

# 龙血素对肝星状细胞的影响

李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 高建梅, 沈涛

李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 云南省第一人民医院 昆明理工大学附属昆华医院消化内科 云南省昆明市 650032  
高建梅, 沈涛, 云南省第一人民医院 昆明理工大学附属昆华医院基础医学研究所 云南省昆明市 650032  
李玉莲, 主要从事消化内科的相关研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30960454/C180108  
云南省科技计划应用基础计划基金资助项目, No. 2008ZC084M  
作者贡献分布: 课题由范红, 宋正己, 彭伟及李玉莲共同设计, 研究过程由宋正己与李玉莲操作完成实验测试及分析工具由高建梅与沈涛提供, 数据分析有范红, 宋正己及李玉莲共同完成。  
通讯作者: 范红, 教授, 650032, 云南省昆明市金碧路157号, 云南省第一人民医院消化科, ynfanhong@163.com  
收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2012-12-28  
接受日期: 2012-12-28 在线出版日期: 2013-01-08

## Influence of treatment with loureirin on rat hepatic stellate cells *in vitro*

Yu-Lian Li, Zheng-Ji Song, Hong Fang, Wei Peng, Jian-Mei Gao, Tao Shen

Yu-Lian Li, Zheng-Ji Song, Hong Fang, Wei Peng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Technological University, Kunming 650032, Yunnan Province, China  
Jian-Mei Gao, Tao Shen, Institute of Basic Medicine, the Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Technological University, Kunming 650032, Yunnan Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30960454/C180108; and the Science and Technology Application Project of Yunnan Province, No. 2008ZC084M  
Correspondence to: Hong Fang, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Technological University, Kunming 650032, Yunnan Province, China. ynfanhong@163.com  
Received: 2012-11-14 Revised: 2012-12-28  
Accepted: 2012-12-28 Published online: 2013-01-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of treatment with loureirin A/B on rat hepatic stellate cells (HSCs) *in vitro*.

**METHODS:** HSC-T6 cells were cultured in 96-well plates for 24 h and then incubated with different concentrations of loureirin A/B for 48 h. MTT assay was used to assess the proliferation of HSCs. The contents of hyaluronic acid, laminin and collagen type IV in culture supernatants were measured by radioimmunoassay. The

mRNA expression of blood vessel endothelium (VEGF<sub>165</sub>) and histoplasma tissue inhibitory factor (HIF-1) was detected by real-time fluorescence quantitative PCR.

**RESULTS:** The half maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of loureirin A/B were 0.3 and 0.1 µg/µL, respectively. Treatment with loureirin A/B significantly inhibited HSC proliferation, the secretion of hyaluronic acid, laminin and collagen type IV (31.1 ± 4.32 vs 43.05 ± 4.96, 441.28 ± 25.38 vs 302.98 ± 29.59, 17.96 ± 3.00 vs 25.23 ± 4.96, all *P* < 0.05), and the mRNA expression of VEGF<sub>165</sub> and HIF-1. The effects of loureirin B were stronger than those of loureirin A.

**CONCLUSION:** Treatment with loureirin A/B could significantly inhibit the proliferation of HSCs, the secretion of hyaluronic acid, laminin and collagen type IV, and the mRNA expression of VEGF<sub>165</sub> and HIF-1, and the effects of loureirin B were stronger than those of loureirin A.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Hepatic stellate cells; Extracellular matrix; Loureirin; VEGF<sub>165</sub>; HIF-1

Li YL, Song ZJ, Fang H, Peng W, Gao JM, Shen T. Influence of treatment with loureirin on rat hepatic stellate cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 87-92

## 摘要

**目的:** 观察龙血素A/B对肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)增殖及各种物质表达的影响。

**方法:** 将HSC分为3组: 空白对照组、细胞对照组、药物干预组。用MTT法观察龙血素A/B对HSC-T6增殖的影响, 并检测细胞上清中透明质酸酶(hyaluronidase, HA)、层粘连蛋白(hyaluronidase, LN)、IV型胶原(collagen type IV, IV-C)的含量。采用Real time-PCR检测HSC经龙血素A/B处理前后血管内皮生长因子(blood vessel endothelium, VEGF<sub>165</sub>)和低氧诱导因子(histoplasma tissue inhibitory factor,

## ■背景资料

龙血素B是龙血竭黄酮的主要成分, 主要分布于血流量大的脏器, 如肝脏、肾脏等。多种黄酮类化合物被证实具有明显的防治肝纤维化的作用。龙血竭能有效地减轻肺纤维化大鼠肺组织的纤维化程度, 龙血素B还能对硫代乙酰胺诱导的大鼠肝纤维化有一定的预防和治疗作用。

## ■同行评议者

管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验医学教研室

## ■ 研究前沿

近年研究发现,肝星状细胞(HSC)活化同时伴有的内皮细胞活化和新生血管形成是进展性肝纤维化间质重建中最突出的病理特征,在肝纤维化病理生理中起重要作用。也有研究表明龙血竭对硫代乙酰胺诱导的肝纤维化有一定的预防和治疗作用。

HIF-1)mRNA表达的影响。

**结果:** HSC的抑制率均随龙血素A/B的浓度增高而增高,且龙血素A的 $IC_{50}$ 约为 $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,龙血素B的 $IC_{50}$ 约为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ;与正常对照组相比,药物干预组的HA、LN、IV-C含量降低( $31.10 \pm 4.32$  vs  $43.05 \pm 4.96$ ,  $441.28 \pm 25.38$  vs  $302.98 \pm 29.59$ ,  $17.96 \pm 3.00$  vs  $25.23 \pm 4.96$ , 均  $P < 0.05$ ); VEGF和HIF-1  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值明显降低,且龙血素B组较龙血素A明显。

**结论:** 龙血素A/B均可抑制HSC的增值,龙血素A抑制较龙血素B明显;其还可下调HSC中HA、LN、IV-C及VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达,龙血素B较龙血素A下调效果明显。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 肝星状细胞; 龙血素; 血管内皮生长因子; 低氧诱导因子

李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 高建梅, 沈涛. 龙血素对肝星状细胞的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 87-92  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/87.asp>

## 0 引言

肝纤维化是肝组织慢性损伤后反复的愈合修复和间质重塑过程,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化和表型改变是肝纤维化的中心事件,活化HSC增殖、细胞迁移、收缩性增加,并产生过量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)聚集于Disse间隙,引起窦毛细血管内皮窗孔关闭,血窦内压力增加,肝细胞营养障碍<sup>[1]</sup>。近年研究发现, HSC活化同时伴有的内皮细胞(endothelial cell, EC)活化和新生血管形成是进展性肝纤维化间质重建中最突出的病理特征,在肝纤维化病理生理中起重要作用<sup>[2-4]</sup>。前期试验也表明龙血竭对硫代乙酰胺诱导的肝纤维化有一定的预防和治疗作用。本实验在此基础上,通过研究传统中药龙血竭主要成分龙血素A/B对HSC生长、分泌,及其中血管内皮生长因子(blood vessel endothelium, VEGF<sub>165</sub>)和低氧诱导因子(histoplasma tissue inhibitory factor, HIF-1) mRNA表达的影响,初步探讨龙血竭改善纤维化的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HSC-T6 细胞系购自中国科学院昆明细胞库。龙血素A/B中药化学对照品,中国药品生

物制品检定所(用甲醇配成 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的原液,  $4^\circ\text{C}$ 储存); DMEM高糖培养液、PBS缓冲液,均购自北京海克隆;新西兰新生牛血清购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素溶液、0.25%胰蛋白酶溶液均购自Bioind公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自sigma公司(用前配成0.5%贮存液微孔滤膜( $0.22 \mu\text{m}$ )过滤后,  $-20^\circ\text{C}$ 储存备用); SW-CJ-2F标准型净化工作台(吴江市绿岛净化设备厂);倒置显微镜(Olympus, BX60);美国Thermo Scientific Forma series II水套 $\text{CO}_2$ 培养箱;细胞基因组总RAN提取试剂盒(离心柱型)、Fermentas K1622逆转录试剂盒、 $2 \times \text{Taq PCR Mastermix}$ ; SYBR Green II (宝生物)、琼脂糖、DNA分子标准Marker, TBE缓冲液。

## 1.2 方法

**1.2.1 MTT法测定龙血素对HSC增殖的影响:** (1)细胞的复苏:细胞自液氮中取出,立即放入 $37^\circ\text{C}$ 水中快速溶化,离心 $1000 \text{ r/min}$ ,  $5 \text{ min}$ ,移去上清液后,加入含10%小牛血清的DMEM高糖培养液,移入 $25 \text{ cm}^2$ 培养瓶,放入 $37^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mL/L CO}_2$ 的培养箱中培养。记录复苏日期,次日换液。当细胞铺满整个培养瓶80%-90%后,0.25%胰蛋白酶消化约30 s,传代培养; (2)MTT比色法检测HSC的增殖:复苏后至少传代培养一代,将处于对数生长期的HSC用含10%小牛血清的DMEM高糖培养液配成 $1 \times 10^5$ 细胞悬液,接种于96孔板,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。将培养的HSC分为3组:空白对照组、细胞对照组、甲醇组(排除甲醇对细胞的影响);药物干预组。各组干预情况见表1。置于 $37^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、 $50 \text{ mL/L CO}_2$ 培养箱内培养,24 h后将不同浓度的药物(设0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、 $0.025 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 6个药物终浓度)加入药物干预组培养孔,各浓度均设5个复孔。48 h后每孔加0.5%MTT贮存液 $20 \mu\text{L}$ ,继续孵育4 h后弃上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) $150 \mu\text{L}$ 溶解细胞内结晶,微型振荡器震荡10 min后,用全自动酶标仪在490 nm波长处比色法测定各孔A值,测得的各复孔A值取平均数。抑制率(IE) = (对照孔 $A_{490}$  - 实验孔 $A_{490}$  / 对照孔 $A_{490}$ )  $\times 100\%$ 。观察药物对细胞生长的影响。

**1.2.2 Real-time PCR:** (1)总RNA提取:将处于对数生长期的HSC-T6用配成 $2 \times 10^5$ 细胞悬液,接种于6孔板,每孔2 mL。将培养的HSC分为2组:正常对照组、药物干预组。24 h后正常对照组加入培养液,药物干预组加入含龙血素A/B的培养液各 $200 \mu\text{L}$ ,药物终浓度龙血素A为 $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

表 1 各组细胞干预情况

| 分组          | 干预情况  |
|-------------|---|
| 空白对照组       | 100 $\mu$ L 培养基, 24 h后加入培养基100 $\mu$ L  |
| 细胞组         | 100 $\mu$ L $1 \times 10^5$ 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加入培养基100 $\mu$ L   |
| 甲醛组         | 100 $\mu$ L $1 \times 10^5$ 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加入加含不同浓度(1/25; 1/100; 1/500)甲醛培养基100 $\mu$ L                                     |
| 药物干预组(龙血素A) | 100 $\mu$ L $1 \times 10^5$ 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加含不同浓度龙血素A(设0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 $\mu$ g/ $\mu$ L, 6个药物终浓度)的培养基100 $\mu$ L |
| 药物干预组(龙血素B) | 100 $\mu$ L $1 \times 10^5$ 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加含不同浓度龙血素B的培养基100 $\mu$ L  |

表 2 PCR扩增引物系列

| 目的基因                | 引物序列   | 退火温度( $^{\circ}$ C) | 产物长度(bp) |
|---------------------|--|---------------------|----------|
| 内参基(GAPDH)          | F: 5'-CTCCCATTCCTCCACCTTTG-3'<br>R: 3'-ATGAGGTCCACCACCCTGTT-5'     | 59                  | 110      |
| VEGF <sub>165</sub> | F: 5'-CCGCAGACGTGTAAATGTTCC-3'<br>R: 3'-GACGGTGACGATGGTGGTGT-5'    | 62                  | 207      |
| HIF-1               | F: 5'-CAGTTACAGGATTCCAGCAGAC-3'<br>R: 3'-TACTTGGGTAGAAGGTGGAGAT-5' | 63                  | 152      |

龙血素B为0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L. 各浓度均设5个复孔. 细胞培养48 h后, 取上清每孔800, 放免发检测细胞上清中HA、LN、IV-C的含量. 剩余上清弃去, PBS洗两遍后, 按细胞基因组RNA提取试剂盒说明提取总RNA, 微量核酸蛋白分析仪测定总RNA浓度和纯度, -80  $^{\circ}$ C保存备用; (2)单链DNA(cDNA)合成: 取1  $\mu$ g总RNA进行逆转录, 反应体系20  $\mu$ L: 其中总RNA 3  $\mu$ L, oligo(dt)18 primer 1、DEPC-treat water 8、5 $\times$  Reaction Buffer 4、Ribolock RNase inhibitor 1、10Mm dNTP Mix 2、RevertAid M-MuLV Reverse transcriptase 1  $\mu$ L. 反应条件: 42  $^{\circ}$ C 60 min, 72  $^{\circ}$ C 5 min; (3)引物特异性检测: 取cDNA进行常规PCR反应. 引物用BLAST软件进行在线核实其特异性后由中美泰和生物技术有限公司合成(表2). 反应体系20  $\mu$ L: 2 $\times$  Taq PCR Master mix 5  $\mu$ L, 上、下游引物各1  $\mu$ L, 模板DNA 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 1  $\mu$ L. 阴性对照管中模板cDNA用ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L代替. 反应条件: 94  $^{\circ}$ C预变性3 min, 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 内参基(GAPDH)59  $^{\circ}$ C、VEGF<sub>165</sub> 62  $^{\circ}$ C、HIF-1 63  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 循环40次, 72  $^{\circ}$ C后延伸3 min, -4  $^{\circ}$ C保存. 取PCR反应产物5  $\mu$ L与溴酚蓝2  $\mu$ L混匀上样, 在1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 电泳在1 $\times$ TBE缓冲液中进行, 电压100 V, 时间45 min, 电泳结束后用凝胶成像分析系统摄像; (4)Real-time PCR: 将逆转录的到的cDNA原液按1、1 $\times$ 10<sup>-1</sup>、1 $\times$ 10<sup>-2</sup>、1 $\times$ 10<sup>-3</sup>梯度稀释后, 各取2  $\mu$ L稀

释好的cDNA进行RT-PCR反应, 检测发现目的基因的扩增效率和管家基因的扩增效率一致, 可应用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>方法进行相对定量. 采用SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> II试剂盒, 在罗氏LightCycler<sup>®</sup>480荧光定量系统上进行检测, 反应条件如下: 荧光染料5  $\mu$ L, 上、下游引物各0.75  $\mu$ L, 模板DNA取2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 1.5  $\mu$ L, 反应体积为10  $\mu$ L. 反应条件: 95  $^{\circ}$ C预变性3 min, 95  $^{\circ}$ C变性10 s, 均为63  $^{\circ}$ C退火20 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 循环40次, 72  $^{\circ}$ C后延伸3 min. 反应完毕后根据溶解曲线分析PCR产物的特异性, 并由LightCycler PCR仪分析定量结果, 以达到阈值的最低循环数(Ct值)计算样本中mRNA拷贝数相对量. 每个样本的Ct值由目的基因和管家基因决定, 即 $\Delta$ Ct(目的基因) = Ct(目的基因)-Ct(管家基因),  $\Delta\Delta$ Ct(目的基因) =  $\Delta$ Ct(目的基因)- $\Delta$ Ct(标准值). 样品中目的基因的相对拷贝量为2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>. 记录各组Ct值, 通过2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>, 计算各组细胞VEGF<sub>165</sub>和HIF-1的mRNA表达水平.

**统计学处理** 数据用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS17.0统计分析软件的配对 $t$ 检验比较,  $P<0.05$ 表示差别有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 龙血素A/B对HSC-T6增值的影响** IC<sub>50</sub>在凋亡方面, 是指一定浓度的某种药物诱导细胞凋亡50%, 该浓度称为50%抑制浓度, 即凋亡细胞与全部细胞数之比等于50%时所对应的浓度, 可

### ■创新盘点

本实验通过MTT法检测龙血素A/B对肝星状细胞生长的抑制作用, 表明: 龙血素A/B均可抑制HSC增值及活化, 且龙血竭主要成分龙血素B的抑制作用较龙血素A明显, 龙血素B对HSC的抑制可能成为临床抗肝纤维化的新途径.



### ■应用要点

龙血素A/B均可抑制HSC的增值并降低其细胞上清中纤维化标志物的含量,还可下调HSC中VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达,且龙血素B的效果较龙血素A明显。以上作用可能与龙血竭胶囊抑制肝纤维化过程中微血管的新生并延缓肝纤维化有关。

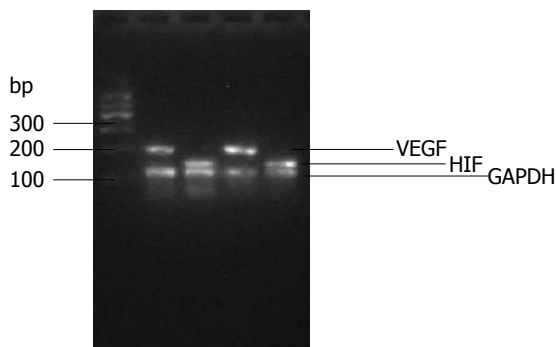


图1 引物特异性检测结果。

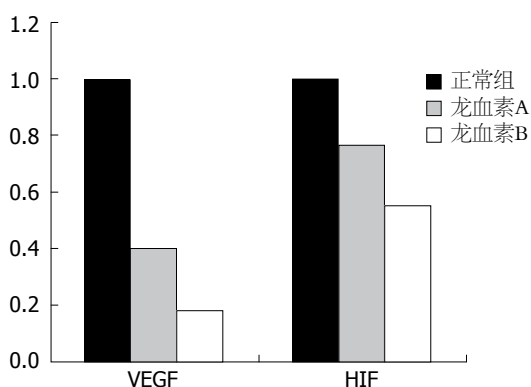


图2 龙血素A/B对肝星状细胞中VEGF及HIF的影响。VEGF: 血管内皮生长因子; HIF: 低氧诱导因子。

以用来衡量药物诱导凋亡的能力,即诱导能力越强,该数值越低,也可以反向说明某种细胞对药物的耐受程度。实验表明龙血素A/B均可抑制HSC的增值,排外甲醇对细胞的影响,抑制率均随药物浓度增高而增高,IC<sub>50</sub>龙血素A为0.3 μg/μL,龙血素B为0.1 μg/μL,龙血素B抑制效果较龙血素A明显(表3)。

**2.2 龙血素A/B对HSC-T6细胞上清中HA、LN、IV-C含量的影响** 龙血素A/B处理细胞后可不同程度抑制HSC分泌透明质酸、层粘连蛋白和IV胶原,且龙血素B的抑制效果优于龙血素A(表4)。

**2.3 龙血素A/B对HSC VEGF和HIF-1 mRNA表达的影响** 用1.5%琼脂糖凝胶电泳分析各组常规PCR产物,以Marker为标准。可见常规PCR产物均显示特异性条带,与预期的DNA片段长度相吻合(图1)。药物干预后,通过2<sup>-ΔΔCt</sup>,计算各组HSC VEGF及HIF mRNA表达水平。与正常对照组相比,龙血素A/B均能降低VEGF和HIF-1的2<sup>-ΔΔCt</sup>值,龙血素B的抑制效果较龙血素A明显,具有统计学意义(P<0.001,图2)。

### 3 讨论

“龙血竭”具有活血、化瘀、止血、补血的功

表3 甲醇对细胞增殖的影响 (n = 5, mean ± SD)

| 甲醇比例  | A值                         | 抑制率(%) |
|-------|----------------------------|--------|
| 0     | 0.572 ± 0.027              | 0.0    |
| 1/25  | 0.565 ± 0.025 <sup>a</sup> | 1.2    |
| 1/100 | 0.569 ± 0.022 <sup>a</sup> | 0.5    |
| 1/500 | 0.567 ± 0.061 <sup>a</sup> | 0.8    |

<sup>a</sup>P<0.05 vs 0(正常对照组)。

效,被誉为“活血圣药”<sup>[5]</sup>。其主要化学成分和生理活性成分是酚类化合物<sup>[6]</sup>,主要为总黄酮,龙血素A、龙血素B是龙血竭黄酮的主要成分,主要分布于血流量大的脏器,如肝脏、肾脏等<sup>[7]</sup>。多种黄酮类化合物被证实具有明显的防治肝纤维化的作用<sup>[8]</sup>。龙血竭能有效地减轻肺纤维化大鼠肺组织的纤维化程度<sup>[9]</sup>,龙血素B还能对硫代乙酰胺诱导的大鼠肝纤维化有一定的预防和治疗作用<sup>[10]</sup>。龙血素A对局灶性脑缺血再灌注引起的损伤具有一定的保护作用<sup>[11]</sup>。但其具体机制尚不明确。

HSC是肝组织内的窦周细胞,其激活是肝纤维化发生、发展的中心环节和共同通路,他的活化表型或肌成纤维样细胞表型在调控间质血管生成方面起着积极作用<sup>[12]</sup>,而间质血管的改建与肝纤维化进展关系密切。活化的HSC在慢性肝损伤时分泌VEGF、转化生长因子β、血小板衍生生长因子等多种细胞因子,他们能同时促进星状细胞活化和血管生成。抑制HSC的活化或促进其凋亡,及减少其分泌的促微血管新生的细胞因子,能改善肝纤维化的发展。本实验通过MTT法检测龙血素A/B对肝星状细胞生长的抑制作用,表明:龙血素A/B均可抑制HSC增值及活化,且龙血竭主要成分龙血素B的抑制作用较龙血素A明显,龙血素B对HSC的抑制可能成为临床抗肝纤维化的新途径。

HA由间质细胞合成HSC是肝脏间质细胞的一种,约占肝脏间质细胞的1/3),是反映肝损害严重程度、判断有无活动性肝纤维化的定量指标,可较准确地反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损状况。IV-C为构成基底膜主要成份,可反映基底膜胶原更新率,含量增高可较灵敏反映出肝纤过程,是肝纤的早期标志之一。LN为基底膜中特有的非胶原性结构蛋白,可以反映肝纤维化的进展与严重程度。血清HA、IV-C、LN联合检测可对肝纤维化程度的判定、肝硬化的早期诊断具有一定的临床意义,是判断肝纤维

表 4 龙血素对肝星状细胞分泌透明质酸、层黏连蛋白和IV型胶原的影响 ( $\mu\text{g/L}$ )

| 剂量( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | 分泌透明质酸                        |                               | 层黏连蛋白                           |                                 | IV型胶原                         |                               |
|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                 | 龙血素A                          | 龙血素B                          | 龙血素A                            | 龙血素B                            | 龙血素A                          | 龙血素B                          |
| 0                               | 43.05 $\pm$ 4.96              | 43.05 $\pm$ 4.96              | 441.28 $\pm$ 25.38              | 441.28 $\pm$ 25.38              | 25.23 $\pm$ 4.96              | 25.23 $\pm$ 4.96              |
| IC <sub>50</sub>                | 31.10 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup> | 28.50 $\pm$ 6.01 <sup>a</sup> | 302.98 $\pm$ 29.59 <sup>a</sup> | 243.53 $\pm$ 22.30 <sup>a</sup> | 17.96 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup> | 13.28 $\pm$ 5.72 <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 0(正常对照组).

化的敏感可靠指标<sup>[13]</sup>. 本实验结果显示: 血竭素A/B均可抑制HSC的增值, 还可不同程度的降低HSC细胞上清中HA、LN、IV-C的含量, 在IC<sub>50</sub>水平抑制效果最明显, 龙血素B的抑制效果优于龙血素A.

肝脏纤维化后, 血管神经纤维条索压迫后扭曲, 血运不畅, 出现缺氧情况, 引起肝组织血管新生<sup>[14]</sup>. 缺氧反应基因的调控主要是由HIF-1来实现. 有研究表明HIF-1-VEGF信号通路基因和蛋白表达上调是血管新生的部分机制<sup>[15]</sup>, 在纤维化形成过程中, 肝血窦的Disse间隙内过多ECM沉积, 使肝脏组织缺氧, 诱导HIF-1产生, 进而VEGF表达增加, 诱导新生血管的形成<sup>[16]</sup>, 机制可能为HIF-1启动VEGF的转录, 其次是缺氧时VEGF mRNA的稳定性增加, 最后HIF-1还可以上调VEGF受体Flt-1的转录, 该受体可增强VEGF的生物学效应. 其中HIF-1诱导VEGF转录活性的增强和表达增加在肿瘤血管生成中起重要作用.

在缺氧情况下, 组织细胞可出现变性坏死, 同时自由基产生增加, 从而诱发炎症反应, 这些炎症介质能刺激静止的HSC活化, 活化的HSC以及内皮细胞合成并分泌VEGF, 从而促进血管的生成, 分泌的VEGF又能促进活化的HSC增殖. 肝硬化炎症介质的释放, 细胞因子的作用及缺氧共同促成了微血管的新生. 由于肝纤维化区域的新生血管本身未成熟, 无法改善局部的组织缺氧, 呈现血管新生增加, 肝纤维化未消退反而增加的现象. 病理性血管新生可作为慢性肝脏疾病的潜在治疗靶标. HIF-1是相对较新的促血管生长因子的上游调控因子, 纠正肝脏缺氧状态或降低HIF的表达可以使HSC活化减少, 纤维化延缓; 抑制HSC的活化或促进活化HSC凋亡, 下调VEGF<sub>165</sub>和HIF-1在HSC中的表达可能成为抗血管新生和抗肝纤维化的有效途径. 本实验采用RT-PCR检测HSC药物处理前后VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA表达的影响, 结果显示药物处理

后HSC细胞中VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达明显下调, 且龙血素B较龙血素A下调效果明显, 说明龙血素A/B可能通过抑制HSC的活化或促进活化HSC凋亡, 下调VEGF<sub>165</sub>和HIF-1在HSC中的表达来抑制血管新生和抗肝纤维化.

综上所述, 本研究初步观察了龙血素A/B对HSC生长、VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA表达及HSC上清中纤维化标志物的影响. 结果发现: 龙血素A/B均可抑制HSC的增值并降低其细胞上清中纤维化标志物的含量, 还可下调HSC中VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达, 且龙血素B的效果较龙血素A明显. 以上作用可能与龙血竭胶囊抑制肝纤维化过程中微血管的新生并延缓肝纤维化有关.

#### 4 参考文献

- 1 Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 208-218 [DOI: 10.1172/JCI200524282]
- 2 Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004; 39: 1185-1195 [PMID: 15122744 DOI: 10.1002/hep.20193]
- 3 Vanheule E, Geerts AM, Van Huisse J, Schelfhout D, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2008; 89: 419-432 [PMID: 19134051 DOI: 10.1111/j.1365-2613.2008.00608.x]
- 4 Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009; 50: 604-620 [PMID: 19157625 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.12.011]
- 5 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 2000: 110
- 6 Zheng QA, Li HZ, Zhang YJ, Yang CR. Dracaenogenins A and B, new spirostanols from the red resin of *Dracaena cochinchinensis*. *Steroids* 2006; 71: 160-164 [PMID: 16271273 DOI: 10.1016/j.steroids.2005.09.007]
- 7 孙晓博, 金描真, 李雪, 金鸽. 龙血竭中龙血素A与龙血素B在大鼠体内的组织分布研究. *广东药学院学报* 2008; 24: 214-216
- 8 闫波, 陈飞虎, 吴繁荣. 鬼针草总黄酮对肝纤维化大鼠治疗作用及机制探讨. *中国药理学通报* 2008; 24: 1640-1645
- 9 聂莉, 程德云, 朱刚艳. 龙血竭对肺纤维化大鼠肺组织

#### ■同行评价

本文对中药血竭有效成分龙血素抗肝星状细胞的作用加以研究, 研究目标明确, 具有一定的创新性和科学意义.

- 转化生长因子 $\beta 1$  mRNA及 I 型胶原蛋白表达的影响. 河北中医 2010; 32: 1071-1072
- 10 彭伟, 范红, 宋正己. 龙血素B对实验性肝纤维化的干预作用及机制. 中华消化杂志 2010; 30: 129-130
- 11 杨波, 郭建恩, 韩俊婷, 王晓峰, 武冬慧, 赵文杰, 朱铁梁. 龙血素A对大鼠局灶性脑缺血再灌注引起的脑损伤及机制探讨. 中药新药与临床药理 2010; 21: 103-107
- 12 Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 2007; 45: 817-825 [PMID: 17326208 DOI: 10.1002/hep.21564]
- 13 刘晓强, 周海中, 吴靖珍. 肝病患者血清HA、PC-III、C-IV、LN测定的临床意义. 实用临床医药杂志 2009; 13: 40-42
- 14 Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 2008; 11: 121-140 [PMID: 18327686 DOI: 10.1007/s10456-008-9107-3]
- 15 吕靖, 陆雄, 陶艳艳, 赵志敏, 刘成海. 肝纤维化小鼠肝组织血管新生特点及其形成机制. 肝脏 2011; 16: 35-40
- 16 Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1010-1021 [PMID: 11981751 DOI: 10.1053/jhep.2002.32524]

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.