

从美丽,刘涛,费璇,等. miRNAs 在大鼠酒精性肝损伤中的作用研究初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 34-41.
Cong ML, Liu T, Fei X, et al. Role and mechanism of miRNAs in alcoholic liver injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 34-41.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.006

miRNAs 在大鼠酒精性肝损伤中的作用研究初探

从美丽^{1,2}, 刘 涛^{1*}, 费 璇², 周 蓓², 孙建新², 赵效国²

(1.新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学动物实验中心, 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 探讨 miRNAs 在大鼠酒精性肝损伤病变过程中的作用及其机制。**方法** 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分成模型组 and 对照组, 模型组灌胃 56% 白酒, 对照组灌胃蒸馏水, 连续 8 周; 解剖取肝组织, 采用大鼠 miRNA 芯片对肝中 miRNAs 进行检测, 对其表达量进行分析, 对差异 miRNA 进行靶基因预测, 并采用 Gene Ontology (GO) 和 KEGG Pathway 富集分析了解差异 miRNA 靶基因的功能, 使用 Cytoscape 构建差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络进一步筛选调控关键 miRNA 与关键通路, RT-qPCR 对挑选的 miRNA 进行表达量验证分析。**结果** 通过比较分析模型组和对照组芯片数据, 共筛选出差异表达 miRNA 12 个 ($P<0.05$, $Fold\ change\geq 2$), 其中上调 2 个, 下调 10 个。差异 miRNA 靶基因 GO 分类注释显示, 差异 miRNA 与信号转导、代谢过程、抗氧化活性、细胞杀伤、酶调控活性、生物调控等生物功能密切相关。差异 miRNA 靶基因 KEGG Pathway 通路分析显示, AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Hippo 信号通路、Wnt 信号通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗、Ras 等信号通路可能在酒精性肝损伤病变过程中发挥着重要的调控作用。通过构建差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络筛选出的 Hub miRNA 和通路有 miR-145-5p、miR-107-3p、miR-297、Hippo 信号通路、癌症、PI3K-Akt 信号通路、AMPK 信号通路等。qRT-PCR 结果显示挑选验证 miRNA 表达变化趋势和基因芯片结果一致。**结论** 本研究建立了大鼠酒精性肝损伤 miRNA 表达谱, 提示 miR-145-5p、miR-107-3p 及 miR-297 可能在肝酒精性病变过程中起着重要的作用。

【关键词】 酒精性肝损伤; miRNA; 靶基因; 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0034-08

Role and mechanism of miRNAs in alcoholic liver injury in rats

CONG Meili^{1,2}, LIU Tao^{1*}, FEI Xuan², ZHOU Bei², SUN Jianxin², ZHAO Xiaoguo²

(1. School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China.

2. Animal Laboratory Center of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanism of miRNAs in alcoholic liver injury in rats.

Methods Thirty male SD rats were randomly divided into model and control groups. The model group was gavaged with 56% liquor and the control group was gavaged with distilled water for 8 weeks. Liver tissue was collected, miRNAs were analyzed, and target genes of differentially expressed miRNAs were predicted by a rat miRNA chip. Gene ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analysis were used to understand the function of differentially expressed miRNA target genes. A differentially expressed miRNA-mRNA-pathway regulatory network was constructed using Cytoscape to further screen important regulatory miRNAs versus important pathways. RT-qPCR was performed for selected miRNAs to validate the expression analysis. **Results** Twelve differentially expressed miRNAs ($P<0.05$, $Fold\ change\geq 2$) were screened out, including two upregulated and 10 downregulated miRNAs by comparative analysis of microarray data between model and

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金联合基金项目 (2021D01C247)。
[作者简介] 从美丽 (1987—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 医学实验动物模型及药理研究。E-mail: congmeili@126.com
[通信作者] 刘涛 (1974—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向: 新疆特色药食兼用植物应用基础研究。E-mail: xjmult@163.com

control groups. GO classification annotation of differential miRNA target genes showed close associations between differentially expressed miRNAs and biological functions such as signal transduction, metabolic processes, antioxidant activity, cell killing, enzyme regulatory activity and biological regulation. Differentially expressed miRNA target genes in KEGG pathway analysis revealed that the AMPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Hippo signaling pathway, Wnt signaling pathway, cancer, autophagy, insulin resistance, Ras signaling pathway, and other signaling pathways might play major regulatory roles in alcoholic liver injury lesions. Hub miRNAs and pathways screened by constructing the differentially expressed miRNA-mRNA-pathway regulatory network were miR-145-5p, miR-107-3p, miR-297, Hippo signaling pathway, cancer, PI3K-Akt signaling pathway, and AMPK signaling pathway. qRT-PCR validated the gene expression trends, and gene chip result were consistent. **Conclusions** We established an miRNA profile of alcoholic liver injury in rats, which suggests that miR-145-5p, miR-107-3p, and miR-297 play major roles in the process of alcoholic liver pathology.

【Keywords】 alcoholic liver injury; miRNA; target genes; signaling pathways
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

酒精性肝损伤(alcoholic liver disease,ALD),通常是由长期大量饮酒引起的疾病,包括早期阶段的脂肪变性、酒精性肝炎、肝硬化,甚至晚期的肝癌^[1-2]。酒精性肝病已成为全世界的一个主要公共卫生问题,也是全世界发病和死亡的主要原因,日益引起人民的高度重视^[3]。大量饮酒是酒精性肝损伤的主要因素,也是全世界发病率和死亡率的主要危险因素,并且我国酒精消费量逐年呈上升趋势^[4]。

miRNA 是一种短链非编码 RNA,可以通过抑制靶基因翻译或促进其降解来调控其表达^[5-6]。在以往人的研究中,miRNA 几乎参与生命活动中所有的生理和病理过程,包括免疫进程、炎症反应、信号转导、代谢过程、肿瘤发生、细胞的分化和增殖等^[7]。很多研究表明 miRNA 在各种疾病发生发展过程中有着十分重要的作用,并且作为关键分子成为疾病诊断和治疗的潜在生物标志物^[8]。目前,miRNA 的作用研究较多应用于肝炎、肝硬化、肝纤维化以及肝癌等疾病中^[9],但在大鼠酒精性肝损伤研究较少,本研究通过灌胃酒精构建大鼠酒精性肝损伤模型,检测分析肝中 miRNA 的表达变化情况,以探究酒精性肝损伤发生发展的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 30 只(SPF 级),7~8 周龄(体重 210~230 g),购自新疆医科大学动物实验中心[SCXK(新)2018-0002],所有实验在实验中心屏障环境中操作完成[SYXK(新)2018-0003],实验获得新疆医科大学实验动物伦理委员会的批准(IACUC20200407-02),饲养和实验过程中按实验

动物 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

56°牛栏山二锅头(北京顺鑫农业股份有限公司,批号:20191126);miRNeasy Mini Kit(德国 QIAGEN 公司,批号:271004);miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit(南京诺唯赞公司,批号:MR201);GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix(北京金沙公司,批号:SQ410);Agilent Rat miRNA(8*15K)V21.0 芯片(design ID:070154)(Agilent,US)。NanoDrop ND-2000 分光光度计购自美国赛默飞公司;Agilent Bioanalyzer 2100 购自美国安捷伦公司;Real-time PCR 仪器购自美国 ABI 公司;高速低温离心仪器购自德国艾本德公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型构建

30 只雄性 SD 大鼠随机分成两组:模型组(model,M)和对照组(control,C),模型组大鼠白酒灌胃,剂量为 10 mL/(kg·d);对照组大鼠灌胃相同剂量的蒸馏水。连续 8 周后,禁食 12 h,处死解剖,采集肝组织,去除残留血液后液氮速冻保存。

1.3.2 肝 miRNA 的提取

参照 miRNeasy Mini Kit 试剂盒流程与步骤,取 20 mg 肝组织,液氮研磨提取 miRNA。所得产物 miRNA 使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计进行定量,Agilent Bioanalyzer 2100 进行完整性检测,以 RIN ≥7 且 28S/18S ≥0.7 作为质量合格标准。

1.3.3 芯片实验

质控合格的 miRNA 产物采用 Agilent Rat miRNA(8*15K)V21.0 芯片检测肝组织中 miRNA 表达水平。对两组样本 miRNA 分子进行荧光标记,而后将荧光标记的 miRNA 样本置于杂交炉中进行

芯片杂交,杂交完成后放入洗片缸中洗片。

1.3.4 靶基因富集分析

GO 分析主要涉及生物学过程、细胞组分和分子功能,对差异表达 miRNA 靶基因进行 GO 条目注释分析和 KEGG 通路分析。对筛选出的差异 miRNA 靶基因,利用 GO 数据库和 KEGG Pathway 数据库展开分析。数据筛选标准均选择 $P<0.05$ 作为显著性富集条件,筛选后的数据纳入 GO 条目注释与 KEGG Pathway 展开分析。

1.3.5 构建差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络

差异 miRNA 数据导入 miRWalk 软件进行靶基因预测分析,以结合能 >26 为标准条件,将过滤筛选出的靶基因导入 String 数据库,在线计算,得出靶蛋白间的互作关系($\text{degree}>1$,置信度 ≥ 0.4 为筛选标准),使用 Cytoscape 软件对 KEGG Pathway 结果数据和 String 计算得出的结果数据进行综合分析,构建调控网络,获得可视化调控网络。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 实验

对筛选的差异 miRNA 进行 RT-qPCR 验证实验,使用 U6 为内参基因,按照 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书步骤操作,将抽提到的 RNA 反转录为 cDNA,反应体系为 20 μL ,其中 GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix 10 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL ,cDNA 2 μL ,ddH₂O 补至 20 μL 。实验采用两步法:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s(40 个循环)。实验数据使用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法计算 miRNA 的相对表达量。

1.4 统计学方法

芯片数据处理采用 Microarray Scanner 进行数据扫描,使用 Feature Extraction software 11.5 软件,对上述扫描数据进行转换,转换之后的数据为原始数据,使用 R 语言程序包 Quantile 算法,导入质控合格的数据,进行归一化处理。最终所得数据处理均使用 t 检验统计学方法,统计学差异分析以 P 值和 $\text{Fold change}(FC)$ 值作为主要参照指标,以 $P<0.05$ 且 $FC\geq 2$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 差异 miRNA 表达分析

分析模型组和对照组间差异表达 miRNA,以 $P<0.05$,差异倍数 $FC\geq 2$ 或 $FC\leq 0.5$ 为筛选差异标准;模型组显著差异表达 miRNA 有 12 个,其中上调

表达的 miRNA 有 2 个,下调表达的有 10 个。差异表达变化较为显著的有 5 个:上调的 miR-107-3p,下调的 miR-292-5p、miR-295-5p、miR-297 和 miR-291b(表 1)。图 1 为两组间差异表达 miRNA 聚类热图。

2.2 差异 miRNA 靶基因 GO 富集结果

采用 miRWalk 2.0 预测差异表达 miRNA 靶基因,以结合能 ≥ 26 为标准阈值,共预测到 946 个靶基因。为了更深入地探讨差异 miRNA 可能发挥作用的生物学过程,将预测到的 miRNA 靶基因导入相关软件做进一步的 GO 富集分析。结果显示,分子功能、生物学过程与细胞组成 3 个分类被不同程度的富集,主要涉及代谢过程、抗氧化活性、信号转导、生物调控、细胞杀伤、酶调控活性等功能。图 2 列举了差异表达 miRNA 靶基因参与的部分主要 GO 条目。

2.3 差异 miRNA 靶基因 Pathway 富集分析

为进一步解析肝酒精性损伤病变过程中可能参与的生物学过程、信号通路等,将筛选出的显著差异表达的 miRNA 靶基因导入 KEGG Pathway 数据库,进行富集分析。结果显示,有 65 个信号通路被显著富集($P<0.05$),主要包括 Hippo 信号通路、

表 1 差异表达 miRNA 信息表

Table 1 Information of differentially miRNA			
miRNA	P 值 P value	差异倍数 $Fold\ change$	表达 Expression
miR-107-3p	2.57E-02	2.42	上调 Up-regulation
miR-122-5p	1.85E-03	2.03	上调 Up-regulation
miR-295-5p	6.14E-04	7.62	下调 Up-regulation
miR-292-5p	4.28E-06	5.53	下调 Up-regulation
miR-297	1.35E-03	4.33	下调 Up-regulation
miR-291b	3.00E-07	3.46	下调 Up-regulation
miR-291a-5p	6.89E-04	2.81	下调 Up-regulation
miR-145-5p	5.90E-05	2.76	下调 Up-regulation
miR-29b-5p	2.54E-03	2.61	下调 Up-regulation
miR-294	3.71E-04	2.35	下调 Up-regulation
miR-505-3p	6.99E-08	2.25	下调 Up-regulation
miR-293-5p	6.79E-04	2.09	下调 Up-regulation

PI3K-Akt 通路、AMPK 通路、Wnt 通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗、Ras 通路等。图 3 展示了差异 miRNA 靶基因参与的排名前 20 的信号通路。

2.4 差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络构建

使用 String 蛋白互作在线软件,对差异表达 miRNA 靶蛋白间的互作关系进行分析,同时联合分析 Pathway 富集结果。分析结果表明,参与调控与肝损伤相关信号通路的 miRNA 9 个(图 4),从图 4

可以得出以下结论: miR-107-3p、miR-145-5p、miR-297 位于调控网络的 Hub 位置,提示 miR-107-3p、miR-145-5p、miR-297 为酒精性肝损伤过程中的重要 miRNA。同时, Hippo、PI3K-Akt、AMPK 通路、癌症、Wnt 通路为重要信号通路,有多个 miRNA 和靶基因参与调控。

2.5 荧光定量 PCR 分析

如图 5 所示,为检验 miRNA 芯片结果的准确

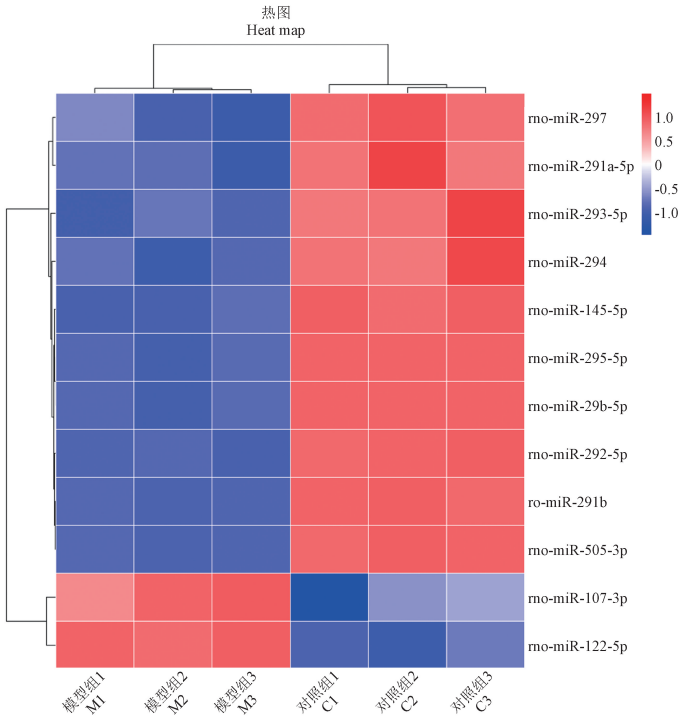


图 1 模型组与对照组差异 miRNA 的聚类热图

Figure 1 Cluster of the miRNAs in the model and the control group

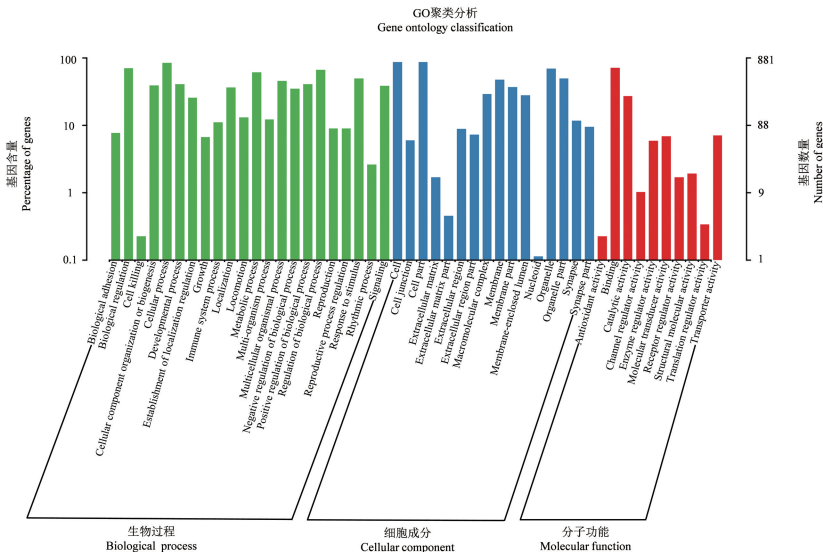


图 2 差异表达 miRNA 参与的 GO 条目

Figure 2 GO terms of differentially miRNA involved



Figure 4 Differentially miRNA-mRNA-Pathway interaction network

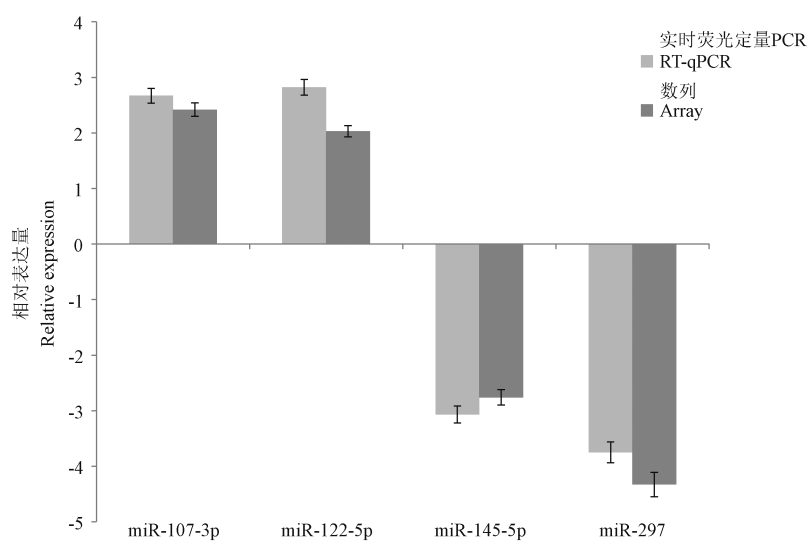


图 5 差异 miRNA 的 RT-qPCR 实验结果

Figure 5 RT-qPCR results of differentially expressed miRNAs

性,挑选了 4 个 miRNA,其中上调表达的 miR-107-3p 与 miR-122-5p;下调表达的 miR-145-5p 与 miR-297;使用 U6 为内参基因,进行 RT-qPCR 实验扩增这些 miRNA,验证芯片数据是否准确。结果显示两组间 miRNA 表达变化模式与芯片实验结果相符,证实本实验中使用 miRNA 芯片技术检测筛选出的差异 miRNA 是准确可靠的。

3 讨论

ALD 是全球慢性病的主要原因,更是我国严重的健康问题。从简单的脂肪变性到肝炎再到肝硬化和肝癌,饮酒是其主要危险因素^[10]。酒精是一种真正的肝毒素,当酒精及中间代谢产物在肝内大量累积,会引起肝慢性损伤。已有研究表明,乙醇代谢相关的氧化应激、谷胱甘肽消耗、细胞损伤、炎症、再生、细菌易位在酒精性肝损伤的发病机制中具有重要作用^[11-12]。尽管对酒精性肝病的发病机制进行了广泛研究,但仍然没有靶向疗法可用。本研究通过构建大鼠酒精性肝损伤模型,探讨 miRNAs 在酒精性肝损伤过程中的分子机制。

miRNAs 是一类长度约为 21~25 个核苷酸的非编码小 RNA,通过结合靶基因,调控靶基因降解或抑制翻译,在转录过程中对靶基因发挥抑制作用,并逐渐成为包括肝癌、肝纤维化、ALD 在内的多种疾病的潜在生物标志物,但 miRNA 作为 ALD 诊断或者治疗工具的临床应用尚未取得很好的研究^[13-15]。已有研究证实了 ALD 发生与一些 miRNA 之间的关系,miR-34a 和 miR-200a 在 ALD 发展过程

中诱导肝细胞凋亡^[16-17],而 miR-26a 可以增加自噬,在 ALD 发挥保护作用^[18];miR-21 可以抑制酒精诱导的细胞凋亡^[19]。然而 miRNA 在大鼠酒精性肝损伤病变过程中发挥的潜在作用机制目前尚不明确,为了深入探讨 miRNA 的具体作用机制,寻找 miRNA 的作用靶点,开展本实验研究。实验中建立 ALD 大鼠动物模型,收集样本并用于相关检测,miRNA 芯片检测结果显示,与对照组相比,模型组差异表达 miRNA 有 12 个,提示大鼠酒精性肝损伤的发生发展是由多个表达异常的 miRNA 参与的复杂的生物学调控过程,研究差异表达 miRNAs 在肝损伤病理进展中的作用,能够为寻找明确的药物治疗作用靶点提供思路和参考。

差异表达的 miR-122 已经被证实与酒精性肝损伤有关,在酗酒后的健康个体和肝损伤的小鼠模型中,已经发现 miR-122 在血液中含量升高^[20];另有研究表明,肝细胞中 miR-122 的恢复可能对酒精性肝病的发展具有保护作用^[21]。此外,miR-122 与肝纤维化的发展和进展的关系已经在体外研究中得到证实,通过靶向 P4HA1 来调节肝星状细胞(HSC)增殖和胶原蛋白的产生^[22]。先前的一项研究发现,ALD 患者肝中 miR-107 表达增加,但在病毒性肝炎受试者和健康对照中却没有上升^[23]。miR-291b 通过负调控腺苷 5'-单磷酸(AMP)激活的蛋白激酶α1 促进肝脂质生成^[24];miR-291b 通过靶向调控 Tollip,进而抑制 TLR4-NF-κB 信号通路,从而诱发机体更多的肝炎症,此外,透明质酸使 miR-291b/Tollip 途径正常化,导致单核细胞/巨噬细胞通过

TLR4 对乙醇诱导的活化降低敏感性^[25]。这些 miRNA 在酒精性肝损伤病变过程中的表达情况与我们 miRNA 芯片检测结果相符,说明他们在酒精性肝损伤病变过程中发挥着重要作用。

对差异表达 miRNA GO 富集分析结果显示,差异 miRNA 靶基因主要与抗氧化、信号转导、生物调控、代谢、酶活性调控、细胞杀伤等生物学功能相关。酒精能促使细胞的脂质过氧化发生,使细胞产生的 ROS 增加,同时使得肝中的氧化应激增强,损伤线粒体 DNA 进而诱导细胞凋亡,是酒精性肝损伤疾病的发生与发展中的关键诱因^[26]。酒精进入机体,酒精会在酒精脱氢酶的作用下转化为乙醛,而后有毒代谢物乙醛会被线粒体脱氢酶进一步氧化成乙酸盐^[27]。生物调控、信号转导也是肝损伤病变过程中的一个重要方面。KEGG 分析结果显示,酒精性肝损伤病变过程中 miRNA 主要调控 AMPK、PI3K-Akt、Hippo、Wnt 信号通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗等信号通路。据报道,酒精通过以 AMPK 通路依赖性方式激活 SREBP-1c 上调 LIPIN1,导致肝细胞中脂质积累增加^[28]。有研究证实,长期大量饮酒后,乙醇会对肝细胞内 IRS1/2、PI3K、AKT 等蛋白的表达或磷酸化产生影响,乙醇能激活 mTORC1 活性,进而抑制 PI3K-Akt 信号通路,从而引起下游相应信号因子的活化或抑制^[29]。Hippo 信号通路在哺乳肝细胞命运、细胞凋亡、肝生长发育、肝癌发生发展以及肝再生等生理和病理过程中都发挥了很重要的作用^[30]。Wnt 信号通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗等机制在酒精性肝损伤病变过程中的作用均已被研究证明^[31-33]。

酒精性肝损伤的发生发展牵涉到多个复杂基因网络调控的变化,本研究通过 KEGG Pathway 信号通路结合蛋白互作调控网络,多层次联合分析 miRNA 在酒精性肝损伤发生发展过程中的表达变化,探寻 miRNA 可能的作用机制,更好地揭示 miRNA、靶基因以及信号通路三者间的调控关系。通过分析筛选出 3 个关键 Hub miRNA,分别为 miR-145-5p、miR-107-3p 与 miR-297,以及相应的关键信号通路:Hippo 通路、癌症、PI3K-Akt AMPK、Wnt 通路,提示 miR-145-5p、miR-107-3p、miR-297 可通过这几个关键信号通路调控下游目标分子进而影响酒精性肝损伤发生发展。

本研究针对大鼠酒精性肝损伤模型 miRNAs 的表达变化进行初步探讨,通过实验及后期数据分

析,筛选出了具有关键作用的 Hub miRNA 与信号通路,以期为酒精性肝损伤进一步的深入研究,包括后期靶标诊断、治疗研究等,提供重要的参考资料。提示 miR-145-5p、miR-107-3p、miR-297 可通过 Hippo、PI3K-Akt、AMPK、Wnt 等信号通路调控下游靶基因或靶蛋白,参与酒精性肝损伤的发生发展,但相关信号通路的调控机制仍需更深入的研究和进一步的实验验证。

参考文献:

- [1] 杨冬晗, 张文龙, 侯瑞丽, 等. Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤中的作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 126-130.
- [2] 林惠武, 林燕琼, 林志辉. 双歧杆菌对慢性酒精性肝损伤大鼠肝功能保护作用的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 760-765.
- [3] Sharma P, Arora A. Clinical presentation of alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease: spectrum and diagnosis [J]. Transl Gastroenterol Hepatol, 2020, 5: 19.
- [4] World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018 [M]. Geneva: World Health Organization; 2018.
- [5] 梁紫君, 张雪儿, 黄健, 等. miRNA 在缺血性脑血管病中作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 132-137.
- [6] 从美丽, 古丽拉莱·多力坤, 周蓓, 等. 应用基因芯片技术分析甘草酸改善大鼠酒精性肝损伤的作用机制 [J]. 医学动物防制, 2022, 38(4): 374-378.
- [7] Hammond SM. An overview of microRNAs [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 3-14.
- [8] Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(9): 542-552.
- [9] Szabo G, Csak T. Role of microRNAs in NAFLD/NASH [J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(5): 1314-1324.
- [10] Kong LZ, Chandimali N, Han YH, et al. Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2712.
- [11] Wang WJ, Xiao P, Xu HQ, et al. Growing burden of alcoholic liver disease in China: a review [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(12): 1445-1456.
- [12] Chu H, Duan Y, Lang S, et al. The Candida albicans exotoxin candidalysin promotes alcohol-associated liver disease [J]. J Hepatol, 2020, 72(3): 391-400.
- [13] 叶蓓, 李曼, 程翔, 等. miRNA-29c 在大鼠脑缺血再灌注神经损伤中的保护作用与机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 31-37.
- [14] Wang Y, Yu D, Tolleson WH, et al. A systematic evaluation of microRNAs in regulating human hepatic CYP2E1 [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 138: 174-184.
- [15] Afonso MB, Rodrigues PM, Simão AL, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers in non-alcoholic fatty liver

- disease and hepatocellular carcinoma [J]. J Clin Med, 2016, 5 (3): 30.
- [16] 从美丽, 周蓓, 吕晓敏, 等. 大鼠酒精性肝损伤模型 RNA 可变剪切变化分析 [J]. 热带医学杂志, 2018, 18(8): 1023–1026.
- [17] Zhao YX, Sun YY, Huang AL, et al. microRNA-200a induces apoptosis by targeting ZEB2 in alcoholic liver disease [J]. Cell Cycle, 2018, 17(2): 250–262.
- [18] Han W, Fu X, Xie J, et al. MiR-26a enhances autophagy to protect against ethanol-induced acute liver injury [J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(9): 1045–1055.
- [19] Francis H, McDaniel K, Han Y, et al. Regulation of the extrinsic apoptotic pathway by microRNA-21 in alcoholic liver injury [J]. J Biol Chem, 2014, 289(40): 27526–27539.
- [20] McCrae JC, Sharkey N, Webb DJ, et al. Ethanol consumption produces a small increase in circulating miR-122 in healthy individuals [J]. Clin Toxicol (Phila), 2016, 54(1): 53–55.
- [21] Satishchandran A, Ambade A, Rao S, et al. microRNA 122, regulated by GRLH2, protects livers of mice and Patients from ethanol-induced liver disease [J]. Gastroenterology, 2018, 154 (1): 238–252.
- [22] Li J, Ghazwani M, Zhang Y, et al. miR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression [J]. J Hepatol, 2013, 58(3): 522–528.
- [23] Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, et al. microRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity [J]. Nature, 2011, 474 (7353): 649–653.
- [24] Meng X, Guo J, Fang W, et al. Liver microRNA-291b-3p promotes hepatic lipogenesis through negative regulation of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase $\alpha 1$ [J]. J Biol Chem, 2016, 291(20): 10625–10634.
- [25] Saikia P, Roychowdhury S, Bellos D, et al. Hyaluronic acid 35 normalizes TLR4 signaling in Kupffer cells from ethanol-fed rats via regulation of microRNA291b and its target Tollip [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15671.
- [26] 从美丽, 马依热·努尔买买提, 周蓓等. 甘草酸介导 miRNAs 对大鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(8): 1374–1379.
- [27] Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3 (3): 178–185.
- [28] Bi L, Jiang Z, Zhou J. The role of lipin-1 in the pathogenesis of alcoholic fatty liver [J]. Alcohol Alcohol, 2015, 50(2): 146–151.
- [29] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease [J]. Cell, 2012, 149(2): 274–293.
- [30] Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations [J]. Genes Dev, 2013, 27(4): 355–371.
- [31] Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, et al. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(2): 121–136.
- [32] Ndoye A, Budina-Kolomets A, Kugel CH, et al. ATG5 mediates a positive feedback loop between Wnt signaling and autophagy in melanoma [J]. Cancer Res, 2017, 77(21): 5873–5885.
- [33] Yazıcı D, Sezer H. Insulin resistance, obesity and lipotoxicity [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 960: 277–304.

[收稿日期]2022-12-29