

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.006

miRNA-129-5p 干扰技术对胆道闭锁小鼠胆道 EMT 作用机制的研究^{*}

王建尧¹,王 斌^{1△},吴宙光¹,叶晓烁¹,陈子民¹,冯 奇¹,刘 冬¹,姚 君²
(1. 广东省深圳市儿童医院普外二科 518000;2. 广东省深圳市人民医院消化内科 518000)

[摘要] **目的** 探讨 miRNA-129-5p 在胆道闭锁上皮间质转化(EMT)中的作用机制。**方法** 构建胆道闭锁小鼠模型(实验组),取实验组胆道组织,构建 TGF-β1 诱导的胆管上皮 EMT 细胞模型,检测 TGF-β1 诱导刺激后胆道上皮细胞株 EMT 相关标志物表达水平,并检测 miRNA-129-5p 的表达变化。同时转染 miRNA-129-5p 的前体,比较转染前后 TGF-β1 刺激下胆道上皮细胞 EMT 相关标志物及细胞外基质的表达改变。**结果** 实验组小鼠肝脏肝外胆道呈 EMT 样改变,miRNA-129-5p 在实验组小鼠中的表达水平下调($P<0.05$),过表达 miRNA-129-5p 可以抑制 EMT 的进程($P<0.05$)。**结论** miRNA-129-5p 可能通过 TGF-β1 通路调控胆道上皮 EMT 的进程。

[关键词] 胆道闭锁;miRNA-129-5p;上皮间质转化
[中图分类号] R726.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1723-04

Study on the mechanism of miRNA-129-5p in epithelial-mesenchymal transition of biliary atresia mouse^{*}
WANG Jianyao¹,WANG Bin^{1△},WU Zhouguang¹,YE Xiaoshuo¹,
CHEN Zimin¹,FENG Qi¹,LIU Dong¹,YAO Jun²
(1. Department of General Surgery Ward II, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China, 2. Department of Gastroenterology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of miRNA-129-5p in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of biliary atresia. **Methods** Constructed bile duct epithelial EMT cell model (the experimental group) induced by TGF-β1, detected the expressions of EMT related markers and miRNA-129-5p. While miRNA-129-5p precursor was transfected, the expressions of EMT related markers and extracellular matrix were contrasted between the original and the renovated biliary epithelial cells. **Results** In the experimental group, extrahepatic bile duct showed EMT, the expression of miRNA-129-5p was decreased ($P<0.05$), overexpression of miRNA-129-5p could inhibit the progression of EMT ($P<0.05$). **Conclusion** miRNA-129-5p may relate to EMT by regulating the expression of TGF-β1.

[Key words] biliary atresia; miRNA-129-5p; epithelium-mesenchymal transition

胆道闭锁是婴儿期累及肝内外胆管、最终导致终末期肝硬化的严重肝脏疾病^[1-4]。miRNA-129-5p 是新近发现的一个与纤维化疾病紧密相关的小分子 RNA(miRNA)家族,在多种器官纤维化的调控中发挥着重要作用^[5-8]。在胆道闭锁胆管上皮细胞纤维化过程中,上皮间质转化(epithelium-mesenchymal transition, EMT)机制发挥着至关重要的作用^[9]。本研究将构建 TGF-β1 诱导的小鼠胆管 EMT 分化细胞模型,检测 TGF-β1 刺激后胆道上皮细胞株 EMT 相关标志物及细胞外基质(ECM)表达水平,并检测 miRNA-129-5p 的表达变化,探讨 miRNA-129-5p 调控 EMT 的机制,现报道如下。

1 材料与方法
1.1 实验动物与试剂 动物 BALB/c 小鼠[广东省医学动物实验中心, SCXK(粤)2014-0035], 5 周龄; Trizol(美国 Invitrogen 公司); DNA 荧光染料 SYBR Green I(美国 Invitrogen 公司); 引物(美国 Invitrogen 公司); RNA 酶抑制剂(美国 Invitrogen 公司); Taq 酶(美国 Invitrogen 公司); 10×buffer(美国 Invitrogen 公司); 5×buffer(美国 Invitrogen 公司); Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); Pre-miR™ miRNA-129-5p(美国 Invitrogen 公司); Pre-miR™ microRNA Pre-cursor 阴性对照(美国 Invitrogen 公司); BCA 蛋白浓

^{*} 基金项目: 广东省医学科研基金(B2014360); 广东省深圳市科技创新委员会科技计划项目(JCYJ20160429174927286, JCYJ20150403101028164)。 作者简介: 王建尧(1982—), 主治医师, 硕士, 主要从事儿童普外疾病研究。 △ 通信作者, E-mail: szwb1967@126.com。

度测定试剂盒(碧云天生物有限公司);重组人 TGF- β 1(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);兔抗人钙黏蛋白(E-cadherin)多克隆抗体(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);山羊抗人 claudin1 多克隆抗体(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);小鼠抗人波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);兔抗人 FN 多克隆抗体(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);辣根过氧化物酶标记抗山羊二抗(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);辣根过氧化物酶标记抗山羊二抗(美国 Santa cruz Biotechnology 公司);miRNA 提取试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司);miRNA 反转录试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司);实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 胆道闭锁动物模型构建及肝脏苏木精-伊红(HE)染色 根据国内汤绍涛等^[10]的造模方法,将 BALB/c 小鼠 30 只按照雄雌比例 1:3 分笼饲养,待生下第 1 胎新生鼠后分 2 组,给新生 12~18 h BALB/c 小鼠经腹腔内分别注入生理盐水(对照组)和轮状病毒(实验组),于注射后 14 d 取肝脏及胆管组织,连续切片行 HE 染色。

1.2.2 RT-PCR 检测 miRNA-129-5p 的表达变化 分别取两组小鼠胆管组织置于-70℃保存备用,切取部分标本后,每份称量 50 mg 置于玻璃匀浆器中,依照 mirVana™ miRNA Isolation Kit 说明书进行总 RNA 提取,将提取物于-70℃保存。

RT reaction master mix 的合成按照 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 说明书的步骤合成,总反应体系为 7.00 μ L,其中 0.15 μ L 100 mmol/L dNTPs,1.00 μ L MultiScribe™ Reverse Transcriptase,1.50 μ L 10 \times Reverse Transcription buffer,0.19 μ L 20 U/ μ L 的 RNase Inhibitor,4.16 μ L 无核酸酶水。

cDNA 的合成按照 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 说明书的步骤合成,总反应体系 15.0 μ L,其中 7.0 μ L RT reaction master mix,3.0 μ L RT590,5.0 μ L 总 RNA。RT 反应程序:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,置冰上冷却,-20℃保存。

PCR 总反应体系 20.00 μ L,其中 1.00 μ L Taqman 590,1.33 μ L RT 反应标本,10.00 μ L TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix,7.67 μ L 无核酸酶水。反应程序:95℃ 10 min 热启动;95℃ 15 s,60℃ 1 min 扩增 40 个循环;每次 PCR 均设去离子水为模板的阴性对照。

1.2.3 TGF- β 1 诱导后细胞中 miRNA-129-5p 及 EMT 标志物表达的变化 将对照组小鼠胆管上皮细胞进行体外分离,并进行传代培养,流式细胞仪鉴定分离培养的胆管上皮细胞。待细胞长至 80%融合时

进行消化,加培养基终止后,用血球计数板行细胞计数,调节细胞浓度为 1×10^5 /mL 接种到 6 孔培养板。待细胞长至约 70%~80%融合时,进行干预实验。

提取 5 ng/mL TGF- β 1 刺激后,分别于 0、12、24、48 和 72 h 通过 RT-PCR 及 Western blot 检测胆管上皮细胞中 miRNA-129-5p、FMNL2、Vimentin 蛋白、E-cadherin、细胞角蛋白-19(CK-19)的表达。

1.2.4 通过细胞转染技术过表达 miRNA-129-5p,检测胆道 EMT 的变化

1.2.4.1 分组 (1)空白组:TGF- β 1 干预终浓度为 5 ng/mL,刺激时间为 48 h;(2)干预组:预先用 50 nmol/L 的 pre-miRNA-129-5p 干预 24 h 后,再以 5 ng/mL 的 TGF- β 1 对细胞进行 48 h 刺激;(3)阴性干预组:预先用 50 nmol/L 的 pre-mir 阴性对照干预 24 h 后,再以 5 ng/mL 的 TGF- β 1 对细胞进行 48 h 刺激。

1.2.4.2 细胞转染 按 Lipofectamine™ 2000 说明书进行细胞转染。转染前 1 d,接种适当数量胆管上皮细胞至 6 孔板中,每孔加入不含抗菌药物的 DMEN 完全培养基 2 mL,使转染时细胞密度能达到 30%~50%。将 pre-mir-lip2000 混合物加入含有细胞及细胞培养液的 6 孔板中,摇动混合。同时以等量 opti-MEMI 低血清培养基设置空白对照孔。将 6 孔板置于 5% CO₂,37℃ 孵育 6 h 后换成 DMEM 完全培养基,孵育 24 h 后换液。

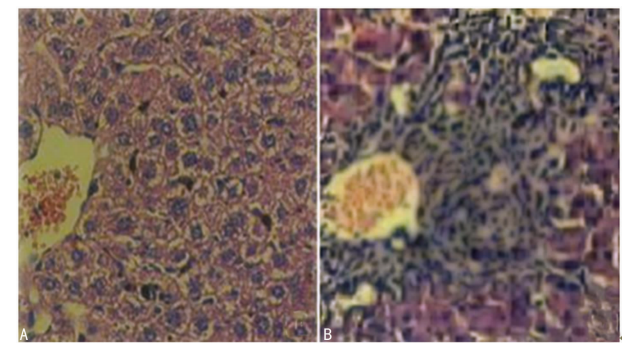
1.2.4.3 免疫荧光法检测 EMT 相关蛋白的表达变化 从孵化器和盖玻片取出 6 孔板,预冷的磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗 10 次。吸取多余的液体,用 4%多聚甲醛 2 mL 室温下固定 10~15 min。吸干固定液,加入渗透液(0.1% TritonX-100/PBS)室温孵育 10 min。吸干渗透液,置于摇床 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。吸干封闭液,加 E-cadherin(1:30 稀释)、CK-19(1:50 稀释)、FMNL2(1:30 稀释)、Vimentin(1:50 稀释),室温下置于摇床上孵育 1 h 后置于 4℃ 孵育过夜,孵育在湿盒内进行。吸出一抗稀释液,置于摇床上 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。滴加异硫氰酸荧光素(FITC)标价的二抗,室温避光孵育 30 min;Hoechst33258 染核 10 min。吸出二抗稀释液,置于摇床上 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。Fluoro-gel III 封片,于荧光显微镜下观察并且拍照。激光扫描共聚焦显微镜检测 FMNL2、Vimentin、E-cadherin 和 CK-19 的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肝脏 HE 染色特点的结果 对照组小鼠肝脏 HE 染色未见明显异常;实验组小鼠肝脏明显黄

染发暗,质地明显发硬,表面呈颗粒状,同时胆囊萎缩,而肝外胆道呈闭锁或索条状狭窄。HE结果显示,大量的炎性细胞浸润肝内门脉系统,伴有明显的肝内胆汁淤积,同时有点片状坏死,见图1。



A. 正常胆管,正常肝脏汇管区炎性细胞极少;B. 胆管呈闭锁状态,内皮细胞破坏,不规则增生,伴炎性细胞浸润,肝脏中可见汇管区炎性细胞明显浸润

图1 小鼠肝脏 HE 染色(×100)

2.2 各组小鼠胆道组织中 miRNA-129-5p 的表达与对照组比较,miRNA-129-5p 在实验组小鼠胆道上皮组织中的表达显著降低($P<0.01$),见图2。

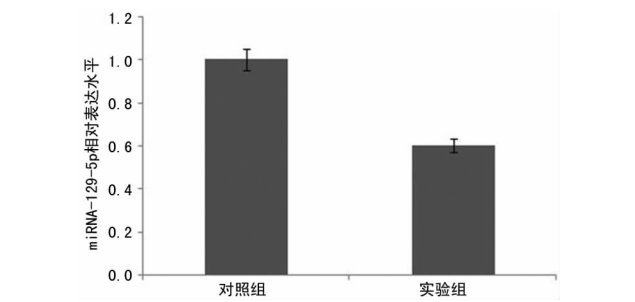


图2 两组小鼠胆道组织中 miRNA-129-5p 的相对表达水平

2.3 TGF-β1 诱导后细胞中 miRNA-129-5p 及 EMT 标志物表达变化 TGF-β1 诱导后胆道上皮细胞中 miRNA-129-5p 的表达水平呈时间依赖性下降,见图3。

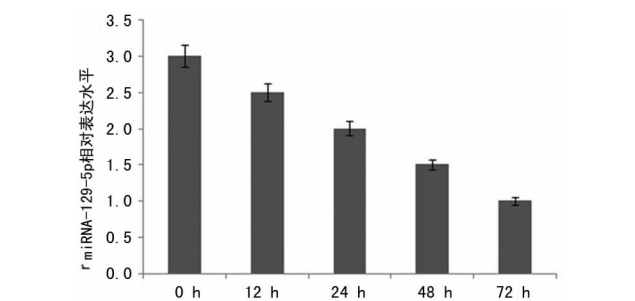


图3 TGF-β1 诱导后小鼠胆道组织中 miRNA-129-5p 各个时间点的相对表达水平变化

2.4 TGF-β1 诱导后各组细胞中 EMT 标志物表达变化 TGF-β1 诱导后胆道上皮细胞 FMNL2 及 Vimentin 的蛋白表达水平随时间增加逐渐增高,24 h 的 mRNA 水平与之前时间点比较,差异有统计学意义($P<0.05$),E-cadherin 及 CK-19 的蛋白表达水平随

诱导时间增加逐渐降低,12 h 的 mRNA 水平与之前时间点比较,差异有统计学意义($P<0.01$),见图4、5。

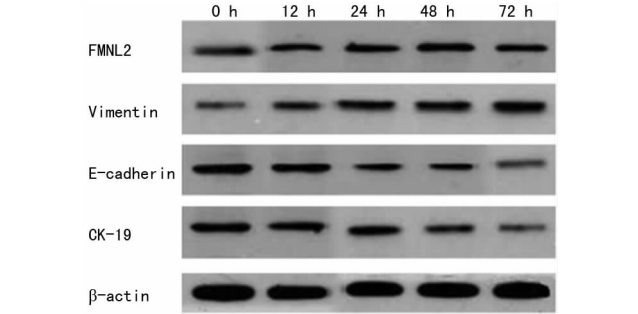
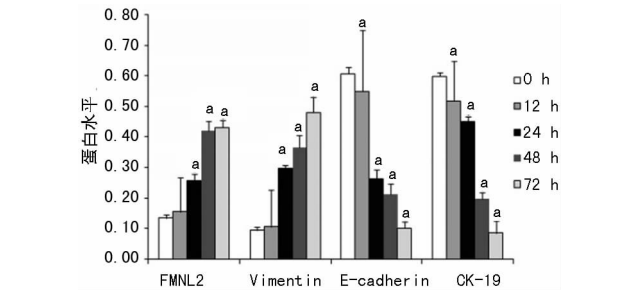


图4 TGF-β1 诱导后各时间点 EMT 标志物的表达水平



^a: $P<0.05$

图5 TGF-β1 诱导后小鼠胆道组织 EMT 标志物的表达水平

2.5 过表达 miRNA-129-5p 后胆道上皮细胞的 EMT 标志物变化 空白组与阴性干预组在 TGF-β1 诱导 48 h 后 FMNL2、Vimentin、E-cadherin、CK-19 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),而干预组 FMNL2、Vimentin 的表达下调($P<0.01$),E-cadherin 及 CK-19 表达水平明显上调($P<0.05$),见图6。

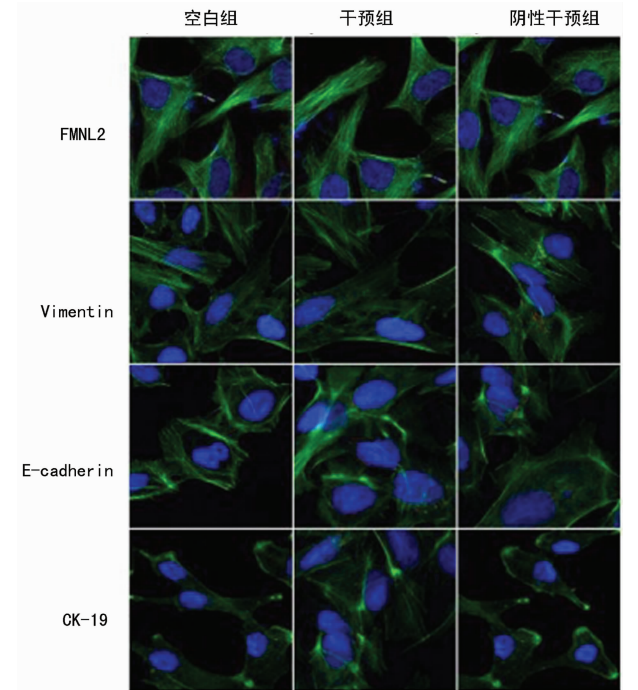


图6 过表达 miRNA-129-5p 后小鼠胆道 EMT 标志物 48 h 免疫荧光图(×400)

3 讨 论

胆道闭锁是婴儿期累及肝内外胆管、最终导致终末期肝硬化的严重肝脏疾病,其特点为胆管进行性的炎症、纤维化,并最终消失形成胆道闭锁。

EMT 是指分化成熟的极化上皮细胞丧失上皮/内皮细胞特征,向间充质细胞转化,使其具有更大的活性和迁移性。EMT 很可能参与了胆道闭锁中多发性硬化性胆管炎的病理机制。

TGF- β 1 在体内外各种上皮细胞和组织纤维化过程中介导 EMT 的发生。目前,部分 miRNA 已被证实 TGF- β 1 诱导的 EMT 中发挥关键作用,miRNA 可能成为新的治疗各种慢性病的靶点。有研究发现 miRNA-129-5p 与 EMT 的过程密切相关,在心脏、肝脏、肺、皮肤纤维化的过程中,miRNA-129-5p 的表达是下调的。

体内外转染 miRNA 的前体,如 pre-miRNA、pre-mir,以增强相应 miRNA 的作用,是当前最容易实现的 miRNA 干扰技术。本课题组通过 5 ng/mL 的 TGF- β 1 的终浓度干预诱导胆道上皮细胞进一步纤维化,从细胞水平模拟胆道闭锁的形成。同时进行 EMT 标志物的检测,证实了 TGF- β 1 诱导下细胞 EMT 的形成,miRNA-129-5p 的表达随时间延长逐渐下调。随后转染了 pre-miRNA-129-5p 以上调 miRNA-129-5p 的表达,并转染了一段随机并不会在体内产生任何影响的序列 pre-mir 作为阴性对照,再给予胆管上皮细胞 TGF- β 1 刺激,检测转分化相关指标及细胞外基质成分的变化。结果发现过表达 miRNA-129-5p 后,胆道上皮细胞标志物 E-cadherin、CK-19 表达有所上调,而间充质细胞标志物 Vimentin、FMNL2 表达水平均有所下调,说明上调 miRNA-129-5p 的表达可以抑制 TGF- β 1 诱导的胆道上皮 EMT。这一结果提示 miRNA-129-5p 可能通过调节 TGF- β 1 通路相关靶基因表达,参与调控胆道上皮细胞转分化及细胞外基质沉积。在胆道闭锁 EMT 进程中起着关键的作用。

(上接第 1722 页)

- [7] MEI Z, JIAO H, WANG W, et al. Polycomb chromobox 4 enhances migration and pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97L[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(6): 610-617.
- [8] LI J, XU Y, LONG X D, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 118-131.
- [9] SANCISI V, CIARROCCHI A. Role of CBX4 in the colorectal carcinoma metastasis-letter[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2548-2549.
- [10] AGRAWAL N, BANERJEE R. Human polycomb 2 pro-

参考文献

- [1] HARADA K. Sclerosing and obstructive cholangiopathy in biliary atresia: mechanisms and association with biliary innate immunity[J]. *Pediatr Surg Int*, 2017, 33(12): 1243-1248.
- [2] HSU Y A, LIN C H, LIN H J, et al. Effect of microRNA-155 on the interferon-gamma signaling pathway in biliary atresia[J]. *Chin J Physiol*, 2016, 59(6): 315-322.
- [3] YE Y, LI Z, FENG Q, et al. Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0180896.
- [4] GOLDMAN M, PRANIKOFF T. Biliary disease in children[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2011, 13(2): 193-201.
- [5] MA N, CHEN F, SHEN S L, et al. MiRNA-129-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion via targeting ETS1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 461(4): 618-623.
- [6] ZHANG J, LI S, YAN Q, et al. Interferon- β induced miRNA-129-5p down-regulates HPV-18 E6 and E7 viral gene expression by targeting SP1 in cervical cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81366.
- [7] DONG R, SHEN Z, ZHENG C, et al. Serum microRNA microarray analysis identifies miR-4429 and miR-4689 are potential diagnostic biomarkers for biliary atresia[J]. *Sci Rep*, 2016, 16(6): 21084.
- [8] GOLDSCHMIDT I, THUM T, BAUMANN U. Circulating miR-21 and miR-29a as markers of disease severity and etiology in cholestatic pediatric liver disease[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(3): e28.
- [9] SHAN Y, SHEN N, HAN L, et al. MicroRNA-499 Rs3746444 polymorphism and biliary atresia[J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(4): 423-428.
- [10] 杨瑛, 汤绍涛, 曹国庆, 等. L-12P35, P40 和 IFN- γ 在胆道闭锁小鼠模型肝脏组织中的表达[J]. *临床小儿外科杂志*, 2008, 7(6): 26-29.

(收稿日期: 2017-10-13 修回日期: 2017-12-24)

tein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine beta-synthase sumoylation[J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e4032.

- [11] YUAN X, WU H, XU H, et al. Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment[J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1): 20-27.
- [12] QIN H, DU D, ZHU Y, et al. The PcG protein HPC2 inhibits RBP-J-mediated transcription by interacting with LIM protein KyoT2[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(5): 1220-1226.

(收稿日期: 2017-10-15 修回日期: 2017-12-26)