

## microRNA-155 对重症急性胰腺炎大鼠急性肺损伤作用的研究

邱兆磊,王振杰,程峰,宋琦,姜海,杜召辉,张福龙,赵亨,王世杰,邵志林,陈硬,王如意

(蚌埠医学院第一附属医院急诊外科,安徽 蚌埠 233000)

**摘要:**目的 探讨 microRNA-155(miRNA-155)及其抑制剂对重症急性胰腺炎大鼠急性肺损伤的影响。方法 将 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠 27 只随机分为:对照组(B1 组)、重症急性胰腺炎组(B2 组)、miRNA-155 抑制组(B3 组),每组 9 只。采取经逆行胆胰管注射 5%牛磺胆酸钠(0.1 ml/100 g)制作 SD 大鼠重症急性胰腺炎肺损伤动物模型,miRNA-155 抑制组(B3 组)于造模前 24 h 经大鼠尾静脉注射 miRNA-155 抑制物 siRNA(80mg/kg)进行干预。动物模型制作 12 h 后处死所有大鼠。检测 3 组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  及淀粉酶水平,计算各组大鼠肺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子(ICAM-1)的蛋白表达情况(Western Blot 法),测量肺湿干比(W/D),并观察各组大鼠肺组织病理变化。**结果** B2、B3 组大鼠与 B1 组比较,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  及淀粉酶水平、W/D、肺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子(ICAM-1)的蛋白表达差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),B2、B3 组高于 B1 组;B3 组较 B2 组降低( $P < 0.01$ ),肺组织病理损伤较 B2 组轻。**结论** miRNA-155 抑制剂能够降低重症急性胰腺炎大鼠炎症因子,能够减少肺组织 ICAM-1 及 TNF- $\alpha$  的蛋白表达,减轻重症急性胰腺炎急性肺损伤。

**关键词:**微小 RNA-155;胰腺炎,急性坏死性;急性肺损伤

**中图分类号:**R576 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2020)02-0151-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.004

## Effects of microRNA-155 on acute lung injury in rats with severe acute pancreatitis

Qiu Zhaolei, Wang Zhenjie, Cheng Feng, Song Qi, Jiang Hai, Du Zhaohui,  
Zhang Fulong, Zhao Heng, Shao Zhilin, Chen Ying, Wang Ruyi

(Department of Emergent Surgery, the First Affiliated Hospital of Bengbu  
Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of microRNA-155(miRNA-155) and miRNA-155 inhibitor on acute lung injury in rats with severe acute pancreatitis. **Methods** Twenty-seven male adult Sprague-Dawley (SD) rats were divided into a control group (group B1), a severe acute pancreatitis group (group B2) and a miRNA-155 inhibitor group (group B3), 9 rats in each group. SD rat models of severe acute pancreatitis lung injury were made by retrograde biliopancreatic duct injection of 5% sodium taurocholate (0.1 ml/100 g). Rats in Group B3 were intervened by tail vein injection with the miRNA-155 inhibitor siRNA (80 mg/kg) 24 h before the modeling. All the rats were killed 12 hours after the animal models were developed. Levels of serum interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and amylase of rats in 3 groups were detected. Protein expressions of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and intercellular adhesion molecule (ICAM-1) of rats in each group were calculated (Western Blot method), lung wet/dry ratio (W/D) was meas-

**基金项目:**安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2015B113by);蚌埠医学院转化医学重点专项项目(BYTM2019017);蚌埠医学院科技发展项目(BYKF1768)

**第一作者简介:**邱兆磊(1975-),男,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:急腹症与急危重症救治研究,E-mail:qiuzhaoleibyfy@163.com

**通讯作者简介:**王振杰(1962-),男,硕士,主任医师,博士、硕士研究生导师,研究方向:急腹症与急危重症救治研究,E-mail:ahbyfywzj@163.com

ured, and pathological changes of lung tissues in each group were observed. **Results** Compared with group B1, the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and amylase, W/D, TNF- $\alpha$  and ICAM-1 protein in group B2 and group B3 were higher than those in group B1 and showed statistically significant differences ( $P < 0.01$ ). Compared with group B2, group B3 had lower IL-1 $\beta$  level, IL-6 level, TNF- $\alpha$  level, amylase level, W/D, lung tissue ICAM-1 protein expression, TNF- $\alpha$  protein expression and pathological score than group B2, there were statistically significant differences ( $P < 0.01$ ). The lung pathological injury in group B3 was less severe than that in group B2. **Conclusion** miRNA-155 inhibitor can reduce inflammatory factors in rats with severe acute pancreatitis, reduce expressions of ICAM-1 protein and TNF- $\alpha$  protein in lung tissues, and reduce acute lung injury in severe acute pancreatitis.

**Key words:** microRNA-155; pancreatitis, acute necrotizing; acute lung injury

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)目前仍缺乏有效的特异性的治疗方法,治疗棘手,仍是死亡率高的疾病<sup>[1]</sup>。肺脏是重症急性胰腺炎最先受累的胰外器官,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是重症急性胰腺炎严重并发症之一,当合并有多脏器功能障碍时死亡率可达54%。microRNA-155(miRNA-155)是一类非编码RNA分子,与靶基因mRNA的碱基配对结合,在免疫调控中发挥重要作用<sup>[2]</sup>,同时参与调控炎症因子,维持细胞生物学稳态。用miRNA-155抑制剂在大鼠中进行试验以明确是否能够通过阻断miRNA-155而减轻重症急性胰腺炎急性肺损伤的研究少见报道。我们通过建立SAP-ALI大鼠动物模型,观察重症急性胰腺炎时miRNA-155抑制组大鼠肺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )蛋白、细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)蛋白的表达水平及肺组织病理和TNF- $\alpha$ 等炎症因子变化,探讨miRNA-155及其抑制剂siRNA对重症急性胰腺炎大鼠急性肺脏损伤的影响,为探索重症急性胰腺炎急性肺损伤相关机制提供新依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 成年雄性清洁级Sprague-Dawley(SD)大鼠27只,体重186~230g,随机均分为:对照组(B1组)、重症急性胰腺炎组(B2组)和miRNA-155抑制组(B3组),每组各9只。

1.2 重症急性胰腺炎动物模型复制和处理 所有雄性清洁级SD大鼠术前均禁食12h,可以饮水,手术部位备皮。采用异氟烷(上海雅培制药有限公司提供)吸入性麻醉对SD大鼠进行麻醉,碘伏常规消毒铺无菌巾,在无菌条件下行腹正中切口进腹。B1组SD大鼠进腹后仅仅翻动胰腺、十二指肠后随即缝合切口;B2组SD大鼠采取5%牛磺胆酸钠(0.1ml/100g)经胆胰管逆行缓慢匀速注入(0.1ml/min)制作大鼠重症

急性胰腺炎肺损伤动物模型;B3组大鼠在制作大鼠动物模型前24h经尾静脉注射miRNA-155抑制剂siRNA(80mg/kg,上海吉玛制药有限公司)。

1.3 标本采集与检测方法 分别于制作模型成功12h后处死所有SD大鼠,经腹主动脉采血备用,一部分肺组织经液氮置入-80℃冰箱冷冻保存,用于检测肺组织TNF- $\alpha$ 蛋白以及ICAM-1蛋白表达情况,另取一部分肺组织用于病理学检查。

1.3.1 各组SD大鼠血清淀粉酶水平测定 采用全自动生化分析仪测定各组SD大鼠血清淀粉酶水平。

1.3.2 各组SD大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的检测 ELISA法测定各组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的含量。

1.3.3 各组SD大鼠肺组织病理学检查 ①测定各组大鼠肺组织ICAM-1蛋白和TNF- $\alpha$ 蛋白表达情况(Western blot法)。②病理学检查:各组大鼠肺组织标本以10%甲醛溶液固定、石蜡包埋、苏木精-伊红染色,在光镜下观察,并按Schmidt等<sup>[3]</sup>对3组肺组织进行病理学评分。

1.4 统计学方法 实验数据应用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较采用方差分析以及 $q$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、淀粉酶水平和肺W/D比较 B2组、B3组IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、淀粉酶水平和肺W/D水平均高于B1组( $P < 0.01$ ),而B2组高于B3组( $P < 0.01$ ),见表1。

2.2 各组大鼠肺组织ICAM-1蛋白和TNF- $\alpha$ 蛋白表达情况 B1组、B2组、B3组肺组织ICAM-1蛋白和TNF- $\alpha$ 蛋白表达比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),B2组、B3组较B1组升高( $P < 0.01$ ),B3组较B2组降低( $P < 0.01$ )。见表2和图1。

表1 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、淀粉酶水平和肺 W/D 比较

组别	IL-1 $\beta$ /(pg·ml <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·ml <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(pg·ml <sup>-1</sup> )	淀粉酶/(U·L <sup>-1</sup> )	肺 W/D
B1 组	102.21±11.36	110.18±13.69	158.14±12.43	1094.24±146.36	1.67±0.36
B2 组	451.08±28.24 <sup>a</sup>	427.40±31.32 <sup>a</sup>	422.80±43.63 <sup>a</sup>	6580.44±536.21 <sup>a</sup>	3.38±0.43 <sup>a</sup>
B3 组	303.7±21.28 <sup>ab</sup>	280.20±19.76 <sup>ab</sup>	281.10±20.19 <sup>ab</sup>	4679.35±526.16 <sup>ab</sup>	2.19±0.22 <sup>ab</sup>

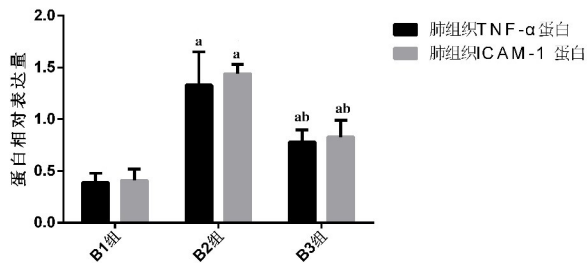
注:①与 B1 组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与 B2 组比较, b:  $P < 0.01$ ; ②表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示

表2 各组大鼠 TNF- $\alpha$  蛋白、ICAM-1 蛋白表达情况

组别	肺组织	肺组织
	TNF- $\alpha$ 蛋白	ICAM-1 蛋白
B1 组	0.39±0.08	0.41±0.10
B2 组	1.33±0.33 <sup>a</sup>	1.44±0.08 <sup>a</sup>
B3 组	0.78±0.16 <sup>ab</sup>	0.83±0.18 <sup>ab</sup>

注:①与 B1 组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与 B2 组比较, b:  $P < 0.01$ ;

②表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示

图1 各组肺组织 ICAM-1 蛋白和 TNF- $\alpha$  蛋白表达

注:与 B1 组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与 B2 组比较, b:  $P < 0.01$

2.3 各组大鼠肺组织病理学变化 B2、B3 组肺组织间质炎症细胞的浸润及纤维化,肺组织损伤较 B1 组重;B3 组肺组织损伤较 B2 组减轻。见图 2。肺组织病理评分:B1 组为(0.39±0.13)分,B2 组为(7.98±1.26)分,B3 组为(6.44±1.15)分;B1 组、B2 组、B3 组肺组织病理评分比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),B3 组与 B2 组比较,B3 组降低,B2 组与 B1 组比较,B2 组升高。

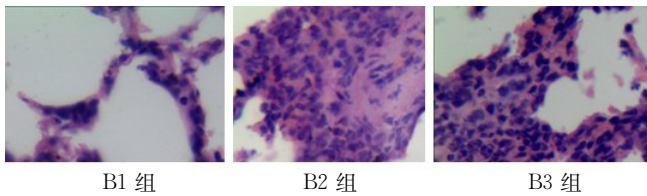


图2 光镜下各组大鼠肺组织病理学改变(HE×400)

### 3 讨论

至今对重症急性胰腺炎发病机制尚不完全清楚,其临床疗效我们一直在不断的探索<sup>[4]</sup>。重症急性胰腺炎时会释放大量的炎症因子,如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等在重症急性胰腺炎病程进展过程中发挥关键的作用,

所引起的 SIRS、多器官功能障碍综合征(MODS)是其死亡的重要因素。

TNF- $\alpha$  是重症急性胰腺炎病程中最早产生并起至关重要作用的炎症因子,在短期内快速升高,并诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等细胞因子的产生,作用于血管内皮细胞,导致细胞出血、坏死、蛋白酶激活等。TNF- $\alpha$  可作为启动因子产生瀑布样级联放大效应,促使血小板活化因子、缓激肽、一氧化氮、氧自由基、IL-6 等释放,这些强效介质相互影响形成高度偶联复杂的网络系统,这种失控性的级联效应在重症急性胰腺炎急性肺损伤中起重要作用,可导致肺组织细胞结构、功能的改变及细胞坏死、SIRS、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、MOF 等。在炎症反应和组织损伤过程中 TNF- $\alpha$  担当重要角色<sup>[5]</sup>,ICAM-1 的表达受 TNF- $\alpha$  调控,ICAM-1 可与粒细胞的整合素相互作用,导致细胞损害,由肺组织炎症感染导致的 ARDS 病死率可达 50%。研究发现淋巴细胞蛋白激酶 R 样内质网激酶表达水平的增加与重症急性胰腺炎大鼠淋巴细胞的凋亡相关,对重症急性胰腺炎淋巴细胞凋亡的起调节作用<sup>[6]</sup>。我们研究发现胸腺素  $\alpha 1$  对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤具有一定的保护作用<sup>[7]</sup>,因此,在重症急性胰腺炎急性肺损伤的治疗过程中逐渐重视抑制或降低炎症因子产生。对重症急性胰腺炎合并脓毒症病人采用参附注射液治疗可以减轻病人 IL-10 的过度表达,有较好的临床疗效<sup>[8]</sup>。

本项研究中 B2 组复制重症急性胰腺炎大鼠动物模型成功 12 h 后血清淀粉酶、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  较 B1 组和 B3 组明显升高,炎症因子大量释放并迁移至肺组织,对肺毛细血管以及肺泡上皮造成严重损伤,肺不张、肺水肿等,最终可导致 ARDS、MOF 等;同时由于中性粒细胞的活化,产生过多的活性氧等,导致肺组织和细胞的损害,加重肺损伤。本研究也发现 B2 组肺组织 TNF- $\alpha$  蛋白、ICAM-1 蛋白含量、病理评分较 B1、B3 组显著升高,病理学检查发现肺组织损伤重。

miRNA-155 在炎症反应中扮演重要的角色<sup>[9-10]</sup>,它参与多种病理炎症反应<sup>[11-12]</sup>,与维持细胞生物学稳态,调控免疫与炎症介质紧密相关<sup>[13-14]</sup>。研究发现 miRNA-155 参与脑缺血/再灌注损伤,在大脑皮层中 miRNA-155 表达增加<sup>[15]</sup>,抑制 miRNA-155 可以改变脑缺血后主要细胞因子的表达,影响炎症反应进

展<sup>[16-17]</sup>。抑制 miRNA-155 可增加内皮一氧化氮合酶表达和一氧化氮产生从而减少炎症反应<sup>[18]</sup>。而 miRNA-155 抑制剂对重症急性胰腺炎急性肺损伤影响如何鲜见报道。本项研究通过采用 miRNA-155 抑制剂 siRNA 对重症急性胰腺炎大鼠急性肺损伤进行干预, 结果发现, 重症急性胰腺炎组(B2 组)大鼠血清淀粉酶、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、肺组织 TNF- $\alpha$  蛋白、ICAM-1 蛋白水平至复制模型成功后 12 h 明显升高, 肺组织可见炎症细胞浸润、组织水肿等。使用 miRNA-155 抑制剂 siRNA 后干预组(B3 组)大鼠血清淀粉酶、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、肺组织 TNF- $\alpha$  蛋白、ICAM-1 蛋白、病理评分较 B2 组显著降低, 肺组织损害较 B2 组减轻, 说明 miRNA-155 抑制剂 siRNA 能够减少重症急性胰腺炎急性肺损伤大鼠炎症因子产生, 能够减轻重症急性胰腺炎肺组织炎症反应, 具有保护作用。本项研究通过血清学检查、蛋白水平分析 miRNA-155 抑制剂 siRNA 对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的影响, ICAM-1 及 TNF- $\alpha$  等炎症介质的下调, 肺组织损伤减轻。重症急性胰腺炎并发急性肺损伤是多种炎症介质共同参与复杂的动态过程<sup>[19]</sup>, 因此, 尽早、有效地抑制这些炎症介质产生将有助于肺损伤的控制, 其确切的作用机制尚需进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 朱青云, 孙运波, 潘新亭, 等. CRRT 联合超声引导下经皮经肝胆囊穿刺置管引流在治疗重症急性胆源性胰腺炎中的临床评价[J]. 中华急诊医学杂志, 2017, 26(6): 669-673.

[2] Macchiaroli N, Cucher M, Zarowiecki M, et al. MicroRNA profiling in the zoonotic parasite *Echinococcus canadensis* using a high-throughput approach[J]. Parasites and Vectors, 2015, 8(1): 83-100.

[3] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. Ann Surg, 1992, 215(1): 44-56.

[4] 邱兆磊, 王振杰, 程峰, 等. 超早期肠内营养联合微生态制剂治疗重症急性胰腺炎患者的临床价值[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(9): 967-971.

[5] Qiu ZL, Wang ZJ, Cheng F, et al. The effects of TNF- $\alpha$  and anti-TNF- $\alpha$ McAb in myocardial injury of rats with traumatic hemorrhagic shock[J]. Biomed Res, 2017, 28(11): 5103-5106.

[6] 徐晨阳, 覃月秋, 宋嗣恩, 等. PERK 在重症急性胰腺炎大鼠淋巴细胞中的表达及其与细胞凋亡的相关性[J]. 右江民族医学院学报, 2019, 41(1): 6-10.

[7] 邱兆磊, 王振杰, 程峰, 等. 胸腺素  $\alpha 1$  对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(16): 6-10.

[8] 欧春元, 李艳美. 大剂量参附注射液对重症急性胰腺炎合并脓毒症休克患者 HSP70 及 IL-10 表达的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2018, 40(1): 48-51.

[9] Zhang Y, Zhang M, Li X, et al. Silencing MicroRNA-155 attenuates cardiac injury and dysfunction in viral myocarditis via promotion of M2 phenotype polarization of macrophages[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 22613.

[10] Mantuano E, Brifault C, Lam MS, et al. LDL receptor-related protein-1 regulates NF $\kappa$ B and microRNA-155 in macrophages to control the inflammatory response[J]. Proc Natl Acad Sci OSA, 2016, 113(5): 1369-1374.

[11] Zheng X, Huang H, Liu J, et al. Propofol attenuates inflammatory response in LPS-activated microglia by regulating the miR-155/SOCS1 pathway[J]. Inflammation, 2018, 41(1): 11-17.

[12] Blaya D, Aguilarbravo B, Hao H, et al. Expression of microRNA-155 in inflammatory cells modulates liver injury[J]. Hepatology, 2018, 68(2): 691-706.

[13] De Santis R, Liepelt A, Mossanen JC, et al. miR-155 targets Caspase-3 mRNA in activated macrophages[J]. RNA Biol, 2016, 13(1): 43-58.

[14] Yang Y, Yang L. Identification of Rab6a as a new target of micro-RNA-155 involved in regulating lipopolysaccharide-induced TNF secretion[J]. Inflammation, 2016, 39(1): 107-112.

[15] 朱旭蓉, 燕玉娥, 狄政莉, 等. miRNA-155 在大鼠脑缺血/再灌注损伤早期大脑皮层组织中的表达及其意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(6): 1144-1149.

[16] 黄真锋, 法宪恩, 朱方涛, 等. 二氧化铈纳米颗粒预处理对大鼠缺血再灌注损伤心肌细胞 Nrf2 信号通路的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53(2): 206-209.

[17] Pena-Philippides JC, Caballero-Garrido E, Lordkipanidze T, et al. In vivo inhibition of miR-155 significantly alters post-stroke inflammatory response[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(2): 287.

[18] Jing C, Guo M, Bao X, et al. Pitavastatin up-regulates eNOS production by suppressing miR-155 expression in lipopoly saccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. Cardiovasc Ther, 2017, 35(5): e12282.

[19] 魏明, 刘佳, 涂玲, 等. 重症胰腺炎肺损伤大鼠磷脂酰肌醇-3 激酶表达及其抑制剂对肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(1): 51-54.

收稿日期: 2020-01-07; 修回日期: 2020-02-20