论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0214-06

肝内胆管上皮细胞上皮-间叶转化的实验研究

赵礼金[1,2*],杨日高[3*],程 龙[1],王麦建[2],江 艳[1],余德刚[2],周廷梅[2],王曙光[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所[1];563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院肝胆外科[2];400020 重庆,解放军324医院普外科[3])

[摘要] 目的 观察人肝内胆管上皮细胞(human intrahepatic biliary epithelial cells,HIBEpiC)上皮-间叶转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)现象,探讨EMT在胆管周围纤维化中的作用及其可能的分子机制。**方法** HIBEpiC用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)处理48、72 h后,用PCR及Western blot技术检测E-cadherin、S100A4和α-SMA的表达,以及与EMT信号通路相关的TGF-β1的表达;同时用紫杉醇、siRNA smad2/3阻断TGF-β1的作用,探讨TGF-β1/smad2/3信号通路在HIBEpiC发生EMT时的可能作用。**结果** HIBEpiC经LPS处理后,TGF-β1 mRNA表达于48 h达到高峰,72 h后开始下降,但维持较高水平($P<0.01$,$P<0.05$);EMT标志物E-cadherin mRNA和蛋白表达随培养时间的延长逐渐降低($P<0.01$),而S100A4、α-SMA mRNA及蛋白表达明显上调($P<0.01$,$P<0.05$)。紫杉醇可使HIBEpiC中LPS所诱导的TGF-β1、Smad2/Smad3 mRNA表达明显下降,特别是在48 h最明显($P<0.01$)。用siRNA技术可使Smad2/3 mRNA及蛋白表达明显下调($P<0.01$),同时可使与HIBEpiC共培养EMT标志物E-cadherin mRNA及蛋白质表达上调($P<0.01$,$P<0.05$),S100A4和α-SMA表达明显下调($P<0.01$)。**结论** LPS可诱导HIBEpiC中TGF-β1的表达,使胆管上皮细胞发生EMT,抑制TGF-β1或Smad2/3,可使EMT发生逆转,提示TGF-β1或Smad2/3可能成为预防胆道周围纤维化的一个潜在靶点。

[关键词] 肝内胆管;上皮细胞;表型;脂多糖类;Smad蛋白类;转化生长因子-β1;紫杉醇;RNA, 小分子干扰

[中图法分类号] R-33; R575.702; R394.3 **[文献标志码]** A

Epithelial-mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells

Zhao Lijin[1,2], Yang Rigao[3], Cheng Long[1], Wang Maijian[2], Jiang Yan[1], Yu Degang[2], Zhou Tingmei[2], Wang Shuguang[1] ([1]Department of Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003; [3]Department of General Surgery, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing, 400020, China)

[Abstract] **Objective** To observe the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human intrahepatic biliary epithelial cells (HIBEpiC) and to study its role in bile duct fibrosis and its molecular mechanism. **Methods** Expressions of E-cadherin, S100A4, α-SMA, and EMT signal-related TGF-β1 in HIBEpiC were detected by RT-PCR and Western blotting 48 and 72 h after treatment of HIBEpiC with lipopolysaccharide (LPS). The effect of TGF-β1 was blocked with paclitaxel and siRNA smad2/3. The role of TGF-β1/ smad2/3 signal pathway in the occurrence of EMT in HIBEpiC was studied. **Results** The expression of TGF-β1 mRNA reached its peak and began to decrease 48 and 72 h, respectively, after treatment of HIBEpiC with LPS , and still maintained a rather high level ($P<0.01$, 0.05). The expression level of EMT marker, E-cadherin mRNA and TGF-β1 decreased with the prolongation of culture time ($P<0.01$) while the expression of S100A4, α-SMA mRNA and TGF-β1 significantly increased ($P<0.01$,0.05), suggesting that paclitaxel can down-regulate the LPS-induced expression of TGF-β1, Smad2 and Smad3 mRNA. siRNA could also down-regulate the LPS-induced expression of Smad2/3 mRNA, S100A4, α-SMA and TGF-β1 while up-regulate the expression of E-cadherin and TGF-β1 in HIBEpiC ($P<0.01$), indicating that EMT can be reversed. **Conclusion** LPS can induce expression of TGF-β1 in HIBEpiC, resulting in EMT in biliary epithelial cells, and reverse EMT by inhibiting TGF-β1 or Smad2/3, which may be a potential target for the prevention and treatment of biliary fibrosis.

[基金项目] 贵州省科学技术基金(2009GZ14798)

*: 同等贡献者

[通信作者] 王曙光,电话:(023)68754181,E-mail: sgwang90@yahoo.com

[Key words] bile ducts, intrahepatic; epithelial cells; phenotype; lipopolysaccharides; Smad proteins; transforming growth factor beta 1; paclitaxel; RNA, small interfering

Supported by the Sci & Tech Foundation of Guizhou Province(2009GZ14798). Zhao Lijin and Yang Rigao are the first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Wang Shuguang, Tel: 86-23-68754181, E-mail: sgwang90@yahoo.com

肝胆管结石常伴随胆道的慢性感染[1,2],其特点是胆道上皮细胞的肥大及炎性细胞的浸润。由此所引发的胆汁淤积最终导致复发性细菌性胆管炎,从而形成胆道感染与肝胆管结石之间相互促进的恶性循环,最终引起胆管周围纤维化及继发性胆汁性肝硬化等。在胆汁淤积、细菌或寄生虫感染、原发性硬化性胆管炎等胆道慢性炎症中,人原代肝内胆管上皮细胞(human intrahepatic biliary epithelial cells, HIBEpiC)常暴露于较高水平的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和其他炎症相关细胞因子等,表现出以细胞损伤和继发性增殖为特征的病理变化,这种对损伤的增殖性反应有可能也是并发其他胆道疾病的过程[3]。

胆道感染是肝胆管结石的常见合并症,并被认为与胆管周围纤维化有关。目前上皮-间叶转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)在良性肝胆管病中的作用引起了高度重视。本研究旨在观察感染微环境下胆管上皮细胞的 EMT 现象,探讨其与胆管上皮细胞纤维化的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和试剂盒

抗体 TGF-β1(Santa Cruz 公司), E-cadherin, S100A4(Gen Way 生物公司),p-Smad 2/3(Santa Cruz 公司),α-SMA (Sigma 公司);Smad2/3siRNA(h), Control siRNA(Santa Cruz 公司);紫杉醇(paclitaxel,PT)和 LPS(Sigma 公司),RT-PCR Kit (宝生物工程有限公司, D501A),RIMP1640(Sigma 公司),Trizol(Invitrogen 分司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HIBEpiC(P5100)购于美国 Sciencell Research Laboratories。细胞解冻后,加入 10 倍体积 10% 胎牛血清 RIMP1640 培养基,1 000 ~ 1 500 r/min,离心 5 ~ 10 min。去上清液,加入含 10% 胎牛血清 RIMP1640 培养液, 37 ℃、5% CO_2 培养。于倒置显微镜下观察,选择合适时相进行实验。LPS 浓度选择 2 μg/ml[4],紫杉醇预处理浓度为 10 μmol/L。分别选用 24、48、72 h 时相点进行实验。

1.2.2 RT-PCR 和 Real time-PCR 用 Trizol 试剂盒参照说明提取 HIBEpiC 中的总 RNA,产物用核酸定量仪做定量检测。RT-PCR 扩增,根据 TaKaRa 逆转录试剂盒说明进行逆转录反应,从 GenBank 中检索 E-cadherin、S100A4、α-SMA、TGF-β1 Smad2/3 基因,序列各设计特异性引物引物 1 和引物 2,同时设计内参 β-actin 或 GAPDH,基因引物由上海生工合成,引物序列及反应条件见表 1。同一条件下进行 PCR 扩增,反应体系 20 μl,反应完毕后 PCR 产物与分子量标准同时在含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定,120 V 电泳 20 min,紫外灯下检测扩增片段并拍照。应用 Quantity One 4.4.0 分析软件对凝胶电泳上的 PCR 条带进行光密度值扫描测定,各基因的 PCR 产物各条带灰度值(IOD)与 β-actin 的 PCR 产物条带 IOD 值的比值,至少 6 次扫描结果,取其平均值作为各基因在 HIBEpiC 中表达的相对含量。荧光定量 PCR 反应体系 20 μl:cDNA 模板 1 μl,SYBR GREEN 荧光定量 PCR 试剂 10 μl,上下游引物各 0.5 μl,每个样品均作 3 个复孔,引物序列及反应条件见表 1,实验结果均为 4 次独立重复实验结果。

表 1 引物序列及产物大小

基因	引物序列	温度(℃)	产物大小(bp)
E-cadherin			
RT-PCR	正义链:5′-TCCATTTCTTGGTCTACGCC-3′	53	361
	反义链:5′-CTCGCCGCCTCCGTACATGTC-3′		
Real time-PCR	正义链:5′-GCCCCGCCTTATGATTCTCTGC-3′	53	171
	反义链:5′-CTCGCCGCCTCCGTACATGTC-3′		
S100A4			
RT-PCR	正义链:5′-GACAGGATGTTGACAATGCG-3′	53	250
	反义链:5′-CATTCTTCTGCCTCCTGCAG-3′		
Real time-PCR	正义链:5′-GGCTGCCAACCGGAACAATG -3′	53	250
	反义链:5′-GCAGGCGGCCAATAGTGTCT -3′		
α-SMA			
RT-PCR	正义链:5′-GCTCACGGAGGCACCCCTGAA-3′	58	590
	反义链:5′-CTGATAGGACATTGTTAGCAT-3′		
Real time-PCR	正义链:5′-CGGGCATCCACGAAACCACC-3′	58	154
	反义链:5′-CTGGGTGCGAGGGCTGTGAT-3′		
Smad2/3			
RT-PCR			
Smad2	正义链:5′-TGAACCCTTACCACTACCAG-3′	53	577
	反义链:5′-GCACTATCACTTAGGCACTCG -3′		
Smad3	正义链:5′-CCACCAGATGAACCACAG-3′	53	515
	反义链:5′-GGTAGACAGCCTCAAAGC -3′		
Real time-PCR	正义链:5′-TCCACCAGGCTGTAATCTGAAGA -3′	53	273
	反义链:5′-GACATGCTTGAGCAACTGACT-3′		
β-actin			
RT-PCR	正义链:5′-CCATGTACGTTGCTATCCTGGC-3′	58	289
	反义链:5′-ATCTCTTGCTCGAAGTCCAGGG-3′		
hTGF-β1			
RT-PCR	正义链:5′-CTATCGACATGGAGCTGGTG-3′	53	810
	反义链:5′-TGCGGAAGTCAATGTACAGC-3′		
GAPDH			
Real time-PCR	正义链:5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′	58	159
	反义链:5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′		

1.2.3 RNA 干扰 转染前,胰酶消化细胞收集并计数,2 × 10^5/孔的密度接种于 24 孔板,密度为 80% ~90%,无抗生素 RIMP1640 培养基培养过夜,待细胞融合达 80% 时进行转染(参照 Lipofectamine™2000 的说明书和 Invitrogen 公司脂质体转染程序),24 h 后弃转染液,换含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640

新鲜培养基,继续培养 24 h 后收集细胞。同时转染 Control siRNA 为对照组。采用 PEGFP 共转染检测转染效率。

1.2.4 Western blot 提取总蛋白并测定浓度(BCA 蛋白浓度测定试剂盒:Beyotime Institute Biotednnology 公司)。选用看家基因 β-actin 或 GAPDH,取相同量蛋白用于 2% SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜,一抗 E-cadherin(1∶200)、S100A4(1∶200)、α-SMA(1∶200) 和室温下加入相应的二抗,室温孵育 2 h,洗膜。加入发光试剂 5 min,X 线片曝光显影,扫描分析。每组实验至少重复 3 次,结果用各样品与内参的条带灰度值之比表示。

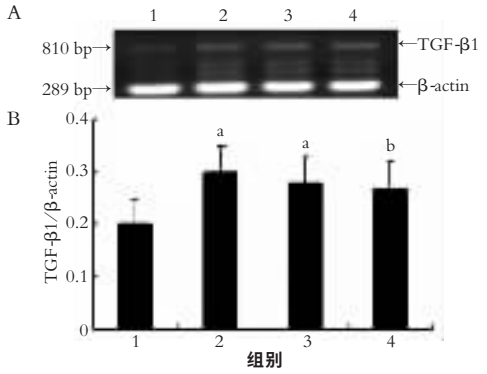
1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 LPS 刺激后 TGF-β1 表达的变化

LPS 刺激 HIBEpiC 24 h 后可测到明显的 TGF-β1 表达,继续培养至 48 h,TGF-β1 mRNA 表达到高峰,72 h 后开始下降,但仍维持较高水平。说明 LPS 可促使胆管上皮细胞 TGF-β1 释放,且在 48 h 释放到高峰($P<0.01$,$P<0.05$,图 1)。因此,以下实验均选用 48、72 h 2 个时相点。



A:电泳结果;B:半定量分析结果($n=4$) 1: LPS 刺激 24 h; 2: LPS 刺激 48 h; 3: LPS 刺激 72 h; 4: LPS 刺激 96 h; a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 LPS 刺激 24 h 比较

图 1 LPS 对 HIBEpiC 中 TGF-β1 mRNA 表达的影响

2.2 LPS 刺激后 E-cadherin、S100A4 和 α-SMA 表达的变化

上皮标志物 E-cadherin mRNA 的表达随培养时间的延长,其表达逐渐降低,在 72 h 时更明显(图 2A,$P<0.01$)。而 S100A4 和 α-SMA 的 mRNA 随培养时间的延长,其表达明显上调(图 2B、C,$P<0.01$),2 个时相点(48、72 h)各标志物的表达无差异($P>0.05$)。Western blot 结果显示,LPS 刺激后,E-cadherin 蛋白表达明显下调(图 3A,$P<0.01$),S100A4 和 α-SMA 蛋白表达明显上调(图 3B、C,$P<0.05$),与其 mRNA 表达水平一致。

2.3 紫杉醇阻断 TGF-β1 后 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 的表达变化

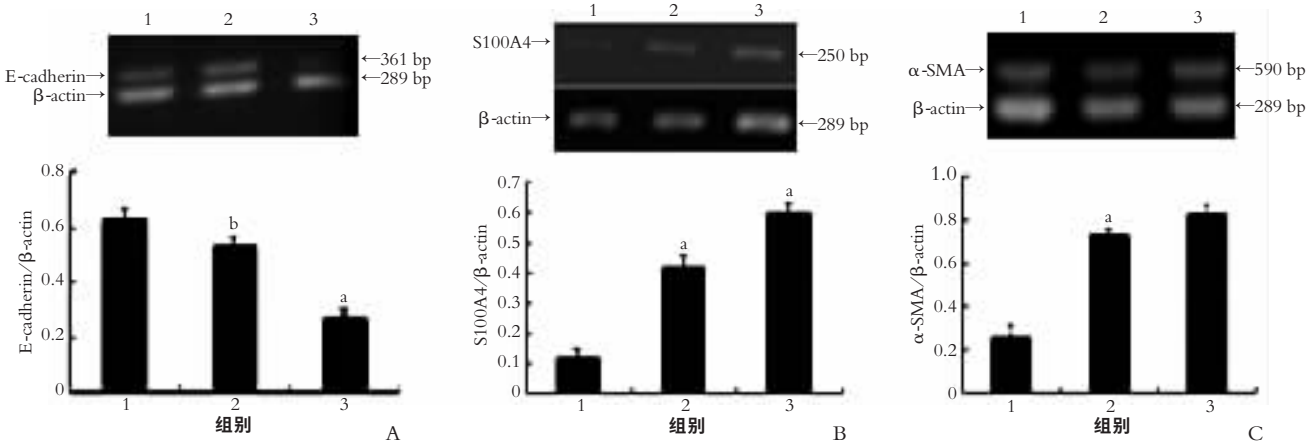
在加入 LPS 的细胞培养基中用紫杉醇预处理后,TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 表达明显下降,特别是在 48 h 最明显($P<0.01$),与处理前相比,分别下降了 60%、36% 和 28%(图 4)。

2.4 siRNA 抑制 Smad2/3 基因表达及其对 EMT 标志物的影响

转染 siRNA Smad2/3 DNA 片段 48 h 后,荧光强度最强,72 h 荧光强度逐渐减弱,细胞转染效率 78%。

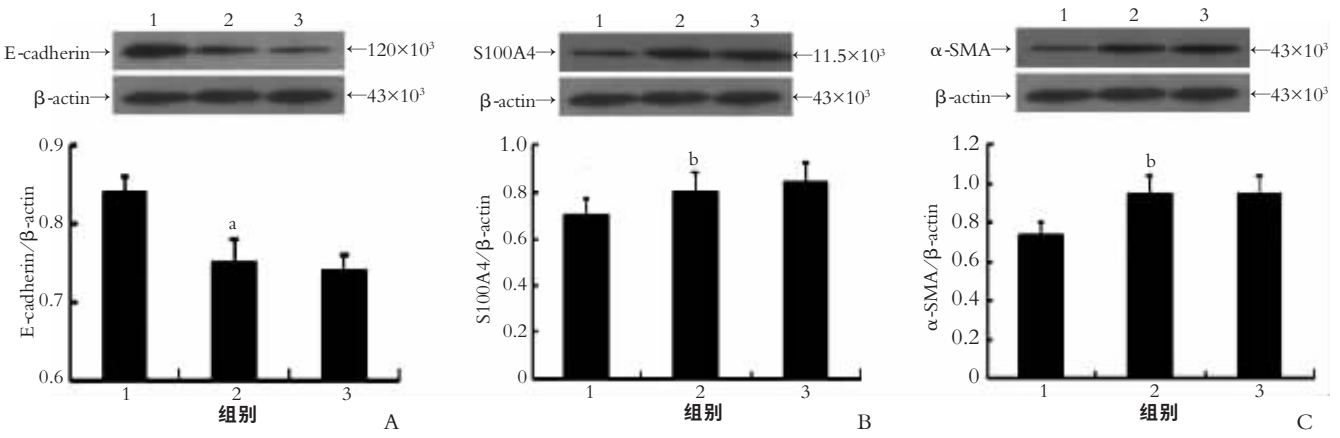
荧光定量 PCR 发现,siRNA Smad2、Smad3 DNA 片段转染的胆管上皮细胞中的 Smad2/3 mRNA 的表达与对照组相比明显下降(图 5A,$P<0.01$),而其上皮标志物 E-cadherin 在转染后表达明显上调,在 48、72 h 分别上调了 64% 和 20%(图 5B,$P<0.01$,$P<0.05$)。间叶标志物 S100A4 和 α-SMA 表达明显下调(图 5B、C,$P<0.01$)。其中以 Smad2/3 基因沉默效果最好,在 2 个时相点转染后,其表达下调 90% 以下。

Western blot 结果示:与干扰以前相比,48、72 h E-cadherin 蛋白表达升高,分别升高了 40%、20%($P<0.01$,$P<0.05$),S100A4 和 α-SMA 表达则下降,在 48 h 分别下降了 20%、35%($P<0.01$),在 72 h S100A4 和 α-SMA 表达分别下降了 21%、44%。48 h 与 72 h 相比,72 h 的 S100A4 和 α-SMA 沉默效果最好($P<0.01$),而 E-cadherin 在 2 个时相点(48、72 h)无显著差异($P>0.05$)。见图 6。



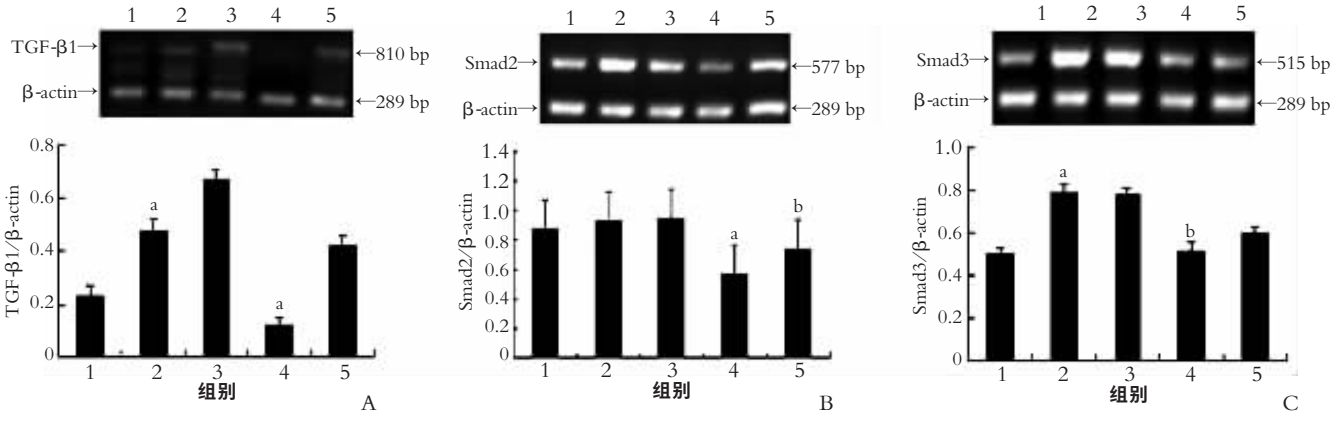
A~C:E-cadherin、S100A4 和 α-SMA 的 RT-PCR 电泳图(上图)及半定量分析结果($n=4$)(下图) 1: 对照组; 2: LPS 刺激 48 h; 3: LPS 刺激 72 h; a:$P<0.01$, 与 LPS 刺激 48 h 比较; b:$P<0.05$,与对照组比较

图 2 LPS 对 HIBEpiC 中 E-cadherin、S100A4 和 α-SMA mRNA 的表达的影响



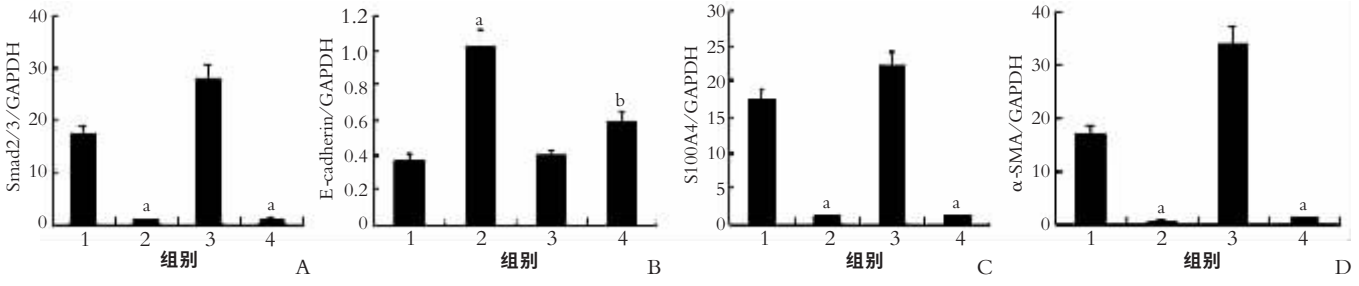
A ~ C:E-cadherin、S100A4 和 α-SMA 的 Western blot 电泳图(上图)及定量分析结果(n =4)(下图)　1:对照组;2:LPS 刺激 48 h;3:LPS 刺激 72 h;a:P <0.01,b:P <0.05,与对照组比较

图 3　LPS 对 HIBEpiC 中 E-cadherin、S100A4、α-SMA 蛋白表达的影响



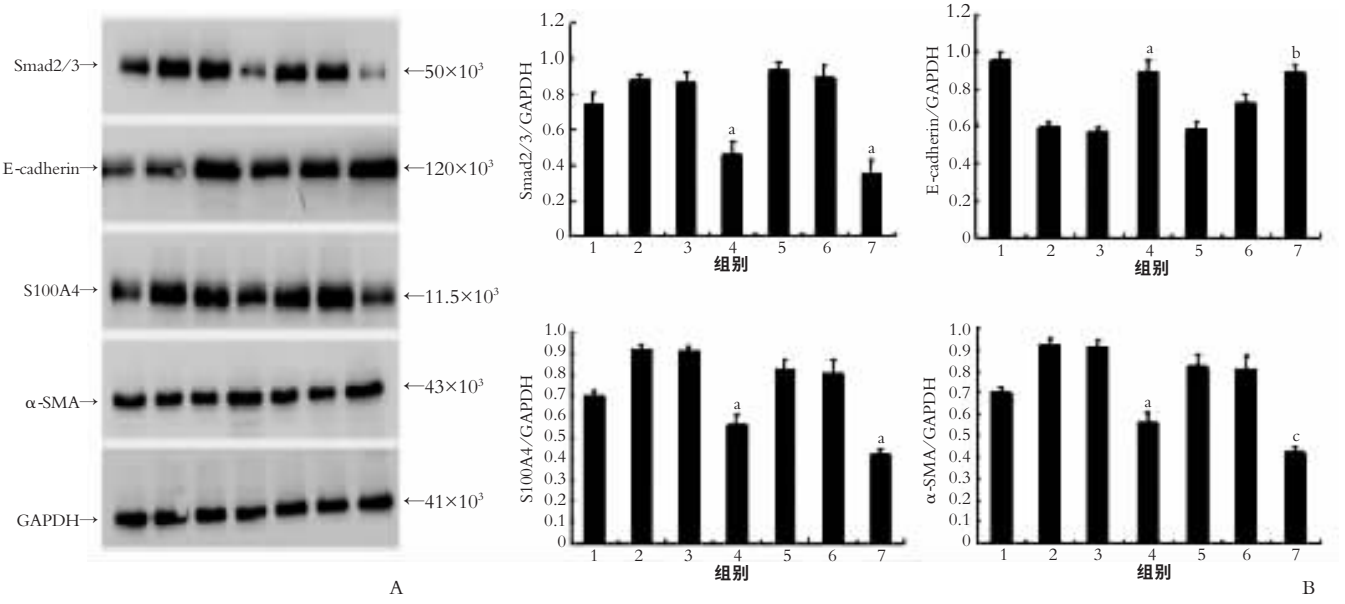
A ~ C:TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA RT-PCR 电泳图(上图)及定量分析结果(n =4)(下图)　1:对照组;2:LPS 刺激 48 h;3:LPS 刺激 72 h;4:LPS-PT 刺激 48 h;5:LPS-PT 刺激 72 h;a:P <0.01,与对照组比较;b:P <0.05,与 LPS 刺激 72 h 比较

图 4　紫杉醇阻断 TGF-β1 后 TGF-β1、Smad2/Smad3 mRNA 的表达变化



A:Smad2/3 mRNA 的表达变化;B:E-cadherin 的表达变化;C:S100A4 的表达变化;D:α-SMA 的表达变化　1:LPS 刺激 48 h 对照组;2:LPS 刺激 48 h Smad2/Smad3 siRNA;3:LPS 刺激 72 h 对照组;4:LPS 刺激 72 h Smad2/Smad3 siRNA;a:P <0.01,与 LPS 刺激 48 h 对照组比较;b:P <0.05,与相应时间点对照组比较

图 5　RNA 干扰抑制 Smad2/Smad3 基因(SiRNA Smad2/3)表达及其对 EMT 标志物的影响(n =4)



A:siRNA 干扰后 Smad2/3、E-cadherin、S100A4 和 α-SMA 蛋白 Western blot 电泳结果;B:半定量分析结果($n=4$) 1:对照组;2:LPS 刺激 48 h 对照组;3:LPS 刺激 48 h 空白对照组;4:LPS 刺激 48 h siRNA smad2/3;5:LPS 刺激 72 h;6:LPS 刺激 72 h 空白对照组;7:LPS 刺激 72 h siRNA smad2/3;a:$P<0.01$,与 LPS 刺激 48 h 空白对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 LPS 刺激 72 h 空白对照组比较

图 6 Western blot 检测 RNA 干扰后 Smad2/3、E-cadherin、S100A4 和 α-SMA 蛋白的表达

3 讨论

肝胆管结石的形成是一个复杂的过程,其发生发展存在着多种因素,胆道感染是导致结石形成的首要因素。胆管结石常伴有胆道纤维化,其机制不详。胆道感染与其解剖学位置有关,细菌经胆胰壶腹逆行进入胆道,主要以革兰阴性菌感染为主。脂多糖(LPS)即革兰阴性菌内毒素(endotoxin),是革兰阴性细菌的细胞壁组成成分,作用于细胞膜受体,通过细胞内信号传递级联使基因表达发生变化,介导内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞、上皮细胞等实质细胞以及单核巨噬细胞激活,诱导炎症前细胞因子合成和释放。用 LPS 刺激胆囊上皮细胞,能使胆囊上皮细胞成纤维细胞标志物的表达[4]。从相关研究中看出,EMT 在胆管病变中可能具有重要的作用。体外培养人肝内肝胆管上皮和 PBC 及肝硬化的有关研究显示,EMT 是普遍的现象[5]。本研究利用 LPS 与人肝内胆管上皮细胞模拟胆道感染的微环境,观察到胆管上皮细胞上皮标识物下调,间叶标识物上调,发生了 EMT。这表明胆管上皮细胞主动参与了胆管周围纤维化的过程,对阐明原发性肝胆管结石的发生、发展具有重要提示意义。

EMT 是一种普遍存在的基本生理和病理现象,其发生机制目前尚不十分清楚。研究证实 TGF-β1 在 EMT 的发生中起着重要的作用[6]。转化生长因子-β(transforming growth factor-beta,TGF-β)是目前公认的最重要的致肝纤维化的细胞因子之一[5],肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs)和受损的肝细胞能自分泌和旁分泌 TGF-β1,使其呈正反馈性增加,从而加重肝纤维化的进程[7]。研究表明 Smads 通路是 TGF-β1 信号转导中最重要的通路。Smad2/Smad3 是 TGF-β1 信号下传的第一个信号分子,在 TGF-β1 生物学效应的发挥中起重要作用[8,9]。E-cadherin 作为上皮标志物,参与介导上皮细胞同质黏附,是细胞黏附、连接的主要组分,其表达下调,可使细胞相互分离,与 EMT 及肿瘤细胞侵袭转移有关[10]。培养人肝内胆管细胞促使其发展成纤维细胞,当培养液中加入 TGF-β,出现 S100A4、α-SMA、纤维蛋白的表达。同时,若干因子能反转 EMT,在肾脏纤维化模型中,BMP-7 能阻断 TGF-β1 的信号传导,从而使肾脏 EMT 反转[11],在体外肝细胞生长因子能逆转 EMT,在结扎的胆管致肝脏纤维化模型中,能减轻肝脏的纤维化[12-14]。在肝移植术后,肝内胆管上皮细胞存在着 EMT 现象,并且用相应的阻断剂能抑制 EMT 发生或转化[15]。这些研究说明在胆道系统中,胆管上皮细胞在特定的环境中(如 LPS 刺激)可以发生 EMT,并且是通过 TGF-β1 smad2/3 信号通路传导的。本研究发现 HIBEpiC 可以通过自分泌 TGF-β1 以调节 HIBEpiC 的反应。增高的 TGF-β1 水平诱导 Smad2/3,导致下游纤维标志物基因及蛋白的表达,并导致细胞外基质的聚集以及最终纤维化的形成。同时 TGF-β1 是细胞通过自分泌或旁分泌作用所释放的纤维蛋白溶酶原因子,它可以刺激 HIBEPIC 分泌细胞因子 TGF-β1,从而启动上皮细胞表型转化的细胞内信号转导通路。

抗肿瘤药物紫杉醇的作用通路与 LPS 诱导的信

号通路重叠,并且 TGF-β1 参与了此通路的信号传导。而 TGF-β1 可拮抗紫杉醇诱导巨噬细胞表达细胞因子的作用[16]。TGF-β 家族通过 Smads 也可以影响微管网状系统。在胆囊上皮细胞培养中加入紫杉醇抗纤维化的作用是通过抑制胆囊上皮下的肌纤维母细胞内 TGF-β1 的释放以及直接阻断 GBMF1 型胶原蛋白的合成等多种渠道,以抑制胆囊壁上皮下层肌纤维母细胞的胶原合成[4]。我们所观察到紫杉醇阻断 TGF-β1 或 siRNA Smad2/3 后,其下游间叶标志物的表达下调,上皮标志物表达上调,导致 EMT 发生逆转。本实验同时还观察到紫杉醇阻断 TGF-β1 后,其下游基因 Smad2/3 下降不是很明显,可能在 TGF-β 与 Smad2/3 之间存在另外一条通路。提示 Smad2/3 是预防肝胆管结石患者胆管周围纤维化的潜在靶点。

LPS 可使胆管上皮细胞发生 EMT,并可能是通过 TGF-β1/Smads 信号转导的。通过阻断或干扰该信号通路,可使 EMT 发生逆转。本研究为临床上对以纤维化为主的胆道疾病,如胆囊结石病、原发性肝胆管结石病以及原发性硬化性胆管炎的治疗提供参考。

参考文献:

[1] Kubo S, Kinoshita H, Hirohashi K, *et al*. Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma[J]. World J Surg, 1995, 19(4): 637 – 641.
[2] Nakai A, Imano M, Takeyama Y, *et al*. An immunohistochemical study of osteopontin in hepatolithiasis[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2008, 15(6):615 – 621.
[3] Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver[J]. Lab Invest, 2004, 84 (2):153 – 159.
[4] Choi H S, Savard C E, Choi J W, *et al*. Paclitaxel interrupts TGF-beta1 signaling between gallbladder epithelial cells and myofibroblasts [J]. J Surg Res, 2007, 141(2):183 – 191.
[5] Rygiel K A, Robertson H, Burt A D, *et al*. Demonstration of the transition of intrahepatic biliary epithelial cells to fibroblasts during chronic inflammatory liver diseases[J]. J Hepatol, 2006, 44 (Suppl 2): S241.
[6] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10 (1) : 76 – 99.
[7] Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis *in vivo* and hepatic stellate cell line *in vitro*[J]. Pathol Int, 2003, 53(1): 18 – 26.
[8] Schiffer M, von-Gersdorff G, Bitzer M, *et al*. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling[J]. Kidney Int Suppl, 2000, 77: S45 – S52.
[9] ten-Dijke P, Hill C S. New insights into TGF-beta-Smad signalling [J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29 (5) :265 – 273.
[10] Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner D C, *et al*. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis[J]. Am J Transplant, 2005, 5(6):1367 – 1374.
[11] Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, *et al*. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury [J]. Nat Mad, 2003, 9(7):964 – 968.
[12] Robertson H, Ali S, McDonnell B J, *et al*. Chronic renal allograft dysfunction: the role of T cell-mediated tubular epithelial to mesenchymal cell transition[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(2):390 – 397.
[13] Tyler J R, Robertson H, Booth T A, *et al*. Chronic allograft nephropathy: intraepithelial signals generated by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-7[J]. Am J Transplant, 2006, 6(6):1367 – 1376.
[14] Xia J L, Dai C, Michalopoulos G K, *et al*. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation[J]. Am J Patgol, 2006, 168(5):1500 – 1512.
[15] Robertson H, Kirby J A, Yip W W, *et al*. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis [J]. Hepatology, 2007, 45(4): 977 – 981.
[16] Mullins D W, Martins R S, Burger C J, *et al*. Tumor cell-derived TGF-beta and IL-10 dysregulate paclitaxel-induced macrophage activation[J]. J Leukoc Biol, 2001, 69(1): 129 – 137.

(**收稿**:2009-09-27;**修回**:2009-10-28)
(编辑 吴培红)

(上接 213 页)

织,手术后可继续妊娠,若合并肝癌,应先终止妊娠后尽量行手术切除及化疗。目前的诊断肝血管瘤的诊断无特异性指标,与肝癌相混淆时,后者多依靠 AFP 测定(AFP > 400 ng/ml)、B 超、CT 扫描、MRI 等影像学资料发现肝脏实性占位、肝脏细针穿刺活检发现癌细胞等确立[2],结合我国国情,若患者无肝炎背景且 AFP 等肿瘤指标阴性,则诊断血管瘤的准确率会进一步提高[3]。对血管瘤的治疗原则、方法,目前的看法是:小的诊断明确的肝海绵状血管瘤无需任何治疗,仅注意定期复查观察病变进展。而当血管瘤直径 > 5 cm 时, 合并有以下情况者宜手术治疗:有很明确的症状;肿块临近第一、二肝门;瘤体生长速度快,每年增长直径 > 2 cm;合并有局部凝血功能障碍,血小板减少;瘤体位于肝脏前缘至肋弓以下,易挤压破裂;并发破裂;患者精神负担过重;不能排除其他肿瘤者[4]。

参考文献:

[1] Cobey F C, Salem R R. A review of liver masses in pregnancy and a proposed algorithm for their diagnosis and management[J]. Am J Surg, 2004, 187(2):181 – 191.
[2] 张雪梅,刘兴会. 妊娠合并肝癌 1 例[J]. 中国现代医药杂志, 2006, 8(4):103.
[3] 耿小平. 肝血管瘤外科治疗的现状、问题和看法[J]. 国际外科学杂志, 2007,34(2):73 – 75.
[4] 欧迪鹏,杨连粤. 肝脏常见良性病变的外科治疗[J]. 中国医刊, 2008,43(3):16 – 18.

(**收稿**:2009-06-04;**修回**:2009-07-20)
(编辑 吴培红)