

氧化苦参碱脂质体对大鼠肝星状细胞作用的差异蛋白电泳分析

柴宁莉 常 青 徐世平 万 军 吴本俨

摘要 目的 应用比较蛋白质组学的方法分析氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)脂质体作用于体外培养的肝纤维化大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)后,其蛋白表达的差异,以进一步阐明 OMT 脂质体对肝纤维化治疗作用的分子机制。**方法** 建立四氯化碳(CCl_4)致慢性肝损伤纤维化的大鼠研究模型,灌注法分离获得大鼠 HSCs,将 P2 代细胞分为 A(模型组)、B(OMT 脂质体处理组)、C(脂质体对照组)3 组进行实验,以正常大鼠来源的 HSCs 作为正常对照组,作用 7 天后,分别提取实验组和正常对照组细胞的总蛋白质,进行等电聚焦双向电泳,建立应用 OMT 脂质体作用前后 HSCs 双向电泳差异表达谱;选取两个差异最明显的蛋白点,经肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF)测定,确定差异蛋白结构和功能。**结果** (1)总蛋白质点在 OMT 脂质体作用前后有所减少,分别为 864 和 756 个,匹配率为 63%;(2)局部区域图像进行放大可得 10 种蛋白质在正常对照组和实验组之间具有表达差异;(3)经 PMF 分析和 SWISS-PROT 蛋白数据库检索可获得两个差异最显著蛋白点为分子量 46.236 kD 的 ATM 和 54.051 kD 的 Miz1。**结论** OMT 脂质体作用于 HSCs 会造成其蛋白质表达的差异性,可能参与诱导其凋亡的信号途径。

关键词 氧化苦参碱脂质体;肝星状细胞;双向电泳;肽质量指纹图谱分析

Differential Proteomic Analysis of Rat Hepatic Stellate Cells Treated by Oxymatrine Liposomes Using Two-dimensional Electrophoresis CHAI Ning-li, CHANG Qing, XU Shi-ping, WAN Jun, and WU Ben-yan Department of Gastroenterology, Division of South Building, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing (100853), China

ABSTRACT Objective To analyze differentially expressed proteins of hepatic stellate cells (HSCs) treated with oxymatrine (OMT) liposomes, thus further exploring the molecular mechanism of OMT liposomes for treating liver fibrosis. **Methods** A rat model of CCl_4 induced chronic liver fibrosis was established. HSCs were perfusion isolated from modeled SD rats and cultured *in vitro*. Passage 2 HSCs were divided into the model group (Group A), the OMT-liposome-treated group (Group B), and the liposome-treated control group (Group C). HSCs from normal rats were taken as the normal control group (Group D). The total proteins of HSCs cells were extracted from Group B and D after 7 days of treatment, and separated with isoelectrofocusing two-dimensional electrophoresis (2-DE). A 2-DE system was established to analyze the differences in the protein profile between Group B and Group C. Two protein dots with most obvious difference were selected to determine the structures and functions of different proteins using peptide mass fingerprinting (PMF). **Results** (1) The total number of proteins decreased after treated with OMT liposomes, with 864 spots before treatment and 756 spots after treatment, and the matching rate was 63%. (2) According to 2-DE results, 10 differential protein spots were found by image analysis of magnifying images in local regions. (3) Two most differently expressed proteins were identified to be ATM (46.236 kD) and Miz1 (54.051 kD) by PMF and SWISS-PROT protein database retrieval. **Conclusion** Action of OMT liposomes on HSCs of rats with chronic liver fibrosis caused different protein expressions, which might be involved in the signaling pathways of inducing the apoptosis of HSCs.

KEYWORDS oxymatrine liposome; hepatic stellate cell; two-dimensional electrophoresis; peptide mass fingerprinting

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072913)

作者单位:中国人民解放军总医院南楼消化内科(北京 100853)

通讯作者:柴宁莉, Tel:010-66876225, E-mail: csxlily@163.com

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝脏内的非实质细胞,通常位于肝窦周围的 Disse 隙内^[1,2]。大量研究表明,在致病因子对肝细胞造成损伤后,肝 Kupffer 细胞(KC)、血小板、肝窦内皮细胞和肝细胞会分泌多种细胞因子共同作用于 HSCs,从而使其转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)。MFB 具有通过旁分泌与自分泌作用,不但可以进一步促使 HSCs 的增殖,同时还合成大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),以致其在肝内大量沉积,肝纤维化逐渐形成^[3]。由此可见,HSCs 活化是各种病因肝纤维化发生的共同中心环节^[4,5]。所以对于 HSCs 活化的干预和凋亡的促进相关因素的探讨可以为肝纤维化治疗提供良好的靶标。

氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是从中药苦豆子中提取的成分,是苦参碱的 N-氧化物。既往研究表明,该药有抗炎、平喘、心肌保护、免疫调节和抗肿瘤等作用^[6-9]。近年的研究又表明 OMT 有抗乙型肝炎和丙型肝炎病毒的作用,并有抑制胶原活动度,防止肝纤维化的作用^[10-12]。但因传统给药方式使药物全身分布,局部血药浓度低,致其难以进入肝实质细胞杀灭病毒,达不到很好的治疗效果。近年来,备受关注的脂质体是一种以磷脂等材料作为膜材而构成的具有封闭囊泡结构的药物载体,且其经静脉注射后,自然靶器官主要为肝脏,由此可提高局部血药浓度并减少全身不良反应。

虽然作为中药有效重要成分的 OMT 具有明显抗病毒作用,而且 Wang YP 等^[13]的研究证实 OMT 可能参与或者阻断了病毒作用中 T 细胞的免疫应答反应,从而发挥其对病毒性肝纤维化治疗效果。然而,对于非病毒性肝纤维化中 OMT 抗纤维化作用的机制以及对肝纤维化作用前后 HSCs 蛋白表达谱变化方面的研究目前尚未见报道。本实验通过建立慢性肝损伤纤维化的大鼠研究模型,对 OMT 脂质体作用前后 HSCs 蛋白质进行双向电泳分析比较,揭示 OMT 脂质体对 HSCs 表达蛋白质特征的影响,为非病毒性肝纤维化治疗中 OMT 的作用机制进行揭示。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,体重(200.00 ± 5.34)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证编号:SCXX(京)2002-0003,在标准的清洁级动物饲养环境下饲养,食用标准饲料,饮自来水。

1.2 试剂 大豆卵磷脂(天津远航化学品有限

公司),胆固醇(北京奥博星生物技术责任有限公司),甲醇、氯仿(西安化学试剂厂),98.9% OMT(西安大河药业有限责任公司),Caspase-3 多克隆抗体(Santa Cruz Biotech, 美国),聚乙烯吡咯烷酮、油酸(天津东丽区天大化学试剂厂),聚山梨酯、尿素、硫脲、丙磺酸盐、异丙醇(天津博迪化工有限公司),甘油、溴酚兰、两性离子去垢剂 CHAPS、乳化剂 NP-40(上海阳光试剂有限公司),1,4-二巯代苏糖醇(DTT)、戊巴比妥钠(天津化学试剂厂),高糖 DMEM、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素双抗、磷酸盐缓冲液(PBS)、肝素、CCK-8 细胞增值曲线试剂盒(In-vitrogen 公司,美国),IV 型胶原酶、DNA 酶 I(DNase I)、链霉蛋白酶 E(Pronase E, Sigma 公司,美国)。

1.3 器材 YS-875A 净化工作台(苏州净化设备有限公司),37XAZ 倒置生物显微镜(Olympus, 日本);IPG 干胶条、IPG 缓冲液(Amersham Biosciences)、三氟乙酸、基质 α 氰基-4-羟基肉桂酸(Sigma 公司,美国)、铁氰化钾、硫代硫酸钠、碳酸氢铵、乙醇、无水碳酸钠(Merck millipore 公司,德国)、IPGphor™ 等电聚焦仪、Hoefer SE600 垂直电泳槽、电泳仪、Umax ImageScanner 扫描仪、凝胶分析软件(ImageMaster 2D Elite);美国 Agilent RRLC 液相色谱仪。

2 方法

2.1 制备 OMT HSCs 靶向脂质体 利用逆相蒸发法^[14]制备 OMT HSCs 靶向脂质体。分别将大豆卵磷脂 5.0 g、胆固醇 2.5 g,溶于氯仿甲醇 50 mL 混合液中,70 °C 水浴挥干溶剂,加入油酸 0.5 g、聚山梨酯 2.5 g,搅拌融化。另将 OMT 1.5 g、聚乙烯吡咯烷酮 2.5 g 溶于 pH 7.4 磷酸缓冲液中,水浴加热至 70 °C,再将两者混合,恒温搅拌,灌装,密封,超声乳化,所得乳剂在旋转蒸发仪上减压蒸除有机溶剂,然后再进行短时超声,即得乳白色脂质体混悬剂。按 10:1 摩尔比加入脂质体,室温震荡过夜,得到 OMT 脂质体,冰浴下旋涡震荡 30 min,通过凝胶柱(CL-4B),层析法除去未偶连的脂质体。

2.2 大鼠 HSCs 分离培养和实验分组 2% 戊巴比妥钠(60 mg/kg 体重)和肝素(100 μ/kg 体重)腹腔注射麻醉 CCl₄ 诱导的 30 只肝纤维化模型大鼠^[15]。开腹后,利用王文兵等^[16]的灌注法,分别分离获得肝纤维化 HSCs。对获得的 HSCs 进行体外培养扩增,培养基为添加 10% FBS 的高糖 DMEM,用第二代(P2)细胞进行实验,30 只肝纤维化模型大鼠随机分为 A(模型组)、B(OMT 脂质体处理组)、C(脂质体对照组)3 组,每组 10 只。同时,以同样方

法对 10 只正常大鼠来源 HSCs 进行分离培养,并作为正常对照组(D 组)。其中,B 组 OMT 脂质体处理,50 mg/kg,3 次/周,C 组脂质体处理作为阴性对照,脂质体剂量与用药时间与 B 组相同,A 组给予等量的 PBS 处理。

2.3 CCK-8 细胞增殖曲线测定 分别处理 A、B、C 及正常对照组 P2 代 HSCs,以 4×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板内,每孔 100 μ L 培养基,每组细胞接种 5 个平行孔。细胞贴壁 24 h 后按 1:10 添加 CCK-8 试剂,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h,进行 OD (490 nm) 值测定,连续观测 7 天。

2.4 细胞总蛋白质提取及其含量的测定 于药物处理 7 天分别收集细胞,0.01 mol/L PBS 洗 1 次,分别加入细胞裂解液 5 mL,Vortex 混匀,冰浴中以超声破碎仪破碎组织按间断脉冲模式操作(400 W,重复 20 次),12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 1 h,取上清,采用 Bradford 法测定蛋白质含量。

2.5 等电聚焦双向电泳

2.5.1 一向等电聚焦电泳 根据所测样品浓度取上述样品 500 μ g 加入水化缓冲液至总体积 350 mL,转移到水化槽中。取预先平衡至室温的固相 pH 梯度(IPG)胶条 1 条,胶面向下放入水化槽,表面加矿物油覆盖,20 $^{\circ}$ C 水化过夜。然后将水化溶胀的 IPG 胶条转移入一向等电聚焦电泳槽中按下述步骤进行电泳:0~250 V,30 min;1 000 V,1 h;1 000~10 000 V,5 h;10 000 V,6 h;500 V,20 min。电泳总伏时数为 8 8367 V。

2.5.2 胶条的平衡 电泳完毕后取出胶条胶面向上置于含二硫苏糖醇(DTT)的平衡缓冲液中平衡 15 min,然后再置于含碘乙酰胺的平衡缓冲液中平衡 15 min,取出后吸去胶条表面多余的液体。

2.5.3 二向 SDS-PAGE 电泳 将平衡好的胶条以胶条背面紧贴玻璃板的方式放入预先制备好的 SDS-PAGE 凝胶中,胶条下部紧贴凝胶上面,再加入 0.5% 的琼脂糖凝胶封闭空隙,加入电极缓冲液,进行二向电泳。10 mA 电泳 15 min 后加大电流至 20 mA 直至溴酚蓝前沿距离玻璃板下缘 0.5 cm 时停止电泳。凝胶在自动染色仪中行硝酸银染色。

2.5.4 凝胶图像分析 图像扫描仪经强度矫正后,透射扫描 2-DE 凝胶(光学分辨率 300 DPI,像素深度 8 bits),所得图谱借助图像分析软件 ImageMaster 2D Elite 进行详细分析、比较蛋白斑点差异。根据斑点的位置、大小、形状等参数,图像分析软件自动将不同图谱中的相同蛋白点匹配,不能匹配的

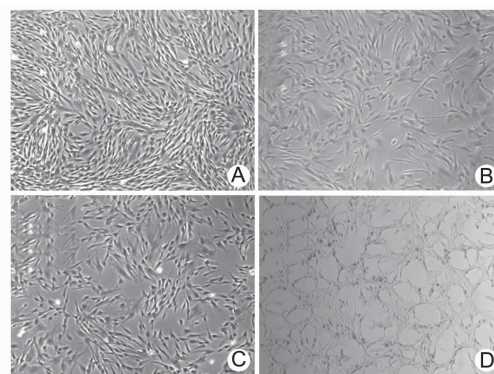
蛋白斑点视为差异点。蛋白分子的等电点和分子量根据 IPG 胶条 pH 标示范围和低分子量蛋白标准测算。

2.5.5 蛋白质质谱分析 选取两个差异比较明显的蛋白点,经胶内胰酶消化,送军事医学科学院仪器分析中心进行肽质量指纹图谱(peptide mass finger, PMF)测定,以确定差异蛋白结构和功能。

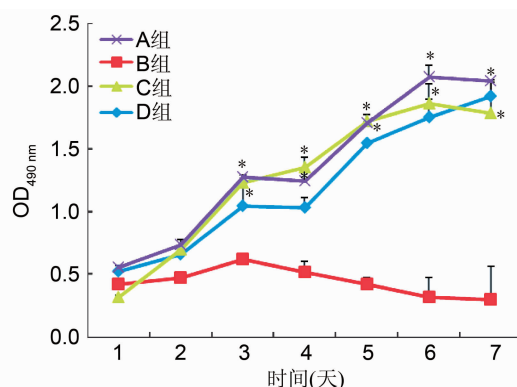
3 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件对结果进行统计学分析,对各组先采用完全随机方差分析,再进一步用 LSD 检验作两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 OMT 脂质体对肝纤维化大鼠 HSCs 增殖的抑制作用(图 1) CCl_4 肝纤维化大鼠 HSCs 呈特异性的肌成纤维细胞状,区别于正常大鼠 HSCs,在体外具有良好的增殖能力。CCK-8 细胞增殖曲线显示从作用第 3 天开始,与 A 组和 C 组比较,B 组(图 1,B) HSCs 增殖能力明显受限($P < 0.05$),细胞形态也出现由长梭形向星形(正常大鼠 HSCs 形态)转变的趋势。而脂质体作用的细胞几乎没有变化。



注:A 为模型组;B 为 OMT 脂质体处理组;C 为脂质体对照组;D 为正常对照组



注:与 B 组同期比较, $P < 0.05$

图 1 OMT 脂质体对肝纤维化大鼠 HSCs 增殖的抑制作用 ($\times 40$)

2 OMT 脂质体处理前后 HSCs 蛋白差异比较 (表 1,图 2、3) 蛋白质第一向电泳等电焦距 PH 3 - 10,上样 100 μg。SDS-PAGE 采用 15 cm × 16 cm × 0.15 cm,10% 均一胶结果依然显色,电泳图谱共有 450 种蛋白,经电泳分离后,按等电点从酸到碱、分布量从低到高分布,利用 ImageMaster 2D Elite 3.01 图像分析软件比较各组电泳图谱(图 2),A、B、C 及正常对照组的检测结果分别为 864、756、630、468 个蛋白质点。总蛋白质点在 OMT 脂质体作用后有所减少,与正常对照组相比有 6 个点位相匹配,匹配率为 63%。不匹配的点主要为低丰度蛋白。

同时,经分析 10 种蛋白质在正常肝细胞中差异表达,并且在 B 组和 A 组之间具有表达差异。差异点的产生与提取和分离条件无关,而是模型大鼠肝脏 HSCs 经 OMT 脂质体作用后蛋白质迁移、增加或消失的结果(表 1)。

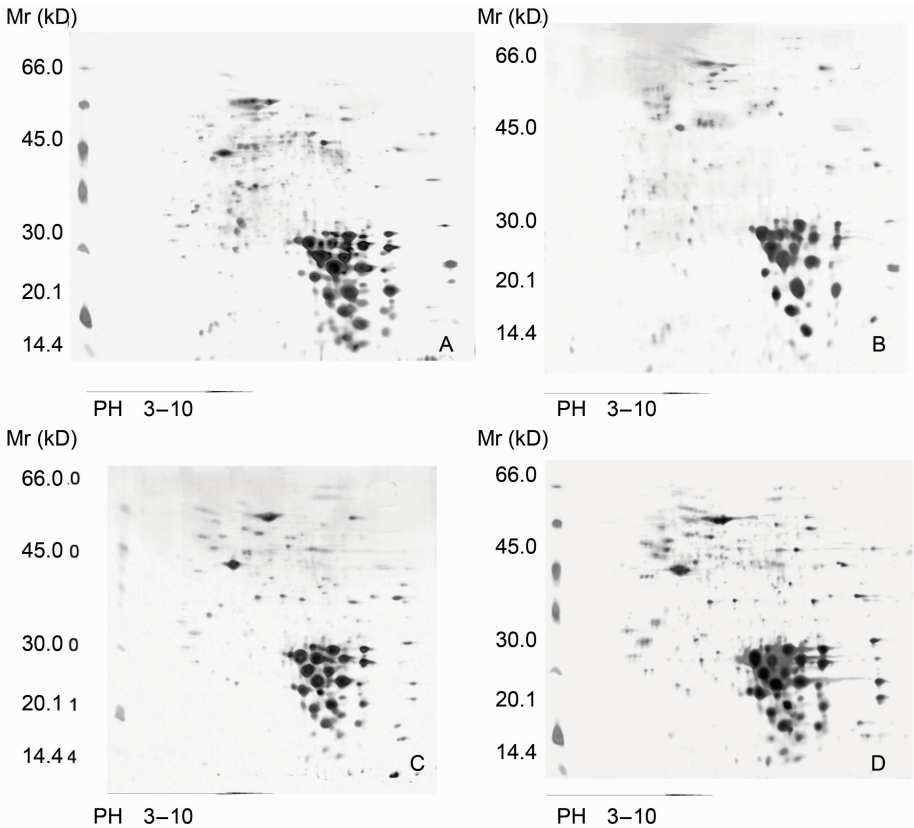
对 10 个差异蛋白质局部区域图像进行放大可显示各组之间有明显的蛋白质点差异(图 3):与正常肝细胞相比;一些正常肝脏特异性的蛋白在纤维化肝脏 HSCs 中下调表达或者不表达,经过 OMT 脂质体作用

表 1 双向蛋白质点基本信息

编号	含量	面积	等电点	分子量
1	221 706	1 338	5.96	64 956.420
2	124 749	804	6.05	62 611.826
3	159 251	918	6.09	58 283.346
4	133 512	771	6.01	40 518.539
5	123 173	806	8.89	45 560.377
6	101 174	584	6.06	46 236.397
7	474 139	2 548	6.24	45 342.992
8	102 380	709	6.66	54 051.639
9	100 942	512	8.18	33 169.140
10	99 267	505	8.04	33 800.377

后,具有明显的上调表达;而另有一些蛋白质在正常肝组织中含量低,在纤维化肝 HSCs 中表达增加,而在经 OMT 脂质体靶向治疗后,表达明显下调,进一步证实差异蛋白与 OMT 脂质体作用相关。

3 差异蛋白点肽质量指纹图谱分析(图 4) 根据局部区域放大结果显示 6 和 8 两个多肽,在正常肝细胞中表达,而在纤维化肝 HSCs 中不表达,但在 OMT 脂质体用后表达明显上调,因此选取 6 和 8 两个差异蛋白,经胶内胰酶消化,进行 PMF 测定。获得的 PMF 以酶自动降解峰进行校正(图 3)。经 Expsasy 软



注:A 为模型组,为肝纤维化大鼠来源 HSCs OMT 脂质体作用前双向电泳图谱;B 为 OMT 脂质体处理组,为肝纤维化大鼠来源 HSCs OMT 脂质体作用后双向电泳图谱;C 为脂质体对照组;D 为正常大鼠来源的 HSCs 对照组

图2 肝纤维化大鼠来源 HSCs OMT 脂质体作用前后双向电泳图谱

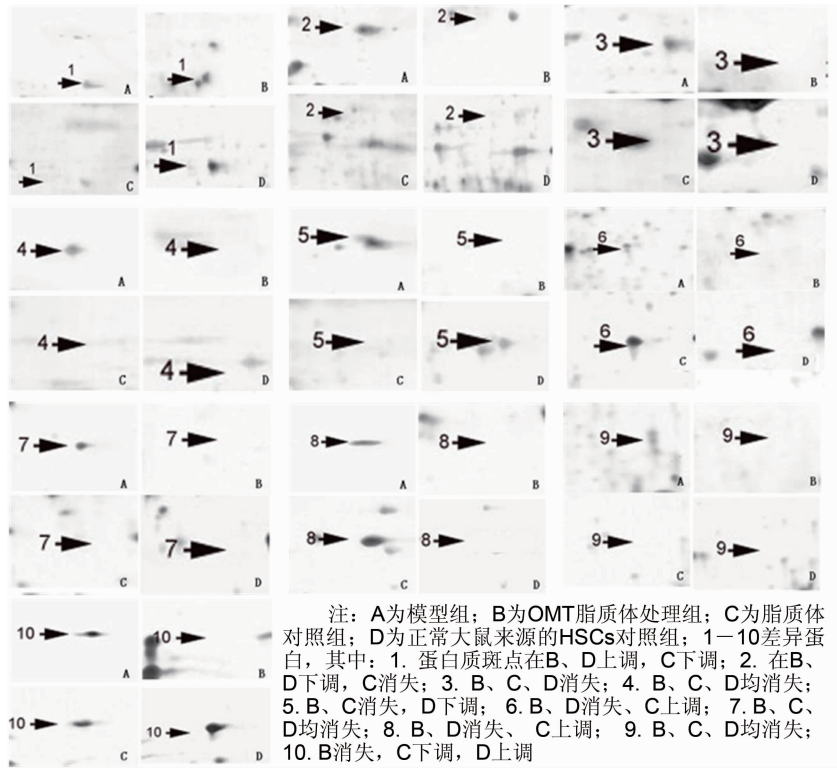
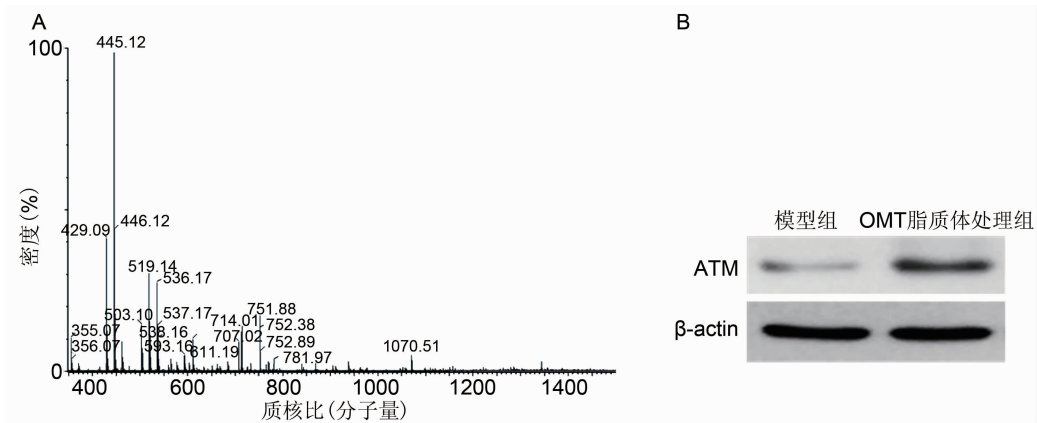


图 3 10 个差异蛋白局部区域图像放大表达比较分析



注:A 为差异蛋白点肽质量指纹图谱;B 为 Western blot 验证 OMT 脂质体中 ATM 的上调表达图

图 4 差异蛋白点肽质量指纹图谱分析

件对 SWISS-PROT 蛋白数据库进行查询,检索查询到两个差异蛋白点,其中之一为细胞周期检定点激酶 ATM 蛋白,由 437 个氨基酸组成,分子量为 46.236 kD,等电点为 6.06。另一差异蛋白为转录锌指蛋白 Miz1,由 490 个氨基酸组成,分子量为 54.051 kD,等电点为 6.66。对两个差异点之一的 ATM 蛋白,我们又进一步进行了 Western bolt 验证,结果显示 ATM 在 OMT 脂质体作用组中表达均明显上调大于 2 倍(图 4 B)。

讨 论

OMT 被证实在病毒性和非病毒性肝纤维化治疗

中具有有良好的疗效,虽然对于其抗病毒机制已经有研究证实主要通过影响免疫应答实现,在非病毒性肝纤维化治疗中发挥作用机制却更多的与细胞凋亡相关的 Caspases 的激活有关。而大量的研究证实肝纤维化与 HSCs 密切相关,HSCs 在肝纤维化发生和进展中发挥关键作用。我们的前期研究中显示,在非病毒性肝纤维化治疗中,OMT 脂质体可以通过促进 HSCs 的凋亡从而发挥治疗作用^[17]。虽然关于 OMT 促进 HSCs 凋亡机制的研究已经陆续展开,但是对于 OMT 脂质体对 HSCs 作用前后蛋白表达谱的变化及其生物信息学分析方面的研究目前尚未见报道。所以,本

研究借助新的差异蛋白质组学研究方法,对 OMT 脂质体作用 HSCs 后的分子生物学变化进行深入研究,对于进一步阐明 HSCs 在 OMT 脂质体作用下的变化机制,以及完善其对肝纤维化治疗作用的理论依据和临床应用价值都有着重要的意义。在本研究中,应用新的差异蛋白组学的方法(主要针对蛋白质的变化特征)比较 OMT 脂质体作用 HSCs 前后细胞蛋白变化,并筛选出 2 个 OMT 脂质体作用前后 HSCs 表达的蛋白质差异点,进行 PMF 对差异蛋白氨基酸序列进行分析、鉴定,初步筛选出与 OMT 对肝损伤保护作用相关的两种重要蛋白质,即 ATM 蛋白和 Miz1 蛋白。其表达在基因修饰后明显增加,说明两种蛋白与 OMT 脂质体对肝损伤保护作用密切相关。

目前 OMT 已经作为抗肿瘤药是肝纤维化细胞凋亡的诱导剂,普遍认为其细胞毒效应可能与肿瘤细胞程序化凋亡信号通路的启动有关。对细胞凋亡的研究证实,大部分细胞凋亡都依赖于 Caspases 的激活。激活 Caspases 的信号途径主要有两条:死亡受体(包括 TNFR1、Fas、DR3、DR4、DR5 和 DR6)途径和线粒体/细胞色素 C 途径^[18]。而在我们的结果中,ATM 是 PI-3 kinase 的一员,已被证实为 p53 的上游调控蛋白,通过对 p53 丝氨酸第 15 个密码子部位进行磷酸化调控 p53 的活性^[19]。p53 进一步通过下游靶蛋白如 p21^{raf-1},抑制 CDK2-4 和 CDK-6 使细胞停留在 G₁ 静止期,从而发挥 p53 的抑癌和缓解肝纤维化的作用。而作为锌指蛋白,Miz1 已被证实通过 JNK 信号通路选择性调节 TNF- α 介导的细胞的凋亡作用^[20]。故我们的研究显示,OMT 脂质体对肝纤维化大鼠肝星状细胞作用前后差异显著的两个蛋白均参与介导了细胞凋亡的细胞信号通路,进一步证实了其逆转治疗肝纤维化的机理与诱导肝星状细胞凋亡有关。

蛋白质组学研究的重要途径之一,就是着重于寻找和筛选有意义的、可引起两个样本之间的差异蛋白质谱的因素,揭示细胞生理和病理状态的进程与本质,探究细胞对于外界环境刺激的反应途径,以及相关调控机制,同时获得对某些关键蛋白的定性和功能分析^[21]。因此,筛选特定情况下的蛋白质组中特殊标志蛋白与关键蛋白的研究具有很大的前景及实际应用价值。双向电泳仍是目前可以覆盖最多蛋白质的技术,因此是差异蛋白质组学研究的重要手段之一。本实验显示将 OMT 脂质体注入大鼠体内后,其与对照组的肝星状细胞表达蛋白存在明显差异,这主要表现在双向电泳图谱斑点的增减以及部分斑点的染色面积和染色深浅发生了明显变化,提示 OMT 脂质体对于 HSCs

的作用引起了其蛋白质在质(蛋白点的缺失、增加)和量(蛋白点染色的深浅、面积的大小)的变化。这种变化很可能由于 OMT 脂质体导致 HSCs 是蛋白质的表达变化引起的。

OMT 是广泛应用于临床的抗肝纤维化的药物,我们在前期的研究中将其成功制备成脂质体,以提高药物被网状内皮系统丰富的肝脏所摄取,药物可被包裹在脂质体微球内部或吸附于膜上,通过细胞内吞和膜融合进入细胞,然后逐渐释放,可以提高药物疗效、降低毒副反应。并进一步构建了对 HSCs 具有特异介导作用的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)受体偶联的 OMT 脂质体,证实该中药靶向载体系统可以特异性将药物主动靶向送至 HSCs,实现通过受体介导的主动靶向,诱导 HSCs 凋亡,使肝纤维化得到有效逆转,但 OMT 脂质体对 HSCs 的作用的具体机制,以及其减轻肝纤维化的信号传导通路的研究比较少。本实验通过比较双向电泳结合 PMF 和氨基酸序列分析比较 OMT 脂质体作用前后 HSCs 蛋白差异,初步获得了发挥关键作用的差异蛋白,为其在肝纤维化临床治疗、诊断和药物研发提供了可参考的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Mann J, Mann DA. Transcriptional regulation of hepatic stellate cells [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7-8): 497-512.
- [2] Iredale JP, Thompson A, Henderson NC. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: biochemistry and regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, doi: S0925-4439(12)00253-0.
- [3] Stern MM, Myers RL, Hammamb N, et al. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 2393-2399.
- [4] Goldschmidt I, Baumann U. Hepatic fibrosis in paediatric liver disease [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2012, 36(3): 268-270.
- [5] Anty R, Lemoine M. Liver fibrogenesis and metabolic factors [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011, 35(Suppl 1): S10-S20.
- [6] 孙宏丽, 高蕾, 初文峰, 等. 氧化苦参碱心肌保护作用及其作用靶点的研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(1): 69-72.
- [7] Violi F, Ferro D, Basili S. Coagulopathy of chronic liver disease [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(15): 1453-1454.
- [8] Li YY, Li H, Lu P, et al. Prognostic value of cirrhosis for intrahepatic cholangiocarcinoma after

- surgical treatment [J]. J Gastrointest Surg, 2011, 15(4): 608-613.
- [9] 周玲. 苦参碱及氧化苦参碱生物活性研究进展[J]. 农业与技术, 2009, 29(6): 66-68.
- [10] Liu HY, Li YX, Hao YJ, et al. Effects of oxymatrine on the neuropathic pain induced by chronic constriction injury in mice[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(12): 1030-1032.
- [11] 戴小军, 刘利军, 蒋袁絮, 等. 氧化苦参碱-甘珀酸钠复合物的制备及其药理活性初探[J]. 中草药, 2007, 38(1): 44-46.
- [12] Baranova A, Jarrar MH, Stepanova M, et al. Association of serum adipocytokines with hepatic steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C [J]. Digestion, 2011, 83(1-2): 32-40.
- [13] Wang YP, Zhao W, Xue R, et al. Oxymatrine inhibits hepatitis B infection with an advantage of overcoming drug-resistance [J]. Antiviral Res, 2011, 89(3): 227-231.
- [14] 柴宁莉, 徐世平, 石卉, 等. 氧化苦参碱减轻大鼠肝纤维化的机制研究[J]. 中国医药导报, 2012, 9(30): 16-18.
- [15] 张丽娜, 龚均, 柴宁莉. 四氯化碳和硫代乙酰胺诱导大鼠肝纤维化的对比研究[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(19): 1909-1912.
- [16] 王文兵, 戴立里, 郑元义. 改良大鼠肝星状细胞分离及性质鉴定[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2005, 14(3): 239-241.
- [17] Chai NL, Fu Q, Shi H, et al. Oxymatrine liposome attenuates hepatic fibrosis via targeting hepatic stellate cells[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(31): 4199-4206.
- [18] Yoshida K, Kubo Y, Kusunoki Y, et al. Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells[J]. Cell Immunol, 2009, 255(1-2): 61-68.
- [19] Slemmer JE, Zhu C, Landshamer S, et al. Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury[J]. Am J Pathol, 2008, 173(6): 1795-1805.
- [20] Liu J, Yan J, Jiang S, et al. Site-specific ubiquitination is required for relieving the transcription factor Miz1-mediated suppression on TNF- α -induced JNK activation and inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(1): 191-196.
- [21] Choi S, Srivas R, Fu KY, et al. Quantitative proteomics reveal ATM kinase-dependent exchange in DNA damage response complexes[J]. J Proteome Res, 2012, 11(10): 4983-4991.

(收稿: 2012-12-07 修回: 2013-02-18)

第八次全国中西医结合男科学术会议征文通知

由中国中西医结合男科专业委员会主办, 河南省中医院和河南省中西医结合男科专业委员会共同承办的“第八次全国中西医结合男科学术会议”将于 2013 年 8 月 23—25 日在河南开封举行, 同时进行“第三届中国中西医结合男科专业委员会和青年委员会”的换届选举工作, 本次会议主题为“传承创新特色疗法, 建设中国特色男科”。现将会议征文通知如下。

征文范围 (1) 各种特色疗法治疗男科病的临床经验和体会; (2) 各种男科疾病(不育症、前列腺病、性功能障碍等)最新基础和临床研究; (3) 中医药在男性养生保健优生领域的研究及保健品的开发研究; (4) 男科相关学科如性医学、心理学、社会学等方面的研究进展; (5) 中医药在辅助生育技术中的应用, 中西医结合治疗性传播疾病的经验和体会; (6) 男科实验室建设的经验和体会; (7) 对男科文献的继承、发掘与整理; (8) 中医男科学学科建设的思路和方法。

征文要求 (1) 来稿限 3 000 字以内, 并附 500 字论文摘要。论文未公开发表; (2) 本次会议全部采用网上投稿, 论文请用 Word 格式排版, 发至下列信箱: zgzyjhnk@126.com; (3) 征文截稿日期为 2013 年 7 月 30 日(以邮件发送时间); (4) 正式会议通知, 请在河南省中医院(www.hnszyy.com.cn)网站下载, 或告知邮寄。

联系方式 联系地址: 河南省郑州市东风路 6 号河南省中医院男科(邮编 450002); 联系人: 孙自学, 王祖龙, 陈建设; 联系电话: 0371-60908730; 13303856925; 15838262155。