

# 苦参素对免疫性肝纤维化大鼠肝脏组织 MMP-1, TIMP-1 表达的影响

张知贵, 杨华\*

(乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000)

**[摘要]** 目的:探讨苦参素对免疫性肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、基质金属蛋白酶-1抑制剂(TIMP-1)表达的影响。方法:建立猪血清诱导的大鼠免疫性肝纤维化模型。SD 雄性大鼠 44 只,随机分为正常对照组、模型组、秋水仙碱组( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )和苦参素组( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),ip,1 次/d,连续 8 周。采用免疫组化方法检测 MMP-1, TIMP-1 在各组大鼠中的表达。结果:与模型组相比,苦参素组 MMP-1 表达为( $3.42 \pm 0.53$ )%,高于模型组的( $2.81 \pm 0.53$ )%,( $P < 0.05$ );苦参素组 TIMP-1 表达水平为( $30.62 \pm 3.18$ )%,明显低于模型组的( $41.64 \pm 4.51$ )%,( $P < 0.01$ );苦参素组 TIMP-1/MMP-1 比值也明显低于模型组( $P < 0.01$ )。结论:苦参素能增加免疫性肝纤维化大鼠肝脏组织 MMP-1 的表达,抑制 TIMP-1 表达,调节 TIMP-1/MMP-1 比值,通过对细胞外基质(ECM)的调节起到抗肝纤维化的作用。

**[关键词]** 苦参素;肝纤维化;基质金属蛋白酶-1;基质金属蛋白酶-1抑制剂;TIMP-1/MMP-1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0236-02

苦参素(oxymatrine, OM)又名氧化苦参碱,是从中药广豆根中提取所得生物碱类,具有抗炎、抗菌、抗病毒、抑制免疫、抗肿瘤等生物学作用,在抗纤维化治疗方面受到广泛的关注。近年来学者对苦参素抗肝纤维化的机制进行了广泛的探讨。基质金属蛋白酶-1抑制剂(TIMP-1)生成增加, TIMP-1/基质金属蛋白酶-1(MMP-1)比例失衡是纤维增生的重要机制<sup>[1]</sup>。目前尚未见到苦参素对 MMP-1, TIMP-1 影响的报道。本实验探讨了苦参素对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 MMP-1, TIMP-1 表达的影响,旨在探讨苦参素的抗纤维化的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 雄性大鼠 44 只,体重( $200 \pm 20$ )g,购自成都中医药大学动物实验中心,合格证号 SCXK(渝)2004-45。

**1.2 药物与试剂** 秋水仙碱,由西双版纳版纳药业有限责任公司提供,批号 20105738;苦参素,由宁夏制药厂提供,批号 106519。MMP-1, TIMP-1 抗体, SABC 免疫组化染色试剂盒, DAB 显色试剂盒,均购自武汉博士德生物工程有限公司;HPLAS-1000 计算机图像分析系统由同济医科大学提供。

## 2 方法

**2.1 模型的制备与给药** 将大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组和苦参素组,除正常组外,其余各组均 ip 猪血清( $0.5 \text{ mL/只}$ ),每周 2 次,连续 16 周,复制大鼠免疫性肝纤维化模型。于造模 8 周末,随机选取 4 只大鼠,股动脉放血处死。取肝组织,用 10% 福尔马林固定,常规组织切片,HE 染色,显微镜观察组织学改变,见汇管区炎性细胞增多,肝星状细胞增多并部分活化,胆管上皮细胞明显增生,纤维间隔从汇管区向小叶内伸展,判断造模已成功。于 8 周末开始苦参素组以苦参素  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip;秋水仙碱组以秋水仙碱  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip。以上各组给药容量  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,正常组、模型组以等量生理盐水代之,1 次/d,共 8 周。

**2.2 MMP-1, TIMP-1 在肝组织表达的检测** 采用免疫组化法。组织常规固定,制成石蜡切片;切片经常规脱蜡至水,滴加 0.1% 胰蛋白酶 10 min。蒸馏水洗涤 3 次,每次 2 min;滴加血清封闭液,室温下 20 min 后甩去多余液体;滴加适当稀释的一抗,  $20 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$  下放置 1 ~ 2 h,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 洗 3 次,每次 2 min;滴加二抗,  $20 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$  下 20 min,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 洗 3 次,每次 2 min;滴加 SABC,  $20 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$  20 min,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 洗 4 次,每次 5 min;DAB 显色,  $20 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$  下显色 5 ~ 30 min,控制反应时间,蒸馏水洗涤;苏木素轻度复染,水洗,乙醇脱水,二甲苯透明,用中性树胶封片;用 HPLAS-1000 计算机图象分析系统对染色后的切片进行定量分析;每一标本

**[收稿日期]** 20120105(108)

**[第一作者]** 张知贵,本科,副教授,从事生物医学研究, Tel: 15182296668, E-mail: 347187827@qq.com

**[通讯作者]** \* 杨华,本科,副教授,从事生物医学研究, Tel: 18990602779, E-mail: 317843968@qq.com

随机选取汇管区 5 个视野,在同一设定条件下,测出阳性着色面积,以阳性着色面积占视野的百分比(相对面积)表示肝组织中该物质的含量。

**2.3 统计学方法** 数据分析采用 SPSS 16.0 统计分析软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 MMP-1 表达的影响** 正常对照组仅见汇管区血管壁、胆管壁周围及肝窦周围细胞有少量 MMP-1 阳性着色;模型组除上述区域外,主要集中于纤维板及汇管区,肝实质细胞亦有部分着色。与正常对照组相比,模型组 MMP-1, TIMP-1 和 TIMP-1/MMP-1 明显升高 ( $P <$

0.01),表明造模成功。与模型组相比,苦参素组 MMP-1 表达高于模型组 ( $P < 0.05$ ),提示苦参素增强了 MMP-1 的表达。秋水仙碱组与模型组相比无显著性差异,见表 1。

**3.2 对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 TIMP-1 表达的影响** 免疫组化显示, TIMP-1 主要位于肝窦、汇管区及纤维间隔等纤维化活跃部位,在纤维化的肝组织中以上部位表达更为明显。与模型组相比,秋水仙碱组、苦参素组 TIMP-1 及 TIMP-1/MMP-1 比值明显下降,差别均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。提示秋水仙碱、苦参素均可降低肝纤维化大鼠肝脏组织 TIMP-1 的表达,且可使 TIMP-1/MMP-1 明显下降,见表 1。

表 1 各组大鼠肝组织 MMP-1 和 TIMP-1 相对面积的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	MMP-1/%	TIMP-1/%	TIMP-1/MMP-1
正常对照	-	2.12 $\pm$ 0.48 <sup>2)</sup>	25.52 $\pm$ 3.49 <sup>2)</sup>	9.14 $\pm$ 2.31 <sup>2)</sup>
模型	-	2.81 $\pm$ 0.50	41.64 $\pm$ 4.51	13.25 $\pm$ 2.59
秋水仙碱	0.1	2.94 $\pm$ 0.45	32.12 $\pm$ 3.71 <sup>2)</sup>	10.15 $\pm$ 2.17 <sup>2)</sup>
苦参素	60	3.42 $\pm$ 0.53 <sup>1)</sup>	30.63 $\pm$ 3.18 <sup>2)</sup>	9.49 $\pm$ 2.24 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

苦参具有清热解毒、祛风燥湿、补中明目、养肝胆气等功效。苦参素(即氧化苦参碱)能降低患者血清透明质酸、层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原的作用,具有明显的抗肝纤维化作用<sup>[2]</sup>。有学者认为,苦参碱类成分抗纤维化作用的机制是全面广泛的,包括抗炎、抗病毒、保护肝细胞、抑制细胞外基质(ECM)降解,减少 ECM 沉积,以及综合作用机制等<sup>[3]</sup>。肝纤维化以 ECM 的合成与降解失衡,导致 ECM 过度沉积为主要特征。肝脏 ECM 的代谢主要由基质金属蛋白酶(MMPs)及其抑制因子(TIMPs)调节, MMP 促进 ECM 的降解,而 TIMPs 则起相反作用,造成 ECM 代谢失衡致大量沉积而形成肝纤维化。研究表明肝脏中具有 TIMP-1 和 TIMP-2 两种因子,而 TIMP-1 的特异性和敏感性均高于 TIMP-2<sup>[4]</sup>。TIMP-1/MMP-1 比值是维持 ECM 在肝内正常代谢的关键。

本研究显示,模型组 MMP-1, TIMP-1 水平明显高于正常对照组;TIMP-1/MMP-1 也明显高于正常对照组,说明大鼠肝纤维化模型组存在 MMP-1, TIMP-1 水平的异常表达及 TIMP-1/MMP-1 失衡。苦参素增强了模型动物 MMP-1 的表达,以促进 ECM 的降解;苦参素抑制了模型动物 TIMP-1 表达,从而减少其对 MMP-1 的抑制作用;苦参素组 TIMP-

1/MMP-1 也明显低于模型组,说明苦参素通过调节 TIMP-1/MMP-1 来实现对 ECM 合成和降解不平衡的纠正,从而起到抗肝纤维化的作用。

前期的研究表明,苦参素能抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),结缔组织生长因子(CTGF)蛋白表达,从而减缓肝星状细胞(HSC)激活与增殖,促进 ECM 分解,起到抗肝纤维化的作用<sup>[5]</sup>,说明苦参素抗肝纤维化机制是多方面的,这为临床应用提供了科学依据。

#### [参考文献]

- [1] 袁建,杨宇. 基质金属蛋白酶-1、基质金属蛋白酶抑制剂-1 与肝纤维化的中医治疗[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2010,31(5):106.
- [2] 李葳,刘晓彦,刘娅. 苦参素抗肝纤维化作用的临床观察[J]. 宁夏医科大学学报,2009,31(5):585.
- [3] 胡彦武,孙罡. 苦参碱类成分抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 食品与药品,2006(7):14.
- [4] Murawaki Y, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1[J]. Clinica Chimica Acta, 1999, 281: 109.
- [5] 杨华,张知贵,封家福,等. 苦参素对肝纤维化大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B 和 CTGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):245.

[责任编辑 何伟]