

川芎嗪干预转化生长因子 β 1诱导肝星状细胞结缔组织生长因子表达中 p38丝裂酶原激活蛋白激酶的途径***

杨建波, 李孝生

Effect of tetramethylpyrazine on transforming growth factor beta 1-induced connective tissue growth factor expression: Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathways in hepatic stellate cells

Yang Jian-bo, Li Xiao-sheng

Abstract

BACKGROUND: Previous studies demonstrated that Tetramethylpyrazine can anti-hepatic fibrosis via inhibiting hepatic stellate cells proliferation, blocking the synthesis of type I, III collagen, as well as down-regulating the expression of connective tissue growth factor (CTGF), however, the detail mechanisms remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effects of Tetramethylpyrazine on expression of CTGF and the role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) signal pathway in hepatic stellate cells (HSCs).

METHODS: HSCs were cultured *in vitro*, stimulated by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1, 5 μ g/L), and then, intervened by Tetramethylpyrazine and P38MAPK specific blocker SB203580. The expressions of CTGF and type I collagen mRNA were measured by reverse transcription polymerase chain reaction. The phosphorylation of p38 MAPK was assessed by Western blotting.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, TGF- β 1-induced CTGF and type I collagen gene expressions were obviously increased ($P < 0.01$). CTGF and type I collagen expressions appeared decreased in varying degrees after the intervened by Tetramethylpyrazine and SB203580. But the Tetramethylpyrazine and Tetramethylpyrazine + SB203580 inhibited the expression of type I collagen and CTGF mRNA higher than that of SB203580. Tetramethylpyrazine and SB203580 also significantly inhibited the phosphorylation p38MAPK protein expression ($P < 0.01$). The inhibitory effects were more obviously in the SB203580 and Tetramethylpyrazine + SB203580 groups. However, the differences between the SB203580 group and Tetramethylpyrazine + SB203580 had no significance ($P > 0.05$). Accordingly, it is supposed that Tetramethylpyrazine inhibits TGF- β 1-induced CTGF gene expression, blocks type I collagen mRNA synthesis, and its mechanism may be related to inhibition p38 MAPK signaling pathways. The role of anti-fibrosis may be multi-target.

Yang JB, Li XS. Effect of tetramethylpyrazine on transforming growth factor beta 1-induced connective tissue growth factor expression: Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathways in hepatic stellate cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(37): 6877-6881. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前期研究发现川芎嗪可通过抑制肝星状细胞的增殖和阻断 I, III 胶原的合成, 下调结缔组织生长因子的表达等, 发挥抗肝纤维化的作用, 但具体机制尚不清楚。

目的: 观察川芎嗪对体外培养肝星状细胞表达结缔组织生长因子的影响, 以及 p38 丝裂酶原激活蛋白激酶(p38MAPK)信号通路在其中的作用。

方法: 用 5 μ g/L 转化生长因子 β 1 诱导活化体外培养的肝星状细胞, 用川芎嗪和 p38MAPK 特异阻断剂 SB203580 进行干预, 以 RT-PCR 法检测结缔组织生长因子 mRNA 和 I 型胶原 mRNA 的表达, Western blot 法检测磷酸化 p38MAPK 蛋白的表达。

结果与结论: 经转化生长因子 β 1 诱导后, 肝星状细胞中结缔组织生长因子和 I 型胶原 mRNA 表达显著增强($P < 0.01$), 用川芎嗪和 SB203580 干预后, 结缔组织生长因子和 I 型胶原 mRNA 的表达均出现不同程度的下降。但川芎嗪和川芎嗪+SB203580 混合干预对这两者的基因表达抑制作用比单独的 SB203580 干预更强。川芎嗪和 SB203580 对磷酸化 p38MAPK 蛋白表达也都有明显的抑制作用($P < 0.01$), 但 SB203580 和川芎嗪+SB203580 对其磷酸化蛋白表达抑制作用更明显, 而 SB203580 与川芎嗪+SB203580 无明显差异($P > 0.05$)。因此, 推测川芎嗪可能通过抑制转化生长因子 β 1 诱导的结缔组织生长因子基因表达, 阻断 I 型胶原合成, 其作用途径可能与抑制 p38mapk 信号通路有关, 同时认为川芎嗪抗纤维化可能是多重作用靶点。

关键词: 川芎嗪; 肝星状细胞; p38 丝裂酶原激活蛋白激酶; 结缔组织生长因子; 中药单体; 组织工程
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.37.009

杨建波, 李孝生. 川芎嗪干预转化生长因子 β 1 诱导肝星状细胞结缔组织生长因子表达中 p38 丝裂酶原激活蛋白激酶的途径 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(37):6877-6881. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Yang Jian-bo*, Studying for master's degree, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
sandy2007anizer@gmail.com

Correspondence to: Li Xiao-sheng, Master, Professor, Master's supervisor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
LXS6896@126.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Chongqing, No. 2006BB5428*; the Scientific Research Foundation of Health Department of Chongqing, No. 2005-A-70*

Received: 2010-03-09
Accepted: 2010-04-02

重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆市400010

杨建波★, 男, 1982年生, 汉族, 四川省遂宁市人, 重庆医科大学在读硕士, 主要从事肝纤维化的防治研究。
sandy2007anizer@gmail.com

通讯作者: 李孝生, 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肝纤维化的防治研究。
LXS6896@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)37-06877-05

收稿日期: 2010-03-09
修回日期: 2010-04-02 (20100205017/YJ·Z)

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础, 是肝内过多或异常的胶原纤维沉积所导致的病理状态及其相关改变^[1-7]。该病理过程是可以逆转的, 阻断乃至逆转肝纤维化是慢性肝病治疗的关键环节。肝纤维化患者细胞外间质合成与降解的稳态平衡被慢性肝实质持续的炎症与坏死所破坏, 细胞外间质合成大于降解。过度纤维化使肝脏萎缩变硬, 直到引起肝硬化失代偿或肝衰竭。结缔组织生长因子是即刻早期基因CCN家族成员之一, 是一种多功能细胞因子, 目前认为在病理状态下, 其过度表达与纤维化程度密切相关。主要是通过促进细胞增殖、刺激细胞外基质的合成、抑制其降解, 使细胞向成纤维细胞趋化等作用, 与肝纤维化的发生发展关系密切^[8-12]。川芎嗪是从中药伞形科植物川芎(Ligusticum Chuanxiong)的根茎中提取的有效成分, 具有活血化瘀、抗血小板凝集、扩张血管等多种作用, 临床上被广泛用于缺血性脑血管病、慢性阻塞性肺病、肾小球疾病及抗肿瘤转移等的治疗并取得较好疗效^[13-17]。近年来的研究发现川芎嗪可通过抗脂质过氧化、抑制肝星状细胞的活化、下调结缔组织生长因子表达、阻断胶原的合成、促进基质金属蛋白酶13的表达等发挥抗肝纤维化作用^[18-20]。但川芎嗪抗纤维化的具体机制仍不很清楚。特别是在肝星状细胞中川芎嗪对结缔组织生长因子的影响是否与p38丝裂酶原激活蛋白激酶(p38MAPK)信号通路之间存在关联, 目前还未见相关报道。本实验以转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)诱导的大鼠肝星状细胞, 用p38MAPK特异性阻断剂SB203580进行干预。观察川芎嗪对结缔组织生长因子及I型胶原mRNA表达的影响, 探讨川芎嗪抗纤维化是否与p38MAPK信号通路有关。

1 材料和方法

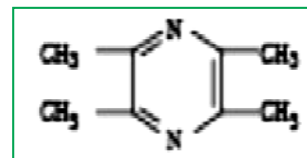
设计: 细胞生物学体外观察性实验。

时间及地点: 实验于2009-03/11在重庆医科大学第二附属医院超声研究所实验室完成。

材料:

细胞: 肝星状细胞株HSC-T6^[19, 21], 由SV40转染SD大鼠肝星状细胞获得, 其表型为活化的肝星状细胞, 由中科院肿瘤研究所提供。

药物: 盐酸川芎嗪注射液(C₈H₁₂N₂; 2, 3, 5, 6-四甲基吡嗪; 2, 3, 5, 6-tetramethylpyrazine) (批号: 0806031)购自河南辅仁怀庆堂制药有限公司(规格: 2 mL : 40 mg), 化学结构式为:



试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|--|---------------|
| DMEM 培养基, 小牛血清 | 美国 Hyclone 公司 |
| DMSO | 美国 Sigma 公司 |
| SB203580 | 美国 ALEX 公司 |
| SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, ECL 显色试剂盒, WESTERN, IP 细胞裂解液 | 南通碧云天生物研究所 |
| 丝裂酶原蛋白激酶 p38 抗体, 磷酸化-丝裂酶原蛋白激酶 p38 抗体 | 北京博奥森生物技术有限公司 |
| Quantity One 图像分析系统 | 美国 Biorad 公司 |

方法:

细胞培养: HSC-T6细胞用含体积分数10%的小牛血清DMEM培养基置于37 °C, 体积分数5% CO₂培养箱培养。传代至三四代后, 用于实验。

分组: 参考本课题组前期的研究^[22], 选取川芎嗪的适宜抑制质量浓度为200 mg/L, 取复苏后处于生长期的HSC-T6细胞, 0.1%胰酶消化, 均匀接种于含体积分数10%小牛血清的DMEM培养液中, 培养24 h后, 将细胞按下表分组, 培养48 h, 备用。

细胞分组:

| 组别 | 处理方法 |
|-----------|---|
| 空白对照组 | 仅加入含体积分数为 10%小牛血清的 DMEM 培养基 |
| TGF-β1 组 | 加入 TGF-β1 5 μg/L |
| 川芎嗪组 | 先加入 5 μg/L 的 TGF-β1 作用 30 min 后 再加入 200 mg/L 的川芎嗪 |
| 阻断剂组 | TGF-β1 5 μg/L + SB203580 15 μmol/L |
| 川芎嗪+ 阻断剂组 | TGF-β1 5 μg/L + 川芎嗪 200 mg/L + SB203580 15 μmol/L |

RT-PCR法检测结缔组织生长因子 mRNA, I型胶原的表达: 取培养好的细胞, 吸去培养基。用磷酸盐缓冲液冲洗二三次后, 加入1 mL RNAiso Plus, 振荡室温静置5 min。加入0.2 mL 氯仿, 用力颠倒离心管, 室温下静置 5 min,

12 000 g离心15 min。向上清液中加入等体积的异丙醇,上下颠倒离心静置10 min。12 000 g 4 °C离心10 min。去上清,缓慢加入体积分数75%乙醇1 mL, 12 000 g 4 °C离心5 min, 弃乙醇。室温干燥2~5 min, 加入250 μL RNase-free水。待RNA沉淀完全溶解后于-80 °C保存。根据260 nm的吸光度值对样品的总RNA初步定量。取0.5 μL RNA作为反转录模板行RT反应^[23]。

目的基因与内参引物序列:

Collagen I (310 bp):

上游序列: 5' -GGT GGT TAT GAC TTC AGC TTC C-3'

下游序列: 5' -GAC CTG TCT CCA TGT TGC AGT AG-3'

退火温度 52 °C

结缔组织生长因子(286 bp):

上游序列: 5' -CAA C TA TGA TGC GAG CCAACT G-3'

下游序列: 5' -CAC ACC CCA CAG AAC TTA GCC-3'

退火温度 55 °C

GAPDH(610 bp):

上游序列: 5' -GTG CTG AGT ATG TCG TGG AGT CT-3'

下游序列: 5' -GTG GAA GAA TGG GAG TTG CTG T-3'

退火温度 57 °C

随后进行PCR扩增, GAPDH为内参, 于94 °C预变性4 min后紧随30个循环, 循环参数: 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s(结缔组织生长因子)及52 °C退火40 s(Collagen I), 74 °C延伸30 s(结缔组织生长因子), 74 °C延伸40 s(Collagen I), 最后74 °C延伸5 min补齐末端。

PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 约310 bp(Collagen I), 286 bp(结缔组织生长因子)处为目的基因片段。电泳结果以Quantity One图像分析系统进行条带吸光度分析, 与内参GAPDH mRNA的比值作为目的基因mRNA的相对水平。

Western blot检测磷酸化p38MAPK蛋白表达水平: 按蛋白提取试剂盒裂解细胞, 提取细胞蛋白定量, 按每孔10 μg/L蛋白量上样, 电泳2 h后电转至PVDF膜上, 以50 g/L脱脂牛奶/TBST封闭1 h。

兔抗鼠磷酸化p38mapk多克隆抗体(1:1 000)4 °C过夜, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:5 000)室温孵育1 h。ECL-plus发光试剂盒显影。应用p38mapk作内参照。

结果以Quantity One图像分析系统进行条带吸光度分析, 磷酸化p38mapk蛋白与非磷酸化p38mapk蛋白条带灰度的比值作为磷酸化蛋白表达的相对含量^[24]。

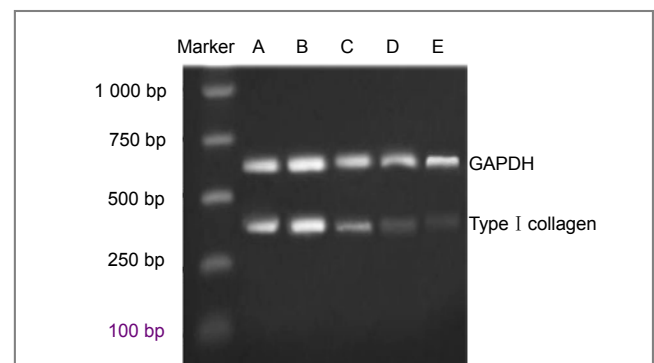
主要观察指标: 川芎嗪对体外培养肝星状细胞表达I型胶原、结缔组织生长因子mRNA与磷酸化p38MAPK蛋白表达的影响。

设计、实施、评估者: 实验设计、实施、评估为全体作者, 参加人员均受过专门培训。

统计学分析: 采用SPSS 13.0软件(美国SPSS公司)完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析, 采用LSD-*t*检验, 按检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

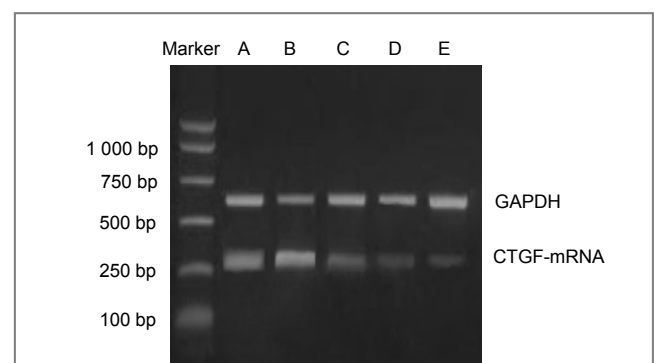
2.1 川芎嗪对I型胶原、结缔组织生长因子基因表达的影响 见图1, 2, 表1。



A: blank control group; B: TGF-β1 group; C: SB203580 group; D: Tetramethylpyrazine group; E: Tetramethylpyrazine + SB203580 group

Figure 1 The effect of tetramethylpyrazine on the transforming growth factor β1(TGF-β1) induced type I collagen mRNA expression

图1 川芎嗪对转化生长因子β1诱导的肝星状细胞细胞I型胶原 mRNA 表达的影响



A: blank control group; B: TGF-β1 group; C: SB203580 group; D: Tetramethylpyrazine group; E: Tetramethylpyrazine + SB203580 group

Figure 2 The effect of tetramethylpyrazine on the transforming growth factor β1(TGF-β1) induced connective tissue growth factor mRNA expression

图2 川芎嗪对转化生长因子β1诱导的肝星状细胞细胞结缔组织生长因子 mRNA 表达的影响

大鼠肝星状细胞经TGF-β1诱导后, I型胶原和结缔组织生长因子 mRNA表达均显著增强($P < 0.01$)。

使用阻断剂SB203580后, 细胞I型胶原和结缔组织生长因子 mRNA表达明显下降($P < 0.01$), 而川芎嗪

和川芎嗪+阻断剂对细胞 I 型胶原和结缔组织生长因子 mRNA 表达的抑制作用比单独的阻断剂(SB203580)更强($P < 0.01$)。

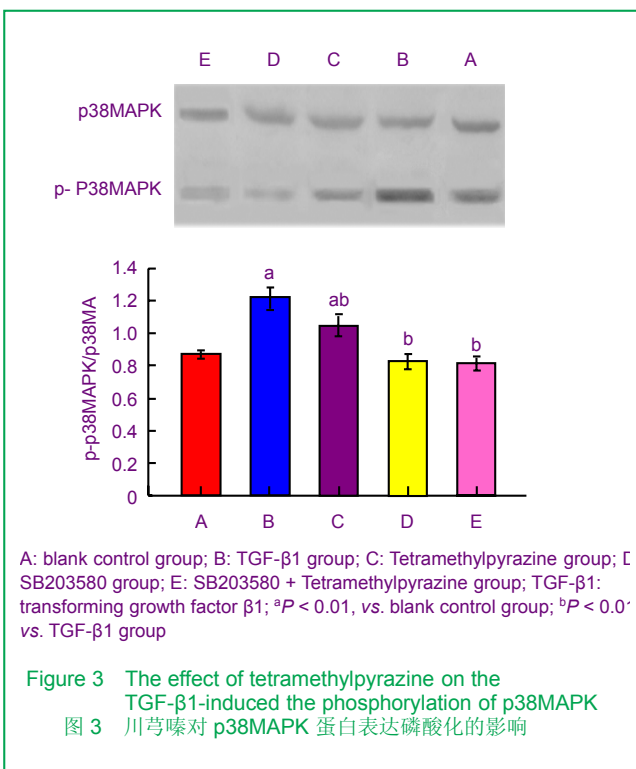
川芎嗪组与川芎嗪+阻断剂组间 I 型胶原和结缔组织生长因子 mRNA 的表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表 1 川芎嗪对转化生长因子β1 诱导的肝星状细胞细胞 I 型胶原、结缔组织生长因子 mRNA 表达的影响
Table 1 The effect of tetramethylpyrazine on the TGF-β1-induced type I collagen and connective tissue growth factor (CTGF) mRNA expression (x±s)

| Group | Type I collagen / Internal reference | CTGF / Internal reference |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Blank control | 0.890±0.018 | 0.881±0.034 |
| TGF-β ₁ | 1.106±0.046 ^a | 1.097±0.024 ^a |
| SB203580 | 0.966±0.007 ^b | 0.936±0.024 ^b |
| Tetramethylpyrazine | 0.846±0.010 ^b | 0.841±0.047 ^b |
| Tetramethylpyrazine + SB203580 | 0.838±0.014 ^b | 0.820±0.016 ^b |

TGF-β₁: transforming growth factor β₁; ^a $P < 0.01$, vs. blank control group; ^b $P < 0.01$, vs. TGF-β₁ group

2.2 川芎嗪对磷酸化p38MAPK蛋白表达的影响 经 TGF-β₁诱导后, 大鼠肝星状细胞磷酸化p38MAPK蛋白表达显著增强($P < 0.01$), 而经过川芎嗪, 川芎嗪+SB203580或SB203580干预, 磷酸化p38MAPK蛋白表达均明显受到抑制($P < 0.01$), 且SB203580和川芎嗪+SB203580对磷酸化p38MAPK蛋白的作用更强烈($P < 0.01$), 但SB203580与川芎嗪+SB203580间差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图3。



3 讨论

肝纤维化是一个复杂的过程, 影响因素很多, 现公认为是肝脏内以胶原成分为主的细胞外基质合成与降解失衡而过度沉积的结果, 活化的肝星状细胞则是肝内细胞外基质的主要来源^[25]。结缔组织生长因子是近年来发现的一种重要致纤维化因子, 能促进 I, III型胶原, 纤维连接蛋白等细胞外基质的增加, 在创伤愈合及肾脏、肝脏、心脏、肺纤维化发生中结缔组织生长因子明显过度表达, 在各类器官纤维化发生中起重要作用^[26-31]。

川芎嗪是从活血化瘀的中药川芎中分离提纯的一种生物碱单体, 被广泛用于心脑血管病等的防治^[32-33]。本课题前期研究表明川芎嗪能阻断 I 型胶原的合成抑制转化生长因子 TGF-β₁ 诱导下的肝星状细胞结缔组织生长因子蛋白的表达, 能促进基质金属蛋白酶 13 的表达^[22-34], 本次实验也发现川芎嗪可以抑制 TGF-β₁ 诱导的大鼠肝星状细胞结缔组织生长因子和 I 型胶原 mRNA 的表达, 同时也对磷酸化 P38MAPK 蛋白的表达有明显的抑制作用。又因 p38MAPK 参与了结缔组织生长因子及 I 型胶原基因表达的调节, 从而表明川芎嗪对 P38MAPK 通路的抑制作用可能是川芎嗪下调结缔组织生长因子表达的机制之一。

川芎嗪对结缔组织生长因子和胶原的基因表达的抑制作用比单用阻断剂更明显, 而与川芎嗪+阻断剂混合组的抑制作用其表达无明显差异性, 提示川芎嗪抗纤维化可能是通过多作用靶点来完成的, 值得作进一步研究证实。

综上所述, 川芎嗪可能通过 p38mapk 途径抑制 TGF-β₁ 诱导肝星状细胞结缔组织生长因子的基因表达, 阻断 I 型胶原合成, 从而发挥其抗纤维化的作用。其抗纤维化也可能是多作用靶点。这将为川芎嗪用于肝纤维化的临床治疗提供细胞分子水平依据。

4 参考文献

- [1] Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 2007;22 Suppl 1: S79-84.
- [2] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem. 2000; 275(4):2247-2250.
- [3] Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. J Gastroenterol Hepatol. 2006;21 Suppl 3:S84-87.
- [4] Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? N Engl J Med. 2001;344(6):452-454.
- [5] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005;115(2): 209-218.
- [6] Friedman SL. Hepatic fibrosis-overview. Toxicology. 2008; 254(3): 120-129.
- [7] Hui AY, Friedman SL. Molecular basis of hepatic fibrosis. Expert Rev Mol Med. 2003;5(5):1-23.
- [8] Kobayashi H, Hayashi N, Hayashi K, et al. Connective tissue growth factor and progressive fibrosis in biliary atresia. Pediatr Surg Int. 2005;21(1):12-16.
- [9] Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. Hepatol Res. 2003;26(1):1-9.

- [10] Blaney Davidson EN, Vitters EL, Mooren FM, et al. Connective tissue growth factor/CCN2 overexpression in mouse synovial lining results in transient fibrosis and cartilage damage. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1653-1661.
- [11] Gressner OA, Lahme B, Demirci I, et al. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol.* 2007;47(5):699-710.
- [12] Li G, Li D, Xie Q, et al. RNA interfering connective tissue growth factor prevents rat hepatic stellate cell activation and extracellular matrix production. *J Gene Med.* 2008;10(9):1039-1047.
- [13] Zhang D. *Shiyong Zhongxiyi Jiehe Linchuang.* 2009;9(4):8-10. 张丹. 川芎嗪联合生脉注射液治疗慢性肺源性心脏病急性加重期疗效观察[J]. *实用中西医结合临床.* 2009,9(4):8-10.
- [14] Guo WL. *Zhongguo Zhongyi Jizheng.* 2009;18(5):741-742. 郭维玲. 川芎嗪注射液联合黄芪注射液治疗早期糖尿病肾病疗效观察[J]. *中国中医急症.* 2009,18(5):741-742.
- [15] Zhang J, Cao PG, Fu HQ, et al. *Yixue Linchuang Yanjiu.* 2006;23(8):1249-1251. 曹培国, 符慧群, 等. 川芎嗪联合顺铂治疗Lewis肺癌的实验研究[J]. *医学临床研究.* 2006,23(8):1249-1251.
- [16] Yang Y, Xiong P. *Jiangsu Zhongyiyao.* 2008;40(1):34-35. 杨彦, 熊萍. 川芎嗪注射液对23例糖尿病肾病患者血糖、尿蛋白及C反应蛋白的影响[J]. *江苏中医药.* 2008,40(1):34-35.
- [17] Wu N, Hu DR, Ji JL, et al. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi.* 2008;24(1):128-131. 吴宁, 胡德蓉, 齐洁琳, 等. 川芎嗪对急性放射损伤小鼠骨髓中LFA-1、ICAM-1表达影响的研究[J]. *中国病理生理杂志.* 2008,24(1):128-131.
- [18] Ji CW, Liu JM, Li LC, et al. *Shanxi Yike Daxue Xuebao.* 2003;34(4):293-295. 姬成伟, 刘晋敏, 李亮成, 等. 川芎嗪抑制大鼠肝纤维化作用实验研究[J]. *山西医科大学学报.* 2003,34(4):293-295.
- [19] Wang XJ, Ma Y, Li XH, et al. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi.* 2009;17(8):809-812. 汪晓军, 马赞, 李秀惠, 等. 川芎嗪对HSC-T6增殖的影响[J]. *世界华人消化杂志.* 2009,17(8):809-812.
- [20] Wang H, Chen ZZ. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi.* 2000;8(2):98. 王红, 陈在忠. 川芎嗪对大鼠肝纤维化脂质过氧化的影响[J]. *中华肝脏病杂志.* 2000,8(2):98.
- [21] Xu JW, Ren XX, Wang Y, et al. *Xi'an Jiaotong Daxue Xuebao: Yixue Ban.* 2009;30(2):192-194, 198. 许君望, 任晓侠, 王云, 等. 植物雌激素木黄酮对HSC-T6细胞增殖及雌激素受体表达的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版).* 2009,30(2):192-194, 198.
- [22] Chen S, Li XS, Wang WL. *Shengming Kexue Yanjiu.* 2009; 13(2):146-151. 陈爽, 李孝生, 王文丽. 川芎嗪对转化生长因子 $\beta 1$ 刺激肝星状细胞CTGF及I型胶原表达的影响[J]. *生命科学研究.* 2009,13(2):146-151.
- [23] Tan JT, McLennan SV, Song WW, et al. Connective tissue growth factor inhibits adipocyte differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(3):C740-751.
- [24] Ma X, Jia YT, Qiu DK. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates experimental autoimmune hepatitis: involvement of nuclear factor kappa B. *World J Gastroenterol.* 2007;13(31):4249-4254.
- [25] Lee KS. Hepatic fibrogenesis. *Korean J Gastroenterol.* 2006;48(5):297-305.
- [26] Wang YJ, Huang Y, Tang H, et al. *Sichuan Daxue Xuebao: Yixue Ban.* 2009;40(3):378-381. 王佑娟, 黄燕, 汤辉, 等. CTGF-siRNA对低氧诱导肺成纤维细胞胶原合成的影响[J]. *四川大学学报(医学版).* 2009,40(3):378-381.
- [27] Chen LM, Wang QY, Wu D. *Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi.* 2009;25(6):556-558. 陈黎明, 王秋月, 吴丹. CTGF反义寡核苷酸对高糖培养肾小球系膜细胞胞外基质表达的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志.* 2009,25(6):556-558.
- [28] Chen MM, Lam A, Abraham JA, et al. CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(10):1805-1819.
- [29] Ito Y, Aten J, Bende RJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int.* 1998;53(4):853-861.
- [30] Gressner OA, Lahme B, Siluschek M, et al. Activation of TGF-beta within cultured hepatocytes and in liver injury leads to intracrine signaling with expression of connective tissue growth factor. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6B):2717-2730.
- [31] Guo H, Chen XL, Chen C, et al. Inhalation of aminoguanidine prevents the up-regulation of connective tissue growth factor in fibrotic lungs of rats. *Sheng Li Xue Bao.* 2009;61(4):361-366.
- [32] Yan YL, Zhou LL. *Shizhen Guoyi Guoyao.* 2008;19(6):1343-1345. 晏亦林, 周莉玲. 川芎嗪的研究概况[J]. *时珍国医国药.* 2008,19(6):1343-1345.
- [33] Chen ZQ, Hong L, Wang H, et al. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi.* 2007;27(12):1078-1081. 陈章强, 洪浪, 王洪, 等. 川芎嗪对急性冠脉综合征患者介入术后血小板活化及血管内皮功能的影响[J]. *中国中西医结合杂志.* 2007,27(12):1078-1081.
- [34] Wang WL, Li XS, Li WS. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(11):2075-2080. 王文丽, 李孝生, 李文生. 川芎嗪对肝星状细胞基质金属蛋白酶13和金属蛋白酶组织抑制剂1表达的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复.* 2009,13(11):2075-2080.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 重庆市自然科学基金(2006BB5428), 重庆市卫生局科研基金(2005-A-70), 课题名称: 川芎嗪对HSC的影响及CTGF信号转导的调控机制探讨。

致谢: 感谢重庆医科大学第二附属医院超声研究所的李攀等老师在实验室方面给予的指导和帮助! 感谢陈爽师姐和我的同学唐鹏等给予的帮助!

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 实验主要通过转化生长因子 $\beta 1$ 对肝星状细胞的刺激, 用川芎嗪和p38MAPK的特异性阻断剂SB203580干预, 从而来分析川芎嗪对CTGF基因表达的影响与p38MAPK途径是否有关系, 进一步说明川芎嗪抗纤维化的作用机制。这也将为川芎嗪用于临床抗纤维化提供分子水平的依据。

课题评估的“金标准”: 目前对胶原的基因表达等指标均通过与对照组进行比较后说明表达的相对多少来衡量的, 尚无统一的标准。

设计或课题的偏倚与不足: p38丝裂酶原激活蛋白激酶(p38MAPK)信号转导通路由多个上游激酶对其活性的调控, 具体通过哪一条途径与I型胶原和结缔组织生长因子基因变化有关仍需要进一步的研究和证明。

提供临床借鉴的价值: 对川芎嗪用于临床抗纤维化提供了分子水平的依据, 但要应用于临床治疗仍需要作进一步的研究和验证。