

治疗肝纤维化药物递送系统研究进展

范倩倩,邢磊,乔建斌,张程璐,姜虎林*

(中国药科大学药学院药剂系,南京 210009)

摘要 肝纤维化是影响人类健康的重大疾病。目前用于治疗肝纤维化的药物存在药物溶解度低、无肝脏特异性及易产生不良反应等问题。在肝纤维化治疗中,为提高药物治疗效果,大量纳米药物递送载体及靶向治疗策略被学者广泛关注。本文从载体及修饰配体类型综述了近年来应用于肝纤维化治疗的药物递送系统及其主动靶向策略,为设计安全高效的肝纤维化药物递送系统,实现肝纤维化的高效治疗提供理论参考。

关键词 肝纤维化;抗纤维化;纳米药物递送系统;靶向策略

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2018)03-0263-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180302

引用本文 范倩倩,邢磊,乔建斌,等.治疗肝纤维化药物递送系统研究进展[J].中国药科大学学报,2018,49(3):263-271.
Cite this article as: FAN Qianqian, XING Lei, QIAO Jianbin, et al. Advances in drug delivery systems for the treatment of liver fibrosis[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(3):263-271.

Advances in drug delivery systems for the treatment of liver fibrosis

FAN Qianqian, XING Lei, QIAO Jianbin, ZHANG Chenglu, JIANG Hulin*

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Liver fibrosis is a major disease that affects human health. Currently, drugs used for the treatment of hepatic fibrosis have such problems as low drug solubility, lack of liver specificity and possible occurrence of side-effects. In order to improve the anti-fibrosis therapeutic efficacy, various nano-drug delivery systems and targeting strategies are explored in liver fibrosis therapy. This review summarizes the drug delivery systems and targeting strategies that have been applied to liver fibrosis therapy in recent years from the types of carriers and modified ligands, which serve as a basis of designing safe and effective drug delivery systems for liver fibrosis therapy.

Key words liver fibrosis; anti-fibrosis; nano-drug delivery systems; targeting strategies

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773667, No. 1573369)

肝脏承担着许多重要的功能,主要包括糖、蛋白质及脂质的代谢、毒物及病原体的清除、体内免疫反应的调控等。这些繁重的功能使得肝脏容易受到各种内源性及外源性的损伤,例如寄生虫及微生物的感染(如疟原虫及肝炎病毒感染);药物及有毒物质的刺激;自身免疫刺激及胆汁分泌过多刺激。当肝脏受到持续性损伤时,将会导致肝脏产生慢性疾病最终发展形成肝纤维化,肝纤维化进一步恶化为肝硬化。近年来,大量临床数据及动物研究

结果均表明,疾病在肝纤维化阶段是可逆的,并且可以通过药物手段进行治疗;而发展到肝硬化阶段则通常需要经过肝脏移植的方法进行手术治疗,且治疗成功率低。数据结果表明,在全球范围内,肝硬化每年导致的死亡人数 1980 年约为 67.6 万人,而在 2010 年已经超过 100 万人,肝硬化的致死率逐年增高^[1],因此,在肝纤维化阶段进行有效的药物治疗,对遏制病程向肝硬化阶段发展显得尤为重要。

研究发现,许多药物在体外实验中均呈现出很好的抗纤维化功能,而在体内实验中治疗效果较差。其原因是大多数治疗药物(化学药物、多肽及基因药物)并不具有很好的肝脏蓄积及肝脏特定细胞靶向性,因此,不能达到有效的治疗浓度,且被非靶器官细胞吸收后易产生不良反应。纳米药物递送系统是目前新兴的一种药物制剂,通过合理的设计,纳米载体能够准确地将药物递送到靶部位及靶细胞,提高治疗效果,减少不良反应。利用纳米技术精准地递送抗纤维化药物,为肝纤维化治疗提供了新方法及新思路。

1 肝纤维化的病理机制及治疗策略

1.1 肝纤维化的主要病理机制^[2]

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝脏中的一种非实质细胞,位于内皮间隙,占肝细胞数的5%~15%。其主要功能包括:参与维生素A的代谢;通过分泌胶原及基质金属蛋白酶调节细胞外基质的平衡;通过自身收缩调节内皮间隙的压力及血流;参与部分药物的代谢;保护肝细胞团。正常情况下,HSCs处于静息状态。当肝脏受到损伤时,各种内源性及外源性的损伤首先会

损伤肝脏中的肝细胞,引起肝细胞的氧化应激、凋亡或坏死,从而招募巨噬细胞及单核细胞引发肝脏炎症。其中损伤诱导产生的活性氧、凋亡或坏死细胞所释放的内容物、炎症反应中释放的炎症因子都刺激着静息的HSCs,使HSCs活化。活化的HSCs增殖能力变强且基因表型发生改变,其纤维化胶原(I、III、V型胶原)表达量上调,基质金属蛋白酶表达量下调,基质金属蛋白酶抑制剂表达量上调,结果使得大量纤维化胶原在细胞外基质中累积。如果这些损伤是急性的,肝脏会启动自我保护机制对损伤进行修复,并维持细胞外基质的代谢平衡;如果这些损伤是持续性的,肝脏的自我修复机制则不可控,过多的纤维化胶原累积于细胞外基质,形成瘢痕组织,严重阻碍肝脏与血液的物质交换,进一步对肝细胞造成损伤,导致肝功能下降,形成肝纤维化。肝纤维化的过程实质是肝细胞不断坏死且被纤维化胶原所取代的过程。

1.2 肝纤维化的治疗策略

肝纤维化的治疗,首先应该清除肝损伤的因素,然后对肝纤维化进行药物治疗。目前研究用于治疗肝纤维化的化学药物分类详见表1。

表1 用于肝纤维化治疗的化学药物分类

药物分类	药物名称
草本植物提取物	黄酮类:水飞蓟宾、甘草酸、胡黄连苷、黄芩素 其他类:姜黄素、阿魏酸钠、氧化苦参碱、槲皮黄酮、岑酮、汉防己甲素、丹参酮ⅡV、秋水仙素
过氧化物酶体增殖化受体 γ 激动剂	罗格列酮(RSG)、匹格列酮、GW570
酪氨酸激酶抑制剂	尼洛替尼、金雀异黄酮、甲磺酸伊马替尼、达沙替尼、索拉非尼
Hedgehog信号抑制剂	维莫德吉(Vismodegib, GDC-0449)
胆酸类	熊去氧胆酸类、奥贝胆酸
其他类	吡非尼酮(广谱抗纤维化药物)、BRD4抑制剂JQ1、氯沙坦、多不饱和磷脂酰胆碱

这些化学药物在体外实验中均呈现较好的抗纤维化功能,而在体内应用时治疗效果较差,其主要原因如下:①多数抗纤维化药物为难溶性药物,如水飞蓟宾、姜黄素、汉防己甲素等,存在口服吸收效果差、生物利用度低的问题;②部分抗纤维化药物非特异性吸收会导致不良反应的产生,例如:索拉非尼在正常组织的非特异吸收可能引发手足综合征、腹泻、以及血压升高等不良反应^[3],吡非尼酮易引发恶心、腹部不适、消化不良及疲劳等不良反应^[4]。此外,多肽及基因类抗纤维化药物存在体内半衰期短的问题,例如: γ -干扰素会快速肾清除,且体内大多数细胞表面均具有 γ -干扰素受体,

易引发治疗不良反应^[5];基因药物在无载体保护的情况下,会迅速被血液中的核酸酶降解失效。

近年来,研究者们设计了不同的药物递送系统以解决肝纤维化治疗中化学药物、多肽和基因药物存在的上述问题。其主要策略是:①通过纳米载体包载难溶性的抗纤维化药物,提高药物溶解度及稳定性,提高生物利用度;②通过在纳米载体的表面接枝特异性的配体,实现药物递送系统对肝脏特定细胞的主动靶向,增加药物在靶细胞的浓度,提高治疗效果,降低非特异性吸收、减少治疗中的不良反应;③共载不同机制的抗纤维化药物(化学药物、多肽及基因药物),通过协同增效的作用提高

治疗疗效。本文将主要针对近年来应用于肝纤维化治疗的药物递送系统及其主动靶向策略进行阐述与展望。

2 抗肝纤维化药物的递送系统

2.1 聚合物胶束及聚合物纳米粒

利用生物相容性的聚合物胶束或聚合物纳米粒递送难溶性化学药物是近年来研究的热点。在肝纤维化治疗方面,目前也有许多生物相容性的新型聚合物被合成,用于递送难溶性的抗纤维化药物。例如,Lin 等^[6]将聚乳酸-羟基乙酸共聚物-聚乙二醇 (PLGA-PEG) 和聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLAG) 不同比例混合,制备了包载索拉非尼的纳米粒。通过 PLGA 的包载提高索拉非尼的溶解度并实现药物的缓慢释放,通过 PEG 实现纳米粒在体内的长循环,从而提高纳米粒在肝脏的蓄积。该制剂在动物实验中表现出良好的抗纤维化效果。此外,Bisht 等^[7]利用聚合物 *N*-异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm)、乙烯基吡咯烷酮 (VP) 及丙烯酸 (AA) 包载姜黄素,制备了聚合物纳米制剂 NanoCureTM,能够很好地持续维持肝脏中姜黄素的水平。

同时,许多阳离子聚合物载体也被合成用于抗纤维化基因的递送。利用聚合物载体递送基因药物,可避免药物在循环过程中被酶降解,加强药物摄取,从而提高基因转染效率。由于肝纤维化疾病涉及多种分子信号通道,利用多种药物进行联合治疗,通过药物之间的协同或者互补作用,可以显著增强肝纤维化治疗疗效。因此,设计新型的聚合物载体对基因药物及化学药物进行联合递送,也是目前的研究热点。目前,Kumar 等^[8]设计并合成了新型聚合物单甲氧基聚乙二醇-*b*-聚(2-甲基-2-羧基碳酸丙烯酯)-*g*-十二烷醇-*g*-四乙烯戊胺 (mPEG-*b*-PCC-*g*-DC-*g*-TEPA) 负载小分子 hedgehog 抑制剂——维莫德吉及 miR-29b1,对肝纤维化进行化学药物与基因药物的结合治疗。与单一疗法相比,联合治疗组具有更强的肝保护能力,能够显著降低肝损伤相关血清酶和胶原蛋白水平。此外,该研究者设计并合成了聚合物单甲氧基聚乙二醇-*b*-聚(碳酸酯-*co*-丙交酯)mPEG-*b*-*p* (CB-*co*-LA),利用其包载了 hedgehog 抑制剂——维莫德吉及 PPAR- γ 受体激动剂——罗格列酮,进行多种化学药物的联合治疗,通过协同作用提高了肝纤维化治疗

疗效^[9]。

由于这些优良的性质,聚合物载体在抗肝纤维化药物递送中备受青睐。但是,载药量低是目前利用聚合物载体对难溶性抗纤维化药物递送过程中所碰到的难题。尤其是对于草本植物提取物类药物,其有效治疗浓度一般相对较高。载药量较低时,要达到有效治疗浓度,所用的聚合物载体量相应增加,这对聚合物载体的生物相容性要求进一步提升。因此,设计能够实现高载药量的聚合物载体或探讨高载药量的聚合物纳米制剂制备方法,对难溶性的抗纤维化药物进行递送具有重要的意义。

2.2 脂质体及固体脂质纳米粒

肝脏是脂质的重要代谢器官,能够通过特异性的受体识别及摄取脂质。此外,内源性的脂质具有很好的生物相容性及安全性,在体内不会触发内皮网状系统,引发免疫反应。因此,脂质体及固体脂质纳米颗粒具有很好的被主动肝脏蓄积效果,利用其对抗纤维化药物进行递送具有天然的优势。此外,在脂质纳米粒中加入阳离子脂质材料可以实现抗纤维化基因药物的高效递送,例如:Kong 等^[10]利用胆固醇油酸酯、三油酰甘油酯、胆固醇、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 (DSPE-PEG)、氨基甲酰基胆固醇 (DC-Chol) 等脂类物质,合成了阳离子固体脂质纳米颗粒 (CSLNs),负载结缔组织生长因子 (CTGF) 的特异性小干扰 RNA 治疗肝纤维化,在纤维化模型小鼠上取得了很好的治疗效果;Calvente 等^[11]利用胆固醇、聚乙二醇-十四烷基甘油酯 (mPEG₂₀₀₀-C14glyceride) 及 98N₁₂-5(1) 制备了脂质纳米粒,负载对抗原骨胶原 I 的小干扰 RNA 对肝纤维化进行治疗。利用该脂质纳米粒对中期和晚期肝纤维化小鼠进行治疗,可以抑制 90% 的原骨胶原 I 表达并使胶原量降低 40% ~ 60%。

2.3 牛血清白蛋白纳米粒

牛血清白蛋白 (BSA) 是一种无毒、可生物降解、生物相容性好且低成本的蛋白质。除此之外,BSA 在体内具有较长的半衰期,且具有亲疏水结构域,既可以负载亲水药物又可以负载疏水药物,经交联后形成纳米颗粒可用于药物递送且具有很好的肝脏蓄积效果。Li 等^[12]利用白蛋白纳米粒负载水溶性药物阿魏酸钠 (SF) 对肝纤维化进行治疗。经小鼠尾静脉分别注射 SF 溶液及 SF-BSA 纳

米粒后, SF-BSA 纳米粒注射组小鼠, 肝脏中的药物浓度增高, 其他组织中药物浓度下降。此外, 有研究者利用葡萄糖交联白蛋白, 并负载黄连素 (BBR) 对肝纤维化治疗; 与游离 BBR 相比, BBR/BSA 纳米粒能够更强的抑制 LX-2 细胞的增殖, 激活半胱氨酸蛋白酶 3; 在较低剂量时, BBR/BSA 纳米粒更大程度缓解 CCl₄ 诱导造成的肝损伤^[13]。

2.4 无机纳米粒

介孔硅纳米粒具有较大的比表面积及间隙体积, 可调节的介孔结构及稳定的物理化学性质。除此之外, 其表面还具有可修饰性。介孔硅纳米粒的这些优良性能使其在药物递送方面具有很强的优势。He 等^[14]利用介孔硅纳米粒表面嫁接正电性的荧光染料罗丹明 B, 然后负载水溶性的 ROS 清除剂丹参酚酸 B (SAB) 对肝纤维化进行治疗。但是, 许多研究表明硅类纳米粒具有一定的肝毒性。Nishimori 等^[15]利用直径 70、300 和 1 000 nm (SP70、SP300 和 SP1000) 的二氧化硅颗粒作为模型材料, 研究了颗粒大小与毒性之间的关系。结果显示, 单次注射时, SP70 剂量为 30 mg/kg 能够引起肝损伤, 而 SP300 或 SP1000 给药剂量即使在 100 mg/kg 也不会引起肝损伤; 注射 SP70 会剂量依赖性地引起血清转氨酶及血清炎性细胞因子增高。在长期毒性考察中, 每周重复两次注射 SP70, 持续 4 周, 在较低剂量 (10 mg/kg), 也会引起肝纤维化。对于损伤的机制, 相关研究报道, SiO₂ 纳米粒可激活枯否细胞 (KCs), 促使其释放生物活性物质介导肝损伤^[16]; Liu 等^[17]的研究也证明静脉注射 SiO₂ 纳米粒引发的肝损伤与枯否细胞密切相关, 与矽肺的发生具有一定相似性。此外, Isoda 等^[18]证明改变纳米硅表面的电性可以改变其肝毒性大小。

除硅纳米粒外, 也有研究者利用金纳米粒递送抗纤维化药物。Kabir 等^[19]将水飞蓟宾共价接枝在金纳米粒表面, 通过静脉注射的方法对 CCl₄ 引发的肝损伤及肝硬化进行治疗; 与注射单纯的水飞蓟宾相比, 水飞蓟宾包被的金纳米粒可以显著降低血清中 ALT、AST、ALP 的水平及肝纤维化面积, 并且该纳米粒具有很好的安全性, 在该治疗过程中未产生不良反应。但研究表明, 金纳米粒能够剂量依赖性的引发肝损伤及肺损伤。Bartneck 等^[20]在金纳棒表面修饰了生物相容性好的聚合物材料 PEG

和靶向性多肽 RGD, 对其肝损伤进行了考察。在健康小鼠中, 金纳米棒即使在很高剂量也不会引发肝损伤; 在慢性肝损伤模型中, 经肽修饰的金纳米棒不会加重肝纤维化; 而在免疫介导性肝炎中, 金纳米棒诱导的枯否细胞活化会显著加重肝损伤。Choi 等^[21]研究表明对金纳米进行修饰时, 金纳米粒上的不同蛋白质电晕, 会改变金纳米棒的物理化学性质, 从而具有不同的肝毒性。

与有机载体相比, 无机载体在较低剂量时更易引发肝损伤。因此, 利用无机纳米载体对肝纤维化进行药物递送时, 应充分考察载体的急性毒性及长期毒性, 避免治疗载体引发二次肝损伤。

2.5 病毒基因载体

利用腺病毒基因载体递送抗纤维化基因对肝纤维化进行治疗, 也一直备受研究者关注。近年来, 基质金属蛋白酶-1^[22]、转化生长因子-β1 反义 mRNA^[23]、孤儿核受体 NR4A2^[24]、骨形态生成蛋白 7^[25] 及耻骨松弛激素^[26] 等抗纤维化基因被腺病毒基因载体递送, 用于治疗肝纤维化的研究。除此之外, 腺病毒基因载体也被应用于肝纤维化生物治疗方面。Rezvani 等^[27]及 Song 等^[28]利用负载肝转录因子的腺病毒, 成功地在体内将肌成纤维细胞转化为肝细胞, 使得肝功能有所恢复, 在肝纤维化治疗方面取得了很好的效果。

3 靶向肝星状细胞的药物递送系统

由于肝星状细胞在肝纤维化形成中发挥的重要作用, 肝星状细胞成为近年来肝纤维化治疗中常见的靶细胞。大量研究者通过在聚合物载体、脂质体、固体脂质纳米颗粒及 BSA/HSA 载体表面修饰相关肝星状细胞表面受体的特异性配体, 将药物选择性地递送至肝星状细胞中, 减轻对肝实质细胞具有损伤的药物的不良反应, 进一步加强药物的治疗效果。

3.1 以维生素 A 作为靶头的递送系统

肝脏是维生素 A 储存与代谢的重要器官, 静息的肝星状细胞吸收和储存人体大约 80% 的视黄醇。肝星状细胞表面高表达视黄醇结合蛋白受体 (RBPR)、细胞视黄醇结合蛋白 (CRBP) 和细胞视黄酸结合蛋白 (CRABP)^[29]。维生素 A 与视黄醇结合蛋白结合, 然后通过与肝星状细胞表面的视黄醇结合蛋白受体结合吸收入肝星状细胞储存^[30]。

Sato 等^[31]将维生素 A 与阳离子脂质体共孵育,维生素 A 具有脂溶性,能够进入阳离子脂质体中。该研究通过细胞实验及免疫组织切片结果证明维生素 A 的脂质体可以结合视黄醇结合蛋白,进而结合肝星状细胞上的视黄醇结合蛋白受体,促进脂质体在肝星状细胞上的摄取。肝脏组织中,含有维生素 A 的脂质体在肝星状细胞、枯否细胞及肝细胞上的摄取率分别为 32.96%、1.65%、0.21%;无维生素 A 的脂质体在肝星状细胞、枯否细胞及肝细胞上的摄取率分别为 1.34%、2.95%、0.15%。具有维生素 A 的脂质体在肝脏具有更好的聚集,且集中蓄积于肝星状细胞中。Zhang 等^[32]将维生素 A 共价接枝在低分子的阳离子聚合物聚乙烯亚胺(PEI)上,与基因结合后形成复合纳米粒。该复合纳米粒在血液循环中吸附血浆蛋白形成蛋白冕,经分析鉴定该蛋白冕的主要成分是视黄醇结合蛋白;该复合纳米粒在体内能够很好地蓄积在肝星状细胞中,结合反义寡核酸 ASO 后对 CCl₄ 诱导及胆管结扎诱导产生的肝纤维化进行治疗,可以显著降低 I 型胶原的表达,减轻肝纤维化。此外,Duong 等^[33]在包载 NO 受体的聚合物纳米粒上修饰维生素 A,证明修饰维生素 A 的聚合物纳米粒在体内外均能够特异性地将 NO 受体递送至肝星状细胞。

3.2 以环状 RGD 肽作为靶头的递送系统

细胞与细胞外基质之间的相互作用主要是通过细胞膜上的跨膜蛋白(特别是异二聚体整联蛋白)介导。研究表明,血液和细胞外基质中常见的黏附蛋白(如 VI 型胶原蛋白、纤连蛋白等),其细胞识别位点均含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽序列(RGD 肽)。Marcellino 等^[34]发现环状 RGD 肽 [C * GRGDSPC * (其中 C * 表示环化半胱氨酸残基)]能够特异性地抑制 VI 型胶原与肝星状细胞的结合,而线型的 RGD 肽并不能产生抑制效果,说明该环状多肽能够特异性地识别肝星状细胞上的 VI 型胶原受体,干扰 VI 型胶原与肝星状细胞的黏附。VI 型胶原是细胞外基质中黏接细胞及其他蛋白(I 型和 III 型胶原蛋白,核心蛋白聚糖和透明质酸)的重要胶原。肝纤维化时,肝星状细胞伴随着大量 VI 型胶原的产生,同时肝星状细胞膜上的 VI 型胶原受体增加^[2]。因此,利用环状 RGD 肽修饰的各类纳米载体均具有特异性靶向肝星状细胞的潜

力,这在大量研究中也得到了证明。Beljaars 等^[35]在血清白蛋白(HSA)上修饰 10 个环状肽 RGD 肽,形成纳米载体 pCVI-HSA。体外研究表明 pCVI-HSA 能够与大鼠 HSCs 特异性结合(尤其是活化的 HSCs)。体内免疫组化分析同时也证明, pCVI-HSA 主要是与纤维化肝脏中的 HSCs 结合(73 ± 14%)。Yang 等^[36]将氧化苦参碱(OM)包载于高分子聚乙二醇-聚(ϵ -己内酯)(PEG-*b*-PCL)的聚合物囊泡中,然后在其表面修饰环状 RGD 肽,形成具有靶向功能的含药纳米粒 RGD-PM-OM。RGD-PM-OM 对 HSCs 的增殖有较好的抑制作用,并显著降低 HSCs 中 α -SMA 和 I 型胶原基因的表达。在胆管结扎诱导的肝纤维化模型中,与 PM-OM 和 OM 相比, RGD-PM-OM 通过降低血清和结缔组织沉积中的 PC-III 和 IV-C 水平,表现出优异的抗纤维化活性。除此之外,Li 等^[37]利用环状 RGD 肽修饰的脂质体包载肝细胞生长因子。实验数据表明,包封 HGF 的靶向脂质体能够更好地促进胶原纤维降解,抑制胶原蛋白生成,促进肝硬化大鼠中 α -SMA 阳性细胞凋亡,缓解肝硬化。

3.3 以 6-磷酸甘露糖作为靶头的递送系统

静息的肝星状细胞会表达甘露糖 6-磷酸/胰岛素样生长因子 II(M6P/IGF II)受体,在溶酶体酶靶向及调节细胞生长的过程中发挥着重要的作用^[38]。在肝纤维化时,肝星状细胞激活,M6P/IGF II 受体的表达进一步上调^[38]。在体内,M6P/IGF II 受体的特异性配基是 IGF-II 及含有 6-磷酸甘露糖基团的蛋白物质:潜在的转化生长因子 β (LTGF- β)、增殖蛋白及溶酶体酶。

Beljaars 等^[39]将不同比例的 M6P 修饰在白蛋白上(M6P_x-HSA, x 为 M6P 与 HAS 的物质的量比)。结果表明,随着 M6P 修饰量的增加,M6P_x-HSA 在肝脏组织的蓄积程度增加。当 $x = 2 \sim 10$ 时,M6P-HSA 在肝脏的蓄积量占单剂量静脉注射总量的(9 ± 0.5)%;而当 $x = 28$ 时,M6P-HSA 在肝脏组织中的蓄积量高达(59 ± 9)%。此外,Beljaars 等^[38]通过双染色技术测定了 M6P_x-HSA 在肝脏各类型细胞中的分布,结果表明随着 M6P 修饰量的增加,M6P_x-HSA 在肝星状细胞中的蓄积程度增加,其中(70 ± 11)% 的 M6P₂₈-HSA 蓄积于肝星状细胞内。Beljaars 等^[39]还发现溶酶体通路抑制剂莫能菌素能够特异性的抑制 M6P₂₈-HSA 在肝星状

细胞上的摄取,进一步确定拟糖蛋白 M6P₂₈-HSA 是通过与 M6P/IGF II 受体结合内吞入肝星状细胞。通过 M6P-HSA 将抗纤维化药物递送至肝星状细胞中进行抗纤维化治疗具有较大的潜力。Luk 等^[40]利用 M6P₂₆-HSA 包载抗纤维化药物 18 β -甘草次酸对胆管结扎诱导的肝纤维化进行治疗,取得了较好的效果。除化学药物外,M6P-HSA 载体也可以对寡核苷酸进行递送。Ye 等^[41]利用 ³³P 对寡核苷酸(TFO)进行标记,并通过二硫键将其接枝在 M6P₂₀-BSA 上;尾静脉注射 ³³P-TFO-M6P-BSA 30 min 后,其 66% 蓄积于肝脏组织中,远高于游离的 ³³P-TFO;通过密度梯度离心的方法分离肝脏各类细胞,发现 ³³P-TFO-M6P-BSA 绝大部分均在肝星状细胞中。值得注意的是,目前仍没有研究证明将 6-磷酸甘露糖修饰在聚合物纳米粒、脂质体或无机纳米粒等其他纳米载体上,具有肝星状细胞靶向的作用。M6P-HSA 能够结合 M6P/IGF II 受体内吞入肝星状细胞,不仅与其修饰 M6P 配基相关,M6P-HSA 作为拟糖蛋白能够在空间上满足 M6P/IGF II 受体配体识别域在其中发挥着重要的作用。

3.4 以双环的血小板衍生生长因子 β 受体结合肽作为靶头的递送系统

肝纤维化时,损伤的肝细胞、炎症细胞及非实质细胞会分泌大量的促生长因子及促纤维化因子,如血小板衍生生长因子(PDGF)及转化生长因子 β (TGF- β),促使静息肝星状细胞表型转变;与此同时,活化的 HSCs 上血小板衍生生长因子 β 受体(PDGFB β R)表达上调,能够特异性结合这些受体的多肽有望用于肝纤维化的靶向治疗^[42]。BiPPB 是能够特异性地靶向 PDGFB β R 的一段结合肽: * Cys-Ser-Arg-Asn-Leu-Ile-Asp-Cys * Gly-Gly-Gly-Asp-Gly-Gly * Cys-Ser-Arg-Asn-Leu-Ile-Asp-Cys * (其中 C * 表示环化半胱氨酸残基)。Bansal 等利用此多肽在向肝星状细胞靶向递送 γ -干扰素(IFN γ)方面做了相关研究。首先,Bansal 等^[43]将 BiPPB 接枝在 HSA 上(PPB-HSA),然后通过双官能团的 PEG(Mal-PEG-SCM)与 IFN γ -SATA 反应,将 IFN γ 接枝与载体上,形成治疗载体 PPB-HSA-PEG-IFN γ 。PPB-HSA-PEG-IFN γ 中 IFN γ 与未修饰的 IFN γ 类似,有着完整的生物学活性;在体外实验中,PPB-HSA-PEG-IFN γ 能够特异性地结合人肝星状细胞及大鼠原代肝星状细胞;在体内实验中,PPB-HSA-PEG-

IFN γ 蓄积于高表达 PDGFB β R 的肝星状细胞中,激活 IFN γ 介导的信号通路,更好的治疗 CCl₄ 诱导形成的肝纤维化。随后,为进一步提高 IFN γ 的靶向递送,Bansal 等^[44]还合成了去除 IFN γ 受体结合段的 IFN γ 模拟肽 mimIFN γ ,通过双官能团的 PEG 直接将 mimIFN γ 与 BiPPB 相连接,形成了 mimIFN γ -PEG-BiPPB;在实验中 mimIFN γ -PEG-BiPPB 也表现出很好的特异性及治疗效果。

4 治疗肝纤维化的其他靶向递送系统

4.1 靶向肝细胞的药物递送系统

肝细胞占整个肝脏细胞比例 60%,占肝体积 80%,并承担着糖、蛋白质及脂质代谢,肝脏解毒等重要功能。肝细胞受到损伤是引发肝纤维化的基本原因,而肝纤维化后,肝星状细胞活化产生的大量纤维化胶原累积于细胞外基质,严重阻碍肝细胞与血液中的物质交换,进一步加剧肝细胞的损伤,导致肝功能下降^[2]。在肝纤维化治疗中,将药物选择性递送至肝细胞,保护肝细胞、维持肝细胞的功能尤为重要。

脱唾液酸糖蛋白受体在肝细胞上高表达,并且具有高亲和力和快速内化率。半乳糖基(GAL)化大分子可以特异性地靶向肝细胞表面的脱唾液酸糖蛋白,大量研究表明半乳糖化的载体可以选择性地将药物递送至肝细胞。例如,Craparo 等^[45]合成了末端接枝半乳糖的高分子 PHEA-EDA-PLA-GAL,利用此聚合物形成的胶束包载疏水性的前药三唑核苷(RBV),在体外证明了该胶束靶向 HepG2 细胞的能力。Morille 等^[46]将 DNA 与阳离子脂质 DOTAP/DOPE 结合,制备阳离子脂质纳米粒。在脂质纳米粒中加入 DSPE-mPEG₂₀₀₀-GAL 或 F108-GAL,与加入未修饰 GAL 的 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 或 F108 相比,能够显著提高阳离子脂质体在各类肝细胞上的转染效率。在肝纤维化治疗方面,Mandal 等^[47]利用半乳糖修饰的脂质体包载槲皮黄酮,通过保护肝细胞的治疗方法,对抗亚砷酸盐诱导形成的肝纤维化。在 NaAsO₂ 注射前,用包载槲皮黄酮的半乳糖化脂质体处理大鼠,该制剂能够保护肝细胞,避免肝细胞发生脂肪变性、坏死。

除此之外,小鼠肝细胞膜表面存在甘草酸(GL)的特殊受体,Mao 等^[48]将甘草酸修饰于白蛋白纳米粒上,通过实验证实了甘草酸修饰的白蛋白

能够与鼠原代肝细胞结合,增强纳米粒的摄取。除此之外,甘草酸还具有肝保护能力,具有抗纤维化的功效^[49]。因此,利用甘草酸修饰的载体对肝细胞进行保肝药物递送具有应用潜力。

4.2 靶向枯否细胞的药物递送系统

枯否细胞是肝脏组织特有的巨噬细胞,位于肝血窦中,占全身巨噬细胞的80%~90%,是先天性免疫的第一道屏障,具有清除内部凋亡细胞及外来异物,维持内环境稳态的重要作用。除此之外,枯否细胞在维持肝脏组织内稳态中也发挥着重要的作用。在肝损伤时,枯否细胞识别肝损伤,处于氧化应激状态,激活的枯否细胞释放大量炎症因子(如转化生长因子-β1和血小板衍生生长因子),活化肝星状细胞,诱导纤维化发生。同时,在损伤修复时,枯否细胞表型转变,释放大量抗炎症因子及基质金属蛋白酶,起到抗炎及降解纤维化的作用^[50]。因此,枯否细胞也是肝纤维化治疗潜在的靶细胞之一,将活性氧清除剂、抗炎药物、促枯否细胞表型转化药物及针对炎症因子表达的小干扰RNA靶向递送至枯否细胞进行抗纤维化治疗具有巨大的潜力。

磷脂酰丝氨酸(PS)是细胞膜中的阴离子磷脂成分,并且通常存在于细胞膜磷脂双层的内层。当细胞发生凋亡时,大量的PS转移到细胞膜外部,暴露的PS是巨噬细胞吞噬凋亡细胞的特异性识别信号^[51]。含有PS的纳米材料可模拟凋亡细胞,被巨噬细胞特异性识别,同时具有一定的免疫调节作用^[52]。Wang等^[53]将磷脂酰丝氨酸(PS)混入包载姜黄素(Cur)的纳米脂质载体(NLCs),制备了纳米制剂Cur-mNLC,并考察了其在大鼠肝纤维化模型中的治疗效果。与未修饰的NLCs相比,PS修饰的NLCs在纤维化的肝脏中蓄积程度最高,PS修饰增强了纳米粒靶向病变肝脏的能力;与所有对照相比,Cur-mNLC在降低肝损伤和纤维化方面更有效。除此之外,纳米粒作为一种外来物,易被枯否细胞通过食腐受体识别吞噬,纳米粒的粒径及表面电荷在其中起到了决定性的作用。通常来说,表面强正电的纳米粒,经静脉注射后在血液循环中易吸附血浆蛋白,被枯否细胞特异性识别吞噬;粒径大于400 nm的纳米粒易被枯否细胞识别吞噬^[54]。表面具有PEG修饰的纳米载体,由于PEG的亲水性及电中性,可以减少纳米载体与血浆蛋白接触,减少枯否

细胞对纳米粒的摄取。与此相反,未经特殊修饰的纳米粒绝大部分都会被枯否细胞识别吞噬,可以被动地实现对枯否细胞进行药物递送,但存在血液循环周期短的问题。如Bonepally等^[55]通过乳化溶剂蒸发法将活性氧清除剂水飞蓟宾包载在聚-ε-己内酯中,该纳米粒通过被枯否细胞识别被动吸收富集于肝脏以达到治疗肝纤维化的目的。在CCl₄诱导的模型中,该纳米颗粒能够使血清肝酶水平逆转95%,而相同量的药物溶液仅能够逆转50%。

5 结语与展望

肝纤维化是严重威胁人类健康的重大疾病,其分子机制复杂,但随着近些年分子机制的研究不断深入,许多的抗纤维化药物也不断地被发现,并在体外表现出强的抗纤维化效果^[56];但大多数药物溶解度低、无特异性、在肝脏蓄积效果差,大大限制了其体内的抗纤维化效果,所以目前临幊上尚无治疗肝纤维化的强效药物。除此之外,肝纤维化的发生是肝脏中各类型细胞共同作用的结果,需要精准针对性治疗。目前,肝纤维化治疗中针对各类型细胞治疗策略基本分为:①保护肝细胞,避免肝细胞损伤,增强肝细胞的增殖能力;②抑制肝星状细胞增殖,促进肝星状细胞凋亡或使其向静息状态转变,抑制肝星状细胞分泌纤维化胶原或促进其表达基质金属蛋白酶;③抑制枯否细胞分泌促炎症因子及促纤维化因子,促进枯否细胞向降解纤维化表型转变;④阻止肝窦内皮细胞血管化等等。

在药物载体上修饰不同的特异性配体,是实现肝纤维化药物靶向递送的重要环节。但是,除此之外,在肝纤维化病程中存在的许多客观因素也会对肝纤维化药物递送系统产生阻碍。例如:正常情况下,肝血窦内皮细胞层有丰富的窗孔,大多聚集形成筛板状,可阻挡直径大小200~500 nm的乳糜微粒,直径较小的乳糜微粒降解物则可通过。而肝纤维化病变中,肝血窦内皮细胞层在结构上出现血管化现象(窗孔减少甚至消失)。此外,在正常的肝脏组织中,肝间隙的低密度膜样基质主要是由胶原IV和VI组成,肝纤维化后主要由I胶原、III胶原及纤维蛋白组成,且胶原沉积量约为正常情况下的3~10倍^[2,57]。上述这些因素严重阻碍了肝脏的物质交换,势必对纳米载体靶向肝细胞及肝星状细胞造成影响。设计合理的纳米载体,从药物制剂方面

着手,成功克服这些药物递送中的障碍,仍是肝纤维化药物递送研究者需要解决的关键问题。

虽然,纳米制剂在临床上的应用仍然有许多关键问题有待考察。随着研究的深入,安全、高效、特异的抗纤维化药物递送在肝纤维化治疗中发挥着不可替代的重要作用,有望在不久的将来应用于临床肝纤维化的治疗。

参考文献

- [1] Mokdad AA, Lopez AD, Shahraz S, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis [J]. *BMC Med*, 2014, **12**(1):145.
- [2] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, **6**(1):425-456.
- [3] Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, **10**(1):25-34.
- [4] Raghu G, Johnson WC, Lockhart D, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone: results of a prospective, open-label phase II study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **159**(4 Pt 1):1061-1069.
- [5] van Dijk F, Olinga P, Poelstra K, et al. Targeted therapies in liver fibrosis: combining the best parts of platelet-derived growth factor BB and interferon gamma [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, **2**:72.
- [6] Lin TsT, Gao DY, Liu YC, et al. Development and characterization of sorafenib-loaded PLGA nanoparticles for the systemic treatment of liver fibrosis [J]. *J Control Release*, 2016, **221**:62-70.
- [7] Bisht S, Khan MA, Bekhit M, et al. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCure) ameliorates CCl₄-induced hepatic injury and fibrosis through reduction of pro-inflammatory cytokines and stellate cell activation [J]. *Lab Invest*, 2011, **91**(9):1383-1395.
- [8] Kumar V, Mondal G, Dutta R, et al. Co-delivery of small molecule hedgehog inhibitor and miRNA for treating liver fibrosis [J]. *Biomaterials*, 2016, **76**:144-156.
- [9] Kumar V, Mundra V, Mahato R I. Nanomedicines of Hedgehog inhibitor and PPAR- γ agonist for treating liver fibrosis. [J]. *Pharm Res*, 2014, **31**(5):1158-1169.
- [10] Kong WH, Park K, Lee MY, et al. Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(2):542-551.
- [11] Jiménez Calvente C, Sehgal A, Popov Y, et al. Specific hepatic delivery of procollagen 1(I) small interfering RNA in lipid-like nanoparticles resolves liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2015, **62**(4):1285-1297.
- [12] Li FQ, Su H, Wang J, et al. Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting [J]. *Int J Pharm*, 2008, **349**(1/2):274-282.
- [13] Lam PL, Kok SHL, Gambari R, et al. Evaluation of berberine/bovine serum albumin nanoparticles for liver fibrosis therapy [J]. *Green Chem*, 2015, **17**:1640-1646.
- [14] He Q, Zhang J, Chen F, et al. An anti-ROS/hepatic fibrosis drug delivery system based on salvianolic acid B loaded mesoporous silica nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(30):7785-7796.
- [15] Nishimori H, Kondoh M, Isoda K, et al. Silica nanoparticles as hepatotoxicants [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, **72**(3):496-501.
- [16] Chen Q, Xue Y, Sun J. Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomed*, 2013, **8**:1129-1140.
- [17] Liu T, Li L, Fu C, et al. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(7):2399-2407.
- [18] Isoda K, Hasezaki T, Kondoh M, et al. Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury [J]. *Pharmazie*, 2011, **66**(4):278-281.
- [19] Kabir N, Ali H, Ateeq M, et al. Silymarin coated gold nanoparticles ameliorates CCl₄-induced hepatic injury and cirrhosis through down regulation of hepatic stellate cells and attenuation of Kupffer cells [J]. *RSC Adv*, 2014, **4**:9012-9020.
- [20] Bartneck M, Ritz T, Keul HA, et al. Peptide-functionalized gold nanorods increase liver injury in hepatitis [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(10):8767-8777.
- [21] Choi K, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Protein corona modulation of hepatocyte uptake and molecular mechanisms of gold nanoparticle toxicity [J]. *Nanotoxicology*, 2017, **11**(1):64-75.
- [22] Iimuro Y, Nishio T, Morimoto T, et al. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat [J]. *Gastroenterology*, 2003, **124**(2):445-458.
- [23] Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, et al. Adenoviral expression of a transforming growth factor- β 1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats [J]. *BMC Gastroenterol*, 2003, **3**:29.
- [24] Chen P, Li J, Huo Y, et al. Adenovirus-mediated expression of orphan nuclear receptor NR4A2 targeting hepatic stellate cell attenuates liver fibrosis in rats [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**:33593.
- [25] Kinoshita K, Iimuro Y, Otogawa K, et al. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats [J]. *Gut*, 2007, **56**(5):706-714.
- [26] Kim JK, Lee JI, Paik YH, et al. A single adenovirus-mediated relaxin delivery attenuates established liver fibrosis in rats [J]. *J Gene Med*, 2016, **18**(1/2/3):16-26.
- [27] Rezvani M, Español-Suñer R, Malato Y, et al. *In vivo* hepatic re-

- programming of myofibroblasts with AAV vectors as a therapeutic strategy for liver fibrosis[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, **18**(6) :809 – 816.
- [28] Song G, Pacher M, Balakrishnan A, et al. Direct reprogramming of hepatic myofibroblasts into hepatocytes *in vivo* attenuates liver fibrosis[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, **18**(6) :797 – 808.
- [29] Lee YS, Jeong WI. Retinoic acids and hepatic stellate cells in liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, **27**:75 – 79.
- [30] Kawaguchi R, Yu J, Honda J, et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A [J]. *Science*, 2007, **315**(5813) :820 – 825.
- [31] Sato Y, Murase K, Kato J, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(4) :431 – 442.
- [32] Zhang Z, Wang C, Zha Y, et al. Corona-directed nucleic acid delivery into hepatic stellate cells for liver fibrosis therapy[J]. *ACS Nano*, 2015, **9**(3) :2405 – 2419.
- [33] Duong HT, Dong Z, Su L, et al. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension[J]. *Small*, 2015, **11**(19) :2291 – 2304.
- [34] Marcelino J, McDevitt CA. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1249**(2) :180 – 188.
- [35] Beljaars L, Molema G, Schuppan D, et al. Successful targeting to rat hepatic stellate cells using albumin modified with cyclic peptides that recognize the collagen type VI receptor[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(17) :12743 – 12751.
- [36] Yang J, Hou Y, Ji G, et al. Targeted delivery of the RGD-labeled biodegradable polymersomes loaded with the hydrophilic drug oxymatrine on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, **52**:180 – 190.
- [37] Li F, Sun JY, Wang JY, et al. Effect of hepatocyte growth factor encapsulated in targeted liposomes on liver cirrhosis[J]. *J Control Release*, 2008, **131**:77 – 82.
- [38] Beljaars L, Olinga P, Molema G, et al. Characteristics of the hepatic stellate cell-selective carrier mannose 6-phosphate modified albumin (M6P(28)-HSA) [J]. *Liver*, 2001, **21**(5) :320 – 328.
- [39] Beljaars L, Molema G, Weert B, et al. Albumin modified with mannose 6-phosphate: a potential carrier for selective delivery of antifibrotic drugs to rat and human hepatic stellate cells [J]. *Hepatology*, 1999, **29**(5) :1486 – 1493.
- [40] Luk JM, Zhang QS, Lee NP, et al. Hepatic stellate cell-targeted delivery of M6P-HSA-glycyrrhetic acid attenuates hepatic fibrogenesis in a bile duct ligation rat model[J]. *Liver Int*, 2010, **27**(4) :548 – 557.
- [41] Ye Z, Cheng K, Guntaka RV, et al. Targeted delivery of a triplex-forming oligonucleotide to hepatic stellate cells. [J]. *Biochemistry*, 2005, **44**(11) :4466 – 4476.
- [42] Borkham-kamphorst E, Kovalenko E, Roeyen CR, et al. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury[J]. *Lab Invest*, 2008, **88**(10) :1090 – 1100.
- [43] Bansal R, Prakash J, de Ruijter M, et al. Peptide-modified albumin carrier explored as a novel strategy for a cell-specific delivery of interferon gamma to treat liver fibrosis[J]. *Mol Pharm*, 2011, **8**(5) :1899 – 1909.
- [44] Bansal R, Prakash J, De Ruiter M, et al. Interferon gamma peptidomimetic targeted to hepatic stellate cells ameliorates acute and chronic liver fibrosis *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2014, **179**(1) :18 – 24.
- [45] Craparo EF, Triolo D, Pitarresi G, et al. Galactosylated micelles for a ribavirin prodrug targeting to hepatocytes[J]. *Biomacromolecules*, 2013, **14**(6) :1838 – 1849.
- [46] Morille M, Passirani C, Letrou-Bonneval E, et al. Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting[J]. *Int J Pharm*, 2009, **379**(2) :293 – 300.
- [47] Mandal AK, Das S, Basu MK, et al. Hepatoprotective activity of liposomal flavonoid against arsenite-induced liver fibrosis[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, **320**(3) :994 – 1001.
- [48] Mao SJ, Hou SX, He R, et al. Uptake of albumin nanoparticle surface modified with glycyrrhizin by primary cultured rat hepatocytes[J]. *World J Gastroentero*, 2005, **11**(20) :3075 – 3079.
- [49] Liang B, Guo XL, Jin J, et al. Glycyrrhizin acid inhibits apoptosis and fibrosis in carbon-tetrachloride-induced rat liver injury[J]. *World J Gastroentero*, 2015, **21**(17) :5271 – 5280.
- [50] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2014, **60**(5) :1090 – 1096.
- [51] Bagalkot V, Deiulius JA, Rajagopalan S, et al. “Eat me” imaging and therapy[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, **99**(Pt A) :2 – 11.
- [52] Ogawa M, Uchino R, Kawai A, et al. PEG modification on (111) In-labeled phosphatidyl serine liposomes for imaging of atherosclerotic plaques[J]. *Nucl Med Biol*, 2015, **42**(3) :299 – 304.
- [53] Wang J, Pan W, Wang Y, et al. Enhanced efficacy of curcumin with phosphatidylserine-decorated nanoparticles in the treatment of hepatic fibrosis[J]. *Drug Deliv*, 2018, **25**(1) :1 – 11.
- [54] Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, et al. Nanoparticle-liver interactions: cellular uptake and hepatobiliary elimination[J]. *J Control Release*, 2016, **240** :332 – 348.
- [55] Bonepally CR, Gandey SJ, Bommineni K, et al. Preparation, characterisation and *in vivo* evaluation of silybin nanoparticles for the treatment of liver fibrosis[J]. *Trop J Pharm Res*, 2013, **12**(1) :1 – 6.
- [56] Wan AN, Xu DS, Cai YF, et al. Anti-liver fibrosis activities of human insulin-like growth factor-1 *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2017, **48**(4) :476 – 482.
- [57] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2005, **115**(2) :209 – 218.