

# 木苏丸对大鼠二甲基亚硝胺肝纤维化肝组织 TIMP-1, MMP-2 mRNA 表达的作用

高峰, 程留芳, 王志强, 杨云生

高峰, 程留芳, 王志强, 杨云生, 中国人民解放军总医院消化内科  
北京市 100853

高峰, 女, 1971-05-29 生, 山东省济南市人, 汉族, 2002 年中国人民解放军总医院博士生, 主要从事消化系统疾病的临床工作和肝硬化及门脉高压的基础研究。  
项目负责人: 程留芳, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院消化内科。

电话: 010-66937096

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-27

## Effects of *musuwan* on TIMP-1 and MMP-2 expression in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Feng Gao, Liu-Fang Cheng, Zhi-Qiang Wang, Yun-Sheng Yang

Feng Gao, Liu-Fang Cheng, Zhi-Qiang Wang, Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China.

Received: 2004-09-18 Accepted: 2004-10-27

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of *musuwan* on the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in rat liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine (DMN).

**METHODS:** Male SD rats were randomly divided into three groups: normal control group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 10$ ) and *musuwan* group ( $n = 10$ ). In all the rats, except those in control group, DMN (10 mg/kg) were given by intraperitoneal injection to establish fibrosis model. Rats in the *musuwan* group were subsequently treated with *musuwan* (3.125 g/kg, stomach perfusion). Blood from the heart was collected for the examinations of liver function, serum hyaluronic acid (HA), superoxide dismutase (SOD), and malonaldehyde (MDA). MMP-2, and TIMP-1 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction.

**RESULTS:** Compared with those in control group, serum ALP, MDA, and HA were significantly higher, whereas serum levels of Alb and SOD were significantly lower. In *musuwan* treated rats, serum ALP, MDA, and HA were remarkably reduced, while Alb and SOD were markedly

elevated. The levels of MMP-2 and TIMP-1 mRNA in model group were significantly higher than those in control group ( $0.70 \pm 0.22$  vs  $0.63 \pm 0.08$ ,  $P = 0.02$ ;  $1.38 \pm 0.48$  vs  $0.99 \pm 0.14$ ,  $P = 0.02$ ). *Musuwan* significantly down-regulated TIMP-1 mRNA ( $0.71 \pm 0.34$  vs  $0.99 \pm 0.14$ ,  $P = 0.03$ ); however, the level of MMP-2 mRNA showed no significant difference between *musuwan* group and model group.

**CONCLUSION:** *Musuwan* can effectively inhibit the expression of TIMP-1, but not MMP-2, in DMN-induced liver fibrosis in rats.

**Key Words:** *Musuwan*; Matrix metalloproteinase-2; Tissue inhibitor of metalloproteinase 1; Dimethylnitrosamine; Liver fibrosis

Gao F, Cheng LF, Wang ZQ, Yang YS. Effects of *musuwan* on TIMP-1 and MMP-2 expression in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(3):355-357

### 摘要

**目的:** 研究二甲基亚硝胺 (DMN) 肝纤维化模型 MMP-2, TIMP-1 mRNA 表达以及木苏丸的干预作用。

**方法:** ♂ SD 大鼠分为正常对照组 10 只 (ip 生理盐水), 模型组及治疗组各 10 只, 每周连续 3 d, 每天 ip 二甲基亚硝胺 10 mg/kg, 共 3 wk。造模同时模型组每天蒸馏水灌胃, 治疗组木苏丸 3.125 g/kg 蒸馏水溶解后每天灌胃, 治疗 4wk。心脏取血观察肝功能、血清透明质酸 (HA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 及丙二醛 (MDA) 的改变, 以逆转录多聚酶链反应方法观察肝纤维化模型肝组织 MMP-2, TIMP-1 mRNA 的表达水平及木苏丸的干预作用。

**结果:** DMN 大鼠肝纤维化模型组 MMP-2 mRNA 为  $1.38 \pm 0.48$ , TIMP-1 mRNA 为  $0.99 \pm 0.14$ , 均高于正常对照组 ( $0.70 \pm 0.22$  vs  $0.63 \pm 0.08$ ,  $P = 0.02$ ); 木苏丸治疗组 TIMP-1 mRNA 为  $0.71 \pm 0.34$ , 低于模型对照组 ( $0.99 \pm 0.14$ ,  $P = 0.03$ ); MMP-2 mRNA 为  $1.29 \pm 0.68$ , 与模型对照组无显著差异。

**结论:** DMN 肝纤维化模型肝组织 MMP-2, TIMP-1 mRNA 表达水平增高, 木苏丸能抑制肝组织 TIMP-1 mRNA 的表达, 从而延缓肝纤维化的形成。

**关键词:** 木苏丸;二甲基亚硝胺;金属蛋白酶2;金属蛋白酶抑制因子1;肝纤维化

高峰,程留芳,王志强,杨云生.木苏丸对大鼠二甲基亚硝胺肝纤维化肝组织TIMP-1, MMP-2 mRNA表达的作用.世界华人消化杂志 2005;13(3):355-357  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/355.asp

## 0 引言

肝纤维化是慢性肝病重要的病理特征,也是进一步向肝硬化发展的主要中心环节,轻型肝炎中肝纤维化发生率64%,中、重型肝炎100%发生肝纤维化<sup>[1]</sup>,因此,阻断或逆转肝纤维化是肝病治疗的关键,也是目前医学研究的重要课题之一.二甲基亚硝胺(DMN)模型是一较有价值的模型,可用于评价中西药对伴有活动性病变的慢性肝病所致肝纤维化及肝癌的防治作用<sup>[2]</sup>.我们应用半定量反转录PCR方法,观察DMN肝纤维化模型肝组织中金属蛋白酶(MMP-2)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)mRNA表达以及木苏丸的干预作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ SD大鼠30只,体质量180-250 g,购自解放军军事医学科学院实验动物中心.木苏丸(由当归、鳖甲、茵陈、红枣、黑豆等组成)由同仁堂研制成粉末,以蒸馏水溶解成适当浓度.二甲基亚硝胺购自日本东京化成工业株式会社.总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂购自Promega公司;PCR引物由上海生工生物制品公司合成;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒为南京建成生物制品公司产品.

**1.2 方法** 按文献[3]方法复制二甲基亚硝胺肝纤维化模型.将30只SD大鼠分为3组,正常对照组10只(ip生理盐水),模型组及治疗组各10只,每周连续3 d,每天ip二甲基亚硝胺10 mg/kg,共3 wk.造模同时模型组每天蒸馏水灌胃,治疗组木苏丸3.125 g/kg蒸馏水溶解后每天灌胃,治疗4 wk处死大鼠,取血清和肝脏组织备用.肝功能检测采用全自动生化仪测定;HA应用放射法测试;SOD、MDA测定按照试剂盒说明操作;肝组织MMP-2, TIMP-1 mRNA表达用一步法总RNA提取试剂盒提取肝组织总RNA,采用分光光度计测定提取的总RNA含量及纯度, A260/A280在1.8-2.0之

间. MMP-2引物序列:上游5' -GCTGATACTGACACTGGTACT-3' 下游5' -CAATCTTTTCTGGGAGCTC-3' 合成片段长度217 bp. TIMP-1引物序列:上游5' -CATGGAGAGCCTCTGTGGAT-3' 下游5' -GTTTCAGGCTTCAGCTTTTGC-3' 合成片段长度393 bp. GAPDH引物序列:上游5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';下游5' TCCACACCCTGTTGCTGTA-3' 合成片段长度454 bp. MMP-2, TIMP-1 mRNA PCR反应体系为50 μL. PCR反应参数:94℃预变性2 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 25个循环;72℃后延伸7 min. 扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳,以Quantity One凝胶成像系统进行半定量分析,用MMP-2、TIMP-1与GAPDH的比值表示其相对表达水平.

**统计学处理** 计数资料用mean ± SD描述,采用STATA7.0统计软件进行数据分析.

## 2 结果

DMN ip 2 wk动物出现乏力、嗜睡、皮毛皱而不洁、进食减少、尿黄,个别大鼠趾甲易出血,造模结束时3只大鼠出现腹水.模型组大鼠死亡2只,木苏丸治疗组大鼠死亡3只,木苏丸治疗组一般状况较模型组好.与正常对照组比较,模型对照组血清ALP, MDA均明显增高;Alb, SOD明显降低( $P < 0.01$ );HA增高( $P < 0.05$ ).木苏丸治疗组较模型对照组ALP, MDA明显下降( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );Alb, SOD明显增高( $P < 0.01$ );HA降低( $P < 0.05$ , 表1).与正常对照组比较,DMN大鼠肝纤维化模型组MMP-2 mRNA  $1.38 \pm 0.48$ , TIMP-1 mRNA  $0.99 \pm 0.14$ , 均高于正常对照组( $0.70 \pm 0.22$  vs  $0.63 \pm 0.08$ ,  $t = 2.56$ ,  $P = 0.02 < 0.05$ );木苏丸治疗组TIMP-1 mRNA  $0.71 \pm 0.34$ , 低于模型对照组( $0.99 \pm 0.14$ ,  $t = 2.35$ ,  $P = 0.03 < 0.05$ ), MMP-2 mRNA  $1.29 \pm 0.68$ 与模型对照组无显著差异(图1).

## 3 讨论

在正常肝脏纤维组织存在着细胞外基质(ECM)的合成与降解的动态平衡,肝纤维化及肝硬化时纤维结缔组织的形成,是各种不同致病因子导致ECM合成与降解的失衡所致.因此,研究肝纤维化的可逆性,在注意胶原合成过程的同时,应加强基质金属蛋白酶

表1 大鼠血清ALP, Alb, HA水平及SOD, MDA含量(mean ± SD)

分组	n	ALP nKat/L	Alb g/L	HA ug/L	SOD u/mL	MDA umol/L
正常对照	10	3779 ± 2255	30.1 ± 4.9	323 ± 147	362 ± 93	7.4 ± 1.4
模型对照	8	9832 ± 2819 <sup>b</sup>	21.1 ± 4.4 <sup>b</sup>	3865 ± 525 <sup>a</sup>	171 ± 52 <sup>b</sup>	9.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
木苏丸治疗	7	3589 ± 632 <sup>d</sup>	29.2 ± 3.0 <sup>d</sup>	332 ± 99 <sup>c</sup>	322 ± 75 <sup>d</sup>	8.4 ± 1.8 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照.

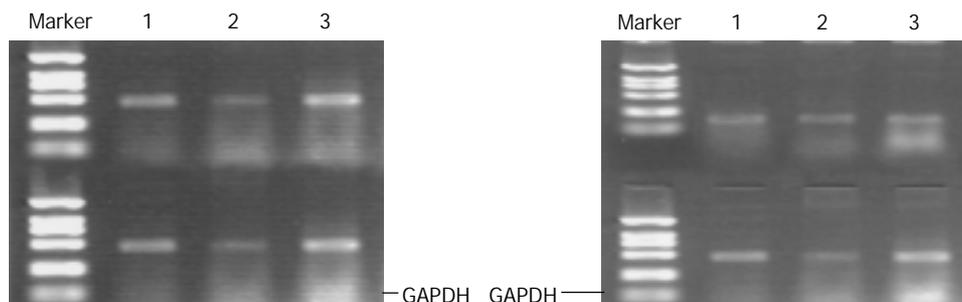


图1 TIMP-1和MMP-2基因电泳图. A: TIMP-1; B: MMP-2; 1: 正常对照组; 2: 木苏丸治疗组; 3: 模型对照组.

(MMPs)及其抑制物(TIMP<sub>s</sub>)在细胞外基质降解的调节过程中的作用研究, 加强观察药物对胶原降解研究, 将为防治肝纤维化的有效药物的发现提供一个重要途径. 肝纤维化早期MMP-2在肝组织中的表达增加, MMP-2主要降解V, VI型胶原和弹性硬蛋白(elastin)、纤维连接蛋白(fibronectin)及变性的I, III型胶原, 而IV胶原是构成基底膜的主要成分, MMP-2增多可破坏Disse间隙的基底膜, 降解正常肝组织, 破坏肝小叶的排列, 激活窦周细胞, 进一步促进纤维化的进展<sup>[4-5]</sup>. 陈治新 *et al*<sup>[6]</sup>研究在体外激活的大鼠HSC中MMP-1、TIMP-1均有较高表达. 谢彦华 *et al*<sup>[7]</sup>研究证实肝纤维化时MMP-2明显增高, 并随造模时间延长而进行性增加, 说明MMP-2与肝纤维化关系密切, 可能起促进作用. 本实验研究发现DMN诱导肝纤维化大鼠肝组织MMP-2 mRNA表达升高, 与国内李东 *et al*<sup>[8-9]</sup>报道的四氯化碳大鼠肝纤维化模型MMP-2的改变相符. TIMP-1是抑制基质金属蛋白酶活性的一组多功能因子家族的主要成员之一, 他在调节胶原的降解代谢中发挥着重要作用. TIMP-1主要抑制MMP-1的功能, 而后者是I型胶原的主要降解酶. HSC在静息状态下, TIMP-1的表达很低, 而一旦被激活, TIMP-1表达进行性升高. TIMP-1不但与MMP-1以1:1形式结合抑制其活性, 而且可以抑制酶原激活、增加活性酶的灭活, 从而使MMP-1对I型胶原的降解作用减弱、沉积增加, ECM合成与降解的失衡促进了肝纤维化乃至肝硬化的形成<sup>[10-11]</sup>. 因此, TIMP-1与细胞外基质的降解有着密切的关系. 本实验结果表明, 与正常对照组比较, DMN模型组TIMP-1 mRNA表达增高, 进一步验证了国内外关于四氯化碳、DMN、胆管结扎肝纤维化大鼠模型TIMP-1表达变化的报道<sup>[8-9]</sup>. 研究表明随着大鼠肝纤维化的发生、发展, 肝组织TIMP-1的基因表达逐渐增强, 并与肝纤维化程度密切相关<sup>[12]</sup>. 本研究显示模型对照组MMP-2及

TIMP-1 mRNA均有较高表达, 木苏丸治疗后MMP-2 mRNA表达无明显改变, 而TIMP-1 mRNA表达降低. 上述结果与本课题前期免疫组织化学结果相符, 进一步证实木苏丸缓解肝纤维化的作用可能与其抑制TIMP-1 mRNA表达, 从而促进胶原降解有关, 而不是通过影响MMP-2 mRNA的表达起作用. TIMP的生物合成与活性受很多因素影响, 但主要是通过改变基因转录来调节的<sup>[13]</sup>. 有必要研究TIMP-1的表达调控机制, 选择以抑制TIMP-1的表达作为抗肝纤维化的作用靶点, 为逆转纤维化机制及药物研究提供有利依据.

#### 4 参考文献

- 1 李东, 李兵顺. 肝纤维化逆转研究近况. 实用肝脏病杂志 2003;6:53-55
- 2 George J, Rao KR, Stern R, Chandrakasan G. Diethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology* 2001;156:129-138
- 3 杨文卓, 曾民德, 范竹萍, 茅益民, 陆伦根, 曹爱平. 氧化苦参碱防治二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的实验研究. 中华消化杂志 2003;23:165-168
- 4 黄月红, 张丽娟, 李丹, 陈治新, 王小众. IL-10对实验性肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶-2影响的研究. 肝脏 2001;6:162-164
- 5 曹名波. 基质金属蛋白酶-2、-9在大鼠肝纤维化中的表达及意义. 新乡医学院学报 2004;21:252-254
- 6 陈治新, 陈运新, 翁山耕, 黄月红, 张莉娟, 王小众. PDGF对肝星状细胞表达MMP-2及TIMP-1的影响. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:46-48
- 7 谢彦华, 李里, 王立娥, 刘春荣, 傅宝玉. 基质金属蛋白酶-2、-9与肝纤维化. 临床肝胆病杂志 2002;18:82-83
- 8 李东, 李兵顺, 刘金星, 甄真. 大鼠肝纤维化逆转机制研究. 肝脏 2002;7:183-184
- 9 李东, 李兵顺, 刘金星. 晚期肝硬化大鼠停止造模后MMP-2、TIMP-1表达的动态变化. 实用医学杂志 2002;18:572-573
- 10 王宇, 高毅, 黄宇琦, 方石岗, 杨继震. 实验性肝纤维化间质胶原酶表达的研究. 中华消化杂志 2000;20:67
- 11 段志军, 胡祥. 免疫性肝纤维化中肝组织中基质金属酶1及其抑制因子1的表达. 中华消化杂志 2002;22:566-567
- 12 朱跃科, 申凤俊, 王宝恩, 马红, 贾继东. 二甲基亚硝胺肝纤维化过程中金属蛋白酶组织抑制因子1基因表达的动态变化. 临床和实验医学杂志 2002;1:147-150
- 13 林海燕, 王红梅, 祝诚. 转化生长因子-β对基质金属蛋白酶及其组织抑制因子调控的研究进展. 生物化学与生物物理进展 2003;30:7-11