

2001

全国肝纤维化专题学术研讨会

论文汇编



2001.9 上海

中国中西医结合学会
肝病专业委员会



保健食品

卫食健字(2001)第0120号
中华人民共和国卫生部批准

申泰牌

甘乐片 GANLE

保护肝脏
调节血脂



本品是以蝙蝠蛾拟青霉菌粉、丹参、绞股蓝、桃仁、壳聚糖为主要原料制成的保健食品，经功能试验证明，具有对化学性肝损伤有辅助保护作用和调节血脂的保健功能。

[主要原料] 蝙蝠蛾拟青霉菌粉、丹参、绞股蓝、桃仁、壳聚糖

[功效成份及含量] (每100g中含)

丹参素 $\geq 150\text{mg}$ 总皂甙 $\geq 500\text{mg}$ 腺苷 $\geq 50\text{mg}$ 多糖 $\geq 1400\text{mg}$

[保健功能] 对化学性肝损伤有辅助保护作用、调节血脂

[适宜人群] 有化学性肝损伤危险者、血脂偏高者

[不适宜人群] 少年儿童、孕妇



SUNDISE

上海现代中医药科技发展有限公司

Shanghai Sundise Chinese Medicine Technology Development Co., Ltd.

地址：上海市天山路600弄思创大厦东7F-C 邮编：200051

电话：86-21-52896102 传真：86-21-52896595

http://www.sundise.com E-mail: sundise@citiz.net

2001

全国肝纤维化专题学术研讨会

论文汇编



2001.9 上海

**中国中西医结合学会
肝病专业委员会**

致 谢

全国肝纤维化专题学术研讨会于新世纪的第一个金秋在上海召开了。此会的主题是总结交流近十年来我国肝纤维化领域的中西医结合研究成果,展望和探讨新世纪初的研究发展方向。

在本次会议的筹备过程中,得到了各级有关领导、全国各地有关专家和医务人员的支持,特别是得到了有关企业的积极赞助,谨借此致以衷心感谢!

一、首要赞助单位

上海现代中医药科技发展有限公司

二、主要赞助单位

重庆药友制药有限责任公司

三、赞助单位

葛兰素史克(中国)投资有限公司

上海市药材公司

正大天晴制药有限公司

中国中西医结合学会肝病专业委员会

2001年9月

会议日程

9月15日

上午 会议主持: 刘平, 姚希贤

08:00 ~ 09:00 大会开幕式

09:00 ~ 09:30 全体人员合影

09:30 ~ 10:50 专题报告(一)

09:30 ~ 10:10 贾继东 细胞外基质及其细胞来源

10:10 ~ 10:50 张锦生 细胞外基质对肝星状细胞的调控作用

10:50 ~ 11:00 会间休息

11:00 ~ 12:00 大会发言(一)

11:00 ~ 11:20 刘成 枯否氏细胞、肝细胞、肌成纤维细胞对肝星状细胞活化的影响

11:20 ~ 11:40 徐正婕 大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型的建立

11:40 ~ 12:00 马红 复方861抑制胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型
MMP2及TIMP1 mRNA表达的研究

12:00 ~ 13:00 午餐

12:30 ~ 13:30 贴报交流(一)

下午 会议主持: 刘克洲, 王灵台

13:30 ~ 14:50 专题报告(二)

13:30 ~ 14:10 王爱民 细胞外基质降解与肝纤维化

14:10 ~ 14:50 徐列明 有关肝纤维化的细胞因子及其在肝星状细胞内的信号传导

14:50 ~ 15:00 会间休息

15:00 ~ 17:00 大会发言(二)

15:00 ~ 15:20 聂广 别毒护肝汤及其拆方对大鼠肝纤维化和脂质代谢的影响

15:20 ~ 15:40 卢青 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞分泌转化生长因子 β_1 的影响

15:40 ~ 16:00 张文胜 免疫性肝纤维化大鼠结缔组织生长因子、转化生长因子 β_1 基因相关表达及汉丹肝乐的影响

16:00 ~ 16:20 姚欣 益肝浓缩煎剂等活血化瘀药抗大鼠肝纤维化作用实验研究

16:20 ~ 16:40 张光华 软肝颗粒抗肝纤维化及保肝的实验研究

16:40 ~ 17:00 何云 银杏叶片治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究

晚间 18:00 ~ 20:00 上海现代中医药技术发展有限公司卫星会议及晚宴

20:00 ~ 21:00 中国中西医结合肝病专业委员会全体委员会议

9月16日

上午 会议主持: 巫善明, 贾继东

08:00 ~ 10:00 专题报告(三)

目 录

专题报告

1. 肝纤维化研究的战略思考	(北京友谊医院)	王宝恩 (另发)	
2. 肝纤维化与细胞外基质	(北京友谊医院)	贾继东	1
3. 细胞外基质对肝星状细胞的调控作用	(上海复旦大学医学院)	张锦生	9
4. 细胞外基质降解与肝纤维化	(解放军 252 医院)	王爱民	13
5. 有关肝纤维化的细胞因子及其在肝星状细胞内的信号传导	(上海中医药大学)	徐列明	26
6. 肝纤维化的无创伤性诊断	(上海市消化病研究所)	曾民德	30
7. 中医药抗病毒治疗的现状和展望	(上海曙光医院)	王灵台	33
8. 肝纤维化病因治疗若干研究进展	(浙江医科大学第一附属医院)	刘克洲	40
9. 中医药抗肝纤维化治疗的研究进展	(上海中医药大学)	刘 平	44
10. 肝纤维化的基因治疗研究现状与展望	(解放军 302 医院)	成 军	52
11. 酒精性肝纤维化在某些方面研究的新动向	(贵阳医学院附属医院)	程明亮	58

大会发言

1. 枯否氏细胞、肝细胞、肌成纤维样细胞对肝星状细胞活化的影响	(上海中医药大学)	刘 成	63
2. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型的建立、非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝星状细胞活化及 TGF β 1 表达的研究	(上海市第一人民医院)	徐正婕	66
3. “复方 861”抑制大鼠胆管阻塞性肝纤维化模型 TIMP1mRNA 表达的研究	(北京友谊医院)	马 红	68
4. “剔毒护肝汤”及拆方对大鼠肝纤维化和脂质过氧化的影响	(深圳市东湖医院)	聂 广	70
5. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞分泌转化生长因子 β 1 的影响	(复旦大学附属华山医院)	卢 青	75
6. 免疫性肝纤维化大鼠结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子 β 1(TGF β 1)基因相关表达及“汉丹肝乐”的影响	(贵阳医学院附属医院)	张文胜	77
7. “益肝浓缩煎剂”等活血化瘀药抗大鼠肝纤维化作用的实验研究	(河北医科大学第二医院)	姚 欣	80
8. “软肝颗粒”抗肝纤维化及保肝的实验研究	(成都中医药大学附属医院)	张光华	85
9. “柔肝冲剂”抗肝纤维化的实验与临床研究	(上海曙光医院)	王灵台	87
10. “抗纤方”抗肝纤维化作用及机理的研究	(昆明医学院第一附属医院)	高连相	94

11. “银杏叶片”治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究	(解放军 44 医院)	何 云	99
12. 乙肝治疗性疫苗加中成药治疗慢性乙型病毒性肝炎初步研究	(解放军第一医院)	陈林芬	101
13. “软坚糖浆”治疗肝豆状核变性肝纤维化	(湖北中医学院附属医院)	甘京洲	103
14. 病毒性慢性肝病的实验室检查特征比较 ——从实验室检查慢性肝病的诊断、预后与治疗	(上海曙光医院)	蒋 健	105

会议交流

1. “肝平胶囊”抗肝纤维化的药理研究	(上海中医药大学)	胡义扬	112
2. 丹酚酸乙治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床观察	(上海中医药大学)	刘 平	117
3. 拉米夫定对肝脏组织学的影响	(复旦大学附属华山医院)	张文宏	127
4. 甘草酸二铵抗肝纤维化的作用与机理	(上海中医药大学)	刘成海	130
5. CCl ₄ 诱导大鼠肝损伤动物模型纤维结合蛋白(FN)的动态表	(上海曙光医院)	赵 钢	135
6. 丹参单体 IH764—3 对肝星状细胞增殖与凋亡的影响	(河北医科大学第二医院)	赵东强	138
7. “复方中药 861”对肝星状细胞系一氧化氮合酶表达 及其活性的影响	(北京佑安医院)	丁惠国	141
8. “复方中药 861”对鼠肝星细胞 Ca ²⁺ 浓度的影响及其意义探讨	(北京佑安医院)	丁惠国	142
9. “复方 861”抑制胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型 MMP2mRNA 表达的研究	(北京友谊医院)	阴赅宏	145
10. “肝结散”抗肝纤维化治疗中 PCⅢ、HA、LN 的动态变化	(第三军医大学大坪医院)	杨国汉	148
11. “益肝煎剂”对实验性肝纤维化大鼠 I、IV 型胶原蛋白表达的影响	(河北医科大学第二医院)	唐有为	152
12. “慢肝消”对乙醛作用下 HSC 细胞周期、细胞内钙浓度、pH 值的影响	(北京东直门医院)	叶永安	154
13. “福尔肝 6 号”对肝星状细胞增殖与转化生长因子 β1 活性的影响	(云南中医学院)	陈文惠	157
14. “清肝活血方”对酒精性肝病大鼠肝组织 I 型胶原表达的影响	(上海龙华医院)	季 光	160
15. “剔毒护肝方”对肝星状细胞表达 I 型胶原及 TGFβ1mRNA 的影响	(湖北中医学院)	朱清静	163
16. 茅台酒诱导大鼠金属硫蛋白的产生及其抗脂质过氧化作用的研究	(武警贵州总队医院)	王海琴	166
17. “奥秘克方组”逆转肝纤维化的实验研究	(湖北省咸宁肝病医院)	王振坤	168
18. “肝炎平”抗大鼠胶原纤维作用实验的研究	(华中科技大学同济医学院)	唐望先	171

19. “益肝煎剂”抗肝纤维化的实验研究	(河北医科大学第二医院)	孙玉凤	173
20. “扶正化癥方”抗肝纤维化机理的拆方研究	(上海中医药大学)	王晓玲	175
21. “抗纤软坚冲剂”防治肝纤维化的拆方研究	(天津市肝病研究所)	程 镭	178
22. 高旋磁加中药治疗肝纤维化的实验研究	(浙江省建工医院)	施维群	180
23. 血清肝纤维化指标与临床及病理变化的关系	(天津市传染病医院)	王 怡	183
24. 病毒性肝炎患者血清 HA、LN、IV—C、PCⅢ 水平变化及其意义	(天津市传染病医院)	宓余强	185
25. 门静脉血流动力学及脾脏大小与肝纤维化的关系	(苏州市第五人民医院)	李 明	187
26. 慢性乙型肝炎肝纤维化中医证型与肝组织病理分型、分级关系的探讨	(上海中医药大学)	王宝珍	188
27. 120 例肝纤维化指标分析及中医病机探讨	(浙江省台州市中医院)	李伟林	191
28. α -干扰素对慢性肝炎患者血清 HA、FN、LN 水平的影响	(北京佑安医院)	张 斌	192
29. 苦参硷联合甘利欣治疗活动性肝纤维化初步疗效观察	(山东省滕州市中心医院)	于咸怀	195
30. 疏肝活血健脾补肾法对肝病患者血清 PCⅢ、LN、IV—C 的影响	(上海龙华医院)	王雨稼	196
31. “疏肝理脾化癥方”对慢性乙型肝炎免疫功能 和纤维化血清指标的影响	(上海龙华医院)	张 波	197
32. “肝溶纤胶囊”与甘利欣注射液对病毒性肝炎肝纤维化的临床研究.....	(浙江中医学院)	陈光华	199
33. “软肝消症散”治疗肝炎肝纤维化的临床观察	(广州市天河区中医院)	杨福泰	201
34. 中药“扶正活血化癥汤”治疗慢性乙型肝炎肝纤维化疗效观察	(湖北黄石市结核病防治院)	王嘉会	202
35. “软肝颗粒”治疗慢性肝纤维化临床观察总结	(北京佑安医院)	李秀惠	204
36. 自拟“益肾活肝方”逆转肝纤维化的临床疗效观察	(安徽省合肥市西市区第二人民医院)	牛进平	208
37. “扶正祛邪方”对肝纤维化指标的影响	(河北省秦皇岛市第三医院)	霍秀萍	210
38. “参珠胶囊”治疗肝纤维化的临床及实验初步研究	(陕西省中医药研究院附属医院)	成冬生	212
39. “慢肝宁 2 号”抗肝纤维化疗效观察	(江西省景德镇市第一人民医院)	程国才	217
40. “活血软肝汤”对 50 例肝炎后肝硬化患者“软肝”作用的临床观察	(上海龙华医院)	邢练军	218
41. “补元解毒健肝片、冲剂”治疗慢性乙型肝炎 62 例	(四川省岳池县中医院)	屈人上	220
42. HD—91—Ⅱ 型肝病治疗仪治疗乙型肝炎肝纤维化临床观察	(深圳市东湖医院)	胡建华	222
43. 中西医结合治疗肝硬变腹水 90 例.....	(江苏省淮安市楚州中医院)	骆稚平	226
44. 肝病合并糖尿病 23 例治疗观察.....	(江西省吉安市中心人民医院)	郭 宇	227
45. 40 例原发性胆汁性肝硬化临床特征分析	(北京友谊医院)	张福奎	228
46. 554 例原发性肝癌临床分析	(第一军医大学南方医院)	李福山	232
47. 肝纤维化治疗现状与进展	(河北医科大学第二医院)	姚希贤	236

48. 抗肝纤维化治疗的思考与实践	(昆明医学院第一附属医院)	高连相	239
49. 中医药抗肝纤维化研究的回顾与展望	(深圳市东湖医院)	聂 广	241
50. 中医药抗肝纤维化治法学研究进展	(山东中医药大学附属医院)	尹常健	244
51. 中医、中西医结合治疗肝纤维化的新进展	(西安中医消化病研究院)	田养年	247
52. 中医药治疗肝纤维化的研究进展	(安徽中医学院第一附属医院)	张国梁	250
53. 中西医结合抗肝纤维化的治疗	(浙江省台州市黄岩第一人民医院)	戴茂国	255
54. 肝炎肝硬化的中医辨治思路	(陕西省延安市人民医院)	刘梅君	257
55. 浅谈中西药结合治疗肝硬化	(青海省西宁市第一人民医院)	戴兴芳	258
56. 慢性乙型肝炎与肝细胞癌	(天津市传染病医院)	邵风珍	260
57. 冬虫夏草对肝纤维化的作用	(上海中医药大学)	吴建良	262
58. 草药引起的肝脏损害	(上海中医药大学)	唐志鹏	265

肝纤维化与细胞外基质

贾继东 王宝恩

首都医科大学附属北京友谊医院肝病研究中心

肝纤维化(hepatic fibrosis)是指肝脏内弥漫性的细胞外基质(特别是胶原)过度沉积。肝纤维化不是一个独立的疾病,而是许多慢性肝病的共同病理过程。如果肝纤维化同时伴有肝小叶结构的破坏(肝再生结节)者则称为肝硬化(cirrhosis)^[2]。但是,慢性肝病由肝纤维化向肝硬化的发展过程是连续的,在临床上难以截然区分二者。在正常肝脏组织中,各种细胞及细胞外基质成分有精确的相对比例和特定的相对空间位置,通过细胞之间、细胞与细胞外基质之间的信号传递精确地调控着其结构、功能和代谢状态,成为一个相对稳定的微生态系统(ecosystem)^[1]。从动态的角度来看,纤维增生(fibrogenesis)是指各种细胞外基质合成增加,而肝纤维分解(fibrolysis)则是指细胞外基质的降解过程,肝纤维化的发生、发展和转归取决于二者的“净效应”。急性肝损害所致肝脏纤维增生是机体对于肝实质损伤的一种修复反应,一旦病因去除则过多的细胞外基质被降解,肝组织内细胞与基质成分恢复正常,因而不产生肝脏纤维化。但许多慢性肝病所致的持续或反复的肝实质炎症坏死可引起纤维结缔组织大量增生、而其降解活性相对或绝对不足,大量细胞外基质沉积下来形成肝脏纤维化。现今的基础和临床研究表明,如果能有效进行病因治疗,或直接抑制细胞外基质的合成和/或促进其降解,则已经形成的肝纤维化乃至早期肝硬化也有可能减轻甚至逆转。

一. 细胞外基质(extracellularmatrix, ECM)的组成

细胞外基质一般包括胶原、非胶原糖蛋白、蛋白多糖及弹性硬蛋白。现在认为 ECM 不是杂乱无章的静态堆积物质,而是组织有序、具有多种生物学活性的生命大分子^[3]。它们对细胞和组织的形态结构、新陈代谢及生长、分化有重要影响。

(一). 胶原(Collagen)^[4,5]

胶原是细胞外基质的最重要成分,目前已发现至少 19 型基因序列不同的胶原,但肝脏中含量较高仅 I、III、IV、V、VI、XVIII 型 6 种。正常人肝脏的胶原含量约为 5mg/g 肝湿重, I:III 型胶原的比为 1:1,各占 33% 左右;肝纤维化和肝硬化时肝脏胶原含量可增加数倍,且 I/III 型的比值增加,到后期此比例可增至 3 左右。根据胶原的结构和功能可将其分为 7 类:

1. 纤维性胶原(fibril forming collagen),这是最经典的胶原,如 I, III, V 和 XI 型胶原。其肽链长达 1000 个氨基酸,是结缔组织中含量最丰富的胶原。如前所述,前胶原三螺旋的端肽被切除后,胶原三螺旋纵向平行排列,其中每个胶原分子纵向稍偏移,相邻的肽链形成共价键交联从而形成微纤维。一般需经前胶原肽酶(procollagenpropeptidase)将羧基端肽去除后才能形成胶原纤维,但是部分胶原可以带有氨基端肽而存在于胶原纤维的表面,以阻止胶原纤维继续增粗,从而继续起到调节胶原纤维直径的作用。

2. 网状胶原(network forming collagen),如 IV, VIII 和 X 型胶原,主要分布于基底膜中。与纤维性胶原不同,其端肽不被去除。两条 IV 型前胶原肽链的羧基端肽(NC1)端一端相连形成二聚体,四条前胶原肽链的氨基端肽(7S)端一端形成四聚体,从而相互交联形成三维网状结构。在肝脏中,IV 型胶原主要分布于血管和胆管的基底层,而且还分布于汇管区的成纤维细胞周围及正常肝血窦的 Disse 腔中。VIII 型胶原常与弹性纤维一起分布于肝脏的汇管区和包膜中,其功能尚不清楚。

3. 微丝状胶原(microfilament forming collagen),目前此组只包括 VI 型胶原。其肽链较短,仅为纤维性胶原的三分之一左右。两条肽链反向平行排列,籍端肽相互交联成二聚体,二聚体再端一端相连聚集成四聚体。许多四聚体端一端相接形成状如串珠的微丝状长链。在肝脏中 IV 型胶原分布于汇管区基质和肝血窦 Disse 腔隙。IV 通常分布在 I 型和 III 型胶原纤维之间,其功能可能为将血管结构锚定到间质上。最近发现

VI 型胶原对上皮细胞和间质细胞包括肝脏星状细胞的生长有促进作用,并可抑制细胞凋亡。

4. 锚丝状胶原(collagen of anchoring filament),VII 型胶原属此组,其肽链三螺旋长达 1530 个氨基酸,中间穿插许多非胶原序列。两条前胶原肽链的羧基端肽端一端重叠交联形成二聚体,多个二聚体以羧基端交联区为中心侧一侧聚集成锚丝状纤维。这一纤维的两个氨基端肽连接到基底膜的某种分子上起锚定作用,故名。

5. 三螺旋区不连续的纤维相关性胶原(fibril associated collagens with interrupted triplehelices, FACIT),这一组包括 IX,XII,XIV,XVI 及 XIX 型胶原,而且其数目还不断增加。其本身不形成纤维,但与纤维性胶原纤维的表面相连。目前对这一组胶原的确切功能及组织、细胞分布尚不了解。XIV 曾被称为 undulin,但现在认为它有典型的胶原结构故不再归属糖蛋白。

6. 跨膜性胶原(transmembrane collagen),如 XVII 型胶原,它有一个细胞内非胶原区,一个跨膜区和细胞外胶原尾巴。这种胶原主要由皮肤基底角化细胞产生,在肝脏中未发现此型胶原。

7. 尚未分类的胶原,包括 XIII,XV 和 XVIII 型胶原。XIII 型胶原主要分布于皮肤附属器、骨、软骨、横纹肌及肠道粘膜,但不见于肝脏。XV 型胶原 mRNA 表达于许多组织和器官的成纤维细胞和上皮细胞。XVIII 型胶原主要分布于肝脏、肺脏和肾脏。值得一提的是,原位杂交研究结果表明在肝脏中 XVIII 型胶原主要由肝实质细胞产生,显然与其它胶原主要由间质细胞产生不同。其羧基末端具有抑制血管增生的作用,故又称 endostatin,初步体外和动物试验发现它对肿瘤有较强的抑制作用。

(二). 非胶原糖蛋白(noncollagenous glycoproteins, GP)^[6-9]

非胶原糖蛋白为细胞外基质的另一重要成分,其分子中有多个功能区,可与其它细胞外基质及多种细胞膜的跨膜蛋白的受体结合,从而影响细胞的生长、分化、代谢等各种生物学行为。肝脏的主要 GP 包括以下几种:

非胶原糖蛋白是一组由侧链 N 或 O 位带有糖基的蛋白分子。随着对其生化组成和分子结构的研究不断深入,已经很难截然区分胶原和非胶原糖蛋白及其它细胞外间质分子。如前所述,undulin 原称为糖蛋白,但现在认为应为 XIV 胶原。

1. 纤维连接蛋白(fibronectin)^[19,20]

纤维连接蛋白为二聚体,其两条链在羧基端有二硫键相连。其分子由多个功能区组成,可分别与细胞表面的细胞外间质分子(胶原,跨膜蛋白多糖、肝素及纤维蛋白原)及其受体(integrin)结合。它的分布十分广泛,几乎可见于所有的结缔组织;其功能也多样而且有的相互抵触,如细胞粘附和伸展需要细胞和基质间的稳固接触,而细胞移行则需要相反。纤维连接蛋白的基因含有许多个外显子,其新生 RNA 通过不同的剪切编辑可表达出 20 种不同的 mRNA 并翻译出相应的肽链,因而从理论上可形成 400 种不同的二聚体,这一高度多样性可能正是为了适应不同组织器官在不同生理或病理生理状态下的功能需要^[22,23]

细胞性纤维连接蛋白为不溶性多聚体,由间质细胞产生,其特点是带有一额外功能区(extradomain)A 或 B,前者的功能为促进与细胞的结合,后者的功能为松解细胞与间质的结合而促进细胞的移行。它通过其细胞结合功能区连接细胞表面的受体 integrin 结合,同时通过其相应的功能区与胶原纤维、肝素等其它细胞外间质成分结合。它不仅象铆钉一样把细胞外间质连接成一体,而且通过 integrin 等分子与细胞骨架肌动蛋白形成联系,这可能是细胞与细胞细胞与间质之间传递信号的一种重要方式。

血浆性纤维连接蛋白为可溶性的二聚体,主要由肝细胞产生,其血浆浓度可达 200 至 400mg/L。它们不含额外功能区,其亚单位的变化也不象细胞性纤维连接蛋白那样大。在组织损伤时,纤维连接蛋白与纤维蛋白结合并沉积于局部作为最早期的细胞外间质以促进修复。另外,纤维连接蛋白可与纤维蛋白、组织碎块、细菌等结合然后被单核吞噬细胞吞噬而清除从而起到调理作用。

2. 层连蛋白(laminin)^[23-27]

层连蛋白是上皮、内皮、肌肉、神经等细胞和组织的基底膜之主要成分之一,其功能多样,包括维持细胞生长、分化和基因表达及细胞移行和肿瘤转移。它由 α (约 440KD)、 β (约 220KD)和 γ (约 210KD)三个亚单位

(最初分别称为 A, B1 和 B2) 构成^[7]。三个亚单位形成十字架结构, 它们的氨基端分别形成三个短臂, 其羧基端并列在一起形成长臂, 在十字架中部和长臂末端有二硫键将三条链连接在一起。这些亚单位由不同的基因编码, 现已知至少有 5 种 α 链, 3 种 β 链和 2 种 γ 链; 它们可以组合成 11 种层连蛋白 (即层连蛋白 1 至 11) 其中 1 至 7 已得到证实^[15]。短臂可分为球形功能区 IV α (在链中称为 IV') 和 VI 及杆状功能区 III 和 V。IV 区的功能尚不清楚, VI 对于层连蛋白形成多聚体至关重要, 可还具有结合肝素和细胞表面的位点。III 和 V 区含有表皮生长因子样重复序列; 另外小鼠 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 链的 III 区分别含有 YIGSR (酪-异-甘-丝-精) 和 RGD (精-甘-门) 序列 (均为细胞表面结合位点), $\gamma 1$ 链 III 区含有结合 entactin (nidogen) 的位点, 可能在基底膜中把层连蛋白和 IV 胶原连成网状结构。长臂可分为杆状功能区 I 和 II, 其中可能有细胞结合位点。另外 α 链羧基末端球形结构为功能区 G, 其中含有结合肝素、硫酸乙酰肝素蛋白多糖及细胞表面的位点; 功能区 B 为 α 链长臂中部一小的环状结构, 它将功能区 I 和 II 分开, 其功能尚不清楚, 但推测可能对层连蛋白链的选择和组装过程中起作用, 或者连接层连蛋白和其它基底膜成分^[25]。

3. Entactin (nidogen)

基底膜的成分之一, 其分子量为 150KD。可分为三个功能区, 两端分别为呈球形的氨基末端 I 区 (较大) 和羧基末端 III 区 (较小), 及二者中间的呈杆状的 II 区, 因而整个分子呈不对称哑铃形。II 区主要由富半胱氨酸的表皮生长因子样重复序列和甲状腺球蛋白样重复序列组成, 它可结合钙离子并促进细胞粘合, 但其主要功能是促进基底膜的装配。其羧基末端球形 III 区可与层连蛋白 1 短臂之 III 区紧密结合, 同时这一区还可与 IV 型胶原羧基末端肽 80nm 处结合, 在层连蛋白和 IV 胶原之间起桥梁作用^[28,29]。

4. Tenascin (hexabrachion, brachionectin, cytotactin)

tenascin 家族至少有三个成员, 即 T-C, T-R, T-X, 它们为不同的基因产物。R 主要分别于神经系统, X 主要分布于骨骼肌和心肌; 而 C 被发现最早, 也是通常所指的 tenascin, 它分布于多种发育中的组织, 包括神经组织, 但不见于骨骼肌和心肌^[11-13]。每一 tenascin 分子为同一基因通过不同的 RNA 剪切而形成的六个亚单位的氨基末端在中央由二硫键连接而成的六聚体。每一长臂带有与纤维连接蛋白 (III 区) 样和表皮生长因子样的同源序列, 在近羧基末端有细胞结合位点。它可通过与纤维连接蛋白上的同源序列竞争细胞受体而干扰和减弱其粘附功能。它和骨连接蛋白 (osteonectin) 及 thrombospondin 均有促进细胞运动的功能, 故有人将这三者称为“抗粘附分子” (anti-adhesive molecules)^[31,33]。因有报道敲除 (knockout) tenascin-C 基因的小鼠发育生长正常而有人认为可能此分子无功能, 但另一种可能的解释是通过同一基因家族的补偿而作用^[33-36]。来自肝实质细胞的细胞系在体外培养中不产生 tenascin-C^[37]。

5. 富含半胱氨酸的分泌性蛋白 (SPARC, secreted protein, acidic and rich in cysteine)

曾因最早发现于骨组织中而又称骨连接蛋白 (osteonectin); 因其分子量为 40KD 且可由小鼠分泌基底膜性肿瘤 (basement membrane-secreting tumor) 产生, 故又名 BM40。SPARC 可分为 4 个功能区, I 和 IV 区具有结合钙的位点, II 区与 serpin 蛋白酶抑制剂 follistatin 有同源性, III 区为 α 螺旋结构^[38]。其含量在骨组织与血小板及成纤维细胞中较高。Northern blot 结果表明在人、大鼠和小鼠肝硬化肝组织中 SPARC mRNA 水平较相应正常肝组织明显升高^[39], 且随肝纤维化的消长而同步变化^[40], 组织原位杂交及体外细胞培养研究发现肝脏星状细胞是 SPARC 的主要细胞来源^[39,41,42]。其功能较为复杂, 包括干扰细胞与细胞外间质的结合改变细胞的形状, 促进其移行对血管增生和肿瘤转移的影响已有许多报道^[43,44]。特别是它可以结合血小板衍生的生长因子的 β 链而抑制其活性, 因而似乎对抗其促进星状细胞增殖和激活。但是另一方面, 它还可以诱导 I 型血浆纤维蛋白酶原激活因子的抑制物, 从而可能抑制细胞外间质的降解过程。因此 HPARC 在肝纤维化和肝硬化发生和发展中的确切作用尚有待深入研究。

6. 血栓粘合素 (thrombospondin, TSP)

血栓粘合素为一基因家族已发现了至少 5 种 TSP, TSP1、2 由 3 条相同的链经二硫键连接而成, TSP3、4、5 由 5 条相同的链经二硫键连接而成^[45,47], 呈扁椭圆形的“流星锤”样。最早发现于血小板的 α 颗粒内, 在血小板激活时释放出来。后发现许多增殖中的细胞也产生 HSP, 包括成纤维细胞、内皮细胞和平滑肌细胞。

TSP 分子中有许多结合位点,包括细胞表面、钙离子、纤维连接蛋白、层连蛋白、I、V 型胶原以及纤维蛋白原、纤溶酶原等。TSP 对细胞增殖有轻度刺激作用,TSP1 可能是 TGF β 1 在体内的激活剂^[48]缺乏 HSP2 的小鼠之皮肤和肌腱发脆、强度降低,说明其对于胶原纤维的形成起重要作用。PDGF 和 bFGF 及血清促进 TSP 的表达。对于肿瘤的作用目前有两种截然不同的观点,即促进^[49]和抑制肿瘤,免疫组化研究表明,TSP 可见于 HCC 及 FNR 的肝组织中^[50,51]。

7. 玻璃体连接蛋白(vitronectin)

也是一种细胞粘附和伸展因子,存在于血浆和 ECM 中,有单体和二聚体两种形式。可以和完整素受体结合,也可以和补体及凝血过程的后期的一些蛋白结合,抑制细胞溶解。在止血、细胞吞噬、组织修复及免疫应答中起保护作用。主要由肝脏合成,但血小板、巨噬细胞和平滑肌细胞也可合成。在正常肝脏中,仅在汇管区见少量 VN 染色,而肝组织中 VN 沉积增多,且主要分布于纤维间隔和灶性坏死区。而在慢性肝炎、肝硬化患者血清中 VN 水平降低。免疫电镜观察提示 VN 由肝细胞产生。有报道慢性酒精性肝病患者血清 VNR 升高者^[52]。

(三)蛋白多糖(proteoglycan)^[10,11]

蛋白多糖是一类由蛋白质作核心骨架,在 N 或 O 位上连有糖胺多糖(glycosaminoglycan,GAG)侧链的大分子物质,它们与胶原一起分布于细胞外基质和基底膜上,同时也分布于细胞膜上。以前根据其糖胺多糖的不同分为硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate)及硫酸角质素(keratan sulfate)。正常肝脏中硫酸乙酰肝素含量最多,而肝纤维化时硫酸皮肤素和硫酸软骨素的含量增加。透明质酸(hyaluronic acid)没有经过硫化,也无蛋白骨架,但通常也归于此类。近年倾向于根据其糖核心蛋白不同进行分类:

1. 与细胞膜相关的蛋白多糖

其核心蛋白往往有跨膜功能区,有的则经其 GAG 侧链与细胞膜相连。含有大量的硫酸乙酰肝素和少量的硫酸软骨素,可与细胞外基质、生长因子、细胞粘附分子(CAM)及蛋白酶抑制物结合,能调节这些物质的活性。

Syndecan 肝组织及体外培养中的肝细胞(hepatocyte)可产生之,它是某些细胞外基质的受体,通过其 GAG 侧链可与 I,III,V 型胶原,纤维连结蛋白及细胞粘素相结合;同时还是 bFGF 的辅助受体(coreceptor)。其主要功能是信号传递。

Thrombomodulin 由血管内皮细胞产生,其 GAG 侧链为硫酸软骨素。可与凝血酶结合,抑制纤维蛋白原和因子 V 的激活,从而调节血液凝固过程。

Betaglycan 其 GAG 侧链为硫酸软骨素和硫酸乙酰肝素。是细胞膜受体,对 TGF- β 有高亲和力,是它的 III 型受体。

2. 与细胞外基质相关的蛋白多糖

它们主要分布于细胞外基质中。

Fibromodulin 其 GAG 侧链为硫酸角质素,可以调节胶原微纤维的形成。在肝脏中尚未发现。Perlecan 由非实质细胞产生,分布于基底膜和胆管、血管。可与内皮细胞和肝细胞结合。Decorin 其 GAG 侧链为硫酸软骨素和硫酸皮肤素。可与 I,IV 胶原、纤维连结蛋白结合,延缓胶原微纤维的形成。它对调节 TGF- β 的生物活性有较大的作用。首先 TGF- β 可使 Decorin 的表达增加,而 decorin 又反过来可使 TGF- β 灭活。在正常情况下星状细胞富含维甲酸,其 decorin 表达较高,TGF- β 的活性受到抑制;而在激活的星状细胞中维甲酸含量减少,decorin 的表达亦降低,因而对 TGF- β 的抑制作用减弱,更有利于肝脏纤维增生。

Biglycan 其 GAG 侧链为硫酸软骨素和硫酸皮肤素,由星状细胞和肌成纤维细胞合成。通过其核心蛋白与 TGF- β 结合,通过其 GAG 与 bFGF 结合。与 Decorin 相反,TGF- β 可使其表达增高,而维甲酸可使其表达减低。

Versican 其侧链为硫酸软骨素,PDGF 和 TGF- β 可使其表达增加。它可与透明质酸结合。至于肝脏细

胞是否可产生 versican, 尚无定论。

(四)细胞-基质粘附分子(cell-matrix adhesion molecules)^[14,15]

广义的 ECM 还包括细胞-基质粘附分子。细胞和细胞外基质成分之间的分子相互作用就是通过特定的质膜蛋白(即各种粘附分子)来实现的。一些在其它上皮细胞和内皮细胞上经常表达的粘附分子,在正常肝细胞和血窦内皮细胞中不表达,但在纤维化的发生过程中这些粘附分子的表达呈上调(up-regulation)改变。细胞-基质粘附分子主要包括整合素(integrin)家族和 CD44 蛋白家族。

1. 整合素

是由 α 和 β 链非共价结合组成的二聚体,现已知有 17 种 α 链和 8 种 β 链共组成 21 种有功能的二聚体。作为受体整合素可以结合多种配体,而一种细胞外基质成分可由多种整合素通过不同的识别位点结合。最重要的识别位点是细胞外基质分子中的 R-G-D(精-甘-天)序列,大多数整合素受体皆可识别之。各种整合素有其特定的组织分布,一种细胞可以存在多种整合素,其配体识别位点亦可有重叠。在非极性细胞上,整合素分布于各个面,在极性细胞只分布于基底面和侧面。它们不仅起粘附作用,而且因其细胞内功能区与细胞骨架相连,故可以传递信号,促进细胞的增殖、分化和移行。

2. CD44 蛋白家族

是一类大量糖基化的跨膜蛋白,广泛分布于体细胞,可以介导细胞-细胞,细胞-间质的相互作用。本家族的成员亦很多,在正常状态下,肝细胞内检测不到 CD44 蛋白的表达,但在血窦内皮细胞中可有表达。

粘附分子在肝纤维化过程中最显著的改变是肝细胞和血窦内皮细胞诱导表达层粘连蛋白受体(属整合素家族),而且其表达的上调早于肝硬化的形成。致纤维化的细胞因子如 TGF- α 和促进炎症的细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 均可促进整合素和 CD44 蛋白的高表达。integrin 受体的激活可以直接和间接地触发一系列的细胞内事件,如细胞的形态、分化、代谢、分泌、胞浆底物的酪氨酸磷酸化等,再次说明细胞外基质对于调节肝细胞和血窦内皮细胞的结构和功能起重要作用。在肝纤维化的早期,整合素的表达能促进细胞外基质在局部的沉积和排列,因而这种粘附分子表达增强的现象不仅是机体对细胞微环境改变的被动适应,而且有可能在启动纤维化本身的过程中起主动作用。

二. ECM 的合成与降解

(一). ECM 的合成^[12]目前对胶原的合成途径比较清楚,以下为胶原合成的特点。

第一步,转录:在细胞核内以前胶原基因 DNA 为模板转录成前胶原 mRNA。

第二步,翻译:经过剪切、拼接后的 mRNA 在细胞质粗面内质网核蛋白体上指导翻译出原始前 α 肽链(prepro α chain)。

第三步,翻译后修饰:(1)新合成的原始前 α 肽链在内质网中转运,并去除 N 端的信号肽成为前 α 肽链(pro α chain);(2)羟化,内质网中的脯氨酸-4-羟化酶、脯氨酸-3-羟化酶及赖氨酸羟化酶在辅助因子(Fe^{++} , Vit. C, α 酮戊二酸)存在的条件下,将前 α 肽链中的脯氨酸和赖氨酸残基羟化成羟脯氨酸和羟赖氨酸;羟化的作用是有利于形成稳定的三螺旋;(3)糖基化,羟赖氨酰半乳糖转移酶能将已被尿苷二磷酸(UDP)活化的半乳糖转移到前 α 肽链中的羟赖氨酸残基上,羟赖氨酰葡萄糖苷半乳糖转移酶可将已被 UDP 活化的葡萄糖苷半乳糖转移到前 α 肽链中的羟赖氨酸残基上。糖基化的作用可能是有助于前胶原的分泌。

第四步,去除端肽及交联:经过羟化和糖基化的前 α 肽链可形成稳定的 α 三螺旋结构,即为前胶原(procollagen)。经微管排泌到细胞外,在内肽酶的作用下切除 N 端和 C 端肽,成为胶原分子(collagen)。但有些胶原可以不去除端肽而直接沉积下来。细胞外液中的赖氨酰氧化酶(一种单胺氧化酶)可将胶原中的赖氨酸或羟赖氨酸残基中的 ϵ 氨基脱氨变为醛基。一个胶原 α 肽链中的醛基可以和相邻胶原中 α 肽链中的类似醛基进行醇醛缩合反应,也可和相邻胶原 α 肽链中的氨基进行醛胺缩合反应,这种胶原分子之间的共价键结合使得它们相互交联成稳定的胶原纤维。

(二)ECM 的降解

1. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)^[13]

据认为,约有 30%的新合成的前胶原合成后很快在细胞内被降解。而在细胞外降解细胞外基质的酶主要是 MMP,现已发现至少 20 种 MMP,根据其底物不同可分为五大组(见表 1)

表 1 基质金属蛋白酶

分类与命名	已知底物
胶原酶	
MMP-1(间质性胶原酶)	I, II, III, VII, VIII, X; 明胶; 蛋白多糖; MMP-2, MMP-9
MMP-8(中性粒细胞胶原酶)	I, II, III, VII, VIII, X; 明胶; 蛋白多糖;
MMP-13(胶原酶-3)	I, II, III, VII, VIII, X; 明胶; 蛋白多糖;
MMP-18(蛙胶原酶)	
基质分解素	
MMP-3(基质分解素-1)	III, IV, IX, X, 蛋白多糖, LN, 酪蛋白 MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
MMP-10(基质分解素-2)	同上
MMP-11(基质分解素-3)	同上
MMP-19	尚不清楚
MMP-20(釉基质分解素)	釉基质
明胶酶/IV 性胶原酶	
MMP-2(72KD 明胶酶)	I, IV, V, VII, X, XI, XIV; 明胶, LN; MMP-9, MMP-13I, IV, V, VII, X, XI, XIV; 明胶, LN;
MMP-9(92KD 明胶酶)	
未分类	
MMP-7(基质降解素)	IV, X, 明胶, 蛋白多糖, FN, 弹性硬蛋白
MMP-12(巨噬细胞胶原酶)	IV, 明胶, 弹性硬蛋白, FN, LN,
膜型胶原酶	
MMP-14(MT1-MMP)	I, II, III; 明胶, 酪蛋白, LN, FN
MMP-15(MT2-MMP)	MMP-2; 明胶, 非胶原糖蛋白
MMP-16(MT3-MMP)	MMP-2
MMP-17(MT4-MMP)	

这些基质金属蛋白酶都属于一个基因家族,其结构特点是它们都有数个氨基酸序列高度保守的共同功能区,例如它们都有维持酶原潜伏性的前肽功能区(含 PRGVPDV 序列)、120 个氨基酸的 N 端功能区以及催化位点的锌结合功能区(含 HELGH 序列)。基质金属蛋白酶的调节可发生在基因转录调控、无活性酶原的激活及组织抑制物对已被激活酶的抑制三个水平上。

某些生长因子、细胞因子和维甲酸对多种基质金属蛋白酶的表达有共同调控作用,而另一些则特异性地调控某种基质金属蛋白酶的表达。

基质金属蛋白酶是以无活性的酶原形式分泌出来的,必须在细胞外中经过水解激活才能降解细胞外基质。尿激酶纤溶酶原激活物(urokinase-plasminogenactivator, uPA)或组织纤溶酶原激活物(tissue-plasminogenactivator, tPA)可将纤溶酶原(plasminogen)转化为纤溶酶(plasmin),纤溶酶再激活基质分解素、部分激活胶原酶前体,而被激活的基质分解素又进一步激活胶原酶。这一激活的瀑布系统又受到纤溶酶原激活物抑制因子-1(PAI-1)的调节。其调节环节多、相互作用复杂,往往是一种效应的启动伴有其相反作用的同时启动,例如,合成基质金属蛋白酶的细胞往往同时也合成纤溶酶原激活物抑制因子,这样可以防

止基质的过度降解。

2. 金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)^[13]

已经激活的基质金属蛋白酶在细胞外间隙又受到特异性金属蛋白酶组织抑制因子的调节。现已发现 4 种 TIMP, 每种 TIMP 都可与催化部位直接结合而抑制所有基质金属蛋白酶的活性, 但 TIMP-1 主要抑制间质性胶原酶、基质分解素和明胶酶 B(92KDIV 型胶原酶), TIMP-2 主要抑制明胶酶 A(72KDIV 性胶原酶)。最近又发现 TIMP 还能和某些金属蛋白酶原的羧基末端结合而防止其被激活。

三. 细胞外基质的细胞来源^[16,17,18]

肝脏细胞(livercells)可分为(1)肝实质细胞即肝细胞(hepatocyte);(2)非实质细胞:血窦内皮细胞、Kupffer 细胞、陷窝细胞(pitcell)及肝脏星状细胞(Hepatic Stellate Cell, HSC)。过去后者的命名较混乱,曾有 Ito 细胞, 贮脂细胞(Fat-Storing Cell, Lipocyte)及窦周细胞(Perisinusoidal cell)等, 现在国际肝病学术界建议尽量采用肝脏星状细胞一词。近年来经过体外细胞培养、免疫组织化学及核酸分子原位杂交研究, 发现肝脏胶原及其它细胞外基质均主要由肝脏星状细胞产生(表 2)。

表 2 细胞外基质的细胞来源

细胞类型	所产生的细胞外基质
星状细胞	I, III, IV, V 型胶原, 层连蛋白, 细胞粘合物, 副层连蛋白, 蛋白多糖
血窦内皮细胞	IV 型胶原, 纤维连接蛋白, 血栓粘合物
Kupffer 细胞	明胶酶/IV 型胶原酶, TIMP
肝细胞	I, III, IV, V 型胶原, 纤维连接蛋白, VN, 蛋白多糖

参考文献

1. Biagini G, Ballardini G. Liver fibrosis and extracellular matrix. J Hepatol 1989; 8;115-24.
2. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the Liver and Biliary System, 9th ed. Oxford; Blackwell Scientific publications, 1993;357-69.
3. 贾继东, 王宝恩. 细胞外间质与肝纤维化. 基础医学与临床, 1992; 12;333-6.
4. Bissell DM, Friedman SL, Maher JJ, et al. Connective tissue biology and hepatic fibrosis; report of a conference. Hepatology, 1990; 11; 488-98.
5. Kleman J, -P, Giry-Lozenguez C, van der Rest M. Diversity and modularity of extracellular matrix macromolecules at the gene and protein levels. J Hepatol 1995; 22(Suppl 2);3-9.
6. Schuppan D, Milani S. 细胞外基质在正常肝脏及肝病中的作用. 见: 王宝恩 主编; 肝脏病学新进展—基础与临床. 北京出版社, 1996; 147-62.
7. Rockey DC. 肝脏各细胞成分在肝纤维化中的作用. 见: 王宝恩 主编; 肝脏病学新进展—基础与临床. 北京出版社, 1996;163-73.
8. Van Eyken P, Sciort R, Desmet VJ. Expression of the novel extracellular matrix component tenascin in normal and diseased human liver; an immunohistochemical study. J Hepatol 1990; 11;43-52.
9. Van Eyken P, Greerts A, DeBleser P, et al. Localization and cellular source of the extracellular matrix protein tenascin in normal and fibrotic rat liver. Hepatology 1992; 15;909-16.
10. Gressner A M, Meyer D. The Role of Proteoglycan in Fibrosis. In; Gressner AM, Ramadori G, eds. Molecular and Cell Biology of Liver Fibrogenesis. Dordrecht; Kluwer Academic Publishers, 1992; 115-36.
11. Rojkind M, Greenwel P. The Extracellular Matrix of the Liver. In; Arias I M, Boyer JL, Fausto N, et al. eds. The Liver; Biology and pathobiology, 3rd ed. New York; Raven Press, 1994;843-68.
12. 李玉瑞, 主编. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 15-25.
13. Arthur MJP. Collagenases and liver fibrosis. J Hepatol 1995; 22(Suppl 2);43.
14. Scoazec J-Y. Expression of cell-matrix adhesion molecules in the liver and their modulation during fibrosis. J Hepatol 1995; 22(Suppl 2);20-27.
15. Couvelard A, Scoazec J-Y, Feldmann D. Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. Am J Pathol 1993;143;738-52.