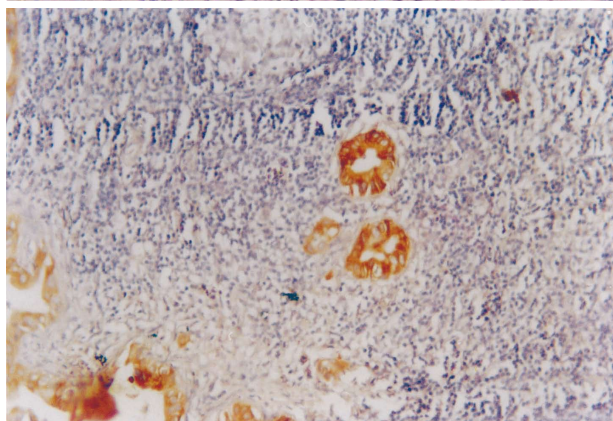
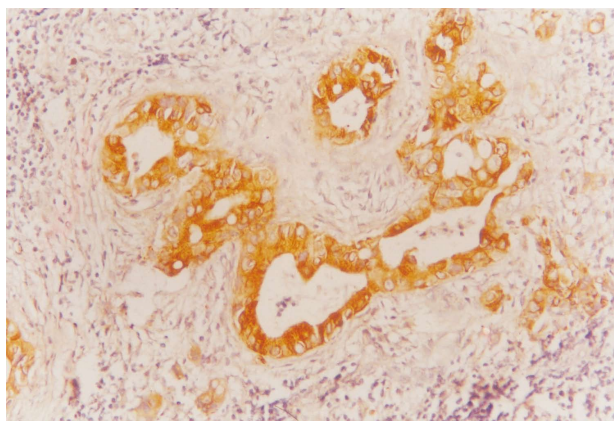
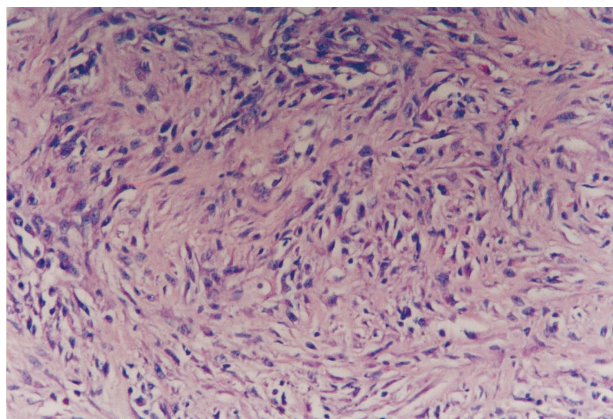
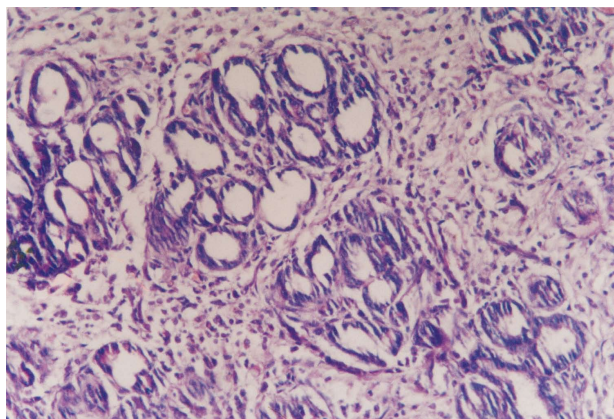


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)



18/2005

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 ●

2005 年 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生
2222 肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦
2243 影响拉米夫定相关乙型肝炎病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴风郁
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星
2275 肝病患者 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2200 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp
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 isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv 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 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 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 2005-09-28
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: wcjd @ 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

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

REVIEW

Lactobacillus as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达

王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山

王巧侠, 兰州大学临床医学院 甘肃省兰州市 730000
成军, 郭江, 魏红山, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
李文凡, 甘肃省人民医院消化科 甘肃省兰州市 730000
王巧侠, 女, 1975-03-29生, 陕西省西安市人, 汉族, 住院医师, 兰州大学2003级传染病学硕士研究生, 主要从事慢性肝脏疾病发病机制的研究。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队九五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-07-05 接受日期: 2005-07-08

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Qiao-Xia Wang, Jun Cheng, Jiang Guo, Wen-Fan Li, Hong-Shan Wei

Qiao-Xia Wang, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Jun Cheng, Jiang Guo, Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Wen-Fan Li, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Supported by National Natural Science Foundation, No. C03011402, No. C30070689; Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038; the Key Technology Research and Development Program of Chinese PLA during the 9th Five-Year Plan Period, No. 98D063; the Key Technology Research and Development Program of Chinese PLA for Distinguished Young Scholars during the 10th Five-Year Plan Period, No. 01Q138; and the Scientific Research Program of Chinese PLA during the 10th Five-Year Plan Period, No. 01MB135
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Anwai Street, Dongcheng District, Institute of Infectious Diseases, 13 Ditan Park, Ditan Hospital, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2005-07-05 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To investigate the regulatory effect of glycyrrhizin on the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expression and to explore its anti-fibrosis mechanism.

METHODS: The TIMP-1 promoter was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the product was named TIMP-1P. The TIMP-1P was cloned into pGEM-Teasy vector to obtain pGEM-Teasy-TIMP-1P, and then the product and pCAT3-basic vector were digested by *NheI* and *XhoI* to construct pCAT3-TIMP-1P. Then pCAT3-TIMP-1P was transfected into HepG2 cells and

the cells were treated with 0.1 mmol glycyrrhizin for 48 h. The HepG2 cells transfected with pCAT3-basic were used as negative controls. The expression level of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in HepG2 cells was detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA).

RESULTS: The expressive vector pCAT3-TIMP-1P was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The optical density (OD) of the cells transfected with pCAT3-TIMP-1P was significantly higher than that with pCAT3-basic (2.329 ± 0.685 vs 0.004 ± 0.002 , $F = 26.075$, $P < 0.05$). After treatment with glycyrrhizin, the expression of CAT in the HepG2 cells transfected with pCAT3-TIMP-1P was notably decreased as compared with that in the same cells without glycyrrhizin treatment ($OD: 0.268 \pm 0.009$ vs 0.490 ± 0.153 , $F = 35.775$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Glycyrrhizin can down-regulate the activity of TIMP-1 gene promoter as well as inhibit the expression of TIMP-1.

Key Words: Glycyrrhizin; Tissue inhibitor of metalloproteinases-1; Anti-fibrosis

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS. Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Shijie Huaren Xiaohuan Zazhi* 2005;13(18):2183-2187

摘要

目的: 了解甘草甜素对基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因启动子活性的调节作用, 探讨甘草甜素的抗纤维化机制。

方法: 应用聚合酶链反应 (PCR) 扩增基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因启动子, 命名为TIMP-1P, 以T-A克隆法, 将TIMP-1P基因片段连入载体pGEM-Teasy。将获得的质粒pGEMTeasy-TIMP-1P, 与报告质粒pCAT3-basic分别用*NheI*和*XhoI*双酶切后构建TIMP-1启动子报告基因表达载体pCAT3-TIMP-1P, 以重组表达质粒pCAT3-TIMP-1P瞬时转染HepG2细胞, 4 h后以0.1 mmol甘草甜素刺激, 48 h后收获细胞。同时以转染pCAT3-basic的HepG2细胞

为阴性对照, 每组设复孔对照, 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测标本在415 nm波长的吸光度值, 其数值反映细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达水平.

结果: 构建的报告基因表达载体pCAT3-TIMP-1P经过序列分析和酶切鉴定正确. 瞬时转染HepG2细胞后, pCAT3-basic的吸光度值为 0.004 ± 0.002 , pCAT3-TIMP-1P为 2.329 ± 0.685 , 经方差分析两者差异有统计学意义($F = 26.075$, $P < 0.05$), pCAT3-TIMP-1在HepG2细胞中能够启动CAT的表达. 转染HepG2细胞的pCAT3-TIMP-1P经0.1 mmol甘草甜素刺激后, 其吸光度值为 0.268 ± 0.009 , 同期未经甘草甜素刺激的pCAT3-TIMP-1P吸光度值为 0.490 ± 0.153 , 方差分析两者差异有统计学意义($F = 35.775$, $P < 0.05$).

结论: 甘草甜素可下调TIMP-1启动子的转录活性, 抑制TIMP-1的基因表达.

关键词: 甘草甜素; 基质金属蛋白酶组织抑制因子-1; 抗纤维化

王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山. 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2183-2187
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2183.asp>

0 引言

甘草甜素(glycyrrhizin, GL)药理作用广泛, 能抑制肝脏炎症反应, 强有力地保护肝细胞膜, 增强肝脏的解毒功能, 减轻肝脏的病理性损害, 提高肝细胞对化学伤害的抵抗力, 促进胆红素代谢, 降低转氨酶, 逆转肝纤维化, 并抑制多种病毒的复制^[1, 2]. 肝星状细胞的活化和增殖是肝纤维化、肝硬化发病机制的重要环节, 肝星状细胞表达产生的胶原和非胶原糖蛋白在肝脏中沉积, 逐渐发展为肝纤维化、肝硬化^[3-5]. 另外, 肝脏中的胶原和非胶原糖蛋白的降解速度也是决定肝纤维化发生发展的重要因素^[6, 7]. 研究表明, 基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)在肝脏中的细胞外基质降解调节过程中具有决定性的意义^[8]. 临床观察和实验研究已经发现GL具有显著的抗肝纤维化作用^[9-12], 但是GL是否是通过TIMP-1基因表达的调节达到抗纤维化的目的还不十分清楚. 我们通过观察GL对TIMP-1基因表达的影响, 探讨其抗肝纤维化的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝肿瘤细胞系HepG2细胞及大肠杆菌DH 5 α 菌株为本室保存. Tag DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶均购自Takara公司. 质粒DNA提取试剂盒, 中间载体pGEM-Teasy及报告质粒pCAT3-basic均购自Promega公司; CAT-ELISA检测试剂盒及质粒DNA转染试剂盒购自

Roche公司. 玻璃奶纯化试剂盒购自博大公司, 其它生化试剂购自Sigma公司.

1.2 方法 根据文献[13]合成引物, 上游引物P1: 5' -GCT AGC AGA ACC GGT ACC CAT CTC AG-3'. 下游引物P2: 5' -CTC GAG CTG TAC CTC TGG TGT CTC TC-3', 在上下游引物的5' -端分别引入Nhe I和Xho I单一酶切位点, 引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成. 以HepG2细胞基因组DNA为模板, PCR扩增TIMP-1基因启动子800 bp的DNA片段, PCR产物经9 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 玻璃奶法回收纯化. 以T-A克隆法, 用T4 DNA连接酶将TIMP-1P基因片段连入载体pGEM-Teasy, 转化大肠杆菌DH 5 α 感受态细胞, 筛选在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒, 酶切(Nhe I/Xho I)及DNA测序鉴定, DNA测序由上海华诺生物科技有限公司完成. 将获得的质粒pGEMTeasy-TIMP-1 P 和报告质粒pCAT3-basic分别用Nhe I和Xho I双酶切后用T4 DNA连接酶进行定向连接, 产物转化大肠杆菌DH 5 α 感受态细胞, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 碱裂解法提取质粒, 再次双酶切(Nhe I/Xho I)及PCR鉴定正向插入克隆, 命名为pCAT3-TIMP-1P, 磁珠法提取质粒以备转染. HepG2细胞在含100 mL/L小牛血清的DMEM中培养. 于35 mm平皿中生长至50-80%融合时采用脂质体转染法, 转染方法参照FuGENE6 Transfection Reagent说明书进行. pCAT3-TIMP-1P转染剂量为1 μ g, 设置pCAT3-basic 1 μ g为阴性对照, pCAT3-control 1 μ g为阳性对照, 每组设复孔对照. 转染48 h后收获细胞, 收集细胞裂解液, 用于CAT活性检测以验证克隆的DNA片段具有启动子活性. 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至50-80%融合时转染pCAT3-TIMP-1P 1 μ g, 于转染后4 h换液时加入GL使终浓度为0.1 mmol, 同时以转染pCAT3-Basic的HepG2细胞作阴性对照, 以转染pCAT3-control的HepG2细胞为阳性对照. 转染48 h后, 收集细胞裂解液, 用于CAT表达水平检测. 检测方法按照试剂盒说明书进行. 取1.0 μ g/L的CAT标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液200 μ L加入已包被抗体的96孔板中, 37 $^{\circ}$ C温育1 h, 再依次加入一抗(地高辛标记的抗-CAT)、二抗(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体anti-Dig-Pod)各200 μ L, 37 $^{\circ}$ C温育1 h后, 加入过氧化物酶的底物室温显色10-30 min. 用酶标仪检测标本在415 nm波长的吸光度值, 其数值反映细胞提取物中的CAT表达水平. 以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 用SPSS11.0统计学软件进行方差分析.

2 结果

成功扩增出TIMP-1基因的启动子序列, 经9 g/L琼脂

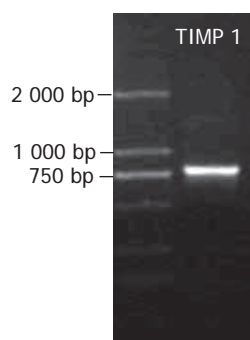


图1 以HepG2基因组DNA为模板, PCR扩增TIMP-1启动子序列

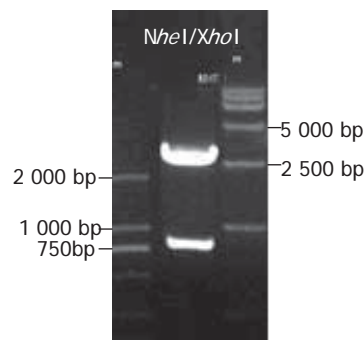


图2 pGEM-Teasy-TIMP-1p双酶切鉴定 (NheI/XhoI)

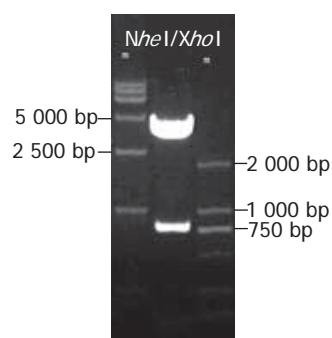


图3 pCAT3-TIMP-1p双酶切鉴定 (NheI/XhoI)

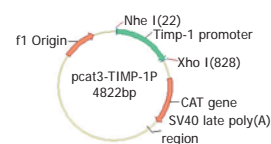


图4 pCAT3-TIMP-1p双酶切鉴定 (NheI/XhoI)

糖凝胶电泳分析显示扩增片段约800 bp, 与预期片段符合(图1). 构建的中间载体pGEM-Teasy-TIMP-1p以NheI/XhoI双酶切鉴定, 9 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(3015bp的pGEM-Teasy载体和800 bp的TIMP-1启动子DNA片段), 与预期一致(图2). DNA测序证实重组质粒含有800 bp的目的基因, 读码框架正确. 将双酶切产物与pCAT3-basic载体连接, 以NheI/XhoI双酶切鉴定, 9 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(4022bp的pCAT3-basic载体和800 bp的TIMP-1启动子DNA片段)(图3), 说明重组质粒pCAT3-TIMP-1p构建正确(图4). 将重组质粒pCAT3-TIMP-1p转染HepG2

细胞, CAT ELISA检测吸光度, 空载体对照组pCAT3-Basic的吸光度为 0.004 ± 0.002 , 阳性对照组为pCAT3-control为 2.029 ± 0.650 , pCAT3-TIMP-1p为 2.329 ± 0.685 (图5), $F = 26.075$ ($P < 0.05$) 差异有统计学意义(表1), 表明pCAT3-TIMP-1p具有很强的启动子活性. 以GL刺激转染了pCAT3-TIMP-1p的HepG2细胞, 当pCAT3-TIMP-1p单独转染时, 其吸光度值为 0.490 ± 0.153 , 加入 0.1 mmol/L GL刺激后吸光度值为 0.268 ± 0.009 , 空载体对照组pCAT3-basic的吸光度值为 0.003 ± 0.002 , GL刺激转染pCAT3-TIMP-1p的CAT吸光度值表达明显降低, $F = 35.775$ ($P < 0.05$) 差异有统计学意义

表1 质粒转染HepG2的CAT吸光度值

组别	$A_{415 \text{ nm}}$
pCAT3-basic	0.004 ± 0.002
pCAT3-control	2.029 ± 0.650^a
pCAT3-TIMP-1p	2.329 ± 0.685^a

^a $P < 0.05$, $F = 26.075$ vs pCAT3-basic.

表2 GL刺激pCAT3-TIMP-1p的CAT吸光度值

组别	$A_{415 \text{ nm}}$
pCAT3-basic	0.003 ± 0.002
pCAT3-control	1.058 ± 0.313^a
pCAT3-TIMP-1p	0.490 ± 0.153^a
GL + pCAT3-TIMP-1p	0.268 ± 0.009^b

^a $P < 0.05$ vs pCAT3-basic; ^b $P < 0.05$, $F = 35.775$ vs pCAT3-TIMP-1p.

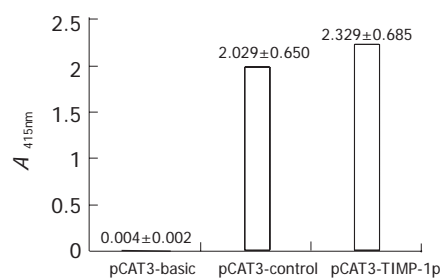


图5 pCAT3-TIMP-1p转染HepG2细胞 CAT表达.

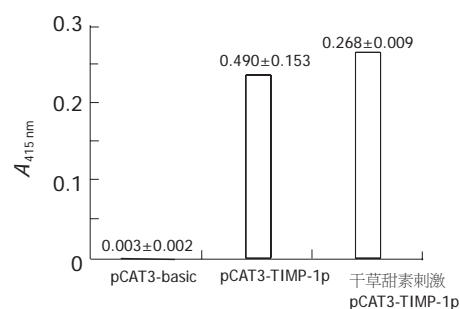


图6 甘草甜素刺激pCAT3-TIMP-1p后CAT表达.

(表2),说明GL对TIMP-1p基因启动子有下调作用(图6)。

3 讨论

正常情况下,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成与降解通过基质金属蛋白酶(MMP)及其抑制剂(TIM P)的相互作用而维持一个平衡的状态,并得到十分精确的调控^[14, 15]。在各种病因造成的肝损伤过程中,ECM合成与降解之间的平衡被打破,以胶原为主的ECM各成分过多沉积在肝内引起纤维化,如果进一步发展造成肝小叶重建,假小叶和结节形成,则进入肝硬化^[16]。许多实验研究表明,在肝损伤早期,MMP一度升高,但随着肝纤维化及肝硬化的发展,TIMP活性持续增高,抑制了MMP的活性,因而学者们认为TIM P是肝纤维化发生过程中的一个非常重要的促发因素^[17-19]。TIM P是一组抑制基质金属蛋白酶活性的多功能因子家族,目前已发现TIM P1, 2, 3, 4 四个成员,TIMP-1是调节肝内ECM沉积的重要因素,主要通过抑制MMP对ECM的降解使ECM在肝脏内沉积增加,也可通过抑制已活化的星状细胞的凋亡使得星状细胞持续活化,而加剧肝内的ECM形成和堆积,促进了肝硬化的形成^[20-26]。GL是从中药甘草中提取的有效成分,该药抗纤维化的机制不清楚。近年来有学者发现GL有减少纤维化动物I型胶原含量,抑制培养细胞I, III型前胶原mRNA的表达的作用^[27]。并且多项研究提示该药可能通过抗细胞毒性作用、免疫调节以及影响多种因子的信号转导而发挥抗肝纤维化作用^[28-31]。采用基因重组技术构建pCAT3-TIMP-1P报告基因载体,瞬时转染人肝肿瘤细胞系HepG2细胞后以0.1 mmol GL刺激,用酶联免疫吸附法(ELISA)测得下游CAT基因的表达降低,证明GL可下调TIMP-1启动子活性,进而抑制TIMP-1基因的表达。说明人和动物应用GL后,通过对TIMP-1表达的直接抑制从而达到其抗纤维化作用。这些结果为深入了解GL的抗纤维化机制提供了新的理论依据。

4 参考文献

- Ohtake N, Nakai Y, Yamamoto M, Sakakibara I, Takeda S, Amagaya S, Aburada M. Separation and isolation methods for analysis of the active principles of Sho-saiko-to (SST) oriental medicine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;812:135-148
- Miyazawa N, Takahashi H, Yoshiike Y, Ogura T, Watanuki Y, Sato M, Kakemizu N, Yamakawa Y, U CH, Goto H, Odagiri S. Effect of glycyrrhizin on anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *Kekkaku* 2003;78:15-19
- 饶慧琪, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. *世界华人消化杂志* 2005;13:671-674
- 黄瑾, 张锦生. 肝星状细胞活化的启动、维持和调控. *国外医学消化性疾病分册* 2002;22:227-230
- 周俊英, 甄真, 姚树坤. 肝星状细胞凋亡与肝纤维化逆转. *国外医学内科学分册* 2004;31:403-406
- Jia JD. Recent advances in the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatic fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:257-258
- 徐斌, 张振华, 黄祝青. 血清基质金属蛋白酶及其组织抑制因子与肝纤维化. *实用肝脏病杂志* 2004;7:56-58
- 郑伟达, 王小众, 张莉娟, 史美娜, 陈治新, 陈运新, 黄月红. TIMP-1表达在实验性大鼠肝纤维化发病中的作用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004;13:475-478
- Zhang QS, Yuan RH, Zhang J, Tian GY. Targeted glycyrrhetic acid to receptors of hepatic stellate cells for the treatment of rat liver fibrosis: a pilot study. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:512
- Zhang YF, Wang LL, Yin WH. Clinical observation on the anti-liver fibrosis treatment by diammonion glycyrrhizinate injection combined with saliva. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2002;22:538-539
- Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neo-minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62 Suppl 1:94-100
- Chen MH, Chen JC, Tsai CC, Wang WC, Chang DC, Lin CC, Hsieh HY. Sho-saiko-to prevents liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *Am J Chin Med* 2004;32:195-207
- Lee M, Song SU, Ryu JK, Suh JK. Sp1-dependent regulation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter. *J Cell Biochem* 2004;91:1260-1268
- Lichtinghagen R, Bahr MJ, Wehmeier M, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:373-382
- 高春芳. 胶原基因转录调控与纤维化. *世界华人消化杂志* 2005;13:166-171
- 郑伟达, 王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2004;12:428-431
- 张洁, 陈晓宇, 彭延申, 李继强. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝组织MMP-13及TIMP-1表达变化与肝纤维化的关系. *世界华人消化杂志* 2005;13:512-515
- 李保森, 游绍莉, 赵志海, 辛绍杰, 赵景民, 王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:483-485
- Zhu YK, Wang BE, Shen FJ, Wang AM, Jia JD, Ma H. Dynamic evolution of MMP-13, TIMP-1, type I and III collagen and their interaction in experimental liver fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:612-615
- Herrmann J, Arias M, Van De Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R. CSRP2, TIMP-1, and SM22alpha promoter fragments direct hepatic stellate cell-specific transgene expression in vitro, but not in vivo. *Liver Int* 2004;24:69-79
- 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;36:850-860
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076
- Murphy F, Waung J, Collins J, Arthur MJ, Nagase H, Mann D, Benyon RC, Iredale JP. N-Cadherin cleavage during activated hepatic stellate cell apoptosis is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Comp Hepatol* 2004;14;3 Suppl 1:S8
- 聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前, 罗红, 罗新栋. 正常及实验性肝纤维化大鼠肝脏中的金属蛋白酶组织抑制因子-1. *世界华人消化杂志* 2003;11:204-208
- Flisiak R, Maxwell P, Prokopowicz D, Timms PM, Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1-possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatology* 2002;49:1369-1372

- 26 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
- 27 Zhang Q, Wang J, Hu M. Effects of glycyrrhelic acid and IFN- α on HSCs collagen metabolism in rat fibrotic liver of varying stages. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2002;10:72-73
- 28 Kinjo J, Hirakawa T, Tsuchihashi R, Nagao T, Okawa M, No-hara T, Okabe H. Hepatoprotective Constituents in Plants 14. Effects of Soyasapogenol B, Sophoradiol, and Their Glucuronides on the Cytotoxicity of tert-Butyl Hydroperoxide to HepG2 Cells. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1357-1360
- 29 Cai Y, Shen XZ, Wang JY. Effects of glycyrrhizin on genes expression during the process of liver fibrosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003;83:1122-1125
- 30 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花, 党晓燕, 徐志强. 应用基因表达谱芯片技术克隆甘草甜素诱导Jurkat细胞后的差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2004;12:70-73
- 31 王建军, 李宝伟, 成军, 刘妍, 徐志强, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 表达谱基因芯片技术研究甘草甜素上调白细胞介素-18基因的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:855-858

电编 李琪 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•

2006 年第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

本刊讯 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展,由中华医学会肝病学会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会”定于 2006-05 在辽宁省大连市召开。届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题继续进行继续教育讲座,并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分。现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1) 病毒性肝炎发病机制的研究进展; (2) 病毒性肝炎的治疗策略; (3) 乙型病毒性肝炎的长期治疗; (4) 丙型肝炎的抗病毒治疗; (5) 肝纤维化发病机制研究进展; (6) 肝纤维化的防治; (7) 肝硬化的规范化治疗; (8) 肝细胞癌的病因学研究进展; (9) 肝癌的发病机制研究进展; (10) 肝癌的早期诊断; (11) 肝癌的手术治疗及方案选择; (12) 肝癌的非手术治疗; (13) 肝癌的生物治疗; (14) 自身免疫性肝病的发病机制; (15) 自身免疫性肝病的诊断和治疗; (16) 肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗; (17) 生物人工肝的应用及进展; (18) 小儿自身免疫性肝病; (19) 肝肾综合征; (20) 肝功能衰竭; (21) 肝干细胞的研究进展及临床应用; (22) 脂肪肝及酒精性肝病; (23) 非酒精性脂肪性肝病。

2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及 500 字(词)左右中文摘要各一份,应包括目的、材料与方法、结果、讨论,并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿,恕不退稿)。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文,不再受理。

3 论文寄送地址

400010, 重庆市渝中区临江路 74 号, 中华肝脏病杂志编辑部收。请在信封左下角注明“会议征文”。欢迎用软盘和电子邮件方式投稿。电子邮件地址: zhgz@vip.163.com。征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准)。