

微小RNA-214对肝纤维化的影响

莫双阳¹, 赵颖雯², 李竞强³ (1.柳州市人民医院 消化内科, 广西 柳州 545006; 2.同济大学 医学院, 上海 200049; 3.上海大学 生命科学院, 上海 200436)

摘要: 目的 探讨miRNA-214对肝纤维化的影响及其可能的机制。方法 通过腹腔注射CCl₄构建小鼠肝纤维化模型, 运用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测miR-214的表达情况。通过脂质体转染方式调控LX-2细胞miR-214的表达水平, 采用CCK-8法、RT-PCR及划痕实验检测转染miR-214模拟物和miR-214抑制物后LX-2细胞增殖、活化及迁移能力的变化。通过蛋白质印迹法对数据库Targetscan预测的miR-214靶基因进行验证。结果 模型组小鼠肝脏miR-214表达水平显著高于对照组($t = 1.928$, $P = 0.040$)。LX-2细胞转染miR-214模拟物后, miR-214表达上调($t = 3.872$, $P = 0.001$); LX-2细胞 α -SMA、胶原 I α mRNA的表达水平上调($t = 1.952$, $P = 0.039$; $t = 2.926$, $P = 0.006$), LX-2细胞增殖和迁移能力增强, 数据库Targetscan预测的靶基因PTEN蛋白表达量下调。结论 miR-214参与HSC的活化、增殖及迁移, 可促进肝纤维化的形成, miR-214可能是通过抑制PTEN的表达来影响HSC的生物学功能。

关键词: 肝纤维化; 微小RNA-214; 肝星状细胞

Effects of microRNA-214 on liver fibrosis

MO Shuang-yang¹, ZHAO Ying-wen², LI Jing-qiang³ (1.Department of Gastroenterology, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, Guangxi, China; 2.School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200049, China; 3.College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200436, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of miR-24 on liver fibrosis *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The model of liver fibrosis was established by intraperitoneal injection of CCl₄ into C57BL/6 mice and real-time PCR was used to determinate the expression of miR-214. The expression of miR-214 in LX-2 cells was regulated by liposome transfection, and the proliferation, activation and migration of LX-2 cells after transfection of miR-214 mimics and miR-214 inhibitor were investigated by CCK-8, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and scratch test. The potential target gene of miR-214 was predicted in the Targetscan database, and was verified by Western-blot. **Results** The expression of miR-214 in the liver of the model group was significantly higher than that of the control group ($t = 1.928$, $P = 0.040$). Compared with the NC-mimics, the miR-214 mimics can promote the LX-2 cell proliferation and migration ($t = 3.872$, $P = 0.001$), increase the mRNA expression of α -SMA ($t = 1.952$, $P = 0.039$) and collagen I α ($t = 2.926$, $P = 0.006$). The miR-214 mimics could also decrease the protein expression of PTEN which were predicted by Targetscan database. **Conclusions** MiR-214 is involved in the activation, proliferation and migration of HSC and promotes the formation of liver fibrosis. It is possible that the biological function of HSC is affected by inhibiting the expression of PTEN.

Key words: Liver fibrosis; miR-214; Hepatic stellate cell

肝纤维化是由各种病因引起肝脏结缔组织异常增生, 导致细胞外基质过度沉积的病理生理过程。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝内胶原及其他细胞外基质的主要来源, HSC持续激活所致的细胞外基质过度沉积是肝纤维化发生和发展的

重要环节^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)已被证实参与了多种肝脏疾病的病理生理过程^[2], 研究结果提示, miRNA-214参与调节肾脏纤维化的过程^[3], 此外miR-214表达上调可促进大鼠HSC-T6细胞的活化^[4]。本研究拟通过动物水平和细胞水平对miR-214在肝纤维化发生过程中的表达情况进行研究, 以探讨miR-214在调控肝纤维化发生机制中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 8周龄清洁级C57BL/6雄性小鼠18只由复旦大学上海医学院动物实验中心提供。QIAzol和RNA抽提试剂盒购自德国QIAGEN公司, 逆转录试剂盒及SYBR Green PCR试剂盒购自Bio-Rad公司, PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成, miRNA引物试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司, AST及ALT检测试剂盒购自南京建成生物工程有限公司。人肝星状细胞株LX-2由上海弘顺生物科技有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠肝纤维化模型的建立 将18只C57BL/6小鼠随机分为实验组(10只)和对照组(8只)。实验组按体重予2 ml/kg的四氯化碳(CCl_4)腹腔注射, CCl_4 按1:4稀释于橄榄油中, 每3天注射1次, 总共注射12次, 对照组每次注射等体积橄榄油。在最后1次注射后第3天处死小鼠, 采集血液及肝脏标本。

1.2.2 小鼠标本的检测 计算肝脏指数[肝脏指数 = 肝脏质量(mg)/体质量(g) × 100%], 按试剂盒说明书测定血浆AST及ALT水平, 肝脏标本制作石蜡切片行HE染色, 光学显微镜下观察肝脏组织学变化情况。提取肝组织总RNA, 逆转录为cDNA, 以GAPDH为内参对照, 运用实时荧光定量PCR技术, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算胶原I α 、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)及miR-214的相对表达量。

1.2.3 细胞学实验 选用人肝星状细胞LX-2为工具细胞, LX-2细胞复苏后接种于10 cm^2 培养皿中, 常规培养液(DMEM + 10%胎牛血清+ 1%青霉素/链霉素)培养, 每隔2~3天用0.05%胰酶消化后按1:2传代1次, 培养箱中常规培养。传代数次待细胞生长稳定后, 取对数生长期细胞用于进一步实验。通过脂质体转染方式, 设立miR-214抑制物组、miR-214模拟物组及各组的阴性对照组, 每组设3个复孔, 建立转染体系, 转染后的细胞在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的恒温培养箱中继续培养48小时。通过实时荧

光定量PCR技术检测感染前后miR-214 mRNA的表达情况, 评估转染效率。采用CCK-8法测定转染成功后LX-2细胞的增殖, 并通过实时荧光定量PCR技术检测miR-214表达水平变化对LX-2细胞 α -SMA、胶原I α mRNA表达水平的影响, 通过划痕实验定性评估miR-214表达水平变化对LX-2细胞迁移能力的影响。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组独立样本均值比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 说明数据差异显著, $P < 0.01$ 说明数据差异极显著。

2 结果

2.1 肝脏大体标本、肝指数、生物化学及组织学变化 实验组小鼠开腹后可见肝脏稍肿大, 颜色晦暗无光泽, 表面有凹凸不平的颗粒感, 质地较硬, 脾脏明显肿大, 部分小鼠可见黄色清亮腹腔积液; 对照组小鼠开腹后, 肝脏和脾脏的大小、形态、外观如常, 未见明显腹腔积液(图1)。实验组小鼠的肝指数、ALT和AST均显著高于对照组($t = 1.924$, $P = 0.042$; $t = 7.630$, $P < 0.001$; $t = 10.784$, $P < 0.001$), 见表1。通过光学显微镜可见对照组小鼠肝细胞形态正常, 肝小叶结构清晰, 小叶间及汇管区未见明显纤维结缔组织; 实验组小鼠肝细胞肿胀, 空泡样变性明显, 肝细胞形态不一, 可见散在坏死及凋亡肝细胞, 肝小叶结构尚正常, 小叶间及汇管区可见纤维结缔组织条索形成, 见图2。

2.2 小鼠肝组织 α -SMA mRNA和胶原I α mRNA的相对表达量 通过实时荧光定量PCR检测发现, 实验组小鼠肝组织 α -SMA mRNA和胶原I α mRNA的相对表达量均显著高于对照组($t = 1.801$, $P = 0.048$; $t = 2.032$, $P = 0.032$), 见图3。

2.3 小鼠肝纤维化模型中miRNA-214的表达 通过腹

表1 小鼠肝脏指数、ALT及AST水平($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 肝脏指数 (mg/g) | ALT (U/L) | AST (U/L) |
|------------------|----------------|-------------------|----------------|
| 对照组 ($n = 8$) | 39.6 \pm 3.1 | 25.14 \pm 8.33 | 150 \pm 17.2 |
| 实验组 ($n = 10$) | 45.6 \pm 5.9 | 62.40 \pm 11.79 | 278 \pm 32.2 |
| t 值 | 1.924 | 7.630 | 10.784 |
| P 值 | 0.042 | < 0.001 | < 0.001 |

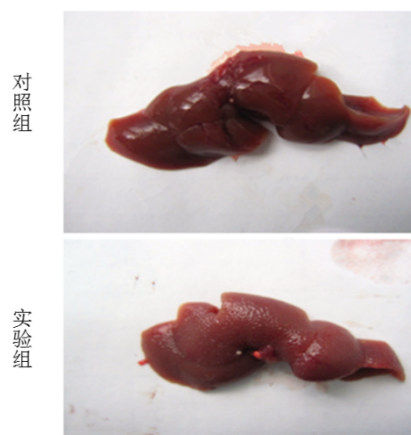


图1 肝脏大体标本

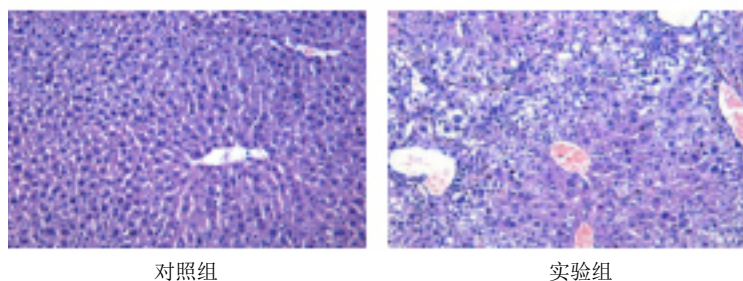


图2 小鼠肝脏组织学表现 (HE 染色, ×100)

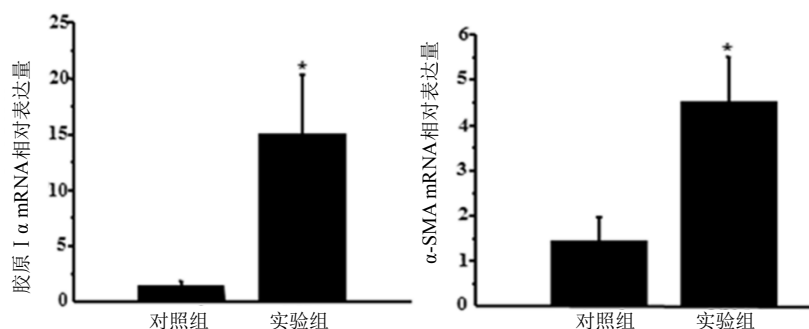


图3 小鼠肝胶原 I α mRNA 和 α-SMA mRNA 的相对表达量

注: * $P < 0.05$

腔注射CCl₄建立小鼠肝纤维化模型,在确认模型成功的基础上,通过实时荧光定量PCR技术检测miR-214在肝纤维化模型中的表达情况后发现,实验组小鼠肝脏miR-214表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义($t = 1.928$, $P = 0.040$),见图4。

2.4 转染效率评估 与各自阴性对照组相比, LX-2细胞转染miR-214抑制物后, miR-214表达水平降低($t = 2.010$, $P = 0.035$); 转染miR-214模拟物后, miR-214表达水平显著升高($t = 3.872$, $P = 0.001$)。

2.5 miR-214对LX-2细胞增殖的影响 转染miR-24模拟物48小时后, LX-2细胞增殖显著加快($t = 2.638$, $P = 0.008$); 相反, 转染miR-214抑制物48小时后, LX-2细胞增殖受抑制($t = 1.986$, $P = 0.038$), 见图5。

2.6 miR-214对LX-2细胞活化的影响 转染miR-24模拟物48小时后, LX-2细胞胶原 I α mRNA和α-SMA mRNA的相对表达量升高($t = 1.952$, $P = 0.039$; $t = 2.926$, $P = 0.006$); 相反, 转染miR-24抑制物48小时后, LX-2细胞collagen I α mRNA和α-SMA mRNA的相对表达量下调($t = 1.892$, $P = 0.043$; $t = 1.843$, $P = 0.046$), 见图6。

2.7 miR-214对LX-2细胞迁移的影响 转染miR-24模拟物48小时后, LX-2细胞在12小时和24小时两个时间点上迁移能力均强于阴性对照组; 而转染miR-24

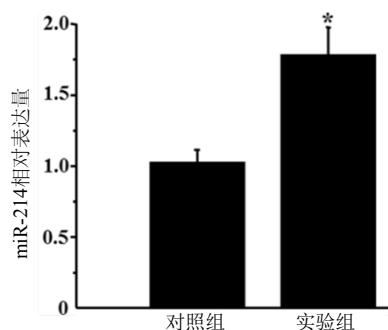


图4 小鼠肝纤维化模型中 miRNA-214 的表达

注: * $P < 0.05$

抑制物48小时后, LX-2细胞在12小时和24小时两个时间点上迁移能力与阴性对照组无显著差异, 见图7。

2.8 miR-214对潜在靶基因PTEN的影响 通过数据库TargetsCan预测PTEN为miR-214的靶基因, 通过蛋白质印迹法检测发现, 转染miR-214模拟物后LX-2细胞PTEN蛋白表达下调, 转染miR-214抑制物后LX-2细胞PTEN蛋白表达上调, 见图8。

3 讨论

肝纤维化是病毒性肝炎、非酒精性肝炎、酒精性肝炎、自身免疫性肝炎和血吸虫性肝炎等慢性肝病所导致的共同病理过程^[5]。慢性肝病所致的肝纤维化在全球范围内发病率较高, 由此导致的肝硬化和肝衰竭给社会带来了沉重的医疗负担。目前肝纤

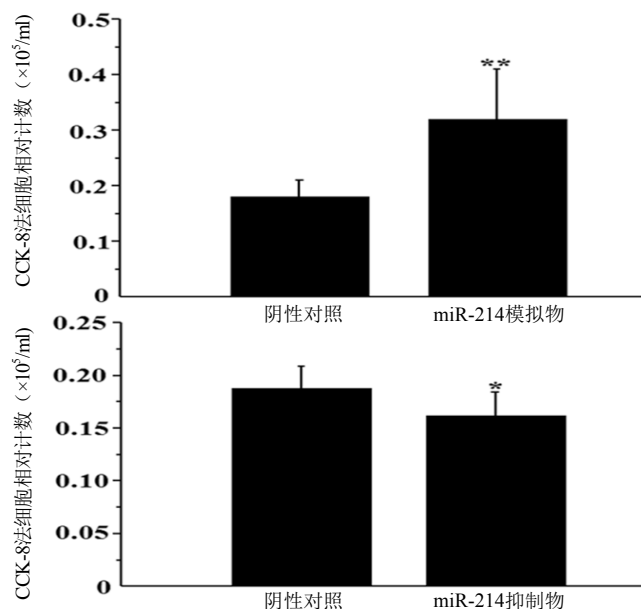
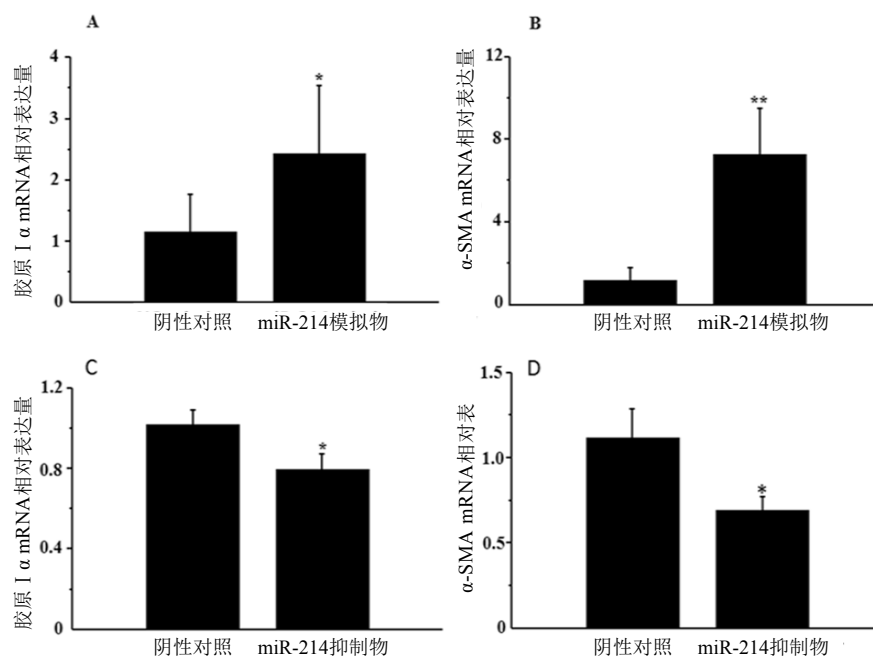


图5 miR-214对LX-2细胞增殖的影响

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 图6 miR-214对LX-2细胞 α -SMA mRNA和胶原 I α mRNA表达的影响注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

维化发生的具体分子机制尚未完全明确, 缺乏有效的预防和治疗手段, 因此需对其发病机制进行深入探索。慢性肝病所致的持续或反复的肝实质炎症和坏死可引起纤维结缔组织大量增生, 同时使其降解程度相对或绝对不足, 大量细胞外基质沉积后形成肝纤维化^[6]。细胞外基质尤其是间质胶原的沉积是肝纤维化的主要改变, 而HSC是肝内胶原及其他细胞外基质的主要来源, 是肝纤维化发生的关键细

胞, HSC持续激活所致的细胞外基质过度沉积是肝纤维化发生发展的关键环节^[7]。

miRNA已被证实参与了多种肝脏疾病的病理生理过程, 在慢性肝病及肝纤维化的发生发展中发挥重要作用^[8]。有研究发现miR-214在肾脏纤维化过程中发挥重要的调节作用, 同时高通量芯片分析显示miR-214在HSC活化过程中高表达^[9], 因此可推测miR-214可通过促进HSC持续激活, 进而参与肝纤

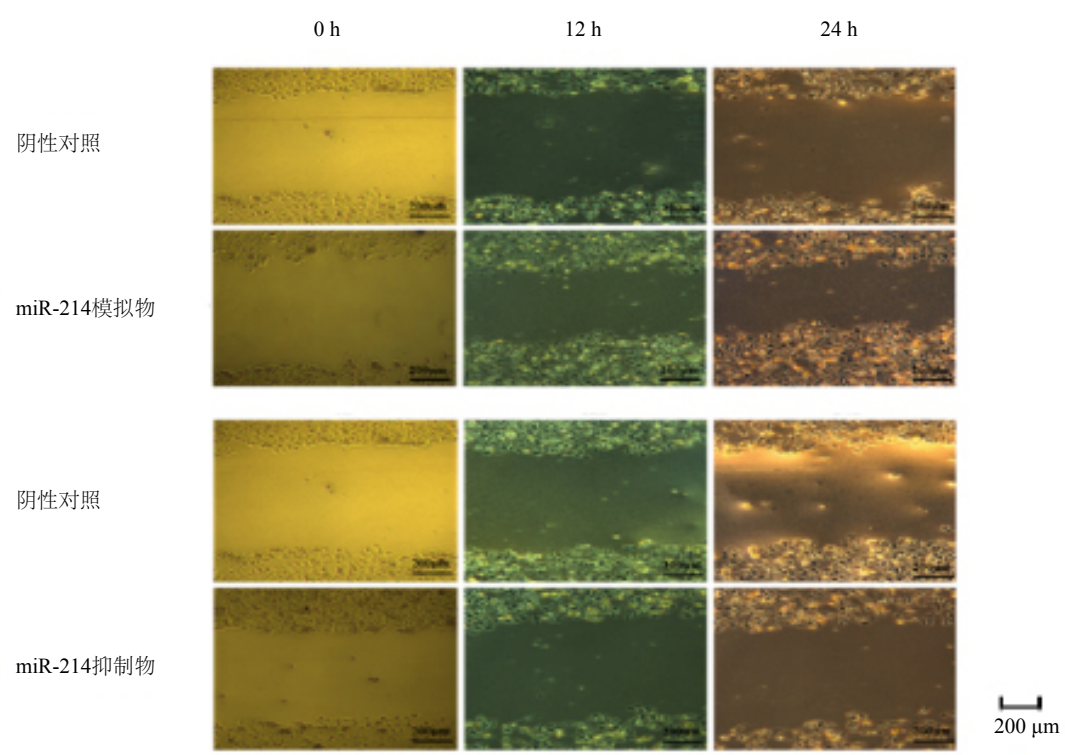


图 7 miR-214 对 LX-2 细胞迁移的影响

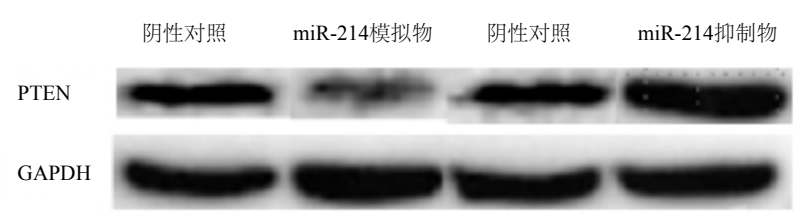


图 8 miR-214 对潜在靶基因 PTEN 的影响

维化的发生发展。

miRNA是一种非编码单链RNA，其生物学功能的发挥需通过对下游靶基因的调控实现^[10,11]。通过miRNA靶基因预测数据库Targetscan预测PTEN为miR-214的靶基因，通过蛋白质印迹法检测发现，转染miR-214模拟物后LX-2细胞PTEN蛋白表达下调，证实miR-214可抑制PTEN蛋白的表达。

第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因（phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN）是继p53后发现的又一个重要的抑癌基因，是迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因^[12]。随着研究的深入，对PTEN的研究已从肿瘤领域延伸到非肿瘤领域。PTEN具有广泛的生物学功能，其可抑制成纤维细胞及HSC的转化和增殖，在脏器纤维化疾病中发挥重要作用^[13]。PTEN参与多种细胞信号转导途径，

可通过负性调控PI3K/Akt信号转导通路调节细胞的生长、增殖、生存及转移^[14]。有研究证实PI3K/Akt信号转导通路参与调控HSC的活化、增殖及凋亡，抑制PI3K/Akt信号转导通路的活性可抑制HSC的活化并促进其凋亡^[15]。

本研究通过动物水平和细胞水平实验对miR-214在肝纤维化发生过程中的表达情况进行研究，构建了小鼠肝纤维化模型，并通过脂质体转染方式调控LX-2细胞miR-214的表达，分析miR-214表达水平对LX-2细胞增殖、活化和迁移能力的影响，预测并验证LX-2细胞中miR-214可能的靶基因，对miR-214在HSC活化及肝纤维化进程中的生物学功能及其可能机制进行初步探讨。实验结果发现，在通过腹腔注射CCl₄建立的C57BL/6小鼠肝纤维化模型中，模型组小鼠肝脏miR-214表达水平显著高于对照组，上调LX-2细胞miR-214的表达水平可促进

LX-2细胞的增殖、活化和迁移,证实miR-214可促进肝纤维化的发生与发展。

综上所述,miR-214可促进HSC的活化、增殖和迁移,是肝纤维化发生与发展的潜在负调控因子,miR-214对HSC生物学功能的影响可能是通过抑制PTEN的表达、降低PTEN对PI3K/Akt通路的负性调控从而加速肝纤维化进程。鉴于本研究样本量较少,今后仍需进一步大样本研究进行确认。

参考文献

- [1] Chen RJ, Wu HH, Wang YJ. Strategies to prevent and reverse liver fibrosis in humans and laboratory animals[J]. Arch Toxicol,2015,89(10):1727-1750.
- [2] 高胜楠,宁宝森,邹春燕,等. microRNAs在肝病中的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2014,14(22):4386-4389.
- [3] 刘剑,王伟铭. 微小RNA与肾脏纤维化的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版),2011,31(12):1786-1789.
- [4] 公绪华,陈超,朱樑,等. miR-214通过抑制TOM1表达促进肝星状细胞活化和迁移[J]. 胃肠病学,2013,18(7):390-395.
- [5] 陆伦根,胡俊杰. 肝纤维化研究进展[J]. 肝脏,2012,17(9):617-620.
- [6] 谌双君,赵卫华,丛敏,等. 靶向肝星状细胞的基因治疗逆转肝纤维化的研究进展[J]. 肝脏,2016,21(1):68-70.
- [7] 涂传涛,王吉耀. 肝纤维化的细胞分子机制研究进展[J]. 中华肝脏病杂志,2014,22(1):5-8.
- [8] Hsu SH, Ghoshal K. MicroRNAs in liver health and disease[J]. Curr Pathobiol Rep,2013,1(1):53-62.
- [9] Safak Y, Chung SS, Park CY. The Role of MicroRNAs in Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Development[M]. New York:Springer,2014:12-18.
- [10] 田晓琳,杨臻,王建英,等. 微小RNA与肿瘤的关系[J]. 癌症进展,2016,14(1):22-25.
- [11] 梁英. miRNA:除了抑制,它还有激活功能[J]. 自然杂志,2017,39(1):31-36.
- [12] Sharma M, Shinde R, McGaha T, et al. The PTEN pathway in Tregs functions as a critical driver of the immunosuppressive tumor microenvironment and tolerance to apoptotic cells[J]. J Immuno Ther Cancer,2015,3(Supple 2):1-5.
- [13] Zheng J, Wu C, Xu Z, et al. Hepatic stellate cell is activated by microRNA-181b via PTEN/Akt pathway[J]. Mol Cell Biochem,2015,398(1-2):1-9.
- [14] 崔晓萍,陈建梅,穆军山,等. PTEN通过拮抗PI3K/Akt信号通路抑制神经干细胞增殖[J]. 西安交通大学学报(医学版),2016,(2):239-243,272.
- [15] Cai CX, Buddha H, Castellino-Prabhu S, et al. Activation of insulin-PI3K/Akt-p70S6K pathway in hepatic stellate cells contributes to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Dig Dis Sci,2017,62(4):968-978.

收稿日期: 2017-07-09

莫双阳,赵颖雯,李竞强. 微小RNA-214对肝纤维化的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018,10(1):64-69.