

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002842

miR-29b-3p 靶向 FoxO3 基因改善 非酒精性脂肪肝预后的初步研究

杨仁国, 罗婷婷, 贺微微

(四川省医学科学院·四川省人民医院感染科, 成都 610072)

【摘要】目的:探讨 miR-29b-3p 靶向叉头转录因子 O 亚型 3(forkhead box class O3, FoxO3) 对非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的作用。**方法:**人肝细胞 HL-7702(L02) 通过 miR-29b-3p 抑制剂或 NC 抑制剂或 pcDNA-FoxO3 转染, 经棕榈酸(palmitic acid, PA) 处理后, 采用油红 O 染色测定脂质积累; 全自动生化分析仪检测甘油三酯(triglycerides, TG)、胆固醇(total cholesterol, TC) 含量; ELISA 检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量; 采用 RT-qPCR 检测 FoxO3、miR-29b-3p mRNA 表达; Western blot 检测 FoxO3 蛋白表达; 双荧光素酶实验验证 miR-29b-3p 靶向 FoxO3。**结果:**与对照组比较, PA 组 TG (2.05 ± 0.22) mmol/L、TC (7.80 ± 1.23) mmol/L、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (149.67 ± 8.96)%、白介素(interleukin, IL)-6 (157.00 ± 18.33)%、IL-8 (177.33 ± 24.58)%、miR-29b-3p (161.00 ± 13.00)%、MDA (0.456 ± 0.028) nmol/mL 及油红 O 染成红色的脂滴数量明显升高, SOD (12.91 ± 0.53) ng/mL、GSH-Px (0.515 ± 0.038) ng/mL 含量及 FoxO3 (65.93 ± 4.56)% 表达明显降低; miR-29b-3p 靶向 FoxO3; 与 PA 组比较, PA+miR-29b-3p inhibitor 组、PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组可明显降低 TG、TC、TNF- α 、IL-6、IL-8、miR-29b-3p、MDA 含量及油红 O 染成红色的脂滴数量, 明显升高 SOD、GSH-Px 含量。**结论:**miR-29b-3p 靶向 FoxO3 可减轻 PA 诱导的 L02 细胞脂质积累和炎症。

【关键词】非酒精性脂肪性肝病; miR-29b-3p; 叉头转录因子 O 亚型 3; 脂质蓄积

【中图分类号】R575.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-10-30

miR-29b-3p targeting FoxO3 gene improves the prognosis of non-alcoholic fatty liver disease

Yang Renguo, Luo Tingting, He Weiwei

(Department of Infectious Disease, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of miR-29b-3p targeting forkhead box class O3 (FoxO3) on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** Human hepatocytes HL-7702 (L02) were transfected with miR-29b-3p inhibitor, NC inhibitor or pcDNA-FoxO3. After palmitic acid (PA) treatment, oil red O staining was used to determine lipid accumulation, fully automatic biochemical analyzer to detect the content of triglycerides (TG) and total cholesterol (TC), ELISA to detect the content of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA), RT-qPCR to detect the expression of FoxO3, miR-29b-3p mRNA, Western blot to detect the expression of FoxO3 protein, and dual luciferase experiments to verify miR-29b-3p targeting FoxO3. **Results:** Compared with the control group, the expression of TG (2.05 ± 0.22) mmol/L, TC (7.80 ± 1.23) mmol/L, tumor necrosis factor- α (TNF- α) (149.67 ± 8.96)%, interleukin (IL)-6 (157.00 ± 18.33)%, IL-8 (177.33 ± 24.58)%, miR-29b-3p (161.00 ± 13.00)%, MDA (0.456 ± 0.028) nmol/mL and the number of lipid droplets dyed red by Oil Red O in the PA group was significantly increased; the content of SOD (12.91 ± 0.53) ng/mL, GSH-Px (0.515 ± 0.038) ng/mL and the expression of FoxO3 (65.93 ± 4.56)% were significantly reduced; miR-29b-3p targeted FoxO3. Compared with PA group, PA+miR-29b-3p inhibitor group, PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 group significantly reduced the content of TG, TC, TNF- α , IL-6, IL-8, miR-29b-3p, MDA and the number

of oil droplets dyed red by Oil Red O, and significantly increased the content of SOD and GSH-Px. **Conclusion:** miR-29b-3p targeting FoxO3 can reduce PA-induced lipid accumulation and inflammation in L02 cells.

【Key words】non-alcoholic fatty liver disease; miR-29b-3p; forkhead box class O3; lipid accumulation

作者介绍: 杨仁国, Email: yshfyjs@163.com,

研究方向: 感染性疾病基础与临床。

通信作者: 贺微微, Email: hww19880423@163.com。

基金项目: 四川省科技厅资助项目 (编号: 2019JDKP0058)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210514.0840.006.html>
(2021-05-16)

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 正迅速成为全球最常见的肝病形式, NAFLD 被定义为在没有大量饮酒、病毒性肝炎、脂肪转化药物或先天性代谢紊乱的情况下, 通过活检或影像学技术发现肝脏脂肪变性的证据。其高患病率已成为一个重要的公共卫生问题, 在中国患病率为 15%~30%^[1]。目前 NAFLD 的发病机制尚不清楚, 且还没有任何治疗方法被证明对 NAFLD 的治疗有效^[2]。研究表明 miRNA 可能在 NAFLD 的发病机制中起重要作用, 已报道 miR-29b-3p 在乳腺癌、成骨细胞分化、心肌细胞缺氧、前列腺癌、心肌纤维化等中发挥作用, 而关于其在 NAFLD 发病中的作用还尚未有报道^[3-4]。叉头转录因子 O 亚型 3 (forkhead box class O3, FoxO3) 在体内外促进肝脏甘油三酯 (triglycerides, TG) 沉积, 提示 FoxO3 的异常表达可能与 NAFLD 密切相关^[5]。目前, 关于 FoxO3 在脂质代谢中的作用知之甚少。因此, 本研究拟探讨 miR-29b-3p 靶向 FoxO3 对 NAFLD 的改善作用, 为进一步研究 NAFLD 的发病机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

肝细胞 HL-7702(L02) 购自中国科学院。细胞在含有 10% 胎牛血清 (FBS; Gibco, CA) 和 1% 青霉素-链霉素 (北京索莱宝生物科技有限公司) 的 RPMI 1640 培养基 (Hyclone, UT, 美国) 中, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。待细胞长至 70%~80% 后用 0.25% 胰蛋白酶消化后传代。

1.2 细胞转染

miR-29b-3p 抑制剂和阴性对照 (NC 抑制剂) 购自广州锐博生物, 人 FoxO3 全长基因序列设计纯化 FoxO3 cDNA 构建 pcDNA-FOXO3 重组质粒由上海吉玛生物技术有限公司设计。转染前 24 h, 胰蛋白酶消化细胞, 按每孔 4×10^4 个细胞接种于 12 孔板。待细胞生长至 30%~50% 时采用 Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen, MA, USA) 按制造商说明用 50 pmol/mL miR-29b-3p 抑制剂和 NC 抑制剂或 pcDNA 50 nmol/L 进行细胞转染。转染 24 h 后收集细胞进行后续分析。

1.3 NAFLD 细胞模型的建立

诱导 NAFLD 细胞模型, L02 细胞用棕榈酸 (PA; Sigma, USA) 0.3 mmol/L 处理 24 h。实验过程中将 L02 细胞分为空白组、棕榈酸 (PA) 组、NC 抑制剂+PA (NC+PA) 组、miR-29b-3p-抑制剂+PA (miR-29b-3p inhibitor+PA) 组、PA+NC-pcDNA 组、FoxO3 过表达+PA (PA+pcDNA-FoxO3) 组、miR-29b-3p-抑制剂+FoxO3 过表达+PA (PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-

FoxO3) 组。

1.4 油红 O 染色

细胞培养板用磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 油红 O 染色 30 min。随后, 用苏木素反复染色 2~3 min, 用 1% 盐酸酒精 (快速) 进行分化。然后在光学显微镜下观察。

1.5 全自动生化分析仪检测 TG、TC 含量

采用全自动血液分析仪检测 TG、胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平。检测方法分别按照 TG 测定试剂盒 (A110-1-1, 南京建成生物工程研究所)、TC 测定试剂盒 (A111-1-1, 南京建成生物工程研究所) 说明进行操作。

1.6 ELISA 检测 SOD、GSH-Px、MDA 含量

按照试剂盒说明操作, 采用 ELISA 试剂盒 (上海茁彩) 检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (ZC-S0623)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) (ZC-S0860)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) (ZC-S0343) 活性。

1.7 qRT-PCR 检测

使用 TRIzol 法提取细胞的总 RNA。用 cDNA 逆转录试剂盒 (Takara, 日本) 进行逆转录。用 SYBR Green PreMix Ex Taq (Takara, 日本) 进行实时定量 PCR。引物序列: FoxO3: 5'-TCAAGGATAAGGGCGACAGC-3' (正向), 5'-GGACCCGCA-TGAATCGACTA-3' (反向); miR-29b-3p: 5'-TGCGGTAGCA-CCATTGTAAAT-3' (正向), 5'-CCAGTGCAGGCTCCGAGGT-3' (反向); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α): 5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGA-3' (正向), 5'-GGAAGACCC-CTCCCAGATAGA-3' (反向); 白介素-6 (interleukin-6, IL-6): 5'-ATTGACAAACAAAATTCGG-3' (正向), 5'-TTACATTTG-CCGAAGAG-3' (反向); 白介素-8 (interleukin-8, IL-8): 5'-AG-AGTGGACCACACTGCGC-3' (正向), 5'-ACATCCCAACGGTCT-ACGTTA-3' (反向); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH): 5'-ATCCCATCACCAT-CTTCCAG-3' (正向), 5'-CCATCAGCCAGTTTTCG-3' (反向)。以 GAPDH 为内参。qRT-PCR 反应条件: 95℃ 初始变性 10 min, 随后 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 10 s, 45 个循环, 记录 Ct 值, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 分析相对表达水平。

1.8 Western blot 检测

用 RIPA 裂解缓冲液 (Be-yotime, 上海) 从细胞中提取蛋白, 然后用 SDS-PAGE 分离, 并转移到 PVDF 膜 (Millipore, USA), 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 用 FoxO3 一抗 (1:1 000, 2497S, Cell Signaling Technology) 和 β -catenin (1:2 000; sc-47778, Santa Cruz) 4℃ 孵育过夜, 随后与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 偶联的二级抗体孵育 (1:3 000; Santa Cruz) 室温孵育 1 h。增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 暗室显色, 图像分析使用 ImageQuantTL LAS 4000 凝胶成像系统。使用 Image J 软件生成图像以确定目标蛋白条带的灰度值。以 β -actin 的比值作为蛋白质的相对表达量。

1.9 双荧光素酶实验

生物信息学软件预测 FoxO3 是 miR-29b-3p 的靶基因,故构建野生型及突变型 FoxO3-3' 非翻译区(3'UTR)的报告基因质粒,将该质粒与 miR-29b-3p 模拟物(mimics)共转染 293T 细胞,分别为:NC+h-FoxO3-3'UTR-wt 组、miR-29b-3p+h-FoxO3-3'UTR-wt 组、NC+h-FoxO3-3'UTR-mut 组、miR-29b-3p+h-FoxO3-3'UTR-mut 组,并同时设置 NC-mimics 组和 miR-29b-3p mimics 组。转染 48 h 后,用双荧光素酶报告试剂盒(北京全式金生物)测定荧光素酶活性,根据萤火虫荧光强度/海肾荧光强度比值来反映不同处理组的相对荧光强度。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。试验数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两两比较采用 LSD-*t* 法,多组间差异采用单因素方差统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PA 诱导 NAFLD 细胞模型中脂质蓄积及 miR-29b-3p、FoxO3 变化

对照组、0.3 mmol/L PA 组 TG 含量分别为(1.11 ± 0.21) mmol/L、(2.05 ± 0.22) mmol/L,TC 含量分别为(4.13 ± 1.21) mmol/L、(7.80 ± 1.23) mmol/L。方差分析 2 组 TG、TC 含量的差异具有统计学意义,两两比较结果显示 0.3 mmol/L PA 组 TG、TC 含量较对照组明显升高($P=0.016$, $P=0.000$)(图 1A)。检测 PA 处理后 L02 细胞的脂质蓄积,0.3 mmol/L PA 组中被油红 O 染成红色的脂滴数量较对照组明显增加,与对照组相比,油红 O 染色表示成功建立了 NAFLD 细胞模型(图 1B)。以对照组细胞中 FoxO3、miR-29b-3p 的 mRNA 水平为对照(即 100%),0.3 mmol/L PA 组的细胞中 FoxO3、miR-

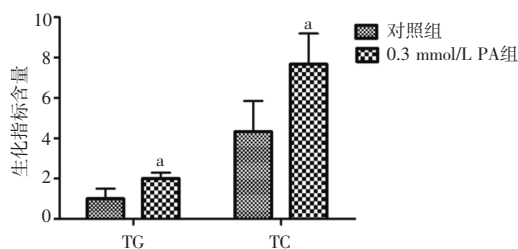
29b-3p 表达量分别为对照组的(65.93 ± 4.56)%、(161.00 ± 13.00)%,比较结果显示 0.3 mmol/L PA 组 FoxO3 的 mRNA 表达较对照组明显降低($P=0.017$),miR-29b-3p 的 mRNA 表达较对照组明显升高($P=0.025$)(图 1C)。

2.2 FoxO3 是 miR-29b-3p 的直接靶点

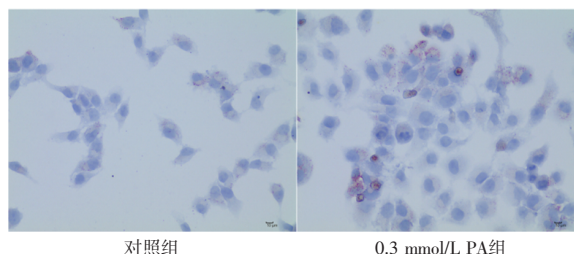
双荧光素酶报告实验分析,通过靶基因预测数据库筛选,发现 FoxO3 基因结合位点与 miR-29b-3p 互补,可能是 miR-29b-3p 下游的靶基因。克隆野生型 FoxO3 3'UTR 的基因报告质粒同 miR-29b-3p mimics 共转染之后,荧光酶活性明显减弱($P=0.000$),而将突变型 FoxO3 3'UTR 的基因报告质粒与 miR-29b-3p mimics 共转染之后,并未对荧光素酶活性产生影响(图 2A)。Western blot 结果显示:以 β -actin 作为内参,定量分析各组 FoxO3 的蛋白表达水平,NC-mimics 组和 miR-29b-3p mimics 组蛋白表达水平分别为 1.000 ± 0.001 、 0.679 ± 0.105 ,方差分析显示 FoxO3 蛋白表达水平差异具有统计学意义($t=5.294$, $P=0.006$),比较结果显示转染 miR-29b-3p mimics 组 FoxO3 蛋白表达水平较 NC-mimics 组明显降低($P=0.006$)(图 2B)。RT-qPCR 检测结果显示:以 NC-mimics 组细胞中 FoxO3、miR-29b-3p 的 mRNA 水平为对照,在转染 miR-29b-3p mimics 后细胞中 FoxO3、miR-29b-3p 表达量分别为 NC-mimics 组的(58.84 ± 8.78)%、(144.11 ± 12.76)%,比较结果显示 miR-29b-3p mimics 组 FoxO3 的 mRNA 表达较 NC-mimics 组明显降低($P=0.029$),miR-29b-3p 的 mRNA 表达较 NC-mimics 组明显升高($P=0.018$)(图 2C)。

2.3 抑制 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型中炎症细胞因子和氧化应激的影响

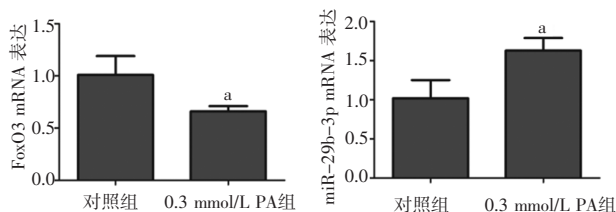
检测 miR-29b-3p 抑制处理后 L02 细胞的脂质蓄积,结果显示 PA 处理组中被油红 O 染成红色的脂滴数量较对照组明显增加,与 PA 处理组相比,转染 miR-29b-3p 抑制后 NAFLD 细胞模型油红 O 染成红色的脂滴数量明显降低(图 3A)。生化



A. 生化指标含量



B. 油红 O 染成红色



C. FoxO3、miR-29b-3p mRNA 相对表达

注:a,与对照组比较, $P<0.05$

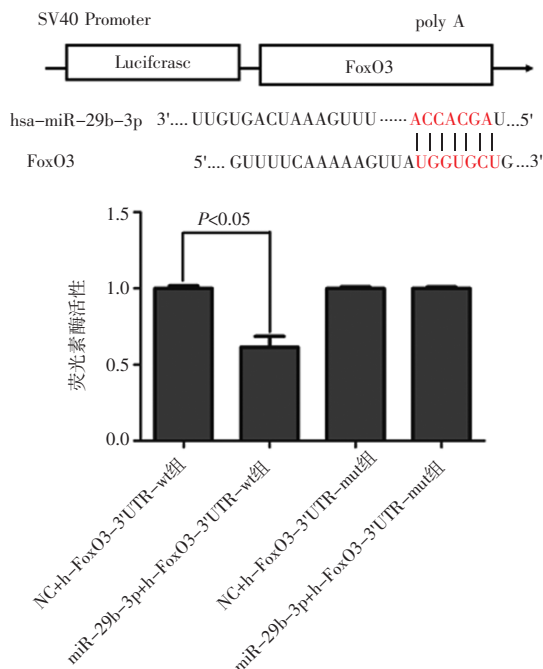
图 1 脂质蓄积及 miR-29b-3p、FoxO3 表达

检测结果显示对照组、PA 组、PA+NC inhibitor 组、PA+miR-29b-3p inhibitor 组 TG 含量分别为 (1.11 ± 0.21) mmol/L、 (2.08 ± 0.20) mmol/L、 (2.11 ± 0.27) mmol/L、 (1.68 ± 0.56) mmol/L, TC 含量分别为 (4.13 ± 1.21) mmol/L、 (7.33 ± 0.98) mmol/L、 (7.57 ± 1.01) mmol/L、 (5.83 ± 1.09) mmol/L。方差分析 4 组 TG、TC 含量的差异具有统计学意义,两两比较结果显示 PA 组 TG、TC 含量较对照组明显升高($P=0.016$, $P=0.000$), PA+miR-29b-3p inhibitor 组 TG、TC 含量较 PA 组明显降低($P=0.026$, $P=0.018$) (图 3B)。RT-qPCR 检测结果显示:以对照组细胞中 TNF- α 、IL-6、IL-8 的 mRNA 水平为对照, PA 组、PA+NC inhibitor 组、PA+miR-29b-3p inhibitor 组 TNF- α 表达水平分别为 $(149.67 \pm 8.96)\%$ 、 $(158.00 \pm 10.15)\%$ 、 $(126.00 \pm 3.46)\%$, IL-6 表达水平分别为 $(157.00 \pm 18.33)\%$ 、 $(160.33 \pm 14.84)\%$ 、 $(126.00 \pm 10.58)\%$, IL-8 表达水平分别为 $(177.33 \pm 24.58)\%$ 、 $(185.33 \pm 26.27)\%$ 、 $(130.00 \pm 10.81)\%$, 方差分析 4 组 TNF- α 、IL-6、IL-8 表达差异具有统计学意义,两两比较结果显示 PA+miR-29b-3p inhibitor 组 TNF- α 、IL-6、IL-8 表达较 PA 组明显降低($P=0.016$, $P=0.002$, $P=0.015$) (图 3C)。ELISA 检测结果显示:对照组、PA 组、PA+NC inhibitor 组、PA+miR-29b-3p inhibitor 组 SOD 含量分别为 (14.64 ± 0.43) ng/mL、 (12.91 ± 0.53) ng/mL、 (12.83 ± 0.49) ng/mL、 (13.84 ± 0.41) ng/mL, GSH-Px 含量分别为 (0.715 ± 0.034) ng/mL、 (0.515 ± 0.038) ng/mL、 (0.504 ± 0.101) ng/mL、 (0.679 ± 0.084) ng/mL, MDA 含量分别为 (0.375 ± 0.022) nmol/mL、 (0.456 ± 0.028) nmol/mL、 (0.458 ± 0.183) nmol/mL、 (0.408 ± 0.018) nmol/mL, 方差分析 4 组 SOD、

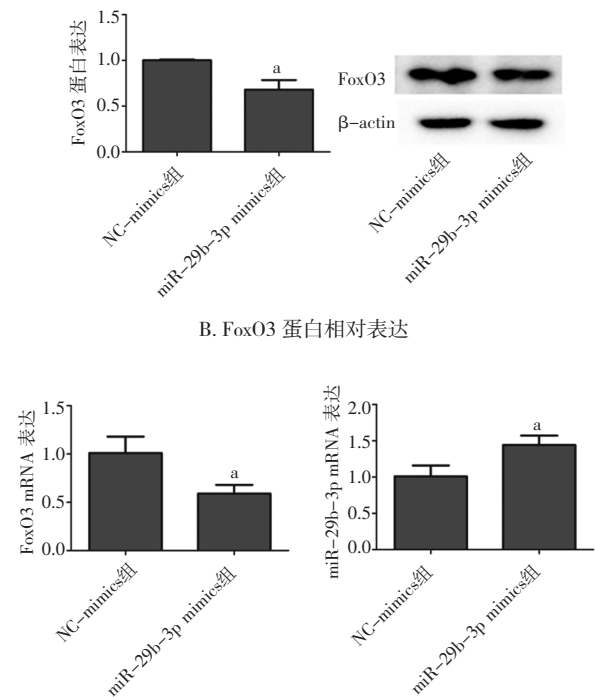
GSH-Px、MDA 含量差异具有统计学意义,两两比较结果显示 PA+miR-29b-3p inhibitor 组 SOD、GSH-Px 较 PA 组明显升高($P=0.031$, $P=0.016$), MDA 含量较 PA 组明显降低($P=0.032$) (图 3D)。

2.4 过表达 FoxO3 加强 miR-29b-3p inhibitor 对脂质积累和氧化应激的抑制作用

油红 O 染色结果显示 PA+NC-pcDNA 组的油红 O 染成红色的脂滴数量明显高于对照组, PA+miR-29b-3p inhibitor 组、PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组的油红 O 染成红色的脂滴数量明显降低 (图 4A)。生化检测结果显示对照组、PA+NC-pcDNA 组、PA+miR-29b-3p inhibitor 组、PA+pcDNA-FoxO3 组、PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组 TG 含量分别为 (1.11 ± 0.21) mmol/L、 (2.25 ± 0.41) mmol/L、 (1.68 ± 0.56) mmol/L、 (2.04 ± 0.84) mmol/L、 (2.27 ± 0.29) mmol/L, TC 含量分别为 (4.13 ± 1.21) mmol/L、 (7.30 ± 0.44) mmol/L、 (5.83 ± 1.09) mmol/L、 (6.57 ± 0.47) mmol/L、 (5.90 ± 0.30) mmol/L。方差分析 4 组 TG、TC 含量的差异具有统计学意义,两两比较结果显示 PA+NC-pcDNA 组 TG、TC 含量较对照组明显升高($P=0.005$, $P=0.001$), PA+pcDNA-FoxO3 组 TG、TC 含量均较 PA+NC-pcDNA 组明显降低($P=0.003$, $P=0.006$) (图 4B)。RT-qPCR 检测结果显示:以对照组细胞中 TNF- α 、IL-6、IL-8 的 mRNA 水平为对照, PA+NC-pcDNA 组、PA+pcDNA-FoxO3 组、PA+miR-29b-3p inhibitor 组、PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组 TNF- α 表达水平分别为 $(160.00 \pm 12.53)\%$ 、 $(138.00 \pm 13.45)\%$ 、 $(128.67 \pm 13.31)\%$ 、



A. 生物信息学分析表明 miR-29b-3p 靶向 FoxO3



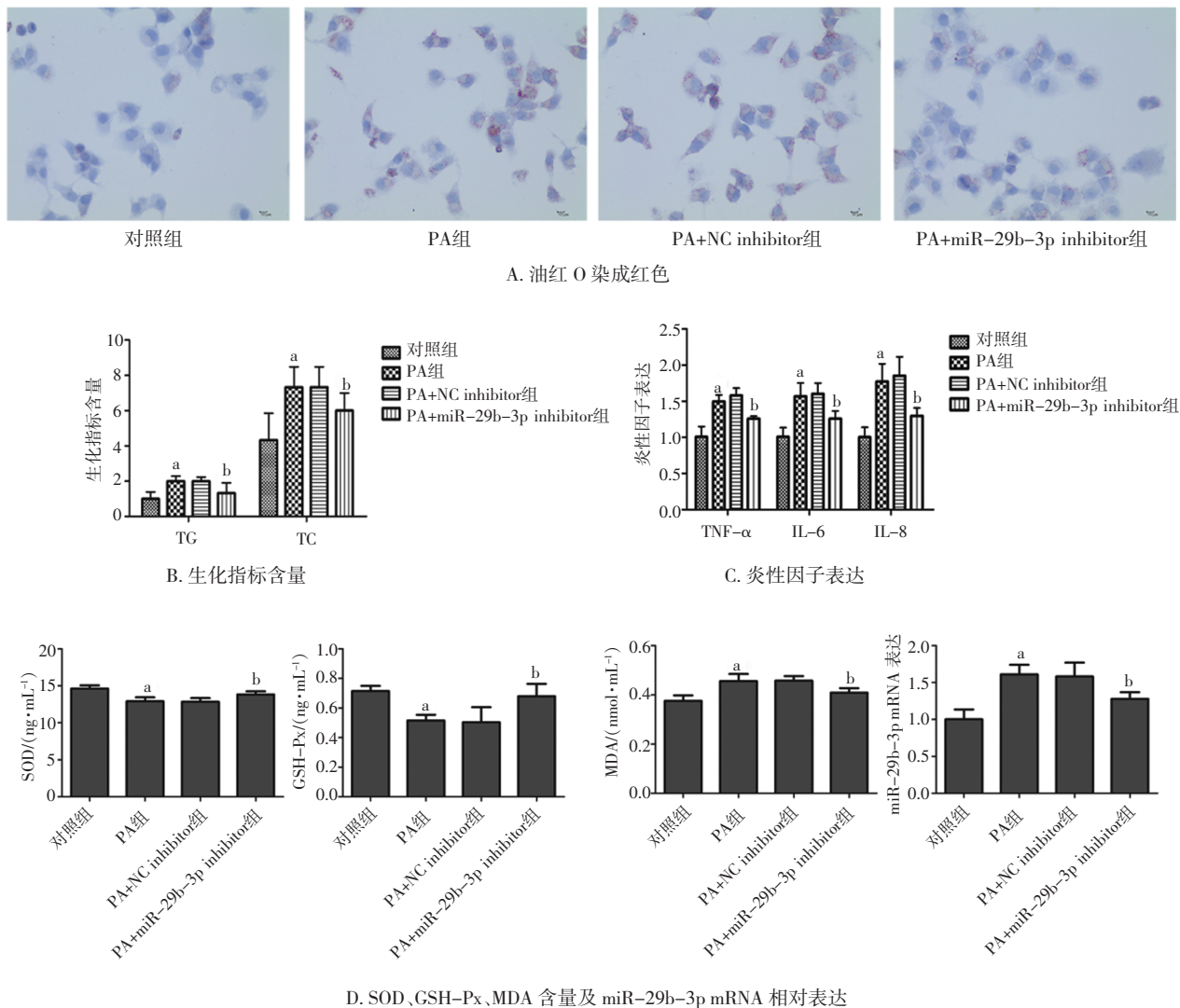
注:a,与 NC-mimics 组比较, $P<0.05$

C. FoxO3、miR-29b-3p mRNA 相对表达

图 2 FoxO3 是 miR-29b-3p 的直接靶点

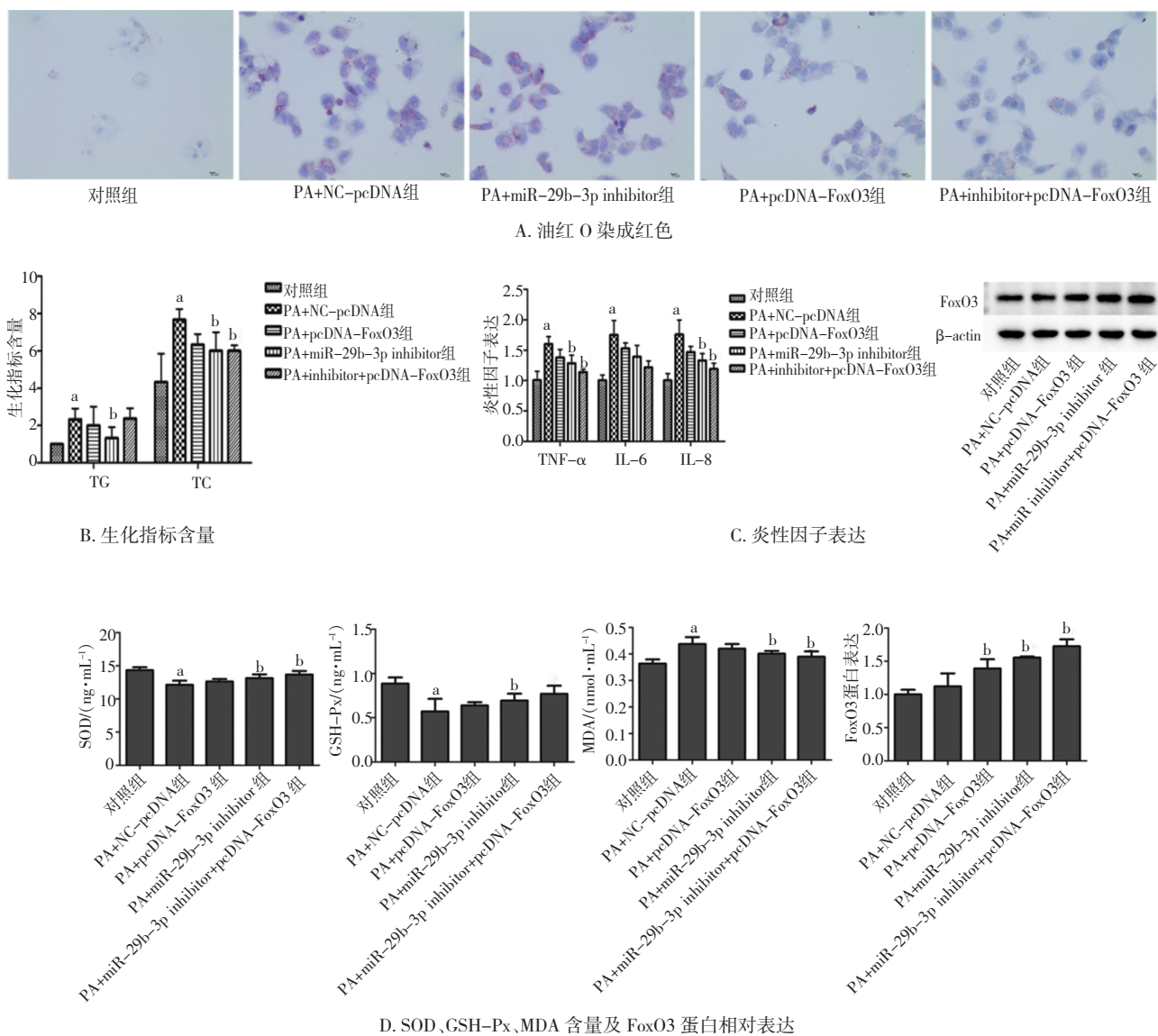
(114.00 ± 4.58)%, IL-6 表达水平分别为(175.00 ± 23.89)%、(153.00 ± 9.00)%、(139.33 ± 18.56)%、(122.00 ± 10.53)%, IL-8 表达水平分别为(176.00 ± 23.51)%、(147.00 ± 9.16)%、(133.33 ± 11.15)%、(119.33 ± 9.29)%, 方差分析 5 组 TNF- α 、IL-8 表达差异具有统计学意义, 两两比较结果显示 PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组 TNF- α 、IL-6、IL-8 表达均较 PA+NC-pcDNA 组明显降低($P=0.001$, $P=0.001$), IL-8 表达无差异统计学意义($P=0.126$) (图 4C)。ELISA 检测结果显示: 对照组、PA+NC-pcDNA 组、PA+miR-29b-3p inhibitor 组、PA+pcDNA-FoxO3 组、PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组 SOD 含量分别为(14.34 ± 0.44) ng/mL、(12.13 ± 0.62) ng/mL、(12.64 ± 0.37) ng/mL、(13.15 ± 0.56) ng/mL、(13.69 ± 0.54) ng/mL, GSH-Px 含量分别为(0.886 ± 0.068) ng/mL、(0.571 ± 0.142) ng/mL、(0.638 ± 0.037) ng/mL、(0.695 ± 0.076) ng/mL、(0.769 ± 0.092) ng/mL, MDA 含量分别为(0.364 ± 0.015) nmol/mL、(0.437 ± 0.026) nmol/mL、

(0.420 ± 0.017) nmol/mL、(0.401 ± 0.010) nmol/mL、(0.389 ± 0.020) nmol/mL, 方差分析 4 组 SOD、GSH-Px、MDA 含量差异具有统计学意义, 两两比较结果显示仅 PA+miR-29b-3p inhibitor 组 SOD、GSH-Px 较 PA+NC-pcDNA 组明显升高($P=0.036$, $P=0.022$), MDA 含量较 PA+NC-pcDNA 组明显降低($P=0.039$) (图 4D)。Western blot 结果显示: 以 β -actin 作为内参, 定量分析各组 FoxO3 蛋白表达水平, 对照组、PA+NC-pcDNA 组、PA+miR-29b-3p inhibitor 组、PA+pcDNA-FoxO3 组、PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组蛋白表达水平分别为 1.000 ± 0.001 、 1.123 ± 0.195 、 1.391 ± 0.139 、 1.156 ± 0.014 、 1.726 ± 0.105 , 方差分析显示 FoxO3 蛋白表达水平差异具有统计学意义($F=19.649$, $P=0.000$), 比较结果显示 PA+miR-29b-3p inhibitor 组、PA+pcDNA-FoxO3 组、PA+miR-29b-3p inhibitor+pcDNA-FoxO3 组 FoxO3 蛋白表达水平均较 NC-mimics 组明显升高($P=0.019$, $P=0.001$, $P=0.000$) (图 4D)。



注: a, PA 组与对照组比较, $P<0.05$; b, 干预组与 PA 组比较, $P<0.05$

图 3 脂质蓄积、炎症细胞因子和氧化应激因子表达



注:a, PA+NC-pcDNA 组与对照组比较, $P<0.05$; b: 干预组与 PA+NC-pcDNA 组比较, $P<0.05$

图 4 脂质蓄积、炎症细胞因子和氧化应激因子表达

3 讨论

NAFLD以肝脏异位脂肪沉积为特征,常伴有代谢综合征和糖脂代谢异常。NAFLD除了诱导肝纤维化和肝癌外,还与肝外疾病(如心血管疾病)有关,其临床重要性日益受到重视^[6]。虽然NAFLD的发病机制很复杂,但“两击”理论正越来越多地被接受,第一次打击涉及肝脏甘油三酯过多和胆固醇积聚。这使肝脏对第二次打击变得敏感,包括肝脏氧化应激升高和炎症,最终导致肝细胞损伤^[7]。因此,抑制脂质蓄积及炎症可能对NAFLD的进一步发展具有重要作用。

miRNAs 调节发育和生理的各个方面,包括代谢性疾病、心血管疾病、免疫功能障碍、癌症及肝纤维化等,miRNAs 通过转录后调控在基因调控中发挥重要作用^[8]。miR-29b-3p 属 miR-29 家族,miR-29 家族包含 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c,已被报道在乳腺癌、成骨细胞分化、心肌细胞缺氧、前列腺癌、心肌纤维化等中发挥作用^[9-11]。Huang C 等^[12]提出慢性乙型肝炎患者血清 miR-29 水平与肝纤维化分期和坏死炎症分级呈负相关。血清 miR-29b 水平已被证明在慢性乙型肝炎病毒感染的患者中更容易检测到^[13]。此外,在进展性肝纤维化过程中血清miR-29b 水平可作为区分无纤维化或轻度纤维化(S0/1)和明显纤维化(S2/3)的生物标志物^[14]。但关于 miR-

29b-3p 调控 NAFLD 的研究还尚少,Chen LQ 等^[15]采用高脂高糖饲料诱导 NAFLD 并使用微阵列筛选可以调节 NAFLD 发病的 miRNAs 发现 miR-29b-3p 在 NAFLD 表达明显上调,提示 miR-29b-3p 在 NAFLD 的发病中起作用。因此,深入研究 miR-29 非常重要。FoxO 是一个核蛋白亚家族,包括哺乳动物中的 4 种同源蛋白:FoxO1、FoxO3、FoxO4 和 FoxO6。研究表明 FoxO3 在体内外促进肝脏 TG 沉积,提示 FoxO3 的异常表达可能与 NAFLD 密切相关。由此,为进一步阐明 miR-29b-3p 在 NAFLD 中的作用,本研究采用 PA 诱导建立 NAFLD 细胞模型,发现 PA 组的脂质积累量明显高于对照组,表明 NAFLD 细胞模型建立成功。在 PA 诱导的 NAFLD 细胞模型中 miR-29b-3p 表达升高,而 FoxO3 表达降低,提示 miR-29b-3p、FoxO3 可能参与 NAFLD 的发病。进一步实验表明 FoxO3 基因结合位点与 miR-29b-3p 互补,可能是 miR-29b-3p 下游的靶基因,然后将 miR-29b-3p 抑制剂转染细胞,结果显示抑制 miR-29b-3p 能降低细胞内脂质蓄积,提示 miR-29b-3p 抑制可能在抑制脂质沉积方面起积极作用。除了在脂质代谢中的作用外,本研究结果表明 miR-29b-3p 在 NAFLD 炎症及氧化应激中也起重要作用,结果显示 miR-29b-3p 抑制可降低炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-8)和氧化应激因子(MDA)表达,升高 SOD、GSH-Px 含量,提示抑制 miR-29b-3p 可以有效调节 NAFLD 细胞模型的炎症状态及氧化应激。进一步结果表明过表达 FoxO3 并抑制 miR-29b-3p 后细胞脂质积累、炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-8)和氧化应激因子(MDA)明显降低,SOD、GSH-Px 含量明显升高,提示过表达 FoxO3 加强 miR-29b-3p 抑制对脂质积累和氧化应激的抑制作用。

综上所述,本研究证实 miR-29b-3p 可直接靶向 FoxO3,抑制 miR-29b-3p 可降低脂质积累及炎性细胞因子表达,且过表达 FoxO3 加强 miR-29b-3p 抑制对脂质积累和氧化应激的抑制作用,为潜在的 NAFLD 治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

[1] Fan JG, Kim SU, Wong VWS. New trends on obesity and NAFLD in Asia[J]. J Hepatol, 2017, 67(4): 862-873.
[2] Fang YL, Chen H, Wang CL, et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: from "two hit theory" to

"multiple hit model"[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(27): 2974-2983.

[3] Zhu CA, Hou XM, Zhu JB, et al. Expression of miR-30c and miR-29b in prostate cancer and its diagnostic significance[J]. Oncol Lett, 2018, 16(3): 3140-3144.

[4] Zeng QC, Wang Y, Gao J, et al. miR-29b-3p regulated osteoblast differentiation via regulating IGF-1 secretion of mechanically stimulated osteocytes[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24: 11.

[5] Morris BJ, Willcox DC, Donlon TA, et al. FOXO3: a major gene for human longevity: a mini-review[J]. Gerontology, 2015, 61(6): 515-525.

[6] 韩 静, 李亚伟, 刘艳萍, 等. 银杏黄酮对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏组织中脂质和炎症因子水平的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2020, 55(1): 100-103.

Han J, Li YW, Liu YP, et al. Effects of ginkgo flavone on lipid and inflammatory factor level in liver tissue of rats with nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Zhengzhou Univ Med Sci, 2020, 55(1): 100-103.

[7] Tana C, Ballestri S, Ricci F, et al. Cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic implications[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(17): 3104.

[8] 曹 玥, 孙梦云, 蔡静明, 等. miR-34a 及其下游基因在铁超载大鼠非酒精性脂肪肝发生过程中的作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(5): 378-383.

Cao Y, Sun MY, Cai JM, et al. Involvement of miR-34a and its downstream genes plus iron overload in rats with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Carcinog Teratog Mutagen, 2018, 30(5): 378-383.

[9] Ni HE, Li WF, Zhuge Y, et al. Inhibition of circHIPK3 prevents angiotensin II-induced cardiac fibrosis by sponging miR-29b-3p[J]. Int J Cardiol, 2019, 292: 188-196.

[10] Sun YP, Wang PF, Yang WJ, et al. The role of lncRNA MSC-AS1/miR-29b-3p axis-mediated CDK14 modulation in pancreatic cancer proliferation and Gemcitabine-induced apoptosis[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(6): 729-739.

[11] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. Hepatology, 2011, 53(1): 209-218.

[12] Huang C, Zheng JM, Cheng Q, et al. Serum microRNA-29 levels correlate with disease progression in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. J Dig Dis, 2014, 15(11): 614-621.

[13] Chen J, Wu X, Cai B, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of HBV infection persistence[J]. Infect Genet Evol, 2017, 54: 152-157.

[14] Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Russo MW, et al. Baseline hepatic levels of miR-29b and claudin are respectively associated with the stage of fibrosis and HCV RNA in hepatitis C[J]. Clin Exp Gastroenterol Hepatol, 2019, 1(1): 105.

[15] Chen LQ, Li Q, Wang J, et al. miR-29b-3p promotes chondrocyte apoptosis and facilitates the occurrence and development of osteoarthritis by targeting PGRN[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3347-3359.

(责任编辑:唐秋姗)