

体内转染微小 RNA-146a 对脓毒症小鼠肺的保护作用

张建国 丁成志 邵强 刘芬 曾振国 聂成 钱克俭

【摘要】 目的 观察体内转染微小 RNA-146a (miR-146a) 对脓毒症小鼠肺脏的保护作用。方法 选择健康雄性 BALB/C 小鼠 24 只,按随机数字表法分为假手术组、脓毒症组、转染组、转染对照组,每组 6 只。转染组小鼠经气管内预先滴入转染试剂 in vivo-jetPEI™ 处理的 miR-146a 模拟物 (agomir),转染对照组滴入 in vivo-jetPEI™ 处理的阴性对照物。转染 12 h 后采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症模型;假手术组仅开腹游离盲肠,不进行结扎穿孔。各组于术后 24 h 处死动物,采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测肺组织 miR-146a 表达,用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平,测定肺组织湿/干质量 (W/D) 比值,光镜下观察肺组织病理学改变并进行肺损伤病理评分。结果 脓毒症组、转染组、转染对照组小鼠肺组织 miR-146a 表达量分别上调至假手术组的 (3.56±0.43)、(27.64±3.46)、(3.72±0.54) 倍 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且转染组 miR-146a 表达上调量明显高于脓毒症组及转染对照组 (均 $P<0.01$);而脓毒症组与转染对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与假手术组比较,脓毒症组、转染组、转染对照组 BALF 中 TNF- α 水平均明显升高 (ng/L: 511.65±43.47、305.74±34.76、492.27±42.21 比 50.72±7.23,均 $P<0.01$),转染组 TNF- α 水平明显低于脓毒症组及转染对照组 (均 $P<0.01$)。与假手术组比较,脓毒症组、转染组、转染对照组肺 W/D 比值明显升高 (6.11±0.32、5.02±0.29、6.05±0.43 比 4.18±0.10,均 $P<0.01$),转染组明显低于脓毒症组及转染对照组 (均 $P<0.01$),且转染组肺损伤病理评分较脓毒症组及转染对照组明显下降 (分: 6.12±0.75 比 10.53±1.52、9.73±1.08,均 $P<0.01$)。结论 通过体内转染 in vivo-jetPEI™ 荷载的 miR-146a agomir 可以上调脓毒症小鼠肺组织 miR-146a 表达,减少肺部炎症因子 TNF- α 的产生,抑制肺部炎症反应,减轻肺组织损伤。

【关键词】 体内转染; 微小 RNA-146a; 脓毒症; 急性肺损伤

The protective effects of transfected microRNA-146a on mice with sepsis-induced acute lung injury in vivo Zhang Jianguo*, Ding Chengzhi, Shao Qiang, Liu Fen, Zeng Zhenguo, Nie Cheng, Qian Kejian. *Department of Critical Care Medicine, Linyi People's Hospital, Linyi 276003, Shandong, China

Corresponding author: Qian Kejian, Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China, Email: qkj0607@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of transfected microRNA-146a (miR-146a) on mice with sepsis-induced acute lung injury (ALI) in vivo. **Methods** Twenty-four healthy male BALB/C mice were randomly divided into sham group, sepsis group, transfection group and transfection control group, each $n = 6$. Mice in transfection group were given miR-146a agomir loaded by in vivo-jetPEI™ via airway before reproduction of model, and mice in transfection control group were given negative control loaded by in vivo-jetPEI™ only via airway. The septic model was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP) 12 hours after transfection, and the mice in the sham group underwent laparotomy and closure only without ligation and puncture of the cecum. The mice of each group were sacrificed at 24 hours post-operation. The expression of miR-146a in lung tissue was determined by real time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the quantity of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the bronchial alveolar lavage fluid (BALF) was determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The wet/dry ratio of lung (W/D) was determined. The pathohistological changes in the lung were observed and scored. **Results** The expression of miR-146a showed a significant increase in sepsis group, transfection group and transfection

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.010

基金项目:国家自然科学基金(81060152,81101410,81160233)

作者单位:276003 山东临沂,临沂市人民医院重症医学科(张建国);330006 江西南昌,南昌大学第一附属医院重症医学科(丁成志、邵强、刘芬、曾振国、聂成、钱克俭)

通讯作者:钱克俭,Email: qkj0607@sohu.com

control group, which were (3.56 ± 0.43) , (27.64 ± 3.46) and (3.72 ± 0.54) folds of that in sham group, respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The miR-146a expression in transfection group was significantly increased compared with sepsis group and transfection control group (both $P < 0.01$), but no statistical difference in the expression was found between sepsis group and transfection control group ($P > 0.05$). Compared with the sham group, higher level of TNF- α in the BALF was found in the sepsis group, transfection group and transfection control group (ng/L: 511.65 ± 43.47 , 305.74 ± 34.76 , 492.27 ± 42.21 vs. 50.72 ± 7.23 , all $P < 0.01$). The level of TNF- α in transfection group was significantly lower than that in sepsis group and transfection control group (both $P < 0.01$). Compared with the sham group, the W/D ratio of lung in sepsis group, transfection group and transfection control group showed a significant increase (6.11 ± 0.32 , 5.02 ± 0.29 , 6.05 ± 0.43 vs. 4.18 ± 0.10 , all $P < 0.01$). The W/D ratio of lung in transfection group was significantly lower than that of sepsis group and transfection control group (both $P < 0.01$). The lung injury score of transfection group was significantly lower than that of sepsis group and transfection control group (6.12 ± 0.75 vs. 10.53 ± 1.52 , 9.73 ± 1.08 , both $P < 0.01$). **Conclusions** miR-146a agomir loaded by in vivo-jetPEI™ instillation into airway was able to increase the expression of miR-146a in the lung tissue of septic mice. Up-regulation of miR-146a inhibit the release of the inflammatory cytokine TNF- α stimulated by sepsis, and alleviate inflammatory reaction and lung tissue injury in mice with sepsis-induced ALI.

【Key words】 Transfection in vivo; MicroRNA-146a; Sepsis; Acute lung injury

微小 RNA-146a (miR-146a) 作为抗炎介质, 在人单核细胞 THP-1 中参与炎症反应的调控, 能够负性调控核转录因子 κ B (NF- κ B) 的炎症通路, 从而下调炎性因子的释放^[1]。但 miR-146a 对脓毒症肺损伤时肺部炎症反应的调控作用目前尚未见报道。本课题组前期的研究发现, 体外转染 miR-146a 能够下调肺泡巨噬细胞炎性因子的表达, 表明上调 miR-146a 表达能够抑制脂多糖 (LPS) 诱导肺泡巨噬细胞的炎症反应^[2]。为了进一步明确 miR-146a 对脓毒症肺部炎症反应的调控作用, 本实验通过给小鼠气管内滴入转染试剂 in vivo-jetPEI™ 介导的 miR-146a 模拟物 (agomir), 观察 miR-146a 在肺内的转染效果及上调 miR-146a 表达对脓毒症小鼠的肺保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及主要试剂: 健康雄性 BALB/C 小鼠 24 只, 8~10 周龄, 体质量 22~25 g, 由南昌大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 赣(动)-96021。按随机数字表法将小鼠分为假手术组、脓毒症组、转染组、转染对照组, 每组 6 只。小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 定量酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (上海科敏生物科技有限公司), 转染试剂 in vivo-jetPEI™ (法国 Polyplus 转染公司), miR-146a agomir 及其阴性对照 (上海吉玛基因股份有限公司), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), TaqMan® miRNA 反转录及检测试剂盒 (美国 ABI 公司), 氯仿、异丙醇及无水乙醇等均为国产分析纯。

1.2 体内转染: 将 20 μ g miR-146a agomir (无核酶水溶解后浓度为 5 μ g/ μ L) 或 20 μ g 阴性对照物与 3.2 μ L in vivo-jetPEI™ 加入到 5% 葡萄糖溶液配

置成 50 μ L 转染复合物, 置于室温中孵育 15 min。转染组小鼠经气管内滴入 in vivo-jetPEI™ 处理的 miR-146a agomir 20 μ g; 转染对照组小鼠经气管内滴入 in vivo-jetPEI™ 处理的阴性对照 20 μ g, 滴入后迅速使小鼠直立, 保证转染复合物充满整个肺组织, 转染 12 h 后复制脓毒症模型。

1.3 脓毒症小鼠模型制备: 采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症模型^[3]。假手术组只开腹把盲肠拉出腹腔, 然后还纳, 不进行结扎穿孔。术后立即皮下注射预热到 37 $^{\circ}$ C 的无菌生理盐水 50 mL/kg, 以补充术中体液丢失及抗休克, 待小鼠麻醉苏醒后常规喂养。术后 24 h 处死小鼠, 取标本进行下列指标检测。

实验过程中对动物的处理严格遵循南昌大学《实验动物管理条例》。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 肺组织 miR-146a 表达的测定: 用 TRIzol 法提取肺组织总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度。miR-146a 反转录采用 TaqMan® miRNA 反转录试剂盒和特异 miRNA 茎环引物, 反应条件: 16 $^{\circ}$ C 30 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。miR-146a 实时聚合酶链反应 (PCR) 采用 TaqMan® miRNA 检测试剂盒, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 40 个扩增循环 (95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s)。在 ABI 7500 定量 PCR 仪上扩增和检测。选取 U6 snRNA 作为内参, miR-146a 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.4.2 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 TNF- α 含量检测: 取出右肺, 用冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行肺灌注, 重复操作 3 次, 回收 BALF, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保

存备用。按照 ELISA 试剂盒操作说明书测定 BALF 中 TNF- α 含量。

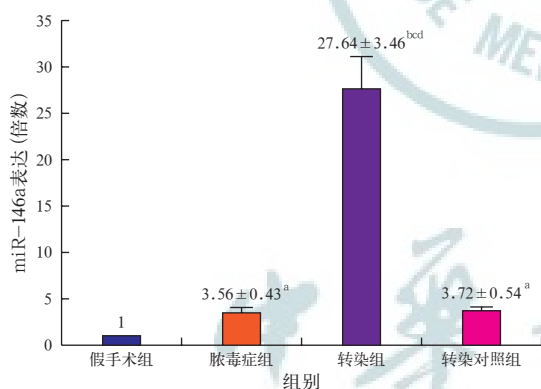
1.4.3 肺组织湿 / 干质量 (W/D) 比值测定:取左肺组织称湿质量 (W), 70 $^{\circ}$ C 干燥 48 h 后称干质量 (D), 计算肺组织 W/D 比值。

1.4.4 肺损伤病理评分:取左肺组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 脱水石蜡包埋制备石蜡切片, 脱蜡后使用苏木素 - 伊红 (HE) 染色, 中性树胶封片, 光镜下观察病理学改变, 按照 Mikawa 等^[4]的方法对切片进行肺组织损伤程度评分。

1.5 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本间均数比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

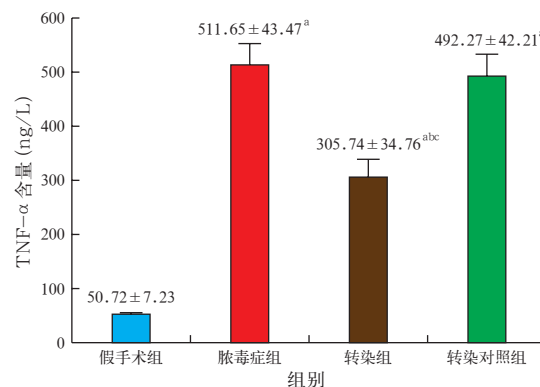
2.1 转染 miR-146a 后小鼠肺组织 miR-146a 表达 (图 1):与假手术组相比, 脓毒症组、转染组、转染对照组 miR-146a 表达量均明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 且转染组 miR-146a 表达上调量明显高于脓毒症组和转染对照组 (均 $P < 0.01$); 而脓毒症组 miR-146a 表达上调量与转染对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: miR-146a 为微小 RNA-146a; 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与脓毒症组比较, ^c $P < 0.01$; 与转染对照组比较, ^d $P < 0.01$

图 1 转染 miR-146a 对脓毒症小鼠肺组织 miR-146a 表达的影响

2.2 上调 miR-146a 表达对脓毒症小鼠 BALF 中 TNF- α 水平的影响 (图 2):脓毒症组、转染组、转染对照组 BALF 中 TNF- α 水平明显高于假手术组 (均 $P < 0.01$); 但转染组 BALF 中 TNF- α 水平明显低于脓毒症组及转染对照组 (均 $P < 0.01$); 而脓毒症组 BALF 中 TNF- α 水平与转染对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: miR-146a 为微小 RNA-146a, BALF 为支气管肺泡灌洗液, TNF- α 为肿瘤坏死因子 - α ; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脓毒症组比较, ^b $P < 0.01$; 与转染对照组比较, ^c $P < 0.01$

图 2 上调 miR-146a 表达对脓毒症小鼠 BALF 中 TNF- α 水平的影响

2.3 上调 miR-146a 表达对脓毒症小鼠肺 W/D 比值的影响 (表 1):与假手术组比较, 脓毒症组、转染组、转染对照组小鼠术后 24 h 肺 W/D 比值均明显升高 (均 $P < 0.01$); 但转染组肺 W/D 比值明显低于脓毒症组与转染对照组 (均 $P < 0.01$); 而脓毒症组肺 W/D 比值与转染对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 上调 miR-146a 表达对脓毒症小鼠术后 24 h 肺 W/D 比值和肺损伤病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺 W/D 比值	肺损伤病理评分 (分)
假手术组	6	4.18 \pm 0.10	1.12 \pm 0.37
脓毒症组	6	6.11 \pm 0.32 ^a	10.53 \pm 1.52 ^a
转染组	6	5.02 \pm 0.29 ^{abc}	6.12 \pm 0.75 ^{abc}
转染对照组	6	6.05 \pm 0.43 ^a	9.73 \pm 1.08 ^a

注: miR-146a 为微小 RNA-146a, 肺 W/D 为肺组织湿 / 干质量比值; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脓毒症组比较, ^b $P < 0.01$; 与转染对照组比较, ^c $P < 0.01$

2.4 上调 miR-146a 表达对脓毒症小鼠肺损伤病理评分的影响 (表 1):与假手术组比较, 脓毒症组、转染组、转染对照组肺损伤病理评分均明显升高 (均 $P < 0.01$); 但转染组肺损伤病理评分明显低于脓毒症组与转染对照组 (均 $P < 0.01$); 而脓毒症组肺损伤病理评分与转染对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

miRNAs 是一类大小约 22 个核苷酸长度的内源性非编码 RNA, 通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区 (3'UTR) 并与其结合, 产生 mRNA 的降解或者抑制 mRNA 的翻译表达^[5-6]。近年来研究发现,

miRNAs 参与机体免疫及炎症反应的调节^[7-11],其中 miR-146a 尤为突出。Pauley 等^[12]将 miR-146a 模拟物 mimic 转染至 THP-1 细胞,可以下调 LPS 诱导的炎症因子释放。Nahid 等^[13]研究发现,THP-1 细胞中的 miR-146a 参与了内毒素耐受形成,在内毒素耐受中起到十分关键的作用。本课题组前期研究发现,体外转染 miR-146a 能下调肺泡巨噬细胞炎症因子表达,负性调控炎症反应^[14-15]。但由于体内外环境的巨大差异,在体内脓毒症肺损伤炎症反应中是否也存在 miR-146a 表达增加,是否能通过上调肺组织中 miR-146a 表达来抑制肺部炎症反应,尚有待进一步研究。

为验证 miR-146a 在体内对肺部炎症反应的调节作用,我们通过体内转染 miR-146a 模拟物 agomir,观察上调 miR-146a 表达对脓毒症肺脏的保护作用。结果显示,经小鼠气管内滴入转染试剂 in vivo-jetPEITM 介导的 miR-146a agomir 后,肺组织 miR-146a 表达上调量明显高于转染对照组,证明应用 in vivo-jetPEITM 介导的 miR-146a agomir 在体内转染成功。采用 CLP 制备小鼠脓毒症肺损伤模型,术后 24 h 肺组织损伤表现及 BALF 中 TNF- α 水平均表明脓毒症肺损伤模型复制成功。

体外实验证实,在 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞中,miR-146a 表达水平与 TNF- α mRNA 表达呈负相关,转染 miR-146a 能下调 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞 TNF- α 表达,抑制细胞的炎症反应^[2,16]。本实验发现,转染组 BALF 中 TNF- α 水平较转染对照组及脓毒症组明显下降,说明在肺内上调 miR-146a 表达同样可以降低 BALF 中 TNF- α 水平,抑制肺内炎症反应。转染组肺组织 W/D 比值及肺组织病理损伤程度也较转染对照组及脓毒症组明显下降,说明上调 miR-146a 表达可以减轻脓毒症诱导的肺组织损伤。

综上,本研究显示,气管内滴入 in vivo-jetPEITM 介导的 miR-146a agomir,可以上调脓毒症小鼠肺内 miR-146a 表达,减轻肺部炎症反应,从而发挥对脓

毒症的肺脏保护作用,提示 miR-146a 可能成为治疗脓毒症肺损伤的新靶点。

参考文献

- [1] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103 (33): 12481-12486.
- [2] 刘芬,曾振国,聂成,等.转染微小 RNA-146a 对肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J].中华危重病急救医学, 2013, 25 (6): 335-338.
- [3] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4 (1): 31-36.
- [4] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. Anesth Analg, 2003, 97 (6): 1751-1755.
- [5] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431 (7006): 350-355.
- [6] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. Cell, 2009, 136 (4): 642-655.
- [7] 刘芬,江榕,李勇,等.微小 RNA-132 在脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应中的表达变化[J].中华危重病急救医学, 2014, 26 (2): 80-83.
- [8] Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19 (20): 2985-2996.
- [9] 张振辉,陈晓辉,江子欣,等.微小 RNA-141 对人单核细胞合成高迁移率族蛋白 B1 的调控作用[J].中华危重病急救医学, 2013, 25 (10): 604-607.
- [10] Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132 (1): 15-26.
- [11] 刘国跃,陈森,戢慧,等.微小 RNA-21-5p 对大鼠高氧性急性肺损伤的影响[J].中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (1): 23-27.
- [12] Pauley KM, Satoh M, Pauley BA, et al. Formation of GW/P bodies as marker for microRNA-mediated regulation of innate immune signaling in THP-1 cells [J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88 (2): 205-212.
- [13] Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, et al. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY [J]. J Biol Chem, 2009, 284 (50): 34590-34599.
- [14] 黄萍,刘芬,曾振国,等.微小 RNA-146a 调控肺泡巨噬细胞中白细胞介素-1 受体相关激酶 1 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的表达[J].中华危重病急救医学, 2014, 26 (5): 300-303.
- [15] Zeng Z, Gong H, Li Y, et al. Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury [J]. Exp Lung Res, 2013, 39 (7): 275-282.
- [16] 曾振国,龚洪翰,李勇,等.脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞中 microRNA-146a 与 TNF- α 的相关性研究[J].中华急诊医学杂志, 2012, 21 (7): 709-712.

(收稿日期: 2015-01-15)

(本文编辑:李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:①品种、品系描述清楚;②强调来源;③遗传背景;④微生物学质量;⑤明确体质量;⑥明确等级;⑦明确饲养环境和实验环境;⑧明确性别;⑨有无质量合格证明;⑩有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪所有动物数量准确;⑫详细描述动物的状况;⑬对动物实验的处理方式有单独清楚的交代,符合动物伦理学标准;⑭全部有对照,部分可采用双因素方差分析。