

• 论 著 •

miRNA-155 靶向调控 MMP-9 对肝纤维化的作用及机制

李 耕

(湖北省武汉市中医医院检验科 430000)

摘要:目的 探讨微小 RNA-155(miRNA-155)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在肝纤维化发生发展中的作用,为临床诊断和治疗肝纤维化提供依据。方法 通过采用 miRNA-155 抑制剂(miRNA-155 inhibitor)、miRNA-155 类似物(miRNA-155 mimic)及 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂处理肝星状细胞-T6 (HSC-T6)细胞株,用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 miRNA-155、 β -catenin 及 MMP-9 的表达;采用荧光素酶标记法检测 MMP-9 与 miRNA-155 相互作用的靶位点,探讨 miRNA-155 表达变化与 MMP-9 和肝纤维化的关系。结果 MMP-9 在肝纤维化大鼠的肝脏内表达显著上升,为正常大鼠的(8.51 $\pm$ 0.30)倍;miRNA-155 是与 MMP-9 相关的靶向 miRNA 分子,其表达升高能显著降低 MMP-9 的表达;在使用 Wnt 通路抑制剂后,miRNA-155 和 MMP-9 的表达量显著降低。通过荧光素报告基因标记法发现,miRNA-155 与 MMP-9 的 3'-UTR 靶向结合。结论 miRNA-155 是一种与肝纤维化密切相关的 miRNA 分子,它可以通过影响 MMP-9 的表达来调节肝纤维化的发生与发展。

关键词:肝纤维化; 微小 RNA-155; 基质金属蛋白酶-9

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.017 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)08-1090-03

Effect and mechanism of miRNA-155 targeted regulating MMP-9 on liver fibrosis

LI Geng

(Department of Clinical Laboratory, Wuhan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430000, China)

Abstract:Objective To explore the effect of miRNA-155 and MMP 9 in the occurrence and development of liver fibrosis to provide the basis for clinical diagnosis and treatment of liver fibrosis. **Methods** The miRNA-155 inhibitor(miRNA-155 inhibitor), miRNA-155 analogues(miRNA-155 mimic) and Wnt/ β -catenin pathway inhibitor were adopted to process HSC-T6 cell lines, the fluorescence quantitative PCR was used to detect the expressions of miRNA-155, β -catenin and MMP-9. And the luciferase labelling detection was adopted to detect the targeted point of MMP-9 and miRNA-155 interaction for exploring the relationship between miRNA-155 expression change with MMP-9 and liver fibrosis. **Results** The MMP-9 expression in the liver of hepatic fibrosis rats was significantly increased, which was (8.51 $\pm$ 0.30) times of normal rats; miRNA-155 was at MMP-9-related targeted miRNA molecules its expression increase could significantly decrease the expression of MMP-9; after using the Wnt pathway inhibitor, the expression amounts of miRNA-155 and MMP-9 were significantly decreased. The fluorescein report genetic marker method found that miRNA-155 was targetedly combined with 3'-UTR of MMP-9. **Conclusion** miRNA-155 is a mRNA molecule closely related with liver fibrosis, which can regulate the occurrence and development of liver fibrosis by influencing the expression of MMP-9.

Key words:liver fibrosis; miRNA-155; MMP-9

肝纤维化是指在持续地肝实质细胞破坏或慢性炎症反应等慢性损伤条件下,肝脏发生的一种常见修复过程,主要表现为富含胶原的细胞外基质(ECM)沉积过多而降解减少,最终导致肝组织瘢痕形成及正常结构破坏^[1]。近年有研究显示,某些基质金属蛋白酶(MMPs)及微小 RNA(miRNA)参与了肝纤维化发展的不同进程。MMPs 是一类能降解 ECM 和基底膜中纤维组织的水解酶^[2]。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)可特异性的降解Ⅳ型胶原,在肝纤维化中起非常重要的作用。此外,关于肝纤维化的治疗出现某些新的分子靶点,miRNA 是其中的研究热点之一^[3]。本研究通过探讨微小 RNA-155(miRNA-155)和 MMP-9 在肝纤维化发生发展中的作用,为临床诊断和治疗肝纤维化提供依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 正常清洁级雄性 SD 大鼠(200~220 g)共 50 只,由实验动物中心提供。所有程序经大学动物护理和使用委员会进行审查和批准。

1.2 试剂 PCR 试剂盒购于美国 Promega 公司,10 000× Sybergreen 购于美国 Invitrogen 公司,Lipofectamine2000 购于

美国 Invitrogen 公司。

1.3 肝纤维化动物模型的建立 实验动物随机分为 2 组:对照组 20 只,普通饲养;肝硬化模型组(实验组)30 只,根据文献报道,给予以四氯化碳/橄榄油(配制体积比为 25:75)腹部皮下注射,每周 2 次^[4]。造模结束后,2 组 SD 大鼠行肝功能检测,处死后做病理切片,苏木精-伊红染色(HE 染色),确认肝脏纤维化程度分级等。

1.4 原代分离提取肝硬化大鼠的肝星状细胞(HSC) 选取体质量 400 g 以上的肝硬化大鼠,麻醉后,依次用 D' Hanks 液,1.3 g/L 链霉素蛋白酶 E 灌注液,0.25 g/L Ⅳ型胶原酶灌注液原位灌注肝脏,取下肝组织振荡消化 20 min,11% Nycodellz 液密度梯度离心,收集 HSC,置于含 20% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,并放入温箱(5% CO₂ 37 ℃)培养。待细胞贴壁后用锥虫蓝拒染方法检测 HSC 的活力,免疫细胞化学染色检测 ItSC 特异性蛋白 Desmin、阳性细胞计数等确定 HSC 的比例和数量。

1.5 miRNA mimic 或 inhibitor 转染 原代大鼠的 HSC 培养 4 d 后,将贴壁细胞制成细胞悬液,用细胞计数板镜下计数,然

后接种于 6 孔板中,使转染前贴壁细胞生长密度达 30%~50%,根据处理因素不同,分别将细胞分为空白对照组(空白对照),miRNA mimic 组(转染 miRNA-155 mic)或 miRNA inhibitor 组(转染 miRNA-155 inhibitor)。待 HSC 转染后,于 72 h 检测各组 MMP-9、miRNA-155 的表达量。

1.6 实时定量聚合酶链式反应(PCR)法检测正常大鼠和肝纤维化大鼠肝组织 miRNA-155 的表达 随机选取对照组大鼠 3 只,肝纤维化大鼠 3 只,处死大鼠后取肝脏组织,提取 RNA,逆转录,设计引物,扩增用 miRNA-155。miRNA-155 的上游引物:5'-GCGGTAGCATCAGACTGA-3',下游引物:5'-TGCGT-GTCGTGGAGTC-3';以 U6 为内参对照,U6 的上游引物:5-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游引物:5 -CGCTTCACGAACCGCGTGTTCAT-3,预计扩增片段长度 89 bp。引物设计软件为 Primer 5.0,将扩增后的 cDNA 产物进行 PCR 反应。

1.7 荧光素酶报告基因检测 将 miRNA-155 及 MMP-9 3' UTR 区共转染 48 h 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,每孔中加入裂解液 100 μ L,15 min 后收集裂解液。将相关试剂准

备好上机检测。使用自动发光检测仪进行检测,检测指标包括萤火虫荧光素酶(F)和海肾荧光素酶(R),活性倍数=(F/R)样品/(F/R)对照。

1.8 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多标本统计推断采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验,对于单独两标本比较采用独立样本的 *t* 检验;计数资料以例数或率表示;以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MMP-9 和 miRNA-155 在对照组和实验组大鼠中的表达情况 分别提取对照组和实验组大鼠肝脏组织的 RNA,并分析 MMP-9 的表达量。对照组为 1.02 $\pm$ 0.05,实验组为 8.46 $\pm$ 0.63,MMP-9 在实验组大鼠中表达显著增多,为对照组大鼠的(8.51 $\pm$ 0.30)倍;通过生物信息学预测发现 MMP-9 的靶向 miRNA 分子为 miRNA-155,见表 1;进一步通过 RT-PCR 分析 miRNA-155 在实验组 and 对照组大鼠的表达水平,对照组为 1.78 $\pm$ 0.46,实验组为 4.19 $\pm$ 0.97,实验组大鼠肝脏中的 miRNA-155 比对照组大鼠增高(4.22 $\pm$ 0.21)倍。

表 1 生物信息学预测 MMP9 相关差异性表达 miRNA

MicroRNA	Stem-Loop ID	DIA NAmt	miR ooda	mi RDB	mi RWak	RNA hybrid	PICT AR4	PICT AR5	PITA	RNA 22	Target scan
has-miRNA-155	has-miRNA-155	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
has-miRNA-491-5p	has-miRNA-491	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
has-miRNA-149	has-miRNA-149	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
has-miRNA-183	has-miRNA-183	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
has-miRNA-296-3p	has-miRNA-296	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
has-miRNA-204	has-miRNA-204	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
has-miRNA-211	has-miRNA-211	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
has-miRNA-133b	has-miRNA-133b	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1

2.2 探讨细胞水平 miRNA-155 与 MMP-9 的关系 鉴于肝纤维化机制的复杂性,利用 NIAID/NIH 提供的 DAVID 6.7 分析平台并结合 Biocarta pathway 和软件对 MMP-9 基因进行了功能聚类及通路分析,发现 MMP-9 基因与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关,且与细胞的黏附、周期、炎性反应等相关。为探讨细胞水平 miRNA-155 与 MMP-9 的关系,笔者进行体外 HSC-T6 细胞培养,然后采用 miRNA-155 抑制剂(miRNA-155 inhibitor)、miRNA-155 类似物(miRNA-155 mimic)及 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂分别处理 HSC-T6 细胞;再用荧光定量 PCR 检测 miRNA-155、MMP-9 的表达。最终发现,经过脂质体包被 miRNA-155 抑制剂转染细胞后,实验组细胞的 MMP-9 水平 23.83 $\pm$ 5.68 较对照组 4.24 $\pm$ 0.64 显著升高(2.43 $\pm$ 0.21)倍;经过 miRNA-155 类似物处理细胞后,实验的 miRNA-155 的表达量是对照组的(4.21 $\pm$ 0.19)倍,其 MMP-9 水平 3.97 $\pm$ 0.58 较对照组 4.25 $\pm$ 0.67 显著降低;预先用 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂处理细胞后,对照组 miRNA-155 的表达量比实验组多(4.28 $\pm$ 0.29)倍,再用 miRNA-155 抑制剂或 miRNA-155 类似物处理细胞时,MMP-9 水平无显著变化,实验组为 0.96 $\pm$ 0.21,对照组为 4.21 $\pm$ 0.62。

2.3 双荧光素酶报告分析法验证 miRNA-155 与 MMP-9 的特异性作用靶点 为了验证 miRNA-155 与 MMP-9 的特异性作用关系,笔者采用双荧光素酶报告分析法检测 miRNA-155 与 MMP-9 之间的相互作用,并根据荧光值的强弱证实 miRNA-155 与 MMP-9 之间的关系。首先通过构建野生型 MMP-9 荧光载体和突变型荧光载体,并导入细胞内,然后用 microR-

NA155 分别转染 HSC 细胞,用荧光电泳检测 3 组的荧光强度,对照组为 0.96 $\pm$ 0.14,突变型 MMP9 荧光载体组为 3.58 $\pm$ 0.72,MMP9 荧光载体组为 3.52 $\pm$ 0.68,MMP-9 荧光载体组的荧光强度是对照组的 0.28 倍,而突变型 MMP-9 荧光载体组与对照组荧光强度差异无统计学意义(*P*>0.05)。

3 讨 论

肝纤维化是慢性肝损伤的重要病变,它不是独立疾病,而是主要由病毒性肝炎、酒精肝、脂肪肝引起,其主要病理特征是肝 ECM 过度积累^[5]。MMPs 通常以无活性的酶原形式存在于人体内,只有在受到外界某些因素刺激作用被激活后,才具有降解 ECM 酶的活性,该蛋白作用底物是 ECM 和基底膜中的纤维网架分子。其中,MMP-9 可特异性的降解 ECM 的主要胶原而成为近年来肝纤维化研究的热点^[6]。

文献报道显示,miRNA 在 HSC 的活化、凋亡、老化等方面发挥着重要作用。有研究发现,miRNA-27 通过抑制 HSC 的增殖,使 HSC 恢复至静息状态,从而抑制肝纤维化的发生^[7]。miRNA-16 也被认为是一个与肝纤维化密切相关的 miRNA 分子,把 miRNA-16 转染进入 HSC 可以显著抑制 HSC 增殖,增加 HSC 的凋亡^[8]。

miRNA-155 位于人 21q21 染色体的非编码转录本 BIC 第 3 个外显子内,其表达水平受 BIC 的转录水平和 miRNA 加工等调控。研究认为,BIC 是一个不含开放读码框的基因,在非翻译 RNA 的编码中具有重要作用^[9]。继 2002 年学者首次在慢性淋巴细胞白血病发现 miRNA-155 的异常表达后,关于 miRNA-155 的作用在人类肿瘤报道中屡多次(下转第 1094 页)

水平显著高于健康人群,这是由于炎症反应导致 CCK 受体数量减少,敏感性降低,从而使血清 CCK 反馈增多。本研究发现,微创保胆术后 CCK 水平较术前显著降低,提示这可能与胆囊去结石或息肉刺激后,炎症反应缓解相关。同时,本研究根据胆囊容积、胆囊收缩指数。最小剩余容积比较,证实微创保胆手术后患者在胆囊功能保留基础上取得一定改善,这与胆囊及周围组织减少结石或息肉刺激后,提高胆囊收缩能力有关。

综上所述,内镜下微创保胆手术能有效降低胆囊良性病变 CCK 水平,为一种可行的治疗方法。

参考文献

[1] Tan YY,Zhao G,Wang D,et al. A new strategy of minimally invasive surgery for cholecystolithiasis: calculi removal and gallbladder preservation[J]. Dig Surg,2013,30(4):466-471.

[2] 施宝民,吴泰璜,吕振惠,等. 胆囊癌与胆囊良性病变的关系[J]. 山东医药,2005,45(9):68.

[3] 胡荣生,于伟,李秋波,等. 腹腔镜下胆囊切除术手术相关并发症危险因素回归分析[J]. 海南医学院学报,2013,19(1):77-79.

[4] Desai NS,Khandelwal A,Virmani V,et al. Imaging in laparoscopic cholecystectomy-What a radiologist needs to know[J]. Eur J Radiol,2014,83(6):867-879.

[5] Wei S. The clinical application of the hard gallbladder endoscope combined with soft choledochoscope in the surgery of laparoscopic microscopic trauma for the removal of calculi and preservation of gallbladder[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A,2013,23(2):106-108.

[6] 白洪祥,赵松. 腹腔镜胆囊大部切除并胆囊造瘘引流术在胆囊三角重度粘连性胆囊切除术中的应用[J]. 中国老年医学杂志,2013,33(11):2666-2667.

[7] 孙斌. 多镜联合微创保胆取石术对老年患者胆囊功能的影响[J]. 中国老年学杂志,2013,33(22):5743-5744.

[8] Castro SM,Reekers JA,Dwars BJ,et al. Delayed intrahepatic subcapsular hematoma after laparoscopic cholecystectomy[J]. Clin Imaging,2012,36(5):629-631.

[9] 罗帝林,卢宝兰,肖晓娟,等. MSCT 双期扫描联合重建技术在鉴别胆囊腺肌症与胆囊癌中的价值[J]. 实用放射学杂志,2015(7):1198-1201.

[10] 胡亦懿,杜国平,李凤棉,等. 内镜下十二指肠乳头括约肌切开和球囊扩张对胆囊功能影响的研究[J]. 中华消化内镜杂志,2014,31(1):9-13.

[11] 周海军,陈炳荣,沈彬,等. 合并胆囊壁间结石保胆取石术后近期疗效评价[J]. 肝胆胰外科杂志,2015,27(5):380-382.

[12] 陈智勇,李钢. 胆囊壁间结石与胆囊腔内结石的临床特点比较[J]. 现代消化及介入诊疗,2015,20(4):392-394.

[13] 明海霞,陈彦文,黄世佐,等. 甘肃金银花对实验动物胆汁分泌及胆囊平滑肌的影响[J]. 中医药学报,2014,42(1):65-67.

[14] 刘皓,范尧夫,王平,等. 胆宁片对胆固醇结石模型豚鼠胆囊运动功能及血浆 CCK 水平的影响[J]. 长春中医药大学学报,2014,30(5):773-776.

(收稿日期:2016-12-15 修回日期:2017-01-26)

(上接第 1091 页)

见^[10]。越来越多的研究表明,miRNA-155 作为主要炎症调节因子之一,可通过炎症因子介导参与非酒精性脂肪肝的病理生理过程^[11]。通过生物信息学分析和实验验证,笔者发现 miRNA-155 与 MMP-9 的作用和肝纤维的发生发展密切相关。通过 Wnt 通路阻断剂等方法,笔者也证实了 wnt 通路在调节 miRNA-155 的表达中起非常重要的作用。

肝纤维化的发生发展是一个非常复杂的病理生理学过程^[12]。通过与 MMP-9 相互作用,miRNA-155 在大鼠肝纤维化的发生发展起重要作用。每种 miRNA 分子均存在多个靶基因,但其表达具有特异性。针对肝纤维化,笔者利用 miRNA 分子作为肝纤维化的诊断指标,通过导入 miRNA 分子或者低表达 miRNA 分子来达到治疗肝纤维化的目的。

参考文献

[1] 李秀伶,陈淑丽,米佳平. 冷沉淀在肝硬化及肝硬化合并消化道出血患者中的应用疗效[J]. 标记免疫分析与临床,2016,23(1):117-119.

[2] Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside[J]. J Hepatol,2003,38(Suppl 1):S38-53.

[3] 王瑾,孙世波,孙铁为. 微小 RNA-21 对肝纤维化影响的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17(1):74-76.

[4] Dang SS,Wang BF,Cheng YA,et al. Inhibitory effects of saikosaponin-d on CCl4-induced hepatic fibrogenesis in

rats[J]. World J Gastroenterol,2007,13(4):557-563.

[5] 王宇高,黄宇琦. 实验性肝纤维化间质胶原酶原表达的研究[J]. 中华消化杂志,2000,20(1):67-68.

[6] Ji J,Zhang J,Huang G,et al. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation[J]. FEBS Lett,2009,583(4):759-766.

[7] Guo C J,Pan Q,Jiang B,et al. Effects of upregulated expression of microRNA-16 on biological properties of culture-activated hepatic stellate cells[J]. Apoptosis,2009,14(11):1331-1340.

[8] 李新华,李立钧. 微小 RNA 在椎间盘退变中的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志,2015,29(10):1307-1311.

[9] 徐丽华,杨乃超,颜青,等. microRNA-155 在小儿急性髓性白血病中的差异表达及分析[J]. 标记免疫分析与临床,2014,21(5):571-573.

[10] 李士华,官成浓. miRNA-155 在消化道肿瘤中的研究进展[J]. 中国医药科学,2014,4(2):38-40.

[11] 崔蕾,王艳林,黄利鸣. miRNA-155、EMT 与肿瘤侵袭转移的研究进展[J]. 生物技术通报,2014,3(1):55-57.

[12] Chen Y,Cheng G,Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection[J]. Pharm Res,2008,25(1):72-86.

(收稿日期:2016-12-20 修回日期:2017-01-11)