DOI:10.16016/j.1000-5404.201508093

鳖甲煎改良方含药血清对肝星状细胞增殖、周期及凋亡的影响

张荣华[1],闫国和[2],汪国建[1],粟永萍[2] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院中西医结合科[1],军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨鳖甲煎改良方含药血清对大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)-T6 增殖、周期及凋亡的影响。**方法** 分别用高剂量[28.4 g/(kg·d)]、中剂量[14.2 g/(kg·d)]与低剂量[7.1 g/(kg·d)]的鳖甲煎改良方及与鳖甲煎改良方高剂量相同剂量的鳖甲煎丸灌胃大鼠以制备含药血清。将等体积不同剂量的鳖甲煎改良方含药血清分别处理 HSC-T6 细胞,以等体积鳖甲煎丸含药血清处理的细胞为阳性对照组,生理盐水处理的细胞为空白对照组,正常大鼠血清处理的细胞为正常对照组。CCK-8 检测不同处理组 HSC-T6 细胞的增殖情况,并绘制其增殖曲线;流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测经不同处理的 HSC-T6 细胞的周期,Annexin V-PI 染色法检测其凋亡;在 mRNA 及蛋白水平分别检测经不同处理的 HSC-T6 细胞的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)基因及其编码蛋白的表达变化。**结果** CCK-8 检测结果显示,鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞增殖具抑制作用,高剂量与中剂量组的增殖速度慢于正常对照组、阳性对照组和空白对照组($P<0.05$,$P<0.01$),且该抑制作用呈剂量-效应关系。FCM 检测证实,鳖甲煎改良方含药血清可将 HSC-T6 细胞阻滞于 S 期,能诱导 HSC-T6 细胞的凋亡,与正常对照组比较,其凋亡诱导率差异具有统计学意义($P<0.01$)。mRNA 与蛋白水平检测结果显示,与空白对照组和阳性对照组比较,高剂量组能在基因与蛋白水平显著下调 HSC-T6 细胞 PCNA 的表达。**结论** 鳖甲煎改良方含药血清能明显抑制 HSC-T6 细胞的增殖,诱导 HSC-T6 细胞的凋亡,并能下调其 PCNA 基因及其编码蛋白的表达。

[关键词] 鳖甲煎改良方;HSC-T6 细胞;增殖;细胞周期;凋亡;增殖细胞核抗原

[中图法分类号] R285.5;R322.47;R329.28

[文献标志码] A

Effect of serum containing modified turtle shell decoction on proliferation, cell cycle and apoptosis of hepatic stellate cell line T6

Zhang Ronghua[1], Yan Guohe[2], Wang Guojian[1], Su Yongping[2] ([1]Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of serum containing modified turtle shell decoction (MTSD) on the proliferation, cell cycle and apoptosis of hepatic stellate cell line T6 (HSC-T6). **Methods** Serum containing MTSD or turtle shell pills (TSP) was prepared, and the rats were treated with MTSD at 28.4 g/(kg·d) as a high-dose group, at 14.2 g/(kg·d) as a medium-dose group, at 7.1 g/(kg·d) as a low-dose group or with TSP at 9.0 g/(kg·d) as a control group by intragastric administration. HSC-T6 cells were treated with serum containing different doses of MTSD in equal to volume. The same cells were treated with serum containing TSP as a positive control, treated with normal salt solution as a blank control, and treated with normal rat serum in equal to volume as a normal control. The proliferation of HSC-T6 cells in different groups were tested by cell count kit-8 (CCK-8) assay, and the proliferation curves were draw. Cell

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273918);重庆市中医药科技项目(2012-2-63);军队中医药科研专项课题(2010ZYZ231)

[通信作者] 张荣华,E-mail:zhrhlggg@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1340.028.html(2015-12-04)

cycle of HSC-T6 cells was tested by flow cytometry (FCM). Annexin V-PI was applied to analyze the apoptosis of the cells. The gene and protein expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of HSC-T6 cells were detected with RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** The results of CCK-8 assay revealed that serum containing MTSD could prevent HSC-T6 cells from proliferation with a dose-effect relationship. The proliferation of the HSC-T6 cells treated with high-dose or middle-dose serum containing MTSD was lower than that of the controls, and the differences were statistically significant after the cells were treated for 48 h ($P<0.05$, $P<0.01$, respectively). Serum containing MTSD affected the cell cycle of HSC-T6 cells, and blocked the cells at S stage. Serum containing MTSD could significantly induce apoptosis of HSC-T6 cells compared with the controls ($P<0.01$). The results of RT-PCR, Western blot and quantitative analyses indicated that the high-dose or middle-dose serum containing MTSD significantly down-regulated the gene and protein expressions of PCNA of HSC-T6 cells, and the differences between the treated cells and the controls were statistically significant ($P<0.05$, $P<0.01$, respectively). **Conclusion** The serum containing MTSD can significantly inhibit proliferation of HSC-T6 cells, induce cell apoptosis and down-regulate the PCNA expressions.

[**Key words**] serum containing modified turtle shell decoction; hepatic stellate cell line T6; proliferation; cell cycle; apoptosis; proliferating cell nuclear antigen

Supported by the General Program of National Nature Foundation of China (81273918), the Project of Traditional Chinese Medicine Science and Technology of Chongqing (2012-2-63) and the Specific Project of Traditional Chinese Medicine of PLA (2010ZYZ231). Corresponding author: Zhang Ronghua, E-mail: zhrhlggg@163.com

肝硬化是严重危害人类健康的多发病。肝纤维化造成肝功异常,影响肝病预后,是慢性肝病发展到肝硬化的必经病理阶段。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化、增殖及细胞外基质的沉积是肝纤维化发生、发展的关键环节,肝脏受损伤后细胞外基质(extracellular matrix, ECM)主要来源于 HSC[1]。

近年来先后出现一些肝纤维化治疗手段,如化学药物、生物制剂与基因疗法等,但理想的临床治疗措施仍然缺乏,除治疗原发性因素如抗病毒、戒酒、杀灭血吸虫等外,目前中药的综合作用已显示出其明显的优势。中药鳖甲煎丸在防治肝纤维化方面已发挥其良好的作用[2],但因其药味较多,其药方中的部分药味具一定的毒副作用或获取困难,而限制了其临床应用。

鳖甲煎改良方是我们根据鳖甲煎丸加减多味药物改制而成。我们的前期研究显示,鳖甲煎改良方在抑制大鼠肝纤维化方面取得了较好的效果[3-4]。

本实验首先自行煎制鳖甲煎改良方,并制备其大鼠含药血清,以不同剂量的该含药血清处理 HSC-T6 细胞,观察其对 HSC-T6 细胞增殖、周期及凋亡的影响,为肝纤维化的防治奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HSC-T6 细胞株(上海艾研公司);CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒(日本 Toyobo 公司);Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒(日本 Dojindo 公司);RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司);增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(德国默克公司);引物合成(上海捷瑞公司)。鳖甲煎改良方(自行煎制);鳖甲煎丸(武汉中联药业集团股份有限公司);陆眠宁Ⅱ(吉林省华牧动物保健品有限公司)。

健康 SPF 级 SD 大鼠[第三军医大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(渝)2012-0003]30 只,雄性,体质量 190~210 g,饲养于恒温 18~22 ℃和恒湿 50%~80%条件的 SPF 级动物实验室,自由摄取标准饲料与无菌水。

1.2 方法

1.2.1 中药剂的制备 用传统方法将 11 味(鳖甲、土鳖虫、柴胡、黄芩、半夏、黄芪、茵陈、桂枝、白芍、桃仁、茯苓)中药浸泡、煎煮、过滤、浓缩,制成鳖甲煎改良方煎剂,含生药量分别为 2.84 g/mL(高剂量药液)、1.42 g/mL(中剂量药液)、0.71 g/mL(低剂量药液),分装成袋,冻存于 -20 ℃备用。鳖甲煎丸用时用生理盐水配制成 2.84 g/mL 的含生药溶液。

1.2.2 含药血清的制备 健康 SPF 级 SD 大鼠 30 只,适应性喂养 3 d 后,采用随机区组法分为 6 组(每组 5 只)。鳖甲煎改良方浓煎液 7.1 g/(kg·d)灌胃(含生药量 0.71 g/mL)作为低剂量组;14.2 g/(kg·d)灌胃(含生药量 1.42 g/mL)作为中剂量组;28.4 g/(kg·d)灌胃(含生药量 2.84 g/mL)作为高剂量组;鳖甲煎丸(简称鳖甲丸)28.4 g/(kg·d)(含生药量 2.84 g/mL)灌胃作为阳性对照组,生理盐水灌胃作为空白对照,不

处理作为正常对照组。各种灌胃用药、液均为10 mL/(kg·d)。每日2次灌胃,连续3 d,灌胃前禁食12 h。末次灌胃2 h后,陆眠宁Ⅱ肌肉注射(0.25 mL/kg)麻醉,下腔静脉采血,4 ℃过夜静置,1 000×g离心15 min,分离血清,同组血清混合,分别制成药物血清与对照血清,0.22 μm滤器过滤分装,56 ℃灭活30 min,以除去可能存在的生物活性物质,-70 ℃保存备用。

1.2.3　鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6增殖的影响　　将HSC-T6细胞接种于96孔板(每孔150 μL,含3×10^3个细胞),常规培养24 h,更换成新鲜培养液(含20%不同剂量的鳖甲煎改良方含药血清),以等体积鳖甲丸含药血清处理的细胞作阳性对照,等体积正常大鼠血清处理的细胞作正常对照,生理盐水处理的HSC-T6细胞作空白对照。24、48、72 h与96 h后分别取出96孔板,倒置显微镜观察各细胞的生长状况并拍照,随后每孔更换成新鲜培养液,每孔添加10 μL CCK-8试剂,继续培养2.5 h后取出,轻微振荡25 s,混匀,用酶标仪检测450 nm处光密度值[D(450)],以此光密度值为Y轴,处理时间为X轴绘制各细胞增殖曲线,该实验重复3次。

1.2.4　鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6细胞PCNA基因表达的影响　　根据大鼠细胞核抗原PCNA的mRNA序列设计其检测引物。上游引物:5′-CCTGCTGGGACATCAGTTCG-3′,下游引物:5′-GGAGACAGTGGAGTGGCTTT-3′。以经高剂量鳖甲煎改良方含药血清处理72 h的HSC-T6细胞总RNA为模板,采用RT-PCR检测PCNA的表达情况,以鳖甲丸含药血清处理72 h的细胞的相同检测作阳性对照,生理盐水处理的细胞的相同检测作空白对照,β-actin作内参。反转录反应条件:30 ℃,10 min与42 ℃,30 min;99 ℃,5 min;5 ℃,5 min,1个循环。PCR反应条件:95 ℃,5 min;94 ℃,46 s;60 ℃,1 min;72 ℃延伸1 min,共30个循环,72 ℃延伸5 min。最后行PCR产物的电泳检测。

1.2.5　鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6细胞PCNA基因编码蛋白表达的影响　　采用Western blot检测,将1.2.4的各细胞总蛋白转移至PVDF膜,浸于含小鼠单克隆抗体(1∶800)的封闭液,过夜(4 ℃),添加辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠(1∶500)二抗,室温孵育2 h后同化学发光底物于25 ℃结合8 min左右,β-actin(相对分子质量为4.3×10^4)作内参。

1.2.6　鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6细胞周期与凋亡的影响　　参照文献[5]检测鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6周期的影响,具体如下。密度为1×10^6个细胞/mL的HSC-T6细胞常规培养24 h,更换成新鲜培养液(含20%的不同剂量的鳖甲煎改良方含药血清),对照血清处理的细胞的相同检测作阳性对照,生理盐水处理的细胞的相同检测作正常对照。72 h后,收集各组细胞,并予以计数,保证各组细胞样品1×10^4~2×10^6个细胞,80%酒精固定细胞24~72 h,常规碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测与分析细胞周期变化情况,实验重复3次。

上述各组细胞样品,各取100 μL细胞(5~10万个细胞)悬液,加入195 μL结合缓冲液重悬细胞,添加5 μL Annexin V-FITC混匀。室温(20~25 ℃)避光孵育10 min。1 000×g离心5 min,用195 μL结合缓冲液重悬细胞,添加10 μL的PI混匀,流式细胞仪检测与分析各组细胞样品凋亡变化情况,实验重复3次。

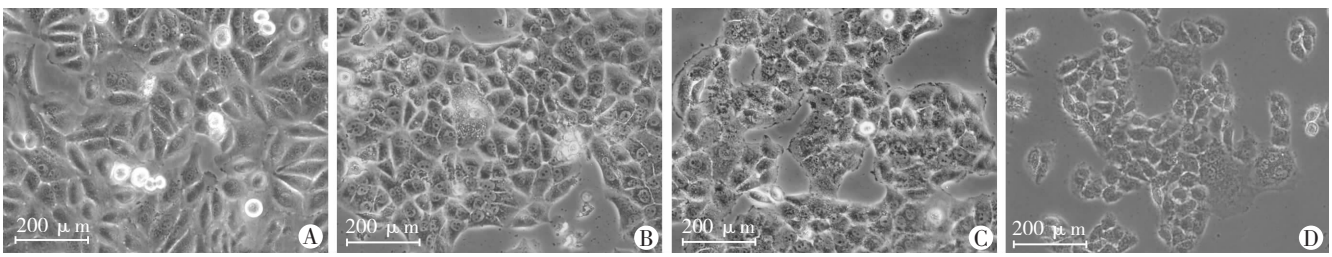
1.3　统计学方法

用SPSS 11.0统计软件对各实验组间数据差异进行方差分析,以$\bar{x}\pm s$表示结果,以$P<0.05$为有统计学意义。

2　结果

2.1　鳖甲煎改良方含药血清影响HSC-T6细胞生长的形态观察

倒置显微镜下观察结果显示,与空白对照组(图1A)比较,低剂量组细胞胞体稍变小、变圆(图1B);中剂量组细胞胞体也变小、变圆,细胞贴壁能力降低(图1C);高剂量组细胞胞体变小、变圆程度加重,部分细胞死亡,见少量细胞碎片(图1D)。可见,鳖甲煎改良方含药血清可抑制HSC-T6细胞的生长,且该抑制呈剂量-效应关系。

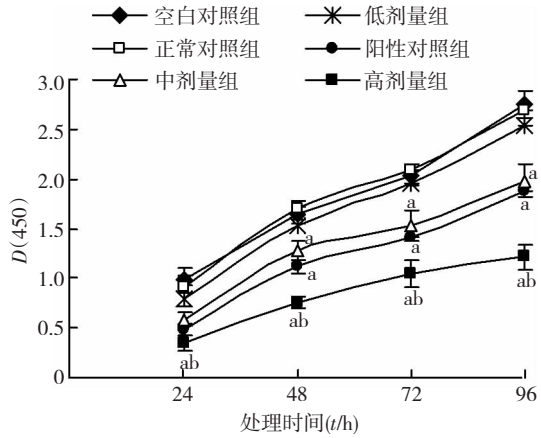


A:空白对照组;B:低剂量组;C:中剂量组;D:高剂量组

图1　鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6细胞生长的影响　(倒置显微镜)

2.2 鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示,高、中及低剂量组均能抑制 HSC-T6 细胞的增殖,其中高剂量组对 HSC-T6 细胞生长增殖的抑制作用最明显,与低剂量组、中剂量组、空白对照组、阳性对照组及正常对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$,图 2)。不同剂量的鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞增殖抑制的强弱依次为:高剂量组 > 中剂量组 > 低剂量组。可见,鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞生长的抑制作用呈"剂量-效应"关系。



a:$P<0.01$,与低剂量组、空白对照组及正常对照组比较;
b:$P<0.05$,与中剂量组及阳性对照组比较

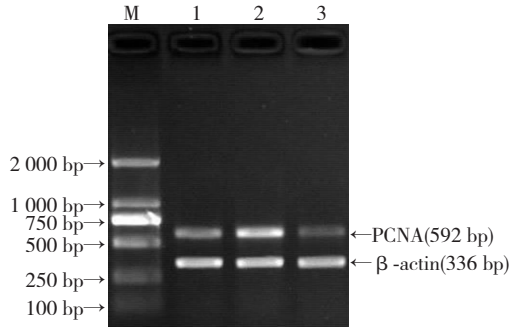
图 2 CCK-8 检测鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞增殖的影响

2.3 鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞 PCNA 基因表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,以经高剂量组的 HSC-T6 细胞总 RNA 为模板,可检测到 PCNA 基因的较弱表达;以阳性对照组的 HSC-T6 细胞总 RNA 为模板,检测到 PCNA 基因的较强表达;以空白对照组细胞总 RNA 为模板,检测到的 PCNA 基因的表达最强(图 3)。由此提示,鳖甲煎改良方含药血清可在 mRNA 水平抑制 HSC-T6 细胞的增殖。

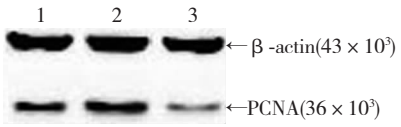
2.4 鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞 PCNA 蛋白表达的影响

Western blot 检测经高剂量组 HSC-T6 细胞在相对分子质量 3.6×10^4 处可见较弱的 PCNA 抗原染色条带;而阳性对照组 HSC-T6 细胞在相对分子质量 3.6×10^4 处出现的 PCNA 抗原染色条带则较强,空白对照组 HSC-T6 细胞在相对分子质量 3.6×10^4 处出现的 PCNA 抗原染色条带则最强(图 4)。由此提示,鳖甲煎改良方含药血清能在蛋白水平抑制 HSC-T6 细胞的增殖。



M:DNA 标准;1:阳性对照组;2:空白对照组;3:高剂量组

图 3 鳖甲煎改良方含药血清影响 HSC-T6 细胞 PCNA 基因表达的 RT-PCR 检测结果



1:阳性对照组;2:空白对照组;3:高剂量组

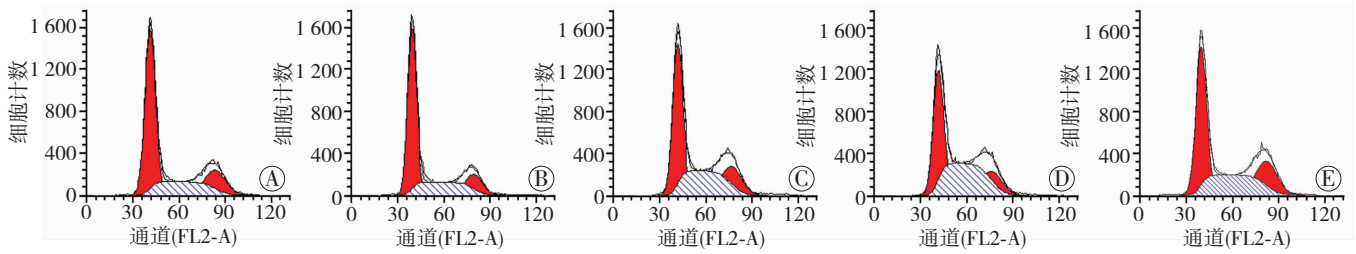
图 4 鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞 PCNA 蛋白表达的影响

2.5 鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 周期的影响

FCM 细胞周期检测结果显示,与正常对照组(图 5A)比较,低剂量组 G_1 期及 S 期的变化均不明显(图 5B);中剂量组 G_1 期细胞降低(10.23 ± 0.08)%,S 期细胞增加(9.64 ± 0.06)%(图 5C),可见,HSC-T6 被阻滞于 S 期,其差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量组 G_1 期细胞降低(17.44 ± 0.11)%,S 期细胞增加(19.36 ± 0.16)%(图 5D),可见,HSC-T6 被阻滞于 S 期,其差异有统计学意义($P<0.01$)。与阳性对照组(图 1E)比较,高剂量组 G_1 期细胞降低(5.79 ± 0.05)%,S 期细胞增加(11.71 ± 0.13)%,HSC-T6 亦被阻滞于 S 期,其差异有统计学意义($P<0.05$)。

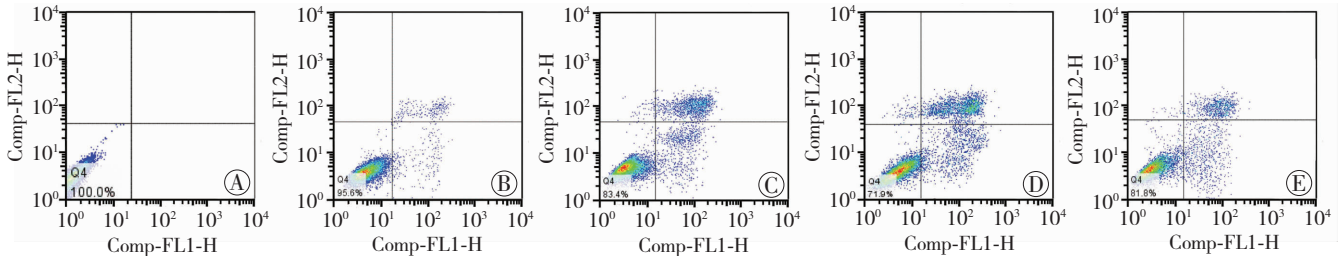
2.6 鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 凋亡的影响

FCM 细胞凋亡检测结果显示,与正常对照组(未见凋亡发生,图 6A)比较,低剂量组凋亡率为(6.86 ± 0.18)%(图 6B),其差异无统计学意义($P>0.05$);中剂量组凋亡率为(16.24 ± 1.08)%(图 6C),其差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量组凋亡率为(27.38 ± 1.54)%(图 6D),其差异有统计学意义($P<0.01$)。与阳性对照组(图 6E)比较,高剂量组凋亡率增加(9.54 ± 0.64)%,其差异有统计学意义($P<0.05$)。这些数据提示,鳖甲煎改良方含药血清能诱导 HSC-T6 凋亡。



A:正常对照组;B:低剂量组;C:中剂量组;D:高剂量组;E:阳性对照组

图5 鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6细胞周期的影响



A:正常对照组;B:低剂量组;C:中剂量组;D:高剂量组;E:阳性对照组

图6 鳖甲煎改良方含药血清对HSC-T6细胞凋亡的影响

3 讨论

肝纤维化是因ECM合成与降解失衡所致,是各种肝病发展为肝硬化的共同途径[6-7]。正常HSC位于肝窦Disse间隙内,HSC的激活是肝纤维化形成的中心环节,在肝损伤修复过程中发挥作用[8-9]。肝损伤后,HSC受各种致病因子刺激,从静态转化为具增生性、纤维原性和可收缩性的肌成纤维细胞[10],肌成纤维细胞产生大量ECM沉积于肝脏,最终导致肝纤维化。因此,抑制HSC的生长、增殖,诱导其凋亡,以减少ECM生成应是治疗肝纤维化的重要策略,寻找能以HSC为作用靶点,进而影响其生物学行为的药物可能是治疗肝纤维化的新手段。

大鼠肝星状细胞株HSC-T6由SV40的T抗原转染大鼠原代HSC而来,是活化型的HSC株,是比较理想的肝纤维化研究用细胞模型[11-13]

就肝纤维化形成的中医论机制而言,研究者们认为肝郁脾虚、气滞血瘀、正虚邪恋是其主要机制。为此提出疏肝解郁、益气健脾、活血化瘀、扶正祛邪的治疗方案。

鳖甲煎丸由鳖甲、地鳖虫、桃仁等23味中药组成,具有活血化瘀、软坚散结之功效。现代研究表明,其方中的鳖甲、地鳖虫、桃仁等具抑制结缔组织增生的作用,鳖甲富含蛋白质、氨基酸、微量元素,能提高血浆蛋白,鳖甲煎丸在防治慢性肝病方面拥有光辉的前景[2]。但由于鳖甲煎丸药味较多,方中的部分药味具一定毒副作用或获得较困难限制了其临床的普遍应用。该方驱邪之力强,但扶正之力颇显不足,正气虚者不宜长期服用。为此,我们在多年的临床实践中对该方不断优化,获得了鳖甲煎改良方。

我们保留鳖甲煎丸具有软坚散结、活血化瘀等功效的8味中药,弃去其长期服用易伤正气、恋邪气与气味厚重的15味中药,加入黄芪、茯苓以益气健脾及扶正祛邪,茵陈为引经药,能入肝经,具保肝利胆作用,从而形成鳖甲煎改良方。我们前期研究以40% CCl_4处理(3 mL/kg)8周复制中毒肝纤维化模型(模型组),复制模型的同时分别用鳖甲煎改良方高剂量组28.4 g/(kg·d)、中剂量组14.2 g/(kg·d)、低剂量组7.1 g/(kg·d)灌胃治疗,结果表明,8周后,与模型组比较,鳖甲煎改良方高、中、低剂量组肝小叶结构破坏明显减轻,部分肝细胞脂肪变性,炎性细胞浸润与少量胶原纤维形成[3-4]

中药含药血清的药理学实现了体外实验和体内实验的极佳结合,尤其适合中药及中药复方成分复杂的特点,现已成为中药及其复方的药理学研究的重要方法,采用中药或其复方的含药血清代替原药物的水煎液或粗提物作为供试材料,加入反应体系进行体外实验,可以提高中药或其复方体外实验结果的科学性、可

信性[14]。本实验在离体水平研究不同剂量的鳖甲煎改良方大鼠含药血清对 HSC-T6 细胞生长、增殖、周期及凋亡的影响,探讨鳖甲煎改良方的抗肝纤维化机制,以期为肝纤维化的防治奠定基础。CCK-8 检测结果显示,高、中及低剂量组 24、48、72 h 及 96 h 均能抑制 HSC-T6 细胞增殖,对 HSC-T6 细胞增殖抑制的强弱依次为:高剂量组 > 中剂量组 > 低剂量组,鳖甲煎改良方含药血清对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用呈"剂量-效应"关系。mRNA 与蛋白水平检测结果显示,与空白对照组和阳性对照组比较,高剂量鳖甲煎改良方含药血清处理 HSC-T6 细胞 72 h 能下调其增殖相关基因 PCNA 及其编码蛋白的表达。细胞周期检测结果显示,中、高剂量组细胞周期均被阻滞于 S 期,与正常对照组比较,其差异均具有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。细胞凋亡检测结果显示,中、高剂量组凋亡率明显增加,与正常对照组比较,其差异具有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。由此提示,鳖甲煎改良方可能是通过抑制激活 HSC 的增殖,诱导其凋亡,使其 ECM 的合成减少,以达到缓解或抑制肝纤维化的目的的。

参考文献:

[1] Mann D A, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2010, 52(6): 949 - 950. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.02.005

[2] 孙玉凤, 李媛, 李风华, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 TGF-β1/samd 信号通路的影响[J]. 中草药, 2013, 44(23): 3364 - 3367.

[3] 艾志波, 张荣华, 闫国和, 等. 鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化的作用及其机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 274 - 277. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.03.004

[4] 艾志波, 张荣华, 闫国和. 鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(1): 13 - 18.

[5] Xiang Y, Li Q, Huang D, *et al*. Preparation and antitumor effect of a toxin-linked conjugate targeting vascular endothelial growth factor receptor and urokinase plasminogen activator [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(2): 160 - 168. DOI: 10.1177/1535370214547154

[6] Kim J H, Lee S, Lee M Y, *et al*. Therapeutic effect of Soshiho-tang, a traditional herbal formula, on liver fibrosis or cirrhosis in animal models: a systematic review and meta-analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(1): 1 - 16. DOI: 10.1016/j.jep.2014.03.034

[7] Salkic N N, Jovanovic P, Hauser G, *et al*. FibroTest/Fibrosure for significant liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B: a meta-analysis[J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(6): 796 - 809. DOI: 10.1038/ajg.2014.21

[8] Soon R K Jr, Yee H F Jr. Stellate cell contraction: role, regulation, and potential therapeutic target[J]. Clin Liver Dis, 2008, 12(4): 791 - 803, viii. DOI: 10.1016/j.cld.2008.07.004

[9] Friedman S L. Hepatic fibrosis - overview[J]. Toxicology, 2008, 254(3): 120 - 129.

[10] Marra F. Hepatic stellate cells and theregulation of liver inflammation[J]. J Hepatol, 1999, 31(6): 1120 - 1130.

[11] Jeong E J, Kim N H, Heo J D, *et al*. Antifibrotic compounds from Liriodendron tulipifera attenuating HSC-T6 proliferation and TNF-α production in RAW264.7 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(2): 228 - 234. DOI: 10.1248/bpb.b14-00583

[12] Dai L, Ji H, Kong X W, *et al*. Antifibrotic effects of ZK14, a novel nitric oxide-donating biphenyldicarboxylate derivative, on rat HSC-T6 cells and CCl4-induced hepatic fibrosis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(1): 27 - 34. DOI: 10.1038/aps.2009.170

[13] 张荣华, 闫国和, 汪国建, 等. 慢病毒介导 shRNA 沉默鼠肝星状细胞 TGF-β1 对 α1 Ⅰ型胶原表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(5): 456 - 460. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.05.008

[14] 李慧, 姚建华, 田芝奥, 等. 季德胜蛇药含药血清对人肝癌细胞 Hep-G2 增殖和凋亡的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(1): 32 - 33, 37.

(**收稿**:2015-08-20;**修回**:2015-10-15)

(编辑 王 红)