

miR-199a-5p 通过调节肠道菌群促进胆总管结扎诱导的大鼠肝纤维化

崔笑妍¹, 于笑涵², 周静¹, 王璐瑶¹, 张荣花¹, 王梅梅¹, 熊亚南¹, 刘志勇³, 章广玲²

(¹ 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病重点实验室, 唐山 063210; ² 华北理工大学

临床医学院, 河北省医工融合精准医疗重点实验室, 唐山 063000; ³ 华北理工大学医学部, 唐山 063210)

摘要 目的 研究 miR-199a-5p 通过调节肠道菌群对胆总管结扎(BDL)诱导的大鼠肝纤维化的影响。方法 25 只 SD 大鼠随机分为 Sham 组、BDL 组、空载腺病毒(NC adv)组、miR-199a-5p adv 组和 miR-199a-5p sponge adv 组, 每组 5 只。HE、Masson 和 Sirius Red 染色观察大鼠肝组织病理变化及肝纤维化程度;全自动生化分析仪检测大鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TBIL)和直接胆红素(DBIL)含量;qRT-PCR 检测大鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达水平;双重免疫荧光和 Western blot 实验检测大鼠肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 I 型胶原 $\alpha 1$ 链(COL1A1)的蛋白表达水平;收集大鼠粪便进行 16S rRNA 高通量测序。结果 miR-199a-5p 在 BDL 大鼠肝组织中表达上调($P < 0.01$)。与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组大鼠肝损伤及胶原沉积现象更为严重,血清中 AST、ALT、TBIL 和 DBIL 含量以及肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 表达水平显著升高(均 $P < 0.05$)。然而,miR-199a-5p sponge adv 干预的结果与之相反(均 $P < 0.05$)。16S rRNA 测序结果显示,miR-199a-5p adv 干预可增加 BDL 大鼠肠道菌群的多样性和丰富度,改变肠道菌群组成,而 miR-199a-5p sponge adv 干预后菌群的结果与之相反(均 $P < 0.05$)。结论 miR-199a-5p 促进 BDL 大鼠肝纤维化,其机制可能与调节肠道菌群多样性和丰度相关。

关键词 miR-199a-5p;肠道菌群;胆总管结扎;肝纤维化;炎症

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1794-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.014

肝纤维化是全球性的健康问题,急需寻找肝纤维化可预测性的标志物以及治疗肝纤维化的替代策略^[1]。“肠-肝轴”的存在使得肠道和肝脏通过胆道、门静脉和体循环进行双向沟通。肠道内微生物的组成和结构失调与肝纤维化密切相关^[2]。miRNA 是一类长度为 21~23 bp 的基因表达调控因子,通过靶向 mRNA 来调节肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的活化,在肝纤维化病理过程中发挥促进/拮抗作用^[3]。此外,很多 miRNA 表达的改变伴随肠道菌群组成的变化^[4]。因此,肠道菌群和 miRNA 均可作为驱动肝纤维化的关键因素。课题组前

期 miRNAs 表达谱基因芯片的结果显示 miR-199a-5p 广泛富集于肝纤维化相关的生物学过程。据报道,miR-199a-5p 通过靶向 SOCS7 来促进 HSCs 活化,而 HSCs 活化是导致肝纤维化的关键因素^[5]。为此,推测 miR-199a-5p 影响了肝纤维化进程,其机制可能与调节肠道菌群有关。为了验证这一假设,在该研究中,构建了 BDL 诱导的大鼠肝纤维化模型,借助腺病毒载体注射和 16S rRNA 高通量菌群测序技术,寻找 miR-199a-5p、肝纤维化、肠道菌群三者之间的密切联系,从 miRNA 和肠道菌群角度为肝纤维化的治疗提供新的依据及方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 25 只 5 周龄 SPF 级健康 SD 雄性大鼠,体质量 130 g 左右,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。在恒温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 65%~70%,自然昼夜(12 h 光照/12 h 黑暗)和自由饮水的环境下适应性喂养 1 周后进行实验。所有动物实验经华北理工大学实验动物伦理委员会批准(批准

2024-07-07 接收

基金项目:河北省自然科学基金项目(编号:H2023209047、H2021209026);河北省教育厅在读研究生创新能力培养资助项目(编号:CXZZSS2024056);河北省引进留学人员项目(编号:C20210340);河北省重点研发计划项目(编号:213777115D);河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(编号:冀财预复[2020]397号)

作者简介:崔笑妍,女,硕士研究生;

章广玲,女,博士,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:zhanggl@ncst.edu.cn

号:LX2021110),所有动物实验过程遵守中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要仪器与试剂 腺病毒(苏州吉玛基因股份有限公司);TRIzol 总 RNA 提取试剂(美国 Thermo 公司);miRNAs 第一链 cDNA 试剂盒(上海生工生物工程有限公司);逆转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒(北京聚合美生物科技有限公司);HE、Masson 和 Sirius Red 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体和抗 GAPDH 抗体(美国 Abcam 公司);抗 I 型胶原 α 1 链(collagen type 1 alpha 1, COL1A1)抗体(美国 Santa 公司);荧光二抗和 DAPI 染液(上海碧云天有限公司);荧光正置显微镜(日本 Olympus 公司);NanoDrop 2000 分光光度仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 25 只 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、胆管结扎(BDL)组、空载腺病毒(NC adv)组、miR-199a-5p 腺病毒(miR-199a-5p adv)组和 miR-199a-5p sponge 腺病毒(miR-199a-5p sponge adv)组。通过腹膜内注射 3% 戊巴比妥钠溶液(0.15 ml/100 g)麻醉大鼠,除 Sham 组外,其余四组大鼠均进行胆总管分离和结扎以建立模型。Sham 组大鼠在开腹后暴露胆总管不予结扎之后仅关腹。术后在伤口处涂抹青霉素以防感染,让大鼠保持平坦待麻醉消退。在术后第 2 天,分别向 NC adv 组、miR-199a-5p adv 组和 miR-199a-5p sponge adv 组尾静脉注射 2×10^{10} 个病毒颗粒,即 200 μ l 浓度为 1×10^{11} PFU/ml 的腺病毒。其中 NC adv 用作 miR-199a-5p adv 和 miR-199a-5p sponge 的阴性对照。miR-199a-5p adv 用作过表达 miR-199a-5p, miR-199a-5p sponge 用作抑制 miR-199a-5p。在大鼠 BDL 术后第 14 天进行标本采集。麻醉后处死大鼠,采集各组大鼠血液、肝组织和新鲜粪便,在 80 $^{\circ}$ C 下储存直至使用。

1.2.2 组织病理学染色 大鼠完整肝右叶经 4% 多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡后分别进行 HE、Masson 和 Sirius Red 染色。正置显微镜镜下观察,采集图像进行分析。

1.2.3 血清生化指标的检测 大鼠腹主动脉取血,静置 2 h,4 $^{\circ}$ C 下 3 500 r/min 离心 15 min 分离得到血清。使用全自动生化分析仪测定各组大鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、

总胆红素(total bilirubin, TBIL)和直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)含量。

1.2.4 qRT-PCR 检测大鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达水平 通过 TRIzol 试剂提取大鼠肝组织总 RNA,使用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。采用 qRT-PCR 检测 miR-199a-5p(U6 为内参)的表达水平。反应程序为 95 $^{\circ}$ C、30 s,循环数 1;95 $^{\circ}$ C、5 s,60 $^{\circ}$ C、34 s,循环数 40。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的方法对实验数据进行处理,实验独立重复 3 次。基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence

Primer	Sequences (5'-3')
miR-199a-5p	F:GTGGAGAGAAAGGCAGTTCCTG
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCAGCACATATA

The downstream (R) sequence of the above primers is the universal downstream primer of the kit.

1.2.5 Western blot 检测大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达水平 用 RIPA 裂解液(含 1% PMSF)提取各组大鼠肝组织总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10% 凝胶)分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。转膜后,将膜在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 2 h。分别用抗 α -SMA(稀释比例 1:1 000)、COL1A1(稀释比例 1:1 000)和 GAPDH(稀释比例 1:5 000)的抗体在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。第 2 天,在相应 HRP 标记的二抗(稀释比例 1:5 000)下进行室温 2 h 的孵育,TBST 洗涤 3 次。最后,于暗室内加入 ECL 试剂,利用凝胶成像系统显影,采用 Image J 软件计算灰度值。

1.2.6 双重免疫荧光染色检测大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 表达 组织切片采用高压修复的方式,之后用 3% 过氧化物酶缓冲液进行封闭。封闭 1 h 后与混合一抗(α -SMA:COL1A1=1:1)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。次日将实验样品与混合二抗(AlexaFluor 555 标记的驴抗兔抗体:AlexaFluor 488 标记的山羊抗小鼠抗体=1:1)在室温下避光孵育 2 h,DAPI 染核 5 min。之后洗涤、干燥并封片。荧光显微镜下观察,采集图像用 Image J 软件计算荧光强度。

1.2.7 肠道菌群 16S rRNA 高通量测序 大鼠粪便标本置于干冰中,送往武汉迈特维尔生物科技有限公司进行 16S rRNA 测序。采用 CTAB 法提取样品

的全基因组 DNA,选择 16S rRNA 的 V3-V4 区域作为 PCR 扩增区域: 341F: 5'-CCTAYGGGRBGCAS-CAG-3'; 806R: 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'。提纯 PCR 产物,构建 cDNA 文库,使用平台 Illumina NovaSeq 测序。

1.3 统计学处理 所有实验均至少独立重复 3 次, GraphPad Prism 9.5.1 用于数据分析和绘图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个独立样本间的比较采用独立样本 *t* 检验的方法,两组及以上组别间的比较采用单因素方差分析的方法。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-199a-5p 在大鼠肝组织中的表达情况

qRT-PCR 结果(图 1)显示,与 Sham 组相比,BDL 组大鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达上调($P < 0.01$);与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组大鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达上调($P < 0.001$),而 miR-199a-5p sponge adv 组大鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达下调($P < 0.01$)。结果提示,miR-199a-5p 在 BDL 大鼠肝组织中表达上调且 miR-199a-5p 腺病毒有效转染至大鼠体内。

2.2 各组大鼠肝组织形态学观察 HE 染色结果(图 2)显示,Sham 组大鼠肝组织排列整齐,没有炎性细胞浸润以及纤维结缔组织增生的迹象。与 Sham 组相比,BDL 组大鼠肝组织中出现肝细胞肿胀和炎性细胞浸润的迹象;与 NC adv 组相比,miR-

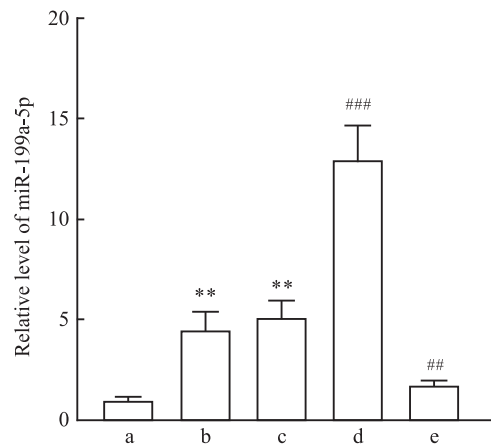


图 1 miR-199a-5p 在大鼠肝组织中的表达情况

Fig. 1 The expression of miR-199a-5p in liver tissues of rats

a: Sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-199a-5p adv group; e: miR-199a-5p sponge adv group; ** $P < 0.01$ vs Sham group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs NC adv group.

199a-5p adv 组大鼠肝组织排列更加紊乱,肝细胞进一步肿胀,炎性细胞浸润加剧。Masson 染色和 Sirius Red 染色结果(图 2)显示,与 Sham 组相比,BDL 组大鼠肝组织中出现大量胶原沉积;与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组大鼠肝组织中胶原沉积现象进一步加重。然而,上述肝脏病理变化在 miR-199a-5p sponge adv 组大鼠肝组织中均得到一定程度的缓解。

2.3 各组大鼠血清生化指标检测结果 如图 3 所示,与 Sham 组相比,BDL 组大鼠血清中 AST、ALT、

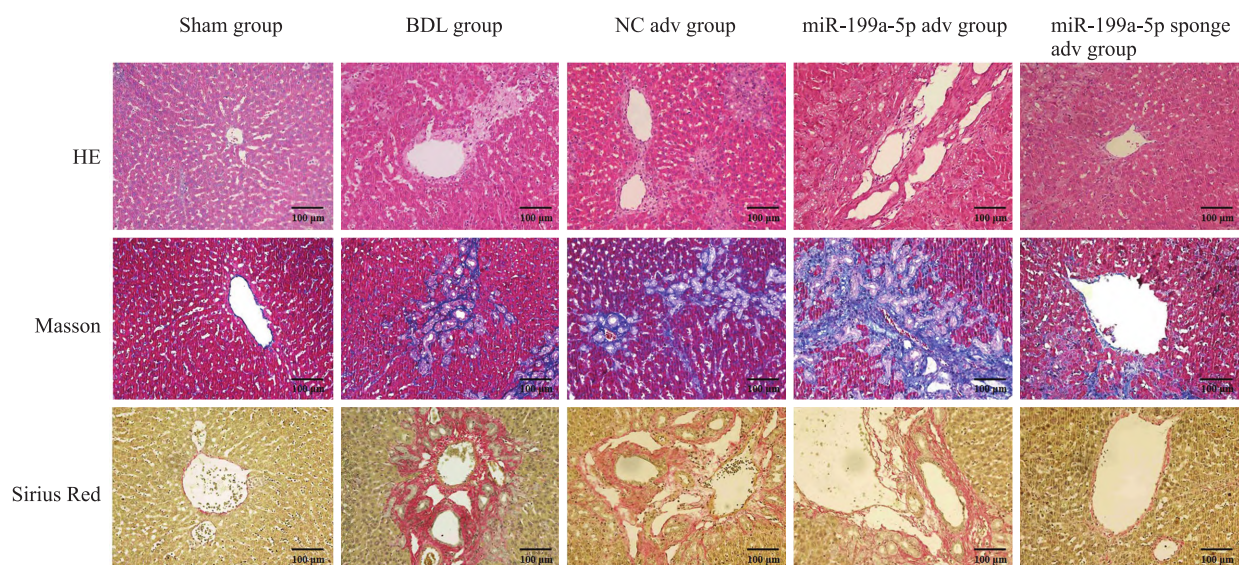


图 2 各组大鼠肝组织 HE、Masson 及 Sirius Red 染色结果 $\times 200$

Fig. 2 The results of HE, Masson, and Sirius Red staining of liver tissues of rats in each group $\times 200$

TBIL 和 DBIL 含量显著升高(均 $P < 0.001$);与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组大鼠血清中 AST、ALT、TBIL 和 DBIL 含量进一步升高(均 $P < 0.001$),而 miR-199a-5p sponge adv 组大鼠血清中上述 4 种生化指标的 含量均显著下降(均 $P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 的表达水平 双重免疫荧光染色结果(图 4A - 4C)显示,与 Sham 组相比,BDL 组大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 的荧光强度显著增强(均 $P < 0.001$);与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 的荧光强度显著增强($P < 0.01$, $P < 0.001$),而 miR-199a-5p sponge adv 组大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 的荧光强度显著降低(均 $P < 0.001$)。

Western blot 实验结果(图 4D - 4F)显示,与 Sham 组相比,BDL 组大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 蛋白的表达均显著上调(均 $P < 0.01$);与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 蛋白的表达均显著上调(均 $P < 0.05$),而 miR-199a-5p sponge adv 组大鼠肝组织中 α -SMA 和 COL1A1 蛋白的表达均显著下调($P < 0.001$, $P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠肠道菌群多样性和丰富度变化

Ace、Chao1 和 Shannon 指数用于反映肠道菌群多样性和丰富度。结果显示,与 Sham 组相比,BDL 组 Ace 和 Chao1 指数显著增加(均 $P < 0.05$),Shannon 指数有增加的趋势,但差异无统计学意义;与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组 Ace 和 Shannon 指数显著增加(均 $P < 0.05$),而 miR-199a-5p sponge adv 组 Shannon 指数显著降低(均 $P < 0.05$),Ace 和

Chao1 指数的差异无统计学意义。见图 5。

2.6 各组大鼠肠道菌群物种组成分析 物种注释结果显示,在门水平上,共鉴定出 10 个菌门,分别是 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Proteobacteria*、*Euryarchaeota*、*unidentified_Bacteria*、*Verrucomicrobiota*、*Actinobacteriota*、*Nanoarchaeota* 和 *Deferribacteres*。其中,*Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 是各组大鼠的优势菌门,占细菌总数的 90% 以上(图 6A)。与 Sham 组相比,BDL 组 *Firmicutes* 的相对丰度显著升高($P < 0.05$),*Bacteroidetes* 的相对丰度显著降低($P < 0.05$);与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组 *Firmicutes* 的相对丰度以及 *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) 比值均显著升高($P < 0.05$),*Bacteroidetes* 的相对丰度显著降低($P < 0.05$),而 miR-199a-5p sponge adv 组 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 的相对丰度以及 F/B 比值的变化与 miR-199a-5p adv 组相反,但差异无统计学意义。见表 2。

在属水平上,丰度排名前 10 的菌属分别是 *Ligilactobacillus*、*Ruminococcus*、*Acinetobacter*、*Limosilactobacillus*、*Lactobacillus*、*Romboutsia*、*Desulfovibrio*、*Bacteroides*、*Enterococcus* 和 *Bifidobacterium* (图 6B)。其中,*Ruminococcus*、*Lactobacillus*、*Romboutsia* 和 *Bifidobacterium* 的变化值得关注。与 Sham 组相比,BDL 组 *Ruminococcus* 的相对丰度显著升高($P < 0.05$),*Lactobacillus*、*Romboutsia* 和 *Bifidobacterium* 的相对丰度显著降低($P < 0.05$);与 NC adv 组相比,miR-199a-5p adv 组 *Ruminococcus* 的相对丰度显著升高($P < 0.05$),*Romboutsia* 和 *Bifidobacterium* 的相对丰度显著降低($P < 0.05$),*Lactobacillus* 的相对丰度有降低趋势,但差异无统计学意义;而 miR-199a-5p

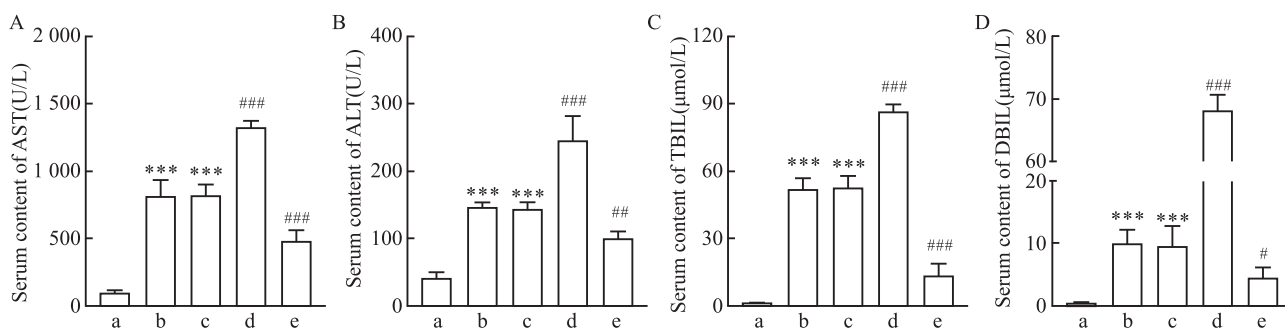


图3 各组大鼠血清生化指标检测结果

Fig. 3 The results of serum biochemical indexes of rats in each group

A: Serum content of AST; B: Serum content of ALT; C: Serum content of TBIL; D: Serum content of DBIL; a: Sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-199a-5p adv group; e: miR-199a-5p sponge adv group; *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs NC adv group.

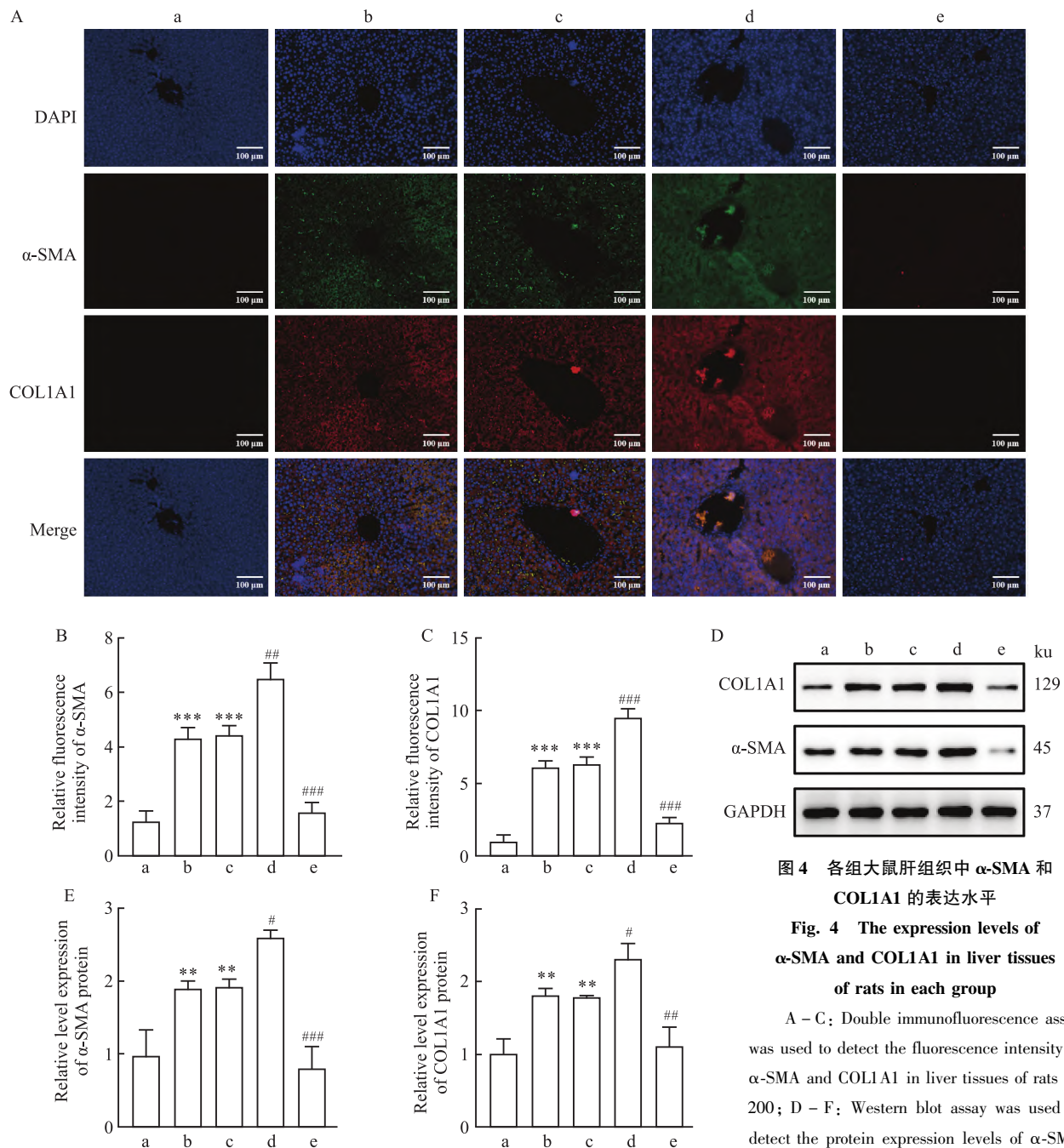


图4 各组大鼠肝组织中α-SMA和COL1A1的表达水平

Fig. 4 The expression levels of α-SMA and COL1A1 in liver tissues of rats in each group

A – C: Double immunofluorescence assay was used to detect the fluorescence intensity of α-SMA and COL1A1 in liver tissues of rats × 200; D – F: Western blot assay was used to detect the protein expression levels of α-SMA

and COL1A1 in liver tissues of rats; a: Sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-199a-5p adv group; e: miR-199a-5p sponge adv group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs NC adv group.

表2 各组大鼠肠道菌群在门水平的丰度比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the abundance of intestinal microbiota at phylum level of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Firmicutes	Bacteroidetes	F/B ratio
Sham	52.42 ± 4.78	45.27 ± 5.04	1.18 ± 0.25
BDL	67.71 ± 2.07*	24.09 ± 2.91*	2.83 ± 0.30
NC adv	66.98 ± 2.93*	25.60 ± 6.36*	2.76 ± 0.87
miR-199a-5p adv	81.03 ± 2.93#	12.79 ± 3.87#	6.72 ± 1.92#
miR-199a-5p sponge adv	59.41 ± 6.14	36.62 ± 2.86	1.64 ± 0.29
F value	20.868	23.884	15.330
P value	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs NC adv group.

sponge adv 组上述四种菌属的相对丰度变化与 miR-199a-5p adv 组相反 ($P < 0.05$)。见表3。

3 讨论

肝纤维化是一种以瘢痕组织取代正常肝组织的进行性病理过程,影响着多种慢性肝脏疾病的进展和预后。尽管一些抗纤维化药物,包括抗炎药、抗氧化剂和抗病毒药,已经用于临床和(或)临床前试验,但有限的疗效和严重的副作用仍然是其应用的

表3 各组大鼠肠道菌群在属水平的丰度比较($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Comparison of the abundance of intestinal microbiota at genus level of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>Ruminococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Romboutsia</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Sham	2.08 ± 1.65	4.84 ± 0.39	3.89 ± 0.74	1.18 ± 0.15
BDL	7.00 ± 1.12 *	1.95 ± 0.92 *	1.22 ± 0.27 *	0.40 ± 0.05 *
NC adv	7.52 ± 2.28 *	1.82 ± 0.70 *	1.39 ± 0.56 *	0.37 ± 0.03 *
miR-199a-5p adv	11.30 ± 0.55 #	0.22 ± 0.12	0.07 ± 0.04 #	0.07 ± 0.09 #
miR-199a-5p sponge adv	1.02 ± 0.05 #	4.50 ± 1.39 #	2.59 ± 0.19 #	0.80 ± 0.11 #
<i>F</i> value	28.035	16.780	32.756	60.217
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

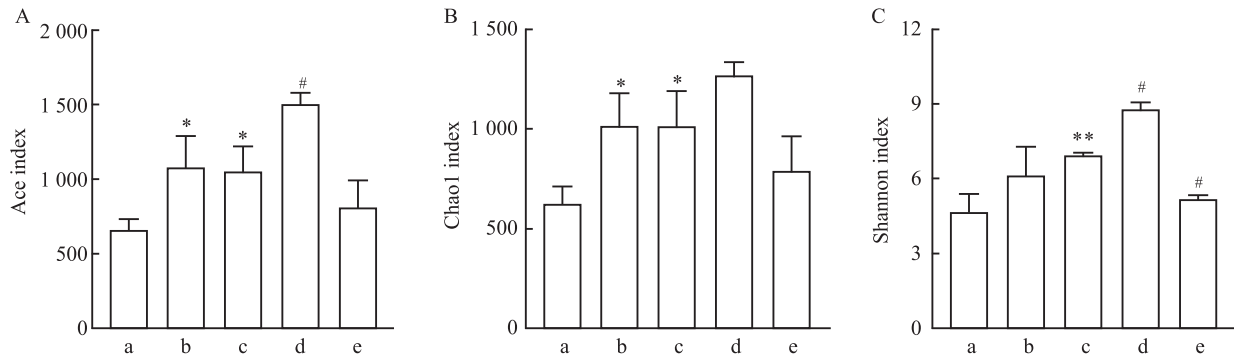
* $P < 0.05$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs NC adv group.

图5 各组大鼠肠道菌群多样性和丰富度变化

Fig. 5 Changes in diversity and richness of intestinal microbiota of rats in each group

A: Ace index; B: Chao1 index; C: Shannon index; a: Sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-199a-5p adv group; e: miR-199a-5p sponge adv group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs NC adv group.

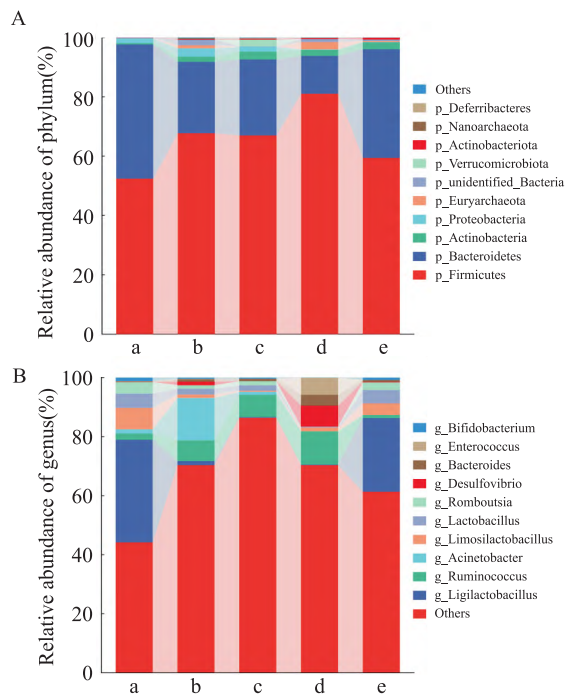


图6 各组大鼠肠道菌群门和属水平的物种组成分析

Fig. 6 Species composition analysis of intestinal microbiota at phylum and genus levels in rats in each group

A: Species composition at phylum level; B: Species composition at genus level; a: Sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-199a-5p adv group; e: miR-199a-5p sponge adv group.

主要障碍^[6]。miRNA 为内源性的小分子非编码 RNA,是宿主免疫反应的重要调节因子。近年来,越来越多的研究^[7]集中在分析 miRNA 在纤维化疾病中的机制,揭示 miRNA 的生物学作用。然而,miR-199a-5p 在肝纤维化进展中的确切作用尚待阐明。该研究通过 BDL 诱导胆汁淤积性大鼠肝纤维化模型,采用腺病毒载体注射和 16S rRNA 高通量测序技术,探讨了 miR-199a-5p 在 BDL 大鼠体内的促肝纤维化作用,并且证实了这种作用与调节肠道菌群有关。

长期的炎症和活化的 HSCs 是肝纤维化形成和发展的重要驱动因素。血清 AST、ALT、TBIL 和 DBIL 可以直接/间接反映肝脏炎症和肝功能的状况^[8]。活化的 HSCs 以 α -SMA 和 COL1A1 高表达为特点,导致细胞外基质蛋白的过量分泌,逐渐加重肝纤维化程度^[9]。实验数据显示,BDL 术后大鼠血清中生化指标 (AST、ALT、TBIL 和 DBIL) 的含量和肝组织中肝纤维化标志物 (α -SMA 和 COL1A1) 的表达水平均显著升高,miR-199a-5p adv/miR-199a-5p sponge adv 干预使上述血清生化指标含量和肝纤维化标志物表达水平进一步升高/降低。结果表明 miR-199a-5p 在 BDL 大鼠肝组织中的过表达可促进

肝纤维化的进展,而抑制其表达大鼠肝纤维化得到缓解。

肝脏和肠道之间存在着密不可分的联系,肠道内微生物的组成和结构失调与肝纤维化的发病机制密切相关^[10]。该研究旨在阐明 BDL 模型中肠道菌群的结构特征,并探讨 miR-199a-5p 是否具有菌群调节作用。16S rRNA 高通量菌群测序分析显示,与 Sham 组相比,BDL 组大鼠的肠道菌群在多样性和丰富度方面存在显著差异。miR-199a-5p adv/miR-199a-5p sponge adv 干预改变了 BDL 大鼠肠道菌群的多样性和丰富度。在门水平上,*Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 是 BDL 大鼠肠道菌群的优势菌门。F/B 比率已被证明与肥胖和代谢紊乱的风险呈正相关^[11]。在该研究中,miR-199a-5p adv 干预导致 *Firmicutes* 的丰度显著增加,*Bacteroidetes* 的丰度显著降低,因此,导致 BDL 大鼠 F/B 比值升高,而 miR-199a-5p sponge adv 干预结果与之相反。在属水平上,miR-199a-5p adv 干预导致 *Ruminococcus* 的丰度显著升高,*Romboutsia* 和 *Bifidobacterium* 的丰度显著降低,且 *Lactobacillus* 的丰度有降低趋势。然而,miR-199a-5p sponge adv 干预菌群的结果与之相反。*Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 是健康人类肠道中的有益菌。有报告显示,在肝损伤过程中,*Lactobacillus* 在肠道中积累并产生 IL-22,这有助于恢复受损的肠道屏障,*Lactobacillus* 可能是代表肝损伤愈合阶段的重要标志物^[12]。已有研究^[13]报道 miR-21 可通过调节 *Lactobacillus* 的丰度抑制 BDL 诱导的肝损伤。Lee et al^[14]研究表明,*Bifidobacterium* 显著降低血液 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GTP)、ALT 和 AST 水平以及肝脏 α -SMA 和 COL1A1 的表达,改善实验小鼠肝损伤和纤维化。*Ruminococcus* 是一种革兰阳性菌,已被证明与肝纤维化的病理变化呈正相关。此外,*Ruminococcus* 的上调可作为非酒精性脂肪性肝病进展的肠道微生物特征^[15]。miR-199a-5p 可以改变 BDL 大鼠肠道菌群的多样性和丰富度,增加 F/B 比值,降低有益菌的丰度,加重肠道菌群失衡。

综上所述,该研究表明 miR-199a-5p 通过调节肠道菌群促进 BDL 诱导的大鼠肝纤维化。研究结果从肠道菌群角度揭示了 miR-199a-5p 与肝纤维化之间的关联,提示 miR-199a-5p 可能是治疗肝纤维化的潜在靶点。但鉴于肠道菌群的组成和结构复杂多样,探究关键菌群在 miR-199a-5p 调控肝纤维化过程中如何发挥作用是未来研究应着重考虑的方

面。

参考文献

- [1] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151–66. doi:10.1038/s41575-020-00372-7.
- [2] Shen B, Zhou C, Gu T, et al. Kuhuano alleviates liver fibrosis by modulating gut microbiota-mediated hepatic IFN signaling and bile acid synthesis[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1080226. doi:10.3389/fphar.2022.1080226.
- [3] Wang H, Wang Z, Wang Y, et al. miRNA-130b-5p promotes hepatic stellate cell activation and the development of liver fibrosis by suppressing SIRT4 expression[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(15): 7381–94. doi:10.1111/jcmm.16766.
- [4] Nikolaieva N, Sevcikova A, Omelka R, et al. Gut microbiota-MicroRNA interactions in intestinal homeostasis and cancer development[J]. Microorganisms, 2022, 11(1): 107. doi:10.3390/microorganisms11010107.
- [5] Ding R, Zheng J, Li N, et al. DZNep, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, suppresses hepatic fibrosis through regulating miR-199a-5p/SOCS7 pathway[J]. PeerJ, 2021, 9: e11374. doi:10.7717/peerj.11374.
- [6] Wu J, Huang J, Kuang S, et al. Synergistic microRNA therapy in liver fibrotic rat using MRI-visible nanocarrier targeting hepatic stellate cells[J]. Adv Sci, 2019, 6(5): 1801809. doi:10.1002/advs.201801809.
- [7] Zhao X, Xue X, Cui Z, et al. MicroRNAs-based diagnostic and therapeutic applications in liver fibrosis[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2023, 14(4): e1773. doi:10.1002/wrna.1773.
- [8] 王玮琛,周大臣,崔笑,等.七叶皂苷钠对胆管结扎诱导的肝纤维化作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(8): 1257–62. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.017.
- [8] Wang W C, Zhou D C, Cui X, et al. Effect of sodium aescinate on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation[J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(8): 1257–62. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.017.
- [9] Niu W X, Bao Y Y, Zhang N, et al. Dehydromevalonolactone ameliorates liver fibrosis and inflammation by repressing activation of NLRP3 inflammasome[J]. Bioorg Chem, 2022, 127: 105971. doi:10.1016/j.bioorg.2022.105971.
- [10] Tilg H, Adolph T E, Trauner M. Gut-liver axis: pathophysiological concepts and clinical implications[J]. Cell Metab, 2022, 34(11): 1700–18. doi:10.1016/j.cmet.2022.09.017.
- [11] Lin Y P, Fang Q L, Fu S N, et al. The alleviating effect of Scutellaria amoena extract on the regulation of gut microbiota and its metabolites in NASH rats by inhibiting the NLRP3/ASC/caspase-1 axis[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1143785. doi:10.3389/fphar.2023.1143785.
- [12] Yu L, Wang L, Yi H, et al. Beneficial effects of LRP6-CRISPR on prevention of alcohol-related liver injury surpassed fecal micro-

- biota transplant in a rat model[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(4): 1015–29. doi:10.1080/19490976.2020.1736457.
- [13] Santos A A, Afonso M B, Ramiro R S, et al. Host miRNA-21 promotes liver dysfunction by targeting small intestinal *Lactobacillus* in mice[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1–18. doi:10.1080/19490976.2020.1840766.
- [14] Lee D Y, Shin J W, Shin Y J, et al. *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* alleviate liver injury and fibrosis in mice by regulating NF- κ B and AMPK signaling[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2024, 34(1): 149–56. doi:10.4014/jmb.2310.10006.
- [15] Zhang J, Wang W, Cui X, et al. *Ganoderma lucidum* ethanol extracts ameliorate hepatic fibrosis and promote the communication between metabolites and gut microbiota *g_Ruminococcus* through the NF- κ B and TGF- β 1/Smads pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322: 117656. doi:10.1016/j.jep.2023.117656.

miR-199a-5p promotes bile duct ligation-induced liver fibrosis of rats by regulating intestinal microbiota

Cui Xiaoyan¹, Yu Xiaohan², Zhou Jing¹, Wang Luyao¹, Zhang Ronghua¹, Wang Meimei¹,
Xiong Yanan¹, Liu Zhiyong³, Zhang Guangling²

(¹Hebei Provincial Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210; ²Hebei Key Laboratory of Integrated Precision Medicine, Clinical School of Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000; ³Health Science Center of North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-199a-5p on common bile duct ligation (BDL)-induced liver fibrosis in rats by regulating intestinal flora. **Methods** The 25 SD rats were randomly divided into five groups: the Sham group, the BDL group, the negative control adenovirus (NC adv) group, the miR-199a-5p adv group and the miR-199a-5p sponge adv group. The pathological changes of liver tissue and the degree of liver fibrosis were observed by HE, Masson and Sirius Red staining. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL) and direct bilirubin (DBIL) in serum of rats were determined by a fully automatic biochemical analyzer. The mRNA expression level of miR-199a-5p in liver tissue of rats was detected by qRT-PCR. The protein expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) in liver tissue of rats were detected by double immunofluorescence staining and Western blot experiment. Rat feces were collected for 16S rRNA high-throughput sequencing. **Results** The expression of miR-199a-5p was up-regulated in the liver tissue of BDL rats ($P < 0.01$). Compared with the NC adv group, the degree of liver injury and collagen deposition were relatively serious, the levels of AST, ALT, TBIL and DBIL in serum and the expression levels of α -SMA and COL1A1 in liver tissue increased in the miR-199a-5p adv group (all $P < 0.05$). However, the results of miR-199a-5p sponge adv intervention were opposite (all $P < 0.05$). The 16S rRNA sequencing results showed that rats treated with miR-199a-5p adv were characterized by increased diversity and richness of intestinal microbiota, changed composition of intestinal microbiota, while the results of miR-199a-5p sponge adv interfering with the bacterial community were opposite (all $P < 0.05$). **Conclusion** miR-199a-5p promotes liver fibrosis of BDL rats, and its mechanism may be related to regulating the diversity and abundance of intestinal microbiota.

Key words miR-199a-5p; intestinal microbiota; bile duct ligation; liver fibrosis; inflammation

Fund programs Natural Science Foundation Project of Hebei Province (Nos. H2023209047, H2021209026); Graduate Student Innovation Ability Training Project of Department of Education of Hebei Province (No. CXZZSS2024056); Returned Overseas Students Project of Hebei Province (No. C20210340); Key Research and Development Project of Hebei Province (No. 213777115D); Government Funded Clinical Medicine Excellent Talents Training Project of Hebei Province (No. Jicaiyufu[2020]No.397)

Corresponding author Zhang Guangling, E-mail: zhanggl@ncst.edu.cn