

大鼠 CCl₄ 所致肝纤维化自发逆转的基因表达谱研究

潘勤, 谢渭芬, 张忠兵, 张新, 韩泽广

潘勤, 谢渭芬, 张忠兵, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003

张新, 韩泽广, 国家人类基因组南方研究中心 上海市 201203

潘勤, 男, 1971-03-12 生, 上海市人, 汉族. 2003 年上海第二医科大学博士, 2005 年中国人民解放军第二军医大学附属长征医院博士后, 主要研究肝纤维化的发生机制及药物防治.

中国博士后科学基金资助项目, No. 2004036325

通讯作者: 潘勤, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科. fangchunhua@online.sh.cn

电话: 021-68452002 传真: 021-63520020

收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-06

Gene expression profile analysis of spontaneous reversion of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats

Qin Pan, Wei-Fen Xie, Zhong-Bing Zhang, Xin Zhang, Ze-Guang Han

Qin Pan, Wei-Fen Xie, Zhong-Bing Zhang, Department of Gastroenterology of Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Xin Zhang, Ze-Guang Han, Chinese National Human Genome Southern Center, Shanghai 201203, China

Supported by Postdoctoral Science Foundation of China, No. 2004036325

Correspondence to: Qin Pan, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, 415 FengYang Road, Shanghai 200003, China. fangchunhua@online.sh.cn

Received: 2005-04-20 Accepted: 2005-05-06

Abstract

AIM: To screen the differentially expressed gene in the spontaneous reversion of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄), and to reveal the gene expression profile in this process.

METHODS: Animal model of hepatic fibrosis with spontaneous reversion was created in SD rats by injection of carbon tetrachloride (CCl₄) for 8 weeks and then withdrawing for 6 weeks. The mRNA of liver tissues was extracted at different time spots in the process of reversion. Then cDNA microarray was used to screen the differentially expressed genes. Finally the products were subjected to hierarchical clustering and confirmed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of α -synuclein, A-raf, presenilin-2 and β -actin.

RESULTS: Hepatic fibrosis was progressively reversed after stopping injection of CCl₄. All together, there were 254 (21.59%) genes that changed at the transcription level.

Meanwhile, 54, 85, 97 and 132 genes were identified differentially expressed in the 8th, 10th, 12th and 14th week, respectively. After confirmed by RT-PCR, the differentially expressed were associated with metabolic enzymes, ion channels, transcription factors, gastrointestinal hormones and their receptors, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3k/Akt signaling pathway.

CONCLUSION: The gene expression profile is significantly changed in the spontaneous recovery of CCl₄-induced hepatic fibrosis. Genes closely related to the spontaneous recovery are associated with metabolic enzymes, transporter/symporter proteins, gastrointestinal hormones/receptors, lipoprotein/fatty acid binding proteins, transcription factor/nuclear factors, and MAPK signal pathway.

Key Words: Gene Microarray; Hepatic fibrosis; Spontaneous reversion

Pan Q, Xie WF, Zhang ZB, Zhang X, Han ZG. Gene expression profile analysis of spontaneous reversion of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1544-1549

摘要

目的: 利用cDNA微阵列杂交筛选肝纤维化自发逆转过程中的差异表达基因, 从而揭示纤维化逆转的基因表达谱.

方法: 通过四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)注射SD大鼠8 wk, 随后停药6 wk 建立肝纤维化自发逆转的动物模型. 提取纤维化逆转过程中不同时间段的肝组织mRNA, 与cDNA微阵列杂交, 筛选表达水平明显上调或下调的差异基因, 并结合Cluster分析等进行分类. 此外选择 α 共核蛋白、A-raf、早老素2及 β 肌动蛋白作RT-PCR以验证检测结果.

结果: CCl₄诱导的肝纤维化在停止毒剂注射后出现进行性消退. cDNA微阵列杂交证实, 肝纤维化消退过程中共有254条基因出现转录水平改变, 占基因总数的21.59%. 其中8, 10, 12, 14 wk的差异表达基因分别为54, 85, 97, 132条. 筛选所得的肝纤维化逆转相关基因主要涉及代谢相关酶、脂肪代谢相关蛋白、离子通道、转录因子、胃肠激素及受体、MAPK及PI3k/Akt信号转导通路等. RT-PCR检测与cDNA微阵列杂交一致, 证实了结果的可靠性.

结论: 肝纤维化逆转过程中基因表达谱发生显著改变,

主要涉及代谢相关酶、转运蛋白/协同转运蛋白、胃肠激素及受体、脂蛋白/脂肪酸结合蛋白、转录因子/核因子、MAPK 信号转导通路等 6 类基因。

关键词: 基因芯片; 肝纤维化; 逆转

潘勤, 谢清芬, 张忠兵, 张新, 韩泽广. 大鼠 CCl₄ 所致肝纤维化自发逆转的基因表达谱研究. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1544-1549
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1544.asp>

0 引言

近年研究显示, 消除致病因素^[1-3]或应用有效的抗纤维化药物^[4-8]都能诱导肝纤维化发生逆转. 然而纤维化的逆转过程十分复杂, 涉及众多基因^[9-11], 目前的研究仅局限于单一因素分析, 难以全面揭示肝纤维化逆转中的基因表达状况. 为此, 我们在建立大鼠纤维化自发逆转模型的基础上, 采用 cDNA 微阵列杂交快速、高通量地筛选纤维化逆转过程中的差异表达基因, 以期阐明纤维化自发逆转的相关基因表达谱, 总结纤维化逆转的确切机制.

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 质量 180-240 g (中国科学院上海实验动物中心); Oligotex mRNA Midi 试剂盒 (Qiagen 公司), ³³P dATP (Life Sciences 公司), Atlas Rat 1.2 cDNA 芯片 (BD 公司); 杂交炉 (Hybaid 公司); phosphorimager 扫描仪 (Molecular Dynamics 公司); Gene AMP PCR system 9700 型 PCR 扩增仪.

1.2 方法 将 Sprague-Dawley 大鼠随机分为正常对照组 ($n = 5$) 及肝纤维化逆转模型组 ($n = 22$). 模型组大鼠 SC 400 mL/L 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) (6 mL/kg, 首剂加倍), 正常对照组则以同样方法注射等量橄榄油, 每 3 d 一次, 共 8 wk, 此后停药 6 wk. 8, 10, 12, 14 wk 末分别处死 5 只大鼠, 肝组织经 HE 及 VG 染色后进行纤维化程度的半定量评级^[12]: S1, 汇管区、汇管区周围纤维化, 局限性窦周纤维化或小叶内纤维瘢痕, 均不影响小叶的完整性; S2, 虽有纤维间隔即桥接纤维化形成, 但大部分小叶结构仍保留; S3, 大量纤维间隔形成, 分隔并破坏肝小叶, 导致小叶结构紊乱, 但尚无肝硬化; S4, 早期肝硬化, 可见肝实质广泛破坏, 弥漫性纤维增生, 被分隔的肝细胞团出现不同程度的再生及假小叶形成, 但纤维间隔宽大疏松, 改建尚不充分. 取正常对照组及 8, 10, 12, 14 wk 肝纤维化逆转模型组大鼠的肝组织 (0.8 g/只), 以酚/氯仿抽提 5 组总 RNA, 分别混合后分离 mRNA. 采用变性 mRNA (1 μg) 与 DTT, dNTP, M-MLV, ³³P dATP 于 37°C 共孵育 1.5 h. 所得探针

经纯化后与鲑精 DNA 封闭的 Atlas Rat 1.2 大鼠 cDNA 微阵列在 68°C 条件下杂交 12-18 h. 随即顺序进行低严谨度及高严谨度洗膜、磷屏曝光、扫描. 图像经均一化后, 以 Array Vision 5.1 软件分析, 筛选出表达水平上调或下调 3 倍的差异表达基因, 并应用 Cluster 3.0 及 Treeview 软件作 Cluster 分析. 在 cDNA 微阵列检测结果中选择表达上调 (α- 共核蛋白、A-raf)、下调 (早老素 2) 及保持稳定 (β- 肌动蛋白) 的基因. 按同样分组方法, 取肝组织总 RNA (2 μg/组)、随机引物 0.5 μg、MMLV 200 U 于 37°C 逆转录 1 h 以生成 cDNA. 引物设计: (1) α- 共核蛋白: 5' GGGTACCCA CAAGAGGGAAT3' (上游), 5' CGATCACTGCTGATGGAAGA3' (下游), 扩增片断长 248 bp; (2) A-raf: 5' ACTCCAG CCTCATGCAGTTT 3' (上游), 5' TGTCGTGTCTTCCTG AGCAC3' (下游), 扩增片断长 401 bp; (3) 早老素 2: 5' CTACCTCGGGGAAGTGTTCA3' (上游), 5' AGTGC GC TGATCACAATGAG3' (下游), 扩增片断长 156 bp; (4) β- 肌动蛋白 (内参照): 5' ACCCACACTGTGCCCATCTATG 3' (上游), 5' AGAGTACTGCGCTCAGGAGGA 3' (下游), 扩增片断长 521 bp. 反应体系: cDNA 3 μL, 上、下游引物各 1 μL, Taq 酶 1 U, dNTP (2 mM) 1 μL, MgCl₂ (25 mM) 1.5 μL, 10 × 反应缓冲液 2.5 μL, 加纯水至 25 μL. 优化反应条件: (1) α- 共核蛋白: 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s, 共 36 个循环; (2) A-raf: 94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 45 s, 共 36 个循环; (3) 早老素 2: 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 共 35 个循环; (4) β- 肌动蛋白: 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 45 s, 共 26 个循环. 另设不加逆转录酶, 或以蒸馏水为模板的阴性对照管, 与各样本管同期扩增. 产物加入 20 g/L 琼脂糖凝胶, 以 100 V 恒压电泳 60 min 左右, 紫外透射仪下观察结果.

统计学处理 结果以 mean ± SD 表示, 采用方差分析检验及 *t* 检验, 以 SPSS 软件处理.

2 结果

2.1 建立肝纤维化自发逆转模型 CCl₄ sc 8 wk 后, 肝纤维化逆转模型组大鼠可见大量胶原沉积于小叶中央静脉、汇管区、肝窦间隙等部位, 并形成纤维间隔及假小叶. 同时出现中央静脉扩大、肝细胞脂肪变性、炎性细胞浸润、肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化及增殖等肝纤维化的特征性改变. 组织纤维化程度达 S3-S4. 正常对照组大鼠的肝组织则均属正常. 停止毒剂注射后, 各类病理改变均逐渐减轻, 胶原纤维显著减少, 纤维间隔变少、变细. 10-12 wk 时纤维化逆转模型组的肝纤维化程度为 S2-S3, 而第 14 wk 时仅为 S1. 通过检测 cDNA 微阵列上各点的

表1 基因簇1中的代谢相关酶

| 基因 | GenBank 号 | 与正常对照组的比率 | | | |
|------------------------|-----------|-----------|-------|-------|-------|
| | | 8 wk | 10 wk | 12 wk | 14 wk |
| 细胞色素 P450, IIC 亚族 | J02657 | 0.19 | 1.52 | 3.73 | 5.20 |
| 细胞色素 P450, 2E1 亚族 | J02627 | 0.91 | 1.55 | 3.22 | 2.53 |
| 细胞色素 P450, 2c39 | M18335 | 0.33 | 0.33 | 0.64 | 2.37 |
| 细胞色素 P450, 4F4 | U39206 | 0.32 | 0.58 | 1.59 | 2.12 |
| 细胞色素 P450, 3A1 | M10161 | 0.24 | 1.64 | 2.08 | 2.23 |
| 细胞色素 P450, 4A3 | M33936 | 0.28 | 0.72 | 0.90 | 1.50 |
| 细胞色素 P450, 4a10 | M37828 | 1.52 | 3.44 | 3.64 | 3.10 |
| 细胞色素氧化酶, I 亚单位 | S79304 | 1.43 | 2.61 | 2.67 | 3.28 |
| 细胞色素 C 氧化酶, IVa 亚单位 | X14209 | 1.55 | 1.54 | 3.28 | 2.88 |
| 细胞色素 C 氧化酶, VIIa 3 亚单位 | X54080 | 0.32 | 0.37 | 2.31 | 3.03 |
| 细胞色素 C 氧化酶, Vb 亚单位 | D10952 | 0.94 | 1.40 | 2.61 | 3.21 |
| μ 型谷胱甘肽 S 转移酶 | J02592 | 0.68 | 2.70 | 5.07 | 4.85 |
| α 型谷胱甘肽 S 转移酶 | K01931 | 0.26 | 0.66 | 4.54 | 9.51 |
| 微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 1 | J03752 | 0.29 | 0.57 | 0.74 | 3.36 |

nARVOL, 并采用 9 个阳性对照点及 3 个阴性对照点对数据进行均一化后, 共筛选出 254 条在肝纤维化逆转过程中表达显著上调或下调的差异基因, 约占基因总数的 21.59%。其中 8, 10, 12, 14 wk 末的差异表达基因数分别达 54 条 (22 条上调, 32 条下调), 85 条 (52 条上调, 33 条下调), 97 条 (77 条上调, 20 条下调), 132 条 (44 条上调, 88 条下调)。

分层 Cluster 分析则显示, 差异表达基因属两大基因簇. 基因簇 1 包含 65 条基因, 主要有多种代谢相关酶, 尤其是细胞色素 P450、细胞色素 C 氧化酶、谷胱甘肽 S 转移酶等 (表 1). 此外, 还包括 I 型及 IV 型载脂蛋白 A、1 型及 7 型脂肪酸结合蛋白等脂肪代谢相关基因. 此类基因在肝纤维化逆转过程中表达上调, 且峰值均出现于 14 wk.

基因簇 2 含有 189 条差异表达基因, 其中除已知的基质金属蛋白酶及基质金属蛋白酶抑制剂^[1-3, 9, 11]外, 既有钙、钾、钠、氢、氯等离子通道的编码基因, 也有水通道蛋白及氨基酸转运蛋白基因 (表 2). 胃肠激素及其受体在基因簇 2 中也较丰富 (表 3).

此外, 基因簇 2 又可依据表达时序等特征分为 2 个亚簇. 第 2 亚簇中转录因子及核因子较多, 如真核细胞启动因子 5, Jun D 原癌基因、c-fos 原癌基因等. 10 wk 时 c-fos 原癌基因、Jun D 原癌基因的转录水平分别达正常对照组的 14.71 及 3.63 倍. 有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide-3-OH kinase, PI3K) /Akt 信号转导通路中的多个重要激酶, 如 A-raf、有丝分裂原活化的蛋白激酶激酶 2

(mitogen-activated protein kinase kinase 2, MAPKK2)、有丝分裂原活化的蛋白激酶激酶 5 (mitogen-activated protein kinase kinase 5, MAPKK5)、有丝分裂原活化的蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、PI3K 等也包含于第 2 亚簇中, 且在肝纤维化逆转的第 8-14 wk 表达高度上调.

A-raf 及 α 共核蛋白的表达水平在肝纤维化自发消退的过程中显著升高, 并在 10 wk 时达到峰值. 而早老素 2 则随肝纤维化的逆转出现表达水平显著降低, 尤其 10 wk 时最为明显. 管家基因 β 肌动蛋白的转录水平在整个过程中基本保持稳定. 半定量 RT-PCR 与 cDNA 微阵列检测相吻合, 由此证实所得结果具有较高的准确性和可信度.

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化进展的主要中间环节. 近年 Iredal *et al*^[13]报道, 经腹腔注射 CCl₄ 2 次/wk, 共 4 wk 可诱发大鼠肝纤维化, 停止毒剂注射后 28 d 纤维化几乎完全消退. 而由胆道梗阻及胆汁郁积导致的患者或大鼠肝纤维化经胆道再通后均出现逆转^[14]. 多项研究也显示, 消除致病因素或者应用抗纤维化药物, 都可部分或完全逆转患者及模型动物中存在的肝纤维化. 为此, 我们依据既往动物模型及相关报道^[1-2, 13], 首先采用 CCl₄/橄榄油皮下注射诱导成年雄性 SD 大鼠发生肝纤维化, 随之停止毒剂接触促使纤维化自发恢复. 结果显示, 经 CCl₄ 注射 8 wk 后可见多项典型的肝纤维化病理改变, 如纤维间隔形成、中央静脉及肝窦

表2 基因簇2中的膜通道蛋白

| 基因 | GenBank 号 | 与正常对照组的比率 | | | |
|-----------------------|-----------|-----------|-------|-------|-------|
| | | 8 wk | 10 wk | 12 wk | 14 wk |
| 内流型整流钾离子通道(J 亚族) | L29403 | 1.06 | 1.34 | 3.21 | 0.87 |
| 内流型整流钾离子通道(J 亚族, 5 型) | L35771 | 1.15 | 2.92 | 3.15 | 0.87 |
| 蛋白激酶 C 调节氯离子通道 | D17521 | 2.67 | 2.84 | 3.22 | 2.26 |
| I 型氯离子通道 | X62894 | 1.06 | 1.46 | 3.05 | 0.74 |
| 感觉神经特异性阳离子通道 | AF013598 | 0.40 | 0.42 | 0.34 | 0.27 |
| 钙离子通道(β 3 亚单位) | M88751 | 0.93 | 1.33 | 3.26 | 0.92 |
| 水通道蛋白 1 | X71069 | 1.14 | 2.46 | 4.14 | 1.06 |
| 水通道蛋白 2 | D13906 | 1.417 | 2.51 | 5.89 | 1.28 |
| 水通道蛋白 3 | D17695 | 1.62 | 2.46 | 3.26 | 2.81 |
| 水通道蛋白 4 | U14007 | 0.36 | 0.39 | 1.49 | 0.22 |
| 水通道蛋白 5 | U16245 | 0.58 | 0.69 | 2.05 | 0.26 |
| 溶质转运蛋白(6 亚族, 3 型) | M80570 | 1.30 | 1.47 | 3.04 | 1.34 |
| 溶质转运蛋白(9 亚族) | M85299 | 1.12 | 5.60 | 0.87 | 0.64 |
| 溶质转运蛋白(12 亚族, 1 型) | U10096 | 0.36 | 0.44 | 0.95 | 0.29 |
| 溶质转运蛋白(12 亚族, 3 型) | U10097 | 0.40 | 0.68 | 0.95 | 0.27 |
| 溶质转运蛋白(17 亚族, 1 型) | U28504 | 1.14 | 1.58 | 3.67 | 1.56 |
| 溶质转运蛋白(17 亚族, 2 型) | L13257 | 1.29 | 1.54 | 3.32 | 1.49 |

周围纤维化、小叶结构紊乱、HSC 增生、汇管区扩大等. 而停药后 10, 12, 14 wk 末, 上述病理改变以及肝纤维化分期均出现进行性改善, 直至第 14 wk 时纤维化分期仅为 S1. 以此为基础, 通过收集肝纤维化逆转过程中不同时间段的肝组织 mRNA, 并与 cDNA 微阵列杂交, 共筛选得到 254 条差异表达基因, 约占微阵列中基因总数的 21.59%. 其中, 8, 10, 12, 14 wk 时的差异基因数分别为 54、85、97 及 132 条. 提示纤维化逆转时肝脏基因表达谱存在广泛改变, 并且随着纤维化的消退, 参与的基因也不断增多. 通过分层 Cluster 可将差异表达基因分为 2 个基因簇及若干基因亚簇. 综合分层 Cluster、基因功能及表达时序分析, 在差异表达基因中共发现 6 类基因: (1) 代

谢相关酶, 包括基因簇 1 中的 7 型细胞色素 P450 同工酶、5 型细胞色素氧化酶的同工酶、以及 3 型谷胱甘肽 S 转移酶的同工酶. 其中绝大多数在肝纤维化逆转的早、中期(10-12 wk)表达水平明显上升. 由于细胞色素 P450 的同工酶在胆汁淤积及 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化中表达水平显著降低^[15], 在重度肝纤维化的患者中也大幅低于正常^[16], 而谷胱甘肽 S 转移酶的同工酶在原发性胆汁性肝硬化患者中较少表达^[17], 因此诸多代谢相关酶的表达上调可能是肝细胞代谢功能增强、肝功能逐渐恢复的表现^[18-20]. (2) 载脂蛋白、脂肪酸结合蛋白等脂肪代谢相关蛋白的编码基因也出现于基因簇 1 中. 由于相关的 mRNA 水平在肝纤维化逆转过程中均表现为上调, 且峰值均出现于 14 wk, 而

表3 基因簇2中的胃肠激素及受体

| 基因 | GenBank 号 | 与正常对照组的比率 | | | |
|------------------------|-----------|-----------|-------|-------|-------|
| | | 8 wk | 10 wk | 12 wk | 14 wk |
| 生长抑素 | M25890 | 3.12 | 3.90 | 1.50 | 0.66 |
| 速激肽 2 | M16410 | 5.96 | 6.81 | 4.31 | 2.16 |
| 成纤维细胞生长因子 10 | D79215 | 13.61 | 18.10 | 11.38 | 9.60 |
| 神经生长因子受体 | X05137 | 0.59 | 0.62 | 0.43 | 0.31 |
| I 型胰岛素样生长因子受体 | L29232 | 0.59 | 0.60 | 0.58 | 0.33 |
| IV 型成纤维细胞生长因子受体 | M91599 | 0.37 | 0.43 | 0.42 | 0.23 |
| 酪氨酸激酶受体 2 型配体 | U97143 | 0.34 | 0.87 | 0.31 | 0.28 |
| 6 型 5 羟色氨受体 | L03202 | 3.75 | 5.54 | 2.78 | 1.45 |
| 2 型雌激素受体 (ER β) | U57439 | 0.89 | 1.12 | 3.30 | 0.34 |

此时肝细胞内脂滴的数量较纤维化时明显减少,因此脂肪代谢相关基因的高表达可能与加强脂肪代谢、减轻肝脏脂肪变性有关。(3)纤维化逆转时,包括多种离子通道(钙、钾、钠、氢、氯离子通道)、谷氨酸盐通道、水通道及溶质转运蛋白在内的膜通道基因出现转录改变.此类基因的特点是均编码转运蛋白或协助转运蛋白,并多在纤维化消退的中、后期(12, 14 wk)表达水平显著上调或下调.钙离子浓度及pH值的改变可影响细胞增殖能力,因而对膜通道水平的调节可能在稳定细胞内环境、促进损伤修复及肝细胞增殖方面发挥重要作用。(4)真核细胞启动因子5、Jun D原癌基因、c-fos原癌基因等典型的转录因子及核因子同样被发现出现差异表达.其中c-fos原癌基因、Jun D原癌基因的转录水平在第10 wk时分别较正常对照组高13.7及2.6倍,从而进一步证实肝纤维化逆转过程涉及大量基因的转录激活。(5)基因簇2中的生长抑素、成纤维细胞生长因子10、速激肽2等胃肠激素在肝纤维化消退的全过程中表达水平均显著增高.与之相反,同期神经生长因子受体、胰岛素样生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体、5羟色胺受体等多数胃肠激素受体的转录却出现下调.业已证实,生长抑素、成纤维细胞生长因子、5羟色胺、IV型成纤维细胞生长因子受体、雌激素受体 β 、神经生长因子受体等均与肝纤维化的发生密切相关^[5,21-24].胃肠激素及其受体的表达改变提示该类基因也可能参与肝纤维化的逆转过程。(6)MAPK及PI3K/Akt信号转导通路的关键激酶A-raf, MAPKK2, MAPKK5, MAPK3, PI3K在肝纤维化逆转的8-14 wk时表达高度上调.MAPK信号通路是主要的细胞生存通路,对损伤修复、细胞增殖都具有重要意义^[25-26],该通路的持续激活可有效地保护肝细胞^[27-30],促进肝纤维化逆转.

通过对各类基因功能及表达特点的总结,初步提示多种胃肠激素可能通过G蛋白耦联受体活化细胞内的MAPK信号通路,并经由MAPK转位入核,磷酸化c-fos、c-Jun等转录因子,促使代谢相关酶、细胞膜通道等效应分子的表达提高,改善细胞代谢功能,恢复正常的内环境,由此加速损伤修复及肝细胞增殖,最终导致肝纤维化的逆转.这可能加深我们对肝纤维化逆转机制的认识,并为确定合理的纤维化防治策略提供科学依据.

4 参考文献

- 1 Lee HS, Huang GT, Miao LH, Chiou LL, Chen CH, Sheu JC. Expression of matrix metalloproteinases in spontaneous regression of liver fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2001;48: 1114-1117
- 2 Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recov-

- ery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001;35:465-473
- 3 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):850-860
- 4 Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000;2:545-551
- 5 Yu C, Wang F, Jin C, Wu X, Chan WK, McKeehan WL. Increased carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in FGFR4-deficient mice. *Am J Pathol* 2002;161:2003-2010
- 6 Zhang LH, Pan JP, Yao HP, Sun WJ, Xia DJ, Wang QQ, He L, Wang J, Cao X. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes: an effective approach to reverse hepatic fibrosis in schistosomiasis through induction of dominant Th1 response. *Gene Ther* 2001;8:1333-1342
- 7 Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124:105-117
- 8 Garcia L, Hernandez I, Sandoval A, Salazar A, Garcia J, Vera J, Grijalva G, Muriel P, Margolin S, Armendariz-Borunda J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol* 2002;37:797-805
- 9 Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003;72:943-959
- 10 Ueberham E, Low R, Ueberham U, Schonig K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible interstitial fibrosis. *Hepatology* 2003;37:1067-1078
- 11 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001;50:58-65
- 12 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订.病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000;8:324-329
- 13 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
- 14 Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001;344:418-423
- 15 Bastien MC, Leblond F, Pichette V, Villeneuve JP. Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78:912-919
- 16 George J, Murray M, Byth K, Farrell GC. Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology* 1995;21:120-128
- 17 Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Sasaki M, Saito T, Gershwin ME, Ikemoto M, Arai H, Nakanuma Y. Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferase-pi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J Hepatol* 2002;37:176-183
- 18 Chalasani N, Gorski JC, Patel NH, Hall SD, Galinsky RE. Hepatic and intestinal cytochrome P450 3A activity in cirrhosis: effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2001;34:1103-1108
- 19 Niemela O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000;

- 33:893-901
- 20 Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:509-518
- 21 Cabre M, Camps J, Ferre N, Paternain JL, Joven J. The antioxidant and hepatoprotective effects of zinc are related to hepatic cytochrome P450 depression and metallothionein induction in rats with experimental cirrhosis. *Int J Vitam Nutr Res* 2001;71:229-236
- 22 Inoue H, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Cui X, Okamura Y, Shono M, Honda H, Inoue S, Muramatsu M, Ito S. Idoxifene and estradiol enhance antiapoptotic activity through estrogen receptor-beta in cultured rat hepatocytes. *Dig Dis Sci* 2003;48:570-580
- 23 潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芹芳. 生长抑素对肝星状细胞的影响机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:1250-1252
- 24 Shimizu I. Impact of oestrogens on the progression of liver disease. *Liver Int* 2003;23:63-69
- 25 Vaidya VS, Shankar K, Lock EA, Dixon D, Mehendale HM. Molecular mechanisms of renal tissue repair in survival from acute renal tubule necrosis: role of ERK1/2 pathway. *Toxicol Pathol* 2003;31:604-618
- 26 Sharma GD, He J, Bazan HE. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* 2003;278:21989-21997
- 27 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Caradonna Z, Alvaro D, Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Macarri G, Benedetti A, Folli F. Regulation of ERK/JNK/p70S6K in two rat models of liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 2003;39:528-537
- 28 孙意, 程瑞雪, 冯德云, 欧阳小明, 郑晖. HCVNS3 蛋白对正常来源肝细胞生长及 MAPK 磷酸化的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:173-177
- 29 Kakazu A, Chandrasekher G, Bazan HE. HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad-but not the ERK1/2-mediated signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3485-3492
- 30 Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* 2004;39:1563-1573

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. *癌症* 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR) 方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5) 的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34) 的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985) 表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985) 在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (*世界胃肠病学杂志* 2004-06-15)