

氧化苦参碱对慢性乙肝和肝硬化患者血清 MMP-2 和 TIMP-2 的影响

刘 江 施柏年 何建方 戴利成

摘要 目的 观察氧化苦参碱对慢性乙型肝炎(简称慢乙肝)和乙型肝炎后肝硬化(简称肝硬化)患者血清基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-2 组织抑制因子(TIMP-2)以及肝纤维化指标[透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)和Ⅳ型胶原(ⅣC)]的影响。**方法** 慢乙肝(36例)和肝硬化(36例)患者用氧化苦参碱治疗前后采用 ELISA 方法检测血清 MMP-2、TIMP-2,采用放射免疫法检测 HA、LN、ⅣC 的变化,并分析 MMP-2、TIMP-2 和肝纤维化指标之间相关性。**结果** 氧化苦参碱能降低慢乙肝中、重度和肝硬化 Child-pugh A、B、C 级血清 HA、LN、ⅣC 水平及血清 MMP-2 水平(与本组治疗前比较, $P < 0.05$)。血清 MMP-2、TIMP-2 水平分别与 HA、LN、ⅣC 均有良好相关性($P < 0.01$)。**结论** MMP-2、TIMP-2 可用来评价纤维化情况,氧化苦参碱有一定抗肝纤维化作用。

关键词 氧化苦参碱;慢性乙型肝炎;肝硬化;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-2 组织抑制因子

Effect of Oxymatrine on Serum Matrix Metalloproteinase-2 and its Inhibitor in Patients with Chronic Hepatitis B and Liver Cirrhosis LIU Jiang, SHI Bai-nian, HE Jian-fang, et al *Central Hospital of Huzhou City, Zhejiang* (313000)

Abstract Objective To observe the effect of oxymatrine on the level of serum matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in patients with chronic hepatitis B (CHB) and post-hepatitis B liver cirrhosis (LC), as well as on liver fibrosis indexes as hyaluronic acid (HA), laminin (LN) and Ⅳ type collagen (ⅣC). **Methods** Changes of all the above-mentioned indexes in patients with CHB ($n = 36$) and LC ($n = 36$) before and after treatment were determined, and the relationship of MMP-2 and TIMP-2 with liver fibrosis indexes were analyzed. **Results** Oxymatrine could decrease the levels of MMP-2, HA, LN and ⅣC in patients with severe or moderate CHB and LC of Child-pugh A, B and C grade, as compared with the data before treatment ($P < 0.05$). Serum level of MMP-2 and TIMP-2 was well correlated with the levels of liver cirrhosis indexes. **Conclusion** MMP-2 and TIMP-2 can be used as a reference for evaluating the degree of LC, and oxymatrine has a certain anti-LC effect.

Key words oxymatrine; chronic hepatitis B; liver cirrhosis; matrix metalloproteinase-2; issue inhibitor of metalloprotenase-2

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的基础,主要是多种原因所致细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)异常增生和降解不足的结果,更大程度上是由于降解减少引起的^[1]。目前的研究表明,肝 ECM 的代谢主要由基质金属蛋白酶家族(matrix metalloprotenase, MMPs)及其抑制剂(tissue inhibitor of metalloprotenase, TIMPs)所调节, MMPs 促进 ECM 降解,而 TIMPs 通过抑制 MMPs 阻止 ECM 的降解从

而促进肝纤维化。本研究通过观察氧化苦参碱对 MMP-2 及其抑制因子(TIMP-2)的影响,来探讨氧化苦参碱对肝 ECM 的作用,从而明确其抗肝纤维化作用。

资料与方法

1 纳入病例 选择:(1)年龄在 18~65 岁之间;(2)符合 2000 年 9 月西安会议中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案^[2]。排除:(1)合并甲、丙、丁、戊型等其他病毒性肝炎;(2)酒精性、药物性、自身免疫性或代谢性肝

作者单位:浙江省湖州市中心医院(浙江 313000)

通讯作者:刘 江, Tel: 0572 - 2217636, E-mail: liujiangxm@yahoo.

com. cn

病;(3)引起 MMP-2、TIMP-2 增高的因素,如肿瘤、肾病、冠心病、肺纤维化、风湿性关节炎等;(4)治疗前曾使用过拉米夫定或干扰素等抗病毒药物、抗纤维化药物、免疫调节剂及皮质激素。

2 一般资料 2004 年 1~9 月在本院确诊的慢乙肝和肝硬化患者 72 例,其中慢乙肝 36 例,男 22 例,女 14 例;年龄(38.42 ± 16.52)岁;轻度、中度、重度各 12 例。肝硬化 36 例,男 25 例,女 11 例;年龄(42.51 ± 12.56)岁;Child-pugh 分级 A、B、C 各 12 例。对照组 20 例,为我院门诊健康体检人员、实习同学、本院职工等,男 11 例,女 9 例;年龄(35.58 ± 13.27)岁。

3 治疗方法 所有患者在一般的护肝、降酶、解毒(甘利欣、苦黄、还原型谷光甘肽)治疗的基础上加用氧化苦参碱(商品名天晴复欣,从豆科植物苦豆草的种子苦豆子或豆科植物苦参的根中提取,分子式为 $C_{15}H_{24}N_2O_2 \cdot H_2O$,分子量为 282,江苏正大天晴药业有限公司生产)600 mg,静脉滴注,每天 1 次,共 30 天,而后改为单用口服天晴复欣胶囊(每粒含氧化苦参碱 100 mg,生产厂家同前),每次 200 mg,每天 3 次,连用 60 天,疗程共为 90 天。不用其他抗病毒药物如拉米夫定、干扰素等。

4 检测指标与方法 所有患者在用氧化苦参碱前后清晨空腹静脉抽血各 3ml。对照组清晨空腹静脉抽血(1 次)3ml。血清 MMP-2 和 TIMP-2 均采用 ELISA 方法检测(试剂购自 USA R&D Systems Inc.)。血清肝纤维化指标[透明质酸酶(hyaluronate, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、IV 型胶原(IV Collagen, IV C)]用放射免疫法检测(试剂购自上海海研医学生物技术中心)。测定前血标本恢复至室温,按试剂说明书操作。

5 统计学方法 用 SPSS 10.0 统计软件包进行数据分析,组间比较用配对 *t* 检验,各组均数比较用方差分析。TIMP-2 和 MMP-2 分别与 HA、LN、IV C 做相关分析。

结 果

1 氧化苦参碱治疗前后患者血清 MMP-2 和 TIMP-2 水平的变化 见表 1。MMP-2 水平:治疗前慢乙肝重度、肝硬化各级分别较对照组和慢乙肝轻、中度明显升高,差异有显著性($P < 0.01$);与慢乙肝重度比较,肝硬化 B、C 级水平更高,差异有显著性($P < 0.05$);肝硬化 A 与 C 级之间比较, B 与 C 级之间比较差异均有显著性($P < 0.05$);各组治疗后 MMP-2 水平均有明显降低($P < 0.05$)。TIMP-2 水平:治疗前慢乙肝重度、肝硬化各级分别较对照组、慢乙肝炎轻、中度明显升高,差异有显著性($P < 0.01$);肝硬化 B、C 级之间比较差异有显著性($P < 0.05$);治疗后各组 TIMP-2 水平变化不明显。

表 1 不同程度的肝病患者血清 TIMP-2 和 MMP-2 水平及氧化苦参碱治疗前后的变化比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	病情程度	例数	MMP-2		TIMP-2	
			治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
慢乙肝	轻度	12	251.8 $\pm$ 83.7	217.0 $\pm$ 65.9*	162.4 $\pm$ 53.6	159.8 $\pm$ 43.7
	中度	12	330.9 $\pm$ 83.9	278.3 $\pm$ 68.2*	172.8 $\pm$ 47.5	179.3 $\pm$ 45.8
	重度	12	416.0 $\pm$ 134.7*	351.0 $\pm$ 100.6*	228.7 $\pm$ 65.5*	239.3 $\pm$ 58.7
肝硬化	A 级	12	485.0 $\pm$ 80.3*	350.0 $\pm$ 61.7*	228.7 $\pm$ 48.4*	246.8 $\pm$ 44.1
	B 级	12	555.4 $\pm$ 94.8* Δ	423.7 $\pm$ 80.2*	219.5 $\pm$ 39.9* Δ	226.9 $\pm$ 39.2
	C 级	12	646.0 $\pm$ 146.8* Δ $\blacktriangle$	527.2 $\pm$ 108.1*	261.0 $\pm$ 52.2* Δ	259.3 $\pm$ 39.6
对照		20	263.3 $\pm$ 77.1	—	160.7 $\pm$ 34.6	—

注:与对照组或慢乙肝轻度、中度比较,* $P < 0.01$;与慢乙肝重度比较, Δ $P < 0.05$;与本病 A 级比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$;与本病 B 级比较, $\#$ $P < 0.05$;与本组治疗前比较, $^{\circ}$ $P < 0.05$

2 氧化苦参碱治疗前后血清 HA、LN、IV C 水平的变化 见表 2。除慢乙肝轻度外,其他各组 HA、LN、IV C 在氧化苦参碱治疗后均有明显降低($P < 0.05$)。

3 肝纤维化指标与 MMP-2 和 TIMP-2 的相关分析 见表 3。本研究采用 Pearson 相关分析,发现它们之间存在显著相关性。

4 不良反应 在本研究中,有部分患者在改口服氧化苦参碱胶囊的前 3 天左右(初期)有一定的胃肠

表 2 不同程度的肝病患者血清 HA、LN、IV C 水平及氧化苦参碱治疗前后的变化比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	病情程度	例数	HA		LN		IV C	
			治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
慢乙肝	轻度	12	173.04 $\pm$ 51.20	161.95 $\pm$ 39.09	104.62 $\pm$ 28.86	97.50 $\pm$ 20.87	80.62 $\pm$ 36.37	80.88 $\pm$ 23.48
	中度	12	225.06 $\pm$ 64.81	194.44 $\pm$ 49.38*	183.08 $\pm$ 59.16	157.54 $\pm$ 38.09*	133.09 $\pm$ 41.97	109.14 $\pm$ 30.08*
	重度	12	324.16 $\pm$ 84.46	273.55 $\pm$ 55.07*	221.22 $\pm$ 111.95	181.36 $\pm$ 70.27*	149.52 $\pm$ 65.84	120.81 $\pm$ 39.61*
肝硬化	A 级	12	357.03 $\pm$ 89.70	304.94 $\pm$ 51.51*	239.88 $\pm$ 57.21	205.16 $\pm$ 44.35*	169.99 $\pm$ 59.78	135.93 $\pm$ 45.93*
	B 级	12	416.16 $\pm$ 67.01	365.84 $\pm$ 43.50*	298.42 $\pm$ 63.34	252.34 $\pm$ 46.18*	214.09 $\pm$ 74.36	173.92 $\pm$ 50.08*
	C 级	12	543.55 $\pm$ 147.10	479.31 $\pm$ 122.00*	357.17 $\pm$ 78.87	311.07 $\pm$ 64.31*	303.54 $\pm$ 109.87	255.61 $\pm$ 89.61*

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$

表 3 不同程度的肝病患者肝纤维化指标
与 MMP-2 和 TIMP-2 的相关分析

	HA		LN		IVC	
	r	p	r	p	r	p
MMP-2	0.938	<0.001	0.889	<0.001	0.838	<0.001
TIMP-2	0.712	<0.001	0.581	<0.001	0.645	<0.001

道反应,表现为恶心、返酸,随着治疗时间的延长,上述反应消失,最终均完成治疗。

讨 论

肝星状细胞(HSC)的激活、增生、表型转化为肌成纤维细胞(MFB)是肝纤维化发生、发展中的中心病理环节。MMP-2 表达增加是肝脏纤维化始动因素之一,随着纤维化的进展,MMP-2 水平在肝纤维化进展阶段升高,而在肝硬化和肝纤维化恢复阶段逐步降低。肝纤维化时 MMP-2 基因表达增强,对正常基底膜Ⅳ型胶原降解增强,激活了 Disse 腔中的 HSC,使它们向成纤维表型(MFB)转化,促进了肝纤维化的发生和发展。在 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型中 MMP-2 的表达随肝纤维化发展逐步增加^[3-5],尤其进展期增加更明显。Murawaki^[6]检测了肝组织内 MMP-2 酶原含量,显示肝硬化患者有明显升高,升高程度与肝组织胶原含量呈正相关。Takahara^[7]证实,慢性肝炎患者较正常者升高 5.4 倍,肝硬化升高 1.4 倍,免疫电泳发现,在肝细胞内皮细胞、kupffer 细胞、毛细血管内皮细胞和淋巴细胞的胞浆和胞膜上均有 MMP-2 沉积,说明这些部位存在有局部 MMP-2 酶原活化,表明 MMP-2 参加了肝纤维化过程中肝组织的重塑。

血清 MMP-2 水平与门静脉周围坏死程度、肝纤维化程度和肝组织活动性评分呈正相关^[8],认为观察这些指标有助于正确评价肝组织肝纤维化程度^[9]。当血中 MMP-2 水平升高,提示慢性肝炎已经向肝纤维化发展,可以为临床诊断和治疗提供依据。检测血清 MMP-2、TIMP-2 的变化有助于筛选良好的抗肝纤维化药物。

氧化苦参碱能抑制 HSC 激活和 MFB 增殖以及转化生长因子 β₁ (TGFβ₁) 的表达,也能抑制Ⅲ型原胶原的表达,并呈剂量依赖性^[10-12]。此外,研究表明^[12]氧化苦参碱有降低自由基生成、减轻脂质过氧化的作用,后者是引起肝细胞损伤与 HSC 活化的重要机制。另外,有研究表明,损伤肝枯否细胞(KC)对静止的 HSC 增殖有促进作用,氧化苦参碱可抑制活化的 KC 对 HSC 的旁分泌活化作用,并可抑制活化的 KC 分泌 TGFβ₁^[13]。因此,在病变的早期给予氧化苦参碱治疗,对肝纤维化的早期预防和治疗有重要的意义。

在我们的研究中,氧化苦参碱治疗后各组 MMP-2 有明显降低,而 HA、LN、IVC 除慢乙肝轻度外也均有明显降低。因此我们认为氧化苦参碱具有良好的抗肝纤维化作用。

参 考 文 献

- 1 Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. J Hepatol 1998 ;29(5):836 - 847.
- 2 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19(1):5 - 10. Guideline on viral hepatitis. Chin J Infect Dis. 2001; 19(1):5 - 10.
- 3 Murawaki Y, Kawasaki H, Burkhardt H, et al. Serum collagenase activity in chronic liver diseases. Pathol Res Pract 1994; 190 (9 - 10):929 - 933.
- 4 Takahara T, Furui K, Funaki J, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. Hepatology 1995 ;21(3):787 - 795.
- 5 刘海林, 李宣海, 王丹艺, 等. 肝纤维化时Ⅳ型胶原酶与金属蛋白酶组织抑制因子-1 的表达. 上海医学 2000;3(2):73 - 75. Liu HL, Li XH, Wang DY, et al. Expressions of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in experimental fibrotic liver. J Shanghai Med 2000;3(2):73 - 75.
- 6 Murawaki Y, Yamada S, Ikuto Y, et al. Clinical usefulness of serum matrix metalloproteinase-2 concentration in patients with chronic viral liver disease. J Hepatol 1999; 30 (6) : 1090 - 1098.
- 7 Takahara T, Furui K, Yata Y, et al. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. Hepatology 1997 ;26(6): 1521 - 1529.
- 8 Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. J Hepatol 1997;26 (3):574 - 583.
- 9 Armendariz-Borunda J, Seyer JM, Kang AH, et al. Regulation of TGF beta gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. FASEB J 1990;4(2):215 - 221.
- 10 朱 梁, 宋 健, 张兴泰, 等. 苦参素对成纤维细胞增殖、形态学及转化生长因子 β₁ 的影响 中国新药与临床杂志 2000;19(6):461 - 463. Zhu L, Song J, Zhang XT, et al. Effect of Kurarinone on fibroblastic proliferation, morphology and expression of TGF-beta 1. Chin J New Drugs Clin Rem 2000;19(6):461 - 463.
- 11 康文臻, 谢玉梅, 聂青和, 等. 苦参素对实验性大鼠肝纤维化防治作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(2):195 - 198. Kang WZ, Xie YM, Nie QH, et al. Effect of oxymatrine on experimental liver fibrosis. World Chinese J Dig 2003;11(2):

- 195-198.
- 12 杨文卓,曾民德,陆伦根,等.氧化苦参碱预防肝纤维化的实验研究.肝脏 2002;7(3):165-167.
- Yang WZ, Zeng MD, Lu LG, et al. Experimental study on oxymatrine in prevention of liver fibrosis. Chin Hepatol 2002; 7(3):165-167.

- 13 卢清,张清波,张继明,等.氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用.肝脏 2004;9(1):31-33.
- Lu Q, Zhang QB, Zhang JM, et al. The inhibition effect of oxymatrine on the activation of paracrine pathway of hepatic stellate cells. Chin Hepatol 2004;9(1):31-33.

(收稿:2005-03-30 修回:2005-07-06)

中西医结合治疗重度有机磷中毒 22 例

林秋生

1998 年 12 月-2004 年 12 月,我院采用常规基础加中药治疗重症有机磷中毒(AOPP)22 例,并与单用常规基础治疗的 24 例作对照,现报道如下。

临床资料 46 例患者均为口服有机磷中毒,依据临床表现及胆碱酯酶(CHE)活性测定,符合重度有机磷中毒诊断标准。按数字表法将 46 例患者随机分为两组,治疗组 22 例,男 8 例,女 14 例;年龄 16~68 岁,平均(42.5±3.2)岁;服毒至抢救时间(2.48±1.60)h;中毒种类:甲胺磷 5 例,甲拌磷 3 例,氧化乐果 4 例,敌敌畏 8 例,混合性有机磷 2 例;服毒量 70~200 ml,平均(112.50±21.36)ml;昏迷 16 例,肺水肿 22 例,心跳骤停 1 例,呼吸衰竭 6 例;CHE(484±150)U/L。对照组 24 例,男 11 例,女 13 例;年龄 14~71 岁,平均(39.2±2.9)岁;服毒至抢救时间(2.65±1.37)h;中毒种类:甲胺磷 6 例,甲拌磷 4 例,氧化乐果 3 例,敌敌畏 8 例,混合性有机磷 3 例;服毒量 75~200 ml,平均(108.00±19.52)ml;昏迷 15 例,肺水肿 24 例,心跳骤停 2 例,呼吸衰竭 5 例;CHE(506±170)U/L。两组患者资料比较差异无显著性($P>0.05$),具有可比性。

治疗方法 两组均及时清除体表残留毒物、持续洗胃、导泻、输液、吸氧、阿托品及 CHE 复能剂应用等常规基础治疗,对服毒量大、救治晚、经常规救治仍不见改善, CHE 活性<30%或持续不升或升后又降的重症患者,根据血压和生命体征情况,采取输血或换血疗法(治疗组输血 5 例,对照组输血 7 例),有条件时行血浆置换。血压不稳者直接输入新鲜血液 400 ml,必要时 2~4 h 重复 1 次,直至病情的改善。治疗组在上述治疗基础上,用中药调胃承气汤(取大黄和甘草各 30 g,加水 800 ml,煮沸 10 min 过滤后加芒硝 30 g,约为 600 ml)洗胃后,先用药用活性炭 50 g 加生理盐水 250 ml 和匀灌入,30 min 后每隔 2 h,每次 200 ml 分 3 次从胃管中灌入中药调胃承气汤,连用 2~3 天;清开灵注射液(北京中医药大学生产)50 ml 加入 5%葡萄糖注射液静脉滴注,每天 2 次,连用 3~5 天。对照组只用常规基础治疗。

观察项目:用阿托品情况、排便和并发症[如中间综合征(即经积极救治急性胆碱能危象消失后,迟发性周围神经病出现之前的一组以肌无力为主要表现的临床综合征,病情笃重)、

应激性上消化道出血等]和死亡等。统计学方法:采用方差分析、 t 检验和 χ^2 检验。

结 果

1 两组患者用阿托品情况 治疗组出现阿托品化时间为(4.90±1.20)h,达阿托品化时用量为(120.6±46.2)mg,阿托品总用量为(289.3±187.5)mg;对照组分别为(6.80±1.20)h、(140.2±60.4)mg 和(449.7±223.6)mg。两组比较差异有显著性($P<0.05$)。

2 两组患者排便、昏迷者苏醒和 CHE 恢复时间 治疗组开始排便时间为(3.60±1.24)h,昏迷者苏醒时间为(6.0±2.4)天, CHE 恢复时间为(8.0±3.8)天;对照组分别为(5.40±1.62)h、(8.5±3.2)天和(11.0±4.6)天,两组比较差异有显著性($P<0.05$)。

3 两组患者预后情况 治疗组治愈 21 例,平均治愈时间为(8.4±4.3)天;死亡 1 例;并发症 3 例(其中中间综合征 1 例,吸入性肺炎 2 例)。对照组治愈 20 例,平均治愈时间为(11.5±6.3)天;死亡 4 例;出现反跳 3 例,并发症 12 例(其中中间综合征 3 例,应激性上消化道出血 2 例,脑水肿 2 例,吸入性肺炎 4 例,急性肾功能衰竭 1 例),两组并发症比较差异有显著性($P<0.05$)。

4 不良反应 治疗组患者未见明显的不良反应及过敏。

讨 论 AOPP 是门诊和内科的常见急诊,阿托品和胆碱酯酶复能剂的应用是标本兼治的特效疗法,但死亡率仍是很高。我们分析,除部分患者送医院太晚而失去救治机会外,阿托品用量不当导致的各种并发症的发生,使 AOPP 的死亡率一直居高不下。调胃承气汤是以大承气汤去枳实、厚朴,用甘草的甘温来保护胃气不致受伤而设,其泻下排毒、清热解毒和保护重要脏器,提高机体对有机磷中毒后缺氧的耐受性。清开灵不仅有清热解毒、镇静安神的作用,而且对 AOPP 所致的脑水肿、昏迷有较好的防治和促醒作用。调胃承气汤重在导泻,与清开灵合用,共奏解毒泻下、化瘀通络、醒脑开窍、益气固脱之功用。根据上述各项观察数据比较,显示治疗组比对照组达阿托品化时间短、阿托品用量少,排便快,并发症及反跳少,死亡率低, CHE 恢复时间及住院时间短,苏醒早,治愈率高等优点。