

lncRNA 锌指蛋白反义链 1 对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的作用

王锦坡^{1,2}, 黄月红^{1,2}, 陈运新^{1,2}, 陈治新^{1,2}, 陈丰霖^{1,2}

摘要: **目的** 探讨长链非编码 RNA (lncRNA) 锌指蛋白反义链 1 (ZFAS1) 在肝纤维化 (LF) 中的作用。

方法 四氯化碳 (CCl₄) 诱导小鼠 LF 模型。苏木精-伊红染色 (H-E 染色) 和天狼猩红染色观察肝脏组织学改变, ELISA 检测肝组织羟脯氨酸 (HYP) 含量, 免疫组织化学 (IHC) 检测肝组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原 $\alpha 1$ (Coll $\alpha 1$) 的表达, 荧光定量 PCR 检测肝组织 ZFAS1 的表达水平, 通过 siRNA 技术在 NCTC1469 细胞中沉默 ZFAS1 表达并模拟小鼠肝细胞的纤维化模型, 免疫印迹法 (Western-blot) 检测细胞 Coll $\alpha 1$ 、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的表达变化。 **结果** 与对照组比较, CCl₄ 诱导模型组小鼠肝组织内炎症细胞浸润明显, 胶原纤维沉积明显增多, 肝星状细胞 (HSCs) 活化增多 ($P < 0.05$), 肝组织胶原分泌及其代谢产物 HYP 表达上调, 肝组织内 lncRNA ZFAS1 表达明显升高 ($P < 0.05$)。与 AML12 细胞比较, NCTC1469 细胞高表达内源性 lncRNA ZFAS1 ($P < 0.05$); 在 NCTC1469 细胞转染 3 种 siZFAS1 片段均可有效抑制 ZFAS1 表达 ($P < 0.05$), 以 siRNA-539 下降最明显。采用 TGF- $\beta 1$ 处理 NCTC1469 细胞构建 LF 模型, Western-blot 结果显示, 与对照组比较, 模型组的 Coll $\alpha 1$ 、TGF- $\beta 1$ 和 MMP-2 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, ZFAS1 干扰+模型组的 Coll $\alpha 1$ 、TGF- $\beta 1$ 和 MMP-2 表达明显下降 ($P < 0.05$)。 **结论** 干扰 lncRNA ZFAS1 对 LF 可能具有治疗作用。

关键词: 长链非编码 RNA; 锌指蛋白反义链 1; 肝纤维化; 表达分析

文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2023)02-0096-07

肝纤维化 (liver fibrosis, LF) 是肝组织内细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的平衡被打破, 导致肝脏结构和功能发生改变的一种病理变化, 出现在慢性肝病的所有类型中。若 LF 无法得到控制, 将导致肝硬化或肝癌, 甚至进展为肝衰竭乃至死亡。全球每年死于肝硬化的 100 万例患者中, 我国就占了约 1/3^[1]。研究^[2-3]表明, 若病因能得到有效控制, LF 可逆转。因此, 寻找并探索新的治疗方法逆转或阻止 LF 已势在必行。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度 > 200 nt 的非编码 RNA, 可参与许多疾病的病理和生理过程, 包括细胞分化和发育、肿瘤的发生和迁移、器官和组织纤维化^[4]。近年来, 多项研究^[5-9]结果表明, lncRNAs 可在多种脏器的纤维化组织中异常表达, 并参与纤维化的调节, lncRNAs 本身、其结合蛋白和靶基因均可能成为新的治疗靶点, 特别是在 LF 的发生过程中, 已发现有多种异常表达的 lncRNAs, 如 MALAT1、lnc-LFAR1、HIF1A-AS1 和 GAS5^[6,8-9] 等。

锌指蛋白反义链 1 (zinc finger antisense 1, ZFAS1) 是新发现的一种长链非编码 RNA, 定位在染色体 20q13, 位于含 NFX-1 型锌指结构 (zinc finger NFX-1-type containing, Znfx1) 启动子区域的反义链上, 是 3 种小核仁 RNA 的宿主^[10]。研究^[11]发现, ZFAS1 在原发性肝细胞癌 (hepatic cell carcinoma, HCC) 患者中高表达, 与肝内、外转移及 HCC 预后不良有关^[12-13]。此外, ZFAS1 参与多种脏器或组织纤维化的发展。YANG 等^[14]在肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 的研究中发现, lncRNA ZFAS1 通过 ZFAS1/miR-150-5p/SLC38A1 轴参与 PF 的发生, 并可能成为治疗 PF 的新标志物。本研究拟探讨 ZFAS1 在 LF 组织和细胞中的表达情况及作用机制, 为 LF 提供新的诊断及治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞 6~8 周龄雄性 SPF 级 C57 小鼠 [北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2016-0006]。NCTC1469 (CL-0407)、AML12 (CL-0602) (上海普诺赛公司)。

1.2 试剂 AML12 细胞专用培养基 (上海普诺赛公司); 转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$, 美国 Affinity 公司); 四氯化碳 (CCl₄, 湖南汇虹试剂有限公司); 橄榄油 (上海源叶生物科技有限公司); Trizol Reagent、Ultrapure RNA 超纯 RNA 提取试剂盒 (CWBIO, 中国康为世

收稿日期: 2022-05-20

资助项目: 福建省卫生健康科研人才培养项目 (2019-1-35); 福建省临床医学专科重点专科基金 (闽卫科教 2012 149 号)

作者单位: 1. 福建医科大学 附属协和医院 消化内科, 福州 350001;

2. 福建省消化系疾病研究室, 福州 350001

作者简介: 王锦坡, 男, 主治医师, 医学硕士

通信作者: 陈丰霖. Email: drchenflxiehe@163.com

纪公司); HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA, 美国 Proteintech 公司); I 型胶原 $\alpha 1$ (collagen I $\alpha 1$, Coll1 $\alpha 1$, 美国 Affinity 公司); 基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2, 英国 Abcam 公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京中杉金桥公司); 羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)测定试剂盒(南京建成公司)。

1.3 方法

1.3.1 LF 模型构建 小鼠按随机数据表分为对照组($n=5$)和模型组($n=5$)。模型组小鼠腹腔注射体积分数为 10% CCl₄(溶于橄榄油, 2 mg/kg), 每周 2 次, 诱导小鼠 LF 模型。对照组小鼠腹腔注射相应体积的橄榄油。于第 6 周末处死小鼠, 留取肝组织样品。

1.3.2 苏木精-伊红染色(H-E 染色) 4%多聚甲醇固定的肝组织经梯度乙醇脱水, 常规透明, 浸蜡。石蜡包埋, 切片。H-E 染色, 中性树脂封片。镜检观察肝组织病理变化。

1.3.3 天狼猩红染色 取出肝组织石蜡切片, 常规脱蜡水化。用天狼星红染色液染色 1 h, 流水冲洗; Mayer 苏木精染细胞核 10 min, 流水清洗; 95%乙醇脱水(5~10 s 脱水 3 次), 二甲苯胺透明 3 次, 后用中性树胶封固。

1.3.4 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC) 组织切片放入 65 ℃烤箱中烤 2 h, 在二甲苯共放置 20 min, 乙醇梯度脱水, 纯化水冲洗。用柠檬酸缓冲液抗原修复, 去除内源性过氧化物酶。常规方法 37 ℃非特异性封闭 30 min。敷一抗 α -SMA(1:100)、Coll1 $\alpha 1$ (1:100)。敷二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1:100)。DAB 显色, 苏木精复染, 盐酸乙醇分化, 返蓝; 冲洗、脱水、透明、封片、镜检。使用 Image J 软件进行半定量分析。

1.3.5 ELISA 检测样本的光密度(optical density, OD)值 小鼠肝组织分组处理后, 严格按照试剂盒说明书操作, 在光径 1 cm、波长 550 nm 条件下测各样本的 OD 值, 计算 HYP 含量。

1.3.6 细胞转染 NCTC1469 细胞按以下分组进行转染: 对照组、干扰对照组、hZFAS1-697、hZFAS1-539 和 hZFAS1-624。当细胞密度达 70% 时准备转染, 转染剂量以 6 孔板 1 个孔计算, 按照说明书转染细胞。将转染 48 h 后的细胞进行检测。各 siRNA 序列见表 1。

表 1 siRNA 序列
Tab. 1 The sequences of siRNA

siRNA 名称	序 列
hZFAS1-697	F:UUGGCCUAUCUGUAGAAUAATT R:UUUUUUUCUACAGAUAGGCCAATT
hZFAS1-539	F:GUGUUGGUCUGAUCUUGAUUUUTT R:AAAUCAAGAUCAGACCAACACTT
hZFAS1-624	F:GAAUGCAAAGAAGAGUUACUUTT R:AAGUAAACUCUUCUUUGCAUUCTT
NC	F:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT R:ACGUGACACGUUCGGAGAATT

ZFAS1: 锌指蛋白反义链 1; NC: 阴性对照组。

1.3.7 实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 收集对照组及模型组的肝组织细胞, 用超纯 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取, 将 RNA 反转录为 cDNA。对各组细胞中目的基因的表达进行检测。收集上述各组 NCTC1469 细胞, 用超纯 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 并将 RNA 反转录为 cDNA。检测上述各组细胞中目的基因的表达。反应如下: 预变性 95 ℃ 10 min→变性 95 ℃ 10 s→退火 58 ℃ 30 s→延伸 72 ℃ 30 s; 40 个循环。引物序列见表 2。

表 2 各引物序列信息及 PCR 反应条件
Tab. 2 Information of primer sequence and condition of PCR

引物名称	引物序列	$l_{引物}$ / nt	$l_{产物}$ / bp	$T_{退火}$ / ℃
ZFAS1	F:AGCGTTTGCTTTGTTCCT	18	113	57.5
	R:CTCCCTCGATGCCCTTCT	18		
β -actin	F:AGGGAAATCGTGCGTGAC	19	192	58.0
	R:CATACCCAAGAAGGAAGGCT	20		
GAPDH	F:TCAACGGCACAGTCAAGG	19	357	58.0
	R:TGAGCCCTTCCACGATG	20		

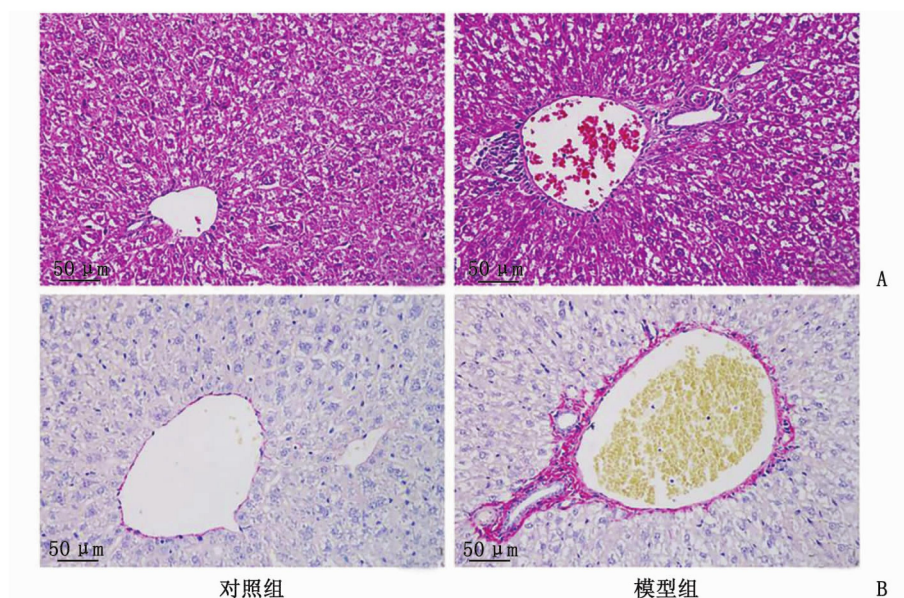
ZFAS1: 锌指蛋白反义链 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.3.8 Western-blot 检测蛋白含量 各组细胞加入裂解液裂解, 获得各组细胞的总蛋白, 测定各组细胞蛋白含量。蛋白变性后, 行凝胶电泳试验, 湿法转膜。加一抗, 4 ℃过夜孵育; 加二抗, 室温孵育 1~2 h。在凝胶成像系统中曝光。采用 Quantity one 软件分析各抗体条带的灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。实验重复 3 次, 计量分析结果以 $\bar{X} \pm S$ 表示。2 组间的计量数值比较采用独立样本 t 检验, 多组之间计量数值的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

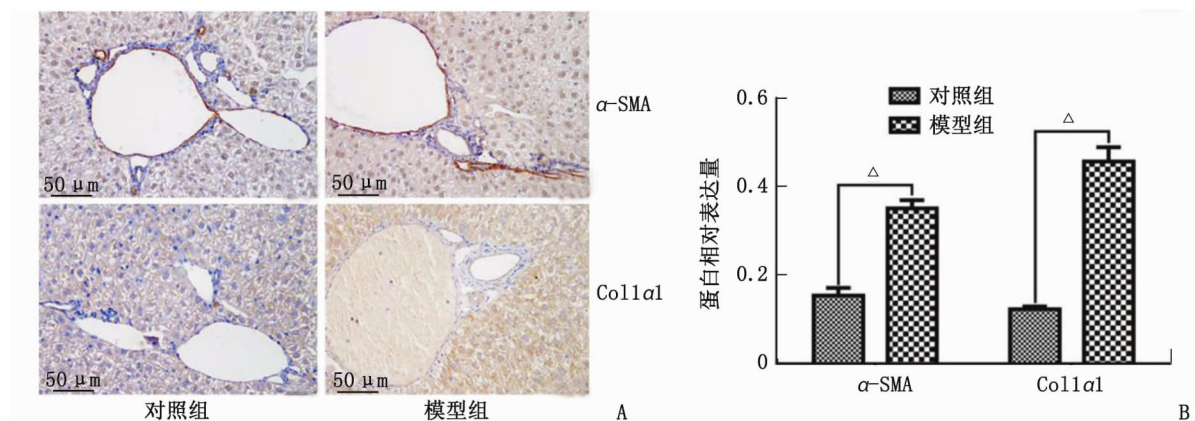
2.1 纤维化小鼠肝脏病理组织形态学改变 与对照组比较,模型组小鼠肝组织内炎性细胞浸润增多,纤维结缔组织生成明显增多(H-E 染色,图 1A);模型组小鼠肝组织内胶原纤维蛋白合成增加,大量沉积(天狼猩红染色,图 1B)。



A: H-E 染色; B: 天狼猩红染色。模型组: CCl_4 处理组。

图 1 纤维化小鼠肝组织病理形态学改变 ($\times 400$)

Fig. 1 Pathomorphological changes of liver tissue in hepatic fibrosis mice ($\times 400$)



α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白; Colla1: I 型胶原 $\alpha 1$; IHC: 免疫组织化学。模型组: CCl_4 处理组。A: IHC 染色检测肝组织 α -SMA 和 Colla1 表达定位; B: 半定量分析肝组织 α -SMA 和 Colla1 表达。与对照组比较, $\triangle$: $P < 0.05$ 。

图 2 IHC 法检测纤维化小鼠肝组织中 α -SMA 和 Colla1 表达

Fig. 2 The expression of α -SMA and Colla1 of liver tissue was detected by IHC in hepatic fibrosis mice

2.3 纤维化小鼠肝组织中 HYP 的含量 与对照组比较,模型组小鼠肝组织的 HYP 含量明显升高 ($P < 0.05$,图 3),提示 CCl_4 处理可促进胶原产生。

2.4 纤维化小鼠肝组织 lncRNA ZFAS1 表达 与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 lncRNA ZFAS1 表达

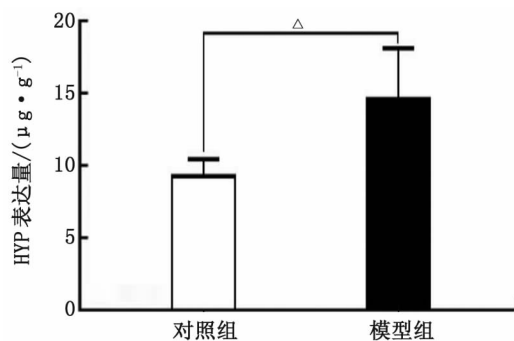
2.2 纤维化小鼠肝组织 α -SMA 和 Colla1 表达情况

肝组织 IHC 染色显示, α -SMA 阳性着色主要位于血管周围和肝窦内肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 的细胞质,而 Colla1 蛋白阳性着色主要位于肝组织纤维间隔 (图 2A)。半定量结果显示,与对照组比较,模型组中的 α -SMA、Colla1 蛋白表达水平明显升高,差别有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2B)。

水平显著增高,差别有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4)。

2.5 小鼠肝细胞系 NCTC1469 和 AML12 细胞中 lncRNA ZFAS1 表达变化 为进一步探讨 lncRNA ZFAS1 在 LF 进展中的作用,体外通过 qRT-PCR 检测小鼠永生化正常肝细胞系 NCTC1469 和 AML12

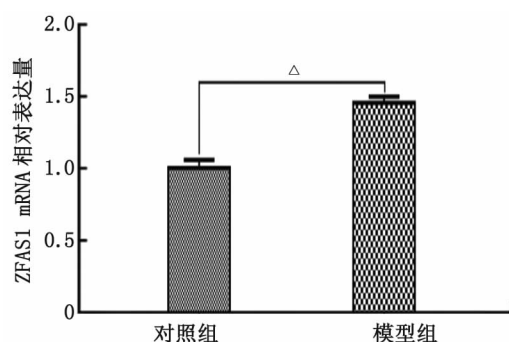
细胞内源性 lncRNA ZFAS1 表达水平。与 AML12 细胞比较,NCTC1469 细胞中 lncRNA ZFAS1 表达水平显著升高($P<0.05$,图 5)。因此,后续 RNA 干扰实验将以 NCTC1469 细胞作为实验对象。



HYP:羟脯氨酸。与对照组比较,△: $P<0.05$ 。

图 3 ELISA 检测肝组织中 HYP 的含量

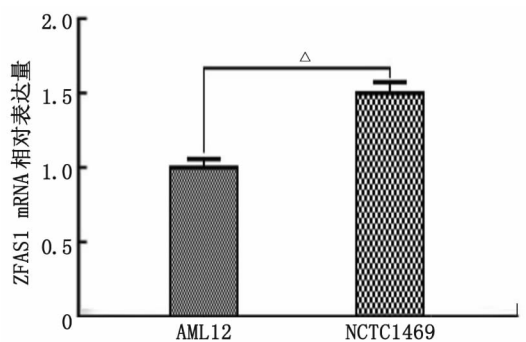
Fig. 3 Hydroxyproline content of liver tissue was detected by ELISA



ZFAS1: 锌指蛋白反义链 1。与对照组比较,△: $P<0.05$ 。

图 4 肝组织中 ZFAS1 表达结果比较

Fig. 4 Expression of ZFAS1 in liver tissues of control group and model group



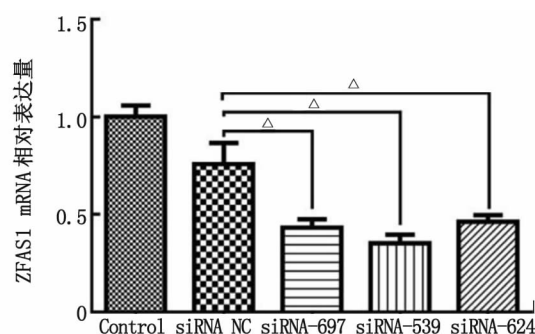
ZFAS1: 锌指蛋白反义链 1。与对照组比较,△: $P<0.05$ 。

图 5 NCTC1469 和 AML12 细胞中 ZFAS1 表达结果

Fig. 5 Expression of ZFAS1 in NCTC1469 and AML12 cells

2.6 lncRNA ZFAS1 敲低细胞株的构建 在 NCTC1469 细胞分别脂质体转染不同靶点的

siZFAS1 片段 (siRNA-697、siRNA-539 和 siRNA-624), qRT-PCR 检测各组 NCTC1469 中 lncRNA ZFAS1 的表达(图 6), 3 种 siZFAS1 片段均可有效抑制 ZFAS1 表达。与空白对照组比较, siRNA 对照组 lncRNA ZFAS1 的表达无明显变化($P>0.05$); 与阴性对照组 (siRNA NC) 比较, siRNA-697、siRNA-539 和 siRNA-624 组的 lncRNA ZFAS1 表达均显著下降, 差别有统计学意义($P<0.05$), 其中 siRNA-539 下降最为明显, 故后续干扰实验以 siRNA-539 为干扰靶点。

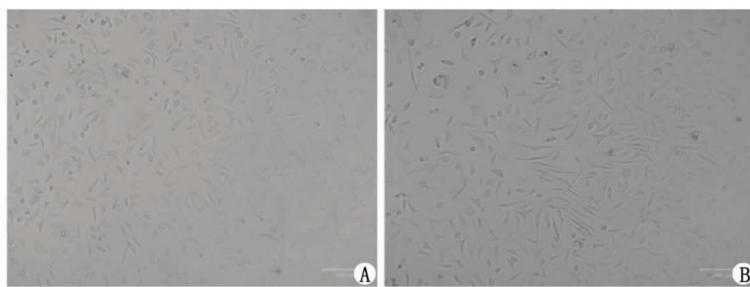


qRT-PCR: 实时荧光定量聚合酶链反应; ZFAS1: 锌指蛋白反义链 1。Control 组: 空白对照组; siRNA NC 组: 阴性对照组; siRNA-697 组: 转染 siRNA-697 组; siRNA-539 组: 转染 siRNA-539 组; siRNA-624 组: 转染 siRNA-624 组。与阴性对照组比较, △: $P<0.05$ 。

图 6 qRT-PCR 验证干扰效率

Fig. 6 The interference efficiency was verified by qRT-PCR

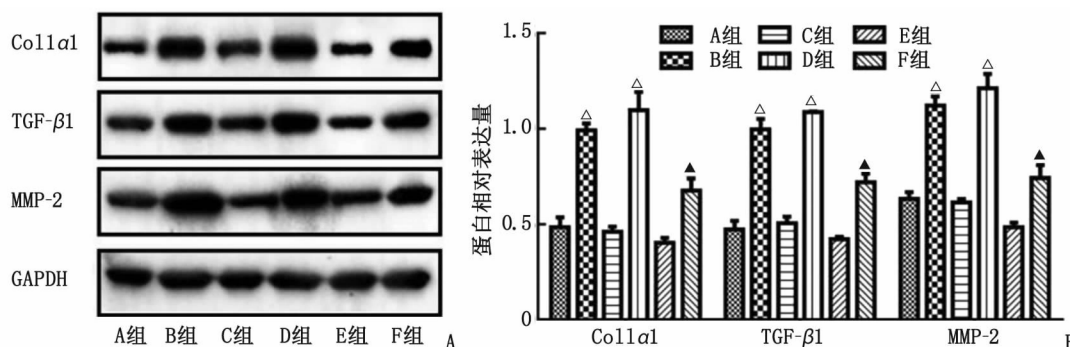
2.7 siRNA 敲低 lncRNA ZFAS1 对肝细胞 Colla1、TGF- β 1 和 MMP-2 表达的影响 TGF- β 1 是公认的致纤维化细胞因子, 研究中常用 5 ng/mL TGF- β 1 处理细胞 24 h 模拟小鼠肝细胞纤维化模型^[15], TGF- β 1 处理细胞出现明显的梭形或针尖样, 类似成纤维样细胞, 提示造模成功(图 7)。本研究通过 Western-blot 检测 NCTC1469 细胞在有、无沉默 lncRNA ZFAS1 的基础上对 TGF- β 1 诱导后, NCTC1469 表达纤维化相关标志蛋白的变化, 评估 lncRNA ZFAS1 表达对 LF 的影响。与对照组比较, 模型组 (即 TGF- β 1 处理组) 的 Colla1、TGF- β 1 和 MMP-2 蛋白的表达水平显著升高, 差别有统计学意义($P<0.05$), 提示 TGF- β 1 处理上调 NCTC1469 细胞表达纤维化相关标志蛋白 Colla1、TGF- β 1 和 MMP-2; 与模型组比较, ZFAS1 干扰 + 模型组 NCTC1469 细胞表达 Colla1、TGF- β 1 和 MMP-2 蛋白显著下降, 差别有统计学意义($P<0.05$, 图 8), 提示 siRNA 干扰抑制 lncRNA ZFAS1 表达后, 可有效阻断 TGF- β 1 对肝细胞的促纤维化作用。



TGF- β 1: 转化生长因子- β 1。A: 对照组细胞维持典型的上皮细胞形态; B: TGF- β 1 处理细胞呈梭形或针尖样, 类似成纤维样细胞。

图 7 对照组和 TGF- β 1 组的肝细胞形态改变

Fig. 7 Morphological changes of hepatocyte in control group and TGF- β 1 group



Coll α 1: I 型胶原 α 1; TGF- β 1: 转化生长因子- β 1; MMP-2: 基质金属蛋白酶-2; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; ZFA1: 锌指蛋白反义链 1。A 组: 对照组; B 组: 模型组 + TGF- β 1 处理组; C 组: ZFA1 干扰对照组; D 组: ZFA1 干扰对照 + 模型组; E 组: ZFA1 干扰组; F 组: ZFA1 干扰 + 模型组。A: 免疫印迹法检测各组 Coll α 1、TGF- β 1 和 MMP-2 蛋白的表达情况; B: 半定量分析各组 Coll α 1、TGF- β 1 和 MMP-2 蛋白相对表达量。与对照组比较, $\triangle$: $P < 0.05$; 与模型组比较, $\blacktriangle$: $P < 0.05$ 。

图 8 各组细胞 Coll α 1、TGF- β 1 和 MMP-2 的表达结果

Fig. 8 The expression level of Coll α 1, TGF- β 1, and MMP-2 in each cell groups

3 讨论

本研究成功构建了 CCl₄ 诱导的小鼠 LF 模型, 探讨了 lncRNA ZFA1 与 LF 发病的关系。与对照组比较, lncRNA ZFA1 在纤维化小鼠肝组织中表达明显升高。进一步构建体外 LF 细胞模型实验发现, 干扰 lncRNA ZFA1 后, Coll α 1、TGF- β 1 和 MMP-2 蛋白的表达水平明显下降, 提示 lncRNA ZFA1 在 LF 发展中的潜在作用及抑制 ZFA1 后可能对 LF 具有治疗作用。

LF 是肝脏慢性损害的共有病理变化, 其关键原因是 HSCs 被激活, HSCs 体积增大, 并和巨噬细胞等其他非实质细胞一起分泌大量的 TGF- β 1, 同时增加 ECM 的分泌。另外, 激活的 HSCs 还可转分化为肌成纤维样细胞, 这些细胞的细胞质内表达 α -SMA 和 Coll α 1 等, 负责 ECM 沉积和 LF^[16-17]。 α -SMA 阳性是 HSCs 活化的标志, 而 Coll α 1 是活化 HSCs 分泌的主要胶原蛋白之一。HYP 是胶原的代谢产物, 其含量的高低可反映肝组织中胶原含

量, 是判断 LF 程度的另一重要指标。由于 CCl₄ 诱导的 LF 模型与人类肝硬化的发病机制类似, 且该模型稳定, 易于操作, 因此笔者采用该模型。本研究结果表明, 纤维化小鼠肝组织内炎性细胞浸润明显, 胶原纤维沉积明显增多, HYP 含量增加, α -SMA 和 Coll α 1 的表达也明显升高。

分子研究的最新进展表明, lncRNAs 导致多种病理生理机制, 并在包括 LF 在内的许多疾病的发生、发展过程中充当基因表达的重要调节者^[7, 18-20]。lncRNAs (如 miRNAs 和 lncRNAs) 的失调导致 HSCs 中的基因表达异常^[21-22]。lncRNA ZFA1 最初通过上调细胞增殖、迁移和上皮间质转换 (epithelial mesenchymal transition, EMT), 被鉴定为一种新的肿瘤相关 lncRNA^[12, 23-24]。最近, lncRNA ZFA1 的上调被证明通过促进 ZEB2 的表达诱导 EMT 和 ECM 沉积^[25], 表明 lncRNA ZFA1 可能参与纤维化的进展。本研究还发现, 与对照组比较, lncRNA ZFA1 在 LF 模型小鼠中表达水平明显升高, 而抑制体外 LF 模型的 lncRNA ZFA1 后,

Col1 α 1、TGF- β 1 和 MMP-2 等蛋白的表达水平明显下降,提示 lncRNA ZFAS1 可能参与小鼠 LF 的形成。

然而,关于 lncRNA ZFAS1 在 LF 发生、发展中可能的机制目前仍未明确。lncRNA 可通过 TGF- β 信号通路、DNA 甲基化和竞争性内源性 RNA 的调节^[5-9]及致死性脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)的异常表达等机制在 LF 中发生作用^[26]。最近,在纤维化相关疾病的组织中还检测到铁死亡生物标志物,如 ROS、丙二醛和谷胱甘肽过氧化物酶 4,并发现铁负荷可能加重肝脏病理,提示铁死亡可能参与 LF 的过程^[27-30],调节铁死亡信号通路能改善 LF 和 HSCs 的活化^[27]。而 lncRNA ZFAS1 可以促进铁死亡^[14],提示 lncRNA ZFAS1 可能通过铁死亡参与 LF 过程。在后续的研究中,笔者将进一步探索其在 LF 中的作用机制。

参考文献:

- [1] ZHOU M G, WANG H D, ZHU J, et al. Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990-2013: A systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2016, 387(10015): 251-272.
- [2] CHANG T T, LIAW Y F, WU S S, et al. Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2010, 52(3): 886-893.
- [3] GEORGE S L, BACON B R, BRUNT E M, et al. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: A 5-year follow-up of 150 patients[J]. *Hepatology*, 2009, 49(3): 729-738.
- [4] YANG Y X, MIN Z S. Effect of long noncoding RNA AK021443 on promoting hepatic fibrosis *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(3): 196.
- [5] WEI J, GHOSH A K, CHU H Y, et al. The histone deacetylase sirtuin 1 is reduced in systemic sclerosis and abrogates fibrotic responses by targeting transforming growth factor β signaling[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(5): 1323-1334.
- [6] ZHANG K, HAN X H, 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.
- [7] HE Y, WU Y T, HUANG C, et al. Inhibitory effects of long noncoding RNA MEG3 on hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(11): 2204-2215.
- [8] ZHANG Q Q, XU M Y, QU Y, et al. TET3 mediates the activation of human hepatic stellate cells *via* modulating the expression of long non-coding RNA HIF1A-AS1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7744-7751.
- [9] YU F J, LU Z Q, CAI J, et al. MALAT1 functions as a competing endogenous RNA to mediate Rac1 expression by sequestering miR-101b in liver fibrosis[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(24): 3885-3896.
- [10] HANSJI H, LEUNG E Y, BAGULEY B C, et al. ZFAS1: A long noncoding RNA associated with ribosomes in breast cancer cells[J]. *Biol Direct*, 2016, 11(1): 62.
- [11] LUO P, LIANG C Z, ZHANG X W, et al. Identification of long non-coding RNA ZFAS1 as a novel biomarker for diagnosis of HCC[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20171359.
- [12] LI T, XIE J J, SHEN C, et al. Amplification of long noncoding RNA ZFAS1 promotes metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15): 3181-3191.
- [13] DUAN R, LI C Y, WANG F, et al. The long noncoding RNA ZFAS1 potentiates the development of hepatocellular carcinoma *via* the microRNA-624/MDK/ERK/JNK/P38 signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4431-4444.
- [14] YANG Y N, TAI W L, LU N H, et al. lncRNA ZFAS1 promotes lung fibroblast-to-myofibroblast transition and ferroptosis *via* functioning as a ceRNA through miR-150-5p/SLC38A1 axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9085-9102.
- [15] 姚芳. ETS2 对肾小管上皮细胞 EMT 和肾纤维化的作用及其机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [16] DESMOULIÈRE A, GEINOZ A, GABBIANI F, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts[J]. *J Cell Biol*, 1993, 122(1): 103-111.
- [17] CASSIMAN D, LIBBRECHT L, DESMET V, et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers[J]. *J Hepatol*, 2002, 36(2): 200-209.
- [18] LI S P, XU H X, YU Y, et al. lncRNA HULC enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma *via* the miR-200a-3p/ZEB1 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42431-42446.
- [19] MASSONE S, CIARLO E, VELLA S, et al. NDM29, A RNA polymerase III-dependent non coding RNA, promotes amyloidogenic processing of APP and amyloid β secretion[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(7): 1170-1177.
- [20] GUO Q Y, QIAN Z D, YAN D D, et al. lncRNA-MEG3 inhibits cell proliferation of endometrial carcinoma by repressing notch signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82: 589-594.
- [21] RODERBURG C, URBAN G W, BETTERMANN K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 209-218.
- [22] WU Y T, LIU X J, ZHOU Q, et al. Silent information regulator 1 (SIRT1) ameliorates liver fibrosis *via* promoting activated stellate cell apoptosis and reversion[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 289(2): 163-176.
- [23] XIE S P, GE Q X, WANG X Y, et al. Long non-coding RNA ZFAS1 sponges miR-484 to promote cell proliferation and in-

- vasion in colorectal cancer[J]. *Cell Cycle*, 2017, 17(2):154-161.
- [24] ZHOU H, WANG F B, CHEN H, et al. Increased expression of long-noncoding RNA ZFAS1 is associated with epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(9):2023-2038.
- [25] LIU G F, WANG L, HAN H M, et al. LncRNA ZFAS1 promotes growth and metastasis by regulating BMI1 and ZEB2 in osteosarcoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(7):1450-1462.
- [26] JAIN M, RIVERA S, MONCLUS E A, et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- β signaling[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(2):770-777.
- [27] SUI M, JIANG X F, CHEN J, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by regulating ferroptosis signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106:125-133.
- [28] SIMÕES F, OUSINGSAWAT J, WANITCHAKOOL P, et al. CFTR supports cell death through ROS-dependent activation of TMEM16F (anoctamin 6)[J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(2):305-314.
- [29] WANG L, ZHANG Z L, LI M M, et al. P53-dependent induction of ferroptosis is required for artemether to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(1):45-56.
- [30] AREZZINI B, LUNGHI B, LUNGARELLA G, et al. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(4):486-495.

Study on the Effect of LncRNA ZFAS1 on Carbon Tetrachloride Induced Liver Fibrosis in Rats

WANG Jinpo^{1,2}, HUANG Yuehong^{1,2}, CHEN Yunxin^{1,2}, CHEN Zhixin^{1,2}, CHEN Fenglin^{1,2}

1. Department of Gastroenterology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China;

2. Fujian Institute of Digestive Disease, Fuzhou 350001, China

ABSTRACT: **Objective** To investigate the role of zinc finger antisense 1 (ZFAS1) in liver fibrosis (LF). **Methods** The LF model was established by CCl₄. Hematoxylin-eosin staining (H-E staining) and Sirius scarlet staining were used to observe the histological changes, and ELISA was performed to detect the hydroxyproline content in liver tissue. Immunohistochemistry (IHC) was performed to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen $\alpha 1$ (Coll $\alpha 1$). Fluorescence quantitative PCR was performed to detect the expression level of ZFAS1. siRNA technology was used to silence ZFAS1 expression and the LF model was mimicked in NCTC1469 cells. The expression level of Coll α I, transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the CCl₄-induced group showed significant increased inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition, increased activation of hepatic stellate cells (HSCs) ($P < 0.05$), upregulated expression of collagen secretion and its metabolite hydroxyproline, and significantly higher expression of lncRNA ZFAS1 in liver tissue ($P < 0.05$). Compared with AML12 cells, NCTC1469 cells highly expressed endogenous lncRNA ZFAS1 ($P < 0.05$). Transfection of all three siZFAS1 fragments in NCTC1469 cells effectively inhibited ZFAS1 expression ($P < 0.05$), especially siRNA-539. The LF model was constructed by treating NCTC1469 cells with TGF- $\beta 1$. Western-blot results showed that the expressions of Coll $\alpha 1$, TGF- $\beta 1$ and MMP-2 were significantly higher in the model group compared with the control group ($P < 0.05$), the expressions of Coll $\alpha 1$, TGF- $\beta 1$, and MMP-2 were significantly decreased in the ZFAS1 interference + model group compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of lncRNA ZFAS1 may have therapeutic effect on LF.

KEY WORDS: long noncoding RNA; zinc finger antisense 1; liver fibrosis; expression analysis

(编辑:张慧茹)