

荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化 TGF- β /Smad 信号通路的影响

喻勤, 傅向阳, 罗伟生*, 欧士钰, 靳雅玲

(桂林医学院附属医院消化内科, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的: 观察荔枝核总黄酮(total flavone from *Litchi chinensis* Sonn, TFL)对二甲基亚硝胺(DMN)诱导的肝纤维化大鼠肝脏组织转移生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路中关键信号传导分子 TGF- β_1 , Smad3, Smad7 表达水平的变化, 探讨 TFL 抗纤维化的作用机制。方法: SD 大鼠 ip DMN 4 周建立大鼠肝纤维化模型, 以 ig 水飞蓟宾为阳性对照 50 mg·kg⁻¹组, 用不同剂量的 TFL(400, 200, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) ig 给药, 造模当日开始分组给药, 每日 1 次, 共给药 6 周。于实验第 6 周末处死大鼠, 抽取下腔静脉血检测天冬氨酸转氨酶(AST), 丙氨酸转氨酶(ALT), 留取肝脏同一部位行 HE, Masson 染色观察大鼠病理改变及肝纤维化程度, 采用 RT-PCR 法检测 TGF- β_1 , Smad3, Smad7 mRNA 的表达。结果: 与空白对照组比较, 模型组大鼠的肝纤维化程度明显增加, 血清 AST, ALT 均显著升高, 肝组织 TGF- β_1 , Smad3 mRNA 的表达明显增强($P < 0.05$), Smad7 mRNA 的表达显著减弱($P < 0.05$); 与模型组比较, TFL 各剂量组和水飞蓟宾组血清 AST, ALT 均明显低于模型组, 肝脏 TGF- β_1 , smad3 的表达明显降低($P < 0.05$), 而 smad7 则有所升高。结论: 荔枝核总黄酮可减轻实验性大鼠肝损伤及改善肝纤维化程度, 其作用机制可能与抑制 TGF- β_1 , Smad3 mRNA 的表达, 上调 Smad7 mRNA 的表达有密切关系。

[关键词] 肝纤维化; 荔枝核总黄酮; 转化生长因子; Smad3 Smad7

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0223-05

[doi] 10.11653/syfy2013180223

Effect of Total Flavone from *Litchi chinensis* on TGF- β /Smad Signaling Pathway in Rats Livers with Hepatic Fibrosis

YU Qin, FU Xiang-yang, LUO Wei-sheng*, OU Shi-yu, JIN Ya-ling

(Department of Digestive Medicine, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** Observed total flavone from *Litchi chinensis* Sonn (TFL) on dimethylnitrosamine (DMN) -induced liver fibrosis in rat liver tissue the transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) /Smad signal path key signaling molecule TGF- β_1 , Smad3, Smad7 expression levels changes, explore the mechanism of TFL antifibrotic. **Method:** SD rats by intraperitoneal injection of DMN in rat liver fibrosis model for 4 weeks, selected silybin 50 mg·kg⁻¹ ig positive for the control group, then apply a different dose TFL (400, 200, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) ig in experimental rats were sacrificed on the sixth week decimation the inferior vena venous detect aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), specimens from the same liver parts for HE Masson staining pathological changes and liver fibrosis in rats, using RT-PCR method to detect the expression of TGF- β_1 , Smad3, Smad7 mRNA. **Result:** Compared with blank control group, the degree of liver fibrosis in rats was obviously increased in model group and the serum AST and ALT were significantly increased, and the expression of TGF β_1 Smad3 mRNA in the liver tissue obviously increased ($P < 0.05$), while the expression of Smad7 mRNA significantly reduced ($P < 0.05$), compared with model group, TFL each dose group and silybin group serum AST, ALT were significantly lower than the model group, the expression of liver TGF-beta 1, smad3 significantly decreased ($P < 0.05$), while the smad7 was increased. **Conclusion:** Total flavone from *Litchi chinensis* Sonn

[收稿日期] 20130227(001)

[第一作者] 喻勤, 硕士研究生, E-mail: yuqin2118@163.com

[通讯作者] * 罗伟生, E-mail: wsluo58@yahoo.com.cn

(TFL) may reduce liver injury and improve liver fibrosis in rats, and its mechanism may be closely related with suppression the expression of TGF- β_1 , Smad3 mRNA, or increase the expression of Smad7 mRNA.

[Key words] liver fibrosis; total flavone from *Litchi chinensis*; transforming growth factors; Smad3; Smad7

肝纤维化是由于各种病因所致慢性肝损伤的修复过程,经过过度的创伤愈合应答,引起细胞外基质(ECM)在肝脏内过多沉积的病理过程。随着肝组织的持续损失,肝纤维化可进一步发展为肝硬化,甚至最终进展为肝癌^[1]。目前经研究证实,肝纤维化的经过积极治疗后是可逆的^[2]。TGF- β_1 是目前发现的最强的致纤维化细胞因子^[3],即是促进肝星状细胞(HSC)表达 ECM 的关键因子。TGF- β_1 促纤维化的作用主要通过下游的 smad 蛋白结合,形成 TGF- β /smad 信号转导通路实现^[4]。荔枝是广西特产水果,其核仁作为广西特色中药已有几千年的应用历史。经研究表明荔枝核含有多种化学成分,其中的黄酮类化合物对乙肝病毒(HBV)和 HBV-DNA 有明显的抑制作用及抗糖尿病、抗肝损伤和抗氧化等作用^[5]。本课题组经前期的实验现已证实 TEL 可抑制肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL),阻滞细胞增殖周期,诱导肝星形细胞(HSC)凋亡,抑制基质金属蛋白酶(MMP-2)的表达,具有良好的抗肝纤维化的作用^[6,9],为进一步探讨荔枝核总黄酮抗肝纤维化作用的机制,本实验观察了荔枝核总黄酮对二甲基亚硝胺诱导的实验性大鼠肝纤维化肝组织中 TGF- β_1 及 Smad 蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物 72 只健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,质量(200 ± 20) g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2009-0002。

1.2 试剂与药物 二甲基亚硝胺(DMN, Sigma 公司),Trizol 总 RNA 提取试剂(TianGen 公司产品),DEPC 焦碳酸二乙酯(Amresco 公司),M-MLV 逆转录试剂盒(invitrogen 公司产品),Taq PCR Master mix(TianGen 公司产品),PCR 引物(上海生工合成),水飞蓟宾(江苏中兴药业有限公司),荔枝核总黄酮(TFL)原材料购自桂林市七星公园药材市场,在桂林医学院药理实验室提取分离,荔枝核总黄酮含量达 56.1%,用蒸馏水稀释为 40,20 g·L⁻¹ 2 种溶液。

1.3 仪器 R5002K 型中试旋转蒸发仪、JS-780 型全自动数码凝胶成像分析系统(南宁市精密仪器仪表有限公司),TPersonal 48 型 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司),ZF-4 型凝胶成像系统紫外投射仪

(上海顾村电光仪器厂),电泳槽(北京六一仪器厂),电泳仪(上海天能科技有限公司),Mini Spin 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 动物造模 将大鼠随机分为空白对照组,模型组,TFL 高、中、低剂量组,水飞蓟宾组,每组各 12 只。模型组,TFL 高、中、低剂量组,水飞蓟宾组按 Ala-Kokko 方法^[10],大鼠以 2 mL·kg⁻¹ 剂量 ip 给予 0.5% 的 DMN 溶液,剂量为 10 mg·kg⁻¹(以生理盐水稀释),每周连续 3 d,共造模 4 周。造模当日开始分组给药,空白对照组及模型组按 5 mL·kg⁻¹ 生理盐水 ig,荔枝核高、中、低剂量组分别按生药计算为 0.4,0.2,0.1 g·kg⁻¹ 灌胃,水飞蓟宾组按 50 mg·kg⁻¹(胶囊内粉末状药品用蒸馏水稀释为 10 g·L⁻¹)灌胃,每日 1 次,共给药 6 周。

2.2 取材 6 周后将大鼠进行麻醉后处死,抽取下腔静脉血。剖开大鼠腹腔暴露肝脏,观察肝脏的外形变化,取每只大鼠同一部位新鲜肝脏组织固定于 10% 中性甲醛溶液中 1 d,并取大鼠肝左叶的相同部位,迅速置于液氮中,速冻后取出冻存于 -80 °C 冰箱中,以备。

2.3 HE 染色及 Masson 胶原染色 HE 染色按常规方法。Masson 胶原染色:10% 三氯醋酸和 10% 重铬酸钾混合液 15 min,蒸馏水洗 6 次;5% 天青石蓝 6 min,蒸馏水洗 6 次;1% 冰醋酸中过一遍,滴上酸性品红与丽春红混合液比例 2:1;滴 1% 亮绿待 1 min;在冰醋酸中过 3 遍;脱水透明封片。

2.4 肝纤维化分级标准 按照 Nanji 方法^[11]对肝纤维化进行分级:0 级:无纤维化;1 级:纤维化在部分门静脉区;2 级:纤维化在大部分门静脉区;3 级:纤维化在门静脉-中央静脉区;4 级:有少量结节形成;5 级:有一定的结节形成。

2.5 RT-PCR 半定量检测 Trizol 抽提大鼠肝组织总 RNA,进行 RT-PCR 扩增,扩增条件:94 °C 变性 40 s,63 °C (TGF- β_1)/64 °C (Smad3)/60 °C (Smad7) 退火 40 s,72 °C 延伸 45 s,扩增 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,以凝胶图像成像系统拍摄打印及分析软件分析其结果,以 GAPDH 的 PCR 产物作为内参照,

用 Smad3, Smad7, TGF-β₁ 与 GAPDH 条带的比值表示其相对表达水平。TGF-β₁ 引物序列:上游 5'-GCTGAACCAAGGAGACGGAA-3', 下游 5'-CACG-TAGTAGACGATGGCA-3', 扩增片段长度 490 bp。Smad3 引物序列:上游 5'-CTCAA-GAAGACGGGGCAGTT-3', 下游 5'-AATGTCTC-CCCAACTCGCTG-3', 扩增片段长度 620 bp。Smad7 引物序列:上游 5'-TGCACAAAGTGTTCCTGGT-3' 下游 5'-AAGGTGGTACCCACTTTCGC-3', 扩增片段长度 608 bp。内参 GAPDH 引物序列:上游 5'-GAC-CACAGTCCATGCCATCA-3', 下游 5'-ATTCGAGAGA-AGGGAGGGCT-3', 扩增片段长度 656 bp。

2.6 统计学分析 应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析, 各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较先进行数据的正态性检验及方差齐性检验, 符合上述条件的采用 ANOVA 行单因素方差分析, 并行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 基本实验情况 实验过程中共 15 只大鼠死亡, 其中造模过程中空白对照组死亡 2 只, 模型组死亡 2 只, TFL 低、中、高剂量组分别死亡 4、2、2 只; 水飞蓟宾组死亡 3 只。其中空白对照组, TFL 低、中、高剂量组, 水飞蓟宾组分别死亡的 2 只大鼠, 灌胃操作后, 大鼠口鼻喷出药液后死亡, 经解剖发现气管有液体, 考虑为窒息死亡; 其余各组死亡的大鼠, 经尸检及肝脏 HE 染色检查, 均死于急性肝衰竭, 故不计入统计学处理。

3.2 造模结果 6 周末时, 模型组大鼠消瘦, 毛发稀疏, 色泽暗淡, 反应迟钝, 少动, 厌食, 剖腹后, 肉眼观察肝脏色泽晦暗, 表面粗糙, 有泥沙样结节, 触之质地较硬, 肝组织病理切片观察有较多纤维生成, 按照 Nanji 肝纤维化分级方法^[11], 证实肝纤维化形成, 造模成功。

3.3 各组 AST, ALT 水平比较 模型组 AST, ALT 水平与其他各组比较均最高, 荔枝核总黄酮高剂量组、中剂量组与水飞蓟宾组 ALT, AST 水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 黄酮低剂量组水平也低于模型组 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.4 肝脏病理学变化 HE 染色及 Masson 染色结果: 空白对照组肝小叶结构完整, 肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状排列, 肝细胞未见明显变性、坏死, 汇管区无炎性细胞浸润。模型组: 肝小叶结构破坏, 肝索排列紊乱, 汇管区可见大量胶原纤维增生, 形成纤维间隔, 分割、包绕肝小叶形成假小叶。

表 1 荔枝核总黄酮对大鼠血清 ALT, AST 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	U·L ⁻¹	
			ALT	AST
空白对照	-	10	37.7 ± 4.3 ¹⁾	129.8 ± 6.4 ¹⁾
模型	-	10	211.8 ± 11.1 ²⁾	346.3 ± 16.7 ²⁾
水飞蓟宾	50	9	136.7 ± 13.1 ^{1,2)}	211.0 ± 14.5 ^{1,2)}
TFL	400	10	96.3 ± 9.3 ^{1,2,3)}	165.6 ± 11.0 ^{1,2,3)}
	200	10	128.6 ± 12.0 ^{1,2)}	203.5 ± 14.5 ^{1,2)}
	100	8	165.3 ± 10.5 ^{1,2,3)}	264.3 ± 9.0 ^{1,2,3)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与空白对照组比较²⁾ $P < 0.05$; 与水飞蓟宾组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

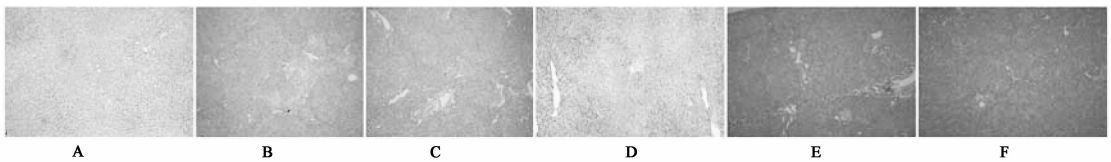
中央静脉、胆管等管壁增厚。汇管区、肝窦及中央静脉周围可见大量炎性细胞浸润。肝细胞大量变性坏死, 气球样变及脂肪变性广泛存在。纤维化程度较空白对照组显著增加。与模型组比较, 各治疗组肝细胞变性、坏死减少, 炎性细胞浸润较轻, 胶原纤维增生较前疏松变窄。TFL 高剂量组可见细胞变性坏死情况明显改善, 肝细胞索排列较整齐, 肝小叶结构基本完整, 未见纤维组织增生, 无假小叶形成, 汇管区、肝窦及中央静脉周围见少量炎性细胞浸润。TFL 低剂量组可见肝细胞水肿, 汇管区、中央静脉周围炎性细胞浸润程度降低, 汇管区及中央静脉周围可见部分胶原纤维组织增生, 较模型组减少, 纤维间隔形成, 纤维较模型组疏松, 且未形成假小叶。TFL 中剂量组及水飞蓟宾组介于低剂量组与高剂量组之间, 纤维组织于汇管区增生并向肝小叶内延伸, 但纤维较纤细。各组大鼠肝组织 HE 染色见图 1, Masson 染色见图 2, 肝纤维化评分见表 2。

表 2 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化程度分期情况 例

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	例					
			0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级
空白对照 ²⁾	-	10	10	0	0	0	0	0
模型 ¹⁾	-	10	0	0	0	1	4	5
水飞蓟宾 ²⁾	50	9	0	0	3	4	1	1
TFL ²⁾	400	10	0	2	6	2	0	0
	200	10	0	0	3	5	1	1
	100	8	0	0	2	3	2	1

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 检测 TGF-β₁, Smad3, Smad7 mRNA 表达 与空白对照组比较, 模型组大鼠肝组织 TGF-β₁, Smad3 mRNA 的表达明显增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Smad7 mRNA 的表达显著减弱 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 荔枝核总黄酮各处理组及水飞蓟宾



A. 空白对照组; B. 水飞蓟宾; C. 秋水仙碱组 (50 mg·kg⁻¹); D. TFL(400 mg·kg⁻¹) 组;
E. TFL(200 mg·kg⁻¹) 组; F. TFL(100 mg·kg⁻¹) 组 (图 2 同)

图 1 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织病变的影响 (HE, × 100)

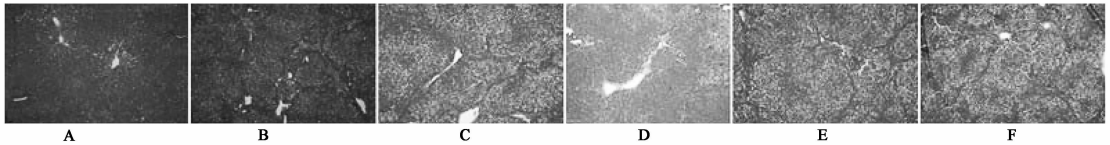


图 2 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝纤维化的影响 (Masson, × 100)

组肝组织 TGF-β₁, Smad3 mRNA 表达明显减弱 ($P < 0.05$), Smad7 mRNA 表达则增强 ($P < 0.05$), 且荔枝核总黄酮各处理组有剂量依从性; 而

荔枝核总黄酮中剂量组与水飞蓟宾组 TGF-β₁, Smad3 mRNA, Smad7 mRNA 的表达的比较则无统计学意义。分析结果见表 3。

表 3 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织 TGF-β₁, Smad3, Smad7 mRNA 的相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	TGF-β ₁ /GAPDH	Smad3/GAPDH	Smad7/GAPDH
空白对照	-	10	0.290 ± 0.029 ²⁾	0.462 ± 0.016 ²⁾	0.506 ± 0.027 ²⁾
模型	-	10	0.973 ± 0.030 ¹⁾	0.986 ± 0.021 ¹⁾	0.399 ± 0.050 ¹⁾
水飞蓟宾	50	9	0.490 ± 0.025 ²⁾	0.600 ± 0.022 ²⁾	0.700 ± 0.027 ²⁾
TFL	400	10	0.425 ± 0.016 ^{2,3)}	0.517 ± 0.025 ^{2,3)}	0.805 ± 0.041 ^{2,3)}
	200	10	0.475 ± 0.027 ²⁾	0.579 ± 0.025 ²⁾	0.728 ± 0.040 ²⁾
	100	8	0.533 ± 0.018 ^{2,3)}	0.668 ± 0.024 ^{2,3)}	0.607 ± 0.029 ^{2,3)}

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与水飞蓟宾组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

肝纤维化其实质是肝内以胶原为主的肝脏细胞外基质 (ECM) 各成分合成增多,降解相对不足,致使 ECM 在肝内过多沉积的病理过程。肝纤维化进一步发展可引起肝硬化,甚至还可以导致肝癌,严重威胁人类健康。有研究表明,肝纤维化病变经过积极的治疗有延缓甚至逆转的可能。因此,如何有效地防治肝纤维化,阻断其进展,已经成为国内外研究的热点。

目前认为:肝星状细胞 (HSC) 的激活是肝纤维化发生的中心环节。肝损伤时各种致病因子刺激引起 HSC 的激活,即 HSC 由静止状态转变成具有增殖性、成纤维性、收缩性的 MFB,致使 MFB 生成与消除速度不平衡, MFB 数量增加,产生大量的 ECM,促使纤维生成^[12]。而 TGF-β₁ 在 HSC 激活与转化过程中起重要作用,是促进 HSC 表达 ECM 的关键因子,即是目前发现的最强的致纤维化细胞因子。

TGF-β₁ 能促进 HSC 合成胶原、纤维连接蛋白及蛋白多糖等细胞外基质,促进 HSC 分泌金属蛋白酶组织抑制物,下调降解蛋白酶的合成,阻止新合成细胞基质的分解而减少 ECM 的降解,由此打破了 ECM 合成与降解的平衡,使 ECM 沉积增多,加速肝纤维化的发展。TGF-β₁ 促纤维化的作用主要通过 TGF-β₁-smad 信号转导通路实现^[13]。Smads 蛋白家族是目前所知最重要的 TGF-β₁ 受体后信号转导的关键底物,由于其磷酸化后可穿过核膜,因此它既是胞内信号分子,又起到转录分子的作用。Smad 蛋白家族主要分为 3 类:受体调节性 Smads (R-Smads)、通用性 Smads (Co-Smads) 及抑制性 Smads (I-Smads)^[14]。来自 TGF-β₁ 的信号与细胞膜表面的 I 型、II 型受体结合后使 R-Smad (Smad2, 3) 磷酸化而活化, Smad2, 3 再和胞质中的 Smad4 (Co-Smad) 结合形成异多聚体转位进入细胞核,进而通过与一系列的转录辅激活蛋白或转录辅阻遏分子结合调节靶基因的表

达^[15-16]; Smad6,7(I-Smad)则分别通过特异性地与活化的 T β R- I 的胞内区结合抑制 R-Smads 磷酸化而阻止该信号转导过程^[17],吴晓玲^[18]等通过实验表明 TGF- β /Smad 信号通路可能参与了大鼠实验性肝纤维化的形成与发展,故 TGF- β /Smad 信号转导通路在肝纤维化发病中起着举足轻重的作用,本实验结果表明:与空白对照组比较,模型组大鼠肝组织纤维化程度明显增加,同时 TGF- β_1 与 Smad3 mRNA 的表达显著增加。TFL 高剂量组中两者表达则接近空白对照组,TFL 低剂量组两者表达接近模型组,而 TFL 中剂量组和水飞蓟宾组中两者表达介于两者之间。Smad7 mRNA 在空白对照组肝组织中的表达增高,与之相比较,模型组肝组织中 Smad7 mRNA 呈低表达,TFL 高、中剂量组与水飞蓟宾组肝组织中 Smad7 mRNA 均呈高表达,表达量与空白对照组相近,与模型组比较差异有显著性意义。

综上所述,本实验研究发现,TFL 可以预防 DMN 诱导的实验性大鼠肝纤维化,抑制肝纤维化大鼠肝脏组织的 TGF- β_1 ,Smad3 mRNA 的表达,上调 Smad7 mRNA 的表达,以其抑制 TGF- β_1 /Smad3 信号传递,抑制 HSC 活化,进而减少 ECM 的沉积,阻断肝纤维化的进程,逆转早期肝纤维化。提示 TFL 对 TGF- β_1 /Smads 的信号转导的抑制可能是其治疗肝纤维化的机制之一,但其中的具体生物学机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Schuppan D, Afdhal N H. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2008, 371:838.
 [2] Ismail M H, Pinzani M. Reversal of liver fibrosis[J]. Saudi J Gastroenterol,2009,15(1):72.
 [3] Taniguchi H,Kato N,Otsuka M, et al. Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription[J]. J Med Virol,2004,72(1):52.
 [4] Yan X,Liu Z,Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7 [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2009, 41(4):263.
 [5] 邓志军,郭洁文,潘竟镛. 荔枝核荔枝核及其有效部位的药理及药效学作用[J]. 今日药学,2009,19(5):7.
 [6] 赵永忠,漆志平,徐庆. 荔枝核总黄酮抗胆管结扎大

鼠肝纤维化的作用及机制[J]. 世界华人消化杂志, 2010,18(20):2084.
 [7] 孙旭锐,覃浩,罗伟生,等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝星状细胞增殖的抑制作用及对蛋白 TGF- β_1 和 α -SMA 表达的影响[J]. 时珍国医国药,2012,23(10):2502.
 [8] 欧士钰,罗伟生,靳雅玲,等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织 MMP-2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):209.
 [9] 覃浩,孙旭锐,欧仕钰,等. 荔枝核总黄酮预防大鼠肝纤维化的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2011,33(22):2353.
 [10] Ala-Kokko L, Pihlajaniemi T, Myers J C, et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat[J]. Biochem J,1987,244(1):75.
 [11] Nanji A A, Jokelainen K, Fotouhinia M, et al. Increased severity of alcoholic liver injury in female rats; role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(6):G1348.
 [12] Friedman S L. Hepatic stellate cells; protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev,2008,88:125.
 [13] Cheng J H, She H, Han Y P, et al. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. Am J Physiol Astrointest Liver Physiol,2008,294(1):G39.
 [14] 俞蕾敏,吕宾. TGF- β -smad 信号转导通路与肝纤维化的关系[J]. 国际消化病杂志,2008,28(5):397.
 [15] Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis *in vivo* and hepatic stellate cell line *in vitro*[J]. Pathol Int,2003,53(1):18.
 [16] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system[J]. EMBO J,2000,19(8):1745.
 [17] 徐珊,包剑锋,周敏,等. 肝纤维化不同证型与 TGF- β_1 /Smad 基因蛋白表达关系的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(1):23.
 [18] 吴晓玲,曾维政,蒋明德,等. 肝纤维化大鼠肝组织 Smads 基因表达状况及意义[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(10):1037.

[责任编辑 聂淑琴]