基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0285-04

红景天甙对 HSC-T6 细胞株 Rho/ROCK 信号通路影响的研究

吴进峰[1],沈 薇[1],曾贵利[1],曾维政[2],左国庆[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400016;2. 成都军区总医院消化内科,成都 610083)

【摘 要】目的:观察红景天甙对大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 细胞增殖活化、胶原合成、Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶-Ⅰ(Rho associated coiled coil forming protein kinase-Ⅰ,ROCK-Ⅰ)及基质金属蛋白酶抑制剂-1(Tissue inhibitor of metalloproteinases-1,TIMP-1)表达的影响并以 ROCK 特异性抑制剂 Y-27632 作为阳性对照,探讨红景天甙抗肝纤维化作用的分子机制。方法:MTT 法检测 HSC-T6 细胞生长增殖;酶联免疫吸附(ELISA)法检测 HSC-T6 细胞上清Ⅰ型胶原含量;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测细胞 α-平滑肌肌动蛋白(Alpha-smooth muscle actin,α-SMA)、ROCK-Ⅰ、TIMP-1mRNA 的表达;Western blot 检测细胞 α-SMA、ROCK-Ⅰ、TIMP-1 蛋白表达. 结果:MTT 检测显示红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞的生长增殖具有抑制作用,并呈剂量依赖性;ELISA 结果提示红景天甙和 Y-27632 可抑制 HSC-T6 细胞Ⅰ型胶原的分泌;Real-time PCR 和 Western blot 结果表明红景天甙和 Y-27632 均能下调 HSC-T6 细胞 ROCK-Ⅰ、TIMP-1 和 α-SMA 的表达。结论:红景天甙可抑制 HSC-T6 细胞活化增殖,减少其Ⅰ型胶原分泌,其机制可能与抑制 HSC-T6 细胞的 Rho/ROCK 信号通路有关。

【关键词】红景天甙;肝星状细胞;Rho/ROCK 信号转导通路

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-10

Effects of salidroside on signal transduction of Rho/ROCK in the hepatic stellate cell

WU Jin-feng, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of salidroside on the proliferation, activation, Collagen Ⅰ secretion as well as expression of ROCK-Ⅰ and TIMP-1 in HSC-T6 cell, and to elucidate the molecular mechanism of salidroside against hepatic fibrosis with Y-27632 as the positive control. *Methods*: HSC-T6 cell line was employed as the model for following study. MTT colorimetric assay was used to detect the proliferation of HSC-T6 cell. ELISA was employed to value the content of collagen Ⅰ in supernatant of HSC-T6 cells treated with salidroside and Y-27632. The effects of salidroside and Y-27632 on expressions of smooth muscle actin (α-SMA)、ROCK-Ⅰ and TIMP-1 expression were analyzed by Real-time PCR and Western blot. *Results*:(1) Both Salidroside(3、6、12 mmol/L)and Y-27632 (5、10、20 μmol/L) had dose-dependent inhibitory effects on α-SMA expression which represents the activated state of HSC-T6 ($P<0.05$) (2)The expression of ROCK-I could be downregulated by the 6 mmol/L salidroside and 10 μmol/L Y-27632 in HSC-T6 ($P<0.05$). (3) The 6mmol/L salidroside and 10 μmol/L Y-27632 both had inhibitory effects on TIMP-1 expression and collagen Ⅰ output in HSC-T6 cell ($P<0.05$). *Conclusion*: Salidroside can inhibit activation, TIMP-1 expression and collagen Ⅰ secretion of HSC-T6 cell, the mechanisms of which may be involved with its inhibitory effect on Rho/ROCK signal transduction pathway.

【Key words】Salidroside; HSC-T6; Rho/ROCK signal transduction pathway

红景天甙是中药红景天的主要活性成分,前期研究证实,红景天甙对体外培养的肝星状细胞活化、增殖有抑制作用,能减少肝星状细胞胶原合成,并能有效抑制 CCl4 诱导的实验性大鼠肝纤维化,其机制可能与红景天甙参与调控多种肝纤维化相关信号传导通路有关。Rho/ROCK 信号通路被证实参与了肝纤维化的形成。本研究利用不同浓度的红景天甙作用 HSC-T6 细胞,并以 ROCK 特异性抑制剂 Y-27632 作为阳性对照,观察红景天甙对

作者介绍:吴进峰(1978-),男,博士,
研究方向:肝纤维化发病机制。

通讯作者:左国庆,男,教授,E-mail:cqzgqly@163com。

HSC-T6 细胞活化增殖、胶原生成的影响并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 由成都军区总医院消化内科曾维政教授馈赠；红景天甙(成都科瑞生物科技有限公司)；Y-27632(美国 ALEXIS 公司)；Trizol regeant(美国 Invitrogen 公司)；反转录试剂盒(美国 Promega 公司)；SYBR Premix Ex TaqTM 荧光染料(日本 Takara 公司)；引物由宝生物工程(大连)有限公司设计合成：GAPDH(上游：5'-ctcatgaccacagtccatgc-3'；下游 5'-ttcagctctgggatgacctt-3')，ROCK-Ⅰ(上游：5'-cgacctgtaacccaaggaga-3'；下游：5'-tgaattcatggcctttgtga-3')，TIMP-1(上游：5'-tccccagaaatcatcgagac-3'；下游：5'-tcagattatgccagggaacc-3')，α-SMA(上游：5'-actgggacgacatggaaaag-3'；下游：5'-catctccagagtccagcaca-3')。大鼠Ⅰ型胶原 ELISA 试剂盒(武汉来福赛斯生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 HSC-T6 细胞培养方法 HSC-T6 细胞按 1×10^5 个/cm^2 接种在 100 ml 培养瓶中，采用含 10%FCS、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液，在 37℃、5%CO_2、饱和湿度的恒温培养箱中培养。根据生长情况，每 2～3 d 更换一次培养液。

1.2.2 HSC-T6 细胞传代方法 HSC-T6 细胞生长至对数生长期时，吸去培养液，加入 0.25%胰蛋白酶于 37℃消化 3 min 左右，加入含 10%FCS 的 DMEM 培养液终止消化，轻轻吹打培养瓶壁，收集细胞悬液，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，加入含 10%FCS 的 DMEM 培养液重悬，以 5×10^4 个/cm^2 接种。

1.2.3 实验分组 分别设立调零组(加 DMEM 培养液，即试剂对照组)、对照组(DMEM 培养液+HSC-T6 细胞，即细胞对照组)、处理组(A：DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+3 mmol/L 红景天甙；B：DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+6 mmol/L 红景天甙；C：DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+12 mmol/L 红景天甙；D：DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+5 μmol/L Y-27632；E：DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+10 μmol/L Y-27632；F：DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+20 μmol/L Y-27632)。以上分组用于 MTT 实验，后继实验分组为：对照组(DMEM 培养液+HSC-T6 细胞)、红景天甙处理组(DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+6 mmol/L 红景天甙)、Y-27632 处理组(DMEM 培养液+HSC-T6 细胞+10 μmol/L Y-27632)。

1.2.4 MTT 法检测红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞生长增殖的影响 取对数生长期 HSC-T6 细胞，消化、离心，用含 10%FCS 的 DMEM 培养液配制成 5×10^4 个/ml 的细胞悬液，按 100 μl/孔加入 96 孔培养板，温培养箱中培养 24 h。弃上清，根据以上实验分组每组 6 个复孔，各孔加入 100 μl 含 20%FCS 的 DMEM 培养液，然后对照组和调零组各孔分别再加入 100 μl DMEM 培养液，处理组各孔分别加入 100 μl 相应终浓度的红景天甙和 Y-27632，培养箱中培养 24 h 后弃上清，各孔分别加入无血清 DMEM 培养液 180 μl 及 MTT(5 mg/ml)20 μl，混匀后培养箱中孵育 4 h，弃清液，按 100 μl/孔加入二甲基亚砜裂解细胞，酶标仪上振荡溶解 10 min 后，以 570 nm 测定 A 值。

计算各处理组细胞的平均生长抑制率，公式如下：细胞生长抑制率$=1-[(A_{处理}-A_{调零})/(A_{对照}-A_{调零})]\times100\%$以 EXCEL 软件(以红景天甙/Y-27632 作用浓度为横轴，细胞生长抑制率为纵轴)绘制红景天甙和 Y-27632 作用于 HSC-T6 细胞的量效反应曲线。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清Ⅰ型胶原含量 按前述分组处理细胞 24 h 后收集上清，按照Ⅰ型胶原 ELISA 试剂盒操作说明书操作。上清和不同浓度的Ⅲ型胶原标准品加入已包被抗大鼠Ⅰ型胶原单抗的酶标板上，37℃反应 120 min，洗板，继之加入第 1 抗体工作液、酶标抗体工作液，邻苯二胺显色，酶标仪波长 492 nm 测定吸光度(A)值，绘出标准曲线，根据样品吸光度值在该曲线图上查出相应Ⅰ型胶原含量。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测-SMA、ROCK-Ⅰ、TIMP-1 mRNA 的表达

细胞接种于 12 孔板，按上述分组每组设 3 个复孔，处理 24 h 后 Trizol 法提取细胞总 RNA，并定量，按试剂盒说明逆转录生成 cDNA。根据 SYBR Premix Ex TaqTM 荧光染料试剂盒说明，ABI7300 荧光定量 PCR 仪扩增 GAPDH、-SMA、ROCK-Ⅰ、TIMP-1，读取 Ct 值，以 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 表示目的基因 mRNA 的表达水平(-△△Ct 计算公式：$-\Delta\Delta Ct_{XY}=Ct_{XY}-Ct_{GAPDH\ Y}-Ct_{X\ 对照}$，其中 X 代表基因，Y 代表处理因素)

1.2.7 Western blot 检测 -SMA、ROCK-I、TIMP-1 蛋白的表达 WB 细胞裂解液裂解细胞，BCA 法检测蛋白浓度，一70℃冻存。以每泳道 70 μg 上样，经 SDS-PAGE 电泳后，电转至硝酸纤维膜，分别加入 GAPDH、α-SMA、ROCK-Ⅰ和 TIMP-1 一抗(1∶20 稀释)，再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶600)，DAB 显色。Quntity one4.52 图像分析软件进行图象分析，将每个样本的积分光密度值与 GAPDH 的积分光密度值相比较，得出积分光密度的比值，以比值代表其蛋白含量。

1.3 统计学处理

实验结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用 SPSS11.5 软件的单因素方差分析及 SNK 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞生长增殖的影响

根据前期实验结果，3、6、12 mmol/L 浓度的红景天甙和 5、10、20 μmol/L 浓度的 Y-27632 对 HSC-T6 细胞毒性作用与正常对照组无显著性差异。本实验中各浓度的红景天甙和 Y-27632 作用细胞 24 h 后，对 HSC-T6 细胞增殖具有明显抑制作用（$P<0.05$），呈浓度依赖性（表 1，图 1，2）。6 mmol/L 红景天甙和 10 μmol/L Y-27632 作用于 HSC-T6 细胞，每 12 h 更换培养液及加入新鲜红景天甙和 Y-27632 以维持药物浓度，分别于 12、24、36、48 hMTT 检测细胞生长增殖。细胞生长抑制率从 12 h 开始升高，24 h 达到峰值。根据以上实验结果取 6 mmol/L 红景天甙、10 μmol/L Y-27632 作用浓度及 24 h 作用时间用于后继实验。

2.2 红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

6 mmol/L 红景天甙和 10 μmol/L Y-27632 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后，ELISA 检测结果显示：处理组上清 I 型胶原含量均较对照组明显降低（$P<0.01$）（图3）。

2.3 红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞 α-SMA 表达的影响

荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示，HSC-T6 细胞经过 6 mmol/L 红景天和 10 μmol/L Y-27632 甙作用 24 h 后，与对照组相比，α-SMA mRMA 与蛋白表达均降低（$P<0.01$）（图 4~6）。

2.4 红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞 ROCK-I、TIMP-1 表达的影响

荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示：HSC-T6 细胞经过 6 mmol/L 红景天和 10 mmol/L Y-27632 甙作用 24 h 后，与对照组相比，ROCK-I、TIMP-1 的 mRMA 与蛋白表达均降低（$P<0.01$）（图 4~6）。

表 1 不同浓度红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞的生长抑制作用

组别 1（红景天甙）	吸光度 1	抑制率 1(%)	组别 2（Y-27632）	吸光度 2	抑制率 2(%)
对照组	0.807 ± 0.049	-	对照组	0.807 ± 0.049	-
A 组	0.743 ± 0.060☆	7.9	A 组	0.723 ± 0.060☆	10.4
B 组	0.684 ± 0.079★	15.2	B 组	0.647 ± 0.079★	19.8
C 组	0.583 ± 0.058★	27.8	C 组	0.521 ± 0.058★	36.5

注：☆与对照组相比 $P<0.05$，★与对照组相比 $P<0.01$

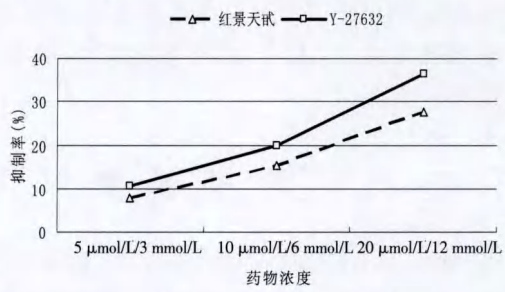


图 1 红景天甙和 Y-27632 作用于 HSC-T6 细胞的量效反应曲线

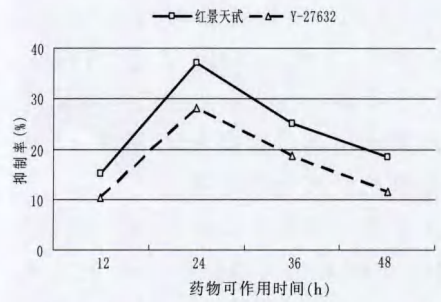


图 2 红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞增殖抑制作用的动力学曲线

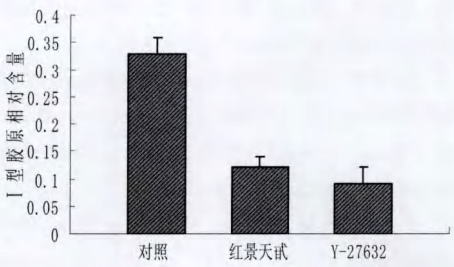


图 3 红景天甙和 Y-27632 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后细胞上清中 I 型胶原的含量

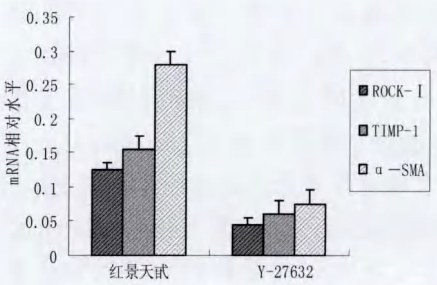


图 4 红景天甙和 Y-27632 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后 αα、TIMP-1、α-SMA mRNA 相对表达水平

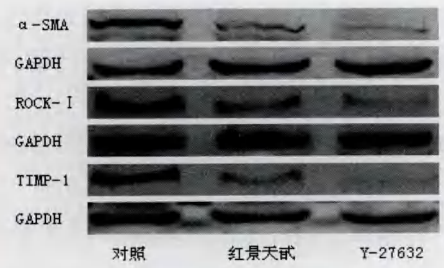


图 5　红景天甙和 Y-27632 对 HSC-T6 细胞 ROCK-Ⅰ、TIMP1、α-SMA 蛋白表达的影响

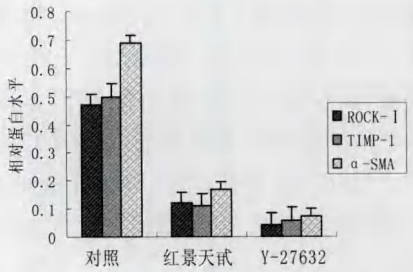


图 6　红景天甙和 Y-27632 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后 ROCK-Ⅰ、TIMP1、α-SMA 蛋白相对表达水平

3　讨　论

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段。目前认为 HSC 的激活是肝纤维化形成的中心环节[1]，α-SMA 可作为 HSC 活化的标志。HSC 活化后分泌大量 ECM，其中Ⅰ型胶原是构成 ECM 众多胶原中的主要成分，是 HSC 活化后表型改变的重要特征[2]。

有研究发现中药红景天可减轻或抑制肺、肾脏、肝脏的纤维化[3,4]。为了进一步探讨中药红景天抗肝纤维化的机制，我们观察了红景天有效单体成分红景天甙对大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 活化、增殖及胶原分泌的影响。

实验结果表明，不同浓度的红景天甙均可抑制 HSC-T6 细胞株的增殖，下调 α-SMA 表达，并减少Ⅰ型胶原的分泌。这些效应在一定浓度范围内呈剂量依赖性。说明红景天可通过抑制 HSC 活化、增殖及胶原分泌从而起到抗纤维化的作用。

红景天甙的上述效应可能涉及到多种信号转导通路。研究表明 Rho/ROCK 信号通路在 HSC 的活化中扮演了重要角色，参与了肝纤维化的形成过程[5]。已证实 Rho/ROCK 信号通路可与 Smads 通路、NF-κB、JAK/STAT 通路、MAPK 通路、整合素受体信号通路等之间形成复杂的网络来进行信号的转导[6]，而这些通路都与 HSC 活化及肝纤维化形成密切相关[7~11]。已有实验研究显示，通过阻断或干扰 Rho/ROCK 信号通路，能够有效延缓或逆转肝纤维化的发展[12]。为了验证红景天甙是否通过抑制 Rho/ROCK 信号途径实现其抗纤维作用，我们使用 ROCK 特异性阻滞剂 Y-27632 作为阳性对照来观察红景天甙抑制 Rho/ROCK 的后继效应，结果显示红景天甙和 Y-27632 在明显下调 ROCK-Ⅰ基因表达的同时，抑制 HSC 的增殖、活化及胶原分泌，提示红景天甙可能通过影响 Rho/ROCK 信号通路发挥其抗肝纤维化的作用[13~15]。

TIMP-1 是组织型基质金属蛋白酶抑制因子（TIMPs）家族中作用最强的成员，为促纤维化因子[16]。研究表明活化 HSC 中 TIMP-1 表达增高[17]。本实验发现红景天甙和 Y-27632 可下调其表达。红景天甙（6 mmol/L）与 Y-27632（10 μmol/L）处理组 HSC 胶原分泌抑制率分别为 69%和 76%，而细胞生长抑制率分别为 28%和 30%，这表明红景天甙减少 HSC 胶原分泌的机制除了细胞增殖抑制外，可能还涉及 TIMP-1 的下调。

我们的研究结果说明红景天甙是一种有前景的抗肝纤维化药物。抑制 ROCK-Ⅰ的表达，阻断/干扰 Rho/ROCK 信号通路是红景天甙抑制 HSC-T6 细胞增殖活化、ECM 合成的重要途径，其具体机制值得进一步探讨。

参　考　文　献

[1]　Bhattacharya M, Babwah A V, Ferguson S S. Small GTP-binding protein-coupled receptors[J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32(6): 1040-1044.

[2]　Th é ret N, Lehti K, Musso O, et al. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 1999, 30(2): 462-468.

[3]　胡晓波，杨礼腾，穆　茂，等.红景天对大鼠肺纤维化治疗作用初探[J].四川医学，2006，27(7)：673-674.

[4]　曾维政，吴晓玲，蒋明德，等.复方红景天干预大鼠肝纤维化作用的实验研究[J].胃肠病学和肝脏病学杂志，2003，12(1)：24-29.

[5]　Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-Binding Proteins [J]. Physiol Rev, 2001, 81(1): 153-208.

[6]　Fukushima M, Nakamuta M, Kohjima M, et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells[J]. Liver International, 2005, 25(4): 829-838.

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0289-04

含川芎嗪的玻璃化保存液对雪旺细胞凋亡及调控基因表达影响的初步实验研究

刘建文,蒋电明,陈增刚,袁 新,欧云生
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨在不同温度下含川芎嗪的玻璃化保存液对大鼠雪旺细胞凋亡及调控基因表达的影响。方法:24 只 SD 大鼠,切取双侧坐骨神经(共 48 条),将其随机分成 2 组(每组 24 条):实验组(含川芎嗪)和对照组(不含川芎嗪)。实验组分为 A、B、C、D 亚组,对照组分为 A'、B'、C'、D'亚组(每亚组 6 条),分别在不同的温度下保存 3 周(A、A'亚组:-4℃保存;B、B'亚组:-20℃保存;C、C'亚组:-80℃保存;D、D'亚组:-196℃保存)。3 周后取神经进行检测:①HE 染色光镜检查;②免疫组化法检测 Bcl-2、Bax;③ TUNEL 法检测细胞凋亡。结果:除 D、D'亚组外,实验组各亚组神经雪旺细胞凋亡数量明显少于对照组相应的各亚组,实验组各亚组 Bcl-2 的阳性表达率均明显高于对照组相应的各亚组,实验组各亚组 Bax 阳性表达率均明显低于对照组相应的各亚组,差异均有显著性($P<0.05$);实验组中 B 亚组雪旺细胞凋亡情况和 Bcl-2 与 Bax 的表达情况与 C、D 亚组接近,比较无显著性差异($P>0.05$)。结论:含川芎嗪的玻璃化保存液能够在 -20℃条件下,通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而有效抑制雪旺细胞的凋亡。

【关键词】川芎嗪;雪旺细胞;玻璃;化保存液;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R318.06 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-10

Preliminary experimental study of the effects of vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine on schwann's cell apoptosis and the expression of regulating gens

LIU Jian-wen, et al
(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

作者介绍:刘建文(1976-),男,主治医师,硕士,
研究方向:周围神经的损伤与修复。
通讯作者:蒋电明,男,教授,E-mail:jdm571026@vip.163.com。

【Abstract】*Objective*:To investigate the effects of vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine on schwann's cell apoptosis and the expression of regulating gens under different

[7] Zhao C, Chen W, Yang L, et al. PPARgamma agonists prevent TGF-beta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 350(2):385-391.

[8] AM Elsharkawy, MC Wright, RT Hay, et al. Persistent activation of nuclear factor-κB in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IκB family proteins[J]. Hepatology, 1999, 30(3):761 - 769.

[9] IJi J, Hu W, Baldassare JJ, et al. The ethanol metabolite, linolenic acid ethyl ester, stimulates mitogen activated protein kinase and cyclin signaling in hepatic stellate cells[J]. Life Sci, 2003, 73(9):1083-1096.

[10] Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, et al. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007, 293(3):631-639.

[11] Saxena N K, Ikeda K, Rockey D C, et al. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice[J]. Hepatology, 2002, 35(4):762-771.

[12] Tada S, Iwamoto H, Nakamuta M, et al. A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats[J]. J Hepatol, 2001, 34(4):529-536.

[13] Murata T, Arii S, Mori A, et al. Therapeutic significance of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, on the established liver fibrosis[J]. Surg Res, 2003, 114(1):64-71.

[14] Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis[J]. Biochem J, 2008, 411(1):1-18.

[15] Nakamura T, Arii S, Monden K, et al. Expression of the Na^+/Ca^{2+} exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(9):5389-5394.

[16] Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, et al. Tissue inhibitor of metal proteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model [J]. Hepatology, 2000, 32(6):1248-1254.

[17] Das S K, Vasudevan D M. Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2008, 68(4):260-269.

(责任编辑:关蕴良)