DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.026
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1181-04

论著

反义 $TIMP_1$ 基因对纤维化肝脏间质胶原合成的影响

曾 仲,韩本立,段恒春 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨反义 $TIMP_1$ 基因对大鼠纤维化肝脏间质胶原合成的影响及其意义。方法 用60%CCl_4+5%乙醇建立大鼠肝纤维化模型;构建反义 $TIMP_1$ 基因真核表达载体后转入大鼠肝脏;采用RT-PCR、原位杂交、免疫组化及RIA等方法,观察了肝脏中 $TIMP_1$ mRNA、α1(Ⅲ)mRNA和蛋白表达及大鼠外周血PCⅠ、PCⅢ水平的变化。结果 反义 $TIMP_1$ 基因能明显地抑制大鼠纤维化肝脏中 $TIMP_1$ 的高表达($P<0.01$)。转基因肝脏中α1(Ⅲ)mRNA和蛋白的表达明显低于未转基因的纤维化肝脏($P<0.01$)。转基因后大鼠外周血PCⅠ、PCⅢ的浓度明显低于未转基因大鼠($P<0.01$)。结论 反义 $TIMP_1$ 基因能下调纤维化肝脏中间质胶原的合成,这对寻找新的肝纤维化防治对策提供了可供探索的途径。

关键词:肝纤维化;间质胶原;反义 $TIMP_1$ 基因
中图法分类号:R329.2+6;R394.3;R575.202 文献标识码:A

Regulation of the extracellular matrix synthesis and degradation in liver fibrotic rats by antisense $TIMP_1$

ZENG Zhong, HAN Ben-li, DUAN Heng-chun (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of antisense $TIMP_1$ on the interstitial collagen synthesis of fibrotic liver in rats. Methods Fibrosis was induced in the liver of rats with the injection of 60% CCl_4 and 5% alcohol. Recombinant antisense $TIMP_1$ gene mammalian expression vectors were construct and infused into the fibrotic liver of rats. The expressions of $TIMP_1$ mRNA, α1(Ⅲ) mRNA and protein were determined by RT-PCR, ISH and immunohistochemistry. The serum levels of PCⅠ, PCⅢ in rats were determined by RIA. Results Antisense $TIMP_1$ gene could markedly suppress the expression of endogenous $TIMP_1$ mRNA in the transfected liver of rats ($P<0.01$). The expressions of α1(Ⅲ) mRNA and protein decreased significantly in the transfected fibrotic liver of rats ($P<0.01$). The serum levels of PCⅠ, PCⅢ markedly decreased in the transfected rats ($P<0.01$). Conclusion Antisense $TIMP_1$ gene can down-regulate the synthesis of interstitial collagen in the fibrotic liver of rats. The results give a new clue to the management strategy for the treatment of the liver fibrosis.

Key words: liver fibrosis; interstitial collagen; antisense $TIMP_1$ gene

肝纤维化的实质就是肝脏细胞外基质(ECM)合成与降解的不平衡,导致ECM在肝中过多堆积,这种过多堆积的ECM的主要成分是胶原,其中Ⅰ、Ⅲ型胶原的含量最高,其又称间质胶原或纤维化性胶原,这也是肝纤维化及肝硬变中引起肝功能严重失调的主要原因和病理基础。而基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP1)在这一过程中发挥了重要作用,它通过对基质金属蛋白酶(MMPs)活性的抑制作用而阻止ECM的降解,促进间质胶原在肝中的沉积[1,2]。因此,本研究选用真核表达载体重组反义 $TIMP_1$ 基因并转染肝纤维化大鼠,观察其对大鼠纤维化肝脏间质胶原合成的影响及其意义,以探讨利用 $TIMP_1$ 反义基因逆转治疗肝纤维化的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠 $TIMP_1$ 基因质粒由法国 Louis Pasteur 大学 Paul Basset 教授赠送,基因片段长度0.75 kb。真核表达载体 pCI-neo 购自 Promega 公司。$TIMP_1$ 多抗购自 DaKo 公司。Ⅲ型前胶原α1链[α1(Ⅲ)]探针质粒由本院传染科李奇芬教授赠送。Ⅱ型前胶原

作者简介:曾 仲(1967-),男,湖南省汉寿县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝纤维化发病机制和治疗方面的研究。电话:(023)68754544
收稿日期:2003-01-09;修回日期:2003-04-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单抗购自 DaKo 公司。Ⅰ型前胶原(PCⅠ)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)放免测定试剂盒分别购自重庆市肿瘤研究所和上海海军医学研究所。脂质体转染试剂盒(DOTAP)和限制性内切酶购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

构建 pCI-neo- $TIMP_1$ 真核表达重组载体,得到重组质粒后用 *Nar*Ⅰ 酶切鉴定,筛选出所需要的反义 $TIMP_1$ 基因质粒 pCIA $TIMP_1$。

1.2 大鼠肝纤维化模型的制作及反义 $TIMP_1$ 基因的体内转移

正常雄性 Wistar 大鼠,体质量 200~250 g,共 50 只,按吴孟超[3]方法用 60% CCl_4+5% 乙醇诱导大鼠肝纤维化模型,2 个月成模后,用脂质体(DOTAP)包裹反义 $TIMP_1$ 反义基因质粒,开腹从大鼠肠系膜下静脉注入导入纤维化肝脏,其中死亡 20 只。大鼠恢复正常饮食后继续用 60% CCl_4 和 5% 乙醇诱导 1 个月后处死动物取标本备检。

1.3 分组

共分 3 组。(1) 正常对照组(NC)10 只;(2) 肝纤维化(LF)未处理组 10 只;(3) 肝纤维化转基因组(ATLF)10 只。

1.4 RT-PCR 定量检测 $TIMP_1$ mRNA 表达

采用一步法提取肝组织总 RNA,并用紫外分光光度计行 RNA 浓度及纯度测定。用德国 Boehringer Mannheim 公司的一步法 RT-PCR 试剂盒对肝组织总 RNA 进行扩增,同时加入 $TIMP_1$ 引物序列:5′-GACTAAGATGCTCAAAGGATTCGACGCT,5′-GAGAAAGAAAGATGGAGGAA AGGTAAA CAG,扩增长度为 493 bp。加入反应体系中的 RNA 和引物的量每组均相同。扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析并 GS300 扫描吸光度仪进行定量分析。

1.5 原位杂交

α1(Ⅲ) mRNA 表达的原位杂交检测按蔡文琴[4]方法进行。探针用地高辛标记。

1.6 免疫组化

免疫组化采用北京中山公司的 SPTM 免疫组化试剂盒进行苏本精复染。

1.7 图像分析

每张切片任选 5 个视野,自动检测其阳性物质的面密度,取其平均值进行半定量分析。

1.8 大鼠外周血 PCⅠ、PCⅢ的检测

采用 RIA 法。

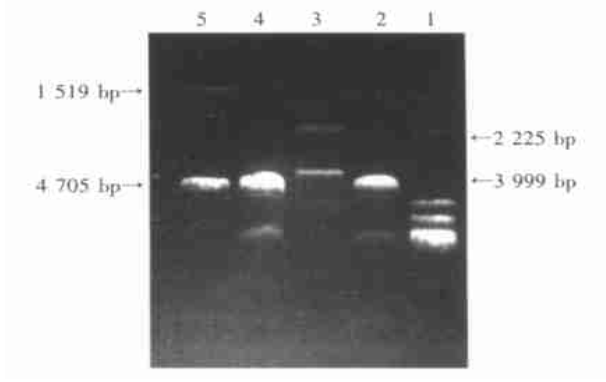
1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用组间 t 检验。

2 结果

2.1 重组质粒的内切酶图

质粒载体为 pCI-neo,长度为 5 474 bp,*Nar*Ⅰ 酶切位点位于 2 593 bp,$TIMP_1$ cDNA 片段长度为 750 bp,*Nar*Ⅰ 酶切位点位于 22 bp,故重组体经 *Nar*Ⅰ 酶切后正义 $TIMP_1$ 重组体产生 2 225 bp 和 3 999 bp 二个片段,而反义 $TIMP_1$ 重组体产生 1 519 bp 和 1 705 bp 二个片段,见图 1。



1:λDNA/*Hind* ⅢMarker;2,4:pCI-neo vector;3:pCISTIMP$_1$ vector;5:pCIATIMP$_1$ vector

图 1 重组体酶切鉴定电泳图谱

Fig 1 Electrophoretic map of recombinant by enzyme digestion

2.2 反义 $TIMP_1$ 基因对纤维化肝脏内源性 $TIMP_1$ mRNA 表达的影响

ATLF 组 $TIMP_1$ mRNA 的表达量明显低于 LF 组($P<0.01$),但仍高于 NC 组($P<0.01$),见表 1。

表 1 反义 **$TIMP_1$** 基因对大鼠纤维化肝脏 **$TIMP_1$ mRNA** 的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of $TIMP_1$ antisense gene on $TIMP_1$ mRNA expression of fibrotic liver of rats($\bar{x}\pm s$)

Group	RT-PCR
LF	0.89±0.07△
ATLF	0.32±0.05△△
NC	0.18±0.03

△:$P<0.01$ *vs* ATLF;△△:$P<0.01$ *vs* NC

2.3 反义 $TIMP_1$ 对α1(Ⅲ) mRNA 表达的影响

原位杂交结果显示,正常肝脏中主要在汇管区间质细胞、血管壁细胞中有弱表达;在纤维化肝脏中明显增强,主要分布于汇管区、血管壁、纤维间隔有明显强阳性表达,肝小叶间间质细胞如贮脂细胞、窦内皮细胞中有较强表达,部分肝细胞也可见阳性反应。转基因后肝脏的表达明显减少,主要表达在汇管区、血管壁及残存的纤维间隔中,纤维间隔内的阳性细胞数及阳性程度明显减少,肝间质细胞及部分肝细胞有弱表达,见图 2、3。图像分析结果显示 LF 组明显高于其余二组($P<0.01$),而以正常组最低($P<0.01$),见表 2。

2.4 反义 $TIMP_1$ 对Ⅲ型胶原合成的影响

免疫组化结果表明,正常肝脏中仅在汇管区的血管内皮、中心静脉壁、窦内皮下、胆管壁基底膜有弱阳性表达。在纤维化肝脏中主要沿纤维间隔分布,主要为成纤维细胞,肌成纤维细胞,还有血管壁、窦内皮细胞、窦壁、小叶间贮脂细胞及胆管基底膜均呈阳性染色,部分肝细胞也有弱阳性反应;转基因肝脏中的分布同上,但纤维间隔少见,小叶间间质细胞阳性散在分布,肝细胞未见阳性着色。图像分析表明 LF 组的表达明显强于 ATLF 和 NC 组($P<0.01$),而 ATLF 组与 NC 组间无显著性差异($P>0.05$),见图 4、5,表 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

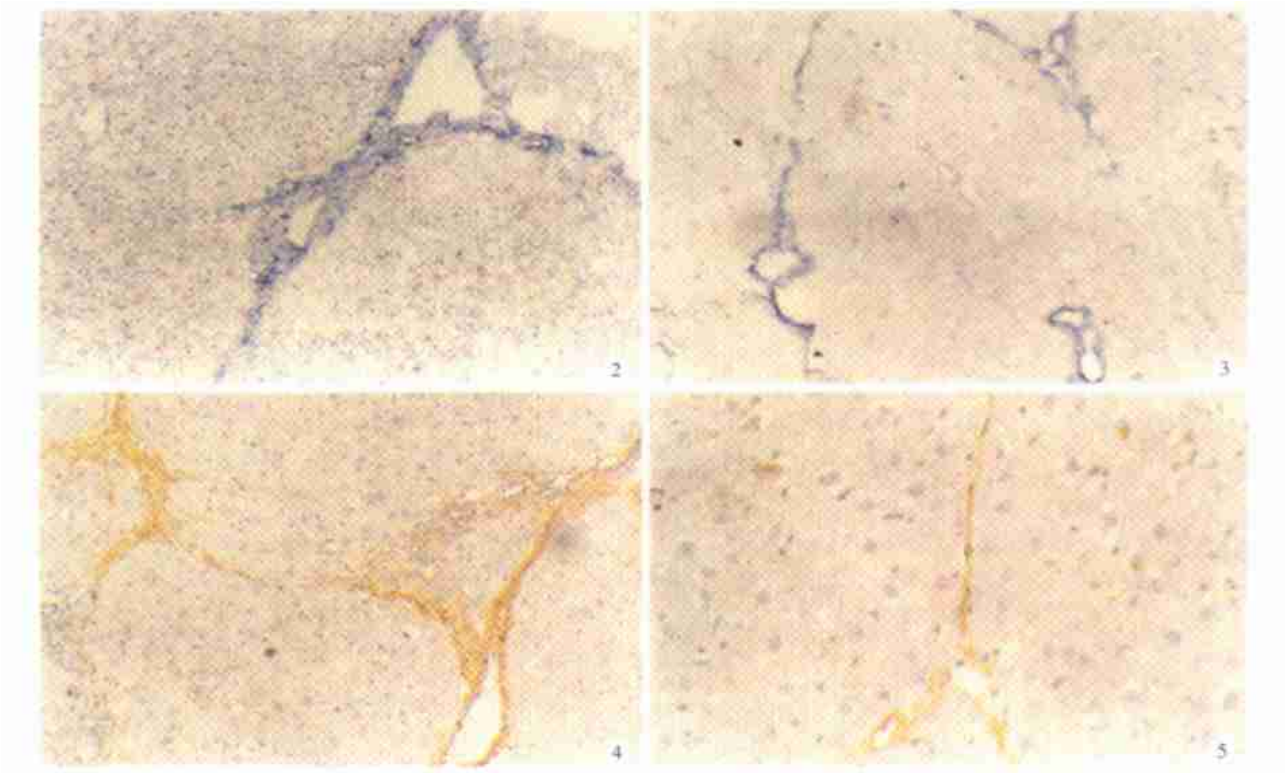


图 2　纤维化肝脏中 α1（Ⅲ）mRNA 的表达　（ISH× 200）

Fig 2　Expression of α1(Ⅲ) mRNA in fibrotic liver of rats　（ISH× 200）

图 3　转基因肝脏中 α1（Ⅲ）mRNA 的表达　（ISH× 200）

Fig 3　Expression of α1(Ⅲ) mRNA in transfected fibrotic liver of rats　（ISH× 200）

图 4　纤维化肝脏中Ⅲ型胶原的免疫组化染色　（SPTM× 200）

Fig 4　Expression of collagen type Ⅲ in fibrotic liver of rats　（SPTM× 200）

图 5　转基因肝脏中Ⅲ型胶原的免疫组化染色　（SPTM× 200）

Fig 5　Expression of collagen type Ⅲ in transfected fibrotic liver of rats　（SPTM× 200）

表 2　反义 $TIMP_1$ 基因对大鼠纤维化肝脏 α1（Ⅲ）mRNA 的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Effects of $TIMP_1$ antisense gene on α1（Ⅲ）mRNA expression of fibrotic liver of rats（$\bar{x} \pm s$）

Group	α1（Ⅲ）mRNA
LF	938.25 ± 92.74 △*
ATLF	218.88 ± 16.95 *
NC	138.00 ± 12.97

△：$P < 0.01$ *vs* ATLF；　*：$P < 0.01$ *vs* NC

表 3　反义 $TIMP_1$ 基因对大鼠纤维化肝脏Ⅲ型胶原合成的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 3　Effects of $TIMP_1$ antisense gene on type Ⅲ collagen protein of fibrotic liver of rats（$\bar{x} \pm s$）

Group	FN protein
LF	776.75 ± 14.60△
ATLF	127.13 ± 11.82
NC	128.13 ± 13.04

△：$P < 0.01$ *vs* ATLF

2.5　反义 $TIMP_1$ 对大鼠外周血 PCⅠ、PCⅢ的影响

LF 组中大鼠外周血 PCⅠ、PCⅢ浓度均显著高于 ATCF 组和 NC 组（$P < 0.01$）。而 ATLF 组与 NC 组间无显著差异（$P > 0.05$），见表 4。

表 4　反义 $TIMP_1$ 对大鼠外周血 PCⅠ、PCⅢ的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 4　Effects of $TIMP_1$ antisense gene on PCⅠ and PCⅢ of liver fibrotic rats（$\bar{x} \pm s$）

Group	PCⅠ	PCⅢ
LF	157.04 ± 9.44△	115.44 ± 10.10△
ATLF	23.67 ± 2.16	30.08 ± 4.23
NC	20.00 ± 2.95	27.63 ± 3.38

△：$P < 0.01$ *vs* ATLF

3　讨论

现已证明，纤维化肝脏中 ECM 的过多堆积，一方面是由于 ECM 产生增多，另一方面是因为调节 ECM 降解的 MMPs 的活性被其特异性抑制剂 $TIMP_1$ 和 $TIMP_2$ 特别是 $TIMP_1$ 所抑制，随着肝纤维化的进展，$TIMP_1$ 的表达持续升高，导致了 ECM 降解减少[1]。因

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

此,如能抑制TIMP$_1$的高表达,将解除其对MMPs的抑制作用,增加MMPs的活性,而有助于降解这种过多沉积在肝脏中的ECM。我们的实验表明反义TIMP$_1$基因确能抑制大鼠纤维化肝脏中TIMP$_1$的高表达,降解这种过多沉积的间质胶原,但是,我们也发现反义TIMP$_1$基因的转入使间质胶原α1(Ⅲ)mRNA的表达明显下调,显然,转基因肝脏ECM的减少与间质胶原的合成减少也有关。

但是,我们的体外实验表明反义TIMP$_1$基因的转入并未减少或抑制贮脂细胞的细胞外基质合成。而转基因细胞培养上清中ECM成份的减少则归因于贮脂细胞TIMP$_1$表达受抑制的结果。由于TIMP$_1$表达的下调势必会增加贮脂细胞培养上清中MMPs的活性,促进了上清中ECM的降解,导致了ECM水平的下降。

因此,我们认为这可能是因为体内、体外的环境和条件不同所致。众所周知,细胞在体内不是独立的发挥其作用,而是通过细胞与细胞、细胞与胞外基质相互作用,形成一复杂的整体,并协调地维持组织结构和功能的完整性。研究表明,细胞外基质在多种组织中不仅起机械性支架作用,而且还具有调节细胞增殖、分化、迁移以及基因表达等作用,在细胞间通讯网络中具有中心位置。现在已经越来越清楚,在肝脏损伤后纤维化发生的过程中,细胞外基质不仅仅是在间质中被动的沉积,它还是纤维化的主动参与者。第一,ECM彼此之间及与其在细胞表面的特异受体相互作用,这种相互作用被认为在调节细胞功能性分化方面发挥了重要作用。据推测,细胞外信号通过能识别细胞外基质(ECM)分子的跨膜受体经细胞膜传导入细胞内,被配体连接的受体改变,依次引起细胞骨架网络和胞内信号转导级联的重排,而导致了细胞基因表达,还有细胞生长和分化状态的改变。研究表明基质沉积能影响细胞形态、生长和ECM产生,例如纤维连接蛋白(FN)作为基质"锚定物",通过与特异的整合素相互作用传递信号,维持细胞于分化表型,纤维化肝脏中过度合成的FN刺激了贮脂细胞向肌成纤维细胞的转化;Ⅳ型胶原则有刺激贮脂细胞增殖的作用。但将贮脂细胞培养在正常基底膜物质上,则细胞保持圆形,很少发生增殖,合成较少的细胞外基质,而培养在塑料或胶原上时,则展示了激活表型、明显增殖、合成大量的细胞外基质,进一步研究表明,正常肝窦周围细胞外基质的三维立体结构对于维持贮脂细胞于静止状态非常重要,而肝纤维化时,过多沉积的细胞外基质特别是胶原的堆积改变了正常ECM的三维结构,促进了贮脂细胞的激活,产生更多的ECM,但正常的ECM三维结构被恢复后激活的贮脂细胞又可恢复到静止状态[5,6]。第二,细胞外基质通过释放入基质的细胞因子指导细胞的功能分化及组织结构的重建。因为炎症反应通常伴有纤维化,一些促炎因子在肝纤维化过程中的作用已被广泛研究。但在培养系统中,将贮脂细胞直接暴露于这些炎症因子中并没有明显的激活作用,提示细胞因子可能是与贮脂细胞周围环境中的其它一些因素共同作用,导致贮脂细胞的激活。研究表明,活性TGF-β$_1$能与Ⅳ型胶原、FN、血栓粘合素及ECM中的蛋白多糖结合。而且血栓粘合素能与潜活形式的TGF-β$_1$连接并激活潜活TGF-β$_1$,而血小板源性生长因子(PDGF)是一种对贮脂细胞有强烈的有丝分裂促进作用的因子,它能将Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型胶原作为细胞外配体,与其相连,在纤维化肝脏的纤维间隔中结合了大量的PDGF分子。因此,在肝纤维化时,过度沉积的细胞外基质能结合大量的细胞因子,起到了如下作用:①作为细胞因子的贮存库,使细胞因子持续对相关细胞产生作用;②限制细胞因子的扩散,使局部达到其产生作用的最大浓度;③ 提供细胞因子的记忆功能;④ 介导细胞因子与细胞间的信号传递[7]。综上所述表明,肝纤维化过程中,过度堆积的ECM不仅引起了肝组织形态结构的改变,而且通过多种方式进一步促进贮脂细胞的活化、增殖和ECM基因表达,合成并分泌大量的细胞外基质,进一步加重肝纤维化。当细胞外基质被降解时,就明显减弱了其对贮脂细胞活化、增殖及细胞外基质合成的作用。这也就不难解释为何反义TIMP$_1$基因的转入能下调肝脏中细胞外基质的表达和合成。这对寻找新的肝纤维化防治对策提供了可供探索的途径。

参考文献:

[1] Arthur M J, Iredale J P, Mann D A. Tissue inhibitors of metalloproteinases: role in liver fibrosis and alcoholic liver disease[J]. Alcohol Clin Exp Res, 1999, 23(5): 940-943.

[2] 曾 仲,马宏敏. 金属蛋白酶及其抑制剂在大鼠正常及纤维化肝脏中的表达[J]. 第三军医大学学报,1999,21(10):734-737.

[3] 吴孟超,杨广顺. 大鼠肝硬变模型复制的研究[J]. 中华实验外科杂志,1984,1(4):145-147.

[4] 蔡文琴,王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版社,1994. 406-409.

[5] Imai K, Senoo H. Morphyology of sites of adhesion between hepatic stellate cells (Vitamin A-storing cells) and a three-dimensional extracellular matrix [J]. Anat Rec, 1998, 250(4): 430-437.

[6] Senoo H, Imai K, Sato M, *et al*. Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphyology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (Vitmin A-storing cells)[J]. Cell Bio Int, 1996, 20(7): 501-512.

[7] Taipale J, Keskij A J. Growth factors in the extracellular matrix[J]. FASEB J, 1997, 11(1): 51-59.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net