·肝纤维化及肝硬化·

DOI：10.12449/JCH260315

司曲替尼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

张 欢[1]，吴翔宇[1]，赵倩雯[2]，芮法娟[2]，耿 楠[2]，靳 睿[2]，李 婕[1,2]

1 南京中医药大学鼓楼临床医学院感染性疾病科，南京 210008

2 南京大学医学院附属鼓楼医院感染性疾病科，南京 210008

通信作者：李婕，lijier@nju.edu.cn（ORCID：0000-0003-0973-8645）

摘要：目的 评估司曲替尼对四氯化碳（CCl_4）诱导的小鼠肝纤维化的治疗作用。**方法** 将30只8周龄雄性C57BL/6J小鼠随机分为对照组、CCl_4模型组及司曲替尼低（5 mg/kg）、中（10 mg/kg）、高（20 mg/kg）剂量组。除对照组外，其余各组通过腹腔注射CCl_4诱导肝纤维化（持续4周）；自造模首日起，各司曲替尼剂量组每日灌胃相应浓度司曲替尼。检测各组小鼠血清总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）水平；测定肝组织羟脯氨酸含量；通过苏木精-伊红、Masson及天狼星红染色观察肝组织病理改变；采用实时荧光定量聚合酶链反应和Western Blot分别检测肝组织中平滑肌肌动蛋白α与Ⅰ型胶原蛋白α1基因的mRNA及蛋白表达水平，以综合评估药物疗效。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验。**结果** 与对照组相比，模型组TC、TG和ALT水平均显著升高（*P*值均<0.05）；与模型组相比，司曲替尼各剂量组TC、TG和ALT水平差异无统计学意义（*P*值均>0.05）。经司曲替尼干预后，肝组织羟脯氨酸水平下降，中、高剂量组与CCl_4模型组相比，差异均有统计学意义（*P*值均<0.05）。病理染色结果显示，司曲替尼治疗组胶原沉积减少，纤维间隔变薄、稀疏；司曲替尼高剂量组中，4只小鼠肝纤维化分期为S0～S1，2只为S2～S3，较CCl_4模型组肝纤维化程度有所缓解（S3～S4为主）。分子水平检测显示，司曲替尼可下调平滑肌肌动蛋白α与Ⅰ型胶原蛋白α1基因的mRNA及蛋白表达（*P*值均<0.05）。**结论** 司曲替尼能有效缓解CCl_4诱导的小鼠肝纤维化，其作用机制可能与抑制肝星状细胞活化及胶原合成有关。

关键词： 肝纤维化；司曲替尼；治疗学；小鼠，近交C57BL

基金项目： 北京肝胆相照公益基金会力肝专项研究项目（iGandanF-1082024-LG004，iGandanF-1082025-LG034，iGandanF-1082025-LG019）；南京鼓楼医院临床研究专项资金项目（2024-LCYJ-PY-52，2025-LCYJ-PY-02）；南京鼓楼医院国家自然科学基金青年培育项目（2025-JCYJ-QP-016，2025-JCYJ-QP-017）；南京大学中医研究院课题项目和南京鼓楼医院医学发展医疗救助基金会资助项目（ICM2024002，ICM2024032）；中国博士后科学基金（2024M761417）

Effect of sitravatinib on a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and its mechanism

ZHANG Huan[1]，*WU Xiangyu*[1]，*ZHAO Qianwen*[2]，*RUI Fajuan*[2]，*GENG Nan*[2]，*JIN Rui*[2]，*LI Jie*[1,2]

1. Department of Infectious Diseases，Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine，Nanjing 210008，China；2. Department of Infectious Diseases，Nanjing Drum Tower Hospital，Affiliated Hospital of Medical School，Nanjing University，Nanjing 210008，China

Corresponding author：LI Jie，lijier@nju.edu.cn（ORCID：0000-0003-0973-8645）

Abstract：Objective To investigate the therapeutic effect of sitravatinib on carbon tetrachloride（CCl_4）-induced liver fibrosis in mice. **Methods** A total of 30 male C57BL/6J mice，aged 8 weeks，were randomly divided into control group，CCl_4 model group，and low-（5 mg/kg），middle-（10 mg/kg），and high-dose（20 mg/kg）sitravatinib groups. All mice except those in the control group were given intraperitoneal injection of CCl_4 for 4 consecutive weeks to induce liver fibrosis，and since the first day of modeling，the

mice in the low-, middle-, and high-dose sitravatinib groups were given sitravatinib at the corresponding dose by gavage every day. The serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and alanine aminotransferase (ALT) were measured for the mice in each group; hepatic hydroxyproline content was measured; HE staining, Masson staining, and Sirius Red staining were used to observe liver histopathological changes; quantitative real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of α-smooth muscle actin (α-SMA) and collagen type I alpha 1 (Col1a1) in liver tissue. The therapeutic effect of sitravatinib was assessed based on the above results. A one-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** Compared with the control group, the model group had significant increases in the levels of TC, TG, and ALT (all $P<0.05$), and there were no significant differences in the levels of TC, TG, and ALT between the model group and the low-, middle-, and high-dose sitravatinib groups (all $P>0.05$). Hepatic hydroxyproline content decreased after sitravatinib intervention, with a significant difference between the middle-/high-dose sitravatinib groups and the CCl_4 model group (both $P<0.05$). Histopathological staining showed that the sitravatinib treatment groups had a reduction in collagen deposition, along with thinning and fragmentation of fibrous septa, and in the high-dose sitravatinib group, 4 mice had a fibrosis stage of S0—S1 and 2 mice had a fibrosis stage of S2—S3, suggesting a certain degree of alleviation of liver fibrosis degree compared with the CCl_4 model group (mainly S3—S4). The measurement of related molecules showed that sitravatinib downregulated the mRNA and protein expression levels of α-SMA and Col1a1 (all $P<0.05$). **Conclusion** Sitravatinib can effectively alleviate CCl_4-induced liver fibrosis in mice, possibly by inhibiting hepatic stellate cell activation and collagen synthesis.

Key words: Hepatic Fibrosis; Sitravatinib; Therapeutics; Mice, Inbred C57BL

Research funding: Beijing iGandan Foundation (iGandanF-1082024-LG004, iGandanF-1082025-LG034, iGandanF-1082025-LG019); Nanjing Drum Tower Hospital Clinical Research Special Fund Project (2024-LCYJ-PY-52, 2025-LCYJ-PY-02); Nanjing Drum Tower Hospital Youth Cultivation Fund (2025-JCYJ-QP-016, 2025-JCYJ-QP-017); Project of Institute of Chinese Medicine, Nanjing University and Aid Project of Nanjing Drum Tower Hospital Health, Education & Research Foundation (ICM2024002, ICM2024032); China Postdoctoral Science Foundation (2024M761417)

肝纤维化是机体对慢性肝炎所致肝细胞持续性损伤的一种病理反应，主要病因包括乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染、毒素（如酒精性肝病）、代谢相关脂肪性肝病和自身免疫性疾病（如原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎）等[1]。肝纤维化的核心发病机制为肝脏中细胞外基质（extracellular matrix, ECM）的合成与降解失衡，导致胶原蛋白等基质成分过度沉积，形成纤维性瘢痕，最终进展为肝硬化[2]。肝星状细胞（hepatic stellate cell, HSC）的异常激活被认为是肝纤维化发生发展的中心环节。活化的HSC高表达平滑肌肌动蛋白α（smooth muscle actin α, α-SMA），并大量分泌Ⅰ型胶原蛋白等多种ECM成分，驱动肝纤维化进程[3]。目前，临床上针对肝纤维化仍缺乏有效的治疗方法。

研究表明，TAM（TYRO3、AXL和MERTK）家族受体AXL和MERTK可直接或间接促进HSC的活化与增殖，从而参与肝纤维化进程。MERTK可通过巨噬细胞来源的转化生长因子β1和血小板衍生生长因子β间接激活HSC；而AXL被其配体生长停滞特异性蛋白6激活后，可进一步启动磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B, AKT）和丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）/细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinase, ERK）等信号通路，直接诱导HSC的活化与纤维化表型转化[4-6]。司曲替尼作为一种多靶点TAM/血管内皮生长因子受体（vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR）/间质-上皮细胞转化因子（mesenchymal-epithelial transition factor, MET）抑制剂，已在非小细胞肺癌、肾细胞癌和肝细胞癌等多种肿瘤的治疗中得到广泛研究[7-9]。然而，其通过抑制TAM通路治疗肝纤维化的潜力与机制尚未明确。

为此，本研究通过建立四氯化碳（CCl_4）诱导肝纤维化小鼠模型，首次探讨司曲替尼对肝纤维化进程的干预效果及其潜在机制，以期为肝纤维化的“老药新用”提供临床前实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体（special pathogen free, SPF）级雄性8周龄C57BL/6J小鼠，购自江苏华创信诺医药科技有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（苏）2020-0009，实验动物使用许可证号：SYXK（苏）2019-

0059。小鼠饲养于SPF级动物房，环境条件为温度（22±2）℃，12 h光/12 h暗循环。所有小鼠均自由摄食、饮水。

1.2 药物与试剂 司曲替尼购自TargetMol Chemicals Inc.（货号：162775）；CCl_4购自江苏强盛功能化学股份有限公司（货号：C0731520224）；玉米油购自上海源叶生物科技有限公司（货号：S50856）；丙氨酸氨基转移酶（alanine amino-transferase，ALT）活性检测试剂盒（货号：YFX0751）购自南京翼飞雪生物科技有限公司；甘油三酯（triglyceride，TG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）及羟脯氨酸检测试剂盒（A110-1-1、A111-1-1、A030-2-1）均购自南京建成生物工程研究所；α-SMA抗体（货号：ab124964）和Ⅰ型胶原蛋白α1（collagen type Ⅰ alpha 1，Col1a1）抗体（货号：ab260043）购自英国Abcam公司；GAPDH（货号：881640-5-RR）购自武汉三鹰生物技术有限公司；Alexa Fluor™ 488 donkey anti-rabbit antibody（货号：R37118）、Alexa Fluor™ 594 donkey anti-mouse antibody（货号：R37115）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；RNA提取试剂Trizol购自日本Takara公司；HiScript Ⅱ Q RT SuperMix for qPCR和ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix购自南京诺维赞生物科技股份有限公司；3，3′-二氨基联苯胺（Diaminobenzidine，DAB）（货号：ZJ1215）购自美国Vector公司；二喹啉甲酸（bicinchoninic acid assay，BCA）蛋白定量试剂盒（货号：ZF394851）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；PVDF膜（货号：IPVH00010）、显影液（货号：KGC4603）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；苏木精购自北京兰杰柯科技有限公司；苏木精-伊红（hematoxylin and eosin，HE）染液套装、天狼星红染液购自武汉赛维尔生物科技有限公司；Masson染液套装购自北京索莱宝科技有限公司；引物α-SMA基因（*ACTA2*）和*COL1A1*由通用生物（安徽）股份有限公司合成，聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）引物序列见表1。

1.3 主要仪器 酶标仪（型号Spark，瑞士TECAN公司），病理切片机、石蜡包埋机（型号RM2235、HistoCore Arcadia H，上海徕卡仪器有限公司），电泳仪（型号EPS 300，美国Bio-Rad公司），全自动化学发光图像分析系统（型号Tanon-4160，上海天能科技有限公司），梯度PCR仪、实时荧光定量PCR仪（型号Veriti、ABI7500，美国Applied Biosystems公司）。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	序列
18S RNA	上游引物：5′-CATTCGAACGTCTGCCCTATC-3′
	下游引物：5′-CCTGCTGCCTTCCTTGGA-3′
ACTA2	上游引物：5′-CCCAGACATCAGGGAGTAATGG-3′
	下游引物：5′-TCTATCGGATACTTCAGCGTCA-3′
COL1A1	上游引物：5′-CGATGGATTCCCGTTCGAGT-3′
	下游引物：5′-AAGGGTGCTGTAGGTGAAGC-3′

注：PCR，聚合酶链反应；*ACTA2*，平滑肌肌动蛋白α基因；*COL1A1*，Ⅰ型胶原蛋白α1基因。

1.4 研究方法

1.4.1 分组、造模及给药 本研究共使用40只C57BL/6J小鼠，其中10只用于预实验以优化模型与给药方案。其余30只小鼠采用完全随机化方法分为5组，分别为对照组、CCl_4模型组和司曲替尼低剂量、中剂量、高剂量组，每组6只，30只小鼠均完成实验流程并纳入最终分析。对照组小鼠饲喂普通饲料（江苏青龙山生物科技有限公司）。司曲替尼溶于生理盐水和聚乙二醇的混合溶剂（体积比为3∶2），根据团队预实验结果，低剂量（5 mg/kg）对小鼠无明显毒性，高剂量（20 mg/kg）未出现严重不良反应，且能观察到对肝纤维化的干预效果，故设置5、10和20 mg/kg 3个浓度梯度进行灌胃给药，于CCl_4腹腔注射当天开始同时灌胃4周（表2）。造模结束后，所有小鼠予以2%异氟烷吸入麻醉，摘眼球取血，于4 ℃、3 000 r/min条件下离心30 min收集血清标本，于−80 ℃储存；随后分离肝脏组织，左外侧叶肝组织置于4%多聚甲醛溶液中固定，进行石蜡包埋。

1.4.2 血清TG、TC及ALT检测 取各组小鼠血清，采用微板法测定血清中TG、TC及ALT水平。

表2 小鼠分组、造模及给药情况

Table 2 Grouping，modeling and drug administration of mice

分组	动物数（只）	给药方案
对照组	6	普通饲料喂养基础上予以玉米油腹腔注射，同时予以等量生理盐水灌胃，连续4周
CCl_4模型组	6	普通饲料喂养基础上予以CCl_4溶液腹腔注射，等量生理盐水灌胃，1次/1.5 d，连续4周
司曲替尼低剂量组	6	普通饲料喂养基础上予以CCl_4溶液腹腔注射，司曲替尼5 mg/kg灌胃，1次/1.5 d，连续4周
司曲替尼中剂量组	6	普通饲料喂养基础上予以CCl_4溶液腹腔注射，司曲替尼10 mg/kg灌胃，1次/1.5 d，连续4周
司曲替尼高剂量组	6	普通饲料喂养基础上予以CCl_4溶液腹腔注射，司曲替尼20 mg/kg灌胃，1次/1.5 d，连续4周

注：CCl_4，四氯化碳。腹腔注射体积分数为10%的CCl_4玉米油溶液（CCl_4与玉米油的比例为1∶9），注射剂量为5 mL/kg，1次/1.5 d，连续4周。

1.4.3 肝组织羟脯氨酸含量 称取约50 mg肝组织，采用碱水解法检测肝组织中的羟脯氨酸含量，参照试剂盒说明书步骤进行操作。

1.4.4 实时荧光定量PCR检测肝组织*ACTA2*、*COL1A1* mRNA的表达水平 采用Trizol法提取肝组织总RNA，逆转录为互补DNA后，使用96孔PCR板加样，实时荧光定量PCR法检测纤维化指标，随后采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各样本mRNA的表达量。

1.4.5 Western Blot检测相关蛋白表达 提取肝组织总蛋白约30 μg，按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书，进行蛋白浓度测定。随后加入上样缓冲液进行蛋白变性，经SDS凝胶电泳分离后，湿转至PVDF膜。使用5%脱脂奶粉封闭1 h，依次加入Col1a1（1∶2 000）、α-SMA（1∶2 000）一抗，于4 ℃孵育过夜。使用TBST缓冲液洗涤3次，加入辣根酶标记二抗（1∶5 000）室温孵育1 h，TBST缓冲液洗涤3次。ECL发光显影后，使用Image J软件对各条带的灰度值进行分析，以GAPDH为内参。

1.4.6 肝组织病理学变化测定 将包埋好的小鼠肝组织连续切片为5 μm切片，二甲苯酒精脱蜡复水，常规进行HE染色、天狼星红染色、Masson染色和免疫组织化学染色（F4/80）。肝纤维化病理分期判断标准：S0期为无肝纤维化；S1期为汇管区纤维扩大，小叶内和窦周局限纤维化；S2期为汇管区或门静脉周围纤维化，形成纤维间隔，小叶结构完整；S3期为纤维间隔伴小叶结构紊乱，无肝硬化；S4期为早期肝硬化。由2名经验丰富的病理科医师在不知晓小鼠分组情况下进行双盲阅片，以确保结果的客观性。

1.5 统计学方法 采用Prism 9.0.0软件对数据进行统计学分析；应用Image J 1.53软件对染色及条带进行定量分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较使用LSD-*t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 司曲替尼对小鼠肝功能的影响 与对照组相比，CCl_4模型组中TG、TC及ALT水平均显著升高，表明CCl_4成功诱导了明显的肝脂质代谢紊乱、脂肪变性及肝损伤。与模型组比较，司曲替尼各剂量组TG、TC及ALT水平差异均无统计学意义（*P*值均>0.05）（表3）。

2.2 HE染色观察各组小鼠肝组织病理学变化 HE染色结果显示，对照组小鼠的肝细胞排列相对整齐，肝组织无脂肪变或纤维化；CCl_4模型组小鼠肝细胞肿胀，散在空泡变性，部分细胞核大而深染，见炎症细胞浸润，肝小叶结构紊乱；司曲替尼低、中、高剂量组小鼠肝细胞肿胀及空泡变性好转，细胞排列情况有所改善。其中，与司曲替尼低剂量组相比，高剂量组肝细胞肿胀及空泡变性改善更显著（图1）。

2.3 司曲替尼对小鼠肝纤维化的影响 天狼星红染色结果显示，对照组小鼠肝组织中胶原纤维极少，呈淡红色；CCl_4模型组小鼠胶原纤维沉积显著增多，红色深染，纤维化主要分布于中央静脉周围和窦周区域；司曲替尼各剂量组小鼠肝组织中胶原沉积均较模型组减少，红色染色变浅，其中高剂量组胶原沉积最少，与中、低剂量组相比差异均有统计学意义（*P*值均<0.05）（图2）。Masson染色结果显示，对照组小鼠肝组织中胶原纤维分布极少，呈淡蓝色；CCl_4模型组小鼠肝组织中胶原纤维沉积显著增加，呈深蓝色，尤其在中央静脉周围和窦周区域形成明显的纤维间隔；经司曲替尼治疗后，小鼠肝组织胶原纤维沉积逐渐减少，纤维间隔变薄、稀疏，且高剂量组和中剂量组胶原沉积均显著低于低剂量组（*P*值均<0.05）（图3）。免疫组织化学染色显示，对照组小鼠肝组织中仅见少量散在的F4/80阳性巨噬细胞；CCl_4模型组小鼠肝组织中F4/80阳性细胞数量显著增多；司曲替尼干预后，各剂量组F4/80阳性细胞数量均减少，高剂量组

表3 各组小鼠血清TG、TC和ALT水平的比较

Table 3 Comparison of serum TG、TC and ALT levels of each group of mice

组别	动物数（只）	TG（mg/dL）	TC（mg/dL）	ALT（U/L）
对照组	6	21.68±7.69	162.10±26.76	63.89±12.50
CCl_4模型组	6	100.56±25.90[1)]	243.84±44.73[1)]	254.60±39.89[1)]
司曲替尼低剂量组	6	99.50±16.00[1)]	245.06±32.95[1)]	245.74±74.11[1)]
司曲替尼中剂量组	6	87.80±22.07[1)]	228.33±43.47[1)]	233.62±25.28[1)]
司曲替尼高剂量组	6	84.23±23.71[1)]	222.46±22.97[1)]	224.37±33.62[1)]
*F*值		15.76	5.58	4.83
*P*值		<0.001	0.002	0.005

注：与对照组比较，1）*P*<0.05。TG，甘油三酯；TC，总胆固醇；ALT，丙氨酸氨基转移酶；CCl_4，四氯化碳。

巨噬细胞浸润程度接近对照组水平，与中、低剂量组相比差异有统计学意义（*P*值均<0.05）（图4）。综合病理学分析结果表明，使用司曲替尼治疗后，小鼠肝脏胶原沉积明显减少，肝纤维化程度有所缓解（表4）。

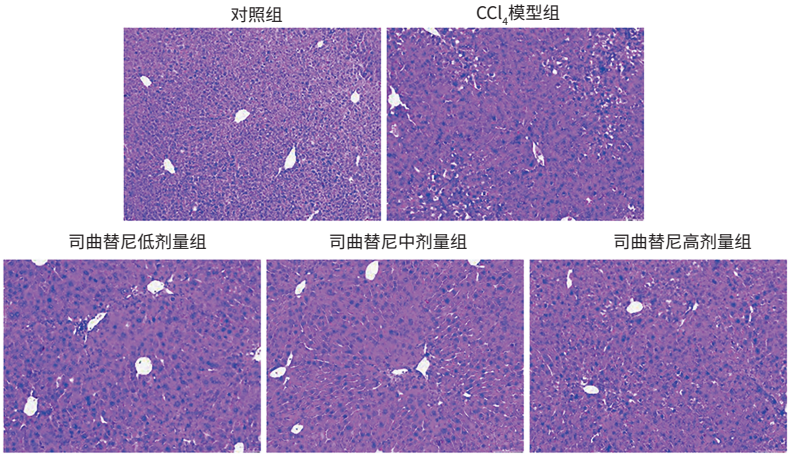
2.4　司曲替尼对小鼠肝组织*ACTA2*、*COL1A1* mRNA表达的影响　实时荧光定量PCR检测结果显示，与对照组相比，CCl_4模型组小鼠肝组织中*ACTA2*、*COL1A1* mRNA表达水平均显著上调。司曲替尼治疗后，低、中、高剂量组小鼠肝组织中*ACTA2* mRNA相对表达量显著降低（*P*值均<0.05）；高剂量组小鼠肝组织中*COL1A1* mRNA相对表达量较CCl_4模型组显著降低（*P*<0.05）（图5）。

2.5　司曲替尼对小鼠肝组织羟脯氨酸的影响　通过碱水解法检测显示，CCl_4模型组小鼠肝组织羟脯氨酸含量较对照组显著升高，与天狼星红染色结果一致，证实纤维化模型构建成功。经司曲替尼干预后，中、高剂量组小鼠肝组织中羟脯氨酸水平显著降低（*P*值均<0.05）（图6）。

2.6　司曲替尼对小鼠肝组织α-SMA、Col1a1蛋白表达的影响　Western blot检测结果显示，与对照组比较，CCl_4模型组小鼠肝组织α-SMA、Col1a1蛋白表达均升高，经低、中、高剂量司曲替尼治疗后，高剂量组小鼠肝组织α-SMA、Col1a1蛋白表达与模型组比较，差异均有统计学意义（*P*值均<0.05）（图7）。

3　讨论

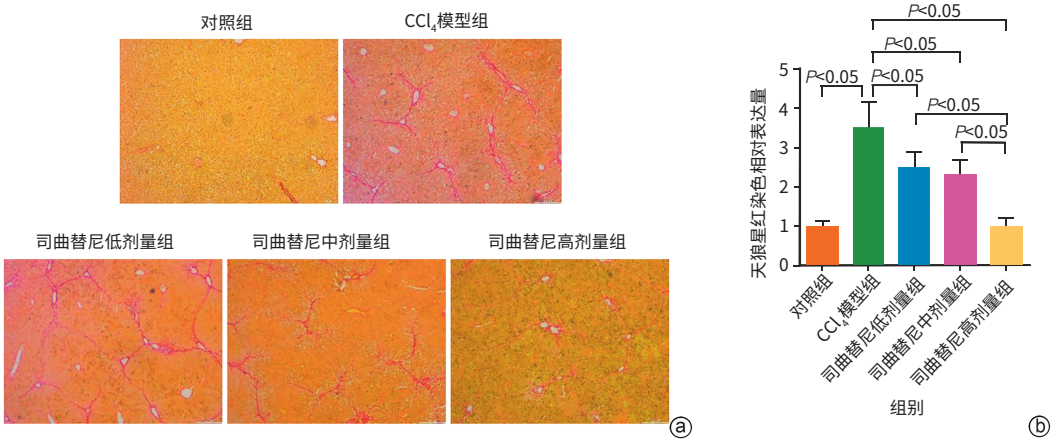
肝纤维化的发生发展涉及多病因、多环节的复杂病理过程，其中HSC的异常激活发挥关键作用。异常激活的HSC高表达α-SMA，且HSC增殖和迁移能力增强，并



注：HE，苏木精-伊红。

图1　各组小鼠肝组织HE染色结果（×100）

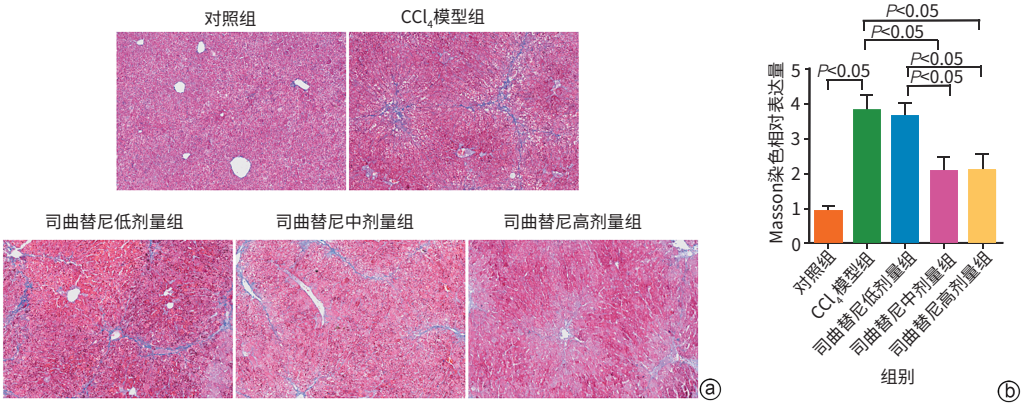
Figure 1　HE staining of liver tissues in mice from each group of mice（×100）



注：a，天狼星红染色（×100）；b，天狼星红染色相对表达量。

图2　各组小鼠肝组织天狼星红染色结果

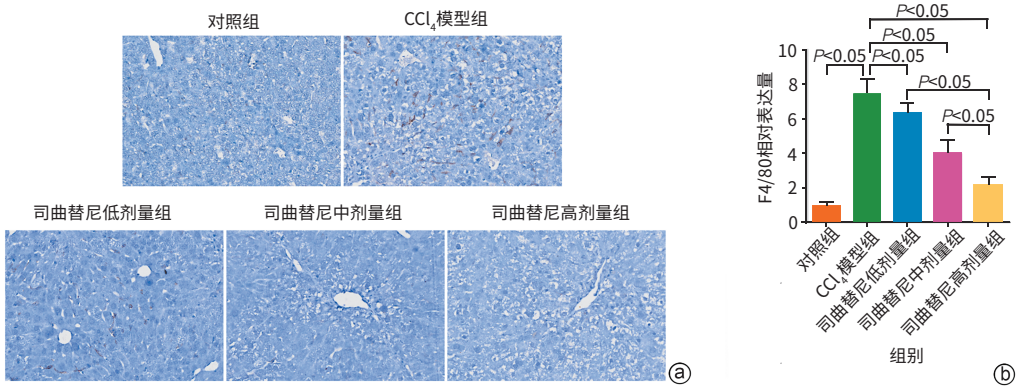
Figure 2　Sirius red staining of liver tissues from each group of mice



注：a，Masson染色（×100）；b，Masson染色相对表达量。

图3　各组小鼠肝组织Masson染色结果

Figure 3　Masson staining of liver tissues from each group of mice



注：a，F4/80免疫组织化学染色（×200）；b，F4/80免疫组织化学染色相对表达量。CCl_4，四氯化碳。

图4　各组小鼠肝组织F4/80免疫组织化学染色结果

Figure 4　Immunohistochemical staining of F4/80 in liver tissues of each group of mice

表4　各组小鼠肝纤维化分期

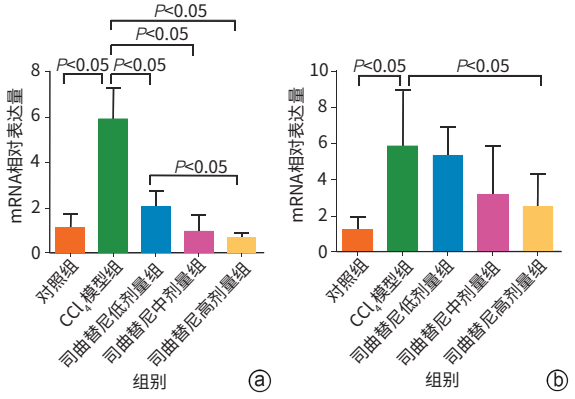
Table 4　Liver fibrosis grades of mice in each group

组别	动物数（只）	肝纤维化分期（只）				
		S0	S1	S2	S3	S4
对照组	6	6	0	0	0	0
CCl_4模型组	6	0	0	0	3	3
司曲替尼低剂量组	6	0	1	2	2	1
司曲替尼中剂量组	6	0	2	2	1	1
司曲替尼高剂量组	6	1	3	1	1	0

注：CCl_4，四氯化碳。

大量分泌以Col1a1为主的ECM，从而促进肝纤维化进展[10]。因此，通过靶向抑制HSC活化、诱导其凋亡或促进其恢复至静息状态，可以有效减少ECM过度积累，减缓甚至逆转肝纤维化的进程[11]。

本研究在CCl_4诱导的肝纤维化小鼠模型中系统评估了司曲替尼的治疗效果。结果显示，CCl_4模型组小鼠血清TC、TG水平显著升高，这与该模型常伴随肝脂肪变性相符。虽然TC、TG并非肝纤维化的直接标志物，但其



注：a，*ACTA2* mRNA相对表达量；b，*COL1A1* mRNA相对表达量。*ACTA2*，平滑肌肌动蛋白α基因；*COL1A1*，Ⅰ型胶原蛋白α1基因。CCl_4，四氯化碳。

图5　各组小鼠肝组织*ACTA2*、*COL1A1* mRNA相对表达水平比较

Figure 5　Comparison of relative mRNA expression levels of *ACTA2* and *COL1A1* in liver tissues of each group of mice

异常升高反映了肝细胞脂质代谢功能障碍，是肝损伤和纤维化进展的促进因素之一。既往研究表明，肝脂肪变

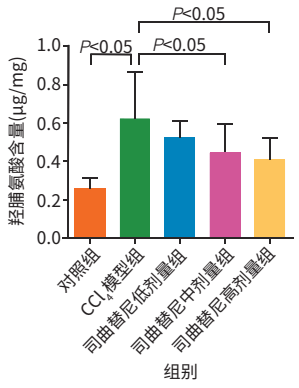
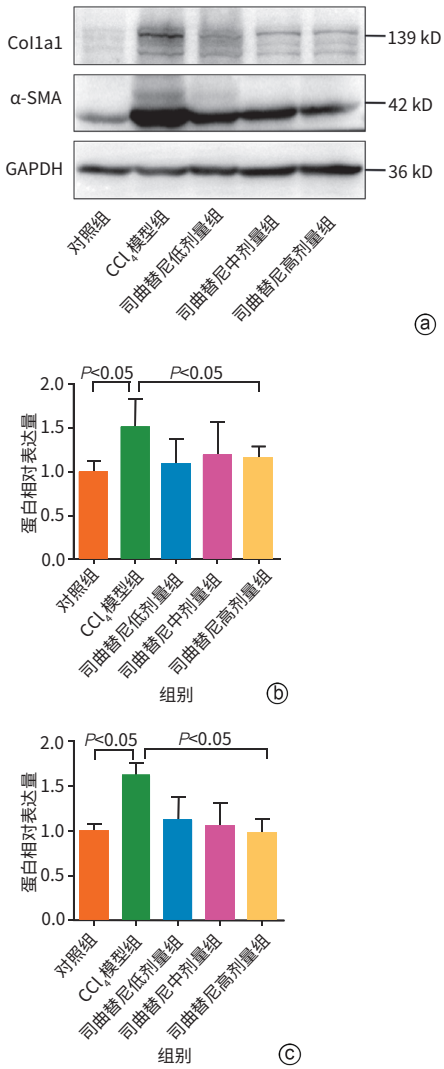


图6　各组小鼠肝组织羟脯氨酸含量比较

Figure 6　Comparison of hydroxyproline detection in liver tissues of each group of mice



注：a，Western Blot结果；b，α-SMA蛋白相对表达量；c，Col1a1蛋白相对表达量。α-SMA，平滑肌肌动蛋白α；Col1a1，Ⅰ型胶原蛋白α1。

图7　各组小鼠肝组织α-SMA、Col1a1蛋白表达量

Figure 7　The protein expression levels of α-SMA and Col1a1 in the liver tissues of each group of mice

性可通过诱导氧化应激和内质网应激，促进炎症因子释放及HSC活化[12]。司曲替尼干预后，TC和TG水平呈下降趋势，提示司曲替尼可能通过改善肝脂肪代谢紊乱，减轻肝组织整体损伤，进而抑制纤维化进展。在肝功能方面，司曲替尼干预后血清ALT水平呈下降趋势，表明其对肝细胞具有保护作用，从而改善肝功能。HE染色与F4/80免疫组织化学染色结果显示，CCl_4模型组小鼠肝组织存在明显的炎症细胞浸润和巨噬细胞聚集，而司曲替尼（尤其是高剂量组）能够减轻肝细胞肿胀与空泡，并显著抑制巨噬细胞的肝脏浸润，提示其可以有效缓解肝纤维化的炎症微环境。天狼星红、Masson染色与羟脯氨酸定量检测显示，CCl_4模型组小鼠肝脏出现显著的胶原沉积与纤维间隔形成，司曲替尼各剂量组，尤其是中、高剂量组，能够显著减少胶原沉积，使纤维间隔变薄、稀疏，并降低羟脯氨酸含量，表明司曲替尼直接抑制了ECM的过度沉积。在分子机制层面，司曲替尼干预后，肝组织中HSC活化标志物α-SMA及胶原合成关键基因*COL1A1*的mRNA和蛋白表达均显著下调，进一步从生化与分子水平证实了司曲替尼抑制HSC活化及胶原合成的作用。

司曲替尼可抑制TAM受体（MERTK/AXL）和分裂激酶家族受体（MET/VEGFR）。研究表明，MERTK可通过促进巨噬细胞释放转化生长因子β1和血小板衍生生长因子β间接激活HSC[4]。HSC表面AXL被配体（如生长停滞特异性蛋白6）激活后，通过招募下游适配蛋白，直接触发PI3K/AKT和MAPK/ERK这两条关键信号通路[5-6]。此外，MET受体作为肝细胞生长因子的唯一受体，与肝细胞生长因子结合后被激活，亦可以触发PI3K/AKT信号通路[13-14]。在PI3K/AKT通路中，PI3K激活进而磷酸化AKT，正向调控细胞周期，促进HSC细胞周期从G1期向S期转换，从而增强HSC增殖能力，加强HSC纤维化表型转化[15]。在MAPK/ERK信号通路中，活化的ERK可进入细胞核调控多种基因的表达，促进HSC的活化和增殖，诱导其转化为肌成纤维细胞，参与肝纤维化的进程；且ERK通路亦诱导活化的HSC分泌血管内皮生长因子，间接促进内皮细胞的生长和增殖，从而促进肝纤维化形成[16]。基于上述证据推测，司曲替尼作为小分子多靶点激酶抑制剂，可能通过抑制TAM受体和分裂激酶家族受体干扰HSC的活化与增殖，进而减缓肝纤维化进程。

本研究也存在一定局限性：仅设立了与CCl_4模型组的对比，未设立单独使用司曲替尼的正常小鼠对照组；未进行肝组织脂肪变直接染色（如油红O染色）；且动物

实验结果与临床应用存在差异,司曲替尼在人体肝纤维化治疗中的最佳剂量、给药疗程及安全性仍需进一步临床研究验证。

综上所述,本研究在动物模型中证实司曲替尼对CCl_4诱导的肝纤维化具有明确的改善作用,其作用机制可能与抑制HSC活化及相关信号通路(如PI3K/AKT、MAPK/ERK)有关,为司曲替尼的应用提供了临床前实验依据,也为肝纤维化的靶向治疗提供了新的潜在候选药物。

伦理学声明: 本研究方案于2024年12月23日经由南京大学医学院附属鼓楼医院实验动物伦理委员会审批,批号:2024AE01094,符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 张欢负责设计论文框架,起草论文,实验操作以及研究过程的实施;赵倩雯负责数据整理,统计学分析;吴翔宇、芮法娟、耿楠和靳睿在论文修改与语言润色方面提供帮助;李婕负责拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

[1] DHAR D, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer[J]. Exp Biol Med, 2020, 245(2): 96-108. DOI: 10.1177/1535370219898141.

[2] HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 425-456. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130246.

[3] ZHAO J, HAN M, ZHOU L, et al. TAF and TDF attenuate liver fibrosis through NS5ATP9, TGFβ1/Smad3, and NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling pathways[J]. Hepatol Int, 2020, 14(1): 145-160. DOI: 10.1007/s12072-019-09997-6.

[4] CAI BS, DONGIOVANNI P, COREY KE, et al. Macrophage MerTK promotes liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Cell Metab, 2020, 31(2): 406-421. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.11.013.

[5] CHEN ML, MU XY, LI WG, et al. Effects of α-Arrestin-domain-containing-3 deficiency on PI3K/AKT signaling pathway and proliferation of renal cell carcinoma cells[J]. Prog Mod Biomed, 2020, 20(13): 2401-2405. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.001.
陈暮霖, 穆星宇, 李维国, 等. 敲除含α-Arrestin结构域蛋白3对肾癌细胞PI3K/AKT信号通路及增殖能力的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(13): 2401-2405. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.001.

[6] GONG PP. Axl upregulate autophagy in experimental autoimmune encephalomyelitis via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022. DOI: 10.27204/d.cnki.glzhu.2022.002383.
巩盼盼. Axl通过PI3K/Akt/mTOR信号通路上调实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠自噬水平的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022. DOI: 10.27204/d.cnki.glzhu.2022.002383.

[7] ZHAO J, YU XM, HUANG DZ, et al. SAFFRON-103: A phase 1b study of the safety and efficacy of sitravatinib combined with tislelizumab in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(2): e006055. DOI: 10.1136/jitc-2022-006055.

[8] WANG X, PAN HM, CUI JW, et al. SAFFRON-103: A phase Ib study of sitravatinib plus tislelizumab in anti-PD-(L)1 refractory/resistant advanced melanoma[J]. Immunotherapy, 2024, 16(4): 243-256. DOI: 10.2217/imt-2023-0130.

[9] WANG S, ZHU L, LI TE, et al. Disruption of MerTK increases the efficacy of checkpoint inhibitor by enhancing ferroptosis and immune response in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Rep Med, 2024, 5(2): 101415. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101415.

[10] YANG FM, LI H, LI YM, et al. Crosstalk between hepatic stellate cells and surrounding cells in hepatic fibrosis[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 99: 108051. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108051.

[11] WANG L, ZHOU JY, WANG J, et al. Hepatic stellate cell-targeting micelle nanomedicine for early diagnosis and treatment of liver fibrosis[J]. Adv Healthc Mater, 2024, 13(12): e2303710. DOI: 10.1002/adhm.202303710.

[12] WANG TT, XIA GQ, LI X, et al. Endoplasmic reticulum stress in liver fibrosis: Mechanisms and therapeutic potential[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2025, 1871(3): 167695. DOI: 10.1016/j.bbadis.2025.167695.

[13] MOHAN CD, SHANMUGAM MK, GOWDA SGS, et al. c-MET pathway in human malignancies and its targeting by natural compounds for cancer therapy[J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155379. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155379.

[14] RAJ S, KESARI KK, KUMAR A, et al. Molecular mechanism(s) of regulation(s) of c-MET/HGF signaling in head and neck cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 31. DOI: 10.1186/s12943-022-01503-1.

[15] LUO XX. Experimental study on the dynamic changes of PI3K/Akt signaling pathway in hepatic stellate cells after X-ray irradiation[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2016.
罗晓旭. PI3K/Akt信号通路与肝星状细胞活化的关系及其在放射性肝纤维化中的作用[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.

[16] DAS A, SHERGILL U, THAKUR L, et al. Ephrin B2/EphB4 pathway in hepatic stellate cells stimulates Erk-dependent VEGF production and sinusoidal endothelial cell recruitment[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(6): G908-G915. DOI: 10.1152/ajpgi.00510.2009.

收稿日期: 2025-09-15;**录用日期:** 2026-01-15

本文编辑: 葛俊

引证本文: ZHANG H, WU XY, ZHAO QW, et al. Effect of sitravatinib on a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and its mechanism[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(3): 600-607.
张欢, 吴翔宇, 赵倩雯, 等. 司曲替尼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(3): 600-607.