DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0140　　**文章编号** 1671-8852(2025)03-0283-08

miR-144-3p靶向调节PTEN/AKT通路减轻坏死性小肠结肠炎新生大鼠肠损伤

乐志晨　刘一帆　张　文
武汉大学中南医院小儿外科　湖北　武汉　430071

摘要　目的：探讨坏死性小肠结肠炎（NEC）新生大鼠肠组织中miR-144-3p的表达，并进一步探究miR-144-3p对NEC新生大鼠肠损伤的影响及可能机制。方法：选取2日龄新生大鼠，采用高渗配方奶喂养、缺氧、冷刺激和LPS灌胃构建NEC动物模型，随机分为正常组、NEC组、NEC＋agomir-NC组、NEC＋miR-144-3p agomir组，每组6只。体外培养大鼠小肠隐窝上皮细胞（IEC-6），采用LPS诱导NEC肠上皮细胞模型，分为对照组、LPS组、LPS＋mimic NC组、LPS＋miR-144-3p mimic组、LPS＋miR-144-3p mimic＋AKT抑制剂（MK-2206 2HCl）组。双荧光素酶报告基因验证miR-144-3p与PTEN的靶向关系；qRT-PCR检测miR-144-3p转录水平；ELISA检测IL-1β和TNF-α蛋白水平；Western Blot检测PTEN、AKT、p-AKT蛋白的表达；HE染色检测肠组织病理改变；流式细胞术检测IEC-6细胞凋亡情况。结果：双荧光素酶报告基因证实PTEN是miR-144-3p的靶基因。在NEC动物和肠上皮细胞模型中，与各自空白对照组比，NEC模型组miR-144-3p转录水平、AKT磷酸化水平均显著下降（$P<0.05$），IL-1β、TNF-α、PTEN蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），肠组织病理学评分和肠上皮细胞凋亡比例均显著升高（$P<0.05$）。与各自阴性对照组比，NEC＋miR-144-3p agomir组和LPS＋miR-144-3p mimic组miR-144-3p转录水平、AKT磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$），IL-1β、TNF-α、PTEN蛋白表达水平均显著下降（$P<0.05$），肠组织病理学评分和肠上皮细胞凋亡比例均显著下降（$P<0.05$）。在细胞模型中，与LPS＋miR-144-3p mimic组比，LPS＋miR-144-3p mimic＋AKT抑制剂组miR-144-3p转录水平、PTEN蛋白表达水平变化不显著（$P>0.05$），而AKT磷酸化水平显著下降（$P<0.05$），IL-1β、TNF-α蛋白表达水平和肠上皮细胞凋亡比例均显著升高（$P<0.05$）。结论：miR-144-3p在NEC新生大鼠肠组织中表达明显下降，过表达miR-144-3p可能通过负性调控PTEN蛋白的表达，进而促进AKT磷酸化，减轻NEC新生大鼠肠损伤。

关键词　坏死性小肠结肠炎；miR-144-3p；PTEN
中图分类号　R725.7
文献标识码　A　　**开放科学（资源服务）标识码（OSID）：**

miR-144-3p targets the regulation of PTEN/AKT pathway to alleviate intestinal injury in neonatal rats with necrotizing enterocolitis

LE Zhichen, LIU Yifan, ZHANG Wen
Dept. of Pediatric Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To detect the expression of miR-144-3p in the intestinal tissues of neonatal rats with necrotizing enterocolitis (NEC) and explore the effect of miR-144-3p on intestinal injury in neonatal rats with NEC and its possible mechanism. **Methods:** Two-day-old neonatal rats were selected to con-

课题来源：武汉大学中南医院优秀博士（后）项目（编号：ZNYB2020025）
作者简介：乐志晨，男，1997—，医学硕士生，主要从事小儿外科疾病研究，E-mail:15243646359@163.com
通信作者：张文，男，1966—，医学博士，副教授，主任医师，主要从事小儿泌尿外科、小儿微创技术研究，E-mail:wzhang115@163.com

struct the NEC animal model using hypertonic formula milk feeding, hypoxia, cold stimulation, and LPS gavage and were randomly divided into the normal group, NEC group, NEC+agomir-NC group, and NEC+miR-144-3p agomir group, with six rats in each group. Rat small intestinal epithelial cells (IEC-6) were cultured *in vitro*, and the NEC intestinal epithelial cell model was induced by LPS. The cells were divided into control, LPS, LPS+mimic NC, LPS+miR-144-3p mimic, and LPS+miR-144-3p mimic+AKT inhibitor (MK-2206 2HCl) groups. The Dual luciferase reporter gene experiment was adopted to validate the miR-144-3p targeting to PTEN; qRT-PCR was performed to detect the transcription levels of miR-144-3p; ELISA was used to detect the levels of IL-1β and TNF-α proteins; Western Blot was used to detect the expression of PTEN, AKT, and p-AKT proteins; HE staining was used to detect intestinal histopathological change; Flow cytometry was performed to detect apoptosis in IEC-6 cells. **Results:** The dual luciferase reporter gene experiment confirmed PTEN as a target gene of miR-144-3p. In the NEC animal and intestinal epithelial cell models, miR-144-3p transcription levels and AKT phosphorylation levels were significantly decreased in the NEC model group ($P<0.05$), IL-1β, TNF-α, and PTEN proteins expression levels were significantly increased ($P<0.05$), and intestinal histopathology scores and the percentage of intestinal epithelial cell apoptosis were significantly increased as compared with those in their respective blank control groups ($P<0.05$). Compared with those in the respective negative control groups, miR-144-3p transcription levels and AKT phosphorylation levels were significantly higher in the NEC+miR-144-3p agomir group and the LPS+miR-144-3p mimic group ($P<0.05$), IL-1β, TNF-α, and PTEN proteins expression levels were significantly decreased ($P<0.05$), and the intestinal histopathology score and the apoptosis percentage of intestinal epithelial cells were significantly decreased ($P<0.05$). In the cell model, as compared with those in the LPS+miR-144-3p mimic group, miR-144-3p transcription levels and PTEN protein expression levels in the LPS+miR-144-3p mimic+AKT inhibitor group did not change significantly ($P>0.05$), whereas AKT phosphorylation levels were significantly decreased ($P<0.05$), IL-1β and TNF-α proteins expression levels and intestinal epithelial cell apoptosis ratio were all significantly elevated ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression of miR-144-3p was significantly decreased in the intestinal tissues of NEC neonatal rats. Overexpression of miR-144-3p may attenuate intestinal injury in NEC neonatal rats by negatively regulating the expression of PTEN protein, which in turn promotes AKT phosphorylation.

Key Words Necrotizing Enterocolitis; miR-144-3p; PTEN

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期常见的胃肠道危急重症,主要发生于早产儿。在极低出生体质量儿中,NEC的发病率约为7%[1-2]。NEC病变主要累及回肠末端、盲肠和近端结肠,主要病理改变包括黏膜和黏膜下层糜烂、坏死以及肠壁炎症等,严重者可出现肠壁全层坏死和穿孔。虽然目前对NEC具体的发病机制尚不完全清楚,但肠壁炎症反应被认为是NEC最主要的病因。

微小RNA(microRNA,miRNA或miR)是一类长约22个核苷酸的非编码单链RNA分子,通过负性调控靶基因的表达,在细胞增殖、凋亡和炎症浸润等多种生物学过程中发挥着重要作用[3]。miR-144-3p作为一种高度保守的miRNA,已被证实参与调控多种炎症反应和上皮细胞凋亡。研究[4]发现,过表达miR-144-3p可抑制小鼠树突状细胞分泌促炎因子TNF-α和IL-6,减轻DSS诱导的结肠炎。此外,外泌体中的miR-144-3p可改善小鼠肠缺血再灌注损伤模型的氧化应激水平和肠上皮细胞凋亡[5]。另有研究[6]发现,过表达miR-144-3p可改善肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤。鉴于肠壁炎症反应、缺血缺氧以及肠上皮细胞受损等均是NEC发病的危险因素,基于既往研究结果推测miR-144-3p可能也参与了NEC的发生发展。

磷酸酶张力蛋白同源物（phosphatase and tensin homolog，PTEN）具有蛋白/脂质双重磷酸酶活性，参与调控蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）的活化，PTEN/AKT通路平衡失调与多种疾病的发生发展密切相关[7]。生物信息学分析[5,8]发现PTEN 3′非翻译区（3′-UTR）存在miR-144-3p的结合位点，且已有研究证实miR-144-3p可靶向结合PTEN 3′-UTR，负性调控PTEN的表达。研究[9]发现，NEC新生大鼠肠组织中PTEN蛋白的表达显著升高，而AKT磷酸化水平显著降低。而miR-144-3p能否通过靶向调节PTEN/AKT通路减轻NEC新生大鼠肠组织损伤和肠上皮细胞凋亡尚不清楚。

因此，本研究通过构建NEC新生大鼠模型和肠上皮细胞模型，初步探讨miR-144-3p在NEC中的作用及其潜在机制，报道如下。

1　材料与方法

1.1　实验动物　24只SPF级新生2日龄SD大鼠，体质量6～7 g，购自湖北贝恩特生物科技有限公司，生产许可证编号为SCXK（鄂）2021-0027。

1.2　主要试剂　脂多糖（lipopolysaccharide，LPS，Sigma-Aldrich公司），DMEM培养基（Gibco公司），AKT抑制剂（MK-2206 2HCl，Selleck公司），细胞凋亡检测试剂盒（杭州联科公司），白细胞介素1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）ELISA试剂盒（武汉博欧特公司），miRNA提取试剂盒、miRNA逆转录试剂盒、miRNA荧光定量PCR试剂盒（上海生工生物公司），兔源一抗β-actin、PTEN、AKT、p-AKT及辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗兔二抗（武汉三鹰公司），agomir-NC及miR-144-3p agomir（广州锐博公司），miR-144-3p mimic及mimic NC（上海生工生物公司），Lipofectamine™ 3000转染试剂（Thermo Fisher公司），双荧光素酶试剂盒（Promega公司）。

1.3　实验方法

1.3.1　NEC动物模型构建与分组　采用随机数字表法将24只新生2日龄大鼠随机分为正常组、NEC组、NEC＋agomir-NC组、NEC＋miR-144-3p agomir组，6只/组，雌雄不限。正常组新生大鼠由母鼠喂养，其余3组大鼠与母鼠分离，参考WEI等[10]的方法构建NEC新生大鼠模型，具体如下：每天间隔6 h人工喂养高渗配方奶，第1天按每次0.1 mL给予，随后每24 h增加0.1 mL，此外，每天间隔12 h进行缺氧（5％氧气＋95％氮气，10 min）和冷刺激（4 ℃，10 min）并联合LPS灌胃（6 mg•kg^{-1}，每天1次），连续3 d重复上述操作完成造模。NEC＋agomir-NC组和NEC＋miR-144-3p agomir组在造模前3 d分别经腹腔注射agomir-NC和miR-144-3p agomir，0.25 mmol•kg^{-1}，正常组和NEC组同期经腹腔注射等量磷酸缓冲盐溶液（PBS），连续处理3 d，末次注射完成24 h后开始NEC模型构建。

1.3.2　HE染色及病理评分　取距回盲部1 cm小肠组织置入4％多聚甲醛固定，经石蜡包埋、切片、脱蜡水化后，HE染色，在光镜下观察其病理变化并拍照。病理评分标准参考NADLER等[11]的报道，具体如下，0分：绒毛上皮完整，组织结构正常；1分：轻微黏膜下和（或）固有层分离；2分：中度黏膜下和（或）固有层分离和（或）黏膜下和肌肉层水肿；3分：严重黏膜下和（或）固有层分离和（或）黏膜下和肌肉层水肿，局部绒毛脱落；4分：肠绒毛消失伴肠坏死。

1.3.3　细胞分组与处理　大鼠小肠隐窝上皮细胞（rat small intestinal epithelial cells，IEC-6）由山东解螺旋生物科技有限公司赠送。取IEC-6细胞进行分组及处理，对照组：不作任何处理；LPS组：细胞采用100 μg•mL^{-1} LPS处理24 h；LPS＋mimic NC组：mimic NC转染细胞24 h后，用100 μg•mL^{-1} LPS处理24 h；LPS＋miR-144-3p mimic组：miR-144-3p mimic转染细胞24 h后，用100 μg•mL^{-1} LPS处理24 h；LPS＋miR-144-3p mimic＋AKT抑制剂（MK-2206 2HCl）组：miR-144-3p mimic转染细胞及20 μmol•L^{-1} AKT抑制剂（MK-2206 2HCl）预处理细胞24 h后，用100 μg•mL^{-1} LPS处理24 h，进行后续检测。

1.3.4　ELISA检测　按照ELISA试剂盒说明书检测各组肠组织匀浆及各组IEC-6细胞上清液中IL-1β及TNF-α的蛋白表达水平。

1.3.5　qRT-PCR检测　采用microRNA提取试剂盒提取各组新生大鼠肠组织及各组IEC-6细胞中的miRNA。miR-144-3p按照miRNA第一链cDNA合成（茎环法）试剂盒说明书进行反转录合成cDNA，茎环法设计miR-144-3p逆转录引物：5′-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG-CACTGGATACGACAGTACA-3′。逆转录产物cDNA则按照miRNA荧光定量PCR试剂盒说明书进行qPCR扩增。miR-144-3p以U6为内参，引物由上海生工生物公司设计合成（表1）。

表1 PCR引物序列

引物	上游引物(5′—3′)	下游引物(5′—3′)
miR-144-3p	GCGCGCGTACAG-TATAGATGA	ATCCAGTG-CAGGGTCCGAGG
U6	CTCGCTTCGGCAG-CACA	AACGCTTCAC-GAATTTGCGT

1.3.6 Western Blot检测 按Western及IP细胞裂解液说明书提取蛋白,用BCA法进行蛋白定量;经电泳分离蛋白后转至PVDF膜上,用5%BSA溶液封闭1 h;分别加入按推荐比例稀释的一抗,4 ℃孵育过夜;用1×TBST溶液于脱色摇床上清洗3次,加入按推荐比例稀释的HRP标记的羊抗兔二抗,室温孵育1 h;最后经1×TBST溶液冲洗后加入ECL化学发光试剂检测蛋白显色情况。

1.3.7 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。每管加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI染液,室温避光孵育15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率,FlowJo™ V10软件分析数据。

1.3.8 双荧光素酶报告基因实验 分别构建PTEN野生型质粒(WT-PTEN)及突变型质粒(MUT-PTEN),将WT-PTEN和MUT-PTEN分别与mimic NC或miR-144-3p mimic共转染于IEC-6细胞。48 h后检测萤火虫荧光素酶活性及海肾荧光素酶活性,以其比值表示荧光素酶相对活性。

1.3.9 统计学分析 使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步多重比较采用SNK-q检验。非正态分布的计量资料以中位数(四分位数间距)[$M(P_{25},P_{75})$]表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-144-3p靶向调控PTEN TargetScan在线数据库预测结果发现PTEN 3′非翻译区存在miR-144-3p的靶点。双荧光素酶实验显示,mimic NC+MUT-PTEN组与miR-144-3p mimic+MUT-PTEN组的荧光素酶相对活性差异无统计学意义($P>0.05$);而与mimic NC+WT-PTEN组比较,miR-144-3p mimic+WT-PTEN组荧光素酶相对活性显著降低($P<0.05$),证实miR-144-3p可靶向调控PTEN(图1)。

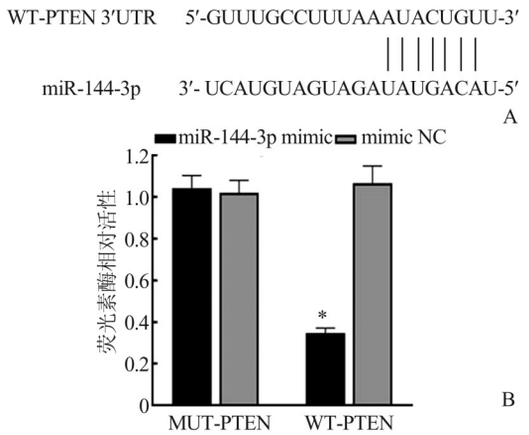


图1 miR-144-3p靶向调控PTEN

A. TargetScan数据库预测结果;B. 荧光素酶相对活性比较。与mimic NC+WT-PTEN组比较,*$P<0.05$

2.2 各组新生大鼠肠组织中miR-144-3p转录水平比较 qRT-PCR检测结果显示:与正常组比较,NEC组、NEC+agomir-NC组新生大鼠肠组织中miR-144-3p转录水平均显著降低($P<0.05$)。与NEC+agomir-NC组比较,NEC+miR-144-3p agomir组新生大鼠肠组织中miR-144-3p转录水平显著升高($P<0.05$)(表2)。

表2 各组新生大鼠肠组织中miR-144-3p转录水平比较

($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	miR-144-3p
正常组	1.00±0.07
NEC组	0.44±0.03*
NEC+agomir-NC组	0.45±0.09*
NEC+miR-144-3p agomir组	1.08±0.13#

与正常组比较,*$P<0.05$;与NEC+agomir-NC组比较,#$P<0.05$

2.3 各组新生大鼠肠组织病理学变化比较 正常组新生大鼠回肠末端结构正常,绒毛上皮完整,未观察到黏膜下层和固有层有断裂或分离现象,病理评分为0.00(0.00, 1.00)。NEC组和NEC+agomir-NC组新生大鼠回肠末端结构紊乱、可见严重的黏膜下层和固有层分离,局部出现绒毛脱落甚至缺失,病理评分分别为3.00(3.00, 4.00)、3.50(2.75, 4.00),均显著高于正常组($P<0.05$)。与NEC+agomir-NC组比较,NEC+miR-144-3p agomir组新生大鼠回肠末端病变明显改善,绒毛脱落断裂等情况减少,病理评分为1.00(0.00, 1.25),显著低于NEC+agomir-NC组($P<0.05$)(图2)。

2.4 各组新生大鼠肠组织中IL-1β、TNF-α蛋白表达水平比较 ELISA检测结果显示:与正常组比较,NEC组、NEC+agomir-NC组新生大鼠肠组织

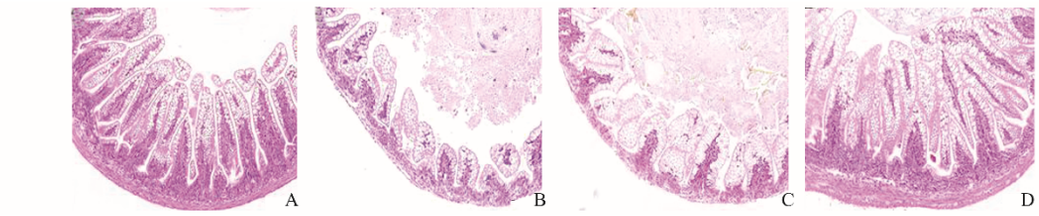


图 2　各组新生大鼠肠组织病理学变化比较（HE×200）

A. 正常组；B. NEC 组；C. NEC＋agomir-NC 组；D. NEC＋miR-144-3p agomir 组

中 IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与 NEC＋agomir-NC 组比较，NEC＋miR-144-3p agomir 组新生大鼠肠组织中 IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）（表 3）。

表 3　各组新生大鼠肠组织中 IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平比较（$pg \cdot mg^{-1}$，$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	IL-1β	TNF-α
正常组	47.88±6.41	91.42±8.23
NEC 组	144.47±7.13*	333.88±18.16*
NEC＋agomir-NC 组	146.09±8.39*	332.68±10.44*
NEC＋miR-144-3p agomir 组	89.76±6.05#	128.52±6.09#

与正常组比较，*$P<0.05$；与 NEC＋agomir-NC 组比较，#$P<0.05$

2.5　各组新生大鼠肠组织中 PTEN、AKT、p-AKT 蛋白表达水平比较　Western Blot 检测结果显示：与正常组比较，NEC 组、NEC＋agomir-NC 组新生大鼠肠组织中 PTEN 蛋白表达显著升高（$P<0.05$），AKT 磷酸化水平显著降低（$P<0.05$）。NEC 组与 NEC＋agomir-NC 组新生大鼠肠组织中 PTEN 及 AKT 磷酸化水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 NEC＋agomir-NC 组比较，NEC＋miR-144-3p agomir 组新生大鼠肠组织中 PTEN 蛋白表达水平显著降低，AKT 磷酸化水平显著升高（$P<0.05$）（图 3）。

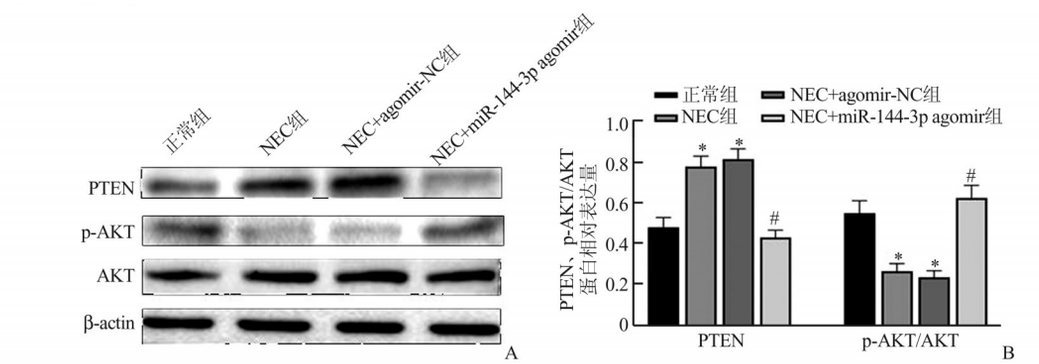


图 3　各组新生大鼠肠组织中 PTEN、AKT、p-AKT 蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

A. 蛋白印迹图；B. 蛋白相对表达量。与正常组比较，*$P<0.05$；与 NEC＋agomir-NC 组比较，#$P<0.05$

2.6　各组 IEC-6 细胞中 miR-144-3p 转录水平比较　qRT-PCR 检测结果显示：与对照组比较，LPS 组、LPS＋mimic NC 组 IEC-6 细胞中 miR-144-3p 转录水平均显著降低（$P<0.05$）。与 LPS＋mimic NC 组比较，LPS＋miR-144-3p mimic 组 miR-144-3p 转录水平显著升高（$P<0.05$）。与 LPS＋miR-144-3p mimic 组比较，LPS＋miR-144-3p mimic＋AKT 抑制剂组 IEC-6 细胞中 miR-144-3p 转录水平差异无统计学意义（$P>0.05$），表明 AKT 抑制剂不影响 miR-144-3p mimic 的转染效率（表 4）。

表 4　各组 IEC-6 细胞中 miR-144-3p 转录水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	miR-144-3p
对照组	1.00±0.02
LPS 组	0.59±0.04*
LPS＋mimic NC 组	0.64±0.02*
LPS＋miR-144-3p mimic 组	1.15±0.03#
LPS＋miR-144-3p mimic＋AKT 抑制剂组	1.08±0.07

与对照组比较，*$P<0.05$；与 LPS＋mimic NC 组比较，#$P<0.05$

2.7　各组 IEC-6 细胞上清中 IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平比较　ELISA 检测结果显示：与对照组比较，LPS 组、LPS＋mimic NC 组 IEC-6 细胞上清中 IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平均明显上调（$P<0.05$）。与 LPS＋mimic NC 组比较，LPS＋miR-144-3p mimic 组 IEC-6 细胞上清中 IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平明显下调（$P<0.05$）。与

LPS+miR-144-3p mimic组比较,LPS+miR-144-3p mimic+AKT抑制剂组IEC-6细胞上清中IL-1β、TNF-α蛋白表达水平明显上调($P<0.05$)(表5)。

2.8 各组IEC-6细胞凋亡率比较 流式细胞术检测结果显示:与对照组比较,LPS组、LPS+mimic NC组细胞凋亡率均显著升高($P<0.05$)。与LPS+mimic NC组比较,LPS+miR-144-3p mimic组细胞凋亡率显著下降($P<0.05$)。与LPS+miR-144-3p mimic组比较,LPS+miR-144-3p mimic+AKT抑制剂组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)(图4)。

表5 各组IEC-6细胞上清中IL-1β、TNF-α蛋白表达水平比较($pg\cdot mg^{-1}$,$\bar{x}\pm s$,$n=3$)

组别	IL-1β	TNF-α
对照组	92.72±4.21	52.62±3.24
LPS组	364.36±6.15*	428.36±6.48*
LPS+mimic NC组	342.82±9.38*	442.58±5.16*
LPS+miR-144-3p mimic组	168.56±5.06#	236.82±5.84#
LPS+miR-144-3p mimic+AKT抑制剂组	286.94±8.42&	386.34±8.62&

与对照组比较,*$P<0.05$;与LPS+mimic NC组比较,#$P<0.05$;与LPS+miR-144-3p mimic比较,&$P<0.05$

2.9 各组IEC-6细胞中PTEN、AKT、p-AKT蛋白表达水平比较 Western Blot检测结果显示:与对照组比较,LPS组、LPS+mimic NC组PTEN蛋白表达显著升高($P<0.05$),AKT磷酸化水平显著降低($P<0.05$)。与LPS+mimic NC组比较,LPS+miR-144-3p mimic组PTEN蛋白表达水平显著降低,AKT磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。与LPS+miR-144-3p mimic组比较,LPS+miR-144-3p mimic+AKT抑制剂组PTEN蛋白表达变化差异无统计学意义($P>0.05$),而AKT磷酸化水平显著降低($P<0.05$)(图5)。

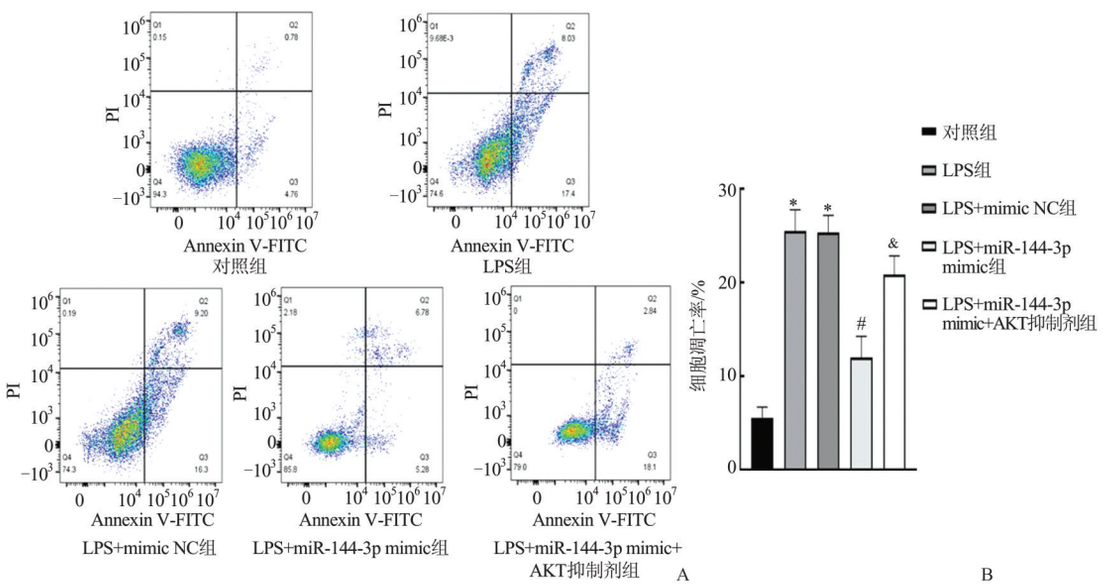


图4 各组IEC-6细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

A.各组IEC-6细胞凋亡情况;B.各组IEC-6细胞凋亡率比较。与对照组比较,*$P<0.05$;与LPS+mimic NC组比较,#$P<0.05$;与LPS+miR-144-3p mimic组比较,&$P<0.05$

3 讨论

NEC仍然是早产儿最常见的胃肠道危急重症,然其发病因素极为复杂,具体的发病机制尚不完全清楚,这为疾病的早期诊断及针对性治疗带来困难。既往研究[12]认为肠壁的炎症反应是NEC的最主要病因,由于早产儿肠道发育不成熟,血供调节能力差,肠蠕动弱以及食物易滞留发酵等因素,肠道致病菌大量繁殖,导致肠道菌群紊乱;此外,因早产儿肠道黏膜屏障不完善且免疫功能低下等因素,肠道致病菌易侵入肠壁,产生内毒素LPS损伤肠上皮细胞并活化TLR4受体诱导产生多种细胞炎症因子,其中包括白细胞介素(interleukin,IL)和TNF-α,引起炎症级联反应,对肠壁产生持续性伤害[12]。

近年来,多篇研究[13-14]基于高通量测序技术发现在NEC患儿和小鼠模型肠组织中存在众多差异表达显著的miRNA,通过与其靶基因构成复杂的生物学调控网络参与NEC的发生发展。其中,miR-144-3p作为一种在肿瘤研究中备受关注的miRNA,

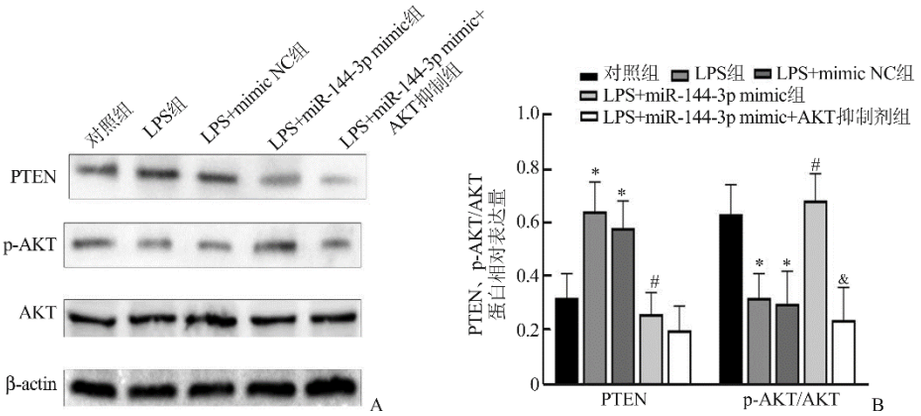


图 5　IEC-6 细胞中 PTEN、AKT、p-AKT 蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

A. 蛋白印迹图；B. 蛋白相对表达量。与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与 LPS＋mimic NC 组比较，$^{\#}P<0.05$；与 LPS＋miR-144-3p mimic 组比较，$^{\&}P<0.05$

已被证实在多种炎症性疾病中发挥一定的抗炎或促炎作用。LIN 等[4]研究发现 miR-144-3p 基因敲除小鼠树突状细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 及 CD40 的表达增加，促炎因子 TNF-α 和 IL-6 分泌增多，加剧了 DSS 诱导的结肠炎。ZHANG 等[15]研究发现在同型半胱氨酸干预的巨噬细胞中 miR-144-3p 表达显著下降，过表达 miR-144-3p 可通过负性调控 Rap1a 抑制巨噬细胞分泌促炎因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α，减轻同型半胱氨酸诱导的炎症反应。另有研究[16]发现，骨关节炎滑膜组织中 miR-144-3p 与 IL-1β 表达水平呈负相关，并在骨性关节炎滑膜成纤维细胞中证实 miR-144-3p 可靶向结合 IL-1β 3′-UTR，过表达 miR-144-3p 可减轻膝骨关节炎大鼠滑膜炎症和软骨损伤。然而，在脓肿分枝杆菌肺病患者外周血单核细胞中，miR-144-3p 与 IL-1β、IL-6 等炎症因子表达水平呈正相关[17]。此外，有研究[18]发现在脓毒症急性肺损伤患者血清中 miR-144-3p 表达水平显著升高，过表达 miR-144-3p 通过负性调控 Caveolin-2 加剧脓毒症急性肺损伤小鼠肺组织炎症反应和细胞凋亡。因肠壁的炎症反应是 NEC 的最主要病因，miR-144-3p 在 NEC 的发生发展中是否能发挥潜在的抗炎作用值得研究。本研究结果显示在 NEC 新生大鼠模型和肠上皮细胞模型中 miR-144-3p 表达显著下降，炎症因子 IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平显著升高，过表达 miR-144-3p 明显降低了 NEC 新生大鼠肠组织和肠上皮细胞 IEC-6 中 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达水平，发挥了一定的抗炎作用，减轻了肠上皮细胞凋亡和肠道炎症损伤。

PTEN 是一种具有蛋白/脂质双重磷酸酶活性的肿瘤抑制分子，可使磷脂酰肌醇-3，4，5-三磷酸（phosphatidylinositol-3，4，5-trisphosphate，PIP3）去磷酸化转化为磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸（phosphatidylinositol-4，5-bisphosphate，PIP2），进而导致 AKT 去磷酸化失去活性，广泛参与细胞增殖、分化及凋亡等过程，是维持细胞生长、发育和凋亡的重要机制之一[7]。本研究通过双荧光素酶实验证实 PTEN 是 miR-144-3p 的靶基因，这与之前的研究[5]结果一致。越来越多的研究表明，PTEN 表达异常参与多种因素诱导的肠上皮细胞凋亡。HOU 等[19]发现脱氧雪腐镰刀菌烯醇诱导的肠上皮细胞凋亡和增殖抑制依赖于 PTEN 的表达，PTEN 缺失可明显改善肠上皮细胞凋亡，促进肠上皮细胞增殖。LIU 等[20]发现在缺氧复氧诱导的肠上皮细胞损伤中 PTEN 表达异常，miR-682 可通过负性调控 PTEN 的表达抑制缺氧复氧诱导的肠上皮细胞凋亡。肠上皮细胞作为肠黏膜的第一道屏障，在抵御致病菌及其毒素等入侵方面具有重要作用，多因素诱导的肠上皮细胞凋亡是 NEC 病理过程中的重要环节。上述研究提示 miR-144-3p 抑制肠上皮细胞凋亡可能与 PTEN 密切相关。本研究发现，在 NEC 新生大鼠模型和肠上皮细胞模型中，PTEN 蛋白的表达显著上调，AKT 磷酸化水平显著降低；而过表达 miR-144-3p 明显抑制了 PTEN 蛋白的表达，促进了 AKT 的磷酸化。在 NEC 肠上皮细胞模型中通过施加 AKT 抑制剂（MK-2206 2HCl）干预发现，AKT 抑制剂可显著降低 IEC-6 细胞中 AKT 的磷酸化水平，减弱了过表达 miR-144-3p 对 LPS 诱导的肠上皮细胞凋亡和炎症反应的保护作用，表明过表达 miR-144-3p 可能通过负性调控 PTEN 蛋白的表达，进而促进 AKT 的活化，减轻 LPS 诱导的肠上皮细胞损伤。

本研究尚存在一定的局限性。首先,本研究仅在细胞水平作了AKT抑制剂的干预,AKT抑制剂在体内是否也能拮抗miR-144-3p的作用未知,且未检测AKT下游相关信号分子的表达变化;此外,本研究未在转染miR-144-3p模拟物的基础上探究过表达PTEN对miR-144-3p作用的影响,以充分证实miR-144-3p通过靶向调控PTEN/AKT通路改善肠上皮细胞凋亡和肠道炎症损伤。以上均有待进一步研究。

综上所述,miR-144-3p可能通过靶向抑制PTEN表达,促进AKT磷酸化,从而减轻NEC新生大鼠肠组织损伤。本研究揭示了miR-144-3p可能是NEC新的生物标志物,为其治疗提供了新的理论依据。

参考文献

[1] NEU J, WALKER W A. Necrotizing enterocolitis[J]. N Engl J Med, 2011, 364(3): 255-264.

[2] ALSAIED A, ISLAM N, THALIB L. Global incidence of Necrotizing Enterocolitis: A systematic review and meta-analysis[J]. BMC Pediatr, 2020, 20(1): 344.

[3] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: From cells to clinic[J]. Trends Genet, 2022, 38(6): 613-626.

[4] LIN Z, XIE X, GU M, et al. microRNA-144/451 decreases dendritic cell bioactivity via targeting interferon-regulatory factor 5 to limit DSS-induced colitis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 928593.

[5] ZHANG G, WAN Z, LIU Z, et al. Exosomes derived from BMSCs ameliorate intestinal ischemia-reperfusion injury by regulating miR-144-3p-mediated oxidative stress[J]. Dig Dis Sci, 2022, 67(11): 5090-5106.

[6] ZHAO S, CHEN W, LI W, et al. LncRNA TUG1 attenuates ischaemia-reperfusion-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by sponging miR-144-3p via targeting Nrf2[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(20): 9767-9783.

[7] SELVAKUMAR S C, PREETHI K A, SEKAR D. MicroRNAs as important players in regulating cancer through PTEN/PI3K/AKT signalling pathways[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(3): 188904.

[8] MURAYAMA N, OKAMOTO K, NAKAGAWA T, et al. miR-144-3p/miR-451a promotes lymphovascular invasion through repression of PTEN/p19 in rectal neuroendocrine tumors[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2022, 37(5): 919-927.

[9] LI W, HUANG X, BI D. miRNA-21 plays an important role in necrotizing enterocolitis[J]. Arch Med Sci, 2019, 18(2): 406-412.

[10] WEI X, YU L, ZHANG C, et al. Prebiotic activity of chitooligosaccharides and their ability to alleviate necrotizing enterocolitis in newborn rats[J]. Carbohydr Polym, 2023, 299: 120156.

[11] NADLER E P, DICKINSON E, KNISELY A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis[J]. J Surg Res, 2000, 92(1): 71-77.

[12] AZIZ M, PRINCE J M, WANG P. Gut microbiome and necrotizing enterocolitis: Understanding the connection to find a cure[J]. Cell Host Microbe, 2022, 30(5): 612-616.

[13] NG P C, CHAN K Y, LEUNG K T, et al. Comparative miRNA expressional profiles and molecular networks in human small bowel tissues of necrotizing enterocolitis and spontaneous intestinal perforation[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135737.

[14] XU Y, LIU Y, XIE H, et al. Profile analysis reveals endogenous RNAs regulate necrotizing enterocolitis progression[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109975.

[15] ZHANG H, HAO Y, YANG A, et al. TGFB3-AS1 promotes Hcy-induced inflammation of macrophages via inhibiting the maturity of miR-144 and upregulating Rap1a[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 26: 1318-1335.

[16] LIN Y Y, KO C Y, LIU S C, et al. miR-144-3p ameliorates the progression of osteoarthritis by targeting IL-1β: Potential therapeutic implications[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(10): 6988-7000.

[17] KIM H J, KIM I S, LEE S G, et al. MiR-144-3p is associated with pathological inflammation in patients infected with mycobacteroides abscessus[J]. Exp Mol Med, 2021, 53(1): 136-149.

[18] XU R, SHAO Z, CAO Q. MicroRNA-144-3p enhances LPS induced septic acute lung injury in mice through downregulating Caveolin-2[J]. Immunol Lett, 2021, 231: 18-25.

[19] HOU L, TONG X, LIN S, et al. MiR-221/222 ameliorates deoxynivalenol-induced apoptosis and proliferation inhibition in intestinal epithelial cells by targeting PTEN[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 652939.

[20] LIU Z, JIANG J, YANG Q, et al. MicroRNA-682-mediated downregulation of PTEN in intestinal epithelial cells ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(4): e2210.

(2024-03-01收稿)
编辑 孙孝云