

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.09.017

论著·基础

荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠 lncRNAs、mRNAs 表达的影响和生物学功能分析

马晓聪, 谢家诚, 黎敏航, 崔引航, 罗伟生

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160834); 广西自然科学基金青年科学基金项目(2021GXNSFBA075020); 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(2021005)

作者单位: 530011 南宁, 广西中医药大学附属瑞康医院

通信作者: 罗伟生, E-mail: 4011188@qq.com



【摘要】目的 基于高通量测序技术探讨荔枝核总黄酮(TFL)对肝纤维化大鼠差异 lncRNAs、mRNAs 表达的影响及其生物学功能分析。**方法** 2021 年 4—7 月于广西中医药大学实验动物中心进行实验, 建立肝纤维化大鼠模型, 将大鼠随机分为对照组(Control, $n=6$)、模型组(Model, $n=7$)和荔枝核总黄酮组(TFL, $n=7$), TFL 组大鼠给予 TFL $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 干预 6 周。采用 HE 和 Masson 染色观察肝脏组织纤维化改变, ELISA 法测定血清透明质酸酶(HA)、IV 型胶原(IV-C)、层黏连蛋白(LN)、III 型前胶原(PC-III), RNA-seq 高通量测序技术筛选 Model 和 TFL 组差异表达 lncRNAs 和 mRNAs, cis 方式预测差异表达 lncRNAs 靶基因, GO 和 KEGG 对各差异表达 lncRNAs 靶基因和 mRNAs 进行生物学功能富集分析。**结果** 纤维化评分比较, Model 组 > TFL 组 > Control 组 ($F=14.420, P<0.001$), 大鼠血清 HA、LN、IV-C 和 PC-III 水平比较, Model 组 > TFL 组 > Control 组 ($F=47.055, 74.655, 177.328, 54.445, P$ 均 < 0.001)。共筛选出 Model 组与 TFL 组差异表达 lncRNAs 73 个(上调 43 个, 下调 30 个), Model 组与 TFL 组差异表达 mRNAs 261 个(上调 150 个, 下调 111 个), 采用 cis 方式共预测到 Model 与 TFL 组 24 个靶基因; 差异表达 lncRNAs 靶基因和 mRNAs 的生物学富集功能分析显示 TFL 通过参与昼夜节律、谷胱甘肽代谢泛醌、戊糖磷酸途径等信号通路发挥抗肝纤维化的作用。**结论** TFL 能够明显改善大鼠纤维化组织病理学形态, 降低血清 HA、IV-C、LN、PC-III 含量, 其作用机制可能与调控特定差异 lncRNAs 和 mRNAs 表达, 参与昼夜节律、谷胱甘肽代谢泛醌、戊糖磷酸途径等信号通路有关。

【关键词】 肝纤维化; 荔枝核总黄酮; 长链非编码 RNA; 基因表达; 生物信息学; 大鼠**【中图分类号】** R285.5; R575.2 **【文献标识码】** A**Analysis of the effects of total flavonoids on differential lncRNAs and mRNAs based on high-throughput sequencing technology** Ma Xiaocong, Xie Jiacheng, Li Minhang, Cui Yinhang, Luo Weisheng. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Province, Nanning 530011, China

Funding program: National Natural Science Foundation of China(82160834); Youth Science Foundation of Guangxi Natural Science Foundation(2021GXNSFBA075020); Qhuang Project High-level Talent Team Cultivation Project, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine (2021005)

Corresponding author: Luo Weisheng, E-mail: 4011188@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of Total Flavonoids from Litchi Seed on the expression of differential lncRNAs and mRNAs in liver fibrosis rats using high-throughput sequencing technology and to analyze its biological functions. **Methods** Experiments was conducted at the experimental animal center of Guangxi University of Chinese Medicine from April 2021 to July 2021. A rat model of liver fibrosis was established, with rats randomly assigned to the control group (Control), model group (Model), and Total Flavonoids from Litchi Seed group (TFL). The TFL group was administered $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of TFL for a total of 6 weeks. HE and Masson staining were used to observe liver tissue fibrosis changes. Serum levels of hyaluronidase (HA), type IV collagen (IV-C), laminin (LN), and type III procollagen (PC III) were measured using ELISA. RNA-seq high-throughput sequencing technology was used to identify differentially expressed lncRNAs and mRNAs between the Model and TFL groups. The cis method was used to predict target genes of differentially expressed lncRNAs. GO and KEGG analyses were conducted for biological function enrichment of the differentially expressed

lncRNAs target genes and mRNAs. **Results** Compared with the Model group, the TFL group exhibited a significant decrease in liver fibrosis score ($F = 14.420, P < 0.001$) and serum levels of HA, IV-C, LN, and PC-III ($F = 47.055, 74.655, 177.328, 54.445, P < 0.001$). A total of 73 differentially expressed lncRNAs (43 up-regulated, 30 down-regulated) were identified between the Model and TFL groups, along with 261 differentially expressed mRNAs (150 up-regulated, 111 down-regulated). Using the cis method, 24 target genes were predicted between the Model and TFL groups. Biological function enrichment analysis indicated that TFL plays an anti-liver fibrosis role by participating in signaling pathways such as circadian rhythm, glutathione metabolism, ubiquinone, and pentose phosphate. **Conclusion** TFL significantly improved the pathological morphology of fibrotic tissue in rats, reduced serum levels of HA, IV-C, LN, and PC-III, and exerted an anti-liver fibrosis effect. The mechanism of action may involve regulating the expression of specific differential lncRNAs and mRNAs and participating in signaling pathways such as circadian rhythms, glutathione metabolism, ubiquinone, and pentose phosphate.

【Key words】 Liver fibrosis; Total flavonoids from litchi chinensis seed; Long chain non-coding RNA; Gene expression; Bioinformatics; Rats

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是肝组织细胞外基质过度增生与沉积导致肝脏结构异常的疾病, 可能演变为肝硬化和肝癌, 目前缺乏特效药物。荔枝核总黄酮 (total flavone from Litchi Chinensis Sonn, TFL) 是一种抗 HF 有效成分, 通过多个靶点和信号通路抑制 HF。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 在肝纤维化中发挥重要作用, 但其作用机制尚需深入研究。本研究采用 RNA-seq 技术研究 HF 大鼠及 TFL 干预后肝组织中的 lncRNAs 和 mRNAs 表达, 结合生物信息学方法揭示 TFL 抗 HF 的可能机制, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 (220 ± 10) g, 饲养于 SPF 级动物实验室, 温度 $20 \sim 26$ °C, 湿度 $40\% \sim 70\%$; 实验大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004, 动物实验经广西中医药大学实验动物伦理委员会审批 (DW2022014-005)。

1.1.2 实验药品、试剂: (1) 药物: TFL 由广西中医药大学药学院药剂教研室提供, 其原料荔枝核购买于南宁市万药堂药物有限公司, 经广西中医药大学药学鉴定为无患子科植物荔枝属荔枝 *Litchi chinensis* 的干燥成熟种子。参照冯宇等^[1]提取 TFL 的方法。(2) 试剂: CCl₄ (天津市恒兴化学试剂制造有限公司, 货号: 20190901); TRIZOL (赛默飞世尔科技有限公司, 货号: 15596018); 特级初榨橄榄油 (山东鲁花集团有限公司, 货号: GB/T23347); 大鼠透明质酸 (HA) ELISA 试剂盒 (货号: MM-0511R1)、大鼠层黏连蛋白 (LN) ELISA 试剂盒 (货号: MM-0852R1)、大鼠 IV 型胶原酶 (IV-C) ELISA 试剂盒 (货号: MM-61483R1)、大鼠 III 型前胶原蛋白 (PC III) ELISA 试剂盒 (货号: MM-20645R1), 均购自江苏酶免实业有限公司。

1.1.3 实验仪器: ST16R 台式高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技公司), Milli-Q IQ7000 超纯水系统 (法国默克公司), HM355S 全自动石蜡切片机 (赛默飞世尔科技公司), Histocentre3 组织包埋机 (赛默飞世尔科技公司), CKX41 倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司), Epoch 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司), Agilent 2100 Bioanalyzer 生物分析仪 (美国安捷伦公司), ABI StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 系统 (美国应用生物系统公司)。

1.2 动物造模与分组 于 2021 年 4—7 月在广西中医药大学实验动物中心进行实验。大鼠适应喂养 1 周后, 参照课题组前期 HF 大鼠模型制备方法制备模型^[2], 按照 CCl₄: 橄榄油 = 4: 6 配置 40% CCl₄ 溶液。造模方法: 大鼠皮下注射 40% CCl₄, 剂量为 0.3 ml/kg, 每 3 日 1 次; 每次皮下注射前称取各大鼠体质量, 根据大鼠体质量调整 CCl₄ 溶液剂量; 造模时间 8 周, 造模期间观察大鼠毛发、神态、动作、饮食和生存情况。造模 8 周后, 随机选取 3 只大鼠采集肝脏组织进行 Masson 染色, 镜下随机选取视野观察肝脏组织病理学形态以判定模型是否成功。

将造模成功的大鼠 14 只随机分为模型组 (Model 组)、荔枝核总黄酮组 (TFL 组), 每组 7 只, 取正常大鼠 6 只作为空白对照组 (Control 组)。给药剂量参照课题组前期研究^[2], TFL 组按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃给药, 共给药 6 周, 均在相同时间段内维持大鼠体内血药浓度相对稳定, 每 2 日称取大鼠体质量调整给药剂量。Control 组和 Model 组正常饲养。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 标本采集: 大鼠末次灌胃结束后, 禁食水 8 h, 采用 4% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 4 °C 下离心留取血清, 保存于 -80 °C 冰箱待测。采血完毕后, 从大鼠肝缘起向内 (即中央汇

管区)剪出一小长条组织,分段剪开放入冻存管中,立即投入液氮中保存,采集结束后转移到 -80°C 冰箱待后续测序,剩余肝脏组织用4%多聚甲醛固定保存用于病理学形态检测。

1.3.2 肝组织纤维化评分:将甲醛固定的肝脏组织石蜡包埋,连续切片厚 $5\ \mu\text{m}$,然后用苏木精-伊红(HE)和Masson三色染色法对样本进行染色,研究肝脏组织学形态和纤维化变化。肝组织纤维化评分标准^[3]:0分,无纤维化;1分,汇管区纤维性扩大,但无纤维间隔形成;2分,汇管区纤维性扩大,少数纤维间隔形成;3分,多数纤维间隔形成,但无硬化结节;4分,肝硬化。

1.3.3 肝组织纤维化指标检测:上述血清采用ELISA方法检测各组大鼠血清HA、LN、IV-C和PCⅢ含量,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.4 高通量lncRNAs和mRNAs测序:在Model组和TFL组中随机选取3只大鼠冻存的肝脏组织,提取总RNA并使用Fragment Analyzer(Standard Sensitivity RNA Analysis Kit(15nt)(DNF-471))对总RNA浓度、RIN/RQN、28S/18S检测。构建lncRNA文库,使用Agilent 2100 Bioanalyzer检测文库的插入片段范围,同时使用ABI StepOnePlusReal-Time PCR System(Taq-Man Probe)对文库进行浓度的定量。检测合格的文库,加入NaOH变性成单链,按照预期上机数据量,稀释至一定的上机浓度。变性稀释后的文库加入到FlowCell内,与FlowCell上的接头杂交,在cBot上完成桥式PCR扩增,最后在Illumina测序系统进行上机测序;测序数据使用<https://github.com/BGI-flexlab/SOAPnuke>进行过滤,去除包含接头的reads(接头污染),去除未知碱基N含量大于5%的reads,去除低质量的reads,过滤后的“Clean Reads”保存为FASTQ格式。

1.3.5 差异表达lncRNAs和mRNAs基因筛选及差异表达lncRNAs靶基因预测:通过DESeq2软件分析并鉴定差异表达基因(DEGs),以 $\log_2\text{FC} > 1$ 和Q值 < 0.05

被认为是显著上调, $\log_2\text{FC} < 1$ 和Q值 < 0.05 被认为是显著下调,确定差异表达lncRNA和mRNA基因;本研究采用顺式(cis)方式通过位置关系预测差异lncRNA上下游100 bp的mRNA作为靶基因,通过对靶基因的功能富集分析,从而预测lncRNA的主要功能。

1.3.6 差异表达lncRNAs靶基因和mRNAs的GO和KEGG富集分析:采用GO分析对差异表达lncRNAs靶基因和mRNAs进行功能富集分析。从基因参与的生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和涉及的分子功能(molecular function, MF)三方面进行GO功能注释,确定差异表达lncRNAs靶基因和mRNAs的主要生物学功能;KEGG数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)对差异表达lncRNAs靶基因和mRNAs进行信号通路富集分析,确定差异表达lncRNAs靶基因和mRNAs参与的生物学信号通路。

1.4 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件分析处理数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*q*检验;采用Mann-Whitney检验各组间纤维化程度的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组大鼠肝脏组织病理学变化比较 HE染色和Masson染色观察大鼠肝脏组织病理学形态并评估其纤维化评分。Control组大鼠的肝组织样本显示完整的小叶结构,中央静脉清晰,肝索呈放射状,无坏死、炎症反应或纤维沉积;Model组部分区域可见肝细胞排列紊乱,小叶结构破坏,间质内明显可见炎性细胞浸润,汇管区周围可见明显蓝紫色的纤维化染色,纤维间隔形成,但未完全包绕小叶,为典型肝纤维化病理表现;TFL组炎性渗出、纤维间隔较Model组减少,小叶结构紊乱也有所恢复。纤维化评分Model组高于TFL组高于Control组($F = 14.420, P < 0.001$),见图1~3。

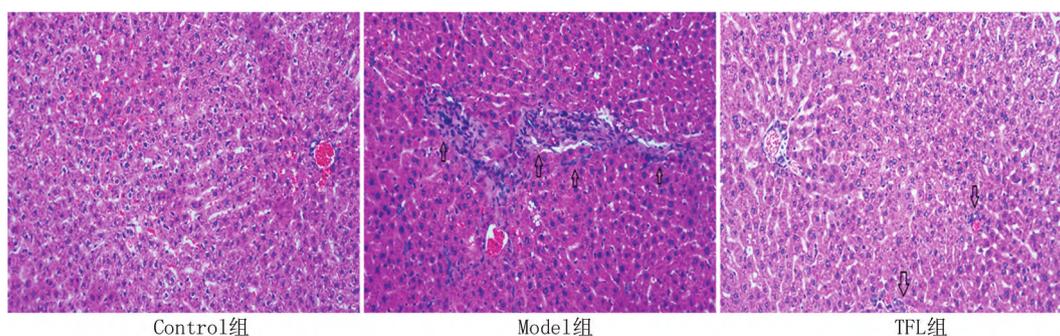


图1 3组大鼠肝组织纤维化程度比较(HE染色, $\times 100$)

Fig. 1 Comparison of the degree of liver fibrosis in three groups of rats (HE staining, $\times 100$)

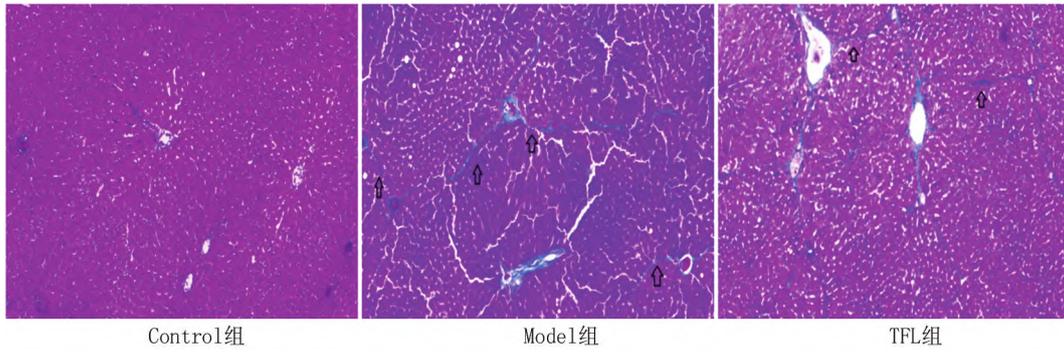
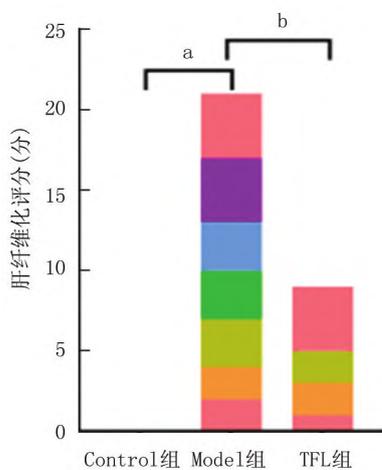


图 2 3 组大鼠肝组织纤维化程度比较 (Masson 染色, ×100)

Fig. 2 Comparison of the degree of liver fibrosis in three groups of rats (Masson staining, ×100)



注: Control 组大鼠肝组织纤维化评分为 0 分。与 Control 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 Model 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 3 3 组大鼠肝组织纤维化程度评分比较图

Fig. 3 Comparison of fibrosis degree scores of liver tissue in three groups of rats

2.2 3 组大鼠血清 HA、LN、IV-C 和 PC III 水平比较

大鼠血清 HA、LN、IV-C 和 PC III 水平 Model 组 > TFL 组 > Control 组 (P 均 < 0.01), 见表 1。

2.3 Model 组、TFL 组大鼠肝脏之间的转录组差异提取总 RNA 并进行测序, 以揭示 Model 组与 TFL

组之间肝脏组织 lncRNA 和 mRNA 基因表达模式, 分别构建差异表达 lncRNA 和 mRNA 的聚类分析热图和火山图。其中, Model 组与 TFL 组比较, lncRNAs 差异表达共 73 个, 其中上调 43 个, 下调 30 个; mRNAs 差异表达共 261 个, 其中上调 150 个, 下调 111 个, 见图 4。

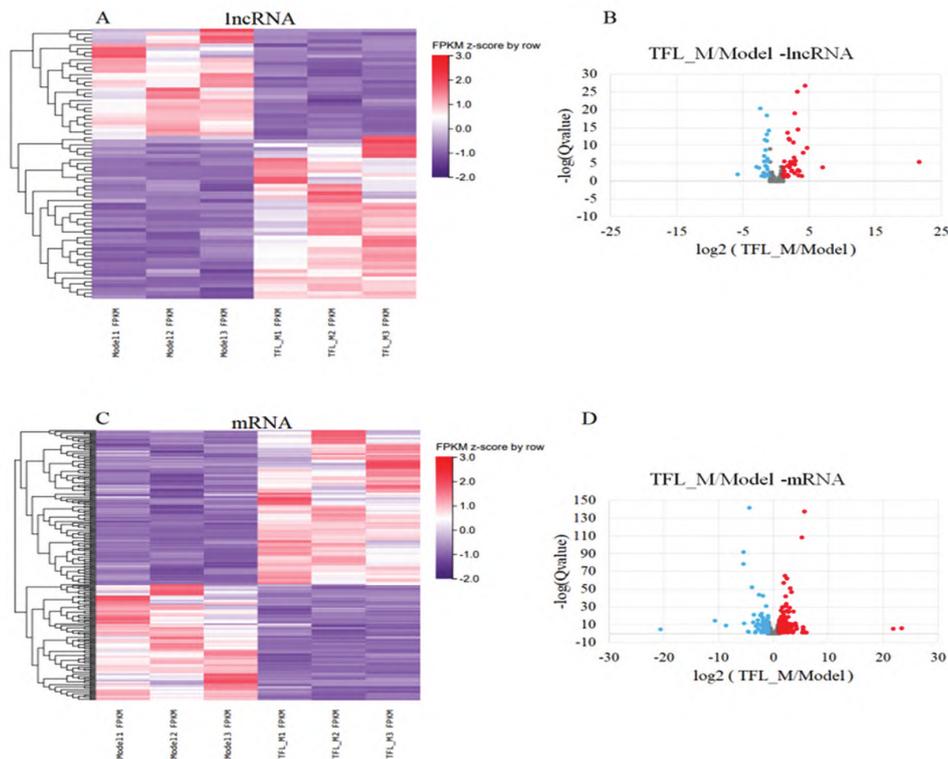
2.4 差异表达 lncRNAs 靶基因预测 通过位置关系, 即 cis 方式预测到 Model 组与 TFL 组 23 个靶基因, 靶基因数量及靶基因预测结果见表 2。

2.5 lncRNA 的潜在分子机制分析 为了进一步揭示 TFL 组治疗后的潜在分子机制, 通过对 lncRNA 靶基因进行 GO 分析, 发现差异表达 lncRNAs 靶基因参与 166 个 BP ($P < 0.05$), 其中显著富集 (Q 值 ≤ 0.05) 的 BP 有 125 个, 主要参与肾脏发育、平滑肌细胞迁移的正调控、肾小球系膜发育等 BP; 参与 26 个 CC, 主要包括溶酶体、胞浆、滑面内质网膜等; 参与 43 个分子功能 MF, 其中显著富集 (Q 值 ≤ 0.05) 的 MF 有 26 个, 包括血小板衍生生长因子激活相关受体活性、果糖-1-磷酸醛缩酶活性和甲酸四氢叶酸连接酶活性等。KEGG 分析发现差异表达 lncRNAs 靶基因富集在昼夜节律、叶酸形成碳库、戊糖磷酸途径、果糖和甘露糖代谢 4 条信号通路, 见图 5 (只列排名前 10 的生物学进程)。

表 1 3 组大鼠血清 HA、LN、IV-C、PC III 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of serum levels of HA, LN, IV-C, and PC III in three groups of rats

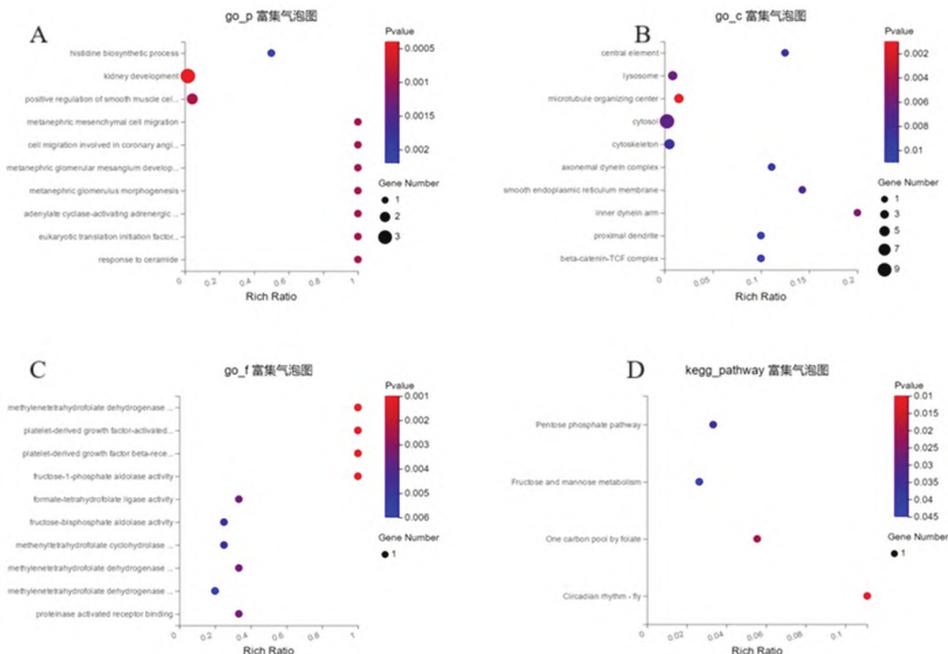
组别	n	HA (ng/L)	LN (μg/L)	IV-C (μg/L)	PC III (μg/L)
Control 组	6	404.85 ± 13.18	411.27 ± 15.76	6.47 ± 0.23	34.92 ± 1.60
Model 组	7	484.93 ± 17.25	509.47 ± 9.32	8.84 ± 0.11	44.94 ± 1.36
TFL 组	7	435.01 ± 14.31	458.61 ± 17.32	7.57 ± 0.30	40.25 ± 2.11
F 值		47.055	74.655	177.328	54.445
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



注:A. Model 组与 TFL 组差异表达 lncRNA 基因聚类分析热图;B. Model 组与 TFL 组差异表达 lncRNA 基因火山图;C. Model 组与 TFL 组差异表达 mRNA 基因聚类分析热图;D. Model 组与 TFL 组差异表达 mRNA 基因火山图。

图 4 Model 组与 TFL 组差异表达 lncRNAs 和 mRNAs 表达聚类热图和火山图

Fig. 4 Cluster heatmap and volcano plot of differential expression of lncRNAs and mRNAs between Model group and TFL group



注:A. Model 组与 TFL 组差异表达 lncRNAs 靶基因 GO 富集中生物学过程图;B. GO 富集中细胞组分富集图;C. GO 富集中分子功能富集图;D. 差异表达的 lncRNA 靶基因 KEGG 的富集图。

图 5 Model 组与 TFL 组差异表达 lncRNAs 靶基因 GO 和 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble plot of GO and KEGG enrichment analysis of differential expression of lncRNAs target genes between Model group and TFL group

表 2 Model 组与 TFL 组差异表达 lncRNAs 靶基因预测结果

Tab. 2 Prediction results of differentially expressed lncRNAs target genes between the Model group and TFL group

序号	基因符号	转录本 ID	类型	靶基因
1	LOC100909928	URS0000B24FE7; XR_353567.2	down	LOC108350772
2	LOC100910424	XR_594153.2	down	Pdcd6ip
3	LOC102547807	URS0000B2C19F; URS0000B2CA6A; XR_001842366.1; XR_001842367.1; XR_361964.3; XR_597303.2	up	LOC100909916
4	LOC102548271	XR_350628.3	up	Spon1
5	LOC102551726	XR_356366.3	up	Tle3
6	LOC102554269	XR_001838802.1; XR_001838803.1; XR_001838804.1; XR_001838805.1	up	Tmcc3
7	LOC102554669	URS0000B29310; XR_595259.2	down	Bri3
8	LOC102555188	XR_354013.3	down	Aldob
9	LOC102555480	XR_001842117.1; XR_361407.3; XR_597025.2	up	Pdgfrb
10	LOC102555570	XR_001839949.1	up	Tgif1;RGD1563667
11	LOC102555894	XR_354920.2	up	Mthfd1
12	LOC103691262	XR_590538.1	down	Syce1
13	LOC103693416	XR_594855.2	down	Hlf
14	LOC103693766	XR_001841406.1; XR_596252.2	up	Klf12
15	LOC108350024	XR_001836737.1	down	Kcnab1
16	LOC108350210	XR_001836982.1	up	Pde4d
17	LOC108350522	XR_001837367.1	down	Sulf2
18	LOC108351556	XR_001839051.1	down	Eif4b;Tns2
19*		URS0000B2B0B1	up	Vom2r7
20*		URS0000B21E2E	up	Btg1
21*		URS0000B30FF4	up	Dnah7

注: * 为新基因。

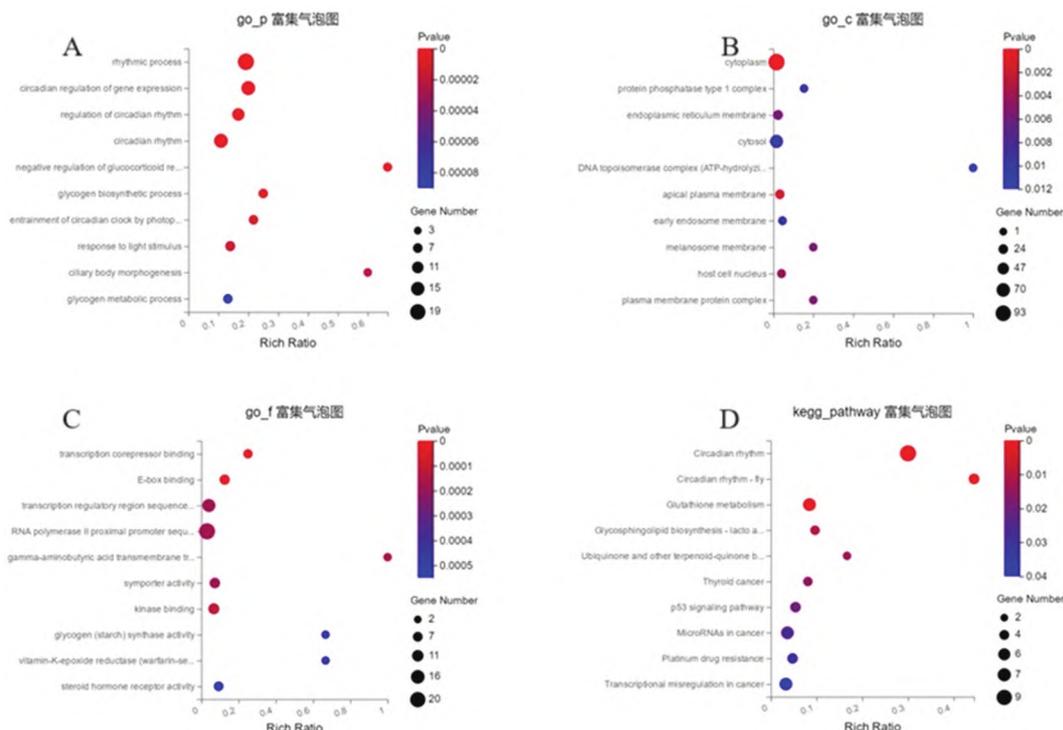
2.6 差异表达 mRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析发现 Model 组与 TFL 组差异表达 mRNAs 参与 397 个 BP ($P < 0.05$), 其中显著富集 (Q 值 ≤ 0.05) 的 BP 有 20 个, 主要包括节律过程、昼夜节律调节和糖皮质激素受体信号通路的负调控等 BP; 参与 51 个 CC ($P < 0.05$), 主要包括细胞质、顶端质膜和宿主细胞核等; 参与 165 个 MF, 其中显著富集 (Q 值 ≤ 0.05) 的 MF 有 12 个, 主要包括转录辅抑制因子结合、激酶结合、 γ -氨基丁酸跨膜转运蛋白活性等; KEGG 分析发现差异表达 mRNAs 富集在 15 条信号通路, 其中显著富集 (Q 值 ≤ 0.05) 的信号通路有 3 条, 主要包括昼夜节律、谷胱甘肽代谢泛醌和其他萜类醌生物合成, 见图 6 (只列排名前 10 的生物学进程和信号通路)。

3 讨论

本研究对 TFL 缓解 HF 进程进行了分析, 发现 TFL 可减缓 HF 进程, 降低炎症反应。TFL 组中低表达的 Tns2 和 Hlf 通过磷酸化进程延缓 HF 进程。RNA-seq 发现 73 个差异 lncRNA 和 261 个差异 mRNA, 差异表达基因主要富集于昼夜节律信号通路, 呈现出影响 HF 的潜在基因和调控网络。在 lncRNA 转录本中注释在血小板衍生生长因子激活相关受体活性、昼夜节律、戊糖磷酸途径的 23 种靶基因, 包括 Hlf、Eif4b 和 Tns2 相关基因。

HF 进程是一个高度协调的过程, 涉及极其复杂的信号调节网络。已发现包括 mRNA、miRNA 和 lncRNA 在内的多种分子通过多种信号通路以各种方



注: A. Model 组与 TFL 组差异表达 mRNAs 的 GO 富集中生物学过程图; B. GO 富集中细胞组分富集图; C. GO 富集中分子功能富集图; D. 差异表达 mRNAs 的 KEGG 富集图。

图 6 Model 组与 TFL 组差异表达 mRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 6 Bubble plot of GO and KEGG enrichment analysis of differentially expressed mRNAs between the Model group and TFL group

式参与肝纤维化。如 LncRNA-ATB 可通过竞争性结合 miR-425-5p 激活肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC), 增加 I 型胶原产生来促进 HCV 诱导的 HF 发生。同时, LncRNA-MEG8 在活化的 HSC、损伤的肝细胞和 HF 组织中过表达, MEG8 可通过抑制 Notch 通路进而抑制肝细胞的 HSC 活化和 EMT 过程, 具有抗纤维化的作用^[4]。LncRNA-Gm5091 对乙醇诱导的 HSC 激活和炎症反应产生负调控作用, Gm5091/miR-27b/23b/24 可以减轻酒精性肝纤维化^[5]。通过 lncRNAs 靶基因和 mRNAs 生物学功能分析表明, 昼夜节律信号通路在 TFL 干预前后均显著富集, 说明昼夜节律信号通路是 lncRNAs 介导 TFL 抗 HF 作用的重要靶点。许多证据表明昼夜节律的破坏是多种脏器从器质性损伤到纤维化的关键分子机制^[6-9], 肝脏正常状态下以昼夜节律的方式表达多种基因, 不同的基因功能受昼夜节律的直接或间接控制^[10], 通过生物信息学分析发现了在转录水平上控制肝脏中昼夜节律动力学的调节结构^[11]。

本研究发现 Clock、Cry2、Per1、Per2、Per3 和 Arntl 等基因显著富集在昼夜节律信号通路。HF 小鼠表现出日常节律的紊乱, 且其昼夜节律信号通路上的时钟

基因 Clock 和 Cry2 以及 2 个重要的时钟调节基因 PPAR- α 和 Cyp450 mRNA 水平显著降低; 胆汁淤积型大鼠长期暴露于完全黑暗环境可抑制胆道增生和 HF, 这与时钟基因 Per1、BMAL1、Clock 和 Cry1 在肝细胞和胆管细胞中的表达下调相关^[12-13]。酒精性肝损伤昼夜节律基因表达分析表明损伤程度与肝脏昼夜节律基因 Per1 的变异有关。Per2 基因也是肝脏昼夜节律系统的重要组成部分, Per2 可能通过调节小鼠 Cyp1A2 的表达, 在醋氨酚 (APAP) 诱导的肝毒性的日变化中发挥作用, Per2 表达下调会激活 HSC, 并通过 TRAIL-R2/DR5 途径抑制 HSC 的凋亡, 从而促进 HF。TGF- β /Smads 依赖的转录信号是 HF 发展过程中重要的细胞内介质, Smad3 在小鼠肝脏中以昼夜节律方式表达, 这取决于 Clock 与 Blml 的比值^[14-17]。时钟基因 Bmal1/Arntl 通过 IDH1/ α -kg 介导的糖酵解抑制 HF 中 HSC 的表型转化, 从而抑制 HF。由此可见昼夜节律信号通路的相关蛋白与 HF 密切相关, 而通过影响时钟基因的表达, 也可以对 HF 起到改善作用^[18-20]。当前研究中医药通过调控昼夜调节信号通路基因治疗 HF 的报道较少, 这也为下一步研究提供了思路。

综上所述, 本研究初步发现 TFL 对 HF 大鼠肝脏

组织差异 lncRNAs 和 mRNAs 表达谱的影响,推测 TFL 通过调控特定差异 lncRNAs 和 mRNAs 表达水平发挥抗肝纤维化的作用,这些 lncRNAs 靶基因和 mRNAs 涉及诸多生物学过程和信号通路,为后续的研究提供了新思路。后续研究将深入筛选关键差异表达 lncRNAs 和 mRNAs 并分析其作用机制,对其生物学功能所富集的信号通路上下游基因、蛋白调控机制进行分子生物学层面的验证。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

马晓聪、谢家诚:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;黎敏航、罗伟生:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;崔引航:实施研究过程,资料搜集整理,统计分析

参考文献

[1] 冯宇,刘雪梅,罗伟生,等.大孔树脂纯化荔枝核总黄酮工艺研究[J].中草药,2019,50(9):2087-2093. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.012.

[2] 冯茵怡,严炯艺,夏星,等.荔枝核总黄酮对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制和潜在 Q-marker 的预测[J].中国中药杂志,2020,45(23):5722-5731. DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20200720.401.

[3] 吴彬彬,徐小琴,顾星星,等.脂肪肝诊断中 ElastPQ 弹性成像技术检测肝硬度与肝纤维化评分及 FIB-4 指数的相关性分析[J].肝脏,2024,29(1):73-76. DOI:10.3969/j.issn.1008-1704.2024.01.022.

[4] Chen T, Lin H, Chen X, et al. LncRNA Meg8 suppresses activation of hepatic stellate cells and epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes via the Notch pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020,521(4):921-927. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.11.015.

[5] Zhou B, Yuan W, Li X. LncRNA Gm5091 alleviates alcoholic hepatic fibrosis by sponging miR-27b/23b/24 in mice[J]. Cell Biol Int, 2018,42(10):1330-1339. DOI:10.1002/cbin.11021.

[6] 蒋云霞,罗伟生,蔡碧莲,等.荔枝核总黄酮对大鼠 HSC-T6 差异表达蛋白的筛选及生物信息学分析[J].时珍国医国药,2021,32(4):776-779. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2021.04.03.

[7] Giri A, Wang Q, Rahman I, et al. Circadian molecular clock disruption in chronic pulmonary diseases[J]. Trends Mol Med, 2022,28(6):513-527. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.383.

[8] Chen L, Xia S, Wang F, et al. m(6)A methylation-induced NR1D1 ablation disrupts the HSC circadian clock and promotes hepatic fibrosis[J]. Pharmacol Res, 2023,189:106704. DOI:10.1016/j.phrs.2023.106704.

[9] 吴智煌.肝纤维化分子机制的研究进展[J].疑难病杂志,2023,22(4):445-448. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.021.

[10] Qu M, Zhang G, Qu H, et al. Circadian regulator BMAL1: CLOCK promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma by controlling apoptosis and cell cycle[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023,120(2):e2214829120. DOI:10.1073/pnas.2214829120.

[11] González-Fernández B, Sánchez DI, Crespo I, et al. Melatonin attenuates dysregulation of the circadian clock pathway in mice with CCl₄-induced fibrosis and human hepatic stellate cells[J]. Front Pharmacol, 2018,9:556. DOI:10.3389/fphar.2018.00556.

[12] Costa R, Mangini C, Domenie ED, et al. Circadian rhythms and the liver[J]. Liver Int, 2023,43(3):534-545. DOI:10.1111/liv.15501.

[13] 沈云海,付明生,刘秀平,等.n-3 多不饱和脂肪酸对大鼠酒精性脂肪肝炎反应及肝纤维化的影响[J].疑难病杂志,2020,19(2):180-183,189. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.02.016.

[14] Xu L, Yang TY, Zhou YW, et al. Bmal1 inhibits phenotypic transformation of hepatic stellate cells in liver fibrosis via IDH1/α-KG-mediated glycolysis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022,43(2):316-329. DOI:10.1038/s41401-021-00658-9.

[15] Zheng W, Chen C, Chen S, et al. Integrated analysis of long non-coding RNAs and mRNAs associated with peritendinous fibrosis[J]. J Adv Res, 2019,15:49-58. DOI:10.21203/rs.3.rs-38693/v1.

[16] 邓威,陈倩.不同病因肝纤维化治疗的研究进展[J].疑难病杂志,2021,20(9):957-962. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2021.09.022.

[17] 刘玮,连晶晶,李洁.恩替卡韦联合治疗对慢性乙型肝炎患者炎症反应、肝功能及肝纤维化的影响[J].临床误诊误治,2019,32(1):35-39. DOI:10.3969/j.issn.1002-3429.2019.01.009.

[18] 喻雪飞,李理,郑林鑫,等.博来霉素诱导小鼠肺纤维化中差异表达的 mRNA 及其与 LncRNA 的共表达网络关系[J].南方医科大学学报,2021,41(1):39-46. DOI:10.12122/j.issn.1673-4254.2021.01.05.

[19] 刘梦,李志峰,冯宇,等.荔枝核化学成分的分离与鉴定[J].中草药,2019,50(15):3593-3597. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.012.

[20] Peng H, Wan LY, Liang JJ, et al. The roles of lncRNA in hepatic fibrosis[J]. Cell Biosci, 2018,8:63. DOI:10.1186/s13578-018-0259-6.

(收稿日期:2024-04-17)