基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000876

丹参含药血清调节大鼠肝星状细胞 TGF-β1 及细胞周期素 CyclinD1 的机制研究

叶　凤，曹文富
（重庆医科大学附属第一医院中西医结合科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究丹参含药血清调节大鼠肝星状细胞内转化生长因子 β1（transforming growth factor β1，TGF-β1）及细胞周期素 CyclinD1 的机制。**方法**：将 20 只 Sprague-Dawley（SD）大鼠按照随机数字表法随机分为丹参低剂量组（1.04 g/kg）、中剂量组（2.08 g/kg）、高剂量组（4.17 g/kg）、空白组，并分别制备含药血清。体外传代培养肝星状细胞经 10 ng/ml 血小板衍生生长因子-BB（platelet-derived growth factor-BB，PDGF-BB）诱导后，再给予相应的含药血清干预，37 ℃培养 24 h 后收集细胞。经高效液相色谱法（HPLC）检测血清中丹参成分，qRT-PCR 测定视黄酸受体-α（retinoic acid receptor α，RXR-α）及 TGF-β1 mRNA，用 Western blot 法检测 α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、Ⅰ型胶原蛋白（Collagen Ⅰ）及细胞周期素 CyclinD1 蛋白的表达情况。**结果**：丹参不同剂量处理组中，RXR-α mRNA 表达量逐渐增加，而 TGF-β1 mRNA、α-SMA 蛋白、Collgen Ⅰ蛋白和 CyclinD1 蛋白表达逐渐降低，且与对照组比有统计学差异。**结论**：丹参含药血清可能通过促进 RXR-α 表达，抑制 TGF-β1 及 CyclinD1 表达，抑制肝星状细胞的增殖，进而抑制肝纤维化。

【关键词】视黄酸受体；转化生长因子-β1；细胞周期素 D1；丹参含药血清；肝星状细胞；肝纤维化；高效液相色谱法
【中图分类号】R285.5　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-11-11

Mechanism of Danshen drug-containing serum on TGF-β1 and CyclinD1 in hepatic stellate cells

Ye Feng, Cao Wenfu
(*Teaching and Research Section of Integration of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the mechanism of Danshen drug-containing serum on transforming growth factor β1 (TGF-β1) and CyclinD1 in hepatic stellate cells. ***Methods***: According to the random number table, 20 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the Danshen (1.04 g/kg, 2.08 g/kg, and 4.17 g/kg dosage) groups and normal control group. Blood was collected after gastric perfusion at 2 hours on 10th day. The method of high performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the composition of Danshen in serum. HSCs were cultured *in vitro* and stimulated with platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), then were treated separately with the serum of Danshen (high, middle, and low dosage), normal saline for 24 hours. After cells being collected, the expressions of retinoic acid receptor and TGF-β1 mRNA were measured by real-time PCR (qRT-PCR), the content of α-smooth muscle actin (α-SMA), type Ⅰ collagen and CyclinD1 were detected by Western blot. ***Results***: Compared with the normal control group, Danshen (low, middle, and high) groups could increase the expressions of retinoic acid receptor mRNA, and decrease the contents of TGF-β1 mRNA, α-SMA, type Ⅰ collagen and CyclinD1. ***Conclusion***: Danshen may be achieved through increasing the expression of retinoic acid receptor and reducing TGF-β1 and CyclinD1 to inhibit the proliferation of HSCs, thus play a role of inhibition in liver fibrosis.

【Key words】retinoic acid receptor; transforming growth factor β1 (TGF-β1); CyclinD1; Danshen drug-containing serum; hepatic stellate cells; hepatic fibrosis; high performance liquid chromato-graphy

作者介绍：叶　凤，Email：1114568226@ qq.com，
研究方向：中西医结合临床（肾病与内分泌、风湿病）。
通信作者：曹文富，Email：caowenfu9316@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81573860）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160311.1712.004.html
（2016-03-11）

肝纤维化(hepatic fibrosis,HF)的形成主要特点是细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的异常增多和大量沉积,而 ECM 主要来源于活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs),人 HSCs 的活化与增殖是肝纤维化形成的中心环节[1-2]。事实上,肝纤维化在一定程度上是可逆的[3],因此,从 HSCs 活化机制中寻找分子靶点的研究可能成为治疗肝纤维化的关键。实验表明,肝纤维化时肝内视黄酸受体-α(retinoic acid receptor α,RXR-α)的水平下降,而过表达的 RXR-α 抑制 HSCs 细胞活化标志物 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)及 ECM 主要成分 Collagen Ⅰ的表达,抑制HSCs 的增殖,减轻肝纤维化的程度[4-5]。

目前认为血瘀是肝纤维化基本病机之一,临床治疗慢性肝病时在辨证论治的基础上加强活血化瘀的应用多能取得更好的疗效,因此采用活血化瘀药成为抑制肝纤维化的有效方法[6]。丹参作为活血化瘀类中药的代表,是临床治疗肝病和肝纤维化时使用最多的活血化瘀中药[7]。其可能的机制在于通过促进 RXR-α 表达,抑制 HSCs 活化,从而减轻甚至逆转肝纤维化。本实验采用丹参含药血清干预 HSCs 内 α-SMA、Collagen Ⅰ、RXR-α、转化生长因子 β1(transforming growth factor β1,TGF-β1)及 CyclinD1的表达,进一步探讨丹参含药血清作用于 HSCs 的机制,为丹参治疗肝纤维化的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级 sprague dawley(SD)大鼠 20 只,雌雄各半,购自重庆医科大学实验动物中心,饲养于 SPF 级动物房,动物许可证号:[SYXK(渝)2012-0001],体质量为(200 ± 20) g。实验前适应性饲养 1 周。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 实验细胞 大鼠肝星状细胞 HSC-T6 购自重庆医科大学附属第二医院消化科。

1.1.3 实验药物 丹参饮片(购自重庆医科大学附属第一医院中药房),符合 2010 年版《中国药典》规定标准。

1.1.4 主要试剂与器材 PDGF-BB(PROSPEC 公司,货号cyt-740,规格 2 μg);丹参素对照品(上海源叶,货号 B20254-20 mg,规格 20 mg);丹参酮 IIA 对照品(上海源叶,货号B20257-20,规格 20 mg);兔抗 Collagen Ⅰ多克隆抗体(BIOSS 公司,货号 bs-0578R,规格 0.1 ml);兔抗 α-SMA 多克隆抗体(BIOSS 公司,货号 bs-10196R,规格 0.1 ml);兔抗 cyclin D1 多克隆抗体(BIOSS 公司,货号 bs-0623R,规格 0.1 ml);Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒(TOYOBO 公司);SDS-PAGE 凝胶试剂盒(上海碧云天生物技术研究所)。岛津高效液相色谱仪(日本岛津 LC-20A);倒置相差显微镜(上海 Olympμs,型号CXX41);离心机(德国 Eppendorf 公司,型号 5702);CFX PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);高压灭菌锅(致微有限公司,型号G154DWS);电子精密天平(METTLER TOLEDO)。

1.2 方法

1.2.1 药物制备 根据"动物与人体的每公斤体质量计量折算系数表",成人与大鼠的折算系数为 6.25,按《中国药典》(2010 版)丹参的用量 10 g 作为人的临床剂量,成人体质量以 60 kg 计算,换算成 SD 大鼠的剂量,以此剂量为低剂量组,再以其 2 倍、4 倍剂量作为中、高剂量组,制备丹参低剂量组(1.04 g/kg)、丹参中剂量组(2.08 g/kg)及丹参高剂量组(4.17 g/kg)水煎剂。储存于-20 ℃冰箱中备用。

1.2.2 含药血清制备 清洁级 SD 大鼠 20 只,随机分为 4 组,每组各 5 只,SPF 级动物房适应性饲养 1 周后,空白组给予生理盐水每只 10.0 ml/(kg·d),丹参低中高剂量组分别给予丹参低、中、高剂量水煎剂 10.0 ml/(kg·d)灌胃,每天 1 次,连续给予 10 d。最后 1 次灌胃 2 h 后,乙醚麻醉下由非抗凝真空采血管经心脏采血。将收集的血液于 4 ℃冰箱中静置过夜后离心,取上层血清。将各组血清均置于 56 ℃ 恒温水浴锅中灭活 30 min,于超净台用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装至无菌 EP 管中,储存于 -80 ℃冰箱中备用。

1.2.3 给药血清中丹参素、丹参酮 IIA 定性 采用高效液相色谱法(HPLC)

1.2.3.1 流动相考察 考察了以下流动相对给药后血清样品测定的影响,流动相 A:乙腈-0.1%甲酸水;流动相 B:乙腈-1%醋酸水。结果表明,只有流动相 B 使丹参素、丹参酮 IIA 和内标达到了基线分离,且极性较小的酚酸类成分基本不干扰样品中丹参素和丹参酮 IIA 的测定。

1.2.3.2 梯度洗脱程序确定 经上述实验选定的色谱条件为 4.6 mm × 250 mm(Hypersil ODS_2 5 μm,型号:E2117074,批号:10643,大连伊利特);流动相:乙腈-1%醋酸水溶液,进行梯度洗脱;检测波长:270 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃。见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 The elution gradient

时间(min)	乙腈(%)
0~	10~
10~	20~
27~	33~
30~	70~
50~	85~
55~60	10

1.2.3.3 线性关系考察 分别将不同浓度的对照品溶液进样分析，以各成分的峰面积为纵坐标（Y），浓度（X）为横坐标，分别计算各成分的线性回归方程及相关系数。

1.2.3.4 样品中丹参素和丹参酮的含量测定 取丹参高、中、低含药血清，按“2.3.2”项下色谱条件分析，测定峰面积，重复 3 次，以外标法计算样品中丹参素和丹参酮 IIA 的含量。

1.2.4 细胞干预 将生长状态良好，处于指数生长期的肝星状细胞分为 4 组：模型组、丹参低剂量组、丹参中剂量组和丹参高剂量组。各实验组均先加 PDGF-BB 处理 0.5 h（PDGF-BB 终浓度为 10 ng/ml），再分别加含 10%空白血清的 RPMI1640 培养基、含 10%丹参低剂量血清的 RPMI1640 培养基、含 10%丹参中剂量血清的 RPMI1640 培养基、含 10%丹参高剂量血清的 RPMI1640 培养基培养于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中，24 h 后收集细胞。

1.2.5 α-SMA、Collagen Ⅰ及细胞周期素 CyclinD1 蛋白含量检测 采用 Western blot 将细胞加入预冷裂解液收集裂解物得到细胞总蛋白，细胞蛋白行 SDS-PAGE 并转印至 PVDF 膜；加入 5%脱脂奶粉室温下封闭 2 h，加入一抗；TBST 洗膜后，加入二抗，室温下孵育 2 h；增强化学发光法（ECL）发光试剂显色，再经显影、定影后行灰度分析。

1.2.6 视黄酸受体及 TGF-β1 mRNA 的表达 采用 qRT-PCR TRIzol 法提取 RNA 并纯化，紫外分光光度计测定 $A_{260\,nm/280\,nm}$ 值在 1.8~2.0 之间。制备第 1 条 c-DNA：逆转录（20 μl 体系），加入 PCR 仪中反应；PCR 反应体系为 cDNA 2 μl、上下游引物各 0.3 μl（PCR 引物如下：RXR-α 上游：5'-GAGGCAAACAT-GGGGCTGAAC-3'；下游：5'-CCAGGGGCAGCTCAGAAAAG-3'；TGF-β1 上游：5'-CCGACCCTTCCTGCTCCTCATG-3'；下游：5'-CCGGGTTG-TGTTGGTTGTAGAGG-3'；β-actin 上游：5'-ACCCCGTGC-TGCTGACCGAG-3'；下游：5'-TCCCGGCCAG-CCAGGTCCA-3'）、2×SYBR Green 10 μl、H_2O 7.4 μl，总共 20 μl。PCR 反应条件：预变性（94 ℃ 5 min）；35 个循环；94 ℃ 30 s；59 ℃ 30 s；72 ℃ 30 s；最后 72 ℃延伸 10 min，4 ℃冰箱保存备用。

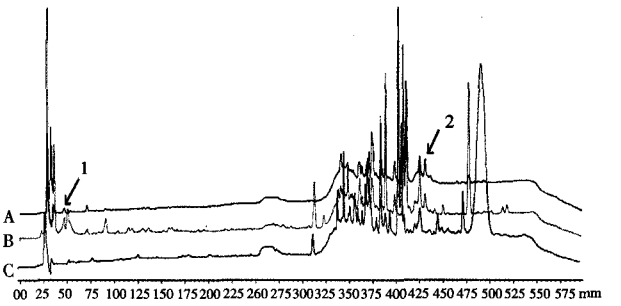
1.3 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析，正态分布的计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。3 组及 3 组以上的比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验进行统计学分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 丹参含药血清中丹参素、丹参酮 IIA 测定

2.1.1 丹参含药血清中丹参素、丹参酮 IIA 的定性 高效液相色谱图显示对照品丹参素、丹参酮 IIA 色谱峰保留时间分别为 4.7、43 min。丹参含药血清组色谱图在与对照品相应保留时间处出现丹参素、丹参酮 IIA 的色谱峰，空白血清组的色谱图在相同的保留时间处没有出现上述色谱峰（见图 1）。



A：丹参素、丹参酮 IIA 混合对照品；B：丹参含药血清；C：空白血清；1：丹参素；2：丹参酮 IIA

图 1 丹参素、丹参酮 IIA 混合对照品、丹参含药血清及空白血清的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of hybrid reference substance, Danshen drug-containing serum and normal saline serum

2.1.2 丹参含药血清中丹参素、丹参酮 IIA 的定量 以峰面积积分值（A）为纵坐标，对照品进样量（m）为横坐标，绘制标准曲线，得丹参素、丹参酮 IIA 的回归方程。结果表明，丹参素、丹参酮 IIA 分别在 0.020 8~0.666 0、0.003 1~0.100 0 μg 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。经 3 次峰面积的平均值，以外标法求得丹参高剂量组中丹参素和丹参酮 IIA 含量明显高于丹参低、中剂量组（见表 2、3）。

表 2 2 种活性成分对照品标准曲线

Tab.2 Calibration curve of two active ingredients

成分	回归方程	r（n=6）	线性范围/μg
丹参素	A=2 053.4 m + 783.9	1.000 0	0.020 8~0.666 0
丹参酮 IIA	A=77 647.0 m + 1 046.6	0.999 5	0.003 1~0.100 0

表 3 样品测定结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Analytical results of samples（$\bar{x}\pm s$，n=3）

样品	丹参素（μg/ml）	丹参酮 IIA（μg/ml）
丹参低剂量组	0.015 0 ± 0.005 5	0.001 8 ± 0.001 3
丹参中剂量组	0.035 0 ± 0.015 0	0.005 0 ± 0.001 0
丹参高剂量组	1.390 0 ± 0.020 0	0.180 0 ± 0.010 0

2.2 丹参含药血清对 PDGF-BB 刺激的肝星状细胞 α-SMA、Collagen Ⅰ、CyclinD1 蛋白含量的影响

Western blot 显示与模型组相比，丹参含药血清低、中、高剂量组 α-SMA、Collagen Ⅰ、CyclinD1 含量均降低（P<0.05），且丹参中、高剂量组降低更明显（P<0.01）（图 2、表 4）。

2.3 丹参含药血清对肝星状细胞 RXR-α、TGF-β1 mRNA 表达量的影响

qRT-PCR 显示与模型组相比，丹参含药血清低、中、高剂量组 TGF-β1 mRNA 表达量下调，而 RXR-α mRNA 表达量上调（P<0.05），且丹参中、高剂量组降低更明显（P<0.01）（表 5）。

表 4 丹参含药血清对 PDGF-BB 刺激的肝星状细胞 α-SMA、Collagen Ⅰ、CyclinD1 蛋白含量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Effects of Danshen drug-containing serum on α-SMA,Collagen Ⅰ and CyclinD1 in HSCs（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	剂量(g/kg)	α-SMA	Collgen Ⅰ	CyclinD1
模型组	-	1.714 7 ± 0.033 5	1.674 3 ± 0.025 9	1.343 7 ± 0.035 8
丹参低剂量组	1.041 7	1.347 8 ± 0.002 8[a]	1.466 6 ± 0.029 9[a]	1.137 5 ± 0.025 0[a]
丹参中剂量组	2.083 3	1.215 7 ± 0.031 9[ab]	1.301 9 ± 0.034 5[ab]	0.870 1 ± 0.044 5[ab]
丹参高剂量组	4.166 7	0.866 2 ± 0.042 0[ab]	0.494 4 ± 0.029 6[ab]	0.310 3 ± 0.026 8[ab]
F 值	-	211.661	533.529	398.199
P 值	-	0.000	0.000	0.000

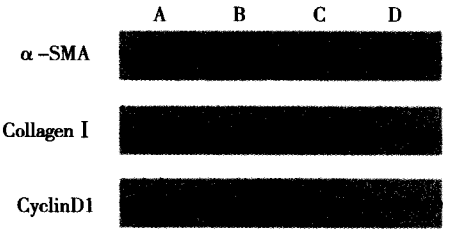
注：a，与模型组比较 $P<0.05$；b：与模型组比较 $P<0.01$

表 5 丹参含药血清对肝星状细胞 RXR-α、TGF-β1 mRNA 表达量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.5 Effects of Danshen drug-containing serum on the expression of RXR-α,TGF-β1 mRNA in HSCs（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	剂量（mg/kg）	RXR-α	TGF-β1
模型组	-	1.000 ± 0.062	1.003 ± 0.067
丹参低剂量组	1.042	2.100 ± 0.236[a]	0.853 ± 0.025[a]
丹参中剂量组	2.083	3.123 ± 0.229[ab]	0.580 ± 0.010[ab]
丹参高剂量组	4.167	4.047 ± 0.125[ab]	0.227 ± 0.006[ab]
F 值	-	235.923	304.458
P 值	-	0.000	0.000

注：a，与模型组比较 $P<0.05$；b：与模型组比较 $P<0.01$



A：模型组；B：丹参低剂量组；C：丹参中剂量组；D：丹参高剂量组

图 2 丹参含药血清对肝星状细胞 α-SMA、Collagen Ⅰ、CyclinD1 蛋白含量的影响

Fig.2 Effects of Danshen drug-containing serum on α-SMA, Collagen Ⅰ and CyclinD1 in HSCs

3 讨 论

肝纤维化是由 HSCs 被激活，转化成肌成纤维细胞（myofibroblast，MFB），大量分泌以 Collagen Ⅰ为主要胶原成分的 ECM，合成大于降解而沉积于肝组织间隙。血小板衍生生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）是目前已知的多肽生长因子中对 HSC 作用最强的有丝分裂原[8]。MFB 的特点之一是表达 α-SMA，α-SMA 常作为 HSC 激活的重要标志物[9]。故有效抑制 HSCs 的活化是抗纤维化的关键点。

中医学中将“肝纤维化”归属于“胁痛”、“黄疸”、“积聚”、“鼓胀”等范畴。中医辨证其病机特点多与气滞血瘀有关，目前普遍认为瘀血内阻是肝纤维化的病理基础。近年来许多中医药治疗肝纤维化临床研究证实，长期使用活血化瘀类药物或方药，可有效抑制肝纤维化的发展。有研究证实，在治疗肝纤维化中就单药而言，丹参的用药频次和频率高于其他药，在所有中药中排第一名[7]。现代药理研究证实，丹参能保护肝细胞，改善异常血液循环，加速肝细胞修复与再生，促进胶原降解，特别对实验性肝硬化有较好的防治及抗肝纤维化作用[10]。RXR-α可能是上述研究的通路。由于肝纤维化生理病理的复杂性，目前国内外临床上仍无理想的抗纤维化药物，因此研究丹参抗纤维化可能的机制意义重大。临床上中药口服后其有效成分经血液到达靶器官发挥治疗作用，即血清中所含有效成分才是中药的体内直接作用物质[11]。因此作者通过丹参含药血清来研究丹参治疗肝纤维化的机制。并且采用高效液相色谱法确定所制血清中是否含有丹参有效成分。

RXRs 在核受体家族中作为“Master Regulator”[12]，参与了很多不同核受体的信号传导过程，在生物体的整个生长发育过程中都起着至关重要的作用。研究表明，视黄酸受体配体的使用，可明显抑制肝纤

维化进展[13]。有研究证明 RXR-α 可通过转录水平的蛋白质-蛋白质作用模式与活性蛋白(activator protein-1,AP-1)作用[14-15]。肝星状细胞活化时 AP-1 蛋白表达增加及视黄酸含量减少,增加视黄酸及其受体的含量可抑制肝星状细胞的活化,减少 AP-1 驱动的 TGF-β1 的产生[16]。此外,Ap-1 作为 ERKs 下游重要的效应分子,直接调控细胞周期素(CyclinD1)的表达,调节细胞增殖水平[17]。由此可见,通过上调视黄酸受体表达,可能抑制 TGF-β1 及 CyclinD1 的表达,从而抑制肝纤维化。

根据上述肝纤维化发生发展过程中的相关因素,本实验通过观察丹参含药血清对经 PDGF-BB预处理后的体外传代培养 HSCs 内 RXR-α、TGF-β1、细胞周期素 CyclinD1 的影响及生物标志物 α-SMA、Collagen Ⅰ的调节作用,从分子水平来探讨丹参含药血清抗肝纤维化的作用机制。经实验结果分析,给药血清中含有丹参的主要水溶性成分丹参素和脂溶性成分丹参酮 IIA,表明所制备的丹参含药血清能够较真实地反映丹参的药效。丹参含药血清干预后,HSCs 中 RXR-α mRNA 表达上调,而 TGF-β1 mRNA 表达下调,同时细胞周期素 CyclinD1、α-SMA、Collagen Ⅰ蛋白含量均降低,表明丹参含药血清可抑制 PDGF-BB 刺激 HSCs 的活化,且其中丹参中、高剂量组上述变化趋势更明显,说明丹参含药血清对上述各因子的作用存在一定的剂量依赖关系。由此,作者推测:丹参含药血清可能通过增加视黄酸受体,使其与 AP-1 相互作用减少 TGF-β1 及 CyclinD1 表达,进而抑制肝星状细胞的活化和增殖,发挥抗纤维化的作用。

参 考 文 献

[1] Mederacke I,Hsu CC,Troeger JS,et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its etiology[J]. Nat Commun,2013(4):2823-2843.

[2] Hernandez-Gea V,Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol,2011(6):425-456.

[3] Ellis EL,Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis[J]. J Hepatol,2012,56(5):1171-1180.

[4] Oda Y,Nakajima M,Tsuneyama K,et al. Retinoid X receptor a in human liver is regulated bymiR-34a[J]. Biochem Pharmacol,2014,90(2):179-187.

[5] Wang Z,Xu JP,Zheng YC,et al. Effect of the regulation of retinoid X receptor-a gene expression on rat hepatic fibrosis[J]. Hepatol Res,2011,41(5):475-483.

[6] 刘鸣昊,薛博瑜. 近 5 年来肝纤维化中医证治用药规律的文献研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):279-282.

[7] 梁峰岗. 中医抗肝纤维化药证规律研究[D]. 武汉:湖北中医学院,2008.

[8] Tibaldi E,Zonta F,Bordin L,et al. The tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits proliferation of activated hepatic stellate cells by impairing PDGF receptor signaling[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1843(2):288-298.

[9] Schuppan D,Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis[J]. J Clin Invest,2013,123(5):1887-1901.

[10] 杨 倩,冯玉彦,蒋树林. 姚希贤瘀血论治慢性肝纤维化经验[J]. 中华中医药杂志,2007,22(3):168-171.

[11] 杨会锦,尹 华. 中药血清药物化学研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(5):399-402.

[12] Szanto A,Narkar V,Shen Q,et al. Retinoid X receptors:X-ploring their(patho) physiological functions[J]. Cell death Differ,2004,11(2s):126-143.

[13] Sharvit E,Abramovitch S,Reif S,et al. Amplified inhibition of stellate cell activation pathways by PPAR-γ,RAR and RXR agonists [J]. PloS One,2013,8(10):e76541-76551.

[14] Benkoussa M,Brand C,Delmotte MH,et al. Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter[J]. Mol Cell Biol,2002,22(13):4522-4534.

[15] Han JS,Crowe DL. Steroid receptor coactivator 1 deficiency increases MMTV-neu mediated tumor latency and differentiation specific gene expression,decreases metastasis,and inhibits response to PPAR ligands[J]. BMC Cancer,2010,16(10):629-643.

[16] Xu L,Kitani A,Stuelten C,et al. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I[J]. Immunity,2010,33(3):313-325.

[17] Davies CC,Chakraborty A,Cipriani F,et al. Identification of a co-activator that links growth factor signaling to c-Jun/AP-1 activation[J]. Nat Cell Biol,2010,12(10):963-972.

（责任编辑:张辉洁）