DOI:10.16016/j.1000-5404.201511073

异丙肾上腺素在去细胞化肝脏再细胞化过程中的作用研究

温旭东,宦宏波,吴黎雳,张 亮,杨大鹏,夏 锋 (400016 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[**摘要**] **目的** 通过制备去细胞化肝脏生物支架,研究自主神经递质对再细胞化过程的影响。**方法** 使用全器官灌注法制备 C57 小鼠去细胞化肝脏生物支架,行 HE 和 Massion 染色鉴定并检测 DNA 残留量;RT-PCR 和免疫荧光化学检测再细胞化肝脏中种子细胞(L02 细胞株)肾上腺素能受体及亚型表达情况;检测平面以及生物支架内异丙肾上腺素对种子细胞增殖的作用,以及对再细胞化肝脏白蛋白分泌和尿素合成水平的影响。**结果** 成功制备去细胞化肝脏生物支架,L02 细胞株表达肾上腺素能受体,并且 β2 受体亚型表达相对较高;异丙肾上腺素显著促进平面及再细胞化肝脏内 L02 细胞株增殖,并增强再细胞化肝脏分泌白蛋白和尿素。**结论** 异丙肾上腺素可促进去细胞化肝脏生物支架再细胞化进程。

[**关键词**] 去细胞化肝脏支架;异丙肾上腺素;再细胞化;组织工程
[**中图法分类号**] R322.47; R329.28; R977.11 [**文献标志码**] A

Isoproterenol promotes proliferation of hepatocytes in decellularized liver bioscaffold

Wen Xudong, Huan Hongbo, Wu Lili, Zhang Liang, Yang Dapeng, Xia Feng (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of specific neurotransmitters on hepatocyte recellularization in prepared decalularized liver bioscaffold. **Methods** Decalularized liver bioscaffold was prepared from the liver of adult C57 mouse with whole organ decalularization. The obtained bioscaffolds were detected by HE and Massion staining, and the quantification of residual DNA was detected. Real-time PCR and immunofluorescence assay were used to detect the expression of adrenoceptors and subtypes in L02 cell line (seed cells). The proliferation of the seed cells cultured in the plate or the bioscaffold was measured in presence of isoproterenol. The secretion of albumin and urea was detected after isoproterenol treatment. **Results** Decalularized liver bioscaffold was successfully prepared. Adrenoceptors were expressed in the L02 cells, with its subtype adrenoceptor beta2 expressed relatively highest. Isoproterenol, as an adrenoceptor beta agonist, promoted the proliferation of the hepatocytes both in plane and bioscaffold, and the secretion of albumin and urea in the recellularized liver. **Conclusion** Isoproterenol promotes the proliferation of hepatocytes in decalularized liver bioscaffold and the function of recellularized liver.

[**Key words**] decalularized liver bioscaffold; isoproterenol; recellularization; tissue engineering

Corresponding author: Xia Feng, E-mail:frankfxia@163.com

终末期肝病最有效的治疗方法是肝脏移植,但由于肝脏供体不足制约了其发展[1]。近年来随着对替代治疗研究的不断深入,全器官灌注法制备去细胞化肝脏生物支架(decalularized liver bioscaffold,DLB)因具有特殊的生物有效性从而成为新的研究热点[2]。制备 DLB 即在一定物理条件下,通过脱细胞化处理去除肝细胞成分,并保留具有生物学效应的细胞外基质成分和超微脉管结构。随后以 DLB 为载体,将种子细胞植入支架内,从结构和功能上模拟正常肝脏的功能,最终起到替代正常肝脏的作用。虽然目前再细胞化肝脏表达一定的肝脏功能,但与正常肝脏功能相比较仍有较大的差距,尚未达到对患肝替代与治疗的作

[**通信作者**] 夏 锋,E-mail:frankfxia@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160131.1127.016.html(2016-01-31)

用[3]。笔者认为可从通过完善肝脏本身的复合性出发,探索进一步提升再细胞化肝脏功能的方法。肝脏受自主神经调节,实验研究发现肝脏内交感神经对肝脏损伤及修复具有重要作用[4]。异丙肾上腺素作为重要的神经递质,其对再细胞化肝脏的作用尚不清楚。本实验想通过观察神经递质对肝脏生物支架再细胞化的作用,探讨提升再细胞化肝脏功能的可能性,为完善再细胞化肝脏的制备提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

8~10 周 C57 小鼠 40 只,雌雄不限,SPF 级,体质量 18~22 g,购置于第三军医大学实验动物中心。L02 细胞株(人永生化正常肝细胞株)购置于上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。曲拉通 X-100(TirtonX-100)(Life Technology 公司,美国),十二烷基硫酸钠(SDS)(Solarbio 公司,中国),DMEM 高糖培养基(Gibico 公司,加拿大),胎牛血清(FBS)(BI 公司,澳大利亚),异丙肾上腺素(ISO)/普萘诺尔(Propranolol)(Sigma 公司,美国),人微量白蛋白 ELISA 试剂盒/人尿素 ELISA 试剂盒(Solarbio 公司,中国),酶联免疫测定仪(Bio-Rad 公司,美国),免疫荧光显微镜(Zeiss 公司,德国)。

1.2 去细胞化肝脏生物支架的制备

C57 小鼠使用 1% 苯巴比妥钠(100 mL/kg)腹腔注射麻醉,取腹部正中十字切口,暴露出肝上、下下腔静脉和门脉系统区域,结扎肝上下腔静脉、肝动脉、胆总管。肝门静脉置静脉留置针(22G)并双重套扎,连接 50 mL 注射器置于微量泵,以 5 mL/min 速度灌注 0.9% 生理盐水,同时剪破下腔静脉,待肝脏由暗红色转为黄色后终止灌流。完整取下肝脏,浸泡于含有 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中,并将静脉留置针连接于生物反应器,以备后续灌注。1% SDS 灌注肝脏 1 h,后续使用 1% TritonX-100 灌洗肝脏 1 h 以去除肝脏实质细胞成分。此后用无菌 PBS 灌洗肝脏 2 h 洗去残留的去垢剂。灌注过程的流速均匀保持在 5 mL/min,并严格注意无菌操作。

1.3 HE 和 Massion 染色

将新鲜肝脏组织以及去细胞化肝脏生物支架经 4% 多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,于石蜡切片机上切片。常规脱蜡后行 HE 染色,观察支架内细胞是否完全洗脱及支架形态。依据试剂盒说明书进行 Massion 染色,观察支架内胶原纤维和弹力纤维保留情况。

1.4 光密度测定法检测 DNA 浓度

肝脏及支架组织使用 DNA 抽提试剂盒(TIANGEN 公司,中国)检测。分别称取正常肝组织及去细胞化肝脏生物支架各 30 mg 组织,蛋白酶 K 消化组织 3 h,实验条件及步骤参照公司试剂说明书。酶联免疫测定仪以 260 nm 波长检测抽提样本的 DNA 光密度值,组织 DNA 含量(ng/mg)按照 5 倍光密度值计算。

1.5 再细胞化肝脏的制备

使用无菌 PBS 再次对去细胞化肝脏支架灌洗去除残留的去垢剂。支架静置于含有 10% FBS 的 DMEM 中,5% CO_2,37 ℃孵箱环境中培养 48 h 检测是否存在细菌或真菌污染。无菌检测完毕后,将 L02 细胞胰酶消化、计数,使用微量泵将 4 mL 细胞悬液(含 10^7 个细胞)分 4 次,通过中心静脉通道缓慢注入无菌支架中。注入完毕以后,将再细胞化肝脏置于 5% CO_2,37 ℃孵箱环境中培养 7 d。每天定时更换细胞培养液。

1.6 细胞 RNA 提取、反转录及实时定量荧光 PCR

用 TRIzol 一步法提取细胞的总 RNA,以 1.5 μg RNA 为模板行反转录,实验条件及步骤参照 TaKaRa 公司的试剂和说明书。以 1.5 μg cDNA 作为模板行 PCR 检测 AR-α1A、α1B、α1D 和 β1、β2、β3 及 GAPDH 的表达。10 μL 反应体系如下配制:0.5 μL cDNA + 0.4 μL 前引物 +0.4 μL 后引物 +5 μL SYBR +3.7 μL 无酶水。反应条件为:95 ℃ 130 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环后,95 ℃延伸 10 s,65 ℃ 5 s,4 ℃保存。引物序列及产物长度见表 1。PCR 反应体系中以无酶水代替 cDNA 模板作为阴性对照,扩增 GAPDH 作为阳性对照及内参照。用 Bio-Rad CFX Manager 软件对受体亚型表达进行定量分析。

表 1 Real-time PCR 引物序列及预计产物长度

引物名称	引物序列(5′至3′)	预计产物长度
AR-α1A	上游:GAAGGGCAACACAAGGACAT 下游:CCTAGACTTCCTCCCCGTTC	301 bp
AR-α1B	上游:TGGGGAGAGTTGAAAAATGC 下游:AATGAAGTAGTTGGTGGGCG	204 bp
AR-α1D	上游:GGTCGTAGCCCTGGTGGTG 下游:CGGAGGAGAAGACAGCGTAGC	116 bp
AR-β1	上游:CGCCTCTTCGTCTTCTTCAACTG 下游:ACATCGTCGTCGTCGTCGTC	236 bp
AR-β2	上游:TGCCAATGAGACCTGCTGTGAC 下游:TGTGTTGCCGTTGCTGGAGTAG	526 bp
AR-β3	上游:GTGTGACCGCCAGCATCG 下游:AGAAGAGGAAGGTAGAAGGAGACG	295 bp
GAPDH	上游:AGGGGCCATCCACAGTCTTC 下游:AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	258 bp

1.7 细胞免疫荧光技术

细胞平铺于细胞爬片(Nest 公司,中国),待细胞生长至适度密度(60%)后固定、封闭。兔源性去甲肾上腺素能 beta2 受体多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国)按照 1∶250 稀释浓度稀释,单纯抗体稀释液作为对照组,覆盖细胞爬片后 4 ℃冰箱孵育过夜。次日 PBS 洗涤后,荧光二抗 1∶1 000 稀释后避光常温孵育 2 h,DAPI 染色剂(5 μg/mL)避光常温孵育 30 min。40% 甘油封片以后通过荧光显微镜观察。

1.8 Cell Titer Blue 细胞增殖活性检测

取对数生长期的 L02 细胞消化、离心后制成单细胞悬液。在流式细胞仪中按照 300 个细胞/孔,接种到 96 孔细胞培养板中。设置异丙肾上腺素浓度为 25 nmol/L,普萘诺尔浓度为 10 nmol/L。每个药物浓度设 3 个附孔,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基作为空白对照。分别于 1、3、5、7 d 在避光条件下,向每次所要检测的孔中,加入 100 μL 检测试剂(10% FBS 的 DMEM 中含有 10% Cell Titer Blue)。细胞培养箱(37 ℃,5% CO_2)中避光培养 2 h,以酶标仪以 560 nm 波长激发荧光,590 nm 波长检测光密度值。每组 3 个附孔取均值标准差作为统计量进行分析。

1.9 组织 EdU 增殖荧光技术

将 EdU 工作液(10 μmol/L)加入支架培养液中,37 ℃,5% CO_2 孵育 2 h,使用 10% FBS 的 DMEM 作为空白对照组使用。O. C. T 包埋剂(樱花公司,日本)-80 ℃ 包埋后行冰冻切片,切片厚度为 20 μmol/L。常温下固定、打孔、封闭。按照试剂盒说明书配置 EdU 反应液,浸泡切片,避光静置 30 min。DAPI 染色剂(5 μg/mL)避光常温孵育 30 min。每个步骤间隙均使用 PBS(3% 胎牛血清)洗涤 2 次。最后使用 40% 甘油封片行荧光显微镜观察。随机挑选切片 5 个视野,一个再细胞化肝脏随机挑选 5 张切片进行拍摄($n=3$)。

1.10 ELISA

人微量白蛋白 ELISA 试剂盒、人尿素 ELISA 试剂盒检测。再细胞化肝脏培养液 5 000 r/min 离心 10 min 后,保留样品上清液。设置标准样品组,空白对照组,绘制出样品标准曲线,实验步骤参照试剂盒说明书。酶联免疫测定仪以 260 nm 波长测定各孔光密度值,计算标准曲线内对应的人白蛋白和尿素的含量(μmol/L)。

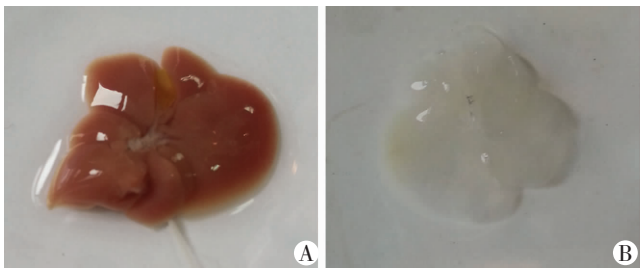
1.11 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理分析,计量资料通过 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用独立样本 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 去细胞化肝脏生物支架制备过程大体形态学观察

暴露小鼠肝脏及门静脉,经门静脉插管后灌注生理盐水清除肝脏内残留血液。腹腔内取出完整肝脏(图 1A)后,经门静脉灌注去垢剂,约 4 h 后,肝脏大体形态得到保留,肝脏支架变为白色、透明的复合物,可以肉眼观察到肝脏内部微血管网络(图 1B)。



A:完整取肝;B:离体肝脏去细胞化

图 1 去细胞化肝脏生物支架的制备

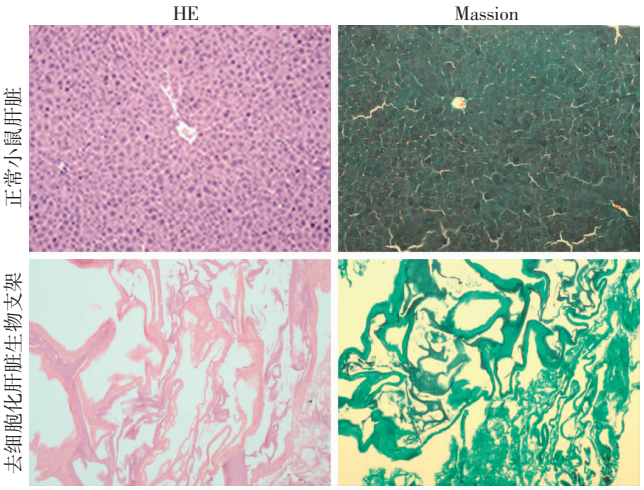


图 2 去细胞化肝脏生物支架的鉴定 (LM ×100)

2.2 去细胞化肝脏生物支架的鉴定

HE 染色可观察到 DLB 内没有蓝色深染的细胞核成分,保留了基本的骨架结构,Massion 染色观察到肝脏经去细胞化处理之后,肝脏内胶原纤维和弹性纤维得到了保留(图 2)。去细胞化肝脏中 DNA 残留量(114.027 ± 5.526)约为正常肝脏(9 450.087 ± 234.387)的 1%,对比组之间的差异具有统计学意义($P<0.05$),达到了较好的去细胞化效果。

2.3 L02 细胞株表达肾上腺素能受体及亚型

RT-PCR 检测 L02 细胞表面受体发现肾上腺素能 α 受体亚型(AR-α)和 β 受体亚型(AR-β)均有一定程度的表达,AR-β2 的表达相对较高,AR-α1A 几乎不表达。为了验证 AR-β2 蛋白表达情况,行免疫荧光染色发现,AR-β2 在细胞膜及细胞质中均有一定程度的表达(图 3)。

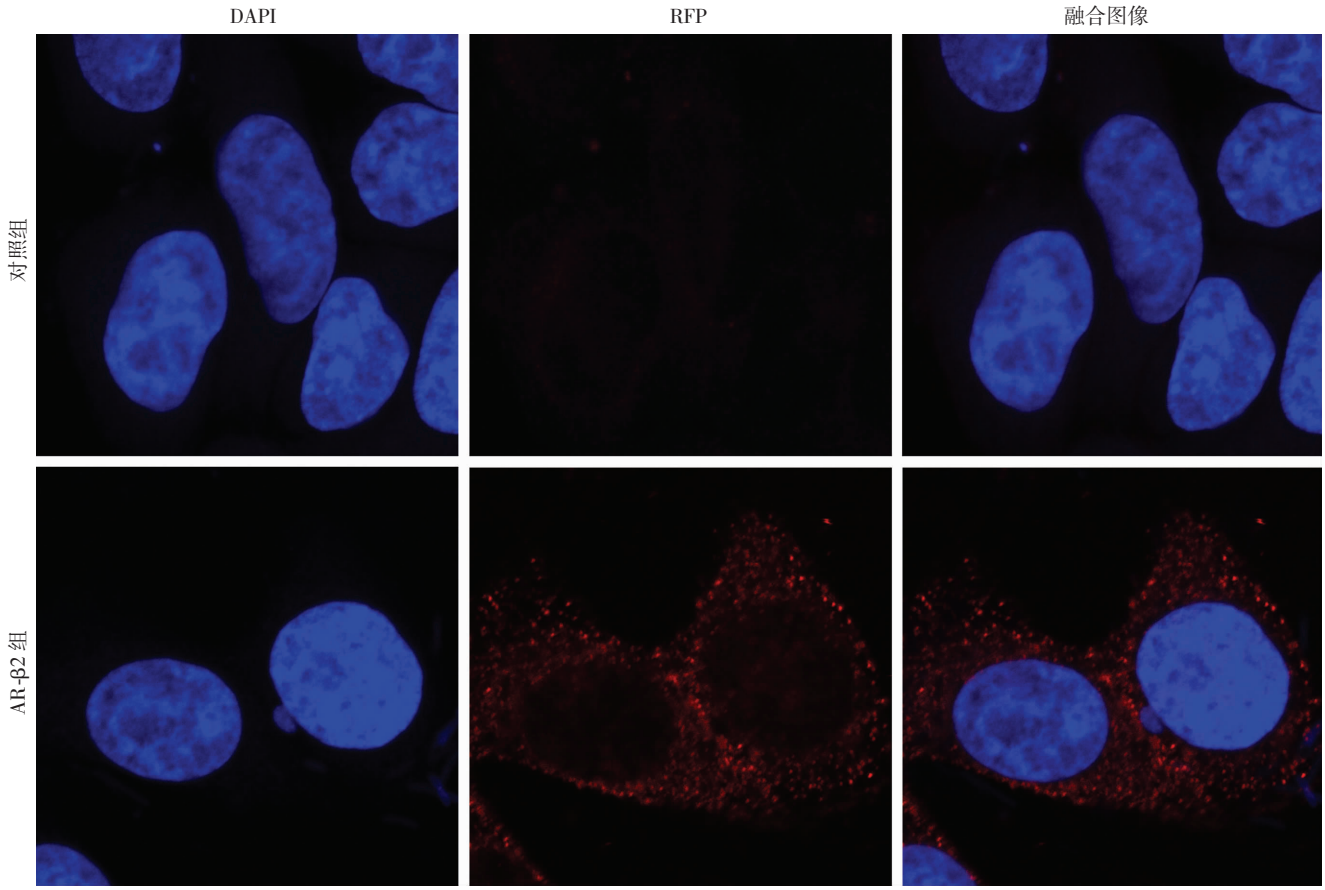


图 3 L02 细胞株肾上腺素能受体检测 （激光共聚焦显微镜 ×400）

2.4 异丙肾上腺素促进肝细胞增殖

Cell Titer-Blue 法检测显示,与对照组比较,异丙肾上腺素(25 μmol/L)能明显促进 L02 细胞在平面上的增殖($P<0.05$),当加入普萘诺尔(10 μmol/L)后,细胞增殖速率明显降低($P<0.05$)。为进一步验证异丙肾上腺素的作用,采用 EdU 方法检测支架内种子细胞的增殖情况(图 4)。蓝色代表细胞核,红色代表反应时间内正在复制的细胞。对红色点与蓝色点的比值,即细胞增殖速率进行统计。结果显示,去细胞化第 7 天,实验组细胞增殖速率(0.644 ± 0.070)明显高于对照组(0.550 ± 0.0567),两组之间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 异丙肾上腺素促进再细胞化肝脏白蛋白和尿素的分泌

再细胞化肝脏培养 7 d 后,培养上清行 ELISA 检测发现,实验组人微量白蛋白(658.018 ± 25.855)和尿素(356.443 ± 36.094)的表达显著高于对照组(424.607 ± 39.760)和(278.966 ± 39.761),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

肝脏疾病是一种极其常见的疾病,全世界总死亡人口中因为肝脏疾病死亡的占 2.5%[5]。原位肝移植是终末期肝病治疗最有效的方法,但制约肝脏移植的最大的问题在于肝脏供体的不足。肝脏替代治疗的出现为终末期肝病患者带来了希望。其中,全器官灌注法制备的 DLB 有特殊生物有效性,具有良好的研究前景[6]。

DLB 是具有原始肝脏大体形态,且保留肝脏内具有生物学效应的细胞外基质成分和超微脉管结构的复合物[7]。最常用的离子型去垢剂是十二烷基硫酸钠(SDS),它可以有效去除致密组织中细胞核成分,Trion X-100 为最常用的非离子型去垢剂,它可以有效地离断 DNA 与蛋白质之间的联系。国内外相关研究表明灌注所用时间从 6 ~ 144 h 不等。经前期实验摸索,本研究中所用支架是通过依次使用 SDS 和 TritonX-100 灌注的方法,约 4 h 时间将支架灌注完成的。并且通过组织学染色和 DNA 残留量检测,支架制备满足制备基本要求[2]。因此,我们所用的去细胞化肝脏生物支架在制备时间上具有一定的优势。

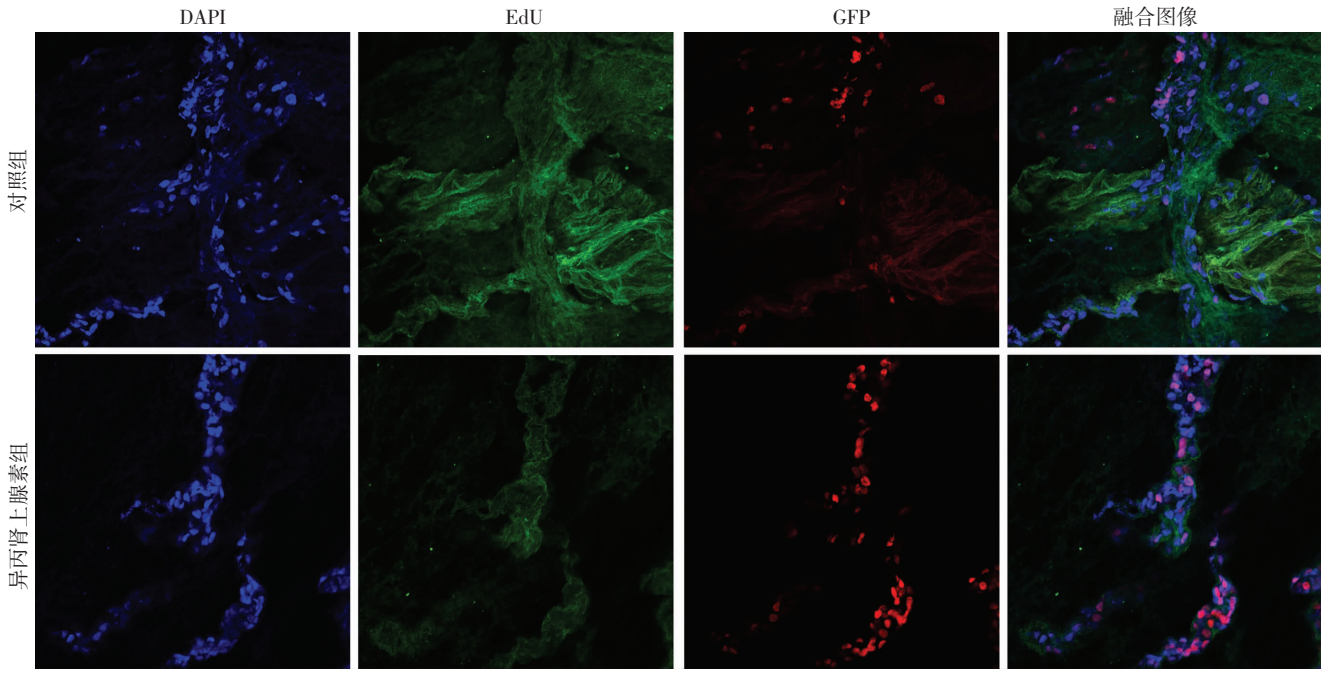


图 4 异丙肾上腺素对细胞增殖作用的检测 (激光共聚焦显微镜 ×120)

制备生物支架的目的是将种子细胞注入其中,获得再细胞化肝脏,模拟机体内肝脏生物培养环境,检测再细胞化肝脏功能,评估其替代效果[8]。如何有效地向 DLB 内植入种子细胞,提升再细胞化肝脏效能亦成为目前研究的热点。以往实验研究中可以肯定的是肝细胞三维培养较平面培养具有更大的优势[9-10]。

2010 年 Uygun 等[9]首次报道以来,不同的研究团队对种子细胞的选择,再细胞化过程等方面进行了诸多尝试和改进[11-13]。本研究中使用的是永生化的正常肝细胞,避免了原代细胞传代数较少,神经递质对其处理时间不足的情况。非实质性细胞如:肝血窦上皮细胞,胆管上皮细胞以一定比例与肝实质细胞共同培养,也可对肝脏结构形成、肝实质细胞有效性发挥重要作用[8]。除此之外,添加细胞因子成分等方法也可以再次提高再细胞化肝脏的功能[14]。Soto-Gutierrez 等[15]通过比较不同的灌注方法发现间歇性灌注可以有效避免种子细胞过度聚集形成微血管死腔,造成细胞死亡。目前的研究成果表明,再细胞化肝脏与正常肝脏相比仍有较大的差距,故本实验组想从完善肝脏自身自主神经调节入手,探索进一步提高再细胞化肝脏功效的可能性。

肝脏受交感神经和副交感神经的双重支配,其中交感神经支配作用约占 80%[16]。已有大量的研究表明,交感神经在肝脏的损伤修复与再生中发挥了重要的作用[17]。在大鼠肝脏切除模型中发现交感神经能够被异常激活,阻断交感神经可以显著降低肝脏再生的速率[18]。阻断肝前体细胞去甲肾上腺素能受体后,细胞间聚集能力下降[19];激活肝脏前体细胞去甲肾上腺素受体后可以通过激活 Wnt 信号通路促进细胞增殖[20]。本研究通过检测发现种子细胞表面表达去甲肾上腺素能受体及亚型,为自主神经递质对细胞发挥作用奠定了实验基础。在细胞平面培养和再细胞化肝脏培养的过程中均发现去甲肾上腺素能 β 受体激动剂(异丙肾上腺素)可以促进 L02 细胞株的增殖,并且可以在之前基础上提升再细胞化肝脏分泌白蛋白和尿素的功能。再细胞化肝脏功能的提高一方面可能是单个细胞功能的提升,也可能是促进细胞增殖的结果。这也要求在以后的研究工作中进一步探索自主神经递质对单个细胞的作用及其机制。在完善再细胞化肝脏的研究中,通过自主神经递质调节再细胞化肝脏功能及促进肝细胞增殖目前尚属首次报道。

去细胞化肝脏生物支架逼真地模拟了肝细胞在肝脏内生长的环境状态。再细胞化肝脏因保留了良好的肝脏生物学特性,在将来肝脏替代治疗中具有良好的应用前景。本实验通过成功制备肝脏生物支架,并观察神经递质在肝脏生物支架再细胞化过程中的作用发现,异丙肾上腺素可促进再细胞化进程,为人工肝脏的制备提供了新的补充材料。相信随着对生物组织工程

研究的不断深入,利用去细胞化肝脏生物支架制备的再细胞化肝脏能够运用于临床实际中,解决肝脏替代治疗的难题。

参考文献:

[1] Uygun B E, Yarmush M L. Engineered liver for transplantation[J]. Curr Opin Biotechnol, 2013, 24(5): 893 - 899. DOI:10.1016/j.copbio.2013.05.008

[2] Crapo P M, Gilbert T W, Badylak S F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes[J]. Biomaterials, 2011, 32(12): 3233 - 3243. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057

[3] Li Y S, Harn H J, Hsieh D K, *et al*. Cells and materials for liver tissue engineering[J]. Cell Transplant, 2013, 22(4): 685 - 700. DOI:10.3727/096368912X655163

[4] Mao S A, Glorioso J M, Nyberg S L. Liver regeneration[J]. Transl Res, 2014, 163(4): 352 - 362. DOI:10.1016/j.trsl.2014.01.005

[5] Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990 - 2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Br Dent J, 2015, 219(7): 329. DOI:10.1038/sj.bdj.2015.751.

[6] Arenas-Herrera J E, Ko I K, Atala A, *et al*. Decellularization for whole organ bioengineering[J]. Biomed Mater, 2013, 8(1): 014106. DOI: 10.1088/1748-6041/8/1/014106

[7] Uygun B E, Yarmush M L, Uygun K. Application of whole-organ tissue engineering in hepatology[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(12): 738 - 744. DOI:10.1038/nrgastro.2012.140

[8] Baptista P M, Siddiqui M M, Lozier G, *et al*. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid[J]. Hepatology, 2011, 53(2): 604 - 617. DOI:10.1002/hep.24067

[9] Uygun B E, Soto-Gutierrez A, Yagi H, *et al*. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix[J]. Nat Med, 2010, 16(7): 814 - 820. DOI:10.1038/nm.2170

[10] Ji R, Zhang N, You N, *et al*. The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice[J]. Biomaterials, 2012, 33(35): 8995 - 9008. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.08.058

[11] Kadota Y, Yagi H, Inomata K, *et al*. Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts[J]. Organogenesis, 2014, 10(2): 268 - 277. DOI:10.4161/org.27879

[12] Zhou P, Lessa N, Estrada D C, *et al*. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice[J]. Liver Transpl, 2011, 17(4): 418 - 427. DOI:10.1002/lt.22270

[13] Yagi H, Fukumitsu K, Fukuda K, *et al*. Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach[J]. Cell Transplant, 2013, 22(2): 231 - 242. DOI:10.3727/096368912X654939

[14] Wang X, Cui J, Zhang B Q, *et al*. Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(4): 1017 - 1025. DOI:10.1002/jbm.a.34764

[15] Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, *et al*. A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2011, 17(6): 677 - 686. DOI:10.1089/ten.tec.2010.0698

[16] Jensen K J, Alpini G, Glaser S. Hepatic nervous system and neurobiology of the liver[J]. Compr Physiol, 2013, 3(2): 655 - 665. DOI:10.1002/cphy.c120018

[17] Xu C, Zhang X, Wang G, *et al*. Role of the autonomic nervous system in rat liver regeneration[J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(4): 527 - 540. DOI: 10.1007/s10571-011-9646-9

[18] Xia F, He Z, Li K, *et al*. Evaluation of the role of sympathetic denervation on hepatic function[J]. Hepatol Res, 2006, 36(4): 259 - 264. DOI:10.1016/j.hepres.2006.08.009

[19] Oben J A, Roskams T, Yang S, *et al*. Sympathetic nervous system inhibition increases hepatic progenitors and reduces liver injury[J]. Hepatology, 2003, 38(3): 664 - 673. DOI:10.1053/jhep.2003.50371

[20] Soeda J, Mouralidarane A, Ray S, *et al*. The β-adrenoceptor agonist isoproterenol rescues acetaminophen-injured livers through increasing progenitor numbers by Wnt in mice[J]. Hepatology, 2014, 60(3): 1023 - 1034. DOI:10.1002/hep.27266

(收稿:2015-11-11;修回:2016-01-03)

(编辑 邓强庭)