

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.13.004

miR-101a 在乙型肝炎病毒相关性肝纤维化患者中的表达及对肝星状细胞的影响*

王旭天 孙亮 刘宇方 尚楚智 郑鑫[△]

(西安交通大学第一附属医院肝胆外科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探究 miR-101a 在乙型肝炎病毒(HBV)相关性肝纤维化患者中的表达及对肝星状细胞(HSC)的影响。方法:根据肝纤维化程度将 HBV 相关性肝纤维化患者进行分组(S0 组、S1 组、S2 组、S3 组和 S4 组),健康受试者作为健康对照组。通过 RT-PCR 检测肺组织中 miR-101a 的表达,并分析 miR-101a 与疾病严重程度的关系。使用重组人 TGF-β1 处理人肝星状细胞系 LX-2,并对 LX-2 细胞转染阴性对照 miRNA 模拟物(NC-mimic 组)、miR-101a 模拟物(miR-101a-mimic 组)、阴性对照 miRNA 抑制剂(NC-inhibitor 组)或 miR-101a 抑制剂(miR-101a-inhibitor 组),未转染的细胞作为对照组,然后通过 RT-PCR 或蛋白质印迹检测激活 HSC 及 ECM 产生的关键基因(α-SMA、COL1A1、COL1A2 和 COL3A1)和蛋白(a-SMA、collagen I 和 collagen III)的表达水平。将 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组、CCl₄ 组、Ad-control 组和 Ad-miR-101a 组,对大鼠腹腔注射 CCl₄(1 mL/kg 体重)诱导肝纤维化模型,每周 3 次,共 4 周。然后将 5× 10⁹ 感染单位的携带 miR-101a 的重组腺病毒(Ad-miR-101a)或对照腺病毒(Ad-control)经尾静脉注射到大鼠中。4 周后,通过苏木精和伊红(H&E)和 Masson 三色染色评估肝脏形态和纤维化,通过免疫组化染色评估肝脏 α-SMA、E-cadherin、vimentin、Smad4 或 p-Smad2/3 的表达。结果:与健康受试者相比,HBV 相关肝纤维化患者肝组织中 miR-101a 的表达水平明显降低,并且 miR-101a 的表达水平随着患者的严重程度升高而降低($P<0.05$)。与未处理的细胞相比,miR-101a 在 TGF-β1 处理的 LX-2 细胞中以浓度和时间依赖性方式显著下降($P<0.05$)。与未处理的细胞相比,5 ng/mL TGF-β1 处理 LX-2 细胞中的 α-SMA、COL1A1、COL1A2 和 COL3A1 mRNA 表达水平及 a-SMA、collagen I 和 collagen III 蛋白表达水平平均显著升高($P<0.05$)。与对照组相比,miR-101a-mimic 组的 α-SMA、COL1A1、COL1A2、COL3A1 和 TGF-β1 mRNA 和 a-SMA、collagen I、collagen III、TGF-β1、Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达均下调($P<0.05$)。与对照组相比,Ad-miR-101a 组大鼠肝组织中 E-cadherin 的表达上调,但 α-SMA、vimentin、Smad4 和 p-Smad2/3 的表达下调($P<0.05$);Ad-miR-101a 组大鼠的肝组织形态基本恢复正常,肝组织纤维化程度低于 CCl₄ 组。结论:miR-101a 水平与乙型肝炎病毒相关性肝纤维化严重程度相关,上调 miR-101a 可能通过抑制 HSC 的活化及上皮间质转化发挥抗纤维化作用。

关键词:miR-101a; 乙型肝炎病毒; 肝纤维化; 肝星状细胞; 上皮间质转化

中图分类号:R512.62; R575.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)13-2415-08

Expression of miR-101a in Patients with Hepatitis B Virus-related Liver Fibrosis and Its Effect on Hepatic Stellate Cells*

WANG Xu-tian, SUN Liang, LIU Yu-fang, SHANG Chu-zhi, ZHENG Xin[△]

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To reveal the expression of miR-101a in patients with hepatitis B virus (HBV)-related liver fibrosis and its effect on hepatic stellate cells (HSC). **Methods:** According to the degree of liver fibrosis, patients with HBV-related liver fibrosis were divided into S0 group, S1 group, S2 group, S3 group and S4 group, and healthy subjects were taken as healthy control group. The expression of miR-101a in the lung tissue of patients with HBV-related liver fibrosis was detected by RT-PCR, and the relationship between miR-101a and disease severity was analyzed. Human hepatic stellate cell line LX-2 was treated with recombinant human TGF-β1 and transfected with negative control miRNA mimics (NC-mimic group), miR-101a mimics (miR-101a-mimic group), negative control miRNA inhibitors (NC-inhibitor group) or miR-101a inhibitors (miR-101a-inhibitor group). Untransfected cells served as control groups. Then the expression levels of key genes (α-SMA, COL1A1, COL1A2 and COL3A1) and proteins (a-SMA, collagen I and collagen III) that activated HSC and ECM were detected by RT-PCR or Western blot. The SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, CCl₄ group, Ad-control group and Ad-miR-101a group. Rats were intraperitoneally injected with CCl₄(1 mL/kg body weight) to induce liver fibrosis model, 3 times a week for 4 weeks. Then, 5× 10⁹ infected units of recombinant adenovirus carrying miR-101a (Ad-miR-101a) or control adenovirus (Ad-control) were injected into rats via tail vein. After 4 weeks, liver morphology and fibrosis were evaluated by

* 基金项目:中国红十字基金会 INTACT 科研基金(XM_HR_INTACT_2020_10_01)

作者简介:王旭天(1989-),男,博士研究生,住院医师,主要研究方向:肝癌,E-mail: SkyWAng89@126.com,电话:15029806914

△ 通讯作者:郑鑫(1982-),男,博士研究生,副主任医师,硕士生导师,主要研究方向:肝癌,E-mail: 15943625@qq.com,电话:15349220051

(收稿日期:2021-01-23 接受日期:2021-02-18)

hematoxylin and eosin(H & E) and Masson trichrome staining, and liver α -SMA, E-cadherin, vimentin, Smad4 or p-Smad2/3 were evaluated by immunohistochemical staining expression. **Results:** Compared with healthy subjects, the expression level of miR-101a in liver tissues of patients with HBV-related liver fibrosis was significantly decreased, and the expression level of miR-101a decreased with the increase of patient severity($P<0.05$). Compared with untreated cells, miR-101a decreased significantly in LX-2 cells treated with TGF- β 1 in a concentration-and time-dependent manner ($P<0.05$). Compared with untreated cells, the expression of α -SMA, COL1A1, COL1A2 and COL3A1 mRNAs and a-SMA, collagen I and collagen III proteins in LX-2 cells treated with 5 ng/mL TGF- β 1 were significantly increased ($P<0.05$). Compared with control group, the expressions of α -SMA, COL1A1, COL1A2, COL3A1 and TGF- β 1 mRNA and a-SMA, collagen I, collagen III, TGF- β 1, Smad3 and p-Smad3 proteins in miR-101a-mimic group were all down-regulated. Compared with control group, the expression of E-cadherin in Ad-miR-101a group was up-regulated, but the expression of α -SMA, vimentin, Smad4 and p-Smad2/3 was down-regulated. The liver tissue morphology of rats in the Ad-miR-101a group returned to normal, and the degree of liver fibrosis was lower than that of the CCl₄ group. **Conclusion:** The level of miR-101a is related to the severity of hepatitis B virus-related liver fibrosis. Up-regulation of miR-101a may play an anti-fibrotic effect by inhibiting the activation of HSC and epithelial-mesenchymal transformation.

Key words: miR-101a; Hepatitis B virus; Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; Epithelial-mesenchymal transition

Chinese Library Classification(CLC): R512.62; R575.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2021)13-2415-08

前言

肝纤维化是大多数慢性肝病的主要特征^[1], 肝纤维化过程中, 肝脏中的纤维状细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)积累并增加, 并且肝纤维化中 ECM 来源于多种细胞类型, 其中, 肝星状细胞 (Hepatic stellate cell, HSC) 是肝损伤后产生 ECM 的主要细胞^[3,4]。HSC 存在于肝窦的 Disse 间隙内, 主要以静态或正常状态存储维生素 A。激活后, HSCs 的增殖导致 α 平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, a-SMA) 的表达增加、维生素 A 含量减少, 并转化为肌成纤维细胞样细胞(Myofibroblast cell, MFC), 产生大量的 ECM^[5]。而 ECM 降解和积累之间的这种不平衡会导致肝纤维化。纤维化会导致过度的疤痕形成和器官衰竭, 增加肝硬化和原发性肝癌的发生风险。

尽管肝纤维化是可逆的疾病, 有效的治疗可以预防或逆转纤维化过程, 但尚缺乏有效治疗药物, 并且尚无可靠的早期诊断生物标志物。肝活检是鉴定肝纤维化的金标准, 但该过程是侵入性的并有并发症的发生风险。因此急需要开发高准确性的诊断标志物及新型抗纤维化疗法。纤维化的发生和发展在很大程度上受到表观遗传修饰的影响, 例如异常的 microRNA (miRNA 或 miR) 或 DNA 甲基转移酶。miRNA 是一组长度为 19-25 个核苷酸的小的单链内源性非编码 RNA, 通过与 3' 非翻译区(3-untranslated region, 3'-UTR)结合来调节靶 mRNA 的翻译。目前已发现 700 多种人类 miRNAs, 参与人类近 1/3 的基因表达过程, 但绝大多数 miRNAs 的功能和作用机制尚未揭示。随着 miRNA 表达谱分析的发展, 越来越多的 miRNAs 与包括肝脏纤维化在内的多种疾病的发生发展有关^[6,7]。其他学者已经证明, miR-101a 可通过靶向转化生长因子 β 受体 1 型(Transforming growth factor beta receptor I, TGF β RI) 来减少缺氧引起的心脏成纤维细胞增殖, 从而发挥抗纤维化作用^[8]。然而, miR-101a 在肝脏纤维化发生中的作用仍然未知。

本研究旨在探究乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)相关的肝纤维化患者的血浆中是否存在 miR-101a 的异常表达, 以及 miR-101a 在肝纤维化发生发展中的作用及对肝星状细胞

激活的影响, 从而为肝纤维化的早期诊断和治疗提供候选分子靶标。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 重组人 TGF- β 1 购自美国 R&D Systems 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂、TRIzol 试剂、AM1560 mirVana miRNA 分离试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; miRNA 的模拟物、抑制剂和阴性对照均购自广州市锐博生物科技有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 E1910 购自美国 Promega 公司; BestarTMqPCR RT 试剂盒购自美国 DBI Bioscience 公司; SYBR Green qPCR Master Mix 购自美国 Applied Biosystems 公司; GAPDH、TGF- β 1、Smad3、p-Smad3 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; collagen I、collagen III、E-cadherin、vimentin、Smad4、p-Smad2/3 购自美国 Abcam 公司; a-SMA 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 增强的化学发光系统购自美国 Thermo Scientific 公司; CCl₄ 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 携带 miR-101a 的重组腺病毒(Ad-miR-101a)或对照腺病毒(Ad-control)购自和元生物技术(上海)股份有限公司; 苏木精和伊红(H&E)和 Masson 三色染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; SignalStain[®] Boost IHC 检测试剂购自美国 Cell Signaling Technology 公司; DAB 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。人肝星状细胞系 LX-2 购自美国 ATCC, 西安交通大学医学院实验动物中心提供 60 只体重为 180~220 g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠,

1.2 实验方法

1.2.1 患者分组和组织取样 根据《慢性 HBV 感染预防和治疗指南》^[9], 选取我院收治并诊断为慢性 HBV 感染合并肝纤维化的患者。排除 HIV 或其他肝炎感染、酗酒、由于其他原因引起的肝损伤、接受过治疗的患者、不适合进行肝活检的患者。所有患有慢性 HBV 感染的患者均接受了肝脏活检穿刺, 然后进行了病理学分析, 并根据 Scheuer 的标准^[10]确定了肝纤维化程

度,然后对患者进行分组(S0 组,无肝纤维化;S1 组,汇管区纤维化扩大;S2 组,汇管区及周围纤维化,可形成纤维间隔;S3 组,纤维化明显,肝小叶结构紊乱,但无肝硬化;S4 组,早期肝硬化)。本研究共收集了本院 50 例慢性 HBV 感染合并肝纤维化患者的肝组织,并收集了 10 例健康肝脏活检受试者的正常肝组织(健康对照组)。在收集样本之前获得受试者的书面同意,并且该研究得到我院伦理委员会的批准。

1.2.2 细胞培养 将人肝星状细胞系 LX-2 细胞在添加了 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素 G 和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中于 37°C、5.0% CO₂ 中孵育。另外,将重组人 TGF-β1 分别以 1、5 或 10 ng/mL 的浓度加入到培养基中,并孵育 24 h。

1.2.3 细胞转染 将 LX-2 细胞培养至 50%~60% 融合,并用 50.0 nM 阴性对照 miRNA 模拟物(NC-mimic 组)、miR-101a 模拟物(miR-101a-mimic 组)、阴性对照 miRNA 抑制剂(NC-inhibitor 组)或 miR-101a 抑制剂(miR-101a-inhibitor 组)瞬时转染,按照说明书使用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行转染,未转染的 LX-2 细胞作为对照组。

1.2.4 RT-PCR 根据说明书,使用 TRIzol 试剂从 LX-2 细胞或组织中提取总 RNA,使用 AM1560 mirVana miRNA 分离试剂盒分离总 miRNA。使用 Bestar™ qPCR RT 试剂盒反转录总 RNA(1 μg)。使用 SYBR Green qPCR Master Mix 在 ABI 7500 系统上进行 RT-PCR 分析。引物序列如表 1 所示。使用 $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 法确定 miRNA 和 mRNA 分别相对于 U6 和 GAPDH 的表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
miR-101a	CGTTAGACTACAAGTAAGCCGTG	GAGGATGAAGTACTGGGTACATA
α-SMA	GACTCCGACATCTCTAGCTCTT	TGCCTTTCCCTGCACATCTGTC
COL1A1	GGCTTGCGCTGAGCTAACAG	GCACTCTCCTGAACGCCA
COL1A2	TAAGCCGCTCACTGCCTTAG	TCCATCCAGCTCCTGCGTAA
COL3A1	AATGGGCCAAGATGATGGCT	GTTACGTGCTGCAGTGGACA
TGF-β1	AGAGCCGCTGTGCAGCCCT	CGAATTGTATGCCCTGTGT
U6	GCAGCTTCGTGATCTGGA	CCATCATCAAGCCATCTTCA
β-actin	CGGTAAACCGAAGCCATAAG	ACAGGCTAGCAGAGACAGCA

1.2.5 蛋白质印迹分析 用 SDS 上样缓冲液变性后,将等量的细胞裂解液中的蛋白质上样到 12% 或 10% SDS-PAGE 凝胶的每个孔中。电泳后,将蛋白质转移至聚乙烯二氟乙烯膜上,在室温下与封闭缓冲液(5% 脱脂牛奶)孵育 1 h,并用以下抗体在 4 °C 孵育过夜:抗 GAPDH(1:1000)、抗 α-SMA(1:5000)、抗 collagen I(1:1000)、抗 collagen III(1:1000)、抗 TGF-β1(1:2000)、抗 Smad3(1:3000)、抗 p-Smad3(1:3000)。然后,将辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:500)与膜室温下孵育 1 h。使用增强的化学发光系统进行显影。GAPDH 作为内部对照,使用 ImageJ 软件进行定量。

1.2.6 实验动物分组和处理 将 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组、CCl₄ 组、Ad-control 组和 Ad-miR-101a 组,每组 15 只。对 CCl₄ 组、Ad-control 组和 Ad-miR-101a 组大鼠腹腔注射 CCl₄(1 mL/kg 体重,与玉米油按 1:50 混合),每周 3 次,共 4 周,以诱导构建大鼠肝纤维化模型。对照组注射等体积的玉米油。另外,将 5×10^9 感染单位的携带 miR-101a 的重组腺病毒(Ad-miR-101a)或对照腺病毒(Ad-control)分别经尾静脉注射到 Ad-miR-101a 组或 Ad-control 组大鼠中。对照组尾静脉注射等体积的 PBS。处理 4 周后,在麻醉下处死大鼠。切取一部分肝组织进行组织学检查,并固定在 4% 多聚甲醛中;另一部分肝组织立即在液氮中冷冻,并保存在 -80 °C。

1.2.7 组织学和免疫组化(IHC)分析 将福尔马林固定、石蜡包埋的大鼠肝组织切成 4 μm 切片。切片用苏木精和伊红(H&E)和 Masson 三色染色。此外,将切片用二甲苯脱蜡,并浓

度递减的梯度乙醇重新水化。将处理过的切片与 α-SMA、E-cadherin、vimentin、Smad4 或 p-Smad2/3 的抗体孵育。使用 SignalStain® Boost IHC 检测试剂和 DAB 来检测结合的抗体。随机选择 6 个视野进行阳性染色评分(阳性细胞计数评分×染色强度评分)。阳性细胞计数评分如下:0:<5%, 1:5~25%, 2:26~50%, 3:51~75%, 4:>75%。染色强度评分如下:0:未染色,1:浅黄色,2:棕黄色,3:深棕色。

1.3 统计学分析

SPSS18.0 软件用于统计分析。所有结果均表示为平均值±标准差。使用单因素方差分析及 LSD 事后检验比较具有正态分布的数据。计数数据使用卡方检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 相关性肝纤维化患者肝组织中的 miR-101a 被下调

健康受试者和肝纤维化患者的年龄和性别无显著差异($P>0.05$),HBV 相关肝纤维化患者肝组织中 miR-101a 的表达水平明显低于健康受试者,并且 miR-101a 的表达水平随着患者的严重程度升高而降低($P<0.05$)。见表 2 和图 1。

2.2 miR-101a 在 TGF-β1 激活的 HSC 中下调

分别用 5.0 ng/mL TGF-β1 处理 LX-2 细胞 0、6、12 和 24 h。结果显示 miR-101a 的表达水平在 TGF-β1 激活的 LX-2 细胞中以浓度和时间依赖性方式显著下降($P<0.05$)。5 ng/mL TGF-β1 处理 LX-2 细胞 24 h 后,α-SMA、COL1A1、COL1A2 和 COL3A1

mRNA 表达水平及 a-SMA、collagen I 和 collagen III 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。该结果提示 TGF- β 1 可以刺激 LX-2

细胞的活化。见图 2 和图 3。

表 2 慢性 HBV 感染患者和健康受试者的基线资料
Table 2 Baseline data of patients with chronic HBV infection and healthy subjects

Parameter	HBV patients (n=50)					Healthy subjects (n=10)	F/ χ^2	P
	S0 (n=10)	S1 (n=10)	S2 (n=10)	S3 (n=10)	S4 (n=10)			
Age (year)	37.65± 4.53	39.32± 5.11	41.73± 4.94	38.63± 5.16	40.26± 5.13	38.23± 5.33	1.588	0.179
Gender							1.357	0.929
Male	5	6	6	7	5	5		
Female	5	4	4	3	5	5		

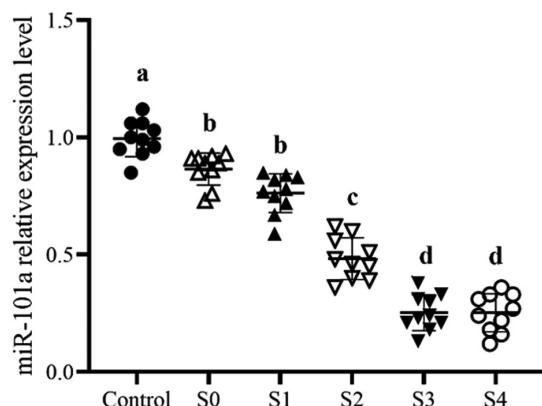


图 1 慢性 HBV 感染患者和健康受试者肝组织中的 miR-101a 水平
Fig.1 miR-101a levels in liver tissues of patients with chronic HBV infection and healthy subjects

Note: Different letters indicate comparison between groups, $P<0.05$; same letter indicates comparison between groups, $P>0.05$.

2.3 miR-101a 抑制了 HSC 活化和 ECM 的产生

结果显示,miR-101a 过表达后,LX-2 细胞中 α -SMA、COL1A1、COL1A2、COL3A1 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达水平,以及 a-SMA、collagen I、collagen III、TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 的蛋白表达水平均发生显著下调($P<0.05$)。通过转染 miR-101a 抑制剂发现 LX-2 细胞中内源性 miR-101a 的表达水

平受到显著抑制,而肝纤维化及 ECM 产生相关基因和蛋白的表达水平均发生显著上调($P<0.05$)。这些结果表明内源性 miR-101a 负向调节肝纤维化。见图 4 和图 5。

2.4 miR-101a 抑制了 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化

与 Control 组比较,CCl₄ 组大鼠肝组织中 miR-101a 的表达水平显著下降;与 Ad-control 组比较,Ad-miR-101a 组大鼠肝组织中 miR-101a 的表达水平显著升高($P<0.05$)。见图 6。

大鼠肝脏的组织病理学 H&E 染色评估结果显示,对照组大鼠的肝组织紧密,未见细胞形态改变;CCl₄ 组和 Ad-control 组大鼠肝组织肿胀、细胞空泡化、细胞肿胀坏死、伴有明显炎性细胞浸润;Ad-miR-101a 组大鼠的肝组织形态基本恢复正常。Masson 三色染色评估胶原沉积结果显示,对照组大鼠的肝组织未发生纤维化;CCl₄ 组和 Ad-control 组中出现明显的纤维化;Ad-miR-101a 组的肝组织纤维化程度低于 CCl₄ 组。见图 7。免疫组化染色检测大鼠肝脏中 α -SMA、E-cadherin、vimentin、Smad4 和 p-Smad2/3 的表达结果显示,与 Control 组比较,CCl₄ 组大鼠肝组织中 E-cadherin 的表达水平下调, α -SMA、vimentin、Smad4 和 p-Smad2/3 的表达水平上调;与 Ad-control 组比较,Ad-miR-101a 组大鼠肝组织中 E-cadherin 的表达水平上调, α -SMA、vimentin、Smad4 和 p-Smad2/3 的表达水平下调($P<0.05$)。见图 8。

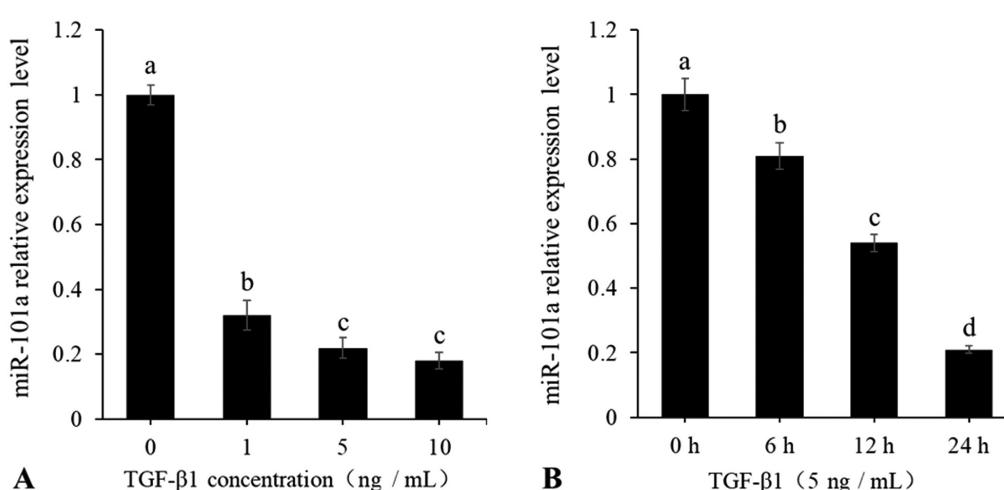
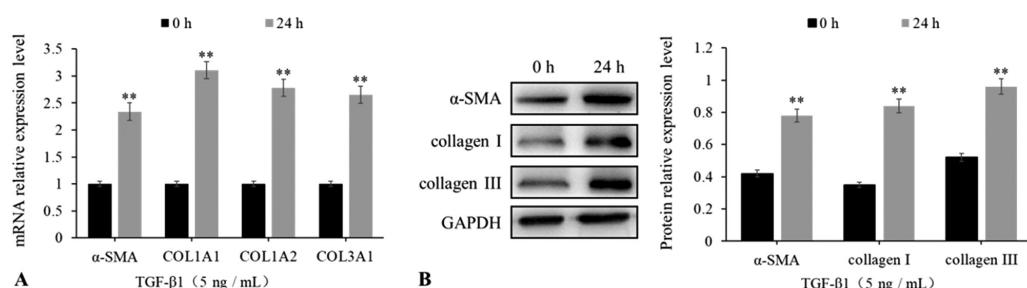
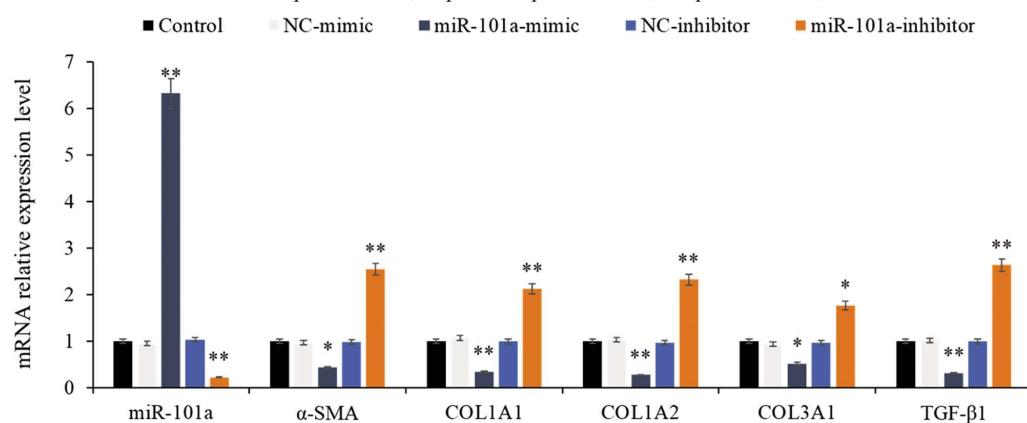
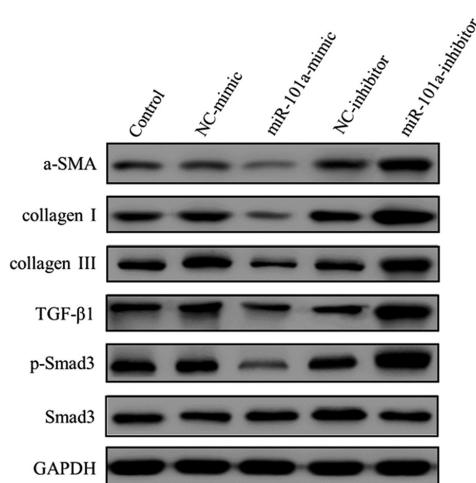
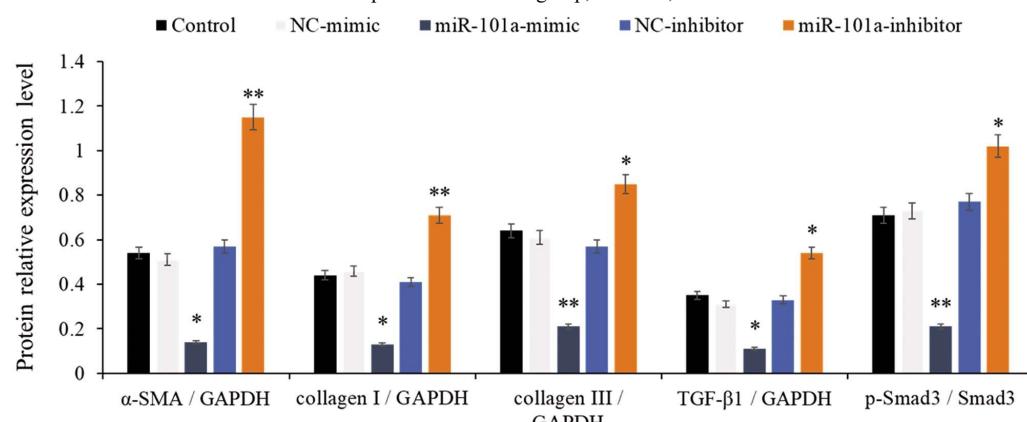


图 2 TGF-β1 处理对 LX-2 细胞中的 miR-101a 水平的影响
Fig.2 Effect of TGF-β1 treatment on the level of miR-101a in LX-2 cells

Note: A: 0, 1, 5 and 10 ng/mL TGF- β 1 treatment of LX-2 cells for 24 h; B: 5 ng/mL TGF- β 1 treatment of LX-2 cells for 0, 6, 12 and 24 h; different letters When comparing between groups, $P<0.05$; when the same letter indicates between groups, $P>0.05$.

图 3 TGF- β 1 处理对 LX-2 细胞中 α -SMA、COL1A1、COL1A2 和 COL3A1 mRNA 和 α -SMA、collagen I 和 collagen III 蛋白表达的影响Fig.3 Effect of TGF- β 1 treatment on the expression of α -SMA, collagen I and collagen III in LX-2 cellsNote: A: mRNA expression level; B: protein expression level; compared with 0 h, ** P <0.01.图 4 miR-101a 对 LX-2 细胞中 miR-101a、 α -SMA、COL1A1、COL1A2、COL3A1 和 TGF- β 1 mRNA 表达的影响Fig.4 The effect of miR-101a on miR-101a, α -SMA, COL1A1, COL1A2, COL3A1 and TGF- β 1 mRNA expression in LX-2 cellsNote: Compared with Control group, * P <0.05, ** P <0.01.图 5 miR-101a 对 LX-2 细胞中 a-SMA、collagen I、collagen III、TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达的影响Fig.5 The effect of miR-101a on the expression of a-SMA, collagen I, collagen III, TGF- β 1, Smad3 and p-Smad3 protein in LX-2 cellsNote: Compared with Control group, * P <0.05, ** P <0.01.

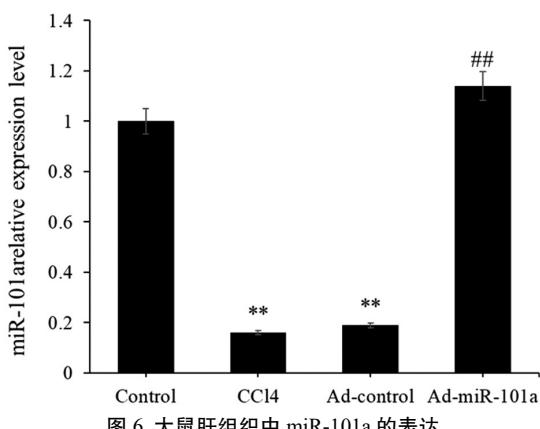


图 6 大鼠肝组织中 miR-101a 的表达

Fig.6 miR-101a expression in rat liver tissue

Note: Compared with Control group, ** $P<0.01$; compared with CCl₄ group, ## $P<0.01$.

3 讨论

miRNA 在控制多种 HSC 功能疾病中起着至关重要的作用^[11-14]。一些报道表明,miR-101a 的下调与多种纤维化疾病有关,miR-101a 具有抗心肌纤维化的作用,并且可促进活化的 HSC 逆转至静止状态^[15]。然而,目前 miR-101a 在 HBV 相关性肝纤维化中的生物学功能尚不明确。本研究发现,HBV 相关性肝纤维化患者肝组织中的 miR-101a 被下调,并且与患者的严重程度呈负相关,提示 miR-101a 可能是 HBV 相关性肝纤维化的潜在诊断标志物。

静止的 HSC 转分化为成肌纤维细胞是肝纤维化的关键,肝脏损伤后,HSC 被激活并转化为肌成纤维细胞,产生大量细胞外基质。另外 HSC 被激活后可诱导 TGF-β1 的生成。反过来,TGF-β1 也可刺激 HSC 的激活并向肌成纤维细胞转化^[16]。

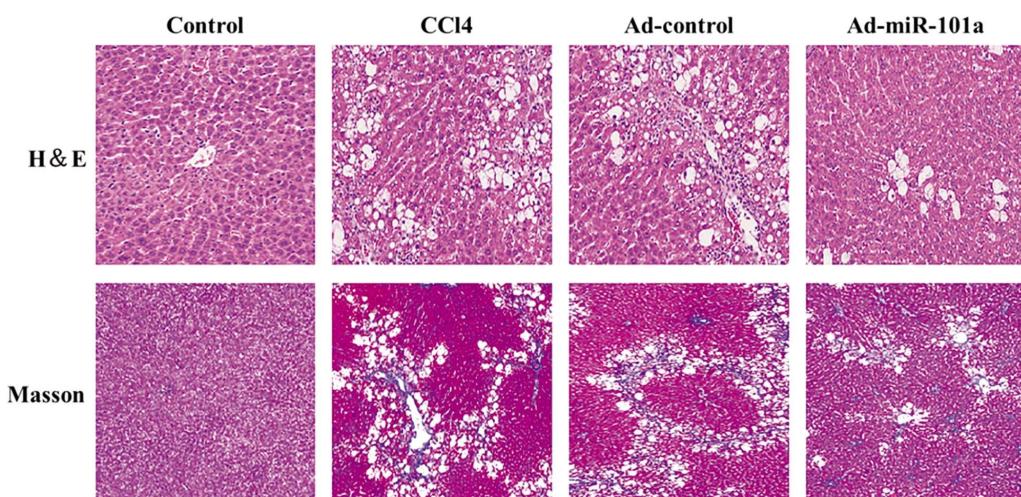


图 7 大鼠肝组织 H&E 染色和 Masson 三色染色(× 100)

Fig.7 H&E staining and Masson trichrome staining of rat liver tissue (× 100)

因此,本研究使用重组人 TGF-β1 蛋白处理人 HSC 细胞系 LX-2 细胞,发现 miR-101a 在 TGF-β1 激活的 HSC 中显著下调,并且 miR-101a 过表达下调了激活 HSC 及 ECM 产生的关键基因和蛋白表达。而抑制 miR-101a 则可逆转上述 HSC 活化及 ECM 产生相关基因和蛋白的表达变化。在体内研究中,对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠尾静脉注射携带 miR-101a 的重组腺病毒(Ad-miR-101a)抑制了大鼠肝组织病变和纤维化。这表明 miR-101a 通过抑制 HSC 的活化来靶向胶原蛋白基质合成,从而负向调节纤维化。

肝纤维化伴随着肝上皮细胞的上皮间质转化(EMT)。肝损伤后,肝细胞、HSC 和胆管细胞可被诱导进行 EMT^[17]。进行 EMT 时伴随着上皮标志物的下调,以及间质标志物的上调^[18,19]。肝细胞 EMT 有助于 ECM 的积累并促进肝纤维化的进展。最近,miRNA 被证明是 EMT 的重要调节剂,它们是靶向肝纤维化中不同信号通路的分子。例如,miR-706 在纤维化肝细胞中被下调,并被证明可以通过直接结合蛋白激酶 Cα 和 TAO 激酶 1 的 3'-非翻译区(UTR)来阻止 EMT^[20]。miR-181a 的过表达可以在体外诱导肝细胞 EMT,这种表型变化可以通过 miR-181a 抑制剂逆转^[21]。miR-21 还通过靶向和调节肝细胞核

因子 4α 的表达来促进肝细胞的 EMT^[22]。本研究发现,miR-101a 的过表达上调了 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏中 E-cadherin 的表达,但下调了间质标志物 α-SMA 和 vimentin 的表达。说明,miR-101a 的过表达可抑制 EMT,进而抑制肝纤维化。

Smad 是 TGF-β1 信号传导途径的下游分子,在 TGF-β 家族的大多数活性中都起着核心作用^[23]。在 TGF-β/Smad 信号通路中,TGF-β1 与细胞表面的 II 型 TGF-β 受体结合,促使 I 型 TGF-β 受体的聚集和磷酸化,进而磷酸化 Smad2、Smad3 的 C 末端。而 Smad4 是 Smad 信号通路必不可少的元素。Smad 信号的传递均需与 Smad4 共同构成 Smad2/3/4 复合物,该复合物将信号从细胞外环境传导至细胞核调控纤维化相关靶基因转录^[24,25]。本研究的体外实验中,miR-101a 的过表达抑制了 HSC 中 Smad3 的磷酸化水平;体内研究中,miR-101a 的过表达下调 Smad4 和 p-Smad2/3 的表达。表明 miR-101a 可能通过抑制 TGF-β/Smad 信号通路来发挥抗纤维化作用。

综上所述,本研究揭示 miR-101a 在 HBV 相关性肝纤维化患者中下调,并且 miR-101a 水平与患者的疾病严重程度呈负相关。上调 miR-101a 可在体内和体外抑制 HSC 的活化及上皮间质转化,从而发挥抗纤维化作用。miR-101a 有望成为评估

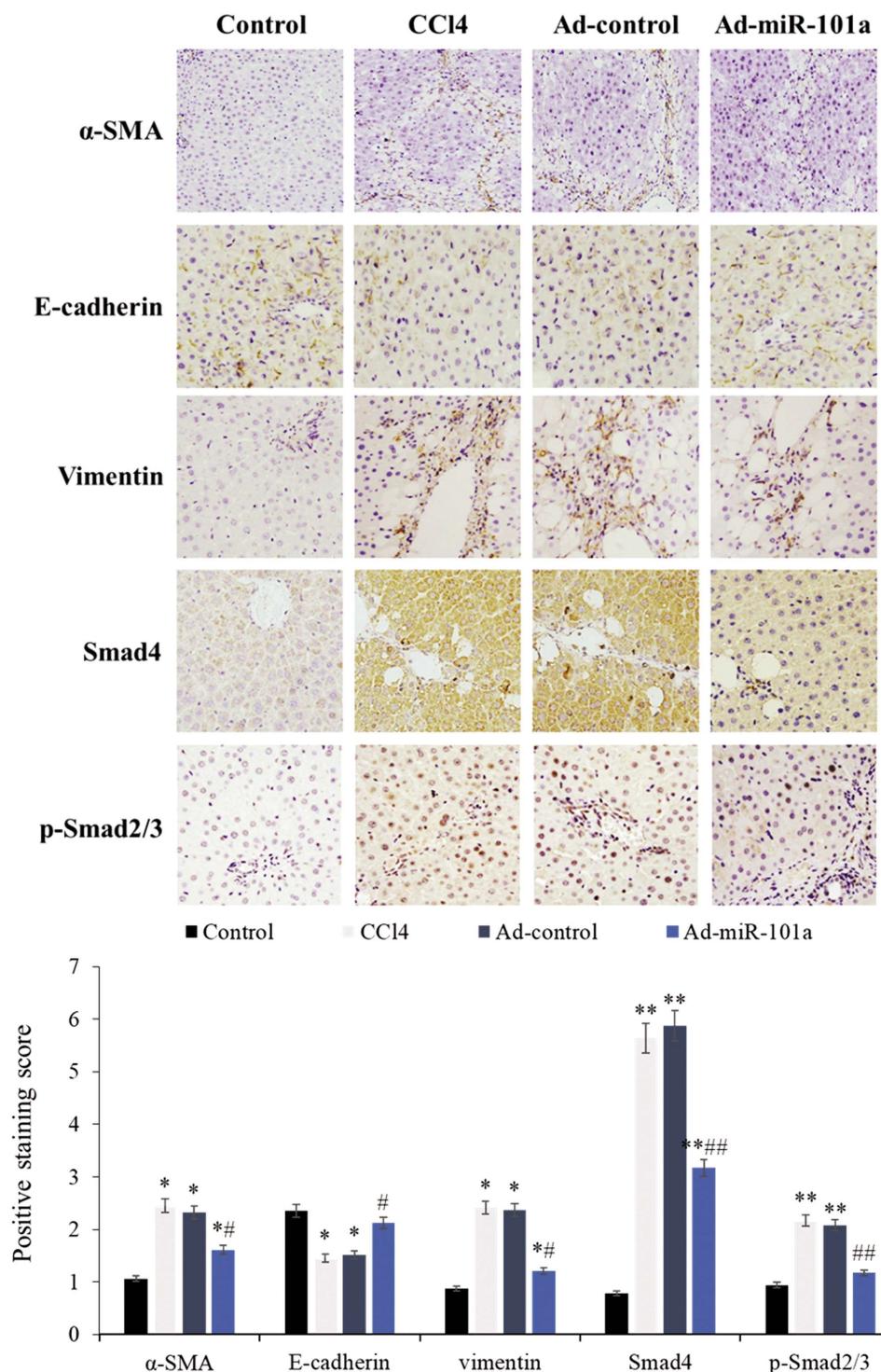


图 8 大鼠肝脏中 α -SMA、E-cadherin、vimentin、Smad4 和 p-Smad2/3 的免疫组化染色($\times 200$)

Fig.8 Immunohistochemical staining of α -SMA, E-cadherin, vimentin, Smad4 and p-Smad2/3 in rat liver ($\times 200$)

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with CCl4 group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

HBV 相关性肝纤维化严重程度和疾病进展的候选预测指标，并且有望成为肝纤维化的潜在分子靶标。

参考文献(References)

- [1] Yigit B, Boyle M, Ozler O, et al. Plasma cell-free DNA methylation: a liquid biomarker of hepatic fibrosis [J]. Gut, 2018, 67(10): 1907-1908
- [2] Lebda M A, Sadek K M, Abouzed T K, et al. Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes [J]. Life Sciences, 2018, 192: 136-143
- [3] Fan Y, Du Z, Steib CJ, et al. Effect of SEPT6 on the biological behavior of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats and its mechanism [J]. Laboratory Investigation, 2019, 99(1): 17-36
- [4] Ezhilarasan D, Sokal E, Najimi M, et al. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets [J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2018, 17(3): 192-197
- [5] Benten D, Kluwe J, Wirth J W, et al. A humanized mouse model of liver fibrosis following expansion of transplanted hepatic stellate cells [J]. Laboratory Investigation, 2018, 98(4): 525-536

- [6] Matsuura K, De Giorgi V, Schechterly C, et al. Circulating let-7 levels in plasma and extracellular vesicles correlate with hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C [J]. Hepatology, 2016, 64 (3): 732-745
- [7] Zeng C, Wang Y, Xie C, et al. Identification of a novel TGF- β -miR-122-fibronectin 1/serum response factor signaling cascade and its implication in hepatic fibrogenesis [J]. Oncotarget, 2015, 6(14): 12224-12233
- [8] Zhao X, Wang K, Liao Y, et al. MicroRNA-101a inhibits cardiac fibrosis induced by hypoxia via targeting TGF β RI on cardiac fibroblasts [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 35(1): 213-226
- [9] Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. Journal of Hepatology, 2017, 67(2): 370-398
- [10] Romanelli R G, Stasi C. Recent advancements in diagnosis and therapy of liver cirrhosis[J]. Current Drug Targets, 2016, 17(15): 1804-1817
- [11] Tao L, Xue D, Shen D, et al. MicroRNA-942 mediates hepatic stellate cell activation by regulating BAMBI expression in human liver fibrosis[J]. Archives of Toxicology, 2018, 92(9): 2935-2946
- [12] Hyun J, Wang S, Kim J E, et al. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression [J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 10993-10993
- [13] Wang J, Chu E S, Chen H, et al. microRNA-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6(9): 7325-7338
- [14] Lei G S, Kline H L, Lee C, et al. Regulation of collagen v expression and epithelial-mesenchymal transition by miR-185 and miR-186 during idiopathic pulmonary fibrosis[J]. American Journal of Pathology, 2016, 186(9): 2310-2316
- [15] Tu X, Zhang H, Zhang J, et al. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF β signalling pathway [J]. The Journal of Pathology, 2014, 234(1): 46-59
- [16] Jin X, Aimaiti Y, Chen Z, et al. Hepatic stellate cells promote angiogenesis via the TGF- β 1-Jagged1/VEGFA axis [J]. Experimental Cell Research, 2018, 373: 34-43
- [17] Choi S S, Diehl A M. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver[J]. Hepatology, 2009, 50(6): 2007-2013
- [18] Cho I J, Kim Y W, Han C Y, et al. E-cadherin antagonizes transforming growth factor β 1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA-dependent Smad3 phosphorylation [J]. Hepatology, 2010, 52(6): 2053-2064
- [19] Lee S, Kim K, Park K, et al. Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition[J]. World Journal of Hepatology, 2014, 6(4): 207-216
- [20] Yin R, Guo D, Zhang S, et al. miR-706 inhibits the oxidative stress-induced activation of PKC α /TAOK1 in liver fibrogenesis [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 37509-37509
- [21] Brockhausen J, Tay S S, Grzelak C A, et al. miR-181a mediates TGF- β -induced hepatocyte EMT and is dysregulated in cirrhosis and hepatocellular cancer[J]. Liver International, 2015, 35(1): 240-253
- [22] Wu K, Ye C, Lin L, et al. Inhibiting miR-21 attenuates experimental hepatic fibrosis by suppressing both the ERK1 pathway in HSC and hepatocyte EMT[J]. Clinical Science, 2016, 130(16): 1469-1480
- [23] Chen L, Yang T, Lu D W, et al. Central role of dysregulation of TGF- β /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 101: 670-681
- [24] Yang Y, Yang S, Chen M, et al. Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza Extract exerts anti-fibrosis by mediating TGF-beta/Smad signaling in myofibroblasts [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 118(2): 264-270
- [25] Deng M, Hou S, Tong B, et al. The Smad2/3/4 complex binds miR-139 promoter to modulate TGF β -induced proliferation and activation of human Tenon's capsule fibroblasts through the Wnt pathway [J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(8): 13342-13352