

# 有氧运动通过miR-154/Wnt通路改善梗阻性黄疸肝损伤的动物模型及临床研究

彭瑞<sup>1</sup> 毛海峰<sup>1</sup> 张小莲<sup>2</sup> 张宇<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>宜春学院体育学院, 宜春 336000; <sup>2</sup>宜春市人民医院, 宜春 336000)

**摘要** 该文探讨了在有氧运动干预下, miR-154通过调控Wnt通路改善梗阻性黄疸患者及小鼠的肝纤维化机制。动物实验采用3周龄雄性KM小鼠, 将小鼠胆总管悬挂于腹壁构建梗阻性黄疸模型, 构模后随机分成模型组(M)、有氧运动组(E)、空白对照组(B), 每组10只。临床研究选取确诊梗阻性黄疸患者20例, 分成规律运动组(RE)、黄疸组(OJ), 每组10例。实验通过一般行为学评估、ELISA酶联免疫法、HE染色、qRT-PCR技术探讨有氧运动介导下肝损伤的改善情况。结果显示, 构模72 h后, 小鼠尿液颜色加深, 粪便显浅灰色, 下背及腹部存在明显抓痕。镜下显示, M组肝细胞索紊乱, 胞核出现畸形或移位于细胞边缘, 且呈空泡样变。M组血清总胆红素(TBIL)、总胆汁酸(TBA)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)蛋白含量增加明显( $P<0.01$ )。相比M组, E组血清肝纤维化指标PIIINP、IV-C、LN、HA含量显著降低, 肝组织Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9蛋白含量下降( $P<0.01$ )。血液中miR-154、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9 mRNA表达降低( $P<0.01$ )。临床观察显示, OJ组巩膜、黏膜、肤色呈现暗黄且多部位有瘙痒症状, 大便呈白陶土色, RE组黄疸症状改善明显且肝纤维化指标PIIINP、IV-C、LN、HA蛋白含量下降( $P<0.01$ )。相比RE组, OJ血清TBIL、TBA、ALT、AST蛋白含量增高, miR-154、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9 mRNA表达上升( $P<0.01$ )。有氧运动干预可降低miR-154表达水平, 从而抑制Wnt/ $\beta$ -catenin通路调控机制, 在梗阻性黄疸动物模型及临床有抗肝纤维化的作用。

**关键词** 有氧运动; Wnt通路; miR-154; 肝纤维化

## Animal Model and Clinical Study of the Mechanism of Aerobic Exercise in Improving Obstructive Jaundice Liver Injury through miR-154 Regulating Wnt Signaling Pathway

PENG Rui<sup>1</sup>, MAO Haifeng<sup>1</sup>, ZHANG Xiaolian<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Physical Education, Yichun University, Yichun 336000, China; <sup>2</sup>Yichun City People's Hospital, Yichun 336000, China)

**Abstract** This paper explored the mechanism of aerobic exercise intervention in improving the liver fibrosis of patients and mice with obstructive jaundice through miR-154 regulating Wnt signaling pathway. In the animal experiment, 3-week-old male KM mice were used. First, the mouse common bile duct was suspended in the abdominal wall to construct an obstructive jaundice model. After the construction of the model, the mice were ran-

收稿日期: 2019-04-01 接受日期: 2019-07-08

江西省教育厅科学技术研究项目(批准号: GJJ14705)和江西省卫计委科技计划项目(批准号: 20175563)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13907959025, E-mail: 443999908@qq.com

Received: April 1, 2019 Accepted: July 8, 2019

This work was supported by Jiangxi Provincial Department of Education Science and Technology Research Project (Grant No.GJJ14705) and Jiangxi Provincial Health Planning Commission Science and Technology Plan Project (Grant No.20175563)

\*Corresponding author. Tel: +86-13907959025, E-mail: 443999908@qq.com

网络出版时间: 2019-11-12 12:26:06

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1034.014.html>

domly divided into the model group (M), the aerobic exercise group (E), and the blank control group (B), 10 mice in each group. In the clinical study, 20 patients with obstructive jaundice were selected and divided into the regular exercise group (RE) and obstructive jaundice group (OJ), 10 cases in each group. The experiment was carried out to evaluate the improvement of liver injury mediated by aerobic exercise through general behavioral assessment, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), HE staining and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results indicated that, in 72 h after construction of the model, the urine color of the mice became deepened, the stool was light gray, and there were obvious scratches on the lower back and abdomen. Under the microscope, it could be seen that the hepatic cell cords of the M group became disorderly and the nucleus was deformed or moved to the cell edges, and cells showed vacuolation. In the M group, the serum total bilirubin (TBIL), total bile acid (TBA), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) protein levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the M group, the serum liver fibrosis indicators procollagen III N-terminal propeptide (PIIINP), type IV collagen (IV-C), laminin (LN), hyaluronic (HA) content significantly decreased, and Wnt5a,  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$  and MMP-9 protein content in liver tissue also decreased ( $P < 0.01$ ). Besides, miR-154, Wnt5a,  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ , MMP-9 mRNA expressions in the blood declined ( $P < 0.01$ ). According to the clinical observation, the sclera, mucous membrane and skin color of OJ group were dark yellow and there were itching symptoms in many parts, the stool showed white clay color, the jaundice symptoms in RE group improved significantly and the contents of PIIINP, IV-C, LN and HA proteins in liver fibrosis decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the RE group, the serum TBIL, TBA, ALT, and AST protein contents in OJ group increased, and miR-154, Wnt5a,  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ , MMP-9 mRNA expressions increased ( $P < 0.01$ ). In conclusion, the aerobic exercise intervention can reduce the expression level of miR-154, accordingly inhibiting the regulation mechanism of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, so the aerobic exercise has anti-fibrosis effect in animal model and clinical application of treatment of obstructive jaundice.

**Keywords** aerobic exercise; Wnt signaling pathway; miR-154; liver fibrosis

肝内外胆管阻塞致使胆汁排泄障碍是梗阻性黄疸病发生、发展的重要因素。临床表现为上皮肤、巩膜及粘膜出现黄染,粪便呈白陶土色或尿液呈深茶色。随着胆管阻塞的时间延长,胆管组织出现纤维化,造成多组织、器官的损伤,肝细胞出现坏死甚至纤维组织增生或肝硬化<sup>[1]</sup>。Micro RNAs(miRNAs)是一类长为20~22个核苷酸的非编码单链RNA分子,其通过降解或抑制相应靶mRNA翻译过程而发挥生物学作用<sup>[2]</sup>。研究表明,miRNAs调节着人类三分之一的基因,miR-154可直接靶向Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中负性调控因子DKK2,促进Wnt受体复合物信号的传导,其表达在组织纤维化的发展中具有重要调控作用<sup>[3]</sup>。目前,梗阻性黄疸患者主要以手术治疗为主,但麻醉、出血、感染等因素可能引发低血压性休克、脓毒症或多器官功能的衰竭。有氧运动作为一种简易、经济的康复治疗手段,可增强机体红细胞免疫能力及粒细胞吞噬能力,在预防炎症的发生、感染性疾病的治疗方面发挥一定促进作用<sup>[4-5]</sup>。因此,

本文拟研究miR-154在Wnt信号通路中的调控作用,构建小鼠梗阻性黄疸模型,进行有氧运动干预,观察小鼠胆管阻塞致肝纤维化的改善情况,初步探索有氧运动介导下miR-154通过Wnt通路对梗阻性黄疸肝纤维化的机制提供实验数据和理论依据,为其相关类疾病的发生发展提供新的研究思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

本研究经湖南师范大学医学伦理委员会科学研究项目第183号批件同意,选用雄性成年昆明种(KM)小鼠30只,购自湖南斯莱克景达实验动物中心(许可证SCXK(湘)2017-0004),体重为23~35 g。小鼠适应性喂养一周,将小鼠胆总管悬挂于腹壁构建梗阻性黄疸模型,共20只。步骤如下,小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(500 mg/kg)麻醉。仰卧位保持静止或无翻身动作时,固定四肢并位于剑突下方1 cm处络合碘局部消毒,眼科剪纵向开1.5 cm手术切口。玻璃

分针拨开肝叶, 暴露肝总管, 于肝门横沟1 cm处进行分离。4-0不可吸收手术线穿入将胆总管成直角悬挂于腹壁, 组织归位并缝合伤口。4 h后腹腔注射2万单位(0.2 mL)青霉素, 待其自然苏醒。72 h后将悬挂线小心抽出, 解除悬挂, 随机分成模型组(M)和有氧运动组(E)。设空白对照组(B), 每组10只。通过行为学、观察肝组织外观及形态结构判断模型。

## 1.2 临床资料

由宜春市人民医院确诊胆总管结石所致的男性梗阻性黄疸患者20例, 时间段为2017年6月15日至2018年6月15日, 纳入标准: 根据对应的病史、临床症状及相关仪器检查确诊的患者; 合并肝损伤诊断依据ALT含量(1%肝细胞损伤可使其成倍增加, 临床肝损伤含量标准为 $ALT \geq 80$  IU/L)及血清结合胆红素含量升高( $\geq 6.8 \mu\text{mol/L}$ ); 大便呈陶土色及具备运动能力的患者。排除标准: 其它因素致肝损伤如酒精性、药物性、自身免疫及肝炎病毒等; 合并患有心脏、肾脏等器官功能不全者; 患有精神障碍或提供资料不全者等。经医学伦理委员会准许, 采用随机数字表法分成两组, 每组10例。规律运动组(RE)中最小年龄为24岁, 最大年龄为65岁, 平均年龄为(45.87±2.96); 发病时间最短为2个月, 最长为20个月, 平均(9.84±1.24)个月。黄疸组(OJ)中最小年龄为25岁, 最大年龄为63岁, 平均年龄为(46.14±2.71); 发病时间最短为2.5个月, 最长为21个月, 平均(10.23±2.07)个月。将两组临床资料进行综合分析差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 1.3 干预方案

动物模型解除胆管悬挂线后观察3天, 随后适应性跑台训练, 为期一周: 1~2天跑台坡度为零, 转速为6 m/min, 20 min/天; 3~4天跑台坡度为5度, 转速为8 m/min, 40 min/天; 5~6天跑台坡度为8度, 转速为10 m/min, 60 min/天。保持此强度进行7周有氧训练, 每天下午4点进行, 每周休息1天, 共7周。若训练过程中小鼠停滞不前, 则用木棒轻敲驱赶或让其休息1 min, 之后继续进行有氧训练。

患者有氧运动锻炼参考Yu<sup>[6]</sup>和Gorantla等<sup>[7]</sup>采取步行、游泳两种方式, 期间每人佩戴心率跟踪器, 估算受试者所能达到的靶心率=(220-目前年龄-静息心率)×(0.6~0.8), 并在运动中根据设定的心率范围和主观疲劳程度评分及时控制运动强度, 每天下午四点进行, 每周休息一天, 共训练12周。运动前后分别进行10 min热身和放松, 前2周进行适应性锻炼, 后

10周年龄35岁以下每天行走2.5~3.0 km, 游泳30 min; 35~55岁每天行走2.0~2.5 km, 游泳20 min; 55~65岁每天行走1.0~1.5 km, 游泳15 min。整个运动过程有体育教师和医护人员进行严格监督并记录数据, 若发现身体不适应立即停止运动。

## 1.4 一般行为学观察

构建模型后, 3天一次记录小鼠肤色、毛发、耳朵、眼睛、排泄物、撕咬行为及攀爬能力等。对小鼠梗阻性黄疸症状进行综合评估。临床观察患者肤色变化情况, 皮肤瘙痒症状是否减轻或扩张, 以及腹胀、脂肪泄和粪便颜色等进行综合评价。

## 1.5 样品采集与处理

7周后, 小鼠禁食过夜, 腹腔注射1%戊巴比妥钠(500 mg/kg)麻醉。直至小鼠处于仰卧位状态保持静止或无翻身动作时, 采用摘眼球法吸取2 mL血液于抗凝管中, 3 000 r/min离心15 min, 取上清-80 °C保存备用。另收集4 mL血液用于提取血液mRNA, 切取10 mm<sup>3</sup>肝右叶组织固定于4%多聚甲醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.4)中, 用于组织病理学研究。剩余肝组织于离心管中-80 °C保存, 用于组织相关蛋白检测。采集所有患者运动干预前后外周空腹静脉血15 mL, 用于检测相关血生化指标和血液相关因子基因的表达情况。

## 1.6 指标检测及方法

采用ELisa酶联免疫双抗体夹心法测定动物及患者血清中TBIL、TBA、ALT、AST、ALP含量, 试剂盒购自艾博抗(上海)贸易有限公司, 测定肝纤维化指标PIIINP、IV-C、LN、HA含量, 试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。取动物肝右叶100 mg, 生理盐水进行清洗, 加入RIPA裂解液制成10%匀浆, 3 000 r/min, 离心15 min, 取上清液根据酶联免疫(ELisa)试剂盒检测Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9蛋白浓度。

## 1.7 病理学检查

肝组织石蜡切片, 厚度为4  $\mu\text{m}$ , 参照HE染色步骤, 切片二甲苯透明后, 中性树胶封片。镜下(200倍)观察肝组织形态结构。

## 1.8 总RNA提取

1.8.1 血液预处理 收集血液4 mL, 加入小鼠/人外周血白细胞分离液(1:1), 室温2 000 r/min离心20 min。吸取中间雾层至离心管中, 加2 mL PBS混匀, 2 000 r/min离心10 min, 弃上清。加1 mL PBS于EP管中混匀, 4 000 r/min离心



5 min, 获得沉淀加入1 mL Trizol试剂吹打至黏稠。试剂购买于上海研谨生物科技有限公司。

**1.8.2 总RNA抽提纯化** 血液总mRNA提取采用Trizol法: 将上述制成溶液中加入0.2 mL氯仿, 振荡, 室温静置5 min, 12 000 r/min, 4 °C离心15 min, 取上层于EP管中, 加入预冷的异丙醇0.5 mL, 振荡混匀, 静置20 min, 12 000 r/min, 4 °C离心15 min, 75%乙醇(DEPC稀释)洗涤, 12 000 r/min, 4 °C离心150 min, 弃上清液, 加40 μL DEPC处理水溶解RNA。

## 1.9 反转录及qRT-PCR

试剂盒购自 TaKaRa公司, 按说明书进行操作。去除基因组DNA反应: 2 μL 5× gDNA Eraser Buffer, 1 μL gDNA Eraser, 依据样本RNA浓度吸取RNase Free dH<sub>2</sub>O配置总体积为10 μL的Master Mixm溶液, 25 °C反应30 min。反转录: 4 μL RNase Free dH<sub>2</sub>O、4 μL 5× Prime Script Buffer 2、1 μL RT Primer Mix、1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I, 共10 μL, 移入装有不同RNA混合液Master Mixm的反应管中, 共20 μL, 37 °C孵育15 min。qRT-PCR: 检测仪器为ABI 7900HT, 试剂为SYBR® Premix Ex Taq™ II(TaKaRa)试剂盒。根据Gene Bank核酸数据库中各因子cDNA序列, 基因引物合成及购买均由上海生工提供, 引物序列见表1。

## 1.10 统计学方法

应用SPSS 20.0软件包进行统计学分析数据。单因素方差分析比较多组数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据比较应用post-hoc检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性,  $P < 0.01$ 为差异具有极显著性。

## 2 结果

### 2.1 一般观察结果

枸橼72 h解悬后, 小鼠排泄物出现黄尿, 粪便颜色变浅, 呈现浅灰色。四肢、尾部及胸腹部黄染显著, 颈部和下背部挠痕明显且存在彼此撕咬行为。但食欲、运动能力正常。随即抽取5只, 解剖发现胆总管悬挂近端出现囊性扩张且肝脏呈淤胆样改变。病理学切片发现, 相比正常组, 枸橼小鼠肝索紊乱, 肝细胞出现结构性改变。临床观察发现患者黏膜、皮肤呈暗黄或黄绿色, 多部位存在瘙痒症状, 上腹有明显压痛感。出现因胆盐入肠道障碍导致腹胀、脂肪泻等, 粪便呈现白灰色。

### 2.2 病理学观察

由图1可知, 肝组织HE染色细胞核呈蓝色, 细胞质被伊红染成深浅不同的粉红色。胶原纤维及弹力纤维发生病变时, 伊红着色由浅转深。相比B组, M组肝索结构破坏, 伴有炎性细胞浸润, 肝细胞出现大量纤维化, 细胞外基质存在沉积现象且间隙扩张, 核空泡、裂变现象显著, 胞核完整性欠缺。E组片状肝细胞坏死面积降低, 肝纤维化程度显著下降, 存在少量核固缩、空泡, 肝索结构较整齐。B组肝索呈现放射状, 无纤维化症状。

### 2.3 血生化相关指标检测

由图2可知, 动物实验中, 相比B组, M组、E组血清中TBIL、TBA、ALT、AST、ALP蛋白含量增加明显, 具有极显著性差异( $P < 0.01$ ); 相比M组, E组血清中TBIL、TBA、ALT、AST、ALP蛋白含量降低, 具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。由图3可知, 临床研究

表1 不同基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for different genes

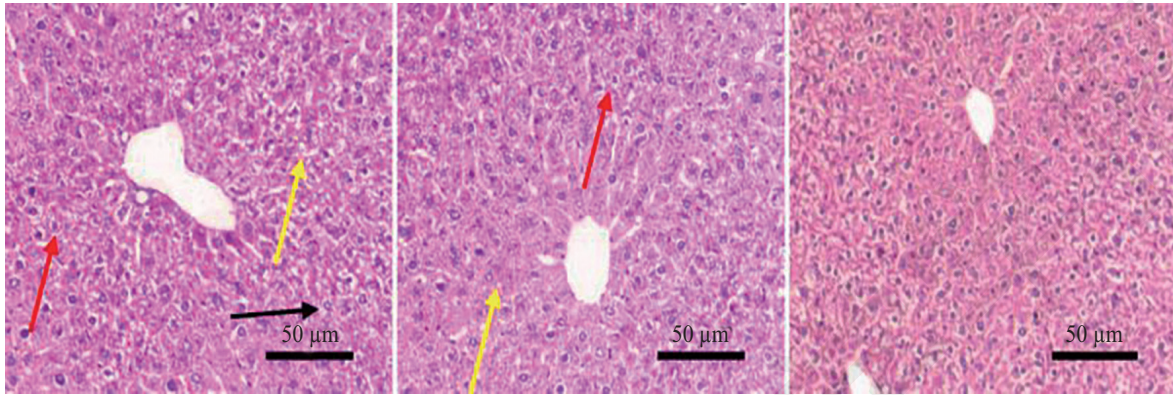
名称 Gene	方向 Direction	动物引物序列(5'→3') Animal primer sequence (5'→3')	患者引物序列(5'→3') Patient primer sequence (5'→3')
miR-154	Forward	TAG GTT ATC GTT GCC TTC GC	TAT CCG TGT TGC CTT CGC TT
	Reverse	TTC TCC GAA CGT GTC ACG TG	AAG GCG GGA TTT GGT ACT GA
Wnt5a	Forward	TGG AGA AGG TGC GAA GAC AG	CAA CTG GCA GGA CTT TCT CA
	Reverse	CGT CTC TCG GCT GCC TAT TT	TTC TTT GAT GCC TGT CTT CG
β-catenin	Forward	CAT CAA GAA GGT GGT GAA GCA	GGC ACC CAG CAC AAT GAA G
	Reverse	CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG	GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT
GSK-3β	Forward	AGG CTG TGT GTT GGC TGA AT	ATG CCA CAG CAG CGT CAG
	Reverse	TTT GCT CCC TTG GTG TTA GCA	GGT CTG TCC ACG GTC TCC
MMP-9	Forward	AGA CGA CTA GAC GGC ATC	CAT TGT TGC AGC AAT CAG AAT
	Reverse	TGG GAC ACA TAG TGG GAG GT	TCA TCT ATA CTT GCA GTG GGT
GAPDH	Forward	AGA GGC AGG GAT GTT GTT CTG	CCT AGT TCG TCA TGG GTG TGA
	Reverse	GAC TCA TGA CCA CAG TCC ATG	GCC AGT AGA GGC AGG GAT GAT

中RE组、OJ组TBIL、TBA、ALT、AST、ALP蛋白含量均高于正常值, 相比OJ组, RE组血清中各指标含量有明显下降( $P<0.01$ )。由表2可知, 7周运动干预后, M组血清中PIIINP、IV-C、LN、HA含量相比B组显著升高( $P<0.01$ ), 相比M组, E组肝纤维化四

项指标含量下降( $P<0.01$ ); 临床研究中相比OJ组, RE组PIIINP、IV-C、LN、HA含量降低( $P<0.01$ )。

### 2.4 小鼠肝组织Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9蛋白检测

由图4可知, 相比M组, E组肝右叶组织Wnt5a、



红、黄、黑箭头分别表示核固缩、空泡、核裂变。

Red, yellow, and black arrows indicate nuclear pyknosis, vacuolization, and nuclear fission, respectively.

图1 小鼠肝组织HE染色

Fig.1 HE staining of liver tissues of mice in each group

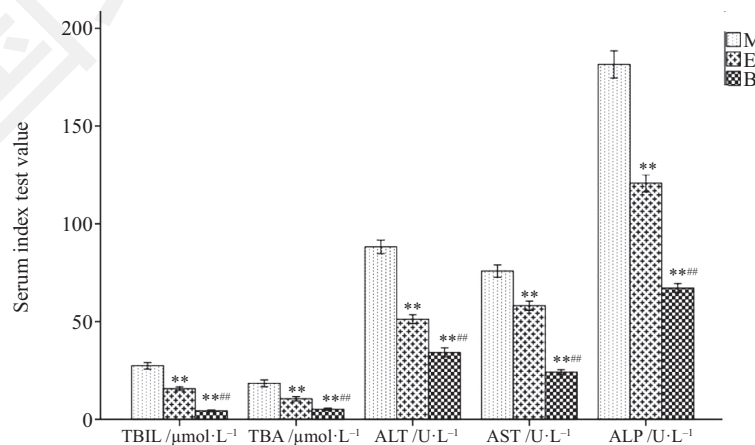
表2 小鼠及患者血清肝纤维化四项指标检测( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Detection of four indicators of serum fibrosis in mice and patients ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

指标/ng·mL <sup>-1</sup> Index /ng·mL <sup>-1</sup>	M	E	B	OJ	RE
PIIINP	164.41±8.59	128.62±6.08**	97.60±6.08***	29.62±3.61	18.14±3.82&&
IV-C	70.84±5.22	56.19±4.15**	43.73±5.92***	189.12±6.73	147.19±7.54&&
LN	1 620.15±28.96	1 470.20±27.50**	1 108.31±24.07***	246.55±8.36	184.28±8.42&&
HA	0.59±0.11	0.35±0.09**	0.21±0.06***	176.81±9.20	138.10±6.07&&

动物实验: \*\* $P<0.01$ , 与M组比较; \*\*\* $P<0.01$ , 与E组比较。临床研究: && $P<0.01$ , 与OJ组比较。

Animal experiments: \*\* $P<0.01$  compared with group M group; \*\*\* $P<0.01$  compared with the E group. Clinical study: && $P<0.01$  compared with the OJ group.



\*\* $P<0.01$ , 与M组比较; \*\*\* $P<0.01$ , 与E组比较。

\*\* $P<0.01$  compared with group M; \*\*\* $P<0.01$  compared with the E group.

图2 小鼠血液相关指标检测

Fig.2 Detection of blood related indicators in mice

$\beta$ -catenin蛋白含量下降,具有非常显著性差异( $P<0.01$ ); GSK-3 $\beta$ 、MMP-9蛋白含量降低( $P<0.01$ )。相比E组, B组Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9蛋白含量显著偏低( $P<0.01$ )。

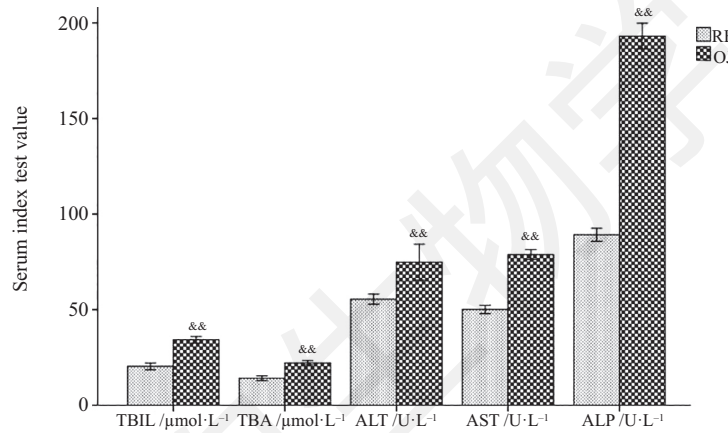
### 2.5 血液miR-154、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9基因mRNA表达

图5可知, M组血液中miR-154、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9 mRNA表达最高, 相比M组, E组、B组各因子mRNA表达有所下降, 具有非常显著性差异( $P<0.01$ ), 相比E组, B组各因子mRNA表达降低, 具有非常显著性差异( $P<0.01$ )。图6可知, OJ组miR-

154、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9 mRNA表达升高, 相比OJ组, RE组各因子mRNA表达下降, 具有非常显著性差异( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

肝纤维化是由于各种因素诱发慢性肝损伤后机体对其进行的修复反应, 可造成肝硬化病理改变, 合并肝脏功能失常所导致的肝门静脉高压、代谢紊乱、凝血障碍等。临床上胆总管结石是梗阻性黄疸的主要病因之一, 机体胆汁经胆总管流入肠道受阻出现返流至血液, 造成巩膜、黏膜、乃至全身皮肤黄染

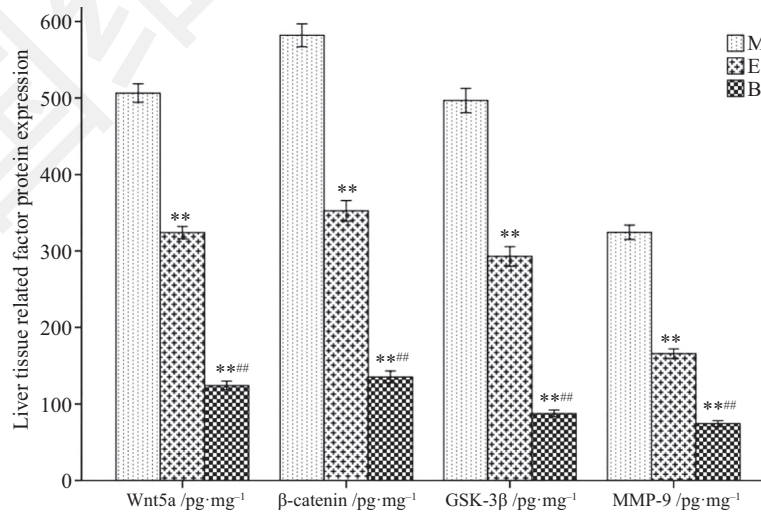


&& $P<0.01$ , 与RE组比较。

&& $P<0.01$  compared with the RE group.

图3 患者血液相关指标检测

Fig.3 Patient blood related indicators detection



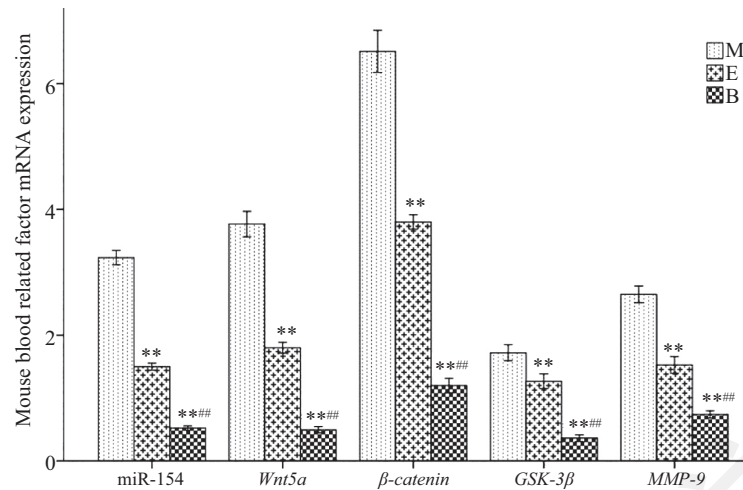
\*\* $P<0.01$ , 与M组比较; # $P<0.01$ , 与E组比较。

\*\* $P<0.01$  compared with group M; # $P<0.01$  compared with the E group.

图4 小鼠肝组织Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9蛋白含量检测

Fig.4 Detection of Wnt5a,  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$  and MMP-9 protein in mouse liver tissue



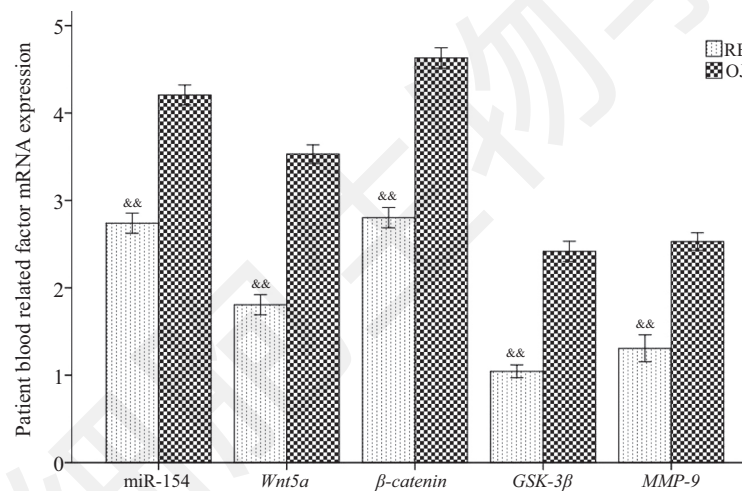


\*\* $P < 0.01$ , 与M组比较; # $P < 0.01$ , 与E组比较。

\*\* $P < 0.01$  compared with group M; # $P < 0.01$  compared with the E group.

图5 小鼠血液相关因子mRNA表达

Fig.5 Mouse blood-related factor mRNA expression



&& $P < 0.01$ , 与OJ组比较。

&& $P < 0.01$  compared with the OJ group.

图6 患者血液相关因子mRNA表达

Fig.6 Patient blood-related factor mRNA expression

症状<sup>[8]</sup>。其肝细胞损伤机制较为复杂,内毒素血症、机体免疫功能失常、肝细胞钙稳态失调等均可促进肝细胞的凋亡或坏死<sup>[9]</sup>。目前,关于梗阻性黄疸的发病机理、病理变化及其防治的实验研究也越来越多,梗阻性黄疸致肝纤维化的理想动物模型是实验研究取得进展的关键因素之一。Mahmoud等<sup>[10]</sup>研究急性胆汁淤积对肝及睾丸的病理变化中,永久性结扎小鼠胆总管构建阻塞性黄疸模型,效率高且能大幅度缩短病变时间,但对机体其它器官的损害极大,存活率较低,后期难以实施康复方案。Wu等<sup>[11]</sup>采用肝毒性化合物 $\alpha$ -萘基异硫氰酸酯诱导小鼠胆汁淤积,造

成肝细胞损伤。但毒性物质的摄入必将对其它组织产生影响,且成功率偏低。Lü等<sup>[12]</sup>予以含3'-甲基-4-二甲氨基偶氮苯食物进行喂养,通过140天构建模型,存活率高且能较好模拟人类梗阻性黄疸发病机制,但时间长、耗费高。本实验参照课题组SD大鼠胆管完全阻塞法并加以改良,采用小鼠胆总管悬挂72 h构建梗阻性黄疸模型,造模时间快且大幅度减少因永久性结扎所导致的高死亡率。解悬挂后一周,构模小鼠食欲及运动能力良好,其粪便呈苍白色,尿液、皮肤出现黄染,解剖发现梗阻处胆管囊性扩张,肝小叶黄状斑点明显。经数次实验证明,此方法构

模时间短且成功率高,是一种模拟人类梗阻性黄疸发病机制程度高的理想模型。

Wnt/ $\beta$ -catenin通路对细胞分化、增殖或凋亡有重要影响,Wnt蛋白是一种脂质修饰糖蛋白,主要通过Wnt/ $\beta$ -catenin通路发挥生物学效应<sup>[13]</sup>。关键调节因子 $\beta$ -catenin可从胞质转移至胞核结合T细胞因子(T cell factor, TCF)激活Wnt转录基质金属蛋白酶-9(matrix metallo proteinases-9, MMP-9)、纤连蛋白等相关纤维化基因。静息情况下,由于缺乏Wnt配体,胞质内 axin- APC-GSK-3 $\beta$ 复合体将游离的 $\beta$ -catenin磷酸化,最后被泛素化并破坏。当Wnt/ $\beta$ -catenin通路活化时,Wnt配体识别并结合 axin-APC-GSK-3 $\beta$ 复合体上的受体,致使其解体。胞内 $\beta$ -catenin去磷酸化而聚集,转移至胞核发挥调控作用<sup>[14]</sup>,对肿瘤的发生、纤维化疾病或器官的结构变化等至关重要,与成人成纤维细胞生物学功能或组织纤维化密切相关。研究发现,Wnt/ $\beta$ -catenin通路的异常活化可促进上皮细胞间变及成纤维细胞分化,激活其它促纤维化因子,导致组织器官纤维化的发生<sup>[15]</sup>。Fu等<sup>[16]</sup>研究发现, $\beta$ -catenin可激活肝星状细胞增生或分泌,介导肝纤维化形成及结构变化,阻断 $\beta$ -catenin表达可显著下降肝星状细胞活性。本实验发现,动物实验中M组血清TBIL、TBA、ALT、AST、ALP及肝纤维指标PIIINP、IV-C、LN、HA蛋白含量相比B组显著增加,镜下观察肝索结构损坏,细胞外基质沉积,空泡、核固缩、核裂症现象明显增多。肝组织Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9蛋白含量及mRNA表达最高。提示胆总管的阻断,导致胆汁流通障碍,促进Wnt/ $\beta$ -catenin通路的异常活化,致使肝纤维化的发生。临床研究中OJ组血清中TBIL、TBA、ALT、AST、ALP及肝纤维指标PIIINP、IV-C、LN、HA蛋白含量显著高于正常值,血液Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9 mRNA表达高于RE组,结合一般行为学观察结果提示梗阻性黄疸患者Wnt/ $\beta$ -catenin通路被激活,出现明显的肝损伤症状。

有氧运动训练作为一种简单、经济且易行的康复治疗手段,受到许多科学家的研究。目前发现,科学有规律的有氧运动能有效改善酒精性脂肪肝、肝癌等造成的纤维化症状或肝脏氧化损伤<sup>[17]</sup>。Delwing-de等<sup>[18]</sup>采用高脂膳食诱发大鼠肝组织及血液中氧化应激参数的增加,发现中等强度连续训练或

高强度间歇训练均可降低蛋白质羰基含量及过氧化氢酶等氧化应激参数。Lin等<sup>[19]</sup>研究发现,中强度有氧运动可增强肝脏炎性细胞因子的表达并提高免疫力,减轻或缓解梗阻性黄疸大鼠肝损伤。近年来,研究发现miRNAs与细胞生长及组织分化密切相关,在器官形成、胚胎发育和癌症治疗等有着重要的调节作用<sup>[20]</sup>。Milosevic等<sup>[21]</sup>研究发现,miR-154在肺纤维化成纤维细胞中显著增加,促进成纤维细胞迁移及增殖,抑制肺成纤维细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin活化途径可大幅度降低miR-154的增殖作用,提示miR-154是成纤维细胞重要的调节因子。本研究发现,动物实验中miR-154蛋白及mRNA表达与Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9呈正相关,相比M组,E组miR-154、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 及MMP-9在肝组织与血液中显著降低,血清生化指标含量明显下降,肝组织镜下观察显示,肝细胞坏死面积降低,肝纤维化程度减弱。结合一般行为学结果提示,有氧运动可下调miR-154的表达,从而抑制Wnt/ $\beta$ -catenin活化途径,控制成纤维细胞进一步迁移与增殖,减轻肝纤维化症状。临床研究中RE组血液miR-154、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9 mRNA表达及TBIL、TBA、ALT、AST、ALP蛋白含量显著低于OJ组,梗黄症状明显减轻,结合动物实验结果提示,规律有氧运动可通过抑制Wnt/ $\beta$ -catenin通路减轻或缓解患者梗阻性黄疸致肝损伤。

#### 4 小结

miRNAs具有复杂的调节网络,降解或抑制相应靶mRNA翻译过程而发挥生物学作用。通过本研究发现,miR-154在梗阻性黄疸动物模型肝组织及血液内高表达,患者血液中高表达,且与肝纤维化密切相关。规律的有氧运动可下调miR-154的表达,抑制Wnt/ $\beta$ -catenin活化途径,在梗阻性黄疸动物模型及临床有抗肝纤维化的作用。

#### 参考文献 (References)

- 1 Kong Z, Hu JJ, Ge XL, Pan K, Li CH, Dong JH, *et al.* Preserving hepatic artery flow during portal triad blood occlusion improves regeneration of the remnant liver in rats with obstructive jaundice following partial hepatectomy. *Exp Ther Med* 2018; 16(3): 1910-8.
- 2 Farokhzadeh Z, Dehbidi S, Geramizadeh B, Yaghoobi R, Malek-hosseini SA, Behmanesh M, *et al.* Association of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in an iranian population.



- Ann Lab Med 2019; 39(1): 58-66.
- 3 Luo Y, Chen JJ, Lü Q, Qin J, Huang YZ, Yu MH, *et al.* Long non-coding RNA NEAT1 promotes colorectal cancer progression by competitively binding miR-34a with SIRT1 and enhancing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Cancer Lett* 2019; 12(8): 440-1.
  - 4 Olioso D, Dauriz M, Bacchi E, Negri C, Santi L, Bonora E, *et al.* Effects of aerobic and resistance training on circulating microRNA expression profile in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 35(12): 187-92.
  - 5 Ghareghani P, Shanaki M, Ahmadi S, Khoshdel AR, Rezvan N, Meshkani R, *et al.* Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. *Obes Res Clin Pract* 2018; 25(11): 80-9.
  - 6 Yu F, Thomas W, Nelson NW. Impact of 6-month aerobic exercise on Alzheimer's symptoms. *J Appl Gerontol* 2015; 34(4): 484-500.
  - 7 Gorantla VR, Pemminati S, Bond V, Meyers DG, Millis RM. A comparison of the effects of swimming and walking on body weight, fat distribution, lipids, glucose, and insulin in older women-the Sedentary Women Exercise Adherence Trial 2. *Metabolism* 2010; 59(11): 1562-73.
  - 8 Bian EB, Xiong ZG, Li J. New advances of lncRNAs in liver fibrosis, with specific focus on lncRNA-miRNA interactions. *J Cell Physiol* 2019; 234(3): 2194-203.
  - 9 Oguz S, Salt O, Ibis AC, Gurcan S, Albayrak D, Yalta T, *et al.* Combined effectiveness of honey and immunonutrition on bacterial translocation secondary to obstructive jaundice in rats: Experimental Study. *Med Sci Monit* 2018; 24(14): 3374-81.
  - 10 Mahmoud YI, Abo-Zeid FS. Epididymal ultrastructural changes associated with chronic cholestasis after bile duct ligation in adult rats. *Ultrastruct Pathol* 2018; 7 (4): 344-9.
  - 11 Wu SY, Cui SC, Wang L, Zhang YT, Yan XX, Lu HL, *et al.*  $\beta$ -Glycyrrhetic acid protects against  $\alpha$ -naphthylisothiocy cholestasis through activation of the Sirt1/FXR signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2018; 25(12): 154-9.
  - 12 Lü Y, Yue J, Gong X, Han X, Wu H, Deng J, *et al.* Spontaneous remission of obstructive jaundice in rats: selection of experimental models. *Exp Ther Med* 2018; 15(6): 5297-301.
  - 13 Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JGG, *et al.* Wnt- $\beta$ -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 46(13): 487-90.
  - 14 Wang JN, Li L, Li LY, Yan Q, Li J, Xu T. Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in liver fibrosis. *Gene* 2018; 67(4): 57-69.
  - 15 Chen Z, Yao L, Liu Y, Zhu P. LncTIC1 interacts with  $\beta$ -catenin to drive liver TIC self-renewal and liver tumorigenesis. *Cancer Lett* 2018; 43(10): 88-96.
  - 16 Fu X, Lin J, Qin F, Yang Z, Ding Y, Zhang Y, *et al.* LncAPC drives Wnt/ $\beta$ -catenin activation and liver TIC self-renewal through EZH2 mediated APC transcriptional inhibition. *Mol Carcinog* 2018; 57(3): 408-18.
  - 17 Ranjbar K, Nazem F, Sabrinezhad R, Nazari A. Aerobic training and L-arginine supplement attenuates myocardial infarction-induced kidney and liver injury in rats via reduced oxidative stress. *Indian Heart J* 2018; 7(4): 538-43.
  - 18 Delwing-de Lima D, Ulbricht ASSF, Werlang-Coelho C. Effects of two aerobic exercise training protocols on parameters of oxidative stress in the blood and liver of obese rats. *J Physiol Sci* 2018; 68(5): 699-706.
  - 19 Lin L, Cai WM, Qin CJ, Miao LC, Yun LT, Hua Y, *et al.* Intervention of TLR4 signal pathway cytokines in severe liver injury with obstructive jaundice in rats. *Int J Sports Med* 2012; 33(7): 572-9.
  - 20 Ramos AE, Lo C, Estephan LE, Tai YY, Tang Y, Zhao J, *et al.* Specific circulating microRNAs display dose-dependent responses to variable intensity and duration of endurance exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; 315(2): H273-83.
  - 21 Milosevic J, Pandit K, Magister M, Rabinovich E, Ellwanger DC, Yu G, *et al.* Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47(6): 879-87.