

明显减慢 [平均清除率为 $4.29 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]。根据文献报道^[14], 当 PEGrhG-CSF 剂量为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 一周只需要 sc 1 次, 就可以达到持续升高中性粒细胞的临床效果; 与每天注射 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的 rhG-CSF, 连续注射 1 周的效果相同。本实验结果也证明了这一长效作用。

3.4 与国外同类产品 Pegfilgrastim 比较: Pegfilgrastim (PEG 化重组人粒细胞集落刺激因子) 是美国 Amgen 公司的同类产品。据文献报道^[15,16], 3 例临床非小细胞肺癌病人化疗后 24 h 按 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量单次 sc Pegfilgrastim 后的平均半衰期为 33.2 h ($30.3 \sim 53.8 \text{ h}$), 平均清除率为 $14.0 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$ [$4.2 \sim 15.8 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]; 而本实验 4 例病人化疗后 48 h 单次 sc 同剂量 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) PEGrhG-CSF, 平均半衰期为 45.7 h ($34.7 \sim 58.2 \text{ h}$), 平均清除率为 $3.36 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$ [$2.96 \sim 3.67 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]。两者比较, 本实验结果的半衰期更长, 清除率更低, 这可能是个体差异或药物本身差异所致, 其所显示的更强的长效和临床意义有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Kuwabara T, Kato Y, Kobayashi S, et al. Nonlinear pharmacokinetics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor derivative species differences among rats, monkeys and humans [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271(3): 1535-1543.
- [2] Tanaka H, Satake-Ishikawa R, Ishikawa M, et al. Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(14): 3710-3714.
- [3] Morstyn G, Foote M A, Walker T, et al. Filgrastim (r-metHuG-CSF) in the 21st century: SD/01 [J]. *Acta Haematol*, 2001, 105(3): 151-155.
- [4] Takahashi M, Yoshizama H, Tanaka H, et al. A phase I dose escalation study of multicyclic, dose-intensive chemotherapy with peripheral blood stem cell support for small cell lung cancer [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25(1): 5-11.
- [5] Vose J M, Crump M, Lazarus H. Randomized, multicenter, open-label study of pegfilgrastim compared with daily filgrastim after chemotherapy for lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(3): 514-519.
- [6] Greenwald R B, Choe Y H, McGuire J, et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(2): 217-250.
- [7] Greenwald R B, Zhao H, Xia J, et al. Poly (ethylene glycol) transport forms of vancomycin: a long-lived continuous release delivery system [J]. *J Med Chem*, 2003, 46(23): 5021-5030.
- [8] Zhao H, Greenwald R B, Reddy P, et al. A new platform for oligonucleotide delivery utilizing the PEG prodrug approach [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(4): 758-766.
- [9] Yang B B, Kido A, Shibata A. Serum pegfilgrastim concentrations during recovery of absolute neutrophil count in patients with cancer receiving pegfilgrastim pegfilgrastim after chemotherapy [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(10): 1387-1393.
- [10] 蔡永明, 孙超渊, 李 铭, 等. 酶联免疫法研究天花粉蛋白突变体在猕猴体内的药理学 [J]. *中草药*, 2006, 37(3): 402-405.
- [11] 化学药物临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2005.
- [12] Roskos L K, Lum P, Lockbaum P, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of pegfilgrastim in healthy subjects [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46(7): 747-757.
- [13] Johnston E, Crawford J, Blackwell S, et al. Randomized dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(13): 2522-2528.
- [14] Van Der Auwera P, Platzer E, Xu Z X, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of single doses of subcutaneous pegylated human G-CSF mutant (Ro 25-8315) in healthy volunteers: comparison with single and multiple daily doses of filgrastim [J]. *Am J Hematol*, 2001, 66(4): 245-251.
- [15] Zamboni W C. Pharmacokinetics of pegfilgrastim [J]. *Pharmacotherapy*, 2003, 23(8): 9-14.
- [16] Green M D, Koelbl H, Baselga J, et al. A randomized double-blind multicenter phase study of fixed-dose single-administration pegfilgrastim versus daily filgrastim in patients receiving myelosuppressive chemotherapy [J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(1): 29-35.

红花注射液对肝星状细胞 HSC-T6 增殖、凋亡及凋亡相关基因表达的影响

刘 璐, 徐选福, 杨文娟, 郭传勇*

(同济大学附属第十人民医院 消化科, 上海 200072)

摘要:目的 研究红花注射液对肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) HSC-T6 增殖、凋亡及凋亡相关基因 bcl-2 及 bax mRNA 表达的影响。方法 体外培养 HSC 株, 用不同质量浓度的红花注射液处理 HSC-T6, 采用

* 收稿日期: 2008-10-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973 计划”资助项目 (2006CB504810); 上海市自然科学基金资助项目 (06ER14090)

作者简介: 刘 璐 (1982—), 女, 山西省洪洞县人, 博士, 讲师, 研究方向为中西医结合消化系统疾病诊治。

Tel: 13816951240 E-mail: liujun19820124@yahoo.com.cn

* 通讯作者 郭传勇 E-mail: guochuanrong@sina.com

MTT法检测细胞增殖;采用5、10、20 mg/mL红花注射液干预细胞24 h,流式细胞仪检测细胞周期;倒置显微镜下观察细胞凋亡形态学改变;并用琼脂糖凝胶电泳法检测DNA Ladder凋亡梯度;Annexin V-FITC/PI双染色流式细胞仪分析凋亡率;Real time-RT-PCR检测凋亡相关基因bcl-2、bax mRNA的表达水平。结果 红花注射液对HSC增殖有明显的抑制作用,且作用呈剂量和时间依赖性;红花注射液(10、20 mg/mL)作用24 h流式细胞术测出G₀/G₁期细胞所占比例增多,与对照组比较差异显著($P < 0.05, 0.01$);药物干预后细胞表现不同程度的凋亡,琼脂糖电泳可见DNA出现断裂;PI/Annexin V双染流式细胞仪分析对照组凋亡率为(0.73 ± 0.33)%,红花注射液在5、10、20 mg/mL凋亡率分别为(2.04 ± 0.58)%(9.46 ± 1.29)%(16.55 ± 1.27)%,差异显著($P < 0.01$);Real time-RT-PCR结果显示红花下调抗凋亡基因bcl-2的mRNA表达,同时上调HSC-T6的促凋亡基因bax的mRNA表达。结论 红花注射液能抑制HSC增殖及增殖周期,促进活化的HSC凋亡,其机制可能是调控bcl-2/bax mRNA的表达。

关键词:红花注射液;肝星状细胞;增殖;凋亡;bcl-2/bax

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)08-1270-05

Effect of Safflower Injection on proliferation, apoptosis, and expression of bcl-2 / bax gene in hepatic stellate cell in vitro

LIU Jun, XU Xuan-fu, YANG Wen-juan, GUO Chuan-yong

(Department of Gastroenterology, Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract : Objective To investigate the effects and mechanism of Safflower Injection on the proliferation, apoptosis, and expression of bcl-2/bax gene in hepatic stellate cell (HSC) *in vitro*. **Methods** HSC Line HSC-T6 was incubated with Safflower Injection at different concentration, cell proliferation was assessed by MTT colorimetric assay. After incubated with Safflower Injection 5, 10, and 20 mg/mL, flow cytometry (FCM) was used to detect the content of DNA in HSC-T6. Morphological change of HSC-T6 was observed under microscope and agarose gel electrophoresis for DNA Ladder was used to detect apoptosis. Besides, the early stage of apoptosis was detected with Annexin V-FITC/PI double labbed assay. And real time RT-PCR was used to detect the expression of bcl-2/bax gene. **Results** The significant inhibition of Safflower Injection on HSC proliferation was observed in a dose- and time-dependent manner. Observed by FCM, the cell ratio in G₀/G₁ phase with Safflower Injection treatment (10 and 20 mg/mL) for 24 h was increased, which showed the significant difference compared with the control group ($P < 0.05$ and 0.01). Microscopy showed that nucleolus disappeared, chromatin condensed, arranged along side the nuclear membrane and agarose gel electrophoresis showed DNA fragmentation. Besides, after treated with Safflower Injection at different concentration of 5, 10, and 20 mg/mL for 24 h, the apoptosis rate were (2.04 ± 0.58)%, (9.46 ± 1.29)%, (16.55 ± 1.27)%, respectively, which was significantly higher than that in control group (0.73 ± 0.33)% ($P < 0.01$). The gene expression of bax was up-regulated and that of bcl-2 was down-regulated after treatment with Safflower Injection. **Conclusion** Safflower Injection could prevent hepatic fibrosis mainly through inhibiting proliferation and promoting apoptosis of HSC. The mechanism may involve bcl-2/bax pathway.

Key words: Safflower Injection; hepatic stellate cell (HSC); proliferation; apoptosis; bcl-2/bax

近年来学者对红花及其复方制剂有效成分在慢性肝病临床治疗中的作用进行了深入研究,已得到广泛共识,并通过动物实验证实了其具有抗肝纤维化的作用,但其机制尚未完全阐明。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在肝纤维化的病理生理过程中起着关键作用,是肝纤维化发生的中心环节^[1,2]。红花抗纤维化作用是否参与抑制HSCs活化,目前尚无定论,因此,本研究观察了红花注射液对HSC-T6细胞增殖和凋亡的影响,为进一步从细胞水平探讨红花抗肝纤维化作用的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料:HSC-T6细胞株,由新华医院消化病研究所李定国教授馈赠,为活化的HSC。红花注射液(批号070904)为山西康宝生物制品股份有限公司产品,每支5 mL,含生药0.5 g/mL。DMEM培养基,胎牛血清,Gibco公司;MTT、DMSO为北方同正生物技术发展公司产品;PI/Annexin V双染荧光标记凋亡检测试剂盒,北京宝赛生物公司。ELX800酶标计数仪,Bio-Tek公司生产;倒置显微镜及成像系统,日本Olympus生产;流式细胞仪,美国BD-FACS Calibur生产;Light Cycler Real Time PCR扩增仪,Roche Diagnostics公司;SYBR ExScript

RT-PCR Kit, TAKARA 公司。

1.2 复苏冻存细胞株:用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基常规培养,倒置显微镜下观察细胞,待细胞生长状态良好,并且细胞数目在 $1 \times 10^9/L$ 以上时,将细胞传代。

1.3 MTT 检测 HSC-T6 数目:将细胞生长状态良好,并且细胞数目在 $1 \times 10^9/L$ 以上的培养瓶中的细胞接种在 96 孔板中,接种密度为 $1 \times 10^6/mL$,每孔 200 μL ,设正常对照组,在加入含红花注射液 2.5、5、10、20、40 mg/mL 的 DMEM 培养液中培养 24、48、72 h 后,各组 HSC-T6 (每组设有 3 个复孔,重复 3 次) 中加入 MTT 50 μL ,继续培养 4 h 后,弃上清液,加入 DMSO 100 μL ,震荡 10 min,上酶标仪于 490 nm 波长处测吸光度 (A) 值,代表各孔的细胞数。

1.4 细胞周期时相检测:将传代的 HSC-T6 接种于 6 孔培养板中,接种密度为 $1 \times 10^6/mL$,每孔 2 mL,生长至 80% 以上融合度时,先弃去培养基,PBS 冲洗两次,0.4% 胎牛血清培养基同步化处理 48 h 后,实验组加不同质量浓度 (5、10、20 mg/mL) 的红花注射液,各组细胞在 CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后取样。取样方法:用 0.25% 胰酶消化细胞,吹打使其分散成单个细胞,用 PBS 离心洗涤两次,调节每个样品细胞数约为 $2 \times 10^6/mL$,用微量移液器通过 350 目尼龙网注入 70% 冷乙醇中,4℃ 固定。测定前离心倒掉乙醇,PBS 洗一遍后用 PI 染色 2 h,4℃ 避光 30 min,上机检测,每次设 3 个复孔,重复 3 次。

1.5 细胞凋亡形态学观察及 DNA 凋亡 ladder 条带检测:将传代的 HSC 接种于两个培养瓶中,接种密度为 $1 \times 10^6/mL$,接种 5 mL 于 50 mL 培养瓶中分别为对照组和实验组,生长至 80% 以上融合度时,先弃去培养基,PBS 液冲洗两次,加入 5、10、20 mg/mL 红花注射液,各组细胞在 CO_2 培养箱中继续培养 24 h,在倒置显微镜下观察各组细胞凋亡形态学改变,后用冰 PBS 刮取细胞,蛋白酶消化,酚氯仿法提取细胞 DNA,2% 琼脂糖凝胶电泳,自动凝胶成像系统拍照。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率:取对数生长期细胞接种于 6 孔板过夜后,弃去原培养液,加入 5、10、20 mg/mL 的药物,继续培养 24 h,PBS 洗涤细胞 1 次,用结合缓冲液 195 μL ,加 5 μL Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育 15 min,具体操作步骤按试剂盒说明进行,用流式细胞

仪检测细胞凋亡率。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (real time quantitative PCR) 检测 bcl-2 及 bax mRNA 的表达:相关引物均由上海生工公司合成,GAPDH:正向引物为 5'-ATCACTGCCACTCAGAA GAC-3';反向引物为 5'-GCA TCAAA GGTGGAA GAA T-3';bcl-2:正向引物为 5'-GCA GAG ATGTCCA GTCA G-3';反向引物为 5'-GCCA TA TA GTTCCACAAA GG-3';bax:正向引物为 5'-ATTGGAG ATGA ACTG GACAA T-3';反向引物为 5'-CCACAAA GATGGGCACTGTC-3'。用 5、10、20 mg/mL 红花注射液干预细胞 24 h 后,细胞总 RNA 的提取参照 Trizol 说明书进行,以 oligodT 为引物将提取的总 RNA 反转录,采用 20 μL 反应体系,应用 Light Cycler (Roche Diagnostics 公司) 制备标准曲线,验证内参及目的基因扩增效率一致后,采用两步法对 bcl-2、bax 及内参照 GAPDH 分别同时进行实时荧光定量 PCR 扩增。反应条件:预变性 95℃、10 s,20℃、1 s,1 个循环;PCR 反应 95℃、5 s,20℃、60 s,20 s,20℃、1 s,35 个循环 (退火温度,GAPDH、bcl-2 均 54℃,bax 为 50℃);融解曲线分析 95℃、0 s,20℃、1 s;65℃、15 s,20℃、1 s;95℃、0 s,0.1℃、1 s。扩增结果以 ΔCt 值进行表示,目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta\Delta Ct$ = 目的基因 ΔCt 值 - 内参 GAPDH ΔCt 值。

1.8 统计学方法:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验、单因素方差分析和多重比较等,由 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 红花注射液对 HSC-T6 增殖的影响:各质量浓度的红花注射液对 HSC-T6 增殖均有抑制作用,且有时间和剂量依赖性。见表 1。

表 1 红花注射液对 HSC-T6 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 1 Effect of Safflower Injection on proliferation of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	$P/$ (mg · mL ⁻¹)	A 值		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	1.08 ± 0.03	1.26 ± 0.05	1.47 ± 0.03
红花注射液	2.5	0.87 ± 0.05 **	1.00 ± 0.07 **	1.08 ± 0.10 **
	5	0.52 ± 0.07 **	0.56 ± 0.04 **	0.62 ± 0.09 **
	10	0.55 ± 0.12 **	0.45 ± 0.05 **	0.47 ± 0.06 **
	20	0.41 ± 0.02 **	0.38 ± 0.03 **	0.24 ± 0.02 **
	40	0.62 ± 0.06 **	0.38 ± 0.06 **	0.26 ± 0.06 **

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.2 红花注射液对 HSC-T6 细胞周期的影响:从流式细胞仪结果可以看出红花注射液在 10、20 mg/

mL 时, G_0/G_1 期细胞所占比例增多, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$); 而 $S + G_2/M$ 期细胞减少, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); 以阻止细胞于 G_0/G_1 期, 说明红花注射液能抑制细胞 DNA 的合成。见表 2。

表 2 红花注射液对 HSC-T6 细胞周期分布的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

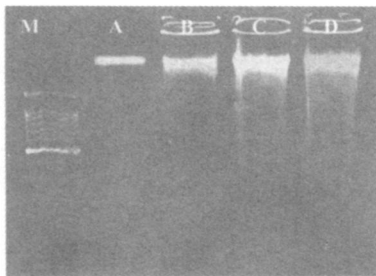
Table 2 Effect of Safflower Injection on cell cycle distribution of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	$\rho/$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞周期/ %	
		G_0/G_1	$S + G_2/M$
对照	-	55.41 $\pm$ 2.54	44.36 $\pm$ 2.54
红花注射液	5	57.45 $\pm$ 4.06	40.25 $\pm$ 3.71
	10	60.24 $\pm$ 3.94 *	37.23 $\pm$ 5.33 **
	20	63.01 $\pm$ 2.05 **	36.51 $\pm$ 2.17 **

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 倒置显微镜观察凋亡细胞形态学改变及细胞 DNA 凋亡 ladder 条带: 对照组细胞生长较好, 形态饱满, 较少见到皱缩变圆, 折光率增强的细胞。20 mg/mL 红花注射液与细胞培养 24 h 后, 细胞常规光镜下观察, 可见散在凋亡细胞, 表现为细胞皱缩变圆、细胞膜出泡、出现凋亡小体, 核质比增大, 核变形、皱缩, 核染色质浓聚或呈月牙形边聚, 5、10 mg/mL 红花注射液组细胞也出现了不同程度的形态学改变。此外, 和对照组相比, 红花注射液作用 24 h 后, HSC-T6 细胞的基因组 DNA 出现了明显的凋亡梯度改变 (图 1), 说明在红花注射液作用下, 部分 HSC-T6 细胞发生了凋亡。



M-100 bp DNA Ladder A-对照组
B~D-红花注射液 5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组
M-100 bp DNA Ladder A-control groups
B~D-Safflower Injection 5, 10, and 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ groups

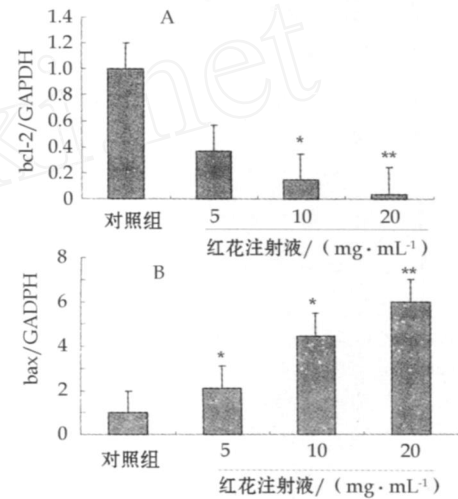
图 1 红花注射液作用后 HSC-T6 细胞的 DNA ladder

Fig. 1 DNA Ladder of HSC-T6 cells treated with Safflower Injection

2.4 红花注射液对细胞凋亡率的影响: 5、10、20 mg/mL 红花注射液作用于体外培养的活化的 HSC-T6 后, 经 Annexin V 和 PI 双染上流式细胞

仪检测, 结果表明药物作用后早期凋亡的细胞增多, 说明红花注射液有促进活化的 HSC-T6 早期凋亡的作用, 对照组凋亡率为 (0.73 $\pm$ 0.33) %, 红花注射液 5、10、20 mg/mL 组凋亡率分别为 (2.04 $\pm$ 0.58) %、(9.46 $\pm$ 1.29) %、(16.55 $\pm$ 1.27) %, 给药组与对照组比较, 差异显著 ($n=9$, $P < 0.01$), 表明红花注射液可诱导 HSC-T6 凋亡, 且随药物质量浓度增加, 凋亡率升高。

2.5 红花注射液干预 HSC-T6 细胞后 bcl-2 和 bax mRNA 表达水平差异: 结果表明, 经红花注射液 5、10、20 mg/mL 干预后, HSC-T6 细胞中 bcl-2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$, 0.01); bax mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$, 0.01), 见图 2。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 红花注射液对 HSC-T6 细胞 bcl-2 (A) 和 bax (B) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 2 Effect of Safflower Injection on mRNA expression of bcl-2 (A) and bax (B) of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

3 讨论

已有研究证实, HSC 是肝硬化时细胞外基质过多产生和沉积的主要来源细胞, 它的活化增殖是肝硬化形成的关键。因此, 抑制 HSC 的增殖是抗肝纤维化的重要策略之一, 阻断 HSC 的活化增殖、促进其凋亡可有效抑制肝纤维化的形成^[3,4]。

本实验研究了红花注射液对 HSC 活化增殖和增殖周期的影响。结果显示, 药物各剂量组吸光值均低于对照组, 其差异有显著性, 提示红花注射液能明显抑制 HSC 的增殖, 且抑制程度与药物剂量呈依赖关系, 但它抑制细胞增殖的哪一个环节尚不清楚。因此, 进一步进行了细胞周期的检测, 结果显

示,药物作用后 G_0/G_1 期 HSC-T6 不能向 M 期过度,造成 G_0/G_1 期细胞堆积。

诱导 HSC 的凋亡也是减少 HSC 数目的途径之一。本实验研究了红花注射液对活化的 HSC-T6 细胞凋亡的影响。研究发现药物干预后细胞出现 DNA 断裂,细胞膜出泡、内陷等细胞凋亡的典型特征。PI/Annexin V 双染色流式细胞仪测定结果表明红花注射液能诱导 HSC 凋亡,且作用呈剂量依赖性。Gong 等^[5,6]实验表明,HSC 与 MFB 对 Fas 诱导凋亡的不同表达是由于二者 bcl 基因家族的表达不同,静止的 HSC 强烈表达抗凋亡基因 bcl-2 和 bcl-xL,而活化的 HSC 的 bcl-2 和 bcl-xL 表达明显下降,且促凋亡基因 bax 的表达增加。(bcl-2 + bcl-xL)/bax 值下降,从而引起 Fas 诱导的凋亡发生^[7~9]。本实验结果发现红花注射液使 bcl-2/bax 值明显下降,说明其可通过下调抗凋亡基因 bcl-2 和上调促凋亡基因 bax 的表达来促进活化的 HSC-T6 的凋亡。

本实验结果对进一步研究红花用于肝纤维化治疗提供了基础实验依据。

参考文献:

- [1] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [2] Chen M H, Chen S H, Wang Q F, et al. The molecular mechanism of gypenosides-induced G1 growth arrest of rat hepatic stellate cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 309-317.
- [3] 刘 珺. 星状细胞活化及其作用研究进展 [J]. 中国医师杂志, 2008, 10(1): 140-142.
- [4] Watson M R, Wallace K, Gieling R, et al. NF- κ B is a critical regulator of the survival of rodent and human hepatic myofibroblasts [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(4): 589-597.
- [5] Gong W, Pecci A, Roth S, et al. Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic stellate cells to apoptosis induced by soluble Fas ligand [J]. *J Hepatol*, 1998, 28(2): 492-502.
- [6] Wang X Z, Zhang S J, Chen Y X, et al. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/ Fas2 ligand and bcl-2/ bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(18): 2706.
- [7] Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, et al. Expression of P53, Bax and bcl-2 proteins in hepatocytes in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(38): 6198.
- [8] Sánchez-Munoz D, Castellano-Megias V M, Romero-Gomez M. Expression of bcl-2 in ductular proliferation is related to periportal hepatic stellate cell activation and fibrosis progression in patients with autoimmune cholestasis [J]. *Digest Liver Dis*, 2007, 36: 262-266.
- [9] Park C, Moon D O, Rhu C H, et al. Beta-sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of bax/ bcl-2 ratio [J]. *Biol Pharm*, 2007, 30: 1317-1323.

姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究

谌 辉¹, 张景辉², 刘文琪^{3*}

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 传染科, 湖北 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 外科实验室, 湖北 武汉 430022; 3. 华中科技大学同济医学院 寄生虫学研究室, 湖北 武汉 430030)

摘 要:目的 探讨姜黄素抗血吸虫病肝纤维化的作用及可能机制。方法 小鼠随机分为 4 组:对照组、感染模型组、吡喹酮治疗组和姜黄素治疗组,除对照组外,各组建立血吸虫病肝纤维化小鼠动物模型,用实时荧光定量 PCR 反应观察小鼠肝组织过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) mRNA 的表达。应用 HE 染色,免疫组化法及多媒体病理图文定量分析,观察各组小鼠肝脏的病理改变及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1), α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 I、III 型胶原表达的变化。结果 姜黄素可显著减轻肝脏纤维组织增生。感染模型组及吡喹酮治疗组 PPAR γ mRNA 表达较对照组及姜黄素治疗组显著减弱 ($P < 0.05$);姜黄素治疗组 TGF- β_1 , α -SMA 及 I、III 型胶原水平均明显低于吡喹酮治疗组和感染模型组 ($P < 0.05$)。结论 姜黄素有明显的抗日本血吸虫病肝纤维化作用,其抗纤维化机制与其激活 PPAR γ 的表达、抑制肝星状细胞 (HSC) 表达 α -SMA 及分泌 TGF- β_1 并减少 I、III 型胶原的合成有密切关系。

关键词:姜黄素; 肝纤维化; 血吸虫病; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)08-1274-04

* 收稿日期:2008-10-27

作者简介:谌 辉(1972—),女,湖北省武汉市人,主治医师,博士,主要研究方向为慢性肝病及肝纤维化。

Tel: (027) 85726132 E-mail: chenhui0515@yahoo.com.cn