

· 论 著 ·

抗结缔组织生长因子小分子干扰 RNA 对大鼠肝纤维化的影响*

毛小荣, 陈 红, 岳 伟, 薛 苗
(兰州大学第一医院传染科, 兰州 730000)

摘 要:目的 观察抗结缔组织生长因子小分子干扰 RNA(CTGF siRNA)对大鼠肝纤维化肝脏功能及肝纤维化指标的影响。方法 雄性 SD 大鼠 30 只, 随机分成 5 组, 即空白对照组、模型组、治疗组、预防组及晚期治疗组, 检测各组肝功能及肝纤维化指标, 并对肝脏进行组织学检测。结果 与模型组相比, 预防组及治疗组肝组织炎症、坏死及纤维化明显减轻, 血清氨基转移酶、总胆红素、肝纤维化指标水平降低, 清蛋白升高($P<0.05$)。晚期治疗组与模型组相比肝组织炎症、坏死及纤维化减轻, 血清、总胆红素、肝纤维化指标水平降低, 清蛋白升高($P<0.05$)。结论 经尾静脉注射抗 CTGF siRNA 可有效防治大鼠肝纤维化, 改善大鼠肝脏功能, 且对已发生的肝纤维化也具有一定的疗效, 提示抗 CTGF siRNA 将成为抗肝纤维化治疗的新策略。

关键词: RNA, 小分子干扰; 肝功能实验; 肝硬化; 结缔组织生长因子
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.019 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2011)13-1443-02

Effect of small interfering RNA targeting connective tissue growth factor on rats with liver fibrosis*

Mao Xiaorong, Chen Hong, Yue Wei, Xue Miao

(Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of small interfering RNA targeting connective tissue growth factor(CTGF siRNA) on liver function and fibre index of rats with liver fibrosis. **Methods** Thirty male rats were randomly divided into five groups, including control group, model group, prevention group, curative group and advanced curative group. All groups were detected for liver function and liver fibrosis. **Results** Compared with model group, liver tissue inflammation, necrosis and fibrosis prevention and curative groups significantly reduced, serum ALT, AST, total bilirubin, index of liver fibrosis were significantly lower and albumin significantly increased ($P<0.05$). Of Advanced curative group, compared with model group, the liver inflammation, necrosis and fibrosis reduced, serum ALT, AST, total bilirubin and liver fibrosis decreased, and albumin increased ($P<0.05$). **Conclusion** The tail intravenous infusion of CTGF siRNA could effectively control rat liver fibrosis, improve liver function, and have certain curative effect for rats with liver fibrosis. CTGF resistance against hepatic fibrosis siRNA would become a new treatment strategy

Key words: RNA, small interferon; liver function tests; liver cirrhosis; connective tissue growth factor

肝纤维化是多种慢性肝病发展至肝硬化甚至肝癌的必经病理过程, 研究显示应用有效的抗肝纤维化药物可部分或完全逆转肝纤维化, 是阻断肝硬化、肝癌进展的重要治疗手段^[1-3]。

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)被喻为致肝纤维化总开关, 该因子的研究为探索肝纤维化的发病机制及新的治疗方案注入了新的思想。作为一种新型的治疗手段, RNA 干扰技术逐渐被人们所重视。它是由双链 RNA 介导的, 引发生物细胞内源性基因特异性转录后沉默(post-transcriptional gene silence, PTGS)的过程^[4-5], 为抗肝纤维化基因治疗提供了新的策略。本研究旨在观察抗结缔组织生长因子小分子干扰 RNA(抗 CTGF siRNA)对大鼠肝纤维化肝脏功能及肝纤维化指标的影响, 探讨是否能改善大鼠肝纤维化状况。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠由甘肃省中医学院 SPF 级动物实验中心提供。大鼠抗 CTGF siRNA(sense: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'; anti-sense: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3')由上海吉玛技术有限公司合成。肝纤维化指标放免试剂盒购自北京北方生物制品研究所。检测血清氨基转移酶、清蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)采用 BeckmanCX-4 全自动生化仪及配套试剂。

1.2 方法

1.2.1 肝纤维化模型的建立 30 只雄性 SD 大鼠, 随机分成 5 组, 每组 6 只。模型组腹腔注射 40% CCl₄ (CCl₄ 与橄榄油按 2:3 比例混合, 3 mL/kg)及尾静脉注射生理盐水(与抗 CTGF siRNA 溶液等量), 每 3 天注射 1 次, 连续 8 周, CCl₄ 首剂加倍。预防组腹腔注射 40% CCl₄ (3 mL/kg)及尾静脉注射抗 CTGF siRNA(0.1 mg/kg, 溶于 300 μ L Opti-MEM1), 每 3 天注射 1 次, 连续 8 周。治疗组腹腔注射 40% CCl₄ (3 mL/kg)2 周后给予抗 CTGF siRNA 及 CCl₄ 6 周。晚期治疗组腹腔注射 40% CCl₄ (3 mL/kg)4 周后给予抗 CTGF siRNA 及 CCl₄ 4 周。空白对照组尾静脉注射生理盐水 8 周。于最后一次 CCl₄ 注射 3 天后所有动物经股动脉取血及肝组织标本。

1.2.2 AST、ALT、ALB、TBIL、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、人Ⅲ型前胶原(hpcⅢ)、Ⅳ型胶原(ⅣC)测定 均按仪器及试剂说明书操作。

1.2.3 组织学检测 肝组织标本以 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋。制备 2 μ m 厚肝组织切片用于常规 HE 染色, 光镜下观察肝细胞变性、坏死、炎症细胞浸润情况。参照慢性肝炎分级分期标准对大鼠肝脏炎症活动度及肝纤维化程度进行病理分级。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。

* 基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(2008GS01165)。

计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 One-Way ANOVA 统计学方法统计,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗 CTGF siRNA 对大鼠肝脏肝功能的影响 见表 1。

表 1 抗 CTGF siRNA 对大鼠肝脏肝功能的影响($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	ALB(g/L)	TBIL(μ mol/L)
空白对照组	6	34.18 $\pm$ 5.02 [*]	26.80 $\pm$ 1.83 [*]	35.98 $\pm$ 1.52 [*]	24.95 $\pm$ 3.81 [*]
模型组	6	325.40 $\pm$ 61.95	136.80 $\pm$ 26.85	19.22 $\pm$ 4.30	101.03 $\pm$ 11.96
预防组	6	98.35 $\pm$ 11.39 ^{*#}	74.10 $\pm$ 8.56 ^{*#}	42.02 $\pm$ 4.41 ^{*#}	15.50 $\pm$ 7.27 ^{*#}
治疗组	6	156.30 $\pm$ 18.46 ^{*#}	88.30 $\pm$ 9.19 ^{*#}	41.92 $\pm$ 5.67 ^{*#}	21.27 $\pm$ 3.63 ^{*#}
晚期治疗组	6	227.90 $\pm$ 19.32 [*]	116.10 $\pm$ 12.45 [*]	28.73 $\pm$ 7.12 [*]	38.97 $\pm$ 9.44 [*]

^{*}: $P<0.05$,与模型组比较;[#]: $P<0.05$,与晚期治疗组比较。

表 2 抗 CTGF siRNA 对大鼠肝纤维化各项指标的影响($\bar{x}\pm s$)					
组别	N	HA(ng/ml)	LN(μ g/L)	hpcⅢ(μ g/L)	ⅣC(ng/mL)
空白对照组	6	40.07 $\pm$ 6.96 [*]	87.37 $\pm$ 14.67 [*]	63.83 $\pm$ 11.45 [*]	26.50 $\pm$ 16.72 [*]
模型组	6	377.90 $\pm$ 40.96	302.52 $\pm$ 29.09	518.37 $\pm$ 79.67	249.45 $\pm$ 24.01
预防组	6	182.17 $\pm$ 20.21 ^{*#}	190.18 $\pm$ 17.09 ^{*#}	199.00 $\pm$ 19.59 ^{*#}	149.40 $\pm$ 11.54 ^{*#}
治疗组	6	218.65 $\pm$ 18.51 ^{*#}	232.05 $\pm$ 21.48 ^{*#}	240.20 $\pm$ 17.15 ^{*#}	183.00 $\pm$ 12.99 ^{*#}
晚期治疗组	6	285.62 $\pm$ 16.97 [*]	278.62 $\pm$ 10.57 [*]	318.45 $\pm$ 18.31 [*]	215.27 $\pm$ 12.02 [*]

^{*}: $P<0.05$,与模型组比较;[#]: $P<0.05$,与晚期治疗组比较。

2.2 抗 CTGF siRNA 对大鼠肝纤维化各项指标影响 见表 2。

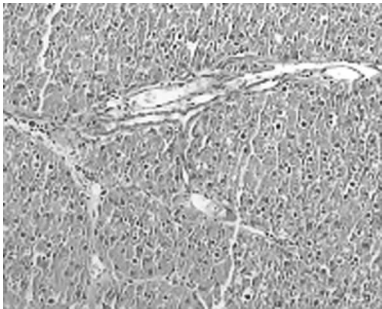


图 1 模型组肝组织(HE 染色,×100)

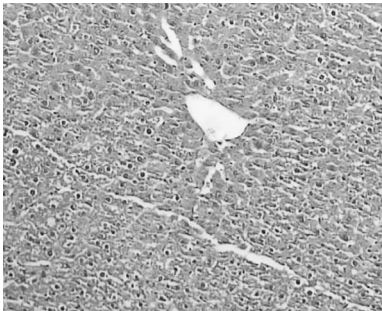


图 2 空白对照组肝组织(HE 染色,×100)

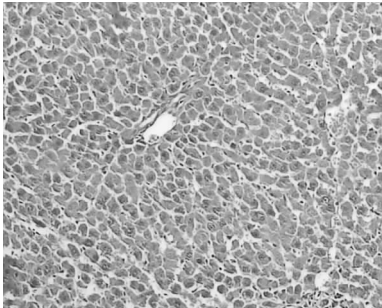


图 3 预防组肝组织(HE 染色,×100)

2.3 肝脏组织学检查 模型组肝小叶结构破坏、紊乱,肝细胞疏松样变,嗜酸性变,汇管区广泛纤维组织增生,分隔肝组织呈大小不等的细胞岛,汇管区充血水肿,伴有淋巴细胞广泛浸润;根据评分标准炎症活动度(G)为 4 级,肝纤维化程度(S)为 3 级。预防组(G 为 0~1 级,S 为 0~1 级)及治疗组(G 为 1 级,S 为 1 级)肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润明显减轻。晚期治疗组肝小叶结构存在,肝细胞轻度疏松样变,汇管区少量纤维组织增生,小胆管轻度增生,少量淋巴细胞浸润,根据评分标准 G 为 1~2 级,S 为 2 级。见图 1~5。

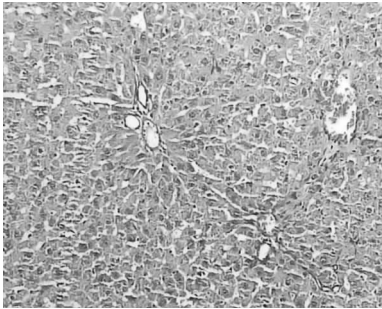


图 4 治疗组肝组织(HE 染色,×100)

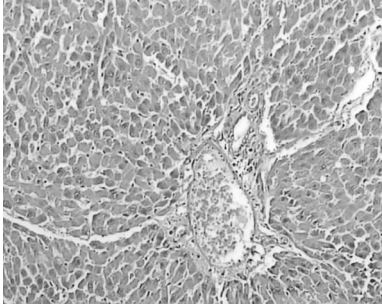


图 5 晚期治疗组肝组织(HE 染色,×100)

3 讨 论

肝纤维化是各种致炎因子引起肝星状细胞(HSC)激活、增殖和分泌细胞外基质(ECM)等胶原物质(HA、(下转第 1446 页)

3 讨 论

SVF 与反应体系中样本、样本稀释液、试剂及试剂稀释液的体积比例关系,即反应体系中样本稀释倍数密切相关。以终点法或两点法检测酶活性时,由于校准物与样本具有相同的 SVF,因此样本和(或)试剂体积改变对检测结果的影响较小,但以速率法测定酶活性时,SVF 的微小变化可导致检测结果的较大变化^[4]。临床通常以速率法,采用商品试剂盒进行 ALT 测定,不同品牌的试剂往往具有不同的最佳参数,一般要求按比例改变样本、试剂用量,保持恒定的 SVF,以获得较为稳定、准确的测定结果^[2,5-6]。在进行 ALT 检测时,可以根据厂家提供的 K 值用因素法(以该 K 值为 ALT 的校准因子,并乘以 ΔA)进行测定,也可以用校准血清以校准法进行测定^[7]。采用因素法进行测定时,必须严格遵守厂家提供的参数,且仪器必须在标准状态,以确保测定结果的准确性。由于各实验室所使用的生化分析仪的性能,尤其是加样准确性各不相同,因此实际 SVF 与仪器用于计算 K 值时的理论 SVF 存在一定的差异,从而造成系统误差^[8]。采用校准法进行测定时,仪器自动计算 K 值,且此时的 K 值是在实际工作条件下计算获得的,反映仪器和试剂等当时的实际情况,从而有利于获得准确的测定结果;校准血清则必须是与仪器和试剂配套的校准品,否则影响测定结果的准确性^[9-10]。本研究显示,由于 SVF 的改变使 K 值发生了变化,因此不同的 SVF 水平对酶活性检测结果产生了不同程度的影响,特别是在进行高活性样本测定时,因 SVF 的改变使测定结果间有较大差异。采用 SVF 不固定校准法进行样本测定时,保持校准品与样本的检测条件一致,有利于保证标本检测结果的准确性^[11-12]。本研究显示,采用不同的校准法检测 ALT 活性相对较低的标本时,检测结果间的差异无统计学意义($P>0.05$),且在 SVF 在 1/25 和 1/50 时,相同方法检测 ALT 活性相对较高的标本时,检测结果间的也无统计学意义($P>0.05$)。由于 SVF 的改变会导致检测线范围的改变,而在不同线性范围条件下相同标本的检测结果的必然存有差异;标本稀释倍数降低时,SVF 减小,检测线性范围缩小,

高值标本测定低于定值;在增加稀释倍数时,SVF 升高,检测线性范围扩大,高值标本测定结果接近或略高于定值;但稀释倍数超过一定限度时将会扩大测定误差,使测定结果偏高。因此,在选择 SVF 时,应考虑样本体积、试剂体积、稀释液体积、加样系统准确性等多方面因素;在参考厂家给定值的同时,应确定适合本实验室的 SVF。

参考文献

- [1] 蒋胜高,高许斌,程梅,等.实测摩尔吸光度在酶活性测定质量控制中的应用[J].临床检验杂志,2000,18(6):342-344.
- [2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:406-410.
- [3] 葛熙.样品体积分数影响 APO-A1 校准曲线的实验分析[J].医学检验与临床,2008,19(6):96.
- [4] 李冬,王志富,焦连亨,等.丙氨酸氨基转移酶测定波长设置的实验研究[J].国际检验医学杂志,2007,28(7):602-606.
- [5] 孟泽,李勇,史利宁,等.酶活性测定中 4 种 K 值的计算方法与应用价值[J].临床检验杂志,2002,20(3):185-186.
- [6] 吕赛平,邹学森.自动生化分析仪的分析参数设置[J].江西医学检验,2007,25(2):159-161.
- [7] 李金奎.通过标准品测定值验证初设实验参数可靠性的探讨[J].国际检验医学杂志,2009,30(11):1125.
- [8] 居漪,唐立萍,王美娟,等.上海地区丙氨酸氨基转移酶测定标准化探讨[J].检验医学,2008,23(5):460-465.
- [9] 郭健,王清涛,童清,等.血清酶测定标准化的实验研究[J].中华检验医学杂志,2002,25(3):147-149.
- [10] 邹荣良,朱军,陆伟石,等.应用校准血清校准血清酶测定结果的调查[J].临床检验杂志,2003,21(3):180.
- [11] 张克坚,张传宝,杨振华.如何在自动生化分析仪上设定测定酶活性的 K 值[J].临床检验信息,1999,6(2):45-48.
- [12] 杨炳益,赵新新.岛津 CL-7000 全自动生化分析仪限额参数的设置[J].临床检验杂志,1995,13(2):77-78.

(收稿日期:2011-01-20)

(上接第 1444 页)

LN、hpcⅢ、ⅣC)增加,使汇管区出现纤维间隔分割小叶、假小叶而破坏肝正常结构,进而发展成肝硬化甚至发展成肝癌。肝纤维化的发生和形成是一个多因素相互促进、相互制约的结果,炎症病理损害贯穿于始终。而 HA、LN、hpcⅢ、ⅣC 作为无创性指标判断肝纤维化已被认可^[6]。

由于使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,因此已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗。其优点在于以 DNA Oligo 为模板,通过体外转录合成 siRNA,成本低于化学合成法,而且在更短的时间内即可获得 siRNA^[7]。

基于上述 RNA 干扰技术的优越性,本研究通过合成高效的抗 CTGF siRNA,且通过动物实验抗 CTGF siRNA 能明显减轻大鼠肝细胞变性、坏死及炎性细胞浸润。亦可显著抑制 CCl₄ 诱导的肝纤维化的发生、发展,说明抗 CTGF siRNA 可以明显改善大鼠肝纤维化时肝脏功能并预防肝纤维化的发生及发展,且对于已发生的肝纤维化也有一定的治疗作用,提示应用抗 CTGF siRNA 治疗肝纤维化将有潜力成为抗肝纤维化治疗新的亮点。

参考文献

- [1] 张锦生. Micro-RNAs 在肝纤维化发生中的作用[J].世界华人消化杂志,2009,17(36):3671-3674.
- [2] Li GM, Li DG, Fan JG, et al. Effect of silencing connective tissue growth factor on the liver fibrosis in rats[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2010, 18(11):822-825.
- [3] Li G, Li D, Xie Q, et al. RNA interfering connective tissue growth factor prevents rat hepatic stellate cell activation and extracellular matrix production[J]. Gene Med, 2008, 10(9):1039-1047.
- [4] Boison D. Inhibitory RNA in epilepsy: research tools and therapeutic perspectives[J]. Epilepsia, 2010, 51(9):1659-1668.
- [5] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution[J]. Nature, 2004, 430(6996):161-164.
- [6] 钟佩怡,邓常春. HA、LN、PⅢNP、Ⅳ-C 在肝纤维化诊断中的意义[J].中国西部科技,2006,5(7):46.
- [7] Geley S, Muller C. RNAi: ancient mechanism with a promising future[J]. Exp Gerontol, 2004, 39(7):985-998.

(收稿日期:2011-01-07)