

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.13.005

人牙源性 iPSCs 3 种培养底物的比较*

谭小兵¹, 刘佳¹, 郭宇¹, 徐静舒¹, 戴青原^{2△}

(1. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院口腔内科, 昆明 650032;

2. 昆明医科大学第一附属医院心内科, 昆明 650032)

[摘要] **目的** 对比研究 3 种人牙源性诱导性多能干细胞(iPSCs)培养底物的特点。**方法** 使用 3 种底物培养人牙源性 iPSCs: 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、基质胶和重组人玻连蛋白(VTN-N), 对比 iPSCs 的生长情况。**结果** 3 种底物的制备时间分别为 14、3、1 h, 三者间差异有统计学意义($P < 0.05$); iPSCs 重编程时间分别为(30±1.6)、(26±2.1)、(27±1.4)d, 其中 MEF 组明显多于其他两组($P < 0.05$); 重编程效率分别为 0.3%±0.03%、0.56%±0.08%、0.7%±0.02% ($P < 0.05$)。3 种底物均能较好支持 iPSCs 生长, 使其保持未分化状态。**结论** 重组人玻连蛋白无异源性动物组分, 制备简便、标准可控、重编程时间较短, 是目前理想的支持 iPSCs 生长的底物。

[关键词] 人诱导性多能干细胞; 小鼠胚胎成纤维细胞; 基质胶; 重组人玻连蛋白

[中图分类号] R78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)13-1743-04

Comparison among 3 kinds of culture substrates of odontogenic induced pluripotent stem cells*

Tan Xiaobing¹, Liu Jia¹, Guo Yu¹, Xu Jingshu¹, Dai Qingyuan^{2△}

(1. Department of Endodontics, Yunnan Provincial First People's Hospital/Kunming University of Science and Technology Affiliated Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To comparatively study the characteristics of 3 kinds of culture substrates of human odontogenic induced pluripotent stem cells(iPSCs). **Methods** The human odontogenic iPSCs were cultured by 3 kinds of substrates: mouse embryonic fibroblasts(MEF), matrigel and recombinant human vitronectin(VTN-N). The iPSCs growth situation was compared among three groups. **Results** The preparation time of these 3 kinds of substrates was 14, 3, 1 h respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The iPSCs reprogramming time was (30±1.6), (26±2.1), (27±1.4) d, respectively, while that in the MEF group significantly higher than in other two groups ($P < 0.05$). The reprogramming efficiencies were 0.3%±0.03%, 0.56%±0.08%, 0.7%±0.02% respectively ($P < 0.05$). Three kinds of substrate could better support iPSCs growth and make them to maintain undifferentiated status. **Conclusion** with no heterologous animal components, and the advantage of simple preparation, controllable standard and shorter reprogramming time is easy to prepare, the standard is controllable and the reprogramming time is shorter, which is an ideal substrate for supporting iPSCs growth.

[Key words] human induced pluripotent stem cell; MEF; matrigel; vitronectin

2007 年 Yamanaka 等^[1-2] 两个独立研究小组先后将转录基因 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 或 Oct4/Sox2/Nanog/Lin28 导入人皮肤成纤维细胞, 将其诱导为具有胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)性质的细胞, 并命名为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 为干细胞治疗与再生医学研究提供了新的思路^[3-6]。iPSCs 在形态、细胞倍增能力、类胚胎和畸胎瘤形成、分化能力等多方面与 ESCs 非常相似, 在组织再生、疾病模型、个性化治疗等方面具有巨大的应用前景^[7-9]。iPSCs 应用于临床研究时必须考虑其生物安全性, 除了采用非整合性重编程方法(如仙台病毒、质粒载体、mRNAs、蛋白等)进行诱导以外^[10], 饲养层底物也是影响 iPSCs 生物安全性的重要因素。人牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源, 一定条件下可分化为脂肪、成骨或软骨系细胞, 但与 iPSCs 相比其增殖和分化能力有限。本研究采用仙台病毒将人 DP-

SCs 诱导为 iPSCs, 观察比较 3 种培养底物对 iPSCs 生长的支持程度, 筛选符合临床要求的最佳底物。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 α-MEM、2.5 g/L 胰蛋白酶、0.25 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、bFGF、重组人玻连蛋白(VTN-N)、I 型胶原酶购自美国 Invitrogen 公司, 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 基质胶(生长因子减少型)购自美国 BD 公司, II 型中性蛋白酶购自瑞士 Roche 公司, CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit 购自美国 Life 公司, 重编程培养基、PSC-easy 培养基购自北京赛贝生物科技公司, H9 细胞购自美国国家干细胞库。

1.2 方法

1.2.1 人 DPSCs 的分离培养 参照 Gronthos 方法^[11]: 收集本院口腔颌面外科拔除的下颌第三磨牙, 术前告知并取得书面同意。分离牙髓组织、剪碎, I 型胶原酶与 II 型中性蛋白酶混

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360161); 云南省教育厅基金资助项目(2015Y153)。 作者简介: 谭小兵(1974-), 硕士, 副主任医师, 主要从事干细胞在牙髓再生中的应用研究。 △ 通信作者, E-mail: dqy0823@163.com。

合液(3:4, mg/mL)孵育 60 min,离心、弃上清液,加入完全培养基(α -MEM + 15% FBS + 1% 谷氨酰胺 + 1% 青/链霉素),过滤得到单细胞悬液,37 °C、5% CO₂ 常规培养,90% 融合后传代,第 3~5 代用于实验。观察细胞形态特征,流式细胞仪检测特异标记物的表达。所有实验均经云南省第一人民医院伦理委员会批准。

1.2.2 人 DPSCs 重编程及培养 利用 Sendai Reprogramming Kit 试剂盒进行细胞转染,0.5 mmol/L EDTA 液消化传代。人胚胎干细胞 H9 为标准对照。仙台病毒(Sendai virus, SeV)转染:前两天,第 3 代 DPSCs 铺到 6 孔板内(1×10^5 /孔)常规培养。转染当天(第 0 天),将适量 SeV 溶解到 70 μ L DPSCs 培养基内,1 d 后再加入 130 μ L 培养基,第 2 天换新鲜含 SeV 培养液。第 3 天将已转染细胞分别转移到 3 种底物覆盖的 6 孔板内,加入重编程培养基继续培养,3 周左右可观察到克隆出现。克隆成熟时,“十字法”分割,转移到新培养板内,PSC-easy 培养基培养。

1.2.3 3 种培养底物的制备 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)按照文献[12]制备:处死受孕小鼠,去除胚胎所有脏器、剪碎,0.25% 胰酶/EDTA,37 °C 消化 15 min,制成单细胞悬液,37 °C、5% CO₂ 培养(此时为第 0 代 MEF),90% 融合时传代或冻存。传代 90% 融合时,加入含丝裂霉素 C 的培养液(10 μ g/mL),2 h 后消化细胞,转入培养皿,第 2 天即可使用。基质胶(matrigel):4 °C 解冻,预冷枪头混匀,冷 PBS 稀释(50 μ g/mL, 1:100),取适量包被培养板,37 °C 孵育 2 h 或 4 °C 过夜,吸去基质胶,加入 PSC-easy 液备用; Vitronectin, VTN-N:常温解冻,常温 PBS 液稀释(5 μ g/mL, 1:100),取适量包被培养板,37 °C 孵育 1 h,吸去 VTN-N,加入 PSC-easy 液备用。

1.2.4 3 种不同底物培养系统的比较

1.2.4.1 iPSCs 克隆生长情况 (1)观察 iPSCs 克隆在 3 组不同底物上的形态特征(H9 为标准对照)。(2)RT-PCR:TriZOL 试剂盒提取 iPSCs 总 RNA,20 μ L 体系逆转录试剂盒合成单链 cDNA,反应条件 25 °C 5 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 保存。PCR 反应程序:95 °C 5 min,35 次循环(95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s),72 °C 7 min,电泳检测、成像,检测 iPSCs 特异性标记物 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 的表达情况,人 H9 为标准对照,水为阴性对照。根据目的基因设计相应引物(表 1)。

表 1 人 DPSCs-iPSCs 标记物基因上下游引物碱基序列

基因	引物序列(5'-3')
Oct4	F:GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG R:CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC
Sox2	F:GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG R:TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG
Klf4	F:ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C R:TGA TTG TAG TGC TTT CTG GCT GGG CTC C
c-Myc	F:GCG TCC TGG GAA GGG AGA TCC GGA GC R:TTG AGG GGC ATC GTC GCG GGA GGC TG
GAPDH	F:CAG AAC ATC ATC CCT GCC TCT AG R:TTG AAG TCA GAG GAG ACC ACC TG

1.2.4.2 重编程时间 包括 3 组不同底物的准备时间(培养基、饲养层细胞的制备)、从目标细胞接种到 iPSCs 克隆出现所

需时间,重复 3 次,取平均值。

1.2.4.3 重编程效率 出现克隆数占重编程体细胞数量的比例是一个重要参数。计算公式:克隆数/体细胞数量 $\times 100\%$,重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.0 统计学软件进行数据处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 DPSCs 培养及鉴定 分离培养第 1 天即可看到细胞贴壁生长,第 4 天形成克隆,第 10 天形成单细胞层。细胞为纺锤形或长梭形,形态较大(图 2A、2B)。流式细胞仪结果显示 DPSCs 不表达 CD34, CD45, 几乎所有细胞为 CD90、CD105 阳性, CD146 染色阳性(28.4%),说明为 MSCs 来源; Stro-1 和 Oct-4 染色均为阳性(分别为 28.3%、43.6%),说明细胞具有多向分化潜能。

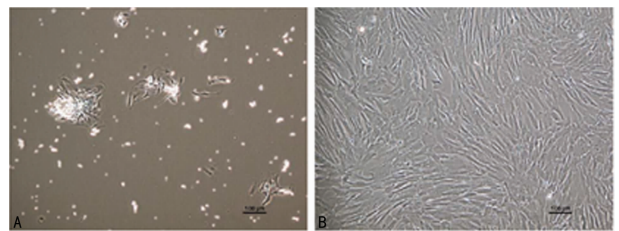
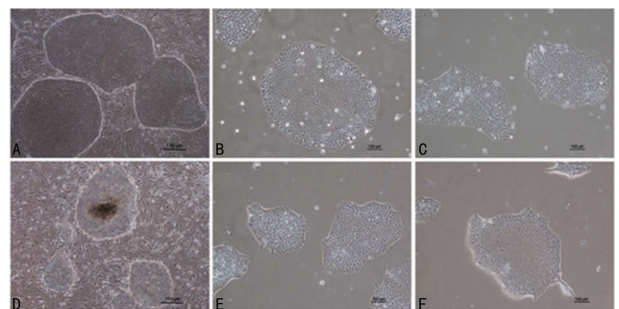


图 2 人 DPSCs 培养及鉴定

2.2 人 iPSCs 重编程及其在 3 种底物上的培养 转染细胞接种到 3 组底物,重编程 3 d 即可观察到纤维细胞样克隆出现,7~10 d 后生长停止,出现胞核凝固,细胞分解,克隆松散直至消失。ES 样克隆多出现于转染后 4 周左右,表现为转染细胞缩小为圆形或规则多边形,单层排列紧密,边缘锐利清晰,边界清楚。此时 ES 样克隆即为 iPS 原代细胞(P0)。吸取原代 iPSCs 克隆种植于底物上传代培养,此时为 iPS 第 1 代(P1)。克隆生长迅速,EDTA 液消化传代,4~5 d 传代 1 次,细胞继续维持 ES 样克隆特征。3 种底物均可很好地支持 DPSCs-iPS 和 H9 细胞的生长,克隆呈集落样生长;与周围有清晰分界线,克隆内细胞排列致密,保持未分化状态(图 3)。RT-PCR 结果显示 iPSCs 特异标记物的表达稳定,提示 iPSCs 处于未分化状态(图 4A)。



A:MEF;B:基质胶;C:重组人玻连蛋白;D:MEF;E:基质胶;F:重组人玻连蛋白。

图 3 人 DPSCs-iPS 与 H9 生长于不同培养底物

2.3 3 种底物准备及重编程时间 MEF 培养基准备 2 h,铺板过夜 12 h,丝裂霉素处理时间 2 h,总计 14 h,重编程第 30 天左右克隆开始出现。基质胶准备时间 1 h,包被孵育 2 h,重编程第 26 天时克隆开始,VTN-N 准备时间 0.2 h,包被孵育 1 h,

重编程第 25 天克隆开始出现 ($P < 0.05$) (图 4B)。

2.4 重编程效率 人 DPSCs 重编程前细胞数量为 1×10^4 , 重编程后 3 种底物上分别得到 30、56、70 个克隆, 重编程效率为 $0.3\% \pm 0.03\%$ 、 $0.56\% \pm 0.08\%$ 、 $0.7\% \pm 0.02\%$, 重编程效率间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5。

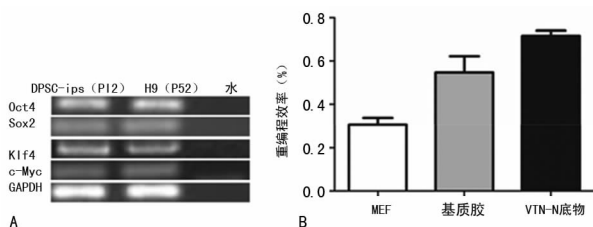


图 4 人 DPSCs-iPS 特异性标记物 RT-PCR 分析及不同底物重编程时间比较

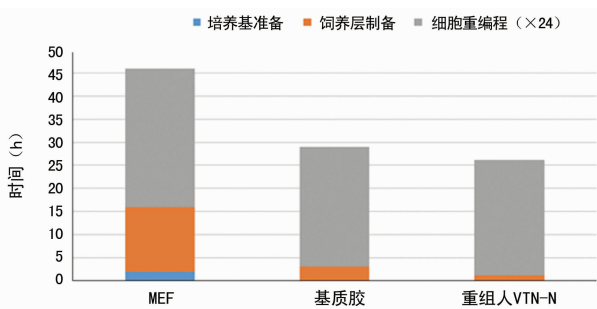


图 5 人 DPSCs-iPS 不同培养底物上的重编程效率比较

3 讨 论

考虑到伦理道德及免疫排斥因素, iPSCs 比 ESCs 更适于细胞移植和再生医学, 是目前最有应用前景的种子细胞^[13]。能满足临床应用要求的 iPSCs 称为临床级别 iPSCs, 理论上须满足以下 3 个条件: (1) 细胞捐献者须符合《组织捐献指南》的要求; (2) 细胞处理全过程须在 GMP 级别实验环境中进行, 使用无异源性动物组分试剂; (3) 获得的 iPSCs 无外源性基因或病毒整合, 生物安全性有保证^[14]。

目前制约 iPSCs 应用于临床的其中一个因素就是其生物安全性, 如重编程载体带来的致瘤性可能、培养底物成分、含异源性动物组分试剂等。本实验采用一种非整合性 RNA 载体-仙台病毒诱导人 DPSCs 重编程为 iPSCs, RT-PCR 结果证实得到的 iPSCs 无仙台病毒或外源性转基因的表达, 同时所用 iPSCs 培养基无异源性动物组分 (重编程培养基和 PSC-easy 培养基), 保证了 iPSCs 的生物安全性 (结果另文报道)。在此基础上笔者选择 3 种培养底物, 对比研究哪种可以最佳支持 iPSC 细胞的生长。

自从人 ESCs 成功培养以来, 许多人 ESCs 和 iPSCs 系陆续成功建立, 细胞生物学特性的研究有助于了解自我更新和定向分化过程中的关键通道和转录因子, 而这又反过来促进了 iPSCs 的培养条件最佳化。iPSCs 的培养底物经历了从饲养层到无饲养层体系的发展。早期 iPSCs 培养大多基于 Thomson 等创立的 ESCs 培养体系^[15], MEF 作为饲养层可以分泌多种生长因子、激素和胞外基质如转化生长因子 β 、激活素 A、层粘连蛋白和玻连蛋白, 支持稳定可靠的 iPSCs。但 MEF 存在异源性动物组分污染可能, 成分不明, 制备耗时, 标准不易控制, 同时 MEF 及其产物对 iPSCs 本身是可能的病原体^[16]。为了纯化细胞产物, 需要采用无饲养细胞的培养体系。无饲养细胞

培养体系大多基于 Thomson 体系加以改良^[17], matrigel 首先用于培养底物。有研究将人 iPSCs 培养于 3 种不同的底物, 结果发现 matrigel 可以很好支持 iPSCs 生长, 与 MEF 无明显差异^[15]。matrigel 是一种富含层粘连蛋白 111 的可溶性基底膜基质, 同时含 TGF- β 、成纤维细胞生长因子、组织纤维酶原活化因子等^[18]。matrigel 在室温下可自动聚集产生类似于哺乳动物细胞基底膜的生物活性基质材料, 生成类似体内环境的良好基底膜状态, 有助于 iPSCs 的附着生长, 为 iPSCs 保持未分化状态提供理想支持, 是常用的培养底物^[17]。matrigel 成分相对单一, 制备简便, 标准可控, 但其为小鼠源性肿瘤组织, 限制了 iPSCs 的临床使用。重组人玻连蛋白 (VTN-N) 来自于人血浆的纯化, 其主要整合素结合多肽是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD), 通过 $\alpha\beta 5$ 整合素支持人 ESCs 和 iPSCs 的生长, 使其保持未分化和自我更新能力^[18]。本研究从细胞形态、特异性标记物表达等方面进行分析, 结果发现 3 种底物均能很好地使人 DPSCs-iPSCs 和 H9 长期维持未分化状态, 与其他学者研究结果一致^[17-19]。同时本研究分别在 3 种底物上对人 DPSCs 进行重编程, 结果发现 VTN-N 所需重编程时间最短, 重编程效率也明显高于其他两组, 说明 VTN-N 可以为 iPSCs 的生长提供理想支持条件。

重组人玻连蛋白无异源性动物组分污染, 制备简便, 标准可控, 是人牙源性 iPSCs 的理想底物。GMP 标准下严格要求 iPSCs 重编程的全过程, 包括目标细胞捐献者筛选、非整合性重编程载体的选择、合适底物、目标细胞及 iPSCs 的生物安全性检测、无异源性动物组分试剂的使用等方面, 建立安全的临床级别人牙源性 iPSCs, 是笔者今后的研究方向。

参考文献

- [1] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872.
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676.
- [3] Ramalho-Santos M. iPS cells: insights into basic biology [J]. Cell, 2009, 138(138): 616-618.
- [4] Liu L, Huang JS, Han C, et al. Induced pluripotent stem cells in huntington's disease: disease modeling and the potential for cell-based therapy[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(10): 6698-6708.
- [5] Pozzobon M, Ghionzoli M, De Coppi P. ES, iPS, MSC, and AFS cells. Stem cells exploitation for pediatric surgery: current research and perspective [J]. Pediatr Surg Int, 2010, 26(1): 3-10.
- [6] Casaroli-Marano RP, Nieto-Nicolau N, Martínez-Conesa EM, et al. Potential role of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for cell-based therapy of the ocular surface[J]. J Clin Med, 2015, 4(2): 318-342.
- [7] Wang A, Tang Z, Park IH, et al. Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering[J]. Biomaterials, 2011, 32(22): 5023-5032.
- [8] Tafaleng EN, Chakraborty S, Han B, et al. Induced pluri-

- potent stem cells model personalized variations in liver disease resulting from α 1-antitrypsin deficiency[J]. *Hepatology*, 2015, 62(1):147-157.
- [9] Montgomery A, Wong A, Gabers N, et al. Engineering personalized neural tissue by combining induced pluripotent stem cells with fibrin scaffolds[J]. *Biomater Sci*, 2015, 3(2):401-413.
- [10] Hibaoui Y, Feki A. Concise review: methods and cell types used to generate down syndrome Induced pluripotent stem cells[J]. *J Clin Med*, 2015, 4(4):696-714.
- [11] Bilic J, Izpisua Belmonte JC. Concise review: induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(1):33-41.
- [12] Thomson JA, Odorico JS. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines[J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(2):53-57.
- [13] Vallier L. Serum-free and feeder-free culture conditions for human embryonic stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 690(1):57-66.
- [14] Ninomiya H, Mizuno K, Terada R, et al. Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(1):1-8.
- [15] Ghasemi-Dehkordi P, Allahbakhshian-Farsani M, Abdian N, et al. Comparison between the cultures of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) on feeder-and serum-free system(matrigel matrix), MEF and HDF feeder cell lines[J]. *J Cell Commun Signal*, 2015, 9(3):233-246.
- [16] Nagaoka M, Kobayashi M, Kawai C, et al. Design of a vitronectin-based recombinant protein as a defined substrate for differentiation of human pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0136350.
- [17] Badenes SM, Fernandes TG, Cordeiro CS, et al. Correction: defined essential 8 medium and vitronectin efficiently support scalable xeno-Free expansion of human induced pluripotent stem cells in stirred microcarrier culture systems[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5):e0155296.
- [18] Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, et al. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin[J]. *Stem cells*, 2008, 26(9):2257-2265.
- [19] Rowland TJ, Miller LM, Blaschke AJ, et al. Roles of integrins in human induced pluripotent stem cell growth on Matrigel and vitronectin[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(8):1231-1240.
- (收稿日期:2016-11-25 修回日期:2017-01-13)
-
- (上接第 1742 页)
- 疗效及影响因素分析[J]. *现代仪器与医疗*, 2013, 19(4):5-7.
- [3] 徐英. 参芍汤加减治疗腹泻型肠易激综合征临床观察[J]. *实用中医药杂志*, 2011, 27(3):161-163.
- [4] 徐建军, 潘锋, 徐虹. 中药正肝汤对乙型肝炎肝硬化患者血清瘦素、脂联素水平以及胰岛素抵抗影响的分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(4):399-401.
- [5] Parveen N, Aleem AK, Habeeb MA, et al. An update on hepatic stem cells: bench to bedside[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(2):226-230.
- [6] Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis[J]. *Ann Hepatol*, 2009, 8(1):283-291.
- [7] Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2007, 112(5):265-280.
- [8] 马建红, 王霞, 贡桂英. 丹参强肝胶囊治疗慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化 54 例疗效观察[J]. *河北中医*, 2015, 37(3):342-344.
- [9] 李杨, 吴丽娜, 李英伦, 等. 中药对黄曲霉毒素 B1 引起肝损伤过程中细胞色素 P450 影响的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(3):107-111.
- [10] 李荣, 李蓉. 苦参黄芪汤抗大鼠肝纤维化作用机制的研究[J]. *陕西中医*, 2011, 23(12):1674-1676.
- [11] 董丽娟, 杨敏, 赵洁, 等. 乙型肝炎肝硬化患者血清促血小板生成素水平与不同 HBV-DNA 载量、Child-Pugh 分级、血小板数之间的关系[J/CD]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2015, 31(1):14-17.
- [12] Zheng J, Wu C, Lin Z, et al. Curcumin up-regulates phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 through microRNA-mediated control of DNA methylation—a novel mechanism suppressing liver fibrosis[J]. *FEBS J*, 2014, 281(1):88-103.
- [13] Aoudjehane L, Bisch G, Scatton O, et al. Infection of human liver myofibroblasts by hepatitis C virus: A direct mechanism of liver fibrosis in hepatitis C[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):134-141.
- [14] Zhang X, Li FH, Liu P, et al. Study on effect of artificial CsB and its components on bile acid metabolism in rats with liver fibrosis and its mechanism[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2013, 38(22):3943-3948.
- [15] Wu BR, Zheng YL, Sang XL, et al. Role of the IGF-1/PI3K pathway and the molecular mechanism of Fuzhenghuayu therapy in a spontaneous recovery rat model of liver fibrosis[J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2013, 21(9):674-678.
- (收稿日期:2016-11-21 修回日期:2017-01-09)