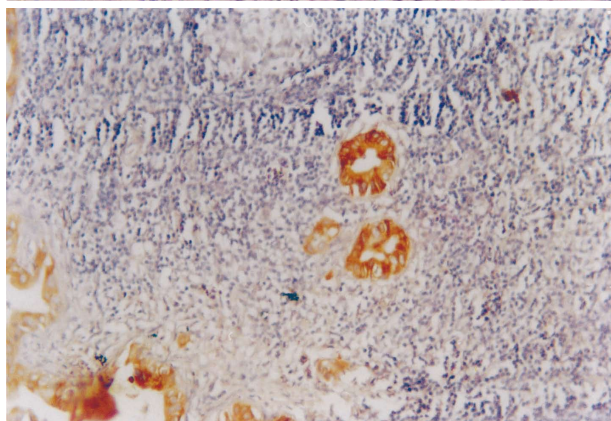
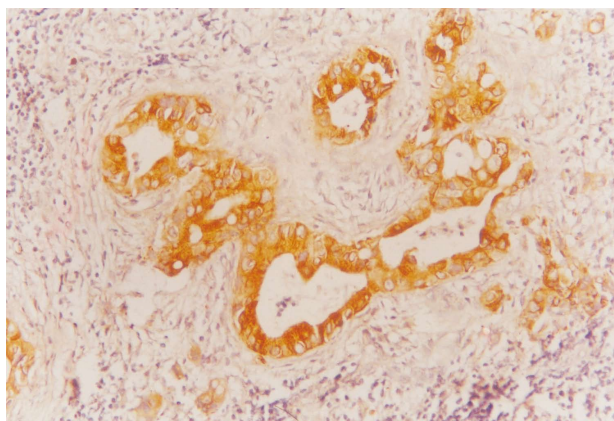
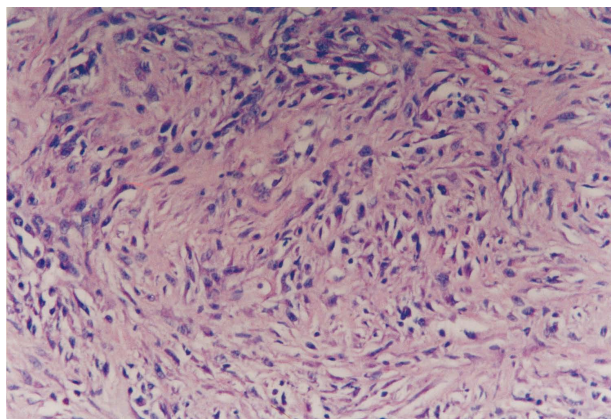
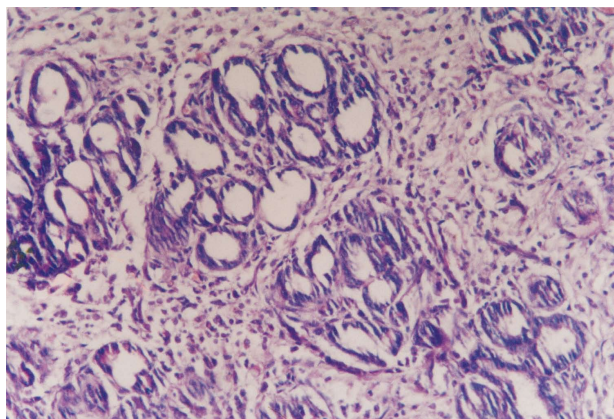


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)



18/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生
2222 肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦
2243 影响拉米夫定相关乙型肝炎病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴凤郁
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星
2275 肝病患者的 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2200 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-09-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

REVIEW

Lactobacillus as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

• 研究快报 •

sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响

唐文, 蒋明德, 李小安

唐文, 蒋明德, 李小安, 第三军医大学成都临床学院 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

全军十五医药卫生科研基金项目, No. 01MB037

通讯作者: 蒋明德, 610083, 四川省成都市成都军区总医院消化内科.

jiangmd88@yahoo.com.cn

电话: 028-86570346 传真: 028-86570346

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-08-05

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Wen Tang, Ming-De Jiang, Xiao-An Li

Wen Tang, Ming-De Jiang, Xiao-An Li, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Supported by the Military Medicine Scientific Research Foundation during 10th Five-Year Plan Period, No. 01MB037

Correspondence to: Dr. Ming-De Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. jiangmd88@yahoo.com.cn

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-08-05

Abstract

AIM: To explore the effect of sp600125, a special inhibitor of c-Jun terminal kinase (JNK), on the acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells-T6 (HSC-T6) and the expression of Caspase-3 protein in rats.

METHODS: The rat HSC-T6 induced by acetaldehyde was treated with different doses of sp600125. The proliferation of HSC-T6 was evaluated by MTT colorimetric assay, and the morphological changes of HSC-T6 were observed by Hoechst 33258 staining. The apoptotic rate of HSC-T6 was analyzed by flow cytometry (FCM), and the expression of Caspase-3 protein was examined by SABC method.

RESULTS: The proliferation of HSC-T6 was inhibited by different doses of sp600125 ($F = 102.53$, $P < 0.01$). The apoptotic rate of HSC-T6 ($F = 38.26$, $P < 0.01$) and the expression of Caspase-3 protein ($F = 38.26$, $P < 0.01$) were significantly increased with the increasing of the sp600125 doses.

CONCLUSION: sp600125 can inhibit the proliferation

and accelerate the apoptosis of HSC-T6, which may be related to the increased expression of Caspase-3 protein.

Key Words: Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; sp600125; Caspase-3

Tang W, Jiang MD, Li XA. Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2263-2265

摘要

目的: 探讨c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号传导通路特异阻断剂sp600125对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)凋亡以及Caspase-3蛋白表达的影响。

方法: 不同浓度sp600125对乙醛刺激的大鼠HSC-T6进行处理后, MTT比色法检测细胞增殖, 用Hoechst 33258染色来观察凋亡细胞的形态变化, FCM检测细胞凋亡率, SABC法检测Caspase-3蛋白表达。

结果: 不同浓度的sp600125能抑制HSC-T6增殖($F = 102.53$, $P < 0.01$), 诱导HSC-T6凋亡; 随着sp600125浓度增加, HSC-T6凋亡率逐渐增高($F = 38.26$, $P < 0.01$), HSC-T6细胞内Caspase-3蛋白阳性表达率也逐渐增高($F = 38.26$, $P < 0.01$)。

结论: 不同浓度sp600125能抑制HSC-T6增殖, 诱导HSC-T6凋亡, 这可能与促进Caspase-3蛋白表达有关。

关键词: 肝纤维化; 肝星状细胞; sp600125; Caspase-3

唐文, 蒋明德, 李小安. sp600125对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及Caspase-3蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(18):2263-2265
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2263.asp>

0 引言

目前认为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活、增殖是肝纤维化发生的关键环节. 乙醛刺激的HSC激活、增殖是导致酒精性肝纤维化发生的关键因素^[1, 2]. 近年来研究表明^[3], MAPK (mitogen-activated protein kinase, 包括ERK、JNK、P38)是HSC激活、增殖并导致肝纤维化发生的主要信号传导通路之一, 其中, JNK信号传导通路参与了细胞增殖、分化以及凋亡的调控. 在我们既往对肝纤维化发病机制的研究中^[4],

已经用Western blot法证实, 乙醛刺激的HSC的p-JNK水平随sp600125 (JNK信号传导通路特异阻断剂) 浓度增加而减少, sp600125可以抑制HSC的增殖, 阻止肝纤维化的发生. 研究显示, JNK信号传导通路在细胞凋亡中起重要作用, HSC凋亡有利于阻止肝纤维化的发生, 但JNK信号传导通路在HSC凋亡过程中的作用机制尚不清楚, 我们拟用sp600125处理乙醛刺激的HSC-T6, 观察sp600125对HSC-T6凋亡以及Caspase-3蛋白表达的影响, 进一步探讨酒精性肝纤维化的发生机制.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠HSC-T6株(上海中医药大学肝病研究所); sp600125(美国Alexis公司); Caspase-3单克隆抗体、SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); MTT(美国Amresco公司); Hoechst 33258试剂盒(碧云天生物技术公司); DAB试剂盒(北京中山生物技术有限公司); 小牛血清(成都哈里生物工程有限公司); DMEM培养基(美国Gibco公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养基, 另添加适量的HEPES、抗生素; 37℃、50 mL/L CO₂的孵箱中培养HSC-T6, 细胞换液时间为1-2 d, 传代时间为3-5 d, 传代前用2.5 g/L胰酶消化.

1.2.2 实验分组 空白对照组(A组): 加入含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液; 乙醛对照组(B组): 在含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液中加入乙醛200 μmol/L; 实验组: 在B组基础上加入sp600125, 终浓度分别为25、50、75、100 μmol/L, 分别称为C、D、E、F组.

1.2.3 MTT检测HSC-T6增殖 取大鼠HSC-T6, 调整浓度至 1×10^5 /L, 接种于96孔细胞培养板中, 每孔200 μL细胞悬液, 每组6复孔, 细胞生长至80%以上融合度时, 无血清培养基同步化处理24 h, 实验组经sp600125预处理1 h后, 加乙醛至200 μmol/L, CO₂培养箱中继续孵育24 h后(乙醛每12 h补充一次), 每孔加5 g/L的MTT 20 μL, 37℃反应4 h, 然后弃去培养液, 每孔加150 μL DMSO, 30 min后用酶标仪, 双波长测定A值, 测定波长为570 nm, 参考波长为630 nm, 酶标仪所示A值为 A_{570nm} 减去 A_{630nm} , A值反应细胞增殖水平.

1.2.4 Hoechst 33258检测HSC-T6凋亡 用6孔板制作HSC-T6细胞爬片(每孔 1×10^5 /L细胞悬液1 mL, 每组重复实验3次), 孵育24 h后再进行无血清DMEM液同步化处理24 h, 实验组经sp600125预处理1 h后, 加乙醛至200 μmol/L, CO₂培养箱中继续孵育24 h后(乙醛每12 h补充一次), 去培养液, PBS洗2遍, 每次3 min, 按Hoechst 33258试剂盒说明操作, 在荧光显微镜下观察HSC-T6细胞形态变化.

1.2.5 FCM测定HSC-T6细胞凋亡 每组重复实验3次, 收集培养的各组HSC-T6, 预冷PBS清洗, 700 mL/L冷乙

醇固定, 50 mg/L Rnase 37℃消化, 65 mg/L碘化丙啶(PI) 4℃染色1 h. 上机检测, 计算细胞凋亡率.

1.2.6 SABC法测定HSC-T6中Caspase-3蛋白表达 制作HSC-T6细胞爬片, 每组重复实验3次, 再按SABC试剂盒说明进行操作, 显微镜下观察, 细胞中有棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性结果, 计算Caspase-3蛋白表达阳性率.

统计学处理 运用SPSS10.0软件, 用One-way ANOVA分析, 并用LSD方法进行组间两两比较, 数据以mean ± SD表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT检测HSC-T6增殖 培养的HSC-T6中加入乙醛后, 细胞增殖明显; 当分别加入不同浓度的sp600125后, HSC-T6增殖受到抑制($F = 102.53$, $P < 0.01$, 表1).

2.2 Hoechst 33258检测HSC-T6凋亡细胞的形态改变 在荧光显微镜下可观察到乙醛组HSC-T6的细胞核染色及大小较均一; 当加入不同浓度的sp600125后, HSC-T6凋亡细胞逐渐增多, 表现为细胞核浓缩、染色深, 细胞核大小不均、裂解、形成凋亡小体.

2.3 FCM测定细胞凋亡 A组HSC-T6凋亡率除了与C组无显著性差异外, 与其他组均有显著性差异($P < 0.01$); 乙醛组与其他组均有显著性差异($P < 0.01$). 随着sp600125浓度增加HSC-T6细胞凋亡率逐渐增加($F = 54.83$, $P < 0.01$, 表2).

2.4 SABC法测定HSC-T6中Caspase-3蛋白表达 A组HSC-T6中Caspase-3蛋白表达阳性率与B组、C组无显著性差异外, 与其他组均有显著性差异($P < 0.01$); 乙醛组与sp600125实验组均有显著性差异($P < 0.01$). 随着sp600125浓度增加HSC-T6细胞中Caspase-3蛋白表达阳性率逐渐增加($F = 38.26$, $P < 0.01$, 表3).

表1 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6增殖的影响 (mean ± SD, $n = 6$)

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	A值
A	0+0	0.0850 ± 0.0065 ^d
B	0+200	0.1410 ± 0.0029 ^b
C	25+200	0.1343 ± 0.0039 ^b
D	50+200	0.1297 ± 0.0033 ^{bd}
E	75+200	0.1138 ± 0.0082 ^{bd}
F	100+200	0.0877 ± 0.0077 ^d

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 乙醛组.

表2 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6凋亡的影响 (mean ± SD, $n = 3$)

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	凋亡率(%)
A	0+0	10.17 ± 0.64 ^d
B	0+200	8.57 ± 0.31 ^b
C	25+200	11.07 ± 0.25 ^d
D	50+200	11.83 ± 0.47 ^{bd}
E	75+200	13.47 ± 0.72 ^{bd}
F	100+200	16.13 ± 1.00 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 乙醛组.

表3 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6 Caspase-3蛋白表达的影响
(mean ± SD, $n = 3$)

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	阳性率(%)
A	0+0	18.34 ± 1.39
B	0+200	16.27 ± 0.47
C	25+200	18.81 ± 1.18 ^d
D	50+200	22.64 ± 1.48 ^{bd}
E	75+200	25.23 ± 1.11 ^{bd}
F	100+200	27.46 ± 1.41 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 乙醛组.

3 讨论

研究^[5,6]表明HSC的激活、增殖是肝纤维化发生、发展的中心环节,而HSC的凋亡有利于肝纤维化的逆转.因而,抑制激活的HSC增殖和诱导激活的HSC凋亡是治疗肝纤维化的一个重要研究方向.

MAPK信号传导通路(包括ERK、JNK、P38)是细胞外的各种信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要通路. JNK为MAPK家族重要成员, JNK的活化是通过其氨基酸残基磷酸化,细胞质中的JNK移位到细胞核,活化的JNK可以和转录因子ATF2及c-JNK的氨基末端区域结合,使转录因子的活性区域发生磷酸化,从而促进相应基因的表达^[7]. JNK信号传导通路的激活在肝纤维化发生中起重要作用: Marra *et al*^[8]研究表明, sp600125能抑制白细胞介素-1(IL-1)或肿瘤坏死因子(TNF)诱导的HSC CCL2(MCP-1)分泌和基因表达; Li *et al*^[9]研究表明酒精代谢产物亚麻酸乙酯(linolenic acid ethyl ester, LAEE)可通过ERK、JNK途径影响HSC AP-1活性及表达; Carriers *et al*^[10]研究表明,放线菌酮(Cycloheximide, CHX)与CD95L一起通过JNK途径诱导HSC凋亡; Anania *et al*^[11]研究表明阻断JNK活性后可抑制HSC内 $\alpha(2)$ -1胶原的表达. 我们用sp600125阻断JNK活性后,能有效抑制HSC-T6增殖,随着sp600125剂量的增加,其抑制HSC-T6增殖的作用增强,说明阻断JNK信号传导通路可以抑制乙醛刺激的HSC增殖,从而阻止酒精性肝纤维化的发生.

细胞凋亡是基因控制的细胞程序化死亡,是一系列半胱氨酸蛋白酶Caspase级联反应的结果.在多种细胞和各种刺激因素的作用下, Caspase-3被认为是凋亡的关键执行者, Caspase-3处于该级联反应的下游,其通过降解细胞内相应底物(如细胞骨架蛋白、核蛋白等)使细胞凋亡.研究^[12,13]表明Superoxide、Tetrandrine等可通过Caspase-3诱导HSC凋亡.本实验用不同浓度sp600125

阻断JNK活性后,乙醛刺激的大鼠HSC-T6凋亡率逐渐增加,同时Caspase-3蛋白表达率也逐渐增加,说明sp600125阻断JNK信号传导通路后可以诱导HSC-T6凋亡,并且其作用机制可能在于上调Caspase-3基因表达.

HSC的凋亡不仅能够减少激活的HSC的数量,而且能够抑制HSC的激活,从而减少细胞外基质成分产生,达到阻止肝纤维化的发生、甚至逆转肝纤维化的目的.我们以sp600125阻断JNK信号传导通路为切入点,研究HSC凋亡,这对进一步阐明肝纤维化发生的分子机制和寻找一条治疗肝纤维化的可能途径均有重要意义.

4 参考文献

- 1 Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate $\alpha(2)$ (I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-857
- 2 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:1130-1140
- 3 王琼. 酪氨酸蛋白激酶及其抑制剂在肝星状细胞激活中的研究进展. *华西医学* 2002;17:147-148
- 4 钟显飞, 蒋明德, 马洪德, 曾维政, 李小安. JNK信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增殖的影响. *西南国防医药* 2004;14:350-353
- 5 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- 6 Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;161:1-151
- 7 陈良恩. JNK信号转导通路及其在应激中的作用. *国外医学. 生理病理科学与临床分册* 2001;21:169-171
- 8 Marra F, Delogu W, Petrai I, Pastacaldi S, Bonacchi A, Efsen E, Aleffi S, Bertolani C, Pinzani M, Gentilini P. Differential requirement of members of the MAPK family for CCL2 expression by hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G18-G26
- 9 Li J, Hu W, Baldassare JJ, Bora PS, Chen S, Poulos JE, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. The ethanol metabolite, linolenic acid ethyl ester, stimulates mitogen-activated protein kinase and cyclin signaling in hepatic stellate cells. *Life Sci* 2003;73:1083-1096
- 10 Carriers A, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Haussinger D. c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:179-186
- 11 Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate $\alpha(2)$ (I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-857
- 12 Thirunavukkarasu C, Watkins S, Harvey SA, Gandhi CR. Superoxide-induced apoptosis of activated rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004;41:567-575
- 13 Zhao YZ, Kim JY, Park EJ, Lee SH, Woo SW, Ko G, Sohn DH. Tetrandrine induces apoptosis in hepatic stellate cells. *Phytother Res* 2004;18:306-309

电编 张勇 编辑 张海宁