

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: RUNX3 对肝星状细胞活化增殖和迁移能力的影响
作者: 凌辉, 汪先晨, 尤峻柏, 范家好, 崔笑, 沙纪名, 余立权
网络首发日期: 2025-12-26
引用格式: 凌辉, 汪先晨, 尤峻柏, 范家好, 崔笑, 沙纪名, 余立权. RUNX3 对肝星状细胞活化增殖和迁移能力的影响[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251225.1710.006>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

RUNX3 对肝星状细胞活化增殖和迁移能力的影响

凌 辉¹，汪先晨²，尤峻柏²，范家好²，崔 笑¹，沙纪名²，余立权¹

(安徽医科大学第二附属医院¹肝胆胰外科、²胸外科，合肥 230601)

摘要 **目的** 探讨靶向沉默矮小相关转录因子 3 (RUNX3) 对小鼠肝星状细胞 (HSCs) 的增殖和迁移以及随后的胶原沉积等作用。**方法** 选取小鼠肝星状细胞系 (JS-1)，在显微镜下观察并鉴定形态。待细胞完全贴壁后使用 5 ng/mL 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 作用 24 h 诱导 HSCs 活化，并用 RUNX3 慢病毒感染构建 RUNX3 沉默模型，实验分为 Control 组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +siRNA-NC 组和 TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 组。Western blot 实验检测 RUNX3、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 及 I 型胶原 (Collagen I) 的蛋白表达变化；细胞免疫荧光实验检测 α -SMA、RUNX3 在 HSCs 中的表达定位变化；RT-qPCR 检测 RUNX3、 α -SMA、Collagen I 的 mRNA 表达变化；EdU 染色检测 HSCs 增殖能力；划痕实验和 Transwell 实验检测 HSCs 的迁移能力。**结果** 与对照组比较，经 TGF- β_1 诱导后，HSCs 中 RUNX3 的表达显著增加 ($P<0.01$)。与此同时，纤维化相关指标 α -SMA、Collagen I 的蛋白及 mRNA 水平均显著上调 ($P<0.001$)，且细胞增殖与迁移能力亦明显增强 ($P<0.001$)。而与 TGF- β_1 +siRNA-NC 组相比在 TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 组中的 RUNX3 以及 α -SMA、Collagen I 的蛋白及 mRNA 水平均明显降低 ($P<0.001$)，与此同时，HSCs 的增殖和迁移能力也被明显抑制 ($P<0.01$)。**结论** 沉默 RUNX3 能够抑制 HSCs 中胶原的沉积及 HSCs 的增殖和迁移，相反，RUNX3 可以促进 HSC 的增殖和迁移能力，并促进 HSC 的活化。

关键词 RUNX3；肝星状细胞；活化；增殖；迁移；肝纤维化；胶原沉积

中国图书分类号 R 333.4；R 322.4+7；R 575.2

文献标志码 A

基金项目：安徽省自然科学基金项目（编号：1808085MH270）；安徽省高校科研计划项目（编号：2024AH050797）；合肥市自然科学基金项目（编号：2021038）

作者简介：凌 辉，男，硕士研究生；

余立权，男，主任医师，副教授，硕士生导师，通讯作者，E-mail：2103822472@qq.com

Effect of RUNX3 on the activation, proliferation, and migration capabilities of hepatic stellate cells

Ling Hui¹, Wang Xianchen², You Junbo², Fan Jiahao², Cui Xiao¹, Sha Jiming², Yu Liquan¹

(¹Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, ²Department of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effects of targeted silencing of Runt-related Transcription Factor 3 (RUNX3) on the proliferation and migration of Mouse Hepatic Stellate Cells (HSCs), as well as subsequent collagen deposition. **Methods** Mouse hepatic stellate cell line (JS-1) was selected and then morphologically observed and identified under a microscope. After the cells had fully adhered, they were treated with 5 ng/mL of transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) for 24 hours to induce hepatic stellate cell activation. Furthermore, a RUNX3 silencing model was established using RUNX3 lentiviral infection. The experiment was divided into four groups: Control group, TGF- β_1 group, TGF- β_1 +siRNA-NC group, and TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 group. Protein expression changes of RUNX3, alpha-smooth muscle actin (α -SMA), and Alpha 1 type I collagen (Collagen I) were detected using Western blot method. Cellular immunofluorescence assays were employed to investigate the deposition changes of α -SMA and RUNX3 in hepatic stellate cells. RT-qPCR was utilized to examine the mRNA expression changes of RUNX3, α -SMA, and Collagen I. The proliferative capacity of hepatic stellate cells was assessed using Edu staining. The migratory ability of hepatic stellate cells was evaluated through wound healing assays and Transwell migration experiments. **Results** Compared with Control group, a significant elevation in RUNX3 was observed in the TGF- β_1 -induced activated HSCs ($P<0.01$). Meanwhile, the protein and mRNA levels of fibrosis-related markers and α -SMA and Collagen I were significantly upregulated ($P<0.001$). Additionally, the proliferation and migration capabilities of HSCs were significantly enhanced ($P<0.001$). In contrast, when compared to TGF- β_1 +siRNA-NC group, TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 group exhibited a notable decrease in RUNX3 and other related indicators, such as the protein and mRNA levels of α -SMA and Collagen I ($P<0.001$). Concurrently, the proliferation and migration capabilities of HSCs were significantly inhibited in TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 group ($P<0.001$). **Conclusion** Silencing RUNX3 can inhibit the deposition of collagen and the proliferation and migration of hepatic stellate cells. Conversely, RUNX3 promotes the proliferation and migration capabilities of HSCs, thereby facilitating the activation of HSC.

Key words RUNX3; hepatic stellate cells; activate; proliferation; migration; liver fibrosis; collagen deposition

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 1808085MH270); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2024AH050797); Natural Science Foundation of Hefei (No. 2021038).

Corresponding author Yu Liquan, E-mail: 2103822472@qq.com

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是肝脏疾病发展过程中一个关键且复杂的病理阶段, 尽管早期 HF 是可逆的^[1], 但目前仍未发现明确且有效的治疗方案^[2], 因此, 深入阐释 HF 的发病机制, 对该病症的治疗尤为重要^[3]。HF 的特征是肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 的增殖和迁移以及随后的胶原沉积^[4], 作为细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的主要生产者, 其活化对于 HF 起着至关重要的作用^[5]。

矮小相关转录因子 3 (runt-related transcription factor 3, RUNX3) 是一个重要的转录因子, 能够激活或抑制靶基因转录, 与多种类型肿瘤紧密关联。作为 TGF- β_1 信号通路的下游效应因子, 与 Wnt 信号通路存在交叉, 同时, RUNX3 在不同生理或病理情境中, 往往表现出具有显著差异的多面性角色, 在部分情境下其特定作用机制可促进肿瘤的发生发展^[6]。有研究指出, RUNX3 在胰腺癌^[7]、支气管哮喘^[8]、胶质瘤^[9]、人类乳腺癌^[10]等疾病中发挥调节作用。另有研究^[11]表明, RUNX3 在 HF 的防治中发挥潜在作用。本研究旨在探讨 RUNX3 对 HSCs 活化、增殖和迁移的影响, 为 HF 治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

小鼠肝星状细胞系 (JS-1) 购自湖南丰晖生物科技有限公司。

1.2 试剂

DMEM/F-12 培养基、TRIZol 试剂 (货号: 11039021、15596018) 购自赛默飞公司; 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 货号: 10099-141); PBS 试剂、Transwell 小室 (货号: 21-031-CM、3470) 购自美国 Corning 公司; 胰蛋白酶、PMSF 蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、Western blot 试剂盒、EdU 试剂盒 (货号: C0203-500ml、ST2573-25g、P0045-100ml、P0010S、P0002、C0071S/C0071L) 购自上海碧云天公司; 逆转录、RT-qPCR 试剂盒 (货号: AG11707、AG11701) 购自湖南艾克瑞生物公司; GAPDH 一抗 (Affinity 公司, 货号: AF7021); α -SMA 一抗、I 型胶原 (Collagen I) 一抗、RUNX3 一抗、Ki-67 一抗 (货号: 55135-1-AP、14695-1-AP、27099-1-AP、27309-1-AP) 购自武汉 Proteintech 公司; 鼠源、兔源二抗 (美国 Abcam 公司, 货号: ab150113、ab150064), 由上海生工公司合成 RT-qPCR 引物 (表 1), si-

RUNX3 由吉玛基因合成，序列为 S：5'-GCAACGCUUCCGCUGUCAUTT-3'；AS：5'-AUGACAGCGGAAGCGUUGCTT-3'。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences	
Gene	Primer sequence (5'-3')
RUNX3	F: TTGATTCTCTAGGATCCGGGC
	R: TCGAAGGTCGTTGAACCTGG
Collagen I	F: CGATGGATTCCCGTTCGAGT
	R: CGATCTCGTTGGATCCCTGG
α -SMA	F: GGCATCCACGAAACCACCTA
	R: GTATGCGTGTGACGGCTCTA
GAPDH	F: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
	R: GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

1.3 仪器和设备

细胞培养超净工作台（型号：SW-CJ-1B）购自中国苏州净化有限公司；倒置荧光显微镜（型号：IX71）购自日本 Olympus Corporation 公司；CO₂ 培养箱（型号：HCP-80）购自上海海尔公司；凝胶成像仪（型号：G:BOX-CHEMI HR）购自英国 Syngene 公司；实时荧光定量 PCR 仪（型号：CFXMaestrol）购自美国 Bio-RAD 公司；酶标仪（型号：VarioskanLUX）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；低温离心机（型号：Centrifuge 5430 R）购自德国 Eppendorf 公司；高压灭菌锅（型号：YXQ-LS-50SII）购自上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；摇床（型号：M-Blot H4000）购自南京中科通仪科技有限公司；分光光度仪（型号：NanoPhotometer® N120）购自德国 Implen 公司。

1.4 方法

1.4.1 HSCs 培养

细胞均在 37℃、5% CO₂ 培养箱中，在含有 10%FBS 和青霉素-链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM/F-12）中培养，培养至铺满瓶底，细胞培养至 90%汇合时使用胰蛋白酶消化后进行传代，并进行后续实验研究。

1.4.2 HSCs 的活化

选取处于对数增殖期的 HSCs，按照标准细胞传代流程将其接种于细胞培养皿，置于恒温 CO₂ 培养箱中进行常规培养。使用无血清 DMEM/F-12 培养基将贴壁细胞饥饿培养 12 h，随后更换含 5 ng/mL TGF- β ₁ 的无血清培养基，继续进行干预培养 24 h。完成各实验组别处理后，采用胰酶消化法剥离贴壁细胞并进行离心（900 r/min, 5min）收集，所得细胞沉淀经 PBS 清后，分别进行总 RNA 抽提和蛋白质印迹分析等下游实验。

1.4.3 siRNA-RUNX3 转染

采用胰蛋白酶消化法终止对数增殖期 HSCs 的体外培养，经离心（900 r/min, 5min）收

集后以 1×10^5 个/ml 密度制备单细胞悬液，分装接种至 6 孔培养板中，每孔定量注入 2 ml 细胞悬液。待细胞贴壁率达 80% 以上时，加入含 5 ng/mL TGF- β_1 的诱导培养基进行活化干预，置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中持续刺激 24 h。完成细胞活化后，实验组严格参照吉玛基因转染试剂操作指南，将 RUNX3 特异性 siRNA 与转染复合物共孵育后注入对应孔位，同时设立空载体转染对照组，以及仅补充无血清培养基的基础对照组。所有处理组均于转染后 4 h 更换完全培养基，继续在标准培养条件下维持 48 h 以满足后续实验需求。所有处理组均设 3 次重复以确保数据可靠性。

1.4.4 实验分组

于 6 孔板中接种处于对数期生长的 HSCs，实验分为正常对照组（Control 组）和实验组（TGF- β_1 组），后根据 1.4.2 中步骤处理细胞；根据 1.4.3 步骤，应用小干扰 RNA 构建阴性对照组（TGF- β_1 +siRNA-NC 组）及应用 siRNA-RUNX 转染构建 RUNX3 沉默组（TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 组）。

1.4.5 Western blot 检测

经低温裂解处理（每孔加入含 PMSF 的 RIPA 裂解缓冲液 100 μ L）后，细胞样本于 4 °C 摇床上轻摇持续裂解 30 min。随后将完全裂解的细胞悬液转移至预冷离心管，离心（13 250 r/min, 30min）以去除细胞碎片，离心后保留上清液进行蛋白浓度检测。采用 BCA 蛋白定量试剂盒对样本进行标准化定量分析，通过酶标仪测定 562 nm 波长吸光度值建立标准曲线。完成定量后，取等量蛋白样本进行凝胶电泳。电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜。转膜后依次用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次，5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h，TBST 清洗后置于 4 °C 摇床与特异性 GAPDH 一抗（1 : 50 000）； α -SMA 一抗（1 : 5 000）、Collagen I 一抗（1 : 1 000）、RUNX3 一抗（1 : 2 000）孵育 16 h，次日复温后 TBST 洗涤 3 次，与特异性鼠源、兔源二抗（1 : 10 000）在室温摇床孵育 1.5 h。最终经化学发光显影系统获取蛋白条带图像，使用 ImageJ 图像分析软件对目标条带与 GAPDH 内参进行灰度值定量分析，所有实验均设置 3 次重复以确保数据可靠性。

1.4.6 提取总 RNA 及逆转录

按照上述实验步骤培养细胞，去除培养基后用 PBS 清洗 2 次，选用 TRIzol 法慢提 RNA。用分光光度仪检测其浓度并按照试剂盒说明书逆转录。

1.4.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

按照上述实验步骤获取 cDNA，并用 Bio-Rad CFX Maestrol 1.0 Real-Time 系统对目的基因进行荧光定量检测。以 GAPDH 作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 的相对表达量（表 1）。

1.4.8 免疫荧光

HSCs 细胞爬片用 4% 多聚甲醛固定后，首先在 0.5% TritonX-100 中透化。使用 5% BSA 进行阻断。然后将细胞爬片与 α -SMA（1 : 200）、RUNX3（1 : 200）、Ki-67 一抗（1 : 200）在 4 °C 下孵育过夜。洗涤后，将相应的鼠源、兔源二抗（1 : 200）在室温下孵育 1 h。细胞核用 DAPI 复染。使用荧光显微镜观察样品并拍照。

1.4.9 EdU 染色

用胰酶消化处于对数增殖期的细胞，适当稀释后以每孔约 1.5×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔培养板中并分组干预。实验过程中向各孔内添加含 EdU 的完全培养基（500 μL /孔），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 2 h。标记结束后，采用 PBS 充分洗涤 3 次以去除未结合试剂。继而于室温条件下向各孔注入 4% 多聚甲醛溶液固定 2 h，弃除固定液后 PBS 清洗 3 次。随后采用 0.3% Triton X-100 溶液透膜处理 15 min，透膜完成后重复 PBS 洗涤步骤。严格参照试剂盒说明书配制 Click 染色反应混合液，避光条件下向各孔加入反应混合液 300 μL /孔，于室温环境中孵育 30 min。移除反应液后经 PBS 彻底漂洗 3 次，最终采用抗荧光淬灭封片剂与 DAPI 染色液实施核复染。染色程序完成后，即刻置于荧光显微镜下进行多视野图像采集，分析各组间荧光信号强度差异。

1.4.10 细胞划痕实验

使用直尺在 6 孔培养板底部预先绘制 3 条等距平行基准线，随后按照实验设计将不同处理组的细胞悬液以标准化密度接种于孔内。待细胞单层生长至完全汇合后，采用 200 μL 微量移液器枪头沿垂直于孔板平面及预设标记线的方向施加恒定压力进行划痕操作，形成 3 条均匀的线性创面。弃去原有培养基后，采用无菌 PBS 轻柔洗涤 3 次以清除悬浮细胞碎片，更换新鲜 3% 完全培养基。使用倒置荧光显微镜进行 0 h 基线图像采集，随后将培养板置于恒温 CO_2 培养箱继续培养。分别于处理后 12 h 及 24 h 时间点，对同一划痕区域进行动态观察，采用 ImageJ 图像分析软件对划痕边缘进行数字化标定，精确计算面积变化，以此量化评估细胞迁移速率。在每个孔中随机选取 3 个视野。

1.4.11 Transwell 细胞迁移实验

将 Transwell 细胞迁移实验体系置于 24 孔培养板内，上室加入 500 μL 无血清培养基平衡小室微环境后转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 、恒温培养箱预活化。取对数增殖期细胞经胰酶消化处理后，用无血清 DMEM/F-12 培养基制备单细胞悬液，细胞计数板计数。依据实验分组设计，以每孔 1.5×10^4 个细胞加样至 Transwell 上室，每组设立 3 个独立重复样本，下室同步注入 500 μL 含 30% 胎牛血清的 DMEM/F-12 完全培养基作为趋化诱导体系。将培养系统置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒湿培养箱中持续孵育 24 h 后，用 PBS 清洗。随后于下室加入 500 mL 4% 多聚甲醛进行室温固定处理 30 min，继而使用 0.1% 结晶紫染色液对细胞特异性染色 30 min。充分洗去除残留染液后，在倒置光学显微镜下系统观察细胞迁移状态，每个样本随机选取 3 个代表性显微视野进行图像采集，最终应用 ImageJ 图像分析软件对迁移细胞数量进行统计学定量分析。

1.5 统计学处理

收集的数据用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用非配对 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，事后两两比较采用 Tukey 多重比较检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义，所有实验均独立重复 3 次以上。

2 结果

2.1 RUNX3 在 HSCs 活化中的表达上调

如图 1 所示，经 $\text{TGF-}\beta_1$ 刺激的 HSCs 后，RUNX3 蛋白表达量较对照组呈现显著升高（ $P_{\text{Tukey}} < 0.01$ ），其 mRNA 转录水平亦显著升高（ $P_{\text{Tukey}} < 0.001$ ）。值得注意的是，在采用 siRNA-RUNX3 转染后，实验组较 $\text{TGF-}\beta_1 + \text{siRNA-NC}$ 对照组表现出明显的 RUNX3 蛋白表达抑制（ $P_{\text{Tukey}} < 0.05$ ），且 mRNA 水平同步下调（ $P_{\text{Tukey}} < 0.01$ ）。这为阐释 RUNX3 在 HSCs 活化过

程中的分子调控机制提供了依据。

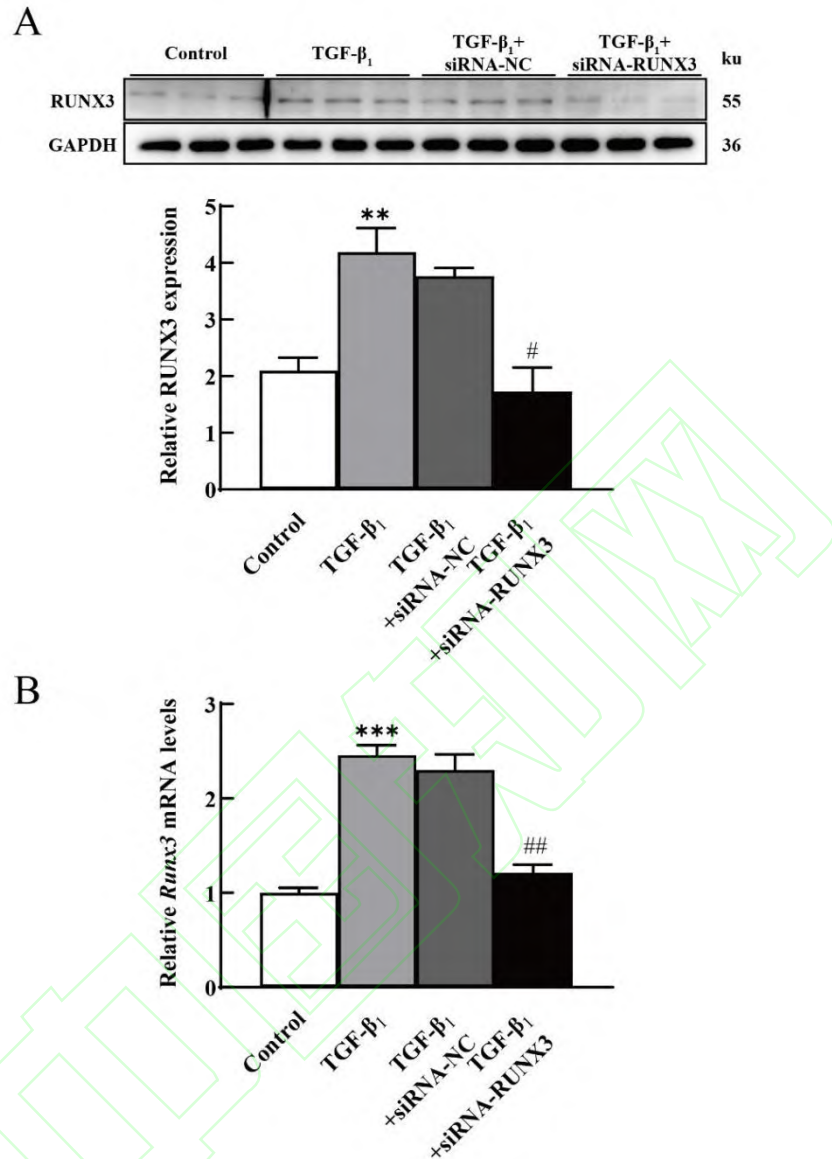


图 1 RUNX3 在不同分组中的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Expression of RUNX3 in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: The protein expression level of RUNX3 was detected by Western blot; B: The expression of *RUNX3* mRNA was detected by qRT-PCR; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs TGF-β₁+siRNA-NC group.

2.2 RUNX3 促进 HSCs 纤维化相关基因中 *Collagen I*、*α-SMA* mRNA 的表达

RT-qPCR (图 2) 结果显示, 经 TGF-β₁ 处理的实验组后, *Collagen I* 与 *α-SMA* 基因的 mRNA 表达水平显著上调 ($P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。相反地, 使用 TGF-β₁+siRNA-RUNX3 转染 HSCs 组中 *Collagen I*、*α-SMA* 的 mRNA 表达水平明显降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。该实验数据提示, 沉默 *RUNX3* 可有效拮抗 TGF-β₁ 介导的促纤维化效应。

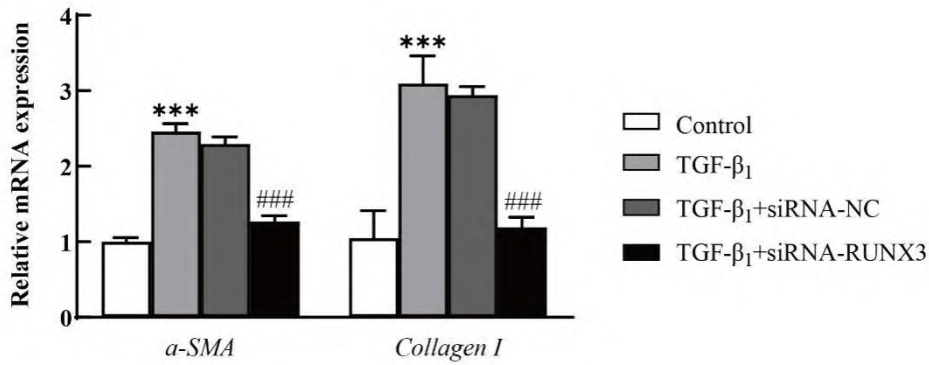


图 2 RUNX3 对 HSCs 中 *collagen I*, α -SMA mRNA 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 The effects of RUNX3 on the expression levels of *Collagen I*, α -SMA mRNA in HSCs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

*** $P < 0.001$ vs Control group; ### $P < 0.001$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

2.3 RUNX3 调控 Collagen I、 α -SMA 蛋白的表达

Western blot 结果显示 (图 3A): TGF- β_1 刺激 HSCs 活化后, α -SMA、Collagen I 蛋白水平明显升高 ($P_{\text{Tukey}} < 0.0001$, $P_{\text{Tukey}} < 0.001$); 而使用 TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 转染的 RUNX3 沉默组 HSCs 中 Collagen I、 α -SMA 的蛋白表达水平相较于 TGF- β_1 +siRNA-NC 组表达明显降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.0001$, $P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。

同时, 通过免疫荧光将 α -SMA、RUNX3 共染, 结果如图 3B 所示, α -SMA 与 RUNX3 在 HSCs 中表达不明显, 但在 TGF- β_1 处理后表达增加 ($P_{\text{Tukey}} < 0.001$); 与此同时, 相比较与 TGF- β_1 +siRNA-NC 组, TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 组中 α -SMA、RUNX3 表达量明显降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.001$), 证明靶向沉默 RUNX3 会抑制 HSCs 中纤维化相关蛋白的沉积。

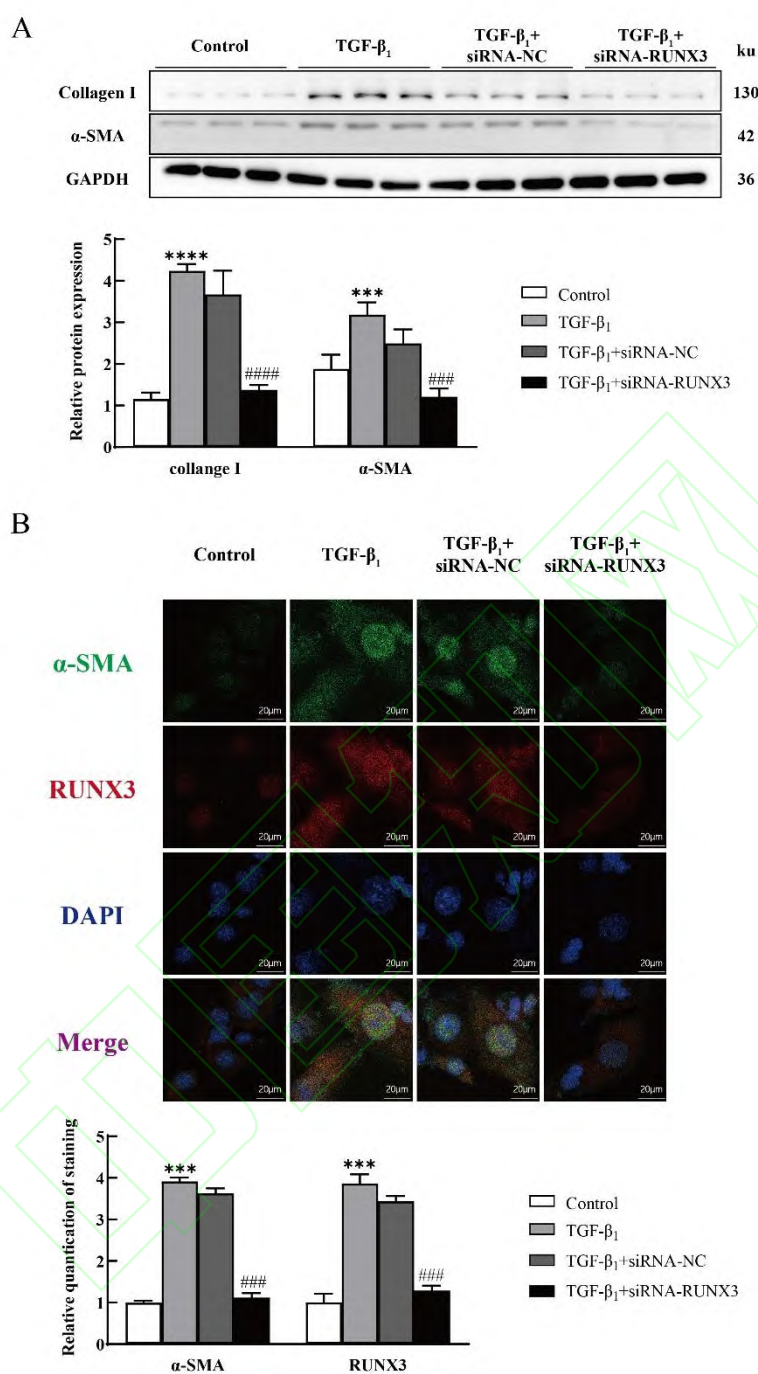


图 3 RUNX3 对 collagen I, α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 The effects of RUNX3 on the expression of Collagen I and α -SMA proteins ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: The protein expression level of Collagen I and α -SMA were detected by Western blot; B: The expression of α -SMA and RUNX3 were detected by immunofluorescence; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control group; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

2.4 RUNX3 沉默抑制 HSCs 的增殖活性

Ki-67 免疫荧光染色实验 (图 4A) 结果显示, 用 TGF- β_1 处理后的 HSCs 与正常组相比

增殖活性明显升高 ($P_{\text{Tukey}} < 0.0001$)。同时, 与 $\text{TGF-}\beta_1 + \text{siRNA-NC}$ 组相比, $\text{TGF-}\beta_1 + \text{siRNA-RUNX3}$ 组中 HSCs 增殖活性明显降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。图 4B 中 EdU 结果同样证实了上述观点, 证明靶向沉默 *RUNX3* 将会抑制 HSCs 的增殖活性 ($P_{\text{Tukey}} < 0.01$)。

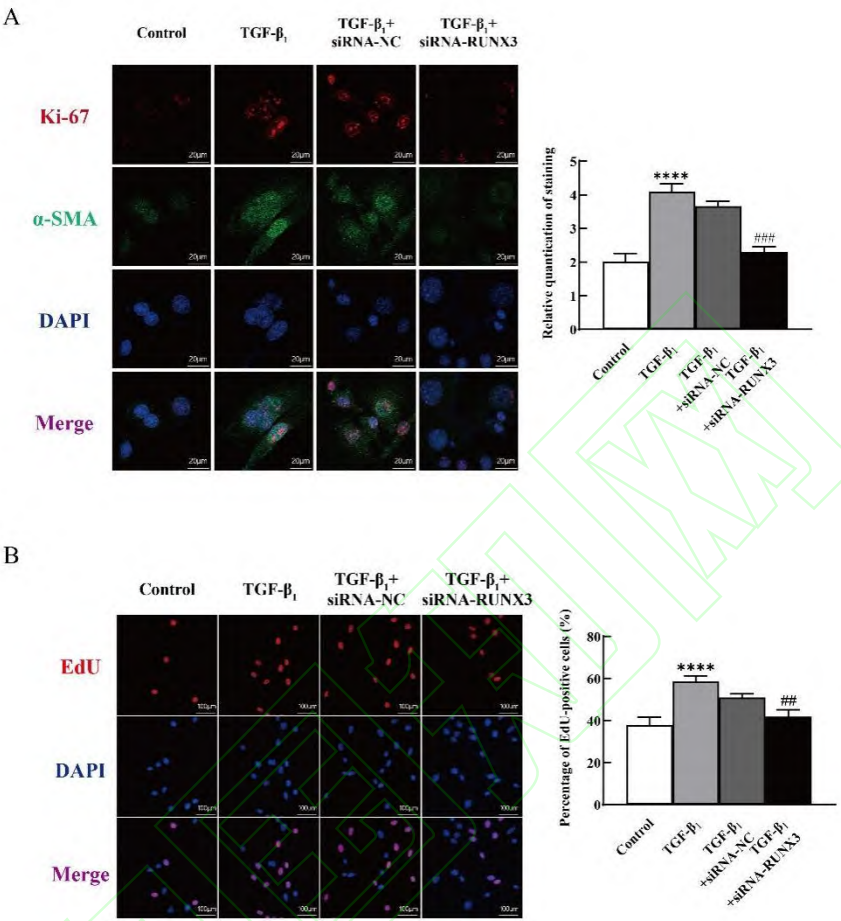


图 4 *RUNX3* 对 HSCs 增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 The effects of *RUNX3* on the proliferation activity of HSCs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: The expression of Ki-67 was detected by immunofluorescence; B: The cell proliferation activity was detected by EdU assay; **** $P < 0.0001$ vs Control group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs TGF- β_1 + siRNA-NC group.

2.5 沉默 *RUNX3* 对 HSCs 迁移能力的影响

细胞迁移功能检测数据如图 5A 所示, 经 TGF- β_1 干预的 HSCs 在细胞划痕实验中迁移活性显著增强 ($P_{\text{Tukey}} < 0.001$)。同时, 用 siRNA-*RUNX3* 转染后, HSCs 的迁移进程受到明显阻滞 ($P_{\text{Tukey}} < 0.001$), 这提示 *RUNX3* 基因的沉默可有效逆转 TGF- β_1 诱导的细胞促迁移作用。Transwell 迁移实验定量分析结果 (图 5B) 进一步证实, 沉默 *RUNX3* 能够显著抑制 HSCs 的迁移能力, 实验组穿膜细胞数较 TGF- β_1 + siRNA-NC 减少 ($P_{\text{Tukey}} < 0.0001$), 该数据验证了 *RUNX3* 在调控 HSCs 迁移中的促进作用。

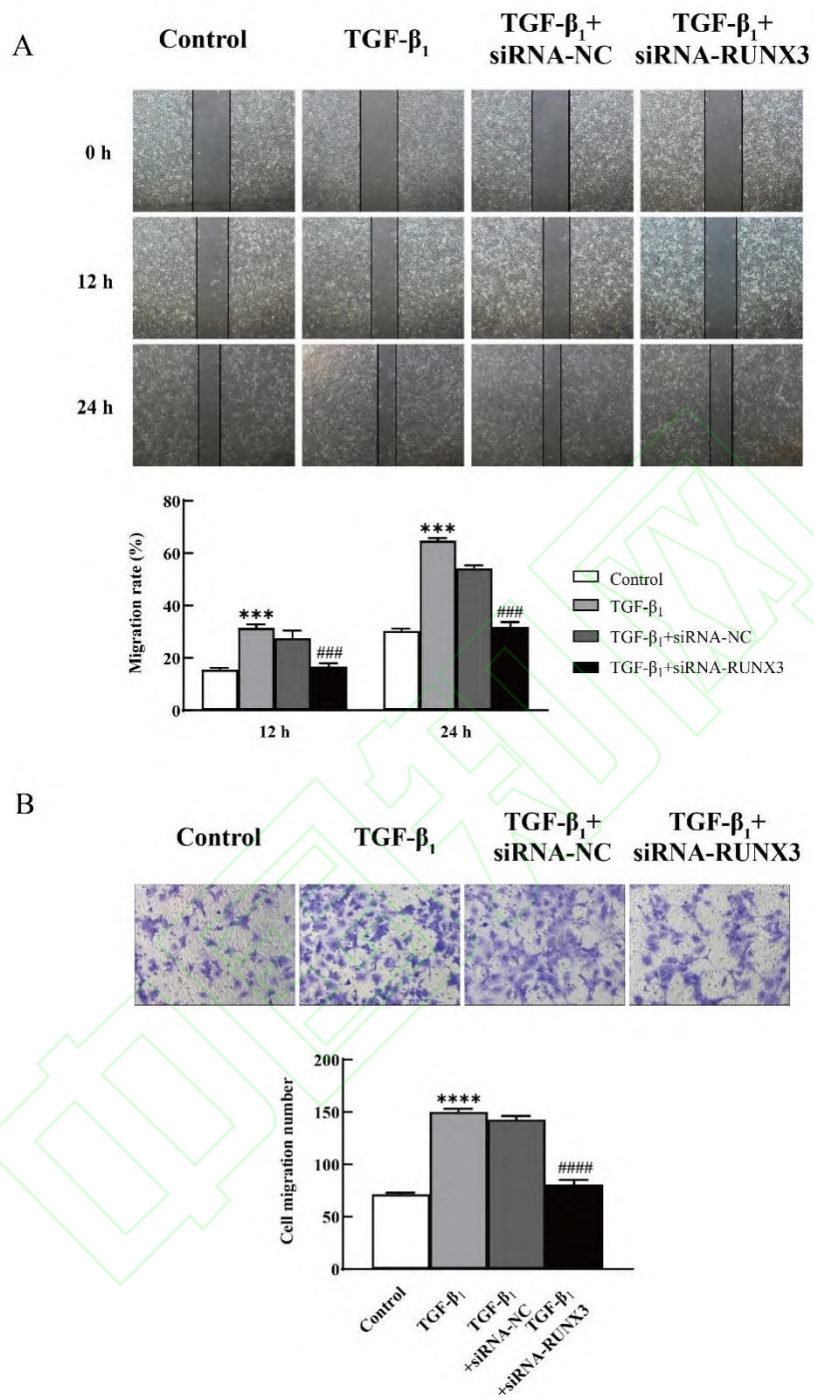


图 5 RUNX3 对 HSCs 迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 The effects of RUNX3 on the migration ability of HSCs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Wound-healing experiment; B: Transwell experiment; *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Control group; ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

3 讨论

越来越多的实验表明，转录因子 RUNX3 在各种疾病进展中发挥重要作用^[7-9]。然而，

RUNX3 在各类疾病的发展进程中扮演着多样化的角色，展现出其复杂且关键的功能特性。Koyama et al^[10]的研究表明，在人类乳腺癌相关成纤维细胞的肿瘤中过表达 RUNX3 会促进该肿瘤细胞的增殖、进展和恶性。相反，Torquati et al^[6]在食管腺癌中发现 RUNX3 可以抑制细胞增殖。同时，Affandi et al^[12]通过研究 RUNX3 在全身性硬化症的作用，发现 RUNX3 的低表达有助于增强纤维化。相反地，赵谦 等人^[13]的研究证明了 RUNX3 能够增强心脏成纤维细胞增殖，并且还参与了心脏成纤维细胞分化和增殖。在本研究中，通过对 HSCs 的研究发现，与对照组相比，RUNX3 在 TGF- β_1 诱导 HSCs 的细胞模型中表达量明显升高。另外，采用 siRNA-RUNX3 转染后降低了 HSCs 细胞中 Collagen I、 α -SMA 的表达水平，这些结果表明 RUNX3 对 HSCs 活化过程具有促进作用。

为深入探讨 RUNX3 在 HF 进程中的作用机制，本研究采用 TGF- β_1 诱导 HSCs 活化构建体外模型，细胞划痕实验及 Transwell 迁移实验等定量分析表明，TGF- β_1 刺激组 HSCs 的增殖活性较对照组提高，其迁移能力亦显著增强。而 RUNX3 基因沉默后，细胞的增殖速率下降，迁移能力亦受到明显抑制，这进一步验证了 RUNX3 对 HSCs 活化过程的促进作用。基于上述实验结果，初步推测 RUNX3 可能通过调控特定纤维化相关基因靶标的转录或蛋白稳定性，从而影响 HSCs 的增殖与迁移等生物学行为。具体而言，该转录因子或通过增强促纤维化基因 mRNA 的翻译效率，或通过抑制相关蛋白的降解，最终导致细胞外基质过度沉积，促进 HF 的病理进程。然而，关于 RUNX3 介导的分子调控网络及其下游信号通路的具体作用机制，仍需进一步实验。该发现与已有研究（如肝细胞癌^[14]、肾纤维化^[15]）在对纤维化调控方向上存在分歧，由于本研究主要选用了 HSCs 的一种细胞系，该病理变化可能因细胞种类有所差异，同时，本研究选取 TGF- β_1 刺激 HSC 活化来构建体外模型，细胞所处状态存在差异，均可能导致细胞作用的改变，接下来，本团队也将继续优化实验设计，构建多种体内外模型来深入研究 RUNX3 在 HSCs 活化以及 HF 中的作用机制。

经 TGF- β_1 刺激诱导 HSCs 发生表型活化后，RUNX3 蛋白表达上调，同时提高了 HSCs 的增殖活性、细胞迁移能力。上述研究结果表明，RUNX3 可能通过增强 HSCs 的活化表型、促进其增殖与迁移能力，从而参与调控 HF 病理进程的进展机制。基于此发现，本团队拟进一步探讨 RUNX3 在表观遗传层面调控的下游信号通路网络及其关键效应分子，以期系统阐明该转录因子介导 HF 发展的分子机制，为临床开发基于 RUNX3 信号轴的新型靶向治疗策略提供理论依据和潜在干预靶点。

参考文献

[1] Lee J H, Kwon Y J, Park K, et al. Metabolic score for insulin resistance is inversely related to incident

advanced liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Nutrients*, 2022, 14(15): 3039. doi: 10.3390/nu14153039.

[2] 谢书乐, 张 瑾, 张 培, 等. 终末期肾脏病患者肝纤维化的发生及影响因素分析[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(11): 1831-5. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.026.

[2] Xie S L, Zhang J, Zhang P, et al. Analysis of the incidence and influencing factors of liver fibrosis in patients with end-stage renal disease[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(11): 1831-5. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.026.

[3] Catalano G, Chatzipanagiotou O P, Kawashima J, et al. Metabolic-associated steatotic liver disease and hepatocellular carcinoma[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2024, 25(17): 2283-91. doi: 10.1080/14656566.2024.2426680.

[4] Higashi T, Friedman S L, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27-42. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007.

[5] Fondevila M F, Fernandez U, Heras V, et al. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1A in hepatic stellate cells protects against fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(1): 15-28. doi: 10.1016/j.jhep.2022.02.003.

[6] Torquati A, O' Rear L, Longobardi L, et al. RUNX3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by reinstating transforming growth factor beta responsiveness in esophageal adenocarcinoma cells[J]. *Surgery*, 2004, 136(2): 310-6. doi: 10.1016/j.surg.2004.05.005.

[7] Whittle M C, Hingorani S R. Runx3 and cell fate decisions in pancreas cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 962: 333-52. doi: 10.1007/978-981-10-3233-2_21.

[8] Yu Y, Wang L, Gu G. The correlation between Runx3 and bronchial asthma[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 487: 75-9. doi: 10.1016/j.cca.2018.09.023.

[9] Sun J, Li B, Jia Z, et al. RUNX3 inhibits glioma survival and invasion *via* suppression of the β -catenin/TCF-4 signaling pathway[J]. *J Neurooncol*, 2018, 140(1): 15-26. doi: 10.1007/s11060-018-2927-0.

[10] Koyama Y, Okazaki H, Shi Y, et al. Increased RUNX3 expression mediates tumor-promoting ability of human breast cancer-associated fibroblasts[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(17): 18062-77. doi: 10.1002/cam4.6421.

[11] Ojha U, Kim S, Rhee C Y, et al. Endothelial RUNX3 controls LSEC dysfunction and angiocrine LRG1 signaling to prevent liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2025, 81(4): 1228-43. doi: 10.1097/hep.0000000000001018.

[12] Affandi A J, Carvalheiro T, Ottria A, et al. Low RUNX3 expression alters dendritic cell function in patients with systemic sclerosis and contributes to enhanced fibrosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(9): 1249-59. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214991.

[13] 赵 谦, 邹 勇, 刘 波, 等. Runt 相关转录因子 3 在 小鼠心肌纤维化中的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(24): 2640-7. doi: 10.16016/j.1000-5404.202106071.

[13] Zhao Q, Zou Y, Liu B, et al. Role of runt-related transcription factor 3 in myocardial fibrosis in mice[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2021, 43(24): 2640-7. doi: 10.16016/j.1000-5404.202106071.

[14] 林万松, 林 洁, 林巧燕, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白通过 DNMT3A 诱导肝癌细胞 RUNX3 基因高甲基化[J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(8): 717-21, 727.

[14] Lin W S, Lin J, Lin Q Y, et al. Hepatitis B virus X protein induced hypermethylation of RUNX3 through DNMT3A in HCC cells[J]. *Chin J Zoonoses*, 2016, 32(8): 717-21, 727.

[15] 蔡琼丽, 刘文洪, 刘恺远, 等. 基于 RUNX3/Smad3 信号通路研究肾消方治疗自发性糖尿病肾脏疾病 db/db 小鼠肾纤维化的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(8): 4573-7.

[15] Cai Q L, Liu W H, Liu K Y, et al. Study on the mechanism of Shenxiao Decoction on treating renal

fibrosis in db/db mice with spontaneous diabetic kidney disease based on RUNX3/Smad3 signaling pathway[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(8): 4573-7.

