

青蒿琥酯对肝纤维化大鼠肝脏基质金属蛋白酶-2 表达的影响

来丽娜^{1*}, 任泽恩², 宋晓亮¹, 刘芳¹, 郭春花¹, 范毅敏¹, 王黎敏¹

(1. 长治医学院药理学系, 山西 长治 046000; 2. 长治市第二人民医院, 山西 长治 046000)

[摘要] **目的:**探讨青蒿琥酯(Art)影响基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的抗肝纤维化作用机制。**方法:**采用二甲基亚硝胺(DMN)ip 6周,制备大鼠肝纤维化模型。动物随机分为6组:正常对照组、模型对照组、Art(5,15,45 mg·kg⁻¹)组、阳性对照秋水仙碱(Col, 0.1 mg·kg⁻¹)。检测肝组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量、动物血清透明质酸(HA),层连蛋白(LN),Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)水平及肝组织MMP-2 mRNA和蛋白的表达。**结果:**与模型组相比,Art各组能降低肝组织Hyp含量($P < 0.01$),同时血清HA, LN, PⅢP,肝组织MMP-2-mRNA和蛋白的表达水平下降($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**Art能有效抑制DMN诱导的大鼠肝纤维化及肝脏中MMP-2的表达。

[关键词] 青蒿琥酯; 肝纤维化; 基质金属蛋白酶2; 羟脯氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0264-04

[doi] 10.11653/syfy2013110264

Effects of Artesunate on Matrix Metalloproteinase 2 Expression in Rat of Liver Fibrosis

LAI Li-na^{1*}, REN Ze-en², SONG Xiao-liang¹, LIU Fang¹, GUO Chun-hua¹, FAN Yi-min¹, WANG Li-min¹

(1. Faculty of Pharmacy of Changzhi Medical Collage, Changzhi 046000, China;

2. Changzhi Second Peoples Hospital, Changzhi 046000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of artesunate (Art) on Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) activity, explore the mechanism against liver fibrosis. **Method:** Liver fibrosis model of rats was induced by injecting *N*-nitroso dimethylamine (DMN) for 6 weeks. Rats were randomly divided into 6 groups: the normal group, the model group, the positive control group treated by colchicine (0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and the three Art groups (5, 15, 45 mg·kg⁻¹·d⁻¹). The content of hydroxyproline (Hyp) of liver tissue, hyaluronic acid (HA), laminin (LN), collagen type III peptide (PⅢP) of serum were analyzed. Expressions of MMP-2 protein and mRNA were assayed by Western blot and RT-PCR. **Result:** The content of Hyp in liver and HA, LN, PⅢP of

[收稿日期] 20120911(006)

[基金项目] 山西省高校科技研究开发项目(20081032);长治市科技项目(20123057)

[通讯作者] *来丽娜,副教授,从事中药药理学、心血管药理学的研究工作, Tel:0355-3151022, E-mail:lailina@126.com

- [8] 曲敏,蒋正尧,何学斌.低剂量精氨酸血管加压素提高大鼠空间学习与记忆能力研究[J].医药导报,2008,27(8):905.
- [9] 万素君,陈朝,郑军.等.柴荆注射液的解热作用机理研究-对下丘脑中精氨酸加压素及前列腺素E₂含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(12):31.
- [10] 杨永录,赖雁,唐瑜.等.内源性精氨酸加压素在昼光期大鼠紧张性体温调节中的作用[J].中国病理生理杂志,2011,27(12):2345.
- [11] 苏文,胡爱霞,徐辉甫.等.利尿方对肾阳虚遗尿大鼠抗利尿激素的调节作用[J].中国医院药学杂志,2010,30(10):825.
- [12] 杨伟,赵锋仓,杨永彦.等.芪苈强心胶囊对慢性充血性心力衰竭患者心功能及血浆抗利尿激素的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):200.

[责任编辑 李玉洁]

serum in artesunate group were remarkably decreased and expressions of MMP-2 protein and mRNA were down-regulated compared with the model group. **Conclusion:** Artesunate can effectively inhibit the progress of hepatic fibrosis and the expression of MMP-2 in rats of liver fibrosis induced by DMN.

[**Key words**] artesunate; hepatic fibrosis; matrix metalloproteinase-2; hydroxyproline

青蒿素是从植物黄花蒿中提取得到的一种内酯化合物。青蒿素及其衍生物具有抗疟、免疫抑制、抗病毒、抗肿瘤等多方面药理作用。青蒿琥酯(Art)为青蒿素水溶性的衍生物。作者先前实验发现 Art 对 CCl₄ 混合因素和牛血清白蛋白免疫性大鼠肝纤维化模型有防治作用且能够抑制肝星状细胞(HSCs)增殖和活化,并对其可能作用机制做了初步探讨^[1-4]。有研究表明肝脏受致病因子侵袭后,基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达与活性增高,激活的 MMP-2 因能降解肝窦状隙内皮下正常基底膜样基质而促使 HSC 活化,从而促进肝纤维化的形成与发展^[5]。而 Art 对基质金属蛋白酶活性的影响尚不清楚。本文采用二甲基亚硝胺(DMN)诱导大鼠肝纤维化,观察 Art 对大鼠肝纤维化的防治作用及对 MMP-2 活性的影响,以期从细胞外基质代谢调节角度进一步了解 Art 抗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雌雄各半,清洁级,体重 175~200 g,由山西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(晋)2009-0001。

1.2 药品和试剂 Art(广西桂林制药二厂馈赠),DMN(先进技术有限公司,分析纯,批号 081016),秋水仙碱(Col,昆明股份制药有限公司,批号 080509),羟脯氨酸(Hyp,上海润成生物科技有限公司,分析纯,批号 20090322),透明质酸(HA)放射免疫试剂盒(上海海研医学生物技术有限公司,批号 20090526);层连蛋白(LN)放射免疫试剂盒(上海海研医学生物技术有限公司,批号 20090527),Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)放射免疫试剂盒(上海海研医学生物技术有限公司,批号 20090603),RNAiso Plus 抽提试剂(TaKaRa 公司,批号 B3404-1),RNA PCR Kit(AMV) Ver3.0(TaKaRa 公司,批号 BK4501),Western Blue(Promega 公司,批号 0000011209),anti-Mouse IgG,AP Conjugate(Promega 公司),小鼠来源 GAPDH 一抗(碧云天生物技术研究所),MMP-2 一抗(Abcam 公司,批号 GR20319-1)。

1.3 仪器 CL31R 型低温超速离心机(美国 Thermo),UV 7500 型紫外-可见分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司),核酸蛋白分析仪(Bio-Rad

公司),S1000PCR 型扩增仪(Bio-Rad 公司),凝胶成像分析系统(美国 Alpha Innotech 公司),FMJ-182 型放射免疫 γ 计数器(中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂)。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组^[6] 生理盐水将 DMN 配成 0.5% 溶液,除正常对照组(ip 同体积生理盐水)外,其余各组大鼠 ip DMN 溶液,每次 10 mg·kg⁻¹,第 1 周 1 次/d,连续 3 d,第 2~4 周 1 次/d,第 5~6 周 2 次/周,共 10 次,42 d。大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、低、中、高剂量 Art 组(5,15,45 mg·kg⁻¹)、Col 组(0.1 mg·kg⁻¹)。从造模第 2 周开始 ig Art,1 次/d,至造模结束后 1 周,疗程 6 周。实验结束后,股动脉放血制备血清,-20℃ 冰箱保存。同时留取肝脏组织用于各项检测。

2.2 肝组织 Hyp 的测定 肝组织脱脂,研磨烘干,称重后取组织粉末 40 mg 装入安瓿,加入 6 mol·L⁻¹ HCl 6 mL 乙醇喷灯封口,105℃ 烤 24 h,冷却后敲开安瓿,取 50 μ L 放入试管中烘干待测,参照 Jamall 的方法^[7]。

2.3 血清 HA, LN, PⅢP 的测定 采用放射免疫法测定 均按试剂盒说明书操作。

2.4 肝组织 MMP-2 mRNA 的表达 RNAiso Plus 提取肝组织总 RNA,核酸蛋白分析仪测定其含量。逆转录反应以总 RNA 1 μ g 为模板,用 oligo(dT)引物反转录 RNA 为 cDNA,然后加入待测定指标的引物进行扩增(引物由上海生工生物公司合成)。MMP-2(414 bp)^[8]:上游 5'-TTTTTGTGCCCAAAGAAAGG-3',下游 5'-ATGTCAGACAACCCGAGTCC-3'; β -actin(300 bp):上游 5'-AGCTGAGAGGGAAATCGTGCG-3';下游 5'-GTGCCACCAGACAGCACTGTG-3'。PCR 反应条件:collagen I (94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环), β -actin(94℃ 45 s,60℃ 45 s,72℃ 2 min,30 个循环)。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相及测定条带的灰度,以 I 型胶原与 β -actin 条带的灰度的比值代表 mRNA 的表达水平。

2.5 Western blot 检测肝组织 MMP-2 蛋白的表达 肝组织加入裂解液匀浆,低温离心,蛋白定量。取

总蛋白 50 μg , 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后分别加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 次日洗膜后再与碱性磷酸酶偶联的二抗杂交, Western blue 显色。以目的条带与内参照 GAPDH 条带的灰度的比值代表蛋白的表达量。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较采用单因素方差分析, 并用 LSD 进行组间比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝组织 Hyp 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏 Hyp 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Art 各剂量组大鼠肝组织 Hyp 的含量明显降低 ($P < 0.01$), 与 Col 组比较无显著差异, 见表 1。

3.2 对血清 HA, LN, PIII P 的影响 与正常对照组比较, 模型组 HA, LN, PIII P 含量均显著增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Art 各组大鼠血清中 HA, LN, PIII P 含量均显著降低 ($P < 0.01$), 而与正常对照组, Col 组比较无显著差异, 见表 2。

表 1 Art 对模型大鼠肝组织 Hyp 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

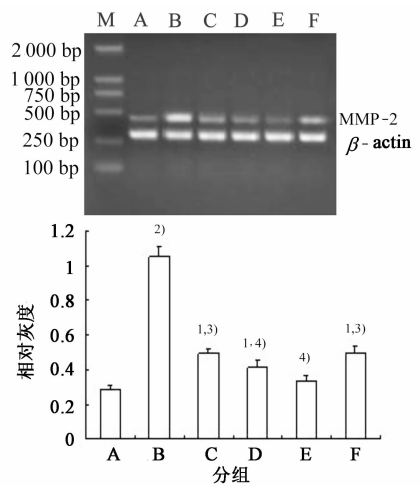
分组	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Hyp/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常对照	-	0.511 \pm 0.184
模型	-	2.556 \pm 0.628 ²⁾
Art	5	0.946 \pm 0.257 ⁴⁾
	15	0.725 \pm 0.297 ⁴⁾
	45	0.816 \pm 0.382 ⁴⁾
Col	0.1	1.129 \pm 0.398 ^{1,4)}

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 Art 对模型大鼠血清 HA, LN, PIII P 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

分组	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	HA	LN	PIII P
正常对照	-	215.99 \pm 12.33	40.15 \pm 6.56	18.24 \pm 1.10
模型	-	385.11 \pm 20.98 ²⁾	80.08 \pm 10.06 ²⁾	27.44 \pm 4.23 ²⁾
Art	5	235.87 \pm 15.54 ⁴⁾	54.92 \pm 8.55 ⁴⁾	20.35 \pm 3.11 ⁴⁾
	15	233.26 \pm 13.84 ⁴⁾	48.35 \pm 7.89 ⁴⁾	19.87 \pm 3.65 ⁴⁾
	45	219.34 \pm 15.41 ⁴⁾	43.26 \pm 9.56 ⁴⁾	19.12 \pm 2.98 ⁴⁾
Col	0.1	228.09 \pm 16.08 ⁴⁾	48.64 \pm 6.43 ⁴⁾	21.56 \pm 3.14 ⁴⁾

3.3 对肝组织 MMP-2 mRNA 表达的影响 模型组 MMP-2 mRNA 表达显著高于正常组 ($P < 0.01$); Art 中、高剂量组 MMP-2 mRNA 表达明显低于模型组 ($P < 0.01$), Art 低剂量组和 Col 组与模型组比较也降低 ($P < 0.05$), 见图 1。



M. DNA marker; A. 正常对照组; B. 模型组; C. Art 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. Art 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. Art 45 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. Col 0.1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (图 2 同) 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)

图 1 Art 对模型大鼠肝组织 MMP-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 Art 对肝组织 MMP-2 蛋白表达的影响 模型组 MMP-2 蛋白表达显著高于正常组 ($P < 0.01$), Art 各剂量组和 Col 组 MMP-2 蛋白表达显著低于模型组 ($P < 0.01$), 但高于正常组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 2。

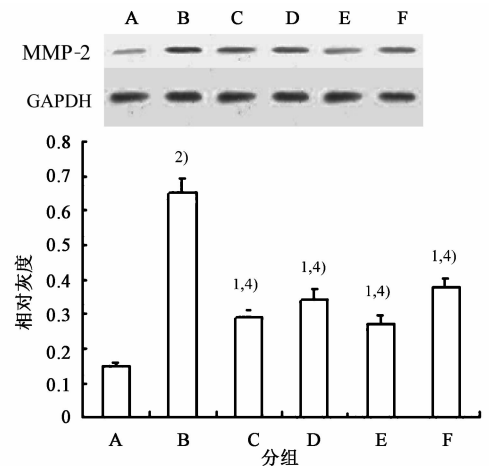


图 2 Art 对模型大鼠肝组织 MMP-2 蛋白表达的影响 (Western blot 法) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 属可逆性病变。我国中药资源丰富, 从天然药物中发掘抗肝纤维化的药物具有广阔的前景^[9-10]。

肝纤维化是肝组织针对各种损伤的修复反应,

各种慢性致肝脏损伤因素均可导致 HSC 的增殖与活化,从而合成大量胶原、非胶原型糖蛋白和蛋白多糖并异常沉积,逐渐形成肝纤维化。作者已采用了不同的动物模型来模拟肝纤维化的形成过程,多方面来评价 Art 的抗肝纤维化作用^[1-4]。本实验采用 DMN 诱导的大鼠肝纤维模型,该模型具有肝纤维化形成率高、死亡率低、造模周期短、肝纤维化病变相对稳定的特点,特别适用于肝纤维化发生机制的研究^[11]。Hyp 是构成机体胶原蛋白的特有成分,测定肝组织 Hyp 的含量可以反映胶原纤维的含量^[12]。本实验发现 Art 组大鼠肝组织 Hyp 含量均明显下降。血清肝纤维化指标的检测简便、经济。血清 PⅢP 是Ⅲ型前胶原分泌到细胞外后被肽酶切下的 N 端肽,其水平升高可提示肝纤维增生活跃。HA 反映肝纤维化活动程度和肝脏损伤程度,被认为是最有价值的血清学标志物。LN 为基底膜的主要成分,在肝内大量沉淀则引起肝窦毛细血管化,它可反映肝窦毛细血管化和汇管区纤维化的范围。目前普遍认为 PⅢP、LN 和 HA 组成联合测定,可较好地反映肝纤维化程度^[13]。本实验结果显示 Art 可以降低血清 PⅢP、LN 和 HA 的含量,与模型组比较有显著的差异。Col 具有较好的抗肝纤维化效果^[14],常作为阳性对照。Art 与 Col 相比无明显差异也反映出 Art 具有很好的抗纤维化疗效。

MMP-2 是 MMPs 家庭中的重要成员,主要降解Ⅳ,Ⅴ,Ⅶ,Ⅹ型胶原,弹性蛋白,纤维连接蛋白及变性的Ⅰ型胶原等。肝内主要由 HSC, kuffer 细胞分泌。MMP-2 的活化可在多个水平受到多种方式调节,研究表明 MMP-2 在肝纤维化阶段其活性明显增加,且在肝纤维化早期其活性不受基质金属蛋白酶组织抑制因子的干预,以Ⅳ型胶原为底物,能持续地降解基膜胶原,破坏其完整性,促进肝窦毛细血管化改变 Disse 间隙中 HSC 的微环境。基底膜分解产物亦能激活 HSC, HSC 活化为肌成纤维样细胞又再次分泌细胞外基质(ECM)及 MMP-2,加速肝纤维化发生发展^[15]。先前实验已观察到 Art 能抑制 HSC 活化^[3-4],本实验观察到 Art 能抑制 MMP-2 mRNA 和蛋白的表达,提示 Art 抑制 HSC 活化有可能是由于防止肝组织正常基底膜结构被破坏,保持 HSC 微环境稳定而致。

综上所述,Art 能有效抑制 DMN 诱导的大鼠肝纤维化及肝脏中 MMP-2 的表达,有利于维持 HSC 处于静止状态所需要的细胞外基质环境,对肝纤维化的防治有积极作用。

[参考文献]

- [1] 方步武,来丽娜,林雅军,等. 青蒿琥酯抗四氯化碳大鼠肝纤维化的作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(6):762.
- [2] 来丽娜,方步武. 青蒿琥酯抗免疫性大鼠肝纤维化作用的研究[J]. 中药药理与临床,2006,22(3/4):35.
- [3] 来丽娜,方步武. 青蒿琥酯对肝星状细胞增殖的影响[J]. 中药药理与临床,2006,22(3/4):25.
- [4] 来丽娜,杨柳絮,郭春花,等. 青蒿琥酯抗大鼠免疫性肝纤维化的作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2011,27(1):125.
- [5] 王宪波,刘平,唐志鹏,等. 大鼠肝纤维化形成中基质金属蛋白酶 2、9 活性变化的病理意义[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(5):267.
- [6] 朱兰香,陈卫昌,许春芳,等. 大蒜素对二甲基亚硝胺诱发的肝纤维化大鼠的保护作用[J]. 中草药,2004,35(12):1384.
- [7] Jamall I S, Finelli V N, Quehee S S. A simple method determine nanogram levels of 4-Hydroxyproline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112(1):70.
- [8] 王海燕,朱跃科,申凤俊,等. 复方 861 对 DMN 损伤性大鼠肝纤维化肝脏中 MMP-2 表达的影响[J]. 中国现代医药杂志,2007,9(4):31.
- [9] 欧贤红,吕林艳,郑作文. 藤茶提取物抗慢性肝纤维化作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):132.
- [10] 张媛辉,刘俊田. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(6):66.
- [11] 谢新梅,庞瑞,曾凡业,等. 康艾注射液对大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(16):2469.
- [12] Attallah A M, Toson E A, Shiha G E, et al. Evaluation of serum procollagen aminoterminal propeptide III, laminin, and hydroxyproline as predictors of severe fibrosis in patients with chronic hepatitis C [J]. J Immunoassay Immunochem,2007,28(3):199.
- [13] Bolarin D M, Azinge E C. Biochemical markers, extracellular components in liver fibrosis and cirrhosis [J]. Nig Q J Hosp Med, 2007,17(1):42.
- [14] Lee S J, Kim Y G, Kang K W, et al. Effects of colchicine on liverfunctions of cirrhotic rats beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF beta1 expression[J]. Chem Biol Interact,2004,147(1):9.
- [15] 崔红燕,姜哲浩,陆雄,等. 扶正化瘀方对纤维化肝脏 MMP-2 活性及Ⅳ型胶原表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(7):43.

[责任编辑 李玉洁]