

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.08.001

NFAT5 基因报告载体的构建及其与 miR-155 关系的实验研究*

舒 彬¹, 李文婷², 刘 真², 张亚洁², 尹 斌², 赵 盼¹, 张同威², 贾赤宇^{2Δ}

(1. 河北北方学院研究生部, 河北张家口 075000; 2. 解放军第三〇九医院烧伤整形科, 北京 100091)

[摘要] **目的** 通过生物信息软件预测出 miR-155 的靶基因, 构建 miR-155 靶基因荧光素酶基因报告载体, 验证其与 miR-155 的对应关系。**方法** 以数据库 miR Base 为依据, 对 miR-155 进行生物信息学分析, 通过 Target Scan、Mir Base、Pic Tar 三大软件预测 miR-155 的靶基因; 将设计合成的 T 淋巴细胞核因子 5(NFAT5) 及其突变序列 NFAT5-mu 序列分别克隆至荧光素酶报告质粒 pMIR-REPORT™ Luciferase; 将第 4 代人胚胎肾 293AD(HEK-293AD) 细胞按随机数字表法分为 4 组: miR-155 mimics + pMIR-NFAT5 组、miR-155 mimics + pMIR-NFAT5-mu 组、miR-155 inhibitor + pMIR-NFAT5 组、miR-155 Negative control + pMIR-NFAT5 组与对照质粒(pRL-TK) 共转染 24 h 后用双荧光素酶检测试剂盒测定相对荧光素酶活性。**结果** Mirbase、TargetScan、PicTar 预测交叉结果显示, NFAT5 基因 3'UTR 与 miR-155 存在结合互补位点; 构建 pMIR-NFAT5、pMIR-NFAT5-mu 重组质粒经酶切及测序鉴定正确; 双荧光素酶报告基因检测系统显示: pMIR-NFAT5 + miR-155 mimics 组较 pMIR-NFAT5 + miR-control 组荧光素酶活性降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而其他组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 成功构建 pMIR-NFAT5、pMIR-NFAT5-mu 荧光素酶报告基因重组质粒; 证实 miR-155 对 NFAT5 基因 mRNA 3'-UTR 具有靶向调控作用, 为下一步研究 miR-155 在吸入性肺损伤机制中的作用提供前期实验室数据和方法。

[关键词] T 淋巴细胞核因子 5; miR-155; 荧光素酶基因报告载体**[中图分类号]** R604**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)08-1009-03

Construction of nuclear factor of activated T-cells 5 mRNA 3'-untranslated region reporter vector and targeting verification between NFAT5 and miR-155*

Shu Bin¹, Li Wenting², Liu Zhen², Zhang Yajie², Yin Bin², Zhao Pan¹, Zhang Tongwei², Jia Chiyu^{2Δ}

(1. Graduate School, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

2. Department of Burn and Plastic Surgery, the 309th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective** To construct a Luciferase reporter vector containing the 3' untranslated region (3'UTR) of NFAT5 and measure the correlation between NFAT5 and miR-155. **Methods** The miR-155 targeting NFAT5 3'UTR was predicted by Target Scan, Mir Base and Pic Tar. NFAT5 and mutant NFAT5 sequence(NFAT5-mu) were then designed and synthesized, and they were cloned into pMIR-REPORT™ Luciferase reporter vector. Human embryonic kidney-293AD (HEK-293AD) cells of the 4th passage were divided into 4 groups according to the random number table. cells in plasimd + miR-155 mimics groups were transfected with pMIR-NFAT5 recombinant plasmid, pRL-Tk plasmid and miR-155 mimics; cells in plasimd + miR-155 mutated groups were transfected with pMIR-NFAT5-mu recombinant plasmid, pRL-Tk plasmid and miR-155 mimics; cells in plasimd + miR-155 control groups were transfected with pMIR-NFAT5 recombinant plasmid, pRL-Tk plasmid and miR-155 Negative control; cells in plasimd + miR-155 inhibitor were transfected with pMIR-NFAT5 recombinant plasmid, pRL-Tk plasmid and miR-155 inhibitor; and were respectively transfected into together by liposome. After culture for 24 h, the luciferase activity was detected by dual luciferase reporter assay system. **Results** TargetScan, Miranda and PicTar shared the results that NFAT5 has the complementary binding sites with 3'UTR of miR-155. And luciferase reporter vector was constructed. Therefore the result of sequencing and double digesting of recombined plasmid were completely correct. Dual-luciferase reporter assay showed that miR-155 possesses a target effect on 3'UTR of NFAT5. Compared to the pMIR-NFAT5 + miR-control group, the luciferase activity of the pMIR-NFAT5 + miR-155 mimics group was decreased, with statistically significant difference ($P < 0.01$), while there was no significant difference at other time points ($P > 0.05$). **Conclusion** The pMIR-NFAT5 recombinant plasmid and pMIR-NFAT5 recombinant mutated plasmid were confirmed with successful construction, and it was found that miR-155 can target NFAT5 mRNA 3'-UTR. The results provide the experiment data for further disclosing the mechanism of inhalation injury on the level of gene expression.

[Key words] nuclear factor of activated T-cells 5; microRNA-155; luciferase reporter gene vector

急性吸入性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)是指心源性以外的各种肺内、外致病因素(创伤, 休克, 严重感染, 吸入有毒气体, 某些药物中毒)引起的急性、进行性、缺氧性呼

吸衰竭。据统计, 烧伤患者合并吸入性损伤约占 5%~10%, 重度吸入性损伤的病死率高达 80%, 是烧伤早期主要死亡原因之一^[1-2]。其发病机制主要是炎症因子骤然增加, 所致的失

控炎症反应有关^[3-4]。核因子 κ B(NF- κ B)信号转导通路的激活和大量的巨噬细胞的浸润在 ALI/ARDS 的病理生物学过程中有着重要作用^[5-6]。微 RNA(miRNA)作为最大的一类基因表达调控因子,miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 区互补或部分互补的结合,使 mRNA 降解或介导其翻译抑制,参与基因转录后水平调控,在细胞发育、增殖、分化和凋亡等生物学行为中发挥着重要作用^[6]。本课题组证实,miR-155 在免疫应答中起重要作用^[7]。本文拟构建 miR-155 靶基因荧光素酶报告载体,验证其与 miR-155 的对应关系,为下一步研究 miR-155 在吸入性肺损伤机制中的作用提供前期实验室数据和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 Bio-ard chromo4 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-ard 公司),化学发光测定仪 Luminometer(美国 Promega 公司),基因扩增仪(杭州博日科技有限公司),Q3000 型 Quawell 分光光度计(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),L1 低温链接仪(珠海黑马医学仪器有限公司),低温台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司),恒温 CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司),Gen5 酶标仪(美国生物科技公司),超净工作台(苏州尚田洁净有限公司),倒置显微镜、数码相机(日本 Olympus 公司),恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司),全自动雪花制冰机 IMS-30(雪花电器有限公司),DW-86L628 超低温保存箱(海尔集团),M8/4R 酶标洗板仪(日本 Olympus 公司),可透射仪(北京金博益生物技术有限公司),DYY-7C 型电泳仪电泳(北京市六一仪器厂)。

1.1.2 主要试剂 质粒抽提试剂盒(美国 Omega 公司),寡核苷酸片段(Invitrogen 公司),胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司),限制性内切酶 Hind III、Spe I、Apa I、BamHI(广州锐博有限公司),2× ligation solution Master Mix(中科瑞泰生物科技有限公司),DNA marker(北京庄盟国际生物基因科技有限公司),质粒中量制备试剂盒(AxyGen 公司),溴化乙锭(ethidium bromide,EB),琼脂粉(美国 Sigma 公司),GeneJammer 转染试剂(美国 Stratagene 公司)。

1.1.3 菌种及细胞 E. coli DH5 α 菌株、HEK-293AD 细胞由解放军总参谋部总医院结核病研究所生物化学实验室孙卫国博士惠赠;pMIR-REPORTTM Luciferase 质粒受赠于 Promega 公司;pRL-TK 质粒购自 Promega 公司,见图 1。

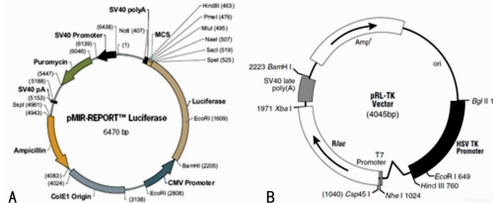


图 1 pMIR-REPORTTM Luciferase(A)和 pRL-TK(B)质粒图谱

1.2 方法

1.2.1 miR-155 的靶基因的预测 miR-155 是人类第 21 号染色体非编码转录本 BIC 第 3 个外显子内,人、鼠、狗、猩猩,以及鸡的基因组中广泛存在;以数据库 miR Base (<http://www.mirbase.org/>)为基础,同时参考 TargetScan 和 PiTar 软件预测 miR-155 的靶基因,并结合文献中报道与炎症相关的基因作为进一步筛选的条件。

1.2.2 靶基因的载体的构建与鉴定

1.2.2.1 寡核苷酸序列的合成 从 MirBase 网站检索 miR-155,以鼠类为研究对象,选定 mmu-miR-155,进入 TargetScan 网页界面,获取活化性 T 淋巴细胞核因子 5(NFAT5) mRNA 3'-UTR 与 miR-155 结合的序列,设计目标序列 NFAT5 和突变序列 NFAT5-mu,包括:含有 miR-155 作用位点,并适当向上游和下游延伸 5~10 nt,分别在 5'端插入 Hind III 和 Spe I 酶切位点,以备后续连接之用,同时添加 Apa I 酶切位点,以备后续鉴定。寡核苷酸基因片段由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2.2.2 靶基因载体构建 退火:两条寡核苷酸片段在 1× 的退火 Buffer 中,95 °C 变性 5 min,每分钟下降 1 °C 直到 30 °C,作为与 pMIR-REPORTTM Luciferase 荧光素酶载体连接的插入片段。退火体系:互补寡核苷酸片段各 0.5 μ L,11.5 μ L 的 1×退火 Buffer,终浓度 2 ng/ μ L。目的基因片段保存 4 °C,长期不用可 -80 °C 保存;pMIR-REPORT 荧光素酶连接载体制备:采用感受态 E. coli DH5 α 扩增 LUC 质粒,抽提质粒并凝胶提纯,行限制性内切酶 Hind III 和 Spe I 酶切和片段凝胶回收。Hind III 和 Spe I 酶切双酶切体系:LUC 质粒 30.0 μ L,双蒸水 4.0 μ L,Hind III 酶 1.0 μ L,Spe I 酶 1.0 μ L,10× Buffer 4.0 μ L,L1 低温链接仪金属浴 37 °C 培养 24 h;靶基因的连接:体系:目的基因 4.0 μ L,连接载体 0.2 μ L,2×连接缓冲液 5.0 μ L,双蒸水 0.8 μ L,L1 低温链接仪金属浴 16 °C 培养 16 h。

1.2.2.3 转化 120 μ L E. coli DH5 α 感受态细胞冰水浴融化(1~2 min),加入 11 μ L 连接产物,置于冰水浴 35 min,擦干离心管后置于 42 °C 热休克 90 s,迅速置于冰水浴 5 min;加入氨苄西林的 LB 液体培养基 800 μ L,37 °C 摇床培养 1 h;吹打混匀沉淀,取 300 μ L 细菌悬液均匀涂布与 Amp^r 平板上,置于 37 °C 恒温箱培养 10 h。

1.2.2.4 挑选菌落及重组质粒的鉴定 挑取白色光亮的单菌落,接种于 5 mL 的 LB 液体培养基,37 °C 摇床孵育 6.5 h(致培养基变浑浊),按质粒抽提试剂盒实验步骤提取重组质粒;将提取的质粒载体,用 Apa I 单酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳,待溴酚蓝迁移至凝胶 2/3 处,用凝胶扫描系统检测 DNA 的位置及条带;将 Apa I 单酶切检测符合的样品送北京博爱永华公司测序。

1.2.3 重组质粒转染与双荧光素酶活性检测 转染前 24 h 将 2×10⁵/mL 的 HEK-293AD 细胞接种于 96 孔板,每孔加 100 μ L 无抗 1640 培养基,当细胞生长密度至培养板底部的 75%~80%时开始转染。转染分组:pMIR-NFAT5+miR-control 组、pMIR-NFAR5+miR-155 mimics 组、pMIR-NFAR5+miR-155+inhibitor 组、pMIR-NFAT5-mu+miR-155 mimics 组;各组中均转入对照质粒 pRL-TK,按每孔 25.0 μ L opti-MEM 培养基稀释 0.5 μ L LipofectmineTM 2000 脂质体,轻柔混合,室温静置 5 min(小于 25 min);按每孔量用 25.0 μ L opti-MEM 培养基稀释 0.20 μ g 报告载体、0.01 μ g pMIR-TK 和 0.375 μ L 寡核苷酸,轻柔混合;将两者混合,室温孵育 20 min。每组设 3 个复孔,分别将 50 μ L 质粒 DNA-寡核苷酸-转染试剂混合物加至 96 孔板中,稍微震荡混匀,4 h 后更换 1640 培养基,37 °C 细胞培养箱共培养 24 h 后。按照 Dual LuciferaseTM 报告基因检测试剂盒说明书进行操作,在荧光仪检测得到各组萤火虫荧光素酶活性值(F)和海肾荧光素酶活性值(R),取 F/R 为相对活性值进行数据统计。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两样本 t 检验,以 P<0.05 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 靶向关系预测 应用 3 个软件预测及相关文献查阅,初步筛选出 miR-155 相关靶点是 NFAT5 和 TRAF3(图 2),miR-155 与靶基因的 3'-UTR 序列部分互补,与 NFAT5 和 TRAF3 的“seed sequences”都在 7-mer 以上。靶点预测结果设计的靶基因序列及突变的对照序列,见图 3。

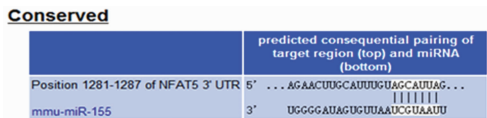
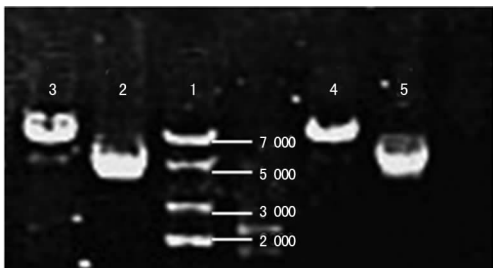


图 2 miR-155 与靶基因的 3'-UTR 序列比对



图 3 靶基因序列及突变序列

2.2 靶基因的载体的构建与鉴定 将目的基因与 PMIR-REPORT 荧光素酶连接空载体连接,转化扩增后提取重组质粒,进行酶切鉴定。行 Apa I 单酶切可见重组质粒能够线性化,比在 pMIR-REPORT™ Luciferase 质粒的条带靠后,进一步测序证实插入片段与预期设计完全相符(图 4)。同时将上述目的连接产物送北京博艾永华公司测序,测序结果证实与设计合成的序列完全吻合,见图 5。



1:DNA 分子标记物;2:NFAT5 质粒;3:NFAT5 质粒 Apa I 单酶切;4:NFAT5-mu 质粒 Apa I 单酶切;5:NFAT5-mu 质粒。

图 4 Apa I 单酶切鉴定图

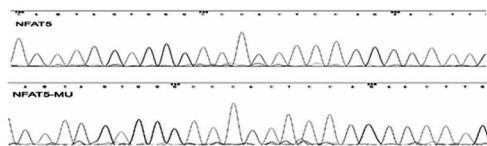


图 5 靶基因及突变基因 3'UTR 测序结果

2.3 双荧光素酶活性检测 为了研究 miR-155 是否直接调控 NFAT5 的表达,本研究成功构建双荧光素酶报告基因载体,通过 Dual-luciferase™ 报告基因检测系统检测各组 F 和 R,取 F/R 值,见图 6。

	萤火虫荧光(F)				海肾荧光(R)				比值(F/R)					
NF-NC	3348104	2198995	3238519	3111810	1814	706	1475	1534	1845.702315	3113.449008	2195.606102	2028.559322		
NF-miics	1460051	832311	1258439	1267885	983	726	1241	1024	1485.301119	1146.433884	1014.052377	1238.168945		
NF-Inhibitor	5205686	3676314	2049594	3106762	2223	1509	1342	1015	2341.739091	2436.258449	1527.245902	3060.849261		
NF-miics	1904340	2279875	2203102	2125021	845	945	841	812	2253.656805	2412.566138	2619.621879	2617.020996		

图 6 双荧光素酶活性及比值

2.4 各组相对荧光素酶值比较 pMIR-NFAT5+miR-control 组(2 295.83±563.50)与 pMIR-TMEM33+miR155-mimics 组(1 220.99±198.78)相对荧光素酶值比较差异有统计学

意义(P<0.01);pMIR-NFAT5-MU+miR-155 组(2 475.72±176.99)与 pMIR-NFAT5+miR-control 组相比,其相对荧光素酶值差异无统计学意义(P>0.05)。

3 讨论

吸入性肺损伤因发病机制错综复杂,其关键因素始终未能得到突破性进展。临床研究和动物实验均表明炎细胞浸润、大量自由基生成及促炎症介质在肺组织过度表达是烟雾吸入肺损伤的早期主要病理特征[8]。而 NF-κB 信号通路的激活诱导的失控炎症反应起着重要的促进作用[9-11]。研究表明,肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、干扰素 γ(IFN-γ)、白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-10、巨噬细胞炎性蛋白-1α(MIP-1α)、环氧化酶-2(COX-2)及前列腺素等炎性因子都是 NF-κB 调控的下游基因。大量炎症因子及炎症因子间的级联放大作用,加重吸入性肺损伤的进展。

NFAT5 是一种广泛表达的核转录因子,细胞外液渗透压能够调节其活性,在肾、脑、肺、皮肤及眼等多种组织中表达[13]。除了在维持渗透压有重要作用外,近些年的研究表明其在胚胎的形成和发育、肝脏解毒和肿瘤转移方面都有重要的生物学作用。研究表明,血糖波动大的患者,血浆中促炎因子 IL-6、IL-8 和 TNF-α 等水平明显增高,且患有糖尿病微血管并发症的患者中,外周血单核细胞中 NFAT5 明显增多,且与弹性反应增强子结合蛋白的 DNA 结合能力明显增多[14]。在海水诱导的吸入性肺损伤模型中,肺组织中 NFAT5 及炎症因子在 mRNA 和蛋白水平上表达量上升。并且体外实验使用 NFAT5 siRNA 抑制 NFAT5 的表达后 p-NF-κB 和炎症因子水平的显著下降[15]。因此,笔者猜想 NFAT5 与肺损伤关系密切,可能参与 NF-κB 信号转导通路激活,从而调节吸入性肺损伤。

miRNA 作为最大的一类基因表达调控因子,在维持自身的稳态,调节机体的生长发育及疾病的发生、发展方面起着重要的作用。miR-155 参与机体对炎症刺激的应答,维持机体的免疫功能[16-17]。研究表明,miR-155 通过其靶基因 IKK 激酶家族、Smad2、Fas 相关死亡蛋白等减少 NF-κB 通路的激活,以及次级效应方式抑制炎症因子的表达,从而减少对机体的损伤。

本研究结果证实,miR-155 能够与 NFAT5 mRNA-3'UTR 互补结合,负向调控海参荧光素酶的表达。吸入性损伤的研究一直是国内外研究的焦点,本课题组立足 miRNA,拟在 ALI、NFAT5 和 NF-κB 架起桥梁,在基因层面转录后水平研究 ALI。本实验成功构建荧光素酶报告基因重组质粒,并验证 miR-155 对 NFAT5 基因 mRNA 3'-UTR 具有靶向调控作用。为进一步研究 miR-155 在吸入性肺损伤机制中的作用奠定了基础。

参考文献

[1] 柴家科.实用烧伤外科[J].北京:人民军医出版社,2014:300-301.
 [2] 包校伟,袁华,吴忠好,等.烧伤治疗 5 235 例回顾分析[J].中国现代手术学杂志,2015,19(5)379-380.
 [3] Lange M,Hamahata A,Traber DL,et al. A murine model of sepsis following smoke inhalation injury[J]. Biochem Biophys Res Commun,2010,391(3):1555-1560.
 [4] 罗慧,李学军,曹雯娟.烧伤并发脓毒症后免疫与凝血功能及营养代谢变化对创面愈合的影响研究进展[J].中华烧伤杂志,2014,30(2):137-140. (下转第 1014 页)

- 2010,126(2):417-422.
- [3] Lee E, Kwon JW, Kim HB, et al. Association between antibiotic exposure, bronchiolitis, and TLR4 (rs1927911) polymorphisms in childhood asthma[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2015, 7(2): 167-174.
- [4] 中华医学会儿科学会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(10): 745-753.
- [5] Yang S, Li R, Qu X, et al. Fosinoprilat alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling in monocytes[J]. *Cell Immunol*, 2013, 284(1/2): 182-186.
- [6] Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright AL, et al. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(4 Pt 1): 1403-1406.
- [7] Liu Y, Yin H, Zhao M, et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases; a comprehensive review[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2014, 47(2): 136-147.
- [8] Lucas K, Maes M. Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation; possible treatments targeting the TLR4 pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(1): 190-204.
- [9] Zhang L, Xu AG, Zhao W, et al. A toll-like receptor 4 (TLR4) variant is associated with asthma severity[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(5): 7849-7854.
- [10] Bravo M, Schurman S, Garantziotis S, et al. Relationships between TLR4 pathway single nucleotide polymorphisms, distance to roadway, and asthma diagnosis and severity[C]. 143 rd APHA Annual Meeting and Exposition, Chicago, American, 2015.
- [11] Kim EH, Lee JS, Lee NR, et al. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis due to house dust mite allergen in normal and allergic rhinitis subjects[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e105814.
- [12] Liu CF, Drocourt D, Puzo G, et al. Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/-4 co-activation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75983.
- [13] Bedoya SK, Lam B, Lau K, et al. Th17 cells in immunity and autoimmunity[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013 (2013): 986789.
- [14] Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(1): 8-18.
- [15] Besnard AG, Togbe D, Couillin IA, et al. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation[J]. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4(1): 3-10.
- [16] Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(9): 1281-1290.
- [17] Karnati HK, Pasupuleti SR, Kandi R, et al. TLR-4 signaling pathway: MyD88 independent pathway up-regulation in chicken breeds upon LPS treatment[J]. *Vet Res Commun*, 2015, 39(1): 73-78.

(收稿日期: 2016-09-28 修回日期: 2016-12-16)

(上接第 1011 页)

- [5] Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex[J]. *Leukemia*, 2015, 29(5): 1004-1017.
- [6] Ivey KN, Srivastava D. microRNAs as developmental regulators[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(7): a008144.
- [7] 李文婷, 舒彬, 刘真, 等. 微小 RNA-155 对脂多糖所致小鼠急性肺损伤的干预作用[J]. *中华烧伤杂志*. 2015, 95(28): 2310-2314.
- [8] Lange M, Hamahata A, Traber DL, et al. A murine model of sepsis following smoke inhalation injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010(391): 1555-1560.
- [9] Cox RA, Burke AS, Jacob S, et al. Activated nuclear factor kappa B and airway inflammation after smoke inhalation and burn injury in sheep[J]. *J Burn Care Res*, 2009(30): 489-498.
- [10] Shwartz MD, Moore EE, Moore FA, et al. Nuclear factor- κ B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(8): 1285-1292.
- [11] Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex Biology gets more complex[J]. *Leukemia*, 2015, 29(5): 1004-1017.
- [12] Kempson SA, Zhou Y, Danbolt NC. The betaine/GABA transporter and betaine: roles in brain, kidney, and liver [J]. *Front Physiol*, 2014(5): 159.
- [13] Farnkvist LM, Lundman BM. Outcomes of diabetes care: a population-based study[J]. *Int J Qual Health Care*, 2003, 15(4): 301-307.
- [14] 薄丽燕. NFAT5 和 Ang- II 及其受体 AT1 在海水吸入型肺损伤中的作用及其机制的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [15] Zhen Liu et al. MicroRNA-146a negatively regulates PTGS2 expression induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells[J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(1): 86-92.
- [16] Xiao B, Liu Z, Li BS, et al. induction of miR-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory in the inflammatory response[J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(6): 916-925.

(收稿日期: 2016-09-21 修回日期: 2016-11-19)