

弗林蛋白酶靶向同源性磷酸-张力蛋白调控线粒体自噬及肝纤维化进展

宋彦威¹, 付振美², 徐静怡¹, 马铭泽¹, 孙琳琳³

(1. 山东第一医科大学附属省立医院感染性疾病科, 山东 济南 250021;

2. 山东第一医科大学附属省立医院医学影像科, 山东 济南 250021;

3. 山东第一医科大学附属省立医院介入诊疗科, 山东 济南 250021)

摘要: **目的** 探讨弗林蛋白酶在肝纤维化发生发展中的调控作用及相关分子机制。**方法** 将40只C57小鼠随机分为弗林蛋白酶过表达组和对照组, 每组20只, 腹腔注射四氯化碳诱导小鼠肝纤维化动物模型, 诱导8周。弗林蛋白酶过表达组小鼠在四氯化碳诱导4周后, 尾静脉注射弗林蛋白酶过表达转染质粒至实验结束, 对照组尾静脉注射无意义对照质粒, 观察弗林蛋白酶调控小鼠肝纤维化进展的作用效应; 采用Nycodenz密度梯度分离法分离C57小鼠肝脏原代星状细胞并进行体外培养; 采用免疫组织化学/免疫荧光染色法检测弗林蛋白酶在肝纤维化/肝硬化组织的表达及定位; 采用Western blotting法检测组织及细胞蛋白表达水平; 采用CCK8法检测弗林蛋白酶处理后肝星状细胞的增殖活力; 采用Transwell法检测不同处理组细胞迁移能力变化; 采用流式细胞法及免疫荧光染色法检测不同处理组细胞线粒体膜电位变化。**结果** 弗林蛋白酶在肝硬化组织及活化的原代肝星状细胞中呈显著阳性。弗林蛋白酶处理组肝星状细胞活化、增殖及迁移能力显著受到抑制($P < 0.05$); 对照组肝星状细胞活化、增殖以及迁移能力未受影响。弗林蛋白酶处理组肝星状细胞线粒体膜电位显著下降, 对照组无明显下降($P < 0.05$); 敲低同源性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog-long, PTEN-L)表达后肝星状细胞线粒体膜电位也显著下降($P < 0.05$), 敲低对照组线粒体膜电位无明显改变。四氯化碳化学诱导实验中, 弗林蛋白酶过表达组小鼠肝纤维化病变程度较轻, 对照组小鼠出现较严重的肝纤维化组织学改变。**结论** 弗林蛋白酶通过靶向作用PTEN-L, 增强肝星状细胞线粒体自噬, 抑制其活化及小鼠肝纤维化进展。

关键词: 肝星状细胞; 肝纤维化; 弗林蛋白酶; 线粒体自噬; 同源性磷酸酶-张力蛋白

中图分类号: R575

文献标志码: A

Furin regulates mitophagy and liver fibrosis progression through phosphatase and tensin homolog-long in mouse

SONG Yanwei¹, FU Zhenmei², XU Jingyi¹, MA Mingze¹, SUN Linlin³

(1. Department of Infectious Diseases, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China; 2. Department of Radiology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China; 3. Department of Interventional Therapy, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory role of Furin in the progression of liver fibrosis and the molecular mechanisms involved. **Methods** Forty C57 mice were randomly divided into the Furin overexpression group and the control group, with 20 mice in each group. The mice were intraperitoneally injected with CCL4 to induce animal models

of liver fibrosis for 8 weeks. Four weeks after CCL4 induction, mice in the Furin overexpression group received tail vein injections of Furin expression transfection plasmids until the end of the experiment, while the control group was injected with empty control plasmids. The effect of Furin on the progression of liver fibrosis was investigated. Primary hepatic stellate cells from C57 mice were isolated by the Nycodenz density gradient separation method and cultured *in vitro*. The expression and localisation of Furin in liver fibrosis/cirrhosis tissues were detected by immunohistochemistry / immunofluorescence staining assay. Protein expression levels in tissues and cells were detected by Western blotting. The proliferation activity of Furin-treated hepatic stellate cells was detected by CCK-8 assay. Changes in cell migration ability of each group by different treatments were detected by Transwell assay. Changes in mitochondrial membrane potential of cells in different treatment groups were detected by flow cytometry and immunofluorescence staining. **Results** Furin was significantly upregulated in cirrhosis tissues and activated primary hepatic stellate cells. The activation, proliferation and migration abilities of hepatic stellate cells in the Furin treatment group were significantly inhibited ($P < 0.05$), while those in the control group were not affected. The mitochondrial membrane potential of hepatic stellate cells in the Furin treatment group was significantly decreased, while that in the control group was not significantly changed ($P < 0.05$). The mitochondrial membrane potential of stellate cells also decreased significantly in PTEN-L knockdown experiments ($P < 0.05$), while there were no significant changes in the control group. In CCl₄-induced liver fibrosis mice, the severity of liver fibrosis was milder in Furin overexpression group mice, while the control group mice showed more severe histological changes of liver fibrosis. **Conclusion** Furin targets PTEN-L to enhance hepatic stellate cell mitophagy and inhibit hepatic stellate cell activation and progression of liver fibrosis in mice.

Key words: Hepatic stellate cells; Liver fibrosis; Furin; Mitophagy; Phosphatase and tensin homolog-long

急慢性肝脏疾病是临床常见病、多发病。肝纤维化以及肝硬化是临床多种慢性肝病进展的严重病理阶段,其主要病因包括嗜肝病毒感染、非酒精性脂肪性肝病、代谢性肝病、自身免疫性肝病等^[1]。肝纤维化以及肝硬化病变的主要特征表现为肝星状细胞持续活化及细胞外基质过度沉积所导致的反复损伤-修复过程,最终导致肝脏假小叶形成和组织结构不可逆损伤,甚至进展为肝细胞肝癌^[2-3]。肝纤维化是一种可逆性病理改变,但目前缺乏有效逆转手段。

肝星状细胞又称 Ito 细胞、肝贮脂细胞,其活化状态称为肌成纤维样细胞^[4]。肝星状细胞活化后大量表达胶原纤维并分泌促纤维化细胞因子,抑制胶原纤维降解,其活化过程是肝纤维化进展的关键促进环节^[5]。

肝星状细胞活化受到转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等细胞因子、线粒体自噬的调节^[6];其中线粒体自噬在调控星状细胞活化过程中起关键作用^[7]。既往研究显示,抑制线粒体自噬促进肝星状细胞持续活化,上调线粒体自噬抑制肝星状细胞活化^[8-10]。线粒体自噬最重要的调控途径是磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1)/帕金森蛋白 (Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase, Parkin) 依赖性通路,其中 PINK1 作为触发线粒体自

噬的起始信号,负责招募 Parkin 至线粒体;Parkin 可被视为线粒体自噬“增强子”,对线粒体蛋白进行泛素化介导并放大自噬信号^[11-14]。

人第 10 号染色体缺失的同源性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog-long, PTEN-L)分子是 PINK1/Parkin 依赖性线粒体自噬通路中的重要抑制性调控因子,对维持线粒体稳态具有重要作用^[11-12]。既往研究显示,弗林蛋白酶具有靶向剪切 PTEN-L 的生物学功能,为探讨相关分子机制提供了重要参考。弗林蛋白酶是内切蛋白酶中的重要一员,可剪切激素、生长因子、基质金属蛋白酶、信号转导分子等^[15-17]。目前,弗林蛋白酶与器官纤维化相关研究较少,与肝纤维化进展的关系尚不明确。因此,深入研究肝星状细胞活化的调控机制,有助于揭示肝硬化及肝纤维化发生机制新的分子靶点。

本研究通过探讨弗林蛋白酶调控线粒体自噬及肝星状细胞活化的效应,揭示弗林蛋白酶对小鼠肝纤维化进展的影响及其发挥效应的关键通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8~10 周龄雄性 C57 品系小鼠 40 只,体质量 17~

22 g,均由山东第一医科大学实验动物学院(山东省实验动物中心)提供。本研究通过山东第一医科大学附属省立医院动物伦理委员会审批(NSFC-2023-119)。实验动物处理过程符合相关伦理要求。

1.1.2 主要试剂与仪器

Hank 平衡液、杜氏改良培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)细胞培养液购自美国 Gibco 公司;胶原酶购自美国 SIGMA 公司;Nycodenz 密度梯度分离液购自挪威 Axis-Shield 公司;弗林蛋白酶过表达质粒购自广州复能基因有限公司;转染试剂 Lipofectamine3000 购自美国 Invitrogen 公司;天狼星红染色试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;弗林蛋白酶抗体 Anti-Furin antibody 购自英国 Abcam 公司;DAB 显色试剂盒购自江苏连云港伊势久生物科技有限责任公司(WB001); α -SMA 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司;组织蛋白提取试剂盒(tissue protein extraction reagent, T-PER)购自美国 Thermo 公司;IP 裂解液购自江苏碧云天生物技术有限公司;荧光 II 抗[Anti-rabbit IgG(H+L)(Dylight™ 800 Conjugate#5151)、荧光 II 抗 Anti-mouse IgG(H+L)(Dylight™ 680 Conjugate# 5470)]购自美国 Earth-hox 公司;JC-1 染色工作液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;正置光学显微镜购自日本 Olympus 公司;正置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;红外荧光成像分析仪器购自美国 Li-COR 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原代肝星状细胞分离与体外培养

采用密度梯度分离法从 C57 小鼠肝脏中分离原代肝星状细胞。采用腹腔注射氯胺酮(60~100 mg/kg)、甲苯噻嗪(20 mg/kg)和阿托品(1 mg/kg)混合液进行麻醉。开腹、经门静脉快速灌注 Hank's 平衡盐溶液、pronase E 溶液、胶原酶 H 溶液。随后浸入 Hank's 缓冲液中进一步消化。所得悬浮液过滤后,应用 Nycodenz 密度梯度(分离液浓度为 8.2%),2 400 r/min 离心 25 min。所得细胞接种于无菌培养皿中,添加 DMEM 培养液(含胎牛血清)进行培养。所有原代造血干细胞在体外培养,37 °C、5%CO₂ 条件下细胞培养 7 d。

1.2.2 四氯化碳诱导小鼠肝纤维化动物模型构建

采用 C57BL/6J 小鼠建立四氯化碳诱导肝纤维化模型,在特定无病原体(specific pathogen free, SPF)条件下饲养。将四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠分为弗林蛋白酶过表达组和对照组。小鼠造模:采用四氯化碳(0.5 μ L/g)以橄榄油稀释(稀释比,1:3),腹腔注射,每周 2 次,连续注射 8 周。处死小鼠,鼠肝标本用福尔马林溶液固定。弗林蛋白酶过表达组小鼠在四氯化碳诱导 4 周后,尾静脉注射弗林蛋白酶表达转染质粒至实验结束,空载质粒对照组注射无意义质粒(无过表达效能)。

1.2.3 采用苏木精-伊红染色和天狼星红染色法检测小鼠肝组织纤维化

小鼠肝组织用福尔马林溶液固定,浸入梯度乙醇脱水,石蜡包埋。切成 5 μ m 组织切片,进行脱蜡至水化,采用天狼星红和苏木精-伊红染色。整张切片浸入天狼星红染色液中染色 1 h,自来水缓慢冲洗 4 min,再将切片置入梯度乙醇进行脱水。中性树胶封片后进行显微镜观察并记录肝组织纤维化图像。肝组织切片脱蜡至水化,苏木精-伊红浸染 3 min,1%盐酸乙醇分化,0.5%伊红染色液染色 2 min、梯度乙醇脱水至二甲苯,自然晾干,中性树胶封片,光学显微镜下观察并记录肝组织纤维化图像。

1.2.4 采用免疫组织化学法检测人肝组织内弗林蛋白酶表达

人肝组织切片,通过脱蜡至水化,并进行热抗原修复(0.01 mol/L 柠檬酸钠抗原)。应用双氧水清除内源性过氧化物酶活性,胎牛血清进行抗原封闭。进行 I 抗(弗林蛋白酶)孵育,4 °C 过夜反应。II 抗孵育在室温进行 1 h。DAB 显色结束后,苏木精进行细胞核染色,自来水终止反应。将切片浸入梯度乙醇进行脱水处理至透明化,中性树胶封片后在显微镜下观察,由两名有经验的病理医师分别进行结果判读。

1.2.5 采用细胞免疫荧光染色法检测小鼠原代肝星状细胞相关物质表达及共定位

将细胞悬液以 1×10^4 /孔的密度接种于细胞培养板中,过夜培养贴壁生长。原代肝星状细胞进行爬片实验前,需要用纤黏蛋白处理玻片。使用 2%多聚甲醛固定细胞,以 Triton X-100 液处理细

胞,以5%BSA溶液进行封闭操作,滴加I抗溶液,4℃孵育反应过夜。次日,荧光II抗溶液孵育,避光、室温反应75 min。洗涤后,滴加DAPI溶液行细胞核染色,封片剂处理玻片,使用荧光显微镜或者共聚焦显微镜进行观察并记录小鼠原代肝星状细胞静止期及活化期弗林蛋白酶、 α 平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α -SMA)、肌间线蛋白的表达以及线粒体外膜蛋白质转运体20(translocator of the outer mitochondrial membrane 20, Tom20)、细胞自噬受体蛋白(optineurin, OPTN)共定位图像。

1.2.6 采用Western blotting法检测蛋白表达水平

组织蛋白的提取采用T-PER试剂,细胞蛋白提取应用IP裂解液。蛋白抽提后进行BCA蛋白浓度测定。提取蛋白后进行SDS-PAGE凝胶恒定电压电泳,恒流电转膜步骤采用“三明治”结构湿转法至NC膜(Millipore)。NC膜浸入5%BSA溶液中进行封闭,I抗孵育,4℃过夜进行;II抗孵育在室温条件避光进行1 h。荧光II抗孵育结束后,使用LI-COR® Biosciences Odyssey® Infrared Imaging System进行图像扫描,以Tif/JPEG格式保存图像并用Image J软件进行条带灰度值半定量分析。

1.2.7 采用CCK8法检测弗林蛋白酶处理的细胞增殖活力

选择生长状态良好的LX-2细胞,胰酶消化后,制成细胞悬液。将LX-2细胞以3 000个/100 μ L的密度接种至96孔细胞培养板,37℃、5%CO₂条件下培养过夜至细胞贴壁。次日,每孔细胞培养液中加入10 μ L的CCK8溶液,置于细胞培养箱中继续孵育1~4 h。应用酶标仪检测上述混合物在450 nm处的吸光度值,每孔设置至少3复孔,记录所有检测值并进行细胞增殖活性分析。

1.2.8 采用Transwell法检测细胞迁移能力

取对数生长期且生长状态良好的LX-2细胞进行细胞迁移实验,分为TGF- β 处理组和TGF- β 联合弗林蛋白酶处理组。应用胰酶消化LX-2细胞并制备细胞悬液以4 \times 10⁴/200 μ L密度滴加Transwell小室上层,下层加入含胎牛血清的DMEM培养液,连续培养20 h后取出。采用4%多聚甲醛固定穿膜细胞,用0.1%结晶紫对细胞进行染色1 h。将小室

倒置晾干后,在正置光学显微镜下进行观察并记录细胞迁移图像。

1.2.9 采用流式细胞法检测细胞线粒体膜电位变化

首先配置1 \times JC-1 Assay Buffer(JC-1染色缓冲液)以及JC-1染色工作液,将原代肝星状细胞离心后应用PBS重悬并计数。取1 \times 10⁵重悬细胞,300 \times g离心5 min,弃上清。在细胞悬液中加入500 μ L JC-1染色工作液重悬细胞,37℃、5%CO₂条件下培养细胞20 min。取出细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入500 μ L预冷的JC-1 Assay Buffer,洗涤2次。加入500 μ L预冷的JC-1 Assay Buffer重悬细胞,在30 min内上流式细胞仪进行检测不同条件下线粒体膜电位变化情况(E_x = 488 nm; E_m = 530 nm,绿色荧光通过FITC通道为FL1检测;红色荧光通过PI通道为FL2检测)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件和GraphPad Prism 5.0软件系统。多组数值变量资料间比较采用One-way ANOVA分析,数值变量资料两组间比较采用F检验、t检验与Welch校正。弗林蛋白酶处理组和对照组细胞增殖水平、细胞迁移数目的差异比较,先行F检验(即方差齐性检验),当F检验呈显著性,说明不同组别的数据波动不一致,方差不齐。随即采用未配对t检验与Welch校正,不假设SD相等,单尾分析作为代替方法,每组数据均有3次重复实验数据,符合统计学分析要求。弗林蛋白酶处理组和对照组细胞膜电位差异,属于数值变量资料两组间比较,采用t检验,每组均有3次重复实验数据,满足统计学要求。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 弗林蛋白酶在肝硬化组织、活化的原代肝星状细胞中的表达

与正常肝组织相比,弗林蛋白酶在肝硬化组织的纤维分隔区呈显著阳性表达,见图1。活化后的原代肝星状细胞内 α -SMA、弗林蛋白酶呈显著阳性表达,见图2A~C。静止期原代肝星状细胞内 α -SMA、弗林蛋白酶呈显著低表达,见图2D~F。

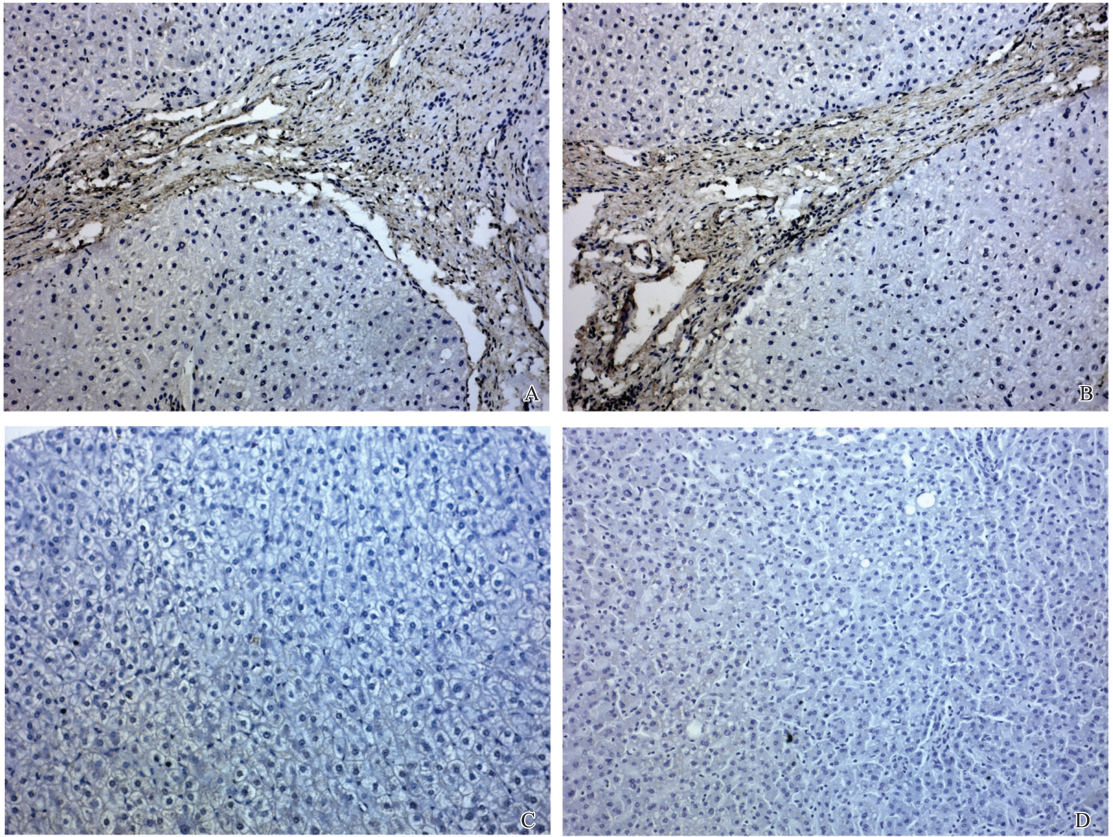


图1 弗林蛋白酶在肝硬化肝组织(A,B)和正常肝组织(C,D)中的表达($\times 100$)
 Figure 1 The expressions of Furin in liver cirrhosis tissue(A,B) and normal liver tissue(C,D) ($\times 100$)

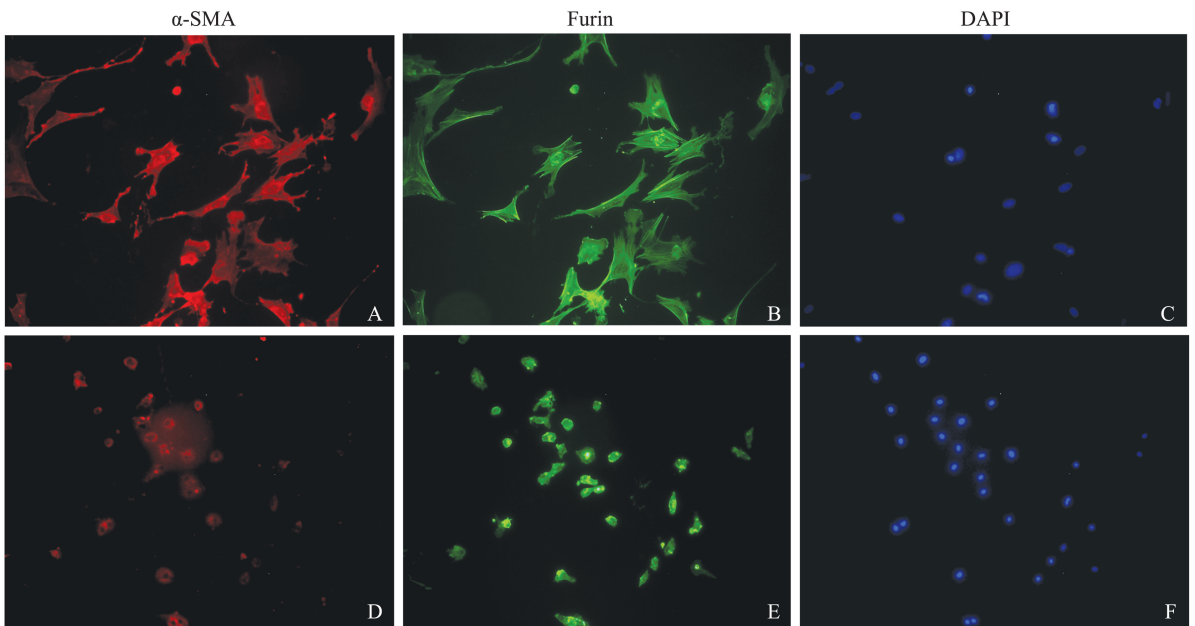


图2 弗林蛋白酶、 α -SMA 和 DAPI 在活化期(A~C)和静止期(D~F)原化肝星状细胞中的表达($\times 200$)
 Figure 2 The expressions of Furin, α -SMA and DAPI in activated(A-C) and quiescent hepatic(D-F) stellate cells($\times 200$)

2.2 弗林蛋白酶对肝星状细胞活化、迁移能力的影响

外源性弗林蛋白酶处理后肝星状细胞活化进程显著延缓(图3A)。与对照组相比,TGF- β 联合弗林蛋白酶处理组肝星状细胞活化物 α -SMA 和

Desmin 表达水平显著降低(图3B), LX-2 细胞 450 nm 处的吸光度值显著降低(图3C), 细胞迁移数目显著下降,显著抑制 LX-2 细胞迁移能力($P < 0.05$,图3D)

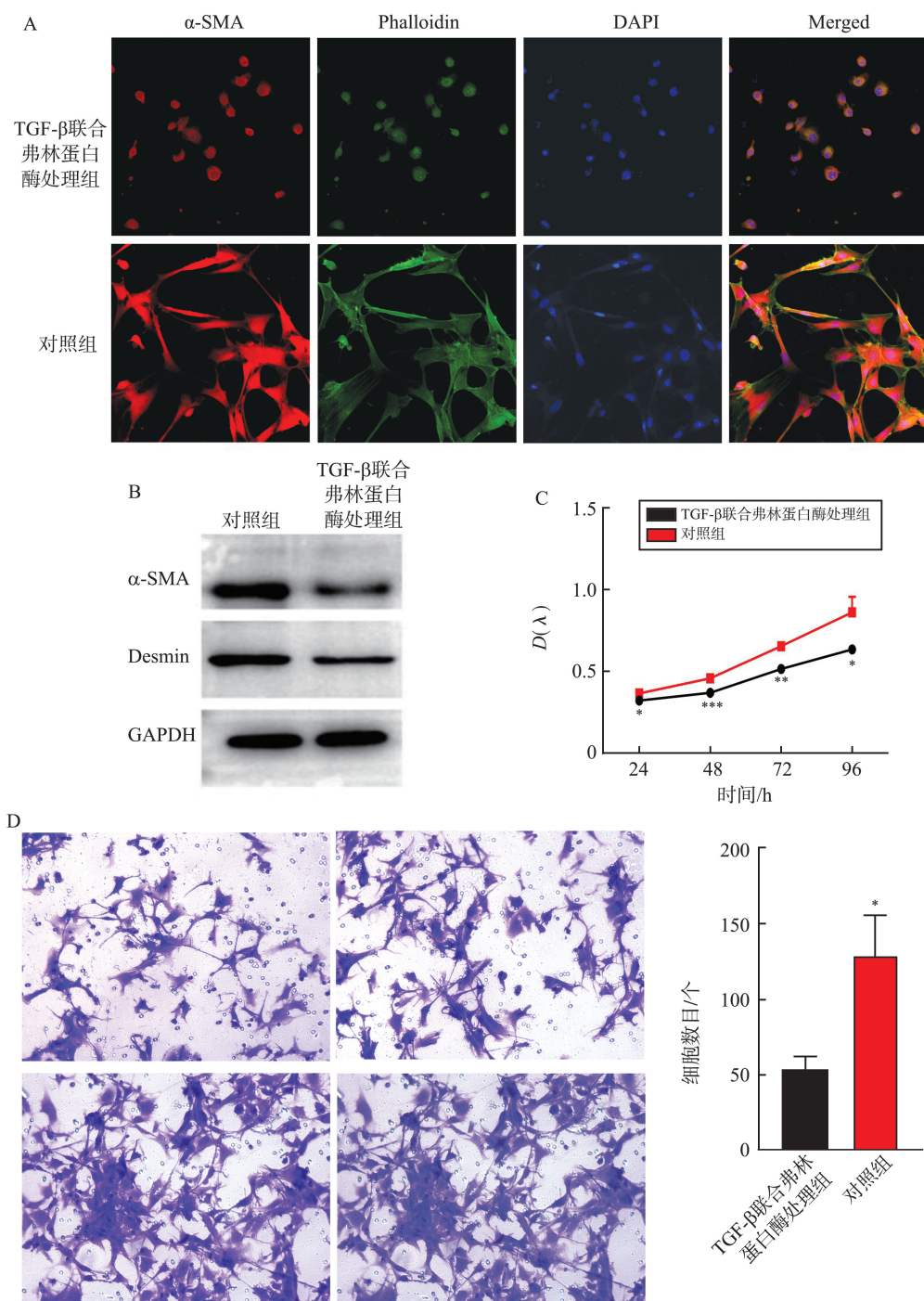


图3 弗林蛋白酶处理组弗林蛋白酶对肝星状细胞活化、迁移能力的影响 ($P < 0.05$ vs. 对照组)

A: TGF- β 联合弗林蛋白酶处理组对肝星状细胞活化的影响; B: TGF- β 联合弗林蛋白酶处理组肝星状细胞活化物 α -SMA及Desmin表达水平; C: TGF- β 联合弗林蛋白酶处理组对LX-2细胞450 nm吸光度值的影响; D: TGF- β 联合弗林蛋白酶处理组对LX-2细胞迁移能力的影响。

Figure 3 Effects of Furin on the activation and migration of hepatic stellate cells ($P < 0.05$ vs. control group)

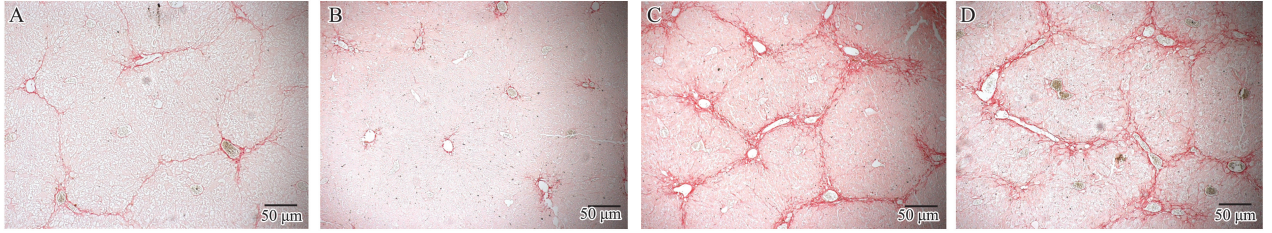
A: Effects of TGF- β combined with Furin treatment on primary hepatic stellate cells; B: Expression levels of activated marker α -SMA and Desmin in primary hepatic stellate cells in the TGF- β combined with Furin treatment group; C: Effects of TGF- β combined with Furin treatment on absorbance value at 450 nm value of LX-2 cells; D: Effects of TGF- β combined with Furin treatment on the migration capacity of LX-2 cells.

2.3 弗林蛋白酶对小鼠肝纤维化进展的影响

弗林蛋白酶过表达组与对照组小鼠在四氯化碳诱导实验中,均出现肝纤维化病理改变;与对照组比

较,弗林蛋白酶过表达组小鼠肝组织纤维化病变明显减轻,见图4A~D;弗林蛋白酶过表达组小鼠肝组织纤维化病变明显减轻,见图4E~H。

天狼星红染色



苏木精-伊色染色

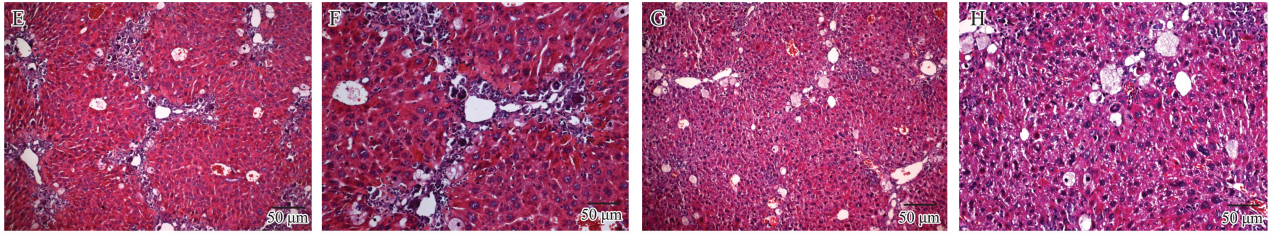


图4 弗林蛋白酶对小鼠肝纤维化进展的影响

A,B: 弗林蛋白酶过表达组小鼠肝纤维化程度减轻; C,D: 四氯化碳诱导对照组小鼠肝纤维化; E,F: 四氯化碳诱导对照组小鼠肝纤维化; G,H: 弗林蛋白酶过表达组小鼠肝纤维化程度减轻。

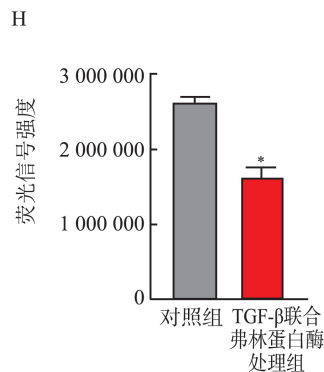
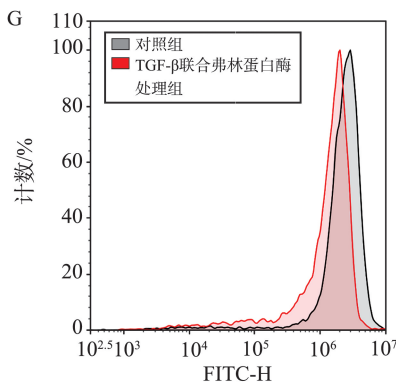
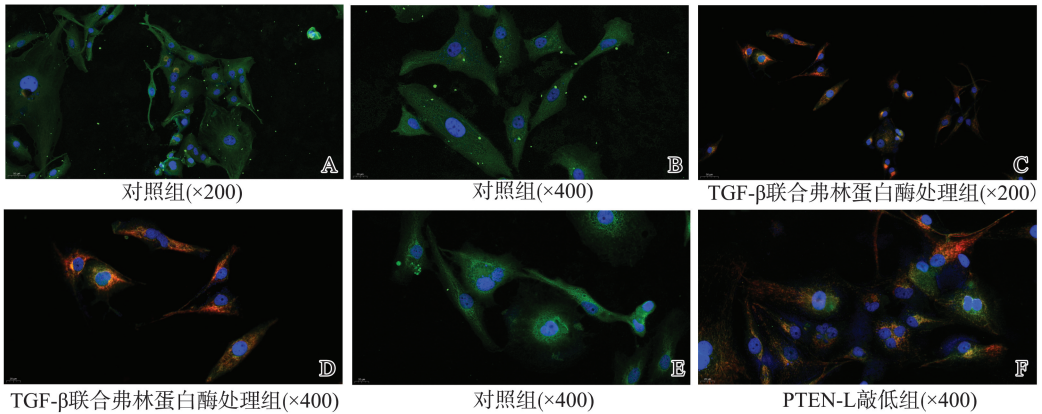
Figure 4 Effects of Furin on the progression of liver fibrosis in mice

A,B: The degree of liver fibrosis in Furin overexpression group was reduced; C,D: CCl₄ induced liver fibrosis in mice in control group; E,F: CCl₄ induced liver fibrosis in mice in control group; G,H: The degree of liver fibrosis was reduced in Furin overexpression group.

2.4 弗林蛋白酶对肝星状细胞线粒体自噬的影响

对照组肝星状细胞 Tom20 与 OPTN 共定位, 见图 5A、B。外源性弗林蛋白酶联合 TGF-β 处理后, 与对照组相比, TGF-β 联合弗林蛋白酶处理组肝星状细胞内 Tom20 与 OPTN 共定位增加, 提示线粒体自噬增强, 见图 5C、D。与对照组相比, PTEN-L 敲低

组肝星状细胞内 Tom20 与 OPTN 共定位增加, 见图 5E、F。TGF-β 联合弗林蛋白酶处理组增强了肝星状细胞线粒体自噬。TGF-β 联合弗林蛋白酶处理组肝星状细胞线粒体膜电位显著下降, 见图 5G、H, 提示线粒体自噬增强。PTEN-L 敲低组线粒体膜电位下降, 见图 5I、J, 提示线粒体自噬增强。



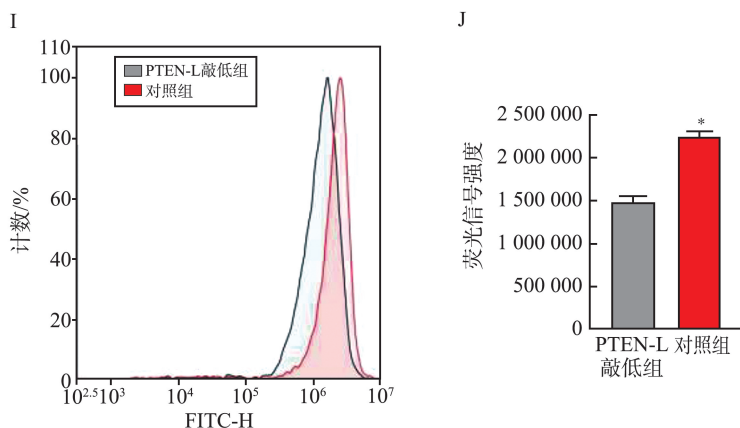


图5 弗林蛋白酶对肝星状细胞线粒体自噬的影响(* $P < 0.05$ vs. 对照组)

A,B: 对照组肝星状细胞 Tom20 与 OPTN 共定位情况; C,D: TGF- β 联合弗林蛋白酶处理增加肝星状细胞 Tom20 与 OPTN 共定位; E,F: PTEN-L 敲低增加肝星状细胞内 Tom20 与 OPTN 共定位; G,H: TGF- β 联合弗林蛋白酶处理致线粒体膜电位下降; I,J: PTEN-L 敲低致线粒体膜电位下降。

Figure 5 Effects of Furin on mitophagy in primary hepatic stellate cells (* $P < 0.05$ vs. control group)

A,B: Co-localisation of Tom20 and OPTN in primary hepatic stellate cells in control group; C,D: Co-localisation of Tom20 and OPTN in primary hepatic stellate cells increased after Furin treatment; E,F: Co-localisation of Tom20 and OPTN in primary hepatic stellate cells increased after PTEN-L knockdown; G,H: Mitochondrial membrane potential decreased with Furin treatment; I,J: Mitochondrial membrane potential decreased after PTEN-L knockdown.

3 讨论

肝纤维化主要由肝炎病毒、乙醇、遗传代谢等多种危险因素引发^[2,18-19],是严重威胁人群健康的常见疾病^[2,3,20-21]。既往研究认为,肝星状细胞活化是肝纤维化/肝硬化发生发展的中心环节^[22]。目前,肝纤维化/肝硬化发病机制尚未阐明,临床亦缺乏治疗肝纤维化进展的有效手段。

Furin 基因编码的弗林蛋白酶是具有重要生理功能的内切蛋白酶。既往研究提示,弗林蛋白酶在肝硬化组织中表达高于正常肝组织^[23]。弗林蛋白酶隶属于胞内丝氨酸 Ca^{2+} 依赖性内肽酶,在内质网和高尔基体中自剪切后活化,活化后剪切、激活众多具有生物功能的蛋白前体,发挥生理作用^[15-16,24]。弗林蛋白酶优先识别切割的氨基酸序列为-Arg-X-Lys/Arg-Arg \downarrow -(\downarrow :切割位点)^[25-26],并对 TGF- β 1、 β -神经生长因子(nerve growth factor- β , β -NGF)等发挥重要的剪切作用^[27-28]。已知弗林蛋白酶促进卵巢癌细胞转移、结直肠癌的发生^[29-32]。但在器官纤维化机制中发挥的作用尚不明确,仅有少量研究提示,在心肌梗死后心肌纤维化发生过程中弗林蛋白酶以及 TGF- β 1 表达显著上调,在肝纤维化方面相关的作用机制尚不明确^[33]。本研究结果显示,弗林蛋白酶在肝硬化组织及活化的原代星状细胞中呈显著阳性表达。弗林蛋白酶不仅降低肝星状细胞增殖活性,也抑制其迁移能力。弗林蛋白

酶抑制了四氯化碳诱导条件下的小鼠肝纤维化的进展。

相关研究结果提示,线粒体自噬在肝星状细胞活化过程中发挥重要的调控效应,其上调可导致肝星状细胞活化减弱,其下调导致肝星状细胞活化增强^[34]。抑制线粒体自噬可显著促进肝纤维化进展;激活线粒体自噬对肝纤维化起抑制作用^[35]。PTEN-L 分子是 PINK1/Parkin 依赖性线粒体自噬途径的经典抑制分子^[35];PTEN-L 具有磷酸酶活性且通过抑制 Parkin 转位及泛素 65 位(pSer65-Ub)磷酸化而发挥抑制线粒体自噬的作用^[36-40]。弗林蛋白酶通过剪切 PTEN-L,可显著逆转其对线粒体自噬的抑制效应^[35]。本研究揭示了肝星状细胞内弗林蛋白酶可通过 PTEN-L 调控线粒体自噬;进一步证实线粒体自噬在肝星状细胞活化过程中的重要调控作用。综上所述,探索线粒体自噬调控机制可成为揭示弗林蛋白酶抑制肝纤维化分子机制的重要科学线索。因此,研究者提出科学假说:弗林蛋白酶可通过靶向剪切 PTEN-L 逆转其对线粒体自噬的抑制效应,从而导致肝星状细胞活化受阻、肝纤维化进展延缓。

相关研究显示,PTEN-L 抑制线粒体自噬,多集中在实体肿瘤研究领域^[41],本研究在肝星状细胞内验证了该分子对线粒体自噬的抑制效应。本研究结果显示,弗林蛋白酶处理后,肝星状细胞内 TOM20 与 OPTN 共定位显著增加,线粒体膜电位也显著下降,线粒体自噬增强;PTEN-L 敲低表达后也呈现出类似的结果。由此可见,弗林蛋白酶促进线粒体自

噬,其靶向剪切 PTEN-L 导致后者功能缺失的分子机制可解释本研究提出的科学假说。在本研究既往相关研究基础上,弗林蛋白酶可负调控肝星状细胞活化及肝纤维化进展,其发挥作用效应依赖于调控肝星状细胞线粒体自噬。

结合既往研究以及本研究结果表明,弗林蛋白酶可被认为是一种新的抑制肝纤维化的内切蛋白酶分子,并直接通过剪切 PTEN-L,促进 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,从而抑制肝星状细胞活化以及肝纤维化进展^[38-39,42]。本研究不足之处,弗林蛋白酶也可能通过作用于其他重要的肝纤维化调控信号通路发挥抑制肝纤维化的效应,相关分子机制有待进一步研究。

综上所述,弗林蛋白酶抑制肝纤维化的探讨为从分子水平阐明肝纤维化进展并实现对其靶向逆转提供新的线索和思路。弗林蛋白酶分子有望成为治疗肝纤维化和肝硬化的关键靶点。

参考文献:

- [1] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55. doi:10.1016/j.mam.2018.09.002
- [2] Park J, Kwon HJ, Sohn W, et al. Risk of liver fibrosis in patients with prediabetes and diabetes mellitus[J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269070.
- [3] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [4] 李亚琦, 张荣花, 刘雨潭, 等. miR-194-5p 通过 Wnt5a 抑制肝星状细胞活化[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(2): 179-187.
LI Yaqi, ZHANG Ronghua, LIU Yutan, et al. MiR-194-5p inhibits hepatic stellate cell activation through Wnt5a[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2023, 43(2): 179-187.
- [5] 肖政华, 石以石则, 杨庆万, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路研究扶肝化纤汤抑制 HSC-T6 活化的作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2023, 61(6): 41-46.
XIAO Zhenghua, SHI Yishize, YANG Qingwan, et al. Mechanism of fufan huaqian decoction inhibiting HSC-T6 activation via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2023, 61(6): 41-46.
- [6] 贾琳, 孙峰, 董琪琪, 等. YTHDF1 调控 Fis1 对肝星状细胞活化、增殖及迁移能力的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60(1): 49-58.
JIA Lin, SUN Feng, DONG Qiqi, et al. YTHDF1 Regulates the effect of fis1 on the activation, proliferation and migration of hepatic stellate cells[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2025, 60(1): 49-58.
- [7] 劳慧霞, 吴姗姗, 王振常, 等. 柔肝化纤颗粒依赖 miR-135a/FOXO1 通路调控线粒体自噬抑制大鼠肝纤维化进程[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2024, 26(4): 957-964.
- [8] Datta S, Cano M, Satyanarayana G, et al. Mitophagy initiates retrograde mitochondrial-nuclear signaling to guide retinal pigment cell heterogeneity[J]. *Autophagy*, 2023, 19(3): 966-983.
- [9] Dou SD, Zhang JN, Xie XL, et al. MitoQ inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by enhancing PINK1/parkin-mediated mitophagy[J]. *Open Med (Wars)*, 2021, 16(1): 1718-1727.
- [10] 曾小晏, 曾子键, 张子欣, 等. 线粒体自噬调节肝纤维化的研究进展[J]. *肝脏*, 2024, 29(11): 1315-1318.
ZENG Xiaoyan, ZENG Zijian, ZHANG Zixin, et al. Research progress on mitochondrial autophagy regulating liver fibrosis[J]. *Chinese Hepatology*, 2024, 29(11): 1315-1318.
- [11] Eldeeb MA, Esmaili M, Hassan M, et al. The role of PTEN-L in modulating PINK1-parkin-mediated mitophagy[J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(4): 1103-1114.
- [12] Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/parkin mitophagy[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(10): 733-744.
- [13] 许允, 李异. PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬在异烟肼诱导的肝细胞损伤中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(9): 1200-1207.
XU Yun, LI Yi. Regulatory effect of PINK1/Parkin axis on mitophagy in isoniazide-induced hepatocellular injury[J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2022, 47(9): 1200-1207.
- [14] 于生友. PTEN 介导的 PINK1/Parkin 信号通路在肾小球足细胞线粒体功能障碍中的作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2021.
- [15] Choi A, Kots ED, Singleton DT, et al. Analysis of the molecular determinants for furin cleavage of the spike protein S1/S2 site in defined strains of the prototype coronavirus murine hepatitis virus (MHV)[J]. *Virus Res*, 2024, 340: 199283. doi:10.1016/j.virusres.2023.199283
- [16] Poyil PK, Siraj AK, Padmaja D, et al. Overexpression of the pro-protein convertase furin predicts prognosis and promotes papillary thyroid carcinoma progression and metastasis through RAF/MEK signaling[J]. *Mol Oncol*, 2023, 17(7): 1324-1342.
- [17] 张欣, 来春林. 前蛋白转化酶在脂质代谢中作用的研究进展[J]. *中西医心脑血管杂志*, 2022, 20(6): 1029-1031.

- [18] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [19] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, et al. Liver fibrosis and repair; immune regulation of wound healing in a solid organ[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14: 181-194. doi:10.1038/nri3623
- [20] Boursier J, Canivet CM, Costentin C, et al. Impact of type 2 diabetes on the accuracy of noninvasive tests of liver fibrosis with resulting clinical implications[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(5): 1243-1251.
- [21] Li Y, Li C, Xiong Y, et al. Didymin ameliorates liver fibrosis by alleviating endoplasmic reticulum stress and glycerophospholipid metabolism; based on transcriptomics and metabolomics[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 1713-1729. doi:10.2147/DDDT.s351092
- [22] Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2823. doi:10.1038/ncomms3823
- [23] Coppola I, Brouwers B, Meulemans S, et al. Differential effects of Furin deficiency on insulin receptor processing and glucose control in liver and pancreatic β cells of mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6344.
- [24] Solovyeva NI, Gureeva TA, Timoshenko OS, et al. Furin as proprotein convertase and its role in normal and pathological biological processes [J]. *Biochem Mosc Suppl Ser B Biomed Chem*, 2017, 11(2): 87-100.
- [25] Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, et al. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves Anthrax toxin protective antigen [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(23): 16396-16402.
- [26] Hatsuzawa K, Murakami K, Nakayama K. Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites[J]. *J Biochem*, 1992, 111(3): 296-301.
- [27] Urban D, Lorenz J, Meyborg H, et al. Proprotein convertase furin enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor[J]. *J Biochem*, 2013, 153(2): 197-207.
- [28] van Kerkhof P, Kralj T, Spanevello F, et al. RSP03 Furin domain-conjugated liposomes for selective drug delivery to LGR5-high cells [J]. *J Control Release*, 2023, 356: 72-83. doi:10.1016/j.jconrel.2023.02.025
- [29] Li D, Liu X, Zhang L, et al. COVID-19 disease and malignant cancers: the impact for the furin gene expression in susceptibility to SARS-CoV-2[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(14): 3954-3967.
- [30] Chen CL, Gupta P, Parashar D, et al. ERBB3-induced furin promotes the progression and metastasis of ovarian cancer via the IGF1R/STAT3 signaling axis[J]. *Oncogene*, 2020, 39: 2921-2933. doi:10.1038/s41388-020-1194-7
- [31] He ZS, Thorrez L, Siegfried G, et al. The proprotein convertase furin is a pro-oncogenic driver in KRAS and BRAF driven colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39: 3571-3587. doi:10.1038/s41388-020-1238-z
- [32] Yang Y, He MQ, Tian X, et al. Transgenic overexpression of furin increases epileptic susceptibility [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1058. doi:10.1038/s41419-018-1076-x
- [33] Chen Z, Lu S, Xu M, et al. Role of miR-24, furin, and transforming growth factor- β 1 signal pathway in fibrosis after cardiac infarction [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 65-70. doi:10.12659/msm.898641
- [34] Lee JH, Seo KH, Yang JH, et al. CCCP induces hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis via mitochondrial and lysosomal dysfunction [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 225: 181-192. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.10.259
- [35] Ding Q, Xie XL, Wang MM, et al. The role of the apoptosis-related protein BCL-B in the regulation of mitophagy in hepatic stellate cells during the regression of liver fibrosis [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51: 1-13. doi:10.1038/s12276-018-0199-6
- [36] Mary A, Eysert F, Checler F, et al. Mitophagy in Alzheimer's disease: molecular defects and therapeutic approaches [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(1): 202-216.
- [37] Long M, McWilliams TG. Lipid droplets promote efficient mitophagy [J]. *Autophagy*, 2023, 19(2): 724-725.
- [38] Zhang Y, Fang Q, Wang H, et al. Increased mitophagy protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced damage [J]. *Autophagy*, 2023, 19(1): 75-91.
- [39] Shen ZF, Li L, Zhu XM, et al. Current opinions on mitophagy in fungi [J]. *Autophagy*, 2023, 19(3): 747-757.
- [40] Sellars E, Gabra M, Salmena L. The complex landscape of PTEN mRNA regulation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(6): a036236.
- [41] Wang M, Pan Z, Chu X, et al. Chemotherapy-induced PTEN-L secretion promotes the selection of PTEN-deficient tumor cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 140.
- [42] Wang L, Wang J, Tang Y, et al. PTEN-L puts a brake on mitophagy [J]. *Autophagy*, 2018, 14(11): 2023-2025.