

蒿鳖养阴软坚方抗小鼠血吸虫病肝纤维化及其机制的研究

寇咏梅¹, 刘洁莹², 方步武²

1. 天津市第二医院, 天津 300141

2. 天津医科大学 药理教研室, 天津 300070

摘要: 目的 明确蒿鳖养阴软坚方对血吸虫病肝纤维化的治疗作用, 探讨肝星状细胞凋亡与抗血吸虫病肝纤维化的关系。方法 血吸虫尾蚴 25 条/只经腹壁皮肤感染小鼠, 12 周之后建立小鼠血吸虫病肝纤维化模型。将全部感染小鼠随机分为蒿鳖养阴软坚方 (8.20、2.59、0.82 g/kg) 治疗组、阳性药物 (复方鳖甲软肝片组 0.54 g/kg、秋水仙碱组 0.1 g/kg) 组、模型对照组 (短模组、长模组) 和正常对照组。蒿鳖养阴软坚方组 ig 蒿鳖养阴软坚方干粉状提取物混悬液; 阳性药物对照组 ig 相应的阳性药物; 模型组 ig 生理盐水, 1 次/d, 共 12 周。光镜观察肝细胞病理变化; 盐酸水解法测定肝细胞羟脯氨酸含量; 免疫组化法测定 α -SMA 表达和 ISOL 技术测定细胞凋亡情况。结果 蒿鳖养阴软坚方高、中剂量组胶原蛋白含量均明显降低 ($P < 0.05$)。模型组 HSC 细胞 α -SMA 大量表达; 而蒿鳖养阴软坚方组肝星状细胞 (HSC) 细胞 α -SMA 表达较模型组明显减少 ($P < 0.01$)。蒿鳖养阴软坚方中剂量组比模型组肝星状细胞数量有显著差异 ($P < 0.05$), 与正常组肝星状细胞凋亡差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 蒿鳖养阴软坚方对小鼠血吸虫病肝纤维化有治疗作用。抑制 HSC 的活化, 并诱导其发生凋亡, 是蒿鳖养阴软坚方抗血吸虫病肝纤维化的机制之一。

关键词: 蒿鳖养阴软坚方; 血吸虫病肝纤维化; 羟脯氨酸; α -平滑肌肌动蛋白; 肝星状细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)03-0288-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.007

Therapeutic effect and its mechanism of Haobie Yangyin Ruanjian Prescription on mice with liver fibrosis caused by schistosomiasis

KOU Yong-mei¹, LIU Jie-ying², FANG Bu-wu²

1. Tianjin No. 2 Hospital, Tianjin 300141, China

2. Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of Haobie Yangyin Ruanjian Prescription on liver fibrosis of schistosomiasis in mice and investigate its mechanism of inducing the apoptosis of hepatic stellate cells (HSC). **Methods** Every mouse was infected by 25 schistosoma cercarias through skin of abdominal wall, and liver fibrosis was induced after 12 weeks. The infected mice were randomly divided into eight groups: high-, mid-, low-dose (8.20, 2.59, and 0.82 g/kg) Haobie Yangyin Ruanjian Prescription groups, positive control group (Componud Biejia Ruangan Tablet 0.54 g/kg group and colchicine 0.1 g/kg group), model control group (3 months after infection group, 6 months after infection group), and normal control group. Haobie Yangyin Ruanjian Prescription groups and the positive control groups were orally given Haobie Yangyin Ruanjian Prescription and positive control drug powder extractive suspension once daily, respectively. Ig administration of physiological saline to mice in model group once daily lasted for 12 weeks. Hepatic tissue was obtained at the end of the experiment to observe the pathological change under microscope, to determine the content of hydroxyproline (Hyp), and to set out α -SMA expression and cell apoptosis using immunohistochemical method. **Results** Compared with the model group, collagen content of high- and mid-dose Haobie Yangyin Ruanjian Prescription groups was significantly lower ($P < 0.05$). α -SMA of HSC expressed a lot in the model group, which demonstrated schistosomiasis induced the activation of HSC. α -SMA expression of HSC in the treatment groups was evidently reduced ($P < 0.01$), reminding HSC activation was inhibited. The quantity of HSC in mid-dose HYRP group was significantly different to that in the model group ($P < 0.05$), but had no remarkable difference compared with the normal control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Haobie Yangyin Ruanjian Prescription has the therapeutic effect on the liver fibrosis of schistosomiasis in mice. It could significantly alleviate the degree and range of liver fibrosis,

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 天津市应用基础研究计划重点项目 (06YFJZJC02900)

作者简介: 寇咏梅 (1970—), 女, 副主任药师, 中药专业硕士, 研究方向: 中药药理与临床。Tel: (022) 26352707-372 E-mail: kouyongmei@126.com

reduce collagen content and α -SMA level of hepatic tissue, and induce HSC apoptosis.

Key words: Haobie Yangyin Ruanjian Prescription; liver fibrosis caused by schistosomiasis; hydroxyproline; α -SMA; hepatic stellate cells apoptosis

蒿鳖养阴软坚方由青蒿、鳖甲、虎杖、丹参、郁金等 9 味中药组成, 具有改善免疫细胞活性、抗肝纤维化作用^[1-2]。我国是病毒性肝炎的高发区, 慢性病毒性肝炎患者数千万, 慢性血吸虫病也有所增加, 慢性酒精性肝病的发病率在上升, 在这些病变过程中均可发生肝纤维化。本实验以蒿鳖养阴软坚方为研究对象, 建立小鼠血吸虫病肝纤维化模型, 给药治疗后通过观察肝组织细胞的病理改变及肝脏纤维的增生程度, 检测肝组织中羟脯氨酸来评价肝损伤及纤维化的程度, 免疫组织化学方法测定 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达和 ISOL 技术检测肝星状细胞 (HSC) 凋亡情况以观察蒿鳖养阴软坚方对血吸虫病肝纤维化小鼠肝星状细胞活化及其凋亡的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

昆明种清洁级小鼠 150 只, 雌雄各半, 体质量 17.9~25.8 g, 购自中国军事医学科学院动物中心, 动物合格证号: SCXK-(军)2007-004。动物房室温 20~22 °C, 24 h 昼夜节律, 饲养于天津医科大学动物中心。钉螺由江西省寄生虫病防治研究所抗原室提供, 采自鄱阳湖区的湖北亚种天然感染钉螺。

1.2 药品

蒿鳖养阴软坚方由天津乐仁堂制药厂提供, 采用水煎醇提法及中试生产规模制备成原料药粉, 含丹酚酸 B (5.91 ± 0.17) mg/g、大黄素 (4.09 ± 0.13) mg/g、虎杖苷 (3.69 ± 0.03) mg/g, 用前配成混悬液。复方鳖甲软肝片为内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司产品, 0.5 g/片, 批号 20080206; 秋水仙碱为 Sigma 公司产品, 批号 C3915-5G, 进口分装, 购自天津市联星生物技术有限公司。

1.3 主要试剂

L-羟脯氨酸, 电泳纯, 上海康达氨基酸厂, 批号 920506; 白蛋白试剂盒, 北京北化康泰临床试剂有限公司, 批号 031215; 琼脂糖, 分析纯, Gibco 进口分装, 批号 041015; 其他剂均为分析纯或优级纯。

1.4 主要仪器

VIS-7220 型紫外可见分光光度仪, 北京瑞利分析仪器公司; RF-510 型荧光分光光度计, 日本

岛津公司。

2 方法

2.1 模型的制备

利用随机数字表, 按体质量随机区组法从 150 只小鼠中取 8 只作为正常组, 雌、雄各 4 只, 正常组不做动态分析, 其余小鼠为感染组, 刮净其腹毛, 将新逸出的血吸虫尾蚴用盖玻片法全部经腹壁皮肤攻击感染, 25 条/只, 感染时间 20 min。将动物置于室温 25 °C 环境下饲养, 标准饲料, 自由进食饮水。感染后 4 周, 小鼠肝脏大小、颜色、质地大体正常; 第 8 周后, 小鼠肝脏轻度肿大, 呈暗紫色, 表面出现白色粟粒样结节, 光镜下已形成典型虫卵肉芽肿病变; 第 12 周后, 小鼠肝脏显著肿大, 质地较硬, 表面密布白色粟粒样结节, 镜下已有大量胶原纤维分布于虫卵结节周围和肝脏汇管区, 呈“干线性”肝纤维化特征, 并有大量已钙化的虫卵结节。同时肝组织胶原蛋白含量水平显著升高, 肝纤维化组织学的主要特点为大量胶原的沉积, 几乎所有的羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 都存在于胶原中, Hyp 被认为是胶原中的特征性氨基酸, 是反映肝脏纤维化程度的直接指标, 表明小鼠血吸虫病纤维化模型建立成功。分组时小鼠数目一样, 成模后因 ig 等原因有部分死亡, 因此以最终入组数为准。

2.2 分组

在造模成功后, 在感染组按体质量进行随机分组: 蒿鳖养阴软坚方组 (高、中、低剂量组)、阳性药组 (复方鳖甲软肝片组、秋水仙碱组)、模型组 (长模组、短模组, 短模组为造模后 12 周, 经肝组织 Hyp 含量测定与肝组织形态学观察证实肝纤维化形成; 长模组为造模后 12 周, 再 ig 生理盐水灌胃 12 周)。同时开始治疗性 ig 相应药物, 蒿鳖养阴软坚方高、中、低剂组分别 ig 蒿鳖养阴软坚方 8.20、2.59、0.82 g/kg, 阳性药物复方鳖甲软肝片组及秋水仙碱组分别 ig 相应药物 0.54、0.1 g/kg, 用药体积 10 mL/kg 体质量, 1 次/d, 每周 6 次, 连续 12 周, 至实验结束。模型组和正常组均 ig 同体积的生理盐水, 其余时间自由进食饮水。

2.3 标本留样

乌拉坦麻醉动物, 采血; 取肝脏称定质量之后,

做病理切片；少量肝脏组织用于组织匀浆测定酶含量及活性；其余肝组织剪碎，用于组织脱水，测定羟脯氨酸。所采血液取血清，测定血清学指标。

2.4 指标检测

2.4.1 动物的一般情况 观察整个实验过程中小鼠的精神状况、活动情况、进食情况、体质量变化情况。

2.4.2 肝组织形态学观察 (HE 染色) 常规石蜡切片，HE 染色和胶原染色，由同一人光镜下观察肝组织病理学改变，病理学分级标准：将纤维增生程度分为 0~IV 级^[3]。

2.4.3 羟脯氨酸 (Hyp) 的测定 用生物化学法测定肝组织中 Hyp 含量。用酸在高温下水解组织使结合状态的羟脯氨酸游离，用氯胺 T 将其氧化形成含吡咯环的氧化物，再用过氯酸终止氧化，然后氧化物与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物，该物质在 558 nm 处有最大吸收峰。

(1) 溶液的配制 取 10 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 11 mL 质量分数 60% 的过氯酸，实验前取 9 mL 该液，用 24 mL 异丙醇混合即得 ER 液。

三水醋酸 5.7 g，柠檬酸三钠 3.75 g，一水柠檬酸 0.55 g，先用水溶解，再加入 39.5 mL 异丙醇定容至 100 mL 即成醋酸-柠檬酸缓冲液，溶液 pH 为 6.5，滴加 1 mol/L HCl 调至 pH 6，即得醋酸-柠檬酸缓冲液。

先配成 20% 氯胺 T 储备液，用时把 20% 储备液用醋酸-柠檬酸缓冲液稀释成 0.56% 氯胺 T 溶液。

(2) 绘制标准曲线 用 50% 异丙醇配置不同浓度的 Hyp (分别含 Hyp 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.6 μg) 1.2 mL，再加 0.56% 氯胺 T 溶液 0.2 mL，放置 10 min，加入 ER 液 1 mL 混匀，50 °C 水浴 90 min，558 nm 波长处测定吸光度值，回归得方程 $Y=0.215 X+0.110$ ($R^2=0.992 8$)。结果表明 Hyp 在 0~1.6 μg 与吸光度值有良好的线性关系。

(3) 测定 称取 1.5~2.0 g 肝组织放于氯仿-甲醇 (2:1) 溶液中，每天换液一次，共 3 d，使肝组织脱水脱脂；研磨肝组织，60 °C 干燥过夜，直至恒质量，称取 20 mg 放入定做的 15 mL 安瓶，再加入 6 mol/L HCl 5 mL，用酒精喷灯封口，放于 110 °C 作用 24 h，冷却后滤过，取 50 μL 滤液，放入离心管中完全干燥；加 50% 异丙醇 1.2 mL，再加 0.56% 氯胺 T 溶液 0.2 mL 放置 10 min，加入 ER 液 1 mL 混匀，50 °C 水浴 90 min，在 558 nm 波长处测定吸

光度值。通过标准曲线得出肝组织中 Hyp 含量，再换算为肝组织胶原含量。

2.4.4 α-SMA 免疫组化及图像分析^[4] 石蜡切片脱蜡，灭活内源性过氧化物酶，修复抗原，封闭非特异性抗原，加特异性抗 α-SMA 单克隆抗体 (1:75 倍稀释) 和生物素化山羊抗小鼠 IgG 抗体，按自拟标准评定 α-SMA 阳性染色结果。

阳性染色程度分级分别为：“-”仅血管壁可见棕黄色阳性染色；“+”仅汇管区和中央静脉周围可见棕黄色阳性染色；“++”纤维隔中可见阳性染色，小叶内镜下 (200 倍) 每个视野内可见 1~3 个胞浆呈棕黄色阳性染色间质细胞；“+++”纤维隔中阳性染色较强，小叶内镜下 (200 倍) 每个视野内可见 4~6 个胞浆呈棕黄色阳性染色的间质细胞；“++++”纤维隔中强阳性染色广泛，小叶内镜下 (200 倍) 每个视野内可见 7 个以上胞浆呈棕黄色阳性染色的间质细胞。

2.4.5 检测肝星状细胞凋亡^[5] 分离石蜡组织部分，应用 DNA 连接酶，用链霉素-过氧化物酶共轭，在过氧化物酶基底里培养颜色，在显微镜下观察，按阳性染色程度计分。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，均数间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。单因素方差分析在总体上差异存在显著性，方差齐时，多组间比较采用 SNK (Students-Newman-Keuls) 法；方差不齐时，采用 Tamhane's T2 法。单向有序的计数资料采用 Ridit 分析。

3 结果

3.1 动物一般情况

正常组小鼠生长良好，活泼好动，饮食正常，体质量增长状况良好，皮毛柔顺有光泽；模型组小鼠精神差，活动少，皮毛松弛无光泽，消瘦；蒿鳖养阴软坚方和两个阳性组小鼠皮毛少光泽，消瘦但精神较好。造模结束后，处死动物解剖小鼠肝脏，可见模型组小鼠肝组织表面光亮度下降，颜色灰暗，边缘不规则，质韧，切割时有沙砾感。治疗组小鼠肝组织表面光亮度好，质稍韧。

3.2 对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织病理学影响

正常组小鼠肝脏肝板，未见纤维组织增生和炎性细胞浸润；模型组小鼠肝小叶结构破坏、纤维结缔组织增生、假小叶形成，增生的纤维组织中有许多炎性细胞浸润；蒿鳖养阴软坚方和两个阳性组中

小鼠仅汇管区有少量纤维增生，有少许炎性细胞浸润，肝细胞索放射状排列，未见假小叶形成。见图1。

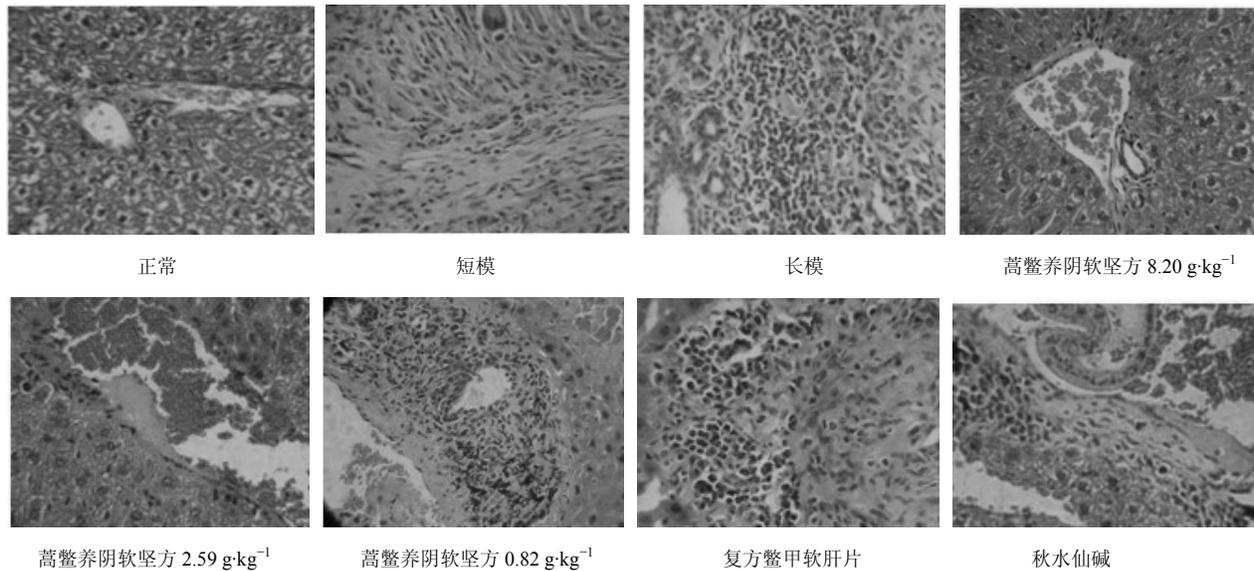


图1 血吸虫性肝纤维化小鼠肝脏 HE 染色

Fig. 1 HE staining of mouse liver fibrosis caused by schistosomiasis

3.3 对肝纤维化小鼠肝组织中 Hyp 含量的影响

短模组与正常组之间的 *t* 检验, $P=0.001$; 除短模组的各组间 One-Way ANOVA, $P=0.001$; 每两组间比较采用 Tamhane 检验。模型组小鼠肝组织 Hyp 含量显著高于正常组 ($P<0.01$), 蒿鳖养阴软坚方高、中剂量组明显低于模型组 ($P<0.01$), 见表1。

表1 蒿鳖养阴软坚方对血吸虫肝纤维化小鼠肝组织 Hyp 的影响

Table 1 Effect of Haobie Yangyin Ruanjian Prescription on contents of collagen in hepatic tissue of mice with schistosomal liver fibrosis

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数	Hyp/ (mg·g ⁻¹)
正常	—	8	0.24±0.27
模型(短模)	—	10	6.07±2.46**
模型(长模)	—	10	7.84±4.12**
蒿鳖养阴软坚方	8.20	11	1.88±1.62 [▲]
	2.59	15	2.18±2.16 [▲]
	0.82	14	3.09±2.73
复方鳖甲软肝片	0.54	14	3.19±1.54
秋水仙碱	0.1	12	2.57±2.11

与正常组比较: ** $P<0.01$ 与长模组比较: [▲] $P<0.05$
** $P<0.01$ vs normal group; [▲] $P<0.05$ vs long model group

3.4 肝组织中 α -SMA 表达的变化

HSC 激活而发生增殖, 转变为表达 α -SMA 的肌成纤维细胞, 并产生大量的 I 型胶原。在血吸虫肝纤维化模型小鼠肝组织中 α -SMA 表达广泛且特点相似, 在纤维间隔、肝窦、纤维间隔周围的肝细胞、汇管区和中央静脉等均可见表达, 显著高于正常组; 蒿鳖养阴软坚方高、中、低剂量组及秋水仙碱组的 α -SMA 的表达水平均低于模型组; 蒿鳖养阴软坚方高、中剂量组 α -SMA 的表达水平较秋水仙碱组低。实验证明蒿鳖养阴软坚方能显著降低 α -SMA 的表达。见图2。

3.5 肝星状细胞凋亡的检测

本实验检测了肝星状细胞的凋亡情况, 每张切片, 在四角和中央各选择2个视野, 共10个视野, 计肝星状细胞数目, 可以看到诱导肝星状细胞等间质细胞凋亡为主。选取蒿鳖养阴软坚方中剂量组作为常规用药组, 发现蒿鳖养阴软坚方中剂量组比模型组小鼠肝星状细胞数量显著减少, 凋亡的肝星状细胞数量增加, 蒿鳖养阴软坚方中剂量组和正常组小鼠肝星状细胞凋亡差异无显著性, 促进活化的肝星状细胞凋亡可减轻肝纤维化, 而抑制其凋亡会增强肝纤维化。所以促进活化的肝星状细胞凋亡从而减轻肝纤维化是蒿鳖养阴软坚方抗血吸虫性肝纤维化的另一重要机制, 见图3、表2。方差齐, 每

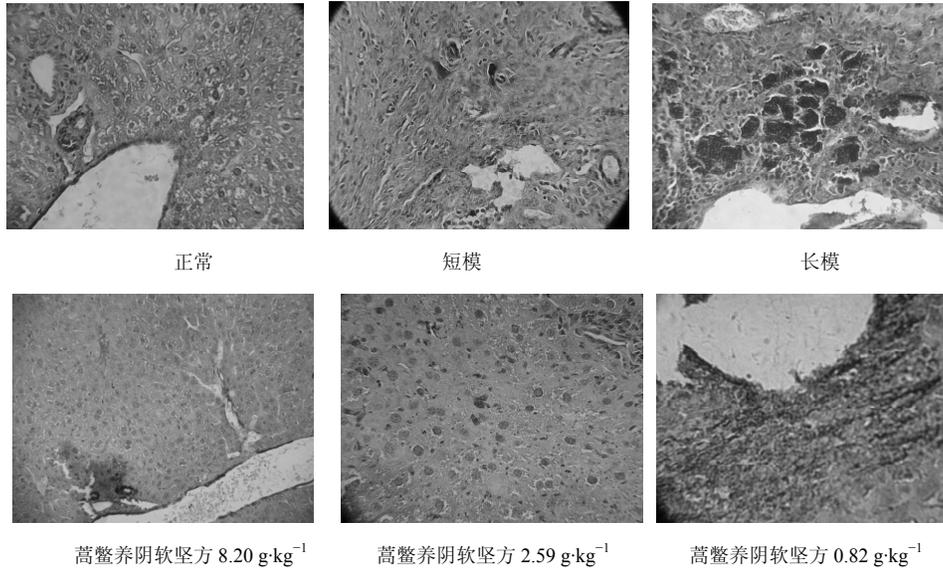


图 2 表达 α -SMA 的肌成纤维细胞

Fig. 2 Expression of α -SMA in fibroblasts

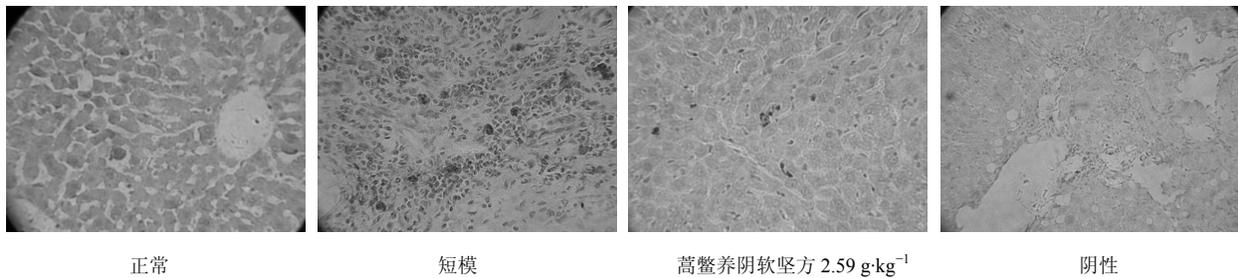


图 3 肝星状细胞的凋亡

Fig. 3 Cell apoptosis of hepatic HSC

表 2 蒿鳖养阴软坚方对血吸虫病肝纤维化肝星状细胞凋亡积分的影响 (n=3)

Table 2 Effect of Haobie Yangyin Ruanjian Prescription on integral of HSC apoptosis of liver fibrosis of mice with schistosomiasis (n=3)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	凋亡积分/(mg·g ⁻¹)
正常	—	0.000±0.000
模型(短模)	—	2.333±0.577*
模型(长模)	—	2.333±0.577*
蒿鳖养阴软坚方	2.59	5.000±0.000 ^{▲#}

与正常组比较: *P<0.05 与长模组比较: [▲]P<0.05 与短模组比较: [#]P<0.05

*P<0.05 vs normal group; [▲]P<0.05 vs long model group [#]P<0.05 vs short model group

2 组间比较, 采用 Games-Howell 检验。

4 讨论

4.1 降低肝组织病理损伤

肝组织病理学检查是确诊肝纤维化最可靠最直接的方法。结果显示, 经蒿鳖养阴软坚方治疗后,

仅汇管区有少量纤维增生, 有少许炎性细胞浸润, 肝细胞索放射状排列, 未见假小叶形成。各治疗组明显低于长模组, 并且蒿鳖养阴软坚方高剂量组的纤维化程度分期低于复方鳖甲软肝片及秋水仙碱组, 说明蒿鳖养阴软坚方可显著减轻肝组织纤维化的程度和范围。

4.2 降低肝组织中 Hyp 含量

Hyp 是组成机体胶原蛋白的一种特有的氨基酸, 除弹性蛋白含少量 Hyp 外, 几乎所有 Hyp 都存在于胶原中。因此 Hyp 含量的测定能间接反映肝纤维化胶原合成代谢情况, 进而反映器官纤维化的程度^[6]。肝纤维化不论发病机制如何, 形成过程如何, 最终的病理表现都是细胞外基质(主要是胶原蛋白)过多沉积在肝内。实验结果表明蒿鳖养阴软坚方减少了细胞外基质在肝内的沉积, 证实了蒿鳖养阴软坚方对血吸虫性肝纤维化小鼠是有效的。

4.3 HSC 的凋亡在抗肝纤维化中起的作用

肝纤维化的形成是一复杂的过程, 涉及多种细

胞及细胞因子之间的相互作用,其中HSC的激活和增生是肝纤维化形成和发展的关键因素。HSC激活并转化为肌成纤维细胞(myofibroblastic-like cell, MFLC)分泌大量细胞外基质是肝纤维化发生发展的核心环节。近年来的研究发现,进展期肝纤维化在去除损伤因子后可以经过一个较短时间的重塑过程恢复为正常肝脏组织结构,而这个过程得以发生的关键性因素就是诱导活化的HSC凋亡。HSC减少的原因可能有:(1)活化的HSC回复到静止细胞;(2)活化的HSC发生凋亡。目前认为主要以后者即活化的HSC发生凋亡,使过量活化的HSC数量减少,从而逆转肝纤维化。通过HSC的体内和体外研究发现,在HSC激活的过程中可以观察到HSC的凋亡现象,且随着激活过程的进展,凋亡数目所占的比例也逐渐增加。认为这种HSC的凋亡可能是肝纤维化过程中一种自身的保护和修复机制。

4.4 在血吸虫病肝纤维化中凋亡的检测方法^[7]

查阅有关抗血吸虫病肝纤维化文献,未见ISOL技术检测抗血吸虫病肝纤维化肝细胞凋亡的报道。TUNEL法检测肝细胞凋亡,假阳性相对较多;ISOL技术检测细胞凋亡用于组织化学染色的形态学资料分析是适宜的,T4 DNA连接酶可用于连接粘性末端和平末端,生化特异性强。ISOL检测技术在配套的快速结扎缓冲器中,室温下快速反应即可完成连接反应,使用方便、快捷,极大的缩短了试验时间。

4.5 蒿鳖养阴软坚方促进活化的HSC凋亡

本实验采用小鼠血吸虫病肝纤维化模型,以肝组织病理学检查、Hyp、 α -SMA免疫组化分析、ISOL技术检测细胞凋亡,来观察诱导凋亡在蒿鳖养阴软坚方治疗血吸虫病肝纤维化中的作用。研究结果显示,模型组 α -SMA免疫组化阳性染色面积明显增加,提示HSC已发生激活和转化,蒿鳖养阴软坚方

明显降低了 α -SMA的表达,病理改变明显好转,肝组织内 α -SMA表达明显减少,仅在汇管区和纤维间隔内有少量阳性细胞,纤维组织增生明显减轻,肝小叶基本正常。表明蒿鳖养阴软坚方对血吸虫病纤维化具有明显的拮抗作用,而降低 α -SMA表达,抑制HSC活化和增殖,减少肝内纤维组织增生可能是其发挥抗肝纤维化作用主要机制之一。

综上所述,蒿鳖养阴软坚方可显著减轻肝组织纤维化的程度和范围,显著降低肝组织胶原蛋白含量及 α -SMA水平,诱导活化的肝星状细胞凋亡,并呈现出一定的量效相关性,对血吸虫病肝纤维化有明确的治疗作用。

参考文献

- [1] 邢伟,孔维涵,方步武.蒿鳖养阴软坚方对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用[J].中草药,2010,41(10):1667-1672.
- [2] 杨凤蕊,娄建石,方步武.蒿鳖养阴软坚方抗CCl₄复合因素所致大鼠肝纤维化的作用[J].中草药,2011,42(3):530-534.
- [3] 王泰龄,刘霞,周元平等.慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案[J].中华肝脏病杂志,1998,6(4):195-197.
- [4] 谌辉,刘文琪,贺永文.罗格列酮对血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏TGF- β 1和 α -SMA表达的影响[J].中国病原生物学杂志,2007,2(4):130-132.
- [5] 朱剑君,赵晓贡,赵兰,等.放免法与酶标法对血吸虫病肝纤维化4项指标检测的效果分析[J].实用预防医学,2004,11(3):504-505.
- [6] 刘红艳,方步武.蒿鳖养阴软坚方对Con A诱导小鼠肝纤维化的预防作用[J].天津医药,2011,39(7):634-637.
- [7] 吕莹,张德禄,张宏,等.细胞凋亡检测方法研究进展[J].西北师范大学学报:自然科学版,2007,43(2):82-87.