

· 研究论文 ·

肌成纤维细胞上调P4ha1增加胶原纤维直径 和细胞外基质硬度的机制研究

丁靖茹 吴美珍 谭琼 岳闻慧 李丽英 杨乐*

(首都医科大学基础医学院细胞生物学系, 首都医科大学基础-临床联合实验室,
肝脏保护和再生调节北京市重点实验室, 北京 100069)

摘要 肝脏疾病严重危害现代社会人类健康。脯氨酰4-羟化酶a1(P4ha1)已被证明在心肌纤维化中发挥重要作用, 但其对于肝纤维化的影响及机制尚不清楚。肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs)在肝纤维化中扮演重要角色, 通过分泌大量以胶原为主的细胞外基质成分, 促进肝纤维化的发展。该文旨在探讨MFs中P4ha1对于胶原纤维直径和细胞外基质硬度变化的调控机制。作者下载并分析了单细胞测序公共数据集明确肝损伤时P4ha1的细胞定位; 在体外实验中, 使用TGFβ1处理小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs), 诱导其分化为MFs, 测定P4ha1在MFs中的表达及亚细胞定位。在MFs中用P4ha1药理学抑制剂DiethylpythiDC后, 使用羟脯氨酸试剂盒检测并定量Pull down分离出的每摩尔I型胶原内羟脯氨酸的含量, 代表P4ha1酶活性, 使用扫描电镜观察胶原形态并测量胶原纤维直径, 使用原子力显微镜测定细胞外基质硬度。结果显示, 在肝纤维化小鼠模型中, P4ha1高表达于损伤肝脏的MFs细胞; 在体外实验中, 使用TGFβ1处理BMSCs细胞使其分化为MFs, 此过程P4ha1表达上调, 且P4ha1主要定位于MFs的细胞质基质区域; 在MFs细胞上使用DiethylpythiDC抑制P4ha1功能后, 羟脯氨酸含量降低, 胶原纤维直径缩小, 细胞外基质硬度也明显降低。该研究证实: 在小鼠肌成纤维细胞中, P4ha1通过促进脯氨酸残基的羟基化增加胶原纤维的直径和细胞外基质硬度, 从而参与肝纤维化的发生和发展。

关键词 脯氨酰4-羟化酶; 肝纤维化; 骨髓间充质干细胞; 肌成纤维细胞; 胶原; 细胞外基质

The Mechanism of Up-Regulated P4ha1 Increasing Collagen Fiber Diameter and Extracellular Matrix Stiffness in Myofibroblasts

DING Jingru, WU Meizhen, TAN Qiong, YUE Wenhui, LI Liying, YANG Le*

(Department of Cell Biology, Laboratory for Clinical Medicine, Municipal Laboratory for Liver Protection
and Regulation of Regeneration, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Liver disease seriously endangers human health in modern society. P4ha1 (prolyl 4-hydroxylase a1) has been found to be involved in cardiac fibrosis, but the effects and mechanism of P4ha1 on liver fibrosis

收稿日期: 2025-05-07 接受日期: 2025-10-16

首都医学科学创新中心有组织科研专项重点项目(批准号: CX25YZ01)资助的课题

*通信作者. Tel: 010-83950469, E-mail: yangle@ccmu.edu.cn

Received: May 7, 2025

Accepted: October 16, 2025

This work was supported by the Chinese Institutes for Medical Research, Beijing (Grant No.CX25YZ01)

*Corresponding author. Tel: +86-10-83950469, E-mail: yangle@ccmu.edu.cn

are still unclear. MFs (myofibroblasts) play an important role in liver fibrosis and promote the progression of liver fibrosis by secreting a large amount of extracellular matrix components such as collagen. The aim of this study is to explore the regulatory mechanism of P4ha1 on collagen fiber diameter and extracellular matrix stiffness in MFs. The cell localization of P4ha1 in fibrotic liver was analyzed using public single cell sequencing databases. *In vitro* primary mouse BMSCs (bone marrow mesenchymal stromal cells) were treated with TGF β 1 (transforming growth factor beta 1) to induce their differentiation into MFs. The expression and cellular localization of P4ha1 in MFs were determined by RT-qPCR and immunofluorescent staining. With the treatment of P4ha1 inhibitor DiethylpythiDC in MFs, this study analyzed and quantified the content of hydroxyproline (per mol type I collagen), representing the enzymatic activity of P4ha1, observed collagen morphology under scanning electron microscope and measured the average diameter of collagen fibers. In addition, the stiffness of extracellular matrix in MFs was measured by atomic force microscopy after the inhibition of P4ha1. The results showed that P4ha1 was mainly localized in MFs of fibrotic liver. *In vitro*, BMSCs were treated with TGF β 1 to induce their differentiation into MFs. P4ha1 expression was up-regulated during MFs activation, and P4ha1 was localized in the cytoplasmic matrix region within MFs. With the treatment of DiethylpythiDC in MFs, the level of hydroxyproline decreased, collagen fiber diameter reduced, and extracellular matrix stiffness decreased. These results demonstrate that P4ha1 plays a key role in modulating collagen fiber diameter and stiffness via the hydroxylation of proline, thus promotes the progression of liver fibrosis.

Keywords prolyl 4-hydroxylase; liver fibrosis; bone marrow mesenchymal stromal cell; myofibroblast; collagen; extracellular matrix

肝脏疾病是现代社会危害人类健康的重大疾病之一,慢性肝病的负担正在全球以惊人的速度增加^[1]。肝纤维化是病毒性肝炎、药物性肝病、代谢功能障碍相关脂肪变性肝病等慢性肝病最重要的病理特征,是肝硬化、肝癌和肝衰竭等长期结局的关键决定因素^[2-3]。肝纤维化时,活化的肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs)通过自分泌或旁分泌的方式分泌多种细胞因子,促进其自身的增殖、迁移和收缩。尤其是, MFs分泌大量细胞外基质成分如I型胶原,而胶原蛋白的过度沉积和交联反过来又会进一步促进肝纤维化的发展^[4]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stromal cells, BMSCs)在肝纤维化时可从骨髓迁移至损伤肝脏,分化为MFs,作为MFs的主要来源之一,其在肝纤维化的发生发展中发挥重要作用^[5]。

脯氨酰4-羟化酶(prolyl 4-hydroxylase, P4h)是位于内质网腔内的一种重要胶原修饰酶,可将胶原Gly-X-Y氨基酸重复序列“Y”位点上的脯氨酸羟化为4-羟脯氨酸,在胶原合成中起重要作用^[6]。P4h是由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成的异源四聚体, α 亚基是催化亚基,根据其不同分为脯氨酰4-羟化酶a1(P4ha1)、脯氨酰4-羟化酶a2(P4ha2)、脯氨酰4-羟化酶a3(P4ha3)三个亚型^[7]。其中,P4ha1广泛表达于各种类型的细胞和组织;而P4ha2和P4ha3表达于有限的细胞,且表

达量较低^[8]。因此,我们将关注点放到P4ha1上。

目前对于P4ha1的研究多集中在肿瘤领域。在肺癌、三阴性乳腺癌、神经胶质瘤和葡萄膜黑色素瘤等多种类型的肿瘤中,P4ha1的表达水平平均增高且与病人生存率呈负相关关系^[9-10]。例如,在成纤维细胞中过表达P4ha1可导致胶原蛋白合成增加、构象改变从而导致细胞外基质重塑,进而诱导乳腺癌细胞形态、黏附和迁移能力的变化,促进肿瘤细胞的侵袭和沿胶原纤维的快速转移。在头颈部鳞状细胞癌中,激活P4ha1促进I型胶原沉积并增强肿瘤干细胞样表型^[11]。在胶质母细胞瘤中,P4ha1/琥珀酸信号通路通过调控琥珀酸的生物合成和磷酸甘油酸激酶1的琥珀酸化从而促进肿瘤生长^[12-13]。此外,P4ha1也可通过促进鼻咽癌细胞的肺定植从而促进鼻咽癌的进展,并可被STAT1转录激活从而促进食管癌的进展^[14-15]。值得注意的是,近期有研究关注到P4ha1在纤维化疾病中的重要作用。例如,P4ha1参与了心肌纤维化的进展,P4ha1活性下降能够抑制心肌成纤维细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进高糖介导的心肌成纤维细胞的细胞周期停滞和细胞凋亡,从而延缓心肌纤维化进程^[16]。但是目前对于P4ha1在肝纤维化中发挥的具体作用及可能的调控机制尚不清楚。

本课题组将关注点放在P4ha1在纤维化肝脏中

的细胞定位及在MFs中的具体作用机制,并且思考能否通过靶向抑制P4ha1进而改善肝脏纤维化^[17]。我们提出科学假说:肝纤维化时MFs中的P4ha1通过对脯氨酸的羟化作用,影响胶原纤维直径变化,进一步增加细胞外基质硬度,从而加重肝纤维化。该研究旨在阐明肝纤维化时P4ha1对于胶原纤维直径变化和细胞外基质硬度的影响及其调控机制,探讨P4ha1在治疗肝纤维化中的可能潜在价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 普通ICR雄性小鼠,体质量为18~20 g,约4周龄,SPF级,购于首都医科大学实验动物中心。所有动物实验均遵循2006年国家科技部办法的《关于善待实验动物的指导性意见》和相关伦理学规范。本实验经首都医科大学伦理委员会批准(伦理编号:AEEI-2022-216)。

1.1.2 细胞 原代培养的小鼠BMSCs,本实验室已建立起成熟的BMSCs分离与培养方法。

1.1.3 主要仪器 Ltd超净工作台(型号:HPH12)购自德国 Heraeus公司;移液器和离心机购自德国 Eppendorf公司;细胞培养箱和微量核酸蛋白检测仪(型号:NanoDrop 2000c)购自美国 ThermoFisher Scientific公司;Real-time PCR仪购自美国 Applied Biosystems公司;荧光显微镜购自德国 Leica公司;原子力显微镜(型号:Bioscope Catalyst)购自美国 Bruker公司;扫描电子显微镜(型号:Hitachi 4800)购自日本 Hitachi公司。

1.1.4 主要试剂 α -MEM培养基购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素购自中国Solarbio公司;TGF β 1购自美国PeproTech公司;胃蛋白酶购自美国Sigma公司;SYBR Green PCR Master Mix购自美国Applied Biosystems公司;FITC羊抗兔二抗购自美国Jackson ImmunoResearch公司;羟脯氨酸测定试剂盒购自南京建成科技有限公司;小鼠I型胶原酶免疫试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;DiethylpythiDC购自美国MCE公司;P4ha1抗体购自ABclonal公司;Col 1抗体购自Proteintech公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠BMSCs的分离与培养 使用颈椎脱臼法处死小鼠后取出后肢骨,并将其放置于生理盐水中。用镊子将骨头上残留的肌肉组织去除,分离出

胫骨和股骨。在无菌条件下,剪去骨髓,暴露骨髓腔,使用1 mL注射器吸取 α -MEM完全培养基(含有20%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗、1%谷氨酰胺、 β -巯基乙醇)冲洗骨髓腔,将骨髓细胞冲于细胞培养皿中,反复冲洗3次,至骨髓腔中无红色骨髓残留。加入抗支原体试剂充分混匀,放入37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中进行培养,此代细胞即为P0代。培养前两天每天进行全量换液,之后每三天换液1次,去除未贴壁细胞,待细胞长满后进行传代。传代后用含15%胎牛血清的 α -MEM完全培养基重悬细胞,以 1×10^6 /大皿进行接种,即为P1代,重复上述操作,传至P3~P5代即可用于后续实验。根据我们已发表的文献[18-19],使用无血清 α -MEM培养基饥饿处理BMSCs 12 h后,加入10 ng/mL TGF β 1刺激细胞24 h,检测MFs标志物 α -SMA等的mRNA和蛋白表达水平,确定BMSCs分化为MFs。

1.2.2 RT-qPCR实验 用Trizol法提取肝组织及细胞总RNA,使用微量核酸蛋白质测定仪定量后取1 mg反转录,将cDNA稀释后进行PCR反应。在PCR扩增过程中,以荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环数(Ct)作为模板初始浓度的间接指标,熔解曲线分析采用默认条件。结果以18S rRNA为内参进行校正,用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因相对表达量。引物分别为18S rRNA: 正向,5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'; 反向,5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'。小鼠P4ha1: 正向,5'-CCA CAG CAG AGG AAT TAC AG-3'; 反向,5'-ACA CTA GCT CCA ACT TCA GG-3'。

1.2.3 细胞免疫荧光 将处理好的细胞用4%多聚甲醛室温固定0.5 h, PBS洗3次,每次5 min,用2% BSA于37 °C封闭30 min,加入相应一抗(稀释比例为1:100),4 °C过夜, PBS洗3次,每次5 min,加入二抗(稀释比例1:100),室温孵育1 h,经DAPI复染后,在荧光显微镜下观察。

1.2.4 抑制剂实验 将BMSCs分离并培养至P3~P5代后,使用无血清 α -MEM培养基饥饿处理细胞12 h后,加入10 μ mol/L DiethylpythiDC(P4ha1药理学抑制剂)预处理1 h,再加入10 ng/mL TGF β 1刺激细胞24 h之后,收取细胞进行后续实验。

1.2.5 I型胶原Pull down实验及羟脯氨酸含量检测 混匀并吸取10 mL磁珠(Dynabeads Protein G),用1 mL PBS(或裂解液)洗2次磁珠,最后1次吸干PBS后,加

入等体积量RIPA(每个样品单独准备磁珠)。按照1:50的比例将抗体加入至200 μ L制备好的蛋白裂解液中(2 mg抗体/1 mg蛋白),将抗原-抗体混合物加至10 μ L上述预处理过的磁珠中,捕捉抗原抗体复合物,4 $^{\circ}$ C缓慢摇动抗原抗体混合物过夜;洗磁珠-抗原-抗体混合物后,在沉淀混合物中加RIPA重悬,轻轻混匀,100 $^{\circ}$ C煮样5 min,以游离抗原、抗体、磁珠,将上清进行后续的羟脯氨酸和I型胶原含量检测实验。羟脯氨酸含量的检测方法如下:样品在95 $^{\circ}$ C下水解20 min后,调节pH6.0至6.8。随后,水解产物中加入活性炭处理。室温1 000 $\times$ g离心10 min后,取部分水解产物,使用Ehrlich试剂进行分光光度法测定羟脯氨酸含量。在560 nm处测量吸光度,细胞中的羟脯氨酸含量则以mg/L表示。

1.2.6 原子力显微镜 使用4%多聚甲醛室温固定细胞30 min后,PBS洗涤3次,每次5 min。放置在检测台上,使用原子力显微镜(Bioscope Catalyst, Bruker, 德国)测量硬度。使用MLCT探针(6个杠杆,0.01~0.50 N/m)检测细胞样本。悬臂梁尖端的探针在(50 $\times$ 50) mm²范围内对样品进行二维扫描。每次按压的速度为20.3 mm/s,按压深度为50~80 nm。每个样本随机选取3个区域进行探测,并使用NanoScope Analysis 1.9软件对硬度数据进行分析。

1.2.7 扫描电子显微镜 为测量胶原纤维直径,使用扫描电子显微镜(日立4800, Hitachi Science System Ltd, 日本)在3 000 $\times$ 、5 000 $\times$ 和20 000 $\times$ 放大倍数下观察胶原形态。每个样本至少拍摄6张图片,在20 000 $\times$ 放大倍数下,对每张图片所拍摄到的所有纵向胶原纤维,使用ImageJ软件测量其直径,并定量各个组别胶原纤维的平均直径。

1.2.8 统计学分析 所有实验数据均以均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示,运用统计学软件SPSS 26.0对实验结果进行分析,两组间的比较采用双侧 t 检验(two-sided Student's t -test)的方法,多组实验设计的统计学检验方法是先进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),然后进行事后LSD检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 通过分析公共单细胞测序数据, P4ha1高表达于小鼠纤维化肝脏的MFs

为探讨P4ha1在纤维化肝脏中的细胞定位,我

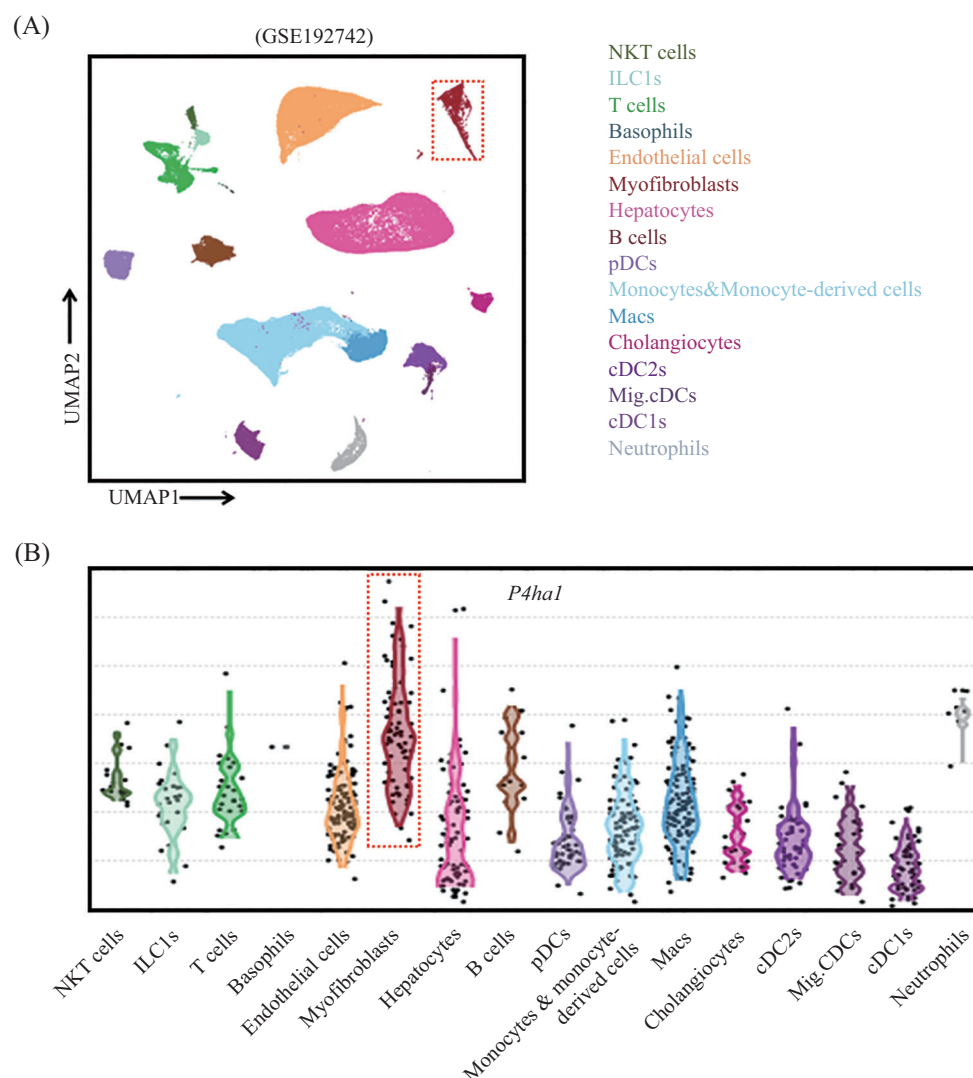
们下载并分析了公开发表的单细胞测序数据。在一个由西方饮食诱导的小鼠肝纤维化模型中,作者对分离出的全肝细胞进行了单细胞RNA测序分析(GSE192742, Liver Cell Atlas),对得到的18 666个细胞进行均匀流形近似与投影(uniform manifold approximation and projection, UMAP)降维分析,确定了16种细胞类型,分别是NKT细胞(自然杀伤T细胞)、ILCs(先天淋巴细胞)、T淋巴细胞、嗜碱性粒细胞、内皮细胞、肌成纤维细胞、肝细胞、B淋巴细胞、pDCs(浆细胞样树突状细胞)、单核细胞和单核细胞来源的细胞、Macrs(巨噬细胞)、胆管细胞、cDC2s(II型经典树突状细胞)、Mig.cDCs(迁移性cDCs)、cDC1s(I型经典树突状细胞)和中性粒细胞(图1A)。根据原作者对该数据集细胞分群的注释及定义,我们进一步分析了P4ha1在各群细胞中的RNA表达情况,发现高表达P4ha1的细胞群主要是MFs(图1B)。以上结果表明,在小鼠肝纤维化模型,P4ha1高表达于损伤肝脏的MFs。

2.2 在MFs活化过程中, P4ha1表达上调

如示意图(图2A)所示,将BMSCs分离并培养后,使用无血清 α -MEM培养基饥饿处理细胞12 h,之后分别用不同浓度的TGF β 1处理BMSCs不同时间,诱导其向MFs分化。RT-qPCR结果显示,随着TGF β 1浓度(1、2、10 ng/mL)的增大,P4ha1的mRNA表达水平也相应增高(图2B)。此外,使用10 ng/mL TGF β 1处理细胞3 h、6 h、12 h或24 h后发现,随TGF β 1处理时间的延长,P4ha1的mRNA表达水平也逐渐上调(图2C)。细胞免疫荧光结果也观察到了P4ha1在TGF β 1处理后的表达,且定位于细胞质基质中,提示其在细胞内发挥功能(图2D)。以上结果表明,在MFs活化过程中,P4ha1在mRNA和蛋白水平上的表达均上调。

2.3 抑制P4ha1后,每摩尔I型胶原中的羟脯氨酸含量降低

接下来我们使用P4ha1抑制剂DiethylpythiDC对P4ha1进行抑制。经过文献查阅并结合前期预实验结果,我们选择使用10 mmol/L DiethylpythiDC处理细胞^[17]。将BMSCs饥饿12 h后,加入10 μ mol/L DiethylpythiDC预处理1 h,再加入10 ng/mL TGF β 1刺激24 h。之后使用羟脯氨酸试剂盒检测并定量Pull down分离出的每摩尔I型胶原内羟脯氨酸的含量,代表P4ha1酶活性(图3A)。结果显示,抑制P4ha1后,每摩尔I型



A: 均匀流形近似和投影(UMAP)图显示在西方饮食诱导的小鼠肝损伤模型的全肝细胞中, 存在16种细胞类型, 分别为: NKT细胞(自然杀伤T细胞)、ILC1s(I型先天淋巴细胞)、T淋巴细胞、嗜碱性粒细胞、内皮细胞、肌成纤维细胞、肝细胞、B淋巴细胞、pDCs(浆细胞样树突状细胞)、单核细胞和单核细胞来源的细胞、Macs(巨噬细胞)、胆管细胞、cDC2s(II型经典树突状细胞)、Mig.cDCs(迁移性cDCs)、cDC1s(I型经典树突状细胞)和中性粒细胞; B: *P4ha1*在肝脏各细胞群体中的表达情况。

A: UMAP (uniform manifold approximation and projection) plot shows the 16 cell types in the liver of Western diet-fed mice: NKT cells (natural killer T cells), ILC1s (type 1 innate lymphoid cells), T cells (T-lymphocyte), basophils, endothelial cells, fibroblasts, hepatocytes, B cells (B-lymphocyte), pDCs (plasmacytoid dendritic cells), monocytes & monocyte derived cells, Macs (macrophages), cholangiocytes, cDC2s (type 2 classic dendritic cells), Mig.cDCs (migratory cDCs), cDC1s (type 1 classic dendritic cells), neutrophils; B: the expression of *P4ha1* among different cell types in the liver of Western diet-fed mice.

图1 *P4ha1*在小鼠纤维化肝脏各种细胞类型中的表达情况

Fig.1 The expression of *P4ha1* in various cell types of fibrotic liver in mice

胶原内羟脯氨酸的含量明显降低(图3B), 提示P4ha1通过对脯氨酸的羟化作用从而发挥其下游的生物学功能。

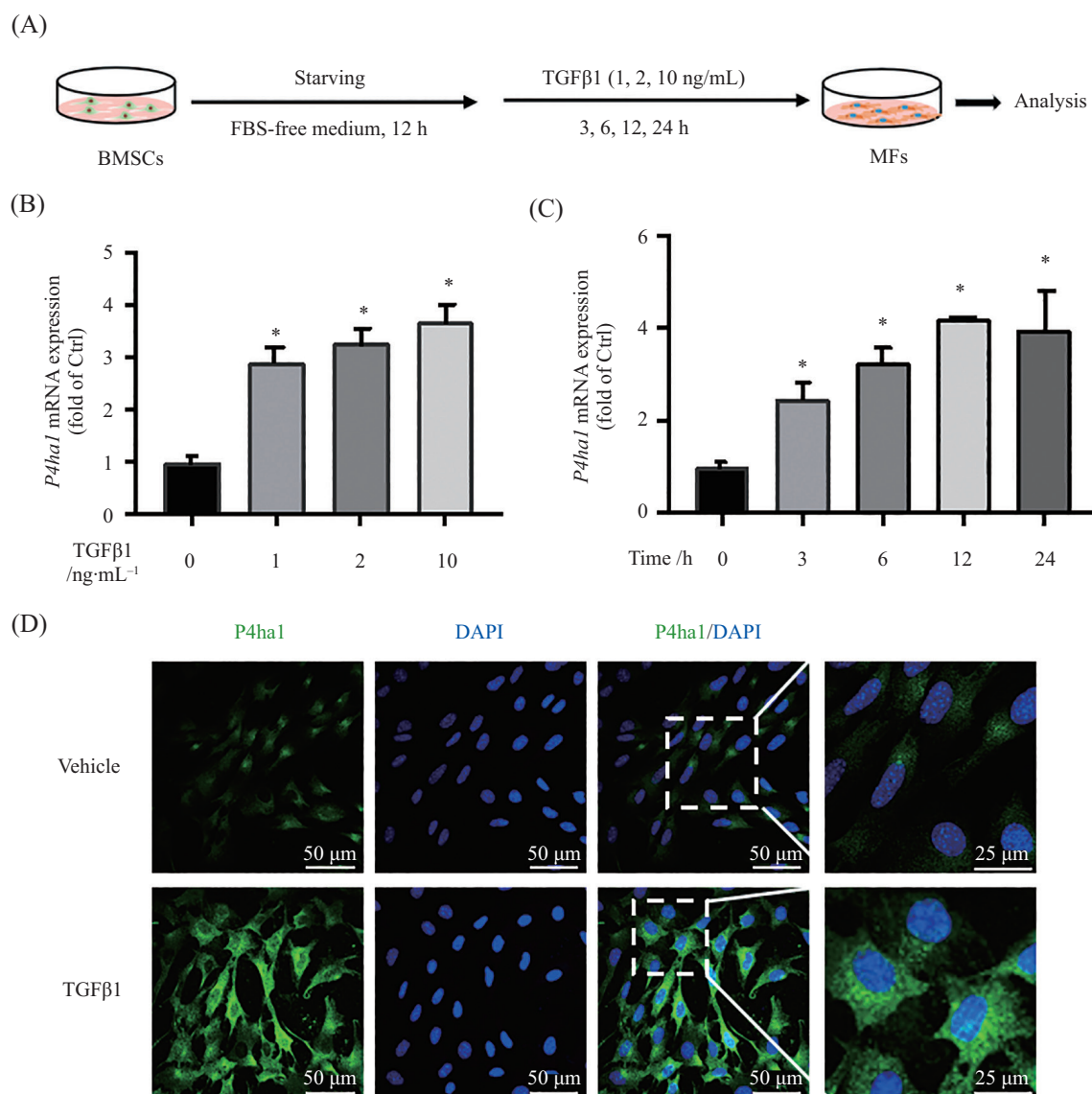
2.4 抑制P4ha1后, 胶原纤维直径缩小

为进一步确定P4ha1与胶原之间的关系, 我们使用扫描电子显微镜观察MFs细胞外基质中的胶原形态(图4A), 使用ImageJ软件测量并定量胶原纤维的平均直径(图4B), 我们惊奇地发现抑制P4ha1

后, 胶原纤维的平均直径明显缩小。以上结果表明, P4ha1通过对脯氨酸的羟化作用从而调控胶原纤维的直径。

2.5 抑制P4ha1后, 细胞外基质硬度降低

胶原纤维的过度堆积会导致细胞外基质硬度的增加。接下来, 我们使用原子力显微镜检测MFs的细胞外基质硬度, 探讨使用P4ha1抑制剂是否会影响细胞外基质的硬度。结果显示, MFs细胞的



A: 细胞处理示意图; B: 用指定浓度的TGFβ1处理细胞24 h后检测*P4ha1*的mRNA表达。* $P < 0.05$, 与TGFβ1(0 ng/mL)处理组比较; C: 用10 ng/mL的TGFβ1处理细胞在指定时间检测*P4ha1*的mRNA表达。* $P < 0.05$, 与TGFβ1处理0 h组比较; D: 用TGFβ1处理细胞后P4ha1(绿)的免疫荧光染色情况, DAPI(蓝)用来对细胞核进行染色。

A: schematic diagram of cell treatment; B: *P4ha1* mRNA expression in MFs activated by indicated concentrations of TGFβ1 for 24 h. * $P < 0.05$ compared with 0 ng/mL TGFβ1 group; C: *P4ha1* mRNA expression in MFs activated by 10 ng/mL TGFβ1 at indicated time points. * $P < 0.05$ compared with 0 h group; D: immunofluorescent staining for P4ha1 (green), DAPI was used to visualize the nuclei.

图2 MFs活化过程中P4ha1的表达变化

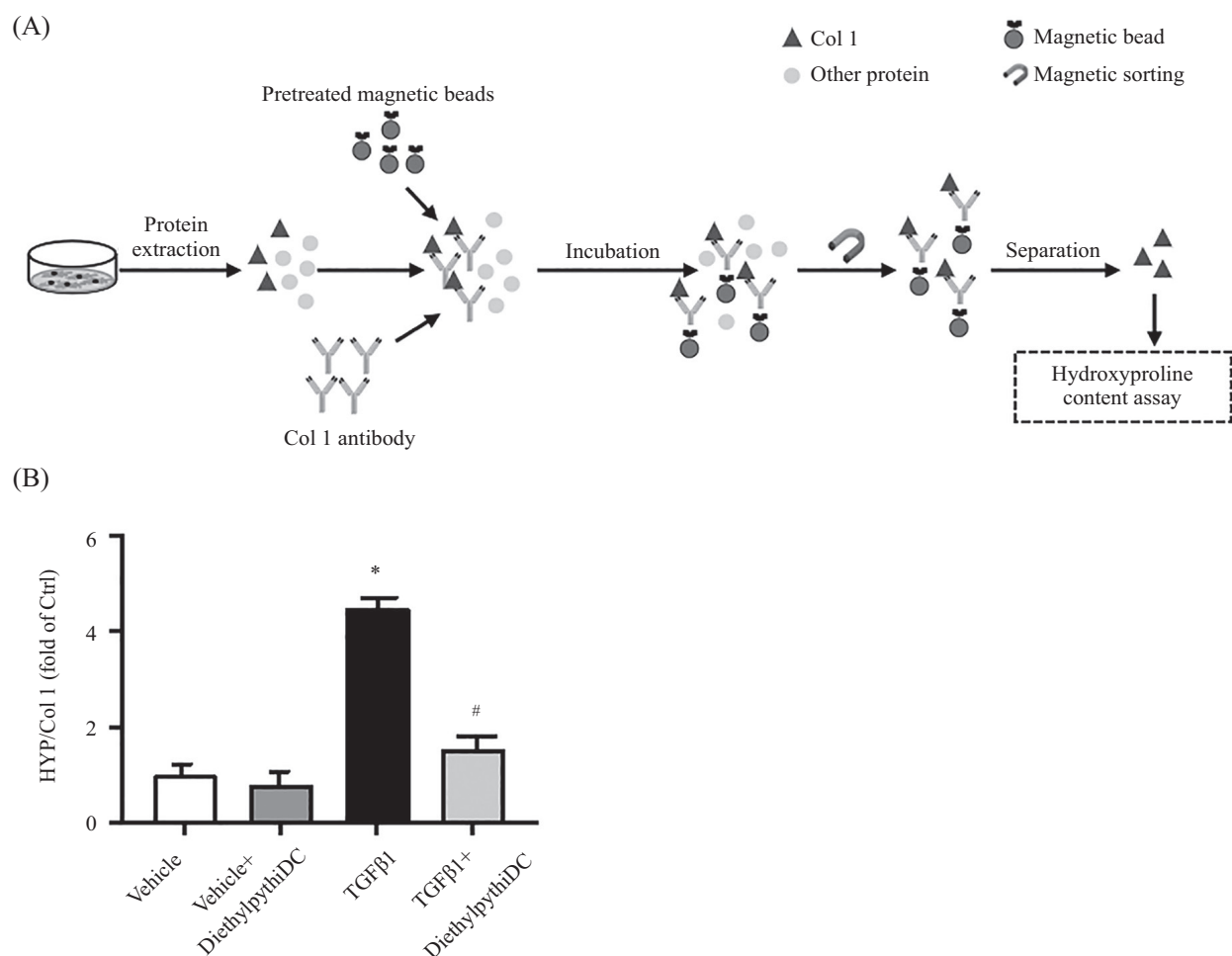
Fig.2 The expression changes of P4ha1 during MFs activation

细胞外基质比对照组的硬度高4倍, 而使用DiethylpythiDC抑制P4ha1显著降低了MFs细胞细胞外基质的硬度(图5B)。以上结果表明, P4ha1通过对脯氨酸的羟化作用改变胶原纤维直径, 进而增加细胞外基质硬度, 从而参与肝脏纤维化的发生发展。

3 讨论

本研究探讨了在体外培养的MFs中P4ha1对于

胶原纤维直径和硬度的调控作用。P4ha1是纤维化中非常重要的因子且在纤维化肝组织中表达上调, 我们首先分析了公开发表的单细胞测序数据集, 证实了在纤维化肝组织中P4ha1主要定位于MFs细胞。在体外实验中, 使用TGFβ1处理BMSCs细胞, 使其分化为MFs。我们已发表的文献已证实: 在小鼠腹腔注射CCl₄和胆总管结扎手术(bile duct ligation, BDL)等多种经典肝纤维化模型中, 损伤肝脏中的MFs有70%~80%



A: pull down I型胶原并检测其中羟脯氨酸含量的示意图; B: 使用DiethylpythiDC抑制P4ha1后, 使用试剂盒检测并定量每摩尔I型胶原内羟脯氨酸的含量。* $P < 0.05$, 与溶媒对照组相比; # $P < 0.05$, 与TGFβ1处理组相比。

A: schematic diagram of type I collagen pull down and hydroxyproline content measurement; B: content of hydroxyproline in collagen I after DiethylpythiDC treatment. * $P < 0.05$ compared with vehicle cells; # $P < 0.05$ compared with TGFβ1-treated group.

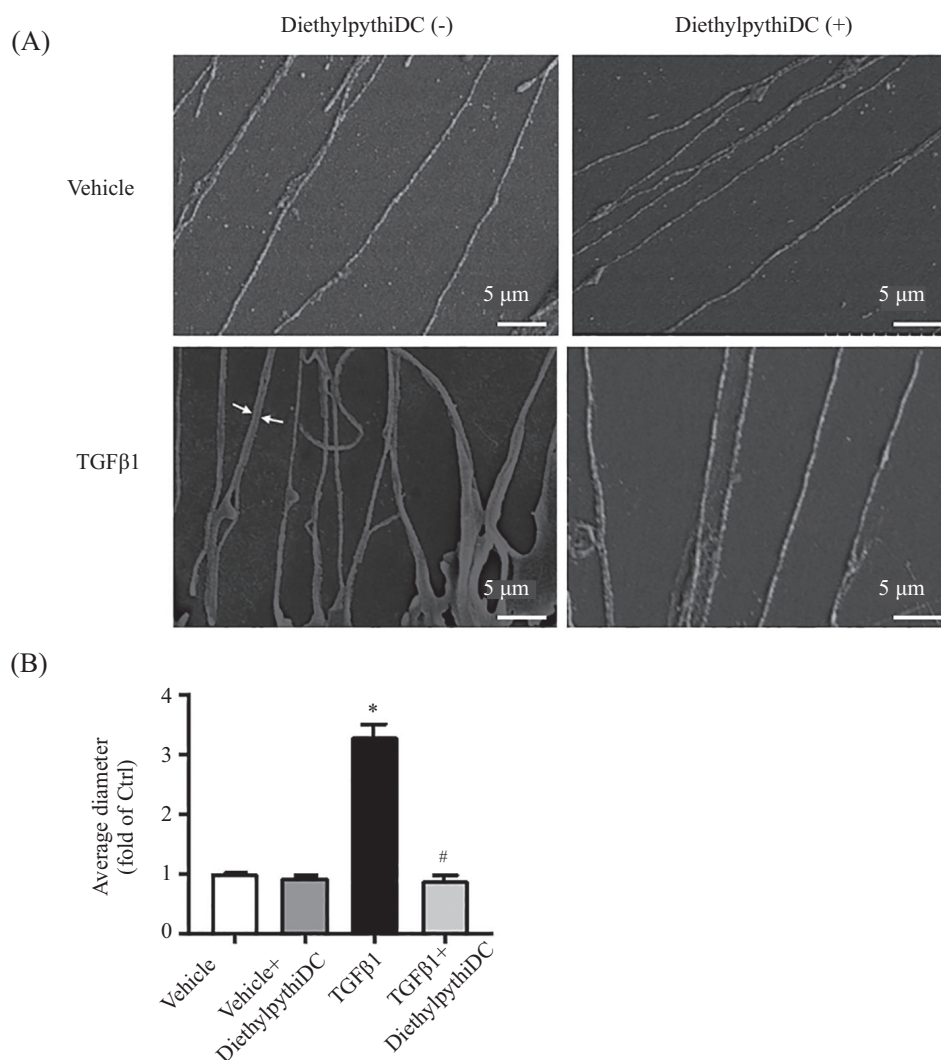
图3 使用抑制剂抑制P4ha1后, 羟脯氨酸含量的变化

Fig.3 The effect of P4ha1 inhibitor on hydroxyproline content

来源于从骨髓迁移而来的BMSCs细胞^[20-21], 提示这群细胞在肝纤维化中可能发挥着重要作用。此外, 相比于内源性的肝星状细胞, 骨髓来源的BMSCs不但易于分离和培养, 且容易被干预和修饰, 有望以其为靶点设计出有效的抗肝纤维化方案。在MFs细胞上, 我们使用P4ha1抑制剂DiethylpythiDC抑制P4ha1后, 观察到其酶活性产物羟脯氨酸含量下降, 扫描电子显微镜观察到胶原纤维直径的缩小, 进一步使用原子力显微镜观察到细胞外基质硬度的降低。于是本研究得出结论: 通过抑制P4ha1缩小胶原纤维的直径和降低细胞外基质硬度, 可以作为肝纤维化有潜力的预防和治疗方案。

胶原是由三条α链围绕中心轴相互缠绕形成的

具有极高拉伸强度的右手三股螺旋结构, 构成胶原三股螺旋的α链具有Gly(甘氨酸)-X-Y(三个氨基酸残基组成的重复序列^[22-23])。胶原蛋白的构象稳定性依赖于立体电子效应, 其中位于“Y”位点的脯氨酸残基的羟基化修饰通过立体电子效应提高了胶原三股螺旋结构的稳定性, 缺乏P4h的胶原分子无法在正常温度下形成稳定的三股螺旋结构^[24-27]。因此, P4h对于胶原分子结构的完整性和三股螺旋结构的形成至关重要。本研究通过体外细胞模型的结果证实: 在MFs中, 使用DiethylpythiDC抑制P4ha1后, 羟脯氨酸的含量显著降低。值得注意的是, 我们还发现P4ha1影响了胶原纤维直径的变化, 扫描电子显微镜结果显示使用DiethylpythiDC抑制P4ha1后胶原纤维直径



A: 使用DiethylpythiDC后, MFs细胞外基质中胶原纤维的代表性扫描电子显微镜图像; B: 胶原纤维直径的定量分析。* $P < 0.05$, 与溶媒对照组相比; # $P < 0.05$, 与TGFβ1处理组相比。

A: representative scanning electron microscopy images of collagen fibers in MFs with or without the DiethylpythiDC treatment; B: quantification of collagen fiber diameter in MFs with or without the DiethylpythiDC. * $P < 0.05$ compared with vehicle cells; # $P < 0.05$ compared with TGFβ1-treated cells alone.

图4 使用抑制剂抑制P4ha1后, 胶原纤维直径的变化

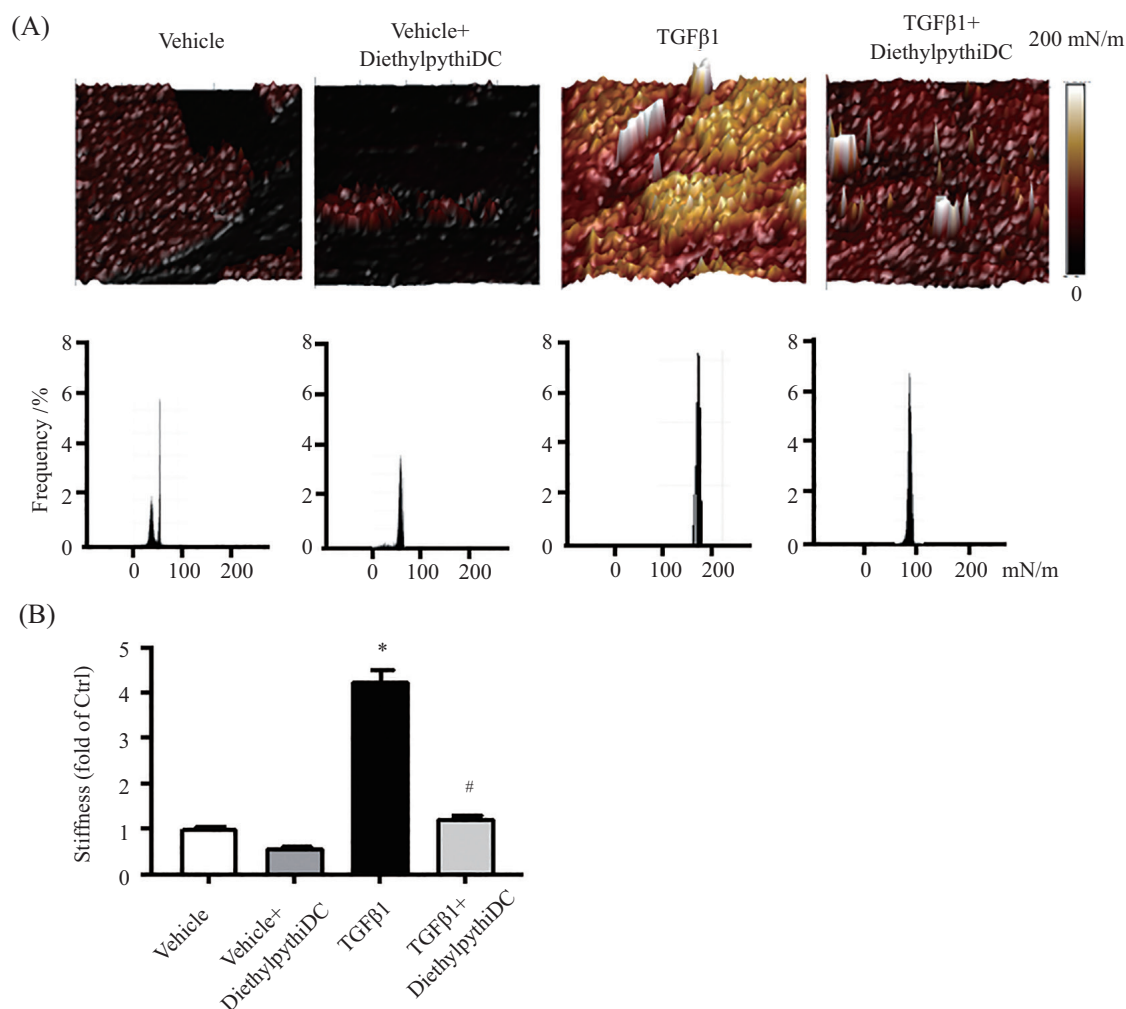
Fig.4 The effect of P4ha1 inhibitor on collagen fiber diameter

明显缩小。未来需要在动物模型中使用P4ha1基因敲除小鼠或者使用P4ha1特异性siRNA或抑制剂来进一步证实P4ha1对于胶原交联和细胞外基质硬度变化的影响。

胶原蛋白作为细胞外基质中最重要的结构蛋白质, 其形成过程复杂, 涉及一系列复杂的翻译后修饰, 包括多肽链的羟基化和糖基化修饰等^[28]。之前多数研究关注的是赖氨酸羟化酶介导的胶原赖氨酸残基的羟基化反应, 该位点羟基化与否决定细胞外基质中胶原纤维之间的交联以及胶原蛋白的溶解性^[29]。本研究证明了由P4ha1介导的脯氨酸残基

的羟基化反应也能够影响胶原纤维直径的粗细和细胞外基质硬度, 从而影响纤维化进程, 但是目前对于P4ha1与其他胶原修饰酶(赖氨酸羟化酶、赖氨酸氧化酶、谷氨酰胺转移酶等)之间是否存在协同作用尚没有相关报道, 有待进一步的研究。

ECM重塑对于正常组织结构是必不可少的, ECM硬度的变化与肝癌、乳腺癌、骨肉瘤和心血管疾病的进展密切相关^[30-34]。胶原蛋白的沉积和交联被认为是可以影响细胞和微环境之间相互作用的生物物理信号, 并可增加ECM的硬度。例如, 肿瘤中的胶原过度沉积增加了组织的硬度, 导致了细胞与



A: 通过原子力显微镜测定使用DiethylpythiDC抑制P4ha1后, 细胞外基质的硬度; B: 采用NanoScope分析软件对硬度数据进行分析。* $P < 0.05$, 与溶剂对照组相比; # $P < 0.05$, 与TGFβ1处理组相比。

A: ECM stiffness in MFs with or without DiethylpythiDC treatment was determined by atomic force microscopy; B: the data of stiffness was analyzed using NanoScope analysis software. * $P < 0.05$ compared with vehicle cells; # $P < 0.05$ compared with TGFβ1-treated group.

图5 使用抑制剂抑制P4ha1后, 细胞外基质硬度的变化

Fig.5 The effect of P4ha1 inhibitor on extracellular matrix stiffness

ECM相互作用的增强, 进一步促进了肿瘤的进展和转移^[35-36]。P4ha1基因敲除小鼠会显示出细胞外基质在生物力学指标上的损伤^[37]。在本研究中, 我们证明了肝纤维化时P4ha1介导的MFs细胞外基质中胶原纤维直径的变化, 增加了细胞外基质的硬度, 并且这些基质特性的改变在功能上进一步导致肝纤维化的加重。

在我们的研究中, TGFβ1信号通路已被确定为P4ha1在BMSCs向MFs分化过程中的一个重要调控因子。但是对于参与调控P4ha1表达和功能的上游信号通路尚未明确。在食管癌和结直肠癌中, STAT1和Wnt信号通路分别参与调控P4ha1功能, 从而影响肿瘤进展^[38-39]。未来有必要在MFs及肝纤维

化小鼠模型中深入解析P4ha1表达和活性调控的上游分子机制, 进一步完善P4ha1在肝纤维化中的作用及调控网络, 这将增加我们对胶原相关疾病的理解, P4ha1有望成为这些疾病的一个有潜力的药物靶点。

综上所述, 本研究阐明了P4ha1在肝纤维化中的重要作用和具体机制, 基于靶向P4ha1的策略, 有助于开发高效性的潜在药物靶点, 为预防和治疗肝纤维化提供新思路, 具有重要的理论意义和应用价值。

参考文献 (References)

- [1] BERUMEN J, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Liver fibrosis: pathophysiology and clinical implications [J]. WIREs Mech Dis,

- 2021, 13(1): e1499.
- [2] AKKIZ H, GIESELER R K, CANBAY A. Liver fibrosis: from basic science towards clinical progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(14): 7873.
- [3] MIYAAKI H, MIUMA S, FUKUSIMA M, et al. Liver fibrosis analysis using digital pathology [J]. *Med Mol Morphol*, 2024, 57(3): 161-6.
- [4] 徐岩, 王雪淞, 周林, 等. 不同策略提高间充质干细胞治疗肝纤维化: 效果与潜在风险分析[J]. *中国组织工程研究*(XU Y, WANG X S, ZHOU L, et al. Different strategies to enhance mesenchymal stem cells in treatment of liver fibrosis: analysis of efficacy and potential risks [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2025, 29(23): 5002-12.
- [5] PLIKUS M V, WANG X, SINHA S, et al. Fibroblasts: origins, definitions, and functions in health and disease [J]. *Cell*, 2021, 184(15): 3852-72.
- [6] SWEENEY S M, ORGEL J P, FERTALA A, et al. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(30): 21187-97.
- [7] MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO K I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms [J]. *Trends Genet*, 2004, 20(1): 33-43.
- [8] SHI R, GAO S, ZHANG J, et al. Collagen prolyl 4-hydroxylases modify tumor progression [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, 53(7): 805-14.
- [9] ROBINSON A D, CHAKRAVARTHI B V S K, AGARWAL S, et al. Collagen modifying enzyme p4ha1 is overexpressed and plays a role in lung adenocarcinoma [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14(8): 101128.
- [10] LIN Y, JIANG M, CHEN W, et al. Cancer and er stress: mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109249.
- [11] SUN Y, CHEN Y, ZHAO H, et al. Lactate-driven type i collagen deposition facilitates cancer stem cell-like phenotype of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *iScience*, 2024, 27(4): 109340.
- [12] WANG Q, ZHANG J, FANG S, et al. P4ha1 down-regulation inhibits glioma invasiveness by promoting m1 microglia polarization [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 1771-82.
- [13] YANG S, ZHAN Q, SU D, et al. Hif1 α /atf3 partake in pgk1 k191/k192 succinylation by modulating p4ha1/succinate signaling in glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2024, 26(8): 1405-20.
- [14] ZHOU R, QIU L, ZHOU L, et al. P4ha1 activates hmgs1 to promote nasopharyngeal carcinoma ferroptosis resistance and progression [J]. *Cell Signal*, 2023, 105: 110609.
- [15] GOU W, YANG Y, SHAN Q, et al. P4ha1, transcriptionally activated by stat1, promotes esophageal cancer progression [J]. *Pathol Int*, 2023, 73(4): 147-58.
- [16] ZHAO T, CHEN H, CHENG C, et al. Liraglutide protects high-glucose-stimulated fibroblasts by activating the cd36-jnk-ap1 pathway to downregulate p4ha1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109224.
- [17] VASTA J D, ANDERSEN K A, DECK K M, et al. Selective inhibition of collagen prolyl 4-hydroxylase in human cells [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(1): 193-9.
- [18] YANG L, CHANG N, LIU X, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor-beta1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (s1p)/s1p receptor axis [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(1): 85-97.
- [19] YANG L, ZHANG H, DONG C, et al. Neuron-glial antigen 2 participates in liver fibrosis via regulating the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell to myofibroblast [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1177.
- [20] LI C, JIANG X, YANG L, et al. Involvement of sphingosine 1-phosphate (s1p)/s1p3 signaling in cholestasis-induced liver fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(4): 1464-72.
- [21] LI C, KONG Y, WANG H, et al. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(6): 1174-83.
- [22] GELSE K. Collagens: structure, function, and biosynthesis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(12): 1531-46.
- [23] VASTA J D, RAINES R T. Collagen prolyl 4-hydroxylase as a therapeutic target [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(23): 10403-11.
- [24] BRETSCHER L E, JENKINS C L, TAYLOR K M, et al. Conformational stability of collagen relies on a stereoelectronic effect [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(4): 777-8.
- [25] LAMBERG A, HELAAKOSKI T, MYLLYHARJU J, et al. Characterization of human type III collagen expressed in a baculovirus system [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(20): 11988-95.
- [26] VUORELA A, MYLLYHARJU J, NISSI R, et al. Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type iii collagen in the yeast *pichia pastoris*: formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase [J]. *EMBO J*, 1997, 16(22): 6702-12.
- [27] PERRET S, MERLE C, BERNOCCHI S, et al. Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 43693-8.
- [28] RICARD-BLUM S, BAFFET G, THÉRET N. Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 122-49.
- [29] DU H, PANG M, HOU X, et al. Plod2 in cancer research [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 670-6.
- [30] PASZEK M J, ZAHIR N, JOHNSON K R, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype [J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(3): 241-54.
- [31] FROESE A R, SHIMBORI C, BELLAYE P, et al. Stretch-induced activation of transforming growth factor- β_1 in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194(1): 84-96.
- [32] CHEN G, XIA B, FU Q, et al. Matrix mechanics as regulatory factors and therapeutic targets in hepatic fibrosis [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12): 2509-21.
- [33] FU Y, WAN P, ZHANG J, et al. Targeting mechanosensitive piezo1 alleviated renal fibrosis through p38MAPK-YAP pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 741060.
- [34] MAI Z, LIN Y, LIN P, et al. Modulating extracellular matrix stiffness: a strategic approach to boost cancer immunotherapy [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 307.
- [35] HU W, ZHANG J, SUN S, et al. Identification of p4ha1 as a prognostic biomarker for high-grade gliomas [J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(11): 1365-9.

- [36] LI C, KONG Y, WANG H, et al. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(6): 1174-83.
- [37] ZOU Y, DONKERVOORT S, SALO A M, et al. P4ha1 mutations cause a unique congenital disorder of connective tissue involving tendon, bone, muscle and the eye [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(12): 2207-17.
- [38] ZHANG Q, YIN Y, ZHAO H, et al. P4ha1 regulates human colorectal cancer cells through hif1alpha-mediated wnt signaling [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(2): 145.
- [39] GOU W, YANG Y, SHAN Q, et al. P4ha1, transcriptionally activated by stat1, promotes esophageal cancer progression [J]. *Pathol Int*, 2023, 73(4): 147-58.