

桂枝茯苓丸抗大鼠肝纤维化作用及其机制研究

李季, 叶军*, 薛冬英, 张洁, 陈蓓, 孙琳, 刘志勇, 李小红
(上海中医药大学附属普陀医院感染科, 上海 200062)

[摘要] **目的:**观察桂枝茯苓丸对大鼠肝纤维化的拮抗作用,并探讨可能的作用机制。**方法:**按照随机数字表将 60 只 Wistar 大鼠分为正常组 8 只(A 组)和造模组 52 只,正常组 sc 予生理盐水 $3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,造模组采用等量 40% 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl_4) 复制肝纤维化模型,共 6 周。再随机将造模组大鼠分为模型组(B 组)、桂枝茯苓丸低、中、高剂量组(C, D, E 组)每组 7 只大鼠。A 组与 B 组大鼠均予生理盐水 $9.0 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ig}$,C, D, E 组分别给予桂枝茯苓丸 $0.45, 0.9, 1.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\text{ig}$ 治疗,共 4 周,并在治疗期间继续使用 CCl_4 维持。采用免疫组化 (immunohistochemistry, IH) 法及实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, Real-time PCR) 法检测各组大鼠肝组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、转化生长因子 β_1 (transforming growing factor β_1 , $\text{TGF-}\beta_1$)、结缔组织生长因子 (connective tissue grower factor, CTGF)、I 型胶原 (Collagen I, C-I) 及 III 型胶原 (Collagen III, C-III) 的蛋白及基因表达量。**结果:**模型组大鼠肝组织 α -SMA, $\text{TGF-}\beta_1$, CTGF, C-I, C-III 蛋白和 mRNA 的表达较正常组显著增多 ($P < 0.01$), 治疗组均能下调大鼠肝组织 α -SMA, $\text{TGF-}\beta_1$, CTGF, C-I 以及 C-III 蛋白和 mRNA 的表达,其中以 D 组, E 组减少 α -SMA, C-I, C-III 蛋白的表达明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以 E 组降低 $\text{TGF-}\beta_1$, CTGF 蛋白表达最为显著 ($P < 0.05$), 以 D 组, E 组降低 α -SMA, $\text{TGF-}\beta_1$, CTGF mRNA 的表达显著 ($P < 0.01$), 以 E 组减少 C-I, C-III mRNA 的表达最明显 ($P < 0.01$)。**结论:**桂枝茯苓丸混悬液可有效减少肝组织 α -SMA, $\text{TGF-}\beta_1$, CTGF, C-I, C-III 蛋白和 mRNA 表达量,有良好的抗肝纤维化作用。

[关键词] 肝纤维化;桂枝茯苓丸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0171-05

Study on Inhibition and Mechanism of Guizhi Fuling Wan on Hepatic Fibrosis Rats

LI Ji, YE Jun*, XUE Dong-ying, ZHANG Jie, CHEN Bei, SUN Lin, LIU Zhi-yong, LI Xiao-hong
(Department of Infectious Diseases, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medical, Shanghai 200062, China)

[Abstract] **Objective:** Guizhi Fuling Wan which inhibited hepatic fibrosis in rats was observed and its possible mechanism of action was explored. **Method:** According to the random-number table, wistar rats of 60 were divided into control group of 8 (group A) and model group of 52. The control group was injected subcutaneously with normal saline by a dose of $3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, model group was injected subcutaneously with 40% CCl_4 to make rat liver fibrosis model by a dose of $3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the consecutive 6 weeks. And according to the random-number table again, model group rats were divided into the model group (group B) and the treatment group which comprised low dose (group C), middle dose (group D) and high dose (group E). Group A and group B were given normal saline by a dose of $9.0 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$. Group C, group D and group E were given Guizhi Fuling Wan by the dose of 0.45, 0.9, 1.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ respectively, and CCl_4 would be maintained subcutaneously during period of 4 weeks. After 4

[收稿日期] 20110406(004)

[第一作者] 李季, 硕士研究生, 中西医结合肝病临床研究方向, Tel:13661860525, E-mail: lxjshanghai@163.com

[通讯作者] * 叶军, 大学, 主任医师, 慢乙肝抗病毒治疗及肝纤维化的防治, Tel:021-52662972, E-mail: PZXYWK@163.com

weeks of treatment, general condition, body weight, liver and spleen weight and their coefficient of rats were compared in each group; rats of pathological changes in each group were determined by naked eye, light microscopy and electron microscopy, respectively. The protein expression of α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, Co- I and Co-III was detected by using immunohistochemical stains in each group. The mRNA genetic expression of α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, Co- I and Co-III was detected by using Real-time quantitative PCR in each group. **Result:** Immunohistochemical stains and real-time quantitative PCR: In model group, protein and mRNA genetic expression of α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, Co- I and Co-III was significantly increased in liver tissue ($P < 0.01$, vs control group). All the treatment group could bring down protein and mRNA genetic expression of α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, Co- I and Co-III in liver tissue of rats. Among the treatment group, group D and group E decreased mRNA genetic expression of α -SMA, Co- I and Co-III significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ vs model group), and Group E lessened protein expression of TGF- β_1 , CTGF obviously ($P < 0.05$ vs model group). Among the treatment group, group D and group E cut down mRNA genetic expression of α -SMA, TGF- β_1 , CTGF significantly ($P < 0.01$ vs model group), and group E of all the treatment group reduced evidently genetic mRNA expression of Co- I and Co-III ($P < 0.01$ vs model group). **Conclusion:** Guizhi Fuling Wan suspension can effectively inhibit liver α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, Co- I and Co-III gene and protein expression, have a good anti-liver fibrosis.

[**Key words**] hepatic fibrosis; Guizhi Fuling Wan; function; mechanism

肝纤维化其实是肝内以胶原为主的肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)各成分合成增多,降解相对不足,致使 ECM 在肝内过多沉积。肝纤维化进一步发展可引起肝小叶结构改建、假小叶及结节形成导致肝硬化,甚至少数还可以发展为肝癌,严重威胁人类健康。目前认为 ECM 累积所形成的肝纤维化通过有效的治疗是可以逆转的,但若没有得到及时有效的治疗,则最终发展为不可逆转的肝硬化^[1]。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。本研究从细胞和分子水平揭示桂枝茯苓丸抗肝纤维化作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,清洁级,雄性,体重(280 ± 20)g,由上海中医药大学附属普陀医院动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005,在清洁级环境下饲养。

1.2 药品 桂枝茯苓丸由桂枝、茯苓、丹皮、芍药、桃仁各等分组成,成都九芝堂金鼎药业有限公司生产,批号 Z20027562。

1.3 试剂 α -SMA 抗体(批号 M0851), I 型胶原抗体(批号 2007-02-04), III 型胶原抗体(批号 B1171), TGF- β_1 抗体(批号 920503), CTGF 抗体(批号 100080-2003), IgG 抗体(批号 100080-2003), IgG 抗体(批号 D0203), SABC 即用型染色试剂盒(批号 20040215)均为 Santa Cruz 产品; PBS 缓冲液(普陀

区中心医院病理科提供), Sybr green (Takara 产品,批号 DRR041A); DEPC(批号 200905), dNTP(批号 c18427013), 随机引物 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (批号 070301) 博彩生物技术公司产品; Trizol(批号 15596-026), M-MLV(批号 28025-021), RNase(批号 10777-019)均为 Invitrogen 产品。

1.4 仪器 RM2235 型轮转式病理切片机(德国 Leica 公司), ST 5010 病理染色机(德国 Leica 公司), DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备公司), centrifuge5417R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), MDF-292 低温冰箱(Sanyo 公司), YXQ. SGH. 280 高压蒸气消毒器(上海医用核子仪器厂), SIM-F124 制冰机(北京长流科学仪器公司), 752 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂), Olympus-ix71 显微镜(日本 Olympus 公司), HMIAS-2000 型高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限公司), Rotor gene 3000 实时定量 PCR 仪(澳大利亚)。

2 方法

2.1 肝纤维化模型制备 大鼠购回后给予普通饲料喂养,自由饮水及进食。经过 10 d 的适应性饲养后实验。首先按照随机数字表将 60 只 Wistar 大鼠分为正常组 8 只(A 组)和造模组 52 只。采用四氯化碳与橄榄油按 4:6 比例配成 40% 混合溶剂,配置好的混合溶液按 3 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量 sc 给予造模组大

鼠,同时应用等剂量生理盐水 sc 给予正常组大鼠,2次/周^[2]。6周后,抽取2只大鼠,光镜下观察经 HE 染色后大鼠肝组织纤维化程度,按实验动物肝纤维化组织学 V 级标准进行肝纤维化程度评判,提示肝纤维化形成。

2.2 分组与用药 按照随机数字表将 28 只造模大鼠分为模型组,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组(0.45,0.9,1.8 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组 7 只。按照实验动物研究等效剂量的计算方法,以成人(60 kg)临床应用量的 20 倍确定大鼠给药的等效剂量^[3],即 0.9 g·kg⁻¹·d⁻¹。低剂量为等效剂量的 0.5 倍,高剂量为等效剂量的 2 倍。ig 每日 1 次。正常组与模型组大鼠均予生理盐水 9.0 mL·kg⁻¹ ig 治疗,每日 1 次,共计 4 周,并在治疗期间继续使用四氯化碳维持。

2.3 观察指标与方法

2.3.1 免疫组化法检测肝脏组织中 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 及 C-III 蛋白的表达 实验第 10 周末,麻醉 Wistar 大鼠,解剖取肝脏,取每只大鼠肝左叶的相同部位,大小约 5 mm × 5 mm × 5 mm,40 g·L⁻¹ 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,连续切片,厚 4 μ m,用免疫组化法观察肝脏 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 及 C-III 蛋白表达,操作按免疫组化染色试剂盒说明书进行。免疫组化定量指标:

阳性指数(positive index, PI) = 阳性平均吸光度(A) × 阳性面积百分率

采用 HPIAS22000 型图像分析软件进行定量分析,随机选取每张切片 10 个视野 × 200 倍,测定阳性细胞占面积及平均吸光度(A),乘积值越大表明组织中该抗原含量越多。

2.3.2 RT-PCR 法检测肝脏组织中 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 及 C-III 基因表达水平 实验第 10 周末,麻醉 Wistar 大鼠,解剖取肝脏,取每只大鼠肝左叶的相同部位,将肝组织迅速置于液氮中保存。实验时称取大鼠肝组织 100 mg,在组织中加入 1 mL Trizol 反复吹打几次,22 °C 静置 5 min;加入氯仿 0.2 mL 颠倒 15 s;22 °C 静置 3 min;4 °C 离心,14 000 r·min⁻¹,15 min;取上清液 0.5 mL;加入 0.5 mL 异丙醇混匀;22 °C 静置 10 min;4 °C 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;弃上液;加入 4 °C 1 mL 75% 乙醇;4 °C 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min;离心管底部白色沉淀即为 RNA;倒掉上清,加 1 mL 75% 乙醇洗涤 RNA,4 °C 7 500 r·min⁻¹ 离心 10 min;自然干燥或真空干燥 RNA,溶于甲酰胺(或 DEPC 处理过的超纯水)中分

装(分装体积视组织和 RNA 浓度而定),-80 °C 保存;将 RNA 反转录,4 × dNTP(each 10 mmol·L⁻¹)1 μ L,引物(100 μ mol·L⁻¹)1 μ L,组织总 RNA 2 μ g,加水至 12 μ L,65 °C 5 min,快速插入冰水中,离心,冰上依次加入 5 × buffer 4 μ L,DTT(100 mmol·L⁻¹)2 μ L,RNasin(40 U· μ L⁻¹)1 μ L,M-MLVRT 反转录酶(200 U· μ L⁻¹)1 μ L,37 °C 50 min,70 °C 15 min(灭活逆转录酶),-20 °C 保存;PCR 扩增,Sybr green 10 μ L,上游引物(5 μ mol·L⁻¹)1 μ L,下游引物(5 μ mol·L⁻¹)1 μ L,反转录产物 2 μ L,加水至 20 μ L,PCR 反应条件为 95 °C 10 s;95 °C 5 s,60 °C 20 s,40 个循环。实时定量 PCR 结果有荧光定量分析仪自动采集给出数据,采用 Excell 处理后,采用 CT 值^[4] 计算基因表达情况。

2.4 统计学方法 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用数理统计学软件 SPSS 16.0 进行多样本均数间比较,经正态分布检验,方差齐时,采用单因素方差分析;方差不齐时,采用 Kruskal-Wallis H 非参数检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 免疫组化检测 模型组大鼠肝组织 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 及 C-III 蛋白的表达较正常组显著增多($P < 0.01$),中、高剂量治疗组均能下调大鼠肝组织 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 及 C-III 蛋白的表达($P < 0.05$)(表 1)。

3.2 实时定量 PCR 检测 模型组大鼠肝组织 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 及 C-III mRNA 的表达较正常组显著增多($P < 0.01$),高剂量治疗组均能下调大鼠肝组织 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 及 C-III mRNA 的表达,其中以 D 和 E 组降低 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF mRNA 的表达显著($P < 0.01$),以 E 组减少 C-I 及 C-III mRNA 的表达最明显($P < 0.01$)(表 2)。

4 讨论

4.1 降低大鼠肝组织中 α -SMA 蛋白和 mRNA 的表达 肝纤维化时 ECM 合成增加,而活化的 HSC 被证明是肝纤维化时 ECM 产生的主要来源^[5],HSC 的活化以 α -SMA 的表达为标志^[6],其蛋白和 mRNA 表达的增强提示大量的 HSC 活化为成纤维细胞,分泌以 C-I 为主的 ECM。因而,抑制 α -SMA 蛋白和 mRNA 的表达是抗肝纤维化治疗的一个重要途径。

表 1 各组大鼠肝纤维化相关蛋白表达量(A) ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	a-SMA	TGF- β_1	CTGF	C-I	C-III
正常	-	0.59 \pm 0.13	0.82 \pm 0.10	1.21 \pm 0.25	0.69 \pm 0.10	0.59 \pm 0.17
模型	-	1.14 \pm 0.17 ¹⁾	1.72 \pm 0.31 ¹⁾	1.94 \pm 0.22 ¹⁾	1.86 \pm 0.44 ¹⁾	1.10 \pm 0.29 ¹⁾
桂枝茯苓丸	0.45	1.01 \pm 0.24 ¹⁾	1.73 \pm 0.14 ¹⁾	1.76 \pm 0.20 ¹⁾	1.35 \pm 0.16 ¹⁾	0.99 \pm 0.14 ¹⁾
	0.9	0.71 \pm 0.14 ²⁾	1.12 \pm 0.12 ^{1,2)}	1.50 \pm 0.36 ^{1,2)}	1.14 \pm 0.24 ¹⁾²⁾	0.78 \pm 0.23 ²⁾
	1.8	0.67 \pm 0.15 ²⁾	0.96 \pm 0.22 ²⁾	1.26 \pm 0.20 ²⁾	0.61 \pm 0.11 ²⁾	0.71 \pm 0.13 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠肝纤维化相关基因表达量(A) ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	a-SMA (倍数)	TGF- β_1 (倍数)	CTGF (倍数)	C-I (倍数)	C-III (倍数)
正常	-	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4	1.0 \pm 0.2
模型	-	2.8 \pm 0.5 ¹⁾	2.0 \pm 0.4 ¹⁾	3.2 \pm 0.6 ¹⁾	12.6 \pm 1.7 ¹⁾	3.1 \pm 0.5 ¹⁾
桂枝茯苓丸	0.45	2.5 \pm 0.4 ¹⁾	1.9 \pm 0.5 ¹⁾	2.8 \pm 0.8 ¹⁾	10.7 \pm 2.2 ¹⁾	2.8 \pm 0.4 ¹⁾
	0.9	1.4 \pm 0.3 ^{1,3)}	1.5 \pm 0.3 ¹⁾	2.0 \pm 0.4 ¹⁾	7.1 \pm 0.9 ¹⁾	2.2 \pm 0.3 ¹⁾
	1.8	1.2 \pm 0.2 ²⁾	1.1 \pm 0.1 ³⁾	1.5 \pm 0.4 ²⁾	3.4 \pm 0.8 ¹⁾²⁾	1.4 \pm 0.2 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$ 。

本实验研究结果发现,用药 4 周后,模型组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白和 mRNA 的表达量较正常组显著增多,治疗组均能下调 α -SMA 蛋白和 mRNA 的表达,且随着剂量的增加下调越明显。提示该方抗肝纤维化的机制可能是下调 α -SMA 蛋白和 mRNA 的表达,抑制 HSC 活化,从而发挥抗肝纤维化作用。

4.2 下调大鼠肝组织中 TGF- β_1 , CTGF 蛋白和 mRNA 的表达 TGF- β_1 是公认的、最重要的促肝纤维化因子之一^[7-9]。ECM 的合成与降解很大程度上由 TGF- β_1 调节^[10]。活化的 HSC 可自分泌、旁分泌 TGF- β_1 ,其中 HSC 的自分泌是 TGF- β_1 的主要分泌途径^[11]。有研究表明,肝组织 TGF- β_1 表达水平与肝组织纤维化程度密切相关^[12]。

CTGF 是一种新发现的促成纤维细胞分裂和胶原沉积的生长因子,与 TGF- β_1 有密切联系,可通过 TGF- β_1 介导作用于结缔组织,促进 HSC 活化、增生及细胞外基质合成^[13-14]。CTGF 的持续表达是纤维化病变缓慢进展的重要因素^[15-16],在肝纤维化发病机制中起重要的作用^[17]。Abou Shady 等^[18]研究发现,肝硬化病人肝脏中 CTGF mRNA 的表达是正常人的 6.5 倍。

由此,通过抑制 TGF- β_1 , CTGF 蛋白和 mRNA 的表达,进而调节 ECM 的合成与降解,是抗肝纤维化治疗的重要策略^[19]。

本实验研究结果显示,用药 4 周后,模型组大鼠

肝组织 TGF- β_1 , CTGF 的蛋白和 mRNA 表达量较正常组明显增强;而治疗组均能下调 TGF- β_1 , CTGF 蛋白和 mRNA 的表达,且随着剂量的增加作用越显著。由此,表明桂枝茯苓丸可能通过抑制肝组织 TGF- β_1 , CTGF 蛋白和 mRNA 的过量表达而逆转肝纤维化进程。

4.3 减少大鼠肝组织 C-I, C-III 蛋白和 mRNA 的表达 肝纤维化的基本病理改变为 ECM 在肝内过度沉积,其中以 C-I, C-III 在肝脏中含量最多,分别占肝脏胶原总量的 33%, 35%,是肝纤维化的重要标志。因此,调节 ECM 的合成与降解,是抗肝纤维化治疗的一个重要途径。

本实验研究结果表明,模型组大鼠肝组织 C-I, C-III 蛋白和 mRNA 的表达水平明显高于正常组,提示肝纤维化大鼠胶原代谢异常;治疗组均能不同程度地减少肝纤维化大鼠肝组织 C-I, C-III 蛋白和 mRNA 的表达,且随着剂量的增加下调越显著。表明桂枝茯苓丸抗肝纤维化的机制可能是通过调节胶原代谢,减轻胶原生成,从而起到良好的抗肝纤维化作用。

桂枝茯苓丸抗肝纤维化的可能机制:通过抑制 ECM 合成的相关基因 α -SMA, TGF- β_1 , CTGF, C-I 和 C-III 在肝脏中的表达,从而减少 ECM 累积,逆转肝纤维化,阻断其进展。桂枝茯苓丸具有抗肝纤维化的潜力和优势,其作用机制值得我们深入研究。

[参考文献]

- [1] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Reversibility of hepatic fibrosis; from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery[J]. *Keio J Med*, 2001, 50(2):58.
- [2] 王宝恩, 王惠吉. 中药复方丹参不同剂型治疗肝纤维化的实验研究与临床观察[J]. *肝脏病杂志*, 1993, 1(2):69.
- [3] 袁盛榕. 药理学实习教程[M]. 北京:世界图书出版公司, 1994:13.
- [4] Mandal M N, Vasireddy V, Jablonski M M, et al. Spatial and temporal expression of MFRP and its interaction with CTRP5 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(12):5514.
- [5] Nieto N, Dminquez-Rosales J A, Fontana L, et al. Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of alpha (I) and alpha (IV) collagen tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix-metalloproteinase-2 messenger RNAs[J]. *Hepatology*, 2001, 33(3):597.
- [6] Russo M W, Firpi R J, Nelson D R, et al. Early hepatic stellate cell activation is associated with advanced fibrosis after liver transplantation in recipients with hepatitis [J]. *Liver Transpl*, 2005, 11(10):1235.
- [7] 肖华, 张平. 肺纤维化中 TGF- β 信号传导通路及其靶点治疗[J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(4):766.
- [8] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1):76.
- [9] 王晓柠, 胡义扬, 刘成海, 等. 丹酚酸 B 盐对二甲基亚硝酸诱导的肝纤维化大鼠肝脏转化生长因子 β_1 及其受体蛋白表达的影响[J]. *中西医结合学报*, 2005, 3(4):286.
- [10] 彭博. 从瘀论治肝纤维化体会[J]. *江苏中医药*, 2007, 39(5):4.
- [11] Gressner A M, Weiskirchen R, Breitkopf K, et al. Roles of TGF beta in hepatic fibrosis[J]. *Front Biosci*, 2002, 7:793.
- [12] 李冠正. 血府逐瘀浓缩丸抗肝纤维化作用的临床研究[J]. *中华临床新医学*, 2005, 5(1):44.
- [13] Qi W, Chen X, Poronnik P, et al. Transforming growth factor-beta/connective tissue growth factor axis in the kidney[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(1):9.
- [14] Arnott J A, Nuglozeh E, Rico M C, et al. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is a downstream mediator for TGF-beta1-induced extracellular matrix production in osteoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(3):843.
- [15] 王念跃, 张岱, 杨成保, 等. 血清结缔组织生长因子对慢性肝病的诊断价值[J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(1):28.
- [16] 游晶, 袁丽芳, 陈红英, 等. TGF- β_1 与慢性乙型肝炎的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(8):869.
- [17] Liu X, Hu H, Yin J Q. The rapcutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis[J]. *Liver Int*, 2006, 26(1):8.
- [18] Abou Shady M, Friess H, Zimmermann A, et al. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis [J]. *Liver*, 2000, 2(4):296.
- [19] Doh K O, Jung H K, Moon I J, et al. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by ribbon antisense to transforming growth factor-beta1 [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(1):33.

[责任编辑 聂淑琴]