

· 论 著 ·

## 糖尿病对大鼠肝纤维化组织 TIMP-1/MMP-1 表达的影响\*

陈 枫<sup>1</sup>, 杨爱萍<sup>2#</sup>, 李 燕<sup>1</sup>, 史小玲<sup>1</sup>, 唐小平<sup>1</sup>, 唐 莉<sup>1</sup>, 王晓燕<sup>1</sup>, 陈 庄<sup>1△</sup>

(1. 泸州医学院附属医院, 四川泸州 646000; 2. 兰州大学第二医院, 兰州 730030)

**摘要:**目的 探讨糖尿病对大鼠肝纤维化组织金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)/金属基质蛋白酶-1(MMP-1)表达的影响。方法 40 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组、糖尿病组、肝纤维化组、糖尿病肝纤维化组(双模型组), 各 10 只。糖尿病组和双模型组大鼠腹腔注射链尿佐菌素(STZ)制作糖尿病模型; 肝纤维化组和双模型组大鼠皮下注射 40% 的四氯化碳花生油溶液建立肝纤维化模型。四氯化碳最后一次注射后 48 h 处死大鼠, 心脏采血, 自动生化检测仪检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、血浆清蛋白(ALB)和清蛋白/球蛋白(A/G); 化学发光法检测肝纤维化指标透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原蛋白(PⅢNP)和Ⅳ型胶原(C-Ⅳ); VG 染色观察大鼠肝组织变性坏死和纤维化的程度; RT-PCR 检测肝脏组织  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、MMP-1 和 TIMP-1 基因表达水平。结果 与正常对照组和糖尿病组比较, 肝纤维化组和双模型组大鼠血清 ALT、AST、HA、LN、PⅢNP 和 C-Ⅳ浓度升高以及 ALB、A/G 下降,  $\alpha$ -SMA、TIMP-1/MMP-1、TIMP-1 基因表达增强, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与肝纤维化组比较, 双模型组大鼠血清 ALT、AST、HA、C-Ⅳ浓度和肝脏纤维化计分升高,  $\alpha$ -SMA、TIMP-1、TIMP-1/MMP-1 基因表达增强, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 高血糖促进了肝纤维化的发展, TIMP-1/MMP-1 表达失衡加剧了肝细胞外基质(ECM)的沉积。

**关键词:**糖尿病; 肝纤维化;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; 金属基质蛋白酶-1; 金属蛋白酶组织抑制剂-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.09.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)09-0964-04

## Effect of diabetes on expression of TIMP-1/MMP-1 in rat hepatic fibrosis tissue\*

Chen Feng<sup>1</sup>, Yang Aiping<sup>2#</sup>, Li Yan<sup>1</sup>, Shi Xiaoling<sup>1</sup>, Tang Xiaoping<sup>1</sup>, Tang Li<sup>1</sup>, Wang Xiaoyan<sup>1</sup>, Chen Zhuang<sup>1△</sup>

(1. Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Second Affiliated Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effect of diabetes on the expression of metalloproteinase-1 (TIMP-1)/ matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in hepatic fibrosis rats. Methods 40 healthy male SD rats were randomly divided into four groups: normal control group, diabetes group, liver fibrosis group and diabetes liver fibrosis group (double model group), 10 rats in each group. The diabetes group and the double model group were intraperitoneally injected with STZ to establish diabetes model. The liver fibrosis group and the double model group were subcutaneously injected with 40% carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) peanut oil solution to establish the liver fibrosis model. At 48 h after final injection of CCl<sub>4</sub>, the blood sample was collected from heart. Serum alanine aminotransferase (ALT), glutamic-oxaloacetic transaminase (AST), albumin (ALB) and albumin/globulin (A/G) were detected by the automatic biochemical detector. Hepatic fibrosis indexes, such as hyaluronic acid (HA), layer-attached proteins (LN), procollagen type-III (PⅢNP), IV type collagen (C-Ⅳ), were detected by the chemiluminescent method. Live tissue sections were stained with HE and VG to observe degeneration necrosis and fibrosis levels. The levels of mRNA expression of  $\alpha$ -SMA, MMP-1 and TIMP-1 were detected by the real-time PCR. Results Compared with the control group and the diabetes group, serum ALT, AST, HA, LN, PⅢNP and C-Ⅳ levels in the liver fibrosis group and the double model group were increased, ALB and A/G were decreased, and  $\alpha$ -SMA, TIMP-1/MMP-1 and TIMP-1 gene expression was increased, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the liver fibrosis group, the serum concentrations of ALT, AST, HA and C-Ⅳ in the double model group were increased,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 and TIMP-1/MMP-1 gene expression was increased and the scores of liver fibrosis were increased, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Conclusion Diabetes can promote and increase the occurrence and development of hepatic fibrosis, TIMP-1/MMP-1 imbalance intensifies the extracellular cell matrix (ECM) deposits.

**Key words:** diabetes mellitus; hepatic fibrosis;  $\alpha$ -SMA; MMP-1; TIMP-1

糖尿病是以慢性血糖水平增高为特征的代谢疾病群。中国糖尿病和糖尿病前期患病率分别高达 9.7% 和 15.5%<sup>[1]</sup>。持续性高血糖对许多脏器如肾脏、心脑血管纤维化具有明显促进作用, 与肝脏纤维化的关系也在研究之中<sup>[2-3]</sup>。但其机制未能完全阐明。肝细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 分解代谢平衡主要是由 TIMPs/MMPs 系统调控, 其中金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)/金属基质蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1,

MMP-1) 的变化更能准确反映肝脏中 ECM 的合成和降解情况<sup>[4]</sup>。为了更好地分析高血糖对肝纤维化的影响, TIMP-1/MMP-1 系统在糖尿病相关性肝纤维化中的作用, 现将糖尿病对大鼠肝纤维化组织 TIMP-1/MMP-1 表达的影响报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 链尿佐菌素 (streptozotocin, STZ) (Sigma 公司); 柠檬酸、柠檬酸三钠 (上海前尘生物公司); 四氯化碳 (国药集团化学试剂公司); 透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白

\* 基金项目: 四川省重点学科建设项目 (SCD0241)。作者简介: 陈枫 (1963~), 副教授, 本科, 主要从事基础医学研究。# : 共同第一作者。△ 通讯作者, Tel: 13619043287; E-mail: zhuangchen\_99@yahoo.com。

(laminin, LN)、Ⅳ型胶原蛋白(collagen type Ⅳ, C-Ⅳ)和Ⅲ型前胶原(procollagen type Ⅲ, PⅢ NP)试剂(郑州安图生物公司);总 RNA 试剂盒(北京天根生化公司);TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3. 0, SYBR Premix Ex Taq Ⅱ(大连宝生物公司);MMP-1、TIMP-1、 $\beta$ -actin RT-PCR 扩增引物(上海生工合成,引物序列见表 1);微量血糖测定仪,血糖试纸(美国强生公司)。pH4.5 的柠檬酸缓冲液配制:A 液 0.1 mol/L 的柠檬酸;B 液 0.1 mol/L 的柠檬酸三钠, A : B=1 : 1.32(用前配制);1%STZ 溶液配制:称所需质量的 STZ,溶于其相应体积的 pH4.5 的柠檬酸缓冲液中(腹腔注射前溶解)。

表 1 RT-PCR 基因及引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
$\alpha$ -SMA	Forward:TTC CTT CGT GAC TAC TGC TGA G
$\alpha$ -SMA	Reverse:CAA TGA AAG ATG GCT GGA AGA G
MMP-1	Forward:CTT TTC AGC CAG GCC CAG GT
MMP-1	Reverse:AGA AAG GCC AAG GGA ATG GC
TIMP-1	Forward:CTG GCA TCC TCT TGT TGC TAT C
TIMP-1	Reverse:CGA ATC CTT TGA GCA TCT TAG TC
$\beta$ -actin	Forward:CCT CAA GAT TGT CAG CAA T
$\beta$ -actin	Reverse:CCA TCC ACA GTC TTC TGA GT

**1.2 动物模型** 清洁级健康雄性 SD 大鼠,体质量 300~350 g,共 40 只,购于重庆第三军医大学动物实验中心。大鼠适应性饲养 1 周,随机分为正常对照组、糖尿病组、肝纤维化组、糖尿病肝纤维化组(双模型组),各 10 只。实验前大鼠尾尖采血,测定血糖值,正常大鼠方可用于试验。正常对照组:腹腔注射同体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和花生油溶液。糖尿病组:一次性腹腔注射 STZ 35 mg/kg,48 h 尾尖采血,测定血糖大于 16.7 mmol/L 为糖尿病模型大鼠<sup>[5]</sup>。肝纤维化组:皮下注射 40%的四氯化碳花生油溶液,首次剂量 0.4 mL/kg,以后每隔 3 天注射 0.2 mL/kg。双模型组:一次性腹腔注射 STZ 35 mg/kg,48 h 尾静脉采血,测定血糖,7 d 后重复测定血糖,血糖大于 16.7 mmol/L 的大鼠皮下注射 40%的四氯化碳花生油溶液,首次剂量 0.4 mL/kg,以后每隔 3 天皮下注射 0.2 mL/kg,8 周末腹腔注射 1%戊巴比妥麻醉,处死各组大鼠。心脏取血、剖腹取肝组织。

**1.3 指标检测** 全自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶(alaniine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotran-sferase, AST)、血浆清蛋白(albumin, ALB)和清蛋白/球蛋白(A/G)。化学发光法测定 HA、LN、PⅢ NP 和 C-Ⅳ。RT-PCR(SYBR Green 相对定量法)检测肝脏组织  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、MMP-1 和

TIMP-1 表达。取肝脏组织 50 mg 磨碎,提取总 RNA,制备 cDNA 模板,反转录反应体系:MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L、10RT Buffer 1  $\mu$ L、dNTP Mixture 1  $\mu$ L、RNase Inhibittor 0.25  $\mu$ L、AMV Reverse Transcriptase 0.5  $\mu$ L、Oligo dT-Adaptor Primer 0.5  $\mu$ L、RNase Free d H<sub>2</sub>O 3.75  $\mu$ L、样品 RNA 1  $\mu$ L、Total volume 5  $\mu$ L。30  $^{\circ}$ C 10 min,42  $^{\circ}$ C 30 min,99  $^{\circ}$ C 5 min,5  $^{\circ}$ C 5 min。

RT-PCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 12.5  $\mu$ L、上游引物 1  $\mu$ L、下游引物 1  $\mu$ L、dH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L、样品 RNA 2  $\mu$ L、Total volume 25  $\mu$ L。95  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 5 s,59.5  $^{\circ}$ C 10 s,检测实时荧光,共 40 个循环;65~95  $^{\circ}$ C 生成融解曲线,每个步骤 10 s,+0.5  $^{\circ}$ C/循环并行实时荧光检测,共 60 个循环。

病理检测:实验结束以后,将大鼠处死,剖腹取肝脏,固定,脱水,石蜡包埋,VG 染色。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。对样本数先行方差齐性检验,方差齐时用 One-Way ANOVA 检验。方差不齐时用 Kruskal-Wallis H 检验比较总的差异,再用 Mann-Whitney U 检验进行两组间比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 大鼠肝功能指标** 与正常对照组比较,肝纤维化组和双模型组 ALT、AST 浓度明显升高,ALB、A/G 明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与糖尿病组比较,肝纤维化组、双模型组 ALT、AST 浓度明显升高和 ALB、A/G 明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与肝纤维化组比较,双模型组 ALT、AST 升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.2 大鼠血清肝纤维化指标** 与正常对照组比较,肝纤维化组、双模型组 HA、LN、PⅢ NP 和 C-Ⅳ 明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与糖尿病组比较,肝纤维化组、双模型组 HA、LN、PⅢ NP、C-Ⅳ 明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与肝纤维化组比较,双模型组 HA、C-Ⅳ 升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.3 肝组织 VG 染色变化** 正常对照组肝脏肝小叶结构正常,肝细胞索排列规则有序,未见脂肪变性、坏死,无胶原纤维增生;糖尿病组肝脏结构基本正常,少量出现炎性坏死、脂肪变性;肝纤维化组肝细胞广泛脂肪变性、坏死,炎性细胞浸润,以汇管区及中央静脉周围较重。有纤维组织增生的情况,但未形成假小叶;双模型组中大部分肝小叶结构破坏,肝细胞索排列失去放射状结构,纤维缔结组织增生形成宽窄不一的纤维条索,伸入肝实质中,形成纤维间隔,包绕、分割正常肝组织,形成假小叶。见图 1 和表 4。

表 2 4 组大鼠肝功能指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

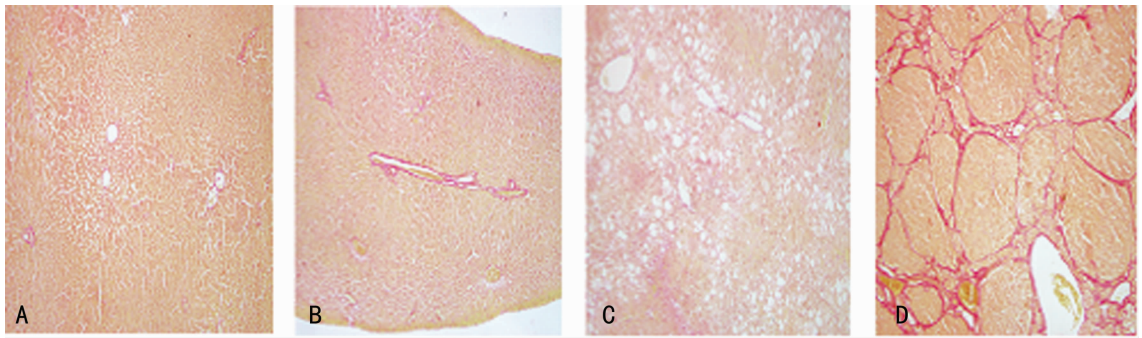
组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)	A/G
正常对照组	10	68.460 $\pm$ 17.534	106.928 $\pm$ 19.659	42.582 $\pm$ 7.667	1.235 $\pm$ 0.420
糖尿病组	10	85.723 $\pm$ 18.998	112.615 $\pm$ 20.178	42.446 $\pm$ 7.915	1.228 $\pm$ 0.143
肝纤维化组	10	171.532 $\pm$ 17.415 <sup>ab</sup>	175.518 $\pm$ 23.711 <sup>ab</sup>	32.046 $\pm$ 9.982 <sup>ab</sup>	0.711 $\pm$ 0.312 <sup>ab</sup>
双模型组	10	224.914 $\pm$ 23.321 <sup>abc</sup>	234.058 $\pm$ 18.001 <sup>abc</sup>	31.762 $\pm$ 7.768 <sup>ab</sup>	0.703 $\pm$ 0.408 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与糖尿病组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与肝纤维化组比较。

表 3 4 组大鼠肝纤维化指标浓度的比较(ng/mL, $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HA	C-Ⅳ	PⅢ NP	LN
正常对照组	10	88.856 $\pm$ 11.848	8.206 $\pm$ 0.953	8.717 $\pm$ 4.546	6.026 $\pm$ 2.331
糖尿病组	10	97.808 $\pm$ 19.123	10.991 $\pm$ 3.315	8.720 $\pm$ 2.582	7.085 $\pm$ 2.404
肝纤维化组	10	194.892 $\pm$ 14.594 <sup>ab</sup>	16.223 $\pm$ 3.217 <sup>ab</sup>	15.122 $\pm$ 5.335 <sup>ab</sup>	10.561 $\pm$ 1.319 <sup>ab</sup>
双模型组	10	251.484 $\pm$ 63.466 <sup>abc</sup>	20.184 $\pm$ 5.032 <sup>abc</sup>	15.646 $\pm$ 2.992 <sup>ab</sup>	10.811 $\pm$ 4.026 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与糖尿病组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与肝纤维化组比较。



A: 正常对照组; B: 糖尿病组; C: 肝纤维化组; D: 双模型组。

图 1 4 组大鼠肝组织胶原纤维影像表现 (VG 染色,  $\times 100$ )

表 4 4 组大鼠纤维化分期和计分的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	分期(n)					计分(分)
		0	1	2	3	4	
正常对照组	10	10	0	0	0	0	0
糖尿病组	10	10	0	0	0	0	0
肝纤维化组	10	0	0	4	4	2	8.7 $\pm$ 5.420
双模型组	10	0	0	2	4	4	13.6 $\pm$ 6.813 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与肝纤维化组比较。

2.4 肝脏组织  $\alpha$ -SMA、MMP-1 和 TIMP-1 基因表达 与正常对照组比较, 肝纤维化组和双模型组  $\alpha$ -SMA、TIMP-1 及

TIMP-1/MMP-1 基因表达升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与糖尿病组比较, 肝纤维化组和双模型组  $\alpha$ -SMA、TIMP-1 及 TIMP-1/MMP-1 基因表达升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与肝纤维化组比较, 双模型组  $\alpha$ -SMA 和 TIMP-1 及 TIMP-1/MMP-1 基因表达升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。正常对照组和糖尿病组中  $\alpha$ -SMA、TIMP-1 及 TIMP-1/MMP-1 基因表达水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 各组间 MMP-1 基因表达水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 5。

表 5 4 组大鼠肝脏组织中的  $\alpha$ -SMA、TIMP-1 和 MMP-1 基因表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	$\alpha$ -SMA	TIMP-1	MMP-1	TIMP-1/MMP-1
正常对照组	10	1.412 $\pm$ 0.237	1.103 $\pm$ 0.777	1.064 $\pm$ 0.681	0.973 $\pm$ 0.772
糖尿病组	10	1.992 $\pm$ 0.166	1.134 $\pm$ 0.306	1.134 $\pm$ 0.122	1.000 $\pm$ 0.091
肝纤维化组	10	3.285 $\pm$ 0.054 <sup>ab</sup>	3.816 $\pm$ 0.887 <sup>ab</sup>	1.488 $\pm$ 0.421	2.561 $\pm$ 0.307 <sup>ab</sup>
双模型组	10	17.927 $\pm$ 0.672 <sup>abc</sup>	6.920 $\pm$ 0.588 <sup>abc</sup>	1.619 $\pm$ 0.524	4.279 $\pm$ 1.414 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与糖尿病组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与肝纤维化组比较。

### 3 讨论

糖尿病与肝纤维化有密切关系, 可促进肝纤维化的进展, 增加肝硬化和肝癌的发生<sup>[6-8]</sup>。同时, 慢性肝损伤也可以影响糖代谢, 形成恶性循环, 但其机制未能阐明。高血糖作为糖尿病的重要表现, 是各型糖尿病的共同特征。本研究采用链尿佐菌素诱导建立糖尿病模型, 通过破坏胰岛  $\beta$  细胞, 诱发大鼠形成糖尿病。四氯化碳是常用的中毒性肝纤维化诱导物, 通过细胞色素氧化酶代谢为三氯甲基自由基从而导致肝细胞损伤, 肝细胞出现坏死、凋亡<sup>[9]</sup>, 反复刺激形成了炎症细胞聚集、释放细胞因子触发间质组织的过量胶原纤维产生肝纤维化。当肝纤维化发生时, 细胞中 ALT、AST 释放于血清是肝细胞炎症和坏死的血清学指标; ALB、A/G 是肝细胞合成代谢功能的指标, 其降低程度与肝脏合成功能损害程度呈正比。ECM 主要由胶原蛋白、LN、HA 等成分组成, 所以, ECM 及其代谢产物是研究血清标志物的首选。目前, HA、LN、PⅢ NP 和 C-IV 为常见的临床检测肝纤维化血清学指标, 同时酶促化学发光法检测具有密度好、准确性高、溶血对检测干扰少等优点<sup>[10-11]</sup>。本研究结果显示, 糖尿病组与正常对照组比较, 各项指标没有显著区别, 表明早期糖尿病对肝脏功能影响较小。肝纤维化组中, ALT、AST、HA、LN、PⅢ NP 和 C-IV 浓度高于正常对照组和糖尿病组, ALB、A/G 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 加之病理改变, 证实造模成功。双模型组与肝纤维化组比较, ALT、AST、HA 和 C-IV 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 双模型组是肝纤维化模型加糖尿病模型, 说明糖尿病加重了肝脏纤维化程度, 促进了肝

纤维化的发展。其结果也与组织切片 VG 染色结果相符合, 在大鼠纤维化分期和计分的比较中, 双模型组与肝纤维化组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

肝纤维化是各种慢性肝病的病理特征, 其发生机制是 ECM 过度增生和异常沉积。研究表明, 肝纤维化发生中心环节是肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的激活和增殖。当各种因素引起 HSC 激活后, HSC 转变为肌成纤维细胞并特异性表达  $\alpha$ -SMA, 主要表达于 HSC 胞核, 说明  $\alpha$ -SMA 是 HSC 激活标志, 进而成为提示肝纤维化病情严重程度的重要指标<sup>[12]</sup>。通过 RT-PCR 结果观察到, 与正常对照组和糖尿病组比较, 肝纤维化组、双模型组  $\alpha$ -SMA 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与肝纤维化组比较, 双模型组  $\alpha$ -SMA 的表达升高 ( $P < 0.05$ )。这与方瑜洁等<sup>[13]</sup>的研究结果一致, 提示高血糖可以促进肝脏 HSC 活化、增殖, 从而加重大鼠肝纤维化的程度。因此, HSC 激活在糖尿病相关性肝纤维化的形成过程中可能起着重要的促进作用。Sugimoto 等<sup>[14]</sup>通过体外实验发现, 高血糖可以引起 HSC 增生和 I 型胶原的产生, 提示高血糖是促进肝纤维化发展的重要因素。其他体外实验也观察到, 不同高浓度的葡萄糖均能刺激 HSC 并导致 HSC 增殖, 且 DNA 合成呈剂量依赖性<sup>[15]</sup>。所以, 糖尿病持续性高血糖对肝纤维化的影响可能是通过激活 HSC 和增加胶原 ECM 的产生, 进而加重肝纤维化。

肝纤维化的产生是由于 MMPs 活性下降和(或)TIMPs 活性升高导致 ECM 的合成和降解的失衡, 从而出现 ECM 在肝

内过度沉积。MMPs 是一组锌离子依赖酶,它对于 ECM 中细胞外大分子如胶原具有降解作用,因此,是调节 ECM 动态平衡最重要的一大酶系<sup>[16]</sup>;TIMPs 是一组有抑制 MMPs 功能的活性多肽,与等比例的 MMPs 以共价键可逆结合和形成复合物,从而抑制 MMPs 的活性。所以,TIMPs/MMPs 系统在维持肝脏中 ECM 平衡起着重要作用。MMP-1 是 MMPs 家族的一员,主要降解 ECM 中的 I、III 型胶原<sup>[17]</sup>,MMP-1 的活性主要受特异性抑制物 TIMP-1 的调节。有研究表明,在肝纤维化发展过程中,TIMP-1 的表达增强,TIMP-1/MMP-1 的比值升高,使 ECM 降解减少,增加了胶原纤维的积累并促进肝纤维化的发展,是肝纤维化形成的重要因素<sup>[18]</sup>。因此,TIMP-1/MMP-1 比值的改变更能准确地反映肝脏中 ECM 合成和降解的情况<sup>[4]</sup>。本研究结果表明,与正常对照组和糖尿病组相比,肝纤维化组中 TIMP-1 表达增加、MMP-1 变化不明显,从而引起的 TIMP-1/MMP-1 改变导致肝纤维化的发生,与文献<sup>[19]</sup>一致。与肝纤维化组比较,双模型组 TIMP-1、TIMP-1/MMP-1 表达升高( $P < 0.05$ ),由此说明高血糖状态下大鼠肝纤维化程度加重与 TIMP-1 表达增加相关,而不是 MMP-1 表达减少,所以,TIMP-1/MMP-1 失衡加剧了 ECM 的形成。糖尿病持续性高血糖影响 TIMP-1/MMP-1 系统的平衡,其可能的机制:高血糖激活了 HSC 的表达,激活的 HSC 释放大量的 TIMP-1,从而导致了 TIMP-1/MMP-1 失衡。其可能的机制还有高血糖状态可能分泌大量 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等炎症介质<sup>[20]</sup>,它们可以进一步刺激 HSC 增殖,影响 TIMP-1/MMP-1 的平衡。Wakisaka 等<sup>[21]</sup>研究认为,在高血糖情况下,ECM 成分的改变会影响 MMPs 的表达。正常情况下,ECM 中的正常成分通常作为 ECM 分泌的负反馈调节信号。在血糖高的情况下,这种负反馈调节机制被破坏,影响了 TIMP-1/MMP-1 正常表达和形成 ECM 的沉积。

因此,糖尿病加重肝纤维化发生的机制与 TIMP-1/MMP-1 的失衡有密切关系。深入研究糖尿病肝纤维化过程中 HSC 激活和 TIMP-1/MMP-1 调节性失衡异常的机制,可以更好地阐明糖尿病相关性肝纤维化的发病机制,为临床上防治糖尿病相关性肝纤维提供新的思路和治疗方法。

#### 参考文献:

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12):1090-1101.
- [2] Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(1):193-203.
- [3] Hickman IJ, Macdonald GA. Impact of diabetes on the severity of liver disease[J]. *Am J Med*, 2007, 120(10):829-834.
- [4] Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13(Suppl):S33.
- [5] 陈枫,程锦楠,唐小平,等.大鼠品系药物剂量对糖尿病大鼠模型的影响[J].*泸州医学院学报*, 2011, 34(2):156-158.
- [6] 曾民德,王秦龄,王宝恩.肝纤维化诊断及疗效评估共识[J].*中华肝脏病杂志*, 2002, 10(5):327-328.
- [7] Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2007, 17(1):13-20.
- [8] Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Maldonado-Garza H. Hepatogenous diabetes: current views of an ancient problem[J]. *Ann Hepatol*, 2009, 8(1):13-20.
- [9] Chobert MN, Couchie D, Fourcot A, et al. Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(1):135-150.
- [10] Zeng MD, Lu LG, Mao YM, et al. Prediction of significant fibrosis in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B by a noninvasive model[J]. *Hepatology*, 2005, 42(6):1437-1445.
- [11] 雷震,谢南,温丽丽,等.化学发光法检测血清肝纤维化指标评价[J].*实验与检验医学杂志*, 2009, 27(6):672-674.
- [12] Chen YW, Lid G, Wu JX, et al. Tetrandrine inhibits the activation of rat hepatic stellate cells via up-regulation of Smad 7[J]. *Chem Pharmacol Bull*, 2005, 21(5):563-567.
- [13] 方瑜洁,裴新明.高血糖对肝纤维化大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA 和 CTGF 表达的影响[J].*中国现代医药杂志*, 2009, 11(7):1-4.
- [14] Sugimoto R, Enjoji M, Kohjima M, et al. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase[J]. *Liver Int*, 2005, 25(5):1018-1026.
- [15] 李芹,邓存良,陈庄,等.高糖、胰岛素对大鼠肝星状细胞增殖影响[J].*中国现代医学杂志*, 2009, 19(11):1669-1672.
- [16] Veidal SS, Karsdal MA, Vassiliadis E, et al. MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis—identification and validation of a novel biochemical marker assay[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24753.
- [17] Iimuro Y, Brenner DA. Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis[J]. *Pharm Res*, 2008, 25(2):249-258.
- [18] 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.
- [19] Nie QH, Duan GR, Lao XD, et al. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(1):86-90.
- [20] Sun X, Han F, Yi J, et al. Effect of aspirin on the expression of hepatocyte NF- $\kappa$ B and serum TNF- $\alpha$  in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats[J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(6):765-770.
- [21] Wakisaka M, Spiro MJ, Spiro RG. Synthesis of type VI collagen by cultured glomerular cells and comparison of its regulation by glucose and other factors with that of type IV collagen[J]. *Diabetes*, 1994, 43(1):95-103.