

虫草菌丝水煎液及其有效组分 C12 对肝纤维化大鼠 HGF- α 及肝细胞凋亡的影响

李风华¹, 刘平^{2*}, 王春树², 张幸¹

(1. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203;

2. 上海中医药大学肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究虫草菌丝治疗二甲基亚硝胺(DMN)模型大鼠肝纤维化有效组分及其作用机制。方法: 大鼠 ip 0.5% DMN 5 mg·kg⁻¹, 每周连续 3 d, 共 4 周。造模结束后, 模型大鼠随机分组, 治疗组分别以虫草菌丝水煎液(CsB)及其组分(C12)以生药 800 mg·kg⁻¹ ig, 每日 1 次, 共 2 周; 正常组及模型组以等量生理盐水 ig。疗程结束后, 分别检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)及天冬氨酸转氨酶(AST), 血清白蛋白(Alb)及血清总胆红素(TBil)含量, 检测肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量、观察肝组织病理及胶原沉积变化, Western 印迹法检测肝细胞生长因子 α (HGF- α) 的表达, TUNEL 染色检测大鼠肝细胞凋亡并计算凋亡数量。结果: 与 6 周模型组比较, CsB 及 C12 治疗组大鼠血清 ALT, AST 活性, TBil 含量和大鼠肝组织 Hyp 含量显著降低, Alb 含量显著升高($P < 0.05$)。与 6 周模型组比较, CsB 及 C12 治疗组的坏死出血、炎性细胞浸润、胶原增生、纤维间隔形成有所改善。与模型组比较, CsB 及 C12 治疗组大鼠肝组织的蛋白表达量显著升高($P < 0.01$)。与 6 周模型组比较, CsB 及 C12 治疗组大鼠肝细胞凋亡数量显著降低($P < 0.01$)。结论: CsB 及 C12 能够显著改善肝功能, 有显著抗肝纤维化作用。CsB 和 C12 能促进 HGF- α 表达, 抑肝细胞凋亡, 使肝细胞凋亡和增殖达到平衡状态, 阻断和逆转肝纤维化。

[关键词] 肝纤维化; 虫草菌丝; 有效组分; 肝细胞生长因子; 肝细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0271-05

[doi] 10.11653/syfy2013140271

[收稿日期] 20130122(009)

[基金项目] 上海市科委自然科学基金(12ZR1431700); 上海市教育委员预算内科研项目(2010JW25); 上海市教育委员会 E 研究院建设计划项目(E03008); 上海市医学领军人才项目(2007A 卫 01); 上海市卫生局中医药科研基金(2012J007A)

[第一作者] 李风华, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药及其复方有效物质基础的研究, Tel: 021-5132391, E-mail: lfh@hotmail.com

[通讯作者] * 刘平, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合治疗肝病的临床及机制研究, Tel: 021-51322391, E-mail: liuliver@vip.sina.com

- [3] 邵毅, 余瑶, 黄国栋, 等. 鬼针草治疗更年期女性中重度干眼症临床研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2985.
- [4] 许慧, 陈飞虎, 邵旭. 鬼针草总黄酮提取工艺中试研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(6): 738.
- [5] 徐雪钰, 于珊, 胡克章, 等. 灵五颗粒对 D-半乳糖胺盐酸盐致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 解放军药学学报, 2010, 26(5): 413.
- [6] Wlodzimirow K A, Eslami S, Abu-Hanna A, et al. A systematic review on prognostic indicators of acute on chronic liver failure and their predictive value for mortality[J]. Liver Int, 2012, 19(10): 1478.
- [7] Wlodzimirow K A, Eslami S, Abu-Hanna A, et al. Systematic review: acute liver failure one disease, more than 40 definitions[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35(11): 1245.
- [8] Lu Y, Bao X, Sun T, et al. Triptolide attenuate the oxidative stress induced by LPS/D-GalN in mice[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(3): 1022.
- [9] Musana K A, Yale S H, et al. Abdulkarim AS Tests of liver injury[J]. Clin Med Res, 2004, 2(2): 129.
- [10] Hsu C M, Wang J S, Liu C H, et al. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism[J]. Shock, 2002, 17(4): 2803.
- [11] Abrams G A, Trauner M, Nathanson M H. Nitric oxide and liver disease [J]. Gastroenterologist, 1995, 3(3): 2209.
- [12] Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, et al. Role of nitric oxide in liver injury [J]. Curr Mol Med, 2003, 3(6): 5192.

[责任编辑 李玉洁]

Effects of CsB and its Effective Components on HGF- α and Hepatocytes Apoptosis at Fibrotic Liver in Rats

LI Feng-hua¹, LIU Ping^{2*}, WANG Chun-shu², ZHANG Xing¹

(1. College of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Shanghai University of Traditional Chinese Medicine),
Ministry of Education, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of CsB and its effective components on liver fibrosis in rats induced by dimethylnitrosamine (DMN). **Method:** From the 1st to 4th week, rats were treated with intraperitoneal injection of DMN ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for three continuous day each week. After modeling, normal group and model group were given saline ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) intragastrically, and rats in drug treatment group were treated separately with CsB and its components C12 ($800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 2 weeks. After all courses of treatment, all rats were sacrificed to harvest blood and liver tissue sample. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate transferase (AST), albumin (Alb), total bilirubin (TBil) and content of hydroxyproline (Hyp) in liver tissue were detected. Histological changes with HE staining and collagen deposition with sirius red staining in rat liver tissue were observed. Expression of hepatocyte growth factor (HGF- α) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected immunohistologically. **Result:** Compared with 6 weeks model group, serum ALT and AST activity, TBil content and Hyp content in liver tissue in CsB and C12 group lowered and Alb content increased significantly ($P < 0.05$). Compared with 6 weeks model group, some histological improvement was made in CsB and C12 group. Compared with the 6 wk model group, HGF- α protein expression in liver tissue in CsB and C12 group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with 6 weeks model group, quantity apoptotic hepatocytes in Cs and C12 group decreased obviously ($P < 0.01$). **Conclusion:** CsB and C12 can block development and formation of liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine, by protecting hepatocytes to resist liver injury, decreasing synthesis of collagen, inhibiting oxidative stress. CsB and C12 can improve the level of expression of HGF- α and inhibit hepatocytes apoptosis to balance apoptosis and proliferation, so as to block or reverse development liver fibrosis.

[Key words] liver fibrosis; CsB; effective components; HGF- α ; hepatocytes apoptosis

虫草菌丝应用于肝纤维化的治疗于 20 世纪 80 年代开始有相关的报道,本课题组在以往的研究中发现虫草菌丝在早期能抑制基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9 活性的增高,对 DMN 诱导大鼠肝纤维化启动有一定干预作用,对肝纤维化的形成具有良好抑制作用;对于 DMN 大鼠肝纤维化,虫草菌丝能显著促进其肝脏功能(肝功能、血管内皮细胞功能)的复常及肝病组织结构的逆转^[1-2]。其后笔者以特定的方法分离出虫草菌丝的十多种不同组分进行药效学实验,获得了良好的实验效果。本研究基于前期课题研究成果,采用 DMN 大鼠肝纤维化模型,研究 CsB 及其有效组分 C12 的药效学,并进一步从肝细胞增殖、肝细胞生长因子- α (HGF- α)及细胞凋亡角度对其有效组分进行研究,以冀明确虫草菌丝组分的作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雄性,清洁级,体重(150 ± 15) g,购自中国科学院上海实验动物中心,动物许可证号 SCXK(沪)2008-0016。上海中医药大学实验动物中心清洁区动物房饲养、造模和观察,自由饮食。

1.2 药物 发酵虫草菌丝(*Cordyceps sinensis* Berk. Sacc 以下简称 CsB)购自江西国药责任有限公司,常规水煎 2 次,每次 30 min 而成的水煎液。虫草菌丝(以下简称 C12)为 CsB 经提取上柱后分离所得的多馏分,经高效液相仪分析指纹鉴定确认后,C12 得率为 0.8%,由上海中国科学院药物研究所提供,鉴定人为谭俊杰副研究员。以上各药物均用蒸馏水稀释后 ig 给药。

1.3 试剂 二甲基亚硝酸胺(dimethylnitrosamine,

DMN),东京化成工业株式会社产品,批号 MAL06,分子式 $C_2H_6N_2O$,相对分子质量 74.08;肝功能[丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),血清白蛋白(Alb),血清总胆红素(TBil)]测定试剂盒,购自南京建成生物试剂有限公司,批号 20100101;羟脯氨酸(hydroxyproline,Hyp)对照品,日本ナカテイトスク株式会社,批号 MIR8282;小牛血清白蛋白(BSA),低分子标准蛋白,购自上海实生细胞生物技术有限公司,批号 20100205;Two-StepTM Anti-Rabbit Detection Reagent(HRP),液体 DAB 酶底物显色试剂盒,批号 201003016;肝细胞原位凋亡检测 ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit,Chemicon 公司,批号 201002055;兔抗大鼠肝细胞生长因子 α (Hepatocyte growth factor α ,HGF $_{\alpha}$)多克隆抗体(Assay Designs Inc 公司,批号 01200603)。

2 方法

2.1 模型制备 参考 Ala-kkok 方法^[1],生理盐水稀释 DMN 为 0.5% (1:199 生理盐水),以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ip 大鼠,每周连续 3 d,每天 1 次,共 4 周。

2.2 分组与给药 造模 4 周后,将大鼠随机分为模型对照组和药物治疗组,药物治疗组 ig 给予虫草菌丝水提取物(CsB)和有效部位(C12),模型对照组给予等量蒸馏水。CsB 剂量为生药 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,C12 剂量为提取物 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig 给药(相当于生药 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

2.3 样品的采集和处理 用药 2 周结束后,将大鼠用 2% 戊巴比妥钠以 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ip 麻醉,仰卧位固定,打开腹腔,观察大体情况,肝脾的色、质、形态情况。经下腔静脉采血,留取肝组织 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4 血清肝功能检测 按试剂盒说明书测定。

2.5 肝组织羟脯氨酸含量 测定参照 Jamall^[2] 氏法。

2.6 肝组织病理学 观察肝组织常规脱水、包埋、切片($4 \mu\text{m}$ 厚),分别作 HE 及天狼星红染色,免疫组织化学染色(两步法)检测指标:肝组织、HGF- α 。

2.7 Western 印迹法 测肝组织 HGF- α 。

2.8 肝细胞凋亡原位检测 (TUNEL 染色) 凋亡肝细胞形态学识别参考 Shi^[3] 的方法,即对于模型组及药物治疗组,在肝细胞中凡满足下列条件之一者即确定为肝细胞凋亡:核呈新月牙状;核浓缩;核碎裂;出现凋亡小体。凋亡细胞的计数采用每组取 4~5 个样本,每个样本计数 5 个不同视野(400 倍)凋亡肝细胞的总数。

凋亡细胞的计数:每张切片选择 5 个具有代表性的高倍视野($\times 400$),计数 500 个肝细胞,取阳性细胞平均率作为凋亡指数。

$$\text{凋亡指数(AI)} = \frac{(\text{5 个高倍视野内阳性肝细胞数之和} / 500) \times 100\%}{}$$

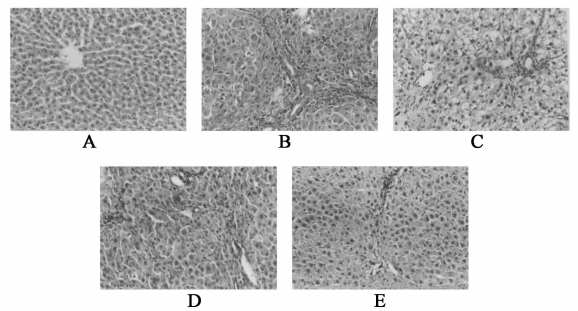
2.9 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计算机统计分析软件 SPSS 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,并用 LSD 或 Tamhane 进行两两比较。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 肝组织形态学变化

3.1.1 大体观察 正常大鼠肝脏表面光滑,质嫩而脆;模型组大鼠肝脏质地韧,边缘钝,肝脏明显缩小,脾脏明显增大,肠系膜粘连严重,个别大鼠肝表面有颗粒感。与模型组比较,CsB 及 C12 治疗组大鼠肝脏质量显著增大,边缘稍锐,脾脏质量显著减轻,肠系膜粘连明显改善。

3.1.2 肝组织观察 正常对照组肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列。模型组大鼠肝组织可见大面积出血,并见大量肝细胞肿胀,部分肝细胞坏死;淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润,汇管区明显增宽,广泛增生的纤维组织将原来的肝小叶分割包绕成大小不等的结节,肝窦壁细胞增生明显,有大量的长梭形细胞附着在窦壁上,窦壁增厚,甚至肝窦扭曲。与模型组比较,CsB 及 C12 治疗组大鼠肝细胞出血、纤维增生、炎细胞浸润都有不同程度的改善,其余各药物组分无明显变化,见图 1。



A. 正常组;B.4 周模型组;C. 6 周模型组;
D. CsB 治疗组;E. C12 治疗组

图 1 各组大鼠肝组织形态学变化(HE 染色, $\times 200$)

3.2 大鼠血清肝功能的的变化

3.2.1 血清 ALT、AST 活性的变化 与同期正常组大鼠比较,模型组大鼠血清 ALT 和 AST 活性显著增高($P < 0.01$);与 6 周模型对照组比较,CsB 及 C12 治疗组大鼠血清 ALT、AST 活性显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),CsB 及 C12 组之间没有统计学意义,

见表 1。

表 1 CsB 和 C12 对肝纤维化大鼠血清 ALT, AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$) U·L⁻¹

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	ALT	AST
正常组	8	-	34.95 ± 5.49	228.53 ± 20.19
4 周模型	8	-	82.21 ± 13.10 ²⁾	301.71 ± 28.04 ²⁾
6 周模型	10	-	61.40 ± 24.47 ²⁾	285.04 ± 27.46 ²⁾
CsB 治疗	10	800	36.70 ± 3.39 ⁴⁾	257.98 ± 14.08 ⁴⁾
C12 治疗	10	800	39.89 ± 5.78 ⁴⁾	257.02 ± 25.76 ⁴⁾

注:与正常比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 6 周模型组比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;C12 治疗组提取物剂量为 5 mg·kg⁻¹(表 2~5 同)。

3.2.2 血清 Alb, TBil 含量的变化 与同期正常组大鼠比较,模型组大鼠血清 Alb 显著降低和 TBil 显著升高($P < 0.01$);与 6 周模型对照组比较,CsB 及 C12 治疗组血清 Alb 显著升高和 TBil 显著降低($P < 0.01$),CsB 和 C12 两组间没有统计学意义,见表 2。

表 2 CsB 和 C12 对肝纤维化大鼠血清 Alb, TBil 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$) g·L⁻¹

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	Alb	TBil
正常	8	-	27.92 ± 2.19	0.26 ± 0.02
4 周模型	8	-	21.82 ± 1.9 ²⁾	0.75 ± 0.28 ²⁾
6 周模型	10	-	22.01 ± 1.79 ²⁾	0.69 ± 0.34 ²⁾
CsB 治疗	10	800	24.17 ± 1.88 ⁴⁾	0.35 ± 0.07 ⁴⁾
C12 治疗	10	800	26.18 ± 2.83 ⁴⁾	0.36 ± 0.08 ⁴⁾

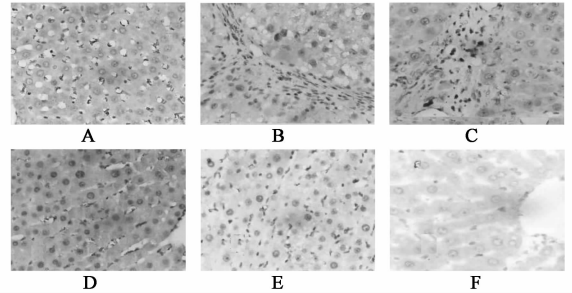
3.3 肝组织 Hyp 含量的变化 与同期正常组大鼠比较,模型组大鼠肝组织 Hyp 含量显著增加($P < 0.01$);与 6 周模型组比较,CsB 及 C12 治疗组肝组织 Hyp 含量显著降低($P < 0.01$),CsB 及 C12 两组间无显著性差异,见表 3。

表 3 CsB 和 C12 对肝纤维化大鼠肝组织 Hyp 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(生药)/mg·kg ⁻¹	Hyp/mg·g
正常	8	-	2.33 ± 0.28
4 周模型	8	-	6.51 ± 1.50 ²⁾
6 周模型	10	-	6.10 ± 1.78 ²⁾
CsB 治疗	10	800	4.71 ± 9.75 ⁴⁾
C12 治疗	10	800	4.80 ± 1.00 ⁴⁾

3.4 大鼠肝组织 HGF-α 蛋白表达变化 免疫组织化学实验结果显示,正常大鼠肝组织大量表达 HGF-α,阳性染色见于肝窦,模型组肝组织 HGF-α 主要表达在炎症坏死区和纤维间隔中,肝窦内表达很少,与正常组相比,模型组阳性染色明显减少,与模型组相比,CsB 及 C12 治疗组肝组织阳性染色有所增加。

蛋白印迹显示,正常组大鼠 HGF-α 大量表达,与正常组比较,4 周模型组、6 周模型组 HGF-α 显著下降($P < 0.01$),与 6 周模型组比较,CsB 及 C12 治疗组大鼠肝组织 HGF-α 显著升高($P < 0.01$),CsB 与 C12 两组间无显著性差异,见表 4,图 2。



A. 正常组;B. 4 周模型组;C. 6 周模型组;
D. CsB 相当生药 800 mg·kg⁻¹ 治疗组;
E. C12 相当生药 800 mg·kg⁻¹ 治疗组;F. 阴性对照(图 3 同)
图 2 各组大鼠 HGF-α 蛋白表达变化免疫组化照片(×400)

表 4 CsB 和 C12 对肝纤维化大鼠肝组织 HGF-α 蛋白印迹积分灰度比值变化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(生药) /mg·kg ⁻¹	HGF-α 蛋白印迹 积分灰度比值
正常	4	-	1.690 ± 0.083
4 周模型	5	-	0.830 ± 0.004 ²⁾
6 周模型	5	-	0.885 ± 0.031 ²⁾
CsB 治疗	5	800	1.027 ± 0.024 ⁴⁾
C12 治疗	5	800	0.993 ± 0.007 ⁴⁾

3.5 各组大鼠肝细胞凋亡变化 正常组大鼠肝组织可见极少量凋亡的肝细胞,与正常组比较,模型组凋亡细胞数明显增加($P < 0.01$),CsB 和 C12 治疗组大鼠肝细胞凋亡数较模型对照组显著减少($P < 0.01$),CsB 与 C12 两组间无显著性差异,见表 5,图 3。

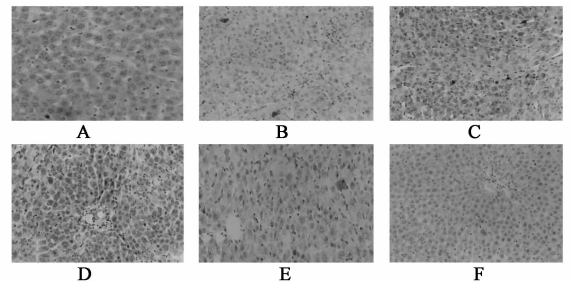


图 3 大鼠肝组织 TUNel 照片(×400)

4 讨论

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)最早从大鼠部分肝切除后的残余肝组织中被发现,因可刺激肝细胞合成 DNA 而得名。后来的研究发现,HGF 具有多种生物学功能,如调控细胞增

表 5 CsB 和 C12 对肝纤维化大鼠肝细胞凋亡数的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(生药) /mg·kg ⁻¹	5 个视野肝细胞凋亡数 /个
正常	4	-	2.50 ± 0.96
4 周模型	5	-	12.50 ± 0.96 ²⁾
6 周模型	5	-	12.00 ± 1.41 ²⁾
CsB 治疗	5	800	10.80 ± 0.55 ⁴⁾
C12 治疗	5	800	11.20 ± 0.84 ³⁾

殖、离散及促血管形成等。实验发现,HGF 能够显著减轻 Fas 诱导的小鼠肝细胞大量凋亡及由此引发的爆发性肝衰竭^[3],表明 HGF 是一种抗凋亡和促进细胞再生的生长因子^[4]。有研究表明,HGF 能促进血管内皮细胞增生和新生血管形成,保护血管内皮细胞^[5];促进组织细胞的发生、生存和再生^[6];通过增加凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达,和减少 Caspase-3 的活性对抗细胞凋亡^[7];抑制肝星状细胞活化;调节胶原纤维的合成和炎性反应,在治疗创伤愈合、防治组织纤维化中起着重要的作用。Ueki 等研究发现,用 HGF- α 基因治疗二甲基亚硝胺致大鼠肝纤维化,可使已形成的肝纤维化完全消散,提示 HGF- α 抗肝纤维化作用可能还与促进细胞外基质的降解有关^[8-10]。在本研究中,免疫组化染色可见,各组均见有 HGF- α 在肝窦内呈阳性表达,正常组表达最明显,模型组在纤维间隔中亦出现阳性表达较正常组明显减少;蛋白印迹示与正常组相比,4,6 周模型组 HGF- α 表达量分别降低了 51% 和 47%。显示肝内 HGF- α 表达降低可能是 DMN 大鼠肝纤维化发生、发展的基本病理变化之一。

有研究报道虫草菌丝在早期实验中可促进肝细胞再生,但是不会引起肝细胞无限度增生^[3]。虫草菌丝提高 HGF- α 的表达可能是肝细胞增殖增加的原因之一。本研究结果表明,与同期正常组比较,DMN 模型大鼠的血清 ALT,AST 活性和 TBil 含量显著升高;Alb 含量显著降低;肝组织 Hyp 含量显著升高;肝组织有大面积出血,肝细胞肿胀,淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润与坏死;天狼星红染色提示胶原增生明显,纤维间隔形成。与模型组比较,CsB 及 C12 可以改善纤维化大鼠一般状态,改善肝脏大体情况,血清 ALT,AST 活性和 TBil 含量显著降低,血清 Alb 含量显著提高;肝组织 Hyp 含量显著降低。血清 ALT,AST 及 TBil 是反应肝细胞损伤程度;Alb 主要由肝细胞合成,是反应肝脏储备功能状态的重要指标;肝组织 Hyp 为胶原特有的氨基酸,可反应胶原增生和纤维化程度。可以认为 CsB 和 C12 有良好的抗肝纤维化作用。与模型组相比,CsB 及

C12 的 HGF- α 分别升高了 1.17 和 1.12 倍,CsB 及 C12 的凋亡指数均显著降低。因此推测,C12 提高 HGF- α 分泌可能是虫草菌丝“益精气、补虚损”的重要物质基础之一。

从以上研究中可以看到,CsB 及其 C12 可以通过有效促进 HGF- α 分泌发挥抗肝纤维化的作用。其进一步作用机制,有待深入研究。

[参考文献]

- [1] Ala-Kokko L, Pihlajaemi T, Myers gene expressions of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat [J]. Biochem, 1987, 244:75.
- [2] Jamall I S, Finelli V N, Que Hee S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyProline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112:70.
- [3] Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, et al. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride [J]. Am J Pathol, 1998, 153(2):515.
- [4] Adams L A. Biomarkers of liver fibrosis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26:802.
- [5] Kastanis G J, Hernandez-Nazara Z. The role of dystroglycan in PDGF-BB-dependent migration of activated hepatic stellate cells/myofibroblasts [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011(301):G464.
- [6] N D D' Ambrosio, J L Walewski, R D Clugston, et al. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage [J] PLoS One, 2011, 6(9):24993.
- [7] Du J X, Sun M Y, Liu C, et al. Ingredients of Huangqi decoction slow biliary fibrosis progression by inhibiting the activation of transforming growth factor-beta signaling pathway [J]. BMC Complement Alternative Med, 2012, 12(1):33.
- [8] Kisseleva T, Brenner D A. The phenotypic fate and functional role for bone marrow-derived stem cells in liver fibrosis [J]. J Hepatol, 2012, 56(4):965.
- [9] Munshi M K, Uddin M N, Glaser S S. The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2011, 236(5):557.
- [10] Shah A G, Lydecker A, Murray K, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009(7):1104.
- [11] Friedman S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(8):425.
- [12] Jiang J X, Chen X, Hsu D K, et al. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis *in vivo* [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302:G439.

[责任编辑 聂淑琴]