

超声微泡介导微小 RNA-146a 基因在缺血 / 再灌注肝损伤大鼠中的表达与作用

晏春根¹ 朱冬芳² 夏国园³¹ 绍兴文理学院附属医院消化内科, 浙江绍兴 312000; ² 绍兴文理学院附属医院检验科, 浙江绍兴 312000;³ 绍兴文理学院附属医院超声科, 浙江绍兴 312000

通信作者: 晏春根, Email: ycg28@163.com

【摘要】 目的 评价肝组织微小 RNA-146a (miR-146a) 表达与大鼠缺血 / 再灌注 (I/R) 肝损伤的关系。**方法** 按随机数字表法将 144 只 SD 大鼠分为对照组 (N 组)、假手术组 (S 组) 及 I/R 组, 各组再分为 4 个亚组 ($n=12$), 分别在实验前 1 h 静脉给予 220 μ L 生理盐水 (A 组)、20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 生理盐水 (B 组)、20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂 (C 组)、20 μ L miR-146a 抑制剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂 (D 组)。通过制备载 miR-146a 的超声微泡造影剂, 运用超声靶向破坏微泡, 于实验前及实验后 24 h 检测血浆丙氨酸转氨酶 (ALT)、白细胞介素 -6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 含量, 用反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肝组织 miR-146a 表达, 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肝组织 Toll 样受体 4 (TLR4)、白细胞介素 -1 受体相关激酶 1 (IRAK-1)、IL-6、TNF- α 蛋白表达, 光镜下观察肝组织细胞损伤情况。**结果** 实验前各组以及实验后 24 h N 组和 S 组血浆 ALT、IL-6、TNF- α 含量差异均无统计学意义, 病理观察也无明显肝组织细胞损伤。实验后 24 h, 与 S 组比较, I/R A 组和 D 组肝组织 miR-146a 表达显著下降 (miR-146a/U6 snRNA: 0.51 ± 0.13 、 0.22 ± 0.09 比 1.01 ± 0.02 , 均 $P < 0.01$), 血浆 ALT、IL-6、TNF- α 含量及肝组织 TLR4、IRAK-1、IL-6、TNF- α 表达量显著升高 [ALT (U/L): 103.23 ± 26.64 比 44.16 ± 18.55 , 176.46 ± 7.26 比 49.74 ± 6.83 ; IL-6 (μ g/L): 64.28 ± 16.19 比 17.68 ± 7.54 , 88.49 ± 3.23 比 15.58 ± 2.38 ; TNF- α (μ g/L): 31.28 ± 2.57 比 5.58 ± 3.35 , 59.12 ± 8.74 比 5.27 ± 1.37 ; TLR4/GAPDH: 2.43 ± 0.36 、 3.23 ± 0.71 比 0.96 ± 0.24 ; IRAK-1/GAPDH: 2.34 ± 0.52 、 3.14 ± 0.63 比 0.76 ± 0.21 ; IL-6/GAPDH: 1.02 ± 0.22 、 1.11 ± 0.16 比 0.98 ± 0.37 ; TNF- α /GAPDH: 2.05 ± 0.48 、 2.86 ± 0.27 比 0.59 ± 0.16 ; 均 $P < 0.01$], 且以 I/R D 组升高更为显著 (均 $P < 0.01$); 病理显示肝组织细胞损伤明显; 而 I/R B 组和 C 组转染 miR-146a 模拟剂后肝组织 miR-146a 表达量显著升高 (miR-146a/U6 snRNA: 1.56 ± 0.31 、 2.40 ± 0.53 比 1.01 ± 0.02 , 均 $P < 0.01$), 肝组织 TLR4、IRAK-1、IL-6、TNF- α 的表达量显著下降 (TLR4/GAPDH: 0.77 ± 0.18 、 0.65 ± 0.27 比 0.96 ± 0.24 , IRAK-1/GAPDH: 0.61 ± 0.14 、 0.47 ± 0.20 比 0.76 ± 0.21 , IL-6/GAPDH: 0.80 ± 0.13 、 0.54 ± 0.22 比 0.98 ± 0.37 , TNF- α /GAPDH: 0.41 ± 0.14 、 0.16 ± 0.03 比 0.59 ± 0.16 , 均 $P < 0.01$), 且以 C 组结合超声微泡后表达更为显著 ($P < 0.01$), 病理显示肝组织细胞损伤也更为轻微, B 组和 C 组血浆 ALT、IL-6 及 TNF- α 含量也与 S 组差异无统计学意义。**结论** 超声微泡能高效转染 miR-146a 模拟剂和抑制剂于肝组织细胞; miR-146a 可能负调控 TLR 信号通路介导的 I/R 肝损伤。

【关键词】 微小 RNA-146a; 缺血 / 再灌注, 肝; 超声微泡; 基因转染**基金项目:** 浙江省自然科学基金 (LY15H180008); 浙江省医药卫生科研项目 (2019333712); 浙江省绍兴市科技计划项目 (2015014001)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.01.005

Expression and effect of microRNA-146a gene mediated by ultrasound microbubble in rats with ischemia/reperfusion liver injury

Yan Chungen¹, Zhu Dongfang², Xia Guoyuan³¹Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Shaoxing University, Shaoxing 312000, Zhejiang, China;²Department of Lab Medicine, Affiliated Hospital of Shaoxing University, Shaoxing 312000, Zhejiang, China; ³Department of Ultrasound Diagnosis, Affiliated Hospital of Shaoxing University, Shaoxing 312000, Zhejiang, China

Corresponding author: Yan Chungen, Email: ycg28@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the relationship between the expression of microRNA-146a (miR-146a) in liver tissue and the inflammatory hepatic injury induced by ischemia/reperfusion (I/R) in rats. **Methods** One hundred and forty-four Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: control (group N), sham operation (group S) and group I/R. Each group was subdivided into four subgroups ($n = 12$), and different substances were respectively injected intravenously to rats in different subgroups at 1 hour before the experiment: 220 μ L physiological saline (group A), 20 μ L miR-146a mimic + 200 μ L physiological saline (group B), 20 μ L miR-146a mimic + 200 μ L ultrasound microbubble contrast agent (group C) and 20 μ L miR-146a inhibitor + 200 μ L ultrasound microbubble contrast agent (group D). Before the experiment and after experiment for 24 hours, the plasma concentrations of alanine aminotransferase (ALT), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected, the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure the expression of miR-146a in liver tissue, and Western Blot was applied to detect protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), IL-1 receptor associated kinase 1 (IRAK-1), IL-6 and TNF- α , and the pathological hepatic cell injury was observed. **Results** Before the experiment and 24 hours after experiment in various subgroups of N and S groups, there were no statistical significant differences in the plasma concentrations of ALT, IL-6 and TNF- α , and the expression of miR-146a level and the protein expressions of TLR4, IRAK-1, IL-6 and TNF- α in liver tissues; the pathological examination also did not show any obvious

hepatic cell injury. After the experiment for 24 hours: compared to the group S, the liver tissue miR-146a expression was significantly decreased in the subgroups A and D of group I/R (miR-146a/U6nsRNA: 0.51 ± 0.13 , 0.22 ± 0.09 vs. 1.01 ± 0.02 , both $P < 0.01$), and the plasma concentrations of ALT, IL-6 and TNF- α and the protein expressions of TLR4, IRAK-1, IL-6 and TNF- α in liver tissues were significantly increased [ALT (U/L): 103.23 ± 26.64 vs. 44.16 ± 18.55 , 176.46 ± 7.26 vs. 49.74 ± 6.83 , IL-6 ($\mu\text{g/L}$): 64.28 ± 16.19 vs. 17.68 ± 7.54 , 88.49 ± 3.23 vs. 15.58 ± 2.38 ; TNF- α ($\mu\text{g/L}$): 31.28 ± 2.57 vs. 5.58 ± 3.35 , 59.12 ± 8.74 vs. 5.27 ± 1.37 ; TLR4/GAPDH: 2.43 ± 0.36 , 3.23 ± 0.71 vs. 0.96 ± 0.24 , IRAK-1/GAPDH: 2.34 ± 0.52 , 3.14 ± 0.63 vs. 0.76 ± 0.21 , IL-6/GAPDH: 1.01 ± 0.22 , 1.11 ± 0.16 vs. 0.98 ± 0.37 , TNF- α /GAPDH: 2.05 ± 0.48 , 2.86 ± 0.27 vs. 0.59 ± 0.16 , all $P < 0.01$], moreover, the hepatic pathological lesions were obvious; the liver tissue expression of miR-146a was significantly increased after being transfected with miR-146a mimic in subgroups B and C of group I/R (miR-146a/U6nsRNA: 1.56 ± 0.31 , 2.40 ± 0.53 vs. 1.01 ± 0.02 , both $P < 0.01$), especially in group C combined with ultrasound microbubble ($P < 0.01$). However, the protein expressions of TLR4, IRAK-1, IL-6 and TNF- α in liver tissues were significantly decreased (TLR4/GAPDH: 0.77 ± 0.18 , 0.65 ± 0.27 vs. 0.96 ± 0.24 , IRAK-1/GAPDH: 0.61 ± 0.14 , 0.47 ± 0.20 vs. 0.76 ± 0.21 , IL-6/GAPDH: 0.80 ± 0.13 , 0.54 ± 0.22 vs. 0.98 ± 0.37 , TNF- α /GAPDH: 0.41 ± 0.14 , 0.16 ± 0.03 vs. 0.59 ± 0.16 ; all $P < 0.01$), and the expressions were more significant in the group C combined with ultrasound microbubbles ($P < 0.01$), and the hepatic pathological damage was mild, however, the plasma concentrations of ALT, IL-6 and TNF- α were of no statistical significant differences. **Conclusion** Ultrasound microbubble can efficiently transfect miR-146a mimic and inhibitor into the liver tissue, and miR-146a may negatively regulate the I/R inflammatory liver injury mediated by TLR signaling pathway.

【Key words】 MicroRNA-146a; Ischemia/reperfusion, liver; Ultrasound microbubble; Gene transfection

Fund program: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY15H180008); Zhejiang Provincial Medical Health Science and Technology Project (2019333712); Shaoxing Science and Technology Project of Zhejiang Provincial (2015014001)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.01.005

缺血/再灌注(I/R)损伤是导致急性肝衰竭影响移植肝存活的重要因素,其发病机制尚未完全阐明。目前认为,局部和全身非感染性炎症反应为 I/R 肝损伤的重要特征^[1-2],但炎症反应的具体过程尚不清楚,各种针对 I/R 损伤的抗炎策略在临床实践中也被证实不够理想。微小 RNA(miRNA)存在于各种生物体内,具有广泛调节细胞代谢、增殖、凋亡、分化和发育的作用。目前已被鉴定的人类 miRNA 约有 600 余种,可调控数千种靶基因的信使 RNA(mRNA),众多 miRNA 与靶基因之间形成复杂的功能网络,在免疫反应强度、时效性、细胞分化和功能调节等各个环节发挥着重要的调控作用。miR-146a 是参与炎症应答最重要的 miRNA 之一,多项研究表明,miR-146a 能减少 Toll 样受体(TLR)介导的核转录因子- κB (NF- κB)信号通路炎症细胞因子分泌^[3-4]。由于超声微泡能增强靶向基因转染^[5],因此,本研究通过制备载 miR-146a 的超声微泡造影剂,运用超声靶向破坏微泡,观察 miR-146a 在肝组织细胞内的表达及对 I/R 肝损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂: 清洁级健康 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 220~250 g,购于浙江大学医学实验中心,动物合格证号: SCXK(浙)2016-0037。给予大鼠标准饮食,于 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、12 h 白天/黑夜循环、湿度 $(55 \pm 5)\%$ 的动物房饲养。TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购于美国 Promega 公司,曲通 X-100(TritonX-100)蛋白裂解液购于美国 Sigma

公司,山羊抗大鼠白细胞介素-1受体相关激酶 1(IRAK-1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、TLR4、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)单克隆抗体及过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,大鼠 IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于加拿大 Stress Gen Biotechnologies 公司,大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒购于深圳晶美生物工程有限公司(进口分装),其余试剂均购于生工生物工程(上海)有限公司。U6 小核 RNA(snRNA)、大鼠 miR-146a 模拟剂及抑制剂购于广州锐博生物科技有限公司。

1.2 微泡制备: 取声诺维 1 支,使用前向装有冻干粉末的小瓶内加入注射用生理盐水 5 mL,用力振摇至冻干粉末完全溶解后,六氟化硫微泡直径约 $2.5\ \mu\text{m}$,声诺维微泡约为 $300 \times 10^9/\text{L}$ 。

1.3 动物分组及处置: 按随机数字表法将 144 只 SD 大鼠分为对照组(N组)、假手术组(S组)及 I/R 组,每组又分为 4 个亚组($n=12$),分别于实验前 1 h 静脉给予 220 μL 生理盐水(A组)、20 μL miR-146a 模拟剂 + 200 μL 生理盐水(B组)、20 μL miR-146a 模拟剂 + 200 μL 超声微泡造影剂(C组)、20 μL miR-146a 抑制剂 + 200 μL 超声微泡造影剂(D组)。

I/R 组用 2.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,开腹,阻断门静脉进入肝脏第一次分叉的远端,造成约 70% 肝脏缺血,45 min 后恢复灌注。S 组麻醉大鼠后开腹、关腹,不阻断肝叶供血。N 组大鼠实验前 30 min 尾静脉注射生理盐水,不开腹。各组大鼠给予相应处置后,应用超声探头〔选用 ESAOTE

MyLab30, LA532E 超声诊断仪探头,谐波成像模式,频率 2.50 MHz,机械指数(MI)1.01]经皮辐照肝脏部位 15 min,方法为:匀速来回摆动探头,同时观察超声仪屏幕,保证全部肝组织受到超声波辐照。

本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准,经绍兴文理学院附属医院医学实验动物福利与伦理委员会审批(审批号:2016003)。

1.4 检测指标及方法:各组于实验前及实验后 24 h 分别处死 6 只大鼠,收集下腔静脉血及肝组织备用。

1.4.1 组织学分析:取肝组织以 4% 甲醛水溶液固定,常规石蜡包埋,制备组织切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肝组织细胞损伤情况。

1.4.2 肝功能测定:用 TMS-1024 全自动生化仪检测血浆丙氨酸转氨酶(ALT)水平。

1.4.3 血浆 IL-6、TNF- α 含量测定:按 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,于波长 450 nm 处检测吸光度(A)值,分别用 IL-6、TNF- α 标准液绘制曲线,从曲线中得出各样本 IL-6、TNF- α 含量。

1.4.4 肝组织 miR-146a 表达测定:肝组织匀浆、TRIzol 抽提 RNA,进行反转录。引物序列由生工生物工程(上海)有限公司合成。20 μ L 反应体系。反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个扩增循环。选取 U6 snRNA 为内参照,用 Tanon Gis 2.0 软件分析 miR-146a/U6 snRNA 的灰度值比值。

1.4.5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肝组织蛋白表达:将肝组织匀浆,离心弃沉淀,用冰磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次,离心弃上清液,10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将蛋白转到尼龙膜上,置于含 5% 脱脂牛奶的 Tris-HCl 缓冲液(TBS)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;更换新鲜 5% 脱脂牛奶 TBS 溶液,加入山羊抗大鼠 TNF- α

(1:2 000)、IRAK-1(1:2 000)、IL-6(1:2 000)、TLR4(1:2 000)、GADPH(1:3 000)单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,1% 脱脂牛奶 TBS 溶液洗膜,分别加入过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG(1:2 000)室温振荡孵育 1 h,压片、定影、显影、洗片。Tanon Gis 2.0 软件半定量分析 TLR4、IL-6、IRAK-1、TNF- α 与 GADPH 的灰度值比值。

1.5 统计学方法:使用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内不同时间点多个均数比较采用单因素方差分析,组内不同时间点均数两两比较采用 q 检验;两组同一时间点比较用 t 检验,方差不齐时采用近似 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

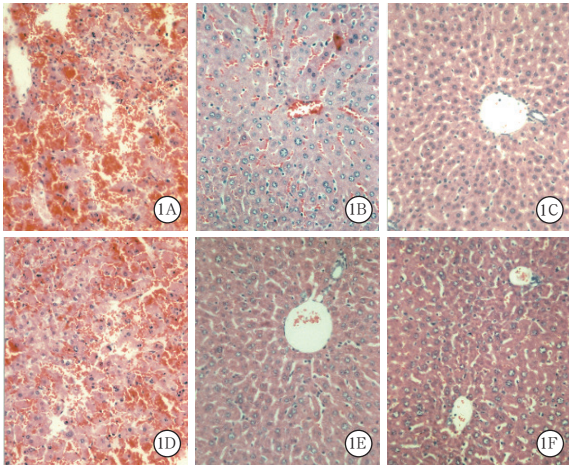
2.1 血浆 ALT、IL-6、TNF- α 含量(表 1):实验前各组血浆 ALT、IL-6 和 TNF- α 含量比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与实验前比较,实验后 24 h, N 组和 S 组血浆 ALT、IL-6 和 TNF- α 含量均无显著变化, I/R A 组和 D 组 ALT、IL-6 和 TNF- α 含量均显著升高,尤以 D 组升高更显著(均 $P < 0.01$),而 I/R B 组和 C 组无显著变化(均 $P > 0.05$)。

2.2 各组肝组织病理学改变(图 1):实验前各组以及实验后 N 组、S 组和 I/R C 组未见明显肝组织损伤现象,肝细胞索排列正常,肝窦无紊乱、充血,肝细胞无变性、坏死,局部可见少量中性粒细胞浸润。实验后 I/R A 组和 D 组肝细胞索结构紊乱,出现大片状肝细胞空泡样变性或肝细胞坏死,大部分肝窦可见淤积的红细胞和微血栓; I/R B 组肝细胞受损较 I/R A 组和 D 组明显减轻,肝细胞索基本正常,肝细胞空泡样变性仍较明显,少数肝窦内可见红细胞淤积和微血栓形成。

表 1 超声微泡介导 miR-146a 基因对 I/R 肝损伤大鼠血浆 ALT、IL-6 和 TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

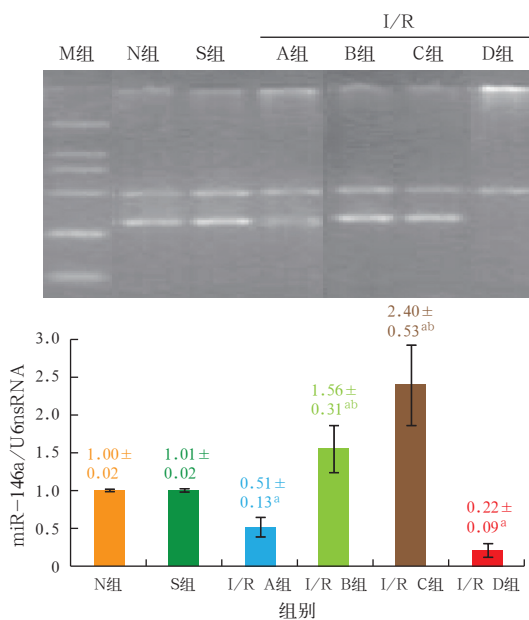
组别	亚组	动物数 (只)	ALT(U/L)		IL-6(μ g/L)		TNF- α (μ g/L)	
			实验前	实验后 24 h	实验前	实验后 24 h	实验前	实验后 24 h
N 组	A 组	6	43.85 $\pm$ 6.48	45.47 $\pm$ 8.17	13.83 $\pm$ 6.42	14.36 $\pm$ 5.34	5.08 $\pm$ 1.52	4.67 $\pm$ 1.36
	B 组	6	44.62 $\pm$ 5.71	45.43 $\pm$ 6.53	14.21 $\pm$ 5.53	13.73 $\pm$ 5.27	4.63 $\pm$ 2.08	4.02 $\pm$ 1.25
	C 组	6	45.06 $\pm$ 7.18	46.43 $\pm$ 9.55	15.06 $\pm$ 4.85	14.47 $\pm$ 6.27	4.16 $\pm$ 1.63	4.57 $\pm$ 1.38
	D 组	6	45.39 $\pm$ 6.37	46.43 $\pm$ 8.53	14.27 $\pm$ 4.92	13.85 $\pm$ 7.34	3.97 $\pm$ 0.85	4.16 $\pm$ 1.02
S 组	A 组	6	45.08 $\pm$ 4.41	44.16 $\pm$ 18.55	15.36 $\pm$ 6.96	17.68 $\pm$ 7.54	4.76 $\pm$ 2.04	5.58 $\pm$ 3.35
	B 组	6	47.06 $\pm$ 7.12	49.43 $\pm$ 8.46	15.24 $\pm$ 5.17	16.63 $\pm$ 6.82	4.61 $\pm$ 1.59	5.16 $\pm$ 5.46
	C 组	6	46.43 $\pm$ 6.09	48.37 $\pm$ 6.25	14.98 $\pm$ 7.26	16.44 $\pm$ 5.54	4.36 $\pm$ 2.01	5.51 $\pm$ 2.52
	D 组	6	47.26 $\pm$ 7.24	49.74 $\pm$ 6.83	14.25 $\pm$ 6.36	15.58 $\pm$ 2.38	4.45 $\pm$ 1.06	5.27 $\pm$ 1.37
I/R 组	A 组	6	46.28 $\pm$ 5.64	103.23 $\pm$ 26.64 ^a	14.37 $\pm$ 5.06	64.28 $\pm$ 16.19 ^a	5.01 $\pm$ 1.24	31.28 $\pm$ 2.57 ^a
	B 组	6	45.81 $\pm$ 4.38	52.63 $\pm$ 5.74 ^b	13.63 $\pm$ 4.52	14.37 $\pm$ 3.62 ^b	4.46 $\pm$ 1.31	4.73 $\pm$ 0.29 ^b
	C 组	6	43.73 $\pm$ 4.72	50.26 $\pm$ 3.45 ^b	14.73 $\pm$ 5.63	15.06 $\pm$ 2.84 ^b	4.76 $\pm$ 1.38	5.28 $\pm$ 1.43 ^b
	D 组	6	45.67 $\pm$ 6.05	176.46 $\pm$ 7.26 ^{ac}	15.06 $\pm$ 4.31	88.49 $\pm$ 3.23 ^{ac}	5.08 $\pm$ 2.23	59.12 $\pm$ 8.74 ^{ac}

注:与 N 组和 S 组相应亚组比较,^a $P < 0.01$;与 I/R A 组比较,^b $P < 0.01$;与 I/R B 组和 I/R C 组比较,^c $P < 0.01$



注: A 为 I/R A 组, B 为 I/R B 组, C 为 I/R C 组, D 为 I/R D 组, E 为 N 组, F 为 S 组; I/R A 组实验前 1 h 静脉给予 220 μ L 生理盐水, I/R B 组给予 20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 生理盐水, I/R C 组给予 20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂, I/R D 组给予 20 μ L miR-146a 抑制剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂
图 1 光镜下观察各组大鼠实验后 24 h 肝组织病理学改变 (HE 染色 低倍放大)

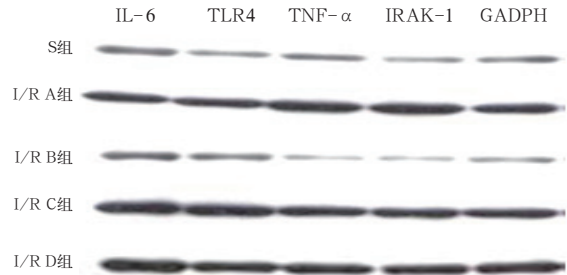
2.3 肝组织 miR-146a 表达 (图 2): 实验后 24 h N 组和 S 组肝组织均有一定的 miR-146a 表达, 但两组间表达量比较差异无统计学意义。实验后 24 h, I/R A 组和 D 组肝组织 miR-146a 表达显著低于 N 组、S 组以及 I/R B 组和 C 组, 尤其 D 组下降更显著 (均 $P < 0.01$); 而 I/R B 组和 C 组显著高于 N 组及 S 组, 且 C 组较 B 组升高更显著 (均 $P < 0.01$)。



注: M 为 DL200 Marker; I/R A 组实验前 1 h 静脉给予 220 μ L 生理盐水, I/R B 组给予 20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 生理盐水, I/R C 组给予 20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂, I/R D 组给予 20 μ L miR-146a 抑制剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂; 与 N 组和 S 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 I/R A 组和 D 组比较, ^b $P < 0.01$

图 2 各组大鼠实验后 24 h 肝组织 miR-146a 表达

2.4 肝组织 TLR4 信号通路信号分子表达 (图 3; 表 2): 实验后 24 h I/R A 组和 D 组肝组织 TLR4、IL-6、IRAK-1、TNF- α 表达量较 S 组显著升高, 且 D 组较 A 组升高更显著 (均 $P < 0.01$); 而 I/R B 组和 C 组表达量则较 S 组明显下降, 且 C 组较 B 组下降更显著 (均 $P < 0.01$)。



注: I/R A 组实验前 1 h 静脉给予 220 μ L 生理盐水, I/R B 组给予 20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 生理盐水, I/R C 组给予 20 μ L miR-146a 模拟剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂, I/R D 组给予 20 μ L miR-146a 抑制剂 + 200 μ L 超声微泡造影剂

图 3 Western Blot 检测各组大鼠实验后 24 h 肝组织 IL-6、TLR4、TNF- α 、IRAK-1 的蛋白表达

表 2 超声微泡介导 miR-146a 基因对 I/R 后 24 h 大鼠肝组织 TLR4 信号通路信号分子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TLR4/GAPDH	IL-6/GAPDH
S 组	6	0.96 ± 0.24	0.98 ± 0.37
I/R A 组	6	2.43 ± 0.36 ^a	1.02 ± 0.22 ^a
I/R B 组	6	0.77 ± 0.18 ^{ab}	0.80 ± 0.13 ^{ab}
I/R C 组	6	0.65 ± 0.27 ^{abc}	0.54 ± 0.22 ^{abc}
I/R D 组	6	3.23 ± 0.71 ^{abcd}	1.11 ± 0.16 ^{abcd}

组别	动物数 (只)	IRAK-1/GAPDH	TNF- α /GAPDH
S 组	6	0.76 ± 0.21	0.59 ± 0.16
I/R A 组	6	2.34 ± 0.52 ^a	2.05 ± 0.48 ^a
I/R B 组	6	0.61 ± 0.14 ^{ab}	0.41 ± 0.14 ^{ab}
I/R C 组	6	0.47 ± 0.20 ^{abc}	0.16 ± 0.03 ^{abc}
I/R D 组	6	3.14 ± 0.63 ^{abcd}	2.86 ± 0.27 ^{abcd}

注: 与 S 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 I/R A 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 I/R B 组比较, ^c $P < 0.01$; 与 I/R C 组比较, ^d $P < 0.01$

3 讨论

免疫系统在维持自身耐受的同时, 会识别外来病原等异己物质, 此种识别功能的敏感性和特异性很大程度上有赖于 TLR 的表达。TLR 不仅能识别细菌脂多糖等外源性配体, 还能识别细胞坏死后释放的热休克蛋白等内源性配体, 内源性配体被识别而启动的炎症应答可能是临床上一些急慢性疾病炎症损伤的重要机制, 调控 TLR 信号通路可能有助于减轻这些疾病的炎症损伤程度^[6]。I/R 是常见的病理生理过程, 而肝脏又是内皮细胞非常丰富的器官, 对 I/R 损伤高度敏感^[7], 自噬可参与免疫耐受的多个环节^[8]。目前认识到 I/R 损伤中存在炎症信号通路的激活, 表现为血清 TNF- α 、IL-6 水平升高^[9]。

本研究显示, I/R 后大鼠血浆及肝组织相关炎症损伤指标如 ALT、IL-6、TNF- α 、TLR4 等显著升高,组织病理也支持肝组织细胞存在炎症损伤改变,而 N 组及 S 组这些指标却无明显改变,提示肝 I/R 过程中确实存在 TLR 介导的非感染性炎症损伤,与本课题组前期研究结果^[1]一致。

由于 miR-146a 参与了对免疫炎症的调控,因此我们推测, miR-146a 可能也参与了肝 I/R 损伤。miR-146 是近来研究较为广泛的 miRNA 之一,包括 miR-146a 和 miR-146b。目前对 miR-146a 的研究较多,而对 miR-146b 知之甚少。miR-146a 是第一个被发现在免疫系统具有调控作用的 miRNA,参与了先天性及获得性免疫。在先天性免疫中, miR-146a 主要负调控 TLR/NF- κ B 通路中信号分子的表达而抑制 NF- κ B 活性;在获得性免疫中, miR-146a 促进调节性 T 细胞表达而影响其功能发挥^[10]。有研究显示,肾脏 I/R 损伤中 miR-146a 可负调控 TLR 信号通路中的 IRAK-1、肿瘤坏死因子受体相关分子 6 (TRAF6) 而抑制 NF- κ B 的活性^[11]。

本研究显示,与 N 组和 S 组比较,大鼠肝 I/R 损伤后肝组织 miR-146a 表达显著下降,结合血浆 ALT、IL-6、TNF- α 等肝细胞炎症损伤指标的显著升高,提示 miR-146a 表达下调可能与 I/R 肝损伤发生相关。由于肝 I/R 损伤中 miR-146a 表达显著下降的同时,肝组织 TLR 信号通路中 TLR4、IRAK-1、TNF- α 的表达显著升高,血浆 ALT、IL-6、TNF- α 水平显著升高,组织病理也提示肝细胞损伤较为严重,表明 miR-146a 与 TLR4-IRAK-1-TNF- α 通路之间表现为负相关性, miR-146a 表达下降的同时, TLR 介导的炎症信号通路被激活,并最终导致肝组织细胞炎症损伤的发生。

为进一步验证 miR-146a 在肝 I/R 损伤中能否调控 TLR 信号通路中的相关基因表达,通过静脉注入 miR-146a 模拟剂(可诱导 miR-146a 表达)或抑制剂(可抑制 miR-146a 表达)发现,转染 miR-146a 模拟剂后能促进 miR-146a 表达,尤其 miR-146a 模拟剂结合微泡并体外超声辐照后肝组织 miR-146a 表达量升高更为显著,随着 miR-146a 表达量升高,肝组织 TLR4、IRAK-1、TNF- α 表达量下降,病理学观察显示肝组织细胞损伤轻微,血浆 ALT、IL-6 及 TNF- α 含量升高并不明显;而给予 miR-146a 抑制剂后大鼠肝组织 miR-146a 表达量显著下降,肝组织 TLR4、IRAK-1、TNF- α 表达量升高,病理学观察显示肝组织细胞损伤明显,血浆 ALT、IL-6

及 TNF- α 含量显著升高。

综上所述, miR-146a 结合微泡并经超声探头体外辐照后, miR-146a 能高效转入肝组织细胞; miR-146a 参与了 I/R 肝损伤过程,其可能通过负调控 TLR4/IRAK-1/TNF- α 信号通路而抑制肝细胞损伤,从而在肝 I/R 损伤过程中起保护作用,上调 miR-146a 或抑制 TLR4/IRAK-1/TNF- α 通路有望成为预防或治疗 I/R 损伤相关性疾病的有效靶点。

参考文献

- [1] 晏春根,朱冬芳,黄丹文,等.超声微泡造影剂介导 HSP72 siRNA 基因转染对大鼠缺血-再灌注肝损伤的作用[J].中华急诊医学杂志,2016,25(3):330-333. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.03.015.
- [2] 徐松涛.缺血预处理对肺缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国临床医学,2012,19(4):443-446. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6358.2012.04.042.
- [3] Xu ST. Protective effects of ischemia preconditioning on lung ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Clin Med, 2012, 19 (4): 443-446. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6358.2012.04.042.
- [4] Lu L, Zhou H, Ni M, et al. Innate immune regulations and liver ischemia-reperfusion injury [J]. Transplantation, 2016, 100 (12): 2601-2610. DOI: 10.1097/TP.0000000000001411.
- [5] Ramkaran P, Khan S, Phulukdaree A, et al. miR-146a polymorphism influences levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in young patients with coronary artery disease [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68 (2): 259-266. DOI: 10.1007/s12013-013-9704-7.
- [6] 周艳清.超声微泡造影剂在肿瘤靶向治疗中的研究进展[J].中国临床研究,2010,23(3):246-247.
- [7] Zhou YQ. Research progress of ultrasound microbubble contrast agent in tumor targeted therapy [J]. Chin J Clin Res, 2010, 23 (3): 246-247.
- [8] Hoyt K, Warram JM, Wang D, et al. Molecular ultrasound imaging of tissue inflammation using an animal model of acute kidney injury [J]. Mol Imaging Biol, 2015, 17 (6): 786-792. DOI: 10.1007/s11307-015-0860-6.
- [9] 李国东,吴莉,付伟伟,等.自噬对大鼠原位肝移植模型供肝缺血再灌注损伤的影响[J].中华器官移植杂志,2016,37(10):635-636. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2016.10.011.
- [10] Li GD, Wu L, Fu WW, et al. Effects of autophagy on ischemia reperfusion injury in rat model of orthotopic liver transplantation [J]. Chin J Organ Transplant, 2016, 37 (10): 635-636. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2016.10.011.
- [11] 王绕绕,宋红丽.自噬在器官移植免疫耐受研究中的进展[J/CD].实用器官移植电子杂志,2016,4(1):57-60. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.013.
- [12] Wang RR, Song HL. Advances in studies on the immune tolerance of autophagy in organ transplantation [J/CD]. Prac J Organ Transplant (Electronic Version), 2016, 4 (1): 57-60. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.013.
- [13] 卢根林,吴爱兵,王宏宾.硫化氢对肠缺血/再灌注损伤大鼠核转录因子- κ B 及下游基因表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2016,23(3):265-268. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.011.
- [14] Lu GL, Wu AB, Wang HB. Influence of hydrogen sulfide on expressions of nuclear factor- κ B and downstream gene in rats with intestinal ischemia/reperfusion injury [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (3): 265-268. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.011.
- [15] Seo HH, Lee SY, Lee CY, et al. Exogenous miRNA-146a enhances the therapeutic efficacy of human mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor secretion in the ischemia/reperfusion-injured heart [J]. J Vasc Res, 2017, 54 (2): 100-108. DOI: 10.1159/000461596.
- [16] Huang Y, Wang H, Wang Y, et al. Regulation and mechanism of miR-146 on renal ischemia reperfusion injury [J]. Pharmazie, 2018, 73 (1): 29-34. DOI: 10.1691/ph.2018.7776.

(收稿日期:2018-05-25)