doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.04.001

·论著·

双荧光素酶报告基因验证微小 RNA410 对白细胞介素-13 基因的靶向调控作用

金蓉,刘冬云,胡素娟,林荣军(青岛大学附属医院,山东青岛 266000)

[摘要]**目的**:验证微小 RNA410(miR-410)对白细胞介素-13(IL-13)mRNA 的靶向调控作用。**方法**:采用生物信息学软件预测 miR-410 与 IL-13 mRNA 3'端非翻译区存在结合位点,设计并合成包含 miR-410 结合序列及突变序列的 IL-13 基因序列片段,分别构建野生型和突变型双荧光素酶基因载体,与 miR-410 和阴性对照序列共同转染 293T 细胞,检测转染后荧光素酶的活性,验证 miR-410 对 IL-13 mRNA 表达的影响。**结果**:生物信息学显示,IL-13 mRNA 存在与 miR-410 的结合位点。基因测序结果显示,野生型和突变型荧光素酶报告基因载体构建成功。通过双荧光素酶报告系统发现,miR-410 能够结合野生型 IL-13 mRNA 荧光素酶基因序列从而抑制其表达,而对突变型 IL-13 mRNA 的荧光素酶表达无影响($P<0.05$)。**结论**:miR-410 可以靶向调控 IL-13 mRNA 的表达。

[关键词]微小 RNA410;白细胞介素-13;双荧光素酶报告基因
[中图分类号]R968 [文献标识码]A [文章编号]1672-108X(2021)04-0001-04

Targeted Regulation Role of MicroRNA410 in Expression of Interleukin-13 Detected by Dual-Luciferase Reporter System

Jin Rong, Liu Dongyun, Hu Sujuan, Lin Rongjun (*The Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao* 266000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To verify the targeted regulation role of microRNA410 (miR-410) on expression of interleukin-13 (IL-13) mRNA. **Methods**: The binding sites of miR-410 in 3'untranslated region (3'UTR) of IL-13 mRNA were predicted by the bioinformatics software. IL-13 gene fragments binding miR-410 and mutant sequences were designed and synthesized. The wild and mutant luciferase reporter gene carriers were respectively constructed. miR-410 mimics or negative control of mimics were respectively co-transfected into 293T cells with wild or mutant luciferase reporter gene. The luciferase activity was detected to observe the effects of miR-410 on expression of IL-13 mRNA. **Results**: Bioinformatics analysis showed that there was binding site located in 3'UTR of IL-13 mRNA. The electrophoresis showed that the wild and mutant luciferase reporter gene carriers were constructed successfully. Through the dual-luciferase reportier system, it was found that miR-410 could bind the wild-type IL-13 mRNA luciferase gene sequence and inhibit its expression, but had no effect on the mutant IL-13 mRNA luciferase expression ($P<0.05$). **Conclusion**: IL-13 mRNA can be targeted by miR-410.

[**Keywords**] microRNA410; interleukin-13; dual-luciferase reporter system

微小 RNA(miRNA)是真核生物中一类长度为 18~25 个核苷酸的内源性非编码 RNA,具有高度保守性、时序性和组织特异性,主要通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 上的互补区域结合,在转录后水平负性调控靶基因的表达,参与生物的发育、增殖、分化、凋亡过程[1-3]。哮喘是一种遗传易感性的慢性气道炎症性疾病,涉及多种细胞、细胞因子以及与免疫调节密切相关的信号通路[4]。越来越多的研究证据表明,多种 miRNA 参与哮喘的气道炎症调节[5]。本课题组前期研究发现,鸡卵白蛋白(OVA)诱导的哮喘小鼠体内微小 RNA410(miR-410)含量较对照组明显降低,考虑 miR-410 可能参与哮喘发病过程。本研究拟通过生物信息学方法预测 miR-410 与 IL-13 基因的结合位点,并通过双荧光素酶报告系统验证 miR-410 对 IL-13 基因的直接靶向关系,为进一步探索 miR-410 在哮喘发病机制中的作用提供参考。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

双荧光素酶检测系统、psiCHECK-2(promega);多功能酶标仪(SpectraMax i3x,Molecular Devices);凝胶成像系统(Tanon-1200,上海天能科技有限公司);大肠埃希菌菌株 DH5α、293T 细胞、miR-410 模拟物和 miRNA 无义序列阴性对照、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];IL-13 目的基因序列和突变序列(Invitrogen);限制性内切酶 XhoI 和 NotI、T4 DNA 连接酶、DNA ladder(Fermentas);质粒 DNA 抽提试剂盒

基金项目:国家自然科学基金,编号 81701587。
作者简介:金蓉(1981.05-),女,博士,主治医师,主要从事哮喘发病机制研究,E-mail:jinrong523@163.com。
通讯作者:林荣军(1962.03-),男,教授,主任医师,主要从事哮喘发病机制研究,E-mail:linrongjun0312@126.com。

(Qiagen);KOD 高保真酶 PCR 试剂盒、Taq 酶(TOYOBA)。

1.2　方法

1.2.1　生物学信息预测　利用靶基因预测软件 targetscan(http://www.targetscan.org)对 miR-410 靶向结合 IL-13 3'UTR 的位点进行分析,结合位点见图 1。

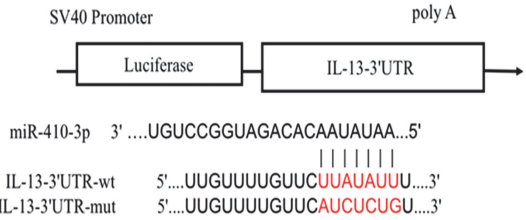


图 1　miR-410 靶向结合 IL-13 3'UTR 的位点

1.2.2　双荧光素酶报告载体的构建和鉴定　分别化学合成 IL-13 mRNA 结合位点的野生型和突变型序列的正义链和反义链,目的片断插入 XhoI、NotI 位点。用 XhoI、NotI 37 ℃酶切 psiCHECK-2 载体回收线性化载体片段。目的基因片段与线性化载体连接,将连接产物转化感受态细胞,筛选质粒克隆,提取质粒 DNA,分别进行酶切鉴定及测序鉴定。

1.2.3　细胞转染　事先准备好用于转染的分到 96 孔板中的 293T 细胞和目的质粒。将 10 μL DMEM 与 0.16 μL 的 psiCHECK-IL-13-wt/mut 目的质粒以及 miR-410-3p/Negative Control(NC)充分混匀后室温放置(溶液 A),之后将 10 μL DMEM 与 0.3 μL 的转染试剂充分混匀(溶液 B),室温放置 5 min。将溶液 A 与溶液 B 充分混匀,室温放置 20 min。转染前为细胞换取新鲜培养基,之后将转染混合物加入混匀。37 ℃、5% CO_2 培养。转染 6 h 后换取新鲜培养基,转染 48 h 后收集细胞检测。

1.2.4　荧光素酶报告基因验证　以 96 孔板每孔 100 μL 的量加入细胞悬液,室温摇床上缓慢摇 15 min 后,将细胞裂解液吸至 1.5 mL 离心管,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液移入新的管子;96 孔板中加入 Luciferase Assay Reagent Ⅱ(LAR Ⅱ)工作液 100 μL,加入 20 μL 细胞裂解液,移液枪吹打混匀 2 ~ 3 次,测定记录 Firefly luciferase(Fl)值(内参值)。加入 100 μL Stop & Glo Reagent,移液枪吹打混匀 2 ~ 3 次,测定记录 Renilla luciferase(Rl)值,即为报告基因发光值。

1.3　统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　荧光素酶报告基因载体酶切分析

psiCHECK-IL-13-wt/mut 质粒提取后应用 XhoI、NotI 双酶切,结果 psiCHECK-IL-13-wt/mut 在相应片段大小的位置切出来载体条带和目的 DNA 片段,释放出约 500 bp 大小的片段。见图 2。

2.2　荧光素酶报告基因测序分析

将含有 miR-410 结合位点的野生型和突变型序列的 IL-13 mRNA 载体进行测序,结果表明野生型和突变型 IL-13 mRNA 荧光素酶报告载体均构建成功。见图 3。

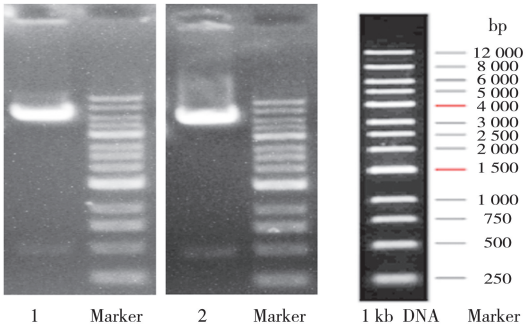


图 2　psiCHECK-IL-13-wt/mut 质粒的酶切鉴定

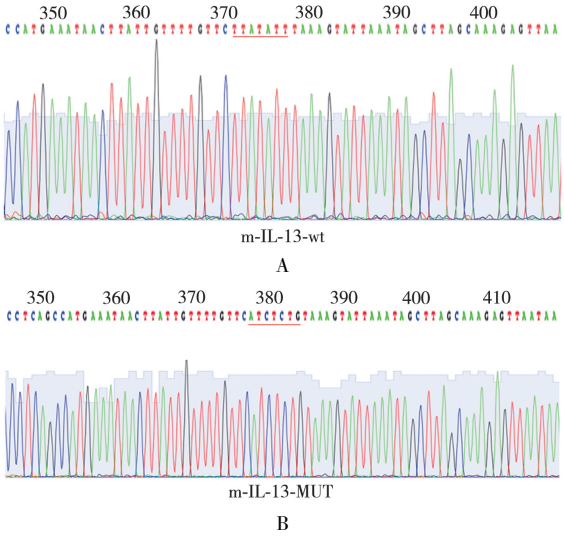


图 3　psiCHECK-IL-13-wt/mut 质粒酶切产物测序

2.3　荧光素酶活性测定

将 miR-410 模拟物与野生型载体 psiCHECK-IL-13-wt 共转染 293T 细胞后,细胞荧光素酶活性明显下降,与突变型载体 psiCHECK-IL-13-mut 比较差异有统计学意义($t=5.697$,$P<0.01$);与对照组 NC 结合野生型 psiCHECK-IL-13-wt 载体比较,荧光素酶活性降低($t=2.852$,$P<0.05$)。见图 4。

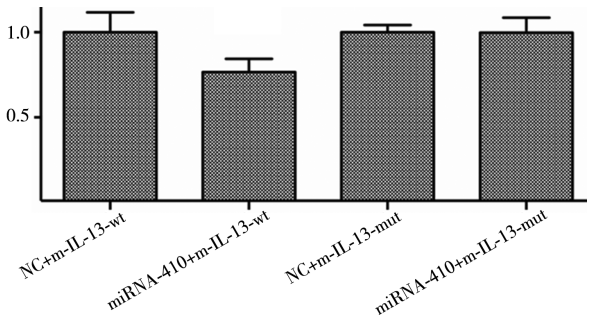


图 4　荧光素酶活性测定

3　讨论

支气管哮喘(简称哮喘)是由包括嗜酸粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞、气道上皮细胞等多种细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病[6]。近

年来 miRNAs 在哮喘发生发展中的作用引起众多关注。miRNA 是一种由 18～25 个核苷酸组成的非编码 RNA，其功能强大，能够通过与靶基因 mRNA 的非编码区的结合位点结合并参与基因转录后的调控和基因的降解[7]。越来越多的研究发现 miRNA 在哮喘发病机制中具有重要作用[8-10]。Williams A E 等[11]发现，哮喘患者肺组织中 miR-92、miR-26a、miR-200c、miR-16、let-7b、miR-125、let-7 及 miR-26 的含量与正常对照组存在差异。Kumar M 等[12]研究证实，let-7 在缓解哮喘气道炎症、降低气道高反应性、防止黏膜上皮细胞化生及上皮细胞纤维化方面的作用。本课题组前期研究显示，miR-410 在 OVA 诱导的过敏性哮喘小鼠模型中的表达水平明显低于对照组小鼠，提示 miR-410 可能参与过敏性哮喘的发病过程[13]。

在过敏性哮喘的发生发展过程中，Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-13 对炎症细胞如巨噬细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞的浸润起到重要作用[14-16]。IL-13 主要由 Th2 细胞、肥大细胞、单核巨噬细胞在活化状态下分泌。IL-13 诱导 B 淋巴细胞合成大量的 IgE 抗体同时增加嗜酸粒细胞的募集，引起气道上皮细胞表达诱导型一氧化氮合酶(iNOS)，诱导黏液产生和杯状细胞增殖，刺激气道平滑肌收缩，提高细胞外胶原蛋白和纤维母细胞向成肌纤维细胞表型转变等[17]。IL-13 能够通过 IL-13 Rα1 与 IL-4R 形成受体复合物，参与信号转导，激活靶基因转录，诱导 Th0 细胞分化、气道炎症、气道高反应、黏液产生。IL-13 主要通过气道上皮细胞、平滑肌细胞来调节哮喘个体小气道嗜酸粒细胞的募集[18]。抑制 Th2 型细胞因子，特别是 IL-13 的促炎作用是哮喘免疫治疗的一个发展方向[19]。目前已经开发出抗 IL-4 抗体、抗 IL-5 抗体以及抗 IL-13 抗体等抑制相关炎症因子的单克隆抗体[20]。相关研究[21-22]发现，抗 IL-5 抗体及抗 IL-13 抗体组可明显抑制 OVA 诱导的哮喘小鼠肺部嗜酸粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润。但是单克隆抗体制作工艺相对较长，还存在安全、免疫原性等一系列问题[23-24]。因此，从哮喘发生机制靶基因方面，本研究试图探讨某种靶向治疗哮喘 Th2 因子相关的药物，从而阻断过敏性哮喘的发生和发展。本研究发现，miR-410 在体外试验方面能够抑制 IL-13 mRNA 荧光素酶载体的荧光素活性，证实了 miR-410 能够靶向调控 IL-13 mRNA。

本研究通过生物信息学软件 targetscan 预测发现了 IL-13 3’ UTR 存在可能被 miR-410 结合的潜在靶点，通过构建 psiCHECK-2 双荧光素酶报告基因载体，从体外试验层面验证了 miR-410 对 IL-13 mRNA 的靶向结合作用，提示 miR-410 能够靶向调控 IL-13 mRNA，从而影响其转录及表达。本研究确定了 miR-410 和 IL-13 mRNA 的靶向调控关系，为进一步在体内试验层面上研究其在哮喘发病中的作用奠定了基础。

参考文献：

[1] LI X S, GONG X H, CHEN J, et al. miR-340 inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing CDK6, cyclin-D1 and cyclin-D2 [J]. Biochemical & biophysical research communications, 2015, 460(3): 670-677.

[2] LIND E F, MILLAR D G, DISSANAYAKE D, et al. miR-155 Upregulation in dendritic cells is sufficient to break tolerance in vivo by negatively regulating SHIP1 [J]. The journal of immunology, 2015, 195(10): 4632-4640.

[3] KIM R Y, HORVAT J C, PINKERTON J W, et al. MicroRNA-21 drives severe, steroid-insensitive experimental asthma by amplifying phosphoinositide 3-kinase-mediated suppression of histone deacetylase 2 [J]. Journal of allergy & clinical immunology, 2017, 139(2): 519-532.

[4] 李雪静，张园园，陈志敏. miRNA 调控支气管哮喘研究进展[J]. 临床儿科杂志，2019，37(6)：466-469.

[5] 何旗，王凌伟，邱晨. microRNA 与支气管哮喘的研究进展[J]. 广东医学，2016，37(14)：2196-2199.

[6] 朱剑洁，李昌崇. 6 岁以下儿童支气管哮喘诊治进展[J]. 儿科药学杂志，2020，26(5)：53-57.

[7] FANG C, LU W, LI C, et al. MiR-3162-3p is a novel MicroRNA that exacerbates asthma by regulating beta-tenin [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149257.

[8] JOHANSSON K, CARINA M, RAMOS-RAMIREZ P, et al. MicroRNA-155 is a critical regulator of type 2 innate lymphoid cells and IL-33 signaling in experimental models of allergic airway inflammation [J]. Journal of allergy & clinical immunology, 2016, 139(3): 1007.

[9] LIU Z, CHEN X, WU Q, et al. miR-125b inhibits goblet cell differentiation in allergic airway inflammation by targeting SPDEF [J]. European journal of pharmacology, 2016(782): 14-20.

[10] YANG H Y, BARBI J, WU C Y, et al. MicroRNA-17 modulates regulatory T cell function by targeting co-regulators of the foxp3 transcription factor [J]. Immunity, 2016, 45(1): 83-93.

[11] WILLIAMS A E, LARNER-SVENSSON H, PERRY M M, et al. MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy [J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5889.

[12] KUMAR M, AHMAD T, SHARMA A, et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation [J]. The journal of allergy and clinical immunology, 2011, 128(5): 1077-1085.

[13] JIN R, HU S J, LIU X M, et al. Intranasal instillation of miR-410 targeting IL4/IL13 attenuates airway inflammation in OVAinduced asthmatic mice [J]. Molecular medicine reports, 2019, 19(2): 895-900.

[14] FAN X H, CHENG L, YAN A H. Ameliorative effect of acetylshikonin on ovalbumin (OVA)-induced allergic rhinitis in mice through the inhibition of Th2 cytokine production and mast cell histamine release [J]. APMIS, 2019, 127(10): 688-695.

[15] HABIBIAN R, DELIREZH N, FARSHID A A. The effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ovalbumin-induced allergic asthma and cytokine responses in mice [J]. Iranian journal of basic medical science, 2018, 21(5): 483-488.

[16] 王红利. 白细胞介素-4 和白细胞介素-13 基因多态性对哮喘患儿 IgE 表达的影响[J]. 儿科药学杂志，2016，22(4)：7-9.

[17] DUGGER K J, CHRISMAN T, SAYNER S L, et al. Beta-2

adrenergic receptors increase TREG cell suppression in an OVA-induced allergic asthma mouse model when mice are moderate aerobically exercised [J]. BMC immunology, 2018, 19(1): 9.
[18] DING F X, FU Z, LIU B. Lipopolysaccharide exposure alleviates asthma in mice by regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 balance [J]. Med Sci Monit, 2018(24): 3220-3229. doi: 10.12659/MSM.905202.
[19] WALSH G M. Biologics targeting IL-5, IL-4 or IL-13 for the treatment of asthma -- an update [J]. Expert review of clinical immunology, 2017, 13(2): 143-149.
[20] 成家军, 张方琪, 张芳, 等. 联合应用IL-4突变体及抗IL-25抗体对哮喘小鼠炎性细胞及细胞因子水平的影响[J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(3): 377-380.
[21] LI J H, SARUTA K, DUMOUCHEL J P, et al. Small molecule mimetics of α-helical domain of IRAK2 attenuate the proinflammatory effects of IL-33 in asthma-like mouse models [J]. The journal of immunology, 2018, 200(12): 4036-4043.
[22] CAZZOLA M, MATERA M G, LEVI-SCHAFFER F, et al. Safety of humanized monoclonal antibodies against IL-5 in asthma: focus on reslizumab [J]. Expert opinion on drug safety, 2018, 17(4): 429-435.
[23] NTONTSI P, PAPATHANASSIOU E, LOUKIDES S, et al. Targeted anti-IL-13 therapies in asthma: current data and future perspectives [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2018, 27(2): 179-186.
[24] 杨光勇, 刘茜明, 刘莉莉, 等. 抗IL-4R单链抗体与蜂毒肽融合蛋白的构建、表达与纯化[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2018, 47(2): 193-197.

(编辑:刘雄志)
(收稿日期:2020-04-07　修回日期:2020-05-22)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.04.002

·论著·

小儿珠珀散治疗感冒药效学的动物实验研究

王敏[1], 李鹏飞[1], 李亚琪[1], 马全涛[1], 王敬康[1], 张驰[1], 邱敏懿[1], 张彩娟[1], 颜期植[2], 王停[3], 赵保胜[3](1. 北京中医药大学中药学院, 北京　100029; 2. 香港保和堂制药有限公司, 香港　999077; 3. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京　100029)

[摘要]**目的**:探讨小儿珠珀散治疗感冒的药物效应,为临床应用提供参考。**方法**:针对感冒过程中儿童可能出现的发热、咳嗽、痰多、消化不良等症状,分别利用脂多糖(LPS)致热家兔,氨水诱发小鼠咳嗽,酚红排泌法、半固体营养糊小鼠肠推进实验探讨小儿珠珀散对症治疗的作用。**结果**:小儿珠珀散可降低小鼠耳肿胀程度、家兔体温上升幅度;延长小鼠咳嗽潜伏期,减少咳嗽次数,减少小鼠气管酚红排出量;促进小鼠胃排空,增加小鼠小肠推进率(P均<0.05)。**结论**:小儿珠珀散可缓解感冒过程中的多种症状。

[关键词]小儿珠珀散;感冒;咳嗽;发热;胃肠动力
[中图分类号]R969.4　　[文献标识码]A　　[文章编号]1672-108X(2021)04-0004-05

Animal Experimental Study on Pharmacodynamics of Xiao'er Zhupo Powder in the Treatment of Cold

Wang Min[1], Li Pengfei[1], Li Yaqi[1], Ma Quantao[1], Wang Jingkang[1], Zhang Chi[1], Qiu Minyi[1], Zhang Caijuan[1], Yan Qizhi[2], Wang Ting[2], Zhao Baosheng[2](1. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*; 2. *Hong Kong Baohetang Pharmaceutical Co., Ltd., Hong Kong* 999077, *China*; 3. *Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To probe into the pharmacodynamics of Xiao'er Zhupo powder in the treatment of cold, so as to provide reference for clinical application. **Methods**: In view of the symptoms such as fever, cough, phlegm and dyspepsia in children with cold, the symptomatic treatment of Xiao'er Zhupo powder for children was investigated by lipopolysaccharide(LPS)-induced fever in rabbits, ammonia-induced cough in mice, phenol red excretion method and semi-solid nutrient paste intestine propulsion experiment. **Results**: Xiao'er Zhupo powder could reduce the ear swelling degree of mice, decrease the temperature ascending range of rabbits, prolong the cough latency of mice, reduce the cough times and tracheal phenol red excretiona, promote the gastric emptyness of mice, and increase the intestinal propulsion rate of mice (P<0.05). **Conclusion**: Xiao'er Zhupo powder can relieve a variety of symptoms of cold.

[**Keywords**] Xiao'er Zhupo powder; cold; cough; fever; gastrointestinal motility

感冒一年四季均可发生,但以冬春季节为多[1]。现代医学认为感冒为多种病原体引发的急性上呼吸道感染,可引发鼻、咽、喉、扁桃体等黏膜充血水肿,上皮细胞破坏、浆液、黏液及脓液渗出产生鼻塞、咳嗽等上呼吸道

作者简介:王敏(1991.05-),男,硕士,主要从事中药新药研发,E-mail: weme9916@163.com。
通讯作者:赵保胜(1973.08-),男,博士,研究员,主要从事中药治疗糖尿病研究与新药研发,E-mail: zhaobs1973@163.com。