

## 非酒精性脂肪性肝病的联合疗法和递送策略

王燕梅<sup>1,2</sup>, 杨 磊<sup>1,2</sup>, 辛晓斐<sup>1,2</sup>, 尹莉芳<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学药学院药剂系,南京 210009; <sup>2</sup>江苏省缓释智能制剂及关键功能性辅料开发与评价工程研究中心,南京 210009)

**摘要** 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是与代谢功能障碍密切相关的一系列慢性肝病,其发病机制复杂,至今仅有一款PPAR- $\alpha/\gamma$ 双重激动剂Saroglitazar上市,用于治疗非肝硬化非酒精性脂肪性肝炎。针对NAFLD发病机制中的相同或不同靶点和信号通路开发的联合治疗策略能有望实现药物与药物间的协同作用,小分子药物联用、RNAi联合疗法和化学基因疗法是目前极富前景的联合治疗策略。此外,设计安全、有效和特异性的药物递送系统能改善小分子药物与基因药物的成药性,并促进其临床转化和产业化。因此,本文介绍了小分子药物联用、基于RNAi的核酸药物联用和小分子与核酸药物联用的最新研发现状及其递送方式,以期为NAFLD的治疗提供新的思路与方法。

**关键词** 非酒精性脂肪性肝病;肝纤维化;联合疗法;化学基因疗法;靶向递送策略

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)04-0423-10

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20220405

引用本文 王燕梅,杨磊,辛晓斐,等.非酒精性脂肪性肝病的联合疗法和递送策略[J].中国药科大学学报,2022,53(4):423–432.

Cite this article as: WANG Yanmei, YANG Lei, XIN Xiaofei, et al. Combination therapy and drug delivery strategies for treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(4):423–432.

## Combination therapy and drug delivery strategies for treatment of non-alcoholic fatty liver disease

WANG Yanmei<sup>1,2</sup>, YANG Lei<sup>1,2</sup>, XIN Xiaofei<sup>1,2</sup>, YIN Lifang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Jiangsu Provincial Engineering Research Center for R&D and Evaluation of Intelligent Drugs and Key Functional Excipients, Nanjing 210009, China

**Abstract** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a series of chronic liver diseases strongly associated with the metabolic disorder with an increasing rate of worldwide prevalence. Due to its complicated pathogenesis, only Saroglitazar has been approved by Indian Drug Controller General (DCGI) as a PPAR- $\alpha/\gamma$  dual agonist to treat non-cirrhotic non-alcoholic steatohepatitis. Combination therapy, which can target same or different signaling pathways of NAFLD pathogenesis, has been developed to achieve synergistic therapeutic efficacy. Currently, small-molecule drug combination, RNAi combination therapy, and chemogene therapy are proposed as promising strategies in NAFLD treatment. In addition, designing a smart, safe and effective drug delivery system is key to realizing the druggability, clinical translation and industrialization of small molecule drugs and gene drugs. This review summarizes the research status and delivery system of small-molecule drug combination, RNAi combination therapy, and chemogene therapy, in the hope of providing some novel insight for the treatment of NAFLD.

**Key words** non-alcoholic fatty liver disease; liver fibrosis; combination therapy; chemogene therapy; targeting strategy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871477)

收稿日期 2022-01-04 \*通信作者 Tel:025-83271018 E-mail:lifangyin\_@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81871477)

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是最常见的与代谢功能障碍相关的一系列慢性肝病。据流行病学统计,过去30年间,NAFLD在普通人群中的患病率为25%,而在肥胖人群中的患病率约为90%,且呈逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。

目前,研究者针对NAFLD发生和发展的复杂性和多因素性,提出了经典的“双重打击学说”<sup>[2]</sup>:第一重打击是由于久坐生活方式、高脂饮食、肥胖和胰岛素抵抗等不同病因,通过增加氧化应激和脂肪酸氧化障碍形成脂肪肝;第二重打击涉及炎症反应、肝细胞损伤和肝纤维化的形成,以上因素是NAFLD向非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)发展的关键<sup>[3]</sup>。然而,“双重打击学说”无法解释在NAFLD发生和发展过程中的分子与代谢水平调控机制,因此“多重打击学说”应运而生。新学说提出,患者的饮食习惯、生活环境和遗传因素可导致胰岛素抵抗、肥胖、脂肪细胞的增殖和肠道菌群的变化,从而导致血液中游离脂肪酸和胆固醇的含量增加,脂肪酸代谢调节失衡和脂毒性增强,从而引起线粒体功能障碍并伴随着活性氧水平的上升、氧化应激和内质网应激的产生<sup>[4]</sup>;胰岛素抵抗能增加肝脏脂肪的重新合成、诱导脂肪分解形成更多的游离脂肪酸,促进脂肪因子和包括肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )和白介素6(interleukin 6, IL-6)等促炎细胞因子的合成与分泌,最终诱导肝脏炎症微环境的形成<sup>[5]</sup>;此外,肝脏炎症会激活肝星状细胞分化为肌成纤维细胞,使其获得收缩、增殖和纤维化的特性,并促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的大量增生,主要表现为 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、I型胶原蛋白1(type I collagen alpha 1, Col1 $\alpha$ 1)和III型胶原蛋白 $\alpha$ 1(type III collagen alpha 1, Col3 $\alpha$ 1)过度表达<sup>[6]</sup>,从而导致更严重的肝脏相关疾病,如非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化、门静脉高压、肝硬化等,并最终诱发肝癌的形成;以上现象在基因敏感的受试者中表现更为显著<sup>[7]</sup>。

针对NAFLD复杂的发病机制,目前有多种治疗药物用于NAFLD/NASH和肝纤维化的治疗,包括胆汁酸代谢调节剂、葡萄糖代谢调节剂、炎症抑制剂、纤维生成抑制剂和脂肪生成抑制剂等<sup>[8]</sup>。尽

管印度药品监管总局(drug controller general, DC-GI)已批准PPAR $\alpha$ / $\gamma$ 双重激动剂Saroglitazar用于治疗非肝硬化性NASH患者,美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药品管理局至今还未有批准用于治疗NAFLD的药物,许多小分子药物和核酸药物正在临床试验研究中。目前处于临床研究阶段的核酸药物和临床Ⅲ期的小分子药物见表1,尽管有少部分药物已经完成了Ⅰ期/Ⅱ期的临床研究并进入Ⅲ期,但目前针对NAFLD的大部分药物在Ⅰ期/Ⅱ期临床试验中都未能达到预期的终点而被终止(NCT01703260; NCT03053063; NCT03551522等);即使进入Ⅲ期,也未有达到临床终点的临床研究,大多都被终止(NCT02704403; NCT03053063; NCT03028740)。这是由NAFLD复杂的发病机制与丰富的靶点和信号通路所致。针对单一靶点的单一疗法使NAFLD患者获益是有限的,因此,作用于相同或不同分子生物学机制的药物联合疗法具有广阔的开发前景。

目前针对NAFLD联合疗法的临床试验正在如火如荼地开展,和单一疗法相比,联合疗法具备以下优势<sup>[9]</sup>:①对单一疗法无响应患者而言,联合疗法可提高药物的反应率和显效率;②联合疗法可通过联合使用针对肝脂肪变性、炎症和肝纤维化的药物,达到同时改善NASH和纤维化的临床终点,最大程度提高药物治疗效果;③联合疗法可降低因剂量依赖性产生副作用的风险,提高用药的安全性。

在肝脏纤维化的进程中,肝脏组织的结构遭到破坏,ECM大量沉积,肝脏血流灌注减少,导致肝脏细胞对治疗药物的摄取减少,极大地降低了疗效;由于缺乏靶向性,治疗药物被非目的细胞摄取后,极易产生细胞毒性和副作用。纳米载体可提高负载药物的稳定性,改善药物的溶解性,可同时负载多种药物;能主动或被动靶向至肝脏中不同的目的细胞,实现特异性药物递送并降低全身毒性<sup>[10]</sup>。目前用于治疗NAFLD/NASH和肝纤维化的递送系统种类众多,根据纳米载体的天然特性,可分为无机纳米颗粒和有机纳米颗粒。无机纳米颗粒包括介孔二氧化硅纳米粒、金纳米粒、超顺磁性氧化铁纳米粒等,它们的尺寸和形状赋予了其光学、电学和磁学等特性。如金纳米粒的表面可修饰性和粒径可控制性使其可被设计成棒状结

表 1 单一疗法治疗 NAFLD/NASH 的小分子药物、核酸药物的临床研究情况

药物种类	药物	作用机制	靶点	剂型	临床阶段
小分子药物	Pentoxifylline	炎症抑制剂	磷酸二酯酶(PDE)抑制剂	片剂	Ⅲ期,进行中,未招募/ NCT05284448
	Estrogen		雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )激动剂	透皮贴剂	Ⅲ期,招募中/NCT04833140
	Cenicriviroc		cc 趋化因子 2/5 受体(CCR2/5)抑制剂	片剂	Ⅲ期,终止/NCT03028740
	Selonsertib	肝细胞凋亡抑制剂	细胞凋亡信号调节激酶 1(ASK1)抑制剂	片剂	Ⅲ期,终止/NCT03053050; NCT03053063
	Aramchol	脂肪生成抑制剂	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)调节剂	片剂	Ⅲ期,招募中/NCT04104321
	Dapagliflozin	葡萄糖代谢调节剂	钠-葡萄糖协同转运蛋白 1/2(SGLT1/2)抑制剂	未报道	Ⅲ期,招募中/NCT03723252
	Semaglutide		胰高血糖素样肽-1 受体(GLP-1R)激动剂	皮下注射剂	Ⅲ期,招募中/NCT04822181
	Lanifibranor		过氧化物酶体增殖物活化受体 $\alpha/\gamma/\delta$ (PPAR- $\alpha/\gamma/\delta$ )激动剂	片剂	Ⅲ期,招募中/NCT04849728
	Elafibranor		过氧化物酶体增殖物活化受体 $\gamma/\delta$ (PPAR- $\gamma/\delta$ )激动剂	片剂	Ⅲ期,终止/NCT02704403
	Obeticholic acid	胆汁酸代谢调节剂	法尼醇 X 受体(FXR)激动剂	片剂	Ⅲ期,进行中,未招募/ NCT02548351
核酸药物	MGL-3196	多功能代谢调节剂	甲状腺激素受体 $\beta$ (THR $\beta$ )抑制剂	片剂	Ⅲ期,招募中/NCT03900429; NCT04197479
	ARO-HSD (siRNA)	脂肪生成抑制剂	羟基类固醇 17- $\beta$ 脱氢酶(HSD17B13)	未报道	I 期,完成/NCT04202354
	ALN-HSD (siRNA)		羟基类固醇 17- $\beta$ 脱氢酶(HSD17B13)	(ESC+)-GalNAc 偶联	I 期,招募中/NCT04565717
	ION839/AZD2693 (ASO)		Patatin 样磷酯酶结构域蛋白 3 (PNPLA3)	ASO-GalNAc 偶联	I 期,招募中/NCT04483947
	ION224 (ASO)		二脂酰甘油酰基转移酶 2(DGAT2)	ASO-GalNAc 偶联	Ⅱ期,招募中/NCT04932512

构、笼状结构和卫星结构,用于抗 NAFLD 药物的递送;介孔二氧化硅具有较大的空隙体积和比表面积,以及良好的化学和热稳定性,载药量高<sup>[11]</sup>。有机纳米颗粒通常由生物大分子如蛋白质、聚合物或脂质组成,具有良好的生物相容性和生物可降解性;表面有较多活性基团,可进行表面修饰,用于肝脏细胞特异性靶向。因此,本文对 NAFLD/NASH 的联合治疗策略与递送系统进行总结,为 NAFLD/NASH 治疗提供新的思路。

## 1 小分子药物联用及其递送

基于 NAFLD 发病的不同分子生物学机制,并发现有效靶点的小分子药物的联用,是 NAFLD 治疗过程中最常见的联合用药策略。首先,针对炎症相关通路和胆汁酸代谢的调节,是联合治疗 NAFLD 的策略之一。NAFLD 发病机制涉及肝脏

外炎症细胞向肝损伤部位的募集,该过程主要由趋化因子与其受体之间的相互作用所介导,并涉及将骨髓来源的单核细胞和巨噬细胞募集到损伤部位,通过产生炎性细胞因子和趋化因子,进而进一步放大免疫反应并诱导肝星状细胞的活化<sup>[12]</sup>。同时,胆汁酸是胆汁的主要成分,胆汁酸的异常积累会诱导肝星状细胞活化、线粒体功能障碍和内质网应激,导致细胞凋亡、炎症和肝损伤。法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)是一种胆汁酸活化的核受体,在肝脏和肠道中高水平表达,能通过降低胆汁酸合成过程的限速酶胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7 $\alpha$ 1)的表达水平来降低胆汁酸的异常积累<sup>[13]</sup>。此外,FXR 激活后直接诱导小异二聚体伴侣(small heterodimer partner, SHP)的表达,SHP 的上调抑制了肝星状细胞的激活,并下调肝星状细胞中胶原合成的相关蛋

白如 Col1a1 和金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitors of metalloproteinases 1, TIMP1) 的表达, 从而缓解肝纤维化<sup>[14]</sup>。临床研究结果显示, cc 趋化因子 2 和 5 受体的双重拮抗剂 cenicriviroc, 在脂肪性肝炎缓解和治疗等方面无显著疗效 (NCT02217475)<sup>[15]</sup>。但是, cenicriviroc 和非胆汁酸 FXR 激动剂 tropifexor 联用后, 在临床研究中显现出比 tropifexor 和 cenicriviroc 单一疗法更好的疗效 (NCT03517540)<sup>[16]</sup>。结果说明, 炎症抑制剂和胆汁酸代谢调节剂可联合用于 NAFLD 的治疗。

其次, 联合抑制纤维化和炎症, 也可用于治疗 NAFLD。上皮细胞向间充质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞丢失上皮特性转变为具有运动性、迁移性和侵袭性的纺锤状间质细胞<sup>[17]</sup>, 它是肝纤维化发生和发展的关键事件。在此过程中, 肝星状细胞能通过 EMT 途径转化为肌成纤维细胞, 加速其增殖, 进而促进肝纤维化的发生和发展, 而 Hedgehog (Hh) 配体可通过激活 Gli 家族转录因子而诱导 EMT 的产生<sup>[18]</sup>。肝星状细胞的过氧化物酶体增殖物活化受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ) 能通过与肝脏 X 受体形成二聚物抑制静息状态的肝星状细胞的激活, 并降低相关炎症因子的表达。因此, Hh 抑制剂和 PPAR- $\gamma$  激动剂联用可同时抑制纤维化和炎症, 具有治疗肝纤维化的潜力。Kumar 等<sup>[19]</sup>发现 Hh 抑制剂 vismodegib 和 PPAR- $\gamma$  激动剂 rosiglitazone 在大鼠胆管结扎的肝纤维化模型中, 能显著下调 EMT 的特征标志物  $\alpha$ -SMA 与纤连蛋白-1 (fibronectin-1, FN-1) 的水平和减少细胞外基质沉积; 此外, 炎症相关蛋白如 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 和 TGF- $\beta$  的水平也得到了显著抑制<sup>[19]</sup>。但由于这两种药物水溶性较差, 且 rosiglitazone 的半衰期仅有 3~4 h, Kumar 等<sup>[19]</sup>合成了两亲性共聚物 methoxy-polyethylene-glycol-b-poly (carbonate-co-lactide) [mPEG-b-P(CB-co-LA)], 采用乳化/溶剂蒸发法制备具有生物可降解特性的聚合物纳米颗粒实现对 vismodegib 和 rosiglitazone 在小鼠肝纤维化模型中的共递送, 该纳米颗粒的平均粒径为 120~130 nm, 显著改善了 vismodegib 和 rosiglitazone 的成药性、在肝脏的蓄积率和药动学行为。

此外, 作用于同一信号通路不同靶点的抗纤维化药物的联用, 可减轻药物不良反应, 提高治疗

NAFLD 的安全性。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应的激活会促进肝星状细胞向肌成纤维细胞转化, 并导致异常的血管生成, 最终诱导肝纤维化的形成。因此, 抑制 MAPK 信号通路也是肝纤维化的治疗策略之一。Sorafenib 是一种靶向 MAPK 级联反应中的细胞表面酪氨酸激酶受体和细胞内丝氨酸/苏氨酸激酶的多激酶抑制剂, 对 Raf 激酶、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) 等均有效<sup>[20]</sup>, 可通过调节血管重塑和血管成熟、抑制相关促纤维化因子的表达、改善线粒体功能和胶原分布障碍来发挥抗纤维化作用<sup>[21]</sup>。然而, 若预防性或长期性使用 sorafenib, sorafenib 对 Raf 激酶活性的不完全抑制可能会诱导恶性或正常基质细胞中 MAPK 通路的异常激活, 从而激活肝星状细胞, 减弱其抗纤维化作用<sup>[22]</sup>。丝裂原细胞外激酶 (mitogenextracellular kinase, MEK) 抑制剂 selumetinib 与 sorafenib 的联合使用, 能显著降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等炎症因子的表达, 降低纤维化标志物  $\alpha$ -SMA 和 Col1 $\alpha$ 1 等的表达并显著促进肝星状细胞的凋亡; 在 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化模型中, selumetinib 能抑制 sorafenib 诱导的 ERK 和 NF- $\kappa$ B 通路的激活, 增强肝星状细胞对 sorafenib 治疗的敏感性; 除此以外, 该联合治疗策略还能抑制纤维化相关的原发性肝癌发展和肿瘤的肝转移<sup>[23]</sup>。此外, sorafenib 的溶解度和生物利用度均很低<sup>[24]</sup>, 其非特异性会引起脱靶效应, 导致手足综合征、腹泻和高血压<sup>[25]</sup>; 并且激活的肝星状细胞表面具有高表达的 C-X-C 基序趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)<sup>[26]</sup>。因此, Sung 等<sup>[23]</sup>将可靶向于 CXCR4 的 CTCE9908 多肽通过稳定的硫醚键结合在 PLGA 纳米粒上, 以共同递送 sorafenib 和 MEK 抑制剂至激活的肝星状细胞<sup>[27]</sup>。

## 2 基于 RNAi 的核酸药物联用及其递送

由于 NAFLD/NASH 发病机制的错综复杂性, 对于没有合适作用“口袋”的重要靶点, 小分子药物较难开发; 大部分小分子药物半衰期较短, 需频繁给药, 患者顺应性差; 小分子药物由于结构较小, 易作用于多个靶点, 引起患者不良反应。小核

酸类药物能通过 RNA 干扰, 诱发对 mRNA 高效特异性降解的现象, 达到对特定蛋白水平调控的目的, 从而实现在对 NAFLD 疾病的源头治疗。与小分子药物相比, 小核酸类药物具有候选靶点丰富, 作用范围广泛, 并可连续数周沉默基因表达的优势。近几年新发现, siRNA、miRNA、反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASO) 和核酸适配体等在 NAFLD 的发病进程发挥着重要作用, 这对于 NAFLD 的治疗干预至关重要。但是, 核酸类药物在体内稳定性差、易被迅速降解、不易在靶组织中积累, 且具有高分子量、阴离子电荷和亲水性等理化性质, 导致这类药物不易透过靶细胞膜, 难以与细胞质中的 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合发挥沉默基因的作用。因此, 设计出一种安全有效的核酸药物递送系统, 是最大限度发挥核酸类药物治疗效果的关键。

目前, 已有少数核酸类药物进入临床研究阶段(见表 1)。Arrowhead 公司于 2021 年已经完成了 ARO-HSD 的 I / II a 期临床试验(NCT04202354), 并在美国肝病研究协会 2021 年 12 月进行的肝病会议中发布了临床结果, 在健康和 NAFLD 受试者中分别给予 25、100 和 200 mg 的 ARO-HSD 后, 能降低  $17\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 13(17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 13, HSD17B13) 基因的表达, 从而降低炎症和纤维化等, 发挥治疗 NAFLD 的作用; ARO-HSD 有较好的安全性、耐受性和有效性: 200 mg 剂量给药 71 d 后, 所有受试者 HSD17B13 mRNA 的表达水平均下降 90% 以上, ALT 水平下降了 42.2%, 肝脏脂质沉积相关指标 MRI-PDFF 下降了 7.3%, 并且给药期间未观察到严重的不良反应事件<sup>[27]</sup>。与此同时, Alnylam 公司也针对 HSD17B13 靶点开发出候选药物 ALN-HSD, 目前关于 ALN-HSD 的 I 期临床试验的受试者正在招募进行中(NCT04565717), 预期于 2023 年 6 月完成。肝实质细胞表面大量表达去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR), 用于结合并清除循环中的糖蛋白; *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 能与去唾液酸糖蛋白受体特异性结合, 通过受体介导的内吞作用将核酸药物递送至肝细胞(图 1)<sup>[28]</sup>。根据表 1 显示, 大部分进入临床试验的 NAFLD 相关核酸药物均采用 GalNAc 偶联技术稳定其结构, 并改善核酸药物的肝脏特异性递送和肝细胞的摄取, 从而增强肝脏靶向效率。GalNAc 偶联技术在核酸药物递送领域具有很大的优势和前景, 目前有 3 种核酸药物已成功上市, 分别是用于治疗成年急性肝卟啉症的 GIVLAARI<sup>®</sup>

teroid dehydrogenase 13, HSD17B13) 基因的表达, 从而降低炎症和纤维化等, 发挥治疗 NAFLD 的作用; ARO-HSD 有较好的安全性、耐受性和有效性: 200 mg 剂量给药 71 d 后, 所有受试者 HSD17B13 mRNA 的表达水平均下降 90% 以上, ALT 水平下降了 42.2%, 肝脏脂质沉积相关指标 MRI-PDFF 下降了 7.3%, 并且给药期间未观察到严重的不良反应事件<sup>[27]</sup>。与此同时, Alnylam 公司也针对 HSD17B13 靶点开发出候选药物 ALN-HSD, 目前关于 ALN-HSD 的 I 期临床试验的受试者正在招募进行中(NCT04565717), 预期于 2023 年 6 月完成。肝实质细胞表面大量表达去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR), 用于结合并清除循环中的糖蛋白; *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 能与去唾液酸糖蛋白受体特异性结合, 通过受体介导的内吞作用将核酸药物递送至肝细胞(图 1)<sup>[28]</sup>。根据表 1 显示, 大部分进入临床试验的 NAFLD 相关核酸药物均采用 GalNAc 偶联技术稳定其结构, 并改善核酸药物的肝脏特异性递送和肝细胞的摄取, 从而增强肝脏靶向效率。GalNAc 偶联技术在核酸药物递送领域具有很大的优势和前景, 目前有 3 种核酸药物已成功上市, 分别是用于治疗成年急性肝卟啉症的 GIVLAARI<sup>®</sup>

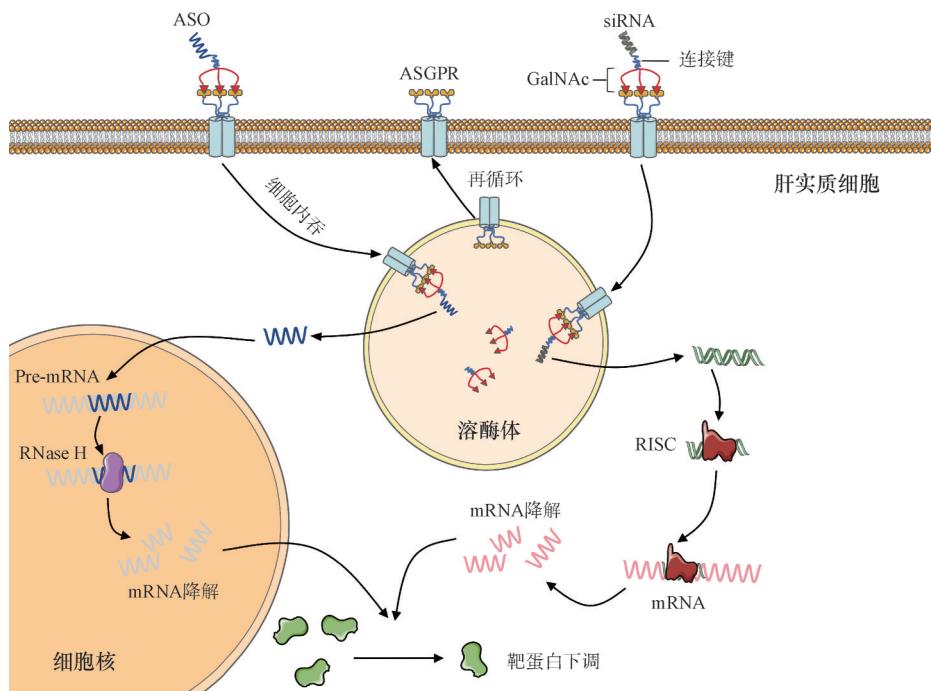


图 1 GalNAc-siRNA 和 ASO 递送至肝实质细胞的作用机制

ASO: 反义寡核苷酸; ASGPR: 去唾液酸糖蛋白受体

(givosiran)、用于治疗原发性高草酸尿症(I型)的OXLUMO®(lumasiran)和治疗杂合子家族性高胆固醇血症的LEQVIO®(inclisiran)。

肝组织中胶原的大量积累与沉积是肝纤维化最为显著的临床特征,靶向不同信号通路但共同抑制肝星状细胞中胶原生成的核酸药物的联用,是联合治疗NAFLD的策略之一。首先,miRNA-29b是肝纤维化的关键治疗靶点,miRNA-29b能直接与Col1α1 mRNA的3'-UTR序列结合抑制胶原生成,还能间接阻断TGF-β1/Smad3(mothers against decapentaplegic homolog 3)或Hh信号通路<sup>[29]</sup>、上调磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)相关信号通路抑制纤维化<sup>[30]</sup>。此外,miRNA-122是成人肝脏中最丰富的肝脏特异性miRNA,能通过调控TGF-β-miR-122-FN1/血清应答因子(serum response factor, SRF)信号通路<sup>[31]</sup>和降低脯氨酰4-羟化酶亚基α1(prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1, P4HA1)的表达来抑制胶原蛋白的产生和成熟<sup>[32]</sup>。Wu等<sup>[33]</sup>合成了维生素A(vitamin A, VA)偶联和pH敏感的共聚物VA-polyethylene glycol-polyethyleneimine-poly(N-(N',N'-diisopropylaminoethyl)-co-benzylamino)aspartamide(T-PBP),组装成超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)修饰的阳离子胶束用于miRNA-29b和miRNA-122的共递送。视黄醇结合蛋白受体(retinol binding protein receptor, RBPR)在肝星状细胞表面大量表达,主要负责摄取和储存VA,因此VA修饰的纳米递送载体能通过吸附血液中的RBP,与RBP受体的相互作用,提高肝星状细胞对纳米载体的摄取<sup>[34]</sup>。体内外结果表明,miRNA-29b和miRNA-122的联合治疗通过下调包括Col1α1、α-SMA和TIMP等在内的相关纤维化基因的表达,产生协同治疗肝纤维化作用;且小核酸药物的协同治疗作用显著大于miRNA-29b或miRNA-122单一药物纳米制剂的疗效<sup>[33]</sup>。因此,miRNA-29b和miRNA-122的联合能通过靶向肝纤维化的不同信号通路来抑制肝星状细胞中胶原蛋白的生成,发挥协同治疗作用。

通过反向调节胶原蛋白合成和降解来逆转胶原蛋白积累,也是治疗肝纤维化的联合治疗策略之一。肝组织中胶原的大量积累与沉积,与金属蛋白酶抑制剂TIMP-1在肝脏组织中的过度表达,

胶原蛋白的降解受到阻滞密切相关。Qiao等<sup>[35]</sup>基于此现象选用分别靶向于抑制胶原蛋白合成和促进其分解的siRNA,并合成两亲性阳离子超支化脂质(C<sub>15</sub>-PA),与辅助磷脂胆固醇-聚乙二醇-维生素A(Chol-PEG-VA)结合,形成脂质纳米颗粒,实现siCol1α1和siTIMP-1的共递送。带正电荷的C<sub>15</sub>-PA与siRNA通过静电作用结合,提高siRNA的稳定性;表面的PEG亲水层赋予脂质纳米颗粒在血液循环中的稳定性;VA可提高纳米载体对肝星状细胞的靶向能力。在CCl<sub>4</sub>诱导的小鼠肝纤维化模型中,siCol1α1和siTIMP-1的双向协同作用能将肝纤维化小鼠中胶原蛋白的积累水平降低到正常小鼠的水平。

由此可见,基因药物联合疗法在改善肝功能和缓解肝纤维化方面表现出显著的疗效。

### 3 小分子与核酸药物联用及其递送

核酸药物通过直接上调或下调特定基因的表达,对特定蛋白水平进行调控,但由于NAFLD发病机制的复杂性,仅使用核酸药物未必能最大限度地发挥治疗NAFLD的作用。化学基因疗法即结合化学和基因药物的治疗,已被提出作为实现协同效应的策略之一,这一概念已在癌症治疗中得到充分证实<sup>[36]</sup>。如Gong等<sup>[37]</sup>发现,抑制自噬的核酸药物siATG7能显著增强多西紫杉醇抑制乳腺癌的疗效;Zhang等<sup>[38]</sup>发现siBcl-2可通过下调Bcl-2蛋白的表达,与氯尼达明协同诱导细胞凋亡,最终导致肿瘤细胞死亡。而在NAFLD治疗领域,小分子药物和核酸药物可通过同时作用于同一或不同靶点实现对NAFLD的协同治疗,核酸药物还可通过上调或下调特定转运蛋白或改善肝脏微环境增强肝脏对小分子药物的敏感性<sup>[39]</sup>。虽然目前化学基因疗法治疗NAFLD这一概念还处于临床前研究阶段,但其对肝纤维化的缓解具有明显优势,是非常具有临床研究前景的治疗策略。

首先,核酸药物和小分子药物可作用于同一靶点协同抑制胶原生成,治疗肝纤维化。水飞蓟素(silymarin)是从菊科草本植物乳蓟(*Silybum marianum* Linn. Gaertn.)的种子中提取得到的一类黄酮木脂素类化合物,由水飞蓟宾(silibinin)、水飞蓟宁、水飞蓟丁以及异水飞蓟宾4种同分异构体组成,其中以silibinin含量最高,活性最强。临床研

究结果表明, silibinin 具有稳定肝细胞膜、保护肝细胞不受损害;清除氧自由基、减轻毒性物质引起的脂质过氧化反应;抑制 Col1 $\alpha$ 1 mRNA 的表达,延缓早期和晚期肝纤维化中的胶原蛋白积聚,已被广泛应用于各种急慢性肝病、肝纤维化和肝硬化<sup>[40]</sup>。然而 silibinin 对肝脏胶原蛋白积累的下调能力仅为 35%<sup>[41]</sup>,并且由于其低特异性、低水溶性(50~430  $\mu$ g/mL)、低生物利用度(23%~47%)等问题<sup>[42]</sup>, silibinin 对肝纤维化的治疗效果极为有限。在这种情况下,靶向于 Col1 $\alpha$ 1 的 siRNA (si-Col1 $\alpha$ 1) 可特异性阻断 Col1 $\alpha$ 1 mRNA 的表达,从而阻断肝纤维化进程并诱导纤维化消退。Qiao 等<sup>[43]</sup>采用维生素 A 修饰的两亲性三嵌段聚合物 PLGA-PSPE-PEG-VA 自组装成核壳聚合物胶束(PVM),并在组装过程中将 silibinin 包裹入 PLGA 的疏水核中;此外,siCol1 $\alpha$ 1 通过静电相互作用与 PSPE 结合形成化学小分子/基因药物共递送系统(CGPVM)。聚合物胶束通过 VA 靶向肝星状细胞,内化后,PSPE 能缓冲酸性内体,通过增加内部渗透压破坏溶酶体膜,实现聚合物胶束的逃逸,silibinin 和 siCol1 $\alpha$ 1 随后从聚合物胶束中释放到细胞质中并协同抑制 Col1 $\alpha$ 1 的表达<sup>[43]</sup>。

其次,具有抑制纤维化作用的核酸药物和小分子药物联用,还可通过作用于不同靶点,实现对肝纤维化的协同治疗。如前所述,miR-29b1 在肝纤维化的发病进程中起关键作用,并在大多数肝纤维化患者和相关动物模型中呈下调的趋势;miR-29b1 能直接抑制胶原生成,间接阻断 TGF- $\beta$ 1/Smad3 通路<sup>[29]</sup>;TGF- $\beta$ 1 能通过 Smad 途径激活转录因子 Gli, Gli 可进一步激活 Hh 的信号通路<sup>[44]</sup>,减弱 miR-29b1 抑制胶原生成的作用。因此,同时递送 Hh 抑制剂 GDC-0449 和 miR-29b1 以抑制肝纤维化进展具有重要意义。Kumar 等<sup>[45]</sup>基于以上理论,合成了共聚物 mPEG-b-PCC-g-DC-g-TEPA,采用薄膜水化法将该共聚物制备成阳离子胶束,共同递送 GDC-0449 和 miR-29b1;在小鼠胆管结扎肝纤维化模型中的治疗效果显示,联合给药后可显著减少胶原沉积和血清损伤标志物的表达,改善肝脏形态,并显著抑制包括 TIMP-1、 $\alpha$ -SMA 和 FN-1 在内的促纤维化基因的表达,发挥协同治疗的目的。

最后具有抑制纤维化的核酸药物和具有抑制炎症的小分子药物联用,也是治疗 NAFLD/NASH

和肝纤维化的联合治疗策略之一。肝炎病毒、酒精、非酒精性脂肪性肝炎和肝毒性药物等诱导的慢性肝损伤能导致肝脏缺氧微环境的形成,从而提高 VEGF 的表达水平,通过促进肝脏血管生成加速肝纤维化进程<sup>[46]</sup>。如前所述,细胞因子和趋化因子是组织炎症的主要调节因子,慢性肝损伤还会诱导趋化因子 SDF1 $\alpha$  及其受体 CXCR4 的表达,加重肝脏的炎症反应<sup>[47]</sup>。因此,CXCR4 抑制剂 AMD3100 和靶向 VEGF 的 siRNA (siVEGF) 的联合疗法有望发挥协同治疗肝纤维化的作用。基于此假设,Liu 等<sup>[48]</sup>制备了具有 CXCR4 靶向并载有 AMD3100 和 siVEG 的脂质体:将小牛胸腺 DNA 作为载体,在鱼精蛋白存在的条件下,将 AMD3100 和 siVEGF 浓缩成核复合物,并包裹入由胆固醇、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、带负电荷的二油酰基磷脂酸(DOPA)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG-2000)组成的脂质体中,再通过电荷相互作用,将带正电荷的 AMD3100 与带负电的脂质体共孵育,使纳米载体表面具有 CXCR4 靶向性;脂质双层中的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)可改善纳米载体的血液循环和生物分布。在 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化模型中,递送 AMD3100 和 siVEGF 的 CXCR4 靶向的纳米颗粒能通过减少血管直径和弯曲度改善肝脏血管的结构,减少细胞外基质的沉积,改善肝脏缺氧的微环境和炎症<sup>[48]</sup>。

#### 4 总结与展望

NAFLD 是由多种细胞、多种细胞因子和多种信号通路等相互作用,导致代谢紊乱而衍生出的慢性疾病,其中肝星状细胞的激活是形成肝纤维化进程中最为关键的因素;目前对 NAFLD/NASH 的治疗已有丰富的潜在治疗靶点,全球多家大型制药企业都在竞相开发 NAFLD 新药且有多种药物已进入临床试验阶段,除了被印度 DCGI 批准的 PPAR $\alpha$ / $\gamma$  双重激动剂 saroglitazar,至今还未有 NAFLD 的相关治疗药物被批准上市,这表明 NAFLD 的患者难以从单一疗法获益;因此,研究者逐渐将目光聚焦于 NAFLD 发病机制中的不同靶点和信号通路,并开发相关的联合治疗策略,以期实现药物与药物的协同效应,减缓 NAFLD 疾病进展甚至逆转 NAFLD。小分子药物联用、RNAi 疗法和

化学基因疗法是目前极富前景的联合治疗策略,各个策略的研发情况及递送方式见表2,目前已有小分子的联合用药处于临床评估阶段。然而,对没有合适作用口袋的靶点,较难开发对应的小分子药物;同时,特异性低也是引发小分子副作用大的主要原因。与之相比,基于RNAi疗法的小核酸药物为扩大治疗靶标的范围提供了独特的机会,各种形式的小核酸药物能选择性地作用于小分子

药物无法靶向的基因和蛋白质,直接调控特定蛋白的表达,作用时间持久且范围更广泛,有望实现对NAFLD相关疾病的源头治疗。将小分子药物和核酸药物联合使用,可通过同时作用于同一或不同靶点实现对NAFLD进行协同治疗,还可增强肝脏对小分子药物的敏感性,是目前极具前景的联合治疗策略。

表2 联合疗法治疗NAFLD/NASH的研发情况及递送方式

联用类型	靶点	药物	聚合物/剂型	研发现状
小分子药物联用	钠-葡萄糖协同转运蛋白1/2(SGLT1/2)抑制剂和法尼醇X受体(FXR)激动剂	Licogliflozin和Tropifexor	未报道	II期,招募中/NCT04065841
	乙酰辅酶A羧化酶(ACC)抑制剂和二脂酰甘油酰基转移酶2(DGAT2)抑制剂	PF-05221304和PF-06865571	片剂	II期,招募中/NCT04321031
	cc趋化因子2/5受体(CCR2/5)抑制剂和法尼醇X受体(FXR)激动剂	Cenicriviroc和Tropifexor	未报道	II期,完成/NCT03517540
	Hh抑制剂和过氧化物酶体增殖物活化受体 $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )激动剂	Vismodegib和Rosiglitazone	mPEG-b-p(CB-co-LA)共聚物/纳米粒	体内:胆管结扎大鼠纤维化模型
	丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)多激酶抑制剂和丝裂原细胞外激酶(MEK)抑制剂	Sorafenib和Selumetinib	DSPE-PEG-Maleimide/CXCR4靶向纳米粒	体内:CCl <sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型
	基于RNAi的核酸药物联用	Col1 $\alpha$ 1 mRNA抑制剂和TGF- $\beta$ -miR-122-FN1/SRF信号通路抑制剂	miRNA-29b和miRNA-122	T-PBP/超顺磁性氧化铁修饰的阳离子胶束
小分子和核酸药物联用	Col1 $\alpha$ 1 mRNA小分子抑制剂和siRNA抑制剂	siCol1 $\alpha$ 1和siTIMP-1	两亲性阳离子超支化脂质(C15-PA)/维生素A修饰的脂质纳米颗粒	体内:CCl <sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型
TGF- $\beta$ 1/Smad3信号通路抑制剂和Hh抑制剂	C-X-C基序趋化因子受体4(CXCR4)抑制剂和VEGF mRNA抑制剂	Silibinin和siCol1 $\alpha$ 1	PLGA-PSPE-PEG-VA/维生素A修饰的胶束	体内:CCl <sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型
		GDC-0449和miR-29b1	mPEG-b-PCC-g-DC-g-TEPA/胶束	体内:胆管结扎小鼠纤维化模型
	AMD3100和siveGF	CXCR4靶向纳米粒		体内:CCl <sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型

安全高效的肝脏靶向递送策略有利于最大限度地减少小核酸药物的脱靶作用,进而发挥药物治疗NAFLD的作用。NAFLD患者的肝脏中胶原蛋白和纤维蛋白大量沉积、血流灌注量减少,形成肝脏药物递送的物理屏障,这会严重阻碍递送系统的有效性和肝脏细胞对治疗药物的摄取率。目前已有大量研究者设计了不同的纳米载体如脂质体、固体脂质纳米粒和聚合物胶束等用于肝脏的递送,并通过在载体表面修饰不同的特异性配体,将药物选择性地递送至肝星状细胞、肝实质细胞和枯否细胞(图2)。活化的肝星状细胞表面过度表达的受体包括视黄醇结合蛋白受体(RBPR)、6-

磷酸甘露糖/胰岛素样生长因子II(mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II, M6P/IGFII)受体、PPAR、整合素、PDGFR等,可设计相应的靶向性载体将药物递送至肝星状细胞;肝实质细胞表面大量表达ASGPR,对半乳糖基化的大分子有高亲和力;磷脂酰丝氨酸(phospholipid serine, PS)是凋亡细胞暴露的信号,因此PS修饰的纳米载体,可被枯否细胞识别,实现对枯否细胞的靶向。虽然有多种靶向方式可实现对以上细胞的特异性递送,但仍需要开发许多策略来改善小核酸药物的成药性、体内代谢稳定性和细胞内递送的有效性。

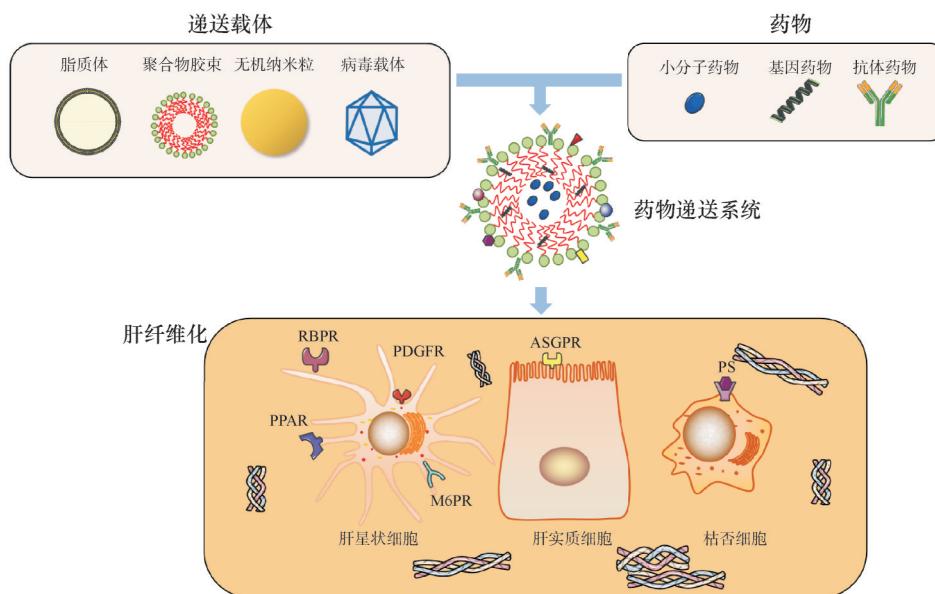


图 2 NAFLD 治疗的相关药物递送系统

## References

- [1] Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease—A global public health perspective [J]. *J Hepatol*, 2019, **70**(3):531-544.
- [2] Guo YT, Chen J, Liu N, et al. Association of circulating TXNIP levels with fatty liver in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2022, **15**:225-233.
- [3] Sodium N, Kumar G, Bojja SL, et al. Epigenetics in NAFLD/NASH: targets and therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2021, **167**:105484.
- [4] Rives C, Fougerat A, Ellero-Simatos S, et al. Oxidative stress in NAFLD: role of nutrients and food contaminants [J]. *Biomolecules*, 2020, **10**(12):1702.
- [5] Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, **76**(8):1541-1558.
- [6] Ahrari A, Najafzadehvarzi H, Taravati A, et al. The inhibitory effect of PLGA-encapsulated berberine on hepatotoxicity and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) gene expression [J]. *Life Sci*, 2021, **284**:119884.
- [7] Juanola O, Martínez-López S, Francés R, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: metabolic, genetic, epigenetic and environmental risk factors [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, **18**(10):5227.
- [8] Prikhodko VA, Bezborodkina NN, Okovityi SV. Pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease: emerging targets and drug candidates [J]. *Biomedicines*, 2022, **10**(2):274.
- [9] Dufour JF, Caussy C, Loomba R. Combination therapy for non-alcoholic steatohepatitis: rationale, opportunities and challenges [J]. *Gut*, 2020, **69**(10):1877-1884.
- [10] Böttger R, Pauli G, Chao PH, et al. Lipid-based nanoparticle technologies for liver targeting [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154/155**:79-101.
- [11] Peng W, Cheng SM, Bao ZH, et al. Advances in the research of nanodrug delivery system for targeted treatment of liver fibrosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, **137**:111342.
- [12] Tacke F. Cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, **27**(3):301-311.
- [13] Radun R, Trauner M. Role of FXR in bile acid and metabolic homeostasis in NASH: pathogenetic concepts and therapeutic opportunities [J]. *Semin Liver Dis*, 2021, **41**(4):461-475.
- [14] Kumar V, Xin XF, Ma JY, et al. Therapeutic targets, novel drugs, and delivery systems for diabetes associated NAFLD and liver fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, **176**:113888.
- [15] Ratiu V, Sanyal A, Harrison SA, et al. Cenicriviroc treatment for adults with nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis: final analysis of the phase 2b CENTAUR study [J]. *Hepatology*, 2020, **72**(3):892-905.
- [16] Pedrosa M, Seyedkazemi S, Francque S, et al. A randomized, double-blind, multicenter, phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of a combination of tropifexor and cenicriviroc in patients with nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: study design of the TANDEM trial [J]. *Contemp Clin Trials*, 2020, **88**:105889.
- [17] Griggs LA, Hassan NT, Malik RS, et al. Fibronectin fibrils regulate TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Matrix Biol*, 2017, **60/61**:157-175.
- [18] Kumar V, Dong YX, Kumar V, et al. The use of micelles to deliver potential hedgehog pathway inhibitor for the treatment of liver fibrosis [J]. *Theranostics*, 2019, **9**(25):7537-7555.
- [19] Kumar V, Mundra V, Mahato RI. Nanomedicines of hedgehog inhibitor and PPAR- $\gamma$  agonist for treating liver fibrosis [J]. *Pharm Res*, 2014, **31**(5):1158-1169.

- [20] Romualdo GR, da Silva TC, de Albuquerque Landi MF, et al. Sorafenib reduces steatosis-induced fibrogenesis in a human 3D co-culture model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Environ Toxicol*, 2021, **36**(2):168-176.
- [21] Ma R, Chen J, Liang YL, et al. Sorafenib: a potential therapeutic drug for hepatic fibrosis and its outcomes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, **88**:459-468.
- [22] Chen Y, Liu YC, Sung YC, et al. Overcoming sorafenib evasion in hepatocellular carcinoma using CXCR4-targeted nanoparticles to co-deliver MEK-inhibitors [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**:44123.
- [23] Sung YC, Liu YC, Chao PH, et al. Combined delivery of sorafenib and a MEK inhibitor using CXCR4-targeted nanoparticles reduces hepatic fibrosis and prevents tumor development [J]. *Theranostics*, 2018, **8**(4):894-905.
- [24] Shafie F, Nabavizadeh F, Shafie Ardestani M, et al. Sorafenib-loaded PAMAM dendrimer attenuates liver fibrosis and its complications in bile-duct-ligated rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, **97**(8):691-698.
- [25] Keating GM. Sorafenib: a review in hepatocellular carcinoma [J]. *Target Oncol*, 2017, **12**(2):243-253.
- [26] Qin LF, Qin JM, Zhen XM, et al. Curcumin protects against hepatic stellate cells activation and migration by inhibiting the CXCL12/CXCR4 biological axis in liver fibrosis: a study *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **101**:599-607.
- [27] Lung YM, Man FY, Christian S, et al. ARO-HSD, an investigational RNAi therapeutic, demonstrates reduction in ALT and hepatic HSD17B13 mRNA and protein in patients with NASH or suspected NASH [R]. AASLD, 2021. [https://www.natap.org/2021/AASLD/AASLD\\_99.htm](https://www.natap.org/2021/AASLD/AASLD_99.htm).
- [28] Cui H, Zhu XY, Li SY, et al. Liver-targeted delivery of oligonucleotides with *N*-acetylgalactosamine conjugation [J]. *ACS Omega*, 2021, **6**(25):16259-16265.
- [29] Ji D, Wang QH, Zhao Q, et al. Co-delivery of miR-29b and germacrone based on cyclic RGD-modified nanoparticles for liver fibrosis therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, **18**(1):86.
- [30] Yu FJ, Chen BC, Dong PH, et al. HOTAIR epigenetically modulates PTEN expression via microRNA-29b: a novel mechanism in regulation of liver fibrosis [J]. *Mol Ther*, 2017, **25**(1):205-217.
- [31] Zeng CX, Wang YL, Xie C, et al. Identification of a novel TGF- $\beta$ -miR-122-fibronectin 1/serum response factor signaling cascade and its implication in hepatic fibrogenesis [J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(14):12224-12233.
- [32] Li J, Ghazwani M, Zhang YF, et al. miR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression [J]. *J Hepatol*, 2013, **58**(3):522-528.
- [33] Wu J, Huang JS, Kuang SC, et al. Synergistic microRNA therapy in liver fibrotic rat using MRI-visible nanocarrier targeting hepatic stellate cells [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, **6**(5):1801809.
- [34] Zhao Z, Li YK, Jain A, et al. Development of a peptide-modified siRNA nano complex for hepatic stellate cells [J]. *Nanomedicine*, 2018, **14**(1):51-61.
- [35] Qiao JB, Fan QQ, Zhang CL, et al. Hyperbranched lipid-based lipid nanoparticles for bidirectional regulation of collagen accumulation in liver fibrosis [J]. *J Control Release*, 2020, **321**:629-640.
- [36] Boakye CHA, Patel K, Doddapaneni R, et al. Novel amphiphilic lipid augments the co-delivery of erlotinib and IL36 siRNA into the skin for psoriasis treatment [J]. *J Control Release*, 2017, **246**:120-132.
- [37] Gong CN, Hu CL, Gu FF, et al. Co-delivery of autophagy inhibitor ATG7 siRNA and docetaxel for breast cancer treatment [J]. *J Control Release*, 2017, **266**:272-286.
- [38] Zhang BF, Xing L, Cui PF, et al. Mitochondria apoptosis pathway synergistically activated by hierarchical targeted nanoparticles co-delivering siRNA and lonidamine [J]. *Biomaterials*, 2015, **61**:178-189.
- [39] Shrestha B, Wang LJ, Brey EM, et al. Smart nanoparticles for chemo-based combinational therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(6):853.
- [40] Salvoza N, Giraudi PJ, Tiribelli C, et al. Natural compounds for counteracting nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): advantages and limitations of the suggested candidates [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(5):2764.
- [41] Jia JD, Bauer M, Cho JJ, et al. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen  $\alpha$ 1(I) and TIMP-1 [J]. *J Hepatol*, 2001, **35**(3):392-398.
- [42] Song IS, Nam SJ, Jeon JH, et al. Enhanced bioavailability and efficacy of silymarin solid dispersion in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(5):628.
- [43] Qiao JB, Fan QQ, Xing L, et al. Vitamin A-decorated biocompatible micelles for chemogene therapy of liver fibrosis [J]. *J Control Release*, 2018, **283**:113-125.
- [44] Jung Y, Brown KD, Witek RP, et al. Accumulation of hedgehog-responsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans [J]. *Gastroenterology*, 2008, **134**(5):1532-1543.
- [45] 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.
- [46] Han J, He YP, Zhao H, et al. Hypoxia inducible factor-1 promotes liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease by activating PTEN/p65 signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, **120**(9):14735-14744.
- [47] Hong F, Tuyama A, Lee TF, et al. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1alpha-mediated stellate cell activation [J]. *Hepatology*, 2009, **49**(6):2055-2067.
- [48] Liu CH, Chan KM, Chiang T, et al. Dual-functional nanoparticles targeting CXCR4 and delivering antiangiogenic siRNA ameliorate liver fibrosis [J]. *Mol Pharm*, 2016, **13**(7):2253-2262.