

养肝软坚丸防治肝纤维化作用及机制

杨泽虹^{1,2,3}, 刘菀尧⁴, 苏炜炫⁴, 林瑛乔⁴, 梁水先⁴, 文艺^{1,2}, 洪日^{1,2}, 丘振文^{1,2}, 孙术宁^{1,2,3}, 赵利娜^{1,2}, 陈昀^{1,2}, 李培武^{1,2*}

1. 广州中医药大学第一附属医院 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510405
2. 广东省中医临床研究院, 广东 广州 510405
3. 广州中医药大学 博士后科研流动站, 广东 广州 510405
4. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405

摘要: **目的** 通过体内外实验及转录组测序技术探讨养肝软坚丸(Yanggan Ruanjian Wan, YGRJW)对肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)的干预作用及其作用机制。**方法** 采用转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)诱导 LX-2 细胞活化模型,通过 CCK-8、细胞划痕、qRT-PCR、Western blotting 实验考察 YGRJW 含药血清对细胞活力、增殖、炎症因子[白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)]及纤维化标志物[α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type I alpha 1 chain, COL1A1)、III型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type III alpha 1 chain, COL3A1)]表达的影响;通过转录组测序技术筛选 YGRJW 含药血清干预活化 LX-2 细胞的差异表达基因及关键通路,并使用 qRT-PCR 和免疫荧光实验验证测序分析结果。小鼠 ip 含 10%四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)的玉米油溶液诱导 HF 模型,给予药物干预后,通过检测体质量、脏器指数、肝肾功能、肝组织病理学改变、肝组织炎症因子及纤维化标志物的表达、血清中炎症因子及肝纤四项的水平,综合评价 YGRJW 对 HF 小鼠的治疗作用,并验证 YGRJW 对潜在药效靶点及关键通路指标表达的影响。**结果** 体外实验结果显示,10% YGRJW 含药血清干预 24 h 可显著抑制 LX-2 细胞活化($P < 0.01$),并下调炎症因子和纤维化标志物的 mRNA 表达水平($P < 0.05$ 、0.01、0.001),抑制效果优于 10%水飞蓟宾含药血清。转录组学分析及验证结果显示,YGRJW 可能通过集落刺激因子 3 受体(colony stimulating factor 3 receptor, CSF3R)/Janus 激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)/信号传导及转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)途径发挥抗 HF 作用;与模型组比较,YGRJW 含药血清干预能显著下调 CSF3R、JAK2、STAT3 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$ 、0.01)。体内实验结果显示,YGRJW 能显著改善 HF 小鼠的体质量增长缓慢($P < 0.05$),降低肝脏指数、脾脏指数及肝肾功能指标($P < 0.05$ 、0.01、0.001),减轻肝组织炎症浸润和胶原沉积,降低肝组织中 TGF- β 、TNF- α 、IL-6、 α -SMA、COL1A1、COL3A1、金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) mRNA 表达水平($P < 0.05$ 、0.01、0.001),升高成纤维细胞生长因子 7(fibroblast growth factor 7, FGF7) mRNA 表达水平($P < 0.05$ 、0.01),降低血清中炎症因子及肝纤四项水平($P < 0.05$ 、0.01、0.001),并下调肝组织 CSF3R、JAK2、STAT3 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** YGRJW 通过调控 CSF3R/JAK2/STAT3 信号通路,抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化并减少细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积,进而发挥抗 HF 作用。

关键词: 养肝软坚丸; 肝纤维化; CSF3R; JAK2/STAT3 信号通路; 肝星状细胞活化; 细胞外基质代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)18-7192-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.010

Effect and mechanism of Yanggan Ruanjian Wan in prevention and treatment of hepatic fibrosis

YANG Zehong^{1,2,3}, LIU Yuyao⁴, SU Weixuan⁴, LIN Yingqiao⁴, LIANG Shuixian⁴, WEN Yi^{1,2}, HONG Ri^{1,2}, QIU Zhenwen^{1,2}, SUN Shuning^{1,2,3}, ZHAO Lina^{1,2}, CHEN Xu^{1,2}, LI Peiwu^{1,2}

1. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of

收稿日期: 2025-12-30

基金项目: 广州中医药大学“固本”工程一级学科能力提升项目(广中医校办[2026]105号);广东省中医药局科研项目(20261121);国家中医药传承创新中心科研专项重点项目(2023ZD07);广东省省名中医工作室(粤府函[2023]16号)

作者简介: 杨泽虹, 博士后, 研究方向为中医药防治脾胃肝胆消化系统疾病。E-mail: yangzehong21@163.com

***通信作者:** 李培武, 主任中医师, 博士生导师, 研究方向为中医药防治脾胃肝胆消化系统疾病。E-mail: doctorlipw@gzucm.edu.cn

Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Guangdong Clinical Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

3. Postdoctoral mobile station, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

4. The First Clinical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of Yanggan Ruanjian Wan (养肝软坚丸, YGRJW) in prevention and treatment of hepatic fibrosis (HF) based on *in vivo* and *in vivo* experiments and transcriptome sequencing technology. **Methods** LX-2 cell activation model was induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), CCK-8 method, cell scratch assay, qRT-PCR and Western blotting were used to detect the effects of YGRJW-mediated serum on cell viability, proliferation, expressions of inflammatory cytokines [interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)] and fibrosis markers [α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), collagen type III alpha 1 chain (COL3A1)]. Transcriptome sequencing was employed to identify differentially expressed genes and key pathways in activated LX-2 cells treated with YGRJW-containing serum, followed by validation through qRT-PCR and immunofluorescence experiments. A HF model was induced in mice via intraperitoneal injection of a 10% carbon tetrachloride (CCl₄)-containing corn oil solution. After drug intervention, the therapeutic effects of YGRJW on HF mice were comprehensively evaluated by measuring body weight, organ indices, liver and kidney function, pathological changes in liver tissue, expressions of inflammatory factors and fibrosis markers in liver tissue, as well as levels of inflammatory factors and four liver fibrosis indicators in serum, while also verifying the effect of YGRJW on potential pharmacodynamic targets and key pathway indicators. **Results** *In vitro* experiments demonstrated that 10% YGRJW-containing serum significantly inhibited LX-2 cell activation after 24 h ($P < 0.01$) and downregulated mRNA expression levels of inflammatory factors and fibrosis markers ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), with superior inhibitory effects compared to 10% silybinin-containing serum. Transcriptomic analysis and validation results showed that YGRJW may exert anti-HF effects through the colony stimulating factor 3 receptor (CSF3R)/Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway. Compared with model group, YGRJW drug containing serum intervention could significantly downregulate the mRNA and protein expressions of CSF3R, JAK2 and STAT3 ($P < 0.05, 0.01$). The *in vivo* experimental results showed that YGRJW could significantly improve the slow growth of body weight in HF mice ($P < 0.05$), reduce liver index, spleen index, liver and kidney function indicators ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), alleviate liver tissue inflammation infiltration and collagen deposition, reduce the mRNA expression levels of TGF- β , TNF- α , IL-6, α -SMA, COL1A1, COL3A1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in liver tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), increase the mRNA expression level of fibroblast growth factor 7 (FGF7) ($P < 0.05, 0.01$), and reduce levels of inflammatory factors and four indicators of liver fibrosis in serum ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and downregulated mRNA and protein expressions of CSF3R, JAK2, STAT3 in liver tissue ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** YGRJW exerts anti-HF effects by regulating CSF3R/JAK2/STAT3 signaling pathway, to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation and reducing extracellular matrix (ECM) deposition.

Key words: Yanggan Ruanjian Wan; hepatic fibrosis; CSF3R; JAK2/STAT3 signaling pathway; hepatic stellate cell activation; extracellular matrix metabolism

肝纤维化是多种慢性肝病（病毒性肝炎、酒精性肝病、代谢相关脂肪性肝病等）向肝硬化及肝癌发展的核心病理阶段，其本质是肝脏在持续性损伤修复过程中，细胞外基质（extracellular matrix, ECM）过度沉积与降解失衡，导致肝窦毛细血管化、假小叶形成及肝实质结构异常重构^[1]。在疾病早期阶段，肝纤维化呈现一定程度的可逆性，但若未及时干预，终将进展为不可逆的肝硬化，因此阻断或逆转肝纤维化是防治终末期肝病的战略需求。

目前临床抗肝纤维化治疗仍面临严峻挑战^[2-3]：一方面，针对病因治疗（如抗病毒、戒酒、代谢调节）虽可延缓疾病进展，但对已形成的肝纤维化逆

转效果有限；另一方面，直接靶向肝星状细胞（hepatic stellate cell, HSC）活化、ECM代谢的候选药物（如吡非尼酮、尼达尼布）因疗效特异性不足、肝肾毒性等问题尚未实现临床突破。在此背景下，中医药基于“脏腑相关理论”和“气血津液理论”，通过多成分、多靶点协同调控 HSC 活化/凋亡平衡、抑制炎症-氧化应激级联反应、调节肠道微生态及免疫稳态等综合作用，展现出独特的“病证结合”治疗优势，为肝纤维化防治提供了新策略^[4-5]。

根据病理变化和临床表现，肝纤维化中医病名多归集于“积聚”“肝积”“胁痛”等范畴，其基本病机可归纳为“虚损生积”^[6]。基于肝脾肾相关理

论和本虚标实关键病机研制的养肝软坚丸，由丹参、白芍、白背叶根、黄芪、鳖甲、绵茵陈、党参、三棱、黄精等组成，具有健脾养肝、活血软坚的功效，临床应用 20 余年，在治疗慢性肝炎、肝硬化方面颇见疗效。本研究通过体内外实验及转录组测序技术探讨养肝软坚丸对肝纤维化的干预作用及其分子机制，为其临床应用提供一定生物学依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

人肝星形 LX-2 细胞（货号 CL-0560）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

SPF 级 SD 大鼠 18 只，雌雄各半，8 周龄，体质量 200~250 g，由广州中医药大学实验动物中心提供，动物生产许可证号 SYXK（粤）2023-0068，动物质量合格证号 NO.44837000000268。动物饲养于广州中医药大学第一附属医院实验动物中心 SPF 级动物实验室，动物使用许可证号 SCXK（粤）2018-0034。动物实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准（批准号 20240816004）。

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 50 只，6 周龄，购自广东省医学实验动物中心，动物生产许可证号 SCXK（粤）2018-0034，动物质量合格证号 NO.44007200132017。动物饲养于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级环境，动物使用许可证号 SYXK（粤）2018-0001。动物实验经由广州中医药大学动物伦理委员会批准（批准号 20240310002）。

1.2 药品与试剂

养肝软坚丸（粤药制字 Z20071206，批号 20240496），主要含有丹参酮Ⅱ_A、芍药苷、芦丁、咖啡酸、阿魏酸、芹菜素、没食子酸、儿茶素、金丝桃苷、绿原酸等成分，实验时取适量养肝软坚丸粉末溶解于 0.5%羧甲基纤维素钠（carboxymethyl cellulose-Na，CMC-Na）溶液中，制成悬浊液备用；水飞蓟宾（国药准字 H20040299，批号 50012434）购自天津天士力制药股份有限公司；转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1，批号 HZ-1011）、α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）抗体（批号 14395-1-AP）、I 型胶原蛋白 α1 链（collagen type I alpha 1 chain，COL1A1）抗体（批号 66761-1-Ig）、III 型胶原蛋白 α1 链（collagen type III alpha 1 chain，COL3A1）抗体（批号 22734-1-AP）、β-actin 抗体（批号 66009-1-Ig）购自美国 Proteintech 公司；四氯化碳（carbon tetrachloride，CCl₄，批号

C15152771）、玉米油（批号 C16082922）购自 Macklin 公司；LX-2 细胞专用培养基（批号 CL-0560）购自武汉普诺赛生命科技有限公司；胰蛋白酶消化液（批号 C100C1）购自苏州新赛美生物科技有限公司；DMEM 培养基（批号 C11995500BT）购自美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒（批号 C0038）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；Trizol（批号 DP424）购自天根生化科技（北京）有限公司；反转录试剂预混液（批号 AG11706）、SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qRT-PCR 试剂盒（批号 AG11701）购自湖南艾科瑞生物工程有限公司；Alexa Fluor 488 荧光二抗（批号 A-11008）、DAPI（批号 D3571）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；集落刺激因子 3 受体（colony stimulating factor 3 receptor，CSF3R）抗体（批号 WL04137）、Janus 激酶 2（Janus kinase 2，JAK2）抗体（批号 WL02188）、信号传导及转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）抗体（批号 WL01836）购自沈阳万类生物科技有限公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 ab181602）购自英国 Abcam 公司；肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）试剂盒（批号 04102901B2M）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）试剂盒（批号 04102901A49M）、透明质酸（hyaluronic acid，HA）试剂盒（批号 04102901F89M）、层黏连蛋白（laminin，LN）试剂盒（批号 04102901C3M）、III 型前胶原（procollagen type III，PCIII）试剂盒（批号 04102901B68M）、IV 型胶原（collagen type IV，Col-IV）试剂盒（批号 04102901D209M）购自泉州市睿信生物科技有限公司；丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）试剂盒（货号 C009-2-1）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）试剂盒（货号 C010-2-1）、肌酐（creatinine，CRE）试剂盒（货号 C011-2-1）、尿素（Urea）试剂盒（货号 C013-2-1）购自南京建成生物工程研究所有限公司；苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂盒（货号 BH0001）、Masson 染色试剂盒（货号 BH0002）购自武汉博尔夫生物科技有限公司。

1.3 仪器

3111 型二氧化碳培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；LD108 型酶标仪、CFX96 型 RT-PCR 仪、ChemiDoc MP 型全能型凝胶成像系统、

CFX Opus 384 型实时定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5417R 型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Cytation5 型细胞成像多功能微孔板检测系统、Cytation10 型自动化共聚焦活细胞成像系统 (美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 含药血清的制备 将 18 只 SD 大鼠随机分为空白组、水飞蓟宾 (63 mg/kg) 组和养肝软坚丸 (6 g/kg) 组, 每组 6 只。适应性饲养 1 周后, 分别 ig 相应药物 (10 mL/kg), 空白组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。于末次给药 1 h 后, ip 戊巴比妥钠麻醉, 经腹主动脉取血, 离心取上层血清, 组内血清均匀混合后经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 min, 分装后置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.1.2 CCK-8 检测细胞活力 取对数生长期的 LX-2 细胞以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁生长至 60%~70%, 分别加入含不同质量浓度 (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 ng/mL) TGF- β 1 或不同体积分数 (5%、10%、15%、20%、25%) 含药血清的培养基干预 24、48、72 h。对照组加入不含药物的培养基, 另设置未接种细胞的空白组。每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光孵育 2 h, 采用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.1.3 细胞划痕实验 将对数生长期的 LX-2 细胞接种于 6 孔板中进行培养, 当细胞密度为 80%~90% 时, 进行划痕, 设置对照组、模型组、水飞蓟宾组和养肝软坚丸组, 对照组加入含 10% 空白含药血清的培养基, 模型组加入含 10 ng/mL TGF- β 1 和 10% 空白含药血清的培养基, 水飞蓟宾组加入含 10 ng/mL TGF- β 1 和 10% 水飞蓟宾含药血清的培养基, 养肝软坚丸组加入含 10 ng/mL TGF- β 1 和 10% 养肝软坚丸含药血清的培养基。于 0、12、24 h 对同一划痕处进行拍照, 用 Image J 软件分析划痕面积, 计算细胞划痕愈合率。

$$\text{细胞划痕愈合率} = (0 \text{ h 划痕面积} - 12 \text{ h 或 } 24 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

2.1.4 qRT-PCR 检测相关基因表达 按“2.1.3”项下方法进行分组和给药, 处理 24 h 后收集细胞, 采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 检测 RNA 浓度

和纯度, 选取 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0 的样品进行逆转录得到 cDNA。按照说明书体系配制不同引物的 qPCR 反应体系, 分别加入到每个反应孔中, 将反应液用离心机离心至孔底, 于荧光定量 PCR 仪上设定反应程序进行扩增反应。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1, 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	种属	引物序列 (5'-3')
<i>IL-1β</i>	人	F: TACCTGTCCTGCGTGTGAAA R: GGTGCTGATGTACCAGTTGGG
<i>IL-6</i>	人	F: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG R: CCATCTTTTGAAGGTTTCAGGTTG
<i>TNF-α</i>	人	F: GCTGCACTTTGGAGTGATCG R: ATGAGGTACAGGCCCTCTGA
<i>α-SMA</i>	人	F: CGACCGAATGCAGAAGGAGAT R: CTTTGGCTAGGAATGATTTGGA
<i>COL1A1</i>	人	F: TGGCAAAGATGGACTCAACG R: TCACGGTCACGAACCACATT
<i>COL3A1</i>	人	F: CCCCATTATTGAGATGAACC R: CCATCAGGACTAATGAGGCTTTC
<i>CSF3R</i>	人	F: GAGCTGAGAACTACCGAACGG R: GGCCTGAGGGTCTCCAAGA
<i>JAK2</i>	人	F: TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA R: AGACATGGTTGGGTGGATACC
<i>STAT3</i>	人	F: CAGCAGCTTGACACACGGTA R: AAACACCAAAGTGGCATGTGA
<i>β-actin</i>	人	F: CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT R: CCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAGC
<i>TGF-β</i>	小鼠	F: CTCCCGTGGCTTCTAGTGC R: GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
<i>TNF-α</i>	小鼠	F: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT R: GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-6</i>	小鼠	F: CCAAGAGGTGAGTGCTTCCC R: CTGTTGTTTCAGACTCTCTCCCT
<i>FGF7</i>	小鼠	F: ACCTGAGGATTGACAAACGAGG R: CCACGGTATTCGATTCCATGA
<i>α-SMA</i>	小鼠	F: CCCAGACATCAGGGAGTAATGG R: TCTATCGGATACTTCAGCGTCA
<i>COL1A1</i>	小鼠	F: GCTCCTCTTAGGGGCCACT R: CCACGTCTCACCATTGGGG
<i>COL3A1</i>	小鼠	F: CTGTAACATGGAACTGGGGAAA R: CCATAGCTGAACTGAAAACCACC
<i>TIMP-1</i>	小鼠	F: GCAACTCGGACCTGGTCATAA R: CGGCCCCGTGATGAGAACT
<i>CSF3R</i>	小鼠	F: CTGATCTTCTTGCTACTCCCCA R: GGTGTAGTTCAAGTGAGGCAG
<i>JAK2</i>	小鼠	F: TTGTGGTATTACGCCTGTGTATC R: ATGCCTGGTTGACTCGTCTAT
<i>STAT3</i>	小鼠	F: AGCTGGACACACGCTACCT R: AGGAATCGGCTATATTGCTGGT
<i>β-actin</i>	小鼠	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

FGF7-成纤维细胞生长因子 7; *TIMP-1*-组织金属蛋白酶抑制剂-1。

FGF7-fibroblast growth factor 7; *TIMP-1*-tissue metalloproteinase inhibitor-1.

2.1.5 Western blotting 检测相关蛋白表达 按“2.1.3”项下方法进行分组和给药,处理 24 h 后收集细胞,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,离心后取上清液,采用 BCA 法检测蛋白浓度,加热使蛋白变性。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%牛血清白蛋白,于室温封闭 2 h,分别加入 α -SMA 抗体(1:2 000)、COL1A1 抗体(1:2 000)、COL3A1 抗体(1:500)、 β -actin (1:20 000)一抗,4 ℃孵育过夜;TBST 漂洗 3 次后,加入二抗(1:2 000),室温孵育 1.5 h, TBST 漂洗 3 次后,使用 ECL 发光试剂盒通过全能型凝胶成像系统进行曝光显影。以 β -actin 为内参,使用 Image J 软件对条带进行定量分析,计算目的蛋白的相对表达量。

2.1.6 转录组测序 按“2.1.3”项下方法进行分组和给药,处理 24 h 后,提取对照组、模型组和养肝软坚丸组细胞总 RNA 进行分离和纯化,质检合格后用 Illumina Novaseq™ 6000 型测序仪进行测序,测序模式为 PE150。获得测序下机数据后,过滤获得高质量的测序数据(clean data),再与参考基因组比对,最后进行基因定量分析。以 $|\log_2$ 差异倍数(fold change, FC) ≥ 1 且 q 值 <0.05 作为阈值标准,筛选差异表达基因,并对差异表达基因进行基因本体(gene ontology, GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。

2.1.7 免疫荧光染色检测 GCSF、JAK2 和 STAT3 表达 按“2.1.3”项下方法进行分组和给药,处理 24 h 后,弃去培养基, PBS 浸洗 3 次;加入 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 浸洗 3 次;加入 0.3% Triton-X 通透室温 10 min, PBS 浸洗 3 次;加入 3%牛血清白蛋白于室温固定 60 min 后,加入 GCSF (1:500)、JAK2 (1:200)、STAT3 (1:200)一抗,4 ℃孵育过夜。次日, PBS 浸洗 3 次,加入荧光二抗(1:500),室温孵育 1 h; PBS 浸洗 3 次后,加入 DAPI 室温染核 10 min; PBS 浸洗 3 次后,封片,使用自动化共聚焦活细胞成像系统进行成像。

2.2 体内实验

2.2.1 动物分组、造模与给药 C57BL/6 小鼠适应性饲养 2 周后,随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾(47.42 mg/kg,相当于成人临床用量)组和养肝软坚丸低、高剂量(2.25、4.50 g/kg,分别相当于成人临床用量的 0.5、1 倍)组,每组 10 只。除对照

组 ip 玉米油外,其余小鼠 ip 含 10% CCl₄ 的玉米油溶液(5 mL/kg)诱导肝纤维化模型,每周 2 次,持续造模 6 周。造模期间同步给药,各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的水,1 次/d,连续给药 6 周。

2.2.2 血清中肝功能、肾功能、肝纤维化相关指标和炎症因子水平的检测 末次给药后,小鼠称定质量,ip 1%戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉,打开腹腔进行下腔静脉取血,离心获得血清后置于-80 ℃保存。按照试剂盒说明书检测肝功能、肾功能、肝纤维化相关指标和炎症因子水平。

2.2.3 肝组织病理学观察 摘取肝、脾组织,并分别称定质量,计算脏器指数。切取小鼠一片肝叶置于 10%中性福尔马林缓冲液中固定,按照试剂盒说明书分别进行 HE 染色和 Masson 染色,观察肝组织病理变化及纤维化病变情况。

脏器指数=脏器质量/体质量

2.2.4 qRT-PCR 检测肝组织相关基因表达 取肝组织,按照试剂盒说明书提取外泌体中总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

2.2.5 Western blotting 检测肝组织相关蛋白表达 取肝组织,加入 RIPA 裂解液提取蛋白。按“2.1.5”项下方法操作,分别加入 CSF3R (1:1 000)、JAK2 (1:500)、STAT3 (1:500)、GAPDH (1:10 000)一抗,4 ℃孵育过夜;加入二抗(1:2 000),室温孵育 1.5 h,进行曝光显影。以 GAPDH 为内参,使用 Image J 软件对条带进行定量分析,计算目的蛋白的相对表达量。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism 10 软件绘制图片,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 Bonferroni 法。

3 结果

3.1 养肝软坚丸含药血清对 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞活化的影响

3.1.1 不同药物干预对 LX-2 细胞活力的影响 如图 1-A 所示, LX-2 细胞活力随 TGF- β 1 质量浓度的增加呈现先升高后降低的趋势,当 TGF- β 1 质量浓度为 10 ng/mL、干预时长为 24 h 时,细胞活力达到峰值($P<0.01$),故后续实验选用此条件诱导 LX-2 细胞活化。如图 1-B、C 所示,5%~20%养肝软坚

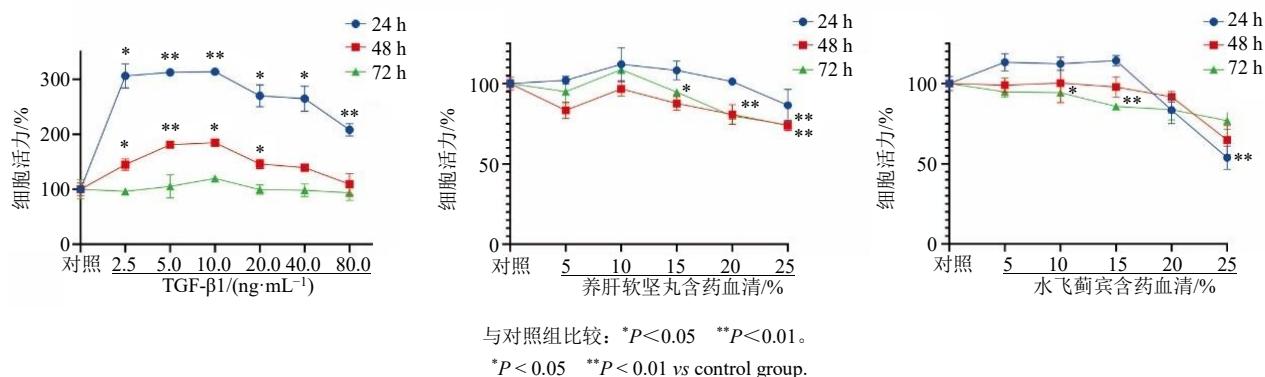
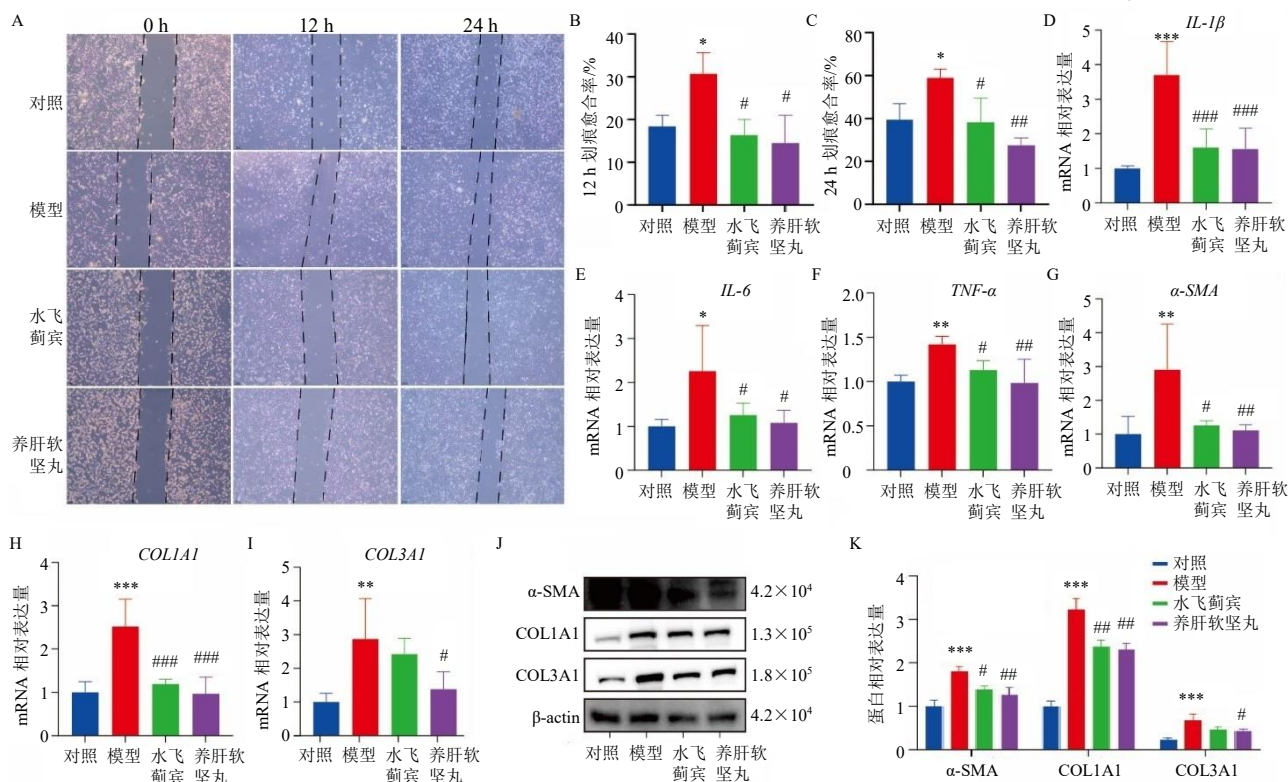


图1 不同药物干预对 LX-2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of different drug interventions on viability in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

丸含药血清组和 5%~15%水飞蓟宾含药血清组细胞活力均在 80%以上,表明该浓度区间无显著细胞毒性。其中 10%养肝软坚丸和 10%水飞蓟宾含药血清干预 24h 均能够明显提高细胞活性,采用 10%养肝软坚丸和 10%水飞蓟宾含药血清干预 LX-2 细胞 24 h 进行后续研究。

3.1.2 养肝软坚丸含药血清对 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞活化的影响 如图 2-A~C 所示,与对照组比较,模型组 12、24 h 划痕愈合率显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组 12、24 h 划痕愈合率显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 2-D~I 所示,与对照组比较,模型组炎症因子 (*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF-*



A~C-细胞划痕实验 ($n = 3$); D~I-qRT-PCR 检测 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 、 *α -SMA*、*COL1A1* 和 *COL3A1* mRNA 表达 ($n = 5$); J、K-Western blotting 检测 *α -SMA*、*COL1A1* 和 *COL3A1* 蛋白表达 ($n = 3$); 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同。

A~C-cell scratch assay ($n = 3$); D~I-expressions of *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *α -SMA*, *COL1A1* and *COL3A1* mRNA detected by qRT-PCR ($n = 5$); J, K-expressions of *α -SMA*, *COL1A1* and *COL3A1* protein detected by Western blotting ($n = 3$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图2 养肝软坚丸含药血清对 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞活化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

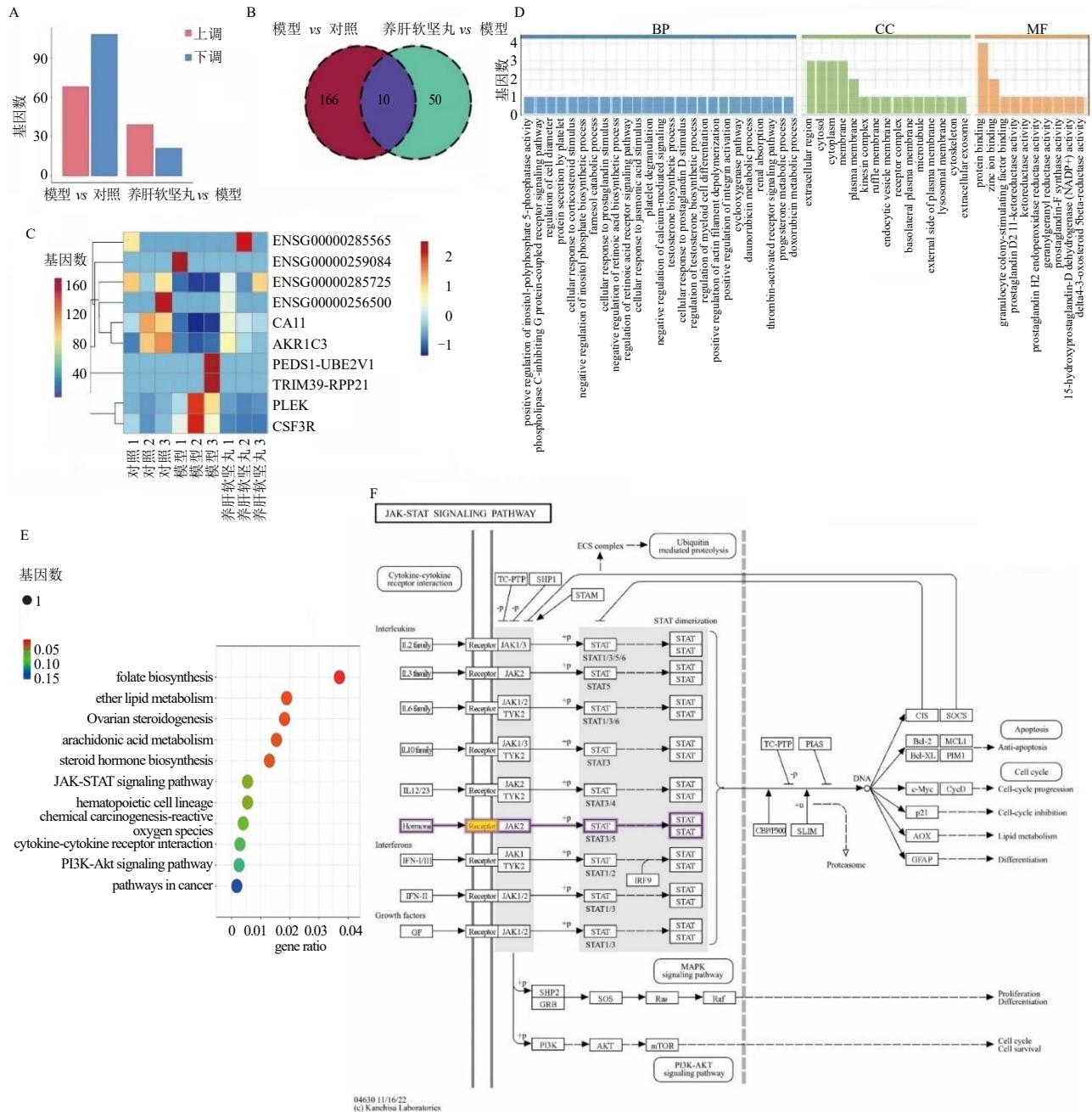
Fig. 2 Effect of Yanggan Ruanjian Wan containing serum on TGF- β 1-induced activation of LX-2 cells ($\bar{x} \pm s$)

α) 和纤维化标志物 (α -SMA、COL1A1、COL3A1) mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与模型组比较, 各给药组 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 α -SMA、COL1A1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 养肝软坚丸组 COL3A1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。如图 2-J、K 所示, 与对照组比较, 模型组 α -SMA、COL1A1、COL3A1 蛋白表达

水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 养肝软坚丸组 α -SMA、COL1A1、COL3A1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。以上结果表明, 养肝软坚丸可通过抑制 HSC 活化、调节炎症因子表达、下调纤维化标志物表达, 协同改善肝纤维化进程。

3.2 转录组测序结果分析及验证

3.2.1 差异表达基因筛选 如图 3-A 所示, 与对照



A-差异表达基因柱状图; B-Venn 图; C-差异表达基因热图; D-GO 功能分析图; E-KEGG 分析结果图; F-信号通路标注图。

A-bar chart of differentially expressed genes; B-Venn diagram; C-differentially expressed gene heatmap; D-GO functional analysis diagram; E-KEGG analysis result chart; F-signal pathway annotation diagram.

图 3 转录组测序结果分析

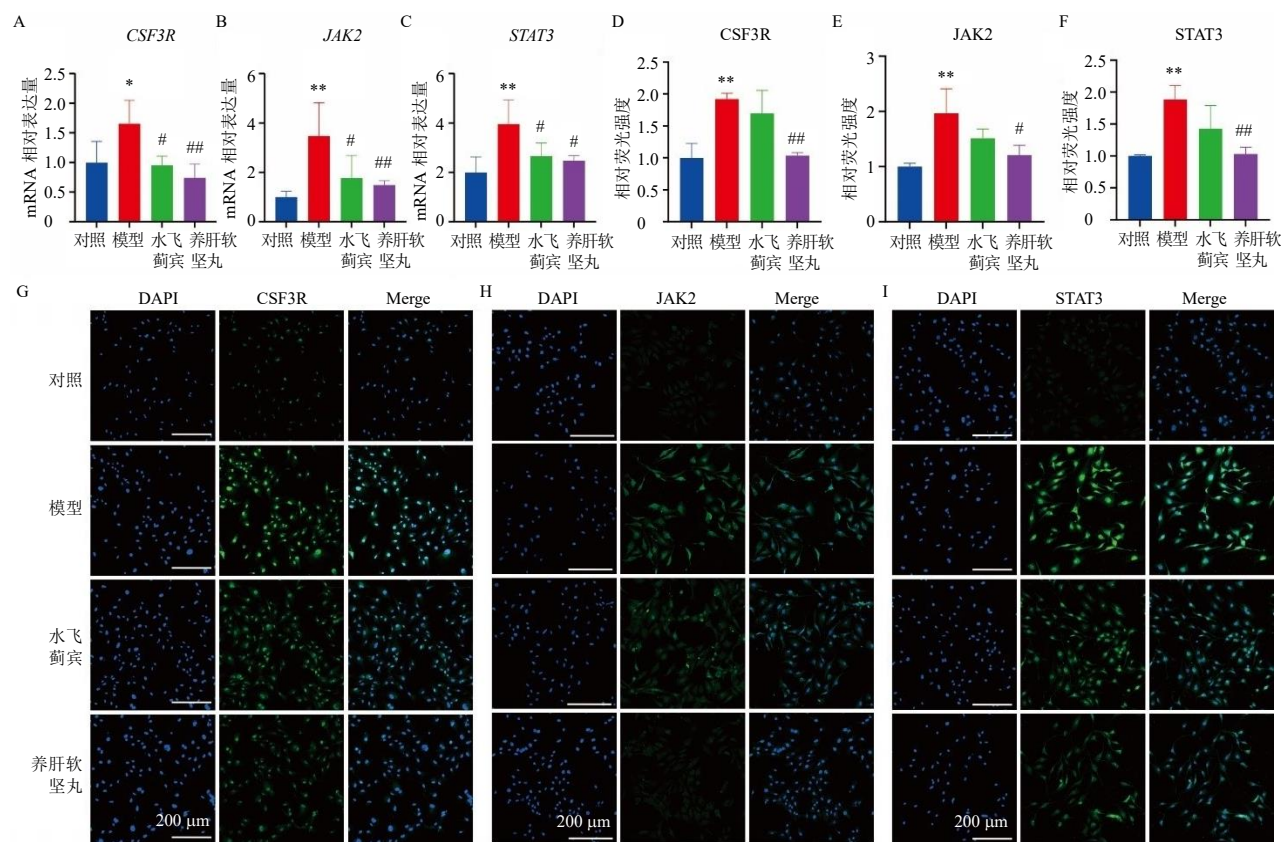
Fig. 3 Results of RNA-seq analysis

组比较,模型组表达显著上调的基因有 68 个、显著下调的有 108 个;与模型组比较,养肝软坚丸含药血清组表达显著上调的基因有 39 个,显著下调的基因有 21 个。对对照组 vs 模型组、模型组 vs 养肝软坚丸含药血清组的差异表达基因取交集,获得 10 个共同基因(图 3-B),其中 CSF3R、普列克底物蛋白基因(pleckstrin, PLEK)表达在模型组上调、在养肝软坚丸含药血清组下调(图 3-C)。

3.2.2 差异表达基因的 GO 功能和 KEGG 富集分析 GO 功能富集结果(图 3-D)显示,生物过程(biological process, BP)主要涉及肌醇多磷酸 5-磷酸酶活性的正向调节、抑制磷脂酶 C 的 G 蛋白偶联受体信号通路、细胞直径的调节等过程;细胞组分(cellular component, CC)主要涉及细胞外区域、细胞质、细胞膜等组分;分子功能(molecular function, MF)主要涉及蛋白质结合、锌离子结合、粒细胞集落刺激因子结合等功能。KEGG 分析结果

(图 3-E)显示,差异表达基因主要富集于代谢相关、信号传导、癌症相关通路。其中,细胞因子-细胞因子受体相互作用与 JAK-STAT 信号通路通过 CSF3R 形成紧密的上下游调控轴,共同协调免疫反应、炎症过程、细胞增殖与分化等关键生物学功能(图 3-F)。CSF3R 作为两者连接的关键节点,养肝软坚丸肝纤维化效应是否通过调控 CSF3R/JAK2-STAT3 通路实现,有待进一步验证。

3.2.3 转录组测序结果验证 如图 4-A~C 所示,与对照组比较,模型组 CSF3R、JAK2、STAT3 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,各给药组 CSF3R、JAK2、STAT3 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$)。免疫荧光染色结果(图 4-D~I)显示,与对照组比较,模型组 CSF3R、JAK2、STAT3 荧光强度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,养肝软坚丸组 CSF3R、JAK2、STAT3 荧光强度显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。



A~C—qRT-PCR 检测 CSF3R、JAK2 和 STAT3 mRNA 表达; D~I—免疫荧光染色检测 CSF3R、JAK2 和 STAT3 蛋白表达 ($\times 20$)。
A—C—expressions of CSF3R, JAK2 and STAT3 mRNA detected by qRT-PCR; D—I—expressions of CSF3R, JAK2 and STAT3 protein detected by immunofluorescence staining ($\times 20$).

图 4 转录组测序结果验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Validation of transcriptome sequencing results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠的治疗作用

3.3.1 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠体重、脏器指数及肝肾功能的影响 如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠体质量增长缓慢($P<0.001$),肝脏指数、脾脏指数及血清中 AST、ALT 活性和 CRE、Urea 水平明显升高($P<0.01$ 、 0.001);与模型组比较,养肝软坚丸各剂量组能显著改善小鼠的体质量增长

缓慢($P<0.05$),显著降低肝脏指数、脾脏指数及血清中 AST、ALT 活性和 CRE、Urea 水平($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001);水飞蓟宾组能改善小鼠的体质量增长缓慢但无统计学差异,显著降低肝脏指数、脾脏指数和血清中 AST、ALT 活性($P<0.05$ 、 0.001)。表明养肝软坚丸对肝纤维化小鼠肝肾功能保护作用优于水飞蓟宾。

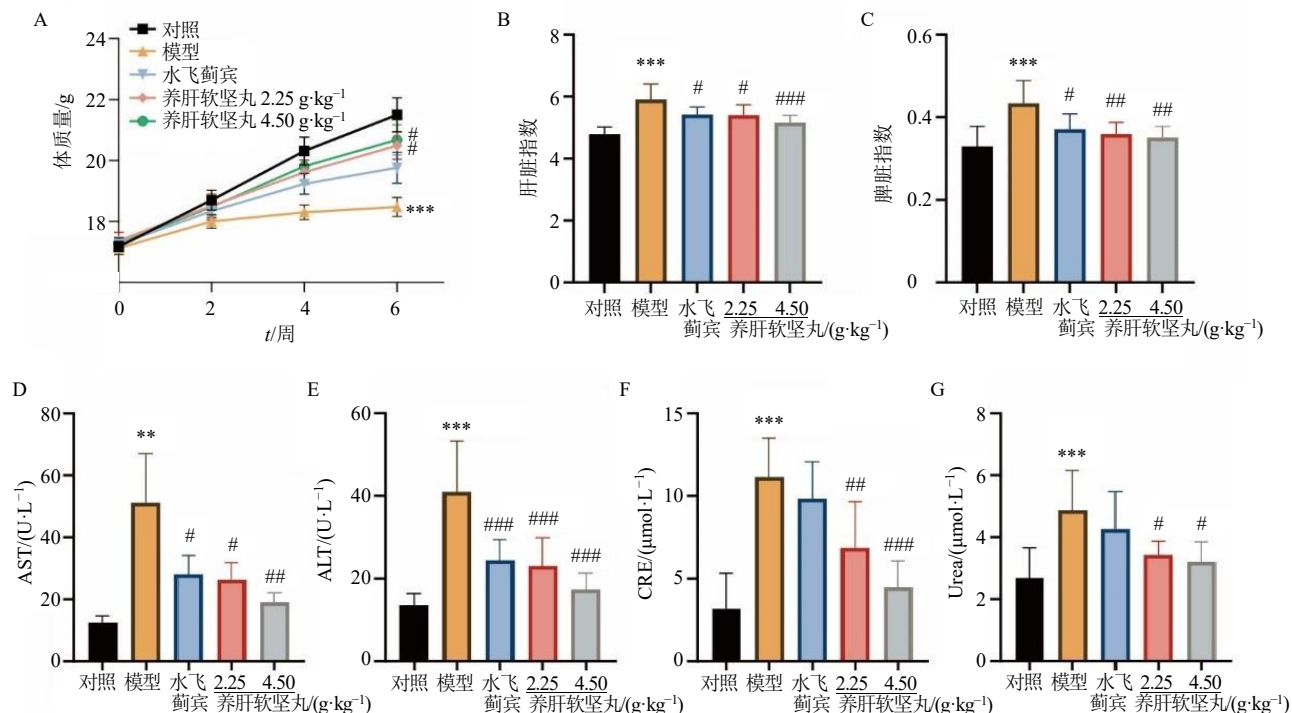


图 5 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠体质量 (A)、肝脏指数 (B)、脾脏指数 (C) 及肝肾功能 (D~G) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 5 Effect of Yanggan Ruanjian Wan on body weight (A), liver index (B), spleen index (C) and liver/kidney function (D~G) in mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.3.2 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠肝组织形态、病理变化、炎症因子和纤维化标志物表达的影响 如图 6-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏表现出明显的病理改变,肉眼观察可见肝脏表面粗糙,边缘钝化,颜色棕红;HE 染色显示炎性细胞浸润、肝细胞损伤、肝小叶结构紊乱;Masson 染色可见较多增生的胶原纤维。与模型组比较,各给药组炎症细胞浸润、肝小叶结构紊乱、胶原纤维沉积现象均明显改善,其中以养肝软坚丸高剂量组改善效果最佳。如图 6-C~J 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中炎症指标 ($TGF-\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$) 和肝纤维化标志物 ($\alpha-SMA$ 、 $COL1A1$ 、 $COL3A1$ 、 $TIMP-1$) mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), $FGF7$ mRNA 表达水平显著降低($P<0.001$);与模型组比较,养肝软坚各剂量组小鼠肝组织中炎症指

标 ($TGF-\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$) 和肝纤维化标志物 ($\alpha-SMA$ 、 $COL1A1$ 、 $COL3A1$ 、 $TIMP-1$) mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), $FGF7$ mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01);水飞蓟宾组 $TGF-\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $\alpha-SMA$ 、 $COL1A1$ mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$)。以上结果表明,养肝软坚丸可通过抗炎、抑制 HSC 活化、改善 ECM 代谢失衡,延缓肝纤维化进展。

3.3.3 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠血清中炎症因子和肝纤四项水平的影响 如图 7 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中炎症因子 ($TNF-\alpha$ 、 $IL-6$) 和肝纤四项 (HA、LN、PCIII、Col-IV) 水平显著升高($P<0.001$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、HA、LN、PCIII 和 Col-IV 水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。表明养肝软坚丸

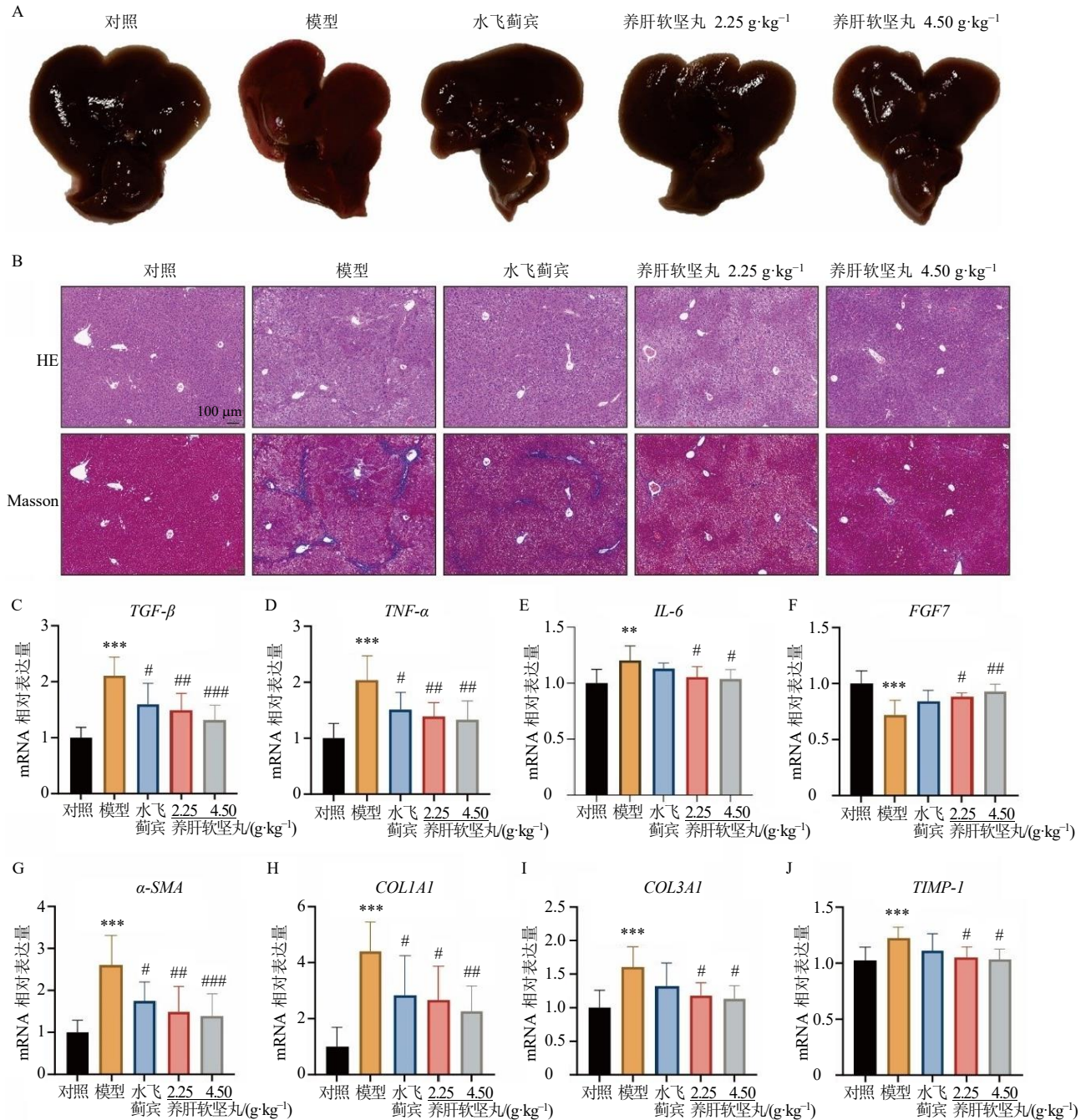


图 6 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠肝组织形态 (A)、病理变化 (B, ×10)、炎症因子和纤维化标志物表达 (C~J) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of Yanggan Ruanjian Wan on liver morphology (A), pathological changes (B, ×10), expressions of inflammatory cytokines and fibrosis markers (C—J) in mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

对肝纤维化小鼠血清中炎症因子、肝纤四项的分泌具有调节效果。

3.3.4 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠肝组织 CSF3R、JAK2、STAT3 表达的影响 如图 8 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织 CSF3R、JAK2、STAT3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、

0.001); 与模型组比较,养肝软坚丸各剂量组小鼠肝组织 CSF3R、JAK2、STAT3 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),水飞蓟宾组 JAK2、STAT3 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$),养肝软坚丸高剂量组 CSF3R、JAK2、STAT3 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

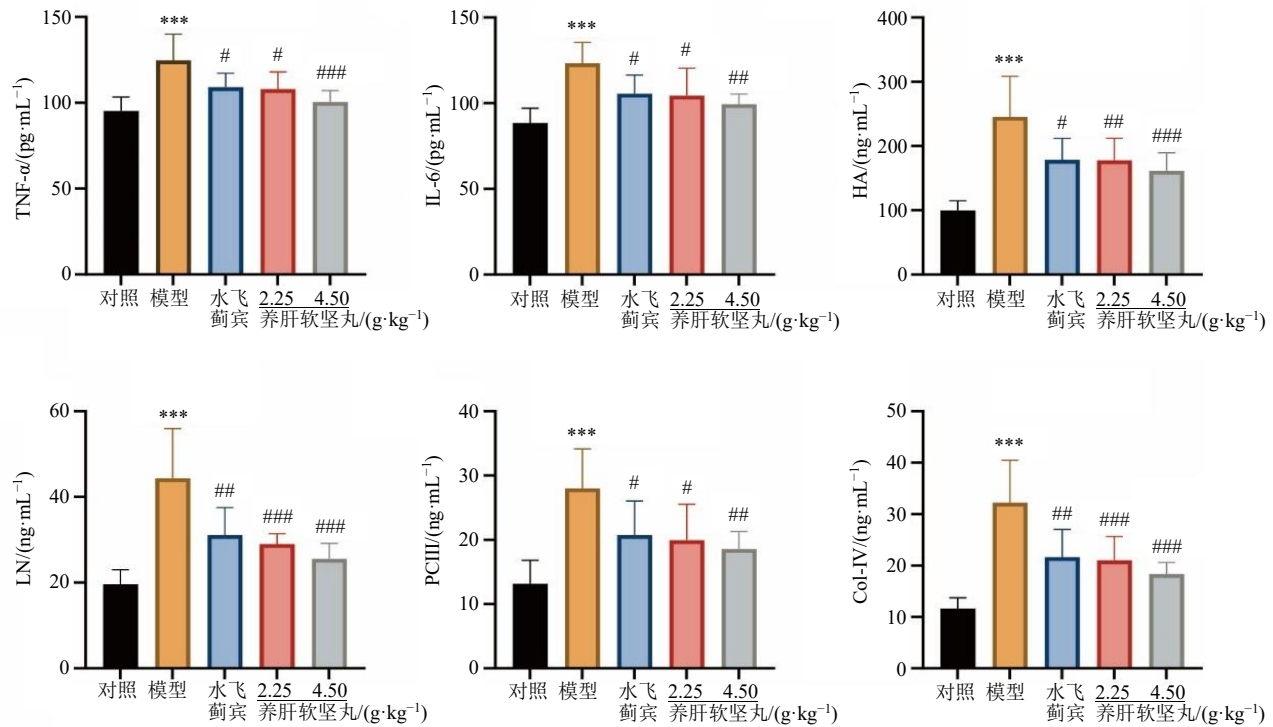


图7 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠血清中炎症因子和肝纤四项水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of Yanggan Ruanjian Wan on levels of inflammatory cytokines and liver fibrosis markers in serum of mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

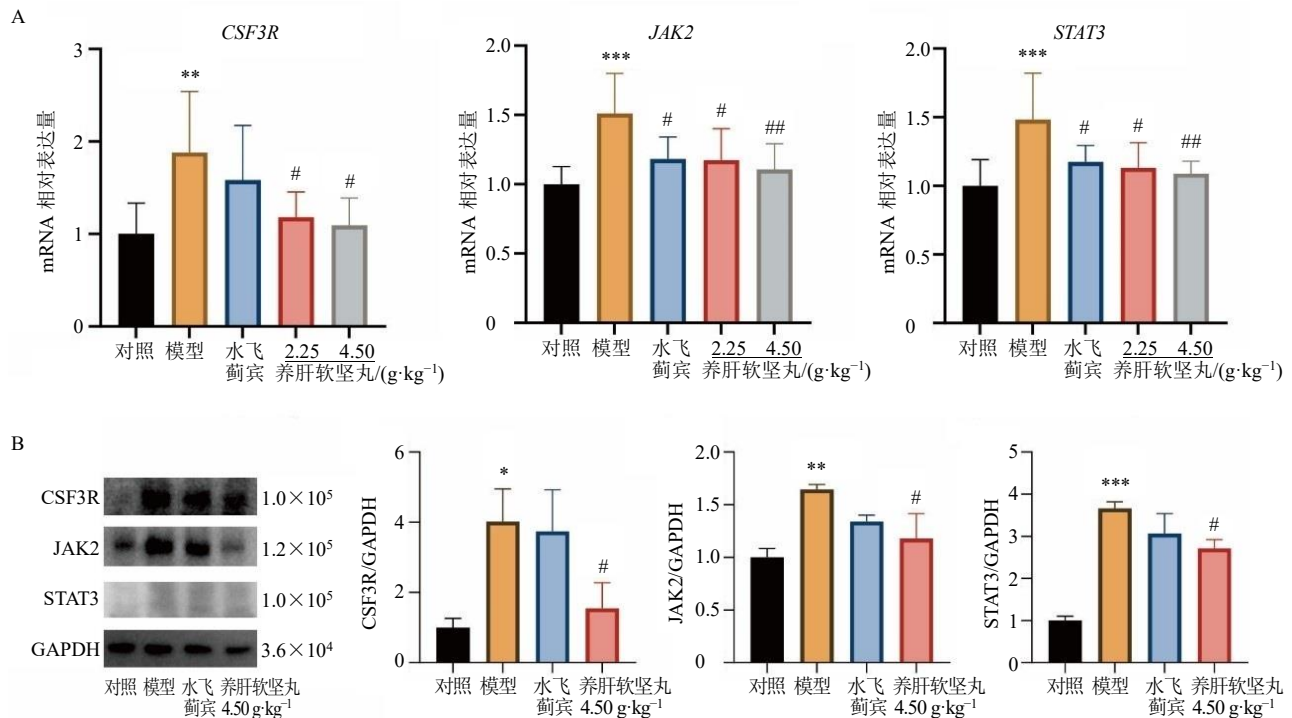


图8 养肝软坚丸对肝纤维化小鼠肝组织 CSF3R、JAK2 和 STAT3 mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 8 Effect of YGRJW on expressions of CSF3R, JAK2, STAT3 mRNA (A) and protein (B) in liver tissues of mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

HSC 活化是肝纤维化发生发展的核心环节^[7]。在正常生理状态下, HSC 处于静息状态; 当肝脏受到损伤时, 邻近的 Kupffer 细胞、巨噬细胞等通过旁分泌释放 TGF- β 、TNF- α 、IL-1 β 、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等细胞因子, 激活 HSC 转化为肌成纤维细胞, 表现为 α -SMA 表达上调并大量分泌 I 型、III 型胶原等 ECM 成分^[8]。其中, TGF- β 作为最关键的促纤维化因子, 不仅直接促进 ECM 合成, 还通过抑制基质金属蛋白酶活性减少 ECM 降解, 导致 ECM 过度沉积。LX-2 细胞是一种来源于人 HSC 的永生化细胞系, 在体外实验中被广泛用作模拟 HSC 活化过程的研究模型^[9]。未刺激的 LX-2 细胞可部分模拟静止期 HSC 的表型, 而通过外源性添加 TGF- β 1 刺激, LX-2 细胞可被激活, 表现出与体内纤维化环境中活化 HSC 相似的特征^[10]。故本研究采用 TGF- β 1 诱导 LX-2 活化构建 HF 细胞模型以探讨养肝软坚丸含药血清对 HF 的干预作用, 发现养肝软坚丸能显著抑制 HSC 活化、调节炎症细胞因子表达、下调纤维化标志物表达; 进一步采用 CCL₄ 诱导复制肝纤维化小鼠模型联合同步给药, 从体内水平证实其对肝纤维化小鼠的治疗效应。以上结果表明, 养肝软坚丸对肝纤维化具有显著的治疗效果, 且对肾脏功能具有保护作用。

CSF3R 又称为 G-CSF-R 或 CD114, 是典型 I 型细胞因子受体超家族结构的跨膜蛋白。其作为粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 的受体, 两者互作可诱导中性粒细胞的增殖、分化和调控^[11]。在肝脏疾病中, 研究发现肝细胞正常表达和分泌 CSF3, 过表达肝细胞中 CSF3 能够增强肝细胞增殖, 促进肝脏再生, 而敲除 CSF3R 则会阻碍肝脏再生^[12]; CSF3R 是 CD8⁺ T 细胞耗竭的标志物, 可预测免疫检查点抑制剂治疗肝细胞性肝癌的反应^[13]。G-CSF 与 CSF3R 结合通过主要诱导受体的酪氨酸磷酸化来激活信号转导途径, 从而激活 JAK/STAT、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路控制细胞的增殖、分化和存活, 同时抑制细胞凋亡。其中, JAK/STAT 途径已被证实是激活 HSC 诱导肝纤维化进程的核心信号通路^[14-16]。近年来, CSF3R 与

JAK/STAT 信号通路的调控关系在多种肝脏疾病中被逐步阐明。G-CSF 可通过 G-CSFR-SOCS3-JAK-STAT3 通路直接作用于肝细胞, 调节免疫细胞浸润肝脏, 间接调节代谢相关脂肪性肝病^[17]; 而在肝细胞癌中, 反义环状 RNA CSF3R-AS 通过 CSF3R/JAK2/STAT3 正反馈回路促进肝细胞癌进展和索拉非尼耐药^[18], 进一步凸显了该通路在肝脏病理过程中的重要作用。

基于转录组测序分析及分子生物学验证结果, 发现养肝软坚丸可能通过 CSF3R/JAK2/STAT3 通路发挥抗肝纤维化作用, 但其具体作用机制仍需深入探究。养肝软坚丸是否通过竞争性结合 CSF3R 或调节其表达来阻断 G-CSF/CSF3R 相互作用, 是否直接抑制 JAK2 或 STAT3 磷酸化以中断下游信号传导, 以及其对 HSC 活化、增殖和胶原分泌的调控是否依赖于 CSF3R/JAK2/STAT3 通路尚需进一步研究。未来可通过构建 CSF3R 基因敲除模型、磷酸化位点突变实验或通路特异性抑制剂联用等手段, 进一步阐明养肝软坚丸防治肝纤维化的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 魏世举, 陈思羽, 陈蕊, 等. 中医药调控 PPAR 信号通路治疗肝纤维化的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2026, 49(1): 357-367.
- [2] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55.
- [3] Friedman S L, Pinzani M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future [J]. *Hepatology*, 2022, 75(2): 473-488.
- [4] Lan T, Chen B, Hu X Z, et al. Tianhuang Formula ameliorates liver fibrosis by inhibiting CCL2-CCR2 axis and MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 321: 117516.
- [5] Qu J R, Xue X Y, Wang Z X, et al. Si-Wu-Tang attenuates liver fibrosis via regulating lncRNA H19-dependent pathways involving cytoskeleton remodeling and ECM deposition [J]. *Chin J Nat Med*, 2024, 22(1): 31-46.
- [6] 徐列明, 刘平, 沈锡中, 等. 肝纤维化中西医结合诊疗指南 (2019 年版) [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 11(39): 1286-1295.
- [7] 许秋莹, 姚路蒙, 王星星, 等. 桑黄中性多糖结构特征及其通过调控肠道菌群改善小鼠肝纤维化的作用机制 [J]. 中草药, 2026, 57(12): 4644-4661.

- [8] Trautwein C, Friedman S L, Schuppan D, *et al.* Hepatic fibrosis: Concept to treatment [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(Suppl): S15-S24.
- [9] Xu L, Hui A Y, Albanis E, *et al.* Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis [J]. *Gut*, 2005, 54(1): 142-151.
- [10] Sharma S, Gali S, Kundu A, *et al.* Tenovin-1, a selective SIRT1/2 inhibitor, attenuates high-fat diet-induced hepatic fibrosis via inhibition of HSC activation in ZDF rats [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(9): 3334-3352.
- [11] Yan L, Li J, Yang Y, *et al.* Old drug, new use: Recent advances for G-CSF [J]. *Cytokine*, 2024, 184: 156759.
- [12] Huang X Y, Yang D, Liu Y Z, *et al.* SETDB1 promotes mammalian liver regeneration by stimulating cytokine CSF3 in hepatocytes [J]. *Cell Rep*, 2025, 44(6): 115843.
- [13] Hsu C L, Ou D L, Bai L Y, *et al.* Exploring markers of exhausted CD8 T cells to predict response to immune checkpoint inhibitor therapy for hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Cancer*, 2021, 10(4): 346-359.
- [14] Ogata H, Chinen T, Yoshida T, *et al.* Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF- β 1 production [J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2520-2530.
- [15] Tang L Y, Heller M, Meng Z J, *et al.* Transforming growth factor- β (TGF- β) directly activates the JAK1-STAT3 axis to induce hepatic fibrosis in coordination with the SMAD pathway [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(10): 4302-4312.
- [16] Ding Y F, Wu Z H, Wei Y J, *et al.* Hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis in the rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(5): 821-834.
- [17] Zhang Y W, Zhou X F, Liu P H, *et al.* GCSF deficiency attenuates nonalcoholic fatty liver disease through regulating GCSFR-SOCS3-JAK-STAT3 pathway and immune cells infiltration [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 320(4): G531-G542.
- [18] Feng Z Y, Gao Y, Cai C J, *et al.* CSF3R-AS promotes hepatocellular carcinoma progression and sorafenib resistance through the CSF3R/JAK2/STAT3 positive feedback loop [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 217.

[责任编辑 李亚楠]