

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.003

葛根素联合小檗碱干预非酒精性脂肪性肝炎两种动物模型的病理学研究 *

续 畅¹ 马致洁² 黄 凤³ 钟晓松^{1Δ}

(1 首都医科大学附属北京世纪坛医院临床基因与细胞工程中心 北京 100038;

2 首都医科大学附属北京友谊医院中药剂科 北京 100050; 3 首都医科大学附属北京中医医院针灸科 北京 100050)

摘要 目的:从病理学的角度探讨葛根素及小檗碱对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的干预作用。**方法:**制备高脂饮食诱导的 SD 大鼠 NASH 模型及蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的 C57BL/6 小鼠 NASH 模型,各给药组造模并同时灌胃给药,大鼠持续 8 周后取材,小鼠持续 2 周后取材。肝组织制成石蜡切片进行 HE 染色,制成冰冻切片进行油红 O 染色,经光镜观察摄片后,采用 NAFLD 活动度积分对各组进行 NASH 评估。**结果:**HE 及油红 O 检测提示葛根素联合小檗碱可减轻两种 NASH 动物模型肝脏的脂肪变性、抑制肝细胞空泡化的发生,减少肝小叶内炎症性病灶的数量。给予葛根素联合小檗碱的 SD 大鼠 NAS 总分为 $2.60 \pm 0.52 (<3)$,给予葛根素联合小檗碱的 C57BL/6 小鼠 NAS 总分为 $2.80 \pm 0.79 (<3)$,均已排除 NASH。**结论:**葛根素联合小檗碱可显著抑制 NASH 相关病理变化的发生发展,对 NASH 具有一定的干预作用。

关键词:葛根素;小檗碱;非酒精性脂肪性肝炎;大鼠;小鼠;病理学

中图分类号:R33;R575.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)13-2414-05

Pathological Study of Puerarin Combined with Berberine on Two Animal Models of Non-alcoholic Steatohepatitis*

XU Chang¹, MA Zhi-jie², HUANG Feng³, ZHONG Xiao-song^{1Δ}

(1 Clinical Gene and Cell Engineering Center, Beijing Shijitan hospital, Capital Medical University, Beijing, 100038, China;

2 Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Friendship hospital, Capital Medical University, Beijing, 100050, China;

3 Department of Acupuncture and Moxibustion, Beijing Traditional Chinese Medicine hospital, Capital Medical University, Beijing, 100050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of puerarin and berberine on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) from the pathological point of view. **Methods:** The NASH model of SD rats induced by high fat diet, the NASH model of C57BL/6 mice induced by methionine-choline deficiency diet were prepared. Each treatment group was given intragastric administration while being modeled. The rats were dissected after 8 weeks and the mice were dissected after 2 weeks. Paraffin sections of liver tissue were stained with HE and frozen sections were stained with oil red O. After light microscopy, NAFLD activity score was used to evaluate NASH in each group. **Results:** HE and oil red O assay showed that puerarin combined with berberine could alleviate steatosis, inhibit vacuolation of hepatocytes and reduce the number of inflammatory lesions in hepatic lobules in two NASH animal models. The total NAS of SD rats treated with puerarin and berberine was $2.60 \pm 0.52 (<3)$, and the total NAS of C57BL/6 mice treated with puerarin and berberine was $2.80 \pm 0.79 (<3)$, which excluded NASH. **Conclusion:** Puerarin and berberine can significantly inhibit the occurrence and development of pathological changes related to NASH. They have a certain intervention effect on NASH.

Key words: Puerarin; Berberine; Non-alcoholic Steatohepatitis; Rats; Mice; Pathology

Chinese Library Classification(CLC): R33; R575.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2414-05

前言

非酒精性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic Steatohepatitis, NASH), 是单纯性脂肪肝向肝硬化、肝纤维化、肝衰竭转化的重要环节, 是隐源性肝硬化的关键病因之一^[1-4]。该病的潜在病患数量巨大, 探索防治 NASH 的多靶点药物已成为目前迫在眉睫的工作。本课题组前期研究显示, 源于《伤寒论》的古方葛

根苓连汤可显著降低 NASH 动物模型的谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、总胆固醇 (cholesterol total, CHO)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)含量, 可显著减少肝组织的脂肪变性及炎性细胞浸润^[5]。而葛根苓连汤由葛根、黄芩、黄连、甘草四味中药组成, 其中葛根为君药, 黄芩、黄连为臣药, 甘草为佐使药^[6]。因此, 葛根应是葛根苓连汤治疗 NASH 过程中弥足重要的成

* 基金项目:北京市科技计划脑科学专项(Z161100000216136);国家自然科学基金青年科学基金项目(81503580)

作者简介:续畅(1990-), 硕士, 助理研究员, 药师, 研究方向:肿瘤的基因与细胞免疫治疗, 电话:010-63926415, E-mail:664107538@qq.com

Δ 通讯作者:钟晓松(1966-), 教授, 博士生导师, 研究方向:肿瘤的基因与细胞免疫治疗, 电话:010-63926416, E-mail:15313000323@163.com

(收稿日期:2019-02-17 接受日期:2019-03-14)

分,而葛根素作为葛根的主要有效成分,小檗碱作为黄连的主要有效成分,理应对 NASH 具有良好的治疗效果。根据此思路,本课题组采用两种 NASH 动物模型,从病理学的角度对葛根素及葛根素联合小檗碱治疗 NASH 的疗效进行评价,从而为 NASH 的防治工作提供新的思路。

1 材料及方法

1.1 动物来源

实验所用的 SD 大鼠及 C57BL/6 小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006)。

1.2 药品与试剂

盐酸小檗碱片(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,国药准字:H21022453);注射用葛根素(北京四环科宝制药有限公司,国药准字:H20030299);维持饲料(配方:豆粕、鱼粉、植物油、麸皮、维生素 A、维生素 D、维生素 E、维生素 B1、维生素 B2、维生素 B6、泛酸、磷酸氢钙、石粉、锰、铁、铜、锌等),购自北京华阜康生物科技股份有限公司;高脂饲料(配方:2%胆固醇+10%猪油+88%基础饲料),购自北京华阜康生物科技股份有限公司;蛋氨酸-胆碱缺乏饲料(methionine-choline-deficient, MCD)^[10](配方:玉蜀黍淀粉 150.0 g/kg、L-氨基酸 175.7 g/kg、纤维素 30.0 g/kg、蔗糖 441.9 g/kg、维生素混合物 10.0 g/kg、玉米油 100.0 g/kg、右旋麦芽糖 50.0 g/kg、盐混合物 35.0 g/kg、碳酸氢钠 7.4 g/kg),购自北京华阜康生物科技股份有限公司;蛋氨酸-胆碱充足饲料(methionine-choline-supplement, MCS)(配方:MCD+胆碱 2 g/Kg+蛋氨酸 3 g/Kg),购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.3 实验仪器

RM2235 型轮状切片机,德国徕卡(Leica);XPE105 电子天平,瑞士梅特勒-托利多(METTLER TOLEDO);ST40R 高速冷冻离心机,美国赛默飞世尔(Thermo Fisher);DW-86L729 -86℃超低温保存箱,中国海尔;DM3000 正置显微镜,德国徕卡(Leica);CamERC5s 照相系统,德国蔡司(ZEISS)。

1.4 动物分组、造模与给药

1.4.1 高脂饮食诱发的 NASH 模型 根据本课题组前期研究成果^[11],将 SD 雄性大鼠 40 只(120 ± 5 g)随机分为 4 组:正常

对照组、NASH 模型组、小檗碱组(按人与大鼠的公斤体重剂量换算公式折算,90.32 mg/kg)、小檗碱+葛根素组(按人与大鼠的公斤体重剂量换算公式折算,90.32 mg/kg+15.05 mg/kg),每组 10 只。所有 SD 大鼠经适应性喂养 7 天后,正常对照组饲喂维持饲料,其他三组均饲喂高脂饲料,共持续 8 周。本实验采用干预给药方式,小檗碱组及小檗碱+葛根素组每日上午灌胃给药 1 次,正常对照组及 NASH 模型组经灌胃给予同体积的生理盐水。各组大鼠自由进食、饮水,每日观察大鼠的活动、毛发、二便等情况。第 8 周实验结束后,所有大鼠禁食不禁水 24 h,称重、麻醉(10%水合氯醛,0.04 mL/kg)、解剖并取相同部位的肝组织(1×1 cm)2 块,一块由 4%多聚甲醛固定用以制作石蜡切片,另一块由 OCT 包埋用以制作冰冻切片。

1.4.2 蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱发的 NASH 模型 根据本课题组前期研究成果^[11],C57BL/6 雄性小鼠 40 只(25 ± 5 g)随机分为 4 组:正常对照组、NASH 模型组、小檗碱组(按人与小鼠的公斤体重剂量换算公式折算,129.78 mg/kg)、(按人与小鼠的公斤体重剂量换算公式折算,129.78 mg/kg+21.63 mg/kg),每组 10 只。所有 C57BL/6 小鼠经适应性喂养 7 天后,正常对照组饲喂 MCS 饲料,其他三组均饲喂 MCD 饲料,共持续 2 周。本实验采用干预给药方式,小檗碱组及小檗碱+葛根素组每日上午灌胃给药 1 次,正常对照组及 NASH 模型组经灌胃给予同体积的生理盐水。各组小鼠自由进食、饮水,每日观察小鼠的活动、毛发、二便等情况。第 2 周实验结束后,所有小鼠禁食不禁水 24 h,称重、麻醉(10%水合氯醛,0.04 mL/kg)、解剖并取相同部位的肝组织(1×1 cm)2 块,一块由 4%多聚甲醛固定用以制作石蜡切片,另一块由 OCT 包埋用以制作冰冻切片。

1.5 病理学检测

经 4%多聚甲醛固定的肝组织,进行常规的石蜡包埋与切片($4 \mu\text{m}$),制成石蜡切片后进行 HE 染色,由光学显微镜观察并摄片;经 OCT 包埋的肝组织,制成冰冻切片($10 \mu\text{m}$)并进行油红 O 染色,由光学显微镜观察并摄片。

NASH 的病理诊断标准采用由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)于 2005 年制定的 NAFLD 活动度积分表(NAFLD Activity Score, NAS)^[12]进行计算评估。NAS 评估系统对非酒精性脂肪性肝病的 3 项病理指标、14 项病理改变进行综合评估计分(如表 1)。

表 1 NAFLD 活动度积分表(NAS)
Table 1 NAFLD Activity Score (NAS)

Score	Hepatic steatosis	Inflammation	Ballooning degeneration
0	<5%	No	No
1	5%-33%	<2	A few
2	33%-66%	2-4	More/Significant
3	>66%	>4	

Note: NAS < 5 can be definitely diagnosed as NASH; NAS < 3 can exclude NASH; 3 < NAS < 5 is possible for NASH.

1.6 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件对 NAS 评分结果进行统计分析。不同组间的差异用表示,对正态分布、方差齐的数据进行 ANOVA

单因素方差分析;对正态分布但方差不齐的数据进行 Welch 检验。 $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示组间差异具有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

各组大鼠及小鼠在实验期间均无死亡。正常对照组的大鼠及小鼠的精神状态良好、活动灵活、毛发顺滑有光泽,取材时肉眼可见肝脏解剖学结构及大小正常、颜色红润、与周边脏器边界清晰。NASH 模型组的大鼠及小鼠精神萎靡、不喜活动、毛发杂乱无光泽,取材时肉眼可见肝脏肿大、局部出现结节、颜色变黄、与周边组织脏器粘连。小檗碱组及小檗碱 + 葛根素组大鼠及小鼠精神状态良好、不喜活动、毛发较顺滑,取材时肉眼可见肝脏解剖结构基本正常,肿大不明显,颜色为浅黄色、与周边组

织脏器有少许粘连。

2.2 肝组织石蜡切片 HE 染色结果

如图 1 所示,正常对照组大鼠及小鼠肝组织着色较为均匀,肝细胞结构完整清晰,沿中央静脉周围呈放射状排列(图 1-A、1-E);NASH 模型组大鼠及小鼠肝组织结构紊乱,发生大面积的脂肪样变,中央静脉周围肝细胞空泡化严重,可见多个炎性病灶(图 1-B、1-F);小檗碱组大鼠及小鼠肝组织脂肪变性减轻,肝细胞基本呈放射状排列,炎性病灶减少(图 1-C、1-G);小檗碱 + 葛根素组大鼠及小鼠肝组织脂肪变性明显减轻,大部分肝细胞呈放射状排列且空泡化明显减轻,炎性细胞浸润减少(图 1-D、1-H)。

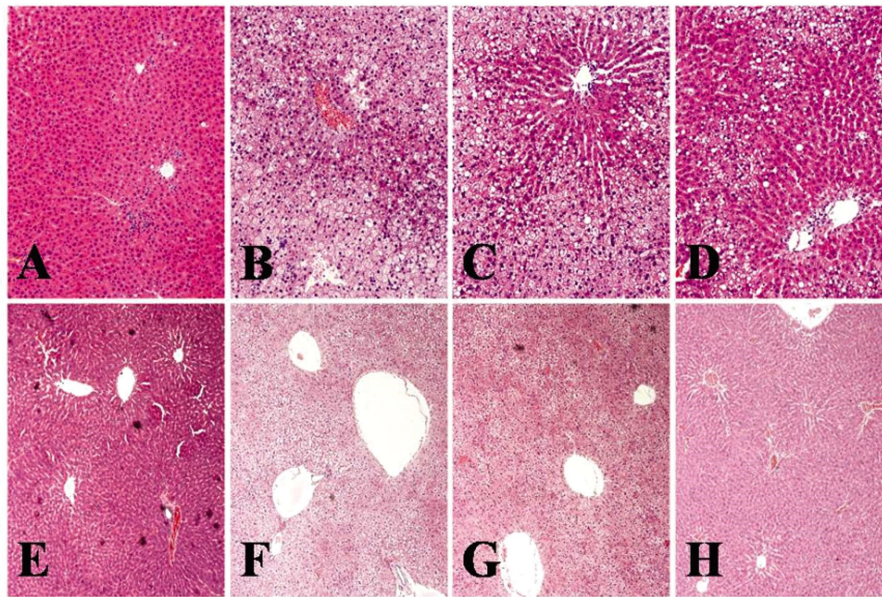


图 1 各组肝组织石蜡切片 HE 染色结果(× 100)

Fig. 1 HE staining results of liver tissues' paraffin sections in each group (× 100)

Note: A: Rats in normal control group B: Rats in NASH model group C: Rats in Berberine group D: Rats in Berberine + Puerarin group

E: Mice in normal control group F: Mice in NASH model group G: Mice in berberine group H: Mice in berberine + Puerarin group

2.3 肝组织冰冻切片油红 O 染色结果

为了显示肝细胞内脂滴分布位置与多少,本实验对肝组织的冰冻切片进行了油红 O 染色,切片中红色为脂滴。如图 2 所示,正常对照组大鼠及小鼠肝组织着色较浅或者不着色(图 2-A、2-E);NASH 模型组大鼠及小鼠肝组织中出现了大量脂滴(图 2-B、2-F);小檗碱组、小檗碱 + 葛根素组的大鼠及小鼠肝组织中的脂滴明显减少并呈不均匀分布(图 2-C、2-D、2-G、2-H)。

2.4 NAS 组织学评分

如表 2 所示,高脂饮食诱发的 NASH 大鼠模型中,正常对照组的 NAS 总分为 $0.20 \pm 0.42 (<3)$,NASH 模型组的 NAS 总分为 $7.20 \pm 0.79 (>5)$,这表示其可明确诊断为 NASH,NASH 造模成功;小檗碱组的 NAS 总分为 $4.90 \pm 0.57 (>3 \sim <5)$,表示其处于 NASH 可能阶段;葛根素 + 小檗碱组的 NAS 总分为 $2.60 \pm 0.52 (<3)$,则表示其已经可排除 NASH。其中,小檗碱组、葛根素 + 小檗碱组的 NAS 总分均显著低于 NASH 模型组($P < 0.01$),这表示小檗碱及葛根素对 NASH 具有显著的干预作用。

如表 3 所示,蛋氨酸 - 胆碱缺乏饮食诱发的 NASH 小鼠模型中,正常对照组的 NAS 总分为 $0.10 \pm 0.32 (<3)$,NASH 模型组的 NAS 总分为 $7.50 \pm 0.71 (>5)$,这表示其可明确诊断为

NASH,NASH 造模成功;小檗碱组的 NAS 总分为 $5.00 \pm 0.47 (>3 \sim <5)$,表示其处于 NASH 可能阶段;葛根素 + 小檗碱组的 NAS 总分为 $2.80 \pm 0.79 (<3)$,则表示其已经可排除 NASH。其中,小檗碱组、葛根素 + 小檗碱组的 NAS 总分均显著低于 NASH 模型组($P < 0.01$),这表示小檗碱及葛根素对 NASH 具有显著的干预作用。

3 讨论

小檗碱(又名黄连素),化学式 $C_{20}H_{18}NO_4$,是自毛茛科植物黄连的根茎中的一种异喹啉类生物碱^[5],目前在临床中主要用于治疗急性胃肠炎、细菌性痢疾等消化系统疾病^[6]。近期有研究显示,小檗碱对 II 型糖尿病具有良好的治疗效果,可显著降低患者的空腹血糖(FPG)、餐后 2 小时血糖(2h PG)及糖化血红蛋白(HbA1c),且其作用机制为抑制胰岛素抵抗的发生发展^[7]。因此,小檗碱对与同属代谢综合征的 NASH 而言,理应具有治疗效果,且本课题组通过 Meta 分析等循证医学方法,也从临床角度证实了葛根芩连汤治疗 NASH 确有效^[30]。

葛根素,化学式 $C_{21}H_{20}O_9$,是自豆科植物葛或野葛的根茎中的一种异黄酮类衍生物^[13-21],目前在临床中主要用于辅助

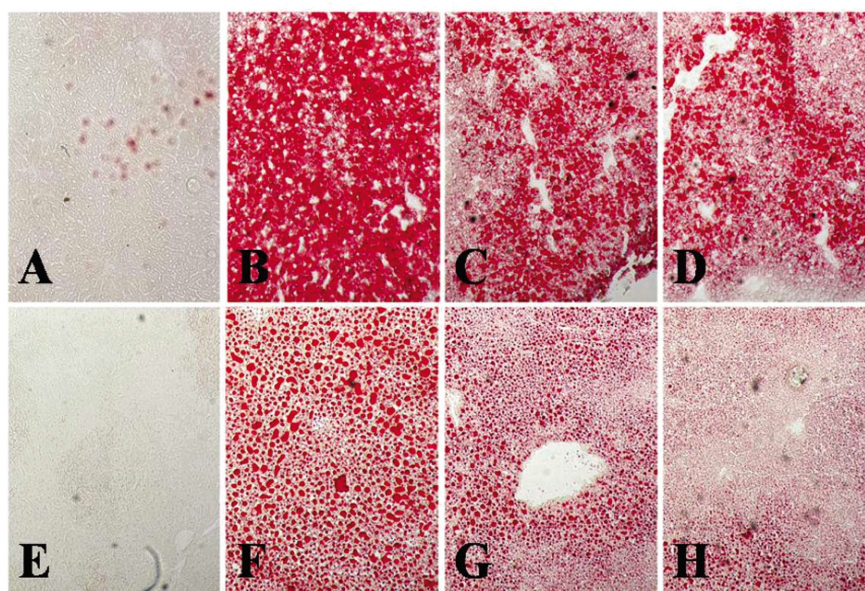


图 2 各组肝组织石蜡切片油红 O 染色结果(× 100)

Fig. 2 Oil red O staining results of liver tissues's paraffin sections in each group (× 100)

Note: A: Rats in normal control group B: Rats in NASH model group C: Rats in Berberine group D: Rats in Berberine + Puerarin group
E: Mice in normal control group F: Mice in NASH model group G: Mice in berberine group H: Mice in berberine + Puerarin group

表 2 SD 大鼠 NAS 组织学评分($\bar{x} \pm s$, n=10)Table 2 NAS in SD rats($\bar{x} \pm s$, n=10)

Groups	Hepatic steatosis	Inflammation	Ballooning degeneration	NAS
Normal control group	0.00± 0.00	0.20± 0.42	0.00± 0.00	0.20± 0.42
NASH model group	2.70± 0.48**	2.70± 0.48**	1.80± 0.42**	7.20± 0.79**
Berberine group	1.70± 0.48 ^Δ	1.90± 0.57 ^Δ	1.30± 0.48 ^Δ	4.90± 0.57 ^Δ
berberine + Puerarin group	1.30± 0.48 ^Δ	0.30± 0.48 ^Δ	1.00± 0.00 ^Δ	2.60± 0.52 ^Δ

Note: ** indicated that compared with the normal control group, $P < 0.01$; Δ Δ indicated that compared with the NASH model group, $P < 0.01$.

表 3 C57BL/6 小鼠 NAS 组织学评分($\bar{x} \pm s$, n=10)Table 3 NAS in C57BL/6 mice($\bar{x} \pm s$, n=10)

Groups	Hepatic steatosis	Inflammation	Ballooning degeneration	NAS
Normal control group	0.00± 0.00	0.10± 0.32	0.00± 0.00	0.10± 0.32
NASH model group	2.80± 0.42**	2.80± 0.42**	1.90± 0.32**	7.50± 0.71**
Berberine group	1.80± 0.42 ^Δ	1.80± 0.42 ^Δ	1.40± 0.52 ^Δ	5.00± 0.47 ^Δ
berberine + Puerarin group	1.30± 0.48 ^Δ	0.60± 0.52 ^Δ	0.90± 0.57 ^Δ	2.80± 0.79 ^Δ

Note: ** indicated that compared with the normal control group, $P < 0.01$; Δ indicated that compared with the NASH model group, $P < 0.05$; Δ Δ indicated that compared with the NASH model group, $P < 0.01$.

治疗心绞痛、心肌梗塞、冠心病、突发性耳聋及视网膜动、静脉阻塞等血管性疾病^[22-29],但针对葛根素治疗非酒精性脂肪性肝病等消化系统疾病方面的研究却鲜有报道。而本课题组前期研究显示,葛根芩连汤可显著降低 NASH 动物模型的谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、总胆固醇(CHO)、低密度脂蛋白(LDL)的含量,并可显著减少肝组织的脂肪变性及炎性细胞浸润^[8]。这表明,葛根芩连汤对 NASH 具有良好的治疗效果。葛根芩连汤由葛根、黄芩、黄连、甘草四味中药组成,其中葛根为君药,在配伍中所占的比例最大,且其作用也最为强劲,因此作为葛根主要有效成分的葛根素对 NASH 的治疗作用具有一定的

理论依据及数据支持。

为验证以上推论,本课题组采用高脂饮食诱发的 NASH 大鼠模型、蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱发的 NASH 小鼠模型,从病理学的角度,对小檗碱、小檗碱联合葛根素治疗 NASH 的效果进行系统的评价。本实验结果表明,小檗碱、小檗碱联合葛根素均可减轻两种 NASH 动物模型肝组织的脂肪变性、抑制肝细胞空泡化的发生,减少肝小叶内炎性病灶的数量,其中小檗碱联合葛根素对 NASH 的疗效优于单独使用小檗碱,经小檗碱联合葛根素干预的两种 NASH 动物模型可维持基本正常、完整的肝组织结构,肝细胞沿中央静脉周围呈放射状排列。

此外, 高脂饮食诱导的大鼠 NASH 模型模拟的是人类高油高脂饮食所导致的 NASH 疾病, 是当今日益富足的物质条件下最常见的 NASH 类型; 而蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的小鼠 NASH 模型则是模拟的贫困地区由于饮食中缺乏胆碱、蛋氨酸所引起的 NASH, 两种模型基本涵盖了人类自然条件下可发生的所有 NASH 类型。在本实验中, 小檗碱、小檗碱联合葛根素均对两种 NASH 动物模型具有良好的治疗效果, 且小檗碱联合葛根素的疗效优于单用小檗碱, 因此可以推断小檗碱及葛根素治疗人类 NASH 应是有效的。今后, 本课题组将从药效学、血清学、分子生物学的角度进一步探索小檗碱及葛根素治疗 NASH 的效能与机制, 从而为防治 NASH 提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(6): 1121-1140
- [2] Eslam M, George J. Genetic and epigenetic mechanisms of NASH[J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(3): 394-406
- [3] Laish I, Mannasse-Green B, Hadary R, et al. Telomere Dysfunction in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cryptogenic Cirrhosis [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2016, 150(2): 93-99
- [4] Chow MD, Lee YH, Guo GL. The role of bile acids in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 56(1): 34-44
- [5] Liu CS, Zheng YR, Zhang YF, et al. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109(1): 274-282
- [6] Chang W, Chen L, Hatch GM. Berberine as a therapy for type 2 diabetes and its complications: From mechanism of action to clinical studies[J]. *Biochem Cell Biol*, 2015, 93(5): 479-486
- [7] Zhou H, Feng L, Xu F, et al. Berberine inhibits palmitate-induced NLRP3 inflammasome activation by triggering autophagy in macrophages: A new mechanism linking berberine to insulin resistance improvement[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89(1): 864-874
- [8] 续畅, 王允亮, 张慧芹, 等. 葛根苓连汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(4): 546-552
- [9] 续畅, 钟萌, 马致洁, 等. 葛根苓连汤的现代研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2015, 35(6): 629-632
- [10] Lee GS, Yan JS, Ng RK, et al. Polyunsaturated fat in the methionine-choline- deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(8): 1885-1896
- [11] 续畅, 刘泽洲, 许可嘉, 等. 高脂及 MCD 饮食诱导非酒精性脂肪性肝病动物模型的比[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(18): 3451-3455
- [12] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321
- [13] Kong H, Zhang G, Cheng J, et al. Distribution kinetics of puerarin in rat hippocampus after acute local cerebral ischemia [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164(1): 196-201
- [14] Zhang S, Chen L, Zhou Z, et al. Effects of Puerarin on Clinical Parameters, Vascular Endothelial Function, and Inflammatory Factors in Patients with Coronary Artery Disease[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 402-408
- [15] Li Z, Xu W, Ren X, et al. Puerarin promotes DUSP1 expression by regulating miR-133a-3p in breast cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 205-212
- [16] Ye G, Kan S, Chen J, et al. Puerarin in inducing apoptosis of bladder cancer cells through inhibiting SIRT1/p53 pathway [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 195-200
- [17] Li W, Wu J, Zhang J, et al. Puerarin-loaded PEG-PE micelles with enhanced anti-apoptotic effect and better pharmacokinetic profile[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 827-837
- [18] Zhao Q, Wang Y, Wang H, et al. Effects of glycyrrhizin on the pharmacokinetics of puerarin in rats [J]. *Xenobiotica*, 2018, 48(11): 1157-1163
- [19] Yang M, Luo Y, Liu T, et al. The Effect of Puerarin on Carotid Intima-media Thickness in Patients With Active Rheumatoid Arthritis: A Randomized Controlled Trial[J]. *Clin Ther*, 2018, 40(10): 1752-1764
- [20] Yang X, Yang Y, Zhou S, et al. Puerarin Stimulates Osteogenic Differentiation and Bone Formation Through the ERK1/2 and p38-MAPK Signaling Pathways[J]. *Curr Mol Med*, 2018, 17(7): 488-496
- [21] Yang B, Du S, Lu Y, et al. Influence of paeoniflorin and menthol on puerarin transport across MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier in vitro model[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70(3): 349-360
- [22] Fu C, Chen B, Jin X, et al. Puerarin protects endothelial progenitor cells from damage of angiotensin II via activation of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3877-3883
- [23] Xiao Y, Huang J, Xu J, et al. Targeted delivery of puerarin/glycyrrhetic acid-PEG-PBLA complex attenuated liver ischemia/reperfusion injury via modulating Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway[J]. *Ther Deliv*, 2018, 9(4): 245-255
- [24] Liu B, Zhao C, Li H, et al. Puerarin protects against heart failure induced by pressure overload through mitigation of ferroptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 233-240
- [25] Li SW, Feng X, Xu H, et al. Comparison on Anticoagulation and Antiplatelet Aggregation Effects of Puerarin with Heparin Sodium and Tirofiban Hydrochloride: An In Vitro Study [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(2): 103-108
- [26] Qiu ZK, Zhong DS, He JL, et al. The anxiolytic-like effects of puerarin are associated with the changes of monoaminergic neurotransmitters and biosynthesis of allopregnanolone in the brain [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(1): 167-175
- [27] Li Y, Hong L, Liu C, et al. Effect of puerarin on collagen metabolism of fibroblasts in pelvic tissue of women with pelvic organ prolapsed [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2705-2711
- [28] Chen X, Yu J, Shi J. Management of Diabetes Mellitus with Puerarin, a Natural Isoflavone From *Pueraria lobata* [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(8): 1771-1789
- [29] Chen G, Pan SF, Cui XL, et al. Puerarin attenuates angiotensin II-induced cardiac fibroblast proliferation via the promotion of catalase activity and the inhibition of hydrogen peroxide-dependent Rac-1 activation[J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(1): 41-52
- [30] 续畅, 刘学龙, 倪建腾, 等. 盐酸小檗碱片治疗非酒精性脂肪性肝病疗效的 Meta 分析[J]. *中国药房*, 2015, 26(30): 4232-4235