

纳米脂质体制剂提高苦参碱去活化肝星状细胞作用研究

崔鲜伟^{1,2}, 邓桂明^{1*}, 欧阳林旗¹, 陈 镇¹, 何怡然¹, 孙文静¹, 王胜玫¹, 刘 涛¹

1. 湖南中医药大学第一附属医院 科研部, 湖南 长沙 410007

2. 湘潭市第一人民医院 药学部, 湖南 湘潭 411100

摘要: 目的 研究通过制备纳米脂质体提高苦参碱(matrine, MT)去活化肝星状细胞的体外作用效果。方法 制备不同载药量(5%、10%、20%)的苦参碱纳米脂质体(Nano-MT)并进行表征;分析药物体外释放行为;给予LX-2细胞不同浓度的Nano-MT(350.00、175.00、87.50、43.75、21.80、10.90、5.40、2.70、1.40 mmol/L),MTT法检测细胞存活率,计算半数抑制浓度(IC₅₀);考察MT、Nano-MT(10 mmol/L)对人肝脏星状细胞LX-2的去活化效果,细胞组化染色检测平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子- β (TGF- β)表达;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测 α -SMA、TGF- β 、成纤维细胞生长因子(FGF)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)mRNA表达。**结果** Nano-MT透射电镜表征下呈圆形颗粒状;载药量10%制剂载药量较高,粒径分布均一,稳定性好,满足给药需求;制剂中药物释放符合Higuchi方程($R^2=0.9513$),72 h左右药物释放量趋于饱和,累计释放量为92.3%。与对照组和MT组比较,Nano-MT组 α -SMA、TGF- β 阳性细胞数均显著下降($P<0.01$ 、 0.001), α -SMA、TGF- β 、FGF、FAP mRNA水平显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。**结论** Nano-MT具有一定的缓释作用;可以通过抑制 α -SMA表达去活化LX-2细胞抑制肝纤维化。

关键词: 苦参碱;纳米脂质体;缓释;肝星状细胞;去活化;平滑肌肌动蛋白;转化生长因子- β

中图分类号: R943, R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)01-0063-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.01.009

Study on nanoliposomal agents in improving effect of matrine on liver fibrosis

CUI Xianwei^{1,2}, DENG Guiming¹, OUYANG Linqi¹, CHEN Zhen¹, HE Yiran¹, SUN Wenjing¹, WANG Shengmei¹, LIU Tao¹

1. Administrative Department, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. The First People's Hospital of Xiangtan, Xiangtan, 411100, China

Abstract: Objective To study the effect of improving matrine (MT) on deactivating hepatic stellate cells and inhibiting liver fibrosis in vitro by nanoliposome delivery technology. **Methods** Matrine nanoliposomes (nano-MT) with different drug loading (5%, 10%, 20%) were prepared and characterized. The drug release behavior *in vitro* was analyzed. LX-2 cells were given different concentrations of nano-MT (350.00, 175.00, 87.50, 43.75, 21.80, 10.90, 5.40, 2.70, 1.40 mmol/L), the cell survival rate was detected by MTT method, and the half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. The expression of α -SMA and transforming growth factor- β (TGF- β) was detected by histochemical staining. The mRNA expression of α -SMA, TGF- β , fibroblast growth factor (FGF) and fibroblast activating protein (FAP) were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** Matrine loaded nanoliposome are round particles under transmission electron microscope characterization. The drug loading of 10% preparation was high, the particle size distribution was uniform, and the stability was good, which can meet the needs of drug delivery. Drug release profile of the formulation conforms to the Higuchi equation ($R^2 = 0.96513$). Drug release tends to 92.3% at time point of 72 h. Compared with control and MT group, the number of α -SMA and TGF- β positive cells in nano-MT group were significantly decreased ($P < 0.01$ and 0.001), and the mRNA levels of α -SMA, TGF- β , FGF and FAP were significantly decreased ($P < 0.01$ and 0.001). **Conclusion** Matrine loaded liposomes have good pharmaceutical properties and have a certain sustained

收稿日期: 2020-04-10

基金项目: 国家中医药管理局“中医药防治重大疑难疾病临床服务能力建设项目”(国中医药办规财发[2013]41号);湖南省高层次卫生人才“225”工程人才项目(湘卫函(2019)196号);湖南中医药大学药理学学科开放基金(2018YX05);湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJ033)

第一作者: 崔鲜伟(1991—),女,硕士研究生,研究方向为药理学。E-mail: djkedu@qq.com

*通信作者: 邓桂明,女,博士(后),研究员,研究方向为临床中医学。Tel: (0731) 85600783 E-mail: guimingd1004@163.com

release effect. The liposome can inhibit liver fibrosis by effectively inhibiting the expression of α -SMA in liver stellate cells, thereby inhibiting liver fibrosis.

Key words: matrine, nanoliposomes; slow-release; hepatic stellate cells; deactivation; α -SMA; TGF- β

苦参碱(MT)是豆科植物苦参的有效成分之一,具有多种临床药理活性,如镇痛、抗病毒、抗炎、抗纤维化和抗肿瘤等^[1-4]。MT的这些药理作用机制尚不明确,已有研究表明其通过抗氧化应激、调节免疫环境,抑制炎症反应^[5];通过调节细胞凋亡的级联反应等来阻断细胞信号转导,进而抑制组织纤维化、促进肿瘤细胞凋亡等^[6]。

肝纤维化是威胁人类健康安全的重大肝脏疾病之一,其病理过程复杂,多种致病因子如酒精、肥胖、药物、外伤、肝炎等导致肝内结缔组织异常增生^[7]。如果肝损伤因素长期存在,不经积极治疗,不及时去除,极易发展成肝硬化、肝癌,严重威胁患者的生命安全。目前对肝纤维化的治疗手段及治疗效果非常有限,有针对致病因素戒酒、抗乙肝、丙肝的抗病毒治疗等。针对肝纤维化本身,抑制肝星状细胞的增生和活化从而促进胶原的降解、抑制肝纤维化的进展具有重要的临床应用价值^[8]。

MT具有重要的抗肝炎、抑制慢性肝损伤、抗肝纤维化的临床应用潜力^[9]。但MT通过氧化应激和诱导细胞凋亡而引起的肝毒性副作用不容小觑,严重限制了其进一步的临床应用^[10]。本研究通过纳米脂质体制剂技术^[8]大大提高了MT的药理作用效果,为该药的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要试剂

1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino (polyethylene glycol) -2000] (DSPE-PEG-2000)(上海金畔生物科技有限公司);胆固醇(质量分数 $\geq 95.0\%$,上海鼓臣生物技术有限公司);MT(CAS 519-02-8,质量分数98%,上海源叶生物科技有限公司,5 g包装,批号S31035201406);MTT[3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide](北京百奥莱博科技有限公司);PCR试剂购于上海翌圣生物科技有限公司;细胞/组织总RNA提取试剂盒(货号19221ES50),cDNA合成试剂盒(货号11123ES60),SYBR Green高特异性定量预混液定量试剂盒(货号11196ES08)。 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体,货号AF1032,100 μ L,Affinity;转化生长因子- β (TGF- β)抗体,货号AF1027,100 μ L,Affinity;二抗Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) FITC-conjugated,货

号S0008,100 μ L。

1.2 主要仪器

动态光散射(DLS),Malvern Zetasizer Nano S;多功能酶标仪 EnVision,英国Perkin公司;实时荧光定量PCR仪,型号ABI7300,美国ABI公司。

1.3 细胞

人源肝星状细胞 LX-2,购于武汉普诺赛生命科技有限公司,培养基:DMEM高糖+10%FBS+1%双抗(青霉素加链霉素),培养条件:37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。

2 方法

2.1 纳米脂质体制备

DSPE-PEG2 000(相对分子质量2 805)和胆固醇(相对分子质量387)以10:1质量比(DSPE-PEG质量200 mg、胆固醇20 mg)混合溶于二氯甲烷,分别加入MT 10、20、40 mg(载药量分别为5%、10%、20%)后,40 $^{\circ}$ C旋蒸30 min除尽残留的有机溶剂。再加入水后超声水化5 min。然后分别过200、100 μ m的水系滤膜。得到MT纳米脂质体 Nano-MT。DLS测试粒径、粒径分布:取脂质体溶液0.5 mL左右加入到DLS样品池,设置DLS温度25 $^{\circ}$ C,平衡时间2 min,自动扫描即得脂质体粒径大小、粒径分布等信息。

2.2 纳米脂质体药物释放

取纳米脂质体3.0 mL置于透析膜内,放在20 mL的pH 7.4的PBS缓冲液中,磁力搅拌24 h。期间在10、30 min及1、2、4、8、16、24 h时各取缓冲液0.5 mL(每个取样点设置3个重复),高效液相色谱法(HPLC)检测缓冲液中MT的药物浓度,HPLC法参考文献报道^[11]。采用零级动力学方程、一级动力学方程、Nibergull以及Higuchi模型对制剂中药物的释放曲线进行拟合分析,根据得到的回归方程推断药物释放结果,进而分析药物的体外释放行为。

2.3 细胞毒性测定

LX-2细胞毒通过MTT法进行分析。取对数生长期的LX-2细胞按照每孔5 000个接种到96孔板内,12 h后吸除培养基,设置Nano-MT组和对照组,对照组以DMEM培养基培养不加药物,Nano-MT组每孔给予100 μ L不同浓度的Nano-MT(350.00、175.00、87.50、43.75、21.80、10.90、5.40、2.70、1.40 mmol/L),每个浓度设置6个复孔。48 h后吸除上清,每孔加入DMEM配制的质量浓度为1 mg/mL的

MTT溶液,培养箱内孵育4 h后吸除MTT溶液,每孔加入150 μ L DMSO溶解产生的结晶,10 min后用酶标仪检测570 nm处的吸光度,得到的结果通过Graphpad6.0软件分析计算Nano-MT对LX-2的半数抑制浓度(IC₅₀)值。另设对照组、Nano-MT(5、10、20 mmol/L)组,给药操作不变,光镜下观察细胞形态变化。

2.4 去活化LX-2效果评估

2.4.1 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 取对数生长期的LX-2细胞按照每孔 1×10^5 个接种到6孔板,设置对照组(给予空白脂质体)、MT(10 mmol/L)、Nano-MT(10 mmol/L)组,每个样品设置3个复孔。细胞接种12 h后加药,药物处理24 h后吸除培养液并按照试剂盒的说明裂解细胞、提取总RNA,提取的RNA用Nanodrop进行定量后依据cDNA合成试剂盒说明书逆转录成单链DNA,再通过SYBR Green高特异性定量预混液定量试剂盒进行qRT-PCR,分析 α -SMA和TGF- β 的基因表达水平。引物序列为 α -SMA(正向引物5'-CGATGCTCCCAGGGCTGTTT-3',反向引物3'-TTCGTCA CCCACGTAGCTGTCTTT-5');TGF- β (正向引物5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3',反向引物3'-AGCTGCTCCTCCACTTGGT-5');GAPDH(正向引物5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3',反向引物3'-CAAAGTTGTCATGGATGHACC-5')。成纤维细胞生长因子(FGF,正向引物5'-CCCTCTAGATCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG-3',反向引物5'-CCCTCTAGATCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG-3')成纤维细胞活化蛋白(FAP,正向引物5'-GGCATGAAGACTTGGGTAAAAATCG-3',反向引物5'-CGCTTAGTCTGACAAAGAGAAACACTG-3')。

2.4.2 细胞组化染色分析 取对数生长期的LX-2细胞按照每孔 1×10^4 个接种到6孔板内的细胞爬片上,细胞分组及给药同“2.4.1”项。药物处理24 h后吸除培养液,每孔加入2 mL 4%的多聚甲醛固定10~15 min,PBS洗净后加入 α -SMA、TGF- β 一抗孵育30 min,然后用PBS洗除一抗,加入荧光标记的二抗孵育30 min,再用PBS洗除二抗后加入少量DAPI染色液,覆盖样品即可,室温放置7 min后吸除DAPI染色液,用PBS或生理盐水洗净。显微镜观察(20 $\times$ 物镜观察即可,每个视野可以看到数百个细胞,便于统计分析),直接在荧光显微镜下观察或封片后在荧光显微镜下观察。

2.5 统计分析

采用Graphpad 6.0软件分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用完全随机分组设计的多样本均数比较进行统计学处理。

3 结果

3.1 Nano-MT制备与表征

不同载药量Nano-MT粒径结果如表1所示,脂质体外观澄清透亮,呈现蓝色乳光(图1)。如表1的DLS测试结果所示,在3个不同的载药量的制剂中,载药量5%组制剂粒径最小,但是由于载药量较低难满足后续实验的给药浓度需求;载药量20%组制剂载药量较高,纳米颗粒在透射电镜下观察发现少许聚集,DLS表征结果也表明粒径较大且大小分布不够均一;载药量10%组制剂载药量提高,粒径并没有明显变化,且粒径分布均一,稳定性好,满足给药需求。因此在后续的研究当中,选择10%载药量的制剂用于进一步的细胞毒和抑制肝星状细胞活化的分析。

表1 nano-MT性质表征

Table 1 Characterization of nano-MT by DLS

组别	载药量	粒径/nm	粒径分布
1	5%	80.93 $\pm$ 3.6	0.253
2	10%	89.56 $\pm$ 6.33	0.160
3	20%	115.64 $\pm$ 12.57*	0.320

与载药量5%、10%组比较:* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs with 5% and 10% drug loading groups

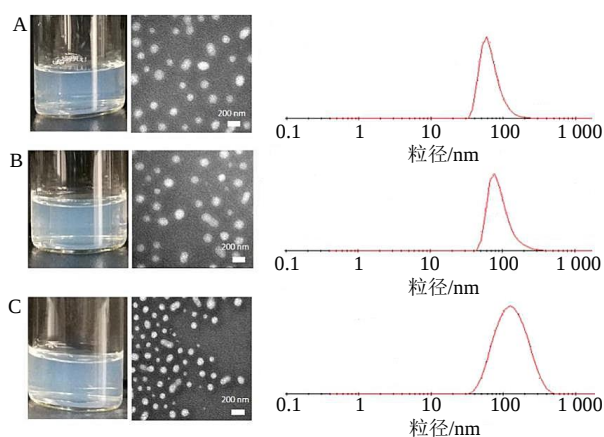


图1 载药量5%(A)、10%(B)、20%(C)的Nano-MT的外观及粒径

Fig. 1 Characterization of Nano-MT loaded with 5%(A), 10%(B) and 20%(C) with clear and uniform size distribution

3.2 Nano-MT药物释放行为

Nano-MT药物释放曲线(图2)显示,药物初期释放较快,随着时间的延长,释放逐渐放缓,这可能是因为药物在脂质体表面有一定的富集而引起药物

的快速释放,但是随着脂质体中药物扩散受限于纳米孔径的大小,药物释放减缓。72 h左右药物释放量趋于饱和,累计释放量为92.3%。如表2所示,MT体外释放曲线拟合最好的是Higuchi方程,得到曲线 R^2 为0.951 3。据此分析Nano-MT具有一定的缓释作用。这对减小游离MT的毒副作用,提高此纳米制剂的安全性具有重要的意义。

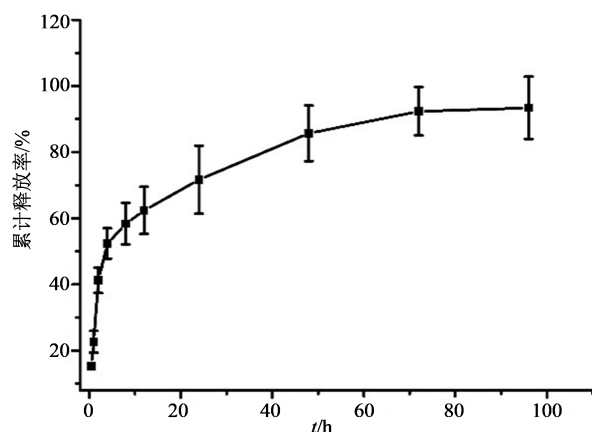


图2 Nano-MT中MT累积释放曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Drug release of nano-MT in liposome ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表2 MT体外释放拟合结果

Table 2 Fitting analysis results of drug release of formulation

	拟合结果	R^2
零级	$Q = 1.690 3 t$	0.781 0
一级	$Q = -0.030 6 t + 4.153 2$	0.877 7
Nibergull	$Q = -0.198 7 t^2 + 6.268 4 t + 19.824 5$	0.852 8
Higuchi	$Q = 8.992 7 t + 24.066 0$	0.951 3

3.3 Nano-MT细胞毒分析

MTT结果如图3所示,Nano-MT对LX-2的 IC_{50} 为19.5 mmol/L。随着药物浓度的增加,LX-2细胞形态受到明显的影响。基于细胞毒作用的分析,选取10 mmol/L作为后续实验的药物浓度,在此浓度下细胞状态有一定的改变又不会对细胞具有严重的杀伤作用。

3.4 Nano-MT去活化LX-2细胞

细胞荧光组化染色结果见图4,与对照组和MT组比较,Nano-MT组 α -SMA、TGF- β 阳性细胞数均显著下降($P < 0.01, 0.001$)。与对照组和MT组比较,Nano-MT组 α -SMA、TGF- β 、FGF、FAP mRNA水平显著降低($P < 0.01, 0.001$),见图5。

4 讨论

MT作为潜在的抗肝纤维化药物,同时具有一定的肝毒性作用。为了将MT推向进一步的临床试验,有必要通过更多的实验研究或者不同的制剂手段来降低其毒副作用,扩大治疗窗口,为临床应用提供有价值的参考。

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)在肝纤维化过程中扮演着非常关键的角色^[12]。在正常肝脏组织中,HSC处于休眠状态,能够分泌各种胶原蛋白(如黏连蛋白、胶原蛋白等),以及降解胶原蛋白所需要的各种酶(如 α -SMA、透明质酸酶、基质金属蛋白酶等),从而维持肝脏微环境细胞外基质的平衡的状态,保持细胞正常生物学功能^[13]。但是当肝脏受到外界损伤时,如慢性肝炎、酒精、药物刺激等,HSC会从静止状态活化变成激活态,这种激活状态表现为:(1)细胞外观形态由圆形或椭圆形变成“星形”; (2)胞内富含维生素A的脂滴丢

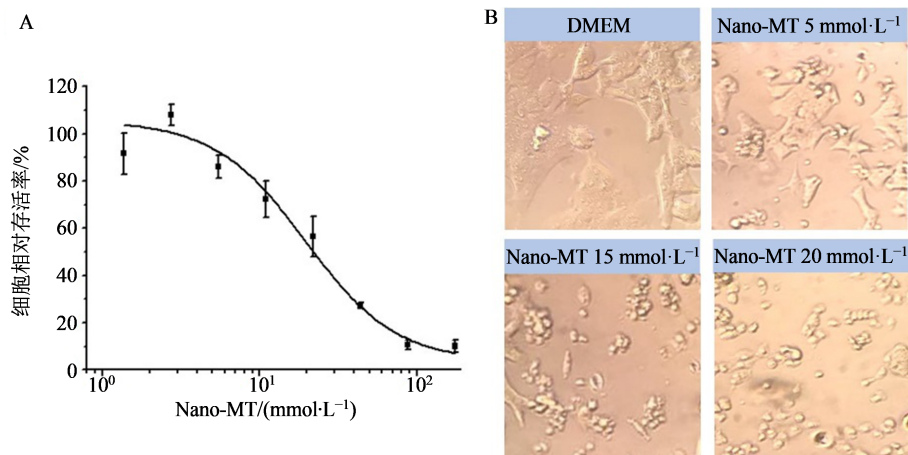
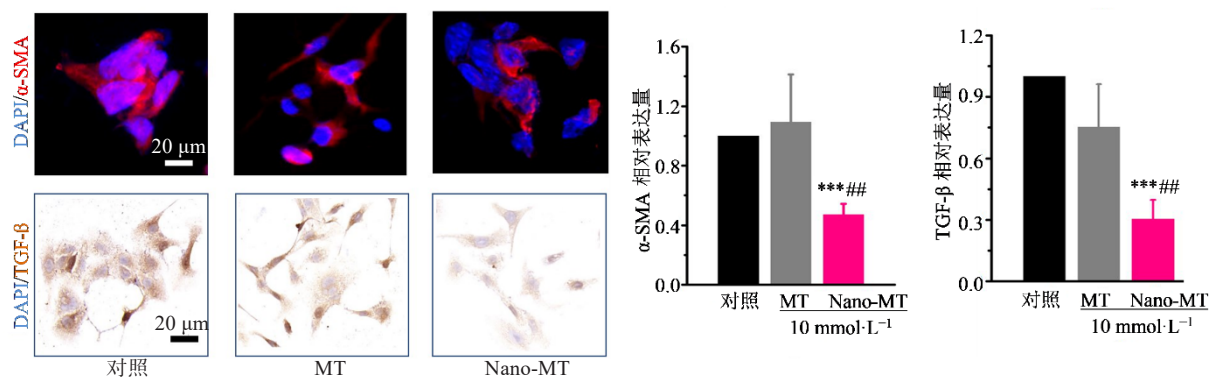


图3 Nano-MT对LX-2的细胞毒作用(A)及细胞状态的影响(B)($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 3 Cytotoxicity (A) of Nano-MT on LX-2 with change of cell morphology (B) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

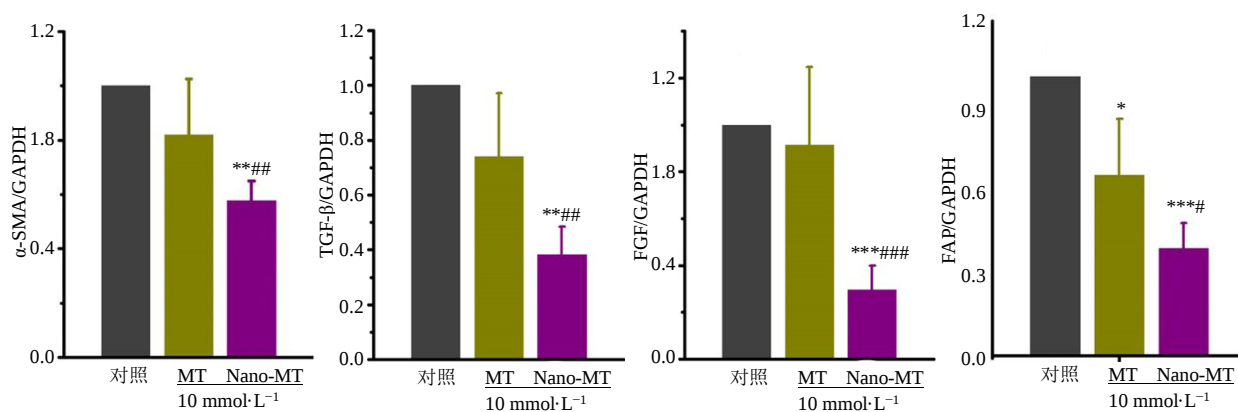


与对照组比较:*** $P < 0.001$;与MT组比较:## $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs MT group

图4 Nano-MT去活化LX-2的作用效果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Deactivation effect of Nano-MT on LX-2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与MT组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs MT group

图5 qRT-PCR分析Nano-MT去活化LX-2的作用效果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Deactivation effect of Nano-MT on LX-2 by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

失;(3)分泌大量的细胞外基质蛋白(如 α -SMA、透明质酸酶、基质金属蛋白酶);(4)分泌大量促细胞增殖的生长因子,促炎症因子(TGF- β 、PDGF、LIF、IL6等)。这种状态的改变使得肝脏损伤部位结缔组织增生,若不及时干预和治疗,极易逐渐发展成为肝硬化、肝癌,严重威胁人们的健康^[14]。因此,通过药物手段抑制肝星状细胞的活化,逆转星状细胞的生物学状态是一个潜在的治疗肝纤维化的有效靶。

在多种体内实验当中,MT类生物碱都能够有效抑制肝纤维化的进展,改善肝纤维化动物模型的血清肝功能和肝纤维化指标^[15-17]。但MT对肝星状细胞的作用效果鲜见于文献报道。本实验首先制备了粒径在100 nm左右的Nano-MT,并根据制剂的外观、粒径、稳定性等性质筛选出10%的载药量,其在纳米颗粒粒径,外观形态及稳定性方面都有较好

的药剂学性质。通过MT体外释放行为的分析,分析其可能的体内药剂学性质。体外释放曲线拟合结果表明,Nano-MT具有典型的缓释特性^[18-20],复合Higuchi拟合方程。前期的MT药物释放较快,后期药物释放明显减慢。这是因为MT在脂质体外层有部分聚集,随着装载的MT药物分子从脂质体纳米孔径中的释放扩散的困难性,药物释放明显减缓,且在72 h后才达到92%左右的累计释放率。对体内效果来说,初期快速释放的药物对有效抑制星状细胞的活化将迅速起效,且随着药物的缓释,有效药物的浓度保持时间较长,将会有更好的去活化效果。就药物缓释这一良好的结构制剂学性质而言,Nano-MT可以通过静脉注射给药,未来可以避免口服药物自身诱导代谢的弊端,从而提高一定的靶向性。

为了进一步验证Nano-MT对LX-2的去活化作

用,先通过MTT法分析其对细胞的 IC_{50} 为19.5 mmol/L,在不杀伤细胞且会对细胞形态有显著作用的前提下,选择10 mmol/L作为后续去活化星状细胞的浓度。在此浓度下,qRT-PCR以及细胞荧光组化染色结果都表明,与游离MT药物相比,nano-MT具有更好的去活化LX-2效果。作为LX-2活化的重要的标记物,通过qRT-PCR分析可知, α -SMA的mRNA表达水平显著降低,与对照组相比,降低了2倍,与MT游离药物相比降低了1.6倍,表明Nano-MT较MT去活化LX-2的作用效果有显著的提升。由于去活化LX-2而引起的细胞分泌因子的水平改变,TGF- β 和FGF明显的降低,胶原蛋白FAP沉积明显减少,进一步验证了LX-2去活化的作用效果。另一方面,细胞荧光组化染色的结果同样说明, α -SMA阳性的细胞数量显著降低,光密度定量分析结果显示,与对照组相比Nano-MT组 α -SMA的表达降低了2.5倍,与游离的MT药物相比降低了2.6倍。而游离的MT与对照组相比没有显著性差异,这是由于细胞对纳米脂质体制剂的内吞作用明显大于游离的MT药物。Nano-MT对于细胞生长因子如TGF- β 、FGF皆有明显的降低作用,这说明由于去活化LX-2,不仅会显著抑制LX-2细胞本身增殖和转移,也会进一步影响星状细胞与其他细胞之间的信号交流,从而抑制由于星形细胞活化而造成的临近肝细胞、免疫细胞等进一步增殖和分化,为后续进一步研究其去活化机理、体内去活化星状细胞的作用效果以及抗肝纤维化作用效果提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨丽,邓扬鸥,吴世星,等. MT镇痛作用及其阿片受体非相关性的研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3): 998-1001.
Yang L, Deng Y O, Wu S X, et al. Study on analgesic effect of matrine and non-correlation to opioid receptors [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(3): 998-1001
- [2] Huang J, Xu H. Matrine: Bioactivities and structural modifications [J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16(28): 3365-3378.
- [3] 朱丹丹,姚树坤. 苦参碱对人肝癌细胞HepG2荷瘤裸鼠的抑瘤作用研究[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(6): 736-741.
Zhu D D, Yao S K. Anti-tumor effect of matrine on human hepatocarcinoma cell HepG2 tumor in nude [J]. Drug Clin, 2016, 31(6): 736-741.
- [4] 晁荣,胡晓燕,朱生东,等. 苦参碱联合化疗药物对人急性髓系白血病HL-60细胞增殖及侵袭力的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(11): 2910-2913.
Chao R, Hu X Y, Zhu S D, et al. Effects of matrine combined with chemotherapeutic drugs on proliferation and invasion of human acute myeloid leukemia HL-60 cells [J]. World Chin Med, 2019, 14(11): 2910-2913.
- [5] 范临夏,潘辉,王小军,等. 苦参碱抑制支气管哮喘大鼠炎症反应、调节Th1/Th2免疫平衡作用研究[J]. 临床内科杂志, 2015, 32(7): 487-490.
Fan L X, Pan H, Wang X J, et al. Study on the effect of matrine on suppressing inflammation and regulating Th1/Th2 balance in asthmatic rats [J]. J Intern Med, 2015, 32(7): 487-490.
- [6] 杨静波,李宏杰. 苦参碱和氧化苦参碱对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(9): 1067-1069.
Yang J B, Li H J. Effects of matrine and oxymatrine matrine on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 34(9): 1067-1069.
- [7] 徐明翠,张峰,诸葛宇征. 肝纤维化发生发展机制的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(9): 1806-1809.
Xu M C, Zhang F, Zhuge Y Z. Current research status of mechanisms of the development and progression of liver fibrosis [J]. J Clin Hepat, 2016, 32(9): 1806-1809.
- [8] 张文娟,陈一桢,唐兰如,等. 二氢杨梅素长循环纳米脂质体的制备及大鼠体内药动学研究[J]. 中草药, 2018, 49(4): 806-813.
Zhang W J, Chen Y Z, TANG L R, et al. Preparation of long-circulating dihydromyricetinliposomes and its pharmacokinetics in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(4): 806-813.
- [9] 张明发,沈雅琴. 氧化苦参碱抗慢性肝损伤的药理作用及其机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(7): 1466-1473.
Zhang M F, Shen Y Q. Research advances on effects of oxymatrine against chronic liver injuries [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(7): 1466-1473.
- [10] 张明发,沈雅琴. 苦参碱类生物碱的毒性研究进展[J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 682-691.
Zhang M F, Shen Y Q. Research progress on toxicity of matrine-type alkaloids [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(4): 682-691.
- [11] 于敏,焦连庆,焦安妮,等. HPLC法测定金钻智胶囊中氧化苦参碱的含量[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(5): 681-683.
Yu M, Jiao L Q, Jiao A N. Determination of Oxymatrine in Jin Zuanzhi Capsule by HPLC [J]. Chin J Tradit Med

- Sci Technol, 2019, 26(5):681-683.
- [12] 胡倩, 梁健, 邓鑫, 等. 星状细胞的激活与凋亡对肝纤维化的影响 [J]. 大众科技, 2015, 17(11): 78-81.
- Hu Q, Liang J, Deng X, et al. Effect of stellate cell activation and apoptosis of liver fibrosis [J]. Pop Sci Technol, 2015, 17(11):78-81.
- [13] Takaaki H, Scott L F, Yujin H. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121: 27-42.
- [14] Chen Z J, Jain A, Liu H, et al. Targeted drug delivery to hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 370(3): 695-702.
- [15] 劳远翔, 贺福初, 姜颖. 肝星状细胞的去活化机制与抗肝纤维化治疗 [J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(1):77-80.
- Lao Y X, He F C, Jiang Y. Deactivation mechanisms of hepatic stellate cells and their implications for anti-hepatic fibrosis therapy [J]. Chin J Hepatol, 2015, 23(1): 77-80.
- [16] 余小虎, 朱金水, 朱祖明, 等. 氧化苦参碱对肝纤维化大鼠肝组织细胞因子表达水平的影响 [J]. 实用肝脏病杂志, 2006, 9(5): 257-259.
- Yu X H, Zhu J S, Zhu Z M, et al. Effect of oxymatrine on the hepatic expressions of cytokines in rats with hepatic fibrosis [J]. J Pract Hepatol, 2006, 9(5): 257-259.
- [17] 智信, 陈晓, 苏佳灿. 苦参碱药理作用研究进展 [J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(1): 123-127.
- Zhi X, Chen X, Su J C. Study of Pharmacological Effects of Matrine [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2017, 40(1): 123-127.
- [18] 张明发, 沈雅琴. 氧化苦参碱治疗肝纤维化的临床评价研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(12): 2484-2491.
- Zhang M F, Shen Y Q. Research advances of clinical evaluation on oxymatrine for treatment of hepatic fibrosis [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(12): 2484-2491.
- [19] 管庆霞, 张悦, 邹淑君, 等. 马钱子碱纳米结构脂质载体的表征及体外释放行为分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(8): 66-70.
- Guan Q X, Zhang Y, Zou S J, et al. Analysis on characterization and *in vitro* release behaviors of brucine nanostructure lipid carrier [J]. Chin J Inform Tradit Chin Med, 2019, 26(8): 66-70.
- [20] 魏晓慧, 徐宇虹. 脂质体纳米药物的"成分-结构-性质"关系研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(10): 1126-1135.
- Wei X H, Xu Y H. Study on the "Composition-structure-function" relationship of nanoliposomal drugs [J]. Chin J Pharm, 2019, 50(10): 1126-1135.

[责任编辑 兰新新]