

肝纤维化或肝硬化所致肝组织结构改变对免疫组化石蜡切片皱缩系数的影响

王川林¹, 刘全明², 崔秋林², 杨靛³, 彭彬⁴, 商义⁵

(1. 川北医学院附属医院感染科; 2. 川北医学院临床医学系; 3. 川北医学院基础医学院; 4. 川北医学院电镜结构研究室; 5. 川北医学院第二附属医院消化内科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 比较研究正常、纤维化和硬化肝组织经石蜡包埋、切片和免疫组化染色等组织处理之后的皱缩系数, 以探讨肝纤维化或肝硬化所致肝组织结构改变对其皱缩系数有无影响。**方法:** 16 只健康 3 月龄 SD 大鼠随机分为对照组 ($n=6$)、肝纤维化模型组 ($n=5$)、肝硬化模型组 ($n=5$)。造模结束后从每只大鼠肝脏随机切取一个约 2 mm 厚的组织块称重和测密度以估计组织块在处理前的体积 ($V_F = \text{肝脏重量} / \text{密度}$)。每个组织块行石蜡包埋后切成 14 μm 厚 (H') 的连续切片, 按照等距随机的方法每 10 张切片抽选 1 张行免疫组化染色 (即切片抽样分数 $f=1/10$)。利用 VIS 体视学系统在测量所抽选切片的面积 (A) 和实际厚度 (H)。根据卡瓦列里原理分别估计每个组织块经包埋处理后的体积 ($V_E = \Sigma H' \times A \times 1/f$) 和经包埋切片染色等处理后的体积 ($V_S = \Sigma H \times A \times 1/f$)。用包埋切片染色后 (V_S) 的体积除以其处理前的体积 (V_F) 可得到包埋切片染色过程产生的皱缩系数; 其中包埋过程产生的皱缩系数为 V_E/V_F , 切片和染色过程产生的皱缩系数为 V_S/V_E 。**结果:** 正常、肝纤维化和肝硬化肝组织经包埋切片染色等处理过程产生的皱缩系数分别约是 $(61.8 \pm 8.33)\%$ 、 $(55.2 \pm 13.8)\%$ 和 $(63.0 \pm 14.3)\%$, 其中, 包埋过程产生的皱缩系数分别约为 $(77.5 \pm 10.3)\%$ 、 $(70.0 \pm 18.6)\%$ 和 $(77.8 \pm 15.3)\%$, 切片和染色过程产生的皱缩系数分别是 $(79.7 \pm 2.14)\%$ 、 $(80.0\% \pm 26.3)\%$ 、 $(80.1 \pm 1.16)\%$ 。三组之间的差异均无统计学意义。**结论:** 石蜡包埋、切片和免疫组化染色步骤均会导致肝组织产生一定程度的组织皱缩。肝纤维化或肝硬化所致肝组织结构改变对其经过石蜡包埋、切片和免疫组化染色等组织处理后产生的皱缩系数无显著影响。

【关键词】 体视学; 肝硬化; 肝纤维化; 免疫组化染色; 石蜡包埋; 皱缩系数

【中图分类号】 R361; R575.2 **【文献标志码】** A

Effects of the changes in liver tissue structures of hepatic fibrosis or cirrhosis on the contraction coefficient of immunohistochemical paraffin sections

WANG Chuan-lin¹, LIU Quan-ming², CUI Qiu-lin², YANG Liang³, PENG Bin⁴, SHANG Yi⁵

(1. Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. Department of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College; 3. Department of Basic Medicine, North Sichuan Medical College; 4. Research Unit of Electron Microscopy Structures, North Sichuan Medical College; 5. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To evaluate the contraction coefficient of normal, fibrotic and cirrhotic liver tissue after a series tissue procedures including paraffin embedding and section-immunohistochemical staining, to investigate whether the structural changes of liver tissue caused by liver fibrosis or cirrhosis have any effect on the shrinkage coefficient. **Methods:** 16 three-month old sprague-dawley rats were randomly divided into 3 groups: the control group ($n=6$), the liver fibrosis model group ($n=5$) and the liver cirrhosis model group ($n=5$). One tissue block with the thickness of approximately 2 μm was randomly sampled from each rat liver in this study and the weight and density of all tissue blocks were measured to evaluate the total volume ($V_F = \text{liver weight} / \text{density}$) of the tissue blocks before paraffin embedding. Each paraffin tissue block was cut into a continuous sections with the thickness of 14 μm and the total number of sections was recorded (H'). Each section was sampled per ten sections according to systematic (equally spaced) manner (i. e. the sampling fraction of sections $f=1/10$) and stained with immunohistochemical technique. The area (A) and thickness (H) of each

slice were measured using a set of stereology equipment. The total volume of each tissue block after paraffin embedding ($V_E = \sum H' \times A \times 1/f$) and the total volume of each tissue block after paraffin embedding, slicing and immunohistochemical staining ($V_S = \sum H \times A \times 1/f$) were estimated according to Cavalieri'S Principle. The contraction coefficient (CC) of each tissue block during embedding, slicing and immunohistochemical staining could be obtained by dividing V_S by V_F , the CC of each tissue block during embedding could be obtained by dividing V_E by V_F , and the CC of each tissue block during slicing and immunohistochemical staining be obtained by dividing V_S by V_E . **Results:** The contraction coefficient during embedding, slicing and immunohistochemical staining of normal, fibrotic and cirrhotic liver tissue were $(61.8 \pm 8.33)\%$, $(55.2 \pm 13.8)\%$ and $(63.0 \pm 14.3)\%$, respectively. The contraction coefficient during embedding of normal, fibrotic and cirrhotic liver tissue were $(77.5 \pm 10.3)\%$, $(70.0 \pm 18.6)\%$ and $(77.8 \pm 15.3)\%$, respectively. The contraction coefficient during slicing and immunohistochemical staining of normal, fibrotic and cirrhotic liver tissue were $(79.7 \pm 2.14)\%$, $(80.0 \pm 26.3)\%$ and $(80.1 \pm 1.16)\%$, respectively. There were no significant differences among the three groups. **Conclusion:** Paraffin embedding, slicing and immunohistochemical staining all can lead to a degree of liver tissue contraction. The changes in the internal structure of normal, fibrotic and cirrhotic liver tissues has no significant effect on the contraction coefficient of liver tissues after paraffin embedding, slicing and immunohistochemical staining.

【Key words】 Stereology; Liver cirrhosis; Liver fibrosis; Immunohistochemical staining; Paraffin embedding; Contraction coefficient

通过单位体积参照空间内的数密度、长度密度或表面积密度乘以参照空间的体积得到参照空间内待测结构的总数、总长度或总表面积是常用的体视学方法。器官组织经过固定、包埋、切片、染色等组织处理后均会产生皱缩,而参照空间的体积估计与密度参数的体视学测试分别是在器官组织处理前(皱缩前)和处理后(皱缩后)进行。如果将密度参数乘以参照空间皱缩前的体积,则会使结果出现偏差(即参照空间陷阱),因此获得的密度值必须用皱缩系数(即处理后体积/处理前体积)进行校正。既往研究表明,相同器官组织的皱缩系数与组织处理过程中使用的包埋介质、切片方法和染色方法等有关^[1-3];不同器官组织的皱缩系数与器官内脂肪组织、胶原纤维和实质细胞等所占比例有关^[4];大脑的皱缩系数与其所处的年龄阶段有关^[5]。各种慢性损伤所致的肝组织内进行性纤维化,最终导致了肝硬化及其功能丧失。那么,正常、纤维化和硬化肝组织内是否会由于其组成成分的变化导致其皱缩系数改变,是在对肝组织进行体视学研究前需要解决的问题。因此,本研究拟采用 CCl_4 建立肝纤维化(5周)和肝硬化(10周)模型,分别采用“重量/体积”方法和“卡瓦列里”原理估计肝组织处理前、后的体积,以探讨肝纤维化的发生发展对肝组织皱缩系数的影响。为以后的形态定量研究提供相关资料参考以及理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康3月龄SD雄性大鼠16只,体重160~180g,由川北医学院动物实验中心提供。大鼠适应性饲养一周后,按随机数字表法分为随机分为3组:对照组($n=6$)、肝纤维化组($n=5$)、肝硬化组($n=5$)。

肝纤维化和肝硬化模型的制备:将 CCl_4 (分析

纯,国药集团化学试剂有限公司)与橄榄油(化学纯,国药集团化学试剂有限公司)按体积比2:3配成40% CCl_4 -橄榄油混悬液,按3 mL/kg 剂量在大鼠背部皮下注射,每周2次,连续注射5周和10周后取材,并随机切取一块2 mm厚的肝组织块,行Masson染色显示胶原纤维,按照Ishak评分系统对肝纤维化进行评分,分别建立肝纤维化和肝硬化模型^[6-7]。

对照组大鼠背部皮下等时等量注射生理盐水。

1.2 组织处理与切片制备

大鼠腹腔注射3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后立即取出肝脏,放入4%多聚甲醛中浸润固定48 h,换入70%酒精保存。实验前从每只大鼠的肝脏中随机切取一块2 mm厚的组织块,用电子天平(g, ANDHR-120型电子天平测量,精度0.1 mg)称取每个组织块的重量,并根据组织块在不同浓度的酒精和蔗糖中悬浮时该液体所代表的比重值来估计该组织块的密度。然后将抽选到的组织块进行石蜡包埋,并用半自动切片机(LEICA RM2145,德国)将每个石蜡包埋块全部切成14 μ m厚的连续切片,按照等距随机原则抽选1/10(f ,切片抽样分数)的切片进行体视学测试:第一张切片在第1~10张中随机抽取,其后按等距随机原则每10张抽取一张切片。本研究中,每个组织块获得的切片总数大约140张,抽选到的切片总数约10~15。将抽选到的切片进行免疫组化染色(一抗用PBS代替)后采用体视学方法测量每张切片的横截面的面积。

免疫组化染色步骤:肝组织切片常规脱蜡至水,经0.01 M 枸橼酸钾钠缓冲液(pH=6.0,北京中杉金桥有限公司)抗原修复,3% H_2O_2 去离子水(pH=6.0,北京中杉金桥有限公司)阻断内源性过氧化物酶;滴加0.01 PBS(代替一抗),4 $^{\circ}C$ 孵育48 h;滴加辅助剂 polymer helper(北京中杉金桥有限公司)

37 °C 孵育 20 min, 辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥有限公司)孵育 30 min; 每一操作步骤期间用 0.01 M 的 PBS 液(北京中杉金桥有限公司)冲洗 3 次, 每次 3 min。DAB 显色、甲苯胺蓝复染、常规脱水透明后封片。

Masson 染色步骤: 根据 Masson 三色染色试剂盒说明书染色。步骤如下: (1) 切片脱蜡处理至水, 首先用试剂 A 染色 5 min, PBS 液冲洗, 然后滴加 1 滴试剂 C(磷钼酸)5 min, 其次甩干后滴加 1 滴试剂 D(苯胺蓝)染色 5 min, PBS 液冲洗, 最后滴加 1 滴(100 μL)分化液(试剂 B)分化 30 s。(2) 甲苯胺蓝复染细胞核 5~10 s。(3) 用 70% 酒精、无水酒精依次脱水, 透明, 封片^[6]。

1.3 体视学测量

1.3.1 肝组织切片横截面积的估计 采用 Visopharm(丹麦)的 New CAsT 体视学系统及 Olympus BX51 型光学显微镜, 在电脑屏幕上观察切片图像。在 ×4 倍物镜下, 每个视野随机叠加 6 × 6 个测点, 每个测点代表的面积(ap)为 2.77 mm², 计数落在肝组织中的总测点数。每张肝组织切片的横截面积(A)等于总测点数乘以每个测点的面积。

1.3.2 切片厚度的测量 在 ×100 油镜(Olympus, 数值孔径 1.40, 最终放大倍数为 ×2 240)下观察肝组织切片, 每张切片随机抽取 7 个视野, 测定其厚度: 将切片从上向下聚焦, 当整个显示屏内肝组织内任何结构刚开始聚焦时则设为切片的上表面, 继续向下聚焦, 当整个显示屏内肝组织中的所有结构刚好不聚焦时设为切片的下表面, 此时系统中测试棒所显示的厚度, 即为切片在该视野处厚度, 该切片的厚度(H)则为 7 个视野处所测厚度的平均值(图 1)。

1.4 皱缩系数(Contraction coefficient, CC)的估计

固定后体积(V_F) = 肝脏重量/密度。

根据卡瓦列里原理:

包埋后体积(V_E) = $\sum H' \times A \times 1/f$ 。其中, H' 为切片机设定的厚度 14 μm, $\sum H'$ 为每个组织块抽选到的切片的切片机设定厚度之和, A 为测得的切片横截面积, f 为切片抽样分数。

染色后体积(V_S) = $\sum H \times A \times 1/f$ 。其中, H 为染色后切片实际测得厚度, $\sum H'$ 为每个组织块抽选到的切片的实际厚度之和, A 为测得的切片横截面积, f 为切片抽样分数。

包埋和切片、染色后的皱缩系数(CC_S) = $V_S/V_F \times 100\%$ 。

包埋后的皱缩系数(CC_E) = $V_E/V_F \times 100\%$ 。

切片与染色的皱缩系数(CC_M) = $V_S/V_E \times$

100%。

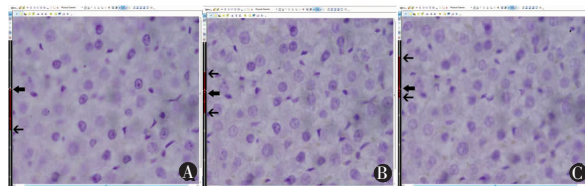


图 1 A、B、C 为在体视学图像系统的显示屏的截图(×100 倍)

图的上边为软件的工具栏; 左边为刻度条, 以显示显微聚焦平面(显微镜调节轮的)的上下移动的距离(μm), 其中红色刻度条的深度为 14 μm(A 中细箭头←与粗箭头←之间或 B、C 中两个细箭头之间的距离)。三幅图的切片图像为同一张石蜡包埋的大鼠肝组织切片(切片机设定厚度为 14 μm)同一视野的 3 个不同聚焦平面(光学切片)。图 A 的切片图像是该切片所测视野最上表面的清晰聚焦平面, 该平面的位置左侧刻度条上的刻度为 0(粗箭头所指); 图 B 是从该视野平面向下聚焦 6.3 μm(粗箭头所指)的聚焦平面; 图 C 是该切片所测视野最下表面的清晰聚焦平面, 其刻度线显示的距离为 11.1 μm(粗箭头所指)。因此该切片所测视野区域的实际切片厚度为 11.1 μm。

1.5 统计学分析

正态分布的计量资料均采用($\bar{x} + s$)表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。组间比较采用单因素重复检测的方差分析, 并结合 LSD 法进行两两比较。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCl₄ 对大鼠肝组织内胶原纤维分布的影响

对照组大鼠肝组织内门管区可见少量胶原纤维, 中央静脉周围偶可见极少量的胶原纤维。肝纤维化组大鼠肝组织内门管区胶原纤维显著增生, 可见纤维间隔形成, 门管区与门管区之间或门管区与中央静脉之间可见少量纤维桥连。肝硬化组大鼠肝组织内可见弥漫分布的胶原纤维大量增生, 增生的胶原纤维将肝小叶分割成假小叶, 可见少量硬化结节(图 2)。

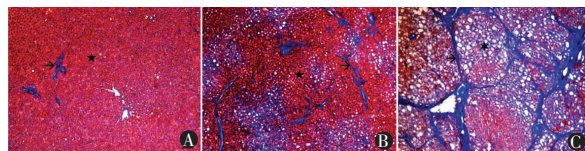


图 2 Masson 染色示大鼠肝组织内胶原纤维(×10 倍)

A. 对照组; B. 肝纤维化组; C. 肝硬化组。→, 胶原纤维; ★, 肝小叶; *, 假小叶。

2.2 肝纤维化或肝硬化所致肝组织结构改变对免疫组化石蜡切片皱缩系数的影响

正常肝组织、纤维化肝组织与硬化肝组织在包埋、切片与免疫组化染色整个过程中产生的皱缩系数分别是 (61.8 ± 8.33)%, (55.2 ± 13.8)% 与

(63.0 ± 14.3)% ,即在包埋切片染色整个过程中正常肝组织、纤维化肝组织与硬化肝组织分别皱缩了(1-皱缩系数):(38.2 ± 8.33)% , (44.8 ± 13.8)% 与(37.0 ± 14.3)% ,三者间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$) (表1)。

正常肝组织、纤维化肝组织与硬化肝组织在包埋过程中产生的皱缩系数分别是(77.5 ± 10.3)% , (70.0 ± 18.6)% 与(77.8 ± 15.3)% ,即在包埋过程中正常肝组织、纤维化肝组织与硬化肝组织分别皱缩了(1-皱缩系数):(22.5 ± 10.3)% , (30.0 ± 18.6)% 与(22.2 ± 15.3)% ,三者间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

正常肝组织、纤维化肝组织与硬化肝组织在切片与免疫组化染色过程中产生的皱缩系数分别是(79.7 ± 2.14)% , (80.0 ± 26.3)% 与(80.1 ± 1.16)% ,即在切片与染色过程中正常肝组织、纤维化肝组织与硬化肝组织分别皱缩了(1-皱缩系数):(20.3 ± 2.14)% , (20.0 ± 26.3)% 与(19.9 ± 1.16)% ,三者间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠肝组织的皱缩系数结果($\bar{x} \pm s, \%$)

处理项目	对照组	肝纤维化组	肝硬化组
包埋、切片、染色	61.8 ± 8.33	55.2 ± 13.8	63.0 ± 14.3
包埋	77.5 ± 10.3	70.0 ± 18.6	77.8 ± 15.3
切片与染色	79.7 ± 2.14	80.0 ± 26.3	80.1 ± 1.16

3 讨论

采用体视学方法估计参照空间(如器官或功能区)内待测结构的总量,常常采用密度值乘以参照空间的体积^[8]。参照空间的体积通常在组织处理前通过重量除以密度获得,而密度值则需要经过包埋、切片并染色后利用体视学系统进行测量。这个方法最大的问题就是空间陷阱,即皱缩后的密度值必定大于皱缩前,那么将其乘以皱缩前的参照空间体积则会导致得到的待测结构的总量实际值。因此,用这种方法估计总量,必须要得到该组织的皱缩系数(即皱缩后的体积与皱缩前的体积之比),并用皱缩系数矫正获得皱缩前的密度值。例如:过去的研究一直认为海马结构神经元的减少是大脑衰老的标志。自1984年新的体视学发展以来,运用新的体视学研究发现老年海马并不存在神经元数目的显著性减少。让人们产生错觉的原因在于青年大脑的皱缩程度大于衰老大脑,因此组织处理后测得的神元的数密度大于老年大鼠。

既然不同年龄的脑组织、同一动物的不同器官

以及同一组织采用不同的包埋或切片方法均会导致皱缩系数的变化。那么,在我们将要进行纤维化肝组织内肝星状细胞的数量研究前,我们不得不先要获取正常、纤维化和硬化肝组织的皱缩系数,并探讨肝纤维化到肝硬化所致的肝组织内结构组成的变化对皱缩系数的影响。因此,本研究采用经典的背部皮下注射 CCl₄ 5周和10周建立肝纤维化和肝硬化动物模型,从每组的每只大鼠各抽选一个肝组织块,组织处理方法与肝星状细胞免疫组化染色石蜡包埋切片制作方法一致。根据卡瓦列里原理设计实验方案,分别获得各组织块包埋、切片和染色后的体积。将该体积除以各组织块处理前的体积即得到不同肝组织的皱缩系数。我们的结果显示,正常、肝纤维化和肝硬化肝组织经过包埋、切片和染色的皱缩系数分别为61.8%、55.2%和63.0%,即在包埋、切片和染色整个过程中分别皱缩了38.2%、44.8%和37.0%,且三者之间的差异无统计学意义。该结果一方面可以为相关的研究提供基础实验数据,避免重复研究;另一方面也证明进行性肝纤维化到硬化的发展过程中,肝组织内的胶原纤维显著增加,肝细胞坏死并形成再生结节,肝内循环破坏等显著的组织结构改变对其皱缩系数并没有显著的影响。

同时,本研究还比较了组织处理过程中包埋步骤以及切片染色步骤分别产生的皱缩系数。我们的结果表明,正常、肝纤维化和肝硬化肝组织在包埋过程中组织分别皱缩了22.5%(正常肝组织)、30%(肝纤维化)和22.2%(肝硬化),在切片和染色步骤过程组织分别皱缩了20.3%、20.0%和19.9%,三者间的差异均无统计学意义。该结果说明,无论在包埋环节还是在切片与染色步骤中组织均产生了皱缩,这可能主要与组织处理过程中的脱水、透明等步骤有关。有研究表明,在组织脱水透明过程中,在失去水分的同时也会丢失很多脂肪颗粒^[9],而肝细胞有存储脂肪的功能,我们推测在包埋与染色过程中肝细胞可能丢失了部分脂肪,这可能是包埋与免疫组化染色后肝组织产生皱缩的原因之一。出乎我们的预料,本研究结果显示正常、纤维化和肝硬化肝组织的皱缩系数之间的差异均无统计学意义。有大量研究^[10-13]表明,在肝纤维化的过程中,作为主要的成纤维细胞,肝星状细胞的激活、增殖是其发生、发展的关键因素。肝星状细胞占肝细胞的15%,其内含有大量脂滴,所以又称为储脂细胞^[14]。有研究^[15-17]表明,随着肝纤维化的进展,发现肝星状细胞胞质内脂滴减少这一病理改变,同时也通过分泌细胞外基质,使胶原纤维显著增加参与肝纤维化的过程。随着纤维化的进程,脂肪颗粒的减少和胶原

纤维的增生的共同作用可能是导致不同程度纤维化肝组织在包埋与免疫组化染色后体积皱缩系数没有统计学差异的原因。

参考文献

[1] Danielle LB. Bias in Image Analysis and Its Solution; Unbiased Stereology[J]. J Toxicol Pathol, 2020, 30(3):183-191.
[2] Kipp M, Kiessling MC, Hochstrasser T, et al. Design-Based Stereology for Evaluation of Histological Parameters[J]. J Mol Neurosci, 2017, 61(3):325-342.
[3] Brown DL, Staup M, Swanson C. Stereology of the Peripheral Nervous System[J]. Toxicol Pathol, 2020, 48(1):37-48.
[4] 彭彬, 陈茂山, 李惠, 等. 不同器官石蜡包埋切片的切片压缩对比研究[J]. 中国体视学与图像分析, 2012, 17(3):219-225.
[5] Bento-Torres J, Sobral LL, Reis RR, et al. Age and Environment Influences on Mouse Prion Disease Progression; Behavioral Changes and Morphometry and Stereology of Hippocampal Astrocytes[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017:1-18.
[6] 王川林, 杨霞, 崔秋林, 等. 异甘草酸镁对四氯化碳肝纤维化大鼠肝组织病理改变的影响[J]. 川北医学院学报, 2018, 33(3):360-363.
[7] Sui M, Jiang X, Chen J, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by regulating ferroptosis signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106:125-133.
[8] Daniel AH, Deng P, Matthew DW, et al. Design-Based stereology and binary image histomorphometry in nerve assessment[J]. Jour-

nal of Neuroscience Methods, 2020, DOI: 10.1016/j.jneumeth.2020.108635.
[9] 徐玉环, 徐艳峰, 刘颖, 等. 脂肪组织切片制备方法的改进[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1):79-84.
[10] Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121:27-42.
[11] Zhu J, Zhang ZQ, Zhang YT, et al. MicroRNA-212 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis via targeting SMAD7[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(1):176-183.
[12] Chen Z, Jain A, Liu H, et al. Targeted Drug Delivery to Hepatic Stellate Cells for the Treatment of Liver Fibrosis[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 370(3):695-702.
[13] Zhu J, Zhang ZQ, Zhang YT, et al. MicroRNA-212 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis via targeting SMAD7[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(1):176-183.
[14] Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7):397-411.
[15] Juan PT, Paul M, Andres FC. Novel Targeted Therapies for the Management of Liver Fibrosis[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2020, 25(1):59-70.
[16] Huang Y, Deng X, Liang J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis[J]. Exp Cell Res, 2017, 352(2):420-426.
[17] Gandhi CR. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals[J]. J Hepatol, 2017, 67(5):1104-1105.

(收稿日期:2020-02-23

学术编辑:刘钧)

(下转第 831 页)

[5] 张明博, 黄鹏, 武成志, 等. 单纯超声引导下经皮椎间孔镜腰椎间盘切除术一例[J]. 中华腔镜外科杂志(电子版), 2019, 12(2):111-114.
[6] 赖居易, 何升华, 孙志涛, 等. 经皮椎间孔镜联合针刺治疗腰椎间盘突出症临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3):1387-1390.
[7] 邢伟园, 匡正达, 邹小丽, 等. 经皮椎间孔镜下髓核摘除与开窗髓核摘除治疗腰椎间盘突出症疗效比较的 meta 分析[J]. 中华灾害救援医学, 2017, 5(1):36-40.
[8] 丁伟国, 徐卫星, 卢笛, 等. 经皮椎间孔镜与开放椎板间开窗术治疗腰椎间盘突出症的疗效分析[J]. 中国内镜杂志, 2016, 22(4):43-48.
[9] 刘振升. 椎间孔镜技术与常规手术治疗腰椎间盘突出症疗效对比研究[J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(12):1623-1625.
[10] 薛皓. 经皮椎间孔镜技术与传统椎板开窗术式治疗复发性腰椎间盘突出症的疗效对比[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2016, 9(3):189-192.

[11] 谭克平, 刘光国, 姚旭, 等. 针药结合对腰椎间盘突出症患者血清细胞因子、MDA、SOD 及血浆血栓素 β_2 水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(6):1523-1526.
[12] Cui Y, Jiang M, Zhou F, et al. Clinical research of manipulation combined with the Taohong-Siwu decoction in the treatment of acute lumbar disc herniation[J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 40(1):30-33.
[13] 邵东旭, 王廷凯. 优化活血利水方对大鼠自体髓核移植后移植髓核 MMP-3、TIMP-1 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(5):1044-1049.
[14] Gorth DJ, Shapiro IM, Risbud MV. Transgenic mice overexpressing human TNF- α experience early onset spontaneous intervertebral disc herniation in the absence of overt degeneration[J]. Cell death & disease, 2018, 10(1):1-14.

(收稿日期:2020-03-10

学术编辑:曾凡伟)