

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.12.1459

## 乙酰肝素酶调控大鼠肝再生机制探讨

张友磊<sup>1△</sup>, 韩秋成<sup>2△</sup>, 卢文峰<sup>1</sup>, 付 雍<sup>1</sup>, 朱 楠<sup>1</sup>, 杨 宁<sup>1</sup>, 杨广顺<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外五科, 上海 200438

2. 上海交通大学医学院仁济医院南院肿瘤介入科, 上海 201112

**[摘要]** **目的** 探讨乙酰肝素酶(HPSE)调控大鼠肝再生的机制。**方法** 设计合成 HPSE 小干扰 RNA(siRNA), 以 *in vivo*-jetPEI-Gal 为载体转染 70% 肝切除大鼠, 转染后免疫组化检测大鼠肝组织肝细胞生长因子(HGF)和血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的表达, 蛋白质印迹法检测肝组织基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 蛋白的表达, Ⅷ因子免疫组化检测肝组织微血管密度(MVD)。**结果** 使用 siRNA 干扰 HPSE 后, 大鼠肝组织中 HGF、VEGF 蛋白的表达降低, MVD 降低, MMP-2 和 MMP-9 表达降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** HPSE 可通过释放激活细胞外基质(ECM)中的 HGF 促进肝细胞增殖, 增加 VEGF 的表达加速血管生成以及上调 MMP-2 和 MMP-9 的表达等途径调控大鼠肝再生。

**[关键词]** 乙酰肝素酶; 小分子干扰 RNA; 肝切除术; 肝脏再生

**[中图分类号]** R 657.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2016)12-1459-05

### Role of heparanase in regulating rat liver regeneration

ZHANG You-lei<sup>1△</sup>, HAN Qiu-cheng<sup>2△</sup>, LU Wen-feng<sup>1</sup>, FU Yong<sup>1</sup>, ZHU Nan<sup>1</sup>, YANG Ning<sup>1</sup>, YANG Guang-shun<sup>1\*</sup>

1. Department of Hepatic Surgery V, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Tumor Intervention, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201112, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of heparanase (HPSE) in regulating the liver regeneration after major hepatectomy in rats. **Methods** The HPSE small interfering RNA (siRNA) was designed and synthesized, and was transfected into the rats after 70% hepatectomy by *in vivo*-jetPEI-Gal vector. Then immunohistochemistry was performed to determine the expression of hepatocyte growth factor (HGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Western blotting analysis was performed to detect the expression of matrix metalloprotein (MMP)-2 and MMP-9 protein expression. Immunostaining for Ⅷ factor was done to observe the microvessels, and the microvessel density (MVD) was calculated. **Results** Compared with control group, the expressions of HGF, VEGF, MMP-2 and MMP-9 were significantly inhibited in HPSE siRNA group, and the MVD was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** HPSE may regulate liver regeneration via promoting HGF release in ECM, inducing hepatocyte proliferation, increasing VEGF expression to accelerate angiogenesis and upregulating the expression of MMP-2 and MMP-9.

**[Key words]** heparanase; small interfering RNA; hepatectomy; liver regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(12): 1459-1463]

在外科实践中, 部分肝切除术 (partial hepatectomy, PHx) 后肝再生有利于恢复肝功能, 预防肝衰竭<sup>[1-2]</sup>。本课题组在前期实验中发现细胞外基质降解酶——乙酰肝素酶 (heparanase, HPSE) 对大鼠 PHx 后肝再生具有正向调控作用<sup>[3]</sup>, 但其机

制目前仍不清楚。为此, 本研究以 70% 肝切除大鼠为肝再生模型, 运用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制 HPSE 表达, 以探讨其调控肝再生的作用机制。

**[收稿日期]** 2016-07-17 **[接受日期]** 2016-09-01

**[基金项目]** 上海市自然科学基金 (10ZR1439700). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (10ZR1439700).

**[作者简介]** 张友磊, 博士, 副教授、副主任医师. E-mail: 13761318681@163.com; 韩秋成, 博士, 副教授、副主任医师. E-mail: 13512180411@163.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81887821, E-mail: yanggsh@163.com

### 1 材料和方法

1.1 大鼠肝再生模型制备 SPF级雄性SD大鼠,体质量250~300g,由第二军医大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016]。按照Higgins和Anderson<sup>[4]</sup>的方法行70%肝切除。

1.2 HPSE siRNA的制备和转染 实验用HPSE siRNA序列为:sense 5'-AGC UUC GUA CCU UGG CCA GTT-3',antisense 5'-CUG GCC AAG GUA CGA AGC UTT-3'(上海吉凯基因化学技术有限公司);转染试剂为*in vivo*-jetPEI-Gal(法国Polyplus公司)。试剂制备和转染方法同文献[3]。

1.3 实验分组 将实验大鼠分为5组:对照组(Control组,无手术操作)、假手术组(Sham组,仅开关腹)、70%肝切除组(PHx组,仅行70%肝切除)、空载体组(PHx+vector组,于70%肝切除后立即从尾静脉注射不含siRNA的*in vivo*-jetPEI-Gal溶液1mL/鼠)和siRNA干扰组(PHx+siRNA组,于70%肝切除后立即从尾静脉注射*in vivo*-jetPEI-Gal-siRNA复合物1mL/鼠)。每组6只大鼠。肝切除后24h处死所有大鼠,分别取肝组织进行相关检测。

1.4 免疫组化检测肝组织肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达 将各组大鼠肝组织标本制成石蜡切片,按照厂家操作说明以enVision法(试剂盒购于丹麦DAKO公司)检测HGF和VEGF蛋白的表达,HGF抗体和VEGF抗体购于美国Santa Cruz公司;二抗染色后,在光镜下连续观察10个高倍视野,分别计数阳性细胞数;然后计算每100个细胞中的

阳性细胞数;最后将各组数据以对照组为参照进行标准化,结果以各组与对照组的比值表示。

1.5 蛋白质印迹法检测肝组织基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein, MMP)-2和MMP-9蛋白的表达 检测按文献[3]方法进行,MMP-2抗体和MMP-9抗体购于美国Santa Cruz公司,最后以Fluor-S多功能成像系统及Quantity One软件(美国Bio-Rad公司)对发光条带进行扫描拍照和定量分析(以GAPDH为内参)。

1.6 肝组织微血管密度(microvessel density, MVD)检测 以Ⅷ因子免疫组化染色(方法同1.4项,一抗为Ⅷ因子抗体,购自美国Santa Cruz公司)标识肝组织微血管,然后进行计数:先用40倍光镜扫视整个切片,寻找高血管密度区域,然后在此区域内以200倍光镜随机取5个视野,计数每个视野中染成棕色的微血管数目,取其平均值。各组数据以对照组为参照进行标准化,结果以各组与对照组的比值表示。

1.7 统计学处理 采用SPSS 14.0软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,独立样本t检验用于两样本间均数的比较,单因素方差分析用于多个样本间均数的比较。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

### 2 结果

2.1 HPSE siRNA对大鼠肝组织中HGF蛋白表达的影响 免疫组化结果(图1)显示,PHx组和PHx+vector组大鼠肝组织中HGF蛋白表达较Control组和Sham组增高( $P < 0.05$ ),而PHx+siRNA组HGF蛋白的表达较其他组均降低( $P < 0.01$ ),提示HPSE对大鼠肝组织中HGF蛋白的表达有正向调控作用。

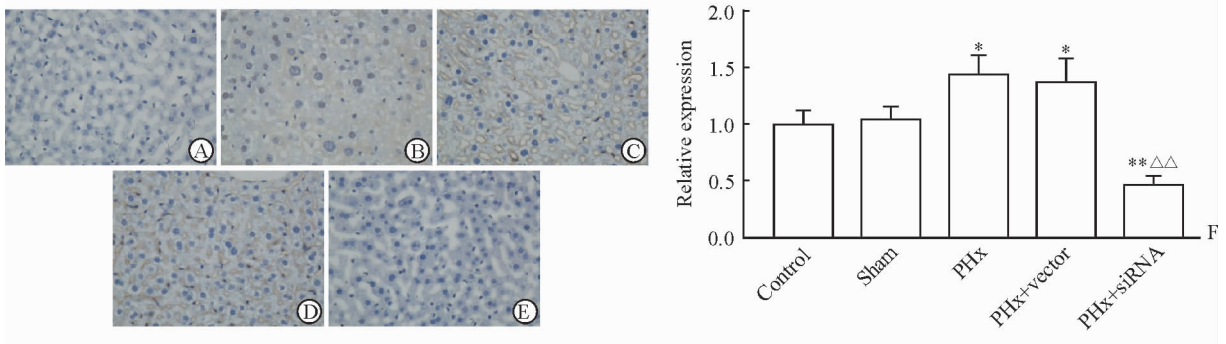


图1 各组大鼠肝组织中HGF蛋白的表达(免疫组化)

Fig 1 Expression of HGF in rat liver (immunohistochemistry)

A: Control group; B: Sham group; C: PHx group; D: PHx+vector group; E: PHx+siRNA group; F: Relative expression compared to control group. HGF: Hepatocyte growth factor; PHx: Partial hepatectomy; siRNA: Small interfering RNA. Original magnification:  $\times 400$  (A-E). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control and sham groups;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs PHx and PHx+vector groups.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 HPSE siRNA对大鼠肝组织中VEGF蛋白表

达的影响 免疫组化结果(图2)显示PHx组和

PHx+vector 组大鼠肝组织中 VEGF 蛋白的表达较 Control 组和 Sham 组增高 ( $P < 0.05$ ), 而 PHx+siRNA 组 VEGF 蛋白的表达较其他组均降低 ( $P <$

0.01), 提示 HPSE 对大鼠肝组织中 VEGF 蛋白的表达有正向调控作用。

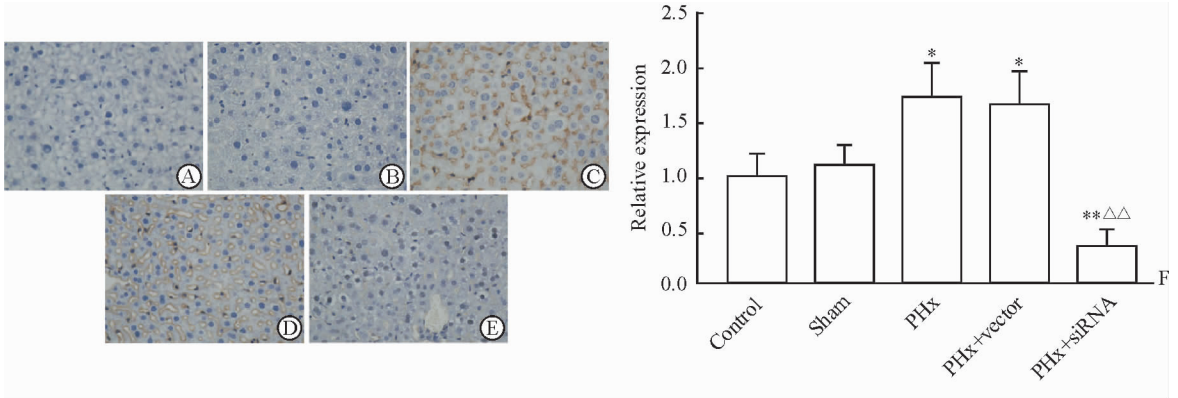


图 2 各组大鼠肝组织中 VEGF 蛋白的表达 (免疫组化)

Fig 2 Expression of VEGF in rat liver (immunohistochemistry)

A: Control group; B: Sham group; C: PHx group; D: PHx+vector group; E: PHx+siRNA group; F: Relative expression compared to control group. VEGF: Vascular endothelial growth factor; PHx: Partial hepatectomy; siRNA: Small interfering RNA. Original magnification:  $\times 400$  (A-E). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control and sham groups;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs PHx and PHx+vector groups.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 HPSE siRNA 对大鼠肝组织中 MVD 的影响 实验结果 (图 3) 显示 PHx 组和 PHx+vector 组大鼠肝组织中 MVD 较 Control 组和 Sham 组增高 ( $P < 0.05$ ), 而 PHx+siRNA 组的 MVD 较其他组均降低 ( $P < 0.01$ ), 提示 HPSE 对大鼠肝组织中的 MVD 有正向调控作用。

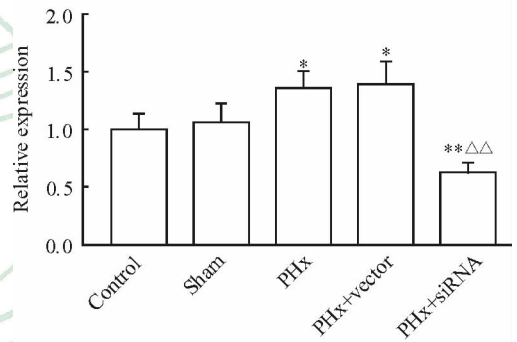


图 3 各组大鼠肝组织中的 MVD (免疫组化)

Fig 3 Expression of MVD in rat liver (immunohistochemistry)

MVD: Microvessel density; PHx: Partial hepatectomy; siRNA: Small interfering RNA. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control and sham groups;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs PHx and PHx+vector groups.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.4 HPSE siRNA 对大鼠肝组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响 PHx 组和 PHx+vector 组大鼠肝组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达较 Control 组和 Sham 组增高 ( $P < 0.01$ ), 而 PHx+siRNA 组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达较其他组均降低 ( $P < 0.01$ , 图 4), 提示 HPSE 对大鼠肝组织中 MMP-2 和 MMP-9 的表达有正向调控作用。

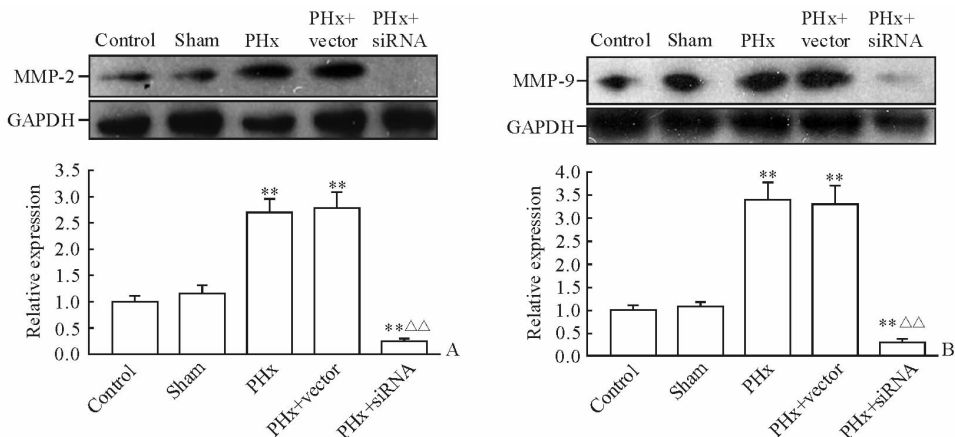


图 4 各组大鼠肝组织中 MMP-2 (A) 和 MMP-9 (B) 表达

Fig 4 Expression of MMP-2 (A) and MMP-9 (B) in rat liver

MMP: Matrix metalloprotein; PHx: Partial hepatectomy; siRNA: Small interfering RNA. \*\*  $P < 0.01$  vs control and sham groups;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs PHx and PHx+vector groups.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

研究表明肝脏再生与细胞外基质(ECM)密切相关,ECM降解重塑一方面能够为再生细胞提供排列骨架,另一方面能够促进肝细胞增殖<sup>[5]</sup>。HPSE是一种特异性糖苷内切酶,其降解底物是硫酸乙酰肝素,后者是ECM中的重要成分。HPSE能够通过参与ECM的降解和重塑、释放活化ECM中的各类生长因子、激活信号转导等多种机制在胚胎发育、组织修复等过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。Carmel等<sup>[7]</sup>研究证实HPSE能够促进肝再生过程中肝细胞和内皮细胞的增殖。

HGF已被证实是最强有力的促肝细胞分裂原,也是启动肝再生的关键因子<sup>[8-9]</sup>。本研究发现HPSE能够显著增加HGF活性蛋白的表达,提示HPSE可能通过HGF通路调控肝再生。Carmel等<sup>[7]</sup>报道HPSE不能增加肝切除后的HGF mRNA表达水平,提示HPSE主要在蛋白质水平调控HGF的表达。其可能机制为正常ECM中绑定有大量无活性的HGF前体蛋白,HPSE表达增加后,特异性水解ECM,将HGF前体蛋白释放,并对其进行剪切活化,使活性HGF蛋白大量增加<sup>[6]</sup>,从而在肝切除后启动肝细胞再生过程中发挥作用。

血管生成是肝再生的重要条件之一<sup>[10-11]</sup>,VEGF是强效促血管生长因子。本研究发现,HPSE能够明显促进大鼠残肝VEGF的表达和增高MVD,提示HPSE可能通过促进血管生成调控肝再生。HPSE可通过3条途径促进血管生成:途径1是与HPSE水解酶活性相关的经典途径,即HPSE通过水解ECM释放和活化其中储存的各种生长因子,如VEGF和碱性成纤维生长因子(bFGF)等,从而刺激血管内皮细胞增殖和迁移,促进血管生成<sup>[12-13]</sup>。途径2是HPSE通过激活蛋白激酶B(Akt)途径刺激内皮细胞迁移,促进血管生成<sup>[14]</sup>;另有研究发现HPSE能够通过激活p38磷酸化促进内皮细胞迁移和血管生成<sup>[15]</sup>。途径3是HPSE通过上调VEGF表达促进血管生成,研究发现无酶活性的HPSE能够上调VEGF mRNA和蛋白表达,其调控作用是通过激活Src家族成员的磷酸化实现的,给予Src磷酸化抑制剂可有效阻断这一通路<sup>[15-16]</sup>。途径2和途径3均是新近发现的不依

赖于HPSE水解酶活性的新的通路,也是目前研究的热点。

已有实验证实MMP-2和MMP-9在肝再生中发挥重要作用,其表达增加能够促进肝再生<sup>[17]</sup>。本研究发现HPSE表达减少能够下调MMP-2和MMP-9的表达,提示HPSE可能通过MMP-2和MMP-9通路调控肝再生。Purushothaman等<sup>[18]</sup>研究发现,HPSE能够通过丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶(mitogenactivated protein kinase/extracellular regulated protein kinase, MAPK/ERK)路径在mRNA水平调控MMP-2和MMP-9的表达,上调HPSE表达可促进ERK磷酸化,ERK磷酸化后MMP-2和MMP-9表达增加;而给予MAPK/ERK通路抑制剂阻断ERK磷酸化能够抑制MMP-2和MMP-9的表达;HPSE还能够促进尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂及其受体(urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor, uPA/uPAR)的表达,后者对MMP-2和MMP-9的基质降解功能有协同作用,可共同促进肝再生。

综上所述,HPSE可能通过以下机制调控肝再生:(1)释放激活ECM中的HGF等生长因子,促进肝细胞增殖;(2)促进血管生成;(3)上调MMP-2和MMP-9的表达,促进肝再生。当然,肝再生是一个非常复杂的生物过程,其调控机制仍有待进一步深入探讨。

### [参考文献]

- [1] YIN C, EVASON K J, ASAHINA K, STAINIER D Y. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer[J]. J Clin Invest, 2013, 123: 1902-1910.
- [2] DUNCAN A W, SOTO-GUTIERREZ A. Liver repopulation and regeneration: new approaches to old questions[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2013, 18: 197-202.
- [3] 张玉霞,崔淑芳,张友磊. 乙酰肝素酶 siRNA 对部分肝切除大鼠术后肝再生的抑制作用[J]. 肝胆外科杂志, 2014, 22: 311-313.
- [4] HIGGINS G M, ANDERSON R M. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal[J]. Arch

- Pathol, 1931, 12: 186-202.
- [5] KWON Y J, LEE K G, CHOI D. Clinical implications of advances in liver regeneration [J]. Clin Mol Hepatol, 2015, 21: 7-13.
- [6] MEIROVITZ A, GOLDBERG R, BINDER A, RUBINSTEIN A M, HERMANO E, ELKIN M. Heparanase enzyme in inflammation and inflammation-associated cancer[J]. FEBS J, 2013, 280: 2307-2319.
- [7] CARMEL J, ARISH A, SHOSHANY G, BARUCH Y. Heparanase accelerates the proliferation of both hepatocytes and endothelial cells early after partial hepatectomy[J]. Exp Mol Pathol, 2012, 92: 202-209.
- [8] MICHALOPOULOS G K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas[J]. Am J Pathol, 2010, 176: 2-13.
- [9] MICHALOPOULOS G K. Advances in liver regeneration[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 8: 897-907.
- [10] UDA Y, HIRANO T, SON G, IIMURO Y, UYAMA N, YAMANAKA J, et al. Angiogenesis is crucial for liver regeneration after partial hepatectomy [J]. Surgery, 2013, 153: 70-77.
- [11] CHEN J A, SHI M, LI J Q, QIAN C N. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration [J]. Hepatol Int, 2010, 4: 537-547.
- [12] ZHANG Y, WANG Y, FU Z, SHEN F. Heparanase, a key target for gene therapy against human malignancies [J]. ScientificWorldJournal, 2007, 7: 1965-1967.
- [13] VREYS V, DAVID G. Mammalian heparanase: what is the message? [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11: 427-452.
- [14] GINGIS-VELITSKI S, ZETSER A, FLUGELMAN M Y, VLODAVSKY I, ILAN N. Heparanase induces endothelial cell migration via protein kinase B/Akt activation[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 23536-23541.
- [15] ZETSER A, BASHENKO Y, EDOVITSKY E. Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation[J]. Cancer Res, 2006, 66: 1455-1463.
- [16] OHAYON O, MAWASI N, PEVZNER A, TRYVITZ A, GILDOR T, PINES M, et al. Halofuginone upregulates the expression of heparanase in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats[J]. Lab Invest, 2008, 88: 627-633.
- [17] KIM T H, MARS W M, STOLZ D B, MICHALOPOULOS G K. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration[J]. Hepatology, 2000, 31: 75-82.
- [18] PURUSHOTHAMAN A, CHEN L, YANG Y, SANDERSON R D. Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma[J]. J Biol Chem, 2008, 283: 32628-32636.

[本文编辑] 杨亚红