

内,即所谓喹诺酮耐药决定区(QRDR),淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药性的发生与 *gyrA* 和 *parC* 基因 QRDR 突变有关^[4]。其中 *gyrA* 基因参与编码的 DNA 旋转酶是喹诺酮类药物的主要作用靶位, Deguchi 等研究发现对喹诺酮类敏感的淋病奈瑟菌 *gyrA* 基因没有突变,耐药株一般都有 *gyrA* 基因突变,其中编码 91 位丝氨酸(S91)和 95 位天冬氨酸(D95)的密码子最易发生突变^[6,7],我们对 50 株耐环丙沙星的淋病奈瑟菌临床菌株的测序结果发现 S91F 突变发生在所有检测菌株,49 株(49/50,98.0%)淋病奈瑟菌临床菌株 G/A/N/E 突变,其中 1 株发生 D95E 突变未见文献报道,1 株 D95 不发生突变而发生 A92P 突变,表明 *gyrA* 基因发生点突变特别 S91 和 D95 突变是造成淋病奈瑟菌临床菌株产生喹诺酮类耐药的主要原因。Deguchi 等也发现对喹诺酮类耐药的淋病奈瑟菌临床菌株 *parC* 基因存在 86、87、88 和 91 的突变,而药物敏感株没有这些突变,另有研究发现,*parC* 基因突变基因仅出现在已存在 *gyrA* 基因双突变且高度耐药的菌株中^[6,7],提示 *parC* 基因突变可能与淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药程度相关。我们检测了 50 株淋病奈瑟菌临床菌株 *parC* 的 QRDR 核苷酸序列,37 株淋病奈瑟菌临床菌株除 *gyrA* 基因存在突变同时伴有 *parC* 基因 QRDR 至少 1 个位点突变引起高度耐药 28 株占 75.7%,13 株 *gyrA* 基因突变不伴 *parC* 基因突变引起高度耐药 3 株占 23.1%,两组间有统计学显著性差异($\chi^2 = 11.3$, $P < 0.01$),说明是否伴随 *parC* 基因突变与淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星高度耐药明显相关。28 株淋病奈瑟菌临床菌株发生

parC 基因单位点突变中 19 株对环丙沙星呈高度耐药占 67.9%,所有发生 *parC* 基因双位点突变的 9 株淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星全部呈高度耐药,有显著性差异($\chi^2 = 3.8$, $P < 0.01$)。说明 *parC* 基因突变位点数目与淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星耐药程度明显相关性,这与国外文献报道相似^[2-4,7]。

参考文献

- 1 Campos - Outcalt D. CDC update: guidelines for treating STDs [J]. J Fam Pract, 2011, 60(3):143 - 146
 - 2 Furuya R, Tanaka M. Neisseria gonorrhoeae infections [J]. Nippon Rinsho, 2009, 67(1):129 - 135
 - 3 Yang Y, Liao MM, Gu WM, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular determinants of quinolone resistance in *N. gonorrhoeae* isolates from Shanghai [J]. J Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(4):868 - 872
 - 4 Zhang TJ, Zhou XM, Zhang JL, et al. Fluoroquinolone resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Shanghai, China; detection of quinolone resistance determining region mutations [J]. Indian J Med Res, 2009, 129(6):701 - 706
 - 5 Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard [M]. 7th ed. 2006; M7 - A7
 - 6 Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al. Quinolone - resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(4):1020 - 1023
 - 7 Pérez - Losada M, Crandall KA, Bash MC, et al. Distinguishing importation from diversification of quinolone - resistant *Neisseria gonorrhoeae* by molecular evolutionary analysis [J]. BMC Evol Biol, 2007, 7(1):84 - 93
- (收稿:2011 - 05 - 30)
(修回:2011 - 06 - 16)

舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞的凋亡的影响

秦文燕 曹群奋 李昌平

摘 要 目的 探讨舒肝颗粒作用于体外培养的大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)其是否对大鼠肝星状细胞凋亡有影响,及其可能的作用机制。**方法** 体外培养大鼠肝星状细胞株(HSC - T6),分实验组和对照组,实验组加入舒肝颗粒,分3个浓度组:4.2、2.8、1.4mg/ml,作用24h后,加入AnnexinV/FITC和碘化丙锭,流式细胞仪检测肝星状细胞的凋亡;加入CD95抗体,流式细胞仪检测CD95的表达;采用免疫细胞化学法检测Bax和Bcl - 2的表达。**结果** 实验组肝星状细胞凋亡率较对照组明显增高,且呈浓度依赖性,差异具有统计学意义($P < 0.05$);随着浓度增高,CD95、Bax的表达率增高,呈浓度依赖性,Bcl - 2的表达,实验组与对照组差别无统计学意义,但Bax/bcl - 2的比值随着药物浓度组的增加而升高。**结论** 舒肝颗粒可诱导肝星状

细胞的凋亡,且呈浓度依赖性,舒肝颗粒可能通过介导 Fas 系统、上调 Bax/Bcl-2 比率促肝星状细胞凋亡。

关键词 舒肝颗粒 肝星状细胞 肝纤维化 凋亡 CD95 Bax/Bcl-2

Shugan Particles of Rat Hepatic Stellate Cell Apoptosis. Qin Wenyan, Cao Qunfen, Li Changping. Ningbo Seven Hospital, Zhejiang 315200, China

Abstract Objective Observe the effect of Shugan particles in cultured rat hepatic stellate cells, whether apoptosis in rat hepatic stellate cells affected, and its possible mechanism. **Methods** Cultured rat hepatic stellate cells (HSC-T6), divided into experimental and control groups, the experimental group to join Shugan particles, divided into three concentrations: 4.2mg/ml, 2.8mg/ml, 1.4mg/ml. During the 24h, we analyze the apoptosis using flow cytometry after staining with Annexin V-FITC/PI and CD95. Then we detect the expression of Bax/Bcl-2 using immunohistochemical method. **Results** Apoptosis rate in experimental group was significantly higher than the control group, and dose-dependent manner, the difference was significant ($P < 0.05$). As the concentration increased, CD95, Bax expression rate increased, Bcl-2 expression in the experimental group and control group no significant difference, but the ratio of Bax/bcl-2 group with the increase of drug concentration ratio increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Shugan Granule can induce apoptosis ($P < 0.05$). Shugan granule may induce HSC apoptosis by mediating fas system. Shugan granule could up-regulate the rat's Bax/Bcl-2 to increase the sensitivity of apoptosis and induced HSC apoptosis.

Key words Shugan granule; Hepatic stellate cell; Liver fibrosis; Apoptosis; CD95; Bax/Bcl-2

肝纤维化是大多数慢性肝病所共有的病理特征,也是慢性肝炎进一步向肝硬化和肝癌发展的重要环节^[1]。而肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化增殖是肝纤维化形成的主要细胞基础,细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的大量合成是肝纤维化形成的直接原因,也是肝纤维化发生的中心环节^[2]。活化的 HSC 主要通过凋亡机制减少,故促进 HSC 凋亡可逆转肝纤维化^[3]。鉴于 HSC 在肝纤维化发病机制中的主导作用,大多数抗肝纤维化研究都以 HSC 为靶标。所以,抑制 HSC 的活化和增殖,促进 HSC 的凋亡,成为治疗肝纤维化的基本策略。已有实验证明舒肝颗粒可通过抑制 HSC 增殖和胶原蛋白的分泌,减少胶原纤维在肝脏内的沉积,但它是否具有促进肝星状细胞凋亡,及其可能的作用机制,未曾进行过研究,故本实验选择观察舒肝颗粒作用于体外培养的活化的大鼠肝星状细胞,采用流式细胞仪进行检测结果^[4]。

肝星状细胞凋亡机制较为复杂,可通过多途径凋亡。目前,国内外对中药诱导 HSC 凋亡的研究实验已逐渐展开,而中药具有多层次、多靶点的抗纤维化作用,且不良反应少,价格低廉,拥有广阔的前景,值得我们深入研究和实践。HSC 凋亡途径主要包括:①经典的线粒体途径;②死亡受体途径:包括 Fas/FasL 途径、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)途径和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)途径;③非死亡受体途径。本实验选择死亡受体途径及 Bcl 家族蛋白两条途径,对舒肝颗粒可能诱导肝星状细胞凋亡的机制进行探讨。

材料与方法

1. 实验材料:肝星状细胞株 HSC-T6,购自上海中医药大学肝病研究所,其表型为活化的 HSC。舒肝颗粒由泸州医学院附属医院药物研究所提供、特级胎牛血清、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶购自北京元亨圣马生物技术研究所,Annexin-v/FITC 抗体购自 Beckman 公司,CD95 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体购自 Sant Cruz Biotechnology 公司,浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. 实验方法:(1)舒肝颗粒的配制:参照杨玲等^[5]方法,由于直接加药法和含药血清法所得结果一致。取舒肝颗粒 10g,用 178ml 蒸馏水溶解,装入 250ml 玻璃瓶中,高压蒸气灭菌,用 0.45 μ m 的滤器除菌及杂质,取 100ml 滤液,其浓度 56mg/ml,再用 0.22 μ m 的滤器过滤除菌分装。(2)实验分组:实验组:肝星状细胞 10% 特级胎牛血清 RPMI 1640 培养液中加入舒肝颗粒药液,参照李志等^[4]研究结果,根据预实验情况,设置 3 个药物浓度组,分别:4.2mg/ml 舒肝颗粒组;2.8mg/ml 舒肝颗粒组;1.4mg/ml 舒肝颗粒组。对照组:肝星状细胞 10% 特级胎牛血清 RPMI 1640 培养液中不加其他处理因素。(3)HSC-T6 的复苏与培养:从液氮罐中取出细胞冻存管,迅速置入 37℃ 水浴中,轻轻振荡至冻存液完全溶解(1~2min)。75% 乙醇擦拭冻存管后打开,将冻存液吸入 15ml 无菌离心管中,边滴加含 10% PBS 的 DMEM 培养基边振荡混匀。1000r/min 离心 5min,吸弃上清液,重复洗 1 次,再加入含 10% PBS 的 RPMI 1640 培养基 3ml,接种于 25ml 培养瓶中,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,24h 后,更换培养基继续培养。待细胞将近长满培养瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:3 传代。(4)流式细胞仪检测舒肝颗粒对肝星状细胞凋亡的影响:细胞复苏后,胰酶消化、离心、吹打、计数、调整细胞浓度 5×10^4 左右,接种六孔板,培养 1 天,分组加药,继续培养 24h,镜下观测细胞形态的变化。然后分别按实验组和对

照组进行流式细胞仪检测,每组选4个复孔,行5次检测。具体如下:吹打细胞,使其成为单细胞悬液,收集细胞液,1500r/min离心,冷PBS冲洗,再离心,丢弃上清液,每根试管中加入100 μ l冷PBS,振荡器振荡摇匀成单细胞悬液,调整细胞浓度 1×10^6 /ml,缓冲液稀释1:4(4ml结合缓冲液加16ml去离子水),取100 μ l细胞悬液,于5ml流式管中加入5 μ l Annexin V/FITC和10 μ l 20mg/ml 碘化丙锭(propidine iodide, PI),混匀后室温避光孵育15min,在反应管中加入400 μ l PBS上机分析。(5)流式细胞仪检测舒肝颗粒对CD95的影响:方法如上述,细胞复苏后,接种六孔板,培养一天,按实验组和对照组分别加药,继续培养24h后,镜下观测细胞形态的变化。同样用流式细胞仪检测CD95表达。(6)免疫细胞化学法检测Bax、Bcl-2的表达:取对数生长期细胞经上述相同处理后接种于置有经多聚赖氨酸处理的盖玻片的24孔板中,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂孵箱中培养,待细胞生长达70%融合,将细胞分4组:空白对照组、4.2mg/ml舒肝颗粒组;2.8mg/ml舒肝颗粒组;1.4mg/ml舒肝颗粒组。以无血清培养基洗细胞3次,加入不同浓度舒肝颗粒。舒肝颗粒处理24h后,采用4%多聚甲醛固定细胞15min,0.3% Tri-tonX-100通透细胞30min,3%过氧化氢-甲醇液中浸泡10min,非免疫性动物血清中孵育10min,加一抗(Bax抗体)4 $^{\circ}$ C冰箱过夜后,生物素标记的二抗中孵育10min,加HRP标记链亲和素孵育10min(以上每次操作均用PBS洗细胞3次后再进行下一步)。然后进行DAB显色(显微镜下观察掌握显色程度):自来水充分冲洗,苏木素复染,盐酸乙醇分化,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察,照相。以PBS代替一抗作阴性对照实验。同样的方法检测Bcl-2表达。Bax、Bcl-2阳性结果判断:阳性信号为棕黄色或棕褐色,位于细胞质的线粒体膜、内质网膜

及核膜上,用Imge plus 7.0版专业图像处理软件半定量分析系统对各组肝星状细胞Bax和Bcl-2反应细胞进行显微图像分析,每组随机检测4个视野细胞的光密度,计算其积分光密度,并计算出Bax/Bcl-2的比值。

3. 统计学方法:所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对照组和实验组凋亡率、CD95的表达率,Bax和Bcl-2的积分光度值,采用One-way ANOVA分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。由SPSS 15统计软件完成。

结 果

1. 舒肝颗粒对肝星状细胞凋亡的影响:从FITC和PI荧光双参数点图观察到,对照组HSC-T6细胞主要分布在3区,因操作等原因引起的机械性死亡细胞数量非常少($< 2\%$)。正常对照组($n = 20$)的凋亡率是 $3.40\% \pm 0.82\%$,不同浓度的舒肝颗粒1.4mg/ml($n = 20$)、2.8mg/ml($n = 20$)、4.2mg/ml($n = 20$)组,对应的肝星状细胞的凋亡率分别是: $42.61\% \pm 6.42\%$ 、 $61.07\% \pm 3.19\%$ 、 $87.84\% \pm 5.49\%$ 。在1.4mg/ml组,肝星状细胞的早期凋亡率明显较正常对照组增加,而中晚期凋亡率较少。在2.8mg/ml组,肝星状细胞的早期凋亡率和中晚期凋亡率均明显升高。4.2mg/ml组,肝星状细胞在舒肝颗粒作用24h后,大部分已属于中晚期凋亡,早期凋亡较低浓度组明显减少,但较正常对照组仍明显增高,从早期凋亡和中晚期凋亡的总体趋势看,随着浓度增高,总的凋亡率增加,且各组间的差别具有统计学意义($F = 2847.115, P < 0.01$),具体见图1。

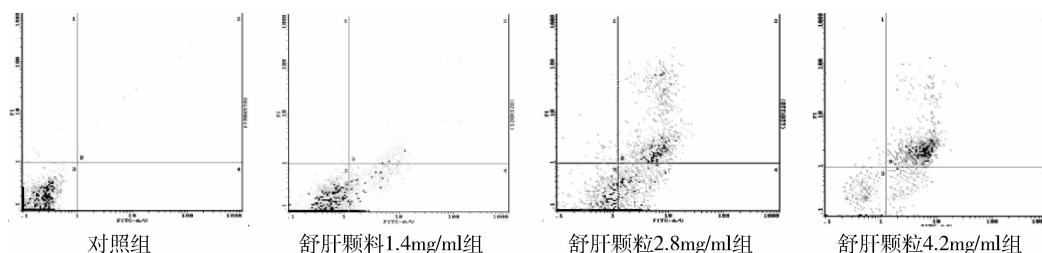


图1 流式细胞术检测舒肝颗粒对HSC凋亡的作用

2. 舒肝颗粒对肝星状细胞表达CD95的影响:活化的大鼠肝星状细胞经不同浓度的舒肝颗粒作用24h后,经流式细胞仪检测荧光标记的CD95的表达率。正常对照组($n = 20$)的CD95的表达率是 $0.10\% \pm 0.04\%$,不同浓度的舒肝颗粒1.4mg/ml($n = 20$)、2.8mg/ml($n = 20$)、4.2mg/ml($n = 20$)组,CD95的表达分别是: $4.77\% \pm 0.84\%$ 、 $9.44\% \pm 0.61\%$ 、 $24.51\% \pm$

5.91% ,并随着浓度增高,CD95的表达率也增高,且各组间的差别具体统计学意义($F = 810.155, P < 0.05$)。

3. 舒肝颗粒对肝星状细胞表达凋亡蛋白Bax/Bcl-2的影响:Bax的表达正常组为 574.17 ± 190.97 ,随着药物浓度组的增高,Bax的表达增多,不同浓度的舒肝颗粒1.4、2.8、4.2mg/ml,对Bax的表达分别

是:1113.14 ± 556.74、1418.75 ± 604.05、1765.43 ± 716.801,且各组间差别具有统计学意义($F = 3.729$, $P < 0.05$),Bcl-2 的表达,药物浓度组与正常对照组无明显差别, ($F = 2.70$, $P > 0.05$)。但总体 Bax/Bcl-2 的比值随着药物浓度组的增加而升高,具体见表 1 及图 2。

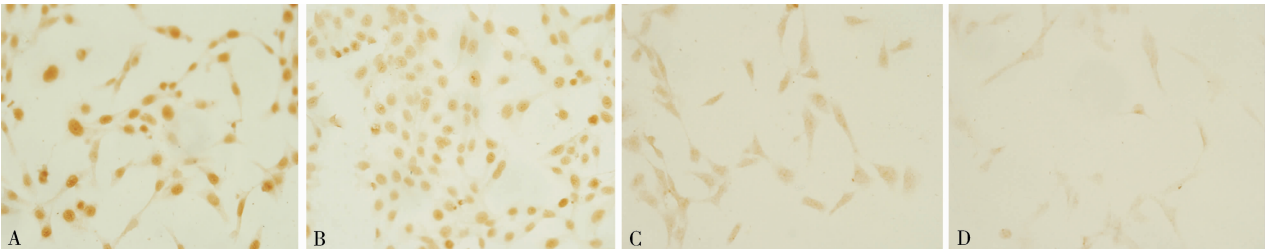


图 2 Bax 表达(SABC, ×400)

A.4.2mg/ml 舒肝颗粒组;B.2.8mg/ml 舒肝颗粒组;C.1.4mg/ml 舒肝颗粒组;D.对照组

讨 论

HSC 是一种主要合成分泌细胞外基质(ECM)和胶原酶的间质细胞。激活的 HSC 的减少主要不是通过转化为静止的 HSC 实现,而是凋亡的结果。HSC 凋亡是导致 HSC 数量减少的中心环节。促进 HSC 凋亡有利于肝纤维化的逆转并可能成为未来抗肝纤维化的突破口。现研究表明 HSC 凋亡是转化依赖性的,即转化中与激活后的 HSC 才能发生凋亡并且与激活程度相平行^[6]。本实验所采用的是激活后的 HSC,这符合肝纤维化中 HSC 的状态。本实验结果表明,舒肝颗粒在 1.4~4.2mg/ml 浓度范围内,舒肝颗粒无细胞毒性作用,能诱导 HSC 凋亡,其作用呈剂量依赖性。1.4mg/ml 舒肝颗粒作用 HSC-T6 24h,流式细胞仪检测 Annexin V 单阳性细胞即凋亡细胞开始增多,至 4.2mg/ml 时 Annexin V 及 PI 双阳性细胞即坏死细胞也开始增多。各实验组总的凋亡率,随舒肝颗粒浓度的增高,而增高,各组间的差别具有统计学意义。这表明舒肝颗粒可诱导肝星状细胞凋亡,且具体浓度依赖性。

肝星状细胞可通过多途径凋亡。激活的 HSC 凋亡主要通过死亡因子 FasL 及其相应的死亡因子受体(Fas 也称 Apo-21 或 CD95)介导的信号传导途径,它是机体内细胞凋亡的主要途径之一。研究发现,因为随着 HSC 活化的进展,其表达 Fas 和 FasL 不断地增加,用阻断 Fas 的抗体可以完全阻止正常的和已经进入凋亡周期的星状细胞继续凋亡;用其激活抗体则可以显著增加凋亡细胞数量^[7]。为了进一步探讨舒肝颗粒诱导 HSC 凋亡的可能作用机制,本实验通过

表 1 不同浓度的舒肝颗粒作用 HSC 后 Bax 和 Bcl-2 的 IOD 值及 Bax/Bcl-2 比值

组别	n	Bax	Bcl-2	比例
正常组	20	574.17 ± 190.97	180.42 ± 80.08	3.18
1.4mg/ml 组	20	1113.14 ± 556.74 *	170.11 ± 102.26	6.54
2.8mg/ml 组	20	1418.75 ± 604.05 *	152.83 ± 142.65	9.28
4.2mg/ml 组	20	1765.43 ± 716.80 *	140.63 ± 83.83	12.55

与正常组比较, * $P < 0.05$

流式细胞仪检测舒肝颗粒作用 24h 的 HSC 细胞,是否有死亡因子受体 CD95 的表达增多。实验结果表明随着舒肝颗粒浓度的增高,其 CD95 的表达明显增强,各组间差别具体统计学意义,提示舒肝颗粒可能是通过 Fas 介导的信号传导途径诱导 HSC 凋亡。

HSC 的另一条凋亡途径 Bcl-2/Bax 家族,Bcl-2 类为凋亡抑制因子,Bax 类,为凋亡促进因子^[8]。正常时 Bax 类和 Bcl-2 类这对正负凋亡调节基因在体内形成二聚体,处于动态平衡之中。当 Bax 的量高于 Bcl-2 时,诱导细胞凋亡,反之,细胞存活。本实验研究中发现随着舒肝颗粒的浓度增高 Bax 的表达明显增加,而 Bcl-2 的表达在正常对照组较少,随着舒肝颗粒的浓度组增高,Bcl-2 的变化无统计学意义,而 Bax/Bcl-2 的比值明显增高,促进了 HSC 的凋亡,考虑 Bcl-2 没有明显的减少,可能是舒肝颗粒诱导肝星状细胞凋亡的机制中对 Bcl-2 的表达无明显影响。Elsharkawy 等^[3]研究也发现在肝纤维化逆转中 HSCs 的凋亡是通过上调 caspase-3、Bax 实现的。故经舒肝颗粒作用的 HSC 促凋亡蛋白表达占优势,对凋亡的敏感性增加而向凋亡转化,这也可能是舒肝颗粒促进 HSC 凋亡的作用机制之一。

综上所述,本实验可以明确舒肝颗粒可以诱导肝星状细胞凋亡,且呈浓度依赖,其作用途径可能为 Fas 介导的信号传导途及与 Bax 蛋白表达上调相关。但舒肝颗粒素通过何种途径影响 HSC 的 Fas、Bax、P53 表达,其具体机制尚不清楚,是否还通过其他信号传导途径诱导 HSC 的凋亡、或通过对凋亡调控基因的调节而影响 HSC 的凋亡,尚有待于进一步的研

究。但本实验为舒肝颗粒治疗肝纤维化临床应用提供了理论依据。

参考文献

- 1 孙妩弋, 桂双英, 吴丽, 等. 芍药苷对肝纤维化大鼠肝脏星状细胞基质金属蛋白酶 13 及组织金属蛋白酶抑制因子 1 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1147-1151
- 2 Novo E, di bonzo LV, Cannito S, *et al.* Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(11): 2089-2093
- 3 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis[J]. Apoptosis, 2005, 10(5): 927-939
- 4 李志, 漆红, 李昌平. 舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞增殖及胶原分泌

的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(2): 169-172

- 5 杨玲, 朱清静, 笪邦红, 等. 中药抗纤软肝颗粒抑制 PDGF 诱导的肝星状细胞 MEK-1 和 c-fos 表达[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12: 347-350
- 6 Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression[J]. Semin Liver Dis, 2010 30(4): 402-410
- 7 Kordes C, Sawitza I, Hussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus[J]. Biol Chem, 2009, 390(10): 1003-1012
- 8 Shin HW, Park SY, Lee KB, *et al.* Down-regulation of Wnt signaling during apoptosis of human hepatic stellate cells[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(89): 208-212

(收稿: 2011-06-01)

(修回: 2011-06-20)

BMP-7 在大鼠肝纤维化组织中的动态表达和意义

朱碧红 陈永平 戴志娟 叶超 程媛 王晓东

摘要 目的 探讨大鼠肝纤维化组织中骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 的表达趋势及意义。**方法** 采用腹腔内注射二甲基亚硝酸胺 (DMN) 构建大鼠肝纤维化模型, 造模后 4 天、1、2、4、6、8 周分别检测血清 ALT、AST、ALB 的变化, 同时取肝组织用半定量 RT-PCR 方法检测 BMP-7 mRNA 的表达。采用 HE 染色及 Masson 三色染色, 光学显微镜下观察肝组织损伤情况。采用单因素方差分析进行多组均数间的比较。**结果** 肝纤维化模型组血清 ALT、AST 明显升高, ALB 明显下降。BMP-7 mRNA 在对照组大鼠和肝纤维化模型组大鼠肝组织中均有表达。与对照组相比, 肝纤维化模型组 4 天时 BMP-7 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.05$)。1~2 周与对照组差别无显著性 (P 均 > 0.05), 1 周与 4 天比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 2 周与 4 天比较显著升高 ($P < 0.05$)。4 周较对照组显著升高, 达高峰 ($P < 0.05$)。6 周较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 较 4 周下降 ($P < 0.05$)。8 周较 6 周有显著下降 ($P < 0.05$), 与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** BMP-7 mRNA 在正常 SD 大鼠肝脏有表达, 在肝纤维化大鼠肝组织中的表达呈动态改变, 在炎症早期表达减少, 随着肝纤维化进展, 表达增加, 在肝纤维化后期表达减少, 提示 BMP-7 参与肝纤维化的发生、发展过程。

关键词 BMP-7 肝纤维化 大鼠

Dynamic Expression and Significance of BMP-7 in Liver Tissues of Rats with Hepatic Fibrosis. Zhu Bihong, Chen Yongping, Dai Zhi-juan, Ye Chao, Cheng Yuan, Wang Xiaodong. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the expression and significance of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in rats models of hepatic fibrosis. **Methods** SD rat models with hepatic fibrosis were established by intraperitoneal injection of dimethyl nitrosamine (DMN). Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and albumin (ALB) levels were tested from hepatic fibrosis group at the time of 4d, 1week, 2week, 4week, 6week, 8week. And levels of BMP-7 mRNA were detected by semiquantitative RT-PCR in hepatic tissue. Pathological characters of liver tissue were also observed under optical microscope after hematoxylin-eosin and Masson staining. Comparisons between groups were analyzed by one-way ANOVA. **Results** ALT and AST in model group were significantly higher than those in control group, but ALB in model group decreased. All rats in normal control group and hepatic fibrosis groups expressed BMP-7. Compared with the rats in normal control group, the expression of BMP-7 mRNA in the 4-day group was significantly lower, but 1/2-week fibrosis groups had no significant difference. Compared with the rats in the 4-day group, the expression of BMP-7 mRNA in the 1-week group had no significant difference, but that of 2-week group was higher obviously. They reached a peak

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院感染内科

通讯作者: 陈永平, 主任医师, 教授, 博士生导师, 电子信箱: ypchen106@yahoo.com.cn