

龙胆苦苷对大鼠肝纤维化 Sonic Hedgehog 信号通路的影响

李梓萌,周 僮,高 雅,徐 杰,连苑宇,冼红良,李迎迎*,张可锋*

桂林医学院,桂林 541004

摘要:探讨龙胆苦苷(GPS)对大鼠肝纤维化(HF) Sonic Hedgehog(Shh)信号通路的影响。将40只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙素(0.12 mg/kg)组和GPS(100 mg/kg)组,每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均每周两次腹腔注射40%的CCl₄橄榄油溶液(1 mL/kg),建立HF大鼠模型;且从造模当天起,秋水仙素组和GPS组大鼠按体重分别灌胃相应体积药物,正常组和模型组大鼠按体重分别灌胃相应体积蒸馏水,每日1次,共持续6周。末次给药后,采用生化法检测血清中ALT、AST、TBIL、ALB含量;ELISA法检测血清中HA、LN、PC III、IV-C含量;采用HE染色和Masson染色观察大鼠肝组织病理学改变程度;免疫组化染色观察各组大鼠肝组织中α-SMA和TGF-β1的表达;Western blot法检测大鼠肝组织中α-SMA、TGF-β1及Shh信号通路Shh、Gli-1蛋白表达水平。结果显示, GPS组和秋水仙素组HF大鼠血清中ALT、AST、TBIL、HA、LN、PC III、IV-C的含量均显著减少, ALB含量增加;病理组织切片结果显示GPS组和秋水仙素组大鼠的病变程度与模型组相比明显减轻;肝组织中α-SMA和TGF-β1的表达减少;肝组织中TGF-β1、α-SMA、Shh及Gli-1蛋白表达水平显著降低。本研究结果表明, GPS对大鼠HF具有显著改善作用,其机制与GPS抑制Shh信号通路有关。

关键词:龙胆苦苷;肝纤维化;四氯化碳;保肝;Shh信号通路

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-0946-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.006

Effects of gentiopicrin on Sonic Hedgehog signaling pathway in rat liver fibrosis

LI Zi-meng, ZHOU Tong, GAO Ya, XU Jie,

LIAN Yuan-yu, XIAN Hong-liang, LI Ying-ying*, ZHANG Ke-feng*

Guilin Medical University, Guilin 541004, China

Abstract: To explore the effect of gentiopicrin (GPS) on hepatic fibrosis (HF) the Sonic hedgehog (Shh) signal pathway of hepatic fibrosis in rats. Forty male SD rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine (0.12 mg/kg) group and GPS (100 mg/kg) group with 10 rats in each group. Except for the normal group, the rats in other groups were intraperitoneally injected with 40% CCl₄ olive oil solution (1 mL/kg) twice a week to establish the HF rat model. And from the day of modeling, rats in colchicine group and GPS group were gavaged with corresponding volume of drugs according to body weight, while rats in normal group and model group were fed with corresponding volume of distilled water according to body weight, once a day for 6 weeks. After the last administration, the contents of ALT, AST, TBIL and ALB in serum were detected by biochemical method, and the contents of HA, LN, PC III and IV-C in serum were detected by ELISA. HE staining and Masson staining were used to observe the histopathological changes of rat livers. Immunohistochemical was used to observe expression of α-SMA and TGF-β1 in liver tissues of rats in each group. Expression levels of α-SMA, TGF-β1 and Shh, Gli-1 in the Shh signal pathway were detected by western blot. The results showed that the contents of ALT, AST, TBIL, HA, LN, PC-III and IV-C in serum of HF rats in GPS group and colchicine group decreased significantly, while the content of ALB increased. The pathological sections showed that the pathological changes of HF in the GPS group and colchicine group were significantly less than those in the model group. Expression of α-SMA and TGF-β1 in liver tissue was decreased. The protein expression levels of TGF-β1, α-SMA, Shh and Gli-1 in liver tissue were significantly decreased. The results of this study indi-

cated that GPS can significantly improve HF in rats, and the mechanism is related to the inhibition of Shh signal pathway by GPS.

Key words: gentiopicroside; liver fibrosis; CCl₄; liver protection; Shh signal pathway

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是由各类以肝细胞为靶点的慢性肝病所引起的,其中包括慢性病毒性肝炎、脂肪性肝炎和自身免疫性肝炎等^[1]。HF与炎症反应和修复反应所致肝实质细胞和非实质细胞的变化有关,其中存在于肝窦周隙内的肝星状细胞(HSC)的活化是HF的关键因素,主要表现为 α -平滑肌激动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)的表达增加,及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的大量分泌,特别是胶原蛋白的过度沉积,同时分化为成纤维细胞,引起纤维结缔组织的厚化与增生^[2]。

龙胆苦苷(gentiopicroside, GPS)属于裂环烯醚萜类化合物,具有解热抗炎、镇痛、保肝、利胆、增强免疫和抗高血压等功效^[3]。有研究表明GPS能减缓或逆转肝损伤、非酒精性脂肪肝、酒精性肝炎及肝内胆汁淤积等疾病,其机理主要与降低炎症反应、抑制氧化应激、调节血脂和增强机体免疫力有关^[4,5]。

在纤维化过程中的一个重要特征是Sonic Hedgehog(Shh)信号通路的异常激活,Shh信号通路在胚胎发育中可调控细胞的增殖、分化,而在正常成熟组织中无表达,具有高度的保守性^[6,7]。Shh信号通路可以调节成人肝脏组织中的伤口愈合反应,并且Shh信号通路对肝纤维化的促进作用与HSC的激活呈正相关,表明Shh信号可能是肝纤维化的潜在治疗靶标^[8]。然而,目前尚无GPS对Shh信号传导途径作用的研究,因此本文旨在研究GPS能否通过抑制Shh信号通路从而发挥对肝脏的保护作用。

1 材料与试剂

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,共40只,体重180~220g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2016-0002,伦理委编号:GLMC201609026。

1.2 实验药物与试剂

龙胆苦苷药品(南京道斯夫生物科技有限公司,纯度>98%,批号:181116A);分析纯CCl₄(广东汕头市西陇化工厂);秋水仙素(上海如吉生物技术发展有限公司,纯度>99%);门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(南京建成生物工程公司);白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、透明质酸(HA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);

IV型胶原蛋白(IV-C)、Ⅲ型前胶原(PC III)、层粘连蛋白(LN)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(南通市碧云天生物技术研究所);PVDF膜(Bio-Rad公司,美国);转化生长因子- β 1(TGF- β 1)抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(Abcam,英国);Shh蛋白抗体、Gli1蛋白抗体(赛默飞世尔科技有限公司); β -actin抗体(天锡傲锐东源生物科技有限公司);辣根酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);Super ECL Plus超敏发光液(北京酷来博科技有限公司)。

1.3 仪器

THZ-C-1台式冷冻恒温振荡器(太仓市实验设备厂);TGL-16K台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机厂);Olympus BX51显微镜(奥林巴斯公司,日本);Epoch酶标仪(Bio-tek公司,美国);垂直电泳仪、转膜仪(Bio-Rad公司,美国);上海天能全自动化学发光图像分析检测系统。

2 方法

2.1 造模及给药

将40只雄性SD大鼠适应性喂养1周后,随机分成4组,即正常组、模型组、秋水仙素(0.12 mg/kg)组及GPS(100 mg/kg)^[4]组,每组10只。除正常组外,其余各组大鼠均每周腹腔注射两次40%的CCl₄橄榄油溶液(1 mL/kg),建立HF大鼠模型。除正常组和模型组大鼠灌胃相应体积(10 mL/kg)的生理盐水外,其余各组大鼠每天在固定时间灌胃相应体积(10 mL/kg)药物,持续6周。末次给药后,禁食不禁水,16 h后收集血液和肝组织。

2.2 实验大鼠情况观察

对大鼠的外观体征、行为活动、体重变化和肝脏的外观、形态进行观察记录。

2.3 肝组织病理学检测

取各组大鼠相同位置肝组织,用4%多聚甲醛水溶液固定,经包埋和切片处理后,分别进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色和Masson染色,并在光学显微镜下观察肝组织的病理改变。

2.4 肝组织免疫组化

肝组织切片置于70℃温箱中恒温30 min,再于

二甲苯中脱蜡。用枸橼酸钠抗原修复液加热进行抗原修复,修复后切片冷却至室温。组织切片被依次加入过氧化氢和牛血清白蛋白。分别用一抗 α -SMA 和 TGF- β 1 孵育 1 h, 二抗孵育 1 h。最后, 用 DAB 浸泡 5 min 着色, 用苏木精复染, 光学显微镜下观察结果并拍摄。

2.5 血清中相关指标测定

将所收集的血液于 4 ℃ 条件下, 4 500 rpm 离心 15 min 后分离血清。采用生化法分别测定血清中 ALT、AST、TBIL、ALB 含量; 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)分别测定血清中 HA、LN、PC III、IV-C 含量。上述指标的测定均严格按照检测试剂盒说明书操作, 并采用酶标仪测定吸光度, 根据标准曲线及公式分析计算 ALT、AST、TBIL、ALB、HA、LN、PC III、IV-C 含量。

2.6 蛋白表达情况的测定

采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肝组织中 TGF- β 1、 α -SMA、Shh 及 Gli 1 蛋白的表达水平。取各组大鼠肝组织约 60 mg, 置于玻璃匀浆器中, 再加入含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液 1 mL, 于冰上充分研磨。待组织完全裂解后, 于 4 ℃ 下, 12 000 rpm 离心 10 min 后取上清液, 按照 BCA 蛋白浓度检测试剂盒说明书步骤对蛋白含量进行测定。加入蛋白样品缓冲液, 并在 95 ℃ 水浴中变性蛋白质 20 min。将蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳, 分离蛋白。于 300 mA 冰水浴条件下以恒流转膜 2 h, 5%

脱脂牛奶封闭 2 h, 使用 TBST 洗涤 3 次, 10 min/次。放入 I 抗轻摇半小时后, 于 4 ℃ 下孵育过夜; 次日, 使用 TBST 同上洗涤 3 次, 放入 II 抗于室温下孵育 1.5 h, 使用 TBST 同上洗涤 3 次, 采用 ECL 法显色, Tanon5 200 全自动化学发光图像分析系统显影, 以 β -actin 为内参, 分析蛋白灰度并计算蛋白相对表达量。

2.7 数据统计学分析

实验数据均采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 各组数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 GPS 对 HF 大鼠状况的影响

正常组大鼠状态良好, 活动灵敏, 皮毛光泽, 饮食和排便正常, 体重明显增加。模型组大鼠精神明显萎靡, 活动迟缓, 皮毛无光泽度, 食欲减退, 排便清稀。与模型组比较, 秋水仙素组和 GPS 组状况均明显改善, GPS 组对 HF 大鼠状况改善效果更佳。

3.2 GPS 对 HF 大鼠肝组织形态的影响

经肉眼观察, 正常组大鼠肝组织色泽红润, 表面光滑, 边缘锐利。模型组肝组织颜色暗沉, 无光泽, 表面粗糙且伴有明显的颗粒, 边缘钝化。与模型组比较, 秋水仙素组和 GPS 组大鼠肝损伤病理特征均有不同程度的改善, 且部分肝组织已恢复至正常(见图 1)。

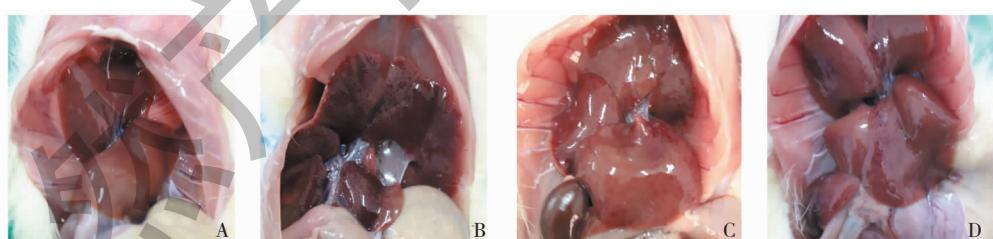


图 1 GPS 对 HF 大鼠肝脏形态的影响

Fig. 1 Effects of GPS on the liver morphology in HF rats

注:A:正常组;B:模型组;C:秋水仙素组;D:GPS 组;下同。Note:A:Normal group;B:Model group;C:Colchicine group;D:GPS group;The same below.

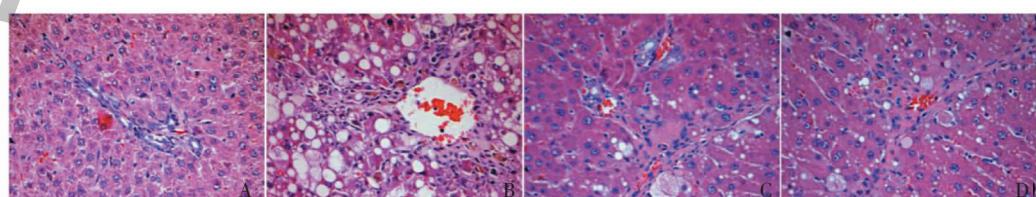


图 2 HE 染色观察 GPS 对 HF 大鼠肝组织病理形态的影响($\times 200$)

Fig. 2 Effects of GPS on the hepatic histopathology in HF rats (HE, $\times 200$)

HE 染色结果显示,正常组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐且生长情况正常,未见纤维组织增生。模型组大鼠肝小叶正常结构被破坏,大量肝细胞变性且坏死,伴有纤维组织增生和炎性细胞浸润现象,表明造模成功。与模型组相比较,秋水仙素组及 GPS 组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞坏死、纤维化及炎症程度均有所改善,表明 GPS 可改善大鼠

肝纤维化(见图 2)。

Masson 染色结果显示,正常组的肝细胞结构完整,排列整齐,无蓝色胶原纤维沉积。模型组大鼠肝组织出现大量蓝色胶原纤维沉积,伴有肝细胞水肿,纤维化程度明显。与模型组相比较,秋水仙素组和 GPS 组大鼠肝组织病理损伤明显减轻,纤维化程度均有不同程度的改善(见图 3)。

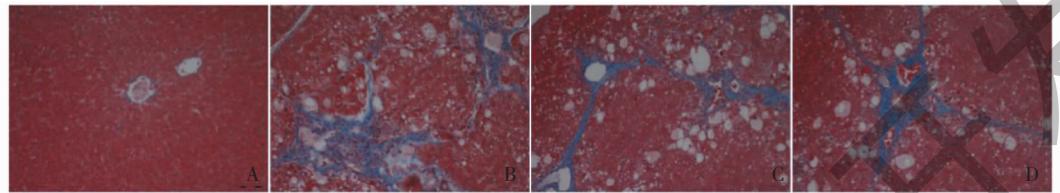


图 3 Masson 染色观察 GPS 对 HF 大鼠肝组织病理形态的影响($\times 200$)

Fig. 3 Effects of GPS on the hepatic histopathology in HF rats (Masson, $\times 200$)

3.3 GPS 对 HF 大鼠肝组织 TGF- β 1 和 α -SMA 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示,正常组中 TGF- β 1 和 α -SMA 无明显表达。模型组 TGF- β 1 和 α -SMA 表达增

多,主要在受损肝细胞周围肝血窦和纤维间隔内表达。秋水仙素组和 GPS 组 TGF- β 1 和 α -SMA 表达明显减弱,多在纤维增生处表达(见图 4 和 5)。

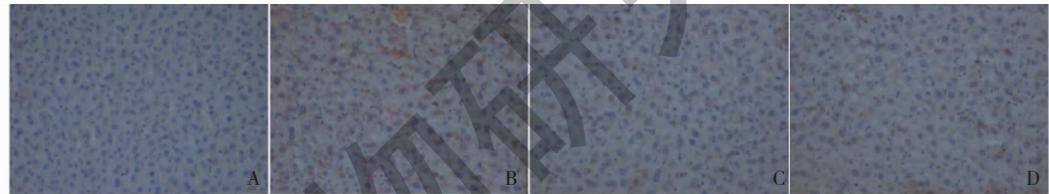


图 4 GPS 对 HF 大鼠肝组织 TGF- β 1 表达的影响($\times 200$)

Fig. 4 Effects of GPS on TGF- β 1 expression in HF rats liver tissues ($\times 200$)

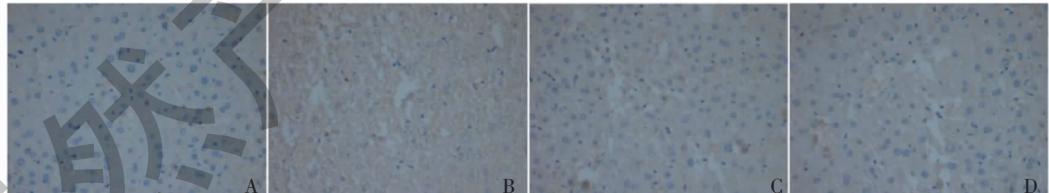


图 5 GPS 对 HF 大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响($\times 200$)

Fig. 5 Effects of GPS on α -SMA expression in HF rats liver tissues ($\times 200$)

3.4 GPS 对 HF 大鼠血清 ALT、AST、TBIL 和 ALB 的影响

模型组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平较正常组大鼠均显著升高,ALB 水平显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。GPS 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平较模型组均显著下降,ALB 水平显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。

3.5 GPS 对 HF 大鼠血清 HA、LN、PC III 和 IV-C 的影响

模型组大鼠血清中 LN、HA、PC III 和 IV-C 含量较正常组大鼠均显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),说明本实验造模成功。GPS 组大鼠血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 含量较模型组大鼠均显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),此结果表明 GPS 对 CCl_4 所造成的肝损伤具有保护作用(见表 2)。

表 1 GPS 对血清中 ALT、AST、TBIL 和 ALB 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effects of GPS on the serum ALT, AST, TBIL and ALB ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL (μmol/L)	ALB (U/L)
正常 Normal		45.65 ± 4.42	56.62 ± 5.21	4.12 ± 0.31	36.23 ± 3.91
模型 Model		151.21 ± 13.21 ^{##}	211.21 ± 18.65 ^{##}	5.96 ± 0.51 ^{##}	25.02 ± 2.01 ^{##}
秋水仙素 Colchicine	0.12	70.53 ± 5.96 ^{**}	110.21 ± 10.11 ^{**}	4.86 ± 0.44 ^{**}	30.12 ± 2.96 ^{**}
GPS	100	63.21 ± 5.51 ^{**}	90.62 ± 84.01 ^{**}	4.32 ± 0.39 ^{**}	31.98 ± 2.87 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;下同。

Note: Compared with normal group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; The same below.

表 2 GPS 对血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of GPS on the serum HA, LN, PC III and IV-C ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	HN (ng/L)	LN (ng/L)	PC III (ng/L)	IV-C (ng/L)
正常 Normal		103.56 ± 9.23	100.32 ± 8.06	63.28 ± 6.89	211.63 ± 17.32
模型 Model		256.32 ± 20.12 ^{##}	263.21 ± 23.12 ^{##}	183.98 ± 15.21 ^{##}	350.66 ± 30.56 ^{##}
秋水仙素 Colchicine	0.12	160.11 ± 13.23 ^{**}	190.92 ± 18.73 ^{**}	160.21 ± 13.99 ^{**}	294.65 ± 26.61 ^{**}
GPS	100	140.32 ± 13.11 ^{**}	180.23 ± 17.64 ^{**}	142.11 ± 11.09 ^{**}	260.52 ± 23.69 ^{**}

3.6 GPS 对 HF 大鼠肝组织 TGF-β1、α-SMA、Shh 及 Gli 1 蛋白表达的影响

模型组大鼠肝组织中 TGF-β1、α-SMA、Shh 及 Gli 1 蛋白表达量较正常组大鼠均显著升高,差异均

具有统计学意义 ($P < 0.01$);GPS 组较模型组大鼠可明显抑制 TGF-β1、α-SMA、Shh 及 Gli 1 表达,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$),此结果表明 GPS 抗肝纤维化可能与 Shh 信号通路有关(见图 6)。

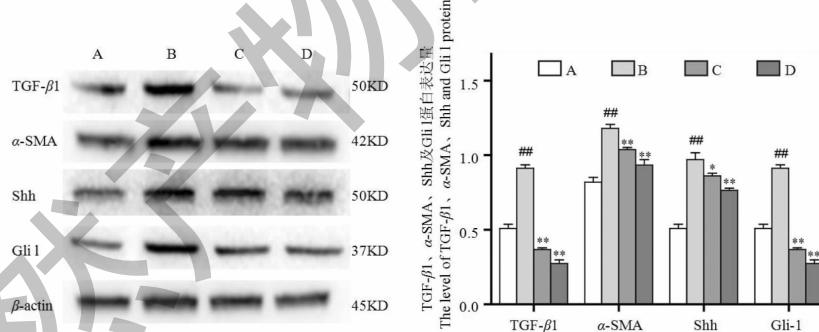


图 6 GPS 对 TGF-β1、α-SMA、Shh 及 Gli 1 蛋白表达的影响
Fig. 6 Effect of GPS on the TGF-β1, α-SMA, Shh and Gli 1 protein

4 结论

肝纤维化是机体肝脏受损时的自我修复反应,是可逆的病变过程,但当各种因素造成肝损伤不能得到及时缓解时,可最终发展为不可逆的肝硬化,对人体造成巨大危害^[9,10]。而目前肝脏疾病在我国具有较高的发病率和致死率,因此,研究 GPS 对肝脏的保护作用具有重要意义^[11]。

本实验采用 CCl_4 造模, CCl_4 为经典的 HF 诱导剂,所建立的大鼠 HF 模型与人体 HF 的病理学改变

极为相似^[12]。 CCl_4 造成肝损伤的机制是破坏肝细胞膜的完整性,使其通透性增加,导致肝细胞内 AST、ALT 进入血清,可通过测定血清中 AST、ALT 含量来观察肝脏受损程度^[13,14]。与此同时,肝细胞的排泄功能降低,导致胆红素的排出发生障碍,使血清中 TBIL 水平显著增高,因此通过测定血清中 TBIL 水平可反映肝脏的分泌、排泄和解毒功能^[15]。合成 ALB 是肝脏的特有功能, CCl_4 诱导生成 HF 后肝脏合成功能发生障碍,使血清中 ALB 水平显著下

降^[16]。HA、LN、PC III、IV-C 是肝细胞外基质的主要成分,肝损伤时可导致其合成大于降解,导致过多沉积于肝组织中,诱发 HF,因此 ECM 含量高低可反映 HF 程度^[17]。在本研究中,模型组大鼠血清中 AST、ALT、TBIL、HA、LN、PC III 及 IV-C 含量显著升高,ALB 含量显著下降,且经 HE 染色和 Masson 染色后,可明显观察到肝组织病理切片中模型组大鼠肝损伤较为严重,具有明显 HF 的特征,提示 CCl₄ 造模成功。GPS 给药后,大鼠血清中 AST、ALT、HA、LN、PC III 及 IV-C 含量显著降低,ALB 含量显著上升,HF 染色结果病变程度改善,可推测 GPS 对 CCl₄ 诱导的 HF 大鼠具有保护作用。

TGF-β1 是促进 HF 的主要因子,可通过上调 HSC 而合成大量的 ECM,加速肝纤维化,TGF-β1 的表达与肝纤维化程度成正相关^[18]。α-SMA 可反映 HSC 的活化情况,作为 HSC 激活的标志性蛋白,同时也可用于评估肝纤维化程度^[19]。实验结果显示,模型组大鼠肝组织 TGF-β1 和 α-SMA 的蛋白表达水平显著提高;采用 GPS 给药后,大鼠肝组织 TGF-β1 和 α-SMA 的蛋白表达水平较模型组显著降低。此结果表明 GPS 可通过抑制 TGF-β1 蛋白表达而发挥抗 HF 作用。

Shh 在多种癌症的发生和发展中起着至关重要的作用,Shh 异常激活会诱导细胞过度增殖和恶性改变^[20]。Shh 信号通路主要由 Shh 配体、两个跨膜蛋白受体(Smo、Ptch)及下游转录因子 Gli 家族(Gli 1、Gli 2、Gli 3)等组成,Shh 配体与 Smo 受体是该信号通路的激动因子,Ptch 受体是该信号通路的抑制因子,其中 Gli 1 是 Shh 通路重要的效应基因,且 Gli 1 的活化是 Shh 信号通路激活的重要标志^[21]。Shh 与 Ptch 结合后导致 Ptch 对 Smo 的抑制作用解除,在细胞核中 Smo 可诱导转录因子 Gli 家族的激活,HSC 活化时,胞内有 Shh 配体表达,可激活 Shh 信号通路促使 HSC 增殖^[22]。因此,抑制 Shh 信号的激活将有助于抑制 HF。实验结果显示,模型组大鼠肝组织 Shh 和 Gli 1 的蛋白表达水平显著提高;采用 GPS 给药后,大鼠肝组织 Shh 和 Gli 1 的蛋白表达水平较模型组显著降低。此结果表明 GPS 可通过抑制 Shh 信号通路而发挥抗 HF 作用。综上表明,GPS 对肝纤维化具有保护作用,其机制可能与抑制 Shh 信号通路有关。

参考文献

1 Pradeep K,Reben R,Chopyk DM,et al. Adiponectin inhibits

- hepatic stellate cell activation by targeting the PTEN/AKT pathway[J]. *Bba-Mol Basis Dis*,2018,1864:3537-3545.
- 2 Chen Y,Ou Y,Dong J,et al. Osteopontin promotes collagen I synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-129-5p inhibition[J]. *Exp Cell Res*,2018,362:343-348.
 - 3 Wu JZ,Yang B,Song B,et al. Effect of gentiopicroside on AMPKα signaling pathway of rats with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*,2018,49:5142-5148.
 - 4 Tang XW,Yang QL,Yang F,et al. Target profiling analyses of bile acids in the evaluation of hepatoprotective effect of gentiopicroside on ANIT-induced cholestatic liver injury in mice[J]. *J Ethnopharmacol*,2016,194:63-71.
 - 5 Yang SQ,Chen YD,Li H,et al. Geniposide and gentiopicroside suppress hepatic gluconeogenesis via regulation of AKT-FOXO1 pathway[J]. *Arch Med Res*,2018,49:314-322.
 - 6 Li R,Cai L,Ding J,et al. Inhibition of hedgehog signal pathway by cyclopamine attenuates inflammation and articular cartilage damage in rats with adjuvant-induced arthritis[J]. *J Pharm Pharmacol*,2015,67:963-971.
 - 7 Feng LL,Cao WF. Mechanism of Ezhu-containing serum in inhibiting expression of Shh and Gli1 in hepatic stellate cells [J]. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*,2017,42:964-969.
 - 8 Lin X,Li J,Xing YQ. Geniposide, a sonic hedgehog signaling inhibitor, inhibits the activation of hepatic stellate cell [J]. *Int Immunopharmacol*,2019,72:330-338.
 - 9 Ning ZW,Luo XY,Wang GZ,et al. MicroRNA-21 mediates Angiotensin II-induced liver fibrosis by activating NLRP3 inflammasome/IL-1β Axis via targeting Smad7 and Spry1 [J]. *Antioxid Redox Sign*,2017,27(1):1-20.
 - 10 Wu Q,Cao WF,Ma L,et al. Effects of Qi-Tonifying decoction on TGF-β1/Smad signaling pathway in rats with hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*,2018,30:634-639.
 - 11 Wang H,Naghavi M,Allen C,et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015 [J]. *The Lancet*,2016,388:1459-1544.
 - 12 Jin ML,Pan ZH,Shu J,et al. Study on different stages of hepatic fibrosis induced by different injection of carbon tetrachloride in rats[J]. *Sichuan Med J(四川医学)*,2018,39:270-272.
 - 13 Xu QM,Li YL,Cao HK,et al. Protective effects and the mechanism study of water extract of *Rabdosia serra* on hepatic fibrosis[J]. *J China Pharm(中国药房)*,2018,29:2791-

2796.

- 14 Zhang KF, Gao Y, Zhong ML, et al. Hepatoprotective effects of *Dicliptera chinensis* polysaccharides on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats and its underlying mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179:38-44.
- 15 Gao Y, Wang G, Du PL, et al. Effect of water extracts from *Serissa serissoides* on oxidative stress and inflammatory reaction in mice with acute liver injury [J]. *J Chin Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2017, 23 (21): 135-140.
- 16 Zhao YL, Ma X, Wang JB, et al. Curcumin protects against CCl₄-induced liver fibrosis in rats by inhibiting HIF-1 α through an ERK-dependent pathway [J]. *Molecules*, 2014, 19:18767-18780.
- 17 Ma DM, Gao Y, Guo D, et al. The protective effect and mechanism of extracts of *Hypericum Japonicum* thunb on hepatic fibrosis rats induced by carbon tetrachloride [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2018, 30:1890-1897.
- 18 Wang G, Cao HK, Cao QY, et al. Protective effect and mecha-

nism of *Phyllanthus urinaria* on hepatic fibrosis in rats induced by carbon tetrachloride [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med(中药药理与临床)*, 2018, 34 (4): 104-108.

- 19 Cao HK, Gao Y, Huang SM, et al. Research on mechanism of effect of total flavonoids extracted from *Polygonum perfoliatum* L. on anti-hepatic fibrosis in rats [J]. *Chin Pharm Bull(中国药理学通报)*, 2017, 33:1303-1308.
- 20 Xie ZM, Wang F, Zhu Y. Advances in the mechanism of Shh signaling pathway in anti-malignant tumor therapy [J]. *Chin J Pract Intern Med(中国实用内科杂志)*, 2019, 39:653-655.
- 21 He YH, Li Z, Ning MM, et al. Cryptolepine derivative-6h inhibits liver fibrosis in TGF- β 1-induced HSC-T6 cells by targeting the Shh pathway [J]. *Can J Physiol Pharm*, 2016, 94: 987-995.
- 22 Davey MG, McTeir L, Barrie AM, et al. Loss of cilia causes embryonic lung hypoplasia, liver fibrosis, and cholestasis in the talpid3 ciliopathy mutant [J]. *Organogenesis*, 2014, 10 (2):177-185.

(上接第 945 页)

- 16 Luo W, Liu QB, Jiang N, et al. Isorhamnetin inhibited migration and invasion via suppression of Akt/ERK-mediated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in A549 human non-small-cell lung cancer cells [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (9):BSR20190159.
- 17 Huang W, Feng H, Zheng Y, et al. The inhibitory effect and mechanism of euscaphic acid on human hepatocarcinoma HepG2 cells [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2018, 30:1502-1508.
- 18 Tummala P, Gondi CS, Dinh DH, et al. RNA interference-mediated targeting of urokinase plasminogen activator

receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression in the IOMM-lee malignant meningioma cell line inhibits tumor growth, tumor cell invasion and angiogenesis [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(1):5-17.

- 19 Noë V, Fingleton B, Jacobs K, et al. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1 [J]. *J Cell Sci*, 2000, 114(Pt 1):111-118.
- 20 Zheng YY, Miu YT, Yang XK, et al. CCR7 Mediates TGF- β 1-Induced human malignant glioma invasion, migration, and epithelial-mesenchymal transition by activating MMP2/9 through the Nuclear Factor KappaB signaling pathway [J]. *DNA Cell Biology*, 2017, 36:853-861.