

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.17.002

## miRNA-24-3P 靶向调节 SP1 对 RAW264.7 细胞功能的影响\*

程东良<sup>1</sup>, 梁媛<sup>2</sup>, 陈衍晨<sup>3</sup>, 卿 娣<sup>4</sup>

(1. 郑州大学人民医院/河南省人民医院儿科, 郑州 450000; 2. 河南省开封市儿童医院血液科 470000;

3. 南方医科大学珠江医院儿科, 广州 510282; 4. 广东省广州市妇女儿童医疗

中心呼吸科 510623)

[摘要] 目的 探讨 miRNA-24-3P(miR-24-3P)在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)过程中的作用机制。

方法 在 RAW264.7 细胞中分别转染 miR-24-3P mimics、miR-24-3P inhibitor 及各自阴性对照,检测各组细胞中 miR-24-3P 的相对表达水平,检测各组细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、SP1、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的相对表达水平,并通过双荧光素酶报告基因检测系统验证 miR-24-3P 对 SP1 的靶向作用。结果TNF- $\alpha$  mRNA、IL-6 mRNA 在各组细胞中的表达水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。SP1 mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA 在各组细胞中的相对表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。SP1 在各组细胞中的表达水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。NF- $\kappa$ B 在各组细胞中的相对表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。双荧光素酶报告基因分析表明,共同转入 miR-24-3P 与 SP1 野生型会显著抑制 HEK293 细胞中的荧光酶表达( $P < 0.05$ )。结论 miR-24-3P 可通过影响 SP1 基因的翻译进而影响炎性介质的释放,在 ARDS 过程中发挥作用。

[关键词] miR-24-3P;急性呼吸窘迫综合征,成人;SP1

[中图分类号] R563.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)17-2257-04

## miRNA-24-3P affect RAW264.7 cell function by modulating SP1\*

CHENG Dongliang<sup>1</sup>, LIANG Yuan<sup>2</sup>, CHENG Yanchen<sup>3</sup>, QING Di<sup>4</sup>

(1. Department of Pediatric, People's Hospital Affiliated to Zhengzhou University/Henan

Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China; 2. Department of

Hematology, Children's Hospital of Kaifeng city, Kaifeng, Henan 475318, China; 3. Department

of Pediatric, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou,

Guangdong 510282, China; 4. Department of Respiratory, Guangzhou

Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

[Abstract] Objective To discuss the mechanism of miR-24-3P in the process of acute respiratory distress syndrome (ARDS). Methods miR-24-3P mimics, miR-24-3P inhibitor and their negative controls were

transfected in RAW264.7 cells respectively. The relative expression of miR-24-3P in each cell was detected. The relative expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, SP1 and NF- $\kappa$ B were detected in each cell, and the regulation of miR-24-3P on the target gene SP1 was detected by dual luciferase reporter gene. Results The expression level ofTNF- $\alpha$  mRNA and IL-6 mRNA in each group was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The relative expression level of SP1 mRNA and NF- $\kappa$ B mRNA in each group was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The expres-sion of SP1 in each group was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The gene analysis of dual luciferase reporter showed that the fluorescence activity was significantly inhibited after cotransfection of miR-24-3P and SP1 inHEK293 cells ( $P < 0.05$ ). Conclusion miR-24-3P can play an important role in the process of ARDS by influencing the translation of SP1 gene and affecting the release of inflammatory mediators.

[Key words] miRNA-24-3P; respiratory distress syndrome, adult; SP1

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)现在仍是儿童重症监护室(pediatric intensive care unit, PICU)中威胁生命的重要原因之一。ARDS的发病机制未完全明了,目前主要考虑与炎症有关,探寻 ARDS 的发病机制及有效的治疗手

段是危重病医学面临的重要临床课题。

微小 RNAs(microRNAs, miRNA)是一类具有 20~22 个核苷酸单位的调控性 RNA,通过与信使 RNA 序列的结合或者在转录后水平抑制目的基因的表达来发挥作用<sup>[1]</sup>。通过前期的研究<sup>[2]</sup>,笔者发现在

ARDS 小鼠模型的肺组织中 miR-24-3P 显著差下调,对 miR-24-3P 进行靶基因的预测发现 SP1 基因是 miR-24-3P 其中一个候选靶基因。SP1 是炎症反应过程中的重要反应蛋白,本研究将 SP1 基因作为 miR-24-3P 的候选目的基因,探讨 SP1 是否为 miR-24-3P 的直接靶基因蛋白。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** RAW264.7 细胞、HEK293 细胞由南方医科大学珠江医院再生医学研究所提供,胎牛血清为澳大利亚的 Hyclone 血清,脂多糖购自美国的 Sigma 公司,miRNA mimics、miRNA inhibitor 及阴性对照购自广州锐博公司,小鼠 SP1、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、GAPDH 一抗购自 Abcam 公司,Trizol、M-MLV 反转录试剂盒、SYBR Green qPCR 试剂盒、Lipofectamine 2000 均购于美国 Invitrogen 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司。倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品,定量 PCR 仪为 ABI PRISM 7500 Sequence Detection System,Western blot 电泳仪及转膜仪为美国的 Bio-Rad 品牌产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及实验分组** 从液氮中取出冻存的细胞 RAW264.7、HEK293 细胞,水浴中剧烈摇晃使细胞快速溶解,3 000 r/min 离心 5 min,吸弃冻存液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 遍,再用新鲜的完全培养基 DMEM(含 10% 的胎牛血清、100 U 青/链霉素)悬浮细胞。培养条件均为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度,倒置显微镜观察细胞生长状态。等待细胞长满后用 0.25% 胰蛋白酶消化,冻存或传代。实验分为 5 组:具体加样见下表。Mock 组(miR-24-3P mimics+OPTI-MEI 培养基)、miR-24-3P mimics 组(miR-24-3P mimics+Lipofectamine 2000)、miR-24-3P mimics control 组(miR-24-3P mimics control+Lipofectamine 2000)、miR-24-3P inhibitor 组(miR-24-3P inhibitor+Lipofectamine 2000)、miR-24-3P inhibitor control 组(miR-24-3P inhibitor+Lipofectamine 2000)。

**1.2.2 RAW264.7 细胞转染** 转染前 1 d,1×10<sup>6</sup> 个/孔细胞铺至 6 孔培养板中,过夜培养,待第 2 天细胞生长至 50% 融合度时进行转染。转染前 2 h 给细胞上 OPTI-MEM(无血清、无双抗)培养基,1.5 mL/孔。采用 250  $\mu$ L 的 OPTI-MEI 培养基稀释各组 siRNA 至适当浓度(mimics、mimics control 转染时终浓度为 50 nmol/L;inhibitor、inhibitor control 转染时终浓度为 100 nmol/L),轻轻混匀。轻轻摇匀转染剂 Lipofectamine 2000,取 10  $\mu$ L 溶于 250  $\mu$ L 的 OPTI-MEI 培养基中,室温孵育 5 min。将前两步所稀释的液体混合成转染液,轻轻混匀,室温孵育 20 min。将转染液加入培养板,轻轻摇匀。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,转染后(用于 RNA 检测需转染 16 h,

用于蛋白检测则需转染 36 h)每孔中加入终浓度为 100 ng/mL 脂多糖进行刺激<sup>[3]</sup>,3 h 后收集细胞进行检测。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR(Q-PCR)检测** 各组细胞中 miR-24-3P 的表达水平 取以上各组处理后的细胞,用 PBS 冲洗 3 遍,使用 Trizol、氯仿等提取出各组细胞的总 RNA,使用分光光度计算出各组总 RNA 的浓度及 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 比值以验证 RNA 的纯度。并进行琼脂糖 RNA 电泳检验 RNA 的完整性。使用通用反转录得到 cDNA,U6 为内参,具体操作按试剂盒说明书进行。miR-24-3P 上游引物为 5'-TGG CTC AGT TCA GCA GGA ACA G-3';下游引物为 5'-GAT CCA GTC TCA GGG TCC GAG-3'。U6 上游引物为 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游引物为 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。反应体系:cDNA(1:20) 5.0  $\mu$ L,上游引物 0.5  $\mu$ L,下游引物 0.5  $\mu$ L,SYBR Green PCR Master Mix 10.0  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 4.0  $\mu$ L,共 20  $\mu$ L。反应条件:95 °C 5 min;95 °C 15 s,65 °C,15 s,72 °C 32 s,40 个循环。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后继续从 72 °C 缓慢加热到 95 °C。每个标本重复 3 次。反应结束后分析 PCR 反应曲线,得到各组的 Ct 值。目的基因相对表达量:实验组 Ct 值/对照组 Ct 值。

**1.2.4 Q-PCR 检测** 各种细胞中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA、白细胞介素-6 (IL-6) mRNA、SP1 mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA 的相对表达水平 取以上各组转染及处理后的细胞,用 PBS 冲洗 3 遍,使用 Trizol、氯仿等提取出各组细胞的总 RNA,使用分光光度计算出各组总 RNA 的浓度及 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 比值以验证 RNA 的纯度。并进行琼脂糖 RNA 电泳检验 RNA 的完整性。按照说明书进行反转录得到 cDNA,以 GAPDH 为内参进行 PCR 反应。TNF- $\alpha$  上游引物为 5'-CCC CAG TCT GTA TCC TTC TAA-3',下游引物为 5'-TCG AGG CTC CAG TGA ATT-3',上游引物为 5'-ACA ACC ACG GCC TTC CCT ACT T-3',下游引物为 5'-AGC CTC CGA CTT GTG AAG TGG T-3';SP1 上游引物为 5'-GAT TTC TCC ACA GCA CTC ATG-3',下游引物为 5'-TTA GAG GAG CTG AAG GAC AGA-3';NF- $\kappa$ B 上游引物为 5'-GAC AAA AAC TGG GCC ACT CT-3',下游引物为 5'-GAT CAC TTC AAT GGC CTC TGT-3';GAPDH 上游引物为 5'-GGC CTC CAA GGA GTA AGA AA -3',下游引物为 5'-GCC CCT CCT GTT ATT ATG G-3'。反应体系:cDNA(1:20)5.0  $\mu$ L,上游引物 0.5  $\mu$ L,下游引物 0.5  $\mu$ L,SYBR Green PCR Master Mix 10.0  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 4.0  $\mu$ L,共 20.0  $\mu$ L。反应条件:95 °C 2 min;95 °C 15 s;60 °C 32 s,40 个循环,为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后继续从 60 °C 缓慢加热到 95 °C。每个标本重复 3 次。

反应结束后分析 PCR 反应曲线,得到各组的 Ct 值。目的基因相对表达水平:实验组 Ct 值/对照组 CT 值。

**1.2.5 Western blot 检测** 各组细胞中 SP1、NF-κB 的表达水平 取上述各组处理后的细胞,用 PBS 冲洗 3 遍,按说明书提取各组细胞中的核蛋白,使用 Bradford 分光光度法测定蛋白含量。每组样品取 20 μg 核蛋白样品分别加到预制的聚丙烯酰胺凝胶后 80 V 电泳 2 h,然后,20 V 30 min 转移至 PVDF 膜,封闭过夜,分别加入一抗抗体 4 °C 孵育 12 h, TBST 充分洗膜后再分别与二抗室温孵育 1 h, TBST 充分洗膜,进行 ECL 化学发光显色。曝光后扫描,分别以 SP1/GAPDH、NF-κB(P65)/GAPDH 显影条带灰度值的比值来代表 SP1、NF-κB(P65)的相对表达水平。

**1.2.6 双荧光素酶报告基因检测** 野生型及突变型 SP1 3'-UTR 载体构建及鉴定由上海吉凯生物技术有限责任公司完成。转染前 24 h 将对数生长期的 HEK293 细胞接种于 24 孔板中,当细胞贴壁并且汇合度达到 30%时,按照 Lipofectmine 2000 说明书进行瞬时转染。设转染 miR-24-3P mimics 的实验组和转染对照序列的阴性对照组。转染后 24 h,用 1×PBS 洗涤细胞,尽可能的弃尽残存液体。每孔各加入 100 μL PLB,室温摇床摇动 20 min 充分裂解细胞。将 20 μL 荧光素酶测试试剂(LAR)加入孔板中,仪器上读取荧光素酶的荧光值(整合时间 2 s,读数时间 10 s),然后再加入 20 μL 缓冲液,放入仪器读取海肾荧光素酶的荧光值。

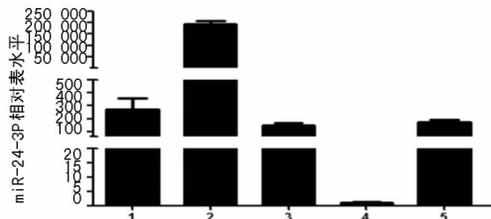
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件对实验数据进行数据分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组样本均数间的比较采用单因素方差分析法(One-Way ANOVA),符合方差齐性检验后使用 LSD 法进行两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 转染后** 各组细胞中 miR-24-3P 的相对表达水平 转染后在荧光显微镜下观察见到细胞质中有绿色荧光。收集细胞后对各组细胞做 Q-PCR,后计算各组  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值为各组细胞 miR-24-3P 相对表达水平,结果显示:Mock 组 miR-24-3P 的相对表达水平是  $256.85 \pm 90.12$ , miR-24-3P mimics 组  $194.215.66 \pm 12.555.57$ , miR-24-3P mimics control 组  $145.99 \pm 22.4$ , miR-24-3P inhibitor 组  $1.04 \pm 0.23$ , miR-24-3P inhibitor control 组  $173.59 \pm 15.94$ 。miR-24-3P mimics 组、miR-24-3P inhibitor 组和 mock 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示转染成功,见图 1。

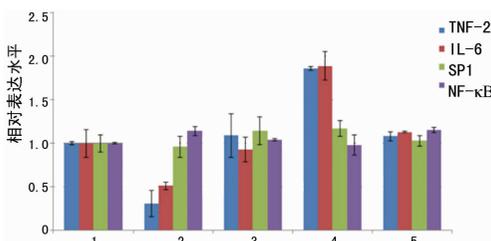
**2.2 Q-PCR 检测** 各种细胞中 TNF-α mRNA、IL-6 mRNA、SP1 mRNA、NF-κB mRNA 的相对表达水平 与 Mock 组比较, TNF-α mRNA、IL-6 mRNA 在转染 miR-24-3P mimics 组细胞中的表达水平显著下降,在 miR-24-3P inhibitor 组细胞中的表达水平显著上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2)。SP1 mRNA

NA、NF-κB mRNA 在各组细胞中的相对表达水平没有显著变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。



1: mock 组; 2: miR-24-3P mimics 组; 3: miR-24-3P mimics control 组; 4: miR-24-3P inhibitor 组; 5: miR-24-3P inhibitor control 组

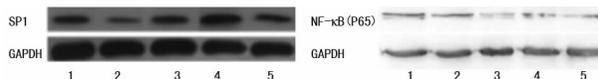
**图 1 miR-24-3P 在各组细胞中的相对表达水平分析图**



1: Mock 组; 2: miR-24-3P mimics 组; 3: miR-24-3P mimics control 组; 4: miR-24-3P inhibitor 组; 5: miR-24-3P inhibitor control 组

**图 2 TNF-α mRNA、IL-6 mRNA、SP1 mRNA、NF-κB mRNA 在各组细胞中的相对表达水平分析图**

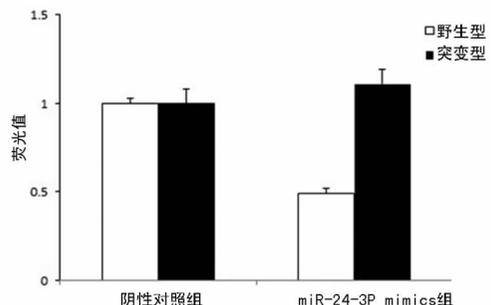
**2.3 Western blot 检测** 各组细胞中 SP1、NF-κB 的表达水平 与 Mock 组比较, SP1 在 miR-24-3P mimics 组细胞中的表达水平显著下降,在 miR-24-3P inhibitor 组细胞中的表达水平显著上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3)。NF-κB 在各组细胞中的相对表达水平无显著意义,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3。



1: Mock 组; 2: miR-24-3P mimics 组; 3: miR-24-3P mimics control 组; 4: miR-24-3P inhibitor 组; 5: miR-24-3P inhibitor control 组

**图 3 SP1、NF-κB 在各组细胞中的表达水平**

**2.4 双荧光素酶报告基因检测** 双荧光素酶报告基因检测结果显示,与阴性对照组比较,转染 miR-24-3P mimics 后能够使标化的荧光值降低 59% ( $P < 0.01$ ),而突变株荧光值则未有明显改变( $P > 0.05$ ),见图 4。



**图 4 双荧光素酶报告基因检测结果**

### 3 讨论

ARDS 是指脓毒症、重症肺炎等肺内外疾病侵袭后出现的以肺泡毛细血管损伤为主要表现的临床综合征。其临床特征包括呼吸频率加快和呼吸窘迫,进行性低氧血症,胸部 X 射线呈现弥漫性肺泡浸润。现阶段 ARDS 的发病机制主要为:多种炎性介质大量释放引起肺泡上皮细胞及肺泡内皮细胞的损伤、肺泡中积聚富含蛋白及中性粒细胞的渗出液,形成透明膜<sup>[4-5]</sup>,后期出现肺纤维化。参与炎性反应的细胞主要有多形核白细胞、巨噬细胞等。巨噬细胞受到刺激后可释放白三烯、IL-1、TNF- $\alpha$  等炎性介质,引发强烈的炎症反应,同时在肺泡局部释放大量蛋白溶解酶、氧自由基,强烈趋化多形核白细胞在肺内聚集,导致炎症的级联反应及 ARDS 的发生。ARDS 目前尚无特效治疗方法,临床上主要采取积极治疗原发病、控制感染、抑制炎症、呼吸及循环功能支持、防治并发症及多器官功能衰竭等综合措施<sup>[6-8]</sup>。

miRNA 是一类广泛存在于真核生物中的、长约 21~25 碱基的非编码小分子 RNA。它的作用机制是以不完全互补的方式和靶基因的 3' 端非编码区序列相结合,通过抑制蛋白质的翻译发挥它的生物学功能,这种调控一般不会影响靶基因 mRNA 的稳定性<sup>[9]</sup>。miRNA 在 ARDS 发生发展过程中的作用越来越引起人们的重视。CAI 等<sup>[10]</sup>通过注射脂多糖建立了 ALI/ARDS 小鼠模型,然后进行 miRNA 芯片筛查,发现了大量差异表达的 miRNAs,并用 RT-PCR 的方法检验其表达的差异。使用内毒素处理巨噬细胞,然后进行 miRNA 芯片筛查,发现 miR-132、miR-146a、miR-155 表达水平增加,miR-125b 水平下降<sup>[11-12]</sup>。XIE 等<sup>[13]</sup>在博来霉素致小鼠肺纤维化模型中发现 161 个差异表达的 miRNA。LIU 等<sup>[14]</sup>发现在特发性肺纤维化患者及博来霉素致肺纤维化模型小鼠中 miR-21 均高表达,肿瘤坏死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ )也可以促进 miR-21 的表达。miR-155 可以标靶角化细胞生长因子从而调节肺纤维化,其水平的高低与肺纤维化程度有关<sup>[15]</sup>。

笔者通过气管内滴注脂多糖构建小鼠 ARDS 模型,发现 miR-24-3P 显著下调,预测其靶基因并进行深度分析,选取了候选 miRNA miR-24-3P 及其候选靶基因 SP1 进行进一步的研究。通过本实验的研究笔者发现 miR-24-3P 对炎症因子的分泌具有调控作用。炎性因子的分泌主要通过两个途径进行的,一个是 NF- $\kappa$ B 通路;另一个是 MAPK 通路,其通路末端的关键转录因子 SP1、API、STAT1、CREB、MAX 均与炎性基因转录有关。当人为的调节细胞内 miR-24-3P 表达时,细胞内的 NF- $\kappa$ B 蛋白及 mRNA 的表达均未受到影响,这说明 miR-24-3P 过表达下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 不是通过调控 NF- $\kappa$ B 转录活性这一途径实

现的。为了检测 miR-24-3P 在细胞内是否存在对 SP1 蛋白的调控作用,笔者在 RAW264.7 细胞中分别转染了 miR-24-3P 及其特异抑制剂,检测核内 SP1 蛋白水平。结果表明 miR-24-3P 能抑制核内 SP1 水平,当把 miR-24-3P 功能抑制后,核内 SP1 水平获得恢复。当在用 miR-1224 转染 RAW264.7 细胞,检测其对 SP1 基因 mRNA 水平的影响,定量结果显示 miR-24-3P mimics 的过表达对 SP1 基因在 mRNA 水平上没有显著影响。通过荧光素酶报告实验结果表明,转染 miR-24-3P 可以明显下调 SP1-3'UTR 相连的荧光素酶活性。所以得出结论:miR-24-3P 可在转录后水平上抑制 SP1 基因的翻译,限制 SP1 的蛋白水平,进而影响炎性介质的释放。RAW264.7 细胞是小鼠单核/巨噬细胞,单核/巨噬细胞是 ARDS 过程中主要的反应细胞,所以本实验选用 RAW264.7 细胞作为实验细胞,检测 miR-24-3P 对 RAW264.7 细胞释放炎性介质的影响。当然本实验具有一定的局限性,未做动物实验,这是笔者下一步实验的重点。

### 参考文献

- [1] OZEN M, CREIGHTON C, OZDEMIR M, et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(12):1788-1793.
- [2] 王斌, 卿娣, 程东良, 等. 脂多糖诱发的小鼠急性肺损伤肺组织中 microRNA 表达谱变化[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(12):931-935.
- [3] NIU Y, MO D, QIN L, et al. Lipopolysaccharide-induced miR-1224 negatively regulates tumour necrosis factor- $\alpha$  gene expression by modulating Sp1 [J]. *Immunology*, 2011, 133(1):8-20.
- [4] LIN J, ZHANG W, WANG L, et al. Diagnostic and prognostic values of Club cell protein 16 (CC16) in critical care patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 32(2).
- [5] EPELBAUM O, ARONOW W S. Mechanical ventilation in the acute respiratory distress syndrome[J]. *Hosp Pract* (1995), 2017, 45(3):88-98.
- [6] YANG T Z, LIU Y, LIU Y Y, et al. The use of rheum palatum L. In the treatment of acute respiratory distress syndrome: a Meta-analysis of randomized, controlled trials[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2017, 14(2):334-347.
- [7] VADASZ I. Keratinocyte growth factor in acute respiratory distress syndrome[J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(6):459-460.
- [8] JONES T K, MEYER N J. What's in a number? Platelet cunct dynamics as a novel mediator of acute respiratory distress syndrome survival[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(10):1285-1287.
- [9] ZEALY R W, WRENN S P, DAVILA S, et al. MicroRNA-binding proteins: specificity and function[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017, 8(5). (下转第 2265 页)

现 CHOP 表达增加,因此 IRE1 $\alpha$  高表达亦可能抑制 CHOP 表达,二者之间的平衡保护细胞适度 ERS<sup>[12]</sup>。

ERS 虽然可以维持内质网稳态,但过强或过久 ERS 则会启动细胞凋亡程序,CHOP 则是其中的一条凋亡通道<sup>[13]</sup>,CHOP 基因敲除小鼠在由三硝基苯磺酸诱导发生结肠炎过程中细胞凋亡减弱<sup>[14]</sup>。本研究中,DSS 诱导的 UC 模型组小鼠结肠上皮组织中 CHOP mRNA 的表达水平较健康组明显上调,与文献<sup>[15]</sup>报道一致;使用冬凌草甲素干预则显著降低增高的 CHOP mRNA,表明冬凌草甲素将 UC 小鼠结肠上皮组织中 ERS 限制在适当程度内从而利于其发挥保护细胞作用。

综上所述,冬凌草甲素可以抑制小鼠结肠上皮组织中炎症相关因子表达,调控 ERS,维持内质网稳定,这可能是冬凌草甲素防治 UC 的作用机制之一。目前国内外对冬凌草甲素在 ERS 方面作用的报道较少,因此仍需在动物水平和细胞水平上对其详细作用机制进行进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 安阿玥. 肛肠病学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:341.
- [2] CHONG W C, SHASTRI M D, ERI R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress;a vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4):771-789.
- [3] HOSOMI S, KASER A, BLUMBERG R S. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(1):81-88.
- [4] 郭萍, 李玉山, 郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展[J]. *药物评价研究*, 2010, 33(2):144-147.
- [5] 臧凯宏, 杜丽东, 刘晓梅, 等. 冬凌草甲素片对醋酸诱导的小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用(英文)[J]. *中国现代应用药学*, 2012, 29(9):781-785.
- [6] 邹一贺, 王丽京, 邓慧君, 等. 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用[J]. *中国实验动物学报*, 2016,

24(6):585-590.

- [7] MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B(p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate Sodium(DSS)-induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1):51-58.
- [8] TRÉTON X, PÉDRUZZI E, CAZALS-HATEM D, et al. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3):1024-1035.
- [9] 王辉, 叶燕, 禹志领. 冬凌草甲素对 HepG2 细胞内质网应激蛋白 IRE-1、PERK 和 CHOP 的作用研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(3):263-266.
- [10] QIAN Y, TIFFANY-CASTIGLIONI E. Lead-induced endoplasmic reticulum(ER) stress responses in the nervous system[J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(1):153-162.
- [11] RUTKOWSKI D T, KAUFMAN R J. That which does not kill me makes me stronger:adapting to ER stress[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(10):469-476.
- [12] ZHANG H S, CHEN Y, FAN L, et al. The endoplasmic reticulum stress sensor IRE1(in intestinal epithelial cells) is essential for protecting against colitis[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(24):15327-15336.
- [13] KASER A, ADOLPH T E, BLUMBERG R S. The unfold protein response and gastrointestinal disease[J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(3):307-319.
- [14] NAMBA T, TANAKA K I, ITO Y, et al. Positive role of CCAAT/Enhancer-Binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis[J]. *American Journal of Pathology*, 2009, 174(5):1786-1798.
- [15] CHOI Y, KOH S J, LEE H S, et al. Roxithromycin inhibits nuclear factor kappaB signaling and endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis in mice[J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(12):1664-1671.

(收稿日期:2017-12-20 修回日期:2018-02-23)

(上接第 2260 页)

- [10] CAI Z G, ZHANG S M, ZHANG Y, et al. MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(1):37-43.
- [11] AMBROS V. microRNAs; tiny regulators with great potential[J]. *Cell*, 2001, 107(7):823-826.
- [12] ALTMAN N. Replication, variation and normalisation in microarray experiments[J]. *Appl Bioinformatics*, 2005, 4(1):33-44.
- [13] XIE T, LIANG J, GUO R, et al. Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis id-

entifies multiple sites of molecularregulation[J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(9):479-487.

- [14] LIU G, FRIGGERI A, YANG Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation ofpulmonary fibroblasts and lung fibrosis[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(8):1589-1597.
- [15] POTTIER N, MAURIN T, CHEVALIER B, et al. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts; implication in epithelial-mesenchymal interactions [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8):e6718.

(收稿日期:2017-12-18 修回日期:2018-02-21)