

网络出版时间:2023-11-30 11:16:54 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231129.1026.010

miR-125b 对肝脏血管新生调控作用的实验研究

王佳慧¹, 郑洋¹, 汪磊¹, 黄艳青¹, 段雪琳², 刘艳芳², 赵铁建², 梁天坚¹

摘要 目的 探讨 miR-125b 对肝脏血管新生的调控作用, 为肝纤维化的防治提供新的靶点。方法 用 miR-125b 模拟物和抑制物对人肝窦内皮细胞进行转染, 而后使用 qRT-PCR 和 ELISA 检测血管内皮生长因子 (VEGF)、分化抗原簇 31 (CD31)、血管性血友病因子 (vWF)、IV 型胶原 (Collagen IV)、层粘连蛋白 (LN) 的 mRNA 和蛋白表达, 荧光探针检测一氧化氮 (NO) 的表达; 扫描电镜检测人肝窦内皮细胞表面窗孔的改变; 血管形成实验观察各组血管新生情况; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-125b 与 VEGF 的靶向关系。结果 qRT-PCR 和 ELISA 检测显示与阴性对照组相比, miR-125b 模拟物转染后 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 的 mRNA 和蛋白表达下降 ($P < 0.05$), 而 miR-125b 抑制物转染后 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 的 mRNA 和蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 荧光探针检测显示与阴性对照组相比, miR-125b 模拟物转染后 NO 平均荧光强度表达下降 ($P < 0.05$), 而 miR-125b 抑制物转染后 NO 平均荧光强度表达增加 ($P < 0.05$); 电镜检测发现与阴性对照组相比, miR-125b 模拟物转染后人肝窦内皮细胞表面窗孔数量增加 ($P < 0.05$), 而 miR-125b 抑制物转染后人肝窦内皮细胞表面窗孔数量下降 ($P < 0.05$); 血管形成实验检测显示与阴性对照组相比, miR-125b 模拟物转染后血管新生数量下降 ($P < 0.05$), 而 miR-125b 抑制物转染后血管新生数量增加 ($P < 0.05$); 双荧光素酶报告基因实验显示与阴性对照组相比, VEGF 野生型转染 miR-125b 模拟物相对荧光强度表达降低 ($P < 0.05$), 而 VEGF 突变型转染 miR-125b 模拟物相对荧光强度表达降低 ($P > 0.05$)。结论 miR-125b 能够抑制肝脏血管新生, 从而发挥抗肝纤维化的作用, 为慢性肝病防治和新药研发提供新的参考。

关键词 miR-125b; 血管新生; 肝纤维化; 血管内皮生长因

子; 肝窦内皮细胞

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2051-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.010

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是肝脏对慢性损伤的应答反应, 以细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 大量沉积为特征^[1]。当肝脏受到损伤, 肝窦内皮细胞 (hepatic sinusoid endothelial cell, HSEC) 表型会改变, 导致分化抗原簇 31 (cluster of differentiation 31, CD31)、血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 以及层粘连蛋白 (laminin, LN) 和 IV 型胶原 (type IV collagen, Collagen IV) 表达增多, 从而介导肝窦毛细血管化发生^[2]。肝窦毛细血管化可导致肝细胞损伤和肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化^[3]。活化的 HSC 可导致大量 ECM 生成促进肝纤维化的发生发展, 进一步表明肝窦毛细血管化是肝纤维化发生的重要病理事件。

miR-125b 通过调控 HSC 的凋亡, 减少 ECM 的沉积发挥抗肝纤维化作用^[4]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 可通过调节一氧化氮 (nitric oxide, NO) 介导血管新生^[5]。miR-125b 作为 VEGF 的上游分子, 可以影响其下游信号传导^[6]。目前围绕血管新生防治肝纤维化的药物研究, 因为缺少明确靶点而进展缓慢。该研究旨在探究 miR-125b 对肝脏血管新生的作用, 为肝纤维化提供新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 人肝窦内皮细胞 (HHSEC) (美国 ScienCellTM 公司, 货号: 5000), Lip2000 (上海赛默飞, 货号: 12566014), miR-125b 相关片段 (上海吉玛制药技术有限公司), TRIzol (美国 Ambion 公司, 货号: 15596-026), VEGF 抗体 (货号: ab52917), CD31 抗体 (货号: ab222783), vWF 抗体 (货号: ab174290), Collagen IV 抗体 (货号: ab6586), LN 抗体 (货号: ab154848), 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (货号: ab228530) 购自 Abcam 公司, 无血清培

2023-10-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82204755, 81960751); 广西自然科学基金 (编号: 2023GXNSFBA026274); 广西中医药大学青年基金 (编号: 2022MS024, 2022QN008); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院科研项目 (编号: 2022MS002, 2022MS008, 2022QJ001)

作者单位: 广西中医药大学¹ 赛恩斯新医药学院、² 基础医学院, 南宁 530222

作者简介: 王佳慧, 女, 讲师;

赵铁建, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 570041687@qq.com;

梁天坚, 男, 教授, 责任作者, E-mail: 593596134@qq.com

培养基(上海赛默飞,货号:12753018),PBS(北京索莱宝科技有限公司,货号:P1003),DAF-FMDA(上海碧云天公司,货号:S0019),多聚甲醛(国药集团,货号:80096618),Matrigel(北京索莱宝科技有限公司,货号:354277),NLRP3 野生型(wild type, wt)/突变型(mutant, mut)的荧光素酶报告基因质粒载体(上海 Genepharma 公司),Easy Pure miRNA Kit(北京全式金生物技术有限公司,货号:ER601-01-V2),ELISA 试剂(上海酶联生物科技有限公司,货号:ml064281; ml060878; ml023069; ml062947; ml028571)。RT-PCR 仪(美国赛默飞,型号:ABI QuantStudio6),扫描电镜(日本 HITACHI,型号:SU-8010),倒置显微镜(日本 OLYMPUS,型号:IX51),培养箱(上海赛默飞,型号:311)、临界点干燥器(美国 tousimis 公司,型号:Autosamdri-931)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 5% FBS 的 ECM 培养基进行 HHSEC 细胞培养,置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养,待细胞长至单层后用于实验。

1.2.2 细胞转染以及分组处理 取生长至单层的 HHSEC 细胞将其分为空白组、过表达组(mimics 组)、过表达对照组(mimics NC 组)、抑制组(inhibitor 组)、抑制对照组(inhibitor NC 组),随后进行转染。将细胞接种于 24 孔板上,第 2 天当细胞密度达到约 30% 时,进行 miRNA-125b mimics 和阴性对照转染。用无血清培养基将 miRNA-125b mimics 和阴性对照配成 miRNA-DMEM,终浓度为 20 nmol/L,轻轻震荡摇匀后在室温下孵育 5 min,同样配制浓度为 5 μl/ml 的 Lipofec-tamine™ 2000 试剂,轻轻震荡摇匀后在室温下孵育 5 min,随后将配制好的 miRNA-125b mimics 和阴性对照分别与 Lipofec-tamine™ 2000 混匀后在室温下孵育 20 s,使之形成 mimics-Lipo2000 混合物,将 100 μl mimics-Lipo2000 混合物加入到 24 板孔中,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 4~6 h,更换新鲜培养液,继续培养 24 h,以供后续实验使用。miRNA-125b inhibitor 和阴性对照转染方法与 mimics 相同,空白组全程使用 ECM 培养基进行培养,培养条件与其它四组相同。各组细胞用 100 μg/L 瘦素活化,培养 48 h,用于各项后续实验。

1.2.3 qRT-PCR 检测 miR-125b 和 U6、VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 和 β-actin mRNA 表达 将各组细胞按上述处理后,借助 TRIzol 试剂和 Easy Pure miRNA Kit 提取 RNA,用 mRNA 逆转录试剂盒

得到 cDNA,进行 PCR 扩增反应,反应条件:预变性 95 °C 10 min,变性 95 °C 15 s,退火/延伸 60 °C 1 min,共 40 个循环。用 miRNA 逆转录试剂盒操作完成高效加尾和合成第一链 cDNA,然后以 cDNA 为模板,进行扩增,反应条件为:95 °C 30 s,1 个循环;95 °C 5 s,60 °C 35 s,40 个循环。通过各目的基因片段的扩增曲线确定 Ct 值;以 β-actin、U6 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 法分析目标基因 mRNA 的相对表达量;用 qRT-PCR 检测相应分子的表达,miR-125b、U6、VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 和 β-actin 上下游引物及长度见表 1。实验重复 3 次。

表 1 引物序列表

基因名	引物序列(5'-3')	大小(bp)
miR-125b	上游:ACACTCCAGCTGGGTCCCTGAGACCC	189
	下游:CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCCA	
U6	上游:CGCTTCGGCAGCACATATAC	126
	下游:AAATATGGAACGCTTCACGA	
CD31	上游:TCCGATGATAACCACTGCAA	297
	下游:GTGGTGGAGTCTGGAGAGGA	
vWF	上游:GCTCTCTCTCTTACCCGGATG	256
	下游:ATACTCCTTGGCCTGATGGA	
Collagen IV	上游:GGGTGATTGTGGTGGCTCTG	175
	下游:CCTCGTGTCCCTTTCGTTCC	
LN	上游:GACCCGTTTCGGTTGTAAAT	279
	下游:GCCAGACTCCACCTCGTTA	
β-actin	上游:ATCACTATTGGCAACGACGGGTTTC	217
	下游:CAGCACTGTGTTGGCATAGAGGTC	

1.2.4 ELISA 检测 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 蛋白表达 将各组细胞按上述处理后,以 5 × 10³/ml 细胞密度接种至 96 孔板中,以离心半径 15 cm、1 000 r/min 离心 20 min,取上清液检测。按试剂盒说明书操作,在酶标仪 450 nm 波长下测量吸光度值,计算细胞上清液中 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV 及 LN 的含量。实验重复 3 次。定量的 ELISA 实验检测蛋白表达更能反映 miR-125b 的靶向作用。

1.2.5 荧光探针检测 NO 的表达 将各组细胞按上述处理后,接入 12 孔板爬片,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,去除细胞培养液,加入 1 ml 稀释好的 DAF-FMDA,37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min,用 PBS 洗涤细胞 3 次,以去除未进入细胞内的 DAF-FMDA,将爬好细胞的玻片浸入 4% 的多聚甲醛溶液中室温固定 25 min,随后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加 DAPI 避光孵育 5 min,PBST 5 min × 4 次洗去多余的 DAPI,用含抗荧光淬灭剂的封片液封

片,然后在荧光显微镜下观察采集图像,实验重复3次。

1.2.6 扫描电镜观察肝窦内皮细胞的结构 各组孵育的细胞爬片,2.5%的戊二醛固定2 h,0.1 mol/L磷酸缓冲液冲洗3次,1%鞣酸处理1 h,1%四氧化锇后固定1 h,磷酸盐缓冲液再次冲洗,梯度乙醇溶液脱水,之后用临界点干燥器对细胞标本进行临界点干燥,扫描电镜观察样品,每组选取随机选取3个视野。

1.2.7 血管形成实验检测血管新生数量 4℃融化Matrigel胶,按每100 μl均匀加至96孔细胞培养板底部,37℃孵育60 min,在40 min时取HHSEC,按照 5×10^4 /ml密度,接种于96孔细胞培养板,各组经过1.2.2项转染处理后,在倒置显微镜下观察管腔形成情况,每组选取随机选取3个视野。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-125b 与 VEGF 的靶向关系 按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书,将 VEGF 野生型(wild type, wt)/突变型载体(mutant, mut)和短链非编码 RNA-125b 模拟物(miR-125b mimic)转染入 HHSEC 细胞中,培养48 h后,3 500 r/min 离心2 min,小心吸取培养液弃去。PBS 洗涤细胞后,再加入细胞裂解液,在室温下震荡5~10 min,收集并在3 000 r/min 条件下离心5 min,取上清液进行检测,实验重复3次。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐时两组间比较用 t 检验,方差不齐用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后 miR-125b 的表达情况 细胞转染结束后,用 qRT-PCR 检测转染各组 miR-125b 的表达量,结果如图1所示。转染 miR-125b mimics 及 in-

hibitor 后,过表达组 miR-125b 的表达明显高于空白对照组($F = 4.617$, $P = 0.001$),同时明显高于 mimics NC 组($F = 3.321$, $P = 0.002$),而 inhibitor 组则没有检测到 miR-125b 表达,表明 inhibitor 对 miR-125b 表达具有较好的抑制作用。

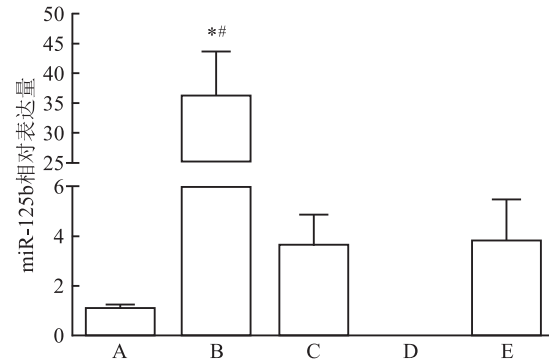


图1 转染后各组 miR-125b 表达情况

A: control 组; B: miR-125b mimics 组; C: miR-125b mimics NC 组; D: miR-125b inhibitor 组; E: miR-125b inhibitor NC 组; 与 control 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-125b mimics NC 组比较: # $P < 0.05$

2.2 miR-125b 对 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN mRNA 表达的作用 与阴性对照组相比, miR-125b mimics 转染后 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN mRNA 表达明显下降(均 $P < 0.05$); 而 miR-125b inhibitor 转染后 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN mRNA 表达明显增加(均 $P < 0.05$)。见表2。

2.3 miR-125b 对 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 蛋白表达的作用 ELISA 检测发现与阴性对照组相比, miR-125b mimics 转染后 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 蛋白表达明显降低(均 $P < 0.05$); 而 miR-125b inhibitor 转染后 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 蛋白表达明显增加(均 $P < 0.05$)。见表3。

表2 miR-125b 模拟物和抑制物对 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN mRNA 表达的比较($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	CD31	vWF	Collagen IV	LN
mimics	1.02 \pm 0.16 *	1.14 \pm 0.35 *	1.25 \pm 0.40 *	1.27 \pm 0.35 *	1.21 \pm 0.45 *
mimics NC	1.89 \pm 0.12	2.00 \pm 0.23	2.11 \pm 0.13	2.52 \pm 0.45	2.52 \pm 0.34
inhibitor	3.85 \pm 0.44 #	4.33 \pm 0.56 #	4.23 \pm 0.63 #	4.44 \pm 0.40 #	4.12 \pm 0.18 #
inhibitor NC	2.48 \pm 0.38	2.95 \pm 0.55	2.85 \pm 0.45	2.78 \pm 0.35	2.82 \pm 0.40
t^a	7.748	3.540	3.542	3.794	4.060
t^b	3.052	3.052	3.048	5.443	5.157

t^a : 与 mimics NC 比较的 t 值; t^b : 与 inhibitor NC 比较的 t 值; 与 mimics NC 比较: * $P < 0.05$; 与 inhibitor NC 比较: # $P < 0.05$

表3 miR-125b 模拟物和抑制物对 VEGF、CD31、vWF、Collagen IV、LN 蛋白表达的比较 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	CD31	vWF	Collagen IV	LN
Mimics	14.69 ± 2.21 *	3.85 ± 1.64 *	8.11 ± 2.33 *	5.89 ± 2.35 *	3.83 ± 1.76 *
mimics NC	22.80 ± 3.00	11.62 ± 3.59	15.89 ± 3.10	12.66 ± 1.96	10.76 ± 1.78
inhibitor	41.80 ± 4.55 #	20.11 ± 3.99 #	27.87 ± 3.36 #	31.95 ± 4.50 #	23.46 ± 3.94 #
Inhibitor NC	32.59 ± 2.71	12.96 ± 2.58	17.96 ± 3.83	19.11 ± 3.41	15.40 ± 2.74
t^a 值	3.769	3.414	3.469	3.831	4.799
t^b 值	2.951	2.892	3.378	3.940	2.913

t^a : 与 mimics NC 比较的 t 值; t^b : 与 inhibitor NC 比较的 t 值; 与 mimics NC 比较: * $P < 0.05$; 与 inhibitor NC 比较: # $P < 0.05$

2.4 miR-125b 对 NO 表达的作用 与阴性对照组相比, miR-125b mimics 转染后 NO 平均荧光强度表达下降 ($t = 5.176$, $P = 0.007$); 而 miR-125b inhibitor 转染后 NO 平均荧光强度表达增加 ($t = 3.752$, $P = 0.020$)。见图 2。

2.5 miR-125b 对肝窦内皮细胞表面窗孔数量的作用 与阴性对照组相比, miR-125b mimics 转染后肝窦内皮细胞表面窗孔的数增加 ($t = 6.897$, $P = 0.002$); 而 miR-125b inhibitor 转染后肝窦内皮细胞表面窗孔的数量下降 ($t = 3.001$, $P = 0.046$)。见图 3。

2.6 miR-125b 对血管新生的作用 与阴性对照组相比, miR-125b mimics 转染后血管新生的数量下降 ($t = 3.223$, $P = 0.032$); 而 miR-125b inhibitor 转染后血管新生的数量增加 ($t = 3.874$, $P = 0.018$)。见图 4。

2.7 miR-125b 对 VEGF 的靶向作用 相比于 NC mimics 组, VEGF-wt 和 miR-125b mimics 共转染明显降低 VEGF 的 3'UTR 区荧光酶活性 ($t = 7.148$, $P = 0.002$), 相比于 NC mimics 组, VEGF-mut 和 miR-125b mimics 共转染荧光酶活性差异不显著 ($t = 1.981$, $P = 0.119$)。表明 miR-125b mimics 通过直接靶向作用于 VEGF 的 3'UTR 区域, 抑制肝窦内皮细胞中 VEGF 的表达。见图 5。

3 讨论

HF 是慢性肝病的中间病理过程, 因此探究 HF 的分子机制具有重要意义^[7]。刘聪等^[8]认为肝脏血管新生与肝纤维化的关系密切, 实验证明肝纤维化中病理性血管新生以肝窦毛细血管化为特点, 并且发现其早于肝纤维化的形成。有研究^[9]表明抑制肝窦毛细血管化的形成, 可以抑制肝纤维化。同时发现失窗孔化的 HSEC 即肝窦毛细血管化的发生会加重 HSC 活化^[10]。

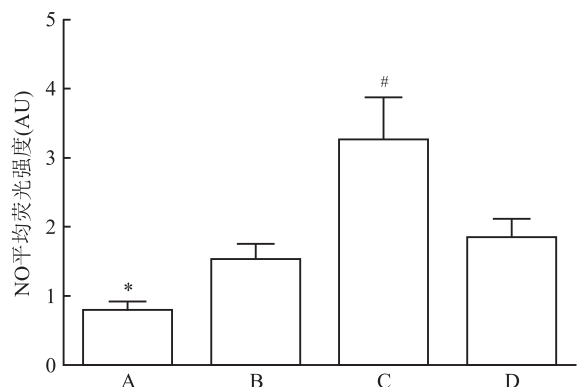
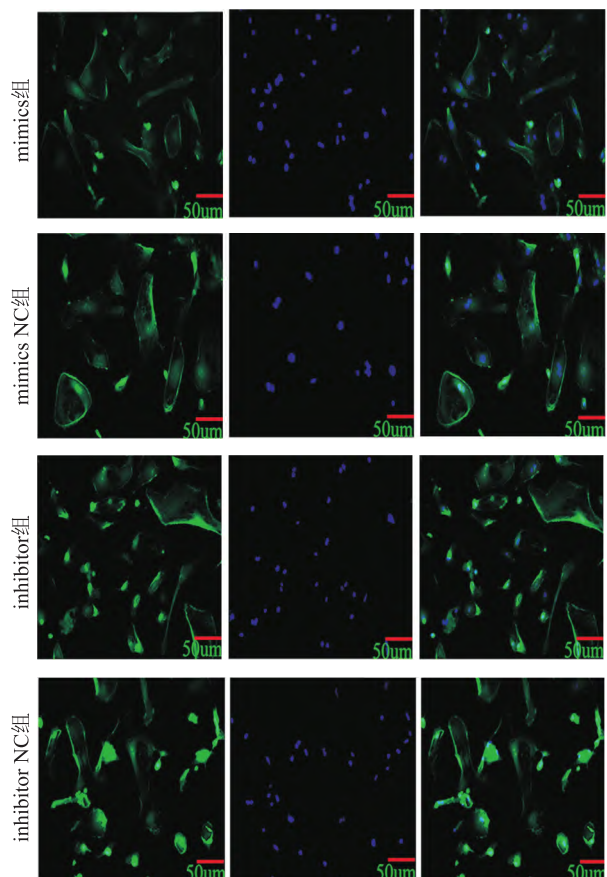


图2 miR-125b 模拟物和抑制物对肝窦内皮细胞 NO 表达的影响

A: miR-125b mimics 组; B: miR-125b mimics NC 组; C: miR-125b inhibitor 组; D: miR-125b inhibitor NC 组; 与 miR-125b mimics NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-125b inhibitor NC 组比较: # $P < 0.05$

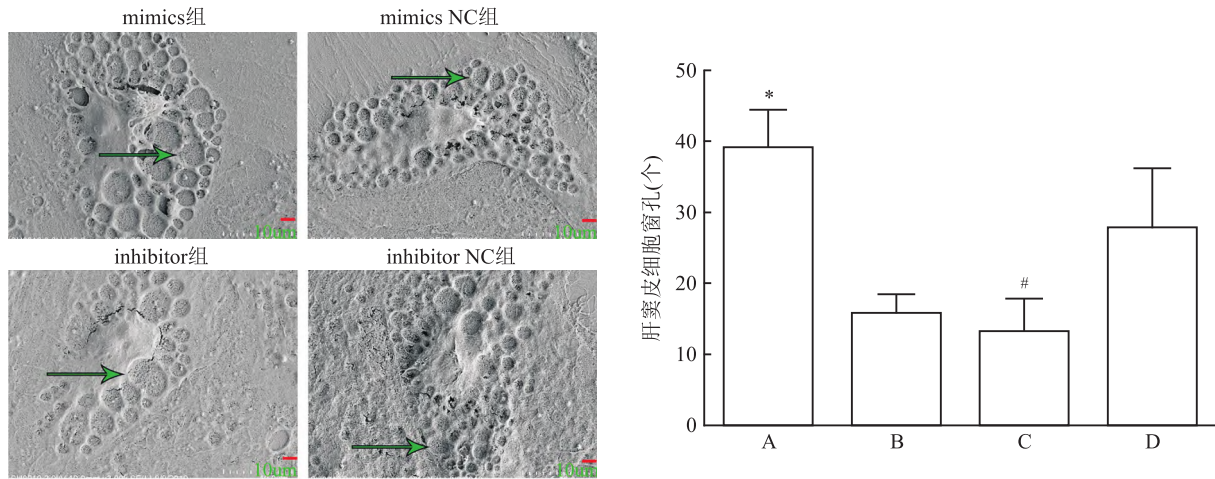


图3 miR-125b 模拟物和抑制物对肝窦内皮细胞窗孔数量的影响

A: miR-125b mimics 组; B: miR-125b mimics NC 组; C: miR-125b inhibitor 组; D: miR-125b inhibitor NC 组; 与 miR-125b mimics NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-125b inhibitor NC 组比较: # $P < 0.05$

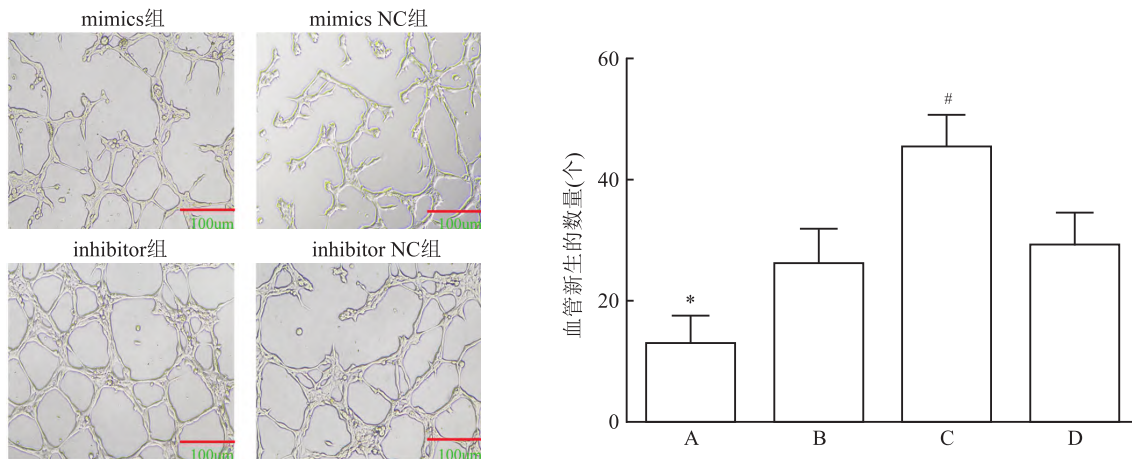


图4 miR-125b 模拟物和抑制物对血管新生数量的影响

A: miR-125b mimics 组; B: miR-125b mimics NC 组; C: miR-125b inhibitor 组; D: miR-125b inhibitor NC 组; 与 miR-125b mimics NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-125b inhibitor NC 组比较: # $P < 0.05$

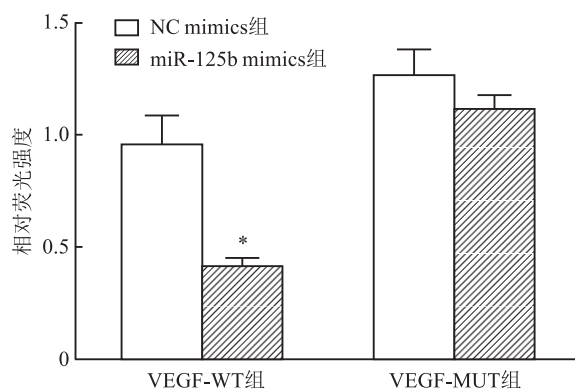


图5 双荧光素酶报告基因检测相对荧光强度

与 NC mimics 组比较: * $P < 0.05$

本研究成功构建 miR-125b 高表达和低表达的细胞模型。后续的 qRT-PCR 检测发现, miR-125b

mimics 可以抑制 *VEGF*、*CD31*、*vWF*、*Collagen IV* 和 *LN* 的 mRNA 表达, miR-125b inhibitor 可以增加 *VEGF*、*CD31*、*vWF*、*Collagen IV* 和 *LN* 的 mRNA 表达。ELISA 检测发现, miR-125b mimics 可以抑制 *VEGF*、*CD31*、*vWF*、*Collagen IV* 和 *LN* 的蛋白表达, miR-125b inhibitor 可以增加 *VEGF*、*CD31*、*vWF*、*Collagen IV* 和 *LN* 的蛋白表达。本研究双荧光素酶报告基因实验发现, miR-125b 可以结合 *VEGF* mRNA 的 3'UTR 区域, 调控其表达, 表明 miR-125b 可以通过靶向 *VEGF*, 从而影响内皮细胞标志物 *CD31* 和 *vWF* 以及连续性基底膜标志物 *Collagen IV* 和 *LN* 的表达。本研究荧光探针实验检测发现, miR-125b mimics 可以抑制 NO 的表达, miR-125b inhibitor 可以增加 NO 的

表达。研究^[11]表明 NO 可以通过血管舒张来调节血管生成因子,从而调节血管生成。血管新生与肝纤维化相促相伴,是肝纤维化重要的早期病变。本研究血管新生实验也发现,miR-125b mimics 可以抑制血管新生,miR-125b inhibitor 可以促进血管新生。表明 miR-125b 调控 NO 表达,可能是其介导血管新生的关键策略。本研究发现 miR-125b mimics 可以增加肝窦内皮细胞窗孔的数量,miR-125b inhibitor 可以减少肝窦内皮细胞窗孔的数量。研究^[12]显示肝细胞损伤可导致肝脏缺氧,使肝窦内皮细胞线粒体功能衰竭,细胞骨架塌陷,导致其失窗孔化发生。并且失窗孔化也促进了肝窦连续基底膜的形成,破坏了肝细胞和肝血窦之间营养物质的交换^[13]。有研究^[14]表明以血管生成与重构为靶点进行药物干预,可能成为抑制或逆转肝纤维化的有效策略。

参考文献

- [1] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. Cells, 2020, 9(4): 875.
- [2] 彭岳,赵铁建,韦燕飞,等.白花丹醌对 HSEC 细胞的肝窦毛细血管瘤化现象干预作用研究[J]. 中药材, 2021, 44(4): 980 - 4.
- [3] 王清兰,张风,雷扬,等.复肝丸调控 miR-424 表达抑制肝窦内皮细胞血管新生的体外研究[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(1): 68 - 73.
- [4] 王佳慧,汪磊,彭岳,等. MicroRNA-125b 对肝星状细胞增殖、凋亡以及胶原蛋白表达的作用[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(8): 1133 - 7.
- [5] Zheng Y, Wang J, Zhao T, et al. Modulation of the VEGF/AKT/

eNOS signaling pathway to regulate liver angiogenesis to explore the anti-hepatic fibrosis mechanism of curcumin[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114480.

- [6] Zhou S, Liang P, Zhang P, et al. The long noncoding RNA PDK1-AS/miR-125b-5p/VEGFA axis modulates human dermal microvascular endothelial cell and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis after thermal injury[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(4): 3129 - 42.
- [7] 张畦,安祯祥,何远利. 异甘草素对大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(4): 649 - 54.
- [8] 刘聪,王思哲,朱莹. 肝窦内皮细胞在肝纤维化发生发展中的作用及其机制[J]. 生理科学进展, 2020, 51(3): 183 - 6.
- [9] 许杰,刘艳,楼汪洲洋,等. 基于肝窦毛细血管瘤化探讨抗肝纤维化抗肝纤维化的作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(2): 319 - 23.
- [10] 陈高峰,麦静怡,陈澍,等. 黄芪汤对肝硬化大鼠胶原沉积和肝窦毛细血管瘤化标志物表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(16): 2205 - 10.
- [11] Machado M J C, Boardman R, Riu F, et al. Enhanced notch signaling modulates unproductive revascularization in response to nitric oxide-angiotensin signaling in a mouse model of peripheral ischemia[J]. Microcirculation, 2019, 26(6): e12549.
- [12] Yadav N, Jaber F L, Sharma Y, et al. Efficient reconstitution of hepatic microvasculature by endothelin receptor antagonism in liver sinusoidal endothelial cells[J]. Hum Gene Ther, 2019, 30(3): 365 - 77.
- [13] Zapotoczny B, Szafranska K, Kus E, et al. Tracking fenestrae dynamics in live murine liver sinusoidal endothelial cells[J]. Hepatology, 2019, 69(2): 876 - 88.
- [14] Li H. Angiogenesis in the progression from liver fibrosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(3): 217 - 33.

Experimental study on the regulatory effect of miR-125b on hepatic angiogenesis

Wang Jiahui¹, Zheng Yang¹, Wang Lei¹, Huang Yanqing¹, Duan Xuelin²,
Liu Yanfang², Zhao Tiejian², Liang Tianjian¹

(¹Faculty of Chinese Medicine Science, ²School of Basic Medicine,
Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222)

Abstract Objective To investigate the role of miR-125b on hepatic angiogenesis, with the hope of providing new targets for the prevention and treatment of liver fibrosis. **Methods** The human hepatic sinusoidal endothelial cells were transfected with miR-125b mimics and inhibitors, and the mRNA and protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), cluster of differentiation antigens 31 (CD31), von Willebrand factor (vWF), collagen IV, and laminin (LN) were detected by qRT-PCR and ELISA, and the expression of nitric oxide (NO) was detected by fluorescent probe, scanning electron microscopy detected the alteration of the window holes on the surface of human hepatic sinusoidal endothelial cells, angiogenesis assay was performed to observe the neovascularization of

each group, and dual luciferase reporter gene assay was performed to validate the targeting relationship between miR-125b and VEGF. **Results** qRT-PCR and ELISA showed that compared with the negative control group, the mRNA and protein expressions of VEGF, CD31, vWF, Collagen IV, and LN significantly decreased after miR-125b mimic transfection ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expressions of VEGF, CD31, vWF, Collagen IV, and LN were significantly increased after transfection with miR-125b mimics ($P < 0.05$); fluorescent probe detection showed that compared with the negative control group, the average fluorescence of intensity expression NO decreased significantly ($P < 0.05$), while the average fluorescence intensity expression of NO increased significantly after miR-125b inhibitor transfection ($P < 0.05$); the number of fenestrations on the surface of human liver sinusoidal endothelial cells significantly increased after miR-125b mimic transfection ($P < 0.05$), while the number of fenestrations on the surface of human liver sinusoidal endothelial cells decreased significantly after miR-125b inhibitor transfection ($P < 0.05$); angiogenesis assay showed that compared with the negative control group, the number of angiogenesis significantly decreased after miR-125b mimic transfection ($P < 0.05$), while the number of angiogenesis significantly increased after miR-125b inhibitor transfection ($P < 0.05$); dual luciferase reporter gene assay showed that compared with negative control group, the expression of relative fluorescence intensity after transfection of miR-125b mimics in VEGF wild-type significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression of relative fluorescence intensity after transfection of miR-125b mimics in VEGF mutant significantly decreased ($P > 0.05$). **Conclusion** miR-125b can inhibit liver angiogenesis and thus play an anti-fibrosis role, which can provide a new reference for the prevention and treatment of chronic liver disease and the development of new drugs.

Key words miR-125b; angiogenesis; liver fibrosis; VEGF; hepatic sinusoid endothelial cell

(上接第 2050 页)

and Western blot to determine the optimal time of hypoxia induction. A549 cells were divided into 5 groups: control group, hypoxia group, hypoxia + ROS inhibitor n-acetylcysteine (NAC) group, hypoxia + (SIRT3 overexpression) SIRT3-OE group and hypoxia + SIRT3-OE + NAC group. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The mRNA and protein expressions of HIF-1 α and SIRT3 in each group were detected by RT-PCR and Western blot. ROS content in each group was detected by flow cytometry. The contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in the cells of each group were detected by biochemical kits. **Results** The optimal induction time of hypoxia was 24 h. Compared with the control group, the apoptosis rate, SIRT3 mRNA and protein levels, SOD and GSH contents in the hypoxia group significantly decreased ($P < 0.01$), the cell proliferation ability, HIF-1 α mRNA and protein levels, ROS and MDA content in cells significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the hypoxia group, the apoptosis rate, SIRT3 mRNA and protein levels, SOD and GSH contents in the hypoxia + NAC and hypoxia + SIRT3-OE groups increased ($P < 0.05$), the cell proliferation ability, HIF-1 α mRNA and protein levels, ROS and MDA content in cells decreased ($P < 0.05$). Compared with the hypoxia + NAC group, the apoptosis rate, SIRT3 mRNA and protein levels, SOD and GSH contents in the hypoxia + SIRT3-OE + NAC group significantly increased ($P < 0.01$), the cell proliferation ability, HIF-1 α mRNA and protein levels, ROS and MDA content in cells significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Under hypoxic conditions, SIRT3 can promote cell apoptosis and inhibit lung cancer progression by mediating ROS to inhibit oxidative stress response and HIF-1 α expression in lung cancer cells.

Key words sirtuin 3; lung cancer; oxidative stress; reactive oxygen species; hypoxia inducible factor-1 α