

文章编号: 1000-7423(2008)-02-0081-05

【论著】

芍药苷对小鼠巨噬细胞产生 TGF- β 1 的影响

储德勇¹, 李丛磊¹, 李静¹, 罗飞¹, 郑美娟¹, 吴强², 罗庆礼¹, 沈继龙^{1*}

【摘要】 目的 探讨芍药苷 (paeoniflorin, PAE) 对血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA) 刺激小鼠腹腔巨噬细胞 (PMs) 产生转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 的影响。方法 研磨法制备 SEA, 分别加入含有小鼠 PMs 的培养板、培养瓶及培养皿中, 培养 24 h, ELISA 法测定 TGF- β 1 含量, RT-PCR 检测 PMs 内 TGF- β 1 基因的表达, Western blotting 检测 PMs 内 TGF- β 1 蛋白的表达; 在含 PMs 的培养瓶和培养皿中分别加入 10 mg/L SEA 5 ml, 培养 12 h, 再分别加入不同浓度的 PAE (0、7.5、15、30、60 及 120 mg/L), 继续培养 12 h 和 24 h。RT-PCR 与蛋白质印迹 (Western blotting) 分别检测 PAE 对 SEA 刺激的 PMs 内 TGF- β 1 基因与蛋白的表达。结果 10 mg/L 的 SEA 可明显刺激 PMs 产生 TGF- β 1 (235.86 \pm 3.43 ng/L), PAE 呈浓度依赖性地抑制 TGF- β 1 mRNA 的表达 ($r=-0.827$, $P<0.01$) 和 TGF- β 1 蛋白的表达 ($r=-0.952$, $P<0.01$)。结论 PAE 能抑制 SEA 刺激的 PMs 产生 TGF- β 1。

【关键词】 芍药苷; 日本血吸虫; 虫卵可溶性抗原; 肝纤维化; 转化生长因子 β 1; 巨噬细胞

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

Effect of Paeoniflorin on Secretion of TGF- β 1 from Macrophages in Mice

CHU De-yong¹, LI Cong-lei¹, LI Jing¹, LUO Fei¹, ZHENG Mei-juan¹,
WU Qiang², LUO Qing-li¹, SHEN Ji-long^{1*}

(1 Department of Parasitology, Anhui Medical University; Key Laboratories of Zoonoses of Anhui Province and Gene Resource Utilization for Severe Diseases, Ministry of Education, Hefei 230032, China; 2 Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of paeoniflorin (PAE) on the production of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) from peritoneal macrophages (PMs) stimulated by soluble egg antigen (SEA) of *Schistosoma japonicum*. **Methods** SEA was prepared by trituration and added into culture plank, flask and dish containing PMs which were cultured for 24 h. TGF- β 1 secreted from PMs was measured by ELISA. TGF- β 1 mRNA and protein produced from PMs were evaluated by RT-PCR and Western blotting, respectively. SEA (10 mg/L) 5 ml was added into culture flask and dish containing PMs. PMs were cultured for 12 h, and PAE at different concentrations (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 mg/L) was added into the culture flask and dish, and PMs were cultured consecutively for another 12 h and 24 h, respectively. TGF- β 1 mRNA and protein from PMs stimulated by SEA were evaluated by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** TGF- β 1 (235.86 \pm 3.43 ng/L) was produced from PMs under stimulation of SEA at 10 mg/L, and the expression of TGF- β 1 mRNA and protein in PMs were depressed significantly by PAE in a concentration-dependent manner ($r=-0.827$, $P<0.01$; $r=-0.952$, $P<0.01$, respectively). **Conclusion** PAE inhibits the production of TGF- β 1 from PMs stimulated by SEA.

【Key words】 Paeoniflorin; *Schistosoma japonicum*; Soluble egg antigen; Hepatic fibrosis; Transforming growth factor β 1; Macrophage

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571631)

* Corresponding author, E-mail: jlshen@ahmu.edu.cn

日本血吸虫病是一种严重危害人类健康的人兽共

患寄生虫病^[1], 它是以血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA) 引起肉芽肿和纤维化为特点的免疫性疾病^[2]。血吸虫病患者主要死于虫卵肉芽肿继发性的肝纤维化。目前已证实, 肝星状细胞 (HSC) 分泌细胞外基质, 引起肝纤维化。转移生长因子 β 1 (TGF- β 1) 是其最强的促细胞外基质 (ECM) 分泌因子^[3]。TGF- β 1 通过与

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30571631)

作者单位: 1 安徽医科大学病原生物学教研室, 教育部部共建和安徽省重要遗传病基因资源利用重点实验室, 人畜共患病安徽省重点实验室, 合肥 230032; 2 安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

* 通讯作者, E-mail: jlshen@ahmu.edu.cn

HSC膜上的 TGF- β 1 I、II、III型受体结合, 激活细胞内 Smads 信号转导通路而发挥其致纤维化作用^[4]。体内实验表明, TGF- β 1 与小鼠日本血吸虫病肝纤维化有关^[5]。芍药苷 (paeoniflorin, PAE) 是芍药 (*Paeonia lactiflora*) 的主要活性单体成分, 毒性极低, 具有抗炎^[6]和免疫调节^[7,8]等作用。体内实验表明, 芍药苷可以下调日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织中的 TGF- β 1 蛋白的表达, 减轻肝纤维化的程度^[5]。

有报道, SEA 可在体外刺激小鼠腹腔巨噬细胞 (PMs) 使之激活, 用后者的细胞培养上清能刺激 HSC, 使之增殖并产生胶原蛋白^[9,10]。探讨经 SEA 刺激的 PMs 是否能产生 TGF- β 1, 及芍药苷对 PMs 表达 TGF- β 1 是否有影响, 对于了解芍药苷抗血吸虫病肝纤维化的机制, 进而开发低毒、高效的抗日本血吸虫病肝纤维化药物具有重要意义。本实验先用 SEA 刺激 PMs, 检测 PMs 表达或分泌 TGF- β 1; 然后加入芍药苷, 了解芍药苷对经 SEA 刺激 PMs 表达和分泌 TGF- β 1 的干预作用。

材料与方 法

1 实验动物

昆明小鼠, 6~8 周, 雄性, 体重 21~25 g, 由安徽医科大学动物中心提供。20~22 °C 下自由进食标准颗粒饲料、饮水。

2 引物

用 Premier primer 5.0 软件, 以 GenBank 中相应基因的 cDNA 序列为模板设计引物, 由大连宝生物工程有限公司合成引物 (表 1)。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 基因作为内参。

表 1 TGF- β 1 与 GAPDH 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of TGF- β 1 gene and GAPDH gene

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度(bp) Product length	GenBank 序列号 No.GenBank
TGF- β 1	5'-ACCGCAACAACGCCATCTA-3'	305	NM011577
	5'-GCCCTGTATTCCGTCCTCT-3'		
GAPDH	5'-TCAACGGCAGTCAAGG-3'	691	BC095932
	5'-AAGTCGCAGGAGACAACC-3'		

3 药物及试剂

PAE 购自安徽宣城百草植物工贸有限公司 (纯度 >95%), 日本血吸虫干卵购自中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, TGF- β 1 Emax 免疫测定法系统购自美国 Promega 公司, Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 反转录系统购自美国 Promega 公司, 耐热性 DNA 聚合酶 (*Taq* DNA poly-

merase) 购自美国 Promega 公司, 亚细胞结构 NE-PER 细胞质和核蛋白提取试剂购自美国 Pierce 生物技术有限公司, 兔抗小鼠 TGF- β 1 抗体购自美国 Promega 公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 兔抗小鼠 β -Actin 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 最高灵敏度化学发光底物 (SuperSignal West Femto Maximum) 购自美国 Pierce 生物技术有限公司, 极限必需培养基 (DMEM) 购自美国 GIBCOBRL 公司。

4 SEA 的制备及浓度测定

参考文献^[11,12] 制备 SEA。取日本血吸虫干卵 60 mg, 放入研钵中, 加入等量石英砂, 慢慢研磨成细粉状, 再加少许灭菌磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2), 继续研磨约 2 h, 直至在显微镜下找不到完整的虫卵为止。继续加入灭菌 PBS 并冲洗研钵, 至所用的液体总量达 50 ml 为止。将此悬浊液转入玻璃试管中, 置 4 °C 保存, 每小时取出 1 次, 震荡 5 min, 连续 8 h。4 °C 2 000 \times g 离心 20 min。取上清, 4 °C 16 000 \times g 离心 120 min。取上清, 即为 SEA 蛋白。将此上清经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后分装, 劳里 (Lowry) 法测定蛋白浓度^[13]。

5 PMs 的分离及培养

按照文献^[14]的方法分离并纯化小鼠 PMs。麻醉小鼠后, 拉颈处死, 浸入 75% 乙醇中消毒 1 min。将小鼠移入超净台中, 每只小鼠腹腔注射 4 °C 无菌 PBS 液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 5 ml。轻揉腹部约 1 min, 收集灌洗液, 4 °C 250 \times g 离心 10 min, 弃上清, 用 4 °C 10% DMEM 培养液重悬沉淀。

用细胞计数板调整细胞浓度至 2 \times 10⁶/L, 分别接种至直径为 100 mm 的塑料培养皿 (10 ml/皿)、25 cm² 的培养瓶 (5 ml/瓶) 及 96 孔板 (100 μ l/孔)。37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 2 h。轻轻敲打底壁, 吸弃上清, 用 37 °C 无菌 D-Hank's 液洗去未贴壁细胞 3 次, 得单层 PMs。分别加入 10% DMEM 培养液 10 ml、5 ml 和 100 μ l, 继续培养 24 h, 换液。48 h 后, 大部分细胞伸展生长, 并铺满单层。取少许 PMs 做常规台盼蓝拒染试验, 鉴定细胞活力。用无血清的 DMEM 洗涤细胞 2 次, 换用无血清的 DMEM 继续培养 24 h, 用于以下实验。

6 SEA 刺激小鼠 PMs 分泌 TGF- β 1 的检测

6.1 ELISA 测定经 SEA 刺激的 PMs 上清中 TGF- β 1 含量 在含有 PMs 的 96 孔板上每孔加入 100 μ l 不同

浓度的 SEA (终浓度分别为 0、2.5、5、10、20 及 40 mg/L, 用无血清的 DMEM 配制), 每个浓度设 3 个复孔。将上述细胞在 37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h。取培养液, 250×g 离心 5 min, 用 ELISA 法测定上清中的 TGF-β1 含量 (按试剂盒说明书操作)。

6.2 RT-PCR 检测经 SEA 刺激的 PMs 内 TGF-β1 基因的表达 于上述含 PMs 的培养瓶中加入不同浓度的 SEA (终浓度分别为 0、2.5、5、10、20 及 40 mg/L, 用无血清的 DMEM 配制) 5 ml, 每个浓度设 3 个复瓶, 培养 12 h。弃尽培养液, 参照说明书用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA。然后参照反转录系统的说明书, 合成 cDNA 第 1 链。以 cDNA 第 1 链为模板, 进行 PCR。反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 50 °C (温度可根据引物不同而改变) 45 s, 72 °C 45 s, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 产物 4 °C 保存备用。

取 8 μl PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳(电压 100 V, 电泳 30 min), 紫外灯下观察结果。采用凝胶成像系统扫描图像, 以特异性 TGF-β1 mRNA 条带光密度值 (optical density, OD) 与内参 GAPDH mRNA 条带的 OD 值进行比较, 得出 OD 比值。比较各组 TGF-β1 mRNA 条带的 OD 比值, 了解 SEA 对 PMs 的 TGF-β1 基因表达的影响。

6.3 蛋白质印迹 (Western blotting) 检测经 SEA 刺激的 PMs 内 TGF-β1 蛋白的表达 在含 PMs 的培养皿中加入不同浓度的 SEA (终浓度分别为 0、2.5、5、10、20 及 40 mg/L, 用无血清的 DMEM 配制) 10 ml, 每个浓度设 3 个复皿, 培养 12 h。

用核和细胞质蛋白提取试剂盒 (nuclear and cytoplasmic extraction kit, NE-PE) 提取细胞层蛋白 (参照试剂盒说明书进行), Lowry 法测定蛋白浓度。每孔上样 20 μl (约 20 μg) 蛋白, 首先进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 然后经半干式电转移法把蛋白电泳条带转移至硝酸纤维素膜, 进行 Western blotting 分析。一抗分别为兔抗小鼠 TGF-β1 抗体 (浓度为 1:50 000) 及兔抗小鼠 β-actin 抗体 (浓度为 1:10 000); 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG (浓度为 1:1 000)。

采用图像分析系统, 以特异性 TGF-β1 蛋白条带的 OD 值与内参 β-actin 蛋白条带的 OD 值进行比较, 得出 OD 比值。比较各组 TGF-β1 蛋白条带的 OD 比值, 了解 SEA 对 PMs 的 TGF-β1 蛋白表达的影响。

7 PAE 对 SEA 刺激的 PMs 的 TGF-β1 基因和蛋白表达的影响

在含 PMs 的培养瓶和培养皿中分别加入 10 mg/L 的 SEA (用无血清的 DMEM 配制) 5 ml 和 10 ml, 每个浓度各设 3 个复瓶和复皿, 培养 12 h。然后, 每瓶 (或皿) 中分别加入不同浓度的 PAE (0、7.5、15、30、60 及 120 mg/L, 用无血清的 DMEM 配制), 分别继续培养 12 h 和 24 h。用 RT-PCR 或 Western blotting 检测 PAE 对 SEA 刺激的 PMs 的 TGF-β1 基因或蛋白的表达。最后, 用 TGF-β1 mRNA 条带的 OD 值与内参 GAPDH mRNA 条带的 OD 值进行比较, 得出 OD 比值, 比较各组 TGF-β1 mRNA 条带的 OD 比值, 了解 PAE 对 SEA 刺激的 PMs 内的 TGF-β1 基因表达的影响; 同样, 用 TGF-β1 蛋白条带的 OD 值与内参 β-actin 蛋白条带的 OD 值进行比较, 得出 OD 比值, 比较各组 TGF-β1 蛋白条带的 OD 比值, 了解 PAE 对 SEA 刺激的 PMs 的 TGF-β1 蛋白表达的影响。

8 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计学分析。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1 小鼠 PMs 培养

倒置相差显微镜下观察原代培养的小鼠 PMs 形态: 48 h 后, 大部分 PMs 伸展生长, 铺满单层, 细胞生长良好。PMs 获得率约为 (2~3) × 10⁶/只, 常规台盼蓝拒染试验鉴定细胞活力达到 98%。

2 SEA 对小鼠 PMs 表达、分泌 TGF-β1 的影响

2.1 ELISA 检测 SEA 对小鼠 PMs 分泌 TGF-β1 的影响 结果显示, SEA 能有效地刺激小鼠 PMs 分泌 TGF-β1, 且这 6 个浓度的 SEA 实验组 (0、2.5、5、10、20 及 40 mg/L) 的 TGF-β1 含量经两两比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 10 mg/L 的 SEA 可明显刺激 PMs 分泌 TGF-β1 [(235.86 ± 3.43) ng/L] (表 2)。

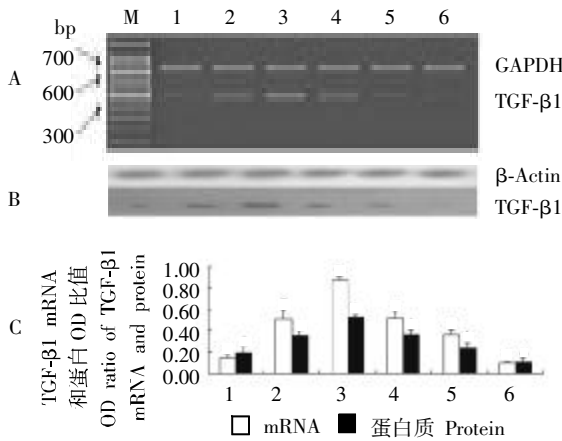
表 2 不同浓度的 SEA 对 PMs 分泌 TGF-β1 的影响
Table 2 Effect of SEA on secretion of TGF-β1 from PMs
($\bar{x} \pm s, n=3$)

SEA 浓度 SEA concentration(mg/L)	吸光度 Absorbance(A ₄₅₀)	TGF-β1 含量 TGF-β1 content(ng/L)
40	0.146±0.005	13.16±2.40*
20	0.367±0.007	118.08±3.17*
10	0.614±0.007	235.86±3.43*
5	0.387±0.006	127.60±2.62*
2.5	0.158±0.006	18.87±2.62*
0	0.134±0.007	7.44±3.34*

注: * 各组之间两两比较, $P < 0.05$ 。

Note: * Showing statistical significance among all groups ($P < 0.05$).

2.2 RT-PCR 和 Western blotting 检测 TGF-β1 基因和蛋白的表达 PMs 与不同浓度的 SEA (0、2.5、5、10、20 及 40 mg/L) 共孵育 12 h 可引起 TGF-β1 mRNA 及 TGF-β1 蛋白不同程度的表达, 各组 mRNA 间两两比较、各组蛋白间两两比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。10 mg/L 的 SEA 能引起 TGF-β1 mRNA 及 TGF-β1 蛋白最大程度的表达 (图 1A、B、C)。



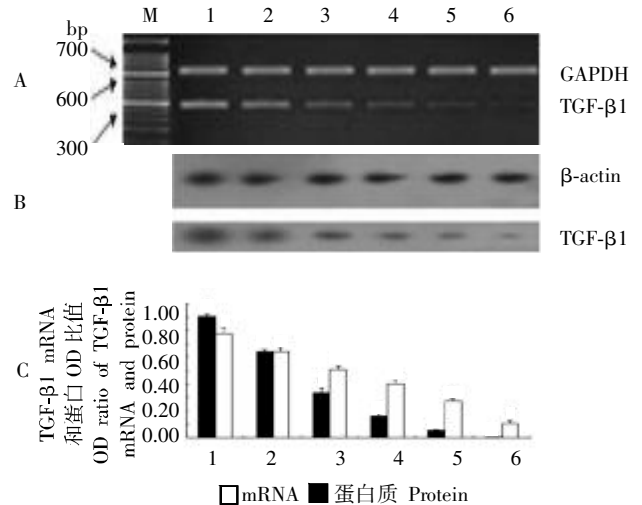
M: DNA 标志物, 1~6: 与 40、20、10、5、2.5 和 0 mg/L SEA 共孵育的 PMs。
M: DNA marker, 1~6: PMs with SEA of 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 mg/L.

A: RT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 的表达, B: Western blotting 检测 TGF-β1 蛋白的表达, C: TGF-β1 mRNA 或 TGF-β1 蛋白相对于 GAPDH mRNA 或 β-actin 蛋白的 OD 比值。
A: Level of TGF-β1 mRNA determined by RT-PCR, B: Level of TGF-β1 protein measured by Western blotting, C: OD ratio of TGF-β1 mRNA or TGF-β1 protein, based on the GAPDH mRNA or β-actin protein band under control conditions.

图 1 SEA 对 PMs 内 TGF-β1 基因和蛋白表达的影响
Fig.1 Effect of SEA on the expression of TGF-β1 gene and protein in PMs

3 PAE 对 SEA 刺激的 PMs 内的 TGF-β1 基因和蛋白表达的影响

PAE 呈浓度依赖性地抑制 TGF-β1 mRNA 的表达 ($r = -0.827, P < 0.01$) (图 2A、2C) 和 TGF-β1 蛋白的表达 ($r = -0.952, P < 0.01$) (图 2B、2C), 各组 mRNA 间两两比较、各组蛋白间两两比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。当 PAE 浓度为 0 mg/L 时, TGF-β1 mRNA 的 OD 比值及蛋白的 OD 比值分别是 0.902 ± 0.016 、 0.776 ± 0.049 ; 当 PAE 浓度为 120 mg/L 时, TGF-β1 mRNA 的 OD 比值及蛋白的 OD 比值分别是 0.007 ± 0.001 、 0.109 ± 0.020 , 即 TGF-β1 mRNA 的相对水平及蛋白的相对水平分别下降了 99.2% 及 86.0%。



M: DNA 标志物, 1~6: 与 0、7.5、15、30、60、120 mg/L PAE 共孵育的 PMs。
M: DNA marker, 1~6: PMs with PAE of 0, 7.5, 15, 30, 60, 120 mg/L.

A: RT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 的表达, B: Western blotting 检测 TGF-β1 蛋白的表达, C: TGF-β1 mRNA 或 TGF-β1 蛋白相对于 GAPDH mRNA 或 β-actin 蛋白的 OD 比值。
A: Level of TGF-β1 mRNA determined by RT-PCR, B: Level of TGF-β1 protein measured by Western blotting, C: OD ratio of TGF-β1 mRNA or TGF-β1 protein, based on the GAPDH mRNA or β-actin protein band under control conditions.

图 2 PAE 对 SEA 刺激的 PMs 内的 TGF-β1 基因和蛋白表达的影响
Fig.2 Effect of PAE on the expression of TGF-β1 gene and protein in PMs stimulated by SEA

讨论

在血吸虫感染初期, 成虫引起 Th1 免疫反应。虫卵沉积于肝组织后, 虫卵中的毛蚴分泌 SEA 促进下调 Th1 免疫反应, 而以 Th2 免疫反应占优势^[15]。有报道指出, 从 SEA 中提取的某些组分能促进白细胞介素-13 (IL-13) 的分泌^[16], 后者可激活巨噬细胞, 使之分泌 TGF-β1^[17], 而 TGF-β1 通过激活 HSC, 在血吸虫肝纤维化形成中发挥重要作用^[10,18]。实验表明, 用 SEA 刺激 PMs, 后者的细胞培养上清能促进 HSC 增殖和分泌胶原^[9]。本研究结果表明, 经 SEA 直接刺激 PMs 的细胞培养上清中含有 TGF-β1; SEA 能上调 PMs 中 TGF-β1 mRNA 和蛋白的表达, 机制尚不清楚。有报道称, 磷脂酰丝氨酸脂质体通过细胞外信号调节激酶能直接诱导巨噬细胞分泌 TGF-β1^[19]。SEA 是否也有类似 Th2 细胞因子的作用, 可以直接激活巨噬细胞而分泌 TGF-β1, 有关 SEA 诱导巨噬细胞分泌 TGF-β1 的机制还有待进一步研究。此外, SEA 并非浓度依赖性地刺激 TGF-β1 分泌, 高浓度的 SEA 反而对 TGF-β1 分泌有抑制作用, 原因不明。根据以上实验结果推测: 血吸虫感染机体后, 虫卵沉积于肝组织。虫卵中毛蚴分泌出的 SEA 既可经过 IL-13, 也可直接

激活 PMs, 并促使其分泌 TGF- β 1, 后者可使 HSC 增殖和分泌胶原, 产生肝纤维化。

用 SEA 最适浓度 (10 mg/L) 刺激 PMs, 再用 PAE 作用该 PMs, 结果表明, PAE 呈浓度依赖性地抑制 TGF- β 1 mRNA 和 TGF- β 1 蛋白的表达。说明 PAE 通过干预 PMs 内的 TGF- β 1 基因和蛋白表达而发挥其抗血吸虫病肝纤维化的作用。至于为什么 SEA 呈非浓度依赖性地刺激 TGF- β 1 的表达, 而 PAE 却呈浓度依赖性地抑制 TGF- β 1 的表达, 可能是因为 SEA 和 PAE 分别作用于细胞内不同的靶点之故。

正常情况下 HSC 居于肝细胞与肝窦内皮细胞之间的窦周隙内, 而枯否细胞 (KC) 位于肝窦内, 从解剖位置看, 两者相距很近; 而在血吸虫病肝肉芽肿中也包含有 HSC 和 KC^[20-22]。故推测在血吸虫病肝纤维化中, 这两种细胞之间可能存在某种信号联系。体外实验表明, KC 培养上清中的 TGF- β 1 等细胞因子能促进 HSC 激活、增殖和分泌胶原^[23,24]。体内实验表明, 血吸虫病肝纤维化时, 肝组织中 TGF- β 1 表达明显升高, HSC 被大量激活^[5]。SEA 能否亦在体内、外刺激 KC, 使之产生 TGF- β 1 等细胞因子, 进而促使肝纤维化呢, PAE 能否干预 KC 内 TGF- β 1 的产生从而发挥其抗肝纤维化作用, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Guo JG. The past and present situation of comprehensive control of schistosomiasis in China[J]. Chin J Prev Med, 2006, 40(4): 225-228. (in Chinese)
(郭家钢. 中国血吸虫病综合治理的历史与现状[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(4): 225-228)
- [2] Boros DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection[J]. Clin Microbiol Rev, 1989, 2(3): 250-269.
- [3] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling[J]. Nature, 2003, 425(9): 577-584.
- [4] Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(Suppl 1): S79-84.
- [5] Chu DY, Li CL, Yang F, et al. Effect of paeoniflorin on hepatic immunopathogenesis in mice with *Schistosoma japonicum* infection[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(1): 10-15. (in Chinese)
(储德勇, 李丛磊, 杨枫, 等. 芍药苷对日本血吸虫感染小鼠肝组织免疫病理的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(1): 10-15.)
- [6] Yamahara J, Yamada T, Kimura H, et al. Biologically active principles of crude drugs: Antiallergic principles of "shoseiryu-to": I. Effect on delayed-type allergy reaction [J]. Yakugaku Zasshi, 1982, 102(9): 881-886.
- [7] Liang J, Zhou A, Chen M, et al. Negatively regulatory effects of paeoniflorin on immune cells [J]. Eur J Pharmacol, 1990, 183: 901-902.
- [8] Tsuboi H, Hossain K, Akhand AA, et al. Paeoniflorin induces apoptosis of lymphocytes through a redox-linked mechanism[J]. J Cell Biochem, 2004, 93(1): 162-172.
- [9] Zhu H, Wu Q, Yang Y, et al. Effect of astragalosides on schistosomal hepatic fibrosis *in vitro*[J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(5): 555-558. (in Chinese)
(朱虹, 吴强, 杨雁, 等. 黄芪总苷对血吸虫卵抗原活化的肝星状细胞增殖与胶原合成的影响[J]. 中国药理通报, 2006, 22(5): 555-558.)
- [10] Chu DY, Luo QL, Li CL, et al. Paeoniflorin inhibits TGF- β 1-mediated collagen production by *Schistosoma japonicum* soluble egg antigen *in vitro*[J]. Parasitology, 2007, 134(11): 1611-1621.
- [11] Harn DA, Mitsuyama M, David JR. *Schistosoma mansoni* anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge *in vivo* [J]. J Exp Med, 1984, 159(55): 1371-1387.
- [12] Li XQ, Di DF, Fu BZ, et al. Study on the purification and application of *Schistosoma japonicum* antigen[J]. J Zhejiang Med Univ, 1984, 13(3): 115-118. (in Chinese)
(李绪琼, 狄德甫, 傅宝珍, 等. 日本血吸虫抗原的纯化及其应用价值的研究[J]. 浙江医科大学学报, 1984, 13(3): 115-118)
- [13] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.
- [14] Takakura R, Kiyohara T, Murayama Y, et al. Enhanced macrophage responsiveness to lipopolysaccharide and CD40 stimulation in a murine model of inflammatory bowel disease: IL-10-deficient mice[J]. Inflamm Res, 2002, 51(8): 409-415.
- [15] Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(7): 499-511.
- [16] Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, et al. Alternatively activated macrophages during parasite infections[J]. Trends Parasitol, 2004, 20(3): 126-133.
- [17] Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, et al. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis[J]. Nat Med, 2006, 12(1): 99-106.
- [18] Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6533-6544.
- [19] Otsuka M, Tsuchiya S, Aramaki Y. Involvement of ERK, a MAP kinase, in the production of TGF- β by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidyl serine [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(4): 1400-1405.
- [20] Bartley PB, Ramm GA, Jones MK, et al. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(9): 993-1001.
- [21] Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, et al. Immunopathogenesis of schistosomiasis[J]. Immunol Rev, 2004, 201(1): 156-167.
- [22] Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, et al. Immunopathology of schistosomiasis[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(2): 148-154.
- [23] Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors[J]. J Clin Invest, 1989, 84(6): 1780-1785.
- [24] Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis[J]. Hepatology, 1990, 11(4): 599-605.

(收稿日期: 2007-07-18 编辑: 高石)