大黄䗪虫丸对大鼠肝星状细胞基质金属蛋白酶表达及活性的影响

潘志恒[1]　谢　瑶[2]　何宏文[2]　武　敬[1]　何义华[1]

摘要　目的　观察大黄䗪虫丸对大鼠肝星状细胞间质胶原酶(MMP-1)基因表达及分泌到培养基中的明胶酶 A(MMP-2)活性的影响。**方法**　分离培养大鼠肝星状细胞(HSC),制备大黄䗪虫丸大鼠药物血清,温育 HSC。逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)法观察 MMP-1 的表达。酶谱法检测 MMP-2 的活性。**结果**　大黄䗪虫丸药物血清可明显促进 HSC 对 MMP-1 的基因表达,同时可明显增加 HSC 合成的 MMP-2 的含量和活性($P<0.05$)。**结论**　大黄䗪虫丸的抗肝纤维化作用与其促进 HSC 的 MMP-1 基因表达,增加 MMP-2 的含量和活性有关。

关键词　大黄䗪虫丸;肝星状细胞;间质胶原酶;明胶酶 A

Effects of Dahuang Zhechong Pill on Expression and Activity of Matrix Metalloproteinase in Rats' Hepatic Stellate Cells

PAN Zhi-heng, XIE Yao, HE Hong-wen, et al *Department of Traditional Chinese Medicine, The Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou (510630)*

Abstract　Objective　To observe the effects of Dahuang Zhechong Pill (DZP) on the gene expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in rats' hepatic stellate cells (HSC) and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) that secreted into the culture base. **Methods**　HSC were isolated from the liver of normal rats and incubated with DZP-contained drug serum. The expression of MMP-1 in the HSC was detected by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The activity of MMP-2 was examined by zymography. **Results**　DZP-contained drug serum could obviously promote the gene expression of MMP-1 in HSC. *In the meantime, it could obviously increase the content and activity of MMP-2 synthesized by HSC* ($P<0.05$). **Conclusion**　The anti-fibrosis action of DZP was correlated to the promotion of HSC's gene expression of *MMP-1* and *increasing of the contents and activity of MMP-2*.

Key words　Dahuang Zhechong Pill; hepatic stellate cells; matrix metalloproteinase-1; matrix metalloproteinase-2

肝纤维化是肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与分解代谢失去平衡状态的结果,其中肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化病理形成的重要细胞学基础,HSC 活化后不但从静止的维生素 A 储存细胞过度转化为肌成纤维样细胞(myofibroblaster, MFB),同时合成 ECM,并通过其合成基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of MMP, TIMP)调节 ECM 降解。近年来,中医经典古方大黄䗪虫丸在临床观察中不断被报道有抗肝纤维化的作用[1-3],为了探讨该药可能存在的抗肝纤维化作用机制,我们观察了大黄䗪虫丸对体外培养的大鼠肝脏 HSC 间质胶原酶(MMP-1)基因表达及分泌到培养基中的明胶酶 A(MMP-2)活性的影响作用,现报告如下。

材料与方法

1　动物　雄性 SD 大鼠 50 只,清洁级动物,体重 250~280 g,购自中山大学中山医学院实验动物中心,普通饲料喂养。随机分成 5 组:(1)细胞培养组:用于体外分离、培养 HSC 细胞;(2)空白对照组;(3)药物血清 A 组;(4)药物血清 B 组;(5)软肝冲剂组。每组 10

基金项目:广东省中医药管理局科研基金项目(No. 1040053)、国家中医药管理局科研基金项目(No. 04-05JP51)

作者单位:1. 中山大学附属第三医院中医科(广州 510630);2. 中山大学中山医学院人体解剖教研室

通讯作者:潘志恒,Tel: 020 - 88337607, E-mail: stevenp2@21cn.com

万方数据

只。

2 药物 大黄䗪虫丸药粉由广东阳江制药厂提供。软肝冲剂为经验方,由女贞子、旱莲草、龟板、鳖甲、赤芍、牡丹皮、山茱萸、虎杖等药物组成,由广东一方制药厂负责生产,本院药剂科监制。

3 试剂及仪器

3.1 主要试剂 链霉蛋白酶(Pronase E)及Ⅳ型胶原酶(Type Ⅳ collagenase)为美国 Sigma 公司产品;DNase Ⅰ为 Boehringer 公司产品;淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品,用 D-Hanks 液调整其密度为 1.053 备用;DMEM/F12 为 GIBCO 公司产品;总 RNA 提取试剂盒(TRIzol)、MMV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶为中山大学达安基因股份有限公司产品;引物由上海博亚生物技术有限公司合成;PCR-markers 为 MBI fermentas 公司产品;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)低分子量标准蛋白质为上海生工生物工程公司产品。

3.2 主要仪器 美国 NAPCO 培养箱,德国 Licca 倒置显微镜,美国 PE 公司 9700 DNA 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司电泳仪,美国 UVP 凝胶扫描系统。

4 实验方法

4.1 药物血清制备 药物血清 A 组按文献法[4]给予大黄䗪虫丸药粉(每只每天 2.7 g)。药物血清 B 组按每只每天 1.5 g 给药。将上述药粉用蒸馏水溶化,分别每天分两次灌胃给药,每次 4 ml,连续给药 5 天。空白对照组灌胃等量的蒸馏水。采血时间为最后一次灌胃后 1 h,以乙醚麻醉大鼠,无菌状态下打开大鼠腹腔,经下腔静脉取血,2 000 r/min 离心 15 min,血清经 56°C,30 min 灭活后置于 −20°C 冰箱保存备用。

4.2 正常大鼠 HSC 分离、培养及传代 参考文献[5]方法,即:大鼠每日经皮下注射维生素 A 油剂 5 万 U,共 2 周。以 1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,常规消毒后打开腹腔,经下腔静脉肝素化(1 000 U/只),门静脉插管,连接滴液瓶,剪断后腔静脉放血,快速灌注 150 ml D-Hanks 液至肝脏变白,流出液不带血色。分离肝脏至大培养皿中,继续灌注 0.05% 链酶蛋白酶液 100 ml 和 0.025% 胶原酶液 100 ml,每分钟约 60 滴。收集灌注液于烧杯内,撕碎肝脏剔除肝包膜及大血管后,连同收集的酶液置于磁力搅拌器上,调整至 200 r/min,继续消化 20 min,3 层纱布过滤。滤液离心(1 200 r/min)10 min,吸弃上清,加入 Hanks 液及 DNase Ⅰ(终浓度 40 μg/ml),吹打使细胞充分离散悬浮再按上述条件离心洗涤 3 次,直至上清液较澄清,弃上清液,加 10 ml 的 DMEM/F 12 培养液充分吹散细胞后小心加到 20 ml 比重为 1.053 的细胞分离液上,以 3 000 r/min 离心 30 min。仔细吸取分离液与细胞悬液界面之间的细胞,Hanks 液洗涤 2 遍,以含 15% 新生小牛血清的 DMEM/F 12 悬浮细胞。台盼蓝染色计算存活率及细胞数。细胞以 1×10^5 cells/cm^2 密度接种,置相对体积分数为 5% CO_2、95% 空气、37°C 恒温恒湿培养箱内培养。每周换液 2~3 次,10~14 天长满后传代。

4.3 MMP-1 基因表达的检测 采用 RT-PCR 法进行测定,用 Trizol 提取 HSC 总 RNA,采用 20 μl 逆转录反应体系进行 cDNA 的合成(内含待测 RNA,MMV 逆转录酶 RNA 酶抑制剂,两种引物的混合液及 dNTP×5RT buffer)。37°C 反应 1 h。95°C 3 min 灭活 MMV。共扩增定量 PCR,反应体系为 50 μl,内含 10× buffer 5 μl、10 mmol/L dNTP 0.4 μl,MMP-1、GAPDH 引物各 0.5 μl,Taq 酶 3 U,cDNA 模板 0.1~1 μg,加水补足至 50 μl,PCR 反应在 PE 9700 扩增仪上进行,反应条件为:93°C 预变性 3 min;93°C 变性 30 s;57°C 退火 45 s,72°C 延伸 45 s;共 35 个循环;72°C 后延伸 7 min。MMP-1 及 GAPDH 引物序列如下:上游 5'- AGG TGA AAA GGC TCA GTG CTGC - 3',下游 5'- GAT CCT TGG GGC TCT CAA TTTC - 3';内参对照 GAPDH 的引物如下:上游 5'- TCA CCA TCT TCC AGG AGCG - 3',下游 5'- CTG CTT CAC CAC CTT CTT GA - 3'。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,MMP-1 和 GAPDH 的扩增产物分别为 494bp 和 571bp,扩增产物以 UVD 凝胶扫描系统进行半定量分析,用 MMP-1/GAPDH 的比值表示 MMP-1 的相对表达水平。

4.4 酶谱法检测 MMP-2 活性 按不同组别分别加药后 HSC 培养 48 h,细胞培养基以 3:1 与样品缓冲液混匀,在含 0.1% 白明胶的 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳,电泳结束后置含 2.5% Triton X-100,50 mmol/L Tris-HCl pH7.5,5 mmol/L $CaCl_2$ 的洗脱缓冲液中,于脱色摇床上洗脱 30 min,换洗脱缓冲液后孵育过夜。接着将凝胶置反应缓冲液(含 50 mmol/L Tris-HCl pH7.5,5 mmol/L $CaCl_2$)37°C 孵育 24 h。孵育结束后经染色液(0.25% 考马斯亮蓝 R-250,30% 甲醇,10% 乙酸)染色 1 h,用含 5% 甲醇和 7.5% 乙酸脱色液脱色至条带清晰,凝胶扫描成像计算机信号密度分析。

5 统计学方法 统计数据以 $x\pm s$ 表示,应用单因素方差分析进行统计学处理。

结 果

1 大黄䗪虫丸药物血清对大鼠肝星状细胞

万方数据

MMP-1 基因表达　见表 1。大黄䗪虫丸药物血清 A、B 两组均有显著促进 MMP-1 基因表达水平的作用，并呈一定的剂量依赖关系。

表 1　大黄䗪虫丸对 HSC 细胞 MMP-1 基因表达的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-1/GAPDH
药物血清 A	10	$2.68 \pm 0.37^{**\triangle\triangle}$
药物血清 B	10	$1.46 \pm 0.21^{*\triangle}$
软肝冲剂	10	0.89 ± 0.24
空白对照	10	0.63 ± 0.15

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与软肝冲剂组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$

2　大黄䗪虫丸对培养液中 MMP-2 活性的影响　见表 2。大黄䗪虫丸能够明显增加传代后 HSC 细胞培养液中活化 MMP-2 含量，大剂量时(药物血清 A 组)还可同时增加培养液中非活化 MMP-2 的含量，两者间呈现明显的剂量依赖关系。

表 2　大黄䗪虫丸对培养液中 MMP-2 活性的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	非活化 MMP-2	活化 MMP-2
药物血清 A	10	$3.07 \pm 0.35^{*\triangle}$	$4.25 \pm 0.26^{**\triangle\triangle}$
药物血清 B	10	1.45 ± 0.21	$2.60 \pm 0.11^{*\triangle}$
软肝冲剂	10	1.46 ± 0.27	1.47 ± 0.36
空白对照	10	1.48 ± 0.32	1.80 ± 0.28

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与软肝冲剂组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$

讨　论

肝内基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPS)是降解胶原、蛋白多糖等 ECM 的主要蛋白酶，直接参与调节 ECM 合成与降解的动态平衡，在肝纤维化发生、发展及形成过程中发挥着重要的作用。按照作用底物的不同，MMPS 至少可分成 4 类[6]：(1)间质胶原酶(MMP-1、MMP-8、MMP-13)；(2)明胶酶(MMP-2、MMP-9)；(3)基质溶解素(MMP-3、MMP-10)；(4)膜型金属蛋白酶(MT-MMP-1、MT-MMP-2)。研究表明[7]，肝纤维化的早期，MMPS 常轻度增高，而肝纤维化中晚期 MMPS 活性则明显降低，以致 ECM 的合成超过降解，引起 ECM 的大量沉积，因此，通过调节 MMPS 的活性，有助于增加基质的降解，促进肝纤维化的逆转。

肝内的 MMP-1 为间质胶原酶，由 HSC 合成，以酶原的方式分泌，其主要的作用底物是Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原。软肝冲剂是我们以往治疗慢性肝炎肝纤维化常用的经验方，对患者临床症状的改善有较好的疗效，因此我们设计把该药作为与大黄䗪虫丸组治疗的阳性对照组。本组资料的研究结果表明，大黄䗪虫丸药物血清 A、B 两组不论与空白对照组或软肝冲剂组比较，均有显著提高 MMP-1 基因表达水平的作用，并呈一定的剂量依赖关系，说明该药的确有增强 MMP-1 基因表达水平，促进Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原降解方面的作用。

MMP-2 即明胶酶 A 或Ⅳ型胶原酶，是金属蛋白酶家族的主要成员之一，主要降解基底膜Ⅳ型胶原及明胶，在肝纤维化的早期和中期，MMP-2 可增加 Disse 腔内皮下基质的降解，破坏肝小叶的排列，影响细胞与基质、细胞与细胞间的正常关系而促进肝纤维化的形成。虽然研究发现在肝纤维化的发展过程中 MMP-2 基因表达逐步增强，到中期达到高峰，但到肝纤维化晚期及肝硬化阶段则明显下降。MMP-2 基因表达的调控机制目前尚不完全清楚。一般认为，肝纤维化早期某些炎症因子、TGF-β 等对 MMP-2 呈正性调节作用，而肝纤维化晚期和肝硬化阶段 MMP-2 的下降则与金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPS)的进行性升高有关[8]。

MMPS 活性受 TIMPS 的调节，后者通过与前者以非共价结合，从而抑制 MMPS 的活性和 ECM 降解，因此单纯 MMPS 的数量并不反映其对 ECM 的降解能力，而测定 MMPS 活性更有实际意义。本研究以酶谱法测定 MMP-2 活性的结果表明，上述药物效应似乎有悖于肝纤维化的治疗，但如果我们仔细研究大黄䗪虫丸主治“五劳虚极羸瘦，腹胀不能食，……内有干血，肌肤甲错，两目黯黑”所描述的症状，便明白古人是将该药的适应证限定于久病瘀血阻络(即相当于肝纤维化晚期及肝硬化)的阶段，这实际上从另一角度证实了中医临床用药时辨证的重要性及古人有关慎用活血破瘀类(特别是走窜入络的虫类)药理论的正确性。如前所述，MMP-2 的主要作用是降解基底膜的Ⅳ型胶原及明胶，在肝纤维化后期阶段由于 TIMP 的表达增强和进行性升高，会造成包括 MMP-2 在内的 MMPS 活性下降，导致 ECM 成分降解减少，沉积增多[8]。因此，在这一阶段活化 MMP-2 含量的增加显然有助“肝窦毛细血管化”的逆转而发挥治疗作用。

本组资料的研究结果显示，大黄䗪虫丸药物血清可明显促进传代 HSC 细胞对 MMP-1 的基因表达，同时可明显增加 HSC 合成 MMP-2 的含量和活性，这与以往研究发现大黄䗪虫丸可显著抑制 TIMP 生成，促进 MMP 活化从而增加对于胶原的降解作用的研究结论一致[9]，也可能是大黄䗪虫丸对纤维组织的降解作用强于其对胶原合成的抑制作用[4]的原因所在。

参 考 文 献

1　焦栓林，申德林，张成道，等. 大黄䗪虫丸对肝硬化患者血清

万方数据

透明质酸酶、门静脉高压和脾功能亢进的影响.山东中医药大学学报 1999;23(2):115—116.
Jiao SL, Shen DL, Zhang CD, et al. Effects of Dahuang Zhechong pills on serum hyaluronidase, portal hypertention and hypersplenism in patients with hepatocirrhosis. J Shandong Univ Tradit Chin Med 1999;23(2):115—116.
2 吴广利,许春华,陈传福,等 大黄䗪虫丸与丹参抗乙肝后肝纤维化的研究. 山东医药 1999;39(22):5—6.
Wu GL, Xu CH, Chen CF, et al. The study of Salviae miltiorrhizae and Dahuang Zhechong pill of anti-hepatic fibrosis of post-hepatitis B. Shangdong Med J 1999;39(22):5—6.
3 潘志恒,程木华,李 林,等.大黄䗪虫丸抗肝纤维化作用的临床研究.中国中西医结合消化杂志 2003;11(4):212—214.
Pan ZH, Cheng MH, Li L, et al. Clinical study on Dahuang Zhechong pill in the treatment of hepatic fibrosis. Chin J Integr Tradit West Med Dig 2003;11(4):212—214.
4 孙克伟,诸裕义,陈 翔,等.大黄䗪虫丸抗大鼠免疫性肝纤维化研究.中西医结合肝病杂志 1997;7(2):90—92.
Sun KW, Chu YY, Cheng X, et al. Experimental study of Dahuang Zhechong pill(DHZC) in treatment of liver fibrosis. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis 1997; 7 (2) :90—92.
5 谢 瑶,潘志恒,曲怀刚,等.大鼠肝脏星形细胞的分离培养及鉴定.解剖学研究 2002;24(2):154—155.
Xie Y, Pan ZH, Qu HG, et al. Isolation, culture and identification of hepatic stellate cells from normal rat liver. Anat Res 2002;24(2):154—155.
6 Massova I, Iakshmi P, Fridman R, et al. Martrix metalloproteinase: structure, evolution, and diversification. FASEB J 1998;12:1075—1095.
7 Okasaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. J Gastroenterol Hepatol 2000;15(Suppl):D26—32.
8 Herbst H, Wege T, Milani S, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. Am J Pathol 1997;150(5):1647—1659.
9 刘 平.肝纤维化的防治.中华肝脏病杂志 2000;8(4):242.
Liu P. Prevention and treatment of hepatic fibrosis. Chin J Hepatol 2000;8(4):242.

(收稿:2005-02-01 修回:2005-10-05)

自制鼓膜穿孔促生长剂的临床应用

邵 权 邵 剑

2002 年 3 月—2004 年 9 月,笔者对 24 例鼓膜穿孔患者外用自制鼓膜穿孔促生长剂治疗,临床上收到了良好的治疗效果,现报告如下。

资料与方法

1 临床资料 本组 24 例鼓膜穿孔患者中,外伤性穿孔 13 例,其中大穿孔 8 例,中穿孔 5 例,男性 7 例,女性 6 例;年龄7~46 岁,平均(27.2±7.8)岁;病程 2~64 天,平均(38.5±9.5)天;均为单耳。静止期中耳炎鼓膜穿孔 11 例,其中小穿孔 3 例,中穿孔 8 例,男 6 例,女 5 例;年龄 15~68 岁,平均(35.6±10.2)岁;病程 6~43 年,平均(24.8±11.4)年;单耳 9 例,双耳 2 例。

2 方法

2.1 促生长剂配制方法 取阿托品(无锡市第七制药有限公司生产,每支 1ml,0.5 mg)0.5 mg,复方丹参(四川升和制药有限公司生产,每支 2 ml,每 1 ml 含丹参、降香生药各 1 g)2 ml,瑞支亭(甲磺酸酚妥拉明,上海复华药业有限公司生产,管制瓶装,每支 10 mg)10 mg,根据黏膜接受刺激反应,比照常规黏膜吸收浓度以及用药次数和用量,配制适当浓度,将 3 种注射剂分别以生理盐水稀释成 0.017%,1:1,0.25%溶液,分置 3 个无菌滴器内于 2~5℃环境下保存备用(或现用现配制,本组有 16 例采取此法)。

2.2 治疗方法 常规局部消毒。治疗过程中,对于外伤<1 周者,仅以无菌棉纱浸药置贴;1~3 周者,局部清拭后,在严格无菌操作下行穿孔区扩创后,敷贴浸药之棉纱;>4 周或静止型中耳炎鼓膜穿孔病例,均行瘢痕上皮扩清再造创伤床后贴敷。按局部情况,一般 5、7、10 天进行 1 次。根据侧重面,3 种药液可更换施用。如创区黏膜红润充血,色泽新鲜,则用复方丹参制剂,若局部瘢痕存,创区上皮红润度差或血管网少,用侧重解痉扩血管的瑞支亭。阿托品作为中介制剂配合应用。门诊处理后,让患者带药,每日 2 次,每次 2~3 滴点耳。

结 果 24 例患者中,5 例外伤性中等穿孔者 3 例 2 次治愈,2 例 3 次治愈。8 例大穿孔中 5 例为 2 个月后就诊,3 例 4 次治愈,2 例 5 次治愈。其他 3 例因伤后就诊早,经门诊 3 次处置治愈。陈旧小穿孔 3 例中 2 例 3 次治愈,1 例 2 次治愈。陈旧性中穿孔 8 例中,4 例 6 次治愈,2 例 5 次治愈,穿孔稍大且瘢痕略重者 2 例中 6 次治愈 1 例,8 次治愈 1 例。11 例陈旧穿孔者治疗期间因感冒引起感染 4 例,待感染控制后 2 个月,重新治疗 5 次,2 例痊愈,另 2 例穿孔大部分缩小,因中途失去联系,未有最终治疗结果。其余 7 例完全愈合,随诊 1~3 年未见复发。

讨 论 本组病例所用 3 种药物,具有抗血管痉挛,抗凝溶栓,扩张血管,改善微循环,增加局部血流量,促进侧枝循环的生长,抑制血小板聚集,防止血栓形成作用。通过 24 例疗效观察,收到良好的功效,,较之烧灼补贴等传统保守治疗,时间短、经济、简便,疗效高,是较为安全、可靠、理想的促生长剂。

(收稿:2005-05-08 修回:2005-09-13)

作者单位:河北省大厂回族自治县人民医院耳鼻喉科(河北 065300)
通讯作者:邵 剑,Tel:0316-8824432,E-mail:shaojian-2001@sohu.com

万方数据