

DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20210667

· 论 著 ·

## 微RNA-144抑制剂通过Toll样受体4/核因子κB信号通路减轻大鼠反流性食管炎食管黏膜损伤

王宝珊, 柳刚, 王雯, 林燕芳, 姚荔嘉\*

中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院消化内科, 福州 350025

**[摘要]** **目的** 探讨微RNA (miRNA)-144抑制剂能否减轻大鼠反流性食管炎 (RE) 食管黏膜的损伤及可能机制。**方法** 取18只雄性SD大鼠, 随机分为假手术组、RE组、miRNA-144抑制剂组, 每组6只。RE组、miRNA-144抑制剂组采用前胃结扎联合幽门限制法建立慢性RE大鼠模型, 造模后miRNA-144抑制剂组大鼠通过尾静脉注射miRNA-144 antagomir抑制体内miRNA-144的表达。应用qPCR法检测miRNA-144抑制剂的有效性及各组大鼠食管组织中Toll样受体4 (TLR4)、NF-κB、核因子κB抑制蛋白α (IkBα) mRNA的表达变化。采用ELISA法检测大鼠食管组织中IL-6、IL-8、TNF-α的含量, 蛋白质印迹法检测密封蛋白3 (CLDN3)的表达, 免疫组织化学染色检测cleaved caspase 3、Ki-67蛋白的表达, TUNEL法检测食管黏膜细胞凋亡情况。**结果** 与假手术组相比, RE组大鼠食管组织中TLR4、NF-κB、IkBα mRNA表达水平升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 炎症因子IL-6、IL-8、TNF-α的含量 ( $P$ 均 $< 0.05$ )及凋亡相关蛋白cleaved caspase 3的表达增加 ( $P < 0.01$ ), 食管黏膜细胞凋亡增加 ( $P < 0.01$ ), 食管黏膜屏障指标CLDN3蛋白的表达减少 ( $P < 0.01$ )。与RE组相比, 抑制miRNA-144表达可降低大鼠食管组织中TLR4、NF-κB、IkBα mRNA的表达 ( $P$ 均 $< 0.05$ ), 减少炎症相关因子IL-6、IL-8、TNF-α的含量 ( $P$ 均 $< 0.05$ ), 抑制RE大鼠食管黏膜细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ), 并增加CLDN3蛋白的表达 ( $P < 0.01$ )。但抑制miRNA-144不影响食管黏膜细胞的增殖, miRNA-144抑制剂组Ki-67阳性细胞数与RE组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** miRNA-144抑制剂可减轻RE大鼠食管黏膜的损伤, 这种作用可能主要通过TLR4/NF-κB信号通路来实现。

**[关键词]** 微RNA-144; 反流性食管炎; Toll样受体4; 核因子κB; 炎症; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R 571 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2022)08-0881-07

### MicroRNA-144 inhibitor alleviates esophageal mucosal injury in rats with reflux esophagitis through Toll-like receptor 4/nuclear factor κB signal pathway

WANG Bao-shan, LIU Gang, WANG Wen, LIN Yan-fang, YAO Li-jia\*

Department of Gastroenterology, 900<sup>th</sup> Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate whether microRNA (miRNA)-144 inhibitor can attenuate the injury of esophageal mucosa in rats with reflux esophagitis (RE) and its possible mechanism. **Methods** Eighteen male SD rats were randomly divided into sham group, RE group, and miRNA-144 inhibitor group, with 6 rats in each group. Rats in the RE group and miRNA-144 inhibitor group were recruited to establish RE animal models by tying the proximal stomach and constricting proximal pylorus. Rats in the miRNA-144 inhibitor group were administered with miRNA-144 antagomir to inhibit the expression of miRNA-144 *in vivo* by tail vein injection. The efficacy of miRNA-144 inhibitor and the mRNA expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor κB (NF-κB) and inhibitor of nuclear factor κB α (IkBα) in esophageal tissues in each group were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The contents of interleukin (IL)-6, IL-8 and tumor necrosis factor α (TNF-α) in rat esophageal tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression of claudin 3 (CLDN3) was detected by Western blotting, the protein expression of cleaved cysteine aspartic acid specific protease (caspase 3) and Ki-67 was detected by immunohistochemistry staining, and the apoptosis of esophageal mucosal cells was examined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay. **Results** Compared with the sham group, the mRNA expression levels of TLR4, NF-κB and IkBα in esophageal tissues of rats in the RE group were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the contents of inflammatory factors (IL-6, IL-8 and TNF-α) and the expression of cleaved caspase 3 (an

**[收稿日期]** 2021-07-03 **[接受日期]** 2021-10-26

**[基金项目]** 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院院立课题(2019L04), 福建省自然科学基金面上项目(2020J011140). Supported by Project of 900<sup>th</sup> Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA (2019L04) and General Program of Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J011140).

**[作者简介]** 王宝珊, 硕士, 住院医师. E-mail: 877790733@qq.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 0591-22859872, E-mail: 18701745163@163.com

apoptosis-related protein) were significantly increased (all  $P < 0.05$  in the former ones and  $P < 0.01$  in the latter one), the apoptosis of esophageal mucosal cells was increased ( $P < 0.01$ ), and the expression of CLDN3 protein (an index of esophageal mucosal barrier) was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the RE group, inhibition of miRNA-144 significantly reduced the mRNA expression levels of *TLR4*, *NF-κB* and *IκBα* (all  $P < 0.05$ ) and the contents of inflammatory factors (IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ) (all  $P < 0.05$ ), and then inhibited the apoptosis of mucosal cells in the esophagus of the RE rats ( $P < 0.05$ ) and elevated the expression of CLDN3 protein ( $P < 0.01$ ). Whereas, there was no impact on the proliferation of esophageal mucosal cells by inhibiting the expression of miRNA-144, and there was no significant difference in the number of Ki-67 positive cells between the miRNA-144 inhibitor group and RE group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** miRNA-144 inhibitor can attenuate the injury of esophageal mucosa in RE rats, and the effect may be mainly through TLR4/NF- $\kappa$ B signal pathway.

[ **Key words** ] microRNA-144; reflux esophagitis; Toll-like receptor 4; nuclear factor  $\kappa$ B; inflammation; apoptosis

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(8): 881-887]

miRNA 是一类长约 18~25 个核苷酸的高度保守的非编码小分子 RNA, 它们基于碱基互补配对原则特异性结合靶基因 mRNA 上的序列, 通过调节、翻译或降解靶 mRNA 来调控基因表达, 在许多生理病理过程中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。研究表明, miRNA-144 能够调控核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 的表达<sup>[3]</sup>, 而 Nrf2 在维持食管黏膜屏障功能、抗氧化应激及减轻炎症反应等方面发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。据报道, Nrf2 与 NF- $\kappa$ B 之间具有潜在的交联及拮抗作用, 可共同调控一些下游靶基因参与反流性食管炎 (reflux esophagitis, RE) 的疾病进程<sup>[6]</sup>, 且 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) /NF- $\kappa$ B 经典信号通路介导的炎症反应持续激活促进食管黏膜细胞凋亡是 RE 重要的病理特征<sup>[7]</sup>。

本课题组前期研究发现, 在利用前胃结扎联合幽门限制法构建的 RE 大鼠模型中, 通过尾静脉注射 miRNA-144 抑制剂 (miRNA-144 antagomir) 抑制 miRNA-144 表达可缓解大鼠的 RE 进程, 但其具体机制尚未完全明确<sup>[8]</sup>。近年来研究发现, miRNA-144 能够在糖尿病、急性肺损伤和恶性肿瘤 (如肺癌、胰腺癌等) 等多种疾病中发挥促炎及促凋亡作用<sup>[9-12]</sup>。本研究主要探究在 RE 大鼠中抑制 miRNA-144 表达对食管组织 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响, 探讨 miRNA-144 抑制剂是否通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻食管黏膜损伤, 明确 miRNA-144 抑制剂对 RE 的治疗价值。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 18 只同系雄性清洁级 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0005], 6 周龄, 体重 220~

250 g, 委托本院比较医学科实验动物中心饲养 [实验动物使用许可证号: SYXK (闽) 2018-0006]。

1.2 试剂 miRNA-144 antagomir 由上海吉玛制药技术有限公司提供, SYBR Green PCR 混合物试剂盒购自厦门生命互联技术有限公司, PCR 引物由中国华大基因公司合成。IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, IL-8 ELISA 检测试剂盒购自上海巧伊生物技术有限公司。TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。cleaved caspase 3 (Asp175) 兔多克隆抗体购自美国 CST 公司, Ki-67 兔多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 兔抗大鼠密封蛋白 3 (claudin 3, CLDN3) 多克隆抗体购自美国 ThermoFisher Scientific 公司, GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司, 兔超敏二步法免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。miRNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulfate, SDS)、三羟甲基氨基甲烷 [tris(hydroxymethyl) aminomethane, Tris]、甘氨酸购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 30% 甲叉双丙烯酰胺购自厦门鹭隆生物科技发展有限公司。

1.3 大鼠 RE 模型的构建及给药 按照完全随机法将 18 只雄性 SD 大鼠分为假手术组、RE 组、RE 联合 miRNA-144 抑制剂治疗组 (miRNA-144 抑制剂组), 每组 6 只。术前行 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 麻醉成功的大鼠呈仰卧位将四肢固定于手术板上。RE 组和 miRNA-144 抑制剂组大鼠采用前胃结扎联合幽门限制法建立慢性 RE 模型<sup>[13]</sup>, 假手术组大鼠充分暴露胃底及幽门周围组织后即关腹。术后大鼠禁食 24 h, 不禁水。

假手术组、RE 组大鼠在术后第 1、2、3 天分别

于尾静脉注射 0.9% 氯化钠溶液 1 mL, miRNA-144 抑制剂组大鼠在术后第 1、2、3 天分别于尾静脉注射 miRNA-144 antagomir 50D (1 mL)。术后第 14 天处死所有大鼠, 取食管组织标本, 肉眼观察食管黏膜损伤情况, 采用 ImageJ 软件评估食管的溃疡病变占比。将食管组织标本置于 0.4% 甲醛溶液中固定, 24 h 内对本标本进行石蜡包埋并切片, H-E 染色观察食管黏膜的病理改变。

**1.4 qPCR 检测 miRNA-144 及 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路相关基因的表达** 将大鼠食管组织研磨成粉末, 用 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 对各组食管组织进行 RNA 提取, 检测 RNA 的纯度及浓度; 采用反转录 PCR 试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 合成 cDNA, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。严格按照 SYBR Green PCR 混合物试剂盒产品说明书进行 qPCR 操作。PCR 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  30 s;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  20 s,  $72^{\circ}\text{C}$  25 s, 共进行 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因的相对表达量。反应体系 (共 20  $\mu\text{L}$ ): cDNA 8  $\mu\text{L}$ ,  $2\times$ UltraSYBR 混合物 10  $\mu\text{L}$ , 引物 2  $\mu\text{L}$ 。引物序列如下: *TLR4* 上游引物为 5'-CTCACAACCTTCAGTGGCTGGATTA-3', 下游引物为 5'-GTCTCCACAGCCACCAGATTCTC-3'; *NF- $\kappa$ B* 上游引物为 5'-CATGCGTTTCCGTTACAA-GTG-3', 下游引物为 5'-GTGCGTCTTAGTGGTA-TCTGTGCT-3'; 核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B  $\alpha$ , *I $\kappa$ B $\alpha$* ) 上游引物为 5'-TGACC-ATGGAAGTGATTGGTCAG-3'; 下游引物为 5'-GATCACAGCCAAGTGGAGTGGA-3';  $\beta$ -肌动蛋白 ( *$\beta$ -actin*) 上游引物为 5'-GGAGATTACTGCCCT-GGCTCCTA-3', 下游引物为 5'-GACTCATCGTAC-TCCTGCTTGCTG-3'; miRNA-144-3p 上游引物为 5'-TACAGTATAGATGATGTACT-3', 下游引物为试剂盒中的 5'-Uni-miRNA qPCR 引物; *U6* 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物为 5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'。

**1.5 ELISA 检测食管组织中炎症因子的表达** 取长度为 1.5~2.0 cm 的大鼠食管组织, 制成食管组织匀浆, 离心后取食管组织上清液, 根据 ELISA 检测试剂盒说明书进行检测, 将酶标仪调至 450 nm 波长测样本光密度, 通过样品的光密度值和标准曲线计算食管组织中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的含量。

**1.6 TUNEL 法检测食管组织的细胞凋亡情况** 将石

蜡包埋的大鼠食管组织样品进行切片, 厚度为 4  $\mu\text{m}$ , 脱蜡至水。参照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒实验步骤进行操作: 滴加蛋白酶 K 抗原修复 20 min, PBS 冲洗 3 次; 加入过氧化物酶转化剂室温孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次; 滴加 50  $\mu\text{L}$  现配的 TUNEL 反应混合液, 保持切片湿润,  $37^{\circ}\text{C}$  孵箱中避光孵育 1 h, PBS 洗涤 1 次; 滴加标记反应终止液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次后进行 DAB 显色; 用苏木精染色液对细胞核进行染色, 光镜下见淡棕色或深棕色细胞为阳性细胞。利用 Image Pro Plus 6.0 软件进行阳性细胞半定量分析, 评价细胞凋亡情况。

**1.7 免疫组织化学染色检测食管组织中 cleaved caspase 3、Ki-67 的表达** 取大鼠食管组织蜡块进行连续切片, 厚度为 4  $\mu\text{m}$ , 展片, 捞片; 置  $60^{\circ}\text{C}$  温箱中烤片过夜; 采用链霉亲和素-过氧化物酶连接法进行免疫组织化学染色, 在光镜下观察 cleaved caspase 3、Ki-67 染色情况, 利用 ImageJ 软件进行阳性细胞半定量分析, 计算平均光密度值。

**1.8 蛋白质印迹法检测食管组织中 CLDN3 蛋白的表达** 用蛋白裂解液提取所取组织的总蛋白, BCA 法对总蛋白进行定量, 取 100  $\mu\text{g}$  总蛋白加入预先配制好的浓缩胶中进行 SDS-PAGE, 后将蛋白转印至 PVDF 膜上。转膜后的 PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶 (TBST 配制) 中室温封闭 1 h。TBST 洗膜 3 次, 置入用封闭液按照合适比例稀释的一抗中 [CLDN3 一抗 1 : 500, GAPDH 一抗 1 : 2 000],  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 置入以 1 : 2 000 比例稀释的二抗山羊抗兔 IgG 中, 室温摇床孵育 1 h; TBST 洗膜 3 次后加入 ECL 显色液显影。利用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值, 以 CLDN3 与 GAPDH 灰度值的比值作为 CLDN3 的表达水平。

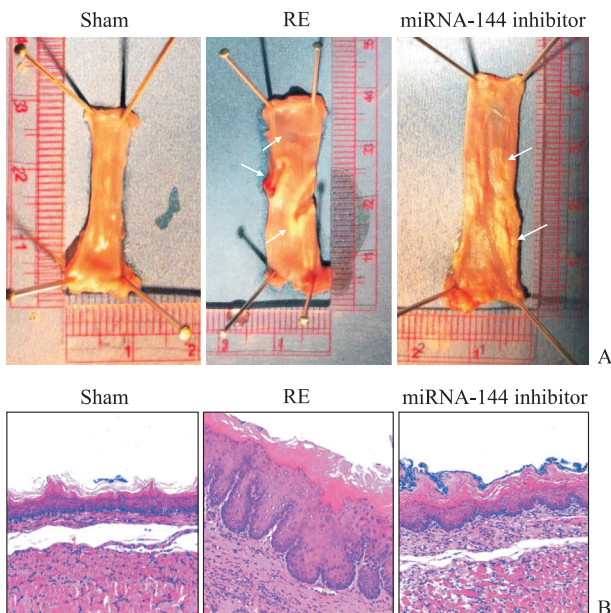
**1.9 统计学处理** 应用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 呈正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (多重比较采用最小显著性差异法); 呈偏态分布的计量资料以中位数 (下四分位数, 上四分位数) 表示, 采用多样本的非参数秩和检验 (Kruskal-Wallis 秩和检验)。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

**2.1 miRNA-144 抑制剂能抑制大鼠食管组织中 miRNA-144 的表达** qPCR 检测结果显示, 与假手

术组大鼠相比, RE 大鼠的食管组织中 miRNA-144 水平上调 ( $9.96 \pm 1.95$  vs  $7.49 \pm 1.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而注射 miRNA-144 抑制剂可抑制 RE 大鼠食管组织中 miRNA-144 的表达 ( $3.11 \pm 1.53$  vs  $9.96 \pm 1.95$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.2 miRNA-144 抑制剂可减轻 RE 大鼠的食管病变程度** 如图 1A 所示, 假手术组大鼠食管黏膜光滑完整, 色淡红, 有光泽; RE 组大鼠食管黏膜粗糙、充血明显, 可见食管多发溃疡, 溃疡表面血管裸露。miRNA-144 抑制剂组大鼠食管黏膜充血程度较 RE 组减轻, 溃疡面积减少, 溃疡表面未见血管裸露。定量分析结果显示, 假手术组大鼠食管溃疡面积占比为 0.97% (0.85%, 1.04%); 与 RE 组比较, miRNA-144 抑制剂组大鼠食管溃疡面积占比降低, 差异有统计学意义 [3.58% (3.23%, 4.73%) vs 8.39% (7.60%, 9.71%),  $P < 0.05$ ]。



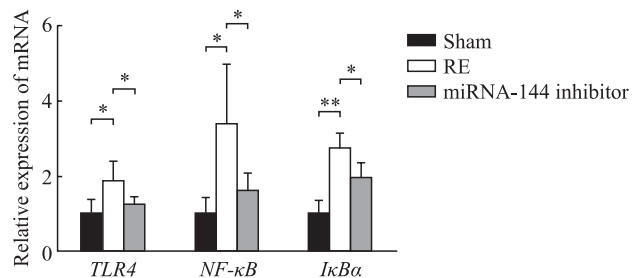
**图 1 抑制 miRNA-144 表达改善 RE 大鼠食管黏膜损伤**  
**Fig 1 miRNA-144 inhibition attenuates the injury of esophageal mucosa in RE rats**

A: Gross observation of esophageal mucosa (arrows indicate esophageal mucosa injury); B: Pathological changes of esophageal mucosa detected by hematoxylin-eosin staining (100 $\times$ ). miRNA: MicroRNA; RE: Reflux esophagitis.

H-E 染色结果 (图 1B) 显示, 假手术组大鼠食管组织上皮细胞排列紧密规整, 鳞状上皮基底层可见 2 层细胞, 未见明显炎症细胞浸润及 RE; RE 组食管大鼠组织可见固有膜乳头延长、上皮细胞间隙增宽、鳞状上皮基底层增厚 (4~5 层细胞), 伴有

黏膜下层炎症细胞浸润等 RE 的表现; miRNA-144 抑制剂组病变程度较 RE 组减轻。

**2.3 miRNA-144 抑制剂对 RE 大鼠体内 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响** qPCR 检测结果 (图 2) 显示, 与假手术组相比, RE 组大鼠食管组织中 *TLR4*、*NF- $\kappa$ B*、*I $\kappa$ B $\alpha$*  mRNA 表达水平平均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与 RE 组相比, miRNA-144 抑制剂组大鼠食管组织中的 *TLR4*、*NF- $\kappa$ B*、*I $\kappa$ B $\alpha$*  mRNA 表达水平平均下降 ( $P$  均  $< 0.05$ )。



**图 2 各组大鼠食管组织中 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关基因的表达**

**Fig 2 Expression of genes related to TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in esophagus tissues of rats in each group**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . TLR4: Toll-like receptor 4; NF- $\kappa$ B: Nuclear factor  $\kappa$ B; I $\kappa$ B $\alpha$ : Inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B  $\alpha$ ; RE: Reflux esophagitis; miRNA: MicroRNA.

**2.4 miRNA-144 抑制剂对 RE 大鼠食管组织炎症细胞因子含量的影响** ELISA 检测结果 (表 1) 显示, 与假手术组比较, RE 组大鼠食管组织中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的含量增加 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 与 RE 组相比, miRNA-144 抑制剂组大鼠食管组织中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的含量下降 ( $P$  均  $< 0.05$ )。

**表 1 各组大鼠食管组织中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的含量**  
**Tab 1 Contents of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in esophageal tissues of rats in each group**

( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

Group	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
Sham	$74.10 \pm 13.20$	$26.07 \pm 5.19$	$55.97 \pm 6.32$
RE	$99.84 \pm 10.43^*$	$43.86 \pm 10.14^*$	$84.95 \pm 15.86^*$
miRNA-144 inhibitor	$86.99 \pm 5.42^\Delta$	$32.15 \pm 5.65^\Delta$	$67.96 \pm 5.19^\Delta$

\* $P < 0.05$  vs sham group;  $^\Delta P < 0.05$  vs RE group. IL: Interleukin; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; RE: Reflux esophagitis; miRNA: MicroRNA.

**2.5 抑制 miRNA-144 表达对 RE 大鼠食管黏膜细胞凋亡、增殖的影响** TUNEL 细胞凋亡检测

结果(图3A)显示,与假手术组比较,RE组大鼠食管黏膜细胞凋亡水平升高( $P<0.01$ ),而抑制miRNA-144表达可降低RE大鼠食管黏膜细胞凋亡水平( $P<0.05$ )。免疫组织化学染色结果显示,凋亡相关蛋白cleaved caspase 3阳性反应定位于细胞质

及核周。与RE组相比,miRNA-144抑制剂可抑制大鼠食管组织中cleaved caspase 3表达的增加( $P<0.01$ ,图3B),这与TUNEL检测结果一致;RE组大鼠食管组织中Ki-67阳性细胞数与miRNA-144抑制剂组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图3C)。

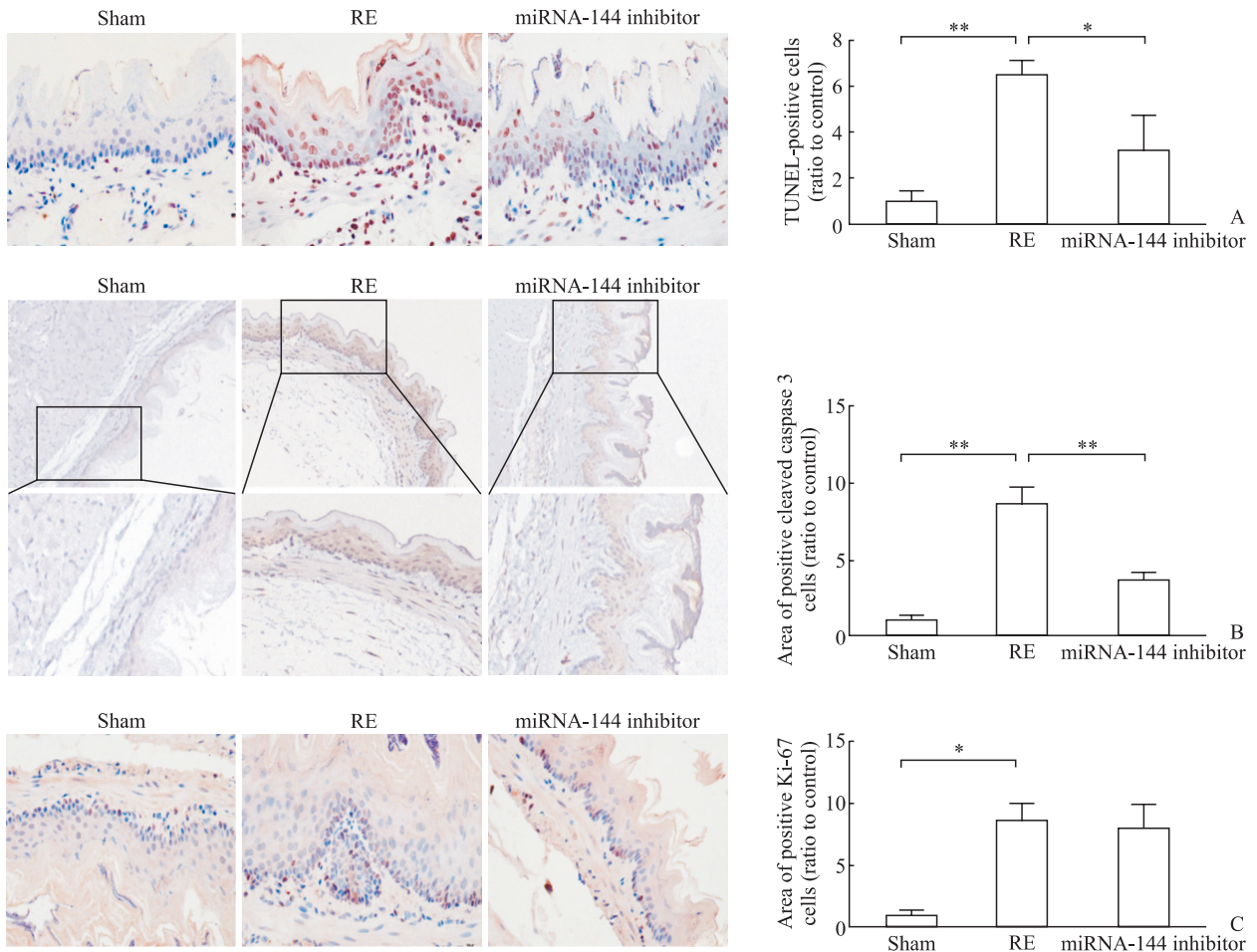


图3 抑制miRNA-144表达对RE大鼠食管黏膜细胞凋亡与增殖的影响

Fig 3 Effect of inhibition of miRNA-144 on apoptosis and proliferation of esophageal mucosal cells in RE rats

A: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay (400 $\times$ ); B: Expression of cleaved caspase 3 detected by immunohistochemistry staining (Upper: 100 $\times$ ; Lower: 400 $\times$ ); C: Expression of Ki-67 detected by immunohistochemistry staining (400 $\times$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm s$ . miRNA: MicroRNA; RE: Reflux esophagitis.

2.6 miRNA-144抑制剂对RE大鼠食管黏膜上皮屏障功能的影响 蛋白质印迹法检测结果显示,与假手术组比较,RE组大鼠食管组织中CLDN3蛋白的表达减少( $0.17\pm 0.05$  vs  $0.52\pm 0.06$ ,  $P<0.01$ );与RE组比较,miRNA-144抑制剂组大鼠食管组织中CLDN3蛋白的表达升高( $0.34\pm 0.07$  vs  $0.17\pm 0.05$ ,  $P<0.01$ )。

### 3 讨论

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease,

GERD)为胃十二指肠内容物反流入食管后,诱发免疫介导的炎症反应及氧化应激、诱导食管黏膜上皮细胞凋亡,进而损伤食管复层鳞状上皮构成的黏膜屏障,导致食管黏膜出现糜烂或溃疡,其进一步发展可引起食管狭窄或巴雷特食管,部分患者甚至可发生食管癌变。尽早采取干预及治疗措施可为临床GERD患者带来福音。GERD的病理生理机制复杂,氧化应激、免疫介导、食管高敏感、食管黏膜屏障等一直该领域研究的热点。临床上,即使采用足剂量、足疗程的质子泵抑制剂,仍有高达40%

的 GERD 患者治疗失败<sup>[14]</sup>,故单纯以质子泵抑制剂治疗 GERD 存在一定的局限性,亟需探索新的治疗策略和方法。

本课题组前期研究证实,miRNA-144 可通过调控 Nrf2 在蛋白层面的表达影响 RE 的疾病进程<sup>[8]</sup>。Nrf2 作为调节细胞抗氧化应激的重要转录因子,有研究表明其与 NF- $\kappa$ B 信号通路之间具有潜在的交联及拮抗作用,且 Nrf2 与 NF- $\kappa$ B 可共同调控一些下游靶基因[包括血红素氧合酶 1 (heme oxygenase 1, *HO-1*)、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, *GCLC*)、G 蛋白转录因子  $\alpha 2$  (G protein  $\alpha 2$ , *Ga2*) 和 *IL-8* 等]的转录和功能<sup>[6]</sup>。TLR4/NF- $\kappa$ B 作为一经典的信号通路,可参与细胞凋亡与增殖的调控及炎症反应<sup>[7]</sup>。据报道, *Nrf2* 基因敲除小鼠在创伤性脑损伤后其肺部的 NF- $\kappa$ B 活性及炎症反应明显增加<sup>[15]</sup>。在慢性结肠炎小鼠模型中, Nrf2 的抗氧化应激作用可减轻 NF- $\kappa$ B 通路介导的炎症反应和细胞凋亡<sup>[16]</sup>。有学者发现,在 GERD 进程中, NF- $\kappa$ B 和 Nrf2 可参与调节食管屏障功能; NF- $\kappa$ B 通路参与 GERD 模型大鼠中的食管黏膜损伤,予 NF- $\kappa$ B 特异激动剂处理可促进体内的炎症反应,增加模型大鼠的食管黏膜细胞凋亡,加重食管黏膜损伤程度;反之,抑制 NF- $\kappa$ B 通路可减轻 GERD 大鼠的食管黏膜细胞凋亡,改善食管黏膜细胞的功能<sup>[7]</sup>。研究表明,GERD 患者食管黏膜中的氧化应激相关因子如活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、活性氮 (reactive nitrogen species, RNS)、环氧合酶 (cyclooxygenase, COX)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 和缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 的表达水平显著增加, NF- $\kappa$ B 通路可被这些氧化应激相关因子激活,并进一步促进炎症介质 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、趋化因子等的合成与分泌,加重食管黏膜的损伤,甚至诱发食管癌<sup>[7,17]</sup>。本实验结果表明,与假手术组相比,RE 组大鼠食管组织中 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路激活;而下调 miRNA-144 表达可抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路活化。与假手术组相比,RE 组大鼠食管组织中的炎症介质 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  含量升高,凋亡相关蛋白 cleaved caspase 3 及 TUNEL 细胞凋亡检测结果持续未缓解的炎症反应可诱发细胞凋亡,这与

Fang 等<sup>[18]</sup>的研究结果一致;另本研究发现,通过抑制 RE 大鼠体内 miRNA-144 表达后,其食管组织中的炎症介质水平下降,食管黏膜细胞凋亡水平降低,表明 miRNA-144 抑制剂可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路有效减少炎症介质的分泌,抑制细胞凋亡,促进 RE 大鼠食管黏膜损伤的修复。

在诱导上皮细胞凋亡后,紧密连接 (tight junction, TJ) 蛋白以一种独特的方式发生蛋白水解,这与 TJ 的破坏密切相关<sup>[19]</sup>。TJ 是构成食管黏膜机械屏障的最重要结构。CLDN 是 TJ 最主要的组成成分,负责调控上皮屏障功能及上皮极性<sup>[20-21]</sup>,在维持食管上皮屏障功能的完整性上具有重要作用<sup>[22]</sup>。既往研究显示,重金属及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激可造成 TJ 结构和功能的改变<sup>[23-24]</sup>。在慢性 RE 动物模型中, Oguro 等<sup>[25]</sup>证实 CLDN3 表达的减少是反映 RE 的敏感指标之一。本研究发现,RE 组大鼠食管组织中 CLDN3 蛋白的表达少于假手术组,表明食管黏膜屏障受损;而 miRNA-144 抑制剂组大鼠食管组织中 CLDN3 的蛋白表达高于 RE 组,提示 miRNA-144 抑制剂可通过保护食管黏膜上皮屏障功能进而缓解 RE 疾病进程。由此,本实验结果进一步证实抑制食管黏膜细胞凋亡、改善食管黏膜屏障对治疗 RE 的重要作用。

综上所述,本研究结果显示 miRNA-144 抑制剂可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,有效减少炎症介质分泌,抑制细胞凋亡,改善食管黏膜屏障功能,进而缓解 RE 大鼠食管损伤。本研究结果为 miRNA-144 抑制剂治疗 RE 提供了有力证据,并为未来临床治疗 RE 提供了新策略。然而,其更深入的分子生物学机制仍有待进一步探究。

#### [参考文献]

- [1] HAM J, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 509-524.
- [2] PILLAI R S, BHATTACHARYA S N, FILIPOWICZ W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?[J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17: 118-126.
- [3] RAVIRAJ S, MALITA A J, AMMAR A A, FOLAMI L P, MENAKA C T, DIANA G, et al. Inhibiting microRNA-144 potentiates Nrf2-dependent antioxidant signaling in RPE and protects against oxidative stress-induced outer retinal degeneration[J/OL]. *Redox Biol*, 2020, 28: 101336. DOI: 10.1016/j.redox. 2019.101336.
- [4] CHEN H, HU Y H, FANG Y, DJUKIC Z, YAMAMOTO M,

- SHAHEEN N J, et al. Nrf2 deficiency impairs the barrier function of mouse oesophageal epithelium[J]. *Gut*, 2014, 63: 711-719.
- [5] WOODLAND P, SIFRIM D. Oesophageal mucosal barrier: a key factor in the pathophysiology of non-erosive reflux disease (NERD) and a potential target for treatment[J]. *Gut*, 2014, 63: 705-706.
- [6] CHEN H, FANG Y, LI W B, ORLANDO R C, SHAHEEN N, CHEN X L. NFκB and Nrf2 in esophageal epithelial barrier function[J/OL]. *Tissue Barriers*, 2013, 1: e27463. DOI: 10.4161/tisb.27463.
- [7] YU H X, WANG X L, ZHANG L N, ZHANG J, ZHAO W. Involvement of the TLR4/NF-κB signaling pathway in the repair of esophageal mucosa injury in rats with gastroesophageal reflux disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51: 1645-1657.
- [8] 林燕芳, 王雯, 王宝珊, 姚荔嘉, 柳刚. miR-144 在大鼠反流性食管炎中的作用和机制[J]. *临床消化病杂志*, 2019, 31: 1-5.
- [9] LI H B, SHI H J, GAO M, MA N, SUN R Q. Long non-coding RNA CASC<sub>2</sub> improved acute lung injury by regulating miR-144-3p/AQP1 axis to reduce lung epithelial cell apoptosis[J/OL]. *Cell Biosci*, 2018, 8: 15. DOI: 10.1186/s13578-018-0205-7.
- [10] YU M L, LIU Y, ZHANG B L, SHI Y C, CUI L, ZHAO X X. Inhibiting microRNA-144 abates oxidative stress and reduces apoptosis in hearts of streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2015, 24: 375-381.
- [11] CHEN S S, LI P, LI J, WANG Y Y, DU Y W, CHEN X N, et al. miR-144 inhibits proliferation and induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells by targeting TIGAR[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35: 997-1007.
- [12] LI J, SUN P S, YUE Z Y, ZHANG D Z, YOU K, WANG J G. miR-144-3p induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells by targeting proline-rich protein 11 expression via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36: 619-626.
- [13] OMURA N, KASHIWAGI H, CHEN G, SUZUKI Y, YANO F, AOKI T. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1999, 34: 948-953.
- [14] SCARPELLINI E, ANG D, PAUWELS A, DE SANTIS A, VANUYTSEL T, TACK J. Management of refractory typical GERD symptoms[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13: 281-294.
- [15] JIN W, ZHU L, GUAN Q, CHEN G, WANG Q F, YIN H X, et al. Influence of Nrf2 genotype on pulmonary NF-kappaB activity and inflammatory response after traumatic brain injury[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008, 38: 221-227.
- [16] LI W G, KHOR T O, XU C J, SHEN G X, JEONG W S, YU S W, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFκB-inflammatory response and elicits apoptosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76: 1485-1489.
- [17] NEJAT PISH-KENARI F, QUJEQ D, MAGHSOUDI H. Some of the effective factors in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 6401-6404.
- [18] FANG Y, CHEN H, HU Y H, DJUKIC Z, TEVEBAUGH W, SHAHEEN N J, et al. Gastroesophageal reflux activates the NF-κB pathway and impairs esophageal barrier function in mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305: G58-G65.
- [19] BOJARSKI C, WEISKE J, SCHÖNEBERG T, SCHRÖDER W, MANKERTZ J, SCHULZKE J D, et al. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2097-2107.
- [20] TSUKITA S, FURUSE M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149: 13-16.
- [21] TSUKITA S, TANAKA H, TAMURA A. The claudins: from tight junctions to biological systems[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44: 141-152.
- [22] KIA L, PANDOLFINO J E, KAHRILAS P J. Biomarkers of reflux disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016, 14: 790-797.
- [23] JEONG C H, SEOK J S, PETRIELLO M C, HAN S G. Arsenic downregulates tight junction claudin proteins through p38 and NF-κB in intestinal epithelial cell line, HT-29[J]. *Toxicology*, 2017, 379: 31-39.
- [24] HASHIMOTO K, OSHIMA T, TOMITA T, KIM Y, MATSUMOTO T, JOH T, et al. Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376: 154-157.
- [25] OGURO M, KOIKE M, UENO T, ASAOKA D, MORI H, NAGAHARA A, et al. Dissociation and dispersion of claudin-3 from the tight junction could be one of the most sensitive indicators of reflux esophagitis in a rat model of the disease[J]. *J Gastroenterol*, 2011, 46: 629-638.