

脂质纳米粒递送靶向 *Cyp2e1* 基因的小干扰 RNA 可减轻小鼠亚急性酒精性肝损伤

吴爽¹, 陈秋冰^{2,3}, 王亚兰¹, 殷昊^{2,3,4,5,6}, 魏渊¹

1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013
2. 武汉大学中南医院医学研究院、免疫与代谢前沿科学中心泌尿外科, 湖北 武汉 430071
3. 武汉大学中南医院肺部与危重症医学科, 湖北 武汉 430071
4. 武汉大学中南医院病理科, 湖北 武汉 430071
5. 武汉大学RNA研究所, 湖北 武汉 430072
6. 中国医学科学院武汉传染病与肿瘤研究中心, 湖北 武汉 430010

[摘要] 目的: 研究脂质纳米粒(LNP)递送靶向 *Cyp2e1* 基因的小干扰 RNA (siRNA)减轻小鼠亚急性酒精性肝损伤的作用及机制。方法: 通过微流控技术将靶向 *Cyp2e1* 基因的 siRNA 封装在 LNP 中得 si-*Cyp2e1* LNP, 并进行表征。筛选 si-*Cyp2e1* LNP 给药的最佳剂量, 将 40 只 C57BL/6N 雌鼠随机分为空白对照组、模型对照组、si-*Cyp2e1* LNP 组、LNP 对照组和美他多辛组, 经 10 d 的乙醇喂养及最后 3 d 的乙醇灌胃处理, 构建亚急性酒精性肝损伤小鼠模型。测定各组血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性, 肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛、活性氧、谷胱甘肽、三酰甘油和总胆固醇含量, 计算肝脏指数; 光学显微镜观察小鼠肝组织病理学变化。实时逆转录聚合酶链反应检测各组小鼠体内氧化应激、脂质合成和炎症相关基因表达的变化情况。结果: 与模型对照组比较, si-*Cyp2e1* LNP 组肝脏指数降低, 血清 ALT、AST 活性降低, 肝组织丙二醛、活性氧、三酰甘油和总胆固醇含量下降, SOD 活性升高, 谷胱甘肽含量增加(均 $P < 0.01$)。苏木精-伊红染色结果显示模型对照组肝细胞排列紊乱, 细胞质稀疏, 有大量的脂肪空泡和坏死, 而 si-*Cyp2e1* LNP 组肝细胞大小均匀, 排列整齐, 肝组织形态结构正常; 油红 O 染色结果显示 si-*Cyp2e1* LNP 组相比模型对照组肝脏脂肪含量减少, 未见脂肪滴积聚; 抗 F4/80 单克隆抗体荧光免疫组织化学结果显示 si-*Cyp2e1*



收稿日期(Received): 2022-12-31 接受日期(Accepted): 2023-05-09 网络预发表日期(Online): 2023-06-07

基金项目(Funding): 国家重点研发计划(2018YFA0801401, 2019YFA0802801, 2020YFE0205100); 中央本级重大增减支项目(2060302-2004-09); 镇江社会发展项目(SH2020036); 国家自然科学基金(31871345, 32071442); 武汉大学医学科学促进计划(基础医学科学)(TFJC2018004); 中央大学基本科研基金; 中国医学科学院非营利中央研究所基金(2020-PT320-004); 武汉市应用基础前沿项目(2020020601012216)

第一作者(First author): 吴爽, 硕士研究生, 主要从事药剂学和药物代谢研究; E-mail: wushuang873@163.com; https://orcid.org/0000-0001-9052-0381

通信作者(Corresponding author): 魏渊, 教授, 博士生导师, 主要从事药物代谢和毒理学研究; E-mail: ywei@ujs.edu.cn; https://orcid.org/0000-0002-4025-6567

LNP组相比模型对照组累积光密度比值降低($P<0.01$),无明显炎症反应。与模型对照组比较,si-Cyp2e1 LNP组活性氧形成相关催化基因P47phox、P67phox和Gp91phox的表达减少(均 $P<0.01$),而抗氧化酶相关基因Sod1、Gsh-rd和Gsh-px的表达增加(均 $P<0.01$);脂质代谢相关基因Pgc-1 α 、Cpt1的mRNA表达增加(均 $P<0.01$),脂质合成相关基因Srebp1c、Acc和Fasn的mRNA表达减少(均 $P<0.01$);肝脏炎症相关基因Tgf- β 、Tnf- α 和Il-6的表达减少(均 $P<0.01$)。结论:si-Cyp2e1 LNP主要通过降低活性氧水平,增加抗氧化活性,阻断氧化应激途径,减少乙醇诱发的脂肪变性和炎症,保护肝脏免受乙醇引起的损伤,为亚急性酒精性肝损伤提供了一种新的靶向治疗方法。

[关键词] 亚急性酒精性肝损伤;小干扰RNA;脂质纳米粒;氧化应激;脂质代谢合成;炎症;小鼠

[中图分类号] R94 [文献标志码] A

Lipid nanoparticle delivery of siRNA targeting *Cyp2e1* gene attenuates subacute alcoholic liver injury in mice

WU Shuang¹, CHEN Qiubing^{2,3}, WANG Yalan¹, YIN Hao^{2,3,4,5,6}, WEI Yuan¹ (1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China; 2. Department of Urology, Frontier Science Centre for Immunology and Metabolism, Medical Research Institute, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 4. Department of Pathology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 5. RNA Institute, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 6. Wuhan Research Centre for Infectious Diseases and Cancer, Chinese Academy of Medical Sciences, Wuhan 430010, China)

Corresponding author: WEI Yuan, E-mail: ywei@ujs.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-4025-6567>

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of lipid nanoparticle (LNP) delivery of small interfering RNA (siRNA) targeting *Cyp2e1* gene on subacute alcoholic liver injury in mice. **Methods:** siRNA targeting *Cyp2e1* gene was encapsulated in LNP (si-Cyp2e1 LNP) by microfluidic technique and the resulting LNPs were characterized. The optimal dose of si-Cyp2e1 LNP administration was screened. Forty female C57BL/6N mice were randomly divided into blank control group, model control group, si-Cyp2e1 LNP group, LNP control group and metadoxine group. The subacute alcoholic liver injury mouse model was induced by ethanol feeding for 10 d plus ethanol gavage for the last 3 d. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, and the superoxide dismutase (SOD) activity as well as malondialdehyde, reactive oxygen species, glutathione, triacylglycerol, total cholesterol contents in liver tissue were measured in each group, and liver index was calculated. The expression of genes related to oxidative stress, lipid synthesis and inflammation in each group of mice were measured by realtime RT-PCR. **Results:** Compared with the model control group, the levels of liver index, serum ALT, AST activities, malondialdehyde, reactive oxygen species, triacylglycerol, total cholesterol contents in liver tissue decreased,

but the SOD activity as well as glutathione increased in the si-Cyp2e1 LNP group (all $P < 0.01$). Hematoxylin-eosin staining result showed disorganized hepatocytes with sparse cytoplasm and a large number of fat vacuoles and necrosis in the model control group, while the si-Cyp2e1 LNP group had uniformly sized and arranged hepatocytes with normal liver tissue morphology and structure. Oil red O staining result showed si-Cyp2e1 LNP group had lower fat content of the liver compared to the model control group ($P < 0.01$), and no fat droplets accumulated. Anti-F4/80 monoclonal antibody fluorescence immunohistochemistry showed that the si-Cyp2e1 LNP group had lower cumulative optical density values compared to the model control group ($P < 0.01$) and no significant inflammatory reaction. Compared with the model control group, the expression of catalytic genes *P47phox*, *P67phox* and *Gp91phox* were reduced (all $P < 0.01$), while the expression of the antioxidant enzyme genes *Sod1*, *Gsh-rd* and *Gsh-px* were increased (all $P < 0.01$). The mRNA expression of the lipid metabolism genes *Pgc-1 α* and *Cpt1* were increased (all $P < 0.01$) and the lipid synthesis-related genes *Srebp1c*, *Acc* and *Fasn* were decreased (all $P < 0.01$); the expression of liver inflammation-related genes *Tgf- β* , *Tnf- α* and *Il-6* were decreased (all $P < 0.01$). **Conclusion:** The si-Cyp2e1 LNP may attenuate subacute alcoholic liver injury in mice mainly by reducing reactive oxygen levels, increasing antioxidant activity, blocking oxidative stress pathways and reducing ethanol-induced steatosis and inflammation.

[**Key words**] Subacute alcoholic liver injury; Small interfering RNA; Lipid nanoparticles; Oxidative stress; Lipid metabolic synthesis; Inflammation; Mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2023, 52(3): 306-317.]

[**缩略语**] 细胞色素P450 2E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1); RNA干扰(RNA interference, RNAi); 信使RNA(messenger RNA, mRNA); 小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA); 脂质纳米粒(lipid nanoparticles, LNP); 靶向*Cyp2e1*的siRNA(siRNA targeting *Cyp2e1*, si-Cyp2e1); 丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT); 天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 杜氏磷酸缓冲盐溶液(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS); 苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE染色); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); 含吐温-20的Tris缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20, TBST); 谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GSH-rd); 谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-px); 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator -1 α , PGC-1 α); 肉碱棕榈酰基转移酶(carnitine palmitoyl transferase, CPT); 固醇调节元件结合蛋白1c(sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c); 脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FASN); 乙酰辅酶A羧化酶(acetyl CoA carboxylase, ACC); 转化生长因子(transforming growth factor, TGF); 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)

酒精性肝病是一种严重危害人类健康的疾病,近年来发病率呈上升趋势^[1-2]。亚急性暴饮

(酗酒)后90%以上的乙醇会在肝脏中代谢,直接刺激、损害肝细胞,肝细胞发生变性、坏死,影响

肝脏对蛋白质、脂肪的正常代谢及解毒功能,导致亚急性酒精性肝损伤^[3-4]。目前,亚急性酒精性肝损伤主要通过戒酒和药物干预来治疗^[5],但存在药物相关不良反应。

CYP2E1是乙醇的主要代谢酶^[6],可以作用于肝脏的微粒体乙醇氧化系统,代谢和激活有毒底物,如对乙醇的氧化作用从而导致乙醛的产生,因此产生大量的反应性毒性产物^[7]。CYP2E1在活性氧的产生中起着关键作用^[8-9]。大量活性氧和多种氧自由基引起的氧化应激导致细胞凋亡和坏死,对机体产生损害。既往研究表明,用乙醇喂养 *Cyp2e1* 基因敲除的小鼠未出现明显肝脏损伤^[10],且CYP2E1抑制剂2-氯-5-氯甲基噻唑可以减弱乙醇引起的啮齿动物肝损伤^[11],提示CYP2E1是导致小鼠酒精性肝损伤的关键因素^[12]。

RNAi疗法是一种新型临床治疗方法,是指在进化过程中高度保守、由双链RNA诱发的同源mRNA的高效特异性降解现象^[13]。特定的siRNA与其目标蛋白结合,形成RNA诱导的沉默复合物,再以siRNA序列为模板裂解目标基因的mRNA,从而破坏其结构,最终使目标基因沉默^[14]。由于siRNA具有分子体积大、亲水性强、带阴离子电荷等特征,不易进入细胞,因此需要不同的给药载体实现递送^[15]。LNP递送系统具有安全性高、免疫原性低以及靶向性强等特点。前期研究结果显示,基于LNP的CYP2E1靶向系统能有效抑制小鼠模型中亚急性酒精性肝病的发展^[16],本研究通过制备si-*Cyp2e1* LNP,观察siRNA药物通过靶向 *Cyp2e1* 基因减轻小鼠亚急性酒精性肝损伤的效果,探讨基于LNP的si-*Cyp2e1*在亚急性酒精性肝损伤中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂与仪器

雌性C57BL/6N小鼠(6~8周龄)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有小鼠均在标准环境条件下饲养:温度(22±2)℃,相对湿度(55±5)%,光照与黑暗各12h循环。动物实验和操作按照江苏大学动物伦理委员会批准的程序(UJS-IACUC-2020091501)和《实验动物护理和使用指南》进行。

4-(*N,N*-二甲基氨基)丁酸(二亚油基)甲酯、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000和二

硬脂酰磷脂酰胆碱为美国Sigma公司产品;胆固醇为上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;10 mmol/L乙酸钠缓冲液为北京酷来搏科技有限公司产品;20 000截留分子量透析袋为美国Spectrum公司产品;Quant-iT™ RiboGreen RNA测定试剂盒为美国Invitrogen公司产品;美他多辛为山东齐都药业有限公司产品;乙醇液体饲料为戴茨生物科技(无锡)有限公司产品;BeyoRT cDNA第一链合成试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒为碧云天生物技术研究所产品;ALT、AST、丙二醛、SOD、谷胱甘肽、三酰甘油和总胆固醇分析试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品;活性氧检测试剂盒为上海贝博生物科技有限公司产品;兔抗人CYP2E1单克隆抗体(BML-CR3271)为美国Enzo公司产品;兔抗人钙联蛋白单克隆抗体(10427-2-AP)为美国Proteintech Group公司产品;抗F4/80单克隆抗体(ab16911)为英国Abcam公司产品。

Spectra Max 190型酶标仪为美国MD公司产品;Pic017台式离心机、NanoDrop 2000分光光度计、NanoDrop™1000分光光度计为美国Thermo Fisher Scientific公司产品;TE601-L电子天平为北京赛多利斯仪器系统有限公司产品;倒置显微镜为日本Nikon公司产品;Light Cycle 96荧光定量PCR仪为瑞士罗氏公司产品;微流控仪器为加拿大Precision Nanosystem公司产品;Nano Brook 90Plus PALS粒径仪为美国Brookhaven Instruments公司产品;透射电子显微镜为日本Hitachi公司产品;SK-1快速混匀器为江苏中大仪器科技有限公司产品;电泳仪为北京市六一仪器厂产品。

1.2 si-*Cyp2e1* LNP的制备和表征

1.2.1 制备si-*Cyp2e1* LNP 参照文献[16]中的方法筛选siRNA序列,所选序列见表1。单链RNA由金斯瑞生物科技股份有限公司生产。siRNA含有2'-O-甲基修饰和dTsdT 3'悬臂(其中“s”表示硫代磷酸酯连接),以提高其在体内的稳定性并抑制免疫刺激。LNP由油相与水相制备,其中油相成分为4-(*N,N*-二甲基氨基)丁酸(二亚油基)甲酯、二硬脂酰磷脂酰胆碱、胆固醇、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000,以摩尔比50.0:10.0:38.5:1.5溶于无水乙醇^[17],将siRNA溶解在10 mmol/L乙酸钠缓冲溶液中。使用微流控装置将混合的油相液体和含有siRNA的水相溶液按1:3混合,以使其自组装形成LNP,收集样

表1 靶向 *Cyp2e1* 的 siRNA 序列Table 1 Sequences of siRNAs targeting *Cyp2e1*

siRNA	正向序列	反向序列
si-Cyp2e1	ccAuGuAcAcAAuGGAAAAdTsdT	UUUUCcAUUGUGuAcAUGGdTsdT
siRNA 对照	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT

siRNA:小干扰RNA;Cyp2e1:细胞色素P450 2E1;si-Cyp2e1:靶向 *Cyp2e1* 的 siRNA.

品,最后使用20 000截留分子量的透析袋在25 °C下透析2 h以去除溶液中残留的无水乙醇。

1.2.2 采用 Zeta 电位及粒度分析仪测定 si-Cyp2e1 LNP 的粒径、多分散指数和 Zeta 电位 吸取 10 μL si-Cyp2e1 LNP 溶液,使用 DPBS 稀释 100 倍,采用 Nano Brook 90Plus PALS 粒径仪测量 si-Cyp2e1 LNP 的粒径、多分散指数和 Zeta 电位。

1.2.3 透射电子显微镜表征 si-Cyp2e1 LNP 形态结构 对 si-Cyp2e1 LNP 进行负染色,将样品用蒸馏水稀释后放在铜格子上,用滤纸除去多余的液体,然后用透射电子显微镜观察染色结果。

1.2.4 核酸荧光染色法测定 si-Cyp2e1 LNP 的包封率 用 1% TritonX-100 处理制备好的 si-Cyp2e1 LNP 溶液,释放出其中的 siRNA。使用 Quant-iT™ RiboGreen RNA 测定试剂盒测定核酸总量与未破乳前的核酸差值,并按下式计算包封率^[18]。包封率=[(总核酸量荧光值-未破乳核酸量荧光值)/总核酸量荧光值]×100%。

1.3 si-Cyp2e1 LNP 实验剂量筛选

取 16 只雌性 C57BL/6N 小鼠,随机分为四组,每组 4 只,食物和水在标准环境条件下自由供应。空白对照组注射 DPBS,其余三组分别按 0.25、0.50、0.75 mg/kg 经尾静脉注射 si-Cyp2e1 LNP,即为 si-Cyp2e1 LNP 小、中、大剂量组。注射后 24 h,通过实时逆转录 PCR 和蛋白质免疫印迹法检测 CYP2E1 蛋白及其 mRNA 的表达,选择最佳剂量进行后续实验。

1.4 实验分组和干预

另取 40 只雌性 C57BL/6N 小鼠,随机分为空白对照组、模型对照组、si-Cyp2e1 LNP 组、LNP 对照组和美他多辛组,每组 8 只。在开始实验前,除空白对照组外各组小鼠首先接受 10 d 的乙醇适应性饮食,乙醇浓度从无逐渐增至 5%。本实验方法基于文献^[19]并进行改进,即除空白对照组外,其余各组每天均接受乙醇浓度为 5% 的 Lieber-DeCarli 液体饮食,持续 10 d,最后 3 d 每天灌服 5 g/kg 的乙醇;空白对照组则给予

不含乙醇的等量 Lieber-DeCarli 液体饮食,最后 3 d 每天灌服 5 g/kg 的水。si-Cyp2e1 LNP 组和 LNP 对照组在第 1 天和第 7 天分别尾静脉注射 0.5 mg/kg 的 si-Cyp2e1 LNP 和 siRNA 对照 LNP,美他多

辛组每天灌胃给予 150 mg/kg 美他多辛。在喂食过程中观察小鼠的生理状态,并记录食物的消耗量。最后一次乙醇灌胃 9 h 后,对小鼠进行称重,眼眶取血。随后处死小鼠,解剖取肝进行后续实验。

1.5 亚急性酒精性肝损伤相关生化指标的检测

将收集的小鼠全血在室温下放置 30 min,以 1000×g 的速度离心 10 min,仔细吸出上层血清,采用南京建成生物工程研究所的试剂盒检测 ALT 和 AST 活性。

小鼠的肝脏用 0.9% 冰冷等渗氯化钠溶液清洗,吸干表面残留水分后,观察肝脏并称量,计算肝脏指数,即肝脏指数=肝脏质量/小鼠体重^[20]。称取肝组织约 0.1 g,以质量(g):体积(mL)为 1:9 的比例加入冰冷的等渗氯化钠溶液中。将组织匀浆 30 s,以 1000×g 离心 10 min,仔细吸出上层液体,制备肝组织匀浆标本,采用试剂盒检测肝脏 SOD 活性及丙二醛、谷胱甘肽、三酰甘油和总胆固醇含量。使用小鼠新鲜肝脏组织标本检测活性氧。组织标本用磷酸盐缓冲液洗净,称取肝组织约 0.1 g,以质量(g):体积(mL)为 1:9 的比例加入匀浆缓冲液,充分匀浆。100×g、4 °C 离心 5 min,取上清液备用。按照活性氧检测试剂盒说明书检测肝脏中活性氧的含量。

1.6 肝组织病理学检查

1.6.1 HE 染色观察肝组织病理学变化 将部分肝脏固定在 10% 的中性福尔马林缓冲液中,石蜡包埋、切片(5 μm),HE 染色后使用光学显微镜观察。

1.6.2 油红 O 染色观察肝组织脂肪堆积情况 将部分新鲜肝组织块用包埋剂包埋,并在 -80 °C 下快速冷冻,切片(10 μm),油红 O 染色后使用光学显微镜观察。

1.6.3 抗 F4/80 单克隆抗体免疫荧光染色观察巨噬细胞激活情况 在常规的石蜡包埋、组织切片(5 μm)后,抗 F4/80 单克隆抗体进行免疫荧光染色处理后使用荧光显微镜观察。

1.7 实时逆转录PCR检测氧化应激、脂质代谢合成和炎症相关基因的表达

取小鼠肝组织,使用TRIzol试剂从肝组织中提取总RNA。使用NanoDrop™ 1000分光光度计测量RNA浓度。根据BeyoRT cDNA第一链合成试剂盒的说明,逆转录合成cDNA。以*Gapdh*作为内参基因,按照试剂盒说明书操作。PCR反应条件:95 °C 10 min;95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s,45个循环。实验重复三次,采用2^{-ΔΔCt}方法进行数据分析。引物见表2。

1.8 蛋白质印迹法检测CYP2E1蛋白表达

用氯化钾-蔗糖缓冲液从肝组织中提取肝脏微粒体,于-80 °C储存备用。以钙联蛋白作为微粒体内参蛋白^[21]。用BCA蛋白浓度测定试剂盒对部分提取的肝脏微粒体蛋白浓度进行定量,然后以5:1的比例加入SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液,将该混合溶液放在沸水浴中煮沸7 min,使蛋白质变性和失活,然后储存在-20 °C条件。将变性失活的蛋白质分别加到10%~12%的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上,电泳结束后转移到聚偏二氟乙烯膜上。用牛血清白蛋白溶液封闭膜1 h,用抗CYP2E1的单克

隆抗体(1:1000)孵育,并在4 °C下放置过夜。用TBST洗三次膜,用辣根过氧化物酶结合的抗兔二抗(1:1000)孵育,并在室温下反应1 h。最后,用TBST洗三次,每次5 min,根据ECL超敏化学发光试剂盒说明,使用多功能成像仪对化学发光信号进行可视化分析,然后使用Image J软件进行灰度值分析。

1.9 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。正态分布的计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 si-Cyp2e1 LNP的物理表征

si-Cyp2e1 LNP的粒径为(79.91±0.35) nm,多分散指数为0.14±0.01,包封率为(94.90±0.01)%。透射电子显微镜观察到si-Cyp2e1 LNP为球形,进一步确认粒径区间与仪器所测结果一致,见图1。

2.2 si-Cyp2e1 LNP实验剂量筛选结果

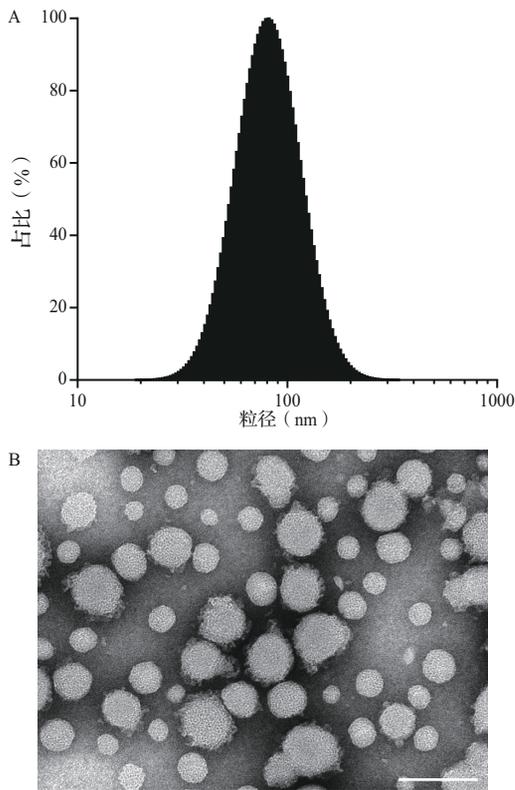
动物实验结果显示,随着si-Cyp2e1 LNP剂量减小,CYP2E1蛋白表达量增加(图2),注射

表2 实时逆转录PCR引物序列(5'→3')

Table 2 Primer sequences for realtime RT-PCR (5'→3')

基 因	正向序列	反向序列
<i>Cyp2e1</i>	GCTGAGTACTCCCTGGATCC	CATGGGTFTCTTGCTGTGTT
<i>Sod1</i>	GCGATGAAAGCGGTGTGCGCTG	TGGACCTGGAACCCATGCTCG
<i>Gsh-rd</i>	GGGATGCCTATGTGAGCCGCC	TGACTTCCACCTGGGCCGA
<i>Gsh-px</i>	GGTGGTGCTCGGTTTCCCGT	AATTGGGCTCAACCCGCCAC
<i>Gp91phox</i>	GGGAAGTGGCTGTGAATGA	CAGTCTGACCCAAGGAGTT
<i>P67phox</i>	GCTGCGTGAACTACTATCCTGG	AGGTCGTAATCTCTCATTTCTGTA
<i>P47phox</i>	ATCAGGCCGCACCTTTGAAGAA	CCAGGGCACTCTCACTGAATA
<i>Cpt1</i>	CTCCGCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Pgc-1α</i>	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT
<i>Srebp1c</i>	GATGTGCCAAGTGGACACAG	CATAGGGGGCGTCAAACAG
<i>Fasn</i>	TATCAAGGAGGCCAATTTTGC	TGTTTCCACTTCTAAACCATGCT
<i>Acc</i>	GCCCTTCTGACTCGCTTAATATG	TGACATCACCCCTAGAGTCCCT
<i>Il-6</i>	AGACAAAGCCAGAGTCTTCAGAGA	GCCACTCCTTCTGTGACTCCAGC
<i>Tnf-α</i>	CCCTCCTGGCCAACGGCATG	CCCTCCTGGCCAACGGCATG
<i>Tgf-β</i>	CGGGAAGCAGTGCCCGAACCC	GGGGTCCAGCAGCCCGTTAC
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

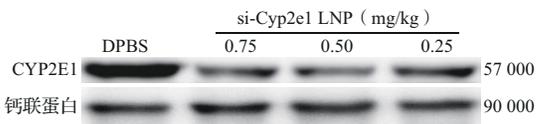
PCR:聚合酶链反应;CYP2E1:细胞色素P450 2E1;SOD:超氧化物歧化酶;GSH-rd:谷胱甘肽还原酶;GSH-px:谷胱甘肽过氧化酶;CPT:肉碱棕榈酰基转移酶;PGC-1α:过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子-1α;SREBP1c:固醇调节元件结合蛋白1c;FASN:脂肪酸合成酶;ACC:乙酰辅酶A羧化酶;TNF:肿瘤坏死因子;TGF:转化生长因子;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶。



A: si-Cyp2e1 LNP的粒径分布; B: si-Cyp2e1 LNP在透射电子显微镜下的代表性图像(标尺=100 nm)。si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰RNA; LNP: 脂质纳米粒。

图1 本研究制备的 si-Cyp2e1 LNP 的粒径分布和透射电子显微镜下图像

Figure 1 Particle size distribution and transmission electron microscopy images of si-Cyp2e1 LNP prepared in this study



DPBS: 杜氏磷酸缓冲盐溶液; CYP2E1: 细胞色素 P450 2E1; si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰RNA; LNP: 脂质纳米粒。

图2 不同剂量 si-Cyp2e1 LNP 作用后小鼠肝脏中 CYP2E1 蛋白表达电泳图

Figure 2 Electrophoresis of CYP2E1 protein expression in mouse liver after different doses of si-Cyp2e1 LNP

0.50 mg/kg si-Cyp2e1 LNP 24 h 后 CYP2E1 蛋白水平下降至 70% 左右, *Cyp2e1* mRNA 约下降了 90%, 见表 3。因此, 选择 0.5 mg/kg 作为后续实验中 si-Cyp2e1 LNP 的注射剂量。

2.3 si-Cyp2e1 LNP 对模型鼠肝脏外观和肝功能指标的影响

空白对照组和 si-Cyp2e1 LNP 组肝脏大小合

表3 不同剂量 si-Cyp2e1 LNP 作用后小鼠肝脏中 CYP2E1 蛋白及其 mRNA 表达情况

Table 3 Expression of CYP2E1 protein and mRNA in liver of mice after the effect of different doses of si-Cyp2e1 LNP

组别	n	蛋白	mRNA
对照组	4	1.01±0.06	1.01±0.03
si-Cyp2e1 LNP 大剂量组	4	0.28±0.03**	0.06±0.01**
si-Cyp2e1 LNP 中剂量组	4	0.31±0.03**	0.12±0.02**
si-Cyp2e1 LNP 小剂量组	4	0.39±0.03**	0.37±0.02**

($\bar{x} \pm s$)
与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。CYP2E1: 细胞色素 P450 2E1; si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰RNA; LNP: 脂质纳米粒。

适、颜色红润、质地柔软, 而模型对照组和 LNP 对照组肝脏颜色暗淡、质地稍硬、表面粗糙(图 3)。从表 4 中可以看出, 与空白对照组比较, 乙醇诱导小鼠的肝脏指数增加($P < 0.01$), 而 si-Cyp2e1 LNP 组肝脏指数较模型对照组明显改善($P < 0.01$), 与空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型对照组的 AST 和 ALT 水平均高于空白对照组(均 $P < 0.01$), 而 si-Cyp2e1 LNP 组这两项指标较模型对照组均明显改善(均 $P < 0.01$), 见表 4。结果提示, si-Cyp2e1 LNP 可以有效缓解乙醇诱导的亚急性肝损伤。

2.4 si-Cyp2e1 LNP 对模型鼠肝组织抗氧化能力和脂质水平的影响

与空白对照组比较, 模型对照组肝组织中活性氧和丙二醛含量升高, 谷胱甘肽含量和 SOD 活性降低(均 $P < 0.01$), 而 si-Cyp2e1 LNP 组上述指标较模型对照组明显改善(均 $P < 0.01$), 见表 5。结果提示, si-Cyp2e1 LNP 作用后小鼠体内抗氧化能力得到改善。

与空白对照组比较, 模型对照组肝组织中三酰甘油和总胆固醇含量升高(均 $P < 0.01$), 而 si-Cyp2e1 LNP 组中三酰甘油和总胆固醇含量恢复至正常值范围, 见表 5。结果提示, si-Cyp2e1 LNP 有助于恢复亚急性酒精性肝损伤引起的体内脂质代谢紊乱, 防止肝脏脂肪堆积。

2.5 si-Cyp2e1 LNP 对模型鼠肝组织病理学变化的影响

HE 染色结果显示, 空白对照组肝细胞大小均匀、排列整齐, 肝组织形态结构正常; 模型对照组肝细胞排列紊乱、细胞质稀疏, 有大量脂肪空泡和坏死; si-Cyp2e1 LNP 组和美他多辛组则与空



si-Cyp2e1: 靶向Cyp2e1的小干扰RNA; LNP: 脂质纳米粒.

图3 各组小鼠肝脏的外观形态

Figure 3 Morphological appearance of the liver in each group

表4 各组小鼠肝脏指数与血清生化指标检测结果

Table 4 Liver index and serum biochemical indicators of mice in each group

组别	n	肝脏指数 (%)	ALT(U/L)	AST(U/L)
空白对照组	8	4.25±0.20	19.06±0.43	30.52±9.78
模型对照组	8	5.15±0.36**	59.52±14.95**	97.39±12.62**
si-Cyp2e1 LNP组	8	4.76±0.14###	23.45±8.11###	33.40±11.80###
LNP对照组	8	5.02±0.21**	53.11±12.16**	94.53±12.24**
美他多辛组	8	4.66±0.15###	37.88±11.51###	47.56±7.21###

($\bar{x} \pm s$)
与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ### $P < 0.01$.
si-Cyp2e1: 靶向Cyp2e1的小干扰RNA; LNP: 脂质纳米粒; ALT: 丙氨酸转氨酶; AST: 天冬氨酸转氨酶.

白对照组形态相似, 但美他多辛组观察到少数脂肪变性空泡。见图4。

油红O染色结果显示, 空白对照组肝组织中无脂滴堆积; 模型对照组肝脏中有大量脂滴积聚; si-Cyp2e1 LNP组只观察到极少量的脂滴。定量分析结果显示, 与空白对照组比较, 模型对照组肝脏脂肪堆积面积约增加10% ($P < 0.01$), 而si-Cyp2e1 LNP组肝脏脂肪含量较模型对照组下降, 与空白对照组相当。见图4、表6。

抗F4/80单克隆抗体荧光免疫组化结果显示,

与空白对照组比较, 模型对照组荧光强度明显增强, 累积光密度值增加 ($P < 0.01$), 而si-Cyp2e1 LNP组F4/80表达明显减少 ($P < 0.01$), 见图4、表6。

上述结果提示, si-Cyp2e1 LNP给药可以维持肝细胞结构, 减少脂滴积聚, 减少巨噬细胞活性, 降低炎症反应, 减轻乙醇对肝脏的损害。

2.6 si-Cyp2e1 LNP对模型鼠肝脏氧化应激、脂质合成和炎症相关基因表达的影响

与空白对照组比较, 模型对照组活性氧形成相关催化基因P47phox、P67phox和Gp91phox的表达增加 (均 $P < 0.01$), 而抗氧化酶相关基因Sod1、Gsh-rd和Gsh-px的表达减少 (均 $P < 0.01$); 与模型对照组比较, si-Cyp2e1 LNP组活性氧形成相关催化基因表达减少, 而抗氧化酶相关基因的表达增加 (均 $P < 0.01$), 与空白对照组差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见图5。

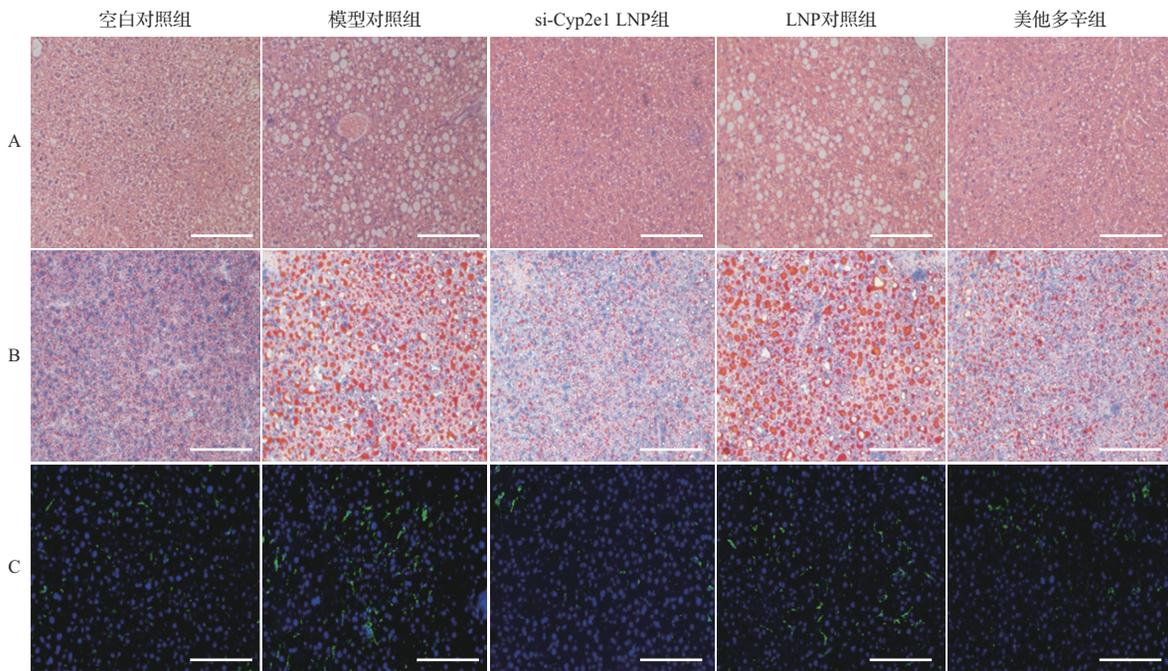
与空白对照组比较, 模型对照组脂质代谢相关基因Pgc-1 α 、Cpt1的mRNA表达减少 (均 $P < 0.01$), 脂质合成相关基因Srebp1c、Fasn和Acc的mRNA表达增加 (均 $P < 0.01$); 与模型对照组比较, si-Cyp2e1 LNP组脂质代谢相关基因表达增加, 脂质合成基因表达减少 (均 $P < 0.01$), 与空白对照组差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见图6。

表5 各组小鼠肝组织中的抗氧化和脂质水平

Table 5 Antioxidant and lipid levels in liver tissue of mice in each group

组别	n	活性氧	谷胱甘肽 ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (U/mg)	丙二醛 (nmol/mg)	三酰甘油 (mmol/g)	总胆固醇 (mmol/g)
空白对照组	8	1.01±0.01	9.83±1.43	88.13±13.22	0.46±0.10	0.17±0.03	0.07±0.01
模型对照组	8	2.15±0.15**	3.87±1.14**	53.50±2.44**	1.65±0.40**	0.32±0.04**	0.17±0.04**
si-Cyp2e1 LNP组	8	1.33±0.19###	8.23±1.16###	82.65±7.82###	0.51±0.10###	0.16±0.05###	0.07±0.02###
LNP对照组	8	2.41±0.30**	3.98±0.78**	57.44±4.60**	1.74±0.56**	0.31±0.03**	0.13±0.03**
美他多辛组	8	1.42±0.14###	7.51±1.55###	75.28±8.55###	0.86±0.16###	0.20±0.04###	0.09±0.02###

($\bar{x} \pm s$)
与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ### $P < 0.01$. si-Cyp2e1: 靶向Cyp2e1的小干扰RNA; LNP: 脂质纳米粒; SOD: 超氧化物歧化酶.



A: HE 染色结果; B: 油红 O 染色结果; C: 抗 F4/80 单克隆抗体免疫荧光染色结果. 绿色为 F4/80, 蓝色为 4', 6-二脒基-2-苯基叫啉. 标尺=100 μm . si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰 RNA; LNP: 脂质纳米粒.

图 4 各组肝组织病理学检查结果

Figure 4 Histopathology of liver in each group

表 6 各组小鼠油红 O 染色阳性面积和荧光免疫组织化学累积光密度值比较

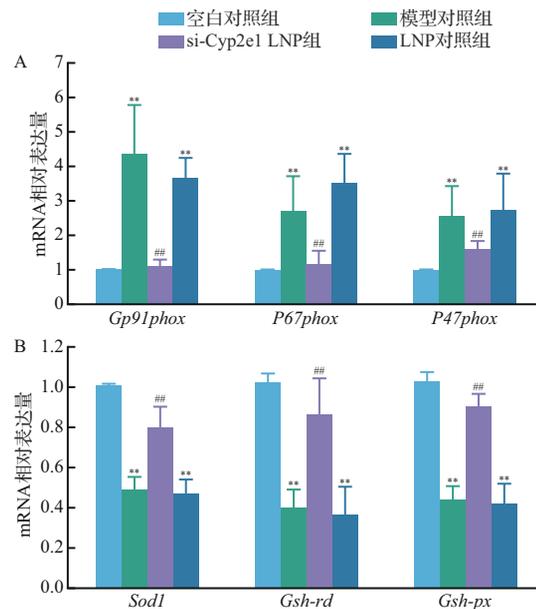
Table 6 Areas of positive oil-red O staining and cumulative optical density values of fluorescence immunohistochemistry in each group

组别	n	油红 O 染色阳性面积(%)	累积光密度值
空白对照组	8	2.78±0.92	120.62±37.07
模型对照组	8	9.21±2.16**	293.46±86.93**
si-Cyp2e1 LNP 组	8	3.20±1.33##	114.14±21.51##
LNP 对照组	8	8.77±2.54**	281.18±64.93**
美他多辛组	8	4.85±0.93##	151.51±24.04##

与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ## $P < 0.01$. si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰 RNA; LNP: 脂质纳米粒.

与空白对照组比较, 模型对照组肝脏炎症相关基因 *Tgf- β* 、*Tnf- α* 和 *Il-6* 的表达增加(均 $P < 0.01$); 与模型对照组比较, si-Cyp2e1 LNP 组炎症相关基因的表达减少(均 $P < 0.01$), 与空白对照组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见图 7。

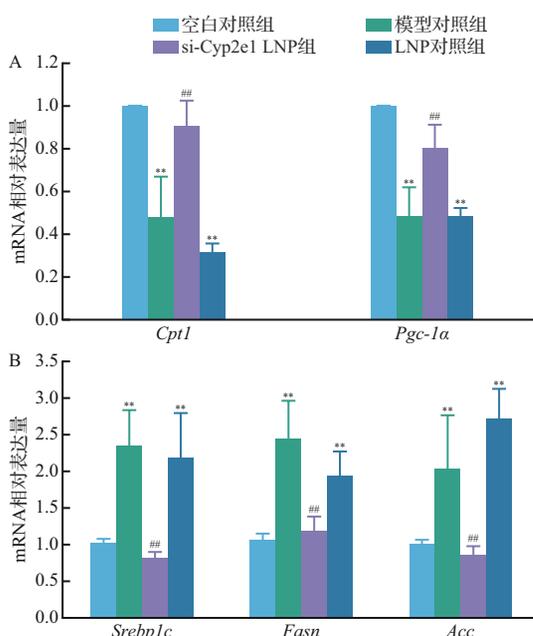
上述结果提示, si-Cyp2e1 LNP 给药可以调控氧化应激、脂质合成和炎症相关基因的表达, 从而减轻肝损伤。



A: 活性氧形成相关催化基因的 mRNA 相对表达水平; B: 抗氧化酶基因的 mRNA 相对表达水平. 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ## $P < 0.01$. si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰 RNA; LNP: 脂质纳米粒; SOD: 超氧化物歧化酶; GSH-rd: 谷胱甘肽还原酶; GSH-px: 谷胱甘肽过氧化酶.

图 5 si-Cyp2e1 LNP 对氧化应激相关基因表达的影响

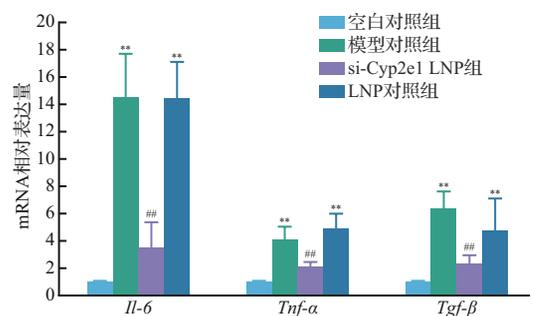
Figure 5 The effect of si-Cyp2e1 LNP on the expression of genes related to oxidative stress



A: 脂质代谢相关基因的 mRNA 相对表达水平; B: 脂质合成相关基因的 mRNA 相对表达水平. 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ## $P < 0.01$. si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰 RNA; LNP: 脂质纳米粒; CPT: 肉碱棕榈酰基转移酶; PGC-1 α : 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α ; SREBP1c: 固醇调节元件结合蛋白 1c; FASN: 脂肪酸合成酶; ACC: 乙酰辅酶 A 羧化酶.

图6 si-Cyp2e1 LNP对脂质代谢和合成相关基因表达的影响

Figure 6 The effect of si-Cyp2e1 LNP on the expression of genes related to lipid metabolism and synthesis



与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ## $P < 0.01$. si-Cyp2e1: 靶向 *Cyp2e1* 的小干扰 RNA; LNP: 脂质纳米粒; TNF: 肿瘤坏死因子; TGF: 转化生长因子.

图7 si-Cyp2e1 LNP对肝脏炎症相关基因表达的影响

Figure 7 The effect of si-Cyp2e1 LNP on inflammation-associated genes expression

3 讨论

CYP2E1可以有效地将分子氧还原成自由基,从而导致肝脏损伤^[22]。血液中吸收的乙醇约有

95%被微粒体乙醇氧化系统氧化。微粒体乙醇氧化系统包括酒精脱氢酶和CYP2E1,主要在肝细胞的细胞质中表达,可以促进大量活性氧的产生,同时在mRNA和蛋白表达水平上调CYP2E1^[23]。乙醇对CYP2E1的诱导可导致肝脏病变的严重程度增加,从而促进亚急性酒精性肝损伤的产生。RNAi疗法可以有针对性地促进特定基因的下调表达,但RNAi介导的基因沉默需要克服多种生理障碍,以便在体内有效传递siRNA^[24]。

与病毒载体比较,包封核酸的阳离子脂质体的免疫原性和毒性均大大降低^[25],经过表面修饰的脂质体药物递送系统可避免被血液、肝脏、脾脏以及其他网状内皮系统丰富的组织或区域快速吞噬、避免载药颗粒被快速消除^[26]。经聚乙二醇-磷脂衍生物修饰的LNP可以达到体内长循环的目的,从而增加药物在肝组织中的聚集,提升治疗效果^[27]。本研究中LNP具有包封率高、可生物降解的优点,si-Cyp2e1 LNP在小鼠体内治疗的最佳剂量为0.50 mg/kg,可使基因沉默率达到90%。同时,根据既往研究结果,si-Cyp2e1 LNP在体内的基因敲低时间可以有效持续7 d^[16],故本研究选择一周一次的给药频率。结果显示,si-Cyp2e1 LNP组小鼠肝脏的外观与空白对照组无明显差异,均为肝组织表面光滑,呈正常的红褐色;肝功能生化指标检测和组织病理学检查结果显示,si-Cyp2e1 LNP可以降低AST、ALT活性,维持肝组织形态结构正常,提示si-Cyp2e1 LNP对亚急性酒精性肝损伤有良好的保护作用。

氧化应激在亚急性酒精性肝损伤中起着重要作用,过多的活性氧可以激活肝细胞的脂质过氧化^[28]。本文资料显示,si-Cyp2e1 LNP能明显降低亚急性酒精性肝损伤模型小鼠肝组织中的丙二醛含量,提高SOD活性和谷胱甘肽含量。NADPH氧化酶是一种重要的酶,在血管系统中催化活性氧的形成,其由Gp91phox、P67phox和P47phox等膜结合的异质体组成^[29-30]。体内中和活性氧的系统由抗氧化酶组成,如GSH-rd、GSH-px和SOD1^[31]。通过分析氧化应激相关基因的表达,模型对照组中Gp91phox、P67phox和P47phox的mRNA表达增加,同时抗氧化酶相关基因的表达减少,而si-Cyp2e1 LNP可以减少Gp91phox、P67phox和P47phox的mRNA表达,增加Gsh-rd、Gsh-px和Sod1的mRNA表达,通过阻碍活性氧的生成,维持机

体氧化与抗氧化平衡,表明 si-Cyp2e1 LNP 对亚急性酒精性肝损伤的保护作用可能与 si-Cyp2e1 LNP 的抗氧化活性有关。

乙醇会促进体内脂质合成,而 si-Cyp2e1 LNP 可以降低三酰甘油和总胆固醇含量,油红 O 染色结果也显示 si-Cyp2e1 LNP 组的肝组织中未出现脂滴积聚现象。PGC-1 α 主要调节体内的氧化代谢^[32],CPT1 是脂肪酸 β -氧化的限速酶^[33]。通过分析脂质氧化代谢相关基因的表达发现,si-Cyp2e1 LNP 可减少 *Cpt1* 和 *Pgc-1a* 的 mRNA 表达,从而改善肝组织中的脂质代谢。SREBP1c、FASN 和 ACC 负责肝脏脂质合成^[34]。小鼠肝脏中 *Srebp1c* 的 mRNA 表达受乙醇影响上调 *Acc* 和 *Fasn* 的 mRNA 表达,并增加三酰甘油和总胆固醇的合成,导致脂质积累^[35],而 si-Cyp2e1 LNP 可下调 *Srebp1c*、*Acc*、*Fasn* 的 mRNA 表达。因此,si-Cyp2e1 LNP 对亚急性酒精性肝损伤的保护作用可能与其对脂质代谢调控有关。

乙醇会引起炎症导致机体炎症指标异常。免疫荧光染色 F4/80 是主要的巨噬细胞标记^[36],本文资料显示,si-Cyp2e1 LNP 可抑制巨噬细胞的激活,改善肝脏炎症。通过检测炎症相关基因的表达发现,*Il-6*、*Tnf- α* 和 *Tgf- β* 等促炎性细胞因子基因在乙醇的作用下表达增加,导致小鼠肝脏出现明显炎症,而 si-Cyp2e1 LNP 可以下调 *Il-6*、*Tnf- α* 和 *Tgf- β* 的表达,从而减轻亚急性酒精性肝损伤的炎症反应。

综上所述,si-Cyp2e1 LNP 主要通过降低活性氧水平,增加抗氧化活性,阻断氧化应激途径,减少乙醇诱发的脂肪变性和炎症,保护肝脏免受乙醇引起的损伤,为亚急性酒精性肝损伤提供了一种新的靶向治疗方法。但鉴于人与小鼠存在的物种差异性,si-Cyp2e1 LNP 在人体内应用的有效性和安全性须进一步评估。

志谢 研究得到国家重点研发计划(2018YFA0801401, 2019YFA0802801, 2020YFE0205100)、中央本级重大增减支项目(2060302-2004-09)、镇江社会发展项目(SH2020 036)、国家自然科学基金(31871345, 32071442)、武汉大学医学科学促进计划(基础医学科学)(TFJC2018004)、中央大学基本科研基金、中国医学科学院非营利中央研究所基金(2020-PT320-004)、武汉市应用基础前沿项目(2020020601012216)支持

Acknowledgements This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFA0801401, 2019YFA080 2801, 2020YFE0205100), Central-level Major Increases and Decreases in Expenditure Project (2060302-2004-09), Zhenjiang Social Development Project (SH2020036), National Natural Science Foundation of China (31871345, 32071442), Wuhan University Medical Science Promotion Program (Basic Medical Science) (TFJC2018004), Central University Basic Research Fund, Fund of the Non-Profit Central Research Institute of the Chinese Academy of Medical Sciences (2020-PT320-004), Wuhan Applied Basic Frontier Project (2020020 601012216)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2023. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] SEITZ H K, BATALLER R, CORTEZ-PINTO H, et al. Alcoholic liver disease[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 16.
- [2] SZABO G, KAMATH P S, SHAH V H, et al. Alcohol-related liver disease: areas of consensus, unmet needs and opportunities for further study[J]. *Hepatology*, 2019, 69(5): 2271-2283.
- [3] FRIEDMAN S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2247-2250.
- [4] GANESAN M, NATARAJAN S K, ZHANG J, et al. Role of apoptotic hepatocytes in HCV dissemination: regulation by acetaldehyde[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 310(11): G930-940.
- [5] SINGH S, OSNA N A, KHARBANDA K K. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: a review[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(36): 6549-6570.
- [6] BEIER J I, MCCLAIN C J. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease[J]. *Biol Chem*, 2010, 391(11): 1249-1264.
- [7] LU Y, WU D, WANG X, et al. Chronic alcohol-induced liver injury and oxidant stress are decreased in cytochrome P4502E1 knockout mice and restored in humanized cytochrome P4502E1 knock-in mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(9): 1406-1416.
- [8] DEY A. Cytochrome P450 2E1: its clinical aspects and a brief perspective on the current research scenario [J]. *Subcell Biochem*, 2013, 67: 1-104.
- [9] SCHATTENBERG J M, CZAJA M J. Regulation of

- the effects of CYP2E1-induced oxidative stress by JNK signaling[J]. **Redox Biol**, 2014, 3: 7-15.
- [10] CEDERBAUM A I. CYP2E1-biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury [J]. **Mt Sinai J Med**, 2006, 73(4): 657-672.
- [11] LEUNG T M, NIETO N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease[J]. **J Hepatol**, 2013, 58(2): 395-398.
- [12] SEITZ H K, STICKEL F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress[J]. **Biol Chem**, 2006, 387(4): 349-360.
- [13] BUMCROT D, MANOHARAN M, KOTELIANSKY V, et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs[J]. **Nat Chem Biol**, 2006, 2(12): 711-719.
- [14] HANNON G J. RNA interference[J]. **Nature**, 2002, 418(6894): 244-251.
- [15] KANASTY R, DORKIN J R, VEGAS A, et al. Delivery materials for siRNA therapeutics[J]. **Nat Mater**, 2013, 12(11): 967-977.
- [16] WANG Y, CHEN Q, WU S, et al. Amelioration of ethanol-induced oxidative stress and alcoholic liver disease by *in vivo* RNAi targeting *Cyp2e1*[J]. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2023. DOI: 10.1016/j.apsb.2023.01.009.
- [17] WU Y, GU W, CHEN C, et al. Optimization of formulations consisting of layered double hydroxide nanoparticles and small interfering RNA for efficient knockdown of the target gene[J]. **ACS Omega**, 2018, 3(5): 4871-4877.
- [18] HEYES J, PALMER L, BREMNER K, et al. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids[J]. **J Control Release**, 2005, 107(2): 276-287.
- [19] RAMIREZ T, LI Y M, YIN S, et al. Aging aggravates alcoholic liver injury and fibrosis in mice by down-regulating sirtuin 1 expression[J]. **J Hepatol**, 2017, 66(3): 601-609.
- [20] TOITA R, KAWANO T, FUJITA S, et al. Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding[J]. **J Toxicol Pathol**, 2018, 31(1): 43-47.
- [21] BERGERON J J, BRENNER M B, THOMAS D Y, et al. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum[J]. **Trends Biochem Sci**, 1994, 19(3): 124-128.
- [22] HARJUMÄKI R, PRIDGEON C S, INGELMAN-SUNDBERG M. CYP2E1 in alcoholic and non-alcoholic liver injury. Roles of ROS, reactive intermediates and lipid overload[J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(15): 8221.
- [23] SEITZ H K, NEUMAN M G. The history of alcoholic liver disease: from an unrecognized disease to one of the most frequent diseases in hepatology[J]. **J Clin Med**, 2021, 10(4): 858.
- [24] YANG X, FAN B, GAO W, et al. Enhanced endosomal escape by photothermal activation for improved small interfering RNA delivery and antitumor effect[J]. **Int J Nanomedicine**, 2018, 13: 4333-4344.
- [25] 李秀英, 曾凡, 赵曜, 等. 脂质体药物递送系统的研究进展[J]. **中国新药杂志**, 2014, 23(16): 1904-1911.
- LI Xiuying, ZENG Fan, ZHAO Yao, et al. Advances in the research and development of liposomal drug delivery systems[J]. **Chinese Journal of New Drugs**, 2014, 23(16): 1904-1911. (in Chinese)
- [26] 刘扬, 吕万良, 张强. 脂质体及纳米粒药物递送系统的研究进展[J]. **中国医学科学院学报**, 2006, 28(4): 583-589.
- LIU Yang, LYU Wanliang, ZHANG Qiang. Recent advances in liposomes and nanoparticles as drug carriers for drug delivery[J]. **Acta Academiae Medicinae Sinicae**, 2006, 28(4): 583-589. (in Chinese)
- [27] MAININI F, ECCLES M R. Lipid and polymer-based nanoparticle siRNA delivery systems for cancer therapy [J]. **Molecules**, 2020, 25(11): 2692.
- [28] JELIC M D, MANDIC A D, MARICIC S M, et al. Oxidative stress and its role in cancer[J]. **J Cancer Res Ther**, 2021, 17(1): 22-28.
- [29] LOUVET A, MATHURIN P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment[J]. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 2015, 12(4): 231-242.
- [30] BRYK D, OLEJARZ W, ZAPOLSKA-DOWNAR D. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, 2017, 71(0): 57-68.
- [31] NIE X, DAI Y, ZHENG Y, et al. Establishment of a mouse model of premature ovarian failure using consecutive superovulation[J]. **Cell Physiol Biochem**, 2018, 51(5): 2341-2358.
- [32] BOST F, KAMINSKI L. The metabolic modulator PGC-1 α in cancer[J]. **Am J Cancer Res**, 2019, 9(2): 198-211.
- [33] DAI J, LIANG K, ZHAO S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis[J/OL]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2018, 115(26): E5896-E5905.
- [34] LIN W, JIN Y, HU X, et al. AMPK/PGC-1 α /GLUT4-mediated effect of icariin on hyperlipidemia-induced non-alcoholic fatty liver disease and lipid metabolism disorder in mice[J]. **Biochemistry**, 2021, 86(11): 1407-1417.
- [35] DU D, LIU C, QIN M, et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutic targets for hepatocellular carcinoma[J]. **Acta Pharm Sin B**, 2022, 12(2): 558-580.
- [36] DOS ANJOS CASSADO A. F4/80 as a major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen[J]. **Results Probl Cell Differ**, 2017, 62: 161-179.