

慢病毒介导 miR-17 过表达对溃疡性结肠炎小鼠的影响及机制初探

张 杰 邵婧娴 庞利群

【摘要】 目的 探究 miR-17 过表达对溃疡性结肠炎(UC)小鼠结肠组织的影响及其作用机制。方法 将造模成功的 30 只小鼠随机分成 B 组、C 组、D 组,另取 10 只正常小鼠设为 A 组。其中 C 组小鼠在第 1、7、14、21 天时于尾静脉注射慢病毒空载体 100 μ L; D 组小鼠于相同时间点注射等量的 miR-17 过表达慢病毒载体,1 周后处死全部小鼠。根据小鼠的症状、体征进行疾病活动指数(DAI)评分;HE 染色观察结肠组织病理改变;TUNEL 法检测结肠组织细胞凋亡水平;RT-PCR 法检测小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 表达水平;Western Blot 法检测小鼠结肠组织中 Bim 蛋白的表达水平。结果 与 A 组相比,B、C、D 组 DAI 评分升高,结肠病理损伤加重,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 B、C 组相比,D 组 DAI 评分下降,结肠病理损伤减轻($P < 0.05$)。TUNEL 法结果显示,与 A 组相比,B、C、D 组结肠组织细胞凋亡指数均显著升高(P 均 < 0.05);与 B、C 组相比,D 组凋亡指数显著下降($P < 0.05$)。与 A 组相比,B、C、D 组小鼠结肠组织中 Bim、PTEN 的表达水平均显著升高(P 均 < 0.05);与 B、C 组相比,D 组 Bim、PTEN 的表达水平显著下降($P < 0.05$)。结论 过表达 miR-17 对 UC 小鼠有保护作用,其机制可能与降低 Bim 蛋白表达及抑制 PTEN/Akt 通路有关。

【关键词】 miR-17;溃疡性结肠炎;细胞凋亡;Bim

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2019.06.009

Effect of lentivirus transfected miR-17 on mice with ulcerative colitis and its mechanism ZHANG Jie, PANG Liqun. Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Huaian No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huaian 223300, China; SHAO Jingxian. Department of Pediatrics, the Affiliated Huaian No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huaian 223300, China

【Abstract】 Objective This paper intends to explore the effects of miR-17 overexpression on colonic tissue in mice with ulcerative colitis (UC) and its possible mechanisms. **Methods** Thirty mice successfully modeled were randomly divided into group B, group C and group D, while another 10 mice were described as group A. The mice in Group C were injected with lentiviral empty vector 100 μ L in the tail vein on day 1, 7, 14, and 21 while the mice in group D were injected with the same amount of miR-17 overexpressing lentiviral vector at the same time point, and all mice were sacrificed 1 week later. The index of disease activity (DAI) was scored according to the symptoms and signs of the mice while the pathological changes of colon tissues were observed by HE staining. TUNEL assay was used to detect apoptosis in colon tissues whereas RT-PCR was used to detected mRNA expression of Bim and PTEN in colon tissues of the mice. The expression of Bim protein was detected by Western Blot. **Results** Compared with group A, the DAI scores and colonic pathological injury of groups B, C, and D were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with groups B and C, the DAI scores and colonic pathological injury of group D were significantly decreased ($P <$

0.05)。The results of TUNEL showed that compared with group A, the apoptosis index of colon tissue was significantly increased in groups B, C, and D ($P<0.05$), while compared with group B and C, group D was apoptotic. The index decreased significantly ($P<0.05$). Compared with group A, the expression of Bim and PTEN in colon tissue of groups B, C, and D were significantly increased ($P<0.05$). However, compared with groups B and C, the expression of Bim and PTEN in colon tissue of group D was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-17 can inhibit the progression of UC by regulating apoptosis of mouse colonic mucosa, which may be related to the decrease of Bim protein expression and inhibition of PTEN/Akt pathway.

【Key words】 miR-17; Ulcerative colitis; Apoptosis; Bim

溃疡性结肠炎(UC)属于炎症性肠病(IBD),好发于直肠和乙状结肠^[1]。UC 的发病机制目前尚未完全明确,其与环境、遗传、感染、细胞凋亡及免疫等多种因素相关。有研究显示,肠道黏膜细胞对维持肠道生态平衡具有重要作用,而肠道黏膜细胞凋亡率升高将导致肠道黏膜屏障受损^[2]。肠道黏膜屏障受损与 UC 久治不愈、病情反复密切相关。miR-17 是由 6 个序列相似、结构相仿的核苷酸组成的 RNA 分子,其序列高度保守,存在于基因组中内含子的非编码区^[3]。研究表明,miR-17 主要与细胞凋亡、细胞周期调控相关^[4]。本研究探讨了 miR-17 过表达对 UC 小鼠结肠组织的影响及可能的机制,以期为 UC 的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠,雄性,共 45 只,体质量为 25~32 g。由中国医科大学提供,许可证号:SYXK(辽)2018-0087。室温保持 22℃~28℃,相对湿度 35%~75%,昼夜自然光照,适应性饲养 1 周。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)(美国 Sigma 公司),裂解液(美国 BD 公司),Tunel 检测试剂盒(上海碧云天公司),水合氯醛(天津福星公司),BCA 蛋白定量测定试剂盒(上海碧云天公司),HE 染色试剂盒(北京索莱宝公司)、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒(美国 Beyotime 公司),兔单克隆抗 Bim 抗体(美国 PAA 公司),HRP 标记羊抗兔二抗(上海碧云天公司),SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(南京建成公司),ECL 发光试剂盒(美国 Thermo 公司)。仪器:垂直电泳槽、稳压稳流电泳仪、RT-PCR 反应扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)。本研究由沈阳万类生物公司设计引物,引物序列见表 1。

1.3 分组与 UC 模型构建

35 只小鼠适应性饲养 1 周后,禁食不禁水维持

24 h,腹腔注射 4%水合氯醛溶液(40 mg/kg),待小鼠麻醉后,从小鼠的肛门插入直径为 5 mm 的硅胶管,进深约 8 mm;该管另一端连接注射器,一次性注射 2.5%TNBS 乙醇溶液(TNBS 溶于 50%的乙醇水溶液)灌肠(100 mg/kg),灌肠完毕后,提拉尾巴使小鼠倒立 3 min,放回原笼继续饲养,参照文献^[5]制作 UC 模型。随机选取 5 只小鼠处死,取结肠组织进行病理学观察,判断小鼠 UC 模型构建成功与否。将 30 只 UC 模型构建成功的小鼠随机分成模型组(B 组)、模型+空载体组(C 组)、模型+miR-17 过表达组(D 组),每组 10 只;另取 10 只小鼠用上述方法注射 100 mg/kg 的生理盐水灌肠,设为正常组(A 组)。其中 C 组小鼠在第 1、7、14、21 天时于尾静脉注射慢病毒空载体 100 μL;D 组小鼠于相同时间点注射等量的 miR-17 过表达慢病毒载体;最后 1 次注射 1 周后处死全部 4 组小鼠,并将结肠组织存于-80℃冰箱中。

表 1 引物序列

基因	序列
miR-17	上游:5'-CAGGGCTTAGCCCGTACCCGG-3'
	下游:5'-CGGGTTTTACCAAACAGACACCT-3'
Bim	上游:5'-CCAAAATACCAGAGCTACGCT-3'
	下游:5'-CCCGTACTAGCTGCATGCGCAA-3'
PTEN	上游:5'-TCCCTAGCTACCAAACCTGAAC-3'
	下游:5'-AAACGCTCTTGGTACCAAACT-3'
U6	上游:5'-CAACTTCTTACAGGGACCTAGC-3'
	下游:5'-AACGTGTGCCGTGCCGCGAATGC-3'
β-actin	上游:5'-AAGCTGGTCGCGTGAGTGCAGC-3'
	下游:5'-CAGCACAGCAGCAACGGTTCAAG-3'

1.4 小鼠症状观察与评分

实验开始后,每日记录每只小鼠的体质量,观察每只小鼠的粪便情况以及便血情况,根据 UC 的疾病活动指数(DAI)标准,并参考文献^[6]进行评分。

具体如下:体质量无下降,粪便正常且无便血计 0 分;体质量下降 $<5\%$,粪便松散且无便血计 1 分;体质量下降 $5\%\sim 10\%$,粪便松散有便血计 2 分;体质量下降 $11\%\sim 15\%$,稀便,有便血计 3 分;体质量下降 $>15\%$,稀便,肉眼血便计 4 分。

1.5 HE 染色观察小鼠结肠组织病理变化

将固定于 4% 多聚甲醛溶液中的结肠组织取出,然后进行脱水、透明、石蜡包埋和切片,对组织切片进行脱蜡、水化、染色和封片。利用显微镜观察切片。

1.6 TUNEL 法检测小鼠结肠组织细胞凋亡情况

将小鼠结肠组织从 4% 多聚甲醛溶液中取出,制成石蜡切片;采用 3% 过氧化氢溶液室温孵育 5 min , 0.05 mol/L 枸橼酸盐溶液 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 修复 10 min , 15% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h ,之后用 $1:500$ TUNEL 检测液室温孵育 90 min , $1:500$ 荧光素抗体 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min ,Hoechst 室温孵育 5 min ,封片,利用荧光显微镜观察并拍照。结果判定标准:凋亡细胞的细胞核呈黄棕色或黄褐色,并且呈散状分布,周围无炎性细胞浸润,核固缩或核碎裂。凋亡指数=(凋亡阳性细胞核数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.7 RT-PCR 法检测小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 的表达水平

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出小鼠结肠组织 80 mg ,加入 RNAiso Plus $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 剪碎,研磨匀浆,室温中加入各项反应试剂, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育, 60 min ; $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 。以 U6 为内参, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 s , 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对实验数据进行分析。

1.8 Western Blot 法检测小鼠结肠组织中 Bim 蛋白的水平

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出小鼠结肠组织,加入裂解液[组织体质量(mg):裂解液(μL)= $1:9$], $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离

心 20 min ,提取上清液中的总蛋白,利用 BCA 蛋白检测试剂盒检测样本总蛋白浓度;随后加入 25% 的上样缓冲液,沸水浴 10 min 变性;应用 SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒进行电泳;完毕后将蛋白转移至 PVDF 膜上。 $1:400$ 兔单克隆 Bim 一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, $1:1\text{ }400$ HRP 标记羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h ,用 ECL 发光液避光显影。应用 Image J-pro 6.0 软件进行灰度值扫描分析,得出目的蛋白表达的相对值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。服从正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 S-N-K 法检验。 $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组症状及 DAI 评分比较

A、B、C、D 组小鼠 DAI 评分分别为(0.10 ± 0.03)分、(3.60 ± 0.05)分、(3.53 ± 0.60)分和(1.57 ± 0.36)分,差异有统计学意义($F=113.57$, $P<0.001$)。与 A 组相比,B、C、D 组小鼠的 DAI 评分均显著升高,差异具有统计学意义($q=22.112\text{ }7$ 、 $21.670\text{ }5$ 、 $9.287\text{ }3$, $P<0.05$)。与 B 组相比,C 组小鼠的 DAI 评分差异无统计学意义($q=0.442\text{ }2$, $P>0.05$),而 D 组则显著降低($q=12.825\text{ }4$, $P<0.05$)。与 C 组相比,D 组小鼠 DAI 评分显著降低,差异有统计学意义($q=12.383\text{ }1$, $P<0.05$)。

2.2 各组小鼠结肠组织切片病理学比较

A 组结肠组织细胞排列整齐,无明显的炎性细胞浸润及纤维化,也没有观察到任何病变。与 A 组相比,B、C 组小鼠结肠组织出现明显的炎性细胞浸润及纤维化,D 组较 B、C 组明显改善。见图 1。

2.3 各组小鼠结肠组织 TUNEL 分析比较

A、B、C、D 组小鼠结肠组织细胞凋亡指数分别为(4.05 ± 3.97)%、(77.68 ± 5.89)%、(71.98 ± 6.72)%和(30.20 ± 8.64)%,差异有统计学意义

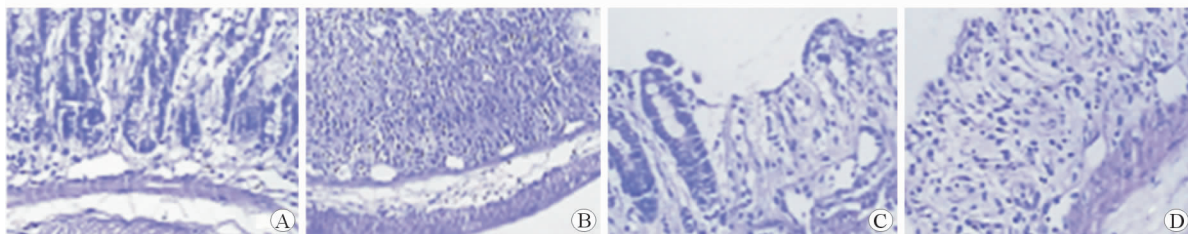


图 1 各组小鼠结肠组织光镜下的病理改变 HE 染色 $\times 200$ A 正常小鼠 B 模型组 C 模型+空载体组 D 模型+miR-17 过表达组

($F = 288.81, P < 0.001$)。与 A 组相比, B、C、D 组小鼠结肠组织细胞凋亡指数均显著升高, 差异具有统计学意义($q = 35.688\ 4, 32.925\ 6, 12.674\ 9, P < 0.05$)。与 B 组相比, C 组差异无统计学意义($q =$

$2.762\ 8, P > 0.05$), 而 D 组则显著降低($q = 23.013\ 5, P < 0.05$)。与 C 组相比, D 组小鼠结肠组织细胞凋亡指数显著降低, 差异具有统计学意义($q = 20.250\ 7, P < 0.05$)。见图 2。

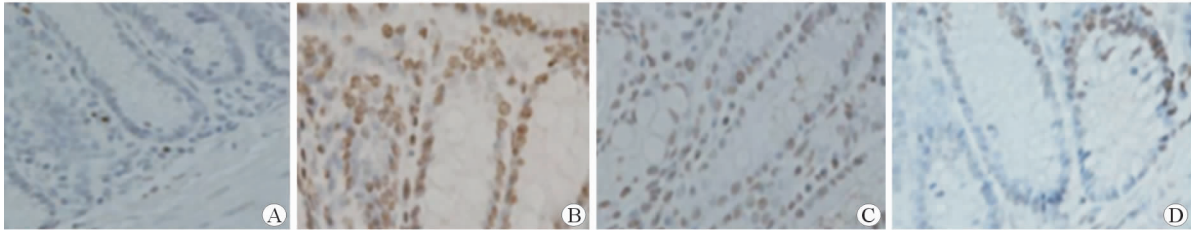


图 2 各组小鼠结肠组织 TUNEL 分析 HE 染色 $\times 200$ A 正常小鼠 B 模型组 C 模型 + 空载体组 D 模型 + miR-17 过表达组

2.4 各组小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 的表达水平比较

如表 2 所示, 4 组小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 的表达水平相比较, 差异有统计学意义($F = 36.88, 86.67, P < 0.001$)。与 A 组相比, B、C、D 组小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 的表达水平均显著升高, 差异具有统计学意义($q = 12.694\ 4, 12.933\ 9, 7.305\ 3, P < 0.05; q = 17.985\ 9, 19.569\ 6, 6.900\ 3, P < 0.05$)。与 B 组相比, C 组小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 的表达水平差异均无统计学意义($q = 0.239\ 5, 1.587\ 3, P > 0.05$), 而 D 组则均显著降低, 差异具有统计学意义($q = 5.389\ 1, 11.085\ 7, P < 0.05$)。与 C 组相比, D 组小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 的表达水平均显著降低, 差异具有统计学意义($q = 5.628\ 6, 12.669\ 3, P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠结肠组织中 Bim mRNA、PTEN mRNA 的表达水平

组别	Bim mRNA	PTEN mRNA
A 组	0.32 ± 0.15	1.03 ± 0.20
B 组	1.38 ± 0.36^a	2.62 ± 0.26^a
C 组	1.40 ± 0.28^a	2.76 ± 0.31^a
D 组	0.93 ± 0.22^{abc}	1.64 ± 0.33^{abc}

注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$

2.5 各组小鼠结肠组织中 Bim 蛋白的表达水平比较

A、B、C、D 组小鼠结肠组织中 Bim 蛋白的相对表达水平分别为 $0.39 \pm 0.16, 0.93 \pm 0.17, 0.70 \pm 0.18$ 和 0.36 ± 0.18 , 差异具有统计学意义($F = 17.25, P < 0.001$)。与 A 组相比, B、C 组小鼠结肠

组织中 Bim 蛋白的相对表达水平均显著升高, 差异具有统计学意义($q = 7.869\ 7, 5.605\ 9, P < 0.05$)。与 B 组相比, C 组小鼠结肠组织中 Bim 蛋白的相对表达水平差异无统计学意义($q = 2.260\ 0, P > 0.05$), 而 D 组则显著降低($q = 8.398\ 3, P < 0.05$)。与 C 组相比, D 组小鼠结肠组织中 Bim 蛋白的相对表达水平显著降低, 差异具有统计学意义($q = 6.138\ 3, P < 0.05$)。见图 3。

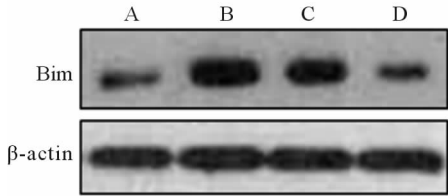


图 3 各组小鼠结肠组织中 Bim 蛋白的表达

3 讨论

UC 患者多伴有肠道炎症反应和肠道黏膜溃疡性损伤, 主要表现为腹痛、腹泻等^[7]。研究发现, UC 是诱发结直肠癌的危险因素^[8]。UC 的病因较为复杂, 其发病机制尚未完全阐明, 多数学者认为其发病机制可能与遗传、环境、免疫、肠道菌群失调及黏膜细胞过度凋亡等因素有关^[9-12]。UC 反复发作可能是因结肠黏膜细胞凋亡增多导致屏障功能受损所致^[13]。因此, 抑制肠道黏膜细胞凋亡可能对 UC 的肠道屏障修复起重要作用。本研究给予小鼠 2.5% TNBS 乙醇溶液灌肠构建 UC 模型, 通过慢病毒转染 miR-17 使之过表达抑制肠道黏膜细胞凋亡, 观察 UC 小鼠的症状及结肠黏膜病理变化, 并探究其机制。

本研究基于小鼠的症状、体征、DAI 评分和小鼠结肠组织病理学检查, 评价 UC 造模成功与否, 结果显示, 与正常小鼠相比, UC 模型小鼠出现明显的

UC 症状及体征,并且 DAI 评分明显升高,小鼠结肠组织出现明显病理损伤,表明 UC 小鼠模型造模成功。本研究观察了慢病毒介导 miR-17 过表达对 UC 小鼠的影响,并通过光镜观察各组小鼠结肠的病理变化,结果表明过表达 miR-17 可能减轻 UC 小鼠结肠组织的病理损伤,使得溃疡得到抑制并逐渐愈合。本研究结果表明,UC 小鼠结肠黏膜细胞的凋亡指数显著增加,导致溃疡加重,而过表达 miR-17 可使小鼠结肠黏膜细胞的凋亡指数明显下降;同时,本研究进一步验证了 Bim mRNA、PTEN mRNA 及 Bim 蛋白的表达情况,也得出上述结论。提示过表达 miR-17 可能是通过降低 Bim 蛋白表达而抑制了 PTEN/Akt 通路,下调 UC 小鼠结肠黏膜细胞的凋亡,从而使得 UC 小鼠的结肠组织溃疡受到抑制。

综上所述,过表达 miR-17 对 UC 小鼠具有保护作用,其机制可能与降低 Bim 蛋白表达及抑制 PTEN/Akt 通路有关,推测 miR-17 可能是 UC 的新靶点,但其具体机制还需要进一步探究。

参 考 文 献

- 1 赵红伟,赵芳霞,韩华,等. Poly I : C 对结肠炎小鼠黏膜通透性的影响[J]. 国际消化病杂志, 2017, 37(1): 45-48.
- 2 Zhang XJ, Yuan ZW, Qu C, et al. Palmatine ameliorated murine colitis by suppressing tryptophan metabolism and regulating gut microbiota [J]. Pharmacol Res, 2018, 137: 34-46.
- 3 Benhamou D, Labi V, Getahun A, et al. The c-Myc/miR17-92/PTEN axis tunes PI3K activity to control expression of recombination activating genes in early B cell development[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2715.
- 4 Yu Z, Wang C, Wang M, et al. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation[J]. J Cell Biol, 2008, 182(3): 509-517.
- 5 Gu P, Zhu L, Liu Y, et al. Protective effects of paeoniflorin on TNBS-induced ulcerative colitis through inhibiting NF-kappaB pathway and apoptosis in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 152-160.
- 6 Amiri M, Navabi J, Shokoohinia Y, et al. Efficacy and safety of a standardized extract from *Achillea wilhelmsii* C. Koch in patients with ulcerative colitis: A randomized double blind placebo-controlled clinical trial [J]. Complement Ther Med, 2019, 45: 262-268.
- 7 冯显清,梁川,刘然,等. 双歧杆菌三联活菌胶囊联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎患者免疫功能及肠黏膜屏障功能的影响[J]. 国际消化病杂志, 2018, 38(2): 144-147.
- 8 Chae JM, Chang MH, Heo W, et al. LB-9, Novel probiotic lactic acid bacteria, ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice by inhibiting TNF- α -mediated apoptosis of intestinal epithelial cells [J]. J Med Food, 2019, 22 (3): 271-276.
- 9 Karamanolis DG, Kyrilagkitis I, Konstantinou K, et al. The Bcl-2/Bax system and apoptosis in ulcerative colitis [J]. Hepatogastroenterology, 2017, 54(76): 1085-1088.
- 10 Yang Y, He J, Suo Y, et al. Anti-inflammatory effect of taurocholate on TNBS-induced ulcerative colitis in mice [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 81: 424-430.
- 11 Luo S, Wen R, Wang Q, et al. Rhubarb peony decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231(6): 39-49.
- 12 Deng S, Wang H, Fan H, et al. Over-expressed miRNA-200b ameliorates ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice through orchestrating epithelial-mesenchymal transition and inflammatory responses by channel of AKT2 [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 61: 346-354.
- 13 Ma J, Yin G, Lu Z, et al. Casticin prevents DSS induced ulcerative colitis in mice through inhibitions of NF- κ B pathway and ROS signaling [J]. Phytother Res, 2018, 32 (9): 1770-1783.

(收稿日期:2019-04-08)

(本文编辑:周骏)