

- ing the impact of alternative splicing on domain interactions in the human proteome. *J Proteome Res* 2004;3:76-83
- 25 Wagner EJ, Baines A, Albrecht T, Brazas RM, Garcia-Blanco MA. Imaging alternative splicing in living cells. *Methods Mol Biol* 2004;257:29-46
- 26 Sorek R, Shamir R, Ast G. How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends Genet* 2004;20:68-71
- 27 Black DL. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 2000;103:367-370

编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

慢性HBV感染肝炎突发患者外周血病毒抗原表位肽特异性CTL的数量研究

王 洪, 周吉军, 夏 杰, 王宇明

王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院感染病分院 重庆市 400038
国家自然科学基金资助项目, No.30200242
项目负责人: 周吉军, 400038, 重庆市高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院感染病分院. zjcrk@mail.tmmu.edu.cn
电话: 023-68754475
收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的: 了解慢性乙肝患者肝炎突发时抗原特异性 CTL 反应水平。

方法: 用四个 HBV 抗原表位肽四聚体(HBcAg18-27, HBsAg183-191, HBeAg335-343, 多聚酶P的575-583)对外周血中抗原特异性 CTL 进行检测, 分析健康献血员和慢性乙型肝炎患者病毒抗原表位肽特异性 CTL 的出现频率。

结果: 6例 HLA-A2 阳性献血员, 6例 HLA-A2 阴性的 HBV 感染患者, 抗原表位肽特异性四聚体阳性细胞占 CD8 细胞的最高百分比为 0.02%, 以 0.02% 为四聚体检测阈值。29 例 HLA-A2 阳性慢性 HBV 感染患者, 其中 27 例外周血四聚体细胞阳性, 检出率 93.1%。肝功能 ALT 在正常上限 5-10 倍者四聚体阳性细胞比例描写高于其他组($P < 0.05$)。

结论: HLA- 表位肽四聚体技术直接检测外周血中抗原特异性 CTL 具有特异性高, 敏感性强的特点。大部分慢性 HBV 感染患者体内仍存在抗原特异性的 CD8 细胞, 而且肝炎突发时抗原特异性细胞数量增加。

王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明. 慢性 HBV 感染肝炎突发患者外周血病毒抗原表位肽特异性 CTL 的数量研究. 世界华人消化杂志 2005;13(1):85-88
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/85.asp>

0 引言

HBV 是非直接致细胞病变病毒, 机体免疫反应是感染发病的主要原因。细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和 Th 细胞, 特别是 CTL 不仅在清除病毒, 而且在肝组织损伤中起主要作用^[1-2], 并且认为 CTL 以直接溶解感染肝细胞的方式造成肝损伤。慢性乙型肝炎的自然发展过程

是肝炎突发(hepatitis flares)和消退(remissions)反复交替、发展的过程。肝炎突发常指在慢性 HBV 感染过程中病情稳定或基本稳定一段时间后再次发作, 肝转氨酶的波动, 当 ALT 升高超过正常上限 3 倍以上时, 定义为肝炎突发(hepatic flares or acute exacerbation)^[3]。肝炎突发根据肝功能 ALT 水平分为轻、中、重三型, 其 ALT 水平分别是正常上限的 3-5 倍、5-10 倍、大于 10 倍。肝炎突发不仅仅是 ALT 的波动, 而且常伴有血清 HBV DNA 的波动和 HBeAg 血清学转换(HBeAg → 抗-HBe)^[4]并且可能获得控制病毒的效果。大量临床资料显示, 肝炎突发患者抗病毒治疗效果好于静止期慢性乙型肝炎患者^[5-6], 提示肝炎突发时机体免疫反应可能增强。有研究认为肝炎突发可能是受 HLA- I 限制的针对 HBV 抗原的 CTL 作用的结果, 免疫反应是肝炎突发的主要原因^[7]。研究肝炎突发时抗原特异性 CTL 数量和功能的变化, 不仅有利于阐明肝炎突发的免疫发病机制, 而且还可以指导临床抗病毒治疗。我们采用了 MHC- I 限制的 HLA-A2 病毒抗原表位的四聚体, 建立了体外直接检测抗原表位特异性 CTL 的方法, 并用该方法研究肝炎突发患者抗原特异性 CTL 出现频数。现过程总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 65 例慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)感染患者来源于我科住院和门诊部, 其中男性 50 例, 女 15 例, 男女比 3.3 : 1, 年龄 18-50 岁平均年龄 27.4 岁。经检测 HBsAg 阳性, HBcAg-IgG 阳性, 或者 HBV DNA 阳性, 诊断标准参照 2000 年第十次全国传染病和寄生虫学会和肝病分会联合修订的病毒性肝炎防治方案。经检测 HLA-A2 阳性 29 例为实验研究组;另随意挑选 6 例 HLA-A2 阴性慢性乙型肝炎患者为对照组。实验研究组按 ALT 水平将慢性 HBV 感染患者分为静止组 9 例(ALT < 40 U/L, 正常上限 upper limit of normal, ULN), 肝炎突发组 11 例(ALT 200-400 U/L, 5-10×ULN), 重型突发组 9 例

(ALT > 400 U/L, > 10×ULN). 所有患者排除甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)、丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)、戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)感染, 无自身免疫性疾病, 近半年未使用拉米夫定和干扰素等免疫调节剂. 献血者 13 例, 其中 HLA-A2 阳性献血者 6 例为阴性对照.

1.1.2 主要试剂及来源 FITC 结合鼠抗人 HLA-A2 单克隆抗体购自 Serotec 公司. 单克隆抗体(mAbs)FITC 结合的鼠抗人 CD8 单克隆抗体, 溶血素购自 BD Pharmingen 公司. 四种 PE 结合 HBV 抗原表位肽-四聚体购自英国 Proimmune 公司, 所含 HBV 抗原表位肽分别为 HBcAg18-27, FLPSDFFPSV; HBcAg 183-191, WLSLLVPFV; HBcAg335-343, FLLTRILTI; 多聚酶 P575-583, FLLSLGIHL. 四聚体阳性 T 细胞分别表示为 Tc18-27, Te183-191, Te335-343, Tp575-583. PE 结合的亲和素购自 Prozyme 公司. FACS 固定液、FACS 洗涤液(按 Proimmune 公司的要求自备).

1.2 方法

1.2.1 HLA-A2 等位型的鉴定 所有研究对象取 100 μL 肝素钠抗凝新鲜全血, 加入检测管和对照管, 分别加入 HLA-A2 单克隆抗体及同型对照 10 μL, 16-27℃, 避光放置 30 min, 经溶血、FACS 洗涤液洗涤, FACS 固定液固定, 4℃保存, 用于流式细胞仪检测.

1.2.2 四聚体和 CD8 染色 所有研究对象分设双阴性对照管、四聚体阴性和 CD8 阳性对照管、四个四聚体和 CD8 双阳性检测管, 进行四聚体和 CD8 染色, 每管取新鲜肝素抗凝全血 100 μL, 加入 CD8 单克隆抗体和四聚体(用量按推荐剂量), 分别加入四聚体和 CD8 抗体以及相应的同型对照. 避光冰浴 30 min, 经溶血、FACS 洗涤液洗涤, FACS 固定液固定, 4℃保存, 用于流式细胞仪检测.

1.2.3 流式细胞仪检测 抗原特异性 CTL 的检测采用 Becton Dickinson 公司流式细胞仪, 数据分析采用 CELLQUEST 数据分析软件进行.

统计学处理 采用 SPSS12.0 统计分析软件进行, 各组标准化的样本数值用 mean±SD 表示, 对各组间数据进行方差分析, 当 P < 0.05 时有显著差异.

2 结果

2.1 抗原肽四聚体阳性细胞的检测 我们检测了 29 例 HLA-A2 阳性 HBV 患者, 6 例 HLA-A2 阴性 HBV 患者和 6 例 HLA-A2 阳性健康献血员外周血中四种四聚体阳性细胞占 CD8 阳性

细胞的比例. HLA-A2 阴性 HBV 患者和健康献血者外周血中很低, 四种抗原肽四聚体阳性细胞都不超过 0.02%, 因而, 选 0.02% 为阴性域值. 在大部分 HLA-A2 阳性 HBV 患者外周血中可以检测到不同抗原肽四聚体阳性细胞, 检出率 93.1% (27/29), 只是个体差异较大, 最高可以达到 2.09%.

2.2 抗原特异性 CTL 与血清 ALT 的关系 我们将慢性 HBV 感染患者按照 ALT 水平分为三组, 静止期慢性肝炎 (ALT < 1×ULN, 肝炎突发 (ALT = 5-10×ULN), 重度肝炎突发 (ALT > 10×ULN). 肝功能化验 ALT 在正常上限 5-10 倍者, 四聚体阳性细胞比例高于其他两组, 三组中重度肝炎突发 (ALT > 10×ULN) 最低 (图 1).

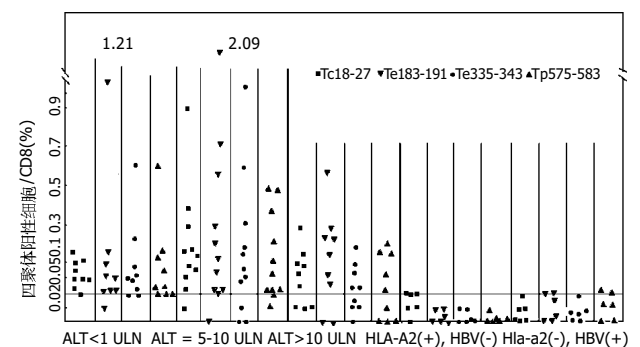


图1 29 例 HLA-A2 阳性 HBV 感染患者、6 例 HLA-A2 阳性献血员和 6 例 HLA-A2 阴性 HBV 感染患者外周血中, 病毒抗原表位肽聚体阳性细胞在 CD8 细胞的比例.

在慢性 HBV 肝炎患者中, ALT 正常组和 ALT > 10ULN 组抗原特异性较低, Te335-343 和 Tp575-583 在 ALT 正常组高于 ALT > 10ULN 组, 但和两组之间经统计学分析无差异. 对于 ALT 处于 5-10ULN 组, Tc18-27、Te183-191 和 Tp575-583 明显高于其他两组, 统计分析相差显著 (表 1).

3 讨论

CD8 细胞的活化以及生物学效应都严格地受 HLA-I 限制, 不同 HLA-I 等位型个体可以有不同的抗原表位, 研究抗原特异性 CTL 必须结合具体 HLA-I 等位型. 我们所用表位肽是针对 HLA-A201 等位型个体 (与 HLA-A2 相同), 采用 HLA-A2 重链制备四聚体, 因此适用于 HLA-A2 阳性个体的研究^[8-10]. 用 HLA-A2 阴性的 HBV 感染者和 HLA-A2 阳性的健康人作为对照, 从而判断所建方法的敏感性和特异性. 我们采用的四聚体复合物检测抗原特异性 CTL, 方法可靠, 具有敏感性高, 特异性强的特点^[11-10], 为下一

表1 HBV 感染患者外周血抗原特异性 CTL 频数 (mean±SD, %)

分组	Tc18-27	Te183-191	Te335-343	Tp575-583
ALT 正常组	0.057±0.030	0.238±0.477	0.128±0.242	0.140±0.238
ALT=5-10ULN 组	0.164±0.027 ^a	0.495±0.936 ^a	0.186±0.312	0.207±0.359 ^a
ALT > 10ULN 组	0.058±0.041	0.218±0.219	0.063±0.082	0.067±0.066

^aP < 0.05 vs 其他组.

步的研究提供了可靠的条件. 在研究中我们对大量的人群进行了 HLA-A2 的研究, 人群中 HLA-A2 的比例达 45% 左右, 与文献报道一致, HLA-A2 人群有较好的代表性. 因此, 对 HLA-A2 个体免疫状态的研究可以反映大部分人群的情况.

以往对抗原特异性 CTL 的研究多采用 Cr⁵¹ 释放实验、有限稀释试验 (LDA) 等, 这些方法对早期 HBV 感染的研究起到了重要作用. 但这些方法误差大, 准确性低, 他们都是采用活化细胞的方法来检测抗原特异性 CTL, 只反映了具有增生潜能的细胞水平, 明显低估了抗原特异性 CTL 水平. 四聚体技术具有特异性强、敏感性高的特点, 其敏感性达到 10 万分之一. 采用四种抗原肽特异性四聚体复合物同时进行检测, 增加了检出的阳性率. 本研究中慢性 HBV 感染患者四聚体阳性细胞检出率高达 93.1%, 说明在慢性 HBV 感染时, 大部分患者仍存在抗原特异性的细胞免疫反应, 并未出现所谓的“免疫耗竭”(exhaustion, deletion)^[12]. 有文献报道, 在病毒慢性感染时, 体内仍存有抗原特异性 CD8 细胞, 但这些细胞的增生潜力降低, 功能存在部分缺陷, 其功能缺陷可以是 T 细胞克隆数降低, 出现寡克隆的现象^[13], 也可以是 T 细胞产生细胞因子的能力下降^[14-15], 因而用传统方法可能出现“免疫耗竭”的假象. 但确实在慢性 HBV 感染静止期外周血四聚体阳性细胞出现频率相对较低, 一般在 0.2% 以下, 在病毒慢性感染时抗原特异性 CD8 细胞与病毒抗原同时存在^[16]. 文献报道, HBV 急性自限性感染患者和 HBV 感染愈合患者, 外周血四聚体阳性细胞高于慢性静止期 HBV 感染, 可达 1% 左右, 而慢性静止期 HBV 感染一般低于 0.5%^[9-11, 17].

病毒特异性 T 细胞反应低下 (hyporesponsiveness) 被认为是 HBV 感染慢性化的一个重要原因. 慢性肝炎突发是常见的临床现象, 在很多研究中都有报道^[18-19], 只是最近几年, 随着临床抗病毒治疗实践的增加和免疫学的发展, 人们对肝炎突发才有了更深的认识^[6, 20]. 大量临床资料显示慢性肝炎突发容易出现 HBV DNA 复制的终止和 HBeAg 血清学转换 (抗病毒治疗和自然发生), 而且有研究发现慢性 HBV 感染急性发作 (exacerbation) 患者^[7], 血清转氨酶 (ALT) 的升高与核心抗原 18-27 的特异性 CTL (Tc18-27) 的增生密切相关, 并且在急性发作时 Tc18-27 细胞表面 HLA-DR 和 CCR5 高表达, 而在静止期则为低表达. 我们发现肝炎突发患者四聚体阳性细胞比静止期患者高, 也提示肝炎突发时, 抗原特异性细胞免疫增强. 肝炎突发时机体处于免疫激活状态, 有利于 HBV DNA 复制的终止和 HBeAg 血清学转换, 是抗病毒治疗的有利时机.

有大量的研究显示慢性乙肝发生肝炎突发时, ALT 水平的高低与发生 HBV DNA 复制终止和 HBeAg 血清学转换 (HBeAg 消失和抗-HBe 的出现) 的几率平行, 肝炎突发不仅有利于拉米呋定的治疗, 而且还减少 YMDD 变异株的产生^[6], 提示机体免疫反应与 ALT 水平直接相关, ALT 越高, 机体免疫反应越强. 在我们的研究中, 重度肝炎突发 (ALT > 10×ULN) 患者四聚体阳性细胞比轻中度肝炎突发

患者低. 可能有两方面的原因: (1) 抗原特异性 CTL 更多的隐藏在肝脏内, 因而外周血中数量少^[21]. (2) 在重度肝炎突发时, 造成肝损伤的主要效应细胞不是抗原特异性 CTL, 有资料也显示, 在发生肝炎突发时, 肝脏中存在大量非抗原特异性 CTL, 非抗原特异性 CTL 是造成损伤的主要效应细胞^[2]. 如果对四聚体阳性细胞的绝对计数以及四聚体阳性细胞功能进行研究可能更有利于阐明肝炎突发的免疫学机制.

我们建立了外周全血直接检测抗原特异性 CTL 数量的方法, 用该方法检测了慢性 HBV 感染患者外周血抗原特异性 CTL 数量, 发现慢性 HBV 感染患者外周血中抗原特异性 CTL 的检出率很高, 但数量很少. 肝炎突发患者抗原特异性 CTL 数量升高, 轻中度肝炎突发患者 CTL 数量高于重度肝炎突发患者 CTL 数量. 认为肝炎突发时抗原特异性细胞免疫增强, 有利于 HBV DNA 复制的终止和 HBeAg 血清学转换, 肝炎突发是抗病毒治疗的有利时机. 如果能够对肝炎突发的全过程进行系统观察, 将有利于阐明肝炎突发的免疫学机制.

4 参考文献

- 1 Freeman AJ, Marinou G, Ffrench RA, Lloyd AR. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001;79:515-536
- 2 Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang SN, Chisari FV. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993;178:1541-1554
- 3 Liaw YF. Hepatitis flares and hepatitis B e antigen seroconversion: implication in anti-hepatitis B virus therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:246-252
- 4 Liaw YF, Pao CC, Chu CM. Changes of serum HBV-DNA in relation to serum transaminase level during acute exacerbation in patients with chronic type B hepatitis. *Liver* 1988;8:231-235
- 5 Akuta N, Tsubota A, Suzuki F, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Long-term prognosis by lamivudine monotherapy for severe acute exacerbation in chronic hepatitis B infection: emergence of YMDD motif mutant and risk of breakthrough hepatitis — an open-cohort study. *J Hepatol* 2003;38:91-97
- 6 Chien RN, Liaw YF. Short-term lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Intervirology* 2003;46:362-366
- 7 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, Hata H, Nakayama E, Shiratori Y. HBeAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
- 8 He XS, Greenberg HB. Detection and characterization of virus-specific CD8+ T cells using the tetramer approach. *Methods Mol Med* 2004;96:89-96
- 9 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002;195:1089-1101
- 10 Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertoletti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999;117:1386-1396
- 11 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-spe-

- cific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280
- 12 Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, Hengartner H, Zinkernagel R. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 1998;187:1383-1393
- 13 Maru Y, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Omata M. Analysis of T cell receptor variable regions and complementarity determining region 3 of infiltrating T lymphocytes in the liver of patients with chronic type B hepatitis. *Intervirology* 2003;46:277-288
- 14 Ou R, Zhou S, Huang L, Moskopidhis D. Critical role for alpha/beta and gamma interferons in persistence of lymphocytic choriomeningitis virus by clonal exhaustion of cytotoxic T cells. *J Virol* 2001;75:8407-8423
- 15 Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce anti-viral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75
- 16 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60
- 17 Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-3458
- 18 Liaw YF, Yang SS, Chen TJ, Chu CM. Acute exacerbation in hepatitis B e antigen positive chronic type B hepatitis. A clinicopathological study. *J Hepatol* 1985;1:227-233
- 19 Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Pao CC, Chen TJ. Acute exacerbation in chronic type B hepatitis: comparison between HBeAg and antibody-positive patients. *Hepatology* 1987;7:20-23
- 20 Liaw YF. Management of YMDD mutations during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S333-S337
- 21 Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000;174:47-62

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

清肝化癥方含药血清对 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响

殷飞, 吴新满, 高洪生, 姚树坤

殷飞, 吴新满, 高洪生, 姚树坤, 河北医科大学第四医院消化科 河北省石家庄 050011

河北省自然科学基金资助项目 NO. 301394

项目负责人: 姚树坤, 050011 河北省石家庄市健康路 12 号, 河北医科大学第四医院消化科。

电话: 0311-6033941-342

收稿日期: 2004-09-24 接受日期: 2004-10-22

摘要

目的: 观察清肝化癥方含药血清对 TGF α 诱导人肝癌细胞, 对 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响。

方法: 采用血清药理学方法, 以病理鼠血清作对照, 用 Western 免疫印迹方法检测清肝化癥方含药血清对 Raf、MEK、ERK 蛋白表达影响, RT-PCR 方法检测清肝化癥方含药血清对 MEK1 mRNA 表达影响。

结果: 清肝化癥方含药血清能抑制 Raf、MEK、ERK 蛋白的表达, 但以抑制 MEK 蛋白为主 ($P < 0.05$), 能抑制 MEK1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。

结论: 清肝化癥方含药血清能够抑制 TGF α 诱导的人肝癌细

胞增生, 阻断 TGF α 在细胞内的信号传导。

殷飞, 吴新满, 高洪生, 姚树坤. 清肝化癥方含药血清对 TGF α 诱导 SMMC-7721 细胞 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13(1):88-90

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/88.asp>

0 引言

信号传导在细胞调控中起重要作用, 选择性的阻断肿瘤细胞自分泌或旁分泌的信号传导通路, 破坏其自控性生长调节机制, 正在成为极具吸引力的研究热点。自研中药清肝化癥方 (半枝莲、白花蛇舌草、苦参、三棱、莪术、黄芪等组成), 以清热解毒、祛瘀散结、健脾理气为治法, 对肝癌患者有抑制肿瘤生长、缓解症状和延长生存期的作用, 基础实验表明他对大鼠肝癌前病变及癌变有明显的阻断作用^[1-3], 其机制有待于进一步研究。我们采用血清药理学方法, 从信号传导的角度, 体外研究清肝化癥方对转化生长因子 α (TGF α) 诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 增生和对 Raf-MEK-ERK 信号传导的影响。