

MicroRNA-484 通过靶向肝星状细胞中 Fis1 调控肝纤维化进程

张利芬[△], 李彬彬[△], 余宏宇*

第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨微 RNA-484 (miR-484) 对肝纤维化发生和发展过程中关键细胞肝星状细胞(HSC)的作用和影响。**方法** 以前期芯片筛选结果为基础, 通过细胞转染人为干预 miR-484 在 HSC-T6 细胞株中的表达。利用 qPCR、蛋白质印迹法检测肝纤维化及凋亡相关指标的表达变化; 以 Annexin V-FITC/PI 双染细胞后, 用流式细胞仪检测 miR-484 对细胞凋亡的影响。**结果** 与对照组相比, 人为下调 miR-484 在 HSC-T6 细胞株中的表达后, 其靶基因 *Fis1* 及促凋亡因子 caspase-3 在 mRNA 和蛋白水平的表达均升高 ($P < 0.05$), 凋亡抑制因子 Bcl-2 表达下降 ($P < 0.05$); 流式细胞仪检测到 HSC-T6 细胞凋亡率升高 $[(32.81 \pm 3.21)\% \text{ vs } (57.54 \pm 6.76)\%, P < 0.05]$; 同时肝纤维化相关指标 α -平滑肌肌动蛋白、I 型胶原的 mRNA 和蛋白水平均下调 ($P < 0.05$)。**结论** miR-484 通过靶向 *Fis1* 抑制 HSC 凋亡、促进其活化, 从而促进肝纤维化的发生和发展。

[关键词] 微 RNA-484; 线粒体分裂蛋白 1; 肝纤维化; 肝星状细胞; 活化; 细胞凋亡

[中图分类号] R 575.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)09-1146-06

MicroRNA-484 regulates liver fibrosis course through targeting Fis1 in hepatic stellate cells

ZHANG Li-fen[△], LI Bin-bin[△], YU Hong-yu*

Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of microRNA-484 (miR-484) on hepatic stellate cells (HSCs), the key cell in the occurrence and development of liver fibrosis, and to investigate the functions. **Methods** On the basis of our previous microarray analysis results, we transfected HSC-T6 cell lines with miR-484 inhibitor to intervene the expression of miR-484 *in vitro*. The expressions of mRNA and proteins related to liver fibrosis and apoptosis were detected by qPCR and Western blotting, respectively. The cell apoptosis with Annexin V-FITC/PI double staining was determined by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the mRNA and protein expression of miR-484-targeted gene *Fis1* and proapoptotic factor caspase-3 were both significantly up-regulated ($P < 0.05$), and apoptosis inhibitory factor Bcl-2 was significantly down-regulated ($P < 0.05$) in the HSC-T6 cells transfected with miR-484 inhibitor; the apoptosis rate of HSC-T6 cells was significantly increased $[(32.81 \pm 3.21)\% \text{ vs } (57.54 \pm 6.76)\%, P < 0.05]$, and α -smooth muscle actin and collagen type I were both significantly down-regulated ($P < 0.05$) in the HSC-T6 cells transfected with miR-484 inhibitor. **Conclusion** MiR-484 promotes the occurrence and progress of liver fibrosis through inhibiting the apoptosis and promoting the activation of HSCs by targeting *Fis1*.

[Key words] microRNA-484; mitochondrial fission 1 protein; liver fibrosis; hepatic stellate cell; activation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(9): 1146-1151]

肝纤维化是多种慢性肝病的共同病理过程, 可由各型病毒性肝炎和其他损伤因素引起, 最初可无症状表现, 部分经过 20~40 年左右发展成为预后极差的肝硬化甚至肝癌^[1]。肝纤维化的早期诊治是该领域的重中之重^[2]。目前肝穿刺活组织检查仍为诊

断肝纤维化的金标准, 但因其有创性而得不到广泛、及时的实施。微 RNA (microRNA, miRNA) 是大小约 20~25 个核苷酸序列的小分子片段, 研究表明 miRNA 与肝纤维化发生密切相关, 可通过影响肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 状态而在肝纤维

[收稿日期] 2017-05-19 **[接受日期]** 2017-06-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81370553)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81370553)。

[作者简介] 张利芬, 硕士生。E-mail: zlf9095@163.com; 李彬彬, 主治医师。E-mail: libinbin286@126.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors)。

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81886121, E-mail: yuhongyu795@hotmail.com

化进程中起重要作用^[3]。近年来研究发现,miRNA可随脂质小体释放入血并受其保护而不被降解,使其稳定游走于血液与细胞之间,并通过改变相应靶基因的表达水平发挥作用^[4]。而在循环血液中,亦有包括 miR-122、miR-125a-5p、miR-181b 等在内的多种 miRNA 呈显著性差异表达,在一定程度上反映了肝纤维化是否已发生以及其进展状况,为肝纤维化的无创性防治研究提供了新的视角^[5-7]。

本课题组前期工作中通过芯片技术筛选了肝纤维化动物模型血液中差异表达的 miRNA,结果显示 miR-484 在肝纤维化动物循环血中显著下调,提示 miR-484 或许在肝纤维化发生、发展中具有重要作用^[8]。研究发现,miR-484 能够通过与其 Fis1 (mitochondrial fission 1 protein)的氨基酸编码序列结合而抑制其翻译,并在心肌细胞和肾上腺皮质癌细胞中抑制 Fis1 调控的线粒体分裂和凋亡^[9]。本研究探讨了 miR-484 靶向 Fis1 对 HSC 生物学功能的影响,为肝纤维化诊疗提供新的分子靶标。

1 材料和方法

1.1 HSC-T6 细胞培养 HSC-T6 细胞株购自美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection, ATCC),用含 10% 胎牛血清 (FBS, Gibco)的 DMEM 培养液置于 37 °C 细胞培养箱 (Thermo)中培养,隔天换液,待细胞生长到铺满培

养皿 (Corning)80%~90%时可进行传代。

1.2 细胞转染 使用广州锐博生物技术有限公司的 riboFect™ CP 转染试剂进行核酸分子 miRNA NC(阴性对照组)或 miR-484 inhibitor 的转染,转染步骤按照说明书操作进行,空白对照组不转染核酸分子。miRNA NC 是与其他任何 miRNA 不具有同源性的 miR-22(广州锐博生物技术有限公司),miR-484 inhibitor(广州锐博生物技术有限公司)是一种即用型的、经过化学修饰的成熟 miRNA 互补单链,可有效抑制 miR-484 的表达,序列为 5'-AUC GGG AGG GGA CUG AGC CUG A-3'。转染 24 h 后,用 riboMONITOR 转染指示剂(广州锐博生物技术有限公司)避光染色,检测转染效率。

1.3 RNA 抽提、反转录及 qPCR HSC-T6 转染 24 h 后换液,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 24 h,TRIzol 法 (Invitrogen) 进行总 RNA 提取。分别参照广州锐博生物技术有限公司反转录试剂盒及 TaKaRa 反转录试剂盒说明书,将 miRNA 及普通 RNA 以 20 μL 体系反转录为 cDNA。利用 SYBR Green 试剂盒 (TaKaRa) 20 μL 反应体系和 Applied Biosystems 7900 型 PCR 仪进行 qPCR。反应条件:95 °C 10 min; 95 °C 15 s、60 °C 60 s,40 个循环,在 75~95 °C 条件下进行熔解曲线分析。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Tab 1 Gene-specific primers for the qPCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Product length (bp)
miR-484	RT: CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG ATC GGG AG Forward: ACA CTC CAG CTG GGT CAG GCT CAG TCC CCT Reverse: TGG TGT CGT GGA GTC G	
U6	RT: CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG CAT CAG AT Forward: GGG CTG TAC TGA CTT GAT GA Reverse: TGG TGT CGT GGA GTC G	
Fis1	Forward: TGA ATA CGC CTG GTG CCT GGT T Reverse: ATC CCG CTG CTC CTC TTT GCT A	109
Caspase-3	Forward: GCG GTA TTG AGA CAG ACA GTG GAA C Reverse: GCG GTA GAG TAA GCA TAC AGG AAG T	91
Bcl-2	Forward: TCC TTC CAG CCT GAG AGC AAC C Reverse: CGA CGG TAG CGA CGA GAG AAG T	173
α-SMA	Forward: GCC ACT GCT GCT TCC TCT TCT T Reverse: CCG CCG ACT CCA TTC CAA TGA A	136
Col I	Forward: GCT CGT GGA TTG CCT GGA ACA G Reverse: CAC CGA CAG CAC CAT CGT TAC C	235
β-Actin	Forward: CAC TAT CGG CAA TGA GCG GTT CC Reverse: CAG CAC TGT GTT GGC ATA GAG GT	154

1.4 细胞凋亡检测 用 Annexin V-FITC/PI 双染法区分活细胞、早期凋亡细胞和死亡细胞。收集处理后的细胞悬液, PBS 洗 2 次, 用 1× 结合缓冲液调整细胞密度为 1×10^6 /mL, 加 5 μ L FITC 和 5 μ L PI, 轻轻涡旋, 避光室温孵育 15 min, 最后加入 400 μ L 1× 结合缓冲液, 在 1 h 内利用流式细胞仪(贝克曼库尔特有限公司)检测凋亡率。

1.5 蛋白质印迹分析 用 PMSF 裂解细胞, 提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度。行 SDS-PAGE, 浓缩胶电压 75 V, 分离胶电压 120 V, 适时终止。使用 PVDF 膜(Millipore)进行转膜, 5% 脱脂奶粉(0.5% TBST 配制)封闭 1 h, 然后分别加入一抗和二抗(Abcam)进行孵育。滴加 ECL 发光液, 置于凝胶成

像仪(Bio-Rad Multilmager)中曝光、显影。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HSC-T6 细胞中 miR-484 inhibitor 的转染效率 以 125 nmol/L 的浓度将 miR-484 inhibitor 转染 HSC-T6 细胞, 转染效率达 90% 以上(图 1)。qPCR 检测结果显示, 转染了 miR-484 inhibitor 的细胞中 miR-484 的表达相较阴性对照组下降了 92.42%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而空白组与阴性对照组比较差异无统计学意义(图 2)。

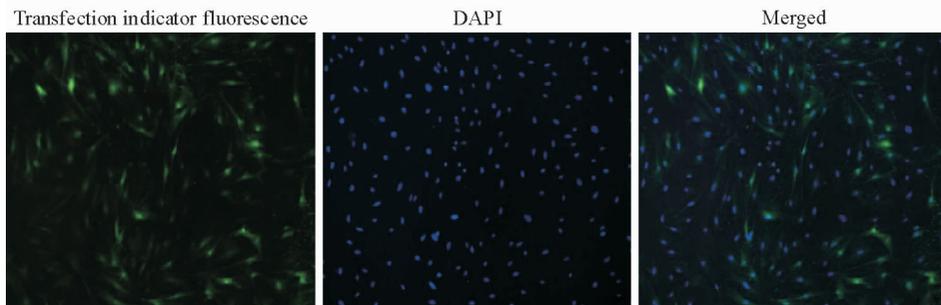


图 1 转染指示剂检测转染效率

Fig 1 Transfection efficiency detected by transfection indicator

The green fluorescence indicated that the cells were successfully transfected, the rate of transfection was more than 90%. DAPI: 4', 6-Diamidino-2-phenylindole. Original magnification: $\times 200$

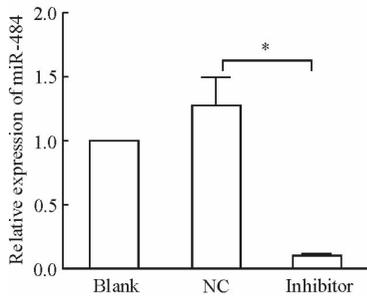


图 2 转染 miR-484 inhibitor 后 miR-484 表达下降 (qPCR 检测结果)

Fig 2 MiR-484 down-regulated after transfected with inhibitor by qPCR

NC: Negative control. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 *Fis1* 为 miR-484 的靶基因 qPCR 提示, 相较阴性对照组, miR-484 inhibitor 组 *Fis1* 和 *caspase-3* mRNA 的表达量分别升高至 1.56 倍和 1.88 倍, 而 *Bcl-2* mRNA 的表达量下降了 72.67%, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 蛋白质印迹结果与 qPCR 结果一致(图 3)。提示 *Fis1* 为 miR-484 的靶基因。

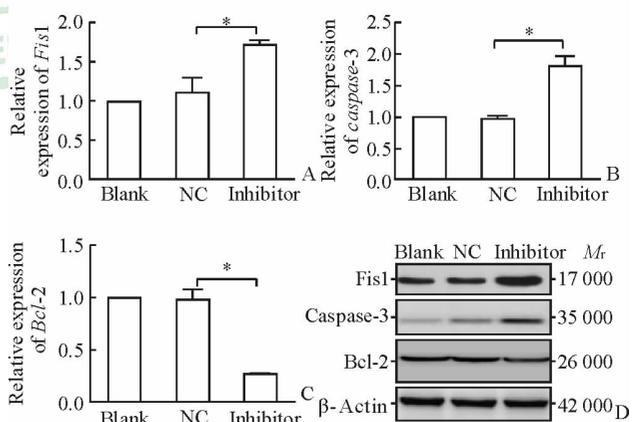


图 3 下调 miR-484 后 *Fis1*、*caspase-3* 和 *Bcl-2* 的表达变化
Fig 3 Changes of *Fis1*, *caspase-3* and *Bcl-2* expression after transfected with miR-484 inhibitors

A, B, and C: *Fis1*, *caspase-3*, and *Bcl-2* mRNA expression in different groups detected by qPCR assay; D: The protein expression of *Fis1*, *caspase-3*, and *Bcl-2* in different groups detected by Western blotting. NC: Negative control; *Fis1*: Mitochondrial fission 1 protein. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 下调 miR-484 后纤维化指标降低 qPCR 结果显示,相对于阴性对照组,miR-484 inhibitor 组 HSC-T6 中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 I 型胶原(Col I)的 mRNA 表达量分别降低了 43.73% 和

65.43%,差异有统计学意义($P < 0.05$);蛋白质印迹结果与 qPCR 结果一致(图 4)。提示 HSC-T6 活化减少,纤维化指标降低。

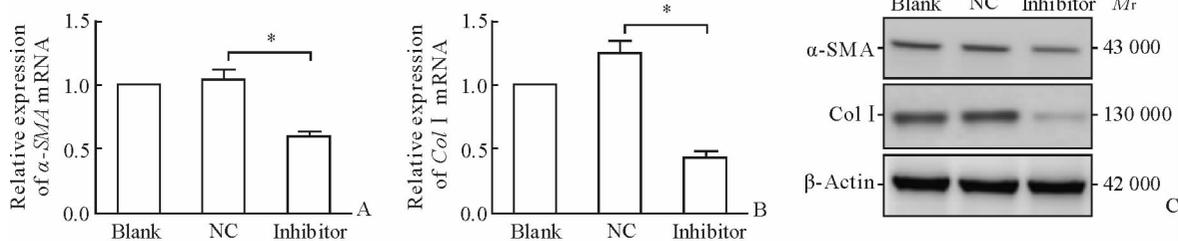


图 4 下调 miR-484 后 α -SMA 和 Col I 表达下降

Fig 4 α -SMA and Col I expression were decreased when miR-484 were down-regulated

A, B: α -SMA and Col I mRNA expressions in different groups detected by qPCR; C: The protein expressions of α -SMA and Col I in different groups detected by Western blotting. α -SMA: α -Smooth muscle actin; Col I: Collagen type I; NC: Negative control. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 下调 miR-484 后 HSC-T6 凋亡率升高 利用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测转染 miR-484 inhibitor 48 h 后细胞凋亡的改变,结果发现空白对照组细胞凋亡率为 (37.27 \pm 2.94)%,阴性对照组为

(32.81 \pm 3.21)%, miR-484 inhibitor 组为 (57.54 \pm 6.76)% (图 5)。空白对照组和阴性对照组差异无统计学意义($P = 0.15$),而 miR-484 inhibitor 组细胞凋亡率高于阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

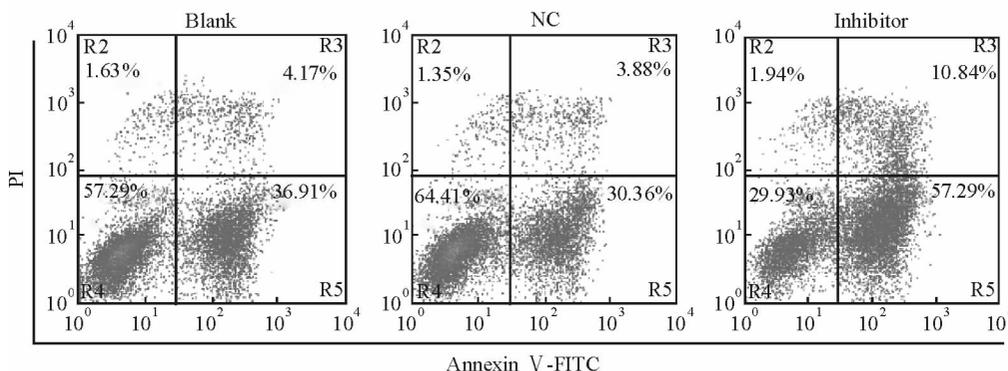


图 5 miR-484 下调时 HSC-T6 细胞凋亡率升高

Fig 5 Apoptosis rate was increased when miR-484 were down-regulated

PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate; NC: Negative control

3 讨论

因肝穿刺的有创性,肝纤维化的早期诊断成为临床上面临的一大难题。在基础研究中,研究者们更倾向于寻找有效的无创性诊疗方法^[10]。目前已有多种研究表明 miRNA 与肝纤维化发生密切相关,miRNA 可通过影响 HSC 状态而在肝纤维化进程中起重要作用^[11]。HSC 活化、增殖是肝纤维化发生、发展的关键环节。各种细胞因子包括转化生长因子(TGF)、血小板源性生长因子(PDGF)等促进 HSC 的活化,miRNA 在 HSC 活化过程中同样起着重要作用^[3, 12]。近年来循环血液中 miRNA 的表达

变化与疾病发生、发展的关系在多个研究领域受到重视。研究发现循环血液中 miRNA 可作为无创性血液学指标,在疾病诊断、治疗及预后评价中起重要作用^[13-14]。而在肝病患者循环血液中,亦有多种 miRNA 呈显著性差异表达,以此提示肝纤维化是否发生以及进展状况,为肝纤维化的无创性防治研究提供了新的视角^[15-16]。本课题组长期从事 miRNA 与肝纤维化发生、发展的研究,各领域关于循环 miRNA 的研究^[16-20]为我们的研究工作提供了新的视野。本课题组前期通过构建肝纤维化动物模型,并用芯片筛选了肝纤维化血液中差异表达的 miRNA,芯片结果显示 miR-484 显著下调^[8]。

MiR-484的显著性差异表达,提示其可能在肝纤维化发生、发展中起重要作用,或许可作为肝纤维化发生及进展的分子标志,为肝纤维化的诊疗提供新的血液学指标。由此我们针对相关分子机制开展了本次研究。

线粒体不断发生融合和分裂,是维持细胞器保真度的两个必要过程。异常线粒体分裂参与很多疾病的发生,但人们对其调控仍然很不了解。Wang等^[9]研究发现,miR-484在心肌细胞缺氧期间下调,而其靶基因线粒体分裂蛋白 Fis1 表达增高;Fis1是细胞线粒体分裂和凋亡过程的关键蛋白,其高表达可促进心肌细胞凋亡和心肌梗死的形成。为探索此现象是否具有细胞特异性,该研究还以肾上腺皮质癌细胞为例,验证了 miR-484 靶向调控 Fis1 对癌细胞同样具有抑制凋亡作用。

HSC是肝纤维化发生的关键细胞,本研究重点利用 HSC-T6 细胞株体外实验探讨了 miR-484 影响其功能的作用。qPCR 和蛋白质印迹实验结果都表明,当 miR-484 表达下调时,Fis1 在 mRNA 和蛋白水平均升高,说明在 HSC-T6 中 miR-484 同样可直接靶向调控 Fis1,对 HSC-T6 凋亡造成影响,且在此过程中伴有凋亡相关分子 caspase-3 和 Bcl-2 的表达变化。Caspase-3 是多种凋亡途径的共同下游效应分子,而 Bcl-2 在线粒体凋亡发生过程中起抵抗细胞凋亡的作用,二者常被作为研究细胞凋亡的关键分子^[21]。本研究中,当人为下调 miR-484 的表达后,Bcl-2 表达下降而 caspase-3 表达升高,Annexin V-FITC/PI 双染法检测显示 HSC-T6 凋亡率升高,这些研究结果提示 miR-484 靶向 Fis1 可促进 HSC 凋亡的产生,且此作用部分是通过线粒体途径实现的。同时,当 miR-484 的表达下调时,HSC-T6 细胞中 α -SMA 和 Col I 在 mRNA 和蛋白水平都下调,说明 miR-484 本身促进 HSC 活化并增加细胞外基质合成,加速肝纤维化的发生和进展。

综上所述,本研究验证了 miR-484 可靶向 Fis1 促进 HSC 的活化并抑制其凋亡的产生,并通过此两种途径促进肝纤维化的形成及进展。若在肝纤维化形成早期干预 miR-484 的表达,或许可成功阻遏肝纤维化进展。本研究为疾病的早期诊断和治疗提供了新的分子靶标。

[参考文献]

- [1] FRIEDMAN S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7: 425-436.
- [2] HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN S L. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425-456.
- [3] GUO C J, PAN Q, CHENG T, JIANG B, CHEN G Y, LI D G. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways[J]. *FEBS J*, 2009, 276: 5163-5176.
- [4] STREMERSCHE S, VANDENBROUCKE R E, van WONTERGHEM E, HENDRIX A, DE SMEDT S C, RAEMDONCK K. Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs[J]. *J Control Release*, 2016, 232: 51-61.
- [5] HALÁSZ T, HORVÁTH G, PÁR G, WERLING K, KISS A, SCHAFF Z, et al. miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 7814-7823.
- [6] ZHENG J, ZHOU Z, XU Z, LI G, DONG P, CHEN Z, et al. Serum microRNA-125a-5p, a useful biomarker in liver diseases, correlates with disease progression[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12: 1584-1590.
- [7] YU F, ZHOU G, LI G, CHEN B, DONG P, ZHENG J. Serum miR-181b is correlated with hepatitis B virus replication and disease progression in chronic hepatitis B patients[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60: 2346-2352.
- [8] LI B B, LI D L, CHEN C, LIU B H, XIA C Y, WU H J, et al. Potentials of the elevated circulating miR-185 level as a biomarker for early diagnosis of HBV-related liver fibrosis[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34157. doi: 10.1038/srep34157.
- [9] WANG K, LONG B, JIAO J Q, WANG J X, LIU J P, LI Q, et al. miR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1[J/OL]. *Nat Commun*, 2012, 3: 781. doi: 10.1038/ncomms1770.
- [10] LURIE Y, WEBB M, CYTTER-KUIN T R, SHTEINGART S, LEDERKREMER G Z. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 11567-11583.
- [11] TENG K Y, GHOSHAL K. Role of noncoding RNAs as biomarker and therapeutic targets for liver fibrosis

- [J]. *Gene Expr*, 2015, 16: 155-162.
- [12] CHEN C, WU C Q, ZHANG Z Q, YAO D K, ZHU L. Loss of expression of miR-335 is implicated in hepatic stellate cell migration and activation[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317: 1714-1725.
- [13] TIAN X, SHIVAPURKAR N, WU Z, HWANG J J, PISHVAIAN M J, WEINER L M, et al. Circulating microRNA profile predicts disease progression in patients receiving second-line treatment of lapatinib and capecitabine for metastatic pancreatic cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11: 1645-1650.
- [14] ARROYO J D, CHEVILLET J R, KROH E M, RUF I K, PRITCHARD C C, GIBSON D F, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 5003-5008.
- [15] CERMELLI S, RUGGIERI A, MARRERO J A, IOANNOU G N, BERETTA L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6: e23937. doi: 10.1371/journal.pone.0023937.
- [16] BUTT A M, RAJA A J, SIDDIQUE S, KHAN J S, SHAHID M, TAYYAB G U, et al. Parallel expression profiling of hepatic and serum microRNA-122 associated with clinical features and treatment responses in chronic hepatitis C patients [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21510. doi: 10.1038/srep21510.
- [17] YAN G, LI B, XIN X, XU M, JI G, YU H. MicroRNA-34a promotes hepatic stellate cell activation via targeting ACSL1 [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3008-3015.
- [18] LI A, YU J, KIM H, WOLFGANG C L, CANTO M I, HRUBAN R H, et al. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 3600-3610.
- [19] ZEARO S, KIM E, ZHU Y, ZHAO J T, SIDHU S B, ROBINSON B G, et al. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers [J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 200. doi: 10.1186/1471-2407-14-200.
- [20] KJERSEM J B, IKDAHL T, LINGJAERDE O C, GUREN T, TVEIT K M, KURE E H. Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment [J]. *Mol Oncol*, 2014, 8: 59-67.
- [21] CHEN C H, CHEN M F, HUANG S J, HUANG C Y, WANG H K, HSIEH W C, et al. Saikosaponin A induces apoptosis through mitochondria-dependent pathway in hepatic stellate cells [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45: 351-368.

[本文编辑] 孙岩