

维药小茴香抗肝纤维化作用 及对TGF- β /smad信号转导通路的影响

张泽高, 肖琳, 詹欣宇, 银皓, 鲁晓擘, 张跃新 (新疆医科大学第一附属医院 感染科, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 探讨小茴香提取物抗肝纤维化的作用及其对TGF- β /smad信号转导通路和肝星状细胞活化的影响。方法 选择44只SD大鼠给予40%四氯化碳(CCl₄)橄榄油溶液4 ml/(kg·体重)皮下注射5周制备肝纤维化模型, 成模后随机分成治疗组和模型对照组, 同时取6只正常大鼠做空白对照。治疗组给予小茴香提取物灌胃, 模型对照组给予生理盐水灌胃, 4周末处死大鼠检测血清ALT、AST、HA、LN, 肝石蜡切片行Masson染色和抗 α 平滑肌动蛋白(α -SMA)、TGF- β 受体I型(TGF- β R I)、TGF- β ₁免疫组织化学染色, 反转录实时荧光定量PCR分析肝组织TGF- β ₁、smad2 mRNA相对内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的表达量。结果 小茴香提取物治疗组血清ALT、AST、HA水平, 肝组织内胶原纤维含量、 α -SMA、TGF- β R I、TGF- β ₁表达以及TGF- β ₁、smad2 mRNA相对表达量均明显低于模型对照组。结论 小茴香提取物可通过抑制TGF- β /smad信号转导通路抑制肝星状细胞活化, 从而减轻大鼠肝纤维化。

关键词: 小茴香; 肝纤维化; 转化生长因子- β ₁; 信号转导通路

Effects of foeniculum vulgare mill of anti liver fibrosis on TGF- β /smad signal pathways

ZHANG Ze-gao, XIAO Lin, ZHAN Xin-yu, YIN Hao, LU Xiao-bo, ZHANG Yue-xin (Department of Infectious Diseases, The First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: Objective To evaluate the therapeutic effects of Foeniculum Vulgare Mill in liver fibrosis rats, and to investigate how it work on TGF- β /smad signal pathways and hepatic stellate cell activation. **Methods** Total of fifty male SD rats were randomly divided into 3 groups: a blank control group (BC group, 6 rats), a hepatic fibrosis model control group (HFC group, 22 rats), a foeniculum vulgare mill treatment group (FVMT group, 22 rats). Forty-four rats of HFC group and FVMT group were given 40% CCl₄ olive oil mixture by subcutaneous injection to make hepatic fibrosis models for 5 weeks. Rats in FVMT group were given FVMT by intragastric administration, while rats in HFC group were treated with saline for weeks and then were sacrificed. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), laminin (LN) were detected. Histopathologic changes were observed after H.E. and Masson stainings. The expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) were detected by immunohistochemical staining. TGF- β ₁, smad2 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** The level of serum ALT, AST, HA, LN and content of collagen fibers, α -SMA, TGF- β R I, TGF- β ₁ in the liver of FVMT group rats were significantly lower than those of HFC group. The expression of TGF- β ₁, smad2 mRNA were higher in HFC group than those of FVMT group. **Conclusions** Uygur Herb foeniculum vulgare mill may reduce liver fibrosis by suppressing the activation of TGF- β /smad signal pathways and prevent the activation of hepatic stellate cell.

Key words: Foeniculum vulgare mill; Hepatic fibrosis; Transforming growth factor- β ₁; Signal pathways

肝纤维化(hepatic fibrosis)是继发于肝脏慢性损伤, 肝组织修复过程中细胞外基质合成、降解、沉积失衡而引起的病理过程, 最终可导致肝硬化。

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)被激活转化为肌成纤维细胞是肝纤维化发生的中心环节^[1], 因而抑制或阻断HSC的活化和促进其凋亡是抗肝纤维化治疗的主要策略。现已证实, 转化生长因子- β ₁(transforming growth factor- β ₁, TGF- β ₁)是最强的

致纤维化细胞因子, TGF- β /smad信号转导通路是肝星状细胞活化、增殖、刺激胶原生成最重要的途径, 也是抗纤维化治疗的重要靶点^[2]。伞科植物小茴香原产于地中海, 从中亚传入新疆地区, 目前在中国吉林、内蒙古、新疆、甘肃等省份以及欧洲中东、中亚多国均有种植。现代研究发现小茴香提取物具有抑菌^[3]、调节胃肠功能^[4]、保护肝细胞、促进肝细胞再生^[5]、减少肝硬化腹水^[6]、抗氧化损伤等^[7]药理作用, 维吾尔族民间有用小茴香治疗肝硬化腹水的偏方, 疗效显著, 但其抗肝纤维化的研究报道极少且机制尚不清楚。本研究旨在探讨小茴香提取物抗肝纤维化的作用及其对TGF- β /smad信号转导通路和肝星状细胞活化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料及药品 SD大鼠购自新疆医科大学实验动物中心, 生产批号(S20100711)。维吾尔草药小茴香购自新疆维吾尔医医院(生产批号20100601), 采用水蒸气蒸馏法提取小茴香有效成分。将100 g小茴香置于双提装置中, 加15倍量的蒸馏水回流提取2小时, 同时收集蒸馏液, 水提液经高速离心机离心, 将所得的离心液浓缩后与蒸馏液混合成总体积200 ml。Masson三色染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司, 小鼠抗 α -SMA单克隆抗体和兔抗TGF- β R I 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 兔抗TGF- β_1 多克隆抗体购自Santa Cruz生物技术公司(美国)。二抗试剂盒及DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。大鼠透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN) ELISA试剂盒购自上海活乐生物科技有限公司。TRIZOL购自Invitrogen公司(美国)。反转录试剂盒RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis

Kit 购自 Fermentas公司(美国)。实时荧光定量PCR仪BIORAD IQ5, SYBR® Premix Ex Taq™购自TAKARA(大连)公司, 引物采用Primer Premier 6软件设计, 由TaKaRa(大连)公司合成, 引物信息见表1。

1.2 动物模型及处理 选择50只7周大雄性Sprague-Dawley大鼠, 体重(200 \pm 30) g, 饲养于恒温12小时黑夜白昼的环境中。50只大鼠随机分成3组, 空白对照组6只正常饲养, 肝纤维化模型对照组和小茴香治疗组各22只, 构建肝纤维化模型。模型构建方法: 每3日1次背部皮下注射40%四氯化碳橄榄油混合液, 剂量为4 ml/(kg·体重), 并给予80%玉米面加20%动物油加0.5%胆固醇压制制成的高脂低蛋白饮食, 造模5周后, 肝纤维化模型对照组和小茴香治疗组各随机抽取2只大鼠验证模型质量, 小茴香治疗组给予小茴香提取物灌胃, 剂量为0.3 ml/(100g·体重), 肝纤维化模型对照组给予等体积生理盐水灌胃, 每日1次, 持续4周后处死所有动物, 取血清检测肝功能和肝纤维化指标, 取质量约0.5 g的肝组织放入无RNA酶的冻存管中液氮冻存。

1.3 血清学检测 血清ALT、AST采用全自动生化检测仪检测。透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)采用ELISA法。

1.4 病理学检查 肝组织病理学检查及Masson染色肝石蜡切片作常规HE染色和Masson染色, 肝脏炎症活动度分级和纤维化分期标准参照中华医学会《病毒性肝炎防治方案》^[8]。

1.5 肝组织免疫组织化学检测 采用免疫组织化学染色方法检测肝组织 α 平滑肌动蛋白(α -SMA)、TGF- β R I、TGF- β_1 的表达。肝组织切片常规脱蜡水化后, 用0.1 M枸橼酸热修复15分钟, 过氧化氢

表1 引物信息表

基因名	基因登录号	引物序列(5' -3')	产物长度(bp)
内参(GAPDH)-上游	NM_017008.3	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	143
-下游		ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	
TGF- β_1 -上游	NM_021578.2	TGCGCCTGCAGAGATTCAAG	82
-下游		AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA	
Smad2-上游	NM_019191.1	GCTGACTCGAATGTGCACCATAA	112
-下游		GCCATTGAGATGAAGTTCAATCCA	

封闭10分钟,小鼠或兔血清封闭10分钟,加一抗(1:100)4℃过夜,加二抗37℃孵育20分钟,辣根过氧化物酶常温孵育15分钟,DAB显微镜下显色,苏木素复染后盐酸乙醇分化、脱水透明封片。

1.6 实验室方法 肝组织TGF- β_1 、smad2 mRNA相对表达量的检测选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参。

提取总RNA:取60~70 mg肝组织于研钵中,加入液氮研成粉末,加入TRIZOL 1 ml后继续研磨,解冻后,转移至1.5 ml EP管中,加入0.2 ml三氯甲烷,4℃ 12 000 r/min离心10分钟,取上清水相,加入0.5 ml 异丙醇,震荡混匀后静置5分钟,4℃ 12 000 r/min离心10分钟,弃液体,保留管底白色沉淀,加入75%酒精洗涤,4℃ 12 000 r/min离心3分钟,弃液体,低温干燥20分钟,加入50 μ l 1% DEPC水溶解RNA。紫外分光光度仪检测核酸浓度和纯度,浓度在1000~2000 ng/ μ l之间,非变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。

反转录:取总量1 μ g 总RNA模板,1 μ l oligo(dT)₁₈,加ddH₂O补齐至12 μ l,加入RNase Inhibitor 1 μ l、Reaction Buffer 4 μ l、dNTP Mix 2 μ l、M-MuLV 1 μ l,总体系20 μ l,45℃反应1小时、70℃反应5分钟。

实时荧光定量PCR:采用荧光染料法。预实验PCR产物琼脂糖凝胶电泳,目的条带切胶回收后,连续10倍稀释10次,作为标准品。反应体系:cDNA模板2 μ l,ddH₂O 7 μ l,上下游引物各0.5 μ l,SYBR® Premix Ex Taq 10 μ l。

1.7 数据处理及分析 Masson染色和免疫组织化学染色随机选取3个视野摄片后用Image-Pro-Plus 软件进行累计光密度(IOD, integrated optical density)分

析,mRNA用各个指标的拷贝数/内参拷贝数分析,计量资料先作正态性检验和方差齐性检验,符合条件后采用方差分析,两组之间的比较采用LSD或Dunnett-T3法,不符合条件行秩和检验,等级资料采用秩序检验,数据采用SPSS 17.0软件分析,检验标准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 空白组大鼠毛色光滑,有光泽,活泼,采食饮水正常。肝纤维化模型大鼠逐渐出现精神萎靡或暴躁、好斗,进食减少,毛色失去光泽,体重下降,肝纤维化模型对照组有1只大鼠死亡,故最终纳入统计学处理的数据为肝纤维化模型对照组19只,小茴香治疗组20只。停止造模后,小茴香治疗组和肝纤维化模型对照组大鼠采食逐渐增多,体重增加。

2.2 试验终点血清学检测结果比较 小茴香治疗组血清ALT、AST、HA水平均明显低于模型对照组($P < 0.05$),小茴香治疗组和肝纤维化模型对照组均高于空白对照组。3组间LN差异均无统计学意义,见表2。

2.3 肝组病理检查 空白对照组大鼠肝脏呈粉红色,表面光滑有光泽,边缘锐利,质脆;肝纤维化模型对照组和小茴香治疗组大鼠肝脏呈灰白色,边缘成锯齿状,质柔韧。

HE染色:空白对照组大鼠肝脏小叶结构完整,肝细胞成条索状分布;肝纤维化模型对照组肝脏结构破坏,肝细胞坏死形成大量空泡,可见纤维组织增生、交连形成假小叶;小茴香治疗组大鼠肝脏坏死,可见纤维组织增生,少数大鼠有假小叶形成,见图1。

小茴香治疗组的炎症活动度分级和纤维化分期均较模型对照组明显减轻($P < 0.05$),见表3。

表2 3组大鼠血清ALT、AST、HA、LN检测结果

	ALT (U/L)	AST (U/L)	HA (ng/L)	LN (μ g/L)
肝纤维化模型对照组 (n=19)	388.86 \pm 228.47 ^a	455.58 \pm 222.54 ^b	221.29 \pm 36.43 ^c	146.84 \pm 25.80 ^d
小茴香治疗组 (n=20)	199.63 \pm 205.41 ^e	282.42 \pm 255.62 ^f	189.17 \pm 44.46 ^g	134.78 \pm 16.56 ^h
空白对照组 (n=6)	39.25 \pm 9.30	91.35 \pm 10.93	176.21 \pm 18.07	146.76 \pm 14.48
F	8.210	6.760	4.760	1.850
P	0.001	0.003	0.014	0.170

注:与空白对照组比较,^a $P = 0.001$,^b $P = 0.001$,^c $P = 0.017$,^d $P = 0.994$,^e $P = 0.007$,^f $P = 0.010$,^g $P = 0.655$,^h $P = 0.297$

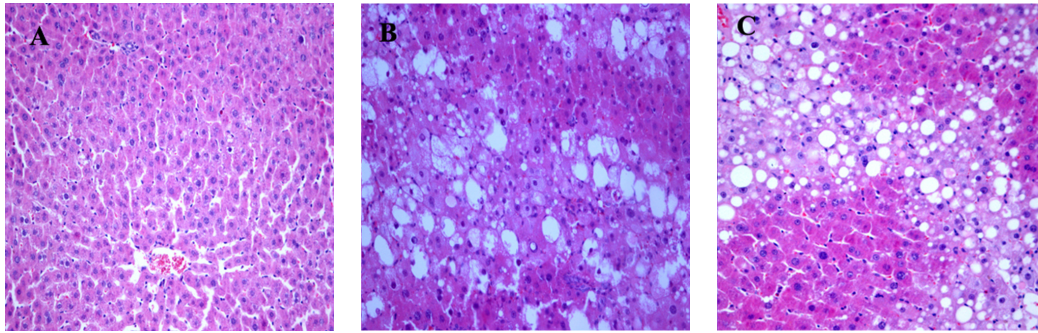


图1 大鼠肝脏组织(HE染色, 20×)

注: A为空白对照组, B为小茴香治疗组, C为模型对照组

表3 肝脏炎症分级和纤维化分期结果

	炎症活动度					肝纤维化程度				
	G ₀	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
肝纤维化模型对照组 (n=19)	0	0	3	13	3	0	3	4	12	0
小茴香治疗组 (n=20)	0	1	10	8	1	0	4	12	4	0
空白对照组 (n=6)	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0

注: 小茴香治疗组炎症活动度与模型对照组比较, $Z = -2.55, P = 0.011$; 小茴香治疗组肝纤维化程度与模型对照组比较, $Z = -2.186, P = 0.290$; 3组炎症活动度和肝纤维化程度比较, P 均=0.000

Masson染色: 小茴香治疗组(图2A)和肝纤维化模型对照组(图2B)肝组织均有纤维形成, 染成蓝色的胶原纤维在肝脏成网格状分布, 纤维间隔内无中央静脉, 但治疗组纤维条索较模型对照组细, 空白对照组仅血管壁染成蓝色。用软件测定胶原纤维累计光密度值, 小茴香治疗组明显低于肝纤维化模型对照组 ($P < 0.01$), 见图2C。

2.4 α -SMA、TGF- β_1 及TGF- β RI的表达 空白对照组大鼠肝脏 α -SMA免疫组织化学染色只在血管内皮细胞有极少表达。小茴香治疗组(图3A)、肝纤维化模型对照组(图3B)可见大量 α -SMA阳染肝星状细胞分布在纤维间隔区和坏死区, 肝纤维化模型对照组大鼠 α -SMA表达明显高于小茴香治疗组。

图3C和图3D分别为小茴香治疗组和TGF- β RI的表达, TGF- β RI在肝细胞和肝星状细胞均有表达, 肝纤维化模型对照组表达高于小茴香治疗组。

TGF- β_1 在肝脏的表达如图3E(小茴香治疗组)和图3F(肝纤维化模型对照组), 在肝组织结构破坏严重的区域, 肝星状细胞大量表达TGF- β_1 , 肝纤维化模型对照组的表达量高于小茴香治疗组。

免疫组织化学染色阳性区域累计光密度测定结果统计见表4。

2.5 TGF- β_1 、smad2 mRNA的相对表达量 从肝

组织中提取总mRNA浓度为1000~2000 ng/ μ l, $A_{260/280}$ 为1.93~2.0, 非变性琼脂糖凝胶(2%)电泳显示mRNA完整, 28 S、18 S、5 S条带清晰(图4C-1)。TGF- β_1 、smad2、GAPDH mRNA标准曲线 R^2 分别为0.994、0.998、0.996, 扩增效率 E 分别为87.6%、91.4%, 84.3%。TGF- β_1 、smad2 mRNA对于GAPDH相对表达量统计结果见图4A和图4B, 肝纤维化模型对照组均明显高于小茴香治疗组 ($P < 0.05$)。图4C-2为PCR产物电泳结果, 片段大小与设计相符。

3 讨论

维吾尔药小茴香又称安息茴香, 其种子中含有挥发油如反式茴香脑、D-柠檬烯、 α -蒎烯、小茴香酮等, 脂肪油如茴香醚、十八碳-烯酸、棕榈酸等, 氨基酸如谷氨酸、谷氨酰胺、天门冬氨酸、脯氨酸等^[9,10], 作为一种传统的民族草药, 其主要应用于治疗寒症腹痛, 睾丸偏坠, 痛经, 少腹冷痛, 食少吐泻, 睾丸鞘膜积液。在维吾尔民间普遍用于清肝明目, 消肿利湿, 其护肝和抗肝纤维化的作用机制研究刚刚起步。

临床和基础实验证实肝纤维化是可逆的, 抑制肝星状细胞的活化、增殖, 肝纤维化可以减轻或完全恢复。TGF- β_1 是目前已知的最重要的致纤维化因

表 4 免疫组化染色累计光密度测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

	α -SMA	TGF- β R I	TGF- β_1
肝纤维化模型对照组 (n=19)	52.14 \pm 23.87	37.13 \pm 23.12	39.94 \pm 25.07
小茴香治疗组 (n=20)	35.93 \pm 19.41	23.11 \pm 13.01	26.21 \pm 13.31
<i>t</i>	2.320	2.210	2.120
<i>P</i>	0.026	0.033	0.041

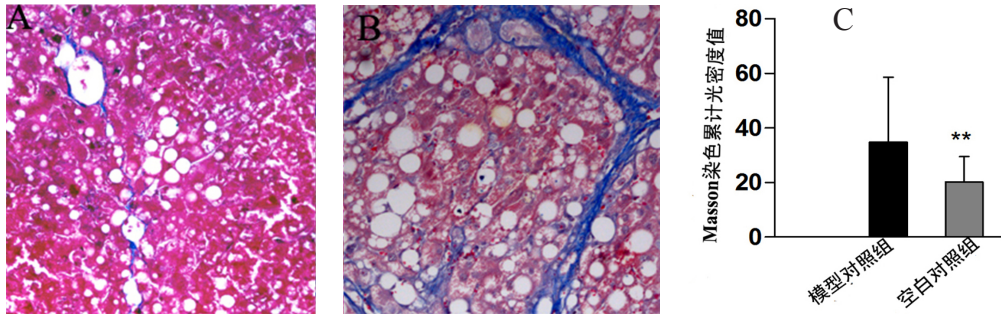


图 2 两组大鼠肝脏Masson染色图及半定量数据图

注: A: 小茴香治疗组; B: 模型对照组, 胶原纤维被染成蓝色, 模型对照组大鼠肝脏纤维条索粗, 间隔宽, 治疗组细而窄; C: 胶原纤维累计光密度结果统计图, 治疗组胶原纤维含量显著低于模型对照组, ***P* < 0.01

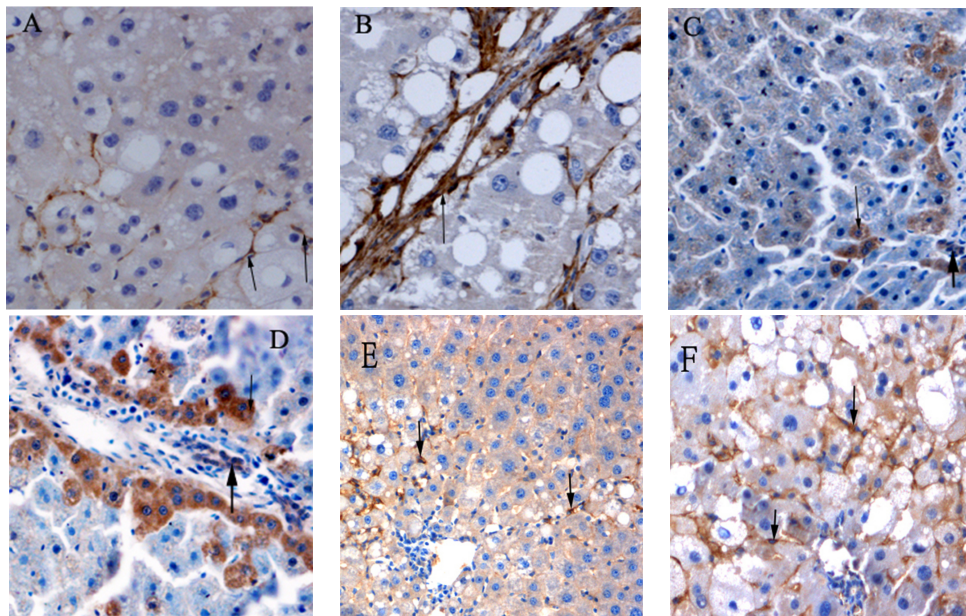


图 3 大鼠肝脏 α -SMA、TGF- β_1 及TGF- β R I 免疫组织化学染色

注: A、B分别为小茴香治疗组、模型对照组 α -SMA免疫组织化学染色, \uparrow 为阳染的肝星状细胞。C、D分别为小茴香治疗组、模型对照组肝脏TGF- β R I免疫组织化学染色, \downarrow 为阳染的肝细胞, \uparrow 为阳染的肝星状细胞。E、F分别为小茴香治疗组、模型对照组TGF- β_1 免疫组织化学染色, \downarrow 为阳染的肝星状细胞

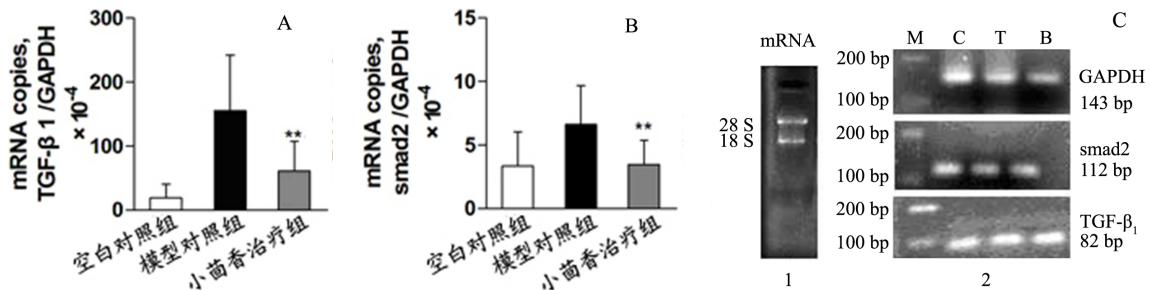


图 4 大鼠肝脏TGF- β_1 、smad2 mRNA表达图

注: A、B分别表示TGF- β_1 mRNA、smad2 mRNA 对GAPDH的相对表达量, **与模型对照组比较, *P* < 0.05。C: 1为总mRNA电泳图; 2为PCR产物电泳图, 其中M为Marker, C、T、B分别为模型对照组、小茴香治疗组、空白对照组

子^[11],通过旁分泌和自分泌刺激HSC活化和增殖,调节细胞外基质的合成,介导肝纤维化的发生^[12]。TGF- β_1 作用的信号转导途径主要是TGF- β /smad途径^[13]。多种因素可以影响TGF- β /smad信号转导通路,肝纤维化的改善总是与TGF- β /smad通路的抑制同时发生。细胞膜上TGF- β 受体分两型T β R- I、T β R- II, TGF- β_1 首先与T β R- II结合, T β R- I与T β R- II发生二聚化, T β R- I活化,形成TGF- β 受体复合物,胞内的R-smad(如smad2和smad3)蛋白被SARA(smada锚定蛋白)锚定,呈递到活化的T β R- I上, R-smad蛋白被T β R- I的Ser/Thr蛋白激酶磷酸化,与复合体脱离,脱离后与Co-Smad(如Smad4)形成三聚体,活化的三聚体转位进入细胞核,与靶基因的Smad结合元件结合,激活基因的转录,抑制型smad如smad7对这一过程起负性调节作用。肝星状细胞在TGF- β_1 的刺激下,转化为肌成纤维细胞,表达 α -SMA,其增殖能力、迁移能力和表达胶原能力大大增强。有研究^[14,15]发现抑制TGF- β_1 的表达,抑制TGF- β /smad信号转导途径的激活,是阻断肝纤维化的关键。

本项研究结果显示,肝纤维化大鼠在给予小茴香提取物治疗后,血清ALT、AST及透明质酸、层粘连蛋白明显降低,组织学检查肝脏纤维化程度明显减轻。抗 α -SMA和TGF- β R I、TGF- β_1 免疫组织化学染色结果显示,治疗后小茴香治疗组大鼠 α -SMA阳性肝星状细胞较肝纤维化模型对照组明显减少,其大鼠肝脏TGF- β R I表达量亦低于肝纤维化模型对照组。从图3可以看出,肝星状细胞被激活后,大量表达 α -SMA,同时还表达TGF- β_1 ,但TGF- β R I主要在肝细胞表达,星状细胞反而表达较少,TGF- β_1 对肝细胞的作用报道较少,有待进一步研究。分子生物学实验显示,肝组织中TGF- β_1 mRNA和smad2 mRNA相对表达量在小茴香治疗组明显低于未治疗组。由此可见,小茴香提取物具有改善肝功能,抑制TGF- β /smad信号通路的活化,减轻肝纤维化的作用。

本项研究尚不能说明小茴香对TGF- β /smad信号转导通路的抑制是直接作用或间接影响,但分析

小茴香的成分,其含有多种不饱和脂肪酸如十八烯-10酸、花生酸、棕榈酸,认为富含烯烃的不饱和脂肪酸可能作为一种还原剂对清除氧自由基、减轻肝内脂质过氧化损伤具有重要作用,本课题组前期研究^[16]已发现小茴香精油具有抗氧化应激损伤及抑制肝纤维化的作用。聚乙炔醇的9,1-环氧-16羟基-十八-17-烯-12、14-二炔-1-醛,具有抑制细胞增殖的功能,认为可能与小茴香抑制肝星状细胞增殖参与抗肝纤维化的机制有关。

参考文献

- [1] Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis[J]. *N Engl J Med*,1993,25:1828-1835.
- [2] 成军. 现代肝炎病毒分子生物学[M]. 第2版. 北京: 科学技术出版社,2009:734.
- [3] 高莉, 斯拉甫·艾白, 韩阳花. 小茴香挥发油化学成分及抑菌作用的研究[J]. *中国民族医药杂志*,2007,12:67-68.
- [4] 陈立国. 小茴香的药理作用[J]. *中草药*,1989,20:41-42.
- [5] Ozbek H, Ugras S, Dulger H, et al. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil[J]. *Fitoterapia*,2003,74:317-319.
- [6] 周世雄, 甘子明, 张力. 中药小茴香对肝硬化腹水大鼠利尿作用机制实验研究[J]. *新疆医科大学学报*,2007,30:33-35.
- [7] Choi EM, Hwang JK. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*[J]. *Fitoterapia*,2004,75:557-565.
- [8] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*,2000,8:324-329.
- [9] 任安祥, 何金明, 郭园, 等. 我国不同来源茴香提取物含量与成分分析[J]. *时珍国医国药*,2006,17:158-159.
- [10] Senatore F, Oliviero F, Scandolera E, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*foeniculum vulgare* mill. ssp. *Vulgare* var. *azoricum* (mill.) Thell][J]. *Fitoterapia*,2013,90:214-219.
- [11] Breikopf K, Haas S, Wiercinska E, et al. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease[J]. *Alcohol Clin Exp Res*,2005,29(11 Suppl):121S-131S.
- [12] Sun X, He Y, Ma TT, et al. Participation of miR-200a in TGF- β_1 -mediated hepatic stellate cell activation[J]. *Mol Cell Biochem*,2014,388:11-23.
- [13] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus[J]. *Cell*,2003,113:685-700.
- [14] Hong SW, Jung KH, Lee HS, et al. Suppression by fucoidan of liver fibrogenesis via the TGF- β /Smad pathway in protecting against oxidative stress[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2011,75:833-840.
- [15] 张国梁, 林红, 戴敏, 等. 中药软肝饮对CCl4诱导的肝纤维化大鼠模型Smad3表达的影响[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2008,1:13-17.
- [16] 张泽高, 鲁晓攀, 肖琳, 等. 小茴香精油对肝纤维化大鼠抗氧化应激损伤作用的研究[J]. *中华肝脏病杂志*,2012,20:221-226.