

微小RNA-140抑制对小鼠非酒精性脂肪性肝病进展的影响及机制

寇小妮, 解新科, 郝明霞, 宋春荣, 吴维 (陕西中医药大学附属医院 肝病科, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 目的 探讨微小RNA (microRNA, miR)-140缺失对小鼠非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 发展的影响及机制。方法 选取60只C57BL/6J小鼠, 采用随机数字表法分为对照组、模型组和miR-140抑制组, 每组20只。对照组小鼠采用普通动物饲料喂养, 模型组和miR-140抑制组采用高脂饮食喂养。从第4周开始, miR-140抑制组每日腹腔注射mimics inhibitor质粒, 持续1周, 对照组及模型组腹腔注射相应体积的生理盐水。在第4周结束时, 每组选取2只小鼠验证是否造模成功, 随后腹膜内注射10%水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 麻醉, 股动脉取血, 同时取出肝脏。计算肝脏脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分及非酒精性脂肪性肝炎活动度积分 (non-alcoholic steatohepatitis activity score, NAS)。采用酶联免疫吸附法检测小鼠肝组织天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 及白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测小鼠肝组织miR-140、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 及Toll样受体-4 (Toll-like receptor4, TLR-4) mRNA相对表达量。采用免疫组织化学法检测NF- κ B和TLR4蛋白水平。**结果** 对照组、模型组和miR-140抑制组小鼠肝组织脂肪变积分[(0.00 \pm 0.00) 分 vs (3.12 \pm 0.23) 分 vs (4.80 \pm 0.16) 分]、炎症坏死灶积分[(0.52 \pm 0.21) 分 vs (2.95 \pm 0.24) 分 vs (4.13 \pm 0.28) 分]、气球样变积分[(0.00 \pm 0.00) 分 vs (1.98 \pm 0.26) 分 vs (2.65 \pm 0.20) 分]、NAS积分[(0.48 \pm 0.32) 分 vs (7.29 \pm 0.34) 分 vs (9.41 \pm 0.51) 分]、AST [(43.24 \pm 6.89) U/L vs (83.21 \pm 10.98) U/L vs (129.36 \pm 11.14) U/L]、ALT [(60.21 \pm 12.36) U/L vs (83.21 \pm 10.98) U/L vs (135.36 \pm 9.34) U/L]、TNF- α [(145.77 \pm 6.46) μ g/L vs (267.86 \pm 6.98) μ g/L vs (439.45 \pm 6.98) μ g/L]、IL-6 [(47.13 \pm 15.95) μ g/L vs (187.66 \pm 9.47) μ g/L vs (334.14 \pm 12.74) μ g/L]、miR-140 mRNA相对表达量 (4.96 \pm 0.21 vs 1.29 \pm 0.49 vs 0.86 \pm 0.54)、NF- κ B mRNA相对表达量 (0.96 \pm 0.21 vs 2.29 \pm 0.49 vs 4.56 \pm 0.54)、TLR4 mRNA相对表达量 (0.89 \pm 0.39 vs 3.01 \pm 0.43 vs 5.81 \pm 0.26)、NF- κ B蛋白相对表达水平 (2.63 \pm 0.32 vs 3.14 \pm 0.29 vs 5.15 \pm 0.31) 和TLR4蛋白相对表达水平 (3.96 \pm 0.31 vs 5.01 \pm 0.26 vs 6.95 \pm 0.34) 差异均有统计学意义 (P 均 $<$ 0.001)。模型组肝组织脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分、NAS积分、AST、ALT、TNF- α 、IL-6、NF- κ B mRNA相对表达量、TLR4 mRNA相对表达量、NF- κ B蛋白相对表达水平和TLR4蛋白相对表达水平均显著高于对照组, miR-140 mRNA相对表达量显著低于对照组, 差异均有统计学意义 (P 均 $<$ 0.001)。miR-140抑制组肝组织脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分、NAS积分、AST、ALT、TNF- α 、IL-6、NF- κ B mRNA相对表达量、TLR4 mRNA相对表达量、NF- κ B蛋白相对表达水平和TLR4蛋白相对表达水平均显著高于模型组, miR-140 mRNA相对表达量显著低于模型组, 差异均有统计学意义 (P 均 $<$ 0.001)。**结论** miR-140缺失可促进小鼠NAFLD的发展, 其机制与miR-140抑制导致肝组织NF- κ B和TLR4 mRNA相对表达量及蛋白表达水平升高有关。

关键词: 微小RNA-140; 抑制; 小鼠; 脂肪性肝病, 非酒精性

Effects and mechanism of microRNA-140 inhibition on the development of non-alcoholic fatty liver disease in mice

Kou Xiaoni, Xie Xinke, Hao Mingxia, Song Chunrong, Wu Wei (Department of Liver Diseases, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China)

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2020.03.007

基金项目: 陕西省科技厅社会发展领域项目 (2018SF295)

通讯作者: 宋春荣 Email: 457680730@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of microRNA-140 deletion on the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. **Methods** Total of sixty C57BL/6J mice were selected and divided into control group, model group and miR-140 inhibition group according to random number table, 20 mice in each group. Mice in control group were fed with ordinary animal feed, while mice in model group and miR-140 inhibition group were fed with a high-fat diet. At the beginning of the 4th week, mice in miR-140 inhibition group were intraperitoneally injected with mimics inhibitor plasmid daily for 1 week, mice in control group and model group were intraperitoneally injected with corresponding volume of saline. At the end of the 4th week, two mice in each group were sacrificed to verify whether the modeling was successful, and then 10% chloral hydrate (0.3 ml/100 g) was used to anesthetize the mice, blood from the femoral artery and the liver were collected. Liver steatohepatitis score, inflammatory necrosis score, ballooning score and non-alcoholic steatohepatitis activity score (NAS) were calculated. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). Real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the relative expression of miR-140, nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and Toll-like receptors 4 (TLR-4) mRNA in liver tissues. Immunohistochemistry was used to detect the levels of NF- κ B and TLR4 protein. **Results** Liver tissue steatosis score [(0.00 \pm 0.00) points vs (3.12 \pm 0.23) points vs (4.80 \pm 0.16) points], inflammatory necrosis score [(0.52 \pm 0.21) points vs (2.95 \pm 0.24) points vs (4.13 \pm 0.28)], balloon integration [(0.00 \pm 0.00) points vs (1.98 \pm 0.26) points vs (2.65 \pm 0.20) points], NAS integration [(0.48 \pm 0.32) points vs (7.29 \pm 0.34) points vs (9.41 \pm 0.51) points], AST [(43.24 \pm 6.89) U/L vs (83.21 \pm 10.98) U/L vs (129.36 \pm 11.14) U/L], ALT [(60.21 \pm 12.36) U/L vs (83.21 \pm 10.98) U/L vs (129.36 \pm 11.14) U/L], TNF- α [(145.77 \pm 6.46) μ g/L vs (267.86 \pm 6.98) μ g/L vs (439.45 \pm 6.98) μ g/L], IL-6 [(47.13 \pm 15.95) μ g/L vs (187.66 \pm 9.47) μ g/L vs (334.14 \pm 12.74) μ g/L], relative expression of miR-140 mRNA (4.96 \pm 0.21 vs 1.29 \pm 0.49 vs 0.86 \pm 0.54), relative expression of NF- κ B mRNA (0.96 \pm 0.21 vs 2.29 \pm 0.49 vs 4.56 \pm 0.54), relative expression of TLR4 mRNA (0.89 \pm 0.39 vs 3.01 \pm 0.43 vs 5.81 \pm 0.26), relative expression of NF- κ B protein (2.63 \pm 0.32 vs 3.14 \pm 0.29 vs 5.15 \pm 0.31) and relative expression of TLR4 protein (3.96 \pm 0.31 vs 5.01 \pm 0.26 vs 6.95 \pm 0.34) of mice in control group, model group and miR-140 deletion group were statistically significant (all $P < 0.001$). Liver tissue steatosis score, inflammatory necrosis score, balloon integration, NAS integration, AST, ALT, TNF- α , IL-6, relative expression of NF- κ B mRNA, relative expression of TLR4 mRNA, relative expression of NF- κ B protein and relative expression of TLR4 protein of mice in model group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.001$), relative expression of miR-140 mRNA of mice in model group was significantly lower than that in control group ($P < 0.001$). Liver tissue steatosis score, inflammatory necrosis score, balloon integration, NAS integration, AST, ALT, TNF- α , IL-6, relative expression of NF- κ B mRNA, relative expression of TLR4 mRNA, relative expression of NF- κ B protein and relative expression of TLR4 protein of mice in miR-140 deletion group were significantly higher than those in model group (all $P < 0.001$), relative expression of miR-140 mRNA of mice in miR-140 inhibition group was significantly lower than that in model group ($P < 0.001$). **Conclusions** The deletion of microRNA-140 can promote the development of NAFLD in mice, and the mechanism maybe related to the increase of expression of NF- κ B, TLR4 mRNA and protein in liver tissue.

Key words: MicroRNA-140; Inhibition; Mice; Fatty liver disease, non-alcoholic

研究表明, 超过80%肥胖个体患有非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)^[1,2]。影响NAFLD的主要因素包括高脂饮食、肥胖和代谢综合征。近年来, 随着肥胖人数的增加, NAFLD患病率急剧上升, 全球约3亿人受影响。NAFLD的特征为肝内脂肪堆积导致的显著炎症和肝功能损伤, 其可进展为肝纤维化和肝硬化^[3]。

微小RNA(microRNA, miR)是一类包含18~23个核苷酸的非编码RNA, 其通过与靶mRNA的特定位点结合对靶mRNA转录后蛋白质的降解合成起抑制作用。miRNA具有调控细胞增殖、分化、代谢、凋亡和先天免疫等生物学功能^[4]。已有多种miRNA(miRNA-421、miRNA-194、miRNA-21等)被证实能在能量稳态、脂质代谢、胰腺细胞发育、脂肪生

成和高脂肪饮食诱导的体质量增加过程中发挥重要作用。

miR-140为软骨分化的调节因子,研究表明肥胖可通过转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导的SMAD3信号转导通路下调乳腺中miR-140的表达,miR-140表达受抑制可导致反馈环路驱动乳腺肌成纤维细胞分化,促进纤维化乳腺微环境的发展^[5-7]。Toll样受体-4 (Toll-like receptor4, TLR-4) 是模式识别受体家族成员,可识别感染因子并诱导炎症信号转导以激活先天免疫系统^[8]。TLR-4最常见的配体是脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 与配体结合后,TLR-4活化,导致核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 磷酸化,MAPK级联反应被激活,进而导致炎症细胞因子的产生^[9]。研究已证实NAFLD患者肝组织中TLR-4和NF- κ B过表达^[10]。目前关于miR-140与NAFLD的关系及致病机制的研究较少。本研究拟探讨miR-140缺失对小鼠NAFLD发展的影响及机制,为该疾病的治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物 60只8周龄C57BL/6J小鼠获自重庆医科大学动物试验中心,体质量22~25 g,动物合格证号:SCXK(渝)2016003,动物许可证号:SCXK(渝)2018005。所有小鼠在(22±1)℃下饲养,12 h光-暗循环,自由饮食、饮水。本研究经本院动物护理与使用委员会批准。

1.2 各组小鼠的制备 采用随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组和miR-140抑制组,每组20只,雌雄各半。对照组小鼠采用普通动物饲料喂养,模型组和miR-140抑制组采用高脂(普通标准饲料82%、猪油10%、胆固醇2%、3号胆盐1%、蛋黄粉5%)饮食喂养。从第4周开始,miR-140抑制组每日腹腔注射mimics inhibitor质粒(由上海生工科技有限公司合成,浓度为100 ng/ml; 2 ml/kg)持续1周,对照组及模型组腹腔注射相应体积的生理盐水。在第4周结束时,每组中选取2只小鼠验证是否造模成功(本实验小鼠均验证造模成功),随后腹膜内注射10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉,股动脉取血,同时取出肝脏。用中性福尔马林固定部分肝组织,置于冰上制备肝细胞悬液,其他部分用液氮快速冷冻,-80℃保存备用。

1.3 观察指标

1.3.1 肝组织病理结构观察及肝细胞损伤指标的测定 将肝组织在4%多聚甲醛中固定24 h后进行石蜡包埋切片(7 μ m),采用苏木精和伊红染色。随机选择

每组中的3个样品,在光学显微镜(日本Olympus公司)下观察。根据Brunt标准计算肝脏脂肪变积分,炎症坏死灶积分、气球样变积分及非酒精性脂肪性肝炎活动度积分(non-alcoholic steatohepatitis activity score, NAS)。

1.3.2 肝组织天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平的检测 制备肝组织匀浆,采用酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测组织液中AST、ALT、TNF- α 及IL-6水平,试剂购自上海邦奕生物科技有限公司,批号分别为WA741598、XZ129687、MN478961、QZ471549。向肝组织匀浆加入AST、ALT、TNF- α 、IL-6生物素缀合物的混合物及100 μ l链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶,孵育30 min。然后将100 μ l稳定的色原体加入100 μ l终止缓冲液中,分别检测混合物在443 nm及551 nm处的吸光度值,绘制标准曲线计算AST、ALT、TNF- α 及IL-6水平。

1.3.3 肝组织miR-140、NF- κ B及TLR4 mRNA相对表达量的测定 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测肝组织miR-140、NF- κ B及TLR4 mRNA相对表达量。采用TriFastTM试剂(德国PEQLAB公司)从肝组织样品中提取总RNA,采用分光光度法检测RNA浓度,用iScript DNA合成试剂盒(德国BioRad Laboratories公司)逆转录0.25 mg总RNA,然后进行DNA酶消化(德国Fermentas公司)。使用Primer 3软件设计PCR引物,序列见表1。使用SsoFast EvaGreen Supermix(德国BioRad Laboratories公司)制备PCR混合物。扩增反应在iCycler(德国BioRad Laboratories公司)中进行,进行40个循环的两步PCR(95℃变性35 s, 95℃变性5 s, 60℃退火/延伸10 s)。在每次温度变化时测量每个样品的荧光强度以监测靶基因的扩增。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算靶基因mRNA的相对表达量。

1.3.4 小鼠肝组织NF- κ B和TLR4表达水平的测定 采用免疫组织化学法检测NF- κ B和TLR4在肝组织中的表达。将肝组织石蜡切片用3% H₂O₂处理10 min,10%牛血清白蛋白封闭30 min。将载玻片在4℃下与抗NF- κ B、TLR4抗体(1:100;美国sigma公司,NO: AZ574159、QA148512)孵育过夜,室温

下二抗(美国Cell Signaling公司, 1:200)处理1 h。磷酸盐缓冲液洗涤载玻片3次, 采用二氨基联苯胺(美国Sigma公司)显影3 min。苏木精染核10 s, 并通过光学显微镜(日本Olympus公司)成像。使用ImageJ软件将GAPDH密度标准化后, 定量计算特定蛋白的条带密度。

1.4 统计学处理 采用SPSS 23.0软件进行数据录入和统计学分析。肝组织脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分、NAS积分、AST、ALT、TNF- α 、IL-6、miR-140、NF- κ B及TLR4 mRNA相对表达量等计量资料均为正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝组织病理 对照组小鼠肝组织细胞完整, 单层索状排列, 围绕中央静脉放射状分布, 结构正常, 染色清晰, 核呈卵圆形, 在肝细胞间质及血管周围可见少量亮绿色胶原纤维; 模型组可见大量脂肪变性及坏死肝细胞, 排列紊乱, 细胞脱落现象明显, 细胞核固缩, 肝纤维化明显, 间质内大量

炎性细胞浸润, 胶原纤维显著增加; miR-140抑制组肝组织脂肪变明显, 可见大量坏死肝细胞, 绿色胶原纤维显著增多, 见图1。

2.2 各组小鼠肝细胞损伤指标 对照组、模型组和miR-140抑制组小鼠肝组织脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分及NAS积分差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), 其中模型组各指标显著高于对照组, miR-140抑制组各指标显著高于模型组, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), 见表2。

2.3 各组小鼠肝组织AST、ALT、TNF- α 及IL-6水平 各组小鼠AST、ALT、TNF- α 及IL-6水平差异有统计学意义(P 均 < 0.001), 其中模型组各指标显著高于对照组, miR-140抑制组显著高于模型组, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), 见表3。

2.4 各组小鼠肝组织miR-140、NF- κ B及TLR4 mRNA相对表达量 各组小鼠肝组织miR-140、NF- κ B及TLR4 mRNA相对表达量差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), 其中模型组肝组织NF- κ B、TLR4 mRNA相对表达量显著高于对照组, miR-140 mRNA相对表达量显著低于对照组, miR-140抑制组肝组织NF- κ B、TLR4 mRNA相对表达量显著高于模型组, miR-140 mRNA相对表达量显著低于模型组, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), 见表4。

2.5 各组小鼠肝组织NF- κ B和TLR4蛋白相对表达水平 各组小鼠肝组织NF- κ B和TLR4蛋白相对表达水平差异有统计学意义(P 均 < 0.001), 其中模型组显著高于对照组, miR-140抑制组显著高于模型组, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), 见表5。免疫组织化学染色示, NF- κ B和TLR4蛋白阳性表达为棕褐色, 各组NF- κ B、TLR4阳性表达情况与各蛋白表达水平符合, 见图2。

表1 PCR法检测小鼠肝组织miR-140、NF- κ B及TLR4 mRNA相对表达量的引物序列

名称	序列
miR-140	上游引物: 5'-ACCTCGCTCGCTCCTAG-3' 下游引物: 5'-CCTACCTCGGATCAG-3'
NF- κ B	上游引物: 5'-CAAAACCAACCTTGACTAGTG-3' 下游引物: 5'-TGACACTACCTTACTC-3'
TLR4	上游引物: 5'-CTTCTGCCACTAGACT-3' 下游引物: 5'-CTAGTCCTACTTAGTTGTC-3'
GAPDH	上游引物: 5'-CTCCTCGGATTCT-3' 下游引物: 5'-CCCTACTTAGGATCGTC-3'

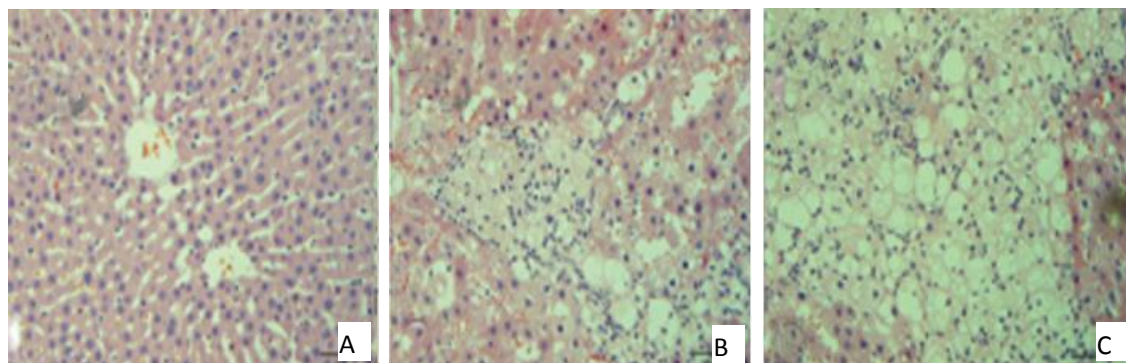


图1 对照组、模型组和miR-140抑制组小鼠肝组织病理图(苏木精-伊红染色, $\times 400$)

注: A为对照组, 肝脏结构完整; B为模型组, 可见大量脂肪变性及坏死肝细胞; C为miR-140抑制组, 肝组织脂肪变明显, 可见大量坏死肝细胞, 绿色胶原纤维显著增多

表2 对照组、模型组和 miR-140 抑制组小鼠肝组织脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分及 NAS 积分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	例数 (例)	脂肪变积分	炎症坏死灶积分	气球样变积分	NAS积分
对照组	20	0.00 ± 0.00	0.52 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.32
模型组	20	3.12 ± 0.23	2.95 ± 0.24	1.98 ± 0.26	7.29 ± 0.34
miR-140抑制组	20	4.80 ± 0.16	4.13 ± 0.28	2.65 ± 0.20	9.41 ± 0.51
F 值		23.365	19.548	26.364	15.635
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_1 值		19.654	20.364	15.697	15.654
P_1 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_2 值		16.325	18.254	19.545	20.326
P_2 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_3 值		21.321	18.541	19.321	18.542
P_3 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: t_1 、 P_1 为模型组与对照组相比, t_2 、 P_2 为 miR-140 抑制组与对照组相比, t_3 、 P_3 为模型组与 miR-140 抑制组相比

表3 对照组、模型组和 miR-140 抑制组小鼠肝组织 AST、ALT、TNF- α 及 IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	AST (U/L)	ALT (U/L)	TNF- α (μ g/L)	IL-6 (μ g/L)
对照组	20	43.24 ± 6.89	60.21 ± 12.36	145.77 ± 6.46	47.13 ± 15.95
模型组	20	83.21 ± 10.98	92.36 ± 10.89	267.86 ± 6.98	187.66 ± 9.47
miR-140抑制组	20	129.36 ± 11.14	135.36 ± 9.34	439.45 ± 6.98	334.14 ± 12.74
F 值		106.324	59.965	123.654	169.654
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_1 值		32.323	29.987	56.369	108.654
P_1 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_2 值		54.365	42.365	36.654	43.326
P_2 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_3 值		69.698	39.874	108.698	210.365
P_3 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: t_1 、 P_1 为模型组与对照组相比, t_2 、 P_2 为 miR-140 抑制组与对照组相比, t_3 、 P_3 为模型组与 miR-140 抑制组相比

表4 对照组、模型组和 miR-140 抑制组小鼠肝组织 miR-140、NF- κ B 及 TLR4 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	NF- κ B	TLR4	miR-140
对照组	20	0.96 ± 0.21	0.89 ± 0.39	4.96 ± 0.21
模型组	20	2.29 ± 0.49	3.01 ± 0.43	1.29 ± 0.49
miR-140抑制组	20	4.56 ± 0.54	5.81 ± 0.26	0.86 ± 0.54
F 值		15.636	13.214	15.654
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_1 值		11.146	13.214	12.541
P_1 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_2 值		13.654	14.521	16.245
P_2 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001
t_3 值		9.654	10.214	8.657
P_3 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: t_1 、 P_1 为模型组与对照组相比, t_2 、 P_2 为 miR-140 抑制组与对照组相比, t_3 、 P_3 为模型组与 miR-140 抑制组相比

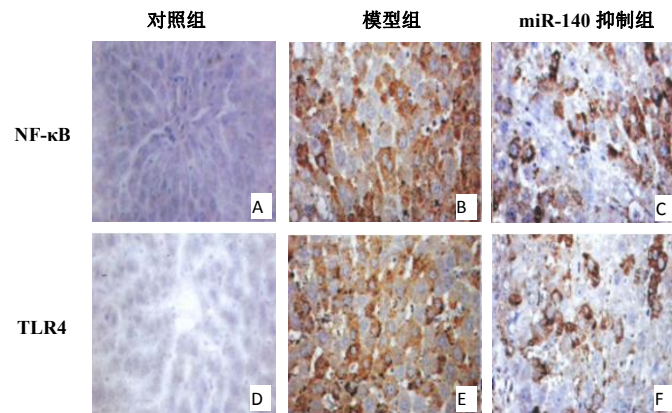


图2 miR-140抑制对小鼠肝组织NF-κB和TLR4蛋白表达水平的影响(二氨基联苯胺染色, ×400)

注: 棕褐色所示为NF-κB和TLR4蛋白阳性, 图A和图D示对照组NF-κB和TLR4阳性表达少, 图B、图C、图E和图F示模型组和miR-140抑制组NF-κB和TLR4阳性表达显著增加

表5 对照组、模型组和miR-140抑制组小鼠肝组织NF-κB和TLR4蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	NF-κB	TLR4
对照组	20	2.63 ± 0.32	3.96 ± 0.31
模型组	20	3.14 ± 0.29	5.01 ± 0.26
miR-140抑制组	20	5.15 ± 0.31	6.95 ± 0.34
F值		13.654	14.521
P值		< 0.001	< 0.001
t ₁ 值		12.654	10.326
P ₁ 值		< 0.001	< 0.001
t ₂ 值		12.996	14.654
P ₂ 值		< 0.001	< 0.001
t ₃ 值		19.646	12.654
P ₃ 值		< 0.001	< 0.001

注: t₁、P₁为模型组与对照组相比, t₂、P₂为miR-140抑制组与对照组相比, t₃、P₃为模型组与miR-140抑制组相比

3 讨论

NAFLD是常见的肝脏疾病, 常有肝脏炎症、结构损伤及脂质沉积等表现。与代谢综合征相关的疾病, 如肥胖、2型糖尿病和血脂异常是NAFLD发展的主要危险因素^[11,12]。NAFLD的发病机制目前尚未明确。在啮齿动物中, NAFLD常由高脂饮食诱导, 其可刺激肝脏中甘油三酯的积累和胰岛素抵抗。miRNA是长度为18~25个核苷酸的短链非编码RNA, 其通过降解或翻译抑制特定靶mRNA。研究表明, 某些miRNA与脂肪性肝病有关。细胞实验表明, miR-140在肝细胞、星状细胞和库普弗细胞中低表达, ob/ob小鼠模型中也发现了肝脏miR-140的低表达现象^[13]。近期研究证实, miR-140主要在肝脏、肠道、肾脏及肾上腺中表达, 可通过调节肝脏中的下游基因, 在维持脂质和葡萄糖稳态中

发挥关键作用^[14]。miR-140控制胆汁酸合成和代谢的关键基因包括胆固醇7α-羟化酶1 (*Cyp7a1*), 胆盐输出泵 (*Bsep*), 小异二聚体伴侣 (*Shp*) 和肠道胆汁酸结合蛋白 (*Ibabp*)^[15-18]。对miR-140基因敲除小鼠的研究表明, miR-140具有保护肝脏的作用, 可下调血浆胆固醇和甘油三酯水平, 抑制肝脏脂质的积累^[19-23]。miR-140表达降低与肥胖小鼠炎症反应的增加有关, 高表达的miR-140能够有效改善肥胖诱导的小鼠代谢功能障碍。临床前和临床证据表明, miR-140激动剂可减少患者肝脏炎症损伤、脂肪变性和胰岛素抵抗, 对NAFLD的治疗有益^[24,25]。因此, miR-140的靶向是NAFLD的潜在治疗方法。本研究表明, 与对照组相比, 模型组脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分、NAS积分、AST、ALT、TNF-α及IL-6水平升高, miR-140 mRNA相对表达量降低; 与模型组相比, miR-140抑制组脂肪变积分、炎症坏死灶积分、气球样变积分、NAS积分、AST、ALT、TNF-α、IL-6水平升高, miR-140 mRNA相对表达量降低。结合病理结果, miR-140抑制组可见大量脂肪变性及坏死肝细胞, 排列紊乱, 细胞脱落现象明显, 细胞核固缩, 肝纤维化明显, 间质内大量炎性细胞浸润, 胶原纤维明显增加, 提示miR-140抑制可促进小鼠NAFLD的发展, 与上述研究结果一致。

近期研究表明, miR-140可调控NF-κB和TLR4的表达。NF-κB是一种重要的转录调节因子, 可调节参与炎症诱导的基因, 在单纯脂肪变性到脂肪性肝炎的转变中具有关键作用。脂肪组织是细胞因子的主要来源, 肝细胞脂肪变时具有强烈的促炎作用, 可促进各种细胞因子的释放, 如TNF-α, 而TGF-β可通过NF-κB信号转导通路发挥作用。

TLR4激活后通过一系列信号转导激活NF- κ B, 促进TGF- β 的释放, 最终诱导肝细胞坏死、炎症和纤维化形成。综上, miR-140抑制可促进小鼠NAFLD的发展, 其机制与miR-140抑制可导致肝组织NF- κ B和TLR4 mRNA相对表达量及蛋白表达水平升高有关。

参考文献

- [1] 谈力欣, 王军芬. 非酒精性脂肪性肝病发病危险因素分析及研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(7): 1359-1363.
- [2] 曹海霞, 范建高. 酒精性肝病合并非酒精性脂肪性肝病和肥胖[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(3): 478-480.
- [3] 池肇春. 非酒精性脂肪性肝炎肝硬化发病机制研究进展与展望[J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21(2): 166-169.
- [4] TITOV I I, VOROZHEYKIN P S. Comparing miRNA structure of mirtrons and non-mirtrons[J]. BMC Genomics, 2018, 19(Suppl 3): 114.
- [5] BAI X, HAN G, LIU Y, et al. MiRNA-20a-5p promotes the growth of triple-negative breast cancer cells through targeting RUNX3[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1482-1489.
- [6] MA J, WANG P, YAO Y, et al. Knockdown of long non-coding RNA MALAT1 increases the blood-tumor barrier permeability by up-regulating miR-140[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(2): 324-338.
- [7] LI X, ZHEN Z, TANG G, et al. MiR-29a and MiR-140 protect chondrocytes against the anti-proliferation and cell matrix signaling changes by IL-1 β [J]. Mol cells, 2016, 39(2): 103-110.
- [8] CHANG J, XIA Y, WASSERLOOS K, et al. Cyclic stretch induced IL-33 production through HMGB1/TLR-4 signaling pathway in murine respiratory epithelial cells[J]. Plos One, 2017, 12(9): e0184770.
- [9] FANG C, XIE L, LIU C, et al. Tanshinone IIA improves hypoxic ischemic encephalopathy through TLR-4-mediated NF- κ B signal pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 1899-1908.
- [10] HE Q, ZHAO X, BI S, et al. Pretreatment with erythropoietin attenuates lung ischemia/reperfusion injury via toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B (TLR4/NF- κ B) pathway[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 1251-1257.
- [11] ESLAM M, VALENTI L, ROMEO S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: clinical impact[J]. J Hepatol, 2018, 68(2): 268-279.
- [12] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20.
- [13] YUAN Y, SHEN Y, XUE L, et al. miR-140 suppresses tumor growth and metastasis of non-small cell lung cancer by targeting insulin-like growth factor 1 receptor[J]. Plos One, 2013, 8(9): e73604.
- [14] PAPAIOANNOU G, INLOES J B, NAKAMURA Y, et al. let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(35): E3291-E3300.
- [15] TARDIF G, PELLETIER J P, FAHMI H, et al. NFAT3 and TGF- β /SMAD3 regulate the expression of miR-140 in osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(6): R197.
- [16] ZHANG K, CHEN J, SONG H, et al. SNHG16/miR-140-5p axis promotes esophagus cancer cell proliferation, migration and EMT formation through regulating ZEB1[J]. Oncotarget, 2018, 9(1): 1028-1040.
- [17] ZHANG M, LI D H, LI F, et al. Integrated analysis of miRNA and genes associated with meat quality reveals that Gga-MiR-140-5p affects intramuscular fat deposition in chickens[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(6): 2421-2433.
- [18] DONG P, XIONG Y, YU J, et al. Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4-miR-18a pathway in cervical cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(39): 5257-5268.
- [19] ZOU W, SHAO R, JONES D. Reply to 'dissecting the role of miR-140 and its host gene'[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(5): 519-520.
- [20] XIE W B, LIANG L H, WU K G, et al. MiR-140 expression regulates cell proliferation and targets PD-L1 in NSCLC[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(2): 654-663.
- [21] WANG Z, HU J, PAN Y, et al. miR-140-5p/miR-149 affects chondrocyte proliferation, apoptosis, and autophagy by targeting FUT1 in osteoarthritis[J]. Inflammation, 2018, 41(3): 959-971.
- [22] INUI M, MOKUDA S, SATO T, et al. Dissecting the roles of miR-140 and its host gene[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(5): 516-518.
- [23] Dong P, Xiong Y, Yu J, et al. Correction: control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4-miR-18a pathway in cervical cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(39): 5257-5268.
- [24] CHEN X, WU S, CHEN C, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway following experimental traumatic brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 143.
- [25] ZHANG X, DU Q, YANG Y, et al. The protective effect of Luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91: 1042-1052.

收稿日期: 2019-04-15

寇小妮, 解新科, 郝明霞, 等. 微小RNA-140抑制对小鼠非酒精性脂肪性肝病进展的影响及机制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2020, 12(3): 34-40.