药 学 文章编号:0253-3626(2009)02-0216-05

复元胶囊对肝纤维化大鼠肝脏中的 TIMP-1 和 TGF-β1 表达的影响

熊盛池[1],李荣亨[1],王淑美[2],张素养[1]
(1. 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科,重庆 400016;2. 重庆医科大学中医药学院中医临床教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究复元胶囊对猪血清所致大鼠肝纤维化的保护作用及其机制。方法:将大鼠随机分为正常组,模型组,复元胶囊低、中、高剂量组,阳性对照组(复方鳖甲软肝片水溶液组)6 组,每组 8 只。除正常组外,其余各组用猪血清,0.5 ml/ 只,腹腔注射,每周两次(星期一,星期四)共 10 周,复制大鼠免疫性肝纤维化模型,以此同时给予复元胶囊低、中、高剂量组,阳性对照组相应药物干预。造模、给药结束后观察各组动物的肝组织病理学变化,并检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性,检测血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)及层粘连蛋白(LN)的含量。免疫组化显示基质金属蛋白酶组织抑制因子 1(Tissue inhibitor of metalloproteinases-1,TIMP-1)及转化生长因子 β1(Transforming growth factor β-1,TGF-β1)。结果:复元胶囊组血清中 ALT、AST、HA、LN、IV-C、PCⅢ比模型组低,特别是复元胶囊高剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组 TIMP-1 及 TGF-β1 的表达明显高于复元胶囊组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:复元胶囊对猪血清诱导的大鼠肝纤维化有明显保护作用。

【关键词】复元胶囊;肝纤维化;基质金属蛋白酶组织抑制因子 1;转化生长因子 β1
【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-29

Effects of FuYuan capsule on the expression of TIMP-1 and TGF-β1 in liver of hepatic fibrosis in Rats

XIONG Sheng-chi, et al
(*Department of Traditional Medicine Integrated Western Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of FuYuan capsule on rat liver fibrosis induced by pig serum. *Methods*: The rats were randomly divided into six groups, including the normal group, the model group, the low, middle and high dose FuYuan capsule group, and the positive control group (compound Biejiaruangan-chip solution). The rat models of immune liver fibrosis were induced with pig serum. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected with autoumatic biochemical analyzer.Hyaluronan (HA), laminin (LN). IV collagen (IV-C) and the type Ⅲ collagen (PCⅢ) in serum were quantified by radiative-immune technology.The expression of TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1)and TGF-β1 (transforming growth factor β-1) in the liver were observed by immunohistochemical assay. *Results*: ALT, AST, HA, LN, IV-C and PC Ⅲ in the model group were significantly higher than those in the other groups($P<0.05$), and there were significant difference between the model group and the FuYuan capsule groups($P<0.05$), especially the high-dose group.Compared with that in model group, the expression of TIMP-1 and TGF-β1 in the Fuyuan groups were significantly lower($P<0.05$), especially in the high-dose group. *Conclusion*: The protective effects of FuYuan capsule on the pig serum-induced liver fibrosis are remarkable.

【Key words】FuYuan capsule; Liver fibrosis; Tissue inhibitor of metalloproteinases-1; Transforming growth factor β1

肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一,其病理学基础是肝纤维化,后者是各种损肝因素(如病毒性肝炎,自身免疫性肝炎,酒精性肝炎等)所致慢性肝病发展为肝硬化的必经病理过程。肝纤维化的主要病理变化就是肝细胞外基质(Extra cellular matrix,ECM)在肝脏中过度沉积。现已证实肝星状细胞(Hepatic satellite cells,HSC)大量合成、分泌ECM是肝纤维化发展的核心环节和共同通路[1]。许多因素都参与了 HSC 的调控,其中(组织抑制因子 1(Tissue inhibitor of metalloproteinases-1,TIMP-1)和(转化生

作者介绍:熊盛池(1974-),男,硕士,
研究方向:老年病治疗。
通讯作者:李荣亨,男,教授,E-mail:Lrongheng1231@163.com。
基金项目:重庆市卫生局资助课题([2004]12 号 B-55).

长因子 β1（Transforming growth factor β-1，TGF-β1 是其中两个主要调控因素。而基质金属蛋白酶（MMPs）和基质金属蛋白酶组织抑制因子（TIMPs）二者参与了肝纤维化形成和降解恢复的全过程[2]。TIMP-1 通过抑制 MMP 活性，抑制 HSC 凋亡[3]，导致肝纤维化的形成。TGF-β1 是促进 HSC 活化的最关键因素，它的分泌持续产生结蛋白，间质胶原纤维增加引起纤维束收缩，导致肝小叶结构物和肝脏血流模式的破坏。本实验即通过观察 TIMP-1 和 TGF-β1 的表达分布情况来了解 HSC 活化、增殖情况，进而研究复元胶囊对猪血清所致大鼠肝纤维化的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 48 只雌雄各半 SD 清洁级大鼠，体重 180～200 g，鼠龄 6～7 周，由重庆医科大学动物实验中心提供，许可证号 SYXK（渝）2002007。

1.1.2 实验试剂 血清透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）、Ⅳ型胶原（Ⅳ-C）及Ⅲ型前胶原（PCⅢ）试剂盒（上海海军生物技术研究所），TIMP-1 和 TGF-β1 试剂盒（北京中杉生物技术有限公司）。

1.1.3 实验药物 复元胶囊由鹿茸、生晒参、三七、淫羊藿、肉苁蓉、菟丝子、黄芪、续断等组成，所有药材均购于重庆桐君阁药材批发公司，由重庆希尔安药业有限公司生产为胶囊。每粒胶囊重 0.41 g，每克粉末相当于生药 3 g，仅供实验使用。复方鳖甲软肝片由内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司出品（批号：国药准字 Z19991011），规格为 0.5 g。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 参照文献[5]取刚刚宰杀的猪血（弃首尾取中段），静置后以 2 000 r/min，4℃离心 15 min，离心血清分装后，-20℃冻存备用，临用前放于 4℃融化。SD 大鼠正常喂养 1 周后造模，除正常组外，其余各组用猪血清每次 0.5 ml/只腹腔内注射，每周两次（星期一，星期四）共 10 周，复制大鼠免疫性肝纤维化模型。从造模第 1 周开始，模型组及正常组不给药，其余各组灌胃给药，每日 1 次，共 10 周。

1.2.2 取材与固定 各组大鼠在造模 10 周后以 3%水合氯醛腹腔注射（10 ml/kg）麻醉，腹主动脉取血，血液以 2 000 r/min，离心 15 min 后分离血清，用于血清学指标的检测。于肝左叶距边缘 3 mm 处取肝脏组织，放入 4%多聚甲醛固定液固定 24 h，常规脱水，石蜡包埋，切片 5 μm，进行 HE 染色和免疫组织化学检测。

1.2.3 主要观察指标

1.2.3.1 观察大鼠的体重（每周一次称体重），毛发，摄食，二便，神态和活动情况。

1.2.3.2 全自动生化仪检测肝功能指标天门冬胺酸氨基转移酶（AST）、丙胺酸氨基转移酶（ALT）。

1.2.3.3 放射免疫法检测肝纤维化指标（透明质酸）HA、层粘连蛋白（LN）、Ⅳ型胶原（Ⅳ-C）、Ⅲ型前胶原（PCⅢ）。

1.2.3.4 采用 S-P 法对肝组织进行 TGF-β1，TIMP-1 免疫组化染色，采用 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它们在整个肝组织以及纤维间隔区域中的平均阳性面积及平均吸光度（A）值。

1.2.4 统计学方法 应用 SPSS11.0 统计分析软件处理，数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，计量资料采用单因素方差分析，两组间比较用 t 检验。

2 结 果

2.1 一般情况观察

随着饲养时间的延长，模型组大鼠毛发稍欠光华，活动稍差，摄食稍减少，粪便变稀，精神状态稍差。阳性对照组大鼠活动正常，毛发光泽好，摄食二便均正常，精神状态可。复元胶囊各组大鼠活动正常，毛发光泽，摄食二便均正常，精神状态好。各组大鼠体重未见明显差异，未出现腹水，无互相撕咬等好斗现象。

2.2 肝功能的观察

各组大鼠肝功能指标 AST、ALT（表 1），模型组显著增高，复元胶囊低剂量组中度增高，复元胶囊中、高剂量组以及阳性对照组轻度增高。复元胶囊低、中、高剂量组与模型组比较，差异有显著性（$P<0.05$）。复元胶囊低，中剂量组与正常组比较差异有显著性（$P<0.05$）；复元胶囊高剂量组与正常组比较差异无显著性（$P>0.05$）。复元胶囊低，高剂量组与阳性对照组比较差异有显著性（$P<0.05$）；复元胶囊中剂量组与阳性对照组比较差异无显著性（$P>0.05$）。

2.3 肝纤维化指标

各组肝纤维化指标 HA、LN、Ⅳ-C、PC-Ⅲ（表 2），模型组显著增高，复元胶囊低组中度增高，复元胶囊中、高剂量组以及阳性对照组轻度增高。复元胶囊低、中、高剂量组与模型组比较差异有显著性（$P<0.05$），复元胶囊低，中剂量组与正常组比较差异有显著性（$P<0.05$），复元胶囊高组与正常组比较差异无显著性，复元胶囊低，高剂量组与阳性对照组比较差异有显著性（$P<0.05$）；复元胶囊中剂量组与阳性对照组比较差异无显著性（$P>0.05$）。

2.4 TIMP-1 的表达

各组 TIMP-144 平均阳性面积及平均吸光度（A）值（表 3）模型组阳性面积和平均吸光度高于其他各组，复元胶囊低组与阳性组比较有显著差异（$P<0.05$），复

元胶囊中组与阳性组比较无显著差异($P>0.10$),复元胶囊高组与阳性组比较有显著差异($P<0.05$),除复元胶囊高组外各组与正常组比较有显著差异($P>0.05$)。

2.5 TGF-β1 的表达

各组 TGF-β1 平均阳性面积及平均吸光度(A)值(见表 4)模型组阳性面积和平均吸光度高于其他各组,复元胶囊低组与阳性组比较有显著差异($P<0.05$),复元胶囊中组与阳性组比较无显著差异($P>0.10$),复元胶囊高组与阳性组比较有显著差异($P<0.05$),除复元胶囊高组外各组与正常组比较有显著差异($P>0.05$)。

2.6 表达位置

肝星状细胞胞浆内 TGF-β 免疫组织化学染色阳性者,呈棕黄色。模型组肝小叶结构破坏,肝细胞索排列紊乱,着色明显增多,色较深(图 1)。阳性对照组血管壁上有少量棕黄色的着色,颜色较浅(图 5)。复元胶囊组有少量着色,且着色明显较模型组变淡,与阳性对照组接近(图 2-4)。肝星状细胞胞浆内 TIMP-1 免疫组织化学染色阳性者,呈棕黄色。对照组在血管壁上有少量棕黄色的着色,颜色较浅(图 7)。模型组着色明显较对照组增多,色较深(图 6)。复元胶囊低组着色明显较模型组变淡,但仍比阳性对照组着色深(图 8)。

3 讨 论

实验发现 TIMP-1 和 TGF-β1 在模型组中的表达明显高于正常组,阳性组及复元胶囊各组($P<0.05$)。提示 TGF-β1 和 TIMP-1 与肝纤维化病变密切相关。肝纤维化是慢性肝病的共同通路,是紧随肝细胞破坏之后的自身修复过程,以 ECM 的合成增多和降解减少为特征[6]。HSC 激活是肝纤维化形成的关键步骤,TGF-β1 是目前最重要的促 HSC 活化因

表 1 各组大鼠肝功能的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	AST(U/L)	ALT(U/L)
正常组	8	等剂量	196.82 ± 19.31	65.22 ± 7.10
模型组	8	等剂量	254.44 ± 8.90	81.76 ± 7.39
阳性组	8	0.625g/kg	215.29 ± 13.28	66.36 ± 4.72
复元低组	8	0.312g/kg	237.11 ± 18.15$^{\triangle\blacktriangle\bullet}$	68.32 ± 8.44$^{\triangle}$
复元中组	8	0.625g/kg	217.20 ± 15.29$^{\triangle\bullet}$	65.23 ± 7.54$^{\triangle}$
复元高组	8	1.25g/kg	198.29 ± 12.53$^{\triangle\blacktriangle}$	64.36 ± 1.95$^{\triangle}$

注:与模型组比较 $^{\triangle}P<0.05$;与阳性组比较$^{\blacktriangle}P<0.05$;与正常组比较$^{\bullet}P<0.05$

表 2 各组大鼠肝纤维化指标($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HA(μg/L)	LN(μg/L)	IV-C(μg/L)	PCⅢ(μg/L)
正常组	8	115.46 ± 7.30	109.83 ± 9.45	65.28 ± 5.11	133.91 ± 11.76
模型组	8	251.27 ± 23.00	246.38 ± 18.66	200.45 ± 18.62	317.68 ± 9.77
阳性组	8	203.51 ± 16.18	192.72 ± 10.42	136.79 ± 16.76	243.15 ± 18.65
复元低组	8	157.46 ± 16.37$^{\triangle\bullet}$	150.02 ± 18.32$^{\triangle\bullet}$	145.06 ± 13.98$^{\triangle}$	232.15 ± 22.67$^{\triangle}$
复元中组	8	131.86 ± 11.45$^{\triangle\bullet}$	124.17 ± 10.86$^{\triangle\bullet}$	125.78 ± 12.37$^{\triangle}$	202.22 ± 14.52$^{\#\bullet}$
复元高组	8	129.55 ± 22.46$^{\triangle\bullet}$	121.94 ± 24.46$^{\triangle\bullet}$	104.86 ± 12.43$^{\triangle\bullet}$	170.86 ± 15.13$^{\triangle\bullet}$

注:与模型组比较: $^{\triangle}P<0.05$;与正常组比较: $^{\blacktriangle}P<0.05$;与阳性组比较:$^{\bullet}P<0.05$

表 3 各组 TIMP-1 平均吸光度(A)值及平均阳性面积($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TIMP-1 A 值	TIMP-1 阳性面积
正常组	8	0.093 ± 0.019	0.084 ± 0.018
模型组	8	0.275 ± 0.017	0.140 ± 0.022
阳性组	8	0.124 ± 0.018	0.105 ± 0.018
复元低组	8	0.155 ± 0.019$^{\triangle\blacktriangle\bullet}$	0.125 ± 0.018$^{\blacktriangle\bullet}$
复元中组	8	0.125 ± 0.029$^{\triangle\bullet}$	0.110 ± 0.018$^{\triangle\bullet}$
复元高组	8	0.099 ± 0.022$^{\triangle\blacktriangle}$	0.082 ± 0.024$^{\triangle\blacktriangle}$

注:与模型组比较 $^{\triangle}P<0.05$;与阳性组比较$^{\blacktriangle}P<0.05$;与正常组比较$^{\bullet}P<0.05$

子之一，它可调节细胞外基质受体的表达，刺激 ECM 的产生，还通过抑制胶原酶和蛋白酶的产生，从而使 ECM 在肝脏大量沉积而导致肝纤维化。肝纤维化是肝内 ECM 过度沉积的结果，但更大程度上特别是后期更是由于胶原的降解减少所致。ECM 的转换主要由 MMPs 及其抑制因子 TIMPs 所调节，因此任何提高 MMPs 或降低 TIMP-1 表达及活性，促进 ECM 降解的方法都有可能成为抗肝纤维化的

表 4　各组 TGF-β1 平均吸光度(A)值及平均阳性面积($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF-β1 A 值	TGF-β1 阳性面积
正常组	8	0.197 ± 0.026	0.033 ± 0.019
模型组	8	0.276 ± 0.019	0.186 ± 0.029
阳性组	8	0.234 ± 0.020	0.104 ± 0.022
复元低组	8	0.267 ± 0.024▲	0.156 ± 0.029●
复元中组	8	0.237 ± 0.023△	0.101 ± 0.014△
复元高组	8	0.202 ± 0.025△▲	0.048 ± 0.015△▲●

注：与模型组比较 △P<0.05；与阳性组比较▲P<0.05；与正常组比较●P<0.05

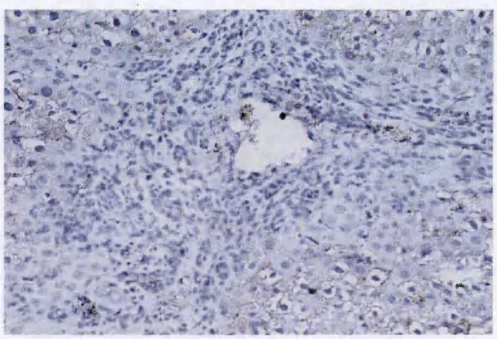


图 1 TGF-β 模型组表达(SABC×400)

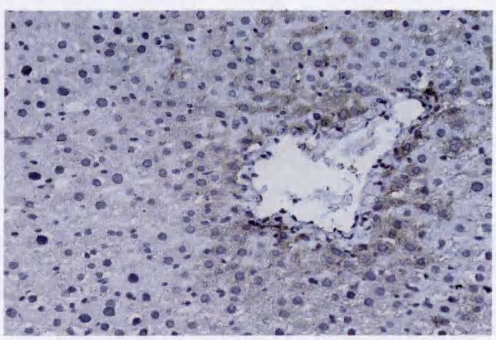


图 2 TGF-β 复元低组表达(SABC×400)

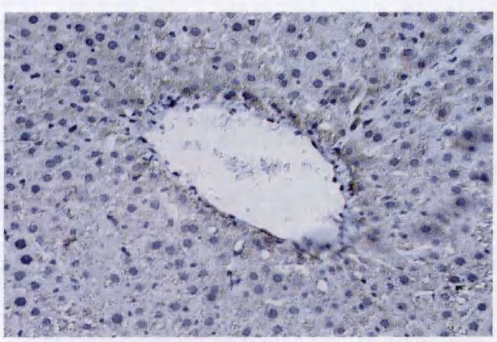


图 3 TGF-β 复元中组表达(SABC×400)

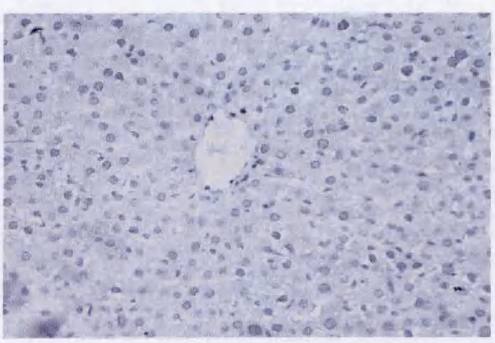


图 4 TGF-β 复元高组表达(SABC×400)

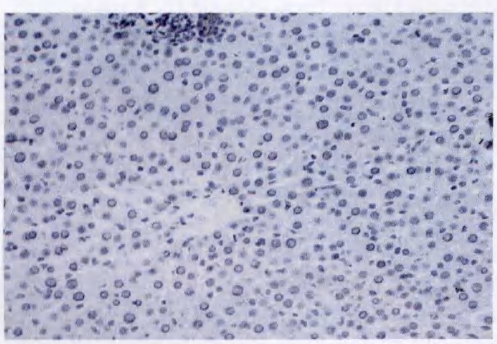


图 5 TGF-β 阳性组表达(SABC×400)

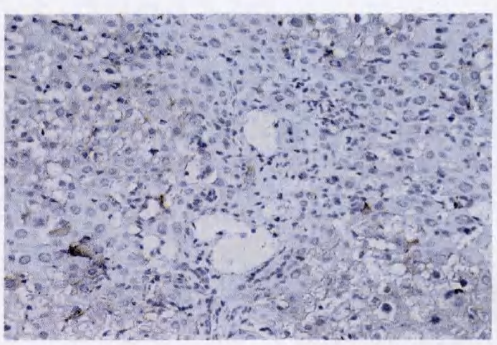


图 6 TIMP-1 模型组表达(SABC×400)

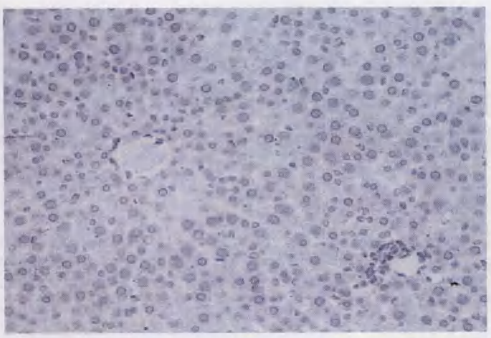


图 7 TIMP-1 阳性组表达（SABC×400）

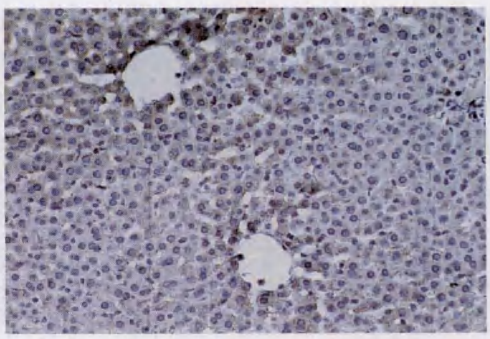


图 8 TIMP-1 复元低组表达（SABC×400）

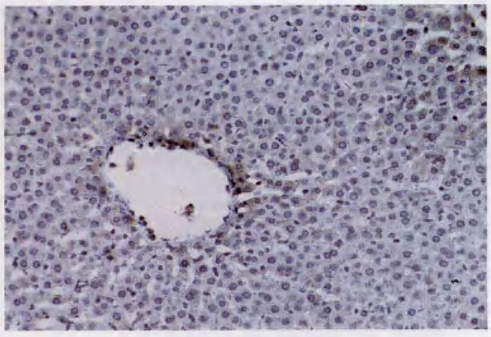


图 9 TIMP-1 复元中组表达（SABC×400）

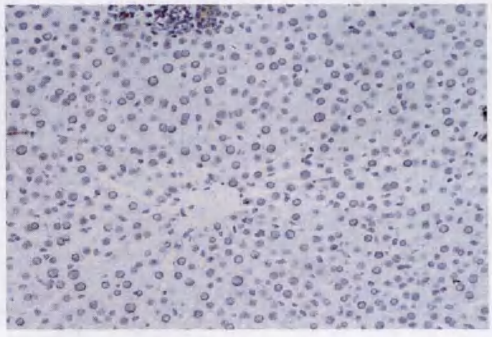


图 10 TIMP-1 复元高组表达（SABC×400）

有效手段。TIMP-1 表达上调会导致 ECM 降解减少，而导致肝纤维化。所以 TIMP-1 是另一种强有力的致纤维化因子。本研究发现 TIMP-1 和 TGF-β1 在模型组中的表达明显高于正常组（$P<0.05$），提示 TIMP-1 和 TGF-β1 与肝纤维化病变密切相关。复元胶囊各组中 ALT、AST、HA、LN、IV-C 及 PCⅢ上升不显著，较模型组为低；而 TIMP-1 和 TGF-β1 的表达与模型组比较也偏低，提示复元胶囊对猪血清所致大鼠肝纤维化有明显保护作用。

复元胶囊来自长期临床实践观察所得的经验方，具有补肾健骨、益气活血功效。经临床近 40 年应用，发现本方对乏力、气短、舌质瘀暗、胸闷痛等气虚血瘀证有较好的治疗作用。

虽然肝纤维化是由炎症、免疫、毒物、缺血、及血流动力学改变等引起的实质细胞损伤为起点导致的一系列病理改变。但现代研究发现鹿茸能明显改善四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的肝组织病理学改变[7]；三七总皂苷对传代 HSC 增殖有明显抑制作用[8]；肉苁蓉能增强实验性败血症大鼠线粒体能量代谢功能[9]；黄芪总苷是一种新的有效的抗肝纤维化药物[10]；综观全方具有显著的抗炎、抗损伤、抗肝纤维化和免疫调节作用。所以，推测其对各种原因所致肝纤维化均有一定保护作用。

参 考 文 献

[1] 齐洪军，胡曼菁.祛瘀化痰汤对肝纤维化大鼠肝组织 α－平滑肌肌动蛋白表达分布影响的实验研究[J]. 青海医药杂志，2004，34(5)：14-16.

[2] Nagase H，Woessner J F J.Matrix metalloproteinases[J]. Biol Chem，1999，274:21491-21494.

[3] 李紫琼，郑 勇.TIMPs 和 MMPs 与肝纤维化研究进展[J].实用肝脏病杂志，2007，10(5)：355-357.

[4] 王宝恩，王志富，殷蔚黄，等，实验性免疫性肝纤维化模型的研究[J]. 中华医学杂志，1989，69(9)：503.

[5] 张连峰，田笑笑，王春峰.转化生长因子和基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 在肝纤维化中的诊断及关系[J]. 中华肝脏病杂志，2007，15(4)：258-259.

[6] Gressner A M，Weiskirchen R，Brietkopf K，et al. Roles of TGF-beta n Hepatic fibrosis[J]. Front Biosci，2002，12(7):793-807.

[7] 李 夏，段冷昕，王楠娅，等.鹿茸多肽对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药学杂志，2007，42(24)：1864-1866.

[8] 王 怡，薛绍礼，张 菁，等.三七总皂甙对传代肝星状细胞增殖的影响[J]. 淮海医药，2008，26(1)：1-3.

[9] 尹 刚，王贵林，袁岳沙.肉苁蓉对败血症大鼠肝线粒体能量代谢功能的影响[J]. 时珍国医国药，2007，18(11)：2742-2743.

[10] 丁向东，王红群，吴 强，等.黄芪总苷对小鼠日本血吸虫病肝纤维化的影响[J]. 世界华人消化杂志，2008，16(2)：125-131.

（责任编辑：关蕴良）