

• 药理与临床 •

三七抗增殖作用的有效成分筛选及机制研究

高洁^{1*}, 张楠楠², 韩彦琪¹, 李红艳³, 邹敏杰³, 侯媛媛¹, 白钢¹

1. 南开大学药学院, 天津 300071

2. 天津中医药大学, 天津 300193

3. 天津嘉氏堂科技有限公司, 天津 300457

摘要: 目的 筛选三七抗瘢痕成纤维细胞(human hypertrophic scar fibroblasts, HSF)增殖作用的有效成分并研究其作用机制。方法 采用索氏提取法将三七药材按照极性依次提取;以MTS法筛选其中具有较好抗HSF增殖作用的提取物,结合流式细胞仪检测其对细胞周期的影响;进一步采用HPLC对其有效成分进行谱效分析,将其中高活性成分进行UPLC-Q/TOF-MS鉴定及验证,通过反向对接技术预测有效成分的抗增殖作用机制。结果 三七醋酸乙酯提取部位有较高的抗HSF细胞增殖活性($P < 0.01$),能显著增加G₀/G₁期细胞的比例($P < 0.01$),降低增殖指数(proliferation index, PI)($P < 0.01$),其中主要活性成分为皂苷类化合物;以人参皂苷Rh₁和人参皂苷Rg₁为例的验证结果显示,这2种成分均能抑制细胞的增殖且呈剂量依赖性。反向对接预测结果显示,皂苷类化合物可能通过MAP2K1、MAPK14、HRAS等靶点作用于抗HSF细胞增殖相关信号通路。结论 三七醋酸乙酯提取物对瘢痕成纤维细胞增殖有抑制作用,主要成分为其中的皂苷类化合物,其作用机制可能与调节MAPK、黏着斑等信号通路有关。

关键词: 三七; 瘢痕成纤维细胞; 谱效分析; UPLC-Q/TOF-MS; 反向对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0801-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.012

Screening of constituents with antiproliferative activity in *Panax notoginseng* and their underlying mechanismsGAO Jie¹, ZHANG Nan-nan², HAN Yan-qi¹, LI Hong-yan³, ZOU Min-jie³, HOU Yuan-yuan¹, BAI Gang¹

1. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Jiashitang Technology Co., Ltd., Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To screen the components with potent antiproliferative effects on human hypertrophic scar fibroblasts (HSF) in *Panax notoginseng* and to explore their mechanisms. **Methods** The Soxhlet extraction method was used to obtain the different extracts from *P. notoginseng* by solvents with different polarities. MTS method was used to screen the ingredients with antiproliferative activity on HSF and flow cytometry was used to detect their influence on cell cycle. Then, spectrum-activity relationship of the active ingredients was analyzed by HPLC. UPLC-Q/TOF-MS was used to identify the ingredients with obvious activity. The antiproliferative mechanism was predicted by reverse docking. **Results** The ethyl acetate extract of *P. notoginseng* showed higher antiproliferative activity ($P < 0.01$), significantly increased the proportion of cells in G₀/G₁ phase ($P < 0.01$), and reduced the proliferation index (PI) ($P < 0.01$). The main active components were saponins. The result of confirming experiment showed that ginsenosides Rh₁ and Rg₁ could inhibit the cell proliferation in a dose-dependent manner. Results of reverse docking indicated the antiproliferative effects might be related to the regulation of some target proteins such as MAP2K, MAPK14, and HRAS, as well as the related pathways. **Conclusion** The ethyl acetate extract of *P. notoginseng* shows the antiproliferative activity on HSF, and the antiproliferative ingredients are saponins. The underlying mechanisms might be related with the regulation of MAPK and focal adhesion signaling pathways.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; hypertrophic scar fibroblast; spectrum-activity relationship; UPLC-Q/TOF-MS; reverse docking

收稿日期: 2013-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173638, 81102835, 81001682)

*通信作者 高洁(1981—), 女, 讲师, 研究方向为中药药理。Tel: (022)23506930 E-mail: gaojie@nankai.edu.cn

传统中药三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根或根茎, 具有散瘀止血、消肿定痛的功效, 临床应用非常广泛, 研究证实三七提取物可改善心肌缺血^[2]、调血脂^[3]、降血压^[4]、抗血栓^[5]等, 并具有较好的抗纤维化^[6]作用。然而, 三七抗纤维化作用的物质基础仍未十分明确, 本研究以抗瘢痕成纤维细胞 (HSF) 增殖为导向, 研究三七不同溶剂提取物的抗纤维化作用, 寻找其抗 HSF 增殖的物质基础, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药材与试剂

三七, 购自天津中医药大学第一附属医院, 经天津药物研究院张铁军教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根; 氢化可的松注射液 (批号 1006281) 天津药业焦作有限公司; 人参皂苷 Rh₁ (质量分数>98%), 购于天津马克生物技术有限公司; 人参皂苷 Rg₁ (质量分数>98%), 购于四川维克奇生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 公司); 特级胎牛血清 (FBS, 以色列 Biological Industries 公司); 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); MTS (美国 Promega 公司); 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 碘化丙啶 (PI)、RNase A (美国 Sigma 公司); HE 染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 细胞

HSF, 上海拜力生物技术有限公司

1.3 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Waters UPLC-Q-TOF Primer 串联质谱仪 (美国 Waters 公司); Masslynx 工作站 (Waters 公司); BD FACS Calibur 流式细胞仪 (BD 公司); 生物安全柜 (ESCO 公司); HF151UV 二氧化碳细胞培养箱 (Heal Force 公司); 倒置生物相差显微镜 (重庆奥特光学仪器公司); 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 三七药材的分段提取

取三七药材 20 g, 粉碎, 采用索氏提取法依次用 200 mL 的石油醚、氯仿、醋酸乙酯、饱和正丁醇和水回流提取 2 次, 每次 5 h, 各提取液分别回收溶剂至膏状, 真空干燥后备用。分别得到石油醚提取物 0.53 g (提取率为 2.65%)、氯仿提取

物 0.13 g (提取率为 0.65%)、醋酸乙酯提取物 0.40 g (提取率为 2.00%)、正丁醇提取物 1.31 g (提取率为 6.55%) 以及水提取部位 0.92 g (提取率为 4.60%)。

2.2 HSF 细胞增殖抑制率的测定

将对数生长期的 HSF 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化重悬于 DMEM 高糖培养基 (含 10% FBS、100 U/mL 的青霉素和链霉素) 中, 计数, 调整细胞浓度为 5×10^4 / mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后更换含药培养基。实验分为对照组 (含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养基), 阳性对照药氢化可的松组 (200 μ g/mL, 加与对照组相同的培养基)、三七各溶剂提取物组 (50 μ g/mL, 加与对照组相同的培养基), 每组设 6 个复孔, 各溶剂提取物均用 DMSO 助溶, 且 DMSO 终体积分数小于 0.1%。培养 24 h 后, 取上清备用, 每孔加入 MTS 溶液, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中继续培养 4 h 后, 在酶标仪上测定 490 nm 处吸光度 (*A*) 值, 并计算增殖抑制率 (增殖抑制率 = $1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}$)。

2.3 HSF 细胞上清液 LDH 活性的测定^[7]

取“2.2”项各组细胞的培养基, 按 LDH 试剂盒 (酶标法) 说明书进行, 于 450 nm 处测定 *A* 值, 计算 LDH 的活性。

2.4 流式细胞仪分析细胞周期

细胞处理及给药同“2.2”项。细胞分为对照组 (含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养基)、阳性药氢化可的松组 (200 μ g/mL, 加与对照组相同的培养基)、三七醋酸乙酯提取物组 (50 μ g/mL, 加与对照组相同的培养基), 加药后继续培养 24 h, 收集各组细胞, PBS 冲洗 2 次, 70% 乙醇-20 $^{\circ}$ C 固定过夜, PBS 洗涤离心去上清, 先加 2.5 μ L RNaseA (10 mg/mL), 再加 2.5 μ L PI 染液 (10 mg/mL), 轻轻吹匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后, 用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测, 并采用 CELLQUEST 软件对结果进行分析, 计算各期细胞百分率及增殖指数 [PI, $PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M)$]。

2.5 抗 HSF 细胞增殖药效成分的分析及鉴定

上述实验结果表明三七醋酸乙酯提取物有较强的抑制 HSF 细胞增殖的作用, 故对其进行成分分析。取三七醋酸乙酯提取物以色谱甲醇溶解, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后, 按以下条件进行 HPLC 分离, 并同时按时间富集流出液于深孔板中, 真空干燥

后,按照“2.2”项方法进行细胞增殖抑制作用分析,并对较高活性成分段进行 UPLC-Q/TOF-MS 鉴定。

HPLC 条件: Aglient Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相水(A)-乙腈(B); 二元梯度洗脱: 0~10 min, 5%~30% B; 10~15 min, 30%~55% B; 15~30 min, 55%~90% B; 30~35 min, 90%~100% B; 35~44 min, 100% B; 44~45 min, 100%~5% B; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温室温; 进样量 100 μL。

质谱条件: Waters UPLC/Q-TOF-MS 串联质谱仪, 扫描方式: 负离子; 扫描范围(*m/z*)为 50~2 000; 毛细管电压为 3 kV(负模式); 锥孔电压 30 V; 脱溶剂气为氮气, 脱溶剂温度 300 °C, 脱溶剂气体积流量 600 L/h; 锥孔气流量 50 L/h, 源温 100 °C; Q-TOF 扫描率 0.1 s, 内扫描延时 0.02 s; 数据采集工作站为 MassLynx 4.1。

2.6 有效成分抗 HSF 细胞增殖的验证

2.6.1 对 HSF 增殖的影响 按“2.2”项方法进行, 实验设对照组(含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养基)、阳性药氢化可的松组(200 μg/mL, 加与对照组相同的培养基)、三七醋酸乙酯提取物组(50 μg/mL, 加与对照组相同的培养基), 人参皂苷 Rh₁ 组(500、250、100 μg/mL, 加与对照组相同的培养基)和人参皂苷 Rg₁ 组(500、250、100 μg/mL, 加与对照组相同的培养基), MTS 测各给药组对 HSF 细胞增殖抑制率。

2.6.2 HE 染色观察 HSF 细胞形态 细胞处理方法同“2.6.1”项, 实验设对照组、氢化可的松组、三七醋酸乙酯提取物组、人参皂苷 Rh₁ (250 μg/mL) 组和人参皂苷 Rg₁ (250 μg/mL) 组, 培养结束后按 HE 染色试剂盒说明书对各组细胞进行染色, 于显微镜下观察细胞形态。

2.7 有效成分的反向对接与靶点预测

将“2.5”项中鉴定的药效成分立体结构通过 PharmMapper Server 网站进行反向对接, 预测其可能作用靶点^[8], 并利用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路数据库进行通路分析, 预测抗成纤维细胞增殖的机制。

2.8 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。两组间数据比较采用 *t* 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 三七各溶剂提取物抗 HSF 细胞增殖作用

细胞增殖实验表明, 三七石油醚、氯仿和醋酸乙酯提取物均能抑制 HSF 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 但石油醚和氯仿提取物对正常细胞有毒性(LDH 活性与对照组比较显著升高, $P < 0.01$), 综合细胞增殖率和 LDH 活性, 三七醋酸乙酯提取物有较好的抑制 HSF 细胞增殖的作用 ($P < 0.01$), 结果见图 1。

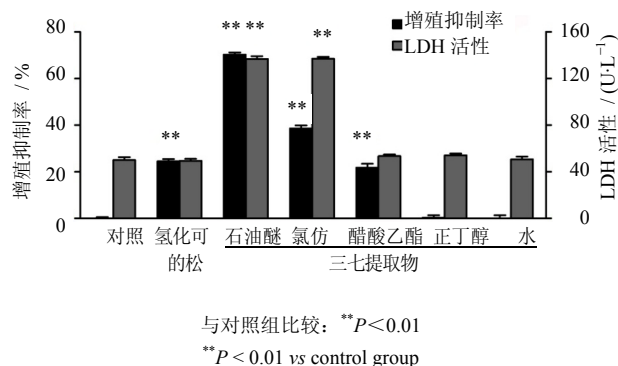


图1 三七各溶剂提取物对 HSF 细胞增殖和 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of various extracts from *P. notoginseng* on proliferation and LDH activity of HSF cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 三七醋酸乙酯提取物对 HSF 细胞周期的影响

流式细胞仪分析显示, 与对照组相比, 氢化可的松组和三七醋酸乙酯提取物组 G₀/G₁ 期细胞比例均显著增加 ($P < 0.01$), S 期和 G₂/M 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 表明三七醋酸乙酯提取物能明显降低 HSF 细胞的 PI ($P < 0.01$)。结果见图 2。

3.3 抗 HSF 细胞增殖成分的谱效分析及鉴定

采用 HPLC 法进行谱效分析的结果见图 3, 13~16 min 的组分有较好的抗增殖作用。进一步对高活性组分进行 UPLC-Q/TOF-MS 鉴定 (图 4), 发现主要含有人参皂苷 Rg₁、三七皂苷 R₂、人参皂苷 Rg₂、人参皂苷 Rh₁ 等成分 (表 1)。选取其中的人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rh₁ 为例进行后续的验证实验。

3.4 人参皂苷 Rh₁ 和人参皂苷 Rg₁ 对 HSF 细胞增殖抑制作用的验证

MTS 的研究结果显示人参皂苷 Rh₁ 和人参皂苷 Rg₁ 各剂量组均能明显抑制 HSF 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 且人参皂苷 Rh₁ 和人参皂苷 Rg₁ 对细胞的抑制作用呈现剂量依赖性 (图 5-A)。HE 染色后, 显微镜下观察对照组细胞形态规则, 胞核呈椭圆形或

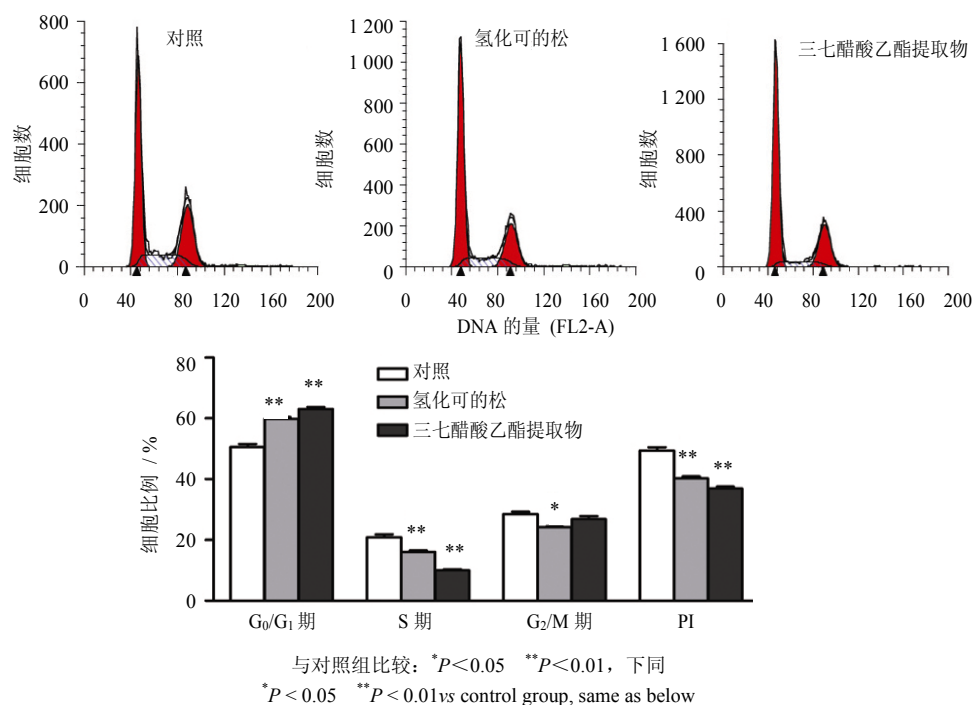
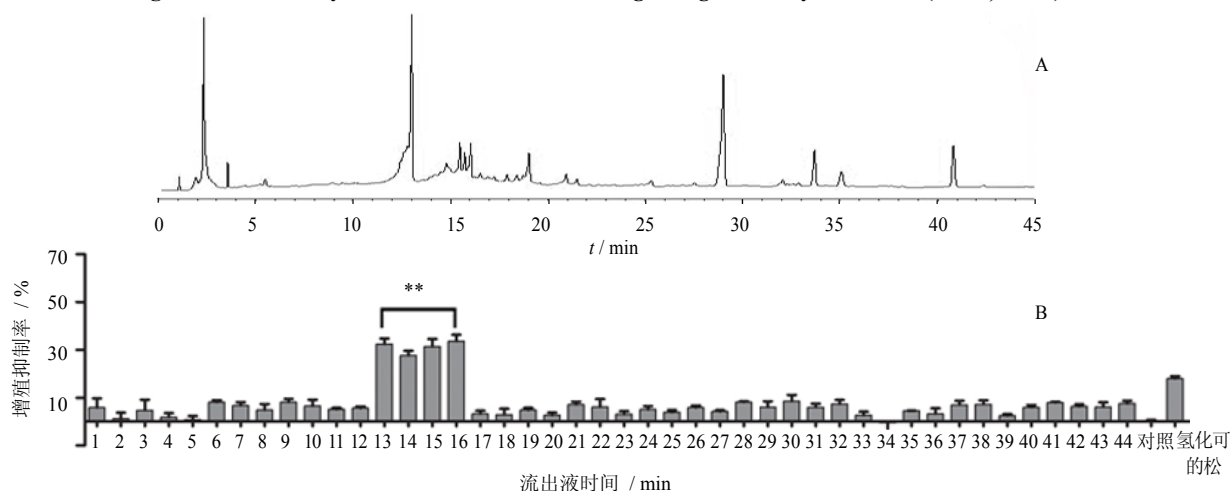
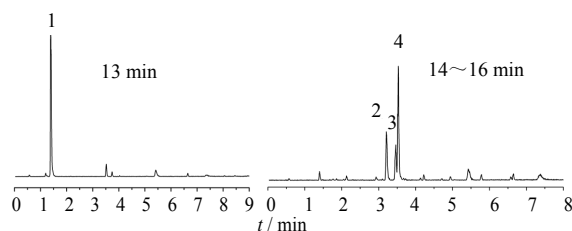
图2 三七醋酸乙酯提取物对 HSF 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 Effect of ethyl acetate extract from *P. notoginseng* on cell cycle of HSF ($\bar{x} \pm s, n=3$)图3 三七醋酸乙酯提取物 HPLC 色谱图 ($\lambda=203$ nm, A) 和三七醋酸乙酯提取物 HPLC 流出液对 HSF 细胞增殖的影响 (B)Fig. 3 HPLC of ethyl acetate extract from *P. notoginseng* ($\lambda=203$ nm, A) and effects of HPLC fractions of ethyl acetate extract from *P. notoginseng* on HSF proliferation (B)

图4 三七醋酸乙酯各活性段 (13 min 和 14~16 min) 总离子流图 (负离子)

Fig. 4 Total ion current of each active period (13 and 14~16 min) ethyl acetate extract from *P. notoginseng* (negative mode)

圆形, 胞体呈梭形; 氢化可的松、三七醋酸乙酯提取物、人参皂苷 Rh_1 和人参皂苷 Rg_1 组均出现不同程度的细胞数量减少, 细胞突起变短或缺失, 细胞质及胞核浓缩。(图 5-B)。

3.5 反向靶点对接及作用通路分析预测

反向对接的结果显示 (图 6), 上述活性成分推测与 MAP2K1、MAPK14、HRAS 等蛋白可能有较强的结合能力, 提示其能够通过与其相应蛋白结合, 调节促丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein

表 1 三七醋酸乙酯提取物中抗 HSF 增殖成分的 Q/TOF-MS 分析

Table 1 Q/TOF-MS analysis of antiproliferative ingredients in ethyl acetate extract from *P. notoginseng* on HSF cells

峰号	化合物	分子式	t_R / min	实验值 m/z [M+HCOO] ⁻	理论值 m/z	MS/MS	偏差
1	人参皂苷 R _{g1}	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	1.389	845.487 3	800.492 2	845 [M+HCOO] ⁻ , 637 [M-H-Glc] ⁻ , 205 [M+H-H ₂ O-CO-CO] ⁺	3.24
2	三七皂苷 R ₂	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	3.206	815.483 9	770.481 6	815 [M+HCOO] ⁻ , 637 [M-H-Xyl] ⁻ , 475 [M-H-Xyl-Glc] ⁻	4.15
3	人参皂苷 R _{g2}	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	3.463	829.298 0	784.497 3	829 [M+HCOO] ⁻ , 637 [M-H-Rha] ⁻ , 475 [M-H-Rha-Glc] ⁻	-3.95
4	人参皂苷 Rh ₁	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	3.533	683.435 9	638.439 4	683 [M+HCOO] ⁻ , 475 [M-H-Glc] ⁻	1.72

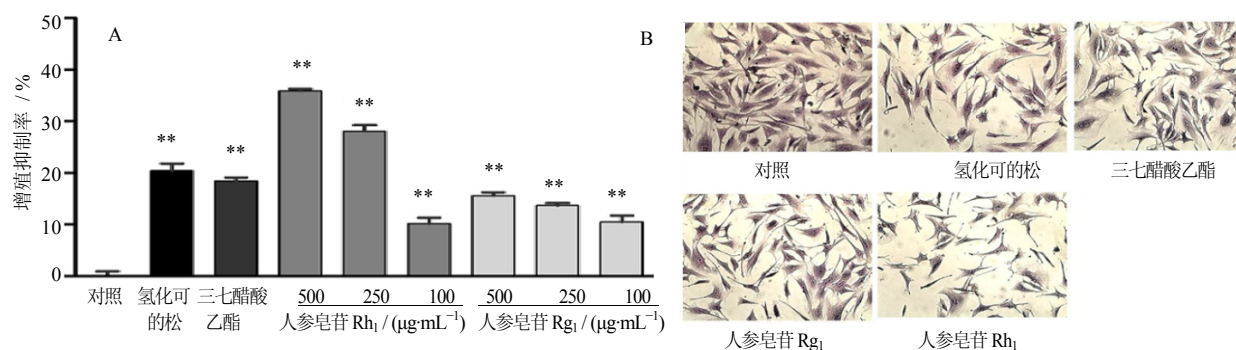


图 5 人参皂苷 Rh₁ 和人参皂苷 R_{g1} 对 HSF 细胞增殖 (A) 和细胞形态 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of ginsenosides Rh₁ and Rg₁ on proliferation (A) and morphology (B) of HSF cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

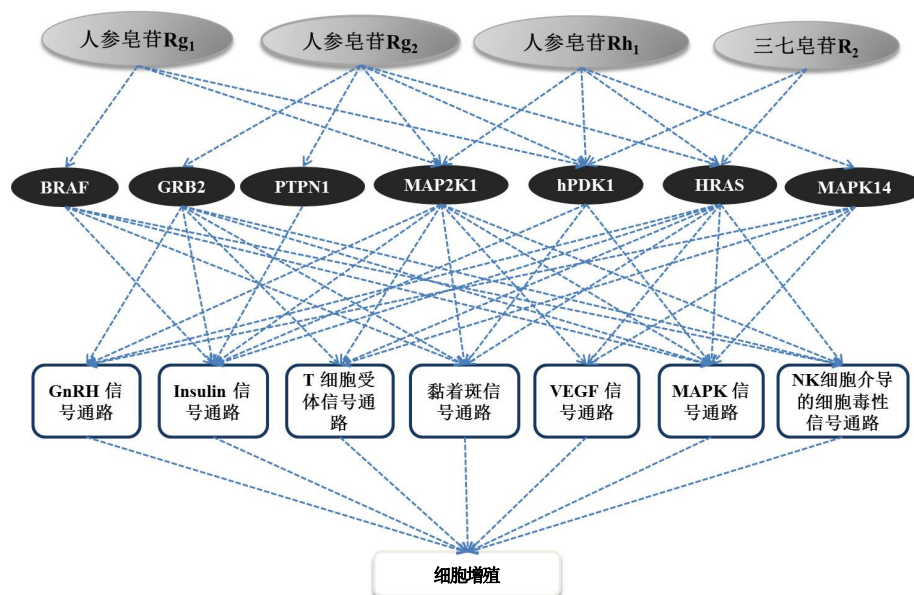


图 6 三七活性成分抗 HSF 细胞增殖作用可能的靶点通路

Fig. 6 Prospective targets and pathways involved in antiproliferative effect of active components from *P. notoginseng*

kinases, MAPK)、黏着斑 (focal adhesion) 等信号通路, 形成了复杂的调控网络而发挥抗增殖作用。

4 讨论

本研究将三七药材按溶剂极性依次提取, 筛选出三七的醋酸乙酯提取部位具有较好的抑制 HSF 细胞增殖的活性, 流式细胞术检测发现其能阻断

HSF 细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期、G₂/M 期转变, 进而抑制细胞的 DNA 合成, 抑制细胞的分裂, 使细胞周期进程减缓, 阻止其发生增殖, 进一步证明其具有抗 HSF 细胞增殖作用。对三七醋酸乙酯提取物进行 HPLC 谱效关系研究发现人参皂苷 R_{g1}、三七皂苷 R₂、人参皂苷 R_{g2} 和人参皂苷 Rh₁ 具有潜在的生物

活性。三七皂苷的抗纤维化活性已经被报道,林丽等^[9]通过三七皂苷干预人肾小管上皮细胞,发现三七皂苷可以抑制细胞转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 和纤维连接蛋白的表达,从而抑制细胞外基质的形成,有效地防治肾间质纤维化的发生。韦颖等^[10]研究发现三七皂苷可明显抑制人肾成纤维细胞的增殖及 I 型胶原的分泌,明显降低细胞整合素 β_1 的表达,表明三七皂苷可成为防治肾间质纤维化的药物。董向前等^[11]在三七总皂及其部分单体对四氯化碳致大鼠肝纤维化模型的治疗中发现人参皂苷 Rg₁ 和三七总皂具有抗肝纤维化的作用。本研究中鉴定的活性成分与文献结果较为一致。

利用 PharmMapper 和 KEGG 等生物信息学手段对三七活性成分的预测分析结果显示其可能通过 MAP2K1、MAPK14、HRAS 等 7 个主要靶点作用于抗细胞增殖的 MAPK、黏着斑等信号通路。MAPK 信号通路参与包括细胞的形成、运动、凋亡、分化及生长增殖等细胞的多种生理过程,包括胞外信号调节激酶 (ERKs)、p38 MAPK 和 JNK 等 3 条通路。有研究表明,三七总皂苷可以明显抑制 PDGF 诱导的 ERK 磷酸化,其抑制人血管平滑肌细胞 (VSMC) 的增殖与 ERK/MAPK 信号通路有关^[12]。此外,研究发现三七总皂苷可以抑制人 PC-3 细胞的增殖,其机制可能与 p38/MAPK 有关^[13]。Wong 等^[14]研究认为,促进创伤的修复和预防瘢痕组织的过度增生是 MAPK、黏着斑等相互关联形成复杂信号网络共同调控的过程。这些报道与本研究中的对接结果基本一致。前期工作证实了这种预测方法的正确性^[15-16],故未在本研究中对预测的靶点及通路进行验证,后续研究将完善对预测结果的验证。

本研究关于三七醋酸乙酯提取物对 HSF 增殖的抑制作用及其中活性成分的明确将为三七在临床上用于治疗增生性瘢痕提供实验依据,对通路和靶点的预测也为今后阐明三七抗增殖的作用机制奠定基础。

参考文献

- [1] Profyris C, Tziotziou C, Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation [J]. *J Am Acad*, 2012, 66(1): 1-10.
- [2] Han S Y, Li H X, Ma X, et al. Evaluation of the anti-myocardial ischemia effect of individual and combined extracts of *Panax notoginseng* and *Carthamus tinctorius* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(3): 722-727.
- [3] Wu J H, Leung G P H, Kwan Y W, et al. Suppression of diet-induced hypercholesterolaemia by saponins from *Panax notoginseng* in rats [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5: 1159-1169.
- [4] Pan C, Huo Y, An X, et al. *Panax notoginseng* and its components decreased hypertension via stimulation of endothelial-dependent vessel dilatation [J]. *Vasc Pharmacol*, 2012, 56(3): 150-158.
- [5] Lau A J, Toh D F, Chua T K, et al. Antiplatelet and anticoagulant effects of *Panax notoginseng*: Comparison of raw and steamed *Panax notoginseng* with *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(3): 380-386.
- [6] 张永胜, 冯一中, 曹志飞, 等. 虫草复方对博来霉素致大鼠肺纤维化的作用及其机制 [J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1766-1772.
- [7] Wu J G, Ma L, Zhang S Y, et al. Essential oil from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* induces apoptosis in hypertrophic scar fibroblasts [J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(1): 86-93.
- [8] Liu X, Ouyang S, Yu B, et al. Pharm Mapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 609-614.
- [9] 林丽, 杨树升. 三七皂苷对肾小管上皮细胞内 TGF- β_1 、纤维连接蛋白的影响 [J]. *中国医药指南*, 2012, 10(9): 3-4.
- [10] 韦颖, 樊均明, 潘丽萍. 三七总皂对人肾成纤维细胞的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(1): 47-49.
- [11] 董向前, 段丽平, 梁兵, 等. 人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 抗肝纤维化的体视学研究 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(1): 85-88.
- [12] Zhang W, Chen G, Deng C Q. Effects and mechanisms of total *Panax notoginseng* saponins on proliferation of vascular smooth muscle cells with plasma pharmacology method [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(1): 139-145.
- [13] 仇炜. 三七总皂苷抑制人前列腺癌 PC-3 细胞增殖、迁移及机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.
- [14] Wong V W, Longaker M T, Gurtner G C. Soft tissue mechanotransduction in wound healing and fibrosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(9): 981-986.
- [15] 张楠楠, 王倩, 高洁, 等. 丹参抗成纤维细胞增殖作用的分子机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2440-2447.
- [16] 程彬峰, 侯媛媛, 姜民, 等. 基于网络药理学的清肺消炎丸抗炎机制的初步研究 [J]. *药学报*, 2013, 48(5): 686-693.