

TGF- β 1 和 smad4mRNA 在慢性肝炎、肝硬化、肝癌旁组织的表达及意义

廖丹, 罗光汉, 吴继周, 江建宁, 黄钰全

廖丹, 罗光汉, 吴继周, 江建宁, 广西医科大学第一附属医院传染科
广西壮族自治区南宁市 530027

黄钰全, 广西医科大学第一附属医院病理科
广西壮族自治区南宁市 530027

廖丹, 女, 1969-01-30 生, 广西省柳州市人, 壮族. 2003 年广西医科大学
传染病学硕士研究生毕业, 现广西中医学院仁爱分院肝病科主治医师, 主要从
事病毒性肝炎基础及临床研究.

项目负责人: 江建宁, 530027, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一
附属医院传染科. jining@yahoo.uk.cn

电话: 0771-3103903 传真: 0771-3103903

收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-27

Expression of TGF- β 1 and smad4 mRNA in chronic hepatitis, liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and para-cancerous tissues, and their significance

Dan Liao, Guang-Han Luo, Ji-Zhou Wu, Jian-Ning Jiang,
Yu-Quan Huang

Dan Liao, Guang-Han Luo, Ji-Zhou Wu, Jian-Ning Jiang, Department
of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical
University, Nanning 530027, China

Yu-Quan Huang, Department of Pathology, The First Affiliated Hospital,
Guangxi Medical University, Nanning 530027, China

Correspondence to: Jian-Ning Jiang, Department of Infectious Diseases,
The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530027,
Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. jining@yahoo.uk.cn

Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-07-27

Abstract

AIM: Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling pathway is involved in a variety of important cellular regulative functions, including cell growth, differentiation, adhesion migration, extracellular matrix formation and immune regulation. The study was aimed to evaluate the relationship and mechanism of transforming growth factor β 1 protein and smad4 mRNA in formation and development of fibrosis by detecting the expression of transforming growth factor β 1 protein and smad4 mRNA in liver biopsy of chronic virus hepatitis, hepatocirrhosis and para-cancerous tissues.

METHODS: In situ hybridization and immunohistochemistry were used in 10 cases of normal liver tissue, 17 cases of para-cancerous tissues, 70 cases of chronic virus hepatitis and hepatocirrhosis.

RESULTS: Increased expression of TGF- β 1 and smad4 mRNA in the intermediate degree of chronic virus hepatitis and hepatocirrhosis; the positive rates of TGF- β 1 and smad4 mRNA were obviously higher in the chronic virus hepatitis and hepatocirrhosis (83.3%, 87.0% and 87.5%,

87.0%) than those in the normal liver (20.0%, 20.0%), the expression of TGF- β 1 and smad4 mRNA had a significant relationship between the intermediate degree of chronic virus hepatitis, hepatocirrhosis and the normal liver ($^{b3}P < 0.01$, $\chi^2 = 12.3980$; $^{b4}P < 0.01$, $\chi^2 = 14.0609$; $^{b1}P < 0.01$, $\chi^2 = 14.6953$; $^{b2}P < 0.01$, $\chi^2 = 14.0609$); the expression of TGF- β 1 and smad4 mRNA in para-cancerous tissues were significantly lower than that in the chronic virus hepatitis and hepatocirrhosis, as compared with the normal liver; the expression of TGF- β 1 and smad4 mRNA reached the highest level at the stage S3, and decreased slightly at the stage S4, with positive relevance ($\chi^2 = 4.5064$, $P = 0.0336$, $r = 0.2668$), in which most of the positive cells were distributed surroundings of portal tract, central vein, and the sinus.

CONCLUSION: TGF- β /smad pathway plays a significant role in formation and development of hepatic fibrosis, and the localization of TGF- β 1 and smad4mRNA in hepatic tissue section can be used to evaluate accurately situation and tendency of hepatic fibrosis.

Liao D, Luo GH, Wu JZ, Jiang JN, Huang YQ. Expression of TGF- β 1 and smad4mRNA in chronic hepatitis, liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and para-cancerous tissues, and their significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(9):2091-2094

摘要

目的: 转化生长因子TGF- β 1信号转导通路具有重要的细胞调节功能, 包括细胞的生长、分化、黏附、转移、细胞外基质的形成及免疫调节等. 通过检测慢性病毒性肝炎、肝硬化、肝癌旁病理组织 TGF- β 1 和 smad4mRNA 的表达, 探讨TGF- β /smad 通路在肝纤维化形成、发展中的关系及作用机制.

方法: 应用免疫组化和原位杂交方法, 对照肝组织 10 例, 肝癌旁肝组织 17 例, 慢性病毒性肝炎肝硬化肝穿组织 70 例的 TGF- β 1 蛋白和 smad4mRNA 表达进行检测.

结果: TGF- β 1 和 smad4mRNA 在慢性病毒性肝炎中度及肝硬化组织中的表达明显增强, 阳性率分别为 83.3%, 87.0% 和 87.5%, 87.0%, 明显高于对照组 (20.0%, 20.0%), 差异均有显著性 ($^{b3}P < 0.01$, $\chi^2 = 12.3980$; $^{b4}P < 0.01$, $\chi^2 = 14.0609$; 和 $^{b1}P < 0.01$, $\chi^2 = 14.6953$; $^{b2}P < 0.01$, $\chi^2 = 14.0609$); 而癌旁肝组织二者的表达均低下, 与对照组无明显差异; 随着肝纤维化的发展 TGF- β 1 和 smad4mRNA 的表达呈逐渐增强趋势, S3 期达高峰, S4 期有所回落; 二者表达呈正相关 ($\chi^2 = 4.5064$, $P = 0.0336$, $r = 0.2668$); 肝组织病理可见

TGF- β 1和smad4mRNA的阳性细胞在肝组织切片上的分布基本一致,大多集中于汇管区、肝窦及纤维条索周边。

结论: TGF- β /smad信号传导通路在肝纤维化的形成和发展中具有重要的促进作用, TGF- β 1和smad4mRNA的组织定位检测能准确的评价肝纤维化形成状况及发展趋势。

廖丹, 罗光汉, 吴继周, 江建宁, 黄钰全. TGF- β 1和smad4mRNA在慢性肝炎、肝硬化、肝癌癌旁组织的表达及意义. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2091-2094

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2091.asp>

0 引言

转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)是TGF- β 超家族的主要成员,能抑制肝细胞、内皮细胞、上皮细胞的增生,诱导细胞外基质的形成^[1-3]。Smads介导TGF- β 超家族受体到核基因的信号传递,smad4为其通用型smad蛋白,为TGF- β 信号传导通路所必须的下游中介分子^[4-8],TGF- β 信号传导通路对病毒性肝炎肝纤维化的形成和发展有十分重要的作用。关于TGF- β /Smads通路在肝纤维化行程中的机制,国内外学者在培养的肝星状细胞及造模动物上作过研究探讨^[9-13]。我们采用免疫组化和原位杂交方法对10例对照肝组织、17例肝癌癌旁组织、47例慢性病毒性肝炎、23例肝硬化组织进行TGF- β 1和smad4mRNA检测,进一步阐明TGF- β /Smads信号转导通路在肝纤维化形成、发展中的关系及作用。

1 材料和方法

1.1 材料 广西医科大学第一附属医院2001-08/2002-10住院患者97例。肝穿病70例,其中慢性病毒性肝炎轻度23例,男17例,女6例,年龄17-56(平均 34.6 ± 11.9 岁),中度24例,男16例,女8例,年龄21-53(平均 34.9 ± 10.9 岁);肝硬化23例,男22例,女1例,年龄16-65(平均 38.2 ± 13.3 岁),临床诊断按2000年西安会议修订的诊断标准^[14]。同期肝胆外科手术切除肝癌癌旁组织17例,男15例,女2例,年龄29-73(平均 44.2 ± 10.8 岁);手术切除肝囊肿、肝血管瘤、肝破裂等所有病毒学指标阴性的对照肝组织10例,男5例,女5例,年龄27-62(平均 42.1 ± 10.8 岁)。标本均经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,常规HE染色及纤维染色,同时检测肝组织中smad4mRNA及TGF- β 1的表达情况。病理诊断按2000年西安会议修订的诊断标准。TGF- β 1免疫组化染色试剂盒、DPC4(smada4)原位杂交检测试剂盒、DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 TGF- β 1的检测 采用免疫组化染色方法。切片厚度4 μ m。以武汉博士德生物工程有限公司提供的阳性对照片为阳性对照,以PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照。

具体步骤如下:4 μ m厚石蜡切片捞片于POLY-LYSINE预处理后的载玻片上,置烤箱65 $^{\circ}$ C 60 min;脱蜡;梯度乙醇至水;蒸馏水新鲜配置30 mL/L H₂O₂室温放置10 min以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水漂洗2 min 3次;0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液煮沸修复抗原,沸腾后断电,自然冷却;滴加正常山羊血清封闭液室温放置10 min;滴加兔抗TGF- β 1抗原,37 $^{\circ}$ C 60 min,0.1 mol/L PBS洗2 min 3次;滴加生物素化山羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C 20 min,0.1 mol/L PBS洗2 min 3次;滴加SABC37 $^{\circ}$ C 20 min,0.1 mol/L PBS洗5 min 4次;DAB显色8-12 min。光镜下观察染色结果满意后水洗终止,苏木素复染,盐酸乙醇分化,自来水返蓝,凉干,中性树脂封片。浏览全片,由于肝穿组织少而狭长(0.8-1.5 cm \times 0.1 cm),仅显示1-3个汇管区,故选取阳性细胞数最集中的汇管区、肝窦及纤维条索周边等部位,连续观察5个高倍镜视野。TGF- β 1阳性结果^[15]以组织细胞胞质中出现棕黄色颗粒为阳性,阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为+, $< 10\%$ 为-。

1.2.2 smad4mRNA的检测 采用原位杂交检测方法。切片厚度6 μ m,以病毒性肝炎smad4阳性片为阳性对照片,以PBS缓冲液代替杂交液作为阴性对照,具体步骤如下:6 μ m厚石蜡切片捞片于POLY-LYSINE及10 g/L DEPC预处理后的载玻片上,置烤箱65 $^{\circ}$ C 60 min;脱蜡;梯度乙醇至水;30 mL/L柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(10:1),37 $^{\circ}$ C消化30 min,10 g/L DEPC处理的0.5 mol/L PBS洗5 min 3次,10 g/L DEPC双蒸水洗5 min 1次,滴加预杂交液37 $^{\circ}$ C 3 h,滴加杂交液,盖上封口膜41 $^{\circ}$ C孵育大于16 h,杂交后在37 $^{\circ}$ C水浴下依次2*SSC液洗5 min 2次,0.5*SSC液洗15 min 1次,0.2*SSC液洗15 min 1次;滴加封闭液37 $^{\circ}$ C 30 min;滴加生物素化鼠抗地高辛,37 $^{\circ}$ C 60 min,0.5 mol/L PBS洗5 min 4次;滴加SABC-POD 37 $^{\circ}$ C 20 min,0.5 mol/L PBS洗5 min 3次;滴加生物素化过氧化物酶,37 $^{\circ}$ C 20 min,0.5 mol/L PBS洗5 min 4次,DAB显色10-15 min。光镜下观察染色结果满意后水洗终止,苏木素复染,盐酸乙醇分化,自来水返蓝,凉干,中性树脂封片。阳性结果以组织细胞胞质和/或胞核中出现棕黄色颗粒为阳性,阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为+, $< 10\%$ 为-。

统计学处理 两样本率比较用 χ^2 检验, $n < 40$ 时用四格表确切概率法,相关分析用配对计数资料相关分析。

2 结果

肝组织切片smad4mRNA原位杂交及TGF- β 1免疫组化染色显示:肝血管瘤及肝囊肿旁正常肝组织,全片未见阳性染色或局部染色浅淡;(肝硬化)肝组织大部分玻璃样变,全片肝组织细胞明显减少,阳性细胞着色较深;慢性病毒性肝炎中度及肝硬化患者肝穿组织smad4mRNA原位杂交可见汇管区、肝窦及纤维条索附近肝细胞、间质细胞质和/或核棕黄色颗粒,TGF- β 1免疫组化可见汇管区、肝窦及纤维条索附近肝细胞、间质细胞质棕黄色颗粒。

2.1 smad4mRNA 和 TGF-β1 在慢性肝炎中度及肝硬化组织的表达明显高于正常对照组及肝癌旁组, 且二者在肝组织切片中的分布一致, 表明 smad4mRNA 和 TGF-β1 与肝病的临床进展以及肝纤维化的发生密切相关 (见表 1).

表 1 肝组织 smad4mRNA 和 TGF-β1 表达 n (%)

分组	n	smad4mRNA 阳性	TGF-β1 阳性
对照组	10	2 (20.0)	2 (20.0)
肝癌旁组	17	8 (47.1)	5 (29.4)
慢性肝炎轻度	23	15 (65.2) ^a	12 (52.2)
慢性肝炎中度	24	21 (87.5) ^{b1d1}	20 (83.3) ^{b3d3e1}
肝硬化	23	20 (87.0) ^{b2d2}	20 (87.0) ^{b4d4e2}

^aP<0.05, ^bP<0.01, 与对照组比较; ^dP<0.01, 与肝癌旁组比较; ^eP<0.05, 与慢性肝炎轻度比较.

2.2 smad4mRNA, TGF-β1 的表达随着肝纤维化程度的加深而呈逐渐增强趋势, 至 S3 期达高峰, S4 期有所回落, 这与 S4 期肝组织纤维含量增多、肝病静止或回退相关 (见表 2).

表 2 smad4mRNA, TGF-β1 的表达与肝纤维化分期的关系 n (%)

肝纤维化分期	n	smad4mRNA 阳性	TGF-β1 阳性
S0	18	5 (27.8)	7 (38.9)
S1	9	7 (77.8) ^a	6 (66.7)
S2	19	16 (84.2) ^{b1}	12 (63.2)
S3	10	9 (90.0) ^{b2}	9 (90.0) ^{b4}
S4	24	20 (83.3) ^{b3}	20 (83.3) ^{b5}

^aP<0.05, ^bP<0.01, 与 S0 期比较.

2.3 TGF-β1 与 smad4mRNA 阳性表达的相关分析表明, TGF-β1 与 smad4mRNA 之间有正相关关系 ($\chi^2=4.5064$, $P=0.0336$, $r=0.2668$, 见表 3).

表 3 TGF-β1 与 smad4mRNA 阳性表达的相关性

Smad4mRNA	TGF-β1		合计
	+	-	
+	43	14	57
-	11	12	23
合计	54	26	80

3 讨论

TGF-β1 为公认的致肝纤维化最主要的细胞因子之一^[16], 主要由激活的肝库氏细胞、肝星状细胞等以自分泌、旁分泌的形式产生, 可在局部形成高浓度^[17]. TGFβ1 通过与肝星状细胞等细胞膜上的 TGFβ 受体结合, 经细胞内信号传导中介分子 smads 蛋白的传导, 将信息传递给细胞核, 启动基因转录, 从而启动肝脏对炎症损

伤等的修复机制. TGF-β 信号转导基本过程为^[18-20]: TGF-β1 配体与细胞膜受体结合, 激活细胞内 mad(增强子 mother against dpp 的基因产物)类蛋白, 协同多种转录因子, 最终导致目的基因表达. Smads 类蛋白是 TGF-β 信号转导通路中必不可少的中介蛋白, 存在于胞质中, Smad4 为其通用型 Smads(common mediator smad), 他是 TGF-β 族各类信号转导过程中共同需要的递质, 而 Smad4mRNA 是 smad4 蛋白在基因水平的直接反映. 本结果显示, 各临床组之间, 慢性肝炎中度组和肝硬化组 smad4mRNA, TGF-β1 的阳性率显著高于对照组与肝癌旁组, Kitamura *et al*^[21]、Calabrese *et al*^[22] 及国内的宋仕玲 *et al*^[23] 也分别从临床和动物实验论证了肝硬化组织 smad4, TGF-beta1 的表达明显高于正常肝组织. 本肝癌旁组肝硬化比例为 59%, 而 smad4mRNA, TGF-β1 的阳性表达却与正常组无明显差异, 提示癌旁肝组织 smad4mRNA, TGF-β1 的低表达可能受邻近肝癌组织的生物学特性, TGFβR II 的低表达以及 TGFβR II、smads 的基因突变等因素影响有关^[24-29]; 在剔除了肝癌旁组的可能影响后, 我们可以看到随着肝组织纤维化程度的加深, smad4mRNA、TGF-β1 的阳性率逐渐增高, S3 期最高, 发展到 S4 期有所回落, 对肝组织病理切片进行分析可知肝硬化组织胶原纤维含量高, 细胞数相对较少, 加上一些肝硬化组织可能正处于静止期或纤维回退期^[30], 而我们采取原位杂交所检测的 smad4mRNA 应在细胞内表达, 故不是肝纤维化越严重的组织 smad4mRNA 表达就越高. TGF-β1 与 smad4mRNA 阳性表达呈正相关, 病理分析显示 TGF-β1 与 Smad4mRNA 在肝组织切片上的分布基本一致, 阳性细胞大多集中于汇管区、肝窦、及纤维条索周边, 与 Calabrese *et al*^[22] 及梁志清 *et al*^[31] 的研究结果相一致; 表明 TGF-β/Smad 信号通路与胶原纤维生成、沉积、肝纤维化关系密切.

此外, 我们还观察到慢性肝炎肝硬化组 Smad4mRNA 组织细胞胞核阳性率为 25%, 以 S2 期为最高(36%), 提示 S2 期可能为肝纤维化胶原形成最活跃阶段, 对治疗有指导意义, 如在此阶段能抑制 TGF-β1 的活化^[32-34] 或有效干预 TGF-β1mRNA, Smad4 基因(DPC4)的转录^[35-36], 则可延缓肝病的进展.

总之, 细胞因子 TGF-β1 通过 Smads 蛋白引起的信号传导可能是导致肝纤维化发生的主要机制之一, 我们的研究表明 TGF-β1 及 Smad4mRNA 的表达在肝纤维化进程中呈明显增强趋势, 且二者呈正相关, 其组织定位检测能准确地评价肝纤维化形成状况及发展趋势.

致谢: 广西医科大学第一附属医院传染科刘志红、苏明华医师, 肝胆外科全体医务人员(标本收集), 病理科廖永建老师(病理诊断), 广西医科大学医学科学实验中心李佳荃老师(实验过程指导).

4 参考文献

- 1 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
- 2 Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002;71:731-740
- 3 Zimmerman CM, Padgett RW. Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators. *Gene* 2000;249:17-30
- 4 Raftery LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 1995;139:241-254
- 5 Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995;139:1347-1358
- 6 Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:790-794
- 7 Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massague J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 1996;87:173
- 8 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-471
- 9 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001;502:4-10
- 10 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001;187:117-123
- 11 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 2003;278:11721-11728
- 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 Shen H, Huang G, Hadi M, Choy P, Zhang M, Minuk GY, Chen Y, Gong Y. Transforming growth factor-beta1 downregulation of Smad1 gene expression in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G539-546
- 14 中华学会传染病与寄生虫病学会, 肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000;8:324-329
- 15 魏红, 杨竹林, 李永国. 原发和转移性肝癌中 Smad4、TGF-β1 及 TGF-β R1 的表达及意义. *肿瘤防治杂志* 2001;8:133-136
- 16 Zhang LJ, Yu JP, Li D, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:77-81
- 17 Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, Ramm GA. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol* 2002;160:1705-1715
- 18 Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002;296:1646-1647
- 19 Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci* 2000;113:1101-1109
- 20 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113(Pt 7):685-700
- 21 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
- 22 Calabrese F, Valente M, Giacometti C, Pettenazzo E, Benvegna L, Alberti A, Gatta A, Pontisso P. Parenchymal transforming growth factor beta-1: its type II receptor and Smad signaling pathway correlate with inflammation and fibrosis in chronic liver disease of viral etiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1302-1308
- 23 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 实验性大鼠肝纤维化 TGFbeta1 及其受体 mRNA 与 Smad3,7 的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:676-679
- 24 Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sugano Y, Yamashiki N, Nakagawa T, Seki T, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K. Regulatory mechanisms for transforming growth factor beta as an autocrine inhibitor in human hepatocellular carcinoma: implications for roles of smads in its growth. *Hepatology* 2000;32:218-227
- 25 Park do Y, Lee CH, Sol MY, Suh KS, Yoon SY, Kim JW. Expression and localization of the transforming growth factor-beta type I receptor and Smads in preneoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *J Korean Med Sci* 2003;18:510-519
- 26 Yalciner MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18:4879-4883
- 27 Teicher BA. Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20:133-143
- 28 申安, 段全红, 马善符, 孙居胜. smad4 和 TGF-βR II 在肝细胞癌中的表达及意义. *山东医药* 2004;44:3-4
- 29 Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4820-4825
- 30 Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis: morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1599-1607
- 31 梁志清, 徐新宝, 何振平. TGF-β 受体及其信号转导分子 smad4 在大鼠纤维化肝脏的表达及意义. *重庆医学* 2002;31:546-547
- 32 Kondou H, Mushiake 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
- 33 Guo SG, Zhang W, Jiang T, Dai M, Zhang LF, Meng YC, Zhao LY, Niu JZ. Influence of serum collected from rat perfused with compound Biejiaruangan decoction on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1487-1494
- 34 龚作炯, 宋仕玲, 阮鹏, 向龙奎, 张志荣. 血管紧张素转换酶抑制剂对肝纤维化大鼠 TGFbeta, TGFRII, Smad3, 7 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:1132-1135
- 35 徐新保, 冷希圣, 杨晓. 反义 Smad4 基因转染对抗昆明小鼠肝脏纤维化发展的效果观察. *中华普通外科杂志* 2004;19:50-52
- 36 He YT, Liu DW, Ding LY, Li Q, Xiao YH. Therapeutic effects and molecular mechanisms of anti-fibrosis herbs and selenium on rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:703-706