·肝纤维化及肝硬化·

DOI：10.12449/JCH260314

胸腺素β4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

朱耘函[1]，王思琪[2]，景登娅[2]，冯勤颖[3]

1 贵州中医药大学第二附属医院普外科，贵阳 550000
2 贵州省血液中心献血服务一科，贵阳 550000
3 北京积水潭医院贵州医院中心实验室，贵阳 550014

通信作者：冯勤颖，57105762@qq.com（ORICD：0000-0001-6635-7086）

摘要：目的 本研究拟探讨胸腺素β4（Tβ4）通过调控血小板衍生生长因子（PDGF）表达及诱导肝星状细胞（HSC）凋亡，对四氯化碳（CCl_4）诱导的肝纤维化小鼠模型的干预作用与潜在机制，为临床抗肝纤维化治疗提供新的实验依据。**方法** 选取30只雄性C57小鼠，随机分为正常对照组、模型组，以及Tβ4低（3 mg/kg）、中（6 mg/kg）和高（12 mg/kg）剂量治疗组，每组6只。正常对照组自由摄食普通饲料，其余各组腹腔注射50% CCl_4与橄榄油混合液建立肝纤维化模型，经超声及病理学验证造模成功后，对各治疗组小鼠连续皮下注射Tβ4干预4周。实验结束后取肝组织行苏木精-伊红及Masson染色观察组织病理变化，应用实时荧光定量聚合酶链反应检测血PDGF mRNA表达，原位末端转移酶标记（TUNEL）法检测HSC凋亡情况。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** 与模型组比较，Tβ4中、高剂量治疗组小鼠肝纤维化程度均呈现不同程度的减轻。实时荧光定量聚合酶链反应结果显示，Tβ4可显著下调肝组织中PDGF mRNA表达，各剂量治疗组间差异有统计学意义（$P<0.05$）；Tβ4高剂量组与正常对照组PDGF mRNA表达差异无统计学意义（$P<0.05$）。TUNEL检测结果显示，Tβ4中、高剂量组HSC凋亡数量显著多于模型组。**结论** Tβ4可能通过抑制PDGF表达和促进HSC凋亡，从而改善CCl_4诱导的小鼠肝纤维化，提示其在肝纤维化治疗中具有潜在应用价值。

关键词：肝纤维化；胸腺素β4；小鼠，近交C57BL

基金项目：贵州省科技计划项目（黔科合成果-LC〔2024〕002）；贵州省卫生健康委科学技术基金项目（gzwkj2026-619）；北京积水潭医院贵州医院院级科研基金项目（JGYYK〔2025〕09）

Effect of thymosin β4 on a mouse model of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis and its mechanism

ZHU Yunhan[1], *WANG Siqi*[2], *JING Dengya*[2], *FENG Qinying*[3]

1. Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China; 2. First Department of Blood Donation Service, Guizhou Blood Center, Guiyang 550000, China; 3. Central Laboratory, Guizhou Hospital, Beijing Jishuitan Hospital, Guiyang 550014, China

Corresponding author: FENG Qinying, 57105762@qq.com (ORCID: 0000-0001-6635-7086)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and potential mechanism of thymosin β4 (Tβ4) on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatic fibrosis by regulating the expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and inducing the apoptosis of hepatic stellate cell (HSC), and to provide new experimental evidence for anti-hepatic fibrosis treatment in clinical practice. **Methods** A total of 30 male C57 mice were randomly divided into normal control group, model group, low-dose Tβ4 treatment group (3 mg/kg), middle-dose Tβ4 treatment group (6 mg/kg), and high-dose Tβ4 treatment group (12 mg/kg), with 6 mice in each group. The mice in the normal control group were fed with a normal diet *ad libitum*, and those in the other groups were given intraperitoneal injection of 50% CCl_4 mixed with olive oil to establish a model of hepatic fibrosis. After successful modeling

confirmed by ultrasound and histopathology, the mice in each treatment group were given subcutaneous injection of Tβ4 for 4 consecutive weeks. Liver tissue was collected at the end of the experiment, and HE staining and Masson staining were used to observe histopathological changes; quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression level of PDGF; TUNEL assay was used to assess the apoptosis of HSC. 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 model group, the middle- and high-dose Tβ4 treatment groups had varying degrees of alleviation of hepatic fibrosis. Quantitative real-time PCR showed that Tβ4 could significantly downregulate the mRNA expression level of PDGF in liver tissue, with a significant difference between the treatment groups (P>0.05), and there was no significant difference in the mRNA expression level of PDGF between the high-dose Tβ4 treatment group and the normal control group (P>0.05). TUNEL assay showed that the middle- and high-dose Tβ4 treatment groups had a significantly higher number of apoptotic HSCs than the model group. **Conclusion** Tβ4 may improve CCl_4-induced hepatic fibrosis in mice by downregulating the expression of PDGF and promoting the apoptosis of HSC, suggesting that it has a potential application value in the treatment of hepatic fibrosis.

Key words: Hepatic Fibrosis; Thymosin Beta 4; Mice, Inbred C57BL

Research funding: Guizhou Provincial Science and Technology Program Project (Qiankehe Chengguo-LC[2024]002); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project (gzwkj2026-619); Beijing Jishuitan Hospital Guizhou Branch Hospital-level Research Fund Project (JGYYK[2025]09)

肝纤维化是多种慢性肝病的共同病理过程,其病理特征为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常增生与过度沉积[1-4]。在肝纤维化进程中,血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)被认为是肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化和迁移的关键因子,可促进ECM合成,加快纤维化进展[5]。近年研究发现,胸腺素β4(thymosin beta 4, Tβ4)在心肌和肾脏纤维化中具有良好的抑制作用,并可降低炎症反应水平[6-10]。尽管Tβ4在其他组织中的抗纤维化效果已有报道[11-15],但其对肝纤维化是否具有改善作用尚未明确。为此,本研究通过构建四氯化碳(CCl_4)诱导肝纤维化小鼠模型,观察Tβ4对PDGF表达和HSC凋亡的影响,旨在初步探讨其对肝纤维化的干预作用及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器 主要仪器包括TGL20M高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国),TG-16-W型高速离心机(湖南湘立科学仪器有限公司,中国),QuantStudio5实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(ABI公司,德国),ProFlex PCR扩增仪(Life公司,美国),核酸提取仪TGuide S16[天根生化科技(北京)有限公司,中国],BX53荧光显微镜及正置显微镜(Olympus公司,美国),微量分光光度计(Quawell公司,美国),以及Appendix Ⅲ型超声仪(西门子公司,德国)。

1.2 实验试剂 总RNA提取试剂盒[DP405,天根生化科技(北京)有限公司,中国],逆转录试剂盒(#K1622,Thermo公司,美国),定量PCR预混液[FP207,天根生化科技(北京)有限公司,中国],原位末端转移酶标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)法检测试剂盒(KGA7051,江苏凯基生物技术股份有限公司,中国),苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒(G1120,北京索莱宝科技有限公司,中国)以及Masson染色试剂盒(PT003,上海博谷生物科技有限公司,中国)。

1.3 实验动物 30只无特定病原体(special pathogen free, SPF)级雄性C57小鼠饲养于SPF动物房,室温20~22 ℃,湿度50%±2%,12 h/12 h明暗周期,分笼饲养,自由饮水,普通饲料喂养。实验动物生产许可证编号为SCXK(湘)2024-0008,实验动物使用许可证编号为SYXK(贵)2024-0005。

1.4 分组与造模 采用随机数字表法将小鼠分为以下5组:正常对照组(阴性对照)、模型组、Tβ4高剂量(12 mg/kg)组、Tβ4中剂量(6 mg/kg)组及Tβ4低剂量(3 mg/kg)组,每组6只,均适应性喂养1周。模型组及Tβ4治疗组均以高脂饲料和10%酒精喂养,1周后腹腔注射50% CCl_4与橄榄油混合液10 μL/g[16],每3日1次,连续8周;正常对照组给予普通饲料及饮水。

1.5 超声检查

1.5.1 仪器参数设置 采用SC6-1凸阵探头,频率1~

6 MHz，图像深度8 cm，图像放大至120%，弹性成像取样框为4 cm×3 cm，测量感兴趣区（region of interest，ROI）直径为20 mm，弹性测量SCALE为40 kPa。二维图像与弹性图像上下排列，弹性成像取样框置于图像中央。

1.5.2 检测方法 （1）二维超声：于小鼠右肋间选择右肝前叶或后叶下段切面，将图像显示清晰，避开肝内粗大管道结构，测量皮肤至肝包膜距离，保存图像并在图像上标记文字。（2）弹性成像：进入超声实时剪切波弹性成像模式，在二维超声图像的引导下，将弹性成像取样框上缘置于肝包膜下1 cm处，待弹性图像稳定后冻结图像，进行弹性模量测量，记录ROI内的均值（单位：kPa）。解冻后重新进行弹性图像及测量，共检测5次，分别保存图像并在每张图像上标记文字。

1.6 给药 参考文献[17]，造模8周后，小鼠呈现肝纤维化。按高（12 mg/kg）、中（6 mg/kg）、低（3 mg/kg）剂量分别予肝纤维化小鼠皮下注射Tβ4，每日1次，连续注射4周。

1.7 取材 最后1次给药3天后，使用1%戊巴比妥钠溶液（50 mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠，将小鼠处死。随后取各组小鼠肝组织的一部分置于包埋盒后用多聚甲醛固定，再取部分肝组织分装放入无菌冻存管中，于-80 ℃超低温冰箱保存。

1.8 组织病理染色

1.8.1 HE染色 滴加苏木精染液，染色2 min，浸入磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）以去除染色液。随后滴加0.4%的稀盐酸分化10 s，观察到颜色略淡。用自来水（蒸馏水）终止分化。滴加伊红染液充分覆盖组织，染色45 s。PBS漂洗2次，每次5 min。

1.8.2 Masson染色 （1）将切片分别浸泡于二甲苯Ⅰ和Ⅱ溶液中，每种溶液持续20 min，然后再分别浸泡于无水乙醇Ⅰ和Ⅱ溶液中10 min、90%乙醇5 min、80%乙醇5 min、75%乙醇5 min，最后放入超纯水中，清洗约5 min。（2）使用Weigert铁苏木精染色5 min，然后将其浸泡在1%的氯化氢乙醇中，以分化切片，最后再以蒸馏水对其进行数分钟的清洗，以确保其质量。（3）使用丽春红酸性品红溶液染色切片，然后在5～10 min内用清水彻底冲洗。（4）对切片用磷钼酸溶液进行染色，5 min后用蒸馏水进行冲洗。（5）用苯胺蓝液复染5 min。（6）用1%的乙酸对切片进行1 min的分化处理。（7）对切片进行脱水并用中性树胶进行封片。

1.9 检测

1.9.1 RNA提取 （1）取肝组织30 mg，加入1 mL TRNzol，匀浆处理。（2）匀浆后置于室温5 min。（3）加入0.2 mL三氯甲烷，剧烈振荡20 s，置于室温5 min。（4）于4 ℃条件下12 000×*g*离心15 min，样品会分成3层：下沉黄色为有机相，上两层为没有颜色的水相，RNA分布在水相中，将水相（600 μL左右）再倒入离心管中。（5）加入250 μL无水乙醇后，振荡20 s，摇匀后放在室温下5 min；瞬时离心收集黏附在管壁和管盖的液体。（6）将离心管中的溶液和絮状沉淀转移到吸附柱CR2中，再将吸附柱放在收集管内，8 000×*g*离心1 min，弃废液后将吸附柱放回收集管。（7）加入500 μL洗涤缓冲液，12 000×*g*离心1 min，弃废液，加入600 μL洗脱缓冲液，室温静置2 min，12 000×*g*离心1 min，弃废液，将吸附柱放回收集管。（8）重复（7）步骤1次。将吸附柱放回收集管中，12 000×*g*离心2 min，使吸附膜完全变干后弃废液。（9）将吸附柱放入RNase-Free离心管中，置于室温2 min，使吸附膜完全变干。向吸附膜的中间部位悬空滴加50 μL RNase-Free ddH_2O，加盖，室温放置5 min。12 000×*g*离心2 min。

1.9.2 单链互补DNA（complementary DNA，cDNA）合成 根据Thermo逆转录试剂盒说明书将上述总RNA以2 μL（浓度2 μg/μL）为模板进行反应。反应条件：25 ℃ 10 min，48 ℃ 60 min，94 ℃ 5 min。

1.9.3 实时荧光定量PCR扩增 取各组肝组织提取总RNA，逆转录合成cDNA，并用特异性引物扩增PDGF和β-actin等各项指标基因片段。基因扩增引物设计：依照PCR引物设计原则和GenBank中检索的PDGF基因序列设计扩增引物，引物合成由上海生工公司完成。

β-actin基因：上游引物为5′-ACTGCTCTGGCTCCTAGCAC-3′，下游引物为5′-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3′；PDGF基因：上游引物为5′-AAGCAGCCTCAGAGACCAAC-3′，下游引物为5′-AACCACAGTTGCCACCACAG-3′。

1.9.4 基因扩增 以上述cDNA为模板克隆β-actin、PDGF基因，同时设置不加模板的阴性对照。PCR扩增条件：45 ℃ 10 min、95 ℃ 5 min、95 ℃ 10 s、60 ℃ 40 s采集荧光，40个循环。熔解条件：95 ℃ 15 s、60 ℃ 1 min、95 ℃ 15 s、60 ℃ 15 s。

1.10 肝组织切片TUNEL法检测HSC凋亡 （1）固定或前处理：取肝组织脱水、浸蜡、石蜡包埋、常规制片，4 μm切片。（2）通透：配制Proteinase K工作液，滴加工作液100 μL、37 ℃反应5 min，PBS洗涤3次。（3）封闭：配制3% H_2O_2封闭液，浸入封闭液10 min，PBS洗涤3次。（4）制阳性片：配制100 μL DNase Ⅰ反应液，滴加DNase Ⅰ反应液室温处理10～30 min，PBS洗涤3次。（5）连接异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记：配

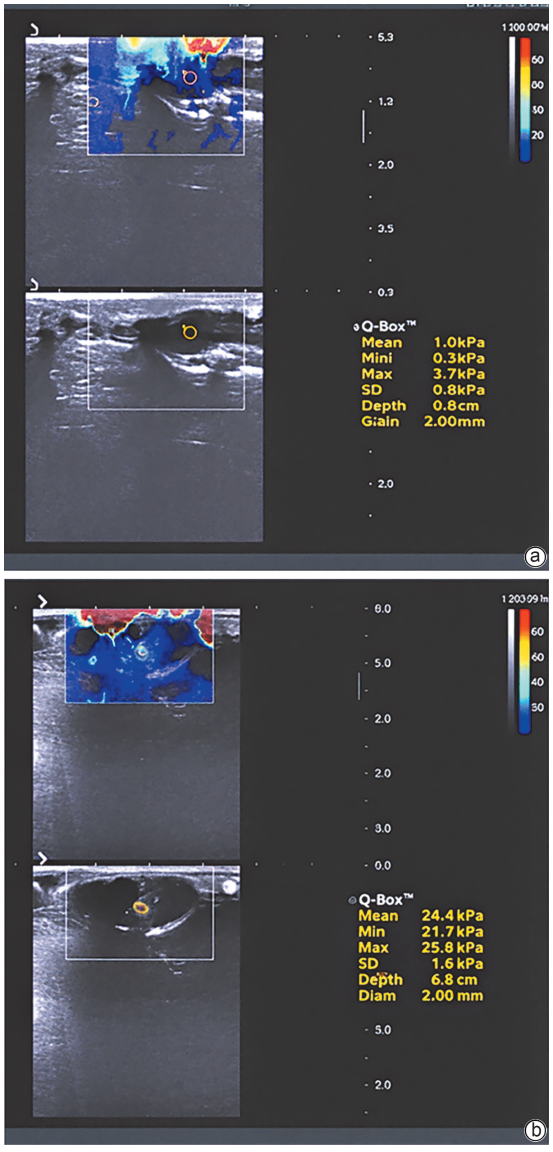
制末端脱氧核苷酸转移酶（terminal deoxynucleotidyl transferase，TdT）反应液，滴加反应液避光显色60 min，PBS洗涤3次；配制streptavidin-FITC标记工作液，滴加工作液50 μL、37 ℃避光反应30 min，PBS洗涤3次，荧光显微镜检测。（6）3，3′-二氨基联苯胺（3，3′-diaminobenzidine，DAB）标记：配制POD-conjugated Anti-FITC工作液，滴加工作液50 μL，加上盖玻片后37 ℃避光反应30 min，PBS洗涤3次。（7）显色：配制DAB工作液，滴加工作液50 μL室温显色反应1～5 min，PBS洗涤3次。（8）复染：苏木精复染，在Olympus光学显微镜下观察。

1.11　*统计学方法*　采用SPSS 17.0软件进行数据分析。所有数据首先进行正态性检验和方差齐性检验，符合正态分布且方差齐的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　*动物观察*　在未注射CCl_4诱导肝纤维化前，小鼠皮毛色泽光亮，毛发柔软，性情温和。注射CCl_4之后，小鼠皮毛色泽灰暗，毛发竖立，烦躁好斗。

2.2　*超声检查*　二维超声显示，正常对照组小鼠肝脏平均前后径为（0.57±0.05）cm，肝实质表现为均匀一致的弥漫细小点状中等回声；造模8周后小鼠肝脏平均前后径为（0.92±0.07）cm，肝脏体积增大，肝实质回声增粗、增强，呈不均匀密集点片状分布。弹性成像显示，正常对照组小鼠肝组织硬度小，成像近似黑色，其平均弹性模量值为（1.00±0.08）kPa；造模8周后小鼠肝脏硬度显著增高，成像为蓝绿色，其平均弹性模量值为（24.4±2.2）kPa。造模小鼠二维超声与弹性成像变化情况见图1。



注：a，正常对照组；b，模型组。

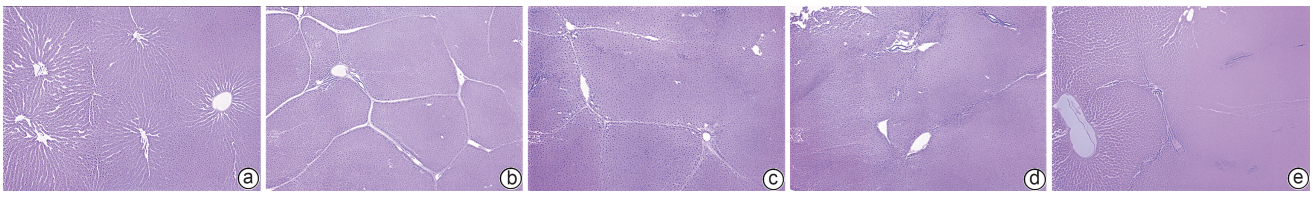
图1　小鼠肝脏二维超声与弹性成像变化情况

Figure 1　Representative ultrasound and elastography images of mouse livers

2.3　*病理HE染色结果*　Tβ4治疗4周后，肝脏HE染色显示（图2）：正常对照组小鼠肝小叶结构正常，肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列，肝细胞互相连接成条索状，形成肝细胞索，汇管区及肝组织内均无胶原纤维增生；模型组小鼠肝实质广泛破坏，小叶内肝细胞结构紊乱，汇管区弥漫性纤维增生，胶原纤维呈条索状向肝实质延伸形成纤维间隔，分割并破坏肝小叶，少部分小鼠甚至形成假小叶；Tβ4低剂量组纤维化程度较模型组无明显改变；Tβ4中、高剂量组肝小叶结构大部分保留，有桥接纤维化形成，恢复效果佳。

2.4　*Masson染色结果*　Tβ4治疗4周后，肝脏Masson染色显示（图3）：正常对照组小鼠肝脏有少量蓝色的胶原纤维；模型组小鼠肝组织胶原纤维明显增生、宽大，延伸分布于肝小叶内，肝小叶结构破坏，部分严重区域形成假小叶；Tβ4低剂量组胶原纤维表达较模型组无明显改变；Tβ4中、高剂量组小鼠增生的胶原纤维明显减少、变细，部分向肝小叶延伸。

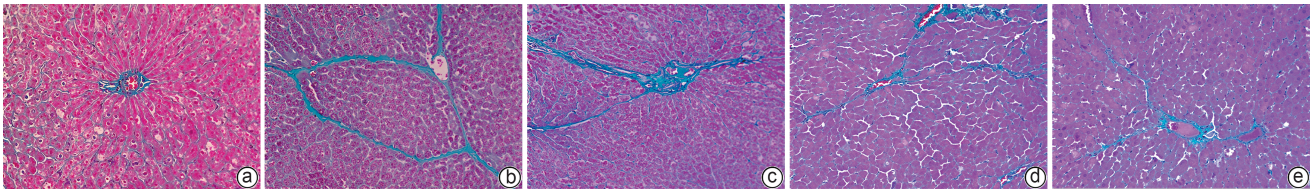
2.5　*小鼠肝组织PDGF mRNA相对表达量*　实时荧光定量PCR检测结果显示，模型组小鼠PDGF mRNA表达明显高于正常对照组（P<0.05）；与模型组相比，Tβ4低、中、高剂量组PDGF mRNA表达均降低，差异均有统计学意义（P值均<0.05）。不同Tβ4剂量组之间比较，差异有统计学意义（P<0.05）；随着Tβ4剂量升高，PDGF表达下降越明显，Tβ4高剂量组的抑制效果优于中、低剂量组。



注：a，正常对照组；b，模型组；c，Tβ4低剂量组；d，Tβ4中剂量组；e，Tβ4高剂量组。HE，苏木精-伊红。

图2 各组小鼠肝组织HE染色结果（×40）

Figure 2 Representative HE stained liver sections from each group（×40）

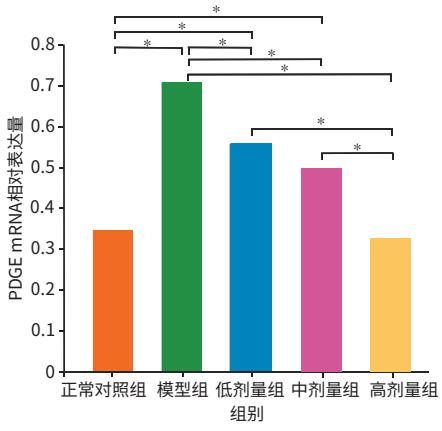


注：a，正常对照组；b，模型组；c，Tβ4低剂量组；d，Tβ4中剂量组；e，Tβ4高剂量组。蓝色所示为胶原纤维。

图3 各组小鼠肝组织Masson染色结果（×100）

Figure 3 Masson's trichrome staining of liver tissues from each group（×100）

Tβ4高剂量组与正常对照组相比，PDGF mRNA表达差异无统计学意义（$P>0.05$）（图4）。



注：*$P<0.05$。PDGF，血小板衍生生长因子。

图4 各组小鼠肝组织PDGF mRNA相对表达量

Figure 4 Relative mRNA expression of PDGF in liver tissues from each group

2.6 细胞凋亡检测结果

2.6.1 荧光凋亡结果 各组小鼠肝组织荧光凋亡结果显示，正常对照组有部分细胞生理性凋亡；模型组由于细胞正常代谢，有少量细胞凋亡；Tβ4低、中、高剂量组与正常对照组和模型组相比，其凋亡细胞明显增加，中剂量组与高剂量组尤为明显（图5）。

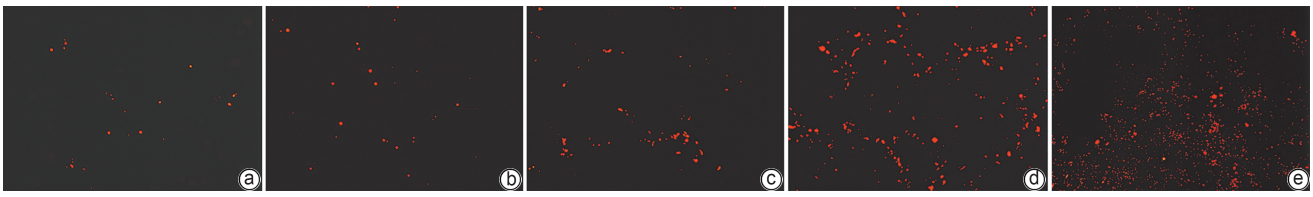
2.6.2 化学凋亡结果 Tβ4治疗4周后肝脏染色显示，正常对照组小鼠肝脏有少量细胞凋亡；模型组小鼠肝组织有大量细胞凋亡；Tβ4中、高剂量组凋亡细胞较模型组无明显改变，Tβ4低剂量组凋亡细胞明显少于中、高剂量组（图6）。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展的关键病理过程，其特征是ECM的过度沉积，而活化的HSC是产生ECM的主要细胞来源[18-19]。HSC的活化和增殖被认为是肝纤维化形成的核心环节，其受到多种细胞因子的调控，其中PDGF是作用最强的促有丝分裂原[20-21]。近年来，靶向HSC活化与增殖已成为抗纤维化治疗的重要策略。因此，探索能够抑制PDGF信号通路或诱导HSC凋亡的药物已成为抗纤维化研究的热点。

Tβ4作为一种多功能蛋白，已被证实可在心肌、肾脏和肺纤维化模型中，通过抗炎、抗凋亡和调节细胞骨架等机制发挥保护作用[6-10,13-14]。然而，既往研究多集中于Tβ4在非肝脏纤维化中的作用，其在肝纤维化中的具体效应及机制尚不明确。本研究创新性地将Tβ4应用于CCl_4诱导的肝纤维化小鼠模型，评估了其整体的抗纤维化效果，同时从抑制活化关键因子和促进活化细胞凋亡两个相互关联的视角，探讨了其潜在作用机制，旨在为肝纤维化的治疗提供新的实验依据和候选策略。

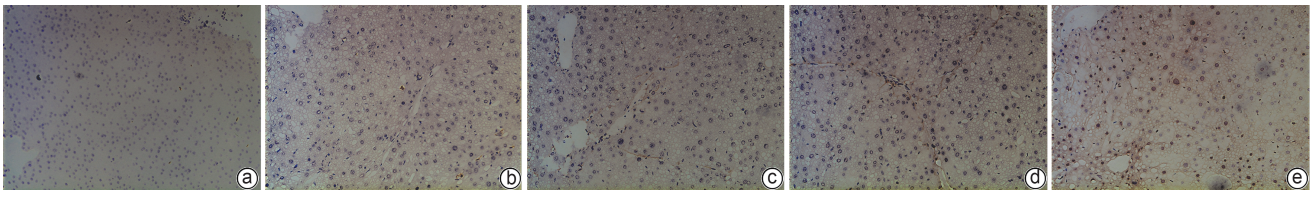
本研究发现，Tβ4干预可明显减轻CCl_4诱导的小鼠肝纤维化。该研究结果与Zhu等[15]研究发现部分一致，该研究报道Tβ4可通过磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B通路抑制HSC增殖并诱导其凋亡。本研究在其基础上进一步深化，不仅证实了Tβ4具有促HSC凋亡效应，还发现其能显著抑制上游关键促纤维化因子PDGF的表达。这表明Tβ4可能通过多靶点、多环节发挥协同抗纤维化作用：一方面可以切断HSC活化的“启动信号”



注：a，正常对照组；b，模型组；c，Tβ4低剂量组；d，Tβ4中剂量组；e，Tβ4高剂量组。红色荧光信号指示凋亡肝星状细胞。FITC，异硫氰酸荧光素。

图5　各组小鼠肝组织荧光凋亡结果（FITC，×200）

Figure 5　Fluorescence assay for apoptosis detection in mouse liver tissues（FITC，×200）



注：a，正常对照组；b，模型组；c，Tβ4低剂量组；d，Tβ4中剂量组；e，Tβ4高剂量组。棕黄色颗粒代表凋亡肝星状细胞。TUNEL，原位末端转移酶标记；DAB，3，3′-二氨基联苯胺。

图6　各组小鼠肝组织TUNEL化学染色结果（DAB，×200）

Figure 6　TUNEL assay for apoptosis detection in mouse liver tissues（DAB，×200）

（PDGF），另一方面可以清除已活化的“效应细胞”（HSC）。这种同时针对“信号源”和“终末细胞”的作用模式，可能是其表现出显著疗效的重要机制。

此外，TUNEL检测结果显示，Tβ4干预（尤其是中、高剂量组）可显著促进肝组织中细胞凋亡，且形态特征典型，提示其可能通过诱导活化HSC凋亡，减少其ECM合成能力，从而缓解肝纤维化进程。相关研究表明，Tβ4可通过调节细胞骨架重构、抑制炎症因子释放和氧化应激反应发挥抗纤维化作用[22-24]。但其具体分子机制有待深入探讨，例如是否涉及蛋白激酶B、转化生长因子β/Smad等经典信号通路。本研究的实验结果为Tβ4的抗肝纤维化效应提供了初步的、提示性的表型证据。

综上所述，本研究证实了Tβ4对CCl_4诱导的小鼠肝纤维化具有明确的改善作用，并提出其作用机制可能与下调肝组织PDGF表达和诱导HSC凋亡密切相关。这一发现将Tβ4的抗纤维化应用从心、肾和肺等脏器拓展至肝脏，填补了Tβ4在肝纤维化研究中机制探索的空白，为其作为肝纤维化治疗候选药物的转化研究提供了新的实验依据。

然而，本研究仍存在一定的局限性。首先，主要关注了上游因子PDGF，未来研究应检测α-平滑肌肌动蛋白、α-1型胶原蛋白等更直接的效应指标以全面验证疗效。其次，本研究主要基于mRNA水平，需在蛋白水平进一步证实。此外，在细胞凋亡检测部分，目前仅停留在荧光显微图片定性判断上，结果的精确性受到限制，未来将采用定量方法以获得更可靠的数据。最后，由于缺乏细胞水平的实验证据，目前难以明确Tβ4是直接还是间接作用于HSC，其精确的分子信号通路有待进一步阐明。

尽管存在上述局限性，本研究结果仍然具有重要的指示意义和科学价值，创新性地将Tβ4的抗纤维化效应拓展至肝脏领域，并提出了其潜在作用靶点（PDGF和HSC），为后续深入机制研究提供了明确的方向和坚实的实验基础。未来研究将围绕上述问题展开，并深入探究其是否调控蛋白激酶B、转化生长因子β/Smad等下游信号通路，以完整揭示Tβ4的作用网络，为临床抗肝纤维化治疗提供新靶点与新策略。

伦理学声明：本研究方案于2024年7月14日经由北京积水潭医院贵州医院实验动物伦理委员会审批，批号：KT2024071535，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：朱耘函负责设计论文框架，撰写文章；王思琪负责实验操作，研究过程的实施；景登娅负责数据收集，统计学分析，绘制图表；冯勤颖负责论文修改，拟定写作思路，指导撰写文章并最后定稿。

参考文献：

[1] FAN XM, YU FJ. Frontier of liver fibrosis research[M]. Shanghai: Fudan University Press, 2015.
樊晓明, 俞富军. 肝纤维化研究前沿[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2015.
[2] SI J, TANG L, LI CC, et al. Pathogenesis of liver fibrosis and progress of research on its related therapeutic drugs[J]. Prog Pharm Sci, 2021, 45(3): 205-211.
司晶, 唐露, 李臣诚, 等. 肝纤维化的发病机制及其治疗药物研究进展[J]. 药学进展, 2021, 45(3): 205-211.
[3] LIAO ZH, XIE ZY. Research progress in molecular mechanism of hepatic fibrosis and related therapeutic targets[J]. J Jilin Univ（Med

Edit), 2024, 50(5): 1450-1456. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240532.
廖昭辉, 谢正元. 肝纤维化发病的分子机制及其相关治疗靶点的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(5): 1450-1456. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240532.
[4] FAN ML, YING MF, ZHAO R, et al. Research progress on the role of TGF-β signaling pathway in fibrotic diseases[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(11): 1171-1177. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2020.11.11.
范美玲, 应苗法, 赵蕊, 等. TGF-β信号通路在纤维化疾病中的作用研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(11): 1171-1177. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2020.11.11.
[5] SUN SH. Study on the mechanism of modified Chaihu Danggui powder in treating hepatic fibrosis based on the PI3K/AKT/Bcl-2 signaling pathway[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2024. DOI: 10.27879/d.cnki.ggxzy.2024.000003.
孙素红. 基于PI3K/AKT/Bcl-2信号通路探讨加味柴胡当归汤治疗肝纤维化的机制研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2024. DOI: 10.27879/d.cnki.ggxzy.2024.000003.
[6] ZHU ZX, LIAO YF, MOU QJ, et al. Thymosin β4 regulates tissue inflammatory response in mouse nonalcoholic fatty liver disease by promoting macrophage M2-type polarization[J]. J Inflamm Res, 2025, 18: 5791-5809. DOI: 10.2147/JIR.S492814.
[7] XING Y, YE YM, ZUO HY, et al. Progress on the function and application of thymosin β4[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 767785. DOI: 10.3389/fendo.2021.767785.
[8] MASON WJ, VASILOPOULOU E. The pathophysiological role of thymosin β4 in the kidney glomerulus[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 7684. DOI: 10.3390/ijms24097684.
[9] BJØRKLUND G, DADAR M, AASETH J, et al. Thymosin β4: A multifaceted tissue repair stimulating protein in heart injury[J]. Curr Med Chem, 2020, 27(37): 6294-6305. DOI: 10.2174/0929867326666190716125456.
[10] YANG L, FU WL, ZHU Y, et al. Tβ4 suppresses lincRNA-p21-mediated hepatic apoptosis and fibrosis by inhibiting PI3K-AKT-NF-κB pathway[J]. Gene, 2020, 758: 144946. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144946.
[11] WANG W, JIA WN, ZHANG CP. The role of Tβ4-POP-Ac-SDKP axis in organ fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 13282. DOI: 10.3390/ijms232113282.
[12] KLEINMAN HK, KULIK V, GOLDSTEIN AL. Thymosin β4 and the anti-fibrotic switch[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 115: 109628. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109628.
[13] YU R, LI SM, CHEN L, et al. Inhaled exogenous thymosin beta 4 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via TGF-β1 signalling pathway[J]. J Pharm Pharmacol, 2025, 77(4): 582-592. DOI: 10.1093/jpp/rgae143.
[14] HOU YC, ZHAO HQ, DONG CE, et al. Research advances in immune checkpoint inhibitor-related cholangitis[J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(2): 463-468. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.02.034.
侯昱丞, 赵洪强, 董草儿, 等. 免疫检查点抑制剂相关胆管炎的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(2): 463-468. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.02.034.
[15] ZHU LL, CHENG ML, LIU YM, et al. Thymosin-β4 inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatic stellate cells through PI3K/AKT pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(40): 68847-68853. DOI: 10.18632/oncotarget.18748.
[16] YANG JJ. Molecular mechanism of DNMT3A mediated LncRNA ANRIL methylation promoted liver fibrosis[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021. DOI: 10.26921/d.cnki.ganyu.2021.000035.
杨晶晶. DNMT3A介导LncRNA ANRIL甲基化促进肝纤维化的分子机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021. DOI: 10.26921/d.cnki.ganyu.2021.000035.
[17] ZHANG WF. Exploring the role and mechanism of mitochondrial autophagy in the inhibition of hepatic fibrosis by soft liver fibrotic particles based on miR-135a/FOXO1/PINK1 pathway[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2024. DOI: 10.27879/d.cnki.ggxzy.2024.000009.
张文富. 基于miR-135a/FOXO1/PINK1通路探讨线粒体自噬在柔肝化纤颗粒抑制肝纤维化中的作用及机制[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2024. DOI: 10.27879/d.cnki.ggxzy.2024.000009.
[18] HU PY. Experimental study of curcumin combined withdihydromyricetin nanoparticle co-delivery system forsynergistic treatment of liver fibrosis[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2025. DOI: 10.26921/d.cnki.ganyu.2025.000015.
胡潘宜. 姜黄素联合二氢杨梅素纳米颗粒共递送系统协同治疗肝纤维化的实验研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2025. DOI: 10.26921/d.cnki.ganyu.2025.000015.
[19] ZHAO TT, LI JF, ZHANG LT. Progress in the potential therapeutic mechanism of mesenchymal stem cell-derived exosomes for liver fibrosis[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2024, 29(4): 475-480. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.04.017.
赵婷婷, 李俊峰, 张立婷. 间充质干细胞源性外泌体对肝纤维化潜在治疗机制的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(4): 475-480. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.04.017.
[20] ZOU JJ. The study on mechanism of Shenkang injection in treating renal fibrosis from the metabolomics and regulation of E3 ubiquitin ligase Smurfs on TGF-β/Smads signaling transduction[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2021. DOI: 10.26988/d.cnki.gcdzu.2021.000374.
邹俊驹. 从代谢组学及E3泛素连接酶Smurfs对TGF-β/Smads信号传导的调节探讨肾康注射液治疗肾纤维化的机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021. DOI: 10.26988/d.cnki.gcdzu.2021.000374.
[21] WANG F, HE YJ, YAO NJ, et al. Thymosin β4 protects against cardiac damage and subsequent cardiac fibrosis in mice with myocardial infarction[J]. Cardiovasc Ther, 2022, 2022: 1308651. DOI: 10.1155/2022/1308651.
[22] YU H, WANG B, LI ZH, et al. Tβ4-exosome-loaded hemostatic and antibacterial hydrogel to improve vascular regeneration and modulate macrophage polarization for diabetic wound treatment[J]. Mater Today Bio, 2025, 31: 101585. DOI: 10.1016/j.mtbio.2025.101585.
[23] WANG YL, YU SN, SHEN HR, et al. Thymosin β4 released from functionalized self-assembling peptide activates epicardium and enhances repair of infarcted myocardium[J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4262-4280. DOI: 10.7150/thno.52309.
[24] LI QX, ZHANG QJ, KIM YR, et al. Deficiency of endothelial sirtuin1 in mice stimulates skeletal muscle insulin sensitivity by modifying the secretome[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 5595. DOI: 10.1038/s41467-023-41351-1.

收稿日期：2025-08-19；**录用日期：**2025-11-06
本文编辑：葛俊

引证本文： ZHU YH, WANG SQ, JING DY, et al. Effect of thymosin β4 on a mouse model of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis and its mechanism[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(3): 593-599.
朱耘函, 王思琪, 景登娅, 等. 胸腺素β4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): 593-599.