

· 自身免疫性肝病 ·

DOI: 10.12449/JCH250513

## 基于微阵列数据的 circRNA-miRNA-mRNA 竞争性内源 RNA 网络构建及其与自身免疫性肝炎小鼠模型肝损伤的相关性分析

郭 地, 刘 莹, 刘 杨

山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619

通信作者: 刘杨, liuyang1980@sxtcm.edu.cn (ORCID: 0000-0002-6627-5002)

**摘要:** 目的 构建环状 RNA (circRNA)-微小 RNA (miRNA)-信使 RNA (mRNA) 竞争性内源 RNA (ceRNA) 网络, 探讨其在刀豆蛋白 A 诱导的自身免疫性肝炎 (AIH) 小鼠模型中的潜在调控机制, 并验证关键基因的表达与肝损伤的关系。方法 使用高通量数据筛选差异表达的 circRNA、miRNA 和 mRNA, 基于 Pearson 相关分析和 Miranda 程序预测 miRNA 与 mRNA 及 circRNA 的配对关系, 构建 ceRNA 网络。对网络中的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。选取 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 12 只, 采用随机数字表法分为对照组和模型组, 每组 6 只, 模型组通过尾静脉注射刀豆蛋白 A 构建 AIH 小鼠模型, 对照组注射生理盐水。通过 qRT-PCR 和 Western Blot 方法验证 circ\_0001577、miR-7055-3p 和 Akt3 的表达。测定血清转氨酶 (ALT、AST) 和肝组织中丙二醛 (MDA) 及一氧化氮 (NO) 含量, 并分析其与基因表达的相关性。计量资料两组间比较采用成组 *t* 检验。使用 Spearman 相关分析法分析基因表达与肝损伤指标之间的相关性。结果 构建了包含 5 795 个 circRNA-miRNA-mRNA 配对的 ceRNA 网络, 发现 circ\_0001577 为中心基因。与对照组小鼠比较, 模型组中的 circ\_0001577 和 Akt3 表达上调, miR-7055-3p 下调, 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $< 0.05$ ), 且 circ\_0001577 与 Akt3 呈正相关 ( $r=0.861, P<0.001$ ), miR-7055-3p 与两者呈负相关 ( $r$  值分别为  $-0.644$ 、 $-0.855$ ,  $P$  值均  $< 0.05$ )。模型组小鼠肝脏 Akt3 蛋白表达显著高于对照组 ( $1.04 \pm 0.10$  vs  $0.72 \pm 0.06$ ,  $t=-6.49, P=0.001$ ), 并与 circ\_0001577 呈正相关 ( $r=0.579, P=0.048$ ), 与 miR-7055-3p 呈负相关 ( $r=-0.891, P<0.001$ )。模型组小鼠血清 ALT、AST 和肝组织 MDA、NO 含量较对照组均显著增加 ( $P$  值均  $< 0.05$ ), 上述肝损伤指标与 circ\_0001577、Akt3 呈正相关 ( $r$  值分别为  $0.849$ 、 $0.865$ 、 $0.811$ 、 $0.801$ ;  $0.889$ 、 $0.954$ 、 $0.938$ 、 $0.961$ ,  $P$  值均  $< 0.05$ ), 与 miR-7055-3p 呈负相关 ( $r$  值分别为  $-0.687$ 、 $-0.818$ 、 $-0.833$ 、 $-0.870$ ,  $P$  值均  $< 0.05$ ), 且与 Akt 蛋白表达呈正相关 ( $r$  值分别为  $0.648$ 、 $0.796$ 、 $0.848$ 、 $0.860$ ,  $P$  值均  $< 0.05$ )。结论 circ\_0001577 通过竞争性吸附 miR-7055-3p, 导致 Akt3 抑制被解除, 进而促进 Akt3 的表达, 参与 AIH 的发生发展。circ\_0001577 及其相关通路可能成为 AIH 的潜在治疗靶点。

**关键词:** 肝炎, 自身免疫性; RNA, 环状; 微 RNAs; RNA, 信使; 小鼠, 近交 C57BL

**基金项目:** 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (2024); 中西医结合防治风湿免疫病山西省科技创新人才重点团队 (202204051002033); 山西省科学技术厅山西省重点国别科技合作项目 (202104041101013); 山西省应用基础研究计划青年科学基金项目 (202203021222272); 山西省中医药管理局科研项目 (2024ZYYAD008); 山西中医药大学科技创新团队项目 (2022TD2003); 中西医结合治疗风湿免疫疾病重点实验室 (zyyyjs2024021)

### Construction of a circRNA-miRNA-mRNA competitive endogenous RNA network based on microarray data and its correlation with liver injury in a mouse model of autoimmune hepatitis

GUO Di, LIU Ying, LIU Yang

College of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China

Corresponding author: LIU Yang, liuyang1980@sxtcm.edu.cn (ORCID: 0000-0002-6627-5002)

**Abstract: Objective** To construct a circRNA-miRNA-mRNA competitive endogenous RNA (ceRNA) network, to investigate its potential regulatory mechanism in a mouse model of autoimmune hepatitis (AIH) induced by concanavalin A (ConA), and to

verify the association between the expression of key genes and liver injury. **Methods** High-throughput data were used to identify differentially expressed circRNAs, miRNAs, and mRNAs, and the Pearson correlation analysis and the Miranda program were used to predict the pairing relationships between miRNAs and mRNAs/circRNAs and construct a ceRNA network. The gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses were performed for the differentially expressed genes in the network. A total of 12 specific pathogen-free male C57BL/6 mice were divided into control group and model group using a random number table, with 6 mice in each group. The mice in the model group were given injection of ConA via the caudal vein to establish a mouse model of AIH, and those in the control group were given injection of normal saline. The methods of qRT-PCR and Western blot were used to validate the expression levels of circ\_0001577, miR-7055-3p, and Akt3. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured, as well as the content of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in liver tissue, and their correlation with gene expression was analyzed. The independent-samples *t* test was used for comparison of continuous data between two groups, and the Spearman correlation analysis was used to investigate the correlation between gene expression levels and liver injury indicators. **Results** A ceRNA network containing 5 795 circRNA-miRNA-mRNA pairings was constructed, and circ\_0001577 was identified as the central gene. Compared with the control group, the model group had significant increases in the expression levels of circ\_0001577 and Akt3 and a significant reduction in the expression of miR-7055-3p (all  $P < 0.05$ ), and circ\_0001577 was positively correlated with Akt3 ( $r = 0.861$ ,  $P < 0.001$ ), while miR-7055-3p was negatively correlated with circ\_0001577 and Akt3 ( $r = -0.644$  and  $-0.855$ , both  $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the model group had a significantly higher protein expression level of Akt3 in the liver ( $1.04 \pm 0.10$  vs  $0.72 \pm 0.06$ ,  $t = -6.49$ ,  $P = 0.001$ ), which was positively correlated with circ\_0001577 ( $r = 0.579$ ,  $P = 0.048$ ) and was negatively correlated with miR-7055-3p ( $r = -0.891$ ,  $P < 0.001$ ). Compared with the control group, the model group had significant increases in the serum levels of ALT and AST and the content of MDA and NO in liver tissue (all  $P < 0.05$ ), and these liver injury indicators were positively correlated with circ\_0001577 and Akt3 ( $r = 0.849$ ,  $0.865$ ,  $0.811$ ,  $0.801$ ;  $0.889$ ,  $0.954$ ,  $0.938$ , and  $0.961$ , all  $P < 0.05$ ) and were negatively correlated with miR-7055-3p ( $r = -0.687$ ,  $-0.818$ ,  $-0.833$ , and  $-0.870$ , all  $P < 0.05$ ); in addition, they were positively correlated with the protein expression level of Akt3 ( $r = 0.648$ ,  $0.796$ ,  $0.848$ , and  $0.860$ , all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** This study shows that circ\_0001577 promotes the expression of Akt3 by competitively adsorbing miR-7055-3p and relieving the inhibition of Akt3, thereby participating in the development and progression of AIH.

**Key words:** Hepatitis, Autoimmune; RNA, Circular; MicroRNAs; RNA, Messenger; Mice, Inbred C57BL

**Research funding:** The Construction Project of High-level Traditional Chinese Medicine Key Discipline of National Administration of Traditional Chinese Medicine (2024); Key Team of Scientific and Technological Innovation Talents of Shanxi Province with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Preventing and Treating Rheumatological Diseases (202204051002033); Special Project with Important Nations of Scientific and Technological Cooperation and Exchange of Shanxi Province (202104041101013); Youth Science and Technology Research Fund of Applied Basic Research Program of Shanxi Province (202203021222272); Scientific Research Project of Administration of Traditional Chinese Medicine in Shanxi Province (2024ZYYAD008); Science and Technology Innovation Project of Shanxi University of Chinese Medicine (2022TD2003); Key Laboratory of Rheumatological and Immunological Diseases Treated by Integrated Chinese and Western Medicine (zyyys2024021)

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种病因尚未完全阐明的慢性进展性肝脏疾病,其发病机制涉及多种因素的复杂相互作用,主要表现为IgG水平升高、自身抗体阳性、界面性肝炎等特征<sup>[1]</sup>。遗传易感性与环境因素共同作用,破坏了机体的免疫耐受机制,导致针对肝脏自身抗原的免疫反应,最终引发肝细胞损伤、炎症或坏死<sup>[2-4]</sup>。如果得不到有效控制,AIH可能进展为肝纤维化或肝硬化<sup>[5-6]</sup>。

近年来,环状RNA(circular RNA, circRNA)作为一种新型的非编码RNA,因其在免疫反应及炎症调控中的重要作用,成为研究AIH等自身免疫性疾病的新兴领域。circRNA通过与微小RNA(microRNA, miRNA)的竞争性结合,作为内源性miRNA海绵调节基因表达;此外,circRNA还通过与RNA结合蛋白的相互作用,调控蛋白质功能<sup>[7-9]</sup>。circRNA具有稳定性高、组织特异性强的优势<sup>[10-11]</sup>,并且可以通过调控母本基因的表达、剪接过程

等途径影响疾病进程<sup>[12]</sup>。已有研究表明, circRNA在系统性红斑狼疮和类风湿关节炎等自身免疫性疾病中发挥关键作用, 特别是在调控免疫反应和炎症反应方面<sup>[13-14]</sup>, 因此被认为是潜在的诊断标志物和治疗靶点。

前期研究中, 课题组通过微阵列芯片技术筛选了刀豆蛋白A(ConA)诱导的AIH小鼠模型的circRNA表达谱, 揭示了circRNA在AIH病程中的潜在作用<sup>[7]</sup>。本研究利用前期获得的ConA诱导肝损伤小鼠模型的转录组学数据<sup>[15-16]</sup>, 构建circRNA-miRNA-mRNA竞争性内源RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA)网络, 并分析该网络的潜在生物学功能及其与AIH肝损伤过程的相关性, 旨在进一步阐明AIH的发病机制, 探索潜在的治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与试剂** SPF级雄性C57BL/6小鼠(25~28 g), 实验动物生产许可证编号: SCXK(京)2021-0006, 使用许可证编号: SYXK(晋)2020-0006。ConA(北京索莱宝科技有限公司, 货号: C8110), ALT、AST、一氧化氮(NO)和丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 货号: C009-2-1、C010-2-1、S0021S和A003-1-2), UNLQ-10柱总RNA提取试剂盒、2X SYBR Abstart Master Mix(上海生工生物工程股份有限公司, 货号: B511321、B110032), Total Protein Extraction Kit(武汉博士德生物工程有限公司, 货号: AR0146), Akt3多克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国, 货号: 4685), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(武汉亚科因生物技术有限公司, 货号: A21020), 抗 $\beta$ -Actin鼠抗体(武汉亚科因生物技术有限公司, 货号: A01010)。

**1.2 circRNA-miRNA-mRNA ceRNA网络的构建** 本研究ceRNA网络构建所使用差异表达circRNA(differently expressed circRNA, DEC)、miRNA(differently expressed miRNA, DEMi)和mRNA(differently expressed mRNA, DEM)数据, 来自本团队前期构建的ConA诱导小鼠肝损伤模型的转录组数据<sup>[15-16]</sup>, 包含27个DEC、49个DEMi和512个DEM。首先, 采用Pearson相关分析(Pearson相关系数 $\geq 0.80$ ,  $P \leq 0.05$ )和Miranda程序(Max Score $\geq 140$ , Total Energy $\leq -2.0$ )预测miRNA-mRNA和miRNA-circRNA之间的相互作用。然后, 基于ceRNA MuTATE方法和超几何分布算法计算ceRNA得分, 并评估circRNA和mRNA共享miRNA的统计显著性<sup>[17-19]</sup>。筛选出具有正相关性的mRNA-circRNA关系, 并与ceRNA得分取交集, 构建ceRNA网络。最后, 使用Cytoscape 3.9.1软件可视化由前200对

circRNA-miRNA-mRNA(按ceRNA得分降序排列)组成的简化ceRNA网络, 以阐明这些差异表达基因的潜在调控功能。

**1.3 基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析** 为预测ceRNA网络中DEMs的生物学功能, 采用R 4.3.1软件包, 通过Fisher精确检验和超几何分布法进行GO和KEGG富集分析<sup>[20-21]</sup>。GO分析包括分子功能(molecular functions, MF)、生物过程(biological processes, BP)和细胞组分(cellular components, CC)3个类别, 计算每个GO条目的富集显著性<sup>[22]</sup>。KEGG分析用于评估DEM与信号通路的相关性。以 $P \leq 0.05$ 或错误发现率(false discovery rate, FDR) $\leq 0.05$ 为阈值,  $P$ 值越低, 富集显著性越高。

**1.4 ceRNA网络中基因表达验证** 为了验证ceRNA网络中注释基因的表达情况, 本研究建立了ConA诱导的AIH小鼠模型。采用随机数字表法将12只小鼠分为对照组和模型组, 每组6只。模型组通过尾静脉注射ConA构建AIH小鼠模型, 对照组注射生理盐水。实验流程参照既往发表的文献<sup>[16-17]</sup>。

为验证ceRNA网络的调控关系, 使用qRT-PCR方法对circ\_0001577、miR-7055-3p和Akt3的表达水平进行验证。使用UNI-Q-10 Column Trizol提取肝组织中总RNA, 采用SYBR Green法在Step One Plus系统中扩增目标基因。基因表达水平以内参基因U6或GAPDH归一化, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量<sup>[23]</sup>, 并用倍数变化(fold change, FC)表示相对转录表达水平。基因特征及引物序列分别见表1、2。

**1.5 Western Blot分析** 使用Western Blot检测肝组织中Akt3蛋白表达水平。利用蛋白裂解液提取肝组织总蛋白, 并通过BCA试剂盒测定蛋白浓度。然后将蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分离, 并转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶封闭2 h。随后用特异性Akt3抗体孵育PVDF膜, 并采用化学发光法显色, 拍照记录结果。最后以 $\beta$ -actin为内参照, 通过图像分析软件计算Akt3蛋白的相对表达量。

表1 用于qRT-PCR验证的基因特征  
Table 1 Gene characteristics for qRT-PCR validation

基因	编号	染色体	FC	$P$ 值	调控情况
circ_0001577	无	chr7	2.35	$9.04 \times 10^{-5}$	上调
miR-7055-3p	MIMAT0028015	chr7	-6.37	$6.83 \times 10^{-3}$	下调
Akt3	XM_006496821.3	chr1	2.31	$3.85 \times 10^{-4}$	上调

表2 引物序列  
Table 2 Primer sequences

基因	引物(5'-3')	长度(bp)
circ_0001577	F: TGATTATGTCCAGGCCCTTC R: TATCTCACAGGCACCCTCAAC	141
miR-7055-3p	RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTGGTGGG F: ACACTCCAGCTGGGTTGCTACTTTGATA R: TGGTGTCTGTTGGAGTCC	21
Akt3	F: CATTGCTTTCAGGGCTCTTG R: TGCCGTCGTCGTCATACTTT	246
GAPDH	F: GGTGTCTCTCTGCGACTTCA R: TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	183
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	96

1.6 血清转氨酶的测定 采集各组小鼠的血液样本,室温静置 30 min 后,1 000×g,离心 15 min 分离血清。使用 SpectraMax Plus 384 微孔板读数器通过微孔板法测量血清 ALT 和 AST 水平,按操作说明进行操作。

1.7 MDA 和 NO 的测定 每只小鼠取 100 mg 肝组织匀浆,通过 SpectraMax Plus 384 微孔板读数器检测 MDA 和 NO 水平。具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.8 统计学方法 使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用成组 *t* 检验。使用 Spearman 相关分析法分析基因表达与肝损伤指标之间的相关性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 基因共表达关系分析 根据设定的阈值(Pearson 相关系数  $\geq 0.80$ 、 $P \leq 0.05$ ,以及 Miranda 程序 Max Score  $\geq 140$ 、Total Energy  $\leq -2.0$ ),本研究共获得了 62 754 个 miRNA-mRNA 对、28 个 miRNA-circRNA 对和 78 524 个 mRNA-circRNA 共表达对(正相关)。

2.2 ceRNA 网络的构建 在  $P \leq 0.05$  的条件下,获得了 6 892 个 ceRNA 对。进一步基于 ceRNA 得分与 mRNA-circRNA 共表达关系的交集,筛选出 5 795 个 circRNA-miRNA-mRNA ceRNA 对,表 3 列出了 ceRNA 得分前 10 位的 ceRNA 对。这些 ceRNA 对由 11 178 个 DEM、49 个 DEMi 和 27 个 DEC 共同构成,反映了潜在的 ceRNA 调控网络。 $P$  值越低,mRNA 或 circRNA 与其共享的 miRNA 相关性越显著。构建了包含前 200 对 circRNA-miRNA-mRNA 的 ceRNA 网络(按 ceRNA 得分降序排列)。如图 1a 所示,circ\_0001577 被认为在 AIH 的发生中起关键作用,因为其作为中心基因位于 ceRNA 网络的中心。图 1b 展示了 miR-101c、miR-1927、miR-7055-3p、miR-802-5p 和 miR-877-3p 与 circ\_0001577 的结合位点。

2.3 GO 与 KEGG 富集分析 根据 Fisher 精确检验的结果,956 个 DEM 富集到 914 个 GO 条目中,其中 930 个 DEM 涉及 649 个 BP,932 个 DEM 涉及 86 个 CC,922 个 DEM 涉及 179 个 MF( $P \leq 0.05$ )。在  $FDR \leq 0.05$  的阈值下,共获得 330 个显著的 GO 条目,包括 239 个 BP、34 个 CC 和 57 个 MF。 $P$  值最低的前 3 个 GO 条目分别为免疫系统过程(GO:0002376)、炎症反应(GO:0006954)和先天免疫反应(GO:0045087)。在各个类别中, $P$  值最低的 GO 条目分别为 MF 中的免疫系统过程(GO:0002376)、CC 中的细胞质(GO:0005737)和 MF 中的蛋白结合(GO:0005515)。图 2 展示了所有 GO 条目中  $P$  值最低的前 30 个术语以及不同类别中  $P$  值最低的前 10 个术语(按  $P$  值升序排列)。

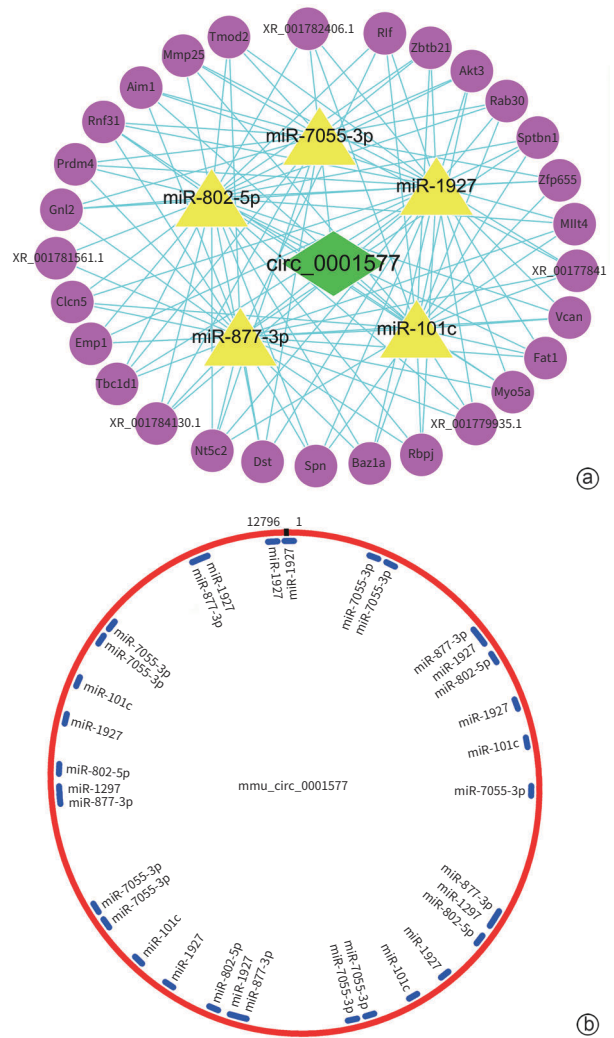
根据超几何分布法的计算结果,在 956 个 DEM 中,有 466 个基因富集到 KEGG 通路。其中,104 个通路的  $P$  值  $\leq 0.05$ ,而在校正后的结果中,有 83 个通路的  $FDR \leq 0.05$ 。在所有显著富集的通路中, $P$  值最低的前 3 个通路分别为 NOD 样受体信号通路(path: mmu04621)、TNF 信号通路(path: mmu04668)和结核病(path: mmu05152),详见图 3。

2.4 qRT-PCR 验证 与对照组小鼠相比,模型组 circ\_0001577 和 Akt3 在转录水平上的表达显著上调,而 miR-7055-3p 的表达显著下调( $P$  值均  $< 0.05$ )(图 4a)。Spearman 相关性分析表明,miR-7055-3p 的表达与 circ\_0001577( $r = -0.644$ , $P < 0.05$ )和 Akt3( $r = -0.855$ , $P < 0.05$ )的表达呈显著负相关(图 4b、c),而 circ\_0001577 的表达与 Akt3 的表达呈显著正相关( $r = 0.861$ , $P < 0.05$ )(图 4d)。

2.5 Western Blot 分析 模型组小鼠肝脏中 Akt3 蛋白的相对表达量显著高于对照组( $1.04 \pm 0.10$  vs  $0.72 \pm 0.06$ , $t = -6.49$ , $P = 0.001$ )(图 5)。Akt3 蛋白的表达与 circ\_0001577 的转录水平表达呈正相关,而与 miR-7055-3p 的

表3 按 ceRNA 评分降序排列的前 10 个 ceRNA 配对  
Table 3 Top 10 ceRNA pairs in descending order of ceRNA Score

mRNA	circRNA	共有 miRNA	P 值	ceRNA 得分
XM_006519062.2	circ_0001577	miR-7055-3p miR-101c miR-877-3p miR-1927 miR-802-5p	<0.001	0.017 2
XM_017318309.1	circ_0001577	miR-7055-3p miR-101c miR-877-3p miR-1927 miR-802-5p	<0.001	0.014 5
XM_017314716.1	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.026	0.014 4
XM_006495688.3	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.019	0.013 5
XM_006495684.3	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.019	0.013 5
XM_006495682.2	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.019	0.013 5
NM_133833.3	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.019	0.013 5
XM_017314712.1	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.019	0.013 5
XM_017314794.1	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.014	0.012 5
XM_017314741.1	circ_0001577	miR-877-3p miR-802-5p miR-1927 miR-7055-3p	0.014	0.012 5



注: a, ceRNA 网络由前 200 个 circRNA-miRNA-mRNA 配对组成。绿色菱形、黄色三角形和粉色圆形节点分别代表 DEC、DEMi 和 DEM。蓝色线条表示基因间的调控关系。b, miR-101c、miR-1927、miR-7055-3p、miR-802-5p 和 miR-877-3p 在 circ\_0001577 序列上的预测结合位点。红色圆圈表示 circ\_0001577 的序列, 每条蓝色短线表示目标 miRNA 的结合位点。

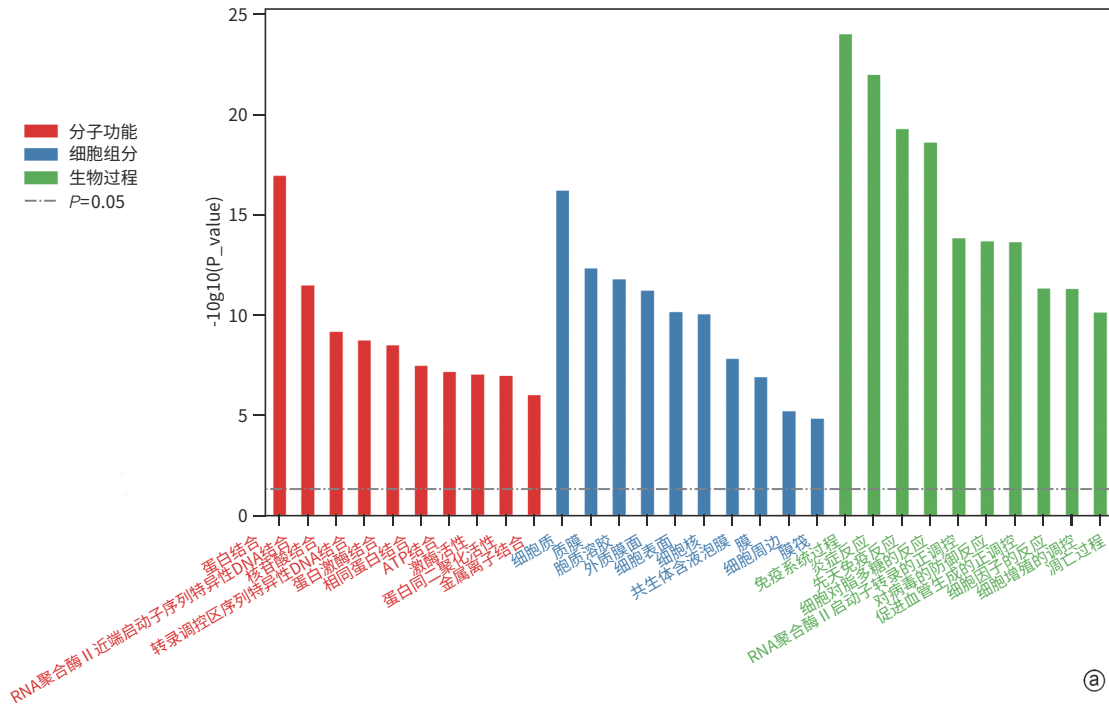
图 1 ceRNA 网络的构建

Figure 1 Constructed ceRNA network

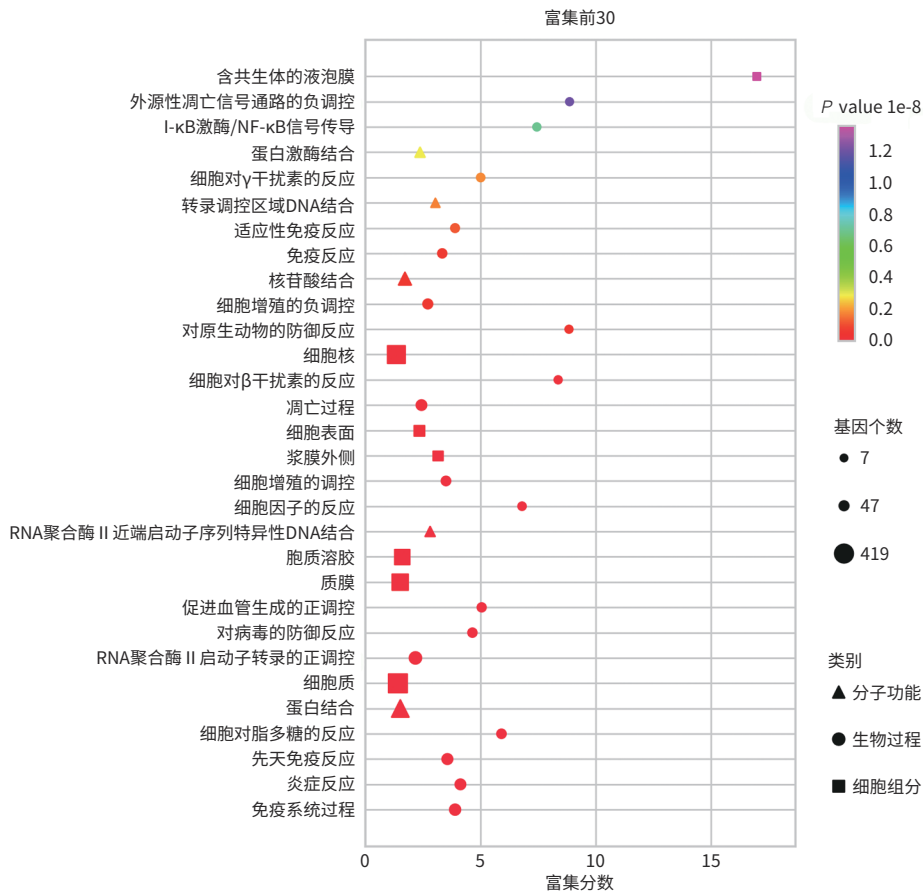
转录水平表达呈负相关( $r$  值分别为 0.579、-0.891,  $P$  值均<0.05)(图 6)。

2.6 肝损伤指标的检测 与对照组相比,模型组小鼠的血清 ALT、AST 水平以及肝组织中 MDA 和 NO 的含量均显著增加( $P$  值均<0.05)(图 7)。

2.7 验证基因的表达与肝损伤指标的相关性 ALT、AST、MDA 和 NO 与 circ\_0001577 及 Akt3 的转录水平表达均呈正相关( $r$  值分别为 0.849、0.865、0.811、0.801; 0.889、0.954、0.938、0.961,  $P$  值均<0.05), 而与 miR-7055-3p 的转录水平表达呈负相关( $r$  值分别为 -0.687、-0.818、-0.833、-0.870,  $P$  值均<0.05)(图 8 ~ 10)。此外,这些肝损伤指标



Ⓐ



Ⓑ

注:a,按P值升序排列的前10个不同类别的GO术语;b,按P值升序排列的所有GO术语中的前30个。

图2 GO富集分析

Figure 2 GO enrichment analysis

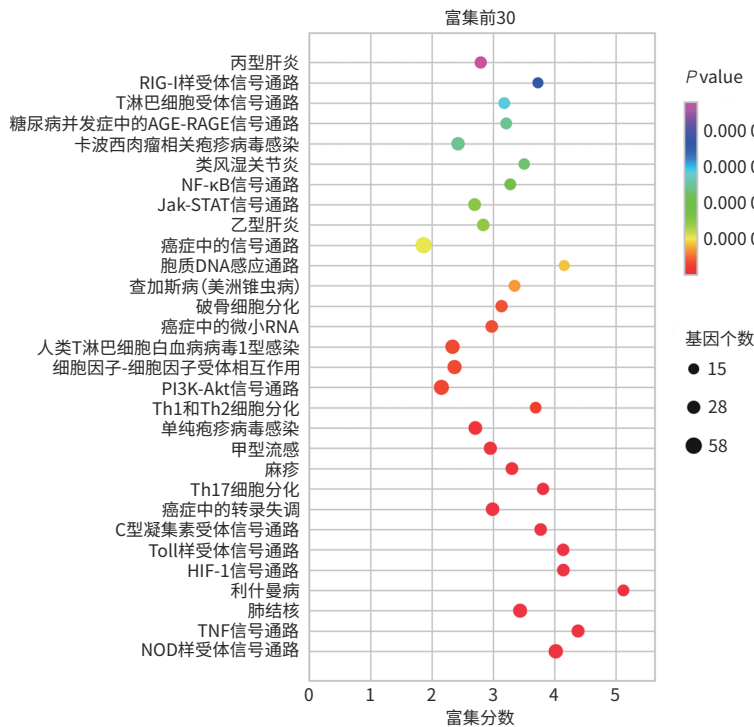
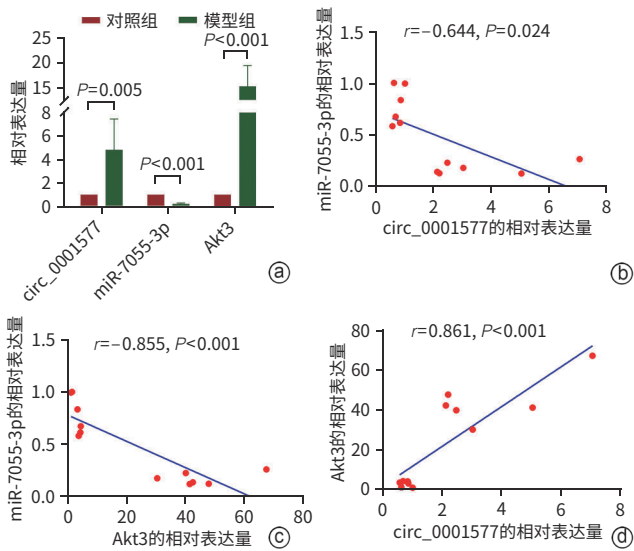


图3 KEGG 信号通路分析

Figure 3 KEGG signaling pathway analysis



注:a. circ\_0001577、miR-7055-3p 和 Akt3 在两组中的相对表达水平;b~d, miR-7055-3p、circ\_0001577 和 Akt3 在转录水平上表达的相关性。

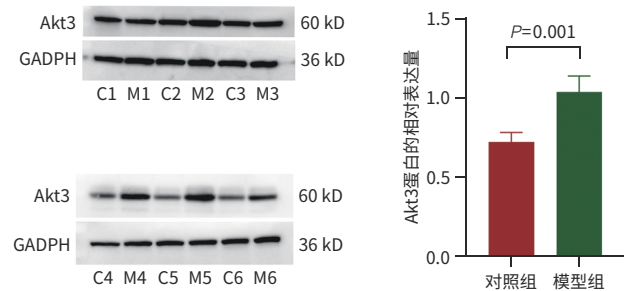
图4 选择基因的相对表达量及相关性

Figure 4 Relative expression and correlation of the selected genes

与 Akt 蛋白的表达亦呈正相关( $r$  值分别为 0.648、0.796、0.848、0.860,  $P$  值均  $< 0.05$ ) (图 11)。

### 3 讨论

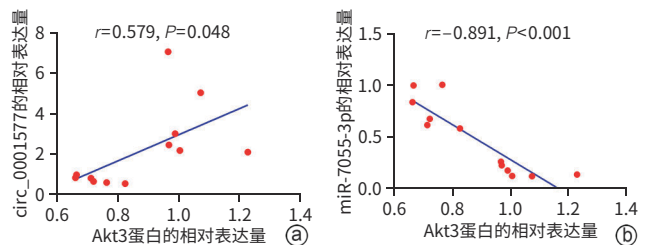
circRNA 是一类具有闭合环状结构的非编码 RNA,



注:C1~6 为对照组 6 只小鼠;M1~6 为模型组 6 只小鼠。

图5 Akt3 蛋白的相对表达

Figure 5 Relative expression of Akt3 protein

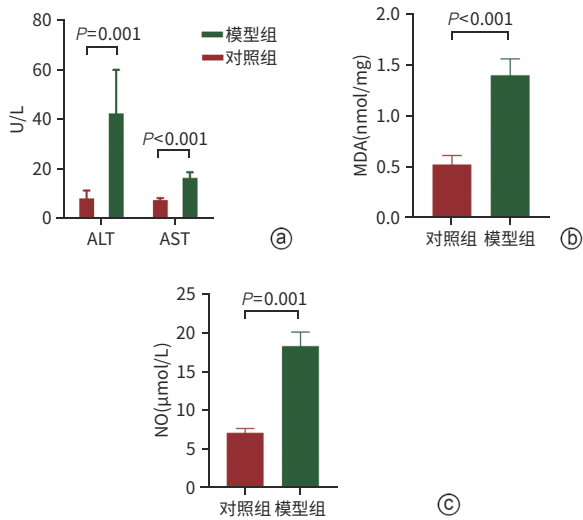


注:a. Akt3 蛋白与 circ\_0001577;b. Akt3 蛋白与 miR-7055-3p。

图6 Akt3 蛋白表达与 circ\_0001577、miR-7055-3p 之间的相关性

Figure 6 Correlation between expression of Akt3 protein and circ\_0001577, miR-7055-3p

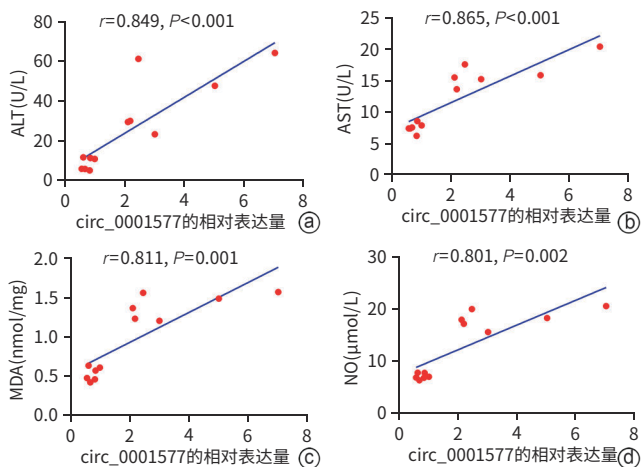
其环状特征最早于 1976 年在植物类病毒中被发现<sup>[24]</sup>。几乎所有物种中都存在 circRNA, 其比线性 RNA 更稳



注:a,血清AST和ALT水平;b,肝组织中MDA含量;c,肝组织中NO含量。

图7 肝损伤指标的比较

Figure 7 Comparison of indicators of liver injury



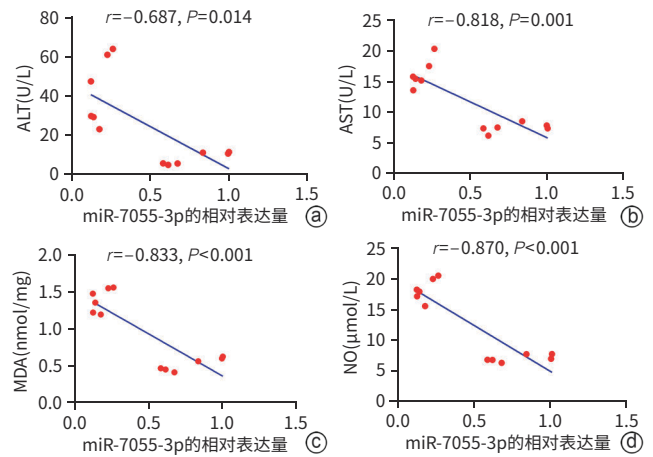
注:a,circ\_0001577与ALT;b,circ\_0001577与AST;c,circ\_0001577与MDA;d,circ\_0001577与NO。

图8 circ\_0001577表达与肝损伤指标之间的相关性

Figure 8 Correlation between expression of circ\_0001577 and liver injury indicators

定,因circRNA的结构能够抵抗RNA酶降解。越来越多的研究集中探讨circRNA与miRNA的关系,并揭示了circRNA的生物功能<sup>[25-26]</sup>。circRNA富含miRNA结合位点,可以竞争性地结合miRNA,从而减弱miRNA对靶基因的抑制作用,增加靶基因的表达<sup>[27]</sup>。近年来,越来越多的研究表明,自身免疫性疾病的发病机制与miRNA海绵机制的紊乱密切相关<sup>[28]</sup>。基于芯片实验的结果,本团队也发现至少有27个DEC可能参与了AIH的发生<sup>[16]</sup>。然而,这些DEC在AIH病理过程中的具体机制尚未阐明。

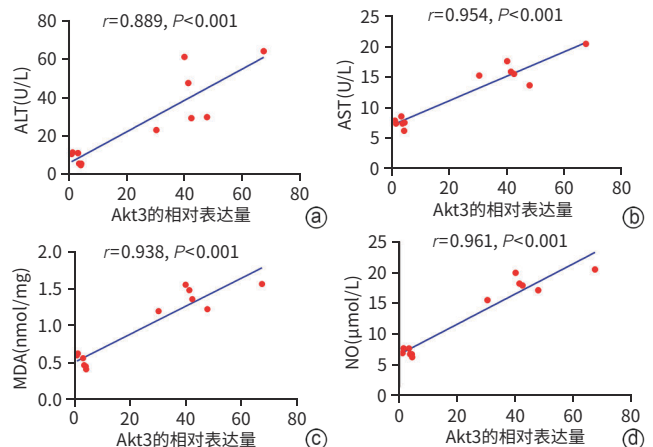
自Salmena等<sup>[29]</sup>于2011年提出ceRNA假说后,该假



注:a,miR-7055-3p与ALT;b,miR-7055-3p与AST;c,miR-7055-3p与MDA;d,miR-7055-3p与NO。

图9 miR-7055-3p表达与肝损伤指标之间的相关性

Figure 9 Correlation between expression of miR-7055-3p and liver injury indicators



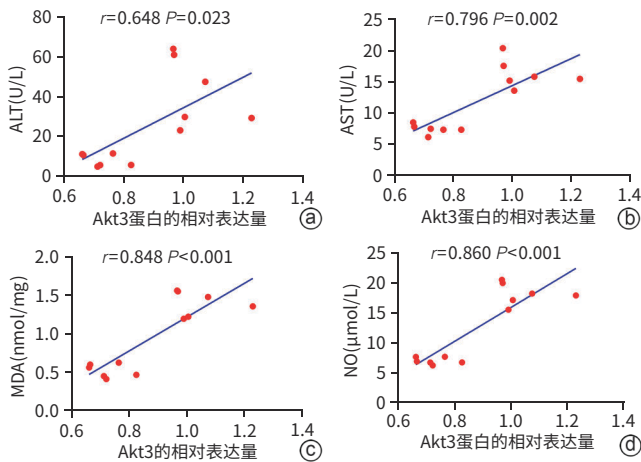
注:a,Akt3与ALT;b,Akt3与AST;c,Akt3与MDA;d,Akt3与NO。

图10 Akt3表达与肝损伤指标之间的相关性

Figure 10 Correlation between expression of Akt3 and liver injury indicators

说已被众多证据支持,并成为转录调控研究领域的焦点。该假说强调RNA(即ceRNA)通过共同的miRNA结合位点发挥竞争性作用。ceRNA能够通过miRNA应答元件与目标miRNA竞争性结合,进而改变后者的转录表达和功能。如上所述,作为miRNA的海绵,circRNA可能通过ceRNA机制在自身免疫性疾病(包括AIH)的发生和进展中发挥重要作用。因此,为了深入探讨这些筛选出的DEC潜在生物学功能,笔者基于之前的研究数据构建了与circRNA相关的ceRNA网络<sup>[7,15-16]</sup>。

通过筛选,本研究获得了5795个circRNA-miRNA-mRNA ceRNA对,共由11178个DEM、49个DEMi和27个DEC组成。研究结果显示,circ\_0001577与AIH的发生密



注:a, Akt3蛋白与ALT;b, Akt3蛋白与AST;c, Akt3蛋白与MDA;d, Akt3蛋白与NO。

图11 Akt3蛋白表达与肝损伤指标之间的相关性

Figure 11 Correlation between expression of Akt3 protein and liver injury indicators

切相关,因其位于 ceRNA 网络的中心,可能通过调控 miR-101c、miR-1927、miR-7055-3p、miR-802-5p 和 miR-877-3p 的表达发挥其生物功能。circ\_0001577 与这些 miRNA 之间的潜在结合位点,形象展示了其作为 miRNA 海绵的生物特性。

此外,这些 DEMi 和 DEM 也在 AIH 发病机制中起重要作用。例如,miR-802 的过表达可导致程序性细胞死亡蛋白 1 的表达上调和 IFN- $\gamma$  分泌的下调,从而抑制 T 淋巴细胞功能<sup>[30-32]</sup>。同时,已有研究验证,miR-101 的过表达可通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 1 的表达并阻断核因子- $\kappa$ B 通路来减轻炎症反应<sup>[33]</sup>。因此,miR-802-5p 和 miR-101 表达的下降有利于自身免疫性疾病(包括 AIH)的发生,这与本团队实验结果一致。作为 3 种同工型 Akt 中的一种,Akt3 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,位于炎症相关信号通路的上游,影响各种促炎性细胞因子的表达和分泌,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6<sup>[34-35]</sup>。在本研究中,不仅检测了位于 ceRNA 网络中的一些 DEC、DEMi 和 DEM 的表达,还分析了这些基因的表达水平与肝损伤程度(如 ALT、AST、MDA 和 NO 等损伤指标)之间的相关性。结果显示,circ\_0001577 和 Akt3 的表达上调与这些肝损伤指标的活性或含量呈正相关,而 miR-7055-3p 的表达下调与这些指标呈负相关。因此,circ\_0001577、miR-7055-3p 和 Akt3 可能是 AIH 发生的重要靶点,其相互作用机制可能与 ceRNA 假说有关。

为了进一步揭示与此构建的 ceRNA 网络相关的潜在生物功能,本研究进行了 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析,发现 ceRNA 网络中富集的 DEM 最显著地参与了

BP 类别中的免疫系统过程。这不仅再次证明了免疫稳态失衡在 AIH 发生中的重要性,也表明了这些差异表达基因的相互作用与 AIH 的发展密切相关。蛋白结合是 MF 类别中最显著的 GO 条目,指的是选择性和非共价地与任何蛋白质或蛋白质复合物相互作用。众所周知,免疫反应通过受体-配体相互作用介导,当该平衡被打破时,便会触发自身免疫性疾病<sup>[36-37]</sup>。提示 ceRNA 网络中富集的正常表达基因之间的相互调节可能干扰了受体与配体之间的正常结合,从而引发了肝脏中的自身免疫反应。GO 富集分析有助于提供新的治疗靶点,并为 T 淋巴细胞介导的自身免疫性疾病的治疗提供了新的视角。

KEGG 信号通路分析显示,这些 ceRNA 富集在 104 个信号通路中,包括 TNF 受体信号通路、Toll 样受体信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等。尽管已有报道指出这些信号通路与 AIH 中的肝损伤发生有关,但 ceRNA 网络将从 RNA-RNA 相互作用来阐明这些通路相关的 AIH 发病机制提供新的线索。此外,ceRNA 网络的构建能使研究者对 AIH 发病机制的理解集中于这些信号通路,从而有助于靶向药物或靶向干预方法的开发。

然而,本研究存在一定局限性。首先,研究结果主要基于 ConA 诱导的动物模型,其对人类 AIH 的适用性尚需进一步验证。其次,关键 circRNA 在不同人群样本中的表达特征和功能尚未得到广泛验证。此外,环境因素与遗传背景对 circRNA 表达的影响,以及 circRNA 在 AIH 病程动态变化中的作用,也需结合临床数据展开深入研究。

**伦理学声明:** 本研究方案于 2024 年 3 月 11 日经由山西中医药大学实验动物伦理委员会审批,批号:AWE202403147,符合实验室动物管理与使用准则。

**利益冲突声明:** 本文不存在任何利益冲突。

**作者贡献声明:** 郭地负责课题设计,资料分析,撰写论文;刘莹参与数据收集和论文修改;刘杨负责拟定写作思路,指导论文撰写,并最终定稿。

#### 参考文献:

- [1] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Autoimmune hepatitis[J]. J Hepatol, 2015, 63(4): 971-1004. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.06.030.
- [2] DALEKOS GN, KOSKINAS J, PAPANICOLAOU GV. Hellenic association for the study of the liver clinical practice guidelines: Autoimmune hepatitis[J]. Ann Gastroenterol, 2019, 32(1): 1-23. DOI: 10.20524/aog.2018.0330.
- [3] KOMORI A. Recent updates on the management of autoimmune hepatitis[J]. Clin Mol Hepatol, 2021, 27(1): 58-69. DOI: 10.3350/cmh.2020.0189.
- [4] WANG HX, LIU M, WENG SY, et al. Immune mechanisms of Con-

- canavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(2): 119-125. DOI: 10.3748/wjg.v18.i2.119.
- [5] FLOREANI A, RESTREPO-JIMÉNEZ P, SECCHI MF, et al. Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis[J]. *J Autoimmun*, 2018, 95: 133-143. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.10.020.
- [6] TANAKA A. Autoimmune hepatitis: 2019 update[J]. *Gut Liver*, 2020, 14(4): 430-438. DOI: 10.5009/gnl19261.
- [7] LIU Y, LI ZC, HAO JH, et al. Circular RNAs associated with a mouse model of concanavalin A-induced autoimmune hepatitis: Preliminary screening and comprehensive functional analysis[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(11): 2350-2362. DOI: 10.1002/2211-5463.12981.
- [8] SALZMAN J. Circular RNA expression: Its potential regulation and function[J]. *Trends Genet*, 2016, 32(5): 309-316. DOI: 10.1016/j.tig.2016.03.002.
- [9] ZHANG Y, ZHANG XO, CHEN T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792-806. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.017.
- [10] HE L, MAN CF, XIANG SY, et al. Circular RNAs' cap-independent translation protein and its roles in carcinomas[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 119. DOI: 10.1186/s12943-021-01417-4.
- [11] DONG ZR, KE AW, LI T, et al. CircMEMO1 modulates the promoter methylation and expression of TCF21 to regulate hepatocellular carcinoma progression and sorafenib treatment sensitivity[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 75. DOI: 10.1186/s12943-021-01361-3.
- [12] QU SB, YANG XS, LI XL, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-148. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.003.
- [13] ZHANG MY, WANG JB, ZHU ZW, et al. Differentially expressed circular RNAs in systemic lupus erythematosus and their clinical significance[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1720-1727. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.161.
- [14] YANG X, LI J, WU Y, et al. Aberrant dysregulated circular RNAs in the peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis revealed by RNA sequencing: Novel diagnostic markers for RA[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2019, 79(8): 551-559. DOI: 10.1080/00365513.2019.1674004.
- [15] LIU Y, CHEN H, HAO JH, et al. Characterization and functional prediction of the microRNAs differentially expressed in a mouse model of concanavalin A-induced autoimmune hepatitis[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(15): 2312-2327. DOI: 10.7150/ijms.47766.
- [16] LIU Y, CHEN H, HAO JH, et al. Microarray-based transcriptional profiling of a mouse model of autoimmune hepatitis[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(10): 2040-2054. DOI: 10.1002/2211-5463.12953.
- [17] WANG HY, RADOMSKA HS, PHELPS MA, et al. Replication study: Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs[J]. *eLife*, 2020, 9: e56651. DOI: 10.7554/eLife.56651.
- [18] PHELPS M, COSS C, WANG HY, et al. Registered report: Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs[J]. *eLife*, 2016, 5: e12470. DOI: 10.7554/eLife.12470.
- [19] LIU K, YAN ZM, LI YC, et al. Linc2GO: A human LincRNA function annotation resource based on ceRNA hypothesis[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(17): 2221-2222. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt361.
- [20] RITCHIE ME, PHIPSON B, WU D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47. DOI: 10.1093/nar/gkv007.
- [21] The Gene Ontology Consortium. The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D330-D338. DOI: 10.1093/nar/gky1055.
- [22] MI HY, HUANG XS, MURUGANUJAN A, et al. PANTHER version 11: Expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D183-D189. DOI: 10.1093/nar/gkw1138.
- [23] YANG J, WANG B, WANG Y, et al. Exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells carrying miRNA-22-3p promote schwann cells proliferation and migration through downregulation of PTEN[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 7071877. DOI: 10.1155/2022/7071877.
- [24] JU J, LI XM, ZHAO XM, et al. Circular RNA FEACR inhibits ferroptosis and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by interacting with NAMPT[J]. *J Biomed Sci*, 2023, 30(1): 45. DOI: 10.1186/s12929-023-00927-1.
- [25] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.08.019.
- [26] TAY Y, RINN J, PANDOLFI PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344-352. DOI: 10.1038/nature12986.
- [27] PASQUINELLI AE. MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 271-282. DOI: 10.1038/nrg3162.
- [28] HANSEN TB, JENSEN TI, CLAUSEN BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388. DOI: 10.1038/nature11993.
- [29] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: The Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.014.
- [30] YANG N, WANG L, CHEN TX, et al. ZNF521 which is downregulated by miR-802 suppresses malignant progression of hepatocellular carcinoma through regulating Runx2 expression[J]. *J Cancer*, 2020, 11(19): 5831-5839. DOI: 10.7150/jca.45190.
- [31] HAO PY, WAXMAN DJ. Functional roles of sex-biased, growth hormone-regulated microRNAs miR-1948 and miR-802 in young adult mouse liver[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(3): 1377-1392. DOI: 10.1210/en.2017-03109.
- [32] SEOK S, SUN H, KIM YC, et al. Defective FXR-SHP regulation in obesity aberrantly increases miR-802 expression, promoting insulin resistance and fatty liver[J]. *Diabetes*, 2021, 70(3): 733-744. DOI: 10.2337/db20-0856.
- [33] ZHAO XY, LI SJ, WANG Z, et al. miR-101-3p negatively regulates inflammation in systemic lupus erythematosus via MAPK1 targeting and inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 359. DOI: 10.3892/mmr.2021.11998.
- [34] YAO YF, WANG H, XI XQ, et al. miR-150 and SRPK1 regulate AKT3 expression to participate in LPS-induced inflammatory response[J]. *Innate Immun*, 2021, 27(4): 343-350. DOI: 10.1177/17534259211018800.
- [35] SHI JS, JIANG K, LI ZD. miR-145 ameliorates neuropathic pain via inhibiting inflammatory responses and mTOR signaling pathway by targeting Akt3 in a rat model[J]. *Neurosci Res*, 2018, 134: 10-17. DOI: 10.1016/j.neures.2017.11.006.
- [36] LOHSE AW, KÖGEL M, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH. Evidence for spontaneous immunosuppression in autoimmune hepatitis [J]. *Hepatology*, 1995, 22(2): 381-388.
- [37] CUETO-SANCHEZ A, NIU H, DEL CAMPO-HERRERA E, et al. Lymphocyte profile and immune checkpoint expression in drug-induced liver injury: An immunophenotyping study[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110(6): 1604-1612. DOI: 10.1002/cpt.2423.

收稿日期: 2024-09-13; 录用日期: 2024-11-27

本文编辑: 葛俊

引证本文: GUO D, LIU Y, LIU Y. Construction of a circRNA-miRNA-mRNA competitive endogenous RNA network based on microarray data and its correlation with liver injury in a mouse model of autoimmune hepatitis[J]. *J Clin Hepatol*, 2025, 41(5): 878-887.

郭地, 刘莹, 刘杨. 基于微阵列数据的 circRNA-miRNA-mRNA 竞争性内源 RNA 网络构建及其与自身免疫性肝炎小鼠模型肝损伤的相关性分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(5): 878-887.