

文章编号 1006-8147(2014)04-0260-04

论 著

## 神经酰胺对肝纤维化治疗作用的初步研究

徐亚洁, 张晓燕, 马淑晶, 杜 岩, 方步武

(天津医科大学药理学教研室, 天津 300070)

**摘要** 目的:探讨神经酰胺代谢酶抑制剂油酰乙醇胺(NOE)和丙咪嗪(Imi)对人源肝星状细胞(HSCs)LX-2中神经酰胺含量的影响,并探讨神经酰胺在肝纤维化治疗中的作用。方法:实验分为给药组(NOE组终浓度为50、75、100  $\mu\text{mol/L}$ ;Imi组终浓度为10、20、30  $\mu\text{mol/L}$ ),乙醇对照组(乙醇终浓度为1%),DMSO组(DMSO终浓度为1%)。高效液相法测定HSCs内神经酰胺的含量,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测HSCs的增殖情况,比色法检测乳酸脱氢酶(LDH)的活性,酶消化法测定羟脯氨酸(Hyp)的含量。结果:与乙醇组比较,NOE各浓度组可显著提高HSCs内神经酰胺的含量( $P<0.05$ );对HSCs的抑制作用呈剂量-效应关系;各浓度组LDH活性与乙醇组比较,无显著性差异( $P>0.05$ );且各浓度组均可显著降低HSCs上清液中Hyp的含量( $P<0.05$ )。30  $\mu\text{mol/L}$  Imi作用24 h后,与DMSO组比较,可降低HSCs内神经酰胺的含量,促进HSCs的增殖,并可升高HSCs上清液中Hyp的含量,且差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:神经酰胺代谢酶抑制剂对HSCs内神经酰胺的含量有显著影响,且神经酰胺可通过抑制HSCs细胞的增殖、减少胶原蛋白的合成来发挥抗肝纤维化作用。

**关键词** 神经酰胺;肝纤维化;油酰乙醇胺;丙咪嗪

中图分类号 R96

文献标志码 A

### Effects of ceramide on hepatic fibrosis

XU Ya-jie, ZHANG Xiao-yan, MA Shu-jing, DU Yan, FANG Bu-wu

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effects of ceramide metabolism inhibitors, N-oleoylethanolamine (NOE) and Imipramine (Imi) on intracellular contents in HSCs LX-2, and to explore the effect of ceramide on hepatic fibrosis. **Methods:** The experimental groups included three NOE-treated groups with 50, 75, 100  $\mu\text{mol/L}$  NOE, three Imi-treated groups with 10, 20, 30  $\mu\text{mol/L}$  Imi, one alcohol-treated group with 1% alcohol and one DMSO-treated group with 1% DMSO. The content of ceramide was determined by HPLC method, MTT assay was applied to detect the rate of cellular proliferation. The activity of LDH was determined by colorimetric method and the content of hydroxyproline (Hyp) was obtained using enzyme digestion method. **Results:** Compared with alcohol-treated group, NOE significantly increased the content of ceramide in HSCs ( $P<0.05$ ). MTT analysis revealed that HSCs treated with various concentrations of NOE (50–100  $\mu\text{mol/L}$ ) were inhibited on dose-effect relationships. LDH activity in NOE-treated groups had no significant difference compared with alcohol-treated group ( $P>0.05$ ) while content of Hyp in NOE-treated groups was significantly decreased compared with alcohol-treated group ( $P<0.05$ ). Compared with DMSO-treated group, 30  $\mu\text{mol/L}$  Imi could decrease the concentration of ceramide in HSCs, promote the proliferation of HSCs and increase the content of Hyp in HSCs. All of these differences were significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The ceramide metabolism inhibitors could change the concentration of ceramide effectively, and the anti-fibrogenic mechanisms of ceramide might inhibit the activation of HSCs, and decrease the synthesis of collagen.

**Key words** ceramide; hepatic fibrosis; N-oleoylethanolamine; Imipramine

神经酰胺 (ceramide, Cer), 即 N-脂酰鞘氨醇 (N-acetyl-sphingosine), 是鞘磷脂信号途径的中心分子,其作为第二信使的作用已经被广泛认可<sup>[1]</sup>,可介导多种信号转导通路,与细胞的分化、增殖、凋亡及衰老等生命活动息息相关<sup>[2-3]</sup>。神经酰胺可直接与一些信号通路相关因子相互作用,激活 JNK 等通路促进细胞凋亡<sup>[4]</sup>。目前神经酰胺在肿瘤细胞凋亡中

的调控作用已有较多报道,而其对于人源肝星状细胞(HSCs)以及可能在肝纤维化中的作用却罕见相关报道。故本课题拟研究神经酰胺在抗肝纤维化中的作用。本研究测定在神经酰胺代谢酶抑制剂油酰乙醇胺 (N-oleoylethanolamine, NOE)<sup>[5]</sup> (抑制由神经酰胺转化为鞘氨醇的神经酰胺酶) 和丙咪嗪 (Imipramine, Imi)<sup>[6]</sup> (抑制鞘磷脂水解为神经酰胺的酸性鞘磷脂酶) 作用下, HSCs 内神经酰胺含量的变化及这种变化对 HSCs 产生的影响,为进一步研究神经酰胺在肝纤维化治疗中的作用提供基础。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30772856)

作者简介 徐亚洁(1988-),女,硕士在读,研究方向:中药药理;通信

作者:方步武, E-mail: fangdch@aliyun.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人源肝星状细胞株 LX-2 由北京市地坛医院提供。

1.1.2 仪器设备 VIS-7220 紫外可见分光光度计:北京瑞利分析仪器公司;680 酶标仪:美国 BIO-RAD 公司;高效液相色谱仪(LC-6A 泵,SCL-6B 系统控制箱,RF-535 荧光检测器,Anastar 色谱工作站):日本岛津;MSB010.CX2.5 型台式高速离心机:SANYO。

1.1.3 主要试剂 NOE 购自 Adamas 试剂有限公司;Imi、邻苯二甲醛、 $\beta$ -巯基乙醇(色谱纯)购自 Sigma-aldrich 公司;羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒购自南京建成试剂公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方法

1.2.1 HPLC 法测定细胞培养上清液中神经酰胺的含量 取对数期生长的 HSCs,以  $2 \times 10^4/\text{mL}$  的密度接种于 96 孔板,分别设有给药组(NOE 组终浓度为 50、75、100  $\mu\text{mol/L}$ ;Imi 组终浓度为 10、20、30  $\mu\text{mol/L}$ ),乙醇对照组(乙醇终浓度为 1%),DMSO 组(DMSO 终浓度为 1%),作用 24 h 后收集细胞上清液,  $-20^\circ\text{C}$  保存。神经酰胺测定完全参照文献[7]采用 HPLC 法。本文采用外标一点法推算出对应的待测样本中的神经酰胺含量。

1.2.2 MTT 法检测不同浓度的 NOE 和 Imi 对肝星状细胞增殖的影响 收集第二代 HSCs,以  $2 \times 10^4/\text{mL}$  密度接种于 96 孔培养板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,实验分组情况同 1.2.1。分别孵育 24、48、72 h,用酶标仪测各孔吸光度,按以下公式计算细胞抑制率(IR),抑制率=[(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值] $\times 100\%$ 。

1.2.3 细胞培养上清液中 LDH 活性的测定 取对数生长的 HSCs,以  $2 \times 10^4/\text{mL}$  的密度接种于 96 孔板,分为给药组(NOE 组终浓度为 50、75、100  $\mu\text{mol/L}$ ),乙醇对照组(乙醇终浓度为 1%), $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  孵育 24 h 后,按照碧云天生物技术研究所提供的 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作。计算公式:细胞培养上清中 LDH 活性=(样品孔吸光度-背景空白对照孔吸光度)/(标准管吸光度-标准空白管吸光度) $\times$ 标准品浓度( $\text{mU/mL}$ )。

1.2.4 测定细胞培养上清液中羟脯氨酸含量 取对数生长的 HSCs,以  $2 \times 10^4/\text{mL}$  的密度接种于 96 孔板,实验分组情况同 1.2.1。 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  孵育 24 h 后收集细胞上清,按照南京建成生物工程研究所提供的羟脯氨酸测定试剂盒说明书进行操作。计算公式:羟脯氨酸浓度( $\mu\text{g/mL}$ )=(测定管吸光度-空白管

吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度) $\times$ 标准管浓度( $5 \mu\text{g/mL}$ ) $\times$ 样本测试前稀释倍数。

1.3 统计学方法 利用 SPSS16.0 软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HPLC 法测定细胞培养上清液中神经酰胺含量 NOE 实验组作用 24 h 后,相对于乙醇组,神经酰胺含量显著升高,且均具有统计学差异( $P < 0.05$ );30  $\mu\text{mol/L}$  Imi 实验组作用 24 h 后,相对于 DMSO 组,神经酰胺含量降低( $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 NOE 及 Imi 对 HSCs 内神经酰胺含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effect of NOE and Imi on the concentration of ceramide in HSCs ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	神经酰胺含量/( $\mu\text{g/mL}$ )
乙醇组	3	0.125 $\pm$ 0.061
NOE 50 $\mu\text{mol/L}$	3	0.220 $\pm$ 0.019*
NOE 75 $\mu\text{mol/L}$	3	0.224 $\pm$ 0.023*
NOE 100 $\mu\text{mol/L}$	3	0.239 $\pm$ 0.029*
DMSO 组	3	0.125 $\pm$ 0.015
Imi 10 $\mu\text{mol/L}$	3	0.123 $\pm$ 0.015
Imi 20 $\mu\text{mol/L}$	3	0.115 $\pm$ 0.026
Imi 30 $\mu\text{mol/L}$	3	0.062 $\pm$ 0.016 <sup>*</sup>

与乙醇组比较,\* $P < 0.05$ ;与 DMSO 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$

2.2 MTT 法检测不同浓度的 NOE 和 Imi 对 HSCs 增殖的影响 由 MTT 法检测的数据(表 2)可以得出,与乙醇组比较,NOE 可显著抑制 HSCs 的增殖且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ ),单次给药,其药效随着时间的延长而降低;Imi 仅在浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$ 、作用时间为 24 h 后,与 DMSO 组比较,可促进 HSCs 的增殖,且其差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 NOE 及 Imi 对 HSCs 的抑制率( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Inhibition rate on HSCs caused by NOE and Imi( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
乙醇组	6	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
NOE 50 $\mu\text{mol/L}$	6	30.27 $\pm$ 8.04*	27.79 $\pm$ 2.11*	14.01 $\pm$ 0.27 <sup>*</sup>
NOE 75 $\mu\text{mol/L}$	6	49.38 $\pm$ 4.39* <sup>#</sup>	39.06 $\pm$ 0.30* <sup>△</sup>	26.44 $\pm$ 4.10* <sup>△</sup>
NOE 100 $\mu\text{mol/L}$	6	61.97 $\pm$ 1.44*	48.6 $\pm$ 6.09*	39.68 $\pm$ 1.00* <sup>△</sup>
DMSO 组	6	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Imi 10 $\mu\text{mol/L}$	6	-2.00 $\pm$ 5.25	5.10 $\pm$ 8.63	3.84 $\pm$ 15.93
Imi 20 $\mu\text{mol/L}$	6	-3.41 $\pm$ 3.22	0.96 $\pm$ 8.63	6.89 $\pm$ 11.61
Imi 30 $\mu\text{mol/L}$	6	-7.28 $\pm$ 4.35 <sup>▲</sup>	0.97 $\pm$ 5.00	20.89 $\pm$ 18.74

与乙醇组比较,\* $P < 0.05$ ;与 NOE 50  $\mu\text{mol/L}$  比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 NOE 75  $\mu\text{mol/L}$  比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与 24 h 比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 48 h 比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 DMSO 组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$

2.3 细胞上清液中 LDH 活性的测定 NOE 作用 24 h 后,各浓度组细胞上清中 LDH 活性无明显变化,与乙醇组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )(图 1)。

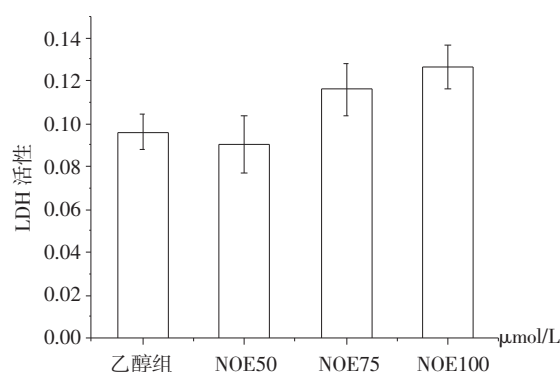


图1 NOE 对 LDH 活性的影响

Fig 1 Effect of NOE on the activity of LDH

2.4 测定细胞培养上清液中羟脯氨酸含量 NOE 作用 24 h 后,各浓度组细胞上清液中的羟脯氨酸含量降低,与乙醇组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );30  $\mu\text{mol/L}$  Imi 作用 24 h 可提高羟脯氨酸水平,与 DMSO 组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表 3)。

表3 NOE 及 Imi 对 HSCs 分泌羟脯氨酸的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 3 Effects of NOE and Imi on secretion of Hyp of HSCs( $\bar{x}\pm s$ )

分组	n	羟脯氨酸含量/( $\mu\text{g/mL}$ )
乙醇组	3	1.292 $\pm$ 0.040
NOE 50 $\mu\text{mol/L}$	3	0.907 $\pm$ 0.013 <sup>*</sup>
NOE 75 $\mu\text{mol/L}$	3	0.838 $\pm$ 0.012 <sup>*</sup>
NOE 100 $\mu\text{mol/L}$	3	0.698 $\pm$ 0.010 <sup>*</sup>
DMSO 组	3	1.332 $\pm$ 0.038
Imi 10 $\mu\text{mol/L}$	3	1.345 $\pm$ 0.120
Imi 20 $\mu\text{mol/L}$	3	1.382 $\pm$ 0.020
Imi 30 $\mu\text{mol/L}$	3	1.410 $\pm$ 0.020 <sup>*</sup>

与乙醇组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 DMSO 比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$

### 3 讨论

神经酰胺作为脂质第二信使,已被证实具有多种生物学功能。神经酰胺的合成代谢途径主要有 3 种:(1)从头合成途径:从头合成途径是神经酰胺合成的重要途径<sup>[8]</sup>。首先丝氨酸和软脂酰辅酶 A 在转移酶作用下生成 3-酮基双氢鞘氨醇,然后在还原酶的作用下变为双氢鞘氨醇,再经神经酰胺合成酶作用,生成二氧神经酰胺,最后脱氧生成神经酰胺。(2)鞘磷脂水解<sup>[9]</sup>:鞘磷脂酶能将鞘磷脂水解成神经酰胺和胆碱,释放的神经酰胺进入膜上一称作“筏”的富集区。鞘磷脂酶分为中性鞘磷脂酶、酸性鞘磷脂酶和碱性鞘磷脂酶等。(3)神经鞘氨醇-神经酰胺

途径:神经酰胺酶可清除神经酰胺。在神经酰胺酶作用下,神经酰胺可生成神经鞘氨醇。本实验中采用的 NOE 可抑制神经酰胺酶,抑制神经酰胺转化成神经鞘氨醇,进而使得神经酰胺含量增高;而 Imi 可抑制鞘磷脂水解为神经酰胺的酸性鞘磷脂酶,从而使神经酰胺含量减少。由于神经酰胺可以透过细胞膜,所以测定细胞培养上清液中的神经酰胺含量可以显示出 NOE 和 Imi 对细胞内神经酰胺含量的影响。本文采用 HPLC 方法检测在不同浓度的 NOE 和 Imi 刺激下,细胞内神经酰胺的含量。发现 NOE 使细胞内神经酰胺含量明显增加,且呈剂量依赖性。而 Imi 仅在 30  $\mu\text{mol/L}$  时使细胞内神经酰胺含量显著性降低( $P<0.05$ ),与理论相符。但在本实验前期 Imi 浓度摸索过程中,发现浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$  以上的 Imi 刺激 24 h 后,或者浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$  以下的 Imi 刺激 36 h 后,均可使细胞内神经酰胺含量升高,与对照组相比有显著性差异,这与文献报道一致<sup>[10]</sup>。笔者认为原因可能如下:用高浓度的 Imi 或者长时间的 Imi 刺激有可能负反馈的激活细胞内其他神经酰胺通路,使得其他途径的神经酰胺量代偿性升高,所以导致细胞内总神经酰胺的含量增高。

HSCs 的增殖和激活是肝纤维化发病的中心环节<sup>[10-11]</sup>。现肝纤维化的治疗途径之一是抑制 HSCs 的激活并诱导其凋亡。本研究结果显示:NOE 能够在体外显著抑制 HSCs 的增殖并呈剂量依赖性,而 Imi 能够促进 HSCs 的增殖。说明细胞内神经酰胺含量增加,可抑制 HSCs 的增殖,提示神经酰胺可通过抑制 HSCs 的增殖来发挥抗肝纤维化作用。

LDH 是一种稳定的胞质酶<sup>[12]</sup>,细胞膜损伤后释放出 LDH 存在于培养上清液中,通过测量培养上清液中的 LDH,可以估算细胞膜完整性,从而反应药物的细胞毒性。本实验发现 NOE 50、75、100  $\mu\text{mol/L}$  实验组 LDH 活性较低,与乙醇组比较均无统计学意义( $P>0.05$ ),说明细胞质膜基本完整。由此可见 NOE 对 HSCs 的抑制作用是通过细胞内神经酰胺含量增加引起的,而不是非特异性细胞毒性所致。Imi 对 HSCs 表现为促进增殖,故没有进行细胞毒性测定。

肝纤维化是以大量的细胞外基质沉积为特征的,特别是 I 型胶原的沉积<sup>[10-14]</sup>。I 型胶原的降解对肝细胞的再生以及 HSCs 细胞的凋亡是非常重要的<sup>[15]</sup>,故肝纤维化另一治疗途径则是减少细胞外基质的合成并促进其降解。羟脯氨酸是一种非必需氨基酸,大部分存在于胶原蛋白中,且其含量恒定。所以羟脯氨酸含量能客观地反映肝纤维化的程度和演变过程。实验结果发现 NOE 可显著减少羟脯氨



酸的含量,而 Imi 可增加羟脯氨酸含量。说明神经酰胺含量升高可减少 HSCs 合成胶原蛋白含量,提示神经酰胺可能是通过减少胶原蛋白的合成来发挥抗肝纤维化作用。

综上所述,神经酰胺代谢酶抑制剂可显著影响细胞内神经酰胺含量,且神经酰胺具有抗肝纤维化作用,其机制可能是抑制 HSCs 的增殖,减少胶原蛋白的合成。这一研究发现对肝纤维化的治疗有着积极的意义。

#### 参考文献:

- [1] Majumder S, Dey R, Bhattacharjee S, et al. Leishmania-induced biphasic ceramide Generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite[J]. *J Infect Dis*, 2012,205(10):1607
- [2] Zhu W, Wang X, Zhou Y, et al. C2-ceramide induces cell death and protective autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014,15(2):3336
- [3] Mencarelli C, Martinez-Martinez P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013,70(2):181
- [4] Mohammadtaghvaei N, Taheripak G, Taghikhani M, et al. Palmitate-induced PTP1B expression is mediated by ceramide-JNK and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation[J]. *Cell Signal*, 2012,24(10):1964
- [5] Glaros E N, Kim W S, Garner B. Myriocin-mediated up-regulation of hepatocyte apoA-I synthesis is associated with ERK inhibition[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010,118(12):727
- [6] Liangpunsakul S, Rahmini Y, Ross R A, et al. Imipramine blocks ethanol-induced ASMase activation, ceramide Generation, and PP2A activation, and ameliorates hepatic steatosis in ethanol-fed mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012,302(5):G515
- [7] 娄婷婷,李英娴,方步武,等.测定生物样本中神经酰胺含量的 HPLC-FLD 法[J]. *药物分析杂志*, 2012,32(10):1807
- [8] Shea B S, Tager A M. Sphingolipid regulation of tissue fibrosis[J]. *Open Rheumatol J*, 2012,6(Suppl 1:M8):123
- [9] Artetxe I, Sergelius C, Kurita M, et al. Effects of sphingomyelin headgroup size on interactions with ceramide[J]. *Biophys J*, 2013, 104(3):604
- [10] Woodhoo A, Iruarizaga-Lejarreta M, Beraza N, et al. Human anti-gen R contributes to hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2012,56(5):1870
- [11] Lakner A M, Steuerwald N M, Walling T L, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis[J]. *Hepatology*, 2012,56(1):300
- [12] Longxi P, Buwu F, Yuan W, et al. Expression of p53 in the effects of artesunate on induction of apoptosis and inhibition of proliferation in rat primary hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2011,6(10): e26500
- [13] Qian H, Shi J, Fan T T, et al. Sophocarpine attenuates liver fibrosis by inhibiting the TLR4 signaling pathway in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(7):1822
- [14] Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013,6(1):19
- [15] Liu L, Yannam G R, Nishikawa T, et al. The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2012,55(5):1529

(2014-02-21 收稿)

.....

(上接第 259 页)

- [3] Dechene A, Sowa J P, Gieseler R K, et al. Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation[J]. *Hepatology*, 2010,52(3):1008
- [4] Iredale J P, Thompson A, Henderson N C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013,1832(7):876
- [5] Ghiassi-Nejad Z, Hernandez-Gea V, Woodrell C, et al. Reduced hepatic stellate cell expression of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor isoforms amplifies fibrosis during acute and chronic rodent liver injury[J]. *Hepatology*, 2013,57(2):786
- [6] Dionysiou M G, Salma J, Bevzyuk M, et al. Kruppel-like factor 6 (KLF6) promotes cell proliferation in skeletal myoblasts in response to TGF $\beta$ /Smad3 signaling[J]. *Skelet Muscle*, 2013,3(1):7
- [7] 方步武,来丽娜,林雅军,等.青蒿琥酯抗四氯化碳致大鼠肝纤维化的作用[J]. *中国药理学通报*, 2005,21(6):762
- [8] 来丽娜,方步武.青蒿琥酯抗牛血清白蛋白免疫性大鼠肝纤维化作用的研究[J]. *中药药理与临床*, 2006,22(3):35
- [9] 王媛,方步武,彭龙希.青蒿琥酯对大鼠原代肝星状细胞产生与分泌转化生长因子  $\beta$ 1 的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2012,20(4): 294
- [10] Peng L X, Fang B W, Wang Y, et al. Expression of p53 in the effects of artesunate on induction of apoptosis and inhibition of proliferation in rat proliferation in rat primary hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2011,6(10):1
- [11] Geerts A. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal[J]. *J Hepatol*, 2004,40(2):331
- [12] 汪美凤,平键,成扬.肝星状细胞主要信号转导通路与肝纤维化的关系[J]. *实用肝脏病杂志*, 2010,13(6):466
- [13] 王晓敏,陈东风.核转录因子 KLF6 在非酒精性脂肪性肝纤维化形成中的作用[J]. *消化外科*, 2006,5(5):355
- [14] Oh W Y, Pyo S, Lee K R, et al. Effect of holotrichia diomphalialarvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 87(2/3):175
- [15] Ratzl V, Lalazar A, Wong L, et al. Zf9, a kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998,95(16):9500

(2014-02-21 收稿)