

· 基础研究 ·

Psalmotoxin-1 抑制活化的肝星状细胞过程中 microRNA 差异表达谱的变化分析

童朝刚¹, 朱月琴², 王亚男², 潘学胜², 芮晨辉², 黄艳^{2*}

¹安徽医科大学附属巢湖医院普外科, 安徽 合肥 238000; ²安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

[摘要] 目的:探讨酸敏感离子通道 1a(acid-sensing ion channel 1a, ASIC1a)特异性阻断剂狼蛛毒素(psalmotoxin-1, PcTx-1)抑制血小板衍生生长因子 BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)过程中微小 RNA(microRNA, miRNA)差异表达谱及生物信息学分析。方法:取对数生长期的 HSC 细胞,分为对照组、模型组和 PcTx 组。对照组不做处理,模型组加入 PDGF-BB(10 ng/mL)培养 24 h, PcTx 组给予 PcTx-1 刺激 1 h 后,再加入 PDGF-BB(10 ng/mL)培养 24 h。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原(collagen- I)和 ASIC1a 的表达, MTT 法检测细胞增殖情况,验证 HSC 细胞是否活化以及 PcTx-1 是否阻断 ASIC1a 的表达。提取的总 RNA 质检合格后进行高通量测序,筛选差异表达的 miRNA。通过 miRanda 算法对差异 miRNA 进行靶基因预测,并对 miRNA 靶基因进行功能和代谢通路分析。结果:PcTx-1 阻断 ASIC1a 后, ASIC1a 的表达降低, HSC 细胞活化的标志性基因 α -SMA 和 collagen- I 的表达明显减少,提示 PcTx-1 可阻断 PDGF 诱导的 HSC 活化。与对照组比较,模型组 miRNA 表达谱中差异表达 miRNA 共有 38 个,其中上调 6 个,下调 32 个($P < 0.05$)。与模型组比较, PcTx 组 miRNA 表达谱中差异表达 miRNA 共有 17 个,其中上调 1 个,下调 16 个($P < 0.05$)。结论:高通量筛选得到的 PcTx-1 抑制 PDGF-BB 活化 HSC 过程中 miRNA 差异表达谱,为肝纤维化的发病机制研究提供了新的靶点和思路。

[关键词] 血小板衍生生长因子 BB;微小 RNA;肝星状细胞;高通量测序

[中图分类号] R575.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)04-513-07

doi:10.7655/NYDXBNS20190409

Changes in differential expression profiles of microRNAs during the inhibition of activated hepatic stellate cells by psalmotoxin-1

Tong Chaogang¹, Zhu Yueqin², Wang Yanan², Pan Xuesheng², Rui Chenhui², Huang Yan^{2*}

¹Department of General Surgery, Chaohu Hospital, Anhui Medical University, Hefei 238000; ²School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the differential expression profile and bioinformatics analysis of microRNA (miRNA) in hepatic stellate cells (HSCs) activated by platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) inhibited by psalmotoxin-1 (PcTx-1), blocker of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a). **Methods:** HSCs in logarithmic growth period were divided into the control group, the model group and the PcTx group. The control group was not treated, after the PcTx group was stimulated by PcTx-1 for 1 h, the model group and the PcTx group were cultured with PDGF-BB (10 ng/mL) medium for 24 h. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen- I and ASIC1a, and MTT was used to detect the proliferation of cells. These results verified whether HSCs were activated and whether PcTx-1 reduced the expression of ASIC1a. High throughput sequencing of total RNA was carried out after quality control, and differential miRNAs were screened. The target genes of differential miRNAs were

[基金项目] 安徽省自然科学基金杰青项目(1908085J30);安徽省高校自然科学研究项目(KJ2017A192);安徽省学术技术带头人后备人选科研活动经费资助项目(2015H040);高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016049);安徽医科大学国家级大学生创新创业训练计划项目(201810366060);安徽医科大学校级青年拔尖人才支持计划(0601037104);青年英才双培工程(0601037206);临床医学(“5+3”一体化)专业“早期接触科研”训练计划立项制项目(2017-ZQKY-26)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: aydhy@126.com

predicted by miRanda algorithm, then the functional significance of miRNA target genes and metabolic pathway involved in miRNA were analyzed. **Results:** After blocking ASIC1a by PcTx-1, the expression of ASIC1a decreased, and the expressions of α -SMA and collagen- I in HSCs activation were obviously reduced. It suggested that PcTx-1 can block the activation of HSCs induced by PDGF-BB. In the miRNA expression profile of PDGF-stimulated HSCs, there were 38 differentially expressed miRNAs, of which 6 were up-regulated and 32 were down-regulated ($P < 0.05$). After ASIC1a was blocked by PcTx-1, there were 17 differentially expressed miRNAs in the miRNA expression profiles between the PcTx group and the model group, including 1 up-regulation and 16 down-regulation ($P < 0.05$). **Conclusion:** The differential expression profile of miRNA in HSCs activated by PDGF-BB inhibited by PcTx-1 in high-throughput screening, providing new targets and ideas for the study of pathogenesis of liver fibrosis.

[**Key words**] platelet-derived growth factor-BB; microRNA; hepatic stellate cells; high-throughput sequencing

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04):513-519]

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化进展的共同途径,多项研究均证实,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是诱导肝纤维化形成的关键细胞^[1]。HSC活化后转化为肌成纤维母细胞(myofibroblast, MFB),分泌大量的细胞外基质成分(extracellular matrix, ECM)和活性细胞因子,具有多种新的生物学行为特性,如收缩性、趋化迁徙性、高增殖性及调节细胞外基质代谢等。HSC的这些异常生物学行为的改变是肝纤维化发生发展的基础^[2]。

酸敏感离子通道(acid-sensing ion channels, ASICs)是胞外酸化激活的一类阳离子通道,肝纤维化前期伴随炎症反应,局部的炎症反应可导致局部组织酸化。而ASIC1a是ASICs的一种主要亚型,能介导 Na^+ 和 Ca^{2+} 内流^[3-4]。本实验室前期研究表明,大鼠肝纤维化组织及活化的HSC中存在ASIC1a的高表达,随着胞外pH值降低,ASIC1a表达增加,同时HSC的增殖也加快^[5-6],但其确切的分子机制尚不明确。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长21~25个核苷酸的内源性单链非编码RNA,能通过降解靶基因的mRNA或与靶基因mRNA的3'-UTR碱基配对结合而干扰其转录过程,调控靶基因在蛋白水平的表达。文献表明,miRNA参与HSC活化、增殖和凋亡等生物学活性的调控,在肝纤维化的发生发展中扮演着重要的角色^[7-11]。狼蛛毒素(psalmotoxin-1, PcTx-1)是一种针对ASIC1a的特异性阻断剂^[12-15]。本研究拟采用高通量测序技术来检测PcTx-1抑制血小板衍生生长因子BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)刺激活化HSC过程中的miRNA表达谱,为进一步研究miRNA在PDGF-BB诱导HSC活化过程中的机制和功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠肝星状细胞HSC-T6细胞株(南京凯基生物有限公司)、DMEM培养基(Gibco公司,美国)。胎牛血清(杭州四季青生物有限公司);PDGF-BB(PeproTech公司,英国);胰酶消化液(上海碧云天公司);氯仿(上海建信化工有限公司);无水乙醇、异丙醇(上海振兴化工一厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组

HSC-T6细胞以DMEM培养基,置于5% CO_2 恒温培养箱中37℃培养,待细胞密度融合达到80%,以EDTA-胰蛋白酶消化,接种在6孔板中,分为对照组、模型组和PcTx组,每组3个复孔。对照组不做处理,模型组加入PDGF-BB(10 ng/mL)培养24 h, PcTx组给予PcTx-1刺激1 h后,再加入PDGF-BB(10 ng/mL)培养24 h。

1.2.2 荧光定量PCR和Western blot检测

Real-time PCR: 使用TRIzol法提取细胞总RNA,微量核酸蛋白检测仪测定RNA浓度。将mRNA反转录为cDNA,real-time PCR检测其mRNA水平的表达,反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,38个循环。以 β -actin为内参,每组设3个复孔,计算平均值。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

Western blot法: 提取细胞总蛋白,浓度经微量核酸蛋白检测仪测定。取各组蛋白样品进行10% SDS-PAGE电泳,切胶转膜后,置于5%脱脂奶粉溶液封闭2 h。洗涤,分别孵ASIC1a一抗(1:1 000,美国Affinity公司); β -actin、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I型胶原(collagen-I)一抗

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因名称	上游引物	下游引物
α-SMA	5'-CGAAGCGCAGAGCAAGAGA-3'	5'-CATGTCGTCCAGTTGGTGAT-3'
collagen- I	5'-GATCCTGCCGATGTCGCTAT-3'	5'-TGTAGGCTAGCTGTTCTTGCA-3'
ASIC1a	5'-CACAGATGGCTGATGAAAAGCAG-3'	5'-CATGGTAACAGCATTGCAGGTGC-3'
β-actin	5'-ACCACAGCTGAGAGGGAAATCG-3'	5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'

(1:1 000,北京博奥森生物技术有限公司),4 ℃过夜。TBST洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000),室温孵育1 h,洗涤后,加入ECL化学发光法显色成像。用图像分析处理软件测定各条带光密度值,以β-actin校正。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖情况

取对数生长期HSC细胞,胰酶消化后接种在96孔板中,分为正常对照组、模型组、PcTx组,培养24 h,每组6个复孔,每孔均200 μL体系;置于37 ℃、5% CO₂培养箱中24 h后每孔加入20 μL浓度为5 mg/mL的MTT溶液,37 ℃继续培养4 h后,吸尽各孔中培养基,每孔加入150 μL的DMSO,5 min后在酶标仪上检测各孔于490 nm波长处的吸光度。

1.2.4 文库构建和测序

使用TRIzol法提取细胞总RNA。采用Nanodrop检测总RNA纯度,采用Qubit检测RNA的浓度并进行精确定量,采用Agilent 2100检测RNA的完整性。从经过质检合格后的RNA开始,3'端接头连接,反转录引物杂交,5'端接头连接,反转录成DNA,然后进行PCR扩增,构建文库。采用Qubit2.0进行初步定量,将文库调整至1 ng/μL,随后使用Agilent 2100对文库的插入片段长度进行检测。用荧光定量PCR方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度>2 nmol/L),以保证文库质量。接着将文库按照有效浓度pooling后进行illumina HiSeq测序。

1.2.5 生物信息学分析

高通量测序下机的原始数据经过去接头、去低质量序列、去污染后得到高质量数据(high quality data, HQ data),将HQ data与参考基因组进行比对。对研究样品进行miRNA的差异表达分析,通过DESeq2对数据进行分析处理,log₂ Fold Change>1且P<0.05的miRNA为差异miRNA。使用miRanda对差异miRNA的靶基因进行预测,通过加权动态规划算法计算miRNA与mRNA的互补配对关系,对配对、错配进行打分和空位罚分。此外,miRanda使用Vienna包对miRNA与mRNA结合的自由能进行估

算作为二次筛选。对差异miRNA预测的靶基因进行功能分析,即KEGG pathway注释和富集分析。KEGG pathway数据库中包含的细胞生化过程有代谢、转运、信号传递、细胞周期等一系列信息,为生物体内代谢网络分析提供了强有力的支持,利用显著性分析可以找出差异miRNA靶基因中显著富集的通路。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析,计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差法。P≤0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PcTx-1对PDGF活化的HSC-T6的影响

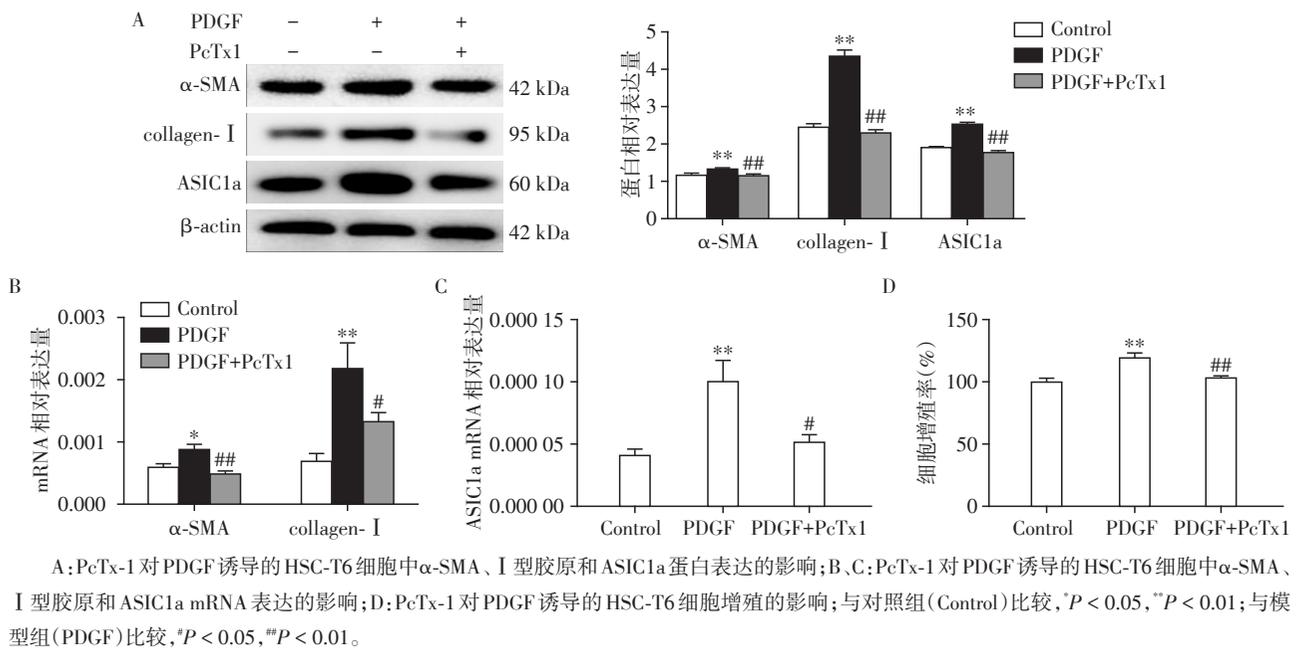
PDGF刺激后,α-SMA、collagen- I和ASIC1a蛋白和mRNA表达水平明显增加,细胞增殖加快。PcTx-1阻断ASIC1a后,ASIC1a的表达降低,由PDGF刺激增加的α-SMA和collagen-I的表达明显减少,细胞增殖也受到抑制,与模型组相比差异有显著性(图1)。提示ASIC1a参与调节HSC-T6的活化增殖;PcTx-1可阻断ASIC1a的表达,抑制HSC-T6的活化增殖。

2.2 illumina HiSeq 测序结果

下机的原始数据包含接头序列、测序低质量的序列,为保证信息分析的准确性,需要对测序的原始数据进行过滤,标准为:①去除序列接头;②去除低质量的序列;③对每条序列进行宽度为4 bp的sliding window质量检测,如果1个window的平均质量低于15,切除该window之后的序列;④去除序列长度低于10 bp的序列。过滤后,得到处理数据,后续基于处理数据进行分析。9个样本处理后的数据碱基质量均较高,占原始序列的比例在80%以上,符合后续分析要求。

2.3 PcTx-1抑制PDGF-BB刺激活化HSC过程中miRNA的差异表达

火山图(volcano plot)可以在同一平面内展示2个重要指标(P值和Fold Change)的数目及分布。在火



A: PcTx-1对PDGF诱导的HSC-T6细胞中 α -SMA、I型胶原和ASIC1a蛋白表达的影响;B、C: PcTx-1对PDGF诱导的HSC-T6细胞中 α -SMA、I型胶原和ASIC1a mRNA表达的影响;D: PcTx-1对PDGF诱导的HSC-T6细胞增殖的影响;与对照组(Control)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组(PDGF)比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

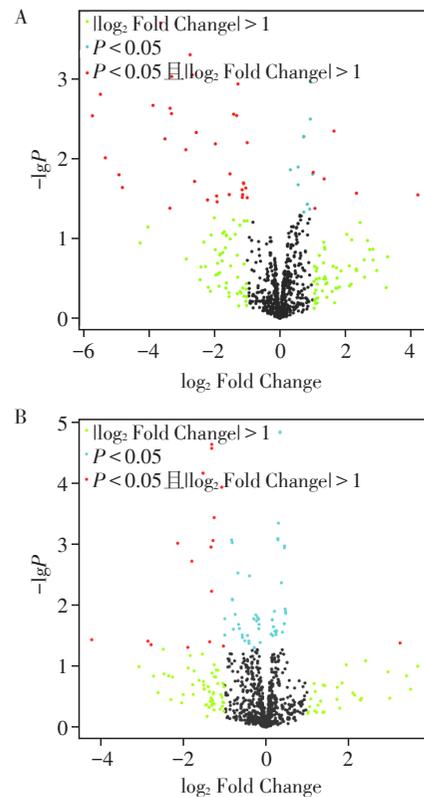
图1 PcTx-1对PDGF诱导HSC-T6细胞活化、增殖的影响

Figure 1 Effect of PcTx-1 on activation and proliferation of HSC-T6 induced by PDGF

山图中,纵坐标为 $-\lg P$,横坐标为 \log_2 Fold Change,正负号代表了基因表达的上调或下调。火山图中的每一个点代表一个miRNA,而红色点是有显著差异的miRNA,它同时满足 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$ 和 $P < 0.05$ 两个条件。蓝点是只满足 $P < 0.05$ 的miRNA,而绿点是只满足 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$ 的miRNA。我们发现PDGF刺激活化的HSC的miRNA表达谱中差异表达miRNA共有38个,其中上调6个,下调32个($P < 0.05$),如图2A和表2所示。在PcTx-1阻断ASIC1a后,PcTx组与模型组之间的miRNA表达谱中差异表达miRNA共17个,其中上调1个,下调16个($P < 0.05$),如图2B和表2所示。提示这些miRNA可能在肝星状细胞的活化过程以及PcTx-1阻断ASIC1a后肝星状细胞的活化减弱过程中起到了重要的作用。

2.4 差异miRNA靶基因的代谢通路分析

通过miRanda算法对差异miRNA进行靶基因预测,再对靶基因进行功能分析即Gene Ontology(GO)分类富集分析。利用KEGG pathway数据库,通过显著性分析找出差异miRNA靶基因中显著富集的通路,如表3所示。差异miRNA的靶基因有Setmar、Ncf1、Col7a1、Col4a2和Kmt2d等,相关的代谢通路涉及到蛋白质消化吸收信号通路、黏着斑信号通路、细胞外基质(ECM)受体相互作用信号通路、钙信号通路和PI3K-Akt信号通路等,参与肝脏代谢的一系列重要过程。



A: 模型组与对照组之间的差异miRNA;B: 给药组与模型组之间的差异miRNA。

图2 火山图筛选模型组与对照组、PcTx组与模型组之间的差异miRNA

Figure 2 Volcanic plot screened up and down-regulated miRNAs between the model group & the control group, between the PcTx group & the model group

表2 各组间差异的 miRNA (部分)

Table 2 MiRNAs of differences among groups (part)

模型组 vs. 对照组			PcTx 组 vs. 模型组		
miRNA	log ₂ Fold Change	P 值	miRNA	log ₂ Fold Change	P 值
chr16_35936	-4.09	<0.01	chr17_37162	1.04	<0.01
chr6_19200	-4.64	<0.01	mo-let-7d-5p	1.03	<0.01
chr16_36737	-3.89	<0.01	chr6_18778	-1.18	<0.01
chr5_15728	-6.62	<0.01	chr5_15550	-1.18	<0.01
chr5_17211	-5.62	<0.01	mo-miR-350	-2.09	<0.01
chr10_26166	-4.91	<0.01	chr13_32014	-2.24	<0.01
chr5_15056	-3.18	<0.01	mo-miR-466b-4-3p	-2.69	<0.01
chr3_8933	-5.51	<0.01	mo-miR-129-2-3p	-1.54	<0.01

表3 差异表达 miRNA 的主要靶基因的富集通路

Table 3 Enrichment pathway table of main target genes of differentially expressed miRNA

信号通路	涉及基因个数	P 值
胰岛素抵抗信号通路	3	<0.01
神经营养因子信号通路	2	<0.01
咖啡因代谢信号通路	1	<0.01
蛋白质消化吸收信号通路	13	<0.01
赖氨酸退化信号通路	5	<0.01
黏着斑信号通路	19	<0.01
ECM 受体相互作用信号通路	7	<0.01
肌动蛋白细胞骨架调节信号通路	8	<0.01
钙信号通路	7	<0.01
致心律失常性右室心肌病信号通路	4	<0.01
PI3K-Akt 信号通路	8	<0.01
Notch 信号通路	3	<0.01
阿米巴病信号通路	4	0.011
萜类化合物骨架生物合成信号通路	1	0.018
背腹轴形成信号通路	2	0.019
血小板激活信号通路	4	0.019
丙型肝炎信号通路	3	0.023
癌症中 miRNA 信号通路	4	0.025
破骨细胞分化信号通路	6	0.034
Hippo 信号通路	3	0.035
小细胞肺癌信号通路	3	0.038
药物代谢-其他酶信号通路	1	0.040
2型糖尿病信号通路	1	0.040
基底细胞癌信号通路	1	0.045
紧密连接信号通路	9	0.045
催产素信号通路	4	0.045
阿尔兹海默病信号通路	3	0.046
昼夜节律夹带信号通路	3	0.046
唾液分泌信号通路	5	0.047
糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路	5	0.048

3 讨论

目前,高通量测序的应用已十分广泛。课题组前期研究发现,ASIC1a 参与了 HSC 的活化增殖和肝纤维化的发生,而 ASIC1a 特异性阻断剂 PcTx-1 可抑制 PDGF-BB 刺激活化的 HSC 增殖^[10-11],其分子机制有待进一步研究。由于 PDGF-BB 是体外培养肝星状细胞最有效的有丝分裂原,所以本研究采用 PDGF-BB 刺激活化的 HSC-T6 细胞模型^[11],通过 Western blot 和荧光定量 PCR 技术检测 α-SMA 和 I 型胶原,以及 MTT 实验检测细胞增殖情况,验证 HSC-T6 是否活化成功。实验结果显示在模型组中 α-SMA 和 I 型胶原显著上调,细胞增殖显著加快,提示模型成功。在 PcTx 组中 α-SMA 和 I 型胶原的上调和细胞增殖都受到明显抑制,提示 PcTx-1 可以抑制肝星状细胞的活化和增殖。并通过 Western blot 和荧光定量 PCR 技术检测 ASIC1a 的表达,发现在模型组显著上调,使用 PcTx-1 后抑制了它的上调。进一步利用高通量测序技术筛选参与其中的 miRNA,包括已知的和新发现的 miRNA,进而通过 miRanda 算法预测差异 miRNA 的靶基因,并进行 miRNA 靶基因功能及代谢通路的显著性分析。

在 PDGF-BB 刺激活化的 HSC-T6 细胞中,筛选出上调的 miRNA 有 6 个,下调的 miRNA 有 32 个。差异 miRNA 的靶基因功能以生物过程 (biological process) 为主,主要表现在细胞部分 (cell part)、细胞器 (organelle)、结合 (binding) 和细胞进程 (cellular process) 等功能。其次,通过 KEGG pathway 数据库进行代谢通路显著性分析,发现参与的代谢通路主要有赖氨酸降解通路、破骨细胞分化通路和蛋白质消化吸收通路等。在 PcTx-1 阻断 ASIC1a 后, PcTx

组与模型组之间的 miRNA 表达谱中差异表达 miRNA 有 17 个,其中上调的 miRNA 有 1 个,下调的 miRNA 有 16 个。差异 miRNA 的靶基因功能以生物过程为主,主要表现在细胞部分、细胞器、结合、细胞进程、生物调节(biological regulation)和单细胞进程(single-organism process)等功能。差异 miRNA 中,以 rno-let-7d-5p 为例,被报道在纤维化及人胰腺星状细胞的活化中发挥着重要的角色^[16]。差异 miRNA 的靶基因有 Setmar、Ncf1、Col7a1、Col4a2 和 Kmt2d 等,而有文献报道,Col7a1、Col4a2 与胶原的沉积密切相关,并且在纤维化的发生中扮演重要角色^[17-18]。代谢通路显著性分析结果显示参与的代谢通路主要有 ECM-受体相互作用通路、黏着斑通路和 Notch 信号通路等。而有文献报道,ECM-受体相互作用通路和 Notch 信号通路参与细胞外基质的过度沉积以及纤维化的发生发展过程^[19-21]。

肝星状细胞的持续活化是肝纤维化的关键环节,通过阻断肝星状细胞的持续活化可以部分逆转肝纤维化的进程。miRNA 可以通过 mRNA 剪切或与靶基因 mRNA 结合而干扰其转录过程,被报道参与了生命过程中的一系列重要环节。PcTx-1 和 PDGF-BB 这两种干预剂可能通过 miRNA 调节相关基因的表达从而使得细胞表型变化,具体机制有待进一步研究证实。此外文献也报道其他多种机制参与肝纤维化的发生发展以及肝星状细胞活化的过程,如基因甲基化、去乙酰化等表观遗传学的变化^[22-24],肠道微生物群的变化^[25],信号通路的磷酸化活化^[26-27]和其他小 RNA 的变化^[28-30]等。基于上述研究,我们推测在 PcTx-1 抑制 PDGF-BB 刺激活化的过程中这些特异表达的 miRNA 在 HSC-T6 中发挥着不同的作用,以这些 miRNA 和 ASIC1a 为靶点间接调控肝星状细胞的活化给研究肝纤维化的发病机制及防治策略提供了新的思路。而高通量筛选得到的 PcTx-1 抑制 PDGF-BB 活化 HSC 过程中 miRNA 差异表达谱,也为挖掘相关的 miRNA 的作用及机制提供了科学的参考依据。

[参考文献]

- [1] 刘雨亭,李书,陈建亮,等.内质网应激调节肝星状细胞 HGF 表达的作用机制[J].南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(9):1046-1051
- [2] Song Y,Zhan L,Yu M,et al. TRPV4 channel inhibits TGF- β 1-induced proliferation of hepatic stellate cells [J]. PLoS One,2014,9(7):e101179
- [3] Liu Y,Hagan R. Dual actions of Psalmotoxin at ASIC1a

- and ASIC2a heteromeric channels (ASIC1a/2a) [J]. Sci Rep,2018,8(1):7179
- [4] Gregory NS,Gautam M,Benson CJ,et al. Acid sensing ion channel 1a (ASIC1a) mediates activity-induced pain by modulation of heteromeric ASIC channel kinetics [J]. Neuroscience,2018,386:166-174
- [5] Wang H,Wang YH,Yang F,et al. Effect of acid-sensing ion channel 1a on the process of liver fibrosis under hyperglycemia [J]. Biochem Biophys Res Commun,2015,468(4):758-765
- [6] 王欢,汪应红,田远耀,等.酸敏感离子通道 1a 在高糖环境下肝纤维化发病中的作用研究[J].中国药理学通报,2016,32(3):384-389
- [7] Xin X,Zhang Y,Liu X,et al. MicroRNA in hepatic fibrosis and cirrhosis [J]. Front Biosci (Landmark edition),2014,19:1418-1424
- [8] Feili X,Wu S,Ye W,et al. MicroRNA-34a-5p inhibits liver fibrosis by regulating TGF- β 1/Smad3 pathway in hepatic stellate cells [J]. Cell Biol Int,2018,42(10):1370-1376
- [9] Tao L,Xue D,Shen D,et al. MicroRNA-942 mediates hepatic stellate cell activation by regulating BAMBI expression in human liver fibrosis [J]. Arch Toxicol,2018,92(9):2935-2946
- [10] Wu K,Ye C,Lin L,et al. Inhibiting miR-21 attenuates experimental hepatic fibrosis by suppressing both the ERK1 pathway in HSC and hepatocyte EMT [J]. Clin Sci,2016,130(16):1469-1480
- [11] Hu J,Chen C,Liu Q,et al. The role of the miR-31/FIH1 pathway in TGF- β -induced liver fibrosis [J]. Clin Sci,2015,129(4):305-317
- [12] Qadri YJ,Berdiev BK,Song Y,et al. Psalmotoxin-1 docking to human acid-sensing ion channel-1 [J]. J Biol Chem,2009,284(26):17625-17633
- [13] Dawson RJ,Benz J,Stohler P,et al. Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1 [J]. Nat Commun,2012,3:936
- [14] Yu H,Yang L,Liu L,et al. Molecular dynamics simulations investigate the mechanism of Psalmotoxin 1 regulating gating process of an acid-sensing ion channel 1a at pH 5.5 [J]. J Biomol Struct Dyn,2018,36(10):2558-2566
- [15] Dibas A,Millar C,Al-Farra A. Neuroprotective effects of psalmotoxin-1, an acid-sensing ion channel (ASIC) inhibitor, in ischemia reperfusion in mouse eyes [J]. Curr Eye Res,2018,43(7):921-933
- [16] Liang H,Pan Z,Zhao X,et al. LncRNA PFL contributes to cardiac fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of let-7 d [J]. Theranostics,2018,8(4):1180-1194
- [17] Pandit KV,Corcoran D,Yousef H,et al. Inhibition and

- role of let-7 d in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Resp Crit Care*, 2010, 182(2): 220-229
- [18] Urushiyama H, Terasaki Y, Nagasaka S, et al. Role of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(8): 872-885
- [19] Zhu C, Kim K, Wang X, et al. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(468): eaat0344
- [20] Zhang K, Han X, Zhang Z, et al. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGF β and Notch pathways [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 144
- [21] Cao Z, Lis R, Ginsberg M, et al. Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2): 154-162
- [22] Chen X, Li WX, Chen Y, et al. Suppression of SUN2 by DNA methylation is associated with HSCs activation and hepatic fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1021
- [23] Page A, Paoli P, Moran Salvador E, et al. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(3): 661-673
- [24] Li M, Hong W, Hao C, et al. SIRT1 antagonizes liver fibrosis by blocking hepatic stellate cell activation in mice [J]. *FASEB J*, 2018, 32(1): 500-511
- [25] Zheng H, You Y, Hua M, et al. Chlorophyllin modulates gut microbiota and inhibits intestinal inflammation to ameliorate hepatic fibrosis in mice [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1671
- [26] Hu YB, Ye XT, Zhou QQ. Sestrin 2 attenuates rat hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis via an mTOR/AMPK - dependent mechanism [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(5): 2111-2122
- [27] Huang Q, Wei J, Wei L, et al. Role of RKIP in human hepatic stellate cell proliferation, invasion, and metastasis [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 120(4): 6168-6177
- [28] Li Z, Wang J, Zeng Q, et al. Long noncoding RNA HOTTIP promotes mouse hepatic stellate cell activation via downregulating miR - 148a [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(6): 2814-2828
- [29] Zheng J, Mao Y, Dong P, et al. Long noncoding RNA HOTTIP mediates SRF expression through sponging miR - 150 in hepatic stellate cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 1572-1580
- [30] Zhu L, Ren T, Zhu Z, et al. Thymosin- $\beta 4$ mediates hepatic stellate cell activation by interfering with circRNA - 0067835/miR - 155/FoxO3 signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(3): 1389-1398
- [收稿日期] 2018-10-16

(上接第 494 页)

- 36(11): 1460-1467
- [11] Chang DC, Meng C. A localized elevation of cytosolic free calcium is associated with cytokinesis in the zebrafish embryo [J]. *J Cell Biol*, 1995, 131(6 Pt 1): 1539-1545
- [12] Xu N, Luo KQ, Chang DC. Ca²⁺ signal blockers can inhibit M/A transition in mammalian cells by interfering with the spindle checkpoint [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(3): 737-745
- [13] 冯珊珊,王远航,蔡文锋,等. 硝苯地平调控 JunB 表达拮抗敲除 L-型电压依赖性钙通道 H9c2 细胞缺氧/复氧损伤的研究 [J]. 汕头大学医学院学报, 2018, 31(2): 69-71
- [14] Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration [J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(9): 575-590
- [15] Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, et al. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1081-1086
- [16] Gant JC, Chen KC, Kadish I, et al. Reversal of aging-related neuronal Ca²⁺ dysregulation and cognitive impairment by delivery of a transgene encoding FK506-binding protein 12.6/1b to the hippocampus [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(30): 10878-10887
- [17] Zhang L, Xia R, Jia J, et al. Oleanolic acid protects against cognitive decline and neuroinflammation-mediated neurotoxicity by blocking secretory phospholipase A2 IIA-activated calcium signals [J]. *Mol Immunol*, 2018, 99: 95-103
- [收稿日期] 2018-09-28