

## 研究论文

# miR-133a-3p负调控NG2参与肌成纤维细胞活化的机制研究

张航 岳闻慧 杨乐 李丽英\*

(首都医科大学基础医学院细胞生物学系, 北京 100069)

**摘要** 该文旨在探讨在肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs)活化的过程中, 微小RNA(microRNA, miRNA)对神经胶质抗原2(neuron-glia antigen 2, NG2; 基因名: *Cspg4*)表达的调控及其分子机制。小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stromal cells, BMSCs)经miRNA mimics转染和转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1)诱导后, 采用qRT-PCR方法检测*Cspg4*以及MFs活化标志物的表达; 通过双荧光素酶报告基因实验检测*Cspg4*与miRNA的结合情况。结果显示, MFs活化后, *Cspg4*的表达以时间和剂量依赖性方式上调, 且与MFs的活化标志物呈正相关。敲减*Cspg4*后, MFs的活化标志物表达下调。在肝损伤模型中, miR-133a-3p表达下调, 且与*Cspg4*呈显著负相关。miR-133a-3p通过与*Cspg4* 3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)的特定位置结合, 对*Cspg4*进行转录后调控。miR-133a-3p可以抑制TGF $\beta$ 1诱导的*Cspg4*和MFs活化标志物的水平升高。总之, miR-133a-3p通过负调控NG2的表达参与了MFs的活化。

**关键词** 神经胶质抗原2; 骨髓间充质干细胞; 肌成纤维细胞; 转化生长因子 $\beta$ 1; miR-133a-3p

## Mechanism of miR-133a-3p Negatively Regulating NG2 in Myofibroblasts Activation

ZHANG Hang, YUE Wenhui, YANG Le, LI Liying\*

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract** The aim of this study is to explore miRNA (microRNA) regulation of NG2 (neuron-glia antigen 2, gene name: *Cspg4*) expression and its molecular mechanism in the process of activating MFs (myofibroblasts). Mouse BMSCs (bone marrow mesenchymal stromal cells) were transfected with miRNA mimics and induced with TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) to differentiate into MFs. The expression of *Cspg4* and MFs activation markers were measured by qRT-PCR. The binding of *Cspg4* and miRNA was detected by dual luciferase reporter gene assay. MFs activation up-regulated *Cspg4* expression in a time-dependent and dose-dependent manner. The mRNA expression of *Cspg4* was positively correlated with MFs activation markers. The mRNA expression of MFs activation markers were down-regulated after *Cspg4* siRNA transfection. In the mouse model of liver injury, the

收稿日期: 2022-03-02 接受日期: 2022-07-05

北京市自然科学基金(批准号: 7202007)、国家自然科学基金(批准号: 82070623)和北京市教委科技计划一般项目(批准号: KM202010025029)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-83950468, E-mail: liliying@ccmu.edu.cn

Received: March 2, 2022 Accepted: July 5, 2022

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (Grant No.7202007), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82070623), and the Scientific Research Common Program of Beijing Municipal Commission of Education (Grant No.KM202010025029)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-83950468, E-mail: liliying@ccmu.edu.cn

miR-133a-3p expression was down-regulated and negatively correlated with *Cspg4*. miR-133a-3p binded to specific sites in the *Cspg4* 3' UTR (3' untranslated region) for post-transcriptional regulation. TGF $\beta$ 1-induced up-regulation of *Cspg4* and MFs activation markers were inhibited by miR-133a-3p. In conclusion, miR-133a-3p is involved in the activation of MFs by negatively regulating the expression of NG2.

**Keywords** neuron-gial antigen 2; bone marrow mesenchymal stromal cells; myofibroblasts; transforming growth factor  $\beta$ 1; miR-133a-3p

肝脏疾病是危害现代社会人类健康的重大疾病之一, 肝脏在受到各种形式的慢性损伤后, 会发生异常的组织修复反应, 由活化的肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs)分泌大量的胶原蛋白, 胶原蛋白过度沉积, 进一步导致肝纤维化, 若未得到有效治疗其可发展为肝硬化及肝癌, 危害人类健康<sup>[1]</sup>。在肝纤维化发生时, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stromal cells, BMSCs)可从骨髓迁移至损伤肝脏, 分化为MFs, 是MFs的主要来源之一<sup>[2-4]</sup>, 在肝纤维化的发生发展中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。活化的MFs可以通过自分泌或旁分泌的方式分泌多种细胞因子, 促进其自身的增殖、迁移和收缩, 并且高表达 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ SMA; 基因名: *Acta2*)和细胞外基质成分如I型胶原[procollagen  $\alpha$ 1(I), *Coll1a1*; 基因名: *Coll1a1*], 以促进纤维化及其伴随的血管新生过程<sup>[7-8]</sup>。

神经胶质抗原 2(neuron-gial antigen 2, NG2; 基因名: *Cspg4*)是一种由 *Cspg4* 基因编码的细胞膜表面I型跨膜蛋白多糖, 又称硫酸软骨素蛋白多糖 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4), 属于硫酸软骨素蛋白多糖家族(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs), 是周细胞的表面标志物之一, 与细胞存活、迁移和血管新生密切相关<sup>[9-10]</sup>。研究显示, NG2在急性淋巴白血病中参与淋巴母细胞的迁移<sup>[11]</sup>; NG2阳性的胶质母细胞瘤细胞的增殖和迁移能力远远强于NG2阴性的细胞<sup>[9]</sup>; 在肌腱中, NG2介导VI型胶原蛋白调节成纤维细胞的行为、影响肌腱基质的组装, 这提示其在组织修复中发挥关键作用<sup>[12]</sup>。然而, 肝纤维化时NG2在MFs活化中的作用及其作用机制尚不清楚。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类由内源性基因编码, 长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子, 它可以与靶mRNA的3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)特异性结合, 通过RNA降解和翻译抑制两种途径影响基因表达<sup>[13]</sup>。本实

验以MFs活化为模型, 探究NG2在此过程中发挥的作用以及是否存在相应的miRNA可以靶向 *Cspg4*。本研究有助于阐明NG2与肝纤维化之间的关系及作用机制, 为制定新的特异性抗纤维化治疗方案提供新的见解, 具有重要的理论意义和临床应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 动物 普通ICR雄性小鼠[体质量为(13 $\pm$ 2) g, 约2周龄; 体质量为(30 $\pm$ 2) g, 约6周龄], 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级, 购于首都医科大学实验动物中心。

1.1.2 细胞 原代小鼠BMSCs从小鼠骨髓中分离培养, 本实验室已建立成熟的细胞分离及培养方法, 293T细胞由首都医科大学生物化学与分子生物学系提供。

1.1.3 主要仪器 Ltd超净工作台(HPH12)购自德国Heraeus公司; 移液器和离心机均购自德国Eppendorf公司; 实时荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司; 细胞培养箱、微量核酸蛋白检测仪(NanoDrop 2000c)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 荧光显微镜购自德国Leica公司; 高通量分子相互作用分析仪购自德国Sartorius公司。

1.1.4 主要试剂  $\alpha$ -MEM培养基、 $\beta$ -巯基乙醇、M-MLV逆转录试剂盒、Lipofectamine RNAiMAX购自美国Invitrogen公司; 胎牛血清(FBS)购自德国Biochrom AG公司; 青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶、Opti-MEM培养基购自美国Gibco BRL公司; TGF $\beta$ 1购自美国PeproTech公司; miR-133a-3p mimics购自广州锐博生物技术有限公司; NG2 siRNA购自美国Thermo Fisher Scientific公司; MCDHF饲料购自美国Research Diet公司; Trizol、氯仿、异丙醇美国Sigma公司; RNeasy Mini Kit购自德国Qiagen公司; SYBR Green PCR Master Mix购自美国Applied Biosystems

公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 小鼠BMSCs的分离培养** 选用普通ICR雄性13 g小鼠(约2周龄, SPF级), 颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌条件下分离小鼠下肢骨, 剔除肌肉筋膜, 放入预热的PBS溶液中, 剪去骨髓, 以 $\alpha$ -MEM完全培养基(含有20%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗、1%谷氨酰胺、 $\beta$ -巯基乙醇)为冲洗液, 用1 mL注射器将骨髓细胞冲于细胞培养皿中, 加入抗支原体充分混匀, 放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中进行培养。第1天进行全量换液, 第2天半量换液, 之后每3天换液1次, 显微镜下观察细胞形态呈长梭形, 克隆样生长, 形成的克隆集落即为BMSCs, 待细胞汇合度达75%~80%时进行传代。传代后用含15%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM完全培养基重悬细胞, 以 $1 \times 10^6$ 个/大皿进行接种, 即为P1代, 待传至P3~P6代时细胞可用于后续实验。所有动物实验均遵循2006年国家科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》和相关伦理学规范。本实验经首都医科大学伦理委员会批准通过(批准号: AEEI-2014-131)。

**1.2.2 小鼠肝损伤模型** 选用蛋氨酸胆碱缺乏联合高脂饮食(methionine-choline-deficient and high fat, MCDHF)制备肝损伤模型。饲料成分包括: 24.1%脂肪、20.8%蛋白、42.9%碳水化合物以及6.0%纤维等。饲料脂肪供能比为45%, 无胆碱, 含微量的蛋氨酸。对照组采用正常饲料, 每只小鼠给予饲料约5 g/天。MCDHF饮食喂养后, 分别造模不同时长(3和14天), 处死小鼠进行取材, 处死前禁食6 h, 常规饮水。

**1.2.3 miRNA mimics的转染** miR-133a-3p mimics用于过表达miR-133a-3p, 阴性对照为一个与其他已知的哺乳动物基因序列不具有同源性的mimics序列, 实验所使用序列均由广州锐博生物技术有限公司合成。将已退火的mimics按说明书溶解于250  $\mu$ L无RNase的灭菌去离子水中, 浓度为20  $\mu$ mol/L。将 $3 \times 10^5$ 个BMSCs接种于直径为6 cm的细胞培养皿中, 使细胞在24 h的汇合度达到40%~50%。贴壁12 h后, 进行miR-133a-3p mimics的转染, 终浓度为40 nmol/L, 培养6~8 h, 将培养基更换为含15%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM完全培养基, 转染48 h后, 收集细胞并鉴定miR-133a-3p mimics的转染效率及相关基因表达情况。NG2 siRNA的转染方法同上。

**1.2.4 小鼠BMSCs的分化** BMSCs汇合度达80%~90%时, 用PBS洗1~2次, 更换为无血清的 $\alpha$ -MEM培养基培养12 h后, 分别加入0、1、2、5、10 ng/mL TGF $\beta$ 1培养24 h, 或加入10 ng/mL TGF $\beta$ 1培养0、3、6、12、24、48 h后, 收集细胞, 提取总RNA进行qRT-PCR实验。

**1.2.5 细胞免疫荧光** 将处理好的细胞固定, 用0.5% Triton X-100打孔, 用2%的BSA于37 °C封闭30 min后, 加入相应一抗(稀释比例为1:100), 4 °C过夜, 加入二抗(稀释比例为1:200), 室温孵育1 h, 经DAPI复染后, 在荧光显微镜下观察。

**1.2.6 qRT-PCR实验** 肝组织及处理后的细胞均以Trizol法提取总RNA, 用微量核酸蛋白检测仪测定RNA浓度。使用M-MLV逆转录试剂盒以1  $\mu$ g RNA进行逆转录, cDNA稀释后进行PCR反应(表1)。在PCR扩增过程中, 以荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环数(Ct)作为模板初始浓度的间接指标, 熔解曲线分析采用默认条件。结果以

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Sequences of primers used for qRT-PCR

基因	引物序列(5'→3')
Gene	Primer sequence (5'→3')
18S rRNA	Forward: GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT Reverse: CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG
<i>Acta2</i>	Forward: GCT TAT CTA CGT GCA AGT GAT GAT TT Reverse: GAA ACT TCT TGG CAC CTT CAA CA
<i>Colla1</i>	Forward: AGG GCG AGT GCT GTG CTT T Reverse: CCC TCG ACT CCT ACA TCT TCT GA
<i>Cspg4</i>	Forward: GGG CTG TGC TGT CTG TTG A Reverse: TGA TTC CCT TCA GGT AAG GCA

18S rRNA为内参进行校正,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

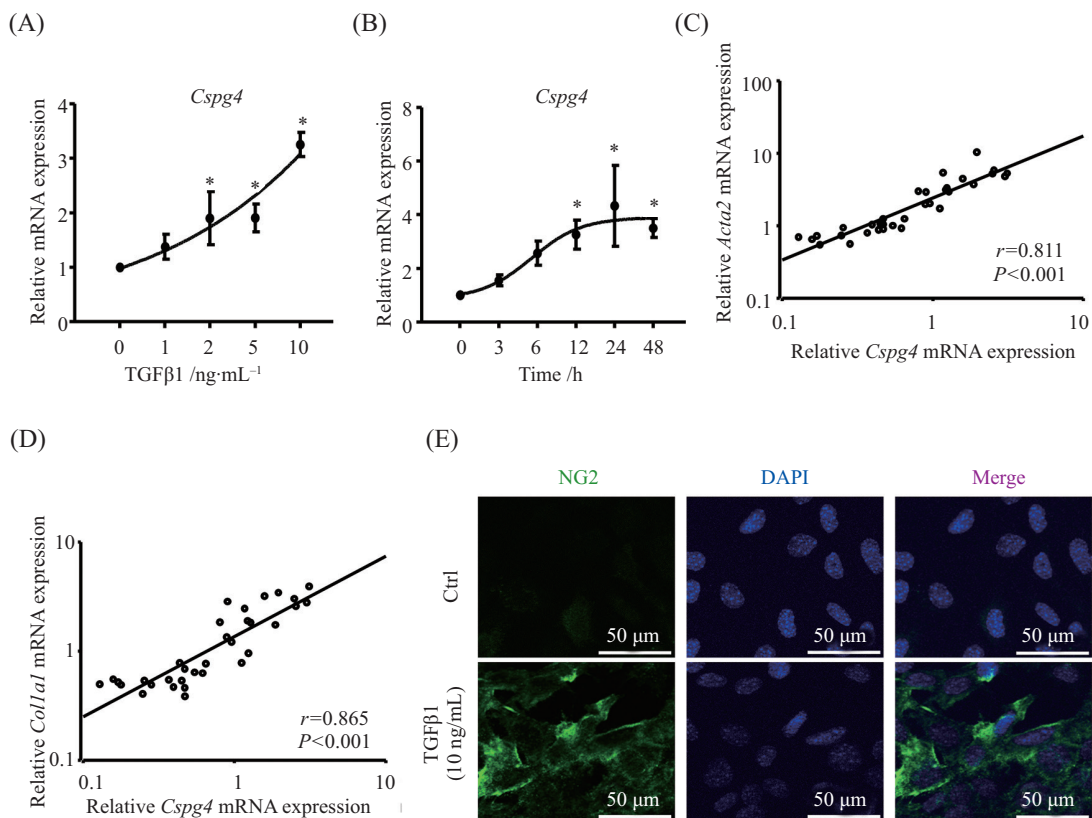
**1.2.7 双荧光素酶报告基因实验** 将纤连蛋白铺于96孔板中,以增加细胞贴壁率,以 $1.5 \times 10^4$ 个/孔的密度接种293T细胞,实验分为四组,分别为共转染NC mimics和*Cspg4*-WT、miR-133a-3p mimics和*Cspg4*-WT、NC mimics和*Cspg4*-Mut、miR-133a-3p mimics和*Cspg4*-Mut组,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒的说明书进行实验,用高通量多标记检测仪检测化学发光情况。

**1.2.8 统计学分析** 所有实验数据均以均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示,运用SPSS 25.0统计软件对实验结果进行分析,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方法进行统计学分析,分析两者之间的相关性采用双变量相关分析与线性回归分析。以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 MFs活化过程伴随NG2表达上调

分别以0、1、2、5、10 ng/mL的TGF $\beta$ 1处理BMSCs 24 h来诱导其向MFs分化,结果显示,随着TGF $\beta$ 1刺激浓度的增大,*Cspg4*的基因表达量相应增加( $P < 0.05$ )(图1A)。此外,在用10 ng/mL的TGF $\beta$ 1处理细胞0、3、6、12、24、48 h后发现,随着TGF $\beta$ 1处理时间的延长,*Cspg4*在mRNA水平的表达量上调,并且在10 ng/mL的TGF $\beta$ 1刺激24 h时,*Cspg4*的表达量达到最大值( $P < 0.05$ )(图1B)。此外,相关性分析结果发现,在MFs中*Cspg4*的mRNA表达量分别与MFs活化标记物*Acta2*和*Colla1*的mRNA表达量呈显著正相关( $P < 0.05$ )(图1C和图1D)。在蛋白水平上,细胞免疫荧光结果显示,在经TGF $\beta$ 1刺激后,NG2的表达量显著增加(图1E)。以上结果表明,在MFs活化过程中,*Cspg4*和

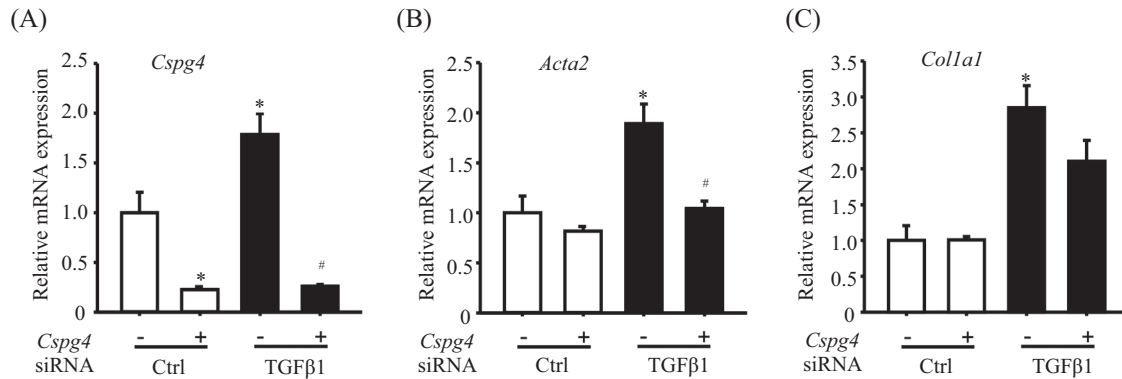


A: 用指定浓度的TGF $\beta$ 1处理细胞24 h后*Cspg4*的mRNA表达情况; B: 用10 ng/mL的TGF $\beta$ 1处理细胞不同时间后*Cspg4*的基因表达情况; C、D: *Cspg4*与MFs活化标记物*Acta2*和*Colla1*在mRNA水平上表达的相关性; E: 用TGF $\beta$ 1处理细胞后NG2(绿)的免疫荧光染色情况。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

A: *Cspg4* mRNA expression in MFs activated by indicated concentrations of TGF $\beta$ 1 for 24 h; B: *Cspg4* mRNA expression in MFs activated by 10 ng/mL TGF $\beta$ 1 for different time; C, D: the correlation between the mRNA levels of *Cspg4* and MFs activation markers *Acta2* and *Colla1*; E: immunofluorescent staining of NG2 (green) in cells treated with TGF $\beta$ 1. \* $P < 0.05$  vs control group.

图1 MFs活化过程中NG2的表达情况

Fig.1 The expression of NG2 during MFs activation



A~C: 转染*Cspg4* siRNA后,检测*Cspg4*、*Acta2*和*Colla1*的表达; \* $P < 0.05$ ,与siRNA阴性对照组相比; # $P < 0.05$ ,与TGF $\beta$ 1处理组相比。

A-C: *Cspg4*, *Acta2*, *Colla1* mRNA expression after *Cspg4* siRNA transfection; \* $P < 0.05$  vs siRNA negative control group; # $P < 0.05$  vs TGF $\beta$ 1-treated group.

图2 敲减*Cspg4*后MFs活化被抑制

Fig.2 MFs activation was inhibited after *Cspg4* siRNA transfection

NG2的表达量均上调,且与MFs活化标记物的表达量呈正相关。

## 2.2 敲减*Cspg4*后MFs活化被抑制

为了进一步确定NG2与MFs活化之间的关系,我们根据*Cspg4*的基因序列构建出特异性敲减*Cspg4*的siRNA。在转染*Cspg4* siRNA后,*Cspg4*在mRNA水平上的表达量显著降低( $P < 0.05$ ),证明*Cspg4* siRNA可以有效地敲减*Cspg4*(图2A)。检测MFs的活化指标,结果显示:在mRNA水平上,*Acta2*的表达量在敲减*Cspg4*后显著降低( $P < 0.05$ )(图2B),*Colla1*的表达量也呈下降趋势(图2C)。以上结果表明,敲减*Cspg4*抑制了MFs的活化。

## 2.3 MCDHF小鼠中miR-133a-3p与*Cspg4*表达量呈负相关

通过qRT-PCR检测小鼠MCDHF肝损伤模型肝内*Acta2*和*Colla1*的表达情况,发现它们均在造模后显著上调( $P < 0.05$ )(图3A和图3B),证明MCDHF模型构建成功。为探讨是否存在miRNA参与调控MFs活化过程中*Cspg4*的表达,运用miRanda数据库对可能调控*Cspg4*的miRNA进行预测,筛选出具有高mirSVR值的miRNA,其中小鼠源的为24个,人源的为7个,人鼠同源的为miR-133a-3p和miR-29b-5p。之后检测了MCDHF模型中*Cspg4*、miR-133a-3p和miR-29b-5p的表达情况,结果显示:随着造模时间的延长,肝内*Cspg4*的表达上调( $P < 0.05$ )(图3C),而miR-133a-3p的表达下调( $P < 0.05$ )(图3D),并且相关性分析结果表明,两者呈现出明显的负相关( $P < 0.05$ )(图3E)。miR-29b-5p的表达也有下调趋势(图3F),但下调不明

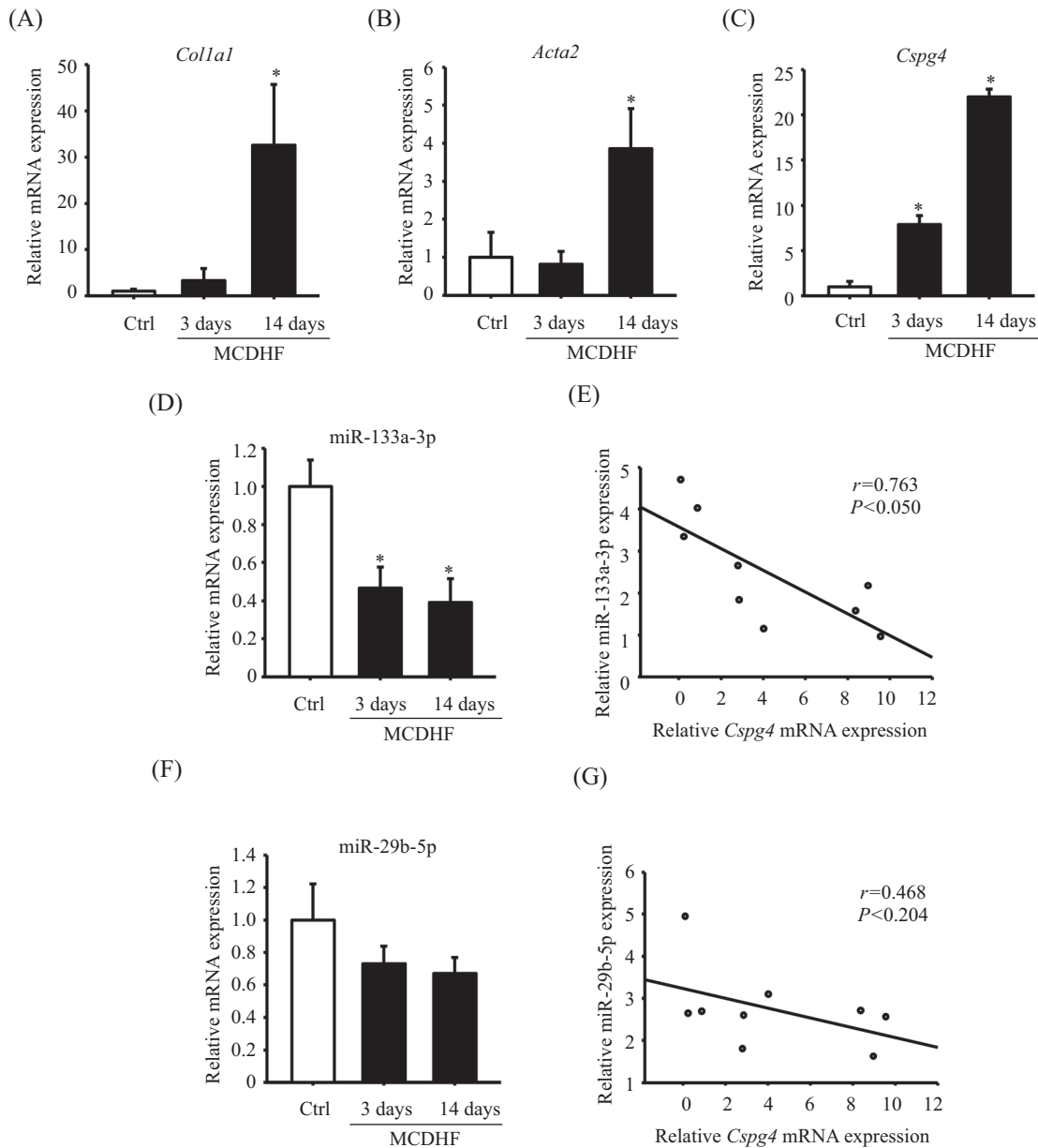
显,并且与*Cspg4*没有明显的相关性(图3G)。因此我们后续关注miR-133a-3p,研究其对*Cspg4*的调控情况。

## 2.4 miR-133a-3p与*Cspg4* 3' UTR的特定位点结合

为了进一步确定miR-133a-3p和*Cspg4*是否直接结合以及其结合位点,我们选择了评分较高的预测结合位点,根据序列结合位点,分别扩增出野生型和反义突变型的序列片段,然后将相应片段插入至双荧光素酶报告基因载体质粒中,从而构建出野生型和突变型的载体质粒。在293T细胞中共转染质粒和miRNA mimics后,化学发光结果显示,miR-133a-3p能够抑制野生型质粒的荧光素酶活性( $P < 0.05$ ),而不能抑制突变型荧光素酶的活性(图4)。这提示miR-133a-3p通过*Cspg4* 3' UTR的特定位点进行转录后调控。

## 2.5 miR-133a-3p通过靶向抑制*Cspg4*从而抑制MFs活化

在体外实验中,使细胞转染miRNA的体外模拟物miR-133a-3p mimics。结果显示,在转染miR-133a-3p mimics后,miR-133a-3p的mRNA表达上调至较高水平( $P < 0.05$ )(图5A),说明转染成功。此外,在TGF $\beta$ 1诱导组,miR-133a-3p可显著抑制MFs活化时所伴随的*Cspg4*表达水平的上调( $P < 0.05$ )(图5B),这提示miR-133a-3p可以负调控*Cspg4*的表达。同时,检测*Acta2*和*Colla1*的表达,发现两者在活化的MFs中的表达量均显著增加( $P < 0.05$ ),而在转染miR-133a-3p mimics后表达量显著降低( $P < 0.05$ )(图5C和图5D)。以上结果表明,在体外miR-133a-3p可以通过靶向抑制*Cspg4*从而抑制MFs活化。



A~C: 小鼠MCDHF造模3天和14天后检测*Colla1*、*Acta2*和*Cspg4*的mRNA表达水平; D: 小鼠MCDHF造模3天和14天后检测miR-133a-3p的RNA表达水平; E: 小鼠MCDHF模型中*Cspg4*与miR-133a-3p在RNA水平上表达的相关性; F: 小鼠MCDHF造模3天和14天后检测miR-29b-5p的表达; G: 小鼠MCDHF模型中*Cspg4*与miR-29b-5p在RNA水平上表达的相关性;  $n=9$ ,  $*P<0.05$ , 与对照组相比。

A-C: *Colla1*, *Acta2* and *Cspg4* mRNA expression in mouse MCDHF diet model for 3 and 14 days; D: miR-133a-3p expression in mouse MCDHF diet model for 3 and 14 days; E: the correlation between the RNA levels of *Cspg4* and miR-133a-3p in mouse MCDHF diet model; F: miR-29b-5p expression in mouse MCDHF diet model for 3 and 14 days; G: the correlation between the RNA levels of *Cspg4* and miR-29b-5p in mouse MCDHF diet model;  $n=9$ ,  $*P<0.05$  vs control group.

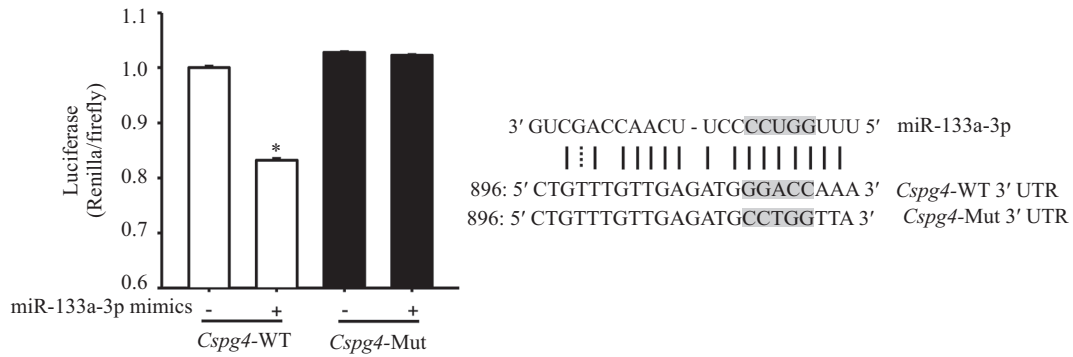
图3 MCDHF小鼠中miR-133a-3p与*Cspg4*的RNA表达量呈负相关

Fig.3 The negative correlation between the RNA levels of miR-133a-3p and *Cspg4* in MCDHF mice

### 3 讨论

在过去的几十年里,肝病已经成为世界范围内导致死亡的主要原因之一,据估计,中国有超过五分之一的人口受到某种肝病的影响<sup>[1,14]</sup>。肝纤维化是各种病因引起的慢性肝病共有的病理过程,其特点是细胞外基质的进行性积累,破坏了肝脏的生理结

构,而MFs是在此过程中起决定性作用的细胞。在短期损伤时,抗纤维化作用抵消MFs的功能,导致MFs失活或凋亡。在慢性肝病中,促纤维化和抗纤维化作用失衡导致MFs的持续激活(包括增殖、收缩和迁移能力的增强),从而导致细胞外基质的过度产生<sup>[15]</sup>。因此,抑制MFs的活化可能是抗纤维化治疗

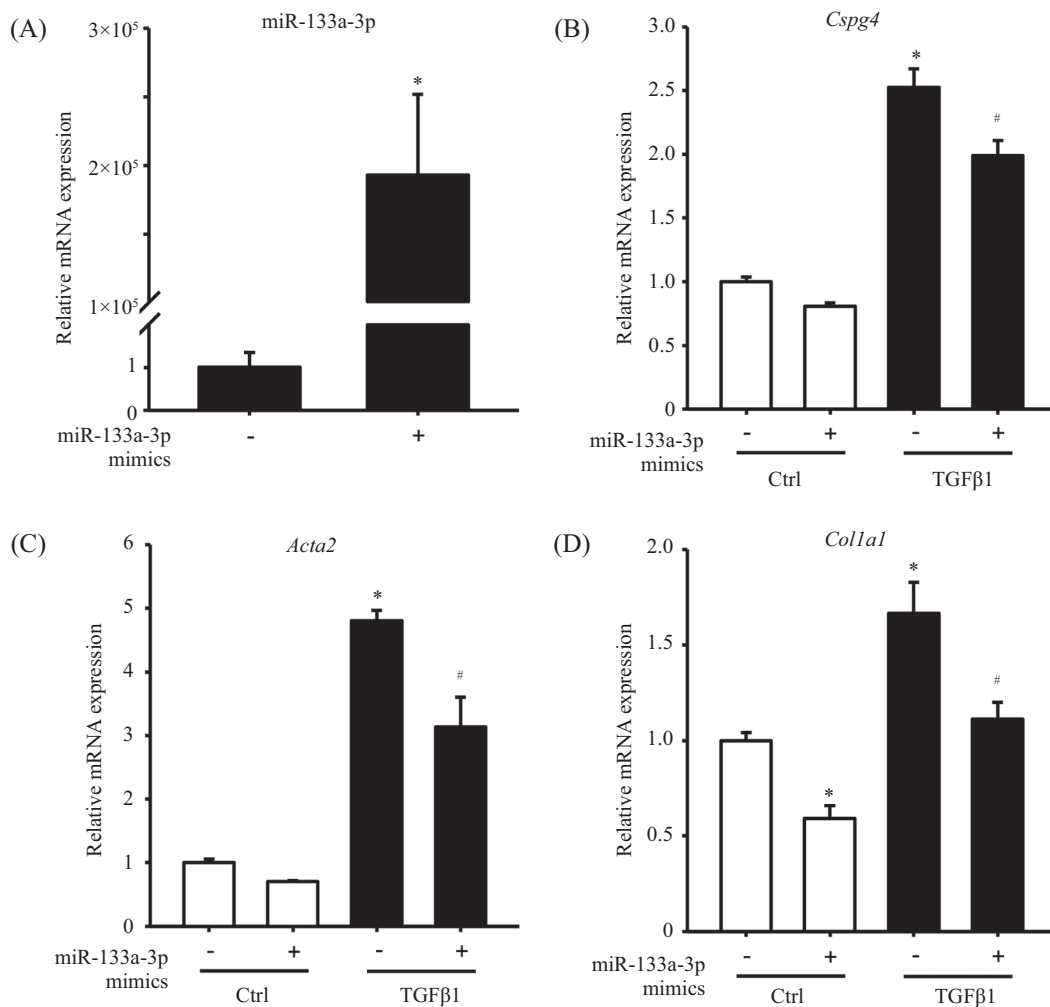


双荧光素酶报告基因检测miR-133a-3p与*Cspg4*的特定结合位点; \**P*<0.05, 与转染*Cspg4*-WT组相比。

The specific binding site of miR-133a-3p and *Cspg4* detected by dual luciferase reporter gene assay; \**P*<0.05 vs *Cspg4*-WT group.

图4 miR-133a-3p与*Cspg4* 3' UTR的特定位点结合

Fig.4 miR-133a-3p bound to specific sites of *Cspg4* 3' UTR



A: miR-133a-3p的转染效率; B-D: 转染miR-133a-3p mimics后, *Cspg4*、*Acta2*、*Coll1a1*的基因表达。\**P*<0.05, 与对照组相比; #*P*<0.05, 与TGFβ1处理组相比。

A: the transfection efficiency of miR-133a-3p; B-D: *Cspg4*, *Acta2* and *Coll1a1* mRNA expression after miR-133a-3p mimics transfection. \**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs TGFβ1-treated group.

图5 miR-133a-3p通过靶向抑制*Cspg4*从而抑制MFs活化

Fig.5 miR-133a-3p inhibited MFs activation by targeting *Cspg4*

的有效方法。

NG2常作为细胞表面标志物用于鉴定某些类型的细胞<sup>[16-17]</sup>,如中枢神经系统中的少突胶质细胞前体细胞,以及血管周围周细胞和间充质干细胞等。研究表明,NG2在健康组织和病理组织中广泛分布,也被认为是一种普遍存在于未成熟和/或“激活”(与静止状态相反)类型细胞的表面标志物,在损伤组织和高度侵袭性的癌细胞中均大量表达,与组织损伤修复以及肿瘤细胞的转移和侵袭密切相关<sup>[17-18]</sup>。这与本研究的结果一致,在MFs活化的体外模型中,*Cspg4*的表达也呈现出了时间和剂量依赖性的上升趋势,提示NG2在MFs的活化中发挥着重要作用。此外,NG2与血管新生相关。在发育的血管中,表达NG2的周细胞可以先于或者引导内皮细胞来组织血管壁的生长,可能介导内皮细胞的募集<sup>[19-20]</sup>;在肿瘤血管生成过程中,内皮细胞和周细胞之间发生的变化也被广泛关注,*Cspg4*的异常表达被认为是血管生成和肿瘤转移的重要因素<sup>[21]</sup>。在肝纤维化中伴随着血管新生,NG2的表达升高是否与血管新生相关,其中的机制又是什么,值得我们进一步探索。

近年来,miRNA被大家广泛关注,在肝脏中的研究显示其参与调节组织稳态和疾病发生等<sup>[13]</sup>。在MFs活化后,可明确观察到NG2的表达变化,因此我们进一步研究了是否存在可以靶向*Cspg4*的miRNA,通过生物信息学分析在数据库中获得了人鼠同源且评分较高的miR-133a-3p,并且通过实验证明其可以抑制TGFβ1所诱导的*Cspg4*表达量的增加,但不直接靶向MFs的活化标记物*Acta2*和*Colla1*。在先前的研究中,miR-133a-3p在多种病理生理反应中发挥着作用:miR-133a-3p过表达抑制肝癌细胞生长和侵袭,并促进细胞凋亡,在肝细胞癌中发挥抑癌作用<sup>[22]</sup>;miR-133a-3p的上调可以提高间充质干细胞来源的外泌体在急性心肌梗死中的治疗效果,促进血管生成、抑制细胞凋亡、减少心肌纤维化从而保护心脏功能<sup>[23]</sup>。在本实验MFs活化的体外模型中miR-133a-3p可以靶向*Cspg4*,从而抑制MFs的活化,使纤维化相关基因表达量降低。那么在整体水平上,miR-133a-3p是否可以通过靶向*Cspg4*抑制MFs的活化,从而减少细胞外基质的分泌,以此减轻肝纤维化呢?这是我们下一步需要探索的科学问题。

综上所述,本研究确定了NG2在体外MFs活化模型中的关键作用,并探讨了miR-133a-3p对靶基因*Cspg4*的负调控作用,以及其潜在的作用机制。本研究结果为治疗肝纤维化提供了新的思路,具有重要的理论意义和临床价值。

## 参考文献 (References)

- [1] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: analysis from a Chinese perspective [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(1): 212-21.
- [2] HALDAR D, HENDERSON N C, HIRSCHFIELD G, et al. Mesenchymal stromal cells and liver fibrosis: a complicated relationship [J]. *FASEB J*, 2016, 30(12): 3905-28.
- [3] YANG L, YUE S, YANG L, et al. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in liver fibrosis-associated angiogenesis [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 114-23.
- [4] ZHANG Z, WANG F S. Stem cell therapies for liver failure and cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 183-5.
- [5] RUSSO F P, ALISON M R, BIGGER B W, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(6): 1807-21.
- [6] LI C, KONG Y, WANG H, et al. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(6): 1174-83.
- [7] WANG L, YANG L, TIAN L, et al. Cannabinoid receptor 1 mediates homing of bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggered by chronic liver injury [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(1): 110-21.
- [8] YANG L, DONG C, YANG J, et al. MicroRNA-26b-5p inhibits mouse liver fibrogenesis and angiogenesis by targeting PDGF receptor-beta [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 206-17.
- [9] FINOCCHIARO G, PELLEGATTA S. NG2/CSPG4 in glioblastoma: about flexibility [J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(6): 697-8.
- [10] YOU W K, YOTSUMOTO F, SAKIMURA K, et al. NG2 proteoglycan promotes tumor vascularization via integrin-dependent effects on pericyte function [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(1): 61-76.
- [11] LOPEZ-MILLAN B, SANCHEZ-MARTINEZ D, ROCA-HO H, et al. NG2 antigen is a therapeutic target for MLL-rearranged B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2019, 33(7): 1557-69.
- [12] SARDONE F, SANTI S, TAGLIAVINI F, et al. Collagen VI-NG2 axis in human tendon fibroblasts under conditions mimicking injury response [J]. *Matrix Biol*, 2016, 55: 90-105.
- [13] WANG X, HE Y, MACKOWIAK B, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases [J]. *Gut*, 2021, 70(4): 784-95.
- [14] 金玉, 武晓旭, 李秋娟, 等. 非酒精性脂肪性肝病流行现状调查 [J]. *人民军医*(JIN Y, WU X X, LI Q J, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *People's Military Surgeon*), 2021, 64(5): 425-8.
- [15] ROEHLN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*,



- 2020, 9(4): 875.
- [16] AMPOFO E, SCHMITT B M, MENGER M D, et al. The regulatory mechanisms of NG2/CSPG4 expression [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2017, 22: 4.
- [17] STALLCUP W B. The NG2 proteoglycan in pericyte biology [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1109: 5-19.
- [18] AL-MAYHANI M T, GRENFELL R, NARITA M, et al. NG2 expression in glioblastoma identifies an actively proliferating population with an aggressive molecular signature [J]. *Neuro Oncol*, 2011, 13(8): 830-45.
- [19] STALLCUP U O W B. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation [J]. *Angiogenesis*, 2003, 6(3): 241-9.
- [20] VIRGINTINO D, GIROLAMO F, ERREDE M, et al. An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2007, 10(1): 35-45.
- [21] SILVER D J, SIEBZEHRUBL F A, SCHILDTS M J, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(39): 15603-17.
- [22] HAN S, DING X, WANG S, et al. miR-133a-3p regulates hepatocellular carcinoma progression through targeting CORO1C [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 8685-93.
- [23] ZHU W, SUN L, ZHAO P, et al. Macrophage migration inhibitory factor facilitates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells derived exosomes in acute myocardial infarction through upregulating miR-133a-3p [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 61.