DOI:10.16016/j.1000-5404.202010016

呼吸道合胞病毒通过调控 miR-409-3p/SIRT1 通路促进支气管上皮细胞凋亡与炎症因子表达

梅娟娟[1],田 曼[1],严莎莎[1],甘 聪[1],张文馨[2] 210000 江苏 南京,南京医科大学附属儿童医院呼吸科[1];南京医科大学附属南京儿童医院康复医学科[2]

[摘要] **目的** 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)对人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBECs)凋亡和炎性因子表达的影响及可能机制。**方法** 体外培养 HBECs,分别转染 miR-409-3p 抑制剂、SIRT1 过表达载体或共转染 miR-409-3p 抑制剂与 SIRT1 小干扰 RNA 后,采用 RSV 感染进行转染,然后 RT-qPCR 法检测细胞中 miR-409-3p 和 SIRT1 mRNA 表达水平,CCK-8 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡率,Western Blot 检测细胞中 Ki-67、p21、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达,试剂盒法检测细胞培养上清液中 IL-6 和 TNF-α 表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 SIRT1 和 miR-409-3p 调控关系。**结果** RSV 感染促进 HBECs 细胞中 miR-409-3p 的表达($P<0.05$),而抑制 SIRT1 表达($P<0.05$),降低 HBECs 细胞增殖活性及细胞中 Ki-67 和 Bcl2 的蛋白表达($P<0.05$),促进 HBECs 凋亡及细胞中 p21 和 Bax 的蛋白及 IL-6 和 TNF-α 表达($P<0.05$)。沉默 miR-409-3p 或过表达 SIRT1 可提高 RSV 感染的 HBECs 增殖活性及细胞中 Ki-67 和 Bcl2 的蛋白表达($P<0.05$),而抑制细胞凋亡率、p21 和 Bax 的蛋白及 IL-6 和 TNF-α 表达($P<0.05$)。miR-409-3p 靶向负调控 SIRT1 表达。沉默 SIRT1 逆转了沉默 miR-409-3p 对 RSV 感染的 HBECs 增殖、凋亡及炎性因子 IL-6 和 TNF-α 表达的影响($P<0.05$)。**结论** 呼吸道合胞病毒通过调控 miR-409-3p/SIRT1 通路促进支气管上皮细胞凋亡与炎症因子表达。

[关键词] 支气管上皮细胞;呼吸道合胞病毒;miR-409-3p;SIRT1;细胞凋亡;炎性因子
[中图法分类号] R373.1;R562.2;R725.6 [文献标志码] A

Respiratory syncytial virus promotes apoptosis and expression of inflammatory factors in bronchial epithelial cells by regulating miR-409-3p/SIRT1 pathway

MEI Juanjuan[1], TIAN Man[1], YAN Shasha[1], GAN Cong[1], ZHANG Wenxin[2] [1]Department of Respiratory Diseases, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu Province, 210000; [2]Department of Rehabilitation Medicine, Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu Province, 210000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of respiratory syncytial virus (RSV) on the apoptosis and the expression of inflammatory factors in human bronchial epithelial cells (HBECs), and investigate its possible mechanisms. **Methods** *In vitro* cultured HBECs were transfected with miR-409-3p inhibitor, overexpression vector of silent information regulator 1 (SIRT1) along, or co-transfected with miR-409-3p inhibitor and SIRT1 small interfering RNA (siRNA), respectively. After RSV infection, RT-qPCR was used to detect the expression levels of miR-409-3p and SIRT1 in the transfected cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay and flow cytometry were performed to determine cell proliferation as well as cell apoptosis. Western

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(ZKX17036)
[通信作者] 田 曼,E-mail: tmsweet@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

blotting was also adopted to verify the expression of Ki-67, p21, Bcl-2 and Bax. In addition, corresponding reagent testing kits were used to detect the contents of IL-6 and TNF-α in culture supernatant. Finally, the regulatory relationship between SIRT1 and miR-409-3p was verified by the dual luciferase reporter assay. **Results** RSV infection promoted the expression of miR-409-3p ($P<0.05$), inhibited that of SIRT1 ($P<0.05$), decreased cell proliferation and protein expression of Ki-67 and Bcl2 ($P<0.05$), and promoted cell apoptosis and protein expression of p21 and Bax and contents of IL-6 and TNF-α ($P<0.05$) in HBECs cells. Silencing miR-409-3p or overexpressing SIRT1 resulted in the enhanced the proliferation activity and the protein expression of Ki-67 and Bcl2 in RSV-infected HBECs cells ($P<0.05$), but decreased apoptotic rate, protein expression of p21 and Bax, and contents of IL-6 and TNF-α ($P<0.05$). miR-409-3p showed a negatively targeted regulation to SIRT1 expression. Silencing SIRT1 reversed the effects of silenced miR-409-3p on the proliferation and apoptosis of RSV-infected HBECs as well as on the expression of inflammatory factors IL-6 and TNF-α ($P<0.05$). **Conclusion** RSV promotes the apoptosis and the expression of inflammatory factors in bronchial epithelial cells by regulating miR-409-3p/SIRT1 pathway.

[**Key words**] bronchial epithelial cells; respiratory syncytial virus; miR-409-3p; SIRT1; apoptosis; inflammatory factors

Supported by the Project of Medical Science and Technology Development of Nanjing (ZKX17036). Corresponding author: TIAN Man, E-mail: tmsweet@163.com

支气管哮喘是一种受多种因素影响、以反复喘息为主要症状的慢性气道性炎症性疾病,其主要病理学特征与气道炎症、气道高原反应及气道重塑等相关[1]。气道上皮细胞是气道屏障的重要组成部分,也是呼吸道受环境刺激后最先被攻击的靶细胞,其损伤与支气管哮喘的发生发展密切相关[2]。呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是常见的诱发支气管哮喘、肺炎等呼吸系统疾病的病毒。气道上皮细胞受 RSV 感染后可诱导上皮细胞产生炎性反应和凋亡,进而引起疾病的发生[3]。因此,预防和治疗 RSV 感染是防治哮喘发作的重要课题。

微小 RNA(miRNA)是一类小分子非编码 RNA,可与其靶基因的 3′非翻译区(3′UTR)靶向结合,调控其靶基因的表达,进而调控细胞的增殖、凋亡、氧化应激和炎症反应等生理或病理过程,与人类多种疾病的发生发展密切相关[4-6]。miR-409-3p 基因位于 14q32.31,参与肿瘤[7]、免疫性疾病[8]等多种疾病的发展进程。研究显示,miR-409-3p 等 miRNA 的表达每增加一倍,哮喘病情恶化的风险增加 25%~67%[9]。生物信息学软件预测显示,沉默信号调节因子 1(SIRT1)可能是 miR-409-3p 的靶基因。SIRT1 是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的去乙酰化酶,可与多种蛋白相互作用,参与调控细胞凋亡、炎症反应等过程[10-11]。ZHANG 等[12]报道称,敲低 SIRT1 抑制支气管上皮细胞增殖并促进其凋亡,SIRT1 参与哮喘气道损伤。本研究以 RSV 感染人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBECs)建立细胞损伤模型,探究了 miR-409-3p 能否靶向调控 SIRT1 影响 RSV 感染的 HBECs 凋亡和炎性反应,以期为支气管哮喘的治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人支气管上皮细胞(HBECs),武汉普诺赛生命科技有限公司;RSV-Long 病毒 2 型株,中国预防医学科学院病毒学研究所;胎牛血清(FBS),浙江天杭生物科技股份有限公司;DMEM 培养基、细胞计数试剂盒-8(CCK-8),北京索莱宝科技有限公司;Lipofectamine™ 2000 试剂盒和 Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒和 PCR 试剂盒,大连宝生物工程有限公司;PCR 引物、miR-409-3p 抑制剂(anti-miR-409-3p)、阴性对照序列(anti-miR-NC)、SIRT1 过表达载体(pcDNA-SIRT1)、空载体(pcDNA-NC)、SIRT1 野生型质粒(WT-SIRT1)和突变型质粒(MUT-SIRT1)、miR-409-3p 模拟物(mimcs)及模拟对照序列(miR-NC),上海生工生物工程有限公司;白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α(TNF-α)试剂盒,南京建成生物工程研究所;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒和二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人 Ki-67、p21 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白(Bax)多克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司;双荧光素酶活性检测试剂盒,美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 复苏 HBECs,加含 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于 37 ℃、CO_2 体积分数 5%、

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

O_2 体积分数 95%、湿度 97%的培养箱中培养。细胞生长密度至 80%左右时,0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞传代。将对数增殖期的 HBECs 以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体法,分别转染 anti-miR-409-3p、anti-miR-NC、pcDNA-NC、pcDNA-SIRT1、共转染 anti-miR-409-3p 与 si-NC、anti-miR-409-3p 与 si-SIRT1。转染 6 h 后,更换培养基。再培养 24 h,收集细胞备用。

1.2.2　细胞分组处理　　未转染的 HBECs 分为对照组(NC 组)和 RSV 组,其中 NC 组细胞常规培养基培养,RSV 组细胞用含感染复数(MOI)为 0.0001[13] RSV 的培养基培养。转染 anti-miR-409-3p、anti-miR-NC、pcDNA-NC、pcDNA-SIRT1、共转染 anti-miR-409-3p 与 si-NC、anti-miR-409-3p 与 si-SIRT1 的细胞均用含 MOI 为 0.0001 RSV 的培养基培养,并分别记为 RSV+anti-miR-409-3p 组、RSV+anti-miR-NC 组、RSV+pcDNA-NC 组、RSV+pcDNA-SIRT1 组、RSV+anti-miR-409-3p+si-NC 组、RSV+anti-miR-409-3p+si-SIRT1 组。

1.2.3　RT-qPCR 检测 miR-409-3p 和 SIRT1 mRNA 表达　　未转染和转染后的 HBECs 细胞均以 5.0×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,按 1.2.2 分组处理,培养 24 h 后,Trizol 试剂提取细胞中总 RNA,并反转录为 cDNA,行 PCR 扩增。扩增条件:95 ℃ 3 min,95 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环。引物序列:miR-409-3p 上游 5′-GTAACGCTAGGACTTCGAGT-3′,下游 5′-TAGACGATCGATCGATC-3′;U6 上游 5′-AGAGCCTGTGGTGTCCG-3′,下游 5′-CATCTTCAAAGCACTTCCCT-3′;SIRT1 上游 5′-GCCGGAAACAATACCTCCAC-3′,下游 5′-ACCCCAGCTCCAGTTAGAAC-3′;GAPDH 上游 5′-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3′,下游 5′-GCCATCACGCCACAGTTTC-3′。$2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 miR-409-3p 相对于 U6、SIRT1 mRNA 相对于 GAPDH 的表达水平。

1.2.4　CCK-8 法检测细胞存活率　　未转染和转染后的 HBECs 细胞均以 1.0×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,按 1.2.2 分组处理,培养 24 h 后,加 10 μL CCK-8 试剂。再孵育 2 h,于酶标仪 450 nm 处测光密度 D(450)值。

1.2.5　流式细胞仪检测细胞凋亡　　未转染和转染后的 HBECs 细胞均以 5.0×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,按 1.2.2 分组处理,培养 24 h 后,收集细胞并用 PBS 清洗 2 次。参照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6　Western Blot 法检测蛋白表达　　细胞按照 1.2.5 进行处理,RIPA 试剂提取各组细胞中总蛋白,BCA 法对蛋白定量,以 20 μg 蛋白/孔行 10% SDS-PAGE 电泳。电泳后,将分离蛋白转至 PVDF 膜,于 5%脱脂奶粉溶液中封闭 1 h。分别置于 Ki-67(1∶1 000)、p21(1∶1 000)、Bcl-2(1∶500)、Bax(1∶500)一抗孵育液中,4 ℃孵育过夜。再置于山羊抗兔二抗(1∶1 000)孵育液中,37℃孵育 1 h。最后加显影液避光显影,曝光拍照,Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.7　试剂盒检测细胞培养上清液中 IL-6 和 TNF-α 水平　　细胞按照 1.2.5 进行处理,培养 24 h 后,收集细胞培养上清液,3 500 r/min 离心 10 min,保留上清。分别参照 IL-6 和 TNF-α 试剂盒说明书,检测上清中 IL-6 和 TNF-α 水平。

1.2.8　双荧光素酶报告基因实验　　将对数增殖期的 HBECs 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体法,分别共转染 WT-SIRT1 与 miR-NC 或 miR-409-3p mimics、MUT-SIRT1 与 miR-NC 或 miR-409-3p mimics。转染 6 h 后,更换培养基。再培养 24 h,收集细胞并裂解,参照双荧光素酶活性检测试剂盒操作说明,检测荧光素酶活性。

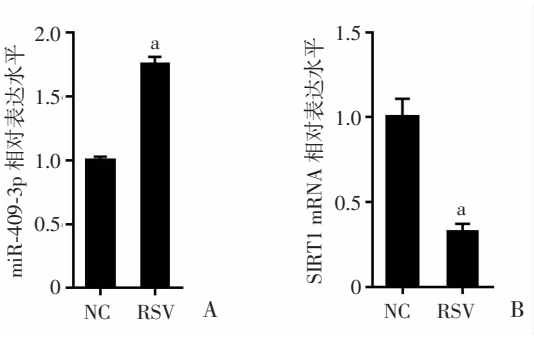
1.3　统计学分析

SPSS.22.0 软件分析实验数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较用独立样本 t 检验;多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　RSV 感染对 HBECs 细胞中 miR-409-3p 和 SIRT1 表达的影响

与 NC 组比较,RSV 组 HBECs 细胞中 miR-409-3p 表达升高($P<0.05$),而 SIRT1 表达降低($P<0.05$)。见图 1。



A:RSV 感染对 HBECs 细胞中 miR-409-3p 表达的影响;B:RSV 感染对 HBECs 细胞中 SIRT1 表达的影响。a:$P<0.05$,与 NC 组比较

图 1　RSV 感染对 HBECs 细胞中 miR-409-3p 和 SIRT1 表达的影响

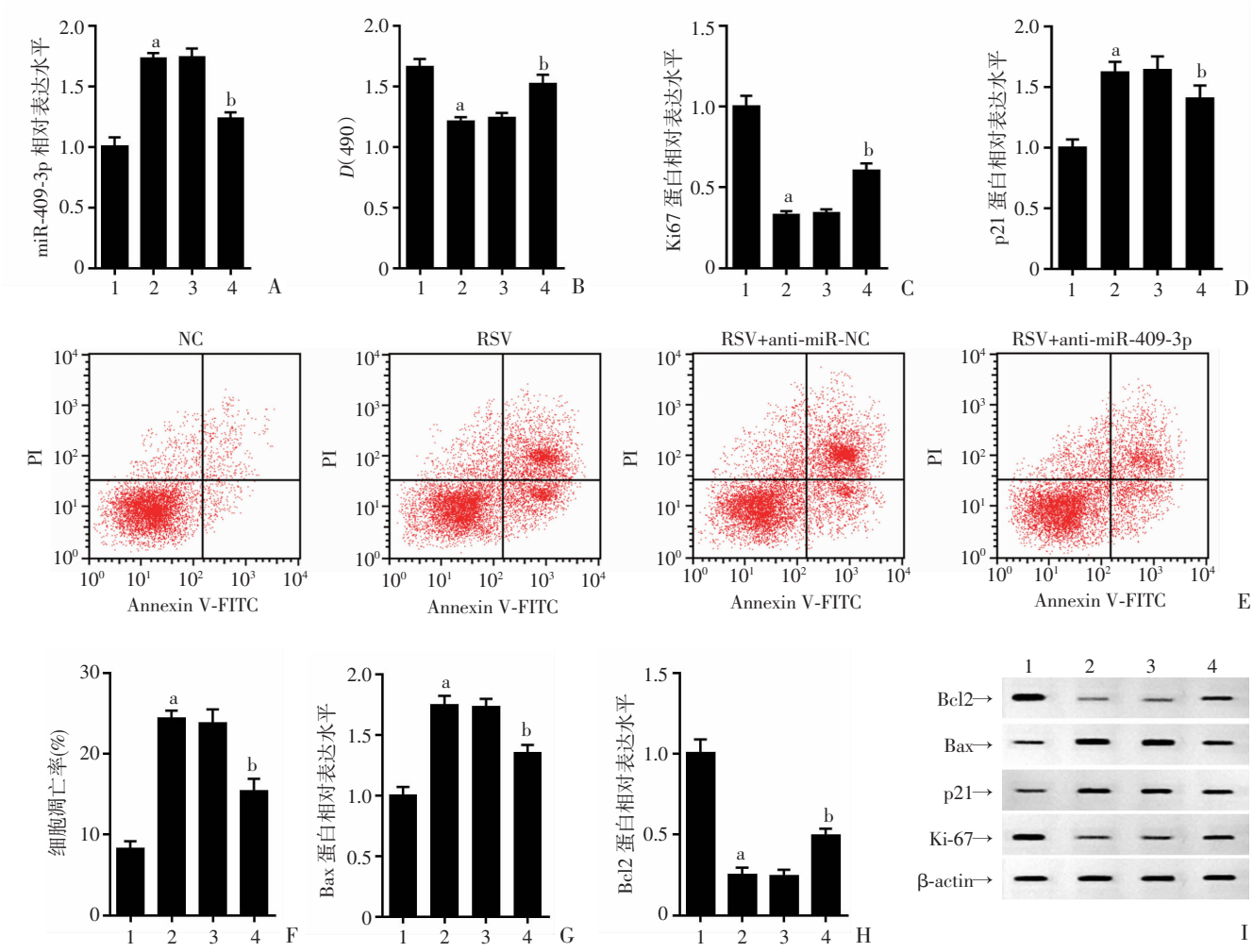
https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

2.2 RSV 对沉默 miR-409-3p 表达的 HBECs 增殖和凋亡的影响

与 NC 组比较,RSV 组 HBECs 细胞 $D(450)$、Ki-67 和 Bcl2 的蛋白表达降低($P<0.05$),细胞凋亡率、p21 和 Bax 的蛋白表达升高($P<0.05$)。与 RSV+anti-miR-NC 组比较,RSV + anti-miR-409-3p 组 HBECs 细胞 OD_{450nm}、Ki-67 和 Bcl2 的蛋白表达升高($P<0.05$),细胞凋亡率、p21 和 Bax 的蛋白表达降低($P<0.05$);而 RSV 组与 RSV+anti-miR-NC 组各检测指标比较均无显著差异($P>0.05$)。见图 2。

2.3 RSV 对沉默 miR-409-3p 表达的 HBECs 炎性因子表达的影响

与 NC 组比较,RSV 组 HBECs 细胞 IL-6 和 TNF-α 表达升高($P<0.05$)。与 RSV+anti-miR-NC 组比较,RSV+anti-miR-409-3p 组 HBECs 细胞 IL-6 和 TNF-α 表达降低($P<0.05$);而 RSV 组与 RSV+anti-miR-NC 组各检测指标比较均无显著差异($P>0.05$)。见图 3。



1:NC 组,2:RSV 组,3:RSV+anti-miR-NC 组,4:RSV+anti-miR-409-3p 组

A:各组中 miR-409-3p 表达水平;B:RSV 对沉默 miR-409-3p 的 HBECs 增殖的影响;C-D:RSV 对沉默 miR-409-3p 的 HBECs 中 Ki-67、p21 蛋白表达的影响;E-F:RSV 对沉默 miR-409-3p 的 HBECs 凋亡的影响;G-H:RSV 对沉默 miR-409-3p 的 HBECs 中 Bax、Bcl2 蛋白表达的影响;I:Ki-67、p21、Bax 和 Bcl2 蛋白表达。a:$P<0.05$,与 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 RSV+anti-miR-NC 组比较

图 2 RSV 对沉默 miR-409-3p 表达的 HBECs 增殖和凋亡的影响

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

2.4 miR-409-3p 靶向调控 SIRT1 的表达

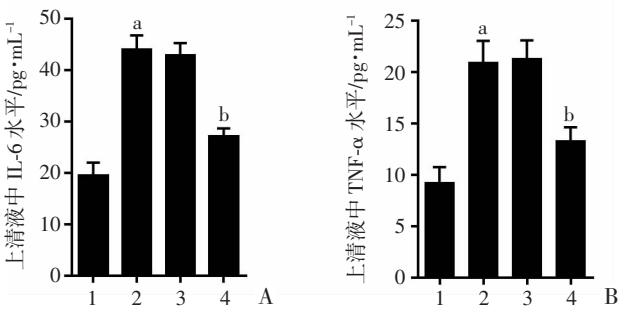
Starbase 生物信息学软件预测显示,miR-409-3p 与 SIRT1 存在连续结合位点,见图 4。共转染 WT-SIRT1 与 miR-409-3p 的细胞荧光素酶活性低于共转染 WT-SIRT1 与 miR-NC 的细胞($P<0.05$),而共转染 MUT-SIRT1 与 miR-409-3p 的细胞荧光素酶活性与共转染 MUT-SIRT1 与 miR-NC 的细胞比较无显著差异($P>0.05$),说明 miR-409-3p 可靶向结合 SIRT1。与 miR-NC 组比较,miR-409-3p 组 HBECs 细胞中 miR-409-3p 表达升高($P<0.05$),SIRT1 表达降低($P<0.05$);与 anti-miR-NC 组比较,anti-miR-409-3p 组 HBECs 细胞中 miR-409-3p 表达降低($P<0.05$),SIRT1 表达升高($P<0.05$),进一步说明 miR-409-3p 靶向负调控 SIRT1 表达。见图 4。

2.5 RSV 对过表达 SIRT1 的 HBECs 增殖、凋亡及炎性因子表达的影响

与 RSV+pcDNA-NC 组比较,RSV+pcDNA-SIRT1 组 HBECs 细胞 $D(450)$、Ki-67 和 Bcl2 的蛋白表达升高($P<0.05$),细胞凋亡率、p21 和 Bax 的蛋白表达降低($P<0.05$),IL-6 和 TNF-α 表达降低($P<0.05$)。见图 5。

2.6 RSV 对同时沉默 SIRT1 和 miR-409-3p 的 HBECs 增殖、凋亡及炎性因子表达的影响

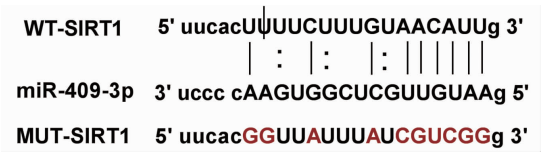
与 RSV+anti-miR-409-3p+si-NC 组比较,RSV+anti-miR-409-3p+si-SIRT1 组 HBECs 细胞 $D(450)$、Ki-67 和 Bcl2 的蛋白表达降低($P<0.05$),细胞凋亡率、p21 和 Bax 的蛋白表达升高($P<0.05$),IL-6 和 TNF-α 表达升高($P<0.05$)。见图 6。

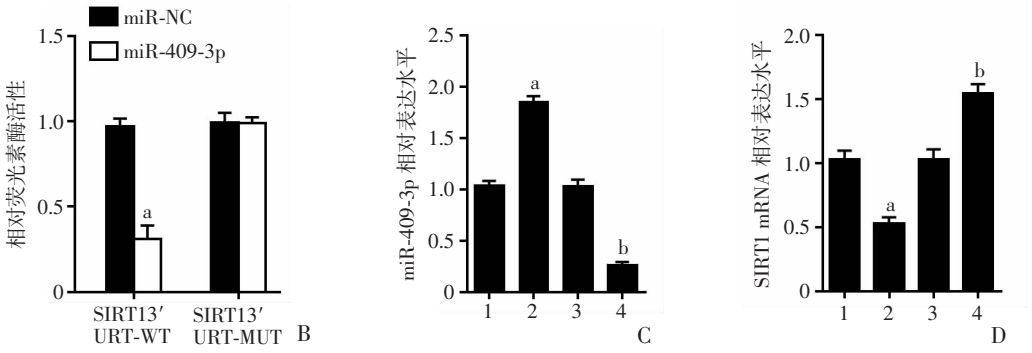


1:NC 组,2:RSV 组,3:RSV+anti-miR-NC 组,4:RSV+anti-miR-409-3p 组

A:RSV 对沉默 miR-409-3p 的 HBECs 中 IL-6 表达的影响;B:RSV 对沉默 miR-409-3p 的 HBECs 中 TNF-α 表达的影响。a:$P<0.05$ 与 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 RSV+anti-miR-NC 组比较

图 3 RSV 对沉默 miR-409-3p 表达的 HBECs 炎性因子表达的影响



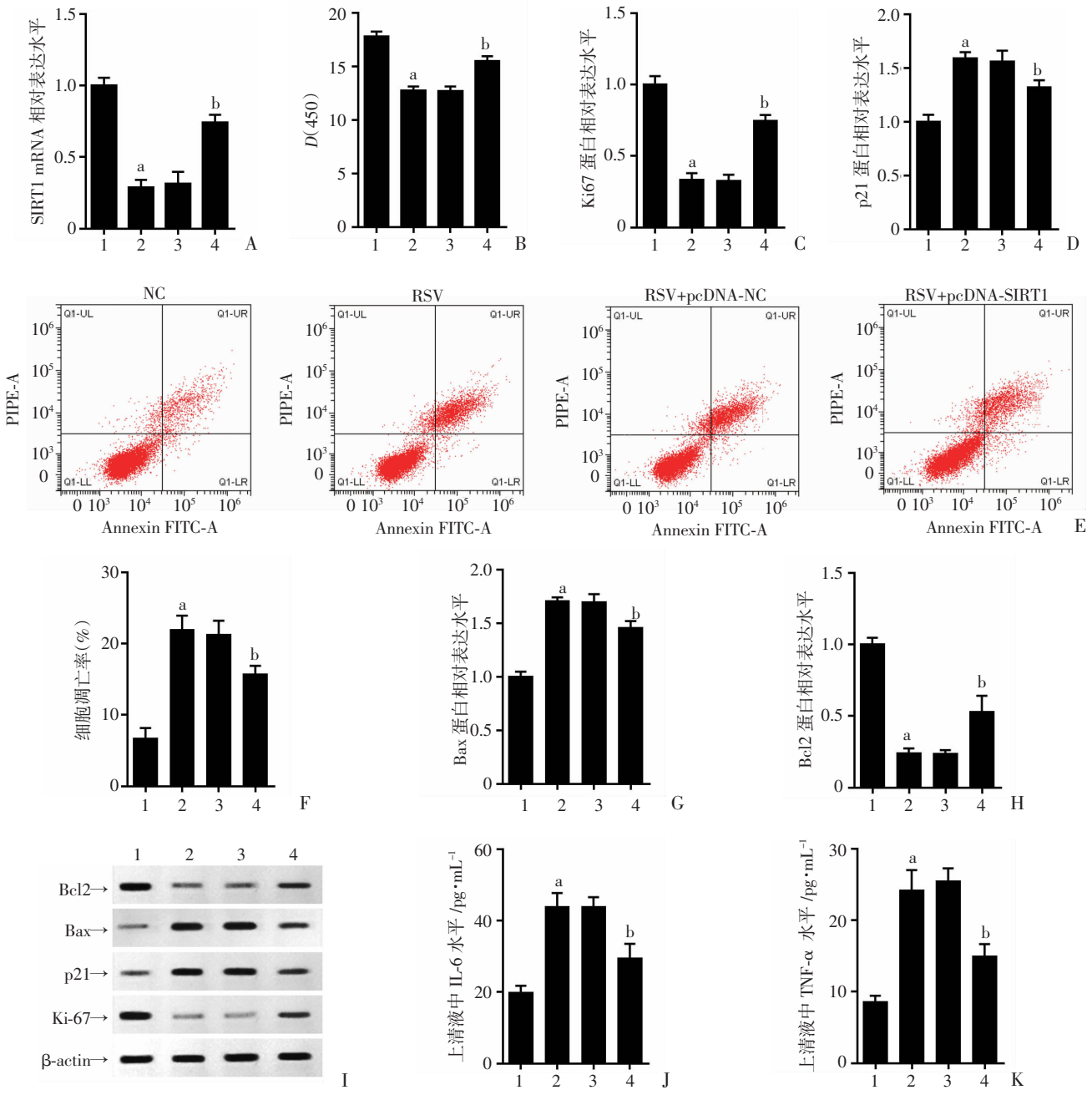


1:miR-NC 组,2:miR-409-39 组,3:anti-miR-NC 组,4:anti-miR-409-39 组

A:starbase 预测到 SIRT1 的序列中含有与 miR-409-3p 互补的核苷酸序列;B:双荧光素酶报告实验结果;C:miR-409-3p 转染效果验证;D:miR-409-3p 对 SIRT1mRNA 表达的影响。a:$P<0.05$,与 miR-NC 组比较;b:$P<0.05$,与 anti-miR-NC 组比较

图 4 miR-409-3p 靶向调控 SIRT1 的表达

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



1:NC 组,2:RSV 组,3:RSV+pcDNA-NC 组,4:RSV+pcDNA-SIRT1 组

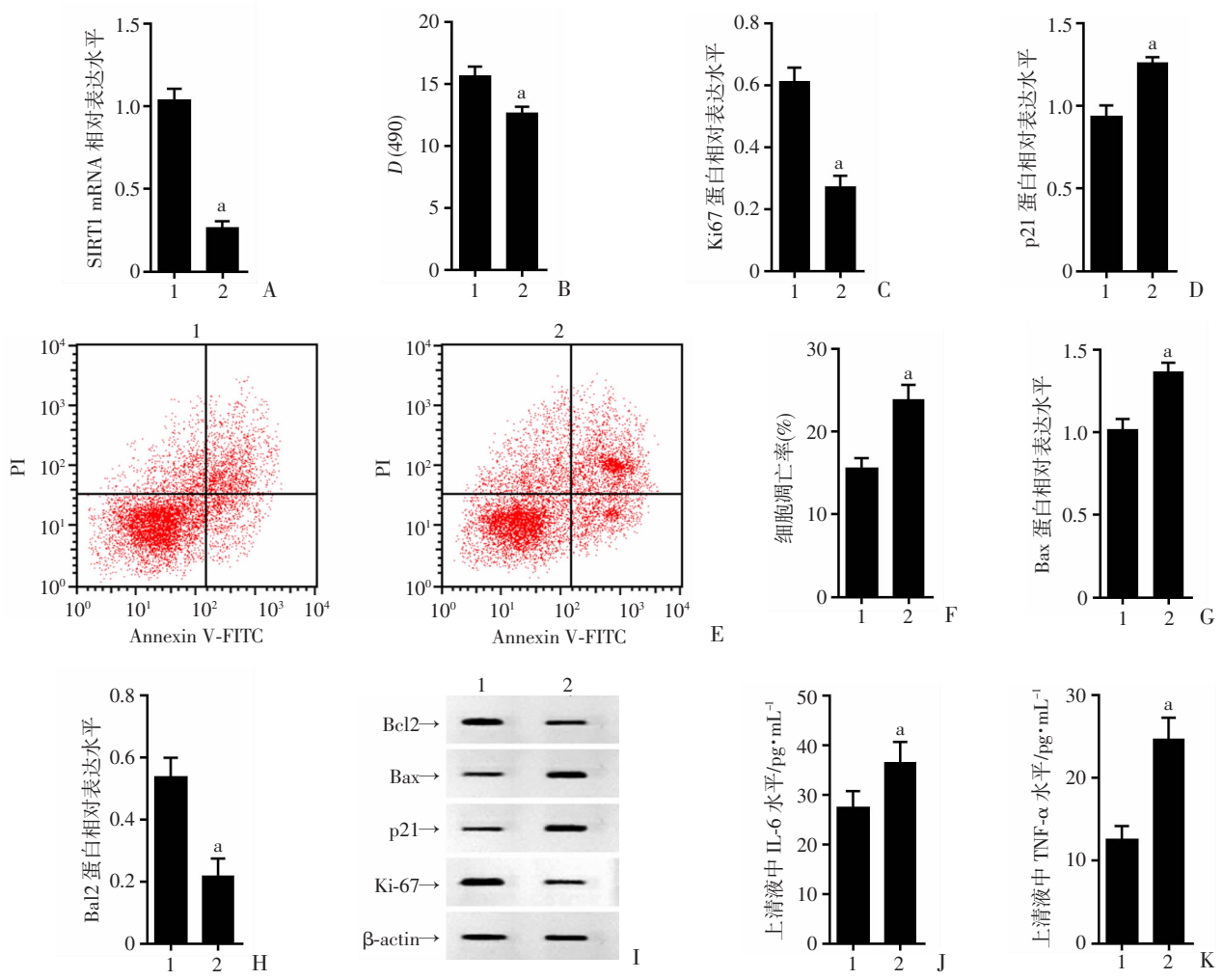
A:各组中 SIRT1 表达水平;B:RSV 对过表达 SIRT1 的 HBECs 增殖的影响;C-D:RSV 对过表达 SIRT1 的 HBECs 中 Ki-67、p21 蛋白表达的影响;E-F:RSV 对过表达 SIRT1 的 HBECs 凋亡的影响;G-H:RSV 对过表达 SIRT1 的 HBECs 中 Bax、Bcl2 蛋白表达的影响;I:Ki-67、p21、Bax 和 Bcl2 蛋白表达;J-K:RSV 对过表达 SIRT1 的 HBECs 中 IL-6、TNF-α 表达的影响。a:$P<0.05$,与 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 RSV+pcDNA-NC 组比较

图 5 RSV 对过表达 SIRT1 的 HBECs 增殖、凋亡及炎性因子表达的影响

3 讨论

miRNA 是一类真核生物中广泛存在的长度约 18~25 个核苷酸的非编码 RNA,在细胞的凋亡、炎症反应和氧化应激等过程中发挥重要调控作用。研究显示,miR-21[14]、miR-181a[15] 和 miR-9-5p[16] 等多种 miRNA 参与调控支气管上皮细胞损伤,可作为防治支气管上皮细胞损伤的分子靶点。miR-409-3p 作为一种 miRNA,参与多种疾病的发展进程。报道称,miR-409-3p、miR-134 和 miR-495 等 miRNA 在胆碱和叶酸缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织中的表达明显升高,且其表达与肝损伤的严重程度密切相

https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10659-1021078147.htm



1:RSV+anti-miR-409-3p+si-NC 组,2:RSV+anti-miR-409-3p+si-SIRT 组

A:各组中 SIRT1 mRNA 表达水平;B:RSV 对同时沉默 SIRT1 和 miR-409-3p 的 HBECs 增殖的影响;C-D:RSV 对同时沉默 SIRT1 和 miR-409-3p 的 HBECs 中 Ki-67、p21 蛋白表达的影响;E、F:RSV 对同时沉默 SIRT1 和 miR-409-3p 的 HBECs 凋亡率的影响;G-H:RSV 对同时沉默 SIRT1 和 miR-409-3p 的 HBECs 中 Bax、Bcl2 蛋白表达的影响;I:Ki-67、p21、Bax 和 Bcl2 蛋白表达;J-K:RSV 对同时沉默 SIRT1 和 miR-409-3p 的 HBECs 中 IL-6、TNF-α 表达的影响。a:$P<0.001$,与 RSV+anti-miR-409-3p+si-NC 组比较

图 6 RSV 对同时沉默 SIRT1 和 miR-409-3p 的 HBECs 增殖、凋亡及炎性因子表达的影响

关[17];过表达 miR-409-3p 可显著降低 SOCS3 的表达并增加 STAT3 的磷酸化,诱导 IL-1β,IL-6,IP-10 等炎性细胞因子表达,增强 CD4 T 细胞定向趋化性,导致自身免疫性脑脊髓炎病情加重,miR-409-3p 和 miR-1896 可能是治疗自身免疫性脑脊髓炎的靶标[18]。

本研究首先采用 RSV 感染 HBECs,结果表明,RSV 感染 HBECs 后,细胞凋亡加剧且炎性因子 IL-6 和 TNF-α 的表达明显升高,与相关报道结果一致[19-20],说明 RSV 感染的 HBECs 损伤模型建立成功。RSV 感染的 HBECs 中 miR-409-3p 的表达明显高于未感染细胞,提示 miR-409-3p 可能参与 RSV 感染的 HBECs 损伤;而沉默 miR-409-3p 促进了 RSV 感染的 HBECs 增殖,降低了其凋亡及炎性因子 IL-6 和 TNF-α 的表达,提示 miR-409-3p 可作为减轻 RSV 感染的上皮细胞损伤的分子靶点。

生物信息学软件预测显示,SIRT1 可能是 miR-409-3p 的靶基因。本研究利用双荧光素酶报告基因实验证实了这一结果。同时,沉默 miR-409-3p 表达促进了 HBECs 中 SIRT1 的表达,进一步说明 miR-409-3p 靶向负调控 SIRT1 表达,这与本文 RSV 感染 HBECs 后细胞中 miR-409-3p 表达升高而 SIRT1 表达降低的结果一致。有报道称,香烟烟雾提取物可降低人支气管上皮细胞中 SIRT1 的活性和表达,从而调节 NF-κB 活性并诱导促炎反应,SIRT1 参与慢性阻塞性肺疾病的发展进程[21]。本研究显示,过表达 SIRT1 可促进 RSV 感染的 HBECs 增殖,且抑制其凋亡及炎性因子

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

IL-6 和 TNF-α 的表达,这与 ZHANG 等[12]报道的结果一致,提示 SIRT1。本研究还显示,沉默 SIRT1 逆转了沉默 miR-409-3p 对 RSV 感染 HBECs 凋亡及炎性因子 IL-6 和 TNF-α 表达的抑制作用,提示 miR-409-3p 可能通过靶向负调控 SIRT1 表达来影响 RSV 感染的 HBECs 凋亡和炎性因子表达。

SIRT1 是依赖于 NAD+的Ⅲ类组蛋白脱乙酰酶,在体内通过乙酰化修饰作用进而调节基因的表达,参与细胞增殖、分化和凋亡等生命过程。SIRT1 可介导 NF-κ B 和 P53 的去乙酰化并抑制其活性,进而抑制其对下游炎症因子、p21、Bax 等细胞周期、凋亡相关基因表达的促进作用,发挥抗炎和抗凋亡作用[22]。Ki-67 是参与调控细胞周期,是细胞增殖的标志性蛋白[23]。p21 是细胞周期调控蛋白,参与细胞增殖、分化和凋亡等过程[24]。Bax 和 Bcl2 参与调控细胞凋亡,其中 Bax 是促凋亡分子,可改变线粒体膜通透性,导致释放细胞色素 C 释放量增加,进而激活 Caspase 级联反应,诱导细胞凋亡。而 Bcl2 是抗凋亡分子,其可与 Bax 结合形成异源二聚体,抑制 Bax 的促凋亡作用[25]。本研究显示,沉默 miR-409-3p 或过表达 SIRT1 均可促进 RSV 感染的 HBECs 中 Ki-67 和 Bcl2 蛋白表达,抑制 p21 和 Bax 的蛋白表达,而沉默 SIRT1 则逆转沉默 miR-409-3p 对 HBECs 中 Ki-67 和 Bcl2 蛋白表达的促进作用及对 p21 和 Bax 的蛋白表达的抑制作用,进一步提示沉默 miR-409-3p 通过靶向上调 SIRT1 进而影响下游 p21、Bax、Ki-67 和 Bcl2 等增殖和凋亡相关基因的表达来影响 RSV 感染的 HBECs 增殖和凋亡。

综上,沉默 miR-409-3p 可促进 RSV 感染的 HBECs 增殖,并抑制其凋亡及炎性因子 IL-6 和 TNF-α 的表达,其可能通过靶向上调 SIRT1 来减轻 RSV 感染的 HBECs 损伤,miR-409-3p 可能是支气管哮喘治疗的潜在分子靶点。

参考文献:

[1] BANNO A, REDDY A T, LAKSHMI S P, *et al*. Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma[J]. Clin Sci, 2020, 134(9): 1063-1079. DOI: 10.1042/cs20191309.

[2] SUN J, HUANG N, MA W, *et al*. Protective effects of metformin on lipopolysaccharide-induced airway epithelial cell injury via NF-κB signaling inhibition[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 1817-1823. DOI: 10.3892/mmr.2019.9807.

[3] 郑志勇, 许尤佳. TLR4 调控 p38 信号通路对呼吸道合胞病毒感染的支气管上皮细胞凋亡的影响[J]. 广东医学, 2018, 39(20): 3019-3024.
ZHENG Z Y, XU Y J. Effect of TLR4 regulating p38 signaling pathway on the apoptosis of bronchial epithelial cells infected by respiratory syncytialvirus[J]. Guangdong Med J, 2018, 39(20): 3019-3024.

[4] CHI X B, JIANG Y, CHEN Y B, *et al*. MicroR-505/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces cell apoptosis through the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Biomarkers Med, 2020, 14(11): 981-996. DOI: 10.2217/bmm-2019-0511.

[5] LI X, LIAO J, SU X, *et al*. Human urine-derived stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury in a rat model via exosomal miR-146a-5p which targets IRAK1[J]. Theranostics, 2020, 10(21): 9561-9578. DOI: 10.7150/thno.42153.

[6] GAO Y W, ZHANG N, LV C, *et al*. lncRNA SNHG1 knockdown alleviates amyloid-β-induced neuronal injury by regulating ZNF217 via sponging miR-361-3p in Alzheimer's disease[J]. J Alzheimer Dis, 2020, 77(1): 85-98. DOI: 10.3233/jad-191303.

[7] 徐佳灵, 喻松霞, 金柏军, 等. miR-409-3p 靶向癌基因 ELF2 抑制非小细胞肺癌细胞系 A549 增殖[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(11): 1592-1596. DOI: CNKI: SUN: JCYL.0.2019-11-019
XU J L, YU S X, JIN B J, *et al*. MiR-409-3p-targeted oncogene ELF2inhibits proliferation of non-small cell lung cancer cell line A549[J]. Basic Clin Med, 2019, 39(11): 1592-1596. DOI: CNKI: SUN: JCYL.0.2019-11-019

[8] 范江砂, 单哲, 汤丽, 等. 原发免疫性血小板减少症患者外周血 CXCL3 及微小 RNA-409-3p 的表达[J]. 江苏医药, 2019, 45(2): 145-147.
FAN J S, SHAN Z, TANG L. Expressions of CXCL3 and microRNA-409-3p in peripheral blood of patients with primary immunethrombocytopenia[J]. Jiangsu Med J, 2019, 45(2): 145-147.

[9] KHO A T, MCGEACHIE M J, MOORE K G, *et al*. Circulating microRNAs and prediction of asthma exacerbation in childhood asthma[J]. Respir Res, 2018, 19: 128. DOI: 10.1186/s12931-018-0828-6.

[10] 郭显, 史承勇, 王文生, 等. 微 RNA-21 通过激活沉默信息调控因子 1 信号通路缓解多柔比星心肌毒性[J]. 第二军医大学学报, 2019, 40(4): 386-393.
GUO X, SHI C Y, WANG W S, *et al*. MicroRNA-21 attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating silent information regulator 1 signaling pathway[J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2019, 40(4): 386-393.

[11] HWANG J W, YAO H W, CAITO S, *et al*. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61: 95-110. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.015.

[12] ZHANG H, SONG Y C, RONG W, *et al*. MiR-221 partici-

http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical/jsyy201906

pates in the airway epithelial cells injury in asthma via targeting SIRT1[J]. Exp Lung Res, 2018, 44(6): 272-279. DOI: 10.1080/01902148.2018.1533051.

[13] 秦岭, 冯俊涛, 胡成平, 等. 呼吸道合胞病毒感染支气管上皮细胞介导 IL-8 致 Th17/Treg 失衡[J]. 中南大学学报(医学版), 2016, 41(4): 337-344. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2016.04.001
QIN L, FENG J T, HU C P, *et al*. Th17/Treg imbalance mediated by IL-8 in RSV-infected bronchial epithelial cells[J]. J Cent South University(Med Sci), 2016, 41(4): 337-344.

[14] LI C L, XU Z B, FAN X L, *et al*. MicroRNA-21 mediates the protective effects of mesenchymal stem cells derived from iPSCs to human bronchial epithelial cell injury under hypoxia[J]. Cell Transplant, 2018, 27(3): 571-583. DOI: 10.1177/0963689718767159.

[15] 梁珍珍, 解玉东, 张艳莉, 等. 上调 miR-181a 抑制香烟提取物诱导的支气管上皮细胞致炎因子生成与 collagen Ⅳ、fibronectin 和 α-SMA 表达[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3): 500-505.
LIANG Z Z, XIE Y D, ZHANG Y L, *et al*. Up-regulation of miR-181a attenuates releases of CSE-induced pro-inflammatory factors and expression of collagen Ⅳ, fibronectin and α-SMA in human bronchial epithelialcells[J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(3): 500-505. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2019.03.020

[16] ZHAO J, PU J D, HAO B W, *et al*. LncRNA RP11-86H7.1 promotes airway inflammation induced by TRAPM2.5 by acting as a CeRNA of miRNA-9-5p to regulate NFKB1 in HBECS[J]. Sci Rep, 2020, 10: 11587. DOI: 10.1038/s41598-020-68327-1.

[17] TRYNDYAK V P, MARRONE A K, LATENDRESSE J R, *et al*. MicroRNA changes, activation of progenitor cells and severity of liver injury in mice induced by choline and folate deficiency[J]. J Nutr Biochem, 2016, 28: 83-90. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.10.001.

[18] LIU X, ZHOU F, YANG Y, *et al*. miR-409-3p and miR-1896 co-operatively participate in IL-17-induced inflammatory cytokine production in astrocytes and pathogenesis of EAE mice via targeting SOCS3/STAT3signaling[J]. Glia, 2019, 67(1): 101-112. DOI: 10.1002/glia.23530.

[19] 江敏时, 檀卫平, 陈小平, 等. 孟鲁司特抑制呼吸道合胞病毒感染人支气管上皮细胞所致炎症的药理机制[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2017, 38(5): 676-684. DOI: CNKI: SUN: ZSYK.0.2017-05-006
JIANG M S, TAN W P, CHEN X P, *et al*. Montelukast inhibits the inflammation of human bronchial epithelial cells infected by respiratory syncytial virus[J]. J Sun Yat-sen University(Med Sci), 2017, 38(5): 676-684. DOI: CNKI: SUN: ZSYK.0.2017-05-006

[20] 李玲, 吴东升, 刘璐, 等. 五倍子含药血清对呼吸合胞病毒感染人支气管上皮细胞损伤及 NF-κB 核转位和表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 790-793.
LI L, WU D S, LIU L, *et al*. Influence of serum containing Galla Chinensis on human bronchial epithelial cell injury by respiratory syncytial virus infection and on NF-κB nuclear transfer and expression[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(2): 790-793.

[21] DI VINCENZO S, HEIJINK I H, NOORDHOEK J A, *et al*. SIRT1/FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelialcells[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(4): 2272-2282. DOI: 10.1111/jcmm.13509.

[22] 甘敏, 周巧雅, 洪美静, 等. 肝 X 受体激动剂通过激活 SIRT1 信号级联改善 Aβ 诱导的视网膜色素上皮细胞炎症和凋亡反应[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(14): 1398-1406. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202003092.
GAN M, ZHOU Q Y, HONG M J, *et al*. Liver X receptor agonist ameliorates amyloid β-induced inflammation and apoptosis in retinal pigment epithelial cells by activating SIRT1 signaling cascade[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(14): 1398-1406. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202003092.

[23] GEORGAKOPOULOU V E, ZYGOURIS E, NIKOKIRIS C, *et al*. Predictive indicators of survival in patients with surgically resected lung carcinoid tumors at a Greek medical center[J]. Cureus, 2020, 12(9): e10300. DOI: 10.7759/cureus.10300.

[24] GAO Z X, LIN Y C, WU Z P, *et al*. LncRNA SNHG6 can regulate the proliferation and apoptosis of rat degenerate nucleus pulposus cells via regulating the expression of miR-101-3p[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(16): 8251-8262. DOI: 10.26355/eurrev_202008_22621

[25] 罗吉, 罗燕, 李勇敏, 等. 重楼皂苷Ⅰ对结肠癌 HCT116 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 174-176. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20180687
LUO J, LUO Y, LI Y M, *et al*. Effect of polyphyllin Ⅰ on apoptosis and protein expressions of Bax, Bci-2 and Caspase-3 in colorectal cancer cell HCT116[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(2): 174-176. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20180687

(**收稿**:2020-10-09;**修回**:2020-12-07)
(编辑 邓强庭)

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/