

网络出版时间:2024-09-25 10:00:19 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240924.1714.013

# miR-296-3p 对胆总管结扎诱导的大鼠肝纤维化的影响

张亚楠<sup>1</sup>,王璐瑶<sup>1</sup>,周 静<sup>1</sup>,张荣花<sup>1</sup>,熊亚南<sup>1</sup>,王梅梅<sup>1</sup>,刘志勇<sup>2</sup>,章广玲<sup>3</sup><sup>(1)</sup> 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;<sup>(2)</sup> 华北理工大学医学部,唐山 063210;<sup>(3)</sup> 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)

**摘要** **目的** 探究微小 RNA-296-3p(miR-296-3p)对胆总管结扎(BDL)诱导的大鼠肝纤维化的影响。**方法** 将 25 只 SD 大鼠随机分为假手术(sham)组、模型(BDL)组、NC adv 组、miR-296-3p adv 组和 miR-296-3p sponge adv 组,每组 5 只。通过苏木精-伊红(HE)、Masson 染色和天狼星红(Sirius Red)染色观察大鼠肝组织病理变化;比较各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TBIL)含量;用 qRT-PCR 检测大鼠肝组织中 miR-296-3p、白介素(IL)-6、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  的表达水平以及平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、I 型胶原(Col1A1)、结缔组织生长因子(CTGF)mRNA 的表达水平;Western blot 检测  $\alpha$ -SMA、Col1A1、CTGF 蛋白的表达水平;免疫组织化学染色(IHC)检测  $\alpha$ -SMA 的表达水平;生物信息学网站预测 miR-296-3p 的候选靶基因;检测锌指和 BTB 结构域蛋白 20(ZBTB20)mRNA 和蛋白的表达水平。**结果** 病理学染色结果显示,与 sham 组相比,BDL 组和 NC adv 组大鼠肝组织中大量炎症细胞浸润和胶原沉积,与 NC adv 组相比,miR-296-3p adv 组肝组织中炎症细胞减少,胶原沉积减少,而 miR-296-3p sponge adv 组胶原聚积和炎症反应加重。与 sham 组相比,BDL 组和 NC adv 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 含量升高,miR-296-3p 的表达水平降低,IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平及  $\alpha$ -SMA、Col1A1、CTGF mRNA 和蛋白表达水平均升高( $P < 0.05$ );与 NC adv 组相比,miR-296-3p adv 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 含量降低,miR-296-3p 表达水平升高,IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平降低且肝组织中  $\alpha$ -SMA、Col1A1、CTGF mRNA 和蛋白表达水平均降低( $P < 0.05$ ),miR-296-3p sponge adv 组结果与 miR-296-3p adv 组结果相反( $P < 0.05$ )。生物信息学网站预测到 ZBTB20 可能是 miR-296-3p 的候选靶基因。与 sham 组相比,BDL 组和 NC adv 组大鼠肝组织中 ZBTB20 mRNA 和蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),与 NC adv 组相比,miR-296-3p adv 组肝组织中 ZBTB20 表达降低( $P < 0.05$ ),而 miR-296-3p sponge adv 组肝组织中 ZBTB20 表达升高( $P < 0.05$ )。**结论** miR-296-3p 在 BDL 诱导的大鼠肝纤维化组织中表达水平降低,miR-296-3p 可能通过靶定 ZBTB20 抑制 BDL 大鼠肝纤维化。

**关键词** miR-296-3p;ZBTB20;胆总管结扎;大鼠;肝纤维化;炎症因子**中图分类号** R 575.2**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1583-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.013

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是多种病因引发的慢性肝脏疾病,例如病毒性感染、血吸虫感染、乙醇、代谢综合征、自身免疫性疾病、胆汁淤积和药物等因素<sup>[1]</sup>。一项全国 570 万人的体检数据分析结果显示肝纤维化患病率为 8.34%<sup>[2]</sup>。早期的肝纤维化如未得到有效的治疗将可能进展为肝硬化、肝衰竭甚至是肝癌,对人类的命健康带来严重的威

胁<sup>[3]</sup>。因此,研究肝纤维化的发病机制并开发有效的治疗策略来治疗或逆转肝纤维化有重要意义。

微小 RNAs (microRNAs, miRNAs)是一类小的非编码 RNA,长度为 20~24 个核苷酸。已有研究报道 miR-296-3p 能够抑制结直肠癌<sup>[4]</sup>、胶质瘤<sup>[5]</sup>以及甲状腺乳头状癌细胞<sup>[6]</sup>的生长。然而,miR-296-3p 在肝纤维化疾病中的影响尚不清楚。该研究通过胆总管结扎(bile duct ligation, BDL)法构建大鼠胆汁淤积肝纤维化模型并给予 miR-296-3p adv 和 miR-296-3p sponge adv 干预,通过肝功能检测、肝组织病理学染色等方法,观察 miR-296-3p 对 BDL 肝纤维化的作用,为肝纤维化的治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物 25 只 SPF 级 SD 雄性大鼠购自

2024-08-15 接收

基金项目:河北省自然科学基金(编号:H2023209047、H2021209026);河北省引进留学人员资助项目(编号:C20210340);河北省重点研发计划项目(编号:213777115D);河北省财政厅 2020 年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:张亚楠,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

北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2020-0004,体质量 130 g。实验动物置于华北理工大学实验动物中心屏障实验室饲养[SYXK(冀):2020-007],大鼠饲养在温度为 22~24℃,相对湿度为 40%~60%,且昼/夜循环为 12 h 的舒适环境中,自由进食和饮水,适应性喂养 1 周后开始实验。动物实验内容经华北理工大学实验动物伦理委员会批准(批准号:LX2021110)。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 腺病毒 NC adv、腺病毒 miR-296-3p adv 及腺病毒 miR-296-3p sponge adv 购自苏州吉玛基因股份有限公司;qRT-PCR 引物购自上海生工生物工程股份有限公司;兔单克隆抗体  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin, $\alpha$ -SMA)(杭州华安公司,货号:ET1607-43);兔多克隆抗体 I 型胶原  $\alpha$ 1 链(type I collagen  $\alpha$ 1 chain,Col1A1)(美国 Affinity Bioscience 公司,货号 AF7001);兔多克隆抗体结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)(天津赛尔生物科技有限公司,货号:SRP01065);兔多克隆抗体锌指和 BTB 结构域蛋白 20(zinc finger and BTB domain containing 20,ZBTB20)(美国 Proteintech 公司,货号 23987-1-AP);鼠单克隆抗体 GAPDH(美国 ABclonal 公司,货号:AC035);HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(北京普利莱公司,货号:C1309)、HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗(北京普利莱公司,货号:C1308);ECL 显色液(北京普利莱公司);荧光定量 PCR 检测试剂盒(北京聚合美生物科技有限公司);Masson 三色染液和天狼星红(Sirius Red)染液(北京索莱宝公司);PV6000 免疫组化试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)。7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);URIT-8210 全自动生化仪(桂林优利特医疗电子有限公司),ChemiScope 6100 EXP 化学发光成像系统(上海秦翔科学仪器有限公司),CX23 正置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及处理** 25 只 SD 雄性大鼠,随机分为假手术(sham)组、模型(BDL)组、NC adv 组、miR-296-3p adv 组、miR-296-3p sponge adv 组,每组 5 只,sham 组仅暴露胆总管,其余组大鼠均进行胆总管结扎。手术第 2 天进行腺病毒注射,各组分别注射 200  $\mu$ l 约  $2 \times 10^{10}$  个病毒颗粒。sham 组和 BDL 组注射同体积的生理盐水,在手术后第 14 天采集各组大鼠肝组织和血清标本进行检测。

**1.2.2 免疫组织化学染色** 石蜡切片脱蜡至水,使

用 EDTA 工作液进行抗原热修复,内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min,滴加兔抗  $\alpha$ -SMA(1:200),放入湿盒 4℃过夜,PBS 清洗后滴加羊抗兔 IgG 聚合物,37℃孵育 2 h,DAB 显色,苏木精染色 2 min,脱水透明,中性树胶封片,显微镜下观察  $\alpha$ -SMA 的表达。

**1.2.3 Western blot 法** 取大鼠肝组织提取总蛋白,通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后将凝胶中的蛋白转到 PVDF 膜上,于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,放入一抗( $\alpha$ -SMA、Col1A1、CTGF、ZBTB20 均为 1:1 000,GAPDH 为 1:10 000)孵育盒中置于 4℃冰箱过夜,TBST 洗膜 4 次,每次 5 min。放入羊抗兔/鼠二抗(1:2 000/5 000)孵育盒中室温孵育 2 h,TBST 洗膜 4 次,每次 5 min。使用凝胶成像系统检测信号。

**1.2.4 血清生化检测** 术后第 14 天禁食禁水 12 h,各组大鼠腹主动脉取血(取血前使用 4% 戊巴比妥麻醉),全血经 3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,-80℃储存备用。全自动生化分析仪测定大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)和总胆红素(total bilirubin,TBIL)含量。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR** 取大鼠肝组织,使用 TRIzol 法提取总 RNA,通过 Nanodrop 2000 测定 RNA 浓度和纯度,取相应体积的 RNA 利用逆转录试剂盒进行逆转录得到 cDNA。按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作。U6 和 GAPDH 作为内参,利用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法对实验数据进行处理,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence

Primer	Sequences(5'→3')
miR-296-3p	F:GAGGGTTGGGTGGAGGCTCTCC
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCAGCACATATA
$\alpha$ -SMA	F:GCGTGGCTATTCTTCGTGACTAC R:CATCAGGCAGTTCGTAGCTCTTCTC
Col1A1	F:TGTGTGCTCCTGCTGGCAAGAATG R:GTACACCTGTTCGCTGCTCTCAC
CTGF	F:GAAATGCTGTGAGGAGTGGGTCTG R:CCTAATGTGCTCTTCCAGTCGCTAGG
IL-6	F:ACTTCCAGCCAGTTGCCCTTCTTG R:TGGTCTGTTGTGGGTGGTATCCTC
IL-1 $\beta$	F:AATCTCACAGCATCTCGACAAG R:TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC
TNF- $\alpha$	F:CACCACGCTCTTCTGCTACTGAAC R:TGGGCTACGGGCTTGCTCACTC
GAPDH	F:GACATGCCGCTGGAGAAAC R:AGCCAGGATGCCCTTTACT

**1.2.6 生物信息学网站预测** 利用生物信息学网站 DIAIA Tools (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/>)、miRDB (<http://mirdb.org/>) 和 TargetScan (<https://www.targetscan.org/>) 预测 miR-296-3p 下游靶基因, 3 个数据库取交集。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-296-3p 对 BDL 大鼠肝组织形态学的影响** 如图 1A, sham 组大鼠肝细胞形态正常, 呈条索状排列, BDL 组和 NC adv 组大鼠肝小叶结构严重受损, 肝细胞排列紊乱, 肝细胞肿胀, 汇管区可见胆小管增生和大量的炎症细胞浸润, miR-296-3p adv 组大鼠肝组织中炎症细胞减少, 而在 miR-296-3p sponge adv 组中肝细胞出现坏死, 炎症反应加重。Masson 染色和 Sirius Red 染色显示, sham 组大鼠肝小叶结构完整, 未见纤维沉积; BDL 组和 NC adv 组汇管区、中央静脉区可见大量的胶原纤维 ( $P < 0.05$ ), 与 NC adv 组相比, miR-296-3p adv 组胶原沉积减少 ( $P < 0.05$ ), 而 miR-296-3p sponge adv 组胶原沉积进一步加重 ( $P < 0.05$ )。与 sham 组相比, BDL 组和 NC adv 组大鼠体重降低 ( $P < 0.05$ ), 与 NC adv 组相比, miR-296-3p adv 组和 miR-296-3p sponge adv 组体重未发生明显改变 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 miR-296-3p 对 BDL 大鼠血清中 ALT、AST 及 TBIL 含量的影响** 如表 2, 与 sham 组相比, BDL 组和 NC adv 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 含量均升高 ( $P < 0.01$ ); 与 NC adv 组相比, miR-296-3p adv 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 含量均降低 ( $P < 0.01$ ), miR-296-3p sponge adv 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 含量均升高 ( $P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 含量 ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Serum ALT, AST, TBIL levels  
in each group of rats ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

Group	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL( $\mu\text{mol/L}$ )
sham	41.50 $\pm$ 7.19	116.0 $\pm$ 35.36	1.32 $\pm$ 0.31
BDL	147.2 $\pm$ 6.63 **	827.4 $\pm$ 105.0 **	52.34 $\pm$ 4.75 **
NC adv	144.7 $\pm$ 9.39 **	824.3 $\pm$ 81.45 **	52.95 $\pm$ 5.07 **
miR-296-3p adv	95.86 $\pm$ 7.66 ##	456.6 $\pm$ 32.80 ##	14.31 $\pm$ 2.08 ##
miR-296-3p sponge adv	226.3 $\pm$ 35.07 ##	1125 $\pm$ 94.69 ##	67.31 $\pm$ 9.55 ##
F value	79.68	131.30	138.70
P value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

\*\*  $P < 0.01$  vs sham group; ##  $P < 0.01$  vs NC adv group

**2.3 miR-296-3p 在 BDL 大鼠肝组织中的表达水平** 如图 2 所示, 与 sham 组相比, BDL 组和 NC adv 组大鼠肝组织 miR-296-3p 表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), 与 NC adv 组比较, miR-296-3p adv 组大鼠肝组织 miR-296-3p 表达水平升高 ( $P < 0.001$ ), miR-296-3p sponge adv 组大鼠肝组织 miR-296-3p 表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), 提示腺病毒成功转染至大鼠体内。

**2.4 miR-296-3p 对 BDL 大鼠肝组织炎症因子表达的影响** 如图 3, qRT-PCR 结果显示, 与 sham 组相比, BDL 组和 NC adv 组肝组织中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), 与 NC adv 组相比, miR-296-3p adv 组 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), miR-296-3p sponge adv 组 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), 过表达 miR-296-3p 可以抑制 BDL 大鼠肝组织的炎症反应。

**2.5 miR-296-3p 对 BDL 大鼠肝组织纤维化标志物表达的影响** 如图 4, qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, 与 sham 组相比, BDL 组和 NC adv 组肝组织中纤维化标志物  $\alpha$ -SMA、Col1A1、CTGF mRNA 和蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), 与 NC adv 组相比, miR-296-3p adv 组  $\alpha$ -SMA、Col1A1、CTGF mRNA 和蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), miR-296-3p sponge adv 组  $\alpha$ -SMA、Col1A1、CTGF mRNA 和蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。

**2.6 miR-296-3p 对 BDL 大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA 蛋白表达的影响** 如图 5, 免疫组织化学染色结果显示, 与 sham 组相比, BDL 和 NC adv 组肝组织中纤维化标志物  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.000 1$ ), 与 NC adv 组相比, miR-296-3p adv 组  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.000 1$ ), miR-296-3p sponge adv 组  $\alpha$ -SMA 表达水平升高 ( $P < 0.01$ )。

**2.7 miR-296-3p 对大鼠肝组织 ZBTB20 表达的影响** 如图 6, 通过生物信息学数据库 DIANA Tools、miRDB 和 TargetScan 预测 miR-296-3p 可能的靶基因, 取交集后共得到 5 个靶基因 (图 6A), 经过文献检索发现 ZBTB20 与肝脏疾病相关, 选择 ZBTB20 作为候选靶基因进行后续实验; ZBTB20 与 miR-296-3p 配对的序列信息 (图 6B)。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示 (图 6C、6D), 与 sham 组相比, BDL 组和 NC adv 组大鼠肝组织中 ZBTB20 mRNA 和蛋白表达水平升高 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 与 NC adv 组相比, miR-296-3p adv 组 ZBTB20 mRNA 和蛋白表达水

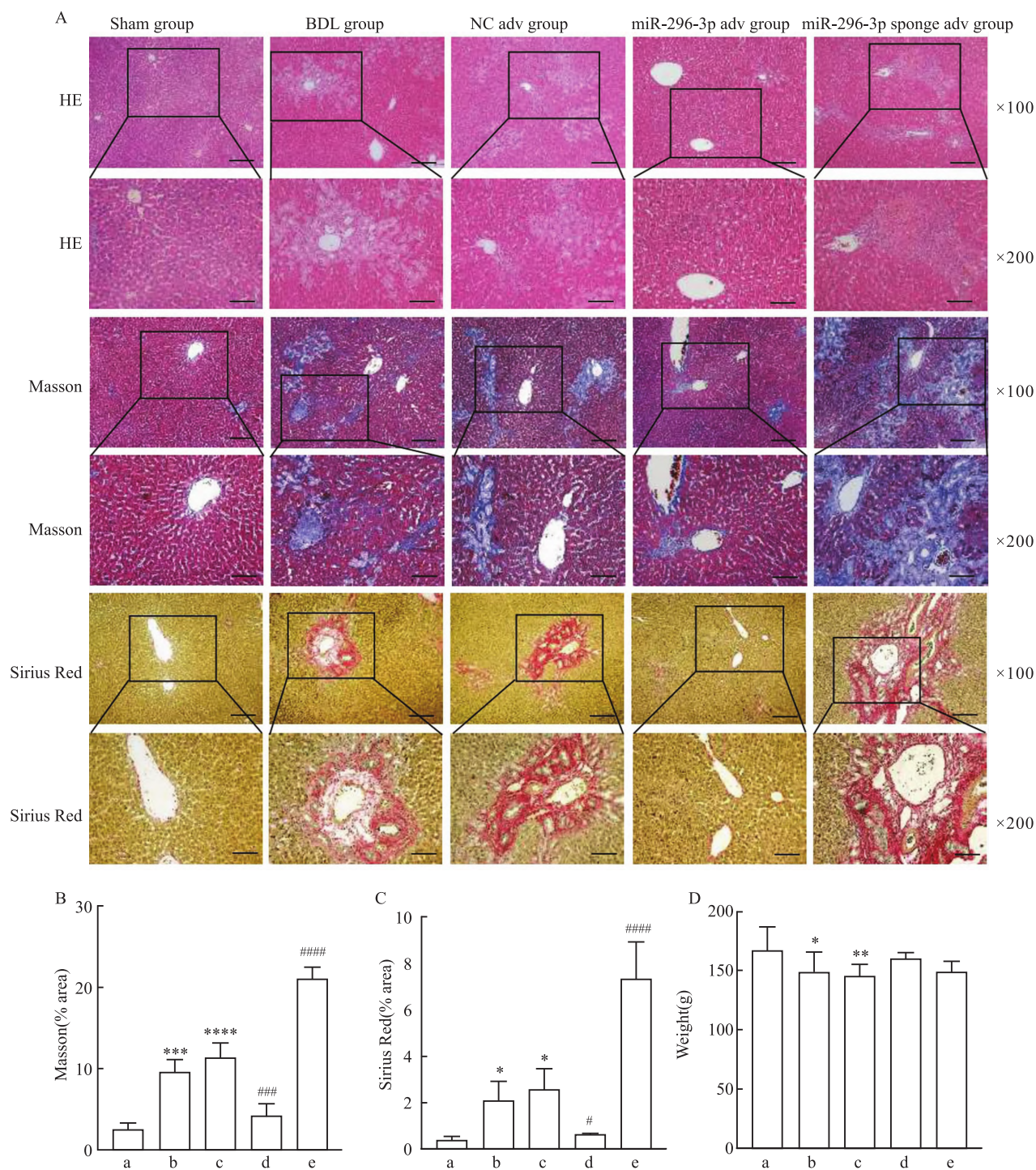


图1 miR-296-3p对BDL大鼠肝组织形态学的影响

Fig.1 Effect of miR-296-3p on the morphology of liver tissue in BDL rats

A: Pathological staining of rat liver tissues; B: Quantification result of Masson staining; C: Quantification result of Sirius Red staining; D: 14-day postoperative body mass; a: sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-296-3p adv group; e: miR-296-3p sponge adv group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$ , ####  $P < 0.0001$  vs NC adv group.

平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 miR-296-3p sponge adv 组 ZBTB20 mRNA 和蛋白的表达水平升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ )。

### 3 讨论

肝纤维化是肝脏长期受到慢性损伤的可逆性病



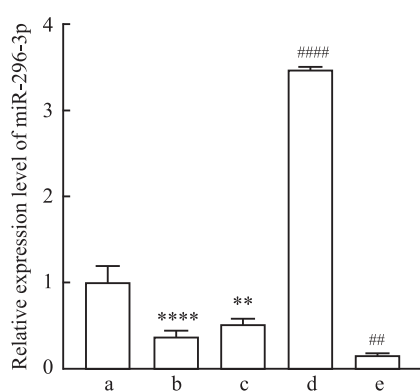


图2 miR-296-3p在BDL大鼠肝组织中的表达水平

Fig. 2 Expression levels of miR-296-3p in BDL rat liver tissues

a: sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-296-3p adv group; e: miR-296-3p sponge adv group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs sham group; ##  $P < 0.01$ , ####  $P < 0.0001$  vs NC adv group.

理过程,以细胞外基质沉积为主要特征<sup>[7]</sup>。然而,现如今仍没有治疗肝纤维化的特效药,每年有数百万人死于该疾病,给世界卫生系统带来严重的经济负担<sup>[8]</sup>。近年来的研究发现多种 miRNA 在肝纤维化疾病发生时表现出显著变化<sup>[9]</sup>。UALCAN 数据库分析发现在肝癌组织中 miR-296-3p 表达水平降低。然而,miR-296-3p 在肝纤维化疾病中的作用及机制尚不清楚。

BDL 模型通过结扎小鼠的胆管,阻断胆汁的正常排泄,引发胆汁淤积和胆道损伤,从而导致肝纤维化的进展<sup>[10]</sup>。本研究通过胆总管结扎诱导大鼠肝纤维化,病理学染色结果显示,在汇管区可观察到大量炎症细胞浸润和胶原沉积,然而经过 miR-296-3p adv 干预之后可缓解胆汁淤积引发的肝纤维化,而

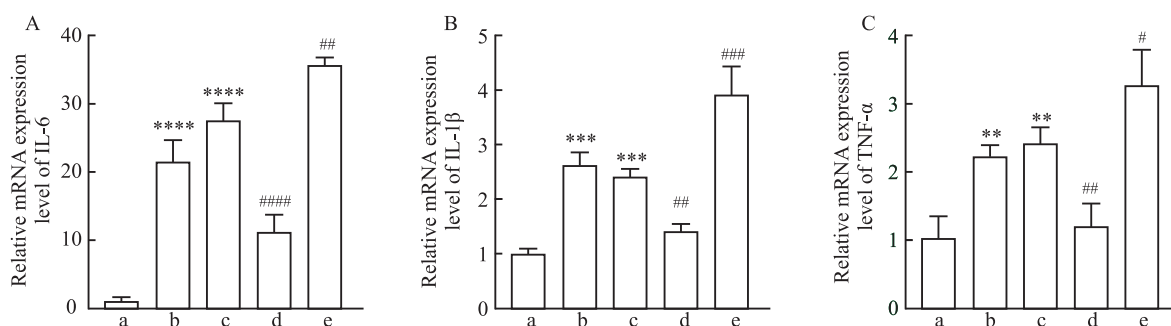


图3 miR-296-3p抑制BDL大鼠肝组织炎症因子的表达

Fig. 3 miR-296-3p inhibits the expression of inflammatory cytokines in BDL rat liver tissues

A: qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of IL-6; B: qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of IL-1 $\beta$ ; C: qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of TNF- $\alpha$ ; a: sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-296-3p adv group; e: miR-296-3p sponge adv group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , ####  $P < 0.0001$  vs NC adv group.

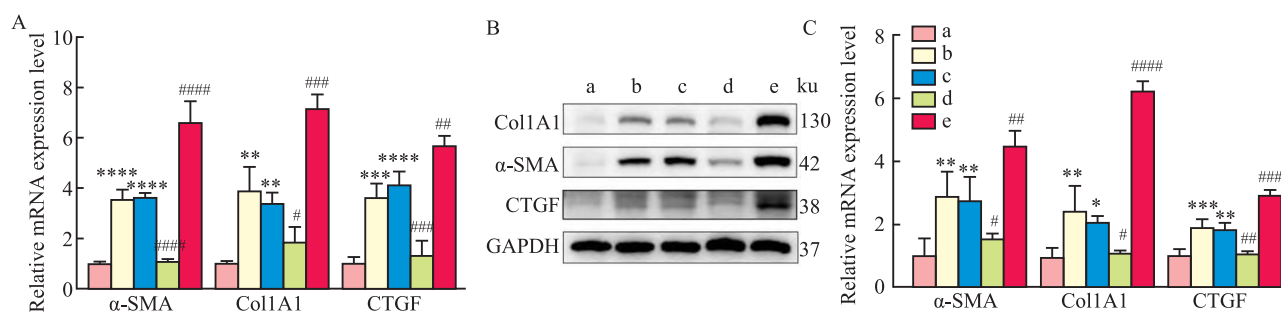


图4 miR-296-3p抑制BDL大鼠肝组织纤维化标志物的表达

Fig. 4 miR-296-3p inhibits the expression of fibrosis markers in BDL rat liver tissues

A: qRT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col1A1 and CTGF; B: Western blot was used to detect the protein expression of fibrosis marker; C: Quantitative results of protein expression of fibrosis markers detected by Western blot; a: sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-296-3p adv group; e: miR-296-3p sponge adv group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , ####  $P < 0.0001$  vs NC adv group.

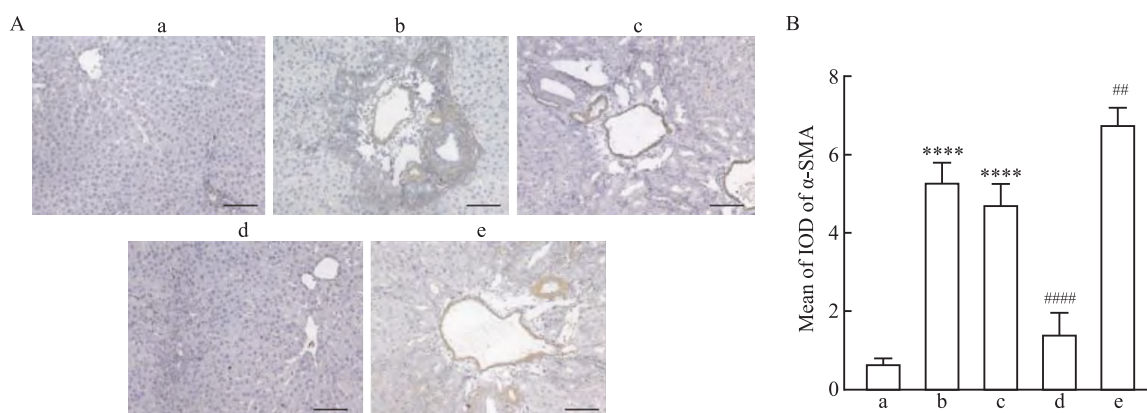


图5 miR-296-3p对BDL大鼠肝组织α-SMA蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of miR-296-3p on α-SMA expression in liver tissues of BDL rat

A: Immunohistochemical staining of rat liver tissues  $\times 200$ ; B: Mean integrated optical density (IOD) of α-SMA positive stained tissues; a: sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-296-3p adv group; e: miR-296-3p sponge adv group; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs sham group; ##  $P < 0.01$ , ####  $P < 0.0001$  vs NC adv group.

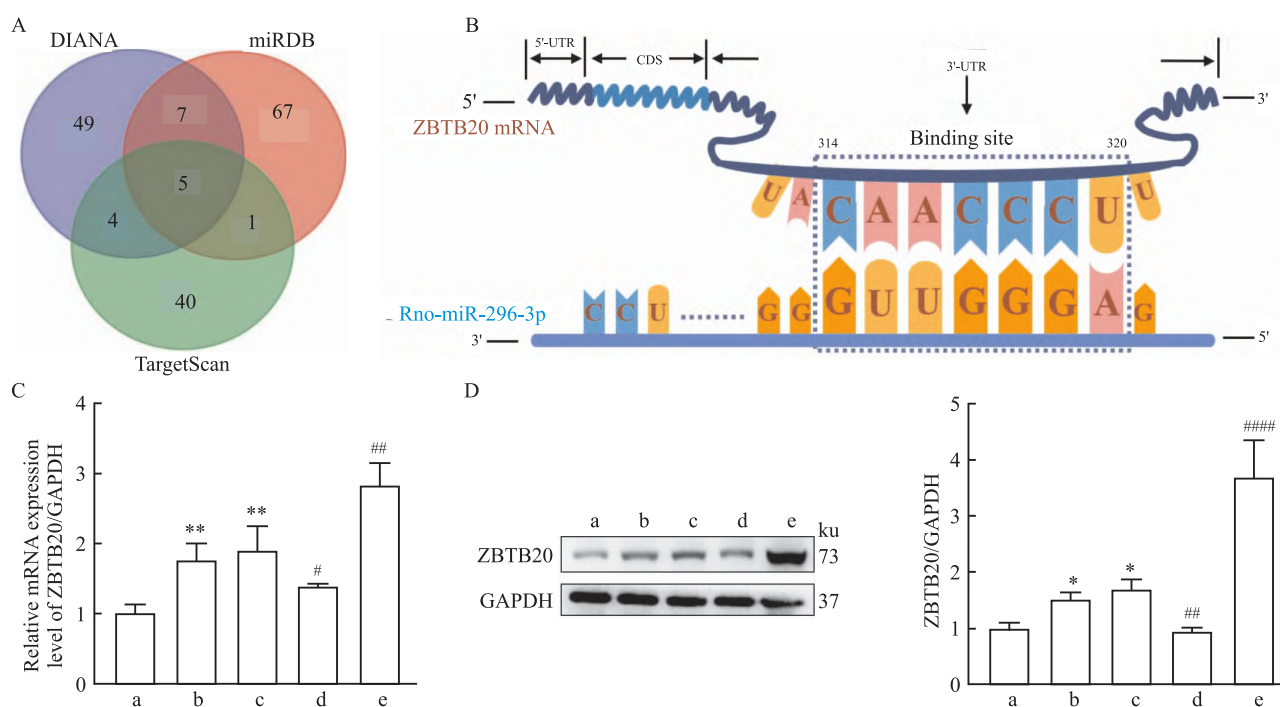


图6 miR-296-3p对大鼠肝组织ZBTB20表达的影响

Fig. 6 Effect of miR-296-3p on ZBTB20 expression in rat liver tissues

A: Prediction of downstream target genes of miR-296-3p; B: miR-296-3p and ZBTB20 sequence information; C: qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of ZBTB20; D: Western blot was used to detect the protein expression level of ZBTB20; a: sham group; b: BDL group; c: NC adv group; d: miR-296-3p adv group; e: miR-296-3p sponge adv group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$  vs sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ####  $P < 0.0001$  vs NC adv group.

miR-296-3p sponge adv 干预之后加重大鼠肝纤维化。肝纤维化疾病中常伴随着肝细胞的受损和死亡,肝细胞的死亡将触发炎症反应并促进肝星状细胞的活化,产生更多的细胞外基质<sup>[11]</sup>。miR-296-3p

adv 干预后大鼠血清肝功能指标 ALT、AST、TBIL 含量均降低;同时,miR-296-3p adv 干预后的大鼠肝组织中炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 及纤维化标志物 α-SMA、Col1A1、CTGF 的表达水平均降低,而 miR-

296-3p sponge adv 组的结果与 miR-296-3p adv 组相反;以上结果表明过表达 miR-296-3p 可以抑制 BDL 诱导的大鼠肝纤维化。

大量的研究已经证实 miRNA 可以与靶序列 mRNA 的 3'-非翻译区(UTR)的部分互补,最终达到切断 mRNA 分子,抑制靶序列 mRNA 翻译的效果<sup>[12]</sup>。通过生物信息学网站预测到 ZBTB20 为 miR-296-3p 的一个靶基因。ZBTB20 是来自 POK 家族的转录因子,是一种促癌因素<sup>[13]</sup>。在肝细胞癌中,ZBTB20 能够通过抑制 PPARG 基因的表达,进而激活 WNT/CTNNB1 信号通路,从而促进肝细胞癌的发生<sup>[14]</sup>。本研究显示,与 sham 组相比,BDL 组和 NC adv 组中 ZBTB20 mRNA 和蛋白表达水平升高,miR-296-3p adv 干预后大鼠肝组织中 ZBTB20 mRNA 和蛋白表达水平下降,miR-296-3p sponge adv 干预后大鼠肝组织中 ZBTB20 mRNA 和蛋白表达水平升高。因此,miR-296-3p 可能通过介导 ZBTB20 的表达调控肝纤维化。后续实验将通过荧光素酶报告基因实验验证 ZBTB20 是 miR-296-3p 的直接靶基因,以探明 miR-296-3p 调控 ZBTB20 表达的具体机制。

综上所述,本研究结果表明 miR-296-3p 在 BDL 诱导的大鼠肝纤维化组织中低表达,过表达 miR-296-3p 可以有效减缓 BDL 诱导的大鼠肝纤维化和炎症反应、抑制肝纤维化的发生发展,其机制可能与下调 ZBTB20 的表达相关。提示 miR-296-3p 可能是治疗肝纤维化的潜在靶点,未来可以进一步探究 ZBTB20 在肝纤维化进程的具体作用机制。深入了解肝纤维化的分子机制可以为寻找潜在治疗靶点以及制定相关治疗策略提供线索,为肝纤维化患者提供更为有效的治疗选择。

### 参考文献

- [1] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875. doi:10.3390/cells9040875.
- [2] Man S, Deng Y, Ma Y, et al. Prevalence of liver steatosis and fibrosis in the general population and various high-risk populations: a nationwide study with 5.7 million adults in China[J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 1025–40. doi:10.1053/j.gastro.2023.05.053.
- [3] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale J P, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 181–94. doi:10.1038/nri3623.
- [4] Li J, Hu M, Liu N, et al. HDAC3 deteriorates colorectal cancer progression via microRNA-296-3p/TGIF1/TGF $\beta$  axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 248. doi:10.1186/s13046-020-01720-w.
- [5] Li C, Liu Y, Lv Z, et al. Circular RNA circHECTD1 facilitates glioma progression by regulating the miR-296-3p/SLC10A7 axis[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(8): 5953–65. doi:10.1002/jcp.30277.
- [6] Chu J, Tao L, Yao T, et al. Circular RNA circRUNX1 promotes papillary thyroid cancer progression and metastasis by sponging MiR-296-3p and regulating DDHD2 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 112. doi:10.1038/s41419-020-03350-8.
- [7] 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/s41515-020-00372-7.
- [8] Zhang X S, Zhang X, Liu M, et al. Global, regional, and national burden of cirrhosis and other chronic liver diseases due to alcohol use, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2019[J]. *BMC Gastroenterol*, 2022, 22(1): 484. doi:10.1186/s12876-022-02518-0.
- [9] Liu M, Cho W C, Flynn R J, et al. microRNAs in parasite-induced liver fibrosis: from mechanisms to diagnostics and therapeutics[J]. *Trends Parasitol*, 2023, 39(10): 859–72. doi:10.1016/j.pt.2023.07.001.
- [10] Faccioli L A P, Dias M L, Paranhos B A, et al. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents[J]. *Life Sci*, 2022, 301: 120615. doi:10.1016/j.lfs.2022.120615.
- [11] Hammerich L, Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(10): 633–46. doi:10.1038/s41575-023-00807-x.
- [12] Preethi K A, Selvakumar S C, Ross K, et al. Liquid biopsy: Exosomal microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 54. doi:10.1186/s12943-022-01525-9.
- [13] Stoyanov D, Stoyanov G S, Ivanov M N, et al. Transcription factor Zbtb20 as a regulator of malignancy and its practical applications[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 13763. doi:10.3390/ijms241813763.
- [14] To J C, Chiu A P, Tschida B R, et al. ZBTB20 regulates WNT/CTNNB1 signalling pathway by suppressing PPARG during hepatocellular carcinoma tumourigenesis[J]. *JHEP Rep*, 2020, 3(2): 100223. doi:10.1016/j.jhepr.2020.100223.

## Effect of miR-296-3p on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rats

Zhang Yanan<sup>1</sup>, Wang Luyao<sup>1</sup>, Zhou Jing<sup>1</sup>, Zhang Ronghua<sup>1</sup>, Xiong Yanan<sup>1</sup>,  
Wang Meimei<sup>1</sup>, Liu Zhiyong<sup>2</sup>, Zhang Guangling<sup>3</sup>

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

**Abstract** *Objective* To explore the effect of miR-296-3p on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation (BDL) in rats. *Methods* 25 SD rats were randomly divided into sham group, model (BDL) group, NC adv group, miR-296-3p adv group and miR-296-3p sponge adv group, with 5 rats in each group. The pathological changes were observed in rat liver tissue *via* HE, Masson and Sirius Red staining; the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and total bilirubin (TBIL) in the serum of rat in each group were detected; the expression levels of miR-296-3p, interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), type I collagen (Col1A1), and connective tissue growth factor (CTGF) mRNA in rat liver tissue were detected by qRT-PCR; the expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col1A1 and CTGF proteins were detected by Western blot. Immunohistochemical staining (IHC) was performed to detect the expression of  $\alpha$ -SMA in liver tissue. Target genes of miR-296-3p was predicted by bioinformatic analysis using the online database. Zinc finger and BTB domain-containing protein20 (ZBTB20) mRNA and protein expression levels were detected. *Results* The pathological staining results showed that compared with sham group, a large number of infiltrated inflammatory cells and collagen deposition were observed in the liver tissues of rats in the BDL group and NC adv group. Compared with NC adv group, the inflammatory cells and collagen deposition decreased in the liver tissues of miR-296-3p adv group. However, in miR-296-3p sponge adv group, collagen product and inflammatory reaction increased. Compared with sham group, the contents of ALT, AST and TBIL in serum of rats in BDL group and NC adv group increased, the expression level of miR-296-3p decreased, the mRNA expression levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  increased, and the mRNA and protein expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col1A1 and CTGF increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the NC adv group, the contents of ALT, AST and TBIL in serum of rats in miR-296-3p adv group decreased, the expression level of miR-296-3p increased, the mRNA expression levels of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , and the mRNA and protein expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col1A1 and CTGF in liver tissues decreased (all  $P < 0.05$ ). The results of miR-296-3p sponge adv group were opposite to those of miR-296-3p adv group (all  $P < 0.05$ ). The bioinformatics website predicted that ZBTB20 might be a candidate target gene of miR-296-3p. Compared with sham group, the expression of ZBTB20 mRNA and protein in the liver tissues of BDL group and NC adv group increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of ZBTB20 in the liver tissues of miR-296-3p adv group decreased compared with NC adv group ( $P < 0.05$ ). However, the expression of ZBTB20 in liver tissues of miR-296-3p sponge adv group increased ( $P < 0.05$ ). *Conclusion* miR-296-3p expression decreases in BDL-induced hepatic fibrosis in rats, and miR-296-3p may inhibit hepatic fibrosis in BDL rats by targeting ZBTB20.

**Key words** miR-296-3p; ZBTB20; bile duct ligation; rats; hepatic fibrosis; inflammatory factors

**Fund programs** Natural Science Foundation of Hebei Province (Nos. H2023209047, H2021209026); Returned Overseas Students Project of Hebei Province (No. C20210340); Key Research and Development Project of Hebei Province (No. 213777115D); Government Funded Clinical Medicine Talents Training Project of Hebei Province (No. [2020]397)

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