

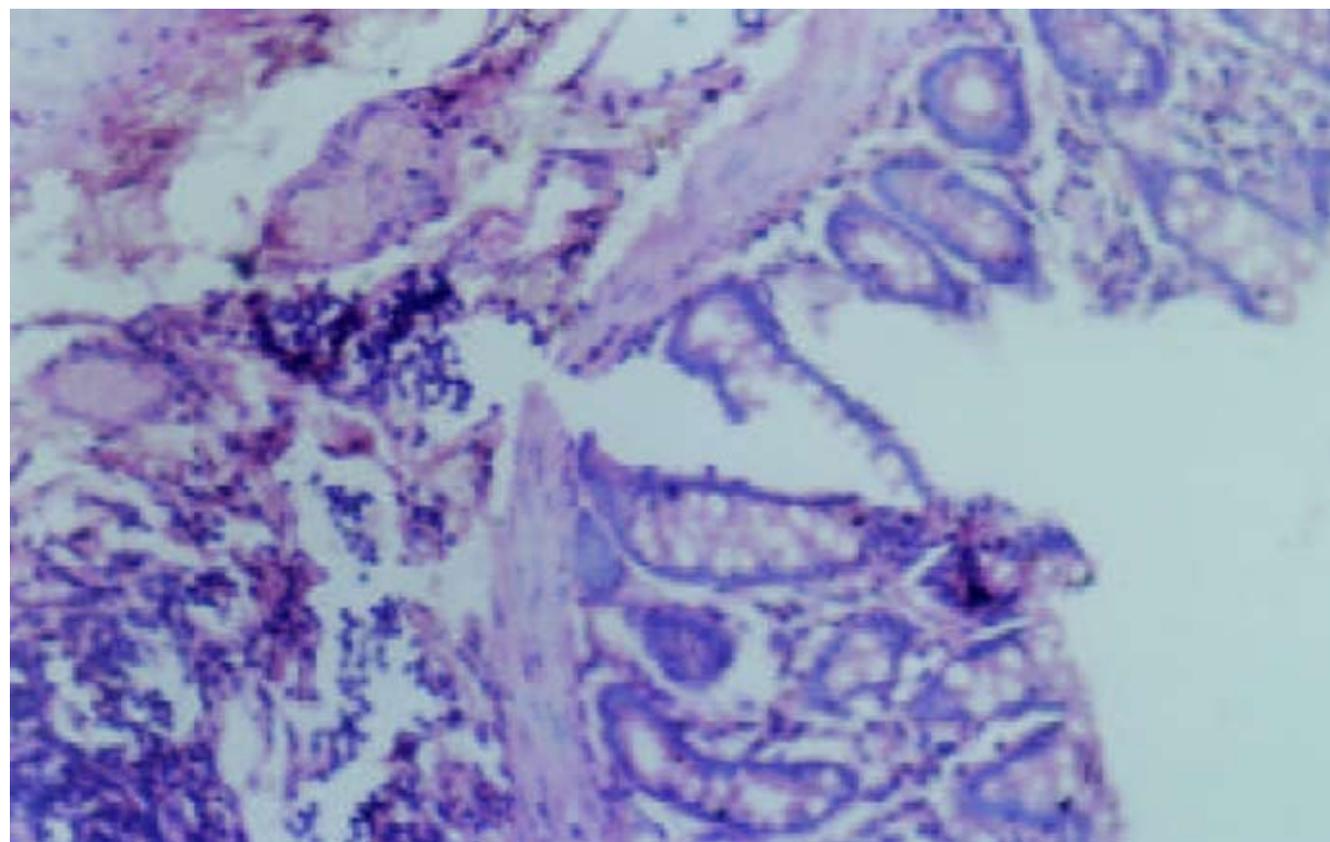
ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2004年2月15日 第12卷 第2期 (Volume 12 Number 2)



**2/2004**

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 ● 2004年2月15日 第12卷 第2期 (总第119期)

述 评	253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军
胃 癌	258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东璇, 辛彦 262 胃癌前病变p21 <sup>ras</sup> , c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤 266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青
肝 癌	271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南 276 肝癌细胞H <sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究 张娟, 张锦堃, 卓少宏 280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊 283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林
病毒性肝炎	286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞 302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花 306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花 311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林 315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅 319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘敏 323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮 327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳 332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明
基础研究	336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭 339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析 刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴旻 344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪 347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达 杨玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安,周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花,胡伏莲,董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅,龚水根,张伟国,陈金华,张连阳,陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲,宋于刚,覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平,董卫国,余保平,罗和生,于皆平,吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红,于皆平,何小飞,余细球</p>
<b>临床研究</b>	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏,董卫国,余保平,罗和生,于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正,劳绍贤,黄志新,张向菊,黄烈平,匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静,梁列新,张志雄,李国华,钱伟,侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波,孔祥泉,熊茵,冯敬生</p>
<b>焦点论坛</b>	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟,张桂英,陈凤英,晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤,成军,张玲霞,李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA多聚酶P结构域研究进展 陈国凤,成军,王琳,张玲霞,李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花,成军,郎振为,王建军,刘妍,杨倩,党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬,成军,王建军,刘妍,杨倩,党晓燕,王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军,成军,刘妍,杨倩,纪冬,王春花</p> <p>408 转录因子C/EBP<math>\beta</math>的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东,成军,吴君,程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆茵英,成军,张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏,成军,张树林</p>
<b>文献综述</b>	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达,王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静,高毅,钟世镇</p> <p>439 肝素酶:抗肿瘤转移的新靶点 陈陵,杨仕明,房殿春,王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳,李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静,汪爽,高毅,孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强,谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇,何生</p>
<b>研究快报</b>	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双,李玉军,田宇彬,张翠萍,孙显路,魏良洲,薛会光,刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健,郭俊明,金之瑾,肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友,孙丹,吕艺,晋桦,胡森,盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东,李俐,黄培林,樊克武,赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟,张桂英,陈凤英,晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增,张建中,岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵,张雪,府伟灵,常杭花,刘为纹,徐采朴,史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯,李兆申,许国铭,张志坚,林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟,张超</p>

## 临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
- 481 内镜下氩离子凝固术治疗胃息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
- 483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
- 485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
- 487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春
- 488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
- 490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
- 492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
- 494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申
- 497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
- 499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
- 501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
- 503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

## 封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响  
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

## 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](mailto:isgcon2005@yahoo.co.in)  
[www.isgcon2005.com](http://www.isgcon2005.com)
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course  
November 18-19, 2005  
[www.asge.org/education](http://www.asge.org/education)
- II Latvian Gastroenterology Congress  
November 29, 2005  
[gec@stradini.lv](mailto:gec@stradini.lv)  
[www.gastroenterologs.lv](http://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](mailto:c.chase@imedex.com)  
[www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm](http://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](mailto:isde@sapmea.asn.au)  
[www.isde.net](http://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 2004-02-15  
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: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@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

# 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达

杨玲, 朱清静, 笄邦红, 张赤志

杨玲, 笄邦红, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科湖北省武汉市 430022  
朱清静, 张赤志, 湖北中医学院附属医院肝病研究所 湖北省武汉市 430061  
杨玲, 女, 1970-12生, 四川省名山县人, 汉族, 1994年泸州医学院本科毕业, 2002年湖北中医学院博士研究生毕业, 讲师, 主治医师。主要从事慢性肝病的中医药防治研究。  
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2000J042  
湖北省教育厅科研基金资助项目, No. 2000A06010  
项目负责人: 张赤志, 430061, 湖北省武汉市武昌区花园山4号, 湖北中医学院附属医院肝病研究所。hepayang@163.com  
电话: 027-85351414  
收稿日期: 2003-08-11 接受日期: 2003-09-24

## Chinese herbs Kangxian ruangan keli inhibits expression of MEK-1 and c-fos in hepatic stellate cell induced by PDGF

Ling Yang, Qing-Jing Zhu, Bang-Hong Da, Chi-Zhi Zhang

Ling Yang, Bang-Hong Da, Department of Traditional Chinese Medicine, Union Hospital, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Qing-Jing Zhu, Chi-Zhi Zhang, Institute of Liver Diseases, Affiliated Hospital of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China  
Supported by the Natural Scientific Foundation of Hubei Province, No. 2000J042, and the Science Research Foundation of the Education Office of Hubei Province, No. 2000A06010  
Correspondence to: Dr. Chi-Zhi Zhang, Institute of Liver Diseases, Affiliated Hospital of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 4 Huayuanshan, Wuchang, Wuhan 430061, Hubei Province, China. hepayang@163.com  
Received: 2003-08-11 Accepted: 2003-09-24

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of Kangxian ruangan keli (KXR) on the expression of MEK-1 and c-fos in hepatic stellate cell (HSC) induced by PDGF.

**METHODS:** In a serum-free culture system, HSC was treated with a KXR preparation for 24 hours, followed by stimulation with PDGF-BB for 24 hours. Then the cells were incubated again in the medium containing KXR for 3 hours stimulated with PDGF-BB for 5 minutes, and collected. The proliferation of HSC was examined using an MTT assay. MEK-1 was detected with Western blotting and visualized by the enhanced chemiluminescent (ECL) method. The expression of c-fos mRNA was analyzed with in situ hybridization.

**RESULTS:** The A values for the HSC growing in the media without and with addition of PDGF were  $0.170 \pm 0.060$  and  $0.820 \pm 0.050$ , respectively. The PDGF-induced increase was hindered remarkably by KXR preparation in a dose-dependent manner. Reaction values for the systems with 5 g/L and 1.25 g/L of KXR were  $0.280 \pm 0.030$  and  $0.430 \pm 0.040$

respectively, lower significantly than that in the culture free of KXR ( $0.820 \pm 0.050$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, values for MEK-1 in HSC treated with 5 mg/mL and 1.25 mg/mL of KXR were  $0.143 \pm 0.013$ , and  $0.170 \pm 0.007$ , respectively, being lower than that in the cells treated only with PDGF-BB ( $0.186 \pm 0.010$ ,  $P < 0.01$ ). The expression level of c-fos mRNA was  $0.152 \pm 0.010$  and  $0.163 \pm 0.005$ , respectively, also lower than that of the PDGF group ( $0.183 \pm 0.014$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Within the dose range used in the present study, KXR preparation shows an inhibitory effect on HSC proliferation induced by PDGF. The mechanism of this process may involve interference with Ras-MEK-MAPK signal transduction mediated by PDGF.

Yang L, Zhu QJ, Da BH, Zhang CZ. Chinese herbs Kangxian ruangan keli inhibits expression of MEK-1 and c-fos in hepatic stellate cell induced by PDGF. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):347-350

### 摘要

**目的:** 探讨抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达的影响。

**方法:** 采用无血清培养, 不同浓度的抗纤软肝颗粒温育肝星状细胞24 h后, PDGF-BB(10 pg/L)刺激24 h, 再加入上述浓度的抗纤软肝颗粒, 3 h后, 又加入PDGF-BB(10 pg/L)作用5 min, 然后收集细胞。采用MTT法测定细胞增生, 免疫印迹化学发光法检测MEK-1, 原位杂交法检测c-fos mRNA。

**结果:** 无血清培养显示抗纤软肝颗粒对于PDGF诱导的细胞增生具有抑制作用, 并呈剂量依赖性, 抗纤软肝颗粒5 g/L、1.25 g/L各组的MTT测定值分别为 $0.28 \pm 0.03$ 和 $0.43 \pm 0.04$ , 与PDGF对照组( $0.82 \pm 0.05$ )相比 $P < 0.01$ ; 对PDGF诱导的MEK-1及c-fos mRNA表达均有显著的抑制作用: 抗纤软肝颗粒5 g/L、1.25 g/L各组细胞的MEK-1表达水平分别为 $0.143 \pm 0.013$ 、 $0.169 \pm 0.007$ , 与PDGF组( $0.186 \pm 0.010$ )比较有显著性差异( $P < 0.01$ ); c-fos mRNA表达水平分别为 $0.152 \pm 0.010$ 、 $0.163 \pm 0.005$ , 与PDGF组( $0.183 \pm 0.014$ )比较也显著减弱( $P < 0.01$ )。

**结论:** 在所应用的剂量范围内, 抗纤软肝颗粒可抑制PDGF诱导的HSC增生, 其机制与干扰Ras-MEK-MAPK信号通路有关。

杨玲, 朱清静, 笄邦红, 张赤志. 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):347-350  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/347.asp>

## 0 引言

肝纤维化是由各种致病因子(包括慢性病毒性肝炎、酒精、药物等)导致的一种增生性疾病,以肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的过度增生及所分泌的细胞外基质过度沉积为特征.因此阻抑激活的肝星状细胞增生是治疗慢性肝损伤和肝纤维化的重要策略<sup>[1-6]</sup>.血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是HSC最强的有丝分裂原,尤其是PDGF-BB<sup>[7-8]</sup>.Ras-MEK-MAPK信号途径是PDGF诱导肝星状细胞增生的重要胞内信号转导途径<sup>[9]</sup>.因此阻断细胞因子的促增生作用,则有望成为肝纤维化治疗的有效手段.中药复方抗纤软肝颗粒具有活血化痰,软坚散结的功效.对于慢性肝病有良好疗效,能防治CCl<sub>4</sub>所致的大鼠肝纤维化形成,并能抑制HSC增生<sup>[10-15]</sup>.我们探讨抗纤软肝颗粒对Ras-MEK-MAPK信号途径的影响如下:

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝星状细胞系(HSC-T<sub>6</sub>)由上海中医药大学徐列明教授惠赠,其表现型为活化的HSC.抗纤软肝颗粒由丹参、莪术、海藻、鳖甲等组成,由湖北中医学院附属医院制备,含生药2 g/g,用DMEM溶解,经0.45 μm滤器过滤除菌备用.DMEM培养基、小牛血清(fetal calf serum, FCS)美国GIBCO公司产品,PDGF-BB购自Sigma公司产品,MEK-1单抗购自Santa Cruz公司、c-fos原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,ECL试剂购自Pierce公司.

**1.2 方法** 细胞培养及药物处理 HSC-T<sub>6</sub>复苏后,接种于含100 ml/L小牛血清,1 × 10<sup>-5</sup> U/L青霉素,100 mg/L链霉素,10 g/L谷氨酰胺和0.1 mmol/L HEPES的DMEM培养基中.在含50 ml/L CO<sub>2</sub>培养箱中于37 °C培养.亚单层HSC无血清培养24 h后,加入无血清培养基稀释的抗纤软肝颗粒(设5 g/L, 1.25 g/L 2个组)作用24 h后,加入PDGF(10 pg/L),经24 h培养后,再加入上述浓度的抗纤软肝颗粒,作用3 h后再加入PDGF 10 pg/L,5 min后将细胞消化离心.并设空白对照组和PDGF组,每组设4复孔,结果取均值.

HSC-T<sub>6</sub>细胞增生的检测采用MTT比色法.细胞按1 × 10<sup>8</sup> cells/L接种于96孔培养板,按上述药物处理后,加入1 g/L的MTT液20 ul,37 °C孵育4 h,加入二甲基亚砷溶解结晶,2 min后,用全自动酶标仪测定波长570 nm处各组细胞的吸光度A值.

Western blot分析MEK-1的表达上述药物处理的细胞用冰冷的PBS洗涤2次,加入样品裂解液[50 mmol/L Tris, CL, pH8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L叠氮钠, 1 g/L SDS, 100 mg/L苯甲基磺酰氟, 1 mg/L Aprotinin, 10 g/L Nonidet P-40, 5 g/L去氧胆酸钠],置冰上孵育20 min,4 °C, 12 000 g,离心2 min,用70 g/L SDS-PAGE,每孔上样6 μg蛋白进行电泳,电转移至硝酸纤维素膜上,MEK-1 mAb 1:400稀释,二抗1:2 000稀释,

应用ECL增强化学发光法显迹,X光片显影,HPIAS-1 000图像分析仪进行半定量分析.

原位杂交分析c-fos mRNA的表达 以地高辛标记c-fos寡核苷酸探针进行原位杂交.细胞爬片经40 g/L多聚甲醛固定,5 ml/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醛室温处理,蛋白酶K消化;每张爬片加20 ul含寡核苷酸探针的原位杂交液,37 °C,杂交过夜;采用过氧化物酶标记地高辛抗体-DAB显色系统显色,阳性杂交信号呈棕黄色;以不加含探针的原位杂交液作阴性对照,结果为阴性;阳性结果用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统进行显微图像分析(结果以平均光密度A值表示).

统计学处理 结果用mean±SD表示,采用t检验,P < 0.05则具有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>细胞增生的影响** 抗纤软肝颗粒呈剂量依赖性抑制PDGF诱导的细胞分裂增生,以5 g/L浓度时最为显著,与PDGF对照组比较差异显著(P < 0.01,表1).

表1 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>增生的影响(mean±SD)

组别	药物浓度 (g/L)	A	抑制率(%)
对照组		0.170 ± 0.060 <sup>b</sup>	-
PDGF组		0.820 ± 0.050	0.000
抗纤软肝颗粒+PDGF组	5.00	0.280 ± 0.030 <sup>b</sup>	65.900
	1.25	0.430 ± 0.040 <sup>b</sup>	47.600

<sup>b</sup>P < 0.01 vs PDGF.

**2.2 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>表达MEK-1的影响** 无血清培养的HSC经PDGF诱导后引起MEK-1表达增强,PDGF组为0.186 ± 0.010(图1),而空白组为0.122 ± 0.008, P < 0.01;经抗纤软肝颗粒作用后引起MEK-1表达呈剂量依赖性减弱,5 g/L与1.25 g/L组MEK-1表达水平分别为0.143 ± 0.013、0.169 ± 0.007,其中以抗纤软肝颗粒5 g/L组作用最显著.

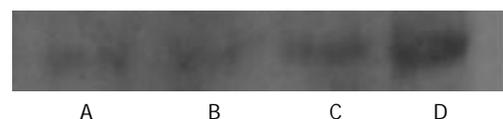


图1 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的MEK-1的影响. A: 空白对照; B: 5 g/L抗纤软肝颗粒; C: 1.25 g/L抗纤软肝颗粒; D: PDGF 10 pg/L.

**2.3 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>表达c-fos基因的影响** 为观察抗纤软肝颗粒对PDGF信号的影响,我们进一步研究了其对MEK-1激活后的下游信号分子c-fos基因表达的影响,结果表明与空白组(0.130 ± 0.010,图2A)比较,PDGF能显著增强c-fos mRNA的表达(0.183 ± 0.014,图2B, P < 0.01),而抗纤软肝颗粒则能显著抑

制 c-fos mRNA 的表达, 5 g/L 与 1.25 g/L 组 c-fos mRNA 的表达水平分别为  $0.152 \pm 0.010$ 、图 2D,  $0.163 \pm 0.005$ , 图 2C, 与 PDGF 组比较有显著性差异,  $P < 0.01$ .

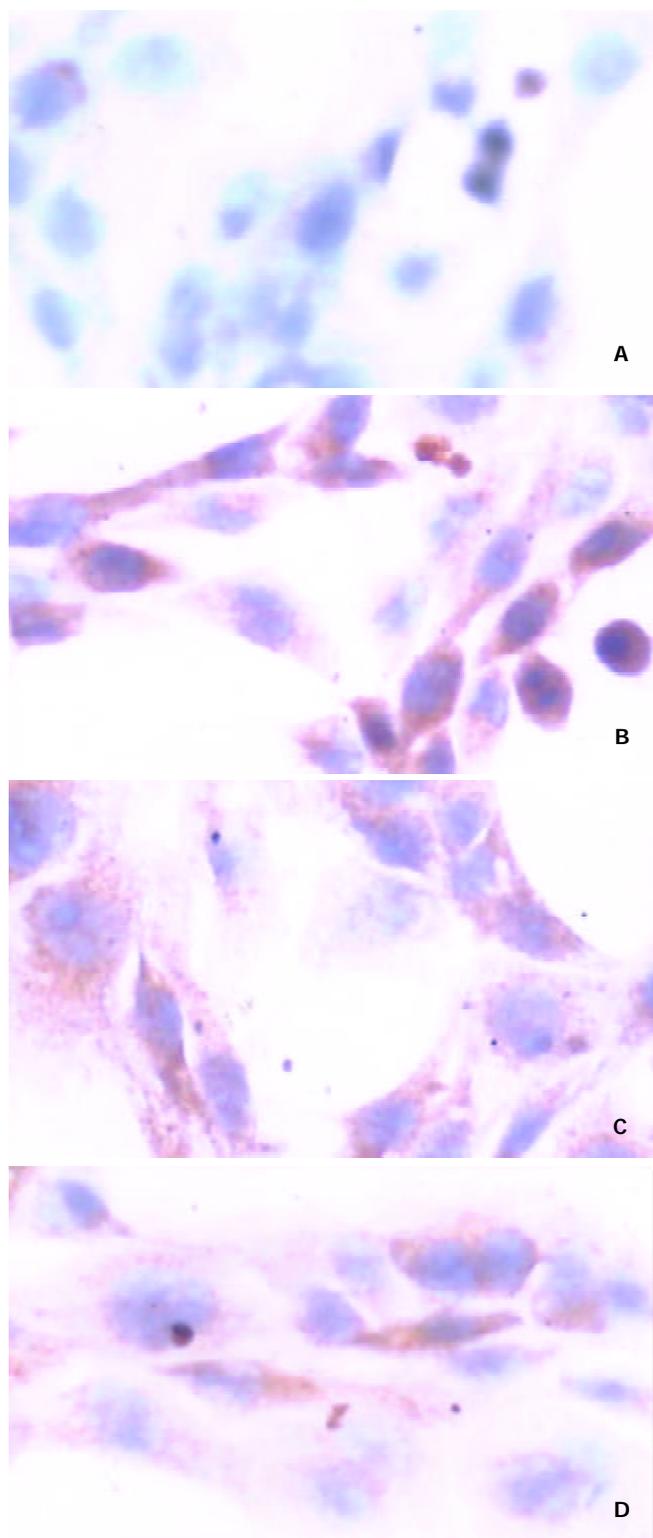


图 2 抗纤软肝颗粒对 c-fos mRNA 的影响原位杂交  $\times 400$ . A: 空白对照组表达呈弱阳性; B: PDGF 组表达呈强阳性; C: PDGF+KXR 1.25 mg/mL 组表达减弱; D: PDGF+KXR 5 mg/mL 组表达显著减弱.

### 3 讨论

抗纤软肝颗粒中丹参具有一系列重要药理作用如抗炎、抗氧化、抑制 HSC 增生等<sup>[16-17]</sup>, 其提取物还能

诱导 HSC 凋亡<sup>[18-19]</sup>; 莪术油能抑制成纤维细胞增生及肝癌增生细胞核抗原(PCNA)的表达<sup>[20-21]</sup>; 海藻能提高机体清除具有重要致纤维化作用的活性氧的能力<sup>[22]</sup>. 该方能改善慢性肝病和肝硬化患者的肝功能, 降低血清肝纤维化指标, 并能防治 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠细胞外基质的产生和沉积, 抑制体外 HSC 增生、分泌胶原及 PDGF 诱导的酪氨酸磷酸化蛋白的表达<sup>[23]</sup>. HSC 被激活后获得了成纤维样细胞的表型特征: 表达  $\alpha$ -SMA、增生活跃、细胞外基质合成增加<sup>[4, 24, 35]</sup>. 在这一过程中, 细胞因子及其胞内信号转导途径发挥了重要作用<sup>[9, 24-29]</sup>. 近年来, 已有不少研究揭示了在肝纤维化形成过程中肝星状细胞激活的胞内信号途径, 其中 PDGF 诱导 HSC 增生的胞内机制研究得相对清楚. 因此以抑制 PDGF 及其信号传递为目标的治疗策略备受重视.

细胞因子与其相应受体结合后, 可启动胞质中信号转导, 通过多种途径将信号传递到胞核内, 促进或抑制特定靶基因的表达<sup>[26, 28]</sup>. MEK-1 是 MAP Kinases 的上游激酶, MAPK 被激活后, 可催化 c-jun、c-fos、c-myc 以及核糖体 S6 蛋白激酶(RSK)的磷酸化, 以调节基因转录和 mRNA 的翻译, 使细胞由 G<sub>0</sub> 期进入到 G<sub>1</sub> 期<sup>[30-35]</sup>. 在 HSC 中, MAPK 通路是 PDGF 激活 c-fos 表达和丝裂原作用的重要信号通路之一. PDGF 受体和接头蛋白 arb2 的联接导致交换因子 mSos 的聚集, 同时激活 Ras, 进一步促使 Raf-1、MEK 和 ERK 的级联激活, 而药物在 MAPK 活化通路中的干扰作用, 可以减低 PDGF 对 HSC 的潜在丝裂原作用<sup>[28, 33]</sup>.

我们采用 Western blotting 方法, 分析了抗纤软肝颗粒对 PDGF 诱导的 HSC Ras-MEK-1-MAPK 信号通路的影响, 结果表明 HSC 中 MEK-1 的表达, PDGF 组明显高于空白对照组及抗纤软肝颗粒各剂量组, 其中 5 mg 组显著低于 1.25 mg 组, 各组间有显著性差异. 本实验所采用的抗纤软肝颗粒的浓度是经预实验获得的, 并在安全范围内, 细胞成活率在 95% 以上. 因此所观察到的以上结果具有一定的特异性, 而与药物的细胞毒作用无关. 进一步研究了抗纤软肝颗粒对 MEK-1 激活后的下游信号分子 c-fos 基因表达的影响, 表明 PDGF 能显著增强 c-fos mRNA 的表达, 而抗纤软肝颗粒则能显著抑制 c-fos 基因的表达. c-fos 基因是 PDGF 丝裂原信号经胞质传递至核内引起细胞增生的转录因子. 结合前期研究表明抗纤软肝颗粒可能通过抑制酪氨酸磷酸化蛋白的表达, 进而使 HSC 内酪氨酸激酶活性水平降低, 导致下游的蛋白激酶水平(如 MEK-1)下调, 核内增生信号减弱, 从而使细胞的生长状态受到抑制, 这可能是该方抑制肝星状细胞增生的作用机制之一.

### 4 参考文献

- Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19:129-140
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. *世界华人消化杂志* 2000; 8:687-689

- 3 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of lycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7:115-119
- 4 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d808-826
- 5 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998;18:2-13
- 6 Kinnman N, Gorla O, Wendum D, Gendron MC, Rey C, Poupon R, Housset C. Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2001;81:1709-1716
- 7 Iwamoto H, Nakamura M, Tada S, Sugimoto R, Enjoji M, Nawata H. Platelet derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Lab Clin Med* 2000;135:406-412
- 8 Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-451
- 9 Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by *in vivo* liver injury in the rat. *Hepatology* 1999;30:951-958
- 10 熊益群, 严红梅, 张赤志. 抗纤软肝冲剂抗大鼠肝纤维化的实验研究. *中国实验方剂学杂志* 2000;6:28-30
- 11 杨玲, 朱清静, 张赤志. 抗纤软肝冲剂药物血清对激活肝星状细胞表达 I 型前胶原及 TGF- $\beta_1$  mRNA 的影响. *中国中医基础医学杂志* 2001;7:38-40
- 12 杨玲, 程红球, 朱清静, 张赤志. 抗纤软肝颗粒对 PDGF 诱导下 HSC 细胞周期及胞内  $Ca^{2+}$  浓度的影响. *中西医结合肝病杂志* 2002;12:20-22
- 13 周正, 张赤志, 陈婕, 周萍. 抗纤软肝冲剂药物血清对肝星状细胞增生的影响. *中药材* 2001;24:809-810
- 14 冯汉鹤, 张洪, 谈道彬. 抗纤软肝冲剂的制备及质量研究. *中西医结合肝病杂志* 2000;10:31-32
- 15 杨玲, 张赤志, 朱清静, 杨胜兰. 抗纤软肝颗粒对肝星状细胞增生的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2002;10:323-324
- 16 Liu CH, Liu P, Hu YY, Xu LM, Tan YZ, Wang ZN, Liu C. Effects of salvianolic acid-A on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production in culture. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:721-726
- 17 Liu P, Liu CH, Wang HN, Hu YY, Liu C. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:733-738
- 18 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
- 19 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
- 20 石灵春, 吴万垠, 张维彬, 区勇全, 谭敏, 肖楚梅. 莜术油对小鼠肝癌增生细胞核抗原的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:156-157
- 21 辛建杰, 李光友, 崔科远. 海藻硒多糖对小鼠免疫功能的影响. *中国海洋药物* 1999;3:36-38
- 22 郑刚, 郝军, 贾钢锐, 钟慧闽. 褐藻胶对大鼠实验性肝纤维化的防治作用. *新消化病学杂志* 1997;5:353-354
- 23 Yang L, Zhang CZ, Zhu QJ. Kangxian ruangan keli inhibits hepatic stellate cell proliferation mediated by PDGF. *World J Gastroenterol* 2003;9:2050-2053
- 24 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416
- 25 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001;21:427-436
- 26 Britton RS, Bacon BR. Intracellular signaling pathways in stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:922-925
- 27 Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai KI, Yoshizato K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2003; [epub ahead of print]
- 28 Pinzani M. Pdgf and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002;7:D1720-1726
- 29 Liu XI, 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
- 30 Carloni V, Defranco RM, Caligiuri A, Gentilini A, Sciammetta SC, Baldi E, Lottini B, Gentilini P, Pinzani M. Cell adhesion regulates platelet-derived growth factor-induced MAP kinase and PI-3 kinase activation in stellate cells. *Hepatology* 2002; 36:582-591
- 31 黄光存, 张锦生. 肝星状细胞激活的细胞内信号转导. *世界华人消化杂志* 2001;9:1056-1060
- 32 刘涛, 胡晋红, 蔡溱, 计一平. 贮脂细胞内的信号传导分子. *世界华人消化杂志* 2001;9:805-807
- 33 蒋明德, 马洪德, 解方为. ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控. *世界华人消化杂志* 2003;11:1037-1039
- 34 梁增文, 张国, 王天才. 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:730-732
- 35 秦建平, 蒋明德. 肝星状细胞的表型及调控与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2001;9:801-804

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.



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

