

分类号: R595.4

单位代码: 10159

密 级: 公开

学 号: 2019120738



中国医科大学

硕士学位论文

中文题目: miR-23a-5p 调控 IL22BP、NLRP3 对百草枯肺上皮间质转化和细胞焦亡的作用及机制研究

英文题目: The role and mechanism of miR-23a-5p regulating IL22BP and NLRP3 on paraquat lung epithelial-mesenchymal transition and pyroptosis

论文作者: 孟婷婷

指导教师: 李铁刚教授

学科专业: 急诊医学

完成时间: 2022 年 3 月

中国医科大学硕士学位论文

miR-23a-5p 调控 IL22BP、NLRP3 对百草枯肺上皮间质转
化和细胞焦亡的作用及机制研究

The role and mechanism of miR-23a-5p regulating IL22BP and NLRP3
on paraquat lung epithelial-mesenchymal transition and pyroptosis

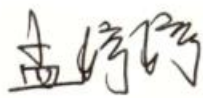
论文作者 孟婷婷 指导教师 李铁刚教授
申请学位 医学硕士 培养单位 第二临床学院
一级学科 临床医学 二级学科 急诊医学
研究方向 百草枯中毒
论文起止时间 2019 年 7 月—2022 年 3 月
论文完成时间 2022 年 3 月

中国医科大学（辽宁）

2022 年 3 月

中国医科大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：本论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究成果，论文中除加以标注的内容外，不包含其他人或机构已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得其他学位而使用过的成果。对本研究提供贡献的其他个人和集体均已在文中进行了明确的说明并表示谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

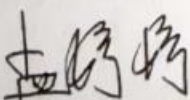
论文作者签名： 

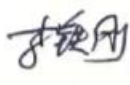
日期： 2022年5月26日

中国医科大学学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的原件、复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅。本人授权中国医科大学可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

保密（ ），在____年后解密适用本授权书。（保密：请在括号内划“√”）

论文作者签名： 

指导教师签名： 

日期： 2022年5月26日

日期： 2022年5月26日

摘要

背景: 百草枯 (Paraquat, PQ) 一种联吡啶类强效除草剂, 因其价格低廉在发展中国家广泛使用, 每年大约有上千人死于 PQ 中毒。PQ 中毒后主要积聚器官: 肺脏和肾脏, 其导致的不可逆性的急性进展性肺纤维化和急性肾衰竭是患者死亡的常见原因。上皮间质 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 转化和过度炎症反应是 PQ 中毒导致肺纤维化发展中的重要环节。在该过程中细胞从上皮形态转变为间质形态的过程被称为 EMT, 伴随相关指标包括黏附蛋白 (Epithelia cadherin, E-cadherin) 以及 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的改变, 赋予细胞迁移和侵袭的能力。此外, PQ 所致的肺纤维化过程中还伴随着过度炎症反应, 导致细胞凋亡、细胞坏死和细胞焦亡; 炎性小体是体内免疫反应的主要参与者。当外界刺激激活 NLRP3 炎性小体后, 导致含有半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶的活化, 从而使一些细胞因子如 IL-18、IL-1 β 的激活和释放。

通过前期转录组高通量测序研究分析 PQ 诱导肺纤维化中差异性表达的基因, 并生信预测基因之间的潜在结合位点。发现有关免疫通路的基因中共有 85 种 mRNA, 597 种 miRNA 差异性表达, 其中白细胞介素 22 受体亚基 2 (interleukin 22 receptor subunit alpha 2, IL22BP) 上调表达倍数较高。IL22BP 是 II 类细胞因子受体家族的一个成员, 在特发性肺动脉高压患者血浆中高表达^[1]。miR-23a-5p 作为近年新发现的 microRNA, 在肝纤维化中表达上调, 但其在百草枯中毒中的作用机制尚未见报道。NLRP3 介导的细胞焦亡介导多种疾病的发生发展, 如神经细胞损伤、急性肾损伤等。miRWalk 网站预测 miR-23a-5p IL22BP、NLRP3 的结合位点, 通过控制 miR-23a-5p 的表达和抑制, 探索 miR-23a-5p 对 IL22BP、NLRP3 的调控作用及该调控对百草枯致肺纤维化过程的影响。

目的: 揭示 PQ 中毒所致的肺 EMT 和细胞焦亡过程中 miRNA-mRNA 的调控关系对, 为 PQ 中毒所致的不可逆性的肺纤维化探寻潜在的治疗靶点。

研究方法: 1、20mg/Kg、30mg/Kg 腹腔单次注射给药于 C57/BL6 小鼠构建 PQ 中毒所致肺纤维化模型, 组织病理生理水平上我们选择 HE 染色、Masson 染色, 切片观察肺组织是否纤维化, 模型是否构建成功。提取组织蛋白通过 Western-Blot 检验 E-cadherin、IL22BP 及 α -SMA 的表达变化, 探索是否发生 EMT 改变。2、基因水平上用 qRT-PCR 方法检测相应蛋白指标和 miR-23a-5p 的表达情况。3、以一定范围的 PQ 浓度梯度, 探索 MLE-12 细胞染毒所致 EMT 的最适浓度。细胞模型构建

后,分别从蛋白水平检测 IL22BP、NLRP3、E-cadherin、IL-18、 α -SMA、IL-1 β 、caspase-1 在染毒组中的表达改变;qRT-PCR 的方法探明 MLE-12 染毒模型中 IL22BP、miR-23a-5p、E-cadherin、 α -SMA 的转录变化。4、转染 miR-23a-5p 的 mimic、inhibitor, 转染 72h 后, qRT-PCR 和 Western blot 方法检验改变 miR-23a-5p 后 MLE-12 染毒模型中的 E-cadherin、 α -SMA 及 IL22BP、NLRP3、IL-18、IL-1 β 、caspase-1 的表达。5、双荧光素酶实验验证 miR-23a-5p 和 IL22BP 结合, 构建含有荧光素酶的 IL22BP 野生型和突变型质粒载体后, 细胞内共转染 miR-23a-5p, 根据荧光素酶值判断两者是否结合。

结果: 组织病理切片结果显示, PQ 组出现纤维化表现: 肺间质水肿, 炎性浸润, 胶原蛋白增加; qPCR 结果显示染毒组 miR-23a-5p、E-cadherin 基因转录水平显著降低, α -SMA、IL22BP 转录水平升高; 这些指标变化趋势与 WB 结果相同。体外细胞模型构建显示, 随着 PQ 浓度的增加 NLRP3、IL-18、IL-1 β 、caspase-1、 α -SMA、IL22BP 蛋白表达水平相对增高, E-cadherin 蛋白较未染毒组降低, 这些结果证明 PQ 中毒后存在细胞焦亡和肺上皮间质转化, 并随着 PQ 浓度的升高趋势逐渐加重。转染 miR-23a-5p 过表达片段后, WB 结果显示 IL22BP、NLRP3 表达降低, 细胞 E-cadherin 表达较未转染组相对升高, 但表达量依然低于未加 PQ 的对照组, α -SMA 表达水平低于未转染组, 高于对照组; NLRP3、IL-18、IL-1 β 、caspase-1 蛋白质表达水平下降, EMT、焦亡趋势减轻; 转染 miR-23a-5p 抑制片段后, IL22BP、NLRP3 蛋白质表达水平升高, E-cadherin 降低, α -SMA 升高; 焦亡相关指标 NLRP3、IL-18、IL-1 β 、caspase-1 蛋白质表达水平升高, EMT、焦亡趋势加重。双荧光素酶实验结果显示 IL22BP 野生型双荧光素的表达较突变组明显降低, 表明 IL22BP 与 miR-23a-5p 之间存在结合位点。

结论: 本研究结果证实 IL22BP 和 NLRP3 炎性小体参与百草枯中毒所致的肺上皮间质转化和细胞焦亡, 并受 miR-23a-5p 调节。

关键词: 百草枯; 细胞焦亡; miR-23a-5p; IL22BP; EMT; NLRP3。

Abstract

Background: Paraquat (PQ), a potent bipyridine herbicide, is widely used in developing countries because of its low price. Thousands of people die of PQ poisoning every year. The main organs of accumulation after PQ poisoning are the lungs and kidneys, which lead to irreversible acute progressive pulmonary fibrosis and acute renal failure, which are common causes of death in patients. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) transition and excessive inflammatory response are important links in the development of pulmonary fibrosis caused by PQ poisoning. The transformation of cells from epithelial to mesenchymal morphology during this process is called EMT, and associated markers include epithelia cadherin (E-cadherin) and α -smooth muscle actin (α -SMA)), which endow cells with the ability to migrate and invade. In addition, PQ-induced pulmonary fibrosis is also accompanied by excessive inflammatory response, leading to apoptosis, necrosis and pyroptosis; the inflammasome is a major player in the immune response in vivo. When the NLRP3 inflammasome is activated by external stimuli, it leads to the activation of cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme, which leads to the activation and release of some cytokines such as IL-18 and IL-1 β .

Differentially expressed genes in PQ-induced pulmonary fibrosis were analyzed by previous transcriptome high-throughput sequencing studies, and potential binding sites between genes were predicted. A total of 85 mRNAs and 597 miRNAs were found to be differentially expressed in genes related to immune pathways, among which interleukin 22 receptor subunit alpha 2 (IL22ra2/IL22BP) had a higher up-regulated expression fold. IL22BP is a member of the class II cytokine receptor family and is highly expressed in the plasma of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension [1]. As a newly discovered microRNA in recent years, miR-23a-5p is up-regulated in liver fibrosis, but its mechanism of action in paraquat poisoning has not been reported yet. NLRP3-mediated pyroptosis mediates the occurrence and development of various diseases, such as nerve cell damage and acute kidney injury. The miRWalk website predicts the binding sites of IL22BP and NLRP3 of miR-23a-5p. By controlling the expression and inhibition of miR-

23a-5p, we explore the regulatory effect of miR-23a-5p on IL22BP and NLRP3 and its effect on paraquat-induced lung fibrosis. influence of the process.

Objective: To reveal the regulatory relationship of miRNA-mRNA in the process of pulmonary EMT and pyroptosis caused by PQ poisoning, and to explore potential therapeutic targets for irreversible pulmonary fibrosis caused by PQ poisoning.

Research methods: 1. A single intraperitoneal injection of 20 mg/Kg and 30 mg/Kg was administered to C57/BL6 mice to establish a model of pulmonary fibrosis caused by PQ poisoning. At the histopathophysiological level, we chose HE staining and Masson staining to observe lung sections. Whether the tissue is fibrotic and whether the model is successfully constructed. The tissue protein was extracted and the expression changes of E-cadherin, IL22BP and α -SMA were examined by Western-Blot to explore whether EMT changes occurred. 2. qRT-PCR was used to detect the expression of corresponding protein indexes and miR-23a-5p at the gene level. 3. To explore the optimal concentration of EMT induced by MLE-12 cell exposure with a certain range of PQ concentration gradient. After the cell model was constructed, the expression changes of IL22BP, NLRP3, E-cadherin, IL-18, α -SMA, IL-1 β , and caspase-1 in the exposure group were detected from the protein levels; qRT-PCR was used to detect the MLE Transcriptional changes of IL22BP, miR-23a-5p, E-cadherin and α -SMA in -12 exposure model. 4. The mimic and inhibitor of miR-23a-5p were transfected. After 72h of transfection, qRT-PCR and Western blot were used to test the E-cadherin, α -SMA and E-cadherin in the MLE-12 infection model after changing miR-23a-5p. Expression of IL22BP, NLRP3, IL-18, IL-1 β , caspase-1. 5. The dual luciferase experiment verified the combination of miR-23a-5p and IL22BP. After constructing IL22BP wild-type and mutant plasmid vectors containing luciferase, miR-23a-5p was co-transfected in cells and judged according to the luciferase value. whether the two are combined.

Results: The results of histopathological sections showed that the PQ group had fibrosis manifestations: pulmonary interstitial edema, inflammatory infiltration, and increased collagen; -The transcript levels of SMA and IL22BP increased; the trend of these indexes

was the same as that of WB. In vitro cell model construction showed that with the increase of PQ concentration, the expression levels of NLRP3, IL-18, IL-1 β , caspase-1, α -SMA, and IL22BP were relatively increased, and the E-cadherin protein was lower than that of the untreated group. These results It is proved that pyroptosis and pulmonary epithelial-mesenchymal transition exist after PQ poisoning, and the trend is gradually aggravated with the increase of PQ concentration. After transfection of miR-23a-5p overexpressed fragment, WB results showed that the expressions of IL22BP and NLRP3 were decreased, and the expression of E-cadherin in cells was relatively higher than that of the untransfected group, but the expression level was still lower than that of the control group without PQ. The expression level of SMA was lower than that of the untransfected group, but higher than that of the control group; the protein expression levels of NLRP3, IL-18, IL-1 β , and caspase-1 decreased, and the trend of EMT and pyroptosis was alleviated; after transfection of miR-23a-5p inhibitory fragment , IL22BP, NLRP3 protein expression levels increased, E-caderin decreased, α -SMA increased; pyroptosis-related indicators NLRP3, IL-18, IL-1 β , caspase-1 protein expression levels increased, EMT, pyroptosis trend aggravated . The results of dual-luciferase assay showed that the expression of IL22BP wild-type dual-luciferin was significantly lower than that of the mutant group, indicating that there was a binding site between IL22BP and miR-23a-5p.

Conclusion: The results of this study confirm that IL22BP and NLRP3 inflammasomes are involved in paraquat poisoning-induced pulmonary epithelial-mesenchymal transition and pyroptosis, and are regulated by miR-23a-5p.

Key words: paraquat; pyroptosis; miR-23a-5p; IL22BP; EMT; NLRP3.

英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
PQ	Paraquat	百草枯
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮-间质转化
3'UTR	3-untranslated region	3'端非翻译区
IL-18	Interleukin18	白介素 18
IL-1 β	Interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
α -SMA	α -smooth muscle actin	α -平滑肌肌动蛋白
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PMSF	phenylmethyl sulfonylfluoride	苯甲基磺酰氟化物
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
qRT-PCR	Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction	实时荧光定量多聚酶链反应
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸铵
ncRNA	non-protein-coding RNA	非编码 RNA
E-cadherin	Epithelia cadherin	E-钙粘附蛋白
SDS	sodium dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
MRE	miRNA response element	miRNA 应答元件
NLRP3	NOD-like receptor protein 3	核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3

目 录

摘 要	III
Abstract	VI
英文缩略语	VI
第一部分 miR-23a-5p 调控 IL22BP 对百草枯中毒所致上皮间质转化作用研究	
1 前言	1
2 材料和方法	4
2.1 主要试剂和仪器	4
2.1.1 实验动物	4
2.1.2 小鼠 MLE-12 上皮细胞培养	4
2.1.3 主要实验试剂	4
2.2 实验方法	7
2.2.1 实验动物分组及给药	7
2.2.2 实验动物一般状况的观察	7
2.2.3 细胞培养	7
2.2.4 PQ 染毒细胞给药浓度初步探索	8
2.2.5 标本收集、处理及保存	8
2.2.6 H&E 染色观察肺组织病理学特征	8
2.2.7 肺组织 IL22BP、E-cadin、 α -SMA、GADPH、miR-23a-5p 的 mRNA 检测	9
2.2.8 肺组织 IL22BP、E-cadin、 α -SMA 的蛋白检测	11
2.2.9 细胞划痕实验	13
2.2.10 Transwell 实验	13
2.2.11 双荧光素酶报告基因	13
2.2.12 干扰 RNA 的转染	14
2.2.14 统计学分析	14
3 实验结果	15
3.1 小鼠一般状况的观察结果	15

3.2 百草枯诱导小鼠肺组织肺纤维化表现.....	15
3.3 MLE-12 细胞 PQ 染毒细胞给药浓度初步探索.....	16
3.4 小鼠肺组织、MLE-12 细胞 IL22BP、E-cadin、 α -SMA mRNA 水平测定结果.....	16
3.5 小鼠肺组织、MLE-12 细胞 IL22BP、E-cadin、 α -SMA 蛋白水平测定结果.....	17
3.6 PQ 染毒后 MLE-12 细胞迁移能力增强.....	17
.....	18
3.7 miR-23a-5p 和 IL22BP 的结合预测.....	18
3.8 双荧光素酶实验报告验证 IL22BP 与 miR-23a-5p 的靶合关系.....	19
3.9 miR-23a-5p 在动物模型和细胞模型中表达下调.....	20
3.10 miR-23a-5p 通过 IL22BP 调节 MLE-12 上皮细胞中 EMT 的表达趋势.....	20
4 讨论.....	23
5 结论.....	25
第二部分 miR-23a-5p 对百草枯所致细胞焦亡中 NLRP3 炎性小体作用研究	
1 前言.....	26
2 材料与方法.....	28
2.1 主要试剂和仪器.....	28
2.1.1 主要试剂.....	28
2.1.2 主要实验仪器.....	28
2.2 实验方法.....	28
2.2.1 细胞培养.....	28
2.2.2 qRT-PCR.....	28
2.2.3 Western-blot.....	28
2.2.4 干扰 RNA 的转染.....	28
3 实验结果.....	29
3.1 NLRP3 炎症小体参与 PQ 诱导后 MLE-12 上皮细胞的细胞焦亡.....	29
3.2 miR-23a-5p -NLRP3 的结合预测.....	29
3.3 miR-23a-5p 通过 NLRP3 炎性小体调节 MLE-12 细胞焦亡水平.....	30
4 讨论.....	31
5 结论.....	33

本研究创新性的自我评价	34
参考文献	35
综述	37
参考文献	42

第一部分：miR-23a-5p 调控 IL22BP 对百草枯中毒所致上皮间质转化作用研究

1 前言

PQ，别名 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶，一种强毒性高效类除草剂。由于其价格低廉使用方便，在世界范围内广泛使用。同时 PQ 也是发展中国家常见的农药中毒致死种类之一。据统计，PQ 中毒致死率高达 90%^[2]。PQ 可通过胃肠道、皮肤、呼吸道吸收导致多器官受损，尤以肺损伤为主。中毒者可出现急性肺损伤、致死性肺出血、水肿，即使经过抢救，大多数患者也会发生不可逆的肺纤维化，最终因呼吸衰竭而死亡^[3]。

已有广泛的研究证实百草枯对肺损伤的机制主要有：EMT，过度的炎症刺激和氧化应激。EMT 涉及多种生理功能蛋白的变化和一系列信号分子的调控，其中最显著的标志是上皮细胞标志物，如上皮细胞黏附蛋白（E-cadherin）、细胞角蛋白（Cytokeratin）的表达显著下降，而间质细胞的标记物如 α -平滑肌肌动蛋白（ α -SMA）、I 型胶原（collagen I）等表达显著上升。

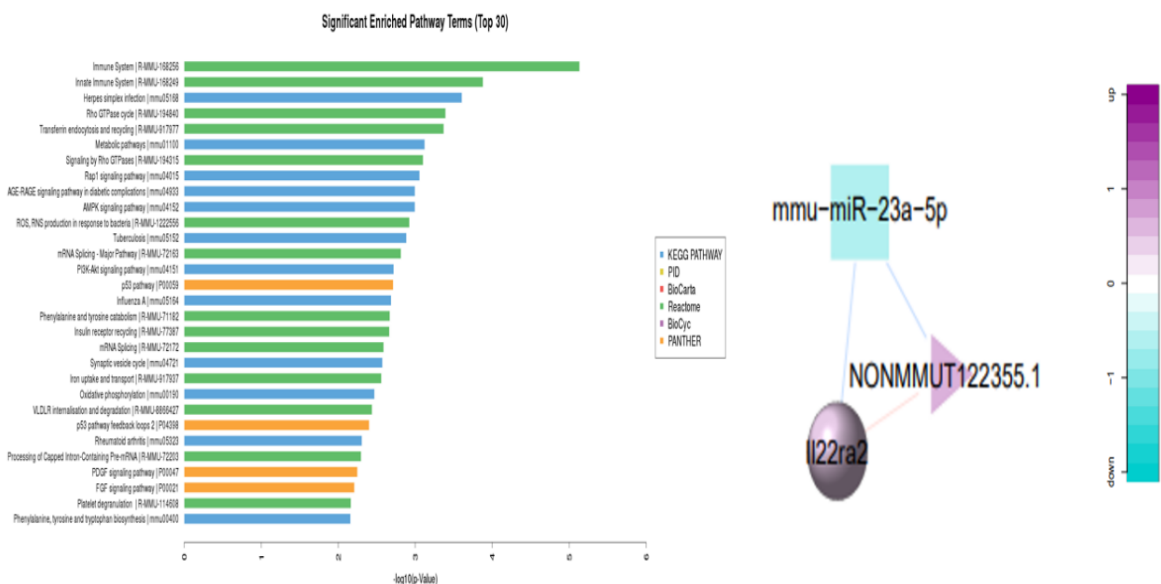


图 1.1 转录组测序分析显示免疫通路在百草枯中毒中改变最大，IL22BP 表达升高，miR-23a-5p 降低，IL22BP 与 miR-23a-5p 形成预测关系。

转录组学研究是众多实验技术中全面性最强的研究之一。即可以了解研究对象其基因转录的整体水平，同时还能揭示其转录调控的规律、揭示疾病中的生物学过程及涉及的分子机制，因而在多个研究领域得到广泛应用。构建小鼠百草枯中毒模型，转录组测序分析差异性表达基因。全转录组 KEGG 分析显示，百草枯中毒后影响较大的前 30 种通路中免疫系统的通路改变占第 1 位（如图 1.1 所示），有关免疫通路差异性表达 mRNA 85 个，其中上调 34 个，下调 51 个；上调基因中差异性表达最高的 5 种分别是 *fbx15*、*H2-Q1*、*Adcy3*、*Il22ra2* 和 *cdkn1a*。

IL22BP（interleukin 22 receptor subunit alpha2, *Il22ra2/IL22BP*）一种可溶性的 IL-22 受体，在多器官组织中表达，缺乏跨膜区和胞内区，与 IL-22 的亲合力是 IL-22R1 的 20-1000 倍^[4]。最近的研究表明，IL22BP 是银屑病和过敏性接触性皮炎炎症发生进展中的重要调节因子，皮肤组织中高表达的 IL22BP 与银屑病的炎症严重程度密切相关^[5]。临床的一项回顾性调查研究显示，特发性肺动脉高压患者血清 IL22BP 表达高于正常组，这预示着 IL22BP 表达含量的高低可能是调控缺氧性肺动脉高压中肺血管顺应性降低的一种新的调节机制^[1]。

非编码 RNA 种类众多，比如 rRNA, tRNA, circRNA、snRNA 以及 microRNA。非编码基因曾一度被称为是“无用之物”。虽然不能翻译成蛋白质，但它们可以通过调节调控和它们相临近的 mRNA 的转录以及翻译，从而与靶 mRNA 结合而在基因沉默和翻译中发挥重要作用。

整个物种的所有真核的细胞中都含有 miRNA。近年来，miRNA 的调节机制因其在生物学过程中的作用以及在包括视网膜病变、神经退行性改变、糖尿病肾损伤和癌症在内的多范围多领域的疾病中的进展作用而得到广泛研究。miRNA 调控过程呈现专一性低、特异性高的特点，如 miRNA 可靶向多个基因，而一个基因可同时受多个 miRNA 调控。miRNA 主要在转录水平发挥调控作用，通过切割 mRNA 或抑制翻译表达，来下调其目的的表达水平。

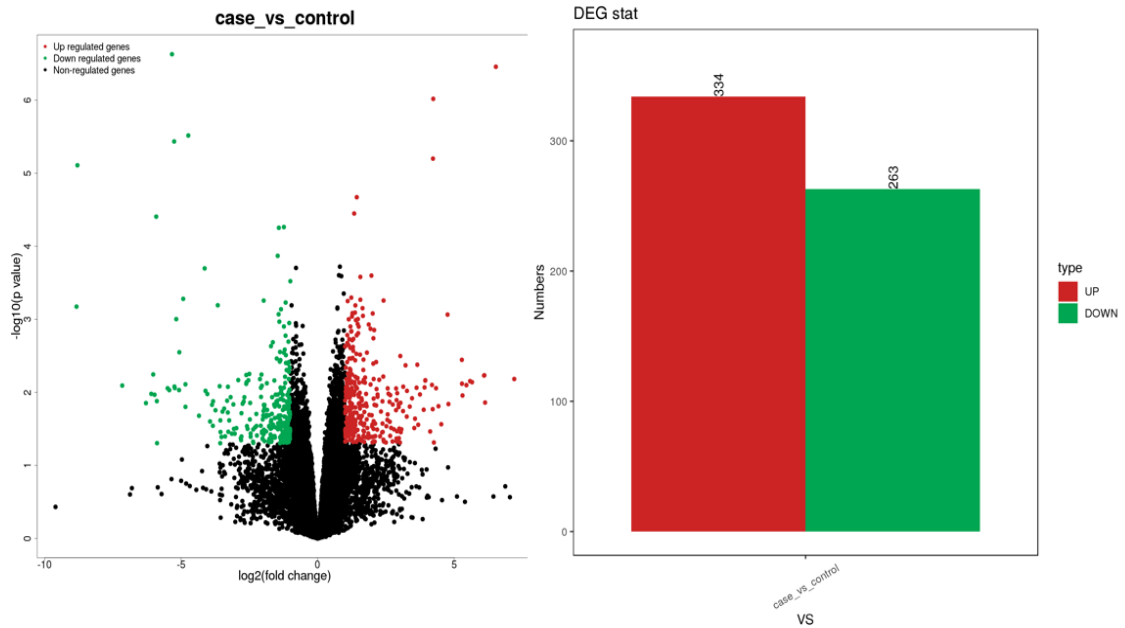


图 1.2 高通量测序结果显示 miRNA 在 PQ 组差异性表达

高通量测序分析 PQ 诱导后的小鼠肺纤维化组织差异性表达基因，非编码 RNA 基因中 334 个基因上调，263 个基因下调（如图 1.2 所示）。其中 miR-23a-5p 表达下调，与上调的 IL22BP 形成靶基因关系对（图 1.1 所示）。但尚未见 miR-23a-5p 在 PQ 中毒中的报道。

本研究通过构建 PQ 中毒的动物和细胞模型，体内体外实验研究探讨 IL22BP、miR-23a-5p 在百草枯中毒致肺上皮间质转化中的作用；高通量测序分析 miR-23a-5p 能够靶合 IL22BP，因此我们通过生信网站预测其结合位点，敲减和过表达 miRNA 来验证 miR-23a-5p 对 IL22BP 的调节机制。

2 材料和方法

2.1 主要试剂和仪器

2.1.1 实验动物

实验小鼠选择 SPF 级的, 6-8 周, C57/BL6, 每次根据实验分组需要耗用 24 只, 从北京华阜康生物购入。实验已获得中国医科大学附属盛京医院伦理委员会批准 (批准号 2017PS243K)。所有动物试验操作均符合 ARRIVE 准则、美国国立卫生研究院实验动物的护理和使用准则 (NIH 出版物 8023 号, 1978 年修订)。

2.1.2 小鼠 MLE-12 上皮细胞培养

表 2.1.2 MLE-12 细胞

MLE-12 上皮细胞	上海冠导生物工程
培养条件	37℃, 95%O ₂ , 5%CO ₂ 。
培养液	DMEM/F12 细胞培养基 (10%胎牛血清、1%双抗 (10000 U / mL 链霉素, 100U/L g / mL 青霉素))

2.1.3 主要实验试剂

表 2.1.3 主要实验试剂

DMEM/F12 细胞培养基	Hyclone
胎牛血清(FBS)	Hyclone
青霉素链霉素溶液	Hyclone
胰蛋白酶	Hyclone
二氯百草枯	sigma

抗 E-cadherin 抗体	Abcam
抗 α -SMA 抗体	Abcam
抗 Il22ra2 抗体	Abcam
HE 染色试剂盒	索莱宝
Masson 三色染色液	索莱宝
RIPA 裂解液	碧云天
BCA 蛋白定量试剂盒	康为
5×蛋白上样缓冲液	达科为
Acrylamide Kit (12%)	BIO-RAD
TEMED	生工
APS	sigma
彩虹 180 Marker	索莱宝
PVDF(0.45 μ m)膜	默克密理博
Tween-20	生工
超敏型 ECL 化学发光液	博奥龙
脱脂奶粉	OXOID
RNAiso plus	TAKARA
反转录试剂盒	TAKARA
qRT-PCR 引物	生工
抗 β -actin 抗体	Abcam

0.1%结晶紫染色液	优唯生物
4%组织细胞固定液	索莱宝
Triton X-100	索莱宝
DAPI 溶液	汇佰
抗荧光衰减封片剂	优唯生物
免疫荧光二抗	Abbkine
miR-23a-5p	广州锐博
U6 引物	广州锐博
siRNA-MateTM 转染试剂	金传
pSI-Check2-IL22ra2-WT 双荧光报告载体	上海生工生物
pSI-Check2-IL22ra2-MUT 双荧光报告载体	上海生工生物
Dual-Luciferase 基因报告检测系统试剂盒	上海生工

2.1.4 主要实验仪器

表 2.1.4 主要仪器

解剖器械	产商
石蜡包埋机	Leica
HE 自动染色机	Leica
移液器	RAININ
37°C 恒温孵育箱	Leica
超声破碎仪	SONICS
石蜡切片机	Leica
高速冷冻离心机	SONICS

高速离心机	Leica
漩涡混合器	Leica
Roche480PCR 仪	Leica
超净工作台	Thermo
电泳仪	中慧天诚
湿转印仪	中慧天诚
显微镜	Nikon
显微拍照系统	Nikon
摇床	Kylin-bell lab instruments,
磁力搅拌器	上海跃进
酶标仪	BioTek
化学发光仪	GE

2.2 实验方法

2.2.1 动物分组及给药剂量、方式

设置三个动物组，分别为正常对照组（CON 组）、PQ 组 20mg/Kg 组(PQ20)、30mg/Kg 组（PQ30），分别在统一屏障环境下饲养。称取一定量体积的 PQ 粉末于 EP 管中，向管中加入生理盐水充分震荡混匀成 5mg/mL 的高浓度浓缩液。稀释浓缩液后，一次性注射器于腹腔内注射，PQ 组注射 20mg/Kg、30mg/Kg（稀释至 1ml）剂量的百草枯、CON 组小鼠腹腔注射给予等体积生理盐水。屏障环境下给予常规饲养。三周后采用异氟烷麻醉小鼠，收集肺泡灌洗液后；安乐处死小鼠（用 CO₂），并取肺组织标本。

2.2.2 观察实验动物的生理状况

PQ 给药前后，分别观察每组小鼠的活动状态变化，进食量、大便量是否改变，是否出现喘息等呼吸窘迫状态，是否死亡等情况。

2.2.3 细胞培养

(1)MLE-12 细胞培养环境：同 2.1.2 描述。

(2)换液: 48h 后待细胞稳定一定时间, 显微镜下观察细胞状态; 细胞形态是否依然呈椭圆形, 培养皿内细胞生长速度, 是否长满整个皿 60%-70%, 培养液是否颜色改变, 有絮状沉积物等。没有以上变化, 正常换液即可。弃去原培养基, PBS 洗皿, 且记动作要轻柔, 以免将细胞吹落。加入新的培养液于培养箱中继续培养。

(3)传代: 培养细胞 2-3 天后, 待细胞覆盖 70%以上的皿底。弃去原培养液, 根据细胞量加入胰酶, 一般是 500 μL -800 μL 。培养箱 3min 后, 10 \times 20 倍镜下观察细胞形态是否变小, 变亮来判断细胞消化程度。加入培养液(含血清) 1ml 终止消化, 将脱落的细胞转移至 EP 管中。1000rpm、离心 5min。等体积分配细胞悬液至六孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。

(4)冻存: 当细胞长满整个皿底 70%时, 先做消化处理。消化所得的沉淀即为要冻存得细胞。1ml 冻存液(配置比例 20% FBS、10% DMSO、70% DMEM/F12 培养基)重悬细胞于冻存管中。渐进性降温冷冻: -80 $^{\circ}\text{C}$ 、程序降温盒 24h, 液氮罐。

(5)复苏: 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅加热融化冻存细胞。离心, 弃上清。一般将复苏的细胞于小皿内, 有利细胞生长。皿内加适量的培养液, 置入重悬的细胞液混匀培养皿后放至培养箱中培养。

2.2.4 PQ 染毒细胞给药浓度初步探索

(1)首先在六孔板内铺满至少 70%的细胞, 以方便后续实验。

(2)EP 管称取一定体积的 PQ 粉末, 加入无血清的培养液。振荡混匀。EP 管喷洒足量酒精拿进超净台, 用无菌一次性滤头过滤。将刚刚配置好的 PQ 液体稀释至 1200 $\mu\text{mol/L}$, 避光保存。

(3)稀释配存液我们选择不含血清的 DMEM/F12 培养基, 稀释的终浓度分别为 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 。

(4)隔天在显微镜下观察皿内细胞生长状态, 是否有大量漂浮细胞, 细胞是否呈梭形, 并进行拍照记录。

2.2.5 标本收集、处理及保存

构建模型 21 天后处理小鼠。麻醉药选择戊巴比妥钠, 手术台麻醉小鼠后; 将右侧支气管结扎, 生理盐水冲洗肺泡收集灌洗液。二氧化碳安乐处死小鼠, 解剖并取下双侧肺叶组织收集于 EP 管中, 冻存-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内以便后续实验。

2.2.6 H&E 染色观察肺组织病理生理学改变

4%多聚甲醛浸润固定肺组织 12h 后，将组织块切割至 5mm 厚度的小样，经过高浓度梯度脱水以及浸蜡后，将肺组织用加热融化后的石蜡包埋，并将组织包块切割成 3.5 μ m 厚。二甲苯脱蜡、水合切片；苏木素孵育 3min 后 PBS 洗涤至少 3 次；伊红室温下染色 1min。高浓度乙醇脱水切片 20min，二甲苯中敷育 2min；洗涤；中性树胶封片。

2.2.7 肺组织 IL22BP、E-caderin、SMA、GADPH、miR-23a-5p 的 mRNA 检测

(一) 肺组织以及细胞 RNA 的提取

(1) 取肺组织 15mg 并用研磨器充分磨碎后，加入 RNA 裂解液 TRIOZOL1ml，置于冰上充分混匀 5min。细胞：培养皿弃去原培养液，加入 1ml TRIOZOL，吹打脱落细胞，收集细胞悬液于不含 RNA 酶的 EP 管中，离心收集上清。

(2) 加氯仿：根据试剂说明书一般是加 1/5 体积，高强度的震荡混匀，静置 15min。

(3) 低温 4 $^{\circ}$ C、高速 14000g，（速度由于过高，离心机机会发生震动的声音，为正常现象），离心 15min。

(4) 转移上清到新的 1.5ml 无 RNA 酶的 EP 管中，切记不能过分吸上清，以免把分离出来的有机物带到 EP 管中，影响后续实验。加入等体积异丙醇震荡，用枪头吹打即可，室温静置 10min。

(5) 4 $^{\circ}$ C、12000g、10min；离心得到的沉淀为 RNA。

(6) 洗涤沉淀：75%乙醇，1ml，涡旋震荡；4 $^{\circ}$ C，12000g，5min。

(7) 风干沉淀，一般是利用超净台的风将其吹干。30 μ l DEPC 水溶解沉淀。

(8) NanoDrop 2000 仪测量样品浓度。

(二) 去基因组 DNA 反应

(1) 在超净台冰盒中按照说明进行以下操作。

表 2.2.7 去 DNA 步骤

5 \times gDNA Eraser Buffer	1.0ul
gDNA Eraser	2.0ul
Total RNA	※ul
RNase Free dH ₂ O	up to 10 ul
*Total RNA 体积=1 μ g/总 RNA 浓度	

(2) PCR 仪运行一下程序：42 $^{\circ}$ C，2min；4 $^{\circ}$ C，1sec。

(三) 反转录反应

(1) 第一步完成后, 继续进行第二步操作:

表 2.2.7.1 反转录配置

上一步骤的反应液	10.0ul
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0ul
RT Primer Mix	1.0ul
5×PrimeScript Buffer 2(for Real Time)	4.0ul
RNase Free dH ₂ O	4.0ul
Total	20.0ul

(2)每次加样完要充分震荡混匀, 然后离心机瞬离, PCR 仪进行反应:

表 2.7.2.2 反应体系设置

37°C	15min
85°C	5sec

4°C 低温冷却。-20°C 保存 cDNA 产物于 PCR 定量检测。

以上是 mRNA 的反转录体系, miRNA 的反转录体系如下:

Reagent	10 ul 体系	终浓度
RNA Template(1ug)	x ul	
Bulge-Loop™ miRNA RT Primer(5uM)	1ul	500nM
5X Reverse Transcription Buffer	2ul	1X
RTase Mix	2ul	
RNase-free H ₂ O	至 10ul	

混匀离心; 反应程序设置为: 42°C 60min, 70°C 10min。

(四) Real Time PCR 检测 IL22BP、E-cadin、 α -SMA、 β -actin、miR-23a-5p

(1) 按以下说明在冰上配制 PCR 反应液:

表 2.7.2.3 qRT-PCR 配备

2× ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10.0ul
Primer1 (10uM)	0.4ul
Primer2 (10uM)	0.4ul
Template DNA/cDNA	X ul

	(cDNA 至少是 500ng)
ddH ₂ O	To 20 ul

(2) 进行 Real Time PCR 反应。根据样品数量的多少可以选择 96 孔板或者八连管，根据引物特性罗氏 480PCR 仪中设置相应程序。

相关基因引物序列：

表 2.7.2.4 qRT-PCR 引物序列

基因名称	Forward primer	Reverse primer
Mus-GAPDH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	CAACAATCTCCACTTTGCCACTG
Mus-E-cadherin	CAGTTCCGAGGTCTACACCTT	TGAATCGGGAGTCTTCCGAAAA
Mus- α -SMA	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG	TCTATCGGATACTTCAGCGTCA
Mus-IL22BP	TGTCTAGAGCAACAGAAATACAAC	CTCAGAGCGCCGCTGGAATGTGCACACATC

2.2.8 蛋白检测和提取

(一)提蛋白、Western-blot

(1)总蛋白提取

动物蛋白提取：取适量肺组织，用眼科剪剪成碎片后，置于蛋白提取柱中，用研磨器研磨 3-5min 后加入 RIPA 裂解液含有 PMSF300，高速离心机，12000g，离心 5min，所得液体即为蛋白液。

细胞蛋白的提取：选择细胞刮板提取。弃去原液，加 1ml 的 PBS，用力刮取，尽量刮取多的细胞。PBS 刮取至少三次，收集悬液至 EP 管中，7500g 离心 5min，所得沉淀为细胞，向沉淀中加入 200 ul 的 RIPA 裂解液（含有 PMSF），冰箱 4℃裂解 30min 后；4℃、12000g、12min，所得上清即为蛋白提取液。

(2)样品浓度测定

上述所得组织蛋白提取液，按照 BCA 试剂盒所述方法测取样品浓度。

(3)样品变性

按上述测得浓度，分别取相应体积的蛋白液于 PCR 管中，加入 1/4 体积的 5×

蛋白缓冲液，PCR 仪 99°C，5min 变性。

(二) Western-blot

(1) 玻璃板洗涤

自来水流下冲洗玻璃板且记不能用刷子洗刷玻璃板，以免留下划痕；并用吹风机吹干。

(2) 配胶与制胶

a) 对齐玻璃板后垂直卡在制胶器中，保证玻璃板底面与桌面平行。

b) 按照说明书 Bio-Rad's TGX™ 配置浓缩胶，将浓缩胶加上后立即加分离胶，时间过长再配容易形成上下分层。将梳齿插进未凝固的上层胶中，并于室温下凝固 30min。

(3) SDS-PAGE 电泳

30min 后上层胶凝固，将两块胶板置于制胶器中，加入电泳液。轻慢小心拔出梳子，用精密加量针向梳孔加入变性好的等量蛋白液。电泳槽盖上电机盖，250V，30min，电泳。

(4) 转膜

a) 根据指示蛋白条带宽度，采取 PVDF 膜，并用甲醇活化 10min。取下玻璃板，在水流下，起开两块玻璃板。在下层板中切胶，将 marker 旁边没有上样的浓缩胶弃去，剩余胶置于滤纸上，根据指示蛋白分子量，铺相应条带，并用滤纸覆盖条带，且记不能有气泡产生。

b) 在电转液中打开转膜夹，提前将海绵垫、滤纸浸湿；夹内两面分别放置一层海绵垫，放胶的一面提前铺上两层滤纸，用 50ml 离心管赶走其中滤泡。另一面待胶放置后，再依次放滤纸，轻柔缓慢放不能产生气泡，否则蛋白不能转到 PVDF 膜。

c) 将转膜好的夹子置于电极槽中，槽中放置冰块，区分正负极，0.3A，90min 转膜。

(5) 免疫反应

a) 成功转印的膜 TBST 洗涤 1min；放入 5% 的脱脂牛奶室温摇床敷育 90min。

b) 倒掉牛奶，将条带放到 TBST 中洗涤 3min，至少 3 次。吸干敷育孔内多余的水分，加入一抗溶液（TBST 稀释，比例 1：1000）。每个敷育孔至少 4ml 液体，保证蛋白面都能接触到抗体。4°C 冰箱摇床过夜。

c) 一抗如果未使用超过 3 次，则回收一抗溶液；条带在 TBST 摇床上洗涤 3 次，10min/次。加入二抗，依然用 TBST 稀释，比例 1：5000。室温摇床孵育条带 90min

后，示二抗使用次数决定是否回收二抗，TBST 洗涤 2-3 次，10min/次。

(6)化学发光曝光条带：

a)按照 1: 1 配置化学发光液，并于锡纸避光保存。

b)取出 PVDF 膜，动作小心，蛋白面不能碰到手或其他物品以免污染。滴取至少 200 μ L 发光液于 PVDF 蛋白面上，在发光仪器特定程序下曝光。

(7)条带数据分析

ImageJ 8.0 软件分析各个条带的光密度值。

2.2.9 细胞划痕实验

(1)用黑色 marker 笔在 6 孔板背面画平行的直线后(每条间距 0.5cm)，向每个孔内内均等接种适宜细胞。

(2)皿内细胞长至 70%-80%时，用 10 μ L 枪头垂直画直线。为使划线的宽度一样，每画完一条线换一次枪头；然后再用 PBS 溶液轻柔缓慢冲洗培养皿三次，洗净细胞碎片。

(3)向划完线条的孔种加入含血清的 DMEM/F12 培养液继续培养 48h，选取三个固定视野，分别在 0h 和 48h 在固定视野内拍照。

2.2.10 Transwell 实验

(1)根据细胞生长速度以及实验所需细胞量选择不同培养皿接种细胞。我们选择六孔板接种细胞，待每孔内细胞长至 80%；分别用不同浓度的 PQ、不含血清的培养液作为 CON 组，诱导细胞 48h，消化，离心，数细胞。

(2)小室内接种 1×10^5 个细胞。

(3)小室外加入含有高浓度(20%)血清的培养液 500 μ L 后，继续放到培养箱培养 48h。

(4)吸净小室内的培养液，加入固定液，本实验中用的是 4%浓度，500 μ L，静置凝固 20min；PBS 洗涤。

(5)小室内加入 0.1%结晶紫染色液 500 μ L, 20min,PBS 洗涤至少两次。

(6)医用棉签轻柔擦掉小室内膜细胞，注意不要用力过猛，以免将小室捅穿。擦净后的小室放于载玻片上于镜下观察拍照。

2.2.11 双荧光素酶报告基因

(1)细胞转染：

1)接种细胞于 12 孔板中，保证每孔板的接种细胞数量大致相等；

2)按照测得的质粒浓度，配置转染所用的质粒液，用不含血清的 DMEM/F12 稀释。根据转染用量，配置相应浓度的 miRNA NC/mimics 稀释液，相同培养液稀释后；

与稀释好的质粒充分震荡混匀，室温静置；标记为 A。按照说明书所需转染试剂的量，DMEM/F12 稀释转染液，标为 B，室温静置。

3) A、B 吹打混匀；静置 20min。

4)已接种好的六孔板中加入转染试剂混合液；培养 12h 后，弃去转染液换液继续培养；显微镜下观察细胞₁并收集细胞。

(2)荧光素的检测：

1)蒸馏水稀释 PLB 至 1×，12 孔板中每孔加入 300μL，用枪头吹打混匀细胞，摇床敷育 15min；回收液体，4°C，12000rpm，10min；吸上清。

2)每孔继续加入含有 Luciferase Assay Reagent II (LAR II)的工作液 300μL。

3)上机前每孔再加入 50μL 细胞裂解液，混匀。根据仪器固定的程序去测量，得到的 Firefly luciferase 值即为内参值。

4)加入 300μL 并混匀 Stop & Glo® Reagent 的工作液，上机测得 Renilla luciferase 值即为目的基因的发光值。

2.2.12 转染 RNA

(1) 消化状态较好的细胞；均等接种到六孔板上，板内细胞量达到 70%左右。

(2) 根据 miRNA 说明书稀释 mimic、inhibitor、NC；制备转染混合液。

(3) 将含有转染试剂以及 miRNA 片段的培养液加入皿中；PQ 组加入相应体积的 PQ 液体；转染 72h 后，收集细胞。

2.2.13 统计学分析

Graphpad Prism 8.0 软件分析数据，用平均值 ± 标准误差(Mean ± SD)表示。单因素方差分析(ANOVA)方法表示每组之间的差异；P<0.05 被认为具有显著意义。本研究中所做的数据分析图 P<0.05 标为*，P<0.01 标为**，P<0.001 标为***。

3 实验结果

3.1 给毒后小鼠状态观察

未染毒的对照组（CON 组）小鼠精神状态较好，反应正常，无异常呼吸运动状态，正常饮食进水，大便正常；PQ 组在中毒后表现为异常呼吸如呼吸快慢不一、部分小鼠口鼻出血甚至喘息，精神状态出现兴奋的症状：四处跳动、转圈、痉挛。

3.2 PQ 组肺组织纤维化表现

百草枯染毒一周后取小鼠右肺组织做 Masson 和 HE 染色，肺组织病理生理学检查显示（如图 1.3），CON 组肺小叶完整，肺泡结构清晰，且无渗出物及炎症细胞浸润；PQ 组无清晰成形的肺泡，大部分肺泡腔塌陷，充满淡红色的渗出液，Masson 染色可见蓝色的胶原蛋白沉积；炎症细胞浸润。

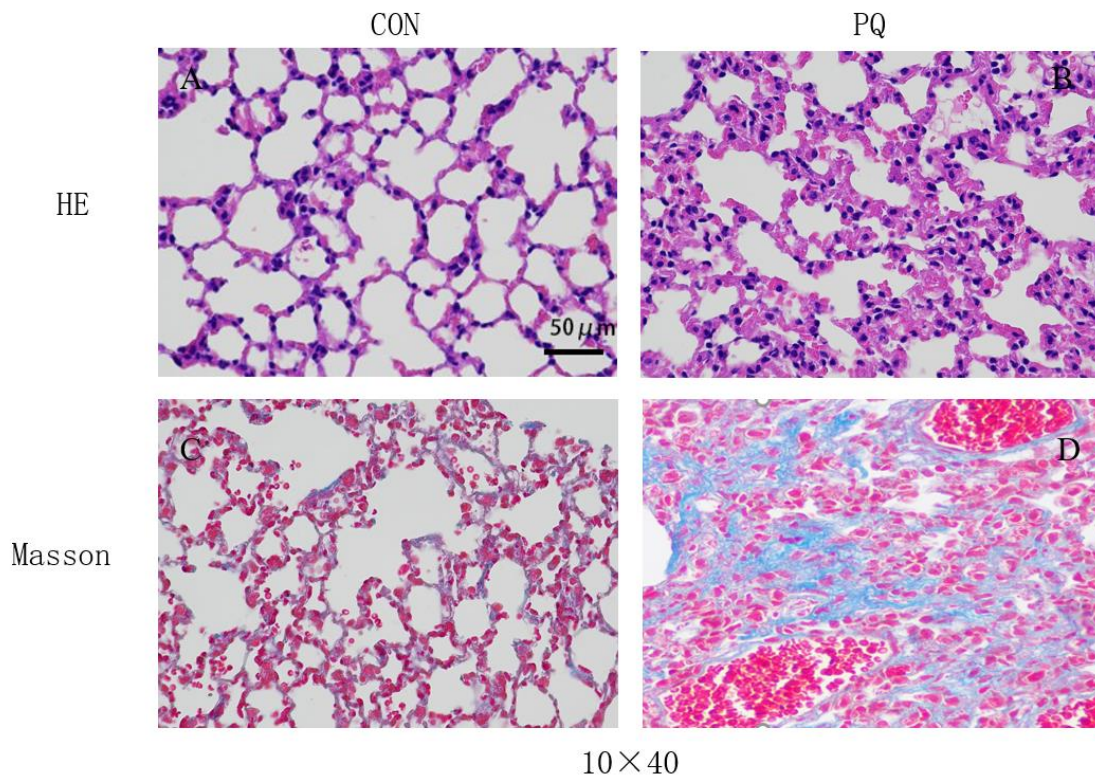


图 1.3 HE 染色和 Masson 染色结果，PQ 组选取的浓度组为 30mg/kg；A、B 为 HE 染色，C、D 为 Masson 染色，PQ 染毒后，B、D 图片显示肺泡结构紊乱，胶原纤维沉积，炎症细胞浸润。

3.3 MLE-12 细胞 PQ 染毒给药浓度初步探索

为便于构建百草枯 MLE-12 模型，我们选取一定梯度的 PQ 来探索细胞的存活量，以及在该浓度范围下细胞形态是否梭形化。实验结果如图所示（图 1.4），PQ 对 MLE-12 细胞活力的抑制作用呈现剂量依赖性；PQ 浓度越高，细胞的存活量越低。PQ 染毒 72h 后，PQ50 μ mol/L、100 μ mol/L、150 μ mol/L 浓度组的细胞有着一定的存活率，细胞形态从椭圆形转变为梭形，当浓度为 200 μ mol/L 时细胞基本死亡。

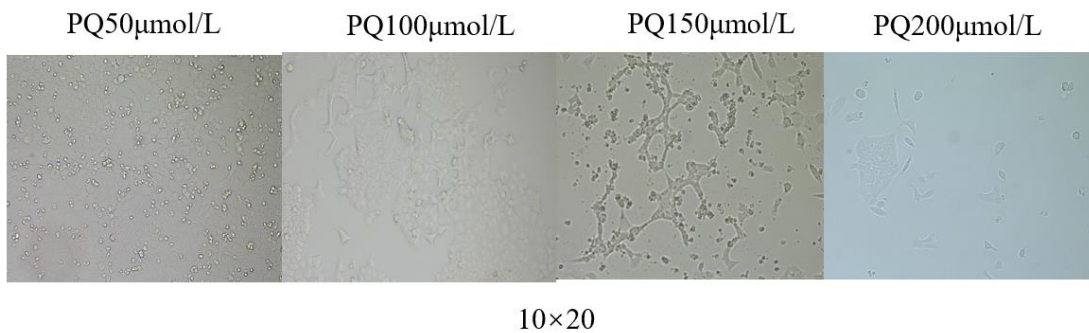


图 1.4 PQ 染毒 3 天后，MLE-12 细胞生长状态

3.4 小鼠肺组织、MLE-12 细胞 IL22BP、E-caderin、 α -SMA mRNA 水平测定结果

qRT-PCR 检测小鼠肺组织，MLE-12 细胞 EMT 表达标志物，（如图 1.5 所示），随着 PQ 诱导浓度的升高，E-cadin 表达量逐渐降低且 PQ 最高浓度组下降最明显， α -SMA 表达量逐渐升高，PQ 组 IL22BP 的表达明显高于 CON 组，并随着 PQ 浓度的升高，表达趋势增强。其中 PQ30、PQ150 组较 CON 组差异最显著（ $P < 0.05$ ）。

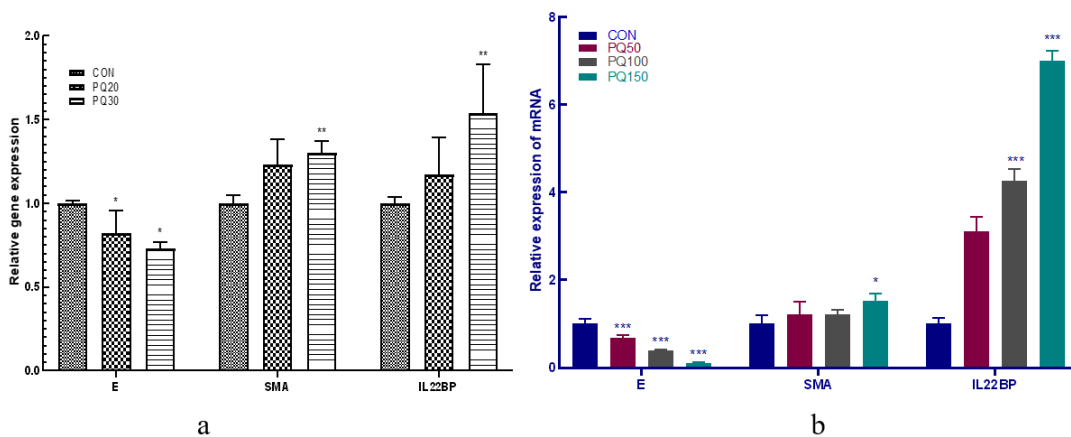


图 1.5 动物模型和细胞模型 IL22BP、E-cadherin、SMA 表达含量变化，a：PQ 诱导小鼠肺纤维化模型中 EMT 相关基因表达水平，PQ 组较 CON 组比较表达差异性；b：PQ 诱导的 MLE-12

细胞 EMT 模型中, E-cadherin、 α -SMA、IL22BP 表达量的变化; $P<0.05$, *; $P<0.01$, **;
 $P<0.001$, ***。

3.5 小鼠肺组织、MLE-12 细胞 IL22BP、E-cadherin、 α -SMA 蛋白水平测定结果

为探索 IL22BP 在 PQ 中毒中发挥何种作用, 采用 Western-blot 法检测各组小鼠肺组织及 MLE-12 细胞中 EMT 模型关键分子蛋白水平表达变化。与 CON 组相比, PQ 组 E-cadherin 降低, α -SMA 升高, 呈现 EMT 趋势, 差异具有显著性意义($P<0.05$); EMT 的蛋白表达水平与基因水平的表达变化趋势相一致; IL22BP 在体内和体外 PQ 诱导模型中较 CON 组, 表达均升高, 并随着 PQ 浓度升高表达趋势增强。如图 1.6 所示。

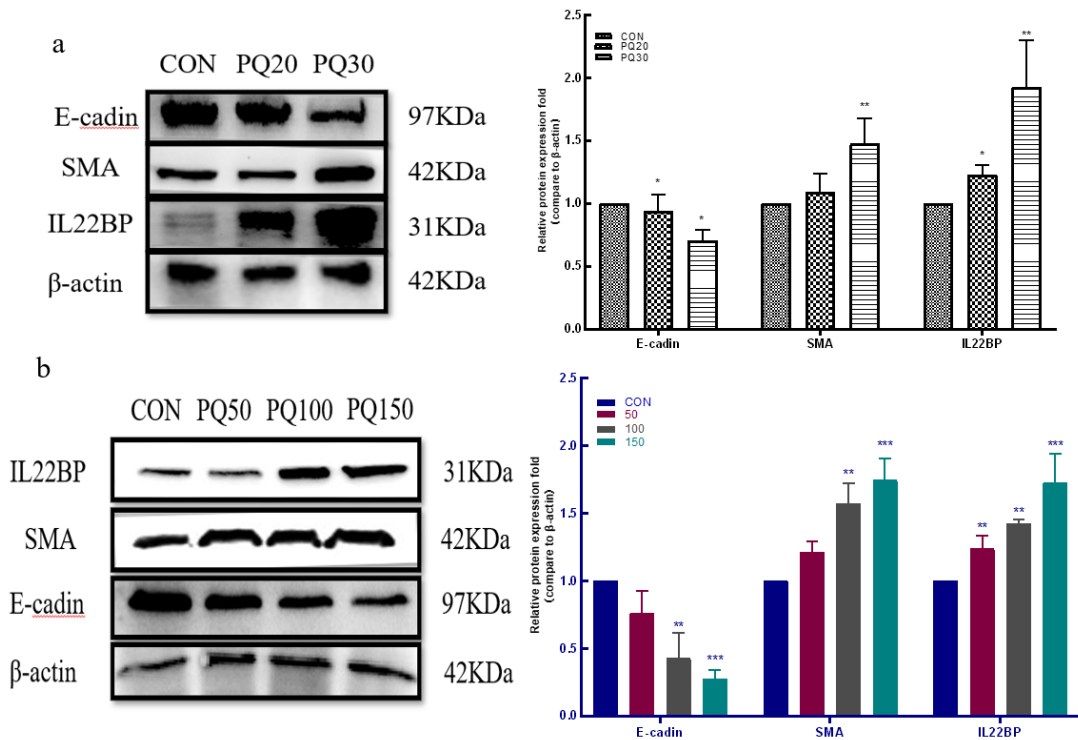


图 1.6 小鼠肺组织和 MLE-12 细胞 WB 数据图片, a 图为 PQ 诱导肺纤维化肺组织 WB 图片和数据分析; b 图是 MLE-12 细胞 PQ 模型 WB 图片和统计学分析: $P<0.05$, *; $P<0.01$, **;
 $P<0.001$, ***。

3.6 PQ 染毒 72h 后 MLE-12 细胞迁移能力增强

CON 组 PQ 组划取相等的面积，72h 后，划痕结果如图 1.7。PQ 组划痕面积缩小，且缩小范围远高于 CON 组， $P<0.05$ ；表明 PQ 组愈合能力、迁移能力高于对照组。Transwell 实验结果同样显示，含高浓度血清的培养液诱导 48h 后 PQ 组小室底面迁移细胞数明显高于 CON 组 ($P<0.05$)；实验结果的一致性，说明 PQ 诱导后细胞迁移能力增强。

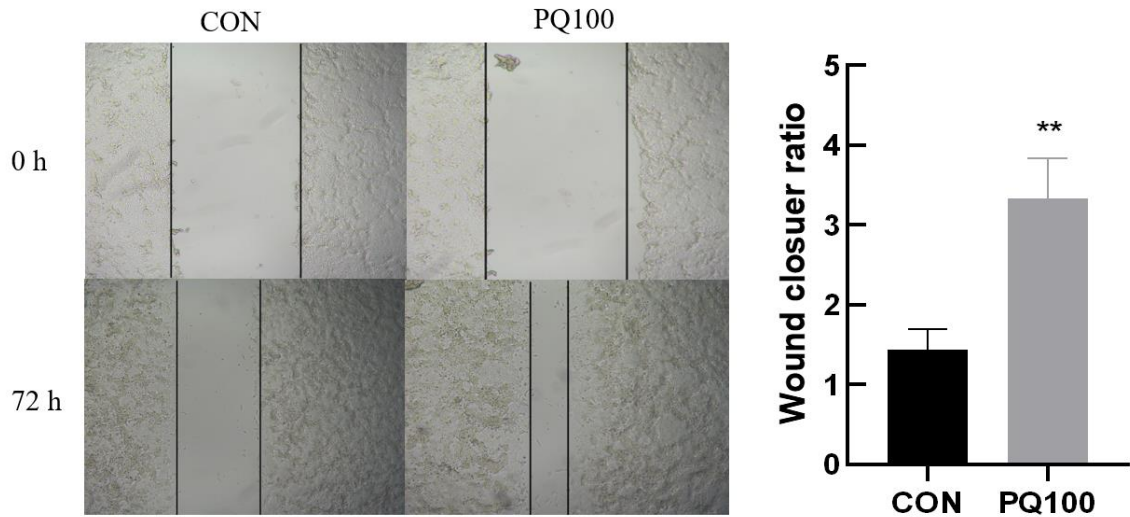


图 1.7 划痕实验结果如图所示，72h 后 PQ100 $\mu\text{mol/L}$ 组划痕面积缩小范围较 CON 组明显 ($P<0.01$, **).

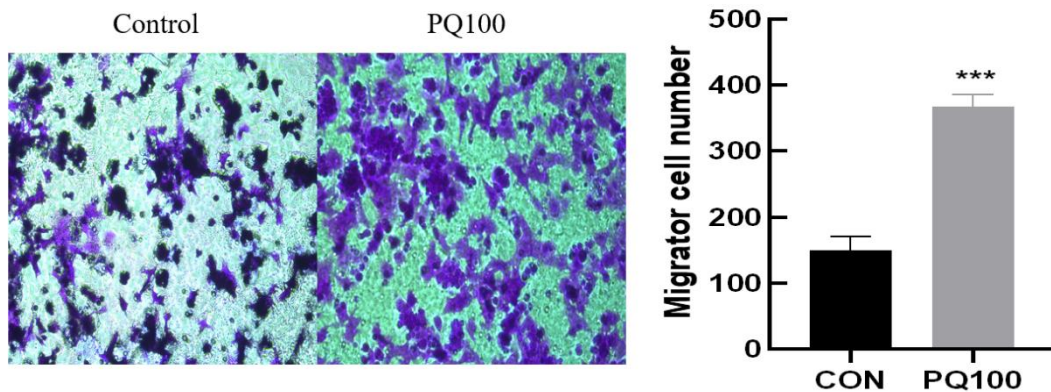


图 1.8 PQ 染毒组小室迁移细胞数目明显高于对照组，细胞染毒后，迁移能力增强 ($P<0.001$, ***).

3.7 miR-23a-5p 和 IL22BP 的结合预测

miRWalk 生信网站分别预测 miR-23a-5p 和 IL22BP 的结合, 预测结合 P 值分别为 0.85, P 值大于 0.5, 这为后续的实验提供了有力的证据 (如图 1.9 所示)。

<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/mouse/gene/216799/?page=24>

mmu-miR-22-5p	NM_178258	IL22ra2	details	0.92	CDS	214,252	0.46	-5.386	19	-	-	-
mmu-miR-22-3p	NM_178258	IL22ra2	details	0.85	CDS	139,156	0.52	-9.593	13	-	-	-
mmu-miR-23a-5p	NM_178258	IL22ra2	details	0.85	CDS	162,181	0.5	-8.938	15	-	-	-

图 1.9 miRWalk 网站预测 miR-23a-5p 与 IL22BP 的结合

3.8 双荧光素酶实验报告验证 IL22BP 与 miR-23a-5p 的靶合关系

构建 IL22BP WT 型和突变型质粒, 将含有目的片段的质粒, 转染细胞测定荧光值; miR-23a-5p 和 IL22BP 之间结合位点示意如图 (图 1.10); 野生型 IL22BP 质粒组 miR-23a-5p 能够显著降低 luciferase 的表达 ($P < 0.001$), 表明 miR-23a-5p 和 IL22BP 之间存在结合作用; 然而 IL22BP 突变后, 其 luciferase 的表达未见降低 ($P > 0.05$), 表明 miR-23a-5p 对 IL22BP 的结合具有特异性。

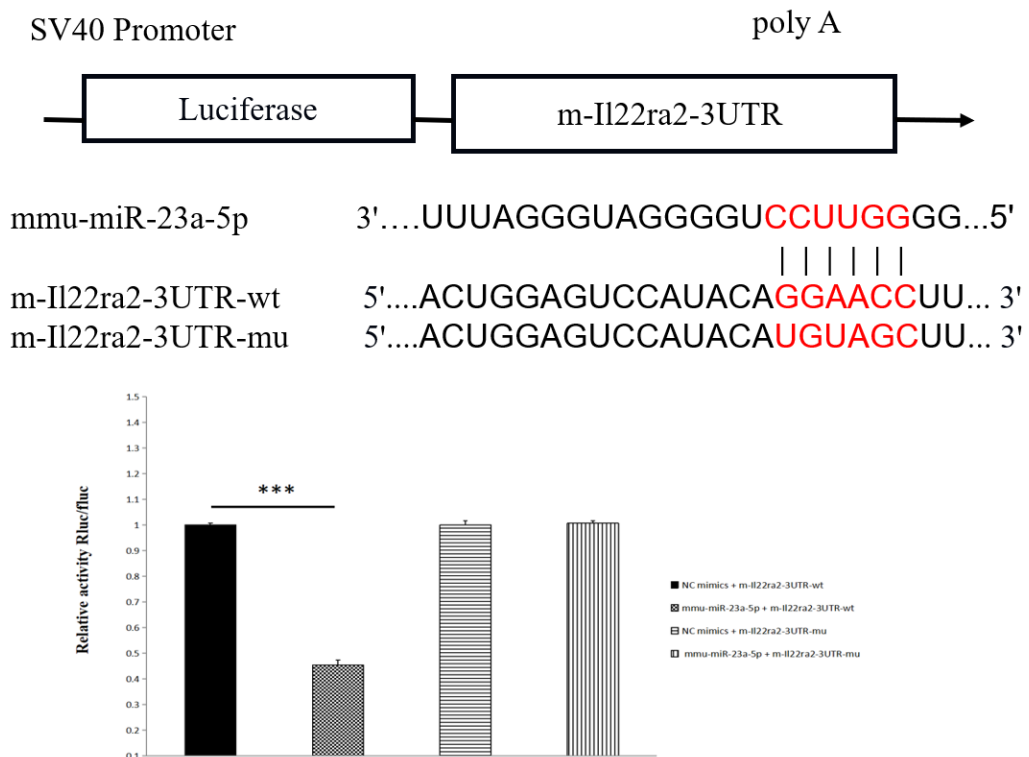
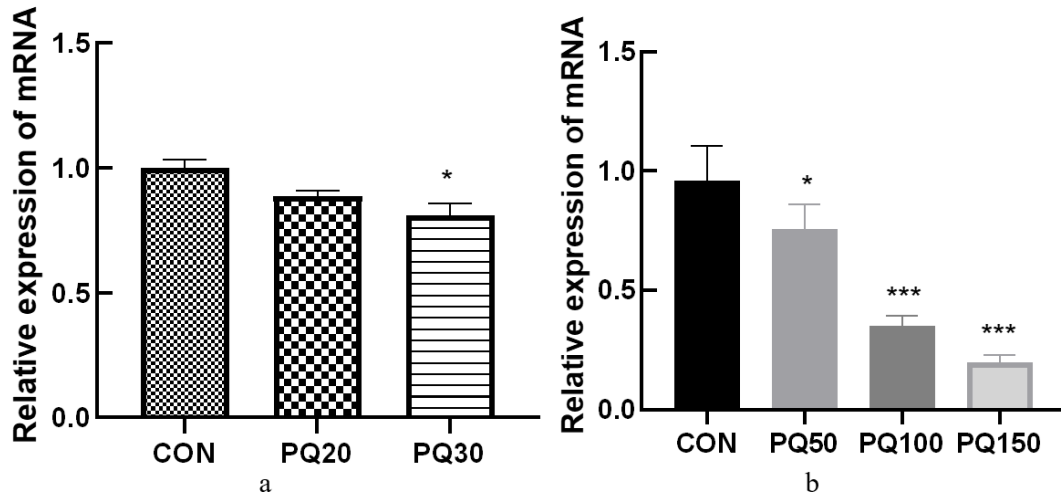


图 1.10 双荧光素酶实验报告显示构建突变质粒的片段和统计学分析结果

3.9 PQ 诱导的动物模型和细胞模型中 miR-23a-5p 表达下调

体内体外 PQ 模型显示, PQ 染毒后 miR-23a-5p 均表达下调。细胞模型中的下调幅度最大, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 其表达趋势变化和 IL22BP 在 PQ 染毒组中相反。

图 1.11 miR-23a-5p 在细胞和动物模型中表达降低, a: PQ 诱导的肺组织纤维化 miRNA 表达降



低, b: PQ 诱导的肺上皮细胞 EMT 中 miRNA 随着浓度增加表达逐渐降低 ($P < 0.05$, *, $P < 0.01$, **, $P < 0.001$, ***).

3.10 miR-23a-5p 通过 IL22BP 调节 MLE-12 上皮细胞中 EMT 的表达趋势

转染 miRNA 过表达片段后, WB 结果显示: IL22BP 表达降低。转染组的 E-cadherin 的表达与未转染组差别不大, 差异没有显著性 ($P > 0.05$); α -SMA 较 PQ100 组表达降低, 但高于 CON 组 ($P < 0.05$); qPCR 结果显示各个指标变化与 WB 结果相一致, 即转染 miR-23a-5p 后, EMT 趋势较百草枯组减轻 (如图 1.12 所示); 转染 miR-23a-5p 抑制片段后: 转染组 IL22BP 表达水平明显升高, E-cadherin 表达显著降低, α -SMA 升高; qPCR 验证这些基因的变化趋势与 WB 一致。即转染 miR-23a-5p 抑制片段后能够显著增高 IL22BP 在 PQ 诱导的肺 EMT 中的表达, 并加重 EMT 的趋势; 以上两部分的实验结果显示, miR-23a-5p 能和 IL22BP 组成靶基因对, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (如图 1.13 所示)。

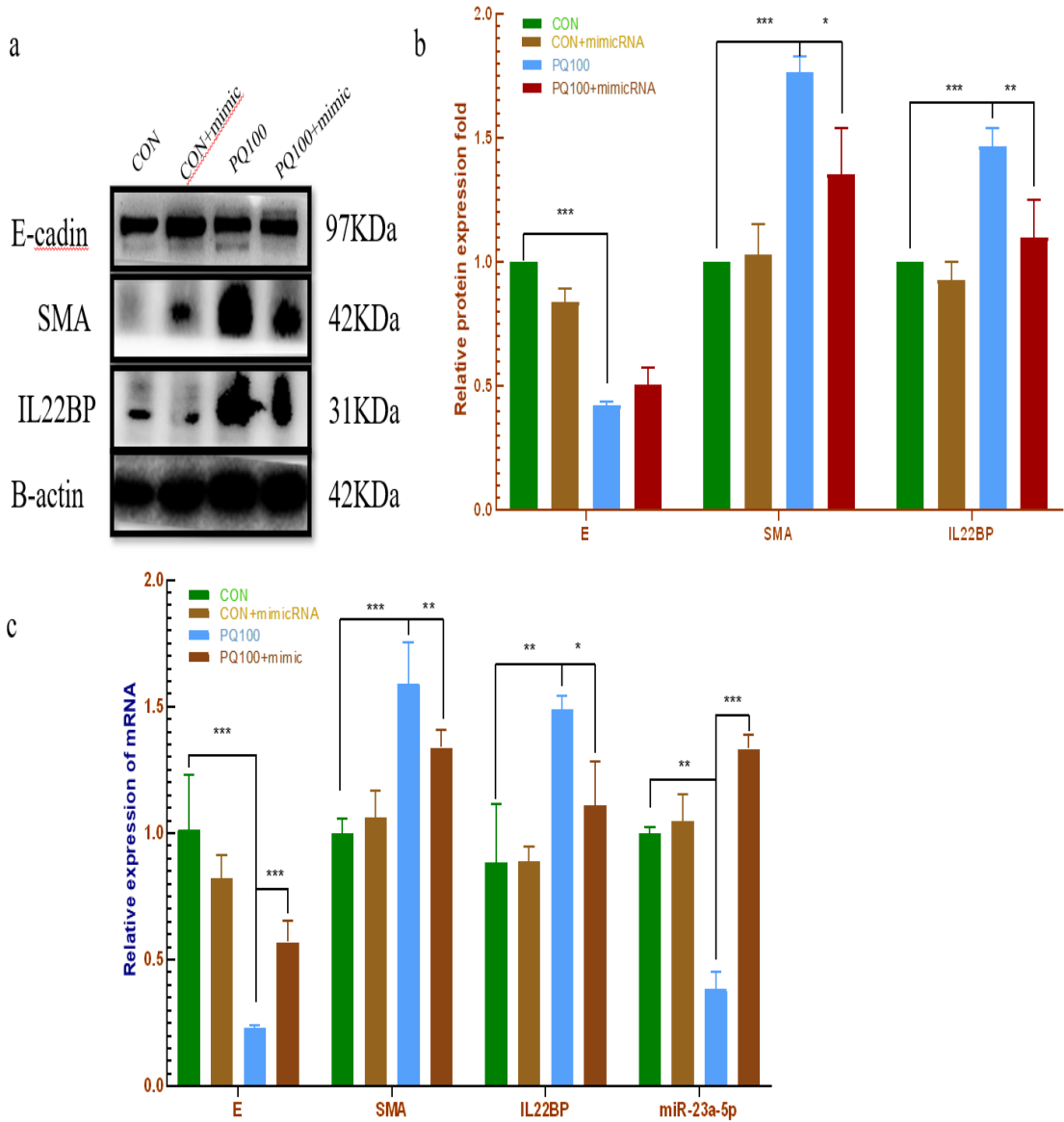


图 1.12 MLE-12 细胞转染 miRNA 过表达片段后，IL22BP 及 EMT 相关指标蛋白表达变化：
a: 转染 miRNA 过表达片段后，WB 显示蛋白表达变化；b: WB 数据分析结果；c: qPCR 基
因水平显示转染 miR-23a-5p 后能够降低 IL22BP 的表达，减低 EMT 趋势 (P<0.05, *;
P<0.01, **; P<0.001, ***)。

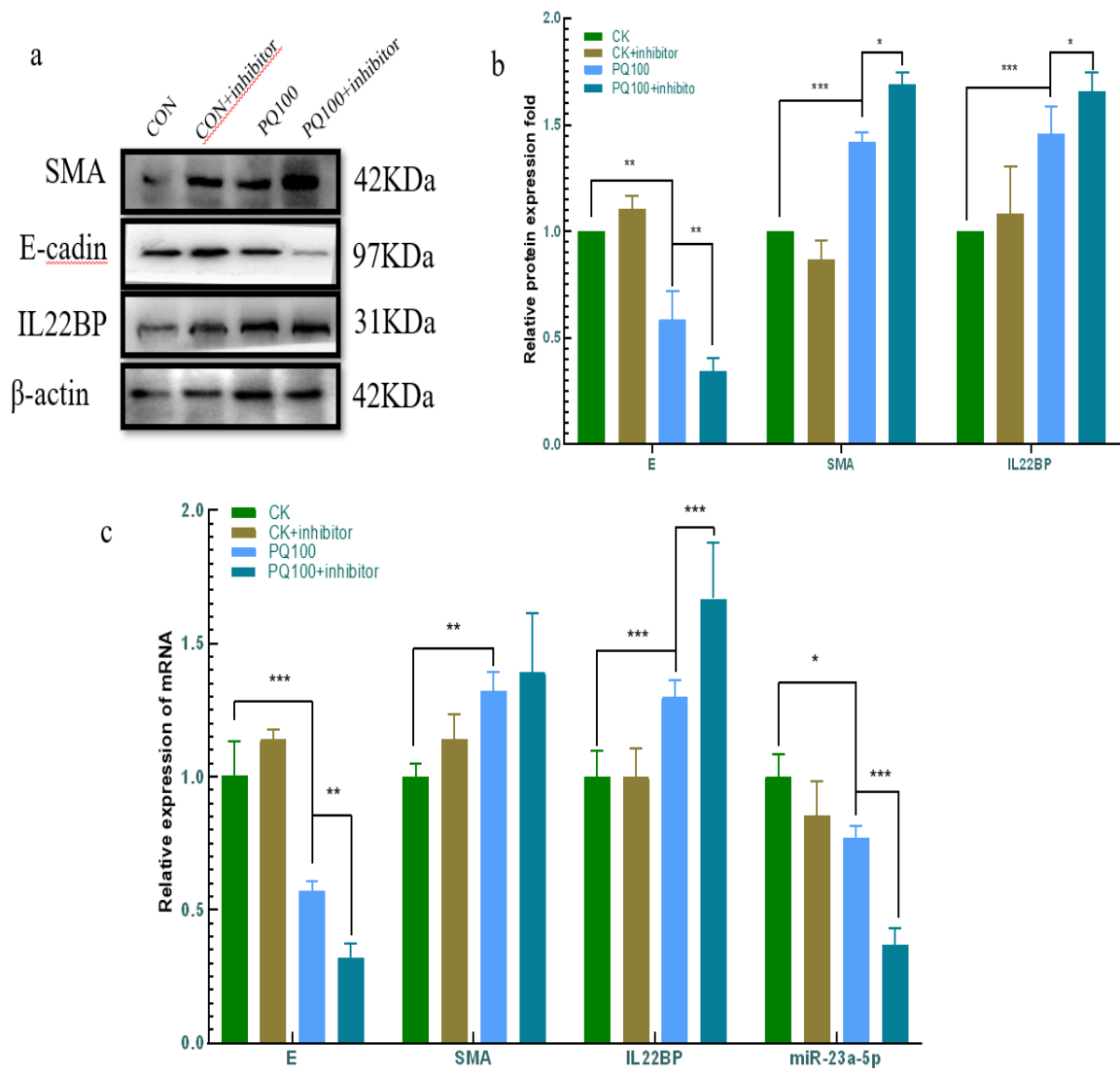


图 1.13 MLE-12 细胞转染 miRNA 抑制片段后，IL22BP 及 EMT 相关指标蛋白表达变化；a：转染 miRNA 抑制片段后，IL22BP 表达增强；b：WB 数据分析结果；c：qPCR 基因水平显示转染 miR-23a-5p 抑制片段后能够增强 IL22BP 的表达，加重 EMT 趋势（ $P < 0.05$, *; $P < 0.01$, **; $P < 0.001$, ***）。

4 讨论

PQ 一旦被人体大量吸收, 将对人体造成致命性损伤。PQ 在人体内多个器官中累积, 引起组织损伤导致多器官功能障碍综合征。肺和肾脏是首当其冲的受损器官。PQ 中毒后导致肺水肿、出血, 尽管马上对患者进行血液过滤等治疗, 但依然不能降低其肺脏内的 PQ 浓度^[6]。PQ 在肺脏内的这种持续性累积特性, 使得肺泡腔破坏较其他器官更加严重, 肺脏进展性损伤直至肺纤维化; 患者出现进行性的呼吸困难、呼吸窘迫综合征直至死亡。

研究数据表明, PQ 致肺纤维化的机制主要有 EMT, 过度炎症反应和氧化损伤。EMT 是肺纤维化发展过程中不可或缺的步骤, 其可演变为成纤维细胞。这个过程也使得细胞从紧密连接状态逐渐转为更具有流动性的间质细胞, 细胞获得侵袭和迁移的能力^[7]。EMT 主要有两个特征: 细胞粘附性降低, 导致上皮细胞与上皮细胞或组织分离, E-cadherin 的表达显著减少; 细胞流动性增强, 平滑肌肌动蛋白 α -SMA 增加。Xie 研究团队发现, PQ 可以诱导人的肺上皮 A549 细胞和大鼠肺组织发生 EMT, 同时激活了 TGF- β /Smad 信号通路, 这些炎症通路的激活进一步加重了肺纤维化的发生^[8]。

基于高通量测序发现 IL22BP 在 PQ 致肺纤维化的小鼠中表达增高, 我们通过分别构建 PQ 致肺上皮 EMT 转化的体内和体外模型验证其表达。IL22BP 一直被作为 IL-22 受体的被广知, 能够专一性的和 IL-22 结合, 不和 IL10 其他家族成员结合, 其结合能力是 IL22ra1 的 20-1000 倍^[9-11], 极高的结合力阻止了 IL22 与 IL22ra1 的结合。IL22BP 在肠道组织损伤中得到广泛研究, 在慢性克罗恩病和结肠炎患者的炎症病变组织检测到 IL22BP mRNA 和蛋白质水平升高; 此外, 在银屑病患者和慢性急性加重期肝功能衰竭的患者中也检测到血清中 IL22BP 水平的升高^{[12] [13]}。最近的研究数据表明, 小鼠体内 IL22BP 的升高可能是导致小鼠流感重复感染的重要原因^[14], 以及与小鼠多发性硬化症疾病的严重性密切相关^[5]。尽管这些研究证实 IL22BP 在肠道和肝脏中发挥致病作用, 但有关 PQ 诱导的肺纤维化的研究尚未报道; 内源性 IL22BP 在体内的重要性以及调节该受体的途径尚不清楚。

体内动物实验和体外细胞实验结果表明, PQ 组 IL22BP 表达水平明显升高, 随着 PQ 浓度的增高, 细胞黏附指标 E-cadherin 表达降低, 而间质蛋白 α -SMA 表达升高, EMT 的趋势加重伴随着 IL22BP 表达逐渐升高, IL22BP 促进 PQ 诱导的肺上皮 EMT 的发生发展。

miRNA 已被广泛研究多年,其功能也逐渐被大家所熟知。如:通过调控染色质结构、增强或抑制转录水平、改变组织细胞表观遗传记忆等实现对各个疾病的生物生理学层面的调节。let-7 是最早被人类中发现的 miRNA 之一。其表达变化与肺纤维化疾病相关联。在肺纤维化模型中,let-7 能够特异性的靶向抑制高迁移率族蛋白 A2 基因的表达,进而间接发挥其抑制 EMT 的作用,阻止肺纤维化的进展^[15];在二氧化硅所致的肺纤维化中,miRNA-34a 靶向抑制了 SMAD4 蛋白表达来阻断其 EMT 进展,达到了减轻肺纤维化的作用^[16];肺泡细胞内高表达的 lncRNA ATB 通过与 miRNA-200c 竞争性的结合 ZEB1,加重 EMT 的表达趋势,加剧肺纤维化的进展^[17]。

本研究中我们构建 PQ 所致肺纤维化的动物模型,首先高通量测序分析在此过程中差异性表达的基因,为后续能够特异性的研究 PQ 中毒提供潜在证据。生信分析结果预测显示 miR-23a-5p 与 IL22BP 存在结合位点。在证实 IL22BP 在 PQ 中毒损伤中体内和体外组织表达均升高,并伴随着组织细胞 EMT 改变后;我们分别在 MLE-12 细胞内转染 miR-23a-5p 的过表达和抑制片段,转染 miR-23a-5p 的过表达片段后,IL22BP 表达水平降低,EMT 程度较未转染组降低;转染 miR-23a-5p 抑制片段后,IL22BP 表达水平升高,EMT 程度较未转染组升高。因此我们证实 miR-23a-5p 通过对 IL22BP 的调节影响 PQ 中毒所致的 EMT。

5 结论

- 1、20mg/kg、30mg/kg 的 PQ 浓度能够诱导 C57/BL6 小鼠发生肺纤维化, 50 μ mol/L、100 μ mol/L、150 μ mol/L 的 PQ 诱导 MLE-12 细胞发生 EMT。
- 2、PQ 诱导的组织细胞 EMT 模型中, IL22BP 表达升高; miR-23a-5p 表达下调。
- 3、过表达 miR-23a-5p, IL22BP 表达减弱, MLE-12 上皮细胞 EMT 趋势减轻; 抑制 miR-23a-5p 后, IL22BP 表达增强, EMT 趋势加强。
- 4、体外细胞实验证明 miR-23a-5p 能够调控 IL22BP 表达。

第二部分：miR-23a-5p 对百草枯所致细胞焦亡 NLRP3 炎性小体作用研究

1 前言

过度炎症反应也是百草枯致肺损伤另一重要机制，适度的炎症反应能激活机体免疫系统，有利损伤恢复；然而炎症因子、炎性细胞的过度活化会加重损伤，造成机体负担。

细胞焦亡一直是近年来的研究热点，在多领域多种疾病中被大家广泛探讨。焦亡是由炎性小体介导的多种半胱天冬酶的激活，切割 GSDMD 氨基端和羧基端的连接体；造成细胞膜穿孔，水分大量渗透进入细胞，炎性因子瀑布样释放，最终导致细胞破裂、死亡。炎性小体的组成包含三个部分即传感器、适配器和酶原。高分子量的免疫复合物能够识别体内病原相关分子，同时对宿主体内的危险信号分子作出及时警告，在天然免疫系统中扮演重要角色。已被研究发现的炎性小体有 5 种：NLRP1、NLRP3、NLRC4、IPAF 和 AIM2。含有 pyrin 结构域的蛋白 3 又被称为 NLRP3，其组成包括 NOD 样受体、接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白、半胱天冬酶原；又是核苷酸结合以及寡聚化结构域样受体家族的成员。NLRP3 通过激活 Caspase-1 介导焦亡，其激活后导致 pro-IL-1 β 、白细胞介素 18 和 gasdermin D 这些前体炎性因子的水解，gasdermin D 的 N 端片段以及 IL-18、白介素 IL-1 β 的释放^[18,19]。既往研究发现 NLRP3 炎性小体与肾癌、动脉粥样硬化、急性肺损伤以及神经元的损伤发生进展密切相关^[20,21]。NLRP3 炎性小体相关蛋白在梗塞后的心肌成纤维细胞中高表达，而这种上调可能导致缺血再灌注损伤中的心肌组织梗塞面积进一步扩大^[22]；与该观点相一致的是，Marchetti 团队研究证实抑制 NLRP3 炎性小体表达后可减少小鼠缺血再灌注后的心肌损伤面积^[23]。

已有研究发现 miRNA 可以通过调节炎性小体的表达影响细胞焦亡，继而参与对细胞生物学的调控。Huang 等人通过构建心肌梗死（myocardial infarction, MI）小鼠模型，发现在 MI 进展过程中，miR-23a-5p 表达逐渐升高，其表达水平与 PI3K/Akt 的磷酸化呈负相关^[24]。Yang 等人探讨 miRNA 在成骨分化中的作用，发现含有破骨细胞外泌体分泌的 miR-23a-5p 可以通过靶向抑制 Runx2 的表达，促进 YAP1 来有效抑制破骨细胞向成骨细胞的转化^[25]。NLRP3 作为研究最广的炎性小体，其在体内的调节机制一直为大众所探讨。最近的研究报告显示，miR-223 能够直接靶向 NLRP3，

并能负性调节炎性因子的表达从而参与对心血管疾病发生发展的调控^[26,27]。

本研究通过构建 PQ 诱导的细胞模型,探索 NLRP3 炎性小体是否参与 PQ 介导的细胞焦亡,生信网站预测 miR-23a-5p 和 NLRP3 结合关系,敲减和过表达 miRNA 来探索 miR-23a-5p 能否调节 NLRP3。

2 材料与方法

2.1 主要试剂和仪器

2.1.1 主要试剂

表 2.1 主要试剂

抗 NLRP3 抗体	Abcam
抗 caspase-1 抗体	Abcam
抗 IL-18 抗体	Abcam
抗 IL-1 β 抗体	Abcam
抗 GAPDH 抗体	沈阳联星生物

其余试剂同第一部分 2.1.3。

2.1.2 主要实验仪器

仪器同第一部分。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

方法同第一部分 2.1.4。

2.2.2 qRT-PCR

实验详细步骤同第一部分 2.2.7。

2.2.3 Western-blot

实验方法同第一部分 2.2.8。

2.2.4 干扰 RNA 的转染

实验方法与第一部分 2.2.12 相同。

2.2.7 统计学分析

数据分析方法和软件同第一部分 2.2.13。

3 实验结果

3.1 NLRP3 炎症小体参与 PQ 诱导后 MLE-12 上皮细胞的细胞焦亡

细胞染毒后, 与 CON 对照组相比, PQ 组炎症小体 NLRP3 表达增强, 介导依赖的 caspase-1 通路有关指标包括 IL1 β 、IL-18 以及活化的 caspase-1 蛋白表达升高。PQ 诱导浓度越高, 其升高趋势越明显 ($P < 0.05$), 表明 PQ 诱导的细胞损伤中存在 NLRP3 介导的焦亡 (图 2.1 所示)。

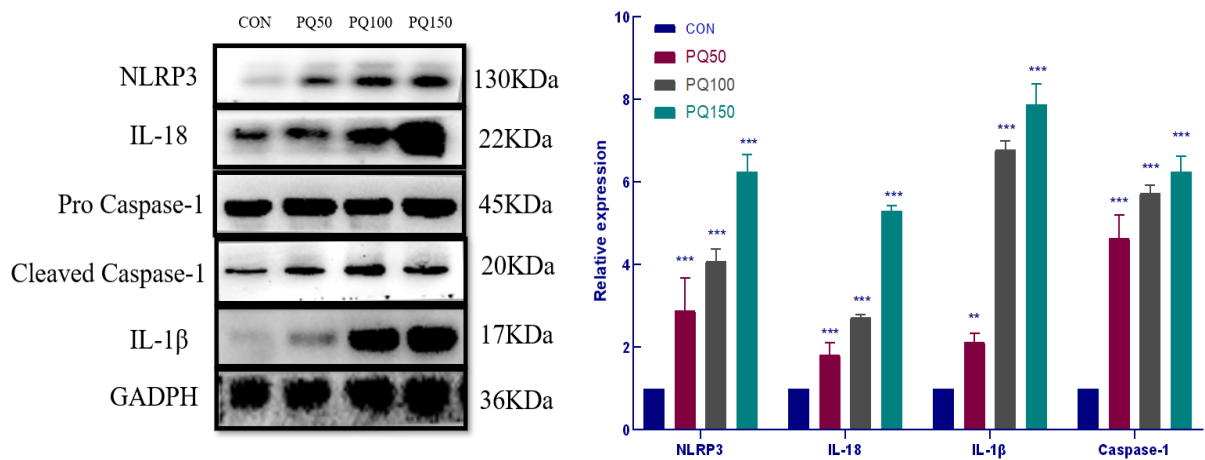


图 2.1 PQ 诱导后, MLE-12 细胞各实验组细胞焦亡相关蛋白表达变化, PQ 组焦亡相关指标明显升高 ($P < 0.05$, *; $P < 0.01$, **; $P < 0.001$, ***)。

3.2 miR-23a-5p -NLRP3 的结合预测

第一部分实验发现 miR-23a-5p 在 PQ 诱导的体内体外肺损伤模型中低表达, 其表达趋势和 NLRP3 相反, 为证实 miR-23a-5p 和 NLRP3 的调节关系, miRWalk 生信网站预测 miR-23a-5p 和 NLRP3 的结合, 预测结合 P 值分别为 1.00, P 值大于 0.5, 这为后续的实验提供了有力的证据 (如图 2.2 所示)。

<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/mouse/gene/237310/>

mmu-miR-22-3p	NM_001359638	Nlrp3	details	0.92	CDS	2271,2300	0.47	-3.793	20	-	-	-
mmu-miR-23a-5p	NM_001359638	Nlrp3	details	1.00	CDS	246,266	0.4	-4.957	18	-	-	-
mmu-miR-24-2-5p	NM_001359638	Nlrp3	details	0.85	CDS	746,772	0.4	-9.041	19	-	-	-
mmu-miR-24-2-5p	NM_001359638	Nlrp3	details	0.92	3UTR	3460,3472	0.46	-6.908	11	-	-	-

图 2.2 miRWalk 网站预测 miR-23a-5p 与 IL22BP 和 NLRP3 的结合

3.3 miR-23a-5p 通过 NLRP3 炎性小体调节 MLE-12 细胞焦亡水平

转染 miR-23a-5p 过表达片段后，NLRP3 蛋白表达水平较未转染组降低，依赖 caspase-1 途径的相关指标 IL1 β 、IL-18、caspase-1 蛋白表达降低，细胞焦亡水平降低（图 2.3）；转染 miR-23a-5p 抑制片段后，NLRP3 变化呈现相反趋势，其表达较 PQ100 组明显升高，caspase-1、IL-1 β 、IL-18 表达也呈升高趋势。这些结果表明抑制 miR-23a-5p 后能明显提高细胞焦亡水平，差异均具有差异性（ $P < 0.05$ ）（图 2.4）。

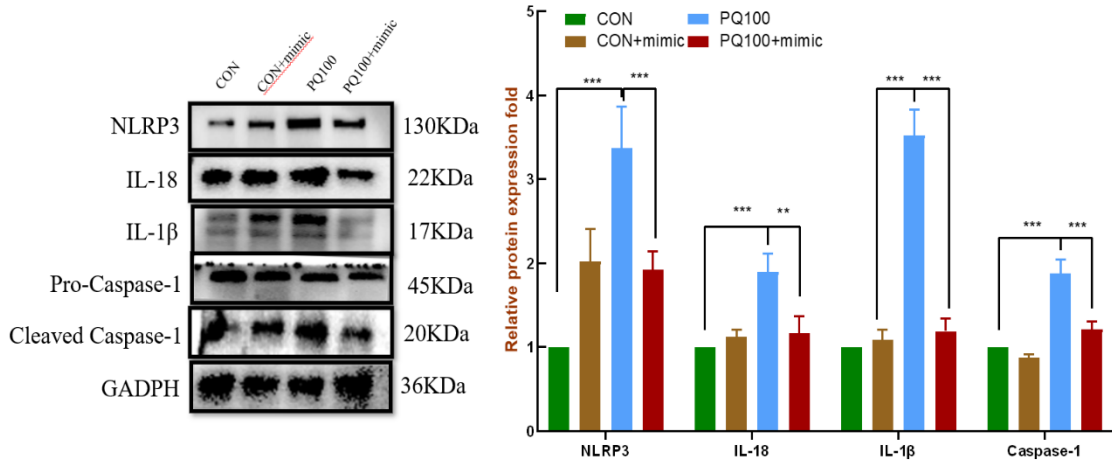


图 2.3 转染 miRNA 过表达后，NLRP3 相关焦亡蛋白表达水平变化，WB 显示转染组相关焦亡蛋白表达降低，焦亡趋势减低（ $P < 0.05$, *; $P < 0.01$, **; $P < 0.001$, ***）。

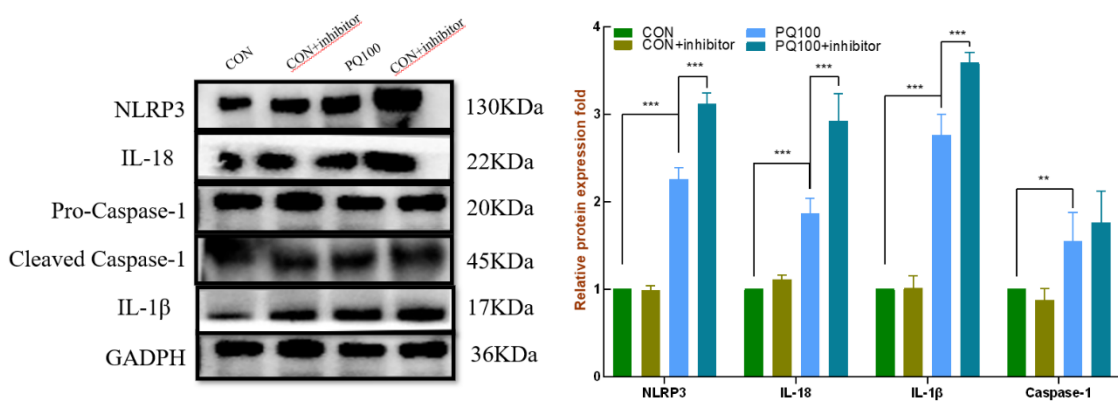


图 2.4 转染 miRNA 抑制片段后，NLRP3 相关焦亡蛋白表达水平变化；NLRP3 表达增强，焦亡相关指标表达增强，细胞焦亡趋势加强（ $P < 0.05$, *; $P < 0.01$, **; $P < 0.001$, ***）。

4 讨论

细胞焦亡概念首次在 2001 年被提出后,在近年来成为主要研究热点。炎性小体是介导焦亡的关键分子,研究表明细胞焦亡依赖途径主要有以下几个通路,即 caspase-1、caspase-4、caspase-5 等。Caspase-1 通路是研究最广,被炎性小体依赖最强的一条通路。在动脉粥样硬化小鼠模型中 NLRP3 与 caspase-1 通路相关指标分子均呈高表达状态;与该结果相一致的是,Zheng 等人进行的一项临床回顾性调查研究结果显示,冠状动脉粥样硬化患者血清高表达 NLRP3,并且其表达高低与动脉狭窄严重程度以及心梗的复发率高度相关^[24,28]。Daeho 团队研究发现敲减宫颈癌关键分子 SIRT1 后,炎性小体 AIM2 的表达显著增强,细胞焦亡加重^[29]。后续的研究表明,AIM2 作为受体蛋白,能够识别人乳头瘤病毒胞质双链 DNA(dsDNA),并与凋亡相关斑点样蛋白形成一个大分子超聚化复合物,激活 caspase-1,诱导焦亡发生^[30]。

炎性小体的激活是一个复杂连续步骤^[31-33]。第一步涉及启动或启动信号的识别,如病原相关分子被 Toll 样受体家族识别,进而激活核因子(NF- κ B)所介导信号的释放,导致有关炎性小体成分的转录的增强,这些成分包括无活性的 NLRP3、NLRC4;第二步涉及其组装和激活。如 NLRP3 通过进行寡聚化并与凋亡相关斑点样蛋白、pro-caspase-1 组装成高分子多聚蛋白复合物,当受到刺激激活后,释放出有活性的炎性因子。有关炎性小体激活主要有三种模型来解释;第一个模型,细胞外三磷酸腺苷诱导膜通透性的改变,胞内 K^+ 的流出致使 NLRP3 炎性体的激活、组装;第二个模型,病原相关分子作为激活剂,触发细胞内活性氧的产生,诱导 NLRP3 炎性体的组装;第三种模型,由外界环境物刺激(如石棉、二氧化硅、百草枯)直接触发 NLRP3 炎性体的组装和激活。

PQ 作为外来刺激物,既往研究尚未证实 PQ 中毒能否引起小鼠肺上皮细胞(MLE-12) NLRP3 炎性体的激活。我们通过构建 PQ 中毒细胞模型,发现随着 PQ 浓度的升高,NLRP3 炎性体的表达水平逐渐升高,并伴随成熟的 IL-1 β 、IL-18、Caspase-1 分泌水平的升高;这表明 PQ 刺激 MLE-12 细胞能够引起 NLRP3 炎性小体的激活和组装,引起细胞焦亡。生信网站预测分析 miR-23a-5p 与 NLRP3 的结合位点,继而构建 miR-23a-5p 过表达和抑制片段,WB 实验从蛋白水平上验证 NLRP3 炎性小体的表达变化。miRNA 过表达后,NLRP3 炎性小体表达水平降低,成熟 IL-1 β 、IL-18、Caspase-1 表达均较未转染片段组降低;抑制 miR-23a-5p 片段后,NLRP3 炎性小体表达水平升高,成熟 IL-1 β 、IL-18、Caspase-1 表达均较未转染组升高;因

此我们证实 miR-23a-5p 通过调节 NLRP3 炎性小体发挥对细胞焦亡的调节作用。

既往的研究表明 miRNA 表达水平的改变会对基因表达调控带来巨大影响，并与各种疾病的发生、发展有着密切的关系。本实验通过人为改变 miRNA 的表达水平，验证其对 IL22BP、NLRP3 的表达调控。当 miR-23a-5p 过表达时，IL22BP、NLRP3 表达降低，PQ 诱导的 EMT 和细胞焦亡趋势减轻；miR-23a-5p 表达抑制时，IL22BP、NLRP3 表达升高，PQ 诱导的 EMT 和细胞焦亡趋势加重。基于探明的 miRNA 对 mRNA 的调控关系对，为下一步人工合成 miRNA 模拟物或者 miRNA 抑制剂药物，实施基因和分子治疗，为临床治疗提供了新的靶点。

5 结论

- 1、PQ 诱导的 MLE-12 细胞模型中存在 NLRP3 介导的细胞焦亡。
- 2、过表达 miR-23a-5p, NLRP3 表达减弱, PQ 诱导的 MLE-12 上皮细胞细胞焦亡表达趋势减轻; 抑制 miR-23a-5p 后, NLRP3 表达增强, 细胞焦亡趋势加强。
- 3、体外细胞实验证明 miR-23a-5p 能够调控 NLRP3 表达。

本研究创新性的自我评价

本研究分别选取 C57/BL6 小鼠、MLE-12 细胞构建 PQ 肺上皮间质转化、细胞焦亡模型，探索 miR-23a-5p、IL22BP、NLRP3 的表达变化；以及 miR-23a-5p 对 IL22BP、NLRP3 的调节机制；探索 miR-23a-5p 治疗 PQ 诱导的 EMT 和细胞焦亡的可行性及潜在的治疗潜力。

参考文献

1. Crnkovic S, Schmidt A, Egemnazarov B, Wilhelm J, Marsh LM, Ghanim B, et al. **Functional and molecular factors associated with TAPSE in hypoxic pulmonary hypertension.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 311(1):L59-73.
2. Wang Y, Chen Y, Mao L, Zhao G, Hong G, Li M, et al. **Effects of hemoperfusion and continuous renal replacement therapy on patient survival following paraquat poisoning.** *PLoS One* 2017; 12(7):e0181207.
3. Williams JH, Whitehead Z, Van Wilpe E. **Paraquat intoxication and associated pathological findings in three dogs in South Africa.** *J S Afr Vet Assoc* 2016; 87(1):e1-e9.
4. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, et al. **IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease.** *J Immunol* 2007; 178(9):5973-5981.
5. Lindahl H, Guerreiro-Cacais AO, Bedri SK, Linnerbauer M, Linden M, Abdelmagid N, et al. **IL-22 Binding Protein Promotes the Disease Process in Multiple Sclerosis.** *J Immunol* 2019; 203(4):888-898.
6. Zerlin T, Kim YS, Hong SY, Song HY. **Protective effect of methylprednisolone on paraquat-induced A549 cell cytotoxicity via induction of efflux transporter, P-glycoprotein expression.** *Toxicol Lett* 2012; 208(2):101-107.
7. Pastushenko I, Blanpain C. **EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis.** *Trends Cell Biol* 2019; 29(3):212-226.
8. Xie L, Zhou D, Xiong J, You J, Zeng Y, Peng L. **Paraquat induce pulmonary epithelial-mesenchymal transition through transforming growth factor-beta1-dependent mechanism.** *Exp Toxicol Pathol* 2016; 68(1):69-76.
9. Wei CC, Ho TW, Liang WG, Chen GY, Chang MS. **Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein.** *Genes Immun* 2003; 4(3):204-211.
10. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, et al. **Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity.** *J Immunol* 2001; 166(12):7096-7103.
11. Xu W PS, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, Dillon SR, Gao Z, Gilbert T, Madden K, Schlutsmeyer S, Yao L, Whitmore TE, Chandrasekhar Y, Grant FJ, Maurer M, Jelinek L, Storey H, Brender T, Hammond A, Topouzis S, Clegg CH, Foster DC. **A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(17):9511-9616.
12. Martin JC, Beriou G, Heslan M, Bossard C, Jarry A, Abidi A, et al. **IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis.** *Mucosal Immunol* 2016; 9(2):539-549.
13. Pelczar P WM, Perez LG, Kempinski J, Hammel AG, Brockmann L, Kleinschmidt D, Wende S, Haueis C, Bedke T, Witkowski M, Krasemann S, Steurer S, Booth CJ, Busch P, König A, Rauch U, Benten D, Izbicki JR, Rösch T, Lohse AW, Strowig T, Gagliani N, Flavell RA, Huber S. **A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease.** *Science* 2016; 354(6310):358-362.
14. Abood RN, McHugh KJ, Rich HE, Ortiz MA, Tobin JM, Ramanan K, et al. **IL-22-binding protein exacerbates influenza, bacterial super-infection.** *Mucosal Immunol* 2019; 12(5):1231-1243.
15. Ding Q, Luckhardt T, Hecker L, Zhou Y, Liu G, Antony VB, et al. **New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis.** *Drugs* 2011; 71(8):981-1001.
16. Qi Y, Zhao A, Yang P, Jin L, Hao C. **miR-34a-5p Attenuates EMT through targeting SMAD4 in silica-induced pulmonary fibrosis.** *J Cell Mol Med* 2020; 24(20):12219-12224.

17. Liu Y, Li Y, Xu Q, Yao W, Wu Q, Yuan J, et al. **Long non-coding RNA-ATB promotes EMT during silica-induced pulmonary fibrosis by competitively binding miR-200c.** *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(2):420-431.
18. Russo HM, Rathkey J, Boyd-Tressler A, Katsnelson MA, Abbott DW, Dubyak GR. **Active Caspase-1 Induces Plasma Membrane Pores That Precede Pyroptotic Lysis and Are Blocked by Lanthanides.** *J Immunol* 2016; 197(4):1353-1367.
19. Man SM, Kanneganti TD. **Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity.** *Nat Rev Immunol* 2016; 16(1):7-21.
20. Zhang Y, Liu X, Bai X, Lin Y, Li Z, Fu J, et al. **Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis.** *J Pineal Res* 2018; 64(2).
21. Tan YF, Wang M, Chen ZY, Wang L, Liu XH. **Inhibition of BRD4 prevents proliferation and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma via NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis.** *Cell Death Dis* 2020; 11(4):239.
22. Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, Bliksoen M, Alfsnes K, Finsen AV, et al. **The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury.** *Cardiovasc Res* 2013; 99(1):164-174.
23. Marchetti C CJ, Toldo S, Mezzaroma E, Tranchida N, Rose SW, Federici M, Van Tassell BW, Zhang S, Abbate A. **A novel pharmacologic inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury after ischemia-reperfusion in the mouse.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2014; 63(4):316-322.
24. Zheng F, Gong Z, Xing S, Xing Q. **Overexpression of Caspase-1 in Aorta of Patients with Coronary Atherosclerosis.** *Heart, Lung and Circulation* 2014; 23(11):1070-1074.
25. Yang JX, Xie P, Li YS, Wen T, Yang XC. **Osteoclast-derived miR-23a-5p-containing exosomes inhibit osteogenic differentiation by regulating Runx2.** *Cell Signal* 2020; 70:109504.
26. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. **NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223.** *J Immunol* 2012; 189(8):4175-4181.
27. Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, Rainey AA, Pich D, McInnes IB, et al. **Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1beta production.** *J Immunol* 2012; 189(8):3795-3799.
28. Zheng F, Xing S, Gong Z, Xing Q. **NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis.** *Heart Lung Circ* 2013; 22(9):746-750.
29. So D, Shin HW, Kim J, Lee M, Myeong J, Chun YS, et al. **Cervical cancer is addicted to SIRT1 disarming the AIM2 antiviral defense.** *Oncogene* 2018; 37(38):5191-5204.
30. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. **AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC.** *Nature* 2009; 458(7237):514-518.
31. Zhong Y KA, Saleh M. **Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases.** *Front Immunol* 2013; 16(4):333.
32. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, et al. **TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation.** *Nat Commun* 2013; 4:1611.
33. Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. **Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives.** *J Inflamm Res* 2015; 8:15-27.

综述

非编码 RNA 在百草枯中毒机制中的研究进展

百草枯 (paraquat, PQ), 世界范围内广泛使用的一种 1-1-二甲基-4-4-联吡啶阳离子盐类强效除草剂。由于其价格低廉, 使用方便, 已经成为发展中国家常见的农药中毒致死原因。不完全统计显示, 百草枯的中毒致死率高达 90%^[1]。百草枯可通过消化道, 呼吸道, 皮肤吸收而致多器官损伤, 但尤以肺损伤为主。一些学者认为百草枯与肺二胺和腐胺、精胺、亚精胺等多胺的结构相似, 从而导致肺竞争性地积累百草枯^[2]。中毒者可出现致死性的肺出血, 水肿; 经过抢救缓过急性期的病人大多数也会发生不可逆性的肺纤维化, 增生等改变; 此外循环、肾脏、神经、肝脏、膀胱等系统也会被累及^[3]。临床对 PQ 的治疗以对症治疗为主, 强毒性无特效药的性质使得 PQ 预后很差。本文对近年来有关百草枯中毒的研究及长链非编码 RNA 在百草枯治疗中的进展进行了复习。

1 什么是非编码 RNA

顾名思义, 即不能转录翻译成蛋白质的 RNA, 我们统称为非编码 RNA。基因组数据结果表明, 在人类浩瀚的基因中只有不到 2% 的核酸序列能够翻译成为蛋白质。因此, 大家把非编码 RNA 称为“无用之物”。然而, 随着研究技术的提高, 研究认知的拓展, 非编码 RNA 逐渐被认为扮演着影响基因表达的角色而被重视^[4]。尽管其不能翻译成蛋白质, 但不能简单的认为其不具有功能。高通量测序技术的突飞猛进, 为 RNA 的研究深入提供了可行性, 研究发现非编码 RNA 包含自己的内部隐藏信号层。这些信号层能够在人类各个生理活动中发挥出不同的调节作用, 如 mRNA 的转录增强、抑制; 以及 RNA 的剪接等。非编码 RNA 发挥其生物学功能主要通过其稳定的二级、三级结构。非编码 RNA 能够根据其长度划分为不同的种类, 主要有三类: 小于 50 nt、50 nt~500 nt、大于 500 nt。研究较广的 ncRNA 主要是: microRNA、snRNA 等。

但目前的研究热点是具有调节功能的 RNA, 主要是 miRNA、LncRNA。许多非编码 RNA 多聚腺苷化后大部分仍会保留在核内, 少数会被运输到胞质。胞内的 miRNA 和 LncRNA 分别与 mRNA 和 miRNA 的 3' 端非翻译区的碱基序列互补结合, 进而影响 RNA 的降解或者翻译过程, 导致靶细胞发生相应病理生理变化。

2. 百草枯中毒机制

百草枯的中毒机制尚未完全清楚，目前研究比较广的主要有以下几个学说：氧自由基产生学说，线粒体损伤学说，分子生物学说和酶失衡学说。这些学说都源于微粒体分数起源理论、线粒体起源理论^[3]；即百草枯在含有肝微粒体和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）生成系统的孵育混合物中的生物转化过程中形成了羟基自由基，而 PQ 中毒中自由基形成的场所又是线粒体。广泛的实验数据表明，PQ 中毒后，细胞损伤，线粒体肿胀，细胞水肿破裂。自由基的强氧化性，氧化还原酶系的失衡损伤细胞的膜结构和功能，细胞内的能量，物质代谢系统障碍，最终导致细胞水肿，凋亡，加重组织炎症反应。而长链非编码 RNA 在百草枯中毒机制中通过其竞争性的结合 mRNA，减弱 miRNA 对细胞调节作用，间接调控 mRNA，而发挥着增强或减弱线粒体的损伤和胞内氧自由基的产生。

3. 百草枯对肺的损伤机制

百草枯中毒的动物实验和临床病例分析均已证明百草枯主要积聚在肺部，即使治疗后血液中的百草枯浓度降低，但肺内百草枯水平却无任何变化^[3]。该效应可用肺内多胺转运系统解释，该转运系统在肺泡 I 型、II 型细胞膜上大量表达。百草枯在肺内易聚集，不易消除的特点，使得肺成为百草枯对人体损害的首要靶器官。那么百草枯在肺内又是通过何种机制来损伤肺的呢？研究证实，上皮-间质转化机制，炎症因子的介导和氧化应激在百草枯致肺损伤中发挥重要作用。

3.1 上皮-间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞转变为间质细胞的过程，该过程伴随着粘附分子表达下降从而导致细胞具有侵袭和迁移的能力。EMT 的这种侵袭特性被认为在肿瘤的发生、器官的纤维化中扮演着重要的角色。Yamada 团队研究证实了该观点^[5]。肺纤维化中肌成纤维细胞大部分是由上皮细胞转化而来，¹ E-cadherin 表达降低，与纤维化相关的基¹ 因如：MMP-2、MMP-9 这些基质金属蛋白酶，I 型、III 型胶原蛋白基因表达水平升高^[5-6]。此外，炎症因子在 EMT 形成过程中也扮演着重要角色。研究表明：转化生长因子 β (TGF- β) 激活 TGF- β /Smad 信号通路^[7-8]；缺氧诱导因子-1 α (HIF1 α) 调控 Snail 和 β -catenin 信号通路^[9-10]；HIF1 α 调节 LOX/ β -catenin 的表达^[11]；结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达^[12]都参与了 EMT 和早期肺纤维化的形成过程。

3.2 炎性介质 我们把参与和介导炎性反应中的一切细胞因子称为炎性介质。目前研究已经发现，炎性介质可参与肿瘤形成，血液病发展，器官纤维化过程。百草枯可激活中性粒细胞、巨噬细胞等分泌细胞因子，参与肺纤维化过程。研究已经

证实, TNF- α , 核因子 (NF- κ B), TGF- β 1, IL-18, 白细胞介素 1 β 和 IL-6 的表达含量, 在 PQ 诱导所致的肺损伤、肺纤维化中表达趋势上升^[13]。

3.3 氧化应激 对百草枯中毒机制的研究发现, 百草枯在被人体吸收进入血液循环后, 经历了一个称为氧化还原循环的交替还原和再氧化过程, 并在氧化还原循环过程中起到催化作用, 生成负氧离子, 然后引发一个级联反应, 导致其他活性氧物种 (ROS) 的产生, 主要是过氧化氢^[14]。Adachid^[15] 在 2003 首次发现连续剂量的百草枯可致胆固醇过氧化和肺损伤¹。Chen^[16] 研究显示, 百草枯处理过小鼠的肺髓过氧化物酶活性、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 和 4-羟基壬醛 (4-hydroxyneonal) 蛋白活性升高, 这也间接表明了氧化应激在 PQ 诱导的肺损伤中发挥重要作用。

2.1 miRNA 与百草枯中毒机制

MiRNA 长度约为 22nt 非编码单链 RNA 分子, 能够与 mRNA 的 3'UTR 互补结合, 抑制 mRNA 的翻译或降低 mRNA 的稳定, 从而调节 mRNA 的表达^[17], 间接调控多种生物学行为, 如增生、分化和凋亡。miRNA 除可在肿瘤发生中发挥重要作用外, 近来研究发现, miRNA 在百草枯中毒中也扮演者重要角色。

黄敏等用微阵列测序分析百草枯诱导肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)的 miRNA 测序谱显示, miR-Let-7e 的表达水平随着 PQ 浓度的升高持续下降, 但 miR-34a 表达在受到 PQ 诱导后显著升高, bcl-2 蛋白表达水平降低, 其降低程度与 miR-34a 呈协同效应。这说明不同的 miRNA 参与介导了 PQ 致 PC12 细胞损伤过程^[18]。朱勇在百草枯致肺纤维化模型中发现缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)及其靶基因 micro RNA-210(miR-210)存在相互调控关系, 并在致肺纤维化中对 EMT 有重要作用^[19]。PQ 中毒后, 大鼠肺组织即有 HIF-1 α 表达显著升高; 上皮标志物 ZO-1 和 E-cadherin 表达减少, 间质标志物 α -SMA 明显增多, 即发生了 EMT; miR-210 表达明显增加。在细胞内沉默 HIF-1 α 后, Snail 和 β -catenin 表达明显较未沉默 HIF-1 α 前减少, 同时肺组织的 EMT 程度减轻; miR-210 表达明显下降。过表达 miR-210 后: α -SMA、HIF-1 α 表达升高, ZO-1、E-cadherin 表达降低, EMT 趋势增强; 抑制 miR-210 后: 其指标趋势变化和过表达相反, EMT 减轻。HIF-1 α 与 miR-210 趋势变化的一致性提示两者之间可能存在正向调控作用, 互相诱导导致 EMT 指标持续升高, 加剧了肺纤维化的进展; 因此我们猜测 HIF-1 α 是 PQ 中毒的潜在治疗靶点。蔡志鹏^[20]用百草枯诱导小鼠神经母细胞, 探讨 miR-380-3p 在百草枯致神经细胞损害中的作用及其与 Nrf2 的关系。用 qRT-PCR 观察细胞 mRNA 表达水平, 显示百草枯处理可下调

神经细胞内 miR-380-3p 的表达水平, 而转录因子 Nrf2 的激活可以上调神经细胞内 miR-380-3p 表达水平, miR-380-3p 的过表达可导致神经细胞(Neuro-2a)增殖活性下降、凋亡率升高以及周期阻滞。詹艳婷^[21]通过实验观察 miR-17-5p 功能获得与功能失去在 PQ 致小鼠神经母细胞瘤细胞(Neuro-2a)细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期改变中的影响; PQ 可诱导神经细胞 miR-17-5p 表达下调和 DNA 甲基化水平升高; 这说明 miR-17-5p 参与 PQ 诱导的神经细胞凋亡, 细胞周期的改变。

因此, miRNA 可以作为一种新的研究标志物, 降低或抑制 miRNA 在体内的表达, 从而引起百草枯诱导的细胞凋亡、细胞周期的改变, 为百草枯中毒、治疗、预后提供一个新思路。

2.2 lncRNA 与百草枯中毒机制

长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)指长度大于 200nt 的非编码类基因^[22]。随着对 lncRNA 的深入研究发现了其功能的多样性。如参与调控体内重要生物过程: 修饰染色质, 激活转录, 调节细胞分化、细胞周期等^[23-25]。在 Poliseno^[26]提出 ceRNA 概念后, 科研人员发现 lncRNA 因于 miRNA 含有某个或多个 MREs(microRNA response elements, MREs), 可与 mRNAs 竞争性结合 miRNAs, 从而调节 mRNA 的表达, 参与肺纤维化、肿瘤、百草枯中毒等疾病的发生发展。近年来, 有不少学者研究 lncRNA 作为调控生命活动的重要大分子在百草枯中毒中所扮演的重要角色, 从而为百草枯中毒治疗, 防治提供新的靶点。

杨虹雨研究 PQ 对神经细胞损伤, 细胞凋亡中 lncRNA NR_030777 对 Zfp326/Cpne5 表达的调控, PQ 处理可引起小鼠神经母细胞瘤(Neuro-2a, N2a)增殖活力下降, 细胞凋亡增加, NR_030777 lncRNA NR_030777 表达升高, Zfp326 mRNA 表达降低, Cpne5 mRNA 表达升高; 敲低 NR_030777, 会使 PQ 诱导的 N2a 细胞增殖活力、Zfp326 mRNA、Cpne5 mRNA 表达量受到抑制; 而过表达 NR_030777, 会使 PQ 诱导的 Zfp326 mRNA、Cpne5 mRNA 表达量产生一定的协同作用; 同时能够拮抗 PQ 对细胞的毒性^[27]。此研究说明, lncRNA 能够调控 mRNA 分子的表达, 并能够抵抗百草枯诱导的神经细胞损害作用。张银银^[28]研究 lncRNA-AK039862 在 PQ 诱导的小鼠帕金森模型中发现, lncRNA-AK039862 在 PQ 抑制神经小胶质细胞以及多巴胺能细胞增殖活力中起到协同作用; 促进 Foxa1、Pafah1b1 基因表达, 正向调节其转录和翻译。陈俊杰^[29]通过构建百草枯诱导的小鼠肺纤维化模型, 抽取小鼠肺组织, 行 lncRNA 芯片分析, 发现多种 lncRNA 参与小鼠肺纤维化过程, 选取其中差异表达的 lncRNAuc.77 及 2700086A05Rik 转染至人肺腺癌细胞(A549), 发现其

靶基因 ZEB2 及 HOXA3 表达明显变化, 纤维化相关基因也发生改变并导致了细胞形态的变化。这些研究结果说明 lncRNA 可以在细胞生命活动中发挥其调节作用。

3 小结与展望

非编码 RNA 虽然不能编码蛋白质, 但能够和具有同源性的 DNA 和 RNA 结合, 从而调节信息表达; 也可以通过折叠其二级结构, 参与转录前和转录后调控。综上所述, 非编码 RNA 在百草枯中毒机制的研究中, 非编码 RNA 主要通过信号通路、细胞因子、蛋白分子的参与, 或竞争性的结合 miRNA 调控 EMT 进程, 调控相关凋亡蛋白分子等发挥影响。非编码 RNA 在百草枯中毒机制研究取得的进展, 为百草枯中毒的治疗提供的非常有价值的生物学标志物和治疗靶点。但目前, 针对非编码 RNA 在百草枯中毒机制的研究尚处于起始阶段, 很多问题尚未解决; 如非编码 RNA 如何在转录前、转录后调控相关信号通路、相关蛋白分子, 又有哪些非编码 RNA 分子介导了炎性反应-免疫反应调控。这些问题引导临床继续深入探究非编码 RNA 在百草枯中毒中所起的作用。

参考文献

- [1] Nasr Isfahani S, Farajzadegan Z, Sabzghabaee AM, Rahimi A, Samasamshariat S, Eizadi-Mood N. Does hemoperfusion in combination with other treatments reduce the mortality of patients with paraquat poisoning more than hemoperfusion alone: A systematic review with meta-analysis. *J Res Med Sci*, 2019, 31; 24:2.
- [2] Zhang L, Li Q, Liu W, Liu Z, Shen H, Zhao M. Mesenchymal Stem Cells Alleviate Acute Lung Injury and Inflammatory Responses Induced by Paraquat Poisoning. *Med Sci Monit*, 2019, 10; 25:2623-2632.
- [3] Wang X, Wang X, Zhu Y, Chen X. ADME/T-based strategies for paraquat detoxification: Transporters and enzymes. *Environ Pollut*, 2021, 15; 291:118137.
- [4] Ransohoff JD, Wei Y, Khavari PA. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(3):143-157.
- [5] Rubio K, Castillo-Negrete R, Barreto G. Non-coding RNAs and nuclear architecture during epithelial-mesenchymal transition in lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Signal*, 2020, 70:109593.
- [6] Olea-Flores M, Zuñiga-Eulogio MD, Mendoza-Catalán MA, Rodríguez-Ruiz HA, Castañeda-Saucedo E, Ortuño-Pineda C, Padilla-Benavides T, Navarro-Tito N. Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Int J Mol Sci*, 2019, 13; 20(12):2885.
- [7] Sisto M, Ribatti D, Lisi S. Organ Fibrosis and Autoimmunity: The Role of Inflammation in TGF β -Dependent EMT. *Biomolecules*, 2021, 18;11(2):310.
- [8] Inui N, Sakai S, Kitagawa M. Molecular Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis, with Focus on Pathways Related to TGF- β and the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Int J Mol Sci*, 2021, 5; 22(11):6107.
- [9] Wei X, Zhu X, Jiang L, Huang X, Zhang Y, Zhao D, Du Y. Recent advances in understanding the role of hypoxia-inducible factor 1 α in renal fibrosis. *Int Urol Nephrol*, 2020, 52(7):1287-1295.
- [10] Romero Y, Aquino-Gálvez A. Hypoxia in Cancer and Fibrosis: Part of the Problem and Part of the Solution. *Int J Mol Sci*, 2021, 3; 22(15):8335.
- [11] Lu J, Qian Y, Jin W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α regulates epithelial-to-mesenchymal transition in paraquat-induced pulmonary fibrosis by activating lysyl oxidase. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3): 2287-2294.

- [12] Chen Z, Zhang N, Chu HY, Yu Y, Zhang ZK, Zhang G, Zhang BT. Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 29; 8:593269.
- [13] Xu Y, Wu T, Wang P, Liang ZX, Shi SS, Xu SF, Liu XJ, Tian Q. Perfluorocarbon Protects against Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis of Endothelial Cells in Pulmonary Microvessels. *Bull Exp Biol*, 2021, 170(4):410-414.
- [14] 孙百胜, 何月忠. 百草枯中毒机制及临床治疗进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(11):1043-1046.
- [15] Morris G, Puri BK, Olive L, Carvalho A, Berk M, Walder K, Gustad LT, Maes M. Endothelial dysfunction in neuroprogressive disorders-causes and suggested treatments. *BMC Med*, 2020, 19; 18(1):305.
- [16] Chen S, Chen H, Du Q, Shen J. Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds. *Front Physiol*, 2020, 19;11:433.
- [17] Mu H, Zhang W, Qiu Y, Tao T, Wu H, Chen Z, Xu G. miRNAs as potential markers for breast cancer and regulators of tumorigenesis and progression (Review). *Int J Oncol*, 2021, 58(5):16.
- [18] 黄敏, 娄单, 常秀丽, 周志俊. 百草枯诱导 PC12 细胞 MicroRNA 的变化及 bcl-2 调控机制[J]. *中华卫生劳动职业病杂志*, 2014, 32(01):32-37.
- [19] 朱勇. HIF-1 α 和 miR-210 在百草枯中毒致肺纤维化中对上皮—间质转化的作用研究[D]. 上海交通大学,2018.
- [20] 蔡志鹏. miR-380-3p 在百草枯致神经细胞损害中的作用及其与 Nrf2 的关系探讨[D]. 福建医科大学 2017.
- [21] 詹燕婷. miR-17-5p 在百草枯致神经细胞损害中的作用及其改变的可能途径探讨[D]. 福建医科大学, 2016.
- [22] 夏天, 肖丙秀, 郭俊明. 长链非编码 RNA 的作用机制及其研究方法[J]. *遗传*, 2013, 35(03): 269-280.
- [23] Lekka E, Hall J. Noncoding RNAs in disease. *FEBS Lett*, 2018, 592(17):2884-2900.
- [24] 张绍峰, 李晓荣, 孙传宝, 何玉科. 植物非编码 RNA 调控春化作用的表观遗传[J]. *遗传*, 2012, 34(7): 485-488.
- [25] Teng L, Meng R. Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Acute Cerebral Infarction Through miRNAs-Mediated hs-CRP Regulation. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(3):494-504.
- [26] Dong BS, Shi MJ, Su SB, Zhang H. Insight into long noncoding competing endogenous RNA

networks in hepatic fibrosis: The potential implications for mechanism and therapy. *Gene*, 2019, 1; 687:255-260.

[27] 杨虹雨, 林清霞, 蔡萍等. LncRNA NR__030777 在百草枯致神经细胞损害 Zfp326/Cpne5 表达的调控及对细胞增殖凋亡的影响[C]. 中国毒理学第七次全国会员代表大会暨中国毒理学会第六次青年学者论坛论文摘要, 中国毒理学会:中国毒理学会, 2018, 2:78-79.

[28] 张银银, 吴静文, 杨虹雨, 邵文亚, 郑馥荔, 蔡萍, 罗周嵩, 吴思英, 李煌元. LncRNA AK039862 在百草枯抑制神经细胞增殖、迁移及改变 Pafah1b1/Foxa1 表达中的作用[C]. 中国毒理学会, 中国毒理学会第七次全国会员代表大会暨中国毒理学会第六次中青年学者科技论坛论文摘要, 中国毒理学会:中国毒理学会, 2018, 2:79-80.

[29] 陈俊杰. 长链非编码 RNA 在百草枯致小鼠肺纤维化模型中的表达谱分析及作用初步研究[D]. 南京医科大学, 2015.

致 谢

弹指一挥间，来去三年也，感恩感激一路以来所有的相遇，相识。三年的学习生涯，有幸让我在科研的门槛徘徊，虽是学艺不精，但也有幸看到科研知识的浩瀚。初始的懵懵懂懂，渐进的有点条理，再到今天的毕业，这一路收获甚多。有为实验焦躁的黑夜，为文章发愁的日常，叹他人之优秀的感慨，息自我垃圾的日常，每日的心路历程促使我今日的成长。

感谢我的导师李铁刚老师，感谢您一路以来对我的鼓励支持和认可；感谢王娜娜老师，对我的实验和论文的帮助；感谢中科院沈阳应用生态研究所徐明恺老师及团队，很幸运能够在如此严谨活泼团结的科研团队中学习，有幸识您，才知大家风范。

感谢急诊科赵宏宇、王煜、张立春主任，感谢沈海涛、刘振宁、陈良宏、张红雷、朱哲老师，对我的指导和帮助，谢谢各位老师开题、中期、预答辩的宝贵建议和指导。

感谢我亲爱的同门大家庭，感谢大家一路互相欣赏、互相帮助、互相鼓励。

感谢父母对我的爱护和多年培养，感谢父母在我求学路上的支持和付出。

未来路且长，愿我们每个人都能甩开膀，抬起头，昂首阔步走花路！

个人简历

姓名：孟婷婷

性别：女

民族：汉族

学习经历：

2014年9月—2019年7月 长治医学院 临床医学 本科

2019年9月—2022年6月 中国医科大学 急诊医学 学术硕士