

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.08.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 08-0006-07

MicroRNA-34a 对小鼠气道平滑肌细胞增殖和 ORMDL3 表达的影响

赵龙, 王宁, 石晓岚, 刘翠翠

(陕西省西安市儿童医院 呼吸哮喘科, 陕西 西安 710003)

摘要: **目的** 探讨支气管哮喘小鼠模型中 microRNA-34a (miR-34a) 对气道平滑肌细胞 (ASMC) 增殖与血清类黏蛋白 1 样蛋白 3 (ORMDL3) 表达的影响。**方法** 以卵清蛋白 (OVA) 诱导复制的小鼠哮喘模型和培养的 ASMC 为研究对象, 筛选与 ORMDL3 密切相关的 miRNA; 利用 miR-34a-mimic 使 miR-34a 过表达; 用苏木精-伊红染色和 MTT 法探究其对 ASMC 增殖的影响; 实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 检测 ORMDL3 的表达变化。**结果** OVA 诱导下小鼠气道组织中 miR-34a 被抑制 ($P < 0.05$)。miR-34a-mimic 可减少哮喘小鼠 ASMC 异常增殖 ($P < 0.05$); miR-34a-mimic 抑制 ASMC 在 490nm 下的光密度值和相对细胞活性 ($P < 0.05$); miR-34a-mimic 下调哮喘小鼠气道组织中 ORMDL3 的表达, 并抑制体外培养 ASMC 中 ORMDL3 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** miR-34a 可抑制 ASMC 的增殖和 ORMDL3 基因表达, 为今后哮喘发病机制的研究提供新的思路。

关键词: microRNA-34a; 气道平滑肌细胞; 血清类黏蛋白 1 样蛋白 3

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

MicroRNA-34a inhibits proliferation of airway smooth muscle cells and expression of ORMDL3

Long Zhao, Ning Wang, Xiao-lan Shi, Cui-cui Liu

(Department of Respiratory Asthma, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China)

Abstract: Objective To explore the regulating effect of microRNA-34a (miR-34a) on airway smooth muscle cell (ASMC) proliferation and orosomucoid1-like protein 3 (ORMDL3) level in bronchial asthma model of mice. **Methods** The mouse asthma model was induced by ovalbumin (OVA). ASMCs were cultured *in vitro*. MicroRNAs which were implicated with ORMDL3 were screened. miR-34a was overexpressed by miR-34a-mimic. Hematoxylin-eosin (HE) staining and MTT method were used for the detection of ASMC proliferation. Quantitative real-time PCR and Western blot were used for examining the expressions of ORMDL3. **Results** The level of miR-34a was markedly inhibited in the airway tissues of the OVA-induced mouse model ($P < 0.05$). The abnormal proliferation of the ASMCs was attenuated by miR-34a-mimic ($P < 0.05$). The OD value at 490 nm and the relative cell activity of the ASMCs were significantly downregulated by miR-34a-mimic ($P < 0.05$). The expression of ORMDL3 in the airway tissues of the asthma mice was significantly inhibited by miR-34a-mimic ($P < 0.05$). *In vitro*, miR-34a-mimic also downregulated the ORMDL3 level in the ASMCs ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-34a plays a role in inhibiting the proliferation of ASMCs and regulating the expression of ORMDL3, and it can provide new ideas for understanding the pathogenesis of asthma.

Keywords: microRNA-34a; airway smooth muscle cell; orosomucoid1-like protein 3

支气管哮喘疾病是由多种炎症细胞、免疫细胞, 以及多种细胞因子作用于肺气道的常见慢性疾病^[1-2]。调查显示, 近年全球儿童哮喘发病率持续上升^[3]。血清类黏蛋白 1 样蛋白 3 (orosomucoid1-like protein 3, *ORMDL3*) 基因位于 17q21, 被 MOFFATT 等^[4]首次发现并确定为儿童哮喘新的候选基因, 此后集中于儿童哮喘的研究^[5]。大量研究显示, *ORMDL3* 转基因小鼠能够增加气道重塑和气道反应等重要的哮喘病理特征, 而该过程可能与 microRNA (miRNA) 的调控关系密切^[6-7]。miRNA 是一种非编码短链 RNA, 可调控多种生物学过程^[8]。研究显示, 大量 miRNA 对哮喘疾病引起的气道平滑肌细胞 (airway smooth muscle cells, ASMC) 和肥大细胞异常增殖具有调节作用, 如 miR-10a 和 miR-133a 通过调控其靶基因影响 ASMC 的增殖^[9-10]。miR-34a 可参与调节多种平滑肌细胞增殖^[11]。SHIN 等^[12]发现, 结节性硬化症相关基因 *TSC1* 通过抑制 miR-34a 水平参与调控哮喘疾病, 然而 miR-34a 对 ASMC 增殖的调控仍然未知。本文旨在探索 miR-34a 对 ASMC 增殖和 *ORMDL3* 表达水平的调控效应及机制, 为哮喘发病机制的研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成年雌性小鼠 [上海斯莱克实验动物中心, 无特定病原体级别, SCXK (沪) 2015-0001], ASMC (美国 Cambrex Bioscience 公司), 卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA)、氢氧化铝 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 购自美国 Sigma 公司, miR-34a-mimic、miR-34a-mimic 购自上海吉玛制药有限公司, 压缩式雾化吸入器 (德国 PARI 有限公司), MTT 细胞增殖检测试剂盒 (美国 Trevigen 公司), Dharma FECT 1 Transfection Reagent (美国 Thermo Scientific 公司), MTT 试剂 (广州新视野生物科技有限公司), miR Neasy mini 试剂盒、miScript 逆转录试剂盒购自德国 Qiagen 公司, M-MLV 逆转录酶 (美国 Clontech 公司), SYBR Green Master Mix (美国生命国际科技有限公司), 聚氰基丙烯酸正丁酯 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒、anti-*ORMDL3*、anti-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 动物模型的复制与分组

小鼠体重 22 ~ 38 g, 共 90 只进行 OVA 诱导, 复

制哮喘模型^[13]。动物处理分为 4 组: ① OVA 组 (30 只) 注射后 1、7 和 14 d 每只小鼠左下腹腔注射 2.5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3 + 25 \mu\text{g}$ OVA 的磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (250 μl), 21 ~ 27 d 用 100 ml 2% OVA 进行气道雾化; ② 对照组 (15 只) 1、7 和 14 d 每只小鼠左下腹腔注射 250 μl PBS; ③ miR-34a-mimic 组 (30 只) 基础处理同模型组, 并于 21 ~ 27 d 左下腹腔注射 50 nmol/50 μl miR-34a-mimic, 1 次/d; ④ miR-34a-mimic-NC 组 (15 只) 左下腹腔注射 50 nmol/50 μl miR-34a-mimic-NC, 1 次/d。

1.3 苏木精-伊红染色

取 28 d 小鼠肺组织固定于 10% 多聚甲醛, 用石蜡包埋, 制作石蜡切片, 厚 5 μm , 用常规苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色并观察肺部气道组织病理学改变。

1.4 ASMC 培养

ASMC 的培养严格按照试剂盒说明书进行操作。将冻存的 ASMC 细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温水浴融化进行复苏。500 r/min 离心 5 min, 加 10 ml 含 1% 青链霉素、1% 谷氨酰胺、10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳 CO_2 细胞培养箱中。每隔 3 d 换液 1 次, 待细胞生长至融合率达 80% 后用 0.25% 胰酶消化, 进行传代, 用于后续指标检测。

1.5 MicroRNA 寡核苷酸的瞬时转染

ASMC 按 2×10^7 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板, 细胞融合率达 60% 时, 使用 Dharma FECT 1 试剂盒转染 25 nmol miR-34a-mimic 或者对应的阴性对照组 miR-34a-mimic-NC 处理 72 h, 随后用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 miR-34a 的表达, 验证转染效率。

1.6 ASMC 增殖实验

MTT 法检测细胞活力, 经过转染的细胞接种于 96 孔培养板, 密度为 5×10^3 个/孔。细胞在接受转染后的 72 h 进行 MTT 试剂孵育, 孵育条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、4 h。随后加入二甲基亚砷溶解形成的甲瓩, 使用 Aspectrophotometer 系统检测 490 nm 下的吸光值。

1.7 qRT-PCR

细胞或者组织进行裂解后, 使用 miR Neasy mini 试剂盒抽提总 RNA, 抽提过程严格按照试剂盒说

说明书进行。采用 M-MLV 逆转录酶将 cDNA 逆转录合成 mRNA。用 miScript 逆转录试剂盒逆转录合成 miRNA。采用 SYBR Green Master Mix 对基因表达水平进行定量。采用 GAPDH 对 mRNA 的相对表达结果进行标准化处理,用 U6 对 miRNA 进行标准化处理,表达水平相对倍数关系和显著性分析用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向引物 (5' -3')	长度 /bp
miR-34a	正向: GTGCAGGGTCCGAGGT 反向: GCCGCTGGCAGTGTCTTAGCTG	51
ORMDL3	正向: TGGTAGCCACCGCCGCTGGTTTGT 反向: CGGGGTACCCAGAGGCTCCTGTCTTCAG	152
GAPDH	正向: ATTGTTGCCATCAATGACCC 反向: AGTAGAGGCAGGGATGATGT	179
U6	正向: GCTCGCTTCGGCAGCACAT 反向: AAAATATGGAACGCTTCACG	145

1.8 Western blot 检测

对 28 d 大鼠气道组织或被转染 72 h 的 ASMC 使用裂解缓冲液 (0.5% v/v Nonidet P-40, 50) 进行裂解,使用 BCA 蛋白检测试剂盒对总蛋白浓度进行检测,并且统一浓度为 $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。用 $10\mu\text{l}$ 蛋白进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳分离后用聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜进行湿转。37℃、5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,一抗 (anti-ORMDL3, 1 : 600) 孵育,4℃ 过夜。用 TBST 清洗 3 次,10 min/次。PVDF 膜经辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 18 000) 室温孵育 1.5 h,使用化学发光增强系统对膜进行曝光。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司) 测量光密度,并使用内参蛋白 GAPDH 进行标准化处理。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OVA 诱导气道平滑肌层异常增殖

首先观察 OVA 对肺部结构的影响,HE 染色结果

表明,OVA 诱导雌性小鼠的肺部结构改变明显。对照组肺部结构正常,平滑肌层厚度均匀,上皮细胞排列整齐。OVA 组结果显示,气道平滑肌层加厚,上皮细胞排列紊乱,肺部结构明显异常。表明 OVA 可诱导小鼠气道组织平滑肌层异常增生。见图 1。

2.2 OVA 诱导气道组织 ORMDL3 表达上调并抑制 miR-34a 水平

ORMDL3 在哮喘中扮演重要角色,第 28 天,OVA 组 ORMDL3 mRNA 和蛋白的相对表达量分别为 (4.562 ± 0.481) 和 (4.064 ± 0.598),对照组 ORMDL3 mRNA 和蛋白的相对表达量分别为 (1.001 ± 0.249) 和 (0.999 ± 0.140),经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($t=16.104$ 和 12.224 ,均 $P=0.000$),与对照组比较 OVA 组 ORMDL3 的相对表达上调。见图 2。

通过生物信息学分析,初步筛选并检测在第 28 天可能调控 ORMDL3 表达的 9 种 miRNA,包括 miR-1、miR-20、miR-34a、miR-34b-5p、miR-34c、miR-106a、miR-133a、miR-302 及 miR-449。OVA 组 miR-34a 表达水平与对照组比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),OVA 组低于对照组。而 OVA 组 miR-1、miR-20、miR-34b-5p、miR-34c、miR-106a、miR-133a、miR-302 及 miR-449 的表达水平与对照组比较,经 *t* 检验,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 和图 3。

2.3 miR-34a-mimic 减少气道平滑肌层的增殖与 ORMDL3 的高表达

将焦点放在被 OVA 显著抑制的 miR-34a,从第 21 天开始连续 7 d 在左下腹腔注射 miR-34a-mimic,HE 染色观察小鼠气道组织变化。与 miR-34a-mimic-NC 组相比,miR-34a-mimic 组小鼠气道平滑肌层的异常增殖明显减缓。见图 4。

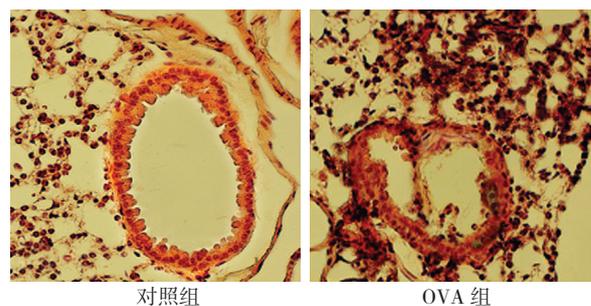


图 1 小鼠肺组织 (HE $\times 400$)

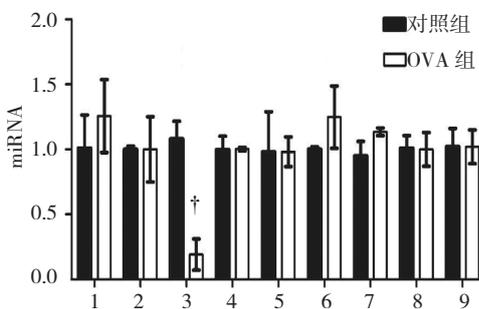


A: ORMDL3 mRNA; B: ORMDL3 蛋白。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 气道组织中 ORMDL3 的表达变化 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

表 2 OVA 与对照组小鼠气道组织中 miRNA 的表达水平比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-1	miR-20	miR-34a	miR-34b-5p	miR-34c	miR-106a	miR-133a	miR-302	miR-449
对照组	1.001 ± 0.013	1.000 ± 0.108	1.000 ± 0.051	1.000 ± 0.121	1.000 ± 0.064	1.000 ± 0.093	1.001 ± 0.086	1.000 ± 0.048	1.001 ± 0.039
OVA 组	1.264 ± 0.281	1.021 ± 0.253	0.188 ± 0.121	1.011 ± 0.012	0.983 ± 0.110	1.252 ± 0.229	1.137 ± 0.117	0.992 ± 0.131	1.044 ± 0.134
<i>t</i> 值	1.294	0.043	-12.619	0.027	-0.435	2.017	1.795	-0.02	0.057
<i>P</i> 值	0.225	0.981	0.000	0.994	0.983	0.071	0.103	0.985	0.956



1: miR-1; 2: miR-20; 3: miR-34a; 4: miR-34b-5p; 5: miR-34c; 6: miR-106a; 7: miR-133a; 8: miR-302; 9: miR-449。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 3 气道组织中 miRNA 的相对水平变化 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

对照组、OVA 组、miR-34a-mimic-NC 组及 miR-34a-mimic 组的 ORMDL3 mRNA 表达量分别为 (1.002 ± 0.132)、(6.242 ± 0.705)、(6.120 ± 0.146) 和 (2.810 ± 0.249), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 488.606, P = 0.000$)。进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, miR-34a-mimic 组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = -28.089, P = 0.000$); 而 OVA 组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异无统计学意义

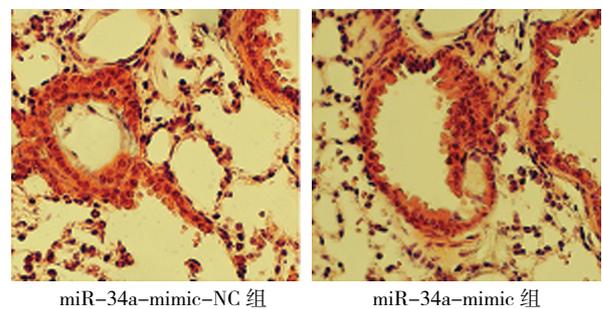
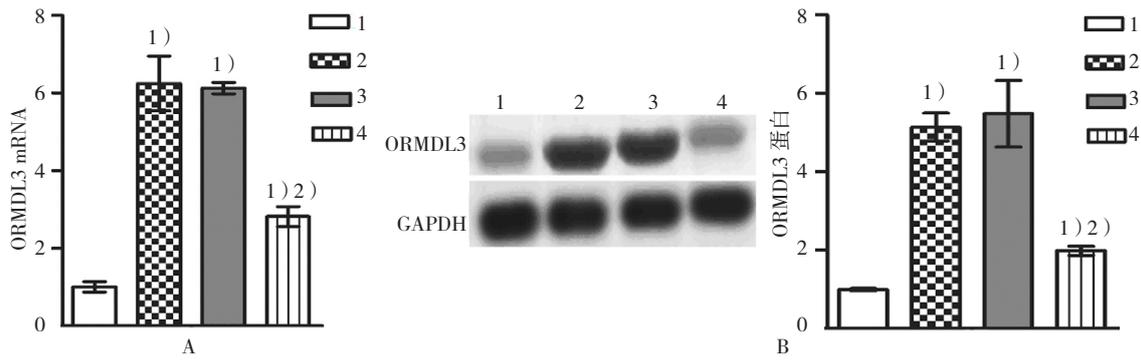


图 4 miR-34a 过表达处理的肺组织 (HE × 400)

($t = 0.415, P = 0.687$)。因此, ORMDL3 的高水平表达可被 miR-34a-mimic 减弱。见图 5。

对照组、OVA 组、miR-34a-mimic-NC 组及 miR-34a-mimic 组的 ORMDL3 蛋白表达量分别为 (1.001 ± 0.012)、(5.238 ± 0.217)、(5.481 ± 0.852) 和 (1.983 ± 0.113), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 23.350, P = 0.000$)。进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, miR-34a-mimic 组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = -9.969, P = 0.000$); 而 OVA 组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.677, P = 0.514$)。结果表明, ORMDL3 的高水平表达可被 miR-34a-mimic 减弱。见图 5。



A: ORMDL3 mRNA; B: ORMDL3 蛋白。1: 对照组; 2: OVA 组; 3: miR-34a-mimic-NC 组; 4: miR-34a-mimic 组。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-34a-mimic-NC 组比较, $P < 0.05$

图 5 各组气道组织中 ORMDL3 mRNA 和蛋白表达水平比较

2.4 miR-34a-mimic 抑制 ASMC 活性与 ORMDL3 的表达

体外培养 ASMC 细胞并转染 miR-34a-mimic 或 miR-34a-mimic-NC, 测得对照组、miR-34a-mimic 组及 miR-34a-mimic-NC 组的 miR-34a 相对表达水平分别为 (1.004 ± 0.183) 、 (8.315 ± 0.282) 和 (1.002 ± 0.092) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 1322.616, P = 0.000$)。进一步两两比较用 LSD- t 检验, miR-34a-mimic 组分别与对照组、miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 53.271$ 和 60.389 , 均 $P = 0.000$); 而对照组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.024, P = 0.981$)。表明 miR-34a-mimic 成功使 miR-34a 过表达。见图 6。

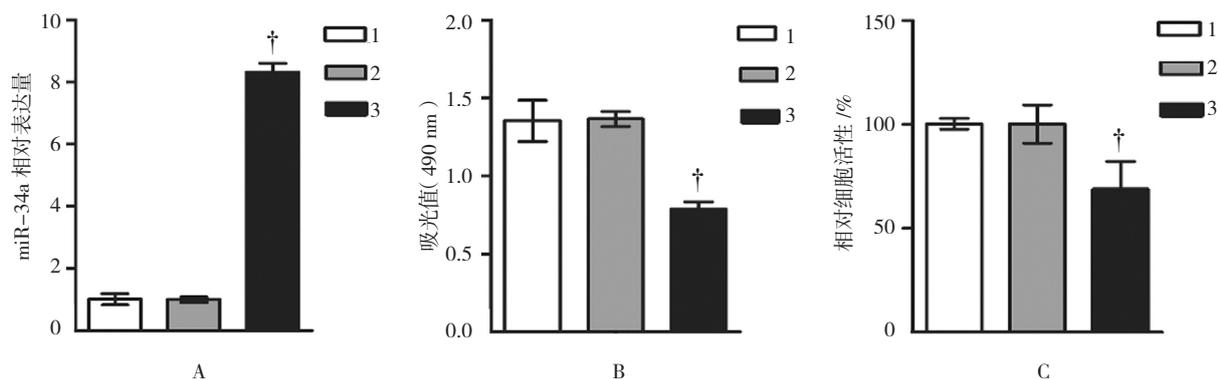
对照组、miR-34a-mimic-NC 组及 miR-34a-mimic 组 490 nm 下的吸光值分别为 (1.347 ± 0.132) 、 (1.363 ± 0.047) 和 (0.794 ± 0.053) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 84.103, P = 0.000$)。进一步两两比较用 LSD- t 检验, miR-34a-mimic 组分别与对照组和 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 9.523$ 和 19.675 , 均 $P = 0.000$); 而对照组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.280, P = 0.785$)。因此, miR-34a 可抑制 ASMC 细胞 490 nm 下的吸光值。见图 6。

对照组、miR-34a-mimic-NC 组及 miR-34a-mimic 组的细胞活性率分别为 (100.034 ± 2.582) 、 (100.243 ± 9.251) 和 $(68.982 \pm 13.243)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 44.785, P = 0.000$)。进一步两

两比较用 LSD- t 检验, miR-34a-mimic 组分别与对照组和 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 5.637$ 和 4.740 , 均 $P = 0.000$); 而对照组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 0.053, P = 0.959$)。结果表明, miR-34a 可抑制 ASMC 细胞的活性。见图 6。

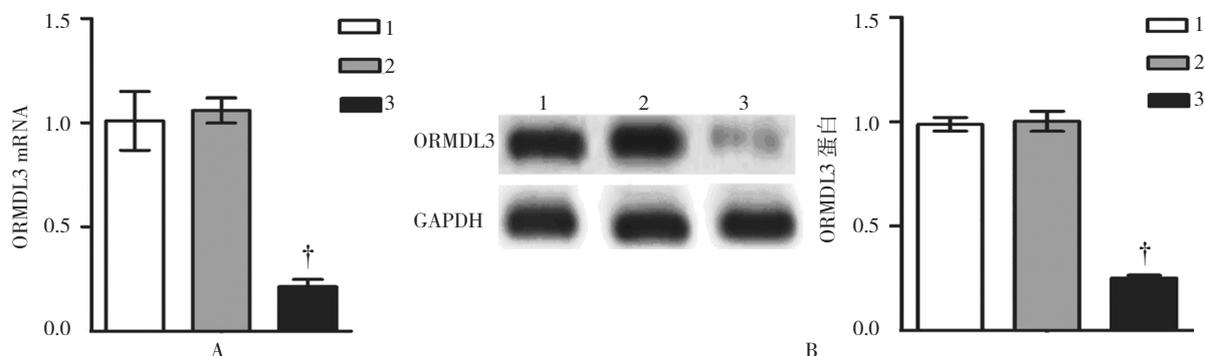
在培养的 ASMC 中, 对照组、miR-34a-mimic-NC 组及 miR-34a-mimic 组的 ORMDL3 mRNA 表达水平分别为 (0.998 ± 0.123) 、 (1.131 ± 0.082) 和 (0.232 ± 0.101) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 2328.823, P = 0.000$)。进一步两两比较用 LSD- t 检验, miR-34a-mimic 组分别与对照组和 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 11.789$ 和 16.927 , 均 $P = 0.000$); 而对照组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($t = 2.204, P = 0.052$)。因此, miR-34a 可以抑制 ASMC 的增殖活性, 并下调 ORMDL3 基因的表达。见图 7。

在培养的 ASMC 中, 对照组、miR-34a-mimic-NC 组及 miR-34a-mimic 组的 ORMDL3 蛋白表达水平分别为 (1.001 ± 0.032) 、 (1.014 ± 0.053) 和 (0.254 ± 0.006) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 876.739, P = 0.000$)。进一步两两比较用 LSD- t 检验, miR-34a-mimic 组分别与对照组和 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 56.201$ 和 34.902 , 均 $P = 0.000$); 而对照组与 miR-34a-mimic-NC 组比较, 差异有统计学意义 ($t = 0.514, P = 0.618$)。结果表明, miR-34a 可以抑制 ASMC 的增殖活性, 并下调 ORMDL3 基因的表达。见图 7。



1: 对照组; 2: miR-34a-mimic-NC 组; 3: miR-34a-mimic 组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 6 miR-34a-mimic 抑制 ASM 增殖 ($n=6, \bar{x} \pm s$)



1: 对照组; 2: miR-34a-mimic-NC 组; 3: miR-34a-mimic 组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 7 各组 ASM 细胞中 ORMDL3 mRNA 和蛋白表达水平比较

3 讨论

ASM 的功能性失调是支气管哮喘的关键因素, 对该功能失调的内在分子与细胞机制仍无统一认识。本研究发现, miR-34a 可能调控 *ORMDL3* 基因表达并参与介导哮喘 ASM 功能。本实验结果显示, 在 OVA 诱导和刺激下小鼠的气道组织中 miR-34a 的表达下降。以往研究表明, miRNA 可通过自身水平的改变, 参与哮喘动物模型气道和平滑肌层功能的调控, miR-10a 可以通过调控其靶基因 *PI3KCA* 促进 ASM 增殖^[9], miR-133a 通过调节靶向调控 IL-13, 从而影响 Ras 同源基因家族成员 A (ras homolog gene family member A, *RhoA*) 的表达, 并且 *RhoA* 的表达增加能够参与平滑肌的收缩调节^[10]。miR-1 在肌肉生理功能中扮演重要角色。研究表明, 下调 miR-1 可以调节哮喘疾病过程中的平滑肌肥大^[14]。miR-155 敲除小鼠表现出迅速地气道重塑和平滑肌细胞中的胶原沉积^[15]。本研究发现, OVA 诱导的小鼠气道组织中 miR-1、miR-133a 有微弱上调趋势。但是引人注目的是, miR-34a 表达下调明显, 说明在哮喘小鼠气道组织中 miR-34a 可能具有

潜在调控作用。大量研究表明, miR-34a 可调控多种细胞功能, 如抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭能力^[16], 以及平滑肌细胞增殖、迁移能力^[11]。另外 SHIN 等^[12]发现, 结节性硬化症相关基因 *TSC1* 通过抑制 miR-34a 水平参与调控哮喘疾病, 并显著抑制肥大细胞的增殖和活力。与上述结果一致, 本研究的结果显示, 过表达 miR-34a 可抑制哮喘小鼠气道平滑肌层的异常增殖和 ASM 的增殖。以上结果说明, miR-34a 能够在包括哮喘在内的多种病理过程中, 抑制多种细胞的增殖和活力。

自首次报道后, *ORMDL3* 被大量用于儿童期哮喘疾病的研究, *ORMDL3* 亦可在胎儿及成人的组织中表达^[4]。研究发现, 在小鼠哮喘模型中过表达 *ORMDL3*, 可增加哮喘气道组织病理性重塑, 包括平滑肌细胞增殖增加、上皮纤维化及黏液分泌加重^[7]。TONCHEVA 等^[17]发现, *ORMDL* 家族基因, 包括 *ORMDLL1*、*ORMDL2* 及 *ORMDL3* 在哮喘患者平滑肌细胞中明显上调, 然而单核苷酸多态性分析发现, *ORMDL3* 是其中最主要的影响因素。本研究获得类

似的结果,即在 OVA 的诱导下,ORMDL3 在气道组织的表达上调。然而,该上调趋势被过表达 miR-34a 抑制。近年来大量研究表明,miRNA 可通过抑制靶基因直接或间接调控各种蛋白表达,从而发挥不同的生理功能^[8],且 miRNA 参与调控哮喘引起的 ASMC 增殖等过程与 ORMDL3 的功能密不可分^[7, 18]。本研究结果发现,在体外培养的 ASMC 中 miR-34a 过表达可抑制 ORMDL3 的表达。以上结果表明,在体内外的 ASMC 中,ORMDL3 水平均可被 miR-34a 抑制。

综上所述,过表达 miR-34a 可缓解哮喘小鼠 ASMC 异常增殖和抑制 ORMDL3 的高表达;另外 miR-34a 可抑制 AMSC 细胞的增殖,并且降低 AMSC 中 ORMDL3 水平。结果表明,哮喘致气道平滑肌层功能异常的内在机制可能与 miR-34a 调节 ORMDL3 水平变化相关。然而,miR-34a 是否对 ORMDL3 进行直接调控,仍需进一步深入研究。

参 考 文 献:

- [1] 尚云晓. 儿童支气管哮喘的诊断进展-2008 PRACTALL 解读[J]. 临床儿科杂志, 2010,28(2): 112-115.
- [2] 胡江彦,何滨. 支气管哮喘治疗新进展[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(4): 587-589.
- [3] de BENEDICTIS F M, ATTANASI M. Asthma in childhood[J]. Eur Respir Rev, 2016, 25(139): 41-47.
- [4] MOFFATT M F, KABESCH M, LIANG L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. Nature, 2007, 448(7152): 470-473.
- [5] ONO J G, WORGALL T S, WORGALL S. 17q21 locus and ORMDL3: an increased risk for childhood asthma[J]. Pediatr Res, 2014, 75(1/2): 165-170.
- [6] AOKI H, MOGI C, OKAJIMA F. Ionotropic and metabotropic proton-sensing receptors involved in airway inflammation in allergic asthma[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014(14): 1855-1870.
- [7] MILLER M, ROSENTHAL P, BEPPU A, et al. ORMDL3 transgenic mice have increased airway remodeling and airway responsiveness characteristic of asthma[J]. J Immunol, 2014, 192(8): 3475-3487.
- [8] MALTBY S, PLANK M, TAY H L, et al. Targeting microRNA function in respiratory diseases: mini-review[J]. Front Physiol, 2016, 7(21): DOI: 10.3389/fphys.2016.00021.
- [9] HU R, PAN W, FEDULOV A V, et al. MicroRNA-10a controls airway smooth muscle cell proliferation via direct targeting of the PI3 kinase pathway[J]. FASEB J, 2014, 28(5): 2347-2357.
- [10] CHIBA Y, MISAWA M. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: miR-133a and bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in asthma[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 114(3): 264-268.
- [11] CHEN Q, YANG F, GUO M, et al. miRNA-34a reduces neointima formation through inhibiting smooth muscle cell proliferation and migration[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 89(Pt A): 75-86.
- [12] SHIN J, PAN H, ZHONG X P. Regulation of mast cell survival and function by tuberous sclerosis complex 1[J]. Blood, 2012, 119(14): 3306-3314.
- [13] 宋冬梅,牛英豪,于磊,等. 乌司他丁通过 Nrf2/HO-1 抗氧化途径在 OVA 诱导的支气管哮喘小鼠中发挥治疗作用[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1713-1720.
- [14] CHEN J F, MANDEL E M, THOMSON J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet, 2006, 38(2): 228-233.
- [15] POTTIER N, MAURIN T, CHEVALIER B, et al. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions[J]. PLoS One, 2009, 4(8): DOI: 10.1371/journal.pone.0006718.
- [16] SHI H, ZHOU S, LIU J, et al. miR-34a inhibits the in vitro cell proliferation and migration in human esophageal cancer[J]. Pathol Res Pract, 2016, 212(5): 444-449.
- [17] TONCHEVA A A, POTACZEK D P, SCHEDEL M, et al. Childhood asthma is associated with mutations and gene expression differences of ORMDL genes that can interact[J]. Allergy, 2015, 70(10): 1288-1299.
- [18] MOFFATT M F. Genes in asthma: new genes and new ways[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008, 8(5): 411-417.

(童颖丹 编辑)