

重组复制缺陷型腺病毒基因治疗肝纤维化的研究与应用

林 勇,陈伟忠,谢渭芬,张忠兵

林勇,陈伟忠,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
上海市青年科技启明星计划资助项目, No.00QB14054
全军医药卫生科研基金课题面上项目, No. 01MA153
项目负责人:谢渭芬,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. weifexie@yahoo.com
电话:021-63610109-73251 传真:021-68452002
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

摘要

肝纤维化的特征性变化是肝内细胞外基质的过多沉积. 抑制肝星形细胞的激活和细胞外基质的合成, 促进基质降解和肝细胞再生是肝纤维化治疗的重要方法. 近年来, 针对上述环节构建重组复制缺陷型腺病毒, 表达不同外源基因产物基因治疗肝纤维化研究取得了较大的进展. 本文对重组腺病毒的结构、构建以及抗肝纤维化作用和安全性研究作一综述.

林勇,陈伟忠,谢渭芬,张忠兵. 重组复制缺陷型腺病毒基因治疗肝纤维化的研究与应用. 世界华人消化杂志 2003;11(3): 321-325
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/321.htm>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝脏对慢性损伤的一种修复反应, 是慢性肝病共有的病理改变, 其特征性改变是肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过多沉积. 近年来, 针对肝纤维化发生的各个环节, 如抑制肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活和 ECM 合成, 促进基质降解和肝细胞再生等方面, 构建了各种携带外源目的基因的病毒载体, 为肝纤维化的基因治疗提供了有力的手段^[1-4]. 由于复制缺陷型腺病毒能较好地克服以往病毒载体的缺点, 加之其具有宿主范围广、可感染分裂期及静止期细胞、包装容量大、不发生整合、繁殖滴度高、性质稳定等优点, 业已成为基因治疗中被广泛应用的载体系统. 随着腺病毒载体广泛应用于基因治疗等医学研究领域, 构建重组腺病毒的方法也有了新的突破^[5,6]. 本文将应用重组复制缺陷型腺病毒基因治疗肝纤维化的研究进展作一综述.

1 腺病毒的结构和重组复制缺陷型腺病毒的构建方法

人腺病毒(adenovirus, Ad)是一群分布广泛的呼吸道病毒, 无包膜的对称 20 面体. Ad 基因组为双股 DNA, 呈线性, 36 Kb, 分早期转录区和晚期转录区, 前者有 E1、E2、E3、E4 四个区, 编码病毒调节蛋白; 后者分 L1、L2、L3、L4、L5 五个区, 编码病毒结构蛋白. 目前对人腺病毒的分子生物学特性研究最为详

细的是人腺病毒 2 型(adenovirus type 2, Ad2)和人腺病毒 5 型(Ad5), 大多数腺病毒载体就是以 Ad2 和 Ad5 为基础构建的. 为了在病毒基因组的特定位点插入目的基因, 并得到能够表达外源基因的重组病毒, 传统方法通常造成 E1 和 / 或 E3 区缺失, 使病毒复制缺陷, 同时在 E1、E2、E3、E4 等位置将含有外源基因的酶切片段与腺病毒基因组片段在 DNA 连接酶的作用下, 直接进行体外连接, 然后转染细胞; 或将带有外源基因和同源区的穿梭质粒与病毒的核酸大片段共转染哺乳动物包装细胞 293 或 911, 在相关酶系的作用下, 通过同源重组机制获得表达外源基因的复制缺陷型重组病毒^[7-10]. 这二种方法繁琐低效的缺点限制了腺病毒载体的更广泛应用. 随着腺病毒载体基因治疗研究的不断深入, 构建重组腺病毒的方法有了很大的改进. Okada et al^[11]通过同源重组产生的复制缺陷性腺病毒 AVC2.null 感染 293 细胞, 分离 AVC2.null DNA-蛋白质复合物, 使用二种黏端酶酶切得到非互补 5' 黏末端, 再与同样酶切处理的外源基因片段直接相连. 因为只有通过外源基因才能将 DNA-蛋白质复合物的左右臂端连接起来, 故不再需要对病毒进行筛选和噬斑纯化, 缩短了构建的过程.

He et al^[12]建立了在大肠杆菌内重组腺病毒的 pAdEasy 系统. 通过已插入外源目的基因的穿梭质粒腺病毒的左臂和右臂同源区与骨架载体上腺病毒基因组在大肠杆菌内同源重组, 由于借助了细菌细胞内高度有效的同源重组机制并能进行抗生素筛选, 可以在很短的时间内得到所需要的重组腺病毒质粒, 再通过 Pac 内切酶线性化, 去除质粒上的 ori 和卡那霉素抗性编码基因, 并暴露其 ITR 序列后, 在适当的包装细胞内就可得到表达外源基因的重组腺病毒. 同时利用在同源重组时整合入腺病毒骨架中的绿色荧光蛋白(GFP), 可以直接地观察转染和感染的效率, 大大方便了腺病毒的重组与纯化. 与传统方法相比, 新的构建重组腺病毒的策略具有其他策略不可比拟的优势^[13,14].

2 重组腺病毒在肝纤维化基因治疗中的应用

由于肝纤维化的发生发展涉及多个环节, 许多学者设计并构建了围绕肝纤维化相关环节的多种重组复制缺陷型腺病毒, 并通过重组腺病毒将外源目的基因导入细胞或动物体内, 以达到抑制纤维生成, 促进肝细胞再生和肝脏结构重建的效果. 一系列体内和体外实验显示重组腺病毒在肝纤维化基因治疗中有着很好的治

疗效果和应用前景,也为肝纤维化的治疗提供了新的思路^[15].

2.1 抑制 HSC 活性和 ECM 合成 HSC 的激活是肝纤维化发生的中心环节,其激活过程分为启动阶段和持续阶段.前者指基因表达和表型的早期变化使其具有对细胞因子和刺激的反应性,后者指由于这些刺激的作用而维持 HSC 的激活状态并导致 ECM 合成.抑制静止的 HSC 转变为活化的肌成纤维样细胞是抗肝纤维化治疗的一个重要途径^[16].

内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是调节 HSC 收缩的主要因子.其受体有 ET_A 和 ET_B 二种,广泛存在于肝脏各种细胞,但以 HSC 最为丰富^[17]. Yu et al^[18]研究发现,一氧化氮(NO)能有效地缓解 ET-1 所引起的 HSC 的收缩,利用重组腺病毒构建含有鼠神经元一氧化氮合酶同工酶(nNOS) cDNA 的表达载体 Ad. nNOS,体外转染至肝细胞、肝窦内皮细胞和 HSC,结果均有 NOS 表达,其中 HSC 表达量最高.经股静脉注射 Ad. nNOS 至肝损伤大鼠,能明显地促进 NO 的合成,抑制 ET-1 的表达,缓解由 ET-1 介导的 HSC 收缩和激活;同时明显减轻肝硬化小鼠肝内血流阻力和门脉压力.

抑制 ECM 的产生一直是抗肝纤维化治疗的主要目标,包括抑制 TGF β 1 等细胞因子的活性,或直接抑制 ECM 的合成和修饰^[17,19-21]. Qi et al^[22]利用复制缺陷型腺病毒载体(E1 和 E3 区缺失),构建由巨细胞病毒增强子和肌动蛋白启动子驱动的缺失型 II 型 TGF- β 受体重组腺病毒(该缺失型受体可与野生型 TGF- β 受体竞争结合 TGF- β ,但无激活作用,从而阻断 TGF- β 的活性),经门静脉注射治疗二甲基亚硝胺(DMN)肝损伤大鼠,免疫组化显示可显著抑制肝脏 I 型胶原、FN、TGF- β 1 等表达,治疗组肝纤维化仅为对照组的 22%,大鼠生存率明显提高. Ueno et al^[23]将可溶性缺失型 II 型 TGF- β 受体重组腺病毒 AdTbeta-ExR (该载体插入的外源目的基因表达的产物含有 II 型 TGF- β 受体的膜外区,可与人 IgG Fc 端相结合)注射至肝纤维化小鼠肝脏以外的其他器官如骨骼肌,表达产物 - 缺失型 II 型 TGF- β 受体亦可在 3 wk 内检测到,通过阻断 TGF- β 的传导信号,明显地减少了肝纤维化小鼠肝脏羟脯氨酸的合成,同时未出现明显副作用.研究发现,一些具有抗炎作用的细胞因子亦能影响肝纤维化的进程,部分细胞因子则可抑制 HSC 的激活和 ECM 的合成^[24-26]. Zhang et al^[27]将携带有鼠 - 干扰素(IFN-) cDNA 的重组腺病毒载体体外转染至正常小鼠肝细胞株 BNL CL2,然后将这些肝细胞通过脾脏内注射移植于肝纤维化小鼠,治疗 4 wk 后肝纤维化小鼠肝脏中 I 型和 III 型胶原表达明显下降;通过 RNA 斑点杂交方法检测到治疗组小鼠肝脏中 TGF- β 1 和其受体的表达亦明显下降.

2.2 促进 ECM 降解 肝纤维化的实质是慢性肝损伤的修复反应,导致以胶原为主的 ECM 各成分合成增多,降解相对不足,致使 ECM 在肝内过多沉积.因此,促进

ECM 各成分的降解无疑是抗肝纤维化治疗的另一重要途径^[28].

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组锌酶,是降解胶原、蛋白多糖等 ECM 的主要蛋白酶. MMPs 至少包括 3 类:间质型胶原酶、IV 型胶原酶和基质溶素.肝纤维化早期, MMPs 轻度增高,而肝纤维化中晚期 MMPs 活性则明显降低,以致 ECM 合成超过降解,引起 ECM 大量沉积.通过调节 MMPs 活性,有助于增加基质的降解,促进肝纤维化的逆转.纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA)包括组织型(tissue-type plasminogen activator, tPA)和尿激酶型(urokinase-type plasminogen activator, uPA)二种. tPA 主要参与纤溶过程,而 uPA 主要作用于生理病理条件下细胞迁移、组织重建、肿瘤浸润及转移等过程,包括 ECM 的降解,也参加部分纤溶过程.通常 uPA 蛋白合成后,穿过内质网膜并通过高尔基体分泌至细胞外.目前研究证实,纤溶酶原激活剂/纤溶酶系统是调节 MMPs 活性和 ECM 降解的关键因素. MMPs 以酶原的形式分泌,在纤溶酶的作用下,伴随失去约 10 kD 的片段而被激活;同时纤溶酶也可直接降解 ECM. 纤溶酶由 uPA 所激活,而被纤溶酶原激活剂抑制因子 1(PAI-1)所抑制^[29]. Lieber et al^[30]构建了 uPA 的腺病毒表达载体,同时在 uPA 的 cDNA 两端进行了修饰:氨基端加入 RR 固定信号序列,羧基端加入了 KDEL 信号序列,使外源表达的 uPA 蛋白的两端可以与内质网膜上的跨膜蛋白相结合,从而固定于细胞内,由分泌型转变为非分泌型.研究显示经过上述修饰后, uPA 蛋白保留在细胞内,可激活 MMPs,降解 ECM,并促进肝细胞再生,同时由于 uPA 蛋白不分泌到细胞外,因而避免了对凝血功能的影响,这一点对于有凝血功能障碍的肝硬化患者尤为重要.

Salgado et al^[31]研究了这种非分泌型的 uPA 重组腺病毒对肝纤维化小鼠的治疗作用.发现通过髂静脉注射 uPA 重组腺病毒后,可增强纤溶酶和 MMP-2 的活性,进而促进 ECM 各种成分的降解,与对照组相比,治疗后 10 d 肝纤维化程度降低 85%,纤维化肝脏 -SMA 阳性细胞仅为对照组的 50%;同时肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其 c-met 受体表达增加,肝细胞增生明显增强,这可能与 uPA 激活 HGF 并形成双链的活性产物有关,此外还可能与 ECM 降解导致肝组织结构改建和血管新生,使肝细胞增生空间扩大有关.

2.3 促进肝细胞再生 HGF 最初作为肝细胞强效的促分裂剂而应用于肝功能衰竭的治疗. HGF 由 728 个氨基酸组成,活性成分是由 α 链(64 kDa)和 β 链(34 kDa)组成的异源二聚体,其前体分布于肝脏、脾脏、肾脏以及肾上腺等组织,最终于肝脏中被灭活.亦有实验证明, HGF 可抑制 HSC 的激活和 ECM 的合成,具有一定的抗肝纤维化作用^[32-37]. Phaneuf et al^[38]构建了由 CMV 驱

动并插入人 HGF cDNA 的重组腺病毒 Ad.CMV. rhHGF, 分别以 $(1-4) \times 10^{11}$ pfu 静脉注射正常小鼠, 5 d 后发现治疗组小鼠肝细胞 DNA 合成和肝脏重量明显增多, 并有剂量依赖性. 在 3×10^{11} pfu 剂量下, 作用最为明显, 肝脏重量增加至 130%; 更为重要的是, 治疗组中腺病毒的肝脏毒性明显低于对照组, 说明外源表达的 HGF 可缓解腺病毒本身对肝脏的损伤.

研究显示, 激活的 TGF- β 可诱发肝细胞的凋亡, 抑制肝细胞的再生^[39]. Nakamura et al^[40] 将缺失 II 型 TGF- β 受体重组腺病毒质粒 AdTbeta-TR 经静脉注入肝纤维化小鼠, 不仅可以阻止 TGF- β 与野生型受体结合, 减轻基质的沉积, 还可明显促进肝细胞的再生.

细胞周期的研究发现, 培养细胞在 G1 期, 通过一些基因的表达, 可诱发细胞由 G1 期向 S 期转化, 复制增生. Nelsen et al^[41] 将体外构建的含有 cyclin E 和 skp2 的表达载体 (cyclin E 和 skp2 可促进细胞由 G1 期进入 S 期) 转染至肝细胞, 可在无促有丝分裂剂的情况下促进肝细胞增生, 为肝细胞再生提供了新的方法.

端粒和端粒酶与细胞增生密切相关^[42-44]. 端粒酶维持端粒长度是促进细胞增生的重要机制, 永生化细胞和恶性肿瘤细胞往往通过激活端粒酶来维持端粒长度并阻止细胞死亡^[45-49]. Rudolph et al^[50] 研究认为肝纤维化进程中端粒长度逐渐缩短, 是影响肝细胞再生并加重肝纤维化程度的主要因素之一. 该学者将腺病毒介导的大鼠端粒酶模板 RNA 基因, 经尾静脉注射导入肝纤维化大鼠肝脏, 发现可恢复肝细胞端粒酶活性和端粒长度, 促进肝细胞再生, 抑制 TGF- β 1 表达, 显著减轻纤维化程度, 肝纤维化进程和肝功能衰竭得到明显抑制. 利用端粒酶进行基因治疗研究的不断深入有望为慢性肝病或其他终末期肝功能衰竭提供更有效的手段^[51,52].

肝细胞移植是恢复肝细胞功能、减轻肝纤维化发展的极有前途的治疗方法之一, 目前主要的问题是供体肝细胞短缺、体外不易培养以及移植后免疫排斥反应^[53,54]. 晚近研究表明: 通过构建带有减轻免疫源性和促进肝细胞增生的重组腺病毒, 可明显提高肝细胞移植的治疗效果. Okada et al^[55] 构建了 CMV 启动子驱动的 IL-10 重组腺病毒 AdCMVvIL-10, 体外感染异源供体肝细胞后, 移植注射于脾脏, 异体免疫排斥反应受到抑制, 供体肝细胞的存活期明显延长, 接近自体肝细胞移植的效果.

促进移植肝细胞在受体肝脏内增生是提高肝细胞移植水平的重要途径. 一些研究认为, 供体肝细胞进入受体肝脏生长增生的数目一般不超过 0.5%, 主要原因可能是受体肝脏内缺乏移植肝细胞增生的刺激因素^[56-59]. Vrancken et al^[60] 将构建成的非分泌型的 uPA 重组腺病毒 Ad.PGK-muPA 以 5×10^9 pfu 效价经门静脉注射入待移植小鼠, 2 d 后行肝细胞移植, 结果发现供体肝细胞在 Ad.PGK-muPA 注射组增生的数目是对照组的

20 倍. 引起肝细胞增生的原因最初认为是由于外源表达的 uPA 可将肝细胞内的纤溶酶原转变为纤溶酶, 继而产生许多活性蛋白, 对受体肝细胞产生毒性作用, 产生了促进肝细胞生长的刺激因素, 从而诱发移植肝细胞的增生. 此外 uPA 可将单链无活性的 HGF 转变为具有活性的双链成分, 进一步促进肝细胞生长. 晚近, 许多学者深入探讨了肝细胞再生的机制, 认为外源导入促进细胞增生的基因可明显提高移植肝细胞的功能和存活时间, 提高肝细胞移植的治疗效果^[61-63].

3 腺病毒用于肝纤维化基因治疗疗效和安全性的评价
鉴于腺病毒载体在肝纤维化基因治疗中的广泛应用, 许多学者对其疗效和安全性进行了充分评估^[64-66]. Connelly^[67] 认为将携带外源基因的重组复制缺陷型腺病毒直接导入肝细胞是进行基因治疗很有前途的方法, 许多体内实验均证明腺病毒治疗的高效性; 但瞬时导入重组腺病毒, 外源基因持续表达不超过 1 mo, 同时腺病毒载体的免疫原性和肝脏毒性也是需要解决的问题. 一些学者认为重组腺病毒进入血液循环后, 主要集中于肝脏表达, 可引起肝脏的急性损伤, 但仅仅是一种非特异性免疫反应, 多由中性粒细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞的激活和一些趋化因子的释放所致. Nakatani et al^[68] 进一步研究评价了重组腺病毒基因治疗肝硬化的疗效和安全性. 静脉注射仅表达 lacZ 的重组腺病毒 4 d 后, 发现 lacZ 基因在肝硬化小鼠肝细胞中的表达是正常小鼠的 2.5 倍; 血清肝功能指标升高不明显; 组织病理学仅在正常小鼠肝脏中出现轻型肝炎的病理变化 (肝细胞增生和炎细胞浸润), 肝硬化小鼠未出现新的明显的病理改变; 各种免疫学指标亦未有显著变化, 动物实验证实严重肝病利用腺病毒载体静脉注射进行基因治疗是安全有效的.

总之, 近年来肝纤维化治疗已取得很大的进展, 分子生物学技术的飞速发展使肝纤维化的基因治疗提供了新的思路^[69-71]. 围绕抑制 ECM 生成、增加 ECM 降解和促进肝细胞再生等方面构建相应的重组复制缺陷型腺病毒在体外和动物实验中显示出较好的治疗效果. 随着基因工程、细胞因子生物学和基质生物学等研究的不断深入, 将会进一步发现和构建更多低毒、高效、简易的载体系统, 为肝纤维化治疗带来新的希望.

4 参考文献

- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260:926-932
- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanism and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328:1828-1835
- Fujimoto J, Kaneda Y. Reversing liver cirrhosis: impact of gene therapy for liver cirrhosis. *Gene Ther* 1999;6: 305-306
- Rockey DC. Gene therapy for hepatic fibrosis-bringing treatment into the new millennium. *Hepatology* 1999;30:816-818
- West J, Rodman DM. Gene therapy for pulmonary diseases. *Chest* 2001;119:613-617
- 潘欣, 潘卫, 柯重伟, 张斌, 曹广文, 戚中田. 腺病毒载体介导四环素调控的 DT/V EGF 体系的基因治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8: 1121-1126

- 7 Nasz I, Adam E. New developments and trends in adenovirus research. *Orv Hetil* 1997;138:2711-2724
- 8 Kochanek S. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999;10:2451-2459
- 9 Thomas CE, Schiedner G, Kochanek S, Castro MG, Lowenstein PR. Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7482-7487
- 10 Zheng BJ, Graham FL, Prevec L. Transcription units of E1a, E1b and pIX regions of bovine adenovirus type 3. *J Gen Virol* 1999;80 (Pt 7):1735-1742
- 11 Okada T, Ramsey WJ, Munir J, Wildner O, Blaese RM. Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vectors using DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1947-1950
- 12 He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514
- 13 Graham FL. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol Today* 2000;21:426-428
- 14 Ng P, Parks RJ, Cummings DT, Eveleigh CM, Graham FL. An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method. *Hum Gene Ther* 2000;11:693-699
- 15 Fujimoto J. Gene therapy for liver cirrhosis. *J Gastro Hep* 2000;15 (Suppl): D33-36
- 16 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:618-633
- 17 Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-140
- 18 Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741-748
- 19 刘芳,刘金星. 转化生长因子 β 1在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- 20 Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnani R, Barresi R, Mora M, Comelio F, Morandi R, Mantegazza R. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest* 1995;96:1137-1144
- 21 Murawaki Y, Nishimura Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kitamura Y, Kawasaki H. Plasma transforming growth factor-beta 1 concentrations in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:680-684
- 22 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type II transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *J Cell Biol* 1999; 5:2345-2349
- 23 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Atsuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000;11:33-42
- 24 Howard M, O Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 1992;13:198-200
- 25 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998;28:1597-1606
- 26 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology* 1998;28:1518-1524
- 27 Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN- γ gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17
- 28 Shetty K, Wu GY, Wu CH. Gene therapy of hepatic diseases: prospects for the new millennium. *Gut* 2000;46:136-139
- 29 Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:104-132
- 30 Lieber A, Peeters MJ, Gown A, Perkins J, Kay MA. A modified urokinase plasminogen activator induces liver regeneration without bleeding. *Hum Gene Ther* 1995;6:1029-1037
- 31 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
- 32 Boros P, Miller CM. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine. *The Lancet* 1995;345:293-295
- 33 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66
- 34 Borset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C, Sundan A, Waage A. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood* 1996;88:3998-4004
- 35 Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995;129:1177-1180
- 36 Itakura A, Kurauchi O, Morikawa S, Okamura M, Furugori K, Mizutani S. Involvement of hepatocyte growth factor in formation of bronchoalveolar structures in embryonic rat lung in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:98-103
- 37 Shiota G, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. Hepatocyte growth factor intrasplenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 1994;19:962-972
- 38 Phaneuf D, Chen SJ, Wilson JM. Intravenous injection of an adenovirus encoding hepatocyte growth factor results in liver growth and has a protective effect against apoptosis. *Mol Med* 2000;6:96-103
- 39 Schrum LW, Bird MA, Salcher O, Burchardt ER, Grisham JW, Brenner DA, Rippe RA, Behrns KE. Autocrine expression of activated transforming growth factor-beta(1) induces apoptosis in normal rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280: G139-148
- 40 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32:247-255
- 41 Nelsen CJ, Hansen LK, Rickheim DG, Chen C, Stanley MW, Krek W, Albrecht JH. Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp2. *Oncogene* 2001;20:1825-1831
- 42 Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;93:56-62
- 43 Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998;392:569-574
- 44 Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349-352
- 45 Hytiroglou P, Kotoula V, Thung SN, Tsokos M, Fiel MI, Papadimitriou CS. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer* 1998;82:1831-1838
- 46 Kojima H, Yokosuka O, Kato N, Shiina S, Imazeki F, Saisho H, Shiratori Y, Omata M. Quantitative evaluation of telomerase activity in small liver tumors: analysis of ultrasonography-guided liver biopsy specimens. *J Hepatol* 1999; 31:514-520
- 47 Ogami M, Ikura Y, Nishiguchi S, Kuroki T, Ueda M, Sakurai M. Quantitative analysis and in situ localization of human telomerase RNA in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 1999;79:15-26
- 48 Yakoob J, Hu GL, Fan XG, Zhang Z. Telomere, telomerase and digestive cancer. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 334-337
- 49 Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995; 85:2315-2320
- 50 Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000;287:1253-1258
- 51 Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Katayama R, Kimura T. Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shortening and replicative senescence in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2001;16:1453-1464
- 52 Haggmann M. New genetic tricks to rejuvenate ailing livers. *Sci-*

- ence 2000;287:1185-1187
- 53 Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406:257
- 54 Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-329
- 55 Okada Y, Saito S, Fujisawa K, Fujiwara T, Tanaka N. Adenovirus-mediated viral IL-10 gene transfer prolongs survival of xenogeneic spheroidal aggregate-cultured hepatocytes. *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1): S485-493
- 56 Strom SC, Chowdhury JR, Fox JJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:39-48
- 57 Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001;79:617-630
- 58 Sterling RK, Fisher RA. Liver transplantation. Living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clin Liver Dis* 2001;5:431-460
- 59 Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-57
- 60 Vrancken Peeters MJ, Patijn GA, Lieber A, Perkins J, Kay MA. Expansion of donor hepatocytes after recombinant adenovirus-induced liver regeneration in mice. *Hepatology* 1997;25:884-888
- 61 Song E, Chen J, Antus B, Su F, Wang M, Exton MS. Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes. *Surgery* 2001;130: 502-511
- 62 Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998; 4:1185-1188
- 63 Grompe M, Laconi E, Shafritz DA. Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin Liver Dis* 1999;19:7-14
- 64 Barnett BG, Crews CJ, Douglas JT. Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta* 2002;1575:1-14
- 65 Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002;9:127-134
- 66 Zhang H, Lin C, Wei Y. Safety evaluation of Ad-ASmyc in vitro and in vivo. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:116-119
- 67 Connelly S. Adenoviral vectors for liver-directed gene therapy. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1:565-572
- 68 Nakatani T, Kuriyama S, Tominaga K, Tsujimoto T, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Yoshiji H, Nagao S, Fukui H. Assessment of efficiency and safety of adenovirus mediated gene transfer into normal and damaged murine livers. *Gut* 2000;47:563-570
- 69 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- 70 Wu GY, Wu CH. Gene therapy and liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998; 4(Suppl 2): 18-19
- 71 王福生, 吴祖泽. 肝纤维化和肝硬变基因治疗的研究现状. 世界华人消化杂志 2000;8:371-373

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学情报研究所 (ISI), 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为 WJG® 影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 44 种, 其中包括 WJG®. Current Contents/Clinical Medicine® (即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 36 种, 其中包括 WJG®. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG® 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席. 53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG® 的合作伙伴. WJG® 被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM) 和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科学引文索引, 中国科技论文统计与分析, 世界消化学网数据库, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG® 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2003 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjg@wjgnet.com http://www.wjgnet.com (世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)