

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.003

丹芍化纤胶囊通过上调 ALK2、p-Smad1/5/8 改善四氯化碳所致大鼠肝纤维化*

余 蕾¹, 赵雪珂^{2△}, 穆 茂², 李 宏², 姚玉梅², 祝娟娟², 张宝芳², 刘 洋², 国 惠²
(贵州医科大学附属医院:1. 产前诊断中心;2. 感染科, 贵阳 550004)

[摘要] **目的** 观察丹芍化纤胶囊(DSHX)对四氯化碳(CCl₄)所致肝纤维化大鼠肝脏骨形态发生蛋白 I 型受体(BMPRI)中的激活素受体样激酶 2(ALK2)、磷酸化 Smad1/5/8(p-Smad1/5/8)与 DNA 结合(分化)抑制因子 2(Id2)表达的影响,探讨该药治疗肝纤维化的可能机制。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 50 只分为对照组(A组)、肝纤维化模型组(B组)、自然恢复组(C组)、DSHX 低剂量治疗组(D组)、DSHX 高剂量治疗组(E),每组 10 只。除 A 组外,其余各组用 CCl₄ 复合因素复制大鼠肝纤维化模型,共 8 周。D、E 组分别用 0.5、1.0 g/kg DSHX 灌胃 8 周,1 次/日。实验结束后分别采用酶联免疫吸附试验测定大鼠肝匀浆透明质酸(HA)、羟脯氨酸(Hyp)水平,Masson 染色法观察肝组织内胶原纤维沉积程度,实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肝组织 ALK2、Id2 mRNA 水平,蛋白质印迹法(Western blotting)分析肝组织 ALK2、Id2 及 p-Smad1/5/8 蛋白的表达。**结果** B 组肝匀浆 HA、Hyp 水平高于 A 组($P<0.01$),肝组织 ALK2、Id2 mRNA 和蛋白的表达及 p-Smad1/5/8 蛋白表达均低于 A 组($P<0.01$);D、E 组大鼠肝纤维化程度较 B 组和 C 组明显改善,肝匀浆 HA、Hyp 水平均低于 B 组和 C 组($P<0.01$),肝组织 ALK2 mRNA 和蛋白及 p-Smad1/5/8 蛋白表达均高于 B 组和 C 组($P<0.01$),肝组织 Id2 mRNA 的表达高于 B 组和 C 组($P<0.01$),但 Id2 蛋白表达与 B 组、C 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** DSHX 对大鼠肝纤维化的治疗作用机制可能与上调 ALK2、p-Smad1/5/8 的表达有关。

[关键词] 肝纤维化;骨形态发生蛋白;Smad1/5/8;DNA 结合/分化抑制因子;丹芍化纤胶囊

[中图分类号] R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4904-04

Danshaohuaxian capsule attenuates hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats by up-regulating expression of ALK2 and p-Smad1/5/8*

Yu Lei¹, Zhao Xueke^{2△}, Mu Mao², Li Hong², Yao Yumei², Zhu Juanjuan², Zhang Baofang², Liu Yang², Guo Hui²
(1. Prenatal Diagnostic Center; 2. Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Danshaohuaxian capsule(DSHX) on expressions of bone morphogenetic protein receptor I (BMPRI), ALK2, phosphorylated Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) and inhibitor of DNA binding/differentiation 2 (Id2) in rat liver of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride(CCl₄), and to explore its possible mechanism for treating liver fibrosis. **Methods** A total of 50 male Wistar rats were divided into control group(A), CCl₄-induce hepatic fibrosis group(B), untreated model group(C), low-dose-DSHX treated group(D), high-dose-DSHX treated group(E), 10 rats in each group. Fibrous liver models of rats were induced by subcutaneous injection of CCl₄ and high-lipid/low-protein diet for 8 weeks except for control group. Then the two DSHX treated groups were treated respectively with low dose(0.5 g/kg) and high dose(1.0 g/kg) DSHX capsule once per day for 8 weeks. By the end of the experiment, the level of hyaluronic acid(HA) and hydroxyproline(Hyp) in the liver homogenate were determined by using enzyme-linked immunosorbent assay, the mRNA expressions of ALK2 and Id2 were determined by using RT-PCR, the protein expressions of ALK2, Id2 and p-Smad 1/5/8 were determined by using Western blotting, respectively. **Results** Compared with group A, the concentration of HA and Hyp increased in group B($P<0.01$), the mRNA and protein expression of ALK2 and Id2, the protein expression of p-Smad 1/5/8 decreased in group B($P<0.01$). Compared with groups B and C, the degree of hepatic fibrosis was significantly improved, the level of HA and Hyp decreased, and the mRNA and protein expression of ALK2, the protein expression of p-Smad 1/5/8, the mRNA expression of Id2 were significantly higher in the two DSHX-treated groups respectively($P<0.01$). However, there was no significant difference in the expression of Id2 protein between the two DSHX-treated groups and groups B and C($P>0.05$). **Conclusion** The therapeutic mechanism of DSHX for hepatic fibrosis in rats may be associated with up-regulation of the expression of ALK2 and p-Smad 1/5/8.

[Key words] hepatic fibrosis; bone morphogenetic protein; Smad1/5/8; inhibitor of DNA binding/differentiation; Danshaohuaxian capsule

肝纤维化是多种病因所致肝病慢性化的共同必经历程,严重威胁人类健康,增加国家医疗负担^[1]。肝细胞在长期反复损

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560104)。 作者简介:余蕾(1982-),副主任技师,博士,主要从事产前诊断及肝纤维化防治研究。 △ 通信作者, Tel:0851-86773914; E-mail:zhaoxueke1@163.com。

伤和修复的过程中,易出现细胞外基质(ECM)代谢失衡,表现为 ECM 生成增多及降解减少,逐渐形成肝纤维化,部分患者甚至进展为肝硬化或肝癌^[2]。医学界对肝纤维化的发生机制仍然处于探索阶段,目前认为肝星状细胞(HSC)活化是其中心环节,多种细胞因子参与了 HSC 活化、增殖的过程^[3],转化生长因子- β 1(TGF- β 1)及其所介导的分子信号转导与肝纤维化密切相关,而骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)是 TGF- β 1 的天然拮抗因子,能负向调控 TGF- β 1 的致纤维化作用^[4-5]。本课题组前期研究发现,丹芍化纤胶囊(DSHX)可通过上调大鼠肝脏 BMP-7 表达从而实现肝纤维化的改善^[6],但其对 BMP-7 通路肝纤维化相关分子信号转导的影响仍然不尽详实。本实验继续以大鼠肝纤维化模型为研究对象,观测 DSHX 对大鼠肝组织中 BMP-7 下游信号分子 BMP1 型受体(BMPRI)中的主要效用分子激活素受体样激酶 2(ALK2),p-Smad 1/5/8 及 DNA 结合(分化)抑制因子 2(Id2)表达的影响,以进一步探讨 DSHX 逆转肝纤维化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 Wistar 大鼠 50 只,清洁级,体质量(180±20)g,购自第三军医大学实验动物中心,批号 SCXK(渝)2007-0003。普通饲料喂养,自由饮水,自然采光,室温 15~25℃,实验前适应环境 1 周。

1.1.2 主要试剂 丹芍化纤胶囊(由汉防己甲素、丹参、赤芍、黄芪、银杏叶等组成),贵阳制药厂生产(批号 20121128),棕黄色细颗粒胶囊制剂,临用前取胶囊内容物研磨成粉末,蒸馏水稀释至所需浓度。透明质酸(HA)、羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒(南京建成,批号 20130212,20130215),逆转录试剂盒(加拿大 Fermentas 公司,批号 00086098),全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司,批号 KGP250),二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 23235);ALK2、Id2 一抗(英国 Abcam 公司,批号 ab135633,ab154379),p-Smad1/5/8 一抗(美国 Santa cruz 公司,批号 sc-12353);ALK2 上、下游引物序列分别为 5'-TCC AGG TGG ATT GTT TCG ATT CTT A -3'和 5'-CAC ATC GTA GAA CGG TGG CTT G-3',引物扩增片段长度 531 bp;Id2 上、下游引物序列分别为 5'-TGT CAG CGT CCT GCA TCA CCA GA -3'和 5'-CCA CAC AGT GCT TTG CTG GCA -3',987 bp; β -actin 上、下游引物序列分别为 5'-TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC T-3'和 5'-GCT CAG TAA CAG TCC GCC TAG AA-3',1 536 bp,上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.3 主要仪器 核酸定量仪(美国 Amersham Biosciences 公司),核酸扩增实时荧光检测系统(DA7600 型,中山大学达安基因公司),752 紫外分光光度计(上海菁华科技公司),Gel Doc EQ 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),显微图像采集系统(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 大鼠随机分为 5 组,即对照组(A 组)、肝纤维化模型组(B 组)、自然恢复组(C 组)及 DSHX 低、高剂量治疗组(D、E 组),每组 10 只。除对照组给予正常饮食外,其余各组用四氯化碳(CCl₄)复合因素复制大鼠肝纤维化模型,共 8 周^[6]。造模结束后处死模型组大鼠,对照组及自然恢复组正常饲养,两治疗组分别予 DSHX 低剂量(0.5 g/kg)、高

剂量(1.0 g/kg)灌胃 8 周,1 次/日^[6]。16 周末麻醉后处死余下大鼠,常规留取血清,全自动生化仪测量血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性。留取全部肝脏,称量肝脏湿重,计算各组大鼠肝指数。制备肝组织匀浆,按试剂盒操作测定各组大鼠肝匀浆 HA、Hyp 水平。

1.2.2 肝脏纤维化程度分析 取相同部位肝脏,石蜡包埋,切片,行 Masson 染色观察肝组织内胶原纤维沉积程度,由本院病理科完成。将实验动物肝组织切片图像采集并输入 Biomias2001 图像分析系统进行单位(视场)面积纤维组织面积测量。每张切片随机选取 5 个视场,HSV 颜色分割法测量单位面积内纤维组织的面积,计算各组小鼠肝内纤维组织面积的均值,比较各组大鼠肝组织纤维化程度。

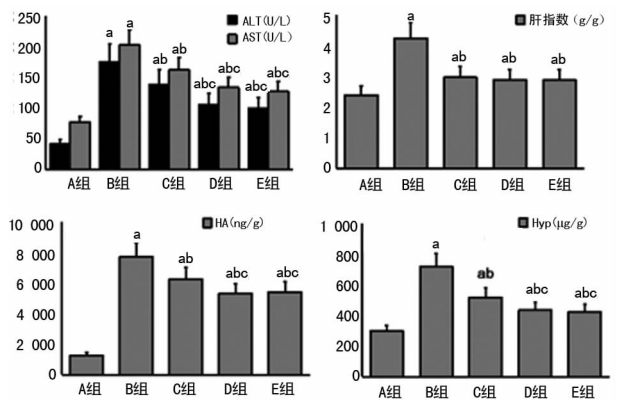
1.2.3 肝组织 ALK2 及 Id2 mRNA 转录水平检测 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肝组织 ALK2 及 Id2 mRNA 转录水平。采用 Trizol 酚-氯仿一步法提取总 RNA 并纯化,测定 RNA 水平,逆转录合成 cDNA 后行 RT-PCR。实验过程中以 β -actin 作内对照,进行标准化转换得到各样品的拷贝数(Ct 值),以 Ct 值的均数反映目的基因的表达水平。

1.2.4 肝组织 ALK2、Id2 及 p-Smad1/5/8 蛋白的表达 采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测肝组织 ALK2、Id2 及 p-Smad1/5/8 蛋白的表达。提取蛋白并测定蛋白含量,取蛋白质样品 40 μ g,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭,分别用 ALK2(1:1 000)、Id2(1:1 000)、p-Smad1/5/8 抗体(1:1 000)4℃ 孵育过夜,二抗(1:5 000)室温 1 h,电化学发光(ECL)曝光显影,Gel Doc EQ 凝胶成像仪扫描,Quantity One 软件分析结果。以 β -actin 表达水平作为内参,目标蛋白的表达强度以目标蛋白与内参蛋白灰度值的相对比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较时,对于方差齐的情况采用 LSD 法,方差不齐的情况采用 Tamhane 法;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

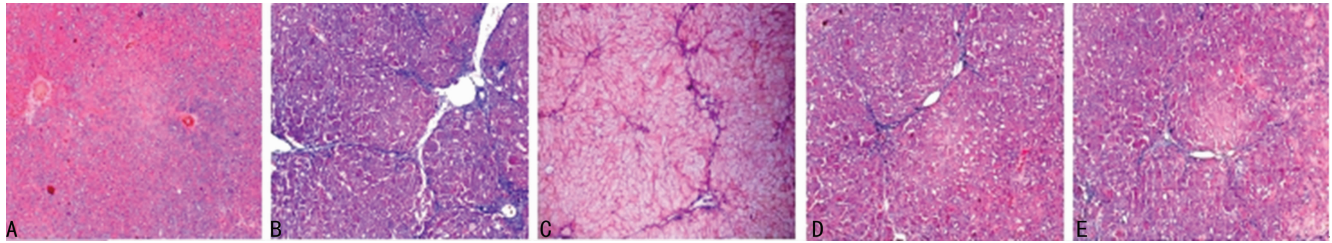
2.1 一般情况 A 组大鼠皮毛光泽,行动灵活,食量及大便正常。B 组大鼠皮毛无光泽,活动、进食及饮水量减少。实验结束时,B 组死亡 3 只,C 组、D 组各死亡 2 只,E 组死亡 1 只。



^a: $P < 0.01$, 与 A 组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 B 组比较; ^c: $P < 0.01$, 与 C 组比较。

图 1 各组大鼠血清 ALT、AST、肝指数及肝匀浆 HA 和 Hyp 水平比较

2.2 各组大鼠血清 ALT、AST、肝指数、肝匀浆 HA 及 Hyp 比较 B~E 各组血清 ALT、AST 均高于 A 组, C~E 组均低于 B 组, D、E 组低于 C 组, 差异均有统计学意义 ($F=423.864$ 、 151.273 , 均 $P<0.01$)。B~E 各组肝指数均高于 A 组, C~E 组均低于 B 组, 差异有统计学意义 ($F=388.373$, $P<0.01$)。B~E 各组肝匀浆 HA、Hyp 均高于 A 组, C~E 组均低于 B 组, D、E 组低于 C 组, 差异均有统计学意义 ($F=3120.282$ 、 377.657 , $P<0.01$), 见图 1。



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组; ^a: $P<0.01$, 与 A 组比较; ^b: $P<0.01$, 与 B 组比较; ^c: $P<0.01$, 与 C 组比较。

图 2 各组大鼠肝组织 Masson 染色 ($\times 100$)

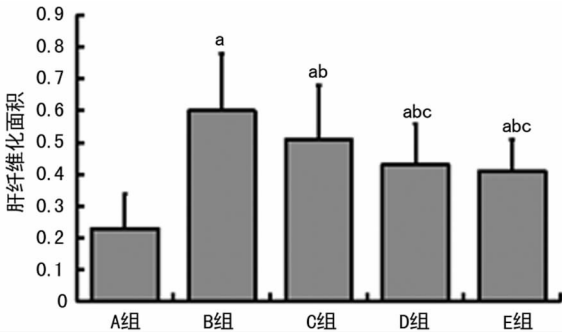
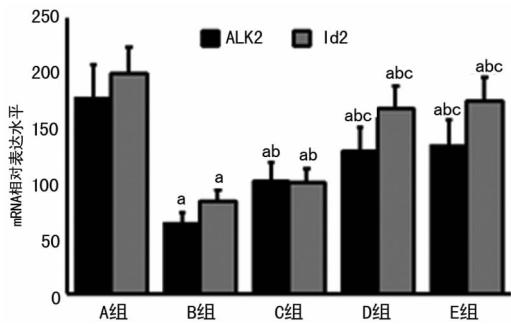


图 3 各组大鼠肝纤维化面积比较

2.4 各组大鼠肝组织 ALK2 及 Id2 mRNA 相对表达强度 B~E 组 ALK2 与 Id2 的 mRNA 相对表达强度均低于 A 组, C~E 组均高于 B 组, 而 D、E 组均高于 C 组, 差异均有统计学意义 ($F=101.348$ 、 199.016 , $P<0.01$), 见图 4。

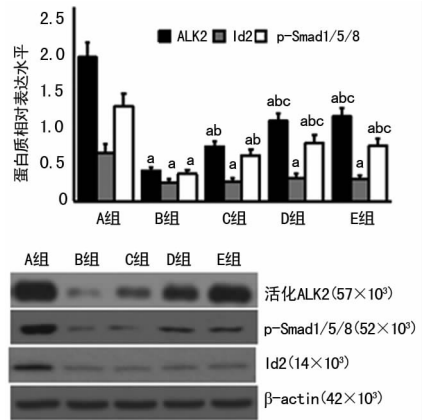


^a: $P<0.01$, 与 A 组比较; ^b: $P<0.01$, 与 B 组比较; ^c: $P<0.01$, 与 C 组比较。

图 4 各组大鼠肝组织 ALK2 和 Id2 的 mRNA 相对表达量

2.5 各组大鼠肝组织 ALK2、Id2 及 p-Smad1/5/8 蛋白质表达情况 B~E 组 ALK2 与 p-Smad1/5/8 的蛋白质相对表达强度均低于 A 组, C~E 组均高于 B 组, D 组、E 组高于 C 组, 差异均有统计学意义 ($F=306.770$ 、 133.840 , $P<0.01$); B~E 组 Id2 蛋白质相对表达强度均低于 A 组, 差异有统计学意义 ($F=66.331$, $P<0.01$), 但 B、C、D、E 各组间表达强度比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 5。

2.3 各组大鼠肝组织 Masson 染色及纤维化半定量检测结果 A 组大鼠肝组织可见少量蓝色胶原纤维, B 组大鼠肝组织胶原纤维增生、宽大, 肝小叶内呈延伸分布, C~E 组大鼠肝组织增生的胶原纤维较 B 组均减少、变细, 部份向肝小叶延伸; B~E 组纤维化面积均高于 A 组, C~E 组纤维化面积均低于 B 组, D、E 组纤维化面积均低于 C 组, 差异有统计学意义 ($F=99.912$, $P<0.01$), 见图 2、3。



^a: $P<0.01$, 与 A 组比较; ^b: $P<0.01$, 与 B 组比较; ^c: $P<0.01$, 与 C 组比较。

图 5 Western blotting 检测各组大鼠肝组织 ALK2、Id2 及 p-Smad1/5/8 蛋白的相对表达量

3 讨论

终末期慢性肝病如肝硬化、肝癌给人类带来的是一个严峻而棘手的公共健康问题, 为减少慢性肝病所造成的健康威胁及医疗压力, 除了祛除病因外, 及时控制肝纤维化的发生、发展显得至关重要^[2]。目前, 积极探索肝纤维化的发生机制与疾病防治方法已成为医务工作者的当务之急。研究表明, 肝纤维化的发生机制与 TGF- β 1/BMP-7 的动态失衡密切相关, TGF- β 1 可通过激活下游 Smads 分子如 Smad 2/3, 活化的 Smad2/3 进一步与 Smad4 形成活性的转录复合物进入核内, 调节相应靶基因转录, 如与胶原和纤溶酶原活化抑制因子 1 基因启动子结合, 促进其蛋白合成, 诱导 HSC 向肌成纤维细胞转化, ECM 合成增加而降解减少^[3,7]。BMP-7 与 TGF- β 1 同属 TGF- β 超家族成员, 二者的信号转导在纤维化形成过程中相互拮抗, BMP-7 能直接拮抗 TGF- β 1 信号转导, 或抑制 TGF- β 1 诱导的上皮间质转化 (EMT), 对纤维化疾病进展起着负向调控的作用^[8-11]。BMP-7 介导的信号转导需要与 I 型及 II 型骨形态发生蛋白受体 (BMPR) 形成复合体形式, BMP-7 首先与 BMPR-II 相结合, 随后诱导 BMPR-I 发生磷酸化。BMPR-I 有 3 种,

即 ALK-2、ALK-3 (BMPR-IA) 和 ALK-6 (BMPR-IB), BMP-7 与其中的 ALK-2 亲和力最强, 而与 ALK-3、ALK-6 亲和力较弱, 提示 BMP-7 主要通过活化下游信号分子 ALK-2 而发挥其生物学效用^[12]。ALK-2 活化后, 可作用于 Smad 1/5/8 羧基末端的 2 个丝氨酸并使之磷酸化, 随后 Smad 1/5/8 再与 Smad4 结合成复合体, 移位到细胞核内, 再作用于特定基因的启动子, 引起许多生物学效应, 如使 Smad6 表达增加等。Smad6 是 TGF- β 信号通路的负反馈调节因子, 可通过与 TGF- β 激活的 I 型受体结合, 抑制 Smad2/3 的磷酸化而抑制其信号传导^[13-14]。因此, 本实验选择检测活化状态的 ALK-2 及 p-Smad 1/5/8。Id2 是一种碱性螺旋-环-螺旋因子 (bHLH) 的内源性负性调节因子^[15], Id2 位于 TGF- β 1 和 BMP-7 的下游, 与 TGF- β 超家族关系密切, 受到 TGF- β 1 的抑制, 而 BMP-7 能诱导其表达^[16]。Id2 是细胞周期的重要调控因子, 具有促进细胞增殖、抑制细胞分化的功能^[17], Id2 还可通过干扰 I 型胶原的启动子转录活性, 发挥类似于肝细胞生长因子的改善肝纤维化的作用^[18], Kinoshita 等^[19] 研究还发现, 腺病毒介导 BMP-7 表达后, 可以通过上调 Id2 水平从而减轻实验性大鼠肝纤维化。

目前, 肝纤维化的药物治疗仍处于探索阶段, 在单一的特异性细胞因子阻断剂难以实现满意疗效之时, 对中药复方制剂抗肝纤维化的研发具有一定的前景。本课题组前期动物实验发现, 中药复方 DSHX 可上调肝纤维化大鼠肝脏 BMP-7 的基因转录和蛋白质翻译, 抑制 TGF- β 1、Smad2/3 的促纤维化作用, 且具有抑制 HSC 增殖的功能^[6,20-21]。本实验在此基础上, 进一步检测 DSHX 对肝纤维化大鼠肝组织中 BMP-7 下游信号分子 BMPR-I (ALK2)、p-Smad 1/5/8 及 Id2 表达的影响, 深入探讨 DSHX 改善肝纤维化的可能机制。结果显示, A 组大鼠肝组织 ALK2、Id2 的 mRNA 及蛋白质表达均低于 B 组, 且肝组织 p-Smad 1/5/8 蛋白表达也低于 A 组, 提示在大鼠肝纤维化进程中, ALK2、p-Smad 1/5/8 及 Id2 表达受抑制, 从而削弱了其对 TGF- β 1 信号通路的负性调控功能, 可能是 CCl₄ 复合因素诱导大鼠肝纤维化的发病机制之一。

肝纤维化大鼠在 DSHX 治疗 8 周后, 血清 ALT、AST、肝脏指数及肝匀浆 HA、Hyp 均低于模型组, 病理组织学检查发现其肝纤维化程度明显减轻, 表明 DSHX 可改善肝功能, 减轻肝纤维化程度, 对 CCl₄ 复合因素诱导的肝纤维化具有一定疗效。对大鼠肝组织 ALK2 与 p-Smad 1/5/8 的检测发现, 治疗组 ALK2 mRNA 及蛋白表达、p-Smad 1/5/8 的蛋白表达均明显高于 B 组和 C 组; 而对大鼠肝组织 Id2 的检测发现, 虽然治疗组存在优于 B 组和 C 组的明显上升的 Id2 mRNA 水平, 但 Id2 在蛋白水平的表达与 B 组和 C 组均无明显差异。同时, 上述 3 项指标在 D 组与 E 组之间无明显差异, 提示低、高剂量 DSHX 对大鼠 ALK2、p-Smad 1/5/8 与 Id2 表达的影响无明显量效关系。本课题组的前期动物及细胞实验曾发现, DSHX 可提高大鼠肝组织及体外培养 HSC-T6 细胞系中 BMP-7 蛋白表达水平^[6,21], 作者从本实验得出的结果中推测, DSHX 刺激大鼠肝组织 BMP-7 表达上调后, 进一步通过 BMP-7 促进其下游因子 ALK2 的活化, 进而磷酸化 Smad 1/5/8, 可能是 DSHX 治疗大鼠肝纤维化的机制之一, 但 DSHX 对 Id2 的蛋白表达水平无明显影响。

本实验是对前期研究工作的延伸, 结果表明 DSHX 可作用于 BMP-7/ALK2/Smad 1/5/8 信号轴, 刺激其蛋白质表达,

具有一定治疗肝纤维化的潜能。研究结果对该药的开发及临床应用具有一定指导价值, 但本实验仍存在不足及尚待完善之处: (1) 尚未采用小干扰 RNA 或基因敲除法深入研究 DSHX 是否只通过 BMP-7 信号通路发挥抗肝纤维化效用, 或是存在着对其他信号通路影响而发挥抗肝纤维化作用的可能。(2) 仍然只处于动物实验阶段, 尚未对人体肝纤维化发生、发展进程中, 其肝组织上述因子的表达变化进行观察。作者相信, 随着本课题的不断深入, 有望明确 DSHX 治疗肝纤维化的确切分子机制, 为将来该药的临床应用提供较可靠的基础数据, 具有较大的转化医学研究价值。

参考文献

- [1] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease; the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6):2099-2108.
- [2] Friedman SL. Hepatic fibrosis: emerging therapies[J]. *Dig Dis*, 2015, 33(4):504-507.
- [3] 过忆, 薛博瑜. 肝纤维化的细胞和分子机制[J]. *重庆医学*, 2015, 44(9):1272-1274, 1275.
- [4] Wang SL, Yang CQ, Qi XL, et al. Inhibitory effect of bone morphogenetic protein-7 on hepatic fibrosis in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(5):897-903.
- [5] Bi WR, Xu GT, Lv LX, et al. The ratio of transforming growth factor- β 1/bone morphogenetic protein-7 in the progression of the epithelial-mesenchymal transition contributes to rat liver fibrosis[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1):1005-1014.
- [6] Zhao XK, Cheng ML, Wu RM, et al. Effect of danshao huaxian capsule on gremlin and bone morphogenetic protein-7 expression in hepatic fibrosis in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(40):14875-14883.
- [7] Wrana JL. Regulation of Smad activity[J]. *Cell*, 2000, 100(2):189-192.
- [8] Khan I, Agarwal P, Thangjam GS, et al. Role of TGF- β and BMP7 in the pathogenesis of oral submucous fibrosis [J]. *Growth Factors*, 2011, 29(4):119-127.
- [9] Zeisberg M, Yang CQ, Martino M, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(32):23337-23347.
- [10] 杨丽, 杨长青, 袁敏, 等. 肝纤维化时骨形态发生蛋白 7 对肝细胞及肝星状细胞产生胶原的影响[J]. *中华医学杂志*, 2009, 89(6):419-422.
- [11] 王胜兰, 杨长青, 杨丽, 等. BMP-7 防治实验性肝纤维化的研究[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2010, 31(2):14-18.
- [12] Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, et al. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(40):25628-25636.
- [13] Chen BL, Peng J, Li QF, et al. Exogenous bone morphogenetic protein-7 reduces hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice via transforming(下转第 4910 页)

机体受到外界刺激时, DNA 链上鸟嘌呤 G 被氧化为 8-OH-dG, 可导致基因发生 G→T 突变, 8-OH-dG 的部位还易发生碱基脱落和 DNA 链断裂。因此, 检测 DNA 氧化损伤产物 8-OH-dG 表达, 将为探讨 DNA 氧化损伤与反复惊厥后脑损伤发生的关系提供生物标志^[15]。本实验研究显示, 反复惊厥发作后 8-OH-dG 持续增高至惊厥发作后 48 h, 提示在反复惊厥发作后存在 DNA 损伤。8-OH-dG 与细胞凋亡的相关性分析显示, 二者之间呈正相关, 但 8-OH-dG 先于细胞凋亡下降, 提示 DNA 损伤后可能通过一系列的机制才能进一步导致细胞凋亡的发生, 与 Qiu 等^[16]的研究结果相似。

综上所述, 新生儿反复惊厥后存在细胞凋亡, 线粒体途径在细胞凋亡过程中发挥重要作用。线粒体损伤及可能的修复途径是一个非常复杂的过程, 涉及众多因子的参与, 还待更进一步的深入研究, 从而为治疗发育期惊厥性脑损伤提供新的思路和治疗靶点。

参考文献

- Hiebert JB, Shen Q, Thimmesch AR, et al. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction[J]. *Am J Med Sci*, 2015, 350(2): 132-138.
- Gürler H, Bilgici B, Akar AK, et al. Increased DNA oxidation(8-OHdG) and protein oxidation(AOPP) by low level electromagnetic field(2.45 GHz) in rat brain and protective effect of garlic[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(10): 892-896.
- Zsurka G, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction and seizures; the neuronal energy crisis[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(9): 956-966.
- 田甜, 孙奇, 赵东敬, 等. 新生儿大鼠反复惊厥后皮质丛生蛋白的表达及生酮饮食的干预作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(9): 694-697.
- Li LY, Li JL, Zhang HM, et al. TGFβ1 treatment reduces hippocampal damage, spontaneous recurrent seizures, and learning memory deficits in pilocarpine-treated rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 50(1): 109-123.
- Streck EL, Gonöalves CL, Furlanetto CB, et al. Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders[J]. *Rev Bras Psiquiatr*, 2014, 36(2): 156-167.
- 王仝荃, 张文丽, 元小冬, 等. 线粒体在细胞凋亡中的作用[J]. *中国医学创新*, 2015, 12(6): 143-146.
- Guaragnella N, Passarella S, Marra E, et al. Knock-out of metacaspase and/or cytochrome c results in the activation of a ROS-independent acetic acid-induced programmed cell death pathway in yeast[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(16): 3655-3660.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, et al. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11): 6161-6166.
- Wang QS, Song F, Zhao X, et al. Expression changes of apoptotic-related proteins in nerve tissues of rats treated with allyl chloride[J]. *Toxicology*, 2007, 231(1): 58-67.
- Ni H, Feng X, Xiao ZJ, et al. Dynamic pattern of gene expression of ZnT-4, caspase-3, LC3, and PRG-3 in rat cerebral cortex following flurothyl-induced recurrent neonatal seizures[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 143(3): 1607-1615.
- Puttachary S, Sharma S, Stark S, et al. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy[J]. *Biomed Res Int*, 2015(2015): 745613.
- Morimoto M, Satomura S, Hashimoto T, et al. Oxidative stress measurement and prediction of epileptic seizure in children and adults with severe motor and intellectual disabilities[J]. *J Clin Med Res*, 2016, 8(6): 437-444.
- Tsai HL, Chang CN, Chang SJ. The effects of pilocarpine-induced status epilepticus on oxidative stress/damage in developing animals[J]. *Brain Dev*, 2010, 32(1): 25-31.
- Ohkawa N, Okumura A, Miyata R, et al. Cerebrospinal fluid oxidative stress marker levels and cytokine concentrations in a neonate with incontinentia pigmenti[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 51(5): 737-740.
- Qiu X, Cao L, Yang X, et al. Role of mitochondrial fission in neuronal injury in pilocarpine-induced epileptic rats[J]. *Neuroscience*, 2013, 245: 157-165.
- (收稿日期: 2016-07-12 修回日期: 2016-10-21)
- (上接第 4907 页)
- growth factor-β/Smad signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(9): 1405-1415.
- Roach KM, Feghali-Bostwick C, Wulff H, et al. Human lung myofibroblast TGFβ1-dependent Smad2/3 signalling is Ca²⁺-dependent and regulated by KCa3.1 K⁺ channels[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2015(8): 5.
- Norton JD, Deed RW, Craggs G, et al. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation[J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(2): 58-65.
- Kowanetz M, Valcourt U, Bergström R, et al. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(10): 4241-4254.
- Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(8): 410-418.
- Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats[J]. *Nat Med*, 1999, 5(2): 226-230.
- Kinoshita K, Iimuro Y, Otagawa K, et al. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats[J]. *Gut*, 2007, 56(5): 706-714.
- 杨婷, 谢汝佳, 罗新华, 等. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠肝脏 Smads 分子表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(9): 1807-1812.
- 赵雪珂, 吴荣敏, 姚玉梅, 等. 丹芍化纤胶囊含药血清对大鼠肝星状细胞 Gremlin 和 BMP7 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(2): 182-186.
- (收稿日期: 2016-05-20 修回日期: 2016-08-08)