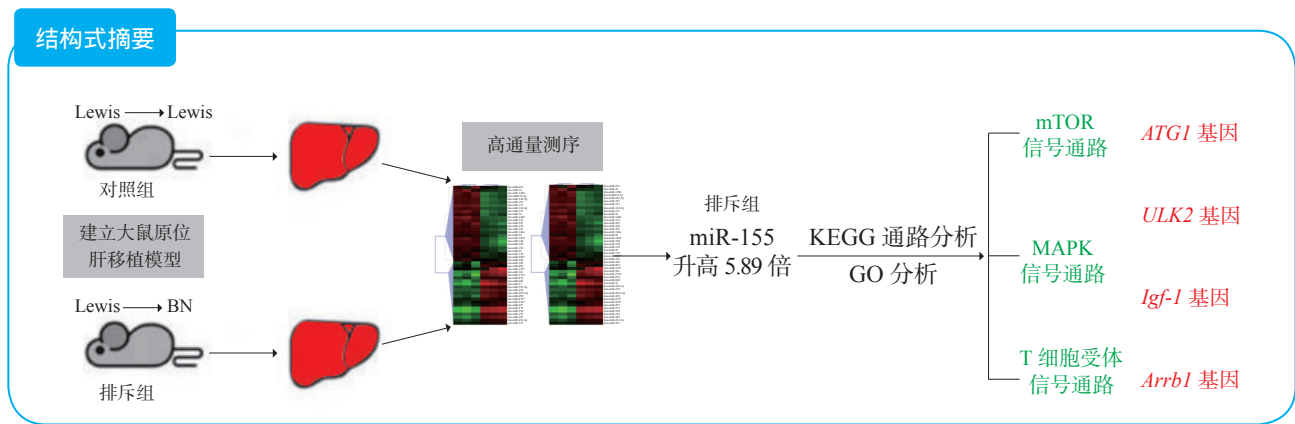


· 实验研究 ·

MiR-155在大鼠肝移植术后排斥反应中作用机制的研究

李坤 孔伟浩 张俊斌 陈强星 孙翀 尹东亮 李慧 张剑



【摘要】 目的 探讨微小核糖核酸 (miRNA, miR) -155 在大鼠肝移植术后排斥反应中的作用机制。方法 将大鼠分为异系移植模型组 (排斥组, $n=10$), 供体为雄性 Lewis 大鼠, 受体为雄性 BN 大鼠; 同系移植模型组 (对照组, $n=10$), 供、受体均为雄性 Lewis 大鼠; 两组均按照“二袖套法”建立大鼠原位肝移植模型。术后第 7 日处死大鼠取血标本和肝组织。检测肝功能指标丙氨酸转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TB) 以及细胞因子白细胞介素 (IL) -2、IL-4、干扰素 (IFN) - γ 的水平; 光学显微镜下观察肝组织的病理变化情况。对两组大鼠肝组织样本每组选取 3 例进行高通量测序, 检测排斥反应相关 miRNA, 进行生物信息学分析, 预测并分析其相关的信号通路以及基因。**结果** 肝功能检测显示排斥组大鼠血清中 ALT、TB 水平均高于对照组, 差异均有统计学意义 (均为 $P<0.01$)。外周血细胞因子检测显示, 与对照组比较, 排斥组的 IL-2 和 IFN- γ 水平升高 (均为 $P<0.01$), IL-4 水平下降 ($P<0.01$)。病理检查结果提示, 与对照组比较, 排斥组发生了明显的排斥反应。高通量检测结果显示排斥组 miR-155 表达上调明显, 为对照组 5.89 倍。生物信息学分析提示, miR-155 的上调表达与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 及 T 细胞受体信号通路有关, 可能参与调节的基因有酵母自噬基因 (*ATG1*) 及其同源基因 *ULK2*、胰岛素样生长因子 -1 (*Igf-1*) 以及 G 蛋白偶联受体的调节基因 (*Arrb1*) 等。**结论** miR-155 可能促进了大鼠肝移植术后排斥反应的发生发展, 涉及此过程的信号通路可能有 mTOR、MAPK 信号通路及 T 细胞受体信号途径, *ATG1*、*ULK2*、*Igf-1* 以及 *Arrb1* 等基因可能参与了此过程。

【关键词】 肝移植; 急性排斥反应; 免疫耐受; 微小核糖核酸 (miRNA); miR-155; 高通量测序; 信号通路; 生物信息学分析; 基因

【中图分类号】 R617, R318.04 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2018) 03-0005-06

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.03.005

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A020212159); 广州市科学研究专项项目 (2060404)

作者单位: 510630 广州, 中山大学附属第三医院肝脏外科暨肝移植中心

作者简介: 李坤, 男, 1993 年生, 硕士, 住院医师, 研究方向为肝脏肿瘤、肝脏移植, Email: likun0708@163.com

通讯作者: 张剑, 男, 1967 年生, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向为肝脏肿瘤、肝脏移植, Email: zhangjian629@sina.com

Study of miR-155 in the mechanism of rejection after liver transplantation in rats Li Kun, Kong Weihao, Zhang Junbin, Chen Qiangxing, Sun Chong, Yin Dongliang, Li Hui, Zhang Jian. Department of Hepatic Surgery and Liver Transplantation Center, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: Zhang Jian, Email: zhangjian629@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of microRNA (miRNA, miR)-155 in the rejection after liver transplantation in rats. **Methods** The rats were divided into two groups. In the xenograft model group (rejection group, $n=10$), the donors were male Lewis rats and the recipients were male BN rats. In the allograft model group (control group, $n=10$), both the donors and recipients were male Lewis rats. The rat models with orthotopic liver transplantation were established by two-cuff technique in two groups. At postoperative 7 d, the animals were sacrificed for the collection of blood and liver tissue samples. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TB), and cytokines of interleukin (IL)-2, IL-4, interferon (IFN)- γ were quantitatively measured. The pathological changes of liver tissues were observed under light microscope. In each group, three liver tissue samples were prepared and subject to high-throughput sequencing. The miRNAs related to rejection were identified for bioinformatics analysis to predict and analyze relevant signaling pathways and genes. **Results** In the rejection group, the serum levels of ALT and TB were significantly higher than those in the control group (both $P<0.01$). Compared with the control group, the levels of IL-2 and IFN- γ were considerably up-regulated (both $P<0.01$), whereas the level of IL-4 was dramatically down-regulated ($P<0.01$). Pathological examination demonstrated that more evident rejections were observed in the rejection group than the control group. High-throughput sequencing revealed that the expression level of miR-155 was significantly up-regulated in the rejection group, which was 5.89 times of that in the control group. Bioinformatics analysis demonstrated that up-regulation of miR-155 was associated with the mammalian target of rapamycin (mTOR), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and T cell receptor signaling pathways. The genes which were probably responsible for regulation included the yeast autophagy related gene 1 (ATG1) and its homologous gene *ULK2*, insulin-like growth factor-1 (*Igf-1*) and G protein-coupled receptor regulatory gene (*Arrb1*), etc. **Conclusions** miR-155 might promote the incidence and progression of rejection after liver transplantation in rats. The involved signaling pathways probably include the mTOR, MAPK signaling pathway and T cell receptor signaling pathway. *ATG1*, *ULK2*, *Igf-1*, and *Arrb1* genes may participate in this process.

【Key words】 Liver transplantation; Acute rejection; Immune tolerance; microRNA (miRNA); miR-155; High-throughput sequencing; Signaling pathway; Bioinformatics analysis; Gene

肝移植手术是治疗终末期肝病的最有效方式^[1]。但是肝移植术后仍存在排斥反应的问题, 制约着患者远期存活率以及生活质量。研究免疫耐受的发生机制以及寻求更为理想的治疗方案一直为改善肝移植术后排斥反应的研究重点^[2-3]。微小核糖核酸 (microRNA, miRNA, miR) 是一类长链非编码 RNA 分子, 在免疫细胞的发育以及应答中扮演重要角色^[4-7]。目前 miRNA 在免疫调节领域的作用机制仍不明确, 表达谱不齐全, 有待深入的完善以及探究。因此, 本研究构建大鼠肝移植排斥反应模型, 通过高通量测序的方式检测大鼠移植肝中 miRNA 表达情况, 筛选出表达明显的 miRNA 并结合生物信息学的方法预测相关信号通路, 为进一步探究其在肝移植排斥反应中的作用机制作前期实验准备。

1 材料与方法

1.1 实验动物以及分组

雄性 Lewis 大鼠 30 只, 体质量 220~280 g, 雌性 BN 大鼠 10 只, 体质量 260~280 g, 均为无特定病原体 (SPF) 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将大鼠分为异系移植模型组 (排斥组, $n=10$), 供体为雄性 Lewis 大鼠, 受体为雌性 BN 大鼠; 同系移植模型组 (对照组, $n=10$), 供、受体均为雄性 Lewis 大鼠; 两组均按照“二袖套法”建立大鼠原位肝移植模型^[8]。本研究开展的动物手术场所为中山大学北校区动物实验中心 SPF 级手术室。

1.2 手术器材和实验材料

手术器械: 持针器 1 把、组织剪 1 把、血管钳若

干把、血管夹2个、手术刀1把、显微剪1把、显微镊2把、显微持针钳1把,均购自广州器化医疗器械有限公司。

实验试剂以及材料:2%戊巴比妥由中山大学北校区动物实验中心提供;林格氏液、生理盐水、阿托品注射液、肝素钠注射液、注射用青霉素钠、医用酒精、安尔碘、介入手术专用穿刺鞘管若干、硬膜外麻醉专用导管若干等由中山大学附属第三医院提供。

1.3 实验方法

本实验大鼠均于术后第7日处死取材。处死前,迅速从下腔静脉采集血标本,检测肝功能指标丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TB)以及细胞因子白细胞介素(IL)-2、IL-4、干扰素(IFN)- γ 的水平。获取肝组织进行苏木素-伊红(HE)染色后于光学显微镜下观察肝组织的病理变化情况。对两组大鼠肝组织样本每组选取3例进行高通量测序,检测排斥反应相关miRNA,此实验由广州市锐博生物科技有限公司施行。筛选出表达差异明显的miRNA,进行生物信息学分析,采用基因本体(gene ontology, GO)分析与京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析法预测并分析其相关的信号通路以及基因。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。实验所得数据以均数 \pm 标准差表示,肝功能、细胞因子组间均数比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。miRNA高通量测序结果采用倍数变化(fold change, FC)来表示表达差异,若两组间miRNA表达差异(上调或下调)的倍数值 >1.5 且 $P<0.05$,则

认为该miRNA的表达差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠血清肝功能和细胞因子水平的比较

两组大鼠术后7d血清肝功能和细胞因子水平的比较见表1。排斥组大鼠血清中ALT、TB水平均高于对照组,差异均有统计学意义($t=16.37$, $P<0.01$; $t=12.11$, $P<0.01$)。与对照组比较,排斥组的IL-2和IFN- γ 水平升高($t=30.43$, $P<0.01$; $t=25.24$, $P<0.01$),IL-4水平下降($t=24.67$, $P<0.01$)。

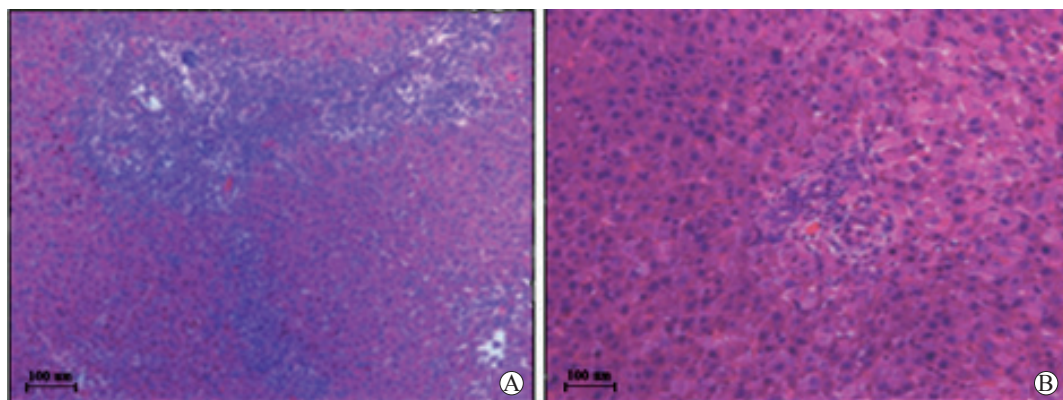
2.2 两组大鼠肝组织病理学检查结果

HE染色结果显示,肝移植术后7d,排斥组大鼠肝细胞大量坏死,肝小叶结构破坏严重,汇管区及附近组织炎症细胞浸润明显,提示排斥反应程度严重;对照组仅有可观察到少量的炎症细胞浸润,未见明显肝细胞坏死,提示未发生明显排斥反应(图1)。

表1 两组大鼠肝移植术后7d肝功能和细胞因子水平的比较

Table 1 Comparison of liver function and cytokine levels of rats between two groups at 7 d after liver transplantation ($\bar{x} \pm s$)

指标	排斥组 ($n=10$)	对照组 ($n=10$)	t 值	P 值
ALT (U/L)	289 \pm 40	64 \pm 16	16.37	<0.01
TB ($\mu\text{mol/L}$)	26.1 \pm 5.3	4.9 \pm 1.6	12.11	<0.01
IL-2 (ng/L)	331 \pm 23	58 \pm 17	30.43	<0.01
IL-4 (ng/L)	88 \pm 24	231 \pm 17	24.67	<0.01
IFN- γ (ng/L)	302 \pm 25	50 \pm 19	25.24	<0.01



A 图为排斥组; B 图为对照组

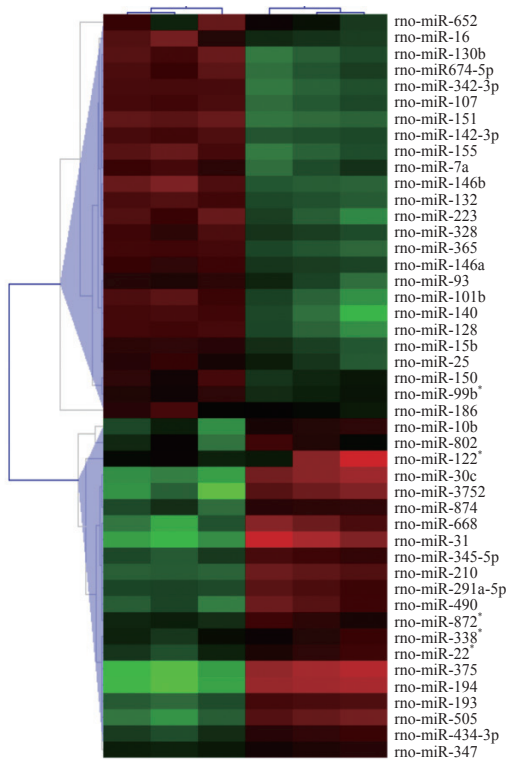
图1 两组大鼠肝移植术后7d肝组织病理学图片(HE, $\times 200$)

Figure 1 Histopathological pictures of liver tissue of rats in two groups at 7 d after liver transplantation

2.3 两组大鼠肝组织 miRNA 差异表达分析

通过比较排斥组和对照组的 miRNA 表达, 发现有 25 个 miRNA 表达上调以及 21 个 miRNA 表达下调, 其中 miR-155 在排斥组中表达上调, 且表达量为对照组的 5.89 倍 (图 2, 表 2)。

上述结果显示, miR-155 在大鼠肝移植术后发生的排斥反应中表达上调, 与对照组比较差异有统计学意义。因此, 我们继续采用 miRWalk 数据库对 miR-155 进行进一步的生物信息学分析。结合 miR-155 与肝移植术后排斥反应相关的研究^[9-11], 我们进一步筛选出 miR-155 在大鼠肝移植术后发生的排斥反应中可能涉及的信号通路有哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及 T 细胞受体信号通路, 可能参与调节的基因有酵母自噬基因 (autophagy related gene 1, *ATG1*) 及其同源基因 *ULK2*、胰岛素样生长因子 -1 (insulin-like growth factors-1, *Igf-1*) 以及 G 蛋白偶联受体的调节基因 (*arrestin beta 1*, *Arb1*) 等。



红色为 miRNA 高表达, 绿色为 miRNA 低表达, rno 为小鼠

图 2 大鼠肝组织 miRNA 表达聚类分析图
Figure 2 Cluster analysis picture of miRNA expression in liver tissue of rats

表 2 大鼠肝移植术后发生排斥反应中表达差异变化的 miRNA

Table 2 The miRNA with differential changes during rejection after liver transplantation in rats

miRNA 名称	FC (P<0.05)
表达上调	
rno-miR-155	5.89
rno-miR-146b	5.52
rno-miR-151	5.21
rno-miR-130b	4.87
rno-miR-140	4.78
rno-miR-223	4.59
rno-miR-101b	4.58
rno-miR-342-3p	4.37
rno-miR-128	4.24
rno-miR-674-5p	4.02
rno-miR-107	3.93
rno-miR-132	3.88
rno-miR-365	3.73
rno-miR-142-3p	3.71
rno-miR-16	3.23
rno-miR-7a	3.17
rno-miR-328	2.96
rno-miR-146a	2.73
rno-miR-15b	2.54
rno-miR-93	2.45
rno-miR-25	2.21
rno-miR-150	2.07
rno-miR-652	1.87
rno-miR-99b*	1.73
rno-miR-186	1.67
表达下调	
rno-miR-194	0.05
rno-miR-375	0.05
rno-miR-31	0.06
rno-miR-30c	0.09
rno-miR-3752	0.11
rno-miR-668	0.14
rno-miR-505	0.15
rno-miR-210	0.19
rno-miR-490	0.21
rno-miR-193	0.24
rno-miR-122*	0.27
rno-miR-291a-5p	0.28
rno-miR-345-5p	0.31
rno-miR-874	0.36
rno-miR-434-3p	0.39
rno-miR-10b	0.40
rno-miR-22*	0.42
rno-miR-872*	0.49
rno-miR-802	0.53
rno-miR-338*	0.55
rno-miR-347	0.61

rno 为小鼠

3 讨论

既往的学者发现 miRNA 参与免疫耐受生物学进程的调控, 在器官移植排斥反应过程的调控中起着重要的调节作用^[12-15]。移植术后受体可以表达不同的 miRNA, 但其 miRNA 表达谱不齐全, 部分 miRNA 的种类表达情况尚未见报道, 且 miRNA 的作用机制也未完全阐明。因此, 本研究从动物实验入手, 探讨大鼠肝移植术后 miRNA 表达谱的差异, 筛选出表达差异明显的 miRNA 并检测的相关信号通路以及作用靶基因, 为进一步探讨 miRNA 在肝移植术后免疫排斥反应中的作用机制进行铺垫。

本研究显示, 肝移植术后 7 d, 排斥组大鼠的 ALT 和 TB 较对照组明显升高, 病理学检查提示肝脏发生明显的细胞排列结构改变, 这些都说明了肝移植术后 7 d, 排斥组大鼠肝脏发生了明显的排斥反应。对受体发生排斥反应的肝脏进行高通量测序分析, 结果显示移植肝的 miRNA 表达谱较同系移植模型组发生显著变化, 其中表达上调的有 25 个, 表达下调的有 21 个。miR-151、miR-146b、miR-155 等上调幅度较大, miR-194、miR-375、miR-31 等下调幅度较大, 这些提示 miRNA 可能与肝移植术后排斥反应的发生关系密切。在异系移植模型组上调的众多 miRNA 中, miR-155 的上调最为明显, 较同系移植模型组上调 5.89 倍, 因此我们选取表达最高的 miR-155 与大鼠肝移植术后排斥反应的关系进行初步探究。

Rodriguez 等^[16]的研究显示 miR-155 在免疫系统中起着重要作用, 但具体研究机制仍未明确, 在大鼠肝移植中的作用也未见报道。而我们的实验结果显示 miR-155 在大鼠肝移植后明显表达, 说明了 miR-155 参与了大鼠肝移植术后的免疫排斥反应。因此, 我们推测在肝移植术后, 大鼠肝细胞可能通过上调 miR-155 的表达促进排斥反应的发生。我们对 miR-155 进行 GO 以及 KEGG 信号通路分析, 初步筛选出了 mTOR 信号通路、MAPK 信号通路及 T 细胞受体信号传导途径可能参与了此过程。C 末端的 mTOR 蛋白具有激酶活性, 是细胞生长和增殖的关键调节分子, 一般通过 PI3K/AKT 或 Ras/ERK 信号通路起作用, 抑制 mTOR 信号通路可以使细胞停滞在 G₁ 期而触发细胞凋亡, 临床上也通过药物抑制 mTOR 信号通路达到减轻急性排斥反应的过程。miR-155 可能促进大鼠肝移植术后排斥反应, 其机制可能是通过激活 mTOR

信号通路参与急性排斥反应的发生与发展, 同时与 MAPK 信号通路及 T 细胞受体信号传导途径密切相关, 其中 *ATG1*、*ULK2*、*Igf-1* 以及 *Arrb1* 等基因可能参与了此过程。以上推测都有待于完善进一步的研究以证实。因此, 我们下一步的研究重点在于给予免疫抑制剂抑制大鼠肝移植术后排斥反应, 检测 miR-155 是否明显受到抑制, 筛选出其与 mTOR、MAPK 以及 T 细胞受体信号传导途径交汇的关键蛋白, 并检测 *ATG1*、*ULK2*、*Igf-1* 等基因的表达情况, 探讨 miR-155 与大鼠肝移植术后排斥反应的作用机制。

综上所述, 肝移植术后排斥反应是一个极其复杂的免疫应答过程, miRNA 与移植免疫密切相关, 但 miRNA 表达谱未完善, 其具体作用机制有待进一步探究。本研究初步发现 miR-155 在肝脏发生排斥反应时表达明显上调, 并初步筛选出相关作用的基因以及信号通路, 为深入阐明 miR-155 与大鼠肝移植术后排斥反应的作用机制及探讨临床诱导免疫耐受, 提供新的思路。

参考文献:

- [1] 陈规划, 姜楠. 肝移植免疫耐受的研究热点和思考[J]. 器官移植, 2017, 8(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.01.001.
CHEN GH, JIANG N. Research focus and thinking of immune tolerance in liver transplantation[J]. Organ Transplant, 2017, 8(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.01.001.
- [2] LODHI SA, LAMB KE, MEIER-KRIESCHE HU. Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success[J]. Am J Transplant, 2011, 11(6): 1226-1235. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03539.x.
- [3] 傅志仁, 施晓敏, 张晓君. 肝移植术后免疫抑制剂的长期应用及其不良反应的控制[J]. 外科理论与实践, 2008, 13(4): 310-312.
FU ZR, SHI XM, ZHANG XJ. Control of long-term adverse effects of immunosuppressor treatment after liver transplantation[J]. J Surg Conc Pract, 2008, 13(4): 310-312.
- [4] 吴永璐, 陈洁. MicroRNAs 表达在泌尿系肿瘤中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(3): 490-492. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.03.043.
WU YL, CHEN J. Research progress of microRNAs expression in urological tumors[J]. J Pract Med, 2017, 33(3): 490-492. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.03.043.
- [5] PALIN AC, RAMACHANDRAN V, ACHARYA S, et al. Human neonatal naive CD4⁺ T cells have enhanced

- activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a[J]. *J Immunol*, 2013, 190(6): 2682-2691. DOI: 10.4049/jimmunol.1202534.
- [6] HU J, WANG Z, TAN CJ, et al. Plasma microRNA, a potential biomarker for acute rejection after liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2013, 95(8): 991-999. DOI: 10.1097/TP.0b013e31828618d8.
- [7] MITCHELL PS, PARKIN RK, KROH EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513-10518. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
- [8] KAMADA N, CALNE RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage[J]. *Transplantation*, 1979, 28(1): 47-50.
- [9] WAN CD, CHENG R, WANG HB, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7(1):29-33.
- [10] SARKAR N, PANIGRAHI R, PAL A, et al. Expression of microRNA-155 correlates positively with the expression of Toll-like receptor 7 and modulates hepatitis B virus via C/EBP- β in hepatocytes[J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22(10): 817-827. DOI: 10.1111/jvh.12390.
- [11] BALA S, PETRASEK J, MUNDKUR S, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases[J]. *Hepatology*, 2012, 56(5): 1946-1957. DOI: 10.1002/hep.25873.
- [12] KUNDROTAS G, GASPERSKAJA E, SLAPSYTE G, et al. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 10788-10802. DOI: 10.18632/oncotarget.7456.
- [13] WEI L, WANG M, QU X, et al. Differential expression of microRNAs during allograft rejection[J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(5): 1113-1123. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03958.x.
- [14] FARID WR, PAN Q, VAN DER MEER AJ, et al. Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2012, 18(3): 290-297. DOI: 10.1002/lt.22438.
- [15] WANG Y, TIAN Y, DING Y, et al. MiR-152 may silence translation of CaMK II and induce spontaneous immune tolerance in mouse liver transplantation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105096. DOI: 10.1371/journal.pone.0105096.
- [16] RODRIGUEZ A, VIGORITO E, CLARE S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 608-611. DOI: 10.1126/science.1139253.

(收稿日期: 2018-02-18)
(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)