

血管紧张素转换酶抑制剂对肝纤维化大鼠 TGF β ₁, TGFR II, Smad3, 7 表达的影响

龚作炯, 宋仕玲, 阮鹏, 向龙奎, 张志荣

龚作炯, 宋仕玲, 阮鹏, 向龙奎, 张志荣, 武汉大学病毒学教育部重点实验室, 武汉大学人民医院感染科 湖北省武汉市 430060
龚作炯, 男, 1962-12-01 生, 湖北省云梦市人, 汉族, 1996 年比利时鲁汶大学医学院博士, 1996-1998 年比利时鲁汶大学医学院博士后, 现任武汉大学人民医院感染科主任, 教授, 博士生导师. 主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究.
项目负责人: 龚作炯, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学病毒学教育部重点实验室, 武汉大学人民医院感染科. zjgong@163.com
电话: 027-88041911-8385 传真: 027-88042922
收稿日期: 2003-12-19 接受日期: 2004-01-15

Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor on expression of TGF β ₁ and TGFR II mRNA, Smad3 and Smad7 on CCl₄-inducing rat hepatic fibrogenesis

Zuo-Jiong Gong, Shi-Ling Song, Peng Ruan, Long-Kui Xiang, Zhi-Rong Zhang

Zuo-Jiong Gong, Shi-Ling Song, Peng Ruan, Long-Kui Xiang, Zhi-Rong Zhang, Key Laboratory of Virology for Ministry of Education, Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China
Correspondence to: Dr. Zuo-Jiong Gong, Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China. zjgong@163.com
Received: 2003-12-19 Accepted: 2004-01-15

Abstract

AIM: To assess the effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril on preventing hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats and to investigate the alternation of the expression of transforming growth factor-beta1 (TGF β ₁) and its receptor II (TGFR II) and smads on liver tissues.

METHODS: 80 Wistar rats were randomly allocated into five groups: group A was healthy controls, groups B and C were hepatic fibrotic models induced by carbon tetrachloride (CCl₄), groups D and E were models treated with perindopril starting at the first and fourth week since rat exposed CCl₄. Except for group A, rats were subcutaneously injected with CCl₄ for eight weeks. Rats in groups A, B and D were killed at eighth week, and rats in groups C and E were sacrificed at twelveth week. The blood and liver of rats were collected for further determinations. The effects of perindopril on hepatic fibrosis were evaluated by detecting the level of TGF β ₁ and TGFR II mRNA by RT-PCR. And the expression and its localization of Smad3 and Smad7 in liver tissue by an immunohistochemical staining. The liver histopathology was also examined by HE staining and an electron microscope.

RESULTS: Contrasted to the groups B and C, the level of TGF β ₁, TGFR II mRNA and the expression of Smad3 were significantly decreased in groups D and E, and the expression

of Smad7 was also significantly increased in liver of the two groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of TGF β ₁ and TGFR II mRNA, Smad3 and Smad7 were not different between groups B and C ($P > 0.05$), but there was a significant difference between groups D and E ($P < 0.05$). Compared with model groups, the histological changes of fibrosis and the dynamic ultrastructural alterations in rats treated with perindopril were also obviously improved ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril has a protective effect on liver injury and can ameliorate hepatic fibrosis in rats induced by CCl₄. The mechanisms of perindopril anti-fibrosis may be associated with their effects of down-regulating TGF β ₁ and TGFR II mRNA and smad3, up-regulating Smad7 and result in suppressing the activation of hepatic stellate cells.

Gong ZJ, Song SL, Ruan P, Xiang LK, Zhang ZR. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor on expression of TGF β ₁ and TGFR II mRNA, Smad3 and Smad7 on CCl₄-inducing rat hepatic fibrogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1132-1135

摘要

目的: 观察血管紧张素转换酶抑制剂培哚普利抗大鼠肝纤维化的疗效及作用机制。

方法: 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组, 每组 16 只大鼠。A 组为正常对照组; B, C 组为肝纤维化模型组; D, E 组为培哚普利治疗组。B, C, D 和 E 组大鼠均给四氯化碳 8 wk 诱导肝纤维化; D, E 组大鼠分别于 4, 8 wk 予以培哚普利灌胃治疗。A, B, D 组大鼠于 8 wk 处死, C, E 组大鼠于 12 wk 处死。RT-PCR 检测大鼠肝组织 TGF β ₁ 与 TGFR II mRNA; 免疫组化技术检测 Smad3 及 Smad7 在肝内的表达及定位; HE 染色及电镜检测检测肝组织病理改变。

结果: 与模型组大鼠比较, RT-PCR 显示经培哚普利治疗大鼠肝内 TGF β ₁ 与 TGFR II mRNA ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以及 Smad3 表达明显降低; 而 Smad7 的表达增加, Smad3 的免疫阳性反应信号主要位于纤维间隔中的细胞质, Smad7 则主要在肝细胞质表达。大鼠肝组织 TGF β ₁ 与 TGFR II mRNA, Smad3 与 Smad7 在 D 组与 E 组表达比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 而上述物质在 B 组与 C 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。培哚普利治疗后, 大鼠肝小叶结构趋于正常, 纤维间隔明显变薄, 肝细胞超微结构改善。

结论: 培哚普利能有效地减轻肝纤维化大鼠的肝脏损伤及纤维化程度, 其机制可能与抑制肝内 TGF β ₁ 与 TGFR II mRNA

及 Smad3 表达, 促进 Smad7 表达有关。

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 TGF β , TGFR II, Smad3, 7 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5): 1132-1135

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1132.asp

0 引言

局部肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)可促进损伤组织修复和纤维化。心、肾及肝中的 RAS 有促纤维化作用^[1-3]。RAS 的这种促纤维化作用主要由多细胞产生并具多功能的转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF β_1)介导。RAS 中首要效应器分子血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)可增强 TGF β_1 的作用^[4-6], 并刺激肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)增生和肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)形成。肝内 TGF β_1 与其受体结合后, 再由 Smad 蛋白传导 TGF β_1 的信号至细胞内发挥作用^[7-8], TGF β_1 在肝纤维形成中起着重要作用^[9-10]。既往研究已经证实 ACEI 具有抗肝纤维化作用, 但其机制不甚明了。我们研究血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)培哚普利(perindopril)对 TGF β_1 信号转导各阶段的影响, 探索培哚普利抗实验性肝纤维化的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 80 只, 雌雄各半, 180-220 g, 6-8 周龄, 武汉大学人民医院实验动物中心提供, 饲养期间, 动物自由进食饮水。四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)分析纯购自武汉亚法生物技术有限公司, 以食用色拉油配制成 400 mL/L 溶液。培哚普利(perindopril)由法国施维雅公司(Les Laboratoires Servier)提供。Catrimox-14TM RNA 提取试剂盒, AMV 逆转录酶, Taq DNA 聚合酶, dNTP 混合物, DL2000 Marker 均为 Takara 公司产品。引物委托大连 Takara 公司合成。(1)TGF β_1 : 正义序列 5' -TGAGTGGCTGTCTTTTGACG -3', 反义序列 5' -ACTTCCAACC CAGGTCCTTC -3', 产物 350 bp; (2) TGFR II: 正义序列 5' -CTACAAGGCC AAGCTGAAGC-3', 反义序列 5' -AGCCATGGAGTAGACATCCG-3', 产物 580 bp; (3)GAPDH: 正义序列 5' -TCCCTCA ACATT GTCAGCAA-3', 反义序列 5' -AGCTCCACAACGG ATACATT-3', 产物 309 bp。抗 Smad3, 抗 Smad7 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。即用型 S-P 试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品。

1.2 方法 肝纤维化大鼠模型制作参照 Wang et al^[11]方法略加改进。大鼠随机分为 5 组: A 组为正常对照组, B 组为肝纤维化模型 1 组, C 组为肝纤维化模型 2 组, D 组为培哚普利治疗 1 组, E 组为培哚普利治疗 2 组, 每组各有大鼠 16 只。除 A 组外, 各组大鼠按 3 mL/kg sc 400 mL/L CCl₄, A 组予以生理盐水 3 mL/kg sc, 2 次/wk,

共 8 wk。D, E 组分别于造模 4, 8 wk 开始培哚普利 5 mg/kg, 加入生理盐水 ig, 1 次/d, 共用药各 8 wk。A, B, D 组大鼠于 8 wk 处死。C, E 组大鼠于 12 wk 处死, 分离血清 -20 °C 冰箱保存; 剖腹取部分肝左叶组织分别用 40 g/L 中性甲醛及 25 g/L 戊二醛固定, 其余肝组织 -70 °C 冰箱保存。

1.2.1 肝组织总 RNA 提取及 RT-PCR 反应 抽提肝组织总 RNA 按照 Catrimox-14TM RNA 提取试剂盒说明书操作, 测定样品 A268nm/A280nm 比值 1.6-1.8 时提取 RNA 纯度较好。逆转录反应: 无菌 0.2 mL 的 Eppendorf 管中加入总 RNA 1 μ g, Random primer (50 μ mol/L) 1 μ L, Ribonuclease inhibitor (40 MU/L) 1 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, AMV (5MU/L) 1 μ L, 5 \times AMV buffer 4 μ L 加 DEPC 处理的 dd H₂O 至 20 μ L。反应条件为 42 °C 1 h, 95 °C 5 min。PCR 扩增: 在无菌 0.2 mL 的 Eppendorf 管中加入: 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, 正、反义引物(30 μ mol/ μ L)各 1 μ L, cDNA 4 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 加无菌 dd H₂O 至 50 μ L, 最后加石蜡油 40 μ L。扩增条件: 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min, 1 个循环。取 PCR 产物 10 μ L 进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 拍照后进行扫描测定灰度值, 将目的 mRNA 与 GAPDH 的 RT-PCR 产物的灰度值比值作为目的 mRNA 相对表达量。

1.2.2 免疫组织化学法检测大鼠肝组织 Smad3 和 Smad7 表达 具体步骤参照 SP 试剂盒说明书进行。抗 Smad3 和抗 Smad7 多克隆抗体稀释度均为 1:100。PBS 代替一抗作阴性对照。光学显微镜下观察, 阳性组织呈棕黄色, 阴性部分呈蓝色。随机选取每张切片 10 个视野(\times 400 倍)测定阳性细胞的 A 值与所占视野面积, 取其乘积平均值为该组织切片所得值, 两项乘积越大表明组织中该抗原含量越高。

1.2.3 肝组织病理形态学观察 HE 染色光镜下观察肝组织炎症与纤维化程度。肝纤维化积分参照《肝纤维化诊断及诊疗评估共识》^[12]。电镜观察大鼠肝脏超微结构变化。

统计学处理 各组计量资料以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 数据呈正态分布采用 SPSS 统计软件(11.0 版)进行单因素组间方差分析。

2 结果

2.1 肝组织 TGF β_1 与 TGFR II mRNA 的表达 A 组大鼠肝脏仅微弱表达, B, C 组模型大鼠肝组织内高表达, 两组表达相对含量无明显差别(P > 0.05)。D, E 组显示缙沙坦对 TGF β_1 与 TGFR II mRNA 有较强抑制作用, 两种物质在肝内表达减弱, D 组两种物质表达相对含量少于 E 组(P < 0.05)。见(表 1, 图 1-3)。

2.2 肝组织 Smad3, Smad7 的表达 Smad3 与 Smad7 表达阳性物质主要集中在胞质内, 胞膜上也有少量表达。A 组在正常肝细胞内未见 Smad3 表达, 汇管区基质及间

质细胞胞质内少量表达; Smad7 在肝细胞胞质内强烈表达, 部分肝细胞核膜也有表达, 在汇管区未见明显表达. B, C 组肝内 Smad3 表达明显增强, 主要见于小叶周围扩大的纤维组织内的成纤维细胞, 窦周细胞, 炎性细胞以及增生的胆小管周围梭状细胞内, 肝细胞内无表达; Smad7 表达极少, 集中在少数肝细胞及纤维间隔梭状细胞胞质内, 阳性细胞着色浅淡. 两种物质在 B,

C 组表达量无明显差别; D, E 组肝组织: Smad3 表达量减少, 接近正常肝组织水平, 阳性表达集中在汇管区, 间质细胞和炎性细胞胞质内; Smad7 在肝细胞胞质内的表达强烈, 汇管区及纤维组织内表达较少, 二组阳性程度强于 B, C 组, D 组表达量与 E 组比较差异有显著性($P < 0.05$). (见表 1).

2.3 肝组织病理变化 光镜下 A 组肝脏肝小叶结构正常,

表 1 肝纤维化大鼠肝组织 TGFβ1 与 TGFR II mRNA, Smad3 和 Smad7 表达和坏死炎症和纤维化积分(mean±SD)

分组	n	TGFβ ₁ mRNA	TGFR2 mRNA	Smad3	Smad7	炎症坏死积分	纤维化积分
A	16	0.40 ± 0.06	0.28 ± 0.03	0.248 ± 0.042	4.674 ± 1.143	0	0
B	11	1.41 ± 0.09 ^b	1.27 ± 0.08 ^b	0.785 ± 0.904 ^b	0.414 ± 0.085 ^b	5.3 ± 1.3	7.4 ± 1.6
C	12	1.39 ± 0.05 ^b	1.31 ± 0.08 ^b	0.815 ± 0.677 ^b	0.481 ± 0.104 ^b	4.9 ± 1.3	7.0 ± 1.6
D	14	0.59 ± 0.05 ^d	0.46 ± 0.03 ^{bd}	0.279 ± 0.085 ^d	2.137 ± 1.011 ^d	3.2 ± 1.0 ^b	4.4 ± 1.3 ^b
E	13	0.693 ± 0.057 ^{bf}	0.563 ± 0.045 ^{bf}	0.323 ± 0.094 ^g	1.674 ± 1.015 ^g	3.8 ± 1.0 ^{ce}	5.5 ± 1.5 ^{de}

^bP < 0.01 vs A 组; ^cP < 0.01 vs B 组; ^dP < 0.01 vs C 组; ^eP < 0.05 vs D 组.

肝细胞索排列规则有序, 肝窦与汇管区成纤维细胞少; B, C 组正常肝小叶结构紊乱, 肝细胞坏死分布不规则, 部分肝细胞呈脂肪变性, 可见嗜酸性小体, 中央静脉偏位, 缺如或二个以上, 肝细胞索失去放射状肝索结构, 间质中有炎性细胞浸润, 坏死区及汇管区纤维结缔组织增生形成细小的条索, 纤维宽窄不一, 呈星芒状向肝小叶内延伸; D, E 组肝细胞坏死, 纤维组织增生减少, 肝小叶结构较为正常, 肝内炎症细胞减少, 接近正常肝组织. 见表 1. 电镜下 A 组大鼠肝细胞结构完整, Disse 间隙内可见富含脂滴的 HSC, 内皮细胞窗孔丰富, 内皮细胞外侧未见基底膜存在, 细胞间隙未见明显胶原纤维. 模型 B, C 组大鼠肝内成纤维细胞形成, 细胞间隙增宽, 其间有大量胶原纤维沉积; 肝细胞内线粒体肿胀, 粗面内质网数量减少, 滑面内质网增多; 内皮细胞间窗孔明显减少, 细胞外侧可见基底膜形成. D, E 治疗组成纤维细胞减少, 可见含有脂滴的 HSC, 肝细胞间胶原纤维明显减少, 线粒体形态基本正常, 内皮细胞间窗孔增多, D 组大鼠肝组织细胞间胶原纤维少于 E 组大鼠, 细胞间隙增宽不明显.

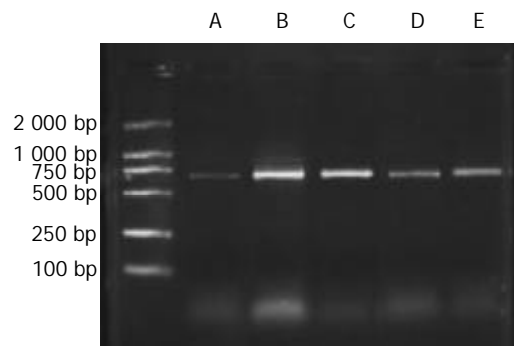


图 2 肝纤维化大鼠肝组织 TGFR II mRNA 的表达

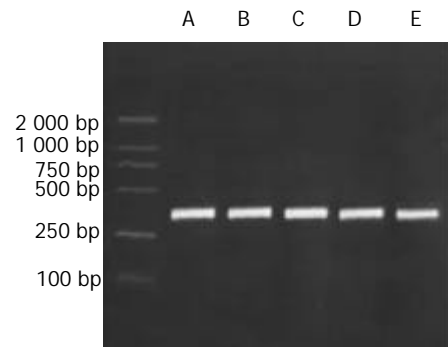


图 3 肝纤维化大鼠肝组织 GAPDH mRNA 的表达

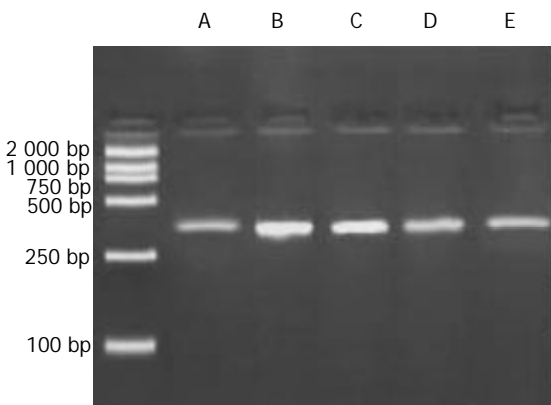


图 1 肝纤维化大鼠肝组织 TGFβ1 mRNA.

3 讨论

培哚普利可显著减轻肝纤维化大鼠肝脏炎症和纤维化程度, 电镜观察肝组织超微结构显示, 与肝纤维化模型组大鼠对比, 经培哚普利治疗后肝细胞器结构接近正常, 细胞间隙变窄, 其间胶原纤维显著减少, 内皮细胞间窗孔明显增多, 未见到成纤维细胞. 说明培哚普利对 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化具有保护肝细胞, 减少胶原纤维形成并在细胞间隙沉积作用, 减轻肝窦毛细血管化, 阻断肝纤维化发生. 既往研究已经证明 ACEI 具有抗实

验性肝纤维化作用^[1, 6, 13], 该类药物可降低肝纤维化动物血清羟脯氨酸酶, 胶原含量, 通过蛋白激酶 C 抑制 TIMP-1 表达, 减少 α -平滑肌肌动蛋白在 HSC 的表达, 本实验结果与之吻合.

慢性肝病时血液循环中 Ang II 增多, HSC 能表达 Ang II 的 I 型受体(Ang II receptor type I, AT1R)^[14], 外源性 Ang II 通过 AT1R 能促进 HSC 分裂增生和胶原合成^[15-16], 上调大鼠原代 HSC 内 TGF β_1 ^[17]. HSC 能通过自分泌与旁分泌作用正反馈增加 TGF β_1 合成分泌^[18-19], TGF β_1 又正反馈刺激 HSC 活化, 增生并转化为成纤维细胞, 最终大量 ECM 沉积于肝内, 形成肝纤维化. 本结果显示, 肝纤维化大鼠肝组织内 TGF β_1 及 TGFR II mRNA 表达明显上升, 而经过培哌普利治疗大鼠肝组织内这两种物质表达明显减少, 说明培哌普利使肝纤维化大鼠 TGF β_1 与其受体结合受阻, TGF β_1 信号下传在其受体水平上首先被抑制. 我们发现在 CCl₄ 致肝纤维化过程中, 早期应用培哌普利防治肝纤维化的作用明显优于晚期治疗组, 并接近于正常组, 说明早期给与 ACEI 培哌普利抑制 Ang II 生成, 可以早期阻止 HSC 活化分泌 TGF β_1 与 TGFR II, 并早期阻断二者结合. 基因转导 Smad7 可抑制实验性小鼠肝纤维化, Smad7 通过活化的 TGF β 受体, 封锁 TGF β_1 信号转导, 抑制 Smad2/3 磷酸化和活化的 Smad 复合物向核内易位, 最终降低 I 型胶原表达, 消除 HSC 的 TGF β_1 依赖增生抑制作用. TGF β 可快速诱导 Smad7 mRNA 表达, Smad7 参与调控 TGF β 反应的负反馈环路, 但在肝纤维化大鼠中未见 TGF β 诱导性 Smad7 上调, 而 Smad3 mRNA 则有增加. 而 Smad3 与 HSC 中的 TGF β 反应元件相连接, 刺激 α I 型胶原与 I 型纤溶酶原激活物抑制因子(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)基因转录, 与 Smad2 不同的是, 这种作用不受 Smad7 过表达的抑制. 我们研究发现, 肝纤维化大鼠经培哌普利治疗后, 在 TGF β_1 重要的下游信号通道蛋白 Smad 中, 对 TGF β_1 具有正反馈作用的 Smad3 表达显著减少, 而具有负反馈作用的 Smad7 表达显著增多, 培哌普利早期治疗组对肝纤维化大鼠肝组织 Smad 作用强于晚期治疗组. 即使大鼠仍不断受到 CCl₄ 促纤维化刺激作用下, ACEI 不但使纤维化大鼠肝组织内 TGF β_1 及其 II 型受体的合成, 结合受到抑制, 且作用于 TGF β_1 细胞内信号通道蛋白, 促进抑制型 Smad7 合成, 降低途径限制型 Smad3 合成, 在多水平阻止 TGF β_1 发挥病理作用, 以抑制 HSC 活化转化为成纤维细胞, 减少 ECM 减轻肝纤维化程度. 证实 ACEI 培哌普利具有抗试验性大鼠肝纤维化作用, 该药可改善肝组织细胞结构, 通过抑制 TGF β_1 和 TGFR II 受体 mRNA 表达, 肝内 TGF β 下游信号通道蛋白 Smad3 与 Smad7 削弱 TGF β 的信号传导通路, 从而抑制 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化程度. 由于病毒性肝炎及肝纤维化在我国是较严重的问题^[15-16], 本

课题须待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Border WA, Noble N. Maximizing hemodynamic-independent effects of angiotensin II antagonists in fibrotic diseases. *Semin Nephrol* 2001;21:563-572
- 2 Reaves PY, Gelband CH, Wang H, Yang H, Lu D, Berecek KH, Katovich MJ, Raizada MK. Permanent cardiovascular protection from hypertension by the AT(1) receptor antisense gene therapy in hypertensive rat offspring. *Circ Res* 1999;85:e44-50
- 3 Bader M. Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:S7-9
- 4 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:828-833
- 5 Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 2001;35:376-385
- 6 Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial growth factor. *Tumour Biol* 2002;23:348-356
- 7 Blobe GC, Schiemann WP, Pepin MC, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt MD. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem* 2001;276:24627-24637
- 8 Fortuno ES 3rd, LeSueur JA, Graff JM. The amino terminus of Smads permits transcriptional specificity. *Dev Biol* 2001;230:110-124
- 9 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003;124:147-159
- 10 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGFbeta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807
- 11 Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, Kawada N, Kaneda K. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology* 2000;32:980-989
- 12 中华肝病协会肝纤维化研究组. 肝纤维化诊断和疗效评估共识. *中华肝病杂志* 2002;10:327-328
- 13 Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Imazu H, Yanase K, Kuriyama S, Fukui H. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats. *J Hepatol* 2002;37:22-30
- 14 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149-1156
- 15 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 16 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-750
- 17 Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H. An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 2003;139:1085-1094
- 18 Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGFbeta. *Gastroenterology* 2001;120:1784-1800