

miR-122-5p通过靶向Circ_MTM1在HBV相关肝纤维化中的分子机制研究

姚福纯¹, 李彬^{2*}, 蔡艳¹, 黄俊文¹, 王振生¹, 王海鑫¹, 刘贵旻¹

¹锦州医科大学, 基础医学院, 基础医学系, 辽宁 锦州

²锦州医科大学, 基础医学院, 病原生物学教研室, 辽宁 锦州

收稿日期: 2023年12月11日; 录用日期: 2024年1月18日; 发布日期: 2024年1月25日

摘要

目的: 研究微小核糖核酸miR-122-5p (miR-122-5p)对HBV感染相关肝纤维化的作用及分子机制。方法: 分别用采用HBsAg、HBeAg酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒和实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测HBV表面抗原(HBsAg)、抗原(HBeAg)水平以及HBV DNA、HBV共价闭环环状DNA(cccDNA)水平, 并采用蛋白质印迹法(Western blot)检测相应蛋白水平。RT-qPCR检测人肝星状细胞(LX-2细胞)和HBV相关性肝纤维化组织细胞中Circ_MTM1、miR-122-5p的表达情况。应用生物信息学软件StarBaseV3.0预测miR-122-5p的可能靶基因, 并应用双荧光素酶检测方法判定miR-122-5p对其靶基因Circ_MTM1表达的调节作用。结果: miR-122-5p在HBV相关性肝纤维化组织和细胞中低表达, 而Circ_MTM1在HBV相关性肝纤维化组织和细胞中高表达。miR-122-5p靶向下调Circ_MTM1的表达, 通过下调Circ_MTM1可抑制HBV相关肝纤维化的进程。结论: miR-122-5p与Circ_MTM1在HBV相关肝纤维化中存在靶向关系, Circ_MTM1通过调控肝纤维化相关蛋白的水平在HBV相关肝纤维化进程中起到启动子作用。

关键词

微小核糖核酸122-5p (miR-122-5p), Circ_MTM1, 乙型肝炎病毒(HBV), 肝纤维化

Molecular Mechanism of miR-122-5p in HBV-Associated Liver Fibrosis by Targeting Circ_MTM1

Fuchun Yao¹, Bin Li^{2*}, Yan Cai¹, Junwen Huang¹, Zhensheng Wang¹, Haixin Wang¹, Guimin Liu¹

¹Department of Basic Medicine, School of Basic Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

²Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

*通讯作者。

文章引用: 姚福纯, 李彬, 蔡艳, 黄俊文, 王振生, 王海鑫, 刘贵旻. miR-122-5p 通过靶向 Circ_MTM1 在 HBV 相关肝纤维化中的分子机制研究[J]. 生物医学, 2024, 14(1): 72-80. DOI: 10.12677/hjbm.2024.141008

Abstract

Objective: To study the effect of microRNA-122-5p (miR-122-5p) on infection-related liver fibrosis and its molecular mechanism. **Methods:** HBsAg and HBeAg enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were used to detect HBV surface antigen (HBsAg), antigen (HBeAg) levels, HBV DNA and HBV covalent closed circular DNA (cccDNA) levels, respectively. The corresponding protein levels were detected by Western blot. The expression of Circ_MTM1 and miR-122-5p in human hepatic stellate cells (LX-2 cells) and HBV-related hepatic fibrosis tissue was detected by RT-qPCR. Bioinformatics software StarBaseV3.0 was used to predict the possible target genes of miR-122-5p, and dual luciferase assay was used to determine the regulatory effect of miR-122-5p on the expression of its target gene Circ_MTM1. **Results:** The expression of miR-122-5p was low in HBV-associated liver fibrosis tissues and cells, while the expression of Circ_MTM1 was high in HBV-associated liver fibrosis tissues and cells. The expression of Circ_MTM1 is down-regulated by miR-122-5p, and the process of HBV-related liver fibrosis can be inhibited by down-regulating Circ_MTM1. **Conclusion:** There is a targeting relationship between miR-122-5p and Circ_MTM1 in HBV-related liver fibrosis, and Circ_MTM1 plays a promoter role in the process of HBV-related liver fibrosis by regulating the level of liver fibrosis-related proteins.

Keywords

miR-122-5p, Circ_MTM1, Hepatitis B Virus, Liver Fibrosis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌(HCC)等疾病的主要危险因素之一,也是一个重大的全球健康问题[1]。全世界有超过 3.5 亿人慢性感染 HBV, 每年约有 100 万人死于 HBV 相关并发症, 慢性 HBV 感染可引起肝纤维化[2] [3], 据报道有 25%~40%的肝纤维化患者后期发展为肝硬化、肝衰竭, 甚至肝癌导致死亡[4]。

microRNAs (miRNAs)是一种长度为 19~25 个核苷酸的非编码小 RNA, 通过与信使 RNA (mRNA)相互作用, 在转录后发挥调控功能[5]。失调的 miRNAs 对细胞存活、生长、转移和分化等一系列细胞生物学行为具有重要影响[6]。越来越多的证据表明, 在多种类型人类疾病中被发现存在 miRNAs 的失调[7]。研究证实 microRNA-122-5p (miR-122-5p)参与了人类肿瘤和其他疾病, 如鼻咽癌[8], 儿童肥胖[9]、胰腺癌[10] 以及肝细胞癌[11]。然而, miR-122-5p 是否介导 HBV 相关性肝纤维化的发病机制仍不清楚。环状 RNA (Circular RNAs, circRNAs)是作为一类主要的非编码 RNA 分子具有组织限制性和癌症特异性表达模式, 可通过不同的作用机制在癌症的发生和进展中发挥关键作用[12] [13]。许多环状 RNA 也已被证实在肝细胞癌中发挥重要作用[14]。例如, 抑制 circ_RPS16 的表达可以在活体水平抑制肝癌移植瘤的生长[15], circ_104348 在 HCC 组织和细胞中表达显著上调, circ_104348 水平高的 HCC 患者预后较差[16]。然而,

Circ_MTM1 在 HBV 诱导肝纤维化中的作用尚不清楚。本文主要研究, miR-122-5p 通过靶向 Circ_MTM1 对 HBV 相关性肝纤维化中的作用和潜在机制。

2. 材料和方法

2.1. 细胞培养

LX-2 细胞(人肝星状细胞)购自中科院生化细胞实验室(中国,上海)。培养液采用 DMED 培养液加 10% 胎牛血清(FBS; 购于 Invitrogen 公司, 美国), 抗生素选用 100 U/mL 的青霉素和 100 μ g/mL 的链霉素(购于 Hyclone 公司, 美国), 细胞培养条件为 37°C、5%二氧化碳的温箱, 在 37°C 下, 用 10^{12} /LHBV 感染 LX-2 细胞 36 小时, 随后, 用 10 ng/mL TGF- β 1 (购于 R&D Systems 公司, 美国)处理细胞 36 小时。

2.2. 组织样本

选取 2021 年 07 月~2023 年 08 月锦州医科大学附属第一医院确诊的 32 例 HBV 相关性肝纤维化患者的肝纤维化组织及其相邻正常组织。所有患者经 B 超、血清学检测和肝穿刺证实, 诊断为 HBV 相关性肝纤维化, 并且无肿瘤、糖尿病等免疫学疾病。该研究已通过锦州医科大学伦理委员会批准, 并根据《赫尔辛基宣言》的道德准则进行, 且该实验获得患者的同意并签订知情同意书。

2.3. 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)检测

分别收集 HBV 感染、TGF- β 1 处理、转染不同时间的 LX-2 细胞培养上清, 之后将上清液 2500 rpm 离心 5 min, -20°C 静置后使用。采用 HBsAg 和 HBeAg ELISA 试剂盒(购于 Abcam 公司, 英国)检测 HBsAg 和 HBeAg, 按标准流程分析。

2.4. HBV DNA 和 HBV cccDNA 检测

HBV DNA 的分离和检测分别采用血液和细胞培养 DNA 试剂盒(购于 QIAGEN 公司, 德国)和 HBV DNA 检测诊断试剂盒(购于达安公司, 中国)。cccDNA 的特异性引物如下: GCCTATTGATTGGAAAGTATGT (正向)和 AGCTGAGGCGGTATCTA (反向), 以插入质粒的单基因型 D 型 HBV 作为定量标准。

2.5. RNA 提取和实时定量聚合酶链式反应

应用 Trizol 试剂(购于 Invitrogen 公司, 美国)根据标准流程从 HBV 相关肝纤维化组织和细胞中分离提取 RNA。采用 SuperScript IV CellsDirect cDNA 合成试剂盒(购于 Invitrogen 公司, 美国)将 mRNA 反转录为 cDNA, 并按 SYBR Green Master Mix (ThermoFisher)的 RT-qPCR 系统说明扩增并检测 mRNA, 确定特异性基因扩增转录水平。以 U6 和 GAPDH 作为内参, 对 miR-122-5p、Circ_MTM1 进行标准化控制。应用的特异性引物如下: Circ_MTM1: 正向引物 GCGACAAGTAGAGGAGAA, 反向引物 AGAAGTTGATGCAGAAGC, miR-122-5p: 正向引物 GTGACAATGGTGAATGTGG, 反向引物 AAAGCAAACGATGCCAAGAC, U6: 正向引物 CTCGCTTCGGCAGCACA, 反向引物 AACGCTTCACGAATTTGCGT, GAPDH: 正向引物 AAGGCTGAGAATGGGAAAC, 反向引物 TTCAGGGACTTGTCATACTTC。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并检测 miR-122-5p 和 Circ_MTM1 的表达。

2.6. 双荧光素酶报告检验检测

将含有野生型(WT)或突变型(MUT) miR-122-5p 结合位点的 Circ_MTM1 序列插入 pGL3 启动子载体(购于 Invitrogen 公司, 美国)中构建报告载体: Circ_MTM1-WT (野生型), Circ_MTM1-MUT (突变型)。然后将 HBV 感染 LX-2 细胞和 HBV 与 TGF- β 1 共处理的 LX-2 细胞, 分别用萤火虫荧光素酶报告载体

(Circ_MTM1-WT 或 Circ_MTM1-MUT)、肾素荧光素酶报告载体和 miR-NC 或 miR-122-5p 共转染。转染 48 小时后, 采用双萤光素酶检测系统测量萤光素酶的相对活性, 用萤火虫萤光素酶活性和海肾萤光素酶活性比值表示萤光素酶的相对活性。

2.7. Western Blot

取 1.3 处理的细胞, 用 RIPA 裂解液(购于 Beyotime 公司, 中国)提取总蛋白, 置于 10%~12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白后转膜(PVDF), 然后用 5%脱脂牛奶在室温下封膜 2 h。再加入细胞增殖核抗原(PCNA, 1:1000, 购于 Abcam 公司, 英国)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2, 1:1000, 购于 Abcam 公司, 英国)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA, 1:2000, 购于 Abcam 公司, 英国)、人 I 型胶原 α 1 链蛋白(COL1A1, 1:1000, 购于 Abcam 公司, 英国)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 1:1000, 购于 Abcam 公司, 英国)于 4℃ 封闭过夜。接着加入对应山羊抗兔二抗(1:2000, 购于 Abcam 公司, 英国)室温封闭 1.5 h, 然后滴电化学反应液曝光, 以 GAPDH 为内参, 使用 Quantity One 软件分析蛋白条带灰度, 最后以目标蛋白与内参蛋白 GAPDH 积分光密度(integrated-optical density, IOD)比值表示蛋白的表达水平。

2.8. 统计学分析

所有统计数据采用 SPSS 22.0 处理, 图形使用 GraphPad Prism 6.0 软件构建。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 one-way ANOVA 分析, 组间差异采用学生 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

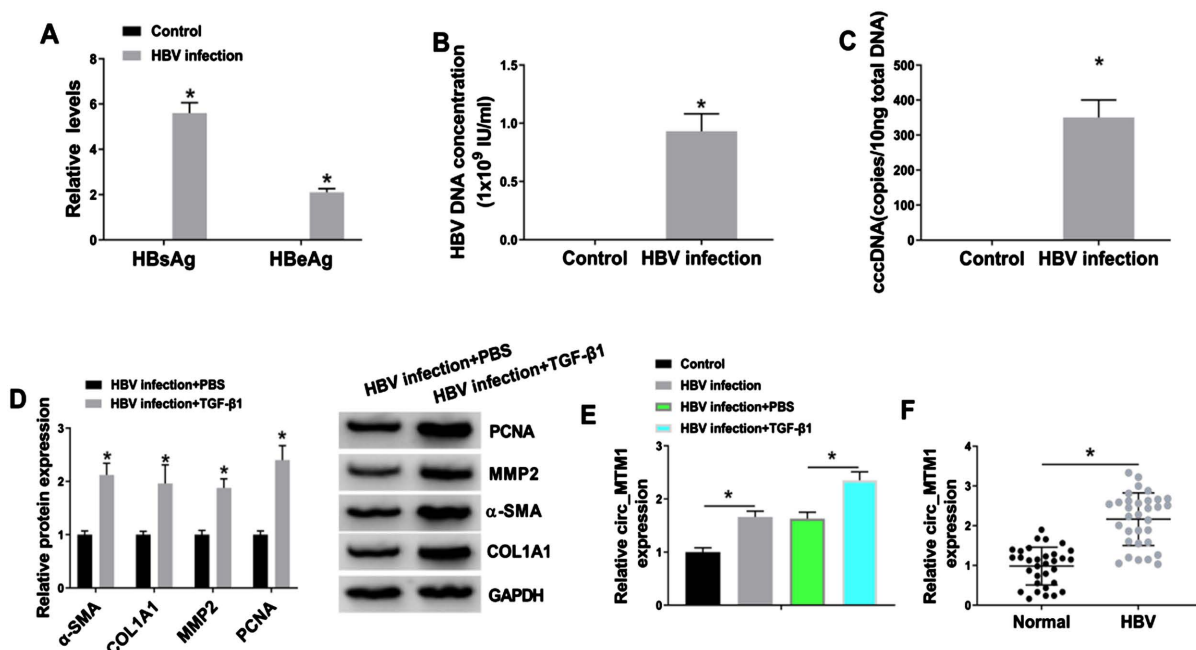
3. 结果

3.1. Circ_MTM1 在 HBV 感染的 LX-2 细胞和肝纤维化组织中高度表达

为研究 HBV 在 LX-2 细胞中的复制情况, 先将 LX-2 细胞与 HBV 在培养基中共同孵育 36 h, HBV 可转染 LX-2 细胞中成功复制, 并在体外表达 HBs 和 HBe (见图 1(A)), HBsAg 和 HBeAg 在 HBV 感染的 LX-2 细胞中较比未处理的 LX-2 细胞中表达上调。同时, HBV 感染也导致了 LX-2 细胞中的 HBV DNA 水平上调(见图 1(B))。同时在 HBV 感染的 LX-2 细胞中检测到病毒转录模板 cccDNA (见图 1(C))。这些结果表明感染成功, 且转化生长因子 β 1 蛋白(TGF- β 1)在 HBV 相关肝纤维化的肝损伤中发挥重要作用。因此, 将 HBV 感染的 LX-2 细胞与 10 ng/mL TGF- β 1 共同孵育 36 h, 检测纤维化相关蛋白(α -SMA、COL1A1、MMP2 和 PCNA)水平。Western blot 实验结果显示, 与未经 TGF- β 1 处理的 HBV 感染 LX-2 细胞相比, TGF- β 1 显著上调 α -SMA、COL1A1、MMP2 和 PCNA 蛋白水平(见图 1(D))。然后继续检测 HBV 感染的 LX-2 细胞和肝纤维化组织中 Circ_MTM1 的表达。与未处理的细胞相比, Circ_MTM1 在 HBV 感染的 LX-2 细胞中表达量增加, 并在 TGF- β 1 和 HBV 联合处理的细胞中表达量进一步增加(见图 1(E))。此外, 我们发现, 与正常肝组织相比 Circ_MTM1 在 HBV 相关肝纤维化组织中表达上调($n = 32$) (见图 1(F))。综上, 结果表明 Circ_MTM1 在 HBV 相关的肝纤维化组织和细胞中高表达。

3.2. Circ_MTM1 基因敲低可减弱 HBV 诱导的肝纤维化

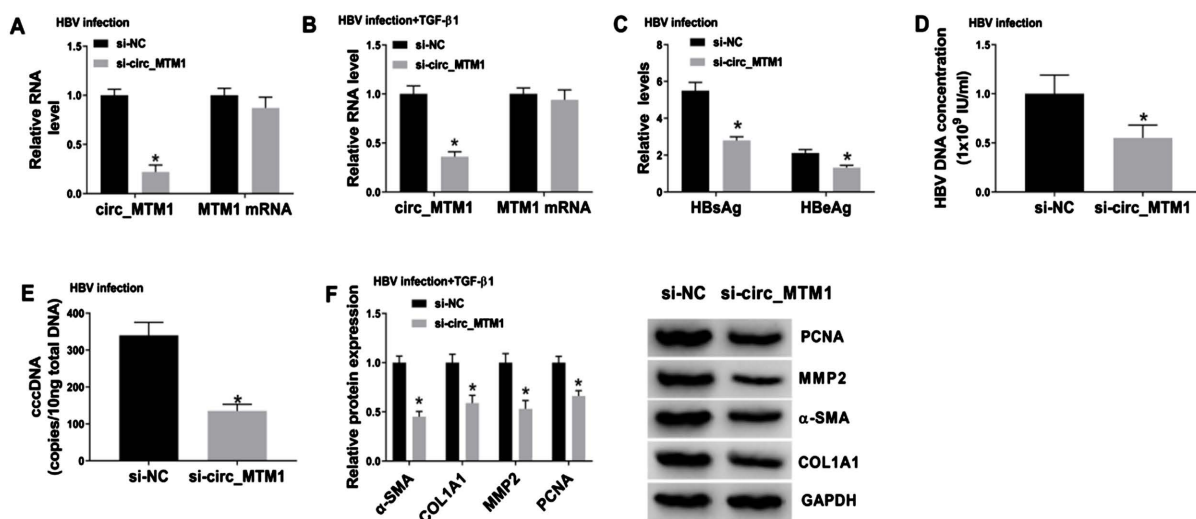
为研究 Circ_MTM1 在 HBV 相关性肝纤维化中的潜在机制, 将 HBV 相关性肝纤维化转染后分组 si-NC 和 si-circ_MTM1。RT-qPCR 结果显示, 转染 si-circ_MTM1 组在 HBV 感染的 LX-2 细胞以及 HBV 感染和 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞中显著抑制了 circ_MTM1 的表达(见图 2(A)~(B))。敲低 Circ_MTM1 可显著抑制 HBV 感染 LX-2 细胞中的 HBsAg 和 HBeAg 水平(见图 2(C))。此外, 我们观察到, 在 Circ_MTM1 敲低的 HBV 感染 LX-2 细胞中, HBV DNA 和 cccDNA 水平下调(见图 2(D)~(E))。而且, western blot 实验结果显示, Circ_MTM1 敲低也可以抑制 HBV 和 TGF- β 1 联合处理 LX-2 细胞中 α -SMA、COL1A1、MMP2 和



(A) 分别用 HBsAg 和 HBeAg ELISA 试剂盒检测 HBsAg 和 HBeAg 水平。
 (B-C) 采用 RT-qPCR 检测 HBV DNA 和 cccDNA 水平。
 (D) Western blot 检测 PCNA、MMP2、 α -SMA 和 COL1A1 的表达。
 (E) RT-qPCR 检测 LX-2 细胞中 Circ_MTM1 水平。
 (F) RT-qPCR 检测 HBV 相关肝纤维化组织中 Circ_MTM1 的表达。* $P < 0.05$ 。

Figure 1. Circ_MTM1 is upregulated in HBV-associated liver fibrosis tissues and cells

图 1. Circ_MTM1 在 HBV 相关肝纤维化组织和细胞中上调



HBV 感染的 LX-2 细胞, HBV 与 TGF- β 1 联合处理的 LX-2 细胞分别转染 si-circ_MTM1 或 si-NC。
 (A-B) RT-qPCR 检测 Circ_MTM1 和 MTM1 水平。
 (C) 分别用 HBsAg 和 HBeAg ELISA 试剂盒检测 HBV 感染 LX-2 细胞的 HBsAg 和 HBeAg。
 (D) 用 RT-qPCR 检测 HBV 感染 LX-2 细胞的 HBV DNA 水平。
 (E) 采用 RT-qPCR 检测 HBV 感染 LX-2 细胞中 cccDNA 水平。
 (F) Western blot 检测 HBV 和 TGF- β 1 联合作用 LX-2 细胞中 PCNA、MMP2、 α -SMA 和 COL1A1 的表达。* $P < 0.05$ 。

Figure 2. Circ_MTM1 knockdown attenuated HBV-related liver fibrosis

图 2. Circ_MTM1 基因敲减 HBV 相关性肝纤维化

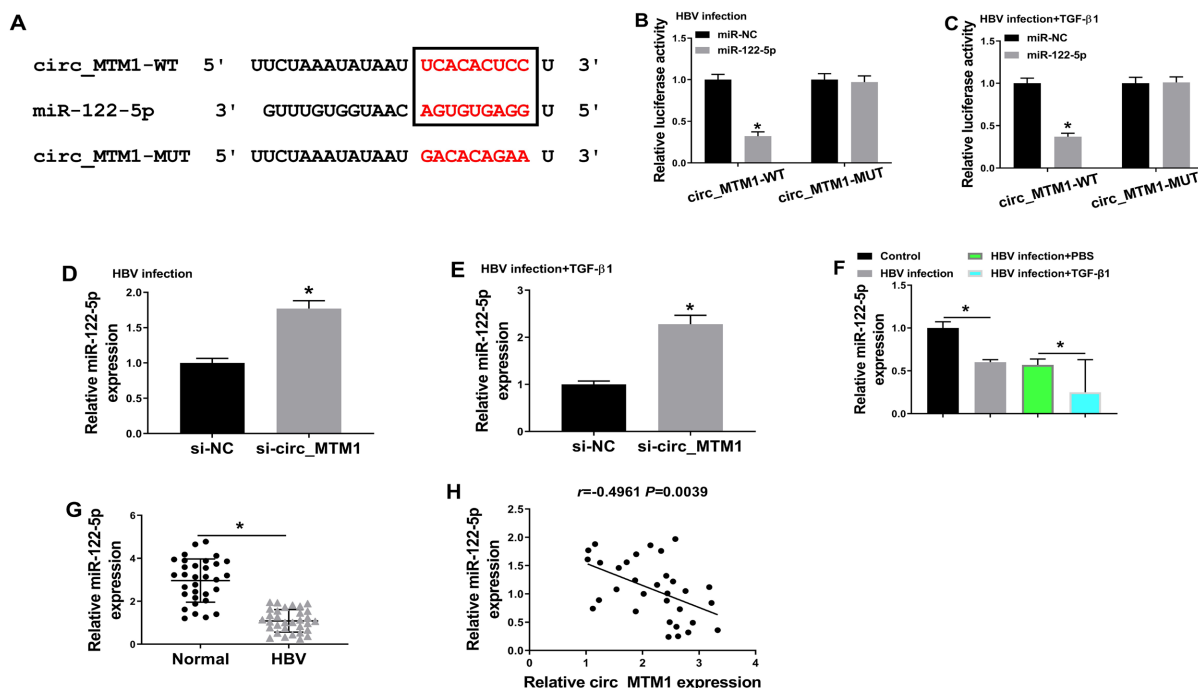
的蛋白水平(见图 2(F))。综上,数据表明 Circ_MTM1 在 HBV 感染和 HBV 相关性肝纤维化中起促进作用。

3.3. Circ_MTM1 是 miR-122-5p 的靶基因

为了解 Circ_MTM1 的作用,我们首先通过生物信息学软件 StarBaseV3.0 预测了 Circ_MTM1 潜在的靶向 miRNAs,其中 miR-122-5p 包含了 Circ_MTM1 的结合位点(见图 3(A))。然后通过双荧光素酶报告基因检测技术来验证此相关性,在 HBV 或 HBV 感染和 TGF- β 1 共同处理的 LX-2 细胞中,与转染 miR-NC 组相比,转染 miR-122-5p 组明显降低了 Circ_MTM1-WT 组的荧光素酶活性,而对 Circ_MTM1-MUT 组的荧光素酶活性影响较小(见图 3(B)~(C))。RT-qPCR 结果显示,敲低 Circ_MTM1 可促进 HBV 感染的 LX-2 细胞以及 HBV 感染和 TGF- β 1 联合处理的 LX-2 细胞中的 miR-122-5p 的表达(图 3(D)~(E))。此外,在 HBV 感染的 LX-2 细胞组中 miR-122-5p 表达下调,而在 HBV 感染和 TGF- β 1 处理组 miR-122-5p 表达降低(见图 3(F))。而且,在 HBV 相关肝纤维化组织中同样发现 miR-122-5p 表达降低($n = 32$) (见图 3(G))。我们发现 Circ_MTM1 表达与 miR-122-5p 表达水平呈负相关($r = -0.4961, P = 0.0039$) (见图 3(H))。综上,数据表明,miR-122-5p 是 Circ_MTM1 的一个靶点,并且受到 Circ_MTM1 的负向调控。

3.4. miR-122-5p 抑制剂可逆转 Circ_MTM1 对 HBV 相关肝纤维化下调的影响

为进一步探讨 Circ_MTM1 是否通过调控 miR-122-5p 对 HBV 相关性肝纤维化的抑制作用,我们采用



(A) StarBaseV3.0 预测 miR-122-5p 包含 Circ_MTM1 的结合位点。

(B-C) 采用双荧光素酶报告基因测定 miR-NC 或 miR-122-5p 与 Circ_MTM1-WT 或 Circ_MTM1-MUT 共转染细胞的荧光素酶活性。

(D-E) RT-qPCR 检测转染 si-circ_MTM1 或 si-NC 的 HBV 感染 LX-2 细胞以及 HBV 和 TGF- β 1 联合处理的 LX-2 细胞中 miR-122-5p 水平。

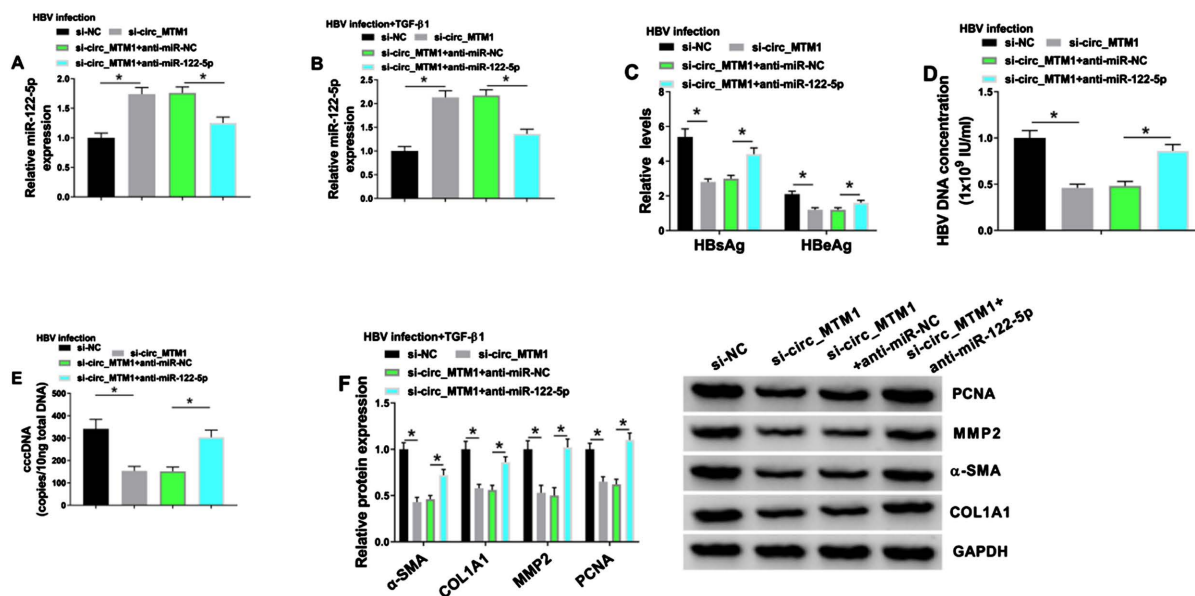
(F) RT-qPCR 检测 HBV 或 TGF- β 1 处理 LX-2 细胞中 miR-122-5p 的表达。

(G) RT-qPCR 检测 HBV 相关肝纤维化组织中 miR-122-5p 的水平。

(H) 采用 Pearson 相关分析方法分析 Circ_MTM1 与 miR-122-5p 的相关性($r = -0.4961, P = 0.0039$)。* $P < 0.05$ 。

Figure 3. Circ_MTM1 directly targeted miR-122-5p

图 3. Circ_MTM1 直接靶向 miR-122-5p



HBV 感染的 LX-2 细胞以及 HBV 和 TGF- β 1 联合处理的 LX-2 细胞分别转染 si-NC、si-circ_MTM1、si-circ_MTM1 + anti-miR-NC 或 si-circ_MTM1 + anti-miR-122-5p。

(A-B) RT-qPCR 检测 miR-122-5p 水平。

(C) 采用 HBsAg 和 HBeAg ELISA 试剂盒分别检测 HBsAg 和 HBeAg 水平。

(D-E) 采用 RT-qPCR 检测 HBV DNA 和 cccDNA 水平。

(F) Western blot 检测 PCNA、MMP2、 α -SMA 和 COL1A1 蛋白水平。* $P < 0.05$ 。

Figure 4. miR-122-5p inhibitor reversed the effects of Circ_MTM1 knockdown on HBV-related liver fibrosis

图 4. miR-122-5p 抑制剂逆转了 Circ_MTM1 敲低对 HBV 相关肝纤维化的影响

miR-122-5p 抑制剂进行挽救实验。在 HBV 感染的 LX-2 细胞以及 HBV 感染和 TGF- β 1 联合处理的 LX-2 细胞中，miR-122-5p 抑制剂显著逆转了 Circ_MTM1 敲低 miR-122-5p 表达的上调作用(见图 4(A)~(B))。在 HBV 感染的 LX-2 细胞中，我们发现 Circ_MTM1 基因的敲低显著降低了 HBsAg 和 HBeAg 的水平，而上述作用可被 miR-122-5p 抑制剂部分挽救(见图 4(C))。此外，miR-122-5p 抑制剂阻断了在 HBV 感染 LX-2 细胞中的 HBV DNA 和 cccDNA 水平因 Circ_MTM1 敲低的抑制作用(见图 4(D)~(E))。同时，WesternBlot 实验结果证明，在 HBV 感染和 TGF- β 1 共同作用的 LX-2 细胞中，miR-122-5p 下调显著逆转了 Circ_MTM1 敲低对 α -SMA、COL1A1、MMP2 和 PCNA 蛋白水平的抑制作用(见图 4(F))。综上，结果证明 Circ_MTM1 可以通过调控 miR-122-5p 对 HBV 感染和 HBV 相关性肝纤维化的进展发挥作用。

4. 讨论

越来越多的证据显示，miRNAs 在肝纤维化进程中发挥重要作用，miRNA 充当基因表达的主要调节剂。在肝纤维化中存在大量 miRNA 的异常表达，如 miR-133b 低表达可能参与慢性乙型肝炎肝纤维化患者发生发展过程[17]，circRNA97 被证明可以通过调控 miR-146b-5p/HIPK1 通路，显著抑制体外的肝星状细胞活化，并在大鼠体内实验中抑制大鼠肝纤维化进程，是肝纤维化的一个潜在性的分子标志物和医治靶标[18]。林等的研究发现 miR-155-5p 促进肝星状细胞的活化、迁移、氧化应激及胶原生成[19]。miR-195-3p 可通过抑制 PTEN 的表达促进肝星状细胞活化及肝纤维化的发展[20]。本研究表明，miR-122-5p 是 Circ_MTM1 的一个靶点，并且可以被 Circ_MTM1 负向调控。同时 HBV 相关肝纤维化组织和细胞中发现 miR-122-5p 下调。此外，miR-122-5p 抑制剂部分逆转了 Circ_MTM1 敲低对 HBV 感染和 HBV 相关肝纤维化的抑制作用。

HBV DNA 水平是乙型肝炎病毒感染的因素，与肝硬化风险的增加密切相关[21]。此外，HBV cccDNA 在抗病毒治疗耐药性和病毒持久性中起着至关重要的作用，也是 HBV 感染的一个标志[22] [23]。TGF- β 1 通过激活肝星状细胞在 HBV 相关肝损伤中发挥重要作用[24]。在本文研究中，将 LX-2 细胞感染 HBV，且 HBV 感染细胞中的 HBsAg、HBeAg、HBV DNA、cccDNA 等 HBV 感染标志物水平升高。在 HBV 感染 LX-2 细胞中，纤维化相关蛋白 PCNA、MMP2、 α -SMA、COL1A1 的表达进一步升高，证明 TGF- β 1 促进了 HBV 感染 LX-2 细胞的肝纤维化。环状 RNA 在肝纤维化的发展进程中发挥重要作用，据报道，circ_0070963 可以通过调控 miR-223-3p 和 LEMD3 抑制肝纤维化[25]。在我们的研究中，首次发现 circRNA Circ_MTM1 参与调节 HBV 相关肝纤维化的发展，并且可检测 HBV 相关肝纤维化的 Circ_MTM1 水平。Circ_MTM1 在 HBV 相关肝纤维化细胞和组织中高表达，Circ_MTM1 在 HBV 感染的肝纤维化中起到启动子作用，这与朱[26]和郑[27]的研究成果相符合，同时 Circ_MTM1 的下调显著降低了 HBV 感染标志物的水平。最终，Circ_MTM1 基因敲低显著抑制了 PCNA、MMP2、 α -SMA 和 COL1A1 在 HBV 相关肝纤维化细胞中的表达。

5. 结论

综上所述，Circ_MTM1 在 HBV 相关的肝纤维化组织和细胞中高度表达，Circ_MTM1 通过调节肝纤维化相关蛋白的水平，在 HBV 相关肝纤维化进程中起到启动子作用，Circ_MTM1 可能是临床 HBV 相关肝纤维化诊断和治疗重要的生物标志物，后续试验仍有待进一步开展。

基金项目

辽宁省大学生创新创业项目(X202210160026)。

参考文献

- [1] Pollicino, T. and Caminiti, G. (2021) HBV-Integration Studies in the Clinic: Role in the Natural History of Infection. *Viruses*, **13**, Article 368. <https://doi.org/10.3390/v13030368>
- [2] Lin, M.H., Li, H.Q., Zhu, L., Su, H.Y., Peng, L.S., Wang, C.Y., He, C.P., Liang, X.E. and Wang, Y. (2022) Liver Fibrosis in the Natural Course of Chronic Hepatitis B Viral Infection: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Digestive Diseases and Sciences*, **67**, 2608-2626. <https://doi.org/10.1007/s10620-021-07009-y>
- [3] Dawood, R.M., El-Meguid, M.A., Salum, G.M. and El Awady, M.K. (2020) Key Players of Hepatic Fibrosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **40**, 472-489. <https://doi.org/10.1089/jir.2020.0059>
- [4] Kisseleva, T. and Brenner, D. (2021) Molecular and Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis and Its Regression. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **18**, 151-166. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- [5] Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H.R., Soleymani Fard, S. and Ghaffari, S.H. (2019) An Overview of microRNAs: Biology, Functions, Therapeutics, and Analysis Methods. *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- [6] Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, **116**, 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- [7] Ingenito, F., Roscigno, G., Affinito, A., et al. (2019) The Role of Exo-miRNAs in Cancer: A Focus on Therapeutic and Diagnostic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article 4687. <https://doi.org/10.3390/ijms20194687>
- [8] Liu, Y.H., Liu, J.L., Wang, Z., Zhu, X.H., Chen, X.B. and Wang, M.Q. (2019) MiR-122-5p Suppresses Cell Proliferation, Migration and Invasion by Targeting SATB1 in Nasopharyngeal Carcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **23**, 622-629.
- [9] Li, D., Chen, J., Yun, C., Li, X. and Huang, Z. (2022) MiR-122-5p Regulates the Pathogenesis of Childhood Obesity by Targeting CPEB1. *Obesity Research & Clinical Practice*, **16**, 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2022.05.006>
- [10] Ren, P., Wu, N.A., Fu, S., Wang, W., Li, Q.I. and Cheng, Q. (2023) miR-122-5p Restrains Pancreatic Cancer Cell Growth and Causes Apoptosis by Negatively Regulating ASCT2. *Anticancer Research*, **43**, 4379-4388.

- <https://doi.org/10.21873/anticancerres.16634>
- [11] Zhang, L., Wang, Y., Sun, J., Ma, H. and Guo, C. (2019) LINC00205 Promotes Proliferation, Migration and Invasion of HCC Cells by Targeting miR-122-5p. *Pathology—Research and Practice*, **215**, Article ID: 152515. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152515>
- [12] Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., *et al.* (2013) Circular RNAs Are a Large Class of Animal RNAs with Regulatory Potency. *Nature*, **495**, 333-338. <https://doi.org/10.1038/nature11928>
- [13] Kristensen, L.S., Jakobsen, T., Hager, H. and Kjems, J. (2022) The Emerging Roles of circRNAs in Cancer and Oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **19**, 188-206. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00585-y>
- [14] Liu, Y., Wang, L. and Liu, W. (2022) Roles of circRNAs in the Tumorigenesis and Metastasis of HCC: A Mini Review. *Cancer Management and Research*, **14**, 1847-1856. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S362594>
- [15] 林树文. CircRPS16 通过 miR-876-5p 上调 SPINK1 的表达从而促进肝细胞肝癌的增殖和侵袭[D]: [博士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- [16] Huang, G., Liang, M., Liu, H., Huang, J., Li, P., Wang, C., Zhang, Y., Lin, Y. and Jiang, X. (2020) CircRNA Hsa_circRNA_104348 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression through Modulating miR-187-3p/RTKN2 Axis and Activating Wnt/ β -Catenin Pathway. *Cell Death & Disease*, **11**, Article No. 1065. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03276-1>
- [17] 田艳茹. miR-133b 与慢性乙型肝炎肝纤维化相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(4): 448-451.
- [18] 谢俊锋. CircRNA97 通过 miRNA-146b-5p/HIPK1 轴逆转肝纤维化的作用及机制研究[D]: [博士学位论文]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [19] 林嘉宜, 娄安妮, 李旭. 脂多糖刺激巨噬细胞分泌含 miR-155-5p 的外泌体促进肝星状细胞的活化及迁移[J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(6): 994-1001.
- [20] 王傲. MicroRNA-195-3p 通过抑制 PTEN 的表达促进肝星状细胞活化及肝纤维化的发展[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.
- [21] Zhang, L., Chen, Y., Zhang, L.J., Wang, M., Chang, D.L., Wan, W.W., Zhang, B.X., Zhang, W.G. and Chen, X.P. (2019) HBV Induces Different Responses of the Hepatocytes and Oval Cells during HBV-Related Hepatic Cirrhosis. *Cancer Letters*, **443**, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.11.020>
- [22] Verrier, E.R., Ligat, G., Heydmann, L., Doernbrack, K., Miller, J., Maglott-Roth, A., Jühling, F., El Saghire, H., Heuschkel, M.J., Fujiwara, N., Hsieh, S.Y., Hoshida, Y., Root, D.E., Felli, E., Pessaux, P., Mukherji, A., Mailly, L., Schuster, C., Brino, L., Nassal, M. and Baumert, T.F. (2022) Cell-Based cccDNA Reporter Assay Combined with Functional Genomics Identifies YBX1 as HBV cccDNA Host Factor and Antiviral Candidate Target. *Gut*, **72**, 1745-1757. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323665>
- [23] Martinez, M.G., Smekalova, E., Combe, E., Gregoire, F., Zoulim, F. and Testoni, B. (2022) Gene Editing Technologies to Target HBV cccDNA. *Viruses*, **14**, Article 2654. <https://doi.org/10.3390/v14122654>
- [24] Li, W., Yu, X., Chen, X., Wang, Z., Yin, M., Zhao, Z. and Zhu, C. (2021) HBV Induces Liver Fibrosis via the TGF- β 1/miR-21-5p Pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **21**, Article No. 169. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9600>
- [25] Ji, D., Chen, G.F., Wang, J.C., Ji, S.H., Wu, X.W., Lu, X.J., Chen, J.L. and Li, J.T. (2020) Hsa_circ_0070963 Inhibits Liver Fibrosis via Regulation of miR-223-3p and LEMD3. *Aging*, **12**, 1643-1655. <https://doi.org/10.18632/aging.102705>
- [26] 朱慧慧. 远端上游结合因子 FUBP1 靶向核心启动子调控 HBV 转录的分子机制研究[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 河南大学, 2023.
- [27] 郑晓桑, 欧启水, 刘灿. HBV 核心启动子的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2023, 41(5): 351-354.