文章编号:1000-5404(2013)24-2671-05

论著

比伐卢定逆转大鼠非酒精性脂肪肝的实验研究

马 娜,傅 念 (421002 湖南 衡阳,南华大学附属南华医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨凝血酶抑制剂比伐卢定逆转大鼠非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)的效果。**方法** 通过喂养高脂饲料复制NAFLD大鼠模型,ELISA法检测肝脏及血清血脂指标,RT-PCR法检测肝脏单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、CD68、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)、Ⅰ型胶原蛋白(COL1A1)、基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)、转化生长因子-β1(TGF-β1)mRNA表达水平,肝组织切片油红O染色、HE常规染色,显微镜下观察。**结果** 比伐卢定可以明显延长大鼠的凝血酶原时间($P=0.000$);比伐卢定可以明显降低CD68及F4/80 mRNA、MCP-1 mRNA水平和肝脏及血清MCP-1水平,与安慰剂组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);比伐卢定组大鼠的血清甘油三酯和总胆固醇比安慰剂组明显下降($P<0.05$);比伐卢定可以明显降低α-SMA蛋白表达和COL1A1 mRNA、TIMP-1 mRNA表达,与安慰剂组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 凝血酶抑制剂比伐卢定可降低巨噬细胞和中性粒细胞在肝脏的聚集,纠正肝脏细胞的炎症状态,降低血清甘油三酯和总胆固醇的水平,并降低肝脏纤维化的风险。

[关键词] 比伐卢定;非酒精性;脂肪肝
[中图法分类号] R-332;R575.505;R977.6 [文献标志码] A

Effect of bivalirudin on reversing nonalcoholic fatty liver in rats

Ma Na, Fu Nian (Department of Digestive Diseases, Affiliated Hospital of South China University, Hengyang, Hunan Province, 421002, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of thrombin inhibitor bivalirudin on reversing nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. Methods NAFLD rat model was established by feeding high-fat diet. Liver and serum lipid levels were detected by ELISA. Liver monocyte chemoattractant protein (MCP-1), CD68, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), type Ⅰ collagen (COL1A1), matrix metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1), and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) mRNA expression levels were detected by RT-PCR. Liver biopsy oil red O staining and HE staining were performed. Results Bivalirudin could significantly prolong the prothrombin time ($P=0.000$) and significantly reduce the levels of CD68 and F4/80 mRNA, MCP-1 mRNA, and liver and serum MCP-1 as compared to the placebo group ($P<0.05$). Compared to the placebo group, the serum triglycerides and total cholesterol in rats of bivalirudin group decreased significantly ($P<0.05$). What's more, bivalirudin could also significantly reduce expression of α-SMA protein, COL1A1 mRNA, and TIMP-1 mRNA ($P<0.05$). Conclusion Thrombin inhibitor bivalirudin can reduce macrophage and neutrophil accumulation in the liver, correct the inflammation of liver cells, reduce serum triglycerides and total cholesterol, and lower the risk of hepatic fibrosis.

[**Key words**] bivalirudin; non-alcoholic fatty liver

Corresponding author: Fu Nian, E-mail: funianhy@126.com

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种肝代谢综合征,以肝脏中的脂肪积累过剩,即肝细胞脂肪变性为主要特征,该病在西方国家的患病比例约为25%[1]。若NAFLD具有明显的组织

[通信作者] 傅 念,E-mail:funianhy@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131011.1727.003.html(2013-10-11)

学炎症则被称为非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),是NAFLD最严重的形式,也是引起肝脏纤维化和肝硬化的重要原因之一[2]。对于NAFLD和NASH,目前临床上尚无有效的药物治疗方案。此外,肥胖和NAFLD可以明显增加2型糖尿病及心血管疾病的风险[3-4]。因此,积极探索非酒精性脂肪肝新的药理方法已成为临床治疗的迫切需要。与肥胖有关的疾病一般具有共同的特征,即炎症[5-6]。肥胖和脂肪肝也与肝脏细胞炎症因子的表达增加有关,白细胞相关的炎症介质的表达增加可进一步加速NASH。此类因子包括:炎症趋化因子,如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein,MCP-1)、肝巨噬细胞等。此类炎症因子的表达增加是NAFLD发病、并发2型糖尿病和心脑血管疾病的机制链中的重要环节。肝脏的促炎反应环境对该病的治疗和预后均具有重要的临床意义。但是诱发NASH的分子机制和代谢性疾病(如肥胖)与NAFLD及NASH的关系,目前仍不十分明确。进一步了解炎症在NAFLD患者的代谢性疾病发生、发展过程中的分子标志,可能为临床的治疗实践提供重要的依据。有研究表明:小鼠缺乏凝血酶受体及激活蛋白酶受体-1(protease activated receptor 1, PAR-1),发生肝细胞脂肪变性的概率下降,提示:凝血酶抑制剂可能会降低NAFLD的发生风险[6]。本研究通过观察凝血酶抑制剂(比伐卢定)对高脂饮食引起的非酒精性脂肪肝大鼠肝脏炎症状态及肝脏纤维化的逆转效果,探讨凝血酶抑制剂对NAFLD的诊疗作用,并试图了解炎症在NAFLD发病过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

5周龄雄性SD大鼠36只,体质量(203.22±13.45)g,清洁级,由南华大学动物实验部提供(批号:2012C324)。

1.2 动物模型的建立

SD大鼠36只,全部给予高脂饮食复制非酒精性脂肪性肝模型。高脂饲料配方:75%普通饲料,15%猪油,8%蛋黄粉,2%胆固醇。胆固醇购于上海康成生物试剂有限公司;猪油、鸡蛋黄自制。自第8周起,每周随机处死1只大鼠,取肝脏HE染色,显微镜下观察,第15周末达到脂肪肝,最终成模24只。

1.3 主要仪器及试剂

Alzet微型渗透压泵(Alzet公司,美国);切片机、全自动组织脱水机、包埋机(徕卡公司,德国);烤箱,孵箱(北京第二仪器厂);光学显微镜(上海光学仪器厂);高清晰度病理图片采集系统(华海医疗信息技术股份有限公司);离心机、PCR(ThermoeyCler,美国);电泳凝胶成像分析仪(上海勤翔科学仪器有限公司);紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);微量电子天平(上海海康电子仪器厂);C2000-4血凝分析仪(北京普利生仪器有限公司)。

冰醋酸、乙酸钠、聚乙二醇、丙二醇、注射用无菌水等由西安润泰化工有限公司提供;比伐卢定为美国Medicines公司产品;抗兔二抗为美国Invitrogen公司产品;ABC试剂盒、PBS缓冲液、ImmPACT DAB过氧化物酶底物试剂盒等由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。

1.4 Alzet渗透压泵的植入和用药

将24只脂肪肝模型大鼠,根据体质量,按照1:1的比例匹配成12对。经3%的异氟烷麻醉,按1 mg/kg腹腔注射盐酸丁丙诺非后经皮下、紧贴肩胛骨为每只大鼠植入ALZET微型渗透压泵(流速0.25 μL/h)。缝合线和创口由专人每天进行监测。根据大鼠及皮肤损害情况,采用锌氧化物进行治疗。植入Alzet渗透压泵后,自由喂养1周。将每个对子中的2只大鼠,按照抛硬币法将对子中的大鼠分别泵入安慰剂(由10%冰醋酸、2 mmol/L的乙酸钠、20%的聚乙二醇、10%的丙二醇、注射用无菌水组成)和含有比伐卢定的安慰剂溶液[浓度为100 mg/mL的比伐卢定溶解于37 ℃的上述混合液中,每只大鼠的用药剂量约15 mg/(kg·d)],药物通过无菌微型渗透压输入大鼠体内。连续泵入药物4周。

1.5 标本采集

经4周药物干预后,比伐卢定组2只大鼠由于药物不耐受而死亡,故10对大鼠列入最后的数据分析。

标本采集前夜大鼠禁食,经异氟醚麻醉,从尾鳍腔静脉抽取静脉血,加入柠檬酸钠(浓度0.38%)收集血浆,并用注射器收集血清。从左外侧叶切除的肝标本固定于10%的福尔马林液中48 h,并用石蜡包埋。剩余的肝脏标本冷冻于液态氮中。

1.6 肝脏组织病理学及脂质水平测定

石蜡包埋的肝脏切片经苏木精伊红染色,采用切片机切成5 μm厚的切片,由病理学家对肝脏纤维化和炎症病灶情况进行评分。具体炎症评分方法如下:炎症组织评分包含汇管区(P)、小叶内(L)、碎屑坏死(PN)及桥接坏死(BN)4项,依病变轻、中、重程度分别记0~4分,总炎症评分=P+L+2(PN+BN),评分越大,表示炎症越明显[7]。福尔马林固定的肝标本采用石蜡切片胶原纤维染色试剂盒(由上海太阳生物技术有限公司提供)进行胶原蛋白染色,严格按照试剂盒的说明进行操作,定量胶原蛋白染色分析采用Meta Morph软件操作。肝脏组织经PBS洗涤2次,10%甲醛固定30 min,PBS洗3次,0.5%油红O染色20 min,PBS洗30次,37 ℃干燥后,显微镜下观察,肝脏细胞内脂质呈红色。肝脏、血清甘油三酯和胆固醇水平采用常规生化方法测量;凝血酶时间采用北京普利生C2000-4血凝分析仪,凝血酶时间测定试剂盒由上海太阳生物技术有限公司提供。

1.7 RNA分离、cDNA合成和实时定量PCR

采用TRI Reagent试剂盒,从约100 mg冷冻的肝脏标本中分离总RNA;取1 μg RNA采用高容量cDNA反转录基因试剂盒合成cDNA。单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、CD68、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule -1,ICAM-1)、巨噬细胞炎性蛋白-2(macrophage inflammatory protein-2,MIP-2)、Ⅰ型胶原蛋白(collagen, type Ⅰ, alpha 1, COL1A1)、基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)、转化生长因子-β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)等采用RT-PCR实验测定。以18S为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法[8]对定量结果进行分析,获得上述基因mRNA的相对表达量。

引物序列如下:MIP-2(61 bp):上游:5′-GAAGTCATAGCCACTCTCAAGG-3′,下游:5′-CTTCCGTTGAGGGACAGC-3′;COL1A1(64 bp):上游:5′-CATAAAGGGTCATGGTGGCT-3′,下游5′-TTGAGTCCGTCTTTGCCAG-3′;18S(84 bp):上游:5′-CTGTAGCCCTGTACTTCATCG-3′,下游:5′-CTACCACATATTCCTGACCATCC-3′;MIP-2、COL1A1和18S引物合成及其他PCR实验相关试剂盒均由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。

RT-PCR体系配置如下:SYBR Green染料10 μL、上游引物1 μL、下游引物1 μL、dNTP 1 μL、*Taq*聚合酶2 μL、cDNA 5 μL,加ddH_2O至总体积为50 μL。

反应条件为:预变性:95 ℃ 2 min;93 ℃ 1 min, -56 ℃ 1 min,共40个循环;最后72 ℃延伸5 min。

1.8 巨噬细胞和嗜中性粒细胞染色

冷冻肝脏制成8 μm的切片用于巨噬细胞染色和嗜中性粒细胞染色。巨噬细胞的识别使用CD68和F4/80抗体参考Luyendyk等[9]的方法进行操作。石蜡包埋的肝脏制成5 μm的切片,兔抗中性粒细胞的多克隆抗体进行中性粒细胞染色。嗜中性粒细胞和中性粒细胞的数目根据10个随机选择视野进行确定。

1.9 α-平滑肌肌动蛋白染色

石蜡包埋肝脏切成5 μm的切片,脱蜡,然后在柠檬酸盐缓冲液中煮沸。切片经兔抗-平滑肌肌动蛋白(SMA)抗体染色后封存于5%的山羊血清,过夜。组织用Tris缓冲液盐水冲洗,并采用生物素标记的抗兔二次抗体染色30 min后加入ABC试剂,30 min后加入ImmPACT DAB过氧化物酶底物,孵育1 min。SMA染色的定量借助MetaMorph软件进行操作。

1.10 MCP-1的ELISA实验

取快速冷冻的肝脏组织100 mg,采用PBS(含0.1%的Triton X-100溶液及蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物)分离获得总蛋白。4 ℃离心15 min,转速为3 000 r/min。蛋白质浓度采用美国伯乐蛋白定量试剂盒(Bio-Rad,美国)确定;肝脏组织和血清MCP-1浓度采用ELISA试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)测定。

1.11 统计学分析

实验数据采用$\bar{x} \pm s$表示,2组比较采用配对设计的t检验进行统计推断,检验水准$\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 脂肪肝造模情况

从喂养第8周开始,大鼠肝表面有明显的油腻感,肝细胞内可见少量脂滴;第12周时,显微镜下显示约1/3肝细胞有颗粒状脂滴;喂养至14周时,有颗粒状脂滴的肝细胞达到2/3左右;第15周,肝细胞脂滴颗粒更大,肝细胞呈不规则形态,正常大鼠肝脏无以上变化,提示:非酒精性脂肪肝大鼠模型建模成功。

2.2 比伐卢定对脂肪肝大鼠凝血酶原时间的影响

比伐卢定组大鼠的凝血酶原时间为(45.22 ± 5.79)s,安慰剂组大鼠凝血酶原时间为(28.39 ± 1.36)s,经配对设计的t检验,2组的凝血酶原时间具有统计学差异($t = 12.397$, $P = 0.000$),提示比伐卢定可以明显延长凝血酶原时间。

2.3 比伐卢定对脂肪肝大鼠肝脏炎性状态的影响

CD68及F4/80为2种具有代表性的巨噬细胞选择基因,经RT-PCR确定,比伐卢定可以明显降低CD68及F4/80 mRNA的表达,与安慰剂组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。比伐卢定可明显降低MCP-1 mRNA水平和肝脏及血清MCP-1水平,提示比伐卢定组大鼠的肝脏巨噬细胞累积和肝细胞脂肪变性程度降低。分析结果显示,比伐卢定还可明显降低ICAM-1和MIP-2 mRNA的表达水平,标志着比伐卢定组大鼠的肝脏细胞嗜中性粒细胞的累积减弱。见表1。此外,对肝脏组织的炎性病灶进行评定,比伐卢定(0.71 ± 0.15)分,安慰剂组(1.69 ± 0.40)分,差异具有统计学意义($t = 7.512$, $P = 0.000$),表明比伐卢定组大鼠的炎症病灶明显减少。以上结果提示:比伐卢定可以有效抑制脂肪肝大鼠肝脏的炎性反应,有效逆转脂肪肝大鼠肝脏的炎性状态。

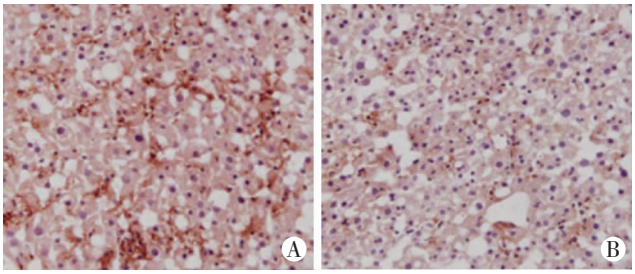
由图1可见,与安慰剂组相比,比伐卢定组肝脏切片视野中,褐色聚集区明显缩小,颜色减弱,表明巨噬细胞聚集和累积程度明显降低,这与上述结果一致。

2.4 比伐卢定对脂肪肝大鼠血脂及肝脏脂肪变性的影响

通过对肝脏的中性脂质进行油红O染色,并对肝脏及血清的甘油三酯、总胆固醇进行定量测量。图2显示,与安慰剂组相比,比伐卢定组肝脏切片视野中,肝脏细胞内脂质红色区域面积缩小,颜色变浅,意味着比伐卢定组大鼠肝脏脂质累积减弱,脂肪变性有所逆转;表2结果显示:肝脏的甘油三酯和总胆固醇的水平在比伐卢定组和安慰剂组大鼠间无统计学差异($P > 0.05$),以上结果表明:经过4周的用药处理,比伐卢定对肝细胞的脂肪变性有逆转作用,但并不特别明显。表2结果还显示:比伐卢定组大鼠血清甘油三酯和总胆固醇比安慰剂组明显下降($P < 0.05$)。上述结果表明:比伐卢定可有效逆转脂肪肝大鼠肝脏甘油三酯、总胆固醇的升高,同时,可明显降低脂肪肝大鼠血清甘油三酯、总胆固醇的含量,对肝细胞脂肪变性有一定的逆转效果。

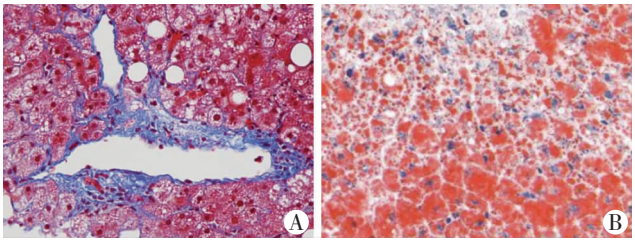
表1 比伐卢定对2组脂肪肝大鼠相关免疫因子mRNA表达水平及MCP-1水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	CD68 mRNA	F4/80 mRNA	ICAM-1 mRNA	MIP-2 mRNA	MCP-1 mRNA	肝脏MCP-1（pg/mg）	血清MCP-1（pg/mL）
安慰剂组	7.52±0.87	5.13±0.79	3.47±0.67	30.27±7.39	20.39±4.59	0.011±0.008	20.88±3.21
比伐卢定组	4.03±0.34	1.88±0.23	2.03±0.32	12.26±3.28	5.39±2.44	0.005±0.006	12.37±2.44
t	2.762	6.091	2.967	3.464	5.689	2.677	4.423
P	0.022	0.000	0.016	0.007	0.000	0.025	0.002



A：安慰剂组；B：比伐卢定组

图1 2组大鼠肝脏组织病理学变化（HE×200）



A：安慰剂组；B：比伐卢定组

图2 4周用药处理后安慰剂组和比伐卢定组大鼠肝脏组织油红O染色观察（×200）

表2 比伐卢定对2组脂肪肝大鼠血脂水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	肝脏甘油三酯（mg/g）	血清甘油三酯（mg/dL）	肝脏总胆固醇（mg/g）	血清总胆固醇（mg/dL）
安慰剂组	47.22±5.79	200.88±47.23	8.27±0.74	837.29±32.78
比伐卢定组	36.32±4.03	121.33±26.79	9.03±0.89	513.87±20.11
t	2.209	5.661	0.259	3.236
P	0.073	0.000	0.801	0.010

2.5 比伐卢定对脂肪肝大鼠肝脏纤维化的影响

表3为2组大鼠α-SMA蛋白表达水平及肝脏纤维化基因mRNA表达水平的比较，结果显示：比伐卢定可以明显降低α-SMA蛋白表达和COL1A1 mRNA、TIMP-1 mRNA表达，与安慰剂组比较，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；2组的胶原蛋白、TGF-β1 mRNA表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果提示：比伐卢定可以降低脂肪肝大鼠的肝脏纤维化生物标志物的表达水平。

表3 比伐卢定对2组脂肪肝大鼠肝脏纤维化的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	胶原蛋白（倍性变化）	α-SMA（倍性变化）	COL1A1 mRNA	TIMP-1 mRNA	TGF-β1 mRNA
安慰剂组	1.48±0.49	5.89±1.06	5.66±2.47	22.46±6.87	1.56±0.22
比伐卢定组	1.32±0.38	2.41±0.87	2.11±1.82	11.34±7.98	1.23±0.18
t	2.200	5.461	3.503	6.003	1.360
P	0.075	0.000	0.007	0.000	0.207

3 讨论

脂肪肝导致的凝血因子合成改变与每一位代谢综合征患者的促凝血状态息息相关。但是，目前为止，类似的研究普遍认为：促凝血状态的改变与代谢综合征密切相关是非酒精性脂肪肝的原因而非结果[10]。本研究通过复制由高脂饮食而导致的以炎症和肝细胞脂肪变性为主要特征的非酒精性脂肪肝大鼠模型，并对大鼠模型直接进行凝血酶抑制剂（比伐卢定）的处理，分析凝血酶抑制剂对脂肪肝大鼠的肝细胞炎症和脂肪变性的影响，为非酒精性脂肪肝提供潜在的治疗方案。分析结果显示：凝血酶抑制剂比伐卢定可以有效地抑制脂肪肝模型大鼠肝细胞的炎性反应，逆转血脂水平的升高和降低肝脏纤维化相关基因的表达水平。类似研究提示：凝血级联反应及其下游信号转导通路的发展可在很大程度上刺激非酒精性脂肪肝的发病，在此过程中，凝血酶起关键性的作用[11]。

在部分脂肪肝患者中，简单的脂肪变性可进展为非酒精性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis，NASH），该病的组织病理学特征表现为更严重炎症伴有肝细胞气球样变性。但无论是NAFLD还是NASH，其发展过程均离不开炎症的参与[6]。NAFLD患者体内，均普遍有慢性炎症介质的低水平表达，例如：MCP-1，主要功能是将巨噬细胞聚集到肝细胞，这是脂肪肝发展必不可缺少的环节。除巨噬细胞外，大鼠模型的中性粒细胞聚集也非常的明显，特别是在脂肪变性肝细胞周围。中性粒细胞浸润到脂肪肝与该病严重程度有关，并可能促使NAFLD发展为NASH。凝血酶抑制剂比伐卢定破坏了非酒精性脂肪肝炎症过程的关键环节，包括巨噬细胞和嗜中性粒细胞在肝脏中的累积，这是比伐卢定有效抑制NAFLD大鼠肝脏炎症的关键机制。

包括MCP-1在内的炎症介质的缺乏，可以明显地降低模型大鼠肝细胞的脂肪变性，这些介质在NAFLD向NASH过渡的过程中，承担重要角色[12]。4周后，比伐卢定组大鼠的MCP-1 mRNA和蛋白表达明显降低。此外，动脉粥样硬化和其他心血管疾病传统的发

病风险因素,例如:血清 MCP-1 水平的提高、高胆固醇血症、高甘油三酯血症等,在比伐卢定组大鼠中明显降低[13]。凝血酶抑制剂降低血浆脂质水平的机制尚不明确。上述研究结果提示:凝血酶剂量用于治疗动脉粥样硬化也可能是有效的方案。

对某些 NAFLD 患者而言,慢性肝损伤和长期的炎症状态促进了细胞外基质特别是胶原蛋白的过度沉积,这可能损伤肝功能,并加速肝硬化和肝纤维化的进程[14]。本研究分析结果显示:比伐卢定可以明显降低肝脏星状细胞活化的生物学标志物 α-SMA 蛋白的表达,同时可以降低Ⅰ型胶原蛋白(COL1A1)和基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)2 种纤维化相关基因的表达;但比伐卢定组和安慰剂组的胶原蛋白、TGF-β1 mRNA 表达水平并无统计学差异,意味着比伐卢定并没有普遍削弱 NAFLD 所有的纤维化相关因子。上述研究结果表明:凝血酶抑制剂比伐卢定可能通过防止肝脏星状细胞的早期活化而降低了 NAFLD 患者肝脏纤维化的风险[15-16]。

综上所述,凝血酶对脂肪肝的多个环节,包括炎症、肝硬化、肝纤维化等,均具有调节作用。凝血酶抑制剂比伐卢定可以通过降低巨噬细胞和中性粒细胞在肝脏的聚集,纠正肝脏细胞的炎症状态,降低血清甘油三酯和总胆固醇的水平,并在一定程度上降低肝脏纤维化的风险。

参考文献:

[1] Malavazos A E, Gobbo G, Zelaschi R F, *et al*. Lifestyle intervention and fatty liver disease: the importance of both disrupting inflammation and reducing visceral fat[J]. Hepatology, 2009, 51(3): 1091-1092.

[2] Pascale A, Pais R, Ratziu V. An overview of nonalcoholic steatohepatitis: past, present and future directions[J]. J Gastrointestin Liver Dis, 2010, 19(4): 415-423.

[3] Alisi A, Devito R, Nobili V. Portal inflammation as index of steatohepatitis in children with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2009, 50(2): 659.

[4] Brunt E M, Kleiner D E, Wilson L A, *et al*. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network[J]. Hepatology, 2009, 49(3): 809-820.

[5] Nigam P, Bhatt S P, Misra A, *et al*. Non-alcoholic fatty liver disease is closely associated with sub-clinical inflammation: a case-control study on Asian Indians in North India[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e49286.

[6] Lee D H, Ha M H, Christiani D C. Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity--a 4-year follow-up study[J]. Int J Epidemiol, 2001, 30(4): 766-770.

[7] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(3): 161-163.

[8] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.

[9] Luyendyk J P, Sullivan B P, Guo G L, *et al*. Tissue factor-deficiency and protease activated receptor-1-deficiency reduce inflammation elicited by diet-induced steatohepatitis in mice[J]. Am J Pathol, 2010, 176(1): 177-186.

[10] Jepsen P, Vilstrup H, Mellemkjaer L, *et al*. Prognosis of patients with a diagnosis of fatty liver--a registry-based cohort study[J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(54): 2101-2104.

[11] Kassel K M, Owens A P 3rd, Rockwell C E, *et al*. Protease-activated receptor 1 and hematopoietic cell tissue factor are required for hepatic steatosis in mice fed a Western diet[J]. Am J Pathol, 2011, 179(5): 2278-2289.

[12] Iwaki T, Sandoval-Cooper M J, Brechmann M, *et al*. A fibrinogen deficiency accelerates the initiation of LDL cholesterol-driven atherosclerosis *via* thrombin generation and platelet activation in genetically predisposed mice[J]. Blood, 2006, 107(10): 883-3891.

[13] Rensen S S, Slaats Y, Driessen A, *et al*. Activation of the complement system in human nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2009, 50(6): 1809-1817.

[14] Claria J, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, *et al*. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators[J]. Front Immunol, 2011, 2: 49.

[15] Tilg H. Adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease: key players regulating steatosis, inflammation and fibrosis[J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(17): 1893-1895.

[16] Ratziu V, Zelber-Sagi S. Pharmacologic therapy of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Clin Liver Dis, 2009, 13(4): 667-688.

(**收稿**:2013-07-20;**修回**:2013-09-08)

(编辑 王 红)