

• 实验研究 Experimental research •

吡非尼酮通过抑制肝星状细胞自噬促进凋亡
治疗肝纤维化

李 苒, 程芝梅, 何慧洲, 张 帅, 王黎洲, 周 石

【摘要】 目的 探究吡非尼酮对于肝星状细胞活性、自噬以及凋亡的影响。**方法** 使用不同浓度吡非尼酮与自噬激动剂雷帕霉素联合用药处理肝纤维化 HSCT6 细胞, CCK-8 和克隆形成实验检测细胞增殖、划痕实验检测细胞迁移、流式细胞术检测细胞凋亡, 蛋白免疫印迹法检测纤维化、自噬及凋亡相关蛋白表达。**结果** CCK-8 和克隆提示随吡非尼酮浓度增加细胞增殖受限, 划痕提示吡非尼酮浓度增加细胞迁移受限, 蛋白免疫印迹法和流式细胞术检测提示吡非尼酮处理细胞后细胞自噬受限、凋亡增加。联合处理结果提示, 自噬激动剂可部分逆转吡非尼酮对 HSCT6 细胞活性抑制。**结论** 吡非尼酮可抑制肝星状细胞增殖、促进凋亡, 可能与其抑制肝星状细胞自噬有关。

【关键词】 肝纤维化; 肝星状细胞; 自噬; 增殖; 凋亡

中图分类号: R575.2 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2023)-07-0651-09

Pirfenidone treats liver fibrosis by inhibiting autophagy of hepatic stellate cells and promoting apoptosis

LI Ran, CHENG Zhimei, HE Huizhou, ZHANG Shuai, WANG Lizhou, ZHOU Shi. College of Medical Imaging, Guizhou Medical University; Department of Intervention, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: zhoushi.gmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of pirfenidone on the activity, autophagy and apoptosis of hepatic stellate cells(HSC). **Methods** Hepatic fibrosis HSC T6 cells were treated with combination medication of different concentrations of pirfenidone and rapamycin (an autophagic agonist). CCK8 assay and clone formation assay were used to check the cell proliferation, scratch testing was used to detect the cell migration, flow cytometry was used to determine the cell apoptosis, and Western blot was adopted to test the fibrosis, autophagy and apoptosis-related protein expressions. **Results** CCK8 assay and clone formation assay tests suggested that cell proliferation was restricted with the increasing concentration of pirfenidone. Scratch testing indicated that cell migration was restricted with the increasing concentration of pirfenidone. Western blot and flow cytometry tests showed that after the treatment with pirfenidone, the autophagy of HSC T6 cells was restricted and the apoptosis of HSC T6 cells was increased. The results of the treatment with combination use of pirfenidone and rapamycin revealed that autophagic agonist (rapamycin) could partially reverse the inhibition effect of pirfenidone on the activity of HSC T6 cells. **Conclusion** Pirfenidone can inhibit the proliferation and promote apoptosis of HSC T6 cells, which may be related to its inhibition effect on the autophagy of HSC T6 cells. (J Intervent Radiol, 2023, 32: 651-659)

【Key words】 hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; autophagy; proliferation; apoptosis

自噬是一种广泛存在于真核生物中的代谢过程, 可消除受损的细胞成分以维持细胞内的稳态^[1]。

有研究显示, 自噬可以通过激活肝星状细胞促进肝纤维化的发生^[1]。吡非尼酮是一种口服吡啶酮类似

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2023.07.006

基金项目: 国家自然科学基金(81760325)

作者单位: 550004 贵州贵阳 贵州医科大学影像学院/贵州医科大学附属医院介入科

通信作者: 周 石 E-mail: zhoushi@gmc.edu.cn

物-5-甲基-1-苯基-2-(1H)吡啶酮(pirfenidone, PFD),被用于治疗特发性肺纤维化和减缓肺功能下降。研究表明,PFD在进行性纤维化和炎症疾病中表现出抗纤维化、抗炎和抗氧化活性作用^[2-5]。吡非尼酮是否通过自噬影响肝纤维化鲜有报道。本研究探索吡非尼酮如何通过自噬机制发挥其抗纤维化作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

大鼠源性肝星状细胞 HSCT6 购自上海富衡生物科技有限公司。培养步骤:当细胞密度达到 80%~90%时,吸去培养基中的培养液,沿侧壁加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,后加入 1 mL 胰酶于 37℃ 培养箱中消化 1~2 min,最后加入 1 mL 培养基终止消化,1 000 r/min 离心 8~10 min,去上清,重悬细胞,将细胞悬液按 1:2 至 1:5 的比例分到新的培养皿中培养。细胞传至 4~6 代用于后续试验。HSCT6 细胞培养于含有 10%胎牛血清和双抗生素的 DMEM 培养基,置于 37℃、体积分数为 0.05 的 CO₂ 恒温培养箱中。

1.2 药物、试剂及抗体

吡非尼酮购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度≥98%;雷帕霉素购自 MCE(美国),纯度为 99.77%;DMEM、胎牛血清购自澳洲 Cellmax 公司;0.25%胰蛋白酶购自上海雅酶生物医药科技有限公司;PBS 缓冲液购自索莱宝生物科技有限公司;细胞计数试剂盒(CCK)-8 购自 TagerMol(美国);细胞凋亡检测试剂盒购自大连美仑生物技术公司;β-actin 购自 Affinity(美国);纤维化相关蛋白 α-SMA 购自 NovusBio(美国),胶原 I 购自 Abcam(英国),HSP-47 购自 SantaCruz(美国);自噬相关蛋白 BECN 购自 LifeSpan(美国),P62 和 LC3B 抗体购自 NovusBio(美国);凋亡相关蛋白 BAX 和 BCL-2 购自北京博奥森生物技术有限公司;HRP-IgG 羊抗兔和 HRP-IgG 羊抗鼠购自 ImmunoWay(美国);ECL 化学发光底物购自北京四正柏生物科技有限公司。

1.3 CCK-8 法检测 HSCT6 细胞增殖

将对数期生长的细胞以 5×10^3 个接种在 96 孔板中,每孔细胞悬液 100 μL。培养 24 h 后将培养基换成含有不同浓度 PFD 的药物培养基。PFD 处理 48 h 后,于每个孔中加入 CCK-8 检测试剂 10 μL,避光孵育 2 h。用分光光度计在 450 nm 下测量吸光度(A)值。根据实验分为对照组及不同药物浓度 PFD

(0、2、4、6、8 mmol/L)组,每组复孔 5 个。选择合适的药物浓度进行后续实验。

1.4 划痕实验检测 HSCT6 细胞迁移能力

将对数期生长的 HSCT6 细胞接种于 6 孔板中,用不同浓度吡非尼酮(0、2.5、5、7.5 mmol/L)以及对照组、吡非尼酮组(5 mmol/L)、雷帕霉素组(100 nmol/L)和吡非尼酮与雷帕霉素联合用药组不同分组处理细胞。当第 2 天细胞密度达到 80%~90%后,用 200 μL 灭菌枪头在各孔中笔直划一条线,并用 PBS 洗去脱离的细胞及碎片,加入不同药物浓度的培养基进行培养。分别于 0、24、48 h 时在标记区域进行拍照记录;实验重复 3 次,利用图像分析软件对划痕区域面积进行测量和统计,以此计算细胞迁移率。

1.5 克隆实验检测 HSCT6 细胞增殖能力

将 HSCT6 细胞以 10 个/孔接种到 6 孔板中培养。培养 24 h 后换成含有不同浓度吡非尼酮的培养基(0、2、4、6、8 mmol/L)处理 48 h,之后换成正常的培养基,每 3 天 1 次更换培养基,在 37℃、体积分数为 0.05 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 2 周。2 周之后吸去培养基,PBS 清洗,4%多聚甲醛固定细胞 20 min,PBS 清洗,结晶紫染色 20 min 并计算克隆集落数。

1.6 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达

将 HSCT6 细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,贴壁后处理细胞。弃各组细胞中的上清液,用预冷的 PBS 清洗 3 次。将配制好的细胞裂解液按照每孔 100 μL 加入 6 孔板中,冰上裂解 0.5 h。BCA 法测定蛋白浓度,按比例加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液,于加热器 100℃加热 5 min,-20℃保存。之后每组取 10 μg 蛋白质样本进行凝胶电泳,转膜、封闭。封闭后经一抗、二抗孵育,化学发光显影后采用图像处理软件进行分析。

1.7 流式细胞术检测 HSCT6 细胞凋亡

取对数期生长的 HSCT6 细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,24 h 后用不同浓度吡非尼酮(0、2.5、5、7.5 mmol/L)以及对照组、吡非尼酮组(5 mmol/L)、雷帕霉素组(100 nmol/L)和吡非尼酮雷帕霉素联合用药组不同分组进行实验,药物处理 48 h。按照 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒的使用说明,收集所有细胞并染色,于流式细胞仪上机检测细胞凋亡,并计算细胞凋亡率。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。正态

分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均进行 3 次重复验证,组间比较采用单因素方差分析,两组比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吡非尼酮抑制大鼠肝星状细胞增殖

CCK-8 法检测 HSCT6 细胞的增殖情况,吡非尼酮浓度为 0、2、4、6、8 mmol/L,随着吡非尼酮浓度的增加 HSCT6 细胞的增殖显著降低,其半数抑制浓度为 5.4 mmol/L(图 1①)。后续实验吡非尼酮浓度为 0、2.5、5、7.5 mmol/L 和 5 mmol/L。克隆实验结果显示随着吡非尼酮的浓度逐渐增加,HSCT6 细胞的集落数逐渐减少(图 1②)。流式细胞术结果也显示吡非尼酮浓度越高,HSCT6 细胞凋亡数越高(图 2①)。蛋白免疫印迹结果显示,随着吡非尼酮浓度增加,促凋亡蛋白 BAX 表达增高,抗凋亡蛋白 BCL-2 表达降低(图 2②)。

2.2 吡非尼酮抑制大鼠肝星状细胞活化

细胞划痕实验结果显示,随着吡非尼酮浓度的增加,HSCT6 细胞的迁移率逐渐降低(图 3);蛋白免疫印迹结果显示纤维化相关蛋白 α -SMA、HSP-47、胶原 I 随着吡非尼酮的浓度增加表达呈下降趋势(图 4)。

2.3 吡非尼酮通过抑制自噬影响肝星状细胞活性

结果显示,随着吡非尼酮的浓度增加,自噬蛋白 LC3B- II/LC3- I 的转化率和 BECN 表达逐渐降低,P62 表达逐渐增高(图 5)。随即采用 PFD 与自噬激动剂联合处理细胞。划痕实验结果显示,在 24、48 h 时对照组的细胞迁移明显高于吡非尼酮组和联合组,且联合组处理的细胞迁移高于吡非尼酮

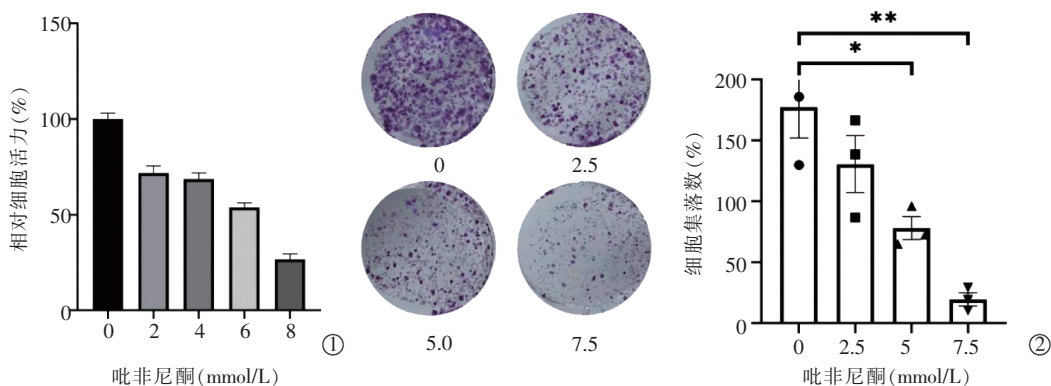
组,差异有统计学意义(图 6)。对于纤维化相关蛋白 α -SMA、HSP-47、胶原 I 的表达,对照组明显高于吡非尼酮组与联合组,雷帕霉素组明显高于吡非尼酮组,吡非尼酮组明显低于联合组,差异均有统计学意义(图 7①)。对于自噬相关蛋白,吡非尼酮组 LC3B- II/LC3- I 的转化率低于联合组和雷帕霉素组,吡非尼酮组 BECN 的表达低于对照组和雷帕霉素组,差异有统计学意义;联合组 BECN 的蛋白表达也高于吡非尼酮组,但差异无统计学意义(图 7②)。吡非尼酮组 P62 的蛋白表达高于对照组、雷帕霉素组以及联合组,差异均有统计学意义(图 7②)。

2.4 吡非尼酮通过抑制自噬促进肝星状细胞凋亡

联合用药处理 HSCT6 细胞后,吡非尼酮组 BAX 的表达比对照组和雷帕霉素组明显提高,BCL-2 的表达对比对照组明显降低,差异均有统计学意义(图 8①);吡非尼酮组对比联合组,BCL-2 的表达有所降低,差异无统计学意义,而 BAX 的表达比联合组明显提高,差异有统计学意义(图 8①);联合组对比雷帕霉素组,BAX 的表达明显降低,BCL-2 的表达明显增多,差异有统计学意义(图 8①)。流式细胞术结果显示,吡非尼酮组的凋亡数明显高于对照组以及联合组,差异均有统计学意义(图 8②);联合组的凋亡数高于对照组和雷帕霉素组,差异无统计学意义(图 8②)。

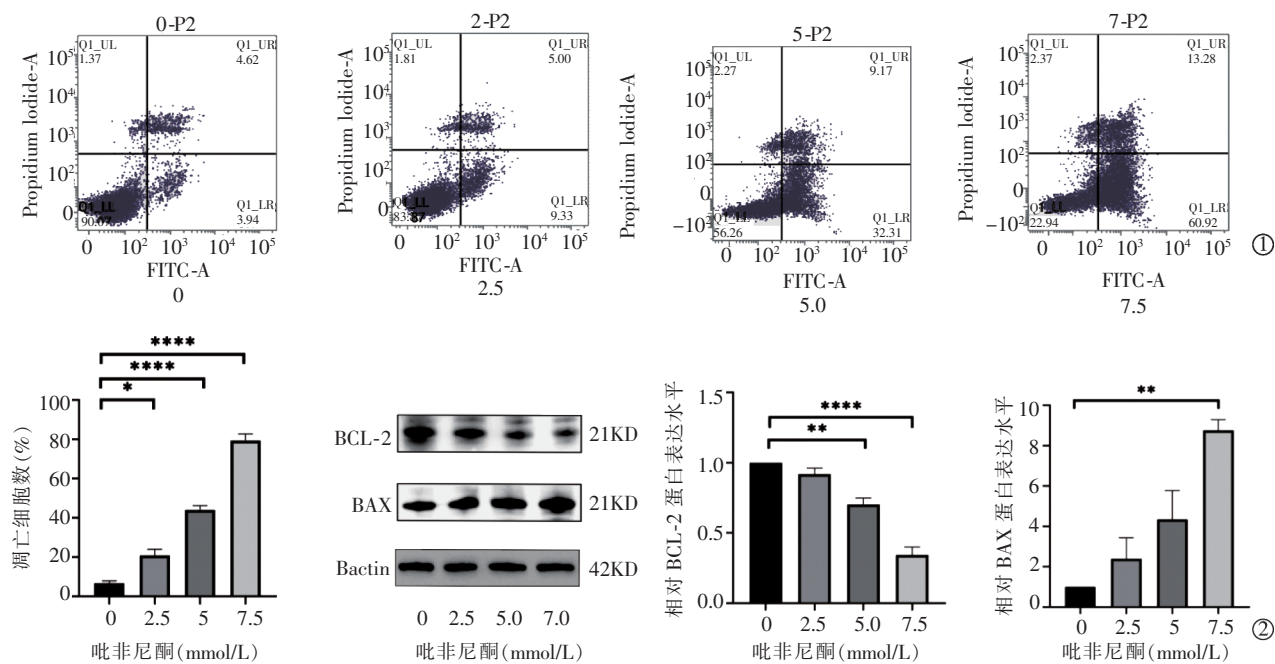
3 讨论

临床上吡非尼酮主要用于治疗特发性肺纤维化,但其治疗肺纤维化并没有明确的靶点^[4]。PFD 被认为可以抑制促纤维化和促炎细胞因子,如转化生长因子(TGF)- β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞



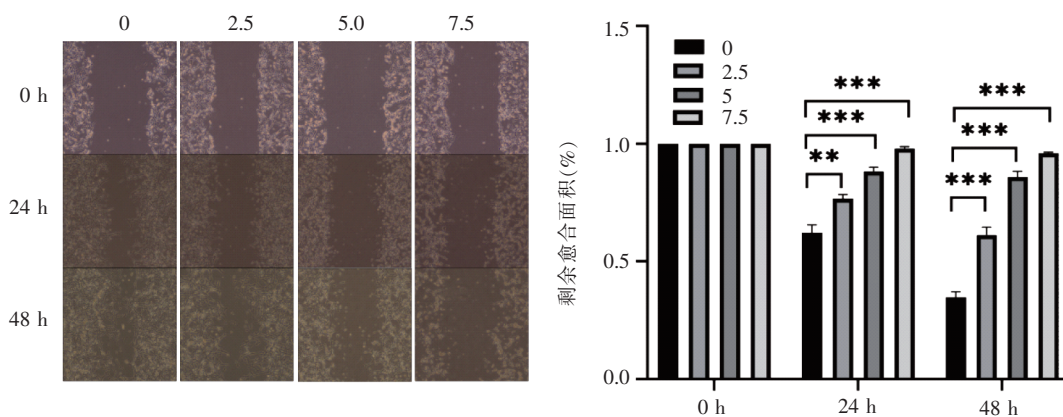
①CCK-8 法检测不同浓度吡非尼酮处理 HSCT6 细胞后的增殖情况;②不同浓度吡非尼酮处理 HSCT6 细胞后的克隆形成情况。 $*P < 0.05$; $**P < 0.01$

图 1 吡非尼酮抑制大鼠肝星状细胞增殖



①不同浓度吡非尼酮对 HSC6 细胞凋亡的影响;②不同浓度吡非尼酮处理 HSC6 细胞后其凋亡蛋白的变化。* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.0001$

图 2 吡非尼酮抑制大鼠肝星状细胞增殖



不同浓度吡非尼酮处理 HSC6 细胞后 0 h, 24 h, 48 h 的迁移变化。** $P<0.01$; *** $P<0.001$

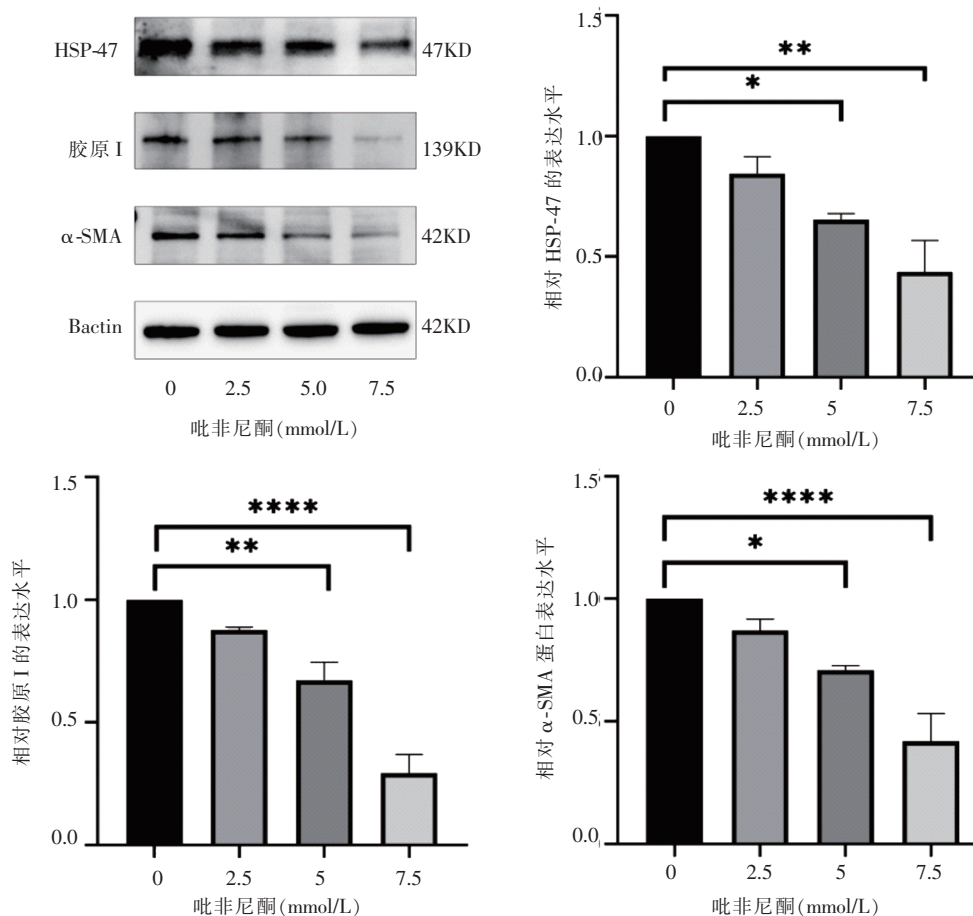
图 3 吡非尼酮抑制肝星状细胞迁移

介素(IL)-6 的产生和释放,从而减缓成纤维细胞的增殖和胶原沉积。此外,PFD 还可调节成纤维生长因子,从而减弱成纤维细胞增殖、肌成纤维细胞分化、胶原蛋白和纤维连接蛋白的合成以及细胞外基质的沉积^[5]。

肺纤维化主要由于肺泡上皮反复亚临床损伤,随后肺泡再上皮化和修复失败,同时肺泡内的活化细胞释放大量的细胞因子和生长因子,导致肺成纤维细胞的募集、增殖和分化为肌成纤维细胞,并释放过度的胶原沉积形成,最终导致进行性肺实质瘢痕形成和不可逆转的功能丧失^[6]。PFD 可以降低大鼠模型肺组织中 TNF- α 、IL-6 水平,抑制上皮间质转化和肺纤维化,这可能与 TGF- β 1/Smad 通路有

关,PFD 还可以反向调节肺成纤维细胞活性,以达到抑制成纤维细胞介导的纤维化过程^[7-8]。

肝纤维化主要因为肝脏持续慢性损伤,肝星状细胞被激活并转分化为具有增殖、收缩、迁移、促炎和纤维化特性的肌成纤维细胞,并分泌大量的细胞外基质形成^[9]。此外,肝星状细胞还可以分泌促纤维化细胞因子,加速成纤维细胞、门脉纤维细胞和肌成纤维细胞的生成,最终导致肝纤维化形成。其与肺纤维化的机制有本质差异,但最终都是细胞外基质蛋白大量沉积引起。迄今为止,还没有专门针对肝纤维化本身的治疗方法^[10]。PFD 可抑制啮齿类动物的肝星状细胞活化和纤维化,但尚未明确分子靶点^[4]。一项小鼠模型显示,PFD 可以通过降



不同浓度吡非尼酮处理 HSC6 细胞后纤维化相关蛋白 α-SMA、胶原 I 及 HSP-47 的蛋白表达情况。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$

图 4 吡非尼酮抑制肝星状细胞活性

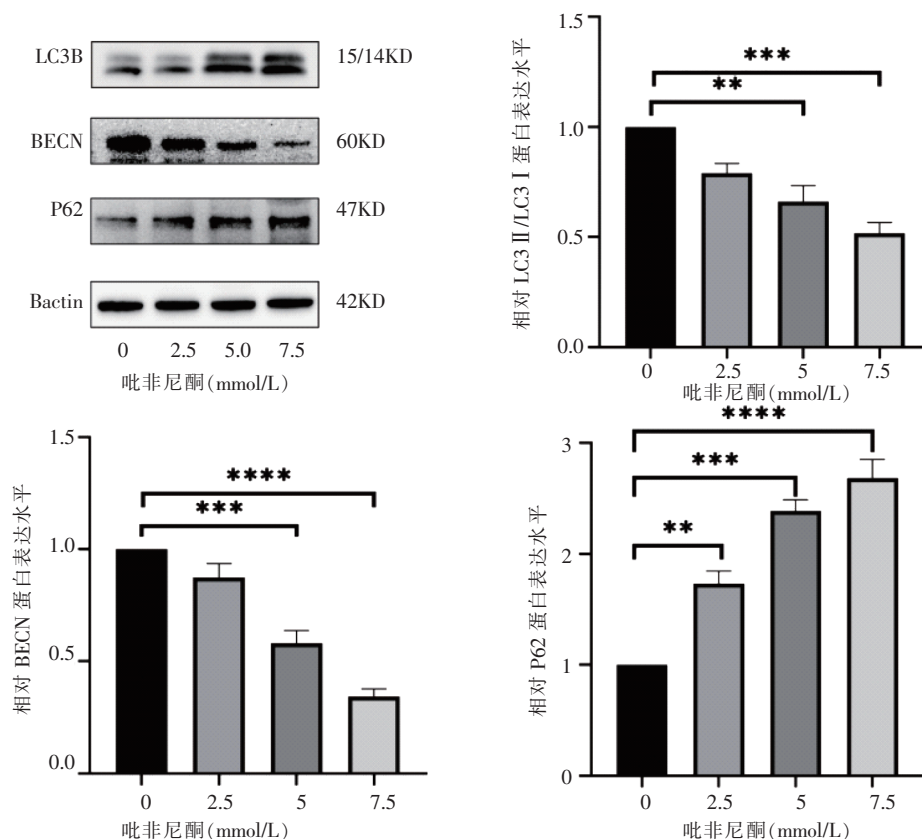
低肝星状细胞活化,降低 TGF- β 、TNF- α 和 α -SMA 水平,改变 TIMP-MMP 平衡使肝纤维化中的细胞外基质降解,促进肝纤维化的消退,导致胶原蛋白含量减少^[11]。

因为 PFD 主要在肝脏中被细胞色素 P450 代谢,所以肝病患者一定要小心使用。接受标准释放的 PFD 治疗的轻度急性肝衰竭患者在 12 个月时炎症和纤维化减少了 30%,在 24 个月时减少了 67%,且没有明显的不良反应^[12-13]。一项晚期肝硬化患者的研究中,缓慢释放 PFD 与标准护理方案相结合,炎症以及肝纤维化有明显的改善,并且不良反应很少^[14]。所以在标准化的治疗当中,吡非尼酮的疗效和不良反应是相对可控的。

在本研究中,吡非尼酮有效地抑制肝星状细胞的增殖、迁移并促进凋亡,降低纤维化标志蛋白 α -SMA、HSP-47、胶原 I 的表达。说明吡非尼酮可以降低肝星状细胞的活性,并促进其凋亡,具有抗肝纤维化的能力。

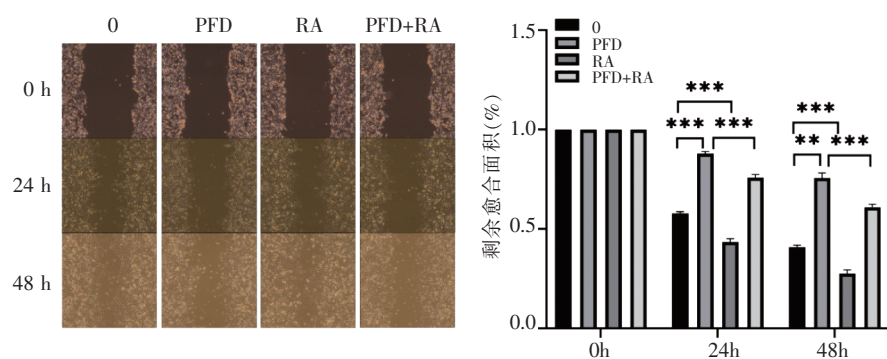
自噬是一个复杂的代谢过程,可分为 3 种类型:巨自噬、微自噬和伴侣介导的自噬^[15]。当细胞经历饥饿或营养过剩或清除受损的细胞器和多余或错误折叠的蛋白质时,自噬途径都会被激活^[16-17]。研究表明,自噬的激活对于肝星状细胞的活化和随后的肝组织纤维化过程是必不可少的^[18]。

迄今为止,自噬在促进或抑制肝纤维化中的作用仍有争议。一方面,自噬可以参与脂滴的消化,为肝星状细胞的激活提供能量,对促进纤维化有直接影响;另一方面,自噬可以通过抗炎作用抑制肝纤维化的出现。如在肝星状细胞中 ATG5 或 ATG7 缺失的小鼠对纤维化表现出了明显抗性^[19]。在 CCL4 和 BDL 诱导的肝纤维化小鼠模型中异鼠李素可通过 TGF- β 途径抑制自噬并减少细胞外基质形成而减少肝纤维化^[20]。在另一项动物研究中,SH2 可通过和 REDD1 激活 mTOR 通路,促进自噬减轻肝纤维化^[21]。在一项体外研究中,姜黄素也可以通过诱导肝星状细胞自噬减轻肝纤维化^[22]。



不同浓度吡非尼酮处理 HSC6 细胞后自噬相关蛋白的表达情况。* $P<0.01$; ** $P<0.001$; *** $P<0.0001$

图 5 吡非尼酮抑制肝星状细胞自噬水平



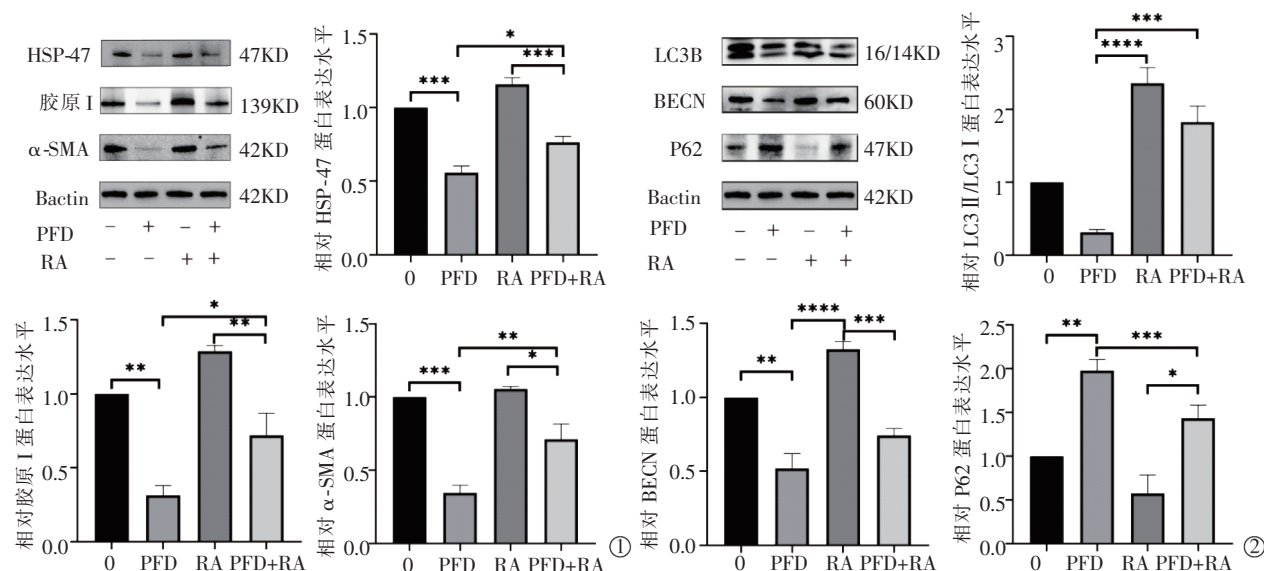
细胞划痕实验检测 0 h, 24 h, 48 h 时联合用药处理 HSC6 细胞后对其迁移的影响。* $P<0.01$;

*** $P<0.001$

图 6 吡非尼酮通过抑制自噬降低肝星状细胞的迁移能力

本研究用吡非尼酮处理肝星状细胞的结果提示, 自噬相关蛋白 BECN 的表达和 LC3B- II / LC3- I 的转化率降低, P62 增加。提示吡非尼酮抑制肝星状细胞的自噬流。相反, 当联合自噬激动剂雷帕霉素后, 肝纤维化蛋白和自噬蛋白的表达以及细胞迁移情况对比单用吡非尼酮都得到明显改善。表明自噬可以通过促进肝星状细胞活化, 进而导致肝纤维化发生发展, 而抑制自噬可以减轻肝纤维化。

在凋亡中, BAX/BCL-2 的比值是衡量细胞经线粒体途径凋亡的重要指标, BAX/BCL-2 比值升高时, 凋亡增加; 反之, 凋亡减少。有体外研究表明, 吡非尼酮可抑制 HCC 细胞和非小细胞肺癌的增殖并促进其凋亡^[23-24]。吡非尼酮还可抑制 TGF- β 信号通路, 以减少 TGF- β 过表达之后血小板衍生生长因子 (PDGF) 或表皮生长因子 (EGF) 信号转导激活增殖和抗细胞凋亡信号^[25]。自噬与凋亡也有 3 种关系: 合作、推动和对抗关系。如在某些细



①联合用药处理 HSC6 细胞后纤维化相关蛋白表达情况;②联合用药处理 HSC6 细胞后自噬相关蛋白的表达情况。 $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; $^{****}P<0.0001$

图 7 吡非尼酮通过抑制自噬影响肝星状细胞活性

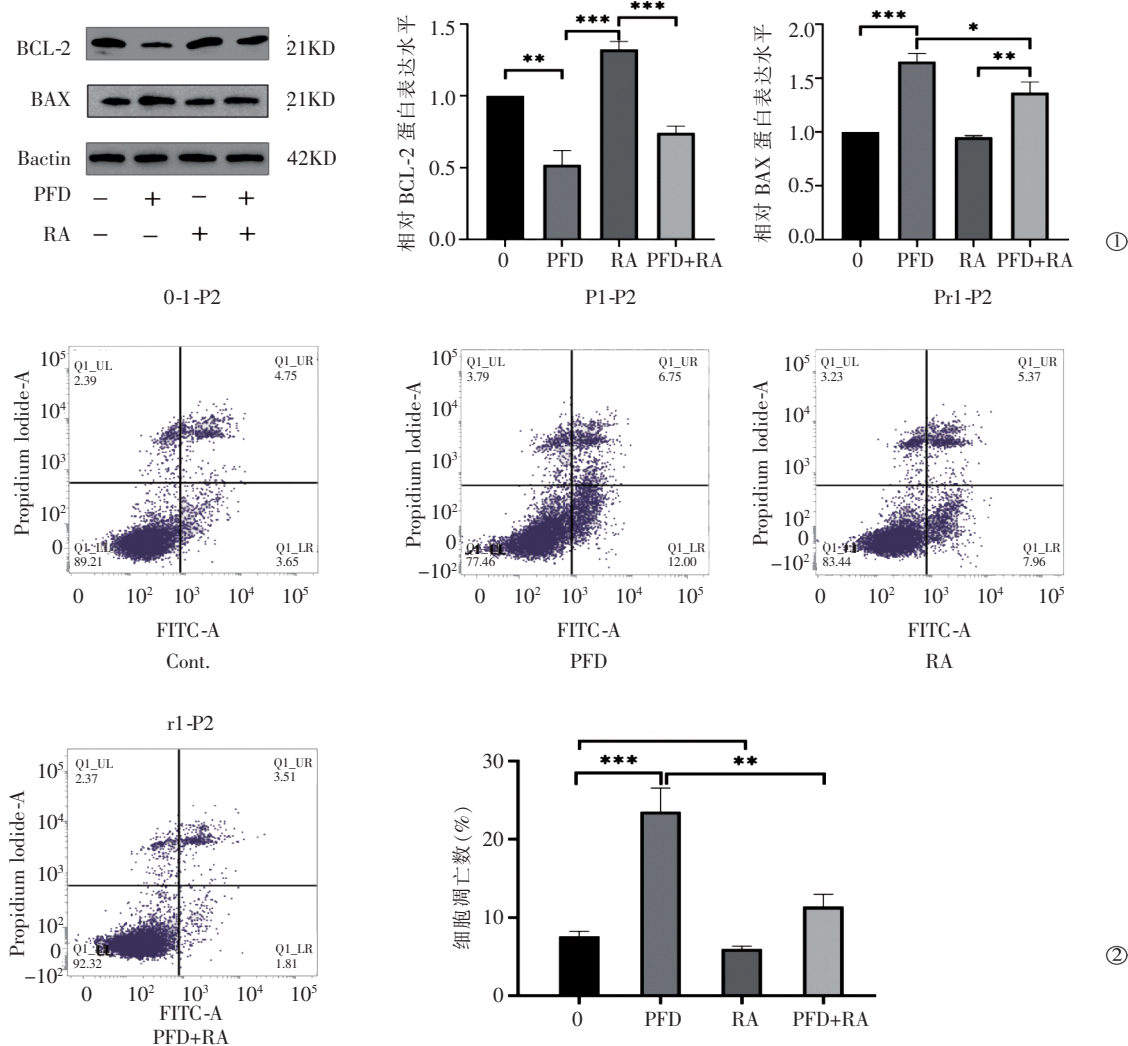
胞环境中,自噬会作为执行死亡过程的备用机制执行细胞凋亡^[19]。有研究表明,在类固醇激素 20-羟基蜕皮酮调控下,自噬会促进棉铃虫中肠的细胞凋亡^[26]。在 IL-24 的调控下,毒性自噬可以诱导人以及啮齿动物癌细胞的凋亡^[27]。这都是合作关系的一种。

本研究中,经吡非尼酮药物处理之后,BAX 的蛋白表达增加,BCL-2 降低;而加入雷帕霉素共作用之后,单用吡非尼酮组凋亡蛋白的表达明显改善,BAX 的蛋白表达量降低,BCL-2 的蛋白表达量增高。比较吡非尼酮组与吡非尼酮和雷帕霉素联合组的细胞凋亡率,联合组的凋亡率明显小于单用吡非尼酮组。与吡非尼酮可促进肝癌细胞凋亡的结果相一致。本研究中吡非尼酮也可以促进肝星状细胞的凋亡增加,减少肝星状细胞的增殖,从而减轻肝纤维化。之后加入自噬激动剂联合处理之后,促进了肝星状细胞的自噬,其表现出了细胞凋亡的减少,肝星状细胞活性的恢复,肝纤维化的程度也明显增强。与前述自噬与凋亡处于合作的关系相反,本研究中自噬与凋亡体现出的是对抗关系,抑制自噬可以促进凋亡。

综上所述,吡非尼酮可抑制肝星状细胞增殖、迁移能力,促进细胞凋亡。此外,吡非尼酮可抑制肝星状细胞活性及自噬流。吡非尼酮有望成为一种治疗肝纤维化的潜力药物,其治疗机制还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Ezhilarasan D, Sokal E, Najimi M. Hepatic fibrosis: it is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2018, 17: 192-197.
- [2] Behr J, Prasse A, Kreuter M, et al. Pirfenidone in patients with progressive fibrotic interstitial lung diseases other than idiopathic pulmonary fibrosis(RELIEF): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial [J]. Lancet Respir Med, 2021, 9: 476-486.
- [3] Sharawy MH, Serriya MS. Pirfenidone attenuates gentamicin-induced acute kidney injury by inhibiting inflammasome-dependent NLRP3 pathway in rats[J]. Life Sci, 2020, 260: 118454.
- [4] Xi Y, Li Y, Xu P, et al. The anti-fibrotic drug pirfenidone inhibits liver fibrosis by targeting the small oxidoreductase glutaredoxin-1 [J]. Sci Adv, 2021, 7: eabg9241.
- [5] Lv Q, Wang J, Xu C, et al. Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo through regulating Wnt/GSK-3 β / β -catenin and TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathways[J]. Mol Med, 2020, 26: 49.
- [6] Spagnolo P, Cottin V. Genetics of idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanistic pathways to personalised medicine[J]. J Med Genet, 2017, 54: 93-99.
- [7] Guo J, Yang Z, Jia Q, et al. Pirfenidone inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis in the rat silicosis model[J]. Toxicol Lett, 2019, 300: 59-66.
- [8] Al-Kuraishy HM, Batiha GE, Faidah H, et al. Pirfenidone and post-covid-19 pulmonary fibrosis: invoked again for realistic goals[J]. Inflammopharmacology, 2022, 30: 2017-2026.
- [9] Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell



①联合用药处理 HSC-T6 细胞后其抗凋亡蛋白的表达情况；②联合用药处理 HSC-T6 细胞后其细胞凋亡率的变化。^{*} $P<0.05$ ；^{**} $P<0.01$ ；^{***} $P<0.001$

图 8 吡非尼酮通过抑制自噬促进肝星状细胞凋亡

- activation[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14: 397-411.
- [10] Bansal MB, Chamroonkul N. Correction to: antifibrotics in liver disease: are we getting closer to clinical use?[J]. *Hepatol Int*, 2019, 13: 40-41.
- [11] Salah MM, Ashour AA, Abdelghany TM, et al. Pirfenidone alleviates concanavalin A-induced liver fibrosis in mice[J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116982.
- [12] Armendáriz-Borunda J, Islas-Carbajal MC, Meza-García E, et al. A pilot study in patients with established advanced liver fibrosis using pirfenidone[J]. *Gut*, 2006, 55: 1663-1665.
- [13] Flores - Contreras L, Sandoval - Rodriguez AS, Mena - Enriquez MG, et al. Treatment with pirfenidone for two years decreases fibrosis, cytokine levels and enhances CB2 gene expression in patients with chronic hepatitis C[J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 131.
- [14] Poo JL, Torre A, Aguilar-Ramirez JR, et al. Benefits of prolonged-release pirfenidone plus standard of care treatment in patients with advanced liver fibrosis: PROMETEO study[J]. *Hepatol Int*, 2020, 14: 817-827.
- [15] Kong D, Zhang Z, Chen L, et al. Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy[J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101600.
- [16] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88: 125-172.
- [17] Yu F, Guo Y, Chen B, et al. LincRNA-p21 inhibits the Wnt/ β -catenin pathway in activated hepatic stellate cells via sponging microRNA-17-5p[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41: 1970-1980.
- [18] Ruwanpura SM, Thomas BJ, Bardin PG. Pirfenidone: molecular mechanisms and potential clinical applications in lung disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62: 413-422.
- [19] Hernandez - Gea V, Ghiassi - Nejad Z, Rozenfeld R, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic

- stellate cells in mice and in human tissues[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142: 938-946.
- [20] Liu N, Feng J, Lu X, et al. Isorhamnetin inhibits liver fibrosis by reducing autophagy and inhibiting extracellular matrix formation via the TGF- β 1/Smad3 and TGF- β 1/p38 MAPK pathways[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 6175091.
- [21] Gao J, Wei B, De Assuncao TM, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 1144-1154.
- [22] Zheng Y, Zhao T, Wang J, et al. Curcumin alleviates liver fibrosis through inducing autophagy and ferroptosis in hepatic stellate cells[J]. *FASEB J*, 2022, 36: e22665.
- [23] Ferro F, Servais S, Besson P, et al. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 129-138.
- [24] Springer MZ, Poole LP, Drake LE, et al. BNIP3 - dependent mitophagy promotes cytosolic localization of LC3B and metabolic homeostasis in the liver[J]. *Autophagy*, 2021, 17: 3530-3546.
- [25] Zhang XW, Zhou JC, Peng D, et al. Disrupting the TRIB3 - SQSTM1 interaction reduces liver fibrosis by restoring autophagy and suppressing exosome-mediated HSC activation[J]. *Autophagy*, 2020, 16: 782-796.
- [26] Thoen LF, Guimaraes EL, Dolle L, et al. A role for autophagy during hepatic stellate cell activation[J]. *J Hepatol*, 2011, 55: 1353-1360.
- [27] Zou WJ, Huang Z, Jiang TP, et al. Pirfenidone inhibits proliferation and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 6107-6113.

(收稿日期:2023-01-20)

(本文编辑:新 宇)

·临床研究 Clinical research·

激光消融联合球囊扩张治疗血栓闭塞性脉管炎导致的重度肢体缺血

郭建明, 谷涌泉, 崔世军, 高喜翔, 佟 铸, 张 帆, 李常洲, 王 飞, 苏志向, 郭连瑞

【摘要】 目的 观察激光消融联合球囊扩张治疗血栓闭塞性脉管炎导致的重度肢体缺血的疗效。**方法** 收集 2021 年 8 月至 11 月于首都医科大学宣武医院接受激光联合球囊扩张治疗的 8 例脉管炎患者的临床资料,观察围手术期并发症及术后 3 个月、6 个月的保肢率、疼痛评分、Rutherford 分级和血管通畅情况。**结果** 8 例患者手术均成功,无围手术期并发症,6 个月保肢率 100%。4 例患者破溃伤口均于 3 个月内愈合。1 例足趾破溃坏疽患者术后 4 个月靶血管出现再闭塞,伤口已愈合,出现静息痛,接受肝细胞生长因子转移酶裸质粒注射治疗。患者术后疼痛评分较术前改善明显。**结论** 激光消融联合球囊扩张治疗血栓闭塞性脉管炎导致的重度肢体缺血是安全有效的。

【关键词】 脉管炎; 肢体缺血; 激光; 球囊扩张

中图分类号:R654.4 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2023)-08-0659-04

Laser ablation combined with balloon angioplasty for critical limb ischemia due to thromboangiitis obliterans GUO Jianming, GU Yongquan, CUI Shijun, GAO Xixiang, TONG Zhu, ZHANG Fan, LI Changzhou, WANG Fei, SU Zhixiang, GUO Lianrui. Department of Vascular Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: GUO Lianrui, E-mail: lianruigu@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy of laser ablation combined with balloon angioplasty in the treatment of critical limb ischemia due to thromboangiitis obliterans(TAO). **Methods** The clinical data of 8 patients with TAO, who were treated with laser ablation combined with balloon angioplasty at the Xuanwu Hospital of Capital Medical University of China between August and November of 2021, were

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2023.07.007

作者单位: 100053 北京 首都医科大学宣武医院血管外科

通信作者: 郭连瑞 E-mail: lianruigu@sina.com