DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.016

文章编号:1000-5404(1999)10-0734-04

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

曾 仲* 马宏敏** (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心)重庆,400038

提 要 **目的**:了解膜型基质金属蛋白酶1(MT_1-MMP)、基质金属蛋白酶2(MMP_2)、基质金属蛋白酶组织抑制剂1($TIMP_1$)在大鼠正常及纤维化肝脏中的表达。**方法**:用60%CCl_4加5%乙醇制作大鼠肝纤维化模型,利用原位杂交及免疫组化的方法检测MT_1-MMP,MMP_2,$TIMP_1$的表达并与正常对照组比较。**结果**:在纤维化肝脏中,MT_1-MMP,MMP_2,$TIMP_1$主要表达在成纤维细胞、肌成纤维细胞中,以纤维间隔及汇管区最明显,血管内皮细胞有低水平表达。而正常组中仅有内皮细胞有低表达,明显弱于肝纤维化组。**结论**:在肝纤维化中,成纤维细胞及肌成纤维细胞是MT_1-MMP、MMP_2、$TIMP_1$表达的主要细胞。

关键词 肝纤维化;膜型基质金属蛋白酶1;基质金属蛋白酶2;基质金属蛋白酶组织抑制剂1;成纤维细胞

中图法分类号 R575.5 **文献标识码**:A

肝纤维化的主要病理变化就是肝细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)在肝脏中过多沉积。目前的研究表明,肝ECM的代谢主要由基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase,MMP)及其抑制剂(Tissue inhibitor of metalloproteinase,TIMP)所调节,MMP促进ECM的降解,而TIMP通过抑制MMP阻止ECM的降解,从而形成和促进纤维化[1,2]。但在正常和纤维化肝脏中由哪些细胞表达和合成MMP和TIMP目前的认识还不尽一致,为此,本研究用原位杂交和免疫组化检测了大鼠正常肝脏和实验性肝纤维化中基质金属蛋白酶2(MMP_2),膜型基质金属蛋白酶1(Membrane type1-MMP,MT_1-MMP)和基质金属蛋白酶抑制剂1($TIMP_1$)的基因表达。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

30只Wistar大鼠分为制作肝纤维化组(LF)20只,正常组(NC)10只;前者利用注射CCl_4加饮用5%乙醇的方法,60 d后制成肝纤维化模型,存活10只,正常组常规喂养60 d,所有动物活杀取肝脏标本,一部份置于液氮中备检,一部份置10%福尔马林中固定备检。

1.2 原位杂交

将质粒MMP_2、$TIMP_1$(本院宋波教授馈赠),MT_1-MMP(日本Sato教授馈赠)转入JM109大肠杆菌后大量扩增、提取、纯化、酶切、回收cDNA片段,按宝灵曼公司试剂盒说明操作,用地高辛随机引物法标记制备cDNA探针,按文献[3]方法进行原位杂交。阴性对照不加探针或经RNase处理后再进行原位杂交。

1.3 免疫组化

按北京中山公司SPTM试剂盒说明书操作。MT_1-MMP单抗(日本Sato教授馈赠)浓度为1∶100,$TIMP_1$多抗(美国癌症研究所William G. Stetler-Stevenson教授馈赠)浓度为1∶50。

1.4 图像分析

每一玻片任选5个视野,自动检测阳性细胞面密度,取其平均值,进行统计分析。

1.5 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示。利用本校统计学教研室的统计程序包行方差分析。

2 结果

2.1 MT_1-MMP的表达

纤维化肝脏中MT_1-MMP mRNA的表达主要在纤维间隔和汇管区成纤维细胞、梭形的肌成纤维细胞及血管、胆管的内皮细胞中表达,见图1,免疫组化也显示了相同的分布,且在肝窦边缘及纤维间隔中的细胞外也有MT_1-MMP的存在,见图2,正常肝脏中仅在内皮有弱阳性表达。图像分析显示LF组显著高于NC组($P<0.0001$),见表1、2。

2.2 $TIMP_1$的表达

大鼠纤维化肝中$TIMP_1$ mRNA主要表达在肌成纤维细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞中,阳性颗粒集中在细胞浆中,见图3,免疫组化也展示了相同的分布,见图4,正常肝脏中仅在血管内皮细胞及汇管区的成纤维细胞中发现有弱阳性表达。图像分析显示LF组显著高于NC组($P<0.0001$),见表1、2。

2.3 MMP_2的表达

MMP_2 mRNA表达在纤维化肝脏中的间质细胞主要有成纤维细胞和肌成纤维细胞、血管内皮细胞,见图5,正常肝脏中仅见血管内皮细胞有少许表达。

* 曾 仲,男,31岁,住院医师,博士研究生

** 普通外科

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

表 1　大鼠肝脏中 MT_1-MMP、MMP_2、$TIMP_1$ mRNA 的表达（$\times 10^{-4}$，$\bar{x} \pm s$，$n=10$）

Tab 1　Expression of MT_1-MMP, MMP_2, $TIMP_1$ mRNA in rat liver（$\times 10^{-4}$，$\bar{x} \pm s$，$n=10$）

Groups	NC	LF
MT_1-MMP	47.63 ± 6.23	336.50 ± 12.99*
$TIMP_1$	288.25 ± 7.85	646.50 ± 16.42*
MMP_2	209.38 ± 15.45	781.50 ± 13.36*

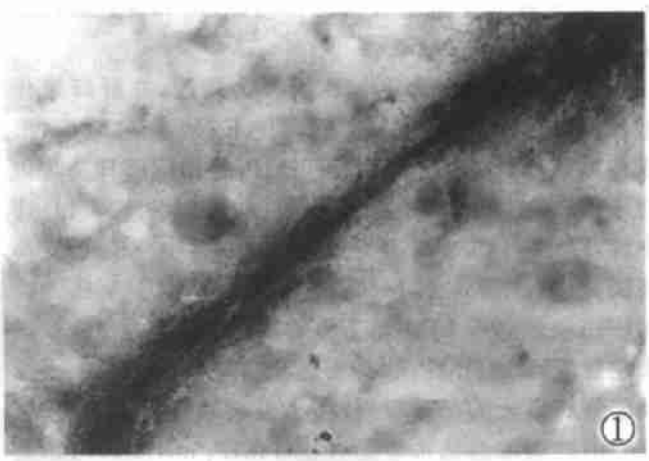
*：$P<0.0001$ *vs* NC

表 2　大鼠肝脏中 MT_1-MMP，$TIMP_1$ 蛋白质的表达（$\times 10^{-4}$，$\bar{x} \pm s$，$n=10$）

Tab 2　Expression of MT_1-MMP, $TIMP_1$ protein in rat liver（$\times 10^{-4}$，$\bar{x} \pm s$，$n=10$）

Groups	NC	LF
MT_1-MMP	15.88 ± 4.36	131.25 ± 9.65*
$TIMP_1$	59.80 ± 20.31	482.50 ± 65.00*

*：$P<0.0001$ *vs* NC



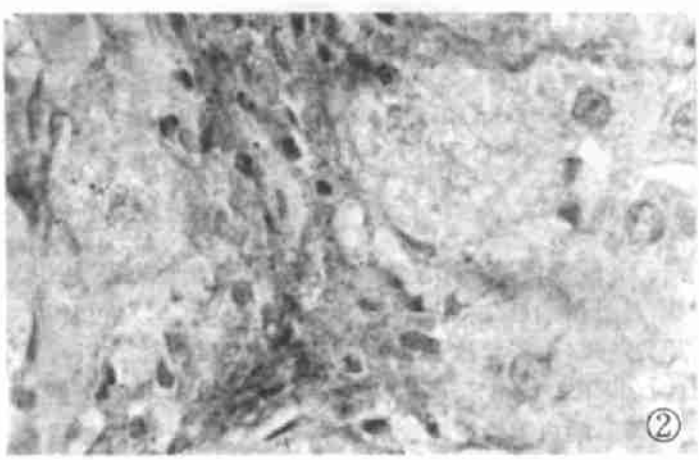
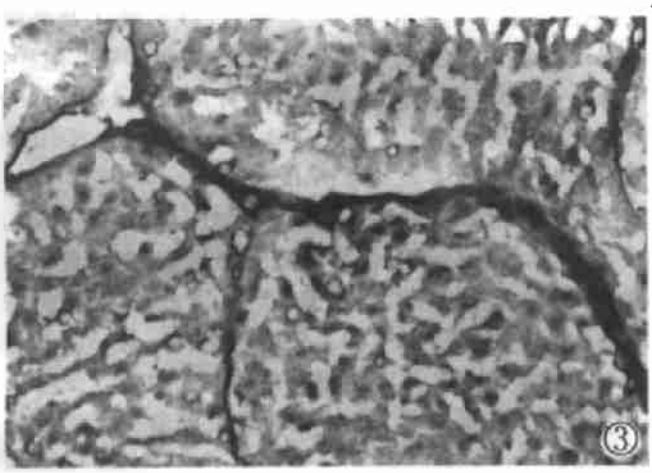


图 1　纤维化肝脏中 MT_1-MMP mRNA 表达　（ISH×400）

Fig 1　Expression of MT_1-MMP mRNA in fibrotic liver　（ISH×400）

图 2　纤维化肝脏 MT_1-MMP 免疫组化染色　（SPTM×400）

Fig 2　Immunohistochemical staining for MT_1-MMP in fibrotic liver　（SPTM×400）



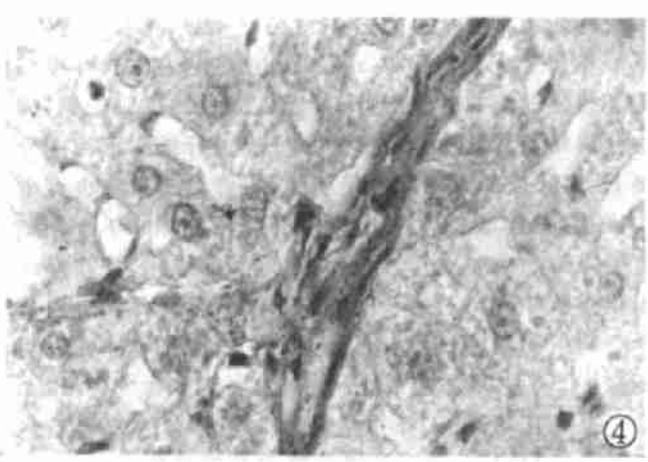


图 3　纤维化肝脏中 $TIMP_1$ mRNA 表达　（ISH×200）

Fig 3　Expression of $TIMP_1$ mRNA in fibrotic liver　（ISH×200）

图 4　纤维化肝脏中 $TIMP_1$ 免疫组化染色　（SPTM×400）

Fig 4　Immunohistochemical staining for $TIMP_1$ in fibrotic liver　（SPTM×400）

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

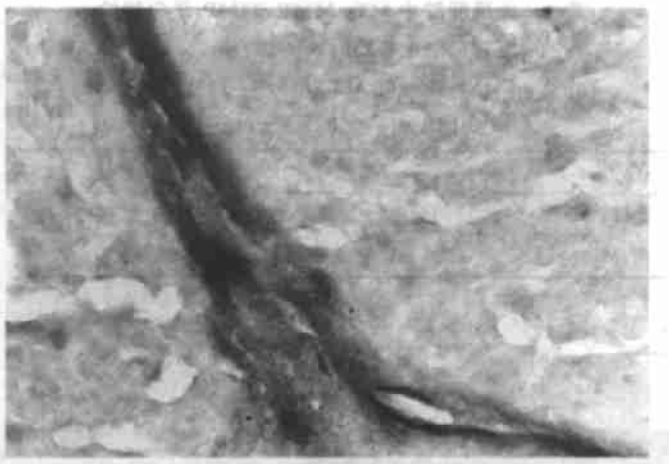


图5 纤维化肝脏中 MMP_2 mRNA 表达 (ISH×400)
Fig 5 Expression of MMP_2 mRNA in fibrotic liver (ISH×400)

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬变发展的病理过程，是肝内细胞之间及其与细胞外基质(ECM)相互作用的结果，最终导致ECM在肝内的过度沉积。这种过度沉积不仅是由于ECM合成增多，更大程度上特别是后期，是由于降解减少引起的[1]。在ECM降解过程中起主要作用的MMP是一组锌离子依赖酶，TIMP是一组具有抑制MMP功能的活性多肽，它们在ECM代谢的调节作用中起着非常重要的作用[2]。但正常和病理情况下肝脏中哪些细胞合成和分泌MMP、TIMP，目前的结果仍不一致，而这对了解肝纤维化中ECM的代谢过程、肝纤维化的发生发展机制及对肝纤维化的防治都有十分重要的意义。

本研究发现 MMP_2 mRNA 主要表达在成纤维细胞和梭形的肌成纤维细胞(可能是激活的贮脂细胞，因为分离培养的贮脂细胞激活后变成成纤维样细胞而分泌ECM)，以纤维间隔中最明显，血管内皮细胞也有少许表达，总体表达水平比正常肝脏明显增多。MMP_2 主要降解基底膜成份，启动和加重肝纤维化，并在肝纤维化过程中持续升高，它与 MMP_1 不同，MMP_1 主要降解间质胶原即纤维化性胶原，在肝纤维化过程中明显减少，而使间质胶原在肝中过度沉积[3,4]。Milani等[4]的研究发现，人纤维化肝中几乎所有的间质细胞都高表达 MMP_2，尤以纤维间隔和汇管区最明显，窦内皮细胞也有表达。但大多数学者对肝贮脂细胞分离培养的研究表明肝贮脂细胞，特别是激活的贮脂细胞是肝内 MMP_2 的主要来源[5~7]，这与我们的发现不一致，可能是因为研究方法不同所致。因为贮脂细胞在光镜下不易鉴别。

MMP_2 以潜活形式的酶原(pro-MMP_2)从细胞(肝贮脂细胞)中分泌到细胞外，必须经过激活后方可发挥其生物学作用，最近的证据表明，MT_1-MMP 主要作用就是激活 pro-MMP_2，从而在肝纤维化中发挥作用[6,7]。我们发现汇管区及纤维间隔中的成纤维细胞、肌成纤维细胞均高表达 MT_1-MMP mRNA，胆管、血管内皮细胞也有表达，免疫组化显示上述细胞浆、细胞膜及细胞外均有强染色，这与 Theret 等[6,7]报道的结果一致。表明表达 MMP_2 的细胞同时也表达和合成 MT_1-MMP，且 MT_1-MMP 被分泌到细胞外，通过其膜结合区域与肝细胞、贮脂细胞膜结合，从而激活 MMP_2，发挥其降解基底膜的作用，启动和促进肝纤维化。

MMP 的活性受 TIMP 的严密调控，在肝纤维化过程中 TIMP 抑制 MMP 从而使 ECM 降解减少，形成和加重肝纤维化。特别是 $TIMP_1$ 的作用已日益为人们所重视。在肝纤维化过程中，目前发现的4种TIMP中仅 $TIMP_1$、TIMP2 在肝中有表达，其中 $TIMP_1$ 升高最明显，它主要抑制 MMP_1 的活性，而对 MMP_2 的抑制作用较弱。而 MMP_1 又称间质胶原酶，主要降解纤维化性胶原。$TIMP_1$ 的高表达严重抑制了 MMP_1 而反映了肝纤维化的严重程度[3,8]。以往的研究表明，分离培养的贮脂细胞低水平的表达 $TIMP_1$ mRNA，当其激活成肌成纤维细胞后，$TIMP_1$ 表达明显增加[9]。而 Roeb[10]通过原位杂交显示在 CCl_4 和胆管结扎大鼠肝损伤模型中，肝细胞及几乎所有间质细胞中均有 $TIMP_1$ mRNA 的表达，尤以炎症区域中的脂肪样细胞中表达最明显。而我们观察发现仅肌成纤维细胞、成纤维细胞有 $TIMP_1$ mRNA 的高表达，以汇管区及纤维间隔中最明显，免疫组化也展示了相同的结果。同样，Iredale 等[11]从实验性纤维化肝中分离出肝细胞、贮脂细胞、Kupffer 细胞，并行细胞总 RNA 的 Northern 杂交发现肝细胞并不表达 $TIMP_1$ mRNA。

可见，纤维化过程中 MT_1-MMP、MMP_2、$TIMP_1$ 的表达均明显增加，且主要为成纤维细胞、肌成纤维细胞(可能是激活的肝贮脂细胞)产生，因此，贮脂细胞的激活是肝纤维化过程中的主要病理事件。进一步加强对 MMP 和 TIMP 及贮脂细胞的研究将有助于了解肝纤维的发生发展过程，并对肝纤维化的防治起到积极的作用。

参考文献

1 Olaso E, Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. J Hepatol, 1998, 29(5): 836
2 Arthur M G. Collagenases and liver fibrosis. J Hepatol, 1995, 22(Suppl 2): 43

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

3 蔡文琴，王伯沄 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都：四川省科学技术出版社，1994. 406～434
4 Milani S, Herbst H, Schuppan D, *et al*. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and-2 genes in normal and fibrotic human liver. Am J Pathol, 1994, 144(3): 528
5 Takahara T, Furui K, Yata Y, *et al*. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrance-type1-matrix metalloproteinase in fibrotic human liver Hepatology, 1993, 26(6): 1521
6 Theret N, Musso O, L'Helgoualc'h A, *et al*. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. Am J Pathol, 1997, 150(1): 551
7 Theret N, Musso O, L'Helgouale'h A, *et al*. Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in association with MMP_2 activation in injured human liver. Am J Pathol, 1998, 153(3): 945
8 Ueno T, Tamaki S, Sugawara H, *et al*. Significance of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in various liver diseases. J Hepatology, 1996, 24(1): 177
9 Irdale J P, Murphy G, Hembry R M, *et al*. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1): Implication for regulation of matrix degradation in liver. J Clin Invest, 1992, 90(1): 282
10 Roeb E, Purucker E, Breuer B, *et al*. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. J Hepatol, 1997, 27(2): 535
11 Iredale J P, Benyon R C, Arthur M J P, *et al*. Tissue inhibiter of metalloproteinase-1 mRNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase mRNA in experimental liver injury and fibrosis. Hepatology, 1996, 24(1): 176

（收稿：1999-04-20；修回：1999-07-22）
（编辑　王　红）

Expression of MT_1-MMP, MMP_2 and $TIMP_1$ in normal and fibrotic liver in rats

Zheng Zhong, Ma Hongming (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To observe the pattern of expression of MT_1-MMP, MMP_2 and $TIMP_1$ in normal and fibrotic liver in rats. **Methods**: Fibrosis was induced in the liver of rats with the injection of 60% CCl_4 and 5% alcohol. The expression of MT_1-MMP, MMP_2 and $TIMP_1$ in the liver was observed with *in situ* hybridization and immunohistochemistry. **Results**: In the fibrotis liver, the expressions occurred predominantly in the myofibroblasts and fibroblasts of the areas of portal tracts and fibrotic septa and in low degrees in the vascular endothelium. Nevertheless, in the normal liver, the expression took place mainly in the vascular endothelium in low degrees. **Conclusion**: In liver fibrosis, fibroblasts and myofibroblasts are the main sites for the expression of MT_1-MMP, MMP_2 and $TIMP_1$ to occur.

Key words liver fibrosis; fibroblast; MT_1-MMP; $TIMP_1$

文章编号：1000-5404(1999)10-0737-02

颈部血管损伤 2 例的救治体会

Treatment of 2 cases of jugular vessels injury

梁　健*　谭颖徽　（第三军医大学附属新桥医院口腔科）重庆，400037

颈动脉损伤死亡率高达 50%。现将我科救治的 2 例颈部大血管损伤病例报告如下。

1　临床资料

病例 1：男，27 岁，尖刀自左上颈部下颌后凹区刺入口咽部 4 h。就诊时昏迷、休克，大量鲜血自颈部伤口和口内涌出，诊断为左侧颈动脉损伤。颈部伤口内填塞止血，气管切开，呼吸机辅助呼吸，快速输血、补液，1 h 后患者自主呼吸恢复，血压上升致 10/6 kPa，急诊室内全麻下手术探查，阻断颈总动脉近心端，向上分离见左侧颈内、外静脉断裂，颈内、外动脉在近颅底处断裂，因过于靠近颅底，尝试吻合颈内动脉失败，故将其全部结扎。术后患者嗜睡，右侧肢体运动差，经脱水、扩血管及抗感染治疗，术后 72 h 患者清醒，伤口一期愈合，右上肢肌张力正常，

（下转 741 页）

* 梁　健，男，29 岁，住院医师，进修生，现在总后第八职工医院口腔科　贵阳，550002

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