·肝纤维化及肝硬化·

DOI: 10.12449/JCH260612

偶氮鬼臼毒素衍生物SU056对四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠模型的影响及其作用机制

葛启超, 陈 睿, 杨雨霏, 郭悦承, 张邸涵婧, 董 辉, 陆伦根

上海交通大学医学院附属第一人民医院消化科, 上海 200080

通信作者: 陆伦根, lungenlu1965@163.com (ORCID: 0000-0002-1533-4068)

摘要: 目的 探究偶氮鬼臼毒素衍生物SU056治疗四氯化碳(CCl_4)诱导的小鼠肝纤维化的效果,并解析相关作用机制。**方法** 选取12只小鼠随机分为3组:对照组、模型组(CCl_4+生理盐水组)和治疗组(CCl_4+SU056),每组4只。通过腹腔注射CCl_4构建小鼠肝纤维化模型,并在造模中期开始每日腹腔注射SU056进行治疗。通过苏木素-伊红染色、马松染色、天狼星红染色评估肝组织病理损伤与胶原沉积,并通过检测肝组织羟脯氨酸含量及血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶水平评价肝功能。采用免疫荧光检测平滑肌肌动蛋白α(α-SMA)、Ⅰ型胶原和Y-框结合蛋白1(YB1)的表达。以人肝星状细胞(HSC)系LX-2以及小鼠原代HSC为研究对象,通过细胞计数试剂盒法检测细胞增殖;Transwell实验检测细胞迁移;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应和免疫印迹检测Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、YB1、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷酸化S6K的表达,从而验证YB1/mTOR信号轴的功能。计量资料多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。**结果** 在CCl_4诱导的肝纤维化小鼠模型中,与模型组相比,治疗组小鼠肝组织炎症细胞浸润、胶原沉积及假小叶形成显著减轻,血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶水平以及肝组织羟脯氨酸水平显著降低(*P*值均<0.01)。免疫荧光显示,SU056显著抑制了肝组织中α-SMA、Ⅰ型胶原及YB1的异常高表达(*P*值均<0.01)。体外实验表明,SU056以剂量依赖性方式抑制转化生长因子β1(TGF-β1)诱导的LX-2细胞增殖(*P*<0.01)、迁移(*P*<0.05)及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原转录上调(*P*值均<0.05);且SU056还可抑制原代HSC的体外自发活化。机制研究表明,TGF-β1可同时上调LX-2细胞中YB1和磷酸化mTOR、磷酸化S6K的表达;两种浓度SU056(10、20 μmol/L)处理均能下调Ⅰ型胶原、YB1、磷酸化mTOR及磷酸化S6K的蛋白水平。特异性敲低YB1或使用mTOR抑制剂雷帕霉素,也能产生与SU056类似的效应。在CCl_4模型小鼠肝组织中,SU056同样能抑制α-SMA与磷酸化mTOR的共表达上调(*P*<0.01)。**结论** SU056在体内外均能有效抑制HSC的活化、增殖、迁移及细胞外基质生成,从而缓解肝纤维化进程,其作用机制是通过阻断YB1/mTOR信号轴的正反馈效应,实现对HSC活化的抑制。

关键词: 肝纤维化; 肝星状细胞; 药物疗法; 小鼠, 近交C57BL

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82170620); 王宝恩肝纤维化研究基金(CFHPC2024026)

Effect and mechanism of the azo-podophyllotoxin derivative SU056 in a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis

GE Qichao, CHEN Rui, YANG Yufei, GUO Yuecheng, ZHANG Dihanjing, DONG Hui, LU Lungen

Department of Gastroenterology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

Corresponding author: LU Lungen, lungenlu1965@163.com (ORCID: 0000-0002-1533-4068)

Abstract: Objective To investigate the effect of SU056, an azo-podophyllotoxin derivative, on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver fibrosis in mice and related mechanisms of action. **Methods** A total of 12 mice were randomly divided into control group, model group (CCl_4+normal saline), and treatment group (CCl_4+SU056), with 4 mice in each group. Mice were given intraperitoneal injection of CCl_4 to establish a model of liver fibrosis, and during the middle stage of modeling, the mice in the treatment group were given daily intraperitoneal injection of SU056. Liver histopathological injury, collagen deposition, and liver

function were assessed based on HE staining, Masson staining, Sirius Red staining, the content of hydroxyproline in liver tissue, and the serum levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, and immunofluorescence assay was used to measure the expression levels of smooth muscle actin α (α-SMA), collagen type Ⅰ, and Y-box binding protein 1 (YB1). The human hepatic stellate cell (HSC) line LX-2 and primary mouse HSC were used, and CCK-8 assay was used to measure cell proliferation; Transwell assay was used to observe cell migration; quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction and Western Blot were used to measure the expression levels of collagen type Ⅰ, collagen type Ⅲ, YB1, phosphorylated mammalian target of rapamycin (mTOR), and phosphorylated S6K, so as to validate the function of the YB1/mTOR signaling axis. The one-way or two-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. **Results** In the mouse model of liver fibrosis induced by CCl_4, compared with the model group, the treatment group had significant alleviation of inflammatory cell infiltration, collagen deposition, and pseudolobule formation in liver tissue and significant reductions in the serum levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase and the content of hydroxyproline in liver tissue (all $P<0.01$). Immunofluorescence assay showed that SU056 significantly inhibited the abnormal high expression of α-SMA, collagen type I, and YB1 in liver tissue (all $P<0.01$). *In vitro* experiments showed that SU056 inhibited the transforming growth factor-β1-induced proliferation of LX-2 cells ($P<0.01$), the migration of LX-2 cells ($P<0.05$), and the transcriptional up-regulation of collagen type Ⅰ and collagen type Ⅲ (all $P<0.05$) in a dose-dependent manner, and SU056 could inhibit the spontaneous activation of primary HSC *in vitro*. Mechanistic studies revealed that transforming growth factor-β1 simultaneously upregulated the expression levels of YB1, phosphorylated mTOR, and phosphorylated S6K in LX-2 cells, and treatment with SU056 (10 and 20 μmol/L) could downregulate the protein expression levels of collagen type I, YB1, phosphorylated mTOR, and phosphorylated S6K. Specific knockdown of YB1 or administration of the mTOR inhibitor rapamycin exerted a similar effect as SU056. SU056 also inhibited the co-upregulation of α-SMA and phosphorylated mTOR in liver tissue of model mice ($P<0.01$). **Conclusion** SU056 can effectively inhibit HSC activation, proliferation, migration, and extracellular matrix production both *in vivo* and *in vitro* and thus delay the progression of liver fibrosis, by disrupting the YB1/mTOR positive feedback signaling axis.

Key words: Hepatic Fibrosis; Hepatic Stellate Cells; Drug Therapy; Mice, Inbred C57BL

Research funding: General Project of National Natural Science Foundation of China (82170620); Wang Bao-en Liver Fibrosis Foundation (CFHPC2024026)

肝纤维化是多种慢性肝病（包括病毒性肝炎、酒精性肝病、代谢相关脂肪性肝病及自身免疫性肝病）向肝硬化及肝衰竭进展的共同病理基础，其本质特征为细胞外基质（extracellular matrix，ECM）的异常过度沉积。在肝纤维化发生与进展中，肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC）由静息状态向肌成纤维样表型的持续转化，被公认为肝纤维化发生与进展的核心事件[1-2]。尽管肝纤维化的分子调控网络高度复杂，但围绕HSC活化关键节点开展靶向干预，仍被视为阻断纤维化进程、延缓疾病恶化的最具前景的治疗策略之一。

Y-框结合蛋白1（Y-box binding protein 1，YB1）是一种多功能冷休克蛋白，广泛参与转录调控、mRNA稳定性维持及翻译调节等多个层级的基因表达调控。Guo等[3]研究发现，YB1可通过介导胆管反应增强HSC的活化状态，从而加速肝纤维化的发生与发展。与此同时，亦有研究报道，肝纤维化发生时YB1在HSC中的表达显著上调，并可通过调控染色质可及性促进HSC活化[4]。上述证据提示，YB1不仅是肝纤维化调控网络中的重要组成部分，也可能处于驱动HSC持续活化的关键枢纽位置，具有潜在的治疗靶点价值。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）是调控细胞生长、增殖与代谢稳态的核心丝氨酸/苏氨酸激酶，多项研究证实其在HSC活化及肝纤维化进程中发挥显著的促进作用。例如，Zhang等[5]证实磷脂酰肌醇3-激酶/mTOR信号轴可促进HSC的活化与增殖。此外，抑制HSC中mTOR相关信号通路可显著缓解实验性肝纤维化[6]。值得注意的是，近年来肿瘤领域的研究进一步揭示了YB1与mTOR信号之间存在正反馈调控关系：在胶质母细胞瘤中，YB1可异常激活mTOR通路，而被激活的mTOR反过来维持YB1的高表达水平，从而驱动细胞持续增殖与侵袭性进展[7]。这一发现提示，在肝纤维化背景下，YB1可能同样通过增强mTOR信号，形成“YB1-mTOR”正反馈环路，维持HSC的持续活化状态并放大促纤维化信号。然而，该分子轴在肝纤维化

中的具体功能及其病理学意义尚缺乏系统研究。

小分子抑制剂偶氮鬼臼毒素衍生物SU056作为一种特异性YB1抑制剂，已在三阴性乳腺癌、卵巢癌及胰腺癌等多种肿瘤模型中显示出明确的抑制肿瘤生长和侵袭的作用[8-10]。然而，迄今尚无研究评估SU056在肝纤维化中的治疗潜力，亦未知其是否能够通过干预YB1相关信号通路影响HSC的活化命运。这一研究空白不仅限制了YB1靶向策略在肝病领域的转化应用，也提示SU056可能作为一种“药物再定位”候选分子，在抗肝纤维化治疗中具有尚未被发掘的潜在价值。基于上述背景，本研究以HSC为核心研究对象，结合体内外肝纤维化模型，系统探讨SU056是否能够通过阻断YB1-mTOR正反馈信号轴抑制HSC的活化及其促纤维化表型转化。本研究首次将YB1特异性小分子抑制剂应用于肝纤维化研究领域，旨在阐明其分子机制并评估其抗纤维化潜能，为肝纤维化的靶向干预提供新的理论依据和潜在治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人HSC系LX-2细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 实验动物 6周龄的雄性C57BL/6J小鼠，体重20～25 g，购自苏州领致生物公司[实验动物生产许可证编号：SCXK（苏）2024-0005]，饲养于上海市第一人民医院无特定病原体级实验动物中心[实验动物使用许可证编号：SYXK（沪）2024-0030]。饲养期间，小鼠自由进食和饮水，饲养温度26 ℃，相对湿度控制在60%±10%，光照周期为12 h明暗交替。

1.3 造模方案 实验开始前，采用随机数字表法将12只小鼠分为3组：对照组、模型组[四氯化碳（CCl_4）+生理盐水]和治疗组（CCl_4+SU056），每组4只。模型组小鼠于8周龄时开始造模，通过腹腔注射15% CCl_4的玉米油溶液，剂量为5 μL/g体重，每周2次，持续6周，以诱导肝纤维化模型。对照组小鼠同期腹腔注射等量玉米油溶液。治疗组小鼠于CCl_4诱导的第4周起，每日腹腔注射SU056溶液，剂量为20 μg/g体重，溶剂为聚乙二醇和生理盐水等比例混合溶液。对照组和模型组则每日腹腔注射等量溶剂。给药3周后取材，小鼠在实验终点采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，确认麻醉充分后行颈椎脱臼处死。肝组织迅速取材，部分固定于4%多聚甲醛用于组织学及免疫荧光分析，其余组织经液氮速冻后置于-80 ℃保存，用于分子生物学检测。所有样本采集及处理过程严格按照统一操作流程执行，以确保实验质量和结果的可靠性。

1.4 肝组织苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色、马松染色和天狼星红染色 对肝组织进行固定、脱水和包埋，切片后脱蜡处理。HE染色用于评估肝组织结构及炎症损伤情况，马松染色和天狼星红染色用于评估胶原沉积程度。肝纤维化程度参照既往文献报道的方法进行半定量评分：根据HE染色观察肝组织结构改变，并结合马松染色和天狼星红染色评估胶原沉积程度，将肝纤维化程度分为0～3级。每张切片随机选取5个高倍视野，由2名不知分组信息的研究人员在盲法条件下独立评分，取平均值用于统计分析。同时采用Image J软件对胶原阳性面积进行定量分析。

1.5 试剂耗材 杜尔贝科改良伊格尔高糖培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自美国Gibco公司；转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）、SU056和雷帕霉素购自美国MCE公司；Trizol试剂购自日本Takara公司；链霉蛋白酶、Ⅳ型胶原酶和DNA酶Ⅰ购自德国Merck公司；离心管、培养皿和细胞培养板等购自中国NEST公司；抗YB1、抗mTOR、抗磷酸化mTOR、抗S6K、抗磷酸化S6K、抗Ⅰ型胶原、抗平滑肌肌动蛋白α（smooth muscle actin α，α-SMA）、抗β-肌动蛋白等抗体购自美国CST公司；SYBR-Green荧光定量聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）试剂盒（RR820）购自日本Takara公司；小鼠血清丙氨酸氨基转移酶和天冬氨酸氨基转移酶水平测定试剂购自中国南京建成生物工程研究所。

1.6 小鼠原代HSC分离及培养 10～12周龄雄性C57BL/6J小鼠经气体麻醉后，采用混合酶原位灌注法分离HSC，具体操作方法参照文献[11]。采用杜尔贝科改良伊格尔完全培养基（含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素）在37 ℃、5% CO_2环境中培养原代HSC。体外培养7 d后，HSC出现体外自发活化表型。

1.7 药物干预 LX-2接种于细胞培养板中，汇合度达40%～50%时加入10 ng/mL转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）以及相应浓度的SU056进行干预。干预24 h后收集细胞，提取总RNA进行实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR）实验；干预24 h后收集细胞，提取总蛋白进行免疫印迹实验；原代细胞在体外培养第5 d时加入药物干预，干预48 h后收集细胞进行后续实验。

1.8 增殖实验 采用细胞计数试剂盒（cell counting kit-8，CCK-8）检测细胞增殖情况，在96孔板中加入100 μL LX-2细胞悬液（5×10^4/mL），每组6个复孔，在37 ℃、5%

CO_2环境中培养48 h；每孔加入10 μL CCK-8试剂，孵育2 h后应用酶标仪测定450 nm处的吸光度值。

1.9 慢病毒转染和质粒过表达 携带有特异性干扰YB1表达的慢病毒载体系统由汉恒生物技术有限公司构建制备。对照组和实验组干扰序列如下：对照组：5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′；shYB1：5′-CGGCAAUGAAGAAGAUAAATT-3′。人源YB1过表达质粒采用pcDNA 3.1载体构建，由汉恒生物技术有限公司构建制备。转染前，用完全培养基重悬LX-2细胞，调整密度至5×10^4/mL，取1 mL接种于24孔板，共3孔，培养过夜；待细胞汇合至50%，更换培养基，分别加入20 μL病毒液，继续培养24 h，收集细胞进行后续实验。过表达质粒转染采用Lipofectamine 3000（Invitrogen，L3000150）进行，细胞铺板密度同慢病毒转染，转染后48 h可收集细胞进行后续实验。

1.10 实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative PCR，qPCR） 使用Trizol试剂提取总RNA，采用Nanodrop测定RNA浓度。按照Takara公司第一链cDNA反转录试剂盒（RR036A）说明书提供的操作步骤将总RNA反转录成cDNA。按照STBR-Green荧光定量PCR试剂盒（RR820）说明书进行操作。PCR条件为：95 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，循环35次。各靶基因引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列

Table 1 Primers used for qPCR

基因	引物序列
Actin	5′-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3′
	3′-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-5′
Col1a1	5′-CCGCTTCACCTACAGCGTCA-3′
	3′-TTGTATTCAATCACTGTCTTGCCC-5′
Col3a1	5′-TGGTCTGCAAGGAATGCCTGGA-3′
	3′-TCTTTCCCTGGGACACCATCAG-5′
YB1	5′-GCAGGAGAACAAGGTAGACCAG-3′
	3′-CTTCATTGCCGTCCTCTCTAGG-5′

注：qPCR，实时荧光定量聚合酶链式反应。

1.11 免疫印迹 采用RIPA裂解液提取胞质蛋白，二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒确定蛋白浓度。取30 μg细胞总蛋白与上样缓冲液按比例混匀，煮沸变性5 min，经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，转移至聚偏二氟乙烯膜。聚偏二氟乙烯膜以5%脱脂牛奶室温封闭1 h，分别与抗YB1（1∶1 000）、抗Ⅰ型胶原（1∶1 000）、抗磷酸化mTOR（1∶1 000）、抗磷酸化S6K（1∶1 000）、抗β肌动蛋白（1∶2 000）一抗4 ℃孵育过夜。TBST缓冲液洗涤3次，每次5 min，加入辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育1 h，TBST缓冲液洗涤3次，每次5 min。使用ECL发光液显影成像。

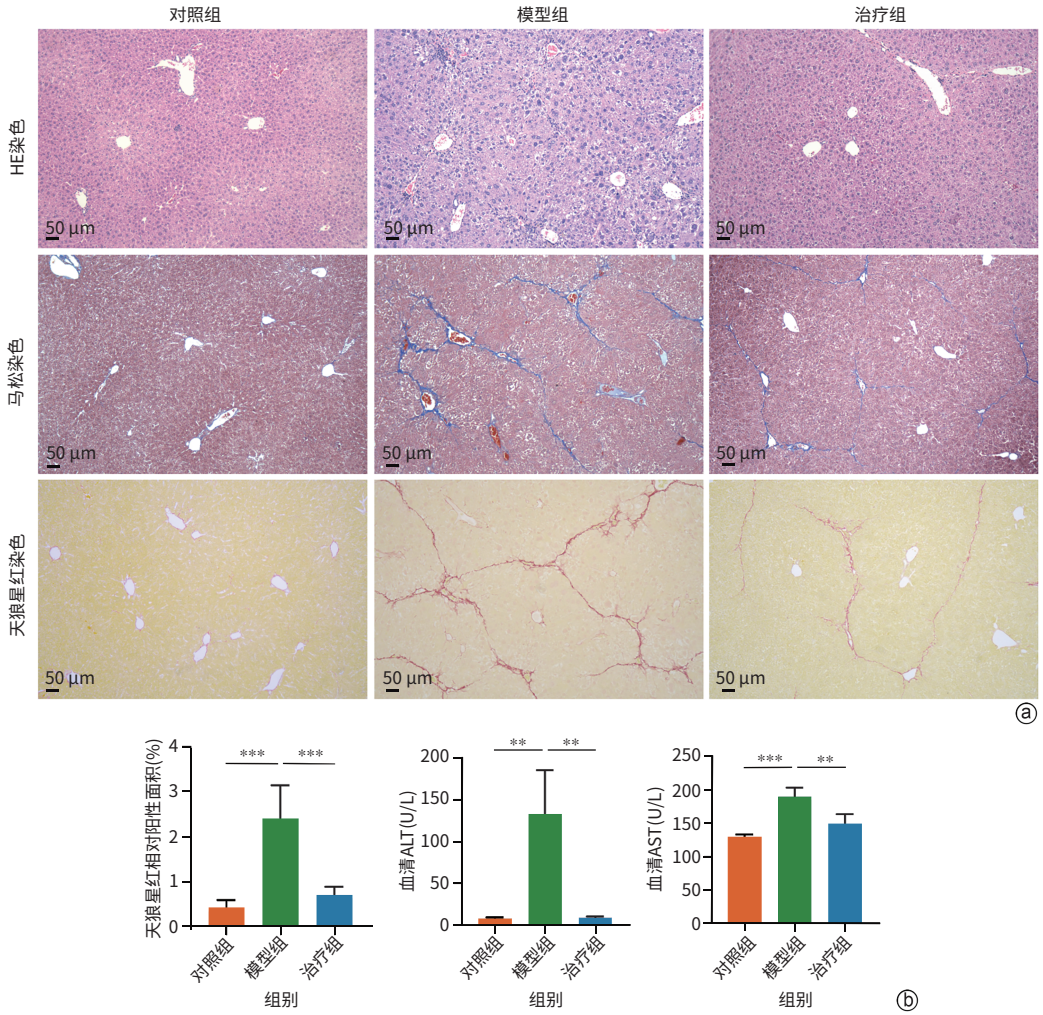
1.12 Transwell迁移实验 将细胞密度调整至1.5×10^5个/孔，上室加入含药无血清培养基100 μL，下室加入500 μL含20%胎牛血清培养基，孵育24 h；小室取出后用4%多聚甲醛溶液固定细胞30 min；加入结晶紫染色20 min；显微镜下计数膜下层细胞。

1.13 免疫荧光染色 对4%多聚甲醛固定的细胞和肝组织石蜡切片进行免疫荧光检测。样本用5%牛血清白蛋白和0.3% Triton X-100进行封闭和通透处理。随后分别与抗YB1（1∶50）、抗Ⅰ型胶原（1∶50）、抗磷酸化mTOR（1∶50）、抗α-SMA（1∶200）一抗4 ℃孵育过夜，然后在室温下与荧光标记的二抗孵育1 h，并用4′-6-二脒基-2-苯基吲哚染色。免疫荧光实验中设置阴性对照和单染对照以验证染色特异性：阴性对照组以磷酸盐缓冲盐水替代一抗，其余步骤与实验组一致，用于排除非特异性结合及背景荧光干扰；单染对照分别仅加入1种一抗和相应荧光标记二抗，用于排除多通道成像过程中荧光串色的影响。所有切片均在相同显微镜参数条件下采集图像。使用STELLARIS 8 DIVE（徕卡）进行荧光成像，并采用Image J软件进行图像分析。

1.14 统计学方法 实验数据采用SPSS 27.0和GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析。计量资料多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SU056治疗CCl_4诱导的肝纤维化及肝损伤 肝组织HE染色显示，与对照组相比，模型组小鼠肝细胞变性坏死明显增加，伴大量炎症细胞浸润。马松染色和天狼星红染色显示，模型组小鼠肝组织胶原沉积与纤维化明显增加；天狼星红定量检测结果也显示，模型组的肝组织胶原沉积显著增加（P<0.001）。模型组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶（P<0.01）和天冬氨酸氨基转移酶水平（P<0.001）均显著升高，提示肝损伤程度明显加重。与模型组相比，治疗组小鼠肝细胞变性坏死、炎症细胞浸润、胶原沉积程度以及肝组织的异常结构均有所改善。天狼星红定量检测结果显示，肝组织胶原沉积显著减少（P<0.001），并且小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶（P<0.01）和天冬氨酸氨基转移酶（P<0.01）水平均显著降低（图1）。以上结果提示，SU056可有效改善肝功能、减少炎症反应并抑制纤维沉积。



注：a，肝纤维化组织染色（×200）；b，天狼星红染色相对阳性面积及肝功能指标。CCl_4，四氯化碳；HE，苏木素-伊红；ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，天冬氨酸氨基转移酶。***P<0.001；**P<0.01。

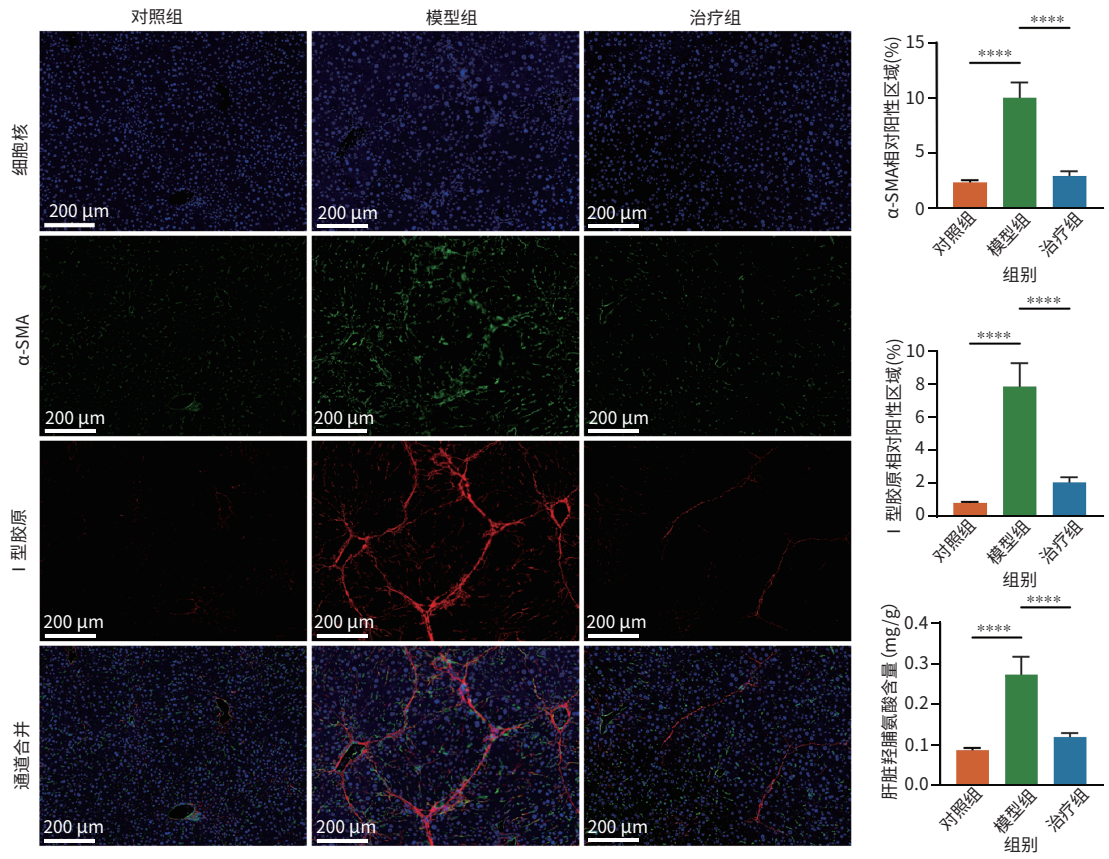
图1　SU056对CCl_4诱导的肝纤维化及肝损伤的影响

Figure 1　Effect of SU056 on CCl_4-induced liver fibrosis and liver function injury

2.2　SU056对CCl_4诱导的小鼠模型肝脏胶原沉积及HSC活化的影响　免疫荧光实验表明，与对照组相比，模型组小鼠α-SMA（P<0.000 1）和Ⅰ型胶原（P<0.000 1）表达显著增加，胶原将肝实质分割成大小不等的假小叶，α-SMA主要分布在沉积的胶原周围。与模型组相比，治疗组小鼠肝组织中α-SMA（P<0.000 1）和Ⅰ型胶原（P<0.000 1）表达显著减少，且肝组织羟脯氨酸（P<0.000 1）含量显著下降。以上结果提示，SU056可有效缓解CCl_4引起的肝脏胶原沉积及HSC活化（图2）。

2.3　SU056对CCl_4诱导的小鼠模型以及体外自活化HSC中的YB1表达的影响　与对照组相比，模型组小鼠肝组织中的α-SMA（P<0.001）和YB1（P<0.000 1）阳性表达显著增多，两者主要分布在肝门管区且高度重合。与模型组相比，治疗组小鼠中的α-SMA（P<0.01）和YB1（P<0.01）阳性表达显著减少（图3a）。提取正常小鼠的原代HSC并在体外培养7 d，分别用二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）、SU056（10 μmol/L、20 μmol/L）和YB1敲低处理，免疫荧光染色结果显示，不同浓度的SU056对体外自活化HSC中的α-SMA表达上调均有抑制作用，并且敲低YB1也可以显著减少α-SMA表达（图3b）。

2.4　SU056对HSC增殖、迁移以及ECM生成的影响　使用TGF-β1（10 ng/mL）处理LX-2细胞24 h，同时予以不同浓度的SU056（0、5、10、20、25 μmol/L）分组处理。CCK-8检测结果提示，TGF-β1+DMSO组的HSC相对细胞活性相较对照组显著升高（P<0.001）。而与TGF-β1+DMSO组相比，SU056处理的LX-2细胞的相对细胞活性均显著降低（P值均<0.01）；且随着SU056浓度升高，其降低相对细胞活性的作用越强（图4a）。同样使用TGF-β1



注：CCl_4，四氯化碳；α-SMA，平滑肌肌动蛋白α。****P<0.000 1。

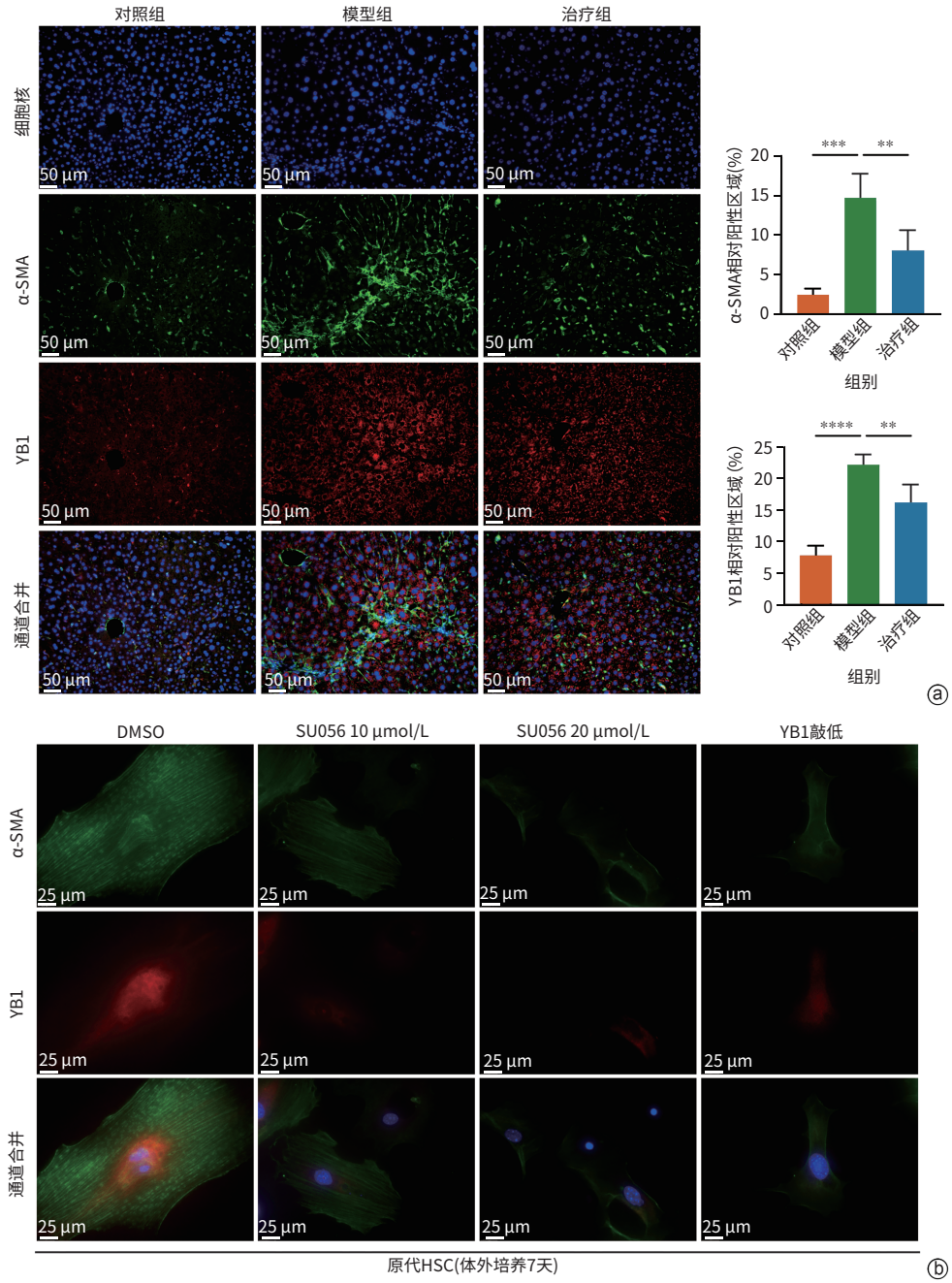
图2 SU056对CCl_4引起的肝脏胶原沉积及HSC活化的影响（免疫荧光染色，×200）

Figure 2 Effect of SU056 on CCl_4-induced liver collagen deposition and HSC activation (IF staining, ×200)

(10 ng/mL)处理LX-2细胞24 h，予10和20 μmol/L的SU056分组处理。qRT-PCR检测显示，SU056处理可显著抑制TGF-β1诱导的Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原转录上调（P值均<0.05）（图4b）。免疫荧光染色结果显示，SU056可显著减少LX-2中TGF-β1诱导的Ⅰ型胶原蛋白生成，且呈剂量梯度效应（图4c、e）。Transwell迁移实验提示，TGF-β1显著增强了HSC的迁移能力（P<0.001），而10 μmol/L SU056（P<0.05）和20 μmol/L SU056（P<0.01）则显著抑制了TGF-β1对HSC迁移能力的增强效应（图4d、e）。

2.5 YB1调控HSC的增殖、迁移以及ECM生成 CCK-8结果提示，在TGF-β1刺激后的LX-2细胞中敲低YB1，与TGF-β1组相比可以显著降低细胞活力（P<0.01）（图5a）。qPCR检测显示，Ⅰ型胶原（P<0.01）和Ⅲ型胶原（P<0.05）的mRNA表达在敲低YB1之后均显著降低（图5b）。免疫荧光染色结果提示，敲低YB1后Ⅰ型胶原蛋白生成显著减少（P<0.01）（图5c）。Transwell迁移实验提示，敲低YB1后HSC迁移数量显著降低（P<0.01）（图5d）。上述结果证实，YB1可以调控HSC的增殖、迁移以及胶原生成。

2.6 SU056通过YB1/mTOR信号轴调控HSC活化 将TGF-β1处理的LX-2细胞分为对照组、10 μmol/L SU056组、20 μmol/L SU056组。免疫印迹实验结果显示，SU056抑制了Ⅰ型胶原、YB1、磷酸化mTOR和磷酸化S6K的蛋白表达，且高剂量SU056的抑制作用更强（图6a、d）。同样的，敲低YB1可抑制Ⅰ型胶原、YB1、磷酸化mTOR和磷酸化S6K等蛋白的表达（图6b、d）。随后，应用mTOR抑制剂雷帕霉素处理TGF-β1刺激后的LX-2细胞，相较于对照组，雷帕霉素也可显著抑制Ⅰ型胶原、YB1、磷酸化mTOR和磷酸化S6K等蛋白的表达（图6c、d）。免疫荧光显示，CCl_4组的小鼠肝组织中α-SMA（P<0.001）和磷酸化mTOR（P<0.01）的表达显著上调，而SU056可显著抑制二者上调（P值均<0.01）（图6e），并且抑制α-SMA和磷酸化mTOR在纤维化肝组织中的共表达。上述结果提示，SU056可通过YB1/mTOR信号轴调控HSC的活化。



注：a，肝组织免疫荧光染色以及α-SMA、YB1相对阳性区域统计（×400）；b，免疫荧光检测小鼠原代HSC体外培养自活化程度以及SU056治疗效果（×400）。CCl_4，四氯化碳；HSC，肝星状细胞；α-SMA，平滑肌肌动蛋白α；YB1，Y-框结合蛋白1；DMSO，二甲基亚砜。****P<0.000 1；***P<0.001；**P<0.01。

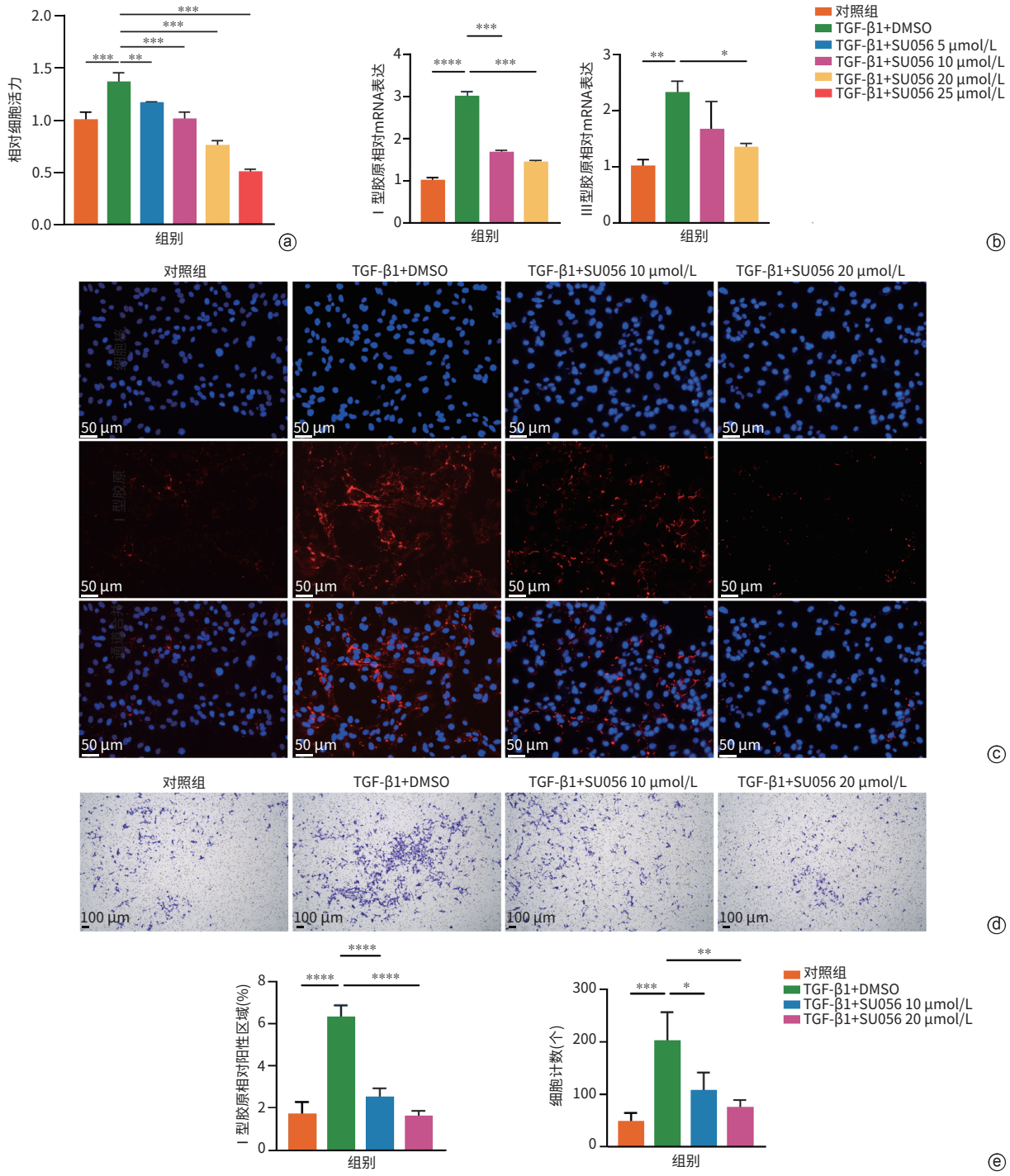
图3　SU056对CCl_4模型以及体外自活化HSC中的YB1表达的影响

Figure 3　Effect of SU056 on YB1 expression in the CCl_4 model and *in vitro* activated HSC

3　讨论

肝纤维化是慢性肝损伤向肝硬化乃至肝癌发展的关键病理过程[12]，其核心机制在于HSC的持续活化及向分泌胶原蛋白的肌成纤维样表型转分化，导致ECM的过度沉积。尽管已有大量临床前和临床研究探索抗纤维化干预[13-15]，目前仍缺乏美国食品药品监督管理局批准的有效药物，晚期肝硬化患者的唯一潜在治愈手段仍为肝移植[16]。因此，靶向抑制纤维化进程中的HSC活化，仍是亟需突破的研究方向。

YB1在肝纤维化组织中高表达，其在HSC活化及纤维化进展中的作用已逐渐被揭示。Li等[17]研究发现，在

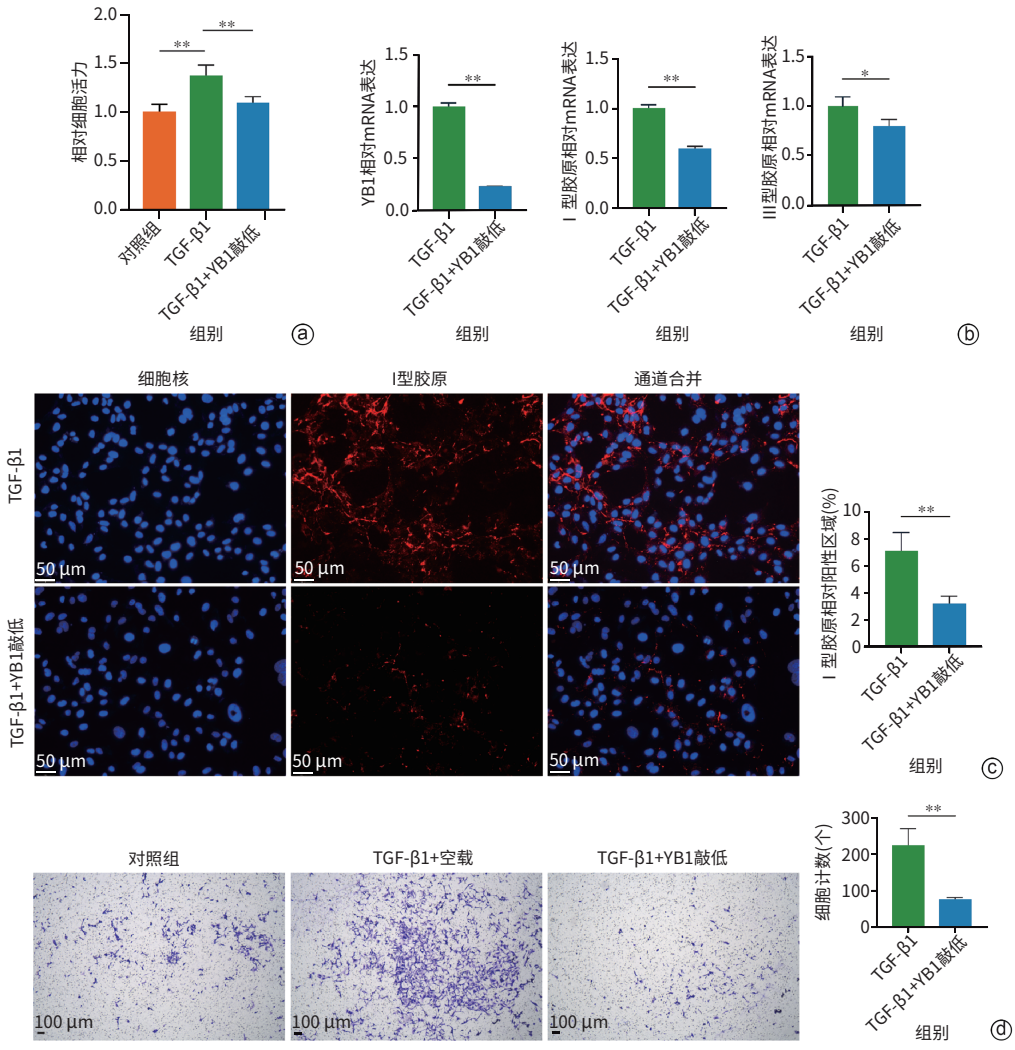


注：a，CCK-8检测不同浓度SU056抑制活化LX-2细胞增殖的效果；b，qRT-PCR检测不同浓度SU056抑制活化LX-2细胞中Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原基因转录；c，免疫荧光检测SU056抑制活化LX-2细胞表达Ⅰ型胶原蛋白（×200）；d，SU056抑制活化LX-2细胞的迁移能力（结晶紫染色，×200）；e：SU056抑制活化LX-2细胞表达Ⅰ型胶原蛋白和细胞迁移能力效果。HSC，肝星状细胞；DMSO，二甲基亚砜；TGF-β1，转化生长因子β1；ECM，细胞外基质。****P<0.000 1；***P<0.001；**P<0.01；*P<0.05。

图4　SU056对HSC的增殖、迁移以及ECM生成的影响

Figure 4　Effect of SU056 on HSC proliferation, migration, and ECM production

肝祖细胞中特异性敲低YB1可显著抑制细胞增殖并缓解肝纤维化。而此前另一项研究也表明，纤维化发生时YB1在HSC中表达上调，且对HSC中YB1表达进行干预可以有效缓解纤维化发生[4]。SU056作为一种小分子YB1特异性抑制剂，在多种肿瘤模型中表现出抑制细胞增殖、促进凋亡及增强化疗敏感性的良好疗效[8-10,18]。鉴



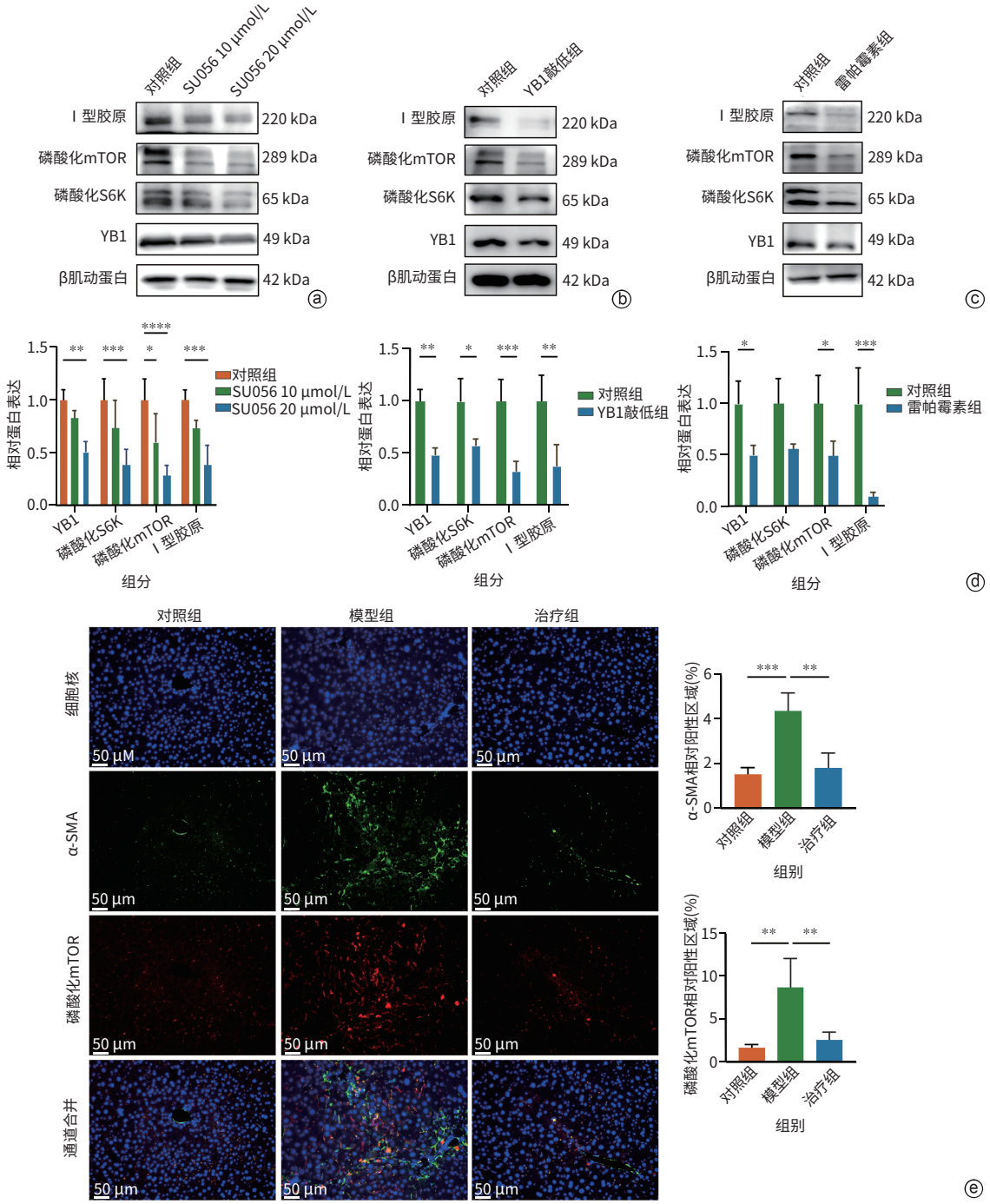
注：a，CCK-8检测YB1敲减抑制活化LX-2细胞增殖的效果；b，qRT-PCR检测YB1敲减抑制活化LX-2细胞中Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原基因转录的效果；c，免疫荧光检测YB1敲减抑制活化LX-2细胞表达Ⅰ型胶原蛋白及统计分析（×200）；d，YB1敲减抑制活化LX-2细胞的迁移能力及统计分析（结晶紫染色，×200）。YB1，Y-框结合蛋白1；TGF-β1，转化生长因子β1；ECM，细胞外基质；HSC，肝星状细胞。$^{**}P<0.01$；$^{*}P<0.05$。

图5　YB1调控HSC的增殖、迁移以及ECM生成

Figure 5　YB1 regulates HSC proliferation，migration，and ECM production

于YB1在不同肝脏细胞类型中的作用可能存在差异，本研究重点探讨SU056是否能够通过靶向YB1抑制HSC活化，从而发挥抗肝纤维化作用。在小鼠CCl_4模型中，SU056治疗显著改善了肝功能，减轻了肝组织病理损伤，并有效降低了胶原沉积及活化HSC标志物α-SMA的表达。上述结果明确表明，SU056能够干预肝纤维化的核心病理环节——通过抑制HSC活化及其ECM生成，延缓肝纤维化进程。体外实验显示，SU056能够以剂量依赖的方式抑制TGF-β1诱导的HSC增殖和迁移，并下调Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原等ECM关键组分的蛋白表达。进一步研究表明，SU056在抑制HSC活化的同时，可显著下调YB1表达。在CCl_4诱导的纤维化肝组织中，YB1与HSC活化标志物α-SMA同步上调且高度共定位，提示YB1在活化的肌成纤维样细胞中富集，这一现象与Kamalov等[19]在心脏纤维化模型中的研究结果一致。体外实验中，敲低YB1同样可显著抑制HSC的增殖、迁移及ECM生成，提示YB1不仅是HSC活化的伴随标志，更可能是驱动其活化的重要调控因子，为抗纤维化治疗提供了新的潜在靶点。

mTOR作为调控细胞生长和代谢的核心激酶，其异常激活与包括肝纤维化在内的多种纤维增生性疾病密切相关[20-25]。本研究结果显示，SU056能够同时下调活化HSC中的YB1及磷酸化mTOR及其下游效应分子磷酸化S6K的表达，且抑制作用呈剂量依赖性。值得注意的是，无论是特异性敲低YB1，还是使用经典mTOR抑制剂雷帕霉素，均能产生与SU056类似的效应——同时抑制Ⅰ型胶原蛋白、YB1蛋白及磷酸化mTOR/磷酸化S6K



注：a，免疫印迹检测SU056抑制活化LX-2细胞中mTOR通路活化；b，免疫印迹检测YB1敲减抑制活化LX-2细胞中mTOR通路活化；c，免疫印迹显示抑制LX-2细胞的mTOR通路可以减少YB1蛋白表达；d，小鼠肝组织免疫荧光染色（×200）以及α-SMA、磷酸化mTOR相对阳性区域统计；e，免疫印迹实验各目的蛋白条带灰度值统计。mTOR，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；YB1，Y-框结合蛋白1；HSC，肝星状细胞；α-SMA，平滑肌肌动蛋白α。****P<0.000 1；***P<0.001；**P<0.01；*P<0.05。

图6　SU056通过YB1/mTOR信号轴调控HSC活化

Figure 6　SU056 regulates HSC activation through the YB1/mTOR signaling axis

的表达。这一系列结果提示，YB1与mTOR信号通路之间并非简单的上下游关系，而是构成了一个正反馈调控环路。近期研究亦为这一观点提供了支持：Tang等[4]研究发现，YB1通过调控染色质开放状态促进mTOR下游促纤维化基因的转录，同时YB1自身也是下游转录产物，这种双向调控为正反馈环路的形成提供了分子基础。Wang等[7]在胶质母细胞瘤模型中进一步证实，YB1可维持mTOR信号的持续活化。因此，无论是直接抑制

YB1，还是阻断mTOR信号通路，都能够有效切断这一正反馈环路，从而协同抑制HSC活化。

综上所述，本研究首次将YB1与mTOR信号在HSC活化中的协同作用相联系，为理解肝纤维化持续进展提供了新的机制线索。SU056作为能够阻断该信号轴的小分子化合物，展示了明确的临床转化潜力。然而SU056的长期疗效、药代动力学特征及潜在毒性仍需系统评估，相关研究有待进一步开展。

伦理学声明：本研究方案于2024年4月19日经由上海市第一人民医院实验动物伦理委员会审批，批号（IACUC）：2024AW019。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：葛启超负责实验实施，采集数据，分析/解析数据，起草文章；陈睿和杨雨霏负责数据统计，部分实验实施；郭悦承和张邸涵婧负责数据审核和分析，修改文章；陆伦根和董辉负责知识性内容审阅，研究指导，研究经费获取。

参考文献：

[1] TSUCHIDA T, FRIEDMAN SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397-411. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.38.

[2] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166. DOI: 10.1038/s41575-020-00372-7.

[3] GUO YC, ZHANG QQ, LI BH, et al. Biliary YB-1/GLI2 axis facilitates ductular reaction and promotes HSC activation via SPP1/integrin αvβ1 signaling during liver fibrogenesis[J]. Hepatology, 2025. DOI: 10.1097/HEP.0000000000001458. [Epub ahead of print]

[4] TANG ZH, LIN BW, LI W, et al. Y-box binding protein 1 promotes chromatin accessibility to aggravate liver fibrosis[J]. Cell Signal, 2023, 109: 110750. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110750.

[5] ZHANG Y, HE FF, LEI MZ, et al. Hepatic stellate cell-derived IL-11 exacerbates liver fibrosis via interplay between HSCs and macrophages[J]. Int J Biol Sci, 2026, 22(1): 126-141. DOI: 10.7150/ijbs.119659.

[6] HUANG H, RU SJ, CHEN JM, et al. Quantitative proteomic study reveals amygdalin alleviates liver fibrosis through inhibiting mTOR/PDCD4/JNK pathway in hepatic stellate cells[J]. Drug Des Devel Ther, 2025, 19: 3735-3749. DOI: 10.2147/DDDT.S500439.

[7] WANG JZ, ZHU H, YOU P, et al. Upregulated YB-1 protein promotes glioblastoma growth through a YB-1/CCT4/mLST8/mTOR pathway[J]. J Clin Invest, 2022, 132(8): e146536. DOI: 10.1172/JCI146536.

[8] DHEERAJ A, GARCIA MARQUES FJ, TAILOR D, et al. Inhibition of protein translational machinery in triple-negative breast cancer as a promising therapeutic strategy[J]. Cell Rep Med, 2024, 5(5): 101552. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101552.

[9] LI BR, XING FL, WANG JY, et al. YBX1 as a therapeutic target to suppress the LRP1-β-catenin-RRM1 axis and overcome gemcitabine resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2024, 602: 217197. DOI: 10.1016/j.canlet.2024.217197.

[10] MENG HY, MIAO HX, ZHANG YS, et al. YBX1 promotes homologous recombination and resistance to platinum-induced stress in ovarian cancer by recognizing m5C modification[J]. Cancer Lett, 2024, 597: 217064. DOI: 10.1016/j.canlet.2024.217064.

[11] LI Y, CAI SM, ZHANG LL, et al. Simultaneous isolation and primary culture of rat hepatocytes, hepatic stellate cells, Kupffer's cells and hepatic sinus endothelial cells[J]. J South Med Univ, 2014, 34(4): 532-537. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2014.04.20.
李洋, 蔡双明, 张莉莉, 等. 大鼠原代肝细胞、星状细胞、枯否细胞和肝窦内皮细胞的同步分离与培养[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(4): 532-537. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2014.04.20.

[12] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 37-55. DOI: 10.1016/j.mam.2018.09.002.

[13] LIU PY, MAO YC, XIE Y, et al. Stem cells for treatment of liver fibrosis/cirrhosis: Clinical progress and therapeutic potential[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 356. DOI: 10.1186/s13287-022-03041-5.

[14] YAO LC, HU X, DAI K, et al. Mesenchymal stromal cells: Promising treatment for liver cirrhosis[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 308. DOI: 10.1186/s13287-022-03001-z.

[15] DAI HR, ZHU C, HUAI Q, et al. Chimeric antigen receptor-modified macrophages ameliorate liver fibrosis in preclinical models[J]. J Hepatol, 2024, 80(6): 913-927. DOI: 10.1016/j.jhep.2024.01.034.

[16] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT TF. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. Cells, 2020, 9(4): 875. DOI: 10.3390/cells9040875.

[17] LI BH, LI F, GU TY, et al. Specific knockdown of Y-box binding protein 1 in hepatic progenitor cells inhibits proliferation and alleviates liver fibrosis[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 921: 174866. DOI: 10.1016/j.ejphar.2022.174866.

[18] XIE GF, XIE YP, XU XC. Multifaceted functions of Y-box binding protein 1 in RNA methylated modifications (Review)[J]. Mol Med Rep, 2025, 32(6): 1-10. DOI: 10.3892/mmr.2025.13707.

[19] KAMALOV G, VARMA BR, LU L, et al. Expression of the multifunctional Y-box protein, YB-1, in myofibroblasts of the infarcted rat heart [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(1): 239-244. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.06.082.

[20] KIM YC, GUAN KL. mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 25-32. DOI: 10.1172/JCI73939.

[21] MOSSMANN D, PARK S, HALL MN. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(12): 744-757. DOI: 10.1038/s41568-018-0074-8.

[22] ZHAO ZZ, ZHANG YM, ZHANG CY, et al. TGF-β promotes pericyte-myofibroblast transition in subretinal fibrosis through the Smad2/3 and Akt/mTOR pathways[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(5): 673-684. DOI: 10.1038/s12276-022-00778-0.

[23] HUANG GC, YANG XS, YU QY, et al. Overexpression of STX11 alleviates pulmonary fibrosis by inhibiting fibroblast activation via the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 306. DOI: 10.1038/s41392-024-02011-y.

[24] ZHAO XJ, YANG WJ, YU TM, et al. Th17 cell-derived amphiregulin promotes colitis-associated intestinal fibrosis through activation of mTOR and MEK in intestinal myofibroblasts[J]. Gastroenterology, 2023, 164(1): 89-102. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.09.006.

[25] ZHANG ZL, SHANG J, YANG QY, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway and remodeling choline metabolism[J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 29. DOI: 10.1186/s12951-023-01788-4.

收稿日期：2026-01-04；**录用日期：**2026-02-06

本文编辑：王亚南

引证本文：GE QC, CHEN R, YANG YF, et al. Effect and mechanism of the azo-podophyllotoxin derivative SU056 in a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis [J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(6): 1310-1320.
葛启超, 陈睿, 杨雨霏, 等. 偶氮鬼臼毒素衍生物SU056对四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠模型的影响及其作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(6): 1310-1320.