

究。但本实验为舒肝颗粒治疗肝纤维化临床应用提供了理论依据。

参考文献

- 1 孙妩弋,桂双英,吴丽,等. 芍药苷对肝纤维化大鼠肝脏星状细胞基质金属蛋白酶 13 及组织金属蛋白酶抑制因子 1 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2010,35(11):1147-1151
- 2 Novo E, di bonzo LV, Cannito S, *et al.* Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(11):2089-2093
- 3 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis[J]. Apoptosis, 2005, 10(5):927-939
- 4 李志, 漆红, 李昌平. 舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞增殖及胶原分泌

的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(2):169-172

- 5 杨玲, 朱清静, 笪邦红, 等. 中药抗纤软肝颗粒抑制 PDGF 诱导的肝星状细胞 MEK-1 和 c-fos 表达[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12:347-350
- 6 Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression[J]. Semin Liver Dis, 2010 30(4):402-410
- 7 Kordes C, Sawitza I, Hussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus[J]. Biol Chem, 2009, 390(10):1003-1012
- 8 Shin HW, Park SY, Lee KB, *et al.* Down-regulation of Wnt signaling during apoptosis of human hepatic stellate cells[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(89):208-212

(收稿:2011-06-01)

(修回:2011-06-20)

BMP-7 在大鼠肝纤维化组织中的动态表达和意义

朱碧红 陈永平 戴志娟 叶超 程媛 王晓东

摘要 目的 探讨大鼠肝纤维化组织中骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 的表达趋势及意义。**方法** 采用腹腔内注射二甲基亚硝酸胺 (DMN) 构建大鼠肝纤维化模型, 造模后 4 天、1、2、4、6、8 周分别检测血清 ALT、AST、ALB 的变化, 同时取肝组织用半定量 RT-PCR 方法检测 BMP-7 mRNA 的表达。采用 HE 染色及 Masson 三色染色, 光学显微镜下观察肝组织损伤情况。采用单因素方差分析进行多组均数间的比较。**结果** 肝纤维化模型组血清 ALT、AST 明显升高, ALB 明显下降。BMP-7 mRNA 在对照组大鼠和肝纤维化模型组大鼠肝组织中均有表达。与对照组相比, 肝纤维化模型组 4 天时 BMP-7 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.05$)。1~2 周与对照组差别无显著性 (P 均 > 0.05), 1 周与 4 天比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 2 周与 4 天比较显著升高 ($P < 0.05$)。4 周较对照组显著升高, 达高峰 ($P < 0.05$)。6 周较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 较 4 周下降 ($P < 0.05$)。8 周较 6 周有显著下降 ($P < 0.05$), 与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** BMP-7 mRNA 在正常 SD 大鼠肝脏有表达, 在肝纤维化大鼠肝组织中的表达呈动态改变, 在炎症早期表达减少, 随着肝纤维化进展, 表达增加, 在肝纤维化后期表达减少, 提示 BMP-7 参与肝纤维化的发生、发展过程。

关键词 BMP-7 肝纤维化 大鼠

Dynamic Expression and Significance of BMP-7 in Liver Tissues of Rats with Hepatic Fibrosis. Zhu Bihong, Chen Yongping, Dai Zhi-juan, Ye Chao, Cheng Yuan, Wang Xiaodong. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the expression and significance of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in rats models of hepatic fibrosis. **Methods** SD rat models with hepatic fibrosis were established by intraperitoneal injection of dimethyl nitrosamine (DMN). Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and albumin (ALB) levels were tested from hepatic fibrosis group at the time of 4d, 1week, 2week, 4week, 6week, 8week. And levels of BMP-7 mRNA were detected by semiquantitative RT-PCR in hepatic tissue. Pathological characters of liver tissue were also observed under optical microscope after hematoxylin-eosin and Masson staining. Comparisons between groups were analyzed by one-way ANOVA. **Results** ALT and AST in model group were significantly higher than those in control group, but ALB in model group decreased. All rats in normal control group and hepatic fibrosis groups expressed BMP-7. Compared with the rats in normal control group, the expression of BMP-7 mRNA in the 4-day group was significantly lower, but 1/2-week fibrosis groups had no significant difference. Compared with the rats in the 4-day group, the expression of BMP-7 mRNA in the 1-week group had no significant difference, but that of 2-week group was higher obviously. They reached a peak

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院感染内科

通讯作者: 陈永平, 主任医师, 教授, 博士生导师, 电子信箱: ypchen106@yahoo.com.cn

at 4-week, and decreased significantly in the 6-week group in which the expression of BMP-7 mRNA was significantly higher than that of normal control group. The expression of BMP-7 mRNA in the 8-week group was significantly lower than that of 6-week group, but had no significant difference with that of normal control group. **Conclusion** BMP-7 mRNA expressed in the liver of normal SD rats, and expressed dynamically in liver fibrogenesis. The expression of BMP-7 mRNA decreased at the early stages of inflammation, and increased along with the progress of hepatic fibrosis, and decreased obviously at the late stage of hepatic fibrosis. These indicated that BMP-7 mRNA might be involved in the pathogenesis and development of hepatic fibrosis.

Key words Bone morphogenetic protein-7; Hepatic fibrosis; Rats

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是肝脏对各种慢性肝损伤的代偿反应所形成的一种肝脏瘢痕组织,并导致细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)、细胞群和细胞因子的复杂改变,是各种慢性肝病 (如病毒性、酒精性、药物性、胆汁郁积性肝病和非酒精性脂肪肝等) 发展的共同途径,也是进一步向肝硬化发展的必经之路^[1,2]。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是一类细胞因子,属于转化生长因子 TGF- β 超家族的一员^[3]。骨形态发生蛋白 7 (BMP-7) 亦称成骨蛋白 1 (osteogenic protein 1, OP-1), 其拮抗组织纤维化作用在肾、心肌、肺等多种组织中已被证实,但至今为止,OP-7 与肝纤维化的关系,国内外鲜见报道^[4]。本研究通过建立大鼠肝纤维化模型,动态观察 BMP-7 的表达情况,初步探讨 BMP-7 在肝纤维化发生、发展过程中的作用,为进一步研究其作用机制打下基础。

材料与方法

1. 实验动物与分组:42 只健康雄性 SD 大鼠,清洁级,质量 200~250g,由中国医学科学院上海实验动物中心提供。按随机数字表法分为两组:对照组 6 只,肝纤维化模型组 36 只。

2. 实验动物模型制备:实验前 12h 禁食。对照组每周前 3 天每天 1 次腹腔内注射 0.9% 氯化钠溶液 0.2ml/100g,连续 4 周。将二甲基亚硝胺 (DMN, 购自日本 WAKO 生物公司) 溶解于 0.9% 氯化钠溶液使其最终浓度为 0.5%,按 0.2ml/100g 的剂量腹腔内注射,每周前 3 天每天 1 次,连续 4 周建立肝纤维化模型。

3. 取材:造模后 4 天、1、2、4、6、8 周按随机数字表随机取 6 只大鼠,留取肝组织,一部分在 10% 中性甲醛溶液中固定,石蜡包埋,制备组织切片;另取部分肝组织立即液氮冻存,以备 RT-PCR 检测。

4. 肝组织病理学观察:取肝组织石蜡切片行常规 HE 染色及 Masson 染色 (染色试剂盒均购自福州迈新公司),光学显微镜下观察组织损伤情况。

5. RT-PCR 测定肝组织 BMP-7 mRNA 的表达水平:肝组织研磨,Trizol 抽提 RNA。引物由上海捷瑞生物公司合成,检索 Pubmed 上相关大鼠基因核苷酸序列全长,采用软件 primer5.0 分析设计引物序列。BMP-7 上游引物:5'-CT-GAGGAGGGCTGCTTGCTATT-3',下游引物:5'-TGCTG-

CGCTTCATGTAGGAGTT-3',产物长度 474bp; β -actin 上游引物:5'-GAGAGGGAAATCGTCGTGAC-3',下游引物:5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3',产物长度 452bp。RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,严格按试剂盒说明书操作,分别反转录和 PCR 扩增。BMP-7 基因扩增参数,94℃ 5min;94℃ 30s,57℃ 30s,72℃ 30s,32 个循环;72℃ 5min。 β -actin 基因扩增参数,94℃ 5min;94℃ 30s,61℃ 30s,72℃ 30s,22 个循环;72℃ 5min。将 5 μ l RT-PCR 产物加 1 μ l 6 $\times$ 上样缓冲液在含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳,在凝胶成像系统上显像,并用 Gel-Pro 3.1 软件分析 RT-PCR 产物电泳条带,与相应的内参基因吸光度比值作为目的基因 mRNA 的相对含量。

6. ALT、AST、ALB 测定:采用全自动生化分析仪测定不同时间点大鼠血清 ALT、AST 和 ALB 水平的变化。

7. 统计学方法:数据经 SPSS 17.0 软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行多组均数间的比较,方差齐性者两两比较采用 LSD 法,方差不齐者进行 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 病理学观察:对照组大鼠肝组织质地柔软,表面光滑;肝纤维化模型组大鼠肝脏质地坚韧,表面粗糙,颜色灰暗,有些可见颗粒状小结节。HE 染色及 Masson 染色后光学显微镜下观察:对照组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞索排列规则有序,肝板以中央静脉为中心呈条索状向四周放射状排列,板间有不规则肝窦,仅于汇管区和中央静脉周围有少许胶原纤维存在。肝纤维化模型组多数小叶结构破坏或消失,由汇管区和中央静脉伸出粗大胶原纤维条索分割、包绕肝小叶,肝细胞索排列紊乱,肝细胞水肿明显,坏死出血较多。纤维隔内有大量炎性细胞浸润,见图 1。

2. 肝纤维化模型组血清 ALT、AST 和 ALB 的变化:造模后 4 天,ALT、AST 已显著升高 ($P < 0.05$),在 4 周达最高峰,而后渐渐下降,但每个时间点均显著高于对照组水平 ($P < 0.05$)。AST 值的变化曲线大致上与 ALT 一致,见表 1。与对照组比较,造模后 2 周,ALB 开始下降 ($P < 0.05$),且在 6 周达最低谷。

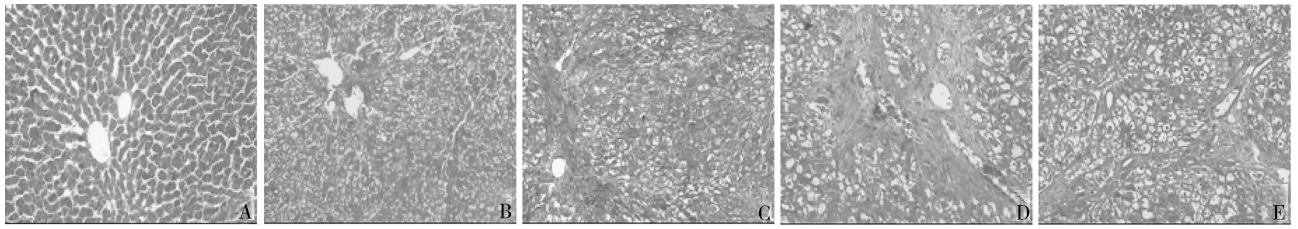


图1 对照组与肝纤维化模型组大鼠肝组织病理图(Masson 染色 $\times 100$)

A. 对照组正常肝组织;B. 模型组 1 周;C. 模型组 2 周;D. 模型组 4 周;E. 模型组 8 周

表1 各组大鼠血清学检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (<i>n</i>)	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)
对照组	6	29.2 $\pm$ 4.7	42.7 $\pm$ 6.3	34.4 $\pm$ 3.1
肝纤维化模型组				
4 天	6	66.2 $\pm$ 17.5 ^a	82.2 $\pm$ 9.1 ^a	31.3 $\pm$ 0.3 ^b
1 周	6	60.1 $\pm$ 7.3 ^a	78.7 $\pm$ 4.7 ^a	29.5 $\pm$ 0.8 ^b
2 周	6	80.8 $\pm$ 5.1 ^a	112.2 $\pm$ 9.2 ^a	27.9 $\pm$ 0.4 ^a
4 周	6	169.2 $\pm$ 16.2 ^a	193.3 $\pm$ 31.1 ^a	26.8 $\pm$ 0.4 ^a
6 周	6	115.2 $\pm$ 20.0 ^a	134.7 $\pm$ 25.0 ^a	22.2 $\pm$ 1.2 ^a
8 周	6	103.8 $\pm$ 28.4 ^a	127.8 $\pm$ 15.3 ^a	25.4 $\pm$ 0.9 ^a

肝纤维化模型组各时间点与对照组比较,^a $P < 0.05$

3. RT-PCR 测 BMP-7 mRNA 结果:BMP-7 mRNA 在对照组大鼠和肝纤维化模型组大鼠肝组织中均有表达。与对照组相比,肝纤维化模型组 4 天时 BMP-7 mRNA 表达显著减少($P < 0.05$)。1~2 周与对照组差别无显著性(均 $P > 0.05$),1 周与 4 天比较差异无显著性($P > 0.05$),2 周与 4 天比较显著升高($P < 0.05$)。4 周较对照组显著升高,达高峰($P < 0.05$)。6 周较对照组显著升高($P < 0.05$),较 4 周下降($P < 0.05$)。8 周较 6 周有显著下降($P < 0.05$),与对照组无显著差异($P > 0.05$)。见表 2、图 2。

表2 各组大鼠肝组织 BMP-7 mRNA 水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	BMP-7/ β -actin IOD 比值
对照组	6	2.13113 $\pm$ 0.25775
肝纤维化模型组		
4 天	6	1.72476 $\pm$ 0.21199 ^{AB}
1 周	6	1.91393 $\pm$ 0.29671 ^B
2 周	6	2.43084 $\pm$ 0.09363 ^{BC}
4 周	6	4.58104 $\pm$ 0.37906 ^{AC}
6 周	6	3.55517 $\pm$ 0.30825 ^{ABC}
8 周	6	1.92141 $\pm$ 0.26457 ^{BD}

IOD 为积分光密度。模型组各时间点与对照组比较,^A $P < 0.05$;模型组各时间点与模型组 4 周比较,^B $P < 0.05$;模型组各时间点与模型组 4 天比较,^C $P < 0.05$;模型组 6 周与模型组 8 周比较,^D $P < 0.05$

讨 论

BMP-7 是一种分泌型多功能蛋白,分布范围极

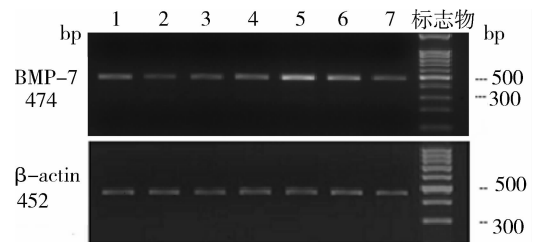


图2 反转录-聚合酶链反应检测各组

大鼠 BMP-7 mRNA 的表达

Marker. DNA 标志物;1. 对照组;2. 模型组 4 天;3. 模型组 1 周;

4. 模型组 2 周;5. 模型组 4 周;6. 模型组 6 周;7. 模型组 8 周

其广泛,主要分布在骨骼、肾、肾上腺、前列腺、膀胱等处,相对分子质量约为 35kDa,在细胞内以前体形式合成,前体分子经蛋白水解酶酶解后再通过二硫键结合形成成熟的二聚体分子,可以释放到细胞外与机体各处靶细胞表面特殊的受体结合,介导 Smad 细胞间信号,激活特殊的基因发挥作用^[5]。目前对 BMP-7 的研究大多集中在肾脏、骨骼系统、眼、心脏、肺等方面。Wang 等^[6]在肾病研究的实验中发现,BMP-7 具有刺激或诱导基质金属蛋白酶-2(MMP-2)降解 ECM 的作用。Schnabl 等^[7]研究显示,BMP-7 在鼠晶状体上皮细胞向间充质细胞转变(EMT)过程中,阻止晶状体纤维组织的形成。还有研究发现,BMP-7 具有能够减少炎症因子的释放、维持细胞内环境稳定的作用^[8,9]。

肝纤维化是指肝细胞发生坏死及炎症刺激时,肝脏中胶原蛋白等 ECM 的增生与降解失去平衡,进而导致肝脏内纤维结缔组织异常沉积的病理过程。炎症反应也参与肝纤维化过程^[12]。本研究通过腹腔内注射 DMN 建立大鼠肝纤维化模型。实验中发现,BMP-7 mRNA 在对照组大鼠和肝纤维化模型组大鼠肝组织中均有表达。与对照组相比,模型组 4 天时 BMP-7 mRNA 表达显著减少。1~2 周与对照组差别无显著性,1 周与 4 天比较差异无显著性,2 周与 4 天比较显著升高。4 周较对照组显著升高,达高峰。

6 周较对照组显著升高,较 4 周下降。8 周较 6 周有显著下降,与对照组无显著差异。这与张立英等研究发现的在四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化中,BMP-7 的表达随着时间和纤维化程度的加重而减少相符合,考虑 BMP-7 可能参与肝纤维化的发生、发展过程,并与肝纤维化的严重程度密切相关。研究表明 BMP-7 可以减少肿瘤坏死因子 α 刺激产生的多种促炎性因子表达,如 IL-6、IL-1、单核细胞趋化蛋白 1、IL-8、内皮素 2 和结缔组织生长因子的表达,以起到抗炎作用^[8]。实验显示 BMP-7 在 DMN 造模早期出现下降,考虑可能与炎症早期肝细胞急性损伤时 BMP-7 大量消耗以减少炎症因子的释放,减轻炎症反应造成的实质细胞损伤有关。

肝纤维化是慢性肝脏疾病的共同病理表现,存在复杂的细胞因子网路调控。随着分子生物学的进展,BMP-7 的细胞和分子机制已是世界研究热点,但到目前为止尚未完全明了。许多研究表明 BMP-7 通过 Smad 途径从基因水平直接拮抗 TGF- β 的作用。本实验结果表明,BMP-7 参与肝纤维化的发生、发展过程,但 BMP-7 影响 TGF- β /Smad 通路的具体作用位点,拮抗肝纤维化的具体机制尚需值得进一步探索,有待于我们更多的研究。

参考文献

- 1 Tsukada S,Parsons CJ,Rippe RA. Mechanisms of liver brosis [J]. Clinica Chimica Acta,2006,364(1-2):33-60
- 2 Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy [J]. Gastroenterol,1997,32(3):424-430
- 3 Heldin CH,Miyazono K. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature,1997,390(6659):465-471
- 4 Weiskirchen R,Meurer SK,Gressner OA,et al. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis [J]. Front Biosci,2009,14:4992-5012
- 5 Chen D,Zhao M,Mundy GR. Bone morphogenetic proteins [J]. Growth Factors,2004,22(4):233-241
- 6 Wang SE,Wu FY,Shin I,et al. Transforming growth factor β (TGF- β)-Smad target gene protein tyrosine phosphatase receptor type kappa is required for TGF- β function [J]. Mol Cell Bio1,2005,25(11):4703-4715
- 7 Schnabl B,Kweon YO,Frederick JP,et al. The role of Smad in mediating mouse hepatic stellate cell activation [J]. Hepatology,2001,34:89-110
- 8 Gould SE,Day M,Jones SS,et al. BMP-7 regulates chemokine,cytokine,and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells [J]. Kidney Int,2002,61(1):51-60
- 9 Marumo T,Hishikawa K,Yoshikawa M,et al. Epigenetic regulation of BMP7 in the regenerative response to ischemia [J]. J Am Soc Nephrol,2008,19(7):1311-1320 (收稿:2011-05-13)
(修回:2011-05-26)

高血糖对成骨细胞增殖分化影响的实验研究

梁军波 徐春丽 潘伟波 江玲军 陈海啸

摘要 **目的** 观察糖尿病大鼠股骨成骨细胞的病理改变以及高糖对成骨细胞增殖分化能力的影响,为临床治疗糖尿病骨质疏松症提供一定的实验基础。**方法** 2 月龄雄性 SD 大鼠 20 只,随机分正常对照组和糖尿病骨质疏松组($n=10$),糖尿病组大鼠经腹腔注射链脲佐菌素造模,同时体外分离培养成骨细胞,随机分为正常培养基组和高糖培养基组。成模 6 周麻醉后处死大鼠,分离各组大鼠的左侧股骨,于小动物放射成像系统上,测其近段骨密度,HE 染色右侧股骨,观察比较两组大鼠股骨成骨细胞、破骨细胞的形态。同时两组成骨细胞各自培养 48h 后检测其形态及 ALP 阳性率。**结果** 糖尿病组大鼠股骨骨密度显著低于对照组,同时骨皮质下成骨细胞显著减少,骨细胞呈扁平或星形,少见新骨形成。而高糖培养组成骨细胞其碱性磷酸酶(ALP)阳性率明显低于正常培养组,增殖分化能力减弱。**结论** 高血糖状态下成骨细胞减少及增殖分化能力减弱,造成成骨细胞和破骨细胞的失衡,从而影响了骨组织的代谢,可能是造成糖尿病骨质疏松症的一个原因。

关键词 糖尿病 骨质疏松 成骨细胞

Experimental Study of Effects of Hyperglycaemia on Osteoblast Proliferation and Differentiation. Liang Junbo,Xu Chunli, Pan Weibo, Jiang Lingjun,Chen Haixiao. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To study the osteoblasts pathological changes in femur bone and study the effect of hyperghycaemia on proliferation and differentiation of osteoblasts,providing experimental basis for the clinical treatment of diabetic osteoporosis. **Methods** Two

作者单位:317000 临海,浙江省台州医院骨科

通讯作者:陈海啸,电子信箱:liangjunbo1972@163.com