

Jagged/Notch 信号通路 在铜负荷大鼠肝纤维化发生过程中的作用*

吴 鹏¹ 王亚东¹ 李茂涛² 蒋怀周³

(¹ 安徽中医药大学中西医结合学院; ² 安徽中医药大学针灸推拿学院; ³ 安徽中医药大学中医学学院, 合肥 230012)

摘要 目的 探讨 Jagged/Notch 信号通路在铜负荷大鼠肝纤维化发生发展中的作用。方法 雄性 SD 大鼠 36 只随机分为对照组、模型组, 模型组按造模后不同时间分为 8、12、16、20、24 周 5 个亚组, 每组 6 只。模型组喂饲含 1.5g/kg 硫酸铜的粉状饲料和 0.185% 硫酸铜去离子水, 观察大鼠一般情况, 全自动生化分析仪测定各组大鼠肝组织血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、血清天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、透明质酸 (HA)、层粘蛋白 (LN)、Ⅲ型前胶原 (PCⅢ) 水平; 比色法测定大鼠肝脏羟脯氨酸 (Hyp) 水平; HE、Masson 染色法观察大鼠肝脏病理学改变; 实时荧光定量 PCR 法检测 TGF-β1、Notch1、Notch3、Hes1、Hes5 mRNA 表达情况; Western blot 检测 Jagged1、Notch3、Hes1 蛋白表达情况, 免疫组化方法检测 Hes1、α-SMA 表达情况。结果 与正常组相比, 模型组大鼠肝组织 ALT、AST、HA 水平自造模第 8 周开始升高, PCⅢ、LN、Hyp 水平自第 12 周开始升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肝组织炎症及纤维化程度进行性加重, TGF-β1、Notch3、Hes1 mRNA 及 Jagged1、Notch3、Hes1 蛋白表达显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Hes1 蛋白在模型组纤维化区域大量表达, 与肌成纤维细胞标志蛋白 α-SMA 表达区域高度重合, 两者表达量呈同步增加关系 ($r = 0.952, P < 0.05$)。结论 Jagged1/Notch3/Hes1 信号通路可能参与铜负荷大鼠肝纤维化的发生与发展, 并与肝纤维化的严重程度密切相关。

关键词 Jagged/Notch 信号通路; 铜负荷大鼠; 肝纤维化; 动态表达

中图分类号: R575.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2018)08-229-06

Jagged/Notch signaling pathway contributes to the progress of hepatic fibrosis induced by copper overload in rats

WU Peng¹, WANG Yadong¹, LI Maotao², JIANG Huaizhou³

(¹ College of integrated traditional Chinese and Western Medicine of AHTCM; ² College of acupuncture and massage of AHTCM; ³ College of traditional Chinese medicine of AHTCM, Hefei 230012, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Jagged/Notch signaling pathway contributing to the progress of hepatic fibrosis induced by copper overload in rats. **Methods** Thirty-six male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group (n = 6) and model group (n = 36). The model group was further divided into five subgroups of 8 weeks, 12 weeks, 16 weeks, 20 weeks, and 24 weeks with six rats in each subgroup, according to different time after modeling. The model group was fed with powdered diet containing 1.5g/kg of copper sulfate and deionized water containing 0.185% copper sulfate. General condition of the rats was observed. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), serum aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type of Ⅲ procollagen (PC), and hydroxyproline content in liver tissues were tested dynamically according to different time points mentioned above. Liver pathological changes were observed with HE and Masson staining. Expressions of TGF-β1, Notch3, Hes1, Jagged1/Notch3/Hes1 proteins were detected dynamically with RT-PCR and Western Blot. Immunohistochemistry was used to detect expressions of Hes1 and α-SMA. **Results** The serum levels of ALT, AST, HA and PCⅢ, LN, Hyp

* [基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助(81202691); 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2016A409); 安徽中医药大学自然科学研究重点项目(2017zrzd003)

after 8 and 12 weeks of modeling were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The degree of inflammation and fibrosis increased progressively. The expressions of TGF- β 1, Notch3, Hes1 mRNA and Jagged1, Notch3, Hes1 protein increased ($P < 0.05$). The Hes1 protein was expressed in a large amount in the fibrotic region, which coincided greatly with the α -SMA (myofibroblast marker protein) expression, and the two proteins increased synchronously ($r = 0.952, P < 0.05$). **Conclusion** Jagged1/Notch3/Hes1 signaling pathway is possibly involved in the occurrence and development of liver fibrosis in rats with copper overload, and is closely related to the severity of liver fibrosis.

Keywords: Jagged/notch signaling pathway; Copper overloaded rat; Liver fibrosis

肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration, HLD) 是一种铜代谢障碍性疾病。铜作为氧化物前体促进氧自由基和有害的脂质过氧化产物形成, 刺激肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 的活化增殖, 转化为肌成纤维细胞, 导致肝损伤修复时细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 的合成与降解不平衡, 表现为较早出现中晚期肝纤维化, 且病理学改变较临床症状严重^[1-3]。

Jagged/Notch 信号通路是相邻细胞之间通讯进而调控细胞发育的重要通路, 在决定细胞命运、影响器官形成和形态发生过程中作用重大^[4-5]。目前发现 Jagged/Notch 信号通路在多种致肝纤维化疾病中被激活^[6-7], 但是对于 HLD 引起的肝纤维化, 尚未清楚。本文通过构建铜负荷大鼠肝纤维化模型, 探讨 Jagged/Notch 信号通路相关基因在大鼠肝组织的动态表达及意义, 为更好认识 HLD 肝纤维化发病机制提供基础实验数据。

1 材料

1.1 动物

雄性清洁级 SD 大鼠 36 只, 安徽医科大学实验动物中心提供, 12 ~ 13 周龄, (200 \pm 20) g, 生产许可证号: SCXK(皖)2013-01, 动物实验符合实验动物福利和动物伦理学要求。

1.2 仪器及试剂

OLYMPUS 全自动生化仪 (OLYMPUS 公司); FJ-2003 γ 放射免疫计数器 (华粤企业集团); 石蜡切片机 (Leica 公司); 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司); 全波长酶标仪 (Thermo Fisher 公司); 化学发光检测系统 (Clinx Science Instruments 公司); 图像采集系统 (Leica 公司)。ALT、AST、HA、LN、PC III、Hyp 试剂盒 (建成生物工程研究所); Masson 试剂盒 (索莱宝科技有限公司); 实时荧光定量 PCR 试剂 (Thermo Fish 公司); 一抗 Jagged1、Notch3、Hes1、

α -SMA 抗体 (Abcam 公司); 二抗山羊抗小鼠、山羊抗兔抗体 (康为世纪生物科技有限公司); 即用型 SABC 试剂盒 (博士德公司)。

2 方法

2.1 分组及造模

36 只 SD 大鼠随机分为正常组 (6 只) 和模型组 (30 只), 正常组普通饲料喂养, 模型组喂饲含 1.5g/kg 硫酸铜的粉状饲料和 0.185% 硫酸铜去离子水建立铜负荷大鼠模型^[8-9], 按造模后不同时间分为 8、12、16、20、24 周 5 个亚组, 每组 6 只。各组动物分别于以上观察时间点结束时, 观察大鼠饮食饮水、活动度及精神状况, 称体质量, 10% 水合氯醛 0.4ml/kg 腹腔麻醉, 心脏采血, 3000r/min 离心 10min 收集血清; 取肝脏称质量, 部分组织 4% 中性甲醛固定, 行病理及免疫组化检测, 余组织迅速液氮冻存后, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。

2.2 指标测定

2.2.1 一般情况观察 观察各组大鼠生存状态、肝脏形态, 计算肝脏指数。

2.2.2 血清学指标测定 采用全自动生化分析仪, 按照试剂盒说明书检测各组大鼠肝功能 ALT、AST 含量; 放免法检测血清肝纤维化指标 HA、LN、PC III 含量。

2.2.3 Hyp 含量测定 采用比色法, 按照试剂盒说明书规范操作, 测定各组大鼠肝组织 Hyp 水平。

2.2.4 病理学检查 取各组大鼠肝叶, 4% 中性甲醛固定。HE 染色及 Masson 染色, 光镜下观察各组大鼠肝组织炎症及纤维化程度。

2.2.5 实时荧光定量 PCR 提取各组大鼠肝组织 RNA 后, 由上海生工生物工程有限公司设计并合成引物 (表 1), 依据以下步骤测定各基因 mRNA 的表达。1) cDNA 合成: 反应体系为总 RNA 8 μ l、10 μ M Oligo (dT) 1 μ l、5 \times M-MLV Buffer 4.0 μ l、

10mM dNTP 2.0 μ l、RNasin 1.0 μ l 等,42 $^{\circ}$ C 60min \rightarrow 70 $^{\circ}$ C 5min,反应液即为 cDNA。2)SYBR Green Real-time PCR:反应体系为 cDNA2.0 μ l、2 \times SYBR Green mixture10 μ l、引物 0.4 μ l、2 \times ROX II 0.4 μ l 等,扩增 40 个循环后(95 $^{\circ}$ C,5s;60 $^{\circ}$ C,34s),95 $^{\circ}$ C,15s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C,60s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C,15s。用 RQ 值($2^{-\Delta\Delta Ct}$)表示待测基因 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列

基因名	引物序列	产物长度
β -actin	上游:5'-CCCGCGAGTACAACCTTCTTG-3'	71bp
	下游:5'-GTCATCCATGGCGAACTGGTG-3'	
Tgf- β 1	上游:5'-CTGCTGACCCCCACTGATAC-3'	94bp
	下游:5'-AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3'	
Notch 1	上游:5'-TGCCTGGACAAGATCAACGA-3'	171bp
	下游:5'-GGTCCCCGTGTAACCTTCTG-3'	
Notch3	上游:5'-CACCTGCCCATCAGGATTCA-3'	117bp
	下游:5'-CGACACTCATAGCCGTCAGG-3'	
Hes1	上游:5'-CGACACCGGACAAACCAAAG-3'	148bp
	下游:5'-TGCCGGGAGCTATCTTCTT-3'	
Hes5	上游:5'-GAAAAATCGACTGCGGAAGC-3'	123bp
	下游:5'-AGTTTGGAGTTGGGCTGGTG-3'	

2.2.6 Western blot 检测 肝组织加入蛋白裂解液后取上清,使用 BCA 法进行总蛋白定量,10% SDS-PAGE 电泳,将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上,5% 脱脂奶粉-TBST 缓冲液进行膜封闭处理,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(beta-actin 1:1000, Jagged1 1:300, Notch3 1:400, Hes1 1:400),TBST 洗脱 3 次,加入相应的二抗(山羊抗小鼠 1:10000,山羊抗兔 1:5000),孵育 1h,TBST 浸泡 PVDF 膜,摇床上洗膜后,ECL 发光试剂盒检测目的蛋白。采用 Quan-

tity one 灰度分析软件分析,计算目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值即为目的蛋白相对表达量。

2.2.7 免疫组织化学染色 采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法,经脱蜡,高压修复后,封闭液孵育 25min,滴加一抗(a-SMA 和 Hes1 均为 1:200 稀释),PBS 冲洗后滴加生物素标记的二抗(1:100)及链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,DAB 显色。阳性标本上用 PBS 代替一抗作阴性对照。Image Pro Plus 6.0 图像分析系统测量肝组织平均积分吸光度(A)值[积分吸光/组织面积],用以代表阳性部位蛋白表达水平。

2.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件对数据进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,相关分析采用 Pearson 相关,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察

正常组大鼠毛发光泽,活跃好动,行动敏捷,食欲良好,体重持续增加。模型组大鼠随着时间延长,逐渐出现精神萎靡,毛发光泽度变差,运动缓慢,食欲减退等现象,从造模第 16 周开始出现体重不增加或增加缓慢,甚至负增长。肉眼观察正常组大鼠肝脏呈红褐色,光滑柔软,无颗粒物;模型组大鼠肝脏颜色暗红,质韧,边缘变钝,第 20 周及 24 周大鼠肝脏表面可见粗糙不平,呈沙粒状的颗粒物。与正常组相比,模型组从第 16 周开始肝脏指数增大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠肝脏指数、肝功能及肝纤维化指标($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	肝脏指数 (%)	肝功能指标(U/L)		肝纤维化指标(μ g/L)		
		ALT	AST	HA	LN	PC III
正常组	3.58 \pm 0.22	77.41 \pm 7.35	127.39 \pm 8.41	89.09 \pm 5.21	41.37 \pm 3.58	48.92 \pm 5.03
模型组						
8 周	3.59 \pm 0.15	92.05 \pm 5.59 *	137.64 \pm 2.67 *	100.27 \pm 3.61 *	41.52 \pm 1.73	49.62 \pm 4.05
12 周	3.77 \pm 0.09	105.17 \pm 6.19 *	209.77 \pm 6.90 *	116.51 \pm 13.00 *	52.46 \pm 3.93 *	58.68 \pm 5.59 *
16 周	4.29 \pm 0.32 *	156.94 \pm 6.62 *	322.71 \pm 13.35 *	162.20 \pm 5.57 *	81.09 \pm 5.66 *	83.25 \pm 3.15 *
20 周	5.38 \pm 0.48 *	240.72 \pm 19.66 *	413.55 \pm 8.17 *	188.83 \pm 9.83 *	86.05 \pm 6.00 *	105.61 \pm 9.70 *
24 周	5.54 \pm 0.16 *	302.14 \pm 10.93 *	486.08 \pm 7.08 *	221.45 \pm 13.71 *	89.41 \pm 5.97 *	106.23 \pm 9.43 *

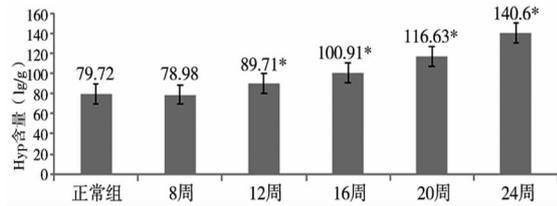
注:与正常组比较, * $P < 0.05$

3.2 大鼠血清学指标水平变化

模型组大鼠 ALT、AST、HA 水平自造模第 8 周开始升高,PC III、LN 自第 12 周开始升高,与正常组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 各组大鼠肝组织 Hyp 水平变化

模型组大鼠自造模第 12 周起 Hyp 含量升高,与正常组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:与正常组比较, * $P < 0.05$

图 1 各组大鼠肝组织 Hyp 含量

3.4 大鼠肝组织病理组织学结果

HE 染色及 Masson 染色结果显示,正常组肝小叶结构完整清晰,细胞条索排列规整。模型组随着铜负荷时间延长,肝组织炎症反应、变性坏死、纤维组织增生呈进行性加重。造模第 8 周表现为肝细胞肿胀、脂肪变性、少量点灶状坏死、炎细胞浸润;第 12 周表现为脂肪变性、坏死加重,可见炎细胞浸润、纤维组织开始增生;第 16 周表现为肝小叶结构紊乱,弥漫性脂肪变性,炎细胞浸润加重,可见轻中度碎片样坏死,纤维条索形成。第 20 周表现为碎片状坏死伴少量桥接坏死,可见大量纤维条索及部分纤维间隔形成。第 24 周表现为碎片状坏死及桥接坏死加重,大量纤维间隔形成,可见部分假小叶。

见图 2、3。

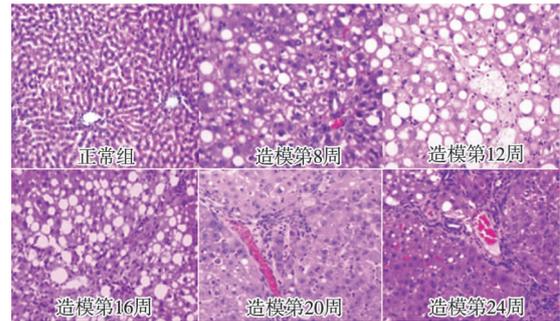


图 2 各组大鼠肝组织病理组织学结果(H-E 染色, ×200)

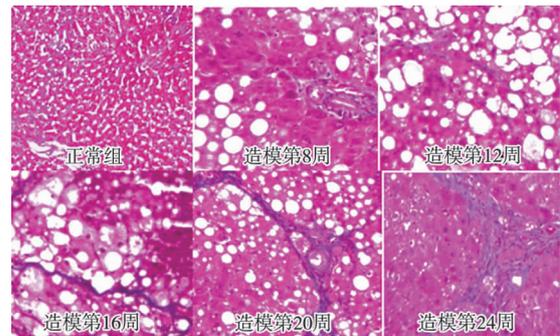


图 3 各组大鼠肝组织病理组织学结果(Masson 染色, ×200)

3.5 大鼠 TGF-β1、Notch1、Notch3、Hes1、Hes5 mRNA 表达情况

模型组自第 12 周开始 Tgf-β1、Notch3、Hes1 mRNA 表达升高,与正常组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。相关分析结果显示 Notch3、Hes1 mRNA 与 Tgf-β1 mRNA 表达水平呈正相关。见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织 Tgf-β1、Notch1、Notch3、Hes1、Hes5 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Tgf-β1	notch1	notch3	Hes1	Hes5
正常组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组					
8 周	1.02 ± 0.10	0.98 ± 0.07	1.01 ± 0.08	0.97 ± 0.06	0.96 ± 0.07
12 周	1.42 ± 0.23*	0.97 ± 0.10	1.29 ± 0.19*	1.28 ± 0.04*	0.97 ± 0.09
16 周	2.38 ± 0.32*	0.99 ± 0.09	2.23 ± 0.38*	1.83 ± 0.10*	0.99 ± 0.07
20 周	2.89 ± 0.42*	0.96 ± 0.11	3.16 ± 0.15*	2.00 ± 0.10*	0.98 ± 0.07
24 周	3.12 ± 0.53*	1.12 ± 0.16*	3.30 ± 0.38*	2.64 ± 0.24*	0.98 ± 0.09

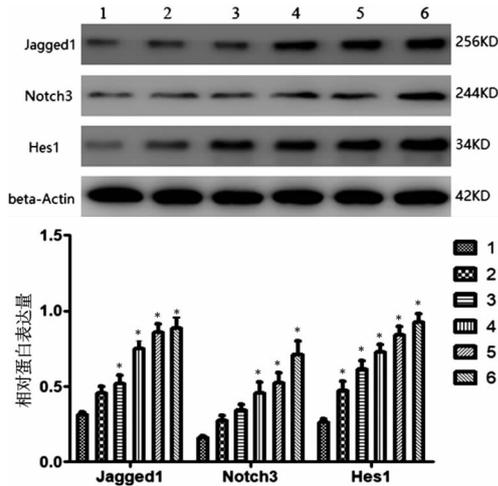
注:与正常组比较, * $P < 0.05$; Notch3、Hes1 mRNA 与 Tgf-β1 mRNA 水平相关性($r = 0.944, 0.941, P < 0.05$)

3.6 大鼠肝组织 Jagged1、Notch3、Hes1 蛋白表达情况

蛋白印迹结果显示,模型组大鼠随着铜负荷时

间延长,肝组织 Jagged1、Notch3、Hes1 蛋白表达量逐渐增加,至 24 周假小叶形成达到高峰。Jagged1 自造模第 12 周、Notch3 自造模第 16 周、Hes1 自造

模第 8 周开始蛋白表达量增加,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

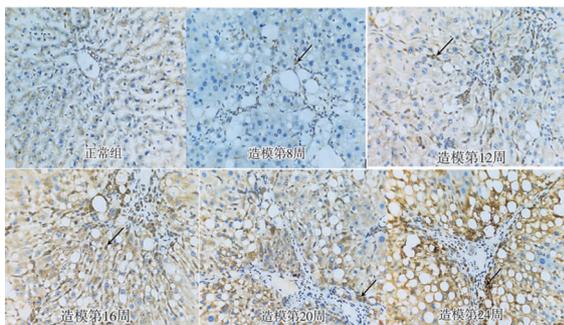


注:1, 正常组;2, 造模第 8 周;3, 造模第 12 周;4, 造模第 16 周;5, 造模第 20 周;6, 造模第 24 周
与正常组比较, * $P < 0.05$

图 4 各组大鼠肝组织 Jagged1、Notch3、Hes1 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s, n = 6$)

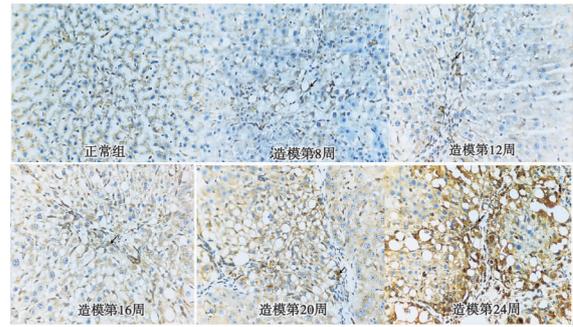
3.7 各组大鼠肝组织 Hes1、 α -SMA 蛋白表达情况

正常组 Hes1 蛋白较少表达于胆管上皮细胞及肝细胞,细胞膜及细胞质呈棕黄色染色,细胞核不着色;模型组随着造模时间延长,Hes1 蛋白表达逐渐增加,在假小叶形成的第 24 周达到高峰,集中于肝纤维化区域,汇管区和靠近肝纤维化区域的肝细胞、胆管上皮细胞及炎性细胞亦有表达。肌成纤维细胞标志蛋白 α -SMA 在正常组大鼠的肝组织未见明显表达;模型组从第 16 周纤维条索形成开始表达显著增加,第 24 周达到顶点,集中于汇管区的纤维间隔或纤维条索。Hes1 与 α -SMA 表达区域大部分重合于纤维化区域。见图 5、图 6。



注:长箭头:肌成纤维细胞

图 5 免疫组织化学法检测各组大鼠肝组织 Hes1 蛋白表达情况(SABC 法, $\times 400$)



注:短箭头:肌成纤维细胞

图 6 免疫组织化学法检测各组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达情况(SABC 法, $\times 400$)

蛋白平均吸光度(A)值结果显示,与正常组相比,模型组大鼠肝组织 Hes1、 α -SMA 蛋白表达逐渐增加,纤维条索开始形成的第 16 周以后增加,到假小叶形成的第 24 周两者均达到高峰。相关分析显示 Hes1 与 α -SMA 蛋白表达量呈同步正相关($r = 0.952, P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠肝组织 Hes1、 α -SMA 蛋白平均吸光度(A)值比较($\bar{x} \pm s, n = 6, \times 10^{-2}$)

组别	Hes1	α -SMA
正常组	5.27 \pm 0.22	1.06 \pm 0.20
模型组		
第 8 周	5.18 \pm 0.08	1.12 \pm 0.06
第 12 周	5.74 \pm 0.46 *	1.17 \pm 0.33
第 16 周	8.04 \pm 0.26 *	2.49 \pm 0.41 *
第 20 周	8.36 \pm 0.44 *	3.02 \pm 0.11 *
第 24 周	10.00 \pm 0.40 *	3.62 \pm 0.16 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$

4 讨论

Jagged/Notch 信号通路进化上高度保守,通过相邻细胞之间的相互作用决定细胞分化、凋亡、增殖。国内外对 Jagged/Notch 信号通路疾病研究以往主要集中在肿瘤、遗传性疾病等,近期发现该通路肝纤维化的发生发展密切相关^[10]。在新鲜分离的原代 HSC 细胞中可检测到 Notch 配体(Jagged1)及受体(Notch1、2、4)的基因表达,致肝纤维化关键因子 TGF- β 1 刺激活化 HSC 细胞转化为肌成纤维细胞后,Notch1、Notch3 mRNA 及蛋白表达呈上升趋势, α -SMA 和 I 型胶原表达增加^[11-12]。在四氯化碳诱发肝纤维化模型,配体 Jagged1,受体 Notch2、Notch3 和下游分子 Hes1 的 mRNA 表达增

加,Notch 信号活化形式 NICD 和 Hes1 在损伤的汇管区大量表达,应用 Notch3 特异性的 siRNA 抑制 Notch3 的表达可使肌成纤维细胞分泌功能明显降低^[13]。目前对于 HLD 铜沉积引起的肝纤维化,尚无 Jagged/Notch 信号通路的相关研究。

肝脏是 HLD 铜蓄积主要靶器官,铜作为一种强氧化剂,长期过载可引起弥漫性肝细胞脂肪变性、活动性肝炎,刺激肝星状细胞活化为肌成纤维细胞,后者大量分泌胶原纤维、层黏蛋白等细胞外基质(ECM),导致肝损伤修复时 ECM 合成与降解不平衡,引起肝纤维化。

本文采用含 1.5g/kg 硫酸铜的粉状饲料和 0.185% 硫酸铜去离子水喂饲大鼠,发现随着铜在肝脏的蓄积,血清肝功能及肝纤维化指标、肝组织 Hyp 含量均呈动态增高趋势,病理学检查展现了从弥漫性脂肪变性、活动性肝炎到肝纤维化形成的完整过程,为研究 HLD 肝纤维化提供了一个参考模型。在此过程中,Jagged1/Notch3/Hes1 信号通路持续被激活,下游靶基因 Hes1 在纤维化区域大量表达,与肌成纤维细胞标志蛋白 α -SMA 表达区域大部分重合,并随着肝纤维化的进行性加重而同步表达增加。由此我们认为铜沉积可以激活 Jagged1/Notch3/Hes1 信号通路,介导肝星状细胞转化为肌成纤维细胞并促其活化增殖,促使了肝纤维化的发生与发展。

通过本文结果,我们推断 Jagged/Notch 信号通路可能与 HLD 肝纤维化密切相关,开展相关研究,可以更好地认识 HLD 肝纤维化的发病机制,为寻找抗 HLD 肝纤维化的可能作用靶点提供重要线索。目前,铜沉积通过相邻细胞之间 Jagged1/Notch3/Hes1 信号通路,刺激肌成纤维细胞活化增殖的作用机制尚未清楚,我们将进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Carlson MD, Al-Mateen M, Brewer GJ. Atypical childhood Wilson's disease [J]. *Pediatr Neurol*, 2004, 30(1): 57-60.
- [2] Cheng N, Wang K, Hu W, et al. Wilson disease in the South Chinese Han population [J]. *Can J Neurol Sci*, 2014, 41(3): 363-367.
- [3] 张东锋,王煜姝,滕军放. 骨髓间充质干细胞对肝豆状核变性合并肝纤维化肝功能的临床研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(2): 193-196, 200.
- [4] Shaya O, Binshtok U, Hersch M, et al. Cell-Cell Contact Area Affects Notch Signaling and Notch-Dependent Patterning [J]. *Dev Cell*, 2017, 40(5): 505-511. e6. DOI:10.1016/j.devcel.2017.02.009.
- [5] Wilson A, Radtke F. Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(12): 2860-2868. DOI:10.1016/j.febslet.2006.03.024.
- [6] Hong Y, Yao Q, Zheng L. Thymosin β 4 attenuates liver fibrosis via suppressing Notch signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(4): 1396-1401. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.09.156.
- [7] Liu Y, Huang G, Mo B, et al. Artesunate ameliorates lung fibrosis via inhibiting the Notch signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 561-566. DOI:10.3892/etm.2017.4573.
- [8] 沈斌,鲍远程,蒋怀周,等. 肝豆灵对 Wilson 病模型大鼠肝组织 miRNA-122 表达的影响 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2014(6): 50-53.
- [9] 李毓雯,万小华,宁琴,等. 铜过量负荷导致肝细胞凋亡及其对 Bax Bcl-2 基因表达的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(1): 42-46.
- [10] Ni MM, Wang YR, Wu WW, et al. Novel Insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 826: 66-74. DOI:10.1016/j.ejphar.2018.02.051.
- [11] 黄颖而,许嘉彬,安海燕. Notch 信号通路对肝纤维化 EMT 环节的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(30): 4588-4592.
- [12] Chen Y, Zheng S, Qi D, et al. Inhibition of Notch signaling by a γ -secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46512. DOI:10.1371/journal.pone.0046512.
- [13] Wang Y, Shen RW, Han B, et al. Notch signaling mediated by TGF- β /Smad pathway in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(13): 2330-2336. DOI:10.3748/wjg.v23.i13.2330.

(收稿日期 2018-05-30)

(本文编辑:石俊强)