

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.009

文章编号: 1005-8982(2016)15-0050-06

论著

川芎嗪对血管紧张素 II 诱导的大鼠肝星状细胞转化生长因子 - β_1 /Smads 通路的影响

魏国微¹, 李克跃²

(贵州省人民医院 1. 干部综合病房, 2. 肝胆外科, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 目的 通过研究川芎嗪对体外培养的血管紧张素 II 诱导的肝星状细胞(HSC)转化生长因子 - β_1 (TGF- β_1)/Smads 通路的作用, 探讨其治疗肝纤维化的机制。**方法** 对大鼠 HSC 使用血管紧张素 II (1×10^{-5} mol/L) 及血管紧张素 II (1×10^{-5} mol/L) 联合不同浓度的川芎嗪(0.04、0.20 和 1.00 mg/ml) 干预 48 h, 活细胞计数法(CCK-8) 检测各组细胞增殖水平的变化, 实时荧光定量聚合酶链反应及 Western blot 检测各组细胞 TGF- β_1 、Smad2、Smad4 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 血管紧张素 II 明显促进 HSC 的增殖, 同时上调该细胞 TGF- β_1 、Smad2、Smad4 的 mRNA 及蛋白表达($P < 0.01$), 而血管紧张素 II 对 HSC 的诱导作用可被川芎嗪抑制($P < 0.01$), 并呈现浓度依耐性。**结论** 川芎嗪抗肝纤维化的机制之一可能是通过调控肝星状细胞 TGF- β_1 /Smads 通路实现的。

关键词: 肝星状细胞; 转化生长因子 - β_1 /Smads; 川芎嗪; 血管紧张素 II

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Effects of Tetramethylpyrazine and angiotensin II on TGF- β_1 /Smads signaling pathway in rat hepatic stellate cells

Guo-wei Wei¹, Ke-yue Li²

(1. General Ward for Cadre, 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Tetramethylpyrazine and angiotensin II on transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)/Smads signaling pathway in rat hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** HSCs were cultured, and then treated by angiotensin II (1×10^{-5} mol/L) or angiotensin II (1×10^{-5} mol/L) combined with different concentrations of Tetramethylpyrazine (0.04, 0.20 and 2.00 mg/ml). The treated cells and control groups were incubated for 48 hours. Cell proliferation was assayed by CCK-8. Relative mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad2 and Smad4 were assayed by quantitative real-time polymerase chain reaction. Relative protein expressions of TGF- β_1 , Smad2 and Smad4 were investigated by Western blot. **Results** Angiotensin II significantly promoted HSC proliferation, significantly up-regulated both the mRNA and protein expressions of TGF- β_1 , Smad2 and Smad4 in HSCs ($P < 0.01$). The effects of angiotensin II in HSCs were significantly inhibited by Tetramethylpyrazine in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusions** This study suggested that the antiliver fibrosis effects of Tetramethylpyrazine may connect with modulation of TGF- β_1 /Smads signaling pathway.

Keywords: hepatic stellate cell; TGF- β_1 /Smads; Tetramethylpyrazine; angiotensin II

肝纤维化是指肝脏内弥漫性细胞外基质(特别是胶原物质)过度沉积,是机体对各种病因引起的慢性肝损伤后的一种损伤修复反应^[1],是肝硬化的早期可逆阶段,如不及时治疗则可能进展成为失代偿期肝硬化并出现各种终末期肝病等并发症^[2]。我国是肝硬化的高发地区,因此,肝纤维化的深入研究对缓解肝纤维化病情具有重要的临床意义。研究发现肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)在肝纤维化发病过程中发挥重要作用^[3-5]。血管紧张素 II 通过促进 HSC 发生,影响转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 ,TGF- β_1),参与肝纤维化形成^[6-8]。TGF- β_1 /Smads 通路在 HSC 激活、增殖及肝纤维化过程中发挥重要作用^[5,9]。报道显示,活血化瘀中药川芎嗪具有一定的抗组织纤维化作用^[10-15],但其未彻底阐明抗肝纤维化的机制,对血管紧张素 II 干预后 HSC 的 TGF- β_1 /Smads 通路作用也不清楚。为探索川芎嗪对血管紧张素 II 干预后 HSC 的 TGF- β_1 /Smads 通路的作用,笔者使用血管紧张素 II 及血管紧张素 II 联合不同浓度的川芎嗪对大鼠 HSC 细胞进行干预,并检测细胞增殖水平及细胞 TGF- β_1 、Smad2、Smad4 的 mRNA 及蛋白表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂、仪器

大鼠肝星状细胞 HSC-T6 购自中国科学院细胞库,达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium,DMEM)(高糖型,美国 Hyclone 公司),0.25%胰酶(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),SYBRR Premix Ex Taq™ 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司),TGF- β_1 、Smad2、Smad4 及 β 肌动蛋白引物(美国 Introgen 公司),TGF- β_1 正向引物:TGGCGTTACCTTGTAACC,反向引物:GGTGTGAGCCCTTTCCAG;Smad2 正向引物:CCAGTCTCTTGATG GTCGT,反向引物:GGCGGCAGTTCTGTTAGAAT;Smad4 正向引物:CTTTGCTTGGGTCAACTCTC,反向引物:TGGGCTCACGCATATATTTC; β 肌动蛋白正向引物:AGCCATGTACGTAGCCATCCA,反向引物序列:TCTCCGAGTCCATCAATG。抗 TGF- β_1 抗体及抗 Smad4 抗体(英国 Abcam 公司),抗 β 肌动蛋白抗体(北京全式金生物技术有限公司),活细胞计数法(cell counting kit-8,CCK-8)试剂盒(上海生工生物技术有限公司),血管紧张素 II (美国

Sigma 公司),注射用盐酸川芎嗪(北京四环科宝有限公司)。

1.2 细胞的培养

大鼠肝星状细胞 HSC-T6,调整细胞密度为 $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个/ml,置于 37°C 、5%二氧化碳 CO_2 培养箱内用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养。每 3 天换培养液 1 次。5~7 d 细胞布满瓶底后使用 0.25%胰蛋白酶消化传代,取 4~6 代 HSC 进行实验。

1.3 细胞的分组及其处理

将培养好的 4~6 代细胞用于实验。总共分为 5 个组,即对照组、血管紧张素 II 1×10^{-5} mol/L 组(血管紧张素 II 组)、血管紧张素 II (1×10^{-5} mol/L)+ 川芎嗪 0.04 mg/ml 组(血管紧张素 II + 川芎嗪 0.04 组),血管紧张素 II (1×10^{-5} mol/L)+ 川芎嗪 0.20 mg/ml 组(血管紧张素 II + 川芎嗪 0.20 组),血管紧张素 II (1×10^{-5} mol/L)+ 川芎嗪 1.00 mg/ml 组(血管紧张素 II + 川芎嗪 1.00 组)。待细胞长到 50%左右后,各组细胞置入无血清的 DMEM 培养饥饿过夜,次日各组细胞加入上述含不同浓度的川芎嗪培养基培养 48 h。

1.4 观察指标及测定方法

1.4.1 CCK-8 法测定细胞增殖水平 将成纤维细胞接种于 96 孔板,细胞浓度为 2×10^4 个/孔,每孔体积为 $100 \mu\text{l}$,每孔做 5 个复孔。各组细胞在 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h,加入不含或含有不同浓度的川芎嗪分别培养 48 h,每孔加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 试剂培养 2.5 h,按细胞计数说明书在酶标仪上 450 nm 波长处测定其光密度值,采用目前普遍使用的扣除本底策略来消除误差。

1.4.2 qRT-PCR 检测 TGF- β_1 、Smad2 及 Smad4 mRNA 的表达 各组细胞提取 RNA,将纯度好、完整性高的 RNA 合成 cDNA。按 $2 \times$ SYBRR Premix $10 \mu\text{l}$,正向引物 $0.4 \mu\text{l}$,反向引物 $0.4 \mu\text{l}$,cDNA $2 \mu\text{l}$,ddH₂O $7.2 \mu\text{l}$ 配成总量 $20 \mu\text{l}$ 体系进行 qRT-PCR。反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,共计 40 个循环。目的基因的表达使用相对定量法,以 β 肌动蛋白作为内参计算 ΔCt ,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.4.3 Western blot 法检测 TGF- β_1 及 Smad4 的蛋白表达 提取各组细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸法定量蛋白浓度,所得蛋白于聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电转至聚偏二氟乙稀膜后以足量的封闭液封闭,用一抗稀释液按 1:5 000 比例稀释检测蛋白的一抗,4 $^\circ\text{C}$

冰箱内孵育过夜。去掉一抗孵育液后以足量三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 (tris buffered saline and tween 20, TBST) 摇床洗涤 3 次, 每次 10 min, 用二抗稀释液按 1 : 5 000 比例稀释辣根过氧化物标记的二抗后室温振荡孵育 2 h, 倒掉二抗孵育液后以足量 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 以电化学发光, 显影和定影方法对胶片进行拍照和扫描, 以 β 肌动蛋白为内参照, Quantity one 系统分析目标条带的相对灰度值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组的比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管紧张素 II 对 HSC-T6 增殖水平的影响

血管紧张素 II 干预后的 HSC 增殖水平较正常值上升 ($t = -18.703, P = 0.000$), 使用不同浓度的川芎嗪干预后, 血管紧张素 II 对 HSC 增殖的刺激作用受到抑制 (川芎嗪浓度为 0.04 mg/ml 时, $t = 5.630, P = 0.000$; 川芎嗪浓度为 0.20 mg/ml 时, $t = 8.628, P = 0.000$; 川芎嗪浓度为 1.00 mg/ml 时, $t = 17.508, P = 0.000$), 且呈现浓度依耐性。见图 1 及表 1。

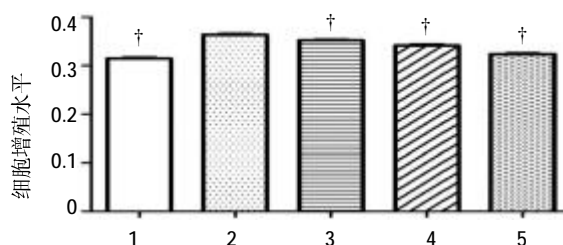
2.2 血管紧张素 II 及 TMP 对 HSC-T6 细胞 TGF- β_1 、Smad2、Smad4 mRNA 表达的影响

使用血管紧张素 II (1×10^{-5} mol/L) 干预后, HSC-T6 的 TGF- β_1 、Smad2、Smad4 mRNA 表达均上调 (TGF- β_1 : $t = -58.751, P = 0.000$; Smad2: $t = -36.644, P = 0.000$; Smad4: $t = -80.719, P = 0.000$), 但血管紧张素 II 对 HSC 的调控作用被川芎嗪不同程度地抑制: ①川芎嗪浓度为 0.04 mg/ml 时, TGF- β_1 : $t = 1.905, P = 0.105$; Smad2: $t = 1.180, P = 0.283$; Smad4: $t = 2.417, P = 0.052$ 。②川芎嗪浓度为 0.20 mg/ml 时, TGF- β_1 : $t = 10.870, P = 0.000$; Smad2: $t = 9.092, P = 0.000$; Smad4: $t = 22.739, P = 0.000$ 。③TMP 浓度为 1.0 mg/ml 时, TGF- β_1 : $t = 15.187, P = 0.000$; Smad2: $t = 14.011, P = 0.000$; Smad4: $t = 27.299, P = 0.000$ 。表现为浓度依耐性。见图 2 及表 2。

2.3 血管紧张素 II 及 TMP 对 TGF- β_1 、Smad4 蛋白表达的影响

使用血管紧张素 II (1×10^{-5} mol/L) 干预后, HSC-T6 的 TGF- β_1 及 Smad4 蛋白表达均上调 (TGF- β_1 : $t = -49.025, P = 0.000$; Smad4: $t = -32.745,$

$P = 0.000$), 但血管紧张素 II 对 HSC 的调控作用被川芎嗪不同程度地抑制: ①川芎嗪浓度为 0.04 mg/ml

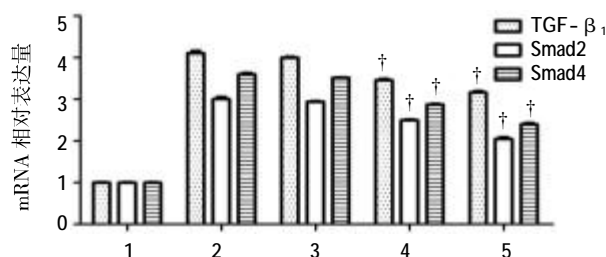


1: 对照组; 2: 血管紧张素 II 组; 3: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.04 组; 4: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.20 组; 5: 血管紧张素 II + 川芎嗪 1.00 组
† 与血管紧张素 II 组比较, $P < 0.01$

图 1 各组细胞增殖水平 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

表 1 各组细胞增殖水平方差分析

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
组间处理	0.008	4	0.002	126.514	0.000
误差	0.008	3	0.003	168.535	0.000
合计	0.008	24			



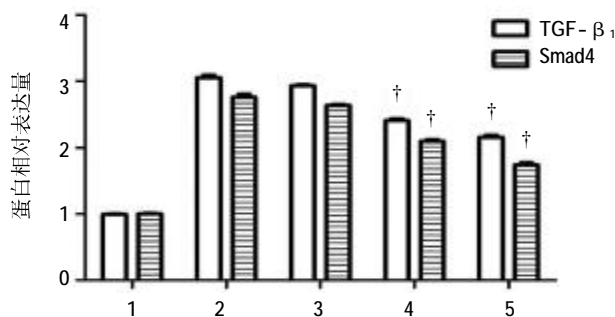
1: 对照组; 2: 血管紧张素 II 组; 3: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.04 组; 4: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.20 组; 5: 血管紧张素 II + 川芎嗪 1.00 组
† 与血管紧张素 II 组比较, $P < 0.01$

图 2 各组细胞各基因 mRNA 相对表达量 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

表 2 各组细胞各基因 mRNA 相对表达量方差分析

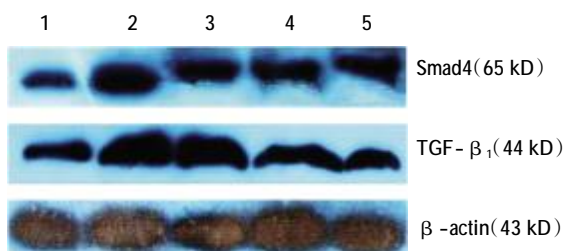
组别	变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
TGF- β_1	组间处理	25.415	4	6.354	1 467.000	0.000
	误差	19.991	3	6.664	1 538.000	0.000
	合计	25.480	19			
Smad2	组间处理	10.812	4	2.703	638.536	0.000
	误差	9.809	3	3.270	772.361	0.000
	合计	10.876	19			
Smad4	组间处理	18.020	4	4.505	2 328.000	0.000
	误差	16.313	3	5.438	2 809.000	0.000
	合计	18.050	19			

时, TGF-β₁: $t=2.380, P=0.055$; Smad4: $t=2.130, P=0.077$ 。②川芎嗪浓度为 0.20mg/ml 时, TGF-β₁: $t=12.983, P=0.000$; Smad4: $t=11.202, P=0.000$ 。③川芎嗪浓度为 1.00 mg/ml 时, TGF-β₁: $t=17.259, P=0.000$; Smad4: $t=16.362, P=0.000$ 。表现为浓度依耐性, 与各基因 mRNA 的变化趋势一致。见图 3、4 和表 3。



1: 对照组; 2: 血管紧张素 II 组; 3: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.04 组; 4: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.20 组; 5: 血管紧张素 II + 川芎嗪 1.00 组 † 与血管紧张素 II 组比较, $P<0.01$

图 3 各组细胞各蛋白相对表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)



1: 对照组; 2: 血管紧张素 II 组; 3: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.04 组; 4: 血管紧张素 II + 川芎嗪 0.20 组; 5: 血管紧张素 II + 川芎嗪 1.00 组。与血管紧张素 II 组比较, $P<0.01$

图 4 各组细胞各蛋白相对表达电泳图

表 3 各组细胞各蛋白相对表达量的方差分析

组别	变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
TGF-β ₁	组间处理	10.807	4	2.702	882.002	0.000
	误差	9.683	3	3.228	1 054.000	0.000
	合计	10.853	19			
Smad4	组间处理	8.193	4	2.048	515.723	0.000
	误差	7.926	3	2.642	665.188	0.000
	合计	8.253	19			

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病共有的病理改变,其

特点是以胶原为主的细胞外基质在肝内过度沉积。肝星形细胞又称 Ito 细胞、维生素 A 储存细胞、窦周细胞等,其约占肝内细胞总数的 5%~8%,正常情况下具有贮存脂肪和维生素 A、维持肝窦细胞外基质平衡、肝窦胶原及微生态平衡等功能^[16]。当肝脏受到物理、化学及生物因素刺激时,通常静止的 HSC 被“激活”或“活化”。而活化的 HSC 是肝纤维化时细胞外基质的主要来源细胞,与细胞外基质相互作用,在肝纤维化中起关键作用^[5,9,17]。

TGF-β₁ 作为一种细胞因子,在活化的 HSC 中的表达明显增强, TGF-β₁ 反过来又能激活 HSC,使其增殖旺盛。如果作用过度或持续表达,将会导致肝纤维化形成,是目前已知的与肝纤维化形成最密切的细胞因子^[2,5,9]。一般情况下, TGF-β₁ 是通过与其相应受体 TβR I、TβR II、内皮蛋白结合形成复合物后调控 Smad2/Smad3、Smad4、Smad6/Smad7 等蛋白形成 TGF-β₁/Smads 信号传导通路发挥作用^[18]。在肝纤维化过程中, HSC 中的 TGF-β₁、Smad2、Smad4 等的表达均明显增强^[19-20], 干预 HSC 中 TGF-β₁/Smads 信号传导通路中的 TGF-β₁、Smad2、Smad4 等的表达已经成为治疗肝纤维化的主要策略之一^[19-23]。

研究发现,在肝纤维化的 HSC 中,血管紧张素 II 的表达明显增强^[24]。血管紧张素 II 通过促进 HSC 发生,影响 TGF-β, 参与肝纤维化形成,在肝纤维化过程中发挥主要作用^[9]。也有报道显示,血管紧张素 II 对 HSC 的调控作用与 JAK2 及 Rho-Rock 通路有关^[25-26]。血管紧张素 II 引起的肝纤维化可能与诱导 NADPH 氧化酶依赖的氧化应激作用有关,而血管紧张素(1-7)能够抑制血管紧张素 II 引起的肝纤维化^[27]。在机体肝纤维化过程中血管紧张素 II 主要是通过肾素-血管紧张素-醛固酮系统发挥作用^[24]。干预 HSC 中肾素-血管紧张素-醛固酮系统的表达已经成为治疗肝纤维化的策略之一^[28]。笔者的体外实验研究提示血管紧张素 II 能够上调 HSC 中 TGF-β₁、Smad2 及 Smad4 的 mRNA 及蛋白表达 ($P<0.01$), 从而促进 HSC 的增殖 ($P<0.01$)。

中药川芎嗪具有抗组织纤维化、抗氧自由基、改变血液流变学、免疫抗肿瘤等功效,尤其是它的抗组织纤维化作用越来越引起人们的重视^[10-14]。报道显示,川芎嗪抑制 HSC 的激活与其干扰血小板源生长因子 β 受体调控 ERK 及 P38 通路有关^[29]。也有报道显示,川芎嗪抑制 HSC 的激活与其抑制胰岛素受

体调控 PI3K/AKT 及 ERK 通路有关^[30]。还有报道显示,川芎嗪抑制 HSC 的激活与其对 Hedgehog 信号转导通路的调控有关^[31]。体内研究提示,川芎嗪的抗肝纤维化作用与其对 HSC 细胞内 PDGF- β R/NL-RP3/Caspase1 通路进行调控从而抑制炎症细胞因子的表达有关^[32]。笔者的体外实验研究提示,盐酸川芎嗪能够明显抑制由血管紧张素 II 诱导的 HSC 中 TGF- β_1 、Smad4、Smad2 的 mRNA 及蛋白上调 ($P < 0.01$, 川芎嗪 0.20 ~ 1.00 mg/ml),从而抑制 HSC 的增殖 ($P < 0.01$, TMP0.04 ~ 1.00 mg/ml),且存在浓度依赖性。

综上所述,血管紧张素 II 上调 HSC 中 TGF- β_1 、Smad2、Smad4 的 mRNA 及蛋白表达,从而促进 HSC 的增殖;而川芎嗪对血管紧张素 II 诱导的 HSC 具有抑制作用,在一定范围内表现为浓度依赖性(0.2 ~ 1.0 mg/ml),提示川芎嗪的抗肝纤维化作用可能是通过其对 HSC 中 TGF- β_1 /Smads 通路的调控产生的。

参 考 文 献:

- [1] FRIEDMAN S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2247-2250.
- [2] ISMAIL M H, PINZANI M. Reversal of liver fibrosis[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2009, 15(1): 72-79.
- [3] TRAUTWEIN C, FRIEDMAN S L, SCHUPPAN D, et al. Hepatic fibrosis: Concept to treatment[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1S): S15-S24.
- [4] PUCHE J E, SAIMAN Y, FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4): 1473-1492.
- [5] GRESSNER A M, WEISKIRCHEN R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76-99.
- [6] GRACE J A, HERATH C B, MAK K Y, et al. Update on new aspects of the renin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 123(4): 225-239.
- [7] MUNSHI M K, UDDIN M N, GLASER S S. The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(5): 557-566.
- [8] ABBAS G, SILVEIRA M G, LINDOR K D. Hepatic fibrosis and the renin-angiotensin system[J]. *Am J Ther*, 2011, 18(6): 202-208.
- [9] KISSELEVA T, BRENNER D A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(1): S73-S78.
- [10] YUAN X P, LIU L S, FU Q, et al. Effects of ligustrazine on ureteral obstruction-induced renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(5): 697-703.
- [11] CAI X, CHEN Z, PAN X, et al. Inhibition of angiogenesis, fibrosis and thrombosis by tetramethylpyrazine: mechanisms contributing to the SDF-1/CXCR4 axis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88176. Doi: 10.1371/journal.pone.0088176.
- [12] LU B, YU L, LI S, et al. Alleviation of CCl4-induced cirrhosis in rats by tetramethylpyrazine is associated with downregulation of leptin and TGF- β 1 pathway[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2010, 33(3): 310-315.
- [13] ZHANG F, NI C, KONG D, et al. Ligustrazine attenuates oxidative stress-induced activation of hepatic stellate cells by interrupting platelet-derived growth factor- β receptor-mediated ERK and p38 pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 265(1): 51-60.
- [14] ZHANG F, ZHANG Z, KONG D, et al. Tetramethylpyrazine reduces glucose and insulin-induced activation of hepatic stellate cells by inhibiting insulin receptor-mediated PI3K/AKT and ERK pathways[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 197-204.
- [15] LEE T F, LIN Y L, HUANG Y T. Studies on antiproliferative effects of phthalides from *Ligusticum chuanxiong* in hepatic stellate cells[J]. *Planta Med*, 2007, 73(6): 527-534.
- [16] GEERTS A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells[J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3): 311-335.
- [17] ZHOU W C, ZHANG Q B, QIAO L. Pathogenesis of liver cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(23): 7312-7324.
- [18] BLOBE G C, SCHIEMANN W P, LODISH H F. Role of transforming growth factor (β) in human disease[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(3): 228.
- [19] KOO J H, LEE H J, KIM W, et al. Endoplasmic reticulum stress in hepatic stellate cells promotes liver fibrosis via PERK-Mediated degradation of HNRNP1 and up-regulation of SMAD2[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(1): 181-193.
- [20] SUN X E, ZHANG X Q, LIU M M. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the TGF- β 1/Smad signaling pathway of hepatic stellate[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 8744-8754.
- [21] LIU X, HU H, YIN J Q. Therapeutic strategies against TGF- β signaling pathway in hepatic fibrosis[J]. *Liver Int*, 2006, 26(1): 8-22.
- [22] KISSELEVA T, BRENNER D A. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2): 305-317.
- [23] 吴芙蓉, 姜玲, 何晓丽, 等. 橙皮苷对肝星状细胞 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(13): 2639-2643.
- [24] PEREIRA R M, DOS S R A, DA C D F L, et al. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(21): 2579-2586.
- [25] 张小兰, 李旭, 肖冰, 等. 血管紧张素 II 对大鼠肝星状细胞收缩及 Rho-Rock 通路的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(6): 968-971.
- [26] GRANZOW M, SCHIERWAGEN R, KLEIN S, et al. Angiotensin- II type 1 receptor-mediated Janus kinase 2 activation

- induces liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2014, 60(1): 334-348.
- [27] DE MACEDO S M, GUIMARAES T A, FELTENBERGER J D, et al. The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases[J]. *Peptides*, 2014, 62: 189-196.
- [28] MORENO M, BATALLER R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis[J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(4): 825-852.
- [29] ZHANG F, NI C, KONG D, et al. Ligustrazine attenuates oxidative stress-induced activation of hepatic stellate cells by interrupting platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ERK and p38 pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 265(1): 51-60.
- [30] ZHANG F, ZHANG Z, KONG D, et al. Tetramethylpyrazine reduces glucose and insulin-induced activation of hepatic stellate cells by inhibiting insulin receptor-mediated PI3K/AKT and ERK pathways[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 197-204.
- [31] HU J, CAO G, WU X, et al. Tetramethylpyrazine inhibits activation of hepatic stellate cells through hedgehog signaling pathways in vitro[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: DOI: 10.1155/2015/603067.
- [32] WU X, ZHANG F, XIONG X, et al. Tetramethylpyrazine reduces inflammation in liver fibrosis and inhibits inflammatory cytokine expression in hepatic stellate cells by modulating NLRP3 inflammasome pathway[J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(4): 312-321.

(申海菊 编辑)