	0.096 \pm 0.031	0.298 \pm 0.081 ^c
M组	0.095 \pm 0.042	0.256 \pm 0.032 ^c
H组	0.094 \pm 0.032	0.213 \pm 0.030 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组。

■ 相关报道

以往大量实验表明, 中药具有保护肝细胞, 改善肝功能, 抑制肝星状细胞的活化增殖, 促进细胞外基质的降解作用, 在促进肝纤维化逆转方面显示了其较大的优势, 倍受国内外专家、学者的关注。

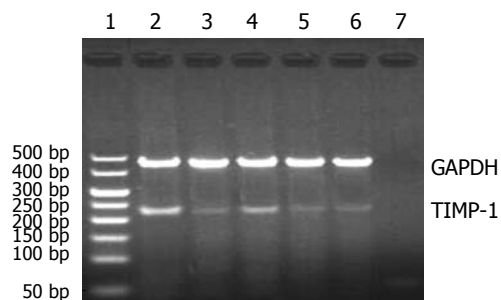


图 1 肝组织中TIMP-1 mRNA表达的动态变化。1: DNA Marker; 2: 模型组; 3: 正常对照组; 4: 复方红景天低剂量组; 5: 复方红景天中剂量组; 6: 复方红景天高剂量组; 7: 电泳空白对照; GAPDH与TIMP-1均不表达。

GGT CTA CAT GGC AAC TG-3', 长度500 bp. 采用25 μ L的反应体系. 其中GAPDH与目的基因的引物浓度均为1 μ mol/L. 反应条件分别是: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 28个循环(经多次预试验摸索最佳实验条件); 72 $^{\circ}$ C 7 min; PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后用Bio-Rad Gel Doc2000型凝胶成像系统照像并用Quangtity One软件计算基因相对表达值。

1.2.4 免疫组化检测肝组织中TIMP-1: 用3', 3-二氨基联苯胺(DAB)二步法检测肝组织中TIMP-1, 具体方法如下: 石蜡切片经常规脱蜡至水. 用30 mL/L H₂O₂消除内源性过氧化氢酶. 以柠檬酸盐工作缓冲液微波热修复. 用100 mL/L正常山羊血清封闭非特异性抗原. 滴加1:200的一抗. 4 $^{\circ}$ C孵育过夜. 滴加适量的二抗(HRP标记)工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min. DAB显色. 苏木素液复染, 封片. 以磷酸盐缓冲液代替第一抗体作阴性对照. 对阳性染色采用HPIAS-2000型高清晰度彩色病理图文分析系统进行灰度分析, 方法按照Weidner方法, 双盲法阅片, 先在低倍镜下选择阳性结果密集区域, 然后在高倍视野下自动计算A值, 取平均值计为该切片的A值。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 统计方法采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组肝纤维化分期 用CCl₄反复ip至第8周. 模型组大鼠均形成肝纤维化或早期肝硬化, 纤维化程度在2-4期之间, 16只大鼠中有12只是3期以上. 而复方红景天防治组大鼠肝纤维化程度较模型组减轻, 随着剂量的增加纤维化程度逐渐减轻, 在高剂量组纤维化程度在1-3期之间, 16只大鼠中只有4只达到3期。

2.2 肝组织中TIMP-1 mRNA的变化 模型组大鼠肝组织TIMP-1 mRNA的水平较正常组显著增高($P < 0.05$); 复方红景天干预组大鼠肝组织中TIMP-1 mRNA的水平较模型组显著降低($P < 0.05$); 复方红景天干预组肝组织TIMP-1 mRNA水平较正常组有所增高($P < 0.05$, 表1)。

2.3 肝组织中TIMP-1表达的变化 在正常组织切片中可见TIMP-1呈微弱水平表达, 阳性信号主要见于肌成纤维细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞中, 在模型组织切片中TIMP-1的表达较正常对照组显著增强, 其A值与正常对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 阳性表达以汇管区及纤维间隔中最明显, 主要表现为胞浆着色, 同时在纤维间隔内也可见复方红景天防治组肝组织中TIMP-1的表达明显强于正常对照组($P < 0.05$), 但较模型组显著减弱. 其A值与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2, 图1-2)。

3 讨论

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝组织内生成胶原纤维等细胞外基质的主要细胞来源. 他的激活是肝纤维化发病过程中的中心环节^[4]。

TIMP-1虽然不是肝纤维化的始发因素, 但在肝纤维化的发展过程中起重要的促进作用. 在肝脏中, TIMP-1主要细胞来源是激活的HSC, 肝脏受损后, 通过一系列细胞因子的作用, HSC被激活, 大量表达TIMP-1, 可以在酶原活化阶段与MMPs可形成稳定复合体, 阻碍

■同行评价

本文用RT-PCR和免疫组织化学方法,研究复方红景天对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化肝组织TIMP-1基因表达的影响,有一定意义,但学术价值一般。

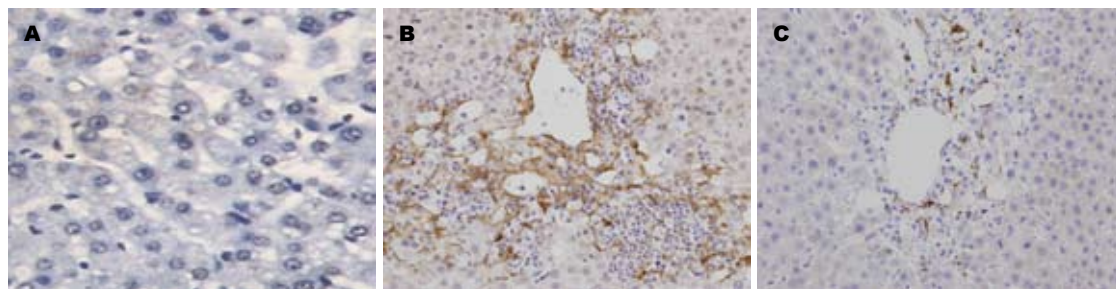


图2 肝组织中TIMP-1表达。A: 正常对照组; B: 模型组; C: 复方红景天高剂量组。

MMP的酶原自我激活,也可在活化的酶原阶段与活化的MMPs形成1:1复合体,抑制其活性^[5-6]。研究表明TIMP-1能结合除MMP-14、19以外的所有MMPs而减低其表达活性。一方面通过抑制胶原酶(MMP-1, MMP-8, MMP-13等)的降解活性,抑制间质性胶原(I型, III型为主的细胞外间质的降解,导致纤维胶原沉积于细胞外;另一方面他可能通过抑制激活的肝星状细胞凋亡,从而持续产生细胞外间质,同时也大量产生TIMP-1^[7]。如此产生的净效应是导致大量的纤维胶原越来越多地沉积于肝细胞外间质,而不能被胶原酶降解。

中药复方红景天通过多年的基础与临床研究被证实具有抗慢性肝炎肝纤维化作用,其作用机制包括减轻肝脏炎症,抑制HSC的增殖与活化,抑制纤维胶原的表达。已知TIMP-1的表达与促进间质性胶原酶的表达^[8],从而促进纤维胶原的降解等,充分显示出中药复方红景天从多层次、多靶位抗肝纤维化作用的特点。但该中药复方红景天对于纤维化肝组织中TIMP-1的表达如何影响,尚无深入报道。

本文应用半定量RT-PCR与免疫组化的方法,分别从mRNA与蛋白表达水平观察复方红景天对纤维化肝组织中TIMP-1表达的影响,结果显示复方红景天可以较好防治CCl₄损伤性肝纤维化,随着复方红景天量的增加,大鼠肝组织

TIMP-1的表达逐渐减少,明显低于模型组,高于正常对照组。这就表明复方红景天具有通过抑制TIMP-1的表达,保护纤维化肝组织内包括HSC在内的细胞周围正常的基底膜样细胞间质,对于抑制HSC的活化与肝纤维化的发展具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 86-90
- 2 谢玉梅, 周永兴, 聂青和. 肝硬化病人血清、肝组织中金属蛋白酶组织抑制因子的表达及意义. *中华医学杂志* 2001; 81: 805-807
- 3 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. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 4 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 5 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839
- 6 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 443-453
- 7 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 8 朱跃科, 段钟平, 王宝恩, 刘芳, 赵军, 谢贤春. 芪参益气滴丸对DMN大鼠肝纤维化及肝组织TIMP-1表达的影响. *中国新药与临床杂志* 2007; 26: 11-16

编辑 史景红 电编 郭海丽