

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2015)03-0209-05

日本血吸虫可溶性虫卵抗原对体外培养大鼠腹腔巨噬细胞活化及 TNF- α 表达的影响

胡 敏, 王亚东, 黄 顺, 钱 琛

(安徽中医药大学 病理学教研室, 安徽 合肥 230038)

【摘要】目的: 观察日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)对体外培养的大鼠腹腔巨噬细胞(PMCs)中 TNF- α 活化及表达的影响。方法: 体外培养大鼠 PMCs, 利用苏木素-伊红染色(HE染色)、免疫细胞化学染色(IHC)、RT-PCR 以及放免法, 对 SEA 作用后的大鼠 PMCs 形态变化和 TNF- α 表达进行观察; 同时, 制备 SEA 活化腹腔巨噬细胞条件培养基(SEA-MCM), 利用 MTT 比色法和 3H-脯氨酸掺入法, 对经过 SEA-MCM 作用后的 HSC-T6 细胞增殖及胶原合成结果进行检测。结果: ①大鼠 PMCs 在 LPS(10 mg/L)和 SEA(10 mg/L)分别作用 3 h、6 h 和 9 h 后, 可以使 PMCs 活化增加, 并促进大鼠 PMCs TNF- α 蛋白表达($P < 0.05$); ②LPS(10 mg/L)和 SEA(10 mg/L)分别作用 6 h, 大鼠 PMCs TNF- α mRNA 表达增加($P < 0.05$); ③LPS(10 mg/L)和 SEA(10 mg/L)分别作用 3 h、6 h 和 9 h, 培养上清中 TNF- α 含量高于阴性对照组($P < 0.05$); 6 h 和 9 h 组均高于 3 h 组($P < 0.05$), 6 h 和 9 h 组间无明显差别($P > 0.05$); ④SEA-MCM 促进 HSC-T6 细胞增殖和胶原合成($P < 0.05$)。结论: 体外实验证实 SEA 与 LPS 在活化大鼠 PMCs、促进 TNF- α 表达和分泌中有相似的作用, 这可能与 SEA 活化大鼠 PMCs 能明显促进 HSC-T6 细胞增殖和胶原合成有关。

【关键词】腹腔巨噬细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 血吸虫可溶性虫卵抗原; 增殖; 胶原合成

【中图分类号】R 392; R 575.2 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.03.002

Effect of soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum* on activation and expression of TNF- α in cultured rat peritoneal macrophages *in vitro*

HU Min, WANG Yadong, HUANG Shun, QIAN Chen

Department of Pathology, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China

【Abstract】Objective: To observe the effect of soluble egg antigen(SEA) on TNF- α expression in rat peritoneal macrophages *in vitro* and proliferation and collagen synthesis of HSC-T6 cells. **Methods:** Rat peritoneal macrophages were harvested via irrigation of the peritoneal cavity, and cultured *in vitro*. The effect of SEA on the expression of TNF- α in the rat peritoneal macrophages was observed after staining of the cells with HE and immunocytochemistry, RT-PCR and radiommunity. SEA-MCM was prepared, and MTT colorimetric assay and 3H-proline incorporation were performed to detect the proliferation and collagen synthesis of HSC-T6. **Results:** ①At 3, 6 and 9 h, the expression of TNF- α in the SEA and LPS group was significantly higher than that in the control treated with RPMI1640($P < 0.05$); ②The level of TNF- α in the supernatant was also significantly higher than that in the control treated RPMI1640($P < 0.05$); ③After exposure to SEA or LPS for 3, 6 and 9 h, the expression of TNF- α mRNA of peritoneal macrophages in the SEA and LPS group was significantly higher than that in the control after treatment with RPMI1640($P < 0.05$); ④SEA-MCM significantly promoted the proliferation and collagen production of HSC-T6 cells($P < 0.05$). **Conclusion:** SEA, functioning similarly with LPS, may have the effect to induce rat peritoneal macrophages activation and promote expression and secretion of TNF- α , which is possibly related to the capacity of SEA that is capable of promoting the proliferation and collagen production of HSC-T6 *in vitro*.

【Key words】peritoneal macrophage; tumor necrosis factor- α ; soluble egg antigen; proliferation; collagen synthesis

血吸虫肝纤维化是由于患者感染血吸虫病而引起肝脏纤维组织失衡的病症。血吸虫病是指血吸虫

成虫寄生于人体,并形成虫卵肉芽肿而引起的慢性免疫性疾病。沉积在组织内的这些成熟虫卵可以刺

基金项目:安徽省高等学校省级优秀青年人才基金(2009SQRZ118)

收稿日期:2014-11-24

作者简介:胡 敏(1976-),女,讲师,博士,(电话)13955139826,(电子信箱)598370287@qq.com.

激机体,使机体产生应答,宿主对活毛蚴分泌的可溶性抗原所产生的病理性免疫应答是血吸虫病的病理基础,同时虫卵肉芽肿组织在血管内形成,堵塞血管,破坏血管结构,导致组织纤维化^[1]。刺激血吸虫虫卵肉芽肿形成的主要因子是日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)^[2]。在血吸虫病肝纤维化的形成和调节过程中细胞因子发挥着重要的作用。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种常见的细胞因子,由巨噬细胞在炎症或免疫刺激下活化所分泌。如果 TNF- α 分泌过多,可以刺激粒细胞和成纤维细胞增生,继而引起组织损伤及纤维化。有报道指出, TNF- α 具有活化肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的作用,并能够促进 HSC 产生细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[3],被认为与肝纤维化有密切关系^[4]。本研究旨在观察 SEA 对体外大鼠腹腔巨噬细胞(PMCs)分泌 TNF- α 含量以及 SEA 活化的腹腔巨噬细胞条件培养基(SEA-MCM)对 HSC 增殖和胶原合成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞株 清洁级健康 SD 大鼠,雌雄不限,购于安徽医科大学实验动物中心(合格证号:皖医实动准 02 号),标准饲养。HSC-T6 细胞为永生化大鼠肝星状细胞株(第二军医大学张俊平教授惠赠)。

1.1.2 试剂 日本血吸虫干卵购买于中国寄生虫病防治中心(上海)。大肠杆菌内毒素(LPS)购于 Sigma 公司。TNF- α 多克隆抗体、二抗试剂盒购于武汉博士得试剂公司。TNF- α 放免试剂盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所(北京)提供。MTT 购于上海博谷生物科技有限公司。3H-脯氨酸(比放射性 37 MBq/mL)购自中国原子能研究所。mRNA 提取试剂盒、TaqDNA 聚合酶和 dNTP 购于 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 制备日本血吸虫虫卵抗原^[5] 参照文献,将购买的日本血吸虫干卵匀浆后利用滤膜进行滤过除菌。对获得的无菌 SEA 进行分装,放于 4℃ 保存,备用。采用紫外分光光度计,通过 Lowry-Kalokar 公式计算,得出蛋白含量为 0.17 mg/mL。

1.2.2 制备大鼠 PMCs^[6] 取 SD 大鼠,对腹腔表面进行消毒,并注射 5 mL 无菌的液体石蜡。3 d 后收集腹腔细胞。调整细胞浓度为 5×10^8 个/L,接种至无菌 6 孔细胞培养板上,在 37℃ CO₂ 孵箱孵育 2

h,再用 RPMI 1640 培养液洗去未贴壁的死亡及杂质细胞。经瑞氏染色法鉴定,巨噬细胞纯度 >90%;台盼蓝染色,细胞存活率 >95%。

1.2.3 细胞实验分组 实验细胞分为 3 组。阴性对照组:每孔加 1 mL 含 10% NBS 的 RPMI 1640 培养液;LPS 组(阳性对照组):每孔加入 1 mL 10 mg/L 的 LPS;SEA 组:每孔加 1 mL 终浓度为 10 mg/L 的 SEA。每组设置 3 个复孔。

1.2.4 大鼠 PMCs 形态学改变的观察 取出 PMCs 爬片, PBS 液清洗后用 4% 多聚甲醛对爬片进行固定,苏木素染色,1% 盐酸酒精分化后,置于伊红染料中,经梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,中性树胶封固后,在光学显微镜下对实验结果进行观察。

1.2.5 TNF- α 蛋白表达的免疫细胞化学染色检测 制备细胞爬片,20% 多聚甲醛固定。H₂O₂ 孵育, PBS 浸泡后,滴加事先按浓度配置好的一抗,孵育后再滴加生物素标记的二抗, PBS 清洗,加入新配制的 DAB 溶液进行显色。实验过程中,每组爬片均设有阴性对照(PBS 代替一抗作为阳性对照)及阳性对照(已知阳性切片作为阳性对照)。每张爬片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),利用 Image-pro Plus 5.02 图像分析系统对实验结果进行定量分析。以平均光密度值(MOD)作为 TNF- α 相对含量,并分析结果。

1.2.6 RT-PCR 测定 TNF- α mRNA 表达 参照说明书提取总 RNA。根据 GenBank 上大鼠 TNF- α 和 β -actin 登录的核苷酸序列,设计合成两对引物。在 94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s 反应条件下循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min 后终止反应,得到两条长度分别为 295 bp 和 285 bp 的引物扩增片段。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。TNF- α 和 β -actin 的光密度值的比值用于对 TNF- α 的相对量进行评估。

1.2.7 利用放射免疫法对上清中 TNF- α 含量进行测定 收集细胞培养上清液,严格按说明书操作指南进行操作,测定上清液中的 TNF- α 含量。

1.2.8 制备 SEA-MCM^[7] SD 大鼠随机分成两组,对照组和模型组(10 只/组),分别腹腔注射无菌生理盐水和日本血吸虫可溶性虫卵抗原,于第 4 天进行断头处死。将离心的大鼠腹腔冲洗液制成腹腔细胞悬液后加入培养板(1 mL/孔),培养 24 h,获得大鼠单层 PMCs。洗去未贴壁细胞。模型组加入总体积 1 mL 含 10% NBS 的 PRMI 1640 培养液,对照组加 1 mL RPMI 1640,继续在上述条件下进行培养,48 h 后分别对两组培养上清进行收集并过滤,即获

得无 SEA 刺激的 MCM 和 SEA-MCM。分装后放置于 -20 °C 保存。

1.2.9 SEA-MCM 对 HSC-T6 细胞增殖的影响^[8-9]

用含 5% NBS 的 DMEM 培养液将 HSC-T6 细胞稀释为 1×10^5 /mL, 加入 96 孔培养板(100 μ L/孔) 培养 24 h, 同时以无血清的 DMEM 培养液同步化培养。换液后, 以无 SEA 刺激的 MCM 作为阴性对照, 在不含血清的 DMEM 培养液中加入不同浓度的 SEA-MCM(稀释比分别为 1: 2、1: 4、1: 8)。培养 48 h 后, 每孔再加入 20 μ L 的 MTT 液, 继续培养。4 h 后, 弃去培养上清, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷 (DMSO), 放于室温静置 10 min, 在 570 nm 处测吸光值。每组设置 3 个复孔并重复 3 次。

1.2.10 SEA-MCM 对 HSC-T6 细胞胶原合成的诱导 细胞接种与换液操作参照 1.2.9。在换液 24 h 后, 每个培养孔内加入 20 μ L 3H-脯氨酸(37 MBq/mL) 继续培养。48 h 后, 用胰蛋白酶和 EDTA 对细胞进行消化, 并对细胞进行收集。把收集有细胞的玻璃纤维滤纸置于 80 °C 恒温箱内干燥 6 h。取出滤纸, 放进已加入闪烁液的闪烁杯中, 用液体闪烁计数器进行计数。取 3 个复孔的 dmp 均值作为实验结果。重复 3 次。

1.2.11 数据处理 实验结果使用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示。采用相关分析和重复测量的方差分析对数据进行分析。P < 0.05 定义为差异显著。

2 结果

2.1 SEA 刺激后大鼠 PMCs 形态学改变 经 SEA (10 mg/L) 分别刺激 3 h、6 h 和 9 h 后, 光镜下观察大鼠 PMCs, 我们发现与阴性对照组相比, SEA (10 mg/L) 组细胞数量增多, 体积增大, 细胞突起增多、加长, 形态产生较为明显的变化(图 1)。SEA (10 mg/L) 组与 LPS (10 mg/L) 组之间无显著差别。

2.2 SEA 对大鼠 PMCs TNF- α 蛋白表达的作用 利用免疫细胞化学染色, 对大鼠 PMCs 中 TNF- α 蛋白表达水平进行检测。采用重复测量的方差分析, 结果显示, 与阴性对照组相比, SEA (10 mg/L) 作用 3 h、6 h 和 9 h 均可以使大鼠 PMCs 中 TNF- α 蛋白表达水平明显增加 ($F = 114.482, P = 0.000$); 6 h、9 h 作用组的 TNF- α 蛋白表达均明显高于 3 h 组 ($P = 0.003$), 而 9 h 和 6 h 两组相比, TNF- α 表达量仅有增加的趋势, 却无统计学意义 ($P = 0.096$)。SEA 组 (10 mg/L) 表达高于阳性对照组 LPS (10 mg/L) ($P = 0.006$), 见表 1、图 2。

2.3 SEA 对体外刺激大鼠 PMCs 中 TNF- α mRNA

表达的影响 RT-PCR 结果显示, 与阴性对照组相比, SEA (10 mg/L) 和 LPS (10 mg/L) 作用 6 h 后, 大鼠 PMCs 中 TNF- α mRNA 表达水平明显增加 ($F = 92.875, P = 0.000$)。SEA (10 mg/L) 组与 LPS (10 mg/L) 组之间无显著差别 ($P = 0.558$), 见表 2、图 3。

表 1 SEA 对大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度 (mg/L)	平均光密度值(TNF- α)		
		3 h	6 h	9 h
阴性对照组	-	0.096 \pm 0.006	0.104 \pm 0.002	0.107 \pm 0.010
SEA 组	10	0.125 \pm 0.005*	0.145 \pm 0.003* Δ	0.135 \pm 0.008* Δ
LPS 组	10	0.121 \pm 0.003*	0.136 \pm 0.011*	0.126 \pm 0.011*

* P < 0.05 与阴性对照组相比; $\Delta P < 0.05$ 与 3 h 时间组相比

表 2 SEA 刺激 6 h 大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 (mg/L)	平均光密度值 TNF- α / β -actin
阴性对照组	-	0.462 \pm 0.044
SEA 组	10	0.709 \pm 0.004*
LPS 组	10	0.722 \pm 0.012*

* P < 0.01 与阴性对照组相比

2.4 SEA 对大鼠 PMCs 分泌 TNF- α 水平的影响 通过放免法检测, 采用重复测量的方差分析, 结果显示, 与阴性对照组相比, SEA (10 mg/L) 和 LPS (10 mg/L) 分别作用 3 h、6 h 和 9 h 后, PMCs 培养上清中 TNF- α 水平明显增加 ($F = 342.332, P = 0.000$)。SEA (10 mg/L) 和 LPS (10 mg/L) 分别作用 6 h 和 9 h 后, 培养上清中 TNF- α 水平高于作用 3 h 组 ($F = 658.442, P = 0.003$); 6 h 组和 9 h 组相比, 虽然 TNF- α 分泌略有增加, 但无统计学意义 ($P = 0.088$)。SEA (10 mg/L) 组高于 LPS (10 mg/L) 组 ($P = 0.013$), 见表 3。

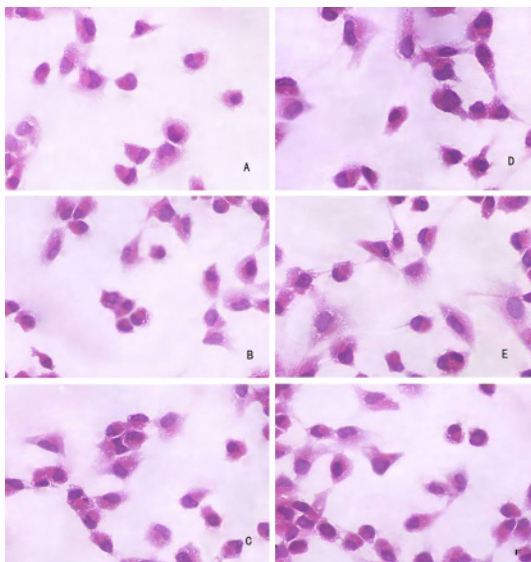
表 3 SEA 对大鼠巨噬细胞上清液中 TNF- α 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 (mg/L)	TNF- α (mg/L)		
		3 h	6 h	9 h
阴性对照组	-	0.126 \pm 0.012	0.254 \pm 0.011	0.266 \pm 0.010
SEA 组	10	0.259 \pm 0.016*	0.429 \pm 0.018* Δ	0.453 \pm 0.013* Δ
LPS 组	10	0.242 \pm 0.008*	0.413 \pm 0.011* Δ	0.446 \pm 0.022*

* P < 0.05 与阴性对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 与作用 3 h 时间组相比

2.5 SEA-MCM 诱导 HSC-T6 细胞增殖和胶原合成 实验结果显示, 终稀释比为 1: 2、1: 4、1: 8 的 3 组 SEA-MCM, 在 570 nm 处测吸光值及 dmp 值均高于

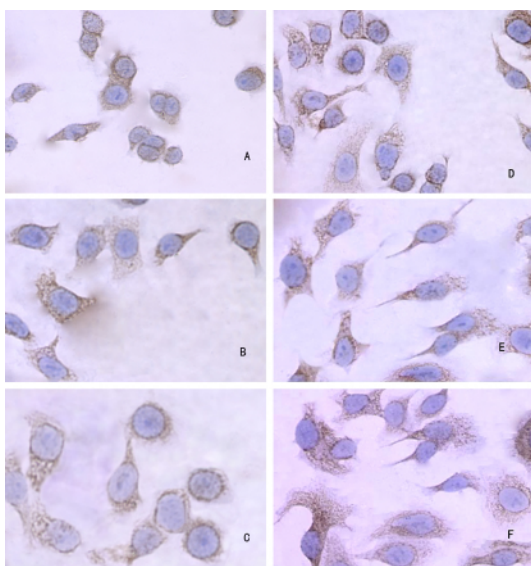
对照组($F = 68.263$, $P = 0.000$) , 1: 2 组与 1: 4 组均高于 1: 8 组($P_{1:2 \& 1:8} = 0.001$, $P_{1:4 \& 1:8} = 0.0009$) , 而 1: 2 和 1: 4 组间差异无统计学意义($P = 0.218$) 。经线性相关系数分析可以得出 , SEA-MCM(终稀释比 1: 2、1: 4、1: 8) 对 HSC-T6 细胞的增殖($r = 0.854$, $P = 0.003$) 和胶原合成($r = 0.809$, $P = 0.008$) 具有诱导作用。而且这个作用呈现明显的浓度依赖相关性(表 4) 。



A , B , C: 阴性对照组; D , E , F: SEA 作用组(10 mg/L) ; A 和 D: 3 h; B 和 E: 6 h; C 和 F: 9 h

与 A , B , C 组相比 , D , E , F 组 PMCs 体积增大 , 数量增多 , 细胞突起增多、加长

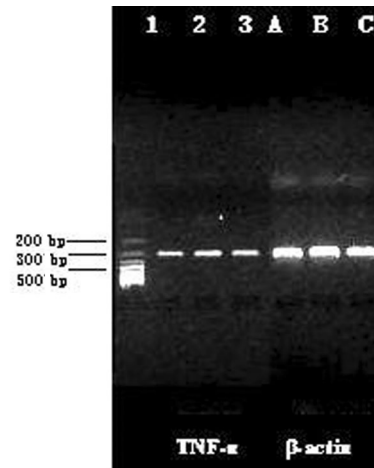
图 1 SEA 刺激大鼠腹腔巨噬细胞 3、6 和 9 h 的形态学特征(HE , $\times 200$)



A , B , C: 阴性对照组; D , E , F: SEA 作用组(10 mg/L) ; A 和 D: 3 h; B 和 E: 6 h; C 和 F: 9 h

与 A , B , C 组相比 , D , E , F 组 PMCs 中 TNF- α 蛋白表达明显增加

图 2 SEA 作用 3、6 和 9 h 后对大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α 表达的影响(IHC , $\times 400$)



TNF- α 中 1: 阴性对照组; 2: LPS 阳性对照组(10 mg/L) ; 3: SEA 作用组(10 mg/L) ; β -actin 中 A: 阴性对照组; B: LPS 阳性对照组(10 mg/L) ; C: SEA 作用组(10 mg/L)

图 3 SEA 作用 6 h 对大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 4 SEA-MCM 对 HSC-T6 细胞增殖和胶原合成的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	终稀释比	细胞增殖(A570)	胶原合成(dmp)
对照组	-	0.613 \pm 0.048	5 669.9 \pm 525.3
SEA-MCM 组	1: 2	1.288 \pm 0.059*	19 436.2 \pm 2 037.1*
	1: 4	1.219 \pm 0.068*	18 301.7 \pm 736.2*
	1: 8	1.042 \pm 0.076* Δ	14 201.5 \pm 1 987.3* Δ

* $P < 0.01$ 与对照组相比; $\Delta P < 0.05$ 与 1: 4 浓度组比

3 讨论

肝纤维化指的是各种致病因子引起肝内纤维结缔组织异常增生 , 以致肝内细胞外基质过度沉淀的病理过程。肝硬化的原因包括纤维增生和分解不平衡 , ECM 合成过多及降解相对不足^[10]。血吸虫病患者死因主要是日本血吸虫病肝纤维化/肝硬化及其并发症^[11]。目前认为 HSC 是 ECM 的主要来源细胞 , 其活化是肝纤维化初始形成的中心环节^[10, 12] , 并伴随多种细胞因子经旁分泌或自分泌途径作用导致星状细胞的激活 , 其过程如下^[10, 13]: 当肝脏受到各种损伤时 , 局部的 Kupper 细胞及巨噬细胞等释放多种细胞因子(如 TNF- α 等) , 共同作用激活 HSC。

巨噬细胞是非特异性免疫细胞 , 在吞噬、细胞免疫和分子免疫学中起重要作用 , 能快速识别并清除外来抗原 , 具有免疫监视功能; 激活 T、B 淋巴细胞 , 发挥介导特异性免疫应答的重要作用; 分泌的细胞因子、趋化因子还能调节其他免疫细胞的功能。因此 , 在肝纤维化进展过程中 , 巨噬细胞在发动炎症反

应、激活 HSC 等方面发挥着不可替代的重要作用。

TNF- α 主要由单核巨噬细胞及 Kupper 细胞等分泌,与其他细胞因子共同形成调节网络,对肝纤维化的启动有重要调控作用。TNF- α 能增强肝星状细胞的趋化性,改变其细胞形态,促进星状细胞增生;通过刺激肝脏产生炎症反应,间接发挥促肝脏纤维化作用^[14]。贺永文等^[15]发现急性感染期小鼠肝内 TNF- α 含量明显增加,主要分布在虫卵肉芽肿内及其周围,这很可能是巨噬细胞对炎症或免疫刺激反应所产生的结果。

本实验通过采用 SEA 体外分别刺激大鼠 PMCs 3 h、6 h 和 9 h,经 HE 染色、IHC 染色、RT-PCR 以及放免法,对 SEA 作用后的大鼠 PMCs 形态和 TNF- α 表达进行观察。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞壁外膜中的重要组成成分,能够与免疫系统相互作用,导致大量抗炎症因子生成及释放,对机体免疫有重要作用。LPS 可以活化单核巨噬细胞系统,促进大量内源性细胞因子,如 TNF、IL-1、IL-6 等释放。因此在实验中,我们以 LPS 组作为阳性对照组。发现细胞体积增大,伸出较长伪足,该结果提示 SEA(10 mg/L)刺激可以引起巨噬细胞活化。通过收集活化的巨噬细胞培养上清所获得的 SEA-MCM 又可以促进 HSC-T6 细胞增殖以及胶原合成。这些结果证明 SEA 通过激活巨噬细胞,进而促进 HSC 活化,使 HSC 增殖及胶原合成增加。此外,研究还发现,SEA 分别作用 3 h、6 h 和 9 h 后,均可观察到 SEA 促进巨噬细胞合成和 TNF- α 分泌,这与文献报道^[16-19]基本一致。SEA 之所以可以促进 HSC 增殖和胶原合成,主要与巨噬细胞活化后,包括 TNF- α 在内的多种细胞因子分泌增加有关。因此,研究结果提示 SEA 与 LPS 在体外活化大鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 中具有相似作用,SEA 诱导 HSC 增殖活化可能是血吸虫肝纤维化的机理之一。

【参考文献】

[1] 赵蔚先,高淑芬.实用血吸虫病学[M].人民卫生出版社,1996:1-82.
 [2] 王雪丽,张玲敏.血吸虫卵虫卵肉芽肿和肝纤维化的形成机制及调节机制研究进展[J].国外医学:寄生虫病分册,2001,28(5):207-211.
 [3] 贺永文.前列腺素 E1 对日本血吸虫病大鼠肝纤维化形成的影

响[J].中国寄生虫病防治杂志,2001,14(2):142-144.
 [4] Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, et al. Plasma transforming growth factor- β 1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2001, 15(10):1667-1672.
 [5] 薛燕萍,胡永秀,田小勇,等.血吸虫卵抗原诱导的日本血吸虫感染小鼠 IFN- γ 及 IL-4 基因转录的研究[J].寄生虫与医学昆虫学报,1996,3(3):146-153.
 [6] 张建新,尹江涛,党胜春,等.氯膦酸二钠脂质体对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J].世界华人消化杂志,2009,17(4):347-351.
 [7] 徐淑芸,卞如衿,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1455-1456.
 [8] 吴强,杨雁,薛绍礼,等.黄芪总苷对肝星状细胞增殖和合成胶原的抑制作用[J].中国药理学通报,2003,19(8):892-895.
 [9] Zhang M, Zhang J P, Ji H T, et al. Effect of six flavonoids on proliferation of hepatic stellate cells *in vitro* [J]. Chin Pharmacol Bull, 2000, 21(3):253-256.
 [10] Du Weidong, Zhang Yue'e, Zhai Weirong, et al. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen-producing cells in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis[J]. World Journal of Gastroenterology, 1999, 5(5):397-403.
 [11] 程钧朴,钱国希,朱海昌,等.173例晚期血吸虫病病人死因分析[J].上海预防医学杂志,1994,6(2):29-30.
 [12] Friedman SL. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications[J]. Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology, 2004, 1:98-105.
 [13] Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis—mechanisms and treatment strategies [J]. N Eng J Med, 1993, 328(25):1828-1835.
 [14] Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells [J]. Liver, 1998, 18(1):2-3.
 [15] 贺永文,刘薇.细胞因子对感染日本血吸虫小鼠肝纤维化的影响[J].中华内科杂志,1998,37(4):258-261.
 [16] Wu Q, Yang Y, Chen M Z. Astrogalosides inhibit proliferation of hepatic stellate through inducing apoptosis and blocking cell cycle [J]. Shock, 2004, 21(Suppl):113.
 [17] Wu Q, Yang Y, Chen M Z. Effect of astrogalosides on MMP13 and TIMP1 expression in hepatic fibrosis [J]. Shock, 2004, 21(Suppl):62.
 [18] Matsuoka M, Pham NT, Tsukamoto H. Different effects of interleukin-1 α , tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta I on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells [J]. Liver, 1989, 9(2):71-78.
 [19] Joseph AL, Boros DL. Tumor necrosis factor play a role in schistosoma mansoni egg-induced granulomatous inflammation [J]. The Journal of Immunology, 1993, 151(10):5461-5467.