

· 基础研究 ·

替米沙坦对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝纤维化基质金属蛋白酶-13 及其抑制因子-1 的表达和胰岛素抵抗的影响

刘江奎^{1*}, 沈毅慧¹, 刘翔川⁴, 张 辉², 吴 晖¹, 殷 明³(华北石油总医院: ¹消化内科, ²骨外科, ³介入科, 任丘 062552; ⁴廊坊矿区第一医院内科, 廊坊 065007)

【摘 要】目的 观察替米沙坦对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠肝纤维化的疗效和对基质金属蛋白酶-13(MMP-13)及其抑制因子-1(TIMP-1)的表达和胰岛素抵抗的影响。方法 30只雄性SD大鼠随机分为正常对照组、模型组和替米沙坦干预组。模型组和干预组给予高脂饲料喂养16周诱发脂肪性肝炎,其中干预组于高脂喂养12周后,给予替米沙坦[5mg/(kg·d)]灌胃治疗4周。16周末处死所有动物。检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)及空腹胰岛素(FINS)、空腹血糖(FPG),并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),RT-PCR和Western blot法检测肝组织TIMP-1、MMP-13 mRNA和蛋白的表达水平。病理切片观察组织学改变,免疫组织化学法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达情况。结果 模型组血清ALT、AST、FPG、FINS及HOMA-IR较正常组均显著升高(均 $P < 0.01$)。与模型组相比,干预组血清ALT、FPG、FINS及HOMA-IR均明显下降,差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$)。AST与干预组相比存在下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组相比,替米沙坦可显著改善肝脏炎症活动度及肝纤维化程度(均 $P < 0.01$)。干预组HOMA-IR较模型组明显降低[(3.59 ± 0.29) vs (6.23 ± 0.19), $P < 0.01$]。干预组肝组织 α -SMA的表达明显减少,肝组织MMP-13 mRNA和蛋白的表达均增加,TIMP-1 mRNA和蛋白的表达均降低(均 $P < 0.01$)。结论 替米沙坦对NASH大鼠具有改善胰岛素抵抗和抗肝纤维化的作用。

【关键词】大鼠; 肝炎, 非酒精性; 基质金属蛋白酶13; 替米沙坦; 肌动蛋白类

【中图分类号】R575.5

【文献标识码】A

【DOI】10.3724/SP.J.1264.2011.00018

Effects of telmisartan on the expression of matrix metalloproteinase-13 and its tissue inhibitor-1 and insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis rat model

LIU Jiangkui^{1*}, SHEN Yihui¹, LIU Xiangchuan⁴, ZHANG Hui², WU Hui¹, YIN Ming³(Department of Gastroenterology, ²Department of Bone Surgery, ³Department of Intervention Treatment, General Hospital of Huabei Petroleum, Renqiu 062552, China; ⁴Department of Internal Medicine, First Hospital in Mining Area of Langfang City, Langfang 065007, China)

【Abstract】Objective To study the effects of telmisartan on matrix metalloproteinase-13(MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1) expressions and insulin resistance in rat model of nonalcoholic steatohepatitis(NASH). Methods Thirty male SD rats were randomized into normal control group, NASH model group and telmisartan intervention group. The rats were given standard food in normal control group, while high fat diet for 16 weeks in the other two groups to induce NASH. In telmisartan intervention group, telmisartan[5 mg/(kg·d)] was administered intragastrically for 4 weeks since the 12th week. All animals were sacrificed at 16 weeks. Serum levels of alanine aminotransferase(ALT), aspartate transaminase(AST), fasting blood glucose(FBG) and fasting insulin(FINS) were detected. Insulin sensitivity was evaluated by homeostasis model assessment of insulin resistance(HOMA-IR). Western blot and RT-PCR were used to measure TIMP-1 and MMP-13 expressions in hepatic tissue. Histological observation and immunohistochemical staining of α -smooth muscle actin(α -SMA) were also performed. Results Serum levels of ALT, AST, FPG, FINS and HOMA-IR were significantly higher in NASH group than in normal control group ($P < 0.01$). Compared with NASH group, serum levels of ALT, FPG, FINS and HOMA-IR decreased significantly($P < 0.01$), and AST level also decreased, but with no significance($P > 0.05$). Telmisartan improved significantly hepatic inflammation and fibrosis($P < 0.01$), decreased HOMA-IR significantly($P < 0.01$), reduced expressions of α -SMA and TIMP-1, and increased expressions of MMP-13 in hepatic tissue($P < 0.01$). Conclusion Telmisartan can improve insulin resistance and prevent hepatic fibrosis in NASH rats.

【Key words】rats; hepatitis, nonalcoholic; matrix metalloproteinase 13; telmisartan; actin

非酒精性脂肪性肝病可发展为脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化和肝硬化, NASH可能是隐源性肝硬化的病因之一^[1]。NASH以窦周纤维化为特征, 由活化的肝星状细胞介导^[2]。血管紧张素- (angiotensin, AT) 已被报道在组织器官纤维化的发生机制上起重要的作用。一些研究已证实AT1受体阻滞剂(angiotensin receptor blockers, ARB)可通过抑制肝星状细胞活化和肝脏转化生长因子- β 1的表达明显改善实验性肝纤维化^[3]。最近研究发现^[4], 替米沙坦除了阻滞AT1受体外, 它还是过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 的部分激动剂, 具有独立于降压作用以外的代谢改善作用。因此, 本研究通过高脂饮食建立大鼠非酒精性脂肪性肝炎模型, 观察替米沙坦对肝纤维化的影响并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

替米沙坦(商品名: 美卡素), 由勃林格殷格翰公司生产。胆固醇购于河北医科大学海森医药有限公司。鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。兔抗组织金属蛋白酶抑制剂1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1) 多克隆抗体和兔抗 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。兔抗基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP-13) 多克隆抗体及 SP 试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术公司。Trizol 试剂盒、逆转录酶 MMLV 购自北京赛百盛基因有限公司。

1.2 动物模型制作及分组

选用清洁级成年健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 (140 $\pm$ 16) g, 由河北医科大学实验动物中心提供。适应性饲养 1 周后随机分为 3 组, 每组 10 只。全部动物均在同一实验室按清洁级大鼠的要求饲养, 自由进食水。正常组饲以普通饲料 16 周。模型组及干预组采用高脂饮食 (88%普通饲料 + 2%胆固醇 + 10%猪油) 16 周, 普通饲料及猪油由河北医科大学动物中心提供。12 周时, 干预组以替米沙坦 5 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃 4 周。16 周末, 2%戊巴比妥钠腹腔麻醉, 处死所有大鼠, 留取实验标本。

1.3 血清 AST, ALT 及 FINS, FBG 测定

采用德国 Bayer 公司全自动生化分析仪测量天

冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)。用罗氏血糖仪测大鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)。采用化学发光法, 胰岛素测定仪检测空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS), 由公式 $HOMA-IR = (FPG \times FINS) / 22.5$ 计算胰岛素抵抗指数。

1.4 肝组织病理学及 α -SMA 免疫组织化学染色检测

将肝组织用 4%多聚甲醛固定后, 制备石蜡切片, 分别进行苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色, 光镜下观察肝细胞脂肪变性分度、炎症活动度及纤维化程度积分^[5, 6]。按免疫组织化学 SABC 试剂盒操作步骤进行 α -SMA 免疫组织化学染色, 应用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统, 在显微镜下每张切片随机选取 5 个视野 ($\times 400$), 检测阳性区域平均灰度值, 阳性表达越多, 灰度值越小。

1.5 RT-PCR 检测 TIMP-1 和 MMP-13 的 mRNA 水平

用 Trizol 试剂盒提取肝组织总 RNA, 在逆转录酶 M-MLV 的催化下合成 cDNA, 取 3 μ l cDNA 为模板在 TaqDNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。利用基因设计软件 Primer 5 进行引物对设计, 由赛百盛公司合成。TIMP-1 上游引物: 5'-GTGTTTCCCTGTTCA-GCCAT-3', 下游引物: 5'-TATTGCCAGGTGCAC-AAATC-3', 扩增产物大小为 149 bp。MMP-13 上游引物: 5'-GCGGGAATCCTGAAGAAGTCTAC-3', 下游引物: 5'-TTGGTCCAGGAGGAAAAGCG-3', 扩增产物大小为 424 bp。内参照 GAPDH 上游引物: 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3', 下游引物: 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3', 扩增产物大小为 298 bp。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火温度分别为 54 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 及 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物 7 μ l 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。电泳后用 G:BOX-HR 型凝胶成像分析系统 (SYGENE 公司英国) 进行扫描, 测定产物条带的吸光度值, 以 GAPDH 为基准, 做半定量分析, 即以扩增目的片段/GAPDH 的灰度值表示所扩增的目的基因片段的相对表达水平。

1.6 肝组织蛋白质提取液的制备及 Western 印迹法检测

取 100 mg 肝组织提取组织蛋白质, 以 8% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭; 分别以兔抗 TIMP-1 多克隆抗体 (1:200)、兔抗 MMP-13 多克隆抗体 (1:200)、兔抗 β -actin 多克隆抗体 (1:200) 作为第一抗体; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG

(1:2000)作为第二抗体。用增强化学发光试剂显色,当条带充分显色后压X光片,采用美国Image pro plus6.0软件对Western blot结果进行定量分析,灰度值以累积吸光度值(A)表示,结果以目的蛋白与 β -actin的累积吸光度值的比值表示。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件处理,所得实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用 Student-Newman-Keuls q 检验,等级资料组间采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清生化指标的变化

如表 1 所示,模型组血清 ALT, AST, FPG, FINS 及 HOMA-IR 较正常组均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,干预组血清 ALT, FPG, FINS 及 HOMA-IR 均明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。AST 与干预组相比存在下降趋势,但差异没有统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 肝组织 HE 和 Masson 染色

正常组大鼠的细胞形态、小叶结构及汇管区均未见异常。模型组大鼠肝组织呈弥漫性大泡脂肪变性,以肝腺泡带靠近中央静脉周围最为明显。炎性细胞浸润,可见肝细胞变性、坏死,甚至部分坏死融合成片形成桥接坏死及局灶性窦周纤维化。与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。干预组肝细胞脂肪变性与炎症分级较模型组明显减轻。与

模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。Masson 染色肝纤维化积分明显改善,与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$; 表 2, 图 1, 图 2)。

2.3 肝组织 α -SMA 表达

正常组大鼠肝脏偶见 α -SMA 阳性细胞;模型组大鼠 α -SMA 阳性细胞明显增多,多位于窦周纤维化显著区域和炎性细胞浸润聚集区,其灰度值(87 ± 5)与正常组(145 ± 16)比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。干预组大鼠 α -SMA 阳性细胞较模型组明显减少,其灰度值(119 ± 10)与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$; 图 3)。

2.4 TIMP-1、MMP-13 mRNA 的表达

模型组 TIMP-1 mRNA 表达量(0.93 ± 0.08)较正常组(0.32 ± 0.03)明显升高($P < 0.01$)。干预治疗后其表达量(0.77 ± 0.07)明显降低($P < 0.01$)。模型组 MMP-13 mRNA 表达(0.56 ± 0.07)较正常组(0.47 ± 0.05)明显升高($P < 0.05$)。干预治疗后其表达量(0.88 ± 0.09)显著升高($P < 0.01$; 表 3, 图 4)。

2.5 TIMP-1 和 MMP-13 蛋白的表达

Western 印迹法分析显示,分别在大约 28 ku、54 ku 位置出现 TIMP-1、MMP-13 特异性条带,在 43 ku 位置可见 β -actin 条带。模型组 TIMP-1 蛋白表达量(1.40 ± 0.15)较正常组(0.50 ± 0.05)明显升高($P < 0.01$)。干预治疗后其蛋白表达量(1.12 ± 0.16)明显降低($P < 0.01$)。模型组和干预组 MMP-13 的蛋白表达量(0.85 ± 0.11)和(1.30 ± 0.13)均较正常组(0.72 ± 0.09)升高(P 值分别 $< 0.05, 0.01$),差异具有统计学意义(表 3, 图 5)。

表 1 实验各组大鼠血清生化指标和胰岛素抵抗指数的变化

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	FBG (mmol/L)	FINS (mU/L)	HOMA-IR
正常组	48 ± 11	153 ± 45	4.6 ± 1.0	10.5 ± 1.5	2.13 ± 0.29
模型组	114 ± 20**	265 ± 52**	6.6 ± 0.9**	20.7 ± 0.9**	6.23 ± 0.19**
干预组	79 ± 16***	212 ± 66*	5.4 ± 0.9##	15.0 ± 1.2***	3.59 ± 0.29***

注: ALT: 丙氨酸转氨酶, AST: 天冬氨酸转氨酶, FBG: 空腹血糖, FINS: 空腹胰岛素; HOMA-IR: 胰岛素抵抗指数。HOMA-IR=(FPG×FINS)/22.5; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, *** $P < 0.01$

表 2 各组大鼠肝细胞脂肪变性程度、炎症活动度及纤维化程度的比较

($n=10$)

组别	肝细胞脂肪变性程度					炎症活动度	纤维化程度
	F0	F1	F2	F3	F4	记分	记分
正常组	10	0	0	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	0	0	0	1	9	2.67 ± 0.27**	1.16 ± 0.23**
干预组	0	1	6	3	0	1.36 ± 0.12***	0.04 ± 0.75##

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

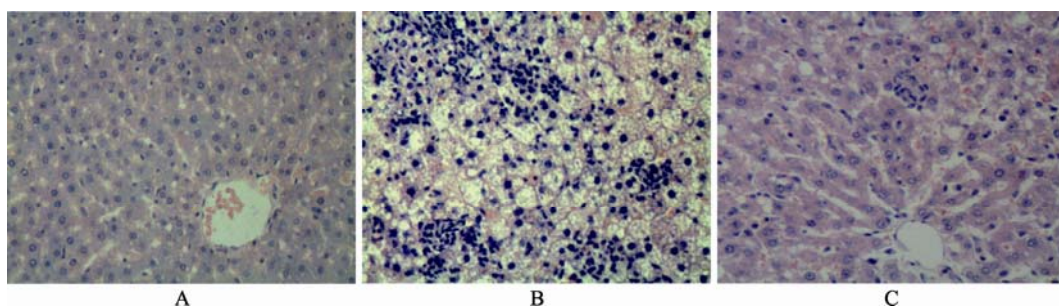


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色结果 (HE ×400)
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 替米沙坦干预组

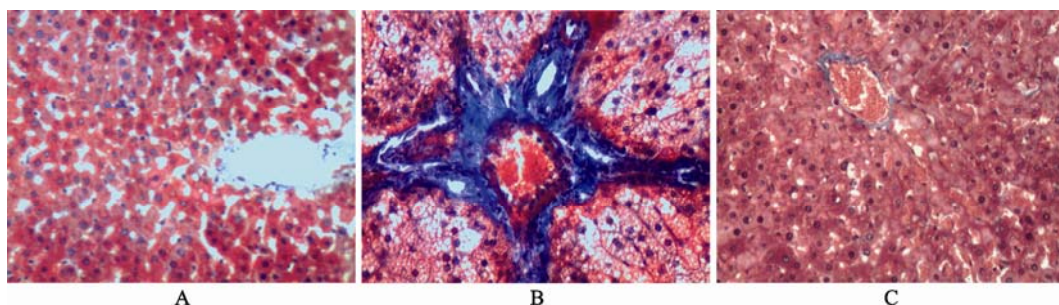


图 2 各组大鼠肝组织 Masson 染色结果 (Masson ×400)
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 替米沙坦干预组

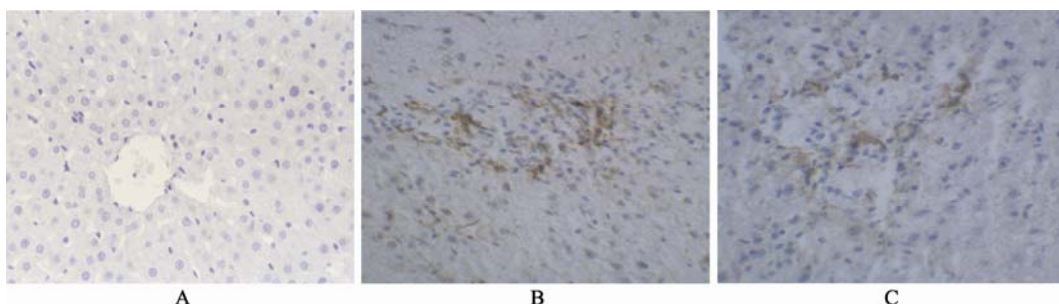


图 3 免疫组织化学法检测各组大鼠肝组织 α-SMA 的表达情况 (DAB ×400)
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 替米沙坦干预组

表 3 实验各组大鼠肝脏 TIMP-1 和 MMP-13 的表达变化
(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	TIMP-1		MMP-13	
	mRNA	蛋白质	mRNA	蛋白质
正常组	0.32 ± 0.03	0.50 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.72 ± 0.09
模型组	0.93 ± 0.08**	1.40 ± 0.15**	0.56 ± 0.07*	0.85 ± 0.11*
干预组	0.77 ± 0.07***	1.12 ± 0.16***	0.88 ± 0.09***	1.30 ± 0.13***

注: TIMP-1: 组织金属蛋白酶抑制剂 1, MMP-13: 基质金属蛋白酶 13。与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, *** $P < 0.01$

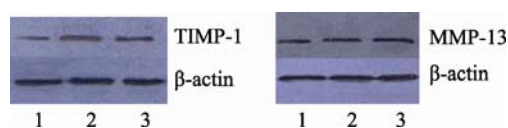


图 5 各组大鼠肝组织中 TIMP-1 和 MMP-13 的蛋白表达变化
1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 替米沙坦干预组

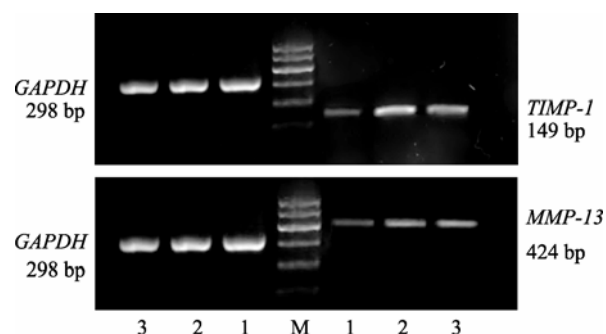


图 4 TIMP-1 和 MMP-13 mRNA 在各组大鼠肝组织中表达的变化
M: marker; 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 替米沙坦干预组

3 讨论

NASH 是进行性纤维化病变, 可发展为肝硬化。非酒精性脂肪性肝病发病机制复杂, 是代谢综合征累及肝脏的表现, 目前, 较为公认的致病因素是胰岛素抵抗^[7]。本实验采用徐正婕等^[8]的高脂饮食致大鼠 NASH 伴肝纤维化模型, 成功复制 SD 大鼠 NASH 并肝纤维化模型。经过持续 16 周的高脂饮食喂养, 大鼠病理形态形成 NASH, Masson 染色可见局灶性窦周纤维化形成。模型组血清 ALT, AST 及 HOMA-IR 较正常组均显著升高, 证实长期高脂饮食可造成胰岛素抵抗及脂肪性肝炎。

肝纤维化是肝脏在损伤因素作用下, 肝脏处于炎症反应和氧化应激状态, 释放的多种促纤维化细胞因子, 如白细胞介素-1、6、8, 转化生长因子- β 、血小板衍生生长因子等^[11], 从而激活肝星状细胞, 后者转变为肌成纤维细胞, 形成细胞外基质。其中 MMPs 及其 TIMPs 在调整细胞外基质过程中起着重要作用。间质胶原酶是降解肝纤维化细胞外基质重要因素, 在人类主要为 MMP-1, 鼠类则为 MMP-13, MMP-13 在肝纤维化早期升高, 参与新形成基质的降解。TIMPs 是一种最重要的调节细胞外 MMPs 活性的酶家族, 其中以 TIMP-1 在肝纤维化中的意义最大, 其水平随肝病进展而逐渐升高, 可反映肝纤维化程度^[9,10]。TIMP-1 可与 MMP-13 形成 1:1 的化学复合物, 抑制后者降解胶原的活性, 导致胶原等细胞外基质在肝内过度沉积, 最终形成肝纤维化。

替米沙坦是 PPAR γ 的部分激动剂, PPAR γ 激动药是目前代谢综合征治疗中的重要药物。其分子结构与 PPAR γ 激动剂吡格列酮相似, 但无噻唑烷二酮类降糖药致水钠潴留和致肥胖等副作用。替米沙坦干预治疗后, 血清 ALT 和 HOMA-IR 均明显下降, 肝脏病理组织学显示肝细胞脂肪变性及炎性细胞浸润均显著减轻, 肝组织 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达明显降低, 同时又减少其对 MMP-13 的抑制作用, 使已升高的肝组织 MMP-13 mRNA 和蛋白表达进一步增强, 从而上调 MMP-13/TIMP-1 比值, 抑制肝纤维化的发展。 α -SMA 是活化的肝星状细胞的相对特异性标志^[11], 干预组 α -SMA 的表达明显减少, 病理学亦证实肝纤维化病变明显减轻。具有确切治疗 NASH、预防肝纤维化形成的作用。考虑其机制为激活 PPAR γ , 促进脂肪细胞分化, 从而逆转了胰岛素抵抗, 减轻脂质过氧化和氧化应激对肝细胞的损伤, 从而抑制肝星状细胞的活化, 达到减轻肝脂肪变、炎症和抗纤维化的目的。另外, 替米沙坦是 ARB 类药物, 可特异性阻断血管紧张素 AT1 受体, 已有研究证实, 应用 ARB 类药物可明显改善慢性丙型肝炎和 NASH 患者的肝纤维化积分, 并降低转化生长因子- β_1 的表达^[12]。本实验中也观察到了这种结果, 表明替米沙坦具有抑制肝星状细胞的活化, 阻止细胞外基质的异常沉积, 达到预防 NASH 肝纤维化发生的作用。

【参考文献】

- [1] Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection[J]. *Hepatology*, 2010, 51(5): 1820-1832.
- [2] Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24(3): 320-327.
- [3] Ueki M, Koda M, Yamamoto S, *et al*. Preventive and therapeutic effects of angiotensin type 1 receptor blocker on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rats[J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(10): 996-1004.
- [4] Sugimoto K, Qi NR, Kazdova L, *et al*. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis[J]. *Hypertension*, 2006, 47(5): 1003-1009.
- [5] Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, *et al*. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2005, 42(3): 641-649.
- [6] Mancini FP, Lanni A, Sabatino L, *et al*. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats[J]. *FEBS Lett*, 2001, 491(1-2): 154-158.
- [7] Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, *et al*. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(5): 969-976.
- [8] 徐正婕, 范建高, 王国良, 等. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型[J]. *世界华人消化杂志*, 2002, 10(4): 392-396.
- [9] Yan S, Chen GM, Yu CH, *et al*. Expression pattern of matrix metalloproteinases-13 in a rat model of alcoholic liver fibrosis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2005, 4(4): 569-572.
- [10] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse[J]. *Hepatology*, 2002, 36(4 pt 1): 850-860.
- [11] Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells[J]. *Sem Liver Dis*, 2001, 21(3): 373-384.
- [12] Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Blockade of renin-angiotensin system in antifibrotic therapy[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(Suppl 1): S93-S95.

(编辑: 周宇红)