

miR-34a 在过敏性鼻炎小鼠中表达及治疗的作用研究

谢伟伟,林秀联,龙 绮,孟 光,刘 硕

摘要 目的 探讨 miR-34a 在过敏性鼻炎小鼠中表达及治疗作用。方法 选取 10 只小鼠作为空白对照组,30 只小鼠采用卵清蛋白构建小鼠过敏性鼻炎模型,随机分为模型组、miR-34a 抑制剂组及阴性对照组(NC 组)各 10 例,分别给予 100 μ l 生理盐水、100 μ l 阴性转染质粒、100 μ l miR-34a 抑制剂载体混合溶液尾部静脉注射。干预 1 周后观察小鼠行为学变化;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测小鼠血清中卵清蛋白特异性 IgE 水平;qRT-PCR 检测小鼠血清中白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-10、IL-35,基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 及血管细胞黏附分子(VCAM)-1 mRNA 相对表达。流式细胞仪检测外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞含量。结果 模型小鼠血清 miR-34a mRNA 水平较空白组增加($P < 0.05$),与阴性对照组相比,miR-34a 抑制剂干预后小鼠行为学总分降低($P < 0.05$),血清中卵清蛋白特异性 IgE 浓度降低($P < 0.05$),同时 IL-6、IL-8、IL-10、MMP-2、MMP-9 及 VCAM-1 mRNA 下降($P < 0.05$),IL-35 上升($P < 0.05$),CD3⁺、CD4⁺/CD8⁺ 增加($P < 0.05$)。与空白对照组(NC 组)相比,模型组 IL-2、IFN- γ 水平下降($P < 0.05$),与模型组相比,miR-34a 抑制剂组 IL-2、IFN- γ 水平升高($P < 0.05$),miR-34a 抑制剂组与 NC 组的上述方面比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组和 NC 组比较差异无统计学意义。结论 miR-34a 在过敏性鼻炎小鼠中高表达,抑制 miR-34a 表达可减轻模型小鼠症状和炎症反应,提升免疫功能。

关键词 过敏性鼻炎;miR-34a;抑制剂;炎症因子;T 细胞

中图分类号 R 765.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0920-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.014

过敏性鼻炎属于鼻黏膜的变应性和炎症性疾病。其主要发病机制为患者暴露于变应原,从而介导 IgE 释放介质,激活多种免疫活性细胞释放细胞因子参与发病过程^[1]。临床表现为鼻痒、鼻塞、打喷嚏和流鼻涕等,显著影响患者生活质量。然而目

前尚不完全明确发病机制,药物治疗仅能缓解患者 80% 左右的症状。加之过敏性鼻炎极易复发,病情反复,给临床治疗带来一定障碍^[2]。因此,深入探索过敏性鼻炎的特异性标志物及寻找可靠有效的治疗靶点显得极为重要。近年研究^[3]显示微小 RNA (microRNA, miR) 参与了过敏性鼻炎发生发展过程。其中,miR-34 是一类研究较多的 miR 分子,在多种炎症性疾病发病中发挥重要作用,可促进炎症反应失衡^[4-5],促炎因子表达上升,抑炎因子表达下调^[6],但 miR-34 在过敏性鼻炎中表达罕见报道。因此,该研究旨在通过 qRT-PCR 检测过敏性鼻炎小鼠外周血 miR-34a 的表达水平,并采用 miR-34 抑制剂及阴性对照干预过敏性鼻炎小鼠,观察其对小鼠症状及炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 40 只 5~6 周龄的 SPF 级 BALB/c 小鼠,雌雄各 20 只,体质量 18~22 g;该研究中的动物实验得到武汉大学人民医院动物伦理委员会的批准。卵清蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司,ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司,血浆/血清 RNA 纯化试剂盒(GenElute™ Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit)购自美国 Sigma 公司,两步法实时定量 PCR 试剂盒(QuantiTect Reverse Transcription Kit)购自美国 Qiagen 公司,miR-34a 抑制剂购自广州锐博生物科技有限公司,NanoDrop 微量分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,ABI 7500 qRT-PCR 购自美国 Applied Biosystems 公司,流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司,miR-34a 和炎症因子的引物序列购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 动物分组及模型制备 选取 10 只作为空白对照组,余下 30 只 BALB/c 小鼠进行建模,建模方法为:500 μ g OVA 溶于 10 μ l 生理盐水配制成 OVA 溶液,腹腔注射隔天 1 次,连续 7 次。第 15 天开始激发实验,以 5% OVA 溶液双侧鼻腔点鼻,0.02 ml/侧,1 次/d,连续 7 次^[7-8]。空白对照组注射等量生理盐水,模型组于激发实验结束 15 min 内小鼠抓鼻次数明显增加,表明成功建立模型,将造模成功的

2022-03-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81160129);海南省自然科学基金(编号:811145);海口市重点科技计划项目(编号:海科工信立〔2012〕72号)

作者单位:中南大学湘雅医学院附属海口医院耳鼻喉头颈外科,海口 570208

作者简介:谢伟伟,女,硕士,副主任医师,责任作者,E-mail:1066156813@qq.com

30 只小鼠随机分为模型组、miR-34a 抑制剂组及阴性对照组(NC 组)。

1.3 干预方法 miR-34a 抑制剂组:造模结束后,小鼠尾部静脉注射 100 μ l miR-34a 抑制剂载体混合溶液,均连续给药 10 d;NC 组在小鼠尾部静脉注射 100 μ l 阴性转染质粒;模型组给予 100 μ l 生理盐水。

1.4 小鼠临床症状评分 干预结束后采用录像观察小鼠 30 min 的打喷嚏、挠鼻、鼻涕等症状。标准^[9]中①鼻痒,1 分:轻搔鼻 1~2 次;3 分:剧烈抓挠鼻面不止;2 分:介于二者之间。②喷嚏,1 分:1~3 个;2 分:4~10 个;3 分:11 个以上。③流涕,1 分:流至前鼻孔;2 分:超出前鼻孔;3 分:涕流满面,均采用叠加量化记分法。

1.5 血清 IgE 检测 干预后于眼眶静脉取血 2 ml。血样静置后离心,取上层血清 ELISA 检测 IgE 水平,严格按照试剂盒说明书操作进行。

1.6 血清总 RNA 的提取与 qRT-PCR 检测 运用 GenElute™ Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit 提取各组小鼠的血清的总 RNA。采用 NanoDrop 微量分光光度计测定总 RNA 浓度,同时计算 A_{260}/A_{280} 比值,计算纯度;通过 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测样品 RNA 完整性。采用 QuantiTect Reverse Transcription Kit 合成第一链互补 cDNA,采用 miScript SYBR GreenPCR Kit 进行 qRT-PCR 检测。采用 U6 作为 miR-34a 的内参,采用 GAPDH 作为炎症因子的内参,最后通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 miR-34a 和炎症因子 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
miR-34a	CCCGTTCGCACTGTCTAGC	GTGCAGGGTCCGAGGT
IL-6	CTGCAGAGACCTTCCATCCAG	GTGGTATAGACAGTTGG
IL-8	CATCTTCGTCCGTCCCTGTG	ACAGAACCTTCATTGCGGT
IL-10	TGTGAGAATAAAAGCAAG	CATTTCATGCCCTGTAGACACC
	GCACTG	
IL-35	CATCTGGCGTCTACACTGCT	ACTGAGGTGGTTAGAGGGC
	GCTGAA	AAGGG
MMP-2	CGTGATCCTATGGGCGCTC	GCGGAATTCACCTCGCTGGACA
	TCCTG	TCAGGG
MMP-9	CCTTTTGAGGGCGACCTCCAAG	CTGGATGACGATGTCTGCGT
VCAM-1	GATAGACAGCCCACTAAACG	TGGAGCCAAACACTTGAC
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTGCGT
GAPDH	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	GTCCACCACCTGTTGCTGTAG

1.7 流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达 干预结束后在无菌条件下于股静脉采集肝素

静脉血 2 ml。各流式管中加入 50 μ l 全血,振荡混匀,避光静置 15 min 后加 0.5 ml 溶血剂避光静置 10 min 后加入 250 μ l PBS。1 管加 4 色标记单克隆荧光抗 CD45-FITC/CD3-PC5/CD4-RD1/CD8-ECD 5 μ l,CD45⁺ 设门,分析 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞表达率。

1.8 Western blot 检测鼻黏膜组织中 IL-2、IFN- γ 表达 各组小鼠鼻黏膜组织加入少量胰蛋白酶消化后,加入蛋白裂解液快速混匀,运转离心机后保留上清液,放置在 75 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 使蛋白变性后放入样孔中,每组取 5 μ g 蛋白进行电泳实验。将蛋白转移到 PVDF 膜 TBS 浸泡 10 min,反复 PBS 冲洗,5 min/次,加入 1 抗 IL-2、IFN- γ 抗体(1:1 000)孵育过夜,后放入 2 抗辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG, (1:1 000) 杂交冲洗。浸入 ECL 工作液,检测、显色等步骤,成像系统对印迹条带的吸光度进行分析。 β -actin 作为内参。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计软件统计分析所有数据,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,采用 t 检验。组间差异比较采用单因素方差分析法,两两比较采用 LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠症状评分比较 与空白对照组相比,模型组评分增加($P < 0.05$),miR-34a 抑制剂组则降低,仍高于空白对照组,但显著低于 NC 组($P < 0.05$),NC 组与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

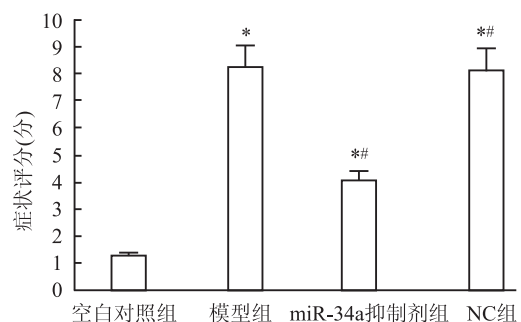


图 1 各组小鼠症状评分比较

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.2 各组血清 IgE 水平 与空白对照组相比,模型组血清 IgE 水平增加($P < 0.05$),miR-34a 抑制剂组则降低,仍高于空白对照组,但低于 NC 组($P < 0.05$),NC 组与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

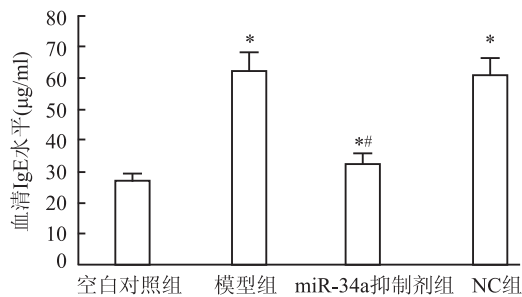


图2 各组血清 IgE 水平

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.3 各组炎症因子 mRNA 表达情况 与空白对照组相比,模型组 IL-6、IL-8、IL-10、MMP-2、MMP-9 及 VCAM-1 mRNA 增加 ($P < 0.05$), IL-35 下降 ($P < 0.05$),与模型组相比,miR-34a 抑制剂组 IL-6、IL-8、IL-10、MMP-2、MMP-9 及 VCAM-1 mRNA 下降,但 miR-34a 抑制剂组低于 NC 组 ($P < 0.05$), IL-35 上升,但 miR-34a 抑制剂组高于 NC 组 ($P < 0.05$), NC 组与模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表2 各组炎症因子 mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

项目	空白对照组	模型组	miR-34a 抑制剂组	NC 组
IL-6	0.997 ± 0.021	2.107 ± 0.103 *	1.305 ± 0.027 * # &	2.086 ± 0.089 *
IL-8	1.003 ± 0.025	2.207 ± 0.112 *	1.362 ± 0.031 * # &	2.193 ± 0.092 *
IL-10	0.983 ± 0.023	1.869 ± 0.098 *	1.294 ± 0.027 * # &	1.904 ± 0.083 *
IL-35	0.994 ± 0.026	0.267 ± 0.006 *	0.867 ± 0.017 * # &	0.254 ± 0.005 *
MMP-2	1.009 ± 0.024	2.561 ± 0.121 *	1.407 ± 0.036 * # &	2.607 ± 0.126 *
MMP-9	0.978 ± 0.017	2.392 ± 0.119 *	1.383 ± 0.034 * # &	2.405 ± 0.022 *
VCAM-1	0.967 ± 0.015	2.084 ± 0.105 *	1.347 ± 0.024 * # &	2.104 ± 0.106 *

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC 组比较:& $P < 0.05$

2.4 各组小鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达

与空白对照组相比,模型组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 下降,与模型组相比,miR-34a 抑制剂组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 增加,但 miR-34a 抑制剂组高于 NC 组 ($P < 0.05$), NC 组与模型组无差异 ($P > 0.05$)。见表 3 及图 3、4。

2.5 Western blot 检测各组小鼠鼻黏膜组织中 IL-2、IFN-γ 表达

与空白对照组相比,模型组 IL-2、IFN-γ 水平下降 ($P < 0.05$),与模型组相比,miR-34a 抑制剂组 IL-2、IFN-γ 水平升高,miR-34a 抑制剂组高于 NC 组 ($P < 0.05$),模型组与 NC 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4、图 5。

3 讨论

过敏性鼻炎是患者暴露于致敏原后导致的鼻黏膜慢性非感染性炎症性疾病,主要由 IgE 介导释放组胺及免疫和细胞因子引起。过敏性鼻炎发病受到基因和环境等多重因素的影响,基因表达异常是主要病理机制^[10],但其机制尚未完全阐明清楚,microRNAs 是一类长度约 19 ~ 23 nt 的非编码 RNA 分子,但到近年来,其广泛的生物学调控功能才逐渐被揭示出来,可与靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合体 (RISC) 降解 mRNA 或阻碍其翻译转录后的调控,参与多种细胞增殖、分化和凋亡等诸多生理过程^[11]。

miR-34 属于一类在哺乳动物中广泛分布的高度保守 miRNA 家族。miR-34a 定于 lp36.22,目前发现 miR-34a 在气道变应性疾病中发挥重要作用,

表3 各组小鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达 ($\bar{x} \pm s$, %)

项目	空白对照组	模型组	miR-34a 抑制剂组	NC 组
CD3 ⁺	66.231 ± 5.233	52.148 ± 5.033 *	60.324 ± 5.371 * # &	51.876 ± 4.907 *
CD4 ⁺	36.622 ± 3.212	29.363 ± 2.187 *	33.687 ± 3.204 * # &	30.542 ± 2.864 *
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.870 ± 0.112	1.215 ± 0.102 *	1.591 ± 0.119 * # &	1.257 ± 0.114 *

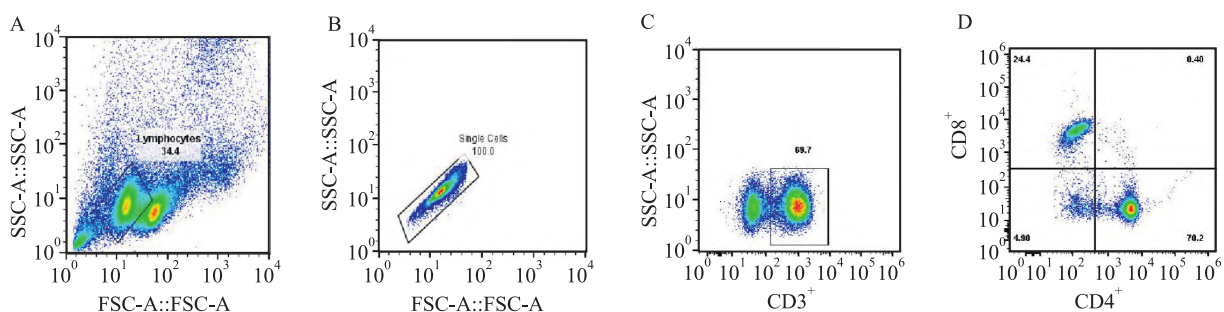
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC 组比较: & $P < 0.05$ 

图3 流式细胞仪检测圈门策略 ×20

A、B:圈门策略图;C、D:CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 表达情况

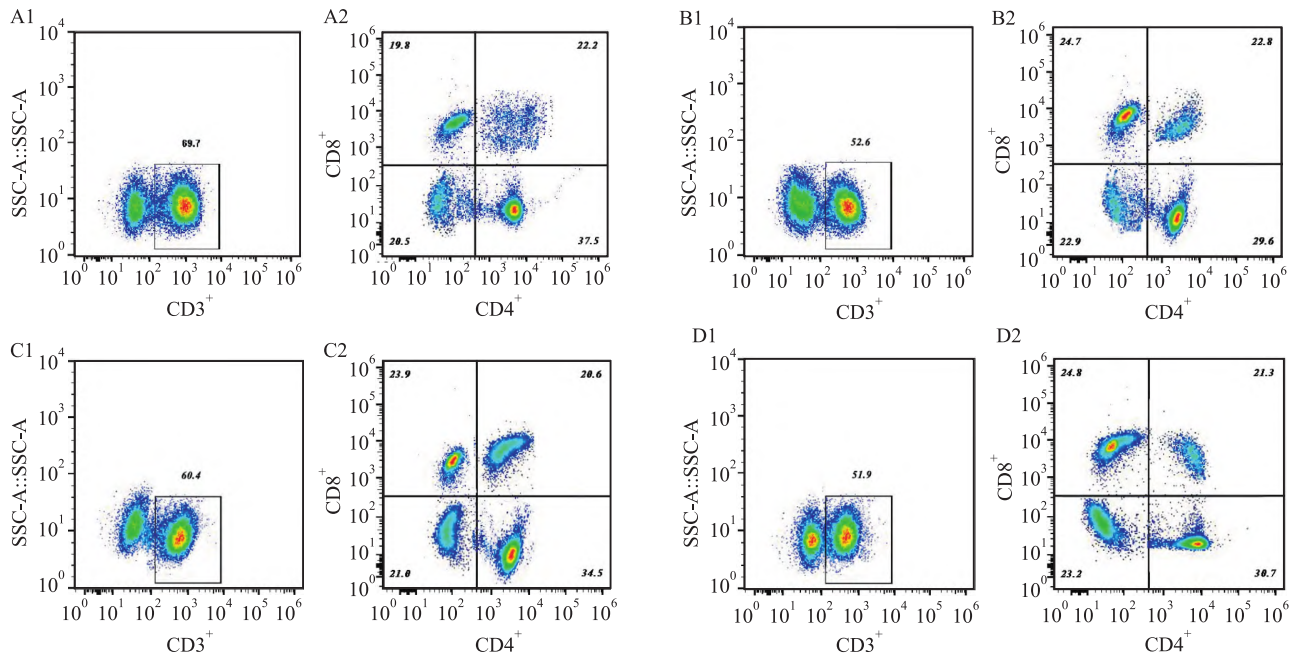
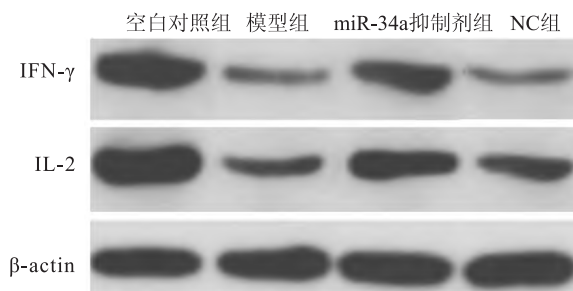


图4 各组流式细胞术检测结果代表图 ×20

A:空白对照组; B:模型组; C:miR-34a抑制剂组; D:NC组; 1:各组CD3⁺表达情况; 2:各组CD4⁺、CD8⁺表达情况表4 各组小鼠血清中IL-2、IFN- γ 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2 (ng/L)	IFN- γ (ng/L)
空白对照	10	11.44 \pm 2.05	45.13 \pm 7.16
模型	10	6.25 \pm 1.21 *	36.16 \pm 4.97 *
miR-34a抑制剂	10	9.05 \pm 0.46 * [#]	40.67 \pm 3.01 * [#]
NC	10	6.11 \pm 1.45 *	37.46 \pm 3.67 *
F值		33.110	6.424
P值		<0.001	0.0013

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与NC组比较:[&] $P < 0.05$ 图5 各组小鼠鼻黏膜组织中IL-2、IFN- γ 表达

Solberg et al.^[12] 研究显示 miR-34s (miR-34c-5p、miR-34b-5p) 在哮喘患者的支气管上皮细胞中的表达显著下调。该研究采用 OVA 造模过敏性鼻炎小鼠, 小鼠均表现出明显的挠鼻、喷嚏和流涕, 叠加各项分数计算总分大于 5 分, 说明造模成功。随后通过 qRT-PCR 检测小鼠外周血 miR-34a 的表达水平, 结果显示, 与空白对照组小鼠比较, 模型组小鼠的

miR-34a 相对表达水平增加 ($P < 0.05$)。提示 miR-34a 可能参与过敏性鼻炎的病理过程, 由于血清中都稳定存在大量特异性表达的 microRNAs, 外周血可重复快速获得, 使得 qRT-PCR 检测结果更快获取到, 技术成本较低, 可操作性高, 为了进一步探讨特异性 miR-34a 对小鼠过敏性鼻炎的治疗作用, 该研究采用特异性 miR-34a 抑制剂及任意序列的阴性对照物滴鼻干预小鼠过敏性鼻炎, 首先评估对临床症状的改善情况, 结果显示, miR-34a 抑制剂治疗过敏性鼻炎组小鼠的临床症状评分显著下降, 低于模型组, 但仍高于空白对照组 ($P < 0.05$)。接下来笔者继续比较各组血清 IgE 水平, 结果显示, 模型组血清 IgE 水平增加 ($P < 0.05$), miR-34a 抑制剂组则降低, 但仍高于空白对照组 ($P < 0.05$), 血清 IgE 升高是过敏性疾病最有力的提示, 过敏原刺激产生的 IgE 与肥大细胞、嗜酸性粒细胞等表面相应受体结合, 诱导过敏性炎症^[13]。已经有研究^[14] 显示 IL-4 及 IL-2 在过敏性鼻炎中也起到关键性的作用, IFN- γ 分泌的下调会增加过敏性疾病发病的可能, 患严重哮喘的患者接触过敏原后常呈现出的 IFN- γ 下调。该研究表明抑制 miR-34a 表达可有效缓解变应性免疫反应, 炎症反应是过敏性鼻炎发病的主要特征。该研究表明模型组小鼠促炎因子 IL-6、IL-8、IL-10、MMP-2、MMP-9 及 VCAM-1 mRNA 上调, 抑炎因子 IL-35 下调, 在注射 miR-34a 抑制剂后则逆转了

促炎因子和抑炎因子的变化。IL-6 和 IL-10 均为常见的促炎因子,参与免疫耐受维持作用,两者均在过敏性鼻炎患者中表达上调,参与炎症疾病进展。IL-35 由 IL-12a、EB 病毒诱导基因 3 亚基构成,具有免疫抑制/抑炎活性^[15]。MMP-2 和 MMP-9 属于 MMP 家族,可促进炎症细胞向气道黏膜固有层浸润激活的炎症细胞通过表达释放 MMP-2 和 MMP-9,形成正反馈,促进炎症反应。而 I 型血管细胞黏附蛋白(VCAM-1)与嗜酸性粒细胞表面受体结合从而黏附于血管壁,促进嗜酸性粒细胞的迁移,参与变态反应。该研究表明抑制 miR-34a 表达可抑制炎症反应,Tregs 在变态反应性疾病的免疫调节中发挥十分重要的作用,机体发生炎症后,外周血中 CD3⁺ 及 CD4⁺ 降低,提示免疫功能下降,而在抑制 miR-34a 表达则可提升 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 表达率,表明抑制 miR-34a 后提高了小鼠免疫功能。

综上所述,miR-34a 抑制剂有效缓解小鼠过敏性鼻炎的临床症状和炎症水平,提示 miR-34a 作为基因治疗小鼠过敏性鼻炎具有巨大潜力,但该研究尚未观察其安全性,今后研究中需进一步研究安全性。

参考文献

- [1] 杨一兵,李欣,王秦,等. 大气 PM_{2.5} 暴露对太原市过敏性鼻炎患者氧化应激水平的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(1):64.
- [2] 刘扬滨,赖志华,黄锦葵. 粉尘螨滴剂和氯雷他定联合治疗小儿过敏性鼻炎的疗效分析[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(5):681-3.
- [3] 唐桥斐,张爽,王岷,等. MiR-155-5p 介导 Treg/Th17 免疫失衡致变应性鼻炎机制研究[J]. 现代免疫学, 2019, 39(2):126-32.
- [4] Wu J, Li X, Li D, et al. MicroRNA-34 family enhances wound inflammation by targeting LGR4[J]. 2020, 21(4):333-7.
- [5] 周珍慧. miR-34/449 调控哮喘气道炎症及与自噬相关性研究[D]. 上海:第二军医大学, 2017:21-6.
- [6] 李朝晖,张建辉,陈玉芝,等. IgE 在过敏性鼻炎患者鼻黏膜中的表达及意义[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(10):1238-40.
- [7] 叶茂宇,谭国林. 变应性鼻炎小鼠造模方法研究进展[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 54(9):712-6.
- [8] Liang C, Yang Z, Zou Q, et al. Construction of an irreversible allergic rhinitis-induced olfactory loss mouse model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513(3):635-41.
- [9] 杨贵,邱书奇,祝小红,等. PLGA 为佐剂的螨变应原纳米疫苗治疗小鼠过敏性鼻炎研究[J]. 生物医学工程与临床, 2017, 21(2):195-200.
- [10] 续珊,陈始明,焦沃尔,等. 变应性鼻炎发病机制研究的新进展[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(6):1180-3.
- [11] Rupaimoole R, Slack F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3):203-22.
- [12] Solberg O D, Osuin E J, Love M I, et al. Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(10):965-74.
- [13] 王佑图,王学艳,刘娜,等. 过敏性鼻炎患者总 IgE、嗜酸性粒细胞和特异性 IgE 结果分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(8):1265-8.
- [14] 努尔阿米娜·铁力瓦尔迪,热依拉·牙合甫,韩利梅,等. 血清 IL-33、IFN- γ 与 IgE 在支气管哮喘患者中的表达及临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(1):15-8.
- [15] 李军,陈力学,沈暘,等. IL-35 在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉组织的表达与意义[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(2):247-50, 255.

Study on the expression and therapeutic effect of miR-34a in mice with allergic rhinitis

Xie Weiwei, Lin Xiulian, Long Qi, Meng Guang, Liu Shuo

(Dept of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated to Xiangya Medical College, Central South University, Haikou Hospital, Haikou 570208)

Abstract Objective To investigate the expression and therapeutic effects of miR-34a in mice with allergic rhinitis. **Methods** 10 mice were selected as blank control group, and 30 mice were used to construct mouse allergic rhinitis model with ovalbumin. They were randomly divided into model group, miR-34a inhibitor group and negative control group (NC group) with 10 cases each. 100 μ l of physiological saline, 100 μ l of negative transfection plasmid, and 100 μ l of miR-34a inhibitor carrier mixed solution were injected into the tail vein respectively. The behavioral changes of mice after 1 week of intervention were observed; ELISA was used to detect the level of ovalbumin-specific IgE in mouse serum; qRT-PCR was used to detect interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, and IL-35, the relative expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1

网络出版时间:2022-05-28 14:49 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220526.1017.015.html

SETD2 在肾透明细胞癌中的表达及对患者预后的影响

胡庆庆,刘浩然,王建忠

摘要 目的 探究组蛋白甲基化转移酶(SETD2)在肾透明细胞癌(ccRCC)中的表达及其对患者预后的影响,讨论其可能的调控机制。方法 从肿瘤基因组计划数据库(TCGA)中下载 ccRCC 患者的基因突变数据、转录组数据和临床数据,使用 R 软件 v 4.0.3 对基因表达差异进行统计分析,用 Kaplan-Meier 绘图仪研究并比较不同免疫浸润情况及对应 SETD2 表达情况与患者总生存期(OS)、无进展生存期(PFS)、无病生存期(DFS)等方面预后的关系,结合临床数据进行验证,揭示 SETD2 突变调控 ccRCC 进展的潜在机制。结果 TIMER2 分析结果显示,SETD2 表达在 ccRCC 中显著下调且与免疫浸润相关,ccRCC 基因突变景观图显示 SETD2 突变频率达 12.5%,位列体细胞突变频率第 4。ccRCC 患者中,SETD2 高表达组较低表达组预后更佳,高免疫浸润组患者较低免疫浸润组患者预后更佳。结论 SETD2 高表达可增加 ccRCC 患者中免疫细胞的浸润及其对肿瘤的杀伤作用,从而对患者预后发挥积极作用。

关键词 SETD2;肾透明细胞癌;预后

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0925-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.015

2022-04-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81500521)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

作者简介:胡庆庆,女,硕士研究生;

王建忠,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

wangjz1905@126.com

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)为泌尿系第 2 大恶性肿瘤,发生率仅次于膀胱癌;肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)作为 RCC 中的最常见亚型^[1],占有 RCC 病理类型的 70%~80%。ccRCC 早期较难发现,且对放化疗不敏感,对于晚期患者,多依赖于免疫治疗。然而,由于肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)存在高度异质性且适应性极强,常出现耐药现象,治疗效果不尽理想^[2]。TME 及其免疫细胞浸润情况对肿瘤进展影响极大^[3-4]。组蛋白甲基化转移酶(histone methyltransferase, SETD2)在多种人类肿瘤中存在突变,其表达缺失可能与患者预后差显著相关;然而作为经典的免疫相关调节分子,SETD2 表达缺失在 ccRCC 肿瘤组织免疫浸润方面的调节及进一步对患者预后的影响有待研究。

1 材料与方法

1.1 数据资料 利用肿瘤基因组计划数据库(the cancer genome atlas, TCGA)中 ccRCC 数据集分析基因表达、基因突变数据。从基因组数据共享(genomic data commons, GDC)数据门户网站下载肿瘤 RNA-seq 数据((https://portal.gdc.cancer.gov/),系统地获取 33 种类型肿瘤的 SETD2 表达谱 mRNA 表达数据。此外,该研究从 TCGA 数据库中下载

mRNA. The content of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells in peripheral blood was detected by flow cytometry. **Results** The serum level of miR-34a mRNA in model mice was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, the total behavioral score of mice after miR-34a inhibitor intervention was significantly reduced ($P < 0.05$). The concentration of ovalbumin-specific IgE was significantly reduced ($P < 0.05$), while IL-6, IL-8, IL-10, MMP-2, MMP-9 and VCAM-1 mRNA were significantly reduced ($P < 0.05$), IL-35 increased significantly ($P < 0.05$), and CD3⁺, CD4⁺/CD8⁺ increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the levels of IL-2 and IFN- γ in the model group decreased ($P < 0.05$); compared with the model group, the levels of IL-2 and IFN- γ in the miR-34a inhibitor group and NC group increased ($P < 0.05$); those indexes of miR-34a inhibitor group and NC group were compared, and there were statistically significant differences ($P < 0.05$); there was no difference between the model group and NC group. **Conclusion** miR-34a is highly expressed in mice with allergic rhinitis. Inhibition of miR-34a expression can significantly reduce the symptoms and inflammation of model mice, and improve immune function.

Key words allergic rhinitis; miR-34a; inhibitors; inflammatory factors; T cells