

微小 RNA-455-3p 调控 Toll 样受体 4 对哮喘大鼠气道平滑肌细胞的影响

薛梅, 廖怡, 卢薇

(四川省成都市中西医结合医院 儿科, 四川 成都, 610000)

摘要: **目的** 探讨微小 RNA-455-3p(miR-455-3p)对哮喘大鼠气道平滑肌细胞(ASMC)增殖、凋亡及炎症因子分泌功能的影响及可能机制。**方法** 建立卵清蛋白(OVA)诱导的哮喘大鼠模型(模型组),同时设立正常对照组(正常大鼠,等量生理盐水),采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 2 组大鼠肺组织 miR-455-3p 表达水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺组织和血清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平。分离大鼠 ASMC,采用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-455-3p 与 Toll 样受体 4(TLR4)的靶向关系;使用 TNF- α 刺激哮喘大鼠 ASMC 产生炎症反应。通过 Lip2000 转染法转染 miR-455-3p NC(miR-455-3p NC 组)、miR-455-3p mimic(miR-455-3p mimic 组)和共转染 miR-455-3p mimic 与 pcDNA(miR-455-3p mimic + pcDNA 组)、miR-455-3p mimic 与 pcDNA-TLR4(miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组)于哮喘大鼠炎症 ASMC,另设正常对照组(正常大鼠 ASMC)和模型组(哮喘大鼠炎症 ASMC),采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖情况,采用原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡情况,采用 ELISA 检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平,采用 qRT-PCR 和免疫印迹法(WB)分别检测 miR-455-3p、TLR4 mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平。**结果** 模型组大鼠肺组织中 miR-455-3p 表达水平低于正常对照组,且肺组织与血清中 TNF- α 、IL-6 表达水平均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-455-3p 可直接靶向抑制 TLR4 基因表达。与正常对照组相比,模型组大鼠 ASMC 中 miR-455-3p 表达水平、ASMC 增殖活性降低,TLR4 mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平、凋亡率和 ASMC 上清液 TNF- α 、IL-6 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 miR-455-3p NC 组相比,miR-455-3p mimic 组 ASMC 中 miR-455-3p 表达水平、ASMC 增殖活性升高,TLR4 mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平、凋亡率和 ASMC 上清液 TNF- α 、IL-6 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较,miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组 ASMC 中 miR-455-3p 表达水平、ASMC 增殖活性降低,TLR4 mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平、凋亡率和 ASMC 上清液 TNF- α 、IL-6 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** miR-455-3p 可通过靶向抑制 TLR4 表达,减轻哮喘大鼠 ASMC 炎症反应,调节其增殖与凋亡平衡。

关键词: 哮喘; 大鼠; 气道平滑肌细胞; 微小 RNA-455-3p; Toll 样受体 4; 增殖; 凋亡; 炎症

中图分类号: R 56; R 36 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2022)22-025-08 DOI: 10.7619/jcmp.20221809

Effects of microRNA-455-3p on airway smooth muscle cells in asthmatic rats by regulating toll-like receptor 4

XUE Mei, LIAO Yi, LU Wei

((Department of Pediatrics, Chengdu Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Chengdu, Sichuan, 610000))

Abstract: **Objective** To investigate the effects of microRNA-455-3p (miR-455-3p) on the proliferation, apoptosis and secretion function of inflammatory factors of airway smooth muscle cells (ASMC) in asthmatic rats and its possible mechanism. **Methods** The ovalbumin (OVA)-induced asthmatic rat model (model group) and the normal control group (normal rats with the same amount of normal saline) were established. The expression level of miR-455-3p in lung tissue was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR), the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels in lung tissue and serum were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Rat ASMC were isolated, double luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-455-3p and toll like receptor 4 (TLR4). TNF- α was used to stimulate the ASMC of asthmatic rats to produce inflammation. The Lip2000 transfection method was used to transfect miR-455-3p NC (miR-455-3p NC group), miR-455-3p mimic (miR-455-3p mimic group), and co-transfect miR-455-3p mimic and pcDNA (miR-455-3p mimic + pcDNA group), miR-455-3p mimic

and pcDNA-TLR4 (miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 group) to inflammatory ASMC of asthmatic rats. ASMC of normal rats was set as normal control group, and ASMC with inflammation of asthmatic rats was set as model group. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect cell proliferation, apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), the levels of TNF- α and IL-6 in the supernatant were detected by ELISA, in addition, the expression levels of miR-455-3p, *TLR4* mRNAs and TLR4 protein were detected by qRT-PCR and western blot (WB). **Results** Compared with the normal control group, the expression of miR-455-3p in the lung tissue of the model group was significantly reduced, and the levels of TNF- α and IL-6 in the lung tissue and serum were significantly increased ($P < 0.05$). Double luciferase reporter gene assay showed that miR-455-3p could directly target and inhibit *TLR4* gene expression. Compared with the normal control group, the expression level of miR-455-3p in ASMC and the proliferation activity of ASMC reduced significantly, and the expression levels of *TLR4* mRNA and TLR4 protein, apoptosis rate and TNF- α and IL-6 levels in ASMC supernatant increased significantly in the model group ($P < 0.05$); compared with the miR-455-3p NC group, the expression level of miR-455-3p and the proliferation activity of ASMC increased significantly, *TLR4* mRNA and TLR4 protein expression levels, apoptosis rate and TNF- α and IL-6 levels in ASMC supernatant were significantly reduced in the miR-455-3p mimic group ($P < 0.05$); compared with miR-455-3p mimic + pcDNA group, miR-455-3p expression level and ASMC proliferation activity in ASMC reduced significantly, *TLR4* mRNA and TLR4 protein expression levels, apoptosis rate and TNF- α and IL-6 levels in ASMC supernatant increased significantly in miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 group ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-455-3p can relieve the inflammatory response and regulate the balance of proliferation and apoptosis of ASMC in asthmatic rats by targeted inhibition of the expression of *TLR4*.

Key words: asthma; rats; airway smooth muscle cells; microRNA-455-3p; toll-like receptor 4; proliferation; apoptosis; inflammation

支气管哮喘简称哮喘,是以气道重塑及慢性炎症为主要病理特点的一种常见呼吸系统疾病^[1],其中气道平滑肌细胞(ASMC)的过度增殖及凋亡不足是气管重构的重要原因,可继发难治性哮喘,危害严重^[2]。微小RNA(miRNA)是一类非编码小RNA,可通过转录后调控干扰其靶基因mRNA表达或抑制其转录,广泛参与细胞分化、增殖、凋亡及免疫等多种生物学进程,研究^[3-4]显示,多种miRNA在哮喘发生与发展中发挥重要作用。微小RNA-455-3p(miR-455-3p)是一种与糖尿病肾病、乳腺癌等多种癌症以及肺动脉高压等炎症性疾病密切相关的miRNA^[5-6]。Toll样受体4(TLR4)是一种高度保守的天然免疫受体家族的成员,其表达水平与哮喘ASMC增殖、凋亡及功能状态密切相关。研究^[7]显示,miR-455-3p可靶向*TLR4*基因调节多种细胞损伤及炎症反应。本研究探讨miR-455-3p与TLR4的靶向关系及其对哮喘大鼠ASMC生物学活性及炎症因子分泌功能的

影响,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8周龄无特定病原体(SPF)级健康雄性SD大鼠12只,体质量190~220 g,生产许可证号SCXK(粤)2016-0041,由南方医科大学提供。

1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清(FBS,货号10099-145)、DMEM/F-12培养基(货号12634010)购自美国Gibco公司;miR-455-3p NC(阴性对照)、miR-455-3p mimic、pcDNA(空质粒)、pcDNA-TLR4(TLR4过表达质粒)和miR-455-3p、U6、TLR4、GAPDH引物均由吉玛生物科技有限公司合成;卵清蛋白(OVA,货号A5503)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂盒(货号11465007001)购自美国Sigma公司;原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(货号11684795910)购自Roche公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号

P0010S)购自上海碧云天有限公司; miRNA 提取试剂盒(货号 AM1561)、Lipofectamine® 2000 转染试剂盒(货号 11668)、兔源一抗 anti-TLR4(货号 14-9924-82)、anti-GAPDH(货号 PA1-16777)、二抗羊抗兔 IgG(货号 A-11008)均购自美国 Invitrogen 公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(货号 ab236712)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(货号 ab234570)均购自英国 Abcam 公司;MODEL550 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;Forma Steri-Cycle i160 CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司;ix75 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 哮喘大鼠模型建立:参考文献[8]方法,随机选取 6 只大鼠,于实验第 1、8 天向大鼠皮下注射含 OVA 10 mg 和氢氧化铝凝胶 200 mg 的混合物 1 mL,同时腹腔注射灭活百日咳杆菌 5×10^9 个,第 15 天雾化吸入 2% OVA 磷酸盐缓冲液 50 mL,30 min/次,1 次/d,持续 1 周。其余 6 只正常大鼠给予等量生理盐水(代替 OVA)进行同等处理。哮喘模型建立成功标准为大鼠出现烦躁不安,呼吸加深、加快,弓背,严重者甚至出现伸颈、喘息状、大小便失禁等。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测大鼠肺组织 miR-455-3p 表达水平:分别取 6 只哮喘大鼠(模型组)和 6 只正常大鼠(正常对照组),腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉,留取血液置于 4 °C 冰箱用于后续 ELISA 检测,开胸取双肺组织,分别称取 0.5 g(其余肺组织置于 -80 °C 冰箱用于后续实验),使用 RNA 提取试剂盒提取肺组织总 RNA 并检测其浓度,然后使用逆转录试剂盒合成 cDNA,并以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书配置聚合酶链反应(PCR)反应体系,反应程序为 95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 2 min,设置 45 个循环。以 U6 作为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法进行 miR-455-3p 表达量的计算与分析。miR-455-3p 上游引物序列 5'-GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC-3',下游引物序列 5'-GUGUAUAUGCCCAUGGACUGC UU-3';U6 上游引物序列 5'-CTCGCTTCGGCAGC ACA-3',下游引物序列 5'-AACGCTTCACGAATT TGCCT-3'。

1.3.3 ELISA 检测大鼠肺组织及血清中炎症因子含量:取上述置于 4 °C 冰箱的 2 组大鼠血液各

2 mL 和 -80 °C 冰箱的肺组织各 0.05 g,按照 TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒检测说明书检测哮喘大鼠和正常大鼠血清与肺组织中 TNF- α 、IL-6 含量。

1.3.4 ASMC 分离、培养及鉴定:取上述置于 -80 °C 冰箱的肺组织,低温融化后,于解剖显微镜下分离支气管平滑肌,剪碎后置于含胶原酶 2 mg/mL、木瓜蛋白酶 3 mg/mL、胰蛋白酶 2 mg/mL 的 D-Hank's 液中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中消化 1 h,以 100 目不锈钢筛网过滤后,800 转/min 离心 10 min,弃上清,添加于含 20% FBS、1% 青链霉素的 DMEM/F-12 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,采用免疫组化染色法鉴定 ASMC α -肌动蛋白表达。选取分离成功的 ASMC(第 4 ~ 8 代)用于后续试验。

1.3.5 双荧光素酶报告基因实验:以 pmir-GLO 质粒为载体,构建与 miR-455-3p 种子区结合的 *TLR4* 基因 3' UTR 野生型(WT-*TLR4*)和突变型(MUT-*TLR4*)双荧光报告重组质粒,之后采用脂质体转染法分别将 miRNA(miR-455-3p NC 或 miR-455-3p mimic)和重组质粒(WT-*TLR4* 或 MUT-*TLR4*)共转染入正常大鼠 ASMC,于 CO₂ 培养箱继续培养,分别为 miR-455-3p NC + WT-*TLR4* 组、miR-455-3p mimics + MUT-*TLR4* 组、miR-455-3p NC + MUT-*TLR4* 组和 miR-455-3p mimics + WT-*TLR4* 组。每组设立 6 个复孔,48 h 后用 PLB 裂解细胞,收集细胞裂解液,离心后取上清检测萤火虫荧光素酶信号和海肾荧光素酶信号,计算其相对活性。

1.3.6 细胞炎症诱导、转染及分组:取对数生长期的哮喘大鼠 ASMC 接种于 96 孔细胞板,使用 TNF- α 刺激哮喘大鼠 ASMC(96 孔板中加入 TNF- α 至终浓度为 20 ng/mL^[9]),使其产生炎症反应后常规培养。转染当天取出细胞于显微镜下观察细胞密度,达到 70% ~ 80% 汇合率时即可进行转染。更换无血清培养基后,采用 Lip2000 转染法转染 miR-455-3p NC(50 nmol/L,阴性对照,miR-455-3p NC 组)、miR-455-3p mimic(50 nmol/L,miR-455-3p mimic 组)和共转染 miR-455-3p mimic 与 pcDNA(miR-455-3p mimic + pcDNA 组)、共转染 miR-455-3p mimic 与 pcDNA-TLR4(miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组)至产生炎症反应的大鼠 ASMC 中,具体操作严格按照试剂盒说明书进行,孵育 4 ~ 6 h 后更换新鲜培养基。另设正常对照组(正常大鼠 ASMC)和模型组(哮喘大鼠炎症

ASMC), 每组 6 个重复。

1.3.7 qRT-PCR 检测各组 ASMC 中 miR-455-3p、*TLR4* mRNA 表达: 采用 RNA 抽提试剂盒提取各组 ASMC 总 RNA, 反转录得到 cDNA 置于 -20 ℃ 冰箱保存待用。采用 qRT-PCR 法扩增 miR-455-3p、*TLR4* mRNA 目的片段。miR-455-3p 引物序列及内参 *U6* 引物序列见“1.3.2”。*TLR4* 上游引物序列 5'-CGCTTTCACCTCTGCCTTCTACTA CAG-3', 下游引物序列 5'-ACACTACCACAATAAC CTTCGGCTC-3'; 内参 *GAPDH* 上游引物序列 5'-TGATTCTACCCACGGCAAGTT-3', 下游引物序 列 5'-TGATGGGTTTCCCATTTCATGA-3'。反应条 件为 95 ℃ 预变性 15 min, 94 ℃ 变性 15 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量分析 ASMC 中 miR-455-3p、*TLR4* mRNA 相对表达水平。

1.3.8 免疫印迹法(WB)检测各组 ASMC 中 TLR4 蛋白表达: 采用蛋白抽提试剂盒提取各组 ASMC 总蛋白, 用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 置 于 -80 ℃ 保存备用。取 40 μg 蛋白样品, 进行十 二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 聚偏氟乙烯(PVDF)膜转膜, 一抗(anti-TLR4 抗体 1: 1 000, anti-GAPDH 抗体 1: 1 000)4 ℃ 孵育过 夜, TBST 缓冲液洗膜, 二抗 IgG(1: 20 000)室温孵 育 1.5 h, 洗膜, 用免疫印记化学发光试剂(ECL) 显色, 数字化多功能图像增强化学发光系统曝片, 拍照保存, 分析蛋白条带灰度值。

1.3.9 MTT 检测各组 ASMC 增殖情况: 将各组 大鼠 ASMC 于消化后计数, 以 1×10^6 /mL 接种于 96 孔细胞板, 培养 48 h 后, 添加 MTT 溶液(5 g/L) 20 μL 孵育 4 h, 弃培养基后添加二甲基亚砷 (DMSO)150 μL, 振荡混匀后使用酶标仪检测正 常对照组、模型组、miR-455-3p NC 组、miR-455-3p mimic 组、miR-455-3p mimic + pcDNA 组和 miR- 455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组 ASMC 光密度

(OD)值, 每组 6 个重复。

1.3.10 TUNEL 法检测各组 ASMC 凋亡情况: 将 正常对照组、模型组、miR-455-3p NC 组、miR-455- 3p mimic 组、miR-455-3p mimic + pcDNA 组和 miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组 ASMC 按 1×10^6 /mL 密度接种于添加盖玻片的 6 孔细胞板, 待 细胞完全汇合后收集盖玻片, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 纯丙酮固定。按照 TUNEL 试剂盒说 明书检测各组 ASMC 凋亡情况, 随机选取 6 个高 倍镜下视野, 计算阳性细胞百分比(即凋亡率)。

1.3.11 ELISA 检测各组 ASMC 上清液中 TNF-α、 IL-6 水平: 收集正常对照组、模型组、miR-455-3p NC 组、miR-455-3p mimic 组、miR-455-3p mimic + pcDNA 组和 miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组 ASMC 细胞上清液, 每孔取 100 μL 样品, 严格按 照 ELISA 试剂盒说明书操作要求检测 TNF-α、 IL-6 表达水平。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量 资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 2 组比较采用 *t* 检验, 多组比 较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 进 一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 为差异 有统计学意义。

2 结 果

2.1 哮喘大鼠与正常大鼠肺组织中 miR-455-3p 表达水平

模型组大鼠肺组织中 miR-455-3p 表达水平 为(0.33 ± 0.04), 低于正常对照组大鼠的(0.64 ± 0.07), 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.2 哮喘大鼠与正常大鼠肺组织、血清中炎症 因子水平

模型组大鼠肺组织与血清中 TNF-α、IL-6 表 达水平均高于正常对照组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 见表 1。

表 1 2 组大鼠肺组织、血清中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	n	肺组织		血清	
		TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
正常对照组	6	43.44 ± 4.55	35.25 ± 3.67	9.16 ± 0.94	18.29 ± 1.97
模型组	6	75.43 ± 7.64*	48.36 ± 4.95*	17.34 ± 1.87*	25.43 ± 2.64*

TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; IL-6: 白细胞介素-6。与正常对照组比较, **P* < 0.05。

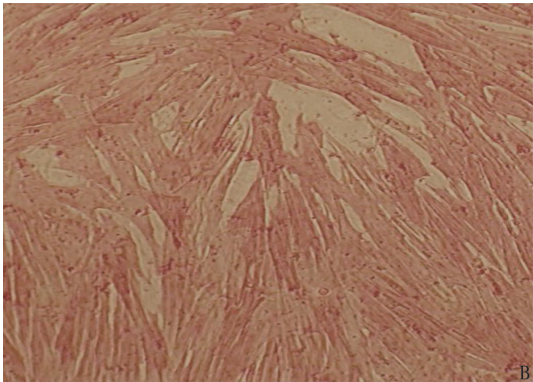
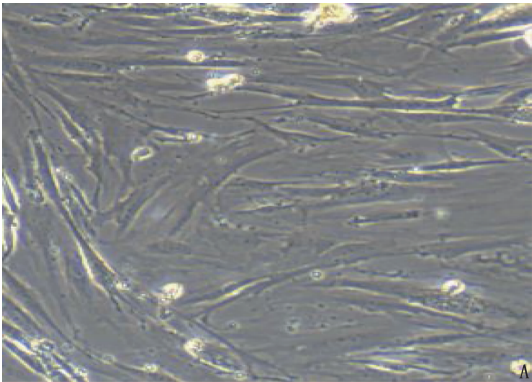
2.3 大鼠 ASMC 鉴定

显微镜下可见, 正常大鼠 ASMC 呈梭形, 细胞

排列疏密相间, 细胞形态正常, 有较长突起(图 1A)。免疫组化染色法鉴定结果显示, α-肌动蛋

白阳性反应细胞为棕黄色(图 1B),提示 ASMC

分离成功,可用于后续试验。



A: 正常大鼠 ASMC; B: 免疫组化染色法鉴定显示大鼠 ASMC 分离成功。

图 1 大鼠 ASMC 显微镜图(放大 100 倍)

2.4 miR-455-3p 与 TLR4 基因靶向关系验证结果

TargetScan 在线生物信息学软件预测 *TLR4* 基因 3'UTR 区可能包含 miR-455-3p 的互补序列,见图 2,提示 *TLR4* 可能是 miR-455-3p 的作用靶点。双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-455-3p mimics + WT-*TLR4* 组 ASMC 相对荧光素酶活性低于另 3 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),另 3 组 ASMC 相对荧光素酶活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2,提示 miR-455-3p 可直接靶向抑制 *TLR4* 基因表达。

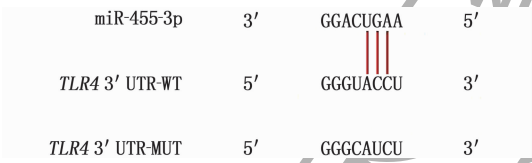


图 2 TargetScan 软件预测 miR-455-3p 与 *TLR4* 基因 3'UTR 区的可能结合位点

2.5 各组大鼠 ASMC 中 miR-455-3p、*TLR4* mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平比较

与正常对照组比较,模型组和 miR-455-3p NC 组 miR-455-3p 表达水平降低, *TLR4* mRNA、TLR4 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组、miR-455-3p NC 组比较,miR-455-3p

表 2 荧光素酶报告基因检测 miR-455-3p 与 *TLR4* 的靶向关系($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	相对荧光素酶活性
miR-455-3p NC + WT- <i>TLR4</i> 组	6	1.03 ± 0.12*
miR-455-3p mimics + MUT- <i>TLR4</i> 组	6	0.96 ± 0.10*
miR-455-3p NC + MUT- <i>TLR4</i> 组	6	1.08 ± 0.11*
miR-455-3p mimics + WT- <i>TLR4</i> 组	6	0.35 ± 0.06

miR-455-3p: 微小 RNA-455-3p; *TLR4*: Toll 样受体 4; WT: 野生型; MUT: 突变型。

与 miR-455-3p mimics + WT-*TLR4* 组比较, * $P < 0.05$ 。

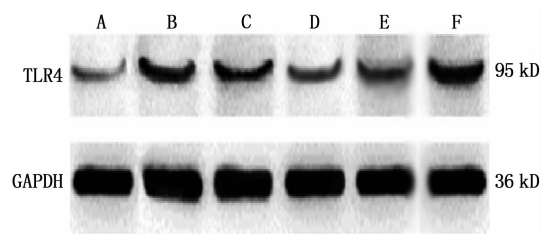
mimic 组和 miR-455-3p mimic + pcDNA 组 miR-455-3p 表达水平升高, *TLR4* mRNA、TLR4 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较,miR-455-3p mimic + pcDNA-*TLR4* 组 miR-455-3p 表达水平降低, *TLR4* mRNA、TLR4 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组 miR-455-3p、*TLR4* mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平与 miR-455-3p NC 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);miR-455-3p mimic 组 miR-455-3p、*TLR4* mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3、图 3。

表 3 各组大鼠 ASMC 中 miR-455-3p、*TLR4* mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-455-3p	<i>TLR4</i> mRNA	TLR4 蛋白
正常对照组	6	1.07 ± 0.11	0.98 ± 0.10	0.07 ± 0.01
模型组	6	0.61 ± 0.07*	4.22 ± 0.45*	0.30 ± 0.05*
miR-455-3p NC 组	6	0.58 ± 0.06*	4.19 ± 0.42*	0.32 ± 0.04*
miR-455-3p mimic 组	6	0.76 ± 0.08 [#] △	1.93 ± 0.21 [#] △	0.18 ± 0.03 [#] △
miR-455-3p mimic + pcDNA 组	6	0.79 ± 0.08 [#] △	1.95 ± 0.20 [#] △	0.16 ± 0.02 [#] △
miR-455-3p mimic + pcDNA- <i>TLR4</i> 组	6	0.21 ± 0.03▲	6.87 ± 0.69▲	0.67 ± 0.08▲

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与 miR-455-3p NC 组比较, △ $P < 0.05$;

与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。



A: 正常对照组; B: 模型组; C: miR-455-3p NC 组;
D: miR-455-3p mimic 组; E: miR-455-3p mimic + pcDNA 组;
F: miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组。

图 3 各组大鼠 ASMC 中 TLR4 蛋白表达免疫印迹图

2.6 各组大鼠 ASMC 增殖活性和凋亡率比较

与正常对照组比较,模型组和 miR-455-3p NC 组 ASMC 增殖活性降低,凋亡率升高,差异有统计

学意义($P < 0.05$);与模型组、miR-455-3p NC 组比较,miR-455-3p mimic 组和 miR-455-3p mimic + pcDNA 组 ASMC 增殖活性升高,凋亡率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较,miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组 ASMC 增殖活性降低,凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组 ASMC 增殖活性、凋亡率与 miR-455-3p NC 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);miR-455-3p mimic 组 ASMC 增殖活性、凋亡率与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 4、表 4。

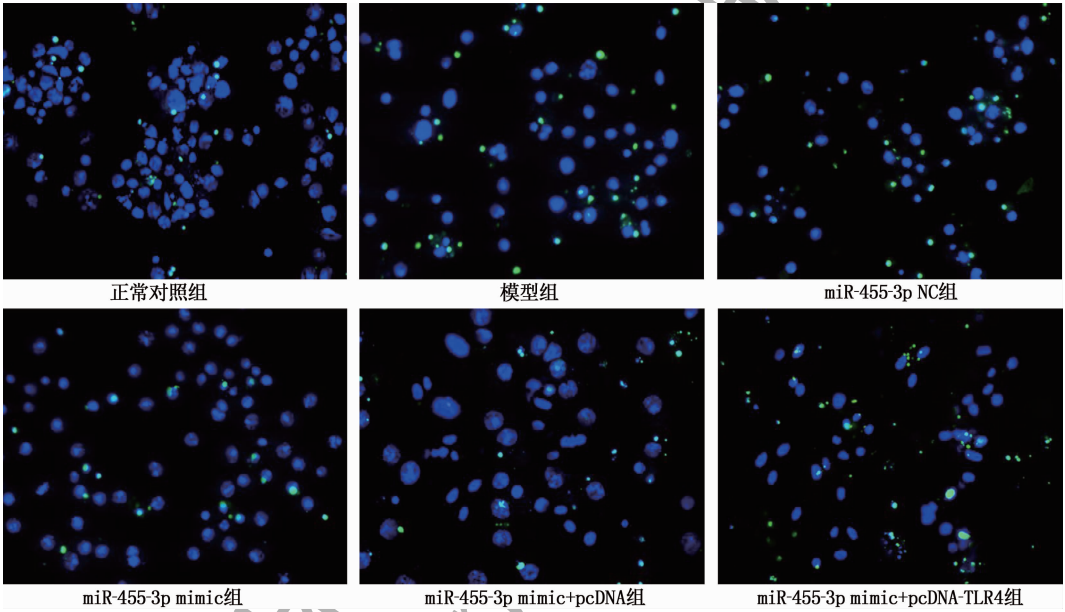


图 4 各组大鼠 ASMC 凋亡检测图(TUNEL 染色法,放大 400 倍)

表 4 各组大鼠 ASMC 增殖活性(OD)、凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD	凋亡率/%
正常对照组	6	0.74 ± 0.08	6.21 ± 0.68
模型组	6	0.49 ± 0.07*	9.52 ± 0.97*
miR-455-3p NC 组	6	0.47 ± 0.05*	9.58 ± 1.01*
miR-455-3p mimic 组	6	0.71 ± 0.10 [#] △	6.56 ± 0.67 [#] △
miR-455-3p mimic + pcDNA 组	6	0.78 ± 0.09 [#] △	6.79 ± 0.71 [#] △
miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组	6	0.34 ± 0.06▲	10.21 ± 1.05▲

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\#P < 0.05$; 与 miR-455-3p NC 组比较, $\Delta P < 0.05$;
与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

2.7 各组大鼠 ASMC 上清液 TNF-α、IL-6 水平比较

模型组和 miR-455-3p NC 组 ASMC 上清液 TNF-α、IL-6 水平高于正常对照组, miR-455-3p mimic 组和 miR-455-3p mimic + pcDNA 组 TNF-α、IL-6 水平低于模型组和 miR-455-3p NC 组, miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组 TNF-α、IL-6 水平

高于 miR-455-3p mimic + pcDNA 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型组 TNF-α、IL-6 水平与 miR-455-3p NC 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);miR-455-3p mimic 组 TNF-α、IL-6 水平与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 各组大鼠 ASMC 上清液 TNF-α、IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s$)ng/L

组别	<i>n</i>	TNF-α	IL-6
正常对照组	6	421.85 ± 47.39	10.25 ± 1.07
模型组	6	1 224.33 ± 127.58*	17.19 ± 1.85*
miR-455-3p NC 组	6	1 221.86 ± 135.69*	18.21 ± 1.92*
miR-455-3p mimic 组	6	439.27 ± 46.74 [#] Δ	10.98 ± 1.11 [#] Δ
miR-455-3p mimic + pcDNA 组	6	487.95 ± 49.12 [#] Δ	12.24 ± 1.37 [#] Δ
miR-455-3p mimic + pcDNA-TLR4 组	6	1 363.52 ± 149.93 [▲]	17.89 ± 1.85 [▲]

与正常对照组比较, **P* < 0.05; 与模型组比较, [#]*P* < 0.05; 与 miR-455-3p NC 组比较, Δ*P* < 0.05;
与 miR-455-3p mimic + pcDNA 组比较, [▲]*P* < 0.05。

3 讨 论

miR-455-3p 是一种与人类多种疾病密切相关的小 RNA, 参与多种病理生理过程的调控^[10]。CHENG F 等^[11]报道, miR-455-3p 参与骨关节炎中白细胞介素-1 (IL-1) 诱导的细胞凋亡和炎症反应。SUN Y 等^[12]研究发现, miR-455-3p 在结直肠癌中发挥抑癌作用, 通过靶向肿瘤蛋白翻译控制 1 基因抑制癌细胞增殖。另外, miR-455-3p 在免疫系统中具有抗炎作用, 与多发性硬化症患者的疾病严重程度高度相关, 其表达与炎症预测靶点髓样分化因子 88 (MyD88) 呈负相关^[13]。由此提示, miR-455-3p 在不同疾病中发挥的作用可能不尽相同。本研究结果显示, 与正常大鼠比较, 哮喘大鼠肺组织中 miR-455-3p 显著下调, 且肺组织和血清中炎症因子 TNF-α、IL-6 水平显著升高, 提示 miR-455-3p 可能在哮喘中发挥负调控作用。本研究通过生物学信息预测发现, miR-455-3p 与 *TLR4* 存在靶向结合位点, 进一步开展双荧光素酶报告基因实验进行验证, 提示 *TLR4* 是 miR-455-3p 潜在靶基因。XU X 等^[7]研究发现, miR-455-3p 可能通过靶向 *TLR4* 基因抑制冠心病进展。然而, miR-455-3p 靶向 *TLR4* 对哮喘大鼠 ASMC 生物学行为及炎症因子分泌功能的影响尚需进一步研究。

TLRs 是固有免疫中重要的模式识别受体家族, 包含 TLR1 至 TLR10 共 10 个成员, 其中 TLR4 信号通路异常激活可导致气道中性粒细胞、单核细胞及 Th2 淋巴细胞等产生大量炎症因子, 引起气道高反应, 促进哮喘发生与发展^[14]。TLR4/MyD88 信号通路参与调控哮喘和小鼠气道炎症的发生与发展^[15]。ASMC 是气道炎症的效应细胞, 其过度增殖或凋亡不足与哮喘进展密切相关。相关研究^[16-17]表明, TLR4 表达可启动和调节哮喘气道炎症反应, 进而激活下游核因子 κB

(NF-κB) 和 TNF-α、IL-6 等炎症因子, 参与调控 ASMC 增殖与凋亡, 促进气道重塑。本研究用 TNF-α 刺激哮喘大鼠 ASMC, 使其产生炎症反应, 然后转染 miR-455-3p NC, miR-455-3p mimic 和共转染 miR-455-3p mimic 与 pcDNA、共转染 miR-455-3p mimic 与 pcDNA-TLR4。本研究结果显示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠 ASMC 中 miR-455-3p 表达水平、ASMC 增殖活性显著降低, *TLR4* mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平、凋亡率和 ASMC 上清液 TNF-α、IL-6 水平显著升高, 提示模型组细胞中 miR-455-3p 下调、TLR4 上调, 两者可能共同参与 ASMC 的凋亡和炎症反应; 与转染 miR-455-3p NC 比较, 过表达 miR-455-3p 可使 ASMC 中 miR-455-3p 表达水平、ASMC 增殖活性显著升高, *TLR4* mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平、凋亡率和 ASMC 上清液 TNF-α、IL-6 水平显著降低, 说明过表达 miR-455-3p 可能通过靶向抑制 *TLR4* 减少 ASMC 凋亡和降低炎症因子水平; 与共转染 miR-455-3p mimic 与 pcDNA 比较, 共转染 miR-455-3p mimic 与 pcDNA-TLR4 可使 ASMC 中 miR-455-3p 表达水平、ASMC 增殖活性显著降低, *TLR4* mRNA 及 TLR4 蛋白表达水平、凋亡率和 ASMC 上清液 TNF-α、IL-6 水平显著升高, 反向验证了上调 TLR4 可减弱 miR-455-3p 对 ASMC 凋亡和炎症反应的抑制作用, 提示过表达 miR-455-3p 可通过靶向抑制 TLR4 表达, 减轻哮喘大鼠 ASMC 炎症反应, 调节其增殖与凋亡平衡, 发挥保护作用, 同时过表达 TLR4 可消除 miR-455-3p 对哮喘大鼠 ASMC 的保护作用。

综上所述, 过表达 miR-455-3p 可能通过靶向抑制 TLR4 表达, 减轻哮喘大鼠 ASMC 炎症反应, 调节其增殖与凋亡平衡, 发挥重要的保护作用。但调控 TLR4 的 miRNA 众多, 且影响哮喘 ASMC 增殖、凋亡的机制复杂, 其他 miRNA 及信号通路是否共同参与哮喘大鼠 ASMC 增殖与凋亡平衡的

调节尚不明确,有待进一步深入探究,且后续将继续开展动物体内实验探讨 miR-455-3p 对哮喘大鼠的影响。

参考文献

[1] 许花芬,冯琼,李春蕾. 支气管哮喘患儿基质金属蛋白酶-16、自噬相关基因 5 和自噬相关基因 7 的表达及其与肺功能的相关性[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(9): 35-39.

[2] ZHOU H, WU Q, WEI L, *et al.* Paeoniflorin inhibits PDGF-BB-induced human airway smooth muscle cell growth and migration[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2660-2664.

[3] WANG H, YAO H, YI B, *et al.* microRNA-638 inhibits human airway smooth muscle cell proliferation and migration through targeting cyclin D1 and NOR1[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 369-381.

[4] FANG L, WANG X, SUN Q, *et al.* IgE downregulates PTEN through microRNA-21-5p and stimulates airway smooth muscle cell remodeling[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): E875.

[5] WU J, LIU J, DING Y, *et al.* miR-455-3p suppresses renal fibrosis through repression of ROCK2 expression in diabetic nephropathy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 977-983.

[6] ZHOU C, CHEN Y, KANG W, *et al.* miR-455-3p-1 represses FGF7 expression to inhibit pulmonary arterial hypertension through inhibiting the RAS/ERK signaling pathway[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 130: 23-35.

[7] XU X, LI H. Integrated microRNA gene analysis of coronary artery disease based on miRNA and gene expression profiles[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3063-3073.

[8] HE Y, LOU X, JIN Z, *et al.* Mahuang Decoction mitigates airway inflammation and regulates IL-21/STAT3 signaling pathway in rat asthma model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 373-380.

[9] 苏海英,莫碧文,韦江红,等. TLR4 在气道上皮细胞诱

导的哮喘气道平滑肌细胞迁移中的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(2): 103-106.

[10] LI Z, MENG Q, PAN A, *et al.* microRNA-455-3p promotes invasion and migration in triple negative breast cancer by targeting tumor suppressor E124[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19455-19466.

[11] CHENG F, HU H Y, SUN K F, *et al.* miR-455-3p enhances chondrocytes apoptosis and inflammation by targeting COL2A1 in the in vitro osteoarthritis model[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(4): 695-702.

[12] SUN Y, WANG Y, YANG H, *et al.* miR-455-3p functions as a tumor suppressor in colorectal cancer and inhibits cell proliferation by targeting TPT1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(5): 2522-2529.

[13] TORABI S, TAMADDON M, ASADOLAH M, *et al.* miR-455-5p downregulation promotes inflammation pathways in the relapse phase of relapsing-remitting multiple sclerosis disease[J]. *Immunogenetics*, 2019, 71(2): 87-95.

[14] CHO M, LEE J E, LIM H, *et al.* Fibrinogen cleavage products and Toll-like receptor 4 promote the generation of programmed cell death 1 ligand 2-positive dendritic cells in allergic asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(2): 530-541, e6.

[15] SHANG L, WANG L, SHI X, *et al.* HMGB1 was negatively regulated by HSF1 and mediated the TLR4/MyD88/NF-κB signal pathway in asthma[J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117120.

[16] 王涛,韩娜. siRNA 沉默凋亡抑制蛋白基因对支气管哮喘小鼠气道平滑肌增殖的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(16): 2186-2189, 2193.

[17] QU D, LING Z, TAN X, *et al.* High mobility group protein B1 (HMGB1) interacts with receptor for advanced glycation end products (RAGE) to promote airway smooth muscle cell proliferation through ERK and NF-κB pathways[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9): 3268-3278.

(本文编辑:陆文娟)

(上接第 24 面)

[21] 王文春,史甜,柏基香,等. 基于 CiteSpace 的国内俯卧位通气研究的可视化分析[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(21): 93-97.

[22] MENG L, QIU H, WAN L, *et al.* Intubation and ventilation amid the COVID-19 outbreak: wuhan's experience[J]. *Anesthesiology*, 2020, 132(6): 1317-1332.

[23] MORA-ARTEAGA J A, BERNAL-RAMÍREZ O J, RODRÍGUEZ S J. The effects of prone position ventilation in patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *A systematic review and metaanalysis*[J]. *Med Intensiva*, 2015, 39(6): 359-372.

[24] LUCCHINI A, BAMBI S, MATTIUSI E, *et al.* Prone Position in Acute Respiratory Distress Syndrome Patients: A Retrospective Analysis of Complications[J]. *Dimens Crit Care Nurs*, 2020, 39(1): 39-46.

[25] RODRÍ GUEZ-HUERTA M D, DÍEZ-FERNÁNDEZ A,

RODRÍGUEZ-ALONSO M J, *et al.* Nursing care and prevalence of adverse events in prone position: characteristics of mechanically ventilated patients with severe SARS-CoV-2 pulmonary infection[J]. *Nurs Crit Care*, 2022, 27(4): 493-500.

[26] 曾丹妮. 改良式俯卧位与传统俯卧位护理在 ARDS 患者中的应用效果对比[J]. 当代护士: 上旬刊, 2021, 28(9): 134-136.

[27] GÜRÜN KAYA A, ÖZ M, EROL S, *et al.* Prone positioning in non-intubated patients with COVID-19 [J]. *Tuberk Toraks*, 2020, 68(3): 331-336.

[28] 中华医学会重症医学分会重症呼吸学组. 急性呼吸窘迫综合征患者俯卧位通气治疗规范化流程[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(10): 781-787.

(本文编辑:周冬梅)