

• 方药研究 •

肝纤维化不同证型与基质金属蛋白酶 及其抑制因子表达的关系

徐珊¹ 周敏² 包剑锋² 张永生¹

(1. 浙江中医药大学科研处, 杭州市滨文路 548 号, 310053; 2. 浙江中医药大学 2005 级博士研究生)

[摘要] **目的** 观察肝纤维化不同证型与基质金属蛋白酶(MMPs)及其抑制因子的关系。**方法** 清洁级雄性SD大鼠140只,依随机数字表法分为4组:正常对照组20只、单纯肝纤维化组30只、肝纤维化肝郁脾虚证组、肝纤维化气虚血瘀证组各45只。各模型组先用四氯化碳注射法复制肝硬化疾病模型,然后肝郁脾虚证组附加夹尾和大黄灌胃法、气虚血瘀证组附加游泳疲劳法,并以相应药物干预。采用免疫组化法测定肝组织基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)和金属蛋白酶抑制因子2(TIMP-2)水平。**结果** 各模型组肝组织中MMP-2、MMP-9和TIMP-2均较正常组明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),以气虚血瘀组最为明显。**结论** 基质金属蛋白酶及其抑制因子与肝纤维化密切相关,在不同中医证型中表达有差异,可作为肝纤维化中医辨证分型及疗效评价的指标之一。

[关键词] 肝纤维化;组织金属蛋白酶;基质金属蛋白酶抑制因子;肝郁脾虚;气虚血瘀

Relationship Among Matrix Metalloproteinases Its Inhibitory Factor and Different TCM Syndromes of Liver Fibrosis

XU Shan¹, ZHOU Min², BAO Jianfeng², et al.

(1. Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053; 2. Doctoral Students of 2005, Zhejiang University of TCM)

ABSTRACT **Objective** To observe the different expressions of matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibitory factor in different TCM syndromes of liver fibrosis. **Methods** The 140 male SD rats were randomized into 4 groups: 20 in normal control group, 30 in simple liver fibrosis group, 45 in liver fibrosis liver stagnation and spleen deficiency group, and 45 in liver fibrosis qi deficiency and blood stasis group. All rats of model groups were treated by CCl₄ to establish the liver fibrosis models first, and the rats of liver stagnation and spleen deficiency group were treated by stimulating tails with forceps and gastric infusion of rhubarb decoction, and the rats of qi deficiency and blood stasis group were treated by the method of swimming-fatigue. Then each group was intervened by the relevant medicine. After treatment, the Matrix Metalloproteinases-2 (MMP-2), Matrix Metalloproteinases-9 (MMP-9) and Tissue Inhibitors of Metalloprotenas-2 (TIMP-2) of liver were examined. **Results** The MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 of model groups were significantly higher than those of the control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the increase of those of qi deficiency and blood stasis group were most obvious. **Conclusion** The MMPs and inhibitory factor closely relate with liver fibrosis, their expression in different TCM syndromes is different, serving as one of indexes for differentiation of TCM syndromes and evaluating therapeutic effect.

Key Words Liver fibrosis; MMPs; TIMPs; Liver stagnation and spleen deficiency, Qi deficiency and blood stasis

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理学基础,其主要原因在于肝损伤期间细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)的沉积和降解间的动态平衡被打破,而细胞外基质的特异性降解酶是基质金属蛋白酶(MMPs)。研究表明MMPs随着肝纤维化进展呈动态变化,其活性可被组织金属蛋白酶抑制物(TIMPs)抑制^[1]。中医药对肝纤维化的治疗取得了较好的效果,但其作用的机制、靶点尚有待进一步研究,因此本实验通过研究基因蛋白的表达与肝纤维化的肝脏损害和炎症,及肝纤维化中医辨证分型的关系,为中医药阻止或

逆转肝纤维化向肝硬化的发展提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级雄性SD大鼠140只,体重(200±20)g。由浙江中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证:SCXK(沪)2003-0003;动物实验条件合格证:SYXK(浙)2003-0003。依随机数字表法分为4组:正常对照组(20只)、单纯肝纤维化组(30只)、肝纤维化肝郁脾虚证组(45只,以下简称“肝郁脾虚组”)、肝纤维化气虚血瘀证组(45只,以下简称“气虚血瘀组”)。

1.2 主要药品及试剂

四氯化碳(CCl₄, 上海凌峰化学试剂有限公司生

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金项目计划(2005A077)

通讯作者:徐珊, xushanhz@163.com, (0571) 86613538

产,批号:050322),临用时与橄榄油按 4:6 比例配制成混合溶液;橄榄油(国药集团化学试剂有限公司生产,批号:F20040614);大黄(购自浙江中医药大学第二门诊部)制粉,水浴浓缩为 2g/ml,4℃ 冷藏备用;逍遥丸(杭州胡庆余堂药业有限公司生产,批号:20050101);扶正化瘀胶囊(上海黄海制药有限责任公司生产,批号:20050501);兔抗人、兔、小鼠、大鼠基质金属蛋白酶 2(MMP-2)多克隆抗体(1:50),兔抗人、小鼠、大鼠基质金属蛋白酶 2(MMP-9)多克隆抗体(1:70),兔抗人、兔、小鼠、大鼠组织金属蛋白酶抑制剂 2(TIMP-2)多克隆抗体(1:60,均购自博士德公司;二抗(编号:PV-6000,品名:PicTureTM,美国 Zymed 公司)。

1.3 主要仪器

隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS-35×40,上海),组织切片机(Leitz 1512 型,上海),偏光摄像显微镜(Leica DMLB,德国),彩色病理分析系统(HPIAS-1000 型,武汉)。

1.4 动物模型制备

1.4.1 单纯肝纤维化模型的建立^[2] 将 CCl₄ 与橄榄油按 4:6 比例配成 40% 油剂。按每 100g 体重 0.3ml 剂量皮下注射,每周 2 次。6 周后据随机抽取大鼠 10 只处死,取肝组织行病理观察,按实验动物肝纤维化组织学 VI 级标准进行肝纤维化程度评判^[3],示模型制备成功。治疗期间继续使用 CCl₄ 维持至实验结束。

1.4.2 中医病证结合模型的建立 在单纯肝纤维化造模的基础上,肝郁脾虚证组第 4 周始加用慢性夹尾激怒加高浓度大黄灌胃法造模,共 2 周,至出现肝郁脾虚的证候群^[4];气虚血瘀组除用 CCl₄ 造模不变外,第 4 周始加用游泳疲劳试验,共 2 周^[5,6]。6 周后各组鼠处死 10 只,其余各组大鼠造模法(包括病证结合造模法)不变的情况下,予相应药物及生理盐水干预。

1.5 药物干预

药物用生理盐水溶解,肝郁脾虚证治疗组按 0.95g/kg 体重灌服逍遥丸,气虚血瘀证治疗组按 0.48g/kg 体重灌服扶正化瘀胶囊,正常对照组和单纯模型组全部以生理盐水 2ml 灌胃,以上干预均为每天 1 次,连续 3 周。

1.6 标本的采集和处理

干预结束后处死全部大鼠,处死前禁食 12h,采用 1% 戊巴比妥按 35mg/kg 注射麻醉,四肢固定于手术台上。剪开腹腔,取大鼠肝脏右叶,立即用 10% 中性磷酸缓冲液(PBS)甲醛液中固定 24h,余组织液氮冷冻备份。

1.7 检测指标

采用免疫组化法观察各组大鼠肝组织 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 蛋白表达情况,并进行组间比较。以已知的阳性切片作阳性对照,以 PBS 作为一抗作阴性对照。细胞浆表达者以细胞浆呈棕黄色或棕褐色为阳性细胞。蛋白表达的定量结果用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统在低倍镜下计算阳性面积百分比(%),每张切片随机选取 5 个视野,求平均值。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计分析软件处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,当方差齐时采用(One-Way ANOVA)单因素方差分析 S-N-K 检验,当方差不齐时采用 Dunnett's T³ 检验。

2 结果

2.1 中药干预前各组间 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 阳性面积率比较

表 1 结合病理图像分析显示,MMP-2 在正常大鼠肝脏呈低水平表达,表达定位于肝细胞浆和肝窦旁细胞。MMP-2 在各模型组表达强烈,阳性信号呈现为棕褐色颗粒状,主要表达在肝细胞浆、肝窦和纤维间隔中。各模型组的 MMP-2 表达较正常对照组明显增强($P < 0.05$);与单纯肝纤维化组、肝郁脾虚组比较,气虚血瘀组表达最强烈($P < 0.05$),尤其是在纤维间隔的表达;肝郁脾虚组和单纯肝纤维化组的表达面积相似($P > 0.05$)。MMP-9 在正常大鼠肝脏呈低水平表达,表达定位于肝细胞浆和肝窦旁细胞。肝纤维化组大鼠肝组织中 MMP-9 表达在肝细胞浆、肝窦和纤维间隔中。各模型组 MMP-9 表达较正常对照组明显增强($P < 0.01$);其中气虚血瘀组 MMP-9 水平升高最明显,与单纯肝纤维化组、肝郁脾虚组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。单纯肝纤维化组与肝郁脾虚组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。TIMP-2 在正常大鼠肝脏呈低水平表达,表达定位于肝细胞浆和肝窦旁细胞。肝纤维化模型大鼠肝组织中 TIMP-2 的阳性反应位于窦壁细胞、肝细胞的胞浆,未见细胞核着色。各模型组的 TIMP-2 表达较正常对照组明显增

表 1 药物干预前(造模 6 周时)各组大鼠 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 阳性面积率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MMP-2 阳性 面积率	MMP-9 阳性 面积率	TIMP-2 阳性 面积率
正常对照组	10	1.97±0.64	1.54±0.61	2.39±0.76
单纯肝纤维化组	10	6.97±1.95△*	5.70±1.57△**	5.28±1.18△*
肝郁脾虚组	10	7.25±2.01△*	5.83±2.77△*	5.45±1.22△**
气虚血瘀组	10	9.54±1.56△*	8.59±1.82△*	7.75±1.78△*

注:与气虚血瘀组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常对照组比较,△ $P < 0.01$

表2 药物干预后(造模9周时)各组间MMP-2、MMP-9、TIMP-2 阳性面积率比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MMP-2 阳性面积率	MMP-9 阳性面积率	TIMP-2 阳性面积率
正常对照组	10	2.35±0.86	1.82±0.81	2.64±0.95
单纯肝纤维化组	15	12.26±1.07△	7.54±1.45△	8.17±1.21△
肝郁脾虚对照组	13	10.96±2.89△	7.27±1.21△	8.44±1.81△
肝郁脾虚治疗组	10	7.09±1.66△▲	5.56±0.83△▲	5.83±1.90△▲
气虚血瘀对照组	12	14.76±6.02△	10.55±2.58△	11.48±4.16△
气虚血瘀治疗组	12	9.55±3.2△*	6.98±1.58△*	7.68±2.08△*

注:与气虚血瘀对照组比较,* $P<0.01$;与正常对照组比较,△ $P<0.01$;与肝郁脾虚对照组比较,▲ $P<0.05$

强($P<0.01$),其中气虚血瘀组TIMP-2 水平升高最明显,与单纯肝纤维化组、肝郁脾虚组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。单纯肝纤维化组与肝郁脾虚组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 中药干预后各组间MMP-2、MMP-9、TIMP-2 阳性面积率的比较

表2 结合病理图像分析显示,随着肝纤维化的发展,各模型组MMP-2 的阳性着色逐渐加强,至肝纤维化中晚期着色区域最广,着色最深;两个治疗组MMP-2、MMP-9、TIMP-2 阳性面积率较阴性对照组都有明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各模型组MMP-9 的表达持续增高。各模型组TIMP-2 的表达持续增高,并保持高水平直至实验结束。

3 讨论

肝纤维化的形成实质上是肝脏的创伤愈合反应的结果,其特征是细胞外基质合成和降解失衡的结果^[7]。MMPs 是一组锌离子依赖酶,几乎能降解除多糖以外的所有ECM 成分,并能使其他MMPs 激活,形成瀑布效应^[8]。MMP-2、MMP-9 主要参与基底膜型胶原的代谢,降解正常肝窦基底膜,破坏肝脏细胞生存的内环境,有利于肝星状细胞(hepaticstellatecell, HSC) 激活,与肝纤维化的发生发展紧密相关。

MMP-2 是肝组织内Ⅳ型胶原酶,主要参与基底膜Ⅳ型胶原的代谢。肝纤维化时,肝内增生的胶原蛋白主要为Ⅰ型、Ⅲ型胶原,Ⅳ型胶原的增生沉积并不占主要地位,但其主要表达于肝血窦基底膜,其过度沉积可使肝血窦毛细血管化,致肝血流和结构改变,影响肝内外物质交换,从而加剧肝脏病变^[9]。本研究结果显示,MMP-2 在正常大鼠肝脏呈低水平表达,各模型组的MMP-2 表达较正常对照组均明显增强,以气虚血瘀组增强最显著,且随着肝纤维化的发展,MMP-2 的表达逐渐增高,与肝纤维化程度一致,说明MMP-2 促进肝纤维化的发生、发展。本研究表明,正常大鼠肝组织MMP-2 表达率极低,气虚血瘀组MMP-2 表达较单纯肝纤维化组及肝郁脾虚组显著升高。

MMP-9 在肝脏的主要细胞来源是Kupffer 细胞,

MMP-9 的表达随Kupffer 细胞的激活而显著增加,它 能被纤溶酶和基质降解素激活。MMP-9 以酶原形式 存在,激活后才能发挥作用,其活性的调节有多种因 素,包括酶原基因表达与调控,酶原的合成与激活以及 抑制因子的作用等。MMP-9 通过降解正常的肝窦基 底膜,破坏肝脏细胞生存的内环境,致使HSC 激活,活 化的HSC 合成间质性胶原增多,从而导致肝纤维化的 Ⅰ型、Ⅲ型胶原特别是Ⅰ型胶原大量沉积,诱发和促进 肝纤维化^[10,11]。本实验结果显示,MMP-9 在正常大鼠 肝脏呈低水平表达,表达定位于肝细胞浆和肝窦旁细 胞。各模型组的MMP-9 表达较正常对照组均明显增 强,其中以气虚血瘀组增强最显著,且随着肝纤维化的 进展,各模型组MMP-9 的表达持续增高。理论上随着 MMP-9 浓度的上升,Ⅰ型胶原的降解增加,肝纤维化 程度应该减轻,但是与实际结果相反。所以,我们认为, 在肝纤维化过程中MMP-9 主要起促进、加重而非逆 转肝纤维化作用。

实验中我们发现,气虚血瘀组MMP-9 的表达明 显增加,且随着造模时间的延长,MMP-9 的表达亦明 显上升,经中药干预后,气虚血瘀治疗组与肝郁脾虚治 疗组中大鼠肝组织MMP-9 的表达较其对照组明显降 低。结果表明,中药的干预对MMP-9 的表达产生一定 影响,为中医证型的客观化和中医治疗本病的疗效评 价提供一定的实验依据。

在慢性肝病和肝纤维化的动物模型中,TIMP-1 和TIMP-2 的表达都显著增高。在肝纤维化发生发展 过程中TIMPs 通过抑制MMPs 活性而发挥重要作用, TIMP-2 对MMP-2、MMP-9 显示出较强的抑制活 性^[12],TIMP-2/MMP-2 系统对Ⅳ型胶原的增生沉积 和降解起着重要的调节作用^[13]。实验观察到模型大鼠 TIMP-2 在肌成纤维细胞中大量表达,并在慢性阶段 持续性增高。各模型组大鼠肝脏中肌成纤维细胞有 TIMP-2 蛋白的高表达,分布在肝细胞胞浆中,未见细 胞核表达,提示在肝纤维化中,肌成纤维细胞是TIMP- 2 表达的主要细胞。实验结果表明,正常大鼠肝组织也 表达水平较低的TIMP-2,肝纤维化各模型组大鼠

TIMP-2 的表达阳性率明显高于正常对照组,表明 TIMP-2 参与肝纤维化的发生和发展。实验结果显示,各模型组的 TIMP-2 表达较正常对照组均明显增强,其中以气虚血瘀组增强最显著,且随着肝纤维化的进展,各模型组 TIMP-2 的表达持续增高,并保持在较高水平。表明 TIMP-2 在肝纤维化发生发展中起重要作用。

综上所述,MMP-2 和 TIMP-2 在对 ECM 的降解上作用相反,但实验观察到二者的表达并非完全相反,故认为肝纤维化的发生发展,乃至肝硬化的形成原因之一可能是 MMP-2 和 TIMP-2 变化的综合结果。有报道,血清中 MMP-2 和 TIMP-2 的浓度与肝组织中二者的表达情况有明显的相关性,故检测血清中 MMP-2 和 TIMP-2 的浓度可以作为肝纤维化的诊断指标^[14]。本实验仅对常见证型作了相关指标的分析,对指导临床还有一定距离。因此我们设想对不施加干预因素的疾病模型上,观察并检测疾病模型是否具备中医证的特点,以更深层次探讨证候的演变过程。

参考文献

[1] Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response[J]. J Hepatol, 1997, 26(3) : 574-583.
[2] 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 20-72.
[3] 王宝恩, 王惠吉, 朱家璇, 等. 中药复方丹参不同剂型治疗肝纤维化的实验研究与临床观察[J]. 肝脏病杂志, 1993, 1(2) : 69-72.
[4] 韩秋艳. 肝郁脾虚证动物模型的建立[J]. 贵阳中医学院学报, 2001, 23(3) : 59.

[5] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 9.
[6] 张红宇, 高菊珍, 张晓华. 补阳还五汤对气虚血瘀证大鼠血液流变学的影响[J]. 云南中医学院学报, 2000, 23(3) : 10-11.
[7] Murawaki Y, Kawasaki H. Pathophysiology of hepatic fibrosis[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1999, 96(10) : 1143-1152.
[8] Watanabe T, Niioka A, Ishikawa A, et al. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat[J]. J Hepatol, 2001, 35(4) : 465-473.
[9] Xu Bo, Broome U, Uzunel M, et al. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis[J]. Am J Pathol, 2003, 163(4) : 1275-1289.
[10] Arthur MJ. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis[J]. Pathol Res Pract, 1994, 190(9-10) : 825-833.
[11] Takahara T, Furuid K, Funaki J, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in experimental liver fibrosis in rats[J]. Hepatology, 1995, 21(3) : 787-795.
[12] 朱跃科, 王宝恩, 贾继东. 基质金属蛋白酶及其组织抑制因子与肝纤维化[J]. 临床和实验医学, 2002, 1(3) : 159-165.
[13] 陆雄, 刘平. 肝纤维化过程中一个重要的病理改变——肝窦毛细血管化[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(1) : 53-54.
[14] Murawaki Y, Yamada S, Ikuto Y, et al. Clinical usefulness of serum matrix metalloproteinase-2 concentration in patients with chronic viral liver disease[J]. J Hepatol, 1999, 30(6) : 1090-1098.
(收稿日期: 2008-03-13; 修回日期: 2009-01-19)
[编辑: 行之]

(上接第 337 页)

虚湿困、湿热困脾、脾虚肝旺、脾肾阳虚、痰浊蒙窍、瘀阻脑窍、胆热痰扰 7 类证型。绝大多数发作性睡病患者具有脾虚的表现, 其中以脾虚湿困证为主要证型(53 例)。脾为后天之本, 脾虚则中气不足, 清阳不升, 清明之府失于清阳之荣, 故发为嗜睡。其余证型分别为湿热困脾(9 例)、脾虚肝旺(8 例)、脾肾阳虚(4 例)、痰浊蒙窍(6 例)、瘀阻脑窍(4 例)、胆热痰扰(5 例)。结果提示本病病机较为复杂, 既有脾肾不足, 尤以脾虚为主的本虚基础, 又存在湿热痰瘀内生, 从而推动病情发展。

本研究以临床症状、舌象、脉象入手, 观察与分析其证候学特点及证类分布特征, 为中医药防治方案提供依据。对证候学演变过程的动态观察和观察指标的进一步量化有待在今后的工作中完善。

参考文献

[1] Han F, Chen EZ, Wei HL, et al. Childhood narcolepsy in North China[J]. Sleep, 2001, 24(3) : 321-324.
[2] 许强华. 发作性睡病的辨治体会[J]. 中医杂志, 2001, 42(6) : 339.
[3] 夏如宁. 辨证治疗发作性睡病 3 则[J]. 山东中医杂志, 2002, 21(6) : 372-373.
[4] 赵忠新. 临床睡眠障碍诊疗手册[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2003: 112-113.
[5] Benca RM. Narcolepsy and excessive daytime sleepiness: diagnostic considerations, epidemiology, and comorbidities[J]. J Clin Psychiatry, 2007, 68(Suppl 13) : 5-8.
[6] 中华人民共和国国家标准·中医临床诊疗术语·证候部分[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 254.
(收稿日期: 2008-06-27; 修回日期: 2009-01-04)
[编辑: 行之]