

重组 GGPPS 腺病毒载体的构建 及其调节肝星状细胞活化的研究

来珊珊^{2,3} 陈卫波¹ 徐 康^{2,3} 丁 尧^{2,3} 沈 宁¹,
潘飞燕^{2,3} 李朝军^{1,4} 薛 斌^{1,4}

(1. 南京大学医学院 江苏 南京 210093)

(2. 南京师范大学生命科学学院 江苏 南京 210046)

(3. 分子医学生物技术江苏省重点实验室 江苏 南京 210046)

(4. 江苏省医学分子技术实验室 江苏 南京 210093)

[摘要] 目的: 构建携带人源 *ggpps* 基因的重组腺病毒并用其研究 GGPPS 对人肝星状细胞的活化作用. 方法: 利用 PCR 方法扩增 *ggpps* 基因片段, 并亚克隆至腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中, 形成穿梭质粒 pAdTrack-CMV-GGPPS. 测序正确后, 经 *PmeI* 单酶切线性化的 pAdTrack-CMV-GGPPS 与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 用电穿孔法共转化大肠杆菌 BJ5183, 进行同源重组. 经 *PacI* 酶切鉴定正确后, 用磷酸钙法转染 QBI-293A 细胞, 包装成重组体腺病毒 Ad-GGPPS 颗粒. 利用穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中 GFP 报告基因的表达, 观察重组腺病毒的产生. 用 TCID₅₀ 法测定病毒颗粒的浓度, 并用免疫蛋白印迹和实时荧光定量 PCR 方法鉴定目的基因的表达. 然后利用该病毒感染人肝星状细胞 LX-2, 观察对肝星状细胞的活化以及细胞外基质合成的影响. 结果: 成功地构建了携带 *ggpps* 基因的重组腺病毒, 得到的病毒滴度经 TCID₅₀ 法检测为 2.5×10^9 PFU/mL. 该病毒能够在人源的肝脏细胞中成功表达 GGPPS 蛋白. 在 LX-2 细胞中过量表达 GGPPS 可以促进肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSCs)转分化成表达平滑肌肌动蛋白 α (Alpha-Smooth muscle actin, α -SMA) 的肌成纤维细胞(Myofibroblast, MF), 同时检测到胞外基质成分纤连蛋白(Fibronectin, FN)的表达量显著增加. 结论: 成功构建的重组 GGPPS 腺病毒能促进肝星状细胞的活化.

[关键词] GGPPS 重组腺病毒 肝星状细胞

[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2011)04-0083-06

Construction of Recombinant Adenovirus Vector Containing Human *ggpps* Gene and Its Effect on Activation of HSCs

Lai Shanshan^{2,3} ,Chen Weibo¹ ,Xu Kang^{2,3} ,Ding Yao^{2,3} ,Shen Ning¹ ,
Pan Feiyan^{2,3} ,Li Chaojun^{1,4} ,Xue Bin^{1,4}

(1. School of Medicine , Nanjing University , Nanjing 210093 , China)

(2. School of Life Sciences , Nanjing Normal University , Nanjing 210046 , China)

(3. Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology , Nanjing 210046 , China)

(4. Jiangsu Key Laboratory for Molecular Medicine , Nanjing 210093 , China)

Abstract: Objective: To construct the recombinant adenovirus vector containing human *ggpps* gene and study its effect on activation of HSCs. Methods: *ggpps* gene was obtained by PCR amplification and subcloned into adenovirus shuttle plasmid of pAdTrack-CMV to form the shuttle vector of pAdTrack-CMV-GGPPS. After sequencing, it was linearized with *PmeI* and co-transfected into *E. coli* BJ5183 cells with adenovirus genomic plasmid of pAdEasy-1 to achieve homologous recombination. The DNA of identified recombinant plasmid was digested with *PacI* and then transfected into QBI-293A cells to package adenovirus carrying GGPPS. Generation of recombinant adenovirus was monitored by the expression of

收稿日期: 2011-05-08.

基金项目: 国家自然科学基金(30700394)、江苏省分子医学生物技术重点实验室开放基金(NMB09KF03)、中央高校基本科研业务费专项资金(1116021402).

通讯联系人: 薛 斌, 讲师, 博士, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: xuebin@nju.edu.cn

green fluorescent protein. The titer of viral stock was determined by TCID₅₀ assay. The expression of GGPPS in human hepatocyte after Ad-GGPPS infection was detected by Western Blotting and Real-time PCR. Activation of HSCs and synthesis of ECM were checked by Real-time PCR after Ad-GGPPS infection in LX-2. Results: The Ad-GGPPS was successfully constructed and the infective titer is 2.5×10^9 PFU/mL. The expression of GGPPS in human hepatocyte infected by Ad-GGPPS was efficient. Over-expressed GGPPS in LX-2 cell can promote the expression of α -SMA, a reliable marker of stellate cell activation, and Fibronectin, the composition of ECM is significantly increased too. Conclusion: GGPPS promotes the activation of HSCs.

Key words: GGPPS, recombinant-adenovirus, HSCs

香叶基香叶基焦磷酸合成酶(Geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)是由GGPPS的2.495 kb的cDNA编码的34 kDa的蛋白,可以催化一分子异戊烯二磷酸和一分子法尼基二磷酸合成香叶基香叶基二磷酸(Geranylgeranyl diphosphate, GGPP)^[1]. GGPPS能够导致如Ras、Rho、Rac和Rap等一类的小分子Rho-GTP酶家族蛋白发生异戊二烯化修饰.这一类小G蛋白在真核细胞中充当分子开关的作用,介导真核细胞许多重要的生物学功能. GGPPS在人体组织内广泛表达,但表达程度不同,其中在睾丸内表达水平最高,在心脏、肌肉组织内有中等水平的表达^[2,3]. 目前对GGPPS功能的研究主要集中在植物,而在哺乳动物细胞和个体水平则很少. 我们实验室前期研究发现,GGPPS作为早期生长反应因子1(Early growth response factor 1, Egr-1)的直接下游调控基因,在香烟刺激的情况下被转录激活,参与对Ras的异戊二烯化修饰,进而调节Ras/MAPK信号通路的活化^[4]. 为了进一步了解该基因的功能,本实验中我们构建了GGPPS重组腺病毒质粒载体,并利用腺病毒的高转染性研究了其对肝星状细胞活化的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌BJ5183、pAdEasy-1腺病毒骨架质粒以及含绿色荧光蛋白(GFP)的穿梭质粒pAdTrack-CMV,由本实验室保存. QBI-293A包装细胞购买自武汉细胞所. LX-2细胞由南大徐强教授惠赠. 对照Ad-GFP由本实验室保存,滴度为 1.2×10^9 PFU/mL. 限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、小牛碱性磷酸酶(CIP)、高保真酶以及其他工具酶,均购自NEB公司. 质粒提取与纯化回收试剂盒购自上海华舜生物有限公司. 兔抗GGPPS多抗由本实验室自行制备. 羊抗兔HRP二抗购买自凯基生物. ECL发光液购自CST公司. 实时荧光定量PCR kit购自Bioneer公司. 荧光定量PCR仪为ABI-7300. 胎牛血清购自Wisent公司. 细胞和细菌培养箱均为Thermo公司产品.

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增

以GenBank中人源 $ggpps$ 基因序列为模板(Gene ID: 9453),用软件Primer Premier 5.0设计一对引物,上游引物序列为:5'-ATAAGAATGCGGCCGC(NotI)ATGGAGAAGACTC-3';下游引物序列为:5'-GGCGAGCTC(XhoI)TTATTCATTTTCTTC-3'. 以人源的WRL-68细胞mRNA反转录的cDNA样品为模板进行目的基因的PCR扩增,条件为:94℃变性1 min,58℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环.

1.2.2 重组腺病毒质粒的构建与鉴定

根据AdEasy™ Adenoviral Vector System操作说明,利用NotI、XhoI两个双酶切位点将 $ggpps$ 基因装入pAdTrack-CMV载体中,再用NotI、XhoI双酶切鉴定,重组的穿梭质粒命名为pAdTrack-CMV-GGPPS. 用PmeI酶切该重组质粒和CIP酶去磷酸化后,用电穿孔法将其与质粒pAdEasy-1共同转化感受态菌BJ5183(条件:电脉冲25 μ F、电压2.5 kV、电阻200 Ω),完成同源重组. 对同源重组后的质粒经PacI酶切鉴定. 以碱裂解法大量抽提重组腺病毒质粒DNA备用. 将构建成功的重组腺病毒质粒命名为pAd-GGPPS.

1.2.3 pAd-GGPPS转染QBI-293A细胞

将重组质粒用磷酸钙法^[5]转染QBI-293A细胞,5% CO₂ 37℃静置培养. 转染后不同时间,在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的表达,了解腺病毒的包装过程. 转染后7 d~10 d,细胞出现病理性变化(Cell pathological effect, CPE),表现为贴壁细胞变圆、核浓缩、脱落,出现病毒空

斑. 待细胞 CPE 达到 70% ,离心收集细胞 ,于 -70°C 和 4°C 反复冻融 3 次 ,离心后收集上清于 -70°C 保存备用. 该获得的重组病毒命名为 Ad-GGPPS.

1.2.4 病毒滴度的测定(TCID₅₀ 法)

Ad-GGPPS 在 QBI-293A 细胞中扩增三代后利用半数组织培养感染量(Tissue culture infectious dose 50 ,TCID₅₀) 法检测腺病毒滴度. QBI-293A 细胞用 2% 的胎牛血清培养基制成浓度约 1×10^5 /mL 的细胞悬液 ,以 100 μL 每孔接种于 96 孔板(同时按 10 倍稀释制备病毒稀释液感染上述细胞) . 每排前 10 孔各加入 100 μL 同一浓度的病毒稀释液 ,第 11、12 孔加入 100 μL 的 2% 胎牛血清培养基作为阴性对照. 置于 CO₂ 培养箱 37°C 培养 10 d ,然后显微镜下观察每排细胞出现 CPE 的情况.

以发生 CPE 即为阳性作为判定标准.

按下列公式计算滴度: $T = 10^{1+d(S-0.5)}$ IU/mL.

其中: d 为 Log₁₀ 稀释倍数;

S 为从第一个稀释度起的阳性比率之和.

1.2.5 细胞培养

腺病毒感染所用细胞: QBI-293A ,人源的肝细胞株 WRL-68 ,人源的肝星状细胞 LX -2 ,均以 10% 的胎牛血清培养基 $5\% \text{CO}_2$ 37°C 静置培养.

1.2.6 腺病毒感染

WRL-68 细胞在感染病毒时换成无血清培养基 ,然后分别加入 Ad-GGPPS 和 Ad-GFP ,待病毒感染 2 h 后补加血清至 10% 24 h 后观察绿色荧光. LX -2 细胞在腺病毒感染前 24 h 换成 0.3% 的胎牛血清 ,加入腺病毒后继续培养 24 h.

1.2.7 Western Blotting

培养的 WRL-68 细胞感染 Ad-GGPPS 48 h 后将培养基弃掉 ,用冰预冷的 PBS 洗两遍 ,加入 500 μL 裂解缓冲液(50 mmol/L HEPES、500 mmol/L NaCl、10 g/L NP40、1 mg/L aprotinin 及 100 mg/L PMSF) ,冰浴 30 min ,刮取细胞 ,以 12 000 g 离心 15 min. 收集上清 ,经蛋白定量后 ,加入 5 μL 5 \times SDS 上样缓冲液 99°C 煮沸 5 min. 样品以 10% 的 SDS-PAGE 电泳 ,120 V 恒压 2 h ,常规转膜 5% 脱脂奶粉封闭 ,兔抗 GGPPS(5% 脱脂奶粉 $1:1\ 000$ 稀释) 抗体 4°C 孵育过夜 ,PBST 洗脱 10 min \times 3 次 ,山羊抗兔 HRP 二抗(PBST $1:3\ 000$ 稀释) 室温孵育 1 h ,PBST 洗脱 5 min \times 6 次 ,ECL 化学发光检测.

1.2.8 Real-time PCR 检测

培养的 WRL-68 细胞感染 Ad-GGPPS 48 h 后将培养基弃掉 ,用冰预冷的 PBS 洗两遍 ,Trizol 抽提 RNA. RNA 用 NanoPhotometer (Implen 公司) 定量后取 800 ng 进行反转录. 反转录采用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 37°C 反应 15 min 85°C 5 s 终止反应. Real-time PCR 反应体系为: 2 \times SYBR green 10 μL , Primers 1 μL , $50 \times$ ROX 0.4 μL , cDNA 1 μL , H₂O 补平体积 20 μL . 检测时使用的引物序列见表 1.

表 1 Real-time PCR 使用的引物序列

Table 1 Sequences of primers for Real-time PCR

基因	上游引物	下游引物
GGPPS	CCAGGTAACAAGTGAGAACCAA	CGTCGGAGTTTGTGAGTTGCT
α -SMA	ACTGGGACGACATGGAAG	TAGATGGGACATTGTGGGT
FN	CCGTGGGCAACTCTGTC	TGCGGCAGTTGTCACAG
Col I	AGGGCCAAGACGAAGACATC	AGATCACGTCATCGCACAACA
18S	GTCTGTGATGCCCTTAGATG	AGCTTATGACCCGCACTTAC

1.2.9 统计学分析

采用 Excel 2003 对实时荧光定量 PCR 的结果进行 t 检测. 所有结果均以 $\pm S$ 表示. 多组间比较采用单因素方差分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Ad-GGPPS 的构建

利用设计的引物从人源肝细胞 WRL-68 中 PCR 扩增出 *ggpps* 基因的产物大小约为 900 bp(图 1) . 将其

亚克隆至穿梭质粒中 构建成重组质粒 pAdTrack-CMV-GGPPS ,经 *NotI* 和 *XhoI* 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳 出现 900 bp 左右的条带(图 2) . 通过测序进一步证实后 将重组质粒经 *PmeI* 单酶切线性化后与腺病毒基因重组质粒在细菌内进行同源重组. 挑选阳性菌落 ,质粒大提后经 *PacI* 酶切鉴定 ,重组病毒出现两条带 ,一条约为 30 kb 的大片段 ,另一条为 4.5 kb 或 3.0 kb 的小片段(图 3) .

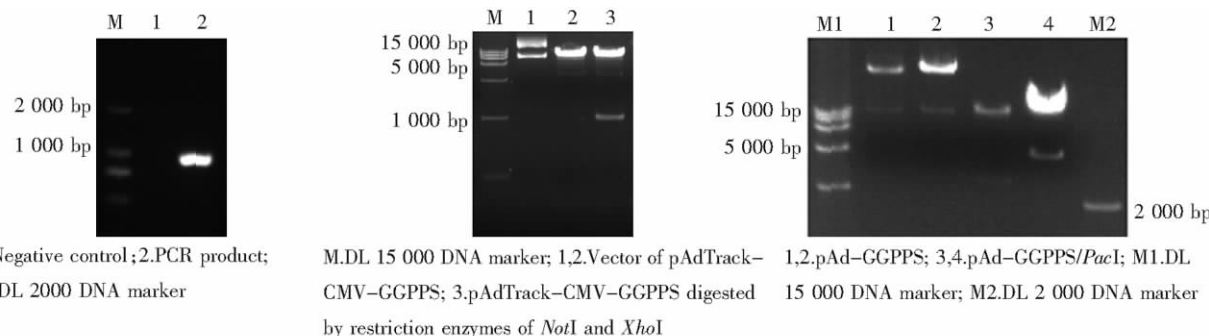


图 1 *ggpps* 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

图 2 重组质粒 pAdTrack-CMV-GGPPS 的酶切鉴定

图 3 重组腺病毒载体 pAd-GGPPS 的 *PacI* 酶切鉴定

Fig.1 Identification of PCR product of *ggpps* gene by agarose gel electrophoresis

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pAdTrack-CMV-GGPPS

Fig.3 Identification of recombinant adenovirus vector pAd-GGPPS by *PacI* enzyme digestion

2.2 腺病毒颗粒滴度的检测

重组腺病毒在扩增三代后 ,进行滴度测定. 依照 TCID₅₀ 法 ,在感染后第 10 d 观察 CPE(图 4) ,计算每个稀释度产生的 CPE 的孔数 ,计算得到腺病毒的滴度为:

$$T = 10^{1+d(s-0.5)} = 10^{1+1(8.6-0.5)} = 10^{9.1} \text{ (每 } 100 \mu\text{L 病毒储存液) .}$$

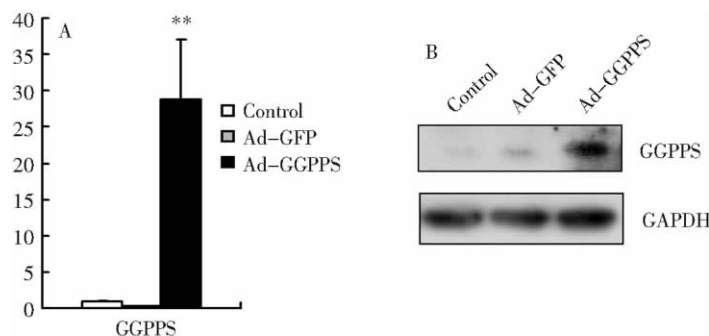
$$T = 10^{10.1} \text{ TCID}_{50} / \text{mL} .$$

由于 TCID₅₀ 法测到的滴度 $d = \log_{10}$ 值比标准空斑法高 0.7 ,所以将 TCID₅₀/mL 转换成 PFU/mL:

$$T = 1 \times 10^{10.1-0.7} \text{ PFU/mL} = 1 \times 10^{9.4} \text{ PFU/mL} \approx 2.5 \times 10^9 \text{ PFU/mL} .$$

2.3 重组腺病毒 GGPPS 在 WRL-68 细胞中的表达

分别提取感染 Ad-GGPPS 和 Ad-GFP 的 WRL-68 细胞与正常 WRL-68 细胞的总 RNA 和总蛋白质 ,分别进行 Real-time PCR 和 Western blotting 检测. 结果显示 ,Ad-GGPPS 感染的肝细胞中 GGPPS 的 mRNA 和蛋白质的表达都明显高于感染对照腺病毒 Ad-GFP 和正常的 WRL-68 细胞 ,该结果证实 GGPPS 重组腺病毒在 WRL-68 细胞中成功表达 GGPPS 蛋白(图 5) .



A.Real-time PCR analysis of GGPPS after infected with Ad-GGPPS in WRL-68;
B.Western Blotting analysis of GGPPS after infected with Ad-GGPPS in WRL-68

图 5 GGPPS 在 WRL-68 细胞中的表达

Fig.5 Expression of GGPPS in WRL-68 cell

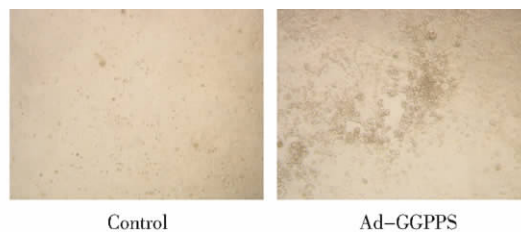
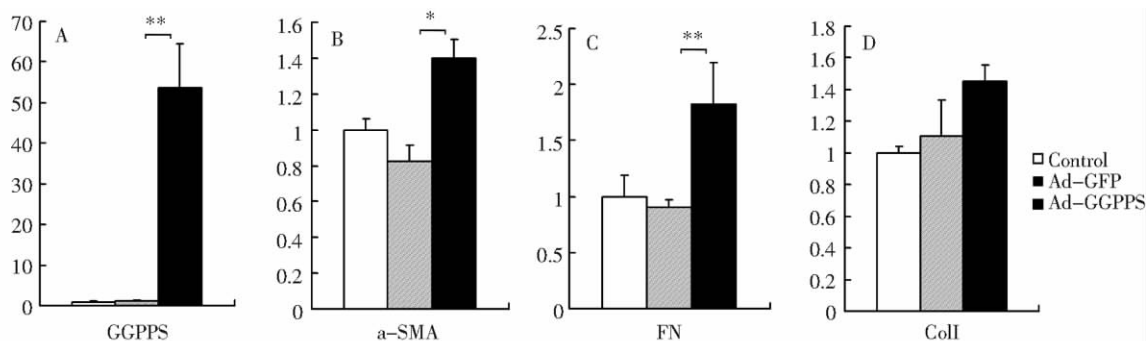


图 4 QBI-293A 在感染 Ad-GGPPS 后 CPE 的产生
Fig.4 CPE occurs in QBI-293A cell after infected with Ad-GGPPS

2.4 过表达 GGPPS 促进 HSCs 的活化

LX-2 细胞是永生化的人源肝星状细胞株^[6]. 在慢性肝损伤引起的肝纤维化中,活化的 HSCs 是 ECM 的主要来源细胞. LX-2 细胞具有原代培养的 HSCs 的特征,因此被广泛地应用于体外研究 HSCs 的活化和肝纤维化的发生. LX-2 在 10% 胎牛血清培养时,处于高度活化状态,呈纤维样,但在 0.3% 胎牛血清浓度培养时会逐渐丧失活化特征转变成未活化状态的 HSCs^[7]. 根据上述的特点,我们用 0.3% 胎牛血清浓度培养 LX-2 细胞 24 h 使其去活化后,分别感染 Ad-GGPPS 腺病毒和对照腺病毒 Ad-GFP,24 h 后提取总 RNA. Real-time PCR 检测发现过表达 GGPPS 可以促进 HSCs 的活化,其标志基因 α -SMA 的表达显著增加 ($p < 0.05$) (图 6B). HSCs 活化后会分泌大量细胞外基质(Extracellular matrix, ECM). 我们在对细胞外基质成分的检测中发现 FN 和 I 型胶原在过表达 GGPPS 的细胞中都是升高的,其中 FN 的 mRNA 增加最为显著 ($P < 0.03$). I 型胶原(Type I collagen, Col I)的表达尽管没有显著型差异,但也是增加的(图 6C, D). 结果显示,GGPPS 可以促进 HSCs 的活化.



A, B, C, D: Real-time PCR analysis of GGPPS, α -SMA, FN and Col I after over-expression GGPPS in HSCs

图 6 过表达 GGPPS 促进 HSCs 的活化

Fig.6 Over-expressed GGPPS can promote the activation of HSCs

3 讨论

GGPP 是类异戊二烯化合物的一种,在植物或某些细菌体内作为合成胡萝卜素和类萜类等物质的前体,但是在真核生物中主要参与对包括 Rho/Rac、Rap 和 Rab 家族在内的多种蛋白质的翻译后修饰,即蛋白质的异戊二烯化修饰^[8]. 这一类蛋白属于小 G 蛋白家族,在真核细胞中充当分子开关的作用,介导真核细胞中许多重要的生物学功能,如控制细胞的形状,调控细胞的收缩、运动和存活等. GGPPS 是合成 GGPP 的关键酶,它催化法呢基焦磷酸与异戊烯焦磷酸的缩合反应而产生 GGPP. Northern 结果显示人 GGPPS 基因在心脏中表达最高,在脾、睾丸、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾、胰腺等组织中为中度表达,而在其他组织中未见有明显的杂交带^[9]. GGPPS 的功能研究集中在植物体内,仅有少量报道表明 GGPPS 在哺乳动物细胞和个体水平有功能. 2006 年 Yoshida 等^[10]发现 GGPPS 在细胞接触诱导的成骨细胞 MC3T3-E1 的分化过程中 mRNA 和蛋白的表达水平都是降低的,但具体机制还不清楚^[10]. 我们实验室前期研究证明,GGPPS 可以作为转录因子 Egr-1 的下游调控基因,通过 Egr-1-GGPPS-MAPK 信号通路在如吸烟导致的肺炎、II 型糖尿病发生^[4]中起调节作用. 为了更好地研究 GGPPS 的生物功能,我们选择构建了 GGPPS 基因的重组腺病毒,因为腺病毒在众多生物载体里以安全性较高(不整合到宿主的基因组中,仅瞬间表达)、转染效率高、宿主范围大、滴度高、稳定、不易致癌等优点被广泛地应用^[11,12].

肝纤维化是多种慢性肝疾病或肝损伤进展成肝硬化的共同病理基础与必经阶段. 持续的肝损伤会引起大量细胞外基质的产生,特别是胶原蛋白类物质,导致肝脏内过多 ECM 的沉积,肝脏的正常结构被破坏,形成肝纤维化^[13]. HSCs 是存在肝血窦内皮细胞与肝细胞间的 Disse 间隙中的一种维生素 A 储存细胞. 其在肝细胞损伤后开始活化、增殖、分泌细胞外基质. HSCs 是在肝纤维化中起着决定作用的关键细胞. 肝脏受损时, HSCs 被激活并大量增殖,发生表型改变,转变成活化形式-肌成纤维细胞,分泌产生胶原、糖蛋白和蛋白多糖,同时表达多种细胞因子及受体. 我们的实验结果表明,在去活化的 LX-2 细胞中过表达 GGPPS 可以促进 HSCs 活化. 由于活化的 HSCs 能分泌产生大量的 ECM,我们又检测了 ECM 成分 FN 和 Col I,结果进一步证明了 GGPPS 对 HSCs 的活化作用. 已被证实有很多信号通路参与到 HSCs 活化的过

程,如 Rho/ROCK、Ras/ERK、PI-3K、JAK/STAT3 等^[14-16]。例如 Rho/ROCK 激活后可引发 ERK 的磷酸化级联反应,促使 Raf-1-MEK-ERK 相继磷酸化活化,ERK 活化后移入胞核,引起 HSCs 增殖等一系列反应。其中 Rho 是属于 Ras 超家族,它的功能的发挥需要被异戊二烯化修饰后转移到细胞膜上。Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiled coil forming protein kinase, ROCK)是 Rho-ROCK 信号通路下游的靶效应分子,可接受 Rho 分子传递的活化信号,发生多个氨基酸位点磷酸化而激活,并介导下游分子的磷酸化/脱磷酸化反应,参与到多种组织器官纤维化的发生。已有研究证明,特异性 ROCK 阻断剂 Y-27632 能够明显抑制肝星状细胞活化,具有抗大鼠肝纤维化作用^[17-20]。GGPPS 是异戊二烯化修饰作用中的一个关键酶,我们猜测,GGPPS 可能是通过调节 Rho、Ras 等在 HSCs 活化过程中起着分子开关作用的小 G 蛋白的活性参与到调控 HSCs 的活化过程之中,最终影响到肝纤维化的发生。我们构建的 Ad-GGPPS 腺病毒,将为我们更加深入研究 GGPPS 在 HSCs 活化过程的作用机制提供便利。

[参考文献]

- [1] KMC C, Hudock M P, Zhang Y, et al. Inhibition of geranylgeranyl diphosphate synthase by bisphosphonates: a crystallographic and computational investigation[J]. J Med Chem, 2008, 51(18): 5 594-5 607.
- [2] Casey P J, Seabra M C. Protein prenyltransferases[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(10): 5 289-5 292.
- [3] Ericsson J, Greene J M, Carter K C, et al. Human geranylgeranyl diphosphate synthase: isolation of the cDNA, chromosomal mapping and tissue expression[J]. J Lipid Res, 1998, 39(9): 1 731-1 739.
- [4] Shen N, Gong T, Wang J D, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammatory responses are mediated by EGR-1/GGPPS/MAPK signaling[J]. American Journal of Pathology, 2011, 178(1): 110-118.
- [5] Choi K L, Aldrich R W, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels[J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88(12): 5 092-5 095.
- [6] Friedman S L. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiological Reviews, 2008, 88(1): 125-172.
- [7] Xu L, Hui A Y, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54(1): 142-151.
- [8] Boguski M S, McCormick F. Proteins regulating ras and its relatives[J]. Nature, 1993, 366(6456): 643-654.
- [9] 赵寿元, 赵余龙, 高洁, 等. 人牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶的 cDNA 克隆基因定位及组织表达谱分析[J]. 中国科学 C 辑, 2000, 30(5): 467-474.
- [10] Yoshida T, Asanuma M, Grossmann L, et al. Geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP) synthase is down-regulated during differentiation of osteoblastic cell line MC3T3-E1[J]. Febs Letters, 2006, 580(22): 5 203-5 207.
- [11] 何金生, 王健伟, 涛洪. 腺病毒载体构建原理与方法的研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学, 2001, 15(4): 399-400.
- [12] 卢大儒, 邱信芳. 腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体与基因治疗[J]. 国外医学: 遗传学, 1995, 18(2): 61-64.
- [13] Povero D, Busletta C, Novo E, et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process[J]. Histol Histopathol, 2010, 25(8): 1 075-1 091.
- [14] Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing[J]. EMBO Rep, 2010, 11(2): 97-105.
- [15] Jiao J, Friedman S L, Aloman C. Hepatic fibrosis[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(3): 223-229.
- [16] Breitkopf K, Roeyen C, Sawitza I, et al. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC) [J]. Cytokine, 2005, 31(5): 349-357.
- [17] Kitamura K, Tada S, Nakamoto N, et al. Rho/Rho kinase is a key enzyme system involved in the angiotensin II signaling pathway of liver fibrosis and steatosis[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2007, 22(1): 2 022-2 033.
- [18] Murata T, Arii S, Mori A, et al. Therapeutic significance of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, on the established liver fibrosis[J]. Journal of Surgical Research, 2003, 114(1): 64-71.
- [19] Tada S, Iwamoto H, Nakamuta M, et al. A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats[J]. Journal of Hepatology, 2001, 34(4): 529-536.
- [20] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology[J]. Journal of Molecular Medicine, 2002, 80(10): 629-638.

[责任编辑: 黄 敏]