

杨仁国,贺微微,罗婷婷. miR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 66-72.

Yang RG, He WW, Luo TT. miR-29b-3p regulates lipid metabolism and fibrosis by targeting IGF-1 in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 66-72.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.010

## miR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化

杨仁国,贺微微,罗婷婷\*

(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 在非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 模型中的表达情况,并确定 miR-29b-3p 在脂质沉积和肝细胞纤维化中的潜在功能。方法 使用棕榈酸 (PA) 构建 L02 细胞 NAFLD 模型。通过 RT-qPCR 或 Western blot 测定细胞中 miR-29b-3p 和胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 的表达水平。将 miR-29b-3p 模拟物/抑制剂或 IGF-1 siRNA 转染到 NAFLD 细胞模型中,通过油红 O 染色,甘油三酯和总胆固醇测定法测定脂质积累。使用双重荧光素酶实验确定 miR-29b-3p 和 IGF-1 之间的靶向关系。结果 miR-29b-3p 在 NAFLD 体外细胞模型中上调,而 IGF-1 则在下降;miR-29b-3p 显著抑制了 L02 细胞模型中的脂质蓄积和纤维化程度;沉默 IGF-1 增强了 miR-29b-3p 过表达并对 L02 细胞模型的脂质积累和纤维化产生影响。结论 miR-29b-3p 通过靶向 IGF-1 对肝细胞 L02 细胞模型中脂质蓄积和纤维化产生负调控作用,表明 miR-29b-3p 可能是 NAFLD 的治疗靶标。

**【关键词】** 非酒精性脂肪肝病;miR-29b-3p;胰岛素样生长因子-1;脂肪堆积;纤维化;L02 细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0066-07

## miR-29b-3p regulates lipid metabolism and fibrosis by targeting IGF-1 in non-alcoholic fatty liver disease

YANG Renguo, HE Weiwei, LUO Tingting\*

(Department of Infections, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Province People's Hospital, Chengdu 610072, China)

**【Abstract】 Objective** Circulating miR-29b has been reported to be positively correlated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, the role of miR-29b-3p in NAFLD progression is unclear. The purpose of this study was to evaluate the expression of miR-29b-3p in NAFLD models and to identify the potential functions of miR-29b-3p in lipid accumulation and fibrosis in hepatocytes. **Methods** Palmitic acid (PA)-treated L02 cells were used as an *in vitro* cellular model of NAFLD. miR-29b-3p and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression levels were determined by RT-qPCR or Western blot. miR-29b-3p mimic/inhibitor or IGF-1 siRNA were transfected into L02 cells exposed to PA. Lipid accumulation was determined by oil red O staining, and triglyceride and total cholesterol assays. Direct interaction between miR-29b-3p and IGF-1 was determined by dual-luciferase reporter assay. **Results** The result revealed that miR-29b-3p was upregulated in our *in vitro* cellular model of NAFLD while IGF-1 concentrations decreased. miR-29b-3p inhibition

**【基金项目】**四川省科技厅科普作品创作项目(2019JDKP0058)。

**【作者简介】**杨仁国(1980—),男,主治医师,硕士,研究方向:肝病。E-mail:yshfujs@163.com

**【通信作者】**罗婷婷(1983—),女,博士,主治医师,研究方向:肝病。E-mail:flyrain\_ing@163.com

significantly suppressed lipid accumulation and fibrosis in PA-treated L02 cells. miR-29b-3p targets IGF-1 and suppresses its expression *in vitro*. Interestingly, the effects of miR-29b-3p overexpression on lipid accumulation and fibrosis in PA-treated L02 cells was enhanced by IGF-1 silencing. **Conclusions** Our result suggested that miR-29b-3p has a negative regulatory effect on lipid accumulation and fibrosis in hepatocytes by targeting IGF-1. This study provides evidence that miR-29b-3p might be a promising therapeutic target for NAFLD.

**【Keywords】** NAFLD; miR-29b-3p; IGF-1; lipid accumulation; fibrosis; L02 cells

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是一个包含非酒精性脂肪肝 (NAFL), 非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 及肝硬化等病变的病理综合征, 是最常见的临床肝病, 病理学改变与酒精性肝病相似<sup>[1-3]</sup>。其中肥胖, 2 型糖尿病, 高胰岛素血症和血脂异常等代谢综合征被认为是 NAFLD 发生的主要因素<sup>[4-5]</sup>。啮齿动物中的 NAFLD 通常是由高脂饮食 (HFD) 引起的, 会刺激肝脏中脂肪的过度积累并增强巨噬细胞的活化, 从而加剧胰岛素抵抗, 肝炎症和纤维化<sup>[6]</sup>。尽管基于 NAFLD 发病机理的“两次打击”理论已被广泛接受, 但 NAFLD 发展中涉及的机制仍在争论中。

miRNA 是一类小非编码 RNA, 长度为 19~24 个核苷酸, 主要通过多种核苷酸的 3'-非翻译区 (3'-UTR) 结合, 在转录后水平上负面调节基因表达, 从而发挥其生物学作用。肝中 miR-29b 的表达已为人所知, 但其功能尚不清楚。Sendi 等<sup>[7]</sup>报道 miR-29b 和 CLDN 是慢性丙型肝炎中肝纤维化晚期和 HCV-RNA 的新预测因子。Zhang 等<sup>[8]</sup>证明 miR-29b 可以抑制肝星状细胞中胶原的成熟, 最近研究显示血清 miR-29b 与 NAFLD 之间存在正相关<sup>[9]</sup>。而 IGF-1 是一种重要的合成代谢生长因子, 在生长过程中参与组织发育, 成熟组织和细胞的适应和再生<sup>[10]</sup>, 血清 IGF-1 水平低与 NAFLD 的组织学严重程度升高相关<sup>[11]</sup>。尽管研究表明 miR-29b 可以通过靶向 IGF-1 抑制结肠癌细胞的生长并调节成骨细胞分化<sup>[12]</sup>, 但尚不清楚 miR-29b 是否可以靶向 IGF-1 来调节 NAFLD 中的脂质蓄积和肝纤维化。因此, 本研究旨在探讨 miR-29b 在 NAFLD 中对 IGF-1 的作用和潜在的调控机制, 为临床治疗作基础研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验细胞

L02 细胞系购于中国武汉普诺赛生命科技公司。

### 1.2 主要试剂与仪器

RIPA-1640 培养基 (含双抗)、胎牛血清、减血清

培养基均购于 Gibco 公司; 牛血清白蛋白、购于 Sigma 公司; 油红 O 染色剂购于北京索莱宝公司; 甘油三酯 (TG) 与总胆固醇 (TC) 试剂盒购于南京建成公司; miR-29b-3p 模拟物、抑制剂与阴性对照模拟物均购于广州日博生物有限公司; IGF-1 siRNA 与阴性对照 siRNA 由上海基因制药科技有限公司合成; RNA 提取试剂盒购于赛默飞世尔公司; RNA 逆转录试剂盒购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司; psiCHECK-2 荧光素酶载体、双荧光素报告试剂盒购于普洛麦格 (北京) 公司; IGF-1、Collagen I、Collagen III、 $\alpha$ -SMA 和  $\beta$ -actin 均购于 abcam 公司; 所有引物及序列由上海生工股份有限公司提供; RT-qPCR 系统; 酶标仪 (Thermo 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 全能成像仪 (Bio-Rad 公司); 蛋白质电泳仪 (Bio-Rad 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 NAFLD 细胞模型的构建

将 L02 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (含 1% 的青霉素与链霉素) 中, 在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中连续培养, 中途更换培养液进行传代备用。使用含有 1% 无脂肪酸的牛血清白蛋白的培养基制备 0.3 mmol/L 棕榈酸溶液, 将培养至生长对数期后的 L02 细胞重新培养至 6 孔板, 生长贴壁后用 0.3 mmol/L PA 溶液在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h, 供后续实验使用。

#### 1.3.2 细胞转染

将培养好的细胞进行分组: 空白组、模型组 (50 pmol/mL 阴性对照 si-RNA)、阴性对照组 (50 pmol/mL 阴性对照模拟物)、抑制组 (50 pmol/mL miR-29b-3p 抑制剂)、过表达组 (50 pmol/mL miR-29b-3p 模拟物) 和 IGF-1 沉默组 (50 pmol/mL miR-29b-3p 模拟物+40 pmol/mL IGF-1 siRNA), 除空白组外, 各组按说明书进行转染 24~48 h 后进行后续实验。

#### 1.3.3 载体构建及双荧光素酶检测实验

使用 Targetscan Human 7.2 数据库 (<http://www.targetscan.org>) 进行生物信息学预测, 发现 IGF-1 是 miR-29b-3p 的直接靶点, 然后使用双荧光

素酶报告进行验证:通过 PCR 扩增包含 miR-29b-3p 结合位点的野生型 (WT) 或突变型 (Mut) 片段的 IGF-1 3' 非翻译区,然后将其克隆到 psiCHECK-2 荧光素酶载体中以形成报告子载体,分别命名为 IGF-1 wt 和 IGF-1 Mut。将 L02 细胞接种到 24 孔板 ( $5 \times 10^4$  细胞/孔<sup>-1</sup>) 培养 24 h 后,用 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 IGF1 3'UTR 载体 (WT 和 Mut)、100 ng/mL 的 pRL-TK 荧光素酶质粒以及 50 pmol/mL 的 miR-29b-3p 模拟物、抑制剂和 NC 模拟物、抑制剂共同转染。转染后 48 h,使用双荧光素报告试剂盒测量荧光素酶活性。

### 1.3.4 脂质沉积指标测定

各组细胞用 PBS 清洗后加入无水乙醇 500  $\mu\text{L}$ , 细胞刮收集细胞后 3000 r/min 离心收集上清液,按试剂盒说明书测定 TG 与 TC 的含量。

### 1.3.5 油红 O 染色

各组细胞培养 24 h 后用 4% 多聚甲醛固定 1 h, 0.2% 的油红 O 异丙醇染液染色 20 min, 清洗后烘干,在倒置显微镜下观察,拍照。

### 1.3.6 RT-qPCR

各组按照 RNA 提取与逆转录试剂盒说明书进行操作,使用 RT-qPCR 法检测 miR-29b-3p 基因的表达,使用软件分析检测样本的 CT 值,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

值反映相对表达水平。

### 1.3.7 Western blot

使用 Western blot 法测定细胞中检测 IGF-1、纤维化标志蛋白  $\alpha\text{-SMA}$ 、Collagen I 和 Collagen III 的蛋白表达量。

## 1.4 统计学方法

数据用平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。使用 SPSS 25.0 用于数据分析,进行方差齐性检测,统计方法为单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PA 对 L02 细胞中 miR-29b-3p 与 IGF-1 的影响

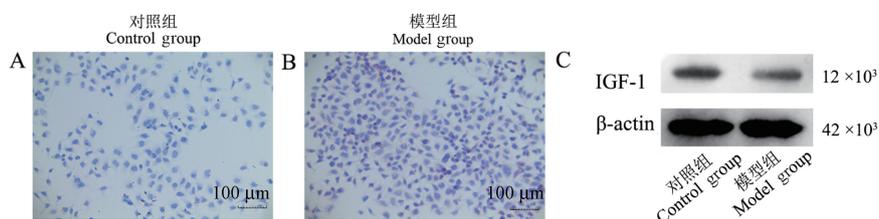
检测发现,与对照组相比,模型组的 TG 和 TC 含量显著增加 ( $P < 0.05$ ) (表 1);同时,油红 O 染色显示 L02 细胞在 PA 未做处理的 L02 细胞中未出现脂质滴 (图 1A),处理后显示出明显的脂质滴 (图 1B),综合两项结果说明 NAFLD 细胞模型构建成功。RT-qPCR 与 Western blot 检测结果显示,与对照组相比,PA 处理后,L02 细胞中 miR-29b-3p 显著增加,而 IGF-1 表达降低 ( $P < 0.05$ ) (表 1 和图 1C)。

表 1 PA 对 L02 细胞中 miR-29b-3p 与 IGF-1 的影响 ( $n = 3$ )  
Table 1 Effect of PA on miR-29b-3p and IGF-1 in L02 cells

组别 Groups	TG (mmol/L)	TC ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	miR-29b-3p ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ )	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein
对照组 Control group	0.227 $\pm$ 0.015	0.160 $\pm$ 0.026	1.007 $\pm$ 0.129	1.034 $\pm$ 0.132
模型组 Model group	0.837 $\pm$ 0.042**	0.743 $\pm$ 0.071**	1.823 $\pm$ 0.114**	0.789 $\pm$ 0.056**

注:与对照组相比,\*\* $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ .



注:A、B:油红染色图;C:蛋白质印迹图。

图 1 NAFLD 细胞模型中油红染色与 WB 结果图

Note. A/B, Oil red staining diagrams. C, Western blot.

Figure 1 Oil red staining and Western blot results in NAFLD cell model

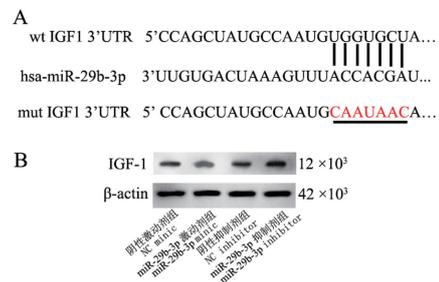
### 2.2 IGF-1 是 miR-29b-3p 的直接作用靶点

双重荧光素酶报告基因检测发现, miR-29b-3p 的过表达明显降低了野生型 IGF-1 3'-UTR 荧光素酶的活性 ( $P < 0.05$ ), 而 miR-29b-3p 的抑制作用显著提高了野生型 IGF-1 3'-UTR 的荧光素酶的活性 ( $P < 0.05$ ), 而突变型 IGF-1 3'-UTR 荧光素酶的活性在用 miR-29b-3p 模拟物或抑制剂转染后没有明显变化 ( $P > 0.05$ ); 同时, 在用 miR-29b-3p 激动剂转染后, IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达显著性降低, 而 miR-29b-3p 抑制剂转染后 IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达显著性升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 2。

### 2.3 抑制 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型的影响

进一步设计功能丧失实验以验证 miR-29b-3p 在脂质代谢和肝细胞纤维化中的作用。与模型组相比, 抑制 miR-29b-3p 后, 经 PA 诱导处理的 L02 细胞中 TG 和 TC 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 油红 O 染色结果表明, 抑制 miR-29b-3p 后再经过 PA 处理可以减少 L02 细胞中脂质滴的数量。此外, 我们发现抑制 miR-29b-3p 可以显著性降低 PA 处理后 L02 细

胞中 IGF-1 与纤维化标记物 (包括  $\alpha$ -SMA, I 型胶原和 III 型胶原) 的蛋白质表达水平 ( $P < 0.05$ ), 见表 3、图 3。



注: A: 预测的 miR-29b-3p 在 IGF-1 上的结合位点; B: 各组 IGF-1 的蛋白质印迹图。

图 2 双重荧光素酶报告与 IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达结果图

Note. A, Predicted miR-29b-3p binding site on IGF-1. B, IGF-1 of each group Western blot.

Figure 2 Dual luciferase report and IGF-1 protein and mRNA expression results

表 2 双重荧光素酶报告与 IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达结果 ( $n = 3$ )  
Table 2 Dual luciferase report and IGF-1 protein and mRNA expression results

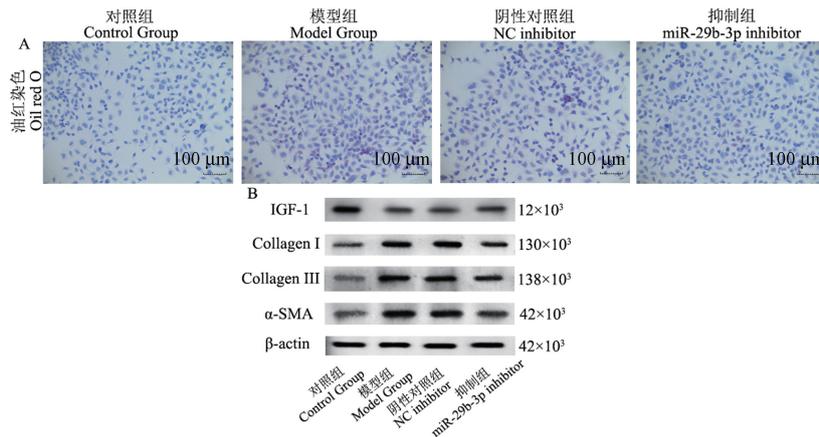
组别 Groups	荧光素酶活性 Luciferase activity		IGF-1 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein
	野生型 WT	突变型 Mut		
阴性激动剂组 NC mimic group	1.00±0.02	1.00±0.07	1.00±0.09	1.00±0.00
miR-29b-3p 激动剂组 MiR-29b-3p mimic group	0.67±0.04**	1.00±0.08	0.52±0.05**	0.77±0.08**
阴性抑制剂组 NC inhibitor group	1.11±0.05	1.00±0.08	0.91±0.16	0.98±0.18
miR-29b-3p 抑制剂组 MiR-29b-3p inhibitor group	1.30±0.06**	1.00±0.04	1.26±0.05**	1.51±0.33*

注: 与阴性激动剂组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with the negative agonist group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

表 3 抑制 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型的影响结果 ( $n = 3$ )  
Table 3 Effect of miR-29b-3p inhibition on NAFLD cell model

组别 Groups	TG (mmol/L)	TC ( $\mu$ mol/L)	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein	$\alpha$ -SMA	Collagen I	Collagen III
对照组 Control group	0.24±0.03	0.16±0.02	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组 Model group	0.85±0.08**	0.78±0.12**	0.54±0.05**	2.03±0.23**	1.79±0.06**	2.73±0.31**
阴性对照组 NC inhibitor group	0.81±0.07**	0.81±0.04**	0.53±0.02**	2.05±0.22**	1.81±0.31**	2.66±0.24**
抑制组 MiR-29b-3p inhibitor group	0.47±0.09***	0.53±0.04***	0.69±0.08#	1.38±0.25#	1.17±0.24#	1.49±0.21##

注: 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .



注:A:油红染色结果;B:蛋白质印迹结果。

图3 抑制 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型的影响

Note. A, Oil red staining result. B, Western blot.

Figure 3 Effect of miR-29b-3p inhibition on the NAFLD cell model

## 2.4 过表达 miR-29b-3p 与沉默 IGF-1 对 NAFLD 细胞模型的影响

功能修复实验显示,与模型组相比,过表达组与沉默组的 TG 和 TC 含量显著性增加以及脂质积累增加( $P < 0.05$ )。Western 印迹结果显示,沉默组中纤维化标记物(包括  $\alpha$ -SMA, I 型胶原和 III 型胶原)的蛋白表达水平增加,IGF-1 蛋白的表达降低( $P < 0.05$ ),见表 4、图 4,说明沉默 IGF-1 的表达可增加 miR-29b-3p 的效果,促进 NAFLD 的形成。

## 3 讨论

NAFLD 是一种慢性进行性肝病,属于单纯性肝脂肪变性,是一种可能发展为严重肝硬化的疾病<sup>[13]</sup>。因此,了解 NAFLD 的发病机理并开发有效的治疗方法就变得越来越重要。miRNA 在各种生理和病理学过程中起重要作用,包括细胞增殖、分化、代谢和先天免疫<sup>[14]</sup>。目前研究已从高脂饮食或遗传因素诱导的肥胖鼠类和重度 NAFLD 患者的肝中发现了 miRNA 失调,这提示 miRNA 在饮食调节引起的肝功能障碍发展中的潜在作用<sup>[15]</sup>。最近的研究表明,各种 miRNA 被确定为脂类代谢、胰腺细胞发育、脂肪因子表达和脂肪形成中的重要调控因子<sup>[16]</sup>。此外,miRNA 被认为是包括 NAFLD 在内的人类肝疾病的潜在治疗靶标和生物标记物<sup>[17]</sup>。因此在本研究中,我们着眼于 miR-29b-3p 的异常表达,并通过靶向 IGF-1 研究了 miR-29b-3p 对 NAFLD 体外脂质代谢和纤维化的调节。

越来越多的研究强调了 miRNA 在肝功能和疾

病中基因调控的作用。许多关于 NAFLD 的肝脏病理学,包括肝炎症反应、结构损伤和脂质沉积,均由一种或多种 miRNA 调节<sup>[18]</sup>。例如,miR-192-5p 可以通过直接 NAFLD 中 SCD-1 的蛋白表达来抑制脂质合成<sup>[19]</sup>。He 等<sup>[20]</sup>报告说,miR-26a 通过 NAFLD 中 miR-26a/IL-6/I/L7 信号通路发挥免疫调节作用。miR-29 家族包括三个同源基因,即 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c,它们由两个基因簇编码<sup>[21]</sup>。Peng 等<sup>[22]</sup>报道,miR-29 在 SCAP/SREBP-1 信号传导中介导新的负反馈回路,以控制脂质代谢。最近的研究表明,miR-29b 与 NAFLD 呈正相关关系<sup>[9]</sup>。但是,没有证据显示 miR-29b-3p 在调控 NAFLD 细胞模型的脂质蓄积和纤维化作用。PA 是高脂食物中最常见的游离脂肪酸之一,也是体循环中第二丰富的游离脂肪酸<sup>[23]</sup>。在本研究中,模型组细胞 TG 和 TC 的含量显著增加与油红 O 染色中出现明显的脂质滴证明我们通过 PA 成功构建了 NAFLD 体外细胞模型。同时,miR-29b-3p 在 NAFLD 体外细胞模型中高度表达,而 IGF-1 表达显著降低( $P < 0.05$ ),这些数据表明 miR-29b-3p 和 IGF-1 在 NAFLD 过程中起关键作用。

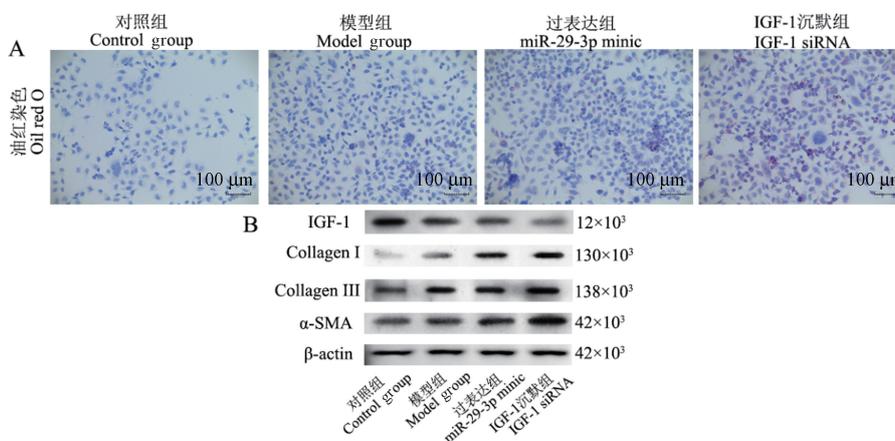
众所周知,miRNA 通过直接调控靶基因来产生细胞生物学行为。目前已经鉴定出许多 miR-29b-3p 的靶基因,其中就包括 IGF-1<sup>[12]</sup>。在本研究中,为了进一步研究 miR-29b-3p 调控 NAFLD 细胞模型中脂质蓄积和纤维化的分子机制,使用生物信息学数据库预测 miR-29b-3p 的潜在靶标。其结果揭示了 IGF-1 是 L02 细胞中 miR-29b-3p 的直接靶标,双

**表 4** 过表达 miR-29b-3p 与沉默 IGF-1 对 NAFLD 细胞模型的影响 ( $n=3$ )  
**Table 4** Effects of overexpression of miR-29b-3p and silent IGF-1 on NAFLD cell model

组别 Groups	TG (mmol/L)	TC ( $\mu$ mol/L)	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein	$\alpha$ -SMA	Collagen I	Collagen III
对照组 Control group	0.27 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	0.87 $\pm$ 0.09**	0.81 $\pm$ 0.16**	0.69 $\pm$ 0.07**	1.18 $\pm$ 0.03*	1.55 $\pm$ 0.24*	1.19 $\pm$ 0.04*
过表达组 MiR-29b-3p mimic group	1.19 $\pm$ 0.12**##	1.03 $\pm$ 0.05**#	0.53 $\pm$ 0.05**#	1.36 $\pm$ 0.02**#	2.34 $\pm$ 0.16**##	1.40 $\pm$ 0.10**#
IGF-1 沉默组 IGF-1 siRNA	1.40 $\pm$ 0.07**##	1.32 $\pm$ 0.15**##	0.41 $\pm$ 0.07**##	1.96 $\pm$ 0.12**##	2.86 $\pm$ 0.13**##	1.72 $\pm$ 0.15**##

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . Compared with the model group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ .



注:A:油红染色结果;B:蛋白质印迹结果。

**图 4** 过表达 miR-29b-3p 与沉默 IGF-1 对 NAFLD 细胞模型的影响

Note. A, Result of oil red staining. B, Western blot.

**Figure 4** The effect of overexpression of miR-29b-3p and silenced IGF-1 on NAFLD cell model

重荧光素酶报告基因检测、RT-qPCR 和 Western blot 的结果也证明 miR-29b-3p 靶向 IGF-1 并在体外抑制 IGF-1 表达。

为了更深入地探讨 miR-29b-3p 与 IGF-1 的调节关系,我们设计了功能丧失实验,进一步探讨了 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型中 IGF-1 表达的调节作用。结果表明,抑制 miR-29b-3p 表达可减少 NAFLD 体外细胞模型中 TG 和 TC 的生成,并减少脂滴的数量和纤维化标记物的蛋白表达水平,表明 miR-29b-3p 可能在 NAFLD 脂质积累和肝细胞纤维化中起着负调节剂的作用。同时 PA 处理后,IGF-1 的表达显著下降,并且被 miR-29b-3p 抑制,提示抑制 miR-29b-3p 可以减少 NAFLD 细胞模型的脂质蓄积和肝细胞纤维化,其机制与 miR-29b-3p 调节 IGF-1 蛋白表达有关。

为了确定 IGF-1 是否参与 miR-29b-3p 调节的肝细胞脂质积累和纤维化,我们设计功能修复实

验。如预期的那样,在 IGF-1 被 siRNA 沉默后,miR-29b-3p 模拟物在 NAFLD 细胞模型中诱导 TG 和 TC 生成以及脂质积累增加,同时过表达的 miR-29b-3p 诱导 L02 细胞大量聚集包括  $\alpha$ -SMA、I 型胶原和 III 型胶原等纤维化标记物,并进一步降低 IGF-1 蛋白的表达水平。综上所述,沉默 IGF-1 增强了 miR-29b-3p 对脂质积累和纤维化标记蛋白表达水平的促进作用,说明 miR-29b-3p 通过直接靶向 IGF-1 改进了肝细胞的脂质蓄积和纤维化,发挥促 NAFLD 的功能。

总而言之,本研究证明了在 NAFLD 体外模型中 miR-29b-3p 表达升高,而 IGF-1 表达则在下降。我们的研究进一步证明,抑制 miR-29b-3p 可靶向抑制 NAFLD 中的 IGF-1 减少肝细胞脂质蓄积和纤维化。我们的数据丰富了 miRNA 在 NAFLD 发育中的生物学功能。同时,我们的研究表明抑制 miR-29b-3p 可能是 NAFLD 治疗的有前途的策略。

## 参考文献:

- [ 1 ] Ray K. NAFLD-the next global epidemic [ J ]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(11): 621.
- [ 2 ] Williams T. Metabolic syndrome; nonalcoholic fatty liver disease [ J ]. FP Essent, 2015, 435: 24-29.
- [ 3 ] 范建高. 中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版) [ J ]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2012, 4(7): 4-10.
- [ 4 ] Agrawal S, Duseja A. Nonalcoholic fatty liver disease--the clinician's perspective [ J ]. Trop Gastroenterol, 2014, 35(4): 212-221.
- [ 5 ] Wong VW, Wong GL, Choi PC, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease; a prospective study with paired liver biopsies at 3 years [ J ]. Gut, 2010, 59(7): 969-974.
- [ 6 ] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis [ J ]. Hepatology, 2006, 43(2): S99-S112.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] Zhang Y, Ghazwani M, Li J, et al. miR-29b inhibits collagen maturation in hepatic stellate cells through down-regulating the expression of HSP47 and lysyl oxidase [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(4): 940-944.
- [ 9 ] He Z, Yang JJ, Zhang R, et al. Circulating miR-29b positively correlates with non-alcoholic fatty liver disease in a Chinese population [ J ]. J Dig Dis, 2019, 20(4): 189-195.
- [ 10 ] Timmer LT, Hoogaars WMH, Jaspers RT. The role of IGF-1 signaling in skeletal muscle atrophy [ J ]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1088: 109-137.
- [ 11 ] Dichtel LE, Corey KE, Misdraji J, et al. The association between IGF-1 levels and the histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease [ J ]. Clin Transl Gastroenterol, 2017, 8(1): e217.
- [ 12 ] Zeng Q, 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.
- [ 13 ] Dong XC. FOXO transcription factors in non-alcoholic fatty liver disease [ J ]. Liver Res, 2017, 1(3): 168-173.
- [ 14 ] Szabo G, Bala S. microRNAs in liver disease [ J ]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(9): 542-552.
- [ 15 ] Yamada H, Suzuki K, Ichino N, et al. Associations between circulating microRNAs ( miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451 ) and non-alcoholic fatty liver [ J ]. Clin Chim Acta, 2013, 424: 99-103.
- [ 16 ] Zhang Y, Cheng X, Lu Z, et al. Upregulation of miR-15b in NAFLD models and in the serum of patients with fatty liver disease [ J ]. Diabetes Res Clin Pract, 2013, 99(3): 327-334.
- [ 17 ] He Z, Hu C, Jia W. miRNAs in non-alcoholic fatty liver disease [ J ]. Front Med, 2016, 10(4): 389-396.
- [ 18 ] Dattaroy D, Seth RK, Das S, et al. Sparstolonin B attenuates early liver inflammation in experimental NASH by modulating TLR4 trafficking in lipid rafts via NADPH oxidase activation [ J ]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 310(7): G510-G525.
- [ 19 ] Liu XL, Cao HX, Wang BC, et al. miR-192-5p regulates lipid synthesis in non-alcoholic fatty liver disease through SCD-1 [ J ]. World J Gastroenterol, 2017, 23(46): 8140-8151.
- [ 20 ] He Q, Li F, Li J, et al. microRNA-26a-interleukin ( IL ) -6-I/L7 axis regulates the development of non-alcoholic fatty liver disease in a murine model [ J ]. Clin Exp Immunol, 2017, 187(1): 174-184.
- [ 21 ] Massart J, Sjögren RJO, Lundell LS, et al. Altered miR-29 expression in type 2 diabetes influences glucose and lipid metabolism in skeletal muscle [ J ]. Diabetes, 2017, 66(7): 1807-1818.
- [ 22 ] Ru P, Guo D. microRNA-29 mediates a novel negative feedback loop to regulate SCAP/SREBP-1 and lipid metabolism [ J ]. RNA Dis, 2017, 4(1): e1525.
- [ 23 ] Mancini A, Imperlini E, Nigro E, et al. Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health [ J ]. Molecules, 2015, 20(9): 17339-17361.

[ 收稿日期 ] 2020-05-29