

熊胆对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的影响

周剑寅^{1,2}, 尹震宇^{1,2}, 王生育³, 颜江华³, 赵一麟^{1,2}, 吴端^{1,2},
刘争进⁴, 张盛^{1,2}, 王效民^{1,2*}

(1. 厦门大学附属中山医院肝胆外科, 福建 厦门 361004; 2. 厦门市消化疾病诊治中心, 福建 厦门 361004;
3. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005; 4. 厦门大学附属中山医院病理科, 福建 厦门 361004)

摘要: 探讨熊胆对二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 诱发大鼠肝癌的影响。将大鼠随机分为正常组、模型组及熊胆两个剂量组 (200、400 mg·kg⁻¹, 灌胃 18 周, 每周 5 次)。DEN 诱发肝癌, 用熊胆粉干预。实验观察了体重等一般情况, 检测肝功能, HE 染色观察肝组织病理改变, 免疫组化检测肝组织中增殖细胞核抗原 (PCNA) 和平滑肌动蛋白 (α -SMA)。结果显示: 4 周后正常组体重高于其他各组 ($P < 0.01$), 熊胆两组均高于模型组 ($P < 0.05$); 除正常组外, 其余各组谷丙转氨酶、总胆红素显著升高, 但熊胆两组显著低于模型组; 模型组呈典型肝硬化、肝癌改变, 熊胆两组肝硬化程度较轻、癌组织分化较好; 模型组高表达 PCNA 和 α -SMA, 熊胆两组较模型组弱, α -SMA 减少具有显著意义。实验提示: 熊胆在一定程度上抑制了 DEN 诱发肝癌的进程, 可能与抑制肝星状细胞活化并减轻肝损害、肝硬化有关。

关键词: 熊胆; 二乙基亚硝胺; 肝癌

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2012) 11-1483-06

Influence of bear bile on rat hepatocarcinoma induced by diethylnitrosamine

ZHOU Jian-yin^{1,2}, YIN Zhen-yu^{1,2}, WANG Sheng-yu³, YAN Jiang-hua³, ZHAO Yi-lin^{1,2},
WU Duan^{1,2}, LIU Zheng-jin⁴, ZHANG Sheng^{1,2}, WANG Xiao-min^{1,2*}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China; 2. Digestive Disease Center of Xiamen, Xiamen 361004, China; 3. Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 4. Department of Pathology, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China)

Abstract: To investigate the influence of bear bile on rat hepatocarcinoma induced by diethylnitrosamine (DEN), a total of 40 rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, model group, and two bear bile treatment groups. The rat liver cancer model was induced by breeding with water containing 100 mg·L⁻¹ DEN for 14 weeks. The rats of the bear bile groups received bear bile powder (200 or 400 mg·kg⁻¹) orally 5 times per week for 18 weeks. The general condition and the body weight of rats were examined every day. After 18 weeks the activities of serum alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and total bilirubin (TBIL) were detected. Meanwhile, the pathological changes of liver tissues were observed after H&E staining. The expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in liver tissue were detected by immunohistochemical method. After 4 weeks the body weights of rats in normal group were significantly more than that in other groups ($P < 0.05$); and that in the two bile groups was sig-

收稿日期: 2012-05-31; 修回日期: 2012-07-27.

基金项目: 国家重大传染病防治科技重大专项“十二五计划”(2012ZX10002-011-005); 国家自然科学基金面上项目(81171976); 福建省卫生厅中医药科研课题(wzy0904).

*通讯作者 Tel: 86-592-2292203, Fax: 86-592-2212328, E-mail: wxm2203@xmu.edu.cn

nificantly more than that in the model group. Compared with normal group, the level of serum glutamic- pyruvic transaminase and total bilirubin increased significantly in other groups; compared with model group, these two indexes decreased significantly in two bile groups. Hepatocellular carcinoma occurred in all rats except for normal group; there were classic cirrhosis and cancer in model group while there were mild cirrhosis and high differentiation in two bile groups. There were almost no expressions of PCNA and α -SMA in normal group while there were high expressions in model group; the two bile groups had some expressions but were inferior to the model group, and α -SMA reduced markedly. It indicated that bear bile restrained the development of liver cancer during DEN inducing rat hepatocarcinoma, which may be related to its depressing hepatic stellate cell activation and relieving hepatic lesion and cirrhosis.

Key words: bear bile; diethylnitrosamine; hepatocarcinoma

肝癌是常见的恶性肿瘤, 死亡率在我国的所有恶性肿瘤中排第二位, 其发生、发展和转移复发的机制尚未完全阐明。药物治疗在肝癌的综合治疗中占据重要地位, 虽然取得了不少进展, 但远期疗效差、缺乏确切有效药物。因此, 寻找新靶点以及新型药物用于预防和治疗肝癌显得尤为迫切^[1]。

近年来, 中医中药被大量应用于防治各种恶性肿瘤的基础和临床研究, 取得了可喜的成就^[2, 3]。国内外研究证实, 熊、鳄鱼、蛇等动物胆汁及其主要提取物胆酸或合成胆酸, 对胆管癌、前列腺癌、白血病和结肠腺瘤等多种肿瘤细胞起到了抑制增殖和诱导凋亡的效果^[4-7]。但利用动物胆汁进行抗肝癌的研究尚未见报道。作者前期研究表明熊胆通过抑制肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 激活, 从而抑制 HSC 的免疫学抑制活性, 提升机体免疫功能^[8]。据此, 推测熊胆可能能够预防和治疗在各种慢性肝病基础上发生的原发性肝癌。本文利用二乙基亚硝胺诱变建立大鼠原位肝癌模型, 探讨熊胆对大鼠肝癌发生、发展的影响和机制。

材料与方法

药品与试剂 二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN, 纯度 >0.99 g·mL⁻¹, Sigma 公司), 临用前配成 100 mg·L⁻¹ DEN 溶液, 避光存放, 隔日更换; 熊胆粉 (批号: 20100809, 福建归真堂有限公司) 为不规则细颗粒、粉末或碎片, 质松脆, 透明光亮, 黄色至深棕色, 呈玻璃样光泽, 主要有效成分为牛磺熊去氧胆酸, 含量为 44.2%; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 酶速率法试剂盒以及总胆红素 (TBIL) 重氮法试剂盒均购自罗氏公司; 兔抗增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 兔抗平滑肌动蛋白 (α -SMA) 抗体购自 DenmarkDako 公司; 兔抗免疫组化试剂盒为欣博盛生物公司产品。

实验动物分组及给药方法 清洁级 SD 大鼠 40 只, 雄性, 体重 (150±19.8) g, 由厦门大学医学院实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK (闽) 2008-0001。所有动物分笼饲养, 适应环境 3 d。

正常对照组 10 只, 正常自由饮水; 模型组、熊胆低剂量组和熊胆高剂量组, 每组 10 只, 均给予新鲜配制的 100 mg·L⁻¹ DEN 代替饮水, 自由饮用, 相当于每天摄入 DEN 2 mg, 至 14 周改为正常饮水^[9]。同时, 熊胆低剂量组 200 mg·kg⁻¹ 和高剂量组 400 mg·kg⁻¹ 给予熊胆粉混悬液灌胃, 每周 5 次, 共 18 周; 正常对照组、模型组给予等量生理盐水灌胃; 各组灌胃方法及间隔时间相同。

取材及固定 实验第 18 周末, 用乙醚麻醉各组大鼠。从腹主动脉取血 4 mL, 离心 (3 000 r·min⁻¹, 2 min), 取血清, 于 -20 °C 冰箱内冻存。动物处死后均剖开腹腔, 剪取整个肝脏, 记录一般情况及表面癌结节数。统一取结节处、结节周围及远离结节处共 3 块标本, 均为 1 cm×1 cm×1 cm 大小, 标本照相留存, 全部标本在 10% 甲醛溶液中固定。

血清生化指标的检测 血清 ALT、AST 活性检测采用酶速率方法, TBIL 含量检测采用重氮法。使用罗氏 MODULAR P800 全自动生化分析仪, 按照罗氏原装试剂盒说明书操作。

组织病理检查 肝组织固定后常规行脱水、透明、浸蜡, 然后石蜡包埋, 制备成 5 μ m 厚的切片, HE 染色, 常规组织学检查。

免疫组化染色及结果判定 组织切片厚 4 μ m, 常规脱蜡至水, 采用免疫组化 SP 法检测, 操作步骤按说明书进行。PCNA 工作浓度为 1:200, α -SMA 工作浓度为 1:500。PBS 代替一抗作为阴性对照, 已知阳性切片作为阳性对照。

PCNA 染色阳性为细胞核着色, α -SMA 染色阳性为胞质呈清晰棕黄色颗粒, 染色明显高于背景为

阳性。采用半定量法进行评分, 高倍镜下根据染色强度和阳性细胞所占百分比判定^[10]。染色强度评分标准: 不着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。阳性细胞所占比例评定标准: 阳性细胞数 < 5% 为 0 分; 6% ~ 25% 为 1 分; 26% ~ 50% 为 2 分; 51% ~ 75% 为 3 分; > 75% 为 4 分。两种评分的乘积, 0 ~ 1 分为阴性 (-), 2 ~ 3 分为弱阳性 (+), 4 ~ 5 分为中度阳性 (++) , > 5 分为强阳性 (+++)。

统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行检验, 等级资料采用秩和检验。结果采用统计软件 SPSS 18.0 进行处理。

结果

1 动物一般情况

正常对照组大鼠进食、饮水, 喜活动, 背毛柔顺、有光泽, 无死亡。4 周后, 模型组和熊胆组大鼠背毛比较凌乱、精神萎靡、活动和食欲减少。实验过程中各组大鼠体重均有增加, 4 周后正常组的体重增加显著高于模型组和熊胆组 ($P < 0.01$), 熊胆两组体重增加均明显高于模型组 ($P < 0.05$); 熊胆高、低剂量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。14 周后, 模型组死亡 2 只, 死亡率为 20%, 其中 1 只因肝癌恶液质伴大量腹水死亡, 另 1 只因肝癌破裂出血死亡; 熊胆低剂量组死亡 1 只, 死亡率 10%, 因肝癌恶液质伴大量腹水死亡。

2 肝功能结果

第 18 周肝功能结果显示: 与正常对照组比较, 模型组大鼠的 ALT、AST、TBIL 均明显升高 ($P < 0.05$);

与正常组比较, 熊胆两组的 ALT、TBIL 均明显升高, 但 AST 升高不显著 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 熊胆两组的 ALT、TBIL 均显著下降 ($P < 0.05$), 熊胆高剂量组的 AST 亦显著下降; 但熊胆高、低剂量组间比较, 肝功能指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

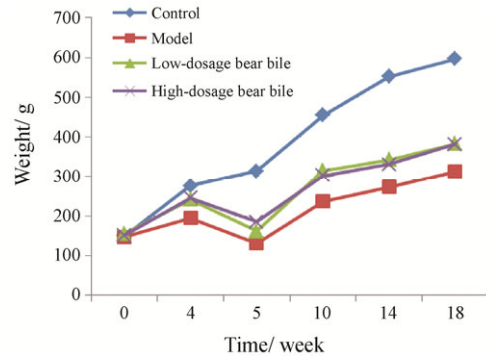


Figure 1 The animals' body weight of the different groups

3 病理改变

除正常对照组, 其余各组大鼠全部诱发出肝癌。巨检发现: 正常组大鼠肝脏表面光滑, 色淡红, 边缘锐利, 质地中等; 其余各组大鼠肝脏表面均散在大小不等的白色结节, 质地较硬, 模型组部分肝脏表面有大结节出现; 熊胆两组肝结节数目较模型组有所减少, 且结节直径较小; 熊胆两组之间大鼠肝结节数目、大小无明显差异。HE 染色: 镜下见正常对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞索排列整齐, 细胞核清晰 (图 2A); 模型组可见肝细胞排列紊乱、肝细胞弥漫性变性, 较多灶状、片状坏死, 汇管区纤维组织明显增生, 纤维间隔较粗, 伸入肝组织内, 肝癌细胞梁状排列、

Table 1 Liver function indexes of rats at the end of 18 weeks ($\bar{x} \pm s$). ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase; TBIL: Total bilirubin. (n): Death numbers of rats. * $P < 0.05$ vs control group; $P < 0.05$ vs model group

Group	n	ALT/u·L ⁻¹	AST/u·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹
Control	10	54.83 ± 5.70	199.37 ± 11.64	1.73 ± 0.38
Model	8 (2)	142.73 ± 15.59*	299.17 ± 38.84*	6.07 ± 1.86*
Low-dosage bear bile (200 mg·kg ⁻¹)	9 (1)	101.70 ± 22.17*	253.90 ± 35.31	3.86 ± 1.15*
High-dosage bear bile (400 mg·kg ⁻¹)	10	95.47 ± 16.61*	207.60 ± 35.31	2.75 ± 0.62*

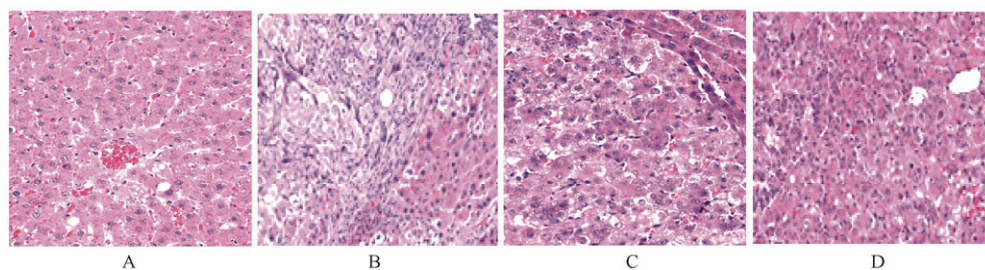


Figure 2 HE staining micrographs of liver below (×200). A: Control; B: Model; C: Low-dosage bear bile; D: High-dosage bear bile

异型、病理性核分裂 (图 2B); 而熊胆两组可见肝细胞变性、坏死较模型组轻, 汇管区纤维组织增生较轻, 纤维间隔较细, 肝癌细胞排列相对有序 (图 2C, D)。

4 PCNA 和 α -SMA 表达

4.1 PCNA 表达 正常对照组的组织中几乎未见 PCNA 阳性细胞 (图 3A 上), 模型组大部分肝细胞核呈 PCNA 阳性表达, 在增生的纤维组织中高表达 (图 3B 上, 箭头处), 而熊胆组 PCNA 表达较模型组弱 (图 3C, D 上)。但经统计学检验, 模型组与熊胆两组间并无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

4.2 α -SMA 表达 正常对照组 α -SMA 在肝小叶中央静脉壁有少量阳性表达, 汇管区的各种血管壁阳性表达, 肝细胞间无阳性细胞 (图 3A 下)。模型组大量肝星状细胞 (HSC, α -SMA) 在增生的纤维组织及间隔内弥漫分布, 实质内散在分布 (图 3B 下)。熊胆两组 HSC 的分布与模型组相似, 但细胞的数量明显减少 (图 3C, D 下)。经统计学检验, 模型组 α -SMA 的表达高于熊胆组 ($P < 0.05$), 而熊胆两组间并无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

Table 2 Comparison of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) or α -smooth muscle actin (α -SMA) in different groups. (*n*): Death numbers of rats. Comparison of PCNA among these three groups, $P > 0.05$; Comparison of α -SMA among these three groups, $P < 0.05$; Comparison of α -SMA between two bile groups, $P > 0.05$

Group	<i>n</i>	PCNA				α -SMA			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Model	8 (2)	0	2	2	4	0	1	2	5
Low-dosage bear bile	9 (1)	0	3	3	3	1	4	3	1
High-dosage bear bile	10	0	3	4	3	2	4	3	1

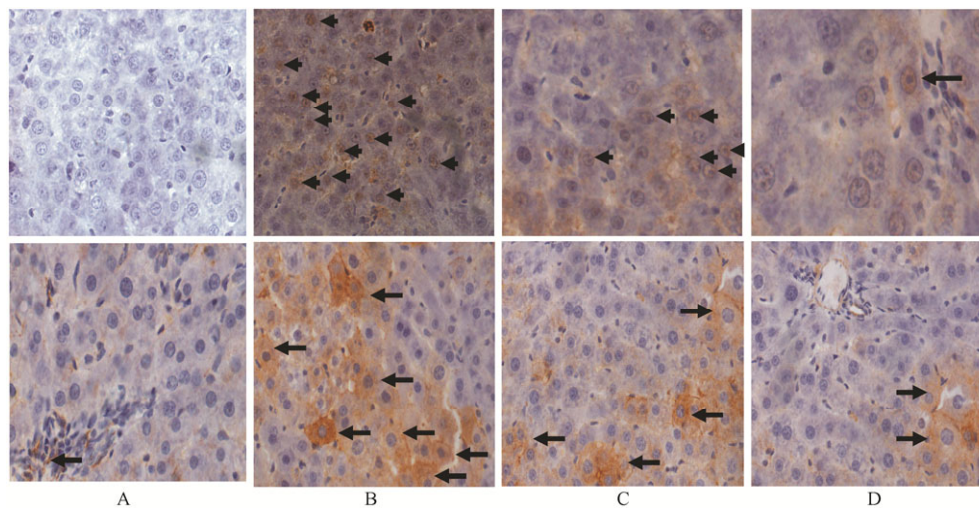


Figure 3 Expression of PCNA above and α -SMA below by immunocytochemistry staining in different groups ($\times 400$). A: Control; B: Model; C: Low-dosage bear bile; D: High-dosage bear bile

讨论

DEN 所含的亚硝酸基团具有中毒剂和诱癌剂的双重效应。利用 DEN 诱发建立大鼠原位肝癌模型, 诱发癌症的方法简单, 大多为肝细胞肝癌, 且成功率高, 已广泛用于诱发原发性肝癌模型。张志敏^[11]等观察到: DEN 诱癌早期肝脏发生中毒性反应, 主要表现为肝细胞变性、坏死; 诱癌中期, 出现肝纤维化和肝细胞再生等征象; 持续诱癌阶段, 肝组织在经历了结节性增生和肝硬化动态演变后渐进性形成肝癌; 其整个过程包括中毒损伤-增生硬化-癌变 3 个阶段, 病理类型典型, 与人类原发性肝癌发生发展过程相似。本实验给予大鼠 DEN 稀释液代替饮水共 14 周, 18 周后经病理证实全部诱发出肝癌。

熊胆是四大名贵动物中药材之一, 在我国有着几千年的药用历史。近年来药理学研究表明, 熊胆有着广泛的药理作用和较少的毒副作用^[12], 用于治疗各种疾病, 尤其是肝胆系统疾病, 临床上常常作为保肝、护肝的良药。本研究中, 通过对熊胆影响 DEN 诱发大鼠肝癌模型的研究, 初步探讨熊胆减轻肝损害乃至抑制肝癌发生的过程及机制。

研究结果显示, 两种浓度的熊胆粉均能显著减轻 DEN 的毒性反应, 具有一定程度的抑癌效果。表现为熊胆粉灌胃两组大鼠体重均显著高于模型组, 肝功能指标谷丙转氨酶、总胆红素均显著低于模型组; 熊胆高剂量组没有大鼠死亡, 而熊胆低剂量组和模型组大鼠分别死亡 1 只和 2 只。病理学观察表明模型组肝癌结节呈弥漫型, 且有大结节, 镜下可见典型肝硬化和肝细胞肝癌改变, 病理性核分裂; 而熊胆两组肝癌结节数量较少、直径较小, 罕有大结节, 镜下

可见肝细胞变性、坏死较模型组轻,肝硬化较轻,不典型增生、不典型肝癌改变。

肝癌的发生机制非常复杂。一般认为,肝癌形成过程中,肝细胞增殖活性的升高和凋亡水平的下降共同发挥了重要的作用。近年来研究结果显示,肝细胞增殖活性的改变在肝癌形成过程中的作用尤为重要^[13]。

PCNA 蛋白又称周期蛋白,是一种细胞增殖标志物,是 DNA 多聚酶的辅酶。PCNA 协调 DNA 前导链和随从链的合成,是细胞增殖所必需,在细胞内的含量具有周期性。静止期细胞内含量很少, G₁ 晚期开始增加, S 期达高峰, G₂ 期、M 期明显下降^[14]。作为一种肿瘤标志物,其表达情况反映机体遗传物质的合成状态以及肿瘤细胞的增殖水平,而且与肿瘤细胞的分化和肿瘤组织类型有关,肝癌、鼻咽癌组织分化越差, PCNA 标记指数越高^[15, 16]。本文通过对 PCNA 表达水平的免疫组化结果分析:低表达的正常对照组并无肝癌发生;而高表达的模型组,肝癌细胞增殖旺盛、分化差;表达水平稍弱于模型组的熊胆两组,也发生了肝癌,但肿瘤细胞增殖水平较低、分化程度较高。

肝星状细胞是肝脏的一种非实质细胞,其活化是肝纤维化、肝硬化形成的中心环节,在各种慢性肝病的发生发展中扮演着非常重要的作用^[17]。HSC 平常处于静息状态,当肝脏受到物理、化学和微生物感染等病理因素刺激时, HSC 就会发生增殖、活化,转变为其活化形式—肌成纤维细胞 (myofibroblast, MFB),表现出明显的细胞增殖、收缩性增加、大量表达 α -SMA 等活化特点^[18]。活化 HSC 参与免疫抑制活性的介导,在肝脏中产生免疫耐受;能够诱导肝癌细胞的增殖和迁移,增强肝癌的肿瘤易感性,在原发性肝癌的发生发展中扮演非常重要的作用^[18, 19]。

作者前期研究证实熊胆通过抑制 HSC 活化,抑制 HSC 分泌各种细胞因子,促进 T 细胞增殖,达到抑制 HSC 的免疫学抑制活性,增强机体免疫系统的效应功能^[8]。HSC 激活的主要标志物是 α -SMA, 本文发现正常对照组 α -SMA 呈低表达,模型组高表达,熊胆两组也有一定的表达,但显著低于模型组。提示熊胆通过抑制 HSC 的激活和转化,减轻了 DEN 所致肝损害,抑制了肝纤维化、肝硬化,一定程度上延缓、抑制了 DEN 所致大鼠肝癌的癌变进程。

本研究发现,熊胆有可能成为在原发性肝癌发生、发展各个阶段都能发挥作用的有效药物,但熊胆

干预还不能完全阻断肝癌的发生,熊胆高低剂量两组之间比较也无明显的量效关系。因此,有关熊胆影响肝癌进程的实验设计和详细机制还有待于进一步研究。

References

- [1] Sun HF, Hou HL, Lu P, et al. Isocorydine inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma cell lines by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis[J]. PLoS One, 2012, 7: e36808. doi:10.1371/journal.pone.0036808.
- [2] Ling J, Wang X. The synergistic antitumor effects of berberine α -hydroxy- β -decanylethyl sulfonate with hydroxycamptothecin and its effect on topoisomerase [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 46: 390-394.
- [3] Huang XY, Wang L, Huang ZL, et al. Herbal compound extract 'Songyou Yin' inhibits tumor growth and prolongs survival in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenograft with high metastatic potential [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135: 1245-1255.
- [4] Jin Y, Moon YS, Choi JJ, et al. Effects of bears bile on the expression of tumor cell p53 protein [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2006, 26: 86-88.
- [5] Kang JH, Zhang WQ, Song W, et al. Apoptosis mechanism of human cholangiocarcinoma cells induced by bile extract from crocodile [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166: 942-951.
- [6] Alberts DS, Martinez ME, Hess LM, et al. Phase III trial of ursodeoxycholic acid to prevent colorectal adenoma recurrence [J]. J Nat Cancer Inst, 2005, 97: 846-853.
- [7] Choi YH, Im EO, Suh H, et al. Apoptosis and modulation of cell cycle control by synthetic derivatives of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in human prostate cancer cells [J]. Cancer Lett, 2003; 199: 157-167.
- [8] Zhou CS, Yin ZY, Zhao WX, et al. Study of bear bile on immunologic feature of hepatic stellate cells *in vivo* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2011, 26: 2251-2254.
- [9] Luo YQ, Wu MC, Chen H, et al. Gene expression of HGF and its receptor in experimental hepatomas [J]. Natl Med J China (中华医学杂志), 1996, 76: 822-825.
- [10] Yang M, Chen Q. Expression and significances of resistance protein P-gp and Topo- in B cell non-hodgkin lymphoma [J]. China Pharm (中国药房), 2012, 23: 1684-1687.
- [11] Zhang ZM, Wang G, Chen C, et al. Pathologic and morphologic study on modified DEN-induced hepatocarcinoma model in

- rats [J]. Acta Acad Med Mil Tert (第三军医大学学报), 2007, 29: 1164-1167.
- [12] Feng Y, Siu K, Wang N, et al. Bear bile: dilemma of traditional medicinal use and animal protection [J]. J Ethnobi Ethnomed, 2009, 5: 2.
- [13] Park Y, chae KJ, KimYB, et al. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhoisis [J]. Cancer, 2001, 92: 2733-2738.
- [14] Bian W, Mu HL, Liu SG, et al. The expression and significance of proliferating cell nuclear antigen in cholangiocarcinom [J]. Chin J Exp Sur (中华实验外科杂志), 2010, 7: 873-875.
- [15] Shen U, Zhang HX, Zhang ZJ, et al. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 459-462.
- [16] Zheng MH, Tian XD, Li H, et al. Expression of PCNA and the count of AgNOR in squamous cell carcinoma of larynx and hypopharynx [J]. J Clin Otorhinolaryngol (临床耳鼻喉科杂志), 2002, 16: 653-655.
- [17] Ping J, Gao AM, Xu D. Therapeutic effect of indole-3-carbinol on pigserum-induced hepatic fibrosis in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 915-921.
- [18] Amann T, Bataille F, Spruss T, et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci, 2009, 100: 646-653.
- [19] Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver [J]. Immunol Rev, 2000, 174: 21-34.