

李维佳,凌晨,霍桂桃,等. 非酒精性脂肪性肝炎相关肝细胞癌进展中小鼠肾损伤程度及其潜在机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2026, 34(3): 411-423.

LI W J, LING C, HUO G T, et al. Renal injury and its potential mechanisms in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2026, 34(3): 411-423.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2026.03.009

非酒精性脂肪性肝炎相关肝细胞癌进展中小鼠肾损伤程度及其潜在机制研究

李维佳^{1,2#}, 凌晨^{2#}, 霍桂桃³, 杨艳伟³, 刘甦苏², 赵皓阳², 王依宁²,
王思浩^{1,2}, 王夏璐^{1*}, 范昌发^{2*}

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所
(国家啮齿类实验动物资源库), 北京 102629; 3. 中国食品药品检定研究院安全
评价研究所(国家药物安全评价检测中心, 北京 100176)

【摘要】 目的 本研究拟基于新型非酒精性脂肪性肝炎(metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH)-肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)小鼠模型(HRAS-HCC), 研究伴随非酒精性脂肪肝炎相关的肝癌发生的肾损伤、功能失调、组织学及分子学特征, 以探索 MASH-HCC 诱发肾损伤的潜在机制, 旨在为临床研究疾病发生机制及探索诊疗方法提供重要模型工具。**方法** 实验采用本课题组自主构建的 HRAS-HCC 小鼠, 以同窝隐性小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠为对照组。5 周龄时通过注射他莫昔芬诱导小鼠肝组织中 HRAS 基因表达, 进而引发 MASH-HCC 的发生与进展。在 MASH-HCC 进展过程中(1 ~ 4 周), 定期监测小鼠的体质量、精神状态等一般特征, 并于选择时间点采集血液样本并检测相关指标; 通过苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色分析小鼠肾组织的病变特征。**结果** 与 HRAS^{NON-TAM} 组相比, HRAS-HCC 小鼠在一个月内从 MASH 阶段, 经肝纤维化进展到 HCC, 表现出黄疸、呼吸急促、弓背、便血、肝肿大和脾肿大等临床症状。4 周时, HRAS-HCC 小鼠血清中碱性磷酸酶(ALP)降低($P < 0.05$), 血清尿酸氮(UREA)、尿酸(UA)和肌酐(CREA)升高($P < 0.05$)。HE 结果显示, HRAS-HCC 小鼠肾组织在不同时期存在程度不一的肾小管嗜碱性变、透明性肾小球、肾小管上皮细胞透明滴样变等多种病变。同时, Masson 染色观察到 HRAS-HCC 小鼠肾组织还存在纤维化病变, 且肾纤维化(2 ~ 3 周)与肝纤维化/肝硬化(2 ~ 3 周)的发生时间及严重程度存在相关性。进一步检测肾损伤相关分子表达发现, 3 周时细胞角蛋白 18(KRT18)、SMAD3、纤维连接蛋白 1(FN1)、转化生长因子 β (TGF β) 在 mRNA 水平表达升高($P < 0.05$)。同时, 蛋白质互作网络(PPI)分析结果显示人源 HRAS 和 FN1、SMAD3 间存在蛋白互作关系。**结论** 本研究结果表明, MASH-HCC 引起的肾损伤与肝纤维化程度呈正相关关系, 初步展示了 MASH-HCC 引起的肾损伤病理特征和分子特征, 提示 HRAS-SMAD3-FN1 轴可能存在重要的作用。本研究呈现了特有的 MASH-HCC 伴随肾损伤动物模型, 该模型较真实的重现了临床上肾损伤的疾病特征, 为制定该疾病的临床治疗策略奠定了基础。

【基金项目】 中国食品药品检定研究院关键技术研究基金课题(GJJSYJ202401)。

Funded by the Key Technology Research Fund Project of the National Institutes for Food and Drug Control (GJJSYJ202401).

【作者简介】 李维佳, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 疾病动物模型。Email: 1821950981@qq.com;

凌晨, 女, 博士, 研究方向: 疾病动物模型。Email: LingChen9403@163.com。

#共同第一作者

【通信作者】 范昌发, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 疾病动物模型。Email: fancf@nifdc.org.cn;

王夏璐, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物诊断试剂开发。Email: wangxialu1985@163.com。

* 共同通信作者

【关键词】 代谢障碍相关脂肪性肝炎;肝细胞癌;*HRAS*;肾损伤;小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2026) 03-0411-13

Renal injury and its potential mechanisms in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma

LI Weijia^{1,2#}, LING Chen^{2#}, HUO Guitao³, YANG Yanwei³, LIU Susu², ZHAO Haoyang², WANG Yining²,
WANG Sihao^{1,2}, WANG Xialu^{1*}, FAN Changfa^{2*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control (National Rodent Laboratory Animal Resource Bank), Beijing 102629, China; 3. Institute for Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control (National Center for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China)

Corresponding author: FAN Changfa. E-mail: fanf@nifdc.org.cn; WANG Xialu. E-mail: wangxialu1985@163.com

【Abstract】 Objective To investigate renal injury, functional impairment, histopathological characteristics, and molecular features accompanying HCC development in the context of non-alcoholic steatohepatitis, utilizing a novel MASH-HCC murine model (HRAS-HCC). This research seeks to elucidate the underlying mechanisms of MASH-HCC-induced renal injury, thereby providing an essential model tool for clinical investigations into disease pathogenesis and the exploration of diagnostic and therapeutic strategies. **Methods** HRAS-HCC transgenic mice generated in-house were employed, with littermate negative controls and wild-type C57BL/6 mice as comparators. At 5 weeks of age, tamoxifen was administered to induce hepatocyte-specific *HRAS* expression, thereby initiating and propagating MASH-HCC. Body mass, general condition, and behavioral parameters were monitored serially during disease progression (weeks 1 ~ 4). Blood was collected at predetermined time points for biochemical analyses. Structural and fibrotic changes in renal tissue were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. **Results** Compared with the HRAS^{NON-TAM} group, Within 4 weeks, HRAS-HCC mice transitioned from MASH through hepatic fibrosis to established HCC, manifesting jaundice, tachypnea, kyphosis, hematochezia, hepatosplenomegaly, and other clinical signs. At week 4, serum alkaline phosphatase (ALP) was significantly decreased ($P < 0.05$), whereas blood urea nitrogen (UREA), uric acid (UC), and creatinine (CREA) were markedly elevated ($P < 0.05$). HE staining revealed temporally heterogeneous renal lesions, including tubular basophilia, hyaline glomerulopathy, and tubular epithelial cytoplasmic hyaline droplet formation. Masson staining demonstrated renal fibrosis whose onset (weeks 2 ~ 3) and severity paralleled those of hepatic fibrosis/cirrhosis (weeks 2 ~ 3). Further analysis of kidney injury-related molecular expression revealed at week 3 showed up-regulation of keratin-18, SMAD3, fibronectin, and transforming growth factor- β mRNAs ($P < 0.05$). Protein-protein interaction analyses further indicated direct interactions among human HRAS, fibronectin (FN1), and SMAD3. **Conclusions** These data establish a positive correlation between MASH HCC-induced renal injury and the degree of hepatic fibrosis, clarify the attendant histopathological and molecular signatures, and implicate the HRAS-SMAD3-FN1 axis as a putative mechanistic pathway. The HRAS-HCC mouse model uniquely recapitulates key clinicopathological features of human MASH-HCC complicated by CKD, thereby providing a robust pre-clinical platform for mechanistic dissection and therapeutic development.

【Keywords】 metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; hepatocellular carcinoma; *HRAS*; renal injury; mouse model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着靶向药物和肿瘤干细胞治疗等新型治疗技术的发展,肝细胞癌(hepatocellular

carcinoma, HCC)患者的中位生存时间已大有改善^[1]。但越来越多的患者会出现HCC相关的肾

疾病,进一步加重了全球疾病负担^[2]。有研究指出,HCC 患者 1 年内发生急性肾损伤的风险为 31.8%^[3]。因此,研究 HCC 相关肾损伤的发病机制对临床早期诊断和靶向治疗有重要的意义。

代谢功能障碍相关脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) 作为代谢功能障碍相关脂肪肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD) 的进展性形式,不仅与 HCC 的发生密切相关,还可能通过系统性炎症、代谢紊乱及氧化应激等途径导致肝外器官损伤^[4-5],尤其是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD)^[6-7]。流行病学调查显示,MASH 患者发生 CKD 的风险显著高于普通人群^[8],且其肾病进展程度与肝纤维化/肝硬化严重程度呈正相关^[9]。然而,因受限于动物模型,MASH 相关肾损伤的具体分子机制尚不明确,限制了临床干预策略的制定^[10]。

目前,关于 MASH 诱发肾损伤的潜在机制存在多种假说,包括脂毒性、炎症因子释放、胰岛素抵抗及肾血流动力学改变等^[11]。这些假说多基于临床观察或体外实验,缺乏可靠的动物模型验证^[12]。值得注意的是,MASH 与 HCC 的协同作用可能进一步加剧肾损伤,而这一过程的分子机制尚未阐明^[11]。此外,原癌基因 *HRAS* 的异常激活已被证实可驱动 MASH-HCC 的进展^[13],但其是否通过特定信号轴参与肾损伤的发生尚无系统研究。

本研究拟基于自主构建并经验证的 *HRAS*-HCC 小鼠模型^[13],通过他莫西芬 (Tamoxifen, TAM) 诱导小鼠肝组织特异性高表达 (harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, *Hras*),于 1 个月内模拟临床 MASH-HCC 的自然病程;系统展示 MASH-HCC 进展过程中肾功能及肾组织病理学的动态变化,并重点分析 *HRAS*-*SMAD3*-*FN1* 轴在肝-肾轴中的潜在作用,进而探讨 MASH-HCC 诱发肾损伤的潜在致病分子机制,为临床早期诊断和靶向治疗提供理论依据和新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究共使用 27 只小鼠,均由中国食品药品

检定研究院实验动物资源研究所模式动物研究室提供【SCXK(京)2022-0002】。使用课题组前期工作中构建的 SPF 级 6 ~ 10 周龄,体质量均为 15 ~ 20 g 的 *HRAS*^{FLOX/-}; Alb-iCreERT2 小鼠^[14] (*HRAS* 基因插入但未启动表达)共 23 只,SPF 级 6 ~ 10 周龄 C57BL/6 小鼠共 4 只(2 只雄鼠,2 只雌鼠),体质量为 15 ~ 20 g。动物饲养于中国食品药品检定研究院【SYXK(京)2022-0014】。所有动物自由饮水和进食,温度 22 ℃,湿度 60%,12 h 的光/暗循环。所有动物实验均由中国食品药品检定研究院实验动物委员会批准(中检动(福)第 2022(B)050 号)。所有动物实验都严格遵守 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

1 × PBS 溶液 (Gibco, 2435453); 胎牛血清 (Gibco, 2443857); RNA later 保存液 (Thermo, 0162209); TRIzol (TaKaRa, CK1205); 氯仿 (国药集团化学试剂有限公司, 20250412-1); 异丙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 20250328-2); 无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 20250405-A); DEPC 水 (生工生物工程股份有限公司, D250318); RT-PCR 逆转录试剂盒 (TaKaRa, CK1304); TB Green 荧光染料 (TaKaRa, AJ60795A); 苏木素-伊红 (HE) 试剂 (生工生物工程股份有限公司, HG-2194); Masson 染色试剂盒 (Solarbio, 20230224)。PCR 扩增仪 (Eppendorf, Mastercycler X40); 水浴锅 (北京长风仪器仪表有限公司, HW-SY11-K); 恒温摇床 (智城, ZWY-1102C); CO₂ 恒温培养箱 (Thermo, Heracell 150i); 组织匀浆仪 (QIAGEN, TissueLyser LT); 微量分光光度计 (Thermo NANODROP, NanoDrop 2000); 基因扩增仪 (LightCycler 480 II, ROCHE); 病理切片扫描仪 (HHM077 日本滨松, NanoZoomer S360); 倒置光学显微镜 (Nikon 80i, Eclipse Ti-U); 全自动生化分析仪 (日本东芝, TBA-2000FR)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

使用课题组前期构建的 *HRAS*^{FLOX/-}; Alb-iCreERT2 小鼠 (*HRAS* 基因插入但未启动表达)^[13],于 5 周龄时通过腹腔注射共 2 mg TAM,以启动 *HRAS* 在肝组织中特异性高表达,得到

HRAS-HCC 小鼠模型 (HRAS^{TAM} 组, $n = 17$); 注射相同剂量玉米油的 HRAS^{FLOX/-}; Alb-iCreERT2 小鼠 (HRAS 基因插入但未启动表达) 为对照组 (HRAS^{NON-TAM} 组, $n = 6$); 注射等剂量 0.9% 氯化钠溶液的野生型 C57BL/6 小鼠为空白对照组 ($n = 4$), 分组详见表 1。将注射 TAM 启动 HRAS 基

因高表达后的第 7、14、21、28 天定义为第 1 ~ 4 周。每周称量体质量, 观察小鼠状态并记录在临床评分表里。于 4 周后进行组织解剖, 取下皮肤、颌下腺、腮腺、胸骨、舌、心脏、胸腺、肺、肝、脾、肾和淋巴结等器官用于进行病理检测和相关实验。

表 1 实验分组信息
Table 1 Group information

组别 Groups	小鼠类型 Mouse strain	处理方式 Intervention method	组别名称 Group name	数量/只 Number of mice/pcs
HRAS ^{TAM} 组 HRAS ^{TAM} group	HRAS ^{FLOX/-} ; Alb-iCreERT2	TAM	HRAS ^{TAM}	17
HRAS ^{NON-TAM} 组 HRAS ^{NON-TAM} group	HRAS ^{FLOX/-} ; Alb-iCreERT2	玉米油 (无他莫昔芬) Maize oil (non-TAM)	HRAS ^{NON-TAM}	6
空白对照组 Native control group	C57BL/6	0.9% 氯化钠溶液 0.9% sodium chloride solution	野生型 Wild-type	4

1.2.2 逆转录实时定量聚合酶链反应 (reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测小鼠肾组织中基因表达

称取用 RNA later 组织保存液浸泡过的小鼠肾组织 0.1 g, 使用 TRIzol 法提取各组小鼠的肾组织总 RNA, Nanodrop 2000 紫外分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度, 纯度在 1.8 ~ 1.9, 根据浓度将 RNA 样品经 DEPC 水稀释至 400 ng/ μ L 后可作为反转录模板, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。通过反转录 PCR 获得 cDNA, 以 cDNA 为模版进行 RT-qPCR 检测。扩增引物序列见表 2。每组 3 个样本, 每个样本设置 3 个复孔。逆转录实时定量 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 1 次循环; 65 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 40 次循环; 95 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 1 次循环。其中只有 HRAS 基因的变性设置为 65 $^{\circ}$ C, 其它 3 个基因为 58 $^{\circ}$ C。数据进行了均一化处理, 即以 GAPDH 作为内参基因, 基因表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算: $\Delta\Delta CT = (CT_{目的基因} - CT_{内参基因})_{HRAS^{TAM}组} - (CT_{目的基因} - CT_{内参基因})_{对照组}$ 。

1.2.3 Masson 染色

新鲜肾组织在 4% 中性缓冲甲醛固定 24 h 后, 进行石蜡包埋及切片, 切片厚度为 5 μ m。将石蜡包埋切片于 60 $^{\circ}$ C 烧片 30 min, 梯度脱蜡, 随后按照 Masson 染色试剂盒说明书进行染色操作。具体步骤为: 将切片浸入 Bouin 液, 室温条件下, 过夜浸染, 然后流水冲洗至切片上的黄色消失; 再滴加天青石蓝染色液, 染色 2 min, 水洗; 再滴加

表 2 基因扩增引物序列

Table 2 Primer sequences for gene amplification

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
HRAS	F: TCATTGATGGGAGACGTGC R: TCACCCGTTTGATCTGCTCC
AFP	F: CTTCCCTCATCCTCTGCTAC R: ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG
KRT18	F: CAGCCAGCGTCTATGCAGG3 R: CTTTCTCGGTCTGGATTCCAC
SMAD3	F: CACGCAGAACGTGAACACC R: GGCAGTAGATAACCTGAGGGA
TGF β 1	F: TCTGCATTGCACTTATGCTGA R: AAAGGGCGATCTAGTGATGGA
GAPDH	F: CAGCAACTCCCACTCTTCCAC R: TGGTCCAGGGTTTCTTACTC

Mayer 苏木素染色液, 染色 2 min, 水洗; 酸性乙醇分化液分化数秒, 流水冲洗 10 min; 丽春红品红染色液滴染 10 min, 蒸馏水清洗; 磷钼酸溶液处理约 10 min, 直接滴入苯胺蓝染色液 5 min, 弱酸溶液处理 2 min。无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。

1.2.4 肾组织病理学检测 (HE 染色)

新鲜肾组织在 4% 中性缓冲甲醛固定 24 h 后, 进行石蜡包埋及切片, 切片厚度为 5 μ m。将石蜡包埋切片于 60 $^{\circ}$ C 烤片 30 min; 进行梯度脱蜡: 二甲苯 3 次, 共 10 min; 梯度乙醇 (无水、无水、95%、80%、70%), 每个梯度 1 min, 随后, 用蒸馏水清洗 5 min; 苏木素染色 5 min, 1% 盐酸乙醇分

化、蒸馏水反蓝,0.5%伊红染色,无水乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片室温固化 24 h 后镜检观察。

1.2.5 血清生化指标检测

空腹采血后离心分离血清,−80 ℃ 保存,使用全自动生化分析仪以酶法、比色法一次性测定血肌酐 (creatinine, CREA)、血清尿素氮 (carbonyl diamide, UREA)、尿酸 (uric acid, UA)、血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 指标,所有项目每天以两点校准、质控并通过室间质评,溶血脂血样本自动剔除,确保结果准确可靠。

1.2.6 蛋白互作网络预测 (protein-protein interaction analysis, PPI)

使用 STRING 数据库 (v12.0, <https://string-db.org/>) 在线进行 PPI。通过 Cytoscape 软件 (v3.33.1) (<https://www.cytoscape.org/>) 的 MCODE 插件对预测网络进行可视化及分析。

1.3 统计学分析

所有统计分析均使用 GraphPad Prism V8.0 分析数据。所有数据显示为平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。两组之间的统计学显著性采用 Student *t* 检

验进行计算。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

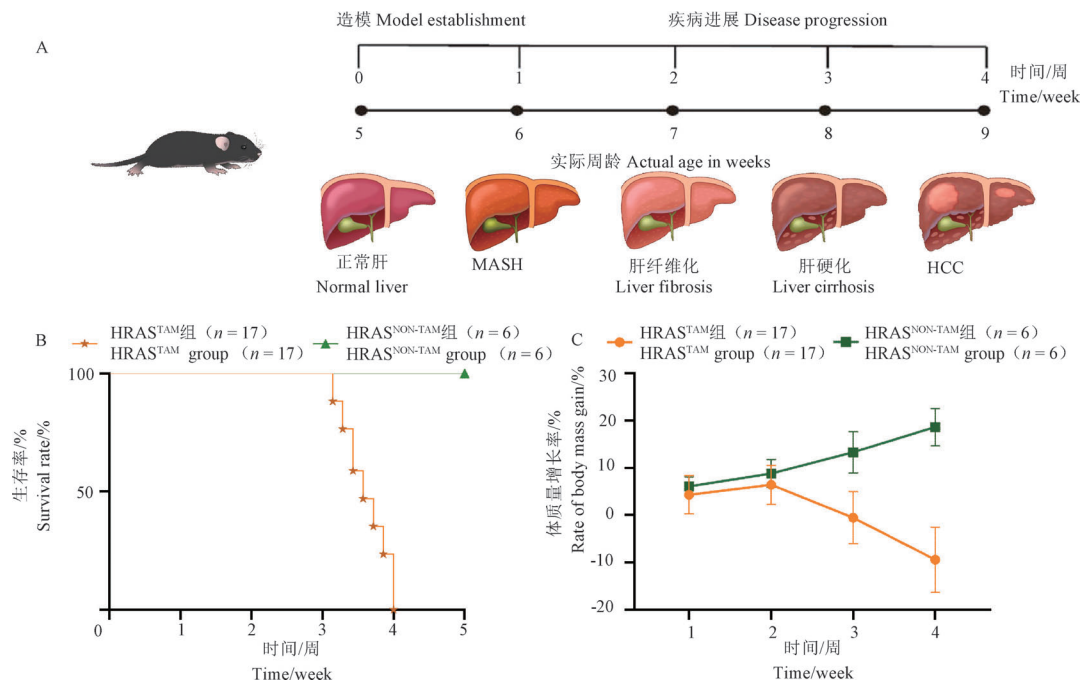
2.1 MASH-HCC 进展时 HRAS-HCC 小鼠模型体质量变化情况

在前期工作中,基于 TAM 诱导的 Cre-ERT2 系统,本课题组成功构建了可在肝组织中特异性高表达人源 *HRAS* 基因的小鼠模型,即 HRAS-HCC 小鼠模型^[13]。人源 *HRAS* 基因在该小鼠模型肝组织中启动表达后的一个月,可在正常饮食下模拟 MASH-肝纤维化-肝硬化-HCC 的阶段性疾病进展过程^[13],如图 1A 所示。HRAS-HCC 小鼠模型于人源 *HRAS* 基因启动表达后第 3 周逐渐死亡,如图 1B 所示。

与人源 *HRAS* 基因不表达的 HRAS^{NON-TAM} 组相比,HRAS-HCC 小鼠 (HRAS^{TAM} 组) 的体质量随 MASH-HCC 的进展逐渐降低,与初始体质量相比,约降低 10%,如图 1C 所示。

2.2 肝纤维化阶段时 HRAS-HCC 小鼠肾损伤情况

1 ~ 4 周时,与 HRAS^{NON-TAM} 组小鼠相比,肝



注:A:HRAS-HCC 小鼠模型构建及 MASH-HCC 疾病进展示意图;B:生存曲线;C:体质量曲线。

图 1 HRAS-HCC 小鼠模型构建及基本特征

Note. A. Construction of HRAS-HCC mouse model and schematic diagram of MASH-HCC disease progression. B. Survival curve. C. Body mass curve.

Figure 1 Construction and basic characteristics of HRAS-HCC mouse model

组织高表达人源 *HRAS* 基因的 *HRAS*-HCC (*HRAS*^{TAM} 组)小鼠具有典型的黄疸(10/17)、便血(1/17)、呼吸急促(3/17)等特征。于4周(HCC阶段)进行解剖,发现 *HRAS*-HCC (*HRAS*^{TAM} 组)小鼠具有肝肿大(12/17)、脾肿大(12/17)、脏器颜色发黄(17/17)等特征,如图2A和表3所示。

与 *HRAS*^{NON-TAM} 组小鼠相比, *HRAS*-HCC (*HRAS*^{TAM} 组)小鼠的 ALP 水平降低,而 UREA, UA 和 CREA 含量升高,如图2B ~ 图2E所示,与临床的肾损伤患者血清指标变化相似^[11]。上述

结果提示,在 MASH-HCC 进展过程中, *HRAS*-HCC 小鼠可能存在肾组织异常。

为明确在 MASH-HCC 进展中 *HRAS*-HCC 小鼠肾组织的病理变化情况,以及其他脏器的病理状态,于4周(HCC阶段)时,通过 HE 染色对各组小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾、胃、淋巴结等全身脏器的病理切片染色,并由病理专家阅片诊断。结果显示,4周时 *HRAS*^{TAM} 组小鼠存在脾髓外造血(16/17)、肺转移 HCC(12/17)、肺血栓(2/17)、肺泡水肿(2/17)、心脏血栓(3/17)等多处脏器病变, *HRAS*^{NON-TAM} 组小鼠无异常,如图2F和表4所示。

表 3 临床症状观察统计

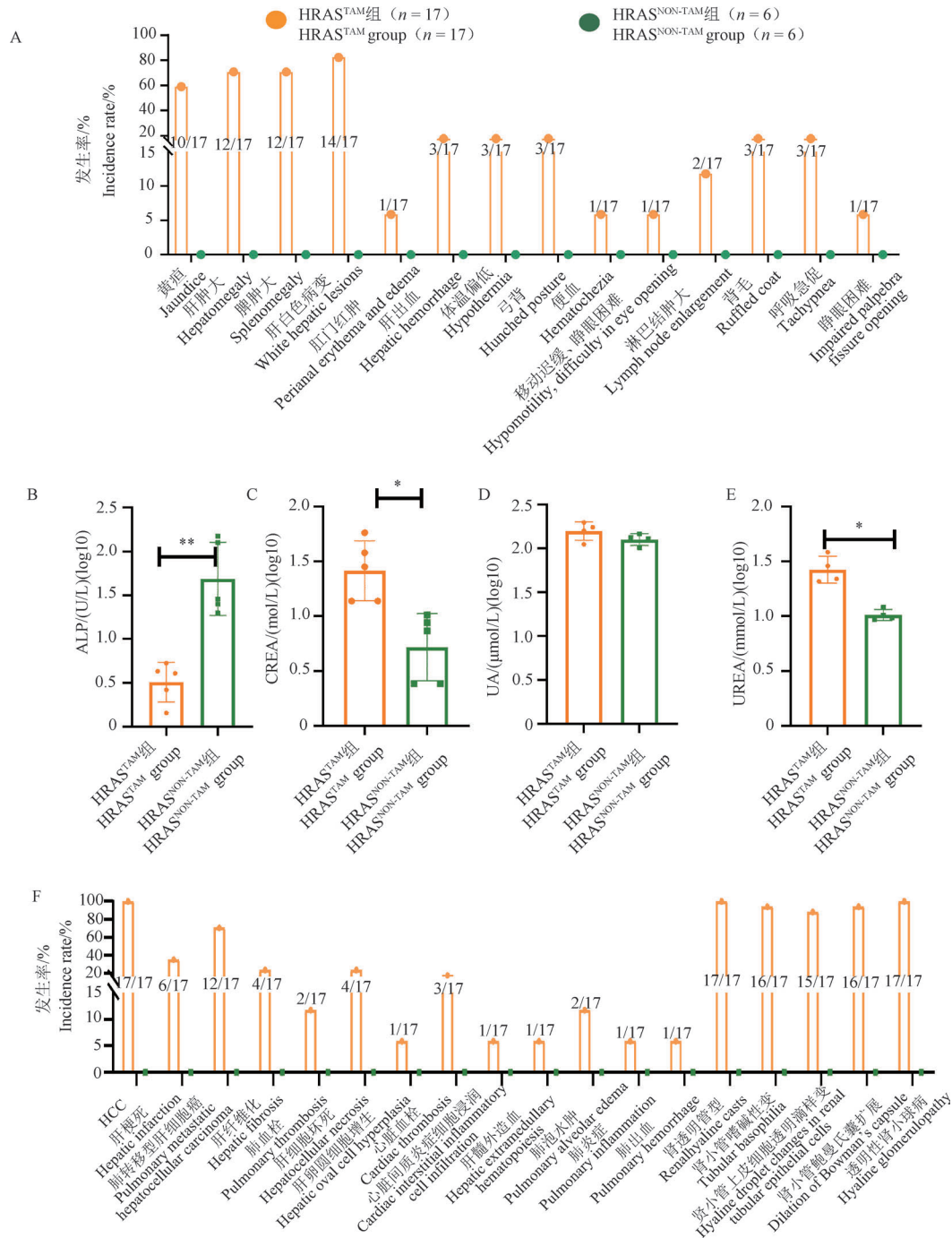
Table 3 Statistical analysis of clinical symptoms in study participants

症状 Symptoms	组别 Groups	
	<i>HRAS</i> ^{TAM} 组(<i>n</i> = 17)	<i>HRAS</i> ^{NON-TAM} 组(<i>n</i> = 6)
	<i>HRAS</i> ^{TAM} group(<i>n</i> = 17)	<i>HRAS</i> ^{NON-TAM} group(<i>n</i> = 6)
黄疸 Jaundice	10	
肝肿大 Hepatomegaly	12	
脾肿大 Splenomegaly	12	
肝白色病变 White hepatic lesions	14	
肛门红肿 Perianal erythema and edema	1	
肝出血 Hepatic hemorrhage	3	0
体温偏低 Hypothermia	3	
弓背、背毛、呼吸急促	3	
Hunched posture, ruffled coat, tachypnea		
便血 Hematochezia	1	
移动迟缓、睁眼困难 Hypomotility, difficulty in eye opening	1	
淋巴结肿大 Lymph node enlargement	2	

表 4 病理诊断统计

Table 4 Pathological diagnosis summary

症状 Symptoms	组别 Groups	
	<i>HRAS</i> ^{TAM} 组(<i>n</i> = 17)	<i>HRAS</i> ^{NON-TAM} 组(<i>n</i> = 6)
	<i>HRAS</i> ^{TAM} group(<i>n</i> = 17)	<i>HRAS</i> ^{NON-TAM} group(<i>n</i> = 6)
HCC	17	0
脾髓外造血 Splenic extramedullary hematopoiesis	16	1
肝梗死 Hepatic infarction	6	
肺转移型肝细胞癌 Pulmonary metastatic hepatocellular carcinoma	12	
肝纤维化 Hepatic fibrosis	4	
肺血栓 Pulmonary thrombosis	2	
肝卵圆细胞增生 Hepatic oval cell hyperplasia	4	
肝细胞坏死 Hepatocellular necrosis	1	0
心脏血栓 Cardiac thrombosis	3	
心脏间质炎症细胞浸润 Cardiac interstitial inflammatory cell infiltration	1	
肝髓外造血 Hepatic extramedullary hematopoiesis	1	
肺泡水肿 Pulmonary alveolar edema	2	
肺炎症 Pulmonary inflammation	1	
肺出血 Pulmonary hemorrhage	1	



注:A:HRAS-HCC 小鼠临床症状统计;B:ALP 含量($n = 5$);C:CREA 含量($n = 5$);D:UA 含量($n = 5$);E:UREA 含量($n = 5$);F:病理结果统计。

图 2 临床症状、病理诊断及血清指标统计

Note. A. Statistical of clinical phenotypes in HRAS-HCC mouse. B. ALP content($n = 5$). C. CREA content($n = 5$). D. UA content ($n = 5$). E. UREA content($n = 5$). F. Statistical of histopathological results.

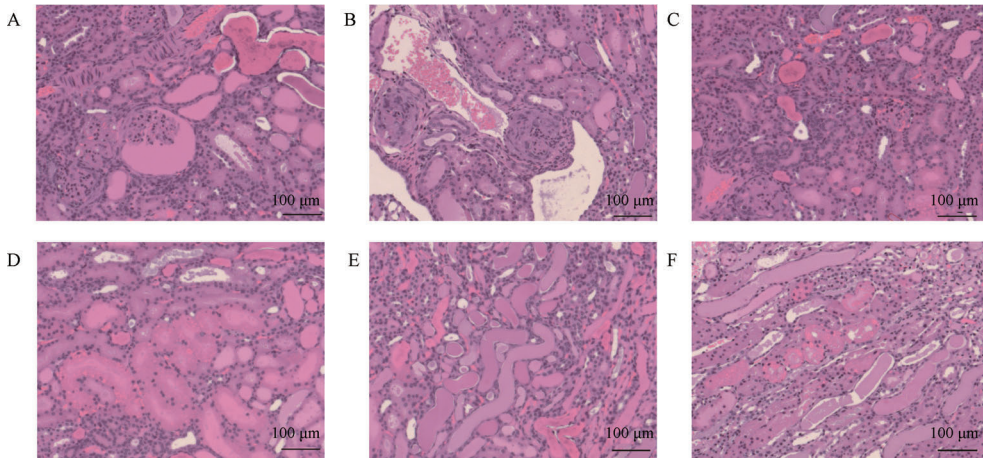
Figure 2 Comprehensive statistical of clinical manifestations, histopathological diagnoses and serum biomarkers

值得注意的是,4 周时(HCC 阶段),HRAS-HCC 小鼠的肾组织存在不同程度的透明性肾小球病(17/17)、肾小管嗜碱性变(16/17)、肾小管上皮细胞透明滴样变(15/17)、肾小球鲍曼氏囊

扩张(16/17)等多种病变,如表 5,图 3 所示。结合临床症状、血清指标变化及和病理检测结果,证实在 MASH-HCC 进展过程中 HRAS-HCC 小鼠伴随存在肾组织损伤。

表 5 肾组织病理诊断统计
Table 5 Pathological diagnosis statistics of renal tissues

症状 Symptoms	组别 Groups	
	HRAS ^{TAM} 组 (n = 17) HRAS ^{TAM} group (n = 17)	HRAS ^{NON-TAM} 组 (n = 6) HRAS ^{NON-TAM} group (n = 6)
肾小管嗜碱性变 Tubular basophilia	16 (94%)	
肾小管上皮细胞透明滴样变 Hyaline droplet changes in renal tubular epithelial cells	15 (88%)	0 (0%)
肾小球鲍曼氏囊扩张 Dilation of Bowman's capsule	16 (94%)	
透明性肾小球病 Hyaline glomerulopathy	17 (100%)	



注: A: 肾小球鲍曼氏囊扩张; B: 肾小球节段性硬化; C: 肾小管嗜碱性变; D: 肾小管上皮细胞透明滴样变; E: 透明性肾小球病; F: 肾小管上皮细胞透明滴样变 + 透明性肾小球病。

图 3 肾组织病变

Note. A. Dilation of Bowman's capsule. B. Tubular changes comprised renal tubular basophilia. C. Tubular basophilia. D. Hyaline droplet changes in renal tubular epithelial cells. E. Hyaline glomerulopathy. F. Hyaline droplet changes in renal tubular epithelial cells + hyaline glomerulopathy.

Figure 3 Histopathological of renal tissue

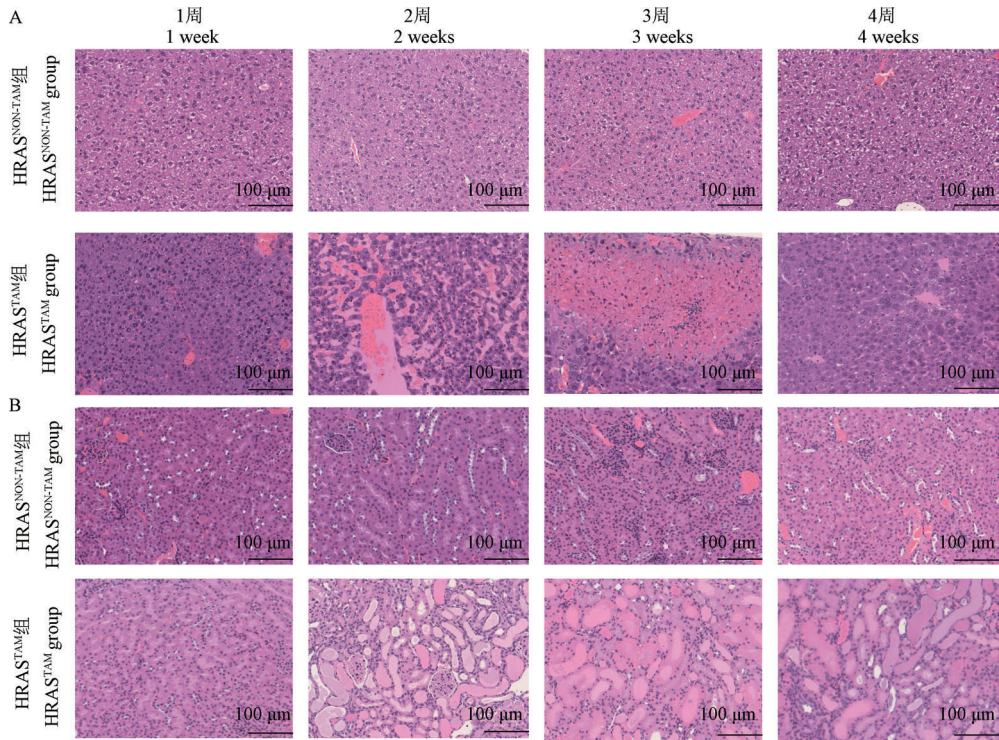
2.3 MASH-HCC 进展与 HRAS-HCC 小鼠肾损伤相关情况

为进一步明确在 HRAS-HCC 小鼠肾损伤的发生与 MASH-HCC 进展的各个疾病阶段是否存在相关性,通过 HE 染色法对 1 ~ 4 周的 HRAS^{TAM} 组和 HRAS^{NON-TAM} 组小鼠肾组织进行病理检测。如图 4 所示,1 ~ 4 周的 HRAS^{TAM} 组小鼠肝组织呈现从 MASH,经肝纤维化、肝硬化逐渐进展到 HCC 的阶段性变化。MASH 阶段(约 1 周),HRAS^{TAM} 组小鼠的肾小管存在轻微透明管型和嗜碱性变,偶见肾小球鲍曼氏囊扩张。肝纤维化/硬化阶段(2 ~ 3 周),HRAS^{TAM} 组小鼠肾组织的多处区域发生以肾小管透明管型和嗜碱性变、

肾小管上皮细胞透明滴样变、肾小球鲍曼氏囊扩张为主的病理改变,其发生区域较 MASH 阶段有所增加,病变严重,个别肾小球还存在节段性硬化。HCC 阶段(4 周),肾小球节段性硬化增多,与临床慢性肾损伤患者晚期特征一致^[14]。Masson 染色结果证实 HRAS^{TAM} 组小鼠肾纤维化始于第 2、3 周达峰值,如图 5 所示。HRAS^{TAM} 组小鼠的肾纤维化进展与肝纤维化严重程度呈强相关。

2.4 HRAS-HCC 小鼠肾组织中肾纤维化相关分子表达情况

鲍曼氏囊扩张是肾小球硬化的早期表现^[15]。有文献指出,转化生长因子 β (transforming growth



注:A:肝组织 HE 染色;B:肾组织 HE 染色。

图 4 肝、肾组织病变

Note. A. HE staining of hepatic tissue. B. HE staining of renal tissue.

Figure 4 Histopathological of hepatic and renal tissue

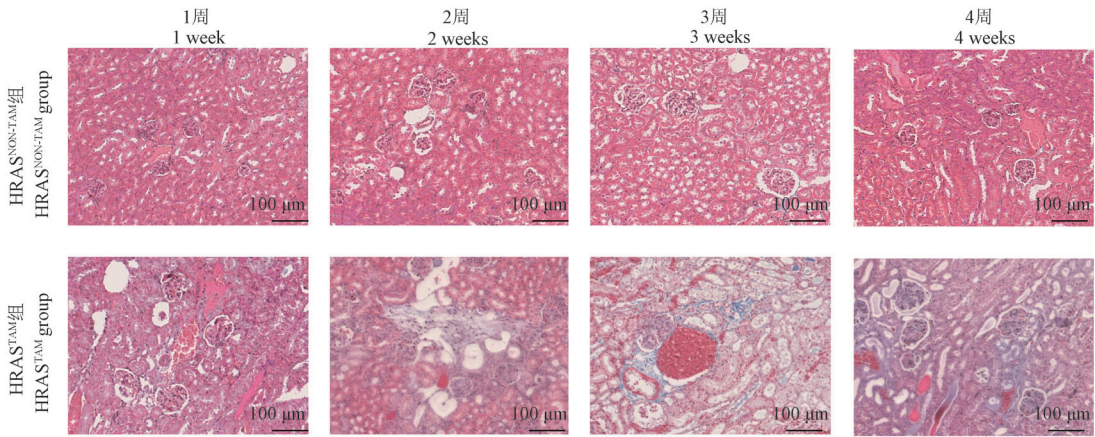
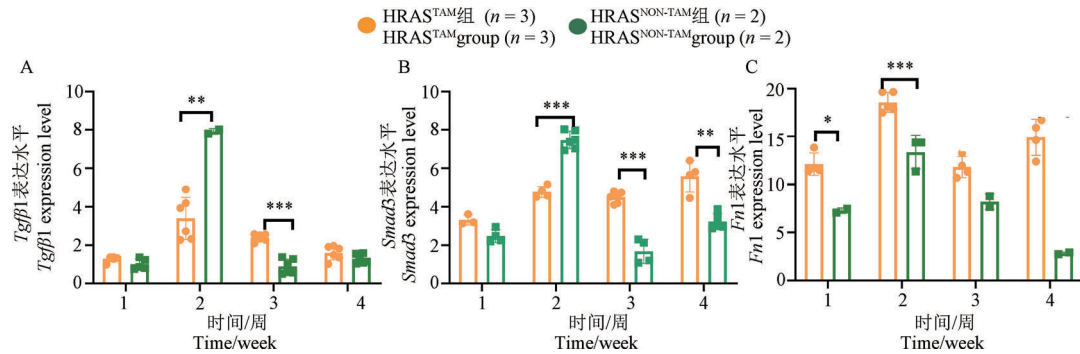


图 5 肾组织 Masson 染色结果

Figure 5 Masson staining results of renal tissue

factor- β , TGF- β)/SMAD 家族蛋白 (Mothers against decapentaplegic homolog, SMAD) 信号通路不仅参与肝纤维化及肾纤维化的调控,还参与诱导肾小球系膜基底扩张和囊壁结构松弛等生物学过程^[16]。如图 6A,图 6B 所示,MASH 阶段(1 周),HRAS^{TAM} 组小鼠肾组织的 *Tgf β 1* 和 *Smad3* 在 mRNA 水平的表达呈升高趋势($P > 0.05$);肝纤维化到 HCC 阶段(2 ~ 4 周),其表达水平显著增

加($P < 0.05$),表达量约为对照组的 2 倍。而纤维连接蛋白(fibronectin, FN)作为细胞外基质的主要成分,其异常表达可能成为连接“肝-肾轴”损伤的重要分子纽带。此外, FN 与血浆渗漏的肝源性脂蛋白结合形成的透明物质沉积易导致肾小管上皮细胞透明滴样变的发生^[17]。如图 6C 所示,在 MASH-HCC 进展过程中,HRAS^{TAM} 组小鼠肾组织的 *Fn1* 在 mRNA 水平的表达始终呈显著



注: A: *Tgfβ1* 表达情况; B: *Smad3* 表达情况; C: *Fn1* 表达情况。

图 6 1 ~ 4 周肾组织目的基因表达情况

Note. A. Expression profiles of *Tgfβ1*. B. Expression profiles of *Smad3*. C. Expression profiles of *Fn1*.

Figure 6 Temporal expression profiles of target genes in renal tissue during 1 ~ 4 weeks

增加趋势 ($P < 0.05$), 其表达量约为对照组的 4 倍。

由于 HRAS-HCC 小鼠模型的肾损伤是发生在肝组织 HRAS 高表达的背景下, 为进一步探究潜在的机制, 本研究对人源的 HRAS、TGFβ、SMAD3、FN1 及 KRT18 这 5 个分子的相互作用进行了 PPI。如图 7 所示, HRAS 蛋白与 TGFβ、SMAD3、FN1 这 3 个分子存在直接的相互作用关系, 并通过 TGFβ 和 FN1 这 2 个蛋白与 KRT18 存在间接的相互作用关系。此外, 通过临床数据库 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 检索发现, SMAD3、TGFβ、FN1 3 个分子的高表达与 HCC 患者 ($n = 182$) 不良预后密切相关, 如图 8A ~ 图 8C 所示。随后, 患者预后生存分析网站 KM plotter (<http://kmplot.com/analysis>) 的数据显示,

在非酒精非病毒因素引起的 HCC 患者中 ($n = 167$), 高表达的 SMAD3、TGFβ、FN1 这 3 个分子均与患者的 HCC 进展后生存概率 (survival probability) 呈负相关关系, 即高表达的 SMAD3、TGFβ、FN1 基因与 HCC 患者的不良预后相关, 如图 8D ~ 图 8F 所示。该结果提示 HRAS 可能通过 TGFβ/SMAD3 信号通路的激活, 导致 FN1 和 KRT18 高表达, 促进了 HRAS-HCC 小鼠模型的肾损伤发生和进展。

3 讨论

在 HCC 进展中, 肝可通过 TGFβ 和细胞因子促进肿瘤的增殖和转移, 而肾功能障碍也会加剧 HCC 进展^[18], 这种肝与肾之间通过神经-体液调节网络形成的双向调控关系被称为“肝-肾轴”。

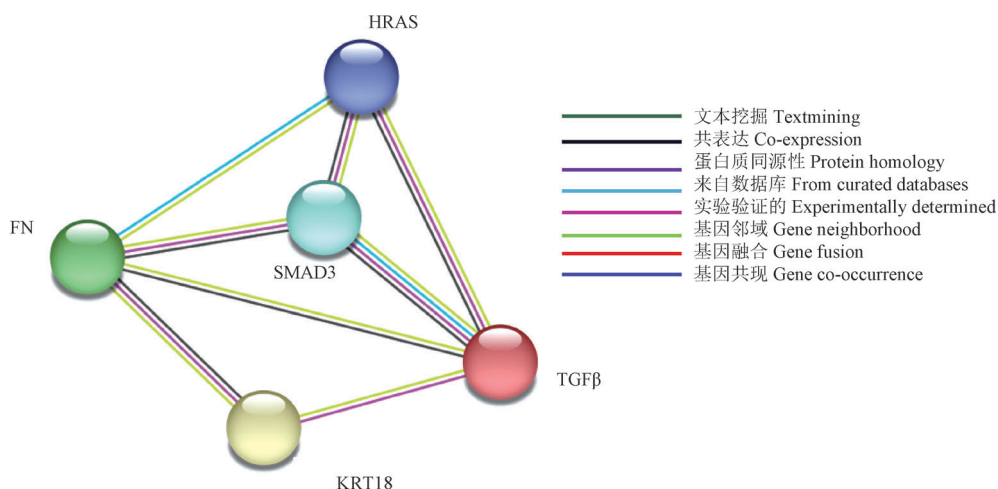


图 7 潜在的肾损伤相关分子 PPI

Figure 7 Potential PPI network of renal injury-associated molecules

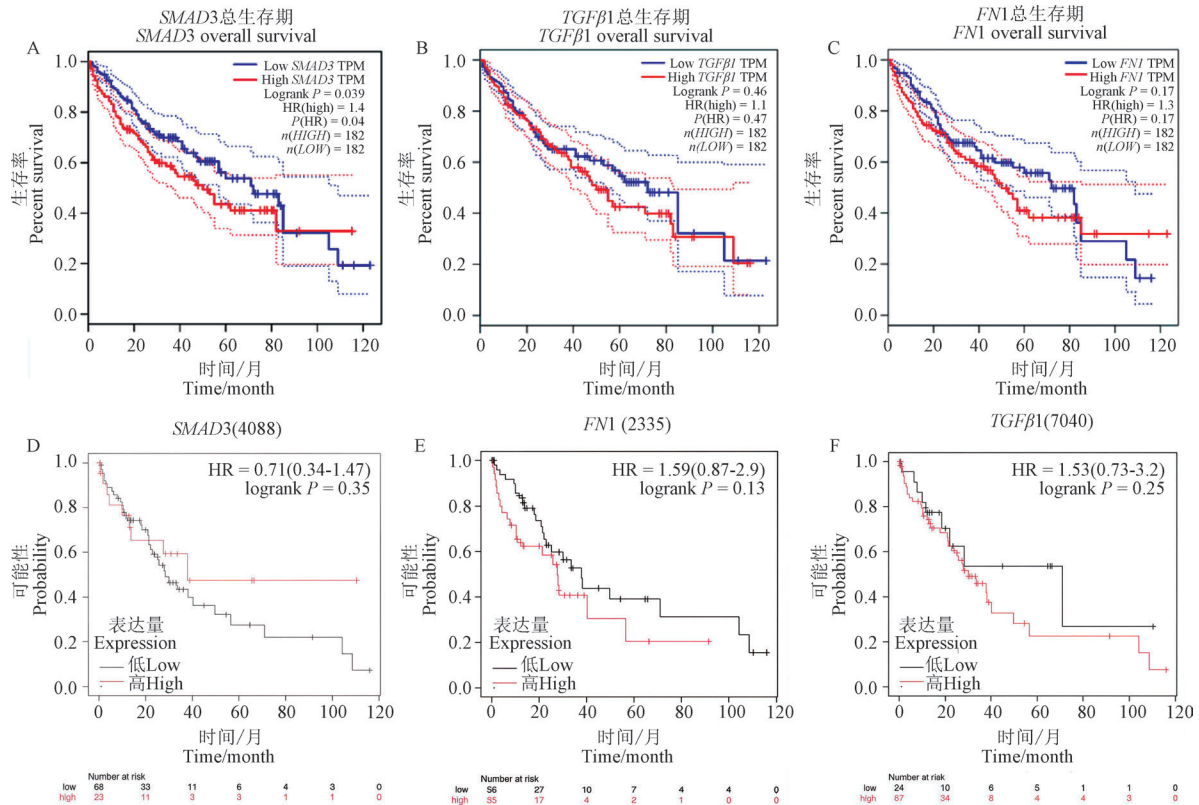


图 8 SMAD3、TGFβ1、FN1 基因表达与 HCC 患者相关性分析

Figure 8 Clinicopathological and prognostic significance of SMAD3, TGFβ1 and FN1 expression in HCC

临床上,多数 MASH-HCC 患者均存在不同程度的肾功能障碍^[19]。

临床前模型研究结果表明 MASH-HCC 与慢性肾损伤的发生密切相关^[20],但其机制仍未阐明。*HRAS* 的激活可启动 MAPK/ERK 信号通路,促进细胞增殖、代谢重编程及炎症反应。本研究先前构建的肝组织特异性高表达 *HRAS* 的 *HRAS*-HCC 小鼠模型可以模拟人类 MASH-HCC 疾病的阶段性进展^[13],该模型的 MASH-HCC 发生在正常饮食下,排除了高脂饮食和致癌化合物对肾组织的潜在影响,为探究 MASH-HCC 和肾损伤之间的关系提供了良好的模式动物。在本研究中, MASH 阶段就观察到肾小管嗜碱性变和透明管型;肝纤维化阶段观察到严重的肾小管上皮细胞透明滴样变性和肾小球鲍曼氏囊扩张;HCC 阶段发生了肾小球节断性硬化,血清肌酐、尿素氮和尿酸含量升高,与临床 MASH-HCC 患者表现相似^[20]。该模型在病理进展上表现出良好的时间可控性和组织特异性。肝组织高表达 *HRAS* 的第 3 ~ 4 周不仅是 HCC 形成的关键节点,也是肾损

伤最为显著的时间窗口。*HRAS*-HCC 小鼠的肾组织在该时间点出现的肾损伤病理变化,提示肝肾损伤在时间上高度同步。这种同步性为研究“肝-肾轴”提供了良好的时间窗口和病理基础。

分子表达检测结果显示,*HRAS*-HCC 小鼠的肾组织中 *Tgfβ1*、*Smad3* 和 *FN1* 等相关基因表达显著上调,PPI 互作分析结果显示 *HRAS* 蛋白与 TGFβ、SMAD3、FN1 这 3 个分子存在直接的相互作用关系,KRT18 又通过 TGFβ 和 FN1 这 2 个蛋白与 *HRAS* 存在间接的相互作用关系,提示 TGFβ/SMAD 信号通路在肾损伤中发挥重要作用。该推论得到了以下文献证据的支持:肝源性 TGFβ1 经血液循环至肾,结合肾小球系膜细胞 TGFβ 受体 (transforming growth factor-β receptor type II, TGFβR II),激活 SMAD3 磷酸化 (phosphorylated SMAD3, p-SMAD3),诱导系膜基质扩张和囊壁结构松弛,导致肾小球鲍曼氏囊扩张,这也是肾小球硬化的早期表现^[21]。同时, TGFβ 通过 SMAD3 依赖性途径上调肾 FN1 合成^[14],FN1 与血浆渗漏的肝源性脂蛋白结合,形

成均质透明物质沉积于肾小球毛细血管袢及小管上皮细胞,导致肾小球及肾小管上皮细胞的透明滴样变生成^[22]。另一方面,SMAD3 核转位后促进 *FN* 基因转录,同时激活肾间质肌成纤维细胞分化,导致胶原过度沉积和节段性硬化^[23]。

HRAS-HCC 小鼠肾组织中相关分子表达变化趋势与肾损伤相关病变的产生存在时间一致性,推测 HRAS-HCC 小鼠肝组织特异性高表达的 *HRAS* 通过 MAPK/ERK 通路促进肝细胞分泌 TGF β ,并和肝损伤产生的 KRT18 蛋白片段共同经血液循环到达肾组织,再经过肾小球滤过作用后沉积在肾组织中,过量的 KRT18 沉积促进了肾小管透明管型的形成,而过量的 TGF β 沉积会激活 SMAD3,SMAD3 一方面上调 FN1 合成,引起透明滴样变发生,另一方面与 FN1 协同作用促进胶原沉积,导致肾小球节断性硬化的发生。这一推论进一步支持了“肝-肾轴”的协同作用假说,并提示这种跨器官的病理联动可能是 MASH-HCC 相关肾损伤的重要机制之一。现有研究已明确 TGF- β /SMAD3 信号通路在肝纤维化与肝癌发生中的核心作用。XU 等^[24]在 2016 年的综述中明确指出,TGF β 作为肝纤维化的主调节因子,通过激活 SMAD3 促进肝星状细胞活化与胶原沉积,是肝纤维化向肝癌过渡的关键驱动机制。多项研究进一步系统阐述了 TGF β 信号从膜受体到 SMAD 核转位的完整机制,并指出 p-SMAD3 是 TGF β 通路活化的直接标志物,可用于评估组织内 TGF β 信号通路的激活程度^[25-27]。这些研究为本研究的通路推测提供了理论基础。针对 MASH 与肾损伤共病机制中 TGF β 作为潜在共同通路的问题,虽然目前尚无直接研究 MASH-HCC 合并肾损伤的临床样本,但已有研究证实,MASH 患者慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)发生率显著升高,且两者共享胰岛素抵抗、炎症、氧化应激与 TGF β 通路激活等机制^[11]。这一发现进一步支持了 TGF β 在相关疾病中的重要作用。

综上,本研究基于 *HRAS* 驱动的 MASH-HCC 小鼠模型,首次系统揭示了肝癌相关肾损伤的病理特征及其可能的分子机制:肝组织高表达的 *HRAS* 通过 MAPK/ERK 通路促进肝细胞分泌 TGF β 等因子,经血液循环激活肾 TGF β /SMAD 通路并诱导肾小管上皮细胞 EMT,导致肾间质纤

维化(TAM 组小鼠肾 *Tgf β 1*、*Smad3* 和 *Fn1* 表达显著上调),提示 HRAS-ERK 轴介导的“肝-肾轴”跨器官信号传递可能是核心损伤路径。该模型在病理和分子层面高度模拟人类 MASH-HCC,第 3 周被确定为肝肾损伤的关键干预窗口,血清 CREA、UREA、UA 联合 ALP 等指标具有早期预警价值,未来可通过肝特异性 *HRAS* 敲除或肾 TGF β 受体阻断实验验证因果关系,并探索 MEK 抑制剂或 TGF β 拮抗剂的肝肾双器官保护作用。本研究不足之处在于:未设置恢复组或干预组,且缺乏单细胞和代谢组学的联合解析,后续需通过药物干预(如 TGF β 抑制剂)和单细胞测序技术明确肾损伤可逆性及细胞亚群互作网络,并收集人类 MASH-HCC 合并肾损伤病例验证临床相关性。同时,研究人员将在后续研究中通过设计针对性的实验,如利用基因编辑技术构建相关基因敲除或过表达模型,结合表型观察与分子检测,直接验证通路中各分子的功能,以更深入地阐明其作用机制。

参 考 文 献(References)

- [1] TRIFYLLI E M, KOUSTAS E, PAPADOPOULOS N, et al. An insight into the novel immunotherapy and targeted therapeutic strategies for hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma [J]. *Life*, 2022, 12(5): 665.
- [2] YE H, CHIANG C C, YEN T H. Hepatocellular carcinoma in patients with renal dysfunction: pathophysiology, prognosis, and treatment challenges [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(26): 4104-4142.
- [3] SALAHUDEEN A K, DOSHI S M, PAWAR T, et al. Incidence rate, clinical correlates, and outcomes of AKI in patients admitted to a comprehensive cancer center [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8(3): 347-354.
- [4] LOOMBA R, FRIEDMAN S L, SHULMAN G I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell*, 2021, 184(10): 2537-2564.
- [5] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 6.
- [6] TARGHER G, BERTOLINI L, RODELLA S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients [J]. *Diabetologia*, 2008, 51(3): 444-450.
- [7] JAIN P, JAIN A, DESHMUKH R, et al. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD):

- exploring systemic impacts and innovative therapies [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2025, 49(6): 102584.
- [8] SIROTA J C, MCFANN K, TARGHER G, et al. Association between nonalcoholic liver disease and chronic kidney disease: an ultrasound analysis from NHANES 1988-1994 [J]. Am J Nephrol, 2012, 36(5): 466-471.
- [9] MANTOVANI A, PETRACCA G, BEATRICE G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis [J]. Gut, 2022, 71(1): 156-162.
- [10] LI X, BHATTACHARYA D, YUAN Y, et al. Chronic kidney disease in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Kidney Int, 2024, 105(3): 540-561.
- [11] SANDIREDDY R, SAKTHIVEL S, GUPTA P, et al. Systemic impacts of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) on heart, muscle, and kidney related diseases [J]. Front Cell Dev Bio, 2024, 12: 1433857.
- [12] VAN HERCK M A, VONGHIA L, FRANQUE S M. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease-a starter's guide [J]. Nutrients, 2017, 9(10): 1072.
- [13] LING C, LIU S S, WANG Y Y, et al. Overexpression of wild-type HRAS drives non-alcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma in mice [J]. Zool Res, 2024, 45(3): 551-566.
- [14] FURUTO Y, HASHIMOTO H, NAMIKAWA A, et al. Focal segmental glomerulosclerosis lesion associated with inhibition of tyrosine kinases by lenvatinib: a case report [J]. BMC Nephrol, 2018, 19(1): 273.
- [15] YENIGUN E C, TATAR E, GUNGOR O, et al. The effect of NF- κ B and MAPK mediated proinflammatory microenvironment on renal aging and amyloid deposition in elder rats [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 10256.
- [16] MENG X M, TANG P M, LI J, et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis [J]. Front Physiol, 2015, 6: 82.
- [17] SALONEN E M, HÄMYLÄ A, JAUHIAINEN M, et al. Lipoprotein(a) binds to fibronectin and has serine proteinase activity capable of cleaving it [J]. EMBO J, 1989, 8(13): 4035-4040.
- [18] DITURI F, MANCARELLA S, CIGLIANO A, et al. TGF- β as multifaceted orchestrator in HCC progression: signaling, EMT, immune microenvironment, and novel therapeutic perspectives [J]. Semin Liver Dis, 2019, 39(1): 53-69.
- [19] FOERSTER F, GAIRING S J, MÜLLER L, et al. NAFLD-driven HCC: safety and efficacy of current and emerging treatment options [J]. J Hepatol, 2022, 76(2): 446-457.
- [20] LI X, BHATTACHARYA D, YUAN Y, et al. Chronic kidney disease in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Kidney Int, 2024, 105(3): 540-561.
- [21] HUANG Y, WONG H, WANG Y, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF- β and Smad7 [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(11): 2963-2972.
- [22] BÖTTINGER E P, BITZER M. TGF-beta signaling in renal disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(10): 2600-2610.
- [23] KIM J H, KIM B K, MOON K C, et al. Activation of the TGF- β /Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis [J]. Kidney Int, 2003, 64(5): 1715-1721.
- [24] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64(3): 157-167.
- [25] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338.
- [26] SHI Y, MASSAGUÉ J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus [J]. Cell, 2003, 113(6): 685-700.
- [27] MASSAGUÉ J. TGF β signalling in context [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(10): 616-630.

[收稿日期] 2025-08-13