

扶正化癥方对肝纤维化大鼠肝脏明胶酶、TIMP-2 和星状细胞凋亡的影响

谭春雨¹ 谭善忠¹ 蒋 健² 徐列明^{1,2}

1 上海中医药大学肝病研究所 (上海 200032) 2 上海中医药大学附属曙光医院 (上海 200021)

摘要: 为研究扶正化癥方(主药:丹参、桃仁、人工虫草菌丝等)治疗肝纤维化的机理,60 只 Wistar 雄性大鼠,除 8 只作为正常对照组(A,腹腔注射生理盐水)外,52 只大鼠腹腔注射 0.5%对二甲基亚硝胺(共 4 周,每周 3 次,每次 2ml/kg),造成肝纤维化模型,并随机分为 3 组,模型对照组(B,18 只)、扶正化癥方组(C,17 只)、秋水仙碱组(D,17 只),分别给予自来水以及相应中西药物灌胃,共 4 周。之后,处死大鼠取材检测各项指标。结果:C 组大鼠 Hyp 和肝组织胶原原分期下降,纤维化程度减轻;活化 HSC 减少,凋亡增加;肝组织 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 表达下降。结论:促进活化 HSC 的凋亡、减少活化 HSC 的数量,并由此降低 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 的表达,减轻肝纤维化程度,可能是扶正化癥方的作用机理之一。

关键词: 肝纤维化;大鼠模型;扶正化癥方;肝星状细胞;基质金属蛋白酶

中图分类号: R 259.752 文献标识码: A 文章编号: 1008-861X(2003)04-0040-05

扶正化癥方是以中医理论为指导,经多年临床科研实践研制开发的抗肝纤维化药物,其临床治疗肝纤维化逆转率达 52%。有关其药效机制已经进行了广泛深入的研究^[1,2]。本研究的目的是探讨该方对 DMN 大鼠肝纤维化肝脏 MMP-2、MMP-9 以及 TIMP-2 表达和 HSC 凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 大鼠: Wistar 雄性大鼠 60 只,清洁级,体重(150±10)g,中科院上海实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及药物: 二甲基亚硝胺,东京化成工业株式会社产品。秋水仙碱,上海医药集团上海试剂公司。扶正化癥方(主药:丹参、桃仁、人工虫草菌丝、绞股蓝、松花粉、五味子等)水煎液,生药含量 0.7g/ml,由上海中医药大学肝病研究所药物制剂室配制。小鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体,DAKO 公司产

品。TUNEL 凋亡检测试剂盒,Roche 产品。TIMP-2 单克隆抗体,CHEMICON 公司产品。小鼠抗人 MMP-9,购自博士德生物工程公司。

1.3 方法: Wistar 大鼠 60 只,分为造模组及正常对照组。造模组 52 只,前 4 周每周一、二、三腹腔注射二甲基亚硝胺 2ml/kg(浓度为 0.5%),共 4 周。之后造模组分为模型对照组(B)18 只,扶正化癥方组(C)17 只,秋水仙碱组(D)17 只。各组分别以自来水、扶正化癥方,0.1%的秋水仙碱按 10ml/kg 大鼠体重灌胃共 4 周,每周 6 次;正常对照组(A)8 只,前 4 周腹腔注射生理盐水,后 4 周用自来水灌胃,方法及剂量同上。治疗 4 周后,以 2%戊巴比妥钠按 2ml/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠,下腔静脉采血,离心分离血清,取肝脏左叶组织,10%福尔马林固定,脱水,透明,石蜡包埋,用于胶原和免疫组化染色。其余肝组织分装在 1.5ml 离心管备用。

1.4 指标检测: 组织羟脯氨酸含量测定:Jamall 氏法^[3];肝组织标本胶原纤维染色(天狼星红染色),胶原纤维增生程度半定量标准,参照文献^[4];免疫组化染色(两步法)包括 α -SMA、MMP-9、TIMP-2; TUNEL 染色、 α -SMA 免疫组化、Masson 染色的三

[基金项目] 上海市科技发展基金项目(00ZB1403);上海市教委重点学科建设项目资助

[作者简介] 谭春雨(1972-),男,甘肃省静宁县人,硕士,实习研究员,从事肝病及中医文献的研究。

重复染色法检测 HSC 的凋亡^[5];基质金属组织蛋白酶 2、9 活性测定:酶谱法^[4]。

1.5 统计方法:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用计算机统计软件 SPSS 10.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析 Q 检验,计数资料用 Riddit 分析。

2 结果

2.1 扶正化癆方对肝纤维鼠肝组织胶原分期和 Hyp 含量的影响: B 组大鼠肝组织胶原染色显示模型组大鼠肝脏的胶原明显增加,形成较粗的纤维束,分割包绕肝小叶,形成假小叶。肝组织 Hyp B 组含量较 A 组显著增高 3 倍左右,纤维化分期为 3、4 期的大鼠为 71%。C 组肝脏胶原沉积显著减少,纤维间隔缩短变窄,胶原分期下降,肝组织 Hyp 含量较 B 组下降 1 倍左右。A、B、C、D 各组 Hyp 含量(mg/g)

分别为: (0.35 ± 0.05)、(1.12 ± 0.16)、(0.62 ± 0.16)、(0.77 ± 0.14)。B 组与 A 组相比, $P < 0.05$; C、D 组与 B 组相比,均 $P < 0.05$ (参见表 1, 图 1)。

表 1 各组大鼠肝组织胶原增生的比较

Table 1 Comparison of liver tissue collagen proliferation in rats

Group	n	Proliferative phase					R value
		-	+	++	+++	++++	
A	8	8	0	0	0	0	0.930
B	14	0	1	3	7	3	0.284 *
C	15	0	7	4	4	0	0.560 #
D	14	0	4	5	3	2	0.446 #

Notes: In comparison with group A, * $P < 0.05$; in comparison with group B, # $P < 0.05$. (same below)

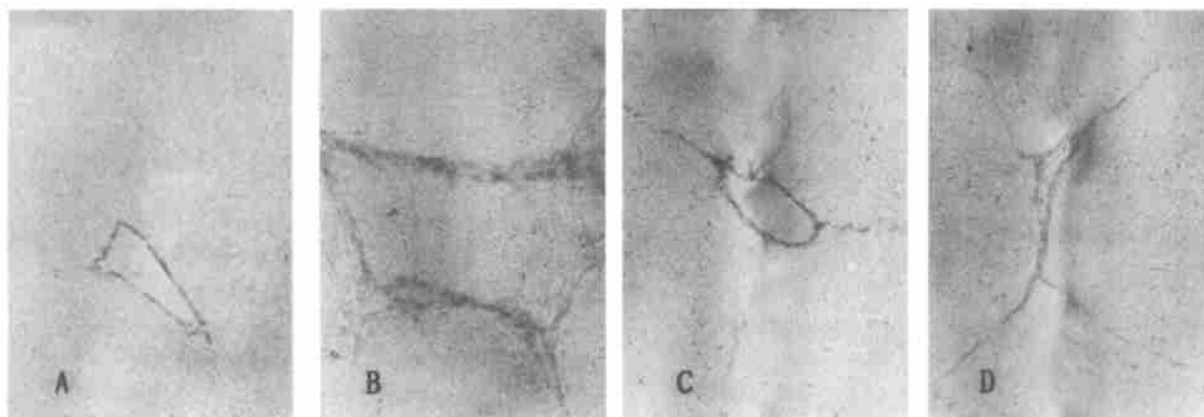


图 1 肝组织胶原染色(天狼星红染色, ×200)

Fig. 1 Liver tissue collagen staining (TUNEL staining ×200)

2.2 扶正化癆方对肝纤维鼠 HSC 及其 α -SMA 表达的影响: 正常大鼠肝组织 α -SMA 免疫组化阳性部位主要在血管壁,肝窦有弱阳性表达;模型大鼠肝窦 α -SMA 阳性面积比较正常组明显增高,扶正化癆方和秋水仙碱治疗组肝窦壁 α -SMA 阳性面积比较模型组明显下降。正常组未见凋亡的 HSC;模型组大鼠肝血窦周围发现凋亡的 HSC;扶正化癆方及秋水仙碱治疗后大鼠肝血窦周围凋亡 HSC 数量较模型组明显增多(参见图 2、3 及表 2)。

2.3 扶正化癆方对肝纤维鼠 MMP-2、MMP-9 表达的影响: Zymography 法显示 MMP-2、MMP-9 在正常大鼠肝组织有一定水平的活性表达;密度扫描积

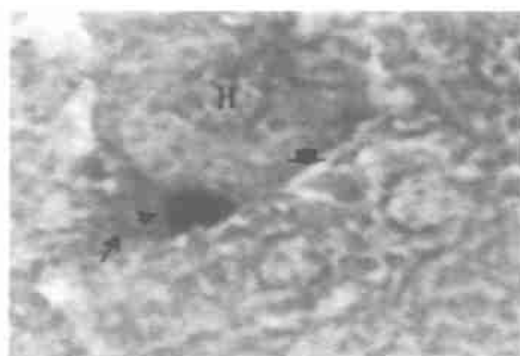


图 2 凋亡的 HSC (TUNEL、 α -SMA、Masson 三重复合染色, ×400 倍)
▼: 凋亡 HSC 胞核, 呈蓝黑色。↘: 凋亡 HSC 胞浆, 呈棕黄色。↓: 窦状隙。H: 肝细胞。

Fig. 2 Apoptosis HSC (TUNEL, α -SMA, Masson triple staining, ×400)
▼: Apoptosis HSC nucleus, blue. ↘: Apoptosis HSC cytoplasm, brown. ↓: sinusoid. H: liver cell

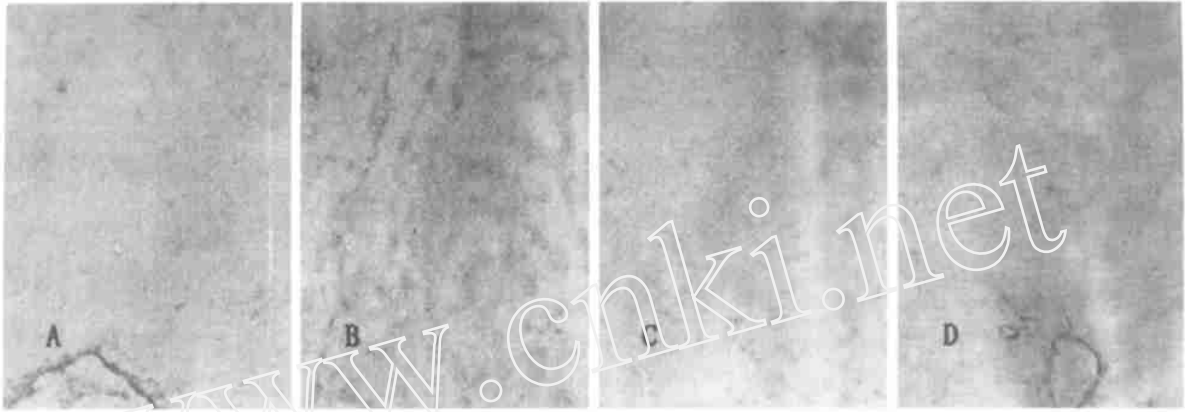


图3 肝组织 -SMA 免疫组化(DAB ×200)
Fig.3 Liver tissue -SMA immunohistochemistry(DAB staining ×200)

分显示模型组大鼠 MMP-2、MMP-9 的活性表达水平较正常组明显增高;药物治疗后 MMP-2 的活性表达水平较模型组明显降低(参见图 4,表 2)。正常大鼠肝血管壁以及肝窦可见 MMP-9 阳性染色;模型组大鼠除血管壁及肝窦外,纤维间隔也出现明显的阳性表达;扶正化瘀方及秋水仙碱组较模型组纤维间隔阳性表达减少(参见图 5)。正常大鼠肝组织 TIMP-2 阳性染色出现在血管壁上;模型组大鼠除血管内皮阳性染色增强外,纤维间隔也呈明显的阳性染色;扶正化瘀及秋水仙碱组较模型组纤维间隔阳性染色减少(参见图 6)。

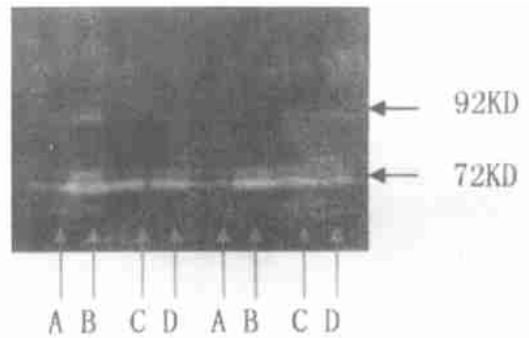


图4 肝组织 MMP- 2(72 KD)、MMP- 9(92 KD)活性表达
Fig.4 Liver tissue MMP-2(72 KD), MMP-9(92 KD) expressions

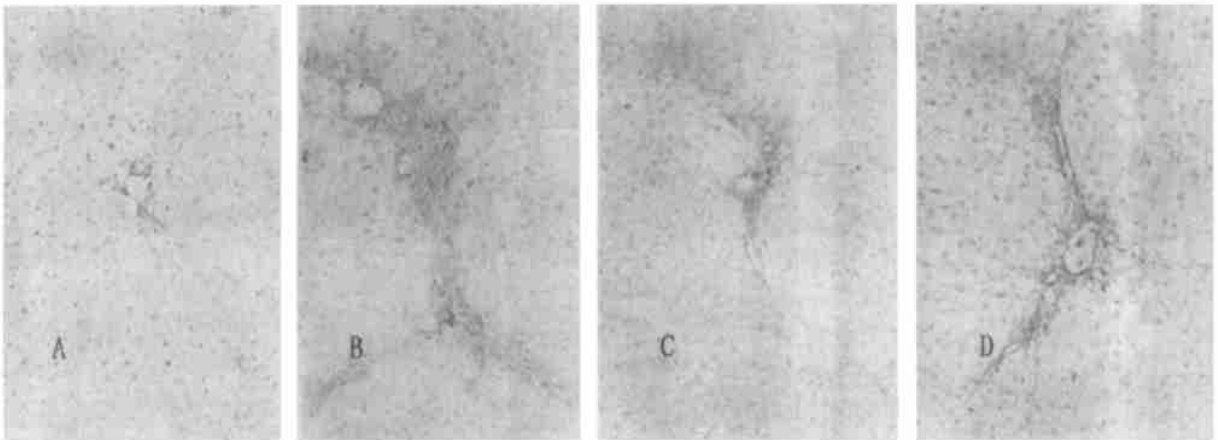


图5 肝组织 MMP- 9 免疫组化(DAB 染色 ×200)
Fig.5 Liver tissue MMP-9 immunohistochemistry(DAB staining ×200)

表 2 各组大鼠凋亡 HSC 及其 -SMA、MMP- 2、MMP- 9 表达水平比较
Table 2 Comparison of apoptosis HSC and its -SMA, MMP-2 and MMP-9 expressions

Group	Apoptosis HSC(n)	-SMA(n)	MMP-2(n)	MMP-9(n)
A	0(4)	1.38 ±0.13(4)	7.90 ±0.38(4)	9.26 ±0.74(4)
B	0.21 ±0.06(8)	8025 ±0.77 *	2.54 ±1.28 *(10)	13.67 ±1.73 *(10)
C	0.38 ±0.07 # (8)	3.24 ±0.24 # (8)	10.98 ±0.62 # (10)	11.52 ±0.49 # (10)
D	0.27 ±0.01 # (8)	4.04 ±0.55 # (8)	11.04 ±0.70 # (8)	11.79 ±0.71 # (8)



图5 肝组织 TIMP-2 免疫组化(DAB 染色 ×200)

Fig. 5 Liver tissue TIMP-2 immunohistochemistry (DAB staining ×200)

3 讨论

肝纤维化概念属于现代医学的范畴。中医学本没有这个名称,但是根据肝纤维化进展为早期肝硬化时的症状表现,多将其归入胁痛、癥积等证。肝纤维化初起多为肝气郁结,瘀血内阻;病变迁延不愈,肝之气血阴精逐渐受损,则虚瘀相互为患。所以在肝纤维化及肝硬化治疗上,顾护正气,活血祛瘀成为其基本原则。扶正化瘀方是基于上述治则,经多年临床科研的反复实践研制而成。其主要由丹参、桃仁、人工虫草菌丝、绞股蓝、松花粉、五味子等组成。全方组合,具有扶助正气祛瘀生新的功效。本实验结果显示扶正化瘀方治疗后,胶原沉积显著减少,纤维间隔缩短变窄,胶原分期下降,再次证明扶正化瘀方具有显著的改善肝功能以及抗肝纤维化的作用。

在肝纤维化形成和发展过程中,HSC的激活和增生是肝纤维化形成和发展的关键因素^[8]。-SMA在肝脏主要在活化的HSC胞浆中出现,是活化HSC的标志物^[9]。以往研究发现,扶正化瘀方能够抑制肝内HSC的活化与增殖,减轻肝窦毛细血管化等^[2,6,7]。本实验结果表明,模型组大鼠肝窦以及纤维间隔处阳性表达显著增强,提示DMN大鼠肝纤维化肝脏中有大量活化增殖的HSC。治疗后,肝组织表达-SMA的水平较模型组明显下降,提示活化HSC显著减少可能是扶正化瘀方抗肝纤维化的作用机制之一。

MMP-2、MMP-9在肝脏主要由肝星状细胞、窦内皮细胞、血管内皮细胞等细胞表达^[10,11],MMP-2、MMP-9活性增强可降解窦状隙型胶原,导致肝

窦毛细血管化,加重肝细胞损伤和肝纤维化^[12];TIMP-2,主要由HSC合成分泌,TIMP-2合成分泌增加能有效抑制活化HSC分泌的基质金属蛋白酶对ECM的降解活性,导致纤维化进展^[13]。本研究显示:模型组大鼠MMP-2、MMP-9的活性表达及TIMP-2、MMP-9蛋白表达较正常组明显增高,免疫组化显示这种增加主要表现在纤维间隔,表明模型组活化HSC的显著增多,导致相应合成分泌MMP-2、MMP-9、TIMP-2能力增强。扶正化瘀方治疗后,MMP-2、MMP-9的活性表达及MMP-9、TIMP-2在纤维间隔阳性染色较模型组显著减低,结合前述-SMA在模型组及治疗组中的相似规律的表达变化,提示MMP-2、MMP-9的活性表达及MMP-9、TIMP-2蛋白表达减少可能主要是治疗后活化HSC数量减少,所以其相应表达MMPs,TIMPs,-SMA的量也下降。

凋亡是一种与坏死不同的主动性的程序性的细胞自杀过程,是细胞对环境的生理性病理性刺激信号,环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程。大量实验研究发现,大鼠的肝纤维化有自愈倾向,已经证明这种自愈倾向与HSC的凋亡密切相关^[14]。TUNEL染色、-SMA免疫组化、Masson染色的三重复合染色法显示正常大鼠几乎没有发生HSC凋亡;而模型组大鼠肝组织有活化HSC的凋亡,表明DMN模型大鼠肝纤维化存在自愈倾向;扶正化瘀方和秋水仙碱治疗后HSC凋亡数量均较模型组明显增加,结合治疗前后-SMA的表达改变,表明扶正化瘀方在体内除了抑制HSC活化外,促进活化HSC的凋亡可能是扶正化瘀方等药物

治疗肝纤维化另一有效重要机制。

扶正化瘀方降低 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 等表达和减轻肝纤维化程度的作用机制之一在于其诱导了活化 HSC 的凋亡,减少了活化 HSC 的数量。

参考文献:

- [1] 刘平,刘成,胡义扬,等.扶正化瘀方对肝炎后肝硬化的治疗作用[J].中华肝脏病杂志,1994,2(2):75-78.
- [2] 刘成,姜春萌,刘平,等.扶正化瘀方对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用[J].中华消化杂志,2001,21(6):367-369.
- [3] Jamall IS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[J]. Analytical biochemistry, 1981, 112:70-75.
- [4] Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases[J]. Anal Biochem, 1994, 218:325-331.
- [5] 尤红,王宝恩,王泰龄,等.复方 861 对肝星状细胞的增殖和凋亡的干预作用[J].中华肝脏病杂志,2000,8(2):78-80.
- [6] 刘成海,刘成,刘平,等.扶正化瘀方对二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化原代脂肪细胞形态及功能的影响[J].中国中西医结合脾胃杂志,1997,5(1):32-35.
- [7] 刘成,姜春萌,刘平,等.扶正化瘀方对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用[J].中华消化杂志,2001,21(6):367-369.
- [8] Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis[J]. J Hepatology, 1998, 29(4):836-847.
- [9] 徐列明. 20 世纪肝纤维化的检阅——美国“肝纤维化的机制和治疗”专题讨论会[J].中华消化杂志,2001,21(10):616-621.
- [10] 吕晓辉,王炳元,谢艳华,等.基质金属蛋白酶-2 和-9 在实验性酒精性肝病中的动态变化及表达[J].中华肝脏病杂志,2001,9(5):268-270.
- [11] Preaux AM, Bortho MP, et al. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2[J]. Hepatology, 2002 Sep, 36(3):612-622.
- [12] Changqing Yang, Michael Zeisberg, Lieming Xu, et al. Liver Fibrosis: Insights Into Migration of Hepatic Stellate Cells in Response to Extracellular Matrix and Growth Factors[J]. Gast Groenterology, 2003, 124:147-159.
- [13] Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, et al. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis[J]. J Clin Invest, 1998 Mar 15, 101(6):1478-1484.
- [14] Iredale JP, Benyon RC, Pickering J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 1998, 102(3):538-549.

编辑:黄健
收稿日期:2003-07-25

Influence of Health-Supporting and Stasis-Resolving Decoction on Gelatin Enzyme, TIMP-2 and Astrocyte Apoptosis in Rat Liver

TAN Chun-yu¹ TAN Shan-zhong¹ JIANG Jian² XU Lie-ming^{1,2}

1. Hepatological Institute of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine
2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

Abstract:

To explore the mechanism of "Health-Supporting and Stasis-Resolving Decoction" in the treatment of liver fibrosis, 52 male Wistar rats were given intra-abdominal injection of 0.5% p-dimethyl-nitroamine (2ml/2kg, three times a week for 4 weeks) to induce liver fibrosis, and then randomized into three groups: group B in which 18 rats were given tap water, group C in which 17 rats were given the Decoction and group D in which 17 rats were given colchicine; moreover, another 8 rats in group A were used as control. Four weeks later, all rats were sacrificed and relevant indexes were detected. Results: The Hyp and liver tissue collagen phase as well as fibrosis reduced; activated HSC decreased and apoptosis increased; the MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 expressions reduced. Conclusion: The Decoction can promote the apoptosis of activated HSC and reduce activated HSC to reduce MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 expressions, as a result to relieve liver fibrosis.

Key words:

Liver fibrosis; rat model; "Health-Supporting and Stasis-Resolving Decoction"; hepatic stellate cell; matrix metalloproteinase