

文章编号: 1000-7423(2011)-02-0093-06

【论著】

# 芍药苷通过 IL-13/STAT6 信号转导通路抑制成纤维细胞产生胶原

杜明占<sup>1</sup>, 沈继龙<sup>2</sup>, 吴强<sup>1</sup>, 胡向阳<sup>1</sup>, 储德勇<sup>2\*</sup>

**【摘要】** 目的 观察芍药苷通过白细胞介素 13 (IL-13)信号转导通路调控 3T3 成纤维细胞的细胞激活、增殖和胶原产生。方法 分别用不同浓度的芍药苷(200、400、600、800 和 1 000 mg/L)或重组白介素 13 (rIL-13, 6.25、12.5、50、100 和 200  $\mu$ g/L), 在体外刺激经无血清培养基培养 12 h 的 3T3 细胞, 同时设空白对照组。培养 24 h 后, 用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)检测 rIL-13 和芍药苷对细胞增殖的影响, 并根据其结果选择 1 个适宜的 rIL-13 刺激浓度。用该浓度 rIL-13(100  $\mu$ g/L)刺激无血清培养基培养 12 h 的 3T3 细胞 12 h 后, 再分别加入不同浓度的芍药苷(200、400、600、800 和 1 000 mg/L), 继续培养 24 h, 同时设空白对照组。用 CCK-8 法检测细胞增殖情况, 碱裂解法测定培养上清羟脯氨酸含量。蛋白质印迹(Western blotting)分析  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、白介素 13 受体  $\alpha$ 1 (IL-13R $\alpha$ 1)和信号转导和转录激活因子 6(STAT6)的表达情况。RT-PCR 检测细胞 I 型胶原(Col-I)、III 型胶原(Col-III)、IL-13R $\alpha$ 1 和 STAT6 的 mRNA 水平。结果 芍药苷能浓度依赖性地抑制 3T3 细胞增殖( $r=-0.980$ ,  $P<0.01$ ), 且各浓度组间差异有统计学意义( $F=198.599$ ,  $P<0.01$ )。rIL-13 能明显促进 3T3 细胞增殖( $r=0.538$ ,  $P<0.05$ )。芍药苷(200、400、600、800 和 1 000 mg/L)能浓度依赖性地抑制 rIL-13 刺激的 3T3 细胞增殖( $1.780\pm 0.177$ 、 $1.636\pm 0.073$ 、 $0.965\pm 0.066$ 、 $0.623\pm 0.037$  和  $0.337\pm 0.022$ ,  $r=-0.971$ ,  $P<0.01$ ), 且各浓度组间差异有统计学意义( $F=198.537$ ,  $P<0.01$ )。芍药苷还能浓度依赖性地抑制 rIL-13 刺激的 3T3 细胞分泌羟脯氨酸 ( $3.030\pm 0.094$ 、 $2.976\pm 0.047$ 、 $2.814\pm 0.047$ 、 $2.652\pm 0.124$  和  $2.408\pm 0.124$ ,  $r=-0.916$ ,  $P<0.01$ ), 且各浓度组间差异有统计学意义( $F=13.642$ ,  $P<0.01$ )。Western blotting 分析结果显示, 芍药苷能抑制 rIL-13 刺激的 3T3 细胞  $\alpha$ -SMA、IL-13R $\alpha$ 1 和 STAT6 蛋白的表达。RT-PCR 结果显示, 芍药苷能抑制 rIL-13 刺激的 3T3 细胞 Col-I、Col-III、IL-13R $\alpha$ 1 和 STAT6 mRNA 的转录水平。结论 芍药苷通过 IL-13/STAT6 信号转导通路抑制成纤维细胞增殖、激活和胶原的产生, 可能是芍药苷抗日本血吸虫病肝纤维化的机制之一。

**【关键词】** 芍药苷; 成纤维细胞; IL-13; IL-13R $\alpha$ 1; I 型胶原; III 型胶原

中图分类号: R532.21 文献标识码: A

## Inhibitory Effect of Paeoniflorin on the Collagen Production by Fibroblasts through IL-13/STAT6 Signaling Pathway

DU Ming-zhan<sup>1</sup>, SHEN Ji-long<sup>2</sup>, WU Qiang<sup>1</sup>, HU Xiang-yang<sup>1</sup>, CHU De-yong<sup>2\*</sup>

(1 Department of Pathology; 2 Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Key Laboratory of Microbiology and Parasitology, Anhui Key Laboratory of Zoonoses, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**【Abstract】** **Objective** To observe the effects of paeoniflorin on 3T3 fibroblast activation, proliferation and collagen production through IL-13/STAT6 signaling pathway. **Methods** 3T3 cell strain was cultured with serum-free medium for 12 h, then stimulated by paeoniflorin (200, 400, 600, 800, and 1 000 mg/L) or rIL-13 (6.25, 12.5, 50, 100, and 200  $\mu$ g/L) for another 24 h. At the same time the blank control group for paeoniflorin or rIL-13 was observed. 3T3 cell proliferation was assayed by Cell Counting Kit-8 (CCK-8), and an appropriate concentration (100  $\mu$ g/L) of rIL-13 was chosen according to the result of cell proliferation. Subsequently, 3T3 cell cultured with serum-free medium for 12 h was stimulated by 100  $\mu$ g/L rIL-13 for 12 h, and then was treated with different concentrations of paeoniflorin (200, 400, 600, 800, and 1 000 mg/L) for another 24 h. Untreated 3T3 cell served as blank control. Cell proliferation was measured by CCK-8. Hydroxyproline content in cell supernatant was determined by alkaline lysis method. IL-13R $\alpha$ 1,  $\alpha$ -SMA and STAT6 protein expression were detected

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No. 30872209); 安徽省高等学校省级自然科学基金项目 (No. KJ2008B282); 安徽医科大学博士学术、科研活动资助项目 (No. XJ200708); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 200803660003)

**作者单位:** 安徽医科大学 1 病理学教研室; 2 病原生物学教研室, 安徽病原生物学省级实验室, 人兽共患病安徽省重点实验室, 合肥 230032

\* 通讯作者, E-mail: chudeyong@126.com

by Western blotting. Col-I, Col-III, IL-13R $\alpha$ 1 and STAT6 mRNA expression were analyzed by RT-PCR. **Results** Paeoniflorin inhibited 3T3 cell proliferation in a concentration-dependent manner ( $r=-0.980, P<0.01$ ), and there was a statistically significant difference among all groups ( $F=198.599, P<0.01$ ). rIL-13 caused a remarkably concentration-dependent increase in proliferation of 3T3 cells ( $r=0.538, P<0.05$ ). Paeoniflorin (200, 400, 600, 800, and 1 000 mg/L) inhibited proliferation of 3T3 cell stimulated by rIL-13 in a concentration-dependent manner ( $1.780\pm 0.177, 1.636\pm 0.073, 0.965\pm 0.066, 0.623\pm 0.037, 0.337\pm 0.022, r=-0.971, P<0.01$ ), and among all groups there existed a significant difference ( $F=198.537, P<0.01$ ). Moreover, paeoniflorin also suppressed secretion of hydroxyproline from 3T3 cell stimulated by rIL-13 in a concentration-dependent manner ( $3.030\pm 0.094, 2.976\pm 0.047, 2.814\pm 0.047, 2.652\pm 0.124, 2.408\pm 0.124, r=-0.916, P<0.01$ ) with a statistical significance among all groups ( $F=13.642, P<0.01$ ). Further investigations showed that paeoniflorin decreased both protein expression of  $\alpha$ -SMA, IL-13R $\alpha$ 1, and STAT6, and mRNA expression of Col-I, Col-III, IL-13R $\alpha$ 1, and STAT6 in 3T3 cell stimulated by rIL-13. **Conclusion** Paeoniflorin inhibits activation, proliferation of fibroblasts and production of collagen from fibroblasts through IL-13/STAT6 signaling pathway, which might be one of mechanisms of anti-hepatic fibrosis of paeoniflorin in schistosomiasis japonica.

**【Key words】** Paeoniflorin; Fibroblast; Interleukin-13; Interleukin-13R $\alpha$ 1; Collagen I; Collagen III

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30872209); Anhui Provincial Higher Education Science Research Project (No. KJ2008B282), Doctoral Fund of Anhui Medical University (No. XJ200708) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 200803660003)

\* Corresponding author, E-mail: chudeyong@126.com

目前,各种细胞因子参与的组织纤维化,日益受到人们的关注。其中白细胞介素 13 (IL-13)是调控纤维化最主要的 Th2 细胞因子之一<sup>[1-3]</sup>。研究表明,IL-13 与成纤维细胞表面的复合受体 IL-4R/IL-13R $\alpha$ 1 结合,导致细胞内转录激活因子 6 (STAT6)磷酸化,磷酸化后的 STAT6 在胞浆中形成同源二聚体,后者转位于细胞核,与核基因的转录起始位点结合,促进与胶原有关的基因转录<sup>[4]</sup>。因此,IL-13 通过 IL-13/STAT6 信号转导通路在组织纤维化过程中,起着关键性的促进作用<sup>[5]</sup>。

芍药苷(paeoniflorin, PAE)是芍药主要的活性单体成分。芍药苷在体内吸收、消除较快<sup>[6]</sup>,毒性极低,具有抗炎、免疫调节和神经保护等作用<sup>[7]</sup>。已有研究表明,芍药苷能有效抑制血吸虫病引起的肝脏纤维化,减小虫卵引起的肉芽肿结节<sup>[8,9]</sup>,但芍药苷抗肝纤维化的作用机制尚不清楚。本研究以重组白细胞介素 13 (rIL-13)刺激成纤维细胞,再用不同浓度的芍药苷干预该细胞,观察细胞增殖、羟脯氨酸(HYP)分泌,以及兔抗小鼠  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、白细胞介素 13 受体  $\alpha$ 1(IL-13R $\alpha$ 1)和 STAT6 蛋白表达情况,以及 I 型胶原(Col-I)、III 型胶原(Col-III)、IL-13R $\alpha$ 1 和 STAT6 mRNA 的转录水平,了解芍药苷是否通过抑制 IL-13/STAT6 信号转导通路而最终抑制成纤维细胞的增殖、激活和胶原产生,为芍药苷用于抗纤维化治疗提供理论和实验依据。

## 材料与方 法

### 1 材料

1.1 细胞株 3T3 细胞株购自中国科学院上海细胞库,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中常规培养。待细胞长满瓶底 70%~80%,胰酶消化后,转移至新的含 10%胎牛血清、10<sup>5</sup> U/L 青霉素和 10<sup>5</sup> U/L 链霉素的 DMEM 培养液的培养瓶内继续培养。待细胞再次长满瓶底 70%~80%后,取部分细胞于液氮中冻存,部分用于以下实验。实验前,各组细胞按一定浓度均匀铺在培养瓶或 96 孔培养板中,待细胞完全贴壁后,以无血清的 DMEM 培养液培养 12 h。

1.2 引物 各引物均使用 Premier primer 5.0 软件,根据 GenBank 中相应基因的 cDNA 序列设计,由宝生物工程(大连)有限公司合成(表 1)。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因作为内参。

1.3 主要试剂 芍药苷(纯度>90%,批号为 2008-1005)购自安徽宣城百草植物工贸有限公司,达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)(DMEM)培养基购自美国 Gbico 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司,细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)购自日本 Dojindo 公司,乳酸脱氢酶检测试剂盒和羟脯氨酸检测试剂盒(碱水解法)购自南京建成生物工程研究所,rIL-13 购自英国 Peprotech 公司,兔抗小鼠白细胞介素 13 受体  $\alpha$ 1(IL-13R $\alpha$ 1)、兔抗小鼠信号转导和转录激活因子 6 (STAT6)、兔抗小鼠  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和兔抗小鼠  $\beta$ -辅肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体购自英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,逆转录试剂盒购自美

表 1 Col-I、Col-III、IL-13R $\alpha$ 1、STAT6 和 GAPDH 的基因引物序列  
Table 1 Primer sequences of Col-I, Col-III, IL-13R $\alpha$ 1, STAT6 and GAPDH gene

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物 (bp) Product	退火温度(°C) Annealing temperature	GenBank 登录号 GenBank accession number
I 型胶原 Col-I	GCCCGGAAGAATACG ACATCTGGGAAGCAAA	204	53	NM007742
III 型胶原 Col-III	GCTGCCATTGTTGGAGTTG TGCTTACGTGGGACAGTCAT	335	52	BC052398
白细胞介素 13 受体 $\alpha$ 1 IL-13R $\alpha$ 1	TCAAACCGACCGACAT CTGCCACTGCCACAA	278	47	NM133990
信号转导和转录激活因子 6 STAT6	GCTGATAAGCCGTCTGG GGGCACCGTGTGTTTC	271	58	NM009284
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	TCAACGGCACAGTCAAGG AAGTCGCAGGAGACAACC	691	55	BC095932

国 Promega 公司, TRIzol 购自英国 Invitrogen 公司, 耐热性 DNA 聚合酶、三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTPs) 和 DNA 标志物 (DL 2000) 购自日本 TaKaRa 公司。

## 2 方法

2.1 乳酸脱氢酶释放法检测芍药苷对 3T3 细胞的毒性作用 3T3 细胞在无血清的 DMEM 中培养 12 h 后, 各组分别加入不同浓度的芍药苷 (200、400、600、800 和 1 000 mg/L), 同时设空白对照组, 并以正常细胞组后续裂解作为阳性对照组, 每组设 6 个复孔, 继续培养 24 h。根据乳酸脱氢酶检测试剂盒操作说明检测细胞上清中乳酸脱氢酶 (LDH) 的含量, 根据用药组与空白对照组细胞上清 LDH 含量间的差异是否有统计学意义, 判断芍药苷对 3T3 细胞是否有毒性作用。

2.2 芍药苷对 3T3 细胞生长的影响 3T3 细胞在无血清的 DMEM 中培养 12 h 后, 各组分别加入不同浓度芍药苷 (200、400、600、800 和 1 000 mg/L), 同时设空白对照组, 每组设 6 个复孔, 继续培养 24 h 后, 每孔加 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 再继续培养 2 h, 测量吸光度 ( $A_{450}$  值)。

2.3 IL-13 对 3T3 细胞生长的影响 3T3 细胞在无血清的 DMEM 中培养 12 h 后, 各组分别加入不同浓度的 rIL-13 (6.25、12.5、25、50、100 和 200  $\mu$ g/L), 同时设空白对照组, 每组设 6 个复孔, 继续培养 24 h 后, 每孔加 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 按试剂盒说明操作, 再继续培养 2 h, 测定  $A_{450}$  值。

2.4 芍药苷对 rIL-13 刺激的细胞增殖、激活、胶原产生和细胞信号转导通路相关分子的影响 3T3 细胞在无血清的 DMEM 中培养 12 h 后, 分为 A、B、C、D、E、F 和 G 等 7 组, A 组为空白对照组, 每组设 6 个复孔。A 组加入生理盐水, 其余各组加入 100  $\mu$ g/L

rIL-13, 培养 12 h; 在 C、D、E、F 和 G 组中分别加入 200、400、600、800 和 1 000 mg/L 芍药苷溶液, 培养 24 h 后, 进行下列检测。

2.4.1 细胞增殖的检测 每孔加 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 继续培养 2 h, 测量  $A_{450}$  值。

2.4.2 细胞上清羟脯氨酸的检测 取培养上清 1.0 ml, 根据羟脯氨酸检测试剂盒操作说明检测上清中羟脯氨酸含量。

2.4.3 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析 弃培养上清, 收集细胞, 提取蛋白, 并对蛋白进行定量。取 20  $\mu$ g 蛋白, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 用甲醇浸泡过的 PVDF 膜转印、用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 缓冲液封闭 1 h, TBS 洗涤, 分别加入兔抗小鼠  $\alpha$ -SMA (1:50 000)、IL-13R $\alpha$ 1 (1:1 000)、STAT6 (1:1 000) 和  $\beta$ -actin (1:1 000) 抗体, 4  $^{\circ}$ C 下封闭过夜。TBS 洗涤后, 加抗兔 HRP-IgG (1:20 000), TBS 洗涤。暗室中以 X-胶片 (柯达公司) 感光、显相和固定。

2.4.4 RT-PCR 检测 弃培养上清, 收集细胞, 用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA, 用以合成 cDNA 第 1 链, 并以 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR, 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C (各基因退火温度见表 1) 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。取 5  $\mu$ l PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 采用凝胶成像系统扫描图像并得出各 mRNA 条带吸光度, 该值与内参 GAPDH mRNA 条带的吸光度进行比较, 计算 Col-I、Col-III、IL-13R $\alpha$ 1、STAT6 mRNA 的相对表达量。

## 3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 多组之间比较采用直线相关分析和单因素方差分析。

## 结 果

### 1 芍药苷抑制 3T3 细胞的增殖

随着芍药苷浓度的增加, 加入 CCK-8 试剂后,  $A_{450}$  值逐渐降低,  $A_{450}$  值与芍药苷浓度之间具有相关性( $r=-0.980, P<0.01$ ), 且各浓度组间  $A_{450}$  值差异有统计学意义( $F=198.599, P<0.01$ )(表 2)。说明芍药苷可浓度依赖性地抑制成纤维细胞的增殖。

表 2 不同浓度的芍药苷对细胞增殖及细胞毒性的影响  
Table 2 Effect of paeoniflorin at different concentrations on cell proliferation and toxicity

芍药苷浓度 Paeoniflorin concentration (mg/L)	细胞增殖( $A_{450}$ 值) Proliferation ( $A_{450}$ value)	细胞毒性( $A_{450}$ 值) Toxicity( $A_{450}$ value)
阳性对照	-	1.477±0.041
空白对照	0.954±0.030	0.222±0.015
200	0.887±0.037	0.213±0.029
400	0.779±0.018	0.230±0.013
600	0.686±0.021	0.215±0.042
800	0.601±0.042	0.211±0.040
1 000	0.457±0.037	0.202±0.025

### 2 芍药苷在给定药物浓度内对 3T3 细胞无毒性作用

LDH 释放法检测芍药苷对 3T3 细胞的毒性作用的结果表明, 随着芍药苷浓度的增加,  $A_{450}$  值无明显变化,  $A_{450}$  值与芍药苷浓度之间无相关性( $r=-0.215, P>0.05$ ), 且除阳性对照组外, 各浓度组  $A_{450}$  值间的差异无统计学意义( $F=0.416, P>0.05$ )(表 2)。说明芍药苷溶液浓度为 0~1 000 mg/L 时, 对 3T3 细胞无毒性作用, 可用该浓度范围的芍药苷进行细胞实验。

### 3 rIL-13 促进 3T3 细胞的增殖

随着 rIL-13 浓度的增加, 加入 CCK-8 试剂后,  $A_{450}$  值显著增加, 且  $A_{450}$  值与 rIL-13 浓度之间具有相关性( $r=0.538, P<0.05$ )(图 1)。说明 rIL-13 可浓度依赖性地直接促进成纤维细胞的增殖。

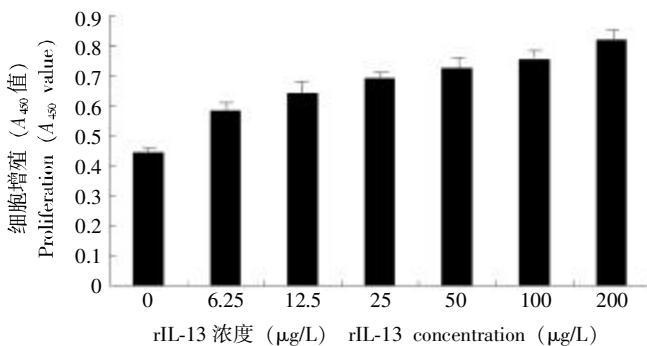


图 1 不同浓度的 rIL-13 对 3T3 细胞增殖的影响  
Fig.1 Effect of rIL-13 at different concentrations on proliferation of 3T3 cells

### 4 芍药苷抑制 rIL-13 刺激的 3T3 细胞的增殖

以 100 μg/L rIL-13 刺激 3T3 细胞后, 加入芍药苷干预。随着芍药苷浓度的增加,  $A_{450}$  值逐渐降低,  $A_{450}$  值与芍药苷浓度之间具有相关性( $r=-0.971, P<0.01$ ), 且各组间  $A_{450}$  值差异有统计学意义( $F=198.537, P<0.01$ )(表 3)。说明芍药苷可浓度依赖性地抑制经 rIL-13 刺激的成纤维细胞增殖。

表 3 不同浓度的芍药苷对 rIL-13 刺激的细胞增殖及羟脯氨酸分泌的影响

Table 3 Effect of paeoniflorin on cell proliferation and hydroxyproline secretion from cells stimulated by rIL-13

组别 Group	rIL-13 浓度 rIL-13 concentration (μg/L)	芍药苷浓度 PAE concentration (mg/L)	细胞增殖 ( $A_{450}$ 值) Proliferation ( $A_{450}$ value)	羟脯氨酸含量 Hydroxyproline content (μg/mg)
A 组 Group A	0	0	1.465±0.148	2.716±0.115
B 组 Group B	100	0	1.980±0.130	3.328±0.281
C 组 Group C	100	200	1.780±0.177	3.030±0.094
D 组 Group D	100	400	1.636±0.073	2.976±0.047
E 组 Group E	100	600	0.965±0.066	2.814±0.047
F 组 Group F	100	800	0.623±0.037	2.652±0.124
G 组 Group G	100	1 000	0.337±0.022	2.408±0.124

### 5 芍药苷能抑制 rIL-13 刺激的 3T3 产生羟脯氨酸

3T3 细胞经 100 μg/L rIL-13 刺激后, 随着加入的芍药苷浓度增加, 细胞培养上清中羟脯氨酸含量逐渐降低, 与芍药苷浓度之间具有相关性( $r=-0.916, P<0.01$ ), 且各组间差异有统计学意义( $F=13.642, P<0.01$ )(表 3)。

### 6 芍药苷能抑制经 rIL-13 刺激的 3T3 细胞表达 α-SMA、IL-13Rα1 和 STAT6 蛋白

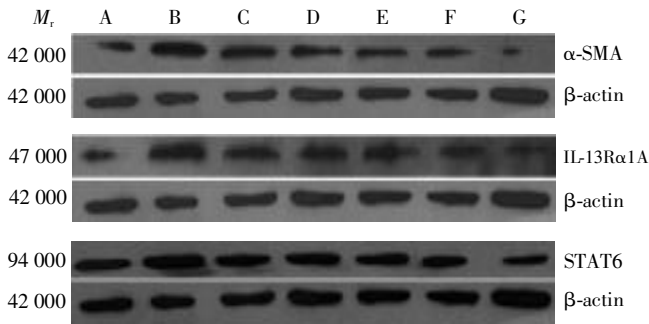
3T3 细胞在 100 μg/L rIL-13 刺激后, α-SMA、IL-13Rα1 和 STAT6 蛋白表达显著增加, 加入芍药苷后, 随着芍药苷浓度的增加, 各组相应的蛋白表达量逐渐减少(图 2)。

### 7 芍药苷能抑制经 rIL-13 刺激的 3T3 细胞表达 Col-I、Col-III、IL-13Rα1 和 STAT6 mRNA

3T3 细胞经 100 μg/L rIL-13 刺激后, Col-I、Col-III、IL-13Rα1 和 STAT6 的转录水平显著升高, 而加入芍药苷后, 随着芍药苷浓度的增加, 各组相应的 mRNA 转录水平逐渐降低(图 3)。

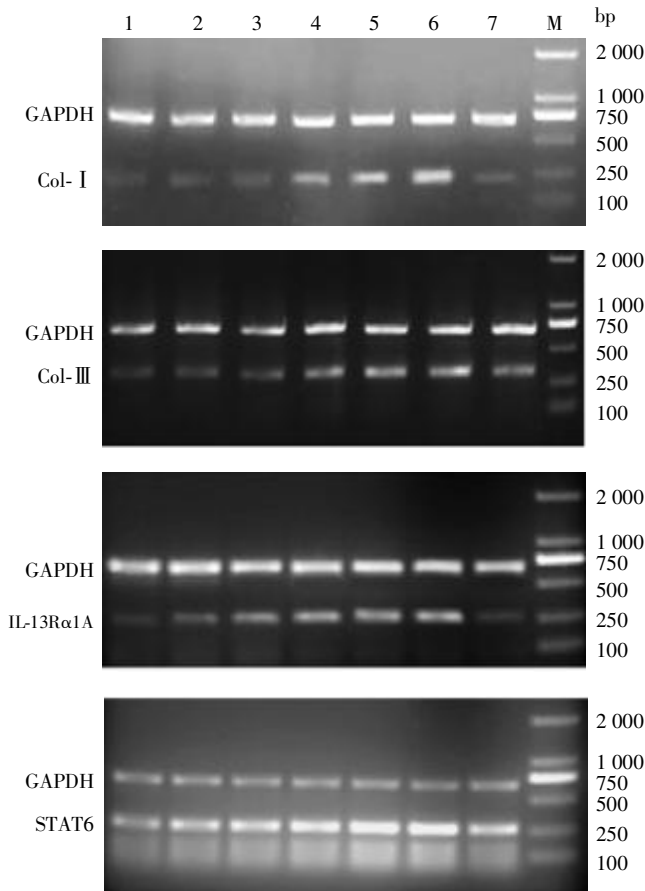
## 讨 论

在正常情况下, 组织中的胶原合成与降解处于动态平衡。在外界的某些刺激因素作用下, 若合成大于降解, 则胶原蛋白在组织内过度沉着而发生纤维化。纤维化的形成受多个局部因子共同调控, 其中 IL-13 是主要的促纤



A: A 组 Group A; B: B 组 Group B; C: C 组 Group C; D: D 组 Group D; E: E 组 Group E; F: F 组 Group F; G: G 组 Group G.

图 2 Western Blotting 检测  $\alpha$ -SMA、IL-13R $\alpha$ 1 和 STAT6 蛋白的表达  
Fig.2 Level of  $\alpha$ -SMA, IL-13R $\alpha$ 1 and STAT6 detected by Western blotting



1: G 组 Group G; 2: F 组 Group F; 3: E 组 Group E; 4: D 组 Group D; 5: C 组 Group C; 6: B 组 Group B; 7: A 组 Group A.

图 3 RT-PCR 检测 Col-I、Col-III、IL-13R $\alpha$ 1 和 STAT6 mRNA 的转录水平  
Fig.3 Level of Col-I, Col-III, IL-13R $\alpha$ 1 and STAT6 mRNA determined by RT-PCR

维化因子之一，而成纤维细胞是主要的产纤维细胞。IL-13 作用于成纤维细胞膜表面复合受体 IL-4R/IL-13R $\alpha$ 1，通过 IL-13/STAT6 信号通路，启动胶原基因的转录，发挥促纤维化的作用<sup>[4,5]</sup>。组织的纤维化与肺脏、肝

脏、皮肤纤维化和气道高反应等多种疾病相关<sup>[10,11]</sup>。因此，对纤维化和抗纤维化机制的探索，具有重要的临床意义。

本研究小组已证实，患日本血吸虫病小鼠的肝肉芽肿中 IL-13 的表达量明显增高，且 IL-13 表达量与肝纤维化程度、活化的成纤维细胞数量成正相关；给予芍药苷后，肝组织中的肉芽肿大小、纤维化程度、IL-13 含量，以及活化的成纤维细胞数量均明显减少。有研究表明，芍药苷可通过影响 TGF $\beta$ 1/SMADs 信号转导通路而减轻日本血吸虫病小鼠肝纤维化反应<sup>[8]</sup>。本研究显示，芍药苷可通过影响 IL-13/STAT6 信号转导通路来抑制成纤维细胞的增殖，激活和产生胶原。这一发现丰富了对成纤维细胞产生胶原，以及芍药苷抗纤维化机制的认识。

为避免培养液中的血清成分影响本研究结果，在实验前 12 h 给细胞换用无血清的培养液。为了解芍药苷对成纤维细胞增殖的影响，用芍药苷干预经 rIL-13 刺激或不经 rIL-13 刺激的 3T3 细胞。结果显示，不管 3T3 细胞是否经 rIL-13 刺激，芍药苷均能浓度依赖性地抑制其增殖。提示芍药苷可能通过抑制 IL-13/STAT6 信号转导通路和其他信号通路来控制细胞的增殖。此外，本研究发现 rIL-13 能浓度依赖性地促进 3T3 细胞增殖，结合 rIL-13 能明显促进 3T3 细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白表达，可能是在血吸虫病肝纤维化的组织中，IL-13 表达量与活化的成纤维细胞数量成正相关的原因。

为了解 IL-13 对胶原产生的影响以及芍药苷是否对细胞产生胶原具有抑制作用，本实验选择 100  $\mu$ g/L rIL-13 刺激 3T3 细胞，再用芍药苷干预。结果显示，rIL-13 不仅促进细胞分泌羟脯氨酸，而且在基因转录水平促进细胞中 Col-I 和 Col-III 的表达，而芍药苷能浓度依赖性地抑制羟脯氨酸的分泌以及 Col-I 和 Col-III 的表达。提示，芍药苷通过抑制成纤维细胞的增殖和胶原的产生来抑制纤维化。

芍药苷是否通过抑制成纤维细胞的 IL-13/STAT6 信号转导通路而影响胶原的产生呢？本研究结果提示，芍药苷能明显抑制 rIL-13 促进的 IL-13R $\alpha$ 1 和 STAT6 蛋白表达和基因转录。说明芍药苷可能通过抑制 IL-13/STAT6 信号转导通路中的受体 IL-13R $\alpha$ 1 和其下游信号分子 STAT6 来抑制胶原的产生，从而起到抗纤维化的作用。

本实验从细胞 IL-13/STAT6 信号转导通路着手，在体外用 rIL-13 刺激成纤维细胞，观察细胞增殖、活化和胶原产生情况，然后用中药芍药的单体成分芍药苷干预该细胞，证实了芍药苷通过抑制 IL-13/STAT6 信号转导通路而抑制成纤维细胞的增殖、活化和胶原

产生,为进一步探索纤维化发生机制,开发高效、低毒的抗纤维化药物进行了尝试,并为芍药苷未来用于治疗纤维化疾病提供了理论和实验依据。

参 考 文 献

[1] Junttila IS, Mizukami K, Dickensheets H, *et al.* Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13; differential expression of IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, and  $\gamma$ c regulates relative cytokine sensitivity[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(11): 2595-2608.

[2] Weng HL, Liu Y, Chen JL, *et al.* The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor-1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis[J]. *Hepatology*, 2009, 50(1): 230-243.

[3] Shinozaki S, Mashima H, Ohnishi H, *et al.* IL-13 promotes the proliferation of rat pancreatic stellate cells through the suppression of NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(1): 61-65.

[4] Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, *et al.* STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells[J]. *Immunity*, 2010, 33(5): 699-712.

[5] Shi X, Cai W, Zhou Y, *et al.* IL-13 upregulates GPIIb expression in megakaryocytic cell lines via STAT6[J]. *Anat Rec(Hoboken)*, 2010, 293(9): 1470-1476.

[6] Liu B, Yang ZY, Wei W. Determination of paeoniflorin in rat

plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2009, 44(6): 707-711. (in Chinese)  
(刘斌, 杨昭毅, 魏伟. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中芍药苷及其药物动力学特征[J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 44(6): 707-711.)

[7] Cao BY, Yang YP, Luo WF, *et al.* Paeoniflorin, a potent natural compound, protects PC12 cells from MPP+ and acidic damage via autophagic pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1): 122-129.

[8] 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.)

[9] Li X, Shen J, Zhong Z, *et al.* Paeoniflorin; a monomer from traditional Chinese medical herb ameliorates *Schistosoma japonicum* egg-induced hepatic fibrosis in mice[J]. *J Parasitol*, 2009, 95(6): 1520-1524.

[10] Mitaka K, Miyazaki Y, Yasui M, *et al.* Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 154(3): 264-274.

[11] Ferreira CM, Pereira AT, de Souza RS, *et al.* Role of IL-13 in a model of *Strongyloides venezuelensis* infection in rats[J]. *Microbes Infect*, 2010, 12(5): 409-414.

(收稿日期: 2010-10-26 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2011)-02-0098-03

【研究简报】

棘阿米巴土壤分离株 CB/S1 内共生细菌的 16S rDNA 序列分析

玄英花, 崔春权, 郑善子\*

【摘要】用地衣红-卡红染色进行共生菌的形态观察, 鉴定棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌。克隆内共生细菌的 16S rDNA 基因, 进行基因序列分析。结果表明, 经地衣红-卡红染色棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌呈黑色和棒状, 在胞质内不规则分布。棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌的 16S rDNA 基因长 1 534 bp, 与类亚洲嗜阿米巴杆菌(*Candidatus Amoebophilus asiaticus* 5a2)和韩国棘阿米巴分离株 KA/E21 内共生细菌的 16S rDNA 基因的同源性均为 98%。进化树分析表明, 棘阿米巴 CB/S1 内共生细菌与韩国棘阿米巴 KA/E21 内共生细菌、类亚洲嗜阿米巴杆菌、黑脚硬蜱内共生细菌和伯恩蚜小蜂内共生细菌等细菌构成单系。

【关键词】棘阿米巴; 16S rDNA; 内共生细菌; 类亚洲嗜阿米巴杆菌

中图分类号: R382.1 文献标识码: B

Sequence Analysis of 16S rDNA Gene of Endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. CB/S1 Isolated from Soil

XUAN Ying-hua, CUI Chun-quan, ZHENG Shan-zi\*

(Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China)

【Abstract】The endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. CB/S1 was identified by orcein-carmin staining and 16S rDNA sequence analysis. The endosymbiont bacteria were rod-shaped and darkly stained, and irregularly localized within the cytoplasm. The length of the 16S rDNA was 1 534 bp and its DNA sequence was closely related to those of *Candidatus*

基金项目: 吉林省教育厅科技项目 (No. 2006-6)  
作者单位: 延边大学基础医学院免疫学与病原生物学教研部, 延吉 133000  
\* 通讯作者, E-mail: szzheng@ybu.edu.cn