

卡维地洛对瘦素诱导的人肝星状细胞活化增殖的影响及机制研究^Δ

穆华^{1*}, 张哲², 梁传栋³, 刘娜^{4#} (1.河北省人民医院门诊办公室, 石家庄 050051; 2.河北省人民医院代谢病重点实验室, 石家庄 050051; 3.河北省人民医院神经外二科, 石家庄 050051; 4.河北省人民医院消化内二科, 石家庄 050051)

中图分类号 R361[·]3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2620-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.08

摘要 目的:研究卡维地洛对瘦素诱导的LX2人肝星状细胞(HSC-LX2)活化增殖的影响及机制。方法:取对数生长期的HSC-LX2细胞分为空白对照组、瘦素刺激组和卡维地洛低、中、高浓度组(5、10、20 μmol/L),除空白对照组外,其余各组均加入0.1 g/L的瘦素及相应浓度的卡维地洛作用24 h。采用MTT法检测细胞的光密度(OD)值,计算细胞增殖抑制率;流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况;实时荧光定量聚合酶链式反应法检测细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、基质金属蛋白酶抑制因子1(TIMP-1)、瘦素及瘦素受体mRNA表达;Western blot法检测磷酸化Janus激酶2(p-JAK2)、磷酸化信号转导和转录激活因子3(p-STAT3)蛋白表达。结果:与空白对照组比较,瘦素刺激组细胞的OD值增加、凋亡率降低、G₀/G₁期细胞减少($P < 0.05$); α -SMA、TIMP-1、瘦素、瘦素受体mRNA表达和p-JAK2、p-STAT3蛋白表达均增强($P < 0.05$)。与瘦素刺激组比较,卡维地洛各浓度组细胞的OD值减小、凋亡率升高、细胞主要阻滞在G₀/G₁期($P < 0.05$); α -SMA、TIMP-1、瘦素、瘦素受体mRNA表达和p-JAK2、p-STAT3蛋白表达均减弱($P < 0.05$),且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。结论:卡维地洛能够抑制瘦素诱导的HSC-LX2细胞的活化增殖,促进HSC-LX2细胞凋亡;其机制可能与下调瘦素、瘦素受体基因表达并阻断瘦素诱导的细胞内JAK2/STAT3信号通路激活有关。

关键词 卡维地洛;人肝星状细胞;增殖;凋亡;瘦素;Janus激酶2;信号转导和转录激活因子3

Study on the Effect and Its Mechanism of Carvedilol on Leptin-induced Activation and Proliferation of Human Hepatic Stellate Cells

MU Hua¹, ZHANG Zhe², LIANG Chuandong³, LIU Na⁴ (1.Outpatient Office, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2.Key Laboratory of Metabolites, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 3.Surgical Ward 2, Dept. of Neurosurgery, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 4.Medical Ward 2, Dept. of Gastroenterology, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect and its mechanism of carvedilol on leptin-induced activation and proliferation of LX2 human hepatic stellate cells (HSC-LX2). METHODS: HSC-LX2 with logarithmic growth periods were divided into blank control group, leptin-stimulated group and carvedilol low-concentration, medium-concentration, high-concentration groups (5, 10, 20 μmol/L). Except for the blank control group, other groups were added 0.1 g/L leptin and corresponding concentration of carvedilol. After 24 h, MTT method was used to detect the optical density (OD) value of cells and calculate the proliferation rate. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method was used to detect the α -smooth muscle actin (α -SMA), matrix metalloproteinase inhibition factor 1 (TIMP-1), leptin, leptin receptor mRNA expressions. Western blot method was used to detect phosphorylated Janus kinase 2 (p-JAK2), phosphorylated signal transduction and transcriptional activator 3 (p-STAT3) protein expressions. RESULTS: Compared with blank control group, OD value of cell was increased in leptin-stimulated group; apoptotic rate was decreased; cells of G₀/G₁ were decreased; α -SMA, TIMP-1, leptin, leptin receptor mRNA expressions and p-JAK2, p-STAT3 protein expressions were increased ($P < 0.05$). Compared with leptin-stimulated group, OD values of cells were decreased in carvedilol concentration groups; apoptotic rate was increased, and the cells were mainly blocked in G₀/G₁ phase; α -SMA, TIMP-1, leptin, leptin receptor mRNA expressions and p-JAK2, p-STAT3 protein expressions were decreased ($P < 0.05$) and was concentration-depended ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Carvedilol can inhibit the activation and proliferation of leptin-induced HSC-LX2, promote its apoptosis. The mechanism may associate with down-regulating leptin, leptin receptor gene expression and blocking JAK2/STAT3 signal pathway activation by leptin in cells.

KEYWORDS Carvedilol; Human hepatic stellate cells; Proliferation; Apoptosis; Leptin; Janus kinase 2; Signal transduction and transcriptional activator 3

^Δ 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(No. ZL20140250)

* 主治医师,硕士。研究方向:慢性肝病。电话:0311-85988343。E-mail: mh8375@126.com

通信作者:主治医师,博士。研究方向:慢性肝病。电话:0311-85988543。E-mail: 1093961170@qq.com

肝纤维化是各种原因引起的慢性肝病形成及发展的中间阶段,其发病机制尚未完全阐明。目前认为,肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSC)活化增殖在肝纤维

化发病中起关键作用。而瘦素是导致肝纤维化的始动因子之一,其通过与HSC的瘦素受体结合能够激活Janus激酶2/信号转导和转录激活因子3(JAK2/STAT3)信号通路,致使HSC活化增殖并抑制HSC凋亡^[1-2]。HSC活化的主要标志物包括 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和基质金属蛋白酶抑制因子1(TIMP-1)。因此,抑制HSC活化增殖、诱导HSC凋亡可能是治疗肝纤维化的重要措施。卡维地洛是第3代 β 受体阻滞药,具有良好的抗肾小球纤维化作用。本文通过研究卡维地洛对LX2人肝星状细胞(HSC-LX2)活化增殖及瘦素诱导的JAK2/STAT3信号通路的影响,初步探讨卡维地洛对肝纤维化的影响及作用机制。

1 材料

1.1 仪器

960 酶标仪(美国Sigma公司);Chemi Doc™ XRS+化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);7300实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国ABI公司);EPICS XL流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司)。

1.2 药品与试剂

重组瘦素(美国Protech公司,批号:8110060R,纯度: $\geq 98\%$);卡维地洛注射用粉末(齐鲁制药有限公司,批号:H20020547,规格:100 mg/瓶);MTT试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C6628);膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)凋亡试剂盒(美国BD公司);碘化丙啶(PI)染液(广州浩玛生物科技有限公司);鼠源磷酸化JAK2(p-JAK2)、磷酸化STAT3(p-STAT3)、 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京康为世纪生物科技有限公司);反转录反应体系、SYBR Green RT-PCR试剂盒、Trizol总RNA提取试剂盒(美国Promega公司)。

1.3 细胞

HSC-LX2细胞购自博慧斯生物医药科技有限公司,在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下,用含10%胎牛血清、100 u/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、4 mmol/mL谷氨酰胺的RPMI 1640培养液常规培养。

2 方法

2.1 分组与给药

将HSC-LX2细胞培养至70%融合时,加入0.25%胰酶消化,以1:3比例传代。将处于对数生长期的HSC-LX2细胞以 5×10^5 mL⁻¹密度接种于6孔板中。细胞分5组:空白对照组(加含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液)、瘦素刺激组[加含10%胎牛血清和瘦素(0.1 g/L)的RPMI 1640培养液]和卡维地洛低、中、高浓度组[加含10%胎牛血清、瘦素(0.1 g/L)和相应浓度卡维地洛(5、10、20 μ mol/L)的RPMI 1640培养液],共培养24 h。

2.2 MTT法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的HSC-LX2细胞,消化、离心,以 $5 \times$

10^5 mL⁻¹接种于96孔板中,每孔100 μ L。待细胞贴壁后弃培养液,按“2.1”项下方法分组、给药,继续培养24 h,每孔加入MTT 20 μ L,培养4 h后在酶标仪490 nm波长处测定各孔光密度(OD)值,重复3次,取均值,计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(瘦素刺激孔平均OD值-给药孔平均OD值)/瘦素刺激孔平均OD值 $\times 100\%$ 。试验重复8次。

2.3 流式细胞术检测细胞周期分布和凋亡情况

取对数生长期的HSC-LX2细胞,消化、离心,以 1×10^5 个/孔接种于24孔板中,按“2.1”项下方法分组、给药,给药后培养24 h,0.25%胰酶消化细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,70%乙醇重悬细胞,4℃固定24 h。测定前30 min加入PI溶液,振荡混匀,避光,流式细胞仪检测细胞周期。测定前1 h加入标记荧光素FITC的Annexin V和PI染液,流式细胞仪检测细胞凋亡率。试验重复8次。

2.4 RT-PCR法检测细胞中 α -SMA、TIMP-1、瘦素、瘦素受体mRNA表达

采用Trizol试剂提取细胞总RNA,按照试剂盒说明书加样进行反转录合成DNA,RT-PCR仪扩增,引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。反应体系:25 μ L;反应条件:93℃预变性5 min;93℃变性45 s,55℃退火1 min,72℃延伸45 s,40个循环。用仪器自带的分析软件得到各样本、各基因扩增的 c 值,其中 c 值是PCR产物的荧光达到检测阈值时的扩增循环数。以 β -actin为内参,按 $2^{-\Delta\Delta c_t}$ 法计算目标基因的相对表达量。试验重复8次。RT-PCR引物序列及产物长度见表1。

表1 RT-PCR引物序列及产物长度

Tab 1 RT-PCR primer sequences and product length

目标	引物序列	产物长度, bp
α -SMA	上游 5'-CTGTTCAGCCATCCTTCAT-3'	175
	下游 5'-CCGTGATCTCCTTCGCAIT-3'	
TIMP-1	上游 5'-GCTAAATTCATGGGTCCCCAG-3'	279
	下游 5'-TAATCTGA GCCCTGCTCAGCAA-3'	
瘦素	上游 5'-CACACACGCAGTCAGTCAGTCTCC-3'	211
	下游 5'-ACCACCTCTGTCGACTAGCCATAG-3'	
瘦素受体	上游 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	254
	下游 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	
β -actin	上游 5'-CACTCTCCAGCCTTCCTTCC-3'	105
	下游 5'-CGTACAGGTCITTCGGATGTC-3'	

2.5 Western blot法检测细胞中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达

提取细胞总蛋白,半干法电泳转移至聚偏二氯乙烯(PVDF)膜,10%脱脂奶粉封闭2 h,依次加入特异性p-JAK2、p-STAT3多克隆抗体,4℃孵育过夜。洗膜后加入HRP标记的羊抗鼠IgG二抗,室温下孵育2 h,洗膜,化学发光法显色、定影。用UVP 7.0软件扫描测定蛋白条带积分光密度(IOD)值。以 β -actin为内参,以目的蛋白与内参IOD值的比值表示目的蛋白的相对表达量。试验重复8次。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。计量资料采用

$\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖情况

与空白对照组比较,瘦素刺激组细胞的OD值明显增加($P < 0.05$),卡维地洛各浓度组细胞的OD值明显减小($P < 0.05$)。与瘦素刺激组比较,卡维地洛各浓度组细胞的OD值明显减小($P < 0.05$),且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。各组细胞增殖抑制率的测定结果见表2。

表2 各组细胞增殖抑制率的测定结果($n=8$)

Tab 2 Determination results of cell inhibition rate in each group ($n=8$)

组别	OD值($\bar{x} \pm s$)	增殖抑制率, %
空白对照组	0.90 ± 0.15	
瘦素刺激组	1.02 ± 0.16*	
卡维地洛低浓度组	0.85 ± 0.14**	16.67
卡维地洛中浓度组	0.78 ± 0.11** ^Δ	23.53
卡维地洛高浓度组	0.72 ± 0.08** [□]	29.41

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与瘦素刺激组比较,** $P < 0.05$;与卡维地洛低浓度组比较,^Δ $P < 0.05$;与卡维地洛中浓度组比较,[□] $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. leptin-stimulated group, ** $P < 0.05$; vs. carvedilol low-concentration group, ^Δ $P < 0.05$; vs. carvedilol medium-concentration group, [□] $P < 0.05$

3.2 细胞周期分布和凋亡情况

与空白对照组比较,瘦素刺激组活细胞数及S期细胞比例明显增加、凋亡率及G₀/G₁期细胞比例明显降低($P < 0.05$);卡维地洛各浓度组活细胞数及S期细胞比例明显降低、凋亡率及G₀/G₁期细胞比例明显增加($P < 0.05$)。与瘦素刺激组比较,卡维地洛各浓度组活细胞数及S期细胞比例明显降低、凋亡率及G₀/G₁期细胞比例明显增加($P < 0.05$),且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。各组细胞凋亡的流式图见图1,细胞周期分布和凋亡率测定结果见表3。

3.3 细胞中活化标志物 α -SMA、TIMP-1 mRNA表达情况

与空白对照组比较,瘦素刺激组细胞中 α -SMA、TIMP-1 mRNA表达明显增强($P < 0.05$);卡维地洛各浓度组细胞中 α -SMA、TIMP-1 mRNA表达明显减弱($P < 0.05$)。与瘦素刺激组比较,卡维地洛各浓度组细胞中 α -SMA、TIMP-1 mRNA表达明显减弱($P < 0.05$),且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。各组细胞中 α -SMA、TIMP-1 mRNA表达的测定结果见表4。

3.4 细胞中瘦素、瘦素受体 mRNA 表达情况

与空白对照组比较,瘦素刺激组细胞中瘦素、瘦素受体 mRNA 表达明显增强($P < 0.05$);卡维地洛各浓度组细胞中瘦素、瘦素受体 mRNA 表达明显减弱($P < 0.05$)。与瘦素刺激组比较,卡维地洛各浓度组细胞中瘦素、瘦素受体 mRNA 表达明显减弱($P < 0.05$),且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。各组细胞中瘦素、瘦素受体 mRNA

表达的测定结果见表4。

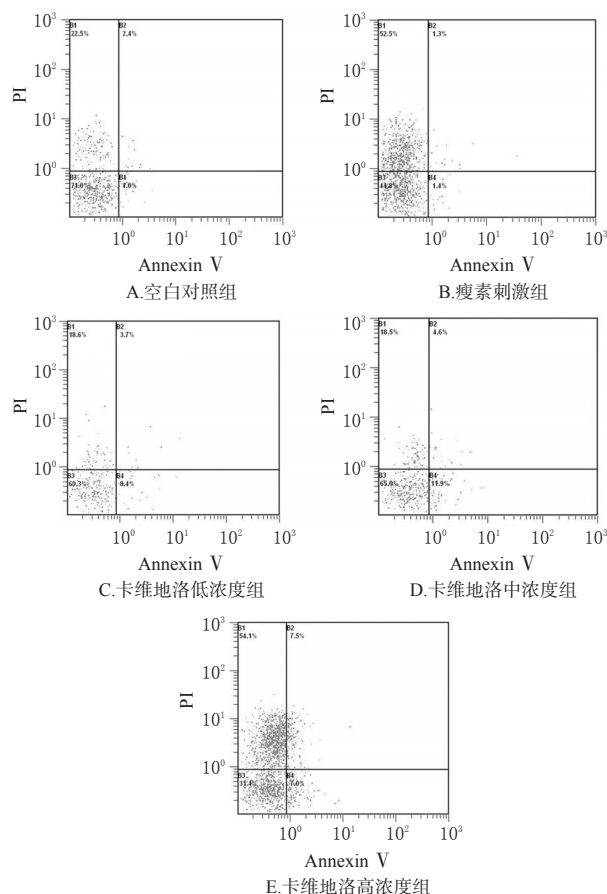


图1 各组细胞凋亡的流式图

Fig 1 Flow graph of cell apoptosis in each group

表3 各组细胞细胞周期分布和凋亡率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Determination results of cell cycle distribution and apoptosis rate in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	活细胞数, 个	凋亡率, %	细胞比例, %		
			G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白对照组	90.44 ± 14.32	2.69 ± 0.42	46.32 ± 7.31	40.67 ± 6.65	2.45 ± 0.35
瘦素刺激组	108.25 ± 16.51*	1.01 ± 0.15*	40.16 ± 6.22*	44.43 ± 6.54*	2.59 ± 0.34
卡维地洛低浓度组	76.56 ± 12.61**	3.41 ± 0.52**	50.33 ± 8.12**	39.13 ± 6.62**	2.37 ± 0.26
卡维地洛中浓度组	61.14 ± 9.56** ^Δ	4.77 ± 0.75** ^Δ	57.77 ± 9.23** ^Δ	36.25 ± 5.12** ^Δ	2.03 ± 0.17
卡维地洛高浓度组	38.28 ± 6.34** [□]	6.43 ± 0.89** [□]	63.08 ± 9.43** [□]	32.88 ± 4.16** [□]	1.79 ± 0.13

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与瘦素刺激组比较,** $P < 0.05$;与卡维地洛低浓度组比较,^Δ $P < 0.05$;与卡维地洛中浓度组比较,[□] $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. leptin-stimulated group, ** $P < 0.05$; vs. carvedilol low-concentration group, ^Δ $P < 0.05$; vs. carvedilol medium-concentration group, [□] $P < 0.05$

3.5 细胞中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达情况

与空白对照组比较,瘦素刺激组细胞中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达明显增强($P < 0.05$);卡维地洛各浓度组细胞中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达明显减弱($P < 0.05$)。与瘦素刺激组比较,卡维地洛各浓度组细胞中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达明显减弱($P < 0.05$),且呈浓

度依赖性($P < 0.05$)。各组细胞中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达的电泳图见图 2, 测定结果见表 5。

表 4 各组细胞中 α -SMA、TIMP-1、瘦素和瘦素受体 mRNA 表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 4 Determination results of α -SMA, TIMP-1, leptin, leptin receptor mRNA expressions in cells in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	α -SMA	TIMP-1	瘦素	瘦素受体
空白对照组	0.88 ± 0.14	0.79 ± 0.13	1.13 ± 0.16	0.98 ± 0.15
瘦素刺激组	0.97 ± 0.16*	0.90 ± 0.15*	1.23 ± 0.18*	1.07 ± 0.16*
卡维地洛低浓度组	0.73 ± 0.12**	0.67 ± 0.11**	0.99 ± 0.12**	0.80 ± 0.14**
卡维地洛中浓度组	0.65 ± 0.10***	0.54 ± 0.09***	0.81 ± 0.13***	0.69 ± 0.11***
卡维地洛高浓度组	0.47 ± 0.07*□	0.41 ± 0.06*□	0.65 ± 0.09*□	0.52 ± 0.08*□

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与瘦素刺激组比较,** $P < 0.05$;与卡维地洛低浓度组比较, $\Delta P < 0.05$;与卡维地洛中浓度组比较, $\square P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. leptin-stimulated group, ** $P < 0.05$; vs. carvedilol low-concentration group, $\Delta P < 0.05$; vs. carvedilol medium-concentration group, $\square P < 0.05$

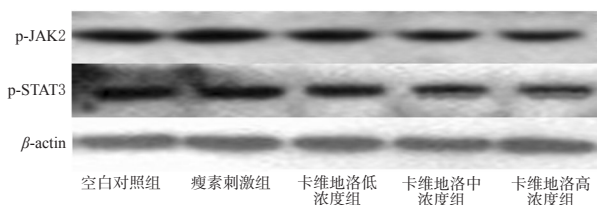


图 2 各组细胞中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达的电泳图
Fig 2 Electrophoresis chart of p-JAK2, p-STAT3 protein expressions in cells in each group

表 5 各组细胞中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 5 Determination results of p-JAK2, p-STAT3 protein expressions in cells in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	p-JAK2 蛋白	p-STAT3 蛋白
空白对照组	0.93 ± 0.15	0.84 ± 0.14
瘦素刺激组	1.14 ± 0.18*	0.98 ± 0.16*
卡维地洛低浓度组	0.81 ± 0.14**	0.72 ± 0.12**
卡维地洛中浓度组	0.69 ± 0.11***	0.60 ± 0.09***
卡维地洛高浓度组	0.51 ± 0.08*□	0.45 ± 0.07*□

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与瘦素刺激组比较,** $P < 0.05$;与卡维地洛低浓度组比较, $\Delta P < 0.05$;与卡维地洛中浓度组比较, $\square P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. leptin-stimulated group, ** $P < 0.05$; vs. carvedilol low-concentration group, $\Delta P < 0.05$; vs. carvedilol medium-concentration group, $\square P < 0.05$

4 讨论

在 HSC 转化为肌成纤维细胞过程中, HSC 活化增殖是肝纤维化的中心环节, 活化的 HSC 大量表达 α -SMA、TIMP-1 及各种细胞外基质成分, 最终导致肝纤维化、肝硬化甚至肝衰竭^[3]。研究显示, 肥胖基因编码产物瘦素通过促进 HSC 活化增殖参与肝脏纤维化的形成及发展。

正常情况下, 肝细胞不表达瘦素, 但表达其受体; 而在肝纤维化发生后, 瘦素及瘦素受体表达随着肝纤维化的严重程度增加而增强^[4]。瘦素与瘦素受体结合后通过激活 JAK2/STAT3 信号通路而发挥其生物学功能^[5]。因此, 下调瘦素及瘦素受体表达或阻断 JAK2/STAT3 信号通路对于延缓或逆转肝纤维化具有重要意义。近年来, 多项研究表明, 交感神经系统过度激活与肝损伤后的修复和纤维化进程密切相关, 而交感神经系统阻滞剂能够明显抑制肝纤维化进程^[6]。笔者前期研究发现, HSC 能够合成和释放去甲肾上腺素, 并表达 α_1 、 β_1 、 β_2 等亚型肾上腺素受体, 且其表达水平随着肝纤维化进展而增强^[7]。此外, 笔者进一步发现去甲肾上腺素能够上调体外活化的大鼠 HSC 瘦素及瘦素受体表达, 并通过肾上腺素 α 、 β_2 受体对 HSC 发挥促增殖和抑凋亡作用, 这可能是交感神经系统促进肝纤维化进程的机制之一^[8]。

卡维地洛是新一代 β 受体阻滞药, 具有阻滞肾上腺素 α_1 、 β_1 、 β_2 受体, 抗炎, 抗氧化, 抑制平滑肌细胞增殖的作用^[9]。临床研究表明, 卡维地洛能够明显降低门脉压力, 可作为预防肝硬化门脉高压消化道出血的首选药物^[10]。另外, Ding Q 等^[11]研究表明, 卡维地洛能够抑制血管生成, 从而抑制肝纤维化进程。然而, 卡维地洛的抗肝纤维化作用是否涉及瘦素机制目前尚未见报道。为此, 笔者选择 HSC-LX2 细胞为研究对象, 旨在观察卡维地洛对 HSC-LX2 细胞活化增殖、凋亡及瘦素诱导 JAK2/STAT3 信号通路激活的影响。本研究结果表明, 卡维地洛通过阻断瘦素诱导的 JAK2/STAT3 信号通路的激活, 可抑制 HSC-LX2 细胞活化增殖、促进其凋亡。

参考文献

- [1] Hellerbrand C. Hepatic stellate cells: the pericytes in the liver[J]. *Pflugers Arch*, 2013, 465(6): 775-778.
- [2] Nepal S, Park PH. Modulation of cell death and survival by adipokines in the liver[J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(7): 961-965.
- [3] Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1887-1901.
- [4] 朱净, 潘亮, 许晶, 等. 瘦素及 I 和 III 型胶原蛋白在肝纤维化大鼠肝组织中的变化[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(10): 1224-1225.
- [5] Bertolani C, Marra F. Role of adipocytokines in hepatic fibrosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(17): 1929-1940.
- [6] Bruinstroop E, Fliers E, Kalsbeek A. Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2014, 28(5): 673-684.
- [7] 刘娜, 张晓岚, 梁传栋, 等. 肝纤维化过程中去甲肾上腺素各受体亚型表达的动态变化[J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(9): 653-656.
- [8] 刘娜, 穆华, 梁传栋, 等. 去甲肾上腺素对肝星状细胞表达

舒肝宁注射液对大鼠酒精性肝纤维化的防治作用研究^Δ

潘婷*,张金娟,熊英,李玲#,雷珊,兰金芝(贵州医科大学基础医学院,贵阳 550025)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2624-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.09

摘要 目的:考察舒肝宁注射液对酒精性肝纤维化(ALF)模型大鼠的防治作用,为其临床用于酒精性肝病的治疗提供实验参考。方法:取50只大鼠,每天ig 60%乙醇-玉米油-吡唑混悬液复制ALF模型;另取同批大鼠10只,ig生理盐水,作为正常对照组。连续16周后,将存活的造模大鼠($n=40$)随机分为模型组、阳性对照组(安络化纤丸0.75 g/kg, ig)和舒肝宁注射液高、中、低剂量组(4.8、2.4、1.2 mL/kg, ip),每组8只。正常对照组和模型组大鼠ip等体积生理盐水(5 mL/kg),给药组大鼠给予相应药物,每天1次,连续给药8周,并同时继续进行造模处理。给药结束后,称定大鼠体质量,检测大鼠血清中肝功能指标[天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)]和肝纤维化指标[透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PⅢNP)和Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)]水平,测定大鼠肝指数并观察肝组织病理变化。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P<0.05$);肝指数以及血清中肝功能指标和肝纤维化指标水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);肝组织出现脂肪变性、肝细胞空泡化、汇管区周围有大量纤维组织沉积等病理改变。与模型组比较,各给药组大鼠上述变化均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:舒肝宁注射液可明显改善ALF模型大鼠的肝组织损伤,对酒精性肝病有一定的防治作用。

关键词 舒肝宁注射液;酒精性肝纤维化;大鼠

Study on the Preventive and Therapeutic Effect of Shuganning Injection on Alcoholic Liver Fibrosis in Rats

PAN Ting, ZHANG Jinjuan, XIONG Ying, LI Ling, LEI Shan, LAN Jinzhi (Basic Medical College of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the preventive and therapeutic effect of Shuganning injection on alcoholic liver fibrosis (ALF) in model rats, and provide experimental basis for its clinical application for alcoholic liver disease. METHODS: 50 rats were enrolled and intraperitoneally given mixed liquid of 60% alcohol-corn oil-pyrazole to reduce ALF model. Another 10 rats were enrolled and intraperitoneally given normal saline, as normal control group. After 16 weeks, survived model rats ($n=40$) were randomly divided into model group, positive control group (Anluo huaxian pill 0.75 g/kg, ig), Shuganning injection high-dose, medium-dose, low-dose groups (4.8, 2.4, 1.2 mL/kg, ip), 8 in each group. Normal control group and model group were intraperitoneally injected equal volume of normal saline (5 mL/kg), administration groups were given relevant medicines, once a day, for 8 weeks; and modeling was continuously conducted at the same time. After administration, body mass of rats was weighed, and the levels of liver function indexes [aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)] and liver fibrosis indexes [hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PⅢNP), type IV collagen (Ⅳ-C)] in serum of rats were detected. Liver index of rats was determined and pathological changes of liver tissue were observed. RESULTS: Compared with normal control group, body mass of rats in model group was significantly decreased ($P<0.05$); liver index, and liver function index, liver fibrosis index levels in serum were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Liver tissue showed steatosis, hepatocyte vacuolization, a large number of fibrous tissue deposition around portal areas and other pathological changes. Compared with model group,

瘦素以及瘦素受体的影响[J].世界华人消化杂志,2015,23(7):1052-1058.

[9] Araújo Júnior RF, Garcia VB, Leitão RF, et al. Carvedilol improves inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in the alcohol-induced liver injury in rats by regulat-

^Δ基金项目:贵州省科技计划课题(No.黔科合重大专项字[2011]6019号)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail:1172359936@qq.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:中药药理。E-mail:354529962@qq.com

ing kupffer cells and hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0148868.

[10] Li T, Ke W, Sun P, et al. Carvedilol for portal hypertension in cirrhosis: systematic review with meta analysis[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(5):e010902.

[11] Ding Q, Tian XG, Li Y, et al. Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF- Src-ERK signaling pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(32):9566-9576.

(收稿日期:2016-10-13 修回日期:2016-11-29)

(编辑:邹丽娟)