

# 赶黄草总黄酮对活化的肝星状细胞 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的影响

余 蕾<sup>1</sup>, 谢晓芳<sup>3\*</sup>, 彭 芙<sup>2</sup>, 谢 君<sup>1</sup>, 李梦婷<sup>3</sup>, 彭 成<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学基础医学院, 成都 610075; <sup>2</sup>四川大学药学院, 成都 610021;

<sup>3</sup>西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137

**摘要:**为研究赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1) 活化的肝星状细胞的作用及可能的机理, 采用 TGF- $\beta$ 1 诱导人肝星状细胞 (hepatic stellate cell LX-2, HSC-LX-2) 活化, 给予不同浓度赶黄草总黄酮后, MTT 法检测赶黄草总黄酮对活化后的 LX-2 增殖的影响, 划痕实验检测细胞迁移率, 胶原收缩实验检测胶原收缩情况, 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测细胞培养液中一型胶原 (collagen I, Col I) 及纤连蛋白 (fibronectin, FN) 等细胞外基质的沉积, 进一步采用 Western blot 法检测 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路相关蛋白 Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3、Smad7 的表达。结果显示, 赶黄草浓度在 5、9、13 mg/L 均可抑制 TGF- $\beta$ 1 活化后的 LX-2 的增殖和迁移, 且 13 mg/L 时效果最显著 ( $P < 0.01$ ); 另外, 赶黄草总黄酮可减少 Col I 及 FN 等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的沉积 ( $P < 0.01$ ), 并抑制胶原收缩; Western blot 结果显示, 赶黄草总黄酮作用后 Smad3、p-Smad2 和 p-Smad3 的表达均显著减少 ( $P < 0.05$ ), Smad7 的表达明显增加。赶黄草总黄酮能明显抑制 LX-2 的增殖, 减少 ECM 的分泌, 其作用机制可能与与其抑制 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路传导有关。

**关键词:**赶黄草总黄酮; 人肝星状细胞; TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)7-1118-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.7.005

## Effect of total flavonoids of *Penthorum chinense* Pursh on activated hepatic stellate cells based on TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway

YU Lei<sup>1</sup>, XIE Xiao-fang<sup>3\*</sup>, PENG Fu<sup>2</sup>, XIE Jun<sup>1</sup>, LI Meng-ting<sup>3</sup>, PENG Cheng<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, College of Basic Medicine, Chengdu 610075, China;

<sup>2</sup>Sichuan University, College of Pharmacy, Chengdu 610021, China;

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources in Southwest China, Chengdu 611137, China

**Abstract:** To investigate the effect and possible mechanism of total flavonoids of *Penthorum chinense* Pursh (TFPCP) on activated hepatic stellate cells, human hepatic stellate cell LX-2 (HSC-LX-2) was cultured, TGF- $\beta$ 1 was used to active LX-2, MTT method was used to detect the effect of TFPCP on LX-2 proliferation rate, the cell migration rate was detected by scarification test and the collagen contraction was detected by collagen contraction test, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to detect the content of collagen I (Col I) and fibronectin (FN), Smad2, Smad3, p-Smad2, p-Smad3, Smad7 protein expressions in LX-2 was determined by Western blot. The results showed that the proliferation and migration of LX-2 were suppressed by TFPCP at three concentrations of 5, 9 and 13 mg/L, and the effect was most significant at 13 mg/L ( $P < 0.01$ ). In addition, TFPCP could inhibit collagen contraction and reduce the deposition of Col I and FN ( $P < 0.01$ ). Further study indicated that treated with TFPCP suppressed the protein expressions of Smad3, phospho-Smad2 and phospho-Smad3 ( $P < 0.05$ ), while significantly promoted the expressions of Smad7. In general, TFPCP inhibited the proliferation and migration of LX-2, reduced the secretion of ECM, the mechanism may be related to its inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smads signaling

收稿日期: 2019-11-22 接受日期: 2020-06-02

基金项目: 四川省中医药管理局项目 (2017ZY001); 四川省科技厅项目 (2018JY0520); 成都中医药大学项目 (ZRY1716)

\* 通信作者 Tel: 86-013708237099; E-mail: pengchengchengdu@126.com, xiexiaofang@cdutcm.edu.cn

pathway.

**Key words:** total flavonoids of *Penthorum chinense* Pursh; human hepatic stellate cells; TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway

肝纤维化是一种世界性的常见病疾病,以肝内纤维结缔组织的异常增生为病理特征,主要是由于酒精肝、脂肪肝、病毒性肝炎、胆汁淤积性和代谢性肝损伤等刺激肝脏产生慢性炎症,诱导肝星状细胞活化,致使 ECM 的过度积累,从而导致肝纤维化<sup>[1-3]</sup>。目前,肝纤维化的治疗主要通过抗炎、抗病毒、减少 ECM 沉积等方式,但这些治疗效果并不理想,因此寻找有效的抗纤维化方法仍是当前的首要任务。

赶黄草又名水泽兰、水杨柳等,是虎耳草科扯根菜属植物扯根菜(*Penthorum chinense* Pursh)的干燥地上部分,始载于明代《救荒本草》<sup>[4]</sup>,具有清热活血、祛湿退黄、利水消肿等功效,可用于黄疸,水肿,跌打肿伤,以及各型肝炎、胆囊炎、脂肪肝等<sup>[5]</sup>。临床上有文献报道以赶黄草制成的单味成方制剂“肝苏颗粒”能明显改善慢性乙肝肝纤维化患者临床症状,具有降酶、退黄、促进肝功能恢复等作用,且对阻断及逆转肝纤维化有一定疗效<sup>[6,7]</sup>。课题组前期研究也证明“肝苏颗粒”对 CCl<sub>4</sub> 诱导所致的大鼠肝纤维化有显著的治疗作用,可改善肝功能、减轻肝脏纤

维化病变。现代研究表明,赶黄草中主要含有黄酮、生物碱、多糖等成分,因黄酮成分含量较高且具有较强的抗氧化活性所以被广泛研究<sup>[8]</sup>。目前已有研究表明赶黄草总黄酮可抑制大鼠酒精性肝纤维化的形成,其抗肝纤维化作用可能与其抗氧化作用及抑制 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌有关<sup>[5]</sup>。但是,赶黄草总黄酮治疗肝纤维化的具体作用机制尚不清楚,因此,本实验选用 LX-2 作为研究对象,采用 TGF- $\beta$ 1 刺激 LX-2 活化建立肝纤维化细胞模型,研讨赶黄草总黄酮抗肝纤维化的作用及可能的机理。

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 实验药物

黄草总黄酮(total flavonoids of *Penthorum chinense* Pursh, TFPCP),赶黄草购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,由成都搏屹科技有限公司提取,测得提取物中总黄酮的含量为 55.3%。实验前将赶黄草总黄酮粉末溶于二甲基亚砜(DMSO)中,使用时稀释成所需浓度,各给药组中 DMSO 浓度均小于 0.1%。

表 1 赶黄草总黄酮含量测定结果

Table 1 Results of determination of total flavonoids in *P. chinense*

样品 Sample	吸光度值 Absorbance value	浓度 Concentration (mg/mL)	含量 Content (%)
对照品 Sample for reference	0.458	0.033 7	-
供试品 Sample for test	0.300	0.022 1	55.3%

### 1.2 实验细胞

HSC-LX2(苏州北纳创联生物技术有限公司,货号:BNCC337957)。

### 1.3 实验试剂

Human TGF- $\beta$ 1(美国 Pepro Tech 公司)、FBS(美国 Gibco 公司)、RPIM-1640 培养基(美国 Gibco 公司)、MTT(德国 Biofroxx 公司)、I 型鼠尾胶原(杭州欣友生物技术有限公司)、 $\alpha$ -SMA(Actin alpha, smooth muscle aorta)、FN、Col I 酶联免疫吸附测定试剂盒(武汉 Elabscience 公司)、兔抗 Smad7 多克隆抗体(美国 Proteintech 公司)、兔抗 Smad2、phospho-Smad2、Smad3、phospho-Smad3、 $\alpha$ -SMA 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.4 实验仪器

二氧化碳培养箱(Thermo 公司)、酶标定量分析仪(Thermo 公司)、MiLL-Q 纯水仪(Millipore 公司)、SW-CJ-1F 型洁净工作台(苏净安泰集团苏州安泰空气技术有限公司)、倒置显微镜(德国蔡司公司)、电泳仪(Bio-Rad 公司)、凝胶成像仪(广州博鹭滕公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞分组及处理

LX2 细胞用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPIM-1640 培养基培养,培养条件为:37 °C、5% CO<sub>2</sub>,取对数生长期的细胞用于实验。在预实验中将赶黄草总黄酮药物浓度设定为 5、10、15、20 mg/L 时,发现浓度超过 15 mg/L 细胞毒性较大,而在浓度

为 10 mg/L 时细胞存活率较高,故降低浓度间距,采用 5、9、13 mg/L 三个浓度进行实验。将细胞分为空白对照组、TGF- $\beta$ 1 组、TGF- $\beta$ 1 + 赶黄草总黄酮 5、9、13 mg/L 组,除空白对照组以外,其余各组均使用 TGF- $\beta$ 1 (6 ng/L) 处理 24 h 造模,造模成功后给予不同浓度的赶黄草处理 24 h。

## 2.2 细胞活力测定

将细胞消化并重悬,调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL,以每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板,次日晨给予 TGF- $\beta$ 1,作用 24 h 后分别给予不同浓度的赶黄草总黄酮,给药结束后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 15  $\mu$ L,避光孵育 4 h 后将细胞液全数吸出,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,摇床上震荡混匀,用酶标仪在波长为 570 nm 处测量 OD 值(A),计算细胞存活率:细胞存活率 = (给药组 A - 调零孔 A) / (空白组 A - 调零孔 A)  $\times$  100%。

## 2.3 细胞划痕试验

用标记笔在 6 孔板背面等距离画 3 条间隙为 0.5 cm 的虚线,用于后续拍照选取视野时定位。以  $1 \times 10^6$  个/mL 种板,次日给予 TGF- $\beta$ 1 造模,24 h 后用 10  $\mu$ L 的枪尖沿背面虚线在孔底画线,然后将培养液吸出,用无菌 PBS 轻轻冲洗将细胞碎片洗掉,分别加入含有不同浓度的赶黄草总黄酮的培养基,此时显微镜下选取视野进行拍照。培养 24 h 后,选择与第一次拍照相同的视野再次拍照。用 Image J 软件测量划痕的宽度。

## 2.4 细胞分泌 ECM 含量测定

将细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 24 孔板,药物作用完毕后将细胞上清液收集起来,离心去除细胞杂质,然后 4  $^{\circ}$ C 保存备用,于一周内检测。检测具体操作方法按 ELISA 试剂盒说明书进行。

## 2.5 胶原收缩试验

因 LX-2 活化后产生的 ECM 可使胶原收缩,增加血管阻力、促进门脉高压<sup>[9]</sup>,故可通过体外建立三维胶原,研究赶黄草总黄酮对胶原收缩的影响。将 I 型鼠尾胶原以 300  $\mu$ L/孔铺满 24 孔板底,待胶原凝固后每孔加 500  $\mu$ L 培养液平衡胶原。将细胞将细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于板内,造模完成后用枪头沿胶原边缘划一圈,使胶原与板壁分离,然后给药处理,药物作用完毕后进行拍照,观察胶原收缩情况。

## 2.6 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路相关蛋白测定

细胞培养完成后用冰 PBS 清洗 3 遍,刮取细胞

后离心,向沉淀中加入含有 1% 磷酸酶抑制剂和 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min 提取总蛋白;测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜转移,用 5% BSA 室温封闭 1 h,一抗 4  $^{\circ}$ C 中过夜;次日用 TBST 洗三次后,每次 8 min;二抗室温孵育 1 h,然后 TBST 洗三次,用凝胶成像仪曝光并拍照。用 Image J 测量条带的灰度值。

## 2.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示;多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 活化的 LX-2 细胞活力的影响

如图 1 所示,与空白组相比,TGF- $\beta$ 1 处理可促进细胞增殖 ( $P < 0.05$ ),而给予药物作用后,各组细胞增殖均降低,且药物浓度越高,抑制作用越明显,在 9 mg/L 时有显著抑制作用 ( $P < 0.05$ )。说明赶黄草总黄酮可抑制 TGF- $\beta$ 1 活化后的 LX-2 的增殖。

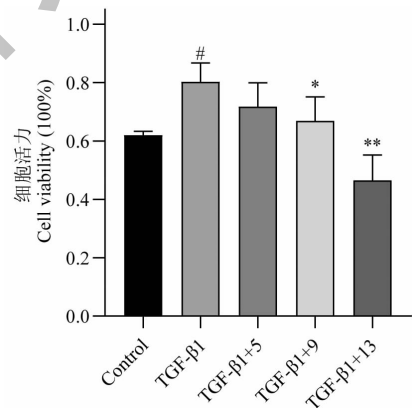


图 1 赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 活化后的 LX-2 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of TFPCP on cell viability after TGF- $\beta$ 1 activation LX-2 cells

注:与空白组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。Note: Compared with normal group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 3.2 赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 活化的 LX-2 细胞迁移和胶原收缩能力的影响

表 2 与图 2 示,与空白组相比,TGF- $\beta$ 1 刺激后,细胞划痕愈合率明显增加 ( $P < 0.01$ );而在给药处理的各组中,划痕愈合率与单纯给 TGF- $\beta$ 1 组相比明显降低,在 9 mg/L 时抑制作用显著 ( $P < 0.01$ ),

说明赶黄草总黄酮可抑制 LX-2 的迁移。

如图 4 示,与空白组相比,单纯给予 TGF-β1 刺激组,胶原收缩明显增加,而赶黄草总黄酮作用后的

各组与单纯 TGF-β1 组相比较,胶原的收缩被明显抑制,作用效果呈剂量依赖,在 9 mg/L 时抑制用显著( $P < 0.01$ )。

表 2 赶黄草总黄酮对 TGF-β1 活化后的 LX-2 后的划痕愈合率( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of TFPCP on cell scratch healing rate after TGF-β1 activation( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	浓度 Concentration (mg/L)	划痕愈合率 Scratch healing rate (%)
Control	-	57.62 ± 1.94
TGF-β1	-	73.86 ± 4.79 <sup>##</sup>
TGF-β1 + 5	5	65.96 ± 5.00
TGF-β1 + 9	9	45.54 ± 0.17 <sup>**</sup>
TGF-β1 + 13	13	39.15 ± 3.04 <sup>**</sup>

注:与空白组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

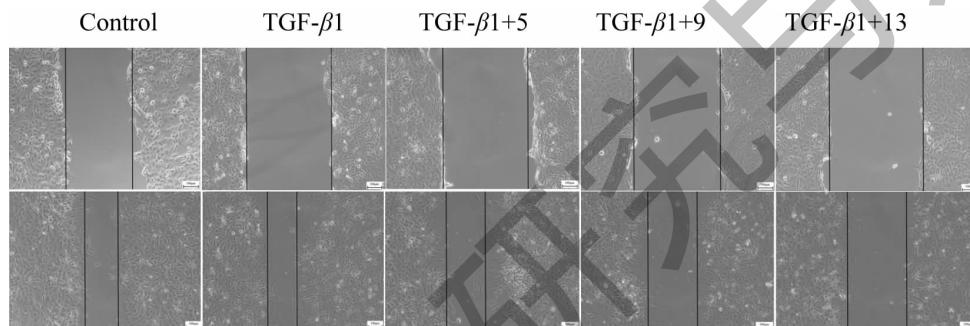


图 2 赶黄草总黄酮对 TGF-β1 活化后 LX-2 细胞迁移的影响

Fig. 2 Effect of TFPCP on cell migration after TGF-β1 activation LX-2 cells

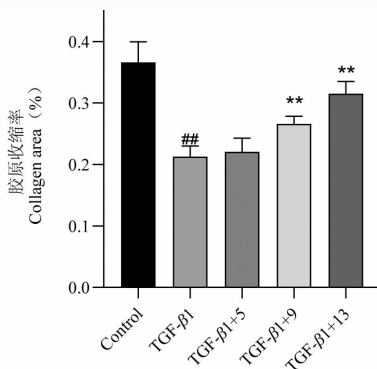
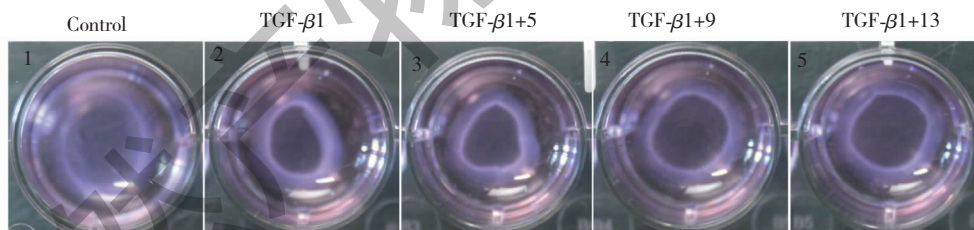


图 3 赶黄草总黄酮对 TGF-β1 活化后 LX-2 细胞胶原收缩的影响

Fig. 3 Effect of TFPCP on collagen contraction after TGF-β1 activation LX-2 cells

注:与空白组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。Note: Compared with normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;

Compared with model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

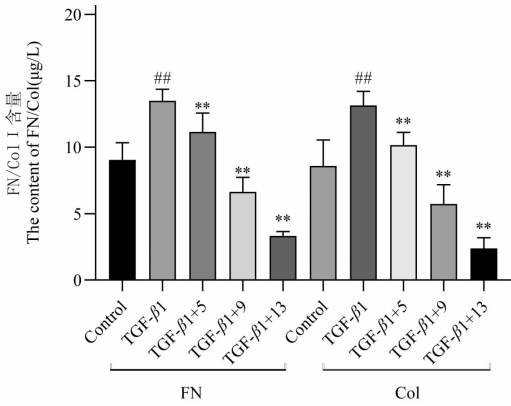


图4 赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 活化的 LX-2 细胞分泌 FN 和 Col I 含量的影响

Fig. 4 Effect of TFPCP on the content of Col I and FN after TGF- $\beta$ 1 activation LX-2 cells

注:与空白组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。Note: Compared with normal group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; Compared with model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

### 3.3 赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 活化的 LX-2 分泌 FN 和 Col I 含量的影响

图4结果显示,与空白对照组相比, TGF- $\beta$ 1 刺激后,细胞分泌 FN 及 Col I 显著增加( $P < 0.01$ ),而在给予药物作用的各组里, FN 及 Col I 含量显著减少( $P < 0.01$ ),说明赶黄草总黄酮可抑制 FN 及 Col I 的沉积。

### 3.4 赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 活化的 LX-2 细胞 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路相关蛋白表达的影响

图5结果显示在给予 TGF- $\beta$ 1 作用后,  $\alpha$ -SMA 分泌明显增加( $P < 0.05$ ),而给予药物作用后,  $\alpha$ -SMA 分泌被抑制。另外, TGF- $\beta$ 1 作用后, Smad3、p-Smad2 和 p-Smad3 均显著增加( $P < 0.01$ ),而给予药物作用后,其表达均有不同程度减少; Smad7 在 TGF- $\beta$ 1 作用后则显著减少( $P < 0.05$ ),而给予不同浓度药物作用后 Smad7 的分泌有一定程度的提升,且在药物浓度达到 9 mg/L 时,差别具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

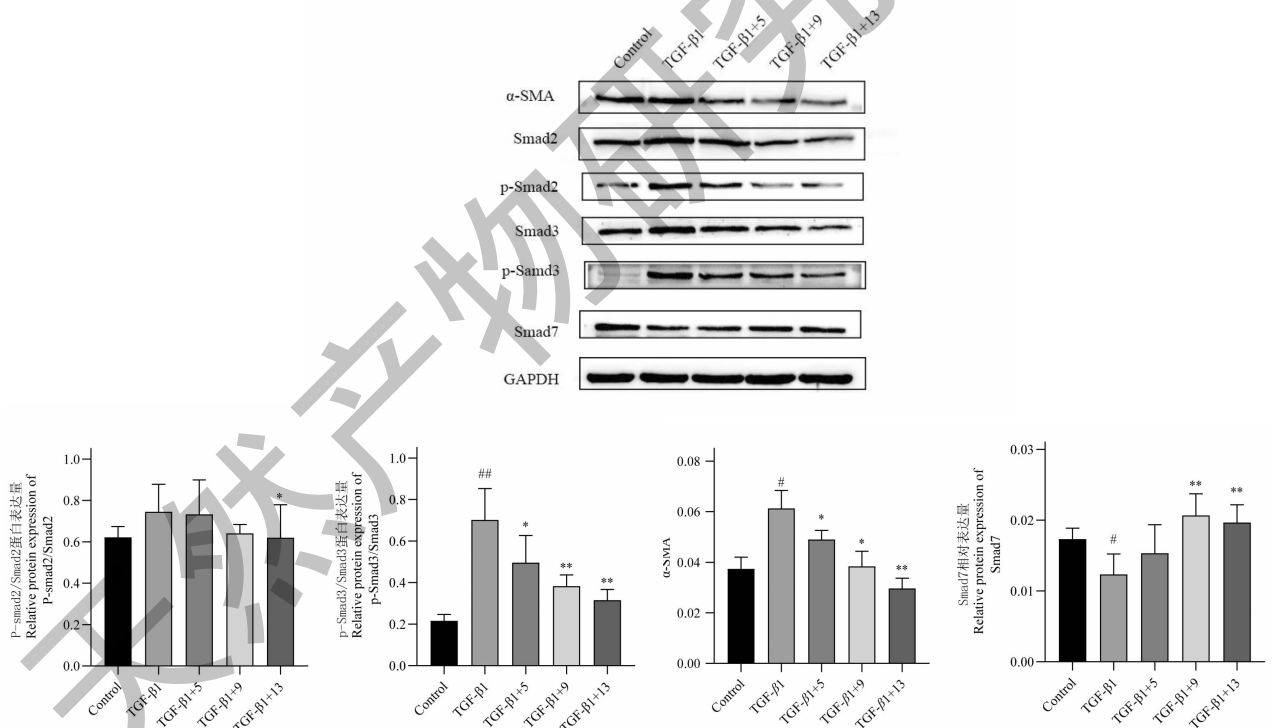


图5 赶黄草总黄酮对 TGF- $\beta$ 1 活化的 LX-2 细胞分泌 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of TFPCP on the expression of TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway-related proteins in TGF- $\beta$ 1-activated LX-2 cells

注:与空白组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。Note: Compared with normal group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; Compared with model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

HSC-LX2 是分布在肝脏各处的常驻的周围型细胞,在肝损伤过程中, LX-2 被激活成肌成纤维细

胞,产生大量  $\alpha$ -SMA、Col I 等 ECM,从而导致肝纤维化<sup>[10-13]</sup>。TGF- $\beta$ 1 是一类能够调节细胞生长和分化的因子,可活化肝星状细胞,促进胶原基因表达、

增加 ECM 沉积,是最重要的促肝纤维化细胞因子之一<sup>[14,15]</sup>。TGF- $\beta$ 1 主要通过 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路促进肝纤维化发展,TGF- $\beta$ 1 与肝星状细胞表面受体结合,然后催化其下游 Smad 分子磷酸化,接着,磷酸化的 Smad 进入细胞核,调节其相应靶基因的转录,导致 ECM 产生<sup>[16,17]</sup>。Smad 家族中 Smad2 和 Smad3 为受体激活型蛋白,可促进肝纤维化的进程;而 Smad7 则是一种抑制型蛋白,过表达可阻止 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,抑制信号通路,减缓肝纤维化进程<sup>[18]</sup>。

本实验中,体外培养的 LX-2 在 TGF- $\beta$ 1 刺激后,细胞增殖及迁移速率显著增加, FN、Col I 等细胞外基质大量沉积,胶原收缩明显增加,说明 TGF- $\beta$ 1 诱导肝星状细胞活化建立肝纤维化模型成立。而在给予赶黄草总黄酮处理后,细胞增殖和迁移速率被抑制,细胞外基质的沉积显著减少,胶原收缩明显降低,说明赶黄草总黄酮可抑制肝星状细胞的活化,减少细胞外基质的沉积,降低血管阻力,减缓肝纤维化的发展进程。此外,Western blot 实验表明,TGF- $\beta$ 1 作用后,Smad3、p-Smad2 和 p-Smad3 表达均显著增加,Smad7 表达则显著减少,可以说明 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路被激活,而在给予赶黄草总黄酮处理后,Smad3、p-Smad2、p-Smad3 表达均明显减少,Smad7 的表达则明显提升,说明赶黄草可抑制 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路。

综上所述,赶黄草总黄酮抑制肝星状细胞的增殖和迁移,减少 Col I 及 FN 等细胞外基质的沉积,机制与其抑制 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路有关。这可能是赶黄草治疗肝纤维化的机制之一。

#### 参考文献

- 1 Wu Q, Cao WF, Ma L, et al. Effects of Qi-Tonifying decoction on TGF- $\beta$ 1/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.
- 2 Nishio T, Hu RL, Koyama Y, et al. Activated hepatic stellate cells and portal fibroblasts contribute to cholestatic liver fibrosis in MDR2 knockout mice[J]. J Hepatol, 2019, 71: 573-585.
- 3 Li J, Wang YH, Ma MZ, et al. Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF- $\beta$  signaling[J]. EBioMedicine, 2019, 40: 43-55.
- 4 Wang L, Liu JD, Chang Q, et al. Advances and prospects of Miao Medicine *Penthorum chinense* Pursh [J]. Pharm Clin Chin Mater Med (中药与临床), 2014, 5(3): 47-49.
- 5 Shi X, Zhuo J. Experimental study on the effect of Total flavonoids of *Penthorum chinense* Pursh on alcoholic liver fibrosis in rats[J]. J Chin Med Mater (中药材), 2015, 38: 1485-1487.
- 6 Sun QS, Li YF, Ding WM, et al. Clinical analysis of Gansu granule in treating hepatic fibrosis[J]. Sichuan Med J (四川医学), 2002(12): 1324.
- 7 He JS, Zheng YJ, Chen L, et al. Clinical study on treatment of liver fibrosis due to chronic hepatitis B with Gansu granule [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis (中西医结合肝病杂志), 2007(3): 136-138.
- 8 Xie J, Xie XF, Dai LP, et al. Effect of Gansu granule on liver function and liver damage for perchlormethane-induced hepatic fibrosis of rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(8): 117-123.
- 9 Li Z. The inhibitory effect and mechanism of metformin on activated hepatic stellate cells in liver fibrosis [D]. Jinan: Shandong University (山东大学), 2015.
- 10 Puche JE, Saiman Y, Friedman SL, et al. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013 3: 1473-1492.
- 11 Wang FX, Jia Y, Li MM, et al. Blockade of glycolysis-dependent contraction by oroxylin a via inhibition of lactate dehydrogenase-a in hepatic stellate cells[J]. J Cell Commun Signal, 2019, 17: 11.
- 12 Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2; new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54: 142-151.
- 13 Lu J, Shi J, Li M, et al. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF-beta-induced collagen production in mouse renal fibroblasts[J]. Life Sci, 2015, 127: 59-65.
- 14 Cheng J, Lin B, Shen X, et al. Effect of dehydrocostuslactone on proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells[J]. Chongqing Med (重庆医学), 2017, 46: 3906-3908.
- 15 Xiao ZH, Zhou Y, Yang H, et al. Effects of serum containing Fugan Huaxian Decoction (扶肝化纤汤) on TGF- $\beta$ 1 induced HSC-T6 proliferation and TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway[J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2019, 60: 1673-1677.
- 16 Wang SS, Zhao C, Chen YX, et al. Effect of plumbagin on  $\alpha$ -SMA expressions in human hepatic stellate cells stimulated by TGF- $\beta$ 1 [J]. Chin Pharma Bull (中国药理学通报), 2019, 35: 1602-1608.
- 17 Chen L, Brenner DA, Kisseleva T, et al. Combatting fibrosis: exosome-based therapies in the regression of liver fibrosis [J]. Hepatol Comm, 2019, 3: 180-192.
- 18 Sayaka T, Masashi H, Yuji K, et al. Inhibition of TGF- $\beta$ 1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases [J]. Oncol Rep, 2009, 21: 205-210.