

文章编号 1006-8147(2020)03-0213-05

论著

口服蛋氨酸饲料致大鼠心室重塑的研究

涂代苗, 阚晨星, 马向红

(天津医科大学第二医院心脏科, 天津市心血管病离子与分子机能重点实验室, 天津心脏病学研究所, 天津300211)

摘要 目的:探讨口服蛋氨酸饲料致大鼠心力衰竭模型的机制,及程序性死亡因子4(PDCD4)通路在此过程中的作用。方法:5周龄健康 Wistar 雄性大鼠 30 只,适应性喂养 1 周后,随机分为实验组与对照组,实验组给予 3%蛋氨酸饲料喂养,对照组标准饲料喂养。12 周后进行血流动力学检测,采用酶联免疫法测定血清同型半胱氨酸(HCY)及 N 端前脑钠肽(NT-proBNP)水平,心脏彩超进行心功能评估,病理染色明确有无细胞肥大、纤维化,Western blot 检测心肌组织中 PDCD4 蛋白的表达。结果:3%蛋氨酸饲料喂养组 HCY 水平较对照组升高(均 $P<0.05$),心脏彩超提示 3%蛋氨酸饲料喂养组大鼠左室射血分数、缩短分数、室间隔厚度显著减低(均 $P<0.05$),左室收缩末内径及舒张末内径较对照组显著增加(均 $P<0.05$),Western blot 结果显示, PDCD4 蛋白表达降低($P<0.05$)。结论:通过口服蛋氨酸饲料造成大鼠高 HCY 血症可导致大鼠出现心室重塑,并造成心功能受损,其机制可能与 PDCD4 信号通路的下调有关。

关键词 蛋氨酸;同型半胱氨酸;高同型半胱氨酸血症;心室重塑;PDCD4 通路

中图分类号 R541.6+1

文献标志码 A

Study of methionine-induced ventricular remodeling

TU Dai-miao, KAN Chen-xing, MA Xiang-hong

(Department of Cardiology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory of Ionic-Molecular Function of Cardiovascular Disease, Tianjin Institute of Cardiology, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of methionine-induced heart dysfunction in rats and the role of programmed cell death factor (PDCD4) pathway in this process. **Methods:** Thirty healthy male Wistar rats were randomly divided into control group or 3% methionine forage fed group after adaptive feeding for 1 week. Twelve weeks later, the hemodynamic assessment were performed. The level of serum homocysteine (HCY) and N-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) were determined by enzyme-linked immunosorbent assays. The cardiac function was evaluated by color Doppler echocardiography, and the ventricular changes were confirmed by pathological stains. Finally, the expression of PDCD4 in ventricle was detected by Western blot. **Results:** The level of HCY in the experimental group was higher than that in the control group ($P<0.05$). Echocardiographic showed the left ventricular ejection fraction, fractional shortening, interventricular septal thickness in the experimental rats were decreasing (all $P<0.05$), while the left ventricular end diastolic dimension and left ventricular end systolic dimension were increasing compared to the control rats (all $P<0.05$). Besides, the expression of protein PDCD4 was lower in experimental rats ($P<0.05$). **Conclusion:** High homocysteinemia induced by methionine feed can lead to myocardial dysfunction and ventricular remodeling in rats, and it may be related to the down-regulation of PDCD4 signaling pathway.

Key words methionine; homocysteine; high homocysteinemia; ventricular remodeling; PDCD4 signal pathway

心力衰竭是许多心血管疾病的终末阶段,严重影响患者的生存。人口老龄化和其他心血管疾病生存率的提高使心力衰竭的发病率增加^[1]。目前认为,心室重构是心力衰竭发生、发展的重要机制^[2]。心室重构是各种原因导致心脏结构和(或)功能的改变,其机制十分复杂,除了代偿机制外,心肌细胞的氧化应激损伤、免疫和炎症改变,能量利用障碍、神经体液调节失衡,细胞因子表达异常等因素的互相影

响也参与其中。

同型半胱氨酸(HCY)是蛋氨酸代谢的中间产物,与冠心病、高血压等发病密切相关^[3],也与心力衰竭的严重程度(NYHA 分级)相关^[4]。HCY 既是心力衰竭的危险因素,也是判断心力衰竭患者预后的预测因子。笔者先前的研究表明 HCY 致动脉粥样硬化机制主要与内皮细胞损伤、平滑肌细胞增生、氧化应激和炎症反应有关^[5]。近年研究提出,同型半胱氨酸引起心力衰竭的机制除了与血管机制有关,还可以直接引起心肌损伤,导致心肌肥大、心肌细胞凋亡和间质纤维化,引起心肌重塑^[6]。程序性细胞

基金项目 天津医科大学第二医院青年基金项目资助(2017ydey18)

作者简介 涂代苗(1993-),女,硕士在读,研究方向:心血管内科;通信作者:马向红, E-mail: ma_xianghong@163.com。

死亡蛋白4(programmed cell death protein 4, PDCD4)是一种抑癌基因,有促进细胞凋亡的作用,研究发现 PDCD4 在心肌纤维化中呈低表达。本研究通过口服蛋氨酸饲料构建高 HCY 大鼠模型,探索 HCY 致大鼠心脏功能的变化,以及引起大鼠心室的病理改变及 PDCD4 信号通路在其中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 5 周龄健康雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量(200±20)g,清洁级,购自北京华阜康公司,适应性喂养 1 周后,随机分为对照组 15 只,实验组 15 只。对照组予普通饲料喂养,不做特殊处理;实验组予 3%蛋氨酸饲料喂养。各组均不定量按需给食,250 mL 饮水瓶每日换水,每周记录体质量。

1.2 主要试剂及设备 HCY 酶联反应试剂盒购自上海抚生生物公司,大鼠 PDCD4(ab51495)单克隆抗体购自 abcam 公司,GAPDH 单克隆抗体购自天津百倍生物科技公司, Vevo2100 小动物超声仪, Biorad 电泳仪。

1.3 模型的制备及样本的留取 各组大鼠分别喂养 12 周后检测心脏彩超,留取内眦静脉血,4℃,2 000 rpm × 20 min 离心制备血浆,处死动物,切取心室,称体质量,用作组织学研究的心室用 4%的中性甲醛固定,脱水,石蜡包埋,4℃保存、备用;其余-80℃保存后续用于分子研究。

1.4 血浆 HCY 及 NT-proBNP 测定 采用 ELISA 法测定已制备的血浆 HCY 浓度,具体步骤为:(1)设计标准孔与样本孔,标准孔加不同浓度的标准液 50 μL,样本每孔加样 50 μL。(2)加入酶标试剂 100 μL。(3)37℃温育 60 min。(4)洗涤 5 次。(5)加入显色剂 37℃避光 15 min。(6)终止反应。(7)测定,以 450 nm 波长依序测定各孔吸光度。

1.5 心脏超声的测量 3%蛋氨酸饲养 12 周后,实验组与对照组大鼠均进行超声心动图检查。应用 GE Vivid 7 型超声仪,使用 7.5 MHz 探头对大鼠行心脏超声检查,应用 Vevo 2100 小动物超声系统用来测量分析,配备 M-型超声,B-型超声和组织多普勒。大鼠采用异氟醚麻醉,仰卧固定,胸前备皮,于左侧胸骨旁取左室长轴切面,连续记录至少 3 个心动周期,保存二维图像,测定室间隔厚度(IVS)、左室收缩内径(LVES)、左室舒张末径(LVED)、左室后壁厚度(LVPW)、左室收缩期容量(LVSV),计算射血分数(EF%),缩短分数(FS%),所有测量数值取 3 次结果的平均值。

1.6 血流动力学指标的测定 取大鼠称体质量,记录,腹腔麻醉后仰卧固定,充分暴露手术区域。大鼠

左侧上肢、左右下肢通过尖端连接针刺皮下,另一端连接于血流动力学换能器上,连续记录肢体导联心电图。连接压力传感器管路系统,压力传感器系统血压调零,于大鼠颈部正中做一纵行切口,钝性逐层分离肌肉,露出一侧的颈总动脉,动脉夹夹闭动脉近心端,传入 2 根 001 号手术缝线,远心端结扎,近心端打单节,用动脉剪剪开动脉管径的 1/3,将自制内径为 1.5 mm 聚苯乙烯心导管(导管内充满含有肝素的氯化钠注射液)通过切口插入右颈总动脉内,导管的另一端通过三通、用压力换能器与 BL-420S 生物机能试验系统相连,随后近心端缝线结扎固定动脉及导管,防止导管脱出,用镊子夹住导管固定,再松开动脉夹,并将导管缓慢插入动脉内,计算机通过生物机能实验系统,进入血流动力学模块。此时波形为动脉血压曲线,待血压稳定 1 min。截取 10 个心动周期的心电图及血压,分别测量各种心电数据,分析测定 HR、血压测量主动脉收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、左室收缩压(LVSP)、左室舒张压(LVDP)等。

1.7 HE 染色 每个标本选取 3 张心肌石蜡切片进行 HE 染色,用 Olympus CX21FSI 光学显微镜留取心肌组织结构图片。石蜡切片 5 μm 厚,经过脱蜡、染色、脱水、透明、封固后光镜观察。

1.8 Masson 染色 每个标本选取 3 张心肌石蜡切片按 Masson 三色染色试剂盒说明进行染色。用 Olympus CX21FSI 光学显微镜观察心肌组织胶原纤维沉积的情况,每张切片在同一光照强度下,随机选取 5 个视野并在相同条件下拍照,应用 Image pro plus 7.0 图像分析软件对组织切片进行图像分析。

1.9 组织蛋白提取 剪取一小块心室肌组织(50 g),放入研钵内,冰上研磨,加入 RIPA 裂解液(500 μL)裂解 20 min,收集裂解液,4℃,12 500 r/min,离心 20 min,取上清液。-80℃保存备用。

1.10 Western blot 法检测 PDCD4 的表达 配胶,每孔加样品 5 μL,经电泳,转膜后,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,PDCD4 (1:5 000)一抗 4℃孵育过夜后,TBST 洗 3 次,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,曝光。

2 结果

2.1 两组大鼠一般情况及体质量的测定 随机分组后,每周记录大鼠体质量,可见 3%蛋氨酸饲料喂养组大鼠约 1 个月后出现体质量增长缓慢。并且,实验组大鼠出现萎靡不振,毛发无光泽,进食减少表现,个别出现体质量不增长或负增长(图 1)。

2.2 血浆 HCY 与 NT-proBNP 结果 3%蛋氨酸喂

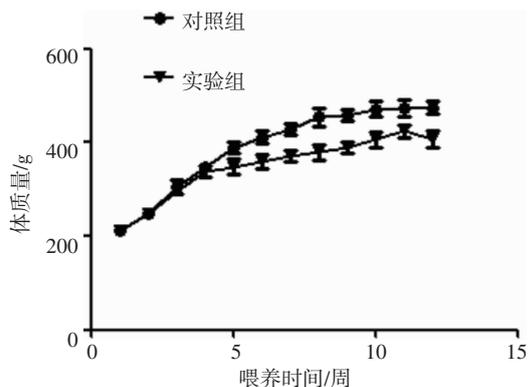


图 1 时间-体重增长曲线
Fig 1 Time-weight growth curve

养组大鼠血浆 HCY 浓度明显高于对照组大鼠 [(5.62±0.44) μmol/L vs. (13.25±0.57) μmol/L], 两组比较差异有统计学意义 (P<0.05), 图 2 为标准曲线。

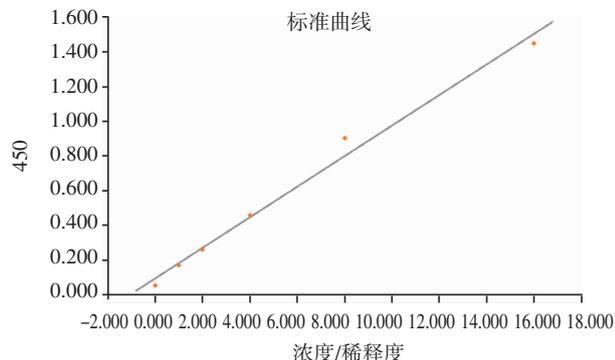
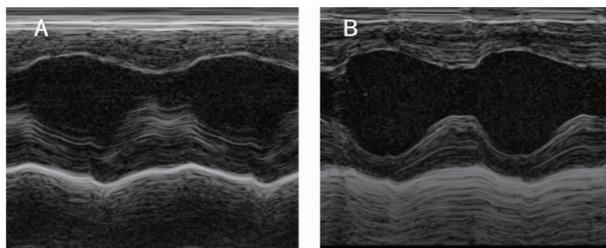


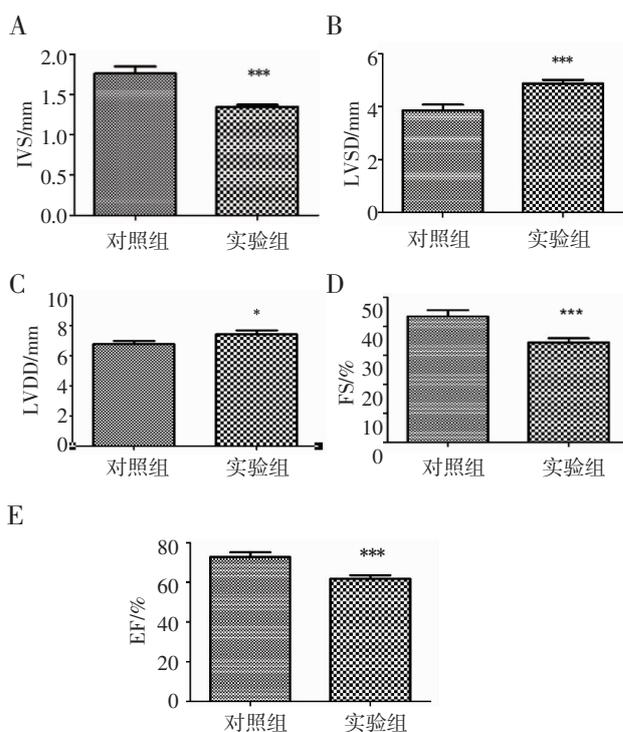
图 2 HCY 测量标准曲线
Fig 2 Standard curve of HCY

2.3 心脏超声 经过统计后发现实验组大鼠的射血分数, 缩短分数, 室间隔厚度减低, 左室收缩末径及左室舒张末径增加。左室收缩期末内径 [(3.86±0.64) vs. (4.88±0.41), P<0.05], 舒张期末内径增高 [(6.79±0.50) vs. (7.45±0.62), P<0.05], 射血分数 [(72.76±7.30) vs. (61.68±5.72), P<0.05], 缩短分数 [(43.40±6.60) vs. (34.45±4.32), P<0.05], 室间隔厚度降低 [(1.76±0.26) vs. (1.35±0.07), P<0.05], 图 3、4。



注:A.对照组;B.实验组

图 3 M 型超声心动图
Fig 3 Representative M-mode echocardiography image of the ventricle



注:IVS:室间隔;LVSD:左室收缩;LVDD:左室舒张内;FS%:缩短分数;EF%:射血分数;与对照组相比 *P<0.05;***P<0.01

图 4 心脏超声指标结果比较

Fig 4 Comparison of echocardiographic index between two groups

2.4 血流动力学结果 血流动力学指标显示,3% 蛋氨酸组大鼠 SBP 和 DBP 较对照组降低 (P<0.05) LVSP/LVDP、HR 等在两组中无差异,见表 1。

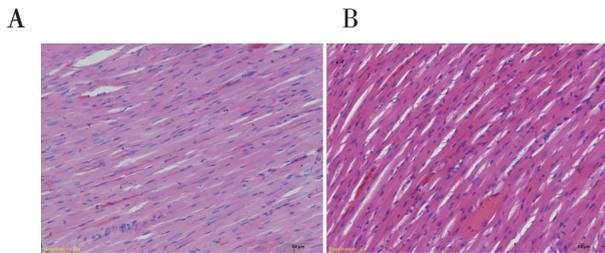
表 1 两组大鼠血流动力学对比

Tab 1 Comparison of hemodynamic parameters between two groups

项目	对照组(n=15)	实验组(n=15)	P
HR/(bpm)	347.2±26.1	350.2±27.5	0.818
SBP/(mmHg)	150.6±13.3	131.6±12.9	<0.05
DBP/(mmHg)	117.7±9.5	107.7±9.0	<0.05
LVSP/(mmHg)	151.7±16.1	137.7±17.1	0.104
LVDP/(mmHg)	11.7±7.7	10.1±6.9	0.663

注:HR:心率;SBP:收缩压;DBP:舒张压;LVSP:左室收缩末内压;LVDP:左室舒张末内压

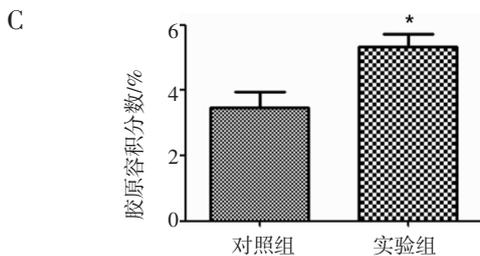
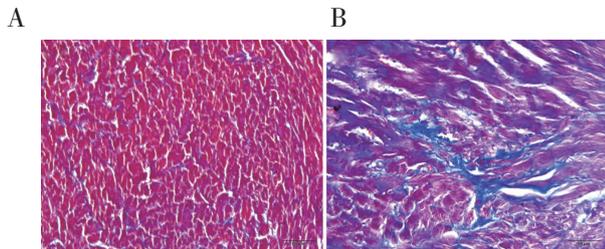
2.5 病理 各组分别喂养 12 周后,取大鼠心室肌组织进行固定,切片,HE 染色光镜下可见,对照组大鼠心肌细胞排列有序、胞浆均匀,心肌间隙小;实验组大鼠心肌组织排列紊乱,大小不均,组织间隙增大(图 5)。Masson 染色显微镜下观察到,与对照组相比,实验组大鼠心肌间质纤维化明显,纤维组织增生显著,可见大量被染成蓝色的胶原纤维呈条索状广泛分布。计算两组大鼠心室组织胶原容积分数,结果显示实验组大鼠心肌组织胶原分数较对照组升高,有统计学意义(图 6)。



注:A.对照组 B.实验组

图 5 心肌组织 HE 染色(20×)

Fig 5 HE staining of ventricular tissues(20×)



注:A.对照组;B.实验组;C.两组胶原容积分数比较;与对照组相比

* $P < 0.05$

图 6 心肌 Masson 染色(20×)

Fig 6 Masson staining of ventricular tissues(20×)

2.6 蛋白定量实验 Western 印迹实验显示, 蛋氨酸喂养大鼠 PDCD4 表达上调, 见图 7。

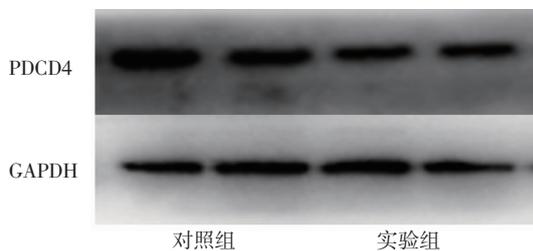


图 7 PDCD4 蛋白表达量

Fig 7 Expression of protein PDCD4

3 讨论

心力衰竭即心脏难以泵出足够的血液以满足机体对血液和氧气的需求而导致机体出现相关症状与体征的复杂的临床综合征。为多种心血管疾病的终末阶段,其发病率高,有临床症状患者的 5 年存活率与恶性肿瘤相仿。近期心力衰竭的发病率持续增长,正在成为 21 世纪最重要的心血管病症^[7]。据统计,人群中心力衰竭的患病率约为 1.5%~2.0%,65 岁以上可达 6%~10%;在过去的 40 年中,心力衰竭导致的死亡增加了 6 倍^[7]。冠心病、心肌梗死、心律

失常、心肌病、心瓣膜病以及代谢性疾病等都可导致心力衰竭的发生。心肌细胞死亡影响心室的收缩功能,纤维化程度的增加导致心室舒张功能的下降,心功能受损、心腔扩大进而导致心室重构,最终发展为心力衰竭。

为了寻求心力衰竭的治疗,以往的研究构建了多种动物模型,多以增高心脏前后负荷,或通过缺血性心肌病,心脏快速起搏,或直接损伤心肌的药物如蒽类抗癌药物来模拟心力衰竭^[8-10]。尚无成熟的代谢性疾病导致心力衰竭的动物模型建立,HCY 是多种心血管疾病的危险因素^[4,11-12]。随着生活水平的提高,蛋白质摄入增多,中国人群的血 HCY 水平较高^[13],高 HCY 血症的总体患病率高达 27.5%,而中国人群中不仅叶酸缺乏比例增高,MTHFR 基因突变比例较高,单纯补充叶酸水平可能难以降低血 HCY 水平^[14-15]。故模拟高 HCY 导致心力衰竭模型,研究其对心室重塑的作用机制,寻求心力衰竭的新的治疗手段,十分有必要。有研究表明高 HCY 血症可致大鼠心力衰竭^[16]。且有实验应用蛋氨酸喂养大鼠构建高 HCY 血症模型^[17-20],但应用蛋氨酸喂养构建大鼠心力衰竭模型尚未得到广泛验证与认可。笔者通过喂养 3%蛋氨酸饲料构建心力衰竭模型,证实蛋氨酸喂养组血浆 HCY 浓度明显高于对照组 $[(5.62 \pm 0.44) \mu\text{mol/L} \text{ vs } (13.25 \pm 0.57) \mu\text{mol/L}, P < 0.05]$,与 Liu 等^[16]实验中的 HCY 测量值有差异(HCY $> 20 \mu\text{mol/L}$),可能与喂养时间、采血时间不同有关。大鼠的超声心动图结果趋势与 Liu 实验中大鼠心功能改变的趋势相似,两组间差别存在统计学意义,故可以认为高蛋白蛋氨酸喂养大鼠心肌重塑模型成功,之后笔者通过 HE 染色和 Masson 染色证实了 HCY 对大鼠心肌的病理损害,可见实验组大鼠心肌细胞排列紊乱,细胞肥大,组织疏松,心室肌纤维化明显。经过蛋白定量实验证实蛋氨酸饲料喂养组大鼠的心室肌 PDCD4 蛋白表达下调,表明蛋氨酸饲料喂养大鼠导致的高 HCY 血症对心肌细胞的直接损伤可能是通过下调 PDCD4 所致。

总之,笔者发现蛋氨酸在体内转化为 HCY 后可直接作用于心肌,损伤心功能,其机制可能与下调 PDCD4 通路有关,调控 PDCD4 通路表达,可能成为心力衰竭治疗的新方向。

参考文献:

- [1] Abdel-Aty H, Zagrosek A, Schulz-Menger J, et al. Delayed enhancement and T2-weighted cardiovascular magnetic resonance imaging differentiate acute from chronic myocardial infarction [J]. Circulation, 2004, 109(20):2411

- [2] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会, 等. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心力衰竭和心肌病杂志:中英文, 2018, 2(4):196
- [3] Kumar A, Palfrey H A, Pathak R, et al. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health[J]. *NutrMetab (Lond)*, 2017, 14:78
- [4] 徐西子, 董昭杰, 马向红. 血同型半胱氨酸水平与冠心病慢性心衰严重程度的相关性分析[J]. 天津医科大学学报, 2017, 23(3):221
- [5] 马向红, 黄体钢, 周丽娟, 等. 同型半胱氨酸对大鼠主动脉内皮细胞分泌一氧化氮、血管紧张素 II、内皮素的影响[J]. 中国心血管杂志, 1998, 3(5):344
- [6] Kunkel G H, Chaturvedi P, Tyagi S C. Resuscitation of a dead cardiomyocyte[J]. *Heart Fail Rev*, 2015, 20(6):709
- [7] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性心力衰竭诊断治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(12):1076
- [8] Khadka D, Kim H J, Oh G S, et al. Augmentation of NAD (+) levels by enzymatic action of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 attenuates adriamycin-induced cardiac dysfunction in mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 124(124):45
- [9] Houser S R, Margulies K B, Murphy A M, et al. Animal models of heart failure a scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circ Res*, 2012, 111(1):131
- [10] Valero-Munoz M, Backman W, Sam F. Murine models of heart failure with preserved ejection fraction: a fishing expedition [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2017, 2(6):770
- [11] Xiao Y, Su X, Huang W, et al. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 67:158
- [12] Wang C, Han L, Wu Q, et al. Association between homocysteine and incidence of ischemic stroke in subjects with essential hypertension: a matched case-control study [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2015, 37(7):557
- [13] Yang B, Fan S, Zhi X, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Nutrients*, 2015, 7(1):74
- [14] 张国领, 张林, 刘桂萍. 高同型半胱氨酸血症的临床研究进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(20):29
- [15] Wang J, Ouyang N, Qu L, et al. Effect of MTHFR A1298C and MTRR A66G genetic mutations on homocysteine levels in the Chinese population: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Transl Int Med*, 2017, 5(4):220
- [16] Liu B, Ma S T, Wang T, et al. A novel rat model of heart failure induced by high methionine diet showing evidence of association between hyperhomocysteinemia and activation of NF-kappaB [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(1):117
- [17] 王成艳, 赵东岳, 胡兴亚. 口服蛋氨酸造成的大鼠肾间质纤维化模型及其机制研究 [J]. 海峡科学, 2015(11):28
- [18] 任晓丽, 杨波, 黄陈平, 等. 高蛋氨酸饮食对大鼠血管内皮细胞分泌功能的影响 [J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(4):50
- [19] 孟斌, 高蔚娜, 杨继军, 等. 高蛋氨酸饲料喂养的大鼠高同型半胱氨酸血症模型的实验研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(2):53
- [20] Korai M, Kitazato K T, Tada Y, et al. Hyperhomocysteinemia induced by excessive methionine intake promotes rupture of cerebral aneurysms in ovariectomized rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):165

(2019-10-14 收稿)

(上接第 212 页)

- suscitation, 2018, 133:88
- [8] Ave A, Shaw D M, Bernat J L. Ethical issues in the use of extracorporeal membrane oxygenation in controlled donation after circulatory determination of death [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(8):2293
- [9] Carter T I, Bodzin A S, Hirose H, et al. Outcome of organs procured from donors on extracorporeal membrane oxygenation support: an analysis of kidney and liver allograft data [J]. *Clin Transplant*, 2014, 28(7):816
- [10] 中华医学会器官移植学分会, 中国医师协会器官移植医师分会. 体外膜肺氧合在中国公民逝世后捐献供器官保护中的应用专家共识(2016 版) [J]. 中华移植杂志:电子版, 2016, 10(3):107
- [11] Fondevila C, Hessheimer A J, Flores E, et al. Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(1):162
- [12] Kalder J, Ajah D, Keschenau P, et al. Microcirculatory perfusion shift in the gut wall layers induced by extracorporeal circulation [J]. *J Vasc Surg*, 2015, 61(2):497
- [13] Andersen K, Kesper M S, Marschner J A, et al. Intestinal dysbiosis, barrier dysfunction, and bacterial translocation account for CKD-related systemic inflammation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(1):76
- [14] Fukudome I, Kobayashi M, Dabanaka K, et al. Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats [J]. *Med Mol Morphol*, 2014, 47(2):100
- [15] He C S, Yang S F, Yu W K, et al. Effects of continuous renal replacement therapy on intestinal mucosal barrier function during extracorporeal membrane oxygenation in a porcine model [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2014, 9:72
- [16] Voth M, Duchene M, Auner B, et al. I-FABP is a novel marker for the detection of intestinal injury in severely injured trauma patients [J]. *World J Surg*, 2017, 41(12):3120
- [17] Meng Y, Zhang Y, Liu M, et al. Evaluating intestinal permeability by measuring plasma endotoxin and diamine oxidase in children with acute lymphoblastic leukemia treated with high-dose methotrexate [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, 16(3):387
- [18] Douhara A, Moriya K, Yoshiji H, et al. Reduction of endotoxin attenuates liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cell activation and remission of intestinal permeability in a rat non-alcoholic steatohepatitis model [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3):1693

(2019-06-14 收稿)