

# 荔枝核总黄酮对肝纤维化模型大鼠肝细胞损伤的改善作用

周学东<sup>1\*</sup>, 刘庆涛<sup>2</sup>(1.成都市公共卫生临床医疗中心药剂科, 成都 610066; 2.四川大学华西药学院, 成都 610041)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3099-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.23

**摘要** 目的:研究荔枝核总黄酮(TFL)对肝纤维化模型大鼠肝细胞损伤的改善作用。方法:大鼠每周前3天ip给予二甲亚硝胺(DMN),每天1次,连续30d以复制肝细胞损伤模型。60只大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)与TFL高、低剂量(200、100 mg/kg)组,除正常对照组外其他各组复制模型的同时ig给药,每天1次,连续45d。采用HE染色,显微镜下观察大鼠肝细胞并分析肝组织病理分期(S<sub>1</sub>~S<sub>4</sub>);采用Masson染色与免疫组化染色,显微镜下观察大鼠肝细胞并统计肝组织纤维化程度与Bcl-2、Bax表达水平;检测大鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性。结果:模型组大鼠肝细胞病理分期以S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>期为主,TFL高、低剂量组以S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>期为主。与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织纤维化程度升高,Bcl-2、Bax表达增强,血清中AST、ALT活性增强;与模型组比较,TFL高、低剂量组大鼠肝组织纤维化程度降低,Bcl-2表达增强,Bax表达减弱,血清中AST、ALT活性减弱;以上差异均具有统计学意义(P<0.05)。结论:TFL对肝纤维化模型大鼠肝细胞损伤具有一定改善作用,其机制可能与上调Bcl-2、下调Bax表达有关。

**关键词** 荔枝核;总黄酮;肝纤维化;肝细胞损伤;大鼠

## Improving Effect of Total Flavone from *Litchi chinensis* on the Hepatocyte Injury in Liver Fibrosis Model Rats

ZHOU Xue-dong<sup>1</sup>, LIU Qing-tao<sup>2</sup> (1.Dept. of Pharmacy, Public Health Clinical Center of Chengdu, Chengdu 610066, China; 2.West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improving effect of total flavone from *Litchi chinensis* (TFL) on the hepatocyte injury in rats with liver fibrosis. METHODS: The rats were given dimethylnitrosamine (DMN), ip, once a day in the first 3 d of every week, which lasted for 30 consecutive days to establish hepatocyte injury model. 60 rats were equally randomized into a normal control (isometric normal saline) group, a model (isometric normal saline) group and the groups of high and low-dose TFL (200 and 100 mg/kg). When the model was being established, drugs were administered, ig, once a day for 45 consecutive days except for normal control group. HE staining was performed, and then the rats' hepatocytes were observed under the microscope and pathological stage (S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub>) of liver tissue was analyzed. Masson staining and immunohistochemical staining were conducted, and then the rats' hepatocytes were observed under the microscope and calculation was made for the degree of liver fibrosis and the expression of Bcl-2 and Bax. The activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in rats' serum were determined. RESULTS: The pathological stages of liver cell of rats in the model group were mainly stages S<sub>3</sub> and S<sub>4</sub> and the groups of high and low doses TFL were dominated by stages S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub>. Compared to the rats in the normal control group, those in the model group had higher degree of liver fibrosis, expression of Bcl-2 and Bax and activities of AST and ALT in serum. Compared to the rats in the model group, those in the groups of high and low doses TFL had lower degree of liver fibrosis, higher expression of Bcl-2, lower expression of Bax, and lower activities of AST and ALT in serum. There were statistically significance (P<0.05). CONCLUSIONS: TFL can alleviate the hepatocyte injury in rats with liver fibrosis to some degree by a mechanism which may be related to the up-regulation the expression of Bcl-2 and the down-regulation of the expression of Bax.

**KEYWORDS** *Litchi chinensis*; Total flavone; Liver fibrosis; Hepatocyte injury; Rat

荔枝是分布在我国亚热带地区的常见水果之一,其核仁可祛寒止痛、行气散结,因此被广泛应用于各种临床方剂中。近年来,利用现代生物科技发现荔枝核主要成分为黄酮类化合物、氨基酸、皂苷、脂肪酸、鞣质等物质,其活性成分具有抗感染、抗病毒、抗菌、清除氧自由基、降糖调脂、保护心血管、保护肝脏等功效,其中黄酮类化合物可有效抑制乙肝病毒、流感病毒及呼吸道合胞病毒活性,因此可用于预防或治疗各类肿瘤、心血管疾病及抗衰老<sup>[1-2]</sup>。荔枝核总黄酮(Total flavone

from *Litchi chinensis*, TFL)主要是经荔枝核仁所提炼的黄酮类化合物<sup>[3]</sup>,笔者在前期动物实验中发现TFL可有效抵抗大鼠的肝纤维化发展,同时还可促进肝脏星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)快速凋亡,抑制肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)、肝内结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子β1(TGFβ-1)的高表达。但是目前临床报道中尚未发现针对TFL通过改善细胞凋亡方式实现抗肝纤维化作用的研究。

相关统计报告证实,我国临床乙型肝炎患者达到2 000多万人,其中30%患者会发展为肝硬化,15%患者发展为代偿性期肝硬化,10%患者发展为肝细胞肝癌<sup>[4]</sup>。肝硬化前期主要表

\* 主管中药师。研究方向:医院中药学。电话:028-86625058。E-mail:1095044651@qq.com

现为肝纤维化。肝纤维化主要是在各种肝脏致伤因素持续作用下引发的肝脏慢性损伤性病理学改变,也是引发肝硬化的必然环节或者早期阶段,临床病理学特征表现为肝脏细胞外基质出现过度沉积、异常增生,并伴有肝实质细胞大量被破坏,肝小叶结构紊乱及行成假小叶等特征<sup>[9]</sup>。若患者肝纤维化、肝硬化症状病情发展未得到有效控制,则会严重危及患者的生命。相关研究发现,肝纤维化、早期肝硬化均具有可逆性<sup>[10]</sup>,肝纤维化发展由于与肝组织的实质、间质细胞凋亡相关联,因此笔者就TFL对模型大鼠肝细胞损伤的作用进行研究,从抑制肝细胞凋亡角度出发治疗肝纤维化,以实现阻断或者逆转肝纤维化进程,现报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

GENIUS 16K 型台式高速离心机(湖南吉尔森科技发展有限公司);iChem-340 型全自动生化分析仪(深圳市库贝尔生物科技有限公司);ER-500 型全自动酶标分析仪(南京希尔健医疗器械有限公司);BX52KS 型电子天平(苏州顺强机电设备有限公司);CX41 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 药品与试剂

TFL(四川大学华西药学院药理实验室提取分离,批号:20130816,纯度:56.5%);Masson 三色染色试剂(北京索莱宝科技有限公司);大鼠肝纤维化诊断[玻璃酸(HA)、板层素(LN)、Ⅲ型前胶原肽(PⅢ)]试剂盒均购自上海海研医学生物技术有限公司;其余试剂均为分析纯。

### 1.3 大鼠

SD 大鼠 60 只,♂,体质量(210±30)g,由四川大学华西药学院实验动物研究中心提供[实验动物使用许可证号:SYXK(川)2012-179]。所有实验大鼠均在常规生存条件下自由生长,入选大鼠在研究前 7 天进入实验室进行适应性饲养。

## 2 方法

### 2.1 复制模型与分组、给药

每周前 3 天 ip 给予二甲基亚硝胺(DMN),每天 1 次,连续 30 d 以复制大鼠肝细胞损伤模型。60 只 SD 大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与 TFL 高、低剂量(200、100 mg/kg)组,除正常对照组外其他各组复制模型同时 ig 给药,每天 1 次,连续 45 d。上述剂量是根据预实验结果制定。

### 2.2 大鼠肝组织病理分期、纤维化程度与 Bcl、Bax 表达观察

2.2.1 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肝组织病理分期 选取大鼠肝组织行常规石蜡切片(厚度 3~5 μm 为宜),将切片放在电烤箱中烤片、过夜;第 2 天将切片浸泡在二甲苯中脱蜡(10 min),反复 3 次;将切片分别浸入无水乙醇、不同体积分数的乙醇(95%、85%、75%),时间为 1 min;将切片经流水冲洗后进行苏木素染色,持续染色 10 min,再次以流水冲洗;冲洗后使用 75% 盐酸乙醇行分化处理,之后以流水冲洗 10 min,直至切片变为蓝色为止;再使用 HE 染液染色 15 s,以流水冲洗 30 s;最后使用不同体积分数的乙醇进行脱水处理,再使用二甲苯透明处理 1 min,反复 2 次,之后制作成中性树胶封片。显微镜下观察大鼠肝细胞并分析肝组织病理分期(S<sub>0</sub>~S<sub>4</sub>)。肝组织经 HE 染色后肝细胞核呈现出蓝紫色,细胞浆则呈现淡红色。根据全国肝病会议相关标准<sup>[6]</sup>(2000 年)将肝纤维化分为 5 期:S<sub>0</sub>,肝脏无纤维化;S<sub>1</sub>,肝脏汇管区出现肝纤维化扩大至窦

周、小叶内;S<sub>2</sub>,肝脏汇管区周围出现纤维化且形成纤维间隔;S<sub>3</sub>,肝脏纤维间隔且出现小叶结构紊乱,但未发展成肝硬化;S<sub>4</sub>,肝脏出现早期硬化。

2.2.2 Masson 染色观察大鼠肝组织纤维化程度 取“2.2.1”项下石蜡切片进行脱水、蒸馏水冲洗,使用地衣红染色液进行首次染色处理 45 min,染色后使用蒸馏水冲洗 2 min;将切片放在 Harris 明矾苏木素液中浸泡约 4 min,之后使用 0.5% 盐酸乙醇进行分化,经水洗后颜色呈蓝色,以蒸馏水冲洗;将上述处理后的切片依次放在丽春红酸性复红液(10 min)、冰醋酸水溶液(1 min)、磷钼酸水溶液(4 min)中浸泡,直至切片颜色呈无色或者淡红色;然后再将其分别置于冰醋酸水溶液(30 s)、亮绿染色液(4 min)、冰醋酸水溶液(30 s)中,再使用 95% 无水乙醇进行脱水处理;使用二甲苯透明处理 1 min 后制作成中性树胶封片。显微镜下观察大鼠肝细胞并统计肝组织纤维化程度。肝组织经 Masson 染色后纤维素呈红色,胶原纤维呈绿色,肝细胞核则呈蓝黑色。依据我国肝纤维化分级法<sup>[6]</sup>,根据 Masson 染色结果对大鼠的肝纤维化严重程度行半定量分析<sup>[6]</sup>。

2.2.3 免疫组化染色观察大鼠肝组织 Bcl-2、Bax 表达 取“2.2.1”项下石蜡切片进行常规脱蜡、水化处理,使用流水进行冲洗;在室温下将切片浸泡在 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中约 10 min,流水冲洗;再对切片进行抗原修复处理[其中 Bax 使用柠檬酸缓冲液进行高温抗原修复 2 min,Bcl-2 使用乙二胺四乙酸(EDTA)加热抗原修复];当修复后的切片冷却至室温后,用蒸馏水进行反复冲洗,再用磷酸盐缓冲液(PBS)进行冲洗;完全清除 PBS 后分别加入 Bcl-2、Bax 一抗抗体,在室温下孵育 60 min,孵育后以 PBS 反复冲洗;清除 PBS 后加入二抗,在室温下孵育 10 min,孵育后用 PBS 反复冲洗;将 PBS 完全清除后进行二氨基联苯胺(DAB)显色,可在显微镜下根据颜色变化程度合理控制染色时间(一般为 5 min 内);用苏木素复染 1 min,经流水冲洗后使用盐酸乙醇分化处理 2 s,再经流水冲洗后切片组织会呈蓝色,经不同体积分数的乙醇脱水后烘干制作成中性树胶封片。细胞染色阳性表达主要表现为细胞膜、细胞浆呈黄色颗粒,以高倍视野观察染色细胞数量、染色颜色深浅等,对肝脏纤维化进行半定量分析。其中,0 分表示不着色,1 分表示淡着色(呈浅黄色),2 分表示中等着色(呈棕黄色),3 分表示重度着色(呈棕褐色)。将所有大鼠肝组织切片的着色程度、范围进行综合分析以评估 Bcl-2、Bax 表达水平。

### 2.3 大鼠肝功能测定

末次给药 1 d 后,ip 给予 10% 苯巴比妥钠,取大鼠下腔静脉血液,采用全自动生化分析仪测定大鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性。

### 2.4 统计学方法

采用 PEMS 3.1 软件处理实验数据。各组数据均为计量资料,以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 LSD 检验进行分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大鼠肝组织 HE 染色结果

正常对照组大鼠肝组织中小叶结构正常,肝细胞索排列具有规律性,未见细胞性坏死、变性及炎细胞浸润;模型组大鼠肝组织出现大面积脂肪变性(呈空泡状水样病变),并出现大量炎细胞浸润、大面积坏死,肝小叶结构被完全破坏,可见假肝小叶,病理分期以 S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub> 为主;TFL 高剂量组大鼠肝组织中

部分小叶结构出现紊乱,但炎细胞浸润、变性及组织细胞坏死程度较低;TFL高、低剂量组大鼠肝组织病理分期主要以S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>期为主。大鼠肝组织纤维化病理分期统计结果见表1;大鼠肝组织HE染色结果见图1。

表1 各组大鼠肝组织纤维化病理分期统计结果(例)

Tab 1 Statistical results of pathological stages of liver tissue fibrosis in rats of all groups(case)

组别	n	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
正常对照组	15	15	0	0	0	0
模型组	15	0	0	2	8	5
TFL低剂量组	15	0	5	10	0	0
TFL高剂量组	15	1	8	6	0	0

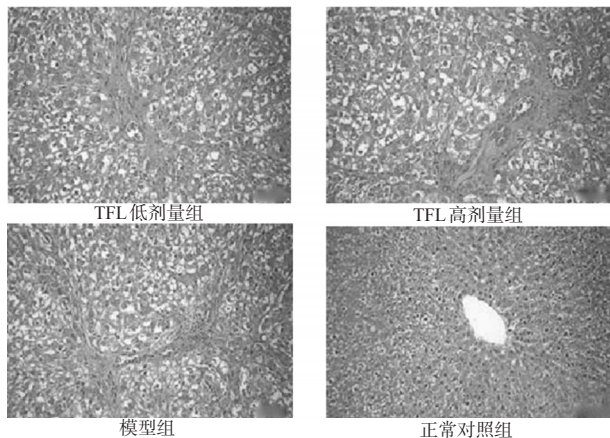


图1 各组大鼠肝组织HE染色结果(x200)

Fig 1 HE staining results of liver tissues in rats of all groups (x200)

### 3.2 大鼠肝组织Masson染色结果

正常对照组大鼠肝脏汇管区、中央静脉区域有少量胶原纤维,但未出现纤维增生;模型组大鼠肝脏汇管区、小叶间可见大量胶原纤维增生现象,并形成了明显的纤维间隔并延伸至肝小叶,并可见少量假小叶;TFL高剂量组大鼠肝组织胶原纤维增生相对较轻,且形成纤细的纤维间隔;TFL低剂量组大鼠肝组织胶原纤维有明显的增生。与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织纤维化程度增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,TFL高、低剂量组大鼠肝组织纤维化程度降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。大鼠肝组织纤维化程度统计结果见表2;大鼠肝组织Masson染色结果见图2。

表2 各组大鼠肝组织纤维化程度与Bcl-2、Bax表达统计结果( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Tab 2 Determination results of the degree of liver fibrosis and the expression of Bcl-2 and Bax in rats of all groups( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	肝组织纤维化程度	Bcl-2表达	Bax表达
正常对照组	0.81 ± 0.433	2.29 ± 0.372	2.79 ± 0.776
模型组	20.04 ± 5.352*	4.01 ± 0.642*	5.77 ± 0.882*
TFL低剂量组	13.47 ± 4.556#	4.56 ± 0.706#	4.77 ± 0.671#
TFL高剂量组	6.69 ± 3.829#	5.33 ± 0.615#	3.58 ± 0.606#

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, # $P < 0.05$

### 3.3 大鼠肝组织免疫组化染色结果

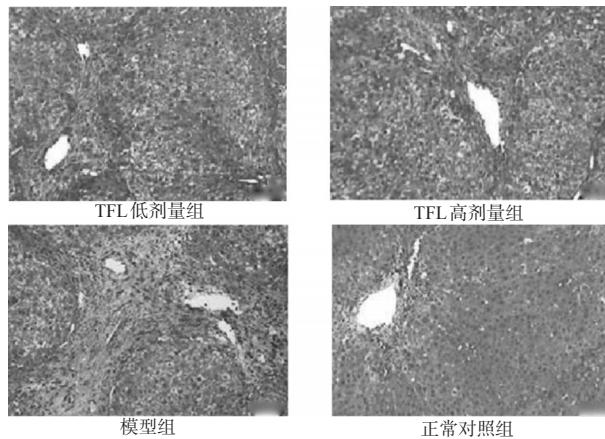


图2 各组大鼠肝组织Masson染色结果(x200)

Fig 2 Masson staining results of liver tissues in rats of all groups(x200)

与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织Bcl、Bax表达减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,TFL高、低剂量组大鼠Bcl表达增强,Bax表达减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。大鼠肝组织Bcl-2、Bax表达统计结果见表2;大鼠肝组织免疫组化染色结果见图3、图4。

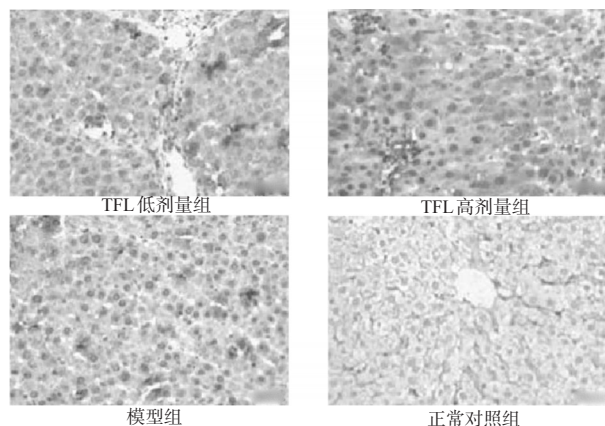


图3 各组大鼠肝组织免疫组化染色结果(Bcl-2,x200)

Fig 3 Immunohistochemical staining of liver tissues in rats of all groups(Bcl-2,x200)

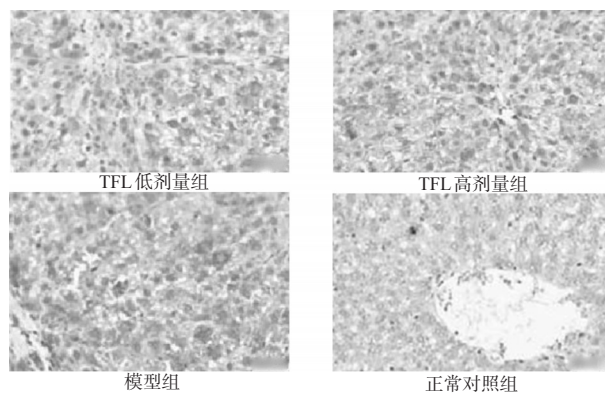


图4 各组大鼠肝组织免疫组化染色结果(Bax,x200)

Fig 4 Immunohistochemical staining of liver tissues in rats of all groups(Bax,x200)

### 3.4 大鼠血清AST、ALT活性测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清AST、ALT活性增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,TFL高、低剂量组大鼠血清AST、ALT活性减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。大鼠血清AST、ALT活性测定结果见表3。

表3 各组大鼠血清AST、ALT活性测定结果( $\bar{x} \pm s, n=15$ )  
Tab 3 Determination results of the activities of AST and ALT in the rats' serum of all groups( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

组别	AST, U/ml	ALT, U/ml
正常对照组	83.84 ± 13.38	44.15 ± 10.05
模型组	292.88 ± 22.88*	193.52 ± 21.74*
TFL低剂量组	218.22 ± 29.89 <sup>#</sup>	140.81 ± 20.03 <sup>#</sup>
TFL高剂量组	155.49 ± 25.18 <sup>#</sup>	108.69 ± 17.57 <sup>#</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$

#### 4 讨论

在抗肝纤维化药物研究中,国内外相关研究已经证实银杏叶提取物、三棱莪术联用以及依那普利药物等可有效调控肝细胞Bax、Bcl-2表达,从而实现抗纤维化治疗目标<sup>[7]</sup>。赵永忠等<sup>[8]</sup>在研究TFL对EAC肉瘤、S180肉瘤及肝癌实体瘤疾病临床抗瘤作用效果时,发现TFL可有效抑制Bcl-2的表达,增强Bax的表达,进而诱导疾病肿瘤因子快速凋亡,以此表现出抗癌功效。

在本实验中,笔者选取免疫组织化学对照分析,结果发现在Bax、Bcl-2的表达方面,肝纤维化模型组大鼠均明显高于正常对照组,这表明大鼠肝脏组织在受到外界刺激之后可促进细胞凋亡蛋白Bax的表达,以此来诱导肝纤维化细胞快速凋亡<sup>[9]</sup>;当机体的肝细胞出现凋亡之后,机体并非通过被动方式接受凋亡,而是借助机体代偿机制来进一步增强Bcl-2的表达以实现抗细胞凋亡<sup>[10]</sup>。与模型组比较,TFL高、低剂量组大鼠肝组织纤维化程度明显改善,Bcl-2表达增强,Bax表达减弱,但TFL高剂量组大鼠在纤维化程度、Bcl-2与Bax表达方面明显优于TFL低剂量组。由此可证明,TFL可以经线粒体途径有效调节Bcl-2家族表达,有效抑制肝细胞凋亡,最终实现控制肝纤维化发展进程的目的。

肝脏作为人体酶含量最丰富的器官之一,其ALT、AST水平是可准确反映肝细胞炎症活动、坏死的主要指标。ALT作为临床肝功能检查中最敏感的指标,在任何因素引发的肝损伤中均可出现异常上升。相关研究证实,当肝细胞出现1%损伤,血清中的ALT水平便可达到正常水平1倍以上<sup>[11]</sup>;Noun R等<sup>[12]</sup>研究肝硬化、肝癌病情发展危险因素时,发现ALT可独立反映肝病发展程度,且与肝脏损伤程度有密切关联性。AST水平上升与肝组织坏死有关,如姚佳燕等<sup>[13]</sup>研究发现AST水平与肝组织病变(尤其是肝纤维化)有密切关联性;Ju HK等<sup>[14]</sup>研究发现可将AST水平变化作为临床诊断因DMN所引发肝纤维化疾病的临床依据。

本实验中,笔者以DMN致肝纤维化模型为研究基础,干预性ig给予不同剂量TFL。结果显示,TFL高、低剂量组大鼠血清AST、ALT活性明显低于模型组,表明TFL可有效降低肝

纤维化模型大鼠的肝脏组织损伤程度,并可通过降低血清ALT、AST活性有效改善肝脏组织功能<sup>[9]</sup>。

综上所述,TFL可有效下调肝纤维化模型大鼠的Bax表达,上调Bcl-2表达,以此来抑制肝细胞快速凋亡,预防肝纤维化发展成为肝硬化;同时,TFL可降低大鼠血清中ALT、AST活性,表明大鼠肝脏细胞损伤得以逐渐减轻,肝脏功能得到逐步改善。由于肝纤维化形成、发展病理学机制比较复杂,在下一阶段将重点研究TFL在肝纤维化防治中的其他作用机制,以为研发新型抗肝纤维化药物提供参考依据。

#### 参考文献

- [1] 中华肝脏病学会肝纤维化学组.肝纤维化诊断及疗效评估共识[J].中华肝脏病杂志,2002,10(10):327.
- [2] 陈剑梅,郭洁文,徐峰.荔枝核活性成分提取及药理作用的研究进展[J].今日药学,2011,21(11):710.
- [3] 邵祥强,肖华胜.肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展[J].世界华人消化杂志,2011,19(3):268.
- [4] 杨广栋.慢性乙型肝炎证候分布特征研究[D].北京:中国中医科学院,2012.
- [5] 罗伟生,欧士钰,靳雅玲,等.荔枝核总黄酮抗肝纤维化作用的实验研究[J].重庆医学,2013,42(4):373.
- [6] 中华肝脏病学会肝纤维化学组.肝纤维化诊断及疗效评估共识[J].中华肝脏病杂志,2002,10(10):327.
- [7] 赵永忠,漆志平,徐庆.荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制[J].世界华人消化杂志,2010,18(20):2084.
- [8] 赵永忠,韦铮武,漆志平,等.荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体表达的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2014,18(4):223.
- [9] Kotsafti A, Farinati F, Cardin R, et al. Bax inhibitor-1 down-regulation in the progression of chronic liver diseases[J]. *BMC Gastroenterol*, 2010(10):35.
- [10] 朱玉山,卢铁元,王蕊,等. Bcl-2家族蛋白调控线粒体膜通透性和细胞色素C释放的新机制[J].生命科学,2011,23(11):1076.
- [11] 童宁,朱凌云,俞斐,等.血管紧张素II受体拮抗药对肝纤维化患者血清学指标影响的Meta分析[J].中国药房,2014,25(4):318.
- [12] Noun R, Jagot P, Farges O, et al. High preoperative serum alanine transferase levels: effect on the risk of liver resection in child grade A cirrhotic patients[J]. *World J Surg*, 1997,21(4):390.
- [13] 姚佳燕,钟碧慧,晁康,等.肝纤维化血清学诊断的研究[J].胃肠病学和肝脏病学杂志,2011,20(8):687.
- [14] Ju HK, Chung HW, Lee HS, et al. Investigation of metabolic alteration in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by GC-MS[J]. *Bioanalysis*, 2013,5(1):41.

(收稿日期:2015-01-27 修回日期:2015-04-01)

(编辑:张静)