

鸡矢藤颗粒剂干预大鼠肝纤维化模型 OPN 与 TGF- β 1 水平表达的试验研究

Experimental study on the expression level of OPN and TGF- β 1
in rat liver fibrosis model with tuber granule intervention

袁 勇

YUAN Yong

(海南医学院, 海南 海口 570102)

(Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China)

摘要:将 30 只大鼠随机分为正常对照组、肝纤维化模型非治疗组和肝纤维化模型治疗组。8 周后采用 Western blotting 检测 OPN 蛋白表达,采用荧光实时定量法检测 TGF- β 1 mRNA 的表达水平。结果显示,采用鸡矢藤颗粒剂治疗组(模型治疗组)的 HA、LN、PCIII、CIV 放射免疫数据与正常组相比有显著差异($P < 0.01$),同时与模型非治疗组比有差异($P < 0.05$);模型非治疗组的 HA、LN、PCIII、CIV 放射免疫数据与治疗组相比有显著差异($P < 0.01$);采用鸡矢藤治疗(模型治疗组)的 OPN 蛋白表达数值水平较正常组有差异($t = 2.236, P < 0.05$),同时较模型非治疗组有显著差异($t = 1.024, P < 0.01$);采用鸡矢藤治疗(模型治疗组)的 TGF- β 1 mRNA 的表达数值水平较正常组有差异($t = 2.245, P < 0.05$),同时较模型非治疗组有显著差异($t = 1.142, P < 0.01$)。说明鸡矢藤可以抑制 OPN 蛋白表达,抑制 TGF- β 1 mRNA 的表达,减缓肝纤维化的进程。研究表明 OPN 与 TGF- β 1 调控的信号通路具有相关性,具体信号通路的调控有待进一步研究。

关键词:鸡矢藤;肝纤维化;骨桥蛋白;转化生长因子

Abstract: Methods The 30 rats were randomly divided into normal control group, the non-treatment group of liver fibrosis model and the treatment group of liver fibrosis model. Each group of rats are take the following operation: Western blotting test OPN protein expression after eight weeks. The PCR detection of TGF- β 1 mRNA expression level. Results This study showed that the treatment group of liver fibrosis model of HA, LN, PCIII, CIV radioimmunoassay were higher than the treatment group have significant differences

($P < 0.01$), and the differences were statistically significant than the non-treatment group of liver fibrosis model at the same time ($P < 0.05$). The non-treatment group of liver fibrosis model of HA (Hyaluronic acid), LN (Laminin), PCIII (Procollagen type III), CIV radioimmunoassay showed significant differences compared to the treatment group of liver fibrosis model ($P < 0.01$). Using the treatment group of liver fibrosis model of OPN protein expression level, differences were found in the normal group ($t = 2.236, P < 0.05$), and the differences were statistically significant than the non-treatment group of liver fibrosis model at the same time ($t = 1.024, P < 0.01$). Using the treatment group of liver fibrosis model of TGF- β 1 mRNA expression level of numerical difference compared with normal group ($t = 2.245, P < 0.05$), and compared with the non-treatment group of liver fibrosis model had significant difference ($t = 1.024, P < 0.01$). Conclusions The *P. scandens* granule could inhibit the OPN protein expression, inhibition of TGF- β 1 mRNA expression, slow down the progress of liver fibrosis. Through the experiments, it showed that OPN associated with TGF- β 1 regulation of signaling pathway and the specific signaling pathways regulating needs further research.

Keywords: *Paederia scandens*; hepatic fibrosis; osteopontin; transforming growth factor β

肝纤维化是肝硬化、肝癌等多种肝病的共同病理过程。它可由多种损肝因素(如病毒性肝炎、酒精性肝病、脂肪肝、药物及化学毒物损伤等)引起,逐步导致肝内弥漫性细胞外基质(胶原或非胶原)过度沉积,其核心病理改变过程是肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSCs)激活并大量增殖,最后转化成肌纤维细胞样细胞^[1]。在 HSCs 激活并增殖的过程中,各种致纤维化介质如转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1)会大量分泌,目前认为,在肝纤维化进程中,TGF- β 1 是最强的致纤维化细胞因子,它有很强的

基金项目:2014 年海南省自然科学基金(编号:0104777039)

作者简介:袁勇(1979—),男,海南医学院副教授,硕士。

E-mail: 2354201085@qq.com

收稿日期:2018-02-07

促 HSC 激活和分泌细胞外基质的作用,与肝纤维化进程密切相关。肝纤维化进展过程中许多细胞外基质非胶原成分如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)会增加^[2]。大量研究^[3]结果表明中医所述肝脏血瘀程度与肝纤维化程度密切相关,并且具有活血化瘀作用的中药用于抗肝纤维化治疗。

鸡矢藤为南药,在中国琼海等地广泛分布,有祛风利湿、消食化积、止咳、活血止痛之效,也是琼海一带最有名的小吃食料之一。据现代研究^[4-5]表明鸡矢藤可以抑制肝脏 P4503A 氧化酶活性,增加谷胱甘肽含量,降低转氨酶,可用于黄疸性肝炎等疾病,有利于保护肝脏。本研究拟探讨南药鸡矢藤干预大鼠肝纤维化模型中 OPN 和 TGF- β 1 水平表达的相关性研究。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

Wistar 雄性大鼠:30 只,体重(150 $\pm$ 10) g,清洁级,海南医学院实验动物中心。随机分为正常对照组(10 只)、肝纤维化模型非治疗组(10 只)和肝纤维化模型治疗组(10 只)。

1.2 主要试剂与药物

小鼠抗大鼠 OPN 抗体、羊抗小鼠抗体:北京博奥森生物技术有限公司;

Trizol 试剂:纯度 99%,美国英杰生命技术有限公司;

引物 TGF- β 1 序列(Forward 5' CTTCAATACGT-CAGATTCCGCGG3'、Reverse5' GTAACGCCAGGAATT-GTTGCTAA3')、内参照引物(GAPDH)序列(Forward:5' GGGGAAGGTGAAGGTCGGAGT3'Reverse5'GGGGTCAT-TGATGGCAACA3');德国默克公司;

肝纤维化指标测定试剂:武汉博士德生物工程有限公司;

鸡矢藤颗粒剂:广州一方药业公司。

1.3 主要仪器设备

放射免疫分析仪:CN202M/KZ4GC-911 型,北京中西远大科技有限公司;

低温冷冻离心机:GTR10-1 型,北京鼎盛荣和科技有限公司;

电动玻璃匀浆机:DY89-II 型,宁波新芝生物科技有限公司;

台式水浴恒温振荡器:SHA-C 型,上海博迅实业有限公司;

干湿恒温孵育器:MSC100 型,宁波立诚科创仪器有限公司;

垂直电泳系统:Bio-Rad 型,宁波新芝生物科技有限公司;

酶标仪:ELX-800 型,宁波新芝生物科技有限公司。

1.4 造模及给药

肝纤维化模型非治疗组和肝纤维化模型治疗组大鼠在 3 周造模期间,每周 3 d 腹腔注射 0.5% 二甲基亚硝胺 1 次(0.2 mL/100 g),稳定 1 周观察。肝纤维化模型治疗组随后 4 周予以鸡矢藤颗粒剂 10 mg/kg 灌胃(溶于注射用水中),正常组与肝纤维化模型非治疗组予 5 mL/(kg $\cdot$ d)剂量的注射用水灌胃。试验 8 周后处死大鼠,以 3% 水合氯醛腹腔注射麻醉各组大鼠,留取血标本。肝脏经生理盐水充分灌洗后称重,部分组织以 4% 的多聚甲醛固定、石蜡包埋,制成 4 μ m 厚切片,其他组织液氮保存备用。

1.5 观测指标及方法

1.5.1 肝纤维化指标测定 血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原肽(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ)采取放射免疫法^[2]完成。

1.5.2 OPN 蛋白表达 用 Westernblot 方法检测,取 100 mg 肝组织加 4 $^{\circ}$ C 匀浆缓冲液,于 5 000 r/min 匀浆 60 s,提取肝组织蛋白,4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min,提取肝组织总蛋白。取 50 μ g 肝组织总蛋白,变性后进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、蛋白转移至硝酸纤维素膜,经 5% 脱脂奶粉封闭后,用小鼠抗大鼠 OPN 抗体 1:5 000 稀释。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,摇床洗涤 3 次后,以辣根过氧化物标记的羊抗小鼠 IgG-HRP 1:5 000 稀释后,室温振荡孵育 2 h,倒掉二抗孵育液后以足量缓冲盐溶液洗涤 3 次,每次 10 min,暗室内 ECL-Plus 连续 3 次显影曝光。以 GAPDH 为内参照,结果以图像灰度值比值对照分析。

1.5.3 TGF- β 1 mRNA 表达的检测 采用荧光实时定量法^[6]。使用 TRIzol 试剂对肝组织总 RNA 进行抽提,取 1 μ g RNA 逆转录,再取 2 μ L 逆转录产物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:50 $^{\circ}$ C 起始 2 min,93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,93 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 变性 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 变性 1 min,延伸 40 个循环。以 GAPDH 为内参照,进行 TGF- β 1 mRNA 表达相对定量分析。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据采用 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,比较采用 t 检验。

2 结果及分析

2.1 鸡矢藤颗粒剂对肝纤维化指标的影响

由表 1 可知,采用鸡矢藤颗粒剂治疗组(模型治疗组)的

表 1 各组大鼠血清 HA、LN、PCⅢ、CⅣ 数值水平比较[†]

Table 1 Comparison of serum HA, LN, PCⅢ and CⅣ in rats of each group ($n=10$)

组别	ng/mL			
	HA	LN	PCⅢ	CⅣ
正常组	90.67 $\pm$ 15.21 *	6.28 $\pm$ 2.45 *	31.12 $\pm$ 6.54 *	7.42 $\pm$ 2.10 *
模型非治疗组	485.67 $\pm$ 105.19	40.35 $\pm$ 5.36	89.24 $\pm$ 8.64	57.36 $\pm$ 3.38
模型治疗组	207.48 $\pm$ 78.29 Δ	29.38 $\pm$ 3.38 Δ	56.28 $\pm$ 7.85 Δ	32.59 $\pm$ 3.54 Δ

[†] * 表示正常组的各项指标与模型非治疗组和模型治疗组相比有显著差异($P<0.01$); Δ 表示模型非治疗组的各项指标与模型治疗组相比有差异($P<0.05$)。

抗肝纤维化疗效理想,数据与正常组相比有显著差异($P<0.01$),同时与模型非治疗组相比有差异($P<0.05$)。模型非治疗组的肝纤维化水平最高,各项纤维化的数据与治疗组相比有显著差异($P<0.01$)。总体说明鸡矢藤颗粒剂延缓了肝纤维化进程。

2.2 鸡矢藤颗粒剂对 OPN 蛋白表达的影响

由表 2 可知,采用鸡矢藤治疗(模型治疗组)后,可以明显抑制 OPN 蛋白表达,其数值水平较正常组有差异($t=2.236, P<0.05$),同时较模型非治疗组有显著差异($t=1.024, P<0.01$)。OPN 蛋白表达显影曝光图见图 1。

表 2 各组 OPN 蛋白表达数值水平比较[†]
Table 2 Comparison of OPN protein expression levels in each group ($n=10$)

组别	OPN/GAPDH
正常组	1.0254±0.0206 *
模型非治疗组	3.0165±0.1726
模型治疗组	1.9687±0.1054 [△]

[†] * 表示模型非治疗组的各项指标与正常组和模型治疗组相比有显著差异($t=1.024, P<0.01$);[△]模型治疗组的各项指标与模型治疗组相比有差异($t=2.236, P<0.05$)。

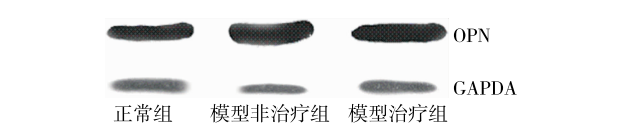


图 1 OPN 蛋白表达显影曝光图

Figure 1 Development exposure of OPN protein expression

2.3 各组 TGF-β1 mRNA 表达数值水平的比较

由表 3 可知,采用鸡矢藤治疗(模型治疗组)后,可以明显抑制 TGF-β1 mRNA 的表达,其数值水平较正常组有差异($t=2.245, P<0.05$),同时较模型非治疗组有显著差异($t=1.142, P<0.01$)。

3 结论

近年来,OPN 作为细胞外基质的非胶原糖蛋白组分,在肝纤维化过程中的作用受到研究者的重视^[7-11]。OPN 可能成为与肝纤维化相关的一个重要的生物标志物。编码人的

表 3 各组 TGF-β1 mRNA 表达数值水平比较[†]
Table 3 Comparison of TGF-β1 mRNA expression levels in each group($n=10$)

组别	TGF-β1/GAPDH
正常组	0.896 2±0.112 4 *
模型非治疗组	2.875 6±0.204 4
模型治疗组	1.156 8±0.105 4 [△]

[†] * 表示模型非治疗组的指标与模型治疗组相比有显著差异($t=1.142, P<0.01$);[△]模型治疗组的指标与正常组相比有差异($t=2.245, P<0.05$)。

OPN 基因位于第 4 号染色体 q13 上,为一单拷贝基因,长度约为 5.4~8.2 kb,人 OPN(humanOPN,hOPN)和鼠类 OPN(mouseOPN,mOPN)具有 59%的同源性。OPN 是细胞外基质重要组成部分,含有特异的精氨酸—甘氨酸—天冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGD)序列,该序列是 OPN 发挥多种功能的结构基础,可通过整合素(integrin)信号通路激活细胞内特异性信号转导系统调节细胞增殖。OPN 等细胞外基质成分黏附于细胞表面的整合素后,引起整合素聚集、黏着斑形成、黏着斑激酶酪氨酸磷酸化、RAS 活化,进而刺激有丝分裂素激活蛋白激酶类级联反应,调节基因表达。如前所述在肝纤维化进程中,TGF-β1 有很强的促 HSC 激活和分泌细胞外基质的作用,与肝纤维化进程密切相关。

本研究证实鸡矢藤颗粒剂可以抑制 OPN 和 TGF-β1 mRNA 表达。考虑作用机制为降低整合素信号通路的有效性,因此未激活蛋白激酶类级联反应,同时间接地抑制了 TGF-β1 mRNA 的表达,HSC 激活数量不足,减少了分泌细胞外基质的作用,减缓了肝纤维化的进程。表明 OPN 与 TGF-β1 调控的信号通路具有相关性,具体信号通路的调控有待进一步研究。

参考文献

[1] 吴孟超, 李梦东. 实用肝病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 485-488.

[2] 贺佩, 胡君健, 何永康, 等. 四种单味中药及其复方对小鼠血吸虫病肝纤维化 I、Ⅲ型胶原及 TGF-β1 表达的影响[J]. 热带病与寄生虫学, 2016, 14(1): 25-27.

[3] 上海中医药大学中医文献研究所. 申江医萃续集: 内科名家姜春华学术经验集[M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 2003: 147-148.

[4] 廖建良, 单沛贤. 乌厥、鸡屎藤提取物的抑菌活性研究[J]. 惠州学院学报: 自然科学版, 2016, 36(3): 9-13.

[5] 韩德承. 活血止痛鸡屎藤[J]. 中国中医药报: 农村与社区版, 2012, 8(30): 5.

[6] 陶翠玲, 金春英, 赵艳波, 等. 肝纤康治疗慢性病毒性肝炎肝纤维化痰瘀互结证的临床研究[J]. 中医药学报, 2003, 31(4): 6.

[7] ARAI M, YOKOSUKA O, KANDA T, et al. Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction[J]. Scand J Gastroenterol, 2006, 41(1): 102-110.

[8] 刘茂希, 杨继武, 张凤. 免疫性大鼠肝纤维化肝组织中骨桥蛋白的表达[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(2): 183-184.

[9] 张斌, 赵莹, 陈建杰, 等. 肝纤维化时肝脏 OPN 和 PAI-1 的表达变化[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(7): 1 407-1 409.

[10] 黄大建, 赵永忠, 卢青, 等. 转化生长因子 β1 和骨桥蛋白在肝纤维化大鼠肝组织的表达及荔枝核总黄酮的干预[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(22): 3 646-3 649.

[11] TANIGUCHI H, KATO N, OTSUKA M, et al. Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta1 transcription[J]. Journal of Medical Virology, 2004, 72: 52.