

文章编号:1005-6947(2007)06-0577-04

· 基础研究 ·

前列腺素 E1 抑制血吸虫病家兔肝脏 I, III 型胶原生成的研究

李良, 朱化刚

(安徽医科大学第一附属医院 普通外科, 安徽 合肥 230032)

摘要:目的 探讨前列腺素 E1 对血吸虫病家兔肝脏 I, III 型胶原的生成及分子伴侣 Grp78/BiP 基因表达的影响。方法 用血吸虫尾蚴皮肤贴法感染 14 只家兔, 构建血吸虫病肝纤维化动物模型。其中 7 只兔于感染后 60d 开始静脉注射 PGE1 [2.5 μg/(kg·d)] 至 120d。用 RT-PCR 检测肝组织 I, III 型胶原和 Grp78/BiP 基因 mRNA 的表达水平。结果 血吸虫病家兔肝纤维化形成过程中 I, III 型胶原基因表达水平明显增加, 分别为 (14.81 ± 3.57)% 和 (12.9 ± 3.25)% ; Grp78/BiP mRNA 表达显著上调 (P < 0.05)。外源性 PGE1 与模型组比较显著降低胶原 I, III mRNA, 分别为 (5.79 ± 1.26)% 和 (5.34 ± 1.08)% (P < 0.01)。分子伴侣 Grp78/BiP mRNA 水平显著下调, 分别为 (0.43 ± 0.07)% 和 (0.29 ± 0.02)% (P < 0.05)。结论 PGE1 可通过抑制基因表达和阻遏胶原成熟而有效地降低血吸虫病家兔肝脏胶原纤维的生成。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(6): 577-580]

关键词: 前列腺素 E1/治疗应用; 纤维胶原类/拮抗剂和抑制剂; 血吸虫病; 模型, 动物

中图分类号: R363.1

文献标识码: A

Inhibition of prostaglandin E1 on accumulation of collagen type I and III in liver of rabbit with schistosoma japonicum

LI Liang, ZHU Hua-gang

(Department of General Surgery, the Affiliated Hospital, Anhui Medical University Hefei 230032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of prostaglandin E1 (PGE1) on production of collagen type I and III in liver of rabbit with schistosoma japonicum (SJ), and on expression of glucose regulatory protein/immunoglobulin heavy chain binding protein (Grp78/BiP). **Methods** Fourteen rabbits were infected with cercaria of SJ by percutaneous patch. From 60th to 120th day after infection, 7 of them received PGE1 (2.5 μg/kg·d-1) by intravenous injection. The mRNA expressions of collagen type I and III, as well as Grp78/BiP were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Up-regulated expressions of collagen I, III mRNA (14.81 ± 3.57 and 12.9 ± 3.25) were observed during the process of liver fibrosis in rabbit with schistosomiasis. Grp78/BiP mRNA increased (P < 0.05). Expression of collagen I, III mRNA (compared with models, 5.79 ± 1.26 and 5.34 ± 1.08, P < 0.01) had been attenuated markedly in the group treated with exogenous PGE1. Expression of Grp78/BiP was inhibited from 0.43 ± 0.07 in models to 0.29 ± 0.02 in treated group (P < 0.05). **Conclusions** These data in experimental models strongly suggest that PGE1 can inhibit the maturation of collagen and thus, can effectually decrease hepatic collagen formation in down-regulated the expression of Grp78/BiP in rabbits with schistosomiasis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(6): 577-580]

Key words: Prostaglandin E1/ther use; Fibrillar collagens/anteg; Schistosomiasis; Models, Animed

CLC number: R363.1

Document code: A

收稿日期: 2006-04-27; 修订日期: 2006-09-25。

作者简介: 李良, 男, 安徽宿州人, 安徽医科大学第一附属医院研究生, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者: 朱化刚 E-mail: huagzhu@yahoo.com

肝脏纤维化是日本血吸虫病的重要病理学改变, I, III型胶原是肝纤维化的主要细胞外基质成分,抑制胶原形成是控制肝纤维化进程的关键环节。PG是机体活性物质,其人工合成物作为药物已用于临床,近来有用于临床肝纤维化的报道,但其有关机制还有待体内实验研究。本实验旨在探讨外源性PGE1对血吸虫病家兔肝脏I, III型胶原基因表达,以及对胶原成熟及纤维含量的影响,旨在为PGE1在治疗临床肝纤维化的应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组和模型构建

成年雄性中国大耳白兔20只,体重1.5~2.2kg(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。随机取6只家兔作为健康对照组,其余14只腹部去毛,于去毛处用皮肤敷贴法感染血吸虫,每兔(200±5)条^[1],感染动物笼养至60d时再随机分成2组: PGE1干预组,7只,以lipo-PGE1(凯时注射液)[2.5 μg/(kg·d)]生理盐水稀释,经耳缘静脉注射;模型对照组,7只,给予注射等体积生理盐水。

1.2 主要试剂

lipo-PGE1由北京泰德公司馈赠(5 μg/mL)。苦味酸天狼星红系美国Sigma公司产品;胶原I, III和Grp78/BiP mRNA扩增引物由武汉基因公司合成。Trizol, Rnase和dNTP系美国Gibco BRL公司产品;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自北京中山生物有限公司。

1.3 样本采集和检测

1.3.1 标本采集 家兔饲养120d后成批过量麻醉致死(1%硫喷妥钠50mg/kg),采集标本作检测。

1.3.2 苦味酸天狼星红染色 切片常规脱蜡水

化,HE染色观察后,经饱和苦味酸天狼星红染1h,脱水透明封片。天狼星红染色胶原纤维在普通显微镜下呈红色(图1),偏振光显微镜下显示不同干涉色和不同强度的双折光,可鉴别I, III胶原纤维。黑色背景中粗大的红、黄色纤维为I型胶原,纤细网状绿色纤维为III型胶原。II型胶原和其他组织细胞在偏振光下不显色。以KDS1D2.0图象分析系统分别测定I, III型胶原纤维辉度面积(s_I 和 s_{III})和单个视野面积,用 s_I/S 和 s_{III}/S 比值(%)表示I, III型胶原的含量。每个标本1张切片,每张切片随机5个汇管区或虫卵结节视野(10×3.3),计算均值。

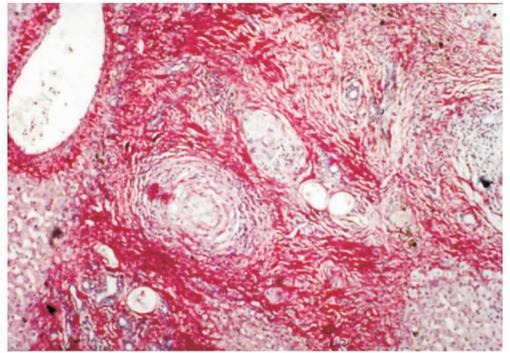


图1 模型组家兔肝脏苦味酸天狼星红染色(普通显微镜下观察,100×)

1.3.3 RT-PCR检测 按Trizol试剂盒说明书提取总RNA,常规方法将mRNA逆转录成为cDNA,再进行PCR扩增。扩增引物及条件见表1。所有PCR产物均在72℃延长10min。PCR产物10 μL,置于2%琼脂糖凝胶电泳。Gene Ruler™ DNA ladder为分子质量参考标准,经过KDS1D2.0图象分析系统测定各条带光密度值,用平均光密度值与各组β-actin光密度平均值之比衡量各指标的mRNA水平。

表1 实验相关PCR引物及实验条件

指标	引物序列	扩增条件	引物来源
collagen I (312bp)	上游 5'-GATGCGTTCAGTTCGAGTA-3'	94℃ 1min, 58℃ 1min,	参考文献 ^[2]
	下游 5'-GGTCTTCCGGTGGTCTTGTA-3'	72℃ 1min; 30 cycles	
Collagen III (204bp)	上游 5'-GATGTGCCACTATGACTGG-3'	94℃ 50S, 60℃ 50S,	参考文献 ^[3]
	下游 5'-ACATCGATGATGGCAGGC-3'	72℃ 50S; 30 cycles	
Grp78/BiP (260bp)	上游 5'-GACATCAAGTTCTTGCCGTT-3'	95℃ 1min, 56℃ 1min,	参考文献 ^[4]
	下游 5'-CTCATAAGATTTAGGCCAGC-3'	72℃ 1min; 28 cycles	
β-actin (540bp)	上游 5'-TGACGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	94℃ 1min, 56℃ 1min,	参考文献 ^[5]
	下游 CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	72℃ 1min; 30 cycles	

1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行统计分析,组间比较用方差分析和 *t* 检验 ($\bar{x} \pm s$)。

2 结果

2.1 血吸虫病肝硬化模型建立

2.1.1 模型成功率 病理证实家兔感染成功率 100%,无家兔死亡。

2.1.2 大体解剖 模型对照组家兔 120d 解剖见肝脏表面密布灰白色或灰黄色粟粒状颗粒,呈现中重度肝纤维化;伴有腹水,脾脏增大,门静脉系统充血、扩张。PGE1 干预组家兔肝纤维化程度明显较轻,肝脏表面只有散在的虫卵结节,而未见明显的炎症和纤维化;无腹水,脾脏增大不明显,内脏静脉未见曲张。

2.1.3 组织学检查 HE 染色显示模型对照组家兔肝脏汇管区有大量虫卵肉芽肿形成,炎性细

胞积聚,大量胶原纤维形成条索状纤维隔,重新分隔肝小叶;肝板排列紊乱,肝细胞广泛空泡样变性;细小胆管和血管增生明显。PGE1 干预组未见明显的纤维化和假小叶,肉芽肿明显较小且数量少;肝脏显微结构存在,基本维持正常小叶结构,纤维成分局限于汇管区。

2.2 PGE1 抑制胶原 I, III 和 Grp78/BiP mRNA 的表达

各组均有不同程度的 I, III 型胶原基因和 Grp78/BiP mRNA 表达(表 2)(图 2-3)。与健康对照组相比较,模型对照组肝组织胶原基因表达显著增强 ($P < 0.01$);Grp78/BiP 基因表达上调 ($P < 0.05$)。PGE1 干预组胶原 I, III mRNA 及 Grp78/BiP mRNA 的表达均较模型对照组显著下降 ($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$),而接近健康对照组(均 $P > 0.05$)。

表 2 各组胶原和 Grp78/BiP mRNA 的表达情况(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	胶原 mRNA 表达		Grp78/BiP mRNA 表达
		Collagen I/ β -actin(%)	Collagen III/ β -actin(%)	Grp78/BiP/ β -actin(%)
健康对照	6	5.32 \pm 1.27	4.77 \pm 1.13	0.23 \pm 0.06
模型对照	7	14.81 \pm 3.57 ¹⁾	12.9 \pm 3.25 ¹⁾	0.43 \pm 0.07 ³⁾
PGE1 干预	7	5.79 \pm 1.26 ²⁾	5.34 \pm 1.08 ²⁾	0.29 \pm 0.02 ⁴⁾

注:1)与健康组比较 $P < 0.01$; 2)与模型组比较 $P < 0.01$; 3)与健康组比较 $P < 0.05$; 4)与模型组比较 $P < 0.05$

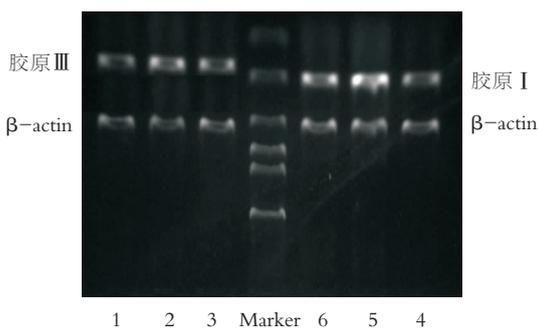


图 2 各组胶原基因 mRNA 表达电泳图 1-3:健康对照、模型对照、PGE1 干预胶原 III mRNA; 4-6:健康对照、模型对照、PGE1 干预胶原 I mRNA

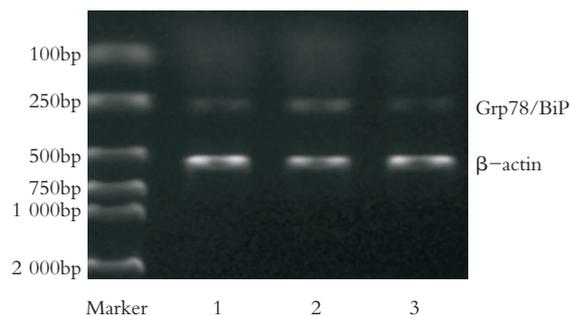


图 3 各组 Grp78/BiP mRNA 电泳图 1:分健康对照 2:模型对照 3:PGE1 干预

2.3 PGE1 抑制胶原生成

光镜下成熟胶原纤维经苦味酸天狼星红染成红色,可见于各组。偏振光显微镜分辨的 I, III 型,健康对照组家兔仅少量分布在汇管区,以 III 型胶原为主(图 4)。模型对照组 I, III 型胶原表达均有明显增加 ($P < 0.01$),形态学呈条索状向肝窦延伸(图 5),分隔肝小叶。PGE1 干预组显著降低 I, III 两种胶原纤维的含量,胶原纤维表达局限

在汇管区(表 3)(图 6)。

表 3 各组组家兔 I, III 胶原纤维含量

组别	胶原含量(%)	
	s I/S	s III/S
健康对照	8.92 \pm 3.66	7.17 \pm 0.32
模型对照	35.25 \pm 9.71 ¹⁾	33.66 \pm 3.59 ¹⁾
PGE1 干预	13.38 \pm 4.24 ²⁾	12.23 \pm 8.92 ²⁾

注:1)与健康组比较 $P < 0.01$; 2)与模型组比较 $P < 0.01$



图4 正常家兔肝脏苦味酸天狼星

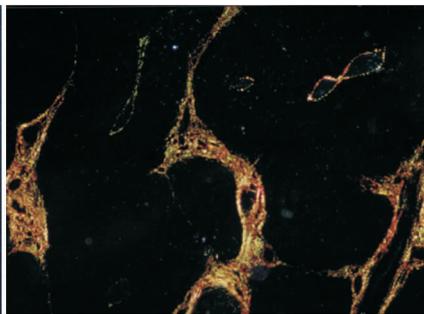


图5 模型对照组家兔肝脏苦味酸天

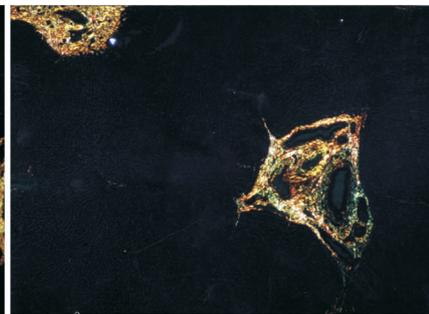


图6 PGE1 干预组家兔肝脏苦味酸天

红染色(偏振光显微镜下观察,10×3.3) 狼星红染色(偏振光显微镜下观察,10×3.3) 狼星红染色(偏振光显微镜下观察,10×3.3)

3 讨论

血吸虫尾蚴经皮肤侵入发育,产生虫卵沉积于肝脏汇管区、形成肉芽肿,在机械性和生物性联合作用下形成稳定的肝纤维化。这种肝纤维化成为实验的良好研究对象,符合人类肝纤维化自然病程和病理发展过程。在家兔血吸虫病肝脏胶原合成高峰期^[6]开始使用 PGE1 干预,此时急性炎症反应已经基本稳定,胶原合成速度大于降解,便于观察实验干预效果。

与健康对照相比较,模型组血吸虫感染 120d 时胶原基因表达增加了接近 3 倍($P < 0.01$),而实验剂量的 lipo-PGE1 可以有效地抑制血吸虫感染后兔肝 I, III 胶原基因 mRNA 表达($P < 0.01$)。说明 PGE1 可以从基因表达和转录水平控制胶原合成^[7]。PGE1 抑制胶原基因表达的确切机制还有待进一步研究,但有可能与 TGF- β 等生长因子无关或在细胞因子作用下游发生^[8]。研究显示, PGE1 可能直接或间接抑制核转录因子的表达,后者转而抑制胶原基因表达。血吸虫病家兔肝脏纤维化形成过程中 I, II, III 型胶原,以及纤维连接蛋白、层黏蛋白等含量都明显增加,苦味酸天狼星红染色显示的 I, III 胶原沉积变化最为明显,主要位于肝窦区。但这种趋势在应用 PGE1 后得到有效的阻遏,在 PGE1 干预下总量下降达 60%。

实验还显示 PGE1 对胶原沉积的抑制作用是在多环节中发生,实验剂量的外源性 PGE1 能有效地降低胶原成熟特异性相关分子伴侣 Grp78/BiP 基因表达,使血吸虫感染后兔肝 Grp78/BiP-mRNA 水平显著下降($P < 0.05$)。胶原基因表达产物经过翻译在内质网的核糖体内合成原胶原蛋白,而后者的成熟、组装、折叠等生物过程都是在热休克分子家族中分子伴侣参与下实现的。PGE1 有效地抑制这种分子伴侣基因表达,进而可以在蛋白成熟水平控制胶原生成^[9]。当然,PGE1 是一种用于临床的成熟的扩血管药物,这里证实

的对胶原基因表达和胶原纤维成熟等环节的抑制作用,还可能与抑制炎症反应、抑制血小板凝集和功能活化,阻断炎症因子和血小板衍化等生长因子^[10]诱导的肝星状细胞(HSCs)活化有关。

参考文献:

- [1] 杨镇,裘法祖,王在华. 家兔血吸虫病模型的建立及特点[J]. 中华实验外科杂志,1993,10(4):145-147.
- [2] Hart DA, Boykiw R, Sciore P, *et al.* Complex alteration in gene expression occur in the knee ligaments of the skeletally mature multiparous rabbit during pregnancy[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1998,1397(3):331-341.
- [3] 萧明第,尤文俊,袁忠祥,等. 冠状动脉旁路移植术后影响静脉移植植物内膜增生因素的实验研究[J]. 中华医学杂志,2002,82(22):1550-1552.
- [4] Ko MK, Kay EP. Differential interaction of molecular chaperones with procollagen I and type IV collagen in corneal endothelial cells[J]. *Mol Vis*, 2002,8(11):1-9.
- [5] 从容,冯友梅,王淳本,等. 兔主动脉平滑肌细胞低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)的诱导表达调节[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2000,16(4):510-513.
- [6] Chen F, Cai WM, Chen Z, *et al.* Dynamic changes in the collagen metabolism of liver fibrosis at the transcription level in rabbits with *Schistosomiasis japonica* [J]. *Chin Med J*, 2002,115(1):1637-1640.
- [7] Riquet FB, Lai WF, Birkhead JR, *et al.* Suppression of type I collagen expression by prostaglandin in fibroblasts is mediated at the transcriptional level[J]. *Mol Med*, 2000,6(8):705-719.
- [8] Beno DA, Espinal R, Edelstein BM, *et al.* Administration of prostaglandin E1 analog reduces rat hepatic and Ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury[J]. *Hepatology*, 1993,17(4):707-714.
- [9] Hatakeyama D, Kozawa O, Niwa M, *et al.* Inhibition by adenyl cyclase-cAMP system of ET-1-induced HSP27 in osteoblasts [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001,281(6):E1260-E1266.
- [10] Koga T, Az-ma T, Yuge O. Prostaglandin E1 at clinically relevant concentrations inhibits aggregation of platelets under synergic interaction with endothelial cells[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*,2002,46(8):987-993.