

微小 RNA 在肝纤维化中作用的研究进展

程 丹 汤绍迁

摘要:微小 RNA(miRNA)是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,是调控蛋白质生物合成的一类重要的非编码 RNA。关于 miRNA 在肝纤维化中的作用一直是近年来的研究热点。已有研究发现,miRNA 在肝纤维化的发生发展中存在异常表达,并在调控肝纤维化相关的信号通路和肝星状细胞(HSC)的增殖、分化和凋亡中起重要作用。此文就近年来有关 miRNA 在肝纤维化中作用的研究进展作一综述。

关键词:肝纤维化;miRNA;肝星状细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2016.06.004

肝纤维化是由各种病因(肝炎病毒、乙醇、血吸虫及药物等)所致的慢性肝损伤的共同病理改变,是慢性肝病进展为肝硬化的必经阶段。各种致病因素会引发肝细胞损伤、坏死及炎症反应,激活肝脏内的巨噬细胞(如库普弗细胞),并分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 IL-6 等多种细胞因子,共同作用于肝星状细胞(HSC),促使 HSC 转变为活化的 HSC,即肌成纤维细胞(MFB),MFB 加速了细胞外基质(ECM)蛋白[包括 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、胶原蛋白、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)和肌间线蛋白]的合成与沉积,并最终导致肝纤维化^[1]。随着对肝纤维化病理的深入认识,现认为肝纤维化是可以逆转的,甚至连肝硬化在某些情况下也是有可能逆转的^[2],并且这种逆转已经在由乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒以及其他原因所导致的肝硬化患者中观察到^[3-4]。但是,由于肝纤维化的过程不易被察觉,以至于多数患者发现时已进展为肝硬化,加大了治疗的难度。因此,如何在早期及时、有效地诊断肝纤维化,对于众多肝病患者而言具有重大意义。

近年来研究发现,微小 RNA(miRNA)可参与并调节肝纤维化的进程,在 HSC 的激活及肝纤维化相关信号通路中发挥着重要作用。Zhang 等^[5]收集了慢性乙型肝炎和肝硬化患者的血浆,通过 miRNA 微阵列检测不同分组的循环 miRNA 的表达量,发现了 12 种在所有分组中均出现异常表达的

miRNA,包括 10 种上调的 miRNA 以及 2 种下调的 miRNA。有关 miRNA 在肝纤维化中的作用已成为近年来的研究热点。

1 miRNA 的合成及其作用机制

真核生物细胞内的 miRNA 主要有两种来源:大部分的 miRNA 可通过特定的基因转录加工而产生;另一小部分 miRNA 可以从内含子或长链非编码 RNA(lncRNA)中产生。许多 miRNA 都具有自身的独立基因,通过 RNA 聚合酶 II(RNase II)转录产生特异性的转录产物,这是 miRNA 产生的经典途径。在 RNase II 的催化作用下,转录产生初级前体 miRNA(pri-miRNA),然后经过 5'-端加帽,3'-端加 poly A 尾^[6]。pri-miRNA 在 RNase III(Drosha)的催化下与双链 RNA 结合蛋白 DGCR8 形成 Drosha-DGCR8 复合物,将 pri-miRNA 加工成一个约 70 nt,含有发卡结构的前体,称为 pre-miRNA^[7]。pre-miRNA 被随机转运至胞质中,在 RNase III(Dicer)催化下与双链 RNA 结合蛋白 TRBP 结合形成复合物,在 TRBP 协助下,Dicer 将 pre-miRNA 进一步裂解产生一个 20 bp 的 miRNA/miRNA* 双链分子^[8]。加工产生的短双链 RNA 中的一条将与 AGO1/AGO2 结合并留在 RISC 中形成 miRNA 诱导的沉默复合体(miRISC),从而行使 miRNA 的功能,而另一条链则被释放降解。

miRNA 的主要功能是在翻译水平调控蛋白质编码基因的表达,且以负调控作用为主。miRNA 调控基因表达主要是通过 miRNA 以不完全互补的方式引导 miRISC 结合靶 mRNA,与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(UTR)结合并阻止其翻译;如果 miRNA 与 mRNA 的靶序列完全互补,则通过 miRISC 中的 AGO2 发挥内切核酸酶作用,促进其降解^[9-10]。

2 miRNA 参与 HSC 的活化、增殖和凋亡

HSC 的激活是肝纤维化的关键环节,也是肝纤维化的主要效应细胞^[1-11],近年来体外及体内的研究表明,miRNA 在 HSC 的激活中起着重要作用。

2.1 miRNA 调节 HSC 活化

近期一项研究发现,在肝硬化患者和硫代乙酰胺(TAA)或四氯化碳(CCl₄)诱导的小鼠纤维化模型的肝组织中,miR-21 均呈高水平表达;下调 miR-21 和活化蛋白-1(AP-1)的表达后可观察到 HSC 的活化显著受到抑制,纤维化的程度则得以缓解;相反,用小干扰 RNA 抑制程序性细胞凋亡因子 4(PDCD4)的表达后,则可以促进 HSC 向成纤维细胞转变,加速肝纤维化的进程,提示 miR-21 可通过 miR-21/PDCD4/AP-1 反馈回路维持其在肝纤维化过程中的高表达水平,并促进 HSC 的活化^[12]。Maubach 等^[13]通过体内及体外的研究发现,与处于静态的 HSC 相比较,激活后 10 d 的 HSC 中有 16 种 miRNA 表达上调及 26 种 miRNA 表达下调。Lakner 等^[14]通过 miRNA 微阵列分析对比处于活化和未活化状态下 HSC 中 miRNA 的表达量,发现 miR-34c、miR-184 和 miR-221 的表达显著上调,而另有 8 种 miRNA (miR-16、miR-19a、miR-19b、miR-29a、miR-29c、miR-92a、miR-150 和 miR-194)的表达则显著下调。Yan 等^[15]检测了 HSC 处于绝对静态的前 3 d 及激活后 10 d 的 miR-34a 和转录因子 ACSL1 的表达量,以及 miR-34a 沉默后 HSC 中 ACSL1 的表达量,发现 miR-34a 可能是通过直接靶向调节 ACSL1 的表达而参与肝纤维化进程。

2.2 miRNA 调节 HSC 的凋亡

Zheng 等^[16]通过基因微阵列发现 miR-150 在肝纤维化中的表达显著降低,而在 LX-2 细胞株中高表达 miR-150 会抑制细胞的增殖,并减少 ECM 以及 α -SMA 的生成,提示 miR-150 在调节 HSC 的凋亡,抑制肝纤维化中起着重要作用。Dai 等^[17]的体外实验研究显示,在肝硬化患者的肝组织、血清以及活化的 HSC 中均发现 miR-155 的表达降低,而在高表达 miR-155 后发现 HSC 的凋亡显著增加,并且抑制了上皮间质转化(EMT)以及细胞外调节蛋白激酶(ERK1)信号通路的活性。在大鼠肝纤维化组织中,miR-150 和 miR-194 同样被发现在 HSC 中表达降低,而使其过表达后则会显著抑制 HSC 的增殖,并减少 α -SMA 和 I 型胶原蛋白的生成^[18]。Wang

等^[19]通过体外实验证实,miR-29 在 LX-2 HSC、LX-1 以及 HSC-T6 细胞株中高表达后,会显著抑制 HSC 的增殖并促进其凋亡。

3 miRNA 在肝纤维化相关信号通路中的作用

目前研究表明,肝纤维化是一个复杂的病理变化过程,受到多种信号通路及细胞因子的调节,包括 TGF- β /Smad、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、核因子- κ B(NF- κ B)以及 Wnt/ β -catenin 等信号通路。

3.1 miRNA 在 TGF- β /Smad 通路中的作用

TGF- β 具有多种生物学作用,可参与细胞增殖、分化、凋亡、ECM 沉积及 ECM 蛋白的合成和降解,是调控机体器官纤维化的核心通路^[20],其中 TGF- β 1/Smad 信号转导通路是调节 ECM 基因表达以及促进 ECM 生成的重要途径^[21-22]。Tu 等^[23]通过对大鼠肝纤维化模型的研究发现,miR-101 可以抑制 TGF- β I 型(T β R I)在肝细胞和 HSC 中的表达,从而阻断 TGF- β 信号通路在肝纤维化中的作用,进而促进活化的 HSC 逆转为静态的 HSC;同时,在人肝细胞中,miR-101 也可以通过阻止 TGF- β 信号通路的转导而抑制肝纤维化相关细胞因子的释放。Lakner 等^[14]研究发现,将大鼠活化的 HSC 中 miR-19b 的表达水平提高后,TGF- β 通路中的组成成分 TGF- β II 型受体(T β R II)的表达量显著降低,同时降低了 I 型胶原蛋白的表达以及 TGF- β 介导的 α 1 和 α 2 型胶原蛋白 mRNA 的表达,表明 miR-19b 可以抑制 HSC 中的 TGF- β 信号通路的活性。Roy 等^[24]在研究 miR-30c 和 miR-193 在肝纤维化中的作用时发现,TGF- β 2 和 Snail1(调控 ECM 的关键因子)可能是 miR-30c 和 miR-193 的两个作用靶点。

3.2 miRNA 在 PI3K/Akt 通路中的作用

PI3K/Akt 通路是一条经典的信号转导途径,在肝纤维化发展过程中发挥着重要的调节作用,通过调节 ECM 的降解,可影响 HSC 的增殖和凋亡,参与肝纤维化的形成^[25]。Wang 等^[19]将 miR-29b 转导入 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化模型中并使其高表达后,发现 miR-29b 可调控半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(caspase-9)并诱导 HSC 凋亡,且 miR-29b 可通过直接结合 PIK3R1 和 Akt3 的 3'端 UTR 区域而抑制 PI3K/Akt 的信号转导。进一步研究发现,在敲除了 PIK3R1 或 Akt3 基因后会抑制 α -SMA 和 I 型胶原蛋白的表达并诱导 HSC 的凋亡,表明 miR-29b 可以通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,阻止

HSC 的激活并诱导其凋亡,在肝纤维化的发生发展中起重要作用。Xiao 等^[26]在研究 miR-200b 在人 HSC 系 LX-2 中的作用时发现,miR-200b 可以提高 Akt 的磷酸化水平,用 miR-200b 模拟物(miR-200b mimic)使其高表达后发现 FOG2(miR-200b 的靶蛋白,可以抑制 PI3K/Akt 通路的活化)的表达水平显著降低,表明 miR-200b 可通过下调 FOG2 而激活 PI3K/Akt 通路,进而刺激 HSC 的生长和迁徙。Wei 等^[27]在研究 miR-21 在人 HSC 系 LX-2 中的作用时发现,上调 miR-21 的表达会刺激 LX-2 的增殖;相反,下调 miR-21 的表达则会抑制 LX-2 的增殖,同时发现 miR-21 的高表达会抑制 LX-2 细胞中 PTEN 蛋白的表达,进而激活 Akt 蛋白,而用 miR-21 的抑制剂 LY294002 抑制 Akt 信号通路后,可以阻止 LX-2 细胞的纤维化,表明 miR-21 可以通过调节 PI3K/Akt 信号转导通路而影响 LX-2 细胞的纤维化进程。

3.3 miRNA 在 NF- κ B 通路中的作用

NF- κ B 能通过调控多种炎症因子以及抗炎因子的表达来影响肝脏炎症反应的损伤修复,从而调节肝纤维化的发生发展;同时,NF- κ B 还能通过影响 HSC 的凋亡而参与肝纤维化的进程^[28-29]。Feng 等^[30]研究了 miR-126 在 LX-2 细胞系中的作用机制,利用 miR-126 类似物或抑制剂上调或下调 miR-126 表达后,观察 NF- κ B 蛋白、NF- κ B 抑制剂 α ($I\kappa B\alpha$) 的 mRNA 和蛋白的表达量以及 NF- κ B 通路的下游信号分子 TGF- β 1 和 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达量,最终发现 miR-126 可以抑制 $I\kappa B\alpha$ 的表达;相反,敲除 miR-126 基因则会上调 $I\kappa B\alpha$ 的表达并抑制 NF- κ B 信号通路的激活,进而影响肝纤维化的进程。Hyun 等^[31]在 CCL₄ 诱导的小鼠肝纤维化模型研究中发现,miR-378a-3p 的表达明显降低,将 miR-378a-3p 过表达后会显著抑制 HSC 的活性;使用 Smoothened 激活 NF- κ B p65 及其信号通路后,发现 miR-378a-3p 的表达明显降低,表明 miR-378a-3p 在 NF- κ B 信号通路的调控下可以影响 HSC 的活化,进而参与肝纤维化。

4 小结与展望

近年来随着对肝纤维化研究的深入,miRNA 在肝纤维化进展、HSC 活化和凋亡以及其相关信号通路中的作用越来越明确,这为肝纤维化患者的诊断及治疗提供了新的靶点,具有十分重要的临床意义。但目前仍有许多问题亟待解决,比如之前的研究大多局限于体外实验,如何在早期有

效诊断肝纤维化,miRNA 能否作为一个早期诊断肝纤维化的生物学指标,这些问题都需要进一步的深入研究。相信随着临床试验的进展,终究会克服肝纤维化诊断及治疗方面的难题。

参 考 文 献

- 1 Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, et al. Hepatic fibrosis: concept to treatment [J]. J Hepatol, 2015, 62: S15-S24.
- 2 Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story [J]. Gut, 2015, 64: 830-841.
- 3 Marcellin P, Gane E, Buti M, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study [J]. Lancet, 2013, 381: 468-475.
- 4 D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis [J]. Hepatology, 2012, 56: 532-543.
- 5 Zhang Q, Xu M, Qu Y, et al. Analysis of the differential expression of circulating microRNAs during the progression of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Mol Med Rep, 2015, 12: 5647-5654.
- 6 Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs [J]. RNA, 2004, 10: 1957-1966.
- 7 Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing [J]. Nature, 2007, 448: 83-86.
- 8 Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. Nature, 2003, 425: 415-419.
- 9 Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs [J]. Nature, 2005, 433: 769-773.
- 10 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- 11 Kitano M, Bloomston PM. Hepatic stellate cells and microRNAs in pathogenesis of liver fibrosis [J]. J Clin Med, 2016, 5: E38.
- 12 Zhang Z, Zha Y, Hu W, et al. The autoregulatory feedback loop of microRNA-21/programmed cell death protein 4/activation protein-1 (MiR-21/PDCD4/AP-1) as a driving force for hepatic fibrosis development [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 37082-37093.
- 13 Maubach G, Lim MC, Chen J, et al. miRNA studies in *in vitro*

- and *in vivo* activated hepatic stellate cells [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17: 2748-2773.
- 14 Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis[J]. Hepatology, 2012, 56: 300-310.
- 15 Yan G, Li B, Xin X, et al. MicroRNA-34a promotes hepatic stellate cell activation via targeting ACSL1[J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 3008-3015.
- 16 Zheng J, Lin Z, Dong P, et al. Activation of hepatic stellate cells is suppressed by microRNA-150[J]. Int J Mol Med, 2013, 32: 17-24.
- 17 Dai W, Zhao J, Tang N, et al. MicroRNA-155 attenuates activation of hepatic stellate cell by simultaneously preventing EMT process and ERK1 signalling pathway [J]. Liver Int, 2015, 35: 1234-1243.
- 18 Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298: G101-G106.
- 19 Wang J, Chu ES, Chen HY, 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: 7325-7338.
- 20 Lee JH, Lee H, Joung YK, et al. The use of low molecular weight heparin-pluronic nanogels to impede liver fibrosis by inhibition the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Biomaterials, 2011, 32: 1438-1445.
- 21 俞蕾敏, 吕宾. TGF- β smad 信号转导通路 with 肝纤维化的关系 [J]. 国际消化病杂志, 2008, 28: 397-400.
- 22 Xu F, Liu C, Zhou D, et al. TGF-beta/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64: 157-167.
- 23 Tu X, Zhang H, Zhang J, et al. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF- β signalling pathway[J]. J Pathol, 2014, 234: 46-59.
- 24 Roy S, Benz F, Vargas Cardenas D, et al. miR-30c and miR-193 are a part of the TGF- β -dependent regulatory network controlling extracellular matrix genes in liver fibrosis[J]. J Dig Dis, 2015, 16: 513-524.
- 25 Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. Roles for PI3K/AKT/PTEN pathway in cell signaling of nonalcoholic fatty liver disease[J]. ISRN Endocrinol, 2013, 2013: 472432.
- 26 Xiao Y, Wang J, Chen Y, et al. Up-regulation of miR-200b in biliary atresia patients accelerates proliferation and migration of hepatic stellate cells by activating PI3K/Akt signaling[J]. Cell Signal, 2014, 26: 925-932.
- 27 Wei J, Feng L, Li Z, et al. MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/Akt signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67: 387-392.
- 28 陈科全, 周宇. 核因子 NF- κ B 与肝纤维化的关系研究现状[J]. 国际消化病杂志, 2007, 27: 9-12.
- 29 Shu M, Huang DD, Hung ZA, et al. Inhibition of MAPK and NF- κ B signaling pathways alleviate carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in Toll-like receptor 5 (TLR5) deficiency mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471: 233-239.
- 30 Feng X, Tan W, Cheng S, et al. Upregulation of microRNA-126 in hepatic stellate cells may affect pathogenesis of liver fibrosis through the NF- κ B pathway[J]. DNA Cell Biol, 2015, 34: 470-480.
- 31 Hyun J, Wang S, Kim J, et al. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10993.

(收稿日期:2016-06-12)

(本文编辑:周骏)