

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.004

荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠核转录因子- κ B 及基质金属蛋白酶-2 表达的影响罗伟生¹, 欧士钰², 靳雅玲², 覃浩², 孙旭锐²

(1. 广西中医药大学第一附属医院消化内科, 南宁 530001; 2. 桂林医学院附属医院消化内科, 桂林 541004)

【摘要】目的: 观察核转录因子- κ B (Nuclear transcription factors- κ B, NF- κ B) 及基质金属蛋白酶-2 (Matrix metalloproteinases-2, MMP-2) 在实验性大鼠肝纤维化肝组织中的表达, 探讨荔枝核总黄酮 (Total flavone from Litchi chinensis Sonn., TFL) 抗肝纤维化的作用机制。方法: 大鼠随机分为正常对照组、模型组、TFL 高剂量组、TFL 低剂量组及秋水仙碱 (Colchicine, Col) 组。模型组、TFL 高剂量组、TFL 低剂量组及 Col 组以二甲基亚硝胺 (Dimethylnitrosamine, DMN) 腹腔注射 4 周制作大鼠肝纤维化模型; 造模同时 TFL 高、低剂量组分别以 TFL [200、100 mg/(kg·d)], Col 组以 Col 0.1 mg/(kg·d) 灌胃给药, 正常对照组及模型组给予等体积生理盐水灌胃, 6 周后处死大鼠, 计算大鼠肝脾指数, 检测血清天冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、透明质酸 (Hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白 (Laminin, LN)、MMP-2, 取肝脏同一部位行 HE、Masson 染色观察大鼠肝纤维化程度, 采用免疫组化检测各组肝组织 NF- κ B、MMP-2 的表达。结果: TFL 高、低剂量组血清 AST、ALT、HA、LN、MMP-2 水平及肝脾指数较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 肝组织 NF- κ B、MMP-2 表达及纤维化程度评分亦较模型组明显减低 ($P < 0.05$)。结论: TFL 具有显著的抗肝纤维化作用, 其机制可能与其抑制 NF- κ B、MMP-2 的高表达有关。

【关键词】荔枝核总黄酮; 肝纤维化; 核转录因子- κ B; 基质金属蛋白酶-2**【中国图书分类法分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-03-07Effect of total flavone from Litchi chinensis Sonn. on the expressions of NF- κ B and MMP-2 in rats with hepatic fibrosisLUO Weisheng¹, OU Shiyu², JIN Yaling², QIN Hao², SUN Xurui²

(1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine;

2. Department of Digestive Medicine, the Affiliated Hospital, Guilin Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the levels of nuclear transcription factors- κ B (NF- κ B) and matrix metalloproteinases-2 (MMP-2)**作者介绍:** 罗伟生 (1959-), 男, 教授, 博士,

研究方向: 慢性肝病的基础与临床研究。

基金项目: 广西卫生厅重点课题资助项目 (编号: 2010052); 广西中医药大学药效研究重点实验室开放课题资助项目 (编号: 10-046-04-k12)。in the liver tissues of rats with hepatic fibrosis and to explore the anti-hepatic fibrosis mechanism of total flavone from Litchi chinensis Sonn. (TFL). **Methods:** Rats were randomized into normal control group, model group, TFL high dose group, TFL

stress and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 26.

[9] Lal B, Goodwin C R, Sang Y, et al. EGFRvIII and c-Met pathway inhibitors synergize against PTEN-null/EGFRvIII + glioblastoma xenografts [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(7): 1751-1760.

[10] Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(7): 5375-5383.

[11] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Inter-cellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(5): 619-624.

[12] Moscatello D K, Montgomery R B, Sundaresan P, et al. Transferrin-mediated and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor [J]. Oncogene, 1996, 13(1): 85-96.

[13] Moscatello D K, Holgado-Madruga M, Emlet D R, et al. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor [J]. J Biol Chem, 1998, 273(1): 200-206.

[14] Lal A, Glazer C A, Martinson H M, et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion [J]. Cancer Res, 2002, 62(12): 3335-3339.

[15] Dreier A, Barth S, Goswami A, et al. Cetuximab induces mitochondrial translocation of EGFRvIII, but not EGFR: involvement of mitochondria in tumor drug resistance [J]. Tumor Biol, 2012, 33(1): 85-94.

(责任编辑: 冉明会)

low dose group and colchicine group. Rat model of hepatic fibrosis was established by intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine for 4 weeks. At the same time, TFL was orally given to fibrosis rats at a dose of 100 or 200 mg/(kg·d), colchicine was administrated intragastrically at a dose of 0.1 mg/(kg·d) and equal amount of normal saline was given to rats in normal control group and model group. After 6 weeks, all rats were sacrificed and their left liver lobes were examined histopathologically. The liver and spleen index was figured out. The degrees of fibrosis were evaluated by HE and Masson staining. Serum trail levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), laminin (LN) and MMP-2 were detected. Expressions of NF- κ B and MMP-2 in liver tissues were assessed by SP immunohistochemical staining. **Results:** The liver and spleen index and the serum trail levels of ALT, AST, HA, LN and MMP-2 were significantly lower in TFL high dose and low dose groups than in model group ($P < 0.01$). Degrees of hepatic fibrosis were less severe in TFL high dose and low dose groups than in model group ($P < 0.05$). Expression levels of NF- κ B and MMP-2 were lower in TFL high dose and low dose groups than in model group ($P < 0.05$). **Conclusions:** TEL has obvious anti-hepatic fibrosis effect; the mechanism possibly correlates with the inhibition of NF- κ B and MMP-2 expression.

【Key words】flavone from Litchi chinensis Sonn.; hepatic fibrosis; nuclear transcription factors- κ B; matrix metalloproteinases-2

核转录因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种具有转录激活功能的蛋白质, 普遍存在于多种组织的多种细胞中。近年来研究表明, NF- κ B 在肝纤维化的发生发展过程中不但参与了肝细胞的凋亡和增殖, 还能促进肝星状细胞的活化, 对肝纤维化的发生和发展有着重要的调控作用^[1,2]。在肝内参与细胞外基质 (Extra cellular matrix, ECM) 降解的主要酶系为基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs), 研究表明 MMPs 中基质金属蛋白酶-2 (Matrix metalloproteinases-2, MMP-2) 与肝星状细胞 (Hepatic satellite cells, HSC) 的活化密切相关, MMP-2 的表达增多促进肝纤维化的进程^[3,4]。本研究中以二甲基亚硝胺 (Dimethylnitrosamine, DMN) 制作肝纤维化模型, 观察荔枝核总黄酮 (Flavone from Litchi chinensis Sonn., TFL) 干预后 NF- κ B、MMP-2 在肝纤维化肝组织的表达, 探讨 NF- κ B、MMP-2 通路在 DMN 诱导的肝纤维化中的作用, 进一步揭示 TFL 抗肝纤维化的作用机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

50 只健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 重量 (200 $\pm$ 20) g, 由桂林医学院实验动物中心提供。大鼠随机分为正常对照组、模型组、TFL 高剂量组、TFL 低剂量组、秋水仙碱 (Colchicine, Col) 组, 每组各 10 只。

1.2 主要试剂和仪器

透明质酸 (Hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白 (Laminin, LN) 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司); 组织 MMP-2 试剂盒 (上海森雄科技有限公司); 兔抗大鼠 MMP-2 多克隆抗体, 兔抗大鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体 (北京中杉); 免疫组织化学二抗试剂、DAB 显色剂 (福建迈新生物科技有限公司);

Col, DMN (SIGMA 公司); TFL (购于广州广弘中药材公司, 经鉴定为无患子科植物荔枝的成熟种子, 桂林医学院药理实验室提取分离, TFL 含量达 54.2%, 用蒸馏水稀释为 20、40 g/L 2 种溶液); 离心机、全自动生化分析仪。

1.3 实验方法

1.3.1 造模及给药 模型组、TFL 高低剂量组、Col 组按 Ala-Kokko 方法^[5], 大鼠以 2 ml/kg 剂量于每周前 3 d 连续腹腔注射 0.5% 的 DMN 溶液 (以生理盐水稀释), 共 4 周制作肝纤维化模型。造模同时, 模型组、TFL 高、低剂量治疗组, Col 组分别用 5 ml/kg 生理盐水, 200、100 mg/(kg·d) TFL^[6] 及 0.1 mg/(kg·d) Col 灌胃, 每日 1 次, 共 6 周。正常对照组以等体积的生理盐水灌胃。6 周后处死大鼠, 观察肝脏外形变化, 抽取下腔静脉血常规分离血清, 取同一部位新鲜肝脏组织固定于体积分数为 10% 的中性甲醛溶液中 24 h。

1.3.2 肝脾指数的测定 大鼠处死前称重, 摘取肝脾, 用滤纸吸取残血后称重, 分别除以大鼠体重, 计算肝、脾指数。

肝指数 = 肝脏重 (g) / 体重 (g) $\times$ 100%; 脾指数 = 脾脏重 (g) / 体重 (g) $\times$ 100%。

1.3.3 血清生化指标检测 血清丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate aminotransferase, AST) 用全自动生化分析仪测定; 血清肝纤维化指标 HA、LN 及 MMP-2 含量用酶联免疫吸附法 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测, 严格按照试剂盒操作。

1.3.4 肝组织病理学检查 制作石蜡切片。HE 染色按常规方法。Masson 胶原染色, 以 10% 三氯醋酸和 10% 重铬酸钾混合液 15 min, 蒸馏水水洗 6 次; 5% 天青石蓝 6 min, 蒸馏水水洗 6 次; 1% 冰醋酸中过 1 下, 滴上酸性品红与丽春混合液比例 2:1; 滴 1% 亮绿待 1 min; 在冰醋酸中过 3 下; 脱水透明封片。

1.3.5 采用免疫组化检测 NF- κ B、MMP-2 蛋白的表达 防脱切片经过常规脱蜡、脱水; NF- κ B 2% EDTA 高温修复 20 min 冷却后 PBS 冲洗, MMP-2 柠檬酸盐工作缓冲液高温修复 2 min 冷却后 PBS 冲洗; 3% H₂O₂ 阻断 10 min, PBS 冲洗; 分别滴加 NF- κ B、MMP-2 多克隆抗体 (1:200), 1 h 后 PBS 洗;

滴加二抗,15 min 后 PBS 冲洗;DAB 显色;苏木精复染,常规脱水,透明,中性树胶封固,光镜下观察,用已知阳性切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定

1.4.1 肝组织 HE、Masson 切片病理学结果判定 纤维化分级评分参照 2002 年中华肝脏病学学会肝纤维化分级法进行胶原纤维增生程度半定量分析^[7],最低 0 分,最高 29 分;得分越高,表示纤维化程度越重。

1.4.2 免疫组化检测 NF- κ B、MMP-2 蛋白的表达 结果判定采用半定量计分方法,NF- κ B p65 以细胞核或胞浆呈棕黄色为(+);MMP-2 以细胞胞浆或包膜呈棕黄色为(+).

参照免疫组化显色标准^[8]:按显色程度分弱、中、强 3 种,分别记以 1、2、3 分。每个指标的每个标本,取 10 个较好的高倍视野,按显色范围分为 4 度:“+”为显色范围占高倍视野<25%;“++”为显色占高倍视野 25%~50%;“+++”为显色占高倍视野 50%~75%;“++++”为显色占高倍视野>75%。将每个高倍视野显色程度和范围换算成显色指数,显色指数=显色程度×显色范围(+为 1 分,++为 2 分,+++为 3 分,++++为 4 分),取其均数作为每个检测指标的最终显色指数。

1.5 统计学处理

各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。先进行数据的正态性检验及方差齐性检验,符合上述条件的行 ANOVA、LSD 检验。不符合上述条件的非参数数据采用 Kruskal-Wallis 的秩和检验。相关分析采用 Pearson 检验。统计学处理采用 SPSS 17.0 统计软件。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中共有 5 只大鼠死亡,尸检和肝脏 HE 染色检查,均死于急性肝衰竭,不计入统计学处理。

模型组大鼠消瘦,毛发稀疏暗淡无光,眼睛混浊,反应迟钝,厌食;剖开腹腔后部分可见腹水,肝脏肉眼观察粗糙,可见结节。TFL 高剂量组形体较丰满,发育基本和月龄符合,被毛浓密有光泽,眼睛明亮,行动迅速,反应灵敏,食欲好;剖开腹腔后无腹水,肝脏肉眼观察较光滑细腻。TFL 低剂量组和 Col 组外观无明显差异,形体中等,发育一般,被毛尚光滑,行

动反应较正常,食欲正常;剖开腹腔后可见少量腹水,肝脏肉眼观察欠细腻。

2.2 TFL 对各组大鼠肝脾指数的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝脾重量明显增加,肝、脾指数明显升高(P 值均=0.000)。与模型组比较,TFL 高、低剂量组及 Col 组大鼠肝、脾指数显著降低(P 值均=0.000)。但 TFL 高、低剂量组及 Col 组与正常对照组比较大鼠肝指数($P=0.037$ 、 $P=0.002$ 、 $P=0.009$)、脾指数(P 值均=0.000)差异仍有统计学意义。结果提示:TFL 能明显对抗 DMN 导致的肝纤维化大鼠肝脾指数的升高(表 1)。

表 1 TFL 对各组大鼠肝脾指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of TFL on indexes of the liver and spleen among groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	肝脏指数(%)	脾脏指数(%)
正常对照组	10	2.42 ± 0.11	0.25 ± 0.02
模型组	8	4.05 ± 0.23 ^a	0.69 ± 0.09 ^a
TFL 高剂量组	9	2.61 ± 0.16 ^{ab}	0.39 ± 0.08 ^{ab}
TFL 低剂量组	9	2.72 ± 0.22 ^{ab}	0.44 ± 0.08 ^{ab}
Col 组	9	2.67 ± 0.22 ^{ab}	0.40 ± 0.10 ^{ab}
F 值		98.293	36.671
P 值		< 0.01	< 0.01

注:与正常对照组比较,a, $P < 0.05$;与模型组比较,b, $P < 0.01$

2.3 TFL 对各组大鼠血清 ALT、AST、HA、LN 及 MMP-2 水平的影响

与正常对照组比较,模型组 ALT、AST、HA、LN、MMP-2 水平提高(P 值均=0.000),差别具有统计学意义;TFL 高、低剂量组及 Col 组 ALT、AST、HA、LN、MMP-2 水平低于模型组(P 值均=0.000),差别具有统计学意义。结果提示:TFL 能显著抑制 DMN 导致的肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST、HA、LN、MMP-2 含量的升高(表 2)。

2.4 各组 HE 及 Masson 染色结果

光镜观察,正常对照组肝小叶结构完整清晰,呈条索状向四周放射状排列,无纤维组织增生,仅见中央静脉周边及肝板间有少许极为蓝色纤细的网状纤维。模型组可见灶性坏死,伴炎性细胞浸润,多数正常小叶结构破坏或消失,粗大胶原纤维分割、包绕肝小叶,在中央静脉之间、汇管区之间、汇管区与中央静脉之间形成纤维间隔,肝细胞索排列紊乱,肝

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST、HA、LN、MMP-2 情况及比较

Tab.2 Comparison on serum levels of ALT,AST,HA,LN,MMP-2 among groups

组别	例数(n)	ALT (U/L)	AST (U/L)	HA (ng/L)	LN (μg/L)	MMP-2 (ng/ml)
正常对照组	10	45.46 ± 11.05	84.95 ± 14.50	226.42 ± 17.66	53.48 ± 4.80	235.08 ± 23.13
模型组	8	194.63 ± 22.86 ^a	293.99 ± 23.78 ^a	656.86 ± 33.31 ^a	167.90 ± 12.14 ^a	429.00 ± 26.02 ^a
TFL 高剂量组	9	109.78 ± 18.69 ^{ab}	156.50 ± 26.29 ^{ab}	350.01 ± 30.18 ^{ab}	88.87 ± 10.94 ^{ab}	303.67 ± 12.21 ^{ab}
TFL 低剂量组	9	141.92 ± 21.05 ^{ab}	219.11 ± 30.90 ^{ab}	362.28 ± 33.17 ^{ab}	107.70 ± 10.50 ^{ab}	370.96 ± 35.50 ^{ab}
Col 组	9	147.11 ± 27.29 ^{ab}	213.83 ± 31.53 ^{ab}	344.65 ± 32.68 ^{ab}	85.57 ± 7.51 ^{ab}	337.39 ± 19.48 ^{ab}
F 值		65.167	81.444	247.454	175.421	79.734
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:与正常对照组比较,a, $P < 0.01$;与模型组比较,b, $P < 0.01$

细胞水肿明显,脂肪变性广泛。TFL 高、低剂量组及 Col 组肝细胞水肿及变性不明显,炎细胞浸润较少,肝小叶结构破坏明显减轻,胶原纤维增生较少,纤维疏松变窄,TFL 高剂量组可见胶原纤维轻度增生,汇管区纤维化扩大,局限于窦周和小叶内纤维化,肝小叶间未见纤维组织增生,无假小叶形成;TFL 低剂量组及 Col 组纤维粗大,数量较 TFL 高剂量组多,见图 1、2。各组肝纤维化半定量评分见表 3。

2.5 免疫组化 NF- κ B、MMP-2 蛋白表达结果

正常肝组织 NF- κ B、MMP-2 均呈弱阳性表达,散在分布于肝窦周围、肝细胞、汇管区血管壁及胆管壁周围的间质细胞,显色较淡。而模型组 NF- κ B、MMP-2 呈强阳性表达(显色指数与正常对照组比较(P 均=0.000),肝小叶内肝窦周围及肝细胞可见呈片状阳性深着色区,汇管区、纤维间隔区亦可见片状融合区,血管壁着色强烈。与模型组比,TFL 高剂量组 NF- κ B、MMP-2 蛋白表达明显下降(P 均=0.000)仅在肝窦周围见明显的中等着色细胞,部分成小片状,肝细胞及汇管区见少量淡黄色着色细胞;TFL 低剂量组及 Col 组 NF- κ B、MMP-2 在肝小叶内片状着色,肝窦周围着色较深,单个肝细胞内可见强着色细胞核,与模型组比较,TFL 低剂量组 NF- κ B、MMP-2 表达明显下降($P=0.037$ 、 $P=0.003$),Col 组 NF- κ B、MMP-2 表达也下降($P=0.030$ 、 $P=0.001$)。TFL 高剂量组与 Col 组 NF- κ B、MMP-2 比较差异有统计学意义($P=0.040$, $P=0.002$),但是 TLF 低剂量组和 Col 组之间 NF- κ B、MMP-2

表达差异均无统计学意义($P=0.820$, $P=0.702$)。见图 3、4,显色指数见表 3。

表 3 各组肝纤维化评分及 NF- κ B、MMP-2 表达情况

Tab.3 Scores of hepatic fibrosis and expressions of NF- κ B and MMP-2 in hepatic tissues

组别	例数 (n)	纤维化评分	NF- κ B	MMP-2
正常对照组	10	0.80 $\pm$ 0.42	1.40 $\pm$ 0.70	1.30 $\pm$ 0.48
模型组	8	21.13 $\pm$ 5.46 ^a	9.00 $\pm$ 2.51 ^a	9.50 $\pm$ 1.60 ^a
TFL 高剂量组	9	6.78 $\pm$ 3.93 ^{abc}	4.11 $\pm$ 2.26 ^{ab}	3.44 $\pm$ 1.33 ^{ab}
TFL 低剂量组	9	14.56 $\pm$ 4.67 ^{ab}	6.56 $\pm$ 2.92 ^{ab}	6.67 $\pm$ 2.45 ^{ab}
Col 组	9	15.67 $\pm$ 5.74 ^{ab}	6.44 $\pm$ 2.74 ^{ab}	6.33 $\pm$ 2.55 ^{ab}
F 值		30.116	13.791	26.688
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:与正常对照组比较,a, P <0.01;与模型组比较,b, P <0.05;与 Col 组比较,c, P <0.05

2.6 相关性分析

血清 MMP-2 水平与 HA、LN 及纤维化评分呈正相关,相关系数分别为 $r=0.844$ 、 0.847 、 0.850 ,而 P 值均=0.000;纤维化评分与肝组织 NF- κ B、MMP-2 表达呈正相关,相关系数分别为 $r=0.586$ 、 0.673 , P 值均=0.000;肝组织 NF- κ B 与 MMP-2 表达也呈正相关, $r=0.936$, $P=0.000$ 。

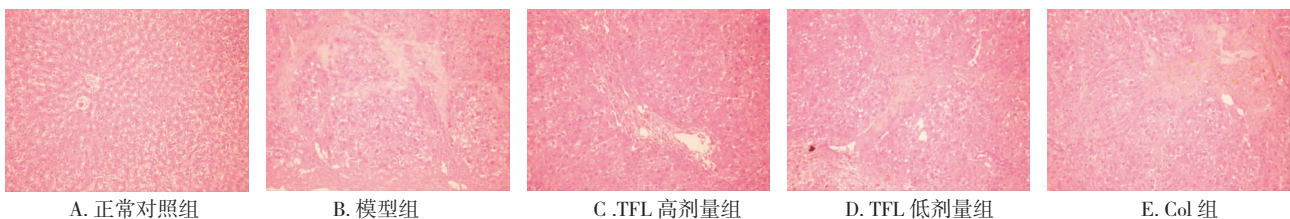


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色 (200 $\times$)

Fig.1 HE staining of hepatic tissues in each group (200 $\times$)

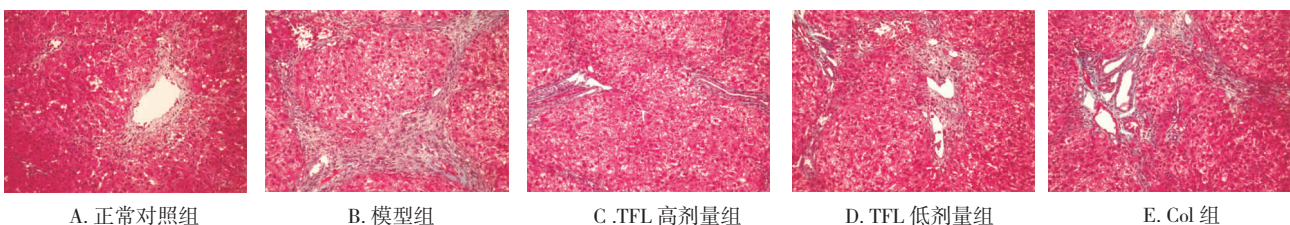


图 2 各组大鼠肝组织 Masson 染色 (200 $\times$)

Fig.2 Masson staining of hepatic tissues in each group (200 $\times$)

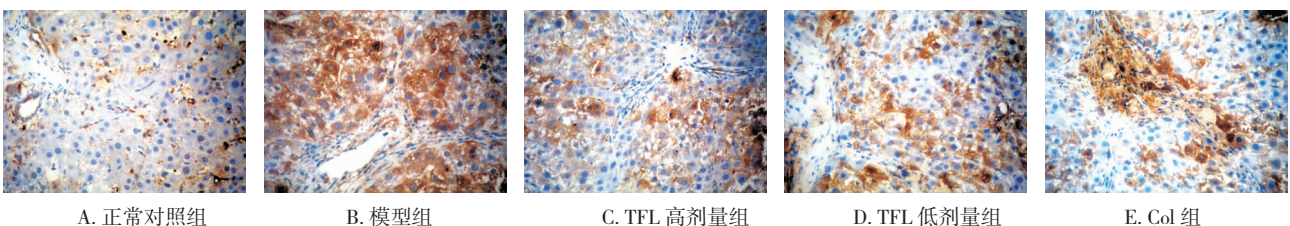
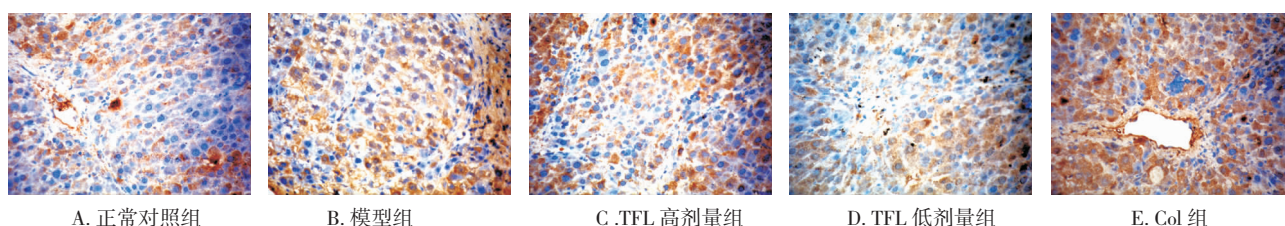


图 3 各组大鼠肝组织 MMP-2 免疫组化染色表达 (400 $\times$)

Fig.3 Expressions of MMP-2 in hepatic tissues in each group detected by immunohistochemical staining (400 $\times$)

图 4 各组大鼠肝组织 NF- κ B 免疫组化染色表达 (400 $\times$)Fig. 4 Expressions of NF- κ B in hepatic tissues in each group detected by immunohistochemical staining (400 $\times$)

3 讨 论

肝纤维化进程中, HSC 是肝组织内生成胶原纤维等 ECM 的主要细胞来源, 它的激活是肝纤维化发病过程中的中心环节^[9,10]。

静止的 HSC 向活化的 HSC 转化时, NF- κ B 的结合使之活性增强, 在细胞受到病毒、细菌毒素感染、缺血缺氧、组织损伤等各种因素作用下 NF- κ B 活化, 进入细胞核与相应的靶基因结合, 启动细胞黏附分子、一氧化氮合酶和环氧化酶-2 等基因转录, 导致促炎因子、自由基、前列腺素等炎症介质的产生, 从而引起相应病变, 并同时以自分泌或旁分泌的形式激活未活化枯否细胞中的 NF- κ B, 产生更多的炎症介质, 形成“炎症瀑布”, 造成肝脏炎症反应, 激活 HSC 参与肝脏纤维化进程^[1,2]。而且 NF- κ B 还具有抗 HSC 凋亡的作用, 使得活化的 HSC 的数量维持在一定的水平, 一定程度上促进了纤维化的发生发展^[11,12]。实验研究也表明, 抑制 NF- κ B 的表达和增殖, 可以作为抗肝纤维化治疗的有效途径之一^[13,14]。

MMP-2 活性增加是纤维化病理发生的重要原因, 肝纤维化早期其活性不受 MMPs 的组织抑制因子-2 的干预, 能持续地降解基底膜的正常基质成分, 破坏其完整性, 促进肝窦毛细血管化, 改变 Disse 间隙中 HSC 的微环境, 促使 HSC 被激活并增殖、转化成肌成纤维细胞样细胞, 同时分泌 ECM 及 MMP-2, 形成破坏、激活的连锁反应, 促进肝纤维化的形成与发展^[15-17]。相关研究也证明, 肝脏 MMP-2 在肝纤维化形成过程中其表达逐渐增强^[18], 而在肝纤维化的逆转过程中, MMP-2 表达逐渐减弱^[19,20]。

荔枝是广西特产, 其核仁作为广西特色中药已有几千年的应用历史, 具有行气散结、祛寒止痛的功效。荔枝核含有多种化学成分, 其中黄酮化合物具有清除氧自由基和保肝作用^[21]。本课题组前期实验已初步研究证实 TFL 具有抗肝纤维化的作用^[22], 但

其作用机制尚未完全清楚。

在本实验中利用 DMN 建造大鼠肝纤维化模型, 对肝纤维化大鼠给予 TFL 干预, 实验结果表明, TFL 能明显改善肝纤维化大鼠的肝脾指数, 减轻肝脾充血, 减少肝脾损伤, 降低血清 AST、ALT 水平, 改善肝功能。TFL 给药组大鼠血清肝纤维化指标 HA、LN、MMP-2 明显下降, 肝组织病理显示肝纤维化程度明显改善, 说明 TFL 具有较好的抗肝纤维化作用。

HSC 的活化是肝纤维化的关键过程, 如何抑制 HSC 的活化是肝纤维化治疗的中药研究方向。本实验中 TFL 给药组血清 MMP-2 水平明显降低, 大鼠肝组织 NF- κ B、MMP-2 的表达显著下降, 表明 TFL 可有效拮抗肝纤维化进程中的重要促进因子 NF- κ B、MMP-2。因此, 认为 TFL 抗肝纤维化作用可能与抑制 NF- κ B、MMP-2 高表达有关, TFL 对 NF- κ B 进行调控, 可抑制炎症介质产生, 抑制 HSC 的活化, 促使 HSC 凋亡, 对 MMP-2 进行调控, 使肝窦基底膜的完整性得以保持, 从而延缓甚至抑制肝纤维化的进程。而相关分析也显示血清 MMP-2 水平与肝纤维化指标及肝纤维化程度呈正相关, 而肝纤维化程度也与 NF- κ B、MMP-2 的表达呈正相关, NF- κ B、MMP-2 之间亦呈高度正相关。MMP-2 分子结构上有 κ B 的结合位点, 上调 NF- κ B 的表达可以促使其下游靶基因 MMP-2 活化。本实验得出结论认为 TFL 抗肝纤维化作用与其抑制 NF- κ B、MMP-2 高表达有关, 但肝纤维化形成机制极其复杂, TFL 防治肝纤维化的其他机制尚有待于进一步研究, 为开发抗肝纤维化新药提供更多科学依据。

参 考 文 献

- [1] Elsharkawy A M, Mann D A. Nuclear factor- κ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis[J]. Hepatology, 2007, 46(2): 590-597.

- [2] 吕 鹏, 罗和生, Shelley C P, 等. 沙立度胺对大鼠肝纤维化核因子- κ B 和肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(9): 1811–1816.
- Lv P, Luo H S, Shelley C P, et al. Effects of thalidomide on the expression of NF- κ B and TNF- α in experimental hepatic fibrotic rats[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007, 23(9): 1811–1816.
- [3] Benyon R C, Arthur M J. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells[J]. Semin Liver Dis, 2001, 21(3): 373–384.
- [4] Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis—a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies[J]. J Hepatol, 2007, 46(5): 955–975.
- [5] Ala-Kokko L, Pihlajaniemi T, Myers J C, et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat[J]. Biochem J, 1987, 244(1): 75–79.
- [6] 赵永忠, 漆志平, 徐 庆, 等. 荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(20): 2084–2089.
- Zhao Y Z, Qi Z P, Xu Q, et al. Anti-hepatic fibrosis effect of total flavone from Litchi chinensis Sonn in rats with bile duct occlusion[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2010, 18(20): 2084–2089.
- [7] 曾民德, 王泰龄, 王宝恩. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 肝脏, 2002, 7(2): 3–4.
- Zeng M D, Wang T L, Wang B E. Consensus on the diagnosis and assessment of treatment effect of liver fibrosis[J]. Cancer, 2002, 7(2): 3–4.
- [8] 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 等. 肝硬化患者肝组织中 TIMP-1, TIMP-2 的表达[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(7): 790–792.
- Xie Y M, Nie Q H, Zhou Y X, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) related antigens expression in liver tissues of patients with liver cirrhosis[J]. Journal of Fourth Military Medical University, 2000, 21(7): 790–792.
- [9] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1655–1669.
- [10] Reeves H L, Friedman S L. Activation of hepatic satellite cells: a key issue in liver fibrosis[J]. Front Biosci, 2002, 7: 808–826.
- [11] Ruddell R G, Hoang-Le D, Barwood J M, et al. Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C ζ /nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2009, 49(3): 887–900.
- [12] Son G, Imuro Y, Seki E, et al. Selective inactivation of NF- κ B in the liver using NF- κ B decoy suppresses CCL4-induced liver injury and fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 293(3): G631–G639.
- [13] 吴义春, 吴 强, 杨 雁, 等. 肝组织中 NF- κ B、TGF- β 1 及其 I 型受体 mRNA 和 HSC 在肝纤维化中的改变及护肝片对其的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 20(3): 212–219.
- Wu Y C, Wu Q, Yang Y, et al. Altered protein expression of NF- κ B and mRNA expression of TGF- β 1 and its type receptor and HSCs of Hepatic tissue in the middle and late stage of rat hepatic fibrosis and the effect of liver aid tablets on them[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2011, 20(3): 212–219.
- [14] 宋维芳, 徐军全, 许瑞玲, 等. 核转录因子- κ B 在实验性肝纤维化中的表达、分布及意义[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(1): 12–16.
- Song W F, Xu J Q, Xu R L, et al. Expression and distribution of NF- κ B in experimental hepatic fibrosis[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2010, 26(1): 12–16.
- [15] 吴运瑾, 翟为溶, 庄 丽, 等. 大鼠肝纤维化模型中基质金属蛋白酶-2 及其抑制物的表达[J]. 上海医科大学学报, 1999, 26(4): 261–264.
- Wu Y J, Zhai W R, Zhuang L, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and its tissue inhibitor in rat liver fibrosis model[J]. Journal of Shanghai Medical University, 1999, 26(4): 261–264.
- [16] Strongin A Y, Collier I, Bannikov G, et al. Mechanism of cell surface activation of 72-kD type IV collagenase—Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase[J]. Biol Chem, 1995, 270: 5331–5338.
- [17] Benyon R C, Hovell C J, Gaca M D A, et al. Proteinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation[J]. Hepatology, 1999, 30(4): 977–986.
- [18] Duka I, Bakris G. Influence of microalbuminuria in achieving blood pressure goals[J]. Curr Opin Nephrol Hypertense, 2008, 17(5): 457–463.
- [19] Zhou X, Hovell C J, Pawley S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis[J]. Liver Int, 2004, 24(5): 492–501.
- [20] 张彩华, 姜妙娜, 李寒姝, 等. 肝复康对肝纤维化大鼠肝组织 NF- κ B、MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(3): 169–172.
- Zhang C H, Jiang M N, Li H S, et al. Influence of Gan-fu-kang compound on hepatic expression of NF- κ B, MMP-2 and TIMP-2 in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2011, 14(3): 169–172.
- [21] 陈衍斌, 武可泗, 顾 宜, 等. 荔枝核化学成分及药理研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(5): 97–98.
- Chen Y B, Wu K S, Gu Y, et al. Chemical composition and pharmacological research situation of Litchi chinensis Sonn[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2007, 14(5): 97–98.
- [22] 覃 浩, 孙旭锐, 欧仕玉, 等. 荔枝核总黄酮预防大鼠肝纤维化的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(22): 2353–2356.
- Qin H, Sun X R, Ou S Y, et al. Total flavone from Litchi chinensis Sonn prevents hepatic fibrosis in rats[J]. Journal of Third Military Medical University, 2011, 33(22): 2353–2356.

(责任编辑: 冉明会)