



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

Let-7 family에 의한
간 성상세포 활성화의 조절

Let-7 family as Regulator of
Hepatic Stellate Cell Activation

2015년 2월

서울대학교 대학원
약학대학 약물학전공
최 영 진

국문 초록

Let-7 family 에 의한 간 정상세포 활성화의 조절

간 정상세포의 활성화는 간 섬유화 발생에 중요한 역할을 한다. 간 정상세포는 Transforming Growth Factor beta (TGF- β) 와 Tumor Necrosis Factor alpha, Insulin-like Growth Factor-1, Platelet Activating Factor 등과 같은 신호전달물질에 의해 활성화가 촉진된다. 본 연구는 Let-7 family microRNA 가 간 정상세포의 세포 표면수용체 발현을 억제하고 결과적으로 간 정상세포 활성화를 억제함을 보고자 하였다. 중증의 간 섬유화 환자의 간에서 경증의 환자에 비하여 Let-7 family, 특히 Let-7a 와 Let-7f 의 발현이 유의적으로 감소하였으며, 콜라겐 면적으로 대표되는 섬유화의 진행 지표와 이들 Let-7 family 의 발현이 역상관계로 나타났다. 또한 CCl₄ 처치로 유도한 간 섬유화 동물의 간에서 Let-7 family 의 발현이 감소해 있음을 관찰하였다. 동물에서 간세포와 간 정상세포를 분리하여 Let-7 family 의 기저 발현을 비교한 결과, Let-7 family 는 간세포보다 주로 간 정상세포에서 높게 발현되어 있음을 확인하였다. Let-7 family 의 잠재적 표적 단백질인 표면수용체들 또한 간세포보다 간 정상세포에서 더 많이 발현되었다. 추가적으로, 간에서 분리한 일차 간 정상세포를 12일 간 배양하여 활성화시킬 경우 Let-7 family 의 발현이 감소 하였다. 인간 유래의 간정상세포주인 LX-2 와 간세포주인 HepG2 를 사용하여 Let-7 family 의 기저발현을 비교하였을 때에도 동물의 간에서 분리한 일차 간 정상세포와 간세포를 비교한 결과와 유사하게 LX-2 세포에서 더 높은 Let-7 family 발현이 관찰되었다. LX-2 세포에 Let-7a 를 형질주입하고 TGF- β 를 가했을 때, TGF- β 에 의해 유도된 표면수용체의 발현이 Let-7a 에 감소하였으며, 이때 간 정상세포 활성화 지표인 PAI1 또한 감소되었다. TGF- β 신호전달체계의 매

개 단백질인 smad2/3의 인산화 역시 Let-7a 에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 간 정상세포 활성화 시 Let-7 family 가 감소하는 조절 기전을 밝히기 위해 Let-7 family 의 maturation 을 억제하는 Lin28B 의 발현에 대한 탐구를 추가적으로 수행하였다. 배양 활성화한 일차 간 정상세포에서 흥미롭게도 Lin28B 의 발현이 증가해 있었다. 종합적으로, 본 연구는 간 정상세포에 주로 발현되는 세포 표면수용체를 제어할 수 있는 miRNA 인 Let-7 family 의 발견과, 그 Let-7 family 의 간 정상세포 활성화 억제에 대한 기전 연구이다. Let-7 family 는 표면수용체의 발현을 조절하여 smad2/3, NF- κ B 및 MAPK 로 대표되는 간 정상세포 활성화 신호를 억제하였으며, 이는 간 섬유화의 치료적 메커니즘으로 활용될 수 있다.

주요어: 간 섬유화, 간 정상세포, miRNA, Let-7 family, 세포 표면수용체,

Transforming growth factor beta receptor 1, Platelet activating factor
receptor

학번: 2013-21619

이름: 최영진

목 차

List of Abbreviations.....	4
List of Figures.....	5
I. 서론.....	6
II. 실험재료 및 방법.....	8
1. 시약 및 항체	8
2. 생물정보학적 분석	8
3. 일차 세포의 분리	9
4. 실험 세포주 배양.....	9
5. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법.....	10
6. miRNA 의 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법	11
7. 리포터 유전자 분석법.....	11
8. 세포 분획의 분리.....	12
9. 면역화학적 분석법	12
10. 통계 처리	13
III. 실험 결과.....	14
VI. 결론 및 고찰	34
V. 참고 문헌.....	37
ABSTRACT.....	40

List of Abbreviations

α SMA	Alpha smooth muscle actin
ECM	Extracellular matrix
GF	Growth factor
HSC	Hepatic stellate cell
IGF1R	Insulin-like growth factor-1 receptor
PAF	Platelet activating factor
PAFR	Platelet activating factor receptor
PAI-1	Platelet-derived growth factor-1
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TGF- β R1	Transforming growth factor-beta receptor 1

List of Figures

- Figure 1.** Identification of miRNA targeting cell surface membrane receptors
- Figure 2.** Let-7 expression in hepatocyte and HSC
- Figure 3.** Cell surface membrane receptor expression in hepatic stellate cell as putative targets of Let-7 family and their direct inhibition by Let-7
- Figure 4.** Role of Let-7 in TGF- β -mediated hepatic stellate cell activation
- Figure 5.** TGF- β signaling pathway inhibition by Let-7
- Figure 6.** Inhibition of PAF-mediated hepatic stellate cell activation and signaling pathway by Let-7
- Figure 7.** Let-7 maturation inhibition by Lin28B during stellate cell activation

I. 서론

간 정상세포는 세포 외 기질(Extracellular matrix, ECM) 단백질을 생성하여 간 섬유화의 진행에 중요한 역할을 한다. 여러 리간드들이 각각의 친화성 높고 특이적인 세포표면 수용체에 결합하여 간 정상세포의 생리를 조절한다 (Chen et al, 2012). 현재까지 활성화 된 간 정상세포에서 여러 종류의 세포표면 수용체의 유도 와 발현이 입증되었다 (Scott L. Friedman, 2008). 이 세포표면 수용체들은 리간드의 종류에 따라 나뉘지는데 리간드의 종류는 크게 성장인자(Growth factor) 그리고 싸이토카인(Cytokine), 지질(lipid mediator), 세포 외 기질로 나누어 진다. 이런 각 기 다른 종류의 수용체들은 특이적인 신호전달체계를 통해 간 정상세포를 활성화 시킨다 (Coulouarn et al, 2012). 그 예로 transforming growth factor beta(TGF- β)에 의한 smad 신호의 활성화와 interleukin-6에 의한 STAT3신호 활성화 그리고 platelet derived growth factor에 의한 MAPK/ERK 신호의 활성화를 들 수 있다 (Lee et al, 2011).

MicroRNAs (miRNAs)는 mRNA의 3'-비번역부위에 상보적으로 결합함으로써 유전자 발현을 전사 후 과정에서 조절하는 작은 비암호화 RNA이다. miRNA 발현의 조절장애는 지방증, 간염 그리고 간 섬유화를 포함한 간질환의 중요한 병인으로 작용할 수 있다 (Wang et al, 2012). 특히 간 정상세포에서 miRNA의 이상 발현은 간 섬유화 기전의 하나일 수 있다. 몇몇 miRNA들은 세포 외 기질의 구성요소들을 표적으로 하여 제어하는 것으로 알려져 있다 (Christoph Roderburg et al, 2011). 그럼에도 불구하고 간 정상세포 활성화에 관여하는 세포 표면 수용체를 표적으로 하는 miRNAs에 대해서는 더 자세한 연구가 필요하다. 더욱이, 간 정상세포의 활성화에 관여하는 각기 다른 종류의 세포표면 수용체를 동시에 표적하여 억제하는

miRNAs에 대한 것은 알려진 바가 없다. miRNAs를 이용하여 간 정상세포의 내인성 제어 시스템을 회복하는 것은 간 섬유화의 회복에 있어 긍정적으로 작용할 것이다.

본 연구에서는 여러 종류의 세포 표면 수용체를 동시에 표적하고 억제하는 miRNA를 규명하고 수용체의 억제가 간 정상세포의 활성화와 간 섬유화에 끼치는 영향을 알고자 한다. 생물정보학적 분석 방법을 통해 여러 종류의 세포 표면수용체를 동시에 표적하는 miRNA들을 찾았다. 그 중에서 Let-7 family는 가장 많은 주요 세포 표면 수용체를 표적으로 가지고 있었다. 더 나아가, 간 정상세포의 활성화 시 Let-7 family의 발현이 감소되는 것을 관찰하였고 동시에 간 정상세포 활성화 수용체의 발현이 증가하는 것도 관찰되었다. Let-7 family와 간 정상세포 활성화 수용체 발현간의 관계를 규명하기 위하여 우리는 여러 간 정상세포 활성화 모델을 실험에 사용하였다. 특히, Platelet activating factor receptor(PAFR)와 TGF- β receptor I 과 Let-7 family간의 관계에 중점을 두어 실험을 진행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Anti-platelet-activating factor receptor (PAFR), anti-transforming growth factor, beta receptor 1 (TGF- β R1), anti-insulin-like growth factor 1 (IGFR1), anti-phospho Smad2, anti-phospho Smad3, anti-Smad 2/3, anti-p38, anti-phospho p38, anti-ERK, anti-phospho ERK 그리고 anti-PAI1 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA) 에서 구입하였다. NK- κ B 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)와 R&D systems (Minneapolis, MN) 에서 각각 제공되었다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 과 goat anti-mouse IgGs 는 Zymed Laboratories (San Francisco, CA) 에서 구입하였다. Human recombinant TGF- β 1는 HumanZyme (Chicago, US) 에서 구매하였으며 anti- β -actin antibody, PAF 그리고 other reagents 는 Sigma (St. Louis, MO) 에서 구입하였다.

2. 생물정보학적 분석

세포 표면 수용체를 표적으로 할 것으로 추정되는 miRNA는 TargetScan database (<http://targetscan.org>) 에 의해 선정되었다. miRNA와 표적간의 유전자 상호작용 네트워크는 GeneMANIA (<http://genemania.org>)에 의해 얻었으며 Cytoscape software에 의해 시각화 되었다

3. 일차 세포의 분리

일차 간세포와 간 정상세포는 과거 사용되었던 방법에 의해 흰쥐에서 분리하였다 (Choi IJ et al, 2010). 일차 세포는 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin 을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양되었다. 일차 세포는 분리 후 6-well plate 에서 7일 동안 배양되었다. 순도 높은 간 정상세포(>95%)를 얻기 위해서는 간으로의 관류가 중요하며 배양 시 간 정상세포는 완전히 활성화 되었다.

4. 실험 세포주 배양

인간 간 정상세포주인 LX-2 세포는 Dr. S. L. Friedmann (Mount Sinai School of Medicine, NY) 으로부터 제공받았다. LX-2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 50 units/ml penicillin 및 50 µg/ml streptomycin 이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 에서 37°C 및 5% CO₂ 조건 하에 약 80%-90%의 confluency 를 갖도록 배양하였다. 흰쥐에서 간 정상세포를 분리하여 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml penicillin 및 50 µg/ml streptomycin 이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 에서 37 ° C 및 5% CO₂ 조건 하에 약 80%-90%의 confluency 를 갖도록 배양하였다. HepG2 세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) 에서 구입하였다. HepG2 세포는 10% Fetal Bovine Serum, 10mM HEPES, 50 units/mL penicillin 및 50 g/mL streptomycin 이 함유 된 Dulbecco's modified Eagle's medium 에서 배양하였다.

5. 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응법

총 RNA는 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 을 사용하여 제조사의 권장 방법에 따라 추출하였다. 추출한 total RNA (2ug) 와 d(T)16 primer 및 AMV 역전사효소 (reverse transcriptase) 를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 상대적인 양은 SYBR Premix Ex Taq (Takara, Shiga, Japan) 과 Applied Biosystems (Foster City, CA) 의 StepOne™ Software v2.1을 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 Real-time RT-PCR을 수행하였다. 각 유전자는 β -actin과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 의 상대적인 값으로 보정하였다. DNA 증폭에 사용된 primer는 다음과 같다 : rat GAPDH1 (sense: 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3', antisense: 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'); human PTAFR (sense: 5'-CTGCCCTTCTCGTAATGCTC-3', antisense: 5'-CCTGAGCTCCCCGAGAACTCA-3'); human TGFBR1 (sense: 5'-ACGGCGTTACAGTGTTTCTG-3', antisense: 5'-GCACATACAAACGGCCTATCT-3'); human IGF1R (sense: 5'-AGGATATTGGGCTTTACAACCTG-3', antisense: 5'-GGCTTATTCCCCACAATGTAGTT-3'); rat Lin28a (sense: 5'-CCCGGTGGACGTCTTTGTG-3', antisense: 5'-CACTGCCTCACCTCCTTGA-3'); rat Lin28b (sense: 5'-GGATCAGATGTGGACTGTGAGAGA-3', antisense: 5'-GGAGGTAGACCGCATTCTTTAGC-3'); and human PAI1 (sense: 5'-TCGTCCAGCGGGATCTGA-3', antisense: 5'-CCTGGTCATGTTGCCTTTC-3'); pri-Let-7a (sense: 5'-GATTCCTTTTCACCATTCACCCTGGATGTT-3',

antisense: 5'-TTTCTATCAGACCGCCTGGATGCAGACTTT-3');

6. miRNA의 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법

세포에서 추출한 총 RNA (2 μ g)와 miScript reverse transcription kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 cDNA를 얻었다. Precursor miRNA와 mature miRNA 발현량은 miScript SYBR GREEN PCR kit kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용해 제조사의 지시된 방법에 따라 수행하였고, 결과값은 U6의 상대적인 값으로 보정하였다. 증폭된 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통하여 확인하였다. DNA 증폭에 사용된 primer는 다음과 같다: Let-7a (5'-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT -3'); Let-7b (5'-TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT -3'); Let-7c (5'-TGATAGTAGTTGTATGGTT-3'); Let-7d (5'-AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT -3'); Let-7f (5'-TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT -3'); Let-7g (5'-TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT-3').

7. 리포터 유전자 분석법

리포터 유전자 분석을 위해 Luciferase reporter assay system을 사용하였다. LX-2 세포(1×10^6)를 12 well plate에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포에 1 μ g의 Luc-PTAFR-3'UTR (Product ID: HmiT015524-MT01, GeneCopoeia)와 Luc-TGFBR1 a fragment-3'UTR (Product ID: HmiT018051-MT01, GeneCopoeia), Luc-TGFBR1 b fragment-3'UTR (Product ID: HmiT018051-MT01, GeneCopoeia)와 miR-Let7a mimics또는 control mimics를 48시간 동안

형질전환 하였다. 형질전환 된 세포는 1% 혈청을 포함한 Eagle's minimum essential medium 에서 24시간 동안 배양 했다. 루시퍼레이즈의 활성은 dual luciferase assay kit (GeneCopoeia) 를 이용하여 측정하였다.

8. 세포 분획의 분리

배양 세포의 배지를 제거한 후 PBS 로 세척하고 세포를 긁어 모아 3000 g 에서 3 분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 단백질 분해효소 억제제를 첨가한 용해 완충액 [10 mM Tris (pH 7.1), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 을 가하여 1 시간 동안 얼음 위에서 완전히 용해한 후 10,000 g 에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 전세포 추출액으로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford 정량법 (Bio-Rad[®] protein assay kit, Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 정량 하였다.

9. 면역 화학적 분석법

획득한 세포 단백질을 Mighty Small II SE 250 장치 (Hoefer, Inc., San Francisco, CA) 를 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 방법으로 분리하였다. 시료를 시료의석완충액 [63mM Tris (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% mercaptoethanol, 0.0013% bromophenolblue] 에 희석하여 6%, 7.5%, 9%, 12%의 젤을 사용하여 전기 완충액 (0.12M Tris, 0.96M glycine, 0.5% SDS) 내에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 젤은 전기영

동 전달장치를 이용하여 전이 완충액 (25mM Tris, 192mM glycine, 20% v/v methanol, pH 8.3) 내에서 190mA로 1시간 동안 nitrocellulose 지에 단백질을 전이시켰다. 관찰하려는 단백질에 대한 1차 항체와 반응시킨 후 이어서 Horseradish peroxidase (HRP) 와 결합되어 있는 2차 항체와 1시간 반응시키고 ECL chemiluminescence 시스템 (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) 을 이용하여 발색하였다.

10. 통계 처리

One-way analysis of variance (ANOVA) 를 이용하여 분석하였다. 통계적으로 유의성이 있는 그룹에 대해서는 two-tailed Student's t-test 로 그룹 간 평균을 비교하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 을 기준으로 분석하였다.

III. 실험 결과

1. 세포 표면 수용체를 표적하는 miRNA 의 규명

간 정상세포의 표면에는 다양한 종류의 세포표면 수용체가 존재한다 (Scott L. Friedman, 2008). TargetScan (Whitehead Institute for Biological Research, Cambridge, MA)을 통한 생물정보학적 분석 방법을 이용하여 간 정상세포 활성화를 촉진하는 세포표면 수용체를 표적하는 miRNA를 검색하였다. 3개 이상의 세포표면 수용체를 동시에 표적하는 miRNA 들로 Let-7 family 와 miR-130, miR-19, miR-30, miR-128을 발견하였다 (Fig. 1A). 이중에서 Let-7 family 가 가장 많은 9개의 세포표면 수용체를 표적으로 가지고 있었다. 이들 수용체는 리간드의 종류에 따라 growth factor, cytokine, lipid, extracellular matrix 로 구분되는 4개의 그룹으로 분류할 수 있으며, 이들을 조절하는 miRNA 와의 상관성을 네트워크를 통해 도식화 하였다. 특히 Let-7 family 는 모든 그룹의 표적들을 하나 이상 포함하는 것으로 확인되었다 (Fig. 1B).

A)

miRNAs Targeting 3 or more HSC activating receptors	
miRs	Number of Targets
Let-7	9
miR-130	5
miR-19	3
miR-30	3
miR-128	3

B)

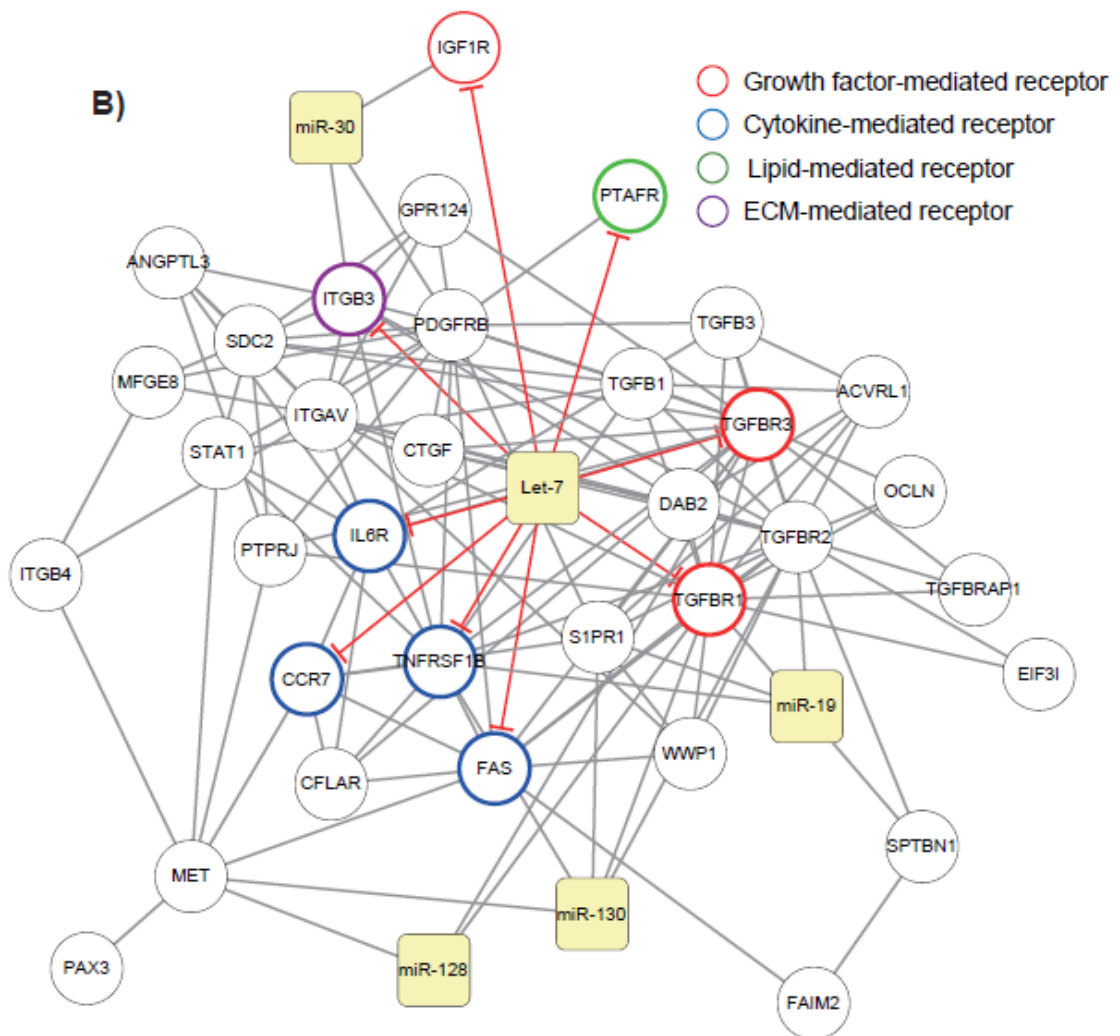


Figure 1. Identification of miRNA Targeting Cell surface membrane receptors

(a) Top 5 miRNAs targeting 3 or more HSC activating receptors were sorted by TargetScan

database (<http://targetscan.org>).

(b) 9 different HSC activating receptors targeted by Let-7 family. 9 receptors targeted by Let-7 family were classified in to 4 different groups based on the receptor-activating ligands as shown in networks. Gene interaction network between the miRNAs and targets was achieved by GeneMANIA (<http://genemania.org>) and visualized by Cytoscape software.

2. 간 정상세포와 간세포에서 Let-7 family 의 발현

예비연구를 통해 중증의 간 섬유화 환자의 간에서 Let-7 family 가 감소하는 현상을 관찰하였다 (data not shown). 이는 간 전체를 분석한 것이므로 간을 구성하는 어떤 세포에서 Let-7 family의 발현이 감소했는지 분석해볼 필요가 있었다. 흰쥐의 간에서 분리한 일차 간 정상세포와 간세포에서 Let-7 family의 발현을 실시 간 역전사 중합 효소 연쇄반응법을 통해 분석하였다. 흥미롭게도 Let-7 family 의 발현은 일차 간세포보다 일차 간 정상세포에서 현저하게 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1A). 인간유래의 세포에서도 적용되는지 확인 위하여 인간 간 정상세포주와 간세포주인 LX-2 와 HepG2 를 이용하였다. 그 결과 인간 세포주를 이용한 분석에서도 일차 세포를 분석한 것과 유사한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1B). 흰쥐의 일차 간 정상세포를 12일 동안 배양하여 활성화 시킨 결과, 활성화 되었을 때 Let-7a 의 발현이 감소되는 것을 관찰하였으며 간 정상세포의 활성화 지표인 α SMA 는 활성화 시 증가하였다 (Fig. 1C).

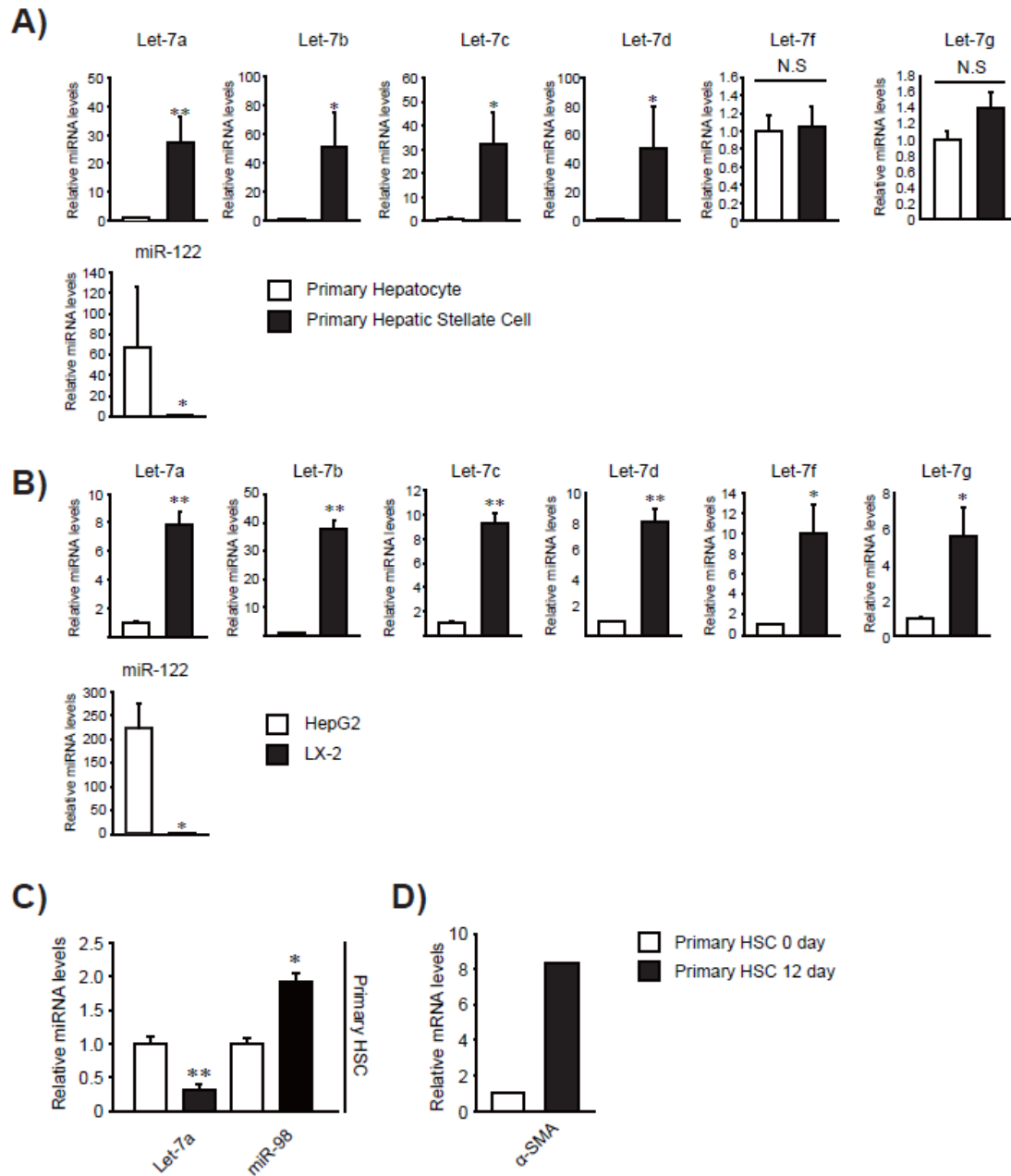


Figure 2. Let-7 family expression in hepatocyte and hepatic stellate cell

(A) Comparison between the levels of Let-7 family and miR-122 in primary hepatocyte and primary HSCs. Let-7a,b,c were significantly higher in primary HSC. Isolated primary HSCs were cultured for 1 day as well as primary hepatocyte. miRNA levels were determined using qRT-PCR assays. Values represent the mean±standard error of mean (significantly different as

compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

(B) Comparison between the levels of Let-7 family and mir-122 in human hepatocyte cell line HepG2 and human HSC cell line LX-2. All Let-7 family miRNA levels were significantly higher in LX-2 cell line. The cells were harvested after 1 day of incubation. miRNA levels were determined using qRT-PCR assays. Values represent the mean±standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

(C) Comparison of Let-7a miRNA levels between 0 day culture-activated primary HSCs and 12 day culture-activated primary HSCs. Let-7a miRNA level was significantly decreased in 12 day culture-activated primary HSCs. Primary HSCs were culture-activated respectively for 0 day and 12 days. mRNA levels were determined using qRT-PCR assays. Values represent the mean±standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

3. 간 정상세포에서 Let-7 family 표적 세포 표면 수용체의 발현

TargetScan (Whitehead Institute for Biological Research, Cambridge, MA) 을 사용한 생물정보학적 분석을 통해 Let-7 family 는 9개의 세포표면 수용체를 표적하고 있다고 추정되었다. 추정된 표적들 중 가장 많은 conserved site 를 가지며 Let-7 family 와 잘 결합할 것이라고 추측되는 세포표면 수용체 유전자는 PTAFR 와 TGFBR1, IGF1R 였다 (Fig. 3A). 12일 동안 배양하여 활성화 시킨 흰쥐의 일차 간 정상세포에서 상기 세포표면 수용체의 mRNA 발현 증가를 관찰하였다 (Fig. 3B) Let-7 family 가 PTAFR 과 TGFBR1 의 3'UTR 부분에 직접적으로 부착하여 이들의 mRNA 전사 후 발현을 억제하는지 관찰하기 위해 PTAFR 3'UTR 벡터, TGFBR1 3'UTR 벡터와 Let-7a mimics를 각각 동시 형질 주입한 후 3'UTR luciferase assay 를 실시하였다. Let-7a mimics와 3'UTR 벡터는 48시간 동안 동시에 인간 간정상세포주인 LX-2에 형질주입 되었다. PTAFR 3'UTR 벡터의 luciferase 활성은 Let-7a에 의해 40% 억제되었고 TGFBR1 3'UTR 벡터의 luciferase 활성은 각각의 fragment 에서 20%씩 감소하였다 (Fig. 3C). 이는 Let-7 family 가 PTAFR 과 TGFBR1 에 직접적으로 부착하여 억제함을 의미한다.

A)

Target gene	Gene name	Conserved site			
		total	8mer	7mer-m8	7mer-1A
PTAFR	Platelet activating factor receptor	3	2	1	0
TGFBR1	Transforming growth factor beta receptor 1	2	1	0	1
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	3	1	1	1
TGFBR3	Transforming growth factor beta receptor 3	1	1	0	0
CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7	1	1	0	0
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1	1	0	0
ITGB3	Integrin beta 3(platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	2	0	1	1
IL6R	Interleukin 6 receptor	1	0	0	1
TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	1	1	0	0

B)

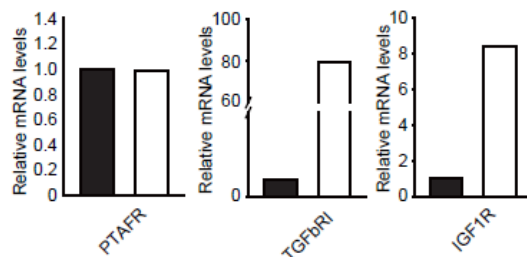


Figure 3. Cell surface membrane receptor expression in hepatic stellate cell as putative targets of Let-7 family and their direct inhibition by Let-7

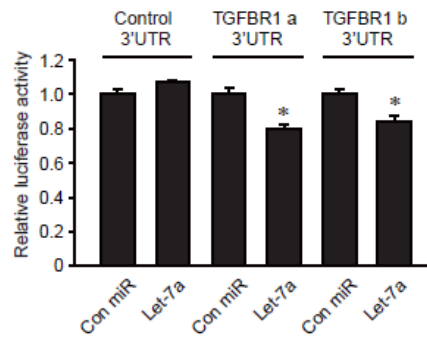
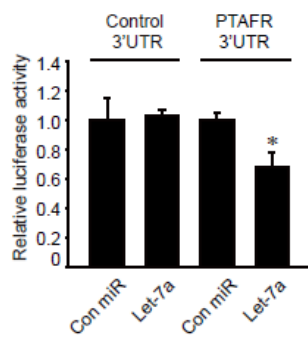
(A) The putative miRNAs which target the putative cell surface membrane receptor candidates and their conserved sites in hepatic stellate cell were extracted from TargetScan database (<http://targetscan.org>).

(B) PTAFR, TGFBR1 and IGF1R genes are selected among the targets since they showed most affinity of conserved site. mRNA level of these three cell surface receptor expression was analyzed in quiescent rat primary HSCs 12 day culture activated rat primary HSCs by qRT-PCR.

(C) Conserved site in PTAFR 3'UTR and TGFBR1 3'UTR for Let-7 family were shown respectively. PTAFR 3'UTR has 2 8mer conserved sites and 1 7mer-m8 conserved site. TGFBR1 3'UTR has 1 8mer conserved sites and 1 7mer-1A conserved site. Luciferase activity was significantly($p<0.05$) inhibited by Let-7a(10nM, 48hours) and PTAFR 3'UTR vector(1 μ g,

48hour) co-transfection. Values represent the mean \pm standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01). Luciferase activity was significantly(p<0.05) inhibited by Let-7a(10nM, 48hours) with TGFBR1 a 3'UTR vector or TGFBR1 b(1 μ g, 48hour) co-transfection. Values represent the mean \pm standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

c)



4. TGF- β 에 의한 간 정상세포 활성화에서 Let-7 의 역할

TGF- β 와 같은 간 정상세포를 활성화 시키는 리간드의 처리는 세포 표면 수용체의 발현을 증가시키며 수용체에 의한 신호전달을 활성화 한다. 간 정상세포에서 Let-7 family 의 역할을 탐구하기 위해 인간 간 정상세포주인 LX-2에 Let-7a mimics 를 48시간 동안 형질주입 하였다. TGF- β 처리는 LX-2 세포에서 세포표면 수용체의 발현을 증가 시켰다. 그러나 Let-7a mimics 는 TGF- β 처리한 군과 대조군 모두에서 세포표면 수용체의 발현을 억제하였다 (Fig. 4A). 반대로, LX-2 세포에 대한 Let-7a antisense oligonucleotide (ASO) 형질주입은 세포표면 수용체의 발현을 증가시켰다 (Fig. 4B). 그러나 Let-7a mimics 와 ASO 를 형질 주입한 실험군 모두 대조군과 비교하였을 때 세포 표면 수용체의 mRNA 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 4A,B).

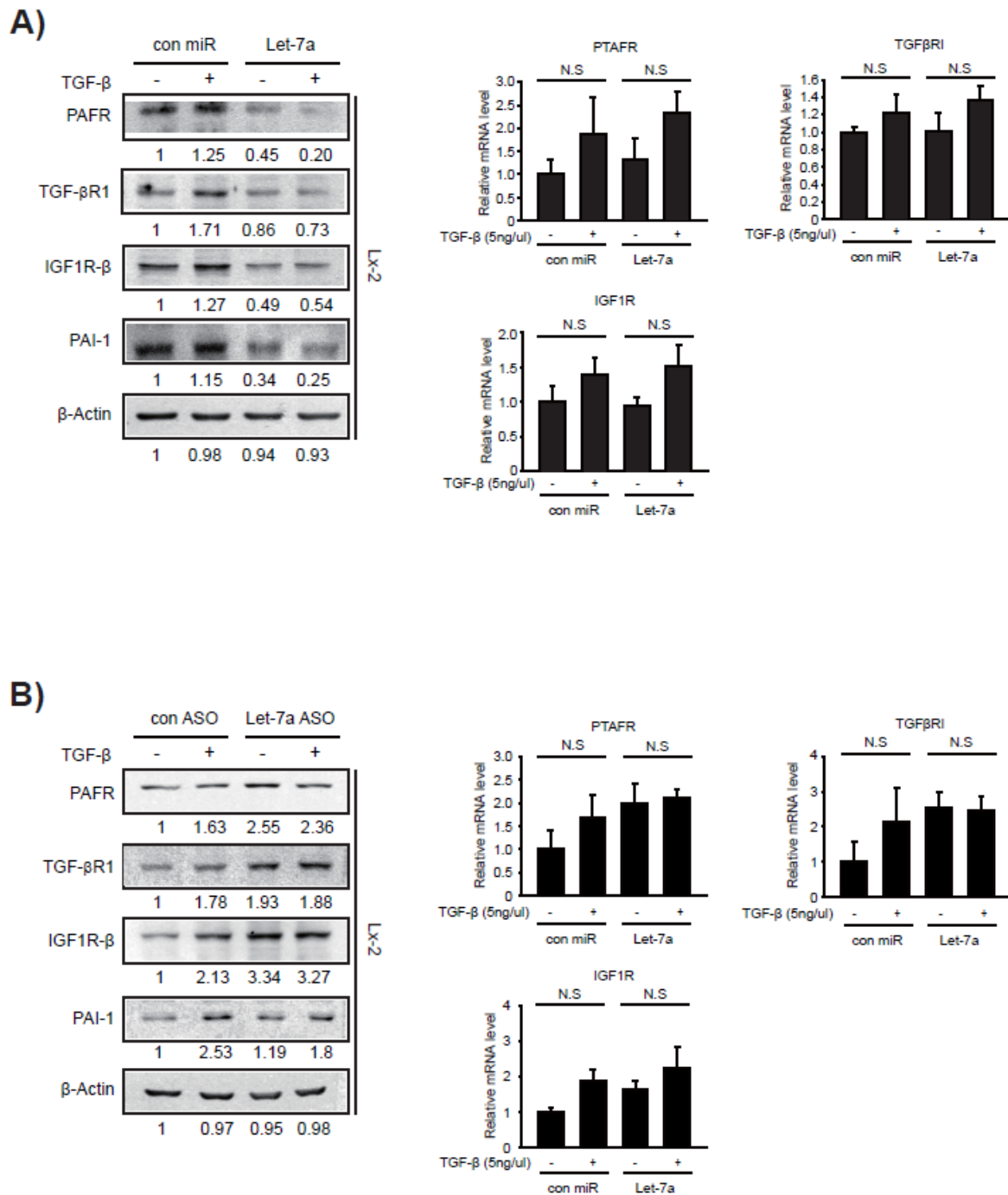


Figure 4. Role of Let-7 in TGF- β -mediated hepatic stellate cell activation

(a) Western blotting for Let-7a targeted receptors (PAFR, TGF β R1 and IGF1R) was performed. LX-2 cells were transfected with control miRNA or Let-7a mimics for 48hours prior to TGF- β (5ng/ml) treatment for 3 hours. mRNA levels of Let-7a targeted receptors (PAFR, TGF β R1 and

IGF1R) were determined using qRT-PCR. LX-2 cells were transfected with control miRNA or Let-7a mimics for 48hours prior to TGF- β (5ng/ml) treatment for 3 hours. Values represent the mean \pm standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

(b) Western blot assay for Let-7a targeted receptors (PAFR, TGF β RI and IGF1R) was performed. LX-2 cells were transfected with control-ASO or Let-7a ASO for 48hours prior to TGF- β (5ng/ml) treatment for 3 hours. mRNA levels of Let-7a targeted receptors (PAFR, TGF β RI and IGF1R) were determined using qRT-PCR. LX-2 cells were transfected with control-ASO or Let-7a ASO for 48hours prior to TGF- β (5ng/ml) treatment for 3 hours. Values represent the mean \pm standard error of mean (significantly different as compared with control ASO treated group *P<0.05, **P<0.01).

5. Let-7 에 의한 TGF- β 신호전달의 억제

활성화된 TGF- β RI 는 smad2/3 의 인산화를 통하여 신호를 전달한다. Let-7a mimics형질주입에 의해 세포표면 수용체의 발현이 억제되었으므로 그 하위 신호전달체계를 연구하는 것이 필요하다. LX-2 세포에 Let-7a mimics를 형질주입 한 후 TGF- β 를 3시간 처치를 하였다. TGF- β 의 처치는 smad2/3 의 현저한 인산화를 유도하였으나 Let-7a mimics는 TGF- β RI 의 발현 억제를 통하여 smad2/3의 인산화를 막았다 (Fig. 5A). 반대로 Let-7a ASO 형질주입은 TGF- β RI 의 발현 증가를 통하여 인산화된 smad2/3 를 증가시켰다 (Fig. 5B). TGF- β 의 처치는 간 정상세포 활성화 지표인 PAI1의 mRNA 발현을 증가시켰다. 이때 Let-7a mimics는 PAI1의 mRNA 발현을 감소시켰고 Let-7a ASO 는 PAI1 mRNA 의 발현을 증가시켰다 (Fig. 5A,B).

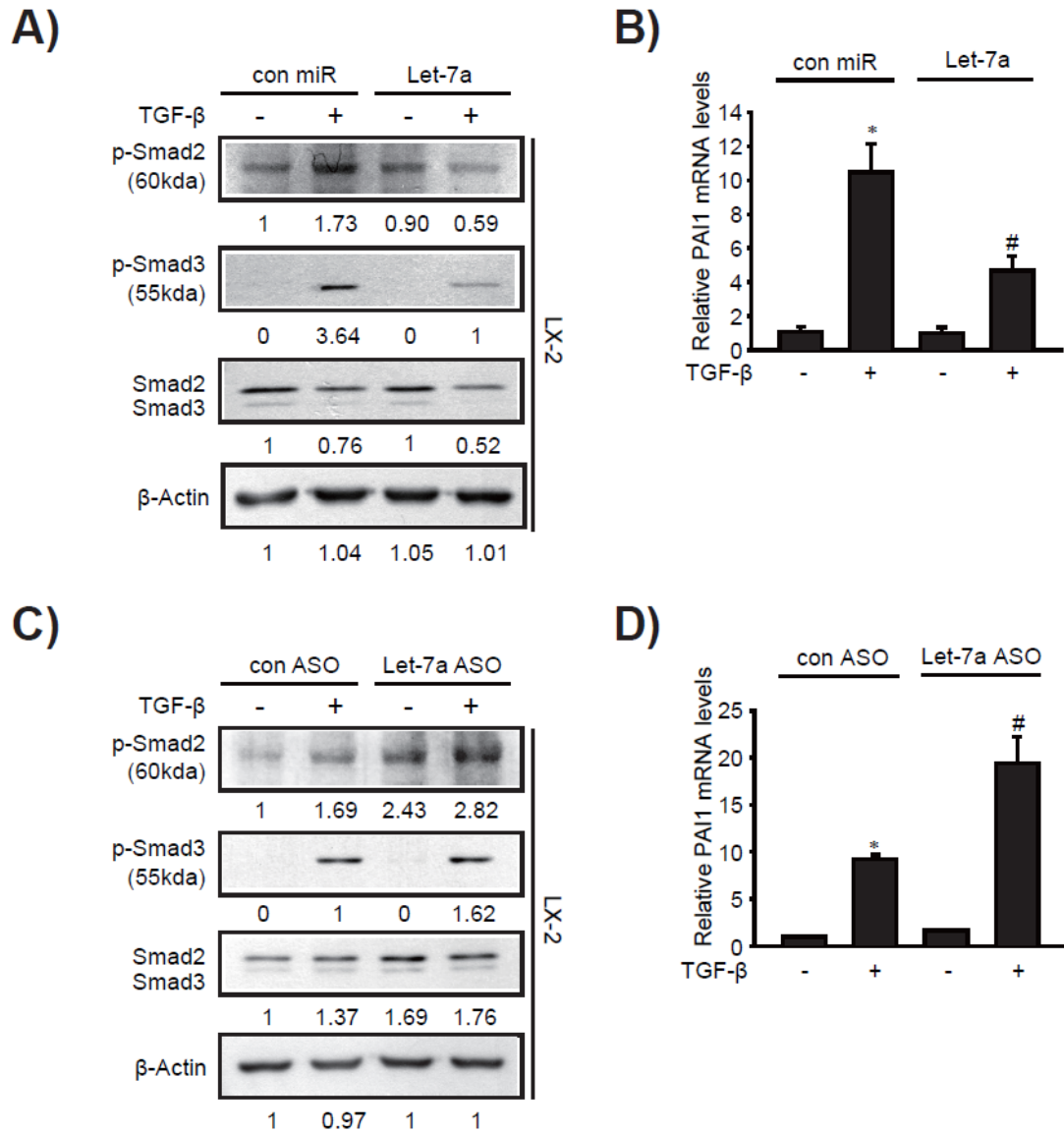


Figure 5. TGF- β signaling pathway inhibition by let-7

(a) Western blot assay for TGF- β signaling (smad2/3, p-smad2, p-smad3) was performed. LX-2 cells were transfected with control miRNA or Let-7a mimics for 48hours prior to TGF- β (5ng/ml) treatment for 3 hours. PAI-1 mRNA level was determined using qRT-PCR. Values represent the mean \pm standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

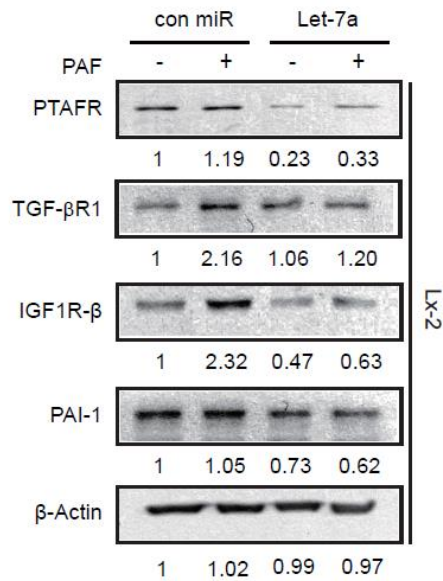
(B) Western blot assay for TGF- β signaling (smad2/3, p-smad2, p-smad3) and HSC activating

marker PAI-1 was performed. LX-2 cells were transfected with control-ASO or Let-7a ASO for 48hours prior to TGF- β (5ng/ml) treatment for 3 hours. PAI-1 mRNA level was determined using qRT-PCR. Values represent the mean \pm standard error of mean (significantly different as compared with control ASO treated group *P<0.05, **P<0.01).

6. Let-7에 의한 PAF-mediated 간 정상세포 활성화와 PAF 신호전달의 억제

활성화된 PAFR 은 ERK 와 p38의 인산화를 통하여 신호전달을 하며 NF- κ B 의 발현을 증가시켰다. PAF 처치는 세포표면 수용체의 발현의 증가를 유도하였다. 그러나 PAFR 의 발현은 Let-7에 의해 억제되므로 PAF 에 의한 세포표면 수용체의 발현증가 역시 Let-7에 의해 억제되었다 (Fig. 6A). 더욱이 PAFR 발현의 감소는 PAF 신호 전달 단백질인 ERK 와 p38의 발현과 인산화를 억제하였다. PAF 의 처치는 NF- κ B 의 발현을 증가시키나 이 역시 Let-7에 의해 억제되었다 (Fig. 6B).

A)



B)

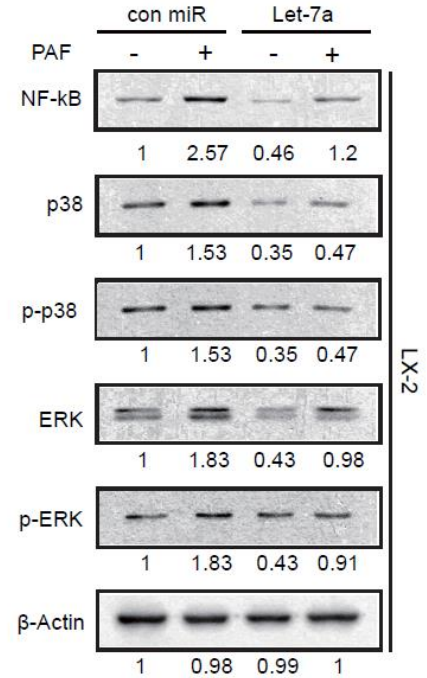


Figure 6. Inhibition of PAF mediated hepatic stellate cell activation and signaling pathway by Let-7a

(a) Western blot assay for Let-7a targeted receptors (PAFR, TGFβRI and IGF1R) and HSC activation marker PAI1 is performed. LX-2 cells were transfected with control miRNA or Let-7a mimics for 48hours prior to PAF (10nM) treatment with 5% BSA for 3 hours. PAF and 5% BSA were activated for 1 hour prior to treatment.

(b) Western blotting for PAF signaling protein (NF-κB, p38, p-p38, ERK, p-ERK) was performed. LX-2 cells were transfected with control miRNA or Let-7a mimics for 48hours prior to PAF (10nM) treatment with 5% BSA for 3 hours. PAF and 5% BSA were activated for 1 hour prior to treatment.

7. 간 정상세포 활성화 시 Lin28B에 의한 Let-7 maturation의 억제

Lin28B 은 오직 Let-7 family 의 maturation 단계를 억제하는 miRNA processing 억제 조절자이다. Lin28B 의 Let-7 family 억제 효과는 암세포와 줄기 세포에서는 많은 연구가 진행되어 왔으나, 간 정상세포에서는 거의 연구된 바 없다 (Seung-Kyoon Kim et al, 2014). Let-7 family 의 발현은 8개의 염색체에서 일어나므로 Let-7 family 의 동시다발적 억제는 전사인자에 의한 전사 조절보다는 Lin28B 에 의한 전사 후 조절일 가능성이 더 높다. 흰쥐의 일차 간 정상세포를 12일 동안 배양하여 활성화 시켰을 때 Lin28B 의 mRNA 발현이 현저히 증가하였으며 이를 통해 Let-7 family 의 maturation 의 억제로서 Let-7 family 의 감소를 설명할 수 있다 (Fig. 7A, B).

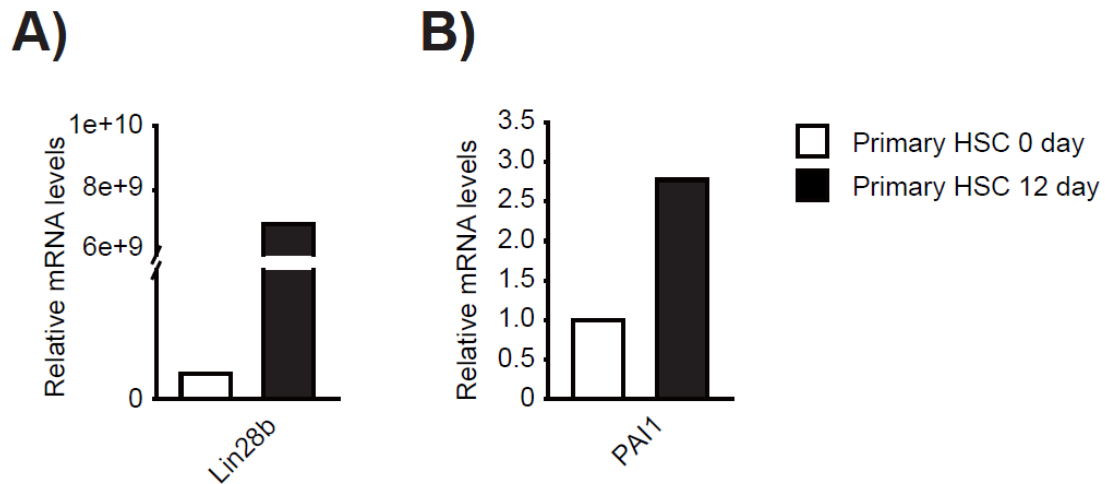


Figure 7. Let-7 maturation Inhibition by Lin28B during stellate cell activation

(A) Comparison of Lin28B mRNA levels between 0 day culture-activated rat primary HSCs and 12 day culture-activated rat primary HSCs. Primary HSCs were culture-activated respectively for 0 day and 12 days. mRNA levels were determined using qRT-PCR assays. Values represent the mean±standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

(B) Comparison of PAI1 mRNA levels between 0 day culture-activated rat primary HSCs and 12 day culture-activated rat primary HSCs. Primary HSCs were culture-activated respectively for 0 day and 12 days. mRNA levels were determined using qRT-PCR assays. Values represent the mean±standard error of mean (significantly different as compared with control miRNA treated group *P<0.05, **P<0.01).

IV. 결론 및 고찰

간 정상세포는 건강한 간에서는 비활성 상태로 존재하나, 지속적인 간 손상에 의해 증가하는 다양한 매개인자에 의해 활성화되어 세포 외 기질의 생성을 촉진하며 점차적으로 간 섬유화를 야기한다 (Tiniakos et al, 2010). 그러므로 간 정상세포 활성화 신호를 매개하는 여러 종류의 세포 표면 수용체의 발현을 억제하는 조절자의 발견은 간 섬유화의 효과적인 예방 및 치료의 수단으로 활용할 수 있다 (Min, H. K. et al. 2012). 본 연구에서는 간 정상세포 활성화 수용체를 동시다발적으로 억제할 수 있는 조절자로서 특정 miRNA 를 처음으로 규명하였다. 생물정보학을 활용한 분석법을 통하여 이들 수용체를 표적으로 하는 miRNA 들을 탐색하였으며, 그 중에서도 가장 많은 세포 표면 수용체를 표적으로 갖는 Let-7 family 에 주목하였다.

중증의 간 섬유화 환자의 간에서 보여지는 Let-7a 와 -7f 의 발현감소 및 콜라겐 면적으로 대표되는 섬유화 지표와의 역상관계는 Let-7 family 가 간 섬유화에 중요한 조절자로서의 가능성을 보여주었다 (예비결과). Let-7 family 의 감소는 CCl₄ 에 의한 간 섬유화 동물 모델에서도 잘 재현되며 분리 배양하여 활성화시킨 간 정상세포에서는 Let-7a 의 감소가 더욱 두드러졌는데, 이는 간에서의 Let-7 family 의 발현감소가 간 정상세포에서 주로 나타날 수 있음을 시사한다.

간 정상세포와 간세포에서 Let-7 family 의 중요성을 검증하기 위해 흰쥐에서 분리한 일차 간 정상세포와 간세포 및 인간 유래의 각 세포주에서 Let-7 family의 기저 발현을 비교하였다. 흥미롭게도 Let-7 family의 발현은 간세포보다 간 정상세포에서 현저하게 높게 나타났으며, 이는 Let-7 family가 간세포보다 간 정상세포에서 중요한 역할을 함을 의미한다. 이때 간 정상세포의 비활성 상태로 유지하기 위해 Let-7 family의 높은 발현이 필수적이라고 생각되었고, 그러므로 Let-7 family

는 간 정상세포의 활성화를 억제하는데 중추적인 역할을 할 가능성을 충분히 가지고 있다고 생각된다.

TGF- β 는 간 정상세포의 표면 수용체의 발현 및 활성화를 촉진하여 세포 외 기질 합성에 중요한 역할을 한다. TGF- β RI 과 II 는 TGF- β 에 반응하여 하나의 중합체를 이루어 세포신호를 매개한다. 그러므로 둘 중 하나의 수용체 발현만 억제하여도 신호전달을 막을 수 있다. 본 연구에서는 Let-7 에 의한 TGF β RI 의 전사 후 억제를 인간 간 정상세포주인 LX-2 에서 관찰하였다. LX-2 세포에 Let-7a 를 형질주입 하였을 때 TGF- β 에 의한 SMAD2/3 의 인산화가 억제되었다. 또한 Let-7a에 의한 TGF β RI 단백질의 발현 억제가 mRNA 의 감소를 동반하지 않은 것으로 보아 Let-7a 는 TGF β RI 의 mRNA 번역 억제를 통한 단백발현을 조절로 생각된다.

PAF 는 인지질로서 간 손상 시 주위의 염증세포들을 활성화 시킨다 (Rui Yang et al, 2014). 간 정상세포에서 PAF 의 역할은 많이 알려진 바 없으나 CCl₄ 에 의한 간경화 동물 모델에서 PAF 와 PAFR 의 증가가 관찰된 것으로 보아 PAF 가 간 정상세포의 활성화에 관여한다고 볼 수 있다 (Y Yang et al, 2003). 또한 PAF 는 면역세포에서 MAPK/ERK 신호를 활성화하여 세포의 증식을 촉진하는데, 간 정상세포에서도 역시 PAFR 과 MAPK/ERK 활성화는 세포 증식에 기여할 것이다. 인간 간 정상세포주에 Let-7a의 형질주입 시 PAF 처치에 의한 PAFR 의 발현과 MAPK/ERK 신호의 활성화를 억제하였으며 간 정상세포 활성화 지표 중 하나인 PAI1 역시 발현이 억제되었다. 그럼에도 불구하고 PAF와 Let-7 family 간의 직접적인 관계는 더 자세히 연구되어야 할 것이다.

Let-7 family 기능연구는 암과 줄기세포에서 많이 연구되어 왔다. 암세포에서 Let-7 family 의 감소는 상피-중간엽 이행 (Epithelial-mesenchymal transition)과

세포 증식을 촉진한다 (Boyerinas, B. et al, 2010). 활성화된 간 정상세포가 간엽세포 (Mesenchymal cell)와 유사한 생리를 가지며 높은 증식능력을 가지는 것에 비추어 볼 때 간 정상세포에서 Let-7 family의 감소는 암세포에서의 세포생리학적 변화와 유사하다 (Castilho-Fernandes, A. et al, 2011).

Let-7 family에는 9개의 miRNAs 가 속해 있으며 8개의 각기 다른 염색체에서 발현된다 (Robert J. A. Frost, 2011). 각각의 Let-7 family 의 miRNA 들은 모두 다른 위치에서 전사 되므로 각기 다른 전사 인자가 발현에 관여 할 것이라고 예상할 수 있다. 간 섬유화 시 Let-7 family 의 거의 모든 miRNA 들이 감소하였다. 공통적인 전사인자가 Let-7 family의 발현에 관여할 가능성이 낮다면, Let-7 family 발현의 조절은 전사 후 조절 (Post-transcriptional regulation) 일 가능성이 높다. 흥미롭게도 Lin28B 단백질은 Let-7 family의 precursor 에만 결합하며 precursor miRNA에서 mature miRNA로의 이행을 막는다 (Zhu, H. et al, 2011). 그러므로 섬유화된 간에서 Let-7 family의 동시다발적 감소는 Lin28B 의 전사 후 조절일 가능성이 크다. 흰쥐에서 분리한 일차 간 정상세포를 12일 동안 배양하여 활성화 시켰을 때 Lin28B의 발현 증가는 이를 지지하는 근거가 될 수 있다.

종합적으로, Let-7 family는 간 정상세포의 활성화에 관여하는 세포 표면 수용체의 발현을 억제하며 간 정상세포의 활성화를 제어한다. 따라서 Let-7 family의 발현 조절을 통한 간 정상세포의 활성억제 메커니즘은 간 섬유화 예방 및 치료적 가치가 있음을 시사한다.

V. 참 고 문 헌

- Chen, Y., S. S. Choi, G. A. Michelotti, I. S. Chan, M. Swiderska-Syn, G. F. Karaca, G. Xie, C. A. Moylan, F. Garibaldi, R. Premont, H. B. Suliman, C. A. Piantadosi and A. M. Diehl (2012). "Hedgehog controls hepatic stellate cell fate by regulating metabolism." *Gastroenterology* 143(5): 1319-1329 e1311-1311
- Scott L. Friedman (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver *Physiol rev*, 2008 January ; 88(1): 125-172. doi:10.1152/physrev.00013.2007.
- Coulouarn, C., A. Corlu, D. Glaise, I. Guenon, S. S. Thorgeirsson and B. Clement (2012). "Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 72(10): 2533-2542
- Lee, U. E. and S. L. Friedman (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(2): 195-206.
- Wang, X. W., Heegaard, N. H., & Orum, H. (2012). MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology*, 142(7), 1431-1443. doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.007
- Christoph Roderburg, Gerd-Willem Urban, Kira Bettermann, Mihael Vucur, Henning Zimmermann, Sabine Schmidt, Jo" rn Janssen, Christiane Koppe, Percy Knolle, Mirco Castoldi, Frank Tacke, Christian Trautwein, and Tom Luedde (2011). Micro-RNA Profiling Reveals a Role for miR-29 in

Human and Murine Liver Fibrosis, *Hepatology*, Vol. 53, No. 1, DOI
10.1002/hep.23922

Il Je Cho, Young Woo Kim, Chang Yeob Han, Eun Hyun Kim, Richard A.

Anderson, Young Sok Lee, Chang Ho Lee, Se Jin Hwang, and Sang Geon
Kim (2010). E-Cadherin Antagonizes Transforming Growth Factor β 1
Gene Induction in Hepatic Stellate Cells by Inhibiting RhoA-Dependent
Smad3 Phosphorylation, *HEPATOLOGY*, Vol. 52, No. 6, 2010. DOI
10.1002/hep.23931

Seung-Kyoon Kim, Hosuk Lee, Kyumin Han, Sang Cheol Kim, Yoonjung Choi,

Sang-Wook Park, Geunu Bak, Younghoon Lee, Jung Kyoon Choi, Tae-
Kyung Kim, Yong-Mahn Han, and Daeyoup Lee (2014). SET7/9
Methylation of the Pluripotency Factor LIN28A Is a Nucleolar
Localization Mechanism that Blocks *let-7* Biogenesis in Human ESCs,
Cell Stem Cell 15, 735–749, December 4, 2014, j.stem.2014.10.016

Tiniakos, D. G., Vos, M. B., & Brunt, E. M. (2010). Nonalcoholic fatty liver
disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 5, 145–171. doi:
10.1146/annurev-pathol-121808-102132

Min, H. K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., . . . Sanyal,
A. J. (2012). Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol
metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver
disease. *Cell Metab*, 15(5), 665–674. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.004

Rui Yang, Yongjun Chen, Cong Tang, Hongbo Li, Bing Wang, Qun Yan, Junbo
Hu, and Shengquan Zou (2014). MicroRNA-144 suppresses

cholangiocarcinoma cell proliferation and invasion through targeting platelet activating factor acetylhydrolase isoform 1b, *BMC Cancer* 2014, 14:917 doi:10.1186/1471-2407-14-917

Y Yang, E M Nemoto, S A K Harvey, V M Subbotin, C R Gandhi (2003).

Increased hepatic platelet activating factor (PAF) and PAF receptors in carbon tetrachloride induced liver cirrhosis. *Gut* 2004;53:877–883. doi: 10.1136/gut.2003.024893

Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., Murmann, A. E., & Peter, M. E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 17(1), F19–36. doi: 10.1677/erc-09-0184

Castilho-Fernandes, A., D. C. de Almeida, A. M. Fontes, F. U. Melo, V. Picanco-Castro, M. C. Freitas, M. D. Orellana, P. V. Palma, P. B. Hackett, S. L. Friedman and D. T. Covas (2011). "Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Exp Mol Pathol* 91(3): 664–672.

Robert J. A. Frost and Eric N. Olson, (2011) Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *PNAS*, vol. 108, no. 52, 21075–21080

Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segre, A. V., Shinoda, G., Shah, S. P., Einhorn, W. S., . . . Daley, G. Q. (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell*, 147(1), 81–94. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.033

ABSTRACT

Let-7 family as Regulator of Hepatic Stellate Cell Activation

Young Jin Choi

Department of Pharmacology

College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Hepatic stellate cell (HSC) activation plays a major role in liver fibrogenesis, which results in part from the activation of cell surface receptors by growth factors, cytokines, lipid mediators, and extracellular matrix components. Regulating these signaling pathways can be effective means in the treatment of liver fibrosis. MicroRNAs regulate a variety of physiological and pathological events. This study investigated the impact of Let-7 microRNA family members on liver fibrosis mediated by HSC activation. Bioinformatic analyses using TargetScan algorithm enabled us to predict candidate microRNAs that may affect different cell surface receptors activating HSCs. Of them, we focused on Let-7 family members because they might target a number of cell-

surface receptors. As an effort to find clinical relevance, the levels of Let-7 members were determined in a group of patients with fibrosis; patients with severe fibrosis showed significantly lower levels of Let-7a and -7f with greater accumulation of fibers than patients with mild disease. Let-7 members were also repressed in the liver of mice treated with carbon tetrachloride. The basal Let-7 expression was much greater in quiescent HSCs than primary hepatocytes, suggestive of the role of Let-7 in regulating HSC transdifferentiation. We found the ability of Let-7a to directly inhibit transforming growth factor beta receptor 1 (TGF- β RI) and platelet activating factor receptor (PAFR), as evidenced by 3'-UTR luciferase assays with Let-7a mimics or ASO transfection. Our results demonstrate that Let-7 family members may prevent liver fibrogenesis by inhibiting the expression of cell surface receptors including TGF- β RI and PAFR in HSCs.

Keyword : Liver fibrosis, Hepatic stellate cell, Let-7 family, cell surface membrane receptor, transforming growth factor beta receptor 1, platelet activating factor receptor