

维甲酸相关孤核受体 α (ROR α) 在奥曲肽 抗大鼠肝纤维化中的作用

龚义飞 张超 何新苗 骆会来 张慧平 张冲

摘要 目的 观察奥曲肽(OCT)对实验性肝纤维化大鼠肝组织病理学及肝脏血清学的影响,探究维甲酸相关孤核受体 α (ROR α)在奥曲肽抗大鼠肝纤维化的作用。方法 将36只雄性SD大鼠随机分成3组:对照组、模型组、OCT组。实验采用四氯化碳(CCl₄)建立肝纤维化模型(模型组和OCT组),饲养8周后处死大鼠并随机采集标本,使用HE及VG染色法观察大鼠肝细胞的病理改变;检测大鼠血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、透明质酸(HA)、大鼠层粘连蛋白(LN)、大鼠Ⅲ型前胶原氨基端原肽(PⅢNP)、大鼠Ⅳ型胶原(COL4)含量;使用Ishak评分系统分析各组肝细胞的炎症活动度及纤维化程度;Western blot法检测肝组织ROR α 受体的表达情况。结果 与对照组比较,模型组和OCT治疗组大鼠肝脏细胞的病理变化程度、肝脏炎症活动度、肝脏纤维化程度、肝脏血清AST、ALT、HA、LN、PⅢNP、COL4含量均显著上升,ROR α 显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较,OCT治疗组大鼠肝脏细胞的病理变化程度、肝脏炎症活动度、肝脏纤维化程度、肝脏血清AST、ALT、HA、LN、PⅢNP、COL4含量显著下降,ROR α 下降程度降低($P < 0.05$)。结论

OCT可降低大鼠体内ROR α 的下降程度,减少肝功能损害及肝纤维化程度,治疗实验性大鼠肝纤维化效果确切。

关键词 维甲酸相关孤核受体 α ; 奥曲肽; 肝纤维化; 肝功能损害

中图分类号 R 657.3+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0841-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.004

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是一种慢性炎症反应过程,研究^[1]显示乙型肝炎等病毒、自身免疫性肝损害、酒精肝等多种因素会导致肝脏内多种炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin 1, IL-1)、IL-6等释放增多,从而导致汇管区内纤维细胞转变为成纤维细胞、肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)转

变为肌成纤维细胞,激活的成纤维细胞、HSC会分泌大量的胶原蛋白,弥漫性分布于肝细胞内,最终导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增多、肝功能受损、肝脏纤维化以及肝硬化。研究^[2]表明肝纤维化具有可逆性,大量药物应用于肝纤维化的防治,其中奥曲肽(octreotide, OCT)可减轻多种因素导致的组织损伤,具有显著的细胞保护作用。而维甲酸相关孤核受体 α (retinoid-related orphan receptor α , ROR α)可能通过调节脂质代谢、参与炎症反应等机制在肝纤维化发生中的可能起到了至关重要的作用^[3]。该实验观察OCT对用四氯化碳(CCl₄)建立大鼠肝纤维化模型的肝细胞表达的影响,研究OCT是否通过减少ROR α 下降的程度来减轻大鼠肝细胞损害。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本实验选用成年清洁雄性SD大鼠36只,220~260 g(购自安徽医科大学实验动物中心);CCl₄(无锡展望化工试剂有限公司)及橄榄油(国药集团化学试剂有限公司),按容积比4:6配制成40%混合溶液;OCT(0.1 mg/ml,瑞士Novartis Pharma Schweiz公司)用生理盐水稀释成0.1、1 mg/ml;透明质酸(hyaluronic acid, HA) ELISA测定试剂盒和大鼠层粘连蛋白(Laminin, LN) ELISA测定试剂盒和大鼠Ⅲ型前胶原氨基端原肽(N-terminal procollagen III propeptide, PⅢNP) ELISA测定试剂盒和大鼠Ⅳ型胶原(collagen IV, COL4) ELISA测定试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒和ECL发光试剂(上海碧云天生物技术研究所);抗 β -actin抗体以及二抗(北京中杉金桥生物技术公司);抗 α 平滑肌蛋白(α -smooth muscle actin α -SMA)抗ROR α 一抗及单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及建立模型 大鼠正常喂养1周后随机分成对照组、模型组和OCT治疗组,每组12只。模型组及OCT治疗组的大鼠皮下注射40%

2018-03-11 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(编号: KJ2014A117)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肝胆胰外科一病区,合肥 230022

作者简介:龚义飞,男,医师;

张超,男,博士,主任医师,责任作者, E-mail: smallcloud2@hotmail.com

CCl₄ 3 ml/kg,每周 2 次; OCT 治疗组的大鼠腹部皮下注射 OCT 100 ng/100 g,每日 2 次;对照组和模型组均予以注射等量生理盐水。给药 8 周后处死大鼠并采集标本。

1.2.2 形态学及病理学观察 取大鼠肝脏左叶大体观察肝脏形态、质地、色泽,甲醛固定后常规石蜡包埋切片,行 HE 和 VG 染色。显微镜下观察肝脏病理组织学改变及肝脏胶原纤维的情况,每张切片随机选取 5 个 400 倍的不连续视野,每个组别的炎症活动和肝组织纤维化程度通过 Ishak 评分标准进行分析和比较,按评分及相应的分值判定病情的轻重,即: A 碎屑样坏死(0~4 分); B 融合性坏死(0~6 分); C 点状坏死、凋亡小体和灶性炎症(0~4 分); D 汇管区炎症(0~4 分)。该评分系统中,纤维化水平的分期标准是按肝组织纤维增生的程度给以相应的分值(0~6 分)^[4]。

1.2.3 肝脏血清学检测 通过全自动生化分析仪测定大鼠血清肝功能谷草转氨酶(aspartate transaminase ,AST) 和谷丙转氨酶(alanine transaminase ,ALT) 的含量,按照试剂盒说明书操作通过 ELISA 法测定 HA、LN、PⅢ NP、COL4 含量。

1.2.4 Western blot 法检测 使用玻璃匀浆器将冷冻的大鼠肝细胞匀浆并且离心取上清液。BCA 法测定蛋白含量,统一样本蛋白总量。按 Western blot 操作流程进行检测,用 Quantity One 软件分析 β-actin、α-SMA、RORα 各条带灰度值,差异性分析蛋白表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异统计使用单因素方差分

析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;等级资料采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏大体标本及病理学检测结果 大体标本检测结果:对照组大鼠肝脏表面颜色鲜红,表面光滑,边缘锐利,质地柔软;模型组大鼠肝脏表面出现结节状改变,边缘圆钝,质地较硬,色泽浅,纤维化明显;OCT 治疗组大鼠肝脏表面色泽较红,边缘较锐利,质地较软。病理学检测结果:对照组肝组织炎症细胞较少,罕见凋亡小体,极少量的胶原纤维分布于汇管区周围,肝细胞条索状排列结构正常;模型组肝组织结构紊乱,汇管区及小叶纤维增生,肝细胞脂肪变性,同时伴有片状坏死,伴有单核细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞浸润;OCT 治疗组可见肝细胞肿胀,气球样变,大量点状坏死,少量碎片状坏死,少量的肝组织炎症细胞浸润,大多数细胞排列结构清晰,细小的胶原纤维围绕着小血管和汇管区。见图 1。

2.2 Ishak 评分结果 模型组及 OCT 治疗组肝细胞炎症活动度及纤维化程度较对照组均明显增高 (*P* < 0.01);与模型组比较,OCT 治疗组评分有显著降低 (*P* < 0.05)。见表 1、2。

2.3 大鼠血清生化指标及肝纤维化检测结果 与对照组比较,模型组和 OCT 治疗组血清 AST、ALT、HA、LN、PⅢ NP、COL4 含量水平明显升高 (*P* < 0.01);与模型组比较,OCT 治疗组血清 AST、ALT、HA、LN、PⅢ NP、COL4 含量水平显著降低 (*P* < 0.05)。见表 3。

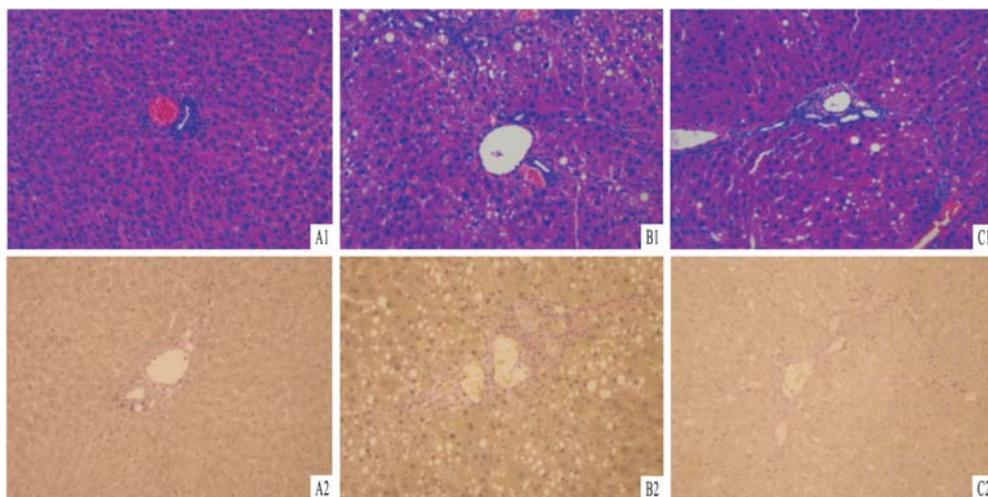


图 1 大鼠肝脏 HE 和 VG 染色结果 ×400
A: 对照组 B: 模型组 C: OCT 组; 1: HE 染色; 2: VG 染色

表1 大鼠肝脏炎症活动度 Ishak 评分 (n = 10 $\bar{x} \pm s$)

组别	炎症活动度评分					秩均值
	0~3	4~6	7~9	10~14	15~18	
对照	12	0	0	0	0	6.5
模型	0	0	3	9	1	28.46**
OCT	0	2	7	3	0	21.25**#
H 值	-	-	-	-	-	28.990
P 值	<0.01					

与对照组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05

表2 大鼠肝脏纤维化程度 Ishak 评分 (n = 10 $\bar{x} \pm s$)

组别	纤维化程度评分						秩均值
	0	1	2	3	4	5	
对照	12	0	0	0	0	0	6.5
模型	0	0	0	0	3	7	28.67**
OCT	0	0	1	3	6	2	20.33**#
H 值	-	-	-	-	-	-	29.093
P 值	<0.01						

与对照组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05

2.4 ROR α 蛋白检测结果 各组之间肝组织 ROR α 蛋白表达量不完全相同, 差异有统计学意义 ($F = 37.79, 45.99, P < 0.01$)。与对照组比较, 模型组大鼠肝组织 ROR α 蛋白的表达水平明显下降 ($P < 0.01$)。OCT 治疗后, ROR α 蛋白表达水平明显上升 ($P < 0.05$)。见图2。

3 讨论

肝细胞损伤是肝脏纤维化形成的重要原因, 一方面是间质细胞, 如 HSC 诱导肝纤维化的促进因素, 另一方面也是细胞因子, 如 TGF- β 1 促进肝纤维化的重要因素^[5]。而生长抑素 (somatostatin, SST) 是一种环形 14 肽类激素, 由下丘脑释放, 目前已广泛应用于重症胰腺炎和肝硬化所致的上消化道出血等疾病的治疗^[6], OCT 是 SST 的一种衍生物, 与 SST 有类似的理化性质, 使用 OCT 可以抑制循环中内毒素的水平, 并且下调循环中的炎症介质, 有保护细胞的作用^[7]。相关研究^[8]表明, ROR α 可预防肝纤维化的发生, 一方面, 通过影响靶基因的表达, 调控脂

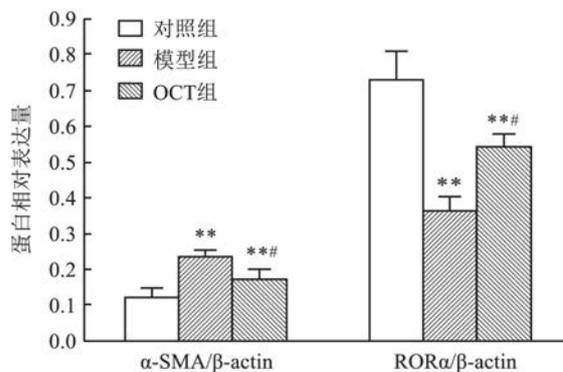
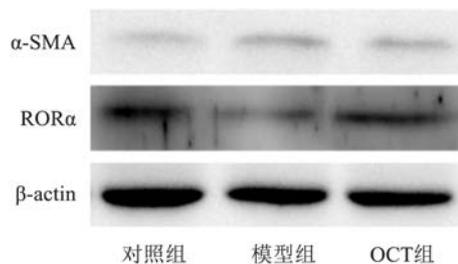


图2 大鼠肝组织 ROR α 蛋白表达量

与对照组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05

代谢过程中的重要物质, 保持脂代谢平衡。另一方面 ROR α 在肝脏炎症反应中也发挥了至关重要的作用, 其表现为抑制了肝脏的炎症反应, 减轻肝脏炎症反应带来的肝脏功能损伤^[9]。HSC 是肝脏纤维化形成的一种核心细胞, 研究^[5]表明, 多种因素均可导致其增殖、活化及分泌 ECM, 参与肝纤维化的形成。其增殖的一个核心机制是活化 Wnt 信号通路^[10]。而磷酸化后的 ROR α 可减少各种转录辅助因子和 RNA 聚合酶 II 在 β 连环蛋白 (β -catenin) 与相关靶向基因启动子结合处的聚合, 进而阻止 Wnt/ β -catenin 信号的传导, 抑制 β -catenin 被激活, 减少了相关产物基因的表达^[11], 为 ROR α 参与抗肝纤维化提供了可能。但 ROR α 与奥曲肽抗肝纤维化中的具体关系未见报道。本实验通过 CCl₄ 建模的大鼠, 病理可见肝组织结构紊乱, 汇管区及小叶纤维增生, 肝细胞脂肪变性, 同时伴有片状坏死, 伴有单

表3 大鼠血清生化指标及肝纤维化检测结果 (n = 10 $\bar{x} \pm s$)

组别	HA (ng/ml)	LN (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	COL4 (ng/ml)	AST (U/L)	ALT (U/L)
对照	64.97 ± 27.05	37.25 ± 12.12	19.80 ± 11.34	13.22 ± 5.65	57.78 ± 18.77	29.47 ± 7.50
模型	329.70 ± 33.36**	156.10 ± 50.93**	193.36 ± 36.62**	90.06 ± 38.95**	171.81 ± 34.14**	102.52 ± 40.90**
OCT	221.72 ± 42.28**#	94.24 ± 29.85**#	84.00 ± 40.45**#	48.56 ± 27.86**#	134.67 ± 36.06**#	64.89 ± 25.68**#
F 值	161.26	34.39	81.71	22.15	40.98	19.71
P 值	<0.01					

与对照组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05

核细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞浸润。血清 AST、ALT、HA、LN、PⅢNP、COL4 含量水平明显升高, ROR α 蛋白的表达水平明显下降, 使用 OCT 治疗后可见肝细胞肿胀, 气球样变, 伴有大量点状坏死及少量碎片状坏死, 少量肝组织炎性细胞浸润, 大多数细胞排列结构清晰, 细小的胶原纤维围绕着小血管和汇管区。血清 AST、ALT、HA、LN、PⅢNP、COL4 含量水平显著降低, ROR α 蛋白表达水平明显上升。说明 OCT 治疗肝纤维化大鼠疗效确切, 同时减少了 ROR α 下降的程度, 也提示 ROR α 具有抗肝纤维化的作用。

参考文献

- [1] 张 硕. 根皮苷抗血吸虫病肝纤维化的作用及机制研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2012.
- [2] Ancha H, Ojeas H, Tedesco D, et al. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow[J]. *Regul Pept* 2003, 110(2): 107-113.
- [3] Fitzsimmons R L, Lau P, Muscat G E. Retinoid-related orphan receptor alpha and the regulation of lipid homeostasis[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012, 130(3/4/5): 159-68.
- [4] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis[J]. *Hepatology* 1995, 22: 696-9.
- [5] 姚 磊, 张 超, 李方跃, 等. 奥曲肽对实验性肝纤维化大鼠瘦素及功能性瘦素受体表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 800-4.
- [6] Zhang C, Xu J M, Kong D R, et al. Immediate effects of different schedules of somatostatin on portal pressure in patients with liver cirrhosis[J]. *Clin Pharm Ther* 2013, 38(3): 206-11.
- [7] Wang G, Wen J, Wilbur R R, et al. The effect of somatostatin, ulinastatin and salvia miltiorrhiza on severe acute pancreatitis treatment[J]. *Am J Med Sci* 2013, 346(5): 371-6.
- [8] Jetten A M, Kang H S, Takeeda Y. Retinoic acid-related orphan receptors α and γ : key regulators of lipid/glucose metabolism, inflammation, and insulin sensitivity [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013, 4: 1.
- [9] McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, et al. Interleukin-33-dependent innatelymphoid cells mediate hepatic fibrosis[J]. *Immunity* 2013, 39(2): 357-71.
- [10] Xiong W J, Hu L J, Jian Y C, et al. Wnt5a participates in hepatic stellate cell activation observed by gene expression profile and functional assays[J]. *World J Gastroenterol* 2012, 18(15): 1745-52.
- [11] 袁 灿. 维甲酸相关孤儿受体 α 抗肝纤维化作用研究进展[J]. *现代医药卫生* 2014, 30(3): 391-3.

Effect of retinoic acid related orphan receptor α (ROR α) and octreotide on liver fibrosis in rats

Gong Yifei, Zhang Chao, He Xinmiao, et al

(Dept of Liver and Biliary Pancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effect of octreotide (OCT) on liver histopathology and liver serology in experimental hepatic fibrosis rats, and explore the role of ROR α in this animal model. **Methods** Thirty-six male SD rats were randomly divided into three groups: control group, model group and OCT group. The model of hepatic fibrosis was established by CCl₄ (model group and OCT group). At the end of 8 week, the rats were killed and randomly collected. The pathological changes of liver were observed by HE and VG staining. The levels of AST, ALT, HA, LN, PⅢNP and COL4 were detected. The degree of hepatic fibrosis and the degree of inflammatory activity in each group were analyzed by Ishak scoring system. The expression of ROR α receptor in liver tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the levels of hepatic pathological changes, inflammatory activity, fibrosis, serum AST, ALT, HA, LN, PⅢNP and COL4 in model group and OCT group were significantly increased and ROR α significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the liver pathological changes, inflammatory activity, fibrosis, serum AST, ALT, HA, LN, PⅢNP and COL4 in OCT treatment group decreased significantly and the expression of ROR α decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** OCT can reduce the degree of hepatic fibrosis and improve liver function in rats, and its mechanism may relate to the decrease of ROR α . **Key words** retinoid-related orphan receptor α ; octreotide; liver fibrosis; impairment of liver function