

pTZU6+1, 从而为研究 DNMT1 基因和胃癌致病发病之间的关系以及为探索胃癌乃至多种肿瘤的治疗途径打下了基础。

致谢: Tong-Chuan He, 刘杞教授, 唐霓副教授, 闫歌博士, 张秉强博士, 蒲丹博士, 陶鹏博士, 卢年芳硕士等。

#### 4 参考文献

- 1 吴汉平, 吴开春, 李玲, 么立萍, 兰梅, 王新, 樊代明. 人环氧化酶-2(hCOX-2)编码基因的克隆及其反义核酸转染胃癌细胞的初步研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1211-1217
- 2 邓大君, 鄂征. 胃癌病因:人 N-亚硝酰胺暴露. 世界华人消化杂志 2000;8:250-252
- 3 薛绪潮, 方国恩, 华积德. 胃癌与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:359-361
- 4 Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management

of cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4: 351-358

- 5 闫歌, 黄爱龙, 唐霓, 张秉强, 蒲丹, 向明确, 兰英华, 吴刚. 短发夹状 RNA 抑制 survivin 基因在肝癌细胞中的表达. 中华肝脏病杂志 2003;11:712-715
- 6 唐霓, 黄爱龙, 张秉强, 闫歌, He TC. 应用 RNA 干扰技术抑制乙型肝炎病毒抗原表达的实验研究. 中华医学杂志 2003;83:1309-1312
- 7 唐霓, 黄爱龙, 张秉强, 闫歌, 向明确, 蒲丹, 郭晖. 1.3 倍乙型肝炎病毒全基因真核表达载体的构建及在 HepG2 细胞中的表达. 中华肝脏病杂志 2003;11:464-466
- 8 Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-811
- 9 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 10 Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5515-5520

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

• 研究快报 •

## 氯沙坦对肝纤维化模型鼠 Smad2/3, Smad7 表达的影响

李 乾, 张桂英, 孟燕妮

李乾, 张桂英, 孟燕妮, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410008  
湖南省卫生厅课题资助项目, No. Y02-010  
项目负责人: 李乾, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院  
消化内科. liqian0816@hotmail.com  
电话: 0731-4327106  
收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-09-09

Smad7 的表达有关。

李乾, 张桂英, 孟燕妮. 氯沙坦对肝纤维化模型鼠 Smad2/3, Smad7 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2469-2471  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2469.asp>

#### 摘要

目的: 探讨 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化模型鼠肝组织 Smad2/3, Smad7 的表达及氯沙坦干预后对其表达的影响。

方法: Wistar 大鼠 40 只, 随机分成正常对照组、模型组、氯沙坦预防组和治疗组, 采用 CCl<sub>4</sub> 皮下注射构建肝纤维化模型. 行 HE 和 VG 染色, 判断肝组织炎症和纤维化的程度. 免疫组化方法检测各组 Smad2, 3 和 Smad7 的表达。

结果: 氯沙坦预防组和治疗组的肝组织炎症和纤维化程度明显低于模型组; Smad2/3 在氯沙坦预防组和治疗组的阳性表达均明显低于模型组(分别为  $1.0900 \pm 0.2767$ ,  $1.3222 \pm 0.2279$ ,  $2.6000 \pm 0.3500$   $P < 0.05$ ); Smad7 在氯沙坦预防组和治疗组的阳性表达高于模型组(分别为  $2.5000 \pm 0.3464$ ,  $2.2111 \pm 0.5926$ ,  $0.4667 \pm 0.2598$ ;  $P < 0.05$ ). Smad2/3, Smad7 在氯沙坦预防组和治疗组的表达无差异性  $P > 0.05$ 。

结论: 氯沙坦抗肝纤维化作用可能与抑制 Smad2/3 和促进

#### 0 引言

已有研究证实血管紧张素 II (Ang II) 受体拮抗剂具有抗肝纤维化作用<sup>[1-2]</sup>, 认为其可以抑制转化生长因子  $\beta$ 1 (transfer growth factor beta 1, TGF $\beta$ 1) 合成. Smad 家族是 TGF- $\beta$ 1 细胞内传导的通道, 有研究发现<sup>[3-4]</sup> TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路在肝纤维化的发生发展中起着重要的作用, 同时也为肝纤维化的防治研究提供了新的有效途径. 那么 Ang II 受体拮抗剂抗肝纤维化作用是否影响 Smad 的表达? 本研究以氯沙坦干预肝纤维化模型鼠, 探讨其对 Smad2, 3 和 Smad7 表达的影响。

#### 1 材料和方法

1.1 材料 同一品系清洁级健康 Wistar 大白鼠 40 只, 雌雄各半, 质量(180  $\pm$  40 g) 及普通饲料均由中南大学湘雅医学院动物学部提供; CCl<sub>4</sub> 购自湖南师范大学生化试剂厂。

1.2 方法 40 只大鼠按雌雄随机分成 4 组: (1) 正常对照组 10 只, 普通饮食饮水, 皮下注射 3 mL/kg 的石蜡

油, 1 wk 2次, 共 12 wk; (2)实验模型组 10只, 普通饮食饮水, 按 3 mL/kg 计量, 皮下注射 400 mL/L 的 CCl<sub>4</sub>(CCl<sub>4</sub>:石蜡油为 2:3)油剂, 2次/wk. 生理盐水灌胃 2 mL 1次/d, 共 12 wk; (3)氯沙坦预防组 10只, 造模条件同模型组, 造模开始即用氯沙坦按 10 mg/kg(溶于 2 mL 稀释液中)灌胃, 1次/d, 共 12 wk; (4)氯沙坦治疗组 10只, 造模条件同模型组, 造模 12 wk, 从周 5 起给予氯沙坦, 给药剂量, 方法均同预防组, 至造模结束. 动物均在环境温度 20 °C 左右, 明暗各 12 h 的清洁动物实验室内饲养. 石蜡切片予以 HE 染色和 van Gieson (VG)染色. Smad2, 3 和 Smad7 的免疫组化测定按试剂盒说明操作.

1.3 免疫组化半定量判断指标 采用 Bresalier<sup>[5]</sup> 半定量公式稍加修改判断染色结果. 切片在 10 倍物镜视野下观察, 随机计数 5 个视野中各染色强度细胞数的百分比. 根据细胞染色强度分为四级, 并分别计分: 阴性, 细胞无着色(0分); 弱阳性, 细胞着色为浅黄色(1分); 中度阳性, 细胞着色为棕黄色(2分); 强阳性, 细胞着色为棕褐色(3分), 计算每一强度的视野数, 根据下列公式计算每张切片的平均染色强度: IS(intensity score) =  $\sum \{ (0 \times F_0) + (1 \times F_1) + (2 \times F_2) + (3 \times F_3) \}$ ,  $F_i = \%10 \times \text{视野数}$  ( $i=0, 1, 2, 3$ ).

统计学处理 免疫组化为计量资料结果用 Mean  $\pm$  SD 表示, 经方差齐性检验后, 用 *t* 检验对数据进行统计分析. 使用统计软件 spss10.0, 取检验水准  $\alpha = 0.05$

## 2 结果

2.1 各组大鼠肝组织 HE 和 VG 染色 光镜下正常对照组大鼠肝组织 HE 染色显示肝板以中央静脉为中心条索状向四周呈放射样排列, 肝小叶内网状纤维支架完整, 分布规律; VG 胶原染色仅见少许纤细纤维分布于血管壁. 实验对照组大鼠肝组织 HE 染色显示明显炎症, 表现为广泛的肝细胞气球样变性、脂肪变性及坏死、炎性细胞浸润, 纤维间质细胞呈束状增生, 肝细胞体积增大, 肝窦变窄、堵塞, 肝索断裂, 肝板离解, 肝小叶结构破坏; VG 胶原染色见汇管区大量胶原纤维和网状纤维沉积, 相互连接形成纤维间隔, 部分重新分割肝小叶形成假小叶. 氯沙坦预防组、治疗组大鼠肝组织 HE 染色肝细胞坏死, 脂肪变性, 炎性细胞浸润等较实验组明显减轻; VG 胶原染色仅于汇管区可见轻度增生的胶原纤维和网状纤维及纤维间隔吸收后的残留.

2.2 各组大鼠肝组织 Smad2, 3 和 Smad7 的表达 正常对照组肝组织可见少量 Smad2, 3 弱阳性表达, 主要分布于血管壁; 实验模型组 Smad2, 3 强阳性表达细胞数明显增多, 主要分布于纤维化汇管区及纤维间隔里的梭型细胞间质和部分肝实质细胞的胞质; 氯沙坦预防组、治疗组肝组织中仅梭型细胞间质的 Smad2, 3 呈中度阳性表达. 其中实验模型组阳性表达细胞的平均染色强度积分明显高于氯沙坦预防组和治疗组, 二者比较

均.  $P < 0.05$ ; 氯沙坦预防组和治疗组 smad2, 3 阳性表达细胞平均染色强度积分比较,  $P > 0.05$  二者无显著性差异(表 1).

表 1 Smad2, 3 和 Smad7 蛋白在各组间表达 (mean  $\pm$  SD)

组别	n	Smad2/3 IS	Smad7 IS
模型组	9	2.6 000 $\pm$ 0.3 500	0.4 667 $\pm$ 0.2 598
预防组	10	1.0 900 $\pm$ 0.2 767 <sup>a</sup>	2.5 000 $\pm$ 0.3 464 <sup>a</sup>
治疗组	9	1.3 222 $\pm$ 0.2 279 <sup>ac</sup>	2.2 111 $\pm$ 0.5 926 <sup>ac</sup>
对照组	9	0.4 556 $\pm$ 0.2 068	0.2 889 $\pm$ 0.1 692

<sup>a</sup> $P < 0.05$  预防组、治疗组 vs 模型组; <sup>c</sup> $P > 0.05$  预防组 vs 治疗组.

Smad7 在正常对照组大鼠肝脏组织仅少量阳性表达; 实验模型组肝实质细胞呈弱阳性表达, 氯沙坦预防组、治疗组大鼠肝脏实质细胞广泛表达 Smad7. 其中实验模型组 Smad7 阳性表达细胞平均染色强度积分明显低于氯沙坦预防组和治疗组, 分别比较二者均  $P < 0.05$ ; 氯沙坦预防组和治疗组阳性表达细胞平均染色强度积分比较,  $P > 0.05$  无显著性差异(表 1).

## 3 讨论

目前认为 TGF $\beta$ 1 是影响活化肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)、促进胶原等细胞外基质合成, 加剧纤维化形成的主要生物因子<sup>[6-7]</sup>. Smad 蛋白家族是 TGF $\beta$ 受体后信息分子, 参与调控细胞的增生、转化、合成、分泌和凋亡<sup>[8]</sup>. TGF $\beta$ 1 信号传导通过 Smad2 和 Smad3<sup>[9]</sup>介导. Smad2 与 Smad3 的氨基酸序列高度同源, 因此他们介导类似的信号. TGF $\beta$ 1 型受体(TGF beta receptor I, T $\beta$ R I)激活后, Smad2 和 Smad3 通过与 T $\beta$ R I 短暂结合而直接发生磷酸化, 激活的 Smad2, Smad3 和被 T $\beta$ R I 间接激活的 Smad4 聚集成共同复合物或形成数个异源二聚体. 其后, Smad 复合物进入细胞核内与特异的 DNA 连接蛋白结合, 直接使靶基因转录<sup>[10-12]</sup>, 产生细胞生物学效应. Smad 7 是 TGF $\beta$  信号的拮抗因子, 能够牢固的与 T $\beta$ R I 结合, 使之无法将 Smad2 磷酸化, 从而阻断 TGF $\beta$  信号的转导途径, 具有与其他信息分子不同的负性调节作用<sup>[13]</sup>. 在肝脏, 他表现为抑制 HSC 的转化和胶原等细胞外基质的合成与分泌<sup>[14-16]</sup>.

Hayashi *et al*<sup>[3]</sup>对肝炎后肝纤维化的肝组织石蜡块检测发现, HSC 中 Smad2/3 和 Smad7 的表达明显高于正常对照组. 国内 CCL<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化模型的研究显示<sup>[17]</sup>, 随着肝纤维化病程进展, 检测 HSC 的 Smad3 RNA 含量显著高于正常肝脏 HSC, 但肝纤维化各个时期之间比较差异无显著性. 而在此过程中, Smad7 RNA 表现为先高后低的特征, 即在肝纤维化初期, Smad7 RNA 明显高于正常肝脏; 随后, Smad7 RNA 的表达不断降低<sup>[18]</sup>.

有关氯沙坦抗纤维化的作用机制目前已有不少实

验依据. Ang II 可引起 HSC 收缩, 促进其增生, 是 HSC 的分裂原之一<sup>[19-20]</sup>. Ang II 是通过其 I 型受体(ATR1)作用于 HSC 而产生作用的<sup>[21]</sup>. 同时, Ang II 还能刺激 TGF $\beta$ 1 的合成和分泌, 通过 TGF $\beta$ 1 间接刺激 HSC 分泌细胞外基质<sup>[22]</sup>. 氯沙坦作为 ATR1 阻断剂, 就是通过阻断上述途径从而延缓肝纤维化的发展.

我们发现, 氯沙坦预防及治疗组与模型组比较, 大鼠肝组织坏死程度及空泡变性均有明显改善, 纤维间隔增生受到抑制. Smad2/3 蛋白在肝脏细胞表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), 而 Smad7 蛋白表达却显著性增加( $P < 0.05$ ), 提示氯沙坦通过阻断纤维化肝组织中 TGF $\beta$ 1 信号传导途径, 即抑制 Smad2/3 蛋白表达, 增加 Smad7 蛋白表达, 从而在一定程度上延缓肝纤维化的发展. 预防组与治疗组相比, Smad2/3、Smad7 蛋白表达均无显著差异( $P > 0.05$ ), 可能与样本量小有关. 我们的研究为氯沙坦防治肝纤维化提供了一定的实验依据, 其更深层的作用机制有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Tuncer I, Ozbek H, Ugras S, Bayram I. Anti-fibrogenic effects of captopril and candesartan cilexetil on the hepatic fibrosis development in rat. The effect of AT1-R blocker on the hepatic fibrosis. *Exp Toxicol Pathol* 2003;55:159-166
- 2 Nie L, Imamura M, Itoh H, Ueno H. Pitavastatin enhances the anti-fibrogenesis effects of candesartan, an angiotensin II receptor blocker, on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *J UOEH* 2004;26:165-177
- 3 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. *Pathol Int* 2003;53:18-26
- 4 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF  $\beta$ -Smad 信号转导通路与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2003;11:1601-1605
- 5 Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, Kim YS, Sleisenger MH, Brodt P, Byrd JC. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* 1996;110:1354-1367
- 6 Kondou H, Mushiaki S, Etani Y, Miyoshi Y, Michigami T, Ozono K. A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *J Hepatol* 2003;39:742-748
- 7 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
- 8 Ungefroren H, Lenschow W, Chen WB, Faendrich F, Kalthoff H. Regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta requires MKK6-p38 mitogen-activated protein Kinase signaling downstream of Smad signaling. *J Biol Chem* 2003;278:11041-11049
- 9 Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, Sekimoto G, Seki T, Matsui H, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K. TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 2004;23:7416-7429
- 10 Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:1-10
- 11 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001;34:89-100
- 12 Lee DK, Park SH, Yi Y, Choi SG, Lee C, Parks WT, Cho H, de Caestecker MP, Shaul Y, Roberts AB, Kim SJ. The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis. *Genes Dev* 2001;15:455-466
- 13 Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associated with the TGF-beta receptor and functions as an antagonist of TGF beta signaling. *Cell* 1997;89:1165-1173
- 14 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178-191
- 15 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
- 16 Weinstein M, Monga SP, Liu Y, Li C, Brodie SG, Tang Y, Li C, Mishra L, Deng CX. Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol* 2001;21:5122-5131
- 17 张国, 王天才, 唐望先, 王颖, 李勤, 梁扩寰. Smad3、Smad7 基因表达与肝纤维化发病关系研究. *中华消化杂志* 2002;22:647-650
- 18 吴建新, 孟祥军, 陈源文, 程计林, 李定国, 陆汉明. Smad7 与转化生长因子  $\beta$ 1 受体后信息调控. *中华肝脏病杂志* 2003;11:315-317
- 19 Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial growth factor. *Tumour Biol* 2002;23:348-356
- 20 Zhang YJ, Yang XS, Wu PS, Li X, Zhang XF, Chen XQ, Yu ZX. Effects of angiotensin II and losartan on the growth and proliferation of hepatic stellate cells. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:219-221
- 21 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>(4). *World J Gastroenterol* 2000; 6:824-828
- 22 Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol* 2003;39:967-971