

杜文雅,代禹美,乐林芝,等. miR-207 调控结核分枝杆菌在巨噬细胞内存活的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (12): 41-49.

Du WY, Dai YM, Yue LZ, et al. Mechanistic study of miR-207 regulation of *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(12): 41-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.12.005

miR-207 调控结核分枝杆菌在巨噬细胞内存活的机制研究

杜文雅,代禹美,乐林芝,马涛,吴利先*

(大理大学基础医学院微生物学与免疫学教研室,云南大理 671000)

【摘要】 目的 miR-207 在许多疾病中存在差异性表达,探究 miR-207 过表达对调控结核分枝杆菌(H37Ra)在巨噬细胞内存活的机制研究,为结核病的靶向治疗提供理论基础。方法 将实验分为4组:空白组(Ana-1 细胞)、对照组(感染 H37Ra 的细胞)、mi 组(感染 H37Ra 并转染 miRNA-207 mimics)和 mi-NC 组(感染 H37Ra 并转染 mimics NC)。使用 H37Ra 感染 Ana-1 细胞建立结核感染模型,使用脂质体转染法将 miRNA-207 mimics 和 mimics NC 转入 Ana-1 细胞。结核菌落形成单位计数评估 miR-207 对胞内分枝杆菌负荷的影响以及对胞外残留分枝杆菌的清除作用。采用流式细胞术检测细胞总凋亡率。实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测 miR-207、细胞凋亡基因、焦亡基因、炎症基因及自噬基因相对表达量。Western blot 检测细胞凋亡蛋白、焦亡蛋白、自噬蛋白的相对表达量。采用荧光显微镜及多功能酶标仪检测细胞内 ROS 的荧光强度,以及检测细胞内 LDH 的含量。结果 显微镜下观察成功建立感染模型,qPCR 检测发现对照组 miR-207 表达量低于空白组($P<0.01$),表明 miR-207 在空白组和对照组中差异性表达,mi 组 miR-207 表达量显著高于 mi-NC 组($P<0.0001$),表明成功建立转染模型。菌落形成单位计数发现 mi 组的菌落数高于 mi-NC 组和对照组($P<0.001$)。流式细胞术检测发现 mi 组总凋亡高于 mi-NC 组和对照组($P<0.05$)。qPCR 及 Western blot 检测发现对照组凋亡基因和凋亡蛋白相对表达量高于空白组($P<0.05$),mi 组高于 mi-NC 组($P<0.05$)。对照组炎症基因相对表达量高于空白组($P<0.001$),mi 组高于 mi-NC 组($P<0.05$),对照组焦亡基因和焦亡蛋白相对表达量高于空白组($P<0.01$),mi 组高于 mi-NC 组($P<0.05$)。自噬正调节基因 LC3 和 Beclin1 在对照组的相对表达量高于空白组($P<0.0001$),mi 组低于 mi-NC 组($P<0.05$)。负调节自噬基因相对表达量与自噬正调节基因趋势相反。自噬相关蛋白相对表达量与自噬基因趋势一致。ROS 荧光强度检测发现对照组的荧光强度高于空白组($P<0.05$),mi 组高于 mi-NC 组($P<0.001$)。LDH 检测发现对照组细胞内 LDH 含量高于空白组($P<0.01$),mi 组与 mi-NC 组含量无统计学意义($P>0.05$)。结论 miR-207 过表达促进细胞凋亡、细胞焦亡及炎症、抑制自噬,有利于 H37Ra 的存活,为结核病的治疗提供新的方向。

【关键词】 结核分枝杆菌;H37Ra;miR-207;自噬;巨噬细胞;凋亡;焦亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 12-0041-09

Mechanistic study of miR-207 regulation of *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages

DU Wenya, DAI Yumei, YUE Linzhi, MA Tao, WU Lixian*

(Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

[基金项目] 云南省地方本科高校基础研究重点项目(202101BA070001-038)。

[作者简介] 杜文雅(2001—),女,硕士研究生,研究方向:感染与免疫。E-mail:huanxi202203@163.com

[通信作者] 吴利先(1972—),女,博士,教授,研究方向:感染与免疫。E-mail:w_lixian@163.com

[Abstract] Objective miR-207 is differentially expressed in many diseases. We investigated the mechanism by which miR-207 overexpression regulates the survival of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) in macrophages, to provide a theoretical basis for the targeted therapy of tuberculosis. **Methods** Macrophages were divided into four groups: blank (Ana-1 cells), control (cells infected with H37Ra), mi (infected with H37Ra and transfected with miRNA-207 mimics), and mi-NC (infected with H37Ra and transfected with NC mimics) groups. A model of tuberculosis infection was established using H37Ra-infected Ana-1 cells, and miRNA-207 and NC mimics were transfected into Ana-1 cells using the liposome transfection method. Tuberculosis colony-forming units were counted to assess the effect of miR-207 on intracellular mycobacterial load and clearance of extracellular residual mycobacteria. The total apoptosis rate was detected by flow cytometry. The relative expression levels of miR-207 and apoptosis, pyroptosis, inflammation, and autophagy genes were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Relative expression levels of apoptosis, pyroptosis, and autophagy proteins were detected by Western blot. Fluorescence microscopy and multifunctional enzyme labeling were used to detect the fluorescence intensity of intracellular reactive oxygen species (ROS) and lactate dehydrogenase (LDH). **Results** Successful establishment of the infection model was observed under the microscope. qPCR showed that miR-207 expression was lower in the control compared with the blank group ($P < 0.01$), indicating differential expression between these two groups. miR-207 expression was significantly higher in the mi compared with the mi-NC group ($P < 0.0001$), indicating successful establishment of the transfection model. The number of colonies and total apoptosis were both higher in the mi group compared with the mi-NC and control groups ($P < 0.001$). qPCR and Western blot showed that the relative expression levels of apoptotic genes and proteins were higher in the control group than in the blank group ($P < 0.05$), and higher in the mi group than in the mi-NC group ($P < 0.05$). The relative expression levels of inflammatory genes were higher in the control than in the blank group ($P < 0.001$). The relative expression levels of inflammatory genes were higher in the mi group than in the mi-NC group ($P < 0.05$), and the relative expression levels of pyroptosis genes and proteins were higher in the control group compared with the blank group ($P < 0.01$) and higher in the mi group compared with the mi-NC group ($P < 0.05$). The relative expression levels of the autophagy positively-regulated genes LC3 and Beclin1 were higher in the control compared with the blank group ($P < 0.0001$), and lower in the mi than in the mi-NC group ($P < 0.05$), while negatively-regulated autophagy genes showed the opposite trend. Autophagy-related proteins showed similar trends to the autophagy genes. ROS fluorescence intensity was higher in the control compared with the blank group ($P < 0.05$), and higher in the mi compared with the mi-NC group ($P < 0.001$). LDH content was higher in the control than in the blank group ($P < 0.01$), but there was no significant difference between the mi and mi-NC groups ($P > 0.05$). **Conclusions** miR-207 overexpression promotes apoptosis, cellular pyroptosis, and inflammation, inhibits autophagy, and favors H37Ra survival. These results provide a potential new direction for the treatment of tuberculosis.

[Keywords] *Mycobacterium tuberculosis*; H37Ra; miR-207; autophagy; macrophage; apoptosis; pyroptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结核病是一种由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染, 可预防且通常可治愈的疾病。然而, 在 2022 年, 结核病是仅次于 2019 冠状病毒病 (COVID-19) 的世界第二大单一传染病死亡原因, 造成的死亡人数几乎是艾滋病的两倍。每年仍有 1000 多万人患结核病^[1]。微小 RNA (miRNA) 被表明在许多感染性疾病中具有重要作用, 如抑制 miR-125b-5p 表达能上调自噬调节因子 2 表达, 减轻受 MTB 感染的人巨噬细胞的炎症反应和凋亡抑制作用^[2], miR-20b-5p 水平上调负调控 Mcl-1 的表达抑制巨噬细胞中 MTB 的存活, 而 miR-20b-5p 水平下调增强巨噬细胞中 MTB 的存活能力^[3]。miR-207 被表明在许多疾病中差异性表达, 通过靶向降低靶基因表达水平, 如靶向溶酶体相关膜蛋白 2

(lysosomal-associated membrane protein 2, LAMP2)、具有富含亮氨酸重复的 TLR4 相互作用物 (TLR4 interactor with leucine-rich repeats, Tril) 在疾病进程中具有重要作用^[4-6], 但并无有关 miR-207 在感染性疾病中的研究。巨噬细胞是 MTB 的主要宿主细胞, 不仅为 MTB 提供生存场所, 也会启动一系列免疫机制抗 MTB, 是抗 MTB 感染的重要防线之一。本文主要探究 miR-207 过表达对感染 MTB 的巨噬细胞的机制研究, 为抗结核治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

小鼠巨噬细胞 (Ana-1) 购于上海赛百慷生物技

术有限公司。

1.1.2 菌株

MTB 减毒株 H37Ra 由大理大学微生物与免疫教研室保存。

1.2 主要试剂与仪器

特级胎牛血清 (Vivacell, C04001); Lipo8000 转染试剂 (Beyotime, C0533); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (Beyotime, P0015L); TritonX-100 (Biosharp, BS084); 12.5% PAGE 凝胶制备试剂盒 (雅酶, PG113); miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (TIANGEN, KR211); miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green) (TIANGEN, FP411); miRNA 检测外参 (TIANGEN, CR100-01); 外参检测引物 (TIANGEN, CD200-01); mmu-miR-207 反向引物 (TIANGEN, CD109); 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase LDH) 活性检测试剂盒 (Solarbio, BC0685); 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (Solarbio, CA1410); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio, PC0020); 彩虹 130 广谱蛋白 marker (Solarbio, PR1950); 超敏 ECL 化学发光检测试剂盒 (Proteintech, PK10003); Annexin V CoraLite488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (Proteintech, PF00005); RNA-easy Isolation Reagent (Vazyme, R701-02); ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, Q711-02); HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme, R333-01)。mmu-miRNA-207 mimics 序列号: sense 5'-GCUUCUCCUGGCUCUCCUCCC UC-3'; antisense 5'-GGGAGGAGAGCCAGG AGAAGCUU-3'。mimics NC 序列号: sense 5'-UUGUACUACA CAAAAGUACUG-3'; antisense 5'-GUACUUUUGUG UAGUACAAUU-3' 及引物序列 (表 1) 均由上海生工生物公司设计合成。Caspase-3 (14220S)、Caspase-8 (4790S)、Caspase-9 (9504S)、Cleaved caspase-1 (89332S)、ASC (67824S)、NLRP3 (15101S)、Gasdermin D (39754S)、 β -actin (4970S)、GAPDH (5174S) 均购 Cell signaling technology 公司; P62 (T55546)、Beclin1 (T55092)、LC3B (T55992) 均购于 Abmart 公司。

超声细菌分散计数仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 型号: SCIENTZ-CF); 隔水式恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司, 型号: GHP-9160); 低温高速离心机 (Eppendorf, 型号: 1730R); 化学发光成像系统 (GE 医疗, 型号: Image1Quant); 实时荧光定量

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 qPCR primer sequences

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
Caspase-3	F: ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT R: TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC
Caspase-8	F: TGCTGGACTACATCCCACAC R: TGCAGTCTAGGAAGTTGACCA
Caspase-9	F: TCCTGGTACATCGAGACCTTG R: AAGTCCCTTTCCGAGAAACAG
Caspase-1	F: ACAAGGCACGGGACCTATG R: TCCCACTCAGTCTCGAAATG
IL-6	F: CCTGAGACTCAAGCAGAAATGG R: AGAAGGAAGGTCGGCTTCAGT
TNF- α	F: GACGTGGAAGTGCAGAAGAG R: TTGGTGGTTGTGAGTGTGAG
IL-1 β	F: GCAACTGTTCTGAACTCAACT R: ATCTTTTGGGCTCCGTC AACT
ASC	F: CTTGTCCAGGGATGAACTCAAAA R: GCCATACGACTCCAGATAGTAGC
NLRP3	F: ATTACCCGCCGAGAAAGG R: TCGCAGCAAAGATCCACACAG
Gasdermin D	F: GCTCGACTCTGAGAACTGG R: CCAAGCGTGTTCACCAAC
P62	F: GCACAGGCACAGAAGACAAGAG R: CCCACCGACTCCAAGGCTATC
Beclin1	F: AAGCCAAGATTGAAGACACTGGAG R: TGAGGACACCCAAGCAAGACC
LC3B	F: GAGCGAGTTGGTCAAGATCATCC R: TCCGTCTTCATCTTCTCCTGTTC
β -actin	F: GGCTGTATCCCTCCATCG R: CCAGTTGGTAAACAATGCCATGT
mmu-miR-207	F: TGCTTCTCCTGGCTCTCCTCCCT

PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 仪 (Applied Biosystems, 型号: STEPONE); 多功能酶标仪 (型号: SynergyHT)、连续波长酶标仪 (型号: powerwave1XS)、超微量分光光度计 (型号: Nano drop2000) 均购于基因有限公司; 垂直电泳系统 (型号: WIX-easyPRO2)、蛋白电泳转印系统 (型号: WIX-miniBLOT) 均购于韦克斯科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将 Ana-1 细胞放入含有 10% 胎牛血清、1% 双抗、RPMI1640 的完全培养基中, 并在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 复苏至对数生长期且状态良好后以 2 \times 10⁵/孔接种至 24 孔细胞培养板中进行铺板, 24 h 后观察细胞密度, 达到 70%~80% 后进行转染。

1.3.2 H37Ra 培养

将-80℃保存的甘油菌解冻,接种至罗氏培养基,37℃温箱培养3~4周,生长至对数期,收集菌落并用超声细菌分散计数仪将菌落超散,并检测菌液浓度,用于建立感染模型。

1.3.3 细胞转染与感染模型建立

按照 Lipo8000 转染试剂说明书配置转染复合物,分别加入空白组(Ana-1 细胞)、对照组(感染 H37Ra 的细胞)、mi 组(感染 H37Ra 并转染 miRNA-207 mimics)、mi-NC 组(感染 H37Ra 并转染 mimics NC)各组细胞中,轻轻晃匀后在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 6 h,随后将培养基换成预热好的 RPMI 1640 不含双抗培养基继续培养 18 h,用 qPCR 测转染效率,继续培养 24 h 后,用不含双抗的培养基以感染系数(multiplicity of infection, MOI)为 10 的比例配置菌悬液,分别加入各组中 5 h 后用 PBS 清洗 3 次,洗去胞外菌,拿出爬片用抗酸染色观察感染情况,或继续培养 48 h 后测相关基因及蛋白的表达量。

1.3.4 菌落形成单位(colony forming unit, CFU)计数法

将 1.3.3 处理好的各组细胞收集至离心管中,并用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次。用 0.1%的 TritonX-100 消化并破碎细胞,经过 10 倍梯度稀释,接种在罗氏培养基上,并在 37℃孵育 3~4 周,计数 CFU 以探究 miR-207 过表达在 H37Ra 感染巨噬细胞中的作用。

1.3.5 qPCR

按照 Vazyme 的总 RNA 提取试剂提取总 RNA,若需检测 miRNA 的转染效率则需在提取 RNA 时加入 TIANGEN 的 miRNA 检测外参,并按照 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒进行 cDNA 的合成,miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)上机检测。若检测凋亡和炎症相关基因的表达则按照 Vazyme 公司的 cDNA 合成及加样上机检测。

1.3.6 蛋白免疫印迹(Western blot)

用 RIPA 裂解液裂解细胞,用 BCA 试剂盒测蛋白浓度,并将 5X 的 SDS-PAGE 上样缓冲液用浓度一致的蛋白样本稀释成 1X 的备用。根据雅酶制胶试剂盒说明书配置上层胶及下层胶,冷却凝固后备用。将准备好的蛋白样本及凝胶转移至电泳槽后以恒压 80 V 将样本跑离上层胶,随后将电压调为

120 V 跑至下层胶的 2/3 处,切胶、恒流 300 mA 电转至 0.45 μm PVDF 膜上,随即用 TBST 配置好的脱脂奶粉封闭 2 h,用 1×TBST 以 10 min 洗 4 次,敷上对应的特异性一抗,4℃摇床过夜以 10 min 洗 4 次后,二抗孵育 1 h 后同样时间洗 4 次,随即配置显影液显影。

1.3.7 细胞内 ROS 检测

按照 ROS 检测试剂盒说明书,制备检测样本,提前预热多功能酶标仪,设置通道激发波长及发射波长,将待测样本加入荧光酶标板中,上机检测。

1.3.8 LDH 分泌检测

按照 LDH 检测试剂盒说明书制定标准曲线、测定管和对照管,450 nm 下测定吸光度(A), $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。LDH 分泌量计算:计算样本丙酮酸的含量,即将 ΔA 带入回归方程中(y),计算 x 值/(μmol/mL)。按照 BCA 检测试剂盒测出每组蛋白质浓度。细胞 LDH 活力的计算单位的定义即每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。 $LDH/(U/mg \text{ prot}) = x \div T \div C_{\text{pr}} \times 10^3 = 66.7 \times x \div C_{\text{pr}}$ (T:反应时间,15 min;C_{pr}:蛋白质浓度/(mg/mL))。

1.3.9 流式细胞术

按照 Annexin V CoraLite488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒制备样本,每组准备 3 个复孔,将样本置于冰上等待上机检测,重复 3 次。

1.4 统计学方法

使用 Image J-win 64 软件定量蛋白灰度值,flowjo v10 分析细胞凋亡状态,Graphpad Prism 8.0.2 软件比较组间差异绘制柱状图,定量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,Adobe Photoshop 2020 进行图片绘制。

2 结果

2.1 H37Ra 感染巨噬细胞模型的建立

使用抗酸染色进行染色,显微镜下观察,红色箭头代表吞噬 H37Ra 的巨噬细胞,黑色箭头代表 H37Ra(图 1)。表明已成功建立巨噬细胞感染模型。

2.2 miR-207 在各组之间的表达量

qPCR 分析结果表明,H37Ra 感染的对照组 miR-207 表达量显著低于空白组中 miR-207 表达量($P < 0.01$),表明 miR-207 对感染 H37Ra 的 Ana-1 细胞有影响,转染 miR-207 mimics 的 mi 组相较于转染

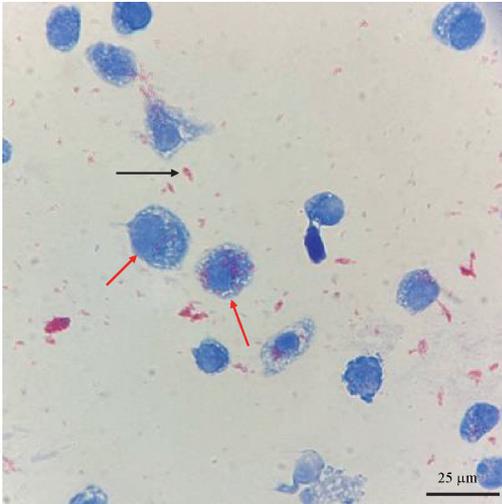


图 1 巨噬细胞感染模型

Figure 1 Models of infection in macrophages

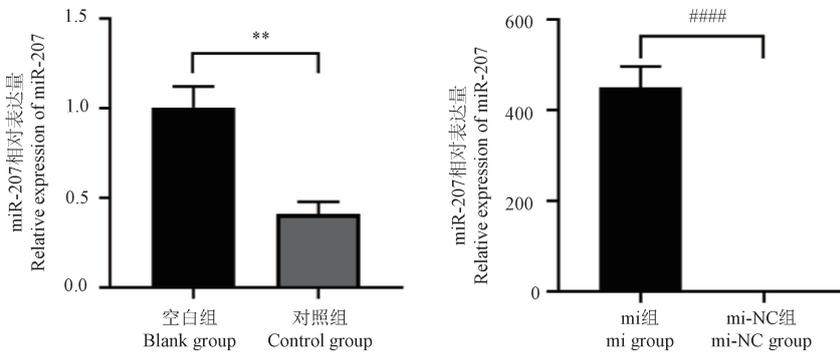
mimics-NC 的 mi-NC 组其表达量显著上调 ($P < 0.0001$) (图 2), 表明成功建立转染模型。

2.3 miR-207 过表达有利于 H37Ra 存活

使用 CFU 评估该处理因素是否有利于 MTB 存活。图 3A 为 H37Ra 在罗氏培养基上的生长状态, 使用统计学分析 H37Ra 在各处理因素下菌落计数的柱状图, 可见 mi 组的菌落数显著高于对照组和 mi-NC 组 ($P < 0.001$) (图 3B)。表明 miR-207 过表达有利于 H37Ra 存活。

2.4 miR-207 过表达促进细胞的凋亡

如图 4 所示, 通过流式细胞术检测细胞凋亡水平, 发现 mi 组中细胞总凋亡率显著高于 mi-NC 组和对照组 ($P < 0.05$)。qPCR 检测发现 mi 组凋亡相关基因 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的相对表达量显著高于 mi-NC 组, 空白组中凋亡基因的相对表

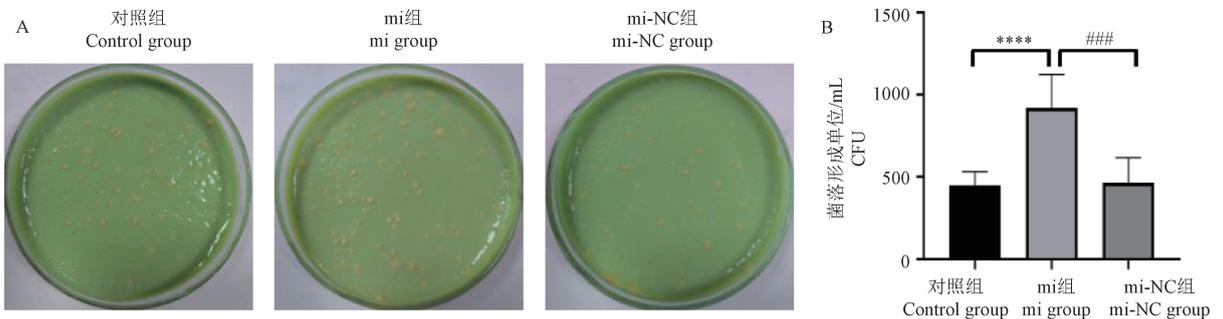


注: 与对照组相比, $** P < 0.01$; 与 mi-NC 组相比, $#### P < 0.0001$ 。

图 2 miR-207 各组的表达量

Note. Compared with control group, $** P < 0.01$. Compared with mi-NC group, $#### P < 0.0001$.

Figure 2 Expression of miR-207 in each groups



注: A: 不同组在罗氏培养基上 H37Ra 生长图; B: 菌落计数统计直方图。与对照组相比, $**** P < 0.0001$; 与 mi-NC 组相比, $### P < 0.001$ 。

图 3 miR-207 过表达对 H37Ra 存活的影响

Note. A, H37Ra growth graph of different groups on Roche medium. B, Histogram of colony counting statistics. Compared with control group, $**** P < 0.0001$. Compared with mi-NC group, $### P < 0.001$.

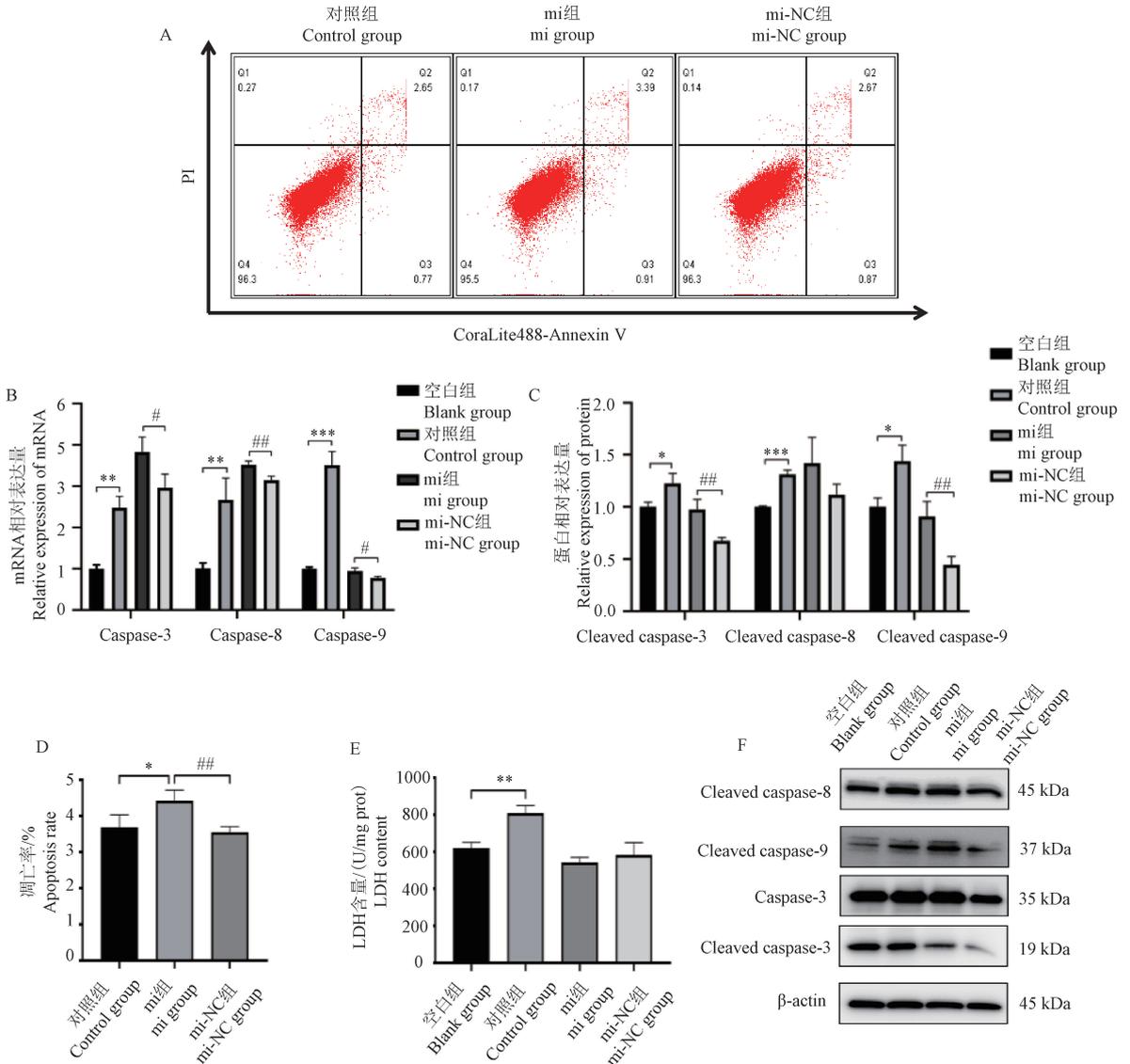
Figure 3 Effect of miR-207 overexpression on the survival of H37Ra

达量显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 4B)。LDH 检测可对细胞活性进行评价,细胞凋亡和坏死都会引发 LDH 升高。对照组细胞内 LDH 的量显著高于空白组 ($P < 0.01$),而 mi 组与 mi-NC 组的值相差不大,差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达量(图 4F)及灰度值计算结果(图 4C)与图 4B 所示趋势一致。以上结果表明过表达 miR-207 能增加 Ana-1 细胞内凋亡相关基因

和蛋白的表达,促进 H37Ra 感染细胞的凋亡。

2.5 miR-207 过表达增强细胞的炎症水平

qPCR 检测炎症相关基因 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的相对表达量(图 5A),对照组的相对表达量显著高于空白组 ($P < 0.001$),而 mi 组的相对表达量显著高于 mi-NC 组 ($P < 0.05$)。Cleaved caspase-1、ASC、NLRP3、Gasdermin D 是正调控焦亡通路的基因,同时也是正向调节炎症因子。焦亡相关基因在对照



注: A、D:流式细胞术测细胞凋亡状态;B:凋亡基因的相对表达量;C、F:凋亡蛋白的相对表达量;E:LDH 在细胞内的表达量。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 mi-NC 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 miR-207 过表达对细胞凋亡的影响

Note. A/D, Apoptosis status measured by flow cytometry. B, Relative expression of apoptotic genes. C/F, Relative expression of apoptotic proteins. E, LDH expression in cells. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with mi-NC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

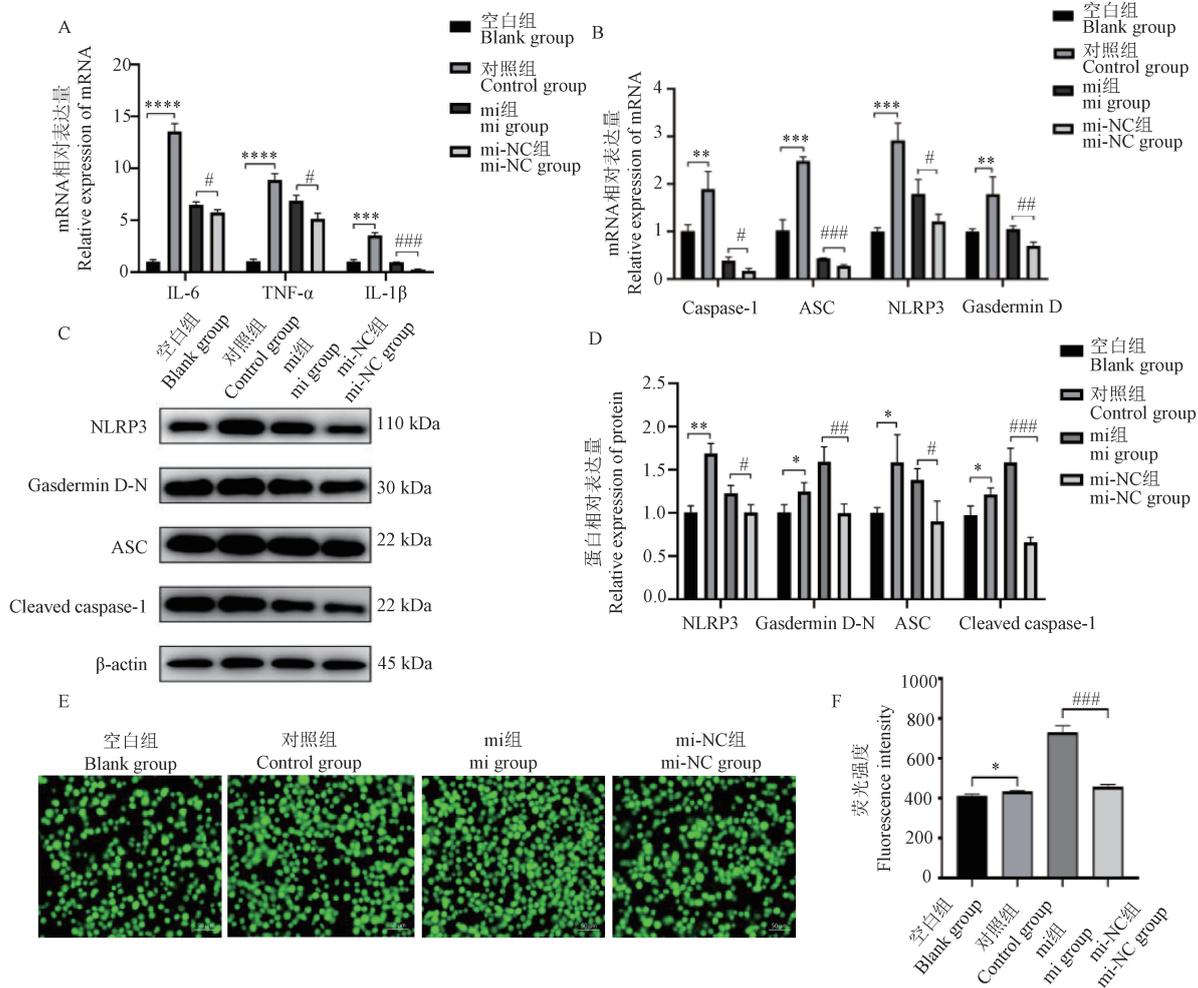
Figure 4 Effect of miR-207 overexpression on apoptosis

组的相对表达量显著高于空白组($P < 0.01$),而 mi 组的相对表达量高于 mi-NC 组($P < 0.05$) (图 5B)。通过 Western blot 检测焦亡蛋白表达水平(图 5C),分析软件分析其灰度值(图 5D),结果表明对照组的焦亡相关蛋白表达水平高于空白组($P < 0.05$),mi 组高于 mi-NC 组($P < 0.05$)。ROS 与细胞炎症水平息息相关,通过分析 ROS 荧光图(图 5E)及根据 ROS 荧光数据所作的柱状图(图 5F),发现对照组的 ROS 荧光强度显著高于空白组($P < 0.05$),mi 组的 ROS 荧光强度显著高于 mi-NC 组($P < 0.001$)。以上结果相互佐证,表明 miR-207 过表达增强感染

细胞的炎症水平。

2.6 miR-207 过表达抑制细胞的自噬水平

qPCR 检测自噬基因的相对表达水平发现正向调节自噬水平基因 LC3B、Beclin1 在对照组的表达量显著高于空白组($P < 0.0001$),mi 组低于 mi-NC 组($P < 0.05$) (图 6A),P62 为负调节蛋白在对照组的表达量显著低于空白组($P < 0.05$),mi 组显著高于 mi-NC 组($P < 0.001$)。通过 Western blot 检测自噬蛋白的表达量(图 6B)及其灰度值的结果(图 6C),与图 6A 趋势一致。提示过表达 miR-207 抑制细胞自噬。

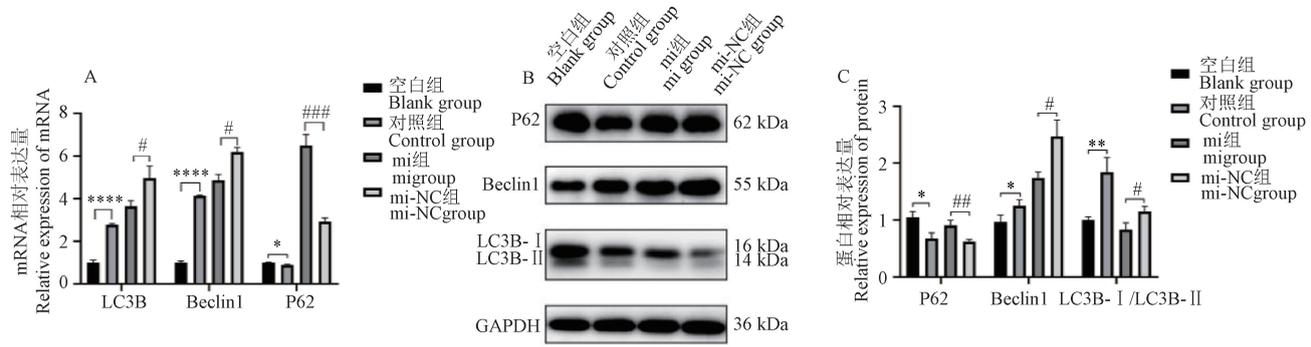


注:A:炎症基因的相对表达量;B:焦亡基因的相对表达量;C~D:焦亡蛋白的相对表达量;E~F:ROS 荧光强度表达量。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;与 mi-NC 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 5 miR-207 过表达对细胞炎症水平的影响

Note. A, Relative expression of inflammatory genes. B, Relative expression of pyroptosis genes. C~D, Relative expression of pyroptosis proteins. E~F, ROS fluorescence intensity expression. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with mi-NC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 5 Effect of miR-207 overexpression on the inflammation level



注:A:各组中自噬有关基因的相对表达量;B-C:自噬蛋白相对表达量。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$;与 mi-NC 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 6 miR-207 过表达对自噬水平的影响

Note. A, Relative expression of autophagy-related genes in each group. B~C, Relative expression of autophagy proteins. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. Compared with mi-NC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 6 Effect of miR-207 overexpression on autophagy levels

3 讨论

经历两年 COVID-19 相关干扰后,2022 年全球诊断出结核病并接受治疗的人数大幅回升。这已开始扭转和减轻 COVID-19 大流行对结核病死亡和患病人数的破坏性影响。2022 年全球结核病目标任务未能实现,仍偏离轨道,急需寻找一种新的抗结核方式^[7]。而 miRNA 和细胞自噬是近年来的热点,有研究表明 miRNA 在结核病发生发展中起作用^[8],以及作为诊断结核的生物标志物^[9]。

本研究使用 H37Ra 感染 Ana-1 细胞后,发现对照组的 miR-207 的表达量显著低于空白组,证明 miR-207 在 MTB 感染中差异性表达,与文献研究结果一致^[4,6,10],推测 miR-207 差异性表达可能在感染过程中产生影响。菌落计数结果发现 mi 组的菌落数高于 mi-NC 组和对照组,这表明 miR-207 过表达有利于 H37Ra 在巨噬细胞中存活。随即进行实验,探究其作用机制,细胞凋亡是细胞内程序性死亡,通过形成凋亡小体清除细胞内有害物质,不会诱导细胞产生炎症。通过将 miR-207 mimic 转染进 Ana-1 细胞内,获得高表达 miR-207 的 Ana-1 细胞,随后将其用 H37Ra 感染,通过流式细胞术发现 mi 组总凋亡率高于转染 mi-NC 组,主要表现为细胞晚期凋亡数量(Q2 区)存在差异,而 Q2 区所示为凋亡和坏死细胞总和。细胞内 LDH 水平与细胞凋亡以及坏死有关,同时调节细胞自噬方面也发挥重要作用^[11]。LDH 的检测表明 mi 组和 mi-NC 组差异无统计学意义,进一步证明 mi 组的凋亡率高于 mi-NC 组,Caspase-3 蛋白是细胞凋亡的重要调控蛋白,与

Caspase-9 介导死亡受体途径,与 Caspase-8 介导线粒体凋亡途径,结合凋亡基因和凋亡蛋白表达水平发现 mi 组 Caspase-3 和 Caspase-8 凋亡基因和凋亡蛋白的表达量比 mi-NC 组高,与 Xing 等^[6]和 Tan 等^[12]研究一致,对照组比空白组高。以上研究表明 miR-207 过表达可通过诱导线粒体凋亡途径的重要蛋白表达,促进细胞凋亡。

对炎症水平进行分析,细胞焦亡也是细胞程序性死亡的方式,伴有炎症因子的参与,与凋亡相似,表现为细胞核皱缩,外吐小泡以及 DNA 断裂;也与细胞坏死相似,细胞肿胀破裂释放内容物,进而引发炎症,释放 MTB 进一步加重感染,促进炎症。ROS 水平与细胞凋亡、炎症密切相关,ROS 水平升高会通过某些信号通路提高炎症水平,改变线粒体膜通透性,引发线粒体释放细胞凋亡因子,发生级联反应使细胞死亡^[13-14]。NLRP3 炎症小体能感知线粒体功能障碍,与细胞焦亡及炎症密切相关^[15],受 ROS 的正向调节,这更好地解释了线粒体损伤与炎症性疾病的关联性^[16]。本研究发现 mi 组炎症基因及焦亡基因焦亡蛋白的相对表达量明显高于 mi-NC 组,与 Li 等^[4]研究结果不同,考虑转染效率及转染细胞导致的差异,对照组高于空白组。mi 组 ROS 荧光强度高于 mi-NC 组,对照组高于空白组。ROS 荧光强度与细胞凋亡、炎症基因表达及细胞焦亡相互佐证。说明 miR-207 过表达通过增加 ROS 水平改变线粒体膜通透性,进而提高 NLRP3 的表达,促进细胞焦亡,增强细胞炎症水平。

自噬是一种分解代谢过程,其水平因饥饿、缺氧、细菌和病毒感染等胞内外应激增加,通过有效

清除代谢应激过程中产生的毒性因子缓解细胞压力并恢复稳态^[17]。细胞自噬是巨噬细胞清除 MTB 重要途径,巨噬细胞可以通过形成成熟的自噬溶酶体降解细菌,MTB 可以通过多种机制干扰宿主自噬,逃避巨噬细胞对其“灭杀”从而在宿主细胞内长期存活并繁殖。有研究通过双荧光素酶报告基因检测发现 miR-207 具有靶向自噬相关蛋白 LAMP2 的作用,降低 LAMP2 表达量,抑制自噬等作用^[6,10]。自噬正调节蛋白基因 LC3B 被蛋白酶切割后形成游离型 LC3B-I,在自噬发生时 LC3B-I 会与磷脂酰丝氨酸结合形成膜型 LC3B-II,表示自噬发生。Beclin1 能够介导其他自噬蛋白定位于吞噬泡,从而调节自噬体的形成与成熟。自噬负调节蛋白基因 P62 是反映自噬活性的标记蛋白之一。在自噬过程中 P62 与泛素化的蛋白结合,再与定位于自噬小体内膜上的 LC3B-II 蛋白形成复合物,共同在自噬溶酶体内降解。当自噬活性减弱、自噬功能缺陷时,P62 蛋白会在细胞质中不断累积,其含量间接反映自噬小体清除水平,在细胞发生自噬时表达量降低。自噬正调节蛋白基因 Beclin-1 和 LC3 相对表达水平以及负调节蛋白基因 P62 的相对表达水平随 miR-207 的表达水平发生变化,miR-207 的表达水平越低,正调节自噬相关基因表达量越高,负调节相关基因表达量越低,说明 miR-207 过表达抑制自噬。有研究表明 LDH 是与 Beclin-1 相关的糖酵解关键分子之一,LDH 抑制能减少乳腺癌细胞自噬,恢复细胞凋亡^[18]。自噬阻断会导致 ROS 的受损线粒体的积累,进而激活 NLRP3 炎症小体,自噬负向调节 NLRP3 炎症小体的活性,促进炎症。ROS 及 LDH 表达量也与自噬相关基因水平相互佐证。以上结论证明,miR-207 过表达促进凋亡、细胞焦亡及炎症、抑制自噬,从而利于 H37Ra 在巨噬细胞内存活。miR-207 可以靶向多个 mRNA 在疾病中产生作用,但并无研究证明 miR-207 通过靶向某一通路促进 MTB 存活,以及 miR-207 在其他疾病中的影响,或许未来可以通过靶向抑制 miR-207 的表达,起到抗结核治疗的作用。

参考文献:

[1] ANTÓNIO G. Sustainable Development Goals [M]. New York: United Nations, 2022.

[2] LIU G, WAN Q, LI J, et al. Silencing miR-125b-5p attenuates inflammatory response and apoptosis inhibition in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages by targeting DNA damage-regulated autophagy modulator 2 (DRAM2) [J]. Cell

Cycle, 2020, 19(22): 3182-3194.

- [3] ZHANG D, YI Z, FU Y. Downregulation of miR-20b-5p facilitates *Mycobacterium tuberculosis* survival in RAW 264.7 macrophages via attenuating the cell apoptosis by Mcl-1 upregulation [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 5889-5896.
- [4] LI D, WANG Y, JIN X, et al. NK cell-derived exosomes carry miR-207 and alleviate depression-like symptoms in mice [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 126.
- [5] CHAVELES I, ZARAVINOS A, HABEOS I G, et al. MicroRNA profiling in murine liver after partial hepatectomy [J]. Int J Mol Med, 2012, 29(5): 747-755.
- [6] XING R, LIU D, CHENG X, et al. MiR-207 inhibits autophagy and promotes apoptosis of cardiomyocytes by directly targeting LAMP2 in type 2 diabetic cardiomyopathy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 520(1): 27-34.
- [7] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2023 [M]. Geneva: World Health Organization, 2023.
- [8] YUAN Q, CHEN H, YANG Y, et al. MiR-18a promotes *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages via inhibiting autophagy by down-regulation of ATM [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(2): 2004-2012.
- [9] CARRANZA C, HERRERA M T, GUZMÁN-BELTRÁN S, et al. A dual marker for monitoring MDR-TB treatment: host-derived miRNAs and *M. tuberculosis*-Derived RNA sequences in serum [J]. Front Immunol, 2021, 12: 760468.
- [10] TAO J, LIU W, SHANG G, et al. MiR-207/352 regulate lysosomal-associated membrane proteins and enzymes following ischemic stroke [J]. Neuroscience, 2015, 305: 1-14.
- [11] URBANŠKA K, ORZECHOWSKI A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2085.
- [12] TAN P X, DU S S, REN C, et al. MicroRNA-207 enhances radiation-induced apoptosis by directly targeting Akt3 in cochlea hair cells [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(10): e1433.
- [13] HERB M, SCHRAMM M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity [J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 313.
- [14] RIUS-PÉREZ S, PÉREZ S, TOLEDANO M B, et al. Mitochondrial reactive oxygen species and lytic programmed cell death in acute inflammation [J]. Antioxid Redox Signal, 2023, 39(10/11/12): 708-727.
- [15] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [16] ZHOU R, YAZDI A S, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. Nature, 2011, 469(7329): 221-225.
- [17] BYRNES K, BLESSINGER S, BAILEY N T, et al. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(1): 33-49.
- [18] DAS C K, PAREKH A, PARIDA P K, et al. Lactate dehydrogenase A regulates autophagy and tamoxifen resistance in breast cancer [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(6): 1004-1018.