

## 加减三甲散抑制自噬降低人肝星状细胞 LX-2 活化作用

王 龙<sup>1,2</sup>, 马 丽<sup>1,2</sup>, 李国花<sup>1</sup>, 贾婷婷<sup>1,3\*</sup>, 张小波<sup>4</sup>

1. 宁夏医科大学 中医学院, 宁夏 银川 750004

2. 宁夏医科大学 中医燥证教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

3. 宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院, 宁夏 银川 750021

4. 成都中医药大学 基础医学院, 四川 成都 611137

**摘 要:** **目的** 观察加减三甲散含药血清对人肝星状细胞 LX-2 自噬的影响。**方法** 将人肝星状细胞 LX-2 作为研究对象, 采用转化生长因子- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ,  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 诱导 LX-2 细胞活化构建肝纤维化细胞模型。通过 CCK-8 法检测不同体积分数 (2.5%、5.0%、10.0%、15.0%、20.0%) 加减三甲散含药血清对 LX-2 细胞活性的影响, 筛选最佳给药浓度。将 LX-2 细胞分为对照组 (20%空白血清)、模型 ( $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta 1$ ) 组、加减三甲散 (2.5%加减三甲散含药血清+ $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta 1$ ) 组、3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 组 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  3-MA+ $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta 1$ )、3-MA+加减三甲散含药血清组 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  3-MA+2.5%加减三甲散含药血清+ $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta 1$ ), 培养 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测 LX-2 细胞存活率; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、TGF- $\beta 1$ 、纤维连接蛋白 (FN) mRNA 表达情况; 采用 Western blotting 法检测自噬标志物 LC3 II/LC3 I、p62、Beclin-1、Atg5 蛋白表达情况; 采用免疫荧光法检测自噬蛋白 LC3B、 $\alpha$ -SMA、FN 荧光表达情况; MDC 染色检测各组细胞自噬活性情况; 透射电镜观察各组细胞的自噬小体形成情况。**结果** 加减三甲散含药血清对 LX2 细胞活性有抑制作用, 且浓度越高, 抑制效果越强, 选择 2.5%含药血清作为最佳干预浓度进行后续实验。与对照组比较, 模型组细胞活性显著增强 ( $P < 0.01$ ); LX-2 活化标记物  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta 1$ 、FN mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 自噬蛋白 LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5 表达显著增加, p62 表达显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 自噬活性增强, 自噬小体增多; LC3B、 $\alpha$ -SMA、FN 蛋白荧光表达强度显著增强 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 加减三甲散组、3-MA 组、3-MA+加减三甲散组细胞活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ), LX-2 活化标记物  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta 1$ 、FN mRNA 显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 自噬蛋白 LC3 II/LC3 I、Beclin-1、Atg5 显著降低, p62 显著增高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 自噬活性减弱, 自噬小体较少; LC3B、 $\alpha$ -SMA、FN 蛋白荧光表达强度显著降低 ( $P < 0.01$ ); 其中 3-MA+加减三甲散组干预效果最为明显。**结论** 加减三甲散可通过抑制自噬降低 LX-2 细胞活化发挥抗肝纤维化的效应。

**关键词:** 加减三甲散; 自噬; LX-2 细胞; 肝纤维化; 自噬小体

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)09-3087-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.09.010

## Inhibitory effect of modified Sanjia San on autophagy and reduction of activation of human hepatic stellate cell LX-2

WANG Long<sup>1,2</sup>, MA Li<sup>1,2</sup>, LI Guohua<sup>1</sup>, JIA Tingting<sup>1,3</sup>, ZHANG Xiaobo<sup>4</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

2. Key Laboratory of Dryness Syndrome in Chinese Medicine, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 7500043, China

3. Ningxia Hui Autonomous Region Traditional Chinese Medicine Hospital and Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750021, China

4. School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

收稿日期: 2026-03-23

**基金项目:** 宁夏自然科学基金资助项目 (2023AAC05040); 宁夏医科大学校级科研资助项目 (XT2022015); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目资助 (zyzdxk-2023209); 宁夏自然科学基金资助项目 (2023 AAC03210); 国家自然科学基金资助项目 (82305085)

**作者简介:** 王 龙, 医学博士, 副教授, 从事中医药治疗肝脏疾病的临床与基础研究。E-mail: 1102151604@qq.com

**\*通信作者:** 贾婷婷, 主治医师。E-mail: 519637578@qq.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of modified Sanjia San-containing serum on autophagy in human hepatic stellate cells (LX-2). **Methods** Human LX-2 cells were used as the research model, and a liver fibrosis cell model was established by activating LX-2 cells with transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) at 10 ng·mL<sup>-1</sup>. The effects of different concentrations (2.5%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%) of modified Sanjia San-containing serum on LX-2 cell viability were assessed using the CCK-8 assay to determine the optimal concentration. Cells were divided into five groups: Control group (20% blank serum), model group (10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1), modified Sanjia San group (2.5% modified Sanjia San-containing serum + 10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1), 3-MA group (0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 3-MA + 10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1), and 3-MA + modified Sanjia San group (0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 3-MA + 2.5% modified Sanjia San-containing serum + 10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta$ 1). After 48 h of culture, cell viability was measured by CCK-8 assay; mRNA expression levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), TGF- $\beta$ 1, and fibronectin (FN) were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR); Protein expression of autophagy markers LC3 II/LC3 I, p62, Beclin-1, and Atg5 was analyzed by Western blotting; fluorescence intensity of autophagy-related proteins LC3B,  $\alpha$ -SMA, and FN was evaluated by immunofluorescence; autophagic activity was assessed by MDC staining; and formation of autophagosomes was observed under transmission electron microscopy. **Results** Modified Sanjia San inhibited LX-2 cell viability, with higher concentrations showing stronger inhibition; Thus, 2.5% drug-containing serum was selected as the optimal intervention concentration for subsequent experiments. Compared with the control group, the model group showed significantly enhanced cell viability ( $P < 0.01$ ); mRNA levels of activation markers  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, and FN were significantly upregulated ( $P < 0.01$ ); Expression of autophagy-related proteins LC3 II/LC3 I, Beclin-1, and Atg5 increased significantly, while p62 expression decreased significantly ( $P < 0.05, 0.01$ ); Autophagic activity was enhanced, and more autophagosomes were observed; fluorescence intensities of LC3B,  $\alpha$ -SMA, and FN proteins were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, cell viability was significantly reduced in the modified Sanjia San group, 3-MA group, and 3-MA + modified Sanjia San group ( $P < 0.01$ ); mRNA levels of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, and FN were significantly downregulated ( $P < 0.05, 0.01$ ); Expression of LC3 II/LC3 I, Beclin-1, and Atg5 decreased significantly, while p62 expression increased significantly ( $P < 0.05, 0.01$ ); Autophagic activity was weakened, and fewer autophagosomes were observed; Fluorescence intensities of LC3B,  $\alpha$ -SMA, and FN proteins were significantly reduced ( $P < 0.01$ ); Among these, the 3-MA + modified Sanjia San group exhibited the most pronounced inhibitory effect. **Conclusion** Modified Sanjia San can exert anti liver fibrosis effects by inhibiting autophagy and reducing LX-2 cell activation.

**Key words:** modified Sanjia San; autophagy; LX-2 cells; liver fibrosis; autophagosome

肝纤维化是多种慢性肝病发展的共同病理基础,可通过多种途径最终发展为肝硬化、肝癌甚至肝衰竭,有效抑制肝纤维化这一关键阶段对于改善慢性肝病预后和降低病死率至关重要。肝星状细胞(HSC)的活化被认为是肝纤维化形成的中心事件<sup>[1-2]</sup>,当肝脏持续损伤时,邻近肝细胞通过旁分泌释放大量细胞因子,如转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 等,作用于HSC,HSC被诱导激活转化为肌成纤维细胞,并大量分泌、合成细胞外基质(ECM),ECM的生成与降解失衡,造成肝功能的损伤,最终导致肝纤维化的发生<sup>[3-4]</sup>。目前研究发现,自噬能诱导HSC活化,促进肝纤维化的形成,HSC可通过自噬消化细胞内的脂滴来维持能量供给,从而诱导自身的活化,促进肝纤维化的形成,抑制自噬能降低HSC活化,改善肝纤维化<sup>[5-6]</sup>。三甲散出自《温疫论》卷下,具有通络消瘀、清热养血之功效。加减三甲散是四川省名中医杨宇教授沿用多年的防治肝纤维化的临床常用方,具有活血通络、软

坚散结、益气养血的功效,契合肝纤维化“血瘀痰凝”病机。前期研究显示该方能够改善肝纤维化大鼠的症状、降低相关血清学指标和肝脏纤维化程度,改善大鼠肝功能,且初步发现其能影响相关自噬指标,但尚未明确是否通过抑制自噬发挥作用<sup>[7-9]</sup>。本研究旨在制备加减三甲散含药血清,联合自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA),探究其对TGF- $\beta$ 1诱导的人肝星状细胞(LX-2)纤维化的抑制作用,并使用透射电镜这一观察自噬的“金标准”明确加减三甲散对LX-2细胞自噬的调控效应。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级雄性4~6周龄SD大鼠20只,体质量180~220 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物使用许可证编号SYXK(ID)2023-0275,质量检测单位为苏州西山生物技术有限公司。大鼠饲养于宁夏医科大学实验动物中心,自由进食和饮水,饲养温度为24~26℃,相对湿度为(60±10)%,光照时间为昼夜明暗交替,实验动物

使用许可证编号 SCXK(京)2024-0003。本动物实验经宁夏医科大学实验动物伦理委员会审批,编号 IACUC-2025229。

## 1.2 细胞株

人肝星状细胞系 LX-2 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号 CL-0560,在宁夏医科大学教育部燥证重点实验室培养,用含 10%胎牛血清的完全培养基悬浮细胞,接种到培养皿中,培养箱 CO<sub>2</sub> 浓度控制在 5%左右,温度为 37 ℃,pH 值为 7.2~7.4。

## 1.3 药物与主要试剂

加减三甲散组成:鳖甲 15 g(批号 CM-B826013708)、僵蚕 10 g(批号 CM-A726012601)、土鳖虫 10 g(批号 CM-K326012602)、柴胡 5 g(批号 CM-T926012603)、桃仁 10 g(批号 CM-C526012604)、黄芪 15 g(批号 CM-P126012605)、当归 10 g(批号 CM-H82601260),购于宁夏明德中药饮片公司,由公司出具合格报告,各药材质量控制均依据《中国药典》2025 年版,黄芪中黄芪甲苷 $\geq 0.08\%$ 、柴胡皂苷总量 $\geq 0.30\%$ ;当归中阿魏酸 $\geq 0.05\%$ ;桃仁中苦杏仁苷 $\geq 2.0\%$ ;虫类药材以浸出物、游离氨基酸综合质控。药液制备方法如下:饮片加 3 倍量蒸馏水浸泡 30 min,煎煮 0.5 h,收集滤液;药渣再加 2 倍量蒸馏水,继续煎煮 0.5 h,合并 2 次煎煮所得药液,滤过后置于恒温水浴中浓缩,制成含生药质量浓度为  $0.38\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的药液,该提取工艺下水溶性总浸出提取率为 27%~29%,经灭菌后置于 4 ℃冰箱内保存备用。3-MA(美国 MCE 公司,货号 HY-19312);Recombinant Human TGF- $\beta$ 1(苏州近岸蛋白公司,货号 CA59);CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(BIOSHARP 生物科技有限公司,货号 BS350B);动物总 RNA 提取试剂盒(成都 Foregene 公司,货号 RE-03014);引物(上海生工生物工程股份有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(biosharp 公司,货号 BL521A);丙酮(成都市科隆化学品有限公司,货号 2023120501);GAPDH Antibody(Affinity 公司,货号 AF7021);EvaGreen Express 2 $\times$ qPCR MasterMix-No Dye(货号 MasterMix-ES)、5 $\times$ All-In-One MasterMix(货号 G492),Abm 公司;山羊抗兔二抗-HRP(货号 GAR0072)、山羊抗鼠二抗-HRP(货号 GAM0072),MULTI SCIENCES 公司;组蛋白 H3 单克隆抗体(Immunoway 公司,货号 YM3038);MDC 染色试

剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号 mls-1552)。

## 1.4 主要仪器

D3024R 台式高速冷冻型微型离心机(美国 SCILOGEX 公司);SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统(上海宏石医疗科技有限公司);荧光定量 PCR 仪(BIORAD 公司);MX-S 涡旋混合器(美国 SCILOGEX 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad Laboratories);HT7800 透射电子显微镜(日立公司);UC7 超薄切片机(德国 Leica 公司);D3024R 离心机(美国 SCILOGEX 公司);MCO-18AC CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(PHC 株式会社);M152-N 倒置显微镜(广州明美光电科技有限公司);MQX200 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司)。

## 2 方法

### 2.1 加减三甲散含药血清制备

SPF 级雄性 4~6 周龄 SD 大鼠 20 只,体质量 180~220 g。适应性喂养 1 周后,随机分为 2 组,每组 10 只,分别为空白血清组和加减三甲散血清组。加减三甲散血清组按照生药剂量  $7.8125\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药,空白血清组 ig 给予等体积 0.9%氯化钠溶液,每天给药 1 次,连续给药 7 d 后,ip 1%戊巴比妥钠实施麻醉,通过腹主动脉采集全血,将血液样本在室温静置 2 h 后,离心 15 min,分离血清,后经 56 ℃水浴灭活 30 min,再在超净台上采用微孔滤膜滤过以除菌,分装后保存于-80 ℃超低温冰箱备用。

### 2.2 细胞培养

将 LX2 细胞接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,置于 5%CO<sub>2</sub>、37 ℃恒温以及饱和湿度环境中进行培养,每 3 天传代 1 次,取对数生长期细胞传代处理以备后续使用。

### 2.3 预实验筛选含药血清干预体积分数

将 LX-2 细胞以每孔  $5\times 10^3$  个的密度铺板接种于 96 孔板中,分别设置 2.5%、5.0%、10.0%、15.0%、20.0%体积分数的加减三甲散含药血清组、空白血清组,对照组不加药。使用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖,用酶标仪在 450 nm 条件下测定吸光度(A)值。计算细胞存活率,明确加减三甲散含药血清的最佳干预体积分数。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.4 细胞分组及干预

无血清培养 LX2 细胞 24 h,采用重组人 TGF- $\beta$ 1



10 ng·mL<sup>-1</sup> 诱导 LX2 细胞 24 h 后<sup>[10]</sup>, 将细胞分为 5 组: 对照组 (2.5%空白血清)、模型组 (10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF-β1)、加减三甲散组 (2.5%加减三甲散含药血清+10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF-β1)、3-MA (0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 3-MA+10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF-β1) 组、3-MA+加减三甲散含药血清 (0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 3-MA+2.5%加减三甲散含药血清+10 ng·mL<sup>-1</sup> TGF-β1) 组, 加 3-MA 的组别先用 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 3-MA 干预 24 h 后再加入 TGF-β1 诱导 LX2 活化并加药。

## 2.5 CCK-8 法检测各药物作用后的细胞活性

取处于对数生长期、生长状态良好的细胞, 每孔 5×10<sup>3</sup> 个接种于 96 孔板中, 细胞贴壁后, 按照“2.4”项分组方法干预处理, 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖, 计算细胞存活率。

## 2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)、TGF-β、纤维连接蛋白 (FN) mRNA 表达情况

取对数生长期 LX-2 细胞, 调整细胞悬液浓度, 以每孔 2.5×10<sup>5</sup> 个的密度接种于 6 孔细胞培养板; 细胞贴壁后按照“2.4”项方法分组完成给药干预, 各组持续培养 48 h 后弃培养基, 预冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 2 次, 收集细胞沉淀用于总 RNA 提取。总 RNA 抽提: 取细胞样本, 加入 Buffer RL1 进行匀浆, 离心后取上清液, 上清中加入 800 μL 的 Buffer RL2, 混匀后离心 1 min, 核酸分析仪检测 RNA 浓度及纯度。后续进行反转录和定量 PCR 检测, qRT-PCR 仪设置反应时间和温度: 预变性 95 °C 5 min, 变性 95 °C 10 s, 退火延伸 60 °C 30 s, 共循环 40 次, 融解曲线 60 °C 升至 95 °C, 每 15 秒升温 0.3 °C。各组以 GAPDH 为内参, 数据的相对定量分析使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法。引物序列通过 NCBI 数据库获取, 随后运用 primer5 软件设计引物, 由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

| 引物     | 引物序列 (5'→3')               | 长度/ bp |
|--------|----------------------------|--------|
| GAPDH  | F-GGAGCGAGATCCCTCCAAAT     | 197    |
|        | R-GGCTGTGTGTCATACTTCTCATGG | 197    |
| α-SMA  | F-TAGCACCCAGCACCATGAAG     | 104    |
|        | R-CTGCTGGAAGGTGGACAGAG     | 104    |
| TGF-β1 | F-GGAAATTGAGGGCTTTCGCC     | 85     |
|        | R-AGTGAACCCGTTGATGTCCA     | 85     |
| FN     | F-TCAGCTTCTCGGCACTTCTG     | 147    |
|        | R-TCTTGTCTACATTCGGCGG      | 147    |

## 2.7 Western blotting 检测自噬标志物 LC3 II/LC3 I、P62、Beclin-1、Atg5 蛋白表达情况

取对数生长期 LX-2 细胞, 以每孔 2.5×10<sup>5</sup> 个接种于 6 孔板, 培养 24 h 后无血清饥饿 24 h, 按“2.4”项方法分组进行药物干预, 各组共培养 48 h。离心收集细胞, 加入适当体积的 RIPA 裂解液, 冰浴, 离心后, 收集上清, 提取总蛋白。按相对分子质量分离蛋白, 加足够的电泳液上样电泳。将蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜, 湿转转膜 0.5 h。用 5% 脱脂牛奶或 BSA 封闭非特异性结合位点, 室温 1 h。抗体孵育: 一抗 4 °C 过夜、二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜。化学发光法显影, ECL 试剂孵育后成像系统采集信号, Image J 软件进行灰度分析。

## 2.8 免疫荧光检测微管关联蛋白 1 轻链 3β (LC3B)、α-SMA、FN 荧光表达情况

取对数生长期 LX-2 细胞, 以每孔 2.5×10<sup>5</sup> 个接种于铺有无菌盖玻片的 6 孔板, 常规培养 24 h 后无血清饥饿 24 h, 按照“2.4”项方法分组给药干预 48 h。将细胞接种于含盖玻片的培养皿中, 培养至融合度达 95%~100%。用 4% 多聚甲醛固定 20~30 min, 再用 0.2% Triton X-100 透化 2~5 min。用 5% BSA 封闭 30 min, 加一抗 (如 G3BP1 抗体) 4 °C 过夜, 再加荧光标记二抗室温避光孵育 30~60 min。用 95% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。对每张照片进行分析得出阳性的累积吸光度 (A) 值以及像素面积, 并求出平均 A 值, 平均 A 值越大, 表明阳性表达水平越高。

## 2.9 MDC 染色检测细胞自噬情况

取对数生长期 LX-2 细胞, 以每孔 2.5×10<sup>5</sup> 个的密度接种于 6 孔板, 培养 24 h 后无血清饥饿 24 h, 按照“2.4”项方法分组给药干预 48 h。弃培养基, PBS 洗涤细胞, 将 MDC 染料加入培养细胞中, 孵育 10~20 min。用 PBS 清洗后, 立即在荧光显微镜下观察自噬体形成的点状荧光。

## 2.10 透射电镜观察不同组别细胞的自噬小体情况

取对数生长期 LX-2 细胞, 以每孔 2.5×10<sup>5</sup> 个的密度接种于 6 孔板, 培养 24 h 后无血清饥饿 24 h, 按照“2.4”项方法分组给药干预 48 h。弃培养液, 收集各组细胞, 细胞经 2% 多聚甲醛-2.5% 戊二醛预固定。标本脱水、浸胶、聚合包埋, 包埋块以 0.8 μm 厚度行半薄切片, 甲苯胺蓝染色, 光镜下观察定位, 选取细胞密度较均匀的区域。以 90 nm 厚度行超薄切片, 裱贴于 200 目方华膜铜网。超薄切片载网在

透射电子显微镜上成像、采图。

### 2.11 统计学方法

采用 GraphPad 9.0 软件进行统计学分析, 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。

## 3 结果

### 3.1 CCK-8 法确定加减三甲散含药血清的最佳干预体积分数

如表 2 所示, 加减三甲散含药血清组的细胞活性随体积分数增加下降, 而空白血清组的变化相对平缓, 波动较小, 表明加减三甲散对 LX2 细胞活性有抑制作用, 且浓度越高, 抑制效果越强。2.5%含药血清组细胞活性为  $(97.39 \pm 3.07)\%$ , 抑制率 2.61%, 无明显细胞毒性; 5%及以上浓度抑制率升

表 2 各体积分数加减三甲散含药血清对细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| Table 2 Effect of various volume fractions of modified Sanjia San-containing serum on cell viability ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ) |        |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------|
| 组别                                                                                                                            | 体积分数/% | 细胞存活率/%           |
| 对照                                                                                                                            | —      | 100.00 $\pm$ 3.93 |
|                                                                                                                               | 2.5    | 99.33 $\pm$ 1.56  |
|                                                                                                                               | 5.0    | 98.68 $\pm$ 1.62  |
|                                                                                                                               | 10.0   | 99.39 $\pm$ 2.78  |
|                                                                                                                               | 15.0   | 98.70 $\pm$ 1.30  |
| 含药血清                                                                                                                          | 20.0   | 99.59 $\pm$ 2.45  |
|                                                                                                                               | 2.5    | 97.39 $\pm$ 3.07  |
|                                                                                                                               | 5.0    | 94.38 $\pm$ 1.57  |
|                                                                                                                               | 10.0   | 92.67 $\pm$ 2.48  |
|                                                                                                                               | 15.0   | 91.83 $\pm$ 2.18  |
|                                                                                                                               | 20.0   | 89.23 $\pm$ 4.47  |

表 4 各组  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、FN mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Expression of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, and FN mRNA in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别         | 剂量                            | $\alpha$ -SMA/GAPDH           | TGF- $\beta$ 1/GAPDH          | FN/GAPDH                      |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照         | —                             | 1.06 $\pm$ 0.05               | 1.08 $\pm$ 0.09               | 1.05 $\pm$ 0.08               |
| 模型         | —                             | 6.39 $\pm$ 0.10**             | 5.98 $\pm$ 0.07**             | 5.44 $\pm$ 0.11**             |
| 加减三甲散      | 2.5%                          | 3.10 $\pm$ 0.16 <sup>#</sup>  | 3.10 $\pm$ 0.22 <sup>#</sup>  | 2.89 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>  |
| 3-MA       | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup>       | 3.73 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>  | 3.92 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup> | 3.59 $\pm$ 0.31 <sup>#</sup>  |
| 3-MA+加减三甲散 | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup> +2.5% | 1.58 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup> | 1.64 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup> | 1.53 $\pm$ 0.11 <sup>##</sup> |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs model group.

### 3.4 Western blotting 检测自噬标志物 LC3 II/LC3 I、p62、Beclin-1、Atg5 蛋白表达情况

与对照组相较, 模型组自噬蛋白 LC3 II/LC3

高, 存在一定风险。同时预试验结果显示 1%体积分数无明显调控效应, 综合考虑, 选择 2.5%作为最佳干预体积分数。

### 3.2 CCK-8 法检测加减三甲散对活化 LX2 细胞活性的影响

与对照组比较, 模型组 LX2 细胞存活率显著增强 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 加减三甲散组、3-MA 组、3-MA+加减三甲散组的 LX2 细胞活性均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 其中 3-MA+加减三甲散组最为显著。见表 3。

### 3.3 qRT-PCR 法观察 HSC 活化指标 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、FN mRNA 表达

与对照组比较, 模型组  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、FN mRNA 表达显著增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 加减三甲散组、3-MA、3-MA+加减三甲散组的  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、FN mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 其中 3-MA+加减三甲散组最为明显, 见表 4。

表 3 加减三甲散对活化 LX2 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of modified Sanjia San on activity of activated LX2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别         | 剂量                            | 细胞存活率/%                         |
|------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 对照         | —                             | 100.00 $\pm$ 2.04               |
| 模型         | —                             | 115.53 $\pm$ 4.03**             |
| 加减三甲散      | 2.5%                          | 107.66 $\pm$ 5.43 <sup>##</sup> |
| 3-MA       | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup>       | 95.16 $\pm$ 3.12 <sup>##</sup>  |
| 3-MA+加减三甲散 | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup> +2.5% | 87.92 $\pm$ 3.65 <sup>##</sup>  |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs model group.

I、Beclin-1、Atg5 表达显著增高, p62 表达显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 加减三甲散组、3-MA 组、3-MA+加减三甲散组自噬蛋白 LC3

II/LC3 I、Beclin-1、Atg5 表达显著降低, p62 表达显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 其中 3-MA+加減三甲散组最为明显。结果见图 1、表 5。

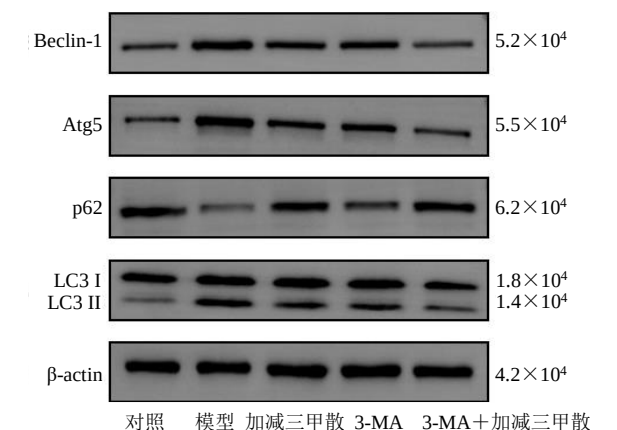


图 1 各组 LC3 II/LC3 I、p62、Beclin-1、Atg5 蛋白表达  
Fig. 1 Expression of LC3 II/LC3 I, p62, Beclin-1, and Atg5 proteins in each group

表 5 各组 LC3 II/LC3 I、p62、Beclin-1、Atg5 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 5 Expression of LC3 II/LC3 I, P62, Beclin-1, and Atg5 proteins in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | 剂量                            | LC3 II/LC3 I | p62/β-actin  | Beclin-1/β-actin | Atg5/β-actin |
|------------|-------------------------------|--------------|--------------|------------------|--------------|
| 对照         | —                             | 0.38±0.04    | 0.49±0.04    | 0.67±0.06        | 0.72±0.15    |
| 模型         | —                             | 0.96±0.17*   | 0.19±0.01**  | 1.65±0.21**      | 2.10±0.03**  |
| 加減三甲散      | 2.5%                          | 0.51±0.23#   | 0.32±0.01#   | 1.05±0.21#       | 1.17±0.04### |
| 3-MA       | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup>       | 0.69±0.22 #  | 0.25±0.01#   | 1.16±0.15#       | 1.30±0.07##  |
| 3-MA+加減三甲散 | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup> +2.5% | 0.44±0.10 #  | 0.36±0.04### | 0.72±0.01###     | 0.80±0.07### |

与对照组比较: \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: # $P<0.05$  ## $P<0.01$ 。  
\*\* $P<0.01$  vs control group; # $P<0.05$  ## $P<0.01$  vs model group.

表 6 各组 LC3B、α-SMA、FN 蛋白荧光表达情况  
Table 6 Fluorescence expression of LC3B, α-SMA, and FN proteins in each group

| 组别         | 剂量                            | 平均A值         |              |              |
|------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|            |                               | LC3B         | α-SMA        | FN           |
| 对照         | —                             | 1.93±0.22    | 3.67±0.71    | 2.53±0.42    |
| 模型         | —                             | 10.08±0.29** | 20.35±2.20** | 11.85±0.88** |
| 加減三甲散      | 2.5%                          | 4.96±0.27### | 9.83±1.04### | 6.63±0.37### |
| 3-MA       | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup>       | 6.74±0.35### | 12.51±1.16## | 8.01±0.43### |
| 3-MA+加減三甲散 | 0.5 mg·mL <sup>-1</sup> +2.5% | 2.79±0.25### | 4.60±0.51### | 3.69±0.27### |

与对照组比较: \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: # $P<0.05$  ## $P<0.01$ 。  
\*\* $P<0.01$  vs control group; # $P<0.05$  ## $P<0.01$  vs model group.

3.6 透射电镜观察不同组别细胞的自噬小体情况  
电镜结果显示 (图 6), 对照组细胞超微结构基本正常, 线粒体内外膜完整, 自噬少见。模型组细胞超微结构异常, 可见正常线粒体, 胞质内普遍含有大量自噬溶酶体, 部分自噬体内可见尚未消化完

### 3.5 免疫荧光检测 LC3B、α-SMA、FN 荧光表达情况

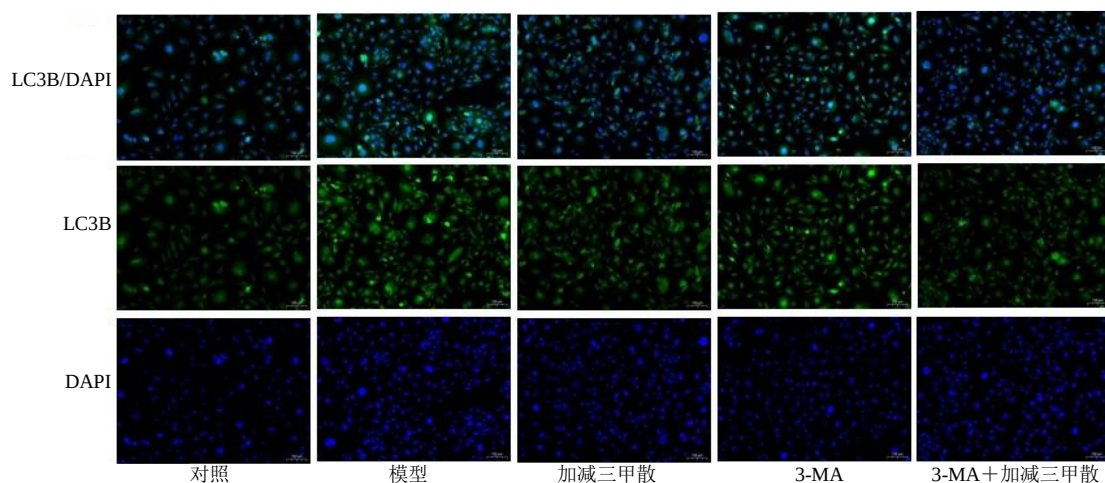
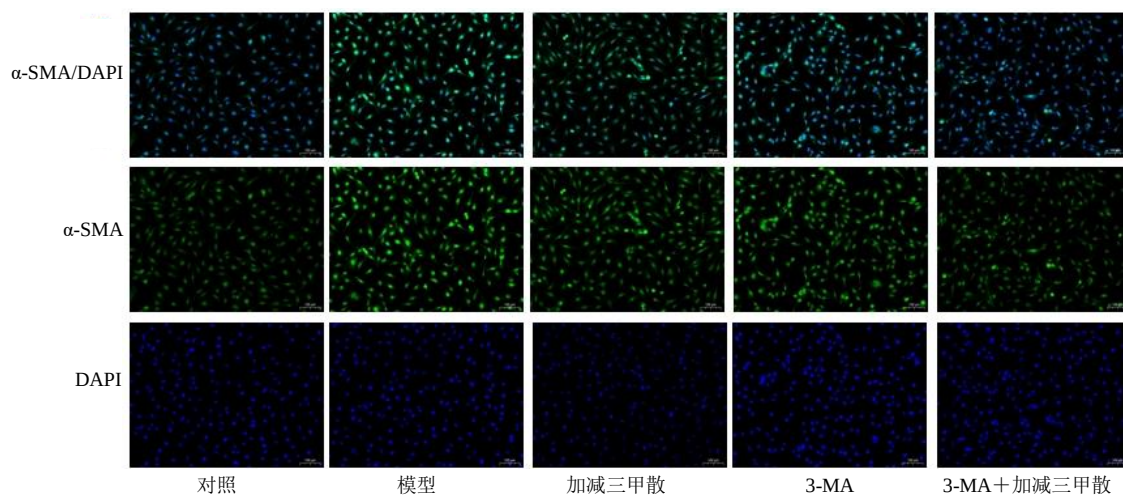
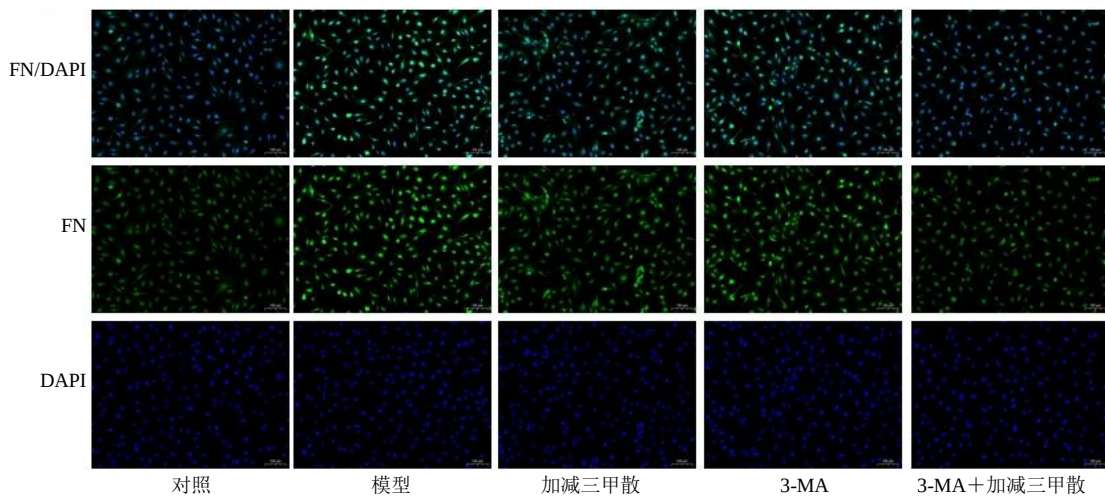
与对照组比较, 模型组 LC3B、α-SMA、FN 蛋白荧光表达强度显著增强 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 加減三甲散组、3-MA 组、3-MA+加減三甲散组 LC3B、α-SMA、FN 蛋白荧光表达强度显著降低 ( $P<0.01$ ), 其中 3-MA+加減三甲散组降低效果最为明显。结果见表 6 和图 2~4。

### 3.6 MDC 染色检测细胞自噬情况

细胞自噬染色检测结果显示, 对照组绿色荧光呈点状分布, 自噬活性低; 模型组的绿色荧光点状聚集显著增多, 自噬小体数量明显增多, 自噬活性明显升高。加減三甲散组和 3-MA 组绿色荧光点状聚集减少, 自噬活性较模型组降低; 3-MA+加減三甲散组绿色荧光点状聚集明显减少, 自噬活性较 3-MA 组和加減三甲散组降低。结果见图 5。

全的线粒体残余结构。加減三甲散组和 3-MA 组细胞超微结构轻度异常, 可见正常线粒体, 部分细胞内自噬溶酶体数量较多, 部分自噬体内可见尚未消化完全的线粒体残余结构。3-MA+加減三甲散组细胞超微结构基本正常, 部分细胞内偶见自噬溶酶体。



图 2 各组自噬标志物 LC3B 的免疫荧光分析 ( $\times 1\,000$ )Fig. 2 Immunofluorescence analysis of autophagy marker LC3B in each group ( $\times 1\,000$ )图 3 各组 HSC 活化标志物  $\alpha$ -SMA 的免疫荧光分析 ( $\times 1\,000$ )Fig. 3 Immunofluorescence analysis of  $\alpha$ -SMA, a marker of HSC activation, in each group ( $\times 1\,000$ )图 4 各组 HSC 活化标志物 FN 的免疫荧光分析 ( $\times 1\,000$ )Fig. 4 Immunofluorescence analysis of HSC activation marker FN in each group ( $\times 1\,000$ )

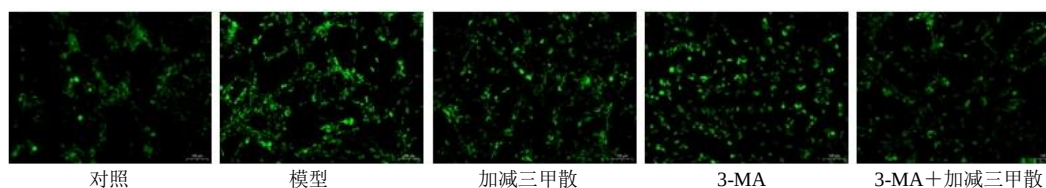
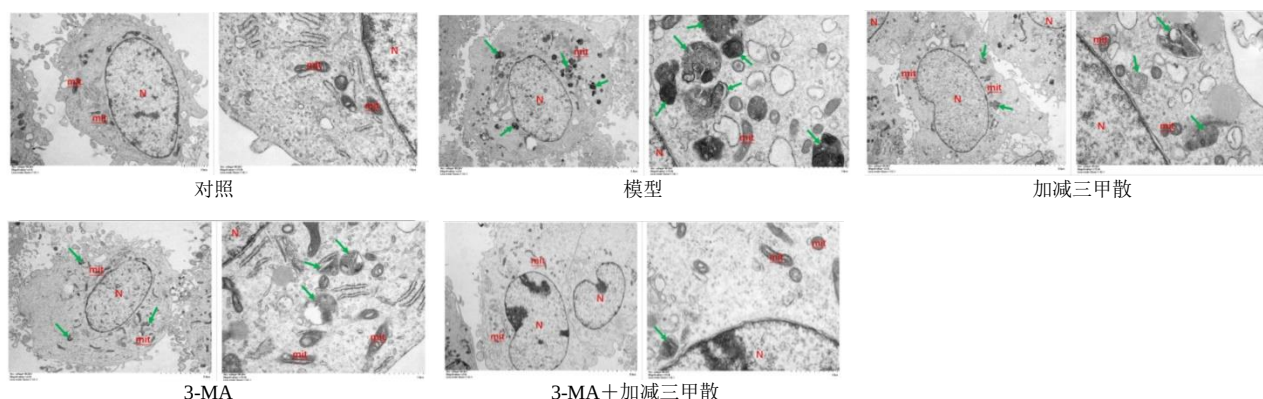


图 5 MDC 染色检测各组 LX2 细胞自噬情况 (×1 000)

Fig. 5 MDC staining detection of autophagy in LX2 cells of each group (×1 000)



每组左图放大倍数为×4 000; 右图放大倍数为×8 000; N-细胞核; mit-线粒体; 绿色箭头-自噬溶酶体。

Magnification of the left image in each group is ×4 000; the magnification of the right image is ×8 000; N-nucleus; mit-mitochondria; green arrow-autophagolysosome.

图 6 透射电镜观察各组 LX-2 细胞自噬小体形态

Fig. 6 Transmission electron microscopy observation of autophagosomes in different groups of cells

#### 4 讨论

自噬是发生在细胞的正常生理过程, 是一种调节细胞内外环境稳态的重要方式<sup>[11]</sup>。广义理解为自噬是细胞的自我吞噬过程, 其原理是细胞通过自噬体与溶酶体融合形成的自噬溶酶体降解受损细胞器和一些老化的蛋白质等大分子物质, 进而维持细胞内代谢平衡的过程, 并为细胞提供物质和能量来源, 对细胞发育、分化和稳态至关重要<sup>[12-14]</sup>。多项研究表明, HSC 可通过自噬消化细胞内的脂滴来维持能量供给, 从而诱导自身的活化, 促进肝纤维化的形成, 抑制自噬能降低 HSC 活化, 改善肝纤维化<sup>[15-17]</sup>。特异性敲除自噬基因 *ATG7*,  $\text{CCl}_4$  诱导的肝纤维化程度降低且 ECM 的沉积减少<sup>[18]</sup>。采用自噬抑制剂巴洛霉素处理 HSC, 可降低 HSC 活化标记物的表达<sup>[19]</sup>。此外, 3-MA 诱导的自噬抑制作用可以使体外培养的 HSC-T6 细胞 (SD 大鼠 HSC 系) 的  $\text{G}_2$  期发生阻滞, 进而抑制 HSC-T6 细胞的增殖, 表明自噬是 HSC 增殖、活化所必需的条件<sup>[20]</sup>。使用成熟的脂肪细胞作用于 HSC, 结果发现 HSC 中的自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3II 显著增高, 产生的  $\alpha\text{-SMA}$ 、

I 型胶原蛋白明显增多, 表明 HSC 发生自噬促进了肝纤维化的进一步发生、发展<sup>[21]</sup>。以上研究均提示, 自噬能促进 HSC 活化, 加剧肝纤维化的形成, 而抑制自噬可改善肝纤维化的病理程度。

中医临床对肝纤维化以“肝积”“胁痛”等为辨治范畴<sup>[22]</sup>。肝纤维化病程迁延, 病机错综复杂, 属“久病入络”之痼疾, 其病机关键在于痰瘀阻滞肝络, 为学界所公认, 其辨治多以络病立论, 其治法以化瘀通络、软坚散结为主。加減三甲散是四川省名中医杨宇教授沿用多年的防治肝纤维化的临床常用方, 其功专于活血化瘀, 搜剔通络、化痰散结兼以扶正祛邪, 专为“久病入络”之痼疾而设。其组成中鳖甲取于蠕动之物, 具有蠕动之性, 能深入肝经至阴之分, 既可破血逐瘀、入络搜邪, 又能滋阴养血、软坚散结。地鳖虫、僵蚕等虫药的运用, 深谙仲景虫药通络之法, “仲景其通络方法, 每取虫蚁迅速飞走诸灵, 俾飞者升, 走者降, 血无凝著, 气可宣通”, 功专“搜剔络中混处之邪”。大量的临床和实验研究已证实, 虫药通络已成为络病治疗不可或缺的重要方法<sup>[23-24]</sup>。在继承虫药搜剔通络之法



的同时,妙用辛散透邪之柴胡,柴胡升散开泄、宣畅气机,使客邪随气血津液而外达于表。加用桃仁泥引药入血,桃仁为厥阴血分之主药,辛润开泄,化瘀通络。黄芪、当归扶正去邪,益气回阳,补血活血。本方刚柔并济,针对肝纤维化的关键病机发挥作用。

本研究结果显示加减三甲散含药血清能抑制自噬降低 LX2 细胞的活化,验证了加减三甲散的效应机制。前期研究采用大鼠来源的 HSC-T6 细胞进行过研究,本实验采用人源性 LX2 细胞,更贴近人类肝病病理机制。3-MA 自噬抑制剂是自噬研究中常用的抑制剂,它通过抑制 III 型 PI3K (VPS34) 来阻断自噬体的形成,从而抑制自噬过程<sup>[25]</sup>,在肝纤维化中,3-MA 通过调节 TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路,阻断自噬以发挥保护作用<sup>[26]</sup>。HSC 活化是肝纤维化发生的中心事件,TGF- $\beta$ 1 是已知最强的 HSC 活化因子和促纤维化细胞因子,它能诱导 HSC 表达  $\alpha$ -SMA、I 型和 III 型胶原等,同时抑制其降解酶——基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达,促进纤维化的持续进展<sup>[27-28]</sup>。在肝纤维化早期,TGF- $\beta$ 1 主要由活化的库普弗细胞和血小板释放,在慢性阶段,活化的 HSC 自身会分泌 TGF- $\beta$ 1,形成自分泌正反馈环路,使活化状态持续<sup>[29]</sup>。 $\alpha$ -SMA 是 HSC 活化的关键标志,是评估肝纤维化活动程度的金标准之一<sup>[30]</sup>。FN 是 ECM 的重要糖蛋白,在肝纤维化早期大量沉积<sup>[31]</sup>。活化的 HSC 会大量表达 FN,而沉积的 FN 又能反过来促进 HSC 的进一步活化和  $\alpha$ -SMA 的表达,形成正反馈<sup>[32]</sup>。本研究结果显示 TGF- $\beta$ 1 诱导 LX2 细胞活化后,TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、FN 的表达显著增多,而加减三甲散含药血清和自噬抑制剂 3-MA 能逆转这一改变,且二者具有协同作用,共同降低了 LX2 细胞的活化和增殖。LC3B 是 LC3 蛋白的一种,它在自噬过程中会从 LC3I 形式,结合到自噬小泡膜上而成 LC3 II 形式,LC3 II/LC3 I 比值是衡量 HSC 自噬活性的关键指标,比值升高通常代表自噬流增强<sup>[33-34]</sup>。P62 是自噬的底物与标志物,在自噬过程中,p62 会与泛素化的底物结合,引导其进入自噬体进行降解,自身也会被一同降解<sup>[35]</sup>。因此,p62 水平的升高通常意味着自噬流受阻。ATG5 是自噬体形成与膜扩展的关键执行者,其脂化修饰是自噬体成熟的关键步骤<sup>[36]</sup>。Beclin-1 是自噬体形成所必需的,它直接决定了自噬的启动和降解效率,其表达水平与自噬活性呈正相关<sup>[37]</sup>。MDC 染色是

检测自噬的常用方法,它能直观显示自噬体形成,染色后可见绿色荧光点状结构,反映自噬体数量。透射电镜是自噬研究的“金标准”,能直接观察自噬体的超微结构,精准判断自噬状态。本研究模型组中 Beclin-1、ATG5、LC3 II/LC3 I 值呈现出高表达,p62 低表达现象,MDC 染色、透射电镜显示自噬活性增强,自噬小体增多,说明在 LX2 细胞模型中自噬被过度激活,而加减三甲散含药血清和自噬抑制剂 3-MA 可以降低 Beclin1、ATG5、LC3 II/LC3 I 的表达和升高 p62 的表达,降低自噬活性,减少自噬小体,抑制 LX2 细胞的过度自噬,从而抑制 LX2 细胞的活化,发挥抗肝纤维化的效应。

本实验验证了加减三甲散通过抑制 LX2 细胞的自噬,降低 LX2 细胞的活化,从分子角度进一步证明了临床有效方加减三甲散治疗肝纤维化的可能机制与潜在靶点,但加减三甲散如何抑制 HSC 的自噬还有待进一步的探索。目前研究发现,调控 HSC 自噬的上游机制包括 SHP/FoxO3 信号通路、Nrf2-Keap1-ARE 信号通路、肝细胞来源的细胞外囊泡、Wnt 信号通路、Notch 信号通路等,且自噬与凋亡、铁死亡等存在密切的关系<sup>[38-40]</sup>。因而,后续将进一步进行体内外实验探究加减三甲散抑制自噬抗肝纤维化的效应机制。本研究暂未开展体内动物实验。后续将构建 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化模型,在体内验证加减三甲散对肝纤维化病理、HSC 活化及自噬通路的调控作用,完善体内外一致性证据,深入阐释其整体效应机制。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Gao J H, Wei B, de Assuncao T M, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis [J]. J Hepatol, 2020, 73(5): 1144-1154.
- [2] Yuan Y, Li J X, Chen M, et al. Nano-encapsulation of drugs to target hepatic stellate cells: Toward precision treatments of liver fibrosis [J]. J Control Release, 2024, 376: 318-336.
- [3] Sharma S, Prathigudupu V, Cable C, et al. Resolving fibrosis by stimulating HSC-dependent extracellular matrix degradation [J]. Sci Transl Med, 2025, 17(813): eads9470.
- [4] Shamsan E, Almezgagi M, Gamah M, et al. The role of PI3k/AKT signaling pathway in attenuating liver fibrosis: A comprehensive review [J]. Front Med, 2024, 11:

- 1389329.
- [5] Zhang Y Q, Hua L P, Lin C F, et al. Pien-Tze-Huang alleviates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis through the inhibition of HSC autophagy and the TGF- $\beta$ 1/Smad2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 937484.
- [6] Jie L, Hong R T, Zhang Y J, et al. Melatonin alleviates liver fibrosis by inhibiting autophagy [J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42(3): 498-504.
- [7] 徐由立, 王宝家, 周文亮, 等. 加减三甲散对肝纤维化模型大鼠微血管生成和血管活性调节因子表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(5): 1059-1062.  
Xu Y L, Wang B J, Zhou W L, et al. Effects of modified Sanjia Powder on pathological angiogenesis and expressions of vaso-activating regulating factors in liver fibrosis model rats [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2018, 45(5): 1059-1062.
- [8] 牟德英, 郑秀丽, 杨宇, 等. 加减三甲散对肝纤维化大鼠 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(4): 801-804, 后插 3.  
Mou D Y, Zheng X L, Yang Y, et al. Influence of modified Sanjia Powder on balance of Th17/treg in rats with hepatic fibrosis [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(4): 801-804, 后插 3.
- [9] 王龙. 基于“主客交”理论的薛氏三甲散调控 HSCs 自噬抗肝纤维化的分子机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.  
Wang L. Molecular mechanism study on the autophagy regulation of HSCs against liver fibrosis by Xue's Sanjia Powder based on the “interaction between host and guest” theory [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [10] 陆倩, 张金娟, 蒋先慧, 等. 木犀草素、欧当归内酯 A 和黄芪皂苷 I 单用及联用对人肝星状细胞株 LX-2 增殖、活化的影响 [J]. *贵州医科大学学报*, 2024, 49(2): 198-204.  
Lu Q, Zhang J J, Jiang X H, et al. Effect of luteolin, levistilide A, and astragaloside I on the proliferation and activation of hepatic stellate cell line LX-2 by single and combined administration [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2024, 49(2): 198-204.
- [11] Liu S Z, Yao S J, Yang H, et al. Autophagy: Regulator of cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 648.
- [12] Li X H, He S K, Ma B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- [13] Lamark T, Johansen T. Mechanisms of selective autophagy [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2021, 37: 143-169.
- [14] Rangel M, Kong J, Bhatt V, et al. Autophagy and tumorigenesis [J]. *FEBS J*, 2022, 289(22): 7177-7198.
- [15] Li J H, Deng X L, Wang S H, et al. Resolvin D1 attenuates CCl<sub>4</sub> Induced Liver Fibrosis by Inhibiting Autophagy-Mediated HSC activation via AKT/mTOR Pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 792414.
- [16] Wang S L, Sun M X, Tang M, et al. Aspirin attenuates liver fibrosis via autophagy induction [J]. *J Cell Mol Med*, 2025, 29(13): e70696.
- [17] Du Y K, Zhu S L, Zeng H J, et al. Research progress on the effect of autophagy and exosomes on liver fibrosis [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2024, 19(6): 785-797.
- [18] Cheng W Y, Zeng X X, Cheng P, et al. Loureirin B ameliorates cholestatic liver fibrosis via AKT/mTOR/ATG7-mediated autophagy of hepatic stellate cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 971: 176552.
- [19] Siapoush S, Rezaei R, Alavifard H, et al. Therapeutic implications of targeting autophagy and TGF- $\beta$  crosstalk for the treatment of liver fibrosis [J]. *Life Sci*, 2023, 329: 121894.
- [20] Zhang X L, Chen Z N, Huang Q F, et al. Methyl helicterate inhibits hepatic stellate cell activation through modulation of apoptosis and autophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 897-908.
- [21] Liu Y J, Wu X L, Wang Y, et al. Endoplasmic reticulum stress and autophagy are involved in adipocyte-induced fibrosis in hepatic stellate cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(6): 2527-2538.
- [22] 胡敏, 郑秀丽, 王宝家, 等. “柴胡-鳖甲”治疗肝纤维化的作用机制研究进展 [J/OL]. *中华中医药学刊*, 1-15. (2026-01-16) [2026-02-23]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20260116.0941.010>.  
Hu M, Zheng X L, Wang B J, et al. “Progress in the study of the mechanism of action of ‘Bupleurum-Biejia’ in the treatment of liver fibrosis” [J/OL]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 1-15. (2026-01-16) [2026-02-23]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20260116.0941.010>.
- [23] 王冬艳, 唐可清. 虫蚁通络法治疗微血管性心绞痛 [J]. *河南中医*, 2024, 44(10): 1532-1536.  
Wang D Y, Tang K Q. Insect-ant-collateral-unblocking method for treating microvascular angina [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2024, 44(10): 1532-1536.
- [24] 潘赐明, 王诗琪, 张书涵, 等. 叶天士通络法治疗痹症特色用药规律研究 [J]. *四川中医*, 2024, 42(8): 73-81.  
Pan C M, Wang S Q, Zhang S H, et al. Research on the characteristic medication rules of Ye Tianshi Tongluo method for treating rheumatism [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2024, 42(8): 73-81.
- [25] Kang J, Chen J Z, Dong Z M, et al. The negative effect of

- the PI3K inhibitor 3-methyladenine on planarian regeneration via the autophagy signalling pathway [J]. *Ecotoxicology*, 2021, 30(9): 1941-1948.
- [26] 惠瑜, 任丽娟, 朱鹏银, 等. 3-甲基腺嘌呤通过 NF- $\kappa$ B/BCL-2 通路调控肝星状细胞自噬与凋亡的实验研究 [J]. *热带医学杂志*, 2026, 26(1): 23-28.
- Hui Y, Ren L J, Zhu P Y, et al. Experimental study on the regulation of autophagy and apoptosis in hepatic stellate cells by 3-methyladenine via the NF- $\kappa$ B/BCL-2 pathway [J]. *J Trop Med*, 2026, 26(1): 23-28.
- [27] Yu F J, Yang J H, Huang K T, et al. The epigenetically-regulated microRNA-378a targets TGF- $\beta$ 2 in TGF- $\beta$ 1-treated hepatic stellate cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1/2): 183-194.
- [28] Perumal N, Perumal M, Halagowder D, et al. Morin attenuates diethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by co-ordinated regulation of Hippo/Yap and TGF- $\beta$ 1/Smad signaling [J]. *Biochimie*, 2017, 140: 10-19.
- [29] Zhong L, Zhao J Q, Huang L, et al. Runx2 activates hepatic stellate cells to promote liver fibrosis via transcriptionally regulating Itgav expression [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(7): e1316.
- [30] 杨子懿, 侯玉宁, 刘彦, 等. 肝纤维化进程中肝窦内皮细胞与肝星状细胞互作机制的研究进展 [J]. *生理学报*, 1-33. (2026-01-12) [2026-01-27]. <https://doi.org/10.13294/j.aps.2026.0003>.
- Yang Z Y, Hou Y N, Liu Y, et al. Advances in the study of the interaction mechanism between sinusoidal endothelial cells and hepatic stellate cells during liver fibrosis progression [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 1-33. (2026-01-12) [2026-01-27]. <https://doi.org/10.13294/j.aps.2026.0003>.
- [31] Zhou Y X, Wang G F, Liu L L, et al. Cellular crosstalk mediated by Meteorin-like regulating hepatic stellate cell activation during hepatic fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 405.
- [32] Lü Y Y, Bing Q Z, Lv Z J, et al. Imidacloprid-induced liver fibrosis in quails via activation of the TGF- $\beta$ 1/Smad pathway [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 705: 135915.
- [33] Zheng P, Ma W J, Gu Y L, et al. High-fat diet causes mitochondrial damage and downregulation of mitofusin-2 and optic atrophy-1 in multiple organs [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2023, 73(1): 61-76.
- [34] Tao Y, Wang N N, Qiu T M, et al. The role of autophagy and NLRP3 inflammasome in liver fibrosis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7269150.
- [35] Jeong S J, Zhang X Y, Rodriguez-Velez A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(6): 458-471.
- [36] Changotra H, Kaur S, Yadav S S, et al. ATG5: A central autophagy regulator implicated in various human diseases [J]. *Cell Biochem Funct*, 2022, 40(7): 650-667.
- [37] Cao Z M, Tian K, Ran Y C, et al. Beclin-1: A therapeutic target at the intersection of autophagy, immunotherapy, and cancer treatment [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1506426.
- [38] Ma W, Cheng L S, Jiang W, et al. The small heterodimer partner inhibits activation of hepatic stellate cells via autophagy [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2020, 29(6): 683-693.
- [39] Xu H, Wang L. The role of Notch signaling pathway in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 792667.
- [40] Horn P, Tacke F. Metabolic reprogramming in liver fibrosis [J]. *Cell Metab*, 2024, 36(7): 1439-1455.

[责任编辑 兰新新]