

【基础研究】

通信作者:李京涛(1981-),男,陕西西安人,博士,副主任医师,研究方向:中西医结合防治肝病的基础与临床研究;E-mail:lijingtao555@163.com

hours after the last administration, and the changes of body mass of mice in each group were observed. The liver mass of mice was weighed and the ratio of liver mass to body mass of mice in each group was calculated. The liver tissues of mice were taken. The pathological changes of liver tissues of mice were observed by hematoxylin-eosin staining and Mason staining. The localization and expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in liver tissues of mice was detected by immunohistochemical method. The expression of α -SMA, collagen type I A1 (COL1A1), tissue-inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) mRNA in liver tissues of mice were detected by real-time polymerase chain reaction. The expression of α -SMA and TGF- β_1 protein in liver tissues of mice were detected by western blot. **Results** There was no significant difference in the body mass of mice among the three groups before experiment ($F = 2.312, P > 0.05$). The body mass gain of mice in the liver fibrosis group and *Roumudan granules* group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). The body mass gain of mice in the *Roumudan granules* group was significantly higher than that in the liver fibrosis group ($P < 0.01$). The ratio of liver mass to body mass of mice in the liver fibrosis group was significantly higher than that in the control group and *Roumudan granules* group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the ratio of liver mass to body mass of mice between the control group and the *Roumudan granules* group ($P > 0.05$). The relative expression of α -SMA protein and mRNA in liver tissues of mice in the liver fibrosis group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The relative expression of α -SMA protein and mRNA in liver tissues of mice in the *Roumudan granules* group was significantly lower than that in the liver fibrosis group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the relative expression of α -SMA protein and mRNA between the *Roumudan granules* group and the control group ($P > 0.05$). The relative expression of COL1A1 and TIMP-1 mRNA in liver tissues of mice in the liver fibrosis group were significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The relative expression of COL1A1 and TIMP-1 mRNA in liver tissues of mice in the *Roumudan granules* group were significantly lower than that in the liver fibrosis group ($P < 0.01$). The relative expression of COL1A1 and TIMP-1 mRNA in liver tissues of mice in the *Roumudan granules* group were significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The relative expression of TGF- β_1 protein and mRNA in liver tissues of mice in the liver fibrosis group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The relative expression of TGF- β_1 protein and mRNA in liver tissues of mice in the *Roumudan granules* group was significantly lower than that in the liver fibrosis group ($P < 0.01$). The relative expression of TGF- β_1 protein and mRNA in liver tissues of mice in the *Roumudan granules* group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Roumudan granules* can improve CCl₄-induced liver fibrosis of mice by reducing the expression of α -SMA, COL1A1, TIMP-1 and TGF- β_1 in liver tissues.

Key words: liver fibrosis; *Roumudan granules*; carbon tetrachloride; α -smooth muscle actin; tissue-inhibitor of metalloproteinase-1; transforming growth factor- β_1

肝纤维化是慢性肝损伤导致的纤维生成和炎症反应过程,表现为肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度增生和异常沉积,导致肝脏的结构和功能异常,可发展为肝硬化,甚至肝癌,严重威胁人类的健康^[1-2]。柔木丹颗粒由黄芪、皂刺、鳖甲、枳壳、柴胡、赤芍、丹参、川芎、汉防己等组成,针对肝纤维化的中医病机和证型,方中黄芪甘温补气,皂刺、鳖甲软坚散结,枳壳、柴胡疏肝理气,赤芍、丹参、川芎活血散瘀,汉防己利湿消肿,诸药配伍寓“气行则血行”、“血行则瘀散”之意,达到补气活血、散结排毒之目的^[3]。本研究旨在探索柔木丹颗粒对小鼠肝纤维化的治疗作用,为其临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 清洁级雄性昆明小鼠 30 只,体质量 25 ~ 35 g,购自成都达硕实验动物有限公司,许可证号:SCXK(川)2015-030。将 30 只小鼠随机分为对照组、肝纤维化组及柔木丹组,每组 10 只。

1.2 主要试剂与仪器 柔木丹颗粒(陕西中医药大学附属医院制剂室,陕药制字 Z20160012);四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)、无水乙醇(上海国药集团化学试剂有限公司),阿格利司(AGRIC)欧丽薇娜特级初榨橄榄油(西班牙亿芭利橄榄油公司),TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、PrimeScript RT Master Mix、SYBR Premix Ex Taq II(日本 TaKaRa 公司),蛋白提取、定量及 Western blot 相关试剂(武汉博士德生物工程有限公司),Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(北京博奥森生物技术有限公司),抗转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)抗体(美国 Santa Cruz 公司),实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)引物(生工生物工程上海股份有限公司)。RM2235 石蜡切片机(德国徕卡公司),TC-120S 型生物组织自动脱水

机、TB-718EL 生物组织包埋机、TK-218II 生物组织摊片、烤片机(湖北泰维科技实业有限公司),A1 研究级正置数码显微镜(德国蔡司公司),BCD-579WE 低温冰箱(青岛海尔股份有限公司),JY3002 电子天平(上海精密科学仪器有限公司),蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),7500 实时 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司),手术用剪刀、注射器、小鼠灌胃针、小鼠笼具(陕西中医药大学医学科研实验中心)。

1.3 实验方法

1.3.1 肝纤维化小鼠模型的建立及给药 3 组小鼠给予基础饲料适应性喂养 1 周,于造模前 1 d 上午禁食不禁水 24 h。肝纤维化组和柔木丹组小鼠腹腔注射含体积分数 20% CCl₄ 的橄榄油混合液 5 mL·kg⁻¹,对照组小鼠腹腔注射相同体积的橄榄油,每周 2 次,连续 8 周;第 3 周起,柔木丹组小鼠灌胃柔木丹颗粒 4 g·kg⁻¹,每日 1 次,共 6 周;肝纤维化组和对照组小鼠灌胃相同体积的生理盐水。

1.3.2 小鼠体质量及肝质量测定 实验前称小鼠体质量,末次给药后小鼠禁食不禁水 24 h(实验后),称体质量;然后 100 g·L⁻¹ 水合氯醛溶液(4 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,取肝脏,称肝质量,计算体质量差及肝体比(肝体比=肝质量/体质量)。

1.3.3 小鼠肝组织病理学检测 取 0.2~0.3 cm 厚度的肝组织,浸入体积分数 10% 中性甲醛溶液固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片(厚度约 3 μm);按照常规步骤进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和 Masson 染色,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.3.4 免疫组织化学染色检测肝组织中 α-SMA 的表达 取肝组织石蜡切片,常规脱蜡至水,体积分数 3% H₂O₂ 室温避光孵育 10 min,纯水冲洗 3 次,每次 3 min;枸橼酸缓冲液煮沸 15 min 修复抗原,自然冷却至室温,磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min;50 g·L⁻¹ 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后滴加抗 α-SMA 的一抗(1:200 稀释),4℃ 孵育过夜,用含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution with Tween-20, PBST)冲洗 5 次,每次 3 min;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h, PBST 冲洗 5 次,每次 3 min;加链霉亲和素-生物素复合物室温孵育 40 min, PBST 冲洗 5 次,每次 3 min;二氨基联苯胺显色,苏木精复染,脱水,封片,显微镜下观察并拍照。

1.3.5 Real-time PCR 检测小鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β₁、COL1A1 和 TIMP-1 mRNA 的表达 取约 30 mg 肝组织,使用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取小鼠肝组织总 RNA。以总

RNA 为模板,经 PrimeScript RT Master Mix 反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板,按照 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒说明书进行 PCR。以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 α-SMA、TGF-β₁、I 型胶原蛋白 A1(collagen type I A1, COL1A1)、组织金属蛋白酶抑制剂 1(tissue-inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的相对表达量。α-SMA 上游引物序列为 5'-GGCTCTGGGCTCTGTAAGG-3',下游引物序列为 5'-CTCTTGCTCTGGGCTTCATC-3';COL1A1 上游引物序列为 5'-ACCTGTGTGT-TCCCTACTCA-3',下游引物序列为 5'-GACTGTTG-CCTTCGCCTCTG-3';TIMP-1 上游引物序列为 5'-GGTGTGCACAGTGTTCCTGTTT-3',下游引物序列为 5'-TCCGTCCACAAACAGTGAGTGTCA-3';TGF-β₁ 上游引物序列为 5'-GCCCTGGATACCAACTATTGC-3',下游引物序列为 5'-TGTTGGACAGCTGCTCCA-CCT-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-TGAACGG-GAAGCTCACTGG-3',下游引物序列为 5'-TCCACC-ACCCTGTTGCTGTA-3'。

1.3.6 Western blot 法检测小鼠肝组织中 α-SMA 和 TGF-β₁ 蛋白的表达 取 30 mg 肝组织,加入添加 Protease and Phosphatase Inhibitor 的蛋白裂解液 500 μL,充分匀浆,冰上孵育 2 h,12 000×g、4℃ 离心 10 min,吸取上清液,二喹啉甲酸法进行蛋白定量;加等量的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白样品转移至聚偏氟乙烯膜,用含 50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 1 h;分别加抗 β-actin(1:1 000)、抗 TGF-β₁(1:200)、抗 α-SMA(1:200)的一抗,4℃ 下在摇床上孵育过夜,用加 Tween-20 的 Tirs-HCl 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min;加辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度 1:1 000 的山羊抗小鼠 IgG 或 1:5 000 的山羊抗兔 IgG),室温下在摇床上孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次,每次 5 min。加电化学发光液,利用凝胶成像系统,选择合适的曝光时间拍照。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠体质量及肝体比比较 结果见表 1。实验前 3 组小鼠体质量比较差异无统计学意义($F = 2.312, P > 0.05$)。肝纤维化组和柔木丹组小鼠体质量增加显著小于对照组,差异有统计学意义

($P < 0.01$); 柔木丹组小鼠体质量增加显著大于肝纤维化组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。肝纤维化组小鼠肝体比显著大于对照组和柔木丹组, 差异

表 1 3 组小鼠体质量及肝体比比较

Tab.1 Comparison of the body mass and the ratio of liver mass to body mass of mice among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	实验前体质量/g	实验后体质量/g	体质量差/g	肝体比
对照组	6	36.56 ± 0.98	44.50 ± 0.88	7.94 ± 1.07	0.043 3 ± 0.001 5
肝纤维化组	6	36.75 ± 1.16	40.43 ± 1.64	3.68 ± 0.85 ^a	0.054 7 ± 0.005 3 ^a
柔木丹组	6	35.00 ± 1.91	41.14 ± 1.77	6.15 ± 0.62 ^{ab}	0.046 1 ± 0.003 4 ^b

注: 与对照组比较^a $P < 0.01$; 与肝纤维化组比较^b $P < 0.01$ 。

2.2 3 组小鼠肝组织病理学变化 结果见图 1。HE 染色结果显示, 对照组小鼠肝细胞排列整齐, 肝小叶结构完整; 肝纤维化组小鼠肝组织出现空泡, 肝细胞明显变形, 肝小叶结构严重破坏; 柔木丹组小鼠

肝组织损伤程度较肝纤维化组显著改善。Masson 染色结果显示, 与对照组相比, 肝纤维化组小鼠肝脏胶原纤维沉积, 出现明显的纤维化; 柔木丹组小鼠肝纤维化程度明显减轻。

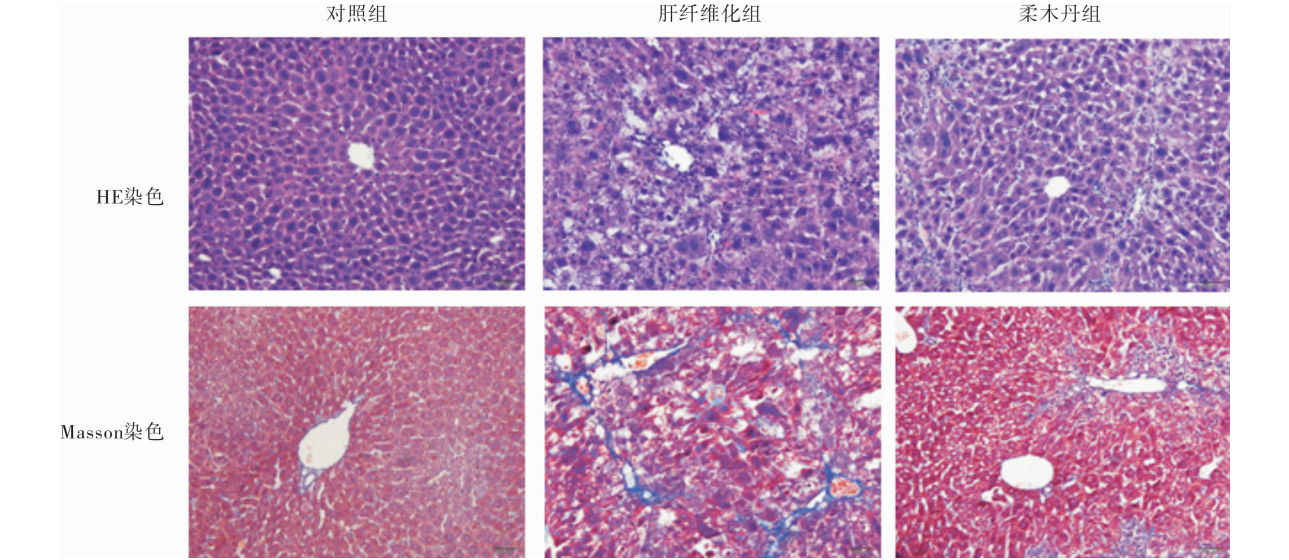
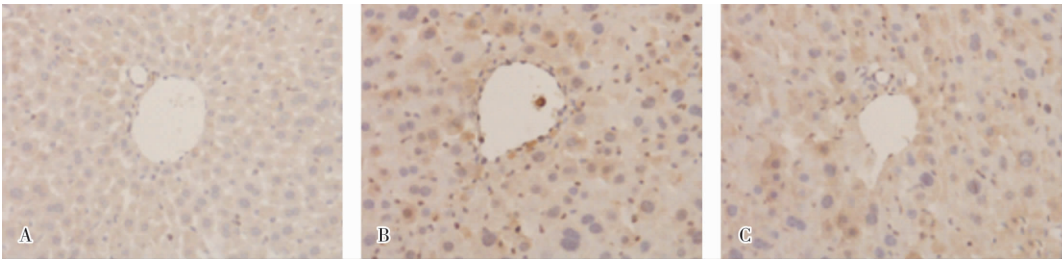


图 1 3 组小鼠肝组织病理学变化 (×100)

Fig.1 Pathological changes of liver tissues of mice in the three groups (×100)

2.3 3 组小鼠肝组织中 α -SMA 表达比较 结果见图 2、图 3 和表 2。免疫组织化学染色结果显示, 对照组小鼠肝组织中未见 α -SMA 阳性表达细胞; 肝纤维化组小鼠肝组织中 α -SMA 阳性表达细胞大量增加, 尤以中央静脉周围较明显; 柔木丹组小鼠肝组织中 α -SMA 阳性表达细胞较肝纤维化组减少, 中央静脉周围几乎无 α -SMA 阳性表达细胞。肝纤维化组

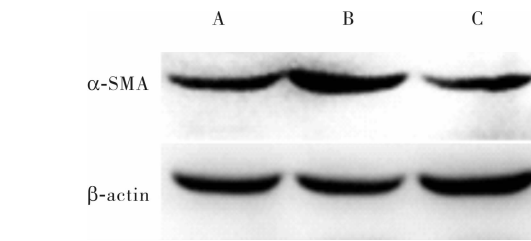
小鼠肝组织中 α -SMA 蛋白及 mRNA 相对表达量显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 柔木丹组小鼠肝组织中 α -SMA 蛋白及 mRNA 相对表达量显著低于肝纤维化组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 柔木丹组与对照组小鼠肝组织中 α -SMA 蛋白及 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A: 对照组; B: 肝纤维化组; C: 柔木丹组。

图 2 3 组小鼠肝组织中 α -SMA 的表达 (免疫组织化学染色, ×200)

Fig.2 Expression of α -SMA in liver tissues of mice in the three groups (immunohistochemical staining, ×200)



A:对照组;B:肝纤维化组;C:柔木丹组。

图3 3组小鼠肝组织中 α -SMA 蛋白的表达 (Western blot)

Fig. 3 Expression of α -SMA protein in liver tissues of mice in the three groups (Western blot)

表2 3组小鼠肝组织中 α -SMA 蛋白及 mRNA 相对表达量比较

Tab.2 Comparison of the relative expression of α -SMA protein and mRNA in liver tissues of mice among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	α -SMA 蛋白	α -SMA mRNA
对照组	6	0.82 ± 0.06	1.00 ± 0.06
肝纤维化组	6	1.50 ± 0.19 ^a	1.63 ± 0.09 ^a
柔木丹组	6	0.82 ± 0.04 ^b	0.97 ± 0.09 ^b

注:与对照组比较^a $P < 0.01$;与肝纤维化组比较^b $P < 0.01$ 。

2.4 3组小鼠肝组织中 COL1A1 及 TIMP-1 mRNA 表达比较 结果见表3。肝纤维化组小鼠肝组织中 COL1A1 和 TIMP-1 mRNA 相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);柔木丹组小鼠肝组织中 COL1A1 和 TIMP-1 mRNA 相对表达量显著低于肝纤维化组,差异有统计学意义($P < 0.01$);柔木丹组小鼠肝组织中 COL1A1 和 TIMP-1 mRNA 相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表3 3组小鼠肝组织中 COL1A1 及 TIMP-1 mRNA 相对表达量比较

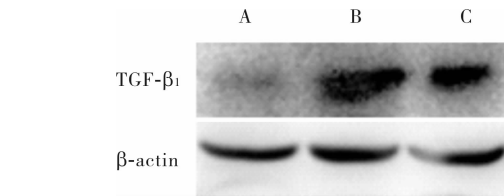
Tab.3 Comparison of the relative expression of COL1A1 and TIMP-1 mRNA in liver tissues of mice among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	COL1A1 mRNA	TIMP-1 mRNA
对照组	6	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.03
肝纤维化组	6	60.65 ± 3.31 ^a	8.34 ± 1.22 ^a
柔木丹组	6	17.06 ± 2.75 ^{ab}	4.65 ± 0.56 ^{ab}

注:与对照组比较^a $P < 0.01$;与肝纤维化组比较^b $P < 0.01$ 。

2.5 3组小鼠肝组织中 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达比较 结果见图4和表4。肝纤维化组小鼠肝组织中 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);柔木丹组小鼠肝组织中 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 相对表达量显著低于肝纤维化组,差异有统计学意义($t = 10.160$ 、

11.873, $P < 0.01$);柔木丹组小鼠肝组织中 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



A:对照组;B:肝纤维化组;C:柔木丹组。

图4 3组小鼠肝组织中 TGF- β_1 蛋白的表达 (Western blot)

Fig. 4 Expression of TGF- β_1 protein in liver tissues of mice in the three groups (Western blot)

表4 3组小鼠肝组织中 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 相对表达量比较

Tab.4 Comparison of the expression of TGF- β_1 protein and mRNA in liver tissues of mice among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TGF- β_1 蛋白	TGF- β_1 mRNA
对照组	6	0.90 ± 0.12	1.00 ± 0.03
肝纤维化组	6	2.18 ± 0.22 ^a	1.82 ± 0.11 ^a
柔木丹组	6	1.21 ± 0.08 ^{ab}	1.26 ± 0.04 ^{ab}

注:与对照组比较^a $P < 0.01$;与肝纤维化组比较^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

肝纤维化是多种原因引起的慢性肝损伤导致的纤维生成和炎症反应过程,是慢性肝病发展为肝硬化甚至肝癌的必经阶段^[4]。目前研究认为,肝纤维化阶段尚有逆转的可能,因此,寻找治疗肝纤维化的有效药物对肝硬化及肝癌的防治具有重要意义^[5-6]。CCl₄ 是一种选择性肝毒性药物,其进入肝脏后经氧化产生 CCl₃· 及 Cl· 自由基,引发活性氧自由基产生和脂质过氧化,损伤肝细胞,促进肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化,分泌大量 α -SMA、COL1A1 和 TIMP-1 等,破坏 ECM 的动态平衡,导致肝纤维化的发生^[7-8]。此外,坏死的肝细胞所释放的 TGF- β_1 可能是激活邻近 HSC 并使其分化为肌成纤维细胞的首要信号,对肝纤维化的发生、发展具有重要影响^[9]。

中医并无“肝纤维化”概念,根据其临床症状、体征及病理特征可归属于“胁痛”、“积聚”、“症瘕”、“鼓胀”等范畴,基本病机特点为气阴两虚、淤阻肝络,基本治法为益气养阴、活血化痰^[10-11]。由于肝纤维化是多因素、多环节相互作用的动态发展过程,而中药复方的优势恰好在于其作用具有多环节、多层次及多靶点性,且不良反应较少,因此,深入研究中药复方对肝纤维化的防治具有重要意义。

柔木丹颗粒治疗肝纤维化具有一定的效果,但其作用方式和机制尚不明确。本研究采用腹腔注射 CCl_4 的方法建立小鼠肝纤维化模型,并对模型小鼠灌胃柔木丹颗粒进行干预,以探索柔木丹颗粒对肝纤维化的治疗效果及相关机制。本研究结果显示,柔木丹颗粒可以显著改善小鼠肝纤维化,减少胶原纤维沉积,使肝脏损伤得到改善,肝小叶结构趋于正常。 $\alpha\text{-SMA}$ 在活化的 HSC 中大量表达,是肝纤维化的重要标志^[12]。本研究结果显示,柔木丹颗粒可以显著降低小鼠肝组织中 $\alpha\text{-SMA}$ 的表达,但其作用是通过促进活化的 HSC 凋亡还是抑制 HSC 的活化而实现,还有待深入研究^[13]。 COL1A1 是 ECM 的重要组成部分,在肝内占蛋白总量的 5% ~ 10%,当肝脏发生纤维化时,胶原蛋白含量可增加至约 50%^[14]。 TIMP-1 在肝纤维化进展过程中持续保持高水平,可与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)结合,使沉积的 ECM 不能被降解,导致 MMP 与 TIMP 之间平衡被破坏,进一步促进肝纤维化的发生^[15]。本研究结果显示,柔木丹颗粒能够显著降低 COL1A1 和 TIMP-1 的转录水平。 $\text{TGF-}\beta_1$ 是一种重要的细胞因子,不仅可诱导 HSC 的活化,还能激活 $\text{TGF-}\beta_1/\text{Smad}$ 信号转导通路,从而促进炎症反应,在肝纤维化中扮演着重要角色。本研究结果显示,柔木丹颗粒可以降低 $\text{TGF-}\beta_1$ 的表达,但其是否会影响 $\text{TGF-}\beta_1/\text{Smad}$ 信号转导通路中其他信号转导分子的作用,还有待进一步研究。

综上所述,柔木丹颗粒能够降低 HSC 中肝纤维化相关基因 $\alpha\text{-SMA}$ 、 COL1A1 和 TIMP-1 的表达,其作用可能是通过抑制 $\text{TGF-}\beta_1/\text{Smad}$ 信号转导通路中 $\text{TGF-}\beta_1$ 的表达而实现的。该研究可能为柔木丹颗粒在肝纤维化防治中的临床应用提供一定的理论依据。

参考文献:

[1] DONGIOVANNI P, ROMEO S, VALENTI L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(36): 12945-

12955.

- [2] SUN M, KISSELEVA T. Reversibility of liver fibrosis[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39(Suppl 1): S60-S63.
- [3] 郭英君. 柔木丹颗粒治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2007.
- [4] 罗宏丽, 肖顺林, 冯碧敏. 抑毒调肝合剂对四氯化碳复合因素所致肝纤维化大鼠的保护作用[J]. *医药导报*, 2017, 36(11): 1244-1249.
- [5] PANEBIANCO C, OBEN J A, VINCIGUERRA M, et al. Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR-gamma signaling[J]. *Clin Exp Med*, 2016, 17(3): 269-280.
- [6] 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.
- [7] 叶国荣, 舒建昌, 何雅军, 等. 四氯化碳腹腔注射致大鼠肝纤维化机理研究[J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(2): 175-178.
- [8] 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.
- [9] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2016, 64(3): 157-167.
- [10] 刘梅, 张斌. 从痰论治肝纤维化[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(3): 310-314.
- [11] 程亚伟, 胡衡, 杨华. 中医辨治肝纤维化进展综述[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(11): 986-988.
- [12] 陈文玲, 王宪东, 陈文慧, 等. 健脾软肝方对四氯化碳致肝纤维化大鼠 $\alpha\text{-SMA}$ 及其 mRNA 表达的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(9): 2261-2267, 2271.
- [13] KOO J H, LEE H J, KIM W, et al. Endoplasmic reticulum stress in hepatic stellate cells promotes liver fibrosis via PERK-Mediated degradation of HNRNPA1 and up-regulation of SMAD2[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(1): 181-193.
- [14] ZHANG X, HAN X, YIN L, et al. Potent effects of dioscin against liver fibrosis[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9713.
- [15] 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.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)