

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2019 年 7 月 8 日 第 27 卷 第 13 期 (Volume 27 Number 13)



13 / 2019

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议、开放获取和在线出版的学术刊物。本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录。

目次

2019年7月8日 第27卷 第13期 (总第633期)

述评

- 791 肛周脓肿三间隙引流术的理论基础及临床应用进展
张心怡, 金黑鹰

基础研究

- 798 miR-183调控Wnt/ β -catenin信号通路影响胃癌SGC-7901细胞生物学特性的研究
张希成, 沈金根, 贾正我, 钱丽芬, 孙元龙
- 807 表达持续活化型ALK3抑制大鼠肝星状细胞活化
石慧, 柳长柏, 肖和杰
- 814 长链非编码RNA MALAT1在大肠癌中的表达及其临床意义: 基于多基因表达数据库分析
倪雅懿, 薛丽华, 张培, 朱广博

临床研究

- 822 异丙酚和依托咪酯复合瑞芬太尼对老年食管白斑胃镜下治疗患者呼吸功能及应激的影响分析
李新鹏, 王世民

文献综述

- 828 嗜酸性粒细胞性食管炎诊疗进展
郑璞, 谭煌英
- 835 基于膳食结构的非酒精性脂肪性肝病动物模型
曾庆敏, 李嘉
- 842 他克莫司治疗炎症性肠病的最新进展
王静静, 范一宏

消 息

- 797 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
806 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事
813 《世界华人消化杂志》修回稿须知
834 《世界华人消化杂志》正文要求
850 《世界华人消化杂志》栏目设置

封面故事

卡世全, 主任医师, 教授, 兰州市第一人民医院消化科主任医师, 西北民族大学医学院兼职教授, 甘肃省消化协会HP学组成员, 全国疑难及重症肝病攻关协作组成员, 全国疑难及重症肝病攻关协作组第三届全国委员, 全国肝胆病咨询专家, 《中国医学创新》杂志编委、审稿人, 《世界消化病杂志》编委、审稿人. 发表学术论文50篇, 发表出版专著2部, 发明国家专利2项, 主持参与省级科研攻关项目5项, 曾获甘肃省医学科技二等奖一项, 兰州市人民政府科技进步二等奖及三等奖各一项. 从事消化专业的卡世全主任医师, 35年来坚守临床一线, 重视学术思想, 视病人为亲人, 在消化及肝病治疗上做出较大的贡献. 经过多年大量临床观察及探索研究, 有他牵头与兰州燕滨扶正有限责任公司共同研制的调节免疫治疗乙肝肝硬化新药——燕滨扶正胶囊, 已获得国家卫生部门批准文号, 进入临床观察使用.

本期责任人

编务 李香; 送审编辑 崔丽君; 组版编辑 刘继红; 英文编辑 王天奇; 形式规范审核编辑部主任 马亚娟; 最终清样审核总编辑 马连生

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 2019-07-08

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科
王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑委员会

编辑委员会成员在线名单, 详见:

<https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

编辑部

马亚娟, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<https://www.baishideng.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部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.

定价

每期136.00元 全年24期3264.00元

© 2019 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 27 Number 13 Jul 8, 2019

EDITORIAL

- 791 Three-cavity clearance for perianal abscess: Theoretical basis and progress in clinical application
Zhang XY, Jin HY

BASIC RESEARCH

- 798 MiR-183 affects biological behaviors of gastric cancer SGC-7901 cells by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway
Zhang XC, Shen JG, Jia ZW, Qian LF, Sun YL
- 807 Stable expression of constitutively activated ALK3 suppresses rat hepatic stellate cell activation
Shi H, Liu CB, Xiao HJ
- 814 MALAT1 gene expression in colorectal cancer and its clinical significance: Data mining based on multiple gene expression databases
Ni YY, Xue LH, Zhang P, Zhu GB

CLINICAL RESEARCH

- 822 Effect of anesthesia with propofol plus remi-fentanil vs etomidate plus remifentanil on respiratory function and stress in elderly patients with esophageal leukoplakia treated by gastroscopy
Li XP, Wang SM

REVIEW

- 828 New developments in diagnosis and treatment of eosinophilic esophagitis
Zheng P, Tan HY
- 835 Diet-induced animal models of nonalcoholic fatty liver disease
Zeng QM, Li J
- 842 Advances in research of tacrolimus for treatment of inflammatory bowel disease
Wang JJ, Fan YH

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 27 Number 13 Jul 8, 2019

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Ka shi-quan, Chief physician, professor, First People's Hospital of Lanzhou, No. 1th, Wu Homeland, Qilihe District, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Indexed/Abstracted by

Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstract Journals, Scopus, CNKI, CSTJ and Superstar Journals Database.

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Li-Jun Cui* Electronic Editor: *Ji-Hong Liu* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Proof Editor: *Ya-Juan Ma* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date July 8, 2019

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

EDITORIAL BOARD MEMBERS

All editorial board members resources online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

EDITORIAL OFFICE

Ya-Juan Ma, Director

World Chinese Journal of Digestology

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-85381892
Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 136 Yuan for each issue
RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2019 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

表达持续活化型ALK3抑制大鼠肝星状细胞活化

石 慧, 柳长柏, 肖和杰

石慧, 海南医学院第一附属医院消化内科 海南省海口市 570000

石慧, 柳长柏, 三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室 湖北省宜昌市 443000

石慧, 柳长柏, 肖和杰, 三峡大学肝病研究所 湖北省宜昌市 443000

石慧, 主治医师, 讲师, 主要从事消化系统疾病尤其是肝病临床及基础研究.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, No. 81070348.

作者贡献分布: 主要实验、数据分析及文章起草由石慧完成; 课题设计、文章修改与审阅由柳长柏与肖和杰完成.

通讯作者: 柳长柏, 教授, 443000, 湖北省宜昌市大学路8号, 三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室. 295489660@qq.com

收稿日期: 2019-03-20

修回日期: 2019-06-19

接受日期: 2019-06-25

在线出版日期: 2019-07-08

Stable expression of constitutively activated ALK3 suppresses rat hepatic stellate cell activation

Hui Shi, Chang-Bai Liu, He-Jie Xiao

Hui Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570000, Hainan Province, China

Hui Shi, Chang-Bai Liu, Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy of Hubei Province, Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China

Hui Shi, Chang-Bai Liu, He-Jie Xiao, Institute of Liver Diseases, China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070348.

Corresponding author: Chang-Bai Liu, Professor, Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy of Hubei Province,

Three Gorges University, No. 8 University Road, Yichang 443000, Hubei Province, China. 295489660@qq.com

Received: 2019-03-20

Revised: 2019-06-19

Accepted: 2019-06-25

Published online: 2019-07-08

Abstract

BACKGROUND

Hepatic fibrosis is related to activation of hepatic stellate cells (HSCs) and epithelial mesenchymal transformation (EMT), in which transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) plays a pivotal role, but bone morphogenetic protein-7 (BMP7) can antagonize TGF- β 1. Currently, the TGF- β /BMPs-Smad signaling pathway is a hot topic of research in this field. ALK3 belongs to the constitutively activated type I receptor of BMPs, and its role in the molecular mechanism of hepatic fibrosis is rarely studied.

AIM

To detect the expression of Samd1, P-Smad1, and fibrosis-related genes E-cadherin, α -SMA, and col1A2 in cultured rat HSCs (HSC-T6) to investigate how BMP-7 antagonizes TGF- β 1 in the development of liver fibrosis and its anti-hepatic fibrosis mechanisms.

METHODS

After HSCs-T6 were transfected with constitutively active cDNA construct expressing ALK3, RT-PCR method was used to screen the cell line with stable ALK3 expression and detect the mRNA level of col1A2. MTT assay was used to examine the proliferation of HSC-T6 cells with high expression

of ALK3. Western blot method was used to detect the expression of Smad1, P-Smad1, E-cadherin, α -SMA, and col1A2. Optic microscopy was used to detect the morphological changes of HSC-T6 cells with high expression of ALK3.

RESULTS

Compared with control cells, ALK3 high expression restrained the growth of HSC-T6 cells, suppressed the expression of α -SMA and col1A2, promoted the expression of P-Smad1 and E-cadherin, but had no significant effect on Samd1.

CONCLUSION

BMP-7 competitively antagonizes TGF- β 1 induced fibrosis by enhancing the phosphorylation of Samd1.

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Bone morphogenetic protein 7; Smad1; P-Smad1; Hepatic stellate cells

Shi H, Liu CB, Xiao HJ. Stable expression of constitutively activated ALK3 suppresses rat hepatic stellate cell activation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2019; 27(13): 807-813

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i13/807.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i13.807>

摘要

背景

肝纤维化与肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)上皮细胞间充质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)相关, TGF- β 1在其中起着重要的作用, 而BMP7能够拮抗TGF- β 1, 目前主要研究的是TGF- β /BMPs-Smad信号通路, ALK3属于BMPs的持续活化 I 型受体, 在肝纤维化分子研究机制中较少运用。

目的

观察大鼠HSCs中稳定表达持续活化型ALK3时 Smad1磷酸化及纤维化相关基因E-cadherin、 α -SMA、col1A2等表达情况, 探讨BMP-7信号转导在肝纤维化发生发展过程中拮抗TGF- β 1信号及其抗肝纤维化机制。

方法

建立体外培养大鼠HSCs (HSC-T6)持续活化型ALK3的稳定表达细胞株, MTT检测细胞的增殖; RT-PCR检测col1A2等相关分子mRNA水平; Western blotting检测Samd1、E-cadherin、 α -SMA、col1A2蛋白表达和Smad1磷酸化; 显微镜下观察细胞形态。

结果

稳定表达持续活化型ALK3的HSC-T6细胞增殖受到抑制, Smad1磷酸化显著升高, α -SMA, col1A2表达下调, E-cadherin表达上调。

结论

BMP-7信号转导通过增强Samd1的磷酸化而拮抗TGF- β 1致纤维化作用, 抑制大鼠HSCs的活化。

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 骨形成蛋白7; Smad1; 磷酸化Smad1; 肝星状细胞

核心提要: 利用BMP-7 I 型受体的持续性活化突变基因真核表达载体, 建立稳定高表达持续活化型BMP-7 I 型受体ALK3细胞株。无需BMP-7刺激, 持续活化型ALK3即可激活下游信号通路, 证实BMP-7信号转导通过增强Samd1的磷酸化而拮抗TGF- β 1致纤维化作用, 抑制大鼠肝星状细胞的活化, 从而逆转肝纤维化, 解决临床上肝硬化难以逆转的问题, 挽救早期肝硬化患者。

石慧, 柳长柏, 肖和杰. 表达持续活化型ALK3抑制大鼠肝星状细胞活化. *世界华人消化杂志* 2019; 27(13): 807-813

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i13/807.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i13.807>

0 引言

在肝纤维化发生发展过程中由于慢性炎症刺激肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)被活化, 由静止的储脂细胞转变成肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)并合成分泌大量纤维化相关因子和胶原蛋白^[1]。TGF- β 1在肝纤维化病理发展过程中发挥着极其重要的作用, BMP-7是TGF- β 超家族成员之一, 许多研究表明BMP-7能够拮抗TGF- β 的促纤维化作用, 在肝纤维化进展过程中, BMP-7表达水平被逐渐下调^[2]。

ALK3属于BMPs的持续活化 I 型受体, 无需BMP-7与BMP-7 II 受体结合, 磷酸化细胞内相关信号蛋白Smad1/5/8, 磷酸化Smad1/5/8进而结合Smad4转移至细胞核并诱导下游靶基因表达。本实验利用BMP-7 I 型受体的持续性活化突变基因真核表达载体pcDNA3-HASL-ALK3(QD)转染大鼠HSCs株(HSC-T6), 建立稳定高表达持续活化型BMP-7 I 型受体ALK3细胞株。无需BMP-7刺激, 持续活化型ALK3即可激活下游信号通路, 探讨持续活化型ALK3对HSC-T6的影响, 探讨活化BMP-7信号通路抗肝纤维化分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠HSCs、DH5 α 大肠杆菌为三峡大学肝病研究所保存; 真核表达载体pcDNA3-HASL-ALK3(QD)质粒由日本东京大学宫园浩平教授惠赠; 限制性核酸内切酶、Taq DNA聚合酶、dNTP、RevertAidTM M-MuLV逆转录试剂盒购自美国Fermentas公司; DNA纯化试剂盒为QIAGEN公司产品; LipofectamineTM 2000和Trizol试剂为美国Invitrogen公司产品; 小鼠Samd1单克隆抗体、兔抗山羊P-Smad1多克隆抗体、山羊抗兔E-cadherin多克隆抗体、兔抗山羊col1A2多克隆抗体均为Santa Cruz Biotechnology公司产品; 小鼠 α -SMA单克隆抗体为Sigma公司产品; 辣根过氧化物酶标记兔抗山羊、山羊抗兔、羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥公司; ECL化学发光检测试剂为GE Healthcare公司产品, MTT及培养基DMEM购自美国Sigma公司; 寡聚核苷酸引物由上海生工技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代: 本实验所用的细胞株大鼠HSCsHSC-T6置于含10%小牛血清及1%青霉素/链霉素的培养液DMEM, 37 °C 5% CO₂培养箱中培养。细胞传代方法: 弃去旧的培养液, 用3 mL PBS洗2次后, 每瓶500 μ L 1%胰蛋白酶消化细胞1 min; 用3 mL细胞完全培养液终止消化并将细胞悬液转入15 mL离心管中, 800 rpm离心3 min, 弃上清液; 细胞用培养液重悬后, 以1:3的比例传代。

1.2.2 重组质粒鉴定: 用重组质粒pcDNA3-HASL-ALK3转化E.coli DH5 α 感受态细胞, 用含0.1 g/L氨苄青霉素的琼脂糖培养平板进行筛选, 挑取阳性单克隆菌落扩增培养, 提取质粒并用EcoRI/XhoI进行双酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒纯化后送上海生工生物工程有限公司测序。测序结果用DNAMAN与GenBank序列比对无误。

1.2.3 建立稳定高表达持续活化型ALK3受体的HSC-T6细胞株: 大鼠HSC-T6在转染前1 d传代, 长至细胞融合约80%, 转染前1 h换为无血清无双抗的DMEM培养液孵育。应用LipofectamineTM 2000试剂法用纯化的重组质粒pcDNA3-HASL-ALK3转染HSC-T6细胞, 同时转染空载质粒pcDNA3.1作为对照。37 °C 5% CO₂培养箱孵育4-6 h后更换为DMEM完全培养液培养, 培养24 h后换为浓度800 μ g/mL Neomycin的完全培养液进行筛选, 2-3 d更换一次培养液, 待细胞克隆形成后, 挑取单克隆细胞进行扩大培养。

1.2.4 RT-PCR法筛选稳定表达持续活化型ALK3的HSC-T6细胞株: 分别收集稳定转染重组质粒pcDNA3-HASL-ALK3及空载质粒pcDNA3.1的HSC-T6细胞, 提取

细胞总RNA, 经DU730紫外分光光度仪检测在260 nm处的吸光度值, A260nm/A280nm比值均介于1.8-2.0之间, RNA琼脂糖凝胶电泳28 S、18 S和5 S条带清晰可见, 表明抽提的RNA较完整, 未见明显降解。提取的总RNA经逆转录合成cDNA第一链, 并以合成的cDNA为模板进行PCR反应。col1A2上游引物: 5'-TGGTCTTACTGGGA ACTTTG-3', 下游引物: 5'-CCGTTTGTCCGGGCTCAC CA-3'; col3A1上游引物: 5'-GTTCTGTAATATGGAAAC CGGAG-3', 下游引物: 5'-CAAGGACATCTTCAGGAA GATC-3'; col4A2上游引物: 5'-CTGGACCCAAAGGAC AACC-3', 下游引物: 5'-ACGGGTCCAGGGTCTCCT-3'; E-cadherin上游引物: 5'-CTCGTGGCTTTGTCAGCA-3', 下游引物: 5'-GACCCAGTCTCGTTTCTG-3', α -SMA上游引物: 5'-GTGTGAAGAGGAAGACAG-3'下游引物: 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGC-3', 以GAPDH为内参照, 上游引物: 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3', 下游引物: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3', PCR循环条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30个循环后, 72 °C 5 min结束扩增。PCR产物于1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并在凝胶扫描仪下观察记录结果。获得稳定高表达持续活化型ALK3的细胞株命名为CA-ALK3-T6, 稳定转染空载体质粒细胞株命名为Vector-T6。

1.2.5 Western blotting法检测稳定表达持续活化型ALK3对HSC-T6细胞的影响: 收集并裂解细胞提取总蛋白, 用BCA试剂盒蛋白定量后进行SDS-PAGE分离蛋白, 采用湿转法将蛋白质转移至PVDF膜上, 1%脱脂奶粉封闭过夜后, 分别用小鼠Samd1单克隆抗体(1:800稀释)、兔抗山羊P-Smad1多克隆抗体(1:800稀释)、山羊抗兔E-cadherin多克隆抗体(1:1000稀释)、兔抗山羊col1A2多克隆抗体(1:800稀释); 小鼠 α -SMA单克隆抗体(1:1000稀释)和小鼠抗大鼠 β -actin单克隆抗体(1:4000稀释)孵育2 h, TBST洗膜10 min/次3次, 再分别用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(1:4000稀释), 兔抗山羊IgG(1:8000稀释)和羊抗小鼠IgG(1:5000稀释)孵育1 h, TBST洗膜3次(10 min/次), 采用ECL增强化学发光法检测结果。

1.2.6 MTT法检测稳定表达持续活化型ALK3对HSC-T6细胞株增殖的影响: 以 2×10^4 个/ml的细胞密度, 接种于96孔板中, 100 μ L/孔; 待细胞完全贴壁后, 加入MTT(200 μ g/mL, 无血清DMEM培养基配制), 37 °C继续孵育4 h, 去除培养基后每孔加入150 μ L的DMSO, 室温摇床振荡充分溶解结晶, 全自动酶标仪570 nm波长测定各孔吸光度(OD)值, 并以此检测时间点为0 h。用同样的方法测定细胞培养24、48、72 h各时间点的OD值, 以各时间点的

OD值与0 h OD值的比值反映细胞增殖的速度。

统计学处理 应用SPSS 13.0进行分析, 数据以mean ± SD表示, 样本均数比较采用*t*检验, 同一药物不同浓度组间采用单因素方差分析进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达持续活化型ALK3受体对HSC-T6细胞形态的影响 倒置相差显微镜下, 对照组Vector-T6细胞呈单层生长, 细胞间连接疏松, 细胞伪足多呈星形, 胞质薄而透明, 核椭圆; 而CA-ALK3-T6细胞连接紧密, 细胞成多角形或蝌蚪形, 胞质饱满, 核圆大(图1)。

2.2 稳定表达持续活化型ALK3受体对HSC-T6细胞生长增殖的影响 为观察稳定表达持续活化型ALK3受体后对HSC-T6细胞生长增殖的影响, 我们采用MTT法检测了稳定表达持续活化型ALK3对HSC-T6细胞增殖的影响(图2)。与0 h相比, 当培养24 h CA-ALK3-T6细胞和Vector-T6细胞增殖倍数分别为1.5和2.6倍; 当培养48 h, 对Vector-T6细胞增殖倍数为4.3倍, 而CA-ALK3-T6细胞为1.7倍($P < 0.05$); 随着时间的延长, CA-ALK3-T6细胞增殖速度较对照细胞要慢($P < 0.05$)。因此稳定表达持续活化型ALK3受体后可抑制HSC-T6细胞的活化增殖, 并且具有时间依赖性。

2.3 半定量RT-PCR检测稳定表达持续活化型ALK3受体HSC-T6细胞 α -SMA、col1A2等基因表达水平 分别收集CA-ALK3-T6细胞和Vector-T6细胞, 提取总RNA, 经逆转录合成cDNA, 并以其作为模板进行RT-PCR反应。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪下观察记录结果(图3)。电泳结果显示, 与阴性对照组Vector-T6细胞相比, CA-ALK3-T6细胞株 α -SMA、col1A2、col3A1、col4A2 mRNA表达水平明显下调, 而E-cadherin水平上调。

2.4 Western blotting检测稳定表达持续活化型ALK3受体HSC-T6细胞BMP信号转导相关蛋白 我们进一步检测了稳定表达持续活化型ALK3受体HSC-T6细胞BMP信号转导及纤维化相关蛋白表达, 培养CA-ALK3-T6细胞和Vector-T6细胞, 分别收集细胞并提取细胞总蛋白, 进行Western blotting分析。与阴性对照细胞株Vector-T6相比, CA-ALK3-T6细胞P-Smad1磷酸化水平明显上升、E-cadherin表达水平上调, α -SMA, col1A2蛋白表达下降, Smad1蛋白水平未见明显改变。以 β -actin作为内参照, 凝胶成像系统成像(图4)。

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段,

是由各种致病因子引起肝脏损伤和炎症, 产生多种细胞因子刺激多种细胞发生上皮-间充质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT), 产生大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)并在肝脏沉积, 近年来, EMT参与肝纤维化被日渐提出, 但肝脏中EMT的发生机制尚不完全明确。肝纤维化过程中发生EMT的最主要细胞为HSCs, HSCs活化增殖是肝纤维化发生发展的中心环节^[3]。Yu等^[4]也提出HSCs的激活是肝纤维化的一个关键事件, 被认为是EMT过程。EMT主要表现为细胞间粘附削弱, E-cadherin等上皮细胞分子标记表达下调, 间质细胞标志分子如 α -SMA表达上调, 典型的细胞外基质成份如I、III、VI型胶原蛋白分泌增加^[5]。因此如何抑制上皮间质转化是治疗肝纤维化重要策略之一。

TGF- β 参与HSCs发生EMT, 直接或间接引起肝肌成纤维细胞的增加^[6]。BMP-7是一分子大小35KD的分泌性同源二聚体蛋白, 属于TGF- β 超家族成员之一^[7]。BMP-7受体是一种跨膜丝/苏氨酸激酶受体, BMP-7首先与II型受体结合, II型受体的蛋白激酶被激活, 再与I型受体结合, 形成异源二聚体, 催化I型受体GS区的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化。I型受体被激活后, 作用于Smad1、Smad5或Smad8的C端SSXS模体, 使其磷酸化, 再与Smad4形成复合物, 进入核内与多种转录因子相互作用发挥基因调控作用^[8]。BMP-7基因表达不足也是纤维化进展的重要原因之一^[9]。Zeisberg等^[7]在慢性肾纤维化小鼠模型中高表达BMP-7能有效拮抗TGF- β 1诱导的上皮间质转化。研究还显示, BMP-7通过影响TGF- β 1信号通路的下游蛋白—Smads蛋白来阻断其信号转导^[10]。

本文运用真核表达载体pcDNA3-HASL-ALK3(QD)建立稳定表达持续活化型ALK3受体的大鼠HSCs株(CA-ALK3-T6)。实验结果显示, 持续活化型ALK3高表达可使大鼠HSCs形态趋向静止化, 抑制大鼠HSCs活化增殖, 进一步观察发现, BMP7信号通路下游信号分子Smad1磷酸化增加、上皮细胞标志分子E-Cadherin表达水平上调; 同时, 间质细胞标志物 α -SMA以及I型胶原mRNA及蛋白表达水平下降, III、IV型胶原蛋白的mRNA水平下降。说明在大鼠HSCs中BMP-7信号通路的持续活化可逆转HSCs活化, 抑制TGF- β 1诱导的上皮间质转化和肌成纤维细胞增殖; 减少ECM的分泌, 从而改善肝纤维化。Yu等^[4]研究发现, 在肝纤维化过程中, MEG3在体内和体外均有降低, MEG3过表达导致肝纤维化的抑制, 减少 α -SMA和I型胶原蛋白。MEG3过表达通过EMT抑制HSC激活, 与上皮标记物增加和间充质标记物减少有关。由此可见EMT是HSC激活致肝纤维化过程的关键环节。王丽惠等^[11]研究发现TGF- β 1刺激HSC-T6后细胞形态发生变化, 伪足增多呈星形, 细胞

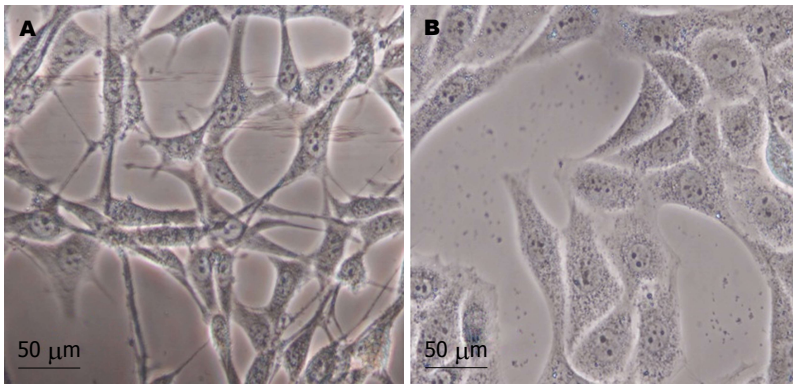


图 1 倒置相差显微镜下观察细胞形态. A: Vector-T6细胞; B: CA-ALK3-T6细胞($\times 400$).

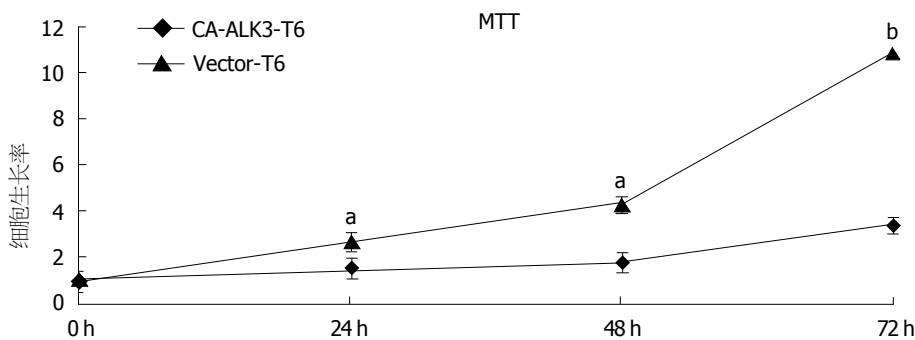


图 2 MTT法检测稳定表达持续活化型ALK3受体对HSC-T6细胞增殖的影响(mean \pm SD, $n = 3$). ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$, 与CA-ALK3-T6对比.

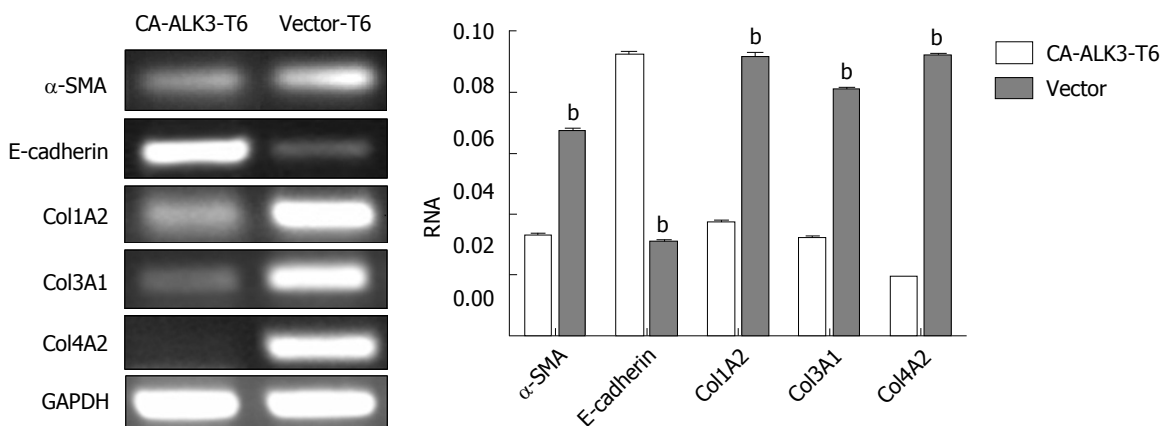


图 3 RT-PCR检测稳定表达持续活化型ALK3受体HSC-T6细胞相关基因表达. CA-ALK3-T6: 稳定表达持续活化型ALK3受体HSC-T6细胞株; Vector-T6: 转染pcDNA3.1空质粒HSC-T6细胞株. ^b $P < 0.001$, 与CA-ALK3-T6比较.

间连接呈疏松状态, 呈现活化生物学特征. 本实验研究通过倒置显微镜观察发现, BMP-7信号通路持续活化导致大鼠HSCs的形态学失去活化形态特征而趋向静止化变化.

肝纤维化传统上被认为是一个不可逆转的过程, 但以上本研究显示了BMP-7信号转导可抑制TGF- β 1信号通路的致纤维化效应, 为BMP-7成为治疗肝纤维化的关键靶点奠定基础. 有望以激活BMP-7信号转导为靶点来探索、开发抗肝纤维化药物并应用到临床.

文章亮点

实验背景

虽然随着人们生活水平的提高及乙肝疫苗接种, 我国乙型肝炎发病率逐年降低, 但是酒精性及丙型肝炎引起的肝硬化却并不少见, 研究数据显示, 感染人员就诊者不足1/3, 简直是冰山一角, 长期不管理的结果便是肝硬化甚至迅速进展至肝癌, 肝硬化是各种慢性肝病的晚期阶段, 治疗效果差, 且耗费大量资源, 慢性乙型病毒性肝炎

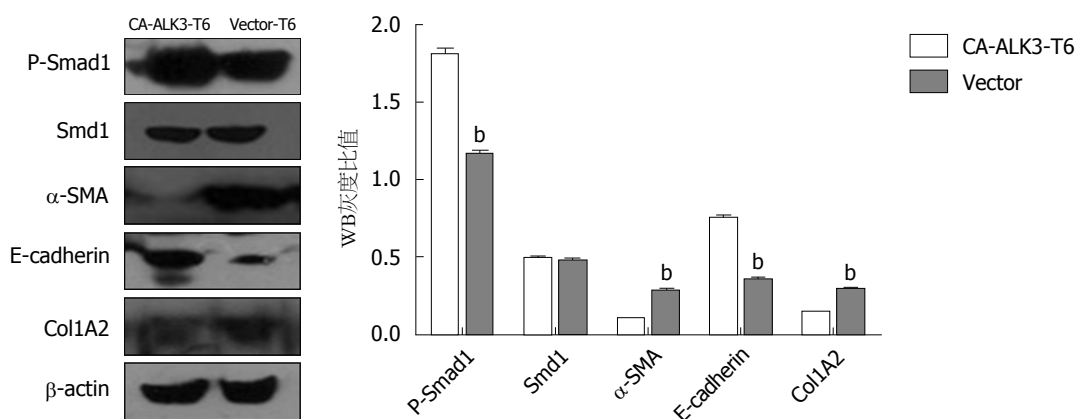


图 4 Western blotting方法检测相关蛋白水平表达. CA-ALK3-T6: HSC-T6转染重组质粒pcDNA3-HSAL-ALK3稳定表达细胞; Vector-T6: HSC-T6转染空载质粒对照细胞株. ^b $P < 0.001$, 与CA-ALK3-T6比较.

临床治愈(珠峰)工程项目、国家“十二五”传染病重大专项等课题对于肝硬化的研究及治疗有巨大的贡献,但目前仍未研究出并适用临床的有效逆转肝硬化方法.

实验动机

拟通过探讨肝硬化分子发生机制找到逆转的肝硬化关键靶点.

实验目标

本实验观察到通过研究BMP7及下游信号通路抑制肝纤维化与肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)能逆转肝硬化核心细胞HSCs.

实验方法

倒置相差显微镜、MTT、半定量PCR、western-blotting.

实验结果

本文实验研究达到我们预期的结果,印证了肝纤维化分子发生发展机制,我们观察到持续活化的HSCs增殖受到抑制,并且向未活化方向逆转,探索了其中的分子机制,磷酸化的smad1水平显著升高,α-SMA和I型胶原蛋白表达下调,而E-cadherin表达上调.本研究提示BMP7有望成为肝纤维化的分子治疗靶点.

实验结论

本研究采用持续活化型ALK3的新方法,进一步探索了肝纤维化分子发病机制,观察到肝纤维化关键细胞HSCs活化有逆转,进一步印证BMP7有望成为肝纤维化分子治疗靶点,为将来肝纤维化的治疗提供新的契机.

展望前景

本实验采取成熟的实验方法,提出了我们的观点,但通过评审专家的意见确实有些忽略之处,会吸取经验教训,使实验更加严谨,本研究未来研究方向是动物模型的研究,未来研究方法的最佳方法仍主要以分子生物学研究方法为主.

4 参考文献

- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250 [PMID: 10644669 DOI: 10.1074/jbc.275.4.2247]
- Yue HY, Yin C, Hou JL, Zeng X, Chen YX, Zhong W, Hu PF, Deng X, Tan YX, Zhang JP, Ning BF, Shi J, Zhang X, Wang HY, Lin Y, Xie WF. Hepatocyte nuclear factor 4alpha attenuates hepatic fibrosis in rats. *Gut* 2010; 59: 236-246 [PMID: 19671543 DOI: 10.1136/gut.2008.174904]
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99 [PMID: 16563223 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00292.x]
- Yu F, Geng W, Dong P, Huang Z, Zheng J. LncRNA-MEG3 inhibits activation of hepatic stellate cells through SMO protein and miR-212. *Cell Death Dis* 2018; 9: 1014 [PMID: 30282972 DOI: 10.1038/s41419-018-1068-x]
- Weiskirchen R, Meurer SK, Gressner OA, Herrmann J, Borkham-Kamphorst E, Gressner AM. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14: 4992-5012 [PMID: 19482601 DOI: 10.2741/3583]
- Fabregat I, Caballero-Díaz D. Transforming Growth Factor-β-Induced Cell Plasticity in Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Front Oncol* 2018; 8: 357 [PMID: 30250825 DOI: 10.3389/fonc.2018.00357]
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9: 964-968 [PMID: 12808448 DOI: 10.1038/nm888]
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J.

- Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994; 37: 341-347 [PMID: 8047140 DOI: 10.1038/370341a0]
- 9 Zeisberg M. Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 568-573 [PMID: 16373388 DOI: 10.1093/ndt/gfk010]
- 10 Wang S, Hirschberg R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 23200-23206 [PMID: 15047707 DOI: 10.1074/jbc.M311998200]
- 11 王丽惠, 程变巧, 朱琪, 林伟国. TGF- β 1诱导大鼠肝星状细胞系HSC-T6活化及上皮间质转换. *基础医学与临床* 2017; 37: 1257-1262 [DOI: 10.3969/j.issn.1001-6325.2017.09.12]

编辑: 崔丽君 电编: 刘继红



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2019 Baishideng Publishing Group Inc.
All rights reserved.

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期发回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、荷兰《医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等国外相关文摘与检索系统收录.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<https://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

