

• 药理与临床 •

丹参抗成纤维细胞增殖作用的分子机制研究

张楠楠¹, 王倩², 高洁^{3*}, 李红艳⁴, 韩彦琪³, 邹敏杰⁴, 白钢³

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 河南广播电视大学, 河南 郑州 450008

3. 南开大学药学院, 天津 300071

4. 天津嘉氏堂科技有限公司, 天津 300457

摘要: **目的** 探讨丹参抗成纤维细胞增殖作用的有效成分及分子作用机制。**方法** 采用索氏提取法制备丹参多种提取物及萃取部位; 以抗人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)增殖的活性为导向, MTS法筛选活性部位, 流式细胞仪检测细胞周期; UPLC-Q/TOF法分析丹参活性成分; 通过反向对接预测测试药抗细胞增殖的机制, RT-PCR检测caspase-3、MAP2K1、MAPK1增殖相关基因的表达水平。**结果** 丹参石油醚提取部位有较强的抗HSF增殖的活性, 能显著增加G₀/G₁期细胞的比例, 降低增殖指数(PI), 其主要活性成分为丹参酮类化合物; 反向对接预测结果显示, 丹参酮类化合物抗HSF增殖机制主要与调节caspase-3和MAP2K1等靶点及其相关通路有关; 隐丹参酮能够上调caspase-3基因的表达, 下调MAP2K1、MAPK1基因的表达, 与预测结果相吻合。**结论** 丹参抗HSF增殖作用的机制与丹参酮类成分调节MAPK、VEGF等信号通路有关。

关键词: 丹参; 人增生性瘢痕成纤维细胞; MAPK1; 反向对接; 丹参酮

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)12-2440-08

Antiproliferative molecular mechanisms of components in roots and rhizomes of *Salvia miltiorrhiza* on fibroblastsZHANG Nan-nan¹, WANG Qian², GAO Jie³, LI Hong-yan⁴, HAN Yan-qi³, ZOU Min-jie⁴, BAI Gang³

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

2. Henan Radio and Television University, Zhengzhou 450008, China

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

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

Abstract: **Objective** To investigate the active components in the roots and rhizomes of *Salvia miltiorrhiza* and their antiproliferative molecular mechanisms on fibroblasts. **Methods** Different components and extraction fractions from the roots and rhizomes of *S. miltiorrhiza* were prepared using Soxhlet extraction method. MTS method was used to screen the active components guided by the antiproliferative activity on human hypertrophic scar fibroblasts (HSF), flow cytometry was used to detect their influence on cell cycle, and the active components were analyzed by UPLC-Q/TOF method. The antiproliferative mechanism was predicted by reverse docking, and the gene expression levels of caspase-3, MAP2K1, and MAPK1 were determined using RT-PCR technology. **Results** The petroleum ether extract fraction from the roots and rhizomes of *S. miltiorrhiza* had higher antiproliferative activity on human HSF, increased the proportion of cells in G₀/G₁ phase significantly, and reduced the proliferation index (PI). The main active components were tanshinones. Results of reverse docking indicated the antiproliferative mechanisms on human HSF, might relate to the regulation of some target proteins, such as caspase-3 and MAP2K1, and the related pathways. RT-PCR results showed that cryptotanshinone could upregulate the gene expression of caspase-3 and downregulate the gene expression of MAP2K1 and MAPK1. **Conclusion** The antiproliferative mechanisms of the components in the roots and rhizomes of *S. miltiorrhiza* on human HSF may be related with the regulation of MAPK and VEGF signaling pathways by tanshinone components.

Key words: roots and rhizomes of *Salvia miltiorrhiza* Bge.; human hypertrophic scar fibroblasts; MAPK1; reverse docking; tanshinone

收稿日期: 2012-07-03

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

作者简介: 张楠楠(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理研究。Tel: (022)23504933 E-mail: zhangnannan1225@163.com

*通讯作者 高洁 Tel: (022)23504933 E-mail: gaojie@nankai.edu.cn

增生性瘢痕是临床上常见的病理性瘢痕,其病理本质是以人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)为主的细胞过度增殖和以胶原为主的细胞外基质过度沉积的结果。肝、肺、肾等内脏纤维化疾病在病理上也表现为胶原等细胞外基质过多无序地沉积,这与皮肤病理性瘢痕产生的机制类似^[1]。近年来纤维化疾病的分子机制研究取得了较大进展,目前已确定转化生长因子 β (TGF- β)、白细胞介素、早期生长应答蛋白 1(EGF-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、过氧化物酶体增生物激活受体(PPARs)、血清淀粉样蛋白 P(SAP)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)以及肾素-血管紧张素-醛固酮系统(血管紧张素 II)等的调控均与器官和组织的纤维化有关,但由于纤维化病理机制的多环节性和复杂性,临床上仍然缺乏有效的抗纤维化药物^[2-4]。

中药具有多成分与多靶点作用的特点,对纤维化疾病可发挥综合治疗优势^[5-6]。丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根及根茎,具有活血化瘀、通经止痛的功效^[7],具有较好的抑制纤维化的作用^[8-10]。但丹参抑制 HSF 增殖的确切机制尚未完全明了。本实验研究丹参不同提取部位抗 HSF 增殖的作用及其有效成分,旨在探讨丹参抗 HSF 增殖作用的药效物质基础和分子机制,为病理性瘢痕和器官纤维化的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

丹参,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研究员鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎;氢化可的松注射液(批号 0910354),天津药业焦作有限公司;隐丹参酮(质量分数 98%),天津一方科技有限公司;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;High-Capacity cDNA Reverse Transcription 试剂盒,美国 ABI 公司;LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I 试剂盒,瑞士 Roche 公司。

1.2 细胞

HSF,上海拜力生物技术有限公司。

1.3 仪器

Waters UPLC-Q-TOF primer 串联质谱仪、Masslynx 工作站, Waters 公司; BD FACS Calibur 流式细胞仪, BD 公司; Light Cycler Real Time PCR 扩增仪, Roche 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。

2 方法

2.1 提取物制备

取丹参 20 g, 粉碎, 依次用 10 倍量的石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇和水索氏提取 5 h, 提取液分别回收溶剂至膏状, 真空干燥, 得石油醚部位 0.63 g、氯仿部位 0.81 g、醋酸乙酯部位 0.79 g、正丁醇部位 0.64 g 以及水提取部位 5.42 g。

2.2 MTS 法检测细胞增殖

对数生长期 HSF 用 0.25%胰蛋白酶消化, 悬于 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS、1%青霉素和链霉素), 调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL , 于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养 12 h 后, 细胞分为对照组(含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养基), 氢化可的松阳性对照组(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 与对照组相同培养基), 丹参各提取部位(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 与对照组相同培养基)组(本课题组对 HSF 细胞的预试验结果表明, 丹参各溶剂浸膏给药质量浓度小于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 HSF 细胞增殖有较高的抑制率且对细胞无毒性, 故本实验选用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为给药质量浓度), 各组给予相应物质培养 24 h 后, 每孔加入 120 μL MTS 溶液(用 DMEM 高糖培养基 1:5 稀释), 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h, 取上清, 酶标仪测 490 nm 处吸光度(A)值, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}})$$

2.3 酶标法检测 LDH 活性^[11]

取“2.2”项中的培养基, 按 LDH 试剂盒(酶标法)说明书操作, 测 450 nm 处 A 值, 计算 LDH 的活力, 以评价试药的细胞毒活性。

2.4 流式细胞仪分析细胞周期

细胞处理与给药同“2.2”项。细胞分为对照组(含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养基), 氢化可的松阳性对照组(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 与对照组相同培养基), 丹参石油醚提取部位组(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 与对照组相同培养基), 加药后继续培养 24 h, 收集各组细胞, PBS 冲洗 2 次, 加 70%乙醇于 -20 $^\circ\text{C}$ 固定过夜, PBS 洗涤, 离心去上清, 加入 10 mg/mL RNaseA 2.5 μL 、10

mg/mL PI 染液 2.5 μ L, 轻轻吹匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后用于流式细胞仪检测, 计算各细胞周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 增殖有效成分的 UPLC-Q/TOF 分析

上述细胞增殖实验、LDH 检测和流式细胞术检测结果表明, 丹参石油醚提取部位有较强的抑制 HSF 增殖的作用, 故选取该部位进行 UPLC-Q/TOF 分析。取丹参石油醚提取物以甲醇溶解, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 按以下 UPLC 色谱条件和质谱条件进行 UPLC/Q-TOF 检测, 按时间收集流出液置于深孔板中, 真空干燥后, 按照“2.2”项下方法进行抗增殖作用实验。

UPLC 色谱条件: Waters UPLC 超高效液相色谱仪; Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相水 (A)-乙腈 (B), 线性梯度洗脱: 0~15 min, 2%~100% B, 15~17 min, 100% B, 17~19 min, 100%~2% B; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 5 μ L; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测波长 270 nm。

质谱条件: Waters UPLC/Q-TOF 串联质谱仪, 扫描方式正离子, 扫描范围为 m/z 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 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气体积流量 600 L/h; 锥孔气流 50 L/h, 源温 100 $^{\circ}$ 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 活性成分的反向对接与靶点预测

将“2.5”项鉴定的药效成分立体结构投入 PharmMapper server 网站进行反向对接, 预测其可能的作用靶点^[12], 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分子机制。

2.7 隐丹参酮抗 HSF 增殖机制验证

2.7.1 隐丹参酮对 HSF 增殖的影响 设对照组 (含 1% FBS 的 DMEM 高糖培养基)、氢化可的松 (200 μ g/mL+与对照组相同培养基) 组、丹参石油醚提取部位 (25 μ g/mL+与对照组相同培养基) 组, 隐丹参酮高、中、低质量浓度 (100、50、25 μ g/mL+与对照组相同培养基) 组, 其他处理按“2.2”项下方法进行, MTS 法检测各组 HSF 增殖抑制率。

2.7.2 HE 染色法观察隐丹参酮对 HSF 形态学的影响 分组与处理同“2.7.1”项。细胞培养结束后, 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 ($\times$ 100) 细胞形态的变化。

2.7.3 隐丹参酮对信号通路相关基因表达的影响 分组与处理同“2.7.1”项。细胞培养结束后, 采用醇沉法提取总 RNA, 按试剂盒说明进行 RT-PCR 实验, 以 β -actin 为内参, 检测隐丹参酮对 caspase-3、MAP2K1、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) 基因表达的影响。引物序列见表 1。参照 High-Capacity cDNA Reverse Transcription 试剂盒条件进行逆转录, 反应程序: 25 $^{\circ}$ C、10 min, 37 $^{\circ}$ C、120 min, 85 $^{\circ}$ C、5 min。参照 Light Cycler Real Time PCR 扩增仪和 LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I 试剂盒说明设置荧光定量 PCR 反应条件, 反应体系为 20 μ L, 反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 10 min, 1 个循环; PCR 反应 95 $^{\circ}$ C、10 s, 55 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、15 s, 45 个循环; 熔解曲线分析 95 $^{\circ}$ C、0 s, 65 $^{\circ}$ C、15 s, 95 $^{\circ}$ C、0 s。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

2.8 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 多组数

表 1 基因引物序列及片段长度

Table 1 Sequences and fragment length of primers

基因	引物序列	产物片段 / bp	退火温度 / $^{\circ}$ C
caspase-3	正向: ATCACAGCAAAAGGAGCAGTTT	214	60.3
	反向: ACACCACTGTCTGTCTCAATGC		60.2
MAP2K1	正向: GGAGAACTGAAGGATGACGACT	225	59.7
	反向: GCTGTAGAACGCACCATAGAAG		59.1
MAPK1	正向: TCCCCATCACAAGAAGACCT	115	59.5
	反向: AGTCAGCATTTGGGAACAGC		60.3
β -actin	正向: GACAGGATGCAGAAGGAGAT	149	60.1
	反向: TGCTTGCTGATCCACATCTG		60.0

据比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 丹参各提取部位对 HSF 增殖的影响

在各组 HSF 培养基中 LDH 活性无显著差异的条件下, 丹参石油醚、氯仿、醋酸乙酯和水提取部位均能抑制 HSF 增殖, 其中石油醚部位作用最强, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 1。

3.2 石油醚提取部位对 HSF 细胞周期的影响

流式细胞仪分析显示, 与对照组相比, 氢化可的松组和丹参石油醚提取部位组 HSF 处于 G_0/G_1 期的细胞比例均显著增加 ($P < 0.01$), S 期和 G_2/M 期细胞比例显著降低 ($P < 0.01$), 丹参石油醚提取物还能明显降低 HSF 的 PI ($P < 0.01$)。结果见图 2。

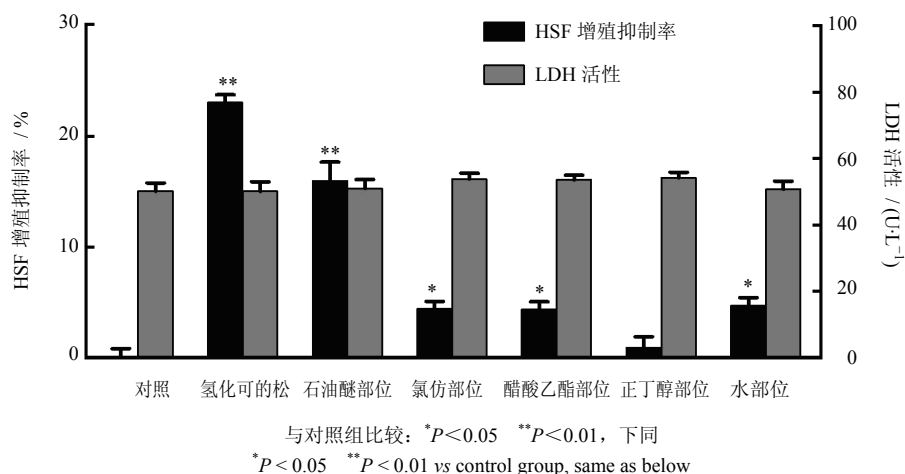


图 1 丹参各提取部位对 HSF 增殖和 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of various solvent extract fractions from roots and rhizomes of *S. miltiorrhiza* on human HSF proliferation and LDH activity ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

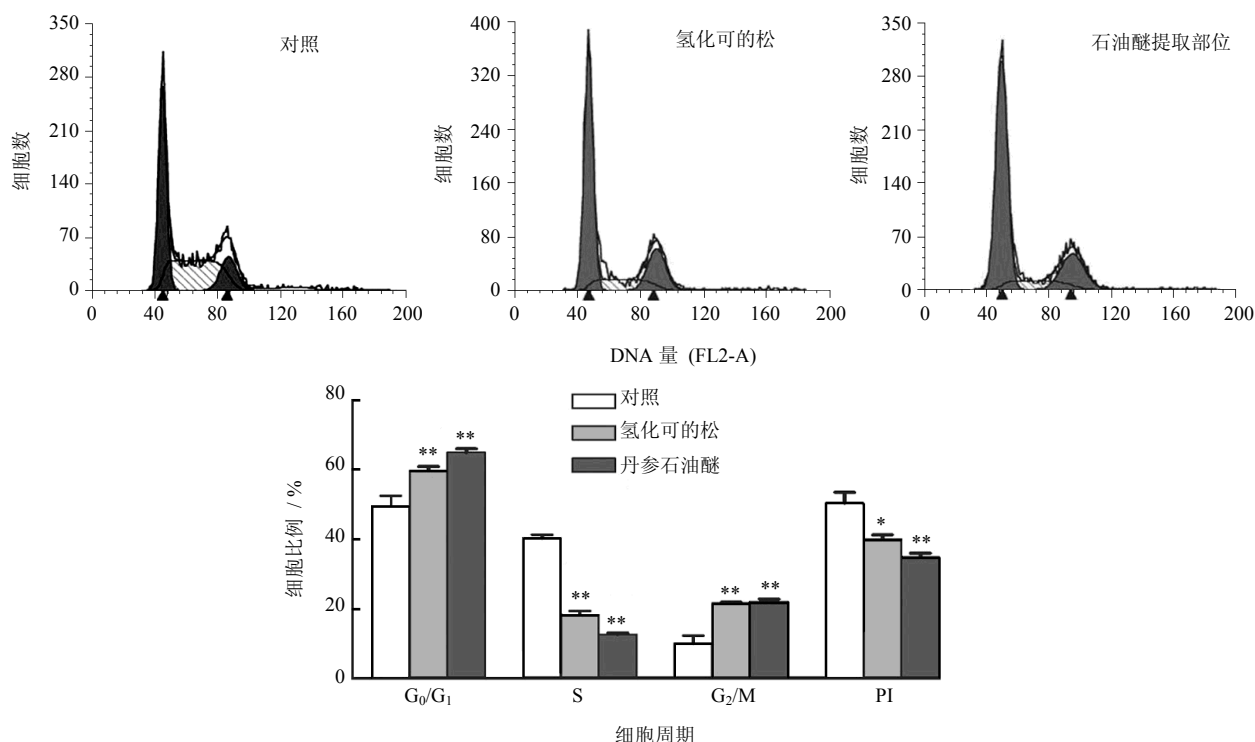


图 2 丹参石油醚提取部位对 HSF 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of petroleum ether extract fraction from roots and rhizomes of *S. miltiorrhiza* on cell cycle of human HSF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 抗 HSF 增殖有效成分的 UPLC-Q/TOF 分析

抗 HSF 增殖成分的 UPLC-Q/TOF 分析显示, 保留时间为 9~12 min 的成分有较好的抗细胞增殖作用 (图 3-A~C)。依据文献报道的精确相对分子质量以及离子碎片信息^[13-19], 丹参石油醚提取部位主要含邻醌型丹参酮类二萜二氢丹参酮 I、隐丹参酮、次甲丹参酮和丹参酮 II_A 以及对酯型罗列酮类二萜丹参新醌 B 等 5 种活性成分, 均属丹参酮类 (表 2)。因它们的结构类似 (图 3-D), 已知药理活性也相似^[20], 因此选用其中的隐丹参酮进行后续细胞水平的验证实验。

3.4 活性成分的反向靶点对接及作用通路分析

根据反向对接结果, 推测上述 5 种丹参酮类成分与 caspase-3、MAP2K1、MAPK14、hPDK1 等蛋白可能有较强的结合能力, 提示其通过与相应蛋白结合, 调节 MAPK、VEGF、黏着斑 (Focal adhesion) 等信号通路发挥抗细胞增殖作用。结果见图 4。

3.5 隐丹参酮对 HSF 抑制作用及机制分析

MTS 检测结果显示, 隐丹参酮各质量浓度组均能明显抑制 HSF 的增殖, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$) (图 5)。HE 染色后, 显微镜观察可见, 对照组细胞形态规则, 胞核呈椭圆形或圆形, 胞体呈梭

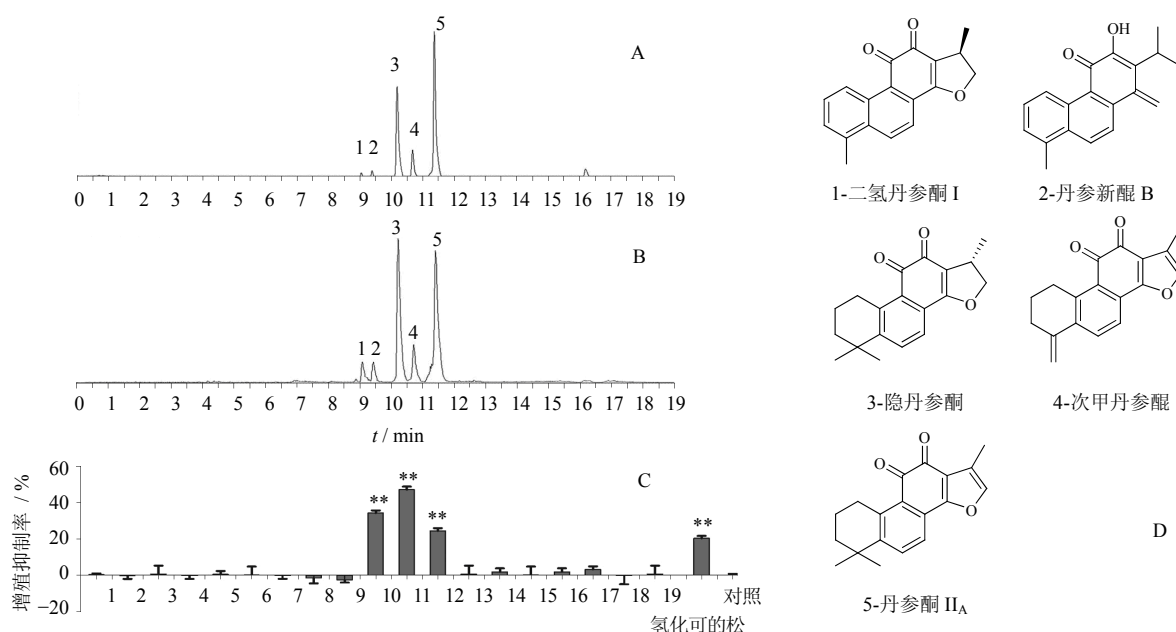


图 3 丹参石油醚提取物 UPLC-Q/TOF 图 (A)、总离子流图 (B)、对 HSF 细胞的抗增殖作用 (C) 及其活性成分结构 (D)
Fig. 3 UPLC-Q/TOF chromatograms (A), total ion current (B), antiproliferative effect on human HSF cells (C), and structures of active components (D) in petroleum ether extract fraction from roots and rhizomes of *S. miltiorrhiza*

表 2 丹参石油醚提取物中抗增殖成分的 UPLC-Q/TOF 分析

Table 2 UPLC-Q/TOF analysis on antiproliferative components in petroleum ether extract fraction from roots and rhizomes of *S. miltiorrhiza*

峰号	化合物	分子式	t_R / min	实验值 m/z [M+H] ⁺	理论值 m/z	MS/MS	偏差
1	二氢丹参酮 I	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	9.089	279.103 1	278.049 3	261 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 233 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 205 [M+H-H ₂ O-CO-CO] ⁺ , 190 [M+H-H ₂ O-CO-CO-CH ₃] ⁺	3.58
2	丹参新醌 B	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	9.430	281.119 0	280.109 9	281 [M+H] ⁺ , 263 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 235 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	4.27
3	隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	10.228	297.150 0	296.141 2	297 [M+H] ⁺ , 279 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 251 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	3.03
4	次甲丹参酮	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	10.710	279.103 4	278.049 3	279 [M+H] ⁺ , 261 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 233 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 205 [M+H-H ₂ O-CO-CO] ⁺	4.66
5	丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	11.405	295.132 4	294.125 6	295 [M+H] ⁺ , 277 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 249 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	-3.39

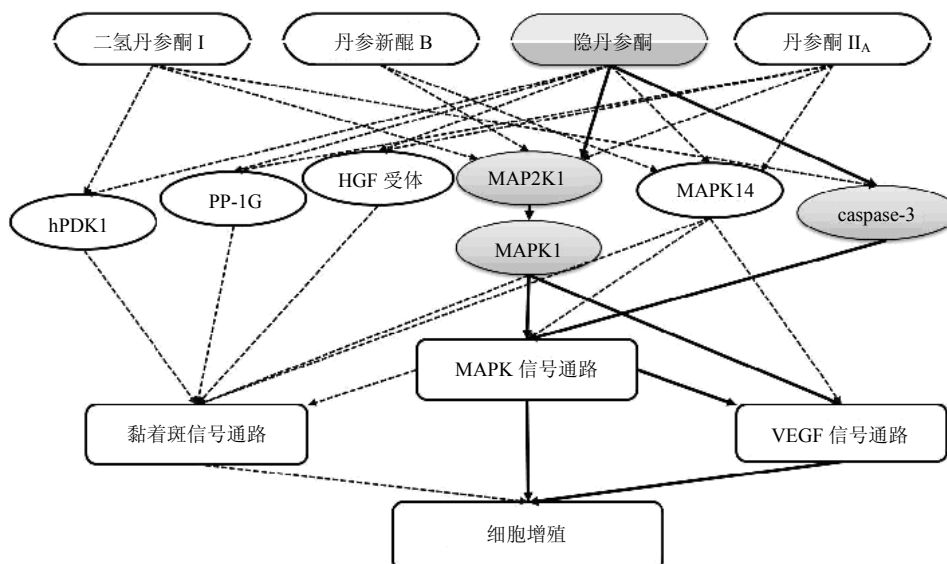


图 4 丹参酮类成分抗 HSF 增殖作用可能的靶点及通路

Fig. 4 Possible targets and pathways for antiproliferative effect of tanshinone components on human HSF

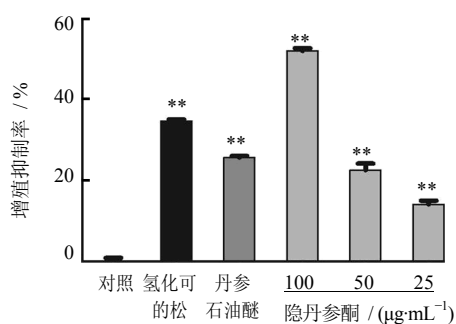


图 5 隐丹参酮对 HSF 增殖的影响

Fig. 5 Effect of cryptotanshinone on proliferation of human HSF

形；氢化可的松、丹参石油醚提取部位和隐丹参酮组 HSF 均不同程度地出现细胞数量减少、细胞突起变短或者缺失、细胞质及胞核浓缩等现象，且隐丹参酮对 HSF 的抑制作用呈现质量浓度相关性(图 6)。

RT-PCR 检测结果显示，隐丹参酮能够显著增加 HSF 细胞 caspase-3 基因的表达，抑制 MAP2K1、MAPK1 基因的表达(图 7)。

4 讨论

本实验对筛选出的抗 HSF 增殖活性较强的丹参石油醚提取部位中的成分进行 UPLC-Q/TOF 分析，

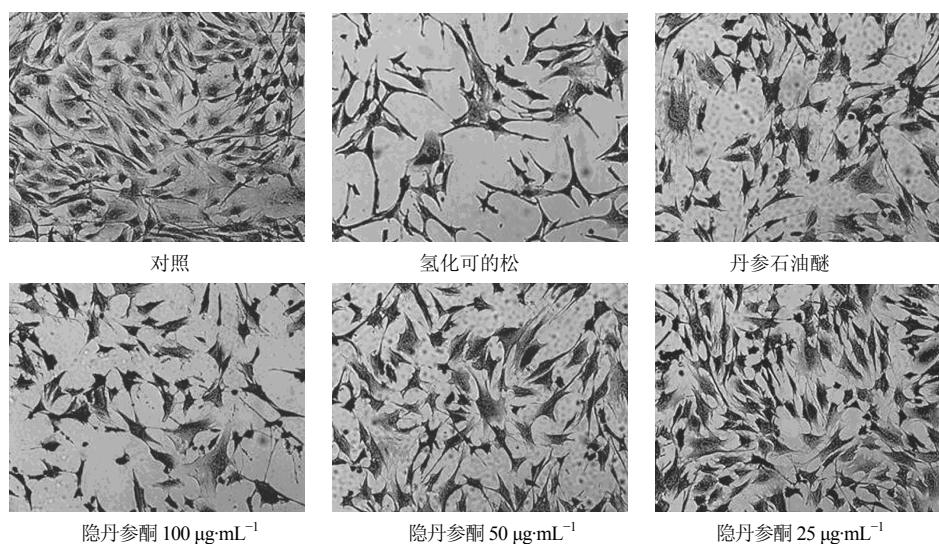


图 6 隐丹参酮对 HSF 形态的影响

Fig. 6 Effect of cryptotanshinone on cell morphology of human HSF

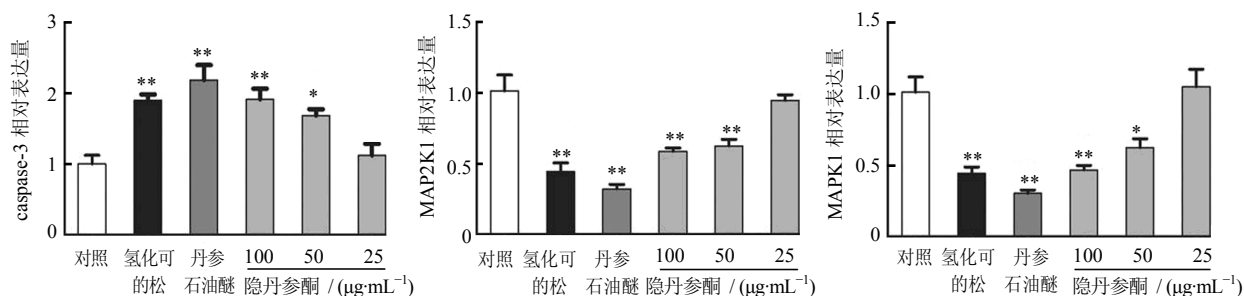


图 7 隐丹参酮对信号通路相关基因表达的影响

Fig. 7 Effects of cryptotanshinone on expression of target genes in signal pathway

鉴定出二氢丹参酮 I、丹参新醌 B、隐丹参酮、次甲丹参醌和丹参酮 II_A 5 个主要的活性成分, 因其均属丹参酮类物质, 故选择隐丹参酮进行细胞增殖抑制实验, 证实这些化合物确有抑制 HSF 增殖的作用。反向对接技术预测了上述 5 个活性成分潜在的结合蛋白靶点, 减少了中药作用机制研究的盲目性^[21], 结果显示, 隐丹参酮具有与 MAP2K1、caspase-3、MAPK14、HGF 受体、PP-1G 等蛋白结合的能力, 提示其可能通过与相应蛋白结合, 调节 VEGF、MAPK、黏着斑等信号通路, 进而发挥抗细胞增殖的作用。

MAPK 可以调节细胞的生长、分化和凋亡, 胞外信号调节激酶(ERK)、p38 MAPK、JNK 是 MAPK 家族的 3 个成员^[22]。ERK1、ERK2 能促进细胞增殖, 决定细胞向终末期分化或发生凋亡, ERK 的持续活化促进细胞增殖和向恶性转化, 而 ERK 的下调则可抑制细胞生长和生长刺激基因的转录。隐丹参酮和丹参酮 II_A 通过 ERK/MAPK 通路抑制 3T3-L1 脂细胞的增殖^[23]。本研究结果显示, 隐丹参酮能通过抑制 ERK/MAPK 通路, 有效下调 MAP2K1 及其下游 MAPK1 基因的表达, 抑制 HSF 增殖。VEGF 信号通路与细胞的增殖、迁移和存活有关, 丹参酮 II_A 抑制乳腺癌细胞株 MDA-MA-231 增殖可能与 VEGF 通路有关^[24-26]。黏着斑由信号、细胞膜上的整联蛋白(integrins)和细胞内的细胞骨架蛋白等相互连接集聚而成, 能够调控复杂的细胞行为, 如细胞增殖、存活、迁移和侵袭^[27]。本实验结果表明, 丹参酮类物质能通过 MEK-ERK 激活 MAPK 信号通路, 进一步激活 VEGF 信号通路, 影响细胞 DNA 合成, 从而影响 HSF 增殖; 还可能通过 MAP2K1、HGF 受体、PP-1G、hPDK1 等靶点作用于黏着斑信号通路, 抑制 HSF 增殖。

本研究初步阐明丹参抗 HSF 增殖的物质基础和分子机制, 为其应用于病理性瘢痕和抗器官纤维化治疗提供了实验依据。

参考文献

- [1] 孙淑君, 向阳, 黄世林. 单味中药及其有效成分抗纤维化机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(24): 2882-2886.
- [2] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210.
- [3] Profyris C, Tziotziros 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.
- [4] Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, et al. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 2005, 45: 605-628.
- [5] Chor S Y, Hui A Y, To K F, et al. Anti-proliferative and proapoptotic effects of herbal medicine on hepatic stellate cell [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100(1/2): 180-186.
- [6] 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.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [8] 张诚玥, 李根林. 丹参干预成纤维细胞增生及其机制 [J]. 眼科新进展, 2011, 31(9): 833-845.
- [9] Wang Y H, Xu F, Chen J, et al. Matrix metalloproteinase-9 induces cardiac fibroblast migration, collagen and cytokine secretion: Inhibition by salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytomedicine*, 2011, 19(1): 13-19.
- [10] 林军, 冯一中, 顾振纶, 等. 丹参总酚酸对博来霉素致肺纤维化小鼠的治疗作用 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 400-403.
- [11] 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.
- [12] Liu X, Ouyang S, Yu B, *et al.* PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: W609-W614.
- [13] Song J Z, Li S L, Zhou Y, *et al.* A novel approach to rapidly explore analytical markers for quality control of *Radix Salviae Miltiorrhizae* extract granules by robust principal component analysis with ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed Lysis*, 2010, 53: 279-286.
- [14] Cao J, Wei Y J, Qi L W, *et al.* Determination of fifteen bioactive components in *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(2): 164-172.
- [15] Xia L, Liu H L, Li P, *et al.* Rapid and sensitive analysis of multiple bioactive constituents in compound Danshen preparations using LC-ESI-TOF-MS [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(18): 3156-3169.
- [16] Liu M, Li Y G, Zhang F, *et al.* Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS) [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(14): 2256-2267.
- [17] Liu A H, Lin Y H, Yang M, *et al.* Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSⁿ [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 846(1/2): 32-41.
- [18] He Q, Hu X J, Cheng Y H. Analysis of 'SHUANGDAN' granules by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(2): 485-492.
- [19] 董 晰, 徐 立, 娄子洋. 丹参药材中水溶性及脂溶性成分的电喷雾离子阱质谱研究 [J]. *中国药学杂志*, 2010, 45(14): 1048-1054.
- [20] 续洁琨, 栗原博, 郑洁静, 等. 丹参酮类化合物对小鼠应激性肝损伤的保护作用 [J]. *药科学报*, 2006, 41(7): 631-635.
- [21] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [22] 滕建英, 徐少骏, 谢 菁, 等. 异搏定对增殖瘢痕成纤维细胞凋亡及细胞信号传导作用 [J]. *健康研究*, 2011, 31(2): 86-90.
- [23] Wu S J, Lee S J, Su C H, *et al.* Bioactive constituents and anti-proliferative properties of supercritical carbon dioxide *Salvia miltiorrhiza* extract in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Process Biochem*, 2012, 47(2): 216-224.
- [24] 杨 彦, 陈庆伟, 曹广煜, 等. 丹参酮 II_A 增效大鼠骨髓源性内皮祖细胞 VEGF、SDF-1 表达 [J]. *激光杂志*, 2012, 33(2): 83-86.
- [25] Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: Therapeutic perspective [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(17): 5018-5022.
- [26] Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction [J]. *Sci STKE*, 2001(112): re21.
- [27] Wozniak M A, Modzelewska K, Kwong L, *et al.* Focal adhesion regulation of cell behavior [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2004, 1692(2/3): 103-119.