

引文格式:陈静,陈艺,邹秀兰,邹玉平. 青蒿琥酯对人 Tenon 囊成纤维细胞增殖与凋亡的影响[J]. 眼科新进展, 2017, 37(6):523-526. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0132

【实验研究】

青蒿琥酯对人 Tenon 囊成纤维细胞增殖与凋亡的影响

陈静 陈艺 邹秀兰 邹玉平

Effects of artesunate on cell proliferation and apoptosis of human Tenon's capsule fibroblasts

CHEN Jing, CHEN Yi, ZOU Xiu-Lan, ZOU Yu-Ping

【Key words】 artesunate; human Tenon's capsule fibroblasts; cell proliferation; cell apoptosis; glaucoma

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of artesunate (Art) on cell proliferation and apoptosis of human Tenon's capsule fibroblasts (HTFs), and discuss the countermeasures of bleb scarring in glaucoma. **Methods** *In vitro*, HTFs were cultivated and applied by different concentrations ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of Art for 48 hours. The effect of Art on cell proliferation was assessed by MTT method. The rate of apoptosis induced by Art was determined by flow cytometry. Western Blot was performed to detect the relative expression levels of Bax and Bcl-2 after Art was treated. **Results** After treated with Art for 48 hours, compared with blank control group, Art ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) group exhibited notable anti-proliferative effect on HTFs with concentration-dependence (all $P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis rates ($8.80\% \pm 0.88\%$, $11.60\% \pm 0.56\%$, $16.30\% \pm 1.03\%$, $23.40\% \pm 1.62\%$) of HTFs were significantly enhanced with the increase of Art concentration (all $P < 0.05$). The relative expression levels of Bax were obviously high with the increase of Art concentration, while Bcl-2 levels were significantly low with the increase of Art concentration (all $P < 0.05$). **Conclusion** Art can inhibit the proliferation and induce cell apoptosis of HTFs possibly by enhancing the expression of Bax and reducing the expression of Bcl-2. Art may be a potential drug in preventing fibrous scar formation after glaucoma filtration surgery.

【中图分类号】 R775.9

【关键词】 青蒿琥酯;人 Tenon 囊成纤维细胞;细胞增殖;细胞凋亡;青光眼

【摘要】 **目的** 观察青蒿琥酯(artesunate, Art) 对人 Tenon 囊成纤维(human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs) 细胞增殖与凋亡的影响,探讨青光眼术后滤过泡瘢痕化的治疗对策。

方法 体外培养 HTFs 细胞,应用不同浓度($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 Art 处理细胞,采用 MTT 法检测 Art 对细胞增殖的影响,流式细胞仪检测 Art 对细胞凋亡的影响,Western blot 检测 Art 对凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响。

结果 Art 作用细胞 48 h 后,MTT 结果显示:与空白对照组比较,不同浓度的 Art 处理组对 HTFs 细胞的增殖均有抑制作用,且呈浓度依赖性抑制(均为 $P < 0.05$)。流式细胞仪结果显示:与空白对照组比较, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Art

作者简介:陈静,女,1976年7月出生,辽宁人,硕士,副主任医师。主要研究方向:青光眼。联系电话:020-88653516(O);E-mail:eyedoctorchening@163.com;ORCID:0000-0002-7617-9209

About CHEN Jing: Female, born in July, 1976. Master degree, associate chief physician. Tel: + 86-20-88653516 (O); E-mail: eyedoctorchening@163.com; ORCID: 0000-0002-7617-9209

收稿日期:2017-01-17

修回日期:2017-03-14

本文编辑:盛丽娜

作者单位:510010 广东省广州市,广州军区广州总医院眼科(陈静,邹秀兰,邹玉平);510010 广东省广州市,广州军区广州总医院培训中心(陈艺)

通讯作者:邹玉平, E-mail: gzzouyuping@sina.com; ORCID: 0000-0002-4756-1863

Received date: Jan 17, 2017

Accepted date: Mar 14, 2017

From the Department of Ophthalmology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command (CHEN Jing, ZOU Xiu-Lan, ZOU Yu-Ping), Guangzhou 510010, Guangdong Province, China; Department of Training Center, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command (CHEN Yi), Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Responsible author: ZOU Yu-Ping, E-mail: gzzouyuping@sina.com; ORCID: 0000-0002-4756-1863

作用后细胞凋亡率逐渐增加(均为 $P < 0.05$),分别为 $8.80\% \pm 0.88\%$ 、 $11.60\% \pm 0.56\%$ 、 $16.30\% \pm 1.03\%$ 、 $23.40\% \pm 1.62\%$ 。Western blot 检测结果显示:与空白对照组比较,不同浓度 Art 处理组 Bax 蛋白表达明显增加, Bcl-2 蛋白表达明显降低,且均呈浓度依赖性(均为 $P < 0.05$)。结论 Art 可抑制 HTFs 细胞增殖并诱导其凋亡,其机制可能是通过调节凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达而实现的。Art 可能成为一种潜在的抗青光眼术后滤过泡瘢痕化的药物。

青光眼现已成为世界第一位的不可逆性致盲性眼病^[1]。目前青光眼滤过术仍是临床上治疗青光眼的主要手术方式。青光眼术后滤过区瘢痕的形成将直接导致手术的失败,其主要是由于术后成纤维细胞的异常增殖、肌成纤维细胞的收缩以及细胞外基质的合成增多等引起^[2]。青蒿琥酯(artesunate, Art)

是青蒿素的衍生物,以往研究表明其具有治疗瘢痕及纤维化疾病的作用^[3],这为进一步研究其防治青光眼滤过手术区瘢痕的形成提供了有益的启示。本研究观察 Art 对人 Tenon 囊成纤维(human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs) 细胞增殖与凋亡的影响,为探讨其作为青光眼滤过术后抗瘢痕形成的药物提供

依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 HTFs 购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.2 主要试剂与仪器 Art(纯度 >99%, 中国桂林南药股份公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Hyclon 公司); 胰蛋白酶、二甲基亚砷(美国 Sigma 公司); MTT 试剂盒(中国南京凯基生物有限公司); 细胞培养箱、ECL 显色试剂盒(美国 Thermo 公司); 全波长多功能酶标仪(美国 Eppendorf 公司); Guava EasyCyte 流式细胞仪、AnnexinV PE-7-AAD 凋亡试剂盒(德国 Merck Millipore 公司); Bax、Bcl-2 兔抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及抗鼠 IgG 单抗(美国 CST 公司); β -actin 鼠抗人单克隆抗体(中国碧云天生物技术研究); BCA 蛋白定量试剂(中国北京康为世纪生物科技有限公司); 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 HTFs 细胞的培养 将细胞培养在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 置于含体积分数 5% 二氧化碳的 37 °C 恒温培养箱中培养。及时换液处理, 当细胞生长至培养瓶底的 80% 时给予 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化并传代。取 3 ~ 6 代细胞用于实验。

1.3.2 MTT 法检测 HTFs 细胞增殖 将处于对数生长期的 HTFs 细胞消化计数后接种于 96 孔板, 实验分为空白对照组、Art 处理组 (50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、150 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹), 同时设置调零孔, 每组每种细胞均设 3 个复孔, 于 37 °C、含体积分数 5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h, 换用含体积分数 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿培养 12 h。空白对照组继续加入含体积分数 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, Art 处理组按照规定的浓度加药。48 h 后, 每孔加入 5 g · L⁻¹ 的 MTT 20 μ L, 继续培养 4 h, 吸弃培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 采用酶标仪测定各孔于 560 nm 波长下的吸光度(A)值。计算 Art 对 HTFs 细胞的生长抑制率, 即生长抑制率 = (1 - 处理组 A/对照组 A) × 100%。

1.3.3 流式细胞仪检测 HTFs 细胞凋亡 细胞培养和实验分组同 MTT 法, 空白对照组和 Art 处理组 (50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、150 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹) 细胞培养 48 h 后, 用 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化细胞, PBS 洗涤 2 次, 制备受试样品细胞悬液。按说明书加入 AnnexinV PE-7-AAD 凋亡试剂盒中的试剂, 避光, 于室温静置反应 20 min 后行流式细胞仪检测。

1.3.4 Western blot 检测 HTFs 细胞凋亡相关蛋白的表达 细胞培养和实验分组同 MTT 法, 空白对照

组和 Art 处理组 (50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、150 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹) 细胞培养 48 h 后, 收集各组细胞, 置冰上裂解并提取总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量。取等量的上样蛋白加入 SDS 凝胶中, 电泳, 电转印至 PVDF 膜上, 待脱脂奶粉液封闭漂洗后, 加入相应一抗 (Bax、Bcl-2 兔抗人单克隆抗体, β -actin 鼠抗人单克隆抗体), 4 °C 孵育过夜, 第 2 天漂洗后用山羊抗兔及抗鼠辣根过氧化物抗体 37 °C 孵育 1 h, 洗膜, ECL 显色, 凝胶成像系统拍照, ImagJ 软件测量蛋白条带灰度值, 以 β -actin 作为内参, 分析目的蛋白的相对含量。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Art 对 HTFs 细胞增殖的影响 MTT 法检测结果显示: Art 处理组 (50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、150 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹) 的 A 值与空白对照组相比, 差异均有统计学意义 (均为 *P* < 0.05); 不同浓度 Art 组间差异亦均有统计学意义 (均为 *P* < 0.05; 见表 1)。Art 对 HTFs 细胞增殖呈浓度依赖性抑制, Art 的浓度越高, 对 HTFs 细胞的抑制率越高。

表 1 Art 对 HTFs 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	A 值	抑制率/%
空白对照组	0.184 ± 0.005	-
Art 处理组		
50 μ g · mL ⁻¹	0.165 ± 0.002 *	10.3 ± 0.6
100 μ g · mL ⁻¹	0.129 ± 0.004 **	29.9 ± 1.1
150 μ g · mL ⁻¹	0.084 ± 0.002 **	54.3 ± 1.0
200 μ g · mL ⁻¹	0.039 ± 0.003 **	78.8 ± 1.3

注: 与空白对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.2 Art 对 HTFs 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示: Art 处理组 (50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、150 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹) HTFs 细胞总凋亡率与空白对照组相比, 差异均有统计学意义 (均为 *P* < 0.01); 不同浓度 Art 组间差异亦均有统计学意义 (均为 *P* < 0.05; 见表 2、图 1)。随着 Art 浓度的增加, HTFs 细胞凋亡率显著增加。

表 2 Art 对 HTFs 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	总凋亡率/%	<i>P</i> 值
空白对照组	5.40 ± 0.62	
Art 处理组		
50 μ g · mL ⁻¹	8.80 ± 0.88	0.005
100 μ g · mL ⁻¹	11.60 ± 0.56	0.000
150 μ g · mL ⁻¹	16.30 ± 1.03	0.000
200 μ g · mL ⁻¹	23.40 ± 1.62	0.000

注: *P* 值为与空白对照组相比的结果

2.3 Art 对 HTFs 细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 Western blot 检测结果显示: 与空白对照组相比较, Art 处理组 (50 μ g · mL⁻¹、100 μ g · mL⁻¹、150 μ g · mL⁻¹、200 μ g · mL⁻¹) HTFs 细胞中

Bax 蛋白的相对表达量均明显增多(均为 $P < 0.01$); Bcl-2 蛋白的相对表达量均明显减少(均为 $P < 0.01$);且随着 Art 浓度的增加,Bax 的表达显著增

加,Bcl-2 的表达显著减少(均为 $P < 0.05$;见表 3、图 2)。故推测 HTFs 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达受 Art 浓度的影响。

图 1 流式细胞仪检测 HTFs 细胞凋亡率

表 3 Art 对 HTFs 细胞中凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2
空白对照组	0.098 ± 0.006	1.122 ± 0.128
Art 处理组		
50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.292 ± 0.005 *	0.898 ± 0.104 *
100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.564 ± 0.015 *	0.430 ± 0.110 *
150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.782 ± 0.032 *	0.318 ± 0.058 *
200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.942 ± 0.021 *	0.161 ± 0.062 *

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$

萜内酯化合物^[8]。因其毒性低、抗疟疾作用强,临床主要用于治疗疟疾,Art 是其衍生物。随着对青蒿素及其衍生物研究的不断深入,人们发现其除传统的抗疟疾作用外,还具有多种其他药理作用:抗炎、抗病毒、抗纤维化、抗寄生虫、抗肿瘤、抗孕、抗瘢痕等^[9-11]。作为新型抗纤维化药物,其对肺、肝、肾脏的作用已得到广泛研究^[12-16]。

青光眼滤过术后成纤维细胞的大量增生和转化,伴随着 I 型胶原的合成和分泌增加,导致瘢痕的形成^[2]。因此通过抑制成纤维细胞的增生,可以达到抑制滤过泡瘢痕形成的目的。本研究选取 Art 作用于体外培养的 HTFs 细胞,观察 Art 对 HTFs 细胞增殖与凋亡的影响。MTT 法检测结果显示:50 ~ 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Art 对 HTFs 细胞增殖有抑制作用,且其抑制作用呈浓度依赖性(均为 $P < 0.05$)。迟寅秀等^[10]研究发现 Art 对肿瘤细胞的增殖有抑制作用,且呈浓度依赖性,本研究结果与其相似,Art 的浓度越高,对 HTFs 细胞的抑制率越高。流式细胞仪检测结果显示:与空白对照组相比较,Art 处理组(50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 HTFs 细胞凋亡率均明显增加,且随着 Art 浓度的增加,凋亡率显著增加(均为 $P < 0.01$)。Bax 和 Bcl-2 蛋白是两个重要的凋亡相关蛋白,前者促进细胞凋亡,后者抑制细胞凋亡^[17-18]。LINDSTEN 等^[17]研究发现,如果没有 Bax 的参与,则无法启动细胞凋亡,由此可见 Bax 在细胞凋亡中发挥着巨大的作用。本研究采用 Western blot 方法检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达,结果表明:与空白对照组相比较,Art 处理组(50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)促进细胞凋亡的相关蛋白 Bax 的相对表达明显增多(均为 $P < 0.01$),抑制细胞凋亡的相关蛋白 Bcl-2 的相对表达量明显减少(均为 $P < 0.01$);且 HTFs 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达受 Art 浓度的影响,随着 Art 浓度的增加,Bax 的表达显著增加,Bcl-2 的表达显著减少。

图 2 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达

3 讨论

抗青光眼的滤过手术是目前青光眼的主要治疗手段,滤过泡的纤维瘢痕化是手术失败的主要原因。针对青光眼滤过手术后滤过泡的瘢痕化,临床工作者进行了多种多样的尝试。抗滤过泡瘢痕化的药物研究扩展到多方面,如免疫抑制剂、生物制剂等^[4-7],各类新药在安全性与有效性之间无法达到平衡。目前临床上对抗滤过泡瘢痕化的方法仍多采用术中抗代谢药物的局部浸润及术后糖皮质激素的应用,但其远期效果欠佳且并发症较多,例如结膜和角膜上皮毒性、薄壁或囊泡状滤过泡、滤过泡渗漏、滤过泡感染、持续性低眼压、浅前房等。

青蒿素是我国科研人员于 1972 年从菊科植物黄花蒿叶中分离提取得到的具有过氧桥结构的倍半

朱奔奔等^[19]报道了 Art 对人胃腺癌细胞有诱导凋亡的作用,且随 Art 浓度增高细胞凋亡率逐渐升高, Bcl-2 蛋白表达逐渐降低, Bax 蛋白表达逐渐增高,本研究的实验结果与其不谋而合。故推测 Art 诱导 HTFs 细胞的凋亡,其机制可能是通过调控 Bax 和 Bcl-2 的表达而实现的,且随药物浓度的增加,其对凋亡相关蛋白表达的调控作用也明显增强。

综上,本研究显示 Art 呈浓度依赖性地抑制 HTFs 细胞的增殖,其作用机制可能是通过调节凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达诱导 HTFs 细胞的凋亡,从而抑制其增殖实现的。因此 Art 极有可能成为预防和治疗青光眼滤过手术后滤过道纤维瘢痕化的新途径。但 Art 通过何种信号通路发挥作用等方面还需做进一步的研究。本实验为体外实验,条件易于控制,与机体内环境有一定差异, Art 在体内的生物活性有待进一步证实。此外, Art 应用的最佳作用浓度、最佳作用时间等仍有待进一步探讨。

参考文献

[1] KINGMAN S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally [J]. *Bull World Health Organ*, 2004, 82 (11): 887-888.

[2] LIU X, LI P, CHEN XY, ZHOU YG. C-ski promotes skin fibroblast proliferation but decreases type I collagen; implications for wound healing and scar formation [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2010, 35 (4): 417-424.

[3] 陈翔, 农晓琳. 青蒿琥酯治疗病理性瘢痕与纤维化疾病机制 [J]. *医药导报*, 2013, 32 (5): 633-636.

CHEN X, NONG XL. The therapeutic mechanism of artesunate on pathologic cicatrix and fibrosis disease [J]. *Her Med*, 2013, 32 (5): 633-636.

[4] LIN X, YU M, WU K, YUAN H, ZHONG H. Pirfenidone inhibits proliferation, migration, and collagen contraction of Human Tenon's fibroblasts *in vitro* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (8): 3763-3770.

[5] YAN ZC, BAI YJ, TIAN Z, HU HY, YOU XH, LIN JX, et al. Anti-proliferation effects of Sirolimus sustained delivery film in rabbit glaucoma filtration surgery [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 2495-2506.

[6] SEET LF, SU R, BARATHI VA, LEE WS, POH R, HENG YM, et al. SPARC deficiency results in improved surgical survival in a novel mouse model of glaucoma filtration surgery [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (2): e9415.

[7] SEET LF, SU R, TOH LZ, WONG TT. *In vitro* analyses of the anti-fibrotic effect of SPARC silencing in human Tenon's fibroblasts; comparisons with mitomycin C [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16 (6): 1245-1259.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [M]. 北京: 化

学工业出版社, 2005: 309.

COMMITTEE OF PHARMACOPEIA OF CHINA. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (second part) [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2005: 309.

[9] TAN W, LU J, HUANG M, LI Y, CHEN M, WU G, et al. Anticancer natural products isolated from chinese medicinal herbs [J]. *Chin Med*, 2011, 6 (1): 27.

[10] 迟寅秀, 高福连. 青蒿琥酯对胃癌耐药细胞 SGC7901 /mdr1 阿霉素耐药性的影响 [J]. *新乡医学院学报*, 2014, 31 (8): 619-621.

CHI YX, GAO FL. Effect of artesunate reversing doxorubicin resistance on gastric cancer drug resistant cells SGC7901 /mdr1 [J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2014, 31 (8): 619-621.

[11] 曾爱红, 欧阳颖, 郭明明, 戴璇, 邹德志, 方建培. 青蒿琥酯体外分次给药对人巨细胞病毒的抗病毒效应 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29 (22): 1703-1707.

ZENG AH, OU-YANG Y, GUO MM, DAI X, ZOU DZ, FANG JP. Antiviral activity research of artesunate against human cytomegalovirus by fractionation dosage method *in vitro* [J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2014, 29 (22): 1703-1707.

[12] CAO J, WANG W, LI Y, XIA J, PENG Y, ZHANG Y, et al. Artesunate attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by regulating the expressions of bone morphogenetic protein-7 and uterine sensitization-associated gene-1 in rats [J]. *Int Urol Nephrol*, 2016, 48 (4): 619-629.

[13] LAI L, CHEN Y, TIAN X, LI X, ZHANG X, LEI J, et al. Artesunate alleviates hepatic fibrosis induced by multiple pathogenic factors and inflammation through the inhibition of LPS/TLR4/NF-κB signaling pathway in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765 (15): 234-241.

[14] WANG C, XUAN X, YAO W, HUANG G, JIN J. Anti-profibrotic effects of artesunate on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in Sprague Dawley rats [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (1): 1291-1297.

[15] XU Y, LIU W, FANG B, GAO S, YAN J. Artesunate ameliorates hepatic fibrosis induced by bovine serum albumin in rats through regulating matrix metalloproteinases [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 744 (5): 1-9.

[16] LI H, GU C, REN Y, DAI Y, ZHU X, XU J, et al. The efficacy of NP114-derived immunotoxin scFv-artesunate in reducing hepatic fibrosis induced by Schistosoma japonicum in mice [J]. *J Biomed Res*, 2011, 25 (2): 148-154.

[17] LINDSTEN T, ROSS AJ, KING A, ZONG WX, RATHMELL JC, SHELS HA, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues [J]. *Mol Cell*, 2000, 6 (6): 1389-1399.

[18] WONG W, PUTHALAKATH H. Bcl-2 family proteins: The sentinel of the mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Iubmb Life*, 2008, 60 (6): 390-397.

[19] 朱奔奔, 张佩景, 谢东. 青蒿琥酯对人胃腺癌 MKN45 细胞株增殖抑制和诱导凋亡作用 [J]. *新乡医学院学报*, 2011, 28 (1): 17-20.

ZHU BB, ZHANG PJ, XIE D. Apoptosis and cell growth inhibition effects of artesunate on human gastric adenocarcinoma MKN45 cell line [J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2011, 28 (1): 17-20.