

丹酚酸 B 盐对转化生长因子-1 刺激肝星状细胞活化与胞内信号转导的作用

刘成海 刘平 胡义扬 朱大元

【摘要】目的 探讨丹酚酸 B 盐 (SA-B) 抗肝纤维化的作用机理。方法 分离大鼠肝星状细胞 (HSC), 于无包被的塑料培养皿上原代培养 1、4、7 d, 细胞分别处于静止、中间活化与完全活化 3 种活化状态。予以 100 pmol/L 转化生长因子-1 (TGF-1) 刺激, 观察细胞 α -肌动蛋白表达与胶原分泌的变化。选择对 TGF-1 刺激最为敏感的中间活化状态 HSC 为细胞模型, [3 H]胸腺嘧啶掺入法观察 0.1 μ mol/L ~ 1 mmol/L SA-B 对该细胞增殖的作用, 倒置显微镜观察药物对细胞形态的影响; Western 印迹与 Northern 印迹等方法观察 SA-B 对 TGF-1 刺激活化的 HSC 胞外基质基因与蛋白表达、 α -肌动蛋白表达的影响; 提取细胞质与细胞核蛋白, Western 印迹方法观察 SA-B 对 TGF-1 刺激的 HSC Smad2/3 蛋白表达、磷酸化与核转位的影响。结果 TGF-1 促进各活化状态 HSC 的胶原分泌, 促进率分别为 128.6%、207.3% 与 188.2%, 中间活化状态 HSC 对 TGF-1 的促胶原分泌最为敏感。除 0.1 mmol/L ~ 1 mmol/L SA-B 引起部分细胞死亡外, 0.1 μ mol/L ~ 10 μ mol/L SA-B 对细胞形态无影响, 但可浓度依赖性抑制细胞增殖, 细胞内 [3 H]胸腺嘧啶掺入量分别为对照组的 76%、60.1% 与 47.8%。1 μ mol/L ~ 10 μ mol/L SA-B 明显抑制 TGF-1 刺激的 HSC 胶原分泌量 (分别为对照组的 68.6% 与 56.1%), 抑制 α -肌动蛋白与纤维蛋白酶原激活物抑制子蛋白表达, 下调 I 型前胶原基因表达。0.1 μ mol/L ~ 10 μ mol/L SA-B 不同程度地抑制 Smad2/3 的蛋白表达量, 明显抑制 Smad2 蛋白胞内磷酸化与核转位。结论 SA-B 抑制 TGF-1 的 HSC 胞内信号转导, 从而拮抗 TGF-1 的促 HSC 活化, 以上作用是 SA-B 抗肝纤维化的主要机理。

【关键词】 肝硬化; 丹参; 受体; 转化生长因子; 信号传递

Effects of salvianolic acid-B on TGF-1 stimulated hepatic stellate cell activation and its intracellular signaling LIU Chenghai*, LIU Ping, HU Yiyang, ZHU Dayuan. *Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

【Abstract】 **Objective** To investigate hepatic stellate cells (HSC) responses at different differentiation stages on transforming growth factor-1, and to elucidate the mechanisms of salvianolic acid-B (SA-B), a water soluble compound from *Salvia miltiorrhiza*, against hepatic fibrosis, relating to interference with TGF-1 stimulated HSC activation and intracellular signal transduction via Smads. **Methods** HSC was isolated from rat by *in situ* perfusion of liver and 8.2% nycondenz gradient centrifugation, and primarily cultured on uncoated plastic for 1 d, 4 d and 7 d respectively, which represented quiescent, intermediate and activated phenotypes. The cells were stimulated with 100 pmol/L TGF-1, cell phenotypes were observed under inverted microscope, α -actin expression was checked by Western blot, and collagen secretion was measured with [3 H] proline incorporation and collagenase digestion, then HSC at one definite differentiation stage that responded most sensitively to TGF-1 was selected as the cell model for the following study. 0.1 μ mol/L ~ 1 mmol/L SA-B was incubated with HSC and the cell proliferation was measured by intracellular [3 H] thymidine pulse. SA-B was also incubated with TGF-1 stimulated HSC, the collagen secretion was measured as above, α -actin and plasmin activator inhibitor 1 (PAI-1) were checked with Western blot, and 1(I) procollagen mRNA levels were analyzed with Northern blot. The cytoplasmic and nuclear proteins were extracted, and cytoplasmic and nuclear Smad2,3 expression and phosphorylation levels were measured with Western blot. **Results** As culture duration prolonged, HSC phenotypes underwent activation gradually, accompanied by the increase of α -actin expression and collagen secretion. TGF-1 increased the basal collagen levels at d1, d4 and d7 by 128.6%, 207.7% and 188.2% of the control respectively, while d4 HSC had the most sensitive response, and this intermediate HSC was used as cell model for

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年基金资助项目 (39825168)、国家自然科学基金资助项目 (39970899)

作者单位: 200032 上海中医药大学肝病研究所 (刘成海、刘平、胡义扬); 中国科学院上海药物研究所 (朱大元)

the following study. Except 0.1 mmol/L-1 mmol/L SA-B caused parts of HSC death, 0.1 μ mol/L-10 μ mol/L SA-B had no influence on cell shape, but decreased HSC proliferation in a dose depend manner, by 76%, 60.1% and 47.8% of the control respectively. 1 μ mol/L-10 μ mol/L SA-B remarkably inhibited the collagen secretion of TGF- β 1 stimulated HSC by 68.6% and 56.1% of the control, PAF1 and α -actin expression, and downregulated 1(I) pro-collagen gene expression. 0.1 μ mol/L ~ 10 μ mol/L SA-B decreased the cytoplasmic and nuclear Smad2,3 protein expression, especially inhibited Smad2 phosphorylation and nuclear translocation **Conclusions** SA-B obviously inhibits intermediate HSC proliferation, decreases TGF- β 1 stimulated HSC activation and matrix protein and gene expression, and inhibited stimulated HSC Smad2,3 protein expression, phosphorylation and nuclear translocation. The inhibition of TGF- β 1 signaling in HSC and its biological responses is the important mechanism of SA-B against hepatic fibrosis.

【Key words】 Liver cirrhosis; Salvia miltiorrhiza; Receptors, transforming growth factor beta; Signal transduction

临床与动物实验证实^[1-3],丹参能有效改善肝脏炎症,减轻胞外基质增生与沉积,有较好的抗肝纤维化作用。丹酚酸 B 盐 (salvianolic acid B, SA-B) 是丹参的主要水溶性成分之一,有良好的抗氧化作用^[4]。我们研究发现^[5,6],该成分能有效保护四氯化碳与二甲基亚硝胺等化学中毒大鼠的肝损伤,预防与逆转肝纤维化的形成;并且证实 SA-B 能有效阻止与逆转慢性乙型肝炎患者的肝纤维化,目前正进行二期临床试验,有望成为抗肝纤维化的二类临床新药。

近年来研究证实^[7-9],肝星状细胞 (HSC) 活化是肝纤维化发生的病理关键。转化生长因子 1 (TGF- β 1) 是最重要的促 HSC 活化与肝纤维化形成细胞因子。TGF- β 1 通过胞内信号分子 Smads 蛋白转导信号,调控细胞胶原等效应基因表达。因此,我们拟分离培养原代 HSC,以 TGF- β 1 刺激活化,观察 SA-B 对 TGF- β 1 刺激的 HSC 活化表型、胞外基质成分蛋白与基因表达以及 Smad2/3 蛋白表达、磷酸化与核转位的影响,探讨 SA-B 影响 TGF- β 1 促 HSC 活化及其胞内信号转导的抗肝纤维化主要作用机理。

材料与方 法

一、材料

1. 药物:SA-B,分子式 C₃₆H₃₀O₁₆,相对分子质量 718,由中国科学院上海药物研究所提取与鉴定,纯度 80%以上。

2. 主要试剂:199 培养液 (Medium 199, M199)、MEM 培养液与 Nycondenz 购自 Life Tech 公司,链酶蛋白酶 E 与 IV 型胶原酶购自 Roche 公司。TGF- β 1 购自 R&D 公司,[³H]胸腺嘧啶、[2,3,4,5-³H]脯氨酸、[³²P]-dCTP 与 cDNA 随机引物标记盒购自 Amersham 公司。总 RNA 提取与凝胶纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。 α -肌动蛋白抗体购自 Sigma 公司,Smad2 抗体、磷酸化 Smad2 抗体 (P-Smad2) 购自 Transduction Laboratoies 公司,Smad3 抗体购自 Zymed

公司,纤溶酶原激活物抑制剂 (PAF1) 抗体购自 American Diagnostic 公司。Northern 印迹杂交液购自 Ambion 公司。

二、方法

1. cDNA 探针制备与同位素标记:大鼠 1(I) 胶原质粒由英国 Southampton 大学 Arthur 博士馈赠,经 EcoR I 与 Hind III 酶切,2%琼脂糖电泳,以凝胶回收试剂盒纯化,获得 400 bp 长度的 1(I) 胶原基因 cDNA。大鼠 α -肌动蛋白 cDNA 购自 Clontech 公司。采用随机引物标记试剂盒,按说明书以 [³²P]-dCTP 标记 cDNA 探针。

2. 肝星状细胞分离培养:方法参考文献[10],并改进。500~600 g SD 大鼠经苯巴比妥钠麻醉后,2 mg/ml 链酶蛋白酶 100 ml 与 0.3 mg/ml 胶原酶 200 ml 原位灌流消化肝脏,细胞悬液经 8.2% Nycodenz 梯度离心 (1 450 r/min, 20 min, 40^o),于梯度界面获取肝星状细胞,以 10% FBS/M199 调整细胞浓度为 5 \times 10⁶/ml,接种于无包被的塑料培养皿上。经结蛋白免疫细胞化学染色与光镜下典型胞内脂滴形态鉴定,细胞纯度为 90%~95%;细胞活力经台盼蓝染色大于 90%。每项实验所用细胞来自同一大鼠,重复 2~3 次。

3. TGF- β 1 与药物温育液添加:无血清 MEM 洗涤细胞 2 次,而后换为 0.3% FBS/M199 培养液。TGF- β 1 以 5 mmol/L HCl 溶解与激活,按 100 pmol/L 的终浓度加入培养液中^[11]。SA-B 以含 0.3% FBS 或无血清 M199 临用前溶解,以 0.1 μ mol/L ~ 1 mmol/L 终浓度加入培养液。

4. 细胞增殖测定:无血清 MEM 洗涤细胞后,以含 SA-B 0.1 μ mol/L ~ 1 mmol/L 的 0.3% FBS/M199 温育细胞 4 h,而后掺入 [³H]胸腺嘧啶 (74 Bq/ml) (1 μ Ci = 37 Bq) 培养液,继续温育 16 h。收集细胞,测定 cpm 值。

5. 胶原蛋白分泌测定:采用 [³H]脯氨酸掺入与

胶原酶消化法测定^[12]。TGF-1 与 0.1 μmol/L ~ 10 μmol/L SA-B 于 0.3 % FBS/M199 中温育细胞 24 h, 其后 18 h 掺入脯氨酸 185 Bq^[3H]/ml 培养液。收集培养上清, 将样本等分为 2: 一份不加胶原酶, 为空白对照; 另一份加胶原酶消化。而后经三氯醋酸沉淀, 离心去上清(去除游离同位素), 溶解离心沉淀物, 测定其 dpm 值, 胶原含量即为空白管 dpm 减去胶原酶管 dpm 后的数值。

6. Western 印迹分析细胞-肌动蛋白与 PAF1 蛋白表达: TGF-1 与 0.1 μmol/L ~ 10 μmol/L SA-B 温育细胞 24 h, 经细胞裂解液(20 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, pH 7.4, 1 % Triton X-100, 1.5 mmol/L PMSF) 裂解细胞, 测定裂解液总蛋白含量, 取 50 μg 总蛋白含量的裂解液进行 10 % SDS-PAGE 电泳, 经硝酸纤维素膜转移, 5 % 脱脂奶粉 TBS-T 溶液(TBS + 0.1 % Tween-20) 封闭后, 分别与-肌动蛋白抗体(1:400)、PAF1 抗体(5 μg/ml) 孵育, 洗涤, 再以 HRP 偶联的第二抗体作用, 反应信号经 ECL 底物(Pierce 公司) 化学发光检测。

7. Western 印迹分析 Smads 蛋白表达、磷酸化与核转位: 同上方法 TGF-1 与 SA-B 温育细胞 24h, MEM 培养液洗涤细胞 2 次, 再以含相同浓度 TGF-1 及 SA-B 的无血清 M199 温育细胞 15 min。加以低盐溶液(20 mmol/L HEPES pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L NaVO₄, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, 0.2 % NP-40, 10 % 甘油, 1 mmol/L PMSF), 冰浴溶解 10 min, 离心(8 000 r/min, 2 min, 4 °C), 收集上清即为胞质蛋白。继以高盐溶液(低盐溶液加上 420 mmol/L NaCl, 20 % 甘油, 减去 NP-40) 重悬细胞, 冰浴 30 min, 同上离心获取上清, 即为核蛋白。测定胞质与核蛋白的总蛋白浓度, 取 50 μg 总蛋白样本经 12 % SDS-PAGE 电泳, 转移至硝酸纤维素膜, 分别与以下第一抗体孵育: Smad 2 (1.25 μg/ml)、Smad 3 (2.5 μg/ml)、P-Smad 2 (1:200), 同上方法进行 Western 印迹分析。

8. Northern 印迹分析 I 型前胶原 mRNA 水平: 同上方法 TGF-1 与 SA-B 温育细胞 24 h。RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 取 15 μg 经 1 % 琼脂糖变性凝胶电泳, 转移至尼龙膜上, 杂交液中 42 °C 预杂交 30 min, 而后加入^[32P]-dCTP 标记的 1(I) 胶原 cDNA 探针 42 °C 杂交过夜。杂交膜经 0.2 × SSC / 0.2 % SDS 洗涤后, X 线片曝光。以煮沸的 0.5 % SDS 洗脱杂交膜上探针, 再以^[32P]-dCTP 标记的-actin cDNA

(看家基因) 探针杂交。

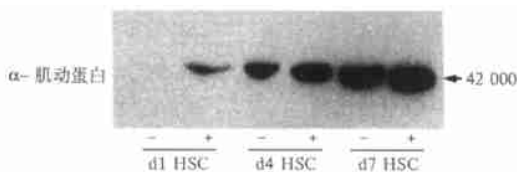
三、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用方差分析。

结 果

一、体外培养过程中 HSC 表型改变及 TGF-1 的影响

原代培养 1 d 时, HSC 呈圆形, 胞内富含脂滴, -肌动蛋白表达极少, 处于静止状态。原代培养 7 d 天时, 细胞胞体伸展, 胞内脂滴减少, -肌动蛋白表达明显, 呈活化形态。而培养 4 d 的细胞则处于两者之间, 为中间活化状态。TGF-1 明显刺激不同活化状态 HSC 的-肌动蛋白表达, 但以静止与中间活化状态细胞较为明显。培养 4 d 与 7 d 比培养 1 d 的 HSC 胶原基础分泌量显著增加, 而 TGF-1 刺激后, 培养 1 d、4 d 与 7 d HSC 胶原分泌分别增加 128.6 %、207.7 % 与 188.2 %, 以培养 4 d 细胞的增加最显著。故以下实验采用 TGF-1 刺激培养 4 d 的中间活化状态 HSC 为细胞模型(图 1, 表 1)。



注: - 示空白对照; + 示 100 pM TGF-1

图 1 TGF-1 对原代培养 1 d~7 d HSC -肌动蛋白表达的影响 (Western 印迹)

表 1 TGF-1 对原代培养 1 d~7 d HSC 胶原分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	^[3H] 脯氨酸 (dpm/孔)	% (TGF-1 组/对照组)
d1 HSC 对照组	6	804 ± 274	
TGF-1 组	6	1 200 ± 708	129 ± 89
d4 HSC 对照组	6	2 966 ± 1 701	
TGF-1 组	6	6 160 ± 1 123 **	208 ± 38
d7 HSC 对照组	6	2 580 ± 767	
TGF-1 组	6	4 583 ± 1 467 *	188 ± 68

注: 与相应对照组比较, $F = 13.81, 5.65; P < 0.01, * P < 0.05$ (单因素方差分析)。(两因素方差分析, TGF-1 与培养时间交互作用, $F = 0.77, P > 0.05$; TGF-1, $F = 4.38, P < 0.05$; 培养时间, $F = 43.83, P < 0.01$)

二、SA-B 对 HSC 增殖的影响

0.1 mmol/L 与 1 mmol/L SA-B 组见少量细胞浮起死亡, 细胞内^[3H]胸腺嘧啶掺入量仅为正常组的 17.9 % 与 12.7 %, 呈一定毒性作用。而 0.1 μmol/L ~ 10 μmol/L SA-B 对细胞形态无影响, 细

胞内³H]胸腺嘧啶掺入量分别为正常组的 76%、60.1%与 47.8%，均有显著抑制作用，故以下实验用 0.1 μmol/L ~ 10 μmol/L SA-B (表 2)。

表 2 SA-B 对原代培养 4 d HSC 内³H]胸腺嘧啶掺入的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	cpm/孔	SA-B/正常组(%)
正常组	4	9 627 ±943	100
SA-B 0.1 μmol/L	4	7 320 ±481 *	76 ±5
SA-B 1 μmol/L	4	5 785 ±617 *	60 ±6
SA-B 10 μmol/L	4	4 605 ±869 *	48 ±9
SA-B 0.1 mmol/L	4	1 720 ±569 *	18 ±6
SA-B 1 mmol/L	4	1 218 ±479 *	13 ±5

注：与正常组比较，*q* 分别为 6.751、11.251、14.689、23.128、24.595，**P* < 0.01

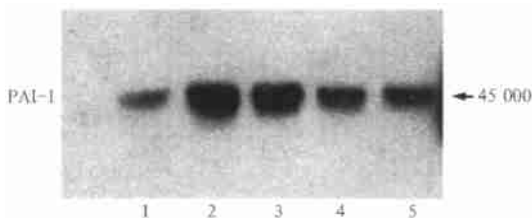
三、SA-B 对 TGF-1 刺激 HSC 胶原蛋白分泌与 PAF-1 蛋白表达的影响

TGF-1 明显促进培养 HSC 胶原分泌与 PAF-1 表达，1 ~ 10 μmol/L SA-B 浓度依赖性明显抑制 TGF-1 的促胞外基质生成作用。但与细胞增殖抑制作用不同的是 0.1 μmol/L SA-B 对基质蛋白生成无明显影响(表 3, 图 2)。

表 3 SA-B 对 TGF-1 刺激原代培养 4 d HSC 胶原蛋白分泌的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	[³ H]脯氨酸(dpm/孔)	SA-B/对照组(%)
正常组	6	3 079 ±1 357	
对照组	6	6 080 ±1 018	100
SA-B 0.1 μmol/L	6	5 988 ±1 368	97 ±22
SA-B 1 μmol/L	6	4 225 ±853 *	69 ±14
SA-B 10 μmol/L	6	3 456 ±1 377 **	56 ±22

注：与正常组比较，*q* = 5.736，*P* < 0.01；与对照组比较 *q* = 3.546、5.016，**P* < 0.05，***P* < 0.01

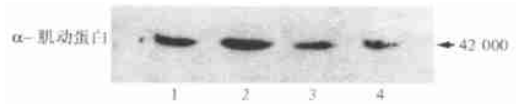


注：1, 正常组；2, 对照组(100 pmol/L TGF-1)；3, 0.1 μmol/L SA-B 组；4, 1 μmol/L SA-B；5, 10 μmol/L SA-B

图 2 SA-B 对 TGF-1 刺激原代培养 4 d HSC 的 PAF-1 蛋白表达的影响(Western 印迹)

四、SA-B 对 TGF-1 刺激 HSC α-肌动蛋白表达的影响

TGF-1 显著促进 HSC 表达 α-肌动蛋白，1 μmol/L ~ 10 μmol/L SA-B 则明显浓度依赖性抑制这种病理性刺激的细胞 α-肌动蛋白表达(图 3)。

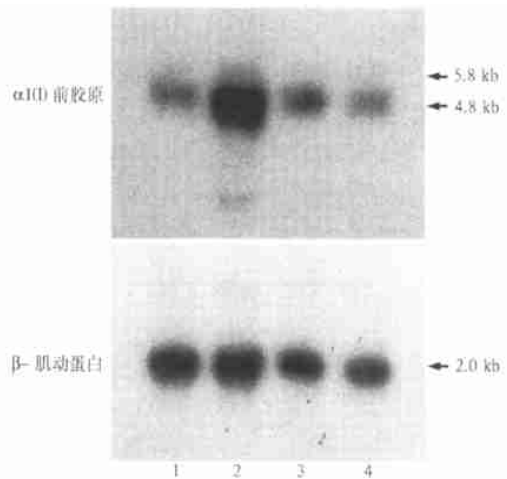


注：1, 正常组；2, 对照组(100 pmol/L TGF-1)；3, 1 μmol/L SA-B；4, 10 μmol/L SA-B

图 3 SA-B 对 TGF-1 刺激原代培养 4 d HSC α-肌动蛋白表达的影响(Western 印迹)

五、SA-B 对 TGF-1 刺激 HSC 的 I 型前胶原 mRNA 水平的影响

TGF-1 至少 5 倍增加 HSC 的 I 型前胶原基因表达水平，1 μmol/L ~ 10 μmol/L SA-B 明显抑制 TGF-1 刺激的细胞胶原基因表达，几乎恢复到基础水平(图 4)。



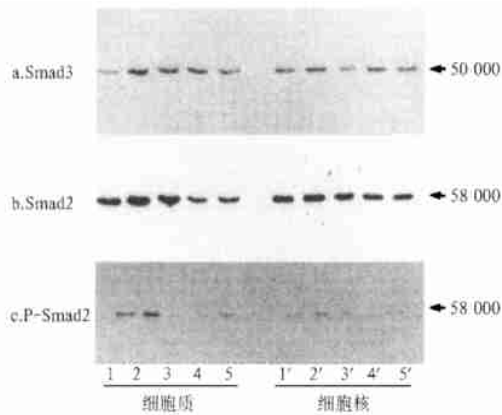
注：1, 正常组；2, 对照组(100 pmol/L TGF-1)；3, 1 μmol/L SA-B；4, 10 μmol/L SA-B

图 4 SA-B 对 TGF-1 刺激原代培养 4 d HSC 之 I 型前胶原 mRNA 表达的影响(Northern 印迹)

六、SA-B 对 TGF-1 刺激 HSC 的 Smad2/3 蛋白表达、磷酸化与核转位的影响

Smad2/3 抗体检测反映磷酸化与未磷酸化的总蛋白水平，相应磷酸化抗体则反映 Smad 蛋白的磷酸化水平。由于 Smad2/3 磷酸化后向核内转位，因此，Smad2/3 核内磷酸化水平可反映其核转位。TGF-1 不同程度促进 HSC 胞质与核内 Smad2/3 总蛋白，明显增加 Smad2 胞质与核内磷酸化水平。1 μmol/L ~ 10 μmol/L SA-B 剂量依赖性抑制 TGF-1 刺激的胞质内 Smad2/3 蛋白表达，不同程度抑制其核内表达，而明显抑制 Smad2 胞质内磷酸化及其核转位水平

(图 5)。



注:a. 胞质与核内 Smad3 总蛋白;b. 胞质与核内 Smad2 总蛋白;c. 胞质与核内磷酸化 Smad2 蛋白;1,1': 正常组;2,2': 对照组(100 pmol/L TGF-1);3,3': 0.1 μmol/L SA-B 组;4,4': 1 μmol/L SA-B 组;5,5': 10 μmol/L SA-B 组
图 5 SA-B 对 TGF-1 刺激原代培养 4 d HSC 之 Smad2/3 胞质与胞核内蛋白表达及磷酸化的影响(Western 印迹)

讨 论

生理状况下,位于肝窦的 HSC 处于静止状态,主要贮存维甲酸。肝损伤后,HSC 发生活化,其主要特征变化包括^[13]:(1)细胞表型转变为肌成纤维样细胞,肌性骨架蛋白如 α -肌动蛋白表达增多。(2)细胞增殖旺盛。(3)细胞生成胶原等胞外基质的能力明显增强,生成胶原酶活化抑制物 PAF1 也明显增多,使胶原酶活性下降。这些变化使肝脏胞外基质生成增加而降解减少,最终导致肝脏胶原沉积与纤维化。

TGF-1 具有抑制生长、促进细胞分化与胞外基质生成等多种作用,是肝纤维化发生的重要促进因子,以自分泌与旁分泌两种方式促进 HSC 活化^[14]。HSC 在无包被的塑料培养皿上培养,可自发活化,与体内肝纤维化过程相似^[8]。对不同病理生理状态的细胞,TGF-1 作用并不一致。我们与其他研究者发现^[15,16],TGF-1 抑制静止状态 HSC 增殖,但对活化 HSC 的增殖无明显作用。虽然 TGF-1 对不同阶段 HSC 的活化与基质蛋白生成均有促进,但以中间活化状态细胞最为敏感。自分泌 TGF-1 也是活化 HSC 的一个重要特点^[8],有助于维持活化的持续。观察发现^[15,17],随着细胞活化,HSC 自分泌 TGF-1 逐渐增加,外源性 TGF-1 刺激细胞胞外基质生成的增幅下降,可能因为完全活化 HSC 内源性 TGF-1 较高,对外源性 TGF-1 反应下降。因而,我们选用对 TGF-1 应答最为敏感的中间活化 HSC 为细胞模型,

研究药物对 TGF-1 刺激 HSC 活化的干预作用,及影响其胞内信号转导的作用机理。

实验发现,SA-B 剂量依赖性抑制血清刺激的中间活化状态 HSC 的增殖,提示药物可抑制 HSC 活化。而且 SA-B 明显抑制 TGF-1 刺激 HSC 的 α -肌动蛋白与 PAF1 表达,抑制细胞胶原分泌与 I 型胶原基因表达,均呈一定剂量依赖性,表明 SA-B 能有效拮抗 TGF-1 对 HSC 的促基质蛋白生成效应。

TGF-1 生物效应的发挥必须通过特定的信号转导过程,该过程已基本明了^[18]。TGF-1 胞外激活后,与其胞膜上特异性受体(TGF-1 type I/II receptor, T R-I/II)结合,继而主要由 Smads 蛋白介导胞内信号传递。Smads 分为 3 类:(1)受体调控型,与 TGF-1 信号转导相关的是 Smad2/3;(2)共同型,主要是 Smad4;(3)抑制型,Smad7 等。Smad2/3 是 T R-I 型受体胞内激酶的特异性底物,经受体激酶磷酸化后与 Smad4 结合,转位细胞核内,调控细胞目的基因表达,在 TGF-1 胞内信号转导中起关键作用。已有研究证实 HSC 中存在 TGF-1/Smads 信号转导通路^[16,18]。我们实验中发现,TGF-1 促进 HSC 胞内 Smad2/3 蛋白表达总量,尤其是促进 Smad2 胞质与核内的磷酸化水平,与其促进 HSC 活化与胞外基质表达作用相一致,进一步证实 HSC 中存在 TGF-1/Smads 信号转导通路。而 SA-B 拮抗 TGF-1 刺激的 HSC 胞内 Smad2/3 蛋白表达,尤其是 Smad2 的磷酸化与核转位,该作用与药物拮抗 TGF-1 刺激的 HSC 胞外基质生成作用相平行,提示 SA-B 影响 TGF-1 刺激 HSC 活化与抗肝纤维化的主要机理在于抑制 Smad2/3 蛋白的表达、磷酸化与核转位,干扰 TGF-1 在 HSC 胞内的信号转导。

体内 TGF-1 往往以潜在无活性形式存在,其完整的信号转导过程包括细胞外活化、跨膜与胞内转导等三个方面,本实验虽已了解 SA-B 干预 HSC 胞内 TGF-1 信号转导的部分重要作用,但是对于药物是否影响 TGF-1 胞外激活与 HSC 信号跨膜,是否影响 HSC 胞内其他信号分子等等,尚需进一步研究,以期系统明确 SA-B 干预 HSC 中 TGF-1 信号转导的抗肝纤维化关键作用机理。

参 考 文 献

- 1 王祯苓. 丹参治疗慢性肝炎的临床应用及实验研究现状. 中西医结合杂志, 1985, 5: 509-510.
- 2 马学惠, 赵元昌, 赵敏岐, 等. 丹参对肝重吸收的作用. 中西医结合杂志, 1988, 8: 161-163.
- 3 Wasser S, Ho JMS, Ang HK, et al. *Salvia miltiorrhiza* reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. J Hepatol, 1998, 29:

760-771.

- 4 黄谕森,张均田. 丹参中三种水溶性成分的体外抗氧化作用. 药理学学报,1992,27:96-100.
- 5 胡义扬,刘平,刘成,等. 丹参提取物对 CCl₄ 和 DMN 诱导的大鼠肝纤维化的影响. 上海中医药杂志,1999,10:7-10.
- 6 Liu P, Hu YY, Liu C, et al. Clinical observation of salvianolic acid B in the treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. World J Gastroenterol, 2002, 8:679-685.
- 7 刘成海,胡义扬,刘平,等. 转化生长因子 1 与肝纤维化. 中华肝脏病杂志, 1996, 4: 51-54.
- 8 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem, 2000, 275: 2247-2250.
- 9 赵俊芳,刘成,刘成海. 转化生长因子 胞内信号转导与 Smads 蛋白. 中国病理生理杂志,2002,18:321-325.
- 10 Friedman SL, Roll FJ. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. Anal Biochem, 1987, 161: 1233-1247.
- 11 Batto MB, Frederick JP, Pan L, et al. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor β -mediated signal transduction. Mol Cell Biol, 1999, 19: 2495-2504.
- 12 Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF 1 and TGF 3. Am J Physiol, 1999, 276: L814-L824.
- 13 Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. N Eng J Med, 1993, 24: 1828-1835.
- 14 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor and the liver. Hepatology, 2001, 34: 859-867.
- 15 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, et al. Modulation of transforming growth factor response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. Hepatology, 2000, 31: 1094-1106.
- 16 Chenghai Liu, Gaca MDA, Reiss M, et al. Differences in TGF β signaling between quiescent and activated hepatic stellate cells. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(Suppl): A254.
- 17 Bachman MG, Meyer D, Melchior R, et al. Activation of rat perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells: a potential mechanism on self-perpetuation in liver fibrogenesis. J Clin Invest, 1992, 89: 19-27.
- 18 Massague J. TGF β signal transduction. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 753-791.

(收稿日期:2002-04-19)
(本文编辑:徐弘道)

病例报告

纯词聋一例

韦立功 卢成岛

患儿女,13岁。因听不懂他人说话3周就诊。患儿于3周前某日晨起突然发病,只听到母亲叫唤声,听不懂母亲的吩咐。当日到校上课时听不懂老师讲课,下课后也不理解同学的问话,未能进行正常的言语交流。但可听到上下课铃声、桌椅移动声、汽车喇叭声。病后神志无异常,无头痛、呕吐、眼花、耳鸣,穿衣、洗漱、饮食、体力等生活如常。3年前曾患过“脑炎”,6个月前曾跌伤头颅。病前无不适,正常上学,但成绩较差。家族无特殊病史。体格检查:神志清醒,步态正常,五官端正,心肺腹及神经系统检查无异常。外耳道、鼓膜、咽无异常。视力正常。表声试验、音叉试验正常。电测定双耳听力正常。头颅CT检查:左颞、顶叶片状低密度灶,边缘欠清,余无异常。脑干诱发电位:、波潜伏期及-峰间期延长。就诊时,可听到问话声,但不能理解言语内容,答非所问,不能复述,无法询问病史。通过书面提问,可完全理解询问内容,回答正确、完整。自发语言正常,无空话、错话。阅读理解和临摹书写正确,计算数值无误。命名测试正确,能指出所问物品名称。可判断关门声、击掌声、喇叭声。嘱作语言交流训练,未作其他治疗。随访1年余,患儿辍学,症状无改善。

讨论 纯词聋(pure word deafness)亦称听词语失认,是一种少见的听言语理解障碍,主要特征为选择性听言语理解受损,无外周听力障碍,可识别非词语声音,仅对语言声音听失认,不能理解和复述口头言语,却能正确阅读及理解文字语言,自发谈话正常。本例患儿突出症状为不能理解和复述他人口头语言,而自发语言功能正常,阅读和理解文字语言无误,非语言声音辨别准确,而仅对口头语言听失认,临床可除外听失认、皮质聋、经皮质感觉性失语,符合纯词聋诊断。

纯词聋首先由 Kussmaul 于 1877 年描述,近一个世纪以来,国外文献报道不足百例,国内报道极少,临床罕见。患者多为成年男性,儿童患者尚未见报道。本病为中枢神经疾患,但病变部位尚存争议。或认为病灶位于左侧后颞叶深部;或认为受损部位大部分为颞叶,某些病变在顶叶、基底节或侧脑室外侧。症状为病灶周围血流量降低或水肿波及颞叶所致;也可能与双侧半球损害关系更密切。发病机制目前亦未定论,离断综合征学说认为,由于 Wernicke 区与输入纤维的离断或该区被孤立的结果;语言感知缺陷理论指出,可能为一般的听觉特有的听觉加工过程和音位过程的混合性受损。有关纯词聋的病理部位及发病机制尚无统一认识,有待发现更多的病例,进行深入的研究。

(收稿日期:2002-04-12)
(本文编辑:高健)

作者单位:530700 广西都安县人民医院儿科

