

微小核糖核酸 21 通过负性调控 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻脓毒症性心肌损伤*

党丹 张欢 魏伏 杨婧*

西安第四医院重症医学科, 陕西西安 710004

摘要 目的:探讨微小核糖核酸 21(miR-21)通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路对脓毒症性心肌病(SIC)的作用和机制。方法:将 48 只成年雄性 SD 大鼠随机划分为对照组、SIC 组、SIC + miR-21 模拟物组和 SIC + miR-21 抑制剂组,每组 12 只。在 SIC 模型构建前 24 h 将 miR-21 模拟物或 miR-21 抑制剂经过尾静脉注射给大鼠。利用细菌脂多糖(LPS)腹腔注射的方法构建 SIC 模型,并在模型构建 24 h 后获取 4 组大鼠的血液和心肌组织。利用逆转录聚合酶链法(RT-PCR)检测心肌组织中 miR-21、TLR4 信号通路分子 TLR4、MyD88、IRAK-1、TRAF6、NF- κ B 和炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- α 相对应 mRNA 的表达水平。利用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血液中心肌损伤标志物肌钙蛋白(cTnI)、脑钠肽(BNP)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌红蛋白(Mb)的表达水平。结果:与对照组比较,SIC 组大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88、IRAK-1、TRAF6、NF- κ B 和炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- α 的表达水平升高(P 均 < 0.05),血 cTnI、BNP、CK-MB、Mb 的表达水平也升高(P 均 < 0.05)。与 SIC 组比较,SIC + miR-21 模拟物组大鼠心肌组织中 miR-21 的表达量升高(P 均 < 0.05),心肌组织中 TLR4、MyD88、IRAK-1、TRAF6、NF- κ B 和 IL-1、IL-6、TNF- α 及血 cTnI、BNP、CK-MB、Mb 的表达水平降低(P 均 < 0.05);而 SIC + miR-21 抑制剂组大鼠心肌组织中的以上各项检测指标与 SIC + miR-21 模拟物组则相反。结论:MiR-21 通过负性调控 TLR4/NF- κ B 信号通路的方式减轻脓毒症后炎症反应,降低 SIC 所致心肌损伤程度。

关键词 脓毒症; 心肌损伤; 微小核糖核酸; TLR4/NF- κ B 信号通路

中图分类号 R542.2⁺1

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzz20220116

MicroRNA-21 alleviated sepsis-induced cardiomyopathy by negatively regulating TLR4/NF- κ B signaling pathway

DANG Dan, ZHANG Huan, WEI Fu, YANG Jing*. Department of Intensive Care Unit, Fourth Hospital of Xi'an, Shanxi Xi'an 710004, China

Corresponding author: YANG Jing, E-mail: 282545245@qq.com

Abstract Objective: To study the effect of microRNA-21 (miR-21) regulating sepsis-induced cardiomyopathy (SIC) by targeting TLR4/NF- κ B signaling pathway and the underlying mechanism. Methods: A total of 48 male SD rats were randomly divided into 4 groups: control, SIC, SIC + miR-21 mimic and SIC + miR-21 inhibitor, with 12 rats in each group. The miR-21 mimic or miR-21 inhibitor was injected via the tail vein at 24 h before the establishment of SIC model. The SIC rat model was constructed through intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). The blood and myocardium samples were collected at 24 h after LPS injection. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the expression of miR-21 and TLR4 pathway molecules including TLR4, MyD88, IRAK-1, TRAF6 and NF- κ B, as well as the expression of cytokines IL-1, IL-6 and TNF- α in the myocardium tissue. Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) was performed to measure the concentration of myocardial damage markers cTnI, BNP, CK-MB and Mb in the blood. Results: Compared to the control group, the expression of TLR4 pathway molecules including TLR4, MyD88, IRAK-1, TRAF6, NF- κ B and the expression of cytokines IL-1, IL-6, TNF- α in the myocardium tissue of SIC group increased, and the concentrations of myocardial damage markers cTnI, BNP, CK-MB and Mb in the blood increased as well. Compared to the SIC group, the expression of TLR4 pathway molecules including TLR4, MyD88, IRAK-1, TRAF6, NF- κ B and the expression of cytokines IL-1, IL-6, TNF- α in the myocardium tissue of SIC + miR-21 mimic group decreased, and the concentrations of myocardial damage

* 基金项目:西安市科技计划项目 - “科技 +”行动计划 [No.201805093YX1SF27(4)]

* 通信作者:杨婧, E-mail:282545245@qq.com, 陕西省西安市新城区解放路 21 号

markers cTnI, BNP, CK-MB and Mb in the blood decreased as well. However, the result in the SIC + miR-21 inhibitor group was just contrary to the SIC + miR-21 mimic group. Conclusion: MiR-21 negatively regulated TLR4/NF- κ B signaling pathway, which inhibited the inflammation reaction after sepsis and further reduced the myocardial damage degree.

Key words Sepsis-induced cardiomyopathy; MicroRNA-21; TLR4/NF- κ B signaling pathway

脓毒症或感染相关性全身炎症反应综合征是由感染所引起的免疫反应,通常会诱发感染性休克或多器官功能障碍综合征^[1]。在脓毒症的早期阶段,心血管功能改变与患者预后密切相关^[2]。心血管并发症会加重脓症患者病情并使死亡率升高^[2,3]。脓毒症所伴发的脓毒症性心肌病(sepsis-induced cardiomyopathy, SIC)可以引起心肌损伤,并进一步导致心肌能量供应减少和心肌收缩能力下降^[3]。脓毒症所产生的炎症因子如白介素(IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 参与了SIC的发生^[4]。研究发现,TLR4/NF- κ B信号通路在SIC的发生发展过程中发挥关键作用^[5,6]。微小核糖核酸(miRNA, miR)是在转录后水平调控基因表达的非编码RNA^[7]。其中miR-21在许多哺乳动物细胞中高表达并具有抑制炎症反应的功能^[8]。研究发现,miR-21可以通过作用于TLR4/NF- κ B信号通路的方式在LPS刺激的骨髓细胞中发挥抑制炎症反应的作用^[9]。本文观察miR-21通过作用于TLR4/NF- κ B通路对脓毒症大鼠炎症反应和心功能的影响。

材料与方法

实验动物 48只成年雄性SD大鼠(周龄:8~10周,体重:250~300g)由本单位实验动物中心[证书编号:SYXK(陕)2015-0032]提供。将这些大鼠饲养在本单位实验室,饲养环境:12h一循环的昼夜节律,温度(21.0 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度50%~55%,并给予提供足够的水和食物。采用随机数字表法将这些大鼠随机分为4组:对照组、SIC组、SIC+miR-21模拟物组和SIC+miR-21抑制剂组,每组12只。医院实验伦理委员会批准开展此项研究,实验动物操作流程按照中国实验动物操作指南进行。

实验试剂 所用试剂包括:构建SIC模型的LPS(Sigma,USA);miR-21模拟物和miR-21抑制剂(上海生工,中国);检测miR-21、TLR4信号通路分子TLR4、MyD88、IRAK-1、TRAF6、NF- κ B和IL-1、IL-6、TNF- α 相对应mRNA的表达水平的逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) TRIzol试剂盒(Invitrogen, USA);检测肌钙蛋白I(cTnI)、脑钠肽(BNP)、肌酸激酶同工

酶(CK-MB)和肌红蛋白(Mb)的酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(英国Abcam公司)。

构建SIC大鼠模型和不同组大鼠处理 将LPS在生理盐水中溶解稀释,以6mg/kg的剂量通过腹腔注射的方法构建SIC大鼠模型^[10]。对照组大鼠只接受同等体积的生理盐水腹腔注射。在SIC+miR-21模拟物组和SIC+miR-21抑制剂组,miR-21模拟物或miR-21抑制剂分别以0.2 μ L/g在LPS注射前24h经过尾静脉注射给大鼠。

血液标本和心肌组织标本获取 在LPS腹腔注射后24h,从髂静脉采集静脉血3mL。将血标本在室温下放置20min后,3000转/min,离心10min后取上清液并分装保存于-80 $^{\circ}$ C。采集血标本后,将大鼠处死,分离出心脏并在预冷生理盐水中洗净,在-80 $^{\circ}$ C保存。

实时定量聚合酶链反应(RT-PCR) 利用RT-PCR检测心肌组织中miR-21、TLR4信号通路分子TLR4、MyD88、IRAK-1、TRAF6、NF- κ B和炎症因子IL-1、IL-6、TNF- α 相对应mRNA的表达水平。所用引物列举如下:miR-21: Forward: 5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGAT-3', Reverse: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGCAATTCAGTTGAGTCAACA-3'; TLR4: Forward: 5'-CTGGGTGAGAAAGCTGGTAA-3', Reverse: 5'-AGCCTTCCTGGATGATGTTGG-3'; MyD88: Forward: 5'-GTTGTGTGTGCCGACCCT-3', Reverse: 5'-GTCAGAAACAACCACCACCATG C-3'; IRAK-1: Forward: 5'-GGCCTGGACCATCTTGTTAC-3', Reverse: 5'-CATGGGTATGA CGGAGTTGT-3'; TRAF6: Forward: 5'-CATCTTCAGTTACCGACAGCTCAG-3', Reverse: 5'-TGGTCGAGAATTGTAAGGCGTAT-3'; NF- κ B: Forward: 5'-CCAAAGAAGGACACGACA GAATC-3', Reverse: 5'-GGCAGGCTATTGCTCATCACA-3'; IL-1: Forward: 5'-ATGAAG TTCCTCTCTGCAAGAGACT-3', Reverse: 5'-CACTAGGTTTGGCCGAGTAGATCTC-3'; IL-6: 5'-GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA-3', 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'; TNF- α : Forward: 5'-GATGGACTCACCAGGTGAG-3', Reverse: 5'-CTCATG GTGTCCTTCCAGG-3'。具体步骤如下:首先利用

TRIzol 试剂并参照说明书提取出损伤心肌组织中的总 RNA, RNA 的量是利用 OD260/280 比值来确定的。每一个标本取 1 μ g RNA 用来逆转录为 cDNA, 每 1 μ l cDNA 被用来做 RT-PCR 检测, 做 RT-PCR 的内参为 β -actin。具体的操作步骤参照各种试剂的说明书进行。PCR 的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。每份标本检测 3 次, 最终取平均值作为最终结果。

酶联免疫吸附试验 采用 ELISA 法检测各组大鼠血 cTnI、BNP、CK-MB、Mb 的表达水平, 具体操作步骤参照相应试剂盒说明进行。每项心肌损伤标志物均检测 3 次, 计算出平均数值作为最终结果。

统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 4 组间数据的总体比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD-t 方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

心肌组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路分子的表达

表 1 4 组大鼠心肌组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路分子的表达水平 (相对表达量) ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 (n=12)	SIC 组 (n=12)	SIC + miR-21 模拟物组 (n=12)	SIC + miR-21 抑制剂组 (n=12)	P
miR-21	0.95 \pm 0.24	2.05 \pm 0.38*	5.63 \pm 0.87 [#]	1.27 \pm 0.22 [#]	0.003
TLR4	1.32 \pm 0.26	2.68 \pm 0.41*	1.57 \pm 0.29 [#]	3.54 \pm 0.46 [#]	0.002
MyD88	1.21 \pm 0.19	3.79 \pm 0.52*	1.66 \pm 0.24 [#]	4.77 \pm 0.53 [#]	0.012
IRAK-1	1.09 \pm 0.21	3.84 \pm 0.48*	1.82 \pm 0.33 [#]	5.02 \pm 0.61 [#]	0.009
TRAF6	1.15 \pm 0.22	4.03 \pm 0.52*	1.46 \pm 0.27 [#]	5.23 \pm 0.68 [#]	0.008
NF- κ B	0.98 \pm 0.18	3.57 \pm 0.44*	1.73 \pm 0.36 [#]	5.61 \pm 0.71 [#]	0.014

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 SIC 组比较, [#] $P < 0.05$

表 2 4 组大鼠心肌组织中炎症因子的表达水平 (相对表达量) ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 (n=12)	SIC 组 (n=12)	SIC + miR-21 模拟物组 (n=12)	SIC + miR-21 抑制剂组 (n=12)	P
IL-1	1.12 \pm 0.34	4.75 \pm 0.69*	2.07 \pm 0.42 [#]	6.88 \pm 0.89 [#]	0.026
IL-6	1.37 \pm 0.41	5.69 \pm 0.72*	2.19 \pm 0.54 [#]	7.34 \pm 0.91 [#]	0.038
TNF- α	1.28 \pm 0.39	5.92 \pm 0.68*	1.96 \pm 0.43 [#]	7.56 \pm 0.93 [#]	0.018

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 SIC 组比较, [#] $P < 0.05$

表 3 4 组大鼠心肌组织的损伤程度 ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 (n=12)	SIC 组 (n=12)	SIC + miR-21 模拟物组 (n=12)	SIC + miR-21 抑制剂组 (n=12)	P
cTnI (ng/mL)	0.98 \pm 0.41	6.55 \pm 1.21*	3.12 \pm 0.61 [#]	8.51 \pm 1.62 [#]	0.005
BNP (pg/mL)	63.83 \pm 9.05	193.41 \pm 25.31*	107.86 \pm 13.63 [#]	231.92 \pm 30.17 [#]	0.026
CK-MB (U/L)	11.59 \pm 3.62	25.82 \pm 5.01*	15.26 \pm 3.96 [#]	56.84 \pm 9.58 [#]	0.032
Mb (ng/mL)	21.47 \pm 4.83	82.72 \pm 10.46*	46.57 \pm 7.04 [#]	135.93 \pm 19.94 [#]	0.041

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 SIC 组比较, [#] $P < 0.053$

水平 与对照组比较, SIC 组大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88、IRAK-1、TRAF6、NF- κ B 的表达水平升高 (P 均 < 0.05)。与 SIC 组比较, SIC + miR-21 模拟物组大鼠心肌组织中 miR-21 的表达量升高, TLR4 信号通路分子的表达水平降低; SIC + miR-21 抑制剂组大鼠心肌组织中 miR-21 的表达量降低, TLR4 信号通路分子的表达水平升高 (P 均 < 0.05), 见表 1。

心肌组织中炎症因子的表达水平 与对照组比较, SIC 组大鼠心肌组织中 IL-1、IL-6、TNF- α 的表达水平升高 (P 均 < 0.05)。与 SIC 组比较, SIC + miR-21 模拟物组表达水平降低; SIC + miR-21 抑制剂组表达水平升高 (P 均 < 0.05), 见表 2。

心肌组织的损伤程度 与对照组比较, SIC 组大鼠血 cTnI、BNP、CK-MB、Mb 的表达水平升高。与 SIC 组比较, SIC + miR-21 模拟物组表达水平降低; SIC + miR-21 抑制剂组表达水平升高 (P 均 < 0.05), 见表 3。

讨 论

本研究发现, 采用 miR-21 模拟物提高 SIC 大鼠

心肌组织中 miR-21 表达量后,心肌中 TLR4 信号通路分子和炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- α 的表达水平降低,血液中心肌损伤标志物 cTnI、BNP、CK-MB、Mb 的表达水平也降低;而采用 miR-21 抑制剂降低 SIC 大鼠心肌组织中 miR-21 的表达量后,以上各项检测指标变化与 SIC + miR-21 模拟物组相反。表明 MiR-21 可以通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活性减轻脓毒症后炎症反应,进而减轻 SIC 所致心肌损伤。

过度的炎症反应在 SIC 病理机制中发挥重要作用,并通常成为始动和加剧 SIC 病情的关键因素。研究发现,TLR4 介导 Myd88 依赖性 NF- κ B 信号通路活化后,释放的 IL-1、IL-6、TNF- α 在诱发脓毒症相关器官损伤中具有关键作用^[11, 12]。当脓毒症在机体内出现后,一系列内毒素会通过活化炎症信号通路促使免疫细胞释放炎症因子,从而导致器官功能受损如 SIC^[13, 14]。发生脓毒症时,革兰氏阴性菌细胞壁上的 LPS 能够识别 TLR4,继而活化 Myd88、IRAK1、TRAF6 和 NF- κ B,随后 NF- κ B 迅速由细胞质进入细胞核并激活靶基因的表达,最后诱发下游炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- α 的释放^[16, 17]。TNF- α 和 IL-6 通过抑制 Ca²⁺ 转运、调节 NO 通路、降解关键收缩蛋白、影响线粒体功能和激活细胞间信号传递等方式导致 SIC 性心肌受损^[15, 16]。因而,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活性进而减少炎症因子的释放是减轻 SIC 病情的有力措施。

miR 是一种由 20-25 个核酸分子组成的内源性非编码 RNA,可以在转录后水平调控基因表达^[9]。研究发现,某些 miRs 具有抑制炎症反应的作用。其中,miR-21 被证实在许多哺乳动物细胞中高表达,且具有抑制炎症反应的功能^[10]。新近研究发现,miR-21 可以通过作用于 TLR4/NF- κ B 信号通路的方式在经过 LPS 刺激的骨髓细胞中发挥抑制炎症反应的作用^[11]。本研究发现 miR-21 可以负性调控 TLR4/NF- κ B 信号通路,进而减轻脓毒症后心肌中炎症反应和 SIC 性心肌损伤。本研究也存在一定的局限性,如血液标本和心肌组织是在 SIC 后 24 h 获取的,miR-21 对于 TLR4/NF- κ B 通路的负性调控作用是否在 SIC 的亚急性期和慢性期也能够体现出来尚不清楚。另外,关于 miR-21 调控 TLR4/NF- κ B 通路后影响 SIC 病情的具体机制仍需要开展更多的研究加以深入探索。

参考文献

1 Sharawy N, Lehmann C. New directions for sepsis and septic shock re-

- search[J]. *J Surg Res*, 2015, 194(2): 520-527.
- 2 Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy[J]. *J Intensive Care*, 2015, 3(1): 48.
- 3 Sato R, Kuriyama A, Takada T, et al. Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: A retrospective cohort study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95: e5031.
- 4 Hobai IA, Edgcomb J, LaBarge K et al. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy [J]. *Shock*. 2015, 43(1): 3-15.
- 5 Li J, Xie C, Zhuang J, et al. Resveratrol attenuates inflammation in the rat heart subjected to ischemia-reperfusion: Role of the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*. 2015, 11(2): 1120-1126.
- 6 Karra R, Knecht AK, Kikuchi K, et al. Myocardial NF- κ B activation is essential for zebrafish heart regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(43): 13255-13260.
- 7 Espiñ-Peérez A, Krauskopf J, Chadeau-Hyam M, et al. Short-term transcriptome and micro RNAs responses to exposure to different air pollutants in two population studies [J]. *Environ Pollut*. 2018, 242 (Pt A): 182-190.
- 8 Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response [J]. *Frontiers Immunol*, 2015, 6(1): 19.
- 9 Keisuke Nara, Nobuyuki Kawashima, Sonoko Noda, et al. Anti-inflammatory roles of microRNA 21 in lipopolysaccharide-stimulated human dental pulp cells [J]. *J Cell Physiol*. 2019, 234(11): 21331-21341.
- 10 Cao C, Zhang Y, Chai Y, et al. Attenuation of sepsis-induced cardiomyopathy by regulation of MicroRNA-23b is mediated through targeting of MyD88-Mediated NF- κ B Activation [J]. *Inflammation*, 2019, 42(3): 973-986.
- 11 Shu-fa Y, Tai-feng Z, Yan-mei S, et al. Coriolus versicolor mushroom polysaccharides exert immunoregulatory effects on mouse B cells via membrane Ig and TLR-4 to activate the MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Mol Immunol*. 2015, 64(1): 144-151.
- 12 Kim E, Kim HC, Lee S, et al. Dexmedetomidine confers neuroprotection against transient global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting inflammation through inactivation of the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 649(1): 20-27.
- 13 Bi W, Zhu L, Jing X, et al. Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated co-cultured BV2 cells through inhibition of the TLR4 pathway [J]. *Mol Med Rep*. 2014, 10(4): 1793-1799.
- 14 Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, et al. Mitochondrial mechanisms in septic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*. 2015, 16(8): 17763-17778.
- 15 Zhou Q, Pan X, Wang L, et al. The protective role of neuregulin-1: A potential therapy for sepsis-induced cardiomyopathy [J]. *Eur J Pharmacol*. 2016, 788(45): 234-240.
- 16 Hiram R, Rizcallah E, Sirois C, et al. Resolvin D1 reverses reactivity and Ca²⁺ sensitivity induced by ET-1 TNF- α and IL-6 in the human pulmonary artery [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014, 307(11): H1547-1558.
- 17 石成玉, 徐艳霞, 周莱, 等. 脓毒症大鼠心肌组织 Toll 样受体 4 和肿瘤坏死因子- α 表达及细胞凋亡研究 [J]. *内科急危重症杂志*. 2018, 24(6): 504-509.

(2019-09-25 收稿 2022-01-20 修回)