

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.06.0514

论著

## p67<sup>phox</sup>在肝纤维化中的作用及其机制

马立业,程欣欣,徐哲龙

(天津医科大学基础医学院病理生理学系,天津 300070)

**摘要** 目的:探讨 NADPH 氧化酶的胞浆亚基 p67<sup>phox</sup> 在肝纤维化中的作用及其机制。方法:用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)腹腔注射的方法建立小鼠肝脏纤维化模型,随机将小鼠分为 5 组:野生型组(WT)、对照组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control)、模型组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>)、NCF<sub>2</sub> 基因敲除加模型组(NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub>)和 NCF2 过表达加模型组(NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>),每组 6 只小鼠。分别用 HE 染色、Masson 染色、天狼猩红染色观察肝脏的病理学改变;免疫组化法检测肝脏平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达水平;Western 印迹检测肝脏组织中 p67<sup>phox</sup>、纤维化相关蛋白  $\alpha$ -SMA 和信号传导及转录激活因子(STAT)3、蛋白激酶 B(AKT)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)通路蛋白的表达。结果:与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control 组相比,注射 CCl<sub>4</sub> 引起小鼠肝纤维化及损伤,p67<sup>phox</sup> 表达下降( $t=2.96, P<0.05$ )。与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组相比,NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> 组肝脏  $\alpha$ -SMA 表达增强( $t=3.6, P<0.05$ )。此外,与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组相比,NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> 组 AKT 通路相关蛋白(p-PDK1、AKT、p-AKT<sup>473</sup>、p-AKT<sup>308</sup>)表达上升( $t=3.17、1.68、3.34、2.47$ ,均  $P<0.05$ ),STAT3 通路相关蛋白(STAT3、p-STAT3<sup>705</sup>)表达升高( $t=3.95、2.67$ ,均  $P<0.05$ ),ERK 通路相关蛋白(p-c-Raf、p-ERK)表达增加( $t=3.68、1.96$ ,均  $P<0.05$ )。与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组相比,NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub> 组小鼠肝脏病理损伤及纤维化程度减轻,p-PDK1、AKT、p-AKT<sup>473</sup> 及 p-AKT<sup>308</sup> 表达下降( $t=2.31、3.53、3.54、2.71$ ,均  $P<0.05$ ),STAT3 及 p-STAT3<sup>705</sup> 表达减少( $t=3.47、2.5$ ,均  $P<0.05$ ),p-c-Raf 和 p-ERK 蛋白表达下降( $t=2.5、6.27$ ,均  $P<0.05$ )。结论:p67<sup>phox</sup> 表达下调,通过激活 STAT3、AKT 及 ERK 通路来诱导肝纤维化的发生。

**关键词** p67<sup>phox</sup>;信号转导及转录激活因子 3;蛋白激酶 B;细胞外调节蛋白激酶;肝纤维化

中图分类号 R363

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)06-0514-08

### The role of p67<sup>phox</sup> in hepatic fibrosis and the underlying mechanism

MA Liye, CHENG Xinxin, XU Zhelong

(Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate the role of cytoplasmic subunit p67<sup>phox</sup> of NOX in hepatic fibrosis and its underlying mechanism.

**Methods:** The mouse hepatic fibrosis model was established by intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub>. Mice were grouped into five groups: WT group, NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control group, NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> group, NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> group and NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub> group, with 6 mice in each group. HE, Masson and Sirius red staining were adopted to observe the pathological changes of liver tissue. Expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) was detected by immunohistochemistry. Expressions of p67<sup>phox</sup> and fibrosis-related proteins including  $\alpha$ -SMA, signal transducer and activator of transcription (STAT)3, AKT and extracellular regulated protein kinases (ERK) were detected by Western blotting.

**Results:** CCl<sub>4</sub> injection induced liver fibrosis and injury, compared with NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control group, the expression of p67<sup>phox</sup> was decreased( $t=2.96, P<0.05$ ). Compared with NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> group, NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> group had increased expression of  $\alpha$ -SMA( $t=3.6, P<0.05$ ). In addition, compared with NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> group, NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> group showed increased expression of the AKT signaling proteins (P-PDK1, AKT, p-AKT<sup>473</sup>, and p-AKT<sup>308</sup>)( $t=3.17, 1.68, 3.34, 2.47$ , all  $P<0.05$ ), enhanced expression of the STAT3 signaling proteins (STAT3 and p-STAT3<sup>705</sup>)( $t=3.95, 2.67$ , both  $P<0.05$ ), and upregulated expression of the ERK signaling proteins (p-c-Raf and p-ERK)( $t=3.68, 1.96$ , both  $P<0.05$ ). Compared with NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> group, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub> group showed less pathological damages and fibrosis. Moreover, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub> group had reduced expression of P-PDK1, AKT, p-AKT<sup>473</sup> and p-AKT<sup>308</sup>( $t=2.31, 3.53, 3.54, 2.7$ , all  $P<0.05$ ), decreased expression of STAT3 and p-STAT3<sup>705</sup>( $t=3.47, 2.5$ , both  $P<0.05$ ), and reduced expression of p-c-Raf and p-ERK( $t=2.5, 6.27$ , both  $P<0.05$ ). **Conclusion:** Down-regulation of p67<sup>phox</sup> induces hepatic fibrosis by activating STAT3, AKT and ERK signaling pathways.

**Key words** p67<sup>phox</sup>; STAT3; AKT; ERK; liver fibrosis

肝脏由于其复杂的功能和结构,易受到各种内、外环境因素的影响而发生病变。肝纤维化是多种肝脏疾病迁延不愈而转为慢性病程的常见病理

过程,可能由多种病因引起,例如病毒感染、酒精摄入过量、寄生虫感染和长期药物损害等。肝纤维化以大量细胞外基质(ECM)形成为主要特点,肝星状细胞(HSC)被激活并产生平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、胶原纤维等是其关键环节。肝纤维化是一个可逆的病理过程,但一旦发展为肝硬化甚至肝癌,

基金项目 国家自然科学基金项目(81970255)

作者简介 马立业(1998-),女,硕士在读,研究方向:病理学与病理生理学;通信作者:徐哲龙, E-mail: zxu@tmu.edu.cn。

则不可逆。因此,在肝纤维化阶段逆转这一病理过程,成为预防肝癌的重要环节<sup>[1-2]</sup>。

NADPH 氧化酶(NOX)广泛存在于真核生物细胞中,是复杂的多亚基复合体,共有 7 个亚型,分别是 NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5 和双重氧化酶 DUOX1、DUOX2。NOX 包括胞膜亚基 gp91<sup>phox</sup>、p22<sup>phox</sup> 以及胞质亚基 p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup> 和小分子 GTPase 结合蛋白 Rac<sup>[3]</sup>。当胞质亚基与胞膜亚基结合时,NOX 被活化并发挥作用。研究表明,NOX 是肝脏中活性氧的主要来源,在多种肝脏疾病中 NOX 的表达异常对病理进程有显著影响<sup>[4]</sup>。

NOX 在 HSC、肝实质细胞和库否细胞(KC)中均广泛表达。研究表明,在肝纤维化小鼠肝脏中 NOX1、NOX2 和 NOX4 的表达均发生变化,而敲除 NOX 或使用抑制剂后,小鼠肝纤维化程度下降<sup>[5,8]</sup>,说明 NOX 可能影响肝纤维化进程。NOX 可能通过损伤肝脏实质细胞产生炎症反应,进而促进 HSC 激活以及  $\alpha$ -SMA 和胶原纤维的合成,或者通过直接调控各种信号通路影响 HSC 的增殖、活化等过程<sup>[9-10]</sup>。因此,调控肝脏中 NOX 的活性已经成为治疗肝纤维化的新靶点。然而,NOX 胞质亚基 p67<sup>phox</sup> 作为 NOX 发挥作用所必须的调节亚基,也是 NOX 组装、发挥活性的重要限速因子,其影响肝纤维化进程及确切机制尚不清楚。本研究通过观察 p67<sup>phox</sup> 对肝纤维化的发生发展的影响,并探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及模型的建立 普通 C57 小鼠由北京斯贝福生物技术有限公司提供 [许可证号: SCXK(京)2019-0010]。此外,利用 Cre-loxP 系统和 CRISPR/Cas9 技术构建 NCF2<sup>fl</sup> 基因型小鼠,由赛业生物科技有限公司构建。ALB-Cre 纯合工具鼠为天津医科大学常永生教授赠送。鉴定结果为纯合子 NCF2<sup>fl</sup> 的小鼠与 ALB-Cre 纯合工具鼠交配,得到 ALB-NCF2<sup>fl</sup> 子一代,子一代进行交配,可得到 ALB-NCF2<sup>+/+</sup> 小鼠,即为肝脏特异性 NCF2 敲除小鼠。为构建 NCF2 过表达小鼠,委托汉恒生物科技有限公司,采用 CMV 广谱启动子及 AAV8 载体制备 NCF2 过表达腺相关病毒,对出生 4 周的小鼠进行尾静脉注射。随机挑选 6 只普通 C57 小鼠作为野生型组(WT)。为建立小鼠肝纤维化模型,对按随机数字表法挑选的 8 周龄 NCF2<sup>fl</sup>、NCF2<sup>fl</sup> 及 NCF2<sup>OE</sup> 小鼠分组如下:模型组(NCF2<sup>fl</sup>-CCl<sub>4</sub>)、NCF2 基因敲除加模型组(NCF2<sup>fl</sup>-CCl<sub>4</sub>)和 NCF2 过表达加模型组(NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>),每组各 6 只小鼠。腹腔注射 1 mL/kg

四氯化碳(CCl<sub>4</sub>, 1:3 的比例溶于玉米油中),每周 2 次,共 4 周;NCF2<sup>fl</sup>-Control 组,每周注射 2 次等量的玉米油,持续 4 周。在最后 1 次注射 CCl<sub>4</sub> 后 72 h 处死各组小鼠,采集肝组织和血液样本用于后续分析。所有动物实验均得到天津医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:TMUaMEC2023101)。

1.1.2 实验试剂 CCl<sub>4</sub> 购自上海易恩化学技术有限公司;腺相关病毒(AAV)购自上海汉恒生物科技有限公司;苏木素购自北京雷根生物技术有限公司;伊红购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Masson 染色试剂盒购自源叶生物科技有限公司;天狼猩红染色液购自飞净生物科技有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、磷酸化的磷酸肌醇依赖性蛋白激酶(p-PDK)1 抗体、蛋白激酶 B(AKT)抗体、p-AKT<sup>473</sup> 抗体、信号转导及转录激活因子(STAT)3 抗体、p-STAT3<sup>705</sup> 抗体、磷酸化的原癌基因丝氨酸蛋白激酶(p-c-Raf)抗体、细胞外调节蛋白激酶(ERK)抗体、p-ERK 抗体、Anti-Rabbit IgG 抗体、Anti-Mouse IgG 抗体均购自美国 CST 公司;p-AKT<sup>308</sup> 抗体购自美国 Invitrogen 公司; $\alpha$ -SMA 抗体、p67<sup>phox</sup> 抗体购自英国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 肝脏特异性敲除 NCF2 小鼠的鉴定 利用 Cre-loxP 系统构建肝脏特异性 NCF2 纯合敲除(NCF2<sup>fl</sup>)小鼠,取小鼠脚趾组织进行 DNA 水平的鉴定引物序列及 PCR 程序,见表 1。NCF2 基因反应条件:94℃、3 min;94℃、30 s,62℃、35 s,72℃、35 s,35 个循环;72℃、5 min。ALB-Cre 的反应条件是 95℃、5 min;95℃、30 s,62℃、30 s,72℃、45 s,35 个循环。经过 PCR 鉴定为纯合的小鼠,在 8 周后进一步通过 mRNA 表达分析和 Western 印迹技术检测其肝脏 p67<sup>phox</sup> mRNA 和蛋白表达水平,表达下降的小鼠确认为肝脏特异性敲除 NCF2 小鼠。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 PCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小
NCF2 F1	ACTGGACTCAACAGAAGACACAAC	307 bp
NCF2 R1	TGCATAGTTCACCTTTCTGATG	239 bp
ALB-Cre 1	TGCAAAATCATCATGCACAC	351 bp
ALB-Cre 2	TTGGCCCCCTTACCATAACTG	500 bp
ALB-Cre 3	GAAGCAGAAGCTTAGGAAGATGG	390 bp

1.2.2 肝脏组织病理学检测 在麻醉处死小鼠后取肝组织,使用 4%多聚甲醛进行固定。经过梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡后进行包埋。后将组织蜡块切成 5  $\mu$ m 厚的薄片,经二甲苯脱蜡、梯度酒精水

化后分别进行 HE、Masson 及天狼猩红染色。HE 染色: 在组织上滴加苏木素染液, 1.5 min 后用自来水返蓝, 在组织上滴加伊红染色液 2 min, 洗净。Masson 染色: 切片放在 Bouin's 固定液中, 56℃ 水浴 1 h, 冲洗。在组织上滴加苏木素染液 30 min, 用自来水返蓝, 放入丽春红染液中 5 min, 冲洗, 放入弱酸工作液中 1 min, 再放入 1% 磷钼酸中分化 2 min, 后放入苯胺蓝染液 40 min, 冲洗, 再次放入弱酸工作液中 1 min。天狼猩红染色: 组织上滴加天狼猩红染料 20 min。染色完成后, 切片放入梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片后, 显微镜下观察确定组织病理损伤及纤维化程度。

1.2.3 免疫组化和免疫荧光技术 将肝组织切片浸泡在枸橼酸钠修复液中加热, 进行抗原修复。冷却后使用山羊血清封闭液在室温下孵育 30 min, 以封闭非特异性结合位点。然后滴加一抗  $\alpha$ -SMA (1: 400 稀释)、p67<sup>phox</sup> (1: 1 000 稀释) 或 CK18 (1: 500 稀释), 在 4℃ 下孵育过夜。再与二抗 (1: 100 稀释) 在 37℃ 环境孵育 30 min。对于免疫组化, 滴加 SABC-POD 工作液, 37℃ 孵育 30 min。最后避光滴加 DAB 显色液显色, 并用苏木素复染细胞核。显微镜下观察确定目的蛋白在组织中表达情况。对于免疫荧光, 滴加与二抗相对应的 SABC 工作液, 37℃ 孵育 30 min。在共聚焦显微镜下观察荧光强度。

1.2.4 mRNA 表达的分析 取适当大小肝脏组织, 加入 Trizol 充分研磨, 通过氯仿抽提、异丙醇、75% 乙醇沉淀离心的方法提取总 RNA, 进行反转录得到 cDNA。通过 qPCR 将目的基因与内参 GAPDH 扩增, 引物序列见表 2, 反应条件为 95℃、10 min, 95℃、15 s, 60℃、60 s, 35 个循环。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析结果, 对比得到目的基因的相对表达量。

表 2 引物序列  
Tab.2 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小
p67 <sup>phox</sup> F1	TCCCGAAGGCTTTTGTGAA	262 bp
p67 <sup>phox</sup> R1	GCAGAAAATTTGTCTCCCCCTC	
GAPDH F	CGTGCCGCCTGGAGAAACCTG	140 bp
GAPDH R	AGAGTGCGGAGTTGCTGTGAAGTCG	

1.2.5 Western 印迹 取适当大小肝组织, 加入 RIPA 裂解液充分研磨, 静置 30 min, 离心取上清得到总蛋白并使用 BCA 法定量。加热使蛋白变性后, 通过蛋白凝胶恒压电泳 100 min, 上样量为 20  $\mu$ g, 使得蛋白质样品分离。将分离的蛋白通过恒电流转 100 min 转移到 PVDF 膜上, 使用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 90 min, 与一抗 (1: 1 000 稀释) 4℃ 孵育过

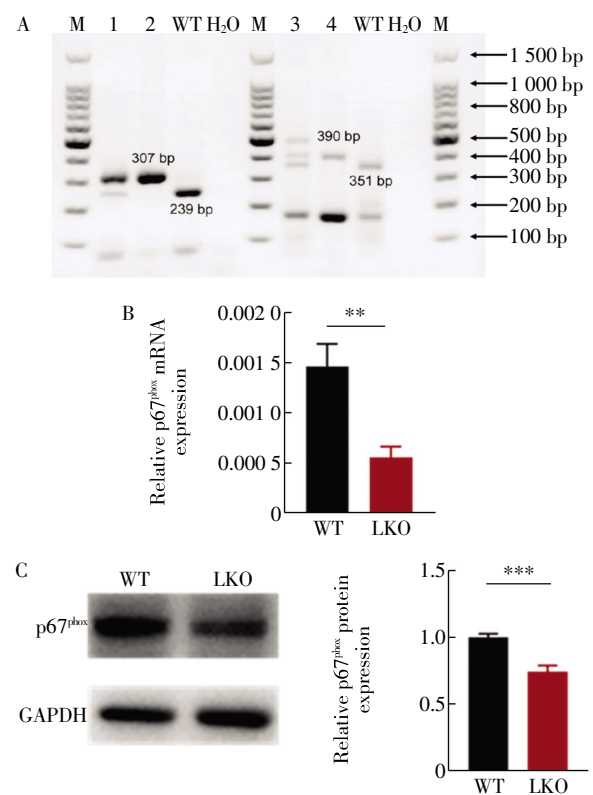
夜。TBST 清洗后与对应种属二抗 (1: 2 000 稀释) 室温孵育 60 min, 使用 ECL 发光液显色。使用 Image J 软件统计灰度值并与 GAPDH 对比计算得到其相对表达量。用于检测 p-PDK1、AKT、p-AKT<sup>T73</sup>、STAT3、p-STAT3<sup>T05</sup>、p-c-Raf、ERK、p-ERK、p-AKT<sup>S08</sup>、 $\alpha$ -SMA 和 p67<sup>phox</sup> 等蛋白表达。

1.3 统计学处理 所有数据的统计学分析均使用 GraphPad Prism 8.4 统计软件完成。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用完全随机设计的独立样本 *t* 检验 (*t*-test) 及单因素方差分析 (*one-way ANOVA*) 比较组间差异。P<0.05 为差异具有统计学差异。

## 2 结果

2.1 肝脏特异性 NCF2 基因敲除小鼠的鉴定 结果如图 1 所示, NCF2<sup>LKO</sup> 小鼠 DNA 鉴定结果带有 ALB-Cre (ALB<sup>+/+</sup> 或 ALB<sup>-/-</sup>) 及 NCF2-fllox 为纯合的小鼠。与 WT 小鼠相比, NCF2<sup>LKO</sup> 小鼠 NCF2 mRNA 表达下降 ( $t=3.65$ ,  $P<0.01$ )。Western 印迹结果显示, 与 WT 小鼠相比, p67<sup>phox</sup> 蛋白表达下降 ( $t=4.85$ ,  $P<0.001$ ), 证明肝脏特异性 NCF2 基因敲除成功, 见图 1。

2.2 肝纤维化小鼠肝组织 p67<sup>phox</sup> 表达变化 如图 2 所示, 与 NCF2<sup>fllox</sup>-Control 组相比, 腹腔注射 CCl<sub>4</sub> 引



注: M: Marker; WT: Wild Type; CK: Control Check; 1: NCF2<sup>+/+</sup>; 2: NCF2<sup>+/+</sup>; 3: ALB<sup>+/+</sup>; 4: ALB<sup>+/+</sup>; GAPDH: 内参蛋白; A: 小鼠组织 DNA 基因型鉴定; B: NCF2<sup>LKO</sup> 小鼠肝脏组织 NCF2 mRNA 水平表达; C: NCF2<sup>LKO</sup> 小鼠肝脏组织 p67<sup>phox</sup> 蛋白表达; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

图 1 肝脏特异性 NCF2 基因敲除小鼠的鉴定

Fig.1 Identification of the liver specific NCF2 gene knockout mice

起小鼠肝脏 p67<sup>phox</sup> 表达下降( $t=2.96, P<0.05$ )。

**2.3 肝脏特异性 p67<sup>phox</sup> 基因敲除对肝脏损伤及纤维化程度的影响** 小鼠体内注射 CCl<sub>4</sub> 导致小鼠肝脏损伤和纤维化,并引起  $\alpha$ -SMA 表达上升(图 3)。HE 染色显示,与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组相比,NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> 组可见更广泛的肝组织结构紊乱、细胞水肿、坏死以及更多炎细胞浸润。Masson 和天狼猩红染色结果显示,与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组相比,NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> 组肝脏纤维化程度更为严重。免疫组化结果显示,与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-

Control 组相比,NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组肝脏  $\alpha$ -SMA 表达上升,NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> 组肝脏  $\alpha$ -SMA 表达进一步上升。Western 印迹法结果进一步证明,与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control 组相比,NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组肝脏  $\alpha$ -SMA 表达上升( $t=2.79, P<0.05$ ),NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub> 组肝脏  $\alpha$ -SMA 表达进一步上升( $t=3.6, P<0.05$ )。

**2.4 肝脏特异性 p67<sup>phox</sup> 敲除上调肝纤维化相关通路的蛋白表达** 如图 4 所示,与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control 组相比,NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组肝脏通路相关蛋白 p-PDK1、

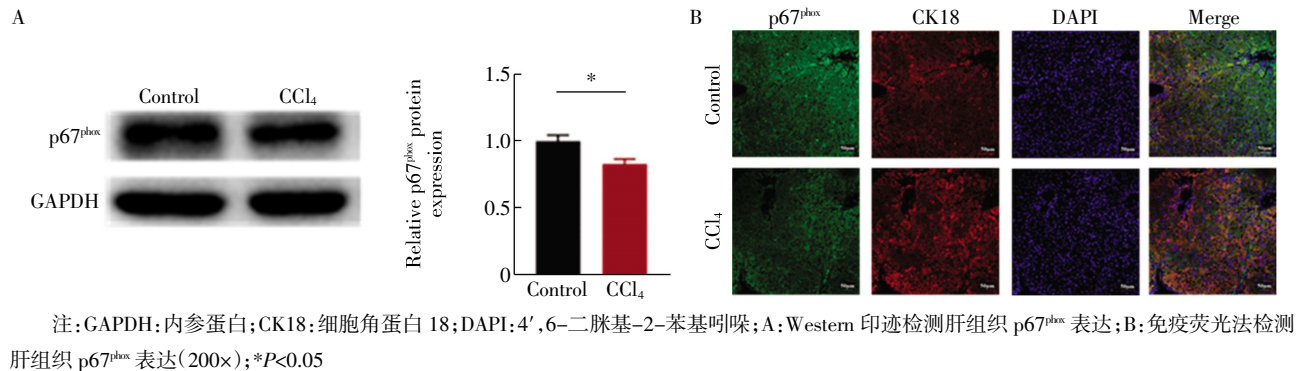
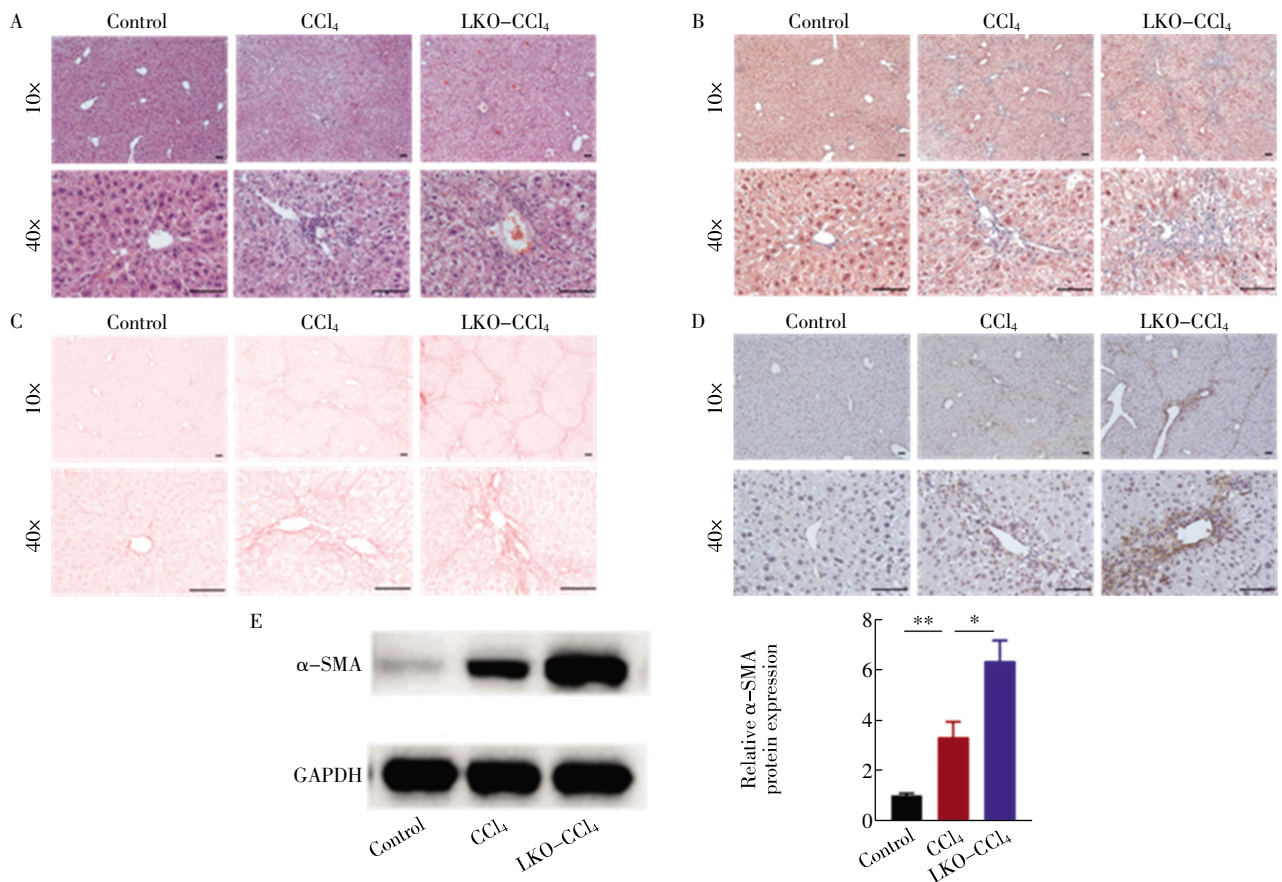


图2 小鼠肝组织 p67<sup>phox</sup> 表达变化

Fig.2 p67<sup>phox</sup> expression in mouse hepatic tissue



注:Control:对照组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control);CCl<sub>4</sub>:模型组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>);LKO-CCl<sub>4</sub>:NCF2 基因敲除加模型组(NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub>); $\alpha$ -SMA:平滑肌肌动蛋白;A:小鼠肝脏石蜡切片 HE 染色;B:小鼠肝脏石蜡切片 Masson 染色;C:小鼠肝脏石蜡切片天狼猩红染色;D:小鼠肝脏石蜡切片  $\alpha$ -SMA 免疫组化染色;E:Western 印迹检测  $\alpha$ -SMA 表达; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

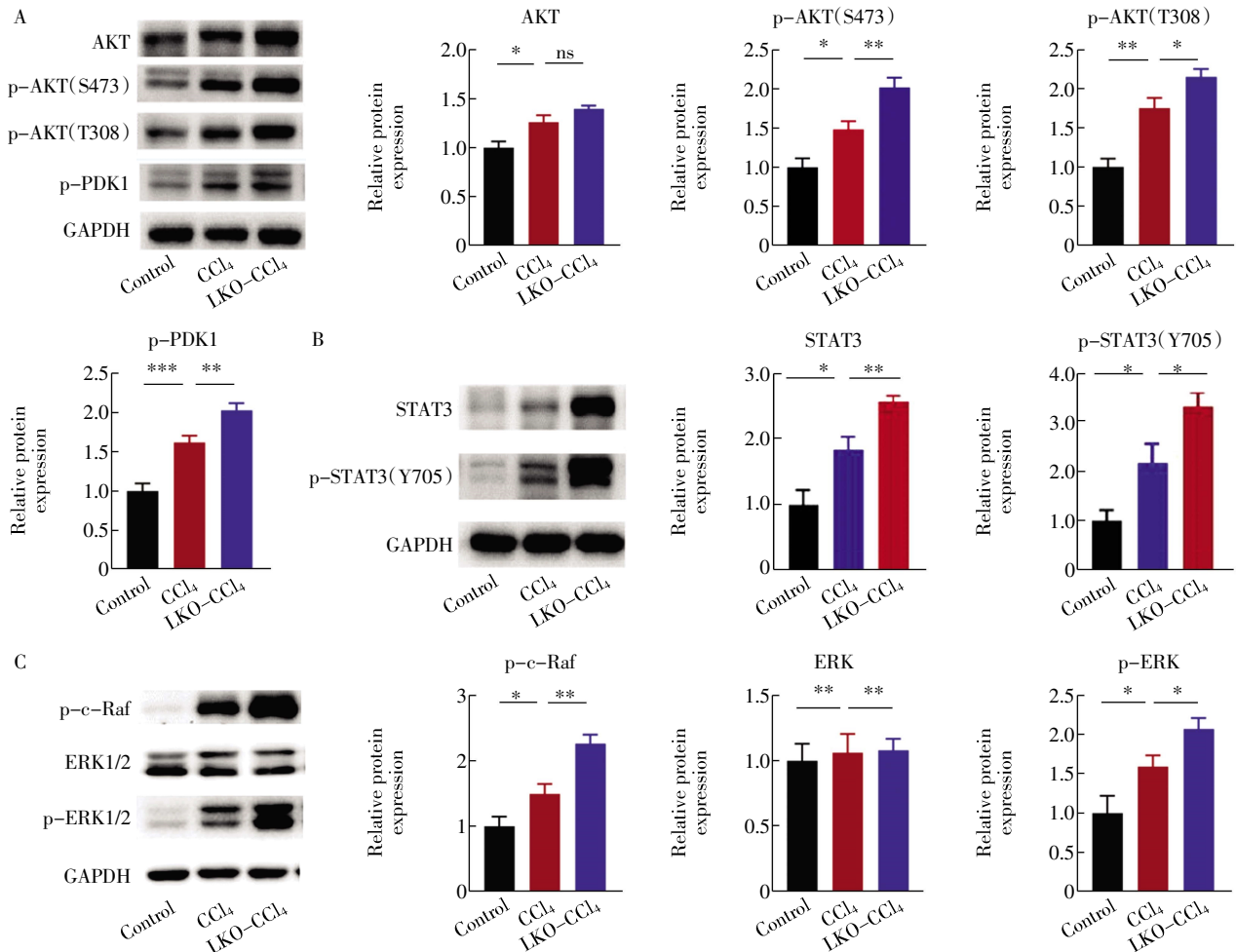
图3 肝脏特异性 p67<sup>phox</sup> 敲除加重肝纤维化及肝脏损伤

Fig.3 Liver specific knockout of p67<sup>phox</sup> aggravates hepatic fibrosis and injury



AKT、p-AKT<sup>473</sup>及p-AKT<sup>308</sup>蛋白表达上升( $t=4.47, 3.19, 2.97, 4.69$ , 均 $P<0.05$ ), NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub>组p-PDK1、AKT、p-AKT<sup>473</sup>及p-AKT<sup>308</sup>蛋白表达进一步上升( $t=3.17, 1.68, 3.34, 2.47$ )。与NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control组相比, NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组STAT3及p-STAT3<sup>705</sup>蛋白表达上升( $t=3.42, 2.77$ , 均 $P<0.05$ ), NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub>组

STAT3及p-STAT3<sup>705</sup>蛋白表达进一步上升( $t=3.95, 2.67$ , 均 $P<0.05$ )。此外, 与NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control组相比, NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组肝脏ERK通路相关蛋白p-c-Raf和p-ERK表达上升( $t=2.38, 2.42$ , 均 $P<0.05$ ), NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub>组p-c-Raf和p-ERK蛋白表达进一步上升( $t=3.68, 1.96$ , 均 $P<0.05$ )。



注: Control: 对照组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control); CCl<sub>4</sub>: 模型组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>); LKO-CCl<sub>4</sub>: NCF2 基因敲除加模型组(NCF2<sup>LKO</sup>-CCl<sub>4</sub>); AKT: 蛋白激酶 B; PDK1: 磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1; GAPDH: 内参蛋白; STAT3: 信号转导及转录激活因子 3; c-Raf: 原癌基因丝氨酸苏氨酸蛋白激酶; ERK: 细胞外调节蛋白激酶; A: AKT 通路相关蛋白 p-PDK1、AKT 及 p-AKT 蛋白表达; B: STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达; C: p-c-Raf、ERK 及 p-ERK 蛋白表达; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

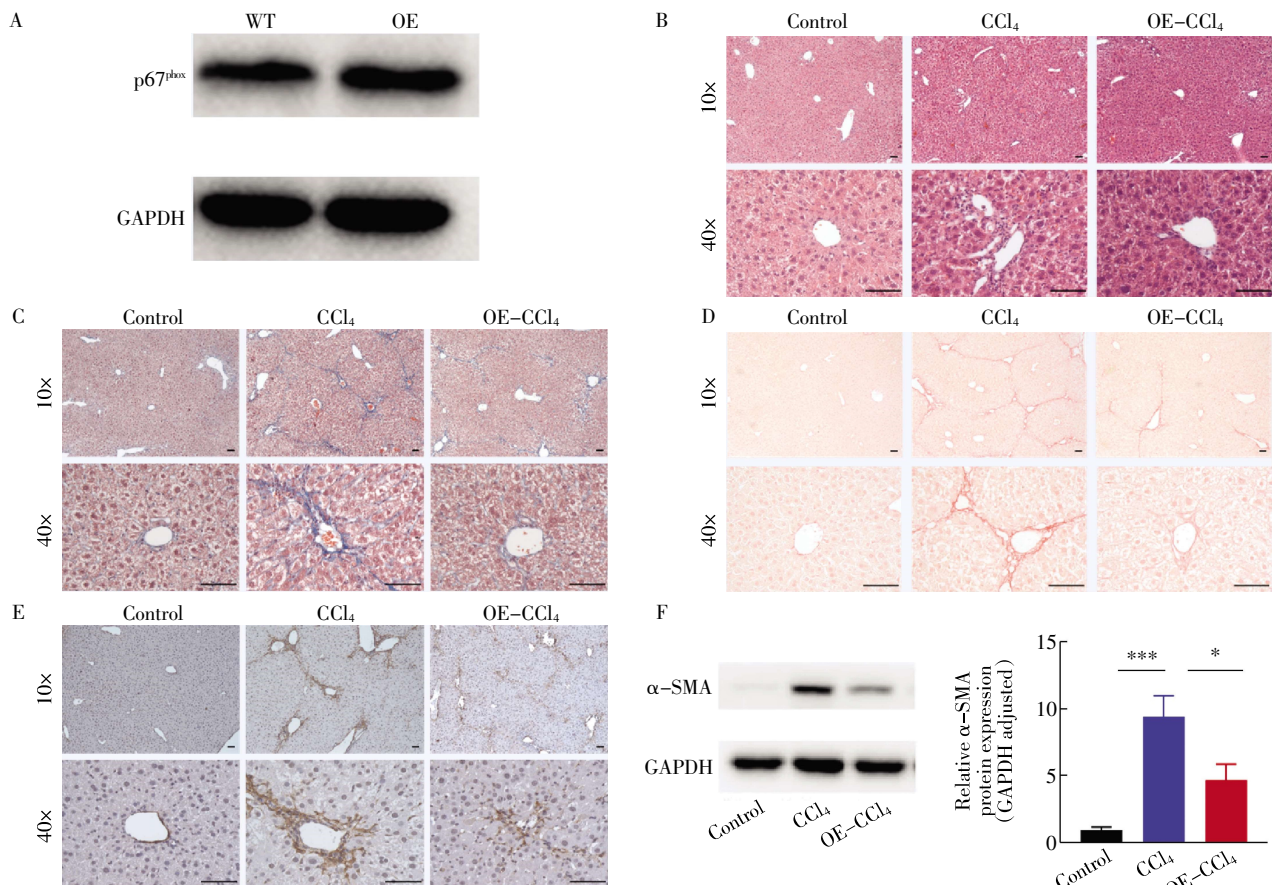
图4 Western 印迹检测小鼠肝组织信号通路蛋白表达

Fig.4 Western blotting analysis of the signal protein expression in hepatic tissue

2.5 p67<sup>phox</sup> 过表达减轻肝脏损伤及纤维化 结果如图5所示, 与WT小鼠相比, OE小鼠p67<sup>phox</sup>蛋白表达明显上升。HE染色结果显示, 与NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组相比, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>组肝脏组织结构紊乱及细胞变性坏死程度减轻, 炎细胞浸润较少。Masson染色和天狼猩红染色结果显示, 与NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组相比, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>组肝脏纤维化程度减轻。免疫组化结果显示, 与NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组相比, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>组肝脏 $\alpha$ -SMA表达降低。Western印迹进一步证实, 与NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control组相比, NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组肝脏 $\alpha$ -

SMA表达上升( $t=5.32, P<0.05$ ), NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>组肝脏 $\alpha$ -SMA表达下降( $t=2.97, P<0.05$ )。

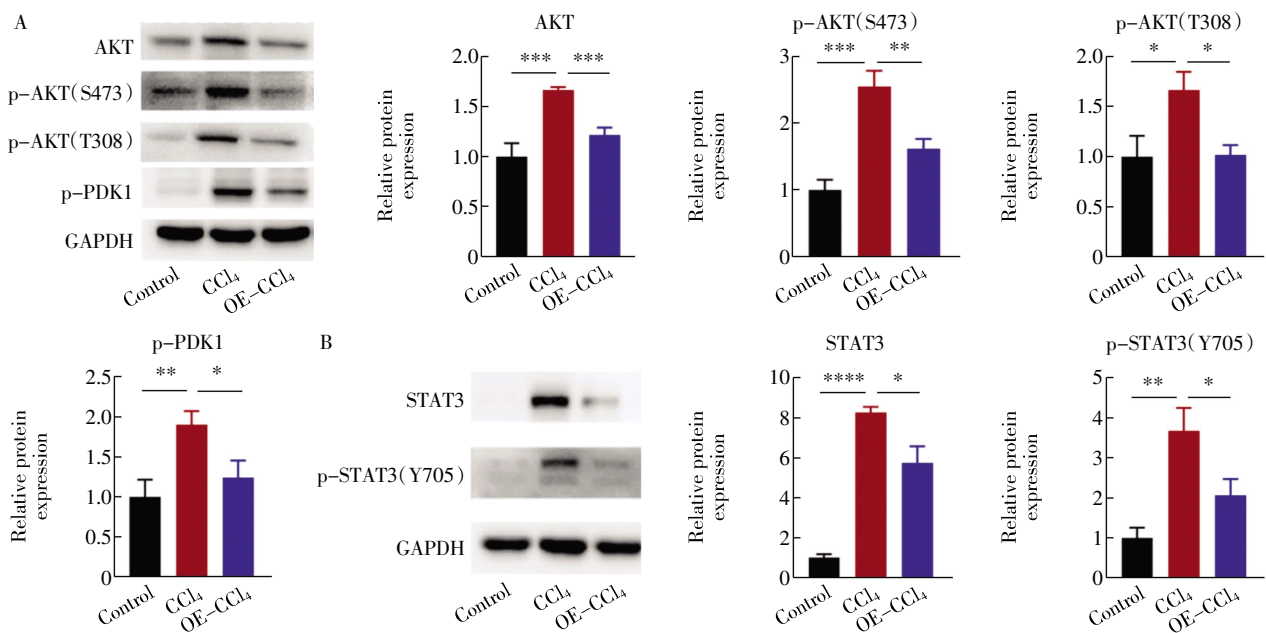
2.6 p67<sup>phox</sup> 过表达下调肝纤维化相关通路蛋白表达 用Western印迹法检测纤维化相关通路蛋白表达, 结果如图6、7所示。与NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control组相比, NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组肝脏AKT通路相关蛋白p-PDK1、AKT、p-AKT<sup>473</sup>及p-AKT<sup>308</sup>表达上升( $t=3.16, 5.23, 5.92, 2.77$ , 均 $P<0.05$ )。与NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>组相比, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>组p-PDK1、AKT、p-AKT<sup>473</sup>及p-AKT<sup>308</sup>表达下降( $t=2.31, 3.53, 3.54, 2.71$ , 均 $P<0.05$ )。与



注: Control: 对照组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control); CCl<sub>4</sub>: 模型组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>); OE-CCl<sub>4</sub>: NCF2 过表达加模型组(NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>); α-SMA: 平滑肌肌动蛋白; GAPDH: 内参蛋白; A: 尾静脉注射 AAV8 后用 Western 印迹测小鼠肝脏 p67<sup>phox</sup> 蛋白表达; B: 小鼠肝脏石蜡切片 HE 染色; C: 小鼠肝脏石蜡切片 Masson 染色; D: 小鼠肝脏石蜡切片天狼猩红染色; E: 小鼠肝脏石蜡切片 α-SMA 免疫组化染色; F: Western blotting 检测 α-SMA 表达; \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001

图 5 p67<sup>phox</sup> 过表达对肝纤维化及损伤的影响

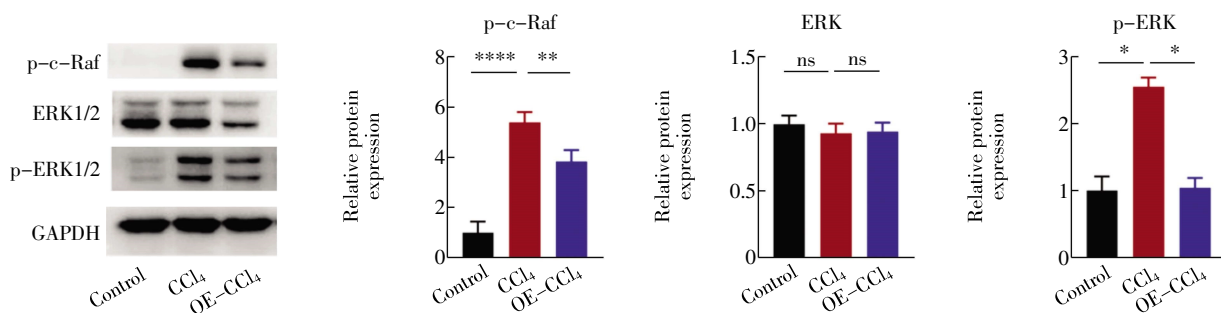
Fig.5 Effect of p67<sup>phox</sup> overexpression on hepatic fibrosis and injury



注: Control: 对照组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control); CCl<sub>4</sub>: 模型组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>); OE-CCl<sub>4</sub>: NCF2 基因敲除加模型组(NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>); AKT: 蛋白激酶 B; PDK1: 磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1; STAT3: 信号转导及转录激活因子 3; A: p-PDK1、AKT 及 p-AKT 蛋白表达; B: STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.0001

图 6 Western 印迹检测肝脏组织信号通路蛋白 PDK1、AKT、STAT3 及其磷酸化蛋白表达

Fig.6 Western blotting analysis of the signal protein PDK1, AKT, STAT3 and their phosphorylated protein expression in hepatic tissue



注: Control: 对照组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control); CCl<sub>4</sub>: 模型组(NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub>); OE-CCl<sub>4</sub>: NCF2 过表达加模型组(NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub>); c-Raf: 原癌基因丝氨酸蛋白激酶; ERK: 细胞外调节蛋白激酶; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\*\**P*<0.0001

图7 Western 印迹检测肝脏组织信号通路 p-c-Raf、ERK 及 p-ERK 表达

Fig.7 Western blotting analysis of the signal protein p-c-Raf, ERK and p-ERK expression in hepatic tissue

NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control 组相比, NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组 STAT3 及 p-STAT3<sup>705</sup> 表达上升( $t=9.94, 4.35$ , 均  $P<0.01$ )。与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组相比, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub> 组 STAT3 及 p-STAT3<sup>705</sup> 表达下降( $t=3.47, 2.5$ , 均  $P<0.05$ )。此外, 与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-Control 组相比, NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组 ERK 通路相关蛋白 p-c-Raf 和 p-ERK 蛋白表达上升( $t=7.06, 6.45$ , 均  $P<0.05$ )。与 NCF2<sup>fl/fl</sup>-CCl<sub>4</sub> 组相比, NCF2<sup>OE</sup>-CCl<sub>4</sub> 组 p-c-Raf 和 p-ERK 蛋白表达下降( $t=2.5, 6.27$ , 均  $P<0.05$ )。

### 3 讨论

肝纤维化作为慢性肝脏疾病的可逆阶段, 在其发展为肝硬化、肝癌之前进行干预对于防治肝功能衰竭引起的死亡至关重要。在慢性肝病发展阶段, HSC 由静止态转化为激活态, 分化成为成纤维细胞, 并产生 ECM, 是肝纤维化的重要特征。去除致病因素、减少肝脏损伤、抑制 HSC 激活和 ECM 生成是逆转肝纤维化的关键<sup>[11-12]</sup>。

NOX 在肝脏各种细胞中广泛表达。研究表明, NOX 调控多种脏器的纤维化。肝损伤时 NOX 复合物调节亚基的表达发生改变, 可调节纤维化的病理过程<sup>[13-14]</sup>。据文献报道, p67<sup>phox</sup> 的表达变化影响肝纤维化<sup>[15-16]</sup>, 但其具体机制尚不明确。肝纤维化过程十分复杂, 涉及到多种肝实质细胞和非实质细胞的相互作用。肝细胞的损伤通过损伤质膜、细胞蛋白及核酸等引发细胞炎症、坏死凋亡及自噬等<sup>[17]</sup>, 肝细胞损伤会直接促进 HSC 激活成为成纤维细胞和增殖, 还间接通过调控各种转录因子和激酶的表达来影响细胞周期<sup>[18]</sup>。研究表明, 多种信号通路在 HSC 的活化、增殖、凋亡以及 KC 活化分泌促纤维化因子等过程中发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>。

STAT3 是一种胞浆信号转录因子, 在调控细胞分化增殖的过程中发挥重要作用。在肝纤维化过程中, STAT3 的表达增加<sup>[21]</sup>。研究表明, JAK2/STAT3 通

路通过 TGF- $\beta$ /Smad 通路调控 HSC 的激活<sup>[22]</sup>。本研究表明, 在肝纤维化过程中 p67<sup>phox</sup> 基因敲除使总 STAT3 表达上升, 促进 STAT3 磷酸化, 加重肝纤维化, 而其过表达则降低 STAT3 磷酸化水平, 减轻肝纤维化, 提示 p67<sup>phox</sup> 通过 STAT3 信号通路调控肝纤维化。

AKT 通路是经典的细胞内信号转导通路, 参与调控细胞增殖、存活、分化以及凋亡等多个过程<sup>[23]</sup>。在酒精或脂多糖诱发的小鼠肝纤维化模型中, AKT 上游信号分子 PDK1 及 AKT 磷酸化水平上升<sup>[24]</sup>, 证明 AKT 在纤维化过程中发挥作用。本研究表明, 在肝纤维化过程中, p67<sup>phox</sup> 敲除使 AKT、PDK1 及 AKT 磷酸化水平升高, 进一步加重肝纤维化, 而其过表达则降低 AKT 磷酸化水平, 减轻肝纤维化程度。这一结果提示 AKT 信号通路在 p67<sup>phox</sup> 对肝纤维化的调控中起着作用。

ERK 是将胞外信号从表面受体转导至细胞核的关键蛋白, 对多种细胞内基因表达起到关键调控作用<sup>[25]</sup>。已有研究表明, ERK 通路参与 TGF- $\beta$ /Smad 通路信号转导。抑制 ERK 通路可防止 HSC 激活及胶原的过度沉积<sup>[26]</sup>。本研究发现, p67<sup>phox</sup> 基因敲除可促进 ERK 磷酸化, 并进一步加重肝纤维化, 而其过表达则降低 ERK 磷酸化水平, 减轻肝纤维化程度。这一结果提示, p67<sup>phox</sup> 对肝纤维化的调控与 ERK 磷酸化水平有关。

本研究中, 在肝纤维化小鼠模型中观察了 p67<sup>phox</sup> 的表达变化, 并探讨了其在肝纤维化进程中的作用及其机制。肝纤维化造模导致肝脏损伤及纤维化程度显著上升, AKT、STAT3 及 ERK 等通路相关蛋白表达上升。这些现象在肝脏特异性 p67<sup>phox</sup> 基因敲除后加重, 而 p67<sup>phox</sup> 过表达则起相反作用。表明 p67<sup>phox</sup> 的表达水平与肝纤维化有关。在肝纤维化过程中, p67<sup>phox</sup> 通过抑制信号通路蛋白减轻肝脏损伤和纤维

化程度。

综上所述,p67<sup>phox</sup>通过调控 AKT、ERK 及STAT3 信号通路调控纤维化。

#### 参考文献:

- [1] ROEHLEN N,CROUCHET E,BAUMERT T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*,2020,9(4):875.
- [2] PAROLA M,PINZANI M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. *Mol Aspects Med*,2019,65:37–55.
- [3] DU J,GEBICKI J M. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals[J]. *Int J Biochem Cell B*,2004,36(11):2334–2343.
- [4] VERMOT A,PETIT-HÄRTLEIN I,SMITH S M E,et al. NADPH Oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology[J]. *Antioxidants (Basel)*,2021,10(6):890.
- [5] PAIK Y H,IWASAKO K,SEKI E,et al. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice[J]. *Hepatology*,2011,53(5):1730–1741.
- [6] JIANG F,LIU G S,DUSTING G J,et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses[J]. *Redox Biol*,2014,2:267–272.
- [7] SANCHÓ P,MAINEZ J,CROSAS-MOLIST E,et al. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development[J]. *PLoS One*,2012,7(9):e45285.
- [8] DE MINICIS S,SEKI E,PAIK Y H,et al. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis[J]. *Hepatology*,2010,52(4):1420–1430.
- [9] LAN T,KISSELEVA T,BRENNER D A. Deficiency of NOX1 or NOX4 prevents liver inflammation and fibrosis in mice through inhibition of hepatic stellate cell activation[J]. *PLoS One*,2015,10(7):e0129743.
- [10] PAIK Y H,KIM J,AOYAMA T,et al. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis[J]. *Antioxid Redox Sign*,2014,20(17):2854–2872.
- [11] YUAN S,WEI C,LIU G,et al. Sorafenib attenuates liver fibrosis by triggering hepatic stellate cell ferroptosis via HIF-1 $\alpha$ /SLC7A11 pathway[J]. *Cell Prolif*,2022,55(1):e13158.
- [12] CHENG Q,LI C,YANG C F,et al. Methyl ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through the TGF- $\beta$ 1/Smad and NOX4/ROS pathways[J]. *Chem Biol Interact*,2019,299:131–139.
- [13] LIANG S,KISSELEVA T,BRENNER D A. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts[J]. *Front Physiol*,2016,7:17.
- [14] GAN D,ZHANG W,HUANG C,et al. Ursolic acid ameliorates CCL<sub>4</sub>-induced liver fibrosis through the NOXs/ROS pathway[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(10):6799–6813.
- [15] KONG D,ZHANG Z,CHEN L,et al. Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy[J]. *Redox Biol*,2020,36:101600.
- [16] LIU Z M,SHEN P C,LU C C,et al. Suramin enhances chondrogenic properties by regulating the p67<sup>phox</sup>/PI3K/AKT/SOX9 signaling pathway[J]. *Bone Joint Res*,2022,11(10):723–738.
- [17] SRIVASTAVA S,BATTU M B,KHAN M Z,et al. Mycobacterium tuberculosis PPE2 protein interacts with p67<sup>phox</sup> and inhibits reactive oxygen species production[J]. *J Immunol*,2019,203(5):1218–1229.
- [18] YI J,WU S,TAN S,et al. Berberine alleviates liver fibrosis through inducing ferrous redox to activate ROS-mediated hepatic stellate cells ferroptosis[J]. *Cell Death Discov*,2021,7(1):374.
- [19] 赖学倩,刘俊宏,王亮,等. 中药调控相关信号通路抗肝纤维化的研究进展[J]. *中华中医药学刊*,2023,41(11):215–221.
- [20] SU S B,QIN S Y,XIAN X L,et al. Interleukin-22 regulating Kupffer cell polarization through STAT3/Erk/Akt crosstalk pathways to attenuate liver fibrosis[J]. *Life Sci*,2021,264:118677.
- [21] KASEMBELI M M,BHARADWAJ U,ROBINSON P,et al. Contribution of STAT3 to inflammatory and fibrotic diseases and prospects for its targeting for treatment[J]. *Int J Mol Sci*,2018,19(8):2299.
- [22] XU S,MAO Y,WU J,et al. TGF- $\beta$ /Smad and JAK/STAT pathways are involved in the anti-fibrotic effects of propylene glycol alginate sodium sulphate on hepatic fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*,2020,24(9):5224–5237.
- [23] ZUO L,ZHU Y,HU L,et al. PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane transportation of acid-sensing ion channel 1a/Calcium ion influx/endoplasmic reticulum stress activation on PDGF-induced HSC Activation[J]. *J Cell Mol Med*,2019,23(6):3940–3950.
- [24] REYES-GORDILLO K,SHAH R,ARELLANES-ROBLEDO J,et al. Akt1 and Akt2 isoforms play distinct roles in regulating the development of inflammation and fibrosis associated with alcoholic liver disease[J]. *Cells*,2019,8(11):1337.
- [25] FOGLIA B,CANNITO S,BOCCA C,et al. ERK pathway in activated,myofibroblast-like,hepatic stellate cells:a critical signaling crossroad sustaining liver fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(11):2700.
- [26] LI X,ZHANG H,PAN L,et al. Puerarin alleviates liver fibrosis via inhibition of the ERK1/2 signaling pathway in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rats[J]. *Exp Ther Med*,2019,18(1):133–138.

(2024-04-08 收稿)