

美洲大蠊提取物对肝纤维化大鼠 NF- κ B 和 α -SMA 表达的影响*刘丽辉,李 武[△],马得宏,陈一晖,王宏图,张 禄,徐雪美,冉慧粉

(昆明医科大学第一附属医院感染科,昆明 650032)

摘要:目的 探讨美洲大蠊提取物(APA)对实验性肝纤维化组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响,并观察 APA 的抗纤维化疗效。**方法** 采用四氯化碳复制大鼠肝纤维化模型,同时用 0.5 g/kg 的 APA 灌胃治疗,测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、清蛋白(Alb)水平。免疫组化测定肝组织中 NF- κ B 和 α -SMA 表达的水平,并以光镜观察肝病理组织学改变,进行炎症活动度分级及纤维化分期。**结果** APA 可以降低血清中 ALT、AST 和肝组织中 NF- κ B、 α -SMA 的水平,APA 组和三七丹参组与模型组相比血清中 Alb 水平差异有统计学意义,用药后的肝脏细胞变性坏死及纤维化程度明显降低。**结论** APA 具有一定的抗纤维化作用,机制可能与其抑制肝组织中 NF- κ B 和 α -SMA 的表达有关。

关键词:肝硬化;美洲大蠊提取物;大鼠;核转录因子- κ B; α -平滑肌肌动蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2152-03

Effect of American cockroach extract on NF- κ B and α -SMA expression in CCl₄ caused liver fibrosis rat model*Liu Lihui, Li Wu[△], Ma Dehong, Chen Yihui, Wang Hongtu, Zhang Lu, Xu Xuemei, Ran Hui fen

(Department of Infectious Disease, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of American cockroach extract on the expression of NF- κ B and α -SMA in experimental liver fibrosis tissue, and to observe its antifibrotic efficacy. **Methods** The rat model of hepatic fibrosis was duplicated by carbon tetrachloride and simultaneously given with American cockroach extract 0.5 g/kg by lavage. The level of serum alanine aminotransferase enzyme (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and albumin (Alb) were determined. The expression levels of NF- κ B and α -SMA in liver tissue were determined by the immunohistochemical method and the liver histological changes were observed by light microscopy for conducting the grading of inflammatory activity and the fibrosis classification. **Results** American cockroach extract could reduce serum ALT, AST and liver tissue NF- κ B and α -SMA levels. The serum Alb level had significant difference among the APA group, Pseudo-ginseng Danshen group and the model group. The degeneration and necrosis of liver cells and the fibrosis degree after medication were significantly reduced. **Conclusion** The American cockroach extract has certain anti-fibrosis effect, its mechanism may be related with the inhibition of expression of NF- κ B and α -SMA.

Key words: liver cirrhosis; American cockroach extract; rats; NF- κ B; α -SMA

在前期研究中,本课题组采用四氯化碳复制小鼠肝纤维化模型,结果表明,美洲大蠊提取物(APA)对小鼠实验性肝纤维化具有一定的保护作用,能够明显改善小鼠受损肝脏的病理形态,降低肝纤维化程度^[1]。为了进一步研究 APA 对肝纤维化的治疗作用,本研究改用大鼠作为肝纤维化模型,观察 APA 对四氯化碳所致大鼠肝纤维化模型是否同样有治疗作用,并探讨其抗纤维化的机制是否与其抑制大鼠肝纤维化组织中核转录因子- κ B (NF- κ B) 和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA) 的表达有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只,胎龄 5~6 周,体质量 120~150 g,由昆明医科大学动物科提供。实验过程中饲养条件相同,而且定期清洁、消毒。动物合格证号:SCXK(滇)2011-0004。40 只大鼠分成 4 组,即正常对照组、模型组、APA 组和三七丹参组。造模当日即开始灌胃,每天 1 次,连续 7 周,

直至动物处死。正常对照组和模型组动物按 20 mL/kg 体质量蒸馏水灌胃,三七丹参组按 20 mL/kg 体质量灌胃,用量为 1 g/kg; APA 组给予 2.5% 原药 20 mL/g 体质量灌胃(0.5 g/kg,相当于临床 60 kg 成人每日用量的 50 倍)。20% 四氯化碳橄榄油溶液按 5 mL/kg 给大鼠颈背部皮下注射,每周 2 次,连续 7 周。正常对照组动物仅皮下注射相同剂量的橄榄油溶液。

1.2 试剂 四氯化碳(分析纯)由昆明泽浩科技有限公司提供,商品编号:1017499。橄榄油(化学纯),由昆明泽浩科技有限公司提供,商品编号:GC1270。NF- κ B、 α -SMA 免疫组化试剂盒由美国 Santa Cruz 公司提供。Masson 试剂盒由福州迈新生物有限公司提供。APA(肝龙)原药由昆明赛诺制药有限公司提供,批号:03122001。三七丹参片由昆明医科大学第一附属医院制剂室提供,批号:20120513,每片 0.33 g(含生药 0.26 g)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与观察指标 观察动物的体质量、食欲、精神状态。第 7 周末,先用乙醚吸入麻醉,立即剖开腹部,找到腹主动脉,用止血钳夹闭腹主动脉的近心端,用采血针后接针筒轻轻平行插入腹主动脉近心端,放开止血钳,抽吸针筒,血液即流入针筒内,将血液迅速转移到加有抗凝剂的离心管中。立即取肝脏左叶中部、左叶及右上叶前部,进行组织病理及免疫组织化学检查。采用全自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、清蛋白(Alb)。

1.3.2 病理组织学检查 石蜡包埋肝脏组织、切片,进行 HE 和 Masson 染色,光镜下观察切片,按高志良标准进行 GS 分级(G 为炎性活动度,S 为纤维化程度)。

1.3.3 免疫组织化学法检查 石蜡包埋肝组织,常规切片,放入 55℃ 烤箱中 3 h 以上,取出切片进行脱蜡,用蒸馏水冲洗切片 3~5 次,用修复液修复,滴加 NF-κB 和 α-SMA 一抗(NF-κB 和 α-SMA 按 1:100 的浓度进行稀释),放入 4℃ 冰箱中过夜,然后滴加二抗,放入温箱内 30 min,再进行染色,树胶封片。采用彩色病理图文报告分析系统在光镜下(×200)计算阳性染色面积,即每个视野棕黄色阳性面积占视野总面积百分比(%)的方法来表示。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准为 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠一般情况 正常对照组处死前状态良好,体质量均大于模型组。模型组大鼠出现饮食减少、尿黄、皮毛粗糙无光泽、乏力、纳差、便溏。模型组和 APA 组大鼠实验过程中各死亡 1 只。

2.2 APA 对实验性肝纤维化大鼠肝功能的影响 与模型组相比,APA 和三七丹参均能显著改善大鼠的肝功能,且 APA 组疗效优于三七丹参组($P<0.01$),但是 APA 组与三七丹参组的 Alb 水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 解剖及病理形态学表现 解剖发现模型组大鼠肝脏肿大,质硬,颜色灰暗,表面出现小颗粒状结节,而其余 3 组大鼠

肝脏颜色较模型组红润,边缘规则。HE 和 Masson 染色结果见图 1。正常对照组大鼠肝小叶结构完整,肝索排列整齐,无肝细胞变性坏死及纤维组织增生(图 1A 及图 1E)。模型组大鼠肝细胞大量脂肪变性,弥漫性点状坏死及可见部分灶状坏死,汇管区有大量炎性细胞浸润,胶原纤维大量增生并形成假小叶(见图 1B 及图 1F)。APA 组和三七丹参组肝细胞变性坏死减轻,弥漫性点状坏死、胶原纤维增生减少,肝纤维化程度降低(见图 1C、1D、1G、1H)。

表 1 APA 对实验性肝纤维化大鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST(U/L)	ALT(U/L)	Alb(g/L)
正常对照组	10	31.37±2.11	39.42±3.59	45.19±3.62
模型组	9	810.20±54.60 Δ	144.92±8.51 Δ	24.84±2.20 Δ
APA 组	9	137.44±13.47 \blacktriangle	72.90±4.52 \blacktriangle	36.46±2.63 \blacktriangle
三七丹参组	10	264.29±34.72 \blacklozenge	97.68±5.40 \blacklozenge	37.23±2.30 \blacklozenge

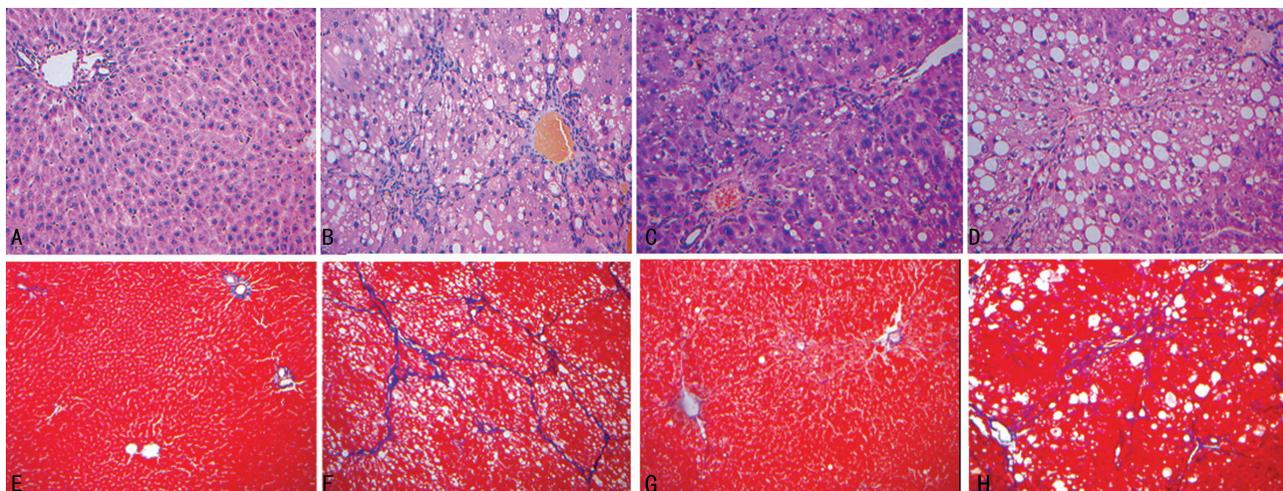
Δ : $P<0.01$,与正常对照组比较; \blacktriangle : $P<0.01$,与模型组比较; \blacklozenge : $P<0.01$,与 APA 组比较。

2.4 大鼠肝脏 GS 分级 等级资料采用秩和检验和 Ridit 分析,结果显示,APA 组和三七丹参组与模型组相比,大鼠肝组织炎性活动度分级及肝纤维化分期差异均有统计学意义($P<0.01$),而 APA 组与三七丹参组比较,大鼠肝脏炎性活动度分级及肝纤维化分期差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠炎性活动度分级及肝纤维化分期(n)

组别	n	炎性活动度分级					肝纤维化分期				
		G ₀	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
正常对照组	10	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0
模型组	9	0	0	2	5	2 Δ	0	0	0	2	7 Δ
APA 组	9	0	3	5	1	0 \blacktriangle	0	2	6	1	0 \blacktriangle
三七丹参组	10	0	1	4	5	0 \blacktriangle	0	1	3	5	1 \blacktriangle

Δ : $P<0.01$,与正常对照组比较; \blacktriangle : $P<0.01$,与模型组比较。



A: 正常对照组(×200); B: 模型对照组(×200); C: APA 组(×200); D: 三七丹参组(×200); E: 正常对照组(×100); F: 模型对照组(×100); G: APA 组(×100); H: 三七丹参组(×100)。

图 1 各组大鼠肝组织 HE(×200)及 Masson(×100)染色结果

2.5 免疫组织化学检测结果 NF- κ B 和 α -SMA 在正常肝组织的所有细胞中均微量表达。NF- κ B 主要分布在细胞核内及部分胞质,而 α -SMA 主要在肝细胞的胞质中表达。镜下观察模型组大鼠肝组织中 NF- κ B 和 α -SMA 蛋白表达广泛,其阳性染色面积均高于正常对照组、APA 组和三七丹参组 ($P < 0.01$),且呈现深棕黄色。而 APA 组与三七丹参组比较,NF- κ B 蛋白阳性染色面积表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), α -SMA 蛋白阳性染色面积表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织中 NF- κ B 和 α -SMA 阳性表达面积的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	NF- κ B	α -SMA
正常对照组	10	13.620 \pm 4.963	22.990 \pm 1.185
模型组	9	44.900 \pm 5.143 Δ	63.020 \pm 5.366 Δ
APA 组	9	25.410 \pm 3.073 \blacktriangle	32.400 \pm 2.721 \blacktriangle
三七丹参组	10	27.330 \pm 5.168 \blacktriangle	43.410 \pm 4.335 $\blacktriangle\blacktriangle$

Δ : $P < 0.01$,与正常对照组比较; \blacktriangle : $P < 0.01$,与模型组比较。

3 讨 论

肝纤维化是多种因素作用的结果,越来越多的国内外学者认为肝纤维化主要是由于多种细胞因子激活肝星状细胞,导致细胞外基质的沉积和降解减少。本实验主要观察了 NF- κ B 和 α -SMA 两个因子在肝脏中的表达情况,并探讨 APA 抗大鼠实验性肝纤维化的作用机制。

NF- κ B 是众多细胞因子和炎性介质表达的主要转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点^[2]。NF- κ B 蛋白正常情况下与 I κ Ba 结合存在于肝脏多种细胞的细胞质中,当 NF- κ B 受到一些反式信号通路激活时(主要是 I κ B 激酶),它可以使 I κ Ba 蛋白泛素化和降解,导致 NF- κ B 激活并向细胞核移位,从而导致肝星状细胞(HSC)活化并呈现 NF- κ B 的核转位活性^[3]。活化的 HSC 内 NF- κ B 活性增强,导致肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、细胞间黏附分子(ICAM)-1、转化生长因子(TGF)- β 1 等 NF- κ B 下游致炎因子表达增强,放大了肝脏炎性损伤反应^[4]。长时间的炎性反应导致肝脏的纤维化。

α -SMA 被视为肝纤维化的一个很好的标志物,有研究表明氧化应激在 HSC 活化过程中起了重要的作用,可以刺激 HSC 活化并转化为 α -SMA 阳性的成纤维细胞^[5]。此外,虽然 α -SMA 也可以由其他类型的细胞来表达,但是 α -SMA 被称为

HSC 活化的一个可靠标志^[6]。HSC 在正常情况下是静态的,它的激活使过量的胶原蛋白沉积在肝脏而导致肝纤维化^[7]。

本实验病理形态学和血液生化检查结果表明,APA 能显著降低肝纤维化分期程度和改善肝功能,对四氯化碳所致的大鼠肝纤维化有一定的防治作用。本研究尚发现 NF- κ B 和 α -SMA 在模型组中高度表达,而在 APA 组和三七丹参组中表达相对较少,即纤维化程度越高,NF- κ B 和 α -SMA 表达水平相对较高。由此可以推断 APA 抗纤维化作用可能与其可以降低肝纤维化组织中 NF- κ B 和 α -SMA 的表达水平有关。进一步深入研究 APA 与肝纤维化的关系及其潜在的机制具有深远意义,将为治疗肝纤维化药物开拓新的道路。

参考文献:

- [1] 李武,段丽芳,何贵清,等.不同剂量美洲大蠊提取物抗小鼠实验性肝纤维化的研究[J].中华肝脏病杂志,2009,17(12):948-951.
- [2] 张彩华,姜妙娜,李寒妹,等.肝复康对肝纤维化大鼠肝组织 NF- κ B、MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响[J].临床肝胆病杂志,2011,14(3):169-172.
- [3] Watson MR,Wallace K,Gieling RG,et al. NF-kappaB is a critical regulator of the survival of rodent and human hepatic myofibroblasts[J].J Hepatol,2008,48(4):589-597.
- [4] 周宇,陈科全,叶石才,等.核因子- κ Bp65 反义寡核苷酸对肝纤维化作用的实验研究[J].中华肝脏病杂志,2009,29(4):254-257.
- [5] 张志勇,金武丕,许晓俊.核转录因子- κ B 与酒精性肝病的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2010,26(3):269-271.
- [6] Leung TM,Fung ML,Liong EC et al. Role of nitric oxide in the regulation of fibrogenic factors in experimental liver fibrosis in mice[J].Histol Histopathol,2011,26(2):201-211.
- [7] Wu LM,Wu XX,Sun Y,et al. A novel synthetic oleanolic acid derivative(CPU-II2) attenuates liver fibrosis in mice through regulating the function of hepatic stellate cells [J].J Biomed Sci,2008,15(2):251-259.

(收稿日期:2013-10-01 修回日期:2014-02-23)

(上接第 2151 页)

- [1,3,5] triazin-5,7-dione and its 5-thioxo analogues on anti-thymidine phosphorylase and associated anti-angiogenic activities[J].Eur J Med Chem,2013(67):325-334.
- [13] Haraguchi M,Miyadera K,Uemura K,et al. Angiogenic activity of enzymes[J].Nature,1994,368(6468):198.
- [14] 李冰.血小板衍生内皮细胞生长因子的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2008,35(2):86-88.
- [15] Li W,Tanaka K,Morioka K,et al. Long-term effect of

gene therapy for chronic ischemic myocardium using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs [J].J Gene Med,2008,10(4):412-420.

- [16] Li W,Tanaka K,Ihaya A,et al. Gene therapy for chronic myocardial ischemia using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2005,288(1):408-415.

(收稿日期:2013-09-24 修回日期:2014-02-11)