

- (1):195-196
- 9 Popovic M, Puchner S, Berzaczky D, *et al.* Uterine artery embolization for the treatment of adenomyosis: a review[J]. J Vasc Interv Radiol, 2011, 22(7):901-909
 - 10 Spies JB, Warren EH, Mathias SD, *et al.* Uterine fibroid embolization: measurement of health-related quality of life before and after therapy [J]. J Vasc Interv Radiol, 1999, 10(10):1293-1303
 - 11 黄明声, 单鸿, 姜在波, 等. 子宫动脉栓塞治疗子宫肌瘤的生命质量评价[J]. 中华放射学杂志, 2002, 36(10):877-880
 - 12 刘兆玉, 单明, 卢再鸣, 等. 子宫动脉栓塞术治疗子宫肌瘤的生命质量观察[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16(4):240-242
 - 13 Smith WJ, Upton E, Shuster EJ, *et al.* Patient satisfaction and disease quality of life after uterine artery embolization[J]. Obstet Gynecol, 2004, 190(6):1697-1706
 - 14 黄明声, 单鸿, 朱康顺, 等. 子宫动脉栓塞治疗子宫肌瘤的远期生命质量评价[J]. 介入放射学杂志, 2006, 15(8):497-499
 - 15 Radeleff BA, Satzl S, Eiers M, *et al.* Clinical 3-year follow of uterine fibroid[J]. Rofo, 2007, 179(6):593-600
- (收稿日期:2012-04-25)
(修回日期:2012-06-04)

甲基莲心碱对肝星状细胞抑制增殖及促凋亡作用

王雅琴 陈少隆 阳 韬 陈永平 林 蜀

摘 要 **目的** 观察甲基莲心碱对肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的抑制增殖及促凋亡作用,探索甲基莲心碱抗肝纤维化的分子机制。**方法** 体外培养 HSC-T6 细胞,用不同浓度甲基莲心碱作用于 HSC-T6, CCK-8 试剂盒(cell counting Kit-8)法检测细胞增殖抑制率,半定量反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测与凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达。**结果** 甲基莲心碱不同浓度处理组对 HSC-T6 抑制增殖率均有显著统计学差异($P < 0.001$),呈剂量依赖性, IC_{50} 为 $6.820 \pm 0.415 \mu\text{mol/L}$ 。甲基莲心碱不同浓度处理组 Bax mRNA 表达上调, Bcl-2 mRNA 表达下调,与空白对照组比较有统计学差异($P < 0.005$)。**结论** 甲基莲心碱可抑制肝星状细胞增殖、上调 Bax 和下调 Bcl-2 的 mRNA 表达,通过线粒体凋亡途径促其凋亡,是一种有效作用肝星状细胞的药物,为其改善肝纤维化提供理论依据。

关键词 甲基莲心碱 Bax Bcl-2 肝纤维化

Effects of Neferine on Proliferation and Apoptosis in Hepatic Stellate Cells. Wang Yaqin, Chen Shaolong, Yang Tao, Chen Yongping, Lin Zhuo. Department of Infectious Disease, Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To observe the effects of neferine on the proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells in vitro, and to clarify the possible molecular mechanism of anti-hepatic fibrosis. **Methods** HSC-T6 cell proliferation was measured by Cell Counting Kit-8, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to evaluate expressions of apoptosis related proteins Bax, Bcl-2 mRNA expression with different concentration of neferine in proper order. **Results** The growth rates of HSC-T6 were dose-dependently reduced by neferine ($P < 0.001$). IC_{50} was $6.820 \pm 0.415 \mu\text{mol/L}$. RT-PCR demonstrated that neferine could increase the expression of Bax mRNA, but the expression of Bcl-2 mRNA was the opposite ($P < 0.005$). **Conclusion** Neferine inhibits the proliferation of HSC-T6 probably, up-regulates the expression of Bax mRNA and down-regulates the expression of Bcl-2 mRNA to promote apoptosis via mitochondria. It is an effective drug in the inhibition of hepatic stellate cell proliferation. Our study provides a possible theoretical basis on anti-hepatic fibrosis.

Key words Neferine; Bax; Bcl-2; Hepatic fibrosis

肝纤维化是由各种致病因子引起的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)如 α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、胶原蛋白 I (collagen I, Col I) 等的合成与降解失衡,是肝内细胞外基质

可逆性过度沉淀的病理过程。若无及时有效干预,肝纤维化将最终发展为肝硬化,严重危害人类健康。目前公认肝星状细胞的活化与激活是肝纤维化发生发展的中心环节^[1]。因此,有效抑制肝星状细胞增殖和(或)促进其凋亡以阻断肝纤维化具有极为重要的临床意义。本实验以体外培养的大鼠肝星状细胞(HSC-T6)为实验模型,着重观察甲基莲心碱(neferine, Nef)对 HSC-T6 增殖活化及凋亡的影响,进一

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院感染内科/温州医学院肝病研究所

通讯作者:陈永平,电子信箱:ypchen106@yahoo.com.cn

步探讨甲基莲心碱的抗纤维化分子机制,为临床肝纤维化的防治提供新策略。

材料与方法

1. 材料:HSC - T6 细胞株由温州医学院附属第一医院感染科董培红老师馈赠,高糖 DMEM (H - DMEM)、胰蛋白酶、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,甲基莲心碱购自上海晶纯实业有限公司,CCK - 8 试剂盒购自日本同仁化学研究所,RNA 提取试剂、PCR 引物、PCR 试剂盒均购自大连宝生物公司。

2. 方法:(1)HSC - T6 细胞培养:HSC - T6 为大鼠肝星状细胞转染 SV40 后由低浓度血清筛选得到的永生化细胞株,将冷冻保存的 HSC - T6 细胞系于 37℃ 快速复苏后接种至含 10% FBS 的 H - DMEM 中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内贴壁培养。待细胞生长至融合状态,铺满瓶壁 70% 以上时,用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化细胞,按 1:3 密度传代接种。取 F3 对数生长期细胞用于实验。(2)甲基莲心碱工作液配制:甲基莲心碱,分子式 C₃₈H₄₄N₂O₆,相对分子质量 624.77,为淡黄色粉末。将 25mg 甲基莲心碱粉末溶于 340μmol DMSO 液中,待粉末完全溶解再加入 3.06ml H - DMEM 配成 10μmol/ml 的甲

基莲心碱原液,4℃ 保存可于 1 周内使用。使用时按比例稀释为工作液。(3)甲基莲心碱对 HSC - T6 增殖的影响:将细胞以 1 × 10⁵ 个/ml 接种于 96 孔板,每孔 100μl,待细胞生长至 60% ~ 70% 融合度时同步化处理 24 h,换用无血清培养基,按空白对照组、甲基莲心碱组(1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5μmol/L)分组处理后培养 48h,每组设 5 个复孔。用 CCK - 8 法检测甲基莲心碱对 HSC - T6 增殖的影响。(4)甲基莲心碱对 HSC - T6 Bax、Bcl - 2 表达的影响:将细胞以 1 × 10⁵ 个/ml 接种于 6 孔板,每孔 2ml,待细胞生长至 70% 融合时换用无血清培养基作用 24h 后,按空白对照组、甲基莲心碱(2、3、4、5μmol/L)分组处理,每组设 5 个复孔。处理因素作用 48h 后提细胞中总 RNA,具体操作参考 RNA 提取试剂盒说明书,用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度,A260/A280 在 1.8 ~ 2.0 范围内。取 RNA 1μl,采用反转录酶将其反转录成 cDNA。根据 NCBI 的 GenBank 基因序列设计引物,按条件进行反应(表 1)。所有 PCR 产物均在 18g/L 琼脂糖凝胶上电泳后,用凝胶成像系统拍照成像,BioSens SC810 软件测定灰度值,以 β - actin 为内参吸光度比值作半定量分析。

表 1 Bax、Bcl - 2 上、下游引物,循环数及退火温度

组别	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	退火温度(℃)	循环数
Bax	CATCCAGGATCGAGCAGAGAG	AGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC	65	32
Bcl - 2	GGATTGTGGCCTTCTTTGAGTT	ACCATTTGCCTGAATGTGTGT	64	35
β - actin	CACCCGCGAGTACAACCTTC	CCCATACCFCACCATCACACC	61	22

3. 统计学方法:计量资料结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件分析。多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间差异采用单因素方差分析,方差齐性者两两比较采用 LSD 法,方差不齐者用 Dunnett's T3 检验,P < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 甲基莲心碱对 HSC - T6 增殖的影响:细胞按

分组条件培养 48h 后,应用 CCK - 8 法检测吸光度 OD 值,如表 2 所示。甲基莲心碱(1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5μmol/L)处理后,HSC - T6 增殖受到抑制(图 1),IC₅₀ 为 6.820 ± 0.415μmol/L。

表 2 甲基莲心碱对 HSC 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	空白对照	Nef1.5μmol/L	Nef2.5μmol/L	Nef3.5μmol/L	Nef4.5μmol/L	Nef5.5μmol/L	Nef6.5μmol/L	Nef7.5μmol/L	Nef8.5μmol/L
OD 值	0.753 ± 0.031	0.618 ± 0.027 ^a	0.579 ± 0.017 ^{ab}	0.521 ± 0.011 ^{ab}	0.491 ± 0.015 ^{ab}	0.464 ± 0.030 ^{ab}	0.387 ± 0.011 ^{ab}	0.343 ± 0.019 ^{ab}	0.310 ± 0.012 ^{ab}
抑制率 (%)	—	17.900 ± 5.076	23.110 ± 3.465	30.792 ± 2.794 ^b	34.760 ± 3.394 ^b	38.220 ± 5.587 ^b	48.500 ± 2.731 ^b	54.350 ± 3.403 ^b	58.870 ± 1.843 ^b

表中各组吸光度均为实测值减去调零值后的差值;抑制率计算公式 = [(空白对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/空白对照组 OD 值 × 100%];与空白对照组比较,^aP < 0.001;与 Nef1.5μmol/L 比较,^bP < 0.001

2. 甲基莲心碱对 HSC - T6 Bax、Bcl - 2 mRNA 表达的影响:以目的基因与内参 β - actin 基因的吸光度比值做半定量比较,甲基莲心碱对 HSC - T6 Bax、Bcl

- 2 mRNA 表达呈剂量依赖性减少(表 3、图 2)。

讨 论

肝纤维化是各种慢性肝病损伤修复后的结果,

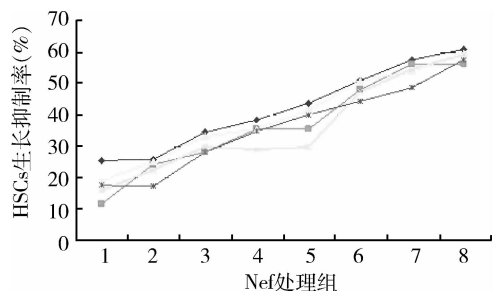


图1 甲基莲心碱对 HSC - T6 增殖的影响

图中 1~8 分别为 Nef 1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5 $\mu\text{mol/L}$

表3 甲基莲心碱对 HSC Bax、Bcl-2 mRNA 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	空白对照	Nef 2 $\mu\text{mol/L}$	Nef 3 $\mu\text{mol/L}$	Nef 4 $\mu\text{mol/L}$	Nef 5 $\mu\text{mol/L}$
Bax	0.3087 $\pm$ 0.00417	0.3344 $\pm$ 0.01451 ^a	0.3828 $\pm$ 0.01859 ^b	0.4801 $\pm$ 0.02079 ^b	0.4966 $\pm$ 0.02561 ^b
Bcl-2	0.8461 $\pm$ 0.01595	0.7710 $\pm$ 0.03072 ^a	0.6039 $\pm$ 0.0371 ^b	0.5375 $\pm$ 0.01010 ^b	0.3941 $\pm$ 0.00994 ^b

表中各组数值为实测值与内参 β -actin 吸光度的比值;与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与空白对照组比较,^b $P < 0.005$

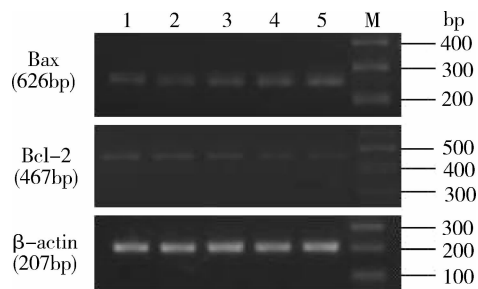


图2 PT-PCR 检测各组 Bax、Bcl-2 mRNA

β -actin 为内参;1. 空白对照组;2. Nef 2 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;3. Nef 3 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;4. Nef 4 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;5. Nef 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;M. DNA 分子质量标志物

活化状态。HSCs 活化后即向组织损伤部位定向迁移并累积,分泌大量 ECM 的同时调节其降解^[1]。

目前认为肝细胞损伤修复中通过 HSCs 的凋亡将激活的 HSCs 清除也能使 HSCs 数量减少,实现肝纤维化的逆转。HSCs 凋亡的途径主要由 Fas/FasL、p75/NGF 和 PBR/PBRL 介导,相关的调控蛋白有核因子- κB 及 Bcl-2 家族蛋白。在线粒体凋亡途径的 Bcl-2 家族在 HSCs 凋亡中起重要作用,Bcl-2 和 Bax 蛋白分别为抑制凋亡和促进凋亡的重要因子。Bcl-2 是世界公认的抑制凋亡基因,通过调节线粒体膜电位和影响膜通透性而阻止线粒体释放 caspase、细胞色素 C 等来调控细胞凋亡。值得一提的是 Bcl-2 亚科 BH3 为仅有的可以抑制抗凋亡蛋白或直接激活 Bax 或 Bak 的蛋白^[3]。相反,Bax 可与 Bcl-2 结合形成异源二聚体以阻断 Bcl-2 的生物学

也是各种慢性肝病向肝硬化发展的可逆环节,早期肝纤维化得到及时有效干预可发生逆转。HSCs 是肝纤维化发生过程中发生过度沉积的 ECM 的主要来源,而 HSCs 的数目受肝纤维化过程中的增殖与凋亡影响^[2]。肝脏的炎症损伤能使 HSCs 激活并增殖,在最初的活化启动期 Col I 大量生成,Col III、Col IV 显著增加,此时 HSCs 基因表达及表型的快速变化,获得肌成纤维细胞样表型。继而进入持续活化期,HSCs 通过自分泌、旁分泌多种细胞因子如 PDGF、IGF、CTGF、TGF- β 1 等进一步放大 HSCs 表型变化,维持其持续

效应,从而发挥细胞凋亡作用^[4]。有研究发现,在肝纤维化病人中 Bcl-2 呈过度表达,HSCs 呈持续活化状态^[2, 5]。

因此,积极寻求一种有效的药物直接作用于肝星状细胞而达到抗肝纤维化的目的显得十分重要。甲基莲心碱由睡莲科植物莲成熟种子的胚芽中提取,分子式为 $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6$ 。最新研究表明它具有直接抗骨肉瘤细胞、肿瘤药物增敏、抗炎抗氧化及扩血管降压等多种药理作用^[6-11]。甲基莲心碱作为一种中药提取成分化学性质明确,国外已有大量研究证实它具有抗纤维化作用,能明显地改善肺纤维化、肾脏纤维化等。Zhao 等^[12]通过体内外实验证实了甲基莲心碱对由博来霉素引起的大鼠肺纤维化有抗炎、抗氧化及抑制核因子- κB 作用。Ding 等^[13]通过体外实验证实甲基莲心碱能作用于肝星状细胞,减少 α -SMA、Col I 的表达。因此笔者大胆推测甲基莲心碱可以作用于肝纤维化的多个环节,也可能参与肝星状细胞的多条信号通路。本实验以体外培养的肝星状细胞为研究对象,经甲基莲心碱处理后光镜下观察到 HSC-T6 细胞皱缩变形,但仍贴壁生长;甲基莲心碱处理组较之细胞对照组能抑制 HSCs 细胞增殖,并呈浓度依赖性;Bax 表达增加,Bcl-2 表达减少($P < 0.05$)。结果证明甲基莲心碱抗纤维化功能确实。笔者推测也许是甲基莲心碱分子结构酚羟基上的氢键易与氧自由基结合而具有抗氧化效能,此过程很可能可以下调细胞内 Bcl-2 的表达而促进 HSC-T6 的凋亡。

有研究表明,增殖和凋亡之间可通过细胞周期存在联系。细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期利于凋亡的发生,凋亡的介导存在细胞周期特异性。HSCs 活化、增殖和凋亡早已成为国内外抗肝纤维化研究关注的焦点,抑制 HSCs 活化、促进其凋亡成为寻找抗肝纤维化有效治疗策略的关键,笔者前期实验体内研究证实了甲基莲心碱能有效抗肝纤维化,从 HSCs 增殖和凋亡入手,探讨了甲基莲心碱体外抗肝纤维化的作用及其机制。

甲基莲心碱在体外研究中虽有利于肝纤维化的逆转,但是肝纤维化形成机制复杂,抑制 HSCs 增殖并促进其凋亡只是其治疗机制中的一部分。由于对甲基莲心碱详细的分子生物学、细胞生物学机制的尚不明朗,这在一定程度上限制了甲基莲心碱在临床各上的应用。因此还有待于进一步研究其他途径机制。

参考文献

- 1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218
- 2 Mutluay R, Ozenirler S, Poyraz A. The expression of bcl-2 in chronic liver diseases[J]. Saudi Med J, 2005, 26(8): 1245-1249
- 3 Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria - specificity in membrane targeting for death[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4): 532-539
- 4 He H. Involvement of G proteins of the Rho family in the regulation of Bcl-2-like protein expression and caspase 3 activation by Gastrins[J]. Cell Signal, 2008, 20(1): 83-93
- 5 Novo E. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans[J]. Gut, 2006, 55(8): 1174-1182
- 6 Zhang X. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 677(1-3): 47-54
- 7 Huang C. Synergistic effect of hyperthermia and neferine on reverse multidrug resistance in adriamycin-resistant SGC7901/ADM gastric cancer cells[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(4): 488-496
- 8 Cao JG, Tang XQ, Shi SH. Multidrug resistance reversal in human gastric carcinoma cells by neferine[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(20): 3062-3064
- 9 Ai XH. Effect of neferine on adriamycin-resistance of thermotolerant hepatocarcinoma cell line HepG2/thermotolerance[J]. Ai Zheng, 2007, 26(4): 357-360
- 10 Jung HA. Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1[J]. Life Sci, 2010, 87(13-14): 420-430
- 11 Qian JQ. Cardiovascular pharmacological effects of bisbenzylisoquinoline alkaloid derivatives[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(12): 1086-1092
- 12 Zhao L. Neferine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 627(1-3): 304-312
- 13 Ding H. Neferine inhibits cultured hepatic stellate cell activation and facilitates apoptosis: a possible molecular mechanism[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 650(1): 163-169

(收稿日期:2012-04-12)

(修回日期:2012-05-08)

近视眼 SBK 术后角膜后表面高度变化及其与角膜生物力学改变的相关性

张 佳 夏哲人 许琛琛 余 野 王勤美

摘 要 **目的** 研究近视眼前弹力层下激光角膜磨镶术(sub-Bowman's keratomileusis, SBK)后角膜后表面高度的变化量及其与角膜生物力学参数变化量的相关性。**方法** 选择行 SBK 术的近视眼患者 44 位(共 88 眼),分别在术前、术后 1 周、术后 1 个月及 3 个月应用 Pentacam 眼前节分析系统测量角膜后表面高度值,取中央点数值。应用眼反应分析仪(ocular response analyzer, ORA)测量角膜生物力学参数角膜滞后量和角膜阻力因子。**结果** 近视眼 SBK 术后与术前角膜后表面高度值的差异没有统计学意义,而角膜滞后量、角膜阻力因子术后较术前低,差异有统计学意义。术后 1 周、1、3 个月的角膜后表面高度变化量分别为 -

基金项目:温州市科技局基金资助项目(Y20090356)

作者单位:325027 温州医学院附属眼视光医院(张佳、许琛琛、余野、王勤美);温州医学院附属第二医院(夏哲人)

通讯作者:许琛琛,电子信箱:xcc@mail.eye.ac.cn