

麝香保心丸对大鼠免疫性肝纤维化的影响及其机制

陈 艳, 姜齐宏, 骆中华

华中科技大学同济医学院 附属普爱医院, 湖北 武汉 430035

摘要: 目的 研究麝香保心丸对大鼠免疫性肝纤维化的抑制作用及其机制。方法 雄性 SD 大鼠制备免疫性肝纤维化模型, 随机均分为模型组, 麝香保心丸低、高剂量 (22.5、45 mg/kg) 组, 另设对照组。麝香保心丸组大鼠每天 ig 给药 1 次, 连续给药 10 周。第 10 周末处死大鼠, HE 染色法观察各组大鼠肝组织病理改变; RT-PCR 法检测肝组织血管内皮生长因子 (VEGF) 基因表达; 免疫组化法检测 VEGF、 α -肌动蛋白 (α -SMA) 蛋白的表达; 并测定肝组织中丙二醛 (MDA) 的量和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性以及胶原纤维面积的变化。结果 与模型组相比, 麝香保心丸低、高剂量可减轻大鼠肝纤维化程度, 显著降低肝组织 VEGF 基因、VEGF、 α -SMA 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 显著降低肝组织 MDA 的量和胶原纤维面积百分比 ($P < 0.05, 0.01$), 使 SOD 活性增强 ($P < 0.05, 0.01$), 并呈剂量相关性。结论 麝香保心丸可减少免疫性肝纤维化大鼠肝纤维化组织中 VEGF 表达, 降低氧化应激反应, 进而发挥抗肝纤维化作用, 其作用可能通过抑制肝星状细胞活化而实现的。关键词: 麝香保心丸; 免疫系统肝纤维化; 血管内皮生长因子; 氧化应激; 肝星状细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2563-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.014

Effect of Shexiang Baoxin Pill on immunological liver fibrosis in rats and its mechanism

CHEN Yan, JIANG Qi-hong, LUO Zhong-hua

Puai Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430035, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of Shexiang Baoxin Pill (SBP) on the immunological liver fibrosis and its possible mechanisms. **Methods** Male rats with immunological liver fibrosis were equally divided into control, model, and low- and high-dose (22.5 and 45 mg/kg) SBP groups. Rats in SBP groups were ig given SBP once daily for consecutive 10 weeks. On the week 10, all rats were sacrificed and a part of liver tissues were preserved. The changes of hepatic histopathology were observed using HE staining. Gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was observed using RT-PCR. The protein expression of VEGF and α -SMA was detected using immunohistochemistry, and MDA content, SOD activity, and the area of collagen fiber in the liver before and after treatments were measured. **Results** Compared to the model control, low- and high-dose SBP groups could relieve the degree of hepatic fibrosis ($P < 0.01, 0.05$), reduce the expression of hepatic VEGF mRNA, VEGF, α -SMA ($P < 0.01$), obviously reduce MDA content and the area of collagen fiber ($P < 0.05, 0.01$), and increase the activity of SOD ($P < 0.05, 0.01$). All the effects were dose-dependent. **Conclusion** SBP may decrease the expression of hepatic VEGF and reduce the level of oxidative stress. The inhibitory effect may depend on its dose, which may be based on inhibiting the activation of hepatic stellate cells.

Key words: Shexiang Baoxin Pill; immunological liver fibrosis; vascular endothelial growth factor; oxidative stress; hepatic stellate cells

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的共同和必经的病理过程, 防治肝纤维化是逆转肝硬化的关键, 然而目前尚无理想的抗纤维化药物。麝香保心丸是由麝香、苏合香脂、肉桂、冰片、蟾酥、牛黄和人参等组成的中成药, 具有抗炎、抗氧化、改善毛细血管内皮功能等药理作用, 并具有一定的抗

CCl₄ 致肝纤维化作用^[1-2], 但其对免疫性肝纤维化作用的研究还鲜见报道。本实验观察麝香保心丸对免疫性肝纤维化大鼠肝组织病理改变、血管内皮生长因子 (VEGF)、 α -肌动蛋白 (α -SMA)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 以及肝脏胶原的影响, 探讨其抗肝纤维化的作用及其机制, 为开发其抗肝纤

收稿日期: 2013-03-03

作者简介 陈 艳 (1979—), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主治医师。主要从事肝脏疾病研究。

Tel: (027)68831421 E-mail: dm20100420@sohu.com

维化的临床应用价值提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

麝香保心丸(22.5 mg/微粒丸),上海和黄药业有限公司生产,批号 101209,使用时以生理盐水配成悬浊液;Trizol 试剂、M-MLV 逆转录酶试剂盒,美国 GibcoBrl 公司;VEGF、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物,北京奥科公司;未灭活猪血清、Masson 三色染色试剂盒、 α -SMA 小鼠抗大鼠单克隆抗体、抗大鼠 VEGF 抗体、SABC 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;MDA、SOD 检测试剂盒,自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠,清洁级,体质量 190~220 g,购自同济医学院动物实验中心,许可证号 HBDW 2008-1015。

1.3 仪器

BX40 型光学显微镜,日本 Olympus 公司;Mastercycler ep realplex 型 PCR 仪,德国 EP-Pendorf 公司产品;Z-DELECTROPHOREIS 型 BIO-RAD 电泳仪、Gel DocTM XR 型凝胶成像仪、Bio-Rad imark 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药

70 只大鼠按文献方法^[3]制备肝纤维化模型,即 ip 猪血清 0.5 mL/只,每周 2 次,连续 12 周。至第 12 周末存活大鼠 66 只,随机均分 3 组,每组 22 只,分别为模型组,麝香保心丸低、高剂量(22.5、45 mg/kg,按体表面积计算相当于人用较小剂量及较大剂量^[4])组,另取 10 只正常大鼠作为对照组。麝香保心丸组大鼠每天 ig 给药 1 次,每次 2 mL/只,连续给药 10 周,模型组、对照组 ig 等体积生理盐水。第 10 周末模型、麝香保心丸低和高剂量、对照组存活大鼠分别为 10、12、16、10 只。

2.2 检测指标

于给药第 10 周末,大鼠 ip 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉,取各组大鼠肝组织进行以下相关指标检测。

2.2.1 HE 染色法观察大鼠肝组织病理改变 大鼠肝组织常规石蜡切片,HE 染色,低倍镜下观察($\times 100$)各组大鼠肝纤维化程度。采用半定量法记分评价肝纤维化程度:0 分,肝细胞无病变,肝脏正常或无明显胶原纤维增生;1 分,变性的肝细胞占全

部肝细胞比例 $<25\%$,胶原纤维增生,中央静脉和汇管区有少量纤维延伸,但无间隔形成;2 分,变性的肝细胞占全部肝细胞的 25%~50%,胶原纤维明显增生,中央静脉和汇管区结缔组织变厚,由此四周伸出纤维索,形成不完全间隔;3 分,变性的肝细胞占全部肝细胞的 50%~75%,胶原纤维大量增生,有个别完全间隔或较厚的不完全间隔形成假小叶;4 分,变性的肝细胞占全部肝细胞比例 $>75\%$,完全间隔较厚,假小叶大量形成。每张切片随机取 10 个视野计评分平均值。

2.2.2 RT-PCR 法检测肝组织 VEGF 基因表达 每组随机抽取 10 份肝组织样本(每份 50 mg),用 Trizol 提取肝组织总 RNA,按 M-MLV 逆转录酶试剂盒说明书逆转录成 cDNA,并进行 PCR 扩增。VEGF 引物:正向引物 5'-TGCACCCACGACAGAAGGG-GA-3',反向引物 5'-TCACCGCCTTGGCTTGTC-ACA-3',扩增片段长度 568 bp;GAPDH(内参):正向引物 5'-CATGGTCTACATGTTCCAGT-3',反向引物 5'-GGCTAAGCAGTTGGTGGTGC-3',扩增片段长度 349 bp。以上引物均由北京奥科公司合成。取逆转录产物 2 μ L 为模板。总反应体系包括 1 Utaq 酶和上下游引物各 0.1 μ g、10 mmol/L dNTP 0.8 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ L(终浓度为 1.5 mmol/L)、10 \times 缓冲液 2 μ L,加水至 20 μ L,将其置 PCR 仪 94 $^{\circ}$ C、5 min,此后 94 $^{\circ}$ C、45 s,66 $^{\circ}$ C、45 s(GAPDH 退火温度为 61 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C、45 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C、5 min 终止反应。取 5 μ L PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳 50 min,电泳结果经电泳凝胶成像分析仪扫描成像,以 Multi-Analyst 软件包进行半定量分析。单位肝组织的 VEGF 基因相对的量用 VEGF 条带平均积分光度与 GAPDH 条带平均积分光度比值表示。

2.2.3 SOD 活性和 MDA 量的测定 每组随机抽取大鼠肝组织样本 10 份,切取大鼠肝组织相应部位 1.0 cm \times 0.5 cm,称质量,加入 9 倍质量的生理盐水,置入匀浆器中在冰水中匀浆,3 000 r/min 离心 5 min,分别吸取 0.1 mL 上清液,按照 MDA、SOD 测定试剂盒说明书测定 MDA 的量和 SOD 活性。

2.2.4 免疫组化法检测肝组织 VEGF、 α -SMA 蛋白的表达 每组随机抽取大鼠肝组织样本 10 份,采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC 法)检测 VEGF、 α -SMA 蛋白表达;采用 MPZAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统,计算

平均积分光密度。

2.2.5 肝组织胶原量的检测 每组随机抽取大鼠肝组织样本 10 份, Masson 法染色, 每张肝组织切片于 ($\times 200$) 镜下随机取 5 个视野, 用 Image-proplus v6.0 软件分析胶原定量, 计算胶原纤维面积比例。

胶原纤维面积比例 = 胶原纤维面积/肝组织面积

2.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 软件行方差分析, 两组均数间比较采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对免疫性肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响

光镜下可见, 对照组大鼠肝组织未见任何病变。

模型组大鼠肝组织内大部分小叶结构受到破坏, 肝组织大片脂肪变性、坏死, 呈空网状, 仅残存少量肝细胞, 汇管区和肝小叶坏死区可见大量淋巴细胞浸润及纤维组织增生, 形成众多假小叶。麝香保心丸 22.5 mg/kg 组大鼠肝细胞片状坏死, 汇管区可见较多淋巴细胞浸润及纤维组织增生, 形成条索状间隔, 多个假小叶形成, 肝纤维化程度较模型组明显减轻; 麝香保心丸 45.0 mg/kg 组大鼠肝组织内可见肝细胞明显脂肪变性、气球样变性及局灶性坏死, 汇管区纤维组织增生, 形成小的条索, 有散在的假小叶形成, 肝纤维化程度较模型组和麝香保心丸 22.5 mg/kg 组均明显减轻。结果见图 1、表 1。

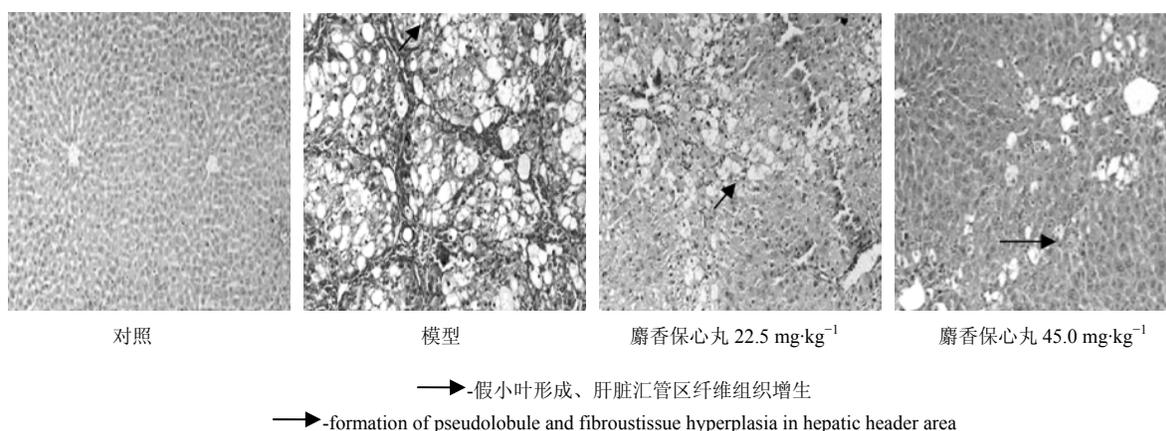


图 1 各组大鼠肝组织切片 HE 染色病理学观察

Fig. 1 Pathological observation of liver tissue in rats among each group by HE staining

表 1 麝香保心丸对免疫性肝纤维化大鼠肝纤维化程度的影响
Table 1 Effect of SBP on degree of hepatic fibrosis in rats with immunological liver fibrosis

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	肝纤维化程度评分				
			0分	1分	2分	3分	4分
对照	—	10	10	0	0	0	0
模型	—	10	0	0	0	1	9
麝香保心丸	22.5	12	0	2	3	3	4
	45.0	16	0	7	6	2	1

3.2 对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 VEGF 基因表达的影响

与模型组相比, 麝香保心丸各剂量组大鼠肝组织 VEGF 基因表达均显著下调 ($P < 0.01$)。与麝香保心丸低剂量组相比, 其高剂量组大鼠肝组织 VEGF 基因表达也显著下调 ($P < 0.01$)。结果见图 2、表 2。

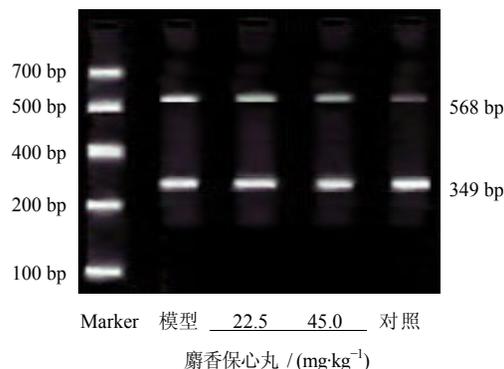


图 2 麝香保心丸对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 VEGF 基因表达的影响

Fig. 2 Effect of SBP on expression of hepatic VEGF mRNA in rats with immunological liver fibrosis

3.3 对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 SOD 活性、MDA 量的影响

与模型组相比, 麝香保心丸组大鼠肝组织中 SOD

表 2 麝香保心丸对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 VEGF 基因表达、SOD 活性、MDA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of SBP on VEGF mRNA expression, SOD activity, and MDA content in rats among each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	VEGF	SOD / (nU·mg ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)
对照	—	0.030 5 ± 0.029 6	28.77 ± 1.330	0.372 ± 1.313
模型	—	0.587 2 ± 0.031 2	10.02 ± 1.422	9.988 ± 1.842
麝香保心丸	22.5	0.373 5 ± 0.062 8 ^{△△}	13.56 ± 2.563 [△]	7.622 ± 2.303 [△]
	45.0	0.135 7 ± 0.013 2 ^{△△△▲}	22.36 ± 1.552 ^{△△▲▲}	2.310 ± 1.305 ^{△△▲▲}

与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与麝香保心丸低剂量组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$
[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group ^{▲▲} $P < 0.01$ vs low-dose SBP group

活性显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)、MDA 的量明显下降 ($P < 0.05, 0.01$)。与麝香保心丸 22.5 mg/kg 组相比, 其 45.0 mg/kg 组大鼠肝组织中 SOD 的活性、MDA 的量均明显下降 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.4 对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 VEGF 和 α -SMA 蛋白表达的影响

免疫组化染色显示, 对照组大鼠肝组织无明显 VEGF、 α -SMA 蛋白表达。模型组中大鼠肝组织 VEGF、 α -SMA 蛋白主要表达于汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦中的细胞中。麝香保心丸 22.5 mg/kg 组大鼠肝组织 VEGF、 α -SMA 蛋白主要表达于汇管区、邻近门静脉的肝血窦中细胞中, 与模型组相比, VEGF、 α -SMA 蛋白阳性表达的细胞数量及分布范围明显减少, 且染色明显减轻 ($P < 0.01$); 45.0 mg/kg 组大鼠肝组织 VEGF、 α -SMA 主要表达于汇管区,

其阳性表达的细胞数量、分布范围减少, 且染色程度较模型组和麝香保心丸 22.5 mg/kg 组均明显减轻 ($P < 0.01$)。结果见图 3、表 3。

3.5 对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中胶原纤维表达的影响

Masson 染色可见, 对照组大鼠肝组织中胶原纤维在血管周围少量表达。模型组中大鼠肝组织中胶原纤维明显增生, 众多区域形成假小叶。与模型组相比, 麝香保心丸 22.5 mg/kg 组大鼠肝组织中形成的纤维间隔和假小叶明显减少, 胶原面积比明显降低 ($P < 0.05$); 45.0 mg/kg 组大鼠肝组织胶原纤维沉积较少, 可见散在纤维间隔和个别假小叶, 胶原面积比明显减小 ($P < 0.01$)。与麝香保心丸 22.5 mg/kg 组相比, 其 45.0 mg/kg 组胶原面积比也明显减小 ($P < 0.05$)。结果见图 4 及表 3。

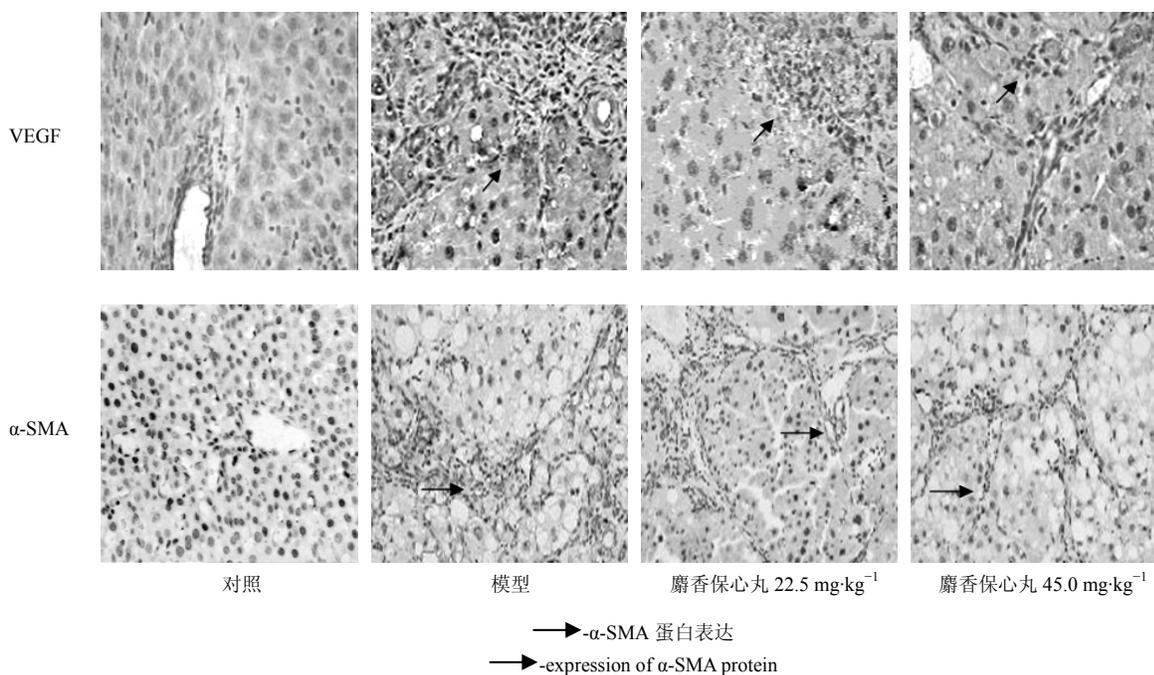


图 3 各组大鼠肝组织中 VEGF 和 α -SMA 蛋白表达

Fig. 3 Expression of hepatic VEGF and α -SMA protein in rats among each group

表3 麝香保心丸对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 VEGF 和 α -SMA 蛋白表达、胶原面积比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of SBP on protein expression of hepatic VEGF, α -SMA, and collagen area ratio in rats among each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	VEGF	α -SMA	胶原面积比 / %
对照	—	0.030 1 ± 0.022 3	1.072 6 ± 0.552 3	1.152 1 ± 0.543 0
模型	—	0.899 4 ± 0.361 5	37.867 9 ± 4.821 8	8.789 2 ± 1.152 4
麝香保心丸	22.5	0.454 6 ± 0.012 4 ^{△△}	14.492 8 ± 1.471 6 ^{△△}	5.566 2 ± 0.423 1 [△]
	45.0	0.164 5 ± 0.082 1 ^{△△▲▲}	7.561 5 ± 0.373 8 ^{△△▲▲}	3.022 7 ± 0.214 3 ^{△△▲}

与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与麝香保心丸低剂量组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$
[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model control; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs low-dose SBP group

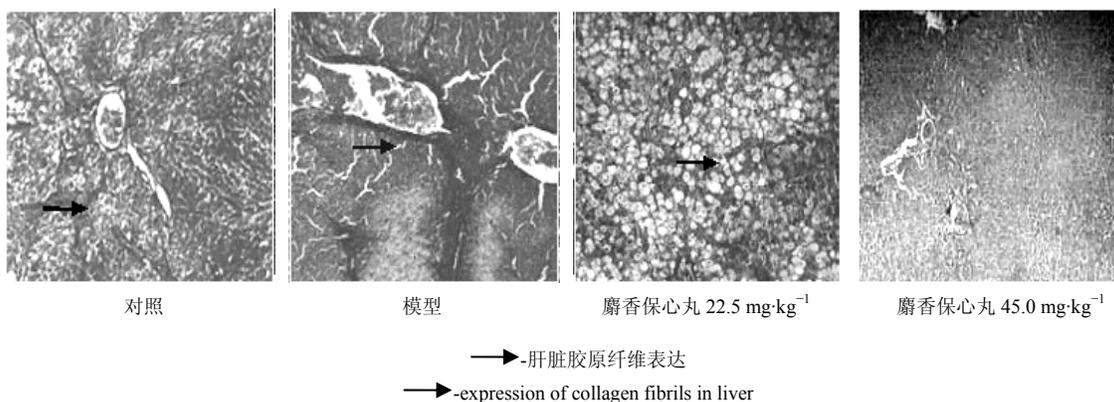


图4 各组大鼠肝组织中胶原纤维的表达

Fig. 4 Expression of hepatic collagen fibrils in rats among each group

4 讨论

麝香保心丸是一种传统的治疗心血管疾病的中药，而在近年临床实践中发现其具有治疗慢性胃炎、偏头痛、支气管哮喘等多种新用途^[5]。麝香保心丸能改善毛细血管内皮细胞功能，促进血管内皮细胞 NO 合成、释放，减轻血管炎症性反应，此作用是其发挥抗氧化、抗炎、抗纤维化的重要作用机制之一^[6]。肝纤维化时炎症细胞因子导致毛细血管内皮细胞结构、功能损伤，从而促进肝纤维化的发生、发展，因此麝香保心丸保护毛细血管内皮细胞功能可能成为其抗肝纤维作用的重要机制之一。

病毒性肝炎是导致人肝纤维化的主要病因。大鼠免疫性肝纤维化模型接近人肝炎肝纤维化的病理机制^[7]，因此本实验选择该模型进行研究更有利于了解麝香保心丸治疗人肝炎肝纤维化的作用及其机制。肝纤维化时肝脏巨噬细胞与淋巴细胞产生血小板衍生生长因子、转化生长因子 β 1 等各炎症细胞因子，它们刺激肝星状细胞 (HSC) 活化、增殖、转化为肌成纤维细胞，并大量合成以 I、III 型胶原为主的细胞外基质。因此抑制 HSC 活化、增殖成为

肝纤维化治疗的重要对策。 α -SMA 是 HSC 活化的最重要的标志物^[8]，检测 α -SMA 在肝组织中的表达可以反映 HSC 的活化情况。

肝窦毛细血管化是肝纤维化的最基本、最初期的特征。炎症细胞因子可激活肝巨噬细胞和 HSC 而产生 VEGF，它不仅促进肝窦内皮细胞的增殖，而且促进毛细血管内皮细胞的增殖，导致肝窦基底膜的形成，内皮细胞筛孔消失，即肝窦毛细血管化，从而造成肝组织微循环障碍，肝组织缺血、缺氧，产生过度氧化应激，促进肝纤维化的形成、发展^[9]。VEGF 亦可能参与 HSC 旁分泌与自分泌激活途径。肝组织损伤后，肝巨噬细胞 VEGF 分泌明显增加，促进 HSC 活化。活化的 HSC 可分泌 VEGF 和 VEGF 受体 Flt-1 和 Flk-1。Flk-1 激活后介导 HSC 的增殖，促进 HSC 趋化、迁移至损伤部位^[10-11]。Shi 等^[12]的研究发现，CCl₄ 致肝纤维化模型大鼠 VEGF 的表达随肝纤维化程度加重的而增加，可见 VEGF 与其受体的相互作用在肝窦毛细血管化形成、过度氧化应激的产生以及 HSC 活化、增殖、促进肝纤维化形成的过程中起重要作用。

氧自由基对肝脏的损害作用日益受到广泛关注。肝细胞脂质过氧化损伤可导致氧自由基生成增多。MDA 为脂质过氧化反应的主要产物,可严重损伤肝细胞膜的结构,导致细胞肿胀与坏死,其量可反映肝组织过氧化损伤的程度。脂质过氧化物是直接刺激胶原基因转录的重要因素之一,HSC 的激活与自由基、脂质过氧化物密切相关^[13]。SOD 是体内氧自由基的主要清除剂,能清除脂质过氧化过程中产生的具有高度活性的超氧阴离子,减轻其毒性,保护细胞的结构和功能。SOD 活性的恢复对于清除氧自由基、抗脂质过氧化、抑制 HSC 激活以及防治肝纤维化等具有重要意义^[14]。

本实验结果显示,模型组大鼠肝组织 α -SMA、VEGF 蛋白表达、VEGF 基因表达及 MDA 的量明显增加,SOD 活性下降,提示肝损伤后各种炎性细胞因子可诱导肝组织过度表达 VEGF,进而引起肝窦毛细血管化,产生过度氧化应激,活化 HSC,从而导致肝纤维化的发生、发展。低剂量麝香保心丸给药后,大鼠肝组织中 α -SMA、VEGF 蛋白表达、VEGF 基因表达及 MDA 的量明显下降,SOD 活性提高,胶原的量亦下降;麝香保心丸高剂量的作用更加显著,表明其具有抗肝纤维化作用并呈剂量相关性,其作用机制与抑制各种炎性细胞因子对 HSC 活化的诱导作用、减少 VEGF 产生、降低肝组织氧化应激水平的能力密切相关。

有观点认为,肝纤维化是可逆转的,而肝硬化是不可逆转的^[15]。若在病变早期进行抗纤维化治疗,可能有利于肝纤维化的逆转。本实验结果显示,在大鼠免疫性肝纤维化早期阶段给予麝香保心丸后,肝纤维化程度明显改善,表明麝香保心丸具有明显的抗肝纤维化早期作用。

参考文献

- [1] 杜文惠,彭风芹,谢素屏,等. 麝香保心丸对急性心肌梗死患者左室重构的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 268-269.
- [2] 徐标,曾昆,杨虹,等. 麝香保心丸对肝硬化大鼠心肌组织即早基因与结缔组织生长因子的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 940-946.
- [3] Toda K, Kumagai N, Kaneko F, et al. Pentoxifylline prevents pig serum-induced rat liver fibrosis by inhibiting interleukin-6 production [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(5): 860-865.
- [4] 曹芳芳,李艳芳,刘飞,等. 麝香保心丸对心力衰竭大鼠心脏血管紧张素受体的影响 [J]. 心肺血管病杂志, 2011, 30(3): 241-245.
- [5] 王桂珍,戈升荣. 麝香保心丸药理作用及临床应用概况 [J]. 中国药师, 2004, 7(5): 392-393.
- [6] 吴建祥,任雨笙,梁春,等. 麝香保心丸对内皮祖细胞功能及分泌一氧化氮的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(6): 511-513.
- [7] Zhao X Y, Zeng X, Li X M, et al. Pirfenidone inhibits carbon tetrachloride-and albumin complex-induced liver fibrosis in rodents by preventing activation of hepatic stellate cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(10): 963-968.
- [8] Lee U E, Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2): 195-206.
- [9] Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(3): 258-270.
- [10] Novo E, Cannito S, Zamara E, et al. Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(6): 1942-1953.
- [11] Liu Y, Lui E L, Friedman S L, et al. PTK787/ZK22258 attenuates stellate cell activation and hepatic fibrosis *in vivo* by inhibiting VEGF signaling [J]. *Lab Invest*, 2009, 89(2): 209-221.
- [12] Shi H, Dong L, Zhang Y, et al. Protective effect of a coffee preparation (Nescafe pure) against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *Clin Nutr*, 2010, 29(3): 399-405.
- [13] Comporti M, Arezzini B, Signorini C, et al. Oxidative stress, isoprostanes and hepatic fibrosis [J]. *Histopathology*, 2009, 24(7): 893-900.
- [14] Tian X P, Yin Y Y, Li X. Effects and mechanisms of *Acremoniumterricola* milleretal mycelium on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(3): 537-550.
- [15] Lee KS. Hepatic fibrogenesis [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2006, 48(5): 297-305.