

萱草花总黄酮改善肝细胞 HL-7702 氧化损伤的研究

沈楠¹, 黄晓东¹, 王艳春^{1*}, 齐玲¹, 陈雪¹, 徐博¹, 刘婷婷²

1. 吉林医药学院基础医学院, 吉林 吉林 132001

2. 吉林医药学院附属医院 病理科, 吉林 吉林 132001

摘要: **目的** 研究萱草花总黄酮(HCTF)对氧化应激引起的肝细胞损伤的改善作用,并探讨其作用机制。**方法** 采用CCl₄诱导小鼠肝氧化损伤和H₂O₂诱导体外肝细胞损伤2种模型,HCTF给药后检测肝组织抗氧化指标,HE染色观察肝组织形态学改变,应用MTT法测定肝细胞存活率,ELISA法检测肝细胞中丙氨酸转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性,实时荧光定量PCR(RT-PCR)和Western blotting法检测LXR α 、FAS mRNA及蛋白的表达。**结果** HCTF可以明显降低CCl₄肝损伤小鼠肝组织内MDA水平,提高肝组织GSH-Px和SOD活性,保护肝组织;HCTF可以明显提高H₂O₂损伤的HL-7702细胞存活率($P < 0.01$);使HL-7702细胞中MDA水平降低($P < 0.05$ 、 0.01),GSH-Px和SOD活性升高($P < 0.01$),ALT、LDH、AST活性降低($P < 0.05$ 、 0.01),LXR α 和FAS mRNA及蛋白的表达水平下降($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** HCTF可能通过提高机体抗氧化能力而起到对CCl₄肝损伤小鼠的保护作用;同时可能通过降低氧化反应、减少LXR α 和FAS的转录及蛋白表达,从而抑制H₂O₂对HL-7702细胞的损伤。

关键词: 萱草花;总黄酮;H₂O₂;CCl₄;氧化应激;肝X受体 α ;脂肪酰合成酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)21-3208-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.015

Amelioration of *Hemerocallis citrina* total flavonoids on oxidative damage of liver cells HL-7702

SHEN Nan¹, HUANG Xiao-dong¹, WANG Yan-chun¹, QI Ling¹, CHEN Xue¹, XU Bo¹, LIU Ting-ting²

1. Basic Medical College of Jilin Medical University, Jilin 132001, China

2. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Jilin Medical University, Jilin 132001, China

Abstract: Objective To study the protective effects of *Hemerocallis citrina* total flavonoids (HCTF) on oxidative damage of liver cells HL-7702, and explore its possible mechanism. **Methods** The liver cell damage model was induced by H₂O₂, and the proliferation of liver cells was examined by MTT assay, and the changes of ALT, LDH, and AST were detected by ELISA assay, the levels of LXR α and FAS were determined by RT-PCR and Western blotting assay. **Results** HCTF (5 and 10 μ g/mL) could significantly improve the proliferation of liver cells ($P < 0.01$), the content of NO increased and the content of MDA decreased ($P < 0.01$ or 0.05), the activity of SOD increased ($P < 0.05$), the levels of mRNA, and protein of LXR α and FAS decreased ($P < 0.01$ or 0.05). **Conclusion** HCTF could inhibit the transcription and protein expression of LXR α and FAS through anti-oxidation, and repair the damage of HL-7702 liver cells caused by H₂O₂.

Key words: *Hemerocallis citrina* Baroni; total flavonoids; H₂O₂; CCl₄; oxidative stress; LXR α ; FAS

肝损伤是临床上常见的一类疾病,除遗传因素外,很多因素都可以诱发肝损伤。药物的护肝作用是现今研究的热点。萱草花 *Hemerocallis citrina* Baroni,又名黄花菜,《本草纲目》中记载,有利湿热、宽胸膈、安五脏、治酒疸,安寐解郁等作用^[1],中医用来

治疗胸膈烦热、肝性黄疸、改善肝功能^[2]。萱草花总黄酮(*Hemerocallis citrina* total flavonoids, HCTF)是其主要成分之一。大量研究表明,HCTF具有护肝、抗抑郁、镇静催眠、抗氧化等药理作用^[3-4]。本实验在体内采用CCl₄诱导小鼠肝氧化损伤模型,在体外采

收稿日期: 2015-03-23

基金项目: 吉林省教育厅基金资助课题(2013359)

作者简介: 沈楠(1972—),女,满族,吉林省人,吉林医药学院副教授,硕士,研究方向为中药药理学。Tel: (0432)64560375 E-mail: snlyg@126.com

*通信作者 王艳春 Tel: (0432)64560305 E-mail: wangyanchun1972@163.com

用 H_2O_2 诱导肝细胞损伤模型, 观察肝组织病理变化及肝细胞损伤过程中肝 X 受体 (LXR) α 和脂肪酸合成酶 (FAS) mRNA 及蛋白表达变化, 探讨 HCTF 对体内和体外肝氧化损伤的保护作用及其可能机制。

1 材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠 65 只, 雄性, 体质量 (20 ± 2) g, SPF 级, 长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供, 合格证号 SCXK (吉) -2010-0001。

1.2 细胞株

人肝细胞株 HL-7702, 购于中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.3 药品与试剂

HCTF 自制; CCl_4 , 宜兴化学试剂三厂; 博莱霉素、 H_2O_2 , 美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清、胰蛋白酶, 杭州四季青生物工程材料有限公司; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 引物由上海生工生物工程技术有限公司提供。

1.4 主要仪器

CM1900 冰冻切片机, 德国 Leica 公司; UV-6300 分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司产品; DYY-11 酶标仪, 北京市六一仪器厂; 3K30 超速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; 双人超净工作台, 上海基星生物科技有限公司; CO_2 培养箱, 上海力申仪器有限公司; BX41TF 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 HCTF 的制备

萱草花药材, 购于湖南祁阳, 经吉林医药学院药学院雷均涛教授鉴定为萱草花 *Hemerocallis citrina* Baroni。取粗粉适量, 添加 20 倍量 70% 乙醇, 加热、回流提取 4 h, 提取 3 次, 冷冻干燥, 得提取物粉末 (得率 0.94%), 按照文献方法^[5]测定, 提取物粉末中含总黄酮 5.6%。取提取物粉末加水溶解成 10 g/L 水溶液 (总黄酮 0.56 g/L), 作为大孔吸附树脂纯化准备液。取预先处理好的 AB-8 大孔吸附树脂, 按照径高比 1:6 湿法装柱, 取准备液 6 倍柱体积 (BV) 上样 (2 mL/min), 上样结束, 用 6 BV 蒸馏水洗脱除杂 (2 mL/min)。加入 30% 乙醇洗脱, 收集 3 BV 洗脱液, 洗脱液浓缩回收乙醇, 冷冻干

燥, 得纯化粉末, 相当于生药材 28 g/g, 纯化粉末含总黄酮 26.5%。以蒸馏水配制成适宜质量浓度溶液, 备用。

2.2 体内实验

2.2.1 分组及给药 将 65 只昆明种小鼠按体质量随机分为 5 组, 每组 13 只, 分别为对照组, 模型组, HCTF 25、50、100 mg/kg 组。HCTF 各组小鼠 ig 给药, 给药体积 20 mL/kg, 每天 1 次, 连续 30 d。对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.2.2 小鼠肝组织氧化损伤模型的制备 除对照组外, 各组末次给药 2 h 后, 小鼠 ip 3.2% CCl_4 的玉米油溶液 5 mL/kg^[6]。

2.2.3 小鼠肝组织 GSH-Px、MDA 水平和 SOD 活性检测 模型制备后, 禁食 24 h, 将小鼠脱颈椎处死, 取肝组织, 4 °C 生理盐水冲洗, 加双蒸水冰浴匀浆, 10% 匀浆液离心, 取上清。取 10% 肝组织匀浆, 考马斯亮蓝法测定总蛋白浓度, 按照试剂盒说明书操作, 硝酸还原酶法检测 GSH-Px 水平^[7], TBA 法检测 MDA 水平^[8], 黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性^[7]。

2.2.4 小鼠肝组织 HE 染色^[9] 取小鼠肝组织 3 mm × 3 mm 大小, 10% 甲醛溶液固定 48 h。冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋后, 切 8 μ m 厚度切片, 脱蜡, 进行 HE 染色, 脱水封片后, 用显微镜观察。

2.3 体外实验

2.3.1 HL-7702 细胞体外培养及实验分组 取 96 孔板接种 5×10^4 /mL 对数生长期 HL-7702 细胞, 无血清 RPMI 1640 培养液培养 24 h。弃上清, 对照组加入含 15% 胎牛血清的完全培养基; 模型组加入 H_2O_2 25 μ mol/mL, 给药组先加入 2.5、5.0、10.0 μ g/mL 的 HCTF 作用细胞 24 h, 再加入终浓度为 25 μ mol/mL 的 H_2O_2 培养 12 h。

2.3.2 MTT 实验 将 HL-7702 细胞接种于 96 孔板, 每孔 5×10^3 个细胞, 接种 150 μ L, 分组及加药处理同“2.3.1”项。加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 每孔 20 μ L, 实验设 4 复孔, 孵育 4 h, 弃上清, 每孔加 150 μ L DMSO, 微型震荡器震荡 10 min。酶标仪检测 490 nm 波长各孔吸光度 (A) 值, 考察 HCTF 对 H_2O_2 损伤 HL-7702 细胞的保护作用, 结果用存活率表示。存活率 = 给药组 A 值 / 对照组 A 值。实验重复 3 次, 取平均值。

2.3.3 HL-7702 细胞上清液中 GSH-Px、MDA 水平和 SOD 活性检测 取 HL-7702 细胞, 以每孔 5×10^4 个细胞接种于 24 孔板, 每孔 150 μ L 体积, 分组及

加药处理同“2.3.1”项。各因素处理后收集细胞培养上清液，DTNB 法检测 GSH-Px 水平，TBA 法检测 MDA 水平，比色法检测细胞内 SOD 活性，分别按照试剂盒说明书操作。

2.3.4 HL-7702 细胞上清液中 ALT、LDH、AST 水平检测 细胞处理及分组给药同“2.3.3”项，ELISA 法测定 ALT、LDH 和 AST 水平，按照试剂盒要求操作。

2.3.5 实时荧光定量 PCR 检测各组 HL-7702 细胞 LXR α 和 FAS mRNA 表达 细胞处理及分组给药同“2.3.3”项。收集细胞，用 TRIzol[®] 试剂提取细胞的总 RNA，将细胞总 RNA 分别稀释为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，以提取的总 RNA 为模板，反转录 mRNA 为 cDNA。扩增引物根据 Entrez Nucleotide database 相关基因序列^[10]，应用 Primer Premier 5 引物设计软件设计，LXR α 上游引物 5'-CTGCCAGCAACAGTGTAAAC-3'，下游引物 5'-CTGCTTTGGCAAAGTCTTCCC-3'；FAS 上游引物 5'-TTGCTAGATTATCGTCCAAAAGTGT-3'，下游引物 5'-GCACTTGGTGTGCTGGTGAGT-3'。以 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。电泳，凝胶分析系统进行灰度分析。

2.3.6 Western blotting 检测各组 HL-7702 细胞 LXR α 和 FAS 蛋白表达 根据文献方法^[11]，HL-7702 细胞 1×10^5 个接种于 6 孔板，培养 24 h，分组及加药处理同“2.3.1”项。收集细胞，提取蛋白，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，转至 PVDF 膜，分别加入 LXR α 、FAS 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，DAB 显色。Imagel 凝胶成像系统采集图像，SPSS 13.0 软件定量分析条带净灰度值，并与内参 GAPDH 比较，计算比值，比较各组差异。

2.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 13.0 统计软件进

行数据分析，组间计量比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对 CCl₄ 肝损伤小鼠 GSH-Px、SOD 活性和 MDA 水平的影响

与对照组比较，模型组小鼠 GSH-Px 和 SOD 活性显著降低、MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，说明 CCl₄ 引起了小鼠肝氧化损伤。HCTF 50、100 mg/kg 剂量组小鼠肝组织的 GSH-Px 和 SOD 活性比模型组显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，HCTF 各剂量组 MDA 水平与模型组比较显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。提示，HCTF 可以抑制 CCl₄ 肝损伤小鼠肝组织中脂质过氧化物的生成，提高肝组织抗氧化酶活性，对 CCl₄ 引起的肝损伤具有保护作用。结果见图 1。

3.2 对 CCl₄ 肝损伤小鼠肝组织形态结构的影响

HE 染色后，显微镜可见，对照组肝细胞整齐排列，胞浆染色均匀，无深染及空泡，细胞核均一未见融合；模型组肝细胞肿胀变形，出现空泡及大量血细胞，细胞核出现部分碎裂及溶解；HCTF 25 mg/kg 组肝细胞结构基本完整，有部分细胞核出现深染或溶解；HCTF 50、100 mg/kg 组肝细胞排列基本整齐，有个别空洞及深染，有极少细胞核结构改变。结果见图 2。

3.3 对 H₂O₂ 损伤 HL-7702 细胞存活率的影响

MTT 测定结果显示，模型组细胞存活率降低，与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)；与模型组比较，HCTF 5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞存活率显著提高 ($P < 0.01$)。结果见图 3。

3.4 对 H₂O₂ 损伤 HL-7702 细胞 MDA 水平和 GSH-Px、SOD 活性的影响

与对照组比较，模型组细胞内 MDA 水平增

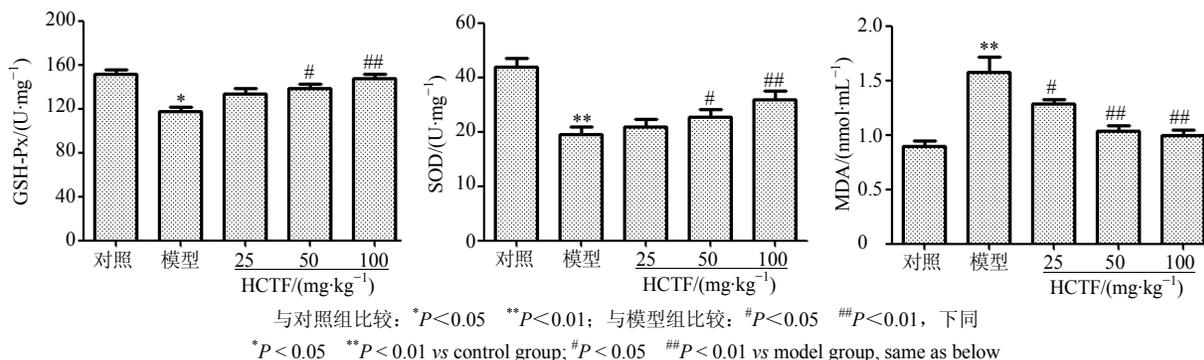


图 1 HCTF 对 CCl₄ 肝损伤小鼠肝组织 GSH-Px、SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Fig. 1 Effect of HCTF on activities of GSH-Px and SOD, and content of MDA in liver tissue of mice with liver injury induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

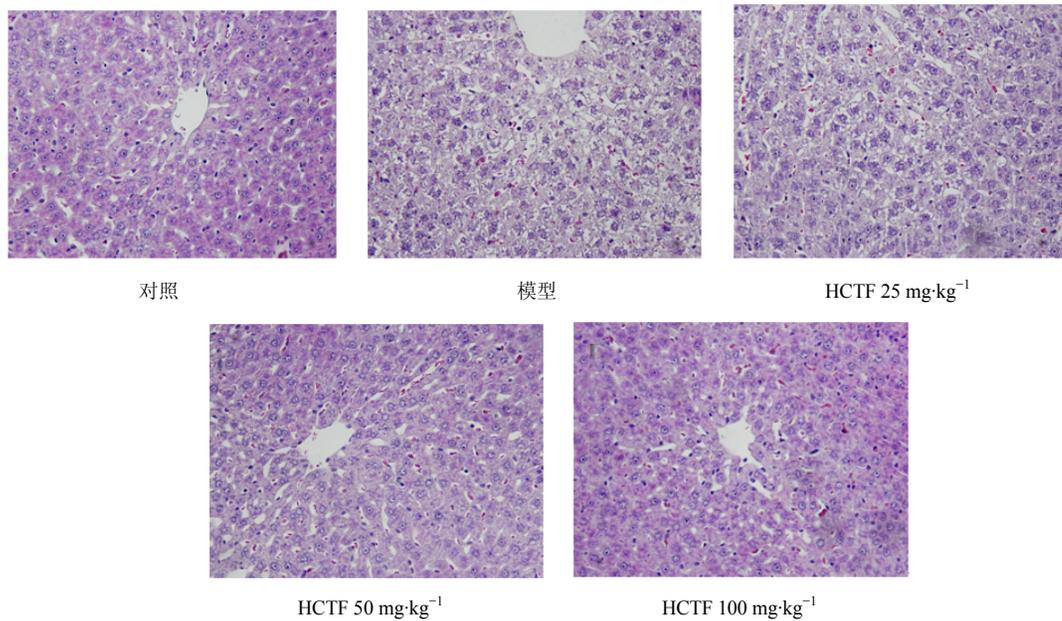


图2 HCTF对CCl₄肝损伤小鼠肝组织形态结构的影响

Fig. 2 Effect of HCTF on morphology of hepatocyte of mice with liver injury induced by CCl₄

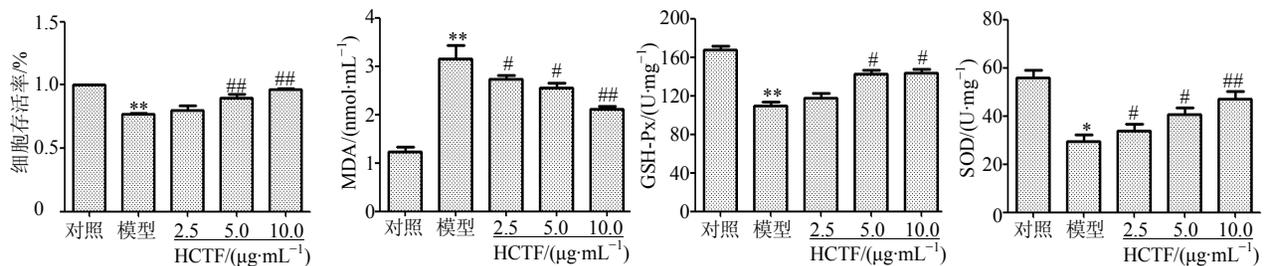


图3 HCTF对HL-7702细胞存活率、MDA水平、GSH-Px和SOD活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of HCTF on cell viability, content of MDA, and activities of GSH-Px and SOD in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

加,不同质量浓度的HCTF孵育,可不同程度地抑制MDA水平增加,说明HCTF可抑制生物体的脂质过氧化反应,呈一定的剂量依赖性。与对照组比较,模型组GSH-Px活性显著降低($P < 0.01$),HCTF孵育后,各剂量组的GSH-Px活性均有所升高,2.5 μg/mL组与模型组比较差异不显著,而5.0、10.0 μg/mL组均差异显著($P < 0.05$),表明HCTF可以提高抗氧化酶活性。与模型组相比,HCTF各剂量组的SOD活性均显著提高($P < 0.05、0.01$),表明HCTF能提高HL-7702细胞SOD酶活性,并呈量效关系。以上结果提示,HCTF能够抑制H₂O₂对HL-7702细胞的氧化损伤。结果见图3。

3.5 对H₂O₂损伤HL-7702细胞ALT、LDH、AST活性的影响

H₂O₂损伤HL-7702细胞后,促进肝细胞内酶的释放,上清中ALT、LDH、AST活性明显增加,与对照组比较差异显著($P < 0.05、0.01$);HCTF 5.0、10.0

μg/mL组与模型组比较,上清中ALT、LDH、AST活性明显受到抑制($P < 0.05、0.01$)。提示HCTF可以改善H₂O₂引起的HL-7702细胞损伤。结果见图4。

3.6 HL-7702细胞中LXRα和FAS mRNA表达

与对照组比较,模型组肝细胞LXRα、FAS mRNA表达明显增高($P < 0.01$),与模型组比较,HCTF 5.0、10.0 μg/mL组细胞中LXRα、FAS mRNA水平明显降低($P < 0.05、0.01$),提示HCTF可以下调H₂O₂诱导的HL-7702细胞的LXRα、FAS mRNA高表达。结果见图5。

3.7 HL-7702细胞中LXRα和FAS蛋白表达

与对照组比较,模型组LXRα、FAS蛋白表达增高,差异显著($P < 0.01$);与模型组比较,HCTF各组LXRα、FAS蛋白表达有不同程度降低,5.0、10.0 μg/mL组差异显著($P < 0.05、0.01$)。提示HCTF可以下调H₂O₂损伤肝细胞后引起的LXRα、FAS蛋白的高表达。结果见图6。

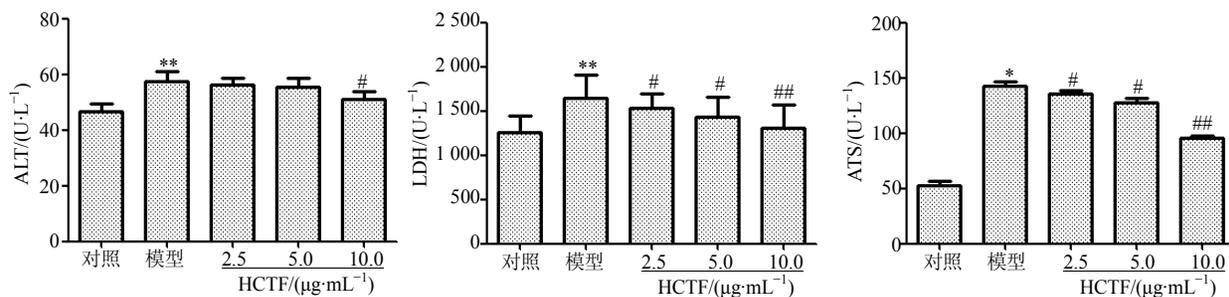


图 4 HCTF 对 HL-7702 细胞 ALT、LDH、AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effects of HCTF on activities of ALT, LDH, and AST in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

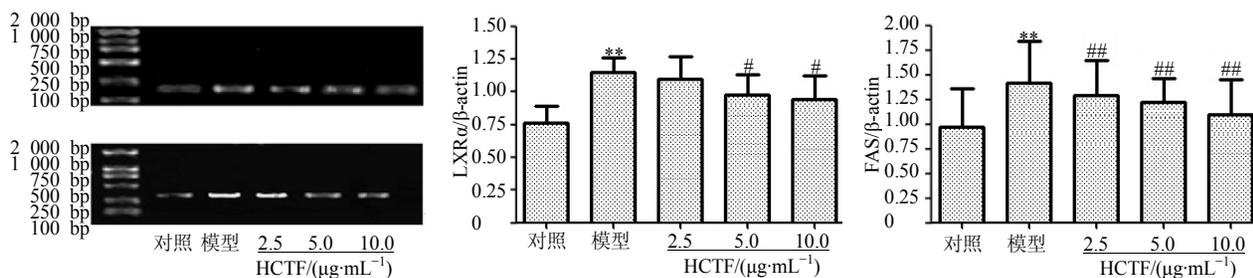


图 5 HL-7702 细胞中 LXRα 和 FAS mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 mRNA expression of LXRα and FAS in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

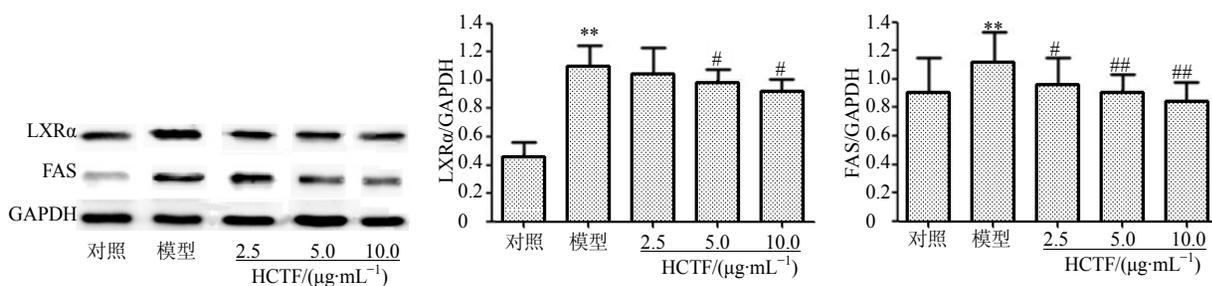


图 6 HL-7702 细胞中 LXRα 和 FAS 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Protein expression of LXRα and FAS in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

氧自由基 (oxygen radical) 与肝损伤密切相关, 在酒精性肝损伤、肝纤维化等病变中, 均观察到有氧化应激的参与^[12]。超氧阴离子、羟基等自由基可以间接或直接损伤肝细胞, 使肝细胞膜中的脂质、蛋白质和 DNA 出现损伤, 细胞变性坏死, 引发肝疾病^[13]。SOD 活性及 MDA 水平可以反应机体抗氧化能力及脂质过氧化水平。体内实验结果显示, HCTF 在 CCl₄ 引起的肝损伤小鼠模型中, 明显提高了肝组织中抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 的活性, 减少脂质过氧化物 MDA 的生成, 减轻了 CCl₄ 对小鼠肝组织的损害。同时, 体外实验结果也显示, HCTF 各剂量组肝细胞的 SOD 活性比 H₂O₂ 模型组均显著提高, 不同程度地抑制 MDA 水平的增加, 这些都表明 HCTF 对肝细胞具有保护作用, 降低了 H₂O₂ 引起的

HL-7702 细胞氧化损伤。综合结果提示, HCTF 的肝保护作用可能是通过提高机体抗氧化能力, 加强清除氧自由基能力, 降低膜脂质过氧化水平而实现的。

ALT、LDH 与 AST 是目前临床上反映肝细胞膜损伤的敏感指标^[14], 它们主要由肝细胞合成、分泌, ALT、LDH 主要存在于肝细胞浆中, AST 主要存在于肝细胞线粒体中, 当炎症、氧化应激、免疫等因素使肝细胞受损时, 肝细胞膜被破坏, 细胞内的 ALT 等大量溢出, 导致细胞外 ALT、LDH、AST 水平急剧升高。ALT、LDH、AST 活性高低可以敏感地反映肝细胞损伤的程度^[15]。本实验结果显示, 与模型组相比, HCTF 各剂量组肝细胞上清液中的 ALT、LDH、AST 水平降低, 表明 HCTF 对肝细胞具有保护作用, 降低了 H₂O₂ 引起的 HL-7702 细胞氧化损伤程度。提示, HCTF 的肝保护作用可能是

通过提高机体抗氧化的能力, 加强清除氧自由基能力, 降低膜脂质过氧化水平而实现的。

有研究报道, LXR 作为胆固醇代谢的感受器, 可以调节细胞的增殖与分化及炎症反应^[16-17]。LXR 有 LXR α 和 LXR β 2 种亚型。LXR α 是脂肪酸代谢的关键调控位点, 主要表达在肝脏、脂肪组织、巨噬细胞中, 在脂肪的生成、分泌、脂质过氧化等过程发挥作用^[18]。FAS 是脂肪合成的关键酶, LXR α 直接活化 FAS 的转录, 促进脂肪酸的合成及抑制脂肪酸的 β 氧化, 从而引起三酰甘油在肝细胞内蓄积和活性氧 (ROS) 增加及炎症因子的生成, 导致肝细胞的损伤^[19]。LXR 的信号传导通路参与了各种病理状态下肝功能的调节。本实验以 H₂O₂ 诱导体外肝细胞氧化损伤模型, 发现模型组肝细胞的 LXR α 、FAS mRNA 及蛋白表达都高于对照组, 这与相关报道相符^[20-21]。本研究显示 HCTF 可改善肝细胞 HL-7702 中 LXR α 、FAS 的表达水平, 综合 HCTF 在肝细胞氧化应激损伤过程中具有的保护作用, 分析 HCTF 的抗氧化机制可能与减轻 LXR α 、FAS 蛋白表达有关, 这也是本研究下一步关注的内容之一。

综上所述, HCTF 对肝细胞保护作用机制可能是通过下调 LXR α 、FAS mRNA 基因和蛋白表达, 抑制 LXR 信号传导通路的脂肪合成关键酶 FAS 的转录, 加强了清除氧自由基的能力而实现的。

参考文献

[1] 李时珍, 李炳文. 本草纲目彩图版 (上篇) [M]. 天津: 天津古籍出版社, 2006.

[2] 郭冷秋, 张颖, 张博, 等. 萱草根及黄花菜的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 74-76.

[3] 王云锋, 赵丽晶, 徐博, 等. 黄花菜的营养成分和生物活性研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2012, 2(33): 46-49.

[4] 詹利生, 李贵荣, 李少旦, 等. 黄花菜中总黄酮的提取及其药理作用初步观察 [J]. 南华大学学报: 医学版, 2005, 33(1): 112-114.

[5] 周向军, 高义霞, 张霞. 响应面法优化黄花菜总黄酮提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 29-32.

[6] 张自强, 刘玉梅, 朱雪敏, 等. 6-苄氨基嘌呤对四氯化碳致小鼠肝氧化损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(11): 928-931.

[7] 茹琴, 欧阳五庆, 张黎. 激动素对小鼠急性四氯化碳肝损伤的保护作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(4): 263-267.

[8] Diniz Y S, Fernandes A A H, Campos K E. Toxicity of

hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42(2): 313-319.

[9] Ronco M T, Francés D E, Ingaramo P I, et al. Tumor necrosis factor alpha induced by Trypanosoma cruzi infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice [J]. *Cytokine*, 2010, 49(1): 64-72.

[10] 韩莉, 杨钦河, 杨雪松, 等. 疏肝健脾方药对 NASH 大鼠 Kupffer 细胞 NF- κ B p65 和 IKK β mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(4): 641-646.

[11] 魏波, 杨钦河, 王文晶, 等疏肝健脾方对 HASH 大鼠肝组织 IKK β mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(8): 1448-1454.

[12] Maki R G. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development and cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(33): 4985-4995.

[13] Velasco-Loyden G, Perez-Carreón J I, Agüero J F, et al. Prevention of *in vitro* hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(11): 1690-1699.

[14] 苑晓焯, 王淼, 曹经琳, 等. 磷酸肌酸钠对离体大鼠肝脏 ALT/LDH 指标的影响 [J]. 河北医药, 2014, 36(24): 3696-3698.

[15] 陈卫东. 注射用内给氧对肝缺血再灌注损伤兔血清 ALT、AST、LDH 和细胞凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(17): 2500-2502.

[16] Wakade C, Kham M M, Desevilla L M, et al. Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(1): 367-379.

[17] Repa J J, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR alpha and LXR beta [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(22): 2819-2830.

[18] Adachi M, Brenner D A. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase [J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 677-685.

[19] Vallim T, Salter A M. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2010, 82(4/6): 211-218.

[20] 蔡晶, 黄巧冰, 迟德彪. 五味子乙素对 H₂O₂ 损伤人肝细胞 Fas 通路的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 3(24): 583-592.

[21] 卢绮萍, 吴在德, 李东. Rxa 对过氧化氢诱导人类肝细胞系 Fas mRNA 表达及 Ca²⁺流变化影响的单细胞分析 [J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(2): 155-157.