

肝、脾等摄取,循环时间短,因此无法进入脑内^[11];另一方面是鼻黏膜在解剖生理上与脑部存在着独特的联系,药物经鼻腔给予后可经嗅神经通路和嗅黏膜上皮通路绕过 BBB 直接进入脑内^[12]。结果表明 T-80-NT-I-PBCA-NP 鼻腔给药后透 BBB 入脑,其机制可能是聚山梨酯-80 包裹的纳米粒在体内与载脂蛋白 E 或 B 结合后与低密度脂蛋白受体作用,再经受体介导的内吞作用被脑毛细血管细胞吸收^[4],也可能经聚山梨酯-80 包裹 PBCA 纳米粒诱导的非特异性的 BBB 通透性的增加有关^[13],有待进一步研究。

脑微透析取样技术不会改变脑脊液总量,即不会影响实验动物的正常生理功能;同时,测定的是脑细胞外液中非结合药物浓度随时间的变化,对于具有脑靶向、脑内活性效应的药物的跨 BBB 研究,具有独特的优势。本实验运用该技术研究 PBCA 纳米粒载 NT-I 跨 BBB 的药动学特征,取得了预期的效果。

参考文献:

[1] Lu Q M, Meng Q X, Li D S, *et al.* Comparative study of three shortchain neurotoxins from the venom of *Naja kaouthia* (Yunnan, China) [J]. *J Nat Toxins*, 2002, 11(3): 221-229.
 [2] 程巧鸳, 朱文静, 李范珠. 鼻腔给药的生物利用度研究进展 [J]. *国外医学·药学分册*, 2004, 31(3): 168-172.
 [3] Kumara M, Misrab A, Babbar A K, *et al.* Intranasal nanoc-

mulson based brain targeting drug delivery system of risperidon [J]. *Int J Pharm*, 2008, 358(1-2): 285-291.
 [4] Kreuter J. Nanoparticle systems for brain delivery of drugs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 65-81.
 [5] Koziara J M, Lockman P R, Allen D D, *et al.* Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors [J]. *Contr Rel*, 2004, 99(2): 259-269.
 [6] Kreuter J, Alvautdin R N, Kharkevich D A, *et al.* Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles) [J]. *Brain Res*, 1995, 674(1): 171-174.
 [7] Fields H L, Heinricher M M. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system [J]. *Philos Trans R Soc Lond*, 1998, 30: 361-381.
 [8] Baqquer M A, Bechgaard E. The potential of nasal application for delivery to the central brain—a microdialysis study of fluorescein in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 21(2-3): 235-242.
 [9] Sullivan C O, Birkinshaw C. *In vitro* degradation of insulin-loaded poly (nbutylcyanoacrylate) nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(18): 4375-4382.
 [10] Das D, Lin S. Double-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticulate delivery systems for brain targeting of dalarigin via oral administration [J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94(6): 1343-1353.
 [11] Gal K P, Jiang X G. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2006, 310(1-2): 213-219.
 [12] Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(1): 1-18.
 [13] Olivier J C. Drug Transport to brain with targeted nanoparticles [J]. *Neuro Rx*, 2005, 2(1): 108-119.

槲皮素联合吡嗪酮对小鼠日本血吸虫病心肌组织即早基因与转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响

徐 标, 彭定凤*, 胡勇钧

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院, 湖北 武汉 430035)

摘要:目的 研究血吸虫肝硬化致心肌损害作用及其机制,探讨槲皮素对吡嗪酮杀虫治疗后血吸虫肝纤维化进一步发展及其致心肌损伤的抑制作用及其机制。方法 80 只小鼠随机分为 4 组。A、B、C 3 组小鼠感染日本血吸虫尾蚴, D 组小鼠为对照组。A、B、C 3 组小鼠感染尾蚴 8 周后, A 组小鼠以吡嗪酮 500 mg/kg 治疗 2 d; B 组小鼠以吡嗪酮 500 mg/kg 治疗 2 d 后继以槲皮素 30 mg/kg 治疗 8 周; C 组小鼠不作任何治疗(模型组)。D 组小鼠正常饲养。第 16 周末处死小鼠, 留取肝脏、心肌组织, 应用 HE 染色法、透射电镜、RT-PCR 及免疫组化染色法, 观察各组小鼠肝脏、心肌组织病理及心肌组织超微结构改变, 分析心肌组织中 c-fos mRNA、c-jun mRNA、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、I 和 III 型胶原的表达变化。结果 模型组、吡嗪酮组、吡嗪酮+槲皮素联合治疗组小鼠均存在不同程度心肌损伤。吡嗪酮治疗后肝纤维化及心肌损伤程度减轻, 心肌组织中 c-fos mRNA、c-jun mRNA、TGF- $\beta 1$ 、I 和 III 型胶原表达均明显低于模型组, 杀虫治疗后继以槲皮素治疗, 可进一步减轻肝纤维化及心肌损伤程度, 降低心肌组织中 c-fos mRNA、c-jun mRNA、TGF- $\beta 1$ 、I 和 III 型胶原表达, 但其表达仍高于对照组。结论 晚期血吸虫

收稿日期: 2009-01-09

作者简介: 徐 标(1979—), 男, 湖北省武汉市人, 内科学硕士, 住院医师, 从事肝脏疾病医疗、科研工作, 已发表论文 10 余篇。

Tel: (027) 65186827 E-mail: xubiao110@126.com

* 通讯作者 彭定凤 E-mail: pdf620630@yahoo.com.cn

病肝硬化可通过刺激心肌即早基因表达、促使 TGF- β 1 过度产生而致心肌重塑。抗肝纤维化治疗可减轻心肌重塑程度。槲皮素可通过减轻肝纤维化程度、抑制心肌即早基因表达,降低心肌 TGF- β 1 水平而发挥保护心肌作用。

关键词:槲皮素;日本血吸虫病;肝硬化;心肌损伤;即早基因;TGF- β 1

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)11-1763-07

Effect of quercetin combined with Praziquantel on expression of myocardial immediate early gene and transforming growth factor- β 1 in mice infected with *Schistosomiasis japonica*

XU Biao, PENG Ding-feng, HU Yong-jun

(Puai Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430035, China)

Abstract: Objective To study the effects and mechanisms of myocardial injury in schistosome-infected mice. To investigate the effects and mechanisms of quercetin on myocardial injury due to the development of hepatic fibrosis after being treated by Praziquantel. **Methods** Eighty mice were divided into four groups: group A, group B, group C, and group D. Group A, group B, and group C were infected with *Schistosoma japonicum* cercariae. After 8 weeks, group A was treated with Praziquantel 500 mg/kg for 2 d, group B was treated with quercetin 30 mg/(kg·d) for 8 weeks after being treated with Praziquantel 500 mg/kg for 2 d. Group C was taken as experimental control without any treatment. Group D was taken as normal control. At the week 16, all mice were sacrificed and a part of liver tissue and myocardium tissue were preserved. HE Staining, electric microscope, RT-PCR, and immunohistochemical technique were applied to observing the changes of hepatic and cardiac histopathology, myocardial ultrastructure, the expression of myocardial c-fos, c-jun mRNA, and the contents of myocardial transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), type I and type III collagen in mice infected with *S. japonicum* before and after treatments. **Results** There was different degree of myocardial injury among three groups of experimental control, Praziquantel treatment, Praziquantel combined with quercetin treatment. Praziquantel treatment relieved the degree of hepatic fibrosis and myocardial injury. The content of myocardial c-fos mRNA, c-jun mRNA, TGF- β 1, type I and type III collagen were obviously reduced compared to the experimental control. When Praziquantel treatment combined with quercetin, the degree of hepatic fibrosis and myocardial injury were further relieved. Although the content of myocardial c-fos mRNA, c-jun mRNA, TGF- β 1, type I and thype III collagen were still higher than those in normal control, those were reduced significantly compared to the group treated with Praziquantel. **Conclusion** Hepatic cirrhosis due to advanced schistosomiasis may lead to cardiac remodeling by stimulating the expression of immediate early gene and promoting the overexpression of TGF- β in myocardium. Anti-fibrosis therapy can reduce the degree of cardiac remodeling. Quercetin may protect myocardium through reducing the degree of hepatic fibrosis and inhibiting the expression of immediate early gene, which could decrease the level of myocardial TGF- β 1.

Key words: quercetin; *Schistosomiasis japonica*; hepatic cirrhosis; myocardium injury; immediate early gene; transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)

研究已证实,肝硬化时存在着以高心输出量、低血压和低外周血管阻力为特征的高动力循环。然而,尽管肝硬化时心输出量的基础水平是增高的,但在应激时(生理的或药理学的)却存在着心肌收缩功能的损害,表现为基础水平的高收缩性和应激时的低收缩性,这种现象即称作肝硬化心肌病^[1]。日本血吸虫病肝硬化可导致门静脉高压和高动力循环,但尚未见其导致心肌损害的研究报道。槲皮素是在许多植物中、多以苷的形式存在的黄酮类化合物,具有保护肝脏及心肌的作用^[2,3],前期研究表明槲皮素可降低血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏即早基因 c-fos、c-jun mRNA 及转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 表达而

发挥抗血吸虫病肝纤维化作用^[4],但未见其对血吸虫病肝硬化及其致心肌损伤作用的研究。本实验观察感染日本血吸虫病的小鼠经杀虫及槲皮素治疗前后肝组织、心肌组织病理改变以及心肌中 c-fos mRNA、c-jun mRNA、TGF- β 1 和 I、III 型胶原的表达变化,以评估和探讨血吸虫病肝硬化致心肌损害作用及其机制,以及槲皮素对杀虫治疗后肝纤维化进展致心肌损伤的抑制作用及其机制。

1 材料

1.1 实验药物:槲皮素为质量分数 99.4% 的原料药(提取自槐米),由成都超人植化开发有限公司提供(批号 041008)。吡喹酮原料药由同济医学院寄

生虫教研室提供(上海菱玉贸易有限公司,质量分数 99.17%,批号 0410031)。以上药物使用时以适量生理盐水配成悬浊液。

1.2 主要试剂及仪器:c-fos 引物(购于北京奥科公司,产物 382 bp):上游 5'-GGCTCTCCTGT-CAACACACA-3',下游 5'-CCGCTTGGAGTG-TATCTGTC-3'。c-jun 引物(购于北京奥科公司,产物 385 bp):上游 5'-CAGTCTGAAGCCGCAC-CTCC-3',下游 5'-TGGTCTGAGGTTGGCG-TAGACC-3'。β-肌动蛋白(β-actin)引物(内参照物,购于北京奥科公司,产物 246 bp):上游 5'-GT-GGGCCGGTGTAGGCACCA-3',下游 5'-GGTTG-GCCTTAGGGTTCAGG-3'。Trizol 试剂购于美国 GIBCOBRL 公司;琼脂糖购自华美生物工程公司;兔抗小鼠 I 型及 III 型胶原抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗小鼠 TGF-β1 抗体、SABC 试剂盒、包括正常山羊血清封闭液、生物素化山羊抗兔 IgG、SABC 试剂(链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)、抗原修复液、复合消化液、DAB 显色试剂盒等,均购自武汉博士德生物工程有限公司。BX40 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);PCR 仪(德国 EP-PENDORF 公司);BIO-RAD 电泳仪(美国 BioRad 公司);BIO-RAD 凝胶成像仪(美国 BioRad 公司)。

2 方法

2.1 小鼠血吸虫病心肌纤维化模型的建立及动物分组:清洁级昆明系小鼠 80 只(雄、雌性各 40 只),20~25 g,4~6 周龄(购自同济医学院动物实验中心),随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 20 只。A 吡喹酮组:每只小鼠感染日本血吸虫尾蚴 25 条(购自湖北省血吸虫病防治所,感染方法参考文献方法^[5](下同),感染尾蚴 8 周后用吡喹酮 ig 治疗 2 d,剂量为 500 mg/(kg·d),溶于生理盐水,1 mL/(只·d);B 吡喹酮+槲皮素组:感染尾蚴 8 周后用吡喹酮 ig 治疗 2 d,剂量为 500 mg/(kg·d),继以槲皮素 ig 治疗 8 周,剂量为 30 mg/(kg·d)(剂量参考文献方法^[6]),溶于生理盐水,1 mL/(只·d)。C 模型组:感染尾蚴 8 周后以生理盐水 ig 8 周,1 mL/(只·d);D 对照组:小鼠未感染血吸虫尾蚴,正常方法饲养 16 周,第 8 周至 16 周以生理盐水 ig 8 周,1 mL/(只·d)。第 16 周末 A、B、C、D 4 组小鼠存活动物分别为 12、17、10、20 只。第 16 周末以 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg ip 麻醉小鼠,分别取各组小鼠肝组织、左室心肌组织行组织病理学(HE 染色)、RT-PCR、免疫组化染色检测以及透射电镜观察。

2.2 小鼠肝组织、心肌组织片 HE 染色光镜检查:常规石蜡切片经 HE 染色后,光镜下观察各组小鼠肝组织和心肌组织的病理变化。

2.3 小鼠心肌组织透射电镜观察:小鼠麻醉后剪取 1 cm×1 cm×0.2 cm 左室心肌组织,行透射电镜(×3 150)观察各组小鼠心肌组织超微结构改变。

2.4 RT-PCR 检测心肌组织 c-fos、c-jun mRNA 表达:各组标本随机抽取 10 份样本(50 mg/份)。按 Trizol 说明书抽提心肌组织总 RNA,每份组织(50 mg)以无菌 5 号针头粉碎后加入 1 mL Trizol 试剂,置入匀浆器中匀浆,3 次×10 s,1.5 mL EP 管;每 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿摇 15 s,室温下放置 15 min;于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min;将上部水相转入新管,每 1 mL Trizol 试剂加入 0.5 mL 异丙醇沉淀 RNA,摇匀,样品置于室温下 10 min;于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min,凝胶样沉淀物为 RNA;吸去上清,加 1 mL 75% 乙醇来回倒置洗 RNA 1 次,随后于 4 °C、7 500 r/min 离心 5 min;吸去上清,晾干 RNA 沉淀,溶于 20 μL DEPC-H₂O(已用高压处理)中。在分光光度计下测 A₂₆₀/A₂₈₀ 值,计算 RNA 得率,调整 RNA 浓度。逆转录聚合酶链反应条件:50 °C,30 min(逆转录);94 °C,2 min(PCR 起始,灭活逆转录酶);94 °C,30 s;58 °C,30 s;72 °C,30 s;72 °C,10 min(PCR 循环)(34 循环)。在 100 V,35 mA 下,PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 50 min。电泳结果经电泳凝胶成像分析仪扫描成像。用 Multi-Analyst 软件包进行半定量分析。单位心肌组织的 c-fos 及 c-jun mRNA 相对量用 c-fos 及 c-jun 条带平均积光度与 β-actin 条带平均积光度比值表示。

2.5 免疫组化法检测心肌组织 TGF-β1 和 I、III 型胶原表达:各组标本随机抽取 10 份样本。染色方法采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法。免疫组化结果采用 MPZAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统,计算平均积分吸光度。

2.6 数据分析:免疫组化、RT-PCR 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SAS 软件行方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。

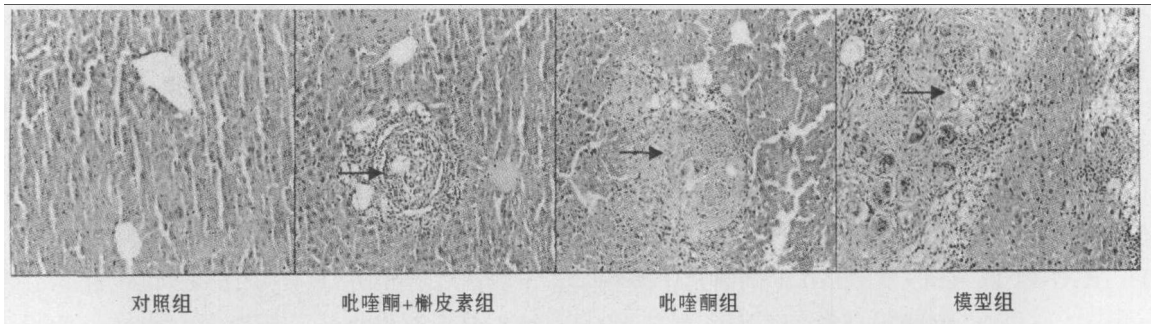
3 结果

3.1 肝组织病理变化:光镜下,对照组小鼠肝组织未见任何病变。模型组、吡喹酮组以及吡喹酮+槲皮素联合治疗组与对照组相比,肝组织病理学观察发现众多慢性虫卵肉芽肿,其虫卵周围包绕梭形细胞和胶原纤维,亦可见少部分急性虫卵肉芽肿,汇管

区有大量炎性细胞浸润;肉芽肿和小静脉周围的胶原纤维束向肝小叶周围延伸。在病变程度和病变范围上,吡喹酮组比模型组明显减轻;吡喹酮+槲皮素联合治疗组比吡喹酮组明显减轻。结果见图 1。

3.2 心肌组织病理变化:对照组心肌未见任何病变。模型组、吡喹酮组、吡喹酮+槲皮素联合治疗组

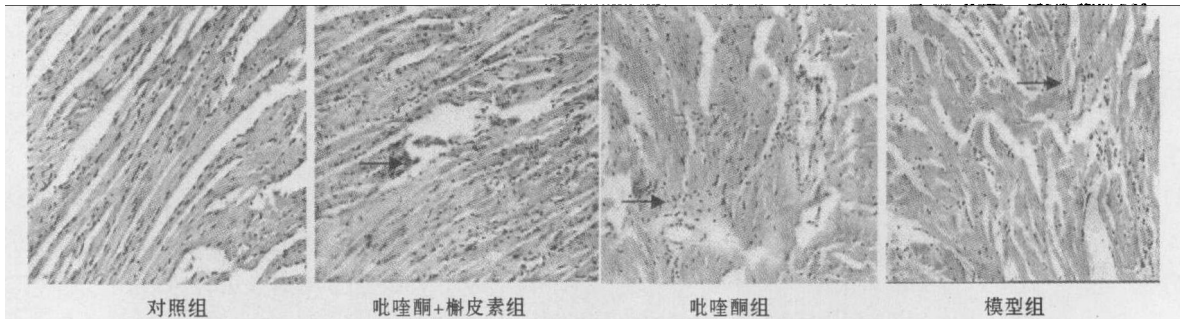
与对照组相比,心肌标本中可见部分心肌肥大、排列紊乱,并可见碎片状坏死,心肌及间质内可见纤维母细胞增生,局部间质纤维化;间质内血管扩张充血,血管周围炎性细胞浸润。在病变程度和病变范围上,吡喹酮组比模型组明显减轻;吡喹酮+槲皮素联合治疗组比吡喹酮组明显减轻。结果见图 2。



→ 示虫卵肉芽肿
→ shows worm egg granuloma

图 1 各组小鼠肝组织 HE 染色

Fig. 1 HE Staining of liver tissue in mice among every group



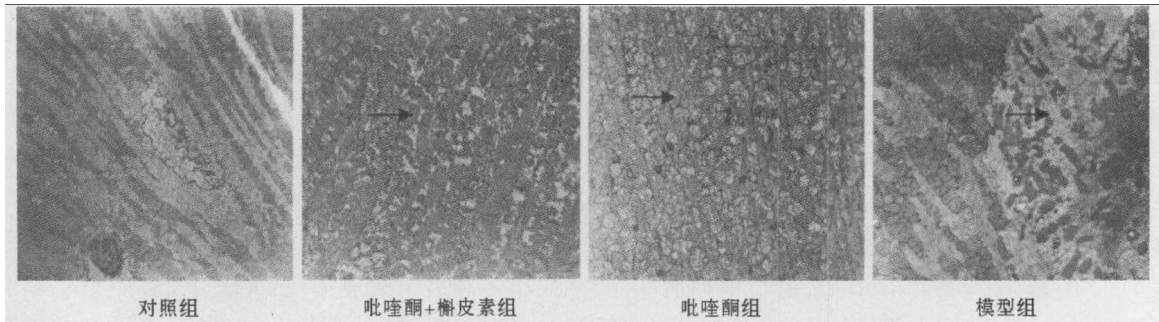
→ 示心肌肥大、排列紊乱及碎片状坏死、毛细血管周围炎性细胞浸润
→ shows myopachynsis and alinement disorder of myocardium as well as disorder inflammatory cell infiltrate around micrangium

图 2 各组小鼠心肌组织 HE 染色

Fig. 2 HE Staining of myocardium in mice among every group

3.3 心肌组织超微结构变化:对照组心肌未见任何病变。模型组心肌细胞内线粒体大量增生、肿胀,嵴分离、断裂,基质变浅,肌原纤维广泛溶解,肌丝排列紊乱。吡喹酮组心肌细胞内线粒体增生、肿胀,肌原纤维多处局灶性溶解,肌浆网扩张,糖原颗粒增多,

肌丝欠规则。吡喹酮+槲皮素联合治疗组心肌细胞内线粒体轻度增生、肿胀,肌原纤维局灶性溶解,肌丝略不规则。在病变程度和病变范围上,吡喹酮组比模型组明显减轻;吡喹酮+槲皮素联合治疗组比吡喹酮组明显减轻。结果见图 3。



→ 示线粒体增生、肿胀、肌原纤维溶解
→ shows hyperplasia and engorgement of mitochondria as well as myofibrillae fibrinolysis

图 3 各组小鼠心肌组织透射电镜观察

Fig. 3 Images of myocardium in mice among every group through transmission electron microscope

3.4 心肌组织中 c-fos、c-jun mRNA 的表达:各组小鼠 RT-PCR 光带吸光度强弱呈梯度变化。吡嗪酮组心肌组织中 c-fos mRNA、c-jun mRNA 表达比模型组显著下降。吡嗪酮+槲皮素联合治疗组与吡嗪酮组相比,c-fos mRNA、c-jun mRNA 表达进一步显著下降;但两者表达水平仍比对照组高。结果见表 1 及图 4 和 5。

表 1 各组小鼠心肌组织中 c-fos、c-jun mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Expression of myocardial c-fos and c-jun mRNA in mice among every group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	c-fos mRNA	c-jun mRNA
对照	-	0.110 5±0.031 8	0.103 2±0.031 4
模型	-	0.685 2±0.090 1**	0.805 1±0.091 6**
吡嗪酮+槲皮素	500+30	0.421 3±0.045 4▲▲	0.541 3±0.051 7▲▲
吡嗪酮	500	0.516 4±0.082 2△△	0.691 6±0.080 3△△

与对照组比较: ** P<0.01

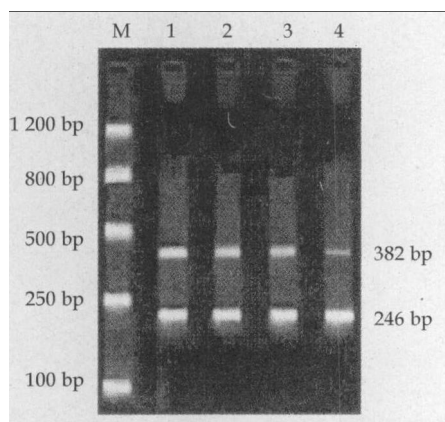
与模型组比较: △△ P<0.01

与吡嗪酮组比较: ▲▲ P<0.01

** P<0.01 vs control group

△△ P<0.01 vs model group

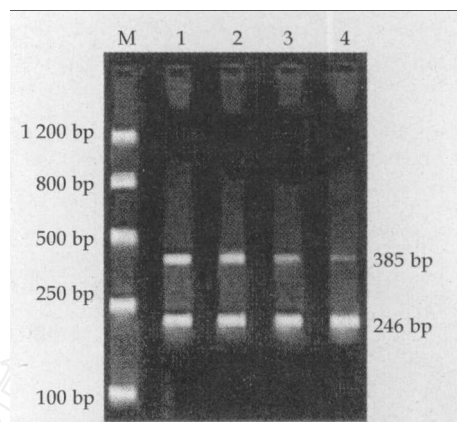
▲▲ P<0.01 vs Praziquantel group



M-标记 1-模型组 2-吡嗪酮组 3-吡嗪酮+槲皮素组 4-对照组
M-Marker 1-model group 2-Praziquantel group
3-Praziquantel and quercetin group 4-control group

图 4 各组小鼠肝组织中 c-fos mRNA 表达
Fig. 4 Expression of myocardial c-fos mRNA in mice among every group

3.5 心肌组织中 TGF-β1 量的变化:对照组心肌未见明显 TGF-β1 阳性着色。吡嗪酮组、模型组心肌组织内 TGF-β1 呈棕褐色,呈局灶性分布于心肌细胞内,部分散在分布于细胞间质。吡嗪酮+槲皮素联合治疗组心肌组织内 TGF-β1 分布区域同上,但着色少而浅。吡嗪酮组心肌组织内 TGF-β1 量比模型组显著下降;吡嗪酮+槲皮素联合治疗组与吡嗪酮组相比,TGF-β1 的量进一步明显下降,但其水平仍比对照组高。结果见表 2 及图 6。



M-标记 1-模型组 2-吡嗪酮组 3-吡嗪酮+槲皮素组 4-对照组
M-Marker 1-model group 2-Praziquantel group
3-Praziquantel and quercetin group 4-control group

图 5 各组小鼠肝组织中 c-jun mRNA 表达
Fig. 5 Expression of myocardial c-jun mRNA in mice among every group

3.6 心肌组织中 I、Ⅲ型胶原的变化:对照组心肌未见明显 I、Ⅲ型胶原阳性着色。吡嗪酮组、模型组心肌组织内 I、Ⅲ型胶原呈棕褐色,散在分布于细胞间质,亦有少量分布于心肌细胞内。吡嗪酮+槲皮素联合治疗组心肌组织内 I、Ⅲ型胶原分布区域同上,但着色少而浅。吡嗪酮心肌组织内 I、Ⅲ型胶原的量比模型组显著降低;吡嗪酮+槲皮素联合治疗组与吡嗪酮组相比,I、Ⅲ型胶原的量进一步显著下降,但其水平仍比对照组高。结果见表 2 及图 7。

表 2 各组小鼠心肌组织中 TGF-β1 与 I、Ⅲ型胶原表达 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Expression of myocardial TGF-β1, types I and III collagen in mice among every group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF-β1	I 型胶原	Ⅲ型胶原
对照	-	0.041 1±0.002 8	0.060 3±0.002 2	0.042 8±0.015 2
模型	-	0.220 9±0.023 6**	0.204 6±0.025 1**	0.183 1±0.021 5**
吡嗪酮+槲皮素	500+30	0.113 6±0.031 2▲▲	0.125 3±0.022 5▲▲	0.102 1±0.020 4▲▲
吡嗪酮	500	0.157 8±0.032 1△△	0.170 3±0.023 1△△	0.153 5±0.022 6△

与对照组比较: ** P<0.01

与模型组比较: △ P<0.05 △△ P<0.01

与吡嗪酮组比较: ▲▲ P<0.01

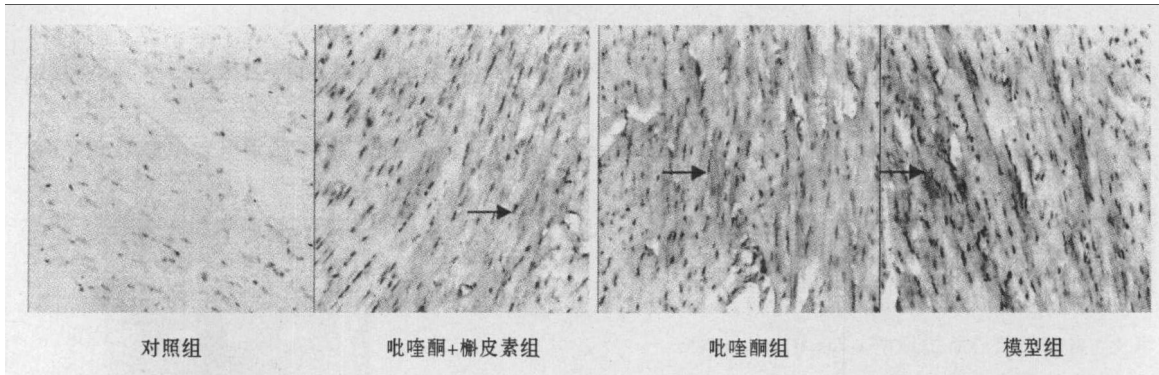
** P<0.01 vs control group

△ P<0.05 △△ P<0.01 vs model group

▲▲ P<0.01 vs Praziquantel group

4 讨论

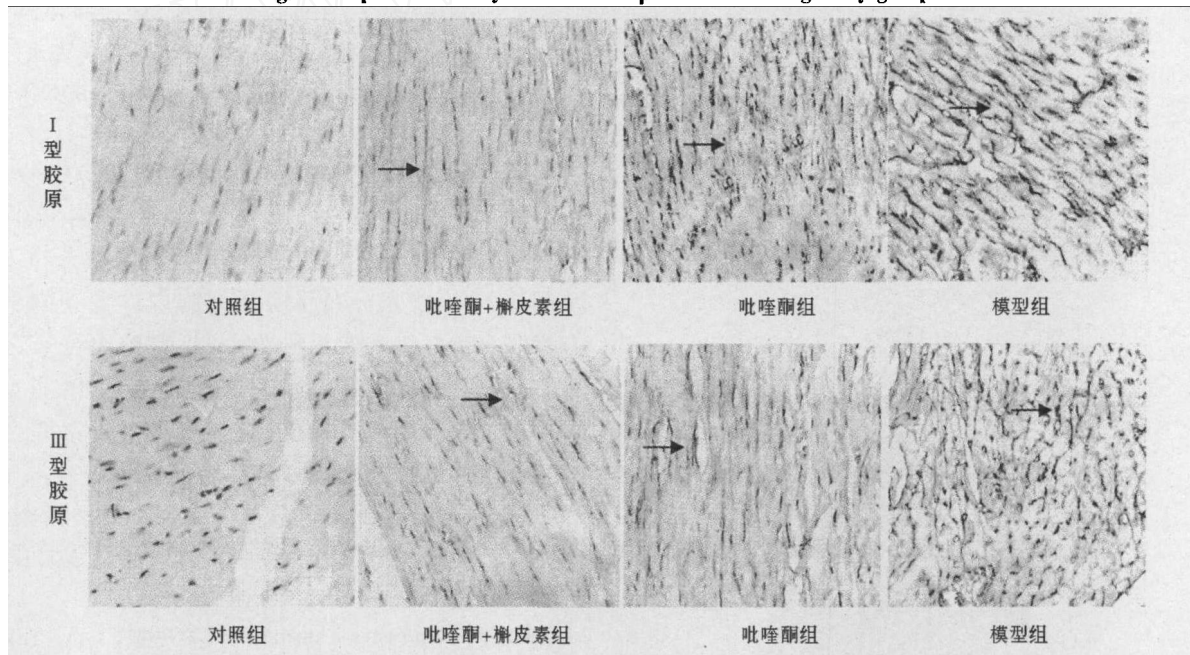
临床研究表明,许多肝硬化患者存在心脏结构和功能的异常,其表现为心脏收缩及舒张功能不全、心房与心室内径扩大。因此临床上提出一个新病种—肝硬化性心肌病。许多研究提示,肝硬化性心肌病的心脏功能不全与心肌硬化的病因无关,而与



→ 示 TGF-β1 表达
 → shows expression of TGF-β1

图 6 各组小鼠心肌组织 TGF-β1 的表达

Fig. 6 Expression of myocardial TGF-β1 in mice among every group



→ 示胶原表达
 → shows expression of collagen

图 7 各组小鼠心肌组织 I、III 型胶原的表达

Fig. 7 Expression of myocardial types I and III collagen in mice among every group

其 Child 分级和体内交感神经的兴奋程度有关。晚期肝硬化患者体内交感神经系统和肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS 系统) 过度激活, 醛固酮表达增高, 同时肝硬化患者门体分流和心肌功能不全导致对某些活性物质的灭活下降以及某些毒素的作用, 均可成为心肌硬化性心肌病的发病因素。

本实验研究发现, 晚期血吸虫肝硬化小鼠心肌存在明显病变, 其主要表现为心肌细胞肥大及间质纤维增生, 即出现心室重塑。心脏重塑是一系列复杂的分子和细胞机制导致心肌结构、功能和表型的变化。心脏重塑不仅表现为心肌细胞的凋亡、坏死、肥大、延长和心肌肥厚, 还表现为心肌间质纤维胶原

合成和降解之间动态平衡的破坏。当心肌间质胶原增多或减少时, 会引起心室重构和心肌纤维化, 最终导致功能障碍。正常状态下心肌间质胶原的降解与生成速度几乎相等, 以保持胶原水平的稳定, 一旦二者之间的平衡失调, 即导致心肌间质病变的产生。

各种炎性细胞因子、脂质过氧化物等均能通过细胞内信号传导途径激活即早基因 c-fos 和 c-jun^[7], 其表达产物 Fos 蛋白与 Jun 蛋白可形成同源或异源二聚体的转录激活蛋白 1 (activator protein-1, AP-1)。Fos 蛋白与 Jun 蛋白 C 末段活化区磷酸化后使 AP-1 具有转录因子活性, 刺激核内其他细胞与增殖有关基因的转录。晚期血吸虫肝硬化时患者门静脉高压症及腹水表现突出, 体内存在门-体分流和

RAAS 系统过度激活,血管紧张素 II、醛固酮表达水平升高,而血管紧张素 II 又可刺激心脏成纤维细胞内即早基因 (c-fos、c-jun 基因) 表达,加速 AP-1 合成^[8]。TGF- β 1 基因启动子区域存在 AP-1 结合位点,c-fos 及 c-jun 基因表达上调后,AP-1 DNA 结合活性增高,可加速 TGF- β 1 的转录及翻译^[9],因而即早基因的过度表达可促使心脏成纤维细胞产生大量 TGF- β 1,从而对心肌细胞产生多种作用。实验证实,TGF- β 1 在心脏重塑中起重要作用。TGF- β 1 可诱导心脏 I 型、III 型胶原产生和分泌,而且调节 MMPs (matrix metalloproteinases, 基质金属蛋白酶)/TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase, 金属蛋白酶组织抑制剂) 的相互作用,使间质胶原酶表达减少、活性降低,TIMPs 水平增加、抑制作用增强^[10]。此外,TGF- β 1 促进心脏成纤维细胞向肌性成纤维细胞分化^[11]。

本研究结果显示,模型组小鼠心肌组织间质 I 型、III 型胶原的量随 TGF- β 1 表达增多而明显增强,经吡嗪酮治疗后肝脏、心肌组织病理损伤明显减轻,心肌组织中即早基因、TGF- β 1 及 I 型、III 型胶原表达水平亦显著下降。此可能为杀虫治疗后小鼠肝组织病理损伤减轻,门静脉高压、门体分流对 RAAS 系统的过度激活作用减弱,由此减少心肌组织中即早基因、TGF- β 1 表达,从而间接减轻心肌病变程度。加以槲皮素治疗后,可进一步减轻肝组织病理损伤程度,从而降低心肌组织中即早基因、TGF- β 1 及 I 型、III 型胶原表达水平。研究表明,槲皮素能抑制 TGF- β 1 对肝星状细胞的促增殖作用,对肝纤维化有抑制作用^[12]。此外,槲皮素可通过增强心肌抗氧化损伤能力,减轻钙超载而减轻缺血造成的心肌组织损伤^[13]。因而推测槲皮素可通过进一步减轻肝纤维化程度或直接保护心肌作用而抑制心肌组织即早基因、TGF- β 1 的过度表达,产生更强的抗心室重塑作用。

总之,血吸虫肝硬化小鼠可发生心肌重塑,即使经早期杀虫治疗,血吸虫肝纤维化仍可继续进展导致肝硬化形成,从而进一步导致心肌损伤。槲皮素

作为一种纯天然药物,可显著抑制杀虫治疗后小鼠血吸虫肝纤维化的进展,减轻心肌损伤。随着其作用机制研究的不断深入,将可能成功应用于肝纤维及其并发症的治疗。

参考文献:

- [1] Alqahtani S A, Fouad T R, Lee S S. Cirrhotic cardiomyopathy [J]. *Semin Liver Dis*, 2008, 28(1): 59-69.
- [2] Amalia P M, Poss M N, Auguto M C, et al. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(10): 2616-2621.
- [3] Pei T X, Xu C K, Li B, et al. Protective effect of quercetin against adriamycin-induced cardiotoxicity and its mechanism in mice [J]. *Acta Pharm Sin*, 2007, 42(10): 1029-1033.
- [4] 徐 标, 韩春荣. 槲皮素对血吸虫肝纤维化小鼠肝组织 c-fos、c-jun mRNA 和转化生长因子 β 1 表达的抑制作用 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 393-398.
- [5] 魏 屏, 罗端德, 熊莉娟, 等. 小鼠感染日本血吸虫后肝组织 Bcl-2、Bax 的表达及己酮可可碱对它的作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(6): 441-443.
- [6] Lee E S, Lee H E, Shin J Y, et al. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(8): 1169-1174.
- [7] Wu X, Lu Z, Chen J, et al. Hepatic c-fos expression is independent of oxidative stress and inflammation induced by acute cadmium exposure in rats [J]. *Ann Nutr Metab*, 2007, 51(3): 258-263.
- [8] Chen K, Chen J, Li D, et al. Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts: modulation by PPAR-gamma ligand pioglitazone [J]. *Hypertension*, 2004, 44(5): 655-661.
- [9] Jiang T, Qu J J, Nishinaka T, et al. Transcription factor AP-1 regulates TGF-beta (1)-induced expression of aldose reductase in cultured human mesangial cells [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2008, 13(3): 212-217.
- [10] Seeland U, Selejan S, Engelhardt S, et al. Interstitial remodeling in beta1-adrenergic receptor transgenic mice [J]. *Basic Res Cardiol*, 2007, 102(2): 183-193.
- [11] Petrov V V, Van Plet J F, Vermeesch J R, et al. TGF-beta1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(7): 1480-1494.
- [12] 毛咏秋, 刘小菁, 姜 愚, 等. 槲皮素对活化大鼠肝星状细胞 TGF- β 1 信号的影响 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(6): 802-805.
- [13] 曹文军, 陈瑞芬, 刘国贞. 槲皮素对缺血再灌注大鼠心肌损伤的保护作用 [J]. 首都医科大学学报, 2004, 25(3): 311-313.