

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.12.007

miR-142-3p 在感染后肠易激综合征中的表达及意义

林湫泠 张定国 熊锋 姚君

【摘要】 目的 探讨微RNA (miR)-142-3p 在感染后肠易激综合征 (PI-IBS) 中的表达及意义, 进一步阐明 miR-142-3p 调控 PI-IBS 发生发展的分子机制。方法 使用脂多糖 (LPS) 刺激后, 在大鼠肠上皮细胞上考察 miR-142-3p 对高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)-Toll 样受体 4 (TLR4) 靶基因的作用; 通过 TargetScan 预测软件分析发现 HMGB1 是 miR-142-3p 的靶基因, 之后采用旋毛虫感染建立 PI-IBS 模型, 原代肠上皮细胞进行小干扰 RNA (siRNA) 转染实验, 提取肠上皮细胞总 RNA, 采用实时荧光定量 PCR 检测, 检测细胞中 miR-142-3p、HMGB1 和 TLR4 的 mRNA 表达水平, 考察 miR-142-3p 对 HMGB1-TLR4 靶基因的作用, 并进一步验证 HMGB1 在 miR-142-3p 抗炎中的介导作用。结果 炎症基因 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 均为 HMGB1-TLR4 的靶基因。使用 LPS 刺激后, 施加 miR-142-3p 大大抑制了 HMGB1-TLR4 靶基因 (NLRP3、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α) 的表达 (P 均 < 0.01)。使用 siRNA 对肠上皮细胞中的 HMGB1 靶向敲低后, 细胞中的 HMGB1 表达降低超过 80%, HMGB1-TLR4 靶基因 (NLRP3、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α) 的表达均无明显变化 (P 均 > 0.05)。结论 miR-142-3p 在肠上皮细胞中具有抗炎作用, 其抗炎作用依赖于 HMGB1。

【关键词】 感染后肠易激综合征; 炎症; 微 RNA-142-3p; 高迁移率族蛋白 B1

Expression and significance of miR-142-3p in post-infectious irritable bowel syndrome Lin Qiuling[△], Zhang Dingguo, Xiong Feng, Yao Jun. [△]Department of General Practice, Shenzhen People's Hospital (the First Affiliated Hospital, Southern University of Science and Technology; the Second Clinical Medical College, Jinan University), Shenzhen 518020, China
Corresponding author, Zhang Dingguo, E-mail: zdg8012@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the expression and significance of miR-142-3p in post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS), and to further clarify the molecular mechanism of miR-142-3p in regulating the incidence and development of PI-IBS. **Methods** After stimulation using the lipopolysaccharide (LPS), the effect of miR-142-3p on high mobility group box 1 (HMGB1) - toll-like receptor 4 (TLR4) target genes was investigated in the rat intestinal epithelial cells. TargetScan prediction software analysis showed that HMGB1 was a target gene of miR-142-3p. Subsequently, the PI-IBS model was established using trichinella infection. Primary intestinal epithelial cells were subjected to the siRNA transfection assay. Total RNA was extracted from intestinal epithelial cells. The expression levels of miR-142-3p, HMGB1 and TLR4 mRNA in cells were quantitatively determined by real-time PCR. The effect of miR-142-3p on the HMGB1-TLR4 target genes was evaluated. The mediating role of HMGB1 in the anti-inflammation of miR-142-3p was further validated. **Results** Inflammatory genes NLRP3, IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α were all the target genes of HMGB1-TLR4. After the LPS stimulation, administration of miR-142-3p significantly inhibited the expression levels of HMGB1-TLR4 target genes (NLRP3, IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α) (all $P < 0.01$). After the targeted knockdown of HMGB1 in intestinal epithelial cells using siRNA, the HMGB1 expression level in the cells was down-regulated by more than 80%, whereas no significant changes were observed in the expression levels of HMGB1-TLR4 target genes (NLRP3, IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α) (all $P > 0.05$). **Conclusion** miR-142-3p plays an anti-inflammatory role in intestinal epithelial cells, which is dependent on HMGB1.

【Key words】 Post-infectious irritable bowel syndrome; Inflammation; miR-142-3p; High mobility group box 1

感染后肠易激综合征 (PI-IBS), 是肠易激综合征 (IBS) 的重要类型和研究热点^[1]。PI-IBS 的

发病机制目前尚不十分明确, 报道表明肠道感染引起的黏膜炎症反应和免疫功能激活可能是 PI-IBS

基金项目: 深圳市科创委项目 (JCYJ20210324113803011)

作者单位: 518020 深圳, 深圳市人民医院 南方科技大学附属第一医院 暨南大学第二临床医学院全科医学科 (林湫泠), 消化内科 (张定国, 熊锋, 姚君)

通信作者, 张定国, E-mail: zdg8012@sina.com

发病的重要因素^[24]。微RNA (miR) -142-3p 是一种在结直肠等多种组织器官中高表达的 miRNA, 对炎症反应具有重要的调控作用。我们对 miR 测序数据进行分析时发现, 表达差异显著的 miR-142-3p 可能可以作为 PI-IBS 的生物学标志物。前期临床实验表明, 与正常人群的样品相比, PI-IBS 患者样品中 miR-142-3p 水平明显下调, 提示 miR-142-3p 与 PI-IBS 发生发展有密切关系。本研究拟进一步在动物实验方面探讨 miR-142-3p 在 PI-IBS 中的表达及意义, 阐明 miR-142-3p 调控 PI-IBS 发生发展的分子机制, 为 PI-IBS 的临床治疗提供理论依据和治疗手段。

材料与方法

一、实验材料与试剂

miR-142-3p、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 和 Toll 样受体 4 (TLR4) 引物 (北京擎科生物科技有限公司), HMGB1 小干扰 RNA (siRNA) 及阴性对照 (广州艾基生物技术有限公司), 脂多糖 (LPS)、胃蛋白酶 (美国 Sigma 公司), 磷酸盐缓冲液 (PBS) (上海碧云天生物技术有限公司), 原代肠上皮细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司), TRIzol 试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 转染试剂 (深圳市达科为生物技术股份有限公司)。

二、PI-IBS 大鼠模型建立

1. 实验动物

10 只 SD 雄性大鼠由深圳市人民医院动物中心提供, 鼠龄 6~7 周, 体质量 23~26 g, 所有大鼠饲养在恒温、恒湿的清洁级动物房, 光线调整为 12 h 日/夜循环。采用旋毛虫感染建立 PI-IBS 大鼠模型, 采用旋毛虫造模过程如下: 将旋毛虫保种大鼠乙醚麻醉后, 颈椎脱臼处死, 剔取四肢及膈肌肌肉。将肌肉尽量剪碎后置于 500 mL 含有 2.5% 胃蛋白酶和 0.5% 盐酸的消化液中, 置于 37 °C 水浴消化 12~20 h。反复将消化后混合液经 200 目滤布过滤收集旋毛虫幼虫。将滤液收集 500 r/min, 10 min 离心, 弃上清, 重悬于 pH 为 7.2~7.4 的 PBS, 计数调整浓度至 1500 只/mL。给予每只大鼠 0.2 mL 含 350~400 条幼虫的琼脂悬液灌胃, 感染后饲养 8 周, 建立 PI-IBS 模型。本动物实验伦理

经深圳市人民医院审批通过 (医院伦理编号: LL-KY-2021248)。

2. siRNA 转染实验

原代肠上皮细胞培养于 12 孔板中。细胞达到 60%~80% 汇合度时, 用 jetPRIME[®] 转染试剂开展 siRNA 转染实验。首先取 10 μL 的 HMGB1 siRNA (10 nmol) 及阴性对照 siRNA (10 nmol) 添加到 100 μL jetPRIME[®] buffer 中, 涡旋 10 s, 离心 10 s, 随后向混合液中加入 3 μL jetPRIME[®] 转染试剂, 涡旋振荡后, 室温静置 10 min。随后将混悬液滴加到细胞中, 置于培养箱继续培养 24 h。随后用 LPS (500 ng/mL) 及 miR-142-3p 处理细胞 24 h, 最后收集肠上皮细胞总 RNA。

3. 实时荧光定量 PCR 检测

检测细胞中 miR-142-3p、HMGB1 和 TLR4 mRNA 的表达水平: 提取肠上皮细胞总 RNA: 使用 TRIzol 试剂盒进行提取。cDNA 合成: 根据反转录试剂盒说明书操作。miR-142-3p 引物序列: 正向引物为 5'-GGGTGTAGTGTTCCTAC-3', 反向引物为 5'-CAGTGCGTGTCGTGGAG-3'。HMGB1 引物序列: 正向引物为 5'-AGGATCCCAATGCACC CAAGAG-3', 反向引物为 5'-TTCGCAACATCACCA ATGGACAG-3'。

TLR4 引物序列: 正向引物为 5'-GGTCAGAC GGTGATAGCGAG-3', 反向引物为 5'-GGTCCAGGT TCTTGGTTGAG-3'。qRT-PCR 反应: a 反应条件: SYBR Green (2 ×) 5 μL/孔, cDNA 2 μL/孔, 正反向引物各 0.5 μL/孔, ddH₂O 2 μL/孔; b 反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s (35 次循环)。反应结束后导出数据, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-142-3p、HMGB1 和 TLR4 mRNA 相对表达量。

三、统计学处理

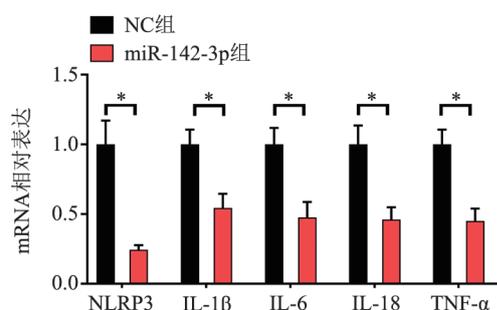
采用 SPSS 22.0 统计软件。所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验或非参数检验 (Mann-Whitney *U* 检验) 进行统计分析, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

一、miR-142-3p 在肠上皮细胞中具有抗炎作用

基于 miR-142-3p 可能与 HMGB1-TLR4 有潜在的相关性, 笔者将在大鼠肠上皮细胞上考察 miR-142-3p 对 HMGB1-TLR4 靶基因的作用。炎症基因

NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (NLRP3)、IL-1 β 、IL-6、IL-18和TNF- α 均为HMGB1-TLR4的靶基因。使用LPS刺激后,施加miR-142-3p大大抑制了NLRP3、IL-1 β 、IL-6、IL-18和TNF- α 的表达,这表明miR-142-3p具有抗炎作用(图1)。



注:与NC组比较, * $P < 0.01$ 。

图1 miR-142-3p在LPS处理的肠上皮细胞中对炎症基因的影响

二、HMGB1是miR-142-3p的靶基因

TargetScan预测软件分析表明miR-142-3p在HMGB1的3'UTR上有潜在的结合位点(CACUAC),表明miR-142-3p很有可能调控HMGB1的表达(图2A)。此外,此结合位点在不同种属之间有良好的保守性。miR-142-3p可抑制HMGB1 3'UTR活性,miR-142-3p浓度越高,HMGB1 3'UTR活性越低($F = 10.86$, $P < 0.05$,其中miR-142-3p浓度为50 nmol vs. 25 nmol, $P = 0.0102$; miR-142-3p浓度100 nmol vs. 25 nmol, $P = 0.0001$)(图2B)。然而

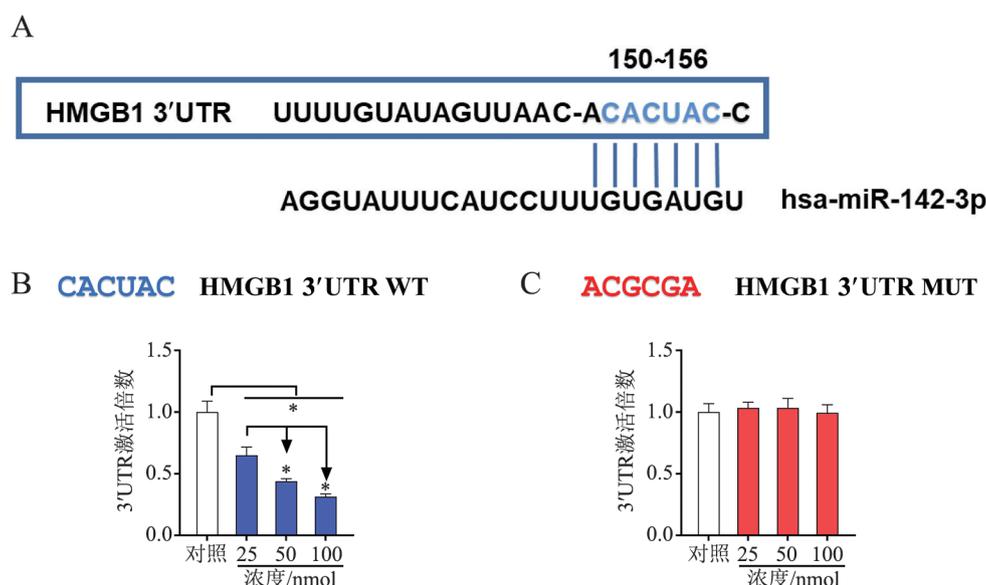
当结合位点突变为ACGCGA,miR-142-3p不再调控HMGB1 3'UTR的活性,这表明miR-142-3p调控HMGB1依赖结合位点CACUAC(图2C)。

三、miR-142-3p的抗炎作用依赖于HMGB1

为验证HMGB1在miR-142-3p抗炎中的介导作用,笔者团队用siRNA对肠上皮细胞中的HMGB1进行靶向敲低。siRNA可以使细胞中的HMGB1表达降低超过80%,这证明敲低效率高,结果可靠(图3A, $P < 0.05$)。敲低细胞中HMGB1后,miR-142-3p失去抗炎作用(图3B)。这表明miR-142-3p通过抑制HMGB1来达到抗炎效果。

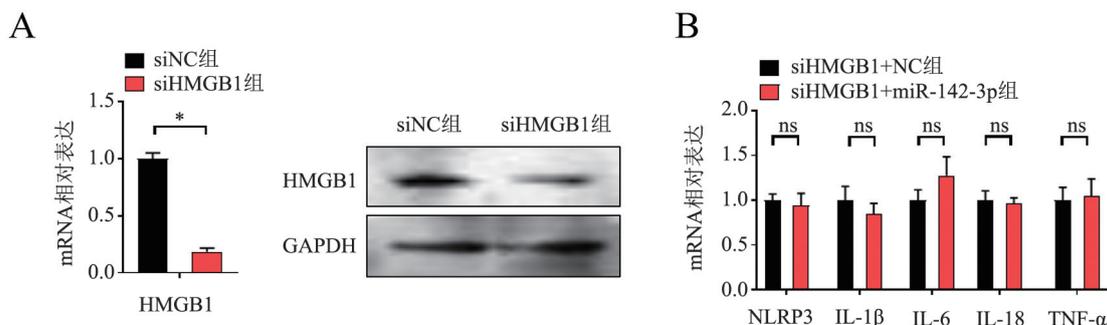
讨 论

IBS是一种以复发性腹部不适或疼痛为特征的临床综合征^[56]。在全球范围内,IBS在男性中的发病率为4%,在女性中为14%,且发病年龄多集中于青壮年,并具有慢性、易复发性等特点,已成为严重影响人们生活质量的主要疾患之一^[56]。临床研究显示,急性胃肠道感染与IBS发病关系密切,3%~36%的急性肠道感染患者最终会发展为IBS^[7]。这种在感染性胃肠炎发生后形成的IBS又称PI-IBS,是IBS的重要类型和研究热点^[4]。PI-IBS的发病机制目前尚不十分明确,有研究认为细胞因子失衡、肠道菌群失调,特别是肠道免疫应答的异常激活是导致PI-IBS发生的关键因素^[24]。



注:与对照组比较, * $P < 0.01$;与25 nmol组比较, * $P < 0.01$ 。

图2 miR-142-3p在HMGB1的潜在结合位点



注: A 为 HMGB1 的 siRNA 敲低效率, 与 siNC 组比较, $*P < 0.01$; B 为在 LPS 和 HMGB1 siRNA 处理的肠上皮细胞中 miR-142-3p 对炎症基因表达的影响, ns 为 $P > 0.05$ 。

图3 HMGB1 在 miR-142-3p 抗炎中的作用

笔者团队既往研究发现 PI-IBS 患者体内抗炎和促炎细胞因子表达水平存在失衡, 其导致低度炎症和免疫激活最终导致了疾病的发生。通过恢复 PI-IBS 患者体内细胞因子的稳态, 可以有效预防和缓解 PI-IBS 的症状。由于免疫细胞因子和应答网络的复杂性, 因此发掘更多调节 PI-IBS 肠道炎症反应的关键调控因子, 对于阐明 PI-IBS 发病机制和开发新型治疗方法至关重要。

miR 是一类内源性非编码小 RNA, 广泛参与调控细胞的多种生理过程, 其异常表达与多种疾病的发生发展密切相关。得益于核酸药物和靶向递送理论和转化研究的迅猛发展, 目前已有靶向 miR 的药物进入到临床研究。miR-142-3p 是一种在结直肠等多种组织器官中高表达的 miR, 对炎症反应具有重要的调控作用。Zhai 等^[8]研究发现, miR-142-3p 通过靶向自噬基因 ATG16L1 缓解炎症反应。笔者对 miRNA 靶基因测序数据进行分析发现, 表达差异明显的 miR-142-3p 可能可以作为 PI-IBS 的生物学标志物。HMGB1 是一种重要的晚期致炎因子, 参与多种组织和细胞的炎症反应和免疫应答。HMGB1 可通过与 TLR 家族受体结合, 激活下游信号通路 (如核因子 κ B) 和炎症小体 (如 NLRP3), 促进细胞因子的合成和释放, 调控免疫应答反应, 并参与多种炎症相关疾病的发生^[9,10]。HMGB1 是一种炎症性蛋白, 其广泛分布于各种组织中, 并可通过与多种受体结合促进下游信号转导通路的激活, 参与炎症性疾病的发生发展。TLR 是 HMGB1 的重要受体, 参与多种感染和机体损伤机制。HMGB1 可以和 TLR4、TLR2 受体结合, 引起核因子 κ B 信号转导通路上调, 促进炎症细胞因子释放, 进而引发炎症反应^[11,12]。有研究显示,

HMGB1 在 NSAID 诱导的 PI-IBS 中起到重要作用。使用 NSAID 诱导 PI-IBS 后, 大鼠肠道和血清中的 HMGB1 表达提高, 施加人重组 HMGB1 蛋白会加重 NSAID 诱导的肠道损伤, 激活核因子 κ B 信号转导通路, 促进肠道 TNF- α 等促炎因子的表达, 并同时降低抗炎因子 IL-10 的水平, 而 HMGB1 抗体则能部分阻断 NSAID 诱导的肠道损伤^[13]。另外, 敲除 HMGB1 的 TLR4 后, 明显缓解 HMGB1 的加重肠道损伤, 证明 HMGB1-TLR4 信号通路在调控 NSAID 诱导的 PI-IBS 中发挥重要作用^[13]。

笔者团队前期收集 PI-IBS 患者及健康人群的样品各 10 例进行 qRT-PCR 实验, 检测 miR-142-3p、HMGB1 和 TLR4 的表达情况, 发现与正常人群相比, PI-IBS 患者中 miR-142-3p 水平明显下调, 而 HMGB1 和 TLR4 的 mRNA 水平明显上调。这说明 miR-142-3p 可能与 HMGB1-TLR4 有潜在的相关性。之后在大鼠肠上皮细胞中进一步发现 miR-142-3p 可降低 HMGB1-TLR4-核因子 κ B 的靶炎症基因如 NLRP3、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 的表达, 并且此抗炎作用依赖于 HMGB1。这提示 miR-142-3p 对 HMGB1 的调节可能与 PI-IBS 的发生密切相关。进一步的软件预测结果表明 miR-142-3p 可以与 HMGB1 的 3'-UTR 直接结合。基于以上证据, 笔者团队预测 miR-142-3p 可能通过抑制晚期促炎因子 HMGB1 的表达, 下调 TLR4-NF- κ B/NLRP3 信号转导通路, 从而减轻肠道黏膜的炎症反应和免疫应答, 最终防止 PI-IBS 的发生发展。后续笔者将在动物实验中系统解析 miR-142-3p 在 PI-IBS 发生发展中的关键作用, 并对其下游炎症反应激活信号转导通路进行探索和验证, 以揭示并阐明 miR-142-3p 调控 PI-IBS 发生发展的分子机制,

为 PI-IBS 的临床治疗提供理论依据和治疗手段。

参 考 文 献

- [1] Austhof E, Schaefer K, Faulkner J, et al. Knowledge and practices of primary care physicians or general practitioners treating post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20 (1): 159.
- [2] Du L, Long Y, Kim J J, et al. Protease activated receptor-2 induces immune activation and visceral hypersensitivity in post-infectious irritable bowel syndrome mice. *Dig Dis Sci*, 2019, 64 (3): 729-739.
- [3] Jalanka-Tuovinen J, Salojärvi J, Salonen A, et al. Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut*, 2014, 63 (11): 1737-1745.
- [4] Balemans D, Mondelaers S U, Cibert-Goton V, et al. Evidence for long-term sensitization of the bowel in patients with post-infectious-IBS. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 13606.
- [5] Ford A C, Lacy B E, Talley N J. Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med*, 2017, 376 (26): 2566-2578.
- [6] Ford A C, Moayyedi P, Lacy B E, et al. American College of Gastroenterology monograph on the management of irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation. *Am J Gastroenterol*, 2014, 109 (suppl 1): S2-S26.
- [7] Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 2009, 136 (6): 1979-1988.
- [8] Zhai Z, Wu F, Dong F, et al. Human autophagy gene ATG16L1 is post-transcriptionally regulated by MIR142-3p. *Autophagy*, 2014, 10 (3): 468-479.
- [9] Steinle J J. Role of HMGB1 signaling in the inflammatory process in diabetic retinopathy. *Cell Signal*, 2020, 73 : 109687.
- [10] 王思仪, 黎洁瑶, 于涛, 等. 丁酸通过下调 HMGB1 抑制高糖诱导下结肠上皮细胞 NCM460 的异常增殖. *新医学*, 2018, 49 (4): 234-240.
- [11] Wang Y, Du F, Hawez A, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes trigger neutrophil recruitment *via* high-mobility group protein 1 (HMGB1) -toll-like receptors (TLR2) / TLR4 signalling. *Br J Pharmacol*, 2019, 176 (17): 3350-3363.
- [12] Chen X, Cheng F, Liu Y, et al. Toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 exhibit distinct regulation of cancer cell stemness mediated by cell death-induced high-mobility group box 1. *EBio Medicine*, 2019, 40 : 135-150.
- [13] Nadatani Y, Watanabe T, Tanigawa T, et al. High mobility group box 1 promotes small intestinal damage induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs through toll-like receptor 4. *Am J Pathol*, 2012, 181 (1): 98-110.

(收稿日期: 2022-09-01)

(本文编辑: 杨江瑜)