

丁秀秀,黄琳惠,黄奕江. microRNA-1247 通过靶向 CCR16 抑制脂多糖诱导的急性肺炎的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 98-103,115.

Ding XX, Huang LH, Huang YJ. microRNA-1247 inhibits lipopolysaccharide-induced acute pneumonia in mice by targeting CCR16 [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 98-103,115.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.015

microRNA-1247 通过靶向 CCR16 抑制脂多糖诱导的小鼠急性肺炎的机制

丁秀秀,黄琳惠,黄奕江*

(海南省人民医院呼吸与危重症医学科,海口 570311)

【摘要】 目的 探讨 microRNA-1247 通过趋化因子 CC 配体 16(CCR16)抑制脂多糖诱导的急性肺炎的作用机制。方法 选取 8 周龄雌性 BABL/c 小鼠 30 只,随机分为 3 组,即急性肺炎模型组(6 h)、急性肺炎模型组(12 h)和正常组,每组 10 只小鼠。模型组小鼠采取气管滴加 LPS(8 mg/kg),正常组给予与 LPS 含量相同的生理盐水。分别在 LPS 造模 6 h 和 12 h 后对小鼠进行麻醉解剖,取腹腔动脉中的血液检测各组的血气值;检测肺组织干湿重含量;应用 qRT-PCR 以及 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 及 microRNA-1247 表达量;应用蛋白质免疫印迹实验检测 CCR16、TLR4、IRAK6、TAK、IKK 与 NF- κ B p52 含量。结果 模型组小鼠与正常组相比较,模型组小鼠的 PaO₂、氧和指数(PaO₂/FiO₂)降低,肺叶组织干湿重比增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 PaCO₂ 值、炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组在造模后 6 h 和 12 h 肺叶组织中的 microRNA-1247 含量与 CCR16 蛋白表达量增高均有统计学意义($P<0.05$)。细胞表面受体蛋白 TLR4 表达量与正常组相比较,TLR4 表达量降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。IRAK6、TAK、IKK 以及转位入核蛋白 NF- κ B 与正常组相比较,在造模后 6 h 和 12 h 组织中 NF- κ B 蛋白表达量降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 在急性肺炎模型中,microRNA-1247 是通过趋化因子配体 CCR16 抑制因 LPS 诱导的急性肺炎而导致的各种细胞因子及蛋白表达升高。

【关键词】 趋化因子;配体;蛋白;肺炎;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 05-0098-06

microRNA-1247 inhibits lipopolysaccharide-induced acute pneumonia in mice by targeting CCR16

DING Xiuxiu, HUANG Linhui, HUANG Yijiang*

(Department of Respiratory and Critical Medicine, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of the inhibitory effect of microRNA (miR)-1247 on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute pneumonia. **Methods** Thirty 8-week-old female BABL/c mice were randomly divided into three groups: acute pneumonia model group (6 h), acute pneumonia model group (12 h) and normal group, with 10 mice in each group. LPS solution (8 mg/kg) was instilled into the mouse trachea of the model group, and the normal group was instilled an equal volume of physiological saline. Autopsy was performed after anesthesia at 6 h and 12 h

[作者简介] 丁秀秀(1988—),女,学士,研究方向:慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、肺部感染疾病等常见多发病的研究。E-mail: jmqf05@163.com

[通信作者] 黄奕江(1963—),男,硕士,主任医师,研究方向:支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺部感染疾病等常见病、多发病、疑难病的研究。E-mail: yijiang12@126.com

after LPS modeling. The blood gas from the celiac artery was measured. The dry and wet weight of lung tissue was measured. qRT-PCR and ELISA were used to detect the expression levels of TNF- α , IL-1 β and miR-1247 in the pulmonary tissues. The levels of CCR16, TLR4, IRAK6, TAK, IKK and NF- κ B p52 proteins in the lung tissues of each group were detected by western blot. **Results** Compared with the normal group, the PaO₂, oxygen index (PaO₂/FiO₂) of the model group mice was decreased, and the dry-wet weight ratio of the lung was significantly increased ($P < 0.05$). However, the differences in PaCO₂ and mRNA expression levels of TNF- α and IL-1 β between the two groups were not statistically significant ($P > 0.05$). The levels of miR-1247 and CCR16 protein expression in the lung tissues of the model group were significantly increased at 6 h and 12 h after modeling ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the expression of TLR4 on the cell surface was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the expressions of IRAK6, TAK, IKK and transfected nuclear protein NF- κ B in the tissues at 6 h and 12 h after modeling were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** The results of this study show that miR-1247 inhibits the increase of various cytokines and proteins in the LPS-induced acute pneumonia model via chemokine ligand CCR16.

【Keywords】 chemokines; ligands; protein; pneumonia; mouse

趋化因子 (chemotactic cytokines, CC) 可以促进白细胞移动^[1], 目前已经发现 70 多种趋化因子以及 40 多种趋化因子受体。趋化因子和其受体结合, 可以在肺部疾病中起到重要的作用^[2-3]。CC 作为趋化家族中的一员^[4-5], 常在肺部感染中起作用^[6], 其主要针对的是 CC 单核或者巨噬细胞^[7-8]。当肺部发生感染时, CC 及其受体的缺乏或者过低的含量表达, 可以使初级免疫细胞巨噬细胞的肺部浸润变少, 从而减少其吞噬杀菌的功能^[9]。在肺叶组织中, 最多的细胞为肺泡巨噬细胞, 而巨噬细胞是人体固有免疫系统的初级防御^[10]。有当肺组织受到炎症因子刺激以后, 细胞膜上的 TLR 受体会被活化^[11], 之后通过级联信号传递, 活化下游通路, 最终激活核转录因子 NF- κ B 转位入核, 诱导炎症因子转录表达。但是大量炎症因子的表达, 会促进炎症的级联放大, 形成肺内炎症“瀑布”反应, 导致 ALI/ARDS 的发生^[12-13]。TRIF 蛋白基因被敲除的小鼠, 在刺激其 TLR3 和 TLR4 受体时, 其 NF- κ B 的转位入核活性会明显降低^[14-15], 炎症因子的分泌也会显著减少, 从而得出炎症因子的分泌是通过 TLR 受体的激活从而激活下游的 NF- κ B 通路。在敲除 TAK1 蛋白基因以后, 可以能下调由脂多糖所诱导的 NF- κ B 蛋白的活化和炎症因子表达。小 RNA 也可以调控炎症反应。虽然小 RNA 不参与编码蛋白, 但是却可以抑制 mRNA 转录表达蛋白, 互补降解掉目的基因, 这在研究中非常的重要, 可以通过小 mRNA 去除掉对实验或者生命体有影响的目的基因。研究发现, 检测脂多糖 (LPS) 处理 A549 细胞前后发生显著变化的 miRNAs, 并验证 miR-1247-3P 在不同浓度 LPS 处理后细胞中有高表达, 提示其可能在 ARDS 的发生发展过程中发挥作用^[16]。故本研究选择

microRNA-1247 作为研究靶点, 并且由于 CC 趋化因子配体 16 是调控炎症介质的关键因子, 故推断 miR-1247-3P 有可能通过靶向 CC 趋化因子配体 16 而发挥作用, 该推断已经在预实验中得到验证。本研究即探讨 microRNA-1247 通过趋化因子 CC 配体 16 抑制脂多糖诱导的急性肺炎的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取雌性清洁级 8 周龄 BALB/c 小鼠 30 只, 体重每只约 22~25 g, 由海南医学院实验动物中心提供 [SCXK (琼) 2016-0009], 小鼠饲养于温度 20℃~28℃ 清洁级鼠笼 [SYXK (琼) 2014-0025]。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖溶液 (美国 Sigma 公司, 批号: Sigma-I2880); 兔抗小鼠 IRAK6 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); 兔抗小鼠 TAK 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); 兔抗小鼠 IKK 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); 兔抗小鼠 NF- κ B p52 多克隆抗体 (Invitrogen 公司, 美国); 兔抗小鼠 TNF- α 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); 兔抗小鼠 IL-1 β 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); 小鼠 IL-1 β ELISA 检测试剂盒 (南京碧云天公司); 小鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒 (南京碧云天公司); 兔抗小鼠 CCR16 多克隆抗体 (Invitrogen 公司, 美国); 兔抗小鼠 TLR4 多克隆抗体 (Invitrogen 公司, 美国)。III 型显微外科手术器械 (宁波医用缝针有限公司); 小鼠固定架 (北京吉安得尔科技有限公司); US/S5TB230 型小动物手术台 (北京中西远大科技有限公司); Misonix Sonicator 4000 型超声波破碎仪 (Misonix 公司, 美国); DDB-300 型多通道电子蠕动泵 (浙江象山石浦海天电子仪器厂); Waters

2695 型高效液相色谱系统 (Waters 公司, 美国); Centrifuge 5810R 型低温高速离心机 (Eppendorf 公司, 德国); 全自动电泳系统 (Bio-Rad 公司, 美国); 18-ODS 型色谱柱 (Dima 公司, 美国); 金盘多媒体图像处理系统 (成都金盘电子科大多媒体技术有限公司) 。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

将 30 只 8 周龄小鼠随机分为 3 组, 急性肺炎模型组 (6 h)、急性肺炎模型组 (12 h) 和正常组, 每组 10 只小鼠。

实验小鼠在实施实验前一夜进行饥饿处理, 但水量供应。按照 8 mg/kg 浓度的脂多糖, 以质量添加标准, 将 10 mL 的脂多糖溶液 (lipopolysaccharides, LPS) 经过气管滴加到小鼠的肺部用以构建急性肺炎模型。采取小鼠股动脉血液实施血气分析, 以动脉血气低于 90% 为 LPS 急性肺炎小鼠模型制作成功的标准。该实验研究经由实验动物使用与管理委员会批准的 IACUC 号为 2017-0017。本研究实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀实施具体措施。

1.3.2 样本采集

在构建急性肺炎模型 6 h 和 12 h 以后, 将 BALB/c 小鼠麻醉处死并解剖, 观察肺部损伤情况。其中左侧肺叶用肺泡灌洗, 检测 TNF-α 和 IL-1β 含量; 右肺叶用以检测蛋白及 microRNA-1247 含量。

1.3.3 血气分析及肺叶组织干湿重检测

小鼠在气管滴加脂多糖 (LPS) 构建急性肺炎模型 6 h 和 12 h 以后, 解剖抽出腹腔中主动脉血进行血气分析。

1.3.4 qRT-PCR 检测肺叶中的 microRNA-1247 转录水平

取 200 μL 右侧肺叶组织匀浆样本, 应用 qRT-PCR 检测右侧肺叶中的 microRNA-1247 表达情况。PCR 引物序列见表 1。

1.3.5 ELISA 法检测 TNF-α 和 IL-1β 蛋白含量

应用小鼠 IL-1β 及 TNF-α 的 ELISA 检测试剂盒, 将标准品用稀释液按照要求以一定比例稀释, 然后严格按照说明书要求操作。将所得到的数据以 Excel 绘制标准曲线, 最终将结果代入标曲, 计算出样品 TNF-α 和 IL-1β 含量数值, 之后再乘以相应的稀释倍数, 计算含量。TNF-α 与 IL-1β 的含量根据 ELISA 方法, 蛋白标准曲线见表 2, 小鼠的 TNF-α 蛋白标准曲线方程为: $y = 173x^2 + 30x + 79.8$, $R^2 = 0.9927$; IL-1β 的标准曲线方程为: $y = 16x^2 + 197x + 13$, $R^2 = 0.9989$ 。由标准曲线数据可知, 实验数据线性良好, 且 R^2 均超过 0.99, 说明数据准确, 曲线可用。注: 最低检测浓度为 10 pg/mL。见表 2。

1.3.6 Western blot 法检测 CCR16 和 TLR4 受体蛋白表达情况

①膜封闭: 把 NC 膜放入到平皿中, 同时向容器中添加浓度为 5% 的脱脂奶粉, 溶液以完全盖住膜为宜, 置于水平摇床暗处封闭 0.5~1.5 h。②洗膜: 在除去脱脂奶粉溶液以后, 取出 NC 膜置于 TBST 中洗涤 3 次, 每次洗涤 5~10 min。③加入一抗 (CCR16 和 TLR4 受体蛋白的一抗): 将一抗用 0.6% TBST 稀释, 将 NC 膜剪至合适的大小, 使蛋白面朝上放在含有抗体的小盒中, 期间不断的轻轻的晃动孵育盒, 抗体与膜充分接触, 在 4℃ 下孵育一夜。④洗膜: 取出 NC 膜, 并放置于 FBS 溶液中洗涤 3 次, 每次大概 20 min。⑤加入二抗: 二抗使用 0.6% 的 PBS 稀释 500 倍以后, 室温孵育 1 h 以上。⑥洗膜: 取出 NC 膜, 将膜放于 TBST 溶液中洗涤 4 次, 每次 20 min。⑦膜显色, 室温晾干, 拍照保存。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
miR-1247	5'-ACACTCCAGCTGGGACCCGTCCCGTTCGTCC-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

表 2 TNF-α 与 IL-1β 蛋白标准曲线数据 (n = 10)
Table 2 Standard curve data of TNF-α and IL-1β proteins

组别 Groups	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)
OD 值 OD value	4000/3.7, 2000/3.2, 1000/2.73, 500/2.10, 250/1.9, 125/1.3, 62.5/0.75	4000/4.6, 2000/4.0, 1000/3.53, 500/3.10, 250/2.60, 125/2.01, 62.5/1.45
标准曲线 The standard curve	$y = 173x^2 + 30x + 79.8$	$y = 16x^2 + 197x + 13$
R ² 值 R ² value	0.9927	0.9989

1.4 统计学方法

应用 SPSS 20.1 软件统计分析,所有数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性检验后,组间比较应用 *t* 检验, $P<0.05$ 代表差异存在统计学意义;用 Pearson Correlation 进行相关性检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组小鼠血气分析及肺叶组织干湿重比较

BALB/c 小鼠模型组的 PaO₂ 以及氧和指数 (PaO₂/ FiO₂) 与正常组相比都有统计学意义 ($P<0.05$),且由模型组(6 h,12 h)的小鼠氧和指数不难看出模型组符合临床 ALI 的诊断标准,也证明建模成功。模型组的 PaCO₂ 值和正常相比无统计学意义 ($P>0.05$)。模型组小鼠的肺组织干湿重(6 h、12 h)与正常组比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (表 3)。

2.2 各组小鼠的血浆炎症因子表达水平变化

本实验测定了 TNF- α 与 IL-1 β 的表达量。与正常对照组 balb/c 小鼠进行比较,模型组(6 h、12 h)的炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平与正常组相比无统计学意义 ($P>0.05$)。而肿瘤坏死因子 TNF- α 的表达量在造模后 6 h 和 12 h 以后略有升高,但是变化不明显。IL-1 β 的表达量在造模后 6 h 和 12 h 以后也略有升高,但是变化也不明显,此变化趋势与 TNF- α 变化趋势相似(表 4)。

表 3 各组小鼠血气值及肺组织干湿重结果($n=10$)

Table 3 Blood gas and dry matter and wet weight of lung tissues in each mouse group				
组别 Groups	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ /FiO ₂	干湿重比较(湿重/干重) Dry and wet weight ratio (W/D)
对照组 Control group	72.21±5.21	37.45±2.79	460.73±5.36	2.13±0.45
模型组(6 h) Model group (6 h)	41.98±3.74*	39.25±1.51	280.14±3.15*	3.97±1.18*
模型组(12 h) Model group (12 h)	36.75±2.86**	40.84±4.28	240.03±4.65**	4.97±0.28**
<i>F</i>	15.762	1.522	22.205	13.528
<i>P</i>	0.003	0.741	0.002	0.004

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$.

表 4 各组小鼠血浆中炎症因子含量对比结果($n=10$)

Table 4 Comparison of plasma inflammatory factors in each group		
组别 Groups	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	99.42±3.41	78.17±3.64
模型组 6 h Model group (6 h)	105.39±8.31	85.82±2.95
模型组 12 h Model group 12 h	109.42±6.21	92.42±3.06
<i>F</i>	0.984	1.275
<i>P</i>	0.837	0.423

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$.

2.3 模型组小鼠肺组织中 microRNA-1247 含量与正常组的倍数关系

与正常组小鼠进行比较,模型组在造模后 6 h 和 12 h 组织中的 microRNA-1247 的含量差异有统计学意义 ($P<0.05$),且模型组 12 h 倍数要高于 6 h,说明随着造模时间的延长,microRNA-1247 的生成量越来越高(表 5)。

2.4 各组小鼠 CCR16 和 TLR4 受体蛋白表达情况

WB 结果显示,CC 趋化因子配体 16(CCR16)与正常组进行比较,模型组在造模后 6 h 和 12 h 组织中的 CCR16 蛋白表达量有统计学意义 ($P<0.05$),且模型组 12 h 含量要高于 6 h,其表达量的变化和 microRNA-1247 变化呈现一定正相关。而细胞表面受体蛋白 TLR4 与正常组进行比较,模型组在造模后 6 h 和 12 h 组织中的 TLR4 蛋白表达量有统计学意义 ($P<0.05$),且模型组 12 h 含量要低于 6 h 组和正常组,其表达量的变化和 microRNA-1247 变化呈现一定负相关(表 6 及图 1)。

2.5 各组小鼠 IRAK6 和 TAK 蛋白表达量比较

模型组的 IRAK6 和 TAK 蛋白表达量与正常组相比较,模型组在造模后 6 h 和 12 h 后组织中 IRAK6 和 TAK 蛋白表达量有统计学意义 ($P<0.05$),且模型组 12 h 灰度值要低于 6 h(表 7 及图 2)。

表 5 不同诱导时间肺组织中 microRNA-1247 倍数($n=10$)

Table 5 miRNA-1247 levels in lung tissues at different induction times	
组别 Groups	倍数 Multiple
对照组 Control group	1.00±0.03
模型组 6 h Model group (6 h)	2.64±0.86**
模型组 12 h Model group 12 h	4.42±0.73**
<i>F</i>	12.301
<i>P</i>	0.001

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$.

表 6 各组小鼠肾小管自噬体膜标志蛋白表达量比较 (n=10)

组别 Groups	蛋白(灰度值)Protein (gray value)	
	CCR16	TLR4
对照组 Control group	0.47±0.02	0.82±0.25
模型组 6 h Model group (6 h)	2.67±0.12 **	0.68±0.07 **
模型组 12 h Model group (12 h)	3.01±0.16 **	0.32±0.05 **
F	21.682	14.105
P	0.001	0.001

注:与对照组比较,*P<0.05。
Note. Compared with the control group, *P<0.05.

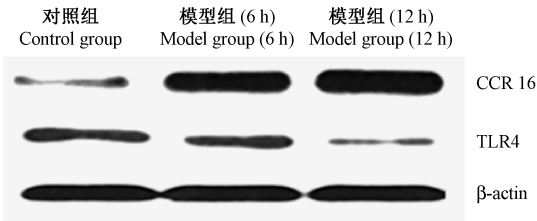


图 1 Western blot 检测 CCR16 和 TLR4 受体蛋白表达情况
Figure 1 Expression of CCR16 and TLR4 receptor proteins detected by Western blot

组别 Groups	IRAK6 (灰度值) IRAK6 (gray value)	TAK (灰度值) IRAK6 (gray value)
	IRAK6 (gray value)	IRAK6 (gray value)
对照组 Control group	1.97±0.09	0.92±0.11
模型组 6 h Model group (6 h)	1.18±0.08 **	0.63±0.04 *
模型组 12 h Model group (12 h)	0.77±0.10 **	0.47±0.03 **
F	13.760	10.312
P	0.001	0.003

注:与对照组比较,*P<0.05。
Note. Compared with the control group, *P<0.05.

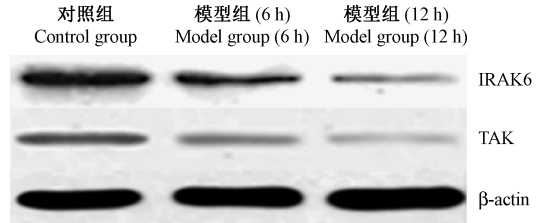


图 2 Western blot 检测 IRAK6 和 TAK 蛋白表达情况
Figure 2 Expressions of IRAK6 and TAK proteins detected by Western blot

2.6 各组小鼠 IKK 蛋白表达量比较

模型组的 IKK 蛋白表达量与正常组相比较,模型组在造模后 6 h 和 12 h 后组织中 IKK 蛋白表达

量有统计学意义 (P<0.05),模型组 12 h 灰度值低于 6 h(表 8 及图 3)。

表 8 各组小鼠 IKK 蛋白表达量比较 (n=10)

Table 8 Comparison of the expression of IKK protein in each group	
组别 Groups	IKK (灰度值) IKK (gray value)
对照组 Control group	1.97±0.21
模型组 6 h Model group (6 h)	1.43±0.25 *
模型组 12 h Model group (12 h)	1.17±0.13 **
F	13.293
P	0.004

注:与对照组比较,*P<0.05。
Note. Compared with the control group, *P<0.05.

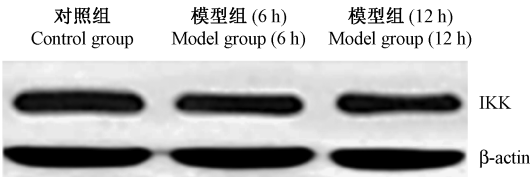


图 3 Western blot 检测 IKK 蛋白表达情况
Figure 3 Expression of IKK protein detected by Western blot

2.7 各组小鼠 NF-κB p52 蛋白表达量比较

WB 检测结果显示,与正常组进行比较,模型组在造模后 6 h 和 12 h 组织中的细胞炎症重要的转位入核蛋白 NF-κB p52 表达量有统计学意义 (P<0.05),且模型组 12 h 灰度值低于 6 h 低于正常组,其表达量的变化和 microRNA-1247 变化呈现一定负相关(表 9 及图 4)。

表 9 各组小鼠 NF-κB 蛋白表达量比较 (n=10)

Table 9 Comparison of NF-κB protein levels in each group	
组别 Groups	NF-κB (灰度值) NF-κB (gray value)
对照组 Control group	1.94±0.09
模型组 6 h Model group (6 h)	1.05±0.03 **
模型组 12 h Model group (12 h)	0.95±0.04 **
F	10.350
P	0.001

注:与对照组比较,*P<0.05。
Note. Compared with the control group, *P<0.05.

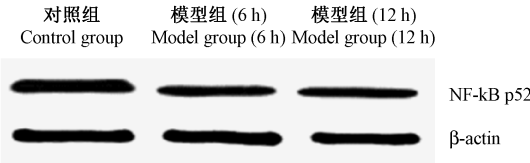


图 4 Western blot 检测小鼠转位入核蛋白 NF-κB p52 表达情况
Figure 4 NF-κB p52 translocation detected by Western blot

3 讨论

肺组织是身体最大的脏器,且有很多毛细血管。它的结构和生理功能的特殊性,决定了其容易受损的特性。现已证实,TLRs 识别受体在哺乳动物中广泛存在,它在调节人体免疫进程中非常的重要。目前已经发现 10 几种 TLRs 受体,他们在固有免疫中承担的作用不同,是刺激物信号转导到下游十分重要的受体蛋白。TLR4 在革兰阴性细菌感染中承担重要作用。革兰氏阴性菌细胞壁成分脂多糖在释放以后,会与细胞膜表面的受体 CD14 形成复合物,并活化 TLR4 受体,进一步活化下游蛋白,促进其下游蛋白的表达,最终降解 I- κ B 将 NF- κ B 释放,使 NF- κ B 发生转位入核,启动炎症基因的转录和翻译,由此引发炎症反应^[16]。

在 Dang 等^[17]的研究中显示小鼠在通过气管向肺部滴加 LPS 诱导的模型中检测到了 miR-146a 基因的上调。但是,小鼠通过雾化吸入 LPS 构建模型后,却没有检测到 miR-146a 基因的上调表达^[18]。出现这一结果的原因可能是 miR-146a 的表达有种属之间特异性,因此本实验所证实的 LPS 诱导的急性肺炎模型中 microRNA-1247 基因的上调表达,在不同的种属小鼠,小鼠或者不同 LPS 诱导方式的模型之间都可能有不同的表达。

许多文献表明 LPS 诱导的炎症模型导致的炎症反应会呈现瀑布式发生,这就增加了小鼠在炎症发生过程中的致死率。本文研究结果表明 LPS 由气管滴入到肺部诱导的模型组小鼠的 PaO₂ 以及氧和指数(PaO₂/FiO₂)和肺叶组织干湿重与正常组相比差异显著。而炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达水平差异却并不明显。后续实验结果显示模型组在造模后 6 h 和 12 h 以后组织中的 microRNA-1247 表达量较正常组升高的十分明显。这与以往的文献相比,小 RNA 含量升高的更明显,且下游蛋白的研究也更为透彻。为了探索小 RNA 的升高的是否与炎症因子的低表达有关,应用后续的 WB 实验验证。WB 结果显示,与正常组相比,模型组在造模 6 h 和 12 h 后肺叶组织中的 CCR16 蛋白表达量差异显著,且随着造模时间的延长逐渐升高。其表达量的升高与 MICRNA-1247 的含量成正相关。而细胞表面受体蛋白 TLR4 表达量与正常组相比,两组模型组的 TLR4 表达量明显降低,与 MICRNA-1247 的表达量呈现负相关。IRAK6、TAK、IKK 蛋白

与正常组相比较,蛋白表达量在造模后显著降低。转位入核蛋白 NF- κ B 与正常组相比较,在造模后 6 h 和 12 h 后肺叶组织中 NF- κ B 蛋白表达量也相应降低,与 MICRNA-1247 的表达量呈现负相关。而 TLR4 正是 NF- κ B 通路的受体蛋白,而 IRAK6、TAK 和 IKK 是 NF- κ B 蛋白的上游蛋白,它们的减少直接决定 NF- κ B 的活化与转位入核,从而影响炎症因子的表达。由此得出炎症因子的降低与 microRNA-1247 的表达升高有关,通过 microRNA-1247 的高表达,抑制 TLR4 和 NF- κ B 因 LPS 而引起的高表达,进而减少炎症因子的分泌,防止由于炎症因子的过量释放造成的机体损伤。且 CC 趋化因子配体 16 的明显升高也可以得出 microRNA-1247 抑制 LPS 诱导的急性肺炎的机制是通过 CCR16 抑制肺泡巨噬细胞的 TLR4 信号通路的活化,通过减少 TLR4 受体的表达,级联反应的影响下游蛋白 IRAK6、TAK 和 IKK 的含量表达,从而影响 NF- κ B 转位入核从而减少肺部炎症因子的释放,进而减轻炎症反应。本研究选择检测 NF- κ B p52 来反应其核转位的原因是,与正常组进行比较,模型组在造模后 6 h 和 12 h 组织中的细胞炎症重要的转位入核蛋白 NF- κ B p52 表达量差异有统计学意义,因其表达量的变化和 microRNA-1247 变化呈现一定负相关,故推测 microRNA-1247 抑制了 NF- κ B p52 蛋白的表达量,从而减少炎症因子的表达。

综上所述,在急性肺炎模型中,microRNA-1247 是通过趋化因子配体 CCR16 抑制因 LPS 诱导的急性肺炎而导致的各种细胞因子及蛋白表达量的升高。

参考文献:

- [1] Minter MR, Main BS, Brody KM, et al. Soluble amyloid triggers a myeloid differentiation factor 88 and interferon regulatory factor 7 dependent neuronal type-1 interferon response *in vitro* [J]. J Neuroinflamm, 2015, 12(8): 71.
- [2] Corbett A, Smith J, Ballard C. New and emerging treatments for Alzheimer's disease [J]. Expert Rev Neurother, 2012, 17(2): 147-156.
- [3] Gaur S, Agnihotri R, Costantini, et al. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? [J]. Geriatr Gerontol Int, 2015, 15(4): 391-404.
- [4] Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy [J]. Neuroscience, 2015, 302(8): 103-111.