

实验研究

肝心宁对大鼠肝纤维化 α -SMA、MMP-13
及 TMP-1蛋白表达的影响李志钢¹ 杨晋翔¹ 张伟² 王再谟³ 谢春光³ 段渠³

肝纤维化是肝脏中纤维生成超过了降解,降解细胞外基质(ECM)在肝脏中过度沉积所致,而肝脏星状细胞(HSC)的激活是肝纤维化形成的中心环节,大量研究表明胶原酶、纤溶酶等参与ECM的降解。经临床长期应用已发现,肝心宁可以明显降低血中透明质酸和层粘连蛋白。本研究旨在探讨在大鼠肝纤维化形成过程中肝心宁对肝内纤维组织的形成与 α -SMA、MMP-13及TMP-1蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性SD大鼠68只,体重(160±10)g,购自四川华西医科大学实验动物中心。

1.2 药品及试剂

CCl₄(上海四星医药科技工贸公司出品);精制花生油(山东鲁花集团产品);秋水仙碱(昆明制药有限公司产品),0.5mg/片;肝心宁处方由成都中医药大学王再谟教授惠赠。前药临用前用单蒸水稀释,后药提前按实验需要的剂量煎煮成汤剂。兔抗大鼠 α -SMA多克隆抗体、兔抗大鼠MMP-13多克隆抗体及兔抗大鼠TMP-1多克隆抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司;即用型SP免疫组化试剂盒购自福州迈新试剂公司;DAB购自北京中山生物公司。

1.3 大鼠分组及用药

雄性SD大鼠68只随机分成5组。模型组(M组,15只):采用CCl₄复合造模法,将CCl₄与花生油以4:6配成40%油剂,每隔3天皮下注射40%油剂CCl₄0.3ml/100g体重(首剂CCl₄与花生油以3:1配成75%油剂,皮下注射CCl₄第1次用0.5ml/100g体重),同时采用高脂低蛋白食物(以玉米面为饲料,加0.5%胆固醇,实验第1、2周加20%猪油),30%酒精为唯一饮料;并且每天用蒸馏水灌胃1ml/100g体重。阳性对照组(PC组,14只):CCl₄造模的同时,用秋水仙碱灌胃,每天0.01mg/100g。肝心宁高剂量组(GXNh组,14只):CCl₄造模的同时,用肝心宁灌胃2.6g/100g。肝心宁低剂量组(GXNl组,14只):CCl₄的造模同时用肝心宁灌胃,每天0.65g/100g。正常组(N组,11只):不做药物处理。

1.4 标本的制备

存活大鼠均于第6周末处死取材,每组各随机抽取10份样品进行检测。取同一部位切除的肝脏于10%中性缓冲福尔马林液中固定、酒精梯度脱水、石蜡包埋、切片,厚度为4 μ m,经常规脱蜡脱水,3% H₂O₂去除内源性过氧化物酶,0.1mol/L枸橼酸盐缓冲液微波处理,马血清封闭非特异性抗原,分别滴加兔抗大鼠多克隆抗体 α -SMA(1:150)、MMP-13(1:100)及TMP-1(1:150),4℃过夜,阴性片以PBS代替一抗,后依次加入羊抗兔抗体IgG、辣根酶标记的链霉卵白素工作液进行反应,用DAB显色、脱水、透明,中性树胶封片,分别检测组织中 α -SMA、MMP-13及TMP-1的表达情况,阳性片细胞胞浆中出现棕黄色,阴性片无着色。

1.5 免疫组化结果判定

采集 α -SMA、MMP-13及TMP-1免疫组织化学染色图像,用Image-Pro Plus分析软件进行图像分析,每张切片取5个视野测定 α -SMA、MMP-13及TMP-1蛋白阳性产物的积分光密度值(IOD值),取平均值代表 α -SMA、MMP-13及TMP-1蛋白表达强度,IOD值越大表示阳性产物表达越强。

1.6 统计学方法

用SAS 9.0软件包统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数两两比较用单因素方差分析, LSD法,用Spearmann法进行相关性检验。

2 结果

2.1 α -SMA的表达

N组可见血管壁少量 α -SMA阳性表达;M组 α -SMA阳性表达细胞数明显增多,胞浆呈棕黄色,有的细胞有2~3个较长突起,主要分布于门静脉、汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦;GXNh、GXNl和PC组汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦阳性细胞数目显著减少,胞浆阳性染色显著减轻,与M组相比有统计学意义($P < 0.05$);GXNl组与PC组相比无统计学差异($P > 0.05$);GXNh组与GXNl组和PC组相比有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 MMP-13的表达

N组MMP-13在汇管区的血管壁和胆管壁周围有阳性染色。M组阳性染色多集中于纤维间隔、中央静脉周围、肝窦处的间质细胞胞浆棕黄色着色明显可见,而在

GXNh、GXNI和 PC组,尤以纤维间隔及肝窦处的间质细胞胞浆棕黄色着色明显增多,与 M组相比,MMP-13的表达显著升高($P<0.05$)。GXNI组与 PC组相比无统计学差异($P>0.05$);GXNh组与 GXNI组和 PC组相比有统计学差异($P<0.05$)。

2.3 TMP-1的表达

TMP-1在 N组汇管区的血管壁和胆管壁周围有少量阳性染色。M组 TMP-1阳性染色表达部位和 MMP-13组一致,与 N组相比有统计学差异($P<0.05$)。GXNh、GXNI和 PC组仅见汇管区和纤维间隔中有少量较淡的阳性染色,与 M组相比表达明显下降($P<0.05$)。GXNI组与 PC组相比无统计学差异($P>0.05$);GXNh组与 GXNI组和 PC组相比有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨论

MMP-13或胶原酶 3属于中性蛋白酶一族,需锌离子的激活,专门降解 I、III型间质胶原酶,胶原酶活性的正常调控受到破坏可促进肝纤维化的进展,而造成肝纤维化、肝硬化形成的主要原因之一是特异性降解 I、III型胶原的间质胶原酶在纤维化进展期活性下降所致。TMP-1则为 MMP-13的抑制物。MMP-13与 TMP-1在肝纤维形成过程中主要由激活的 HSC分泌。Iredale^[9]等认为肝纤维化过程中 TMP-1与 MMP-13动态平衡破坏即前者升高后者降低的结果是促进了胶原纤维的累积并促进肝纤

维化的发展,我们发现 TMP-1在模型组于纤维间隔、中央静脉周围、肝窦处的间质细胞胞浆可见大量棕黄色着色,MMP-13亦可见表达,应用肝心宁后,TMP-1表达明显减少,而 MMP-13表达则显著升高。模型组肝纤维化程度与 TMP-1蛋白表达升高呈正相关,由此可见,CCl₄造模诱导肝纤维化 6周末,TMP的蛋白表达显著升高,而 MMP-13的蛋白表达明显降低,MMP-13/TMP-1的不平衡表达,可能是肝纤维化形成的主要原因。而同时给予肝心宁后,MMP-13则显著升高,TMP-1则明显降低,说明肝心宁可以逆转该不平衡,促进过多 ECM的降解,因此,肝心宁是否对 MMP-13有激活作用尚未知,但我们认为不能排除这种可能性。对模型组、肝心宁高剂量组及肝心宁低剂量组 α -SMA、MMP-13及 TMP-1三者之间蛋白表达的相关性进行分析表明,各组 α -SMA与 TMP-1二者蛋白表达有正相关,而与 MMP-13蛋白表达呈负相关,由此亦可说明,HSC在肝纤维化形成的过程中发挥着重要作用,而肝心宁使肝纤维化的程度明显减轻很可能是通过抑制 HSC的活化起作用的。

1 北京中医药大学东直门医院(100700)

2 新疆维吾尔自治区中医医院耳鼻喉科

3 成都中医药大学临床医学院

桑精胶囊对 2型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢的影响

张馨¹ 陆付耳² 邹欣² 徐丽君² 董慧² 杨明炜²

桑精胶囊由桑叶、桑椹、桑枝和桑白皮等药组成,临床用于治疗 2型糖尿病(T2DM)显示出良好的效果。本研究所前期研究证明,桑精胶囊能显著 T2DM 大鼠的胰岛素抵抗(IR)^[1]。为进一步明确其对 T2DM 的治疗效应,本实验主要观察桑精胶囊对 T2DM 大鼠葡萄糖和脂质代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲料

清洁级雄性 Wistar大鼠 60只,约 2月龄,体重 200~220g 购于湖北省实验动物研究中心(许可证号:SCXK(鄂)2007-0005)。基础饲料购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,高脂高热卡饲料按配方(蔗糖:猪油:奶粉:鸡蛋:基础饲料=30:20:4:2:63)配制。

1.2 药物及试剂

桑精胶囊由桑叶、桑椹、桑枝和桑白皮等药按 2:4:2:3比例组成,生药均购于武汉同济医院,水煎醇沉后浓缩成浸膏(1ml浸膏相当于 2g桑精胶囊生药),置 4℃冰箱保存备用。二甲双胍(MF),成都川力制药有限公司

产品(批号:060910),临用前用双蒸水配制成含二甲双胍 61mg/ml的混悬液;链脲佐菌素(STZ),Sigma公司产品(批号:060811);葡萄糖测定试剂盒为北京北化康泰临床试剂有限公司产品;胰岛素放免测定试剂盒为北京北方生物技术研究所产品;甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白 AI(ApoAI)和载脂蛋白 B(ApoB)测定试剂盒均为温州东瓯生物工程有限公司产品;游离脂肪酸(FFA)测定试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 动物造模及分组处理

动物基础饲料适应性喂养 2周后按体质量随机分为正常对照组 10只和造模组 50只。造模方法参考文献[2]并结合本实验室经验^[3],造模组按 25mg/kg剂量经尾静脉注射 STZ溶液 1次,并饲以高脂高热卡饲料。2周后作口服葡萄糖耐量试验(OGTT),50%葡萄糖溶液按 2.2g/kg剂量灌胃,用剪尾法在灌胃前及灌胃后 30、60和 120min从尾静脉采血检测血糖值。筛选糖耐量异常者共