

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.10.003

# 活化的肝星状细胞 RBP-J 可诱导性基因敲除小鼠的构建及应用\*

岳振生<sup>1</sup> 蒋子剑<sup>1</sup> 杨毅聪<sup>1</sup> 阮柏<sup>1,2</sup> 王婷婷<sup>3</sup> 王琳<sup>1Δ</sup>

(1 第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学航空航天临床医学中心 陕西 西安 710032; 3 第四军医大学生物化学与分子生物教研室 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**利用 Cre-loxp 可诱导系统构建活化的肝星状细胞 RBP-J 可诱导性基因敲除小鼠模型,以实现肝纤维化过程中活化的肝星状细胞 Notch 信号通路的特异性阻断。**方法:**将 Sm22α<sup>CreERT2</sup> 和 RBP-J<sup>lox/lox</sup> 转基因小鼠杂交,得到 F1 小鼠,将繁殖的 F1 小鼠继续进行交配,得到 F2 小鼠,通过 PCR 鉴定出基因型为 Sm22α<sup>CreERT2</sup>,RBP-J<sup>lox/lox</sup> 的小鼠。通过腹腔注射四氯化碳建立肝纤维化模型,检测四氯化碳注射不同时间段后肝脏纤维化进展情况和肝星状细胞活化过程中 Sm22α 的表达情况。注射他莫昔芬诱导活化肝星状细胞中 RBP-J 基因的特异性敲除。分选肝星状细胞,q-PCR 和 Western Blot 检测活化肝星状细胞中 Notch 下游靶基因 Hes1、Hey1 表达情况以验证敲除效果。**结果:**通过连续交配我们获得了 Sm22α<sup>CreERT2</sup>,RBP-J<sup>lox/lox</sup> 小鼠。四氯化碳腹腔注射 4 周即可诱导肝脏发生较为明显的纤维化,同时肝星状细胞活化并逐渐高表达 Sm22α。给予他莫昔芬诱导 Cre 重组酶发挥作用后,敲除了活化的肝星状细胞中的 RBP-J 基因,其下游基因 Hes1、Hey1 表达降低 70% 以上,阻断了 Notch 信号通路。**结论:**我们成功构建了 RBP-J 可诱导性条件性基因敲除小鼠模型,实现了小鼠肝纤维化过程中活化肝星状细胞 Notch 信号通路的阻断,为深入研究 Notch 信号通路在肝纤维化中的作用和机制奠定了坚实的基础。

**关键词:**RBP-J; 诱导性条件性基因敲除; 肝星状细胞; Cre/loxp; 纤维化**中图分类号:**R-33; Q593.1; Q78; R575.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)10-1812-06

## Generation and Application of Activated Hepatic Stellate Cell RBP-J inducible Knockout Mice\*

YUE Zhen-sheng<sup>1</sup>, JIANG Zi-jian<sup>1</sup>, YANG Yi-cong<sup>1</sup>, RUAN Ba<sup>1,2</sup>, WANG Ting-ting<sup>3</sup>, WANG Lin<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Hepato-biliary Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Aerospace Clinical Medical Center, School of Aerospace Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032,

China; 3 Department of Molecular and Cellular Biochemistry, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To generate an inducible mouse line of conditional knockout of RBP-J in activated hepatic stellate cells, thus disrupting the Notch signaling of activated hepatic stellate cells in liver fibrosis. **Methods:** The Sm22α<sup>CreERT2</sup> and RBP-J<sup>lox/lox</sup> transgenic mice were crossed. The genotypes of their offspring were determined by polymerase chain reaction analysis and Sm22α<sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>lox/lox</sup> mice were obtained. Liver fibrosis model was established by intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub>. Sm22α, a marker of activated hepatic stellate cells during the process of liver fibrogenesis, was evaluated by immunofluorescence. Specific knockout of RBP-J in activated hepatic stellate cells was then realized by intraperitoneal injection of tamoxifen in mice. After purifying hepatic stellate cells from the fibrotic liver, the Notch target genes of Hes1 and Hey1 were examined by using q-PCR and Western-blot. **Results:** Mice with genotype of Sm22α<sup>CreERT2</sup> RBP-J<sup>lox/lox</sup> were obtained by consecutive breeding. Intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub> for 4 weeks could establish obvious liver fibrosis. During liver fibrosis, hepatic stellate cells were activated and began to express Sm22α. After intraperitoneal tamoxifen injection, RBP-J was successfully suppressed in Sm22α+ activated hepatic stellate cells as evidenced by significantly reduced expression (more than 70%) of Notch target genes—Hes1 and Hey1. **Conclusions:** We have successfully generated an inducible RBP-J conditional knockout mouse line and further developed a model of specific disruption of Notch signaling in activated-HSCs during the process of hepatic fibrogenesis, paving the way for study of the role and mechanisms of Notch signaling in modulating liver fibrosis in the future.

**Key words:** RBP-J; Inducible conditional gene knockout; Hepatic stellate cells; Cre/loxp; Fibrosis**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q593.1; Q78; R575.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)10-1812-06

\* 基金项目:国家重点研究发展计划青年科学家项目(2016YFA0102100);国家自然科学基金项目(81800533)

作者简介:岳振生(1993-),硕士研究生,研究方向:肝血窦与肝损伤,电话:15332415380,E-mail:18392181767@163.com

Δ 通讯作者:王琳(1981-),博士生导师,教授,研究方向:肝血窦与肝损伤,电话:13709113260,E-mail:fierywang@163.com

(收稿日期:2018-11-15 接受日期:2018-12-09)

## 前言

转录因子 RBP-J (J kappa recombination signal-binding protein) 是 Notch 信号通路的关键分子。当相邻细胞表面上的 Notch 配体与受体结合后,由  $\gamma$ -secretase 酶水解、切割 Notch 的跨膜区,并释放 Notch 胞内段 (notch intracellular domain, NICD) 入细胞核<sup>[1,2]</sup>。进入细胞核的 NICD 通过与 RBP-J 相互作用并募集其他转录激活因子,激活直接靶基因 Hes (hairy enhancer of split) 与 Hey (hairy enhancer of split-related with YRPW motif-like) 及间接靶基因 c-myc 和 CD25 等<sup>[2-4]</sup>。已有研究表明,肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的活化与 Notch 信号通路关系密切。在大鼠 HSC 细胞系中,Notch3 的胞内段参与调节 HSC 活化,影响该细胞的  $\alpha$ -SMA 和 I 型胶原 (collagen type I, Col I) 的表达<sup>[5]</sup>。此外,Notch1 和 TGF $\beta$ /BMP 信号通路协同作用可以调控下游基因 Hes1 的表达,从而诱导 HSC 的活化。体内实验也证实了肝纤维后 Notch3、Hes1、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、Col I 的表达增高<sup>[6-8]</sup>。提示了 Notch 信号通路调控 HSC 的活化参与肝纤维化的进展,但是具体机制并未得到详细地阐明。此外,肝脏纤维化的逆转和消融是近年来肝纤维化研究的重点和热点,多篇文章对肝纤维化后活化的 HSC (activated hepatic stellate cell, aHSC) 参与的纤维化逆转现象及机制进行了报道<sup>[9-12]</sup>,但是 Notch 信号是否参与调控肝纤维化的逆转和消融过程以及是否参与 aHSC 的衰老或凋亡的调控却尚未报道,也没有良好的基于 aHSC 中 Notch 信号通路的体内实验小鼠模型。本研究基于转凝蛋白 (transgelin, Sm22 $\alpha$ ) 在 aHSC 中的动态表达情况和同源重组理论,利用 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup> 小鼠和 RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠构建了 aHSC 的可诱导性条件性 RBP-J 基因敲除小鼠模型 (Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup>), 从而可以有条件地在特定的时间敲除 aHSC 中的 RBP-J 基因,为进一步深入研究肝纤维化模型中 Notch 信号通路对 HSC 活化过程以及对 aHSC 命运的调控及机制奠定了坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物: Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup> 小鼠来自南京大学模型动物研究所, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠购自 Jackson 实验室, 所有实验所用动物均按照无特定病原 (specific pathogen free, SPF) 级标准进行繁殖饲养。

动物实验相关试剂: 橄榄油 (国药集团: 69018028)、四氯化碳 (天津富宇)、他莫昔芬 (Sigma 公司: T5648)、玉米油 (Sigma 公司: C8267)。

PCR 相关试剂: 2 $\times$  Taq MasterMix (康为世纪: CW0682)、蛋白酶 K (康为世纪公司: CW2584)、TRIzol 裂解液 (Invitrogen 公司: 15596018)、cDNA 反转录试剂盒 5 $\times$  PrimeScript RT Master Mix (Takara 公司: RR036)、2 $\times$  SYBR Premix Ex Taq II (Takara 公司: RR820)。

HSC 分离相关试剂及仪器: HBSS 缓冲液 (Hyclone 公司)、DMEM 培养基 (Hyclone 公司)、IV 型胶原酶 (Sigma 公司: C5138)、OptiPrep 分离液 (AXIS-SHIELD PoCAS 公司: 1114542)、DNase-I (Roche 公司: 10-104-159-001)、100  $\mu$ m 细胞

筛网 (BD 公司: 352360)、Gentle MACSTM 全自动组织处理器 (Miltenyi 公司)、低温高速离心机 (Eppendorf)、恒温摇床 (Infors)。

Western Blot 及免疫荧光染色相关试剂: QuickBlock™ 免疫荧光封闭液 (碧云天公司: P0260)、QuickBlock™ 免疫染色一抗/二抗稀释液 (碧云天公司: P0262/P0265)、Hoechst33342 (Thermo 公司: H3570)、小鼠源性  $\alpha$ -SMA 抗体 (Servicebio 公司: GB13044)、Sm22 $\alpha$  抗体 (Abcam 公司: ab14106)、兔源性抗 HES1 抗体 (Sigma, SAB2108472)、鼠源性抗  $\beta$ -ACTIN 抗体 (CST, 3700s)、Cy3 标记山羊抗小鼠荧光二抗 (Servicebio 公司: GB21301)、FITC 标记山羊抗大鼠荧光二抗 (Jackson 公司: 112-095-003)、HRP 标记山羊抗兔/小鼠二抗 (康为世纪公司: CW0103/CW0102)。

### 1.2 方法

1.2.1 四氯化碳肝纤维化模型 以橄榄油配制 15% 四氯化碳, 按照 4  $\mu$ L/g 体重的剂量, 每周腹腔注射两次, 对小鼠诱导肝纤维化模型, 在指定时间点进行取材。

1.2.2 小鼠基因型的鉴定 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup> 小鼠与 RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠交配产生第一代, 得到第一代小鼠基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/+</sup>, 将子一代小鼠进行交配, 繁殖得到基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup>, Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/+</sup>, Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>+/+</sup> 的三种基因型小鼠。筛选出基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 的小鼠, 即获得 aHSC 中可诱导性条件性基因敲除的纯和小鼠 (Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup>)。Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>+/+</sup> 小鼠为对照组。

1.2.3 小鼠基因组 DNA 的提取 取三周龄小鼠的鼠尾 0.5~1 cm, 使用蛋白酶 K 于 tail buffer 中 55  $^{\circ}$ C 消化过夜后, 根据试剂盒说明书提取鼠尾基因组 DNA。

Cre 重组酶的鉴定: 上游引物 5'-CCGGTCGATGCAAC-GAGTGATGAGG, 下游引物 5'-GCCTCCAGCTTGCAT-GATCTCCGG。使用 Cre 重组酶引物扩增小鼠基因组 DNA, 鉴定是否含有 Cre 重组酶。1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 带有 Cre 酶基因的小鼠扩增产物条带为 900 bp 左右, 野生型小鼠无扩增产物条带。

1.2.4 RBP-J 基因组基因型的鉴定 含有 loxp 位点基因序列的上游引物 5'-GTTCTTAACCTGTTGGTCGGAACC, 下游引物 5'-ACCGGTGGATGTGGAATGTGT。不含 loxp 位点基因序列的上游引物 5'-GTTCTTAACCTGTTGGTCGGAACC, 下游引物 5'-GCTTGAGGCTTGATGTTCTGTATTGC。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定是否含有 PCR 产物, 含有 loxp 位点的 RBP-J 基因组扩增产物大小为 250 bp 左右, 不含 loxp 位点的 RBP-J 基因组扩增产物大小为 500 bp 左右。

1.2.5 小鼠 Cre 酶的诱导表达 取 6-8 周龄鉴定成功的 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠, 腹腔注射 15% 四氯化碳, 按照 4  $\mu$ L/g 体重的剂量, 每周腹腔注射两次, 对小鼠诱导肝纤维化模型, 使 HSC 活化并表达 Sm22 $\alpha$ , 注射 4 周。第 5 周开始连续 5 天腹腔内注射他莫昔芬 2 mg/次 (溶于 100  $\mu$ L 玉米油中), 待小鼠恢复一周后进行取材分析。

1.2.6 HSC 的分离及 RBP-J 敲除效率鉴定 采用密度梯度离心法分离 HSC<sup>[13]</sup>, q-PCR 及 Western Blot 检测 Notch 下游信号分子 Hes1、Hey1 表达情况。

1.2.7 肝脏病理切片 HE 染色, 天狼猩红染色, Sm22 $\alpha$  免疫荧光染色检测肝脏纤维化以及 Sm22 $\alpha$  表达情况。解剖四氯化碳诱导不同时间点的小鼠肝脏进行石蜡包埋、冰冻包埋、切片、HE 染色、天狼猩红染色以及免疫荧光染色检测肝脏的组织学变化。

### 1.3 统计学方法

形态学定量统计使用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计, 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 定量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 t 检验。P<0.05 表示有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 小鼠基因型鉴定

将 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup> 小鼠和 RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 转基因小鼠交配, 繁殖得到 F1 小鼠, 基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/+</sup>, F1 小鼠继续交配, 得到 F2 小鼠, 鉴定基因型分别为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup>、Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/+</sup>、Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>+/+</sup>。三种基因型子代数量比例约为 1:2:1, 符合孟德尔基因分离定律。其中基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 即为 aHSC 可诱导性条件性 RBP-J 敲除小鼠, Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>+/+</sup> 的小鼠即为野生型 (wild type, WT) 小鼠。用 RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 引物扩增小鼠 DNA 时, 若只得到 250 bp 左右的产物, 则说明该小鼠两条 RBP-J 等位基因上均含有 loxp 位点, 如图 1 中 6、7、8 号小鼠所示。若只得到 500 bp 左右的产物, 则说明该小鼠两条 RBP-J 等位基因上均无 loxp 位点, 如图 1 中 4 号小鼠所示。若同时得到 250 bp 和 500 bp 的产物, 则说明只有一条 RBP-J 等位基因上含 loxp 位点, 为杂合子, 如图 1 中 1、2、3、5、9、10 号小鼠。然后再用 Cre 酶引物扩增小鼠基因组 DNA, 若能得到 900 bp 左右的条带, 则说明为基因组带有 Cre 酶基因, 如图 1 中 1、2、3、4、6、7、8、9、10 号小鼠, 结合两种 PCR 结果, 即可鉴定小鼠基因型, 筛选出目标转基因小鼠。如图 1 中 10 只小鼠基因组鉴定结果: 6、7、8 号小鼠基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup>, 1、2、3、9、10 号小鼠基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/+</sup>, 4 号小鼠基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>+/+</sup>, 5 号小鼠基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/+</sup>。

### 2.2 四氯化碳诱导肝纤维化进展

肝脏组织学检测发现: 如图 2A 所示, HE 染色显示四氯化碳腹腔注射小鼠一周后, 可见肝脏组织汇管区出现少许炎症细胞浸润, 肝组织破坏轻微。四氯化碳注射三周后, 肝脏汇管区炎症浸润增多, 肝脏组织破坏加重。四氯化碳注射四周后, 肝脏组

织破坏更加严重, 汇管区炎症细胞进一步增多, 出现大片红色坏死区域。诱导第六周肝脏组织破坏及炎症浸润进一步严重。如图 2B 所示, 天狼猩红染色可见四氯化碳注射一周时肝脏汇管区出现较多胶原沉积, 肝小叶区也出现少许胶原沉积, 此后随着注射时间的延长, 肝脏汇管区及肝小叶区的胶原沉积逐渐增加, 第六周最多。

### 2.3 四氯化碳诱导活化肝星状细胞的 Sm22 $\alpha$ 的表达

如图 3A 所示, 免疫荧光染色表明 Sm22 $\alpha$  分子在四氯化碳注射一周后在肝脏即有表达, 三周后 Sm22 $\alpha$  分子表达明显增加, 在汇管区的表达较多, 肝小叶区也可见表达。注射四周后 Sm22 $\alpha$  在全肝组织中表达增加, 汇管区以及肝小叶区均表达丰富, 注射六周后最多。图 3B 为四氯化碳注射四周后 Sm22 $\alpha$  与 aHSC 的标志物  $\alpha$ -SMA 的共定位染色结果, 显示 Sm22 $\alpha$  与  $\alpha$ -SMA 存在很高比例(92%)的共定位(黄色区域)。表明四氯化碳注射四周后肝脏中即有大量 HSC 发生活化, 且活化后的 HSC 表达丰富的 Sm22 $\alpha$  分子。

### 2.4 小鼠活化肝星状细胞中 RBP-J 敲除, 实现 Notch 信号通路的阻断

如图 4 所示, 取四氯化碳诱导四周的 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠, WT 鼠为对照, 连续五天腹腔注射他莫昔芬, 四氯化碳按原方案注射。造模结束后分选小鼠肝脏 aHSC, 检测 aHSC 中 Notch 信号通路下游分子 Hes1, Hey1 的表达情况。如图 5A 所示, 与 WT 对照组相比, Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 组在 mRNA 水平可看到 Hes1 和 Hey1 均明显降低 70% 以上, 差异有统计学意义。图 5B 可看到 Notch 下游分子 HES1 的蛋白质表达水平在 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 组也明显下调, 证明了 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>fllox/fllox</sup> 组 aHSC 中 RBP-J 基因被敲除, Notch 信号通路被成功阻断。

## 3 讨论

Notch 信号通路家族成员的结构具有高度保守性, 在胚胎和成年个体组织中广泛表达, 主要由表达于相邻细胞上的 Notch 受体和配体, 细胞内的下游分子、转录因子和其他调节分子组成<sup>[2]</sup>。Notch 信号通路参与调节胚胎发育、细胞分化、细胞角色转变等过程并发挥重要调控作用<sup>[14-16]</sup>。哺乳动物中 Notch 受体有 4 种, 分别为 Notch1-4; 配体有 5 种, 分别为 DLL(Delta like)1、3、4 和 Jagged1、2<sup>[17]</sup>。在成人肝脏中, 受体 Notch1-4 均有表达, 5 种配体中只有 Jagged1 和 DLL4 有表达<sup>[18-21]</sup>。转录因子 RBP-J 作为 Notch 信号通路中的关键分子, 是 Notch 信号通路的枢纽, 作用至关重要。在细胞中特异性敲除 RBP-J 基因, 可以有效地阻断 Notch 信号通路<sup>[22]</sup>, 从而干扰 Notch 信号对下游基因的调控。

肝纤维化是许多慢性肝病逐渐发展为肝硬化的必经阶段, 其发病原因和发病机制非常复杂。HSC 是肝脏中重要的一类细胞, HSC 的持续激活被认为是肝纤维化进展的关键环节。Schumacher 的近期研究证实了静息态的 HSC 并不表达 Sm22 $\alpha$ <sup>[23]</sup>, 然而当肝脏遭受损伤或炎症侵害, 处于静息态的 HSC 会发生活化。此时, aHSC 开始具有收缩性和趋化作用并表达纤维化蛋白如  $\alpha$ -SMA、Col I 和波形蛋白<sup>[24]</sup>, 其中也包括肌成纤维细胞和平滑肌细胞的标志物 Sm22 $\alpha$ <sup>[23]</sup>, 从而导致大量

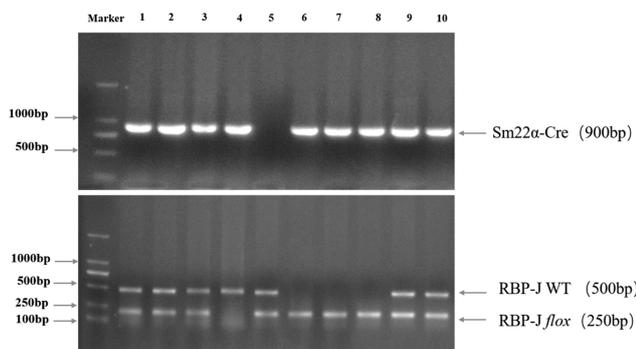


图 1 子二代小鼠基因组 PCR 鉴定结果

Fig.1 PCR genotype identification results of F2 mice

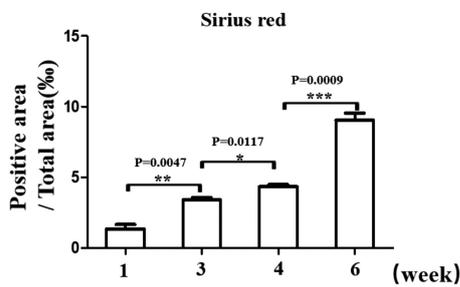
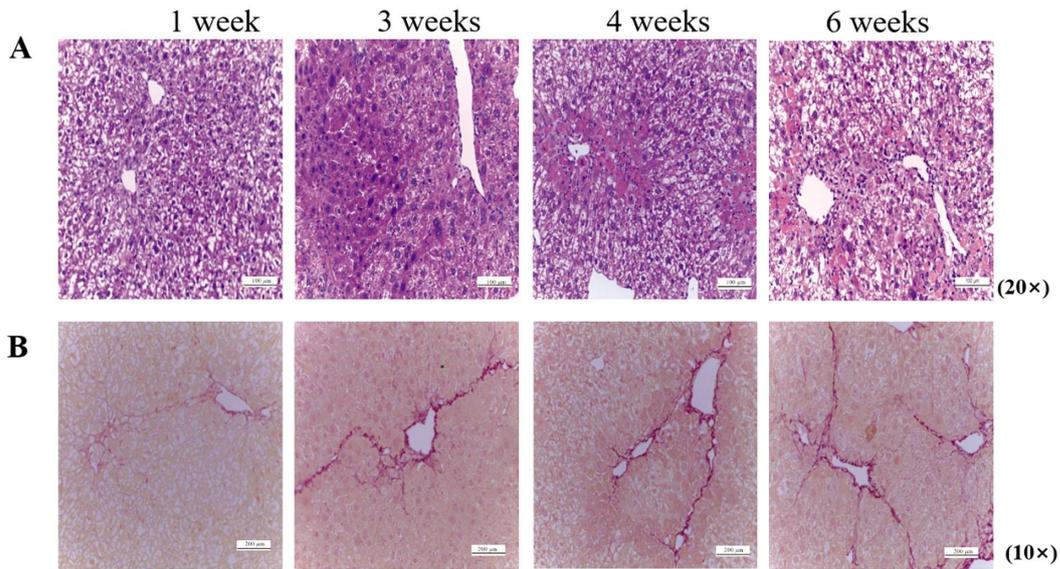


图 2 四氯化碳注射不同周数后小鼠肝脏组织 HE 和天狼猩红染色结果。(n=3, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

Fig.2 HE and sirius red staining of mice liver after different weeks CCl4 injection. (n=3, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

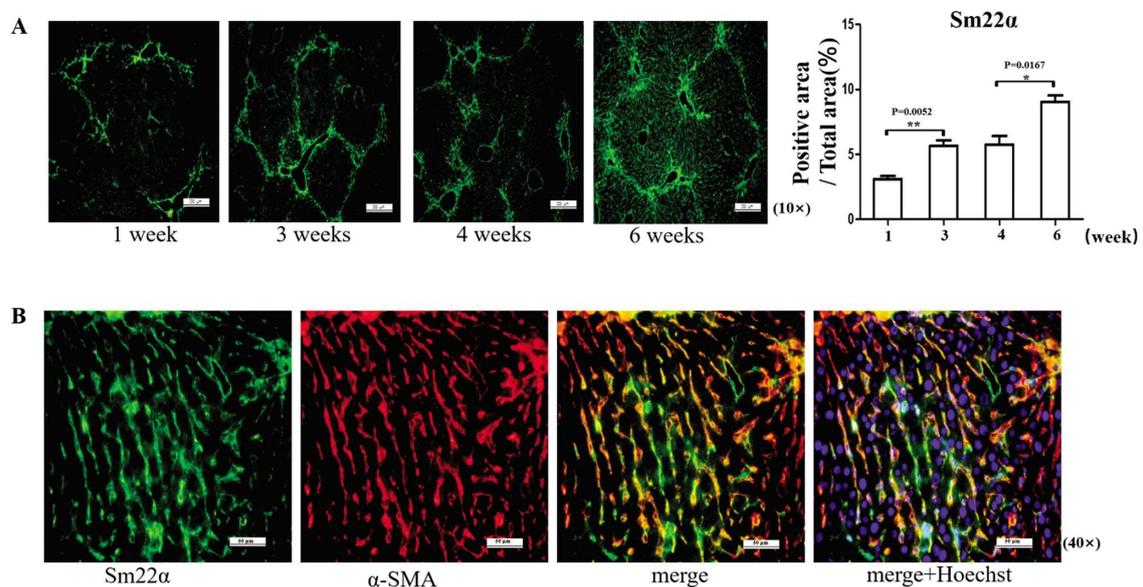


图 3 小鼠肝脏组织 Sm22 $\alpha$  的动态表达和 Sm22 $\alpha$  与  $\alpha$ -SMA 共定位染色。(n=3, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

Fig.3 Sm22 $\alpha$  dynamic expression and Sm22 $\alpha$  &  $\alpha$ -SMA colocalization staining of mice liver. (n=3, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

细胞外基质的沉积。这些变化与多个信号通路相关,是纤维化形成的关键。因此,阻止 HSC 活化、减少 aHSC 细胞外基质的产生、促进 aHSC 的衰老或凋亡是肝纤维化治疗的关键,也一直是肝纤维化研究领域的热点和焦点。前期研究已证明 Notch 信号通路参与了肝纤维化的各个环节,其中初步发现 Notch 可与多种信号通路协同参与调节 HSC 活化,如 TGF- $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、

WNT 和 Hedgehog 信号通路<sup>[6,25-27]</sup>。但是由于 Notch 信号通路的功能多效性以及肝脏内各种细胞之间信号通路作用的复杂性,具体是哪些分子在 HSC 的活化和活化后的调节过程中起关键作用以及具体机制并不明确。此外,Notch 信号通路是否参与了 aHSC 的衰老和凋亡过程也尚未见报道。因此,想进一步明确在肝纤维化后 Notch 信号通路在 aHSC 中的作用,亟需一种良好

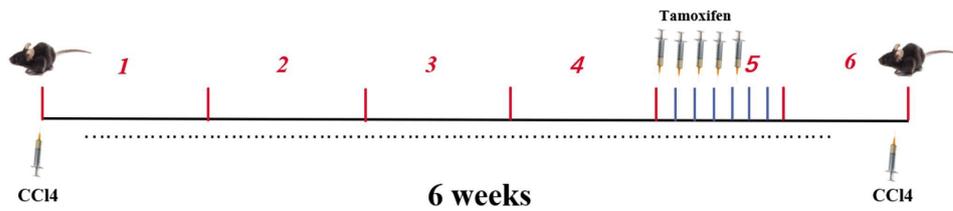


图 4 肝纤维化模型以及 aHSC 中 RBP-J 基因敲除的诱导方案

Fig.4 Programme of inducing mice liver fibrosis and RBP-J knockout in aHSC

的针对体内 aHSC 中 Notch 信号通路的肝纤维化动物模型。

转基因小鼠可以从整体水平研究基因功能,并能最大限度的排除其它非基因自身因素的影响,而得到广泛应用。目前,由于常规的组成型基因敲除技术无法以组织和时间特异性方式发挥作用,通常会影响到动物的胚胎发育和代谢,导致无法存活或发育异常。而可诱导性条件性基因敲除技术可以完美规避常规基因敲除技术这样的缺点,并且可以精确地在特定的时间点和细胞类型中研究基因的功能,如 Cre/loxp 可诱导系统。Cre 基因可编码一种重组酶,可以识别基因序列中相邻的 loxp 位点,根据 loxp 位点的方向,将两个 loxp 位点之间的 DNA 序列剪切,从而达到基因敲除的目的<sup>[28]</sup>。我们实验室引用了一种受 Sm22 $\alpha$  启动子操控,表达 Cre 的转基因小鼠<sup>[29]</sup>。Sm22 $\alpha$  是一种肌动蛋白片段相关蛋白,可以参与调节肌动蛋白对细胞形态,迁移以及转化的作用<sup>[30]</sup>,被默认为 aHSC 和平滑肌细胞的特异性标志分子<sup>[31]</sup>。因此通过启动子驱动 Cre 重组酶的表达,可以在 aHSC 中完成特定基因的敲除。在这个系统中,Cre 重组酶融合了一种突变的雌激素受体(ERT2),在细胞未进行药物诱导时,Cre-ERT2 游离在细胞质中,不能发挥作用。当给予他莫昔芬(ERT2 突变体的配体)后,Cre-ERT2 转移到细胞核内,Cre 重组酶识别目的基因 RBP-J 上的 loxp 位点,将目的基因 RBP-J 的第 6,7 外显子切除,使 RBP-J 在 aHSC 中不能转录和翻译蛋白,从而达到在 aHSC 中敲除 RBP-J,阻断 Notch 信号通路。

我们通过鼠尾鉴定初步筛选出了基因型为 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>lox/lox</sup> 小鼠,诱导肝纤维化后促使 HSC 活化,然后连续 5 天腹腔注射他莫昔芬,一周后从肝脏中分离 aHSC,用 q-PCR 检测 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>lox/lox</sup> 小鼠与 WT 小鼠 aHSC 中 Notch 信号通路下游分子的表达。q-PCR 结果显示,Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>lox/lox</sup> 小鼠 aHSC 中的 Notch 信号通路下游分子 Hes1、Hey1 明显下调,说明了 RBP-J 基因在 aHSC 中被成功敲除。Western Blot 结果也显示 Sm22 $\alpha$ <sup>CreERT2</sup>, RBP-J<sup>lox/lox</sup> 小鼠 aHSC 中 HES1 的蛋白质水平同样明显下调。综上,本实验成功构建了 RBP-J 可诱导性条件性敲除小鼠并诱导了小鼠肝纤维化模型,并在肝纤维化模型中对 aHSC 中的 Notch 信号通路进行了阻断,从基因组 DNA 片段的鉴定,mRNA 的转录水平,以及蛋白质的表达水平三个方面证明了小鼠肝纤维化模型 aHSC 中的 RBP-J 的敲除,即 Notch 信号通路的阻断。为后续在体内探索 aHSC 中 Notch 信号通路对肝纤维化进展及逆转的作用及潜在机制奠定了坚实的基础。

本研究应用 Cre-loxp 系统成功地诱导敲除了小鼠肝纤维化模型中 aHSC 中的 RBP-J 基因,构建了可诱导性条件性 Notch 信号通路阻断小鼠模型。然而对于该小鼠在肝纤维化进展以及肝纤维化消融、逆转过程中的表型以及潜在机制并未进

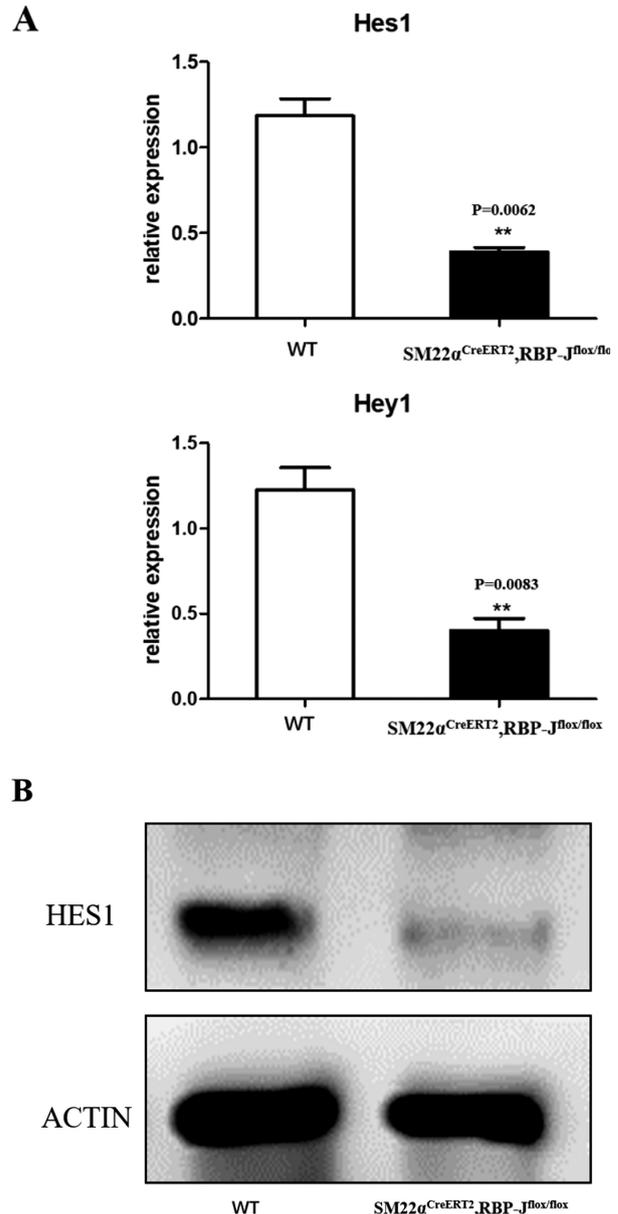


图 5 aHSC 中 Notch 信号通路下游分子 mRNA 以及蛋白质表达情况 (n=3, \*\*P<0.01)

Fig.5 mRNA and protein expression of Notch signaling pathway downstream molecule in aHSC (n=3, \*\*P<0.01)

行深入分析和探索,仍需进一步研究。

参考文献(References)

[1] Paul M S, Dutta D, Singh A, et al. Regulation of Notch signaling in the developing Drosophila eye by a T-box containing transcription factor, Dorsocross[J].Genesis, 2018. [Epub ahead of print]

- [2] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini M E. Notch signaling[J]. *Science*, 1995, 268(5208): 225-232
- [3] Haque R, Song J, Haque M, et al. c-Myc-Induced Survivin Is Essential for Promoting the Notch-Dependent T Cell Differentiation from Hematopoietic Stem Cells[J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8(3)
- [4] Liu X, Ren S, Ge C, et al. Sca-1+Lin-CD117- mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IRF8-controlled regulatory dendritic cells through Notch-RBP-J signaling[J]. *J Immunol*, 2015, 194(9): 4298-4308
- [5] Chen Y X, Weng Z H, Zhang S L. Notch3 regulates the activation of hepatic stellate cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18 (12): 1397-1403
- [6] Xie G, Karaca G, Swiderska-Syn M, et al. Cross-talk between Notch and Hedgehog regulates hepatic stellate cell fate in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 58(5): 1801-1813
- [7] Wang Y, Shen R W, Han B, et al. Notch signaling mediated by TGF-beta/Smad pathway in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(13): 2330-2336
- [8] Aimaiti Y, Jin X, Wang W, et al. TGF-beta1 signaling regulates mouse hepatic stellate cell differentiation via the Jagged1/Notch pathway[J]. *Life Sci*, 2018, 192: 221-230
- [9] Tacke F, Trautwein C. Mechanisms of liver fibrosis resolution [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4): 1038-1039
- [10] Feng M, Ding J, Wang M, et al. Kupffer-derived matrix metalloproteinase-9 contributes to liver fibrosis resolution [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(9): 1033-1040
- [11] Mauro E, Crespo G, Montironi C, et al. Viral eradication and fibrosis resolution in post-liver transplant cholestatic hepatitis C virus [J]. *Liver Transpl*, 2018, 24(5): 703-707
- [12] Ramachandran P, Iredale J P, Fallowfield J A. Resolution of liver fibrosis: basic mechanisms and clinical relevance[J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(2): 119-131
- [13] Liu W, Hou Y, Chen H, et al. Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies [J]. *Proteomics*, 2011, 11(17): 3556-3564
- [14] Corson F, Couturier L, Rouault H, et al. Self-organized Notch dynamics generate stereotyped sensory organ patterns in *Drosophila* [J]. *Science*, 2017, 356(6337)
- [15] Guo Z, Ohlstein B. Stem cell regulation. Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency [J]. *Science*, 2015, 350(6263)
- [16] Magnusson J P, Goritz C, Tatarishvili J, et al. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse [J]. *Science*, 2014, 346(6206): 237-241
- [17] Luca V C, Kim B C, Ge C, et al. Notch-Jagged complex structure implicates a catch bond in tuning ligand sensitivity[J]. *Science*, 2017, 355(6331): 1320-1324
- [18] Lin W, Zhao J, Cao Z, et al. *Livistona chinensis* seeds inhibit hepatocellular carcinoma angiogenesis in vivo via suppression of the Notch pathway[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1723-1728
- [19] Verginelli F, Adesso L, Limon I, et al. Activation of an endothelial Notch1-Jagged1 circuit induces VCAM1 expression, an effect amplified by interleukin-1beta [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (41): 43216-43229
- [20] Wang J, Dong M, Xu Z, et al. Notch2 controls hepatocyte-derived cholangiocarcinoma formation in mice [J]. *Oncogene*, 2018, 37(24): 3229-3242
- [21] Mao Y, Tang S, Yang L, et al. Inhibition of the Notch Signaling Pathway Reduces the Differentiation of Hepatic Progenitor Cells into Cholangiocytes in Biliary Atresia[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49 (3): 1074-1082
- [22] Wang L, Wang C M, Hou L H, et al. Disruption of the transcription factor recombination signal-binding protein-Jkappa (RBP-J) leads to veno-occlusive disease and interfered liver regeneration in mice [J]. *Hepatology*, 2009, 49(1): 268-277
- [23] Schumacher E C, Gotze S, Kordes C, et al. Combined Methylome and Transcriptome Analysis During Rat Hepatic Stellate Cell Activation[J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(24): 1759-1770
- [24] Anderson J E. Hepatocyte Growth Factor and Satellite Cell Activation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 900: 1-25
- [25] Zhang K, Zhang Y Q, Ai W B, et al. Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF-beta/BMP signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(3): 878-887
- [26] Ang H L, Tergaonkar V. Notch and NFkappaB signaling pathways: Do they collaborate in normal vertebrate brain development and function?[J]. *Bioessays*, 2007, 29(10): 1039-1047
- [27] Rashid S T, Humphries J D, Byron A, et al. Proteomic analysis of extracellular matrix from the hepatic stellate cell line LX-2 identifies CYR61 and Wnt-5a as novel constituents of fibrotic liver [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(8): 4052-4064
- [28] Bouabe H, Okkenhaug K. Gene targeting in mice: a review [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1064: 315-336
- [29] Kuhbandner S, Brummer S, Metzger D, et al. Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle[J]. *Genesis*, 2000, 28(1): 15-22
- [30] Liu R, Hossain M M, Chen X, et al. Mechanoregulation of SM22alpha/Transgelin[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(41): 5526-5538
- [31] Klein S, Rick J, Lehmann J, et al. Janus-kinase-2 relates directly to portal hypertension and to complications in rodent and human cirrhosis[J]. *Gut*, 2017, 66(1): 145-155