

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1452-12

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250602

工程化外泌体递送 *ANGPTL6* mRNA 对小鼠肝纤维化的改善作用

唐小茜, 温升聪, 董振亚, 陈静仪, 曹煜, 张云华

(石河子大学医学院生化教研室 新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002)

[摘要] **目的:** 探讨血管生成素样蛋白6 (ANGPTL6) 在肝脏纤维化中的作用, 分析工程化外泌体 (Exo) 递送 *ANGPTL6* mRNA 对肝脏纤维化的改善作用。**方法:** 将12只C57BL/6小鼠随机分为橄榄油组 (OIL组) (腹腔注射橄榄油) 和四氯化碳 (CCl₄) 组 (腹腔注射橄榄油与CCl₄混合液), 每组各6只; 另12只C57BL/6小鼠, 随机分为对照组 (喂食含蛋氨酸胆碱对照饲料) 和蛋氨酸胆碱缺乏 (MCD) 组 (喂食MCD饲料), 构建2种小鼠肝脏纤维化模型, 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 和Western blotting法检测各组小鼠肝组织中 *ANGPTL6* mRNA 和蛋白表达水平。将30只小鼠随机分为橄榄油+磷酸盐缓冲液 (PBS) 组 (OIL+PBS组) (腹腔注射橄榄油, 每周2次, 8周后, 尾静脉注射PBS缓冲液6周, 每周2次)、CCl₄+Exo-绿色荧光蛋白 (GFP) mRNA 组 (腹腔注射CCl₄混合液制备肝纤维化模型后, 尾静脉注射装载GFP mRNA的工程化Exo 6周) 和CCl₄+Exo-*ANGPTL6* mRNA 组 (腹腔注射CCl₄混合液制备肝纤维化模型后, 尾静脉注射装载*ANGPTL6* mRNA的工程化Exo 6周), 每组10只。CCl₄+Exo-GFP mRNA组CCl₄+Exo-*ANGPTL6* mRNA组小鼠每周注射工程化Exo 2次, 每次每只小鼠注射20 μg (体积100 μL)。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性, Masson染色和天狼猩红染色观察各组小鼠肝脏胶原沉积情况, 免疫组织化学法检测各组小鼠肝组织中α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 表达水平, RT-qPCR法检测各组小鼠肝组织中α-SMA、I型胶原α1链 (*Col1a1*)、转化生长因子β1 (*TGF-β1*) 和金属蛋白酶组织抑制剂1 (*TIMP-1*) mRNA表达水平。**结果:** 生物信息学分析, *ANGPTL6* 在活化肝星状细胞 (aHSC) 中表达明显下调。超声检查, OIL组小鼠肝脏表面细腻光滑; 与OIL组比较, CCl₄组小鼠肝脏切面粗糙, 表面凹凸不平。RT-qPCR和Western blotting法检测, 与OIL组比较, CCl₄组小鼠肝组织中 *ANGPTL6* mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。从HEK293T细胞上清液中提取的工程化Exo结构完整, 经尾静脉注射后能够在纤维化肝脏中大量富集, GFP蛋白在肝脏中大量表达。ELISA法检测, 与OIL+PBS组比较, CCl₄+Exo-GFP mRNA组小鼠血清中ALT和AST活性均明显升高 ($P < 0.05$); 与CCl₄+Exo-*ANGPTL6* mRNA组比较, CCl₄+Exo-GFP mRNA组小鼠血清中ALT和AST活性均明显降低 ($P < 0.05$)。Masson染色和天狼猩红染色观察, 与OIL+PBS组比较, CCl₄+Exo-GFP mRNA组小鼠肝脏胶原沉积明显增加, 相对胶原面积增加 ($P < 0.05$); 与CCl₄+Exo-GFP mRNA组比较, CCl₄+Exo-*ANGPTL6* mRNA组小鼠肝脏胶原沉积明显减少, 相对胶原面积减少 ($P < 0.05$)。免疫组织化学法检测, 与OIL+PBS组比较, CCl₄+Exo-GFP mRNA组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与CCl₄+Exo-GFP mRNA组比较, CCl₄+Exo-*ANGPTL6* mRNA组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。RT-qPCR法检测, 与OIL+PBS组比较, CCl₄+Exo-GFP mRNA组小鼠肝组织中 *Col1a1*、α-SMA、*TGF-β1* 和 *TIMP-1* mRNA表

[收稿日期] 2024-11-07 [录用日期] 2025-02-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82260126, 32460221)

[作者简介] 唐小茜 (1999—), 女, 四川省攀枝花市人, 在读硕士研究生, 主要从事代谢性疾病基础和临床方面的研究。

[通信作者] 张云华, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: yunhuazhang@shzu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 $\text{CCl}_4 + \text{Exo-GFP}$ mRNA 组比较, $\text{CCl}_4 + \text{Exo-ANGPTL6}$ mRNA 组小鼠肝组织中 *Colla1*、 $\alpha\text{-SMA}$ 、*TGF- β 1* 和 *TIMP-1* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。结论: 小鼠尾静脉注射工程化 Exo 递送的 *ANGPTL6* mRNA 主要富集在肝脏, 工程化 Exo 递送 *ANGPTL6* mRNA 对小鼠肝纤维化具有改善作用。

[关键词] 血管生成素样蛋白 6; 工程化外泌体; 肝脏纤维化; 肝脏损伤; 疾病模型, 动物

[中图分类号] R34 [文献标志码] A

Improvement effect of engineered exosomes delivering *ANGPTL6* mRNA on liver fibrosis in mice

TANG Xiaoqian, WEN Shengcong, DONG Zhenya, CHEN Jingyi, CAO Yu, ZHANG Yunhua
(Key Laboratory of Xinjiang Endemic & Ethnic Diseases, Ministry of Education, Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the role of angiopoietin-like protein 6 (*ANGPTL6*) in liver fibrosis, and to analyze the improving effect of engineered exosome (Exo)-delivered *ANGPTL6* mRNA on liver fibrosis. **Methods:** A total of 12 C57BL/6 mice were randomly divided into olive oil group (OIL group) (intraperitoneally injected with olive oil) and carbon tetrachloride (CCl_4) group (intraperitoneally injected with a mixture of olive oil and CCl_4), with 6 mice in each group; another 12 C57BL/6 mice were randomly divided into control group (fed a with methionine-choline sufficient diet) and methionine-choline deficient (MCD) group (fed a with MCD diet), and two kinds of mouse liver fibrosis models were established. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting method were used to detect the *ANGPTL6* mRNA and protein expression levels in liver tissue of the mice in various groups. A total of 30 mice were randomly divided into olive oil + phosphate buffered saline (PBS) group (OIL+PBS group) (intraperitoneally injected with olive oil twice a week for 8 weeks, then injected with PBS buffer by tail vein twice a week for 6 weeks), $\text{CCl}_4 + \text{Exo-green fluorescent protein (GFP)}$ mRNA group (established liver fibrosis model by intraperitoneal injection of CCl_4 mixture and were injected by tail vein with engineered Exo loaded with *GFP* mRNA for 6 weeks), and $\text{CCl}_4 + \text{Exo-ANGPTL6}$ mRNA group (established liver fibrosis model by intraperitoneal injection of CCl_4 mixture and were injected by tail vein with engineered Exo loaded with *ANGPTL6* mRNA for 6 weeks), with 10 mice in each group. The mice in $\text{CCl}_4 + \text{Exo-GFP}$ mRNA group and $\text{CCl}_4 + \text{Exo-ANGPTL6}$ mRNA group were injected with engineered Exo twice a week, 20 μg per mouse each time (volume 100 μL). ELISA method was used to detect the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities in the mice in various groups; Masson staining and Sirius red staining were used to observe the collagen deposition in liver tissue of the mice in various groups; immunohistochemistry method was used to detect the α -smooth muscle actin ($\alpha\text{-SMA}$) expression levels in liver tissue of the mice in various groups; RT-qPCR method was used to detect the expression levels of $\alpha\text{-SMA}$, collagen type I alpha 1 chain (*Colla1*), transforming growth factor β 1 (*TGF- β 1*), and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (*TIMP-1*) mRNA in liver tissue of the mice in various groups. **Results:** The bioinformatics analysis results showed that *ANGPTL6* expression was significantly down-regulated in activated hepatic stellate cell (aHSC). The ultrasound examination results showed that the liver surface of the mice in OIL group was fine and smooth; compared with OIL group, the liver section of the mice in CCl_4 group was rough and uneven. The RT-qPCR and Western blotting results showed that compared with OIL group, the *ANGPTL6* mRNA and protein expression levels in liver tissue of the mice in CCl_4 group were significantly decreased ($P < 0.05$). The engineered Exo extracted from the supernatant

of HEK293T cells had intact structure and could be largely enriched in the fibrotic liver after tail vein injection, with GFP protein being largely expressed in the liver. The ELISA assay results showed that compared with OIL+PBS group, the ALT and AST activities in CCl₄+Exo-GFP mRNA group were significantly increased ($P<0.05$); compared with CCl₄+Exo-ANGPTL6 mRNA group, the serum ALT and AST activities in CCl₄+Exo-GFP mRNA group were significantly decreased ($P<0.05$). The Masson staining and Sirius red staining results showed that compared with OIL+PBS group, the collagen deposition in liver tissue of the mice in CCl₄+Exo-GFP mRNA group was significantly increased, and the relative collagen area was increased ($P<0.05$); compared with CCl₄+Exo-GFP mRNA group, the collagen deposition in tissue liver of the mice in CCl₄+Exo-ANGPTL6 mRNA group was significantly decreased, and the relative collagen area was decreased ($P<0.05$). The immunohistochemistry results showed that compared with OIL+PBS group, the α -SMA protein expression level in liver tissue of the mice in CCl₄+Exo-GFP mRNA group was significantly increased ($P<0.05$); compared with CCl₄+Exo-GFP mRNA group, the α -SMA protein expression level in liver tissue of the mice in CCl₄+Exo-ANGPTL6 mRNA group was significantly decreased ($P<0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with OIL+PBS group, the expression levels of *Colla1*, α -SMA, *TGF- β 1*, and *TIMP-1* mRNA in liver tissue of the mice in CCl₄+Exo-GFP mRNA group were significantly increased ($P<0.05$); compared with CCl₄+Exo-GFP mRNA group, the expression levels of *Colla1*, α -SMA, *TGF- β 1*, and *TIMP-1* mRNA in liver tissue of the mice in CCl₄+Exo-ANGPTL6 mRNA group were significantly decreased ($P<0.05$).

Conclusion: Engineered Exo-delivered *ANGPTL6* mRNA injected via the tail vein in the mice is mainly enriched in the liver, and engineered Exo delivery of *ANGPTL6* mRNA has an improving effect on liver fibrosis in the mice.

KEYWORDS Angiopoietin-like protein 6; Engineered exosome; Liver fibrosis; Liver injury; Disease model, animals

肝脏纤维化是细胞外基质成分在肝脏过度弥漫性积累的一种动态性病理性损伤,随着病程的发展,晚期肝纤维化可能会进展为肝硬化和肝细胞癌^[1-2]。研究^[3]预测2019—2039年,肝硬化的发病率将逐年上升。但目前尚无获批的抗纤维化药物^[4-5]。因此,亟需探索一种有效抗肝纤维化的方法。

血管生成素样蛋白6 (angiopoietin-like protein 6, ANGPTL6),也称血管生成素相关生长因子,是肝源性的血管生成素相关蛋白家族的新成员。研究^[6]发现:ANGPTL6在表皮再生以及血管生成中发挥作用。研究^[7]显示:ANGPTL6在抑制肥胖和相关的胰岛素抵抗方面也具有一定功能。目前,关于ANGPTL6功能的研究主要集中在家族性颅内动脉瘤^[8]、甲状腺癌^[9]、肥胖和糖尿病^[10]等方面,而在肝脏纤维化方面的研究较少。外泌体(exosome, Exo)是一种装载各种蛋白质、脂质和核酸的小脂质膜囊泡,能够通过质膜融合或内吞作用进入“受体”细胞^[11]。而经工程改造的工程化Exo可以将小分子或核酸药物递送到特定类型的组织或细胞中,以达到增加局部药物浓度和减少药物不良反应的目的^[12]。

本研究通过工程化Exo递送ANGPTL6 mRNA,探讨并验证ANGPTL6在减轻小鼠肝脏纤维化中的作用,为肝纤维化治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)芯片数据分析 在GEO芯片数据库中下载GSE149508数据集的原始数据,上传至生物和信息学分析系统(<https://maayanlab.cloud/biojupies/>)进行基因差异表达分析,并生成热图,分析静态肝星状细胞(quiescent hepatic stellate cell, qHSC)与活化肝星状细胞(activated hepatic stellate cell, aHSC)二者之间的基因差异。

1.2 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 6周龄SPF级C57BL/6雄性小鼠54只,体质量18~22 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物生产许可证编号:SCXK(京)2024-0010,动物使用许可证编号:SYXK(新)2023-0003。所有实验动物均在石河子大学医学院SPF级动物实验中心饲养,动物实验获得了石河子大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批件号:A2023-214-01)。

HEK293T 细胞购自河南北纳生物有限公司。蛋氨酸胆碱缺乏 (methionine and choline-deficient, MCD) 饲料和含蛋氨酸胆碱对照饲料均购自美国 MP biomedical 公司, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 购自武汉 Servicebio 公司, 工程化 Exo 和 mRNA 购自北京睿博兴科生物技术有限公司, 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和胎牛血清购自苏州伊科赛生物科技有限公司, DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, 线性 PEI40000 转染试剂购自上海翌圣生物科技有限公司, SMM 293-T II 无血清培养基购自北京义翘神州生物技术有限公司, Exo 提取试剂盒购自美国 SBI 公司, 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海酶联科技有限公司, α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体购自武汉 ABclonal 公司, *ANGPTL6* 抗体购自英国 Abcam 公司, Flag 和 β -actin 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 SYBR 绿色染料试剂盒均购自南京诺唯赞生物技术有限公司。小动物超声成像系统购自加拿大 FUJIFILM 公司, 小动物活体荧光成像系统购自美国 PerkinElmer 公司, 电泳仪和转膜仪均购自美国 Bio-Rad 公司, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购自瑞士罗氏公司。

1.3 2种小鼠肝纤维化模型制备 小鼠自适应1周后, 首先通过化学药物构建小鼠纤维化肝脏模型^[13], 即腹腔注射四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl_4) 混合液造模。将12只实验小鼠, 随机分为橄榄油组 (OIL组) (小鼠腹腔注射橄榄油) 和 CCl_4 组 (小鼠腹腔注射橄榄油与 CCl_4 混合液), 每组各6只。混合液由 CCl_4 与橄榄油按照 1:7 的比例混合均匀, 剂量为 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 每周注射2次, 造模时间持续8周。此外, 还通过饮食诱导法构建小鼠纤维化肝脏模型^[13], 即小鼠喂食 MCD 饲料造模。将12只实验小鼠, 随机分为对照组 (小鼠喂食含蛋氨酸胆碱对照饲料) 和 MCD 组 (小鼠喂食 MCD 饲料), 每组各6只, 造模时间持续8周。

1.4 实验动物分组和工程化 Exo 给药处理

将30只小鼠随机分为橄榄油+PBS组 (OIL+PBS组)、 CCl_4 +Exo-GFP mRNA 组和 CCl_4 +Exo-*ANGPTL6* mRNA 组, 每组10只。OIL+PBS组小鼠腹腔注射橄榄油, 每周2次, 8周后, 尾静脉

注射 PBS 缓冲液6周, 每周2次; CCl_4 +Exo-GFP mRNA 组小鼠按“1.3”的方法腹腔注射 CCl_4 混合液制备肝纤维化模型后, 尾静脉注射装载 GFP mRNA 的工程化 Exo 6周; CCl_4 +Exo-*ANGPTL6* mRNA 组小鼠按“1.3”的方法腹腔注射 CCl_4 混合液制备肝纤维化模型后, 尾静脉注射装载 *ANGPTL6* mRNA 的工程化 Exo 6周。后2组每周注射工程化 Exo 2次, 每只小鼠每次注射 $20 \mu\text{g}$ (体积 $100 \mu\text{L}$)。

1.5 采用小动物超声成像系统检查2组小鼠肝纤维化情况 将小鼠麻醉并固定于操作台, 剔除腹部毛发, 并应用小动物超声系统以高频超声探头对 OIL 组和 CCl_4 组小鼠肝脏进行超声扫描。观察2组小鼠肝脏形态表现和回声等特征, 代表肝脏纤维化情况。

1.6 HEK293T 细胞培养上清中提取工程化 Exo 及鉴定

HEK293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 待细胞密度为 85% 左右时更换完全培养液, 并按照组别转染相应质粒。细胞分为对照组和处理组, 对照组细胞上清液中提取的工程化 Exo 用于对照组小鼠的研究; 处理组细胞提取的工程化 Exo 则用于处理组小鼠的研究。对照组细胞同时转染 pcDNA-8HIS-RGD-CD63-mCherry-L7ae 和 pcDNA-GFP-Ha (KT) 2 种质粒, 而处理组细胞则同时转染 pcDNA-8HIS-RGD-CD63-mCherry-L7ae 和 pcDNA-*ANGPTL6*-Flag (KT)。按照 2 mL 培养基需转染 $2 \mu\text{g}$ 质粒 (2 种质粒各 $1 \mu\text{g}$) 的条件进行转染。转染 24 h 后, HEK293T 细胞用 PBS 缓冲液清洗 2 次, 并更换为 SMM 293-T II 无血清培养液继续培养。HEK293T 细胞于无血清培养基中培养 36 h 后, 收集细胞培养基。首先于 4°C 条件下 3000 g 离心 15 min, 去除细胞和细胞碎片。接下来细胞上清通过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤, 并收集滤液。然后滤液采用 15 mL 100000 Da 超滤管超滤浓缩, 4°C 条件下 3000 g 离心 30 min。随后转移浓缩液至 4 mL 离心管, 加入 Exo 提取试剂, 混匀并置于 4°C 层析柜旋转过夜。 1500 g 离心 30 min, 吸除上清, 加适量 PBS 缓冲液重悬沉淀。通过 Nanosight 粒径分析、电镜和活体荧光成像系统鉴定所提工程化 Exo。

1.7 小动物活体荧光成像系统检查小鼠肝组织中工程化 Exo 分布情况 将提取的工程化 Exo 经尾静脉注射至小鼠体内, 由于提取的工程化 Exo 自带

mCherry 红色荧光蛋白, 因此可以直接经荧光活体成像系统观测到工程化 Exo 在机体不同时间(30 min、2 h 和 24 h) 的分布情况。利用小动物活体荧光成像系统, 检测 OIL+PBS 组和 CCl_4 +Exo-GFP mRNA 组小鼠在尾静脉分别注射 PBS 缓冲液和含有 GFP mRNA 的工程化 Exo 后 30 min、2 h 及 24 h 的 mCherry 荧光信号强度。同时在注射后 24 h 检测肝脏中的 GFP 荧光信号强度, 以代表工程化 Exo 在体内的分布情况和 GFP 蛋白表达状况。

1.8 采用试剂盒检测各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性 小鼠心脏采血后, 将所得血浆在室温条件下静置 2 h, 随后将血液样本转移至 4 °C 环境中, 以 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离并收集血清。依照 ELISA 试剂盒说明书要求检测各组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性。

1.9 Masson 染色、天狼猩红染色和免疫组织化学法检测各组小鼠肝组织中胶原沉积情况 将取材的肝组织先浸泡在 4% 多聚甲醛中进行固定, 24 h 后放入 20% 蔗糖溶液中脱水, 随后用石蜡包埋肝组织。对肝组织切片进行 Masson 和天狼猩红染色及使用 α -SMA (1:200) 抗体标记肝组织切片, 以检测肝组织纤维化情况。采用 Image J 图像分析系统分析肝组织中胶原沉积情况 (Masson 染色胶原沉积颜色为蓝色, 天狼猩红染色胶原沉积颜色为红色) 和 α -SMA 蛋白表达情况, 计算相对胶原面积和 α -SMA 蛋白表达水平。相对胶原面积=胶原面积/组织总面积, α -SMA 蛋白表达水平= α -SMA 蛋白阳性染色面积/组织总面积。

1.10 Western blotting 法检测各组小鼠肝组织中 ANGPTL6 和 Flag 蛋白表达水平 采用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液裂解肝组织, 使用 BCA 试剂盒定量蛋白浓度。利用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离等量的蛋白质, 并转移至 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉封闭, 并在 4 °C 下一抗孵育过夜, ANGPTL6 (1:500)、Flag (1:2000) 和 β -actin (1:1000)。清洗膜后, 加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠/兔二抗, 室温孵育 2 h, 再次清洗膜后, 加入发光液曝光。采用

Image J 图像分析系统分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值。

1.11 RT-qPCR 法检测各组小鼠肝组织中 ANGPTL6 mRNA 和纤维化相关基因表达水平 根据试剂说明书操作, 使用 Total RNA 试剂提取肝脏总 RNA, 使用逆转录试剂盒逆转录 RNA, 使用 SYBR 绿色染料, 采用 RT-qPCR 检测各组小鼠肝组织中 ANGPTL6、 α -SMA、I 型胶原 $\alpha 1$ 链 (collagen type I alpha 1 chain, *Col1a1*)、转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, *TGF- $\beta 1$*)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, *TIMP-1*) mRNA 表达水平, 所有引物均由北京睿博兴科生物有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.12 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行作图和统计学分析。各组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性, 各组小鼠肝组织中相对胶原面积和蛋白阳性表达率和 α -SMA、ANGPTL6 及 Flag 蛋白表达水平, 各组小鼠肝组织中 ANGPTL6、 α -SMA、*Col1a1*、*TGF- $\beta 1$* 和 *TIMP-1* mRNA 表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEO 芯片数据分析 分析 qHSC 和 aHSC 的芯片数据集 (GSE149508), 结果显示: 2 种肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 中, ANGPTL6 在 aHSC 中表达明显下调。见图 1。

2.2 2 组小鼠肝脏形态表现 超声检查结果显示: OIL 组小鼠肝脏表面细腻光滑。与 OIL 组比较, CCl_4 组小鼠肝脏切面粗糙, 表面凹凸不平。提示腹腔注射 CCl_4 混合液成功建立了肝纤维化模型。见图 2。

2.3 2 组小鼠肝组织中 ANGPTL6 mRNA 和蛋白表达水平 与 OIL 组比较, CCl_4 组小鼠肝组织中 ANGPTL6 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 工程化 Exo 提取和鉴定 根据工程化 Exo 吸附特异 mRNA 的原理构建相关质粒。见图 4。在 HEK293T 细胞中转染 CD63 融合质粒后, 荧光显示: CD63 蛋白在细胞膜上表达, 同时红色荧光蛋白 mCherry 表达量较高, 证实 pcDNA-8HIS-RGD-

表1 RT-qPCR引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequences (5'-3')	NCBI Refseq
<i>ANGPTL6</i>	Forward: CTGGGCCGTCGTGTAGTAG	NM_145154.2
	Reverse: CAGTCCTCTAGGAGTATCAGCAG	
α -SMA	Forward: GTCCAGACATCAGGGAGTAA	NM_007392.3
	Reverse: TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	
<i>Coll1a1</i>	Forward: GCTCCTCTTAGGGGCCACT	NM_007742.4
	Reverse: CCACGTCTCACCATTGGGG	
<i>TGF-β1</i>	Forward: CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	NM_011577.2
	Reverse: GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG	
<i>TIMP-1</i>	Forward: GCAACTCGGACCTGGTCATAA	NM_001044384.2
	Reverse: CGGCCCGTGATGAGAACT	
β -actin	Forward: GGCTGTATTCCCCTCCATCG	NM_007393.5
	Reverse: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

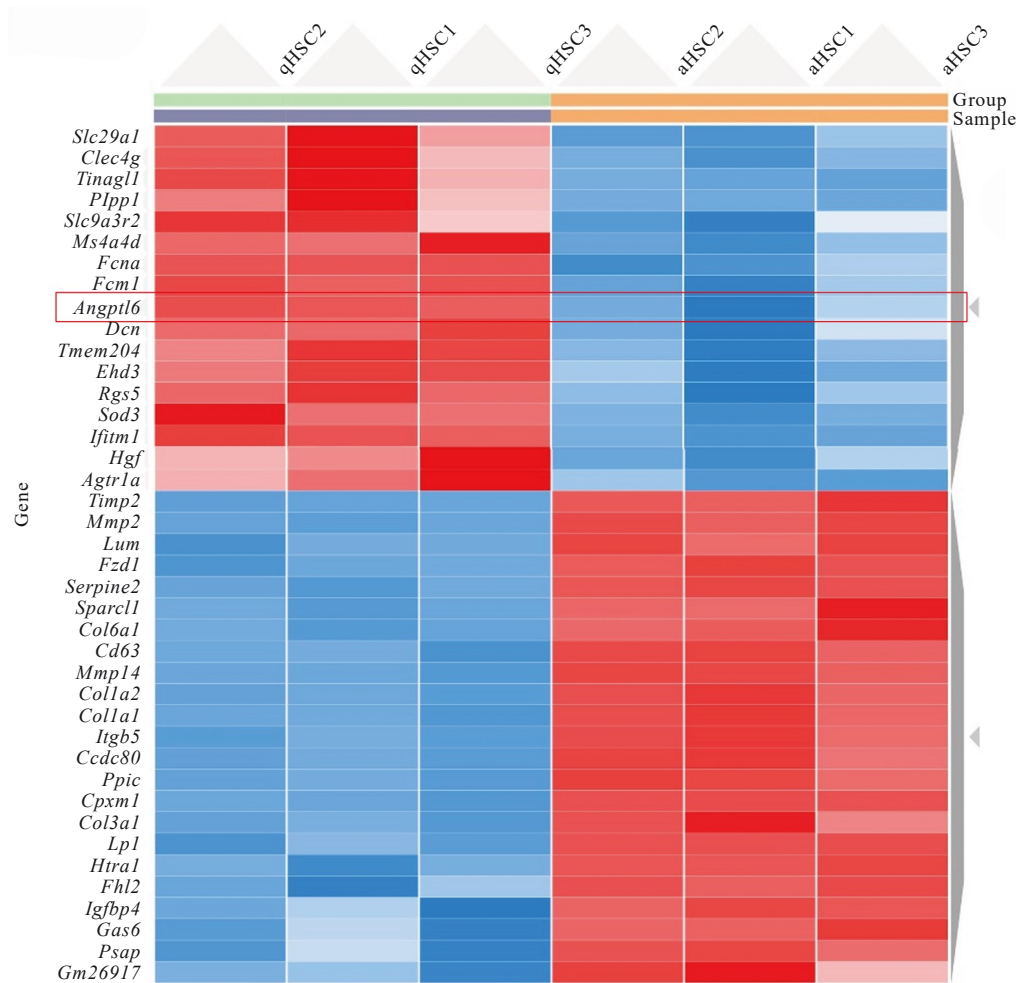
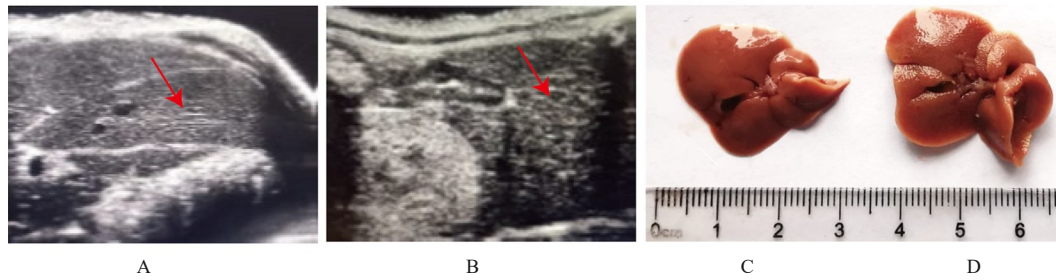


图1 2种HSCs的GEO数据分析

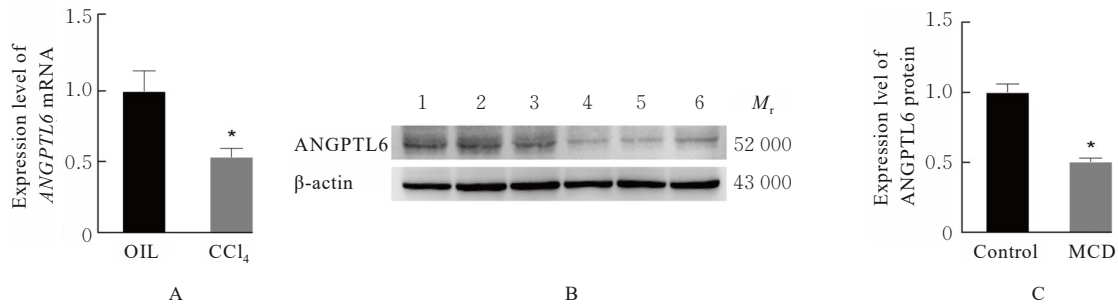
Fig. 1 Analysis of GEO data for two types of HSCs



A, B: Ultrasonographic findings; C, D: liver appearances; A, C: OIL groups; B, D: CCl_4 group. Red arrow: Ultrasound images of liver sections of mice in two groups.

图2 2组小鼠超声检查结果(A~B)及肝脏外观(C~D)

Fig. 2 Ultrasonographic findings (A-B) and liver appearances (C-D) of mice in two groups



Lane 1-3: Control group; Lane 4-6: MCD group. * $P < 0.05$ compared with OIL group or control group.

图3 2组小鼠肝组织中ANGPTL6 mRNA表达水平(A)和ANGPTL6蛋白表达电泳图(B)及直条图(C)

Fig. 3 Expression levels of ANGPTL6 mRNA (A) and electrophoregram (B) and histogram (C) of expressions of ANGPTL6 protein in liver tissue of mice in two groups

CD63-mCherry-L7ae融合质粒表达成功且转染效率高。此外, pcDNA-GFP-Ha (KT) 质粒转染后, GFP蛋白大量表达且转染效率较高。见图5。经试剂盒提取的工程化Exo, 采用Nanosight粒径分析和电镜鉴定, 结果显示: 囊泡直径约为100 nm, 且电镜下呈现“茶托状”及双层囊膜样外观。见图6。证实由细胞上清中成功提取出结构完整的工程化Exo。

2.5 肝脏中工程化Exo的分布情况 小鼠尾静脉注射24 h后, 荧光活体成像系统切换为GFP荧光模式, 通过检测到强烈的荧光信号显示GFP蛋白在肝脏中大量表达。见图7。提示经尾静脉注射的工程化Exo成功在肝脏中富集, 且投递的mRNA能够高效翻译。

2.6 各组小鼠血清中ALT和AST活性 与OIL+PBS组比较, CCl_4 +Exo-GFP mRNA组小鼠血清中ALT和AST活性均明显升高 ($P < 0.05$)。与 CCl_4 +Exo-ANGPTL6 mRNA组比较, CCl_4 +Exo-GFP mRNA组小鼠血清中ALT和AST活性均明显降低 ($P < 0.05$)。见表2。

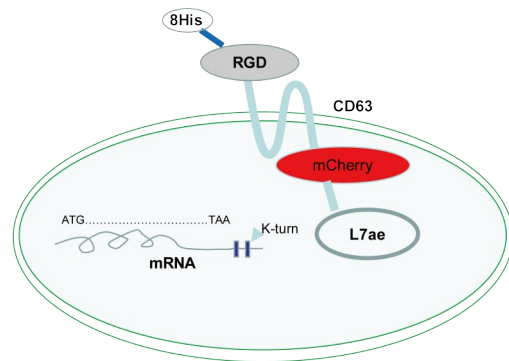
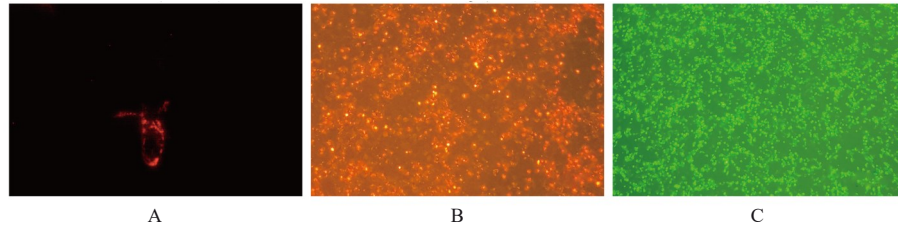


图4 工程化Exo吸附特异mRNA原理图

Fig. 4 Schematic diagram of absorption of specific mRNA by engineered Exo

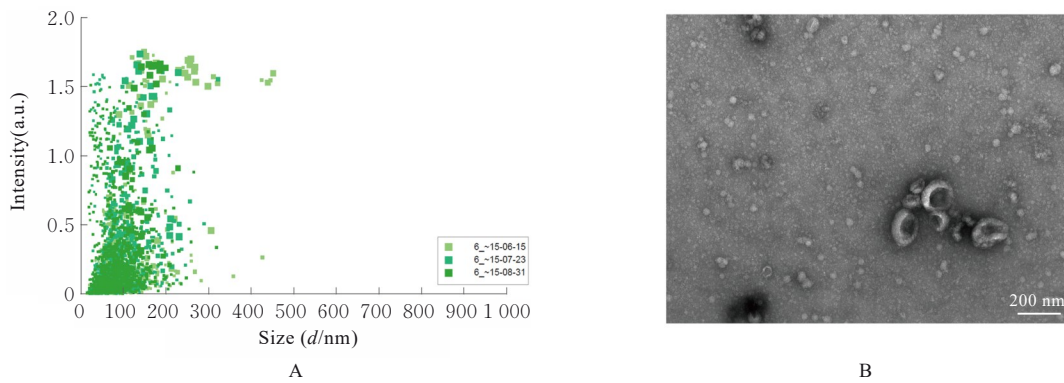
2.7 各组小鼠肝组织中Flag和 α -SMA蛋白表达水平和胶原沉积情况 在 CCl_4 +Exo-ANGPTL6 mRNA组中Flag蛋白大量表达, 证实工程化Exo投递的ANGPTL6 mRNA在肝脏中翻译表达。见图8。与OIL+PBS组比较, CCl_4 +Exo-GFP mRNA组小鼠肝脏胶原沉积明显增加, 相对胶原面积增加 ($P <$



A:CD63 (×200);B: mCherry (×200); C:GFP (×10).

图5 工程化Exo相关荧光蛋白表达情况

Fig. 5 Expression of fluorescen proteins associated with engineered Exo



A: Particle size analysis. B: Electron microscopic identification

图6 工程化Exo粒径分析和电镜鉴定

Fig. 6 Particle size analysis and electron microscopic identification of engineered Exo

0.05); 与 $\text{CCl}_4 + \text{Exo-GFP mRNA}$ 组比较, $\text{CCl}_4 + \text{Exo-ANGPTL6 mRNA}$ 组小鼠肝脏胶原沉积明显减少, 相对胶原面积减少 ($P < 0.05$)。与 $\text{OIL} + \text{PBS}$ 组比较, $\text{CCl}_4 + \text{Exo-GFP mRNA}$ 组小鼠肝组织中 $\alpha\text{-SMA}$ 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 $\text{CCl}_4 + \text{Exo-GFP mRNA}$ 组比较, $\text{CCl}_4 + \text{Exo-ANGPTL6 mRNA}$ 组小鼠肝组织中 $\alpha\text{-SMA}$ 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图9和表3。

2.8 各组小鼠肝组织中纤维化相关基因表达水平

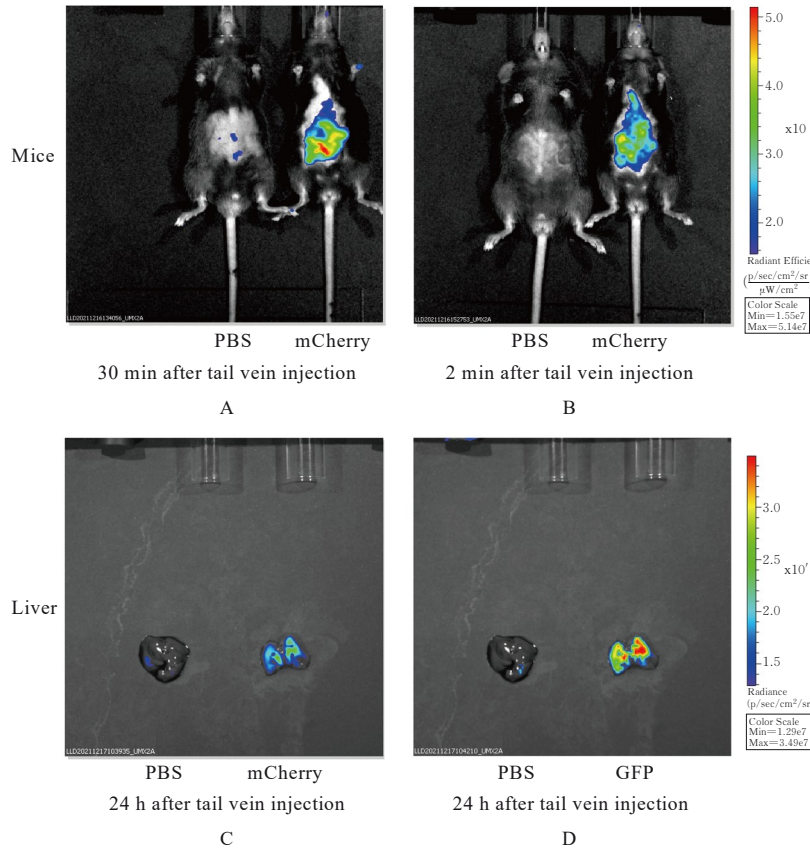
与 $\text{OIL} + \text{PBS}$ 组比较, $\text{CCl}_4 + \text{Exo-GFP mRNA}$ 组小鼠肝组织中 *Colla1*、 $\alpha\text{-SMA}$ 、*TGF- β 1* 和 *TIMP-1* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 $\text{CCl}_4 + \text{Exo-GFP mRNA}$ 组比较, $\text{CCl}_4 + \text{Exo-ANGPTL6 mRNA}$ 组小鼠肝脏组织中 *Colla1*、 $\alpha\text{-SMA}$ 、*TGF- β 1* 和 *TIMP-1* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图10。

3 讨论

肝脏纤维化是一种复杂的病理过程, 涉及多种细胞和分子机制的相互作用, 在这一过程中, HSC 扮演了关键角色^[14]。在正常肝脏中, HSC 处于静

止状态; 当处于慢性肝损伤时, HSC 被激活并转化为肌成纤维细胞, 分泌大量细胞外基质, 导致纤维化的发生^[15-17]。本研究结果显示: *ANGPTL6* 在活化的 HSC 中表达下调, 提示 *ANGPTL6* 可能在维持 HSC 静止状态中发挥重要作用。此外, *ANGPTL6* 在 2 种小鼠肝纤维化模型中的表达呈现一致性下调, 进一步表明 *ANGPTL6* 的表达水平与肝纤维化的进展存在密切的负相关关系。

在肝纤维化的治疗探索中, 工程化 Exo 作为一种新兴的药物递送系统, 逐渐受到广泛关注^[18]。工程化 Exo 是一种通过生物工程或化学工程策略设计并装载的递送系统, 其设计策略包括构建含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 的纤维化组织靶向肽、Exo 分子标志物 CD63、古细菌核糖体蛋白 L7ae、kink-turn (KT) 碱基序列和 mCherry 荧光示踪蛋白等功能分子^[19-20]。基于 Exo 自身的特性, 工程化 Exo 具有高效、特异性递送药物的优势^[21-22]。本研究结果显示: 从 HEK293T 细胞中提取的工程化 Exo 经过 Nanosight 粒径分析和电镜鉴定, 其直径约为 100 nm, 且具有典型的双层囊膜结构, 表明工程化 Exo 提取成功。通过尾静



A: Expression of mCherry fluorescence signal in mice 30 min after tail vein injection of engineered exosomes; B: Expression of mCherry fluorescence signal in mice 2 h after injection; C: Expression of mCherry fluorescence signal in liver 24 h after injection; D: Expression of GFP fluorescence signal in liver 24 h after injection.

图7 肝脏中工程化Exo的分布情况

Fig. 7 Distribution of engineered Exo in liver

表2 各组小鼠血清中ALT和AST活性

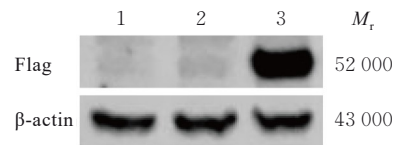
Tab. 2 Activities of ALT and AST in serum of mice in various groups [n=6, $\bar{x} \pm s$, $\lambda_B / (U \cdot L^{-1})$]

Group	ALT	AST
OIL+PBS	27.42±10.02	25.35±6.31
CCl ₄ +Exo-GFP mRNA	262.80±17.07*	189.20±25.15*
CCl ₄ +Exo-ANGPTL6 mRNA	51.07±6.93 [△]	59.16±7.39 [△]

*P<0.05 compared with OIL+PBS group; [△]P<0.05 compared with CCl₄+Exo-GFP mRNA group.

脉注射后, 工程化Exo在肝脏中大量富集, 且携带的GFP mRNA在肝脏中高效表达, 提示提取的工程化Exo具有良好的靶向性和递送效率。

肝纤维化是慢性肝病进展的重要病理特征, 与血清转氨酶AST和ALT活性密切相关。血清AST和ALT活性是肝损伤的常用生物标志物, 其升高与肝细胞损伤程度相关^[23]。在肝纤维化过程中, 胶原沉积是关键环节, 其合成增加和降解减少均可



Lane 1: OIL+PBS group; Lane 2: CCl₄+Exo-GFP mRNA group; Lane 3: CCl₄+Exo-ANGPTL6 mRNA group.

图8 Western blotting法检测尾静脉注射工程化Exo后肝组织中Flag蛋白表达电泳图

Fig. 8 Electrophoregram of expressions of Flag protein in liver tissue of mice after engineered Exo injection via tail vein detected by Western blotting method

导致纤维化的发生^[24-25]。在HSC活化过程中, 其特征性标志物 α -SMA和Colla1的表达水平显著上调^[26]。这一活化过程受到多种细胞因子的精密调控, 其中TGF- β 1作为关键的促纤维化因子, 能够有效诱导纤维胶原和 α -SMA的合成^[27]。同时, TIMP-1通过抑制基质金属蛋白酶的活性, 阻碍胶原降解, 加剧胶原沉积^[28]。本研究结果显示:

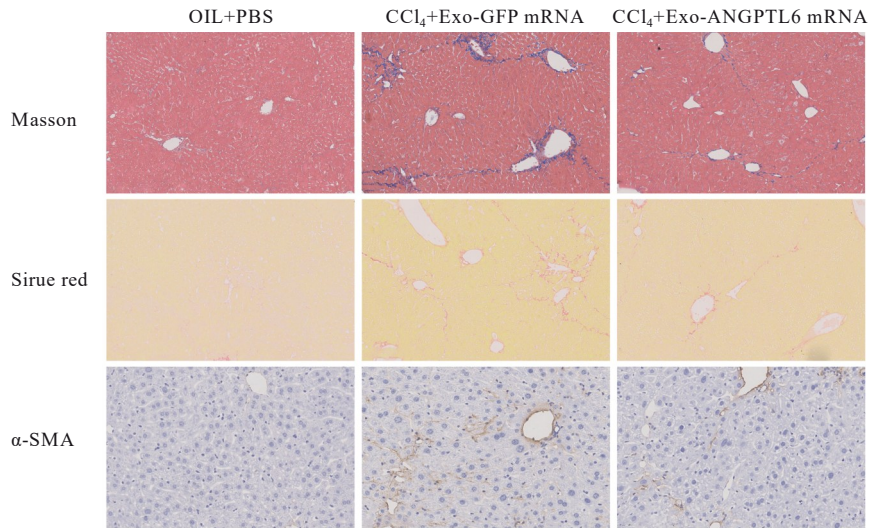


图9 Masson染色、天狼猩红染色和免疫组织化学法检测各组小鼠肝组织中胶原沉积及检测肝组织中 α -SMA蛋白表达情况($\times 200$)

Fig. 9 Collagen deposition in liver tissue expressions of α -SMA protein in liver tissue of mice in various groups detected by Masson, Sirius red staining and immunohistochemistry staining ($\times 200$)

表3 各组小鼠肝组织中相对胶原面积和 α -SMA蛋白表达水平

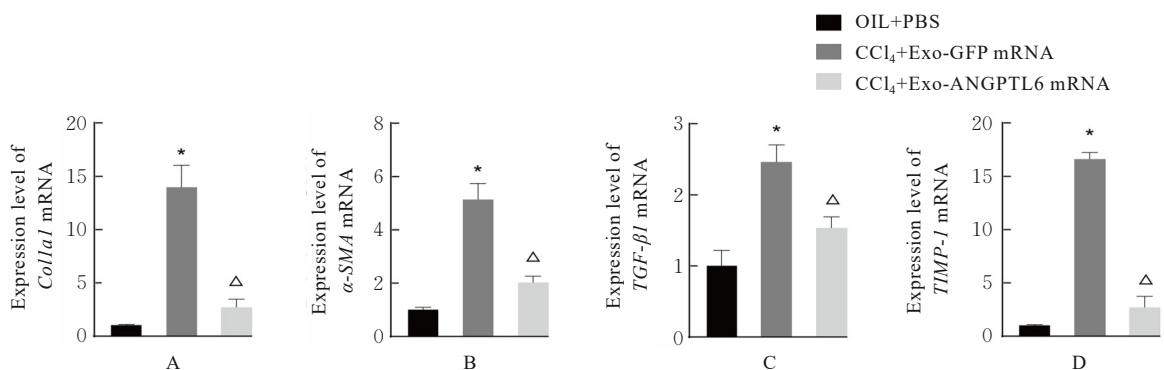
Tab. 3 Relative collagen areas and expressions levels of α -SMA protein in liver tissue of mice in various groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Masson	Sirius red	α -SMA
OIL+PBS	0.72 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.46 ± 0.08
CCl_4 +Exo-GFP mRNA	$5.16 \pm 0.78^*$	$1.21 \pm 0.09^*$	$1.87 \pm 0.13^*$
CCl_4 +Exo-ANGPTL6 mRNA	$1.31 \pm 0.22^\Delta$	$0.61 \pm 0.04^\Delta$	$1.07 \pm 0.12^\Delta$

* $P < 0.05$ compared with OIL+PBS group; $^\Delta P < 0.05$ compared with CCl_4 +Exo-GFP mRNA group.

CCl_4 +Exo-ANGPTL6 mRNA组小鼠血清ALT和AST活性明显降低,表明ANGPTL6能够减轻肝

脏损伤。此外, Masson和天狼猩红染色结果显示, CCl_4 +Exo-ANGPTL6 mRNA组小鼠的肝脏胶原沉积明显减少,提示ANGPTL6具有显著的抗纤维化作用。免疫组织化学法和Western blotting法检测结果进一步证实: CCl_4 +Exo-ANGPTL6 mRNA组小鼠肝组织中ANGPTL6蛋白表达水平明显升高,而纤维化相关基因(如 α -SMA、*Colla1*、*TGF- β 1*和*TIMP-1*)表达水平明显下调,表明ANGPTL6可能通过抑制纤维化相关基因的表达,减轻了肝纤维化的程度。已有研究^[29-30]表明:成纤维细胞生长因子21(Fibroblast growth factor 21, FGF21)是改善肝脏纤维化的关键因子,而ANGPTL6可调控FGF21的表达和分泌^[31]。因此,ANGPTL6在改



A: *Col1a1* mRNA; B: α -SMA mRNA; C: *TGF- β 1* mRNA; D: *TIMP-1* mRNA. * $P < 0.05$ compared with OIL+PBS group; $^\Delta P < 0.05$ compared with CCl_4 +Exo-GFP mRNA group.

图10 RT-qPCR法检测各组小鼠肝组织中纤维化相关基因表达水平

Fig. 10 Expression levels of fibrosis-related genes in liver tissue of mice in various groups detected by RT-qPCR method

善肝脏纤维化的过程中是否通过FGF21途径发挥作用,值得进一步探索。

综上所述,本研究通过工程化Exo递送ANGPTL6 mRNA至纤维化肝脏,证实了ANGPTL6在减轻肝脏损伤和抑制纤维化中的重要作用。本研究为肝纤维化的治疗提供了新的思路和策略。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

唐小茜参与研究设计、实验操作和论文撰写,温升聪参与实验质量控制和统计学分析,董振亚参与实验数据收集与分析,陈静仪参与实验数据收集和实验质量控制,曹煜参与参考文献整理,张云华参与研究设计、实验质量控制和论文审校。

[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] WANG Y K, WANG M Q, LIU C R, et al. Global burden of liver cirrhosis 1990-2019 and 20 years forecast: results from the global burden of disease study 2019[J]. *Ann Med*, 2024, 56(1): 2328521.
- [4] MOHAMMED O S, ATTIA H G, MOHAMED B M S A, et al. Current investigations for liver fibrosis treatment: between repurposing the FDA-approved drugs and the other emerging approaches [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2023, 26: 11808.
- [5] ZHANG C Y, LIU S, YANG M. Treatment of liver fibrosis: Past, current, and future[J]. *World J Hepatol*, 2023, 15(6): 755-774.
- [6] OIKE Y, YASUNAGA K, ITO Y, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(16): 9494-9499.
- [7] OIKE Y, AKAO M, YASUNAGA K, et al. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance[J]. *Nat Med*, 2005, 11(4): 400-408.
- [8] HOSTETTLER I C, O' CALLAGHAN B, BUGIARDINI E, et al. ANGPTL6 genetic variants are an underlying cause of familial intracranial aneurysms[J]. *Neurology*, 2021, 96(6): e947-e955.
- [9] WANG Z H, TANG M Z, RONG Y, et al. ANGPTL6 can be used as potential biomarkers for the diagnosis and prognosis of thyroid cancer [J]. *Asian J Surg*, 2024, 47(7): 3079-3081.
- [10] QADDOUMI M G, ALANBAEI M, HAMMAD M M, et al. Investigating the role of myeloperoxidase and angiopoietin-like protein 6 in obesity and diabetes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6170.
- [11] ABELS E R, BREAKFIELD X O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(3): 301-312.
- [12] RAFIEEZADEH D. Extracellular vesicles and their therapeutic applications; a review article (part 2) [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2024, 16(4): 81-88.
- [13] FAN W G, LIU T H, CHEN W, et al. ECM1 prevents activation of transforming growth factor β , hepatic stellate cells, and fibrogenesis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(5): 1352-1367.e13.
- [14] HORN P, TACKE F. Metabolic reprogramming in liver fibrosis [J]. *Cell Metab*, 2024, 36(7): 1439-1455.
- [15] KAMM D R, MCCOMMIS K S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology [J]. *J Physiol*, 2022, 600(8): 1825-1837.
- [16] ZHANG M F, SERNA-SALAS S, DAMBA T, et al. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives [J]. *Mech Ageing Dev*, 2021, 199: 111572.
- [17] KONG M, ZHOU J J, KANG A Q, et al. Histone methyltransferase Suv39h1 regulates hepatic stellate cell activation and is targetable in liver fibrosis [J]. *Gut*, 2024, 73(5): 810-824.
- [18] DING J, XU C, XU M, et al. Emerging role of engineered exosomes in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World J Hepatol*, 2023, 15(3): 386-392.
- [19] KOJIMA R, BOJAR D, RIZZI G, et al. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1305.
- [20] SAITO H, KOBAYASHI T, HARA T, et al. Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(1): 71-78.
- [21] LIANG Y J, DUAN L, LU J P, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-3195.
- [22] URABE F, KOSAKA N, ITO K, et al. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(1):

- C29-C39.
- [23] AMERNIA B, MOOSAVY S H, BANOOKH F, et al. FIB-4, APRI, and AST/ALT ratio compared to FibroScan for the assessment of hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease in Bandar Abbas, Iran[J]. *BMC Gastroenterol*, 2021, 21(1): 453.
- [24] DUAN B W, LIU Y J, LI X N, et al. An autologous macrophage-based phenotypic transformation-collagen degradation system treating advanced liver fibrosis [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(7): 2306899.
- [25] XUE X Y, ZHAO X T, WANG J, et al. Carthami flos extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis *via* alleviating angiogenesis in mice [J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154517.
- [26] XU S X, CHEN Y E, MIAO J D, et al. Esculin inhibits hepatic stellate cell activation and CCl₄-induced liver fibrosis by activating the Nrf2/GPX4 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155465.
- [27] WANG C, ZHANG S L, LI Y Z, et al. Phillygenin inhibits TGF- β 1-induced hepatic stellate cell activation and inflammation: regulation of the bax/bcl-2 and Wnt/ β -catenin pathways [J]. *Inflammation*, 2024, 47(4): 1403-1422.
- [28] MEDEIROS T, SARAIVA G N, MORAES L A, et al. Liver fibrosis improvement in chronic hepatitis C after direct acting-antivirals is accompanied by reduced profibrogenic biomarkers-a role for MMP-9/TIMP-1 [J]. *Dig Liver Dis*, 2020, 52(10): 1170-1177.
- [29] JI Y, DUAN Y L, LI Y Y, et al. A long-acting FGF21 attenuates metabolic dysfunction-associated steatohepatitis-related fibrosis by modulating NR4A1-mediated Ly6C phenotypic switch in macrophages [J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(16): 2923-2946.
- [30] YANG J, CHEN L, ZHAO S S, et al. FGF21-dependent alleviation of cholestasis-induced liver fibrosis by sodium butyrate [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1422770.
- [31] KANG S G, YI H S, CHOI M J, et al. ANGPTL6 expression is coupled with mitochondrial OXPHOS function to regulate adipose FGF21 [J]. *J Endocrinol*, 2017, 233(1): 105-118.