

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.17.006

藏红花酸对 TGF- β 1 刺激的人肝星状细胞 LX-2 信号转导通路的影响 *

杨培青 汪云[△] 梅夏齐 王凤秀

(哈尔滨医科大学附属第四医院感染科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究藏红花酸(crocetin)对转化生长因子- β 1(TGF- β 1)刺激的人肝星状细胞 LX-2 信号转导通路的影响。**方法:**体外培养 LX-2 细胞,随机设立空白对照组,模型组,藏红花酸低剂量组,藏红花酸中剂量组,藏红花酸高剂量组,用含 10%血清的 1640 培养液培养 48 h,MTT 法测各组细胞增殖,蛋白免疫印迹测定各组细胞 α -SMA 蛋白的表达,实时荧光定量 PCR 法测各组细胞 Smad2、Smad3、Smad7 mRNA 的表达。**结果:**与对照组比较,TGF- β 1 刺激后人肝星状细胞 LX-2 增殖作用明显,且上调 α -SMA 蛋白、Smad2 mRNA、Smad3 mRNA 表达,下调 Smad7 mRNA 表达($P<0.01$)与模型组比较,藏红花酸组均能抑制 LX-2 细胞增殖,并呈剂量依赖性,高、中剂量组作用明显,能够明显下调 α -SMA 蛋白、Smad2 mRNA、Smad3 mRNA 表达,上调 Smad7 mRNA 表达,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**藏红花酸对 TGF- β 1 刺激的 LX-2 细胞中 Smad7 mRNA 具有上调作用,对 Smad2、Smad3 mRNA 具有下调作用,其抗肝纤维化作用可能与抑制 TGF- β 1/Smads 信号转导通路有关。

关键词:肝星状细胞;转化生长因子;藏红花酸;TGF- β 1/Smads

中图分类号:R-33;R575.2;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)17-3230-05

Effects of Crocetin on Signal Transduction Pathway of Human Hepatic Stellate Cells Stimulated by TGF- β 1 *

YANG Pei-qing, WANG Yun[△], MEI Xia-qi, WANG Feng-xiu

(Department of Infectious disease of The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of crocetin on TGF- β 1 stimulated signal transduction pathway in human hepatic stellate cells (HSC-LX2). **Methods:** HSC-LX2 cells were cultured in vitro and randomly divided into 5 groups: blank group, model group, low-dose crocetin group, medium-dose group, high-dose crocetin group. Then cells proliferation were measured by MTT, the expression of α -SMA was measured by Western blot, the gene expression of Smad2/Smad3/Smad7 mRNA were measured by Real-time PCR. **Results:** Compared with control group, the model group promotes cells proliferation. It can upregulate the expression of α -SMA protein, Smad2 mRNA and Smad3 mRNA and downregulate the expression of Smad7 mRNA ($P<0.01$). Compared with model group, crocetin group can inhibit the effect of TGF- β 1 in a dose-dependent manner($P<0.05$). The high-dose and medium-dose crocetin groups can down-regulate the expression of α -SMA protein, Smad2 mRNA and Smad3 mRNA and upregulate the expression of Smad7 mRNA ($P<0.05$). **Conclusions:** Crocetin can upregulate the expression of Smad7 mRNA and downregulate the expression of Smad2 mRNA and Smad3 mRNA in LX-2 cells induced by TGF- β 1. Thus the anti-hepatic fibrosis mechanism of crocetin may be related to the inhibition of TGF- β 1/Smads signal transduction pathway.

Key words: Hepatic stellate cell; Transforming growth factor- β 1;Crocetin;TGF- β 1/Smads

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.2; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)17-3230-05

前言

肝纤维化是机体对各种慢性肝损伤的修复反应,表现为肝内结缔组织的异常沉积^[1]。它是一个动态过程,呈双向性发展,经积极有效地治疗可逆转,如不及时治疗,肝纤维化亦可进展为肝硬化甚至肝癌^[2,3]。目前认为静息状态的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)受到各种致病因子的刺激活化成肌成纤维细胞是肝纤维化发展的中心环节^[4]。其中,转化生长因子- β 1

(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是刺激 HSC 激活和分泌细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)作用最强的细胞因子^[5,6],主要通过 TGF- β 1/Smads 信号通路发挥作用^[7,8]。

藏红花(Saffron)是一种传统中药,为我国重点发展的 39 种中药之首^[9]。藏红花酸(crocetin)是藏红花的有效成分之一,属于类胡萝卜素类物质,具有多不饱和共轭烯酸结构。研究表明,藏红花酸在治疗神经系统疾病^[10]、抗心血管疾病^[11,12]、抗氧化^[13]、抗肿瘤等^[14]方面具有明确的作用,在抗纤维化方面

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D201076)

作者简介:杨培青(1992-),硕士研究生,主要研究方向:肝纤维化机制的研究,E-mail: 1361374166@qq.com

[△] 通讯作者:汪云(1966-),硕士生导师,教授,主要研究方向:肝纤维化机制的研究,

E-mail: wangyun85939563@163.com,电话:0451-85939563

(收稿日期:2018-01-03 接受日期:2018-01-30)

^[15-17]亦表现出积极的作用。因对藏红花酸的抗肝纤维化的研究很少见,本研究通过建立 TGF- β 1 诱导的人肝星状细胞(LX-2)纤维化增殖模型,观察不同剂量藏红花酸对活化的肝星状细胞的作用及 TGF- β 1 下游 Smad2、Smad3、Smad7 信号分子表达的影响,试图探讨藏红花酸的抗肝纤维化作用及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品与试剂 藏红花酸,上海同田生物科技有限公司; Recombinant Human TGF β 1,美国 PEPROTECH 公司;人肝星状细胞株 LX-2,上海中科院细胞所;PRMI-1640 MEDIUM 培养基,美国 Hyclone 公司;血清,进口 "LONSERA" 胎牛血清;0.25%胰酶,北京索莱宝科技有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO),美国 sigma 公司;Trizol Reagent 试剂,Reverse Transcription System 逆转录试剂盒,Thermo Fisher 赛默飞世尔科技有限公司;PCR 试剂盒,瑞士罗氏公司;Smad2、Smad3、Smad7 引物,上海生工生物工程技术有限公司合成;兔抗 α -SMA 多克隆抗体,北京博奥森生物技术有限公司; β -actin、辣根过氧化物酶标记二抗,北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 显影液,碧云天生物技术公司。

1.1.2 主要仪器 医用超净工作台、CO₂ 细胞培养箱,上海博迅实业有限公司;倒置显微镜及成像系统,舜宇光学科技有限公司;Millipore 实验室纯水系统,美国 Pall 公司;全自动酶标仪、BIO-RAD 凝胶成像仪 XRS+、电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;PCR 扩增仪,德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 LX-2 细胞在含 100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素、10%血清的 1640 培养液中培养,置于 37℃ 5%CO₂ 的环境中培养,隔天换液一次。待细胞生长达到 80%-90%密度时,传代培养。

1.2.2 实验分组 细胞贴壁后换含无血清培养液过夜后加药,实验分组:空白对照组,TGF- β 1 (5 ng/mL) 刺激的模型组,TGF- β 1 (5 ng/mL)+ 藏红花酸 10⁻⁷ mol/L 低剂量组,TGF- β 1 (5

ng/mL)+ 藏红花酸 10⁻⁶ mol/L 中剂量组,TGF- β 1 (5 ng/mL)+ 藏红花酸 10⁻⁵ mol/L 高剂量组。

1.2.3 MTT 测细胞增殖 取对数生长期细胞用于实验,0.25%胰蛋白酶消化细胞,离心及台酚蓝染色计数后,用含 10%FBS 的 1640 培养液调整细胞数以 1 $\times$ 10⁵/mL 的细胞悬液,按每孔 100 μ L 加入 96 孔培养板,每组设 3 个复孔,在 37℃ 5% CO₂ 恒温培养箱中培养,细胞培养 12 h 贴壁后换含无血清 1640 培养液同步化培养过夜,按照以上分组换药,培养 48 h。终止前 4 h 各孔分别加入 20 μ L MTT (5 mg/mL) 继续培养 4 h,吸弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,震荡混匀,酶标仪 490 nm 处测定吸光度 A 值。实验重复三次。

1.2.4 蛋白免疫印迹(western blot)测定 α -SMA 蛋白水平 对数生长期的 LX-2 细胞接种于培养瓶中,用含有 10%FBS 的 1640 培养液,在 37℃ 5%CO₂ 恒温培养箱中培养,待细胞贴壁后换无血清培养液培养过夜,按照以上分组培养 48 h。干预结束后,提取细胞总蛋白;用 BCA 法测蛋白浓度,并调平蛋白浓度;加入 5 $\times$ loading,100 °C 沸水煮 10 min;配制 SDS-PAGE 凝胶,加样电泳;转膜;6%牛奶室温封闭 2 h;加入兔抗 α -SMA 一抗 4℃ 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次;辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次。采用凝胶成像系统,用 ECL 发光试剂盒,在膜上均匀滴上显影液,置于 Bio-rad 自动显影仪器中进行目的蛋白显影,凝胶成像分析系统进行灰度扫描分析,结果以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白灰度值比值表示目标蛋白相对表达水平。

1.2.5 Real-timePCR 法测 Smad2、Smad3、Smad7 mRNA 表达 按照上述分组处理,干预结束后,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,用逆转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA,采用 actin 为内参对照,对转录产物进行 PCR 扩增。引物序列见表 1,扩增体系均为 20 μ L:SYB 10 μ L,水 7 μ L,模板 1 μ L (100 ng/ μ L),上游引物 1 μ L (10 mol),下游引物 1 μ L (10 mol)。扩增条件:预变性 95 °C,10 min;变性 95 °C,15 s;退火 60 °C,1 min;40 个循环。用 PCR 仪随机软件计算循环阈值(Ct),相对基因表达分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行,计算目的基因的相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Sequence of Primers used for RT-PCR

Genes	Primer Sequences	Product Length(bp)
Smad2	Forward: 5'ACCGAAGGCAGACGGTAACA3'	118
	Reverse: 5'CTTGAGCAACGCACTGAAGG3'	
Smad3	Forward: 5'TGACTGTGGATGGCTTCACC3'	118
	Reverse: 5'ACGCCTCTTCCGATGTGTCT3'	
Smad7	Forward: 5'CTAGTGGCCGAACCAGAACC3'	108
	Reverse: 5'GGAGATCCAGGAGCAGATGG3'	
β -actin	Forward: 5'CAGAAGGATTCTATGTGG3'	224
	Reverse: 5'CATGATCTGGGTCATCTTC3'	

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,各组数据以均值 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$),两组间比较采用 t 检验,多组间比较采

用单因素方差分析,P<0.05 表示差异有统计学意义。作图采用 Graphpad Prism5.0 软件。

2 结果

2.1 藏红花酸对 TGF-β1 刺激的 LX-2 增殖影响

与正常组细胞相比,外源性刺激因子 TGF-β1(5 ng/mL)刺

激的模型组,LX-2 增殖明显 ($P<0.01$), 而藏红花酸(10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L)干预后,与模型组比较 OD 值明显减小,抑制 LX-2 的增殖($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 藏红花酸对 TGF-β1(5 ng/mL)刺激的 LX-2 增殖的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Crocetin on the proliferation of LX-2 stimulated with TGF-β1($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	concentration(mol/L)	A value
control	-	0.5387± 0.0066
model	-	1.061± 0.0236 [#]
crocetin	10^{-7}	0.9103± 0.0505*
	10^{-6}	0.8453± 0.00957*
	10^{-5}	0.668± 0.0113*

Note:Compared with control group, [#] $P<0.01$.compared with model group, * $P<0.05$.

2.2 藏红花酸对 TGF-β1 刺激的 LX- 细胞 α-SMA 蛋白表达的影响

Western Blot 结果显示, 模型组 TGFβ1 能够刺激 LX-2 细胞活化,即 α-SMA 的表达增加,与正常组比较差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比较,在藏红花酸高、中剂量组作用 48 h 后,LX-2 细胞中 α-SMA 蛋白表达明显减低($P<0.05$),说明藏红花酸对 TGF-β1 刺激的 LX-2 细胞活化具有抑制作用。结果见图 1。

2.3 藏红花酸对 TGF-β1 刺激的 LX-2 细胞的 Smad2、Smad3、Smad7mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示,与正常组比较,经过 TGFβ1 刺激,模型组 LX-2 细胞中 Smad2、Smad3mRNA 表达上调 ($P<0.01$), Smad7mRNA 表达下调($P<0.01$),与模型组比较,藏红花酸高、中剂量组使 Smad2、Smad3mRNA 表达下调,Smad7mRNA 表达上调($P<0.05$)。结果见图 2。

3 讨论

肝纤维化是一个缓慢进展的病理过程,由多种慢性肝病发展而来。病因包括感染性疾病和非感染性疾病,前者主要是以乙肝和丙肝为首的病毒性肝炎,后者包括酒精性肝病、脂肪肝、自身免疫性肝病等。经积极有效的治疗可逆转,如错过治疗的

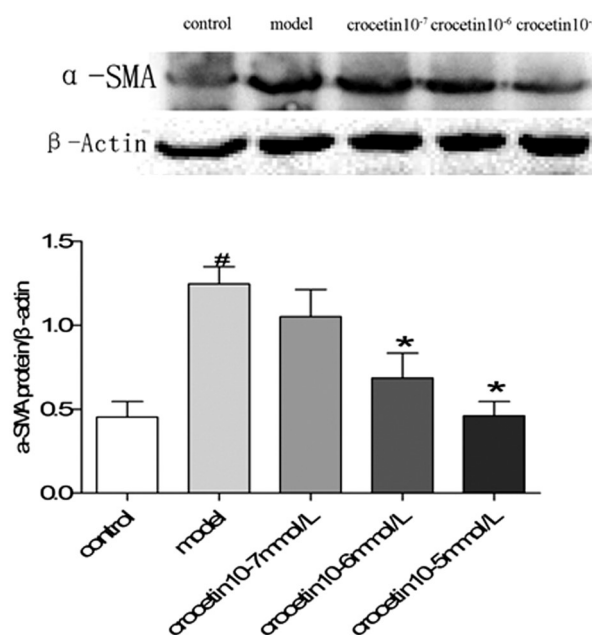


图 1 藏红花酸对 LX-2 细胞α-SMA 蛋白表达的影响

Fig1 Effect of crocetin on α-SMA protein expression in LX-2 cell

Note: Compared with control group, [#] $P<0.01$. compared with model group, * $P<0.05$.

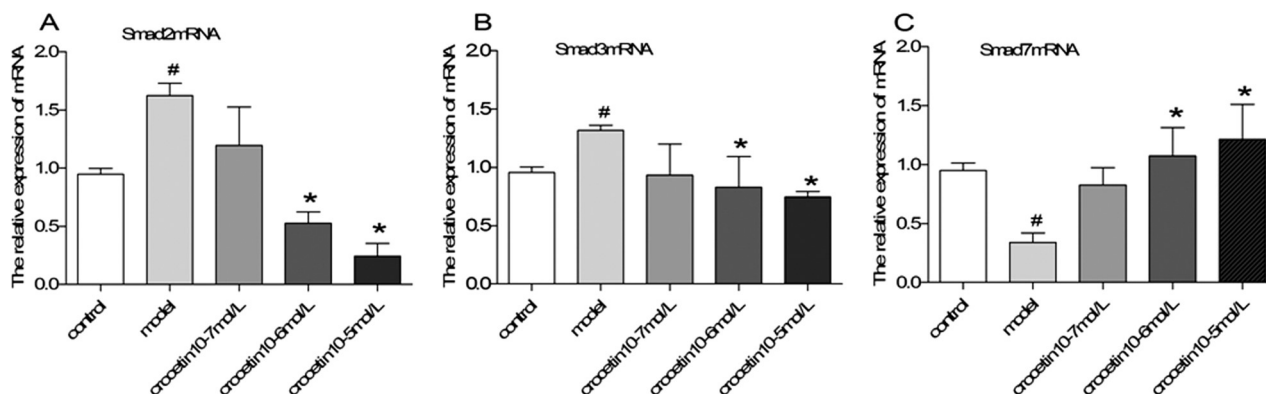


图 2 藏红花酸对 LX-2 细胞 Smad2(A)/Smad3(B)Smad7mRNA(C)表达的影响

Fig.2 Effect of crocetin on Smad2(A)/Smad3(B)Smad7mRNA(C) expression in LX-2 cell

Note: Compared with control group, [#] $P<0.01$. compared with model group, * $P<0.05$.

有效时机则不可逆地发展成肝硬化、甚至肝癌。当进展到肝硬化失代偿期时,会出现以肝功能损害和门脉高压症为特点的临床表现,晚期出现上消化道出血、肝性脑病、继发性感染等合并症,严重者甚至引发原发性肝癌。因此,肝纤维化早发现,并采用行之有效的治疗手段治疗,是阻止疾病进一步恶化的关键措施。阻断肝纤维化,最有效的方法是去除病因,包括核苷类似物、干扰素抗病毒治疗、禁止饮酒、停用损害肝脏的药物等。但事实上很多肝病如:自身免疫性肝病、原发性胆汁性肝硬化等无法从根本上去除病因。因此,积极寻找有效的抗肝纤维化药物成为研究的热点和难点。

近年来,很多学者开始关注中药的抗肝纤维化作用,因其具有多靶点、多途径的作用特点,疗效确切。我们实验所研究的藏红花酸是藏红花的重要活性成分之一,因藏红花价格昂贵,限制其开发和利用,因此着重其有效成分的研究。藏红花酸具有广泛的药理作用,在我们前期的体内研究中发现藏红花酸能够改善四氯化碳诱导的小鼠肝脏的炎症浸润、胶原沉积,并且抑制 P38、CTGF 等细胞因子的表达。本研究在前期实验基础上,建立 TGF- β 1 诱导的体外肝纤维化模型,进一步明确藏红花酸的抗肝纤维化作用及相关的分子机制。

在各种慢性损伤因子刺激下,肝脏内大量 ECM 聚集是肝纤维化的特点,其中 HSC 细胞是 ECM 的主要来源细胞^[4]。HSC 位于窦周 Disse 间隙,主要功能是储存和代谢 VitA,合成与分泌少量的 ECM,并有产生一定胶原酶的能力。正常情况下 HSC 处于静止状态,当致肝病因子造成肝细胞损伤时,多种细胞因子和某些化学介质共同作用于 HSC,使 HSC 激活并转化为具有表达 α -SMA 能力的肌成纤维细胞,激活的 HSC 通过自分泌和旁分泌,促进 HSC 增殖,合成大量细胞外基质并在肝内沉积,导致肝纤维化^[18]。因此,HSC 的增殖、活化是肝纤维化进程的标志,抑制 HSC 的增殖和活化则阻碍肝纤维化的进一步发展。在本实验中,模型组促进 LX-2 细胞大量增殖,并且 α -SMA 蛋白表达增加,而藏红花酸组 LX-2 增殖受到抑制,活化标志物 α -SMA 表达减少,尤以高、中剂量组效果明显,差异具有统计学意义。这说明藏红花酸可以抑制 LX-2 细胞的活化和增殖,进而抑制肝纤维化的发展。

在众多的致纤维化因子中,TGF β 1 是最关键的细胞因子^[5,6],当肝脏损伤时,TGF β 1 促进 HSC 激活、增殖、分化成肌成纤维细胞,促进胶原沉积,抑制 HSC 凋亡。作为 TGF β 1 唯一的受体后蛋白,Smad 在肝纤维化过程中发挥重要作用^[9]。

Smads 蛋白家族根据结构和功能不同,可分为三类: Smad2、3 称受体调控性 Smad (R-Smad),可通过与活化的 T β R1 结合将信号传递至细胞内;结合共介导型 Smad (Co-Smad)Smad4 可与 R-Smad 结合协助其进入细胞核;抑制型 Smad (I-Smad)Smad6、7 是 TGF- β 1 信号转导抑制分子,能与 R-Smad 竞争干扰其活化,在 TGF- β 1 信号转导中形成负反馈环路,从而发挥抗 HF 作用^[20]。在信号转导时,TGF- β 1 先与 T β RII 结合,形成复合物,再与 T β RI 结合,使胞质内下游分子 Smad2/3 磷酸化,Smad2/Smad3 再与 Smad4 结合形成异源寡聚体,将信号从胞浆转移至胞核内^[21],调节 I 型胶原、III 型胶原及 α -SMA 的转录。R-Smad 与 I-Smad 表达失衡是肝纤维化发生的分子机制之一,上调 Smad7 或下调 Smad2/Smad3 均为理论

上可行的基因治疗策略^[22]。近年来,越来越多的研究提出以 TGF β 1 为靶目标抗纤维化^[23,24],Xu 等^[25]通过 TGF- β 1 小 RNA 干扰(siRNA)技术研究刀豆蛋白 A 诱导的肝纤维化小鼠,结果表明 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 表达下调,Smad7 表达上调,明显抑制了肝纤维化的发展;有研究表明^[26],敲除 Smad3,MMPs 表达增多,肝纤维化程度减轻,当 Smad3 过表达时,MMPs 表达降低,肝纤维化程度加重;有学者^[27]应用转染了 Smad7 的鼠骨髓间充质干细胞与肝星状细胞共培养,结果表明星状细胞早期凋亡率增高,I 型胶原、III 型胶原、Smad2、Smad3 等表达均下降,TGF- β 1 信号通路受阻。此外,也有很多中药针对 TGF- β 1/Smad 信号通路探讨抗肝纤维化作用,如吴茱萸碱^[28]、人参皂苷^[29]等均可通过抑制 TGF- β 1/Smad 这一信号通路发挥抗纤维化作用。在本研究中,TGF- β 1 刺激可明显促进 LX-2 细胞内 Smad2、Smad3mRNA 表达,抑制 Smad7mRNA 的表达,高中剂量组藏红花酸则抑制 TGF- β 1 的这种作用,使 Smad2、Smad3mRNA 表达下调,Smad7mRNA 表达上调,抑制这一信号通路,这与上述研究结果一致,进一步证实了藏红花酸可能的抗肝纤维化机制。

综上所述,在一定浓度范围内,藏红花酸可能通过促进 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞中 Smad7 表达,抑制 Smad2、Smad3 表达,恢复正常的 TGF- β 1 跨膜信号转导,从而抑制星状细胞活化及 α -SMA 表达,发挥抗纤维化作用,但确切的分子作用机制及是否也作用于其他的信号通路尚有待进一步研究。藏红花酸有望成为抗肝纤维化的有效药物,但肝纤维化的治疗是一大难题,尚需有待进一步开发新药。

参考文献(References)

- [1] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(3): 181-194
- [2] Hansen T, Christensen E. Cirrhosis and liver fibrosis are potentially reversible[J]. Ugeskr Laeger 2015, 177(48): V06150527
- [3] Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis [J]. Lancet, 2014, 383: 9930, 1749-1761
- [4] 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
- [5] Cui W, Jin HB, Li ZW. Mechanism of the transforming growth factor-beta induction of fibronectin expression in hepatic stem-like cells [J]. Braz J Med Biol Res, 2010, 43(1): 36-42
- [6] Yoshida Katsunori, Murata Miki, Yamaguchi Takashi, et al. TGF- β /Smad signaling during hepatic fibro-carcinogenesis (review) [J]. Int J Oncol, 2014, 45(4): 1363-1371
- [7] Dropmann A, Dediulia T, Breitkopf Heinlein K, et al.TGF- β 1 and TGF- β 2 abundance in liver diseases of mice and men [J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 19499-19518
- [8] Breitkopf K, Godoy P, Ciucan L, et al. TGF- β /Smad Signaling in the Injured Liver[J]. Z Gastroenterol, 2006, 44(1): 57-66
- [9] 国家重点发展的 39 种中药材 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10 (11): 34
39 species Traditional Chinese Medicine in the national major Development [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2003, 10(11): 34
- [10] Nam KN, Park YM, Jung HJ, et al. Anti-inflammatory effects of

- crocetin in rat brain microglial cells [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 648(1-3): 110-116
- [11] Lee IA, Lee JH, Baek NI, et al. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite Crocetin [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(11): 2106-2110
- [12] He SY, Qian ZY, Wen N, et al. Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic-diet quails [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 554(2-3): 191-195
- [13] 石磊. 西红花酸体内外抗氧化作用的研究[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(15): 118-120
Shi Lei. Study on the antioxidant effect of crocetin in vitro and in vivo [J]. *Guide of China Medicine*, 2012, 10(15): 118-120
- [14] Moradzadeh M, Sadeghnia HR, Tabarraei A. Anti-tumor effects of crocetin and related molecular targets[J]. *J Cell Physiol*, 2017
- [15] 朱艳虹, 陈真, 钱之玉, 等. 西红花酸对乙醛诱导的肝星状细胞增殖和胶原合成的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(08): 841-847
Zhu Yan-hong, Chen Zhen, Qian Zhi-yu, et al. Effects of crocetin on proliferation and collagen synthesis of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2013, 18(08): 841-847
- [16] 胡慧, 钱之玉, 成文媛, 等. 西红花酸对心肌纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(03): 282-288
Hu Hui, Qian Zhi-yu, Cheng Wen-yuan, et al. Effects of crocetin on proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblast cells[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2012, 17(03): 282-288
- [17] 周忠启. 西红花酸对单侧输尿管大鼠肾组织结缔组织生长因子表达的影响[J]. *牡丹江医学院学报*, 2008, 29(04): 34-36
Zhou Zhong-qi. Effects of crocetin on expression of connective tissue growth factor in UUO rats with renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *Journal of Mudanjiang Medical College*, 2008, 29(04): 34-36
- [18] Delire Bénédicte, Stärkel Peter, Leclercq Isabelle. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2015, 3(1): 53-66
- [19] Tang LY, Heller M, Meng Z, et al. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Directly Activates the JAK1-STAT3 Axis to Induce Hepatic Fibrosis in Coordination with the SMAD Pathway[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(10): 4302-4312
- [20] Wang Y, Zhang L, Lei R, et al. Effects of blocking two sites of transforming growth factor- β /Smads signaling on the formation of scar-related proteins in human skin fibroblasts[J]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2015, 31(5): 372-377
- [21] Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sánchez A, et al. TGF- β signalling and liver disease[J]. *FEBS J*, 2016, 283(12): 2219-2232
- [22] Tang Li-xia, He Rui-hua, Yang Guang, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e31350
- [23] Schuppan D, Kim Yo. Evolving therapies for liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1887-1901
- [24] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis [J]. *Gut*, 2007, 56(2): 284-292
- [25] Xu W, Wang LW, Shi JZ, et al. Effects of RNA interference targeting transforming growth factor-beta 1 on immune hepatic fibrosis induced by Concanavalin A in mice[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(3): 300-308
- [26] Zhang L, Liu C, Meng XM, et al. Smad2 protects against TGF- β 1/Smad3-mediated collagen synthesis in human hepatic stellate cells during hepatic fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 400(1-2): 17-28
- [27] Wu Shi-Pin, Yang Zhi, Li Fu-Rong, et al. Smad7-overexpressing rat BMSCs inhibit the fibrosis of hepatic stellate cells by regulating the TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2568-2576
- [28] Yang D, Li L, Qian S. Evodiamine ameliorates liver fibrosis in rats via TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. *J Nat Med*, 2017
- [29] Hafez MM, Hamed SS, El-Khadragy MF, et al. Effect of ginseng extract on the TGF- β 1 signaling pathway in CCl4-induced liver fibrosis in rats[J]. *BMC complementary and alternative medicine*, 2017, 17(1): 45
- [30] 徐念, 李恒青, 黄政文, 等. 循环内皮微颗粒与高脂血症患者血管内皮功能的相关性研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2016, 24(5): 153-155
Xu Nian, Li Heng-qing, Huang Zheng-wen, et al. Correlation between circulating endothelial microparticles and vascular endothelial function in patients with hyperlipidemia [J]. *Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease*, 2016, 24(5): 153-155

(上接第 3292 页)

- [29] 张亮, 刘亚杰, 贺雄军, 等. CD62E+ 微颗粒水平与急性脑梗死患者病情严重程度、预后及血管危险因素关系 [J]. *中华神经医学杂志*, 2014, 13(4): 388-392
Zhang Liang, Liu Ya-jie, He Xiong-jun, et al. Relationship of CD62E+microparticles level with degree of severity, prognosis and vascular risk factors in patients with acute cerebral infarction[J]. *Chinese Journal of Neuromedicine*, 2014, 13(4): 388-392