

双氢青蒿素对胆管结扎致大鼠肝纤维化的治疗作用研究

许霞¹, 付金柏^{2*}, 姚真³, 陈一凡³, 钱磊³, 江朔仪³, 周静怡³, 郑仕中³

(1.南京中医药大学附属张家港中医医院,江苏 张家港 215600;2.南京中医药大学附属医院,江苏 南京 210029;3.江苏省中药药效与安全性评价重点实验室,江苏 南京 210023)

摘要:目的 探究双氢青蒿素(Dihydroartemisinin,DHA)对胆管结扎(Bile duct ligation,BDL)所致的大鼠肝纤维化的初步治疗作用。方法 采用BDL诱导大鼠肝纤维化模型,DHA(14 mg/kg)及阳性药物秋水仙碱(0.1 mg/kg)干预处理,末次给药24 h后,取血清检测ALT、AST、Bilirubin;HE染色、马松染色和天狼猩红染色检测肝组织病理变化;Western blot检测肝组织中肝星状细胞(HSC)活化指标 α -SMA与 $\alpha 1(I)$ collagen的表达;免疫荧光检测肝组织TGF β -R II的表达。体外培养活化的HSC-T6,并用DHA干预处理,Western blot检测 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ collagen以及TGF β -R II、p-Smad2、Smad2的表达。结果 血清学指标结果显示,与空白对照组比较,模型组SD大鼠ALT、AST、Bilirubin显著升高,DHA能降低血清中ALT、AST、Bilirubin水平;HE、马松染色、天狼猩红染色结果显示,与模型组比较,DHA能够明显改善肝脏病理组织结构以及胶原纤维的沉积;Western blot结果显示,DHA还可抑制HSC活化的标志物 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ collagen以及TGF β -R II、p-Smad2的表达。结论 DHA对BDL诱导的肝纤维化具有显著的保护作用,这一效应主要与其抑制HSC活化以及调控TGF β -R II/Smad2信号通路相关。

关键词:DHA;肝纤维化;肝星状细胞;活化;TGF- β II/Smad2信号通路

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2017)04-0376-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0376

Therapeutical Effect of Dihydroartemisinin on Bile Duct Ligation-Induced Liver Fibrosis in Rats and Its Mechanism

XU Xia¹, FU Jin-bai^{2*}, YAO Zhen³, CHEN Yi-fan³, QIAN Lei³, JIANG Shuo-yi³, ZHOU Jing-yi³, ZHENG Shi-zhong³

(1. Affiliated Zhangjiagang Hospital of Chinese Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, Zhangjiagang, 215600, China; 2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 3. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the therapeutical effect of dihydroartemisinin on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. **METHODS** Hepatic fibrosis model was established by bile duct ligation, treatment groups in which rats received intraperitoneal injection of DHA at 14 mg/kg and colchicine treatment. At the end of the experiment, the rats were sacrificed, Blood was collected to exam Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and Bilirubin in serum samples. Hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome stain and sirius red collagen staining were used to Pathological changes in liver tissue. Western blotting analyses were used to evaluate the indicators related with HSC activation such as α -SMA, $\alpha 1(I)$ collagen in liver tissue. Immunofluorescence was used to evaluate the expression of TGF β -R II in liver tissue. HSC-T6 was cultured *in vitro* and treated with DHA. Western blotting analyses were used to evaluate the expressions of α -SMA, $\alpha 1(I)$ collagen, TGF β -R II, p-Smad2, and Smad2. **RESULTS** As shown in Serological indicators, compared with the control group, contents of serum ALT, AST, Bilirubin was significantly increased in the model group, DHA could decrease the serum levels of ALT, AST, Bilirubin. As shown in HE, Masson, and Sirius red staining, compared with the model group, DHA significantly alleviated liver pathology tissue and deposition of collagen fibers, and inhibited expression of α -SMA, $\alpha 1(I)$ collagen and TGF β -R II, p-Smad2. **CONCLUSION** DHA had the protective effect on liver fibrosis induced by BDL, which was primarily related to inhibition of HSC activation and regulation of TGF- β II/Smad2 signaling pathways.

KEY WORDS:DHA;liver fibrosis; hepatic stellate cells; activation; TGF- β II/Smad2 signaling pathway

收稿日期:2017-03-09;修稿日期:2017-06-28

基金项目:国家自然科学基金(81270514)

作者简介:许霞(1982-),女,江苏张家港人,张家港中医医院主管护师。*通信作者:1918598016@qq.com

肝纤维化是继发于各种类型的慢性肝损伤之后组织的修复反应过程,也是所有慢性肝病的共同病理过程;如无效治疗,肝纤维化最终将发展为肝硬化、门脉高压、肝细胞癌等^[1]。肝纤维化的实质是肝组织内细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的合成大于降解,导致大量 ECM 过度生成,肝组织结构与功能受到破坏^[2]。近十年来的基础与临床研究均证实,活化的肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)是肝脏纤维化时 ECM 成分的主要来源^[3-4]。

青蒿素是我国药学工作者从菊科植物黄花蒿叶中提取分离到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物,其化学结构经过改造、修饰,先后发展了青蒿琥酯、蒿甲醚、双氢青蒿素(Dihydroartemisinin, DHA)等多种衍生物^[5]。DHA 是青蒿素及其衍生物蒿甲醚和青蒿琥酯在体内的有效活性代谢产物,其进入体内后具有吸收好、分布广、排泄和代谢迅速等特点^[6-7]。近年来研究显示,DHA 具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节和抑制瘢痕的作用。最新研究显示,青蒿琥酯可以抑制 LPS/TLR4/NF- κ B 信号转导保护肝脏免受多种致病因子诱导的肝脏炎症和肝纤维化^[8]。另有研究发现,DHA 能减轻博来霉素诱导的肺损伤和纤维化^[9-10]。目前关于 DHA 抗肝纤维化方面的研究鲜有报导,本研究创新性选择 DHA,运用胆管结扎(Bile duct ligation, BDL)诱导大鼠肝纤维化模型和大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 来探究其在抗肝纤维化方面的作用及其机制,为后续的 DHA 防治肝纤维化的研究与开发奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

雄性 SD 大鼠,9 周左右,体质量 180~220 g,购自上海斯莱克实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002。原代肝星状细胞(HSC)购自中科院上海细胞库。

1.2 仪器

莱卡倒置荧光显微镜(德国莱卡公司,型号 DM1L);微量离心机(上海安科学仪器厂,型号 KA-1000);冷冻离心机(Beckman,型号 CS-15R),电子天平(德国赛多利斯有限公司,型号 BT323S);电泳槽(美国 Bio-Rad 公司,型号 525BR027843);半自动生化仪(东北沃特科技有限公司)。

1.3 试剂

一抗 α -SMA(批号:14968)、Smad2(批号:

5339)、p-Smad2(批号:3104)均购自 Cell Signaling Technology 公司; α 1(I) procollagen(批号:ab6308)、TGF β -R II(批号:ab78419)均购自 Abcom 公司。二抗 Goat a-rabbit-IgG-HRP(批号:ab6721)购自 Abcom 公司。

1.4 动物分组及 BDL 造模

将 50 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组、DHA 干预组、阳性药治疗组,每组 10 只。除空白组和假手术组外,其余 SD 大鼠进行胆管结扎,胆管结扎 2 周后,第 4 周开始,给药组腹腔注射 DHA 按 14 mg/kg^[6],每周注射 5 d,每日给药 1 次,阳性药组口服给予秋水仙碱,每日 1 次,持续 4 周。

1.5 肝纤维化血清指标检测

实验大鼠末次给药 24 h 后,颈总动脉取血,血样 4℃、3 500 r/min 离心 15 min,取血清。检测血清中 AST、ALT、Bilirubin 含量。AST(批号:C010-2)、ALT(批号:C009-2)、Bilirubin(批号:C019-1)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.6 病理学切片检测

肝组织脱水,石蜡包埋,HE、Masson 以及天狼星红染色切片,光镜下观察纤维化的有无及程度。

1.7 免疫荧光检测

肝组织切片经脱蜡和水化后,甲醛固定,经一抗 TGF β -R II 孵育和二抗染色,抗荧光淬灭剂封片。激光共聚焦显微镜观察各组肝组织荧光表达情况。

1.8 Western blot 检测

取肝组织,提取肝组织蛋白,检测 α -SMA、 α 1(I) procollagen 的表达;检测各组中 HSC 中 α -SMA、 α 1(I) procollagen 以及 TGF β -R II、p-Smad2、Smad2 的蛋白表达。将肝组织蛋白提取液和 HSC 细胞蛋白提取液 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液测定蛋白浓度,确定上样量,配制 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE),进行电泳,转膜,非特异性封闭;加入一抗 α -SMA、 α 1(I) procollagen、TGF β -R II、p-Smad2、Smad2 封闭,过夜,加入二抗进行杂交,于伯乐凝胶成像仪中对条带进行成像, β -actin 作为内参,对蛋白条带进行灰度定量分析。

1.9 数据分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 SPSS16.0 软件进行数据分析,GraphPad Prism 5 软件进行作图。多组均

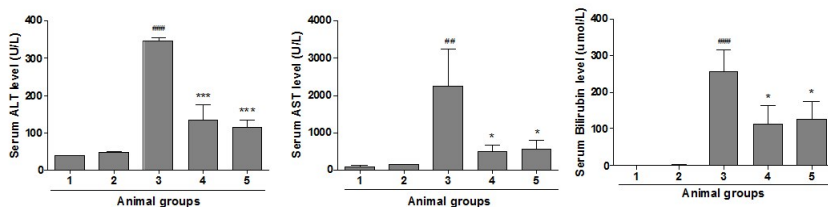
数间的比较采用单因素方差分析,再用 Dunnett 检验进行 post-hoc 分析,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 DHA 对 BDL 诱导的肝纤维化血清指标的影响

与正常组比较,模型组大鼠 ALT、AST、Bilirubin

显著升高 ($P < 0.01$);DHA 干预组能明显地降低血清中 ALT、AST、Bilirubin 水平 ($P < 0.05 \sim 0.01$),减轻 BDL 引起的肝组织损伤,秋水仙碱组中 ALT、AST、Bilirubin 水平也得到明显的降低。假手术组与空白组比较,3 个指标均未见显著性变化。见图 1。



注:1.空白对照组;2.假手术组;3.模型组;4.DHA 组(14 mg/kg);5.秋水仙碱组(0.1 mg/kg)。

与空白对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 1 各组间大鼠 ALT、AST、Bilirubin 水平比较

2.2 DHA 对 BDL 诱导的肝纤维化病理组织学的影响

BDL 可导致有细胞毒性的胆汁酸在肝组织内堆积,可导致肝细胞坏死,肝细胞脂肪变性^[11]。HE 染色结果显示,正常组肝小叶结构完整,中央静脉周围呈放射状排列的肝细胞索;模型组肝小叶结构及肝索排列均紊乱,大量肝细胞发生脂肪变性、坏死;DHA 组可减轻组织损伤情况,使肝小叶结构基本恢复正常,只有少数肝细胞可见脂肪变性,秋水仙碱组中肝组织中几乎见不到纤维组织增生和假小叶。见图 2。

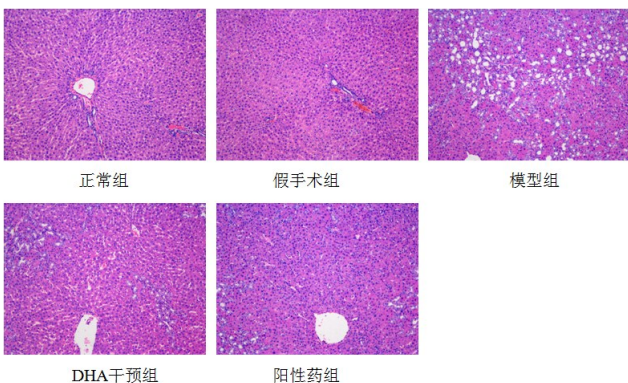


图 2 大鼠肝组织 HE 染色(×100)

慢性肝损伤时胶原成分的过度积累会导致纤维化的发生发展^[12]。Masson 染色和天狼猩红染色结果显示:正常组肝小叶结构正常,肝细胞索排列整齐,肝窦和汇管区可见被染成蓝绿色的胶原纤维,几乎见不到弥漫增生的胶原纤维;模型组汇管区周围胶原纤维增生显著,增生的胶原纤维向四周延伸,并向邻近肝小叶延伸形成纤维间隔,多数纤维间隔完

全包裹肝细胞团形成完整的假小叶;DHA 干预组中汇管区周围胶原纤维增生程度明显减轻,纤维间隔变细,假小叶形成不明显;秋水仙碱组中肝组织中几乎见不到纤维组织增生和假小叶。见图 3~4。

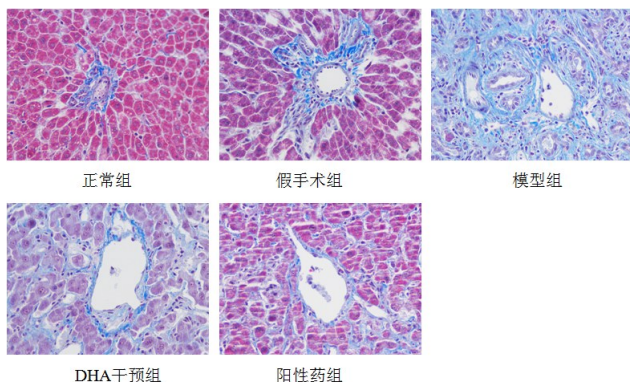


图 3 大鼠肝组织 Masson 染色(×400)

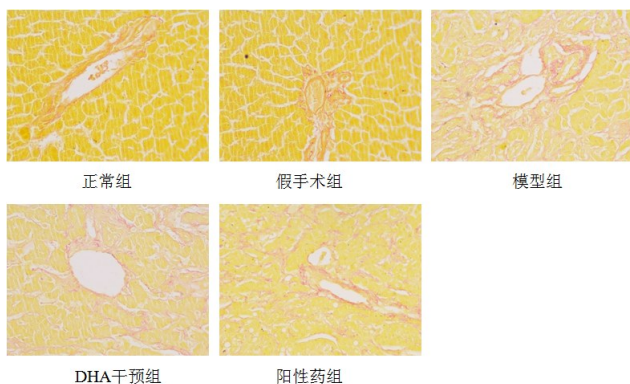


图 4 大鼠肝组织天狼猩红染色(×400)

2.3 DHA 对 HSC 中 ECM 表达的影响

HSC 的活化是肝纤维化形成的中心环节, α -SMA 是 HSC 活化的主要标志物, $\alpha 1(I)$ procollagen 是 HSC 生成的 ECM 的主要成分。Western

blot 的检测结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织中 HSC 内高表达 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ procollagen($P<0.01$),DHA 治疗组的 HSC 内这两个纤维化标志物的表达明显降低($P<0.05$),与阳性药物秋水仙碱组的治疗效果相近。见图 5。同时,体外培养活化的 HSC,用不同剂量的 DHA 处理,Western blot 的检测结果显示 DHA 可以剂量依赖性的下调 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ procollagen 的蛋白表达($P<0.05\sim 0.01$),与体内实验结果相一致。见图 6。

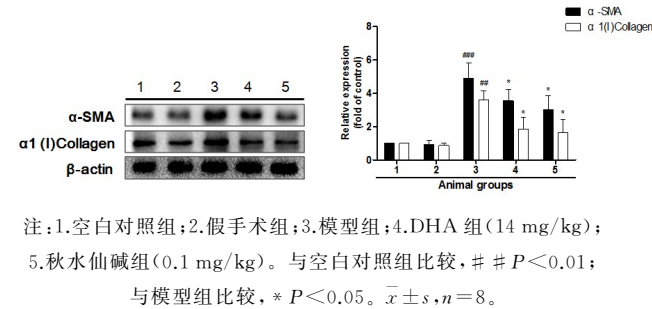


图 5 各组大鼠肝星状细胞中 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ procollagen 的蛋白表达和定量分析

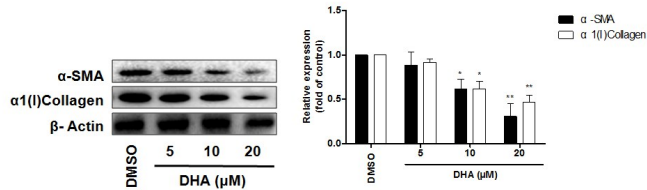


图 6 HSC-T6 中 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ procollagen 的蛋白表达和定量分析

2.4 DHA 对 BDL 诱导的肝纤维化组织中 TGF β -R II 表达的影响

在肝纤维化进程中,有多种细胞因子及多条细胞信号通路参与到这一病变过程中,对肝纤维化的进展发挥重要调控作用^[13]。TGF- β 1 是一类调节细胞生长和分化的细胞因子,是目前公认的最强的致肝纤维化的细胞因子之一^[14]。HSC 的活化也会伴随着其表面 TGF β -R II 受体的过度表达。我们利用免疫荧光双染对 TGF β -R II 在以 α -SMA 标记的 HSC 中的表达进行检测。结果显示,与正常大鼠比较,BDL 造模的纤维化大鼠肝脏中 HSC 中 TGF β -R II 表达显著提高,提示纤维化肝脏中 HSC 中 TGF β -R II 信号通路可能高度活化;而给予 DHA 干预后,TGF β -R II 的表达被显著降低。见图 7。

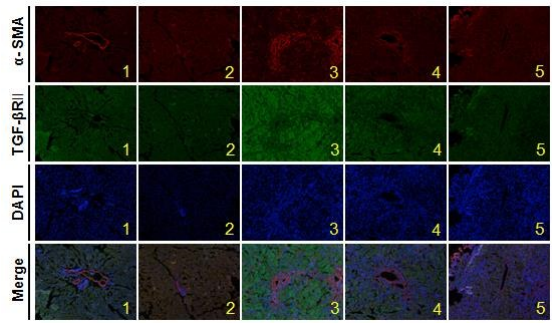


图 7 肝组织 TGF β -R II 的免疫荧光检测

2.5 DHA 对活化 HSC 中 TGF β -R II /Smad2 信号通路的影响

在体内的研究结果中,我们发现,DHA 可以抑制大鼠肝纤维化中 HSC 表面 TGF β -R II 受体的表达,接下来我们选用大鼠 HSC-T6 进一步探究 DHA 对 TGF β -R II 信号通路的影响。Western blot 的检测结果显示,DHA 可以降低 TGF β -R II、p-Smad2 的蛋白表达($P<0.01$),并呈现一定的剂量依赖性,对 Smad2 总蛋白的表达并无影响。见图 8。

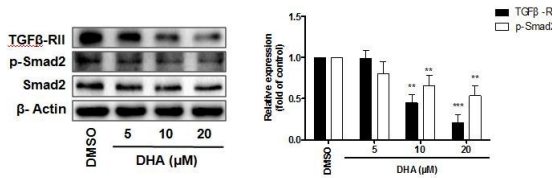


图 8 HSC-T6 中 TGF β -R II、p-Smad2、Smad2 的蛋白表达和定量分析($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

关于 DHA 药理活性的研究一直是国内外研究的热点。DHA 作为青蒿素体内的主要活性代谢物,其作用活性远远优于青蒿素本身。大量研究已经证实,DHA 不仅具有良好的抗疟疾活性,还具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节等药理活性^[10,15]。已有一些动物实验表明,青蒿素及青蒿琥酯对肝纤维化具有良好的疗效^[9],此外,最新研究发现,DHA 可以缓解致病因子诱导的肺损伤,抑制炎症反应和胶原沉积的生成^[9,16]。然而,目前关于 DHA 治疗肝纤维化方面的研究还鲜有报道。

本研究采用经典的动物肝纤维化模型,探究 DHA 的抗肝纤维化作用。BDL 致大鼠肝纤维化模型是一个经典的动物模型,许多体内研究均运用了这个模型^[17]。该模型的周期较短,自发的逆转率较低,与临床上因胆汁分泌障碍,胆道闭锁而引起的肝

纤维化病程相似^[18],故广泛运用于抗肝纤维化药物的筛选。

谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)主要存在于肝细胞的细胞核和线粒体内,当肝脏受到损伤时,肝细胞会将 ALT 和 AST 释放入血,导致其在血清中的水平升高。因此,临床上通常将血清 ALT 与 AST 作为衡量肝损伤程度及药物保肝作用的重要指标^[19]。胆红素(Bilirubin)可经肝脏作用后,随胆汁分泌排出,一般作为胆汁淤积型肝损伤的检查指标。本实验通过血清 ALT、AST、Bilirubin 来判断肝损伤的程度,再结合 HE 染色、Masson 染色、天狼星红染色及肝组织免疫荧光,从不同的角度来反映 DHA 对肝纤维化的作用。血清学指标的检测结果发现,DHA 可以降低 BDL 诱导肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST 及 Bilirubin 水平,说明 DHA 可减轻肝纤维化大鼠的肝损伤,发挥肝脏保护的作用。病理切片分析也表明 DHA 能够有效地抑制大鼠肝纤维化病变程度。

HSC 的活化是肝纤维化形成的中心环节,而 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ procollagen 是 HSC 活化的标志物。考察这两个标志物蛋白水平的表达情况可以反映 DHA 对 HSC 活化的影响。我们的研究发现,DHA 不仅可以降低 BDL 诱导的纤维化大鼠肝组织中 α -SMA、 $\alpha 1(I)$ procollagen 的表达,而且体外的研究结果也显示出 DHA 能剂量依赖性的下调这两个蛋白的表达,体内外的研究结果表明 DHA 改善肝纤维化损伤的作用与抑制 HSC 活化,减少胶原合成密切相关。

大量研究已经证实,枯否细胞、肝窦内皮细胞、活化型 HSC 均可释放大量细胞因子、炎症因子或趋化因子,作用于 HSC 表面受体,激活促纤维化信号转导途径,激活促纤维化信号转导途径,诱导 HSC 的活化和胶原的分泌^[20]。其中,TGF- β 被认为是最关键的促纤维化因子,阻断 TGF β 及其细胞信号转导通路已经成为当今抗肝纤维化研究的热点。本实验体内研究发现,DHA 能够显著抑制纤维化肝组织 TGF β -R II 的表达,与阳性药物秋水仙碱的作用相一致,体外的研究结果进一步揭示,DHA 能剂量依赖性的抑制 TGF β -R II 的蛋白表达以及其下游信号分子 Smad2 的磷酸化。这一结果提示我们,DHA 的抗肝纤维化作用与调控 TGF- β II /Smad2 信号通路相关,其具体的作用机制尚待进一步的揭示。

综上所述,本实验研究表明 DHA 能够减轻

BDL 诱导的肝纤维化损伤,抑制 HSC 的活化,调控 TGF- β II /Smad2 促纤维化信号转导途径,发挥抗肝纤维化的作用,这提示我们,DHA 可作为新型抗肝组织纤维化药物。本课题组将进一步深入去揭示 DHA 干预肝纤维化的分子基础,为肝纤维化药物的研究和开发奠定实验基础。

参考文献:

- [1] ZHANG Z, ZHANG F, LU Y, et al. Update on implications and mechanisms of angiogenesis in liver fibrosis[J]. *Hepatol Res*, 2015, 45(2):162-178.
- [2] 张自力, 张衍, 张涉, 等. 大麻素受体在肝纤维化及肝硬化中的作用及研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(3):10-13.
ZHANG ZL, ZHANG Y, ZHANG S, et al. Research progress on role of cannabinoid receptors in hepatic fibrosis and liver cirrhosis[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2014, 30(3):10-13.
- [3] FRIEDMAN SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8):425-436.
- [4] 张自力, 赵士峰, 许文萱, 等. 细胞因子信号转导抑制分子-3 在肝纤维化中的作用及研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2015, 11(12):1646-1651.
ZHANG ZL, ZHAO SF, XU WX, et al. Research progress of role of SOCS-3 in treating liver fibrosis[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 11(12):1646-1651.
- [5] EASTMAN RT, FIDOCK DA. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(12):864-874.
- [6] ZHANG Z, GUO M, ZHAO S, et al. ROS-JNK1/2-dependent activation of autophagy is required for the induction of anti-inflammatory effect of dihydroartemisinin in liver fibrosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 101(1):272-283.
- [7] MORRIS CA, ONYAMBOKO MA, CAPPARELLI E, et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin in pregnant and non-pregnant women with malaria[J]. *Malar J*, 2011, 10(1):114.
- [8] GU Y, WANG X, YUAN M, et al. Artemisinin attenuates post-infarct myocardial remodeling by down-regulating the NF-kappaB pathway[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 227(3):161-170.
- [9] YANG D, YUAN W, LYU C, et al. Dihydroartemisinin suppresses inflammation and fibrosis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2):1270-1281.
- [10] ZHANG XG, LI GX, ZHAO SS, et al. A review of dihydroartemisinin as another gift from traditional Chinese medicine not only for malaria control but also for schistosomiasis control[J]. *Parasitol Res*, 2014, 113(5):1769-1773.
- [11] STIEGER B. Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis[J]. *Drug Metab Rev*, 2010, 42(3):437-445.
- [12] SEKI E, SCHWABE RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways[J]. *Hepatology*, 2015, 61

- (3): 1066-1079.
- [13] ZHANG Z, GUO Y, ZHANG S, et al. Curcumin modulates cannabinoid receptors in liver fibrosis *in vivo* and inhibits extracellular matrix expression in hepatic stellate cells by suppressing cannabinoid receptor type-1 *in vitro*[J]. Eur J Pharmacol. 2013, 721(1-3):133-140.
- [14] 张自力, 张涉, 郭瑶, 等. 大麻素受体在肝星状细胞活化中的作用及姜黄素干预效应[J]. 中国药理学通报, 2013, 29 (5):626-631.
- ZHANG ZL, ZHANG S, GUO Y, et al. Research on the role of cannabinoid receptors in hepatic stellate cell activation and interfering effects of curcumin[J]. Chin Pharmacol Bull, 2013, 29(5):626-631.
- [15] ZHANG Z, ZHAO S, YAO Z, et al. Autophagy regulates turnover of lipid droplets via ROS-dependent Rab25 activation in hepatic stellate cell[J]. Redox Biol. 2017, 11:322-334.
- [16] 袁晓梅, 袁彬, 马五林, 等. 双氢青蒿素对大鼠肺组织纤维化的干预作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28 (16) :1253-1256.
- YUAN XM, YUAN B, MA WL, et al. Intervention effect of dihydroartemisinin on pulmonary fibrosis in rats[J]. J Appl Clin Pediatr, 2013, 28 (16) :1253-1256.
- [17] SHEEN JM, CHEN YC, TAIN YL, et al. Increased circulatory asymmetric dimethylarginine and multiple organ failure: bile duct ligation in rat as a model[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 3989-4006.
- [18] SHEEN JM, HUANG LT, HSIEH CS, et al. Bile duct ligation in developing rats: temporal progression of liver, kidney, and brain damage[J]. J Pediatr Surg, 2010, 45(8): 1650-1658.
- [19] SHEWEITA SA, ABE EM, BASTAWY M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants[J]. Toxicology, 2001, 165:217-224.
- [20] FRIEDMAN SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88 (1): 125-172.

(编辑:董宇)