

miR-124在运动干预下负调控Hedgehog通路对OJ致肝损伤的改善作用

邱杰¹ 刘少华¹ 陈伟^{2*}

(¹湖南机电职业技术学院, 长沙 410151; ²湖南体育职业学院, 长沙 410019)

摘要 为探讨运动干预下通过miR-124/Hedgehog传导途径对梗阻性黄疸小鼠致肝损伤的改善作用, 该文采用雄性KM小鼠构建胆汁淤积性黄疸模型, 随机分成模型组(M)和有氧运动组(TE), 设空白组(SO), 每组15只。采用一般情况观察、ELISA技术、HE染色、肝组织纤维化及炎症指标检测、qRT-PCR验证研究规律有氧运动的改善作用机制。结果显示, M组多部位黄染, 尿液颜色加深, 粪便呈浅灰色, 解剖观察到其胆管悬挂处呈囊性扩张。且血清TBIL、TBA、ALT、AST、ALP蛋白含量及炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B p65、MMP-9的含量相比SO组显著升高, 抗炎性因子IL-10显著降低($P < 0.01$)。与M组比较, TE组肝功能指标及炎症因子表达有明显改善, IL-10蛋白含量显著增高, 肝湿重下降, 肝纤维化指标HA、LN、V-C、PIIINP蛋白含量下降($P < 0.01$)。镜下观察M组肝索排列紊乱, 且空泡、核裂症、变性大量出现, 肝纤维化严重, TE组肝细胞损伤症状显著减轻。与M组相比, TE组中miR-124表达显著增高($P < 0.01$), *shh*、*Ptch-1*、*Gli1* mRNA表达降低($P < 0.01$)。提示规律有氧运动可通过上调miR-124负性调控Hedgehog通路中关键基因的表达水平, 进而减轻胆汁淤积性黄疸后炎症反应, 改善肝损伤。

关键词 胆汁淤积; 黄疸; 有氧运动; Hedgehog通路; 炎症通路; miR-124

miR-124 Improving OJ-induced Liver Injury through Downregulation of Hedgehog Pathway under Exercise Intervention

QIU Jie¹, LIU Shaohua¹, CHEN Wei^{2*}

(¹Hunan Mechanical & Electrical Polytechnic, Changsha 410151, China;

²Hunan Sports Vocational College, Changsha 410019, China)

Abstract In order to study the protective effect of aerobic exercise on OJ (obstructive jaundice)-induced liver injury in mice, and explore the possible liver protection mechanism of aerobic exercise from the miR-124-mediated regulation of Hedgehog pathway, KM mice were used to construct a cholestatic jaundice model. They were randomly divided into model group (M), aerobic exercise group (TE), and blank group (SO), with 15 mice in each group. General observation, ELISA technique, HE staining, liver tissue fibrosis and inflammatory indicator detection, qRT-PCR were employed to verify the improvement mechanism of regular aerobic exercise. The results indicated that in M group, many parts were yellow stained, and the urine color became darker. The stool was light gray. After anatomy, cystic dilatation could be observed at the bile duct suspension. Compared with SO group, the

收稿日期: 2020-05-26 接受日期: 2020-08-28

湖南省教育科学“十三五”规划(批准号: XJK18CTW004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0731-85072663, E-mail: chen125wei@qq.com

Received: May 26, 2020 Accepted: August 28, 2020

This work was supported by the “13th five year” Plan of Hunan Province Education Sciences (Grant No.XJK18CTW004)

*Corresponding author. Tel: +86-731-85072663, E-mail: chen125wei@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5358>

contents of TBIL, TBA, ALT, AST, ALP proteins and inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , NF- κ B p65, and MMP-9 in serum were significantly increased, while anti-inflammatory factor IL-10 was significantly reduced ($P<0.01$). Compared with M group, liver function indicators and inflammatory factor expression in TE group were significantly improved; IL-10 protein content was significantly increased; wet liver weight decreased, and liver fibrosis indicators HA, LN, IV-C, PIIINP protein content decreased ($P<0.01$). Under the microscope, it could be seen that the liver cords in M group were disorderly arranged; vacuoles, mitosis and degeneration appeared in large number, accompanied with severe liver fibrosis, and the symptoms of liver cell injury in TE group were significantly alleviated. Compared with M group, miR-124 expression in TE group was significantly increased ($P<0.01$), while *shh*, *Ptch-1*, *Gli1* mRNA expression was reduced ($P<0.01$). In conclusion, regular aerobic exercise can alleviate the cholestatic jaundice-induced inflammatory reaction by upregulating miR-124 downregulation of related protein and gene levels of Hedgehog pathway, so as to improve the liver injury.

Keywords cholestasis; jaundice; aerobic exercise; Hedgehog pathway; inflammatory pathway; miR-124

肝内外胆管阻塞致使胆汁排泄障碍是梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)病发生、发展的重要因素,目前主要采用手术进行治疗。临床表现为肝胆功能出现异常及全身多系统发生病理生理变化的症候群,梗塞性黄疸继发性损伤与免疫炎症过程密切相关,可致使各种炎症介质及细胞因子发生“瀑布样”效应、内毒素血症、肝功能障碍,甚至肝细胞变性坏死。肝组织纤维化演进过程中一个典型特征是Hedgehog信号的异常激活,调控细胞增殖、分化等,且对肝纤维化的促进作用与炎性反应呈正相关,提示Hedgehog信号传导途径可能是肝纤维化的潜在治疗靶标^[1]。研究发现,miR-124调节因子可通过靶向作用于Hedgehog,减弱mRNA翻译过程,降低Hedgehog信号通路活性,减轻肝脏炎症反应,且证实Hedgehog信号是miR-124的监管目标^[2]。近年来,有氧运动康复治疗因具有操作简单、易行且经济的特点备受科研者关注。同时对预防或治疗多种慢性疾病的研究也已证实,长时间运动可增强机体免疫系统功能,提高机体抗氧化能力^[3]。基于以上研究和发现,该文提出运动改善梗阻性黄疸肝损伤是否与miR-124靶向Hedgehog炎性通路的抗炎机制存在特殊关系,通过抑制炎性通路的传导,深入分析miR-124在有氧运动干预梗阻性黄疸小鼠中肝损伤的炎症改善机制,为研究梗阻性黄疸疾病新的干预方式提供实验数据和理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂

主要仪器: BM-II型生物组织石蜡包埋机购于

北京佳源兴业科技有限公司; YD-A生物组织摊烤片机购于上海精密仪器仪表有限公司; YD-335轮转切片机购于浙江金华益迪医疗设备厂; Thermo Fisher酶联免疫检测仪购于美国Rayto公司; 奥林巴斯倒置相差显微镜购于日本Olympus公司; TGL-16M台式高速冷冻离心机购于湖南湘仪离心机仪器有限公司; Bio-Rad CFX96Touch实时荧光定量PCR仪购于美国ABI公司。主要试剂: 血清肝组织指标试剂盒购于南京建成生物工程研究所; Trizol溶液、反转录试剂盒购自TaKaRa公司; miR-124引物购于Ribobio公司; *shh*、*Ptch-1*、*Gli1*引物购于南京建成生物工程研究所。

1.2 构模与分组

3周龄雄性KM小鼠45只(湖南师范大学医学伦理委员会, 审批号: 2018183), 体质量35~45 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物中心, 室温控制在23~25 °C, 湿度40%~60%, 每笼5只, 自由饮水、进食。适应性喂养1周。30只采取胆总管呈直角悬挂于腹壁72 h构建小鼠梗阻性黄疸模型, 构模过程中出现少量小鼠死亡, 并及时进行补充, 存活率达97.78%。步骤: 给予2%戊巴比妥钠(500 mg/kg)麻醉小鼠, 待无翻正反射后, 仰卧固定四肢, 取腹腔正中线局部消毒, 眼科剪纵向开1 cm切口, 棉絮棒拨开肝叶至暴露胆总管, 玻璃分针分离后穿入4-0不可吸收手术线并悬挂于腹壁, 缝合伤口。术后1.5 h腹腔注射2万单位(0.1 mL)青霉素, 自然苏醒。3天后抽出悬挂线, 随机分组为模型组(M)和有氧运动组(TE), 设空白对照组(SO), 每组15只。

1.3 干预方案

解除胆总管悬挂线并观察3天, 小鼠运动能力

良好。有氧运动方案前期采取6天适应性跑台训练, 1~2天设置跑台坡度为0°, 转速5 m/min, 共25 min/天; 3~4天设置跑台坡度为5°, 转速7 m/min, 共40 min/天; 5~6天设置跑台坡度为8°, 转速10 m/min, 共1 h/天。保持此运动强度并固定于每天下午4点进行有氧训练, 每周6次, 共8周。训练期间, 若小鼠停滞不前, 则进行轻微刺激或将其休息1~2 min后继续进行锻炼, 训练前期存在少量由互相撕咬行为导致的小鼠死亡情况, 但不影响后续数据检测所需样本量。

1.4 一般状态观察

训练期间, 每隔3天观察并统计小鼠生活状态, 主要从活动能力、兴奋度、体质量、排泄物、撕咬行为等方面进行综合性评价。

1.5 样品采集与处理

实验结束后, 各组小鼠禁食12 h, 给予2%戊巴比妥钠(500 mg/kg)麻醉小鼠, 待无翻正反射后, 眼科镊摘眼球取血2 mL于抗凝管中, 低速离心(3 000 r/min) 10 min, 取上清液于-80 °C保存备用。取肝组织称量湿重, 于肝右叶相同部位切取10 mm³放入装有10%多聚甲醛溶液(0.1 mol/L, pH7.4)固定, 石蜡包埋后进行病理学观察和免疫组织化学染色。另取部分用于肝组织总RNA提取和组织匀浆。

1.6 指标检测及方法

采用ELISA酶联免疫双抗体夹心法检测血清中总胆红素(total bilirubin, TBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)、谷丙转氨酶(glutamic pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)蛋白含量。取肝右叶组织100 mg, 加入RIPA裂解液匀浆, 低速离心15 min, 取上清液, 采用Bradford法测定肝组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)及白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)蛋白含量, 双抗体夹心法检测肝组织纤维化四项血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层黏蛋白(laminin, LN)、IV型胶原(type IV collagen, IVC)和III型前胶原(procollagen typeII, PCII)蛋白含量。

1.7 病理学检查

肝组织石蜡包埋, 厚度4 μ m切片, 按常规HE染色步骤, 脱蜡、脱水、染色、透明, 中性树胶封片,

镜下(\times 200倍)观察肝组织结构变化及损伤程度。

1.8 qRT-PCR

肝组织总RNA抽提纯化: 天平称取肝组织20 mg, 移液枪吸取1 mL Trizol溶液至1.5 mL离心管中, 与捣碎后的肝组织制成匀浆, 静置15 min。加氯仿200 μ L, 振荡, 4 °C、12 000 r/min离心20 min。取上清, 加异丙醇500 μ L, 混匀, 静置15 min, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 弃上清液, 加75%酒精(DEPC稀释)洗涤2次, 12 000 r/min离心10 min。弃上清, 40 μ L DEPC处理水溶解, -80 °C保存。按常规步骤去除基因组DNA后进行反转录, 条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 min, 10 °C 5 min。qRT-PCR: 试剂盒SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II由TaKaRa提供, 程序设置为95 °C 1 min; 94 °C 30 s, 引物退火温度30 s, 70 °C 30 min, 40个循环; 72 °C延伸5 min。引物序列如下: *GAPDH*(5'→3') F: GTT TCC TCG TCC CGT AGA CA, R: AAT CTC CAC TTT GCC ACT GC, 长度120 bp; *shh*(5'→3') F: AGG CTG GAT TCG ACT GGG TCT, R: AAC TTG GTG CCA CCC TGC TC, 长度149 bp; *Ptch-1*(5'→3') F: ACC CGC CAG AAG ATA GGA GA, R: GGA GTG CTG AGT CCA GGT GT, 长度134 bp; *Gli1*(5'→3') F: AAC ATG GCA GTC GGT AAC ATG AG, R: CCG CGT GTG TGT AGC CAT TTA G, 长度121 bp。2^{- $\Delta\Delta$ Ct}表示因子表达量, $\Delta\Delta$ Ct=实验组(Ct目的基因-Ct内参基因)-校正组(Ct目的基因-Ct内参基因)。

1.9 统计学方法

应用SPSS 20.0软件包进行统计学分析数据。所有数据的方差齐性Bartlett检验后, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组数据比较采用post-hoc test检验。P<0.05表示具有显著性差异, P<0.01表示具有非常显著性差异。

2 结果

2.1 OJ模型构建结果

解除小鼠胆总管悬挂线3天后发现, 小鼠多部位出现黄染和挠痕, 尿液颜色明显加深, 粪便呈浅灰色, 食欲、体质量下降, 肝湿质量、肝指数增加, 毛发粗糙无光泽, 存在相互撕咬行为, 解剖发现胆管悬挂处呈囊性扩张, 肝脏淤胆样改变和炎症发生。血清ALT、AST活性升高, DBIL、TBA蛋白含量增加(表1)。

2.2 血生化相关指标检测

图1结果显示: 有氧运动干预8周后, 相比SO组,

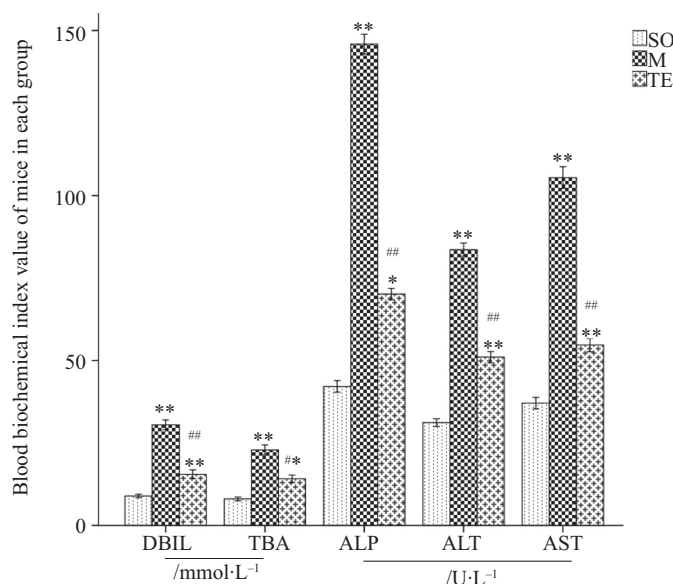
表1 梗阻性黄疸小鼠血生化指标、体质量、肝湿重检测

Table 1 Blood biochemical index, body mass and liver wet mass test in obstructive jaundice mice

指标 Index	SO组 SO group	M组 M group
DBIL /mmol·L ⁻¹	10.55±1.82	21.96±3.80**
TBA /mmol·L ⁻¹	8.50±1.61	21.96±3.80**
ALT /U·L ⁻¹	32.76±4.64	98.61±7.51**
AST /U·L ⁻¹	38.90±3.27	109.46±6.83**
Body mass /g	41.62±1.15	32.77±1.01**
Liver wet mass /g	1.51±0.21	2.57±0.82**
Liver indexes /%	3.6±0.79	7.8±0.93*

$\bar{x}\pm s$, $n=15$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空白组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=15$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the blank group.



SO: 空白对照组; M: 模型组; TE: 有氧运动组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与SO组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与M组比较。

SO: blank control group; M: model group; TE: aerobic exercise group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with SO group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with M group.

图1 各组小鼠血生化指标检测

Fig.1 Detection of blood biochemical indexes of mice in each group

M组血清DBIL、TBA、ALP、ALT、AST蛋白含量显著升高($P<0.01$), TE组血清DBIL、TBA、ALP、ALT、AST蛋白含量升高($P<0.05$, $P<0.01$); 相比M组, TE组血清中DBIL、TBA、ALP、ALT、AST含量显著下降($P<0.01$)。

2.3 病理学观察

图2结果显示, SO组小鼠肝索轮廓清晰, 细胞核、细胞质丰富, 未出现纤维化及炎症浸润, 相比SO组, M组肝索结构排列紊乱, 肝细胞变性、坏死, 细胞核变形、空泡或固缩且多部位大量中性粒细胞浸润, 出现气球样变性纤维化灶。相比M组, TE组坏死及纤维化灶显著降低, 炎症浸润减少, 肝索结构呈

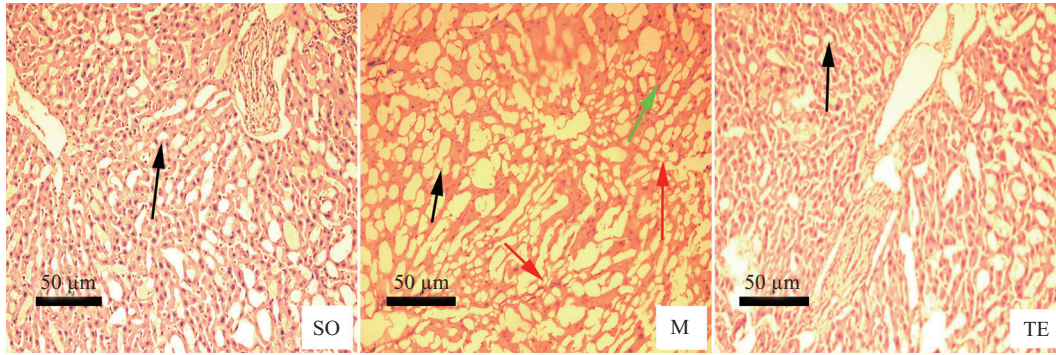
放射状, 症状具有明显的改善。

2.4 肝纤维化四项检测

图3结果显示, 相比SO组, M组肝组织肝纤维化四项指标中PIIINP、IV-C、LN、HA蛋白含量升高($P<0.05$, $P<0.01$); 相比M组, TE组肝组织中PIIINP、IV-C、LN蛋白含量显著下降($P<0.01$), HA蛋白含量降低($P<0.05$)。

2.5 肝组织相关炎症因子蛋白检测

图4结果显示, 相比SO组, M组肝组织炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B p65、MMP-9含量显著升高, 抗炎因子IL-10显著升高($P<0.01$); 相比M组, TE组肝组织炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B p65、MMP-9

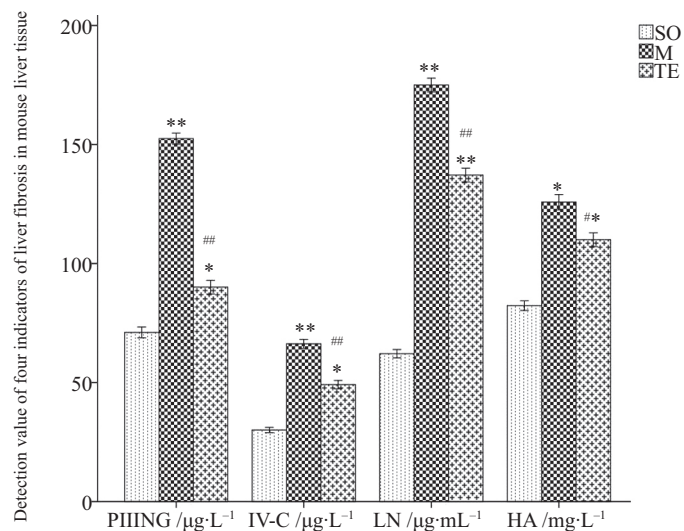


SO: 空白对照组; M: 模型组; TE: 有氧运动组。黑色箭头: 空泡; 绿色箭头: 胞核裂变; 红色箭头: 炎症浸润。

SO: blank control group; M: model group; TE: aerobic exercise group. Black arrow: vacuole; green arrow: nuclear fission; red arrow: inflammatory infiltration.

图2 肝组织HE染色

Fig.2 HE staining of liver tissue



SO: 空白对照组; M: 模型组; TE: 有氧运动组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与SO组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与M组比较。

SO: blank control group; M: model group; TE: aerobic exercise group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with SO group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with M group.

图3 小鼠肝组织肝纤维化四项指标检测

Fig.3 Detection of four indicators of liver fibrosis in mouse liver tissue

含量下降($P<0.05$, $P<0.01$), IL-10显著升高($P<0.01$)。

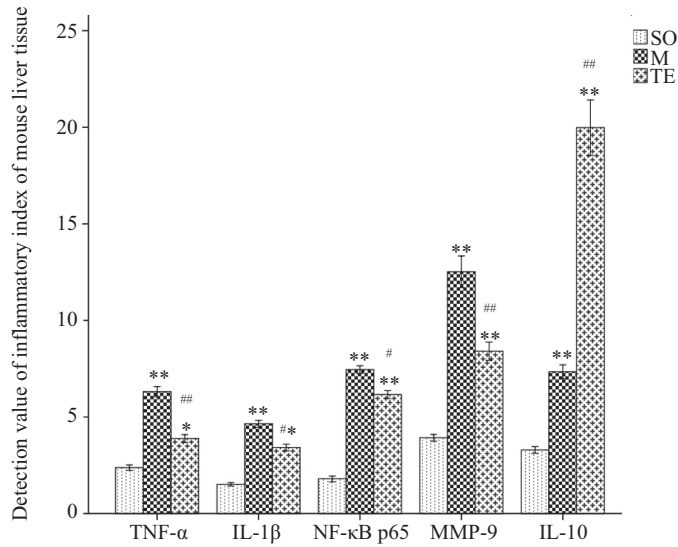
2.6 肝组织miR-124、shh、Ptch-1、Gli1 mRNA表达验证

由表2可知, 相比SO组, M组肝组织中miR-124、shh、Ptch-1、Gli1基因表达显著升高, 具有非常显著性差异($P<0.01$), TE组肝组织中shh基因表达上升, 具有非常显著性差异($P<0.01$), Ptch-1、Gli1基因表达具有显著性差异($P<0.05$), 相比M组, TE组shh、Ptch-1、Gli1基因表达显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 讨论

肝脏在机体中扮演着重要角色, 具有代谢、解

毒以及胆汁分泌等多种生理作用。正常生理情况下, 肝细胞更新周期长至1~2年, 急性肝损伤或切除后, 肝组织会迅速刺激再生功能, 30天左右损伤部位即可恢复正常, 由于病毒、药物、胆汁淤积、代谢异常等因素造成胆汁肝脏损伤时, 肝组织正常结构、功能被破坏, 肝组织前体细胞、窦状隙内皮细胞、免疫细胞、肝星型细胞等被激活, 促进增殖分化、神经血管重塑、炎症反应或纤维化等^[4-5]。WANG等^[6]发现, 胆汁淤积性小鼠血清中肝功能指标ALT、AST、DBIL蛋白含量显著升高, 肝组织炎症指标上升; 吴晨等^[7]采用胆总管结扎致胆汁淤积性肝纤维化模型研究发现, 模型组ALT、AST水平显著增加,



SO: 空白对照组; M: 模型组; TE: 有氧运动组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与SO组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与M组比较。

SO: blank control group; M: model group; TE: aerobic exercise group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with SO group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with M group.

图4 小鼠肝组织炎症指标检测

Fig.4 Detection of inflammatory index of mouse liver tissue

表2 小鼠肝组织shh, Ptch-1, Gli1 mRNA表达

Table 2 Expression of shh, Ptch-1 and Gli1 mRNA in mouse liver tissue

指标 Index	SO组 SO group	M组 M group	TE组 TE group
miR-124	1.08±0.04	2.33±0.17**	M group
shh	0.91±0.11	2.79±0.22**	2.01±0.06**#
Ptch-1	1.03±0.08	3.55±0.41**	1.54±0.10*##
Gli1	1.17±0.15	4.08±0.16**	1.93±0.24*##

$\bar{x} \pm s$, $n=15$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与SO组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与M组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=15$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with SO group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with M group.

肝脏炎症浸润, 肝组织纤维化严重; LI等^[8]研究发现, 胆汁淤积性小鼠可通过肠道微生物组的改变诱导肝损伤, 表现为血清胆汁酸、炎症因子等含量升高。本实验中, 对比分析M组与SO组, M组中小鼠表现出明显的梗阻性黄疸症状, 血清中肝功能指标蛋白含量显著上升, 肝湿重显著上升, 肝组织炎症因子TNF-α、IL-1β、NF-κB p65、MMP-9含量增加, 提示小鼠肝功能被破坏, 且有明显炎症浸润。肝组织纤维化四项指标显著上升, 结合肝组织病理检测发现, 肝索结构排列紊乱, 胞核畸形, 且出现气球样变性纤维化灶。表明胆汁淤积性小鼠肝组织已出现明显损伤, 但引起损伤的可能机制尚未确定。

Hedgehog信号通路在细胞增殖、组织模式、干细胞维持和发育的控制中扮演者重要角色, 并参与多个成体组织的损伤再修复, 初级纤毛是脊椎动

物中Hedgehog信号转导的重要中心。在Hh不存在的情况下, Ptch受体定位于纤毛抑制Smo激活, Gli蛋白被PKA、CKI和GSK3B磷酸化, 部分降解为截短的Gli阻遏物形式, 可抑制Hh靶基因在细胞核中的转录; 在Hh存在的情况下, Ptch从纤毛中消失, 活化的Smo促进了蛋白复合物Gli、Sufu、Kif7到睫状尖端的转运, Gli在此处从负调节剂Sufu分离^[9]。VERDELHO等^[10]通过对非酒精性脂肪肝致肝损伤与Hedgehog通路的综述中发现, 抑制过量的Hh通路活性是防止NAFLD进行性肝损害的潜在方法。HYUN等^[11]研究发现, 调节Hedgehog通路的miRNA诱导肝星状细胞失活, 可显著降低肝纤维化的发生, 同时证明调节Hh信号的miRNA是用于治疗肝纤维化的有前途的治疗剂; LI等^[12]研究发现, miRNA的下调可能通过靶向Hedgehog信号的上游转录激活因子

Gli3来增强肝纤维化的形成,而升高的miRNA则可以通过抑制Gli3来减弱肝纤维化的进展。同时有研究发现,Hedgehog信号传导途径的激活,可促进炎症反应的增强,而高表达的miR-124可抑制Hedgehog传导信号,从而降低组织炎性损伤^[13]。本实验中,肝组织qRT-PCR技术检测发现,*shh*、*Ptch-1*、*Gli1*基因表达显著升高,M组中高表达的miR-124基因,可能是机体应激反应的表现,结合血生化、肝组织纤维化四项、炎性指标检测及病理观察结果,提示胆汁淤积性小鼠可能由于激活Hedgehog信号传导途径,促进炎症“瀑布样”效应,导致肝组织损伤,但是高表达的miR-124是否参与Hedgehog信号的传导抑制有待进一步探讨。

多项研究表明,作为非药物疗法的适宜运动是一种具有预防健身、简单易行且经济的康复治疗手段,在慢性疾病的防治上发挥着重要作用。LIN等^[14]研究发现,长期规律运动训练可以显著降低单核细胞中TLR4的表达和炎性细胞因子的分泌,且对炎性细胞因子的调节具有抑制作用,增强免疫力,减轻梗阻性黄疸大鼠的肝损伤; FARZANEGI等^[15]发现,定期运动可以通过上调几种抗氧化酶和抗炎介质来抑制肝损伤中的活性氧过度产生和炎症引起的氧化应激。RADM-AIZIK等^[16]发现,运动可导致循环中性粒细胞miRNA基因表达谱的快速变化,通过qRT-PCR验证后,确定了泛素介导的蛋白水解、Jak-STAT和Hedgehog信号通路三种作用途径,均在炎症损伤的关键机制中起重要作用。WANG等^[17]利用生物信息学方法,结合Northern blot验证发现,miR-124的预测靶基因中存在大量与DNA损伤、修复、凋亡、周期调控等功能相关的基因,可通过诱导凋亡产生抑制肝癌进展; WANG等^[18]发现,miR-124的过表达可显著降低*Gli1*基因表达,增强细胞增殖和集落形成能力,miR-124抑制剂转染后细胞增殖和集落形成能力显著降低; 刘娅^[19]发现,Hedgehog信号通路中存在“GLI/miR-124/AURKA”信号轴,并从分子、细胞和临床水平三个层面分别验证“GLI/miR-124/AURKA”信号轴的正确性,丰富Hh-GLI信号网络的调控机制,综上所述,miR-124与Hedgehog信号传导途径存在重要的靶向调控关系。本实验中,对比分析M组与TE组,TE组miR-124基因表达显著升高,*shh*、*Ptch-1*、*Gli1*基因表达降低,提示有氧运动干预促进miR-124基因高表达,且对Hedgehog信号

通路具有抑制效应。结合TE组中肝功能指标、肝组织炎性指标含量降低结果,提示Hedgehog信号传导途径的抑制,有效降低了肝组织的炎性损伤。同时,肝组织纤维化四项指标蛋白含量显著降低,提示有氧运动可有效降低胆汁淤积性小鼠后肝组织炎症反应,改善肝功能和肝纤维化,对肝组织损伤后的修复具有一定促进作用,其可能的机制是运动干预下高表达的miR-124负性调控Hedgehog通路进而降低炎性肝损伤。

4 结论

Hedgehog信号传导途径对胆汁淤积性小鼠致肝损伤过程中具有重要调控作用,8周规律有氧运动可促进肝组织miR-124基因高表达,抑制Hedgehog信号传导途径,降低肝组织炎性损伤及纤维化,改善肝功能。

参考文献 (References)

- [1] XIAO Q, ZHANG S, REN H, et al. Ginsenoside rg1 alleviates anit-induced intrahepatic cholestasis in rats via activating farnesoid receptor and regulating transporters and metabolic enzymes [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 3(24): e109062.
- [2] HAO L, LIU M W, GU S T, et al. Sedum sarmentosum bunge extract ameliorates lipopolysaccharide- and d-galactosamine-induced acute liver injury by attenuating the hedgehog signaling pathway via regulation of miR-124 expression [J]. *Complement Ther Med*, 2020, 20(1): 88.
- [3] ASOKAN S M, WANG T, WANG M F, et al. A novel dipeptide from potato protein hydrolysate augments the effects of exercise training against high-fat diet-induced damages in senescence-accelerated mouse-prone 8 by boosting pampk/sirt1/pgc-1 α /pfoxo3 pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(8): 7334-49.
- [4] FUCHS S, BAYER M, TAUBERT R, et al. Effects of adenovirus-induced hepatocyte damage on chronic bile duct inflammation in a sclerosing cholangitis mouse model [J]. *Liver Int*, 2019, 39(12): 2330-40.
- [5] YANG R, ZHAO Q, HU D D, et al. Metabolomic analysis of cholestatic liver damage in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 12(8): 253-60.
- [6] WANG G F, LI Y Y, SHI R, et al. Yinchenzhufu decoction protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced acute cholestatic liver injury in mice by ameliorating disordered bile acid homeostasis and inhibiting inflammatory responses [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 25(4): e112672.
- [7] 吴晨, 邱玉保, 孙雪倩, 等. 姜黄素对小鼠胆汁淤积性肝纤维化的改善作用及其机制研究[J]. *中国应用生理学杂志(WU C, QIU Y B, SUN X Q, et al. Effects of curcumin on liver fibrosis induced by cholestasis in mice [J]. *Hinese Journal of Applied Physiology*), 2019, 35(5): 468-73.*
- [8] LI D S, HUANG Q F, GUAN L H, et al. Targeted bile acids and gut microbiome profiles reveal the hepatoprotective effect of wz

- tablet (schisandra sphenanthera extract) against lca-induced cholestasis [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 3(20): 211-6.
- [9] 金立方, 倪坚, 闫俊艳, 等. Hedgehog信号通路对肝脏损伤修复作用的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(JIN L F, NI J, YAN J Y, et al. Role of hedgehog signaling pathway in regeneration of liver injury [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(8): 1615-21.
- [10] VERDELHO MACHADO M, DIEHL A M. The hedgehog pathway in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Crit Rev Biochem Mol*, 2018, 53(3): 264-78.
- [11] HYUN J, JUNG Y. MicroRNAs in liver fibrosis: focusing on the interaction with hedgehog signaling [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(29): 6652-62.
- [12] LI L, RAN J, LI L, et al. Gli3 is a novel downstream target of mir-200a with an anti-fibrotic role for progression of liver fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(4): 1861-71.
- [13] EL-DERANY M O, EL-DERMERDASH E. Pyrvinium pamoate attenuates non-alcoholic steatohepatitis: insight on hedgehog/gli and wnt/ β -catenin signaling crosstalk [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 17(7): e113942.
- [14] LIN L, CAI W M, QIN C J, et al. Intervention of tlr4 signal pathway cytokines in severe liver injury with obstructive jaundice in rats [J]. *Int J Sports Med*, 2012, 33(7): 572-9.
- [15] FARZANEGI P, DANA A, EBRAHIMPOOR Z, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease: roles of oxidative stress and inflammation [J]. *Eur J Sport Sci*, 2019, 19(7): 994-9.
- [16] RADM-AIZIK S, ZALDIVAR F, OLIVER S, et al. Evidence for microrna involvement in exercise-associated neutrophil gene expression changes [J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109(1): 252-61.
- [17] XU L Y, LIU H, YAN Z M, et al. Inhibition of the Hedgehog signaling pathway suppresses cell proliferation by regulating the gli2/mir-124/aurka axis in human glioma cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5): 1868-78.
- [18] WANG X, WANG X. Systematic identification of micro rna functions by combining target prediction and expression profiling [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(5): 1646-52.
- [19] 刘嫒. “GLI/mi R-124/AURKA”调控模型的构建及其在神经胶质瘤中的作用[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [20] 吴文晓, 王婷, 耿兴超, 等. 药物性胆汁淤积型肝损伤的研究进展[J]. *中国新药杂志*(WU W X, WANG T, GENG X C, et al. Progress in study of drug-induced cholestasis liver injury [J]. *Chinese Journal of New Drugs*), 2020, 29(2): 143-51.
- [21] MA Z, WANG X, YIN P, et al. Serum metabolome and targeted bile acid profiling reveals potential novel biomarkers for drug-induced liver injury [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(31): e16717.
- [22] LI C, TAN Y H, SUN J. PAX6 contributes to the activation and proliferation of hepatic stellate cells via activating hedgehog/gli1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(2): 314-20.
- [23] YE L, YU Y, ZHAO Y. Icaritin-induced mir-875-5p attenuates epithelial-mesenchymal transition by targeting hedgehog signaling in liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 35(3): 482-91.
- [24] YANG S, LIU J, JIAO J, et al. Ar-turmerone exerts anti-proliferative and anti-inflammatory activities in hacat keratinocytes by inactivating hedgehog pathway [J]. *Inflammation*, 2020, 43(2): 478-86.