

异甘草酸镁对纤维化大鼠肝脏 TGF- β 1 及 Smad 蛋白表达的影响

彭忠田^{1,2Δ} 李 佳¹ 王 培¹ 李红梅² 刘书香²

(1 南华大学附属第一医院感染科 湖南 衡阳 421001; 2 南华大学附属第一医院肝病研究中心 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的: 观察异甘草酸镁对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝脏组织 TGF- β 1 及 Smad 蛋白表达的影响, 以期揭示其抗纤维化的机制。方法: 利用腹腔注射四氯化碳 (CCl₄) 建立大鼠肝纤维化模型, 然后应用不同剂量的异甘草酸镁和 INF- γ 处理, 于实验第 16 周末检测大鼠血清透明质酸 (HA)、层粘连蛋白 (LN)、III 型前胶原 (PC-III)、IV 型胶原 (C-IV) 的水平, 采用 RT-PCR 法检测 TGF- β 1、Smad3、Smad7 mRNA 的表达。结果: 与模型组比较, 异甘草酸镁各剂量组血清 HA、LN、PC-III、C-IV 水平显著下降 ($P < 0.05$), 肝脏 TGF- β 1、smad3 的表达明显降低 ($P < 0.05$), smad7 则有所上升。结论: 异甘草酸镁可以改善肝纤维化大鼠肝组织纤维化程度, 其作用机理与抑制 TGF- β 1、Smad3 mRNA 的表达, 上调 Smad7 mRNA 的表达有密切关系。

关键词: 肝纤维化; 异甘草酸镁; 大鼠; RT-PCR

中图分类号: Q95-3, R575.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)02-240-03

Effects of magnesium isoglycyrrhizinate on hepatic TGF- β 1 and Smad protein expression in rats with experimental hepatic fibrosis

PENG Zhong-tian^{1,2Δ}, LI Jia¹, WANG Pei¹, LI Hong-mei², LIU Shu-xiang²

(1 Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hu nan Province, China; 2 Liver Research Center, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hu nan Province, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the probable effects of Magnesium Isoglycyrrhizinate on rats of experimental hepatic fibrosis and its potential molecular mechanisms. **Methods:** Healthy male SD rats were randomly divided into different groups: normal control, model of hepatic fibrosis, INF- γ -treated and Magnesium Isoglycyrrhizinate-treated groups. Hepatic fibrosis in healthy male SD rats was induced by intraperitoneal injection of Tetrachloride. The serum concentration of Hyaluronic acid (HA), Laminin (LN), Procollagen Type III (PCIII) and Collagen Type IV (C-IV) were assayed with Radioimmunoassay. The mRNA levels of TGF β 1, Smad 3, and Smad 7 in rat's liver tissue were detected with RT-PCR. **Results:** Compared with model group, the level of serum HA, LN, PC-III, C-IV in Magnesium Isoglycyrrhizinate groups were significantly decreased ($P < 0.05$), the pathological fibrosis scores were also decreased obviously ($P < 0.05$), and the expression of TGF- β 1, Smad3 mRNA in rat's liver tissue were decreased significantly ($P < 0.05$), but Smad7 mRNA was increased. **Conclusion:** The mechanisms of Magnesium Isoglycyrrhizinate on protecting against tetrachloride--induced liver fibrosis in SD rats may be reduced the expression of TGF- β 1, Smad3 mRNA, and increase the expression of Smad7 mRNA at the same time.

Key words: Hepatic fibrosis; Magnesium Isoglycyrrhizinate; Rat; RT-PCR

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-240-03

前言

肝纤维化是肝硬化的前期阶段, 预防肝纤维化的发生发展或促进其逆转, 是防止肝硬化发生的重要策略。而肝纤维化的形成是个复杂的过程, 有多种细胞因子参与其中, 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1), 被认为是目前致肝纤维化最重要的细胞因子, Smad 蛋白家族是近年来发现的在 TGF- β 信号转导中具有重要作用的蛋白家族, 它可直接将 TGF- β 信号从细胞膜转入细胞核内^[1]。异甘草酸镁 (MgIG) 作为第四代甘草酸制剂, 在临床取得了很好的治疗效果。以往的研究工作虽然对甘草酸类药物的抗肝纤维化作用有了一定的研究, 但是对于第四代甘草酸制剂的研究报道比较鲜见, 本实验室曾在细胞形态学上探

讨了 MgIG 对大鼠肝星状细胞增殖和氧应激和表达细胞外基质的影响^[2], 本实验是后续研究中的一部分, 着重观察 MgIG 对纤维化大鼠肝脏 TGF- β 1 及 Smad 蛋白表达的影响, 并初步探讨其可能的抗肝纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SN-695B 智能放免 γ 测量仪 (上海核所日环光电仪器有限公司); 超速离心机 (Heraeus Biofuge28RS, 德国 HERAEUS 生产); 显微照相系统和 IX70 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司生产); FeroTeeGradienPCR 基因扩增仪 (杭州大和热磁电子有限公司); DYY-8 型稳压稳流电泳仪 (上海琪特分析仪器有限公司); 异甘草酸镁注射液 (江苏正大天晴药业股份有限公司批号: 0810182); γ -干扰素 (上海克隆生物高技术有限公司); HA、LN、PC-III、C-IV 放射免疫分析试剂盒 (上海海岩医学生物技术中心); TRIZOL Reagent (Invitrogen 公司); Taq DNA 聚合酶 (Lot: CK3502AA), 四种 dNTPs (Promega 公司); DEPC (美

作者简介: 彭忠田 (1971-), 男, 医学博士, 南华大学附一医院感染科及肝病研究中心主任, 主要从事肝脏疾病的研究, 电话: 13873488377
Email: hncspzt@yahoo.com.cn

Δ通讯作者: 彭忠田 (1971-), Email: hncspzt@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2010-10-03 接受日期: 2010-10-28)

国 SIGMA);PCR 引物(上海生工合成)。

1.2 方法

1.2.1 动物处理 70 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 180-220g,正常饲养一周后,随机选取 10 只作为正常对照组,正常喂养;余 60 只用作肝纤维化动物模型的制备,以腹腔注射 CCl₄ 3ml/kg (用橄榄油 4:6 稀释),每周 3 次,6 周后每周末处死 2 只大鼠,取肝组织作病理学检查,按照 2000 年西安会议《病毒性肝炎防治方案》的标准来判断肝纤维化程度。8 周末,可见大鼠肝纤维化模型建成,随将剩下的 50 只大鼠随机再分为 5 组(期间死掉 4 只):模型对照组、MgIG 低剂量组(15mg/kg)、MgIG 中剂量组(30mg/kg)、MgIG 高剂量组(60mg/kg)、干扰素- γ (10MU/kg)治疗对照组,每组 10 只,继续予以 CCl₄ 腹腔注射的同时,治疗组按剂量予以 MgIG 每日腹腔注射,IFN- γ 组予以 IFN- γ 10 万 U/kg 每日肌肉注射,共 8 周。实验第 16 周末,麻醉大鼠,采用股静脉放血法取血,分离血清于 -20℃ 冰箱保存待检。剖开大鼠腹腔暴露肝脏,取每只大鼠肝左叶的相同部位,迅速置于液氮中,速冻后取出冻存于 -70℃ 冰箱中,以备。

1.2.2 肝纤维化指标(HA, LN, PC-III、C-IV)的测定 HA、LN、PC-III、C-IV 检测按照试剂盒说明书加样,智能放免 Y 测量仪自动检测计算结果。

1.2.3 RT-PCR 法检测 TGF- β 1,Smad3,Smad7mRNA 的表达按 Triozl 试剂盒操作说明进行提取大鼠肝组织总 RNA,采用分光光度计测定提取的总 RNA 含量及纯度,OD260/OD280 在 1.8-2.0 之间。Smad3 引物序列:上游 5'-TGTTAGTAGAGCCGCA-CACCC-3' 下游:5'-GCTCTGTGAGTTTCGCCTTCA-3' 扩增片段长 575bp。Smad7 引物序列:上游 5'-GCCCTTCACGAAGC-TAATCT-3' 下游:5'-ACTGTCCAGACGCTGTACCT-3' 扩增片段长 536bp。TGF- β 1 引物序列:上游 5'-GTAAGCA-TGTTGGCAGTGGCT-3' 下游 5'-CTGAGAAGGGCTCAACACC-

3' 扩增片段长 312Pb。内参 GAPDH 引物序列 上游 5'-GGGTA-GTGCTGGTGTAGGTATGT-3' 下游:5'-AAG-AATGGGAG-TTGCTGTTGAAGTC-3' 扩增片段长 605bp。PCR 反应体系为 100ul,PCR 反应参数:94℃ 变性 30s,62℃ (TGF- β 1)/63℃ (Smad3)/60℃ (Smad7)退火 30s,72℃ 延伸 45s,扩增 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,以 Tanon GIS 系列数码凝胶图像处理系统与分析软件进行半定量分析,用 Smad3、Smad7、TGF- β 1 与 GAPDH 的比值表示其相对表达水平。

1.2.4 统计学分析 使用 SPSS13.0 统计软件统计分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,多组数据间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 基本实验情况

整个实验中有 13 只小鼠死亡,其中造模过程中死亡 4 只,模型组死亡 3 只,MgIG 低、中、高剂量组分别死亡 2、2、1 只;干扰素- γ 组死亡 1 只。

2.2 造模结果

8 周末时,造模组大鼠肝脏色泽便暗,表面有泥沙样结节,质地较硬,肝组织病理切片观察有较多纤维生成,证实肝纤维化形成,造模成功。

2.3 肝纤维化指标(HA, LN, PC-III、C-IV)检测结果

模型组与正常组比较,模型组肝纤指标明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),与模型组比较,异甘草酸镁低、中、高三组随着剂量的增加,升高的肝纤指标有不同的降低,且差异有统计学意义($P < 0.05$),干扰素- γ 组的肝纤指标与模型组比较,明显降低,有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 异甘草酸镁对肝纤维化大鼠血清 HA、LN、PC-III、C-IV 含量的影响(mean $\pm$ SD)

Tab1 Effect of MgIG on serum HA, LN, PC-III and C-IV levels in CCL₄-induced liver fibrosis in rats(mean $\pm$ SD)

Group	N	HA(ng/ml)	LN(ng/ml)	PC-III(ng/ml)	C-IV(ng/ml)
A:Normal	10	59.6 $\pm$ 5.7	32.2 $\pm$ 4.1	11.6 $\pm$ 1.8	39.6 $\pm$ 3.7
B:Model	7	391.0 $\pm$ 21.2#	69.3 $\pm$ 5.2#	49.1 $\pm$ 3.0#	107.4 $\pm$ 16.6#
C: IFN- γ	9	130.2 $\pm$ 17.3*	38.8 $\pm$ 4.5*	20.1 $\pm$ 2.3*	49.1 $\pm$ 7.7*
D:MgIG 15mg/kg	8	322.7 $\pm$ 17.0*	48.4 $\pm$ 5.1*	30.9 $\pm$ 2.7*	66.7 $\pm$ 8.4*
E:MgIG 30mg/kg	8	303.3 $\pm$ 18.7*	42.5 $\pm$ 4.1*	26.3 $\pm$ 2.1*	53.1 $\pm$ 6.2*
F: MgIG 60mg/kg	9	215.2 $\pm$ 22.1*	41.6 $\pm$ 4.2*	22.3 $\pm$ 2.6*	50.2 $\pm$ 6.1*

与正常组比较, # $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$

$P < 0.05$, compared with normal group; * $P < 0.05$, compare with model group

2.4 RT-PCR 法检测 TGF- β 1,Smad3,Smad7mRNA 表达的结果

模型组与正常组比较,肝组织 TGF- β 1,Smad3mRNA 的表达明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),Smad7mRNA 的表

达减弱($P < 0.05$);与模型组比较,MgIG 各处理组及 IFN- γ 组肝组织 TGF- β 1, Smad3mRNA 表达减弱($P < 0.05$), Smad7mRNA 表达则增强($P < 0.05$)。分析结果见表 2, 扩增结果见图 1。

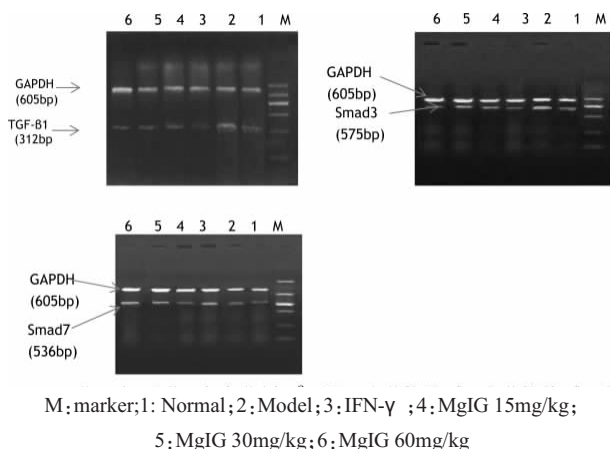
表 2 肝组织 TGF- β 1,Smad3,Smad7mRNA 的表达(mean $\pm$ SD)

Tab2 TGF- β 1,Smad3 and Smad7mRNA expression in rats' liver(mean $\pm$ SD)

Group	N	TGF- β 1	Smad3	Smad7
Normal	10	0.289 $\pm$ 0.047	0.469 $\pm$ 0.041	0.498 $\pm$ 0.041
Model	7	0.924 $\pm$ 0.078#	1.020 $\pm$ 0.067#	0.379 $\pm$ 0.066#
IFN- γ	9	0.369 $\pm$ 0.033*	0.488 $\pm$ 0.033*	0.851 $\pm$ 0.038*
MgIG 15mg/kg	8	0.514 $\pm$ 0.053*	0.636 $\pm$ 0.044*	0.606 $\pm$ 0.052*
MgIG 30mg/kg	8	0.474 $\pm$ 0.062*	0.574 $\pm$ 0.048*	0.726 $\pm$ 0.062*
MgIG 60mg/kg	9	0.403 $\pm$ 0.036*	0.502 $\pm$ 0.040*	0.809 $\pm$ 0.056*

与正常组比较, # $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$

$P < 0.05$, compared with normal group; * $P < 0.05$, compare with model group

图1 TGF- β 1,Smad3,Smad7mRNA 的表达Fig.1 TGF- β 1,Smad3 and Smad7mRNA expression in rats' liver

3 讨论

CCl4 目前被广泛用于诱导制备肝纤维化模型,由其诱导的动物肝纤维化或肝硬化在形态学、病理生理学的某些方面与人类肝纤维化相似。且该造模方法简单易行,病变有明显分期,形成率高^[3]。

目前临床评价病人肝纤维化的金标准仍是肝活检标本的病理检查,但是肝活检是一种创伤性的方法,有一定风险,且肝纤维化组织在肝内分布不均匀,而肝穿刺组织仅占全肝的五万分之一,难以准确反映病人肝纤维化的病变程度,不易动态观察和随访。目前较为公认的肝纤维化血清标志物为透明质酸、层粘连蛋白、III型前胶原、IV型胶原^[4]。本实验即采用了检查上述血清指标,来研究异甘草酸镁对肝纤维化的防治作用。

TGF- β 1 在肝纤维化疾病的发生、发展中起着重要作用,被认为是最主要的致纤维化因子^[5]。TGF- β 1 是激活肝星状细胞(HSC)的主要因子,而 HSC 的活化被认为是肝纤维化的中心环节。TGF- β 1 同时可促进活化后肌纤维母细胞过表达 ECM,并抑制其降解,具有间接促 ECM 增殖作用,因此,在肝纤维化疾病的形成过程中,TGF- β 1 起着重要作用^[6]。Smad 蛋白是 TGF- β 1/Smad 信号通路中重要组成部分,与肝纤维化形成密切相关^[7]。Smad 蛋白作为 TGF- β 1 受体胞内激酶的唯一底物,它既是胞内信号分子,又有转录激活作用。Smad 蛋白家族中的 Smad3 与 Smad7 是 TGF- β 受体后信息分子,参与调控细胞的增生、转化、合成、分泌和凋亡。其中 Smad3 是 HSC 活化的重要媒介^[8],Smad7 是 TGF- β 1/Smad 信号转导通路中的主要抑制性调控蛋白,可与 Smad2、Smad3 竞争性结合 T β RI,抑

制 TGF- β 1/Smad 的信号转导^[9]。本实验研究发现,异甘草酸镁可以抑制肝纤维化大鼠肝脏组织的 TGF- β 1、Smad3 mRNA 的表达,上调 Smad7mRNA 的表达,提示异甘草酸镁对 TGF-1/Smads 的信号转导的抑制可能是其治疗肝纤维化的机制之一,对于 MgIG 是否通过影响其他通路而发挥抗肝纤维化作用,有待于进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Zhang E Xiong, Zi Li Dan, Wang Xian Tang, et al. Effects of traditional Chinese medicine Ganyanping on TGF- β 1/Smad signaling pathway in Carbon tetraChlonde-induced hepatic fibrosis of rats[J]. Shi jie Hua ren Xiao hua Zazhi, 2006,14(2):152-157
- [2] 龙素军,彭忠田,刘映霞,等.异甘草酸镁对大鼠肝星状细胞增殖和活力的影响[J].中国实用医药,2010,26(4):37-38
- [3] Long Su-jun, Peng Zhong-tian, Liu Ying-xia, et al. Effects of Magnesium Isoglycyrrhizinate on the proliferation and activity of rat hepatic stellate cell [J]. China Prac Med, 2010,26(4):37-38
- [4] Guo Y, Wang H, Zhang C. Establishment of rat precision-cut fibrotic liver slice technique and its application in verapamil metabolism [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007,34(5-6):406-413
- [5] 陆伦根,曾民德.肝纤维化非创伤性诊断研究进展[J].中华医学杂志, 2005, 85(15):1078-800
- [6] Lu Lun-gen, Zheng Min-de. The research of Hepatic fibrosis nontraumatic diagnosis [J]. Natl Medical Journal of China, 2005, 85 (15): 1078-800
- [7] Paradis H, Liu CY, Saika S, et al. Tubedown-1 in remodeling of the developing vitreal vasculature in vivo and regulation of capillary outgrowth in vitro[J]. Dev Biol, 2002,249(1):140-155
- [8] 付荣泉,谭德明,彭忠田. TGF- β 1 si RNA 对肝星状细胞 Smad3、Smad7 mRNA 表达的影响[J].医学临床研究, 2006,23(6):875-877.
- [9] Fu Rong-quan, Tan De-ming, Peng Zhong-tian. The Effect of TGF- β 1siRNA on Smad3, Smad7 mRNA Expression in the Hepatic Stellate cells [J]. CIN Res, 2006, 23(6):875-877
- [7] 李蕴枷,魏来. 转化生长因子 β /Smad 信号传导机制及其与肝纤维化的关系[J].中华肝脏病杂志,2005,Vol1 3, No.6
- [8] Li Yun-ru, Wei Lai. Mechanism of transforming growth factor beta/Smad signaling and the relationship between its transduction and liver fibrosis. [J] China J Hepatol, 2005,Vol1 3, No.6
- [8] Cui X, Shimizu I, Lu G, et al. Inhibitory effect of a soluble transforming growth factor beta type II receptor on the activation of rat hepatic stellate cells in primary culture [J]. J Hepatol, 2003, 39: 731-7371
- [9] Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins[J]. J Cell Physiol, 2002,191: 1-16