

清肝活血方及其拆方抗酒精性肝损伤大鼠肝细胞内质网应激性凋亡的作用及机制

韩向晖¹ 王见义² 郑培永¹ 张亚利¹ 尤圣富¹ 季光¹

摘要 目的 研究中药复方清肝活血方及其拆方抗酒精性肝损伤大鼠肝细胞内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)性凋亡的作用及机制。**方法** 利用酒精-玉米油-吡唑复合试剂制备大鼠慢性酒精性肝损伤模型。将造模大鼠随机分为模型组、清肝活血方组、清肝方组及活血方组,另设 CCl₄ 对照组和正常对照组,每组 10 只。造模各组大鼠每天上午以酒精复合试剂灌胃,下午各中药组分别给予清肝活血方 9.5 g/(kg·d)、清肝方 3.0 g/(kg·d)、活血方 6.5 g/(kg·d)灌胃,模型组给予等体积生理盐水灌胃;CCl₄ 组每周 1 次腹腔注射 CCl₄ 0.3 mL/kg,正常对照组给予生理盐水灌胃,连续治疗 2 周。组织病理学观察肝脏病理变化;ELISA 法检测血清总同型半胱氨酸(total homocysteine, tHcy)水平;流式细胞术检测肝细胞凋亡率;RT-PCR 和 Westernblot 法检测大鼠肝脏 ERS 凋亡相关因子真核生物翻译起始因子(eukaryotic translation initiation factor 2 alpha, eIF-2 α)、磷酸化 eIF-2 α (p-eIF-2 α)、葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、Caspase-3 基因和蛋白表达。**结果** 与正常对照组比较,模型大鼠出现了典型的慢性酒精性肝损伤病理改变如脂肪变性、炎症甚至纤维化;肝细胞凋亡明显增加,凋亡率达到了正常大鼠的 5 倍以上,且以早期凋亡为主;血清 tHcy 水平显著升高;p-eIF-2 α 、GRP78 及 Caspase-3 蛋白表达明显增高($P < 0.01$);GRP78 及 Caspase-3 mRNA 表达量显著增高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组比较,清肝活血方及拆方组大鼠肝损伤及肝细胞凋亡程度明显减轻,血清 tHcy 水平显著降低,p-eIF-2 α 、GRP78 及 Caspase-3 蛋白表达明显降低($P < 0.01$);清肝活血方组 GRP78 和 Caspase-3 mRNA 表达明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);清肝方组仅 GRP78 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$)。**结论** 清肝活血方及其拆方可能通过降低血清 tHcy 水平及肝脏 ERS 凋亡相关因子的表达抑制酒精性肝损伤动物肝细胞 ERS 性凋亡。

关键词 清肝活血方;拆方;酒精性肝病;内质网应激;细胞凋亡

Attenuation and Mechanism of Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Hepatocyte Apoptosis in Rats with Alcohol-induced Liver Injury by Qinggan Huoxue Recipe and Its Disassembled Formulas HAN Xiang-hui, WANG Jian-yi, ZHENG Pei-yong, et al *Institute of Gastroenterology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032)*

ABSTRACT Objective To explore attenuation and mechanism of endoplasmic reticulum stress (ERS)-mediated hepatocyte apoptosis in rats with alcohol-induced liver injury by Qinggan Huoxue Recipe (QGHXR) and its disassembled formulas (Qinggan Recipe and Huoxue Recipe respectively). **Methods** A rat model of chronic alcoholic liver injury was successfully established using a compound reagent of alcohol, corn oil, and pyrazol. The modeled rats were randomly divided into the model group, the QGHXR group, the Qinggan Recipe (QGR) group, and the Huoxue Recipe group (HXR). The CCl₄ control group and the normal control group were also set up. There were ten rats in each group. All rats of modeled groups were gastrogavaged with alcohol compound reagent every morning. Rats in the QGHXR group (at the daily dose of 9.5 g/kg, QGR group (at the daily dose of 3.0 g/kg), and HXR group (at the daily dose of 6.5 g/kg) were administered with corresponding medicines by gastrogavage every afternoon. Equal volume of normal saline was given to rats of the model group by gastrogav-

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCE107-0563);上海市教委重点学科(No. J50305-E3008);上海市教委青年基金(No. 07CZ08)

作者单位:1. 上海中医药大学龙华医院中药药理实验室,上海中医药大学脾胃病研究所(上海 200032);2. 上海中医药大学附属曙光医院肝病科(上海 200021)

通讯作者:季光, Tel: 021-64286261, E-mail: jiliver@vip.sina.com

age. CCl_4 was intraperitoneally injected at the dose of 0.3 mL/kg to rats in the CCl_4 control group, once per week. Normal saline was given to rats in the normal control group by gastrogavage. The treatment was lasted for two weeks. Pathological changes of the liver were observed by histopathology. Serum total homocysteine (tH-CY) level was detected by ELISA. The hepatocyte apoptosis rate was detected using flow cytometry. The gene and protein expressions of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF-2 α), phosphorylation eIF-2 α (p-eIF-2 α), glucose-regulated protein 78 (GRP78), and Caspase-3 in the liver were examined using Real-time PCR and Western blot respectively. **Results** Compared with the normal control group, typical pathological changes of chronic alcoholic liver injury such as steatosis, inflammation, and even fibrosis occurred in model rats. The hepatocyte apoptosis obviously increased, with the apoptosis rate reaching the five-fold of that in normal rats. Besides, early apoptosis dominated. The serum tH-CY level significantly increased. The expressions of p-eIF-2 α , GRP78, and Caspase-3 protein obviously increased ($P < 0.01$). Expressions of GRP78 and Caspase-3 mRNA significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the degrees of the liver injury and the hepatocyte apoptosis in the QGHXR group, the QGR group, and the HXR group were significantly alleviated. The serum tH-CY level was significantly lowered. The protein expressions of p-eIF-2 α , GRP78, and Caspase-3 obviously decreased ($P < 0.01$). mRNA expressions of GRP78 and Caspase-3 obviously decreased in the QGHXR group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Only GRP78 mRNA expression obviously decreased in the QGR group ($P < 0.05$). **Conclusion** QGHXR and its disassembled formulas could attenuate ERS-mediated hepatocyte apoptosis in alcohol-induced liver injury rats by lowering the serum tH-CY level and expressions of ERS apoptosis correlated factors.

KEYWORDS Qinggan Huoxue Recipe; disassembled formula; alcohol-induced liver disease; endoplasmic reticulum stress; cell apoptosis

随着经济发展和人们生活方式的改变,由于酒精摄入过量导致的酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的发病率迅速增加,已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病^[1]。酗酒患者常伴有高半胱氨酸血症,同型半胱氨酸作为应激原,能引起过度内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),从而导致肝细胞凋亡。ERS时发生的非折叠蛋白反应与真核生物翻译起始因子(eukaryotic translation initiation factor 2 alpha, eIF-2 α)的磷酸化及内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)、Caspase-3、12等ERS标志物的活化密切相关。前期研究发现,临床上对ALD具有良好的综合治疗效果的中药复方——清肝活血方能显著降低酒精性肝纤维化模型动物的肝细胞凋亡指数,表现出较强的抗肝细胞凋亡作用^[2]。本研究通过进一步观察清肝活血方及其拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠ERS凋亡相关信号分子eIF-2 α 、磷酸化eIF-2 α (p-eIF-2 α)、GRP78、Caspase-3蛋白和基因表达的影响,以期揭示该方抗肝细胞凋亡的机制,为中医药防治ALD提供可行的方法和新的理论依据。

材料与方

1 动物 健康SD大鼠68只,SPF级,10周龄,

体质量(280±20)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,饲养于上海中医药大学附属龙华医院科研中心,动物许可证号:SCXK(沪)2003-0003号。

2 药物 清肝活血方(柴胡9g 黄芩9g 丹参15g 鳖甲9g 葛根15g)、清肝方(柴胡9g 黄芩9g)及活血方(丹参15g 鳖甲9g 葛根15g)配方颗粒由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备,临用前生理盐水配制成相应浓度的溶液。酒精-玉米油-吡啶复合试剂:由北京红星牌二锅头56度白酒、玉米油、吡啶(Sigma公司)以5:1:10的比例充分混合后制成。 CCl_4 橄榄油溶液:将50 mL CCl_4 (国药集团化学试剂有限公司)溶于150 mL 橄榄油中配制而成。

3 试剂与仪器 Annexin-FITC 凋亡检测试剂盒(美国BD公司),TRizol/Easy-DNATM 试剂盒(Introgen公司),逆转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI公司),兔抗大鼠GRP78/Bip、GRP94和Caspase-12多克隆抗体(英国Abcam公司),其余试剂均为分析纯。ABI7300型Real-Time PCR仪(美国Gene公司),快速筛选型电泳系统和GEL DOC 2000凝胶成像分析系统(美国伯乐公司)。

4 方法

4.1 分组、造模与给药 大鼠慢性酒精性肝损伤模型在课题组原有造模方法的基础上建立^[3],即每天

上午 9:00 时灌胃酒精 - 玉米油 - 吡啶复合试剂 15 mL/kg 1 次,同时每周腹腔注射 CCl₄ 橄榄油溶液 0.3 mL/kg 1 次,连续 10 周。处死 8 只动物,取肝脏组织石蜡包埋、切片,行常规 HE 染色,根据文献[4]对肝组织病变程度进行评分,结果显示造模 10 周的动物肝脏脂肪变性和炎症均达到重度 and 9 分以上,表明造模成功,出现了明显的慢性酒精性肝损伤症状。第 11 周起将造模大鼠按体质量和状态均衡随机分为模型组、清肝活血方组、清肝方组、活血方组;另设 CCl₄ 对照组和正常对照组,每组 10 只。造模各组每天上午 9:00 时仍以酒精复合试剂灌胃 1 次及每周腹腔注射 CCl₄ 1 次,下午 14:00 时中药各组分别给予清肝活血方 9.5 g/(kg·d)、清肝方 3 g/(kg·d)、活血方 6.5 g/(kg·d) 灌胃,模型组给予等体积的生理盐水灌胃; CCl₄ 组每周 1 次腹腔注射 CCl₄ 0.3 mL/kg,正常对照组仅给予等体积生理盐水灌胃,连续 2 周,末次给药后 1 h 称体质量,腹主动脉采血,2 000 r/min 离心 2 min,分离血清。分离肝脏,分成 3 份:第 1 份新鲜肝组织立即处理成肝细胞悬液,进行流式分析;第 2 份于 10% 中性甲醛溶液固定,用于病理学检查;第 3 份于 -80 °C 冻存,用于蛋白和基因水平检测。

4.2 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测肝细胞凋亡率 每组取 7 只大鼠新鲜肝组织,剪碎后置于 100 目铜网上轻搓,边搓边以生理盐水冲洗,2 500 r/min 离心 5 min,弃去上清及细胞碎片,收集细胞悬液;冷 PBS 液洗涤 2 遍,用结合缓冲液调整细胞浓度至 1 × 10⁹ cell/L;加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL;漩涡混匀,避光室温孵育 15 min 后立即用流式细胞仪进行检测,Cell Quest 软件分析。

4.3 ELISA 法检测血清总同型半胱氨酸 (total homocysteine, tHCY) 水平 按照大鼠同型半胱氨酸试剂盒操作说明进行。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μL,余孔分别加标准品或待测样品 100 μL,充分混匀,37 °C 温育 120 min。用洗涤液将反应板充分洗涤 4 ~ 6 次。每孔加一抗 100 μL,充分混匀,37 °C 温育 60 min。洗板,每孔加底物溶液 100 μL,37 °C 避光反应 15 min。当标准孔的前 3 ~ 4 孔有明显的梯度蓝色,加终止液 100 μL,终止反应,30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光值。以标准品不同稀释浓度为横坐标,光学密度值 (optical density, OD) 为纵坐标作标准曲线图,根据样品 OD 值查出相应 tHCY 含量。

4.4 Real-time PCR 检测肝组织 GRP78 和 Caspase-3 mRNA 表达 每组取 6 只大鼠肝组织进行定量 PCR 实

验。100 mg 肝组织液氮粉碎,Trizol 法抽提总 RNA,分光光度计测 RNA 浓度, -70 °C 冻存。用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 对总 mRNA 进行逆转录,合成 cDNA,逆转录条件为 42 °C, 60 min; 70 °C, 10 min。取 0.5 μL 的 cDNA 于 25 μL 反应体系中进行 PCR 扩增,所用引物序列根据 GeneBank 公布的相关数据设计,由上海英骏生物工程公司合成,引物序列和长度见表 1。扩增条件为 95 °C 30 s, 62 °C 45 s, 72 °C 45 s, 40 个循环。ABI Prism 7300 SDS Software 进行 PCR 结果分析,通过 Comparative Delta-delta Ct 法对获得的 Ct 值进行处理。

表 1 引物序列及扩增长度

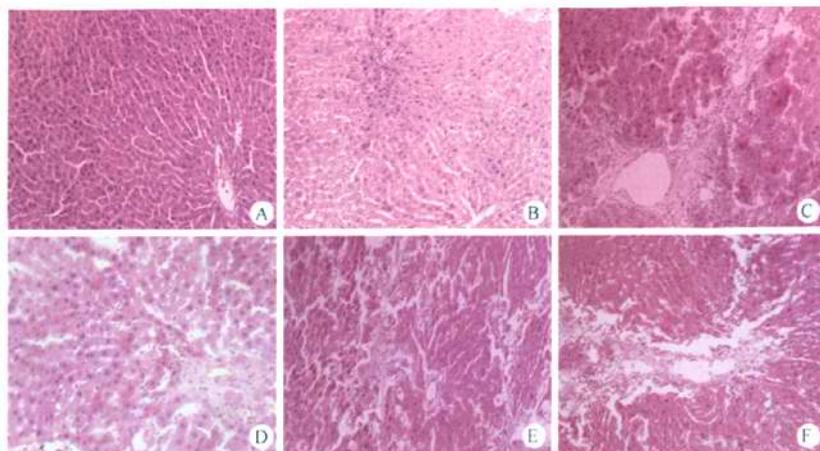
基因	引物序列(5' - 3')	产物长度 (bp)
GRP78/Bip	上游引物: ATCAGCGCAACCCGATCAGACC	312
	下游引物: ACGCCTCGGCAGTTTCCTTCATTT	
Caspase-3	上游引物: AGTCTGACTGGAAGCCGAA	342
	下游引物: CGGGATCTGTTCCTTTCAT	
GAPDH	上游引物: GTTACCAGGCGCTGCTCTCTTC	245
	下游引物: CCTTGACTGCCCCGTGAAGCTTG	

4.5 Western blot 检测肝组织 eIF-2α、p-eIF-2α、GRP78、Caspase-3 蛋白表达 每组挑选 3 只大鼠肝组织进行 Western-blot 实验。100 mg 肝组织液氮粉碎,先加入 RIPA 缓冲液 (3 mL/g),在 4 °C 条件下匀浆 (15 000 r/min, 1 min); 然后加入 PMSF 储存液 (30 μL/g, 10 g/L PMSF),冰浴 30 min,离心 (15 000 r/min, 15 min); 分离细胞裂解液 (上清液),提取蛋白质, -70 °C 冰箱保存备用。Lowery 比色法测定蛋白含量。取样品 50 μg,加入等量的细胞裂解液及等体积的 2 × 电泳加样缓冲液,沸水浴中 3 min,上样,SDS-PAGE 电泳 (浓缩胶 20 mA,分离胶 35 mA),电转膜仪转膜 (100 mA, 40 min); 转膜完毕后加入 Western 封闭液,封闭 2 h,分别加入 GRP78、Caspase-3 多克隆抗体 (一抗),4 °C 过夜; Western 洗涤液洗膜 15 min,共 3 次;加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗,4 °C 反应 1 h。化学发光法试剂作用后,X 胶片曝光,经显影、定影处理后观察结果。凝胶成像及分析系统扫描图像,进行灰度分析,以目的条带/β-actin 条带灰度比值表示各样本表达强度。

4.6 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件进行数据处理及分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数的两两比较采用 One-Way ANOVA 分析 (方差齐, LSD 法; 方差不齐, Games-Howell 法), P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组肝组织病理学变化比较 (图 1) 大体观察,正常大鼠肝脏被膜光滑,呈红褐色,质地柔软; 镜



注:A:正常对照组;B:CCl₄ 对照组;C:模型组;D:清肝活血方组;E:清肝方组;F:活血方组;下

图同

图 1 各组肝组织病理学变化比较 (HE 染色, ×200)

下表现为肝小叶结构清晰,肝细胞索以中央静脉为中心呈放射性排列,肝窦正常;CCl₄ 对照组的肝脏基本同正常大鼠,无明显的病理改变;12 周造模大鼠肝脏表面粗糙,体积明显增大,呈土黄色,质地较脆,表面布有白色脂肪斑点;镜下观察可见,肝索界限不清,肝细胞出现不同程度的空泡变性及明显的脂肪变性;肝小叶可见不同程度的点状或灶状坏死,坏死区及肝窦内可见大量炎症细胞浸润,个别坏死区可见纤维细胞增生;经 2 周的药物治疗后,中药组大多数动物肝脏颜色、质地明显改善,肝细胞脂肪变和炎症程度明显轻于模型组,以轻度至中度脂肪变为主,肝细胞形态大致正常。

2 各组血清 tHCY 水平比较(表 2) 与正常对照组比较,12 周时模型组大鼠的血清 tHCY 水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,CCl₄ 对照组及中药各组血清 tHCY 水平明显降低($P < 0.01$),接近正常对照组水平。各中药组间血清 tHCY 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组肝细胞凋亡率比较(表 3) 早期凋亡细

表 2 各组血清 tHCY 水平比较 ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 tHCY
正常对照	10	16.59 ± 2.13
CCl ₄ 对照	10	17.32 ± 2.11 [△]
模型	10	24.30 ± 3.53 [*]
清肝活血方	10	16.77 ± 3.59 [△]
清肝方	10	17.78 ± 2.22 [△]
活血方	10	16.71 ± 4.34 [△]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

胞百分数(位于流式细胞分析图右下区)和晚期凋亡细胞百分数(位于流式细胞分析图右上区)之和为总凋亡率。正常对照组和 CCl₄ 对照组大鼠有少量肝细胞发生凋亡,主要以早期凋亡为主。12 周时模型组肝细胞凋亡率明显升高,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);中药各组大鼠肝细胞早期凋亡率和总凋亡率较模型组显著降低($P < 0.01$)。与活血方组比较,清肝活血方及清肝方组肝细胞总凋亡率明显降低($P < 0.01$)。

表 3 各组肝细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	早期凋亡率	总凋亡率
正常对照	7	4.97 ± 1.04	5.62 ± 1.31
CCl ₄ 对照	7	5.07 ± 1.14	6.25 ± 1.23
模型	7	25.26 ± 11.60 [*]	29.76 ± 12.36 [*]
清肝活血方	7	5.18 ± 2.24 [△]	6.44 ± 3.29 ^{△▲}
清肝方	9	6.91 ± 4.29 [△]	8.55 ± 4.42 ^{△▲}
活血方	7	6.12 ± 4.21 [△]	8.72 ± 6.05 [△]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与活血方组比较,[▲] $P < 0.01$

4 各组肝组织 GRP78 和 Caspase-3 mRNA 表达比较(图 2) 以 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 值作为 mRNA 相对表达量。正常对照组大鼠肝组织 GRP78 和 Caspase-3 mRNA 表达量分别为(0.475 ± 0.110)、(0.440 ± 0.200)。与正常对照组比较,12 周时模型组 GRP78 和 Caspase-3 mRNA 表达量显著增高,分别为正常对照组 4.89 倍和 4.05 倍,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$);CCl₄ 对照组 GRP78 和 Caspase-3 mRNA 表达量与正常对照组相近;清肝活血方组 GRP78 和 Caspase-3 mRNA 表达较正常对照组有一定增高,差异无统计学意义

研究发现 ALD 患者血浆 HCY 水平明显升高,酒精能够减弱蛋氨酸合成酶活性,从而引起含硫氨基酸代谢紊乱导致高半胱氨酸血症^[6]。在酒精饲养的动物模型中,HCY 的增加同时与 ERS 应答基因 (GRP-78、GRP-94、CHOP、SREBPs) 以及凋亡因子 (CRADD、Caspase-12、Caspase-7、ATM、BAD) 的表达上调有关^[7]。ERS 发生时,非折叠蛋白反应使 eIF-2 α 发生磷酸化,p-eIF-2 α 能激活一种转录因子,诱导 GRP78、GRP94 等内质网分子伴侣蛋白表达增加,启动凋亡程序^[8]。GRP78 是内质网腔中含量最丰富的分子伴侣,也是目前公认的 ERS 标志物。应激发生时,内质网内未折叠蛋白增多,非折叠蛋白与 GRP78 的竞争性结合,是激活 PERK 引起 eIF-2 α 磷酸化的前提^[9,10]。Caspase-3 是肝细胞 ERS 凋亡的关键执行分子。当一个包括 Caspase-12,9,3 的特异性级联反应被触发后,活化的 Caspase-3 能通过切割多聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 和多种其他细胞内的底物,导致细胞凋亡^[11]。

本研究通过给予 12 周的酒精复合试剂后,模型大鼠出现了典型的慢性酒精性肝损伤病理改变如脂肪变、炎症甚至纤维化;肝细胞凋亡明显增加,凋亡率达到了正常大鼠的 5 倍以上,且以早期凋亡为主;血清 tHCY 显著高于正常水平;肝脏 eIF-2 α 蛋白磷酸化增多,同时 GRP78、Caspase-3 表达明显增高。CCl₄ 对照组大鼠的上述指标与正常大鼠无明显差异,表明腹腔注射小剂量 CCl₄ 并不会造成肝损伤病变及增加肝细胞凋亡程度,而对酒精复合试剂造模起到一定的辅助作用。而经过 2 周的中药治疗后,大鼠肝损伤及肝细胞凋亡程度明显减轻;血清 tHCY 水平显著降低;同时肝脏 eIF-2 α 蛋白磷酸化减少,GRP78、Caspase-3 的表达明显降低。

综上,酒精性肝损伤模型大鼠发生了明显的 ERS 反应性肝细胞凋亡,而中药复方清肝活血方及其拆方对其有明显的抑制作用,其机制可能通过降低血清 tHCY 水平,抑制 eIF-2 α 蛋白磷酸化及下调 ERS 凋亡相关因子 GRP78、Caspase-3 的表达来实现的。另外,各中药组间比较表明,全方和清肝方在改善酒精性肝损伤大鼠肝细胞总凋亡率及调节 ERS 凋亡基因和蛋白水平方面均优于活血方。提示君药柴胡和黄芩可能是抗 ERS 反应性肝细胞凋亡的主要药物,而调控 ERS 凋亡信号转导通路可能是“清肝法”治则的机制之一,为进一步研究防治 ALD 中药的组方配伍提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] 鞠辉,魏良洲. 酒精性肝病的流行病学现状[J]. 肝脏,

2006,11(1):57-58.

Ju H, Wei LZ. Current status of alcoholic liver disease epidemiology [J]. Chin J Hepatol, 2006, 11(1): 57-58.

[2] 季光,王磊,柳涛,等. 酒精性肝纤维化大鼠肝星状细胞及肝细胞凋亡和清肝活血方调控机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007,27(5): 427-425.

Ji G, Wang L, Liu T, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells and hepatocytes and regulatory effects of Qinggan Huoxue Recipe on it in alcoholic liver fibrosis rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2007, 27(5): 427-425.

[3] 王磊,季光,郑培永,等. 大鼠酒精性肝纤维化复合模型的建立[J]. 中西医结合学报, 2006,4(3):281-284.

Wang L, Ji G, Zheng PY, et al. Establishment of a rat model of alcoholic liver fibrosis induced by complex factors [J]. J Chin Integr Med, 2006, 4(3): 281-284.

[4] 王泰龄. 酒精性肝病的病理诊断标准分级、分期与分类[J]. 中华肝病杂志, 2001,9(5):312-313.

Wang TL. The grading, staging, and classification of the pathological diagnostic criteria of alcoholic liver disease [J]. Chin J Hepatol, 2001, 9(5): 312-313.

[5] 季光,王育群,曹承楼,等. 清肝活血方治疗酒精性肝病的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004,24(1):13-17.

Ji G, Wang YQ, Cao CL, et al. Clinical study on treatment of alcoholic liver disease by Qinggan Huoxue Recipe [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2004,24(1): 13-17.

[6] Blasco C, Caballeria J, Deulofeu R, et al. Prevalence and mechanisms of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholics [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2005, 29(6): 1044-1048.

[7] Purohit V, Abdelmalek MF, Barve S, et al. Role of S-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 86(1): 14-24.

[8] Gomez E, Powell ML, Bevington A, et al. A decrease in cellular energy status stimulates perk-dependent eIF2alpha phosphorylation and regulates protein synthesis in pancreatic beta-cells [J]. Biochem J, 2008, 410(3): 485-493.

[9] Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(3): 374-384.

[10] Li TK, Hsu JL, Lin CJ, et al. Genistein induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas via interaction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial insult [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(6): 782-792.

[11] Nagy G, Kardon T, Wunderlich L, et al. Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver [J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 459(2): 273-279.

(收稿:2010-04-28 修回:2011-01-18)