

扶正化癥方对纤维化肝脏 MMP-2 活性 及 IV 型胶原表达的影响

崔红燕^{1,2}, 姜哲浩¹, 陆 雄³, 刘 成¹, 刘成海^{1*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203; 2. 上海中医药大学药理教研室, 上海 201203;
3. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 探讨扶正化癥方影响基质金属蛋白酶-2 活性和 IV 型胶原蛋白表达的抗肝纤维化作用机制。方法: 二甲基亚硝胺腹腔注射 4 周诱导大鼠肝纤维化模型, 成模后治疗组以扶正化癥方灌胃 4 周。检测血清肝功能、肝脏病理学、羟脯氨酸含量; 免疫组织化学方法检测肝组织 IV 型胶原表达; Western 印迹法分析肝组织 IV 型胶原、基质金属蛋白酶-2/9 (matrix-metalloproteinases-2, MMP-2/9)、金属蛋白酶组织抑制物-2 (tissue inhibitors of metalloproteinase-2, TIMP-2) 表达水平; 明胶酶图法检测肝组织 MMP-2/9 活性。结果: 与正常大鼠比较, 模型大鼠血清肝功能异常、肝组织炎症明显、肝组织 IV 型胶原表达与沉积增加, TIMP-2 蛋白表达增加, MMP-2 蛋白表达变化不明显, 而 MMP-2 活性水平明显上升。扶正化癥方显著减轻肝脏炎症和胶原沉积; 减少 IV 型胶原蛋白表达和沉积; 降低 TIMP-2 蛋白表达; 抑制 MMP-2 活性。结论: 扶正化癥方可通过抑制肝脏 IV 型胶原病理增生沉积、下调 MMP-2 活性水平、减轻肝组织的破坏与重构而发挥抗肝纤维化的作用。

[关键词] 扶正化癥方; 基质金属蛋白酶-2; IV 型胶原; 肝纤维化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)07-0043-05

The Effects of Fuzheng Huayu Recipe on Collagen IV Expression and MMP-2 Activity in Rat Fibrotic Liver

CUI Hong-yan^{1,2}, JIANG Zhe-hao¹, LU Xiong³, LIU Cheng¹, LIU Cheng-hai^{1*}

(1. Institute of Liver Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, ShuGuang Hospital, Shanghai 201203, China; 2. Department of Pharmacology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. The Experimental Center of Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Fuzheng Huayu recipe (FZHY recipe) on collagen IV expression and matrix-metalloproteinases-2 (MMP-2) activity, explore the mechanisms of the recipe action against liver fibrosis. **Methods:** Liver fibrosis was induced by intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine (DMN). The rats in FZHY group were administered with FZHY recipe ig for 4 weeks after the model was established. Serum ALT, AST activities, total bilirubin and Alb levels were determined using commercial kits; serum hepatic inflammation and collagen deposition were evaluated with HE staining and Sirius-red staining respectively; the contents of hepatic hydroxyproline (Hyp) were measured by Jamall's method. expression of collagen IV in liver tissue was analyzed by immunohistochemistry; the protein expressions of collagen IV, MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 were analyzed by Western

[收稿日期] 2007-11-05

[基金项目] 上海市教委曙光计划资助项目(99SG44); 上海市科委重点基础项目(04JC14069); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0437); 上海市教育委员会 E 研究院建设计划(E00308)与上海市重点学科建设项目(Y0302)部分资助

[通讯作者] * 刘成海, Tel: (021) 51328888-8111; E-mail: chenghai_liu@yahoo.com.cn

blotting; and the activities of MMP-2/9 were analyzed by gelatin zymography. **Results:** Abnormal liver function, obvious hepatic inflammation, excess collagen deposition, high protein expressions of collagen IV and TIMP-2, and increased activities of MMP-2 were observed in model group, compared with those in normal group. Compared to model group, FZHY recipe significantly alleviated liver inflammation and the excess collagen deposition; Also it significantly down-regulated protein expression of collagen IV and TIMP-2, and inhibited the activity of MMP-2. **Conclusion:** The mechanisms of FZHY recipe action against liver fibrosis were related to inhibiting the excessive deposition of collagen IV and down-regulating MMP-2 activity in liver tissue.

[**Key words**] FZHY Recipe; MMP-2; Type IV Collagen; Liver Fibrosis

扶正化癥方(FZHY)胶囊与片剂是抗肝纤维化常用中成药^[1]。既往研究曾发现该方有抗肝细胞过氧化损伤、抑制肝星状细胞活化等作用^[2,3],对基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)活性影响尤其是基膜型MMPs的活性影响尚不清楚。肝纤维化的病理特点在于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度增生沉积,而ECM代谢主要由MMPs调控。因此,本文探讨扶正化癥方对基膜型MMPs-MMP-2活性,及其基膜型胶原-IV型胶原表达的影响,以期从ECM代谢调节角度进一步了解扶正化癥方抗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠 37 只,清洁级,体重(150±10)g,中科院上海实验动物中心提供。

1.2 药物 扶正化癥方,每剂组成为:丹参 8 g、发酵虫草菌粉 4 g、桃仁 2 g、松花粉 2 g、绞股蓝 6 g、五味子 2 g。主要工艺:丹参、桃仁、绞股蓝,加水煎煮两次,合并煎液,静置 24 h,取上清液,在(50~55)℃条件下浓缩至相对密度为 1.20 的浸膏,冷却,在搅拌中缓缓加 95% 乙醇使含醇量至 70%,沉淀过滤,滤液浓缩至相对密度 1.3~1.4,减压干燥成干膏;另取发酵虫草菌粉、五味子加 70% 乙醇热回流 2 次,合并回流液,过滤,滤液浓缩至相对密度 1.3~1.4,减压干燥;另取处方量松花粉,加 50% 乙醇,水浴 40℃,在搅拌下提取 2 次,合并提取液,滤过,滤液在(50~55)℃条件下浓缩至相对密度 1.3~1.4,减压干燥。主要质控指标:1 剂处方所含成分(HPLC 测定),丹参素钠不低于 16.5 mg;腺苷不低于 6 mg;丹酚酸 B 不少于 15.6 mg;五味子乙素不少于 2.28 mg。该浸膏干粉由上海现代中医药技术发展公司提供,稀释为含生药 0.46 g·mL⁻¹的浸膏灌胃液。

1.3 试剂 二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)购自日本东京化成工业株式会社;羟脯氨酸

(hydroxyproline, Hyp)标准品,分析纯,日本ナカライテスケ株式会社产品;兔抗人 MMP-2 多克隆抗体,购自武汉博士德生物工程公司;小鼠抗人 MMP-9 和金属蛋白酶组织抑制物-2(tissue inhibitors of metalloproteinase-2, TIMP-2)单克隆抗体,小鼠抗人 IV 型胶原单克隆抗体,美国 NeoMarker 公司产品;辣根过氧化物标记驴抗兔抗体和辣根过氧化物标记驴抗鼠抗体,美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品;明胶,美国 Amersco 公司产品。

2 方法

2.1 模型制备 参考文献并改进^[4],即大鼠以 DMN 10 mL·kg⁻¹腹腔注射,每周连续 3 d,1 次/d,共 4 周。正常组给予等量生理盐水。

2.2 分组与给药 大鼠随机分为正常组、模型组和治疗组。大鼠 4 周造模成型后,治疗组以扶正化癥方生药 4.6 g·kg⁻¹(相当于 60 kg 成人剂量的 10 倍)灌胃,1 次/d,共 4 周。正常组和模型组灌以等量生理盐水。

2.3 肝脏组织病理学观察 HE 染色和天狼猩红胶原染色,光镜观察。

2.4 血清肝功能测定 试剂盒方法检测血清 ALT 活性、AST 活性、Alb 和 T Bil 水平。

2.5 肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量测定 盐水水解法,参照 Jamall 氏法^[5]。

2.6 肝组织 IV 型胶原、MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 蛋白表达水平分析 蛋白印迹法。100 mg 肝组织置于 0.1 mL RIPA 裂解液(20 mmol·L⁻¹ NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mmol·L⁻¹ Tris, 5 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mmol·L⁻¹ PMSF)中裂解蛋白,测定裂解液总蛋白含量。取含 30 μg 总蛋白含量的裂解液进行 10% SDS-PAGE 电泳。经硝酸纤维素膜转移。5% 脱脂奶粉 TBS-T(TBS+ 1% Tween 20)封闭后,分别与 IV 型胶原(1:100)、MMP-2(1:133)、MMP-9(1:100)和 TIMP-2(1

像分析目的条带光密度。

2.7 肝组织 MMP-2/9 活性检测 采用明胶酶图法^[6]。取 100 mg 肝组织置 0.9 mL 匀浆缓冲液(1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, pH7.0)中匀浆。取含 30 μg 总蛋白的匀浆液进行含 0.1% 明胶的 8% SDS-PAGE 还原、非变性电泳。电泳结束后,凝胶置于洗脱液(2.5% Triton X-100, 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1 μmol·L⁻¹ ZnCl₂, pH7.6)中洗脱 2 次,每次 45 min;再以漂洗液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1 μmol·L⁻¹ ZnCl₂, pH7.6)漂洗 2 次,每次 30 min。其后,将凝胶置于孵育液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1 μmol·L⁻¹ ZnCl₂, 0.02% Brij 35, pH7.6)中 37 °C 孵育 18 h。孵育结束后经考马斯亮蓝染色液染色,可显示出 MMP-2 和 MMP-9 位于蓝色背景上的透亮带。电泳凝胶在灰阶

2.8 统计学方法 计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,计算机统计软件 SPSS 10.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,LSD 程序进行两组比较, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

3 结果

3.1 扶正化痰方对模型大鼠肝脏炎症与纤维化的影响 病理组织染色发现:与正常组比较,模型大鼠肝组织汇管区与纤维间隔内有单核细胞和淋巴细胞等浸润,胶原纤维明显增生沉积,部分可见完全纤维间隔与假小叶;生化检测发现模型组大鼠肝组织 Hyp 水平较正常组明显升高;血清 ALT 和 AST 活性明显升高,TBil 与 Alb 变化不明显。与模型组比较,扶正化痰方组大鼠肝组织炎性细胞浸润与坏死明显减轻,胶原纤维沉积减少;肝组织 Hyp 含量显著降低,表 1。

Table 1 Effect of FZHY recipe on serum liver function and hepatic Hyp content in fibrotic rats($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose(g·kg ⁻¹)	n	ALT(U·L ⁻¹)	AST(U·L ⁻¹)	TBIL(μmol·L ⁻¹)	Alb(mg·L ⁻¹)	Hyp(μg·g ⁻¹)
Normal	—	5	45.51 ± 7.62 ²⁾	134.91 ± 29.07 ²⁾	1.01 ± 0.18	34.80 ± 3.12	130.55 ± 18.84 ¹⁾
Model	—	18	79.59 ± 13.80	176.22 ± 17.27	1.07 ± 0.21	33.50 ± 2.04	163.59 ± 31.47
FZHY	4.6	14	72.63 ± 11.58	169.21 ± 9.92	0.98 ± 0.18	33.92 ± 2.55	137.78 ± 29.11 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs. Model.

3.2 扶正化痰方对模型大鼠 IV 型胶原蛋白表达的影响 蛋白印迹检测发现:与正常组比较,模型组大鼠肝组织 IV 型胶原表达明显增加,而扶正化痰方明显降低模型大鼠肝组织异常升高 IV 型胶原蛋白的表达(图 1)。免疫组织化学染色同样发现,模型组大鼠肝组织 IV 型胶原沉积明显增加,而扶正化痰方减少纤维化肝脏的 IV 型胶原沉积。(图 2)

3.3 扶正化痰方对模型大鼠 MMP-2/9 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 MMP-2 蛋白表达变化不明显,MMP-9 蛋白表达显著升高,与模型组相比,扶正化痰方对纤维化肝脏的 MMP-2 蛋白表达无明显影响,但降低其 MMP-9 表达。(图 3)

3.4 扶正化痰方对模型大鼠肝组织 MMP-2 和 MMP-9 活性的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织 MMP-2 活性,尤其是活化型 MMP-2(62 kDa)活性显著上升,MMP-9 活性也明显升高。扶正化痰方组显著降低模型大鼠肝组织 MMP-2 活性、尤其是活化型 MMP-2 活性水平,对 MMP-9 活性也有一定抑制作用。(图 4)

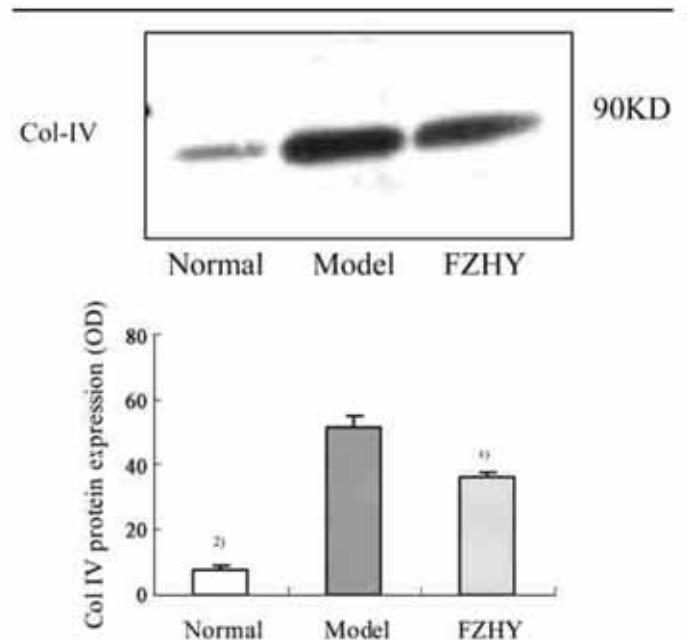


Fig. 1 Effect of FZHY recipe on hepatic type IV collagen protein expression in fibrotic rats, with western blot.

The test was replicated 3 times ($n = 3$),

the semi-quantification results:

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs. Model.

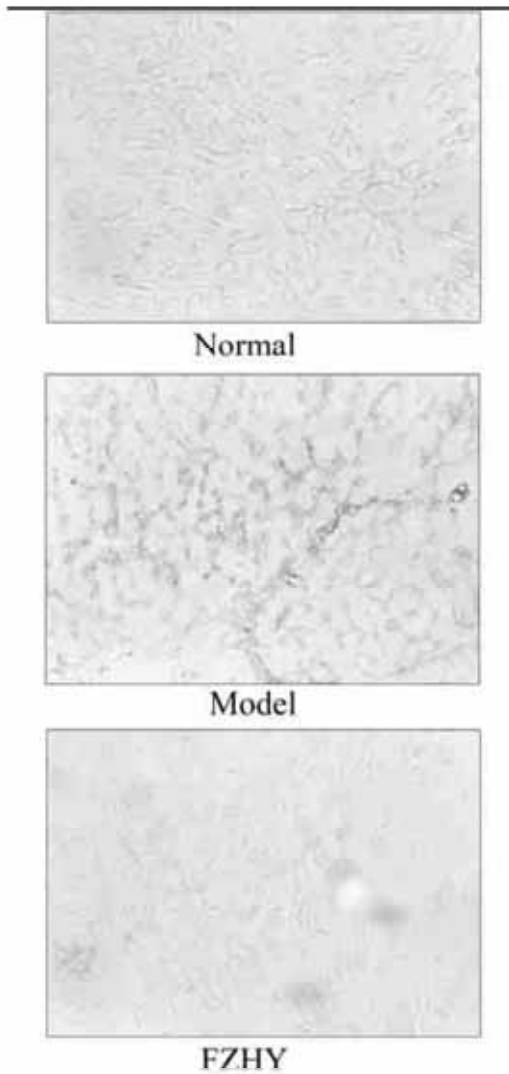


Fig. 2 The effect of FZHY recipe on hepatic type IV collagen deposition in model fibrotic rats, Immunohistochemistry ($\times 200$).

3.5 扶正化癥方对肝组织 TIMP-2 蛋白表达的影响
与正常组比较,模型组大鼠肝组织 TIMP-2 蛋白表达明显升高,扶正化癥方组明显减少模型大鼠肝组织的 TIMP-2 蛋白表达。(图 5)

4 讨论

肝纤维化以胶原等 ECM 成分的过度增生与沉积为特征,而胶原代谢主要由 MMPs 调节。胶原具有间质型与基膜型等不同型别,肝纤维化时 I 型胶原为主的间质型胶原的增生沉积增多已是共识^[7],但对于基膜型胶原-IV 型胶原在肝纤维化中的变化与作用,尚有不同认识。有学者认为肝纤维化时 IV 型胶原减少^[8],被增生的 I 型胶原所取代,从而形成肝窦毛细血管化与肝纤维化。但我们与其他学者发现^[9,10],无论免疫组化病理染色还是蛋白印记生化分析,纤维化大鼠肝组织的 IV 型胶原蛋白表达均明显增加,可见于肝窦及小叶内,说明肝纤维化时 IV 型胶原与其他类型胶原一样是增加的。本实验再次证

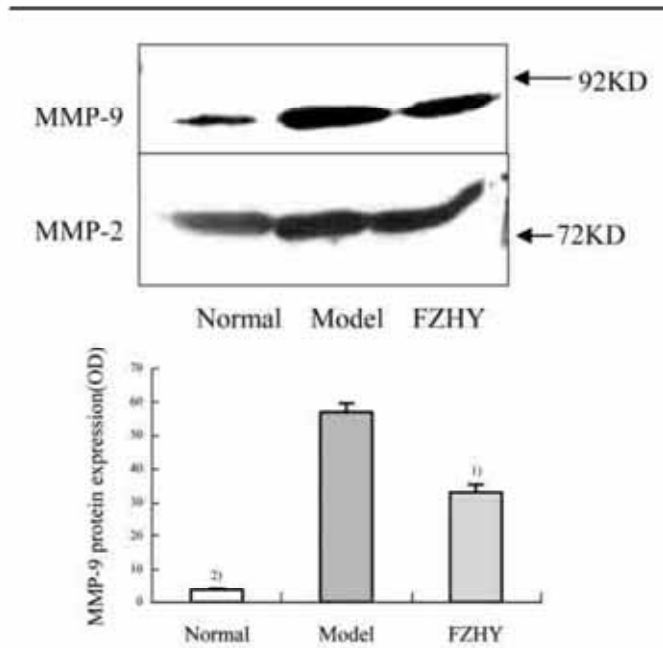


Fig. 3 Effect of FZHY recipe on hepatic MMP-9 protein expression in fibrotic rats, With western blot. The test was replicated 3 times ($n = 3$), the semi-quantification results: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs. Model.

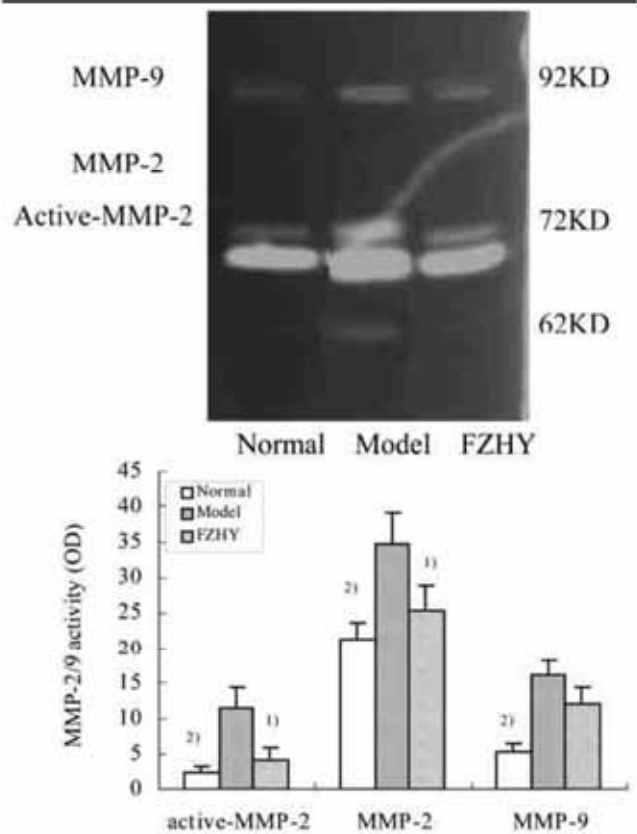


Fig. 4 Effect of FZHY recipe on hepatic MMP-2/9 activity in fibrotic rats with gelatin zymography (Left), and figure of MMP-2/9 activity (Right). The test was replicated 3 times ($n = 3$), the semi-quantification results: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs. Model.

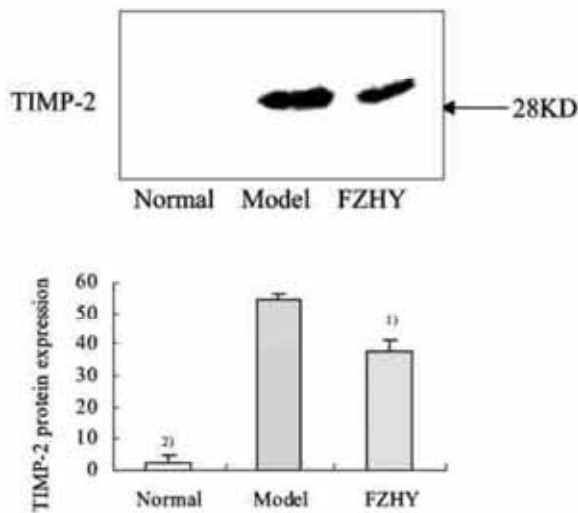


Fig. 5 Effect of FZHY recipe on hepatic TIMP-2 protein expression in fibrotic rats with western blot (Left), and figure of TIMP-2 expression (Right). The test was replicated 3 times ($n=3$), the semi-quantification results: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs. Model.

实纤维化肝脏 IV 型胶原表达增加,且同时其降解酶——MMP-2 活性也增加,提示纤维化病理中既存在正常 IV 型胶原的降解,又存在 IV 型胶原的异常增生,IV 型胶原的破坏与沉积同时存在,促进肝组织重构与纤维化。扶正化癆方明显减轻肝脏炎症,减少肝组织胶原生成沉积,同样抑制 IV 型胶原表达。结合我们既往结果^[11],提示扶正化癆方不仅抑制间质型胶原生成,也同时通过减少肝组织基膜型胶原表达,而发挥抗肝纤维化作用。

肝脏 MMP-2 主要来源于肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC), 其活性水平与肝脏炎症过氧化损伤等密切相关^[12], 而 MMP-2 活性上升则导致正常基膜成分的降解, 破坏正常肝组织微环境, 促进 HSC 活化与肝纤维化。实验中扶正化癆方抑制 MMP-2 尤其是活性型 MMP-2 水平, 提示该方可防止肝组织正常基膜结构与微环境的破坏, 阻止肝纤维化的进一步发展。MMP-9 主要由库弗细胞分泌, 也与炎症相关, 其与纤维化的关系尚在进一步研究中, 实验中扶正化癆方对其蛋白表达与活性不同程度抑制, 可能与该方抗炎作用有关。MMP-2 活性调控主要与其蛋白表达水平、抑制物——TIMP-2 表达等有关, TIMP-2 对 MMP-2 的活性调节作用复杂^[13]: 高浓度时抑制 MMP-2 活性, 低浓度时促进 MMP-2 活性, MMP-2 酶原的活化有赖于 TIMP2 作为桥接分子, 与 MT-MMP 连接而被激活。纤维化肝脏 MMP-2 活性增加,

除与肝脏炎症 HSC 活化与 MMP-2 蛋白表达增加等有关外, 与 TIMP-2 表达增加也密切相关。而扶正化癆方可改善肝脏炎症、抑制 HSC 活化^[2,3]、抑制 MMP-2 与 TIMP-2 蛋白表达, 这些作用是该方下调纤维化肝组织 MMP-2 活性的重要机理。

总之, 本实验发现扶正化癆方可通过抑制纤维化肝脏 IV 型胶原病理增生与 MMP-2 活性而发挥其抗肝纤维化的作用。

[参考文献]

- [1] 刘平, 胡义扬, 刘成, 等. 扶正化癆胶囊干预慢性乙型肝炎肝纤维化作用的多中心临床观察[J]. 世界科学技术·中医药现代化, 2005, 7(1): 24-32.
- [2] 刘成海, 陈文惠, 刘平, 等. 二甲基亚硝胺致大鼠脂质过氧化变化与药物干预作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(suppl): 18-20.
- [3] 刘成, 姜春萌. 扶正化癆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.
- [4] Alakokko L, Pilaianemi T, Myers J, et al. Gene expression of type II, III and IV collagen in hepatic fibrosis induced by diethylnitrosamine in the rat[J]. Biochem J, 1987, 244: 75.
- [5] Jamall IS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[J]. Analytical biochemistry, 1981, 112: 70-75.
- [6] Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases[J]. Anal Biochem, 1994, 218: 325.
- [7] Milani S, Herbst H, Schuppan D, et al. Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver[J]. Am J Pathol, 1990, 137(1): 59-70.
- [8] Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1999, 14(7): 618-33.
- [9] 陆雄, 刘成海, 徐光福, 等. 大鼠肝纤维化形成过程中肝窦壁层粘连蛋白及 IV 型胶原蛋白的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(3): 260.
- [10] 王宪波, 刘平, 唐志鹏, 等. 肝窦毛细血管化的形成机制研究[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(5): 289-292.
- [11] 崔红燕, 姜哲浩, 刘成, 等. 扶正化癆方对肝纤维化大鼠间质性基质金属蛋白酶活性的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(3): 35-38.
- [12] Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism[J]. Hepatology, 2005, 41: 1074-1084.
- [13] 崔红燕, 刘成, 刘成海. 基质金属蛋白酶与肝纤维化的研究进展[J]. 国外医学·消化系疾病分册, 2003, 23: 37-40.