

## • 实验研究 Experimental research •

## 鞣花酸经活性氧与血管再生途径对四氯化碳诱导肝硬化的保护作用研究

田 伟, 黄学卿, 王黎洲, 周 石, 安天志, 宋 杰, 蒋天鹏

**【摘要】 目的** 研究鞣花酸(EA)对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导的肝硬化小鼠模型的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 将 40 只小鼠随机分为对照组( $n=10$ , 予 0.9%氯化钠溶液)和肝硬化模型组( $n=30$ , 由橄榄油稀释 10%CCl<sub>4</sub> 诱导建模),模型组又随机分为 EA 未干预组( $n=10$ )、7.5 mg/kg EA 组( $n=10$ )、15 mg/kg EA 组( $n=10$ )。检测所有小鼠血清谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和白蛋白(ALB)水平,苏木精-伊红(HE)染色观察肝细胞形态。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝细胞 I 型胶原蛋白 mRNA 水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-3 活性,蛋白印迹检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、VEGF 受体(VEGFR)-2 表达水平。**结果** 根据肝细胞 ALT、AST、ALB 含量检测及 HE 染色细胞形态观察结果,推测 EA 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝硬化小鼠具有保护作用。EA 能显著抑制 I 型胶原和 iNOS 表达,氧化应激及活性氧(ROS)形成显著降低,EA 干预组 VEGF、VEGFR-2 表达及 caspase-3 活性显著提高。**结论** EA 通过 ROS 及血管再生途径对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝硬化有保护作用。

**【关键词】** 鞣花酸; 四氯化碳; 肝硬化; 活性氧; 血管再生

中图分类号:R575.2 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2018)-04-0357-06

**The protective effects of ellagic acid on carbon tetrachloride - induced cirrhosis through reactive oxygen species and angiogenesis ways** TIAN Wei, HUANG Xueqing, WANG Lizhou, ZHOU Shi, AN

Tianzhi, SONG Jie, JIANG Tianpeng. Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: JIANG Tianpeng, E-mail: 26900988@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effect of ellagic acid (EA) on carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induced cirrhosis in mouse models, and to discuss its mechanism. **Methods** A total of 40 mice were randomly divided into the control group ( $n=10$ , receiving 0.9% sodium chloride solution) and the cirrhosis model group ( $n=30$ , cirrhosis modeling was induced by olive oil-diluted 10% CCl<sub>4</sub>). The cirrhosis model group was further randomly divided into EA non-intervention group ( $n=10$ ), 7.5 mg/kg EA group ( $n=10$ ) and 15 mg/kg EA group ( $n=10$ ). The serum levels of ALT, AST and ALB were checked for all experimental mice. Hematoxylin eosin (HE) staining was adopted to observe the morphology of hepatocytes. Using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique to detect the mRNA level of type I collagen of liver cells, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to test the activities of the glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA) and caspase-3. Western blot method was employed to measure the inducible nitric oxide synthase (iNOS), the protein expression levels of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 (VEGFR-2). **Results** According to the results of content determination of ALT, AST and ALB and the findings of HE-staining cell morphology observation, it could be presumably judged that EA had protective effects on CCl<sub>4</sub>-

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.04.015

基金项目: 贵州省普通高等学校工程研究中心项目(黔教合 KY 字 2016-012)

作者单位: 550004 贵阳 贵州医科大学附属医院介入科

通信作者: 蒋天鹏 E-mail: 26900988@qq.com

induced cirrhosis mice. EA could significantly inhibit the expressions of type I collagen and iNOS, the formation of ROS was strikingly decreased, and the expressions of VEGF, VEGFR-2 and the activity of caspase-3 were remarkably improved. **Conclusion** Through ROS and vascular regeneration ways, EA exerts its protective effects on CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis in experimental mice. (J Intervent Radiol, 2018, 27: 357-362)

【Key words】 ellagic acid; carbon tetrachloride; cirrhosis; reactive oxygen species; angiogenesis

肝硬化作为一种慢性肝脏系统疾病,表现为弥漫性肝纤维化,伴随假小叶和再生结节形成<sup>[1]</sup>。临床症状主要表现为肝功能损害和门静脉高压症<sup>[2]</sup>,晚期可出现消化道出血、肝性脑病和继发感染等严重并发症<sup>[3]</sup>。其发病机制在我国主要是病毒性肝炎,其它病因包括胆汁淤积、循环障碍、工业中毒、药物滥用、代谢紊乱、营养不良、免疫紊乱及其它未知因素<sup>[4]</sup>。细胞氧化损伤与许多慢性疾病有关。肝硬化小鼠存在明显的氧化和抗氧化失衡<sup>[5]</sup>。正常条件下,肝脏中氧化与抗氧化系统处于动态平衡中<sup>[6]</sup>。某些因素通过激活氧分子引起肝组织脂质过度氧化,从而引起肝损伤<sup>[7]</sup>,而自由基产生与脂质过氧化协同作用,会产生自由基反应和肝脏损害<sup>[8]</sup>,进而加重炎症反应和肝损伤<sup>[9]</sup>。这种病理性改变,被认为是肝硬化患者难治的原因<sup>[10]</sup>。鞣花酸(ellagic acid, EA)具有多种生物活性,如抗氧化、抗突变、抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)作用<sup>[11]</sup>,也是一种有效促凝剂,对各种细菌和病毒具有良好抑制作用<sup>[12]</sup>。它可保护伤口表面免受细菌侵袭和感染,并抑制溃疡形成<sup>[13]</sup>。有研究表明 EA 具有降压、镇静作用<sup>[14]</sup>。本研究旨在探讨 EA 对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导肝硬化的保护作用是否是经由活性氧(ROS)和血管再生途径,进而抑制肝硬化病程发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型与实验分组

本研究方案获得了医院动物伦理委员会批准。取 C57BL/6 无特定病原体(SPF)级雄性小鼠(医院实验动物中心提供)40 只,体质量为(20±2) g,均饲养于(25.1±1.0)℃、12 h 为一周期的光/暗交替标准环境;随机分为对照组( $n=10$ )和肝硬化模型组( $n=30$ ),对照组小鼠仅接受 0.9%氯化钠溶液,肝硬化模型组小鼠由橄榄油稀释 10%CCl<sub>4</sub> 诱导构建肝硬化(2 mL/kg,腹腔注射,每周 3 次,连续 6 周)。肝硬化模型形成第 4 周,根据 EA 干预与否及给予剂量,模型组又随机分为未干预组( $n=10$ )、7.5 mg/kg EA 组( $n=10$ )、15 mg/kg EA 组( $n=10$ ),EA 干预持续 5 周。

### 1.2 血清生化检查

获取肝组织匀浆样品,在 110℃ 6 N 氯化氢(HCl)中水解,并在 60℃氯胺(2.5 mg)和范式乙基氨基苯甲醛混合液中孵育 30 min;采用 560 nm 分光光度计(美国 Amersham 生物科学公司)读取血清谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和白蛋白(ALB)水平。

### 1.3 肝组织病理检查

采集肝组织样本于 4%甲醛中固定,梯度乙醇脱水、二甲苯清除乙醇,浸入石蜡制作切片,苏木精-伊红(HE)染色后进行病理学检查。

### 1.4 胶原蛋白 I 检测

TRIzol 试剂(美国 Sigma-Aldrich 公司)提取肝组织样本中胶原蛋白 I 总 RNA,RevertAid™ 第一链 cDNA 合成试剂盒(美国 Fermentas 生命科学公司)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法合成 2 μg RNA。cDNA 扩增使用特异性引物序列:上游 5'-CAGAGTGGAAGAGCGATTA-3',下游 5'-CAAGGACAGTGTAGGTGAA-3';扩增过程在 DNA 恒温箱(美国 Applied Biosystems 公司)(95℃ 10 min、94℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 40 s,×40 周期,4℃保存)中进行。

### 1.5 ROS 检测

肝组织匀浆标本采集后在 10 000 r/min 离心机中离心 10 s,持续 3 次,选取其中 30 μg 蛋白,二辛可酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术公司)检测 ROS 水平。检测原理为:ROS 存在条件下,二氯二乙酸酯(DCFH-DA)被氧化生成二氯(DCF)荧光素,荧光强度与细胞内 ROS 水平呈正比。

### 1.6 氧化应激检测

血液标本采集后在 12 000 r/min 离心机中离心 10 min,冷却至室温,用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒及分光光度计(美国 Amersham 公司)检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)活性。

### 1.7 蛋白印迹检测

采集肝组织样本进行均质处理,在 10 000 r/min

分离 10 s, 持续 3 次, BCA 试剂盒测定总蛋白。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转移至硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲液 (TBST) 封闭 2 h, 加入抗诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体 (1:4 000)、抗血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 抗体 (1:2 500)、抗 VEGF 受体 (VEGFR)-2 抗体 (1:3 000)、抗  $\beta$ -肌动蛋白 (actin) 抗体 (1:5 000, 美国 Santa Cruz 生物技术公司) 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜; TBST 洗涤 3 次, 加抗鼠 IgG 抗体 (1:3 000, 美国 Santa Cruz 生物技术公司) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 增强型化学发光 (ECL) 试剂显色, ImageQuant™ 400 凝胶成像系统 (美国通用公司) 分析蛋白表达情况。

### 1.8 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 活性确定

采集肝组织样本进行均质处理, 10 000 r/min 下离心 10 s, 持续 3 次, BCA 试剂盒测定总蛋白。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白于 N-乙酰基-天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸-对硝基苯胺 (Ac-DEVD-pNA) 中室温下培育 30 min, ELISA 及分光光度计 (波长 405 nm) 检测半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (caspase)-3 吸光率。

### 1.9 统计学处理

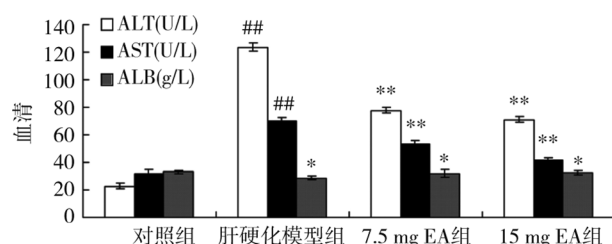
采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资

料均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 多组均数两两比较用完全随机单因素方差分析及 Tukey 事后检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EA 对肝硬化小鼠的作用

血清标本检测显示, 肝硬化模型组小鼠血清 ALT、AST、ALB 水平较对照组明显增高, EA 干预 5 周后肝硬化小鼠 ALT、AST、ALB 水平显著下降 ( $P<0.05$ ) (图 1)。肝脏组织 HE 染色显示, 肝硬化模型组小鼠有明显肝硬化细胞改变, EA 能有效抑制肝硬化形成过程中细胞形态改变 ( $P<0.05$ ) (图 2)。



注: ## 模型组与对照组比较,  $P<0.05$ ; \*\*EA 组与模型组比较,  $P<0.05$ ; \* 模型组与对照组及 EA 组与模型组 ALB 水平比较,  $P_{\text{模型组}}=0.525$ ,  $P_{7.5\text{ mg EA组}}=0.350$ ,  $P_{15\text{ mg EA组}}=0.763$

图 1 各组小鼠血清 ALT、AST、ALB 水平

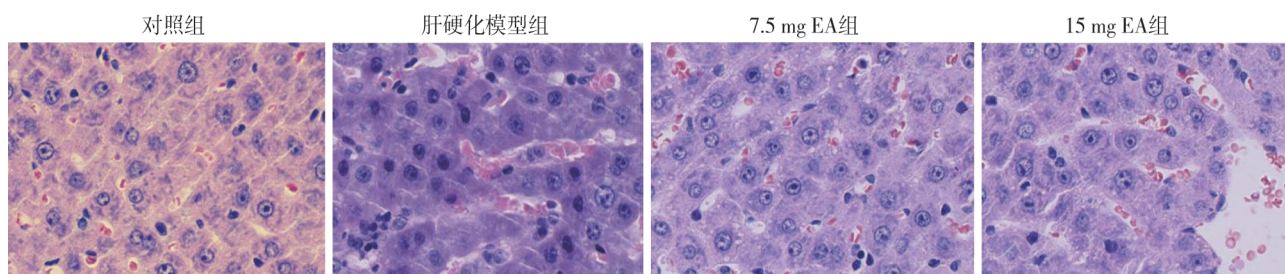
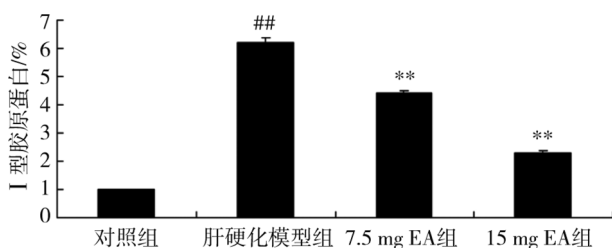


图 2 各组小鼠肝脏组织 HE 染色结果

### 2.2 EA 对肝硬化小鼠 I 型胶原蛋白的作用

RT-PCR 检测显示, 肝硬化模型组 I 型胶原表达水平较对照组显著升高, EA 能显著抑制 I 型胶原表达水平 ( $P<0.05$ ) (图 3)。



注: ## 模型组与对照组比较,  $P<0.05$ ; \*\*EA 组与模型组比较,  $P<0.05$

图 3 各组小鼠 I 型胶原蛋白表达水平

### 2.3 EA 对肝硬化小鼠 iNOS 蛋白表达的作用

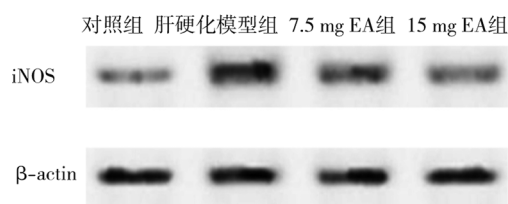
蛋白印迹检测显示, 肝硬化模型组小鼠肝脏 iNOS 蛋白表达水平明显高于对照组, EA 干预后 iNOS 表达水平明显受抑制 ( $P<0.05$ ) (图 4)。

### 2.4 EA 对肝硬化小鼠氧化应激的影响

ELISA 检测显示, 肝硬化模型组小鼠 GSH-PX、GSH、SOD、MDA 活性水平均较对照组显著抑制, EA 干预 5 周后 GSH-PX、GSH、SOD、MDA 活性均显著逆转 ( $P<0.05$ ) (图 5)。

### 2.5 EA 对肝硬化小鼠 ROS 的影响

ROS 检测显示, 肝硬化模型组小鼠 ROS 水平与对照组相比显著升高, EA 干预后 ROS 水平显著受抑制 ( $P<0.05$ ) (图 6)。



注: # 模型组与对照组比较,  $P < 0.05$ ; \*\*EA 组与模型组比较,  $P < 0.05$

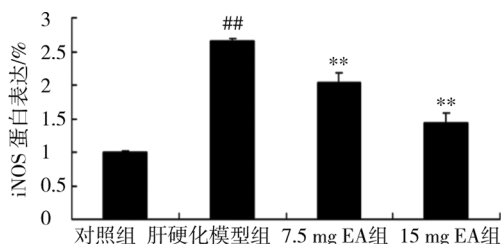
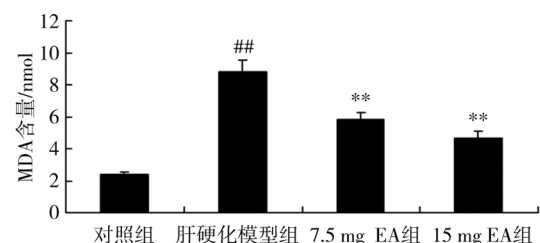
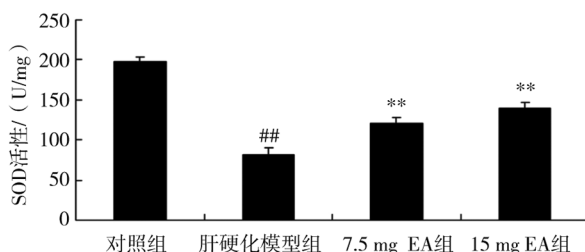
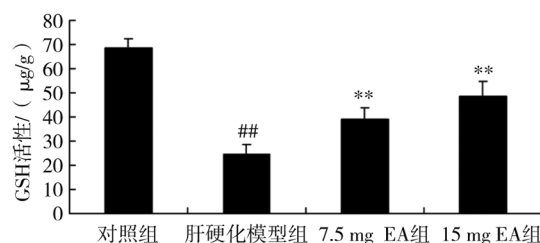
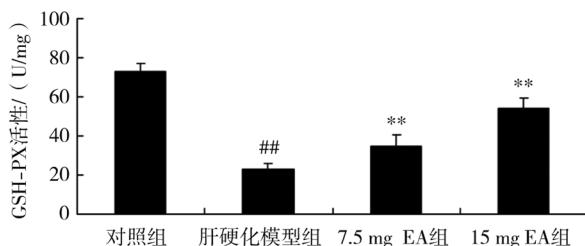
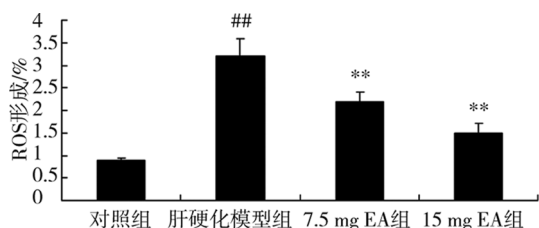


图 4 各组小鼠 iNOS 蛋白表达水平



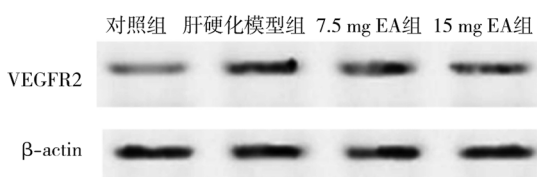
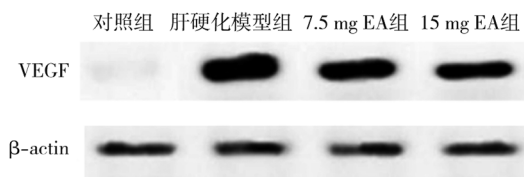
注: # 模型组与对照组比较,  $P < 0.05$ ; \*\*EA 组与模型组比较,  $P < 0.05$

图 5 各组小鼠 GSH-PX、GSH、SOD、MDA 活性水平



注: # 模型组与对照组比较,  $P < 0.05$ ; \*\*EA 组与模型组比较,  $P < 0.05$

图 6 各组小鼠 ROS 水平



注: # 模型组与对照组比较,  $P < 0.05$ ; \*\*EA 组与模型组比较,  $P < 0.05$

## 2.6 EA 对肝硬化小鼠 VEGF、VEGFR-2 的影响

蛋白印迹检测显示, 肝硬化模型组 VEGF、VEGFR-2 表达水平与对照组相比显著升高, EA 干预后显著抑制 VEGF、VEGFR-2 表达 ( $P < 0.05$ ) (图 7)。

## 2.7 EA 对肝硬化小鼠 caspase-3 活性的影响

ELISA 检测显示, 肝硬化模型组 caspase-3 活性与对照组相比显著升高, EA 干预能显著降低 caspase-3 活性水平 ( $P < 0.05$ ) (图 8)。

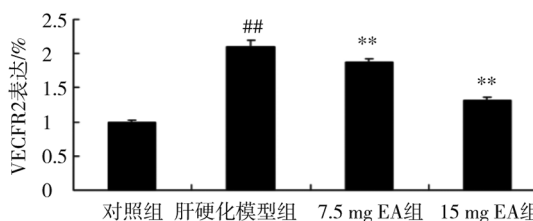
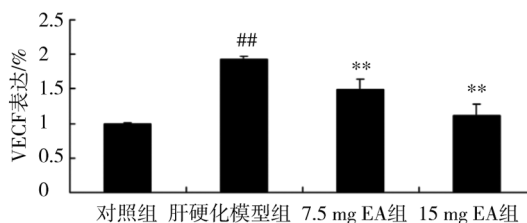


图 7 各组小鼠 VEGF、VEGFR-2 蛋白表达水平

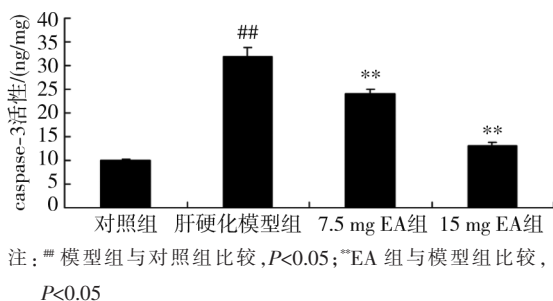


图 8 各组小鼠 caspase-3 活性水平

### 3 讨论

随着病程进展,肝纤维化常并发门静脉高压致上消化道出血,甚至有演变为肝癌可能。虽然目前对肝硬化门静脉高压并发食管胃底静脉曲张破裂出血及肝癌均能采用介入治疗,但对肝硬化尚无特殊介入治疗方法。氧化应激被认为是肝损伤的一个重要因素,氧化应激亢进和抗氧化机制破坏,最终导致肝损伤<sup>[15]</sup>。ROS 超载使细胞 DNA 受损,质膜和胞内重要的酶蛋白氧化,导致细胞发生坏死或凋亡,如果受损 DNA 不能得到及时修复,会诱发突变致正常细胞癌变<sup>[16]</sup>。正常细胞和肿瘤细胞在新陈代谢中产生内源性 ROS,且能维持相对平衡。细胞内存在的还原类物质 GSH 和 SOD 可主动清除积累 ROS<sup>[17]</sup>。正常情况下肝组织主要表达内皮型一氧化氮合酶(eNOS),iNOS 无或仅有少量表达。iNOS 在肝组织受到内毒素(脂多糖)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)- $\gamma$  等细胞因子刺激后表达增加,活性可持续较长时间,催化一氧化氮(NO)大量持续产生,介导广泛的毒性作用<sup>[18]</sup>。在氧化应激造成肝损伤中,iNOS 表达与肝细胞坏死程度有关<sup>[19]</sup>。本研究表明,EA 能抑制肝硬化小鼠 iNOS 蛋白表达,逆转 GSH-PX、GSH、SOD、MDA 活性并抑制 ROS 形成。

VEGF 诱导血管内皮细胞增殖,在调节血管生成中具有重要作用<sup>[20]</sup>。近年研究表明,VEGF 可诱导肝脏血管生成,促进损伤肝细胞再生,同时因有强烈的微血管通透性,促进急性炎性改变,引起血浆蛋白(包括纤维蛋白原)外渗并可凝集于血管外基质,形成纤维蛋白,促进肝硬化进展<sup>[21-22]</sup>。但仍有实验证明,肝硬化小鼠肝部分切除术后,VEGF 能积极促进肝再生<sup>[23-25]</sup>。本研究提示,EA 能明显抑制肝硬化小鼠 VEGF、VEGFR-2 蛋白表达。

Caspase-3 是 caspases 家族成员之一,是细胞凋亡途径末端底物酶解的关键效应蛋白酶,其被激活后将引起细胞凋亡<sup>[26]</sup>。caspase-3 表达水平可代表机体组织细胞的凋亡水平<sup>[27-28]</sup>。本研究结果表明,

EA 显著降低肝硬化小鼠中 caspase-3 活性。

EA 对肝脏有保护作用,可抑制血清中 ALT、AST、ALB 水平和 I 型胶原基因在肝硬化小鼠的表达。这些保护作用与抗氧化机制相关,即通过调节 iNOS、VEGF 和 caspase-3 表达,减少氧化应激反应发生,增加抗氧化酶而发挥作用;表明 EA 可能是一个潜在的新型药物,可在急性低氧条件下通过 iNOS、VEGF 和 caspase-3 表达缓解肝硬化、保护肝脏。本研究是 EA 对肝硬化作用的基础研究,未来将进一步开展经肝动脉插管灌注 EA 对肝硬化保护作用的动物试验研究<sup>[28]</sup>,为采用介入手术方式缓解肝硬化病程进展提供理论依据。

### [参考文献]

- [1] 王磊,刘福全,岳振东,赵洪伟.应用介入技术建立猪肝硬化门脉高压模型的实验研究[J].介入放射学杂志,2012,21:756-759.
- [2] Caprai S, Vajro P, Ventura A, et al. Autoimmune liver disease associated with celiac disease in childhood: a multicenter study [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008, 6: 803-806.
- [3] Assy N, Kayal M, Mejirisky Y, et al. The changes in renal function after a single dose of intravenous furosemide in patients with compensated liver cirrhosis [J]. BMC Gastroenterol, 2006, 6: 39-43.
- [4] Kuiper EM, Hansen BE, Lesterhuis W, et al. The long-term effect of ursodeoxycholic acid on laboratory liver parameters in biochemically non-advanced primary biliary cirrhosis [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011, 35: 29-33.
- [5] Misik M, Hoelzl C, Wagner KH, et al. Impact of paper filtered coffee on oxidative DNA-damage: results of a clinical trial [J]. Mutat Res, 2010, 692: 42-48.
- [6] Spahr L, Bresson-Hadni S, Amann P, et al. Allopurinol, oxidative stress and intestinal permeability in patients with cirrhosis: an open-label pilot study [J]. Liver Int, 2007, 27: 54-60.
- [7] Simon-Talero M, Garcia-Martinez R, Torrens M, et al. Effects of intravenous albumin in patients with cirrhosis and episodic hepatic encephalopathy: a randomized double-blind study [J]. J Hepatol, 2013, 59: 1184-1192.
- [8] Deng G, Wang J, Zhang Q, et al. Hepatoprotective effects of phloridzin on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride against oxidative stress-triggered damage and fibrosis in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35: 1118-1125.
- [9] Fang H, Liu A, Dirsch O, et al. Liver transplantation and inflammation: is lipopolysaccharide binding protein the link? [J]. Cytokine, 2013, 64: 71-78.
- [10] Marotta F, Yoshida C, Barreto R, et al. Oxidative-inflammatory damage in cirrhosis: effect of vitamin E and a fermented papaya

- preparation[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22: 697-703.
- [11] Modi M, Goel T, Das T, et al. Ellagic acid & gallic acid from *Lagerstroemia speciosa* L. inhibit HIV-1 infection through inhibition of HIV-1 protease & reverse transcriptase activity[J]. *Indian J Med Res*, 2013, 137: 540-548.
- [12] Ural MS, Yonar ME, Mise Yonar S. Protective effect of ellagic acid on oxidative stress and antioxidant status in *Cyprinus carpio* during malathion exposure[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015, 61: 58-63.
- [13] Mishra S, Vinayak M. Role of ellagic acid in regulation of apoptosis by modulating novel and atypical PKC in lymphoma bearing mice[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 281
- [14] Zhang HM, Zhao L, Li H, et al. Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid [J]. *Cancer Biol Med*, 2014, 11: 92-100.
- [15] De Minicis S, Brenner DA. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(Suppl 1): S98-S103.
- [16] Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782: 469-473.
- [17] Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, et al. Combination of oxidative stress and steatosis is a risk factor for fibrosis in alcohol-drinking patients with chronic hepatitis C[J]. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103: 147-153.
- [18] Li J, Wang Y. Effect of different methods of hypoxic exercise training on free radical oxidation and antioxidant enzyme activity in the rat brain[J]. *Biomed Rep*, 2013, 1: 925-929.
- [19] Yan Z, Qu K, Zhang J, et al. CD147 promotes liver fibrosis progression via VEGF-A/VEGFR2 signalling-mediated cross-talk between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129: 699-710.
- [20] Tekkesin N, Taga Y, Sav A, et al. Induction of HGF and VEGF in hepatic regeneration after hepatotoxin-induced cirrhosis in mice[J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58: 971-979.
- [21] Kishta SA, Abd-Alhade AA, Hamam O, et al. Prognostic value of TNF a mRNA and VEGF mRNA expression in patients with chronic hepatitis C genotype-4, with and without cirrhosis and hepatocellular carcinoma to predict disease outcome[J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2010, 40: 515-530.
- [22] Jaroszewicz J, Januszkiewicz M, Flisiak R, et al. Circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in patients with liver cirrhosis: possible association with hepatic function impairment[J]. *Cytokine*, 2008, 44: 14-17.
- [23] Mukozu T, Nagai H, Matsui D, et al. Serum VEGF as a tumor marker in patients with HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33: 1013-1021.
- [24] Surapaneni KM, Vishnu Priya V, Mallika J. Effect of pioglitazone, quercetin, and hydroxy citric acid on vascular endothelial growth factor messenger RNA (VEGF mRNA) expression in experimentally induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH)[J]. *Turk J Med Sci*, 2015, 45: 542-546.
- [25] Labrecque L, Lamy S, Chapus A, et al. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 821-826.
- [26] Izawa T, Horiuchi T, Atarashi M, et al. Anti-fibrotic role of miR-214 in thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats[J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43: 844-851.
- [27] Liu C, Wang G, Chen G, et al. Huangqi decoction inhibits apoptosis and fibrosis, but promotes Kupffer cell activation in dimethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 51.
- [28] 初金哲, 王黎洲, 张 帅, 等. 改良的经大鼠胃十二指肠动脉逆行肝动脉插管实验研究[J]. *介入放射学杂志*, 2016, 25: 798-802.

(收稿日期:2017-05-22)

(本文编辑:边 皓)