



SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE 学者介绍



王俊青 博士
WANG Jun-qing Ph.D

副主任医师、硕士生导师
Associate Chief Physician, Master Supervisor



ORCID ID: 0000-0003-1219-639X



王俊青(1982—),上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科副主任医师。美国德州大学西南医学中心访问学者,法国斯特拉斯堡大学医学院访问学者,美国密西西比大学医学中心外籍合作学者。现任中国抗癌协会肝癌专业委员会—华东肝癌外科中青年联盟成员、上海市医学会普外科分会门脉高压学组成员、上海市科学技术专家库专家、上海交通大学医学院优秀青年科技人才库专家、《中国普通外科杂志》中青年编委。入选上海市浦江人才计划、上海市教育委员会高峰高原学科建设计划—上海交通大学医学院“双百人”队伍。主持国家自然科学基金2项、省部级课题1项、上海市局级等课题3项;主要参与国家自然科学基金面上项目4项、上海市科学技术委员会科研计划项目等6项。长期从事肝脏恶性肿瘤的临床和基础研究,揭示了假基因等非编码转录产物在肝细胞癌形成、复发和转移等方面的作用。

该研究依托上海交通大学医学院“双一流”暨高水平地方高校建设一流学科—临床医学—临床科研支撑体系建设。

代表性论著

1. Hao F, Wang N, Wang X, Chen Y, Wang J. Identification of prognostic long non-coding RNA signature with potential drugs in hepatocellular carcinoma[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(14):18789–18805.
2. Xu W, Li K, Song C, Wang X, Li Y, Xu B, Liang X, Deng W, Wang J, Liu J. Knockdown of lncRNA LINC01234 suppresses the tumorigenesis of liver cancer via sponging miR-513a-5p[J]. Front Oncol, 2020, 16(10): 571565.
3. Xiao JX, Xu W, Fei X, Hao F, Wang N, Chen Y, Wang J. Anillin facilitates cell proliferation and induces tumor growth of hepatocellular carcinoma via miR-138/SOX4 axis regulation[J]. Transl Oncol, 2020, 13(10):100815.
4. Wang J, Wang X, Bhat A, Chen Y, Xu K, Mo YY, Yi SS, Zhou Y. Comprehensive network analysis reveals alternative splicing-related lncRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Front Genet, 2020, 15(11): 659.
5. Hao F, Fei X, Ren X, Xi Xiao J, Chen Y, Wang J. Pseudogene AKR1B10P1 enhances tumorigenicity and regulates epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via stabilizing SOX4[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(20):11779–11790.

论著·基础研究

阿托伐他汀对肝纤维化的改善作用及其机制

汪楠*, 陆晔*, 郝风节#, 王俊青#

上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科, 上海 200025

[摘要] **目的**·探讨阿托伐他汀在肝纤维化患者和动物模型中的作用及其机制。**方法**·检索PubMed上他汀类药物不同慢性肝病的文献, 起止时间为2010年1月—2020年6月。对肝纤维化发生率、肝功能失代偿发生率及患者总体死亡率进行meta分析。将16只雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组、阿托伐他汀组、四氯化碳(CCl₄)注射组、CCl₄注射联合阿托伐他汀组, 每组4只。CCl₄注射组小鼠以20%体积分数的CCl₄按1 mL/kg的剂量, 每周行2次腹腔注射; 对照组使用同剂量玉米油进行腹腔注射; 阿托伐他汀组小鼠每日以15 mg/kg剂量的阿托伐他汀灌胃1次; CCl₄注射联合阿托伐他汀组联合采用上述CCl₄和阿托伐他汀的处理方式。4周后处死小鼠, 检测血清谷丙转氨酶(glutamic pyruvic transaminase, GPT)、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)浓度; 采用天狼星红染色检测小鼠肝内纤维化程度; 采用免疫荧光染色检测肝纤维化标志物IA型胶原蛋白(collagen IA)的表达; 采用实时荧光定量PCR检测肝组织α平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、collagen I、collagen III, 以及白介素(interleukin, IL)-1b、IL-6、转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)的表达; 采用免疫印迹法检测肝组织α-SMA蛋白和磷酸化Smad4(pSmad4)蛋白的表达。**结果**·最终选取9篇文献进行meta分析, 结果显示他汀类药物可降低肝病患者肝纤维化、肝功能失代偿的发生率及总体死亡率。在动物实验中, 4周处理后, 与对照组比较, CCl₄注射组和CCl₄注射联合阿托伐他汀组小鼠体质量均显著下降(均 $P=0.000$); 而CCl₄注射联合阿托伐他汀组小鼠体质量与CCl₄注射组比较, 下降程度较轻, 组间差异有统计学意义($P=0.040$)。与对照组比较, CCl₄注射组和CCl₄注射联合阿托伐他汀组小鼠GPT、GOT浓度均显著上升(均 $P=0.000$); 而CCl₄注射联合阿托伐他汀组小鼠肝酶与CCl₄注射组比较, GPT、GOT上升幅度均较小, 组间差异有统计学意义($P=0.020$)。天狼星红染色显示CCl₄注射组肝内纤维过度沉积, 免疫荧光染色显示collagen IA在CCl₄注射组中高表达。实时荧光定量PCR、免疫印迹法检测结果显示: 与对照组相比, CCl₄注射组中α-SMA蛋白表达升高, α-SMA、collagen I、collagen III的mRNA表达升高(均 $P<0.05$); 而CCl₄注射联合阿托伐他汀组与CCl₄注射组比较, 上述指标均有所下调, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与对照组相比, CCl₄注射组中IL-1b、IL-6的mRNA表达轻微上升, TGF-β的mRNA表达显著升高(均 $P<0.05$); 而CCl₄注射联合阿托伐他汀组与CCl₄注射组比较, IL-1b、IL-6的mRNA表达显著升高, TGF-β的mRNA表达显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与对照组相比, CCl₄注射组pSmad4蛋白表达升高; 而CCl₄注射联合阿托伐他汀组与CCl₄注射组相比, pSmad4蛋白表达较低。**结论**·阿托伐他汀可能通过调控TGF-β通路, 延缓肝纤维化的发生及发展。

[关键词] 阿托伐他汀; 肝纤维化; 炎症; 转化生长因子β; 信号通路**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.12.011 **[中图分类号]** R575.2 **[文献标志码]** A

Ameliorative effect of atorvastatin on hepatic fibrosis and its mechanism

WANG Nan*, LU Ye*, HAO Feng-jie#, WANG Jun-qing#

Department of General Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the role of atorvastatin and its mechanisms in patients and animal models of hepatic fibrosis. **Methods**·The literatures in PubMed were searched for statins for different chronic liver diseases from January 2010 to June 2020. Meta analysis was performed based on the occurrence of liver fibrosis, liver failure and overall patient mortality. Sixteen male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, atorvastatin group, CCl₄ injection group, and CCl₄ injection combined with atorvastatin group with 4 mice in each group. The mice in the CCl₄ injection group were administered intraperitoneally twice a week with 20% volume fraction of CCl₄ at a dose of 1 mL/kg; the control group was administered intraperitoneally by using the same dose of corn oil; the mice in the atorvastatin group were gavaged once daily with a dose of 15 mg/kg of atorvastatin; the mice in the CCl₄ injection combined with atorvastatin group were treated with a combination of CCl₄ and atorvastatin. After 4 weeks, the animals were euthanized, and serum glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) were detected; the degree of intrahepatic fibrosis in the mice was detected by Sirius red staining; immunofluorescence staining was used to detect the expression of collagen IA; the mRNA

[基金项目] 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划(20191901); 上海市浦江人才计划(18PJD029); 上海交通大学医工交叉研究基金(YG2021QN21)。**[作者简介]** 汪楠(1997—), 男, 硕士生; 电子邮箱: wangnan2020@sjtu.edu.cn。陆晔(1977—), 男, 主治医师, 学士; 电子邮箱: eric_luye@163.com。
*为共同第一作者。**[通信作者]** 郝风节, 电子邮箱: fengjie_haochn@163.com。王俊青, 电子邮箱: wangjunqingmd@hotmail.com。*为共同通信作者。**[Funding Information]** Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support(20191901); Shanghai Pujiang Talent Project(18PJD029); Interdisciplinary Research Foundation for Medicine and Engineering from Shanghai Jiao Tong University(YG2021QN21)。**[Corresponding Author]** HAO Feng-jie, E-mail: fengjie_haochn@163.com. WANG Jun-qing, E-mail: wangjunqingmd@hotmail.com。*Co-corresponding author.

expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen I, collagen III, interleukin (IL)-1b, IL-6, and transforming growth factor- β (TGF- β) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR; the expressions of α -SMA protein and phosphorylated Smad4 (pSmad4) protein were detected by Western blotting. **Results** Finally 9 papers were selected for meta analysis, and the results showed that statins reduced the incidence of liver fibrosis, liver failure and overall mortality in patients with liver disease. In the animal experiments, the weight of mice in both the CCl₄ injection group and the CCl₄ injection combined with atorvastatin group decreased significantly compared with that in the control group ($P=0.000$); while the weight of mice in the CCl₄ injection combined with atorvastatin group decreased to a lesser extent compared with that in the CCl₄ injection group ($P=0.040$). Compared with the control group, GPT and GOT concentrations were significantly increased in both the CCl₄ injection group and CCl₄ injection combined with atorvastatin group ($P=0.000$), while liver enzymes in the CCl₄ injection combined with atorvastatin group showed a smaller increase in GPT and GOT compared with that in the CCl₄ injection group ($P=0.020$). Sirius red staining showed excessive deposition of intrahepatic fibers in the CCl₄ injection group, and immunostaining suggested high expression of collagen I A in the CCl₄ injection group. The results of fluorescence quantitative PCR and Western blotting suggested that α -SMA protein expression increased, and mRNA expressions of α -SMA, collagen I, and collagen III were upregulated in the CCl₄ injection group compared with the control group ($P<0.05$), whereas the expressions of these markers were downregulated in the CCl₄ injection combined with atorvastatin group compared with the CCl₄ injection group ($P<0.05$). The mRNA expressions of *IL-1b* and *IL-6* were slightly upregulated and the expression of *TGF- β* was significantly upregulated in the CCl₄ injection group compared with the control group ($P<0.05$). In contrast, the mRNA expressions of *IL-1b* and *IL-6* were significantly up-regulated and the expression of *TGF- β* decreased in the CCl₄ injection combined with atorvastatin group compared with the CCl₄ injection group ($P<0.05$). The expression of pSmad4 protein increased in the CCl₄ injection group compared with the control group, while the expression of pSmad4 protein was lower in the CCl₄ injection combined with atorvastatin group compared with the CCl₄ injection group. **Conclusion** Atorvastatin may attenuate the occurrence and development of liver fibrosis via manipulating TGF- β signaling pathway.

[Key words] atorvastatin; liver fibrosis; inflammation; transforming growth factor- β ; signaling pathway

他汀类药物是肝脏合成胆固醇的限速酶——羟甲基戊二酰辅酶A (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMG-CoA) 还原酶的抑制剂, 不仅能有效抑制胆固醇和低密度脂蛋白合成, 还能轻度降低三酰甘油和升高高密度脂蛋白含量, 是临床上广泛使用的调脂药物^[1]。肝纤维化是临床常见的进展期肝病, 常由多种基础肝病如病毒性肝炎、脂肪性肝病、酒精性肝病、胆汁淤积性肝炎等慢性疾病发展而来。每年全球有超过100万人死于重度肝纤维化, 其中约11%的患者来自中国^[2]。在临床工作中, 他汀类药物常用于脂肪肝的治疗。然而, 近年来多项研究揭示他汀类药物在肝脏中具有缓解肝内脂肪堆积之外的保护作用^[3]。Schierwagen等^[4]证实, 他汀类药物可通过抑制GTP蛋白酶RhoA及Ras蛋白异戊二烯化缓解非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)导致的肝内炎症。此外, 他汀类药物在多种动物模型中具有缓解纤维化形成、保护肝脏功能的作用。既往研究^[5]表明, 在严重NASH导致的肝纤维化中, 他汀类可抑制肝细胞对星状细胞的旁分泌, 以及星状细胞的激活。在胆源性肝纤维化中, 他汀类药物可激活孕烷X受体(pregnane X receptor, PXR)及过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferation-activated receptor α , PPAR α)通路, 降低肝内胆汁酸浓度^[6]。在本研究中, 首先通过meta分析探讨他汀类药物在多种慢性肝病中是否可缓解肝纤维化进展及门脉高压症; 再通过腹腔注射四氯化碳(CCl₄)构建小鼠肝纤维化模型, 进一步明确他汀类药物在肝纤维化这一严重肝脏病变中的作用和机制。

1 资料与方法

1.1 检索策略

检索PubMed上相关文献, 起止时间为2010年1月—2020年6月。检索策略为(statin OR statins OR simvastatin OR pravastatin OR lovastatin OR atorvastatin OR fluvastatin OR rosuvastatin) AND (liver diseases OR hepatitis B OR hepatitis C OR alcoholic liver disease OR fatty liver OR liver cancer OR hepatocellular carcinoma OR HCC)。

1.2 文献的纳入和排除

文献纳入标准: 英文语言; 存在使用他汀类药物与不使用他汀类药物的组间比较; 患者存在明确基础肝病; 患者具有明确肝功能失代偿及肝纤维化; 其他并发症如静脉曲张、腹水、肝性脑病等有明确定义; 队列中患者年龄均>18周岁。文献排除标准: 基础研究; 病例分析; 综述; 实验设计存在明显缺陷; 临床数据缺失。

所有文献的纳入和排除分别由2位研究者独立完成。当两人意见不一时, 则由第三位研究者协调直至达成一致意见。

1.3 实验材料

1.3.1 实验动物 健康的雄性SPF级C57BL/6小鼠共16只, 周龄8周, 体质量为20~25 g, 由上海交通大学医学院实验动物科学部提供。实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2018-0007, 使用许可证号为SYXK(沪)2018-

0027。动物饲养于12 h循环光照/黑暗、恒温、恒湿的环境下,提供标准饲料及饮水。本研究动物实验经上海交通大学医学院附属瑞金医院动物伦理委员会批准[2020动伦审第(102)号]。

1.3.2 主要试剂与仪器 阿托伐他汀(杭州昊鑫生物科技股份有限公司,中国),CCl₄、TRIzol试剂(Sigma-Aldrich,美国),反转录酶、dNTPs、高保真DNA聚合酶(Invitrogen,美国),氯仿、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,中国),DEPC水、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(上海翊圣生物科技有限公司,中国),反转录试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa,日本),聚氨基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,中国),蛋白裂解液(ThermoFisher,美国),collagen I抗体、Smad4抗体(Abcam,英国),辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗(Jackson ImmunoResearch,美国),ECL发光试剂盒(ThermoFisher,美国)。

主要实验仪器包括高速离心机(Eppendorf,德国)、紫外分光光度计(ThermoFisher,美国)、实时荧光定量PCR仪(Roche,瑞士)、Odyssey红外荧光扫描仪(LICOR,美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠肝纤维化模型的建立及分组 将16只小鼠随机分为对照组、阿托伐他汀组、CCl₄注射组、CCl₄注射联合阿托伐他汀组,每组4只。CCl₄注射组小鼠以20%体积分数的CCl₄按1 mL/kg的剂量,每周行2次腹腔注射;对照组使用同剂量玉米油进行腹腔注射;阿托伐他汀组小鼠每日以15 mg/kg剂量的阿托伐他汀灌胃1次;CCl₄注射联合阿托伐他汀组联合采用上述CCl₄和阿托伐他汀的处理方式。

动物每周固定时间称重。饲养4周后对所有小鼠进行安乐死处理,记录体质量后开腹游离腹腔大血管和肝脏。从下腔静脉抽取血液约1.5 mL,12 000×g离心5 min,获得的血清于-80℃冰冻保存。离断相关韧带及血管,完整取出小鼠肝脏。将肝脏按肝叶解剖切成小片,分别置于4%多聚甲醛(制备石蜡切片)及冻存管(-80℃超低温冰箱)中,以备后续使用。检测小鼠血清谷丙转氨酶(glutamic pyruvic transaminase, GPT)、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)浓度。

1.4.2 天狼星红染色观察肝组织纤维化 将小鼠肝脏制备石蜡切片,厚度为4 μm,二甲苯脱蜡至水洗;将切片

置0.1%天狼星红染液中1 h后,蒸馏水洗涤2次(每次4 min);将Harris's 苏木素染料滴于切片上,于37℃孵育20 min,蒸馏水洗涤2次(每次4 min);使用95%、70%的乙醇脱水,二甲苯通透5 min后,中性树胶封片;使用显微镜观察、拍照。

1.4.3 免疫荧光染色观察collagen I A的表达 取小鼠肝脏切片,磷酸盐缓冲液洗涤10 min,重复2次;5%胎牛血清室温封闭1 h后,使用0.2%Triton X-100通透10 min;随后加入抗collagen I A的一抗,4℃孵育过夜;次日,磷酸盐缓冲液清洗,重复2次;荧光二抗室温孵育1 h,使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)室温染细胞核10 min;于倒置荧光显微镜下观察、拍照。

1.4.4 实时定量PCR TRIzol法提取小鼠肝组织RNA;将小块肝组织在1 mL的TRIzol中匀浆,随后加入0.2 mL氯仿使蛋白与RNA分离;待分层后吸取含RNA的水相部分,与0.5 mL异丙醇充分混匀使RNA沉淀;以75%乙醇洗涤3次后干燥,得到肝组织RNA,并利用紫外分光光度计进行浓度和纯度测定。

以所获样本的RNA添加反转录酶进行反转录PCR,得到cDNA。利用Syber Green试剂盒及目标基因序列引物进行实时定量PCR,检测肝组织α平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、collagen I、collagen III,以及白介素(interleukin, IL)-1b、IL-6、转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)的表达。

1.4.5 免疫印迹法检测肝组织α-SMA蛋白和磷酸化Smad4的表达 将小块肝脏组织在预先配制好的含有蛋白酶抑制剂的组织裂解液中碾磨,直至云雾状后于冰上放置30 min;随后,11 000×g高速离心并吸取上清;最后,采用BCA法测定小鼠肝脏组织的蛋白浓度。蛋白质加热变性后进行SDS-PAGE电泳,随后以湿转法将蛋白由凝胶上转印至PVDF膜上;5%脱脂牛奶封闭1 h后加入稀释后的抗α-SMA抗体(1:1 000)、抗pSmad4抗体(1:1 000)或抗GAPDH抗体(1:2 000),4℃振荡孵育过夜;TBST洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h,再次用TBST洗膜;最后以ECL法将膜上蛋白显色,经显影处理后,采用凝胶成像分析系统对胶片进行拍照。

1.5 统计学分析

采用逆方差加权评估入组研究的异质性,若 $I^2 > 50\%$ 则认为不同研究间存在异质性。采用Stata software 15.0软件进行统计学分析。相对危险度(RR)和各研究的权

重均在结果中显示。实验数据采用SPSS 19.0软件进行统计学处理,数据比较应用Student *t* 检验及 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 文献筛选及数据提取

通过初步检索,筛选了2 705篇英文文献。经过阅读题目及摘要初筛后,排除不达标的2 469篇文献,剩余236篇文献。精读文献全文后,根据设定的纳入和排除标准,排除了48篇文献,剩余188篇文献。经过2名研究者反复评估,最终选取9篇文献^[7-15],见图1、表1。

2.2 文献统计结果分析

2.2.1 肝纤维化进展风险 纳入4篇文献^[9-10,12,14],共106 947例患者,其中试验组38 770例,对照组68 177例。分析结果显示 $RR=0.32$,95% CI 为0.31~0.33(图2)。与

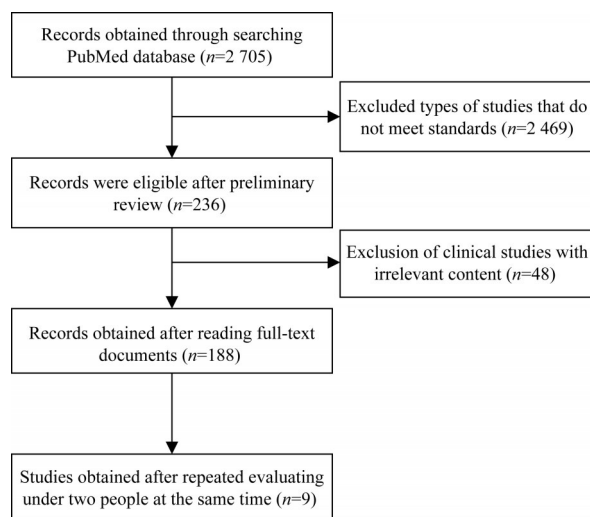


图1 文献筛选流程

Fig 1 Flow chart of literature inclusion

对照组比较,他汀类药物组能显著降低肝纤维化发生率;但异质性检验结果显示 $I^2=0.989$, $P<0.01$,表明纳入的文献具有较强异质性。

表1 纳入文献的相关数据

Tab 1 Associated data of the selected literatures

No.	Author	Year	Location	Type	Time period	Patients numbers	Etiology	Outcomes of interest	Statin users	Nonusers
1	Chang	2017	Chinese Taipei	Propensity matched cohort	2000–2013	1 350	HBV, HCV, ALD	Decompensated cirrhosis; Mortality	14%; 9%	28%; 18%
2	Huang	2016	Chinese Taipei	Propensity matched cohort	1997–2009	13 086	HBV	Decompensated cirrhosis; Developing cirrhosis	2.6%; 0.9%	6.1%; 1.9%
3	Simon	2016	USA	Retrospective cohort	2001–2014	9 135	HCV	Developing cirrhosis	14.0%	21.4%
4	Hsiang	2015	Chinese Hongkong	Propensity matched cohort	2000–2012	53 513	HBV	Mortality	6.5%	14.3%
5	Mohanty	2016	USA	Propensity matched cohort	1996–2009	2 747	HCV	Decompensated cirrhosis; Mortality	2.1%; 6.3%	3.9%; 11.1%
6	Simon	2015	USA	Retrospective cohort	2000–2004	543	HCV	Developing cirrhosis	10%	28%
7	Yang	2015	Chinese Taipei	Propensity matched cohort	1999–2010	84 213	HCV	Developing cirrhosis	6.0%	21.9%
8	Kumar	2014	USA	Retrospective cohort	1988–2011	243	Mixed	Decompensated cirrhosis	30.0%	40.5%
9	Abraldes	2016	Spain	RCT	2010–2013	147	Mixed	Mortality	9%	22%

Note: HBV—hepatitis B virus; HCV—hepatitis C virus; ALD—alcoholic liver disease; RCT—randomized controlled trial.

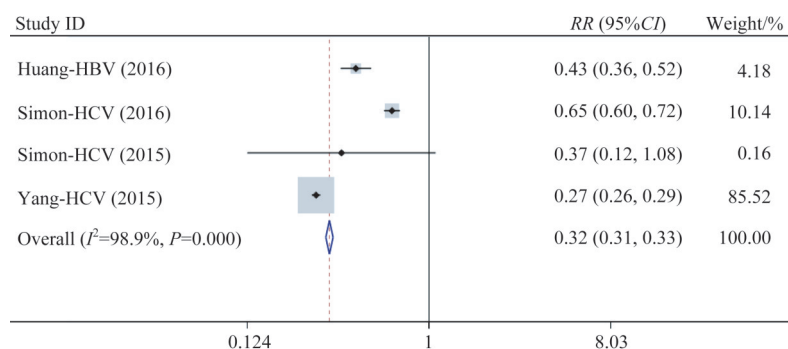


图2 他汀类药物对于肝纤维化发生风险的影响

Fig 2 Effect of statins on the risk of hepatic fibrosis

2.2.2 肝功能失代偿风险 纳入4篇文献^[7,12-13,15],共17 374例患者,其中试验组7 973例,对照组9 401例。分析结果显示 $RR=0.53$,95% CI 为0.46~0.62(图3)。异

质性检验结果显示 $I^2=0.357$, $P=0.169$,表明纳入的文献同质性较好。与对照组比较,他汀类药物能显著减缓肝硬化患者肝功能失代偿的进展。

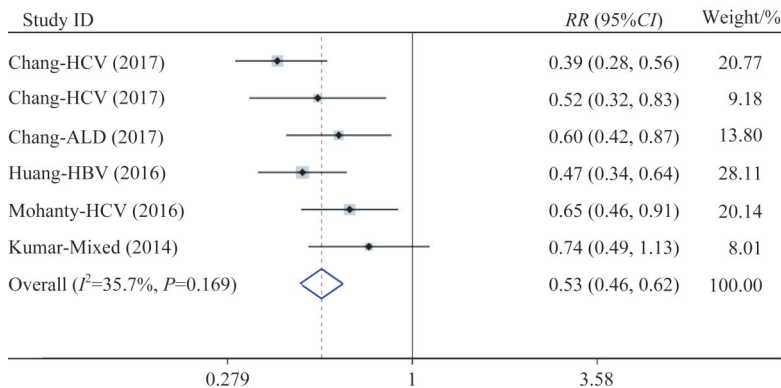


图3 他汀类药物对于肝功能失代偿风险的影响

Fig 3 Effect of statins on the risk of liver decompensation

2.2.3 总体死亡率 纳入5篇文献^[7-8,11,13,15],共59 329例患者,其中试验组3 600例,对照组55 729例。分析结果显示 $RR=0.55$,95% CI 为0.48~0.63(图4)。异质性检验

结果显示 $I^2=0.156$, $P=0.311$,表明纳入的文献同质性较好。与对照组比较,他汀类药物组患者总体死亡率显著降低。

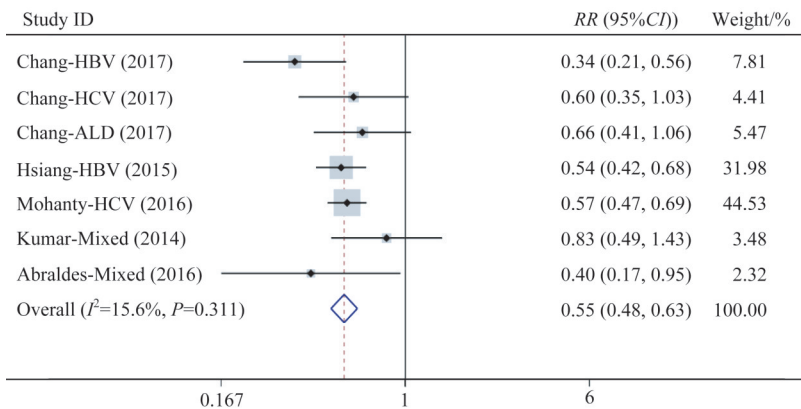


图4 他汀类药物对于总体死亡风险的影响

Fig 4 Effect of statins on the overall risk of death

2.3 阿托伐他汀对小鼠体质量及肝脏损伤的影响

4周处理后,与对照组比较, CCl_4 注射组和 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组小鼠体质量均显著下降(均 $P=0.000$);而 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组小鼠体质量与 CCl_4 注射组比较,下降程度较轻,组间差异有统计学意义($P=0.040$),见图5A。与对照组比较, CCl_4 注射组和 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组小鼠GPT、GOT浓度均显著上升(均 $P=0.000$);而 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组小鼠与 CCl_4 注射组比较,GPT、GOT上升程度均较小,组间差异有统计学意义(均 $P=0.020$),见图5B、C。

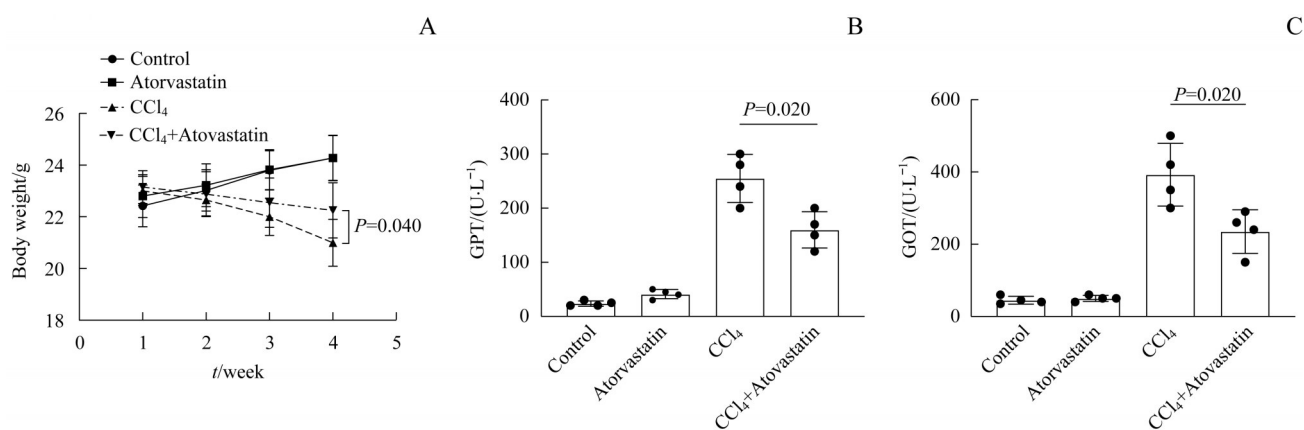
2.4 阿托伐他汀对小鼠肝纤维化的影响

天狼星红染色结果显示, CCl_4 注射组肝内纤维过度沉积,以小叶中央区为主(图6A);而 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组小鼠中肝脏纤维化情况有所缓解。免疫荧光染色结果同样显示,collagen I A在 CCl_4 注射组高表达(图6B)。

进一步通过实时荧光定量PCR、免疫印迹法检测纤维化相关标志物 α -SMA、collagen I、collagen III的表达情况,结果显示:与对照组比较, CCl_4 注射组中 α -SMA蛋白表达升高, α -SMA、collagen I、collagen III的

mRNA 表达升高 (均 $P<0.05$); 而 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组与 CCl_4 注射组比较, 上述指标均有所下调, 差异均

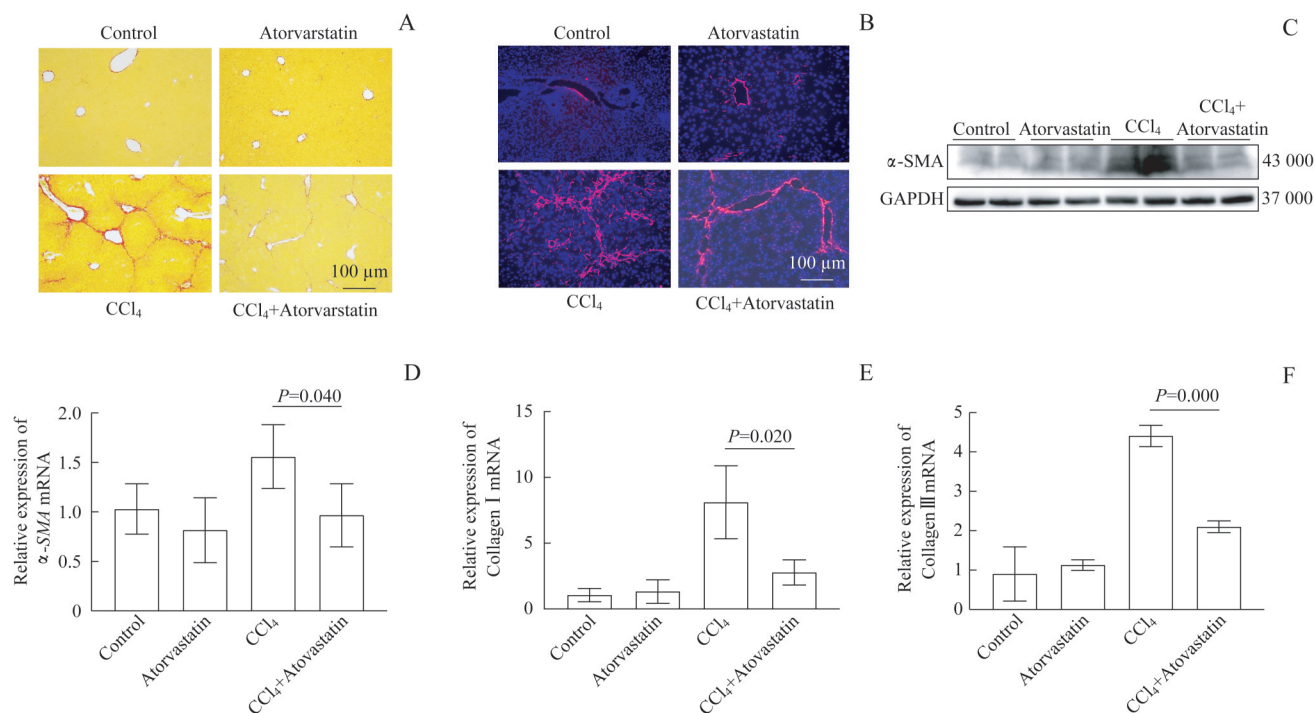
有统计学意义 (均 $P<0.05$), 见图 6C~F。



Note: A. Weight changes of mice. B. GPT levels after 4 weeks of treatment. C. GOT levels after 4 weeks of treatment.

图5 阿托伐他汀对 CCl_4 注射导致的小鼠肝脏损伤及体质量的影响

Fig 5 Effect of atorvastatin on liver injury and weight of mice caused by CCl_4 injection



Note: A. Hepatic tissue stained with Sirius red. B. Immunofluorescence staining of collagen I. C. Protein expression of α -SMA. D. mRNA expression of α -SMA. E. mRNA expression of collagen I. F. mRNA expression of collagen III.

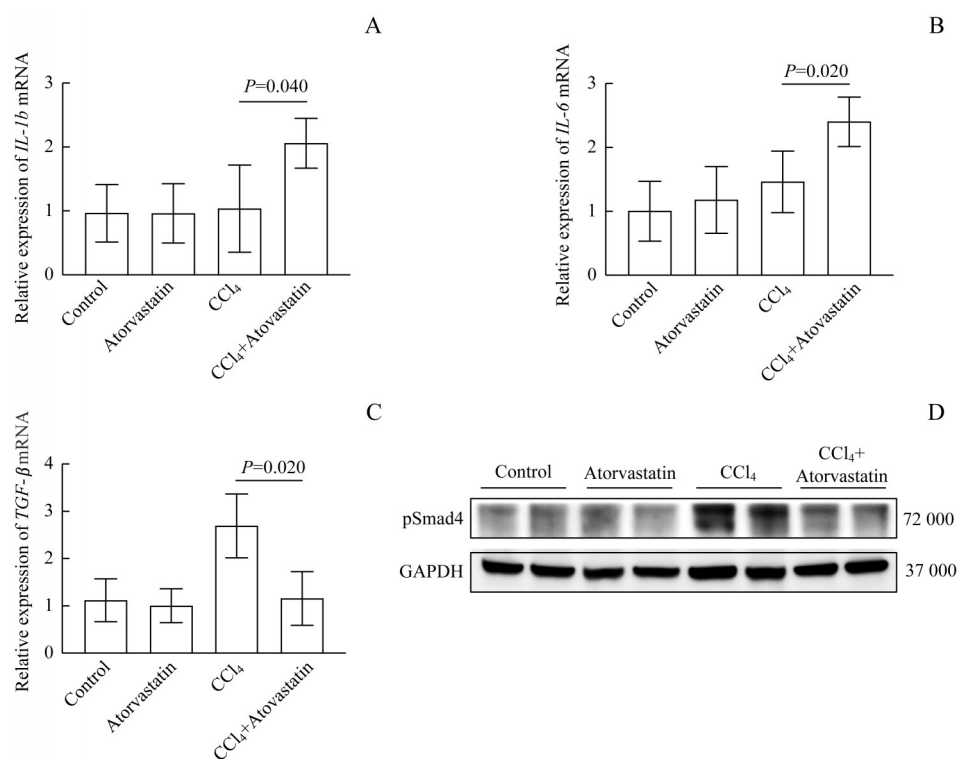
图6 阿托伐他汀对 CCl_4 注射导致的小鼠肝纤维化的缓解作用

Fig 6 Mitogenic effect of atorvastatin on hepatic fibrosis in the mice after CCl_4 injection

2.5 阿托伐他汀对肝内炎症因子表达及 $\text{TGF-}\beta$ 通路的影响

实时荧光定量PCR检测结果显示: 与对照组相比, CCl_4 注射组中 $IL-1b$ 、 $IL-6$ 的 mRNA 表达轻微上升, $\text{TGF-}\beta$ 的 mRNA 表达显著升高 (均 $P<0.05$); 而 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组与 CCl_4 注射组比较, $IL-1b$ 、 $IL-6$ 的 mRNA

表达显著升高, $\text{TGF-}\beta$ 的 mRNA 表达显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 见图 7A~C。免疫印迹法检测结果显示: 与对照组相比, CCl_4 注射组 pSmad4 蛋白表达升高; 而 CCl_4 注射联合阿托伐他汀组与 CCl_4 注射组相比, pSmad4 蛋白表达较低 (图 7D)。



Note: A. mRNA expression of *IL-1β*. B. mRNA expression of *IL-6*. C. mRNA expression of *TGF-β*. D. Protein expression of pSmad4.

图7 阿托伐他汀对肝内炎症因子表达及 TGF-β 通路的影响

Fig 7 Effect of atorvastatin on expressions of intrahepatic inflammatory factors and TGF-β pathway

3 讨论

肝纤维化是肝细胞被反复破坏后再生,胶原、糖蛋白、蛋白多糖等细胞外基质在肝内过度沉积并异常分布形成的病理变化。在肝病慢性病程中,肝纤维化往往由早期病变如脂肪肝、肝炎发展而来。全球范围内,肝纤维化发生率居全球致死疾病第11位^[16]。重度肝纤维化患者因肝功能严重受损、生活质量低下,生存率很低。目前,药物治疗虽然可延缓疾病发展进程,但是对于已形成肝纤维化的肝组织缺乏保护作用;而作为现阶段根治性手术方案的肝移植等,也只能满足少量患者的治疗需求。

他汀类药物的主要作用是减少胆固醇和低密度脂蛋白合成,目前已作为一线治疗及预防用药在心血管疾病中得到大量应用。该类物质在调整血脂的同时,可有效改善局部脂肪肝症状。此外,既往研究^[17-18]已经揭示,他汀类具有包括抗炎、抗增殖、抗氧化、抗纤维化在内的多重药理作用。在本研究的meta分析中,通过对9篇入选文献的研究,同样发现他汀类药物对不同病因导致的肝纤维化均具有保护作用。基于meta分析的结果,本研究构建了肝纤维化小鼠模型并予以阿托伐他汀治疗。通过组织染色、实时荧光定量PCR、免疫印迹法等方法,检测肝纤维化标志物α-SMA及胶原蛋白的分布和表达,

验证了他汀类药物对肝纤维化的保护作用。

肝纤维化是肝内多种细胞、生物因子和信号通路长期协同作用形成的复杂的病理性改变。目前认为,多种病因导致的肝内炎症激活肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化的经典机制,其中TGF-β通路的激活是其中的重要环节^[19]。本研究通过实时荧光定量PCR、免疫印迹法等方法,检测*IL-1β*、*IL-6*、*TGF-β*的mRNA表达以及pSmad4蛋白的表达量,提示他汀类药物可能通过调控TGF-β通路,延缓肝纤维化的发生及发展。有研究者已尝试利用他汀类药物的作用机制,使肝脏疾病患者在临床治疗中获益。Huang等^[12]及Simon等^[9]分别证实,使用他汀类药物可显著降低乙型和丙型肝炎肝硬化患者的肝硬化发病率,且药物用量与肝硬化风险之间存在剂量-效应关系;其他不良事件如肝功能失代偿、腹水、死亡的发生率均在使用他汀类药物后下降。Trebecka等^[20]在动物模型中发现,阿托伐他汀通过抑制RhoA/Rho激酶信号,激活一氧化氮合酶,促进一氧化氮的释放,并最终舒张肝内血管,降低肝硬化导致的门脉高压。Pollo-Flores等^[21]在临床研究中证实,使用辛伐他汀后门脉高压患者肝静脉压力梯度平均降低20%以上。肝细胞癌是最常见的终末期肝病。Zhou等^[22]在一项meta分析中发现,阿托伐他汀及氟伐他汀可显著降低肝

癌发生风险。Wu等^[23]则发现,使用他汀类联合非手术治疗,可提高晚期肝癌患者的总体存活率。

综上所述,他汀类这一临床常用药物具有诸多独立于调节脂肪代谢的药理机制,在肝脏疾病的临床治疗中

具有广阔的应用前景;但需要进一步明确药物在不同肝脏疾病中的具体作用机制,并在大规模前瞻性临床研究中加以证实,为包括肝硬化在内的多种肝脏疾病的治疗提供思路。

参·考·文·献

- [1] Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins[J]. *Cell*, 2015, 161(1): 161-172.
- [2] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 151-171.
- [3] Pose E, Trebicka J, Mookerjee RP, et al. Statins: Old drugs as new therapy for liver diseases? [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 194-202.
- [4] Schierwagen R, Maybuchen L, Hittatiya K, et al. Statins improve NASH via inhibition of RhoA and Ras[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311(4): G724-G733.
- [5] Chong LW, Hsu YC, Lee TF, et al. Fluvastatin attenuates hepatic steatosis-induced fibrogenesis in rats through inhibiting paracrine effect of hepatocyte on hepatic stellate cells[J]. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15: 22.
- [6] Dold S, Laschke MW, Lavasani S, et al. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(3): 466-474.
- [7] Kumar S, Grace ND, Qamar AA. Statin use in patients with cirrhosis: a retrospective cohort study[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(8): 1958-1965.
- [8] Hsiang JC, Wong GL, Tse YK, et al. Statin and the risk of hepatocellular carcinoma and death in a hospital-based hepatitis B-infected population: a propensity score landmark analysis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(5): 1190-1197.
- [9] Simon TG, King LY, Zheng H, et al. Statin use is associated with a reduced risk of fibrosis progression in chronic hepatitis C[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1): 18-23.
- [10] Yang YH, Chen WC, Tsan YT, et al. Statin use and the risk of cirrhosis development in patients with hepatitis C virus infection[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(5): 1111-1117.
- [11] Abiralde JG, Villanueva C, Aracil C, et al. Addition of simvastatin to standard therapy for the prevention of variceal rebleeding does not reduce rebleeding but increases survival in patients with cirrhosis[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(5): 1160-1170 e3.
- [12] Huang YW, Lee CL, Yang SS, et al. Statins reduce the risk of cirrhosis and its decompensation in chronic hepatitis B patients: a nationwide cohort study[J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111(7): 976-985.
- [13] Mohanty A, Tate JP, Garcia-Tsao G. Statins are associated with a decreased risk of decompensation and death in veterans with hepatitis C-related compensated cirrhosis[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(2): 430-440. e1.
- [14] Simon TG, Bonilla H, Yan P, et al. Atorvastatin and fluvastatin are associated with dose-dependent reductions in cirrhosis and hepatocellular carcinoma, among patients with hepatitis C virus: results from ERCHIVES[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 47-57.
- [15] Chang FM, Wang YP, Lang HC, et al. Statins decrease the risk of decompensation in hepatitis B virus- and hepatitis C virus-related cirrhosis: a population-based study[J]. *Hepatology*, 2017, 66(3): 896-907.
- [16] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. *Gut*, 2015, 64(5): 830-841.
- [17] Bosch J, Gracia-Sancho J, Abiralde JG. Cirrhosis as new indication for statins[J]. *Gut*, 2020, 69(5): 953-962.
- [18] Musial J, Undas A, Gajewski P, et al. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia[J]. *Int J Cardiol*, 2001, 77(2/3): 247-253.
- [19] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 181-194.
- [20] Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Hepatology*, 2007, 46(1): 242-253.
- [21] Pollo-Flores P, Soldan M, Santos UC, et al. Three months of simvastatin therapy vs. placebo for severe portal hypertension in cirrhosis: a randomized controlled trial[J]. *Dig Liver Dis*, 2015, 47(11): 957-963.
- [22] Zhou YY, Zhu GQ, Wang Y, et al. Systematic review with network meta-analysis: statins and risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 21753-21762.
- [23] Wu LL, Hsieh MC, Chow JM, et al. Statins improve outcomes of nonsurgical curative treatments in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(36): e4639.

[收稿日期] 2021-06-29

[本文编辑] 吴 洋

