

网络出版时间:2025-12-26 14:48:06 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260129.0856.012

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Control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($P<0.05$),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

中图分类号 R 333.4;R 322.4+7;R 575.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)02-0277-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.013

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。作为转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , 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。该研究旨在探讨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)购自美国赛默飞世尔有限公司;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(货号:AF7021)购自Affinity公司; α -平

2025-11-18 接收

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,通信作者, E-mail:2103822472@qq.com

滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)一抗、I型胶原(Collagen I)一抗、RUNX3一抗、增殖标志物Ki-67(marker of proliferation Ki-67, Ki-67)(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(货号:ab150113、ab150064)购自美国 Abcam 公司,由上海生工公司合成 RT-qPCR 引物(表1),si-RUNX3由苏州吉玛基因股份有限公司合成,序列为S:5'-GCAACGCUUCCGCGUCAUTT-3';AS:5'-AUGACAGCGGAAGCGUUG CTT-3'。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')
RUNX3	F: TTGATTCTCTAGGATCCGGCC
	R: TCGAAGGTCGTTGAACCTGG
Collagen I	F: CGATGGATTCCCGTTCGAGT
	R: CGATCTCGTTGGATCCCTGG
α -SMA	F: GGCATCCACGAAACCACCTA
	R: GTATGCCTGTGACGGCTCTA
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;分光光度计(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 °C、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 实验分组 于 6 孔板中接种处于对数期生长的 HSCs,实验分为对照组(Control 组)和实验组(TGF- β_1 组),后根据 1.4.3 中步骤处理细胞;根据

1.4.4 项步骤,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)。

1.4.3 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, 5 min)收集,所得细胞沉淀经 PBS 清洗后,分别进行总 RNA 抽提和 Western blot 等下游实验。

1.4.4 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, 5 min)收集以后以 1×10⁵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。

1.4.5 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, 30 min)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。

1.4.7 定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR) 按照上述实验步骤获取总RNA,用分光光度仪检测其浓度并按照试剂盒说明书逆转录,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。

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℃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1h。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 μ L/孔),置于37℃、5% CO₂培养箱中培养2h。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2h,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 μ L/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 μ L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CO₂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 μ L无血清培养基平衡小室微环境后转移至37℃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 μ L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℃、5% CO₂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 μ L 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。充分清洗去除残留染液后,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TGF- β_1 刺激后的HSCs, RUNX3蛋白表达量较对照组升高($P_{\text{Tukey}}<0.01$),其mRNA转录水平亦明显升高($P_{\text{Tukey}}<0.001$)。值得注意的是,在采用siRNA-RUNX3转染后, TGF- β_1 +siRNA-RUNX3组较TGF- β_1 +siRNA-NC对照组表现出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。

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- β_1 处理的实验组后, Collagen I与 α -SMA基因的mRNA表达水平较对照组明显上调

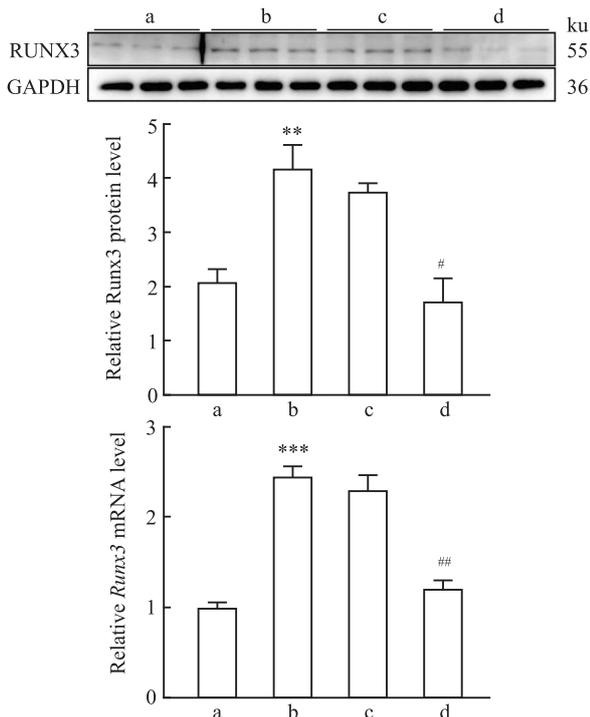


图1 RUNX3在不同分组中的表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

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 RT-qPCR; a: Control group; b: TGF- β_1 group; c: TGF- β_1 +siRNA-NC group; d: TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

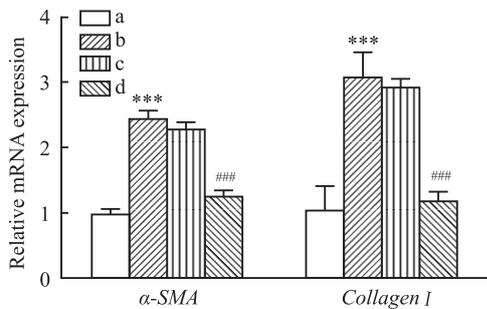


图2 RUNX3对HSCs中Collagen I, α -SMA mRNA表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

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

a: Control group; b: TGF- β_1 group; c: TGF- β_1 +siRNA-NC group; d: TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 group; *** $P<0.001$ vs Control group; ### $P<0.001$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

($P_{Tukey}<0.001$)。相反地,使用 TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 转染 HSCs 组中 *Collagen I*, α -SMA 的 mRNA 表达水平较 TGF- β_1 +siRNA-NC 组明显降低(均 $P_{Tukey}<0.001$)。该实验数据提示,沉默 *RUNX3* 可有效拮抗 TGF- β_1 介导的促纤维化效应。

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 蛋白水平较对照组明显升高(均 $P_{Tukey}<0.001$); 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(均 $P_{Tukey}<0.001$)。

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(均 $P_{Tukey}<0.001$); 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(均 $P_{Tukey}<0.001$),证明靶向沉默 *RUNX3* 会抑制 HSCs 中纤维化相关蛋白的沉积。

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 与对照组相比增殖活性明显升高($P_{Tukey}<0.0001$)。同时,与 TGF- β_1 +siRNA-NC 组相比, TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 组中 HSCs 增殖活性明显降低($P_{Tukey}<0.001$)。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($P_{Tukey}<0.01$)。

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明显增强($P_{Tukey}<0.001$)。同时,用 siRNA-RUNX3 转染后, HSCs 的迁移进程受到明显阻滞($P_{Tukey}<0.001$),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, TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 组穿膜细胞数较 TGF- β_1 +siRNA-NC 减少($P_{Tukey}<0.0001$),该数据验证了 *RUNX3* 在调控 HSCs 迁移中的促进作用。

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

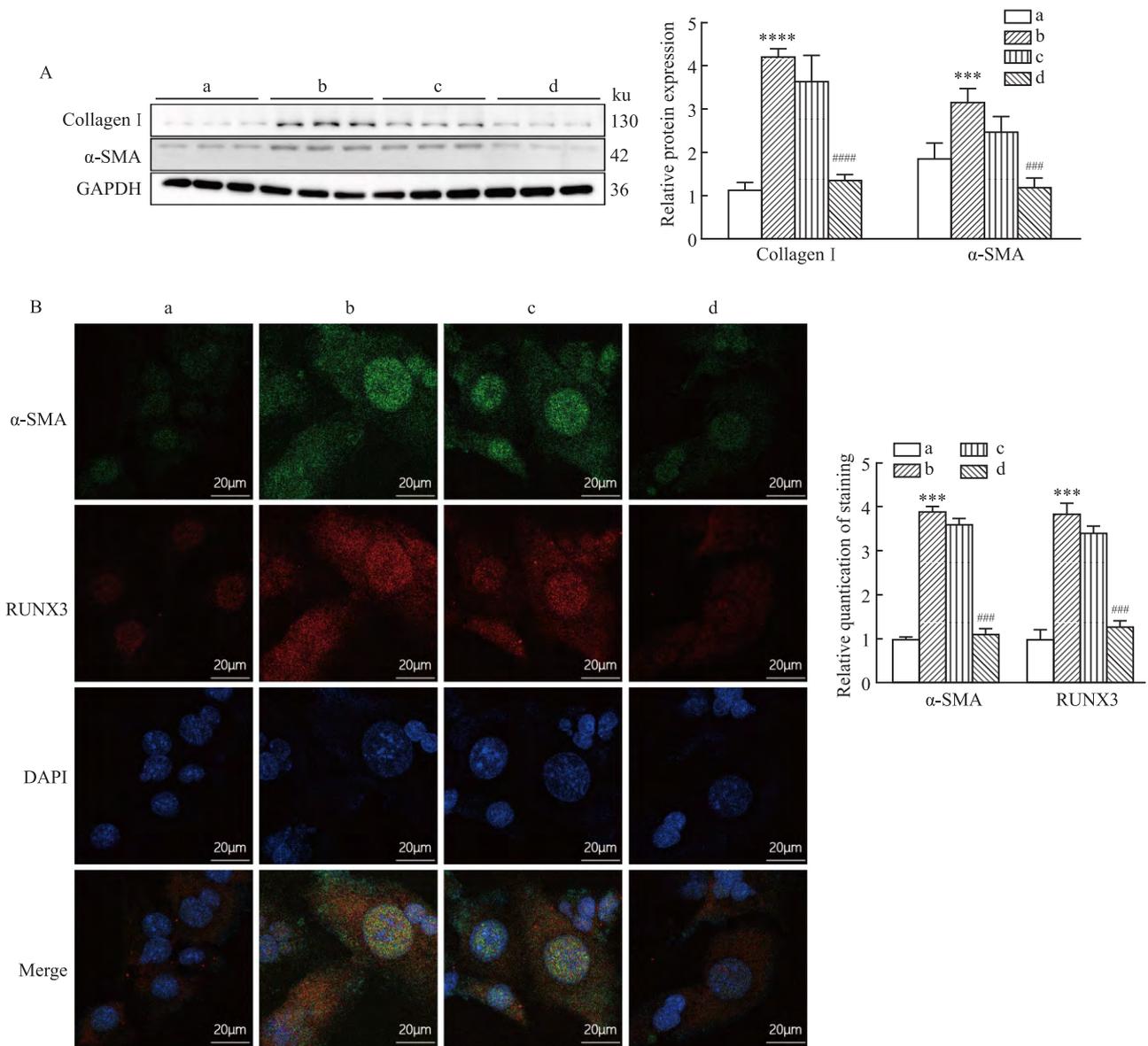


图 3 RUNX3对 Collagen I, α-SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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 ×200; a: Control group; b: TGF-β₁ group; c: TGF-β₁+siRNA-NC group; d: TGF-β₁+siRNA-RUNX3 group; ****P*<0.001, *****P*<0.0001 vs Control group; ###*P*<0.001, ####*P*<0.0001 vs TGF-β₁+siRNA-NC group.

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^[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-β₁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-β₁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-β₁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

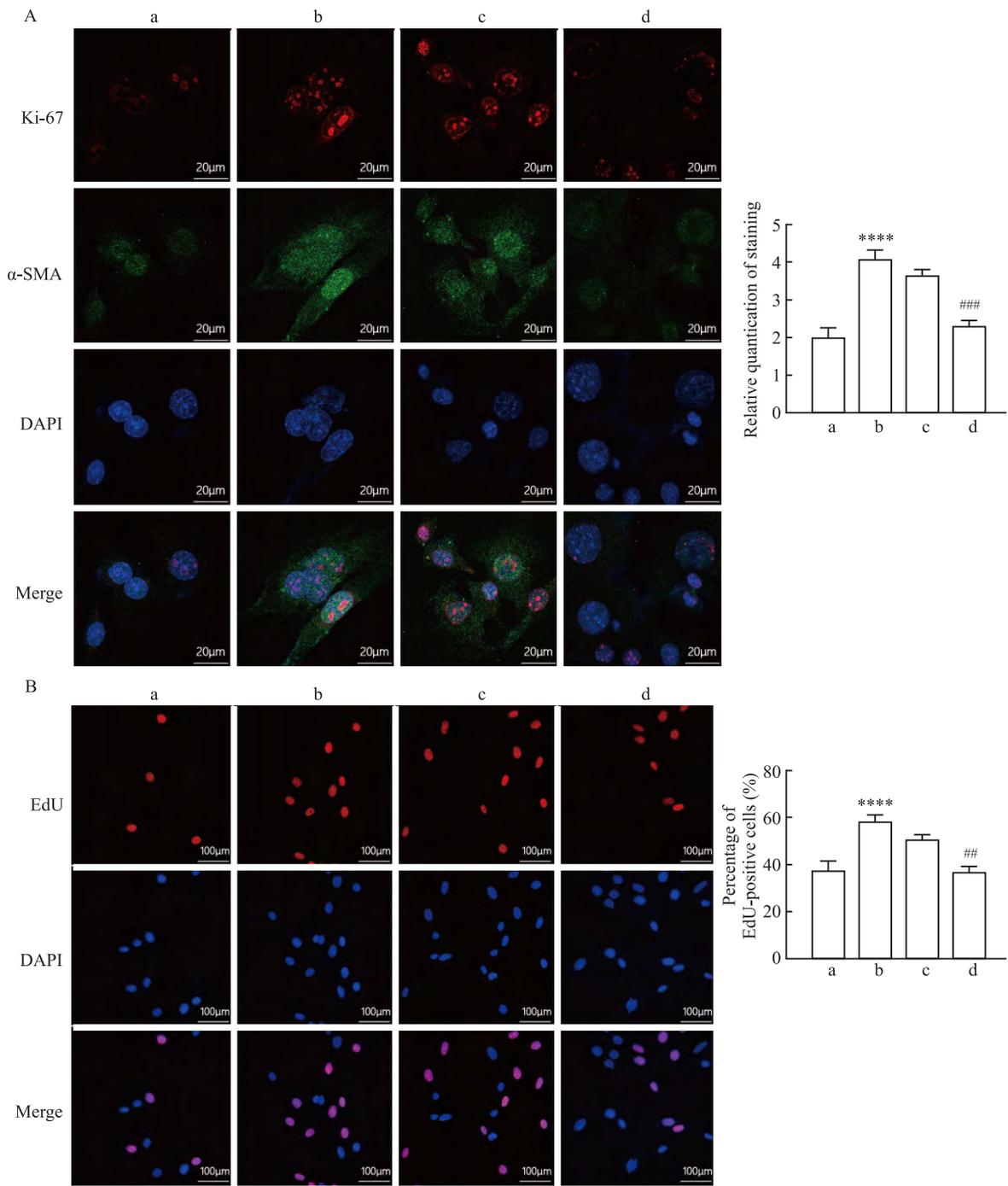


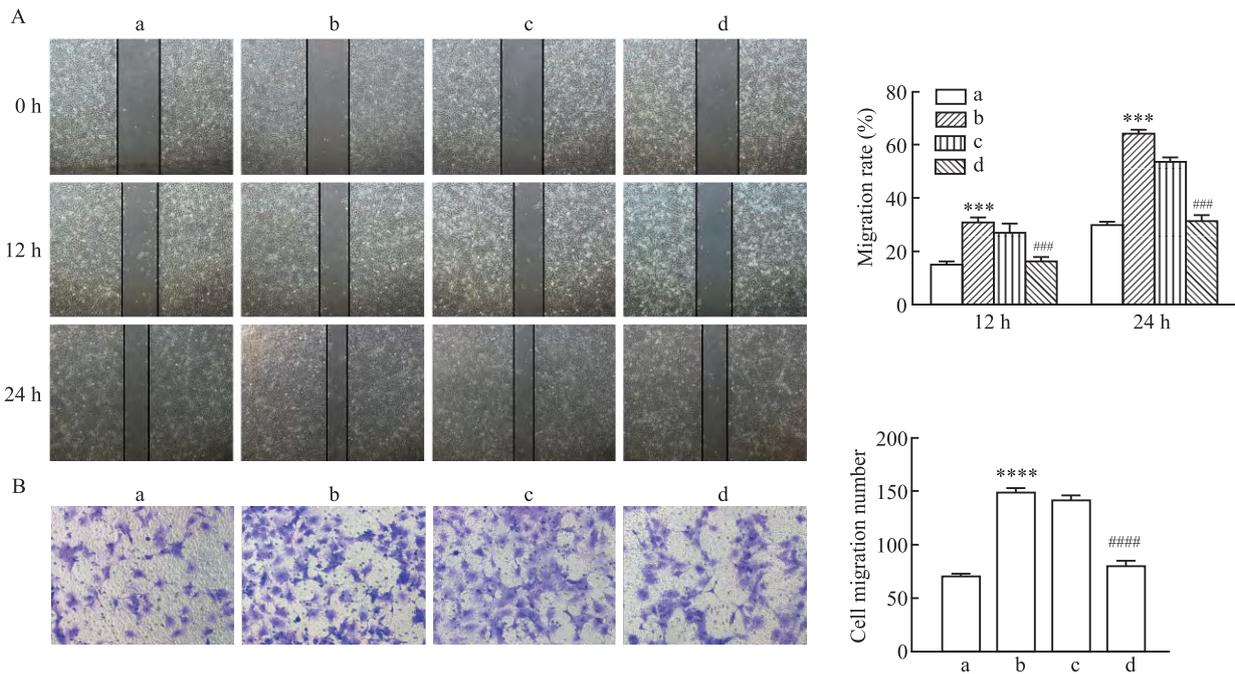
图4 RUNX3对HSCs增殖活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

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 $\times 200$; B: The cell proliferation activity was detected by EdU assay $\times 40$; a: Control group; b: TGF- β_1 group; c: TGF- β_1 +siRNA-NC group; d: TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 group; **** $P < 0.0001$ vs Control group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs TGF- β_1 +siRNA-NC group.

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

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 $\times 10$; B: Transwell experiment $\times 40$; a: Control group; b: TGF- β 1 group; c: TGF- β 1+siRNA-NC group; d: TGF- β 1+siRNA-RUNX3 group; *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Control group; ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$ vs TGF- β 1+siRNA-NC group.

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。

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. doi: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.08.007.
- [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. doi: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.08.007.
- [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.

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 ($P < 0.05$). Concurrently, the proliferation and migration capabilities of HSCs were significantly inhibited in TGF- β_1 +siRNA-RUNX3 group ($P < 0.01$). **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; hepatic 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