

基于 miRNA-204/NUAK1/Hippo 信号轴研究红花总黄酮抑制肝星状细胞活化的作用[△]

李明奇*, 赵晓璐, 张晨璐, 王映荷, 马月宏[#](内蒙古医科大学基础医学院/内蒙古自治区分子病理学重点实验室, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)03-0311-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.03.07



摘要 目的 基于微RNA(miRNA)-204/NUAK 家族SNF1样激酶1(NUAK1)/Hippo 信号轴研究红花总黄酮(TFCTL)抑制肝星状细胞(HSC)活化的作用,为进一步阐明TFCTL抗肝纤维化的作用机制提供参考。**方法** 将HSC-T6细胞分为对照组、模型组、TFCTL低浓度组(20 μg/mL)、TFCTL中浓度组(40 μg/mL)、TFCTL高浓度组(60 μg/mL)。除对照组外,其余各组均加入5 ng/mL的转化生长因子β诱导HSC活化,然后加入相应药液/培养基培养24 h。培养结束后,检测细胞凋亡情况以及细胞中α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、I型胶原蛋白(Collagen I)和Hippo/Yes相关蛋白(YAP)通路相关蛋白[YAP、大肿瘤抑制激酶1(LATS1)、哺乳动物STE20样激酶1(MST1)]表达。另采用细胞转染法从基因、蛋白层面分别考察TFCTL对miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴活性的影响。**结果** 经TFCTL干预后,HSC-T6细胞凋亡率和细胞中MST1(TFCTL高浓度组除外)、LATS1蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),细胞中α-SMA、Collagen I、YAP(TFCTL中浓度组除外)蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。进一步的细胞转染实验结果显示,转染miRNA-204模拟物后,HSC-T6细胞中α-SMA、Collagen I、NUAK1、YAP mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),LATS1 mRNA及其蛋白表达水平、MST1 mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$),且转染miRNA-204抑制剂后的结果与之相反(MST1 mRNA除外)。**结论** TFCTL可通过上调miRNA-204表达,下调NUAK1表达,抑制Hippo/YAP通路活性,从而抑制HSC活化并促进其凋亡,进而发挥抗肝纤维化作用。

关键词 红花总黄酮;miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴;Hippo/YAP通路;肝星状细胞;肝纤维化;凋亡

Effects of total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. on hepatic stellate cell activation based on miRNA-204/NUAK1/Hippo signaling axis

LI Mingqi, ZHAO Xiaolu, ZHANG Chenlu, WANG Yinghe, MA Yuehong (College of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University/Inner Mongolia Key Laboratory of Molecular Pathology, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. (TFCTL) on hepatic stellate cell (HSC) activation based on the microRNA (miRNA)-204/NUAK family SNF1-like kinase 1 (NUAK1)/Hippo signaling axis, thereby elucidating the potential mechanism underlying their antifibrotic effects. **METHODS** The HSC-T6 cells were divided into control group, model group, TFCTL low-concentration group (20 μg/mL), TFCTL medium-concentration group (40 μg/mL), and TFCTL high-concentration group (60 μg/mL). Except for control group, the remaining groups were treated with 5 ng/mL of transforming growth factor-β to induce the activation of hepatic stellate cells, followed by the addition of corresponding drug solutions/culture medium and incubation for 24 hours. Cell apoptosis was assessed, the expression levels of α-smooth muscle actin (α-SMA), type I collagen (Collagen I) and proteins associated with the Hippo/Yes-associated protein (YAP) pathway [YAP, large tumor suppressor kinase 1 (LATS1), and mammalian STE20-like kinase 1 (MST1)] were detected. Additionally, cell

transfection was used to investigate the activity of the miRNA-204/NUAK1/Hippo signaling axis at both the genetic and protein levels. **RESULTS** After intervention with TFCTL, the apoptosis rate of HSC-T6 cells and the protein expressions of MST1 (except for the TFCTL high-concentration group) and LATS1 were significantly increased ($P<0.05$), while the protein expressions of α-SMA, Collagen I, and YAP (except for the TFCTL medium-concentration group) were significantly decreased ($P<0.05$). Further results from cell transfection experiments revealed that after transfection with

[△] **基金项目** 国家自然科学基金项目(No.82460819);内蒙古自治区自然科学基金项目(No.2024LHMS08029);内蒙古自治区“英才兴蒙”工程蒙药抗肝纤维化研究团队项目(No.202530);内蒙古医科大学“致远”人才项目“治学”人才项目(No.ZY20241201);内蒙古人才开发基金项目(No.22056);内蒙古医科大学重点项目(No.YKD2022ZD019);内蒙古医科大学蒙药抗肝纤维化作用研究科技创新团队项目(No.YKD2022TD039)

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向:中蒙药抗肝纤维化药理。
E-mail:2269681801@qq.com

[#] **通信作者** 教授,博士生导师。研究方向:中蒙药抗肝纤维化药理。E-mail:myh19982002@sina.com

miRNA-204 mimics, the mRNA and protein expressions of α -SMA, Collagen I, NUAK1, and YAP in HSC-T6 cells were significantly decreased ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expressions of LATS1 and the mRNA expression of MST1 were significantly increased ($P < 0.05$). Conversely, the results were opposite following transfection with miRNA-204 inhibitors.

CONCLUSIONS TFCTL can exert anti-hepatic fibrosis effects by up-regulating the expression of miRNA-204, thereby down-regulating the expressions of NUAK1, inactivating the Hippo/YAP pathway, which in turn suppresses the activation of HSC and promotes their apoptosis.

KEYWORDS total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L.; miRNA-204/NUAK1/Hippo signaling axis; Hippo/YAP pathway; hepatic stellate cell; hepatic fibrosis; apoptosis

肝纤维化是慢性肝损伤后组织修复失衡引发的病理状态,其核心机制为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成与降解失衡,导致肝实质内ECM异常沉积,进而破坏肝脏正常结构^[1]。活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是产生ECM的核心细胞,当肝损伤发生时, HSC受到转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、肿瘤坏死因子 α 等细胞因子的刺激,转化为具有增殖活性、纤维生成能力、促炎作用及收缩功能的肌成纤维细胞,并伴随 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)水平的升高以及I型胶原蛋白(type I collagen, Collagen I)等ECM成分的异常沉积^[2]。因此,抑制HSC活化,减少ECM合成可能是逆转肝纤维化的重要策略。

研究发现,微RNA(microRNA, miRNA)是肝纤维化表观遗传调控的关键分子,具有多靶点干预潜力,如miRNA-29b可靶向胶原基因抑制ECM合成^[3-4]; miRNA-4465可通过修饰外泌体抑制HSC活化^[5]; miRNA-204可通过激活UNC-51样激酶1转录、增强巨噬细胞自噬,抑制HSC活化^[6]。本课题组前期通过TargetScan数据库预测,发现NUAK1是miRNA-204的直接靶基因;进一步查阅文献发现,NUAK家族SNF1样激酶1(NUAK family SNF1-like kinase 1, NUAK1)在纤维化组织中高表达,下调NUAK1表达可抑制Hippo/Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)通路活性,从而减轻纤维化^[7]。另有研究发现, Hippo/YAP通路是调控HSC活化与纤维化进展的核心通路之一^[8],其核心效应分子YAP、含PDZ结合基序的转录共激活因子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)的核易位,可驱动HSC向肌成纤维细胞转化^[9]。此外, NUAK1还可通过磷酸化大肿瘤抑制激酶1(large tumor suppressor kinase 1, LATS1)调控YAP表达,从而影响HSC活性^[10]。哺乳动物STE20样激酶1(mammalian STE20-like kinase 1, MST1)为LATS1的上游激酶,可通过磷酸化作用激活LATS1^[11];当MST1、LATS1表达上调时, Hippo/YAP通路被抑制,从而降低YAP转录活性^[12]。由此可知, miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴与HSC活性密切相关,可能是肝纤维化治疗的新靶点。

红花是菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,性辛、温,归心、肝经,具有活血通经、散瘀止痛的功效。红花总黄酮(total flavonoids from *C. tinctorius* L.,

TFCTL)是红花的主要活性成分,具有抗炎和抗纤维化活性^[13]。然而, TFCTL是否可通过调控miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴抑制HSC活化,进而发挥抗肝纤维化的作用尚不明确。基于此,本研究拟基于miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴探讨TFCTL抑制HSC活性的作用,并进一步研究TFCTL抗肝纤维化的作用机制,以期为临床应用TFCTL治疗肝纤维化提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

CT15RE型高速台式冷冻离心机购自日本Hitachi公司;7500 Fast型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪、M16710-3354型漩涡振荡器均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;DYY-6C型电泳仪购自北京六一生物科技有限公司;ODYSSEY c1x型近红外激光成像系统购自基因有限公司;DMIL LED Fluo型荧光显微镜购自德国Leica公司;NovoCyte 2040R型流式细胞仪购自安捷伦生物(杭州)有限公司。

1.2 主要药品与试剂

TFCTL提取物由本课题组前期制备(批号C294220505, TFCTL含量为60%~65%);miRNA-204模拟物转染试剂、miRNA-204模拟物阴性对照转染试剂、miRNA-204抑制剂转染试剂、miRNA-204抑制剂阴性对照转染试剂、Ribo FECTTM CP转染试剂盒(批号分别为V0722、W0828、R0516、S1127、X0220)均购自广州锐博生物技术有限公司;DAPI染色液、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(批号C1062M)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;兔源 α -SMA、Collagen I、YAP、LATS1抗体(批号分别为bs-10196R、bs-10423R、bs-3605R、bs-2904R)均购自北京博奥森生物技术有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、MST1、NUAK1抗体(批号分别为00195792、00075987、00050172)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;山羊抗兔荧光二抗(批号A23920)购自武汉艾美捷科技有限公司;牛血清白蛋白(批号A8020)购自北京索莱宝科技有限公司;miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒(批号KR211)购自天根生化科技(北京)有限公司;DMEM培养基(批号6124441)购自美国Gibco公司;TGF- β (批号0713AF354-1,纯度 $\geq 98\%$)购自美国Pepro-Tech公司。

1.3 细胞

大鼠肝星状细胞系 HSC-T6(货号 TCR-C627)购自苏州海星生物科技有限公司。

2 实验方法

2.1 细胞培养

将HSC-T6细胞接种于含10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基中,然后置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。当细胞融合度为80%时进行传代等后续处理。

2.2 细胞分组、造模与给药

将细胞分为对照组、模型组(TGF-β, 5 ng/mL)、TFCTL低浓度组(20 μg/mL)、TFCTL中浓度组(40 μg/mL)、TFCTL高浓度组(60 μg/mL)。除对照组外,其余各组均加入5 ng/mL的TGF-β诱导HSC活化^[4]。培养24 h后,TFCTL各浓度组加入相应药液(浓度根据本课题组前期研究结果设置),对照组和模型组加入等体积培养基,培养24 h后进行后续研究。

2.3 细胞凋亡情况检测

将处于对数生长期的HSC-T6细胞接种于6孔板中,然后按“2.2”项下方法分组、造模与给药,每组设3个复孔。培养24 h后,收集各组细胞沉淀,以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,根据Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书方法操作,再采用流式细胞仪检测HSC-T6细胞的凋亡情况,并计算细胞凋亡率(细胞凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数×100%)。

2.4 细胞中α-SMA、Collagen I及Hippo/YAP通路相关蛋白表达检测

将处于对数生长期的HSC-T6细胞接种于6孔板中,然后按“2.2”项下方法分组、造模与给药,每组设3个复孔。培养24 h后,收集各组细胞,提取细胞中总蛋白,经BCA法测定蛋白浓度后,进行变性处理。取变性后蛋白样品适量,上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,经转膜、封闭后,加入α-SMA、Collagen I、YAP、MST1、LATS1、GAPDH一抗(稀释度分别为1:5 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:10 000),于4℃下孵育过夜;次日,以TBST洗膜3次,加入二抗(稀释度为1:10 000),室温孵育1 h;以TBST洗膜3次,经显影成像后,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带的灰度比值表示目的蛋白的表达水平。

2.5 细胞中活化标志物α-SMA蛋白的荧光表达检测

将处于对数生长期的HSC-T6细胞接种于12孔板中,然后按“2.2”项下方法分组、造模与给药,每组设3个复孔。培养24 h后,用4%多聚甲醛固定15 min,以0.1% Triton X-100透化6 min,经5%牛血清白蛋白封闭30 min后,加入α-SMA一抗(稀释度为1:100),于4℃下孵育过夜;以PBS清洗5次后,加入二抗(稀释度为1:

500),室温孵育过夜;采用含DAPI的抗荧光淬灭封片剂避光孵育5 min后,置于荧光显微镜下观察并采集图像(阳性细胞呈明亮、清晰的绿色纤维状或束状荧光,与蓝色细胞核形成明显共定位)。采用Image J软件分析细胞中α-SMA蛋白的荧光强度。荧光强度越强,表明蛋白表达水平越高。

2.6 细胞中miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴活性考察

采用细胞转染法进行考察。将处于对数生长期的HSC-T6细胞接种于24孔板中,分为miRNA-204模拟物组、miRNA-204模拟物阴性对照组、miRNA-204抑制剂组、miRNA-204抑制剂阴性对照组,每组设3个复孔。各组细胞加入相应转染试剂(模拟物及其阴性对照转染试剂的终浓度均为50 nmol/L,抑制剂及其阴性对照转染试剂的终浓度均为100 nmol/L,上述浓度均根据试剂盒要求设置),室温孵育15 min后,将培养基更换成不含1%青霉素-链霉素双抗的培养基,继续培养48 h后进行相关实验(笔者利用PCR实验验证了各组细胞的转染效率,结果显示均转染成功)。(1)基因层面的考察:取上述培养48 h后的各组细胞适量,提取细胞中总RNA,再将RNA反转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR扩增体系为:2×SuperReal PreMix Plus 10 μL, 50×Rox Reference Dye 0.4 μL,正、反向引物各0.6 μL, cDNA模板2 μL,无酶水6.4 μL。PCR扩增程序为:95℃预变性15 min;94℃变性20 s,60℃退火/延伸34 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法对目的基因进行定量分析。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,具体引物序列及扩增产物长度见表1。(2)蛋白层面的考察:按“2.4”项下方法,检测转染后细胞中α-SMA、Collagen I和miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴相关蛋白YAP、MST1、LATS1、NUAK1的表达水平。其中,NUAK1的稀释度为1:500,其余条件均同“2.4”项下。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增产物长度/bp
α-SMA	TGTGCTGGACTCTGAGATG	GATCACCTGCCATCAGG	102
Collagen I	TGTTGGTCTGCTGGCAAGAATG	GTCACCTGTTCGCTGTCTCAC	129
YAP	CCTTTCTTAACAGTGGCACCTATC	TGCTCTGGCTGATGGTGTCTC	112
MST1	GAACAGTATCGTGGCTCAGTCAG	ATTGTGGCTTATGTGGTGTCTCTG	94
LATS1	TGCACTGGCTTCAGATGGAC	CACACCGACAGTTGGAAGGA	108
NUAK1	TTTTGAGCCGAGTGGTTGC	TCGTCTGATGTGAACATGTCT	150
GAPDH	TGTGAACGGATTGGCCGTA	ACTGTGCCGTGAATTTGCC	173

2.7 统计学方法

利用GraphPad Prism 8软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 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-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 TFCTL对细胞凋亡的影响

与对照组[细胞凋亡率为(9.08±0.62)%]比较,模型组细胞凋亡率[(9.04±0.58)%]差异无统计学意义($P>$

0.05);与模型组比较,TFCTL低、中、高浓度组细胞凋亡率[分别为(11.20±0.77)%、(12.32±0.77)%、(14.58±0.93)%]均显著升高($P<0.05$)。结果见图1。

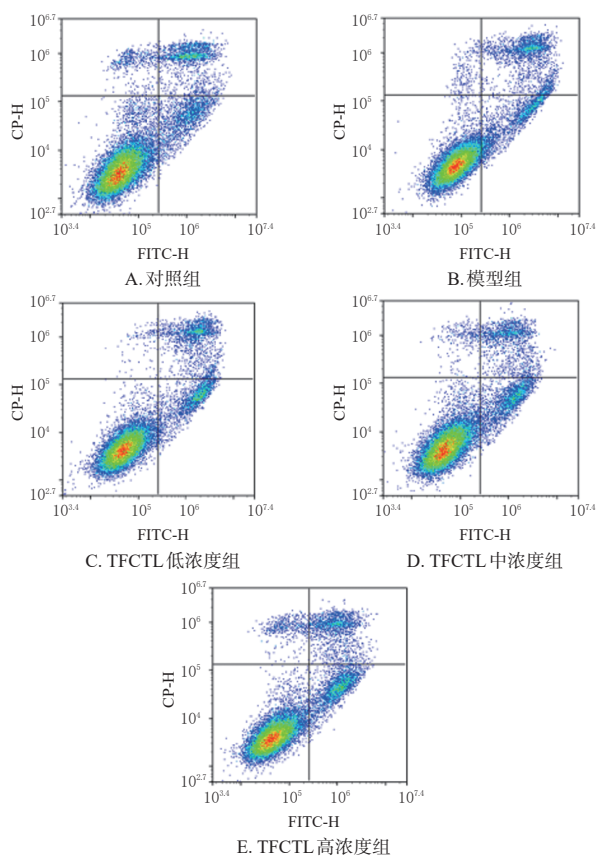
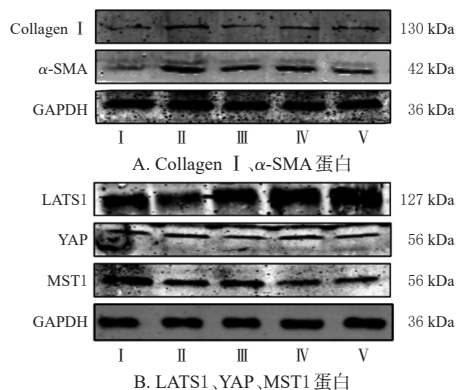


图1 各组细胞凋亡检测的流式细胞图

3.2 TFCTL对细胞中 α -SMA、Collagen I和Hippo/YAP通路相关蛋白表达的影响

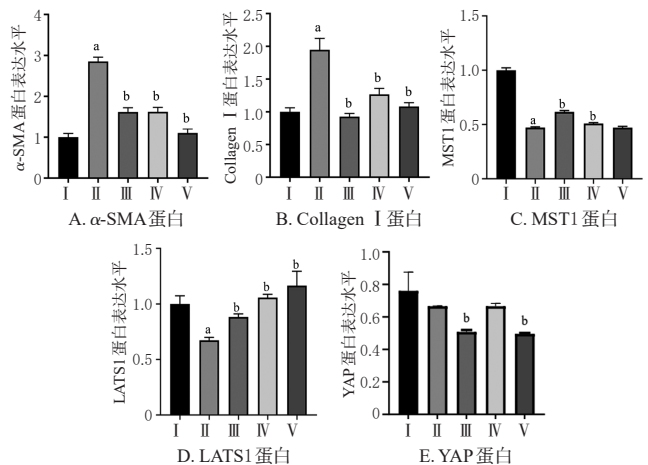
与对照组比较,模型组细胞中 α -SMA、Collagen I蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),MST1、LATS1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,TFCTL各浓度组细胞中 α -SMA、Collagen I、YAP(TFCTL中浓度组除外)蛋白表达水平均显著降低($P<$

0.05),MST1(TFCTL高浓度组除外)、LATS1蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图2~图4。



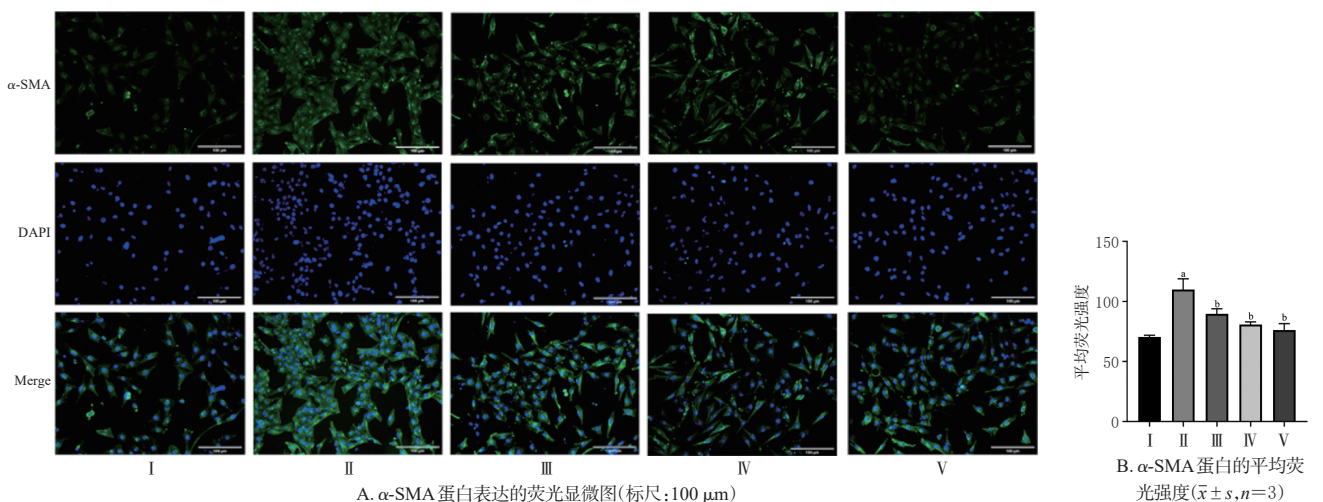
I: 对照组; II: 模型组; III: TFCTL低浓度组; IV: TFCTL中浓度组; V: TFCTL高浓度组。

图2 各组细胞中 α -SMA、Collagen I、MST1、LATS1、YAP蛋白表达的电泳图



I: 对照组; II: 模型组; III: TFCTL低浓度组; IV: TFCTL中浓度组; V: TFCTL高浓度组; a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

图3 各组细胞中 α -SMA、Collagen I、MST1、LATS1、YAP蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)



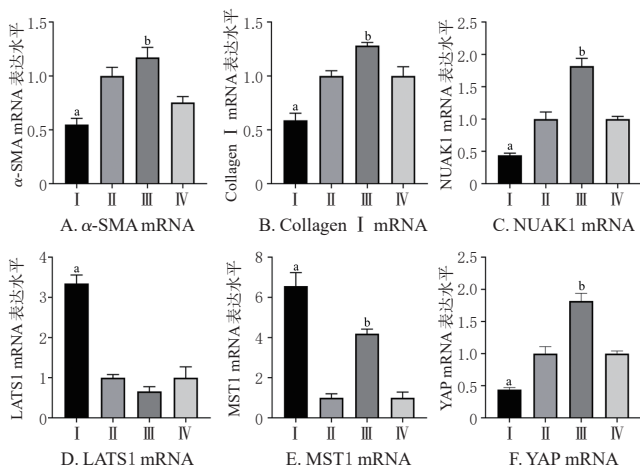
I: 对照组; II: 模型组; III: TFCTL低浓度组; IV: TFCTL中浓度组; V: TFCTL高浓度组; a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

图4 各组细胞中 α -SMA蛋白表达的免疫荧光染色图

3.3 转染实验中细胞 miRNA-204/NUAK1/Hippo 信号轴活性考察结果

3.3.1 基因层面考察结果

与 miRNA-204 模拟物阴性对照组比较, miRNA-204 模拟物组细胞中 α -SMA、Collagen I、NUAK1、YAP mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), LATS1、MST1 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与 miRNA-204 抑制剂阴性对照组比较, miRNA-204 抑制剂组细胞中 α -SMA、Collagen I、NUAK1、MST1、YAP mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图 5。



I: miRNA-204 模拟物组; II: miRNA-204 模拟物阴性对照组; III: miRNA-204 抑制剂组; IV: miRNA-204 抑制剂阴性对照组; a: 与 miRNA-204 模拟物阴性对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 miRNA-204 抑制剂阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

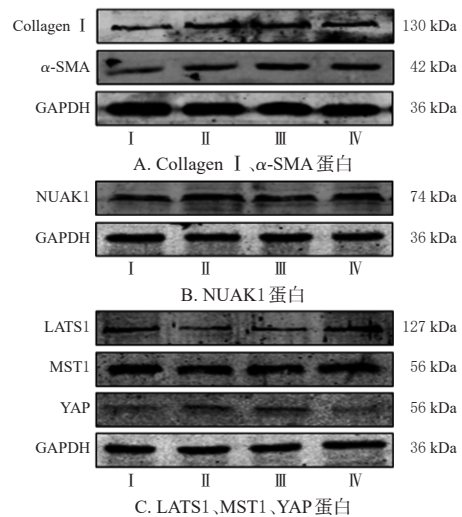
图5 转染实验中各组细胞 α -SMA、Collagen I、NUAK1、MST1、LATS1、YAP mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3.2 蛋白层面考察结果

与 miRNA-204 模拟物阴性对照组比较, miRNA-204 模拟物组细胞中 α -SMA、Collagen I、NUAK1、YAP 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), LATS1、MST1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与 miRNA-204 抑制剂阴性对照组比较, miRNA-204 抑制剂组细胞中 α -SMA、Collagen I、NUAK1、YAP 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), LATS1、MST1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 6、图 7。

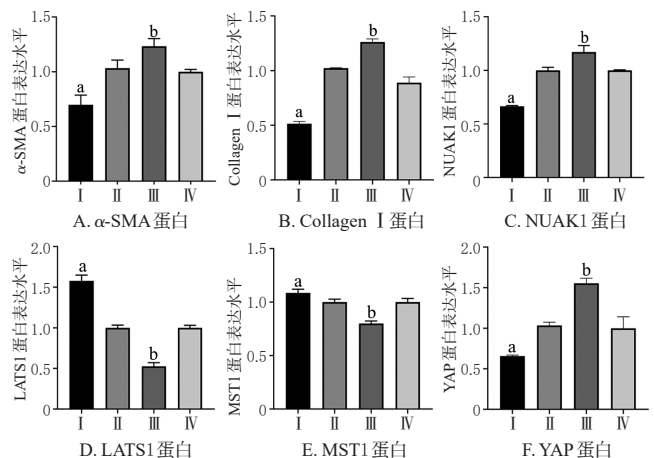
4 讨论

肝纤维化是一种以 ECM 异常沉积为特征的病理性修复过程,其作为多种慢性肝损伤的共同终末期病理结局,可能会发展为肝硬化或肝癌^[15]。该疾病的致病机制涉及多因素相互作用,目前已被证实的主要诱因包括胆汁淤积性肝损伤以及酒精性肝病的进行性肝损伤等^[16]。作为肝纤维化病理进程的核心效应细胞, HSC 在生理稳态下维持静止表型,当肝脏微环境遭到破坏时, HSC 会被激活,从静止表型转变为激活表型,并转化为肌成纤维细胞;同时 HSC 的活化标志物 α -SMA 的表达显著上



I: miRNA-204 模拟物组; II: miRNA-204 模拟物阴性对照组; III: miRNA-204 抑制剂组; IV: miRNA-204 抑制剂阴性对照组。

图6 转染实验中各组细胞 α -SMA、Collagen I、NUAK1、MST1、LATS1、YAP 蛋白表达的电泳图



I: miRNA-204 模拟物组; II: miRNA-204 模拟物阴性对照组; III: miRNA-204 抑制剂组; IV: miRNA-204 抑制剂阴性对照组; a: 与 miRNA-204 模拟物阴性对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 miRNA-204 抑制剂阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

图7 转染实验中各组细胞 α -SMA、Collagen I、NUAK1、LATS1、MST1、YAP 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

调,并且 HSC 将进行异常增殖和分泌过量 I 型胶原 $\alpha 1$ 链等 ECM^[17]。这个病理进程受到复杂的细胞因子网络调控,其中 TGF- β 可通过自分泌和旁分泌双重作用机制,形成促纤维化信号的正反馈循环^[18]。基于此,本研究采用 TGF- β 构建 HSC 活化模型。

本课题组前期预实验发现, TFCTL 可通过调节 Hippo/YAP 通路发挥抗肝纤维化作用,本研究进一步通过体外实验证明 TFCTL 可通过抑制 Hippo/YAP 通路活性,进而抑制 HSC 活化,并进一步对其上游调控网络进行探析。miRNA 是一种短链、非编码小 RNA,在细胞分化、增殖、周期调控及凋亡等生物学过程中扮演着重要角色。相关研究发现,多种 miRNA 均可通过调节肝纤

维化相关基因表达,从而调控肝纤维化进程^[19-20]。NUAK1是miRNA-204的靶点之一,在肝癌中过度表达;当miRNA-204表达上调时,可显著下调NUAK1的表达^[21]。另有研究发现,NUAK1和Hippo/YAP通路之间也存在相关性——在Hippo/YAP通路中,YAP/TAZ的缺失导致肌成纤维细胞中NUAK1表达下调,而NUAK1又能通过激活YAP促进纤维化,形成相互调节关系;另外,LATS1、MST1是影响YAP和TAZ磷酸化的关键因子^[7]。由此推测,miRNA-204/NUAK1/Hippo信号轴可能是TFCTL抗肝纤维化的重要靶点。

本研究实验结果显示,与模型组比较,TFCTL各浓度组的细胞凋亡率均显著升高, α -SMA、Collagen I、YAP(TFCTL中浓度组除外)蛋白表达水平均显著降低,MST1(TFCTL高浓度组除外)、LATS1表达水平均显著升高。这提示,TFCTL抗肝纤维化作用的发挥可能依赖于Hippo/YAP通路。进一步的细胞转染实验结果显示,转染miRNA-204模拟物后,细胞中 α -SMA、Collagen I、NUAK1、YAP mRNA及其蛋白表达水平均降低,LATS1 mRNA及其蛋白表达水平均升高,且转染miRNA-204抑制剂后的结果与之相反。然而,转染miRNA-204模拟物后,细胞中MST1 mRNA及其蛋白表达水平均升高,且转染miRNA-204抑制剂后MST1 mRNA表达水平也升高(蛋白表达水平降低)。笔者推测上述结果可能是由于miRNA-204间接调控MST1 mRNA表达,而MST1 mRNA转录上调后未能有效转化为蛋白,其具体原因仍有待进一步分析。

综上所述,TFCTL可通过上调miRNA-204表达,下调NUAK1表达,抑制Hippo/YAP通路活性,从而抑制HSC活化并促进其凋亡,进而发挥抗肝纤维化作用。

参考文献

[1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3):151-166.

[2] YAN Y F, ZENG J F, XING L H, et al. Extra- and intracellular mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(8):1014.

[3] ZHANG T Y, YANG Y, WANG B J, et al. XSSJS inhibits hepatic fibrosis by promoting the miR-29b-3p/VEGFA axis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(2):BSR20212241.

[4] HE Y, HUANG C, LIN X, et al. microRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases[J]. *Biochimie*, 2013, 95(7):1355-1359.

[5] WANG Y J, CHEN Y F, YANG F J, et al. miR-4465-modified mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles inhibit liver fibrosis development via targeting LOXL2 expression[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2024, 25(7):594-604.

[6] ZOU Z W, LIU X, YU J, et al. Se in mice. Nuclear miR-204-3p mitigates metabolic dysfunction-associated stea-

totic liver disease[J]. *J Hepatol*, 2024, 80(6):834-845.

[7] ZHANG T Z, HE X L, CALDWELL L, et al. NUA1 promotes organ fibrosis via YAP and TGF- β /SMAD signaling[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(637):eaa4028.

[8] ACHARYA P, CHOUHAN K, WEISKIRCHEN S, et al. Cellular mechanisms of liver fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:671640.

[9] MIA M M, SINGH M K. New insights into Hippo/YAP signaling in fibrotic diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(13):2065.

[10] WEI Y Z, HUI V L Z, CHEN Y L, et al. YAP/TAZ: molecular pathway and disease therapy[J]. *MedComm*, 2023, 4(4):e340.

[11] NI L S, ZHENG Y G, HARA M, et al. Structural basis for Mob1-dependent activation of the core MST-LATS kinase cascade in Hippo signaling[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(13):1416-1431.

[12] FU M Y, HU Y, LAN T X, et al. The Hippo signaling pathway and its implications in human health and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):376.

[13] 李阳, 焦扬, 牛洁. 红花中的黄酮类化学成分及其药理作用研究进展[J]. *环球中医药*, 2024, 17(1):137-143.

[14] LIU Z K, LI C, KANG N L, et al. Transforming growth factor β (TGF β) cross-talk with the unfolded protein response is critical for hepatic stellate cell activation[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(9):3137-3151.

[15] KITTO L J, HENDERSON N C. Hepatic stellate cell regulation of liver regeneration and repair[J]. *Hepatol Commun*, 2021, 5(3):358-370.

[16] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4):875.

[17] LIU Q Q, CHEN J, MA T, et al. DCDC2 inhibits hepatic stellate cell activation and ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis by suppressing Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):9425.

[18] CIERPKA R, WEISKIRCHEN R, ASIMAKOPOULOS A. Perilipin 5 ameliorates hepatic stellate cell activation via SMAD2/3 and SNAIL signaling pathways and suppresses STAT3 activation[J]. *Cells*, 2021, 10(9):2184.

[19] LIU M Q, CHO W C, FLYNN R J, et al. microRNAs in parasite-induced liver fibrosis: from mechanisms to diagnostics and therapeutics[J]. *Trends Parasitol*, 2023, 39(10):859-872.

[20] ZHAO Z, LIN C Y, CHENG K. siRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis[J]. *Transl Res*, 2019, 214:17-29.

[21] YU Y H, WANG Y S, XIAO X Y, et al. miR-204 inhibits hepatocellular cancer drug resistance and metastasis through targeting NUA1[J]. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97(5):563-570.

(收稿日期:2025-08-07 修回日期:2026-01-20)

(编辑:唐晓莲)