

- the development of Th2 cells[J]. *J Immunol*, 2001, 167(9): 4974-4980.
- [8] Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, et al. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis[J]. *J Gastroenterol*, 2011, 46(3): 401-409.
- [9] Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(17): 3653-3669.
- [10] Kang SW, Kim SH, Lee N, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region[J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5276-5282.
- [11] Chen S, Sims GP, Chen XX, et al. Modulatory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation [J]. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1634-1647.
- [12] Binkley N, Ramamurthy R, Krueger D. Low vitamin D status; definition, prevalence, consequences, and correction[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2010, 39(2): 287-301.
- [13] Bouillon R. Genetic and environmental determinants of vitamin D status[J]. *Lancet*, 2010, 376(9736): 148-149.
- [14] Fisher L, Fisher A. Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007, 5(4): 513-520.
- [15] Arth J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(9): 2624-2628.
- [16] Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B₁-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(5): 887-893.
- [17] Petta S, Camma C, Scazzone C, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C[J]. *Hepatology*, 2010, 51(4): 1158-1167.
- [18] Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance[J]. *Nature*, 2009, 461(7262): 399-401.
- [19] Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, et al. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C[J]. *Hepatology*, 2011, 53(4): 1118-1126.
- [20] Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, et al. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1570-1579.
- [21] Lange CM, Bibert S, Kutalik Z, et al. A genetic validation study reveals a role of vitamin D metabolism in the response to interferon-alfa-based therapy of chronic hepatitis C[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40159.
- [22] Kitson MT, Dore GJ, George J, et al. Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(3): 467-472.
- [23] Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(3): 248-254.
- [24] Falletti E, Bitetto D, Fabris C, et al. Vitamin D binding protein gene polymorphisms and baseline vitamin D levels as predictors of antiviral response in chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2012, 56(5): 1641-1650.
- [25] Baur K, Mertens JC, Schmitt J, et al. The vitamin D receptor gene bAt(CCA) haplotype impairs the response to pegylated-interferon/ribavirin-based therapy in chronic hepatitis C patients[J]. *Antivir Ther*, 2012, 17(3): 541-547.
- [26] Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, et al. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naive patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(47): 5184-5190.
- [27] Nimer A, Mouch A. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naive patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(8): 800-805.
- [28] Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, et al. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C[J]. *Transpl Int*, 2011, 24(1): 43-50.

(收稿日期: 2013-01-18 修回日期: 2013-05-13)

• 综 述 •

胆总管结扎致肝纤维化动物模型研究现状*

刘 玲¹综述, 谭正怀^{2△}审校

(1. 重庆市急救医疗中心药剂科 400014; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041)

关键词: 胆总管结扎(BDL); 肝纤维化; 动物模型; 年龄; 基因; 周期

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2013. 23. 039

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)23-2793-04

肝纤维化是许多肝病发展至肝硬化-肝脏疾病终末期的最后共同通路。据 55 个国家向世界卫生组织(WHO)提供的数

* 基金项目: 四川省科学技术厅成果转化基金资助项目(11010119); 四川省科学技术厅支撑项目(2012SZ0184); 重庆市卫生局中医药科技项目(2012-02-31)。作者简介: 刘玲(1962~), 副主任药师, 大学本科, 主要研究方向为医院药学、临床药学、药事管理。△ 通讯作者, Tel: (028)85258982; E-mail: tanzhh616@sohu.com。

据显示:近几年,每年全世界死于肝硬化的人数已增加到 50 万。西欧因肝硬化致死人数居死亡原因第 5 位,美国则位居第 4 位。其中,胆汁淤积是引起肝纤维化的重要因素。长期慢性胆汁淤积,由于胆酸及胆红素的作用引起肝细胞变性、坏死及肝纤维化,最终导致肝硬化,病理学上称为胆汁性肝硬化。已知原因的胆汁淤积性肝硬化称为继发性胆汁性肝硬化(SBC);未知原因的肝内胆汁淤积引起的肝硬化称为原发性胆汁性肝硬化(PBC)。无论是 SBC 或 PBC,目前均无有效的防治药物,因此,积极开发防治胆汁性肝纤维化新药是目前医药科研工作中的热点,而总胆管结扎致肝纤维化动物模型是评价这类药物的重要工具。为方便各研究者使用该模型,本文将系统介绍该动物模型的造型方法以及影响因素。

1 造模方法

动物可用 Wistar 大鼠、SD 大鼠、C57BL 小鼠、ICR 小鼠、兔、豚鼠、猫、犬以及鸡等,性别、年龄不限。麻醉动物后,消毒腹部皮肤,在无菌条件下腹部正中切开皮肤、肌层,进入腹腔后仔细分离胆总管,双结扎后剪断,然后依次关闭腹膜、缝合肌层及皮肤,动物清醒后正常饲养即可。在术后 1~10 周,取血测定肝功能、肝纤维化相关指标,取肝脏组织测定羟脯氨酸含量,显微镜下对其肝组织进行纤维化评分^[1-2]。

2 检测指标

本模型动物可检测的指标较多,以下指标在该模型中均呈阳性结果。

2.1 肝损伤指标 该模型主要表现为血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(D-BIL)以及间接胆红素(IBIL)显著升高。

2.2 肝纤维化指标 肝脏病理显微镜检查结果,肝脏羟脯氨酸含量以及胶原含量是肝脏纤维化最直接的指标;而血清前胶原 I 型蛋白、前胶原 III 型蛋白、纤维连接蛋白(FN)以及层粘蛋白(LN)含量可间接反映肝纤维化的程度;至于肝脏 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达则是星状细胞(HSC)活化的重要标志。上述指标在本模型中均表现为显著升高。

2.3 细胞因子 在本模型表现明显的细胞因子主要有:血清或血浆肿瘤坏死因子(TNF- α)、转化生长因子(TGF β 1)以及白细胞介素 1(IL-1)水平,肝脏组织基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、基质金属蛋白酶 13(MMP-13)及基质金属蛋白酶 9(MMP-9)表达及活性改变;肝脏基质金属蛋白酶组织抑制剂 1(TIMP1)表达等。

2.4 过氧化损伤指标 本模型动物血清或肝脏组织还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、一氧化氮(NO)以及丙二醛(MDA)水平有明显改变,超氧化物歧化酶(SOD)活性也有明显变化。

3 影响因素

对本模型影响因素的研究,目前主要集中在性别、年龄、造模周期、基因以及食物等方面。

3.1 性别 胆总管结扎(BDL)后 7 d,雄性大鼠的肝脏 IL-6 浓度低于雌性大鼠,假手术组则未检测出。不同性别大鼠血清 TNF- α 浓度比较差异无统计学意义($P < 0.05$)。雄性大鼠血清 ALT 和 GMT 活性均高于雌性大鼠,雄性大鼠血清雌二醇浓度显著低于雌性大鼠,组织病理研究结果显示雌性大鼠的肝脏纤维化以及炎症改变比雄性的稍为严重^[1]。

3.2 年龄 大鼠年龄对 BDL 后肝组织病理改变有一定的影响。研究表明青年大鼠在 BDL 40 d 后最先在门管区出现胆管增生导致隔膜纤维化,这种现象在肝实质发生结节性改变的区域逐渐消失。而成年大鼠的肝脏组织则表现为胆管增生与胆

管结构组织混乱地侵入肝实质,将肝板分割成类似恶性肿瘤生长的模式,提示年龄因素与胆汁性肝损伤有关。将 4、7、14 和 22 周龄的大鼠进行 BDL,4 周后检查发现:随着年龄的增加,其基质所占的比例越来越少,由(64.0 \pm 11.2)%降到(46.4 \pm 8.4)%,这些降低的比例由增殖的管道和纤维化来补充。微粒体的功能则随年龄的增加而恶化得更加厉害。微粒体胆固醇以及一些磷酸脂也显出与年龄相关的改变。门脉压的改变也随着年龄的增加而降低^[2]。

3.3 造模时间 BDL 后,随着时间的推移,动物肝脏纤维化程度、细胞因子水平、胶原堆积程度以及部分生化指标都发生着明显的变化。

3.3.1 不同时间肝组织发生明显改变 BDL 后肝细胞增殖显著增加,其增殖在术后 4 d 达到高峰,为正常组织的 24 倍,与此相似,胆管上皮细胞也在术后发生增殖,但这种现象是短暂的,在术后 24 h 达最大,为正常组织的 50 倍。BDL 40 d 后,肝细胞所占比例减少,而胆管细胞及基质所占比例增加,胆管基质增加支持新胆管组织而不存在过度的纤维化,这种改变与胆汁淤积时间密切相关。肝细胞的绝对数量可能在胆汁淤积期有所减少,但这种减少的程度比预期的少,因为其整个阶段都有肝体积增加^[3]。

3.3.2 不同时间细胞因子水平也发生显著变化 在 BDL 后 1、2、4、6、8、10 周时各处死 5 只大鼠进行检测,用免疫组织化学技术分析肝组织干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、TNF- α 、白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)以及 TGF- β 表达,血清水平则用 ELISA 检测。结果与对照组比较,上述细胞因子在 BDL 大鼠肝组织的表达明显增强,并随着肝硬化的进展而逐步增强,其血清 TNF- α 逐渐升高,并在术后 6 周达到高峰,血清 TGF- β 水平逐渐升高一直到术后 8 周,但血清 IFN- γ 并无明显变化,而 IL-10 水平则逐渐下降一直到术后 6 周^[3]。大鼠胆汁阻塞性肝增殖胆管上皮细胞以及胆管周围的间充质细胞上的血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)-BB 和 B chain mRNA 表达增加直到 4 周后,受体 β 亚单位逐渐增加,主要集中在肌间线阳性的导管周围的肝星状细胞^[4]。

3.3.3 胶原以及胶原酶时间变化趋势明显 大鼠在 BDL 后 10~42 d,肝纤维化逐渐发展,I 型胶原 mRNA 表达显著升高,MMP-2 和 MMP-13 mRNA 表达在术后 10~20 d 增加达到最大,但在术后 42 d 有减少的趋势。DNA 微阵列分析显示在术后 10 d 钙粒蛋白(calgranulin B)、溶解性载体家族(solute carrier family 34)、胸腺素(thymosin)和微管蛋白(tubulin)等基因表达显著增加,但与纤维化相关的细胞因子或 MMPs/TIMPs 均未见增加^[5]。在 BDL 后 2 d 其肝脏组织的 MMP-2 和 MMP-9 的活性显著升高,在术后第 10 天达到高峰,并一直持续到术后 30 d,而血浆明胶酶活性没有改变。随着明胶酶活性升高,其 TIMP mRNA 转录也增加,TIMP-1 转录出现在术后第 2 天,一直增加到术后 10 d,并一直保持到术后 42 d。TIMP-2 和 TIMP-3 转录在术后 10 d 才可检测到,随后就一直保持这种水平。用反向明胶酶谱(reverse zymography)发现 TIMP 蛋白活性并未升高,这好像是由于 TIMP/MMP 形成复合体之故。提示局部 MMP/TIMP 平衡的打破可能与其肝纤维化有关^[6]。

3.3.4 血液生化部分指标也随时间而变化 大鼠 BDL 后,其血清 5'-核苷酸酶(5'-nucleotidase)、ALP 以及胆红素在术后前 3 d 短暂性升高,然后这些指标在随后的 4 周内分别下降到其正常的 1/3、1/2 以及 1/100^[7]。

3.3.5 氧化应激指标随时间的变化而发生显著变化 肝脏组织 NO 水平显著升高发生在 BDL 后 4 周,此时已有腹水出现,

肝细胞诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA在术后3d即可检测到,在术后3周升高达3倍,然后减少,iNOS蛋白表达与其mRNA表达相似,但iNOS活性在BDL后3~7d是下降的,自此之后又上升一直到术后21d^[8]。与对照组比较,大鼠肝脏GSH在BDL后24h显著升高(+37%),在术后5d升高达53%,然后GSH持续下降一直到术后38d;GSSG在术后6~24h内显著降低,然后持续升高,在术后23、38d升高达100%。血浆的GSH水平与肝脏水平相平行,只是维持在较低的水平。而血浆GSSG则与肝脏的相反,在术后先升高,然后降低。这些变化与肝脏氧化应激增加,以及从细胞将GSSG运输到血浆有关^[9]。

3.3.6 小鼠BDL后部分指标也存在明显的时间依赖性BDL后8h至6周之间进行相关指标的检测发现:C57BL/6小鼠胆汁性梗死和转氨酶升高提示急性肝细胞损害发生在术后2~3d,与之平行是前增殖介质转录增加,术后5d肝细胞增殖明显并达高峰。大胆管细胞增殖在术后2~3d发生,而小胆管细胞增殖发生在术后5d,中性白细胞浸润发生在术后8h一直到术后3d。急性损伤后是组织修复、淋巴细胞和Kupffer细胞渗出以及胶原堆积,这些现象发生在术后第2周。在此之后, α -SMA阳性细胞数量减少,TGF β 1、TIMP1以及前I型胶原(procollagen I)表达减少,肝纤维化趋于稳定^[10]。

3.4 基因 基因敲除动物模型是研究单个基因作用的最佳工具,目前,用于BDL的基因敲除动物模型主要有血小板源生长因子(platelet-derived growth factors,PDGF)、因子7活化蛋白酶(factor VII activating protease,FSAP)、Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)、补体因子C5(complement factor C5)、缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)以及TNF- α 等基因,研究表明这些基因在BDL肝纤维化中发挥保护作用或促进作用。

3.4.1 对BDL肝纤维化具有保护作用的基因

3.4.1.1 FSAP 该酶是在肝脏生成的一种循环丝氨酸蛋白酶,细胞损害可导致该酶活化,其底物包括多种生长因子和凝血蛋白。研究表明FSAP(-/-)小鼠有促进肝纤维化的作用,表现为 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA),I型胶原及纤维连接蛋白(FN)表达升高,微矩阵分析发现FSAP对炎症信号通路具有调节作用^[11]。

3.4.1.2 YAP YAP为Hippo肿瘤抑制因子途径的效应子。在促进胆管上皮细胞以及肝细胞增殖以及生存中发挥重要作用。去除YAP小鼠肝脏在BDL后,不仅表现出胆管增殖减弱,同时也表现出肝细胞坏死增加,肝细胞增殖受抑制^[12]。

3.4.1.3 腺苷受体[A(1) adenosine receptors, A(1)AR] 与野生型小鼠比较,A(1)AR(-/-)在BDL后,其肝纤维化显著增加,严重的胆汁性梗死,与之伴随的是胆汁酸水平升高^[13]。

3.4.2 对BDL肝纤维化具有促进作用的基因

3.4.2.1 PDGF 该因子为器官纤维化的主要介质,研究发现PDGF-C(-/-)小鼠或PDGF-C拮抗剂并不能减轻胆总管结扎所引起的肝纤维化或肝功能损伤,而且肝内单核细胞、巨噬细胞以及树突状细胞的浸润也没有发生变化,趋化因子[CC趋化因子配体5(CC chemokine ligand 5,CCL5),CCL2,和CC趋化因子受体2(CC chemokine receptor 2,CCR2)]mRNA表达也没有发生改变。PDGF配体转录增加,PDGFR- β 及其信号传递(anti-PDGF-C group)无明显差异甚至升高。体外研究显示在门管区肌成纤维细胞中对肝纤维化起主要作用的是PDGF-B和PDGF-D的信号通路^[14]。运用抗PDGF-B的抗体治疗BDL小鼠可显著减少其肝组织内羟脯氨酸的含量,但对其血清ALT水平无明显影响^[15]。

3.4.2.2 补体因子C5(C5) Hc(0)/Hc(0)小鼠(C5缺乏)在BDL后1周末检测到肝纤维化(F0.5 \pm 0.5),而野生型小鼠在1周已经存在肝纤维化(F2.0 \pm 0),在4周后肝纤维化无明显差异。在Hc(0)/Hc(0)小鼠,伴随肝纤维化在1周时的推迟,肝纤维化指标显著降低,炎症细胞因子TNF- α 也显著降低,C5缺乏导致胆管周围纤维化区CD45(+)细胞浸润减少,MMP-9表达及活性也显著减少^[16]。

3.4.2.3 HIF 采用Cre/lox技术产生骨髓细胞特异性缺乏HIF-1 α 或HIF-1 β 敲除小鼠,当这些小鼠在BDL后,其肝脏组织的 α -SMA以及I型胶原显著减少(与HIFs正常组比较),巨噬细胞中HIFs缺乏并不影响BDL所造成的肝损伤以及炎症,但可以减少PDGF-B mRNA及其蛋白表达。提示巨噬细胞中的HIF活化可通过调节PDGF-B的生成而促进肝纤维化^[17]。HIF-1 α 缺乏小鼠在BDL14d后,其I型胶原和 α -SMA mRNA及其蛋白显著低于对照组,PDGF-A、PDGF-B和纤溶酶原激活物抑制剂1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)mRNA水平也显著低于对照组^[18]。

3.4.2.4 早生长反应蛋白(early growth response 1, Egr-1) 该蛋白是调节与肝纤维化相关基因的重要因素。肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α)通过3个DR1反应元件活化Egr-1启动子。通过剔除这些反应元件或敲除HNF4 α 可以大大地减弱Egr-1启动子的活化。小异质二聚体伙伴(SHP)共表达而抑制HNF4 α 活性,主要表现在Egr-1启动子上,HNF4 α 可短暂地诱导Egr-1 mRNA及其蛋白表达,相反,HNF4 α siRNA可减少Egr-1 mRNA及其蛋白的表达,而过表达SHP可以翻转这些效应。反之,通过siRNA抑制SHP可以升高Egr-1蛋白,出乎意料的是HNF4 α (-/-)小鼠的Egr-1 mRNA及其蛋白上调,而SHP(-/-)小鼠在BDL后,其HNF4 α 和Egr-1表达均大大地升高^[19]。

3.4.2.5 TNF- α 野生型小鼠在BDL后的生存率为60%,而TNF- α (-/-)小鼠的生存率则为90%,TNF- α (-/-)小鼠体质量降低以及肝脏对体质量的比值小于野生型小鼠,野生型小鼠血清ALT升高至(268.6 \pm 28.2)U/L而TNF- α (-/-)小鼠则为(105.9 \pm 24.4)U/L。组织学检测发现TNF- α (-/-)小鼠肝组织胶原表达较低,肝纤维化程度也较低,而且其肝组织 α -SMA及TGF β mRNA表达均显著降低^[20]。

3.4.2.6 纤溶酶原激活物抑制剂1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 与其野生型组比较,PAI-1(-/-)小鼠在BDL后的肝纤维化程度轻微,与该变化一致的是其组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, tPA)及MMP-9活性升高,而且tPA底物肝细胞生长因子(HGF)活化增加。相反,肝脏以及血浆中的尿激酶纤溶酶原激活物的活性并无差异,其TGF- β 1、星状细胞活化或胶原生成均无差异,提示PAI-1缺乏减少BDL肝纤维化主要是通过活化tPA和HGF^[21]。PAI-1(-/-)BDL后3d,其肝脏损伤以及炎症均显著低于野生型,细胞外基质堆积显著减少,但星状细胞活化指标以及胶原合成并没有减少,然而纤溶酶原激活物活性以及基质金属蛋白酶活性均增加,基质金属蛋白酶抑制剂-1无显著差异。肝脏尿激酶纤溶酶原激活物的活性升高伴随更多的肝细胞生长因子受体c-Met活化^[22]。

3.4.2.7 血管紧张素I(angiotensin type 1, AT1) AT1 α 敲除小鼠AT1 α (-/-)在BDL后,其血清肝酶活性升高的程度与野生型相似,在炎症改变以及肝纤维化方面,AT1 α (-/-)仅有微弱的纤维化(野生型对照显示炎症改变以及严重隔膜式纤维化),肝脏TGF β 1以及前炎性因子减少,炎细胞浸润、脂质过氧化、c-Jun和p42/44 MAPK磷酸化均显著减少^[23]。

4 特点分析

BDL 诱导肝纤维化模型具有成模时间短,重复性好,对动物的要求不高,其致病因素与临床上胆汁淤积性肝纤维化极为相似,因此,该模型在用于防治肝纤维化特别是胆汁淤积性肝纤维化的药效评价中具有重要价值,同时,该模型也是研究肝性脑病^[24]和门脉高压的有力工具^[25]。由于目前对模型的影响因素特别是基因方面的研究较为透彻,因此,该模型也适宜于用于相关药物作用机理的探讨。

但是,该模型不足之处也是明显的,该模型死亡率较高,一般在 30% 以上,在手术中注意胆总管的分离、结扎,以及术中无菌操作是提高模型成功以及动物存活率的关键。由于该模型是通过结扎胆总管导致胆汁淤积而对肝组织发生损伤,因此,该模型不适合用于通过利胆而发挥药效的药物作用评价。

参考文献:

[1] Zivna H, Zivny P, Palicka V, et al. The differences in selected biochemical markers and histological findings after bile duct ligation in male and female rats[J]. *Adv Clin Pathol*, 2001, 5(4): 147-153.

[2] Zimmermann H, Blaser H, Zimmermann A, et al. Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat[J]. *J Hepatol*, 1994, 20(2): 231-239.

[3] Lee BS, Kim NJ, Jeong HY, et al. Changes in serum cytokine concentration; a morphological study of liver cirrhosis induced by common bile duct ligation in rats[J]. *Korean J Intern Med*, 2003, 18(1): 6-12.

[4] Grappone C, Pinzani M, Parola M, et al. Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats[J]. *J Hepatol*, 1999, 31(1): 100-109.

[5] Sugihara T, Koda M, Matono T, et al. Extracellular matrix metabolism-related gene expression in bile duct-ligated rats[J]. *Mol Med Report*, 2009, 2(3): 345-351.

[6] Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, et al. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(6): 1895-1902.

[7] Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY, et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat[J]. *Am J Pathol*, 1990, 137(6): 1333-1342.

[8] Wei CL, Hon WM, Lee KH, et al. Temporal expression of hepatic inducible nitric oxide synthase in liver cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(3): 362-367.

[9] Purucker E, Winograd R, Roeb E, et al. Glutathione status in liver and plasma during development of biliary cirrhosis after bile duct ligation[J]. *Res Exp Med(Berl)*, 1998, 198(4): 167-174.

[10] Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation[J]. *Br J Surg*, 2008, 95(5): 646-656.

[11] Borkham-Kamphorst E, Zimmermann HW, Gassler N, et al. Factor VII activating protease (FSAP) exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in liver fibrosis in mice and men[J]. *J Hepatol*, 2012, 12: 697-703.

[12] Bai H, Zhang N, Xu Y, et al. Yes-associated protein regu-

lates the hepatic response after bile duct ligation[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 1097-1107.

[13] Yang P, Han Z, Chen P, et al. A contradictory role of A1 adenosine receptor in carbon tetrachloride- and bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(3): 747-754.

[14] Martin IV, Borkham-Kamphorst E, Zok S, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C neutralization reveals differential roles of PDGF receptors in liver and kidney fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2012, 9(12): 718-721.

[15] Ogawa S, Ochi T, Shimada H, et al. Anti-PDGF-B monoclonal antibody reduces liver fibrosis development[J]. *Hepatol Res*, 2010, 40(11): 1128-1141.

[16] Schmitt J, Roderfeld M, Sabrane K, et al. Complement factor C5 deficiency significantly delays the progression of biliary fibrosis in bile duct-ligated mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(3): 445-450.

[17] Copple BL, Kaska S, Wentling C. Hypoxia-inducible factor activation in myeloid cells contributes to the development of liver fibrosis in cholestatic mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(2): 307-316.

[18] Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, et al. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(3): G582-592.

[19] Zhang Y, Bonzo JA, Gonzalez FJ, et al. Diurnal regulation of the early growth response 1 (Egr-1) protein expression by hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) and small heterodimer partner (SHP) cross-talk in liver fibrosis[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34): 29635-29643.

[20] Gäbele E, Froh M, Arteel GE, et al. TNFalpha is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(3): 348-353.

[21] Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO. PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(16): 3098-3104.

[22] Bergheim I, Guo L, Davis MA, et al. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(2): 592-600.

[23] Yang L, Bataller R, Dulyx J, et al. Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(2): 317-323.

[24] Hsu SJ, Hsin IF, Lin YL, et al. The influence of sorafenib on hepatic encephalopathy and the mechanistic survey in cirrhotic rats[J]. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42(12): 1309-1316.

[25] Huebert RC, Jagavelu K, Hendrickson HI, et al. Aquaporin-1 promotes angiogenesis, fibrosis, and portal hypertension through mechanisms dependent on osmotically sensitive microRNAs[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(4): 1851-1860.