

# 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织 MMP-2 表达的影响

欧士钰, 罗伟生\*, 靳雅玲, 覃浩, 孙旭锐  
(桂林医学院附属医院消化内科, 广西 桂林 541004)

**[摘要]** 目的:观察基质金属酶-2(MMP-2)在实验性肝纤维化大鼠组织中的表达,探讨荔枝核总黄酮(total flavone from *Litchi chinensis* Sonn, TFL)抗肝纤维化的作用机制。方法:大鼠随机分为正常组,模型组,TFL高、低剂量组及秋水仙碱阳性对照组。模型组,TFL治疗组及秋水仙碱阳性对照组以二甲基亚硝胺腹腔注射4周制作大鼠肝纤维化模型;造模同时TFL高、低剂量组及秋水仙碱分别以TFL(200,100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),秋水仙碱(colchicine,col)灌胃给药,正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃,6周后处死大鼠,抽取下腔静脉血检测谷草转氨酶(AST),谷丙转氨酶(ALT),取肝脏同一部位行HE,Masson染色观察大鼠肝纤维化程度,采用免疫组化检测各组肝组织MMP-2的表达。结果:TFL高、低剂量组和正常组血清AST,ALT均明显低于模型组,具有显著性差异( $P < 0.05$ )。与模型组比较TFL治疗组可明显抑制MMP-2的表达( $P < 0.05$ ),改善大鼠肝纤维化程度( $P < 0.05$ )。结论:荔枝核总黄酮可减轻肝损伤及改善实验性大鼠肝纤维化程度,抑制MMP-2的表达可能是其抗肝纤维化作用的机制之一。

**[关键词]** 荔枝核总黄酮;肝纤维化;基质金属酶-2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0209-05

## Effect of Total Flavone from *Litchi chinensis* Sonn on Expression of MMP-2 in Rats Livers with Hepatic Fibrosis

OU Shi-yu, LUO Wei-sheng\*, JIN Ya-ling, QIN Hao, SUN Xu-rui

(Department of Digestive Medicine, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the livers of rats with hepatic fibrosis, and the effects of total flavone from *Litchi chinensis* Sonn (TFL) on rats. **Method:** The rat model of hepatic fibrosis was established by intraperitoneal injection of DMN (dimethylnitrosamine). TFL was orally given at a dose of 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. Colchicine was used as a positive control. After 6 weeks, all rats were sacrificed and their left liver lobes were examined histopathologically. The degree of fibrosis was evaluated by HE and Masson staining; serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by a biochemical analytical tool in the laboratory test department of our hospital. The expression of MMP-2 in liver tissue was assessed by S-P immunohistochemical staining using polyclonal antibodies against MMP-2. **Result:** Serum levels of ALT and AST were significantly lower in the TFL group and the colchicine group than that in the fibrosis model group (all  $P < 0.05$ ). The degree of hepatic fibrosis in the TFL group was less severe compared with those of the fibrosis model. The expression levels of MMP-2 in the TFL group and colchicine group were lower than in that the liver fibrosis model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** TFL can improve the degree of fibrosis, the mechanism possibly involve the inhibition of the expression of MMP-2.

**[Key words]** flavone from *Litchi chinensis* Sonn; hepatic fibrosis; matrix metalloproteinases-2

**[收稿日期]** 20120305(020)

**[基金项目]** 广西卫生厅重点课题(2010052)

**[通讯作者]** \* 罗伟生, Tel: 0773-5898018, E-mail: wsluo58@yaho.com.cn

肝纤维化是肝脏对各种慢性肝损伤的共同后果,同时也是一个可逆的过程。荔枝是广西特产,其核仁作为广西特色中药已有几千年的应用历史。荔枝核含有多种化学成分,其中黄酮化合物具有清除

氧自由基和保肝作用<sup>[1]</sup>。本课题组前期实验已证实荔枝核总黄酮具有抗肝纤维化的作用<sup>[2]</sup>,为进一步探讨荔枝核总黄酮抗肝纤维化作用的机制,本实验观察了荔枝核总黄酮对二甲亚硝胺诱导的实验性大鼠肝纤维化肝组织中 MMP-2 表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 50 只健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,质量(200 ± 20)g,由桂林医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK 桂 2007-0001。

**1.2 试剂** 二甲亚硝胺(DMN, Sigma 公司),兔抗大鼠 MMP-2 多克隆抗体(北京中杉),免疫组织化学二抗试剂、DAB 显色(福建迈新生物科技有限公司),秋水仙碱(colchicine, Col),荔枝核总黄酮(TFL, 购于广州广弘中药材公司,经鉴定为无患子科植物荔枝(litchi chinensis sonn)的成熟种子,桂林医学院药理实验室提取分离,荔枝核总黄酮含量达 54.2%,用蒸馏水稀释为 20, 40 g·L<sup>-1</sup>两种溶液),离心机、全自动生化分析仪(桂林市第三人民医院检验科)。

**1.3 大鼠分组及处理** 大鼠随机分为正常对照组,模型组,TFL 高、低剂量组,秋水仙碱组,每组各 10 只。模型组,TFL 高、低剂量组,秋水仙碱组按 Ala-Kokko 方法<sup>[3]</sup>,大鼠以 25 mL·kg<sup>-1</sup>剂量于每周前 3 d 连续腹腔注射 0.5% 的 DMN 溶液(以生理盐水稀释),共 4 周制做肝纤维化模型。造模同时,模型组,TFL 高、低剂量治疗组,秋水仙碱组分别用 5 mL·kg<sup>-1</sup>生理盐水,200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> TFL<sup>[4]</sup>及 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Col 灌胃,每日 1 次,共 6 周。正常对照组以等体积的生理盐水灌胃。

6 周后处死大鼠,抽取下腔静脉血。观察肝脏的外形变化,取同一部位新鲜肝脏组织固定于 10% 中性甲醛溶液中 1 d。

## 1.4 指标检测

**1.4.1 肝功能检测** 血液离心,取血清用全自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)。

**1.4.2 肝组织病理学检查** 制作石蜡切片。HE 染色按常规方法。Masson 胶原染色,以 10% 三氯醋酸和 10% 重铬酸钾混合液 15 min,蒸馏水水洗 6 次;5% 天青石蓝 6 min,蒸馏水水洗 6 次;1% 冰醋酸中过一下,滴上酸性品红与丽春混合液比例 2:1;滴 1% 亮绿待 1 min;在冰醋酸中过 3 下;脱水透明封片。纤维化分级评分参照 2002 年中华肝脏病学会肝纤维化分级法进行胶原纤维增生程度半定量分

析<sup>[5]</sup>,最低 0 分,最高 29 分;得分越高,表示纤维化程度越重。

**1.4.3 免疫组化检测 MMP-2 蛋白的表达** 防脱切片经过常规脱蜡、脱水;柠檬酸盐工作缓冲液高温修复 2 min 冷却后 PBS 冲洗;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断 10 min, PBS 冲洗;滴加 MMP-2 多克隆抗体(1:200),1 h 后 PBS 洗;滴加二抗,15 min 后 PBS 冲洗;DAB 显色;苏木精复染,常规脱水,透明,中性树脂胶封固、光镜下观察。用已知阳性切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

MMP-2 采用半定量计分方法,以细胞胞浆或包膜呈棕黄色为(+ )。参照免疫组化显色标准<sup>[6]</sup>:按显色程度分弱、中、强 3 种,分别记以 1, 2, 3 分。每个指标的每个标本,取 10 个较好的高倍视野,按显色范围分为 4 度:“+”为显色范围占高倍视野 < 25%;“++”为显色占高倍视野 25% ~ 50%;“+++”为显色占高倍视野 50% ~ 75%;“++++”为显色占高倍视野 > 75%。将每个高倍视野显色程度和范围换算成显色指数,显色指数 = 显色程度 × 显色范围(+ 为 1 分,++ 为 2 分,+++ 为 3 分,++++ 为 4 分),取其均数作为每个检测指标的最终显色指数。

**1.5 统计学处理** 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。先进行数据的正态性检验及方差齐性检验,符合上述条件的行单因素方差分析(ANOVA),组间比较应用 Student-Newman-Keuls(SNK)检验。统计学处理采用 SPSS 17.0 统计软件做相关分析。

## 2 结果

**2.1 一般情况** 实验过程中共有 5 只大鼠死亡,尸检和肝脏 HE 染色检查,均死于急性肝衰竭,不计入统计学处理。模型组大鼠消瘦,毛发稀疏暗淡无光,眼睛混浊,反应迟钝,厌食;剖开腹腔后部分可见腹水,肝脏肉眼观察粗糙,可见结节。荔枝核总黄酮高剂量组形体较丰满,发育基本和月龄符合,被毛浓密有光泽,眼睛明亮、行动迅速、反应灵敏,食欲好;剖开腹腔后无腹水,肝脏肉眼观察较光滑细腻。荔枝核总黄酮低剂量组和秋水仙碱组外观无明显差异,形体中等,发育一般,被毛尚光滑,行动反应较正常,食欲正常;剖开腹腔后可见少量腹水,肝脏肉眼观察欠细腻。

**2.2 各组 AST, ALT 水平比较** 模型组 AST, ALT 水平最高,荔枝核总黄酮高剂量组 ALT, AST 水平明显低于模型组及秋水仙碱组( $P < 0.05$ ),黄酮低剂量组、秋水仙碱组水平也低于模型组( $P < 0.05$ ),见表 1。

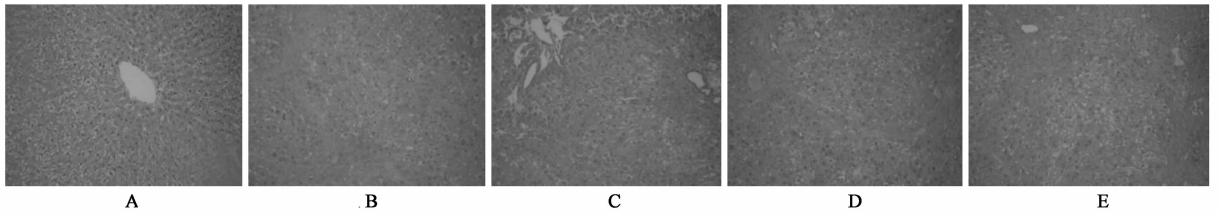
表 1 荔枝核总黄酮对大鼠血清 ALT,AST 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量		U·L <sup>-1</sup>	
	/mg·kg <sup>-1</sup>	n	ALT	AST
正常对照	-	10	45.46 ± 11.05	84.95 ± 14.50
模型	-	8	194.63 ± 22.86 <sup>1)</sup>	293.99 ± 23.78 <sup>1)</sup>
TFL	200	9	109.78 ± 18.69 <sup>1,2,3)</sup>	156.50 ± 26.29 <sup>1,2,3)</sup>
	100	9	141.92 ± 21.05 <sup>1,2)</sup>	219.11 ± 30.90 <sup>1,2)</sup>
秋水仙碱	0.1	9	147.11 ± 27.29 <sup>1,2)</sup>	213.83 ± 31.53 <sup>1,2)</sup>

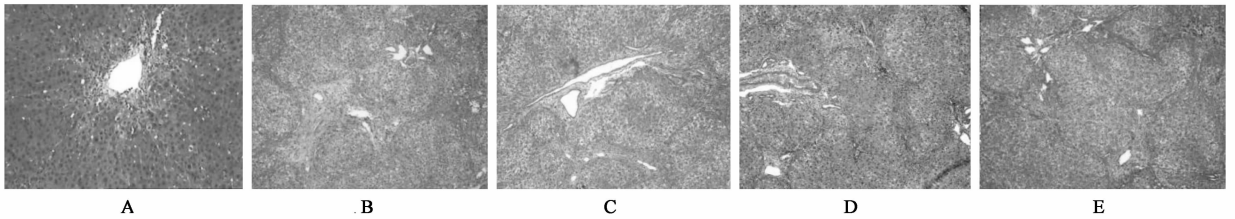
注:与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与秋水仙碱组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ (表 3 同)。

2.3 各组 HE 及 Masson 染色结果 光镜观察,空白对照组肝小叶结构完整清晰,呈条索状向四周放射状排列,无纤维组织增生,仅见中央静脉周边及肝

板间有少许蓝色纤细的网状纤维。模型组可见灶性坏死,伴炎性细胞浸润,多数正常小叶结构破坏或消失,粗大胶原纤维分割、包绕肝小叶,在中央静脉之间、汇管区之间、汇管区与中央静脉之间形成纤维间隔,肝细胞索排列紊乱,肝细胞水肿明显,脂肪变性广泛。与模型组比较,各治疗组肝细胞水肿及变性不明显,炎细胞浸润较少,肝小叶结构破坏明显减轻,胶原纤维增生较少,纤维疏松变窄,TFL 高剂量组可见胶原纤维轻度增生,汇管区纤维化扩大,局限于窦周和小叶内纤维化,肝小叶间未见纤维组织增生,无假小叶形成;TFL 低剂量组及秋水仙碱组纤维略粗大,数量较 TFL 高剂量组组多。各组大鼠肝组织 HE 染色见图 1,Masson 染色见图 2,肝纤维化评分见表 2。



A. 空白对照组;B 模型组;C. TFL 高剂量组;D. TFL 低剂量组;E. 秋水仙碱组  
图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色(×100)



A. 空白对照组;B 模型组;C. TFL 高剂量组;D. TFL 低剂量组;E. 秋水仙碱组  
图 2 各组大鼠肝组织 Masson 染色(×100)

表 2 荔枝核总黄酮对肝纤维化程度分期情况

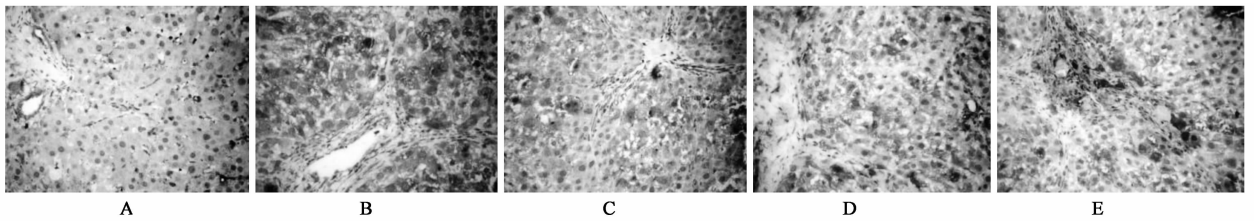
组别	n	例				
		0 期	1 期	2 期	3 期	4 期
空白对照	10	10	0	0	0	0
模型	8	0	0	1	4	3
TFL 高剂量	9	0	1	5	3	0
TFL 低剂量	9	0	0	3	5	1
秋水仙碱	9	0	0	2	6	1

2.4 免疫组化 MMP-2 蛋白表达结果 正常肝组织 MMP-2 呈弱阳性表达,散在分布于肝窦周围,肝细胞,汇管区血管壁及胆管壁周围的间质细胞,显色较淡;而模型组 MMP-2 呈强阳性表达,肝小叶内肝窦周围及肝细胞可见呈片状阳性深着色区,汇管区、纤维间隔区亦可见片状融合区,血管壁着色强烈;与模

型组比,TFL 高剂量组 MMP-2 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ ),仅在肝窦周围见明显的中等着色细胞,部分成小片状,肝细胞及汇管区见少量淡黄色着色细胞;TFL 低剂量组及秋水仙碱组在肝小叶内片状着色,肝窦周围着色较深,单个肝细胞内可见强着色细胞核,MMP-2 表达与模型组比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。但是 TFL 低剂量组和秋水仙碱组之间比较无统计学意义。MMP-2 表达见图 3,显色指数见表 3。

### 3 讨论

肝纤维化是肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成与降解平衡被破坏,导致细胞外基质过度沉积的病理过程,是各种慢性肝病进一



A. 空白对照组; B 模型组; C. TFL 高剂量组; D. TFL 低剂量组; E. 秋水仙碱组

图 3 各组大鼠肝组织 MMP-2 免疫组化染色 (×400)

表 3 荔枝核总黄酮对肝组织纤维化评分及 MMP-2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	n	纤维化评分	显色指数
正常对照	-	10	0.80 ± 0.42	1.30 ± 0.48
模型	-	8	21.13 ± 5.46 <sup>1)</sup>	9.50 ± 1.60 <sup>1)</sup>
TFL 高	200	9	6.78 ± 3.93 <sup>1,2)</sup>	3.44 ± 1.33 <sup>1,2,3)</sup>
	100	9	14.56 ± 4.67 <sup>1,2)</sup>	6.67 ± 2.45 <sup>1,2)</sup>
秋水仙碱	0.1	9	15.67 ± 5.74 <sup>1,2)</sup>	6.33 ± 2.55 <sup>1,2)</sup>

步向肝硬化发展的必经阶段<sup>[7-8]</sup>。目前认为,肝纤维化乃至早期肝硬化均是可逆的<sup>[9]</sup>。所以,早期肝纤维化阶段的治疗具有重要的临床意义。实验研究表明,中医药具有良好的抗肝纤维化效果<sup>[10-11]</sup>,能够多途径、多层次、多靶点地发挥抗肝纤维化作用<sup>[12]</sup>。荔枝核总黄酮是从中药荔枝核仁中提取的,应用微波法,通过大孔树脂柱和聚酰胺柱进行分离纯化得到的黄酮类化合物,具有保肝、抗肝纤维化等作用<sup>[1-2]</sup>。本实验为进一步观察并探讨荔枝核总黄酮抗肝纤维化作用及可能机制。

目前认为,在肝内参与细胞外基质降解的主要酶系为基质金属蛋白酶(MMPs),MMPs 促进 ECM 的降解,组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)抑制 MMPs 的活性,阻止 ECM 的降解,MMPs 和 TIMPs 间的平衡决定了 ECM 的代谢。实验研究证明<sup>[13]</sup>,调节 MMPs/TIMPs 的表达,可以改变肝纤维化的进程甚至可以逆转肝纤维化。

肝星状细胞(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,它的激活是肝纤维化发病过程中的中心环节<sup>[14]</sup>。

研究证明,MMPs 中 MMP-2 与 HSC 的活化密切相关<sup>[15]</sup>,而且 MMP-2 的表达增多促进肝纤维化的进程<sup>[16]</sup>。在肝纤维化阶段 MMP-2 基因、潜酶和活性酶表达均明显增加,肝纤维化早期其活性不受基质金属蛋白酶的抑制因子-2(TIMP-2)的干预,能持续地降解基底膜的正常基质成分,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,促使 HSC 被激活并增殖、转化成肌成纤维细胞样细胞,同时分泌 ECM 及 MMP-2,形成破坏、激活的连锁反应,促进肝纤维化的形成与发展<sup>[17-19]</sup>。实验证明,在四氯化碳诱导的实验性肝纤维化大鼠模型中,模型组肝组织 MMP-2 mRNA 表达明显增高,而治疗组肝纤维化程度减轻同时 MMP-2 水平显著性下降<sup>[20-21]</sup>。

在本实验中,笔者利用 DMN 建造大鼠肝纤维化模型,采用免疫组化染色法检测了各组大鼠肝组织 MMP-2 的表达,结果显示各组肝脏组织均有 MMP-2 的表达,与空白对照组比较,模型组肝组织纤维化程度明显增高,同时 MMP-2 的表达显著增加。与模型组比较,荔枝核总黄酮组肝组织纤维化程度明显减轻,其 MMP-2 的表达显著性降低。因此,笔者认为荔枝核总黄酮能下调 MMP-2 的表达,对 MMP-2 进行调控,使肝窦基底膜的完整性得以保持,从而延缓甚至抑制肝纤维化的进程,这可能是荔枝核总黄酮对抗肝纤维化的部分作用机制之一,但其中的具体生物学机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 陈衍斌,武可泗,顾宜,等.荔枝核化学成分及药理研究概况[J].中国中医药信息杂志,2007,14(5):97.

[2] 覃浩,孙旭锐,欧仕钰,等.荔枝核总黄酮预防大鼠肝纤维化的初步研究[J].第三军医大学学报,2011,33(22):2353.

[3] Ala-Kokko L, Pihlajaniemi T, Myers J C, et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat[J]. Biochem J, 1987, 244:75.

[4] 赵永忠,漆志平,徐庆,等.荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制[J].世界华人消化杂志,2010,18(20):2084.

[5] 曾民德,王泰龄,王宝恩.肝纤维化诊断及疗效评估共识[J].肝脏,2002,7(2):3.

[6] 谢玉梅,聂青和,周永兴,等.肝硬化患者肝组织中 TIMP-1, TIMP-2 的表达[J].第四军医大学学报,

- 2000, 21(7):790.
- [ 7 ] Tsukada S,Parsons C J,Rippe R A. Mechanisms of liver fibrosis[J]. Clin Chim Acta,2006,364(1/2):33.
- [ 8 ] Manning D S,Afdhal N H. Diagnosis and quantitation of fibrosis[J]. Gastroenterology,2008,134(6):1670.
- [ 9 ] Benyon R C, Iredale J P. Is liver fibrosis reversible? [J]Gut,2000,46(4):443.
- [10] 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.
- [11] 曾建国,肖俐,王宇红,等. 博落回提取物对实验性肝纤维化的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):134.
- [12] 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.
- [13] 都广礼,陈德兴,张艳. 猪血清肝纤维化大鼠肝组织基质金属蛋白酶-9/13 和基质金属蛋白酶抑制因子-1/2 表达的动态变化及下瘀血汤对其影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):48.
- [14] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Gastroenterology,2008,134(6):1655.
- [15] Benyon R C, Arthur M J P. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells[J]. Semin Liver Dis, 2001, 21: 373.
- [16] Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis-a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies [J]. Hepatol,2007,46(5):955.
- [17] 吴运瑾,翟为溶,庄丽,等. 大鼠肝纤维化模型中基质金属蛋白酶-2 及其抑制物的表达[J]. 上海医科大学学报,1999,26(4):21.
- [18] Strongin A Y, Collier I, Bannikov G, et al. Mechanism of cell surface activation of 72-KDa type IV collagenase-isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase[J]. J Biol Chem,1995,270:5331.
- [19] Benyon R C, Hovell C J, Gaca M D A, et al. Proteinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation [J]. Hepatology, 1999, 30: 977.
- [20] Zhou X, Hovell C J, Pawley S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and-14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis[J]. Liver Int, 2004,24:492.
- [21] 张彩华,姜妙娜,李寒姝,等. 肝复康对肝纤维化大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B, MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2011,14(6)3:169.

[责任编辑 邹晓翠]

## 《中国实验方剂学杂志》优先数字出版声明

优先数字出版就是以数字出版方式提前出版印刷版期刊内容。按照《中国实验方剂学杂志》与中国知网签订的优先数字出版协议,已经完成审稿及编排的、符合相关规定的稿件可以在印刷版出版前在中国知网优先数字出版平台上发布。发布内容也属于正式出版范畴。这一方式对于加快文献的出版传播,提升学术影响力具有积极作用。作者如希望稿件采用优先数字出版方式出版,请在投稿时说明,经过编辑部审查符合条件者可实现优先出版。