

甲乙煎对肝纤维化大鼠肝组织 MMP2 及 TGFβ1 表达的作用

王卫华, 王兵亮, 郭卫刚, 柴广丽, 贾世复

(邯郸市传染病医院, 河北 邯郸 056002)

[摘要] **目的** 观察中药甲乙煎对实验性肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶-2(MMP2)及转化生长因子 1(TGFβ1)表达的作用。**方法** 雄性清洁级 Wister 大鼠 60 只,随机分为正常对照组和肝纤维化模型组,运用二甲基亚硝胺对模型组大鼠诱导肝纤维化。4 周后,将模型组大鼠随机分为模型对照组、甲乙煎高剂量[22 g/(kg·d)]组和低剂量[5.5 g/(kg·d)]组。对甲乙煎高、低剂量组大鼠分别给予甲乙煎灌胃,共治疗 4 周,处死全部大鼠。采用免疫组化法检测大鼠肝组织 MMP2 和 TGFβ1 的表达。**结果** 经中药甲乙煎高、低剂量治疗后,甲乙煎高、低剂量组的大鼠肝细胞浆内 TGFβ1 的阳性表达与模型对照组比较,显著降低($P < 0.05$),其中甲乙煎高剂量组优于低剂量组($P < 0.05$);而甲乙煎高、低剂量组 MMP2 的表达较模型对照组无明显差异($P > 0.05$)。**结论** 中药甲乙煎能下调实验性肝纤维化大鼠肝组织 TGFβ1 的表达,这是其抗肝纤维化的作用机制之一。

[关键词] 甲乙煎;肝纤维化;基质金属蛋白酶-2;转化生长因子 1;大鼠;医学,中国传统;中药

[中图分类号] R256.4 R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)01-0018-05

The MMP2 and TGFβ1 expression changes of rat liver fibrosis tissue influenced by Jiayijian

WANG Wei-hua, WANG Bing-liang, GUO Wei-gang, CHAI Guang-li, JIA Shi-fu (Handan Infectious Diseases Hospital, Handan 056002, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of a traditional Chinese medicine Jiayijian on the matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and transforming growth factor-beta1 (TGFβ1) expression in experimental hepatic fibrosis rats. **Methods** Sixty male Wister rats were randomly divided into normal control group and liver fibrosis model group. Dimethylnitrosamine(DMN) was administered to induce liver fibrosis in the model group, and rats in model group were randomly divided into model control group and Jiayijian treatment groups with high concentration (22g/[kg·d]) and low concentration (5.5g/[kg·d]) 4 weeks after liver fibrosis had been induced. All rats were killed after 4 weeks intragastric administration of Jiayijian. The expression of MMP2 and TGFβ1 of rat liver tissue were detected by immunohistochemical method. **Results** The expression of TGFβ1 in high and low concentrations of Jiayijian treatment groups was significantly lower than that in the model control group ($P < 0.05$), and the expression of TGFβ1 in the high concentration of Jiayijian treatment group was significantly lower than the low concentration of Jiayijian treatment group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the expression of MMP2 between high and low concentrations of Jiayijian treatment groups and the model control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Jiayijian can down-regulate the expression of TGFβ1 of experimental hepatic fibrosis model rat's liver tissue, which is the one of the mechanisms of anti-liver-fibrosis.

[Key words] Jiayijian; liver fibrosis; matrix metalloproteinase-2; transforming growth factor-1; rat; medicine, Chinese traditional; traditional Chinese medicine

[Chin Infect Control, 2011, 10(1): 18-21, 66]

肝纤维化是许多慢性肝病共同的病理过程,在 病毒、乙醇、寄生虫、胆汁淤积等不同病因作用下,肝

[收稿日期] 2010-09-01

[基金项目] 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(0923108133)

[作者简介] 王卫华(1972-),男(汉族),河北省邯郸市人,主治医师,主要从事肝病学研究。

[通讯作者] 王卫华 E-mail: wangweiuhad@sina.com

星状细胞激活并转化成肌成纤维细胞样细胞,细胞外基质过度合成,同时降解能力下降,从而导致肝纤维化的发生^[1]。近年来,对肝纤维化细胞和分子生物学机制研究的不断深入,细胞因子作为肝纤维化的重要调节因子已越来越受重视,尤其是转化生长因子 1(transforming growth factor β 1, TGF β 1)可直接使肝星状细胞增殖并活化,而基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP2)是降解细胞外基质的主要酶。本研究通过观察甲乙煎对肝纤维化大鼠的治疗效果及 MMP2 和 TGF β 1 在肝纤维化大鼠肝组织的表达,探讨甲乙煎抗肝纤维化的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性清洁级 Wister 大鼠 60 只,体重(200±20)g,由河北医科大学动物中心提供,实验动物合格证号:603036。

1.1.2 实验用品 中药甲乙煎由茵陈、茯苓、苡仁、佩兰、泽泻、郁金、柴胡、连翘、生甘草组成,其药量比为 3:3:3:1:1:1:1:1:1。由邯郸市传染病医院药剂室制成流浸膏,水煮醇提,每毫升药液含生药 2.50 g。二甲基亚硝胺(DMN)由天津市化学试剂研究所提供(批号: MAL05)。MMP2 和 TGF β 1 试剂盒由北京中衫金桥生物技术有限公司提供。

1.1.3 主要仪器 奥林巴斯光学显微镜 BX41(OLYMPUS 公司);BM-II 型病理组织包埋机(安徽电子科学研究所);303-4A 数显电热保温箱(上海阳光实验仪器有限公司);CS-II 型摊片烤片机(孝感市宏业医用仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养 60 只大鼠按清洁级标准饲养,每只大鼠大致喂饲料 50 g/d,充足饮水,相对湿度 60%,温度 20℃。动物饲料由河北医科大学动物中心提供。

1.2.2 动物分组及模型制备 大鼠 60 只,随机分为正常对照组 10 只和模型组 50 只。模型组 50 只大鼠,每周连续 3 日腹腔注射 DMN 10 mg/(kg·d),共 4 周,首次用量减半。造模结束后随机抽取 1 只大鼠做肝脏病理切片,证实有假小叶形成,为肝纤维化。模型组死亡 19 只,故有 30 只大鼠进入下一步实验。

1.2.3 分组及给药方法 将模型组 30 只大鼠随机

分为 3 组:模型对照组及甲乙煎高、低剂量组。甲乙煎高、低剂量组分别给予 22 g/(kg·d)、5.5 g/(kg·d)甲乙煎灌胃治疗,容量 3 mL;肝纤维化模型组和正常对照组给予等容量的 0.9%氯化钠注射液灌胃,共 4 周。

1.2.4 免疫组化法检测大鼠肝细胞 MMP2 和 TGF β 1 的蛋白表达 末次给药次日,空腹处死全部大鼠,取肝左叶组织部分,用 10%中性甲醛固定 24 h,石蜡包埋切片。免疫组化采用 SP 法,常规脱蜡去水,入 3%过氧化氢室温 15 min,枸橼酸缓冲液 2 500 mL 注入进口 EDTA 高压锅,切片置于金属架上,位于液面以下,盖锅加热至沸腾。7 min 后压力锅开始喷气,计时 1.5 min,将压力锅远离热源,室温冷却后,打开锅盖,取出切片,蒸馏水冲洗,PBS 液洗 2 min(×3 次),擦干净片子,吸去多余液体,加 I 抗;4℃过夜,PBS 液洗 5 min(×3 次),擦干净片子,吸去多余液体,加 II 抗;37℃ 25 min,PBS 液洗 5 min(×3 次),擦干净片子,吸去多余液体,加 III 抗;37℃ 20 min, PBS 液洗 5 min(×3 次),应用 DAB 显色,蒸馏水冲洗,复染脱水,中性树胶封片。结果评定:大鼠肝组织 MMP2 和 TGF β 1 的蛋白表达均在细胞浆内,根据着色程度及着色细胞百分率进行计算。不着色为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分;着色细胞计数阳性细胞百分率,≤5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,≥51%为 3 分;每张切片着色程度与着色细胞百分率得分定性:0~1 分为阴性(-),2~4 分为弱阳性(+),5~6 分为阳性(++),>6 分则为强阳性(+++)。

1.3 统计方法 采用 SPSS13.0 软件包进行统计学处理,计数资料组间比较采用秩和检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况比较 正常对照组大鼠生长状态良好,体重增加,动作敏捷,皮毛光滑,大、小便正常;模型组大鼠精神萎靡,嗜睡,皮毛杂乱无光泽,尿黄,大便稀,有异味;治疗组大鼠生长状态尚好,体重无明显下降,动作灵活,皮毛较顺但缺光泽,大、小便基本正常。其中,甲乙煎高剂量组小鼠状态优于低剂量组,整体状态优于模型对照组,但次于正常对照组。正常对照组大鼠无死亡,造模组大鼠死亡率 38.00%(19/50)。

2.2 肝组织 MMP2 和 TGFβ1 的表达 正常对照组大鼠肝组织 MMP2 阳性表达偶见于肝细胞的细胞浆,大部分无表达(图 1);TGFβ1 无表达(图 2)。模型对照组大鼠肝细胞浆内 MMP2(图 3)和 TGFβ1(图 4)的阳性表达较强,明显高于正常对照组,且差异均有高度显著性($P < 0.01$)。甲乙煎高

剂量组大鼠肝细胞浆内 MMP2 阳性表达(图 5)与其低剂量组大鼠肝细胞浆内 MMP2 的阳性表达与模型对照组之差异均无显著性(均 $P > 0.05$)。甲乙煎高、低剂量组大鼠肝细胞浆内 TGFβ1 的阳性表达(图 6)较模型对照组有明显抑制作用($P < 0.05$),其中甲乙煎高剂量组优于低剂量组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠一般资料比较(只)

Table 1 General information of rats in each group (case)

组别	有效大鼠(只)	MMP2				TGFβ1			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照组	10	9	1	0	0	10	0	0	0
模型对照组	10	0	1	5	4	0	0	5	5
甲乙煎高剂量组	10	0	2	7	1	5	4	1	0
甲乙煎低剂量组	10	0	1	6	3	1	4	5	0

MMP2 的阳性表达:模型对照组与正常对照组比较, $P < 0.01$;甲乙煎高、低剂量组分别与模型对照组比较,均 $P > 0.05$
 TGFβ1 的阳性表达:模型对照组与正常对照组比较, $P < 0.01$;甲乙煎高、低剂量组分别与模型对照组比较,均 $P < 0.05$

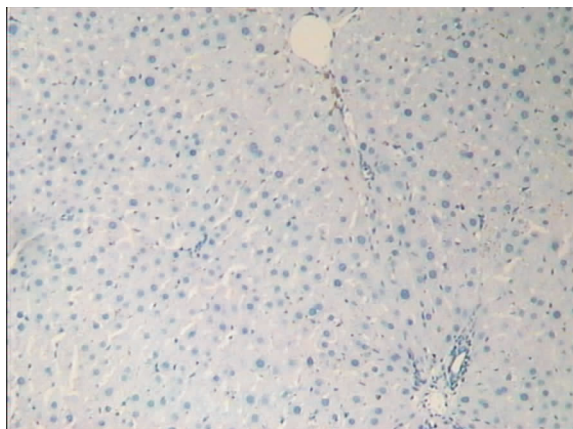


图 1 正常对照组 MMP2 的表达(×400)

Figure 1 The expression of MMP2 in normal control group (×400)

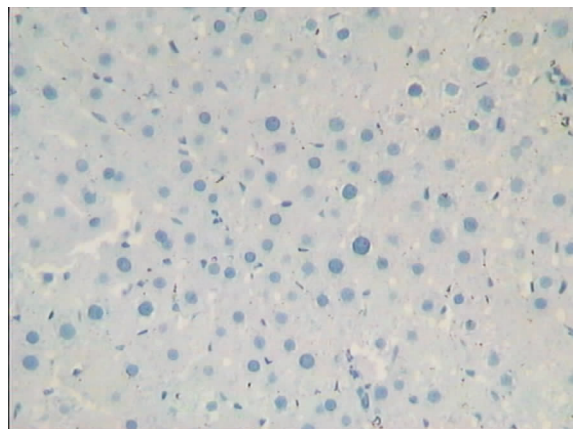


图 2 正常对照组 TGFβ1 的表达(×400)

Figure 2 The expression of TGFβ1 in normal control group (×400)

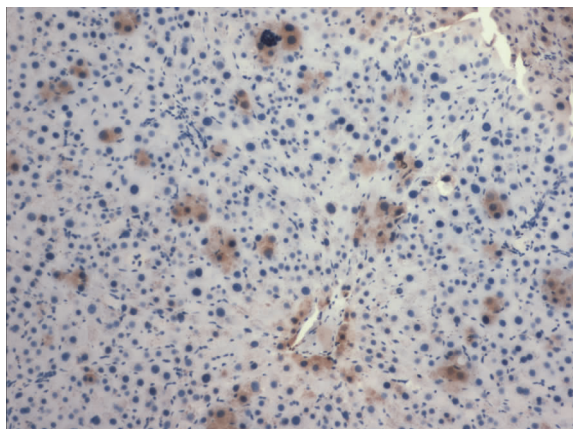


图 3 模型对照组 MMP2 的表达(×400)

Figure 3 The expression of MMP2 in model control group (×400)



图 4 模型对照组 TGFβ1 的表达(×200)

Figure 4 The expression of TGFβ1 in model control group (×200)



图 5 甲乙煎高剂量组 MMP2 的表达(×400)

Figure 5 The expression of MMP2 in Jiayijian high dosage treatment group (×400)

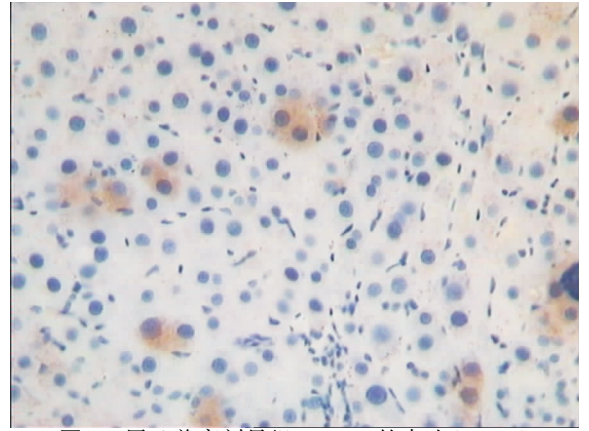


图 6 甲乙煎高剂量组 TGFβ1 的表达(×400)

Figure 6 The expression of TGFβ1 in Jiayijian high dosage treatment group (×400)

3 讨论

甲乙煎是根据古代医家王旭高和李冠仙治肝大法并结合我们多年的临床实践组成的方剂。全方重在健脾利湿、理气和胃、疏肝解郁。本实验研究结果显示,甲乙煎能够明显减轻实验性大鼠肝组织纤维化程度。

中医认为肝纤维化是各种外感内伤因素长期损伤肝脏,正气耗散,邪气不退,伤及五脏,肝气郁滞,肝络瘀滞,日久伤脾犯胃,气血水凝结而成的“积聚”、“鼓胀”、“黄疸”等。肝病传脾是重要的病理环节,古医家李冠仙曰:“肝气一动,既乘脾土,作痛作胀,甚则作泄”;“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”。因此,本方体现了上述原则。

西医认为肝纤维化是各种病因引起的肝细胞发生坏死和炎症刺激导致的细胞外基质的合成增多而降解减少,沉积于肝内形成的肝纤维化^[2]。研究发现,肝纤维化时肝细胞间质有 MMP2 和高水平的 TGFβ1 转录物能引起细胞外基质量的变化。MMPs 是参与肝内细胞外基质降解的主要酶系,其中 MMP2 又称明胶酶 A,系 IV 型胶原酶,在肝星状细胞肝窦内皮细胞、库普弗细胞均有表达。在肝纤维化时,MMP2 表达明显增强,它通过降低胶原螺旋结构的稳定性,改变底物的二级结构,为其他蛋白酶作进一步降解创造条件^[3]。TGFβ1 是一个多功能多肽生长因子,在肝纤维化中能增加细胞外基质的合成而减少降解,是目前所知的最强大的促胶原生成因子,是调控肝纤维化发生发展的核心物质。

在大鼠胶原 2 条多肽链基因的启动上均有 TGFβ1 的作用位点,因而它是肝纤维化治疗的重要目标^[4]。肝损害时,肝星状细胞通过自分泌或旁分泌的方式产生大量 TGFβ,炎症或损伤过程中释放的纤溶酶可进一步增强其活性,激活的 TGFβ 通过细胞膜上的 TGFβ I 型和 II 型受体相结合发挥作用,减少细胞外基质的分解,从而促进肝纤维化的形成^[5]。其机制包括促进肝星状细胞分泌肝脏组织金属蛋白酶抑制因子,抑制胶原酶 mRNA 的表达,减少间质胶原酶基因的表达等。

本研究显示,运用中药甲乙煎高、低剂量治疗后,大鼠肝组织纤维化程度得到显著改善,肝组织 TGFβ1 的表达较模型对照组明显降低($P < 0.05$);其中,高剂量组优于低剂量组,差异有显著性($P < 0.05$)。表明中药甲乙煎通过抑制 TGFβ1 的表达来抑制肝纤维化是其抗肝纤维化的机制之一。

中草药治疗肝纤维化历史悠久,现有方药及治法研究停留在活血化瘀及扶正祛瘀上^[6],比较局限。而甲乙煎从调脾入手,健脾利湿、理气和胃、疏肝解郁,为中医药防治肝纤维化开拓了新思路。

[参考文献]

[1] 夏启荣,何峰. 肝硬化的诊断和治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:11-12.
 [2] 张斌,万谟彬,王灵台. 肝纤维化大鼠 TGFβ1 与 TIMP-1mRNA 的表达及补肾柔肝方的治疗作用[J]. 中西医结合学报,2004, 2(4):274-277.

(下转第 66 页)

【收稿日期】2010-04-09
 【作者简介】傅小芳(1961-),女(汉族),浙江省诸暨市人,副主任护师,主要从事医院感染管理研究。

漱液或复方氯己定含漱液漱口。合并细菌感染患者,根据细菌培养和药敏试验结果,选择敏感药物联合治疗。同时根据病情及各项检查结果给予升白细胞药物、输血、白蛋白、服用中药等营养支持综合治疗,适当控制和调整放疗剂量。本组除6例病例因并发症而中断治疗,2例自行出院外,其余鼻咽癌口腔真菌感染患者均通过积极治疗和护理得以控制,完成放疗整个疗程。

3 讨论

3.1 真菌感染危险因素 由于恶性肿瘤细胞在体内的浸润、破坏,严重影响了肿瘤患者机体的免疫功能,加之肿瘤是消耗性疾病,常需要大剂量放疗或化疗,使机体免疫功能更为低下^[1]。胡自省等^[2]对鼻咽癌放疗后患者免疫指标进行测定,发现11项免疫指标有10项与正常人有显著差异,其免疫损伤主要是细胞免疫损伤、体液免疫亢进和紊乱。因此,鼻咽癌放疗患者是医院感染的高危人群。

放疗是鼻咽癌患者首选的治疗方法。在放疗过程中由于腮腺、唾液腺均在照射范围内,导致腮腺及唾液腺功能受到抑制,引起唾液量减少,质变黏稠。随着放射剂量的增加,唾液分泌减少更加明显,唾液pH下降,致口腔自洁功能减弱。当敏感者照射10 Gy时,唾液分泌量即锐减,出现口干,口腔黏膜充血水肿、溃疡,增加了医院感染机会。放射性反应与损伤增加了真菌感染的机会,例如:放射性龋齿,出现牙痛、口臭,咀嚼、吞咽困难和疼痛,继发放射性溃疡、口咽部干燥、白膜形成,从而诱发口咽部的内环境发生变化,破坏正常屏障,引起菌群失调,真菌乘机生长繁殖,形成病灶,并侵犯周围组织,向他处扩散而造成医院感染。

除上述原因外,在日常医疗护理中,无菌观念不强,消毒隔离意识淡薄,如鼻咽镜、压舌板消毒灭菌不严格,换药不正规,操作前后不洗手以及雾化器、

氧气湿化瓶、吸氧管带菌等,也是造成医院感染的因素之一。

3.2 预防对策 结合本组病例,我们认为鼻咽癌放疗患者口咽部真菌感染与多种因素有关,提出以下预防对策:(1)加强健康宣教,使患者充分了解放疗中应注意的事项,尤其如何减轻黏膜反应、预防口腔感染方面的知识,发挥患者的主观能动性,积极配合治疗和护理;(2)加强营养支持,补充蛋白质、维生素和新鲜蔬菜、水果等;(3)对胃肠功能障碍者给予静脉营养、输血、白蛋白,以保证患者营养需要,能耐受放疗,减少医院感染。鼻咽癌患者口腔真菌感染的预防:必须保持口腔卫生,早晚用软毛牙刷及含氟牙膏刷牙,鼓颊和吸吮动作交替,以清除松动的牙垢;经常做张口叩齿运动,使口腔黏膜皱襞处充分进行气体交换,破坏真菌的生长环境,防止继发感染。口腔护理:放疗前应拔除龋齿、义齿,对牙周炎、牙龈炎患者也需采取相应治疗后再进行放疗。治疗期间多喝水、多漱口,减轻局部水肿,稀释口腔内有害菌群密度,尤其是碳酸氢钠溶液能改变口腔黏液酸碱度,是预防真菌感染的重要措施。

对已发生口腔溃疡合并真菌感染者,可用3% NaHCO₃(苏打水)漱口,并用制霉菌素10万IU含漱。溃疡形成者可在漱口液中加入利多卡因或局部擦利多卡因,以减少患者进食时的疼痛,提高生活质量。控制鼻咽癌放疗期间真菌感染与其他病原菌所致的医院感染一样,关键在于病原菌的早期诊断,早期预防,合理使用抗真菌药物,同时给予适宜的免疫增强剂,正确选择照射野。

[参考文献]

- [1] 王文伟,林欣莉. 肺癌并医院真菌感染38例原因分析[J]. 中华医院感染学杂志,2000,10(5):344-345.
- [2] 胡自省,廖遇平. 针刺结合放射治疗鼻咽癌远期疗效[J]. 中华放射肿瘤学杂志,1995,1(1):7.

(上接第21页)

- [3] 贺宇彤,刘殿武,丁里玉. 抗纤I号和硒对肝纤维化大鼠免疫功能的调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(3):40-43.
- [4] 严茂祥,陈芝芸,项伯康. 中药肝力克对实验性大鼠肝纤维化的影响[J]. 浙江中医学院学报,2003,27(5):55.

- [5] Brunt E M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic-hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond[J]. Hepatology, 2000,31(1):241-246.
- [6] 姚乃礼,白宇宁. 中药抗肝纤维化的研究现状与对策[J]. 山西中医,2004,20(6):20-23.