

丹参滴丸对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及其作用机制

刘兆凤¹, 胡金芳^{1,2}, 马洁³, 刘静², 王晶晶², 申秀萍^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300301

3. 天津天士力制药股份有限公司, 天津 300402

摘要: 目的 观察丹参滴丸对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化的保护作用, 并探讨其作用机制。方法 除对照组外, 其余各组大鼠用 CCl₄ 复合因素法诱导肝纤维化大鼠模型, 丹参滴丸各组同时 ig 给予丹参滴丸 700、350、175 mg/kg, 阳性对照组给予扶正化瘀胶囊 1 500 mg/kg, 每天给药 1 次, 连续给药 7 周, 正常大鼠给予蒸馏水作为对照组。测定各组大鼠血清中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 的活性及总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、IV 型胶原的水平; 测定肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 和羟脯氨酸 (Hyp) 的量; HE 和 Masson 染色观察肝组织病理形态学改变; 免疫组化法检测 α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 的表达。结果 丹参滴丸能明显抑制肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST、NAG 活性的升高, 降低 IV 型胶原的量, 增加 TP 和 ALB 的量; 降低肝组织中 Hyp 和 MDA 的量, 提高 SOD 的活性, 抑制胶原纤维的增加, 亦能降低 α-SMA 的表达。结论 丹参滴丸有明显的抗肝纤维化作用, 其作用机制与其抗脂质过氧化、抑制胶原纤维的增加及降低 α-SMA 的表达等密切相关。

关键词: 丹参滴丸; CCl₄; 肝纤维化; 脂质过氧化; 胶原纤维; α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1991-06

Effect of Danshen Dropping Pills on hepatic fibrosis in rats induced by carbon tetrachloride and its mechanism

LIU Zhao-feng¹, HU Jin-fang^{1,2}, MA Jie³, LIU Jing², WANG Jing-jing², SHEN Xiu-ping²

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

2. Tianjin Center for Drug Safety Assessment and Research, Tianjin 300301, China

3. Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China

Abstract: Objective To study the protective effect of Danshen Dropping Pills (DDPs) on hepatic fibrosis in rats induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and its mechanism. **Methods** The hepatic fibrosis rat model was established by CCl₄ composited factor. The rats in DDPs group were ig administrated with DDPs (700, 350, and 175 mg/kg), the rats in positive control group with Fuzhenghuayu Capsule (1 500 mg/kg), once daily for seven weeks, and the rats in control group with distilled water. The activities of alanine transaminase (ALT), aspartate transferase (AST), and N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG), and the contents of total protein (TP), albumin (ALB), and collagen type IV in serum of rats were examined; Meanwhile, superoxide dismutase (SOD) activities and the levels of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (Hyp) were determined; Then, the morphological changes of liver pathology were also observed by HE and Masson stainings, and the expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) in the liver tissue was analysed by immunohistochemical staining. **Results** DDPs could inhibit the increasing of ALT, AST, and NAG activities in serum of rats with hepatic fibrosis, decrease the level of collagen type IV, increase the contents of TP and ALB, lower the Hyp and MDA levels, improve the SOD activities in liver tissue, suppress the collagen fibers increasing, and reduce the expression of α-SMA as well. **Conclusion** DDPs have obviously protective effects on the hepatic fibrosis of rats, which may be closely related to the antiperoxidation of lipid, inhibition on the collagen fibers increasing, and reduction of the expression of α-SMA, etc.

Key words: Danshen Dropping Pills (DDPs); CCl₄; hepatic fibrosis; peroxidation of lipid; collagen fibers; α-smooth muscle actin (α-SMA)

收稿日期: 2012-02-16

作者简介: 刘兆凤 (1985—), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向为药理毒理学。Tel: 15900392402 E-mail: zhaofeng819@yeah.net

*通讯作者 申秀萍 Tel: (022)84845266 E-mail: shenxp@tjipr.com

肝纤维化是肝硬化的必经阶段,目前临床上对肝纤维化的治疗尚缺乏有效药物,细胞因子类、抗氧化剂等多种类型的药物已被用于实验研究,但治疗效果却不理想^[1-4]。近年来,中药抗肝纤维化的作用日益受到重视,并已显现出良好的应用前景^[5-8]。丹参滴丸具有活血化瘀、理气止痛的功效,组分为丹参,丹参具有抗肝纤维化的作用^[9]。本实验采用 CCl₄ 致肝纤维化大鼠模型,研究丹参滴丸对肝纤维化的保护作用及其机制,为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹参滴丸(每丸含丹参素 47.8 mg,总酚酸以丹参素计为 485.3 mg),批号 100101,天津天士力制药股份有限公司产品;扶正化瘀胶囊,批号 100403,上海黄海制药有限责任公司,实验时用蒸馏水配制成混悬液。丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总蛋白(TP)及白蛋白(ALB)测定试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(Hyp)、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;IV型胶原试剂盒,美国 Adlitteram Diagnostic 实验室;α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)小鼠单克隆抗体,Abcam 公司;超敏二步法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒,北京中杉金桥生物公司;CCl₄,天津天河化学试剂厂。

1.2 动物

雄性 Wistar 大鼠,体质量 140~160 g,天津市山川红实验动物科技有限公司提供,许可证号 SCXK(津)2009-0001。

1.3 仪器

LXJ—IIB 型低速大容量多管离心机,上海安亭科学仪器有限公司;Sunrise 酶标仪,奥地利日升公司;PL203 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;日立 7080 全自动生化仪,日本日立株式会社;Olympus BH—2 普通光学显微镜,日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 模型制备

除对照组外,其余大鼠首次 sc 纯 CCl₄ 5 mL/kg,以后每隔 3 天 sc 40%CCl₄ 橄榄油 3 mL/kg,连续 7 周。前 2 周喂饲 20%猪油加 0.5%胆固醇的玉米粉饲料,在 3~6 周喂饲单纯玉米粉饲料。

2.2 分组、给药及样本采集

大鼠随机分为 6 组:对照组(10 只),模型组

(16 只),扶正化瘀胶囊(1 500 mg/kg)阳性对照组(16 只),丹参滴丸(700、350、175 mg/kg,其中中剂量相当于临床等效量)组(每组 16 只)。各给药组均于造模当日起每天 ig 相应药物 1 次,连续给药 7 周,对照组和模型组给予蒸馏水(10 mL/kg)。末次给药 1 h 后,戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血,离心收集血清备用。迅速取同一部位肝组织,固定于 12%福尔马林中,用于 HE 染色、Masson 染色;取另一部位肝组织固定于 10%福尔马林中,用于免疫组化染色;剩余肝组织用生理盐水制成 10%肝组织匀浆,用于检测 SOD 活性与 MDA、Hyp 水平。

2.3 血清及肝组织生化指标检测

按相应试剂盒说明,检测血清 ALT、AST、TP、ALB、NAG、IV 型胶原的水平以及肝组织中 SOD 活性与 MDA、Hyp 的量。

2.4 免疫组化方法检测肝组织中 α-SMA 的表达

肝组织石蜡包埋,切片,常规脱蜡、水化,PBS 洗 15 min,3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,室温孵育 10 min,PBS 洗 15 min,置 0.01 mol/L 枸橼酸钠盐缓冲溶液中于电磁炉修复 15 min。自然冷却后 PBS 洗 15 min,甩去多余液体,滴加 α-SMA(1:100)单抗,37 °C 孵育 1 h;PBS 洗 15 min,滴加 Polymer Helper,37 °C 孵育 20 min;PBS 洗 15 min,滴加 poly-HRP 鼠抗 IgG 抗体,37 °C 孵育 20 min;PBS 洗 15 min,DAB 显色,自来水冲洗 10 min。苏木素复染,脱水,透明,封片,镜检。α-SMA 阳性染色呈棕黄色,采用 Image-Proplus 6.0 图像分析软件分析图像,每张切片随机取 5 个视野,记录每个视野的积分吸光度,其值越大,表明阳性表达产物越强。

2.5 肝组织病理学观察

HE 和 Masson 染色后,光学显微镜下观察(×100)肝脏纤维化程度并进行半定量分析。肝细胞纤维化分级标准:“-”,正常肝脏,汇管区内极少量纤维结缔组织,为正常结构成分;“+”,汇管区、小叶中央静脉周围胶原纤维增生,中央静脉及门静脉有少量纤维束放散延伸,但无纤维间隔形成,小叶结构仍保存;“++”,胶原纤维增生,中央静脉和门静脉区纤维束向周围延伸,形成不完全间隔,小叶结构大部分保留;“+++”,胶原纤维大量增生,有少量薄的完全间隔形成,小叶结构破坏;“++++”,完全间隔增厚,假小叶形成。

2.6 统计学处理

所有数据均采用统计软件 SPSS 11.5 进行统

计学分析,以 *t* 检验分析组间差异,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,病理组织的病变程度采用 SPSS 11.5 NPar Tests Mann-Whitney Test 分析,并采用 Excel 作图。

3 结果

3.1 对肝纤维化大鼠血清生化指标的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST 水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), ALB、TP 的量显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较,丹参滴丸中、低剂量组大鼠血清 ALT、AST 水平明显降低 ($P <$

0.05), TP、ALB 的量则明显升高 ($P < 0.05$); 扶正化瘀胶囊组血清 ALT、AST 水平也明显下降,但对 TP、ALB 的作用不明显。结果见表 1。

3.2 对肝纤维化大鼠血清 NAG 和 IV 型胶原的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清 NAG 水平明显升高 ($P < 0.01$), IV 型胶原水平升高。与模型组比较,丹参滴丸各剂量组及扶正化瘀胶囊组血清 NAG 水平显著下降 ($P < 0.01$), 且丹参滴丸中、低剂量组血清 IV 型胶原水平也明显下降 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 1 丹参滴丸对肝纤维化大鼠血清 ALT、AST、TP 和 ALB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of DDPs on ALT, AST, TP, and ALB levels in serum of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	ALB / (g·L ⁻¹)	TP / (g·L ⁻¹)
对照	—	10	35.49 ± 6.99	159.40 ± 20.74	32.90 ± 1.08	58.26 ± 3.08
模型	—	9	97.28 ± 54.80 ^{▲▲}	238.54 ± 92.11 [▲]	27.19 ± 3.53 ^{▲▲}	47.49 ± 4.38 ^{▲▲}
丹参滴丸	700	9	68.94 ± 25.62	178.82 ± 24.61	29.78 ± 2.17	51.19 ± 3.46
	350	10	40.85 ± 12.59 [*]	153.88 ± 23.99 [*]	30.58 ± 1.77 [*]	53.05 ± 3.11 [*]
	175	9	46.52 ± 11.60 [*]	165.84 ± 24.37 [*]	30.78 ± 1.23 [*]	52.34 ± 1.40 [*]
扶正化瘀胶囊	1 500	10	33.75 ± 2.95 ^{**}	152.02 ± 11.64 [*]	29.51 ± 1.45	50.46 ± 2.29

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 表 3 同

[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as Table 3

表 2 丹参滴丸对肝纤维化大鼠血清中 NAG 和 IV 型胶原水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of DDPs on levels of NAG and collagen type IV in serum of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	NAG / (U·L ⁻¹)	IV 型胶原 / (ng·mL ⁻¹)
对照	—	10	24.37 ± 8.18	0.61 ± 0.15
模型	—	9	38.15 ± 7.43 ^{▲▲}	1.05 ± 0.71
丹参滴丸	700	9	27.32 ± 6.46 ^{**}	0.87 ± 0.45
	350	10	25.10 ± 8.18 ^{**}	0.48 ± 0.17 [*]
	175	9	27.23 ± 5.27 ^{**}	0.45 ± 0.06 [*]
扶正化瘀胶囊	1 500	10	21.11 ± 10.05 ^{**}	0.54 ± 0.21

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.3 对肝纤维化大鼠肝组织中 SOD 活性及 MDA 和 Hyp 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠肝组织中 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$), MDA、Hyp 的量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,丹参滴丸各剂量组大鼠肝组织中 SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$), 低剂量组 MDA 水平明显降低 ($P < 0.05$), 各剂量组 Hyp 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 扶正化瘀胶囊组大鼠肝组织中 Hyp 的量也显著减少 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

3.4 对肝纤维化大鼠肝组织中 α -SMA 表达的影响

对照组大鼠肝组织 α -SMA 阳性染色仅见于

血管壁。模型组大鼠肝组织 α -SMA 阳性表达较对照组明显增强, 阳性染色广泛表达于纤维间隔、血管壁以及纤维组织增生区, 胆管细胞无表达。丹参滴丸各剂量组大鼠肝组织中 α -SMA 阳性染色分布区与模型组相似, 但黄染区域有所减少。积分吸光度测定结果显示, 与对照组比较, 模型组积分吸光度值明显增大 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 丹参滴丸中、低剂量组积分吸光度值明显减小 ($P < 0.05$), 表明丹参滴丸能对抗肝纤维化大鼠肝组织中 α -SMA 表达的增强。结果见图 1 和表 4。

表 3 丹参滴丸对肝纤维化大鼠肝组织中 SOD 活性及 MDA 和 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of DDPs on SOD activities and levels of MDA and Hyp in liver tissue of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	SOD / (U·mL ⁻¹)	MDA / (nmol·mg ⁻¹)	Hyp / (μg·g ⁻¹)
对照	—	10	62.01 ± 13.48	1.11 ± 0.24	126.89 ± 13.48
模型	—	9	45.06 ± 13.11 [▲]	4.98 ± 2.60 ^{▲▲}	241.11 ± 56.03 ^{▲▲}
丹参滴丸	700	9	57.01 ± 9.14 [*]	3.63 ± 1.39	176.58 ± 56.72 [*]
	350	10	58.11 ± 11.02 [*]	3.67 ± 2.37	175.49 ± 34.79 ^{**}
	175	9	58.16 ± 5.60 [*]	2.12 ± 0.41 [*]	156.12 ± 31.01 ^{**}
扶正化瘀胶囊	1 500	10	54.17 ± 8.18	4.02 ± 2.17	164.26 ± 38.71 ^{**}

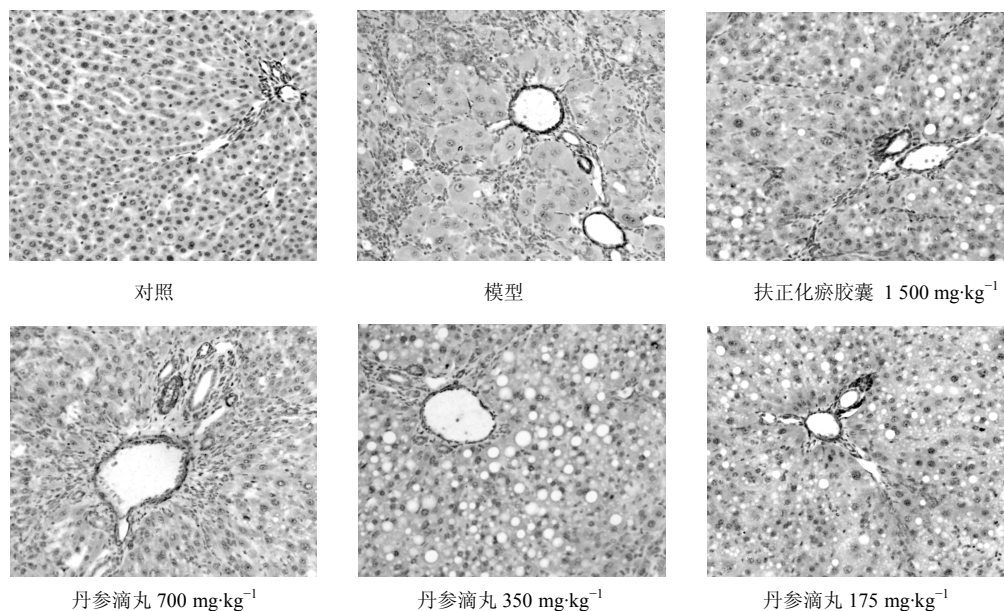


图 1 丹参滴丸对肝纤维化大鼠肝组织中 α -SMA 表达的影响

Fig. 1 Effects of DDPs on expression of α -SMA in liver tissue of rats with hepatic fibrosis

表 4 丹参滴丸对肝纤维化大鼠肝组织中 α -SMA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of DDPs on expression of α -SMA in liver tissue of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	积分吸光度 ($\times 10^2$)
对照	—	10	5.08 ± 0.81
模型	—	9	20.54 ± 6.71 [▲]
丹参滴丸	700	9	12.12 ± 2.92
	350	10	9.75 ± 1.68 [*]
	175	9	8.39 ± 1.25 [*]
扶正化瘀胶囊	1 500	10	9.62 ± 3.53 [*]

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[▲] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.5 对肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响

对照组大鼠肝脏肝小叶结构完整, 组织结构清晰, 肝细胞形态正常并以中央静脉为中心成条索状排列, 肝窦清晰, 较大汇管区有极少量纤维组织存在, 为正常结构。模型组大鼠肝脏肝小叶均有不同程度的破坏, 肝细胞排列紊乱, 汇管区、中央静脉、门静脉均有不同程度的纤维组织增生, 提示肝纤维化造模成功。丹参滴丸各剂量组亦有上述病变, 但病变程度明显轻于模型组。将大鼠肝纤维化程度分级结果进行等级资料的显著性检验, 结果显示, 丹参滴丸各剂量对大鼠肝纤维化均有不同程度的改善作用 ($P < 0.05$ 、 0.01), 扶正化瘀胶囊的作用则不明显 ($P > 0.05$), 结果表明丹参滴丸对肝纤维化大鼠有明显的保护作用。结果见图 2、3 及表 5。

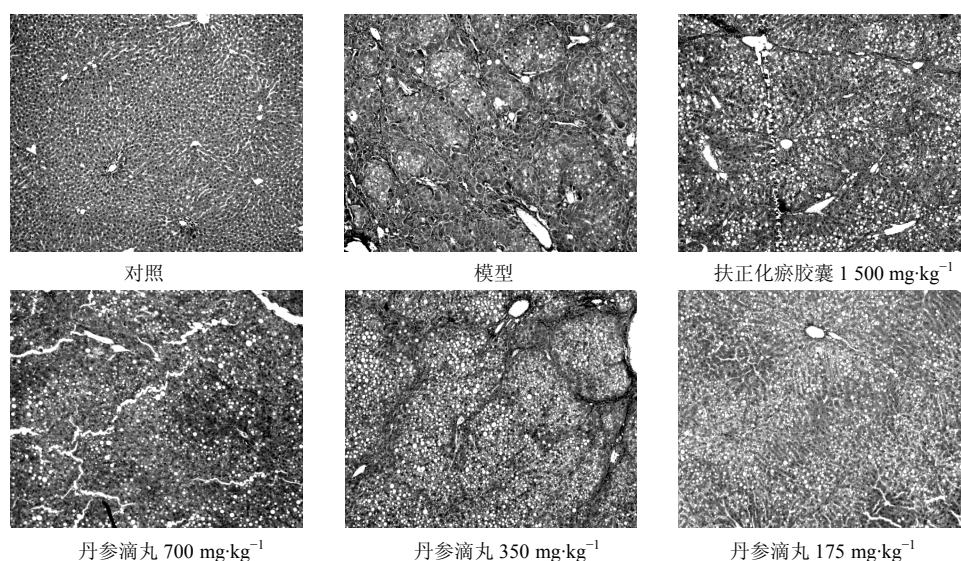


图 2 丹参滴丸对肝纤维化大鼠肝组织病理形态的影响 (HE 染色)

Fig. 2 Effects of DDPs on pathological morphology of liver tissue in rats with hepatic fibrosis (HE staining)

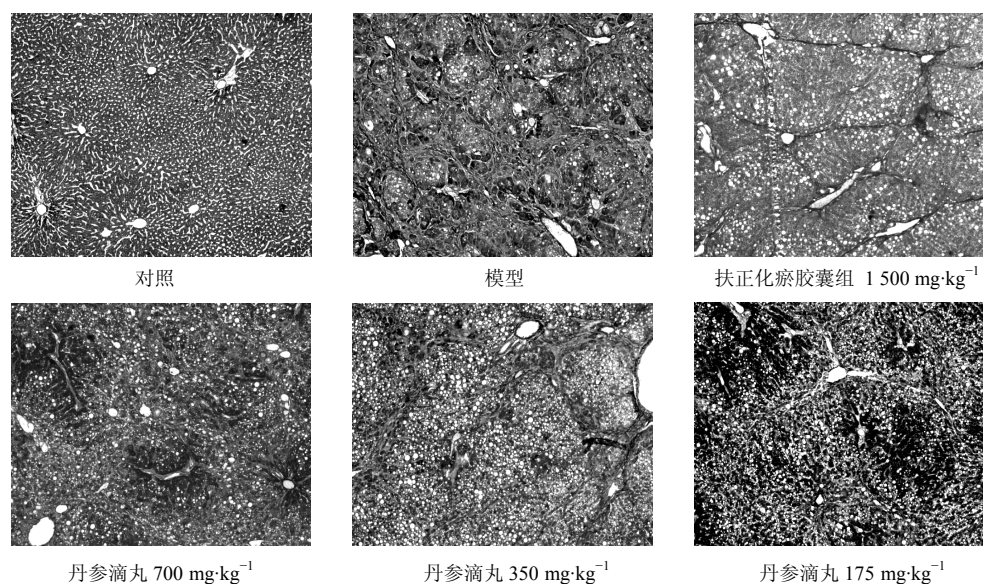


图 3 丹参滴丸对肝纤维化大鼠肝组织病理形态的影响 (Masson 染色)

Fig. 3 Effects of DDPs on pathological morphology of liver tissue in rats with hepatic fibrosis (Masson staining)

表 5 丹参滴丸对肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响

Table 5 Effects of DDPs on pathological changes of liver tissue in rats with hepatic fibrosis

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	肝纤维化程度 / 只					P
			-	+	++	+++	++++	
对照	—	10	10	0	0	0	0	0
模型	—	9	0	0	1	7	1	—
丹参滴丸	700	9	0	2	4	2	1	0.045*
	350	10	0	2	5	2	1	0.028*
	175	9	0	4	5	0	0	0.000**
扶正化瘀胶囊	1 500	10	0	3	3	3	1	0.056

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

4 讨论

本实验采用 CCl₄ 致肝纤维化大鼠模型, 研究丹参滴丸对肝纤维化的保护作用及其机制。由于 CCl₄ 诱导形成的纤维化自愈倾向明显, 故采用预防给药方式。结果表明, 丹参滴丸可明显抑制 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST 的升高, 增加 TP、ALB 合成, 且中、低剂量效果明显, 表明丹参滴丸具有保护肝细胞、抑制肝损伤的作用。

肝纤维化发生的关键是肝星状细胞 (hepatic stellate cell) 的激活和细胞外基质的过度沉积, 活化的肝星状细胞大量增殖, 并转化为肌成纤维细胞, 进而产生大量的细胞外基质^[10]。胶原是细胞外基质的主要组分, 而 Hyp 是胶原蛋白的主要成分, 在纤维化过程中, 肝组织中 Hyp 随着胶原的消长而变化, 是评估胶原蛋白量和肝纤维化程度的重要指标^[11]。NAG 是溶酶体中的一种蛋白水解酶, 参与结缔组织基质的水解代谢, 在血清中的活性与肝纤维化过程有关, 可揭示结缔组织-胶原的分解程度^[12]。血清中 IV 型胶原量的变化, 也同样是判断肝纤维化程度极具实用价值的指标。本实验结果显示, 丹参滴丸能抑制肝纤维化大鼠肝组织中 Hyp、血清中 IV 型胶原水平的升高, 使 NAG 活性降低, 且中、低剂量效果明显, 表明丹参滴丸抑制胶原蛋白的沉积, 促进胶原降解, 明显改善肝纤维化的程度。SOD、MDA 的变换直接或间接反映了肝损伤的程度^[13-14], 丹参滴丸还可增强 SOD 活性, 降低 MDA 水平, 且中、低剂量的作用明显, 表明其有降低自由基产生和减少脂质过氧化的作用。

在病理状态下, 肝星状细胞被激活, 而 α -SMA 表达是肝星状细胞激活的显著特征之一。本实验结果显示, 丹参滴丸抑制肝纤维化大鼠 α -SMA 表达的增强, 且中、低剂量效果明显, 表明丹参滴丸抗肝纤维化的机制与其抑制肝星状细胞表达 α -SMA 有密切关系。病理观察也见丹参滴丸各剂量组能明显改善肝纤维化损伤程度, 且中、低剂量效果明显。

综上所述, 丹参滴丸有明显的抗肝纤维化的作用, 其作用机制与其保护肝细胞、抑制胶原蛋白沉积、促进胶原降解进而减少细胞外基质合成、抗脂质过氧化、降低 α -SMA 的表达、阻断肝星状细胞激活、抑制胶原纤维的增加等有关, 具有多靶向性。丹参滴丸在分子水平上的机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Adrian J E, Poelstra K, Scherphof G L, *et al.* Effects of a new bioactive lipid-based drug carrier on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in bile duct-ligated rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(2): 536-543.
- [2] Prud'home G J. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic consideration [J]. *Lab Invest*, 2007, 87(11): 1077-1091.
- [3] Song M, Song Z, Barve S, *et al.* Tetrathiomolybdate protects against bile duct ligation-induced cholestatic liver injury and fibrosis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 325(2): 409-416.
- [4] Miao X D, Yan J, Ying B Z, *et al.* Emodin protects rat liver from CCl₄-induced fibrogenesis via inhibition of hepatic stellate cells activation [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(38): 4753-4762.
- [5] Zou Y H, Yang Y, Li J, *et al.* Potential therapeutic effects of a traditional Chinese formulation, BJ-JN, on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120(3): 452-457.
- [6] Yuan L P, Chen F H, Ling L, *et al.* Protective effects of total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(10): 1393-1402.
- [7] 倪春艳, 郑仕中, 陆茵, 等. 以瘦素为靶点中药单体成分防治肝纤维化研究策略及进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1837-1841.
- [8] 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.
- [9] 覃燕, 严莉, 唐丽, 等. 丹参酮 II_A 对肝纤维化大鼠肝组织胶原表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(4): 782-784.
- [10] 谌辉, 张景辉, 刘文琪. 姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1274-1277.
- [11] 蔡卫民, 张彬彬, 翁红雷, 等. 八项肝纤维化血清标志物比较研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(4): 219.
- [12] 陈兰羽. 疏肝软坚汤对肝纤维化大鼠 NAG 的动态影响 [J]. *山西中医学院学报*, 2003, 4(3): 13-14.
- [13] 王根生, 韩哲武. 甘草类黄酮对乙醇所致肝脏损伤的影响 [J]. *中国药理学学报*, 1993, 9(4): 271-274.
- [14] 周程艳, 艾凌艳, 王美, 等. 杜仲多糖抗纤维化的实验研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(2): 324-329.