

Оригинальная статья

УДК 616.36-003.93

Роль микроРНК в регуляции фиброза печени

Кирилл Сергеевич Коробейщиков, Екатерина Романовна Судницына,
Михаил Владимирович Попугайло[✉], Дмитрий Юрьевич Гребнев

Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

[✉] pathophis@yandex.ru

Аннотация. МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие молекулы РНК длиной 19–24 нуклеотида. Путем РНК-интерференции, ингибирования инициации или удлинения трансляции каждая микроРНК способна ингибировать экспрессию генов большого количества целевых транскриптов. В последние годы было показано, что измененные паттерны микроРНК после хронических заболеваний печени оказывают значительное влияние на прогрессирование фиброза благодаря их способности нацеливаться на экспрессию белков внеклеточного матрикса и синтез медиаторов профиброгенных путей. В статье изложены современные представления о роли микроРНК в фиброзе печени. На примере ряда микроРНК продемонстрированы внутриклеточные пути, реализующие защиту от фиброзных процессов в печени. Демонстрируется, что основным способом подавления фиброза печени при помощи микроРНК является инактивация перисинусоидальных клеток печени. В экспериментах с индукцией фиброза печени четыреххлористым углеродом у мышей и культивированием перисинусоидальных клеток было выяснено, что при генетической делеции микроРНК-223 фиброз печени усиливался, а при введении микроРНК этого семейства, процесс накопления внеклеточного матрикса, напротив, замедлялся. В других исследованиях было показано, что процесс фиброза печени замедлялся за счет влияния микроРНК-101 путем перевода активированных перисинусоидальных клеток в состояние покоя. Об этом свидетельствовало подавление пролиферации и миграции перисинусоидальных клеток, а также потеря ими маркеров активации и усиление маркеров покоя. Было показано, что микроРНК-16 ингибировала экспрессию CD1, важного регулятора пути клеточного цикла. Отмечалось, что уровни экспрессии miR-16 и циклина D1 обратно коррелировали при активации перисинусоидальных клеток. Сверхэкспрессия этой микроРНК в активированных перисинусоидальных клетках приводила к накоплению клеток в G0/G1-фазе клеточного цикла.

Ключевые слова: микроРНК, перисинусоидальные клетки, печень, фиброз, сигнальный путь TGFβ

Для цитирования: Роль микроРНК в регуляции фиброза печени / К. С. Коробейщиков, Е. Р. Судницына, М. В. Попугайло, Д. Ю. Гребнев // Вестник УГМУ. 2022. № 3–4. С. 31–38.

The Role of MicroRNAs in the Regulation of Artificially Induced Liver Fibrosis

Kirill S. Korobeishchikov, Ekaterina R. Sudnitsyna,
Mikhail V. Popugailo, Dmitry Yu. Grebnev

Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

✉ pathophis@yandex.ru

Abstract. MicroRNAs are small non-coding RNA molecules with a length of 19–24 nucleotides. By RNA interference, inhibition of initiation, or lengthening of translation, each microRNA is able to inhibit gene expression of a large number of target transcripts. In recent years, it has been shown that altered microRNA patterns after chronic liver diseases have a significant effect on the progression of fibrosis due to their ability to target the expression of extracellular matrix proteins and the synthesis of mediators of profibrogenic pathways. The article presents modern ideas about the role of microRNAs in liver fibrosis. On the example of a number of microRNAs, intracellular pathways that implement protection against fibrous processes in the liver are demonstrated. It is demonstrated that the main way to suppress liver fibrosis using microRNA is inactivation of perisinusoidal liver cells. In experiments with induction of liver fibrosis with carbon tetrachloride in mice and cultivation of perisinusoidal cells, it was found that with the genetic deletion of microRNA-223, liver fibrosis increased, and with the introduction of microRNAs of this family, the process of accumulation of extracellular matrix, on the contrary, slowed down. Other studies have shown that the process of liver fibrosis was slowed down due to the influence of microRNA-101 by transferring activated perisinusoidal cells to a resting state. This was evidenced by the suppression of proliferation and migration of perisinusoidal cells, as well as the loss of activation markers and the strengthening of resting markers. microRNA-16 has been shown to inhibit the expression of CD1, an important regulator of the cell cycle pathway. It was noted that the expression levels of miR-16 and cyclin D1 were inversely correlated with activation of perisinusoidal cells. Overexpression of this microRNA in activated perisinusoidal cells led to the accumulation of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle.

Keywords: microRNA, HSC, liver, fibrosis, TGF β signal path

For citation: Korobeishchikov KS, Sudnitsyna ER, Popugailo MV, Grebnev DY. The role of microRNAs in the regulation of artificially induced liver fibrosis. *Bulletin of USMU*. 2022; (3–4):31–38. Russian.

Введение. МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие молекулы РНК длиной 19–24 нуклеотида. Путем РНК-интерференции, ингибирования инициации или удлинения трансляции каждая микроРНК

способна ингибировать экспрессию генов большого количества целевых транскриптов [1].

В последние годы было показано, что измененные паттерны микроРНК после хронического заболевания печени оказывают значительное влияние на прогрессирование фиброза благодаря их способности нацеливаться на экспрессию белков внеклеточного матрикса и синтез медиаторов профиброгенных путей [2; 3].

Цель исследования — описать механизмы влияния различных семейств микроРНК на процессы фиброза печени.

МикроРНК-101. Точкой приложения микроРНК-101 является трансформирующий фактор роста- β (TGF β), имеющий решающее значение для фиброгенеза печени. Представители данного семейства микроРНК действуют как супрессоры сигнализации TGF β , нацеливаясь на T β RI и его транскрипционный активатор Kruppel-like factor 6 (KLF6) во время фиброгенеза печени [4].

С помощью индукции четыреххлористым углеродом (CCl₄) фиброза печени у мышей было выяснено, что в фиброзной печени и поврежденных гепатоцитах наблюдалось значительное снижение экспрессии микроРНК-101 [5]. В последующих исследованиях было установлено, что T β RI и KLF6 были прямыми мишенями микроРНК-101. Более того, лентивирус-опосредованная эктопическая экспрессия микроРНК-101 в печени значительно снижала CCl₄-индуцированный фиброз печени, тогда как внутривенное введение антисмысловых олигонуклеотидов микроРНК-101 усугубляло фиброгенез печени, что подтверждает вышеперечисленные особенности микроРНК-101. Предполагается, что ключевую роль в фиброзе печени играет активация перисинусоидальных клеток печени, а инактивация этого процесса является механизмом остановки фиброза. Было выявлено, что процесс фиброза печени замедлялся за счет влияния микроРНК-101 путем перевода активированных перисинусоидальных клеток в состояние покоя. Об этом свидетельствовало подавление пролиферации и миграции перисинусоидальных клеток, а также потеря ими маркеров активации и усиление маркеров покоя [5].

Кроме того, было выявлено, что помимо ослабления передачи сигналов профиброгенного TGF β в гепатоцитах микроРНК-101 подавлял и последующие регуляторные воздействия профиброгенных цитокинов, а также апоптоз гепатоцитов и ингибирование их пролиферации [5].

МикроРНК-223. Как было сказано выше, фиброз печени является распространенным следствием хронического повреждения печени и характеризуется накоплением внеклеточного матрикса, в основном генерируемого из активированных перисинусоидальных клеток печени. В экспериментах с индукцией фиброза печени четыреххлористым углеродом у мышей и культивированием перисинусоидальных клеток было выяснено, что при генетической делеции микроРНК-223 фиброз печени усиливался, а при введении

микроРНК этого семейства процесс накопления внеклеточного матрикса, напротив, замедлялся [6–9].

Дополняя вышесказанное, отметим, что сверхэкспрессия микроРНК-223 также непосредственно ослабляла экспрессию гена *Gli2*, а также рецептора фактора роста тромбоцитов в перисинусоидальных клетках, тем самым подавляя их активацию и пролиферацию [10–13].

МикроРНК-30. Фактором транскрипции, который потенцирует передачу сигналов TGF- β путем подавления транскрипции ингибирующего *Smad7*, является Крупель-подобный фактор 11 (*KLF11*) [14]. Путем индукции CCl_4 фиброза печени на мышах была показана значительная стимуляция *KLF11* активности перисинусоидальных клеток во время фиброгенеза печени. Помимо этого, при проведении аденовирус-опосредованной эктопической экспрессии было выявлено, что увеличение микроРНК-30 в перисинусоидальных клетках значительно снижало CCl_4 -индуцированный фиброз печени [15; 16].

Последующие исследования показали, что микроРНК-30 подавлял экспрессию *KLF11* в перисинусоидальных клетках и приводил к значительному усилению влияния *Smad7*, который способствовал ингибированию фиброза. Дополнительные исследования подтвердили, что *KLF11* являлся прямой мишенью *miR-30*, и показали, что *miR-30* подавлял профиброгенную передачу сигналов TGF- β в перисинусоидальных клетках путем подавления экспрессии *KLF11* и, следовательно, усиливал механизм отрицательной обратной связи передачи сигналов TGF- β , активированной *Smad7* [14].

Таким образом, вышеперечисленные исследования микроРНК-30 определяют их как критический супрессор передачи сигналов TGF- β при активации перисинусоидальных клеток печени, давая дополнительные сведения о патогенезе фиброза печени и факторах противодействия ему.

МикроРНК-378. Профилирование микроРНК продемонстрировало, что экспрессия членов семейства микроРНК-378 (*miR-378a-3p*, *miR-378b* и *miR-378d*) снижается у мышей, обработанных четыреххлористым углеродом (CCl_4), по сравнению с мышами, обработанными кукурузным маслом. Экспрессия гена *Gli3* приводила к усилению процесса активации перисинусоидальных клеток и, как следствие, фиброзу печени. В ходе исследования на мышинной модели было выяснено, что сверхэкспрессия микроРНК-378a-3p, непосредственно нацеленная на *Gli3* в активированных печеночных перисинусоидальных клетках, снижала экспрессию *Gli3* и профибротических генов, но индуцировала маркер инактивации перисинусоидальных клеток — *gfar* в печени животных, получавших CCl_4 [17].

МикроРНК-29. У мышей с индуцированным четыреххлористым углеродом (CCl_4) фиброзом печени наблюдалось значительное снижение экспрессии всех семейств микроРНК-29 [18]. На клеточном уровне пониженная экспрессия *miR-29* была обусловлена трансформирующим фактором роста бета (TGF- β) и ядерным фактором каппа В (NF- κB), являющимся универсаль-

ным фактором транскрипции, контролирующим экспрессию генов апоптоза и клеточного цикла. Сверхэкспрессия miR-29b, напротив, в мышинных перисинусоидальных клетках печени приводила к снижению регуляции экспрессии коллагена, являющейся одной из основных в процессе формирования фиброза [19].

Вышеописанные свойства семейства микроРНК-29 говорят об их потенциальном использовании в качестве инструментов патогенетического лечения фиброза печени, а также как маркеров при его диагностике.

МикроРНК-146. При TGF- β -индуцированной активации перисинусоидальных клеток экспрессия микроРНК-146а понижалась, в то время как сверхэкспрессия miR-146а в перисинусоидальных клетках приводила к повышению регуляции тканевого ингибитора металлопротеиназы 3 (TIMP-3) и снижению уровня IL-6. Другие исследования показали, что сверхэкспрессия микроРНК-146а приводила к ингибированию пролиферации активированных перисинусоидальных клеток путем снижения активации пути TGF- β , имеющего одно из ключевых значений в патогенезе фиброза и регуляции воспалительного ответа.

Более того, miR-146а имела особое значение и в регуляции воспалительных реакций во время реперфузионного повреждения печени, ингибируя IL-1 рецептор-ассоциированную киназу 1 (IRAK1) и Toll-подобный рецептор-ассоциированный фактор 6 (TRAF6), приводя к снижению продукции провоспалительных цитокинов [20].

МикроРНК-16. Семейство miR-16 явилось одним из регуляторов пролиферации и активации перисинусоидальных клеток печени. Было показано, что эта микроРНК ингибировала экспрессию CD1, важного регулятора пути клеточного цикла. Отмечалось, что уровни экспрессии miR-16 и циклина D1 обратно коррелировали при активации перисинусоидальных клеток. Сверхэкспрессия этой микроРНК в активированных перисинусоидальных клетках приводит к накоплению клеток в G0/G1-фазе клеточного цикла.

МикроРНК-16 подавляла экспрессию фактора роста гепатоцитов (HGF) и Smad7 в индуцированном вирусом гепатита С фиброзе, что дает дополнительные сведения о противодействии этого семейства микроРНК фиброгенным изменениям печен [21; 22].

МикроРНК-200. В основе влияния miR-200а на фиброз печени лежит ингибирование пролиферации перисинусоидальных клеток путем остановки фазы G0/G1 клеточного цикла. Также было показано, что miR-200а могла частично регулировать сигнальный путь TGF- β через трансляционное подавление экспрессии TGF- β 2.

В ходе исследований выяснилось, что семейство miR-200а также подавляло β -катенин, ключевой фактор сигнального пути Wnt/ β -катенина, участвующего в ремоделировании печени и активации перисинусоидальных клеток [23–25].

Выводы:

- 1) накапливается все больше сведений, позволяющих предполагать, что путем экспрессии различных семейств микроРНК могут регулироваться основные внутриклеточные пути развития фиброза печени;
- 2) основным способом подавления фиброза печени при помощи микроРНК является инактивация перисинусоидальных клеток печени.

Список источников

1. MicroRNA in Regenerative Medicine / Ed. by C. K. Sen. Academic Press, 2015. 1259 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2012-0-02839-6>.
2. Biotechnologies for Gene Therapy. RNA, RISPR, Nanobots, and Preclinical Applications / Ed. by Y. H. Yun, K. E. Yoder. Springer, 2022. 212 p.
3. MicroRNA function in the profibrogenic interplay upon chronic liver disease / J. Huang, X. Y., J. W. U. Fries [et al.] // International journal of molecular sciences. 2014. Vol. 15, Iss. 6. P. 9360–9371. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms15069360>.
4. Loss of MicroRNA-101 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocytes / S. Zhao, Y. Zhang, X. Zheng [et al.] // J. Cell Physiol. 2015. Vol. 230, Iss. 11. P. 2706–2717. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.24995>.
5. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF β signalling pathway / X. Tu, H. Zhang, J. Zhang [et al.] // The Journal of Pathology. 2014. Vol. 234, Iss. 1. P. 46–59. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.4373>.
6. MicroRNA-223 Ameliorates Nonalcoholic Steatohepatitis and Cancer by Targeting Multiple Inflammatory and Oncogenic Genes in Hepatocytes / Y. He, S. Hwang, Y. Cai // Hepatology. 2019. Vol. 70, Iss. 4. P. 1150–1167. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.30645>.
7. MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6-p47(phox)-oxidative stress pathway in neutrophils / M. Li, Y. He, Z. Zhou [et al.] // Gut. 2017. Vol. 66, Iss. 4. P. 705–715. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311861>.
8. MicroRNA 223 3p Negatively Regulates the NLRP3 Inflammasome in Acute and Chronic Liver Injury / C. Jimenez Calvente, H. Del Pilar, M. Tameda [et al.] // Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2020. Vol. 28. P. 653–663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.013>.
9. Xiaolin W., Wonhyo S., Seol H. P. MicroRNA-223 restricts liver fibrosis by inhibiting the TAZ-IHH-GLI2 and PDGF signaling pathways via the cross-talk of multiple liver cell types // International journal of molecular sciences. 2021. Vol. 17. P. 1153–1167.
10. Treiber T., Treiber N., Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways // Nature reviews Molecular cell biology. 2019. Vol. 20. P. 5–20.
11. Machado M. V., Diehl A. M. Hedgehog signalling in liver pathophysiology // Journal of hepatology. 2018. Vol. 68. P. 550–562.

12. Neutrophils contribute to spontaneous resolution of liver inflammation and fibrosis via microRNA-223 / C.J. Calvente, M. Tameda, C.D. Johnson [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. 2019. Vol.130. P. 4091–4109.
13. Role of miR-223 in the pathophysiology of liver diseases / D. Ye, T. Zhang, G. Lou, Y. Liu // *Experimental & molecular medicine*. 2018. Vol. 50. P. 128.
14. Xiaolong T., Xiuxiu Z., Huanan L. MicroRNA-30 Protects Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Fibrosis by Attenuating Transforming Growth Factor Beta Signaling in Hepatic Stellate Cells // *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2015. Vol. 146. P. 157–169.
15. Downregulation of microRNA-30 facilitates podocyte injury and is prevented by glucocorticoids / W. Junnan, Z. Chunxia, F. Yun [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014. Vol. 25, Iss. 1. P. 92–104.
16. Triptolide protects podocytes from TGF- β -induced injury by preventing miR-30 downregulation / Y. Qianqian, S. Mengjie, J. C. Ying [et al.] // *American journal of translational research*. 2017. Vol. 9, Iss. 11. P. 5150–5159.
16. Hyun J., Wang S., Kim J. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression // *Nature Communications*. 2016. Vol. 7. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms10993>.
17. Micro-RNA Profiling Reveals a Role for miR-29 in Human and Murine Liver Fibrosis / C. Roderburg, G.-W. Urban, K. Bettermann [et al.] // *Hepatology*. 2011. Vol. 53, Iss. 1. P. 209–218. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.23922>.
18. The roles of microRNA families in hepatic fibrosis / X.-P. Jiang, W.-B. Ai, L.-Y. Wan, Y.-Q. Zhang, J.-F. Wu // *Cell & Bioscience*. 2017. Vol. 7, Iss. 34. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0161-7>.
19. Lambrecht J., Mannaerts I., van Grunsven L.A. The role of miRNAs in stress-responsive hepatic stellate cells during liver fibrosis // *Frontiers in physiology*. 2015. Vol. 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00209>.
20. MicroRNA-16 inhibits migration and invasion via regulation of the Wnt- β -catenin signaling pathway in ovarian cancer / N. Li, L. Yang, Y.-n. Sun, X. Wu // *Oncology Letters*. 2019. Vol. 17. P. 2631–2638. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9923>.
21. Increased miR-16 expression induced by hepatitis C virus infection promotes liver fibrosis through downregulation of hepatocyte growth factor and Smad7 / B. Zhu, X.-x. Wei, T.-b. Wang [et al.] // *Archives of Virology*. 2015. Vol. 160. P. 2043–2050. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2474-3>.
22. Participation of miR-200a in TGF- β 1-mediated hepatic stellate cell activation / X. Sun, Y. He, T.-T. Ma [et al.] // *Molecular and cellular biochemistry*. 2014. Vol. 338. P. 11–23. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1895-0>.
23. Functional Role of the microRNA-200 Family in Breast Morphogenesis and Neoplasia / B. Hilmarsdottir, E. Briem, J. Bergthorsson [et al.] // *Genes*. 2014. Vol. 5, Iss. 3. P. 804–820. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes5030804>.
24. Cancer and Noncoding RNAs / Ed. by J. Chakrabarti, S. Mitra. Academic Press, 2017. 551 p.

Сведения об авторах

Кирилл Сергеевич Коробейщиков — студент лечебно-профилактического факультета, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия).

Екатерина Романовна Судницына — студент лечебно-профилактического факультета Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия).

Михаил Владимирович Попугайло — кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры патологической физиологии, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: pathophis@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4820-5964>.

Дмитрий Юрьевич Гребнев — доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия).

Information about the authors

Kirill S. Korobeishchikov — Student of the Medical and Preventive Faculty, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia).

Ekaterina R. Sudnitsyna — Student of the Medical and Preventive Faculty, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia).

Mikhail V. Popugaylo — Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of Department of Pathologicalphysiology, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: pathophis@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4820-5964>.

Dmitry Yu. Grebnev — Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Head of Department of Pathologicalphysiology, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia).