

## 【药效学评价】

氧化苦参碱通过胰腺星状细胞中 miRNA-211-5p 调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路调控炎症反应李如月<sup>1,2</sup>, 向晓辉<sup>2</sup>, 张 斌<sup>2</sup>, 张 青<sup>2</sup>, 夏时海<sup>1,2\*</sup>

1. 新乡医学院, 河南 新乡 453003

2. 武警后勤学院附属医院 消化二科/肝胆胰脾中心, 天津 300162

**摘要:** 目的 探讨氧化苦参碱(OM)是否通过胰腺星状细胞株(LTC-14)中 miR-211-5p 调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路调控炎症反应。方法 用生物预测、文献分析筛选出目的 miR; 脂多糖(LPS)刺激 LTC-14 细胞制备炎症模型, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)法检测 miR 的变化以及 OM 对其的调节作用; 通过转染 mimics 和 inhibitor 来过表达和低表达目的 miR 后, 以 Western Blotting 法、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)法检测 LTC-14 细胞中 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关分子(TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B)的表达情况, ELISA 法检测细胞上清中炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达情况。结果 经生物信息学预测筛选出的目的 miR 为 miR-211-5p; 与对照组比较, LPS 刺激 LTC-14 细胞后 miR-211-5p 表达明显下降 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 经 OM 干预后 miR-211-5p 表达显著上升 ( $P < 0.001$ )。过表达 miR-211-5p 后, TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 和蛋白水平, 以及炎症因子 TNF- $\alpha$  表达显著下降 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 低表达 miR-211-5p 后, TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 和蛋白水平, 以及炎症因子 TNF- $\alpha$  表达上升 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。结论 PSCs 中的 miR-211-5p 通过调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调节炎症反应, OM 可以调节炎症模型中 miR-211-5p 的表达, OM 调节炎症反应的作用机制可能是通过 miR-211-5p 调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路实现的。

**关键词:** miR-211-5p; 氧化苦参碱; TLR4; 胰腺星状细胞; 炎症反应**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)04-0540-07**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.04.007Oxymatrine participates in regulation of TLR4/NF- $\kappa$ B inflammatory response pathway via miRNA-211-5p in PSCsLI Ruyue<sup>1,2</sup>, XIANG Xiaohui<sup>2</sup>, ZHANG Bin<sup>2</sup>, ZHANG Qing<sup>2</sup>, XIA Shihai<sup>1,2</sup>

1. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

2. Department of Hepatopancreatobiliary and Splenic Medicine, Affiliated Hospital, Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

**Abstract: Objective** To investigate the anti-inflammatory mechanism of oxymatrine (OM) on targeting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway by regulating miRNA-211-5p in LTC-14 cells. **Methods** The target miRNAs were screened by biological prediction and literature analysis. Lipopolysaccharide (LPS) stimulates LTC-14 cells to prepare inflammatory models, and miRNAs expression variation and the regulation of OM were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). Up-regulation and down-expression of miRNAs were manufactured by mimics and inhibitor transfection. The expression of related molecules (TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B) in TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway of LTC-14 cells was detected by Western blotting and RT-qPCR. The expression of inflammatory factor TNF- $\alpha$  was detected by ELISA assay in cell supernatant. **Results** miRNA-211-5p was chosen as target for further study after bioinformatics screening. The expression of miR-211-5p in LTC-14 cells stimulated by LPS decreased significantly ( $P < 0.001$ ) compared with the control group. The decreased expression of miRNA-211-5p induced by LPS was promoted

**收稿日期:** 2017-09-05**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(81173393); 天津市应用基础与前沿技术计划项目(17JCYBJC26700); 新乡医学院研究生创新基金(YJSCX201651Y)**第一作者:** 李如月(1989-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为消化内科研究。Tel: 13103939143 E-mail: ruyue\_li@163.com**\*通信作者:** 夏时海(1971-), 男, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为消化内科研究。Tel: (022) 60578929 E-mail: xshhc@sina.com

by OM administration ( $P < 0.001$ ) compared with the model group. After up-regulating of miRNA-211-5p, the expression of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway related molecules (TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B) and TNF- $\alpha$  decreased significantly ( $P < 0.05$ , 0.01, and 0.001). After down-regulation of miRNA-211-5p, the expression of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B TNF- $\alpha$  were increased ( $P < 0.05$ , 0.01, and 0.001). **Conclusion** OM can modulate TLR4/NF- $\kappa$ B inflammatory response signaling pathway by regulating the expression of miRNA-211-5p in the PSCs.

**Key words:** miRNA-211-5p; oxymatrine; Toll-like receptor 4; pancreatic stellate cells; inflammatory reaction

慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 是多种病因引起的以胰腺组织和功能不可逆性改变为特征的慢性炎症性疾病, 其发病率有逐年增高的趋势<sup>[1]</sup>。CP 发病机制尚未明确, 临床上缺乏有效的治疗方法阻止疾病进展, 目前其治疗仍是缓解症状和控制并发症<sup>[3-5]</sup>。胰腺纤维化是 CP 的主要病理生理过程<sup>[2]</sup>, 近年来研究表明, 在胰腺纤维化发生和发展过程中, 胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 活化发挥着关键作用, 是多种诱因作用的靶点<sup>[6-8]</sup>, 先后有多类药物研究用于抑制 PSCs 激活和激活后的致纤维化效应<sup>[9]</sup>。由于氧化苦参碱 (oxymatrine, OM) 具有免疫调控及抗纤维化作用<sup>[10-15]</sup>, 因此 OM 很有可能对 CP 有治疗作用。

Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是模式识别受体家族关键受体 (PRRs) 的一种, 可受细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 激活, 启动机体炎症链式反应, 从而促进炎症介质产生和释放<sup>[16]</sup>。近年来研究显示, TLR4 在人体胰腺组织中表达, 可能在胰腺炎发病中发挥作用<sup>[17]</sup>。miRNAs (miRs) 是一类高度保守的非编码小 RNA, 可调控基因表达, 参与细胞增殖、凋亡、分化、代谢、发育、肿瘤转移等多种生物学过程<sup>[18-19]</sup>。近些年, miRs 的功能被详细研究, 特别是在调控 TLR 信号通路和炎症反应方面起到最重要的作用<sup>[20]</sup>, miRs 在慢性胰腺炎的作用也得到广泛重视和研究<sup>[21]</sup>。

基于上述研究, 本实验主要探讨目的 miRs 在 LPS 刺激 PCSs 后的变化及目的 miR 对 TLR4 的影响, 同时观察 OM 是否通过影响 miRs 阻断 TLR4 信号通路。通过对 TLR4 通路及 miRs 以及 OM 的相关研究, 探寻胰腺纤维化的具体机制, 为以后胰腺纤维化的相关治疗寻找新的分子靶点。

## 1 材料

### 1.1 药物及主要试剂

LPS、OM, 购自 Sigma 公司; 胎牛血清, 购自 Gibco 公司; 青链霉素混合液, 购自 Solarbio 公司; IMDM 培养基, 购自 HyClone 公司; 胰酶消化液、

750 mL/L 乙醇 (分析纯)、氯仿 (分析纯)、异丙醇 (分析纯)、DEPC 水、BCA 蛋白定量试剂盒, 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; TRIzol, 购自 Invitrogen 公司; 实时荧光定量 PCR 扩增试剂盒和逆转录试剂盒, 购自北京全式金生物技术有限公司和苏州吉玛基因股份有限公司; ECL 显色试剂盒, 均购自万类生物科技有限公司; NF- $\kappa$ B、MyD88、 $\beta$ -actin 单克隆一抗, 购 Proteintech 公司; ELISA 试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 主要仪器

ABI 7500 PCR 仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, 美国); ABI 2720 PCR 仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, 美国); JY92-IIIDN 超声波细胞粉碎仪 (新芝生物科技股份有限公司); 1510-01959 全波长酶标仪 (Thermo Fisher, Waltham, MA, 美国); 电转仪 (Bio-Rad, 美国); 垂直板电泳槽 (Bio-Rad, 美国); 5200 自动荧光/化学发光成像仪 (天能科技有限公司); 细胞培养箱 (Thermo Fisher, Waltham, MA, 美国); 超净工作台 (新苗医疗器械制造有限公司); -80 °C 超低温冰箱 (日本 Sanyo); CKX41 倒置相差显微镜 (日本 Olympus)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

胰腺星状细胞株 (LTC-14), 由德国 Rostock 大学医院的 Robert Jaster 教授惠赠<sup>[22]</sup>。细胞在含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱 (相对湿度为 95%) 中培养。待细胞生长到培养瓶约 70%~80% 密度时, 用 0.25% 胰酶将细胞消化后传代。取对数生长期细胞用于实验研究。

### 2.2 炎症细胞模型的制备与用药刺激

在 6 孔板中将细胞培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中, 待细胞生长到培养瓶约 70%~80% 密度时, 更换为无血清的 IMDM 培养基 2 mL 继续培养 4 h。对照组: 不加药处理; LPS 组: 加入 10  $\mu$ g/mL LPS 20  $\mu$ L 刺激 3 h; OM+LPS 组: 预加入 0.5 mg/mL OM 10  $\mu$ L, 30 min 后加入 10  $\mu$ g/mL LPS 20  $\mu$ L 刺激 3

h; OM 组: 加入 0.5 mg/mL 10  $\mu$ L OM 刺激 3 h<sup>[23]</sup>。

### 2.3 生物预测

利用 TargetScan7 ([http://www.targetscan.org/vert\\_70/](http://www.targetscan.org/vert_70/)) 进行生物预测靶向 TLR4 的 miR, 并查阅相关文献/微阵列数据<sup>[24]</sup>进行筛选。

### 2.4 实时荧光定量 (qRT-PCR) 法测定 OM 对 miR-211-5p 表达的影响

将“2.2”项各组细胞按 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 取 1  $\mu$ g RNA 按反转录试剂盒说明书进行逆转录反应合成 cDNA。用 ABI 7500 PCR 仪按 qPCR 说明书将 cDNA 进行 PCR 扩增, 以 U6 为内参。95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后进行循环扩增, 95  $^{\circ}$ C 变性 12 s, 60  $^{\circ}$ C 退火加延伸 40 s, 共 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析, miRNA 的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的形式表示。miR-211-5p 引物由苏州吉玛基因股份有限公司设计, 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

| 引物                         | 引物序列 (5'→3')            |
|----------------------------|-------------------------|
| RmiR-211-5p-forward        | CAGTGCTGTCCCTTTGTCATC   |
| RmiR-211-5p-reverse        | TATGGTTGTTACGACTCCTTCAC |
| R-U6 (内参)-forward          | ATTGGAACGATACAGAGAAGATT |
| R-U6 (内参)-reverse          | GGAACGCTTCACGAATTTG     |
| TLR4-forward               | GGAGTACAAAACCTCTGCGCC   |
| TLR4-reverse               | ACTTCCTTGTCGCCCTGTGAG   |
| MYD88-forward              | ATGGTGGTGGTTGTCTCTGATG  |
| MYD88-reverse              | GACAGGATGAACCTCAGGATGC  |
| NF- $\kappa$ B p65-forward | CATACGCTGACCCTAGCCTG    |
| NF- $\kappa$ B p65-reverse | TTTCTTCAATCCGGTGGCGA    |
| $\beta$ -Actin -forward    | TGCCTGACGGTCAGGTCA      |
| $\beta$ -Actin -reverse    | CAGGAAGGAAGGCTGGAAG     |

### 2.5 转染 oligo

将 LTC-14 细胞接种于 6 孔板中, 加入 1.8 mL 培养基, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 细胞密度达 70% 时用于转染。转染前 4 h 将细胞培养基换成不含血清、不含抗体的新鲜培养基。转染的基本步骤: 先将 5  $\mu$ L X-treme GENE HP DNA 转染试剂、5  $\mu$ L oligo (miR-211-5p mimics、mimics NC、inhibitor、inhibitor NC) 加入 200  $\mu$ L 的 IMDM 中混匀室温静置 15 min, 将 DNA-lipo 复合体逐滴均匀地加入细胞培养液中, 4~6 h 后用含有血清、抗体的新鲜培养基, 终止转染。转染 miR-211-5p mimics、inhibitor 分别过表达、低表达 miR-211-5p, 并分别转染 mimics NC、inhibitor NC 作阴性对照。相应的 miRNA 的序列见表 2。

表 2 miR-211-5p 过表达/低表达引物序列

Table 2 Primer sequences of miR-211-5p over/low expression

| 引物                   | 引物序列 (5'→3')           |
|----------------------|------------------------|
| miR-211-5p           | UUCCCUUUGUCAUCCUUUGCCU |
| mimics -sense        |                        |
| miR-211-5p           | GCAAAGGAUGACAAAGGGAAUU |
| mimics -antisense    |                        |
| mimics NC-sense      | UUCUCCGAACGUGUCACGUTT  |
| mimics NC-antisense  | ACGUGACACGUUCGGAGAATT  |
| miR-211-5p inhibitor | AGGCAAAGGAUGACAAAGGGAA |
| inhibitor NC         | CAGUACUUUGUGUAGUACAA   |

miR-211-5p mimics 转染 0、24、48、72 h 后提取 RNA 和蛋白, 检测 miR-211-5p 和 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平, 确定转染后最佳检测时间; 于转染 72 h 后, 检测细胞中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 水平, 上清中 TNF- $\alpha$  水平。miR-211-5p inhibitor 转染 72 h 后提取细胞 RNA 和蛋白, 检测 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白水平, 上清中 TNF- $\alpha$  水平。

### 2.6 qRT-PCR 法测定 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 表达

将各组细胞按 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 取 1  $\mu$ g RNA 按反转录试剂盒说明书进行逆转录反应合成 cDNA。用 ABI 7500 PCR 仪按 qPCR 说明书将 cDNA 进行 PCR 扩增, mRNA 以  $\beta$ -actin 为内参。94  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 然后进行循环扩增, 94  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 34 s, 共 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析。mRNA 的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的形式表示。引物序列见表 1。

### 2.7 Western blotting 法 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达

用 RIPA 裂解提取细胞总蛋白, 经 BCA 法蛋白定量, 经变性蛋白电泳、转膜, 牛奶封闭 2 h, 一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 摇床洗膜 3 次, 每次 15 min; 二抗室温摇床孵育 2 h, TBST 摇床洗膜 3 次, 每次 15 min。ECL 法化学发光经 Tanon 5 200 全自动化学发光图像分析系统拍摄图像后进一步分析, Image J 软件灰度比较分析。

### 2.8 ELISA 法测定 TNF- $\alpha$ 表达水平

将细胞 3 000 r/min 离心 20 min 后, 取上清。每孔取 50  $\mu$ L 上清按照说明书依次加入生物素抗原、亲和素, 分别于 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min; 洗板后加入显色液 A、B, 37  $^{\circ}$ C 避光显色 10 min; 加入终止液,

立即以空白孔调零, 450 nm 波长测量吸光 ( $A$ ) 值。用四参数 (logistic 曲线) 做标准曲线, 用 mELISA 进行计算 TNF- $\alpha$  含量。

## 2.9 统计学处理

使用 GraphPad Prism 6 统计学软件分析处理数据, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 生物预测

TargetScan7 是一个常用的功能性 miRs 靶基因生物预测网站。用 TargetScan7 网站, 预测大鼠源以 TLR4 为靶目标的 miRs; 参考安捷伦芯片实验结果<sup>[23]</sup>, 筛选出 PSCs 激活后发生变化的 miRs。通过网站分析找出结合位点较为稳定的 miRs, 并找出芯片中变化倍数较大的 miRs 取交集, 最终选择 miR-211-5p 进行实验。

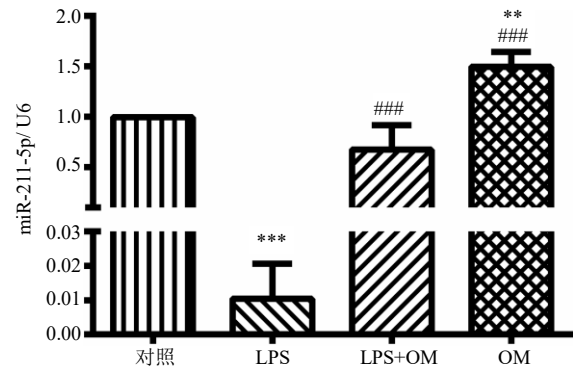
### 3.2 OM 对 LPS 诱导的 LTC-14 细胞 miR-211-5p 表达的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, LPS 组 miR-211-5p 的表达量明显下降, 差异显著 ( $P < 0.001$ )。与 LPS 组比较, (LPS+OM) 组 miR-211-5p 的表达量显著回升 ( $P < 0.001$ ); 与对照组和 LPS 组比较, OM 组 miR-211-5p 的表达量明显上升 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

### 3.3 miR-211-5p 对 TLR4 通路的影响

**3.3.1 过表达 miR-211-5p 对 TLR4 通路的影响** 与 0 h 组比较, PSCs 中 miR-211-5p 的表达量在转染 48、72 h 后显著升高 ( $P < 0.001$ ), 在转染 48 h 后效率最强, 结果见图 2。

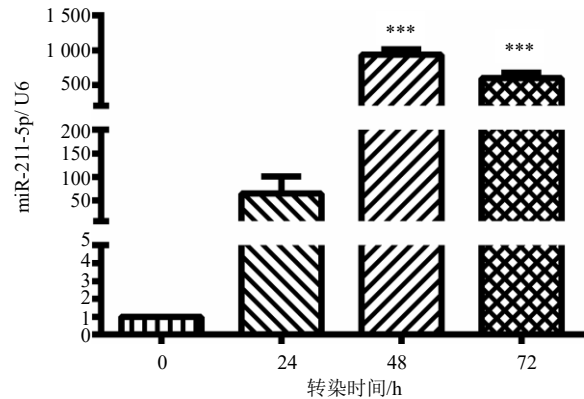
如图 3 所示, miR-211-5p mimics 分别转染 0、24、48、72 h 后, TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的各节点分子 (TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B) 蛋白表达水平随着



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 LPS 组比较: ### $P < 0.001$   
\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ### $P < 0.001$  vs LPS group

图 1 OM 对 LPS 诱导的 LTC-14 细胞 miR-211-5p 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Fig. 1 Effects of OM on miR-211-5p expression after LPS stimulation in PSCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

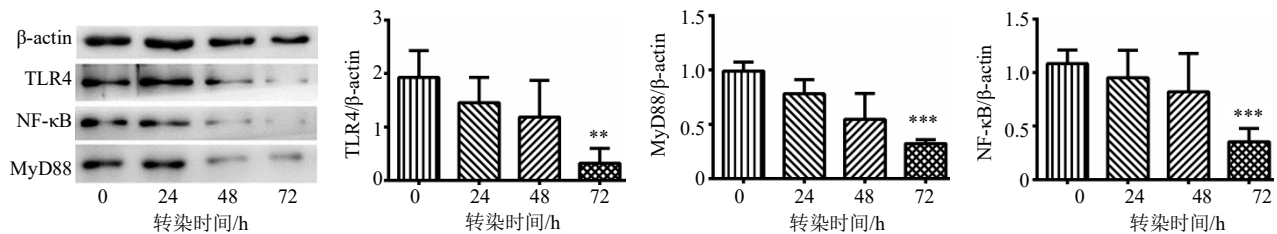


与 0 h 组比较: \*\*\* $P < 0.001$

\*\*\* $P < 0.001$  vs 0 h group

图 2 PSCs 中 miR-211-5p 过表达的转染效率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 Transfection efficiency of overexpression of miR-211-5p in PSCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



与 0 h 组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs 0 h group

图 3 PSCs 中 miR-211-5p 过表达后 TLR4 通路蛋白水平表达下降 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Fig. 3 Expression of protein levels of TLR4 pathway decreased after overexpression of miR-211-5p in PSCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

转染时间的延长而下降, 72 h 组下降最明显, 与 0 h 组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

miR-211-5p mimics 转染 72 h 后, TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的各节点分子 (TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B) mRNA 表达水平下降, 与 0 h 组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 结果见图 4。

**3.3.2 低表达 miR-211-5p 对 TLR4 通路的影响**  
根据上述 miR-211-5p 转染效率, 转染 inhibitor 72 h

后, 与对照组比较, TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的各节点分子 (TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B) 蛋白表达水平显著上升, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

转染 inhibitor 72 h 后, TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的各节点分子 (TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B) mRNA 表达水平显著上升, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 结果见图 6。

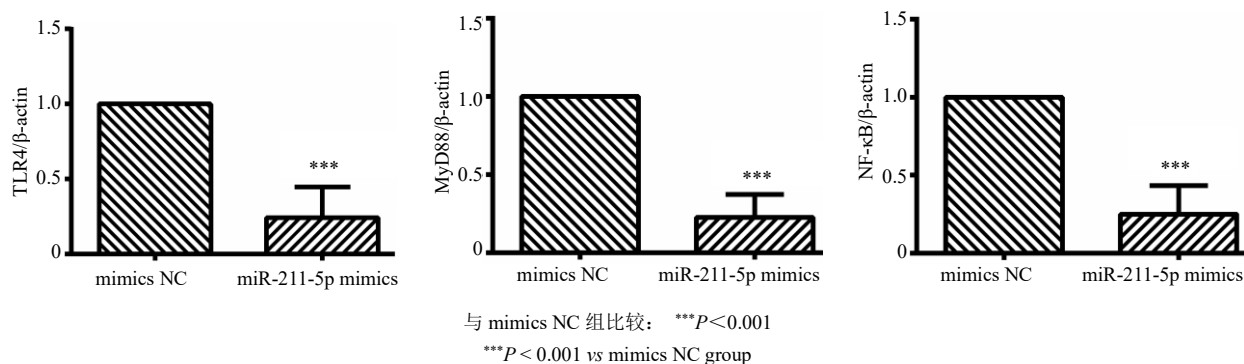


图 4 PSCs 中 miR-211-5p 过表达后 TLR4 通路 mRNA 水平表达下降 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Fig. 4 Expression of mRNA levels of TLR4 pathway decreased after overexpression of miR-211-5p in PSCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

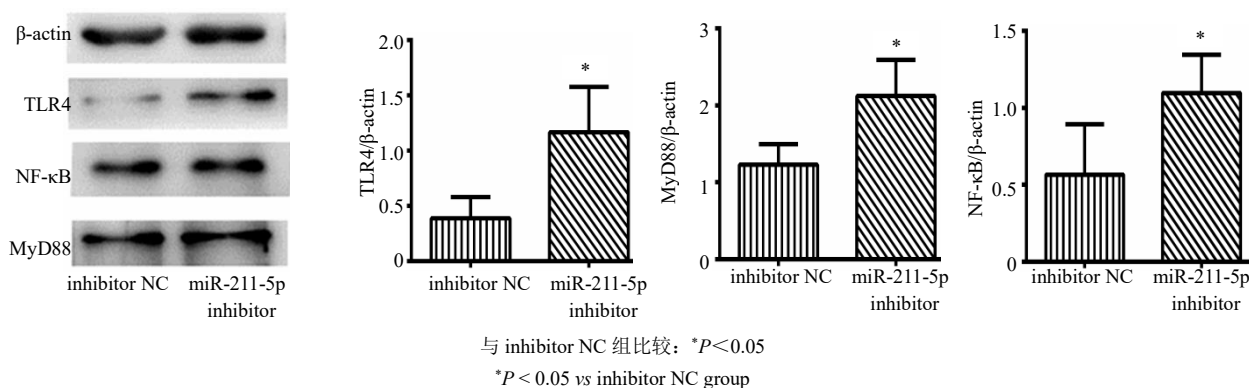


图 5 PSCs 中 miR-211-5p 低表达后 TLR4 通路蛋白水平表达上升 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Fig. 5 Expression of protein levels of TLR4 pathway increases after low expression of miR-211-5p in PSCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

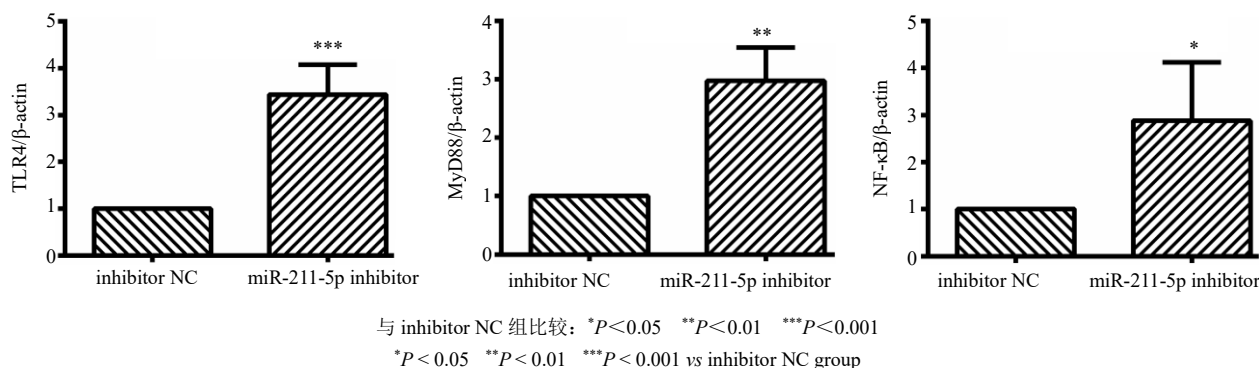
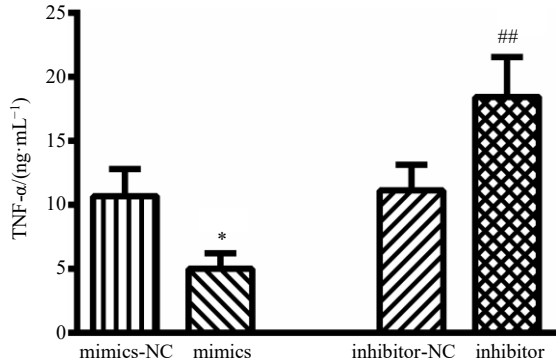


图 6 PSCs 中 miR-211-5p 低表达后 TLR4 通路 mRNA 水平表达上升 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Fig. 6 Expression of mRNA levels of TLR4 pathway increases after low expression of miR-211-5p in PSCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

### 3.4 MiR-211-5p 对 TNF- $\alpha$ 的影响

MiR-211-5p 过表达后, TNF- $\alpha$  表达量显著下降, 与 mimics NC 组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); miR-211-5p 低表达后, TNF- $\alpha$  表达量显著上升, 与 inhibitor NC 组比较, 差异显著 ( $P < 0.01$ ), 见图 7。



与 mimics NC 组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 inhibitor NC 组比较: ## $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  vs mimics NC group; ## $P < 0.01$  vs inhibitor NC group

图 7 miR-211-5p 对 PSCs 上清中 TNF- $\alpha$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 7 Effect of miR-211-5p on expression of TNF- $\alpha$  protein in PSCs supernatant ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 4 讨论

研究表明, TLR4/MyD88 信号通路在 LPS 诱导的胰腺细胞炎症反应中起关键作用<sup>[25]</sup>。本课题组在前期研究中发现, LPS 可以激活 LTC-14 细胞中 TLR4/MyD88 信号通路, 而 OM 可以通过下调 LTC-14 细胞中 TLR4、NF- $\kappa$ B 的表达, 减轻炎症因子 TNF- $\alpha$  的释放, 进而对大鼠慢性胰腺炎起到治疗的作用<sup>[23]</sup>。与此同时, OM 对大鼠胰腺纤维化模型有治疗作用, 而且其作用是通过抑制 PSCs 的激活和诱导胰腺细胞凋亡来实现的<sup>[26-28]</sup>。近年来抗胰腺纤维化药物研究都着眼于 PSCs 激活机制及其抑制措施, 涉及抗炎、抗氧化、促进激活的 PSCs 去活化、恢复 ECM 代谢平衡等方面<sup>[29-32]</sup>。本实验重点研究 OM 在抑制 PSCs 激活中的抗炎机制。

miRs 是一类具调节功能的非编码小 RNA, 大量研究表明 miRs 可以有效调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[33]</sup>, 且 miR-211-5p 可参与炎症反应调控<sup>[34]</sup>。但 miR-211-5p 在慢性胰腺炎细胞模型中对 TLR4 信号通路及相关炎症反应的调节作用尚不清楚。本实验结果表明, PSCs 被 LPS 激活后 miR-211-5p 表达量明显下降, 由此推测 miR-211-5p 在 PSCs 中的表达与炎症反应相关。结合 PSCs 中 TLR4 表达在 LPS 刺激后上调, miR-211-5p 在炎症模型中的变化与 TLR4 的变化呈现负向相关, 与 miR-211-5p 靶向 TLR4

的预测吻合。本研究在 PSCs 中对 miR-211-5p 进行过表达和低表达, 观察 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路, 来进一步验证靶向预测, 并检测相关炎症因子。结果显示, miR-211-5p 的过表达可以下调 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白和炎症因子的表达; 抑制 miR-211-5p 的表达则结果相反。进一步证实了 miR-211-5p 与 TLR4 的靶向关系, 同时证明了 miR-211-5p 可以通过调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调节炎症反应。

研究表明, OM 具有免疫调控及抗纤维化作用, 且本课题组前期证明 OM 可以调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路, 但 OM 并非 TLR4 的特异性配基, OM 如何调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路参与炎症反应的机制尚不清楚。迄今为止, 尚无研究探讨 OM 对 PSCs 中 miRs 表达和功能的影响。本研究发现, PSCs 接受 LPS 刺激后 miR-211-5p 的表达量明显下降, 经 OM 干预后 miR-211-5p 表达量显著回升, 可见 miR-211-5p 表达量的变化受 OM 的调节。OM 可能通过调节 miR-211-5p 起到调节炎症反应的作用。

PSCs 中的 miR-211-5p 通过调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调节炎症反应, OM 可调节炎症模型中 miR-211-5p 的表达, OM 调节炎症反应的作用机制可能是通过 miR-211-5p 调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路实现的。

### 参考文献

- [1] 苗 毅, 刘续宝, 赵玉沛, 等. 慢性胰腺炎诊治指南 (2014) [J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(3): 277-282.
- [2] Lew D, Afghani E, Pandol S. Chronic pancreatitis: current status and challenges for prevention and treatment [J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(7): 1702-1712.
- [3] Braganza J M, Lee S H, McCloy R F, et al. Chronic pancreatitis [J]. Lancet, 2011, 377(9772): 1184-1197.
- [4] Majumder S, Chari S T. Chronic pancreatitis [J]. Lancet, 2016, 387(10031): 1957-1966.
- [5] Singh V K, Drewes A M. Medical management of pain in chronic pancreatitis [J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(7): 1721-1728.
- [6] Klieser E, Swierczynski S, Mayr C, et al. Differential role of Hedgehog signaling in human pancreatic (patho-) physiology: An up to date review [J]. World J Gastrointest Pathophysiol, 2016, 7(2): 199-210.
- [7] Jakubowska M A, Ferdek P E, Gerasimenko O V, et al. Nitric oxide signals are interlinked with calcium signals in normal pancreatic stellate cells upon oxidative stress and inflammation [J]. Open Biol, 2016, 6(8): 160149. doi: 10.1098/rsob.160149.
- [8] Strobel O, Dadabaeva N, Felix K, et al. Isolation and

- culture of primary human pancreatic stellate cells that reflect the context of their tissue of origin [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2016, 401(1): 89-97.
- [9] Jagannath S, Garg P K. Novel and Experimental Therapies in Chronic Pancreatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(7): 1751-1761.
- [10] Liu L, Wang Y, Yan R, et al. Oxymatrine inhibits renal tubular EMT induced by high glucose via upregulation of snon and inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151986.
- [11] Parvez M K, Arbab A H, Al-Dosari M S, et al. Antiviral natural products against chronic hepatitis B: recent developments [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(3): 286-293.
- [12] He M, Wu Y, Wang M, et al. Meta-analysis of the clinical value of oxymatrine on sustained virological response in chronic hepatitis B [J]. *Ann Hepatol*, 2016, 15(4): 482-491.
- [13] He M, Wu Y, Wang M, et al. The clinical value of oxymatrine in preventing lamivudine induced YMDD mutation: a meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 971616.
- [14] Mao Y M, Zeng M D, Lu L G, et al. Capsule oxymatrine in treatment of hepatic fibrosis due to chronic viral hepatitis: a randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter clinical study [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(22): 3269-3273.
- [15] 李嫚华, 许威, 张青, 等. 氧化苦参碱对 TGF- $\beta$ 1 诱导的 PANC-1 细胞 Smad3/Gli1 通路相关因子表达的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(24): 5200-5205.
- [16] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384.
- [17] Vaz J, Akbarshahi H, Andersson R. Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(5): 616-630.
- [18] Azlan A, Dzaki N, Azzam G. Argonaute: The executor of small RNA function [J]. *J Genet Genomics*, 2016, 43(8): 481-94.
- [19] Verma P, Pandey R K, Prajapati P, et al. Circulating microRNAs: potential and emerging biomarkers for diagnosis of human infectious diseases [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1274.
- [20] He X, Jing Z, Cheng G. MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 945169.
- [21] Wang D, Xin L, Lin J H, et al. Identifying miRNA-mRNA regulation network of chronic pancreatitis based on the significant functional expression [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(21): e6668.
- [22] Tsang S W, Zhang H, Lin C, et al. Rhein, a natural anthraquinone derivative, attenuates the activation of pancreatic stellate cells and ameliorates pancreatic fibrosis in mice with experimental chronic pancreatitis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82201.
- [23] 荣亚梅, 夏时海, 向晓辉, 等. 氧化苦参碱对胰腺星状细胞中脂多糖诱导的 NF- $\kappa$ B 表达的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(5): 761-766.
- [24] Masamune A, Nakano E, Hamada S, et al. Alteration of the microRNA expression profile during the activation of pancreatic stellate cells [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(3): 323-331.
- [25] Liu Y, Li Y, Chen K L, et al. Knockdown of myeloid differentiation factor 88 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in pancreatic ductal cells [J]. *Pancreas*, 2016, 45(5): 755-760.
- [26] 王昱良, 郑永青, 夏时海, 等. 氧化苦参碱对慢性胰腺炎胰腺组织中 I 型胶原及  $\alpha$ -SMA 的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(13): 1331-1336.
- [27] 邸瑶, 夏时海, 齐莉, 等. 氧化苦参碱诱导慢性胰腺炎大鼠胰腺细胞凋亡的实验研究 [J]. *武警医学*, 2010, 21(4): 327-330.
- [28] 苏丽婷, 夏时海, 郑永青. 转化生长因子  $\beta$ 1 II 型受体在大鼠慢性胰腺炎中的表达及氧化苦参碱对其的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(2): 121-125.
- [29] Piao R L, Xiu M, Brigstock D R, et al. An immortalized rat pancreatic stellate cell line RP-2 as a new cell model for evaluating pancreatic fibrosis, inflammation and immunity [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2015, 14(6): 651-659.
- [30] Vonlaufen A, Phillips P A, Yang L, et al. Isolation of quiescent human pancreatic stellate cells: a promising in vitro tool for studies of human pancreatic stellate cell biology [J]. *Pancreatol*, 2010, 10(4): 434-443.
- [31] Treiber M1, Neuhöfer P, Anetsberger E, et al. Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(4): 1473-85, 1485.e1-7.
- [32] Vonlaufen A, Phillips P A, Xu Z, et al. Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats [J]. *Gut*, 2011, 60(2): 238-246.
- [33] 李如月, 向晓辉, 张斌, 夏时海. TLR4 信号通路相关 miRNAs 在炎症反应调节中的研究进展 [J]. *天津医药*, 2017, 45(6): 989-994.
- [34] Prasadam I, Batra J, Perry S, et al. Systematic identification, characterization and target gene analysis of micromRNAs involved in osteoarthritis subchondral bone pathogenesis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 99(1): 43-55.