

# 柔肝方含药血清对 TGF- $\beta_1$ 诱导人肝星状细胞表达骨桥蛋白的影响及其机制

吴惠春, 张斌\*, 王灵台

(上海中医药大学 附属曙光医院, 上海 201203)

**[摘要]** **目的:**研究柔肝方含药血清对转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )诱导人肝星状细胞表达骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的影响及其作用机制。**方法:**30只SD大鼠,随机分成正常组、柔肝方低剂量( $9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )给药3d及5d组、柔肝方高剂量( $18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )给药3d及5d组,每组6只,按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌服饮用水或柔肝方药液,制备含药血清。用含10%正常血清或含药血清的DMEM培养基体外培养LX-2人肝星状细胞株,MTT法检测细胞增殖;LX-2细胞经含10%正常血清或含药血清的培养基预处理24h,再予TGF- $\beta_1$ (终质量浓度 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )刺激24h,收集细胞,RT-PCR法检测OPN mRNA表达,Western blot法检测OPN及磷酸化蛋白激酶B(p-protein kinase B, p-PKB)蛋白表达。**结果:**与正常组比较,各含药血清组均能抑制LX-2细胞增殖( $P < 0.05, P < 0.01$ );予含药血清预处理再经TGF- $\beta_1$ 刺激的细胞,与正常组细胞比较,OPN mRNA, OPN和p-PKB蛋白表达明显下调( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**柔肝方含药血清对TGF- $\beta_1$ 诱导的人肝星状细胞表达OPN具有抑制作用,其机制可能与抑制PI3K/PKB信号通路活化有关。

**[关键词]** 柔肝方; 骨桥蛋白; 肝星状细胞; 转化生长因子 $\beta_1$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0109-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015130109

**Effects and Mechanisms of Serum Containing Rougan Decoction on Expression of Osteopontin in Human Hepatic Stellate Cells Induced by TGF- $\beta_1$**  WU Hui-chun, ZHANG Bin\*, WANG Ling-tai (Shuguang Hospital Affiliated Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects and mechanisms of serum containing Rougan decoction on expression of osteopontin in human hepatic stellate cells induced by TGF- $\beta_1$ . **Method:** Thirty rats were randomly divided into 5 groups: the control group, the 3/5 d groups with low-dose Rougan decoction ( $9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the 3/5 d groups with high-dose Rougan decoction ( $18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) of 6 rats each. Rats in each group received distilled water or Rougan decoction at  $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  and the corresponding serums containing drug were obtained. Human hepatic stellate cell line LX-2 was cultured in DMEM containing 10% control serum or serum containing Rougan decoction. The proliferation of LX-2 cells was detected by using MTT method. LX-2 cells were pretreated with control serum or serum containing Rougan decoction for 24 h followed by incubation with TGF- $\beta_1$  at the final concentration of  $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h. The expression of OPN was detected by real-time PCR and Western blot, the expression of p-PKB was detected by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the proliferation of LX-2 cells in serum containing Rougan decoction groups was significantly inhibited ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Meanwhile, the expression of OPN and p-PKB were significantly down-regulated in serum containing Rougan decoction groups ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** The serum containing Rougan decoction has an inhibitory effect on the expression of OPN induced by TGF- $\beta_1$ , the mechanism may be related to the inhibition of PI3K/PKB signaling pathway.

**[Key words]** Rougan decoction; osteopontin; hepatic stellate cells; transforming growth factor- $\beta_1$

**[收稿日期]** 20141118(003)

**[基金项目]** 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50307)

**[第一作者]** 吴惠春,在读博士,从事中西医结合防治慢性肝病临床和基础研究, Tel:021-20256507, E-mail:86whc@163.com

**[通讯作者]** \*张斌,博士,主任医师,博士生导师,从事中西医结合防治慢性肝病临床和基础研究, Tel:021-20256507, E-mail:zhangbsh@126.com

肝纤维化是各种慢性肝病病情进展的中间过程,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的活化及表型改变是肝纤维化发生发展的核心环节<sup>[1]</sup>。转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 是一个强有力的促肝纤维化因子,具有活化 HSC 和促进细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 合成等作用。骨桥蛋白 (osteoopontin, OPN) 是 ECM 中一种重要的非胶原糖蛋白分子,能够调节肉芽肿的形成,参与组织修复和纤维化的形成<sup>[2-3]</sup>。课题组前期研究显示, TGF- $\beta_1$  可在一定范围内,以时间-剂量依赖方式诱导 LX-2 人肝星状细胞株表达 OPN,与文献报道一致<sup>[4]</sup>。柔肝方是课题组长期应用于临床治疗肝纤维化、肝硬化的有效方药,既往研究表明,柔肝方对 HSC 活化、胶原合成等具有良好的抑制作用<sup>[5-6]</sup>。本研究通过传统的血清药理学方法,观察柔肝方含药血清对 TGF- $\beta_1$  诱导 LX-2 细胞表达 OPN 的影响,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞株** 雄性 SD 大鼠 30 只,体重 160 ~ 180 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号 SCXK(沪)2007-0005,饲养于上海中医药大学实验动物中心。动物自由饮水,进食标准颗粒饲料。LX-2 人肝星状细胞株,由上海复蒙生物基因公司提供。

**1.2 药物及试剂** 柔肝方全方含淫羊藿 15 g,炙黄芪 15 g,鳖甲 12 g,丹参 30 g,郁金 12 g,枸杞子 12 g,苦参 12 g,由上海中医药大学附属曙光医院药房提供。药物按常规方法煎煮,过滤后浓缩,制备成含生药 0.9 g·mL<sup>-1</sup> 的低剂量和 1.8 g·mL<sup>-1</sup> 的高剂量浓缩液,冷藏备用。DMEM 高糖培养基(批号 1313831),澳洲胎牛血清(批号 8206513),胰酶消化液(批号 1234954)均购于美国 Gibco 公司; TGF- $\beta_1$  (批号 020M1337),兔抗人 OPN 抗体(批号 O7264)均购于美国 Sigma 公司;兔抗人蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 批号 0011),兔抗人 p-PKB (批号 0009)均购于美国 CST 公司; Trizol (批号 28202,美国 Invitrogen 公司), RT-PCR 反应试剂盒(批号 00102730 和 00136426,美国 Ferments 公司), Western blot 实验所需蛋白裂解、制胶、电泳等试剂均为碧云天生物技术研究所产品。

**1.3 仪器** SW-CJ-1B 型生物安全柜(苏州安泰公司), BM42 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), Heal Force HF90 型二氧化碳培养箱(上海力康生物安全柜公司), Millipore 实验室纯水系统(美国 Pall

公司), J6-MI 型水平离心机(美国 Beckman Coulter 公司), H1850R 型低温高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司), 5332 型 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司), 垂直蛋白电泳仪和蛋白电转移(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 将 30 只 SD 大鼠随机分为 5 组,即正常组、柔肝方低剂量给药 3 d 组、柔肝方低剂量给药 5 d 组、柔肝方高剂量给药 3 d 组和柔肝方高剂量给药 5 d 组各 6 只。给药组大鼠按照 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 予灌服柔肝方药液,正常组则相应予以灌服饮用水,连续给药 3 d 或 5 d,末次给药 1 h 后 3% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血。标本室温静置 2 h, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 分离血清,经 56 °C 灭活 30 min,过滤除菌, -80 °C 保存备用。

**2.2 细胞培养** LX-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,隔天换液。当细胞生长接近铺满瓶底时,用 0.25% 胰酶消化,传代。

**2.3 实验分组及药物干预** 实验分 5 组,即正常组、柔肝方低剂量给药 3 d 组、柔肝方低剂量给药 5 d 组、柔肝方高剂量给药 3 d 组和柔肝方高剂量给药 5 d 组。取生长对数期细胞,接种 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞于培养瓶内,12 h 后弃去培养基, PBS 洗 2 次,换用含 10% 正常血清或各含药血清的 DMEM 培养基,24 h 后再加入 TGF- $\beta_1$ ,使其终浓度为 10 μg·L<sup>-1</sup>,继续培养 24 h,收集各组细胞。

**2.4 MTT 法检测细胞增殖** LX-2 细胞按每孔 1 × 10<sup>3</sup> 个细胞接种于 96 孔板,24 h 后换用含 10% 正常血清或各含药血清的 DMEM 培养基,继续培养 24 h,每孔加入 10 μL MMT,37 °C 孵育 4 h,每孔再加入 100 μL DMSO,用酶标仪在 490 nm 波段处测定吸光度 A,分析柔肝方含药血清对 LX-2 细胞增殖的影响,用  $(A_{\text{正常组}} - A_{\text{含药血清组}}) / A_{\text{正常组}} \times 100\%$  计算含药血清对 LX-2 细胞增殖的抑制率。

**2.5 RT-PCR 法检测 OPN mRNA 表达** 用 Trizol 提取细胞总 RNA,取 1 μg 总 RNA 进行逆转录反应,再取 2 μL 逆转录产物进行 PCR 扩增反应。OPN 引物序列:上游 5'-AGACCCTTCCAAGTAAGTCC-3',下游 5'-TCATCTACATCATCAGAGTCGT-3',产物长度为 124 bp; GAPDH 引物序列:上游 5'-GGGAAGC TGAAGGTCGGAGT-3',下游 5'-GGGGTCATTGAT GGCAACA-3',产物长度为 105 bp。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s,

72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法, 以 GAPDH 为参照, 进行 OPN mRNA 表达的相对定量分析。

**2.6 Western blot 法检测 OPN, p-PKB 和总 PKB 蛋白表达** 细胞用预冷 PBS 洗 2 次, 加入含 1% PMSF 的细胞裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 制样, 每孔上样蛋白总质量 30  $\mu\text{g}$ , 总体积 10  $\mu\text{L}$ , 电泳, 蛋白经半干法电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, PBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h, PBST 洗膜, ECL 化学发光法显影。以 GAPDH 为参照, 结果用灰度值比值表示。

**2.7 统计学分析** 应用 SPSS 15.0 数据分析软件进行统计分析, 数值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 LX-2 细胞增殖的影响** 与正常组比较, 各含药血清组对 LX-2 细胞增殖均有一定程度的抑制作用 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 给药 5 d 组与给药 3 d 组相比, 高剂量组与低剂量组相比, 尚无统计学差异, 但结果显示随着给药剂量及给药天数的增加, 含药血清对细胞增殖的抑制作用呈上升趋势。见表 1。

表 1 柔肝方含药血清对 LX-2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effects of serum containing Rougan decoction on proliferation of LX-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药时间/d	A	抑制率/%
正常	-	-	$0.23 \pm 0.01$	-
柔肝方	9	3	$0.20 \pm 0.30^{1)}$	10.18
		5	$0.20 \pm 0.01^{2)}$	13.27
	18	3	$0.20 \pm 0.01^{2)}$	12.39
		5	$0.19 \pm 0.01^{2)}$	15.49

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05, ^{2)}$   $P < 0.01$ 。

**3.2 对 TGF- $\beta_1$  诱导 LX-2 细胞表达 OPN mRNA 的影响** 各组细胞经柔肝方含药血清预处理后再予 TGF- $\beta_1$  刺激, 与正常组比较, OPN mRNA 表达水平明显下调 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。两两比较发现, 高剂量组作用优于低剂量组, 低剂量给药 5 d 组优于给药 3 d 组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 对 TGF- $\beta_1$  诱导 LX-2 细胞表达 OPN, p-PKB 蛋白的影响** Western blot 结果显示, 经柔肝方含药血清预处理的各组细胞, 与用正常血清预处理的细胞比较, OPN 蛋白表达水平均下调 ( $P < 0.05, P <$

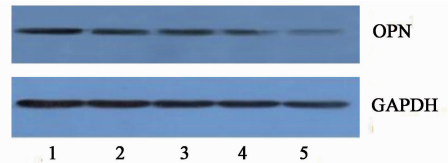
表 2 柔肝方含药血清对 TGF- $\beta_1$  诱导 LX-2 细胞表达 OPN mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effects of serum containing Rougan decoction on expression of OPN mRNA in LX-2 cells induced by TGF- $\beta_1$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药时间/d	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
正常	-	-	$1.00 \pm 0.04$
柔肝方	9	3	$0.90 \pm 0.05^{1)}$
		5	$0.81 \pm 0.01^{2,3)}$
	18	3	$0.74 \pm 0.03^{2,4)}$
		5	$0.69 \pm 0.02^{2,5)}$

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05, ^{2)}$   $P < 0.01$ ; 与低剂量给药 3 d 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05, ^{4)}$   $P < 0.01$ ; 与低剂量给药 5 d 组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ 。

0.01), 其中以高剂量给药 5 d 组下调最为显著 ( $P < 0.01$ )。正常血清预处理的细胞有一定量 p-PKB 表达, 各柔肝方含药血清预处理组与其比较, p-PKB 表达水平均受到了不同程度的抑制 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中高剂量组抑制效果明显优于低剂量组 ( $P < 0.01$ )。见图 1, 2, 表 3。



1. 正常组; 2. 柔肝方  $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药 3 d 组; 3. 柔肝方  $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药 5 d 组; 4. 柔肝方  $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药 3 d 组; 5. 柔肝方  $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药 5 d 组 (图 2 同)

图 1 柔肝方含药血清对 TGF- $\beta_1$  诱导 LX-2 细胞表达 OPN 蛋白的影响

Fig. 1 Effects of serum containing Rougan decoction on expression of OPN in LX-2 cells induced by TGF- $\beta_1$

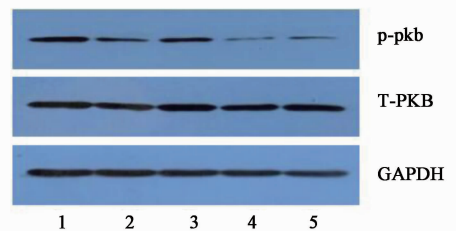


图 2 柔肝方含药血清对 TGF- $\beta_1$  诱导 LX-2 细胞表达 p-PKB 蛋白的影响

Fig. 2 Effects of serum containing Rougan decoction on expression of p-PKB in LX-2 cells induced by TGF- $\beta_1$

### 4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病病情进展的共同病理环节, 以 ECM 成分合成增加、降解不足而过度沉积为主要特征。HSC 是位于肝窦周围 Disse 腔内的一

表 3 柔肝方含药血清对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 LX-2 细胞表达 OPN 和 p-PKB 蛋白的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of serum containing Rougan decoction on expression of OPN and p-PKB in LX-2 cells induced by TGF-β<sub>1</sub>

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	给药时间 /d	OPN	p-PKB
			/GAPDH	/GAPDH
正常	-	-	0.88 ± 0.02	0.96 ± 0.01
柔肝方	9	3	0.84 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.85 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	9	5	0.84 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.93 ± 0.01 <sup>1,3)</sup>
	18	3	0.63 ± 0.02 <sup>2,4)</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>2,4)</sup>
	18	5	0.38 ± 0.02 <sup>2,5,6)</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>2,5,7)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与低剂量给药 3 d 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与低剂量给药 5 d 组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ;与高剂量给药 3 d 组比较<sup>6)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>7)</sup>  $P < 0.05$ 。

种间质细胞,正常时呈静止状态,仅分泌少量 ECM,参与维系肝细胞的正常框架和生理功能,当肝脏受到各种损伤时,HSC 可被激活,形成具有增殖性、成纤维性的肌成纤维细胞,通过旁分泌和自分泌方式产生大量细胞因子,如 TGF-β<sub>1</sub>,促进 ECM 的合成,成为过量 ECM 的主要来源。HSC 的活化被认为是肝纤维化时的中心环节,在整个过程中具有重要意义<sup>[1]</sup>。

OPN 是 ECM 中一种重要的非胶原糖蛋白分子,在肝纤维化的发生发展中同样有着重要作用。OPN 是一种具有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的分泌型磷酸化糖蛋白,最早由国外学者在骨基质中分离出来而得名。近年研究表明,OPN 能够调节肉芽肿的形成,参与组织修复和纤维化的形成<sup>[2-3]</sup>。课题组前期研究发现,正常大鼠肝组织 OPN 表达极弱,肝纤维化模型大鼠肝组织 OPN 表达明显上调,两者具有显著性差异<sup>[7-8]</sup>。研究报道酒精性肝病患者血清、脂肪组织和肝脏组织中 OPN 的含量均高于正常人,其表达量随着疾病的进展而升高;在肝脏,OPN 的表达量与中性粒细胞浸润、肝脏炎症、TGF-β 含量及肝纤维化程度呈正相关<sup>[9]</sup>。静止的 HSC 基本不表达 OPN,培养 7,14 d 后,OPN 表达明显上调,OPN 可引起 HSC 增殖与迁移,诱导基质金属蛋白酶 2 的产生与活化,上调 I 型胶原和 TGF-β 受体 II 水平<sup>[10]</sup>。研究显示,OPN 作为一种氧化应激敏感的细胞因子,能通过 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> 整合素结合及活化 PI3K/pAkt/NFκB 途径上调 α-SMA 和 I 型胶原表达,加速肝纤维化的进程<sup>[11]</sup>。上述研究均提示,OPN 对肝纤维化的发展具有重要作用,为此 OPN 将可能成为判断慢性肝病纤维化进展的一个新的预测因子。

中医学无“肝纤维化”、“肝硬化”等概念,根据其病机特点和临床症状,可将其归属于“胁痛”、“黄疸”、“积聚”等范畴,一般认为气虚血瘀是肝纤维化的基本病机。王灵台教授认为,气虚血瘀在肝纤维化的病机中具有重要地位,但在本病发展过程中,涉及方面颇多,正邪相搏,虚实交错,病情多变,故不能以“瘀”概全,临证用药也不能拘泥于“以瘀立论,化瘀为法”。早在 20 世纪 70 年代初,王老就提出了以“补肾”治疗慢性乙型肝炎的学术观点,经过多年的临床实践及实验研究,证实补肾为主的方药是治疗慢性肝病的有效手段之一。根据肝纤维化的病机特点,王老提出了“补肾益气、化瘀解毒、软坚散结”的治疗法则,结合自身的临床经验成功创制了柔肝方<sup>[12]</sup>。方中淫羊藿直入肾脉,温养精血而畅通阳气;炙鳖甲滋阴潜阳,活血化痰,软坚散结;枸杞子滋补肝肾,补而不腻;炙黄芪健脾补中,益卫固表,扶正培本;丹参活血化瘀,兼能止痛;郁金行气活血,清利肝胆湿热;苦参清热利湿。诸药合用,共奏益肾健脾、软坚散结、化瘀解毒之功。

现代药理学研究表明,淫羊藿和枸杞子对 CCl<sub>4</sub> 引起的化学性肝损伤具有明显的保护作用,其机制可能与免疫调节及抗氧化有关<sup>[13-14]</sup>,苦参碱能显著减轻大鼠肝细胞变性、坏死及纤维组织形成<sup>[15]</sup>,鳖甲提取物可降低肝组织 III 型,IV 型胶原含量<sup>[16]</sup>,郁金所含姜黄素可以明显降低肝组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 及 I 型前胶原的表达<sup>[17]</sup>,丹参素能抑制 HSCs 活化和增殖,并下调 HSC 细胞膜上 TGF-β 受体 I, II 的表达<sup>[18]</sup>,黄芪多糖和黄芪总苷可通过上调基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 表达而促进胶原降解<sup>[19]</sup>。

本研究显示,柔肝方含药血清对 LX-2 细胞增殖具有一定抑制作用,经柔肝方含药血清预处理再经 TGF-β<sub>1</sub> 刺激的细胞,与正常细胞比较,OPN 和 p-PKB 蛋白表达明显下调,提示柔肝方含药血清 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 HSC 表达 OPN 具有抑制作用,其机制可能与抑制 PI3K/PKB 信号通路活化有关。由此进一步推测,通过调控 PI3K/PKB 信号通路,下调 OPN 表达将可能成为抗肝纤维化治疗的新举措。

[参考文献]

[1] 高鹏飞,李凤贤,李辉,等. 近期国内外应用天然药物防治肝纤维化的研究进展[J]. 中国中药杂志,2012, 37(2):158-164.

[2] Fickert P, Thueringer A, Moustafa T, et al. The role of

- osteopontin and tumor necrosis factor alpha receptor-1 in xenobiotic-induced cholangitis and biliary fibrosis in mice[J]. *Lab Invest*,2010,90(6):844-852.
- [ 3 ] Fan K, Zhang B, Yang H, et al. A humanized anti-osteopontin antibody protects from concanavalin a induced-liver injury in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011,657(1/3):144-151.
- [ 4 ] Xiao X, Gang Y, Gu Y, et al. Osteopontin contributes to TGF- $\beta_1$  mediated hepatic stellate cell activation[J]. *Dig Dis Sci*,2012,57(11):2883-2891.
- [ 5 ] 王灵台,陈建杰,张斌,等. 柔肝冲剂抗肝纤维化的动物实验[J]. *上海中医药大学学报*,2002,16(4):52-56.
- [ 6 ] 张斌,王灵台. 柔肝冲剂对大鼠肝星状细胞表达转化生长因子  $\beta_1$  和胶原的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*,2004,12(5):260-262.
- [ 7 ] 赵莹,张斌,王灵台. 血瘀型肝纤维化大鼠骨桥蛋白的动态变化特征[J]. *中西医结合肝病杂志*,2009,19(6):356-359.
- [ 8 ] 张斌,赵莹,陈建杰,等. 肝纤维化时肝脏 OPN 和 PAI-1 的表达变化[J]. *中国病理生理杂志*,2010,26(7):1407-1409.
- [ 9 ] Patouraux S, Bonnafous S, Voican C S, et al. The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease[J]. *PLoS One*,2012,7(4):e35612.
- [ 10 ] Lee S H, Seo G S, Park Y N, et al. Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells[J]. *Biochem Pharmacol*,2004,68(12):2367-2378.
- [ 11 ] Urtasun R, Lopategi A, George J, et al. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen- $\alpha_1$  integrin  $\alpha v \beta 3$  engagement and PI3K/pAKT/NF $\kappa$ B signaling[J]. *Hepatology*,2012,55(2):594-608.
- [ 12 ] 赵钢. 从“灵甲胶囊”的研制思路及过程,论王灵台教授对肝纤维化病机学说及治疗的发展[J]. *实用肝脏病杂志*,2010,13(1):58-60.
- [ 13 ] 聂红明,江蓉,胡锦涛,等. 淫羊藿水煎液和淫羊藿甙的保肝利胆实验研究[J]. *实用中医内科杂志*,2006,20(4):370-372.
- [ 14 ] 齐彦,郭丽新,周迎春. 枸杞子对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的作用研究[J]. *中医药学报*,2006,34(4):34-37.
- [ 15 ] 陈伟忠,朱梁,张兴荣,等. 苦参碱对大鼠肝纤维化的影响[J]. *中国新药与临床杂志*,2000,19(5):410-413.
- [ 16 ] 唐尹萍,刘焱文,许腊英. 中药鳖甲提取物抗肝纤维化的实验研究[J]. *湖北中医药大学学报*,2011,13(2):44-46.
- [ 17 ] Vizzutti F, Provenzano A, Galastri S, et al. Curcumin limits the fibrogenic evolution of experimental steatohepatitis[J]. *Lab Invest*,2010,90(1):104-115.
- [ 18 ] 戴晴,李欣,郑磊,等. 丹参素对肝星状细胞 TGF- $\beta$  信号转导的影响[J]. *中国病理生理杂志*,2009,25(10):1988-1994.
- [ 19 ] 李淑萍,许晓燕,孙箴,等. 黄芪多糖和黄芪总甙调控 LX-2 细胞因子分泌[J]. *浙江大学学报:医学版*,2007,36(6):543-548.

[责任编辑 周冰冰]