

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期 (Volume 11 Number 6)



**6/2003**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑  
潘伯荣  
总编辑  
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®,  
Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®  
Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/  
Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子  
1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/  
Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告:  
世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.



# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

## ● 目 次 ●

2003 年 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期 (总第 110 期)

### 述 评

689 肝脏胶原蛋白检测进展与评析 刘成海

### 病毒性肝炎

693 甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1 株)大规模免疫长期效果观察 龚健,李荣成,徐志一,江世平,罗东,杨进业,李艳萍,陈修荣,黄贵彪,凌文武,韦光武,汪莹怡

697 HCV-Fc 融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达 冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和

701 胸腺肽  $\alpha 1$  对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响 段国荣,聂青和,周永兴,王全楚,田长印,刘拉羊,薛红安

705 蛋白激酶 C 对肾小球前小动脉平滑肌细胞 I 型  $IP_3$  受体表达影响 王静艳,刘沛,韩峰

### 肝 癌

708 抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的 PBMCs 在动物体内的抑瘤作用 程虹,刘彦仿,张惠中,沈万安,张菊,张静

712 经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌 31 例 钱国军,陈汉,吴孟超

716 大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响 张志,方石岗,高毅,蒋泽生,孙尔维

### 基 础 研 究

719 西安酒精性肝病流行病学 鲁晓岚,陶明,罗金燕,耿燕,赵平,赵红莉

723 蛋白激酶 C 在肝细胞缺氧预处理中的作用 单毓强,高毅,王瑜,潘明新

726 肝硬化不同病期 ET-1, NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用 姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍

730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

733 环氧合酶-2 反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响 吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖

737 ONO-3403 对胆囊收缩素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响 陈少夫,刘维新,山本光胜,大槻真

741 内皮抑素-可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定 李喆,潘欣,潘卫,曹贵松,闻兆章,方国恩,戚中田,毕建威,华积德

745 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响 刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明

749 脾静脉结扎诱导继发性脾功能亢进犬动物模型的评价 刘全达,马宽生,何振平,丁钧,董家鸿

753 IL-6 与整合素家族细胞黏附分子在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型中的表达 孙威,张俊东,赵滢,赵宇,王强

### 临 床 研 究

756 老年消化道多原发癌的早期诊断及综合治疗 蔡昌豪,吴本伊,吴道宏,邵勇,王孟薇

### 焦 点 论 坛

760 进一步深化慢性乙型肝炎诊断治疗的实用性研究 李梦东,聂青和

762 慢性乙型肝炎临床分度、诊断的一些问题 周永兴

766 慢性乙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症 聂青和

768 特殊人群乙型肝炎的临床特点及处理 罗新栋,聂青和

772 病理学检测在慢性乙型肝炎诊断治疗中的价值 郎振为

775 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展 滕光菊,聂青和

776 乙型肝炎的实验检查及其临床意义 郝春秋,聂青和

780 慢性乙型肝炎的抗病毒治疗 程明亮,吴亚云

783 慢性乙型肝炎的免疫治疗 施光峰

785 慢性乙型肝炎的中医药治疗 申德林,王全楚,焦栓林

787 乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗 江家骥,朱琪

789 慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗 蔡卫民,张彬彬

791 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生 苏勤

795 治疗性疫苗-慢性乙型肝炎患者的希望 王全楚,聂青和

### 文 献 综 述

799 抗乙型肝炎病毒肝靶向药物制剂的研究进展 王九平,白雪帆

803 腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用 郝春秋,冯志华,聂青和

806 HCVC 区 DNA 疫苗的研究现状 孙利,周永兴

810 病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战 贾战生,冯志华,周永兴



文献综述	815 抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备及功能研究 王全楚,冯志华,周永兴 819 疫苗新概念及新型疫苗的研制 冯志华,王全楚 823 特殊状态下的逆行胰胆管造影检查术 智发朝 824 胃肠道出血的内镜诊治 陈村龙,宋于刚,周殿元 827 介入内镜学在胆胰疾病中的应用 刘思德 829 老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别 吴保平,肖冰 831 老年人消化道急症 黄纯炽
研究快报	834 肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用 王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹 836 三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用 喻智勇,王曙光,郑秀海,李昆 838 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义 陈会松,柳利明,黄华,杨晋辉
临床经验	841 结肠黑变病 25 例 孙军,李岩 842 保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义 陈志新,胡建昆,张波,陈佳平,周总光 844 萎缩性胃炎临床证型分类研究 朱方石,姒健敏,王良静 846 叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响 曹大中,刘顺英,赵建学 848 短肠综合征的远期并发症 4 例 周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿 851 幽门螺杆菌感染与慢性肝病的临床关系 焦建中,聂青和,赵春林,吴永胜,文绍先,吴群 853 内支架术与腔内近距离放射治疗联合应用治疗晚期食管癌 8 例 申宝忠,于友涛 855 组织黏合剂 Histoacryl 治疗胃静脉曲张活动性出血的疗效 曾黎明,陈村龙,智发朝 856 肝病患者血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平变化 徐学刚,张美稀,董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台 859 尼美舒利引起肝脏损害 14 例 关英,徐峰,胡莲,周甘平 861 脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义 王秀艳,游晓功,施宝民,穆庆岭,吴泰璜 863 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较 孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪松 865 影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值 张国梁,韦斌,朱春兰,任旭 867 分离培养在 Hp 感染诊断中的重要地位 史济经,闵海阳,王青,杨慧芳,王洪涛,张振华 870 HBV 感染者 HBV DNA 与抗原抗体标志物的关系 陈雪娟,李刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠 871 乙型肝炎肝组织中细胞间黏附分子-1 及 Fas 的表达及意义 张闯峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地 873 轮状病毒全身感染对肝胆胰的影响 姚英氏,李宁,欧巧群 877 良性肝病患者血清 AFP 升高的临床意义 程天霞 875 胆源性胰腺炎手术治疗 58 例 黄建勇,马清涌,马建新 879 经皮肝穿刺胆道引流治疗外伤后胆瘘 汪邵平,霍枫,张玉新,裴世强
病例报告	840 以肠梗阻为首表现的原发性小肠肿瘤 4 例 赵永玲,魏芳
编委来信	707 711 江学良
投稿细则	附 1-4 世界华人消化杂志投稿细则
封面故事	730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

# 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

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2003-06-15  
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀  
黄象谦  
黄志强  
黎介寿  
刘耕陶  
裘法祖  
汤钊猷  
王宝恩  
危北海  
吴孟超  
吴咸中

张金哲  
张学庸  
赵东海  
周殿元  
社长总编辑 马连生  
中文编辑 潘伯荣  
王瑾晖  
英文编辑 张建中  
排 版 李少华  
校 对 李天华

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  
E-mail:wcjd@wjgnet.com  
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)85381892  
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 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)85381892  
传真:(010)85381893  
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

## 本刊已被国内外 检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》  
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》  
俄罗斯《文摘杂志(PJ)》  
中国科技论文统计与分析  
中国学术期刊文摘  
中国中医药信息服务网  
中国生物医学文献光盘数据库  
《中文科技资料目录(医药卫生)》  
中国生物医学期刊目录数据库  
中国医学文摘外科学分册(英文版)  
中国医学文摘内科学分册(英文版)

## 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.

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 288.00 元

广告经营许可证  
1401004000050

# 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响

刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明

刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明,上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092  
刘清华,女,1971-02-11,浙江宁波人,汉族,1989/1996 年在上海第二医科大学攻读学士、硕士学位,现为主治医师,消化内科博士研究生,主要从事消化疾病的临床和基础研究。■

国家自然科学基金资助项目, No.30170411

项目负责人:李定国,200092,上海市杨浦区控江路 1665 号,上海第二医科大学附属新华医院消化内科。 Dingguo\_li@yahoo.com.cn  
电话:021-65790000-5316 传真:021-55055127

收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-12-09

## Effect of Activin on extracellular matrix secretion in isolated rat hepatic stellate cell

Qing-Hua Liu, Ding-Guo Li, Xin Huang, Han-Ning You, Qin Pan, Lei-Ming Xu, Qin-Fang Xu, Han-Ming Lu

Qing-Hua Liu, Ding-Guo Li, Xin Huang, Han-Ning You, Qin Pan, Lei-Ming Xu, Qin-Fang Xu, Han-Ming Lu, Department of Gastroenterology of Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30170411

Correspondence to: Dr. Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. Dingguo\_li@yahoo.com.cn

Received:2002-11-19 Accepted:2002-12-09

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of activin A on the extracellular matrix secretion of rat hepatic stellate cell.

**METHODS:** Hepatic stellate cells were isolated and purified from normal male Sprague-Dawley rat liver by a combination of pronase-collagenase perfusion and density gradient centrifugation. Passaged hepatic stellate cells were divided randomly into eight groups: control group(A group), ACTA 1  $\mu\text{g/L}$  group (B group), ACTA 10  $\mu\text{g/L}$  group(C group), ACTA 100  $\mu\text{g/L}$  group (D group), TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  group(E group), TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  plus ACTA 1  $\mu\text{g/L}$  group(F group), TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  plus ACTA 10  $\mu\text{g/L}$  group(G group), TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  plus ACTA 100  $\mu\text{g/L}$  group(H group). 24 h after incubation secretion of procollagen III, collagen IV and mRNA of collagen III in hepatic stellate cells were detected by radioimmunoassays and semi-quantitative RT-PCR method respectively.

**RESULTS:** Extracellular matrix secretion in passaged hepatic stellate cells was enhanced by activin A according to its concentration, the capacity of extracellular matrix secretion by 100  $\mu\text{g/L}$  activin A was equal to that of 10  $\mu\text{g/L}$  TGF  $\beta_1$ , extracellular matrix secretion and type III collagen mRNA expression in passaged hepatic stellate cells were enhanced by activin A and TGF $\beta_1$  in a synergistic manner.

**CONCLUSION:** Activin A may contribute to hepatic fibrogenesis.

Liu QH, Li DG, Huang X, You HN, Pan Q, Xu LM, Xu QF, Lu HM. Effect of Activin on extracellular matrix secretion in isolated rat hepatic stellate cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):745-748

## 摘要

**目的:**探讨激活素A(activin A, ACT A)对肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成的影响。■

**方法:**采用原位酶灌注法和密度梯度离心法分离HSC。初次传代后, HSC 随机分为 8 组:空白对照组(A 组)、ACTA 1  $\mu\text{g/L}$  组(B 组)、ACTA 10  $\mu\text{g/L}$  组(C 组)、ACTA 100  $\mu\text{g/L}$  组(D 组)、TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  组(E 组)、ACTA 1  $\mu\text{g/L}$ +TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  组(F 组)、ACTA 10  $\mu\text{g/L}$ +TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  组(G 组)、ACTA 100  $\mu\text{g/L}$ +TGF  $\beta_1$  10  $\mu\text{g/L}$  组(H 组)。加药后 24 h, 采用放射免疫法检测培养液 III 型前胶原、IV 型胶原含量及半定量 RT-PCR 方法测定细胞 III 型胶原 mRNA 表达。

**结果:**ACT A 能刺激体外培养 HSC 分泌 ECM, 在一定浓度范围内(1-100  $\mu\text{g/L}$ )呈剂量依赖关系; 100  $\mu\text{g/L}$  ACT A 刺激 HSC 分泌 ECM 的能力与 10  $\mu\text{g/L}$  TGF- $\beta_1$  相当, 而且 ACT A 能协同 TGF- $\beta_1$  发挥这一生物学效应。

**结论:**激活素 A 参与肝纤维化形成。

刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明. 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(6):745-748

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/745.asp>

## 0 引言

激活素(activin, ACT)属于转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族, 是由两个亚单位( $\beta_A$  和  $\beta_B$ )组成的二聚体糖蛋白, 根据亚单位组成不同可分为 ACT A( $\beta_A\beta_A$ )、ACT B( $\beta_B\beta_B$ ) 和 ACT AB( $\beta_A\beta_B$ ), 其中以 ACT A 最为重要<sup>[1-3]</sup>。近年研究表明, ACT A 是肝脏生长抑制性递质, 可抑制肝细胞生长, 诱导其凋亡<sup>[4-6]</sup>。这种特性与 TGF- $\beta_1$  在肝内的作用相似。已知 TGF- $\beta_1$  作为重要的细胞因子参与肝纤维化形成<sup>[9-12]</sup>, 关于 ACT A 在肝纤维化形成中所起的作用以及与 TGF- $\beta_1$  关系还不是很明确, 为此我们进行研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Sprague-Dawley  $\delta$  大鼠, 质量 400-450 g,



购自中国科学院上海实验动物中心, 普通饲料喂养, 自由进食. 基因重组人 TGF- $\beta$ 1, 为 R & D 公司产品; 基因重组人 ACTA 由日本 Ajinomoto 药物研究室 Eto Yusuzu 博士惠赠; 链酶蛋白酶、IV 型胶原酶、DNA 酶、Nycodenz 为 Sigma 公司产品; DMEM 培养基为 Gibco 公司产品; 小牛血清、胰蛋白酶、mRNA 抽提试剂盒为上海华美生物工程公司产品; 逆转录试剂盒为 Promega 公司产品; Tag 酶、琼脂糖、dNTP 为上海生物工程公司产品; III 型胶原及  $\beta$ -actin 引物由上海生物工程公司合成.

**1.2 方法** 采用原位酶灌注法和密度梯度离心法分离 HSC<sup>[13,14]</sup>. 大鼠经 2.5 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后, 门静脉穿刺, 恒流泵以 20 ml/min 速度依次灌注前灌流液、链酶蛋白酶溶液和胶原酶溶液. 肝组织软化后, 分离肝脏, 剪碎后于链酶蛋白酶、胶原酶和 DNA 酶液中振荡消化 30 min. 所得悬液 200 目网过滤, 滤液离心, 500 g $\times$ 7 min, 弃上清, D-hanks 液重复离心洗涤 3 次. 以 1:2 的体积与 180 g/L Nycodenz 混匀, 上覆少许 DMEM 培养液, 行密度梯度离心, 1 500 g $\times$ 7 min. 取界面处细胞, D-hanks 液离心洗涤 2 次, 500 g $\times$ 7 min. 用含 200 ml/L 小牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞, 5-10 $\times$ 10<sup>8</sup>/L 的浓度接种培养细胞, 24 h 后换液, 14 d 后传代. 台盼蓝排斥法鉴定细胞活率; 自发荧光观察鉴定其纯度. 取初次传代的 HSC, 以含 200 ml/L 小牛血清的 DMEM 培养液调整细胞浓度约为 2 $\times$ 10<sup>8</sup>/L 接种 6 孔板. 待细胞融合生长后, 换含 10 ml/L 小牛血清的 DMEM 培养 24 h, 将细胞分为 8 组: (1)空白对照组(A 组); (2)ACTA 1  $\mu$ g/L(B 组):加 ACTA 浓度为 1  $\mu$ g/L; (3)ACTA 10  $\mu$ g/L(C 组):加 ACTA 浓度为 10  $\mu$ g/L; (4)ACTA 100  $\mu$ g/L(D 组):加 ACTA 浓度为 100  $\mu$ g/L; (5)TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 10  $\mu$ g/L(E 组):加 TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 浓度为 10  $\mu$ g/L; (6)ACTA 1  $\mu$ g/L+TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 10  $\mu$ g/L(F 组):加 ACTA 浓度为 1  $\mu$ g/L, TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 浓度为 10  $\mu$ g/L; (7)ACTA 10  $\mu$ g/L+TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 10  $\mu$ g/L(G 组):加 ACTA 浓度为 10  $\mu$ g/L, TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 浓度为 10  $\mu$ g/L. (8)ACTA 100  $\mu$ g/L+TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 10  $\mu$ g/L(H 组):加 ACTA 浓度为 100  $\mu$ g/L, TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 浓度为 10  $\mu$ g/L. 药物作用 24 h 后, 分别采用放射免疫法检测培养液 III 型前胶原(procollagen III, PC III)、IV 型胶原(collagen IV, C IV)含量或半定量 RT-PCR 方法测定细胞 III 型胶原 mRNA 表达. PC III、C IV 含量测定采用放射免疫法, 按试剂盒说明书操作.

**III 胶原 mRNA 相对表达量 RT-PCR 检测:**(1)RNA 提取和逆转录反应按试剂盒说明书操作; (2)引物设计及扩增条件:根据文献报道的大鼠 III 型胶原及  $\beta$ -actin 的 cDNA 序列, 应用 Oligo 引物设计软件在计算机上设计相应引物. III 型胶原:上游, 5' -tggtcca acc agg aga gaa gg-3'; 下游, 5' -atccgtctc gac ctg gct ga-3', 扩增片段长 300 bp. 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次; 72  $^{\circ}$ C 7 min.  $\beta$ -actin:上游, 5' -tac ccc att gaa cac ggc at-3'; 下游, 5' -tca cgc acg att tcc ctc tc-3',

扩增片段长 428 bp. 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 循环 28 次; 72  $^{\circ}$ C 7 min. (4)半定量分析:PCR 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳后摄像, 图像使用复日 Smartview 分析软件行密度定量, III 型胶原与  $\beta$ -actin 比值作为 III 型胶原 mRNA 相对表达量.

统计学处理 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间差异采用方差分析, 两组组间差异用 Dunnett's t 检验, 所有数据均用 SPSS10.0 软件分析.

## 2 结果

**2.1 HSC 细胞的得率和纯度** 用本法分离的 HSC, 其得率为 5 $\times$ 10<sup>6</sup>-1 $\times$ 10<sup>7</sup>/肝, 以 4 g/L 台盼蓝染色细胞存活率在 90% 以上. 新鲜分离的 HSC 在波长为 325-328 nm 紫外线激发下, 呈明亮蓝绿色荧光(图 1). 培养 1 wk 后, HSC 完全激活, 呈梭型生长(图 2).

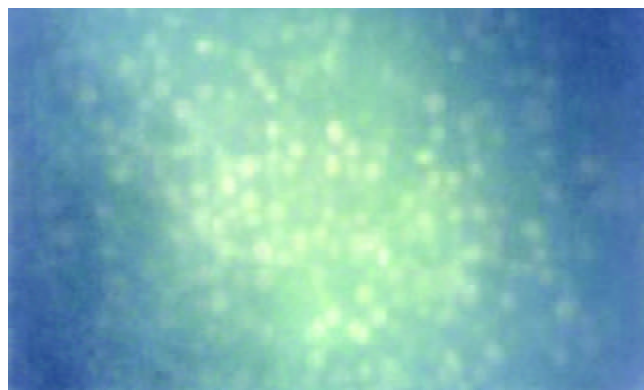


图1 新鲜分离的 HSC 在紫外线激发后呈蓝绿色荧光 $\times$ 1100.

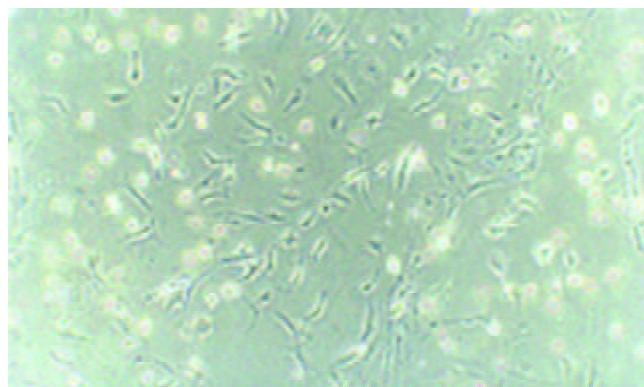


图2 HSC 完全激活后呈梭型生长 $\times$ 1100.

**2.2 ACTA 及联合 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 对 HSC 分泌 PC III、C IV 影响** ACTA 促进 HSC 分泌 PC III 型、C IV, 并呈剂量依赖关系(表 1). 当 ACTA 浓度为 100  $\mu$ g/L 时, 能显著促进 HSC 分泌 PC III、C IV ( $P < 0.01$ ). 100  $\mu$ g/L ACTA 促进 HSC 分泌 ECM 作用与 10  $\mu$ g/L TGF  $\beta$ <sub>1</sub> 相当 ( $P > 0.05$ ). 不同浓度 ACTA (1, 10, 100  $\mu$ g/L) 与 TGF  $\beta$ <sub>1</sub> (10  $\mu$ g/L) 合用引起的剂量依赖性促进 HSC 分泌 ECM 作用不仅比单独使用 ACTA 时作用强, 而且两药合用时 HSC 分泌 ECM 比两药理论相加值大 ( $P < 0.05$ ) (图 3、4).

表1 不同浓度 ACTA 及其与 TGFβ<sub>1</sub> 合用对大鼠分泌 ECM 的影响

组号	分组	PC III (ng/L)	C IV (μg/L)
1	空白对照组	6.6 ± 2.3	90.6 ± 12.7
2	ACTA 1 μg/L	6.7 ± 1.8	92.5 ± 9.1
3	ACTA 10 μg/L	7.9 ± 2.6	112.1 ± 25.4
4	ACTA 100 μg/L	20.5 ± 3.6 <sup>b</sup>	240.5 ± 47.2 <sup>b</sup>
5	TGFβ <sub>1</sub> 10 μg/L	20.7 ± 6.8 <sup>b</sup>	253.1 ± 44.3 <sup>b</sup>
6	TGFβ <sub>1</sub> 10 μg/L+ ACTA 1 μg/L	23.3 ± 7.1 <sup>b</sup>	261.7 ± 56.5 <sup>b</sup>
7	TGFβ <sub>1</sub> 10 μg/L+ ACTA 10 μg/L	30.1 ± 10.7 <sup>b</sup>	331.2 ± 97.6 <sup>b</sup>
8	TGFβ <sub>1</sub> 10 μg/L+ ACTA 100 μg/L	50.4 ± 10.0 <sup>b</sup>	526.3 ± 103.1 <sup>b</sup>

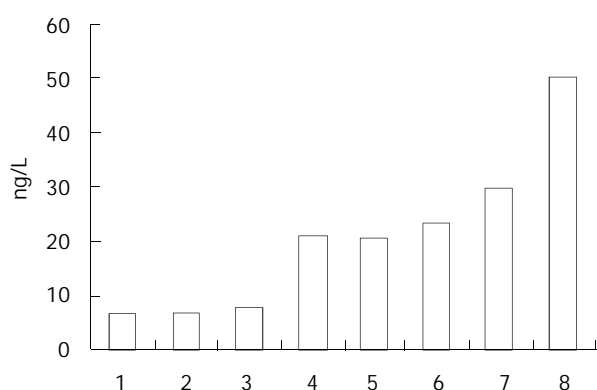
<sup>b</sup>P < 0.01 vs 空白对照组.

图3 ACT A及联合 TGFβ1 对 HSC 分泌 PC III 影响.

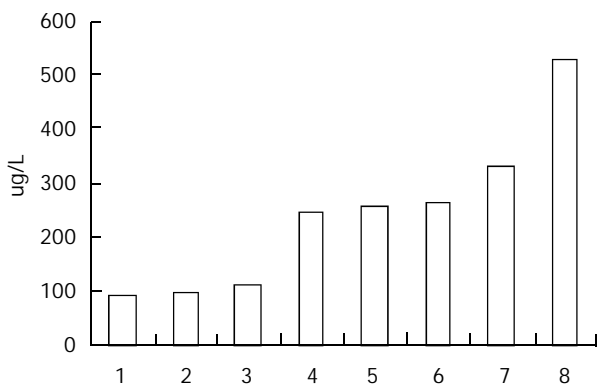


图4 ACT A及联合 TGFβ1 对 HSC 分泌 C IV 影响.

**2.3 HSC 总 RNA 质量鉴定** 用微量紫外分光光度仪检测 RNA A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 介于 1.8-2.0, 表明 RNA 未被蛋白质污染. 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 28S 和 18S 两条带(图 5). 摄像后, 图像使用复日 Smartview 分析软件行密度定量, 28S 约为 18 S 两倍, 说明 RNA 无明显降解, 可用于 RT-PCR 实验.

**2.4 ACT A 及联合 TGFβ<sub>1</sub> 对大鼠 HSC III 型胶原 mRNA 表达影响** 10 μg/L TGFβ<sub>1</sub> 能显著增加 HSC 分泌 III 型胶原 mRNA (52.6 ± 5.1 % vs 23.4 ± 3.5 %, P < 0.01), 10 μg/L ACT A 对其影响不明显 (25.1 ± 6.5 %), 但是联合 10 μg/L TGF β<sub>1</sub> 后促进 HSC 分泌 III 型胶原 mRNA 较二者理论相加值大 (66.1 ± 8.2 %, P < 0.05) (图 6、表 2).

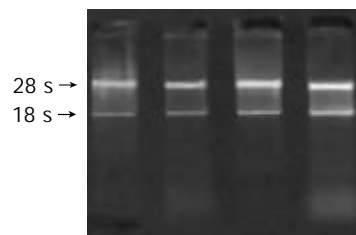
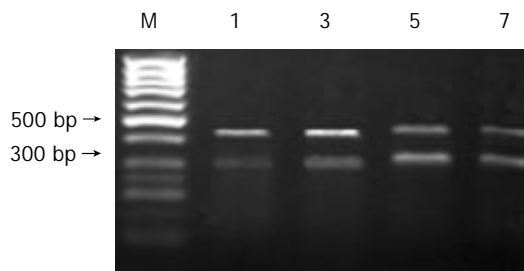


图5 RNA 电泳图.

图6 10 μg/L ACTA 及其与 10 μg/L TGFβ<sub>1</sub> 合用对大鼠 HSC III 型胶原 mRNA 影响.表2 ACTA 及其与 TGFβ<sub>1</sub> 合用对大鼠 HSC III 型胶原 mRNA 影响

组号	分组	III 型胶原 mRNA (%)
1	空白组	23.4 ± 3.5
3	ACTA 10 μg/L	25.1 ± 6.5
5	TGFβ <sub>1</sub> 10 μg/L	52.6 ± 5.1 <sup>b</sup>
7	TGFβ <sub>1</sub> 10 μg/L+ ACTA 10 μg/L	66.1 ± 8.2 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 空白对照组.

### 3 讨论

我们研究证实了 ACTA 能刺激体外培养 HSC 分泌 ECM, 在一定浓度范围内 (1-100 μg/L) 呈剂量依赖关系; 100 μg/L ACT A 刺激 HSC 分泌 ECM 的能力与 10 μg/L TGF-β<sub>1</sub> 相当, 而且 ACT A 能协同 TGF-β<sub>1</sub> 发挥这一生物学效应. Sugiyama et al.<sup>[15]</sup> 研究发现在二甲基亚硝胺和猪血清诱导的大鼠肝纤维化模型中 ACTA 表达增高, 首次证实除 TGF-β<sub>1</sub> 外, 这一家族其他成员 ACTA 在肝纤维化组织中过量表达; 我们的研究也显示正常肝脏能够表达 ACT A, 在肝纤维化形成过程中其表达一过性下降, 然后又逐渐升高<sup>[16,17]</sup>, 这些资料均显示 ACTA 可能参与肝纤维化形成.

HSC 在肝损伤过程中被激活经表型转化而成为肌成纤维细胞, 产生大量 ECM 促进肝纤维化形成, 是肝纤维化发生发展的中心环节, 体外培养 HSC 常作为肝硬化基础及实验治疗研究的重要手段<sup>[18-26]</sup>. ECM 过度沉积是肝纤维化形成中关键的一步, 检测 ECM 成分的含量常作为肝纤维化的辅助诊断手段<sup>[12,27]</sup>. 目前认为 PC III, C IV, 层粘连蛋白及透明质酸是最具代表性的肝纤维化血清学指标. 肝纤维化时, HSC 胶原 mRNA 表达增加, 特别是 I, III 型胶原<sup>[28,29]</sup>. 因此, 在实验中我们采用体外培养的 HSC 作为研究的靶细胞, 用放射免疫

检测培养细胞上清液 PC III、C IV 含量及细胞 III 型胶原 mRNA 表达。我们研究证实随着 ACT A 浓度增加, 其促进 HSC 分泌 ECM 能力增加。在 1-100  $\mu\text{g/L}$  剂量范围内, 以 100  $\mu\text{g/L}$  促进 HSC 分泌 PC III, C IV 能力最强 ( $P < 0.01$ ); 在 10  $\mu\text{g/L}$  ACT A 时对 HSC 表达 III 型胶原 mRNA 影响不明显, 当联合 10  $\mu\text{g/L}$  TGF  $\beta_1$  后, 其促进 HSC 表达 III 型胶原 mRNA 较二者理论相加值大 ( $P < 0.05$ ), 说明二者具有协同作用。

在肝星状细胞表面存在 ACTA 受体, 其结构与 TGF- $\beta_1$  受体相似, 均属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 有 3 种形式, 即 I 型受体(R I)、II 型受体(R II)和 III 型受体(R III)。在信号转导时, ACTA, TGF- $\beta_1$  分别与各自的 R II 结合, 然后激活各自的 R I, 由 R I 向细胞内转导生物学信息变化; R III 因缺乏细胞内区, 不是信号转到所必需<sup>[30-36]</sup>。在 HSC 表面分别存在 ACTA 与 TGF- $\beta_1$  两种受体, 其生物学活性相似, 但又各自独立。我们的研究证实 ACTA 协同 TGF- $\beta_1$  刺激 HSC 分泌 ECM, 共同参与肝纤维化形成。

#### 4 参考文献

- Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227: 724-752
- Sakai R, Eto Y. Involvement of activin in the regulation of bone metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2001;180:183-188
- Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 2002;191:35-43
- 黄新, 李定国. 激活素、抑制素及卵泡抑素与肝脏。世界华人消化杂志 1999;7:780-781
- Hughes RD, Evans LW. Activin A and follistatin in acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:127-131
- Rossmann W, Chabicovsky M, Grasl-Kraupp B, Peter B, Schausberger E, Schulte-Hermann R. Follistatin overexpression in rodent liver tumors: a possible mechanism to overcome activin growth control. *Mol Carc* 2002;35:1-5
- Ichikawa T, Zhang YQ, Kogure K, Hasegawa Y, Takagi H, Mori M, Kojima I. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. *Hepatology* 2001; 34:918-925
- Takabe K, Lebrun JJ, Nagashima Y, Ichikawa Y, Mitsushashi M, Momiyama N, Ishikawa T, Shimada H, Vale WW. Interruption of activin A autocrine regulation by antisense oligodeoxynucleotides accelerates liver tumor cell proliferation. *Endocrinology* 1999;140: 3125-3132
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-d807
- Wells RG, Fibrogenesis V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G845-G850
- 向德栋, 魏永利, 李奇芬. 转化生长因子  $\beta-1$  对 Ito 细胞作用的分子机制。世界华人消化杂志 1999;7:980-981
- Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by  $\text{CCl}_4$ . *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 朱永红, 胡大荣. 肝脏星形细胞系的建立及其应用。世界华人消化杂志 1999;7:348-349
- 龚建平, 韩本立. 肝脏细胞的分离、培养和鉴定技术。世界华人消化杂志 1999;7:417-419
- Sugiyama M, Ichida T, Sato T, Ishikawa T, Matsude Y, Asakura H. Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. *Gastroenterology* 1998;114:550-558
- Huang X, Li DG, Lu HM, Wang ZR, Wei HS, Wang YP, Zhang J, Xu QF. Expression of activins, follistatin mRNA in the development of hepatic fibrosis. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:85-88
- Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:739-745
- Liu XJ, Yang L, Wu HB, Qiang O, Huang MH, Wang YP. Apoptosis of rat hepatic stellate cells induced by anti-focal adhesion kinase antibody. *World J Gastroenterol* 2002;8:734-738
- Cheng ML, Wu J, Wang HQ, Xue LM, Tan YZ, Ping L, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LZ, Ye L, Li L, Jia ML. Effect of Maotai liquor in inducing metallothioneins and on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:520-523
- Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002;8:515-519
- Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514
- Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang YE, Ling YQ, Gu YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:647-651
- Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:115-119
- Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen-producing cells in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- Liu C, Liu P, Liu CH, Zhu XQ, Ji G. Effects of Fuzhenghuayu decoction on collagen synthesis of cultured hepatic stellate cells, hepatocytes and fibroblasts in rats. *World J Gastroenterol* 1998; 4:548-549
- Yao L, Yao ZM, Yu T. Influence of BOL on hyaluronic acid, laminin and hyperplasia in hepatofibrotic rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:872-875
- 王晓玲, 刘平, 刘成海, 刘成. 拆方扶正化瘀方对肝细胞及肝星状细胞功能的影响。世界华人消化杂志 1999;7:663-665
- 向德栋, 李奇芬, 王宇明, 王雅凡. 维生素 E 乳剂对肝脏星状细胞 III 型前胶原和 MMP1mRNA 表达的影响。世界华人消化杂志 1999; 7:1085
- Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Sakitani K, Inoue K. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J Hepatol* 2000;32:251-260
- Chen W, Woodruff TK, Mayo KE. Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins. *Endocrinology* 2000;141:1263-1272
- Chen YG, Lui HM, Lin SL, Lee JM, Ying SY. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227:75-87
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001;502:4-10
- Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochem J* 2002;368(Pt 3):683-693
- Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002;35:49-61
- Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000;31:1094-1106



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

