

胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1 mRNA 表达及复方 861 抑制作用的研究

□ 阴赅宏* 马 红 马雪梅 朱跃科 贾继东 王宝恩

(首都医科大学附属北京友谊医院肝病研究中心 北京 100050)

摘 要 目的: 观察胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1 mRNA 表达以及复方 861 的治疗作用。方法: 给雌性 Wistar 大鼠胆管内逆行注入粘合剂加胆管结扎制备胆管阻塞性肝纤维化模型。术后第 7 天开始给予不同剂量的复方 861 灌胃, 共 49 天。以 RT-PCR 法观察复方 861 对肝组织 TIMP1 mRNA 表达水平的影响。结果: 模型组肝组织 TIMP1 mRNA 为 1.691 ± 0.646 , 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); 复方 861 3g/kg、6g/kg、9g/kg 组肝组织 TIMP1 mRNA 分别为 0.858 ± 0.132 、 0.771 ± 0.227 、 0.872 ± 0.306 , 明显低于模型组 ($P < 0.05$ 或 0.01)。结论: 胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1 mRNA 明显增高, 复方 861 能够抑制该增高, 可能是其抗肝纤维化作用的机理之一。

关键词 胆管阻塞性肝纤维化模型 组织基质金属蛋白酶抑制因子 1mRNA 复方 861

肝纤维化、肝硬化是由于细胞外基质 (ECM) 的合成增多和/或降解减少所致。其中组织基质金属蛋白酶抑制因子 1 (TIMP1) 在调节胶原的降解代谢中发挥着重要作用, TIMP1 表达增加是肝纤维化过程中胶原降解减少的主要原因。复方 861 是临床治疗肝纤维化的有效药物^[1,2]。为进一步研究复方 861 对胶原降解的影响, 本实验应用逆转录半定量 PCR 方法, 观察了复方 861 对胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1 mRNA 表达的影响, 以阐明复方 861 抗肝纤

维化的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料 雌性 Wistar 大鼠由中国医学科学院实验动物中心提供。N-丁基-2-氰基丙烯酸酯 (商品名: Histoacryl): 德国 B. BRAUN 公司产品。HA、LN 试剂盒: 上海海军医学研究所生物技术中心产品。总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol)、MMV 逆转录酶: 均为 GIBCO 公司产品。

1.2 复方 861 主要由丹参、黄芪、柴胡等药物组成。采用江阴天江制药公司生产的单味中药浓缩颗粒剂配成。

* 作者简介 阴赅宏, 男, 医学博士, 副研究员。

1.3 胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型的制备 参照文献方法^[3]进行。胆总管近端注入 Histoacryl, 行双重结扎并剪断胆总管。假手术组仅暴露胆总管。80 只大鼠随机分为假手术组 10 只、模型组 25 只、复方 861 3g/kg、6g/kg、9g/kg 剂量组各 15 只。术后第 7 天开始给药, 其中模型组、假手术组 (正常对照组) 给予生理盐水, 复方 861 治疗组分别给予不同剂量的药物。于治疗后 49 天处死大鼠, 取肝组织制备石蜡切片。

1.4 血清生化学检测

1.5 血清纤维化检测 放免分析法。

1.6 形态学观察 HE 等染色光镜观察。

1.7 以 RT-PCR 方法观察胆管堵塞性大鼠肝纤维化肝组织 TIMP1mRNA 表达水平 共扩增定量 PCR 参照分子克隆实验指南^[4]进行。用 TIMP1/GAPDH 的比值表示 TIMP1 的相对表达水平。

2 实验结果

2.1 黄疸情况 胆管阻塞大鼠于术后 1 周开始出现黄疸 (95%)。

表 1 复方 861 治疗 49 天血清纤维化指标的变化 (IU/L, $\bar{x} \pm s$)

	n	HA	LN
正常对照组	9	214.54 ± 59.98	46.03 ± 10.94
模型对照组	11	635.88 ± 200.35 Δ	93.43 ± 16.55 Δ
复方 861 3g/kg 组	8	223.29 ± 108.93 **	69.34 ± 19.21
复方 861 6g/kg 组	6	376.76 ± 162.47 *	106.28 ± 6.35 *
复方 861 9g/kg 组	6	248.56 ± 176.57 **	84.27 ± 18.39 *

注:与正常组比较 Δ $P < 0.01$
与模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1mRNA 表达及复方 861 抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TIMP-1/GAPDH
正常对照组	6	0.720 ± 0.301
模型对照组	6	1.691 ± 0.646 Δ
复方 861 3g/kg 组	6	0.858 ± 0.132 *
复方 861 6g/kg 组	6	0.771 ± 0.227 **
复方 861 9g/kg 组	6	0.872 ± 0.306 *

注:与正常组比较 Δ $P < 0.05$
与模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 血清生化学指标的变化 与正常对照组比较, 模型组血清 ALT、AST、TBIL、DBIL、ALP、GGT,

血清纤维化指标 LN、HA 等均明显升高 ($P < 0.01$); 复方 861 治疗组 ALT、AST、LN、HA 均有明显下降, 与模型组比较 $P < 0.05$ 或 0.01 。见表 1。因此, 复方 861 对胆管阻塞性肝纤维化模型具有降低血清 ALT、AST、HA、LN 作用。

2.3 形态学变化 模型组大鼠可见弥漫增生的胆小管, 大量胶原沉积在胆小管周围, 肝细胞与增生的胆小管相比明显减少。复方 861 治疗组大鼠肝脏汇管区明显缩小, 增生的胆小管明显减少, 网织 + Masson 染色发现胶原纤维明显减少, 仅见不完整的胶原纤维沉积, 肝组织明显恢复; 肝组织内仍可见增生的胆小管, 但周围的纤维化组织不连续。

2.4 胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1 mRNA 表达及复方 861 的抑制作用 与正常对照组比较, 模型组肝组织 TIMP1 mRNA 明显升高, $P < 0.05$ 。复方 861 治疗组肝组织 TIMP1 mRNA 明显降低, $P < 0.05$ 或 0.01 。见表 2。

3 讨论

研究肝纤维化的发生及其治疗对策时, 应对基质合成和降解两方面都加以考察。笔者课题组既往的研究结果^[2]提示复方 861 抗肝纤维化及早期肝硬化不仅与其抑制胶原合成作用有关, 而且与其促进胶原降解作用有关。TIMPs 是抑制基质金属蛋白酶活性的一组多功能因子家族, 其中 TIMP1 mRNA 在正常肝组织中有低水平的表达, TIMP1 能结合除 MMP14、MMP19 以外的所有 MMPs 而使其活性减弱, 从而抑制胶原的降解。动物实验表明, 在 CCl₄ 肝损伤和胆管结扎肝损伤中, TIMP1 表达均明显增加^[5]。因此, 笔者课题组应用逆转录半定量 PCR 方法对复方 861 抑制胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1 mRNA 表达的作用进行了研究。

胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型具有炎症反应少, 纤维化形成快, 自发逆转率低的特点, 目前已用于有关肝纤维化研究。本实验结果表明, 复方 861 治疗组 ALT、AST、LN、HA 均较模型组有明显下降, 且 TIMP1 mRNA 明显降低, 提示该药物增强胶原降解的机理与抑制 TIMP1 mRNA 表达, 从而减少 TIMP1 对 MMP13 的抑制作用有关。因此, 复方 861 抑制肝组织 TIMP1 mRNA 表达可能是其抗肝纤维化的机制之一。

补益心气心血法对心血虚患者 左心室收缩时相的影响

□ 杨振平 (安徽省滁州市第一人民医院 安徽 滁州 239000)

摘要 本研究通过测试 95 例心血虚患者负荷 STI, 进而通过对心血虚证患者分别采用单纯补益心血法和双补心气心血法进行治疗 15 天后, 再次测定两组患者的负荷后 STI 变化。结果显示, 心血虚患者具有潜在的左心功能低下情况; 双补心气心血组患者的负荷 STI 变化显著优于单补心血组, 提示对于心血虚患者的遣方用药, 应当在补心血的同时也补心气。

关键词 心血虚证 补益心血法 双补心气心血法 左心室收缩时相

心血虚为中医临床常见病证, 多种疾病如心血管病、各类贫血、慢性肝炎、神经性血循环衰弱症等均可表现为中医脏腑证型谱中的心血虚证。笔者曾对心血虚证的左心室收缩时相 (STI) 变化进行过初步研究, 发现对心血虚患者施加负荷后, 其 STI 主要指标测值均显著异常, 而在施加负荷前与正常人组比较无显著性差异, 提示心血虚证存在潜隐的左心功能低下这一病理

生理学基础 (详见《中医杂志》1989 年第 1 期)。在此研究基础上, 笔者又进一步观察了单补心血和双补心气心血两种疗法对心血虚证负荷 STI 的影响, 现将有关资料整理报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 按照全国中西医结合虚证与老年病研究专业委员会修订的《中医虚证辨证参考标准》中“心血虚证”诊断标准 (主症:

①心慌、心悸; ②心烦、少寐、多梦、健忘; ③头晕、起立时眼前昏暗; ④脉细弱或结代。次症为面色淡白或萎黄、口唇色淡, 舌质淡白、苔薄白, 怔忡、胸闷。) 进行诊断。经临床辨证凡具备主症 3 项 (第①、③项必备)、次症 2~3 项即可确诊为心血虚证。纳入本研究的心血虚证患者 95 例, 其中男 46 例, 女 49 例; 年龄 17 岁~61 岁, 平均 42.1 岁。西医诊断为冠心病

参考文献

- [1] 马红, 王宝恩, 马雪梅. 复方 861 对大鼠肝星状细胞增殖及胶原合成的影响. 中国临床药理学与治疗学杂志, 1998, 3 (3): 172-174.
- [2] 王爱民, 王宝恩, 董忠, 等. 复方丹参合剂提高胶原酶活性逆转实验性肝纤维化的研

究. 中华肝病杂志, 1997, 5 (1): 56-58.

- [3] Nan JX, Park EJ, Lee SH, et al. Antifibrotic effect of Stephania tetrandra on experimental liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. Arch Pharm Res, 2000, 23 (5): 501-506.

[4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning (2). 2nd ed. NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 14: 14-21.

- [5] Roeb E, Purucker E, Breuer B, et al. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. J Hepatol, 1997, 27 (3): 535.