

李春桃,唐苏婷,徐云柯,等. miR-16-5p 靶向 NLRP1 抑制缺氧复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 68-75.

Li CT, Tang ST, Xu YK, et al. miR-16-5p targets NLRP1 to inhibit BRL-3A cell pyrolysis induced by hypoxia-reoxygenation [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 68-75.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 10. 011

miR-16-5p 靶向 NLRP1 抑制缺氧复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡

李春桃,唐苏婷,徐云柯,高 源,郭 勇,方 超,喻淋淋*

(西南医科大学附属中医医院肝胆外科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨 miR-16-5p 对缺氧复氧诱导的大鼠正常肝细胞系 BRL-3A 焦亡的作用以及作用机制。**方法** 通过细胞缺氧复氧的方法构建肝缺血再灌注损伤(HIRI)的体外模型,通过流式细胞术检测细胞焦亡率;通过荧光实时定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-16-5p 的表达水平;运用 miR-16-5p mimic 在细胞中过表达 miR-16-5p 并研究 miR-16-5p 对细胞焦亡的影响;通过蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测焦亡相关蛋白 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达水平;通过生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验预测并鉴定 miR-16-5p 与 NLRP1 的靶向关系;通过过表达和干扰 NLRP1,研究 NLRP1 及 miR-16-5p/NLRP1 轴对细胞焦亡的影响。**结果** 与空白对照组相比,模型组焦亡率极显著上升($P<0.01$),miR-16-5p 表达量显著降低($P<0.05$)。过表达 miR-16-5p 极显著抑制细胞焦亡($P<0.01$)并抑制焦亡相关蛋白 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验显示 NLRP1 是 miR-16-5p 的靶基因,过表达 miR-16-5p 显著降低了 NLRP1 的 mRNA 和蛋白水平($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。此外,过表达 NLRP1 逆转了 miR-16-5p 对细胞焦亡的抑制作用($P<0.01$)和对 caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达的抑制作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** MiR-16-5p 通过靶向 NLRP1 来抑制 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达,从而改善缺氧复氧引起的 BRL-3A 细胞焦亡。

【关键词】 miR-16-5p;NLRP1;缺氧复氧;BRL-3A;焦亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0068-08

miR-16-5p targets NLRP1 to inhibit BRL-3A cell pyrolysis induced by hypoxia-reoxygenation

LI Chuntao, TANG Suting, XU Yunke, GAO Yuan, GUO Yong, FANG Chao, YU Linlin*

(the TCM Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of miR-16-5p on pyrolysis of rat normal liver cell line BRL-3A induced by hypoxia-reoxygenation. **Methods** An *in vitro* model of hepatic ischemia reperfusion injury was established by cellular hypoxia-reoxygenation and the pyrolysis rate was measured by flow cytometry. RT-qPCR was used to measure the expression level of miR-16-5p. Overexpressed miR-16-5p in cells by miR-16-5p mimics was used to examine the effect of miR-16-5p on pyrolysis. Western blot was used to measure protein expression levels of pyrolysis-related proteins caspase 1, IL-1 β , and IL-18. The relationship between miR-16-5p and NLRP1 was predicted through bioinformatics

【基金项目】西南医科大学-西南医科大学附属中医医院自然科学基金青年苗圃项目(2018XYLE-051)。

【作者简介】李春桃(1988—),男,硕士,住院医师,研究方向:肝癌及其多药耐药相关研究。E-mail:373632809@qq.com

【通信作者】喻淋淋(1987—),男,学士,主治医师,研究方向:肝癌及其缺血再灌注损伤机制研究。E-mail:qwertyui552@163.com

analysis and dual luciferase reporter gene assays. Interference and overexpression of NLRP1 were performed to investigate the effect of NLRP1 and the miR-16-5p/NLRP1 axis on pyrolysis. **Results** Compared with the blank control group, the pyrolysis rate of the model group was increased significantly ($P<0.01$) and expression of miR-16-5p was decreased significantly ($P<0.05$). Overexpression of miR-16-5p significantly decreased the pyrolysis rate ($P<0.01$) and inhibited the expression of caspase 1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.01$ or $P<0.05$). The dual luciferase reporter gene assay showed that NLRP1 was a target gene of miR-16-5p. Overexpression of miR-16-5p significantly reduced the mRNA and protein levels of NLRP1 ($P<0.01$ or $P<0.05$). Additionally, overexpression of NLRP1 reversed the inhibitory effect of miR-16-5p on pyrolysis ($P<0.01$) and the inhibitory effect on the expression of caspase 1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusions** MiR-16-5p inhibits expression of caspase 1, IL-1 β , and IL-18 by targeting NLRP1, thereby improving pyrolysis of BRL-3A cells caused by hypoxia-reoxygenation.

【Keywords】 miR-16-5p; NLRP1; hypoxia-reoxygenation; BRL-3A; pyrolysis

肝缺血再灌注损伤 (Hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 是各种肝手术过程的主要并发症,例如肝移植和因罹患肝癌而进行的肝切除术^[1-4]。HIRI 会造成肝及远端器官的损伤,对术后恢复及临床预后造成严重影响^[5-6]。研究 HIRI 的潜在机制并寻找可以有效改善 HIRI 的新型治疗靶点具有重要意义。最近的研究发现,细胞焦亡 (pyroptosis) 可能参与了 HIRI,抑制细胞焦亡可能成为一种新的治疗 HIRI 的策略^[7-9]。细胞焦亡于 1992 年由 Zychlinsky 等^[10]发现并命名,是一种有别于凋亡的细胞程序性死亡。在形态学上,细胞焦亡的典型特征是细胞的过度肿胀、快速裂解和细胞内容物的释放,生化特征为炎性小体的激活促进半胱天冬酶 1 前体 (pro-caspase1) 的切割活化并介导促炎介质白细胞介素 1 β (Interleukin-1 beta, IL-1 β)、白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18) 等的释放^[11]。

微小 RNA (miRNA) 是长度在 21-25 nt 的短链非编码 RNA,通过靶向目的基因的 3' 端非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR) 干扰目的基因的表达而发挥生物学功能^[12]。最新证据表明,miRNA 参与了细胞焦亡的调控。王艳等^[13]发现 miR-214 通过靶向 caspase1 改善高糖诱导的心肌细胞焦亡。Xue 等^[14]发现 miR-21 通过靶向锌指蛋白 A20 基因调控核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 的表达,从而促进了脂多糖诱导的巨噬细胞焦亡。一项研究表明,miR-16-5p 在肝移植后 HIRI 患者中表达下调,但 miR-16-5p 在 HIRI 中的作用还不明确^[15]。Yang 等^[16]发现,miR-16-5p 能够抑制炎症因子的活性改善急性肺损伤。本研究采用缺氧复氧的方法模拟肝缺血再灌注损伤,基于

细胞焦亡探讨 miR-16-5p 对缺氧复氧诱导的肝细胞的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

大鼠正常肝细胞 BRL-3A (货号 CL-0036) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

FAM FLICA™ Caspase-1 kit (货号: ICT097) 购自英国 AbD Serotec 公司; 碘化丙锭 PI 溶液 (货号: C0080)、RPMI-1640 培养基 (货号: 31800)、化学发光显影液 (货号: PE0010)、胰酶 (货号: T1350) 购自北京索莱宝科技有限公司; RNAiso Plus (货号: 9108Q)、RNAiso for Small RNA (货号: 9753Q)、PrimeScript™ RT Master Mix (货号: RR036Q)、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (货号: 638315)、TB Green® Fast qPCR Mix (货号: RR430S) 以及 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green® Kit (货号: 638314) 购自日本 TaKaRa 公司; 胎牛血清 (FBS) (货号: SH30084.03) 购自美国 Hyclone 公司; OPTI-MEM 培养基 (货号: 31985088) 以及青链霉素双抗 (货号: 15240062), 购自美国 Gibco 公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013B) 购自上海碧云天公司; 蛋白定量试剂盒 (货号: 23250)、Lipofectamine™ 3000 (货号: L3000008) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 抗 NLRP1 (货号: sc-166368) 的一抗购自美国 Santa Cruz 公司; 抗 caspase1 (货号: ab74279)、IL-1 β (货号: ab9787)、IL-18 (ab191860)、 β -actin (货号: ab8226) 的一抗及辣根素过氧化物酶标记的二抗 (货号: ab205718) 购自英国 Abcam 公司; miR-16-5p 模拟物 (miR-16-5p mimic, 货号: miR10000785-1-5)、阴性对照模拟物 (NC mimic, 货号: miR1N0000001-1-5)、NLRP1 小干

扰 RNA (si-NLRP1, 货号: siG170413090825-1-5)、阴性对照小 RNA (si-NC, 货号: siN0000002-1-5) 购自广州锐博生物有限公司; pcDNA3.1-NLRP1 (ov-NLRP1) 过表达质粒及其阴性对照 (ov-NC) 由成都擎科梓熙生物科技有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及造模

BRL-3A 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中, 并放置于 37℃, 含 5% 二氧化碳的细胞培养箱中。2 d 换液一次, 细胞长至 90% 融合时进行传代。缺氧/复氧造模: 细胞过夜培养后, 加入不含 FBS 和双抗的培养基, 放置于 37℃、94% 氮气、5% 二氧化碳、1% 氧气条件的三气培养箱中进行缺氧 12 h 处理, 再放入正常培养箱复氧 4 h, 收集细胞。

1.3.2 细胞转染及分组

miRNA 的转染: 首先将 miR-16-5p mimic 或 NC mimic 用 100 μL 的无血清 Opti-MEM 稀释成 50 nmol/L, 将 1.5 μL Lipofectamine™ 3000 用 100 μL 的无血清 Opti-MEM 培养基稀释并保持 5 min。随后, 分别将稀释的 miR-16-5p mimic 或 NC mimic 与 Lipofectamine™ 3000 混合并在 37℃ 下孵育 30 min。BRL-3A 细胞接种于 24 孔板中过夜培养, 第 2 天弃掉培养基, 加入无血清 Opti-MEM 培养基饥饿细胞 4 h, 再分别将孵育好的混合物加入细胞中, 放入细胞培养箱中培养 6 h 更换培养基, 培养 48 h 后收集细胞。siRNA 及过表达质粒的转染: 首先将 si-NLRP1、si-NC、ov-NLRP1、ov-NC 用 100 μL 的无血清 Opti-MEM 稀释成 20 μmol/L (siRNA) 或 20 mg/L (过表达质粒), 将 1.5 μL Lipofectamine™ 3000 用 100 μL 的无血清 Opti-MEM 培养基稀释并保持 5 min。随后, 分别将稀释的 si-NLRP1、si-NC、ov-NLRP1、ov-NC 与 Lipofectamine™ 3000 混合并在 37℃ 下孵育 30 min。BRL-3A 细胞接种于 24 孔板中过夜培养, 第 2 天弃掉培养基, 加入无血清 Opti-MEM 培养基饥饿细胞 4 h, 再分别将孵育好的混合物加入细胞中, 放入细胞培养箱中培养 6 h 更换培养基, 培养 48 h 后收集细胞。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)

MiR-16-5p 的检测: RNAiso for Small RNA 提取细胞总 RNA, Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 将总 RNA 反转录为 cDNA。反应体系为: 超纯水 9

μL、2×TB Green Advantage Premix 12.5 μL、50×ROX Dye 0.5 μL、上游引物 0.5 μL、mRQ 3' Primer 0.5 μL、cDNA 模板 2 μL。反应条件为: 95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 5 s, 退火延伸 20 s, 40 个循环。

NLRP1 的检测: RNAiso Plus 提取细胞总 RNA, PrimeScript™ RT Master Mix 将总 RNA 反转录为 cDNA。反应体系为: 超纯水 7 μL、2×TB Green Mix 10 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、cDNA 模板 1 μL。反应条件为: 95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 5 s, 退火 10 s, 72℃ 延伸 10 s, 40 个循环。

引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司进行合成或试剂盒自带, 引物信息如下: miR-16-5p (上游引物: 5' TAGCAGCACGTAAATATTGGCG 3', 下游引物由 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green® Kit 提供, 退火温度 60℃)、NLRP1 (上游引物: 5' GCCCTGGAGACAAAGAATCC 3', 下游引物: 5' AGTGGGCATCGTCATGTGT 3', 退火温度 58℃)、U6 (上下游引物均由 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green® Kit 提供, 退火温度 60℃)、β-actin (上游引物: 5' AGGGAAATCGTGCGTGAC 3', 下游引物: 5' CGCTCATTCGCGATAGTG 3', 退火温度 56℃)。

1.3.4 Caspase1 FLICA/PI 双染法流式细胞术检测细胞焦亡

各组细胞经过胰酶消化, PBS 洗涤细胞 2 次, 1000 r/min 离心 5 min。根据说明书, 加入 5 μL caspase1 FLICA 避光孵育 1 h, PBS 洗涤细胞 2 次, 1000 r/min 离心 5 min, 再加入 5 μL PI 避光孵育 15 min, 上 FACSCalibur™ (BD, 美国) 流式细胞仪检测细胞焦亡。

1.3.5 蛋白免疫印迹实验 (Western blot)

RIPA 裂解液裂解细胞 30 min 提取各组细胞总蛋白, 蛋白定量试剂盒对总蛋白浓度进行定量。用 12% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 分离等量蛋白, 并转移到聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上, 在室温下用 10% 的脱脂牛奶封闭后, 将膜与抗 NLRP1、caspase1、IL-1β、IL-18、β-actin 的一抗在 4℃ 下过夜。冲洗后, 将膜与二抗在室温下孵育 2 h。使用化学发光显影剂使蛋白条带可视化, 并使用 BioSpectrum 成像系统 (UVP, 美国) 进行分析。

1.3.6 双荧光素酶报告基因实验

NLRP1 3' UTR 片段上海汉恒生物科技有限公

司合成。将片段插入 pSI-Check2 双荧光素酶报告载体 (Progen, 美国) 构建重组质粒 (pSI-Check2-NLRP1 3' UTR)。BRL-3A 细胞接种于 96 孔板中过夜培养, 第 2 天弃掉培养基, 加入无血清 Opti-MEM 培养基饥饿细胞 4 h。将 10 μ L 的 Opti-MEM 与 0.16 μ g 的 pSI-Check2-NLRP1 3' UTR 重组质粒以及 5 pmol 的 miR-16-5p mimic/NC mimic 充分混匀后室温放置 5 min, 用 10 μ L Opti-MEM 稀释 0.3 μ L 的 Lipofectamine™ 3000, 然后将稀释的质粒、模拟物和转染试剂混合, 孵育 30 min。将混合液加入细胞, 放入细胞培养箱中培养 6 h 更换培养基, 培养 48 h 后收集细胞。然后参照双荧光素酶报告基因试剂盒的说明书检测荧光活性。

1.4 统计学方法

利用 SPSS 20.0 软件对本实验所有数据进行统计分析, 多组间差异使用单因素方差分析并进行事后最小显著差异检验 (least significant difference, LSD), 两组间差异分析采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著差异, $P < 0.01$ 为差异有极显著。

2 结果

2.1 缺氧/复氧后 BRL-3A 细胞发生焦亡并造成 miR-16-5p 表达量降低

如图 1A 所示, 与空白对照组相比, 模型组 PI+Caspase1 阳性率极显著上升 ($P < 0.01$), 提示缺氧/复氧造成 BRL-3A 细胞发生焦亡。此外, 与空白对照组相比, 模型组 miR-16-5p 的表达量显著降低 ($P < 0.05$) (图 1B), 提示 miR-16-5p 可能参与了缺氧/复氧造成的 BRL-3A 细胞焦亡。

2.2 过表达 miR-16-5p 能够抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡

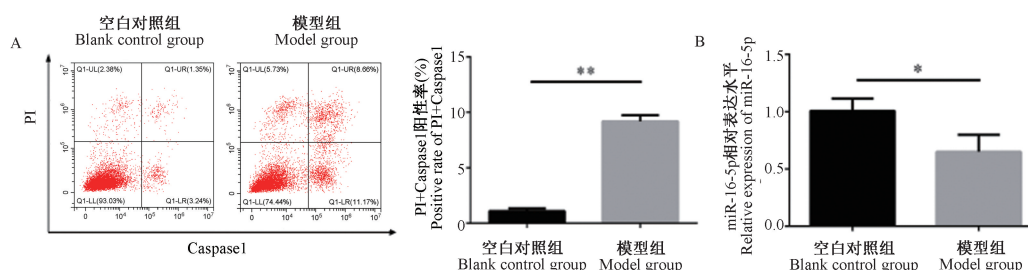
为了探讨 miR-16-5p 在细胞焦亡中的作用, 我们在 BRL-3A 细胞中对 miR-16-5p 进行了过表达。如图 2A 所示, miR-16-5p mimic 组 miR-16-5p 表达量是 NC-mimic 组的 152 倍, 提示在 BRL-3A 细胞中过表达 miR-16-5p 成功。随后通过流式细胞术检测过表达 miR-16-5p 对 BRL-3A 细胞焦亡的影响。如图 2B 所示, 与空白对照组相比, 模型组 PI+Caspase1 阳性率极显著上升 ($P < 0.01$); 模型组与 NC-mimic 组 PI+Caspase1 阳性率差异不显著 ($P > 0.05$); 与 NC-mimic 组相比, miR-16-5p mimic 组 PI+Caspase1 阳性率极显著降低 ($P < 0.01$)。提示 miR-16-5p 能够抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡。

2.3 miR-16-5 过表达通过抑制 BRL-3A 细胞 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达起抗焦亡的作用

如图 3 所示, 与空白对照组相比, 模型组 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达量极显著上升 ($P < 0.01$); 模型组与 NC-mimic 组 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达量差异不显著 ($P > 0.05$); 与 NC-mimic 组相比, miR-16-5p mimic 组 Caspase1 表达量极显著下调 ($P < 0.01$), IL-1 β 、IL-18 表达量显著下调 ($P < 0.05$)。

2.4 NLRP1 是 miR-16-5p 的靶基因

为进一步探讨 miR-16-5p 的作用机制, 通过 Targetscan 在线软件 (http://www.targetscan.org/vert_72/) 预测了 miR-16-5p 的潜在靶基因, 发现 NLRP1 的 3' UTR 与 miR-16-5p 存在潜在结合关系 (图 4A)。通过构建 NLRP1 3' UTR 的双荧光素酶报告载体, 与 NC-mimic/miR-16-5p mimic 共同转染 293T 细胞, 双

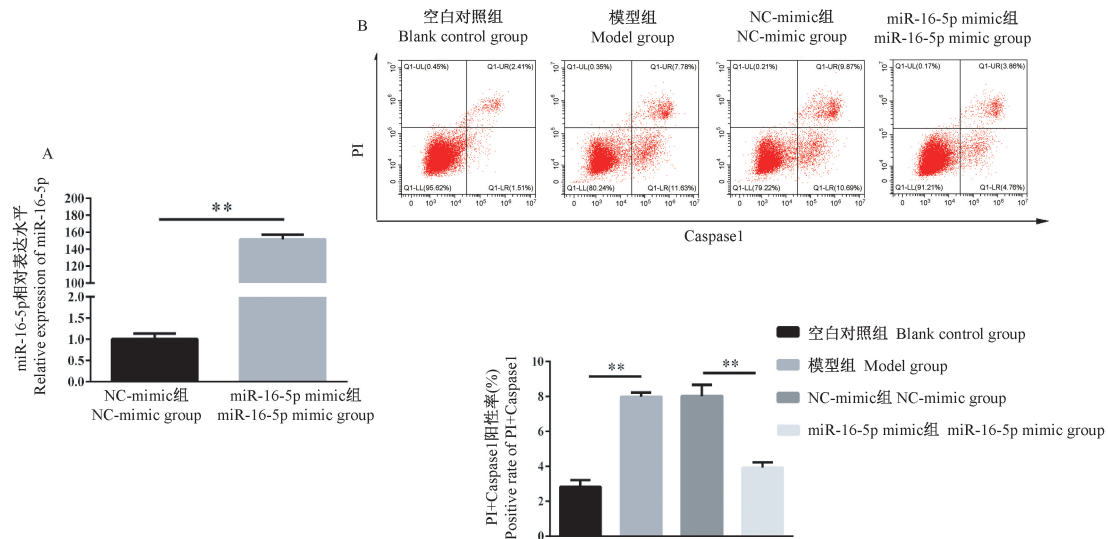


注: A: 流式细胞术检测缺氧/复氧对 BRL-3A 细胞 PI+Caspase1 阳性率的影响; B: RT-qPCR 检测缺氧/复氧对 BRL-3A 细胞 miR-16-5p 表达的影响。与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 缺氧/复氧对 BRL-3A 细胞焦亡及 miR-16-5p 表达的影响

Note. A, Flow cytometry was used to detect the effect of hypoxia/reoxygenation on the positive rate of PI+Caspase1 in BRL-3A cells. B, RT-qPCR was used to detect the effect of hypoxia/reoxygenation on the expression of miR-16-5p in BRL-3A cells. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Effects of hypoxia/reoxygenation on pyrolysis and the expression of miR-16-5p in BRL-3A cells

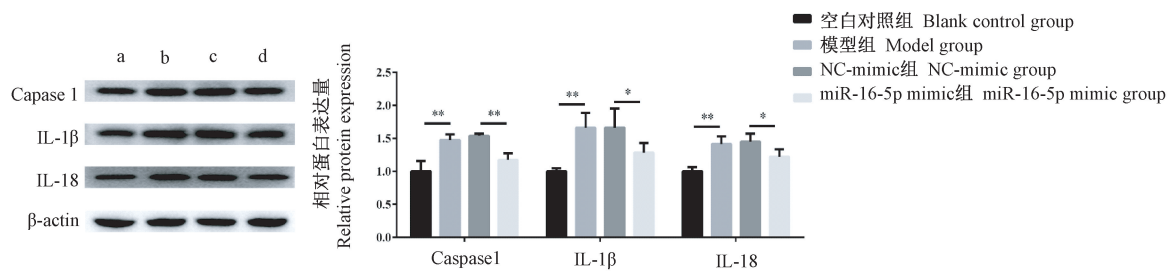


注:A:RT-qPCR 检测 miR-16-5p 过表达效率;B:流式细胞术检测 miR-16-5p 过表达对 BRL-3A 细胞 PI+Caspace1 阳性率的影响。与空白对照组或 NC-mimic 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 miR-16-5p 对缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡的影响

Note. A, RT-qPCR was used to detect the overexpression efficiency of miR-16-5p in BRL-3A cells. B, Flow cytometry was used to detect the effect of miR-16-5p overexpression on the positive rate of PI+Caspace1 in BRL-3A cells. Compared with the blank control group or the NC-mimic group, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Effect of miR-16-5p on pyrolysis induced by hypoxia/reoxygenation in BRL-3A cells



注: a:空白对照组; b:模型组; c: NC-mimic 组; d: miR-16-5p mimic 组。与空白对照组或 NC-mimic 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 miR-16-5p 对 BRL-3A 细胞 Caspace1、IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响

Note. a, Blank control group. b, Model group. c, NC-mimic group. d, miR-16-5p mimic group. Compared with the blank control group or the NC-mimic group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

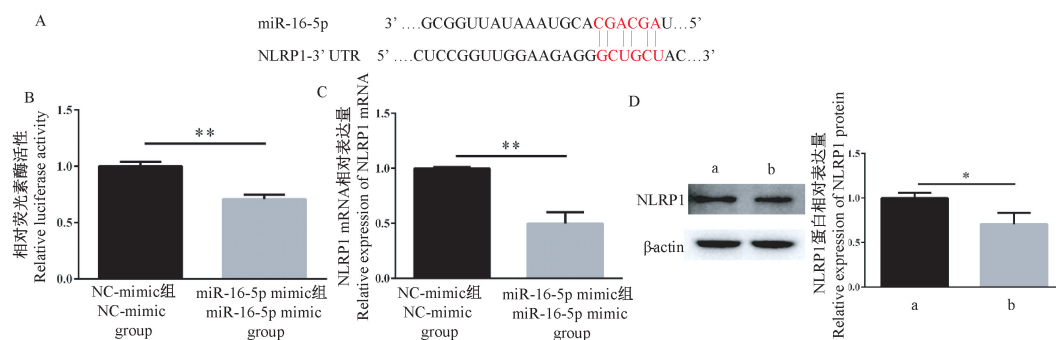
Figure 3 Effect of miR-16-5p on the expression of Caspace1, IL-1β and IL-18 in BRL-3A cells

荧光素酶报告系统检测荧光活性。结果如图 4B 显示, miR-16-5p mimic 组相对荧光活性极显著低于 NC-mimic 组 ($P < 0.01$)。此外, 过表达 miR-16-5p 极显著降低了 NLRP1 的 mRNA 水平 ($P < 0.01$) (图 4C), 显著降低了 NLRP1 的蛋白水平 ($P < 0.05$) (图 4D)。

2.5 miR-16-5p 通过调控 NLRP1 抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡

为进一步探讨 miR-16-5p 靶基因 NLRP1 在细胞焦亡中的作用, 本研究通过小 RNA 干扰技术干扰 NLRP1 在 BRL-3A 细胞中的表达 (图 5A), 与 si-NC 组相比, si-NLRP1 组 NLRP1 蛋白水平极显著

降低 ($P < 0.01$); 与 ov-NC 组相比, ov-NLRP1 组 NLRP1 蛋白水平极显著增加 ($P < 0.01$)。随后通过流式细胞术检测 miR-16-5p/NLRP1 轴对 BRL-3A 细胞焦亡的影响。如图 5B 所示, si-NLRP1 组与 miR-16-5p mimic 组 PI+Caspace1 阳性率极显著低于模型组 ($P < 0.01$); ov-NLRP1 组 PI+Caspace1 阳性率极显著高于模型组 ($P < 0.01$); 过表达 NLRP1 极显著逆转了 miR-16-5p mimic 对 BRL-3A 细胞焦亡的抑制作用 ($P < 0.01$) (图 5B)。提示 miR-16-5p 通过调控 NLRP1 能抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡。

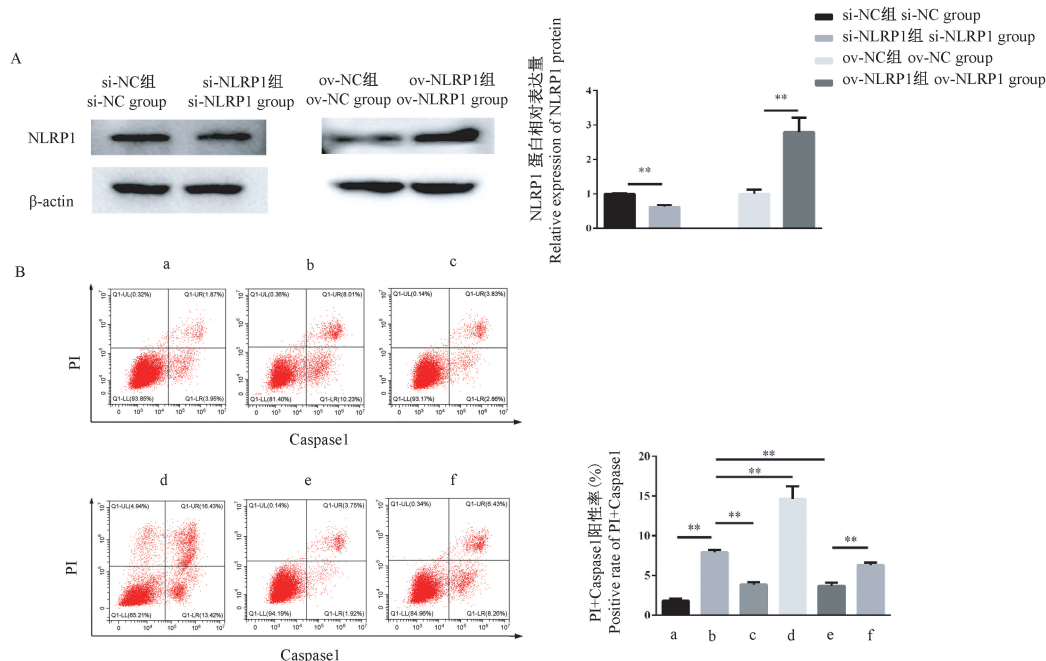


注:A;NLRP1 3' UTR 与 miR-16-5p 的潜在结合位点;B:将连有 NLRP1 3' UTR 的双荧光素酶报告载体与 NC-mimic/miR-16-5p mimic 共同转染 293T 细胞,证实 NLRP1 是 miR-16-5p 的靶基因;C:RT-qPCR 检测 miR-16-5p 对 NLRP1 mRNA 表达的影响;D:Western blot 检测 miR-16-5p 对 NLRP1 蛋白表达的影响。a:NC-mimic 组;b:miR-16-5p mimic 组。与 NC-mimic 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 miR-16-5p 直接靶向 NLRP1 并抑制 NLRP1 的表达

Note. A, Sequence of the binding sites between NLRP1 3' UTR and miR-16-5p. B, NLRP1 3' UTR, connected to the luciferase coding region, were transfected into 293T cells with NC-mimic or miR-16-5p mimic to confirm NLRP1 is the target gene of miR-16-5p. C, RT-qPCR was used to detect the effect of miR-16-5p on NLRP1 mRNA expression. D, Western blot was used to detect the effect of miR-16-5p on NLRP1 protein expression. a, NC-mimic group. b, miR-16-5p mimic group. Compared with the NC-mimic group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 miR-16-5p directly targets NLRP1 and inhibits the expression of NLRP1



注:A:Western blot 检测 NLRP1 的过表达和干扰效率;B:流式细胞术检测 miR-16-5p/NLRP1 轴对 BRL-3A 细胞 PI+Caspase1 阳性率的影响;a:空白对照组;b:模型组;c:si-NLRP1 组;d:ov-NLRP1 组;e:miR-16-5p mimic 组;f:miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 组。与模型组或 miR-16-5p mimic 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 5 NLRP1 对缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡的影响

Note. A, Western blot was used to detect the interference and overexpression efficiency of NLRP1. B, Flow cytometry was used to detect the effect of miR-16-5p/NLRP1 axis on the positive rate of PI+Caspase1 in BRL-3A cells. a, Blank control group. b, Model group. c, si-NLRP1 group. d, ov-NLRP1 group. e, miR-16-5p mimic group. f, miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 group. Compared with the model group or the miR-16-5p mimic group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of miR-16-5p/NLRP1 axis on pyrolysis induced by hypoxia/reoxygenation in BRL-3A cells

2.6 miR-16-5p 通过抑制 NLRP1 调控 BRL-3A 细胞 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达

如图 6 所示,与模型组相比,与 si-NLRP1 组 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达量极显著下调 ($P < 0.01$),ov-NLRP1 组 Caspase1、IL-18 表达量极显著上调 ($P < 0.01$),IL-1 β 表达量显著上调 ($P < 0.05$)。与 miR-16-5p mimic 组相比,miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 组 Caspase1、IL-18 表达量显著上调 ($P < 0.05$),IL-1 β 表达量极显著上调 ($P < 0.01$)。

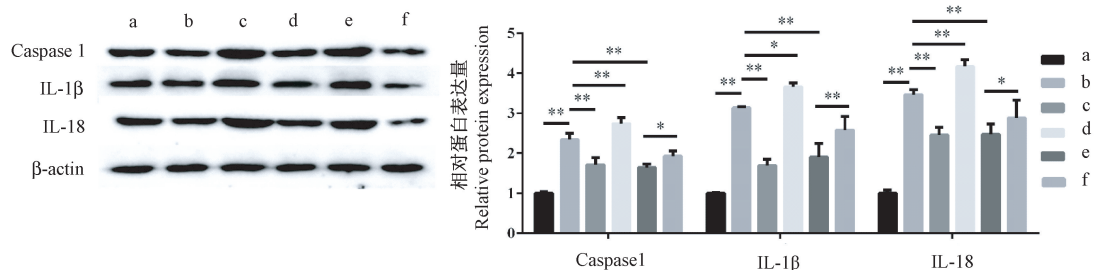
3 讨论

目前,关于 HIRI 仍旧缺乏有效干预手段^[17]。最近的研究表明,细胞焦亡途径可能是 HIRI 发展中的关键因素。在本研究中,通过对正常大鼠肝细胞系 BRL-3A 进行缺氧复氧处理,建立 HIRI 体外模型。本研究发现,缺氧复氧能导致 caspase1/PI 阳性率的增加,caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平上升,提示缺氧复氧诱导肝细胞焦亡模型构建成功。

本研究发现缺氧复氧能导致肝细胞中 miR-16-5p 的表达水平下降,提示 miR-16-5p 可能与缺氧复氧诱导肝细胞损伤有关。Zhang 等^[18]发现 miR-16-5p 通过靶向细胞因子诱导的细胞凋亡抑制剂 1 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1, CIAPIN1) 调节核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路介导的炎症从而改善缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤。而 Chen 等^[19]发现 miR-16-5p 通过靶向 B 细胞淋巴瘤 2 基因 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 加剧了肾的缺血再灌注损伤。但 miR-16-5p 在缺氧复氧诱导的肝细胞损伤的作用尚不明确。本研究运用

miR-16-5p mimic 在肝细胞中过表达了 miR-16-5p,发现过表达 miR-16-5p 能显著降低 caspase1/PI 阳性率,并抑制 caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平,提示 miR-16-5p 可以有效抑制缺氧复氧诱导的肝细胞焦亡从而改善细胞损伤。

为了进一步研究 miR-16-5p 抑制细胞焦亡的机制,通过 Targetscan 在线软件预测了 miR-16-5p 的潜在靶基因,发现 NLRP1 的 3' UTR 与 miR-16-5p 存在潜在结合关系。接下来,我们通过双荧光素酶报告基因实验确定了 NLRP1 为 miR-16-5p 的靶基因,过表达 miR-16-5p 能显著降低 NLRP1 的 mRNA 和蛋白表达水平。NLRP1 属于 Nod 样受体家族,与凋亡相关斑点样蛋白 (Apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 以及 caspase1 一同构成炎症小体复合物,炎症小体的激活诱导 caspase1 的活化,caspase1 诱导细胞膜膨胀破裂并促进 IL-1 β 、IL-18 的成熟和释放,导致细胞焦亡^[20-21]。Tan 等^[22]发现颞叶癫痫患者海马区中 NLRP1 与 caspase1 蛋白表达升高,在癫痫小鼠模型中干扰 NLRP1 与 caspase1 的表达可以显著降低神经元焦亡。李嵘等^[23]发现 miR-497 可以靶向 NLRP1 抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞焦亡。但 NLRP1 是否参与了缺氧复氧诱导的肝细胞焦亡尚不清楚。本研究通过小 RNA 干扰技术干扰 NLRP1 在肝细胞中的表达水平,发现降低 NLRP1 的表达可以抑制 caspase1/PI 阳性率,并下调 caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平。与之相反,过表达 NLRP1 进一步促进了缺氧复氧导致的 caspase1/PI 阳性率增加,上调 caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平,并逆转了 miR-16-5p 对焦亡的抑制作用,提示 NLRP1 可能是缺氧复氧诱导的肝细胞焦



注:a:空白对照组;b:模型组;c:si-NLRP1 组;d:ov-NLRP1 组;e:miR-16-5p mimic 组;f:miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 组。与模型组或 miR-16-5p mimic 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 6 miR-16-5p/NLRP1 轴对 BRL-3A 细胞 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达的影响

Note. a, Blank control group. b, Model group. c, si-NLRP1 group. d, ov-NLRP1 group. e, miR-16-5p mimic group. f, miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 group. Compared with the model group or the miR-16-5p mimic group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of miR-16-5p/NLRP1 axis on the expression of Caspase1, IL-1 β and IL-18 in BRL-3A cells

亡过程中的关键因子,而 miR-16-5p 通过抑制 NLRP1 的表达来抑制缺氧复氧诱导的肝细胞焦亡。

综上,本研究发现 miR-16-5p 能够抑制 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达改善缺氧复氧引起的 BRL-3A 细胞焦亡,其机制可能是通过靶向调控 NLRP1 的表达。

参考文献:

- [1] Arkadopoulos N, Deftereos G, Nastos C, et al. Development of a porcine model of post-hepatectomy liver failure [J]. J Surg Res, 2011, 170(2): e233-e242.
- [2] Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, et al. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock; the role of hypoxemic resuscitation [J]. PloS One, 2012, 7(3): e32968.
- [3] Lu TF, Yang TH, Zhong CP, et al. Dual effect of hepatic macrophages on liver ischemia and reperfusion injury during liver transplantation [J]. Immune network, 2018, 18(3): e24.
- [4] 沈洁, 从长慧. 异氟烷预处理对大鼠肝缺血再灌注时脑线粒体钙及线粒体转运通道的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(3): 25-29.
- [5] Van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, et al. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(3): 394-400.
- [6] Kretschmar M, Krüger A, Schirrmeyer W. Hepatic ischemia-reperfusion syndrome after partial liver resection (LR): hepatic venous oxygen saturation, enzyme pattern, reduced and oxidized glutathione, procalcitonin and interleukin-6 [J]. Exp Toxicol Pathol, 2003, 54(5-6): 423-431.
- [7] 王小莹, 申丽娟, 刘作金. 细胞焦亡与肝脏缺血再灌注损伤 [J]. 重庆医学, 2019, 48(18): 3184-3187.
- [8] 孙向丽. PGAM5/Caspase-1 介导细胞焦亡参与肝脏缺血再灌注损伤的机制研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2019.
- [9] 谷保红. 细胞焦亡在小鼠肝脏缺血再灌注损伤中的作用研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [10] Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages [J]. Nature, 1992, 358(6382): 167-169.
- [11] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2): 99-109.
- [12] Chou J, Shahi P, Werb Z. microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment [J]. Cell cycle, 2013, 12(20): 3262-3271.
- [13] 王艳, 赵然尊, 陈攀科, 等. 微小 RNA-214 改善高糖诱导的 H9c2 细胞焦亡的机制探讨 [J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(10): 820-828.
- [14] Xue Z, Xi Q, Liu H, et al. miR-21 promotes NLRP3 inflammasome activation to mediate pyroptosis and endotoxic shock [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 461.
- [15] Gehrau RC, Mas VR, Dumur CI, et al. Regulation of molecular pathways in ischemia-reperfusion injury after liver transplantation [J]. Transplantation, 2013, 96(10): 926-934.
- [16] Yang Y, Yang F, Yu X, et al. miR-16 inhibits NLRP3 inflammasome activation by directly targeting TLR4 in acute lung injury [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108664.
- [17] Jiménez-Castro MB, Comide-Petronio ME, Gracia-Sancho J, et al. Inflammasome-mediated inflammation in liver ischemia-reperfusion injury [J]. Cells, 2019, 8(10): 1131.
- [18] Zhang HJ, Zhang YN, Teng ZY. Downregulation of miR-16 protects H9c2(2-1) cells against hypoxia/reoxygenation damage by targeting CIAPIN1 and regulating the NF- κ B pathway [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3113-3122.
- [19] Chen HH, Lan YF, Li HF, et al. Urinary miR-16 transactivated by C/EBP β reduces kidney function after ischemia/reperfusion-induced injury [J]. Sci Rep, 2016, 6: 27945.
- [20] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. Cell, 2010, 140(6): 821-832.
- [21] 丁世彬, 高丽云, 李玉春, 等. 慢性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠肺组织炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 444-449.
- [22] Tan CC, Zhang JG, Tan MS, et al. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 18.
- [23] 李嵘, 郑昊林, 田秀娟, 等. microRNA-497 在肾小球系膜细胞焦亡中的作用及机制 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(6): 533-538.

[收稿日期] 2020-09-11