

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.32.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 32-0017-08

MicroRNA-29b 对肝纤维化及肝星状细胞增殖、凋亡的影响

王艳景, 谷征, 李圆圆

(河南大学淮河医院 感染科, 河南 开封 475000)

摘要: 目的 探究 microRNA-29b (miR-29b) 在肝纤维化过程中的作用, 以及对肝星状细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 将大鼠随机分为对照组和模型组, 每组 10 只。模型组大鼠经腹部注射 60% 3 ml/kg CCl₄ 复制肝纤维化模型; 对照组注射等量生理盐水。分别观察两组大鼠肝纤维化情况, 检测肝组织中 miR-29b、TGF-β₁、SAM3D3 基因及 TGF-β₁、SAM3D3 蛋白的表达。体外培养肝星状细胞 HSC-T6、LX-2, 转染 miR-29b siRNA, 检测 miR-29b 对 HSC-T6、LX-2 细胞增殖、凋亡的影响, 以及对 TGF-β₁、SAM3D3 表达的影响。**结果** 与对照组相比, 模型组心肌纤维比例增加, 随着时间延长, 第 6 和 12 周心肌纤维比例逐渐升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组 miR-29b 基因相对表达量降低, 随着时间延长, 模型组 miR-29b 基因相对表达量逐渐降低 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组 TGF-β₁、SAM3D3 基因和蛋白相对表达量升高; 随着时间延长, TGF-β₁、SAM3D3 基因和蛋白相对表达量逐渐升高 ($P < 0.05$)。在 HSC-T6、LX-2 细胞中, miR-29b 转染组 G₁ 期细胞比例高于空白对照组、阴性转染组, S 期细胞比例低于空白对照组、阴性转染组 ($P < 0.05$)。miR-29b 转染组 HSC-T6、LX-2 细胞凋亡率高于空白对照组、阴性转染组 ($P < 0.05$)。与空白对照组、阴性转染组相比, HSC-T6、LX-2 细胞中 TGF-β₁、SAM3D3 基因和蛋白相对表达量升高, miR-29b 基因相对表达量降低 ($P < 0.05$)。**结论** miR-29b 在肝纤维化过程中表达降低, miR-29b 可抑制肝星状细胞增殖, 诱导其凋亡。

关键词: miRNA-29b; 肝纤维化; 肝星状细胞; 细胞增殖凋亡
中图分类号: R575.2 **文献标识码:** A

Role of microRNA-29b in process of hepatic fibrosis and its influence on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells

Yan-jing Wang, Zheng Gu, Yuan-yuan Li

(Department of Infectious Diseases, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng, Henan 475000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of microRNA-29b (miR-29b) in the process of hepatic fibrosis and its influence on the proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. **Methods** The experimental rats were divided into two groups, including a control group and a model group, with 10 cases in each group. The rats in the model group were injected with 60% 3 ml/kg CCl₄ by abdominal approach, and those in the the control group were injected with the same amount of normal saline. Liver fibrosis was observed in the control group and the model group. The expressions of miR-29b, TGFβ₁ and SAM3D3 genes, the expressions of TGF-β₁ and SAM3D3 proteins were detected in the liver tissue. Hepatic stellate cells HSC-T6 and LX-2 were cultured *in vitro* and transfected with miR-29b siRNA, and the effect of miR-29b on proliferation and apoptosis of HSC-T6 and LX-2 cells, and on the expressions of TGF-β₁ and SAM3D3 were detected. **Results** Compared with the control group, the proportion of myocardial fibers increased in the model group, and with the prolongation of time that increased gradually in the 6th and 12th weeks ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative expression of miR-29b gene in the model group decreased,

收稿日期: 2018-05-14

and decreased gradually with the prolongation of time ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative expressions of *TGF β 1* and *SAMD3* genes and proteins increased in the model group, and gradually increased with the prolongation of time ($P < 0.05$). The G1-phase cell percentage of HSC-T6 and LX-2 cells in the *miR-29b* transfection group was higher than that in the control group and the negative transfection group, and S-phase cell ratio was lower than that in the control group and the negative transfection group ($P < 0.05$). The apoptosis rate of HSC-T6 and LX-2 cells in the *miR-29b* transfection group was higher than that in the control group and the negative transfection group ($P < 0.05$). Compared with the control group and the negative transfection group, the relative expression of *TGF β 1* and *SAMD3* mRNAs and proteins in HSC-T6 and LX-2 cells increased, and the relative expression of *miR-29b* mRNA decreased in the *miR-29b* transfection group ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of *miR-29b* decreases in the process of hepatic fibrosis, and *miR-29b* can inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatic stellate cells.

Keywords: *miR-29b*; hepatic fibrosis; hepatic stellate cells; cell proliferation; apoptosis

肝纤维化并非一种独立疾病,而是伴发于多种慢性肝病的肝脏病变。近年来,我国肝纤维化发病率逐渐上升,若不及时治疗,肝内纤维组织大量增生,由肝纤维化发展到肝硬化,严重威胁患者的生命健康^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活在肝纤维化发展过程中发挥重要作用^[2]。MicroRNA(miRNA)主要调控细胞的增殖、分化、凋亡。较多研究证实,miRNAs与HSC向成纤维细胞发展有关,其中miR-29b在多种肿瘤中表达下调,被认为是肿瘤抑制型miRNA^[3-4]。关于miR-29b与肝纤维化的研究已有较多报道,但是HSC中miR-29b的研究较少^[3-4]。本研究通过CCl₄复制肝纤维化模型,旨在探究miR-29b在肝纤维化过程中的作用及其对HSC的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠20只,8周龄,体重200g,由上海医科大学动物实验中心提供,合格证号:SYXK(沪)2014-0004,所有动物在统一环境中饲养,温度25℃,湿度65%,严格按照动物饲养规则进行喂养。

肝星状细胞HSC-T6、LX-2购自北京医科大学肝病研究中心,来源于美国标准生物物品收藏中心,保存于-80℃。

1.2 主要试剂与仪器

CCl₄(美国RD公司)使用前加入中性菜籽油进行稀释,调整浓度为600 ml/L。兔抗大鼠转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、SAMD3(sterile alpha motif domain containin protein 3)单克隆抗体一抗、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔二抗购自美国Santacruz公司, RNA提取试剂盒(北京生化科技有限公司),逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司),

BCA测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司), Lipofectamine™ 2000转染试剂(美国Invitrogen公司, miR-29b siRNA正向引物:5'-TGCGCTAGCACCATT TGAAATC-3';反向引物:5'-CCAGTGCAGGGTCCG AGGTATT-3'),光学显微镜(上海光学仪器厂),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(美国BioRed公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的复制 将大鼠随机分为对照组和模型组,每组10只。模型组大鼠经腹部注射60% 3 ml/kg CCl₄, 2次/周,对照组以同样方式注射等量生理盐水。在第0、6和12周,大鼠禁食12 h,腹腔注射50 mg/kg戊巴比妥钠进行麻醉,切开腹部皮肤,取出肝脏组织,留取一部分在4%多聚甲醛中固定,另一部分保存在-80℃冰箱备用。

1.3.2 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining) 大鼠肝组织行HE染色。常规制备石蜡切片浸入二甲苯固定30 min,在质量分数为100%、95%、85%和75%的乙醇溶液中分别脱水5 min,流水冲洗后,加入苏木精染色10 min,浸入1%盐酸后用蒸馏水冲洗。均加入伊红液染色3 min,依次在75%、85%、95%和100%乙醇溶液中脱水2 min,加入二甲苯透明处理,滴加中性树脂封片,放置于显微镜下观察,选取5个视野计算纤维化面积,无纤维化为0分,纤维化面积<25%为1分,25%~50%为2分,50%~75%为3分,>75%为4分。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 采用qRT-PCR检测肝组织中*miR-29b*、TGF- β_1 、SAMD3基因的表达。取出冷冻肝组织,用无菌剪刀将组织剪碎,采用RNA提取试剂盒提取肝脏总RNA,按照

逆转录试剂盒说明书进行操作, 将 RNA 逆转录为 cDNA, qRT-PCR 引物由广州 Invitrogen 公司合成, 引物序列见表 1。反应体系: $10 \times$ cDNA 模板 $1 \mu\text{l}$, 正反向引物各 $1 \mu\text{l}$, H_2O $8 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{l}$ $2 \times$ SYBR Mix。反应条件: 95°C 预变性 2 min, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 72°C 继续延伸 10 min。在 CFX manager 3.0 软件上以 GAPDH 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法行基因相对定量分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

| 基因 | 引物序列 (5' -3') | 长度 /bp |
|----------------|-------------------------------|--------|
| miR-29b | 正向: GCTAGCTTATCAGACTGATGTTGA | 223 |
| | 反向: GTAGCACCATTGAAATCAGTGT | 216 |
| TGF- β_1 | 正向: GTGGACCGCAACAACGCAATCTATG | 204 |
| | 反向: GGCCTGCTTCCCGAATGTCTGA | 206 |
| SAMD3 | 正向: CAGGGCTTTGAGGCTGTCTA | 196 |
| | 反向: CTGGCATCTTCTGTGGTTTC | 188 |
| GAPDH | 正向: TGTGTCCCTGGTGGATCTGA | 172 |
| | 反向: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG | 178 |

1.3.4 Western blot 检测 采用 Western blot 检测肝组织中 TGF- β_1 、SAMD3 的蛋白表达。将肝脏组织剪碎后加入蛋白裂解液, 在冰上反应 30 min, 离心后收集上清液, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 制备 8% 分离胶、12.5% 浓缩胶, 蛋白上样量统一为 $30 \mu\text{g}$, 电泳开始时电压设置为 80 V, 进入分离胶后, 电压调整为 120 V, 电泳结束后转移蛋白凝胶至 PVDF 膜上, 转膜反应在冰上进行, 电压设置为 100 V, 转膜反应 1 h, 加入 TBST 溶液清洗后, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温下封闭 1 h, TBST 溶液清洗 PVDF 膜, 加入一抗稀释液 (TGF- β_1 、SAMD3 抗体), 4°C 震荡过夜, PBST 清洗 3 次, 加入二抗稀释液, 室温下孵育 2 h, PBST 清洗。凝胶成像仪观察蛋白的表达。

1.3.5 miR-29b 转染 HSC-T6、LX-2 细胞 采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 置于 37°C 、5% 二氧化碳 CO_2 培养箱中培养 HSC-T6、LX-2 细胞。细胞贴壁生长后, 加入 0.25% 胰蛋白酶溶液消化, 生长至 80% 时, 加入 DMEM 培养基终止消化。将细胞随机分为空白对照组、miR-29b 转染组、阴性转染组。miR-29b 转染组、阴性转染组参照转染试剂盒分别转染 miR-29b siRNA 和无意义对照序列, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h。

1.3.6 MTT 法 采用 MTT 法检测 HSC-T6、LX-2 细胞的增殖。收集培养后的细胞制备单细胞悬浮液,

调整细胞密度为 5×10^4 个 /ml, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中分别培养 12、24、48 和 72 h, 加入 $10 \mu\text{l}$ MTT 孵育 4 h, 加入 $100 \mu\text{l}$ DMSO 溶液, 在 570 nm 波长处测定吸光度值 (OD 值)。细胞抑制率 = $(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白对照组}}) / \text{OD}_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ 。

1.3.7 流式细胞术 采用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡的变化。收集培养后的细胞制备单细胞悬浮液, 调整细胞密度为 5×10^4 个 /ml, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 当细胞生长至 80% 时, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞后加入预冷 PBS 溶液洗涤, 70% 乙醇溶液中固定 1 h, PBS 清洗, 加入 PI 染色悬液后置于流式细胞仪中检测细胞周期变化。在细胞悬浮液中加入 Annexin V-APC, 室温下黑暗中孵育 15 min, 用细胞流式仪检测细胞凋亡情况。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝纤维化状况

HE 染色结果显示, 对照组大鼠肝脏组织细胞形态正常结构完整, 呈四周放射样整齐排列; 模型组大鼠肝组织出现纤维增生, 结构遭到破坏, 存在炎症细胞浸润, 随着时间的延长肝纤维化程度逐渐加重。对照组第 0 周大鼠肝组织纤维化评分为 (0.00 ± 0.00) 分, 模型组第 0、6 和 12 周大鼠肝组织纤维化评分分别为 (0.97 ± 0.13) 、 (1.66 ± 0.15) 和 (2.57 ± 0.32) 分, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 4.032$, $P = 0.000$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, 模型组第 6 周大鼠肝组织纤维化评分高于模型组第 0 周 ($P < 0.05$); 模型组第 12 周大鼠肝组织纤维化评分高于模型组第 6 周 ($P < 0.05$)。见图 1、2。

2.2 各组大鼠肝组织中 miR-29b、TGF- β_1 、SAMD3 表达水平

对照组、模型组大鼠不同时间 miR-29b、TGF- β_1 、SAMD3 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 3、4。

2.3 miR-29b 对 HSC-T6、LX-2 细胞增殖的影响

空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 12、

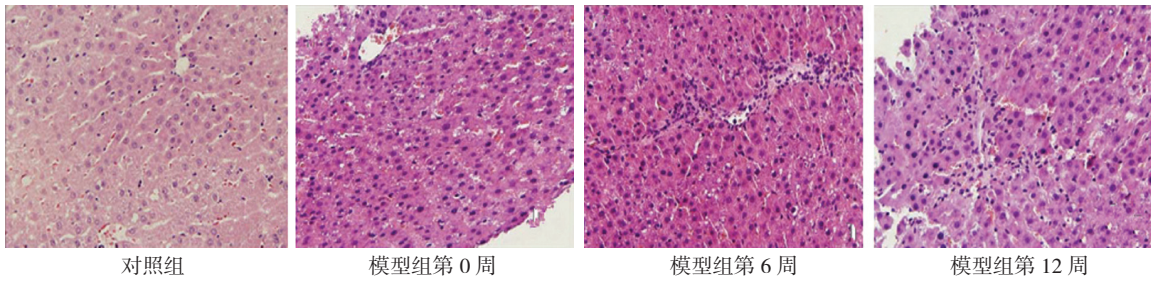
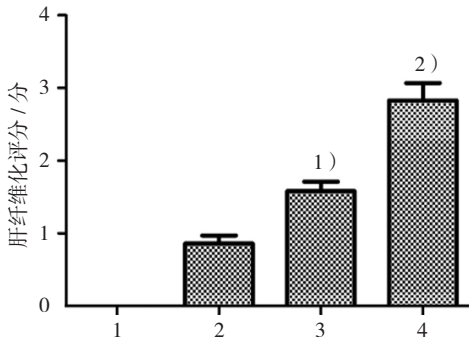


图 1 各组大鼠肝组织 (HE × 100)



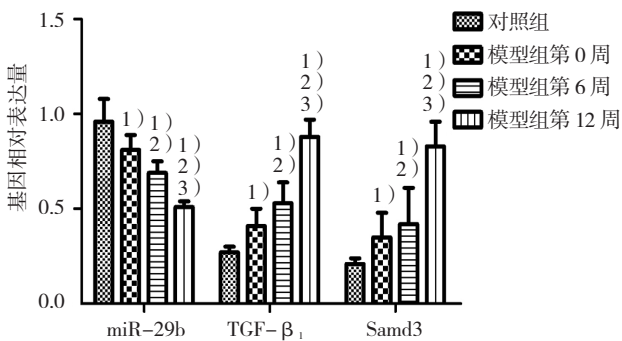
1: 对照组; 2: 模型组第 0 周; 3: 模型组第 6 周; 4: 模型组第 12 周。1) 与模型组第 0 周比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组第 6 周比较, $P < 0.05$

图 2 各组大鼠肝组织纤维化评分比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

表 2 各组大鼠肝组织中 miR-29b、TGF- β_1 、SAMd3 表达水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | miR-29b | TGF- β_1 | | SAMd3 | |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 基因 | 蛋白 | 基因 | 蛋白 |
| 对照组 | 0.98 ± 0.10 | 0.26 ± 0.04 | 0.29 ± 0.03 | 0.23 ± 0.03 | 0.36 ± 0.06 |
| 模型组第 0 周 | 0.78 ± 0.15 ¹⁾ | 0.43 ± 0.08 ¹⁾ | 0.41 ± 0.06 ¹⁾ | 0.39 ± 0.06 ¹⁾ | 0.43 ± 0.05 ¹⁾ |
| 模型组第 6 周 | 0.67 ± 0.14 ¹⁾²⁾ | 0.54 ± 0.09 ¹⁾²⁾ | 0.78 ± 0.11 ¹⁾²⁾ | 0.46 ± 0.11 ¹⁾²⁾ | 0.72 ± 0.09 ¹⁾²⁾ |
| 模型组第 12 周 | 0.52 ± 0.12 ¹⁾²⁾³⁾ | 0.82 ± 0.06 ¹⁾²⁾³⁾ | 1.12 ± 0.14 ¹⁾²⁾³⁾ | 0.76 ± 0.14 ¹⁾²⁾³⁾ | 1.17 ± 0.07 ¹⁾²⁾³⁾ |
| F 值 | 11.417 | 58.591 | 79.247 | 27.559 | 143.552 |
| P 值 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组第 0 周比较, $P < 0.05$; 3) 与模型组第 6 周比较, $P < 0.05$



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组第 0 周比较, $P < 0.05$; 3) 与模型组第 6 周比较, $P < 0.05$

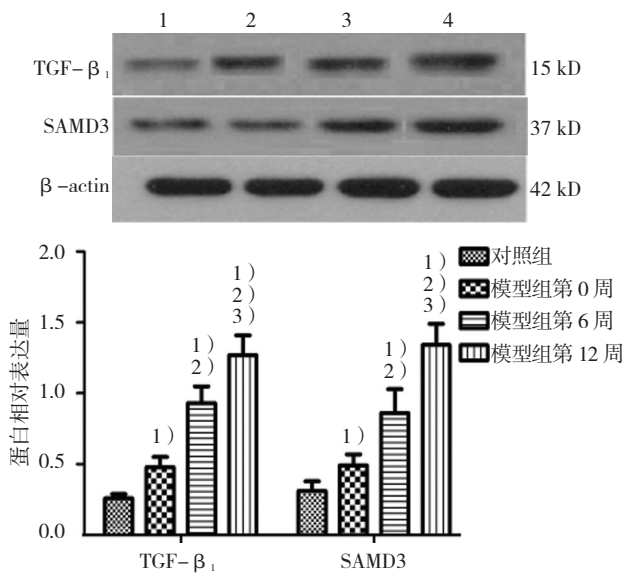
图 3 各组大鼠肝组织中 miR-29b、TGF- β_1 、SAMd3 基因表达水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

24、48 和 72 h 的 HSC-T6 细胞抑制率比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞抑制率有差别 ($F=36.675, P=0.000$); ②3 组细胞抑制率有差别 ($F=9.566, P=0.000$); ③3 组细胞抑制率变化趋势有差别 ($F=48.755, P=0.000$)。

空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 12、24、48 和 72 h 的 LX-2 细胞抑制率比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞抑制率有差别 ($F=35.258, P=0.000$); ②3 组细胞抑制率有差别 ($F=5.810, P=0.000$); ③3 组细胞抑制率变化趋势有差别 ($F=12.908, P=0.000$)。见表 3 和图 5。

2.4 miR-29b 对 HSC-T6、LX-2 细胞周期的影响

空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 HSC-T6、LX-2 细胞 G₁ 期比例比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=5.048$ 和 $3.605, P=0.014$ 和 0.041)。进一步两两比较经 SNK-q 检验, HSC-T6、LX-2 细胞 miR-29b 转染组 G₁ 期比例 [(62.34 ± 13.66)% 和 (56.83 ± 8.28)%] 均高于空白对照组 [(49.73 ± 7.56)% 和 (50.34 ± 9.65)%]、阴性转染组 [(48.23 ± 10.64)% 和 (46.79 ± 8.35)%]。见图 6。



1: 对照组; 2: 模型组第 0 周; 3: 模型组第 6 周; 4: 模型组第 12 周。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组第 0 周比较, $P < 0.05$; 3) 与模型组第 6 周比较, $P < 0.05$

图 4 各组大鼠肝组织中 miR-29b、TGF- β_1 、SAMD3 蛋白表达水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 HSC-T6、LX-2 细胞 S 期比例比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=14.091$ 和 4.418 , $P=0.000$ 和 0.022)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, HSC-T6、LX-2 细胞 S 期比例 [$(25.37 \pm 6.24)\%$ 和 $(30.36 \pm 5.47)\%$] 低于空白对照组 [$(38.51 \pm 6.64)\%$ 和 $(39.65 \pm 9.64)\%$]、阴性转染组 [$(39.76 \pm 7.23)\%$ 和 $(36.74 \pm 5.52)\%$]。见图 6。

2.5 miR-29b 对 HSC-T6、细胞凋亡的影响

空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 HSC-T6、LX-2 细胞凋亡率比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=100.553$ 和 97.438 , 均 $P=0.000$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, miR-29b 转染组 HSC-T6、LX-2 细胞凋亡率 [$(23.64 \pm 6.37)\%$ 和 $(20.13 \pm 5.26)\%$] 高于空白对照组 [$(3.16 \pm 0.87)\%$ 和 $(3.83 \pm 0.76)\%$]、阴性转染组 [$(3.07 \pm 0.75)\%$ 和 $(2.98 \pm 0.72)\%$]。见图 7。

表 3 转染后 HSC-T6、LX-2 细胞抑制率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | HSC-T6 | | | | LX-2 | | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 空白对照组 | 6.13 ± 0.87 | 6.26 ± 0.79 | 6.14 ± 0.88 | 6.28 ± 0.71 | 5.38 ± 0.62 | 5.64 ± 0.34 | 5.49 ± 0.51 | 5.52 ± 0.46 |
| 阴性转染组 | 7.41 ± 0.92 | 6.83 ± 0.89 | 6.25 ± 1.02 | 6.48 ± 0.84 | 5.83 ± 0.76 | 5.65 ± 0.77 | 5.76 ± 0.68 | 5.74 ± 0.79 |
| miR-29b 转染组 | $13.95 \pm 2.37^\dagger$ | $24.44 \pm 3.85^\dagger$ | $37.57 \pm 6.16^\dagger$ | $28.17 \pm 8.15^\dagger$ | $11.33 \pm 2.36^\dagger$ | $21.16 \pm 4.49^\dagger$ | $29.47 \pm 5.06^\dagger$ | $18.69 \pm 3.18^\dagger$ |

注: \dagger 与空白对照组、阴性对照组比较, $P < 0.05$

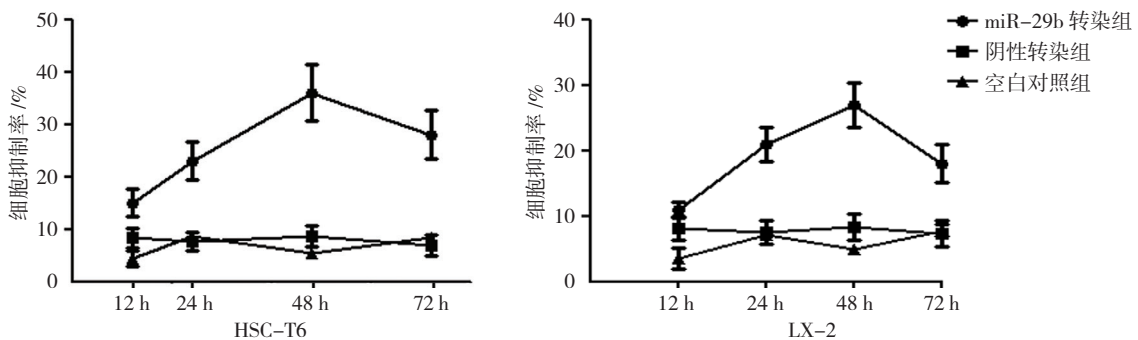


图 5 HSC-T6、LX-2 细胞抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.6 miR-29b 对 HSC-T6、LX-2 细胞中 TGF- β_1 、SAMD3 表达的影响

空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 HSC-T6 细胞中 TGF- β_1 、SAMD3 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=29.988$

和 16.315 , 均 $P=0.0000$)。空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 LX-2 细胞中 TGF- β_1 、SAMD3 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=44.951$ 和 50.643 , 均 $P=0.000$)。见表 4 和图 8。

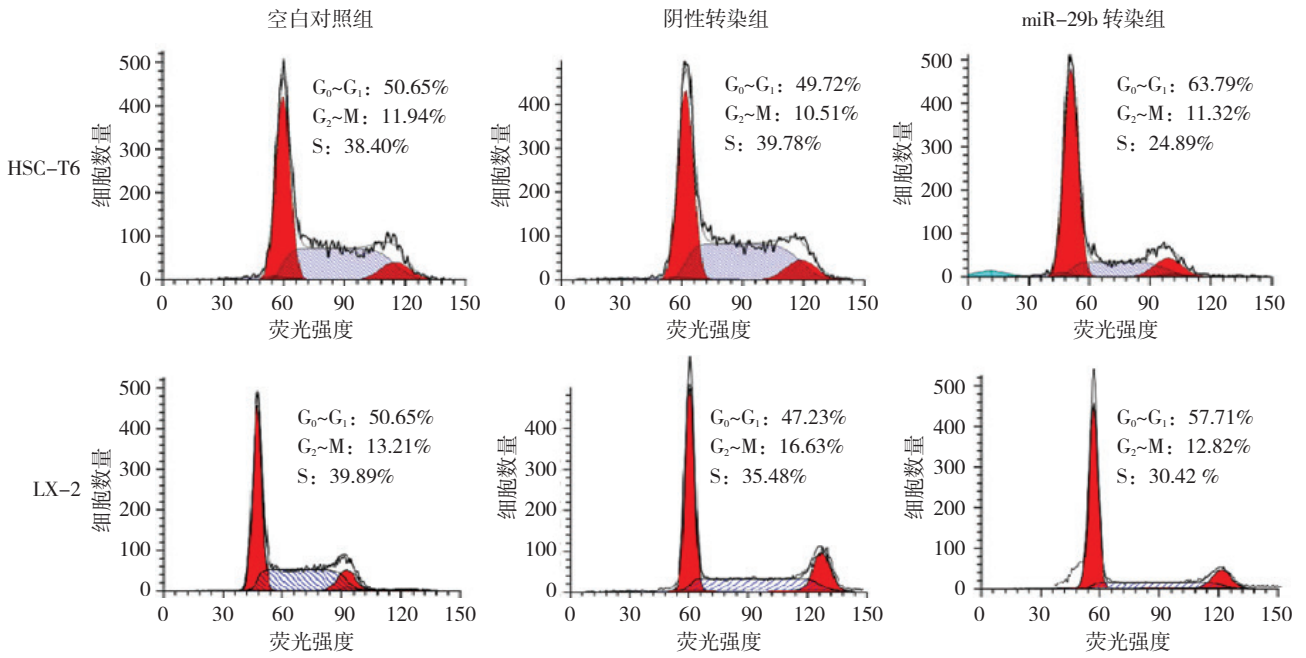


图 6 HSC-T6、LX-2 细胞周期

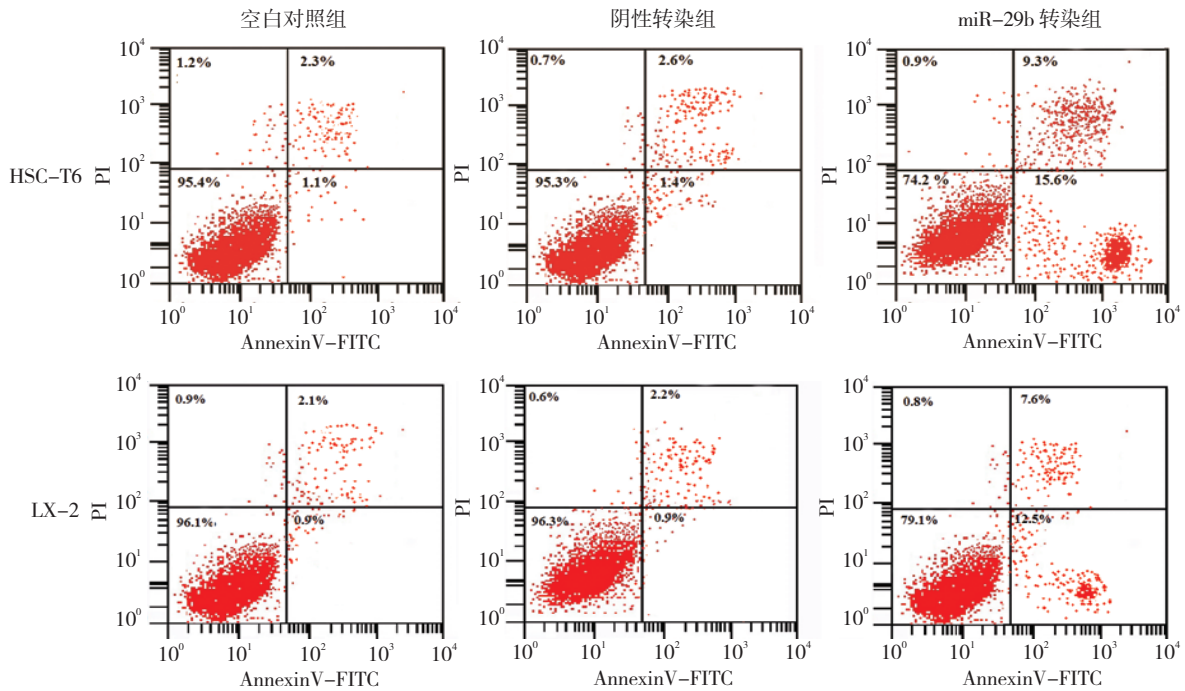


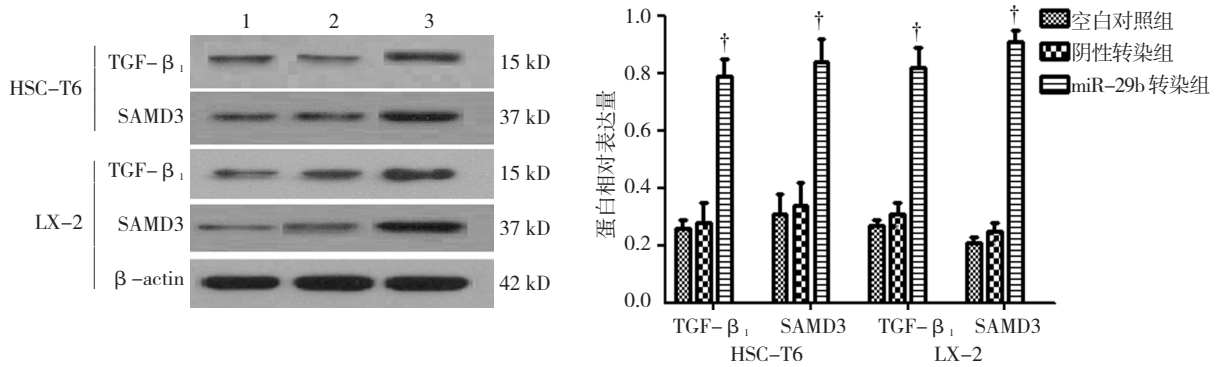
图 7 miR-29b 对 HSC-T6、LX-2 细胞凋亡的影响

表 4 HSC-T6、LX-2 细胞中 TGF-β₁、SAMD3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | HSC-T6 | | LX-2 | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | TGF-β ₁ | SAMD3 | TGF-β ₁ | SAMD3 |
| 空白对照组 | 0.28 ± 0.05 | 0.31 ± 0.04 | 0.25 ± 0.04 | 0.22 ± 0.05 |
| 阴性转染组 | 0.31 ± 0.26 | 0.30 ± 0.05 | 0.29 ± 0.05 | 0.26 ± 0.09 |
| miR-29b 转染组 | 0.82 ± 0.05 [†] | 0.88 ± 0.15 [†] | 0.78 ± 0.09 [†] | 0.94 ± 0.04 [†] |

注: † 与空白对照组、阴性对照组比较, P < 0.05

空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 HSC-T6 细胞中 miR-29b、TGF-β₁、SAMD3 基因相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (F = 10.784、21.085 和 24.096, 均 P = 0.000)。空白对照组、阴性转染组、miR-29b 转染组 LX-2 细胞中 miR-29b、TGF-β₁、SAMD3 基因相对表达量的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (F = 37.022, 30.513 和 36.648, 均 P = 0.000)。见表 5 和见图 9。



1: 空白对照组; 2: 阴性转染组; 3: miR-29b 转染组。† 与空白对照组、阴性转染组比较, $P < 0.05$

图 8 HSC-T6、LX-2 细胞中 TGF-β₁、SAMD3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

表 5 HSC-T6、LX-2 细胞中 miR-29b、TGF-β₁、SAMD3 基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | HSC-T6 | | | LX-2 | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | miR-29b | TGF-β ₁ | SAMD3 | miR-29b | TGF-β ₁ | SAMD3 |
| 空白对照组 | 0.82 ± 0.05 | 0.36 ± 0.04 | 0.29 ± 0.04 | 0.86 ± 0.65 | 0.33 ± 0.04 | 0.23 ± 0.05 |
| 阴性转染组 | 0.80 ± 0.09 | 0.738 ± 0.05 | 0.31 ± 0.05 | 0.79 ± 0.87 | 0.34 ± 0.05 | 0.26 ± 0.09 |
| miR-29b 转染组 | 0.42 ± 0.05 [†] | 0.80 ± 0.03 [†] | 0.79 ± 0.15 [†] | 0.35 ± 5.37 [†] | 0.78 ± 0.09 [†] | 0.75 ± 0.04 [†] |

注: † 与空白对照组、阴性对照组比较, $P < 0.05$

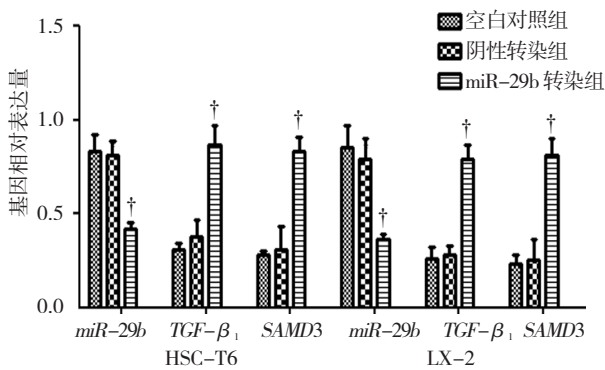


图 9 HSC-T6、LX-2 细胞中 miR-29b、TGF-β₁、SAMD3 基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

肝纤维化主要由不同因子共同作用下破坏肝细胞外基质降解、分泌的平衡状态, 导致细胞外基质逐渐沉积于肝细胞间造成肝脏损伤。引起肝纤维化的因素较多, 一般能够引起慢性肝病的因素均能导致肝纤维化。研究显示, 其病因主要包括感染性、代谢缺陷、化学毒性、免疫性肝病等方面^[5]。近年来肝纤维化研究取得了较好的成果, 较多临床研究证实肝硬化能够逆转, 其中 HSC 在逆转过程中发挥重要作用, 并且 miRNA-29b 也参与其中^[6]。最新研究证实, 在肝硬化恢复阶段激活后的 HSC 主要通过凋亡机制进行调节^[7]。因此, 了解肝纤维化的形成机制、HSC 凋亡机制,

以及与 miRNA-29b 的关系对肝纤维化临床治疗具有一定的参考意义。

miRNA 属于内源非编码单恋分子, 通过与靶基因 mRNA 上 3' 配对结合抑制 mRNA 的转录。最近研究发现, miRNA 与肿瘤的发生、发展密切相关, 参与肿瘤增殖、周期改变及迁移侵袭^[8]。miR-29b 基因属于 microRNA 一员, 在胚胎组织中几乎不表达, 在成熟组织细胞中广泛表达。较多研究显示, miR-29b 在肺癌、卵巢癌等肿瘤组织中表达下调^[9]。临床研究显示, 与正常人相比, 肝病患者血清 miR-29b 水平降低, 且降低程度与病情严重程度呈正相关, 表明 miR-29b 参与肝纤维化病程的发展^[10]。体外研究显示, 上调 miR-29b 能够促进胶原纤维生成, 使星状细胞发生活化, 加速胞外基质的生成^[11]。国内外研究证实, TGF-β₁/SAMDs 通路参与肝纤维化形成过程, TGF-β₁ 与细胞膜受体结合后发生磷酸化, 通过 SAMD3 等信号分子进入细胞核中, 与转录因子结合进行基因调控^[12-13]。动物研究发现, TGF-β₁ 刺激 HSC 后 miR-29b 过表达, SAMD3 受抑制表达量下降, 说明 miR-29b 可能位于 TGF-β₁/SAMDs 通路上游^[14]。本研究为证实 miR-29b 在肝纤维化中的作用, 通过 HE 染色发现肝组织随着模型复制时间的延长, 纤维化比例逐渐升高, 表明模型复制成功, 大鼠肝脏组织逐渐形成纤维化, 且组织病变特征符合肝纤维化病理特征。本研究结果显示在

纤维化形成过程中, *miR-29b* 基因表达水平逐渐降低, *TGF- β ₁*、*SAMD3* 表达水平逐渐升高, 推测抑制 *miR-29b* 的表达能够增强 *TGF- β ₁*/*SAMDs* 信号通路, 进而促进肝纤维化, 与国内学者研究结果相似^[15]。

正常状态下, HSC 为静止状态, 当肝脏受到刺激后迅速激活 HSC, 数量迅速升高, 生成大量纤维细胞, 破坏细胞外基质合成、降解^[16]。在肝纤维化恢复阶段, 活化 HSC 数量明显降低, 诱导 HSC 凋亡^[17]。国外学者研究显示, *miR-15b* 可以下调线粒体凋亡蛋白 *Bcl-2*, 上调 *Caspase-3*, 诱导 HSC 细胞凋亡^[18]。细胞周期检测结果显示, *miR-16* 能够抑制周期蛋白 *D1* 表达, 使其在 *G₁* 期增殖受阻滞, 抑制细胞增殖, 诱导凋亡^[19]。体外研究结果显示, 促纤维化细胞因子能够使 HSC 中 *miR-21* 上调, 进而促进 *PTEN* 的表达, 抑制 HSC 激活诱导其凋亡^[20]。国外相关研究结果显示, *miR-29b* 为肿瘤抑制因子, 能够抑制肿瘤细胞增殖, 诱导凋亡, 同时抑制细胞侵袭能力^[21]。国内研究报道, *miR-29b* 能够通过抑制 *PTEN* 基因促进乳腺癌细胞迁移、凋亡^[22]。本研究结果表明, 转染 *miR-29b* 后 HSC-T6 细胞增殖明显受到抑制, 尤其在 48 h 时抑制最为明显。流式细胞仪检测结果显示, 细胞在 *G₁* 期增殖受到阻滞, *G₁* 期细胞数高于空白对照组、阴性转染组, 而 *S* 期细胞数量降低。细胞流式仪检测结果显示, 细胞凋亡率增加, 提示转染 *miR-29b* 后能够抑制 HSC-T6、*LX-2* 细胞增殖, 诱导 HSC-T6、*LX-2* 细胞早期凋亡, 抑制肝纤维化。

本研究也存在一定的局限性, 选取的模型时间较少, 后期需要设置不同时间的模型组进一步验证, 此外并未对肝纤维化大鼠进行给药治疗, 以便探究 *miR-29b* 在肝纤维化恢复期的作用。总之, 随着大鼠肝纤维化加重, *miR-29b* 表达量逐渐降低, 可抑制肝星状细胞增殖, 诱导凋亡。

参 考 文 献:

- [1] 范慧宁, 陈尼维. 肝纤维化的流行病学研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2014, 34(1): 29-31.
- [2] 劳远翔, 贺福初, 姜颖. 肝星状细胞的去活化机制与抗肝纤维化治疗 [J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(1): 77-80.
- [3] 王红艳, 郑少秋, 涂永生, 等. 肺癌转移相关 microRNA *miR-29b* 的生物信息学分析 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(16): 1021-1025.
- [4] MELO S A, KALLURI R. *miR-29b* moulds the tumour microenvironment to repress metastasis[J]. *Nature Cell Biology*, 2013, 15(2): 139-140.
- [5] 曾璐, 周本杰. 肝纤维化发病机制和治疗方法的研究进展 [J]. 广东医学, 2014, 35(24): 3918-3921.
- [6] 汪丽娜, 叶华山, 郑敏, 等. 2 型糖尿病肝纤维化大鼠中 *microRNA-29b* 的表达变化 [J]. 湖北科技学报 (医学版), 2016, 30(5): 375-377.
- [7] 汪应红, 王欢, 左龙泉, 等. 自噬在内质网应激诱导的肝星状细胞凋亡中的作用研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(8): 1115-1119.
- [8] 杜叶平, 吴洁, 苗晋华. Micro RNA 对肿瘤基因的调控及其临床意义的研究进展 [J]. 肿瘤研究与临床, 2013, 25(6): 426-428.
- [9] STEELE R, MOTT J L, RAY A R B. *MBP-1* upregulates *miR-29b* that represses *Mcl-1*, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells[J]. *Genes Cancer*, 2015, 1(4): 381.
- [10] 郑建建, 俞富军, 董培红, 等. 血清微小 RNA-29b 在原发性肝癌患者中的表达及意义 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(12): 888-891.
- [11] 王春梅, 刘玉刚, 白波. *miR-29* 表达载体的构建及在 HBV 相关肝癌中靶基因的初步鉴定 [J]. 济宁医学院学报, 2012, 35(4): 243-247.
- [12] QU Y, ZONG L, XU M, et al. Effects of 18 α -glycyrrhizin on *TGF- β 1*/*Smad* signaling pathway in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis[J]. *International Journal of Clinical Experimental Pathology*, 2015, 8(2): 1292-1296.
- [13] 邱建利, 柴玉娜, 李悦, 等. 加味茵陈四逆汤含药血清对 *TGF- β 1* 干预的大鼠肝星状细胞 *TGF- β 1*/*Smads* 通道及胶原蛋白的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 21(13): 142-145.
- [14] 詹迪迪, 李飞龙, 李俊, 等. 玉屏风多糖对 *TGF- β 1* 诱导的肝星状细胞增殖的作用及与 *Smads* 通路的关系 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(9): 886-889.
- [15] 曹海军, 王牡丹, 李善高, 等. 大鼠肝纤维化形成过程中肝组织 *miR-21*、*miR-29b*、*TGF- β 1*、*Smad3* 及 *Smad7* 水平的动态变化 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(12): 911-915.
- [16] 吴义春, 吴强, 杨雁, 等. 肝组织中 *NF- κ B*、*TGF- β 1* 及其 I 型受体 mRNA 和 HSC 在肝纤维化中的改变及护肝片对其的影响 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 20(3): 212-219.
- [17] 江远, 张玲, 邓远绮, 等. 不同铁负载水平影响肝星状细胞活化和凋亡的抗肝纤维化机制研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(6): 369-373.
- [18] WANG Q, DU H, LI M, et al. *MAPK* signal transduction pathway regulation: a novel mechanism of rat HSC-T6 cell apoptosis induced by FUZHENGHUAYU tablet[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013(3): 697-715.
- [19] ZHANG D S, LI Y Y, CHEN X J, et al. *BCL2* promoter methylation and *miR-15a/16-1* upregulation is associated with sanguinarine-induced apoptotic death in rat HSC-T6 cells[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2015, 127(1): 135-144.
- [20] 孙世波, 王瑾, 冯亮. *miRNA-21* 在肝硬化过程中表达的变化 [J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(12): 2126.
- [21] BI S, CHU F, WANG M, et al. *Ligustrazine-oleanolic acid glycine derivative*, G-TOA, selectively inhibited the proliferation and induced apoptosis of activated HSC-T6 cells[J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1599-1605.
- [22] 王晨. *microRNA-29b* 对人乳腺癌迁移和凋亡的影响研究 [D]. 南京: 南京大学, 2010.

(童颖丹 编辑)