

天然牛磺酸对肝硬化大鼠 MMP-9、Integrin- β 1 表达的调控

文彬, 陈然, 彭佩纯, 邓鑫*

广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011

摘要:天然牛磺酸广泛存在于海洋生物中, 研究发现具有一定抗纤维化作用, 基质金属蛋白酶(MMP-9)、整合素 β 1(Integrin- β 1)与肝纤维化密切相关, 实验中通过给予肝硬化大鼠不同剂量天然牛磺酸(0.3、0.6、1.2 g/kg·d), 采用放射免疫法检测血清肝纤四项含量; 实时荧光定量 PCR 检测大鼠肝组织 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 表达, 免疫蛋白印迹法(Western-blot)检测相应蛋白的表达。结果表明, 肝硬化大鼠 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 及蛋白表达显著升高, 天然牛磺酸能显著减少模型大鼠血清肝纤四项水平, 降低 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 及相关蛋白表达, 以 0.6 g/kg·d 剂量组效果最佳。天然牛磺酸下调肝硬化大鼠 MMP-9 和 Integrin- β 1 的表达, 与其发挥肝保护作用密切相关。

关键词:肝硬化; 天然牛磺酸; 基质金属蛋白酶; 整合素- β 1; 细胞外基质

中图分类号: R34

文献标识码: A

Regulation Effect of Natural Taurine On MMP-9, Integrin- β 1 Expression In Rats With Liver Cirrhosis

WEN Bin, CHEN Ran, PENG Pei-chun, DENG Xin*

Department of Gastroenterology, The Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi

Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China

Abstract: Natural taurine widely exists in marine organisms, and it has been reported to exert certain anti-fibrosis activity. Matrix metalloproteinase (MMP-9), Integrin β 1 is closely related to liver fibrosis. In this study, liver cirrhosis rats were treated with different doses of natural taurine (0.3, 0.6, 1.2 g/kg·d). Four indices of serum liver fibrosis were analyzed by radioimmunoassay method. MMP-9, Integrin- β 1 mRNA expression levels were detected in liver tissue through real-time PCR and related protein levels were determined by Western-blot analysis. The results showed that natural taurine can significantly reduce four indices of serum liver fibrosis in cirrhotic rats. In addition, natural taurine markedly reverted the elevated levels of MMP-9, integrin- β 1 mRNA and related protein. The 0.6 g/kg·d dosage group showed the highest activity. These results indicated that natural taurine downregulating of MMP-9 and Integrin- β 1 expression was closely associated with its protective effects against liver cirrhosis in rats.

Key words: cirrhosis; natural taurine; MMP-9; integrin- β 1; ECM

肝硬化的形成是一个多因素、多环节、多途径的病理损伤过程。MMP-9 是基质金属蛋白酶(MMPs)家族类重要成员, 可以水解沉积的细胞外基质(ECM)。整合素作为跨膜信号分子, 介导细胞与细胞外基质黏附, 通过激活多种信号分子, 导致细胞生物学行为改变^[1]。越来越多证据表明细胞外基质的合成、降解功能失衡^[2]及整合素介导的细胞外基质-整合素-细胞骨架黏附网络系统可以调控肝星状

细胞的增殖与凋亡, 在肝纤维化形成中发挥重要作用^[3]。天然牛磺酸是名贵中药“牛黄”的有效成分之一, 前期的实验研究发现天然牛磺酸具有较好的抗肝纤维化作用^[4]。本研究通过荧光定量 PCR、免疫蛋白印迹法探讨天然牛磺酸对肝硬化大鼠 MMP-9、Integrin- β 1 表达的影响, 旨在为进一步揭示天然牛磺酸抗肝硬化的作用机制提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SD 大鼠, SPF 级, 6~7 周龄, 雄性, 体重(170±20)g, 广西医科大学动物实验中心提供, 动物合格

收稿日期: 2014-01-20 接受日期: 2014-05-13

基金项目: 国家自然科学基金(81160433); 广西科技厅重点课题(2011GXNSFD018035); 广西卫生厅重点课题(重20122031); 中南大学博士后科学基金(2013M531816)

* 通讯作者 Tel: 86-013607884892; E-mail: dwx857@163.com

证:scxk 桂 2009-0002。

1.2 主要试剂及仪器

天然牛磺酸从乌蛤肉提取,采用热水提取法^[5],红外光谱仪鉴定产品质量;四氯化碳(CCl_4),分析纯,购于天津富宇精细化工试剂厂产品;食用酒为北京方庄酒厂提供;食用橄榄油(西班牙贝蒂斯);肝纤四项放射免疫分析测定盒(上海海军医学研究所生物技术中心产品);总 RNA 提取试剂盒(K0731)、逆转录试剂盒(K1622)、荧光扩增试剂盒(k0222)均由(加拿大 Fermentas 公司)提供;鼠抗单克隆 Integrin $\beta 1$ 抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab52971)、鼠抗单克隆 MMP9 抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab76003);HRP 标记的二抗(美国 Bio-rad 公司,批号:172-1011);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号:IPVH00010);超微量分光光度计(美国 Qμawell, Q5000);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,ABI Stepone Plus)。

2 实验方法

2.1 模型制备

采用复合因素法^[6]制备肝硬化大鼠模型,大鼠首次以 0.5 mL/100 g 皮下注射(橄榄油 60% + 40% CCl_4)混合液,以后每隔 3 日按 0.3 mL/100 g 体重皮下注射,每周 2 次;15% 酒精为唯一饮料,0.5% 胆固醇、20% 猪油、79.5% 玉米面的高脂饲料喂养,满 10 周时随机抽取 5 只大鼠行肝脏病理学检测;正常组则以普通饲料和纯净水喂养。

2.2 动物分组

75 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为对照组、模型组、天然牛磺酸高、中、低剂量组,每组各 15 只。正常对照组不经造模处理,从实验第 1 d 开始,给予相同剂量的生理盐水皮下注射;模型组给药方法同模型制备;天然牛磺酸治疗组在造模成功后,按高中低(1.2、0.6、0.3 g/kg·d)剂量灌胃,每天一次,连续 60 d,直至实验结束;模型组及对照组大鼠给与相同剂量生理盐水灌胃。

2.3 血清肝纤维四项指标测定

血清 HA、LN、IV、PCIII 的检测采用放射免疫法,严格按试剂盒步骤操作。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 MMP-9、Integrin- $\beta 1$ mRNA 的表达

各基因引物序列如下: MMP-9 上游: AAG-GTCGCTCGGATGGTTAT, 下游: AGTTGCCCCAGT-

TACAGTG; Integrin- $\beta 1$ 上游: TTGCCTTGCTGCT-GATTTGG, 下游: AGTTGTACACGGCACTCTTGT; GAPDH 上游: TGA CTCTACCCACGGCAAGT, 下游: TACTCAGCACCAGCATCACC。取新鲜肝脏组织,应用 TRIzol 法抽提总 RNA,超微量分光光度计测定 OD260/280 吸光值,计算总 RNA 含量及纯度。严格按照逆转录试剂盒(K1622)将 RNA 逆转录成 cDNA 后进行扩增反应。以 GAPDH 为内参基因, QPCR 体系配置(20 μL): 2 \times Master Mix 10 μL , Forward Primer(10 mM)0.8 μL , Reverse Primer(10 mM)0.8 μL , cDNA 0.8 μL , Water nuclease-free 7.6 μL 。QPCR 反应条件: Integrin- $\beta 1$ 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s 变性, 62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 退火, 扩增 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。MMP-9 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min 后, 以 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应结果数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 进行相对定量比较。

2.5 免疫蛋白印迹检测 MMP-9、Integrin- $\beta 1$ 蛋白的表达

采用免疫蛋白印迹技术,取 100 mg 新鲜肝组织加裂解液(50 mmol/L Tris-HCL pH 7.2, 0.15 mol/L NaCl, 1% NP-40, 1% SDS, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF)充分裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清提取肝组织总蛋白, 测定总蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白转移至 PVDF 膜上, 经 5% 脱脂奶粉溶液封闭后, 分别加入一抗 MMP-9(1:100)、integrin- $\beta 1$ (1:500), 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗涤后以偶联 HRP 标记的二抗(1:5000)结合反应, ECL 显影曝光, GAPDH 为内参, Quantity One 软件半定量分析特异性条带灰度值, 与内参灰度值的比值为蛋白相对含量。

2.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间指标的检测采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠一般情况

正常对照组大鼠一般情况好, 皮毛色泽光滑、柔顺; 模型组大鼠精神萎靡, 易惊恐烦躁, 体重减轻, 皮毛色泽无光滑, 造模期间死亡 4 只, 随机抽取的 5 只大鼠肝脏病理学检测均提示肝硬化模型制作成功;

天然牛磺酸治疗组大鼠皮毛柔顺,体重增加,精神状态明显改善,治疗期间无死亡。

3.2 天然牛磺酸对大鼠血清肝纤四项的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清 HA、LN、IV-C 和 PCIII 水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,

天然牛磺酸各剂量组 HA、LN、IV-C 和 PCIII 均明显降低 ($P < 0.01$);中、高剂量组降低 HA、LN、IV-C 和 PCIII 水平明显优于低剂量组 ($P < 0.05$),中、高剂量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

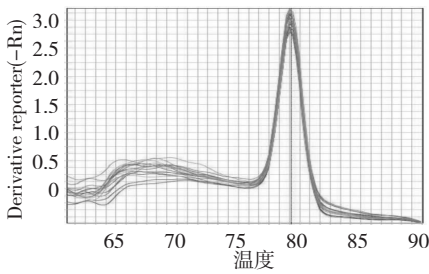
表 1 各组大鼠血清肝纤维化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Indices of serum liver fibrosis in rats ($\bar{x} \pm s$)

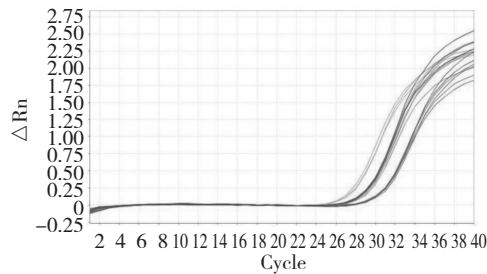
组别 Group	动物(只) Animal(n)	血清透明质酸 HA (ng/mL)	层黏连蛋白 LN (ng/mL)	IV 型胶原 IV-C (μg/L)	III 型前胶原 PCIII (μg/L)
对照组 Control	15	108.33 ± 17.71	71.33 ± 8.21	26.11 ± 2.92	78.25 ± 7.41
模型组 Model	14	408.91 ± 75.44 [△]	174.58 ± 43.95 [△]	68.17 ± 5.79 [△]	269.94 ± 24.36 [△]
NT 低剂量组 NT-L	14	262.86 ± 26.45 [*]	126.32 ± 20.35 [*]	43.55 ± 4.74 [*]	155.94 ± 11.81 [*]
NT 中剂量组 NT-M	14	144.54 ± 22.53 [*]	99.39 ± 19.92 [*]	34.12 ± 4.01 [*]	109.59 ± 12.46 [*]
NT 高剂量组 NT-H	14	150.54 ± 22.53 ^{*○}	97.39 ± 20.92 ^{*○}	35.12 ± 4.31 ^{*○}	112.59 ± 12.46 ^{*○}

注:NT 代表天然牛磺酸,与对照组比较,[△] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.01$;与中剂量组比较,[○] $P > 0.05$ 。

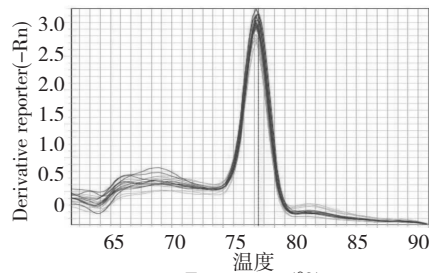
Note:NT-Natural Taurine,Compare with control,[△] $P < 0.01$;Compare with Model,^{*} $P < 0.01$;Compare with NT-M,[○] $P > 0.05$.



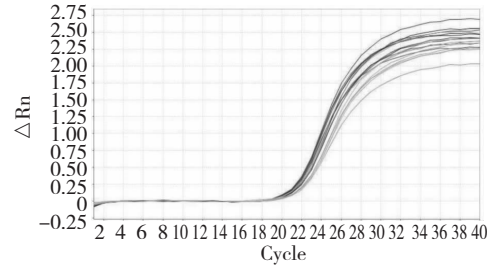
MMP-9 溶解曲线
MMP-9 melt curve



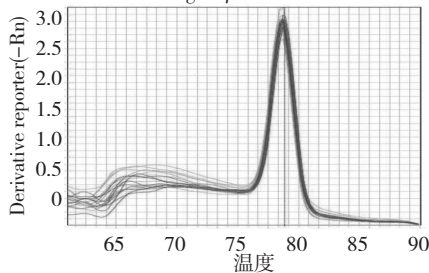
MMP-9 扩增曲线
MMP-9 amplification plot



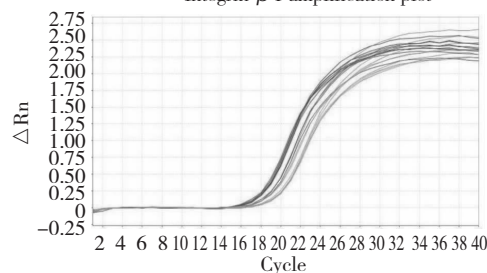
Integrin-β1 溶解曲线
Integrin-β1 melt curve



Integrin-β1 扩增曲线
Integrin-β1 amplification plot



GAPDH 溶解曲线
GAPDH melt curve



GAPDH 扩增曲线
GAPDH amplification plot

图 1 GAPDH、MMP-9、Integrin-β1 扩增和溶解曲线图

Fig. 1 Amplification and meltcurves of GAPDH, MMP-9, Integrinβ1

3.3 RNA 纯度及 PCR 扩增曲线

提取总 RNA 用超微量分光光度计测定 OD260/280 吸光值在 1.8 ~ 2.0 之间, RNA 纯度符合扩增要求。GAPDH、MMP-9、Integrin- β 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线呈 S 型, 基线平滑, 将检测临界点定在 CT 值, 即 PCR 产物进入指数增长期的起始点。产物熔解曲线呈锐利的单一峰, 熔解温度 (T_m) 均一, 说明 PCR 产物特异性高, 无杂带 (见图 1)。

3.4 天然牛磺酸对大鼠肝组织 MMP-9、Integrin β 1 mRNA 的表达水平影响

以相对定量法 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值^[7] 比较各组大鼠 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 表达水平, 发现模型组 MMP-9、Integrin β 1 mRNA 表达水平明显高于正常对照组; 天然牛磺酸低剂量组 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 表达降低, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 天然牛磺酸中高剂量组 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 表达降低尤明显, 与模型组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。 (见图 2)。

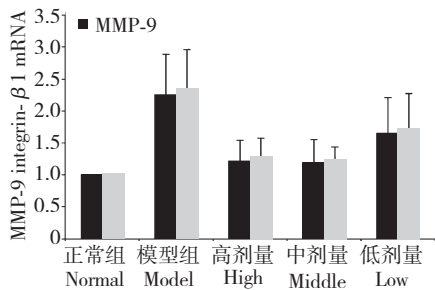


图 2 各组大鼠肝组织 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 表达水平比较

Fig. 2 MMP-9, Integrin- β 1 mRNA expression level in different groups

3.5 天然牛磺酸对肝硬化大鼠 MMP-9、Integrin- β 1 蛋白表达的调控

各组大鼠肝组织 MMP-9、Integrin- β 1 与内参 GAPDH 平均灰度值比值分别为: 正常组 (4.1 ± 1.0 , 2.2 ± 0.6), 模型组 (9.0 ± 1.9 , 5.0 ± 1.1), 高剂量组 (4.4 ± 1.1 , 2.4 ± 0.7), 中剂量组 (4.3 ± 1.1 , 2.4 ± 0.8), 低剂量组 (6.1 ± 1.3 , 3.6 ± 0.9)。与正常组相比, 模型组大鼠肝组织 MMP-9、Integrin- β 1 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$); 天然牛磺酸各剂量组可以显著降低模型组 MMP-9、Integrin- β 1 蛋白表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 中剂量组降低 MMP-9、Integrin- β 1 蛋白表达明显优于低剂量组 ($P < 0.01$), 与高剂量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)

(见图 3)。

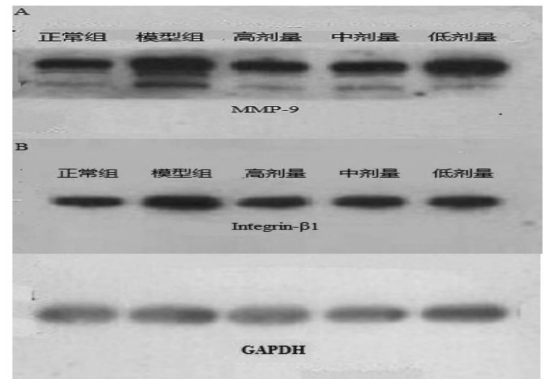


图 3 各组大鼠 MMP-9 蛋白 (A)、Integrin- β 1 蛋白 (B) 表达水平

Fig. 3 MMP-9 (A) and Integrin- β 1 (B) protein expression levels in different groups of rats

4 讨论

肝硬化目前尚缺乏良好的治疗手段, 中医中药在此方面具有广阔前景, 天然牛磺酸是名贵中药“牛黄”的有效成分之一, 也是多种中药的有效成分, 海洋生物如乌蛤、珍珠母、牡蛎、海藻等含有丰富的天然牛磺酸, 现代药理学研究表明^[8,9]: 天然牛磺酸具有解毒护肝, 抗氧化损伤, 抗肿瘤及增强机体免疫功能等活性。我们的前期研究也证实天然牛磺酸可以通过减轻肝细胞炎症反应, 降低脂质过氧化而达到抗纤维化的作用^[4]。

随着对肝纤维化机制了解的深入, 细胞外基质-整合素-细胞骨架调控系统在肝纤维化中的作用越来越受到重视。整合素作为一类黏附分子, 主要由 α 和 β 两条肽链以非共价键连接而形成的异二聚体的跨膜糖蛋白, 其配体主要为细胞外基质 (ECM) 蛋白^[10]。目前认为肝星状细胞的激活、凋亡等与细胞外基质、黏附分子的相互作用密切相关^[11]。也有报道 ECM-整合素-细胞骨架组成的黏着斑已成为肝纤维化进展的关键环节, ECM 可以与整合素通过 FAK 信号传导来调控肝星状细胞 (HSC) 的活化增殖与凋亡, 进而影响肝纤维化的进程^[3]。

基质性 MMPs 主要包括 MMP-2 和 MMP-9, 是调控肝内细胞外基质 (ECM) 降解的主要酶类, 其在肝纤维化中的作用, 目前仍存在不同观点, 有认为 MMP-9 可以破坏肝窦内基底膜, 破坏肝细胞内环境, 致使肝星状细胞 (HSC) 活化, 促进肝纤维化的形成^[12]。也有研究表明增加 MMP-9 表达量不仅可以

降解过多沉积的间质性胶原纤维,而且抑制 HSC 胶原酶表达及减少基质金属蛋白酶抑制因子的产生,对逆转肝纤维化发挥有利作用^[13,14]。本实验结果发现模型组大鼠 MMP-9 表达量明显增多,至于在肝纤维化进程中起促进或逆转作用,目前机制尚未明确:一方面肝纤维化形成中由于胶原过度沉积, MMP-9 持续升高可能是机体代偿性降解过度沉积的细胞外基质;另一方面 MMP-9 持续增多,是否破坏内基底膜及促进 HSC 激活,此方面的论据仍有待进一步考证。

Sheu 等研究表明 MMP-9、Integrin- β 1 存在多种生物体内,并且可以表达于多种正常细胞^[15]。本实验中各组大鼠肝内均可见到 MMP-9、Integrin- β 1 表达,与 Sheu 等研究结果一致。但肝硬化大鼠 MMP-9、Integrin- β 1 表达较正常大鼠异常增多,说明 MMP-9、Integrin- β 1 与肝纤维化密切相关,其在基因和蛋白的高表达与肝硬化呈正相关,两者之间可能通过(细胞外基质-整合素-细胞骨架)的黏附而发挥协同作用。天然牛磺酸可以显著降低 MMP-9、Integrin- β 1 mRNA 及蛋白表达,以中、高剂量组较明显,可见天然牛磺酸抗肝硬化的作用机制可能与调控 MMP-9、Integrin- β 1 表达水平有关,但天然牛磺酸对 MMP-9、Integrin- β 1 调控机制及信号传导途径仍未明了,有待进一步深入研究。

参考文献

- Huang H, Kamm RD, Lee RT. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287:1-11.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 2008, 214:199-210.
- Geng JZ(耿建章), Zhen Z(甄真), Chen CY(陈翠英), et al. The mechanism of integrin α 5 β 1 and focal adhesion kinase in hepatic fibrosis. *Chin J Diff Comp Cases*(疑难病杂志), 2009, 8:344-346.
- Deng X(邓鑫), Liang J(梁健), Huang B(黄彬), et al. Effects of natural taurine on TGF- β 1/Smad signaling pathway

in rats of hepatic fibrosis. *J Dalian Med Univ*(大连医科大学学报), 2007, 29:336-339.

- Liang J(梁健), Deng X(邓鑫), Zhao LC(赵立春), et al. Attenuation of portal hypertension by natural taurine in rats with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*(世界华人消化杂志), 2009, 15:4529-4537.
- Liang KH(梁扩寰), Li SB(李绍白). *Men Jing Mai Gao Ya Zheng*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999. 414.
- Livakand KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *J Neurosci Meth*, 2001, 25:402-408.
- Devi SL, Anuradha CV. Mitochondrial damage, cytotoxicity and apoptosis in iron-potentiated alcoholic liver fibrosis: amelioration by taurine. *Amino Acids*, 2009, 28:823-829.
- Li CZ(李超柱), Pan ZF(潘珍凤), Chen YH(陈艳辉), et al. Research progress in active substance of oyster softbody. *Sci Technol Food Ind*(食品工艺科技), 2012, 33:412-415.
- Grzesiak JJ, Ho JC, Moossa AR, et al. The integrin-extracellular matrix axis in pancreatic cancer. *Pancreas*, 2007, 35:293-301.
- Huveneers S, Truong H, Fassler F, et al. Binding of soluble fibronectin to integrin α 5 β 1 link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J Cell Sci*, 2008, 121:2452-2462.
- Li DH(李德辉). Diagnostic value of serum MMP-9 for liver fibrosis in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Chin General Prac*(中国全科医学), 2011, 14:945-947.
- Ross J, Gherardi E, Mallorqui-Fernandez N, et al. Protein engineered variants of hepatocyte growth factor/scatter factor promote proliferation of primary human hepatocytes and in rodent liver. *Gastroenterol*(胃肠病学), 2012, 142:897-906.
- Hao RC(郝瑞春), Meng JZ(门九章), Li X(李霞), et al. Effects of Xiongsaodecoction on MMP-9 and TIMP-1 in rats with immune liver fibrosis. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18:219-221.
- Sheu JR, Fong TH, Liu CM, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in *in vitro* and *in vivo* studies. *Br J Pharmacol*, 2004, 143:193-201.