

AKT3 逆转 miR-22-3p/29a-3p 对 LX-2 细胞活化的协同抑制作用

张荣花¹, 张亚楠¹, 韩向阳¹, 崔笑妍¹, 田晓丽², 章广玲³, 刘志勇⁴

摘要 目的 探讨丝氨酸/苏氨酸激酶 3 (AKT3) 能否逆转 miR-22-3p/29a-3p 对人肝星状细胞 LX-2 活化的协同抑制作用。方法 利用 TargetScan、Starbase、miRDB 和 DIANA 预测 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因, 对筛选出的靶基因进行 KEGG、GO 和蛋白-蛋白互作 (PPI) 分析; RNAhybrid 分析候选靶基因与两个 miRNAs 结合的自由能, 并通过双萤光素酶报告实验确定它们的靶向关系; 采用 CCK-8、Transwell 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 LX-2 细胞增殖、迁移以及纤维化标志物的表达。结果 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因有 24 个, 且它们富集在与肝纤维化相关的信号通路和生物学过程; 候选靶基因 AKT3 与 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的结合自由能分析结合双萤光素酶实验结果提示 AKT3 是 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因; miR-22-3p 和 miR-29a-3p mimics 能够单独或协同抑制 LX-2 细胞的增殖、迁移以及纤维化标志物 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 I 型胶原 $\alpha 1$ 链 (COL1A1) mRNA 的表达 ($P < 0.05$), AKT3 过表达后能够逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p mimics 对 LX-2 细胞的上述协同抑制作用 ($P < 0.05$)。结论

AKT3 过表达可逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞活化的协同抑制作用。

关键词 LX-2; 丝氨酸/苏氨酸激酶 3; miR-22-3p; miR-29a-3p; 增殖; 迁移

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1132-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.012

2023-05-04 接收

基金项目: 河北省自然科学基金 (编号: H2021209026); 河北省人力资源和社会保障厅项目 (编号: C20210340); 河北省省级科技计划 (编号: 213777115D); 河北省财政厅项目 (编号: 冀财预复[2020]397 号)

作者单位: ¹ 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 唐山 063210

² 唐山市截瘫疗养院, 唐山 063000

³ 华北理工大学临床医学院, 河北省医工融合精准医疗重点实验室, 唐山 063000

⁴ 华北理工大学医学部, 唐山 063210

作者简介: 张荣花, 女, 硕士, 实验师;

章广玲, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhanggl@ncst.edu.cn;

刘志勇, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: macromicro@126.com

肝纤维化是一种病理性修复反应, 针对肝脏损伤所产生, 其主要特征是肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 活化, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积, 慢性肝损伤可发展为肝硬化, 最终发展为肝癌^[1]。越来越多的 miRNAs 参与到 HSCs 的增殖、上皮间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT)、炎症和凋亡等生物学功能, 调控肝纤维化。丝氨酸/苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 是由 AKT1、AKT2 和 AKT3 组成的蛋白激酶家族的创始成员, 又称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 调节不同的细胞功能, 并在许多癌症中发挥重要作用^[2], miR-433 通过下调靶基因 AKT3 抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖^[3]。课题组前期研究^[4]显示 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 在胆总管结扎诱导的胆汁淤积性肝纤维化大鼠肝脏和活化的肝星状细胞 LX-2 中低表达, 但是 AKT3 作为 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的功能靶基因以及 AKT3 在肝纤维化发生发展过程中的具体机制仍未被完全阐明。该研究探讨过表达 AKT3 能否逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞活化的协同抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 人肝星状细胞 LX-2 购自武汉普诺赛生物有限公司; DMEM 高糖培养基购自北京 EallBio 公司; TRIzol、LipofectamineTM 2000、三氯甲烷购自美国 Thermo 公司; 反转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒购自北京聚合美生物科技有限公司; 新快速 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自庄盟生物有限公司; AKT3 兔单克隆抗体购自美国 Affinity 公司; CCK-8 试剂盒、结晶紫染液、双萤光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Transwell 小室购自美国康宁公司; miRNA mimics/NC 购自天津中实同创有限公司; pcDNA3.1、pcDNA3.1-AKT3 购自通用生物 (安徽) 股份有限公司。

1.1.2 主要仪器 CO₂ 培养箱 (型号: BPN-80CH) 购自上海一恒科学仪器有限公司, 生物安全柜 (型号: AC2-4S1) 购自艺斯高 (上海) 贸易有限公司; 垂

直电泳槽(型号:JY-SCZ2+)购自北京君意东方电泳设备有限公司,电泳仪电源(型号:DYY-6C)、转印电泳系统(型号:DYY-TC-DYCP-40D)购自北京六一科技有限公司,核酸蛋白检测仪(型号:Nanodrop 2000)、实时荧光定量 PCR 仪(型号:StepOnePlusA-BI)购自美国 Thermo 公司;倒置荧光显微镜(型号:CKX53)购自日本 Olympus 公司。

1.2 生物信息学分析 利用 TargetScan、Starbase、miRDB 和 DIANA 数据库预测 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因,并用 TargetScan 预测两个 miRNAs 与靶基因的结合位点,RNAhybrid 分析计算 miRNAs 和靶基因的结合自由能。将获得的共同靶基因在仙桃学术网站上进行基因本体(gene ontology, GO)功能与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia genes and genomes,KEGG)信号通路分析。

1.3 细胞培养与转染 LX-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中,培养环境为 37 ℃、5% CO₂。用 Lipofectamine™ 2000 试剂将 mimics NC、miR-22-3p mimics、miR-29a-3p mimics、miR-22-3p + miR-29a-3p mimics、pcDNA3.1 空载质粒、pcDNA3.1-AKT3 过表达质粒分别或共同转染 LX-2 细胞,转染 24 h 后进行后续实验。

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验 使用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA,利用反转录试剂盒逆转录为 cDNA,qRT-PCR 检测目的基因的表达水平,反应条件为 95 ℃、30 s,循环数为 1;95 ℃、5 s,60 ℃、34 s,循环数为 40。采用 2^{-ΔΔCt} 的方法计算基因的相对表达量,GAPDH 作为 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、I 型胶原 α1 链(type I collagen α1 chain, COL1A1)和 AKT3 表达的内参,U6 作为 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 表达的内参,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'→3')
miR-22-3p	F: CAAGCTGCCACTTGAAGAAGCTGT
miR-29a-3p	F: CCCTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACATA
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT R: GAAGGCTGGGGCTCATTT
α-SMA	F: CATGAAGTGTGACATCGACATC R: TGATCTTGATCTTCATGGTGCT
AKT3	F: AGATGCAGCCACCATGAAGACATTTC R: GTCTACTGCTCGGCCATAGTCATTATC
COL1A1	F: AAAGATGGACTCAACGGTCTC R: CATCGTGAGCCTTCTCTTGAG

1.5 双荧光素酶报告实验 共转染实验分组如下:质粒 1 + mimics NC、质粒 1 + miR-22-3p mimics、质粒 1 + miR-29a-3p mimics、质粒 2 + mimics NC、质粒 2 + miR-22-3p mimics、质粒 2 + miR-29a-3p mimics、质粒 3 + mimics NC、质粒 3 + miR-22-3p mimics、质粒 3 + miR-29a-3p mimics、质粒 4 + mimics NC、质粒 4 + miR-22-3p mimics、质粒 4 + miR-29a-3p mimics。24 孔细胞培养板中每孔质粒转染量为 200 ng,miR-22-3p/miR-29a-3p mimics 或 mimics NC 转染终浓度为 40 nmol/L,每组 3 个复孔。转染 48 h 后按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书裂解细胞,加入 200 μl 裂解液裂解后,12 000 r/min 离心 5 min,每孔取上清液 20 μl,加入到避光的 96 孔板中。然后加入 100 μl 萤火虫荧光素酶试剂,测定荧光强度(relative light unit, RLU),再加入 100 μl 海肾荧光素酶试剂,测定 RLU,计算二者比值。

1.6 Western blot 实验 细胞用 RIPA 裂解液裂解后用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定,然后用 SDS-PAGE 进行电泳,湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上,接着用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。一抗(AKT3, ab 2839860, 1:3 000; GAPDH, ab 9485, 1:5 000)4 ℃ 孵育过夜后,TBST 洗膜 4 次,每次 10 min;二抗(ab 6721, 1:5 000)室温摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 4 次。最后经显影仪成像并使用 Image J 软件识别条带灰度进行分析。

1.7 CCK-8 实验 实验分组为:mimics NC + pcDNA3.1 组、miR-22-3p mimics + pcDNA3.1 组、miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组、miR-22-3p + miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组、mimics NC + pcDNA3.1-AKT3 组、miR-22-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 组、miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 组、miR-22-3p + miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 组。将 miRNAs mimics 和 pcDNA3.1-AKT3 质粒共转染 LX-2 细胞,使每孔 miRNAs mimics 或 NC 的终浓度是 50 nmol/L,每孔质粒总质量是 2 μg。各组转染 24 h 后细胞用胰酶消化后接种至 96 孔细胞培养板,每孔 2 000 个细胞。在培养 24、48、72、96 h 时,分别向各孔中加入 10 μl CCK-8 试剂和 100 μl 无双抗培养基的混合液,孵育 2 h 后在 450 nm 波长条件下测定细胞的吸光度值,实验独立重复 3 次,计算不同培养时间各组光密度(optical density, OD)值的平均值和标准差。

1.8 Transwell 实验 转染后的细胞按 5 × 10⁴ 个/孔的密度接种于 Transwell 小室的上室并加入无血

清 DMEM 培养基, 下室加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基。培养 24 h 后终止培养, 弃去上室培养液并用棉签擦净, 结晶紫染色 10 min 后倒置显微镜下观察细胞迁移情况, 随机选取视野拍照并用 Image J 软件计数各组细胞迁移数, 将对照组细胞迁移数标准化为 1。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计学软件对实验数据进行分析, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。呈正态分布的数据以平均值 \pm 标准差表示, 实验独立重复 3 次, 两组间的差异比较采用双尾 t 检验, 多组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 靶基因的筛选及其 KEGG 和 GO 功能分析

通过 TargetScan、Starbase、miRDB 和 DIANA 预测 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因, 共筛选出 24 个共同靶基因 (图 1A)。然后对筛选出的 24 个共同靶基因进行 KEGG 和 GO 功能分析, KEGG 通路分析及富集分类结果显示, 这些共同靶基因与

PI3K-AKT、Ras、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin kinase, mTOR) 等信号通路相关 (图 1B、1C)。GO 分析结果显示, 在生物过程方面, 主要富集在细胞分化、衰老调控、细胞分解代谢、氧化应激反应等; 在细胞组分方面, 主要富集在上皮细胞增殖、平滑肌细胞分化等 (图 1D)。

2.2 靶基因的蛋白互作分析 STRING 网站对 24 个靶基因进行蛋白-蛋白互作 (PPI) 分析, 其中 8 个蛋白具有相互作用, 且磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN)、神经母细胞瘤鼠肉瘤同系物 (NRAS)、AKT3 为排名靠前的 3 个蛋白, 见图 2A, 图中圆圈代表节点, 节点越大则介数中心度越大, 边的粗细代表连接评分, 边越粗, 蛋白间的互作关系越强。通过文献查找、研究现状、miRNAs 靶点评分、保守性分析等多方面的评估, 初步确定 AKT3 为共同候选靶基因。AKT3 的 PPI 分析结果显示其与 mTOR、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK3B) 等蛋白存在相互作用关系 (图 2B)。

2.3 miR-22-3p 和 miR-29a-3p mimics 转染有效性检测 qRT-PCR 法检测 miR-22-3p 和 miR-29a-3p

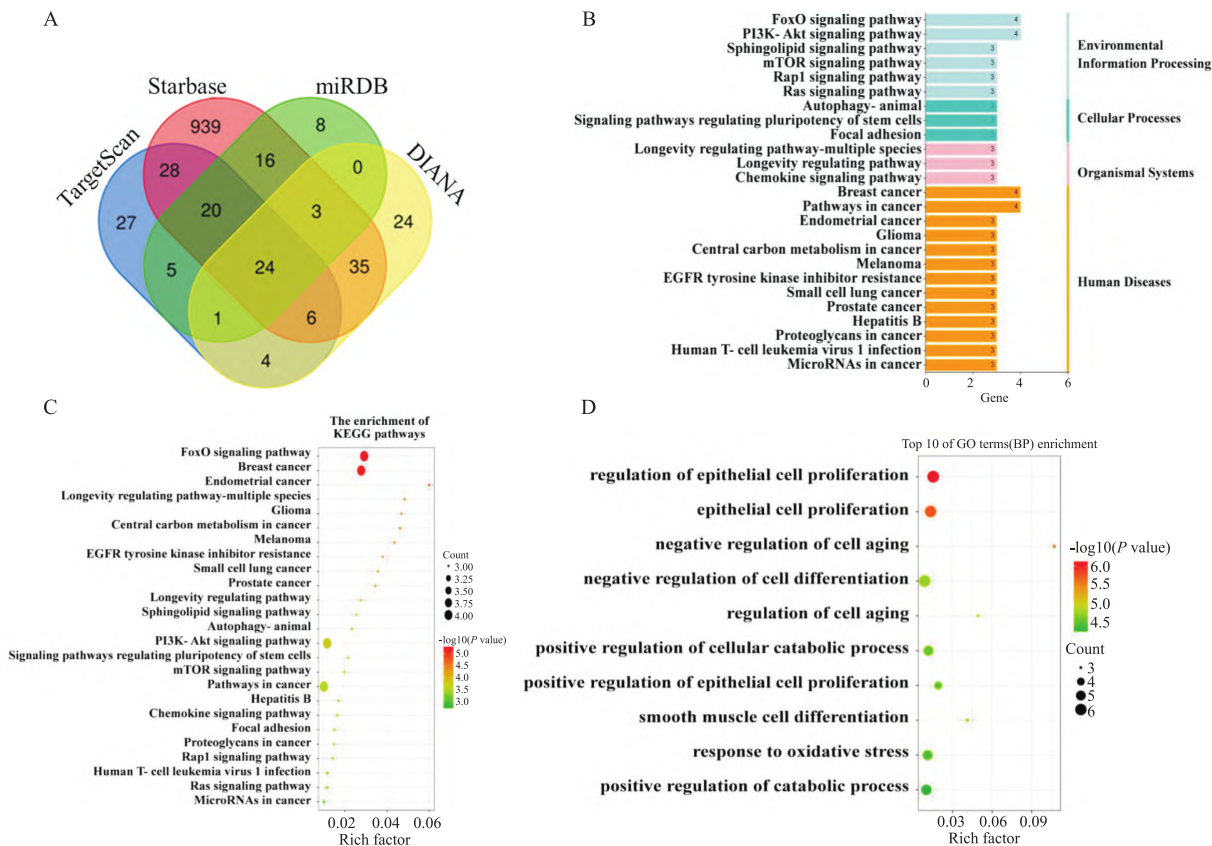


图 1 生物信息学网站筛选并分析 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因

A: 生物信息学网站分析 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因; B: 靶基因的 KEGG 通路富集分析; C: 靶基因的 KEGG 通路分析; D: 靶基因的 GO 功能分析

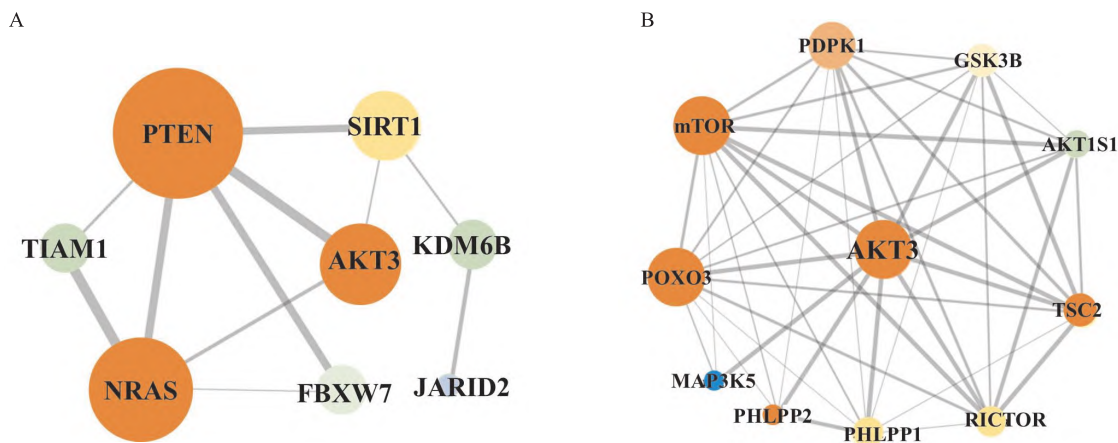


图2 靶基因的蛋白互作网络分析

A:候选靶基因的 PPI 分析;B:AKT3 的 PPI 分析

在 LX-2 细胞中的表达水平。与对照组相比,miR-22-3p mimics 组 miR-22-3p 表达水平明显升高,其相对表达量为 42.72 ± 3.77 ($t = 19.16, P < 0.0001$); miR-29a-3p mimics 组 miR-29a-3p 表达水平明显升高,其相对表达量为 53.09 ± 6.02 ($t = 14.97, P = 0.0001$)。以上结果提示这两个 miRNAs 的 mimics 可有效升高 LX-2 细胞中相应 miRNA 的水平。

2.4 AKT3 是 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶基因 TargetScan 查找并绘制 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 与 AKT3 的结合位点图(图 3A),RNAhybrid 数据库查找分析 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 与 AKT3 之间的最小配对结合自由能(MFE)分别为 -106.3 、 -93.8 kJ/mol,提示均具有序列结合的可能性(图 3B)。双萤光素酶报告实验结果(图 3C)提示,质粒 1 含有 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的结合位点,分别与 miR-22-3p 或 miR-29a-3p mimics 共转染后,萤光素酶活性均显著降低,差异有统计学意义($F = 310.9, P < 0.0001$)。质粒 2 突变 miR-22-3p 结合位点,含有 miR-29a-3p 结合位点,与 miR-22-3p mimics 共转染后,其萤光素酶活性差异无统计学意义($t = 0.867, P = 0.43$),而与 miR-29a-3p mimics 共转染后,其萤光素酶活性降低,差异有统计学意义($t = 20.05, P < 0.0001$)。质粒 3 含有 miR-22-3p 的结合位点,突变 miR-29a-3p 结合位点,与 miR-22-3p mimics 共转染后,其萤光素酶活性降低,差异有统计学意义($t = 27.20, P < 0.0001$),而与 miR-29a-3p mimics 共转染后,其萤光素酶活性差异无统计学意义($t = 1.01, P = 0.37$)。质粒 4 均突变 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的结合位点,当与 miR-22-3p 或 miR-29a-3p mimics 共转染后,萤光素酶活性差异均无统

计学意义($F = 2.75, P = 0.14$)。以上结果表明 AKT3 是 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 共同的靶基因。

2.5 pcDNA3.1-AKT3 质粒转染有效性检测

qRT-PCR 和 Western blot 实验检测各组细胞中 AKT3 mRNA 和蛋白的表达水平。pcDNA3.1-AKT3 质粒转染 LX-2 细胞后,与 pcDNA3.1 组相比,细胞中 AKT3 mRNA 的相对表达量是 15880 ± 1641 ($t = 16.76, P < 0.0001$),蛋白的相对表达量是 1.48 ± 0.21 ($t = 3.09, P = 0.03$),见图 4。以上结果提示 LX-2 细胞中转染 pcDNA3.1-AKT3 后可有效升高细胞中 AKT3 的 mRNA 和蛋白表达水平。

2.6 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞增殖的协同抑制作用 CCK-8 实验结果(图 5)提示,在转染后的 24、48、72、96 h,miR-22-3p 和 miR-29a-3p mimics 不仅可以单独抑制 LX-2 细胞的增殖,二者的半剂量组合也可以协同抑制 LX-2 细胞的增殖;当 pcDNA3.1-AKT3 质粒与两个 miRNAs mimics 共转染时,两个 miRNAs mimics 对细胞增殖产生的抑制作用可以被部分逆转,差异有统计学意义($F_{24h} = 229.4, F_{48h} = 153.4, F_{72h} = 89.5, F_{96h} = 78.7, P < 0.0001$),即 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞增殖的协同抑制作用。

2.7 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞迁移的协同抑制作用 Transwell 实验结果(图 6)所示,miR-22-3p 和 miR-29a-3p mimics 能够抑制 LX-2 细胞的迁移能力,且二者的半剂量组合可协同抑制 LX-2 细胞的迁移能力,pcDNA3.1-AKT3 与两个 miRNAs 共转染后,两个 mimics 对 LX-2 细胞迁移的抑制作用被部分逆转,差异有统计学意

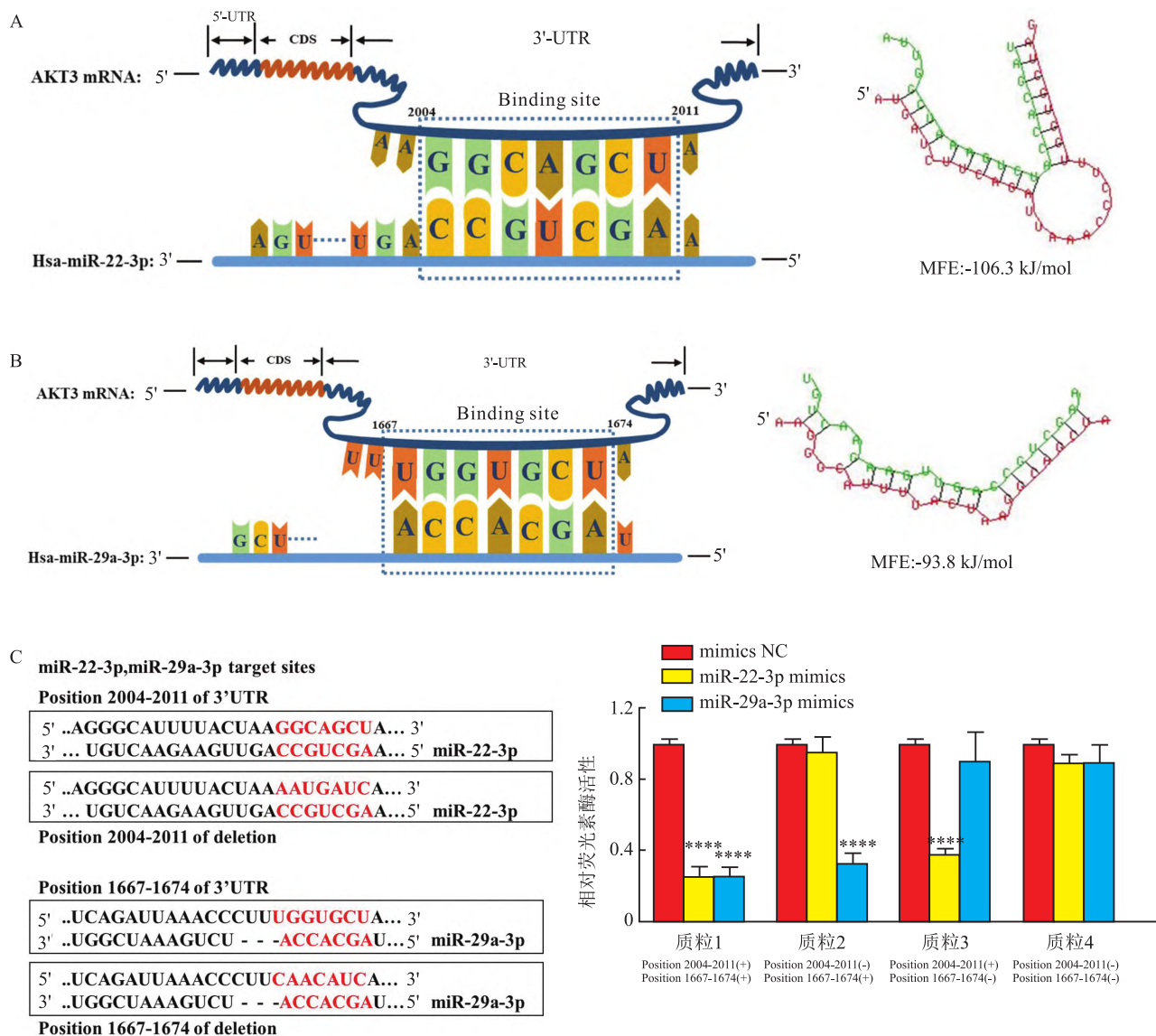


图3 AKT3 是 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 的共同靶点

A: miR-22-3p 与 AKT3 3'UTR 的结合位点及 MFE; B: miR-29a-3p 与 AKT3 3'UTR 的结合位点及 MFE; C: 双萤光素酶报告基因分析两个 miRNAs 与 AKT3 3'UTR 的靶向作用; 与 mimics NC 组比较: **** $P < 0.0001$

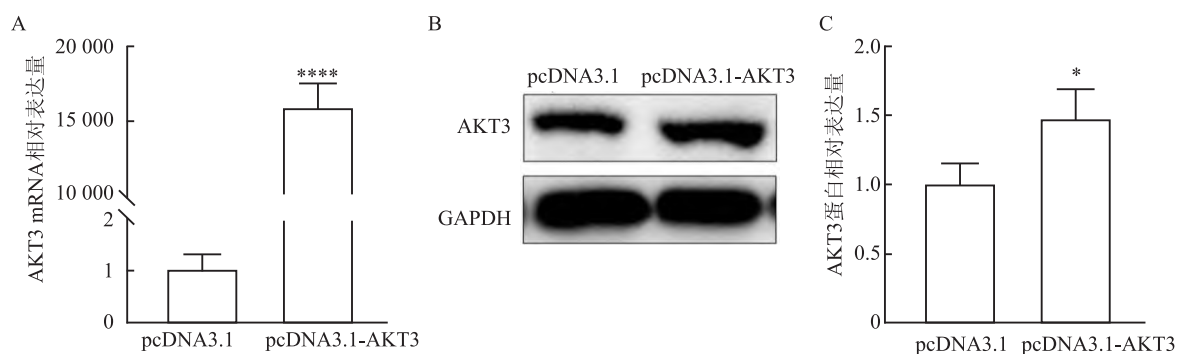


图4 pcDNA3.1-AKT3 质粒转染有效性检测

A: LX-2 细胞中 AKT3 mRNA 表达; B: LX-2 细胞中 AKT3 蛋白表达; C: 蛋白表达量化结果; 与 pcDNA3.1 组比较: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$

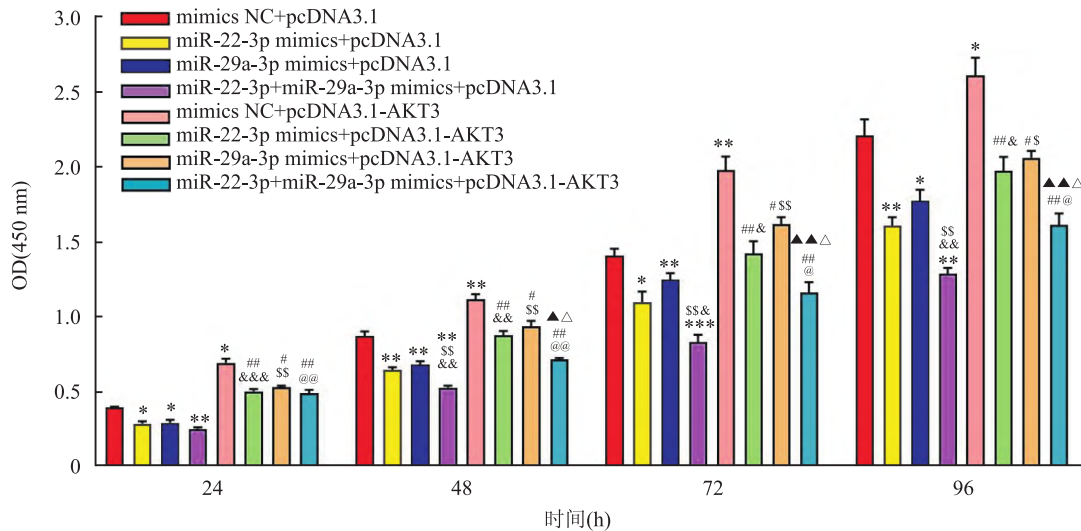


图5 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞增殖的协同抑制作用

与 mimics NC + pcDNA3.1 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 mimics NC + pcDNA3.1-AKT3 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 miR-22-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$; 与 miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$; 与 miR-22-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 组比较: △ $P < 0.05$; 与 miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 组比较: ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 miR-22-3p + miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$

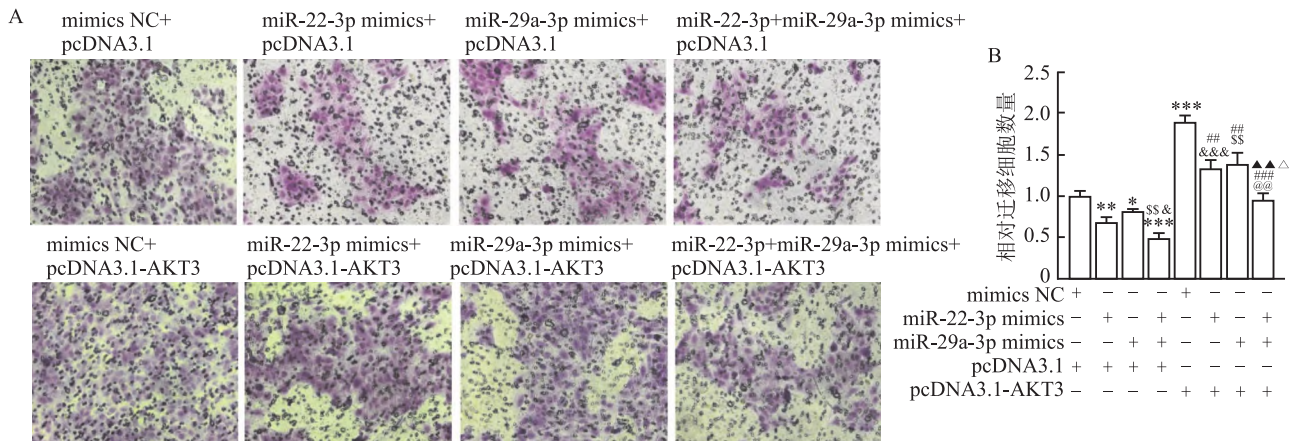


图6 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞迁移的协同抑制作用

A: 各组细胞迁移情况 $\times 100$; B: 细胞迁移数量量化结果; 与 mimics NC + pcDNA3.1 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 mimics NC + pcDNA3.1-AKT3 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 miR-22-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.001$; 与 miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: \$ $P < 0.01$; 与 miR-22-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 组比较: △ $P < 0.05$; 与 miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 组比较: ▲▲ $P < 0.01$; 与 miR-22-3p + miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: @@ $P < 0.01$

义 ($F = 95.17$, $P < 0.0001$), 即 AKT3 过表达可以逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞迁移的协同抑制作用。

2.8 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞中纤维化标志物表达的协同抑制作用

qRT-PCR 结果显示, miR-22-3p 和 miR-29a-3p 能够单独或协同抑制纤维化标志物 α -SMA ($F = 41.54$, $P < 0.0001$) 和 COL1A1 ($F = 77.34$, $P < 0.0001$) 的 mRNA 表达, pcDNA3.1-AKT3 与两个

miRNAs 共转染后, LX-2 细胞中的 α -SMA 和 COL1A1 的 mRNA 表达水平降低可被 AKT3 过表达而逆转, 差异有统计学意义, 即 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞中纤维化标志物表达的协同抑制作用, 见图 7。

3 讨论

miRNAs 生物学的一个重要特征就是单个 miRNA 可以靶向数百个 mRNAs, 从而调节整个蛋白

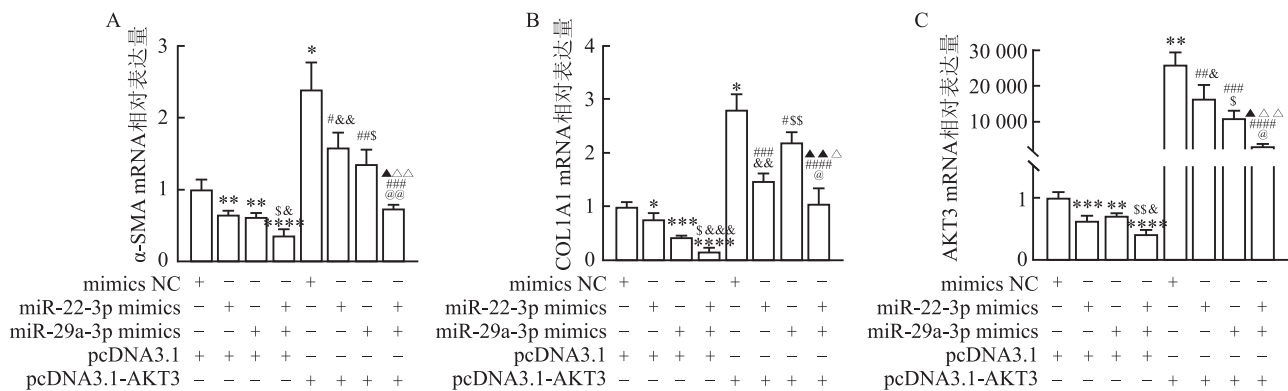


图7 AKT3 过表达逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 中纤维化标志物表达的协同抑制作用

A: α-SMA mRNA 相对表达量; B: COL1A1 mRNA 相对表达量; C: AKT3 mRNA 相对表达量; 与 mimics NC + pcDNA3.1 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 mimics NC + pcDNA3.1-AKT3 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$; 与 miR-22-3p mimics + pcDNA3.1 比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$; 与 miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$; 与 miR-22-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 比较: Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$; 与 miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1-AKT3 比较: ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 miR-22-3p + miR-29a-3p mimics + pcDNA3.1 组比较: @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$

质表达网络,一个 mRNA 可以被多个 miRNAs 靶向^[5]。与这些特性相关的主要后果有两个,一是多个 miRNAs 和其他因素可能会竞争特定 mRNAs 上的结合位点;二是特定 miRNAs 靶标在不同细胞中的定位可以影响 miRNAs 和特定 mRNAs 之间的预期相互作用。关于两个或多个 miRNAs 通过靶基因对疾病的作用,已有研究^[6]表明,miR-140e-5p 和 miR-146a 的协同作用通过靶向 Toll 样受体 4/核因子-κB (TLR4/NF-κB) 信号传导对骨关节炎软骨细胞中炎症介质的产生具有很强的保护作用。circ-ERBIN 通过靶向 miR-125a-5p 和 miR-138-5p 促进结直肠癌细胞的增殖、侵袭、血管生成和转移,从而协同增加 eIF4E 结合蛋白 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, 4EBP-1) 的表达增强缺氧诱导因子-1α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF-1α) 表达^[7]。

miRNAs 与靶基因的相关研究中,挽救实验是进一步验证二者之间靶定关系和调控作用的重要实验。过表达 miR-1297 或敲低自噬启动激酶 1 (ULK1) 后可下调心肌纤维化小鼠原代心肌成纤维细胞中 COL1A1 和 α-SMA 的蛋白水平,ULK1 过表达可以逆转 miR-1297 对心肌纤维化的调节作用^[8]。过表达 miR-10a-5p 可明显抑制肝癌细胞系 HepG2 和 SMMC-7721 的迁移、侵袭能力以及 EMT 进程,靶基因着丝粒复合体亚基 1 (SKA1) 过表达逆转了 miR-10a-5p 对这两个肝癌细胞系的抑制作用^[9]。Tuo et al^[10] 研究结果表明,miR-204-3p 抑制间充质干细胞对巨噬细胞的极化作用,而过表达 C-X-C 基

序趋化因子受体 (CXCR4) 抵消了这一过程。Ren et al^[11] 发现靶点 DNAJC3-AS1 可显著逆转 miR-144 诱导的阿霉素耐药的乳腺癌细胞系 MCF-7 的凋亡,逆转 miR-144 对自噬的抑制。miR-22-3p 通过靶向丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14) 显著抑制破骨细胞的增殖并诱导其凋亡^[12], miR-29a-3p 能够抑制心脏成纤维细胞到肌成纤维细胞转化和肺动脉相关的心脏纤维化进展^[13],课题组前期研究^[14] 显示 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 能够抑制 HSCs 的活化以及肝纤维化的进程,但是二者联合应用发挥作用的机制目前未见相关报道。

本研究通过生物信息学分析结合双荧光素酶报告实验证明了 AKT3 为 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 共同的靶基因,为进一步证明 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 是通过靶向 AKT3 调控 LX-2 细胞的生物学效应,设计并进行挽救实验。CCK-8、Transwell、qRT-PCR 实验结果提示,AKT3 过表达能够逆转 miR-22-3p 和 miR-29a-3p 对 LX-2 细胞增殖、迁移能力以及肝纤维化标志物 α-SMA 和 COL1A1 mRNA 表达的协同抑制作用。

参考文献

- [1] Gordon-Walker T T, Bove K, Veldtman G. Fontan-associated liver disease: a review[J]. J Cardiol, 2019, 74(3):223-32.
- [2] Hoxhaj G, Manning B D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(2):74-88.
- [3] Hu X L, Wang J, He W, et al. MicroRNA-433 targets AKT3 and inhibits cell proliferation and viability in breast cancer[J]. Oncol Lett, 2018, 15(3):3998-4004.

- [4] 侯晓丽, 苏静慧, 刘章心怡, 等. 大鼠肝纤维化相关 microRNA 及其候选靶基因的筛选[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3):1383–90.
- [5] Yi Y X, Liu Y Y, Wu W R, et al. Reconstruction and analysis of circRNA-miRNA-mRNA network in the pathology of cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(4):2209–25.
- [6] Papathanasiou I, Balis C, Trachana V, et al. The synergistic function of miR-140-5p and miR-146a on TLR4-mediated cytokine secretion in osteoarthritic chondrocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(3):783–91.
- [7] Chen L Y, Wang L, Ren Y X, et al. The circular RNA circ-ERBIN promotes growth and metastasis of colorectal cancer by miR-125a-5p and miR-138-5p/4EBP-1 mediated cap-independent HIF-1 α translation[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):164–80.
- [8] Li M L, Li R N, Ma Y M, et al. MiRNA-1297 inhibits myocardial fibrosis by targeting ULK1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4):2070–6.
- [9] Shen D, Zhao H Y, Gu A D, et al. MiRNA-10a-5p inhibits cell metastasis in hepatocellular carcinoma *via* targeting SKA1 [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(9):784–94.
- [10] Tuo L, Song H, Jiang D, et al. Mesenchymal stem cells transfected with anti-miRNA-204-3p inhibit acute rejection after heart transplantation by targeting C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) *in vitro*[J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(8):5077–92.
- [11] Ren R P, Yuan Z G, Xu Z Y. MiRNA-144 targeting DNAJC3-AS1 reverses the resistance of the breast cancer cell line Michigan Cancer Foundation-7 to doxorubicin[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2):9885–92.
- [12] Jia X L, Yang M, Hu W, et al. Overexpression of miRNA-22-3p attenuates osteoporosis by targeting MAPK14[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1):692–70.
- [13] Hsu C H, Liu I F, Kuo H F, et al. MiR-29a-3p/THBS2 axis regulates PAH-induced cardiac fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10574.
- [14] Wang Y T, Zhang R H, Li J W, et al. MiR-22-3p and miR-29a-3p synergistically inhibit hepatic stellate cell activation by targeting AKT3[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247(19):1712–31.

AKT3 reverses the synergistic inhibition of miR-22-3p/29a-3p on LX-2 cell activation

Zhang Ronghua¹, Zhang Yanan¹, Han Xiangyang¹, Cui Xiaoyan¹, Tian Xiaoli², Zhang Guangling³, Liu Zhiyong⁴

(¹*School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology,*

Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063210; ²*Paraplegia Sanatorium of*

Tangshan, Tangshan 063000; ³*School of Clinical Medicine, North China University of Science and*

Technology, Hebei Key Laboratory of Medical-Industrial Integration Precision Medicine, Tangshan 063000;

⁴*Health Science Center of North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)*

Abstract *Objective* To investigate whether serine/threonine kinase 3 (AKT3) is able to reverse the synergistic inhibition of miR-22-3p/29a-3p on the activation of human hepatic stellate cell LX-2. **Methods** TargetScan, Starbase, miRDB and DIANA were used to predict the common target genes of miR-22-3p and miR-29a-3p, and the selected target genes were analyzed by Kyoto encyclopedia genes and genomes (KEGG), gene ontology (GO), protein-protein interaction (PPI). The binding free energy of candidate target genes with two miRNAs was analyzed by RNAhybrid, and their targeting relationship was determined by double luciferase reporting experiment. CCK-8, Transwell and qRT-PCR were used to detect the proliferation, migration and the expression of fibrosis markers of LX-2 cells. **Results** There were 24 common target genes of miR-22-3p and miR-29a-3p, and they were enriched in the hepatic fibrosis-related signaling pathways and biological processes. The binding free energy analysis of candidate target gene AKT3 with miR-22-3p and miR-29a-3p combined with the double luciferase experiment results showed that AKT3 was the common target gene of miR-22-3p and miR-29a-3p. The proliferation, migration and the mRNA expression of fibrosis markers of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen α 1 chain (COL1A1) of LX-2 cells were inhibited by miR-22-3p and miR-29a-3p mimics independently or cooperatively ($P < 0.05$), and AKT3 overexpression could reverse the synergistic inhibition of miR-22-3p and miR-29a-3p mimics on LX-2 cells mentioned-above ($P < 0.05$). **Conclusion** The overexpression of AKT3 can reverse the synergistic inhibition of miR-22-3p and miR-29a-3p on the activation of LX-2 cells.

Key words LX-2; serine/threonine kinase 3; miR-22-3p; miR-29a-3p; proliferation; migration