

# Notch信号转导通路在原代肝星状细胞体外培养活化中的作用

潘艳<sup>1</sup>, 张启迪<sup>2</sup>, 房凤梅<sup>1</sup>, 华香<sup>1</sup>, 王维<sup>1</sup>, 傅承宏<sup>2</sup>, 秦娟<sup>1</sup>, 王万鹏<sup>3</sup> (1.涟水县人民医院 检验科, 江苏 淮安 223400; 2.上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院 消化科, 上海 200080; 3.涟水县人民医院 肾脏科, 江苏 淮安 223400)

**摘要:** 目的 探讨Notch信号转导通路在肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)体外培养活化中的作用。方法 采用两步酶灌注法分离培养原代大鼠HSC并进行体外培养。激光共聚焦显微镜检测体外培养HSC第1天和第7天时形态、胞内维生素A、静止标志胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和活化标志 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的变化。采用RT-PCR和Western blot检测HSC体外培养0天、3天和7天时上皮-间充质转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)相关分子 $\alpha$ -SMA、I型胶原(collegen I)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、蜗牛家族转录抑制因子1(snail family transcriptional repressor 1, Snail 1)等和Notch信号转导通路(受体Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4与靶基因Hes1、Hey1、Hey2、HeyL)的变化。使用Notch受体阻断剂DAPT干预后,检测体外培养的HSC中活化相关分子( $\alpha$ -SMA、Collegen I、N-cadherin和Snail 1等)的改变。结果 ①初分离的HSC经7天体外培养后逐渐向肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs)样转化,表现为形态变长、维生素A水平和GFAP表达降低, $\alpha$ -SMA表达升高。②RT-PCR与Western blot结果表明,HSC体外培养存在自发EMT现象,表现为 $\alpha$ -SMA、Collegen I、N-cadherin和Snail 1表达上调及E-cadherin、CK7、CK19和Desmoplakin表达下调,同时Notch 2、Notch 3及Notch靶基因Hey2、HeyL表达逐渐增加。③使用DAPT后,可显著抑制原代HSC体外活化,表现为 $\alpha$ -SMA、Collegen I、N-cadherin和Snail 1的下调及E-cadherin、CK 7、CK 19和Desmoplakin转录或蛋白表达水平上调。结论 Notch信号转导通路的激活可能参与HSC的活化,可能是抗肝纤维化治疗的潜在靶点。

**关键词:** 细胞分离; 肝纤维化; 上皮-间充质转分化; 肝星状细胞; Notch信号转导通路

## The role of Notch signal transduction pathway on the activation of primary hepatic stellate cells *in vitro*

PAN Yan<sup>1</sup>, ZHANG Qi-di<sup>2</sup>, FANG Feng-Mei<sup>1</sup>, HUA Xiang<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, FU Chen-Hong<sup>2</sup>, QIN Juan<sup>1</sup>, WANG Wan-peng<sup>3</sup> (1.Department of Laboratory Medicine, LianShui People's Hospital, Huai'an 225400, Jiangsu Province, China; 2.Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China; 3.Department of Nephrology, Lianshui People's Hospital, Huai'an 225400, Jiangsu Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of Notch signal transduction pathway on the activation of primary hepatic stellate cells (HSC) *in vitro*. **Methods** HSC were isolated from the liver of male rats by enzymatic perfusion. Laser scanning confocal microscope (LSCM) was carried out to detect the change of cell shape, expression of vitamin A, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) at day 0 and day 7 *in vitro*. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of gene associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [ $\alpha$ -SMA, Collegen I, N-cadherin, snail family transcriptional repressor 1 (Snail 1), et al] and Notch signaling pathway (Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4 and their target gene Hes 1, Hey1, Hey2, HeyL) in HSC at day 0, day 3 and day 7. DAPT were administrated to inhibit Notch signaling pathway of primary HSC at day 4, and the expression of gene associated with EMT ( $\alpha$ -SMA, Collegen I, N-cadherin, Snail 1, et al) were detected by RT-PCR and Western blot at day 7. **Results** ①The primary isolated HSC was cultured *in vitro* for 7 days and then gradually transformed to myofibroblast (MFs), which showed that the morphology

became longer, the expression of vitamin A and GFAP decreased, and the expression of  $\alpha$ -SMA increased. ②RT-PCR and Western blot showed that spontaneous EMT occurred during the culture of HSC *in vitro*, characterized by the up-regulation of  $\alpha$ -SMA, Collagen I, N-cadherin, Snail 1 and down-regulation of E-cadherin, CK7, CK19 and Desmoplakin. The expression of Notch 2, Notch 3 and their target genes (Hey2, HeyL) increased. ③DAPT could significantly inhibit the expression mRNA or protein of  $\alpha$ -SMA, Collagen I, N-cadherin and Snail 1, et al, and could increase the expression of E-cadherin, CK-7, CK-19 and Desmoplakin, which were typical ductal epithelial cell markers. **Conclusions** The activation of primary HSC is closely associated with the activation of the Notch signaling pathway. Notch signaling may provide a possible new therapeutic target for the treatment of liver fibrosis.

**Key words:** Cell separation; Liver fibrosis; Epithelial-mesenchymal transition; Hepatic stellate cells; Notch signaling transduction pathway

肝纤维化是指各种致病因素所致的肝内结缔组织异常增生, 导致肝内弥漫性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉淀的病理过程, 是慢性肝病进展不可分割的一部分, 最终可导致肝硬化和肝细胞癌<sup>[1,2]</sup>。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)位于肝脏的Disse腔, 正常肝脏中HSC约占肝脏细胞总数的6%<sup>[3]</sup>。HSC呈纺锤形或不规则形, 细胞内含丰富的维生素A, 是肝脏合成ECM的主要细胞。HSC活化时, 富含维生素A的静止HSC转化为增殖的肌成纤维细胞(myofibroblast, MFs)是肝纤维化发生发展的中心事件<sup>[4-6]</sup>。上皮细胞-间充质转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)现象是细胞失去上皮特征获得间质细胞表型的生物现象。HSC的活化也可看作EMT的一种表现<sup>[7]</sup>。近来研究显示, Notch信号转导通路不仅在胚胎发育与肿瘤发生中发挥重要作用, 而且与多种纤维化疾病有关<sup>[8,9]</sup>。基于此, 本研究将观察Notch信号转导通路在HSC活化中的作用。

## 1 资料与方法

1.1 实验动物 雄性SD大鼠10只, SPF级, 体质量为400~500 g, 用于原代细胞培养, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

1.2 主要试剂 Percoll分离液购于GE Healthcare公司, Nycodenz购于挪威Axis-shield公司, 2,4-二氨基-5-苯噻唑(2,4-diamino-5-phenylthiazole amphenazole, DAPT)购于美国Sigma公司; DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素双抗、IV型胶原酶和I型DNA酶购于美国Invitrogen公司; 抗体 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、Hes相关家族转录因子L(Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif-like, HeyL)、E-钙连接素(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、细胞角蛋白7(cytokeratin 7, CK7)、磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde

phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购于美国Abcam公司, 抗体cytokeratin 19(CK-19)、Notch 2、Notch 3购于美国Santa Cruz公司; 抗体Hey 2购于美国Sigma公司; ECL化学发光试剂盒购自PIERCE公司。各种PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; RNA抽提试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green PCR试剂盒购于宝生物工程有限公司(大连)。

1.3 HSC的分离、培养、自然活化和干预 大鼠麻醉后, 门静脉插管并灌注EDTA液和0.5 mg/ml胶原酶溶液。剪下肝脏并剔除肝包膜及结缔组织, 撕碎后用0.5 mg/ml IV型胶原酶与20  $\mu$ g/ml DNA酶I于37℃振荡消化30分钟, 无菌网过滤后收集细胞悬液。以链蛋白酶E和20  $\mu$ g/ml DNA酶I孵育使肝细胞破坏, 梯度离心(8.2%和17.6% Nycodenz)法收集并纯化HSC<sup>[10]</sup>。原代HSC种植于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液中, 5% CO<sub>2</sub>、37℃孵育箱培养, 24小时首次换液, 以后隔日换液。干预组在第4天使用含DAPT(溶解于DMSO中并加入细胞培养基, 至终浓度为1  $\mu$ mol/L)的高糖DMEM培养液, 以含同等剂量DMSO的高糖DMEM培养液作为对照组, 作用时间3天。每组实验重复3次。

1.4 激光共聚焦显微镜检测HSC活化指标 免疫荧光: 4%多聚甲醛固定细胞, 0.5% tritonX-100破膜, 4℃孵育一抗GFAP(1:200, 静止HSC的标志)和 $\alpha$ -SMA(1:100, 活化HSC的标志)24小时, PBS清洗3遍后, 加入对应荧光二抗37℃孵育1小时。DAPI染核3分钟后封片、拍照, 观察细胞内GFAP和 $\alpha$ -SMA含量。维生素A可自发蓝绿色荧光, 细胞固定后, 激光共聚焦显微镜328 nm波长下观察细胞内维生素A(蓝绿色)含量。

1.5 实时定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 使用TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit提取HSC内总RNA, 以2  $\mu$ g总RNA为模板进行反转录, 反应条件为37℃15分钟, 85℃5秒。

PCR 体系 10  $\mu$ l, 引物由上海生工合成, 序列见表 1, 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 30 秒; 95  $^{\circ}$ C 5 秒, 60  $^{\circ}$ C 30 秒, 40 个循环。以 GAPDH 标准化数据, 根据所得 Ct 值运用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量法分别计算目的基因的相对表达量。每个样本做 3 复孔, 取平均值。

**1.6 Western blot** HSC 体外培养第 0 天、3 天、7 天及 DAPT 干预 3 天时, 弃去细胞培养基, PBS 漂洗 5 分钟, 重复 3 次, 加入 200  $\mu$ l 含 1% PMSF 的细胞裂解液, 刮取所有细胞, 室温 13000 rpm 离心 15 分钟, 离心半径为 10 cm, 进行蛋白浓度定量并配成统一浓度。加入 1/4 体积  $5\times$  上样缓冲液, 沸水中加热 10 分钟。配制 7.5% 或 10% 分离胶电泳, 以稳定电压 100 V 湿转 2~3 小时 (由蛋白质分子量而定), 分别加入各种一抗, 4  $^{\circ}$ C 过夜, PBST 漂洗 10 分钟, 重复 3 次。加入 HRP 标记的相应二抗 (1 : 4000), 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, PBST 漂洗 3

次, 每次 15 分钟。用 Super-GL ECL 超敏发光液进行化学发光检测, 并对 X 光片曝光。经显影定影处理后, 晾干的胶片最后用凝胶成像分析系统拍照。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 21 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 原代 HSC 分离培养及鉴定** 初分离的肝星状细胞呈圆形, 体积较小, 胞内含折光性较强的脂滴 (图 1A), 在 328 nm 激发光下可见维生素 A 自发蓝色荧光 (图 1B), 免疫荧光可见高表达的 HSC 标志蛋白 GFAP (图 1C), 但很少见 MFs 标志蛋白  $\alpha$ -SMA (图 1D)。培养至 7 天时, HSC 胞体逐渐变为长梭型 (图 1E), 细胞未见含维生素 A (图 1F), 标志蛋白 GFAP 表达减少 (图 1G), 并高表达 MFs 特征性标志  $\alpha$ -SMA, 即 HSC 的活化标志

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)	序列号
GFAP	正向: 5'-CGTCTCAGTTGTGAAGGTCTATT-3'	96	NM_017009.2
	反向: 5'-CAGAAGGATGGTTGTGGACTC-3'		
PPAR $\gamma$	正向: 5'-GAGATCCTCCTGTTGACCCAG-3'	129	NM_013124.3
	反向: 5'-CCACAGAGCTGATTCCGAAGT-3'		
$\alpha$ -SMA	正向: 5'-GCTCCAGCTATGTGTGAAGAGG-3'	151	NM_031004.2
	反向: 5'-CAACCATCACTCCCTGGTGTC-3'		
Collagen I	正向: 5'-CGGAATGAAGGGACACAGA-3'	148	NM_053304.1
	反向: 5'-ACCTCTCTCACCAGGCAGAC-3'		
CK-7	正向: 5'-CCAGCGTGCCAAGTTAGAGT-3'	75	NM_001047870.1
	反向: 5'-GCATGAGCATCCTTGATTGC-3'		
CK-19	正向: 5'-GTCTTCTATGGGGCATGG-3'	170	NM_199498.2
	反向: 5'-TAAAACTTCCACCGCGTCCT-3'		
desmoplakin	正向: 5'-AGAACACCCTCAGAAAGCGG-3'	185	XM_225259.8
	反向: 5'-TAGGACTACCCTGGTGAGC-3'		
E-cadherin	正向: 5'-CTGGGGTCATCAGTGTGGTC-3'	183	NM_031334.1
	反向: 5'-CTTGACCCTGGTACGTGCTT-3'		
N-cadherin	正向: 5'-CTGACTGAGGAGCCGATGAAG-3'	101	NM_031333.1
	反向: 5'-TCTCTCTTCTGCCTTTGTAGACG-3'		
Snail 1	正向: 5'-GGTTCCTGCTTGGCTCTCTT-3'	157	NM_053805.1
	反向: 5'-CAGTGGGTTGGCTTTAGTTCT-3'		
Notch 1	正向: 5'-CACCCATGACCACTACCCAGTT-3'	186	NM_001105721.1
	反向: 5'-CCTCGGACCAATCAGAGATGTT-3'		
Notch 2	正向: 5'-CTCCAAGCCGTGTATGAACA-3'	105	NM_024358.1
	反向: 5'-TTGATGTCCTCCTCACAGTCC-3'		
Notch 3	正向: 5'-TGAGACTGACTTGCTGGACTG-3'	114	NM_020087.2
	反向: 5'-CAATGTGTGCCTGTGTAGCC-3'		
Notch 4	正向: 5'-CTCTGTCCGCCTTCTTTCTG-3'	156	NM_001002827.1
	反向: 5'-CAAGCACACACCTCCGTTG-3'		
Hes 1	正向: 5'-CGACACCGACAAACCAAA-3'	174	NM_024360.3
	反向: 5'-GAATGTCTGCCTTCTCCAGCTT-3'		
Hey 1	正向: 5'-GCCCTGGCTATGGACTATCG-3'	146	NM_001191845.1
	反向: 5'-CGCTGGGATGCGTAGTTGT-3'		
Hey 2	正向: 5'-TGACAGAAGTGCGAGGTA-3'	93	NM_130417.1
	反向: 5'-CACAGGTGCTGAGATGAGAG-3'		
Hey L	正向: 5'-CACAGGTGCTGAGATGAGAG-3'	119	NM_001107977.1
	反向: 5'-CACAGGTGCTGAGATGAGAG-3'		
GAPDH	正向: 5'-ATCAACGGGAAACCCATCA-3'	108	NM_017008.4
	反向: 5'-GGTGGTGAAGACGCCAGTAG-3'		

(图 1H)。

**2.2 原代 HSC 体外培养时自发 EMT 转化伴随的分子变化** 为进一步确认体外培养 HSC 时是否存在自发 EMT 过程, 选择体外培养 0 天、3 天和 7 天的 HSC 作为检测对象。RT-PCR 及 Western blot 结果见图 2, 随着培养时间的延长, EMT 及 MFs 标志物  $\alpha$ -SMA、Collegen I、N-cadherin、Snail 1 转录

或蛋白表达逐渐升高(图 2A、2D、2E), 而 HSC 蛋白标志物 GFAP、PPAR $\gamma$  以及管状上皮细胞标志物 CK-19、CK-7、Desmoplakin 以及 E-cadherin 表达下降(图 2B、2C、2D、2E)。

**2.3 体外培养 HSC 向 MFs 转化时伴随的 Notch 信号转导通路激活** 如图 3 所示, 伴随 HSC 体外培养时间的延长, HSC 内 Notch 2、Notch 3 mRNA 和蛋白

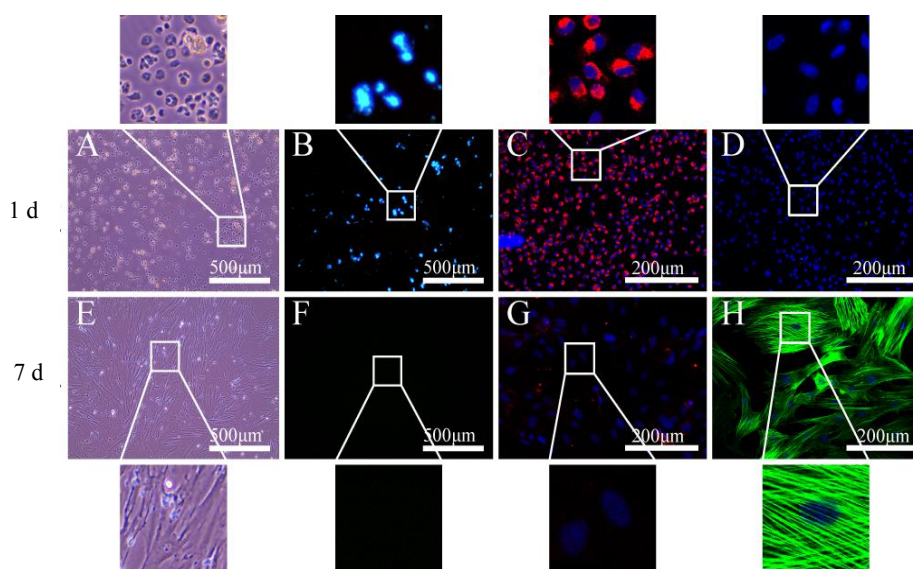


图 1 肝星状细胞的分离、培养及鉴定

注: A、E 为 HSC 培养 1 天(A)和 7 天(E)时形态学观察; B、F 为 HSCs 培养 1 天(B)和 7 天(F)胞内维生素 A 荧光; C、G 为免疫荧光观察培养 1 天(C)和 7 天(G) HSC 内 GFAP 的表达(红色), 蓝色为 DAPI 核染色; D、H 为免疫荧光观察 1 天(D)和 7 天(H) HSC 内  $\alpha$ -SMA 的表达(绿色), 蓝色为 DAPI 核染色

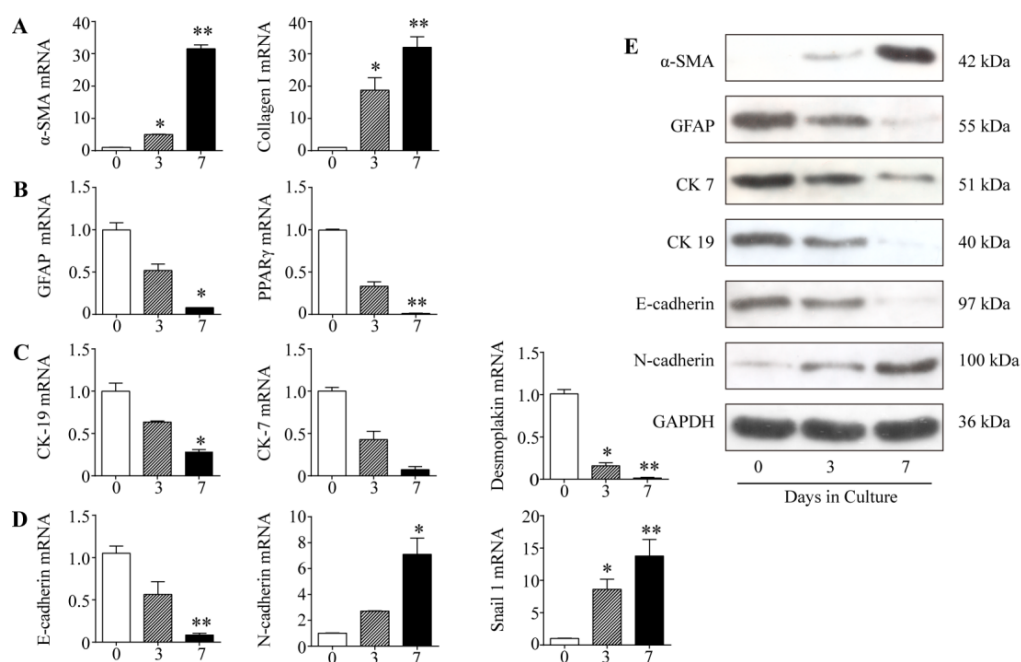


图 2 HSC 体外培养时自发 EMT 转化伴随的分子变化

注: A~D 为 qRT-PCR 分析体外培养 HSC 0 天、3 天和 7 天时  $\alpha$ -SMA、Collegen I、GFAP、PPAR $\gamma$ 、CK-19、CK-7、Desmoplakin、E-cadherin、N-cadherin 及 Snail 1 mRNA 水平的变化, 与 0 天比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; E 为 Western blot 检测  $\alpha$ -SMA、GFAP、PPAR $\gamma$ 、CK-19、CK-7、E-cadherin、N-cadherin 和 Snail 1 蛋白水平表达变化

表达逐渐增加(图3A、3C),而Notch 1和Notch 4未见显著变化(图3A)。进一步观察Notch信号转导通路的靶基因,结果显示Hey2和HeyL存在转录和蛋白水平上调(图3B、3C),而Hes1和Hey1的表达无显著变化(图3B),进一步提示体外培养时,在HSC向MFs转化过程中伴随Notch信号转导通路的激活。

**2.4 DAPT抑制Notch信号转导通路对体外培养HSC活化的影响** 为进一步验证抑制Notch信号对HSC活化的影响,采用Notch信号转导通路抑制

剂DAPT干预HSC。结果如图4所示,DAPT可显著降低原代HSC体外培养时Notch靶基因Hey2和HeyL(图4A)、MFs标志物 $\alpha$ -SMA和Collagen I、EMT激活标志物Snail 1和N-cadherin(图4D)的mRNA或蛋白表达(图E);而与DMSO组相比,DAPT组HSC的静止标志物如E-Cadherin(图4B)、CK-7、CK-19及Desmoplakin(图4C)在mRNA或蛋白水平表达显著升高(图4E),进一步证明了Notch信号转导通路参与HSC体外自发EMT过程。

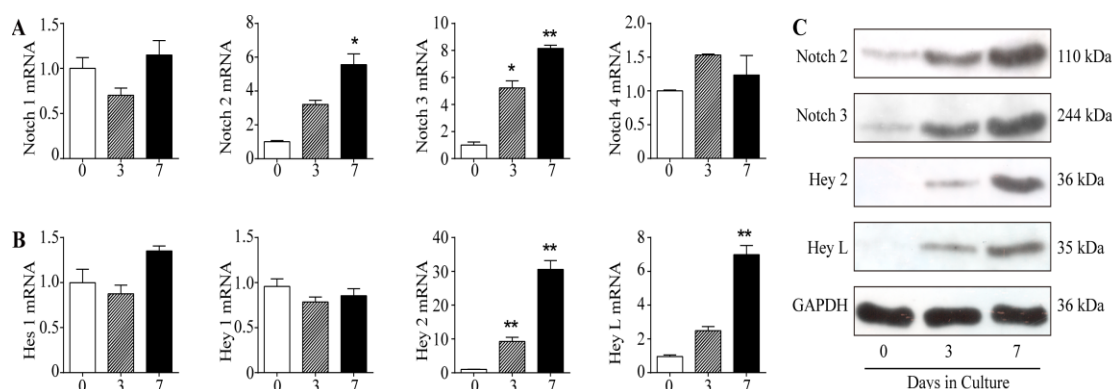


图3 体外培养HSC伴随Notch信号转导通路的自发激活

注: A为RT-PCR分析Notch受体表达变化(0天、3天、7天); B为RT-PCR分析Notch靶基因表达的变化(0天、3天、7天); C为Western blot检测原代HSC体外培养时Notch受体及靶基因蛋白表达变化;与0天比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

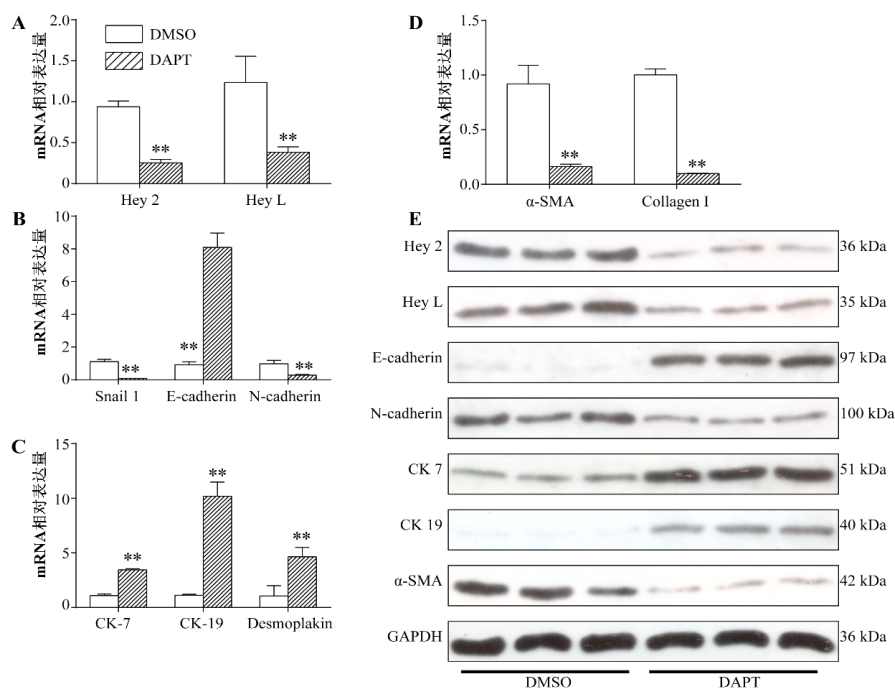


图4 DAPT抑制Notch信号转导通路对HSC活化的影响

注: A~D分别为RT-PCR检测DAPT作用于原代HSC后对Notch靶基因(A)、EMT标志物(B)、上皮细胞标志物(C)及MFs标志物(D)mRNA水平的影响,与DMSO组比较, \*\* $P < 0.01$ ; E为Western blot检测DAPT对HSC培养过程中Notch信号转导通路和EMT相关蛋白表达的影响

### 3 讨论

肝纤维化是慢性肝病进展的重要环节,最终可导致终末期肝病,引起严重的肝功能不全和血流改变,甚至威胁生命。越来越多的研究显示,MFs激活和再生可能是肝纤维化的核心环节<sup>[11,12]</sup>。目前认为,肝脏MFs可来源于HSC、汇管区纤维母细胞(portal fibroblasts, PFs)、骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)或肝/胆管细胞EMT作用<sup>[11,13]</sup>。

近年来,HSC在肝纤维化中的作用越来越受到关注。HSC在正常生理环境下处于静息状态,增殖活性低,合成胶原能力低,胞内存储丰富的维生素A,但不表达 $\alpha$ -SMA<sup>[14,15]</sup>。HSC在活化时形态与功能发生改变,胞浆内贮存的维生素A丧失并高表达 $\alpha$ -SMA,其功能和形态均与MFs相似,因此目前很多学者认为HSC的活化可看作EMT的一种表现。EMT现象是指细胞失去上皮特征而获得间质细胞表型的生物现象。EMT的主要表现有<sup>[16]</sup>:①病理状态下上皮细胞黏附连接变弱;②上皮细胞内 $\alpha$ -SMA表达逐渐上升,并伴有肌动蛋白的聚合,细胞骨架重组;③基底膜崩解;④向成纤维细胞或肌成纤维细胞转化,并伴有迁移和侵袭能力增强及ECM的大量分泌,从而导致ECM的过量产生和积蓄,最终形成肝硬化,肝功能丧失。EMT过程主要的分子生物学特征<sup>[16,17]</sup>为上皮细胞标志如CK-19、CK-7、Desmoplakin等和细胞连接蛋白E-cadherin、ZO-1等表达下降,成纤维细胞特征性分子特征变强,如 $\alpha$ -SMA、FSP1 collagen I、fibronectin和N-cadherin的表达增加。本研究结果表明,体外培养原代HSC 7天时,HSC的细胞形态和胞内维生素A水平变化与上述HSC活化表现一致,亦出现了与EMT现象相同的分子生物学变化。

多种细胞内信号转导通路参与调控EMT的发展,如TGF- $\beta$ /Smad、MRPK/ERK何Wnt/ $\beta$ -catenin等。有研究表明,Notch通路能够促进EMT从而在肾纤维化发病中起关键调节作用<sup>[18,19]</sup>。本研究从细胞水平观察了HSC转化为MFs过程中Notch信号转导通路的变化,结果表明当HSC在体外转化为MFs时,Notch 2、Notch3及其靶基因Hey2、HeyL的表达升高,提示Notch信号在原代HSC转化过程中处于激活状态。本研究中Notch信号在HSC转化过程中的变化与先前研究结果有所差异。如Chen等<sup>[20]</sup>研究发现HSC细胞系HSC-T6主要表达Notch3,而TGF- $\beta$ 1刺激后,靶基因改变主要为Hes 1,而非本研究中的Hey2和HeyL;Xie等研究显示原代小鼠

HSC在自然转化过程中,Notch-2受体升高,靶基因Hey1、Hey2表达增高<sup>[21]</sup>。这种Notch变化的差异可能与种、属、原代细胞和细胞系有关。然而,使用Notch信号转导通路特异性抑制剂DAPT可抑制体外培养HSC时的自发活化与之前的研究结果一致。虽然体外实验表明抑制Notch信号转导通路可抑制HSC体外培养的自发活化,但对体内HSC的活化是否有作用,还需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 涂传涛,王吉耀.肝纤维化的细胞分子机制研究进展[J].中华肝脏病杂志,2014,22(1):5-8.
- [2] 马艳华,韩铭,冯胜虎,等.HBV相关肝纤维化患者血浆microRNA的差异表达[J/CD].中国肝脏病杂志(电子版),2017,9(1):20-26.
- [3] Li G, Li J, Li C, et al. MicroRNA-125a-5p Contributes to hepatic stellate cell activation through targeting FIH1[J]. Cell Physiol Biochem,2016,38(4):1544-1552.
- [4] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. Gut,2015,64(5):830-841.
- [5] Guan W, Cheng F, Wu H, et al. GATA binding protein 3 is correlated with leptin regulation of PPARgamma1 in hepatic stellate cells[J]. J Cell Mol Med,2017,21(3):568-578.
- [6] Zhou DD, Wang X, Wang Y, et al. MicroRNA-145 inhibits hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting ZEB2 through Wnt/beta-catenin pathway[J]. Mol Immunol,2016,75:151-160.
- [7] Dai W, Zhao J, Tang N, et al. MicroRNA-155 attenuates activation of hepatic stellate cell by simultaneously preventing EMT process and ERK1 signalling pathway[J]. Liver Int,2015,35(4):1234-1243.
- [8] Lee SJ, Kim KH, Pak SC, et al. Notch signaling affects biliary fibrosis via transcriptional regulation of RBP-jkappa in an animal model of chronic liver disease[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(10):12688-12697.
- [9] Zheng S, Zhang P, Chen Y, et al. Inhibition of Notch signaling attenuates schistosomiasis hepatic fibrosis via blocking macrophage M2 polarization[J]. PLoS One,2016,11(11):e0166808.
- [10] Mederacke I, Dapito DH, Afio S, et al. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers[J]. Nat Protoc,2015,10(2):305-315.
- [11] Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study[J]. J Cell Biol,1969,43(3):506-520.
- [12] Fullár A, Firneisz G, Regős E, et al. Response of hepatic stellate cells to TGF $\beta$ 1 differs from the response of myofibroblasts. Decorin protects against the action of growth factor[J]. Pathol Oncol Res,2017,23(2):287-294.
- [13] Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, et al. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury[J]. Exp Toxicol Pathol,2013,65(7-8):1159-1171.
- [14] Xu T, Ni MM, Xing L, et al. NLR3 regulates TGF-beta1-induced proliferation and activation of hepatic stellate cells during hepatic fibrosis[J]. Int J Biochem Cell Biol,2016,70:92-104.
- [15] Zhong C, Jiang C, Xia X, et al. Antihepatic fibrosis effect of active components isolated from green asparagus (*Asparagus officinalis*

- L.) involves the inactivation of hepatic stellate cells[J]. J Agric Food Chem,2015,63(26):6027-6034.
- [16] Pan Q, Wang YQ, Li GM, et al. Fuzheng Huayu recipe ameliorates liver fibrosis by restoring balance between epithelial-to-mesenchymal transition and mesenchymal-to-epithelial transition in hepatic stellate cells[J]. Biomed Res Int,2015,2015:935903.
- [17] Hazzan M, Hertig A, Buob D, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients[J]. J Am Soc Nephrol,2011,22(7):1375-1381.
- [18] Bielez B, Sirin Y, Si H, et al. Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans[J]. J Clin Invest,2010,120(11):4040-4054.
- [19] Zheng J, Yu F, Dong P, et al. Long non-coding RNA PVT1 activates hepatic stellate cells through competitively binding microRNA-152[J]. Oncotarget,2016,7(39):62886-62897.
- [20] Chen YX, Weng ZH, Zhang SL. Notch3 regulates the activation of hepatic stellate cells[J]. World J Gastroenterol,2012,18(12):1397-403.
- [21] Xie G, Karaca G, Swiderska-Syn M, et al. Cross-talk between Notch and Hedgehog regulates hepatic stellate cell fate in mice[J]. Hepatology,2013,58(5):1801-1813.

收稿日期: 2017-08-01

潘艳, 张启迪, 房凤梅, 等. Notch信号转导通路在原代肝星状细胞体外培养活化中的作用[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018,10(3):66-72.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 《中国肝脏病杂志(电子版)》表格规范

文内表格的设置应有助于简洁、明了、直观地表达结果。若表中的内容简单, 仅少数几个统计数字, 用简洁文字可表达清楚的, 可删去表格, 选用文字描述; 若文字叙述冗长烦琐, 而用表格表达便于理解, 则建议作者选用表格。表、图、文字描述三者之间应无重复。

表格设计的基本原则是重点突出、简单明了, 主谓分明、层次清楚, 结构完整、有自明性。自明性即只看表, 不阅读正文, 即可理解统计或对比的意义。

表格一律采用三线表, 即以表顶线、表头线、表底线3条横线为基本线条构架的表。每个表均应有序号和表题, 居中排印在表的上方。表的序号一律用阿拉伯数字。全文只有一个表时, 表序号为“表1”。表题说明表的内容, 应简明扼要, 突出中心。

表头由主语横标目和谓语纵标目组成, 表明表格内的项目。所谓主语、谓语, 是根据表格所要表达的内容划分的。被研究的事物的主要标志, 或者说是分组标志, 一般作为主语; 而各类统计指标, 一般作为谓语。主语一般安排在表的左侧, 谓语一般安排在表的右侧。尽量避免主谓语倒置, 影响表格的表达效果。

本刊编辑部