

辛伐他汀对大鼠肝纤维化的影响及其作用机制

徐明¹, 孙申², 冯盼盼³, 刘静³

1. 徐州医学院病理生理学教研室, 江苏徐州 221002
2. 徐州医学院组织与胚胎学教研室, 江苏徐州 221002
3. 徐州医学院病理学教研室, 江苏徐州 221002

摘要 观察辛伐他汀对大鼠肝纤维化的影响并探讨其机制。60只健康的睡眠剥夺(Sleep Deprivation, SD)大鼠随机分为对照组、模型组和药物组。模型组和药物组,大鼠皮下注射四氯化碳(CCl₄)油溶液造模,药物组造模同时给予辛伐他汀灌胃(5mg·kg⁻¹·d⁻¹)至实验结束;对照组给予等量的橄榄油皮下注射。8周后处死所有动物,全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)活性,苏木精-伊红染色观察肝组织病理学改变,免疫组织化学法检测各组肝组织中I、III型胶原及转化生长因子-β₁(TGF-β₁)的表达情况。结果表明,与模型组相比,药物组大鼠肝脏炎症反应和纤维化较轻,I、III型胶原及TGF-β₁的表达显著减少(P<0.05),血清ALT、AST水平降低(P<0.05)。由此得出,辛伐他汀可以减轻肝纤维化程度,其机制可能与抑制TGF-β₁和I、III型胶原表达有关。

关键词 辛伐他汀;肝纤维化;转化生长因子-β₁;I型胶原;III型胶原

中图分类号 R363

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)24-0089-04

Effects of Simvastatin on Hepatic Fibrosis in Rats and Its Mechanism

XU Ming¹, SUN Shen², FENG Panpan³, LIU Jing³

1. Department of Pathophysiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China
2. Department of Histology and Embryology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China
3. Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Abstract To observe the effects of simvastatin on hepatic fibrosis in rats and to study its possible mechanism, 60 male and female SD rats were randomly divided into control group, model group, and trial group. Rats of the model group were injected with tetrachloride (CCl₄), rats of the trial group were injected with CCl₄ and was gavaged with simvastatin 5mg·kg⁻¹·d⁻¹, and rats of the control group were injected with the equal volume of olive oil. Rats were all executed after 8 weeks, the contents of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured by full automatic biochemical analyzer. The pathological change of liver was observed under light microscope (hematoxylin-eosin staining). The expression of collagen I (Col I), collagen III (Col III), and Transfer Growth Factor-β₁ (TGF-β₁) were detected by immunohistochemistry. The results show that comparing the trial group with the model group, the inflammation and fibrosis are decreased in pathological sections, the expressions of Col I, Col III and TGF-β₁ in the liver tissues are remarkably decreased (P<0.05), the contents of ALT and AST are decreased (P<0.05). Simvastatin can inhibit liver fibrosis induced by CCl₄. The mechanism may be attributed to its effect of downregulating TGF-β₁, Col I and Col III.

Keywords simvastatin; hepatic fibrosis; Transfer Growth Factor-β₁ (TGF-β₁); collagen I (Col I); collagen III (Col III)

收稿日期: 2010-09-27; 修回日期: 2010-12-06

基金项目: 江苏省高校自然科学基金研究计划项目(08KJD310009); 徐州医学院科研课题项目(07KJ49)

作者简介: 徐明, 讲师, 研究方向为病理生理学, 电子信箱: xzmexm@163.com

0 引言

肝纤维化是细胞外间质合成与降解的稳态被慢性肝实质持续的炎症与坏死所破坏,细胞外间质合成大于降解,导致肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过程。其特征是以胶原为主的细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)在肝内过量沉积。肝纤维化时 ECM 的一些基本成分(如胶原、非胶原糖蛋白、蛋白多糖等)均不同程度地增加,其中以胶原增加最明显,尤其是 I 型和 III 型胶原,它们是肝纤维间隔的重要来源。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)是介导肝损伤及纤维化最关键的细胞因子,它既可以促进肝星状细胞(HSC)增生和激活表达,又可以促进产生 I、III、IV 型胶原^[1-2]。因此,如何通过有效途径抑制 TGF- β_1 活化,减少 I 型和 III 型胶原的增生,是当前预防各种病因引起肝脏纤维化的一个重要思路。

辛伐他汀是 HMG-CoA 还原酶选择性抑制剂,通过抑制 HMG-CoA 还原酶和胆固醇在肝脏的生物合成而降低血浆胆固醇和低密度脂蛋白水平,同时它还能够增加肝脏表面低密度脂蛋白(LDL)受体数量而增加 LDL 的摄取和分解代谢。最近的研究发现,辛伐他汀除了降脂作用外,在部分器官组织中还表现出抗纤维化作用^[3-5]。但是他汀类药物在肝脏纤维化的过程中起到何种作用,至今尚无报道。本研究利用四氯化碳制备大鼠肝纤维化模型,给予辛伐他汀观察其对血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)水平,肝组织病理改变, I、III 型胶原及 TGF- β_1 影响,探讨辛伐他汀对大鼠肝纤维化的影响及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

健康的睡眠剥夺(Sleep Deprivation, SD)大鼠 60 只,雌雄各半,体重(200±20)g,由徐州医学院实验动物中心提供。四氯化碳(CCl₄)(分析纯,上海长江化工厂生产),ALT、AST 试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司生产),兔抗大鼠 I、III 型胶原多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),兔抗大鼠 TGF- β_1 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),二抗 PV-6001、PV-6002 试剂盒及 DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司),其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 实验模型建立与实验分组

大鼠肝纤维化模型建立参照 Nakamura 等^[6]方法,即 CCl₄ 与橄榄油按 1:1 体积比配成 50%油剂,按 0.3mL/100g 剂量背部皮下注射,2 次/周,共 8 周。

动物分组:大鼠随机分为 3 组,即模型组、药物组和对照组,每组 20 只,雌雄各 10 只。① 模型组,建立肝纤维化模型并给予蒸馏水灌胃(5mg·kg⁻¹·d⁻¹);② 药物组,造模同模型组,同时给予辛伐他汀灌胃溶液(5mg·kg⁻¹·d⁻¹);③ 对照组,按 0.3mL/100g 剂量背部皮下注射橄榄油并给予蒸馏水灌胃(5mg·kg⁻¹·d⁻¹)。

1.3 取材

实验第 8 周各组动物末次给药后,禁食不禁水 12h,腹腔注

射 2%戊巴比妥钠麻醉。腹主动脉取血,3500r/min 离心 15min,分离血清,-80℃冷藏备用。处死动物取肝叶相同部位组织,常规固定,作苏木素-伊红(HE)染色、免疫组织化学染色。

1.4 肝功能指标测定

全自动生化分析仪检测 ALT、AST 活性。按试剂盒说明操作。

1.5 肝脏病理学检查

肝组织以 10%中性甲醛充分固定,经各级乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。每一组织块作切片 7 张,切片厚 4 μ m,常规 HE 染色,光镜观察。

1.6 肝组织 I、III 型胶原和 TGF- β_1 水平的检测

肝组织中 Col I、Col III 和 TGF- β_1 水平采用免疫组织化学染色检测。染色步骤按照北京中杉金桥生物技术有限公司提供的 Power Vision TM 二步法免疫组化检测系统进行。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水,中性树胶封片。光镜下观察到胞质或胞核内有棕色颗粒者,即为阳性细胞。对每组每张切片选取 4 个角加中央区共 5 个视野(400 \times)阳性细胞计数,以阳性细胞占观察细胞总数百分比作为检测指标。

1.7 统计学方法

全部数据用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 一般情况

对照组 20 只大鼠皮毛有光泽、浓密,体重逐渐增加。相比对照组,模型组大鼠逐渐出现体毛稀疏,喜静少动,摄食、饮水减少,体重增长较慢。药物组大鼠一般状态较对照组稍差,比模型组明显改善。造模结束时,模型组死亡 4 只、药物组死亡 2 只、对照组无死亡。

2.2 大鼠血清 ALT 和 AST 活性检测

模型组、药物组与对照组比较,大鼠血清 ALT、AST 活性都明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);但药物组大鼠血清 ALT、AST 活性比模型组又有所下降,差异也有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组血清 ALT 和 AST 活性比较
Table 1 Comparison of ALT and AST in serum in each group

分组	只数	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照组	20	48.4±5.1	102.7±8.3
模型组	16	139.2±15.7 ^a	245.6±30.1 ^a
药物组	18	103.4±13.9 ^{ab}	169.4±29.5 ^{ab}

注: a 表示与对照组比较, $P < 0.05$; b 表示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

Notes: a means $P < 0.05$ as compared with control group; b means $P < 0.05$ as compared with model group.

2.3 肝组织的病理组织学观察

HE 染色镜下可见,对照组肝小叶结构清晰,肝索排列整

齐,肝细胞无变性、坏死,无界面性炎症及纤维化。模型组正常肝小叶结构遭到破坏,部分假小叶形成,部分肝细胞脂肪变性、气球样变性,可见散在的坏死肝细胞,在汇管区见大量纤维结缔组织增生和炎症细胞浸润。药物组纤维化程度相对模型组较轻,肝小叶结构受到一定的破坏,在汇管区少量纤维结缔组织增生和炎性细胞浸润,假小叶和纤维间隔形成不明显(图1)。

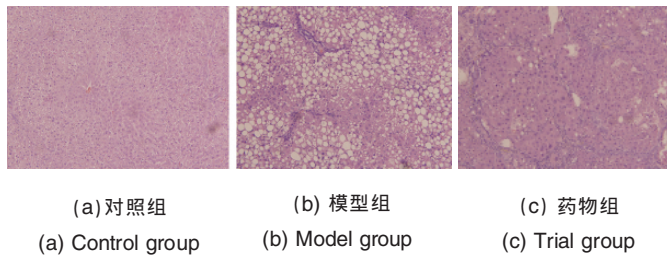


图1 各组大鼠肝组织 HE 染色(200×)
Fig. 1 HE stain of hepatic tissue of the three groups (200×)

2.4 肝组织 I、III 型胶原表达

免疫组织化学发现,对照组大鼠肝组织 I、III 型胶原仅在汇管区和中央静脉处少量表达,染色淡(图2、图3)。模型组与对照组相比,大鼠肝组织 I、III 型胶原表达显著增强,差异有统计学意义($P<0.05$),阳性表达广泛见于变性的肝细胞、中央小叶和门静脉周围纤维带及肝纤维间隔,着色深。而药物组大鼠肝组织的 I、III 型胶原表达高于对照组但低于模型组,差异也均有统计学意义($P<0.05$)(表2)。

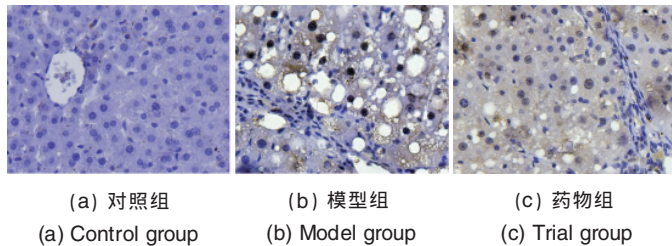


图2 各组大鼠肝组织 I 型胶原表达切片
(免疫组织化学染色,400×)
Fig. 2 Expression of Col I in hepatic tissue of the three groups (immunohistochemistry stain, 400×)

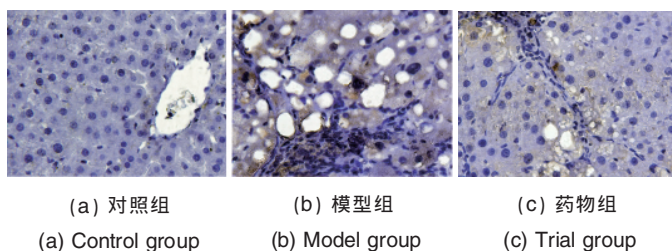


图3 各组大鼠肝组织 III 型胶原表达切片
(免疫组织化学染色,400×)
Fig. 3 Expression of Col III in hepatic tissue in each group (immunohistochemistry stain, 400×)

2.5 肝组织 TGF-β₁ 表达

对照组 TGF-β₁ 仅在汇管区基质及间质细胞胞浆内有少量表达(图4)。模型组与对照组相比,TGF-β₁ 表达显著增强, ($P<0.05$),大量阳性染色分布于汇管区及肝纤维间隔周围。而药物组 TGF-β₁ 阳性表达水平高于对照组但低于模型组,且差异均有统计学意义($P<0.05$)(表2)。

表2 各组肝组织 I、III 型胶原表达和 TGF-β₁ 表达的阳性细胞百分比比较

Table 2 Comparison among percentages of the Col I, Col III and TGF-β₁ positive cells in hepatic tissue in each group

分组	只数	Col I/%	Col III/%	TGF-β ₁ /%
对照组	20	6.31±1.07	4.98±1.73	7.90±2.04
模型组	16	17.11±4.45 ^a	26.22±6.32 ^a	21.82±6.07 ^a
药物组	18	11.13±4.05 ^{ab}	18.98±6.36 ^{ab}	15.76±4.73 ^{ab}

注:a 表示与对照组比较, $P<0.05$;b 表示与模型组比较, $P<0.05$ 。

Notes: a means $P<0.05$ as compared with control group; b means $P<0.05$ as compared with model group.

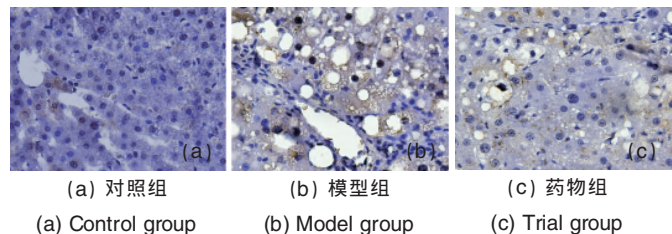


图4 各组大鼠肝组织 TGF-β₁ 表达切片
(免疫组织化学染色,400×)

Fig. 4 Expression of TGF-β₁ in hepatic tissue among the three groups (immunohistochemistry stain, 400×)

3 讨论

肝组织受到损害因素(如乙醇、寄生虫、HBV 和 HCV 病毒感染、自体免疫攻击、非酒精性脂肪肝疾病、药物等)可以引起肝细胞损伤,使肝星状细胞或肝成纤维细胞(myofibroblasts, MFB)活化、分化与增殖,合成大量细胞外基质,并逐渐沉积从而引起肝纤维化^[1,7-8]。

本实验用 CCl₄ 造成大鼠肝脏纤维化模型,并给以辛伐他汀干预。实验结果显示,药物组较模型组的肝脏炎性损害减轻,假小叶形成减少,提示辛伐他汀对肝脏的纤维化起到了抑制作用。血清转氨酶 ALT 和 AST 是肝细胞损害的主要指标。本实验模型组的 ALT 及 AST 活性异常升高,而药物组的血清 AST 及 ALT 活性明显低于模型组($P<0.05$),提示应用辛伐他汀减轻了肝细胞的炎症和坏死。

胶原为 ECM 的最主要成分,主要有 5 型,分别为 I 型(占 33%)、III 型(占 33%)、IV 型(占 1%)、V 型(占 1%~10%)及 VI 型(占 0.1%~1%)。肝纤维化时肝脏胶原含量可数倍增加,而且以 I、III 型胶原增加为主^[2,9-10]。本结果显示,药物组肝组织

中 I、III 型胶原表达明显少于模型组 ($P < 0.05$), 提示辛伐他汀抑制了肝脏 ECM 主要成分的形成。

当肝脏受到各种病因损伤刺激后, 炎性细胞就会释放细胞因子 TGF- β_1 。作为最强的促 HSC 纤维化生成因子, 它促进 HSC 的增殖和活化, 使肝细胞外基质 ECM 成分合成增多, 降解减少。除此之外, 它还可以通过 TGF- β_1 /Smad 信号传导通路调节 ECM, 通过下调 MMPs 和上调 TIMPs 调节 ECM, 进而促进肝纤维化的进程^[11-15]。本研究结果显示, 药物组肝组织中 TGF- β_1 的表达明显减少 ($P < 0.05$), 表明辛伐他汀通过抑制 TGF- β_1 的表达, 从而减轻肝脏的纤维化程度。

4 结论

综上所述, 辛伐他汀可以减轻 CCl₄ 引起的大鼠肝纤维化, 减少肝细胞的炎症和坏死, 其机制可能与抑制 TGF- β_1 及 I、III 型胶原表达有关。

参考文献 (References)

- [1] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. *Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- [2] Xu L, Hoi A Y, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. *Gut*, 2005, 54(1): 142-51.
- [3] 尹永红, 吕申. 氟伐他汀对肾小球系膜细胞产生细胞外基质的影响[J]. 大连医科大学学报, 2006, 28(4): 293-295.
Yin Yonghong, Lu Shen. *Journal of Dalian Medical University*, 2006, 28(4): 293-295.
- [4] 汪燕舞, 熊永炎, 陈智龙, 等. 辛伐他汀对肾性高血压心肌纤维化及结缔组织生长因子的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(10): 1101-1104.
Wang Yanwu, Xiong Yongyan, Chen Zhilong, et al. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004, 9(10): 1101-1104.
- [5] 奚吉成, 吴清玉, 陈连凤. 辛伐他汀对大鼠肺成纤维细胞功能及其抑制通路的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(19): 200-202.
Xi Jicheng, Wu Qingyu, Chen Lianfeng. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2005, 9(19): 200-202.
- [6] Nakamura T, Akiyoshi H, Saito I, et al. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers [J]. *J Hepatol*, 1999, 30(1): 101-106.
- [7] Le Bousse-Kerdilès M C, Martyré M C, Samson M. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: A review [J]. *Eur Cytokine New*, 2008, 19(2): 69-80.
- [8] Gressner O A, Rizk M S, Kovalenko E, et al. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(7): 1024-1035.
- [9] Albanis E, Friedman S L. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy[J]. *Clin Liver Dis*, 2001, 5(2): 315-334.
- [10] Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, et al. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Arch Pediatr*, 2002, 9(4): 392-405.
- [11] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210.
- [12] Gressner A M, Weiskirchen R, Breitkopf K, et al. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis[J]. *Front Biosci*, 2002, 7(4): 793-807.
- [13] Cutroneo K R. TGF- β -induced fibrosis and SMAD signaling: Oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring[J]. *Wound Repair Regen*, 2007, 15(Suppl) : S54-S60.
- [14] Schnur J, Olah J, Szepesi A, et al. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 16(2): 127-133.
- [15] 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.

(责任编辑 吴晓丽)

·学术动态·



“第十二届国际岩石力学大会”征文

国际岩石力学学会主办, 中国岩石力学与工程学会承办的“第十二届国际岩石力学大会”将于 2011 年 10 月 18—21 日在北京市召开。会议主题: 岩石力学与环境的和谐发展。

征文内容: 现场勘察与野外观测; 岩石材料与岩体性能测试(实验室与现场测试); 分析技术与设计方法(模拟与数值分析方法); 信息系统(人工智能及其他先进技术); 灾害性地质环境下的岩石工程; 岩石破碎与开挖技术; 石油、天然气、二氧化碳的地下储藏及核废料处理。

征文截止时间: 2011 年 2 月 15 日。

联系方式: 北京市朝阳区北土城西路 19 号中国岩石力学与工程学会(100029)冯婷, 胡威; 电话/传真: 010-82998164/82998163。

会议网站: www.isrm2011.com。