

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.09.1098

• 专题报道 •

腺相关病毒介导的肝细胞核因子 1 α 过表达改善四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化

姚荔嘉, 邓 星, 丁晨虹, 冯仁鑫, 谢渭芬*

第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003

【摘要】 目的 探讨特异性上调肝细胞中肝细胞核因子 1 α (HNF1 α)表达对四氯化碳(CCl₄)诱导的小鼠肝纤维化的影响。**方法** 取 18 只 C57/B6 小鼠随机分为正常组、AAV8-TBG-Ctrl 组和 AAV8-TBG-HNF1 α 组, 每组 6 只。应用 CCl₄ 诱导制备小鼠肝纤维化模型, 造模后 AAV8-TBG-HNF1 α 组小鼠通过尾静脉注射带有甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子驱动表达 HNF1 α 的腺相关病毒 AAV8-TBG-HNF1 α 特异性上调肝细胞中 HNF1 α 的表达, AAV8-TBG-Ctrl 组小鼠注射对照病毒 AAV8-TBG。采用免疫组织化学法及 qPCR 检测各组小鼠 HNF1 α 的表达, 苏木素-伊红(H-E)染色、天狼猩红染色检测肝组织的病理改变及胶原沉积, 免疫组化法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达, 并对 I 型胶原(COL1A1)及 α -SMA 的表达进行软件定量分析; qPCR 法检测小鼠肝组织中纤维化相关基因(α -SMA 和 COL1A1)、上皮指标(*E-cadherin* 和 *Plakoglobin*)及间质指标(*Vimentin*, *Slug* 和 *Twist1*)的 mRNA 水平; 免疫组化法及 TUNEL 法检测上调 HNF1 α 对纤维化肝脏中细胞增殖、凋亡的影响。**结果** 与正常组小鼠相比, CCl₄ 造模可促进小鼠肝脏胶原沉积及 α -SMA 的表达, 且在肝纤维化发生过程中 HNF1 α 的表达下降($P < 0.01$); 与 AAV8-TBG-Ctrl 组相比, 应用 AAV8-TBG-HNF1 α 特异性上调肝细胞 HNF1 α 的表达可抑制纤维化肝脏中的 COL1A1 及 α -SMA 的水平($P < 0.01$)。上调肝细胞 HNF1 α 表达对纤维化肝脏中 *E-cadherin*、*Vimentin* 等上皮间质转换指标的表达无明显影响($P > 0.05$), 也不影响肝细胞的增殖与凋亡($P > 0.05$)。**结论** 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达可显著改善 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化。

【关键词】 肝细胞核因子 1 α ; 肝细胞; 肝纤维化; 胶原 I 型**【中图分类号】** R 575.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 0258-879X(2017)09-1098-08

Overexpression of hepatocyte nuclear factor 1 α mediated by adeno-associated virus attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice

YAO Li-jia, DENG Xing, DING Chen-hong, FENG Ren-xin, XIE Wei-fen*

Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】 To explore the influence of the hepatocyte-specific up-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α) on mouse hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄). **Methods** Eighteen C57/B6 male mice were randomly divided into normal group, AAV8-TBG-Ctrl group and AAV8-TBG-HNF1 α group, with 6 mice in each group. Mice in the AAV8-TBG-Ctrl and AAV8-TBG-HNF1 α groups were intraperitoneally injected with CCl₄ to establish the hepatic fibrosis mouse model, and then the mice in the AAV8-TBG-HNF1 α group were injected with AAV8-TBG-HNF1 α carrying HNF1 α gene under the control of the thyroid-binding globulin (TBG) promoter to specifically up-regulate expression of HNF1 α in hepatocytes, while the mice in the AAV8-TBG-Ctrl group were injected with control vector AAV8-TBG. The expression of HNF1 α was determined by immunohistochemistry and qPCR. The pathological changes and collagen deposition of liver tissues were detected by hematoxylin-eosin (H-E) staining and sirius red staining, respectively. Immunohistochemistry method was used to detect α -smooth muscle actin (α -SMA), and the expression of fibrosis related genes (type I collagen α 1 chain [COL1A1], α -SMA), epithelial related genes (*E-cadherin*, *Plakoglobin*) and mesenchymal related genes (*Vimentin*, *Slug* and *Twist1*) in liver tissues were analyzed by qPCR. The

【收稿日期】 2017-05-04 **【接受日期】** 2017-06-29**【基金项目】** 国家自然科学基金重点项目(81230011)。Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (81230011)。**【作者简介】** 姚荔嘉, 硕士生。E-mail: 18701745163@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875341, E-mail: weifensie@medmail.com.cn

cell proliferation and apoptosis in fibrotic livers were detected by immunohistochemistry and TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) method, respectively. **Results** Compared with the normal mice, CCl₄ promoted collagen deposition and the expression of α -SMA in livers, and the expression of HNF1 α was significantly decreased ($P < 0.01$) in the process of hepatic fibrosis. Compared with the AAV8-TBG-Ctrl group, the expression of COL1A1 and α -SMA in the fibrotic livers in the AAV8-TBG-HNF1 α group was significantly decreased ($P < 0.01$). There was no significant difference in the expression of *E-cadherin*, *Vimentin* or other Epithelial-mesenchymal transition related genes, or in the cell proliferation and apoptosis between the AAV8-TBG-Ctrl and AAV8-TBG-HNF1 α groups ($P > 0.05$).

Conclusion Hepatocyte-specific up-regulation of HNF1 α significantly improves CCl₄-induced liver fibrosis in mice.

[Key words] hepatocyte nuclear factor 1 α ; hepatocytes; liver fibrosis; collagen type I

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(9): 1098-1105]

肝细胞核因子 (hepatocyte nuclear factors, HNFs) 是一组在肝细胞中优势表达的转录因子, 其相互作用并构成强大的转录因子网络系统, 在促进肝细胞分化和功能维持方面发挥重要作用^[1-2]。HNF1 α 是 HNFs 家族的主要成员之一, 在分化成熟的肝细胞中高表达, 并在肝脏早期发育中起关键作用^[3]。研究表明 HNF1 α 可结合至少 222 个肝脏靶基因顺式作用元件, 其转录调控的靶基因参与肝酶合成及代谢反应的不同阶段, 维持肝细胞的正常功能^[4]。

本课题组前期研究发现, HNF1 α 在肝纤维化患者和大鼠肝组织中表达均下降, 在二甲基亚硝胺 (DMN) 或胆管结扎 (BDL) 构建的大鼠肝纤维化模型中, 利用腺病毒 AdHNF1 α 上调肝脏 HNF1 α 的表达可缓解大鼠的肝纤维化进展^[5]。由于腺病毒可介导肝脏中多种细胞过表达 HNF1 α , 而内源性的 HNF1 α 仅在肝细胞中表达, 因此, HNF1 α 是否可通过特异性地改善肝细胞功能抑制肝纤维化仍有待进一步明确。甲状腺素结合球蛋白 (thyroxine-binding globulin, TBG) 为成熟肝细胞特异表达蛋白, 已有研究表明, 携带 TBG 启动子和内含子的腺相关病毒 (AAV8-TBG) 可驱动下游基因在成熟肝细胞中特异表达^[6]。本研究在四氯化碳 (CCl₄) 诱导的小鼠肝纤维化模型中, 利用 AAV8-TBG-HNF1 α 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达, 观察肝细胞中 HNF1 α 的表达对小鼠肝纤维化的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 随机选取 18 只同系雄性清洁级 C57/B6 小鼠, 8 周龄, 体质量 16~18 g, 委托第二军医大学实验动物中心培育 [许可证号: SYXK (沪)

2012-0003]。

1.2 病毒与试剂 通过携带 TBG 启动子的腺相关病毒载体 pENN-AAV-TBG-PI-RBG (Penn Vector Core, p1015-R) 构建可特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达的腺相关病毒 AAV8-TBG-HNF1 α , 病毒的包装及纯化均由深圳百恩维生物科技有限公司完成。CCl₄ 购自国药集团化学试剂有限公司 (纯度 $\geq 99.5\%$, 进口分装), 天狼猩红试剂购自 Sigma 公司。TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; 反转录酶链反应试剂盒和 SYBR[®] Green PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司, PCR 引物由华大基因公司合成。HNF1 α 兔多克隆抗体购自 Abcam 公司, α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 小鼠单克隆抗体购自 Boster 公司, TUNEL 试剂盒购自碧云天生物技术公司。

1.3 小鼠肝纤维化模型的构建及给药 将 18 只小鼠随机分为正常组、对照病毒造模组 (AAV8-TBG-Ctrl 组)、治疗病毒造模组 (AAV8-TBG-HNF1 α 组), 每组 6 只。对照组及治疗组小鼠腹腔注射 33.3% CCl₄ (按植物油: CCl₄ = 2:1 配制) 建立小鼠肝纤维化模型, 注射剂量为 1 μ L/g, 每周注射 2 次, 连续 5 周。在首次 CCl₄ 处理 1 周后, 两组小鼠分别通过尾静脉注射腺相关病毒 AAV8-TBG 或 AAV8-TBG-HNF1 α , 剂量为 2×10^{11} Vg/只 (Vg 表示 AAV 病毒滴度), 待造模结束后, 麻醉处死小鼠 (图 1)。取每只小鼠同部位完整肝叶组织, 充分浸泡于 10% 中性甲醛中固定、石蜡包埋, 用于后续天狼猩红染色、苏木精-伊红 (H-E) 染色、免疫组化及 TUNEL 实验; 其余肝脏部分快速剪碎, 存储于标记好的 1.5 mL 离心管中并置于液氮速冻, 后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中长期保存, 用于提取组织 RNA。

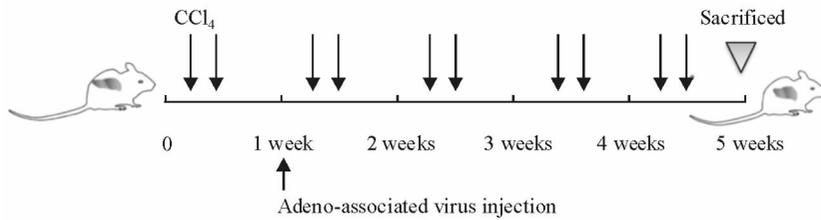


图1 实验性小鼠肝纤维化模型造模过程示意图

Fig 1 Schematic representation of induction of experimental hepatic fibrosis in mice

1.4 免疫组织化学法检测肝组织中 HNF1 α 、 α -SMA和 Ki-67 的表达 取石蜡包埋的肝组织进行连续切片,厚度为 4 μ m,并附着于载破片上,通过链霉亲和素-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP) 连结法进行免疫组化染色,在光学显微镜(Axiovert 40 CFL, ZEISS)下观察 HNF1 α 、 α -SMA 和 Ki-67 表达。

1.5 肝脏的组织学检查 取石蜡包埋的肝组织用切片机切为 3 μ m 厚的组织片,并附着于载玻片上,分别使用 H-E 染色法和天狼猩红染色法对组织切片进行染色,在光学显微镜(Axiovert 40 CFL, ZEISS)下观察肝脏的组织形态和肝组织的胶原沉积情况。

1.6 qPCR 法检测肝组织中纤维化相关基因、上皮指标及间质指标的变化 将肝组织研成粉末,用 TRIzol 试剂提取各组小鼠肝组织中的 RNA,使用紫外分光光度计(NANODROP2000, Thermo Scientific)检测 RNA 的纯度和浓度,应用反转录酶链反应试剂盒合成 cDNA,反应条件:37 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 30 s; 4 $^{\circ}$ C, ∞ 。cDNA 产物于 -20 $^{\circ}$ C 中保存。随后应用 SYBR[®] Green PCR 试剂盒检测 HNF1 α 及肝纤维相关基因、上皮指标及间质指标的表达,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 10 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 连续扩增 40 个循环后检测熔解曲线。以 β actin 为内参,比较目的基因和 β actin 的 Ct 值。各基因的引物序列见表 1。

表 1 qPCR 检测基因的引物序列

Tab 1 Primers for qPCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
HNF1 α (human)	GAG CAA AGA GGC ACT GAT CC	CTC CAG CTC TTT GAG GAT GG
COL1A1(mouse)	TAA AGG GTC ATC GTG GCT TC	GAC GGC TGA GTA GGG AAC AC
α -SMA(mouse)	CTG TCC CTC TAT GCC TCT GG	AGG GCT GTG ATC TCC TTC TG
E-cadherin(mouse)	GAT CCT GAG CTG CCT CAC AA	CAG CCT GAA CCA CCA GAG TG
Plakoglobin(mouse)	GGC ATC ATG GAT GAG GAT GA	GCC GTT GTG GAC ATC TGG TA
Vimentin(mouse)	GCA CTA GCC GCA GCC TCT AT	GCG AGA AGT CCA CCG AGT CT
Slug(mouse)	GCG AAC TGG ACA CAC ACA CA	GCC GAC GAT GTC CAT ACA GT
Twist1(mouse)	GGC CAG GTA CAT CGA CTT CC	CCA TCC TCC AGA CGG AGA AG
β Actin(human, mouse)	TGT CAC CAA CTG GGA CGA TA	GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG

HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1 α ; COL1A1: Type I collagen α 1 chain; α -SMA: α -Smooth muscle actin

1.7 TUNEL 法检测肝组织的细胞凋亡情况 配制 20 μ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K,对肝组织切片进行抗原修复,37 $^{\circ}$ C 孵箱中作用 20 min;滴加现配的 TUNEL 检测液,保持切片的湿润,37 $^{\circ}$ C 孵箱中避光孵育 60 min,用含有 DAPI 的抗荧光淬灭封片液进行封片,共聚焦荧光显微镜(SP5, Leica)观察标本的 TUNEL 阳性细胞数,判断细胞的凋亡程度。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用非配对 t 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 病毒 AAV8-TBG-HNF1 α 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达 免疫组化结果(图 2A)显示,与正常

组小鼠相比, 经 CCl₄ 造模后小鼠肝脏肝细胞中 HNF1 α 的表达下调, 而注射 AAV8-TBG-HNF1 α 可上调小鼠肝脏肝细胞中 HNF1 α 的表达。进一步放大免疫组化染色图片(图 2B)可见, AAV8-TBG-HNF1 α 组小鼠肝细胞胞核中 HNF1 α 染色加深, 而肝星形细胞 (hepatic stellate cells, HSCs)、胆管细

胞、内皮细胞和 Kupffer 细胞等非实质细胞的细胞核染色未见明显变化。qPCR 结果(图 2C)显示, AAV8-TBG-HNF1 α 组小鼠肝脏 HNF1 α mRNA 的表达水平相比 AAV8-TBG-Ctrl 组升高 ($P < 0.01$), 变化趋势与免疫组化结果相符。

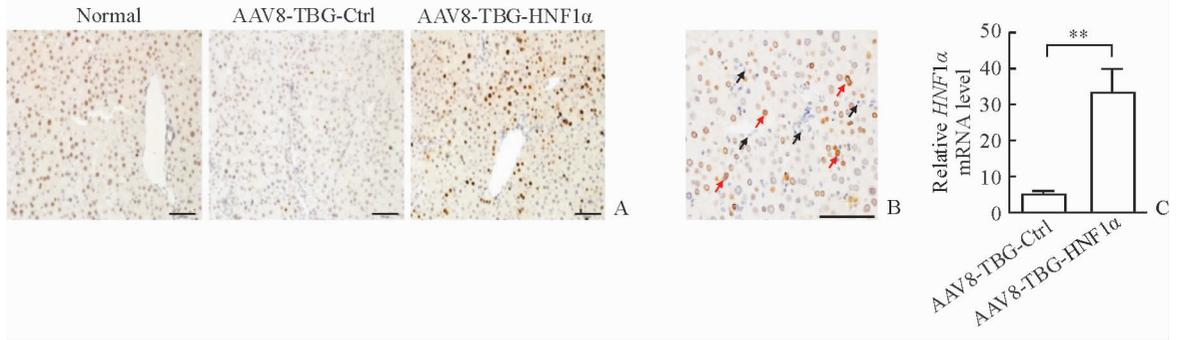


图 2 AAV8-TBG-HNF1 α 特异性上调小鼠肝细胞 HNF1 α 表达

Fig 2 Hepatocyte-specific up-regulation of HNF1 α in mice mediated by AAV8-TBG-HNF1 α

A; Immunohistochemical staining of HNF1 α in normal livers and fibrotic livers treated with AAV8-TBG/AAV8-TBG-HNF1 α ; B; Immunohistochemistry for fibrotic mice after AAV8-TBG-HNF1 α injection, more HNF1 α was located in hepatocytes (red arrow) but not in non-parenchymal cells (black arrow); C; Expression of HNF1 α mRNA in livers analyzed by qPCR. AAV: Adeno-associated virus; TBG: Thyroid-binding globulin; Ctrl: Control; HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1 α . Scale bars=100 μ m (A, B). ** $P < 0.01$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.2 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达对小鼠肝纤维化的治疗作用 H-E 及天狼猩红染色结果(图 3A)显示, 与正常组小鼠相比, CCl₄ 造模后小鼠肝组织结构紊乱, 汇管区周围结缔组织增生明显, 组织中可见大量炎性细胞浸润, 且红色胶原纤维明显增粗变长。与 AAV8-TBG-Ctrl 组相比, AAV8-TBG-

HNF1 α 组小鼠结缔组织条索减少, 炎性细胞浸润减轻, 同时肝脏中胶原沉积降低; 胶原定量分析结果显示两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3B)。与 AAV8-TBG-Ctrl 组相比, AAV8-TBG-HNF1 α 组小鼠纤维化肝脏中 COL1A1 mRNA 的表达水平降低 ($P < 0.01$, 图 3C), 其变化与免疫组化结果一致。

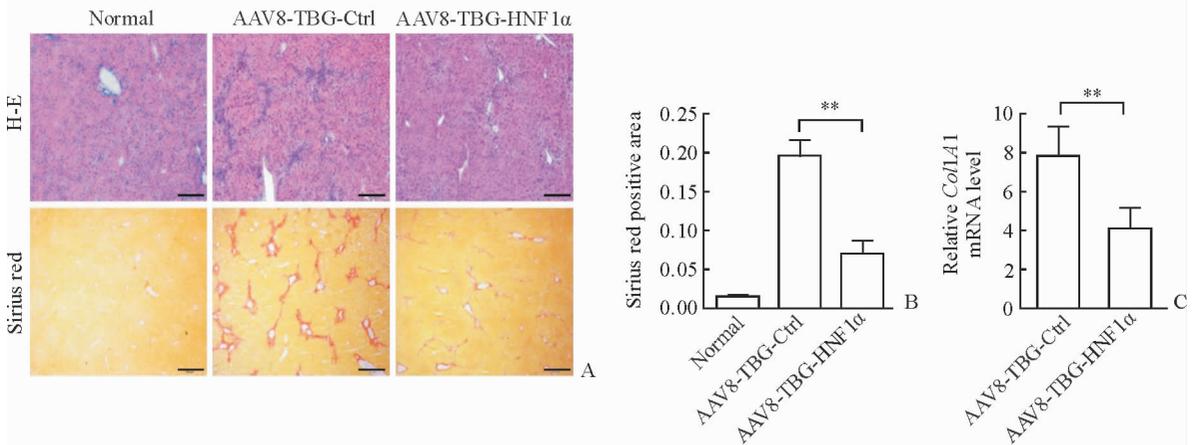
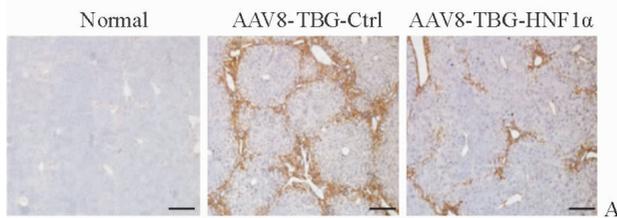


图 3 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达改善小鼠肝纤维化

Fig 3 Hepatocyte-specific up-regulation of HNF1 α improves liver fibrosis in mice

A; Liver morphology in mice in the normal, AAV8-TBG-Ctrl and AAV8-TBG-HNF1 α groups was determined by H-E and sirius red staining; B; Semi-quantitative analysis of sirius red; C; Relative expression of COL1A1 mRNA in mice livers analyzed by qPCR. AAV: Adeno-associated virus; TBG: Thyroid-binding globulin; Ctrl: Control; HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1 α ; COL1A1: Type I collagen α 1 chain. Scale bars=100 μ m (A). ** $P < 0.01$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.3 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达对 HSCs 活化的影响 免疫组化结果(图 4A)显示,CCl₄ 造模后小鼠肝组织中肝纤维化指标 α -SMA 的表达增高,而注射 AAV8-TBG-HNF1 α 特异性上调肝细胞 HNF1 α 的表达后,纤维化肝脏中的 α -SMA 的表达降低,与 AAV8-TBG-Ctrl 组相比差异有统计学意义($P < 0.01$,图 4B)。此外,与 AAV8-TBG-Ctrl 组相比,AAV8-TBG-HNF1 α 组小鼠肝脏中 α -SMA mRNA 的表达水平也下降(图 4C),说明特异性上调肝细胞 HNF1 α 的表达可抑制 HSCs 的活化。



2.4 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达对纤维化肝脏中上皮间质转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 进程的影响 用 qPCR 检测上皮指标 (*E-cadherin* 和 *Plakoglobin*) 及间质指标 (*Vimentin*、*Slug* 和 *Twist1*) 等 EMT 指标的表达变化,结果(图 5)显示,AAV8-TBG-HNF1 α 组小鼠纤维化肝脏中 EMT 相关指标的表达与 AAV8-TBG-Ctrl 组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明 HNF1 α 在调控肝纤维化进程时并不影响纤维化肝脏的 EMT 进程。

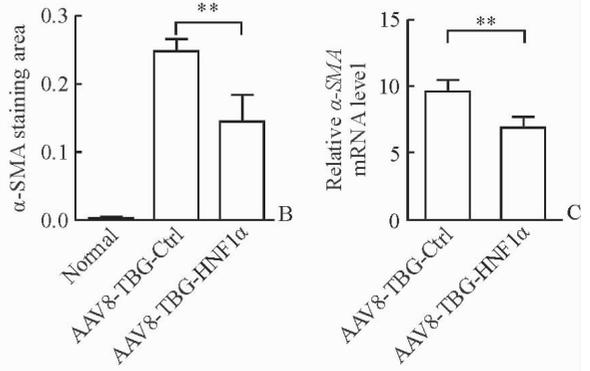


图 4 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达抑制 HSCs 活化

Fig 4 Hepatocyte-specific up-regulation of HNF1 α inhibits HSCs activation

A: Expression of α -SMA in paraffin-embedded hepatic tissues by immunohistochemistry; B: Quantitation of α -SMA staining; C: Relative expression of α -SMA mRNA in mouse livers by qPCR. AAV: Adeno-associated virus; TBG: Thyroid-binding globulin; Ctrl: Control; HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1 α ; HSCs: Hepatic stellate cells; α -SMA: α -Smooth muscle actin. Scale bars=100 μ m (A). ** $P < 0.01$. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

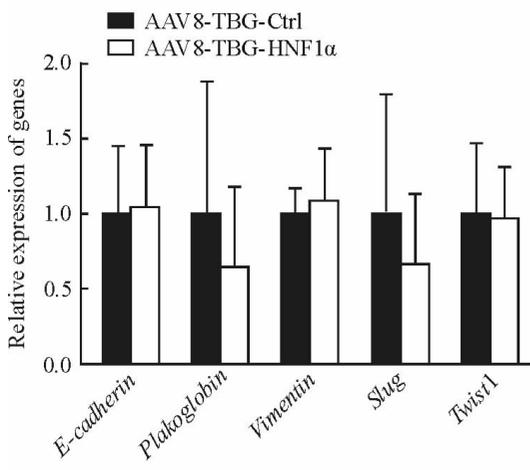


图 5 特异性上调 HNF1 α 对小鼠纤维化肝脏 EMT 进程的影响

Fig 5 Effect of hepatocyte-specific up-regulation of HNF1 α on EMT in fibrotic livers in mice

AAV: Adeno-associated virus; TBG: Thyroid-binding globulin; Ctrl: Control; HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1 α ; EMT: Epithelial-mesenchymal transition. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

2.5 特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达对肝脏细胞增殖、凋亡的影响 AAV8-TBG-HNF1 α 组小鼠纤维化肝脏中的 Ki-67 阳性细胞数(图 6A、6B)和细胞凋亡数(图 6C、6D)与 AAV8-TBG-Ctrl 组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明特异性上调肝细胞中 HNF1 α 的表达可能并非通过促进肝细胞增殖、减少肝细胞凋亡改善肝纤维化。

3 讨论

肝纤维化是肝脏针对不同慢性损伤的修复反应,其进一步发展可引起假小叶形成,导致肝硬化,部分患者可发展成肝癌^[7-8]。肝纤维化属于可逆性病变,尽早采取干预及治疗措施有望逆转,可为临床慢性肝病患者带来福音。既往研究认为,HSCs 的激活是肝纤维化发生的中心环节,肝损伤时产生的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)主要来源于活化的 HSCs,而 HSCs 激活可能是细胞与细胞、

ECM 与细胞相互作用的结果^[9-10]。近年来研究发现,肝细胞作为肝脏最主要的细胞,其细胞功能的完

整性对维持肝脏稳态及再生至关重要^[11],已逐渐成为急慢性肝病的研究热点。

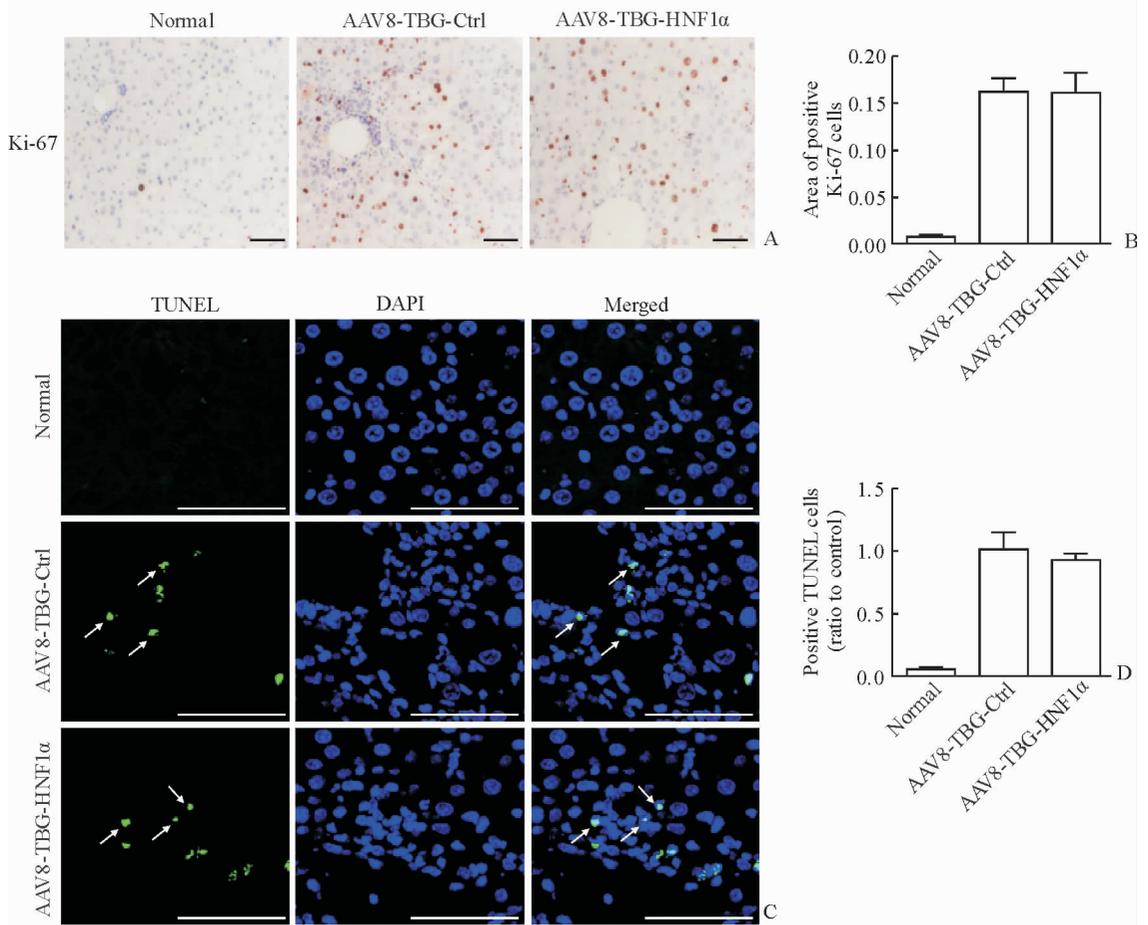


图 6 特异性上调 HNF1 α 对肝细胞增殖与凋亡的影响

Fig 6 Effect of hepatocyte-specific up-regulation of HNF1 α on liver cell proliferation and apoptosis

A: Expression of Ki-67 in paraffin-embedded liver sections analyzed by immunohistochemistry; B: Positive Ki-67 cells analyzed by semi-quantitative analysis; C: Liver tissues were co-stained with DAPI (blue) and TUNEL (green, arrows) and visualized under confocal microscopy; D: TUNEL-positive cells analyzed by semi-quantitative analysis. AAV: Adeno-associated virus; TBG: Thyroid-binding globulin; Ctrl: Control; HNF1 α : Hepatocyte nuclear factors 1 α ; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole. Scale bars=100 μ m (A, C). $n=6$, $\bar{x}\pm s$

既往研究发现,HNF4 α 可通过保护肝纤维化过程中的肝细胞功能和抑制活化的 HSCs 缓解肝纤维化进程,故提出了 HNFs 治疗肝纤维化的新策略^[12]。HNF1 α 是 HNFs 家族中的重要成员,在肝脏发育、肝细胞分化及维持肝细胞生物学功能方面发挥重要作用^[3-4,13]。本课题组前期研究发现,在 DMN 或 BDL 诱导的大鼠肝纤维化模型中,肝细胞和 HSCs 之间存在炎症因子介导的交互作用,下调肝脏 HNF1 α 可促进肝纤维化的发生和发展,而利用腺病毒 AdHNF1 α 上调肝脏 HNF1 α 的表达可抑制肝细胞炎症通路活化,维持肝细胞功能,并影响 HSCs 活化,进而改善肝纤维化,该结果证明了肝脏

中 HNF1 α 的抗纤维化效应,并提出维持肝细胞功能对改善大鼠肝纤维化的重要意义^[5]。近期,本课题组构建了 HNF1 α 肝细胞特异性基因敲除模式小鼠,发现肝细胞 HNF1 α 基因缺失可诱发肝细胞自发脂肪变,并引起肝纤维化,最终导致肝癌发生,进一步说明肝细胞 HNF1 α 表达与肝纤维化间的关系密切^[4-6]。鉴于内源性 HNF1 α 仅在肝细胞中表达,为明确 HNF1 α 是否可通过特异性改善肝细胞功能治疗肝纤维化,本研究以 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化模型为研究对象,探讨特异性上调肝细胞 HNF1 α 的表达对肝纤维化的治疗作用。

近年来,AAV 载体因其安全性好、可在体内长

时间表达及低免疫原性等特点,被越来越多地运用于基因治疗的基础研究及动物实验中^[14]。不同血清型的 AAV 对组织或细胞的嗜性不同,其中 AAV8 病毒具高嗜肝性,在肝脏疾病的基因治疗领域具有广泛的应用前景^[15]。TBG 为成熟肝细胞特异表达蛋白,有大量研究利用携带 TBG 启动子及内含子的腺相关病毒(AAV8-TBG)驱动下游基因在成熟肝细胞中特异表达^[6]。Yanger 等^[16]利用腺相关病毒 AAV8-TBG-Cre 制备肝细胞谱系追踪小鼠,明确了成熟肝细胞在肝脏再生中作用。本研究应用 AAV8-TBG-HNF1 α 特异性上调小鼠肝细胞中 HNF1 α 的表达,在小鼠肝纤维化模型中证实了特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达可显著抑制纤维化肝脏中的结缔组织增生及胶原沉积,降低肝纤维化程度,提示 AAV8-TBG-HNF1 α 用于肝纤维化治疗的可能性。本研究首次利用 AAV 介导 HNFs 在肝细胞中特异表达,并发现 HNF1 α 对肝纤维化具有治疗作用,为未来 HNFs 治疗肝纤维化提供了新的手段。

在 EMT 进程中,上皮细胞逐渐失去上皮形态特征继而获得间质细胞特性。大量研究表明,EMT 参与肝纤维化的形成,是肝纤维化发生过程中重要的致病机制^[17]。有文献报道,在转化生长因子 β (TGF- β) 诱导的肝细胞 EMT 进程中伴随着 HNFs 表达水平的降低,包括 HNF4 α 及 HNF1 α ^[18]。本课题组前期研究已证实 HNF4 α 可抑制肝细胞及 HSCs 的 EMT,从而缓解实验大鼠肝纤维化^[12]。而本实验结果显示,特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达对纤维化肝脏的 EMT 进程未见明显影响,说明肝细胞 HNF1 α 可能并非通过 EMT 影响肝纤维进程。

肝细胞为肝脏中最主要的组成细胞,在正常情况下很少分裂,但在肝脏过度损伤时可触发肝细胞增殖,以修复肝损伤^[19]。本研究结果显示,特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达对纤维化肝脏中的肝细胞增殖无明显影响。肝细胞增殖和肝细胞凋亡间相互对立,肝细胞凋亡是肝损伤以及肝纤维化发生、发展过程中的一个重要特征,是目前肝病的研究热点^[20]。特异性敲除肝细胞中 *Bcl-xL*、*Mcl-1* 或 *TAK1* 基因可诱发肝细胞凋亡,加重肝损伤,并通过细胞凋亡小体激活 HSCs,进而促进肝纤维化^[21-23]。本研究结果显示,特异性上调肝细胞 HNF1 α 表达对 HSCs 的活化具有明显的抑制作用,而 TUNEL

染色结果显示在 CCl₄ 诱导的纤维化肝脏中仅有少量细胞凋亡,而 HNF1 α 治疗组肝脏中的细胞凋亡未见明显改变,表明 HNF1 α 对 HSCs 的抑制作用并非通过减轻肝细胞凋亡实现。由此,本实验结果进一步证实了改善肝细胞功能对 HSCs 活化的影响。

综上,特异性上调肝细胞 HNF1 α 的表达可改善小鼠肝纤维化,为 HNFs 治疗肝纤维化提供了强有力的证据,并为未来临床抗肝纤维化治疗提供了新的思路。其更深入的分子生物学机制仍有待于今后进一步研究。

[参考文献]

- [1] NISHIKAWA T, BELL A, BROOKS J M, SETOYAMA K, MELIS M, HAN B, et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 1533-1544.
- [2] SCHREM H, KLEMPNAUER J, BORLAK J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression [J]. *Pharmacol Rev*, 2002, 54: 129-158.
- [3] PONTOGLIO M, BARRA J, HADCHOUEL M, DOYEN A, KRESS C, BACH J P, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome[J]. *Cell*, 1996, 84: 575-585.
- [4] ODOM D T, ZIZLSPERGER N, GORDON D B, BELL G W, RINALDI N J, MURRAY H L, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors[J]. *Science*, 2004, 303: 1378-1381.
- [5] QIAN H, DENG X, HUANG Z W, WEI J, DING C H, FENG R X, et al. An HNF1 α -regulated feedback circuit modulates hepatic fibrogenesis via the crosstalk between hepatocytes and hepatic stellate cells[J]. *Cell Res*, 2015, 25: 930-945.
- [6] BELL P, GAO G, HASKINS M E, WANG L, SLEEPER M, WANG H, et al. Evaluation of adeno-associated viral vectors for liver-directed gene transfer in dogs[J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22: 985-997.
- [7] LEE U E, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25: 195-206.

- [8] BATALLER R, BRENNER D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115: 209-218.
- [9] HELLERBRAND C. Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver[J]. Pflugers Arch, 2013, 465: 775-778.
- [10] BANSAL M B. Hepatic stellate cells: fibrogenic, regenerative or both Heterogeneity and context are key [J]. Hepatol Int, 2016, 10: 902-908.
- [11] MALATO Y, NAQVI S, SCHÜRMMANN N, NG R, WANG B, ZAPE J, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration[J]. J Clin Invest, 2011, 121: 4850-4860.
- [12] YUE H Y, YIN C, HOU J L, ZENG X, CHEN Y X, ZHONG W, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α attenuates hepatic fibrosis in rats[J]. Gut, 2010, 59: 236-246.
- [13] NI Q, DING K, WANG K Q, HE J, YIN C, SHI J, et al. Deletion of HNF1 α in hepatocytes results in fatty liver-related hepatocellular carcinoma in mice [J]. FEBS Lett, 2017, 591: 1947-1957.
- [14] MAK K Y, RAJAPAKSHA I G, ANGUS P W, HERATH C B. The Adeno-associated virus-a safe and effective vehicle for liver-specific gene therapy of inherited and non-inherited diseases [J]. Curr Gene Ther, 2017, 17: 4-16.
- [15] SEN D, GADKARI R A, SUDHA G, GABRIEL N, KUMAR Y S, SELOT R, et al. Targeted modifications in adeno-associated virus serotype 8 capsid improves its hepatic gene transfer efficiency *in vivo*[J]. Hum Gene Ther Methods, 2013, 24: 104-116.
- [16] YANGER K, KNIGIN D, ZONG Y, MAGGS L, GU G, AKIYAMA H, et al. Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation[J]. Cell Stem Cell, 2014, 15: 340-349.
- [17] IKEGAMI T, ZHANG Y, MATSUZAKI Y. Liver fibrosis: possible involvement of EMT [J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185: 213-221.
- [18] TU X, ZHANG Y, ZHENG X, DENG J, LI H, KANG Z, et al. TGF- β -induced hepatocyte lincRNA-p21 contributes to liver fibrosis in mice[J]. Sci Rep, 2017, 7: 2957.
- [19] FAUSTO N. Liver regeneration[J]. J Hepatol, 2000, 32 (1 Suppl): 19-31.
- [20] HIGUCHI H, GORES G J. Mechanisms of liver injury: an overview[J]. Curr Mol Med, 2003, 3: 483-490.
- [21] TAKEHARA T, TATSUMI T, SUZUKI T, RUCKER E B 3rd, HENNIGHAUSEN L, JINUSHI M, et al. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses[J]. Gastroenterology, 2004, 127: 1189-1197.
- [22] VICK B, WEBER A, URBANIK T, MAASS T, TEUFEL A, KRAMMER P H, et al. Knockout of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes [J]. Hepatology, 2009, 49: 627-636.
- [23] INOKUCHI S, AOYAMA T, MIURA K, OSTERREICHER C H, KODAMA Y, MIYAI K, et al. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 844-849.

[本文编辑] 曾奇峰