

· 论著 ·

桃红四物汤对肝纤维化小鼠病理性血管生成相关因子VEGF、KDR与Flt-1表达的影响

史萌萌, 奚胜艳, 王彦晖, 程尧, 彭樱, 王欣榕, 康志军, 李晗婧, 李茜

(厦门大学医学院中医系, 厦门 361102)

摘要:目的: 从整体水平研究复方桃红四物汤对四氯化碳所致肝纤维化模型小鼠肝组织血管内皮生长因子(VEGF)、含激酶插入区受体(KDR)及Flt-1蛋白与mRNA表达的影响。方法: 昆明小鼠60只, 随机分组为空白组, 模型组, 秋水仙碱组, 桃红四物汤高、中、低(17.00、8.50、4.25g/kg)剂量组, 采用左侧腹股沟处皮下注射四氯化碳花生油溶液建立小鼠肝纤维化模型, 给药6周后, 运用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肝组织VEGF蛋白含量; 蛋白印迹法(Western blot)测定小鼠肝脏KDR、Flt-1蛋白的表达; 逆转录PCR(RT-PCR)法测定小鼠肝脏VEGF、KDR及Flt-1 mRNA表达。结果: 桃红四物汤治疗后, 桃红四物汤高、中剂量组肝组织VEGF蛋白表达量较模型组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 中药高剂量组肝组织KDR与Flt-1蛋白表达较模型组显著降低($P < 0.05$); 而桃红四物汤高、中剂量组肝组织VEGF、KDR与Flt-1 mRNA表达较模型组、秋水仙碱组明显减少($P < 0.01$), 并且呈现一定的量效正相关。结论: 桃红四物汤能够降低肝纤维化病理血管生成相关因子的表达, 减缓病理性的微血管生成可能是其改善肝纤维化的机制之一。

关键词: 桃红四物汤; 血管内皮生长因子; 含激酶插入区受体; Flt-1; 肝纤维化

基金资助: 国家自然科学基金青年基金项目(No.81202659), 福建省自然科学基金项目(No.2014J01373), 厦门大学新聘教师科研启动基金项目(No.ZK1014), 福建省大学生创新创业训练项目(No.DC2013174)

Effects of Taohong Siwu Decoction on the expression of pathological angiogenesis correlation factors including VEGF, KDR and Flt-1 in hepatic fibrosis mice

SHI Meng-meng, XI Sheng-yan, WANG Yan-hui, CHENG Yao, PENG Ying,
WANG Xin-rong, KANG Zhi-jun, LI Han-jing, LI Qian

(Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of Taohong Siwu Decoction (THSWD) on protein and mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), kinase insert domain containing receptor (KDR) and Flt-1 in hepatic fibrosis model mice caused by CCl_4 . Methods: Sixty Kunming mice were randomly divided into blank, model, colchicine (control) and three THSWD (17.00, 8.50, 4.25g/kg) groups, with 10 mice in each group. Except the blank group, the other groups' mice were subcutaneously injected with carbon tetrachloride (CCl_4)-arachis oil solution in left inguen to establish hepatic fibrosis mouse model. After administration for six weeks, the content of VEGF protein in liver tissue was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), protein expressions of KDR and Flt-1 in liver tissue were detected by Western blotting, and mRNA expressions of VEGF, KDR and Flt-1 in liver tissue were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: After treatment, the content of VEGF protein in THSWD (17.00, 8.50g/kg) groups were lower than that in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expressions of liver tissue KDR and Flt-1 in THSWD (17.00g/kg) group were less than that in model group ($P < 0.05$). The mRNA expressions of liver tissue VEGF, KDR and Flt-1 were significantly lower than that in both model and colchicine groups ($P < 0.01$), which showed a certain positive correlation between dose and effect. Conclusion: Taohong Siwu Decoction could decrease the expression of pathological angiogenesis correlation factors of hepatic fibrosis, thus helpful to induce the formation of pathological capillary vessels, which may be one of the possible mechanisms of ameliorating hepatic fibrosis.

通讯作者: 奚胜艳, 福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学医学院中医系, 邮编: 361102, 电话: 0592-2183069

E-mail: xishengyan13204@163.com

Key words: Taohong Siwu Decoction; Vascular endothelial growth factor; Kinase insert domain containing receptor; Flt-1; Hepatic fibrosis

Funding: Young Scientists Fund of National Natural Science Foundation of China (No.81202659), Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2014J01373), Scientific Research Starting Foundation for the Newly Appointed Teachers of Xiamen University (No.ZK1014), Undergraduate Innovation and Pioneer Training Programs of Fujian Province (No.DC2013174)

桃红四物汤原名加味四物汤,录自于《玉机微义》,是在四物汤的基础上加桃仁、红花而成,是活血之代表方。桃红四物汤在临床上应用广泛^[1-3],特别是用于治疗慢性肝炎和肝纤维化方面取得了一定疗效^[4-6],近年的研究表明桃红四物汤及其不同药物组合具有调控病理血管生成的作用,抗病理血管生成可能是活血化瘀药的现代药理作用之一^[7-8]。而肝纤维化是从肝损伤转变到肝硬化的重要环节,且肝纤维化发展过程中存在明显的病理性微血管生成与重构,阻碍了肝纤维化的逆转与恢复^[9-10]。因而如能减少纤维化肝组织的病理性微血管生成,治疗上可能会取得更好疗效,目前中药在此方面研究鲜见。有鉴于此,本研究旨在从整体水平以及影响微血管生成相关因子角度探讨桃红四物汤对肝纤维化小鼠肝组织可能存在的作用机制,为临床肝纤维化的治疗提供一定实验依据。

材料

1. 动物 SPF级昆明小鼠60只,雌雄各半,4周龄,16±2g,购自于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号[SCXK(沪)2012-0002]。动物饲养于厦门大学实验动物中心,自由饮食、水,1周后供实验用。

2. 药物 桃红四物汤组成:桃仁9g(批号:140218);红花6g(批号:131125);生地黄12g(批号:131129);赤芍9g(批号:131209);当归9g(批号:140211);川芎6g(批号:140117),厦门燕来福制药有限公司。秋水仙碱片剂(Colchicine Tablets),规格:0.5mg/片,批号:131126,云南西双版纳药业有限公司。0.9%生理盐水(氯化钠注射液),规格:每瓶100ml,批号:1404122311,辰欣药业股份有限公司(中国山东)。

3. 主要试剂 CSB-E04756m小鼠血管内皮生长因子(VEGF)酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:U13030187),13687-1-AP VEGFR-1(KDR)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:00004813),BS1373 VEGFR2(Flt-1)(F945)抗体(美国Bioworld Technology公司,批号:

CJ36131),引物 -actin、VEGF、KDR、Flt-1 Primer(由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成)。四氯化碳(规格:500mL/瓶),汕头达濠精细化学品有限公司,批号:20140102,金龙鱼花生油(规格:900mL/瓶,泉州福海粮油工业有限公司,批号:20140107)。

4. 主要仪器 低速多管架自动平衡离心机TDZ5WS(中国湘仪离心机仪器有限公司),迷你双垂直电泳槽DYZ-24DN、北京六一双稳定时电泳仪DYY-6C(中国北京六一仪器厂),半干型转膜仪Typ-Nr.B337874(德国Biometra公司),TS-8转移脱色摇床(中国海口市其林贝尔仪器制造有限公司),PCR反应扩增仪(美国ABI公司),Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Scientific公司),凝胶成像系统(上海复日科技有限公司),TU-1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),GNP-9080-上海精宏隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),DEM-3自动洗板机(北京拓普分析仪器有限公司)。

方法

1. 药品配置 桃红四物汤水煎液制备:加水煎煮2次,第1次按比例1:8加水浸泡20min,煎煮沸持续30min,第二次按比例1:6加水煮沸30min,然后将两次煎煮药液混合,8层纱布过滤,再分别浓缩成浓度为1.70、0.85、0.425g/mL的药液,剩余的药则制备成冻干粉存于4℃保存备用。秋水仙碱片:按0.1mg/kg剂量用单蒸水配成浓度为0.01mg/mL的溶液。建模用药四氯化碳花生油溶液:按CCl₄与花生油体积比配制成40%的溶液。

2. 建模与给药 SPF级昆明小鼠60只,随机分成6组,每组10只,分空白组、模型组、秋水仙碱组(对照)、桃红四物汤(高、中、低)剂量组。空白组:常规饲养。模型组、秋水仙碱组、桃红四物汤各种剂量组:以40%CCl₄花生油溶液按0.1mL/10g剂量于左侧腹股沟处皮下注射,首剂加倍,每5天1次,连续6周。第1次模型用药24h后,桃红四物汤高中低剂量组分别给予1.70、0.85和0.425g/mL(分别相当于17.00、8.50及4.25g/kg)桃红四物汤液按0.2mL/10g灌胃,每日1次,连续6周;西药秋水仙碱组给予0.01mg/mL秋

水仙碱溶液,按0.2mL/10g灌胃,每日1次,连续6周;空白组及模型组按0.2mL/10g给予等量的0.9%氯化钠溶液灌胃,每日1次;连用6周。

3. 取材及样品制备 末次给药24h后,常规小鼠颈椎脱臼处死小鼠,迅速解剖剥取肝组织,用手术刀切取肝脏火柴头大小数块,装入冻存管并迅速投入液氮冻存,全部取材完毕欲于-70 低温冰箱保存备检测。蛋白印迹检测每只小鼠使用肝组织1小块;ELISA实验按每50mg样本加入500 μ L匀浆液。

4. ELISA法检测小鼠肝组织VEGF蛋白的表达 取肝组织,经去离子水清洗,用眼科剪剪碎,转移至匀浆器中,加入提取液,冰浴匀浆后转移至离心管,15 000r/min离心30min,弃沉淀,取上清液做蛋白定量后,分装,-20 保存待用。加样后,37 振荡孵育120min;分别加VEGF抗体,温育60min;加入工作液,温育30min;加显色液显影,于酶标仪450nm处读板,依序测量各孔的光密度(OD值),计算浓度。

5. Western blot法检测肝组织KDR、Flt-1蛋白表达 每份样品取肝组织1小块,RIPA buffer裂解液提取总蛋白,Bradford比色测定蛋白浓度,调整蛋白浓度,煮沸蛋白变性5 min;SDS-PAGE电泳后用半干转印仪转膜,5%脱脂奶粉TBST(0.05%Tween-20)封闭1h;一抗(抗磷酸化Flt-1、KDR抗体)4 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗(1 10 000)孵育1h;洗膜后放射自显影1min, β -actin为内对照,显影、定影、晾干后,扫描,用Image-Pro Plus 6.0图像分析仪对显影目的条带及 β -actin内参条带的平均光密度值进行分析。

6. 逆转录多聚酶链反应法(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)测肝组织VEGF、KDR及Flt-1 mRNA表达 每份样品取肝组织约80mg,按TRIzol试剂说明,采用异硫氰酸胍1步法抽提总RNA,运用1%琼脂糖凝胶进行电泳,在凝胶成像系统下观察RNA的电泳带,比较核糖体RNA(rRNA) 28S和18S两条带,确定完整性。

TOYOBO反转录将RNA逆转录为cDNA后进行PCR扩增反应,引物经过Blast分析,显示具备特异性,序列分别为:内标基因GAPDH:上游引物5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3',下游引物5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3',扩增大小318bp;VEGF:上游引物5'-TTC AGA GCG GAG AAA GC A TT-3',下游引物5'-GAG GAG GCT CCT TCC TGC-3',扩增大小165bp;Flt-1:上游引物5'-GGA GGG ATA ACA GGC AAT-3',下游引物5'-CCA TCA

GGG GTA AGA GTA-3',扩增大小298bp;KDR:上游引物5'-TCT GTG GTT CTG CGT GGA GA-3',下游引物5'-GTA TCA TTT CCA ACC ACC CT-3',扩增大小270bp。

RT-PCR采用25 μ L反应体系:在0.2mL PCR管内,依次加入1 μ L反转录产物(RT产物),各基因上游与下游引物各0.25 μ L,12.5 μ L PCR Master Mix,用ddH₂O水补足体积至25 μ L。混匀后立即置PCR仪中反应。反应结束后,样品保存于-20 备用。

PCR循环参数:94 预变性2min,94 变性30s,退火温度分别为56、53、58、53、72 延伸30s,35循环。

PCR扩增产物5 μ L采用2%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统下观察PCR产物的电泳带,并拍照存档。用One-Dscan图像分析软件分析目标条带的灰度值。样本目标基因mRNA表达水平用目标基因条带灰度值相对于内标基因条带灰度值的比值来表示。检测结果重复3次。

7. 统计学方法 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 19.0统计软件对数据进行统计分析,采用One-way ANOVA单因素方差分析,LSD检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

结果

1. 桃红四物汤对肝纤维化小鼠肝组织VEGF蛋白含量的影响 ELISA实验结果显示模型组与空白组相比VEGF含量显著升高($P < 0.01$);经治疗后,桃红四五汤高剂量、中剂量组、秋水仙碱组与模型组相比,VEGF含量均显著的降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表1。

表1 各组小鼠肝组织VEGF蛋白含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	VEGF($\times 10^5$ pg/mL)
空白组	1.31 \pm 0.66
模型组	1.81 \pm 0.34 ^{***}
秋水仙碱组	1.23 \pm 0.30
桃红四物汤高剂量组	1.37 \pm 0.14
桃红四物汤中剂量组	1.51 \pm 0.31
桃红四物汤低剂量组	1.53 \pm 0.23

注:与空白组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$;与秋水仙碱组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。下表同。

2. 桃红四物汤对肝纤维化模型小鼠肝组织VEGF、KDR及Flt-1 mRNA表达的影响 RT-PCR实验统计表明,VEGF mRNA表达量模型组与空白组相比显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$);桃红四物汤各剂

量治疗后及秋水仙碱组与模型组相比表达量显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 其中桃红四物汤高剂量组降低最为明显, 与秋水仙碱组相比, 差异亦具有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明桃红四物汤治疗存在一定的量效正相关效应。模型组与空白组 VEGF 主要受体 Flt-1 mRNA 表达量, 相比显著升高 ($P < 0.01$); 桃红四物汤各治疗组与模型组相比表达量降低较显著 ($P < 0.01$), 其中桃红四物汤高、中剂量治疗后其表达量与西药秋水仙碱组相比显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明复方天然植物药一定程度上优于单纯西药治疗。经桃红四物汤治疗后, VEGF 另一主要受体 KDR mRNA 表达量在 THSWT 高、中剂量组及秋水仙碱组较模型组显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 其中, 桃红四物汤高剂量治疗组表达量降低最为显著, 有明显的量效趋势, 见表 2。

表2 各组小鼠肝组织 VEGF、KDR 及 Flt-1 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	VEGF mRNA	Flt-1 mRNA	KDR mRNA
空白组	0.61±0.07	0.49±0.06	0.44±0.04
模型组	0.79±0.08 ^{**}	0.71±0.02 ^{**}	0.68±0.05 ^{**}
秋水仙碱组	0.67±0.12	0.63±0.09	0.57±0.10
桃红四物汤高剂量组	0.44±0.03	0.45±0.07	0.39±0.07
桃红四物汤中剂量组	0.61±0.07	0.49±0.05	0.54±0.15
桃红四物汤低剂量组	0.64±0.14	0.59±0.08	0.60±0.11

3. 桃红四物汤对肝纤维化小鼠 KDR、Flt-1 蛋白表达的影响 蛋白印迹检测结果显示, VEGF 两个主要受体 KDR、Flt-1 蛋白表达存在明显改变。模型组与空白组 Flt-1 蛋白表达相比, 表达量显著升高 ($P < 0.05$); 桃红四物汤高剂量治疗后与模型组相比表达量显著降低 ($P < 0.05$)。模型组 KDR 蛋白表达与空白组相比升高明显 ($P < 0.01$); 桃红四物汤高、中剂量治疗后与模型组相比表达量降低 ($P < 0.05$, 见表 3)。

表3 各组小鼠肝组织 Flt-1 和 KDR 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Flt-1	KDR
空白组	0.69±0.18	0.29±0.13
模型组	1.02±0.37 [*]	0.54±0.16 ^{**}
秋水仙碱组	0.91±0.27	0.43±0.12
桃红四物汤高剂量组	0.74±0.12	0.37±0.12
桃红四物汤中剂量组	0.76±0.25	0.37±0.15
桃红四物汤低剂量组	0.82±0.09	0.40±0.13

讨论

VEGF 是目前发现的作用最强、特异性最高的

促进血管内皮细胞生长的重要因子, 它能通过增加血管通透性, 刺激血管内皮细胞增殖来促进血管形成。Corpechot C 等^[11]发现, 肝纤维化严重程度与病理性微血管生成呈高度正相关, VEGF 的表达随肝脏微血管密度和肝纤维化严重程度而增加。在血管内皮细胞 VEGF 上有两个高亲和力的酪氨酸受体 Flt-1 和 KDR, 提供信号转导通路中蛋白磷酸化所需的磷酸基团。Flt-1 主要介导细胞骨架重排而引起迁移, KDR 主要介导内皮细胞增殖, 引起血管通透性升高, 并有抗细胞凋亡维持内皮细胞存活效应。其在血管生成过程中的作用十分重要。有研究发现先天缺陷 Flt-1 表型的小鼠内皮细胞可以发育但无法形成血管通道, 在 KDR 表型缺陷的小鼠中发现血管生成减少, 无法建立血岛, 形成正常的血管^[12-13]。活化的 KDR 能激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K), 发挥维持细胞存活效应。实验证明单独使用 KDR 抗体可抑制 VEGF 诱导的血管生成, 其机制是阻断了 KDR 下游的酪氨酸激酶信号转导系统^[14]。KDR 在 VEGF 诱导的血管新生和增强血管通透性中起主要作用^[15]。因此血管内皮生长因子 VEGF 及其受体 KDR 和 Flt-1 在病理血管生成这一复杂过程中具有重要地位。

在肝纤维化的进展过程中, 肝纤维化区的新生血管多数是未成熟的无效血管, 并导致在再生肝细胞周围形成血管丛和分流, 阻碍血窦与肝细胞间的物质交换, 再生的肝细胞不能建立正常的门脉分支, 进而加剧肝细胞损伤。宋正己等^[10]指出病理性血管新生与肝纤维化进展关系密切。时磊等^[16]研究发现随着造模时间的延长, 模型组大鼠肝脏 VEGF mRNA 的表达量呈现明显的逐步增加趋势, 这也进一步证实了 VEGF 参与了肝脏损伤后病理血管新生的过程, 同时也会对肝窦毛细血管化的发生发展产生相应的影响作用。

应用桃红四物汤为何能够下调 VEGF 及其受体表达, 从传统中医理论中我们可以找到答案的。肝纤维化是现代病理学范畴, 根据临床表现可将其归于中医“胁痛”“癥瘕积聚”“臌胀”“肝积”等范畴, 《素问·缪刺论》说:“邪客于足少阳之络, 令人胁痛不得息”。清代薛瘦吟《医赘》说:“鼓胀证, 湿邪入络者居多”。秦伯未在《中医临证备要》中指出肝气胁痛, 初时在气, 久则入络, 意指胁痛为邪入肝络所致。瘀血阻积于肝络是肝纤维化的一个主要病理基础和致病因素, 活血化瘀法及活血化瘀中药在长期的临床实践及抗肝纤维化研究中具有重要地位。

肝纤维化过程中的病理血管生成与中医学中络病的络脉亢进理论不谋而合。中医络的概念在形态和功能上与西医学的微血管与微循环概念相似。络病是指络脉功能和(或)结构异常导致的病变。络病病机特点:易滞易瘀,易入难出、易积成形^[17]。因而有学者^[18]指出:肝纤维化阶段可以定义为“微癥积”。络脉迂曲纵横,络体细小,易致气血瘀滞;气血环流缓慢,病则容易聚积成形;病久入深,难以速愈。李岩等^[19]研究认为在中医络病的病理机制中血行不畅、络脉失养、气血瘀滞、津凝痰结、络毒蕴结等病理变化涉及了血管活性物质调控异常血管内皮细胞、血管平滑肌细胞的损伤机制、ECM代谢异常细胞因子及信号传导通路调控异常等生物学内容。刘为民等^[20]提出肝纤维化可归入络病进行辨证论治,其主要病理机制是毒损肝络,痰瘀交阻,应重视运用中医络病理论指导对肝纤维化、肝硬化病因、病机的分析,指导诊断、治疗和判断预后。

本实验针对病理微血管生成过程中最为关键的内皮细胞生长环节,于分子水平研究桃红四物汤对CCl₄诱导肝纤维化小鼠肝组织中VEGF及其主要受体KDR和Flt-1的改变;通过ELISA法对肝组织VEGF蛋白的检测;RT-PCR对肝组织中VEGF、KDR、Flt-1 mRNA表达的检测以及蛋白印迹法对肝组织KDR、Flt-1蛋白表达的检测,首次从调控病理微血管生成因子角度深入研究了桃红四物汤对小鼠纤维化肝组织的影响及可能相关作用机制。通过实验结果可以发现,肝纤维化小鼠在使用桃红四物汤治疗之后无论是通过ELISA法、RT-PCR法还是蛋白印迹法,小鼠肝组织中VEGF、KDR、Flt-1表达明显呈现出被下调的趋势;且以桃红四物汤高剂量治疗下调幅度最为显著,部分作用优于西药秋水仙碱,存在一定量效关系,表明适当浓度的中药可通过抑制病理性微血管的生成来延缓肝纤维化的发生。从中医辨证论治角度采用活血化瘀等方法减少VEGF及其受体对表达,抑制内皮细胞的活化和存活,减少肝组织中病理性微血管的新生,从而改善肝细胞间的物质交换,延缓或阻抑肝纤维化的进展。由此可以证实传统中药复方在中医学治疗肝纤维化方面具有不可或缺的地位。

参 考 文 献

[1] 李兆顺,李泽伟.活血化瘀法抗肝纤维化的研究进展.宜春学

院学报,2013,35(9):84-85,150

- [2] 雷娜,郑仕中,陆茵.活血化痰类中药防治肝纤维化的机制及研究进展.中华中医药杂志,2010,25(2):265-268
- [3] 连红琴,秦铮然,张月虹,等.桃红四物汤的临床应用及实验研究进展.中华中医药学刊,2010,28(9):1868-1870
- [4] 杨倩,冯玉彦,蒋树林,姚希贤.瘀血论治慢性肝纤维化经验.中华中医药杂志,2007,22(3):168-171
- [5] 李红哲,李伯先.桃红四物汤加减配合拉米呋啶治疗慢性乙型肝炎120例.陕西中医,2009,30(9):1115-1117
- [6] 王舜.桃红四物汤联合干扰素对乙型肝炎病毒感染患者肝纤维化的影响.实用药物与临床,2014,17(5):655-657
- [7] 徐晓玉,王淑美,陈伟海,等.桃红四物汤号抗血管生成作用及其对KDR/FLK-1表达的影响.中药新药与临床药理,2005,16(5):329-332
- [8] 杨海燕,童彩玲,楚爱景,等.桃红四物汤对乳腺癌血管生成的影响.广州中医药大学学报,2012,29(6):623-626
- [9] Thabut D, Routray C, Lomberk G, et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. Hepatology, 2011, 54(2):573-585
- [10] 宋正己,王吉耀.血管新生与肝纤维化.国际消化病杂志,2008,28(5):407-409
- [11] Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. Hepatology, 2002, 35(5):1010-1021
- [12] Soker S, Takashima S, Miao H Q, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell, 1998, 92(6):735-739
- [13] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T P, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature, 1995, 376(6535):62-66
- [14] Li Y Q, Xia Y, Jin B. Effect of anti-KDR antibody on the proliferation of hemangioma vascular endothelial cells in vitro. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2007, 27(5):551-553
- [15] Bates D O. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. Cardiovasc Res, 2010, 87(2):262-271
- [16] 时磊,刘绍能,李敏,等.芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响.世界华人消化杂志,2009,23(36):3675-3678
- [17] 吴以岭.络病理论科学求证.北京:科学出版社,2007:8-12
- [18] 张永生,徐珊,朱飞叶,等.肝纤维化“微癥积”中医病证探究.中华中医药杂志,2014,29(9):2903-2905
- [19] 李岩,赵雁,黄召福,等.中医络病的现代认识.北京中医药大学学报,2002,25(3):1-5
- [20] 刘为民,姚乃礼.络病理论与肝纤维化关系探讨.中医杂志,2003,45(2):85-87

(收稿日期:2015年5月12日)