·肝纤维化及肝硬化·

DOI：10.12449/JCH260317

Wnt5a基因敲低的M1型骨髓源性巨噬细胞对肝硬化大鼠模型的影响及其作用机制

邢飞飞，王丹阳，郑欣瑞，许燕楠，张士豪，战俊邑，刘 伟，陈高峰，陈佳美，刘 平，慕永平

上海中医药大学附属曙光医院，上海市中医药研究院肝病研究所，肝肾疾病病证教育部重点实验室，上海市中医临床重点实验室，上海 201203

通信作者：慕永平，ypmu8888@126.com（ORCID：0000-0002-6808-8243）

摘要：目的 本研究通过观察Wnt5a基因敲低的M1型骨髓源性巨噬细胞（BMDM）对肝硬化大鼠模型肝纤维化与再生的影响，旨在揭示其相对于未修饰M1-BMDM的功能增益效应。**方法** 分离大鼠原代BMDM并极化为M1表型，构建Wnt5a敲低的M1-BMDM。建立四氯化碳/二乙酰氨基芴（CCl_4/2-AAF）诱导的肝硬化大鼠模型，于第8周末随机分为模型组（n=6）、M1-BMDM组（n=6）、M1-BMDM Wnt5a基因敲减空载质粒组（M1-BMDM^{KD-EV}组）（n=6）、M1-BMDM Wnt5a基因敲减组（M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组）（n=6）。第9周首日，各组大鼠予以相应的细胞经尾静脉一次性注射，同时腹腔注射C-C趋化因子受体2型抑制剂。此外，设立未经任何处理的正常对照组（n=6）。于12周末取材，检测肝组织病理、血清肝功能、活化肝星状细胞以及成熟肝细胞标志物的表达水平。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。**结果** 与模型组大鼠比较，各细胞治疗组大鼠肝脏炎症反应明显减轻，血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）活性均显著降低（P值均<0.01），且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组血清AST水平显著低于M1-BMDM组（P<0.05）。免疫组织化学染色半定量分析显示，与模型组比较，各细胞治疗组CD68阳性面积百分比均明显减少（P值均<0.05）；与M1-BMDM^{KD-EV}相比，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组CD68阳性面积百分比显著下降、CD163的阳性面积百分比显著升高（P值均<0.05）。与模型组比较，各细胞治疗组的CD68及肿瘤坏死因子α的mRNA表达显著降低（P值均<0.05），CD68的蛋白表达显著降低（P值均<0.01）；与M1-BMDM^{KD-EV}组比较，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组CD163蛋白及mRNA表达均显著升高（P值均<0.05），CD68蛋白及mRNA表达显著降低（P值均<0.05），肿瘤坏死因子α的蛋白表达显著降低（P<0.01）。天狼星红胶原染色和α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）的免疫组织化学染色结果显示，与模型组比较，各细胞治疗组肝脏胶原沉积和α-SMA阳性面积明显减轻，尤以M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组最为显著；且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组天狼星红阳性面积、α-SMA阳性面积和肝组织羟脯氨酸（Hyp）含量亦显著低于M1-BMDM^{KD-EV}组（P值均<0.05）。与M1-BMDM^{KD-EV}组相比，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组α-SMA蛋白和mRNA以及Ⅰ型胶原蛋白和转化生长因子β的mRNA表达水平显著降低（P值均<0.05）。与模型组比较，各细胞治疗组肝组织肝细胞核因子4α（HNF-4α）蛋白表达显著升高（P值均<0.05），且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组HNF-4α和肝细胞特异性抗原的蛋白与mRNA的表达均显著高于M1-BMDM^{KD-EV}组（P值均<0.05）。M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组血清白蛋白含量亦显著高于M1-BMDM^{KD-EV}组（P<0.01）。免疫荧光共染检测技术显示，与模型组相比，各细胞治疗组HNF-4α/Ki67共染细胞数量显著增多（P值均<0.01），且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组HNF-4α/Ki67共染细胞数量显著高于M1-BMDM^{KD-EV}组（P<0.05）。**结论** 抑制Wnt5a表达可提高M1-BMDM治疗CCl_4/2-AAF诱导肝硬化大鼠模型的效果，为基因修饰提高M1-BMDM抗肝硬化作用提供了新思路。

关键词： 肝硬化；骨髓源性巨噬细胞；Wnt5a蛋白；肝星状细胞；肝再生；大鼠，Wistar

基金项目： 国家自然科学基金面上项目（81874390）；上海市科委自然科学基金面上项目（21ZR1464100）；上海市科委2022年度“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项（22S11901700）；上海市临床重点专科建设项目（shslczdzk01201）

Effect and mechanism of Wnt5a knockdown on the efficacy of M1 bone marrow-derived macrophage in treatment of liver cirrhosis

XING Feifei, *WANG Danyang*, *ZHENG Xinrui*, *XU Yannan*, *ZHANG Shihao*, *ZHAN Junyi*, *LIU Wei*, *CHEN Gaofeng*, *CHEN Jiamei*, *LIU Ping*, *MU Yongping*

Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; *Institute of Liver Disease*, *Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine*; *Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases*, *Ministry of Education*; *Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine*, *Shanghai 201203*, *China*

Corresponding author: *MU Yongping*, *ypmu8888@126.com* (*ORCID*: *0000-0002-6808-8243*)

Abstract: **Objective** To observe the effect of M1 bone marrow-derived macrophages (M1-BMDM) with Wnt5a knockdown on liver fibrosis and regeneration in a rat model of liver cirrhosis, and to investigate its gain-of-function effect compared with unmodified M1-BMDM. **Methods** Primary bone marrow-derived macrophages were isolated from rats and were polarized to M1 phenotype to construct M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ cells. A rat model of liver cirrhosis induced by CCl_4/2-AAF was established, and at the end of week 8, rats were randomly divided into model group, M1-BMDM group, M1-BMDM Wnt5a-knockdown empty vector group (M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group), and M1-BMDM Wnt5a-knockdown group (M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group), with 6 rats in each group. On the first day of week 9, the rats in each group were given a single injection of the corresponding cells via the caudal vein, along with an intraperitoneal injection of a CCR2 inhibitor. Six rats without any treatment were used as normal control group. Samples were collected at the end of week 12 to assess liver histopathology, serum liver function parameters, hepatic stellate cell activation, and the expression levels of mature hepatocyte markers. A one-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the model group, all cell treatment groups had significant alleviation of liver inflammatory response and significant reductions in the activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase (AST) in serum (all $P<0.01$), and the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had a significantly lower serum level of AST than the M1-BMDM group ($P<0.05$). The semi-quantitative analysis based on immunohistochemical staining showed that compared with the model group, all cell treatment groups had a significant reduction in the percentage of CD68-positive area (all $P<0.05$), and compared with the M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group, the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had a significant reduction in the percentage of CD68-positive area and a significant increase in the percentage of CD163-positive area (both $P<0.05$). Compared with the model group, all cell treatment groups had significant reductions in the mRNA expression levels of CD68 and tumor necrosis factor-α (all $P<0.05$) and the protein expression level of CD68 (all $P<0.01$); compared with the M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group, the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had significant increases in the protein and mRNA expression levels of CD163 (both $P<0.05$), significant reductions in the protein and mRNA expression levels of CD68 (both $P<0.05$), and a significant reduction in the protein expression level of tumor necrosis factor-α ($P<0.01$). Sirius Red collagen staining and alpha-smooth muscle actin (α-SMA) immunohistochemical staining showed that compared with the model group, all cell treatment groups had significant alleviation of liver collagen deposition and α-SMA-positive area, with the most significant changes in the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group, and compared with the M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group, the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had significantly smaller Sirius Red-positive area and α-SMA-positive area and a significantly lower content of hydroxyproline in liver tissue (all $P<0.05$). Compared with the M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group, the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had significant reductions in the protein and mRNA expression levels of α-SMA and the mRNA expression level of COL-I and TGF-β (all $P<0.05$). Compared with the model group, all cell treatment groups had a significant increase in the protein expression level of HNF-4α in liver tissue (all $P<0.05$), and the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had significantly higher protein and mRNA expression levels of HNF-4α and hepatocyte specific antigen than the M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group (both $P<0.05$). The M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had a significantly higher serum level of albumin than the M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group ($P<0.01$). Immunofluorescence co-staining showed that compared with the model group, all cell treatment groups had a significant increase in the number of cells stained positive for HNF and HNF-4α and Ki67 (all $P<0.01$), and the M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$ group had a significantly higher number of such cells than the M1-BMDM$^{KD\text{-}EV}$ group ($P<0.05$). **Conclusion** Inhibition of Wnt5a expression enhances the therapeutic effect of M1-BMDM on rats with liver cirrhosis induced by CCl_4/2-AAF, which provides new ideas for enhancing the anti-cirrhotic effect of M1-BMDM through genetic modification.

Key words: Liver Cirrhosis; Bone Marrow-Derived Macrophage; Wnt-5a Protein; Hepatic Stellate Cells; Liver Regeneration; Rats, Wistar

Research funding: General Project of National Natural Science Foundation of China (81874390); Sponsored by Natural Science

Foundation of Shanghai (21ZR1464100); Special Project for Biomedical Science and Technology Support of the "Science and Technology Innovation Action Plan" of Shanghai Science and Technology Commission in 2022 (22S11901700); Shanghai Key Specialty of Traditional Chinese Clinical Medicine (shslczdzk01201)

肝硬化是多种慢性肝病发展的晚期阶段[1]。在其发展过程中,肝细胞持续受损并发生坏死,同时伴随纤维组织过度增生和假小叶形成,导致肝脏正常结构破坏和功能丧失[2]。巨噬细胞是肝纤维化发生和消退过程中的关键免疫细胞,目前已有多种蛋白被开发用于靶向内源性巨噬细胞(又称为库普弗细胞)的功能[3]。此外,外源性巨噬细胞移植也是调节肝脏微环境的一种替代疗法。已有研究表明,骨髓源性巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage,BMDM)经尾静脉注射,能够减轻四氯化碳(CCl_4)诱导的肝纤维化小鼠的肝脏胶原沉积、抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)活化、改善肝功能,从而缓解肝纤维化进展[4]。值得注意的是,经典极化的巨噬细胞可能提供更优的疗效或安全性,这可能与极化的细胞群体在表型上更稳定均匀相关[5]。

本课题组前期研究表明,在CCl_4/二乙酰氨基芴(2-acetylaminofluorene,2-AAF)诱导的肝硬化大鼠模型中,Wnt5a/Fzd2信号通路可能发挥重要作用[6]。Wnt5a是非经典Wnt信号通路中的配体之一,可调节造血、间充质和神经干细胞的功能[7-9]。研究表明,巨噬细胞是分泌Wnt的主要效应细胞,其中M1-BMDM可分泌肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-alpha,TNF-α)等炎症因子激活非典型Wnt信号通路[10]。但本课题组前期研究结果表明,M1-BMDM注射后具有良好的抗肝纤维化作用[11],这与文献报道一致[5]。但Wnt5a基因表达水平是否会影响M1-BMDM的抗肝纤维化作用,目前尚不明确。基于此,本研究拟通过尾静脉注射Wnt5a基因敲减的M1-BMDM至大鼠模型体内,探究其对肝硬化进展的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 RPMI 1640细胞培养基(货号:118775085)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(货号:0412265)、脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)(货号:ST1470)购于赛默飞世尔科技公司(美国);Wnt5a慢病毒(lentivirus,LV)转染试剂由上海吉凯基因科技有限公司(中国)合成;2-AAF(货号:A-1075)购于西格玛-奥德里奇有限公司(美国);C-C趋化因子受体2(CC chemokine receptor 2,CCR2)抑制剂(货号:RS-102895)购于CSNpharm公司(美国);α-平滑肌肌动蛋白抗体(α-smooth muscle actin,α-SMA)(货号:ab124964)、CD68抗体(货号:a125212)、TNF-α抗体(货号:ab205587)、Ki67抗体(货号:ab279653)和肝细胞核因子4α抗体(hepatocyte nuclear factor 4 alpha,HNF-4α)(货号:ab201460)均购于Abcam公司(英国);小鼠抗肝细胞特异性抗原(hepatocyte specific antigen,Hep)(货号:GTX73779)单克隆抗体购于GeneTex公司(美国);Wnt5a(货号:sc-365370)购于Santa Cruz公司(美国);CD163(货号:16646-1-AP)、GAPDH(货号:10494-1-AP)购于武汉三鹰生物技术有限公司。Think color-3色Rab多标试剂盒(货号:20240516)购于南京弗瑞思生物科技有限公司;实时荧光定量聚合酶链反应引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;肝组织羟脯氨酸(hydroxyproline,Hyp)含量测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。携带增强绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein,EGFP)标记的慢病毒载体LV-Wnt5a-RNAi(编号:92640-1,滴度:1×10^9 TU/mL)及空载体对照慢病毒(编号:CON313,滴度:8×10^8 TU/mL)均由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。LV-Wnt5a-RNAi的靶序列为5′-TGCCATGTCTTCCAAGTTCTT-3′。

1.2 实验动物 选用30只无特定病原体级雄性Wistar大鼠(160~180 g),购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证编号:SCXK(沪)2022-0004,实验动物使用许可证编号:SYXK(沪)2017-0005,于上海中医药大学实验动物中心进行饲养造模。

1.3 BMDM的处理 参考Haag等[12]的研究方法分离大鼠原代BMDM,分为不经LPS处理的BMDM(未处理组)和经100 ng/mL LPS极化的M1表型BMDM(处理组),并进行鉴定。根据预实验结果,选择适宜的感染复数对M1表型BMDM进行转染,分为敲减空载质粒组和Wnt5a敲减组。转染4 h后更换为正常培养液;转染48 h后,于荧光倒置显微镜下观察细胞形态及EGFP荧光表达情况;转染72 h后,分别提取细胞总RNA和总蛋白,用于检测慢病毒转染后目标基因及蛋白的表达水平。

1.4 大鼠模型制备与分组干预 所有大鼠适应性饲养1周后,随机分为正常对照组(N组)(n=6)和肝硬化造模组(n=24)。正常对照组正常喂养,不作任何处理。造模

组大鼠经皮下注射50% CCl_4-橄榄油溶液(2 mL/kg)，2次/周；第8周末，按大鼠体重随机分为模型组(M组)、M1-BMDM组、M1-BMDM Wnt5a基因敲减空载质粒组(M1-$BMDM^{KD-EV}$组)、M1-BMDM Wnt5a基因敲减组(M1-$BMDM^{Wnt5a-KD}$组)，每组6只。在第9周第1天，分别将M1-BMDM、M1-$BMDM^{KD-EV}$、M1-$BMDM^{Wnt5a-KD}$细胞经尾静脉单次注射至相应组别的大鼠体内，注射剂量为1×10^6 cells/只；M组大鼠正常喂养，不作处理。第9~12周予以M组、M1-BMDM组、M1-$BMDM^{KD-EV}$组、M1-$BMDM^{Wnt5a-KD}$组大鼠肝毒性致癌物2-AAF(10 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)灌胃用以抑制肝细胞再生，腹腔注射CCR2抑制剂(5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)以阻断外周巨噬细胞向肝脏募集，于第12周末取材。N组不作任何处理。

1.5 血清生化指标检测 天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transferase，AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine amino-transferase，ALT)和白蛋白(albumin，Alb)等在上海中医药大学附属曙光医院临床医学检验中心检测。

1.6 肝组织Hyp含量测定 根据试剂盒说明书，采用碱水解法测定肝组织Hyp含量[13]。

1.7 肝组织病理和免疫组织化学分析 肝组织石蜡切片经二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱水，分别进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin，HE)染色、天狼星红染色或免疫组织化学分析。天狼星红及HE染色切片利用数字病理分析系统采集图像[数字病理切片扫描仪(江丰生物信息技术有限公司)]，Image Scope软件定量分析胶原阳性区域占比；免疫组织化学切片经一抗α-SMA(1∶400)、CD68(1∶800)、CD163(1∶200)、HNF-4α(1∶1 000)、Hep(1∶100)4 ℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶1 000)孵育30 min，二氨基联苯胺显色，封片，如上扫描，ImageJ 1.8.0软件进行阳性表达面积的半定量分析。

1.8 肝组织免疫荧光染色 根据Think color-3色Rab多标试剂盒说明书进行染色，细胞核用4′，6-二脒基-2-苯基吲哚(1∶1 000)染色。封片后，使用激光扫描共聚焦显微镜(FV10i，日本Olympus公司)采集图像。

1.9 细胞免疫荧光 4%多聚甲醛固定细胞，10%山羊血清封闭，抗CD68(1∶1 000)进行孵育过夜，辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶1 000)孵育，室温孵育1 h，细胞核采用4′，6-二脒基-2-苯基吲哚(1∶1 000)染色，激光扫描共聚焦显微镜采集图像。

1.10 实时荧光定量聚合酶链反应 采用RNA纯化试剂盒(货号：Lot.360502，Toyobo公司)提取总RNA，按标准流程操作。使用SYBR Green PCR Master Mix预混体系，包含1 μL cDNA，于384孔板中加样，ViiA™ 7 real-time PCR System检测目标mRNA表达水平。检测指标为CD86、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase，iNOS)、TNF-α、白细胞介素(interleukin，IL)12β、Wnt5a、CD11b、CD11c、CD163、CD68、α-SMA、转化生长因子(transforming growth factor，TGF)β、Ⅰ型胶原蛋白(type Ⅰ collagen，COL-Ⅰ)、HNF-4α和Hep。

1.11 免疫印迹 取肝组织50 mg经RIPA裂解后于4 ℃、12 000 r/min条件下离心15 min，收集蛋白上清。以BCA法测定蛋白浓度，等量蛋白经10% SDS-PAGE分离后转至PVDF膜。用快速封闭液室温封闭30 min，4 ℃孵育一抗过夜、室温孵育二抗1 h。采用ECL化学发光显影，目标蛋白条带灰度值通过ImageJ分析，并以GAPDH作为内参校正。一抗稀释比例为：Wnt5a(1∶1 000)、α-SMA(1∶5 000)、CD68(1∶1 000)、TNF-α(1∶500)、CD163(1∶500)、HNF-4α(1∶1 000)、Hep(1∶200)和GAPDH(1∶10 000)。

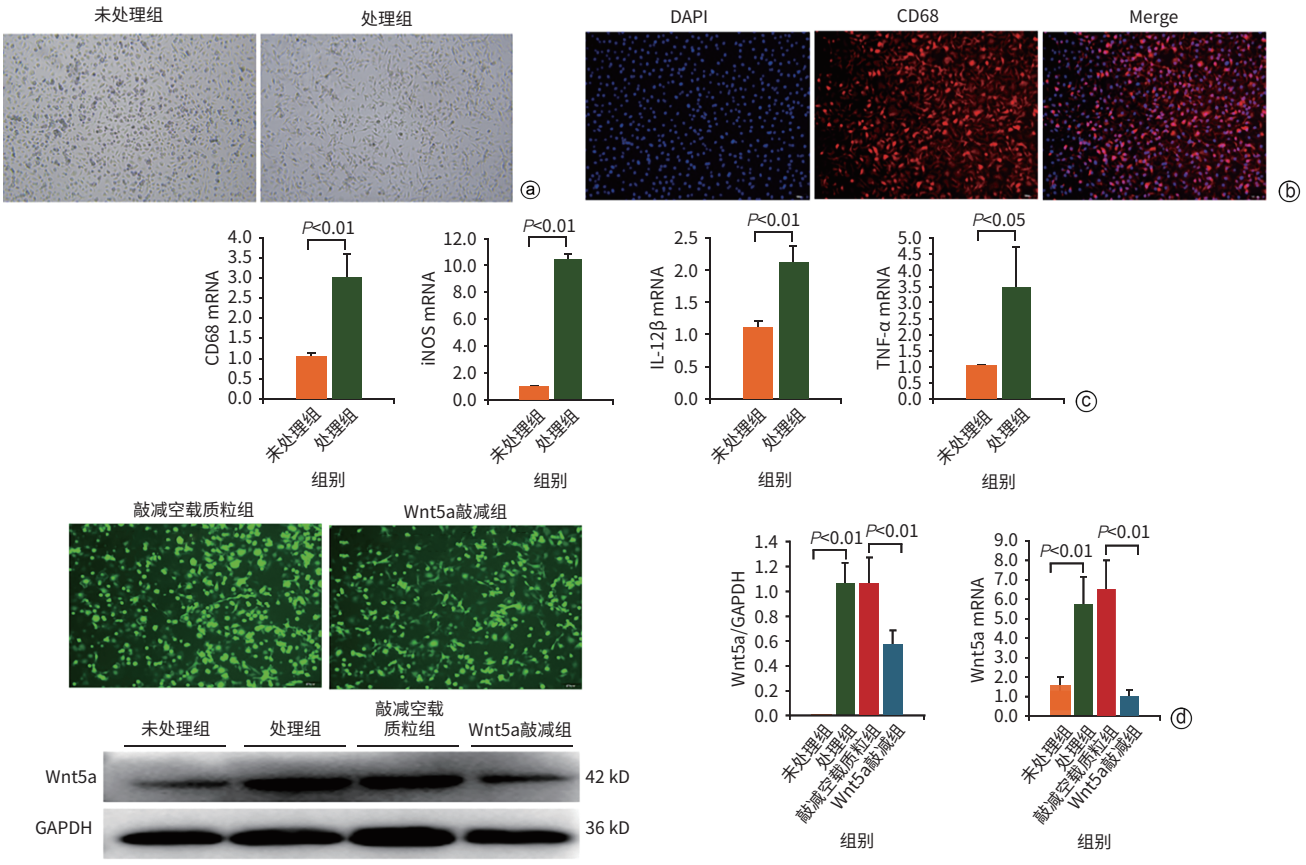
1.12 统计学方法 采用SPSS 23.0软件进行数据分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代BMDM分离、M1极化及鉴定 细胞形态学观察显示，处理组细胞呈现活化状态：贴壁生长特性良好，胞体伸展形成多极伪足(图1a)。免疫荧光显示，未处理组细胞高表达CD68(图1b)。与未处理组比较，处理组细胞标志物CD86、iNOS、IL-12β和TNF-α的mRNA表达均显著上升(P值均<0.05)(图1c)，表明M1-BMDM达到实验要求。

进一步采用EGFP标记的LV转染M1-BMDM以敲减Wnt5a基因。当感染复数为30时，慢病毒成功转染至M1-BMDM(图1d)。与未处理组比较，处理组细胞Wnt5a蛋白和mRNA表达水平均显著升高(P值均<0.01)；与敲减空载质粒组细胞比，Wnt5a敲减组细胞Wnt5a的表达水平均显著降低(P值均<0.01)(图1d)，提示M1-BMDM中Wnt5a基因敲减成功。

2.2 Wnt5a敲低提高M1-BMDM抑制肝脏炎症反应的作用 HE染色结果显示，M组大鼠肝组织呈现大面积损伤坏死，汇管区伴有密集炎症浸润。相较于M组，各细胞干预组均能显著减轻肝脏炎症反应并缩小纤维间隔宽度，其中M1-$BMDM^{Wnt5a-KD}$组的改善效果最为显著(图2a)。



注：a，镜下形态学观察（×100）；b，未处理组CD68免疫荧光染色（×100）；c，CD86、iNOS、IL-12β和TNF-α的mRNA表达水平；d，慢病毒转染后M1-BMDM EGFP荧光图（×100）以及Wnt5a蛋白与mRNA表达水平验证。iNOS，诱导型一氧化氮合酶；IL-12β，白细胞介素12β；TNF-α，肿瘤坏死因子α；BMDM，骨髓源性巨噬细胞；EGFP，增强绿色荧光蛋白；DAPI，4′，6-二脒基-2-苯基吲哚。

图1　BMDM和M1-BMDM的鉴定

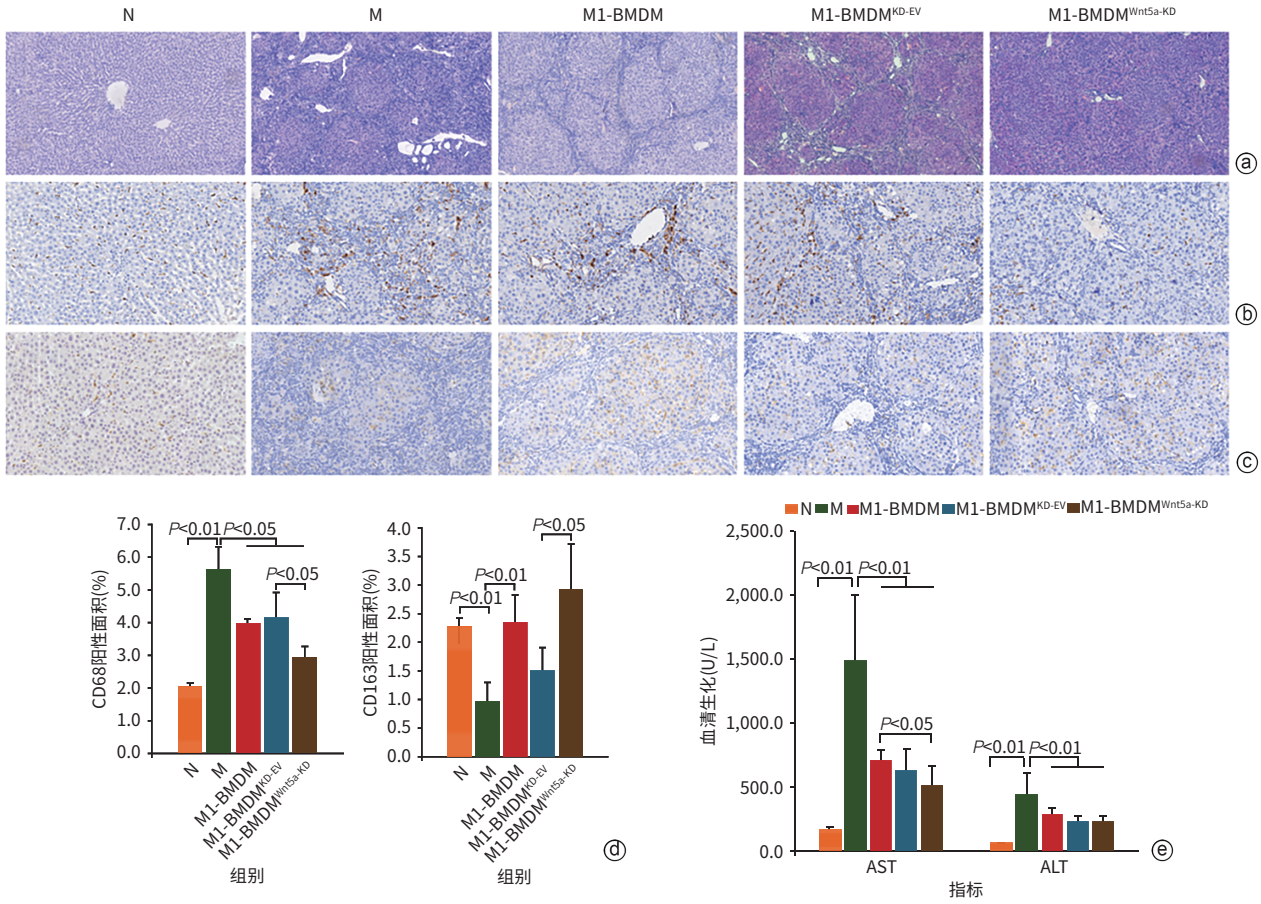
Figure 1　Identfcation of BMDM and M1-BMDM

免疫组织化学染色分析表明，与M组比较，各细胞治疗组CD68阳性面积百分比明显减少（*P*值均<0.05）；与M1-BMDM^{KD-EV}相比，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组CD68阳性面积百分比显著下降、CD163的阳性面积百分比显著升高（*P*值均<0.05）（图2b～d）。血清学分析显示，各干预组血清ALT和AST水平均显著低于M组（*P*值均<0.01），且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组在降低AST水平方面显著优于M1-BMDM组（*P*<0.05）（图2e）。

免疫印迹结果进一步证实，相较于M组，各细胞治疗组CD68蛋白表达均显著降低（*P*均值<0.01）；与M1-BMDM^{EV-KD}组相比，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组CD68和TNF-α蛋白表达显著降低（*P*值均<0.05），CD163蛋白表达显著升高（*P*<0.05）（图3a）。M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组CD68的mRNA表达显著低于M1-BMDM^{EV-KD}组（*P*<0.05），CD163的mRNA表达显著高于M1-BMDM^{EV-KD}组（*P*<0.05），CD11b和CD11c的mRNA表达水平均显著低于M1-BMDM^{EV-KD}组（*P*值均<0.01）（图3b）。

2.3　Wnt5a敲低提高M1-BMDM的抗肝纤维化作用　天狼星红染色结果显示，M组肝组织存在广泛胶原纤维增生及完整假小叶结构；各细胞干预组胶原沉积较M组明显减少，其中M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组最为明显（图4a）。半定量分析结果亦显示，各细胞治疗组天狼星红阳性面积均显著低于M组（*P*值均<0.05），且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组显著低于M1-BMDM^{KD-EV}组（*P*<0.05）（图4c）。免疫组织化学结果显示，与M组相比，各细胞治疗组的肝组织中HSC活化标志物α-SMA的表达均明显减少，尤以M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组最为显著（*P*<0.05）（图4b、d）。M1-BMDM组Hyp含量较M组显著降低（*P*<0.01），而M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组Hyp含量进一步低于M1-BMDM^{KD-EV}组（*P*<0.05）（图4e）。

免疫印迹和实时荧光定量聚合酶链反应结果显示，与N组比较，M组α-SMA的mRNA和蛋白表达水平均显著升高（*P*值均<0.01）；与M组比较，各细胞治疗组α-SMA的mRNA表达水平均显著降低（*P*值均<0.05），且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组α-SMA的蛋白和mRNA的表达水平



注：a，苏木精-伊红染色（×200）；b，CD68免疫组织化学染色（×400）；c，CD163免疫组织化学染色（×400）；d，CD68和CD163免疫组织化学阳性面积百分比；e，各组血清AST、ALT水平。M1-BMDM，M1型骨髓源性巨噬细胞；AST，天冬氨酸氨基转移酶；ALT，丙氨酸氨基转移酶。

图2　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$抑制肝脏炎症反应

Figure 2　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$ inhibits hepatic inflammatory response

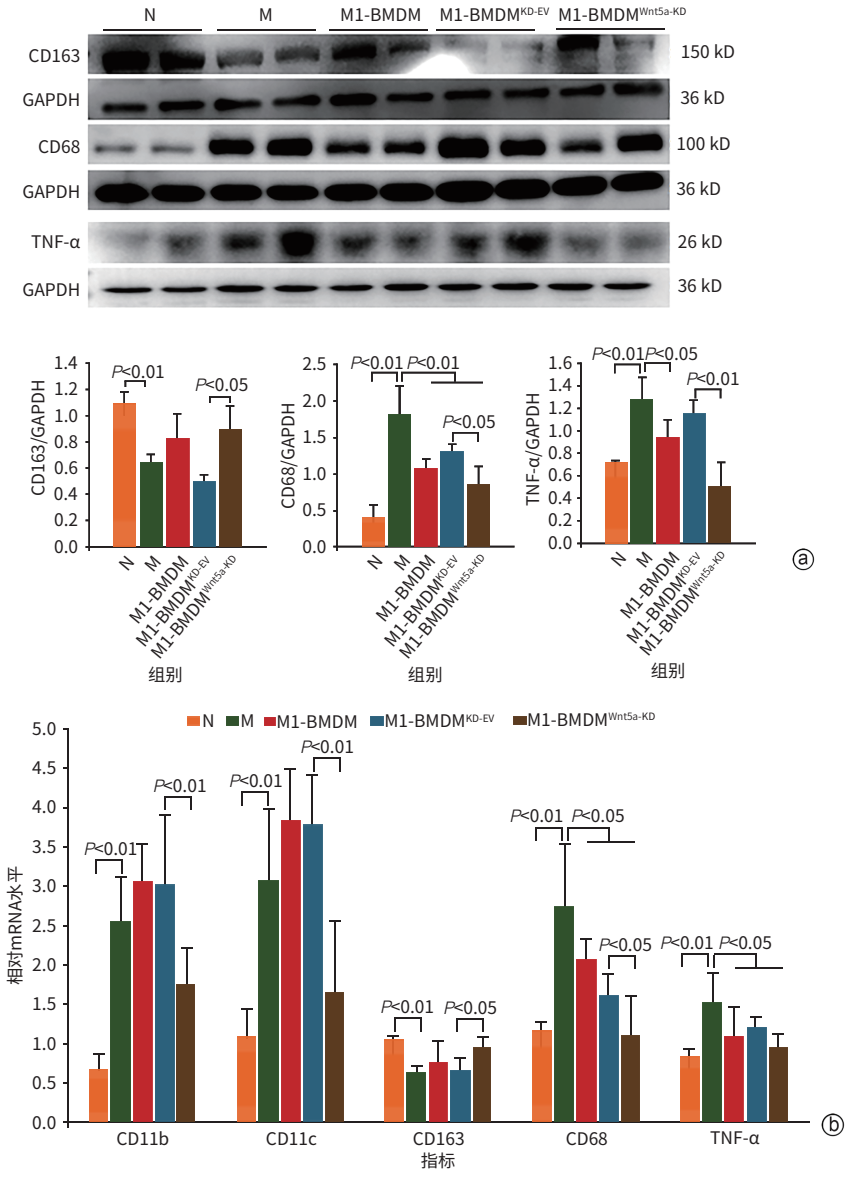
显著低于M1-BMDM^{KD-EV}组（P值均<0.05）（图5a、b）。与M1-BMDM^{KD-EV}组相比，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组肝组织中细胞外基质的主要成分COL-Ⅰ和促纤维化细胞因子TGF-β的mRNA表达水平均显著下降（P值均<0.05）（图5c）。

2.4　Wnt5a敲低提高M1-BMDM促肝细胞再生的作用　免疫组织化学结果显示，与N组比较，M组肝细胞特异性标志物HNF-4α与Hep的阳性表达明显减少；与M组相比，各细胞治疗组HNF-4α与Hep阳性表达明显增加，尤以M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组增加最为显著（图6a、b）。免疫印迹结果显示，与N组比较，M组HNF-4α与Hep蛋白表达水平均显著降低（P值均<0.05）；与M组比较，各细胞治疗组HNF-4α蛋白表达均显著增加（P值均<0.05），且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组HNF-4α和Hep蛋白及mRNA表达水平均显著高于M1-BMDM^{KD-EV}组（P值均<0.05）（图6c、d）。

为评估肝细胞增殖情况，采用免疫荧光共染技术检测HNF-4α与细胞增殖标志物Ki67的表达情况。结果显示，与M组相比，各细胞治疗组HNF-4α/Ki67共染细胞数量显著增多（P值均<0.01），与M1-BMDM^{KD-EV}组比较，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组HNF-4α/Ki67共染细胞数量进一步显著增加（P<0.05）（图7a、b）。与N组比较，M组Alb含量显著下降（P<0.01）；且M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$组Alb含量显著高于M1-BMDM^{KD-EV}组（P<0.01）（图7c）。

3　讨论

肝脏中的巨噬细胞主要由肝巨噬细胞和髓系单核细胞来源的巨噬细胞组成[14]。在肝损伤期间，巨噬细胞向损伤部位方向迁移，并启动组织修复反应[15]。与肝巨噬细胞相比，外源性巨噬细胞（特别是在经典极化后）表现出更稳定的表型和作用[16-17]。经体外基因修饰后的巨噬细胞可能获得特定的活性，从而发挥更佳的治疗作用。本课题组前期研究发现，在CCl_4/2-AAF诱导的大鼠肝硬化模型中，非经典Wnt信号通路相关分子Wnt5a的表达水平显著增加[6]。因此，本研究首次关注了Wnt5a



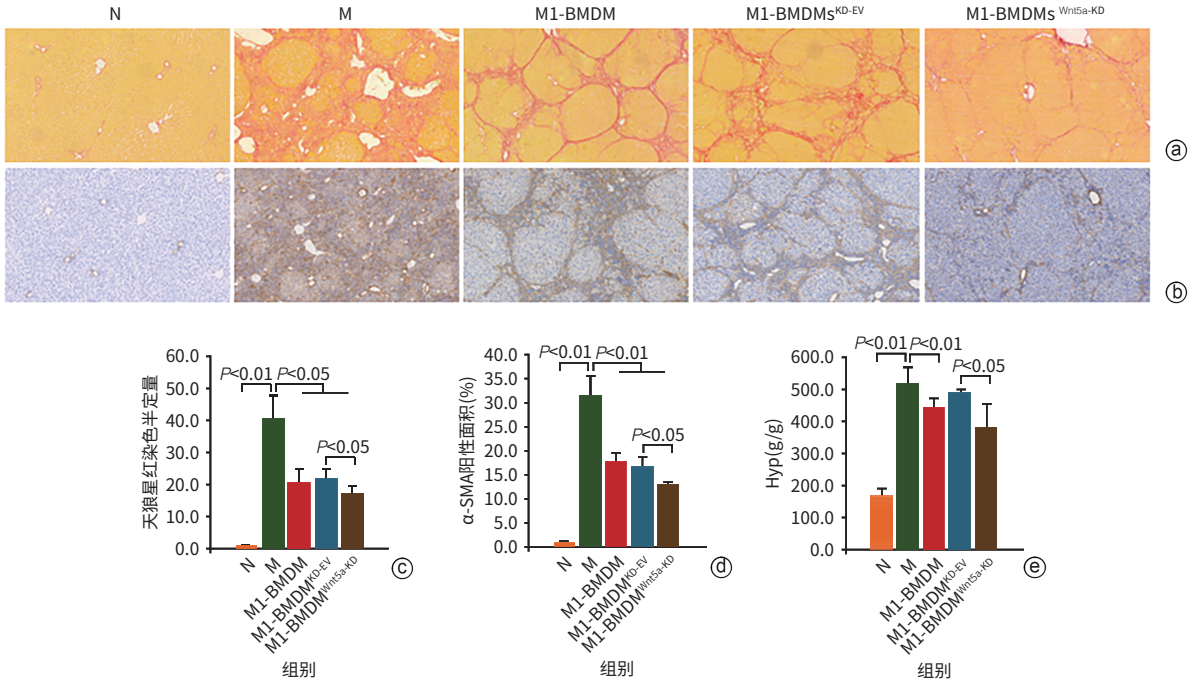
注：a，肝组织CD163、CD68和TNF-α蛋白表达水平和灰度积分比值；b，肝组织CD11b、CD11c、CD163、CD68和TNF-α的mRNA表达水平。M1-BMDM，M1型骨髓源性巨噬细胞；TNF-α，肿瘤坏死因子α。

图3　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$抑制炎症因子的表达

Figure 3　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$ inhibits the expression of inflammatory factors

基因水平对M1-BMDM抗肝纤维化作用的影响及其机制，并采用CCR2抑制剂以抑制内源性单核细胞募集，从而在排除其干扰的前提下，更准确地评估外源性回补巨噬细胞的治疗潜能。

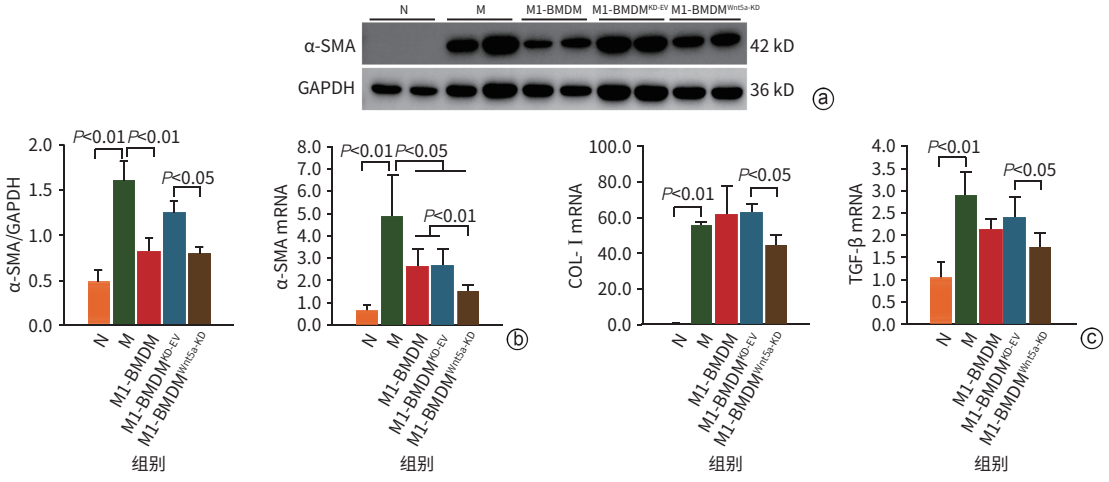
在慢性肝炎和肝硬化患者中，肝脏Wnt5a的表达水平异常升高，与疾病的不良预后密切相关[18]。巨噬细胞来源的Wnt5a不仅作为一种可溶性蛋白分泌，还通过巨噬细胞来源的外泌体和微囊泡传递到受体细胞，从而发挥广泛的治疗作用[19]。研究表明，Wnt5a可以作为促炎因子激活非经典Wnt信号通路及核因子-κB等信号通路，促进IL-6、IL-8和TNF-α等炎症因子的释放，从而触发炎症反应[18]。此外，Wnt5a还可诱导CC亚族趋化因子配体2的表达，使其具有招募巨噬细胞和中性粒细胞的潜力，从而放大炎症反应[20]。本研究结果表明，与M1-BMDM相比，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$显著降低了促炎因子CD68和TNF-α的蛋白表达水平以及CD11b和CD11c的mRNA表达，并显著增加了抗炎因子CD163的蛋白和mRNA表达水平。此外，M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$能进一步缓解肝纤维化，减轻受损肝组织中的胶原沉积，这一现象可能与M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$进一步抑制了炎症因子的表达从



注：a，天狼星红染色（×200）；b，α-SMA免疫组织化学染色（×200）；c，天狼星红染色面积半定量；d，α-SMA免疫组织化学阳性面积百分比；e，肝组织Hyp含量。α-SMA，α-平滑肌肌动蛋白；Hyp，羟脯氨酸。

图4　M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$减少肝脏胶原沉积

Figure 4　M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$reduces hepatic collagen deposition



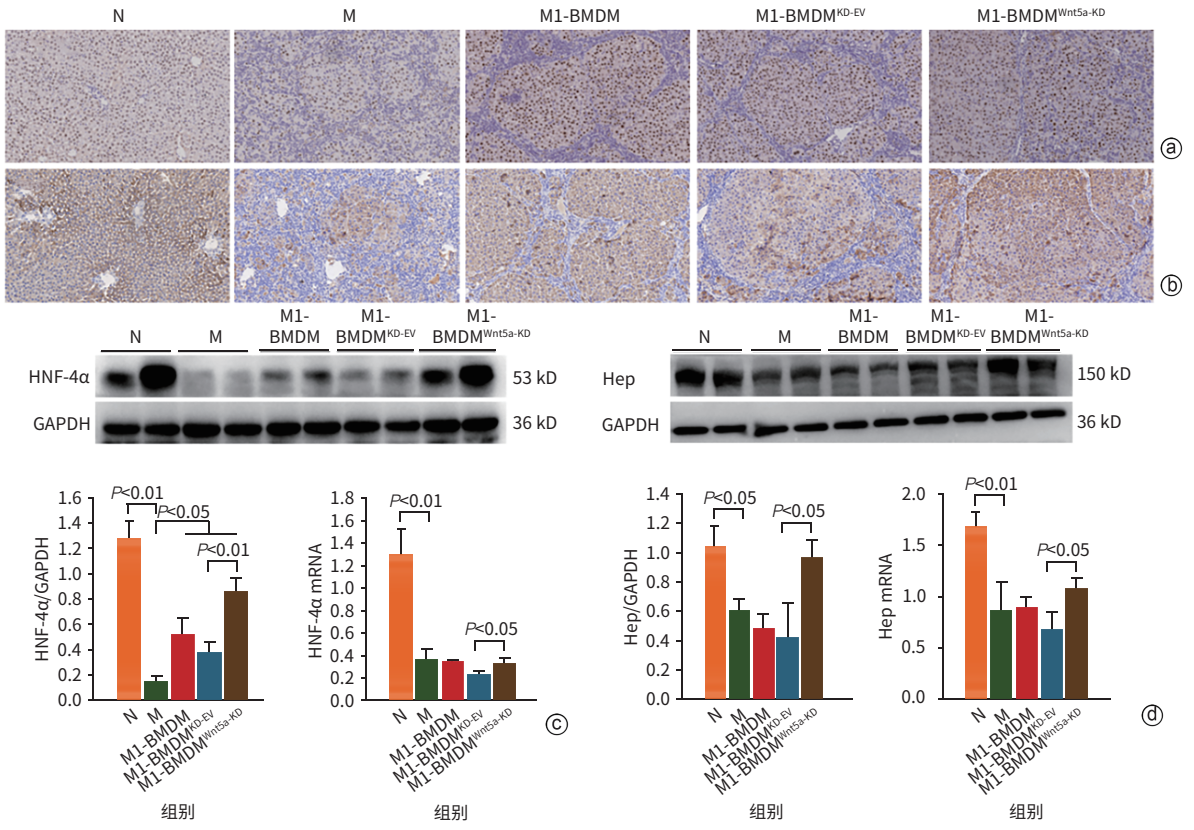
注：a，肝组织α-SMA蛋白表达水平；b，肝组织α-SMA的蛋白灰度值积分和mRNA表达水平，肝组织COL-Ⅰ和TGF-β的mRNA表达水平。M1-BMDM，M1型骨髓源性巨噬细胞；COL-Ⅰ，Ⅰ型胶原蛋白；TGF-β，转化生长因子β。

图5　M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$抑制肝星状细胞活化

Figure 5　M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$inhibits the activation of HSC

而减少HSC的活化相关。

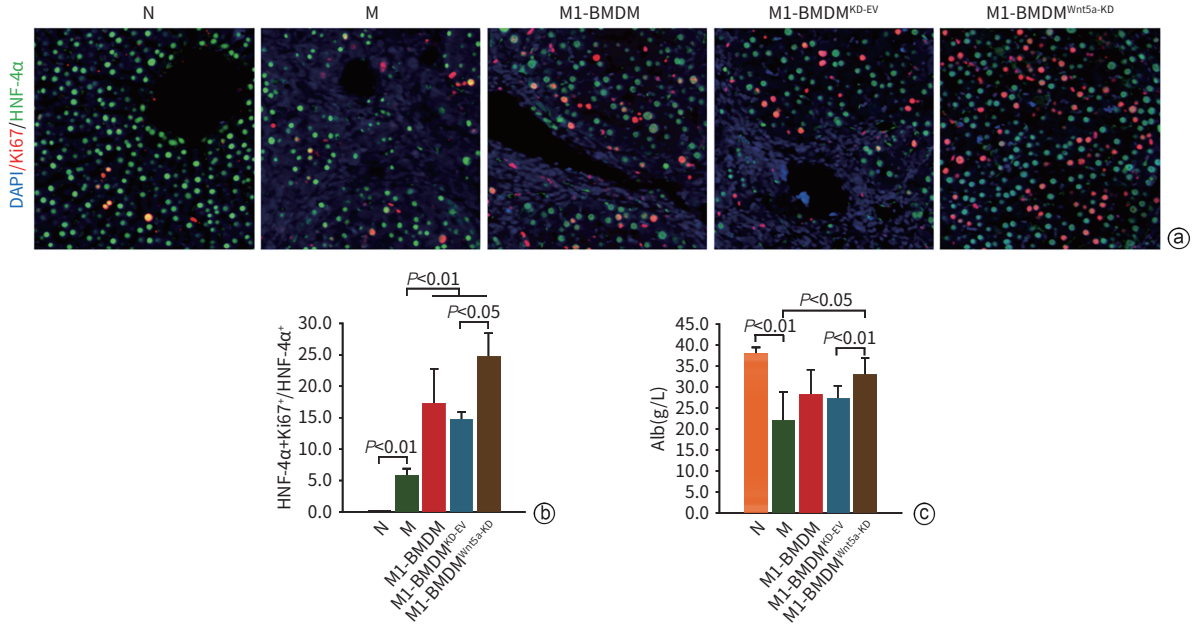
肝再生是一个复杂的生物学过程，涉及多种细胞类型和信号通路的协同作用[21]。HNF-4α是肝细胞分化和功能维持的关键转录因子，其表达增加通常与肝细胞再生能力的增强相关[22]。Hep被广泛用作监测肝细胞分化和功能的生物标志物，在肝再生研究中，其表达水平常用于评估肝细胞的增殖和功能恢复情况[23]。Ki67是细胞增殖的标志物，其表达增加表明细胞进入增殖周期[24]。本研究中，M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$经外周血注射后显著提高了HNF-4α和Hep的表达水平，其作用显著优于M1-BMDM；且M1-BMDM$^{Wnt5a\text{-}KD}$组肝组织HNF-4α/Ki67共染细胞数量显著高于M1-BMDM和M1-



注：a，肝组织HNF-4α免疫组织化学染色（×400）；b，肝组织Hep免疫组织化学染色（×400）；c，肝组织HNF-4α蛋白和mRNA表达水平；d，肝组织Hep蛋白和mRNA表达水平。M1-BMDM，M1型骨髓源性巨噬细胞；HNF-4α，肝细胞核因子4α；Hep，肝细胞特异性抗原。

图6　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$促进肝再生

Figure 6　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$promotes liver regeneration



注：a，肝组织Ki67和HNF-4α免疫荧光共染和半定量；b，HNF-4α与Ki67共染数量占肝细胞总数的百分比；c，血清Alb含量。M1-BMDM，M1型骨髓源性巨噬细胞；HNF-4α，肝细胞核因子4α；Alb，白蛋白；DAPI，4′，6-二脒基-2-苯基吲哚。

图7　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$促进肝细胞增殖

Figure 7　M1-BMDM$^{Wnt5a-KD}$ promotes hepatocyte proliferation

$BMDM^{KD\text{-}EV}$组，提示M1-$BMDM^{Wnt5a\text{-}KD}$抗肝纤维化的效应机制与促进肝再生有关，但其具体机制仍有待进一步研究。尽管本研究聚焦于Wnt5a基因敲减后M1-BMDM的治疗与再生效应，但其整体疗效可能依赖于M1/M2表型转换的动态网络。Wnt5a敲低的M1型巨噬细胞可能通过改变微环境，间接促进了具有抗炎、促再生作用的M2型巨噬细胞活化[25]，从而协同增强疗效。为验证此假说并厘清M1型巨噬细胞在疾病进程中的动态角色，构建包含多时间点的纵向研究图谱是阐明核心机制并优化策略的必然方向。

综上所述，尽管巨噬细胞疗法在肝硬化治疗领域已取得显著进展[26-27]，但通过基因修饰技术优化M1-BMDM的治疗效应尚未见报道。本研究首次证实，通过LV介导的Wnt5a基因敲低后的M1-BMDM经外周血注射后能够显著增强其治疗肝硬化的效果，其潜在机制与抑制肝脏炎症反应、减少HSC活化以及促进肝细胞增殖等密切相关。这一发现为基于基因编辑技术优化M1-BMDM的肝硬化治疗策略提供了新思路。

伦理学声明：本研究方案于2021年6月11日经由上海中医药大学动物研究委员会批准，批号为PZSHUTCM200807008，符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：邢飞飞、王丹阳负责实验实施，收集数据，资料分析；邢飞飞负责论文撰写；郑欣瑞、许燕楠、张士豪、战俊邑参与实验研究；陈高峰负责病理分析；刘伟、陈佳美、刘平参与实验设计；慕永平负责课题设计、经费支持、指导论文撰写。邢飞飞和王丹阳对本文贡献等同，同为第一作者。

参考文献：

[1] OAKLEY F. Interrogating mechanisms of liver fibrosis with omics[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(2): 89-90. DOI: 10.1038/s41575-021-00567-6.

[2] LIAO ZH, XIE ZY. Research progress in molecular mechanism of hepatic fibrosis and related therapeutic targets[J]. J Jilin Univ: Med Edit, 2024, 50(5): 1450-1456. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240532.
廖昭辉, 谢正元. 肝纤维化发病的分子机制及其相关治疗靶点的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(5): 1450-1456. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240532.

[3] LI L, CUI L, LIN P, et al. Kupffer-cell-derived IL-6 is repurposed for hepatocyte dedifferentiation *via* activating progenitor genes from injury-specific enhancers[J]. Cell Stem Cell, 2023, 30(3): 283-299.e9. DOI: 10.1016/j.stem.2023.01.009.

[4] THOMAS JA, POPE C, WOJTACHA D, et al. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function[J]. Hepatology, 2011, 53(6): 2003-2015. DOI: 10.1002/hep.24315.

[5] MA PF, GAO CC, YI J, et al. Cytotherapy with M1-polarized macrophages ameliorates liver fibrosis by modulating immune microenvironment in mice[J]. J Hepatol, 2017, 67(4): 770-779. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.05.022.

[6] ZONG MY, JIAN X, WANG DY, et al. Effect of Yiguan Decoction on the efficacy of M1 bone marrow-derived macrophages in treatment of liver cirrhosis rats and its mechanism[J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(8): 1612-1619. DOI: 10.12449/JCH240817.
宗梦瑶, 简迅, 王丹阳, 等. 一贯煎对M1型骨髓巨噬细胞治疗肝硬化大鼠模型效果的影响及其机制分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(8): 1612-1619. DOI: 10.12449/JCH240817.

[7] CAO MZ, CHAN RWS, CHENG FHC, et al. Myometrial cells stimulate self-renewal of endometrial mesenchymal stem-like cells through WNT5A/β-catenin signaling[J]. Stem Cells, 2019, 37(11): 1455-1466. DOI: 10.1002/stem.3070.

[8] LIN QQ, WU LM, CHATLA S, et al. Hematopoietic stem cell regeneration through paracrine regulation of the Wnt5a/Prox1 signaling axis[J]. J Clin Invest, 2022, 132(12): e155914. DOI: 10.1172/JCI155914.

[9] ZHAO CG, QIN J, LI J, et al. LINGO-1 regulates Wnt5a signaling during neural stem and progenitor cell differentiation by modulating miR-15b-3p levels[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 372. DOI: 10.1186/s13287-021-02452-0.

[10] TIAN Y, CHEN JC, HUANG WS, et al. Myeloid-derived Wnts play an indispensible role in macrophage and fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(6): 2310-2322. DOI: 10.7150/ijbs.94166.

[11] JIAN X, WANG DY, XU YN, et al. Effect of polarized bone marrow-derived macrophage transplantation on the progression of CCl_4-induced liver fibrosis in rats[J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(12): 2830-2837. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.12.020.
简迅, 王丹阳, 许燕楠, 等. 极化骨髓巨噬细胞移植对CCl_4诱导的肝纤维化大鼠模型的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(12): 2830-2837. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.12.020.

[12] HAAG SM, MURTHY A. Murine monocyte and macrophage culture[J]. Bio Protoc, 2021, 11(6): e3928. DOI: 10.21769/BioProtoc.3928.

[13] JAMALL IS, FINELLI VN, QUE HEE SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[J]. Anal Biochem, 1981, 112(1): 70-75. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90261-x.

[14] GUILLOT A, TACKE F. Spatial dimension of macrophage heterogeneity in liver diseases[J]. eGastroenterology, 2023, 1(1): e000003. DOI: 10.1136/egastro-2023-000003.

[15] FLORES MOLINA M, ABDELNABI MN, MAZOUZ S, et al. Distinct spatial distribution and roles of Kupffer cells and monocyte-derived macrophages in mouse acute liver injury[J]. Front Immunol, 2022, 13: 994480. DOI: 10.3389/fimmu.2022.994480.

[16] NA YR, KIM SW, SEOK SH. A new era of macrophage-based cell therapy[J]. Exp Mol Med, 2023, 55(9): 1945-1954. DOI: 10.1038/s12276-023-01068-z.

[17] CHEN T, CHEN Y. Research progress in mechanism of fibrosis regulated by macrophage polarization[J]. J Jilin Univ: Med Edit, 2024, 50(5): 1465-1473. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240534.
陈潭, 陈艳. 巨噬细胞极化调控纤维化机制的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(5): 1465-1473. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240534.

[18] SHAO Y, ZHENG QQ, WANG W, et al. Biological functions of macrophage-derived Wnt5a, and its roles in human diseases[J]. Oncotarget, 2016, 7(41): 67674-67684. DOI: 10.18632/oncotarget.11874.

[19] MENCK K, KLEMM F, GROSS JC, et al. Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated

by two types of extracellular vesicles[J]. Oncotarget, 2013, 4(11): 2057-2066. DOI: 10.18632/oncotarget.1336.
[20] LIU Q, SONG JL, PAN Y, et al. Wnt5a/CaMKII/ERK/CCL2 axis is required for tumor-associated macrophages to promote colorectal cancer progression[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(6): 1023-1034. DOI: 10.7150/ijbs.40535.
[21] MA X, HUANG TD, CHEN XZ, et al. Molecular mechanisms in liver repair and regeneration: From physiology to therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2025, 10(1): 63. DOI: 10.1038/s41392-024-02104-8.
[22] HUCK I, GUNEWARDENA S, ESPANOL-SUNER R, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha activation is essential for termination of liver regeneration in mice[J]. Hepatology, 2019, 70(2): 666-681. DOI: 10.1002/hep.30405.
[23] SONG ZM, LIN SR, WU XW, et al. Hepatitis B virus-related intrahepatic cholangiocarcinoma originates from hepatocytes[J]. Hepatol Int, 2023, 17(5): 1300-1317. DOI: 10.1007/s12072-023-10556-3.
[24] SCHOLZEN T, GERDES J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(3): 311-322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182: 3<311: : AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
[25] SUN DQ, ZHOU XL, WU T, et al. Quercetin promotes the M1-to-M2 macrophage phenotypic switch during liver fibrosis treatment by modulating the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2026, 21(1): 31-46. DOI: 10.2174/0115748928318948240920044716.
[26] MORONI F, DWYER BJ, GRAHAM C, et al. Safety profile of autologous macrophage therapy for liver cirrhosis[J]. Nat Med, 2019, 25(10): 1560-1565. DOI: 10.1038/s41591-019-0599-8.
[27] BRENNAN PN, MACMILLAN M, MANSHIP T, et al. Autologous macrophage therapy for liver cirrhosis: A phase 2 open-label randomized controlled trial[J]. Nat Med, 2025, 31(3): 979-987. DOI: 10.1038/s41591-024-03406-8.

收稿日期：2025-08-04；**录用日期**：2025-11-07
本文编辑：林姣

引证本文：XING FF, WANG DY, ZHENG XR, et al. Effect and mechanism of Wnt5a knockdown on the efficacy of M1 bone marrow-derived macrophage in treatment of liver cirrhosis[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(3): 618-628.
邢飞飞, 王丹阳, 郑欣瑞, 等. Wnt5a基因敲低的M1型骨髓源性巨噬细胞对肝硬化大鼠模型的影响及其作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(3): 618-628.

·国外期刊精品文章简介·

Lancet Gastroenterology & Hepatology | Linerixibat治疗原发性胆汁性胆管炎伴胆汁淤积性瘙痒症患者：一项随机、多中心、双盲、安慰剂对照的Ⅲ期临床试验

胆汁淤积性瘙痒在原发性胆汁性胆管炎（PBC）中常见且并未获得足够有效的治疗干预，严重影响患者的生活质量。PBC患者中有高达55%～89%会经历瘙痒，其中25%～53%为中重度瘙痒，同时31%的重度瘙痒患者伴有重度抑郁。一线PBC治疗药物熊去氧胆酸（UDCA）对瘙痒没有效果。瘙痒的严重程度与PBC的疾病活动度并不直接相关。这意味着即使患者的生化指标得到控制，仍然可能遭受严重的瘙痒困扰。

来自多伦多肝病中心的Hirschfield等通过研究发现Linerixibat（一种回肠胆汁酸转运蛋白抑制剂）可显著改善PBC患者的瘙痒症状。该研究招募了伴有中重度瘙痒的PBC患者[最严重瘙痒数值评定量表（WI-NRS）评分≥4分]接受口服Linerixibat 40 mg每日2次或相匹配的安慰剂治疗，以瘙痒严重程度与是否合并使用止痒治疗作为分层因素。主要终点为24周内瘙痒程度的变化，采用WI-NRS评分进行评估。研究采用随机撤药设计，同时设计了Part B部分的探索性研究，进行了停药反弹及再用药改善的双重验证。结果显示，Linerixibat组患者在24周内瘙痒症状显著改善。Linerixibat组较基线的最小二乘均值变化为-2.86，安慰剂组为-2.15；校正后的均值差为-0.72（P=0.001 3）。不良事件主要以腹泻、腹痛等胃肠道反应为主，研究期间未报告死亡病例。关键次要终点第2周Linerixibat组WI-NRS评分显著改善（P=0.000 2）。在24周后交叉时，观察到Linerixibat与安慰剂之间的疗效存在差异：转换为Linerixibat的患者其瘙痒得到改善，而转换为安慰剂的患者出现恶化。

本研究证明，在发生中重度瘙痒的PBC患者中，Linerixibat可减少瘙痒以及与瘙痒相关的睡眠干扰，同时有更大规模的扩展研究正在进行，以验证其长期安全性及有效性。

摘译自HIRSCHFIELD GM, BOWLUS CL, JONES DEJ, et al. Linerixibat in patients with primary biliary cholangitis and cholestatic pruritus (GLISTEN): A randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2026, 11(1): 22-33. DOI: 10.1016/S2468-1253(25)00192-X.

（吉林大学第一医院感染病中心肝病科 高沿航 王星语 报道）