

分类号：  
UDC：

密级：  
学号：361439919086

南昌大学专业学位博士研究生  
学位论文

**MiR-223-3p 靶向 FBXW7 基因调控变应性鼻炎嗜  
酸性粒细胞的脱颗粒功能研究**

**MiR-223-3p regulates the degranulation function of eosinophils in  
allergic rhinitis by targeting FBXW7**

伍书红

培养单位（院、系）：南昌大学第二附属医院

指导教师姓名、职称：刘月辉 教授 主任医师

专业学位种类：临床医学博士

专业领域名称：耳鼻咽喉科学

论文答辩日期：2022 年 5 月 30 日

答辩委员会主席： 张剑

评阅人： 盲审

盲审

2022 年 5 月



## 摘要

### 背景及目的:

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是一种由特定 IgE 介导的鼻黏膜慢性炎症性疾病, 以鼻塞、流鼻涕、鼻痒、打喷嚏为主要临床特征。目前 AR 已成为一种全球性健康问题, 但目前临床上针对 AR 的治疗仍未取得较好的效果。因此深入探讨 AR 的发病机制, 寻找更加有效的治疗方法具有重要意义。MiR-223-3p 是一种受多种转录因子调控的多功能 microRNA (miRNA), 具有调节免疫细胞增殖、分化和极化的作用, 在炎症中发挥关键作用。嗜酸性粒细胞 (eosinophils, EOS) 是过敏反应的主要效应细胞, 其脱颗粒作用被认为是导致过敏性炎症的重要效应反应。近年来的研究表明, miR-223-3p 在 AR 患者血清中上调, 并与血清中 EOS 数目及其分泌的嗜酸性粒细胞阳离子蛋白 (eosinophil cation protein, ECP) 水平密切相关, 提示 miR-223-3p 可能与 AR 和 EOS 脱颗粒作用有关, 但具体作用机制仍不清楚。泛素连接酶 FBXW7 能调控多种底物蛋白的降解, 并在免疫调节和炎症反应中发挥重要作用。基于我们生物信息学预测到 FBXW7 是 miR-223-3p 的靶标, 本研究主要聚焦在 miR-223-3p 和 FBXW7 在 AR 中的表达、作用及二者的相关性, 并进一步探讨其对 AR 影响的具体机制。

### 方法:

(1) 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 和荧光原位杂交检测 AR 患者、AR 小鼠及相应对照组鼻黏膜中 miR-223-3p 的水平。

(2) RT-qPCR 检测 ECP、嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白 (eosinophil major basic protein, MBP)、嗜酸性粒细胞过氧化物酶 (eosinophil peroxidase, EPO) 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜中的表达。通过改变 EOL-1 中 miR-223-3p 的表达, 观察卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 和 CCL11 刺激后细胞中 ECP、MBP、EPO 的变化。同时构建小鼠 AR 模型, 并应用 miR-223-3p 激动剂 (miR-223-3p agomir) 和 miR-223-3p 拮抗剂 (miR-223-3p antagomir) 改变 miR-223-3p 在体内的表达水平, 采用 RT-qPCR 检测小鼠鼻黏膜中 miR-223-3p、ECP 和 MBP 的表达, 苏木素-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色和电镜观察鼻黏膜的形态变化, 流式细胞术检测小鼠鼻黏膜和外周血中 EOS 比例, 免疫荧光观察 MBP 在组织中的表达变化情

况，酶联免疫吸附（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）检测小鼠血清中 ECP 和 EPO 的分泌情况。

（3）从 miRTarBase、miRDB、TargetScan、miRmap 和 DIANA-microT 五个数据库中获取并下载 miR-223-3p 靶基因，利用在线韦恩图工具取交集后得到较为可信的靶基因，并进行 RT-qPCR 验证。通过双荧光素酶报告验证 miR-223-3p 与靶基因的结合后，进一步改变 EOL-1 细胞中 miR-223-3p 水平，并采用蛋白免疫印迹反应（western blot）观察靶基因的变化。

（4）在过表达 miR-223-3p 的 EOL-1 细胞中进一步上调 FBXW7 的水平，并应用 OVA 和 CCL11 进行刺激，通过 western blot 检测 FBXW7 的表达，免疫荧光观察细胞中 MBP 蛋白的表达变化情况。将构建完成的腺相关病毒 sh-FBXW7 经鼻腔滴入处理小鼠，应用 OVA 和氢氧化铝构建小鼠 AR 模型，同时使用 miR-223-3p antagomir 抑制 miR-223-3p 的表达，采用 western blot 检测小鼠鼻黏膜中 FBXW7 的表达，HE 染色观察鼻黏膜的组织病理形态，免疫荧光观察鼻黏膜中 MBP 的表达，RT-PCR 和 ELISA 分别检测小鼠鼻黏膜与血清中 ECP、EPO 的表达水平。

## 结果：

（1）与对照组相比，miR-223-3p 在 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中的表达水平升高，且其表达位置主要在胞质。

（2）与对照组相比，AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中 ECP、MBP、EPO 的 mRNA 水平均升高。

（3）经 OVA 和 CCL11 处理后，EOL-1 细胞中 miR-223-3p、ECP、MBP 和 EPO 的表达水平均升高。上调 miR-223-3p 的水平促进了经 OVA 和 CCL11 处理的 EOL-1 细胞中 ECP、EPO mRNA 的表达，而下调 miR-223-3p 后其表达被抑制。ELISA 结果表明，miR-223-3p 上调可以促进 EOL-1 细胞分泌 ECP、EPO、MBP，下调 miR-223-3p 则抑制其分泌。免疫荧光结果显示，经 OVA 刺激后 OVA 组的 MBP 荧光表达量更高，在上调 miR-223-3p 后进一步增强了 MBP 的表达，miR-223-3p 的降低则减弱了 MBP 的表达。

（4）动物实验 HE 染色结果显示，采用 miR-223-3p agomir 上调鼻黏膜中 miR-223-3p 的表达后加重了鼻黏膜的破坏及 EOS 的浸润。电镜结果显示，miR-223-3p agomir 处理组的鼻黏膜纤毛脱落更为明显、排列更为紊乱，而 miR-223-

3p antagomir 组的鼻黏膜纤毛较整齐, 少量出现倒伏。流式细胞术、免疫荧光、RT-qPCR 和 ELISA 的结果则进一步表明, 上调 miR-223-3p 增加了外周血和鼻黏膜中 EOS 比例, 提高了鼻黏膜中 ECP、MBP mRNA 的表达及血清中 ECP、EPO 的分泌。

(5) 通过生物信息学预测, 获得 IL6ST、FBXW7、FOXO1 和 NFIA 四个靶基因, 经过 mimics 转染及 RT-qPCR 检测, 得出 miR-223-3p 对 FBXW7 的抑制作用最为显著。双荧光素酶报告实验结果表明 miR-223-3p 可以靶向结合 FBXW7 3'UTR。利用 miR-223-3p mimics 和 miR-223-3p inhibitor 转染 EOL-1 细胞后采用 western blot 进一步验证两者的靶向关系, 结果显示过表达 miR-223-3p 降低了 FBXW7 蛋白表达水平; 而下调 miR-223-3p 表达则增加 FBXW7 蛋白的表达水平。RT-qPCR、western blot 和免疫组化检测黏膜中 FBXW7 的结果显示, 相较于对照组, FBXW7 在 AR 组鼻黏膜中的表达更低。

(6) 在过表达 miR-223-3p 的 EOL-1 细胞中进一步上调 FBXW7 的水平, 再应用 OVA 和 CCL11 进行刺激后, western blot 和细胞免疫荧光结果显示, 在过表达 miR-223-3p 的 EOL-1 细胞中, FBXW7 表达水平下调, 细胞炎症水平上调; 进一步上调 FBXW7, miR-223-3p 的表达水平依然上调, 而 FBXW7 的表达水平恢复, 且细胞的炎症水平下降。

(7) 在应用干扰病毒的基础上, 采用 OVA 和氢氧化铝构建小鼠 AR 模型, 同时加入 miR-223-3p antagomir 抑制 miR-223-3p 的表达。结果发现下调 FBXW7 后小鼠鼻粘膜上皮肿胀和纤毛破损明显, 其间可见大量嗜酸性粒细胞浸润, 且增加了小鼠鼻黏膜中 ECP、EPO mRNA 和 MBP 表达水平, 同时血清中 ECP 和 EPO 的分泌也增加; 进一步下调 miR-223-3p 后, 可以抑制因 FBXW7 下调所导致的 AR 炎症水平升高。

### 结论:

MiR-223-3p 通过介导 FBXW7 的表达来调控嗜酸性粒细胞的脱颗粒功能, 从而促进 AR 炎症。MiR-223-3p 有望成为 AR 疾病的治疗靶点, 为治疗 AR 提供新的途径。

**关键词:** 变应性鼻炎; 嗜酸性粒细胞; MiR-223-3p; FBXW7

## ABSTRACT

### Background and Objectives:

Allergic rhinitis (AR) is a chronic inflammatory disease of the nasal mucosa mediated by specific IgE, with nasal congestion, runny nose, nasal itching and sneezing as the main clinical features. At present, AR has become a global health problem, but the clinical treatment of AR has not achieved good results. Therefore, it is great significance to deeply explore the pathogenesis of AR and find more effective treatment methods. MiR-223-3p is a multifunctional microRNA (miRNA) regulated by multiple transcription factors, which regulates immune cell proliferation, differentiation and polarization, and plays a key role in inflammation. Eosinophils (EOS) is the main effector cell of allergic response, and its degranulation is considered to be an important effector response leading to allergic inflammation. In recent years, studies have shown that miR-223 is up-regulated in the serum of AR patients, and is closely related to the number of EOS in serum and the level of eosinophil cation protein (ECP) secreted, suggesting that miR-223-3p may be related to AR and EOS degranulation, but the specific role is still unclear. The ubiquitin ligase FBXW7 can regulate the degradation of various substrate proteins, and studies have shown that it plays a certain role in immune regulation and inflammatory responses. Based on our bioinformatics predictions that FBXW7 is a target of miR-223-3p. This study mainly focused on the expression and role of miR-223-3p and FBXW7 in AR, and their correlation, further explored the specific mechanism of their impact on AR.

### Methods:

(1) Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and fluorescence in situ hybridization were used to detect the levels of miR-223-3p in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients, allergic rhinitis mice and corresponding controls.

(2) RT-qPCR was used to detect the expressions of ECP, eosinophil major basic protein (MBP) and eosinophil peroxidase (EPO) in the nasal mucosa of AR patients and mice. Change the expression of miR-223-3p in EOL-1, and observe the changes of ECP, MBP and EPO in cells stimulated by ovalbumin (OVA) and CCL11. At the same

time, miR-223-3p agomir and antagomir were used to change the expression level of miR-223-3p in vivo while building a mouse AR model, and RT-qPCR was used to detect the expressions of miR-223-3p, ECP and MBP in mouse nasal mucosa, Hematoxylin-eosin (HE) staining and electron microscope were used to observe the morphological changes of the nasal mucosa. Flow cytometry was used to detect the proportion of EOS in the nasal mucosa and peripheral blood of mice. The expression changes of MBP in tissues were observed by immunofluorescence. Finally, the secretion of ECP and EPO in mouse serum was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

(3) Mir-223-3p target genes were obtained and downloaded from online databases such as miRTarBase, miRDB, TargetScan, miRmap and DIANA-microT. The online Venn diagram tool was used to obtain a more reliable target gene after the intersection, and it was verified by RT-qPCR. After verifying the binding of miR-223-3p to target genes by dual luciferase reporter, the level of miR-223-3p in EOL-1 cells was further changed, and the changes of target genes were observed by western blot.

(4) The level of FBXW7 was further up-regulated in EOL-1 cells overexpressing miR-223-3p, and then stimulated with OVA and CCL11. The expression of FBXW7 was detected by western blot, and the expression of MBP protein in the cells was further observed by immunofluorescence. The constructed adeno-associated virus sh-FBXW7 was instilled into mice through nasal cavity, and OVA and aluminum hydroxide were used to construct mouse AR model, and miR-223-3p antagomir was used to inhibit the expression of miR-223-3p. Western blot was used to detect the expression of FBXW7 in the nasal mucosa of mice, and HE staining was used to observe the histopathological morphology of the nasal mucosa. The expression of MBP in the nasal mucosa was observed by immunofluorescence, and the expression levels of ECP and EPO in the nasal mucosa and serum of the mice were detected by RT-PCR and ELISA, respectively.

### **Results:**

(1) Compared with the control group, the expression level of miR-223-3p in AR patients and AR mice was increased, and its expression location was mainly in the cytoplasm.

(2) Compared with the control group, the mRNA levels of ECP, MBP, and EPO in the nasal mucosa of AR patients and AR mice were increased.

(3) The mRNA expression levels of miR-223-3p, ECP, MBP, and EPO were all increased in EOL-1 cells after treatment with OVA and CCL11. Up-regulation of miR-223-3p level promoted ECP and EPO mRNA expression in EOL-1 cells treated with OVA and CCL11, while down-regulation of miR-223-3p suppressed their expression. ELISA results showed that up-regulation of miR-223-3p promoted the secretion of ECP, EPO and MBP in EOL-1 cells, whereas down-regulation of miR-223-3p inhibited the secretion. The immunofluorescence results showed that the MBP fluorescence expression in the OVA group was higher after OVA stimulation, and the expression of MBP was further enhanced after up-regulation of miR-223-3p, and reducing the level of miR-223-3p weakened the expression of MBP.

(4) HE staining results of animal experiments showed that the use of miR-223-3p agomir to upregulate the expression of miR-223-3p in the nasal mucosa aggravated the destruction of the nasal mucosa and the infiltration of eosinophils. Electron microscope results showed that the shedding of nasal mucocilia in the miR-223-3p agomir treatment group was more obvious and the arrangement was more disordered, while the nasal mucocilia in the miR-223-3p antagomir group were tidier, with a few lodgings. The results of flow cytometry, immunofluorescence, RT-qPCR and ELISA further showed that up-regulation of miR-223-3p increased the proportion of EOS in peripheral blood and nasal mucosa, increased the expression of ECP and MBP mRNA in nasal mucosa and the secretion of ECP and EPO in serum.

(5) Through bioinformatics prediction, we obtained four target genes IL6ST, FBXW7, FOXO1 and NFIA, which were further verified by RT-qPCR after mimics transfection. The results showed that miR-223-3p had the most significant inhibitory effect on FBXW7. Double luciferase reporter assay showed that miR-223-3p could target and bind Fbxw7 3'UTR. EoL-1 cells were transfected with mir-223 mimics and mir-223 inhibitor to further verify their targeting relationship by western blot. The results showed that overexpression of miR-223-3p decreased the expression level of FBXW7 protein; while down-regulation of miR-223-3p expression increased the expression level of FBXW7 protein. The results of RT-qPCR, western blot and

immunohisto-chemistry showed that the expression of FBXW7 in the nasal mucosa of AR group was lower than that of the control group.

(6) The level of FBXW7 was further up-regulated in EOL-1 cells overexpressing miR-223-3p, and then stimulated with OVA and CCL11. The results of western blot and cell immunofluorescence showed that in EOL-1 cells overexpressing miR-223-3p, the expression level of FBXW7 was down-regulated and the level of cellular inflammation was up-regulated, and further up-regulation of FBXW7, the expression level of miR-223-3p was still up-regulated, while the expression level of FBXW7 was restored, and the level of inflammation in the cells decreased.

(7) Based on the application of interfering virus, the mouse AR model was constructed by OVA and aluminum hydroxide, and the expression of miR-223-3p was inhibited by adding miR-223-3p antagomir. The results showed that after down-regulation of FBXW7, the nasal mucosa epithelium of mice was significantly swollen and cilia were damaged, during which a large number of eosinophils were infiltrated. Moreover, the expression levels of ECP, EPO mRNA and MBP in the nasal mucosa of mice were increased, and the secretion of ECP and EPO in serum was also increased. Further down-regulation of miR-223-3p could inhibit the increase in AR inflammation caused by down-regulation of FBXW7.

### **Conclusions:**

MiR-223-3p regulates eosinophil degranulation by mediating FBXW7 expression, thereby promoting AR inflammation. MiR-223-3p is expected to be a therapeutic target for AR diseases, and providing a new way to AR treatment.

**Key Words:** Allergic rhinitis; Eosinophils; MiR-223-3p; FBXW7

## 目 录

前 言 .....	1
第 1 章 AR 患者及小鼠鼻黏膜中 miR-223-3p 的表达 .....	5
1.1 引言 .....	5
1.2 实验材料 .....	5
1.2.1 主要实验仪器 .....	5
1.2.2 主要实验试剂及耗材 .....	6
1.2.3 临床研究标本 .....	7
1.2.4 实验动物 .....	7
1.3 实验方法 .....	8
1.3.1 构建小鼠变应性鼻炎模型 .....	8
1.3.2 鼻黏膜组织总 RNA 的提取 .....	8
1.3.3 RNA 逆转录合成 cDNA .....	9
1.3.4 实时荧光定量 PCR .....	10
1.3.5 荧光原位杂交 .....	12
1.3.6 统计学分析 .....	13
1.4 实验结果 .....	13
1.4.1 RT-qPCR 检测 miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜中的表达 .....	13
1.4.2 FISH 检测 miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠中的表达及分布情况 .....	14
1.5 讨论 .....	15
1.6 结论 .....	16
第 2 章 miR-223-3p 通过调控嗜酸性粒细胞的脱颗粒作用影响变应性鼻炎炎症 .....	17
2.1 引言 .....	17
2.2 实验材料 .....	18
2.2.1 实验主要仪器 .....	18
2.2.2 实验主要试剂 .....	19

## 目 录

2.2.3 主要试剂的配制 .....	20
2.2.4 实验动物和实验细胞株 .....	21
2.3 实验方法 .....	21
2.3.1 细胞培养 .....	21
2.3.2 细胞药物处理和转染 .....	23
2.3.3 细胞免疫荧光 .....	24
2.3.4 建立小鼠变应性鼻炎模型及干预 miR-223-3p.....	24
2.3.5 标本的收集 .....	25
2.3.6 细胞和组织总 RNA 的提取.....	25
2.3.7 RNA 逆转录合成 cDNA .....	26
2.3.8 实时荧光定量 PCR.....	27
2.3.9 小鼠鼻粘膜 HE 染色.....	27
2.3.10 小鼠鼻黏膜组织免疫荧光 .....	27
2.3.11 小鼠鼻粘膜电镜观察 .....	28
2.3.12 流式细胞术检测外周血及鼻黏膜中的 EOS 比例.....	29
2.3.13 ELISA 检测 .....	30
2.3.14 统计学分析 .....	31
2.4 实验结果 .....	31
2.4.1 ECP、MBP、EPO 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜中表达增高 .....	31
2.4.2 OVA 和 CCL11 刺激后 miR-223-3p 和颗粒蛋白表达增加.....	32
2.4.3 miR-223-3p 对 OVA 刺激后细胞中 ECP、EPO、MBP 的影响 ....	33
2.4.4 miR-223-3p 在各组实验小鼠中的表达情况.....	36
2.4.5 miR-223-3p 对 AR 小鼠鼻黏膜组织形态学的影响 .....	37
2.4.6 miR-223-3p 减少 AR 小鼠鼻黏膜和外周血中 EOS 的比例.....	39
2.4.7 免疫荧光检测 AR 小鼠鼻黏膜中 MBP 的变化 .....	40
2.4.8 RT-qPCR 和 ELISA 检测 AR 小鼠鼻黏膜或血清中 EPO、ECP、 MBP 的变化.....	41
2.5 讨论 .....	42
2.6 结论 .....	43

第 3 章 基于生物信息学预测并验证 miR-223-3p 靶基因 FBXW7 及其在 AR 中的表达 .....	44
3.1 引言 .....	44
3.2 实验材料 .....	44
3.2.1 实验主要仪器 .....	44
3.2.2 实验主要试剂 .....	45
3.2.3 主要试剂的配制 .....	46
3.2.4 实验动物和实验细胞株 .....	47
3.3 实验方法 .....	48
3.3.1 生物信息学预测 miR-223-3p 靶基因 .....	48
3.3.2 荧光素酶报告 .....	48
3.3.3 细胞转染 .....	49
3.3.4 组织 RNA 的提取 .....	49
3.3.5 RNA 逆转录合成 cDNA .....	49
3.3.6 实时荧光定量 PCR .....	49
3.3.7 蛋白免疫印迹反应 .....	49
3.3.8 免疫组化 .....	52
3.3.9 统计学分析 .....	53
3.4 实验结果 .....	53
3.4.1 生物信息学预测 miR-223-3p 的靶基因 .....	53
3.4.2 双荧光素酶报告验证 miR-223-3p 靶向结合 FBXW7 3'UTR .....	54
3.4.3 改变 miR-223-3p 观察 EOL-1 细胞中靶基因 FBXW7 的表达 .....	55
3.4.4 FBXW7 在 AR 患者和 AR 小鼠中的表达情况 .....	56
3.5 讨论 .....	58
3.6 结论 .....	58
第 4 章 miR-223-3p 通过调控 FBXW7 基因介导变应性鼻炎嗜酸性粒细胞脱颗粒功能 .....	59
4.1 引言 .....	59
4.2 实验材料 .....	60

## 目 录

4.2.1 实验主要仪器 .....	60
4.2.2 实验主要试剂 .....	60
4.2.3 主要试剂的配制 .....	60
4.2.4 实验动物和实验细胞株 .....	60
4.3 实验方法 .....	60
4.3.1 细胞培养 .....	60
4.3.2 OE-FBXW7 慢病毒转染细胞 .....	60
4.3.3 RT-qPCR 实验 .....	61
4.3.4 蛋白免疫印迹反应 .....	61
4.3.5 细胞免疫荧光 .....	62
4.3.6 建立小鼠变应性鼻炎模型及干预 miR-223-3p 和 FBXW7 .....	62
4.3.7 HE 染色 .....	62
4.3.8 组织免疫荧光 .....	63
4.3.9 ELISA 实验 .....	63
4.3.10 统计学分析 .....	63
4.4 实验结果 .....	63
4.4.1 FBXW7 过表达慢病毒感染细胞后验证 FBXW7 表达 .....	63
4.4.2 过表达 miR-223-3p 同时上调 FBXW7 后观察细胞 MBP 变化 .....	64
4.4.3 腺相关病毒介导的 shRNA 下调 FBXW7 表达效果的筛选 .....	64
4.4.4 下调 miR-223-3p 同时沉默 FBXW7 后观察 AR 小鼠炎症情况 .....	65
4.5 讨论 .....	68
4.6 结论 .....	69
总 结 .....	70
致 谢 .....	71
参 考 文 献 .....	73
攻读学位期间的研究成果 .....	78
综 述 .....	79

## 中英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
AR	Allergic rhinitis	变应性鼻炎
cDNA	Complement DNA	互补 DNA
ECP	Eosinophil cation protein	嗜酸性粒细胞阳离子蛋白
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
EOS	Eosinophils	嗜酸性粒细胞
EPO	Eosinophil peroxidase	嗜酸性粒细胞过氧化物酶
FBXW7	F-box/WD repeat-containing protein7	F 框/WD-40 域蛋白 7
HE	Hematoxylin-eosin	苏木素-伊红
miRNA	MicroRNA	微小核糖核酸
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
MBP	Eosinophil major basic protein	嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白
OVA	Ovalbumin	卵清蛋白
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
RT-qPCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
shRNA	Short hairpin RNA	短发夹 RNA
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
Tris	Three hydroxymethy aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
TBST	Tris buffered saline add Tween-20	Tris 缓冲盐水+吐温
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺

## 前言

### 变应性鼻炎现状

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是一种由特定 IgE 介导的鼻黏膜慢性炎症性疾病, 以吸入变应原引起鼻塞、流清涕、鼻痒、打喷嚏为其主要临床特征<sup>[1]</sup>。近年来, AR 的发病率在全球范围内呈上升趋势, 已成为一种全球性健康问题<sup>[2,3]</sup>。AR 与哮喘、过敏性结膜炎、鼻窦炎等黏膜炎症性疾病密切相关<sup>[4,5]</sup>, 可显著影响患者的生活质量或工作效率。

尽管目前针对变应性鼻炎的诊治方案不断更新改进, 但在治疗上仍未取得较好的效果。目前用于控制 AR 症状的治疗主要包括避免环境过敏原、药物治疗及过敏原特异性免疫治疗。避免接触过敏原可减轻鼻炎症状, 然而始终避免花粉、霉菌等户外过敏原具有挑战性且通常难以实施。抗组胺药、鼻内皮质类固醇激素和白三烯受体拮抗剂作为 AR 的临床一线用药, 虽然在缓解鼻痒、流涕、喷嚏等症状方面起到关键作用, 但仍存在诸多不足之处。而特异性免疫治疗作为目前唯一可能改变 AR 病程的治疗方法, 它不仅能够改善临床症状, 还可以减少变应性鼻炎向哮喘进展的风险<sup>[6-9]</sup>。但过敏原免疫治疗涉及数年的基础治疗及维持治疗导致大多数患者治疗依从性降低, 因此持久的用药时间成为免疫治疗应用过程中不容忽视的问题。

尽管近年来 AR 的诊断和治疗方案不断完善, 但由于 AR 的发病机制较复杂, 涉及许多不同的细胞类型、炎症介质和黏附分子等, 导致 AR 的总体治疗效果不甚满意, 因此深入探讨 AR 的发病机制, 对于寻找此病更好的治疗方法具有重要意义。

### 嗜酸性粒细胞功能及其在 AR 发病中的作用

普遍认为 AR 是过敏原作用于敏感个体后诱发 Th2 型细胞因子分泌参与免疫反应启动, 导致炎症细胞向鼻黏膜积聚的慢性炎症反应性疾病。嗜酸性粒细胞 (eosinophils, EOS) 是鼻炎晚期过敏反应中的主要效应细胞, 在持续炎症和组织

损伤中起关键作用。EOS 在其细胞质颗粒中除储存大量预制的趋化因子和细胞因子外<sup>[10-12]</sup>, 还含有重要的颗粒蛋白, 包括嗜酸性粒细胞过氧化物酶 (eosinophil peroxidase, EPO)、嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白 (eosinophil major basic protein, MBP)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白 (eosinophil cation protein, ECP) 和嗜酸性粒细胞衍生的神经毒素 (eosinophil-derived neurotoxin, EDN) 等。经局部刺激后 EOS 可通过细胞溶解脱颗粒, 零碎脱颗粒和胞吐机制释放大量介质和细胞毒性产物。目前的研究表明, 炎症疾病的组织损伤与这些阳离子蛋白和促炎介质的分泌密切相关<sup>[13]</sup>, ECP 是嗜酸性粒细胞增多和活化的标志物, EOS 功能实验显示 ECP 促进氧化应激, 对气道上皮细胞可产生细胞毒性作用<sup>[14]</sup>, 导致纤毛停滞和上皮细胞溶解。在 AR 和特应性哮喘中已检测到组织 EOS 脱颗粒的证据, 并且与临床症状恶化有关<sup>[15]</sup>。因此, EOS 脱颗粒过程已成为抗过敏反应的重要靶标。目前的研究显示 EOS 表达多种生物活性细胞表面分子, 通过不同表面受体的活化导致颗粒储存的介质释放<sup>[16]</sup>。近年来针对 EOS 向作用部位的募集和趋化性得到了较好的研究, 但 EOS 受胞外信号刺激后发生脱颗粒的胞内调控机制尚不完全清楚。因此确定并了解指导 EOS 活化脱颗粒的分子机制对制定针对 EOS 相关炎症疾病的治疗策略具有重要意义。

## MiR-223-3p 在炎症中的作用

MicroRNA(miRNA)是一类长度约为 18–24 个核苷酸的内源性非编码 RNA, 并通过与 mRNA 的 3'-UTR 非翻译区域结合, 转录后抑制其靶 mRNA 在细胞中的表达, 从而抑制翻译控制基因表达<sup>[17,18]</sup>。近年来研究证据表明 miRNA 广泛参与免疫应答, 人类单核细胞中 miR-146a/b、miR-132、和 miR-155 可调节病原体识别后的免疫反应<sup>[19]</sup>, 而 miR-21、miR-22、miR-24、miR-103、miR-155 和 miR-204 在活化 T 细胞中上调<sup>[20]</sup>。随着 miRNA 对免疫系统功能的调控作用的证实, 其在 AR 中的表达也已成为近年来研究的热点。一项早期研究显示 AR 儿童人脐带血样本中的单核白细胞表达更低的 miR-21 和 miR-126, 且 miR-21 水平与脐带血中升高的 IgE 相关, 因此提出 miR-21 可作为 AR 的潜在早期预测指标<sup>[21]</sup>。余等人<sup>[22]</sup>报道了关于 AR 患者和非过敏个体之间的 miRNA 表达谱差异, Suojalehto H 等人进一步分析 AR 有症状和无症状者中差异表达的 miRNA, 发现有症状的受试者表达较高的 miR-155, miR-205 和 miR-498 表达水平, 而 let-7e

水平降低<sup>[23]</sup>。此外研究表明,在 IL-13 刺激下,miR-143 在鼻上皮细胞中高表达显著降低了粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、嗜酸性粒细胞趋化因子和粘蛋白(MUC5AC)的表达<sup>[24]</sup>。以上研究表明靶向这些 miRNA 分子可能有效地抑制炎症性疾病。因此,了解 EOS 激活所涉及的关键 miRNA 对引起过敏性炎症因素的反应可能有助于更好地控制和治疗变应性疾病。

在已知的 miRNA 中,miRNA-223-3p 在炎症中得到了更多的关注。近来的研究发现,miR-223-3p 参与巨噬细胞的分化和活化,miR-223-3p 过表达可抑制炎症小体产生 IL-1 $\beta$  并抑制巨噬细胞的促炎性激活<sup>[25,26]</sup>,同时也可通过靶向胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)调节肥大细胞的凋亡<sup>[27]</sup>、活化脱颗粒<sup>[28]</sup>。另有文献报道,miR-223-3p 是一种中性粒细胞衍生的 microRNA,可调节 TLR/Th17 信号传导和内质网应激,与哮喘的临床特征相关<sup>[29]</sup>,增加肺上皮细胞中 miR-223 的表达可抑制小鼠的急性肺损伤<sup>[30]</sup>,由此可见 miR223-3p 在炎症中发挥了重要作用。目前已经证实,miR-223-3p 可通过影响嗜酸性粒细胞祖细胞的生长和分化来调节嗜酸性粒细胞的发育<sup>[31]</sup>,而 miR-223-3p 在 AR 发病机制中的作用尚未明确,miR-223-3p 是否参与了 AR 发病机制中 EOS 的功能,其作用机制又是怎样的,还有待进一步研究。

## FBXW7 与炎症

F 框/WD-40 域蛋白 7 (F-box/WD repeat-containing protein7, FBXW7) 也被称为 FBW7, CDC4 和 Ago, 为 Skp-Cullin-F-box (SCF) E3 泛素连接酶复合物中的 F-box 蛋白家族成员之一,能通过特异性识别和结合靶蛋白介导其底物泛素化及蛋白降解。许多研究证实 FBXW7 作为一种泛素化连接酶受到 p53、C/EBP-8、EBP2、Pin1、Hes-5、Numb4 和 microRNAs 等分子的调控,可靶向降解 c-Myc、cyclin E、mTOR、c-Jun、Notch 和 HIF-1 $\alpha$  等蛋白质,调控多种生理病理过程<sup>[32]</sup>。FBXW7 在癌症方面研究较为广泛,先前的研究显示其对癌蛋白具有降解作用,在多种癌症中充当肿瘤抑制因子<sup>[33]</sup>,另有文献报道 FBXW7 还可调节葡萄糖、脂质代谢<sup>[34-36]</sup>、与 CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP $\delta$ )相互作用,在感染后的先天免疫反应中发挥重要作用<sup>[37]</sup>。近来的文献报道表明,FBXW7 在炎症中也具有重要的调节作用。FBXW7 在鼠 T 细胞发育中的条件性失活会导致胸腺 CD4 单阳性细胞和脾脏 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>细胞减少,在 HDM 诱导的过敏性炎症中,Sox 家族

蛋白 Sox12 通过增强 FBXW7 介导的 GATA3 降解抑制了 Th2 细胞分化从而减轻炎症反应<sup>[38]</sup>。研究发现，在结肠炎小鼠的结肠组织中 FBXW7 表达增加，上调 FBXW7 可诱导 NF- $\kappa$ B 抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  泛素依赖性降解、NF- $\kappa$ B 激活和随后肠上皮细胞的肠道炎症加重，揭示了 FBXW7 对 NF- $\kappa$ B 和炎症的增强作用<sup>[39]</sup>。相比之下，chen 等<sup>[40]</sup>的报告则显示 FBXW7 调节 NF- $\kappa$ B 通路在急性结肠炎中起保护作用。He 等人<sup>[41]</sup>的研究也发现，FBXW7 的表达量与炎症性肠病的严重程度显著相关，FBXW7 的髓系敲除可有效降低 CCL2 和 CCL7 的产生，进而减少炎症巨噬细胞募集来改善结肠炎的进展。由此可见，FBXW7 除具有抑癌作用外，在炎症疾病中也具有一定的调控作用，另外我们基于生物信息学发现 FBXW7 是 miR-223-3p 的预测靶点。然而，关于其在 AR 中的作用及影响 AR 的具体机制尚未清楚，有待进一步研究。

## 课题实验设计

在本研究中，我们首先检测 AR 患者和 AR 小鼠鼻粘膜中 miR-223-3p 的表达水平，并进一步证明 miR-223-3p 对嗜酸性粒细胞株 EOL-1 脱颗粒功能的影响及其在小鼠 AR 模型中的作用。随后采用生物信息学方法预测 miR-223-3p 的靶基因，并通过双荧光素酶报告对其进一步验证，同时再检测 miR-223-3p 靶基因 FBXW7 在 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中的表达情况。最后，我们进一步分析证明 miR-223-3p 通过调控 FBXW7 影响 EOS 脱颗粒功能，并进而影响 AR 炎症。

## 第 1 章 AR 患者及小鼠鼻黏膜中 miR-223-3p 的表达

### 1.1 引言

MiRNA 属于一类非编码 RNA，可通过调节靶 mRNA 的表达来影响免疫反应、癌症发展及细胞增殖、分化和凋亡<sup>[42]</sup>。miR-223-3p 是 miRNA 家族的重要成员，2003 年首次通过定量聚合酶链反应鉴定<sup>[43]</sup>。既往研究表明，miR-223-3p 在粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞、内皮细胞和上皮细胞的炎症反应期间出现显著变化<sup>[44]</sup>，继而调节这些细胞的各种功能并减弱或加剧相关的组织炎症。在不同炎症性疾病如急性肺损伤<sup>[45]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[46,47]</sup>、肠炎<sup>[26]</sup>、神经系统炎症<sup>[48]</sup>的组织中 miR-223-3p 均高表达。但 miR-223-3p 在 AR 中相关研究报道较少，其在 AR 中的作用和相关机制需进一步研究。

本章节拟采用实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR, RT-qPCR）和荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization, FISH）方法检测 AR 患者、AR 小鼠及相应对照组鼻黏膜膜中 miR-223-3p 的水平，以明确 miR-223-3p 在 AR 中的差异性表达及其在细胞中的定位分布情况。

### 1.2 实验材料

#### 1.2.1 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
荧光显微镜	日本奥林巴斯公司
电子天平	上海奥豪斯仪器有限公司
超低温冰箱（-80℃）	美国 Thermo 公司
低温冰箱（4℃、-20℃）	青岛海尔公司
移液枪	德国 eppendorf 公司
制冰机	日本 Sanyo 公司
组织研磨仪	武汉赛维尔科技有限公司

低温高速离心机	美国 Thermo 公司
NanoDropOneC 紫外分光光度计	美国 Thermo 公司
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
普通 PCR 仪	美国 Thermo 公司
恒温箱	日本 Sanyo 公司

### 1.2.2 主要实验试剂及耗材

试剂名称	生产厂家
75%消毒酒精、无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
Trizol	美国 Thermo Fisher 公司
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
RNase-free 水	北京全式金公司
逆转录试剂盒	北京全式金公司
Hsa-miR-223-3p 引物	广州锐博公司
mmu-miR-223-3p 引物	广州锐博公司
U6 逆转录及 PCR 引物	广州锐博公司
荧光定量试剂盒	日本 Takara 公司
RNA Keeper	南京诺唯赞生物公司
无核酶枪头(10 $\mu$ l、200 $\mu$ l、1000 $\mu$ l)	武汉赛维尔科技有限公司
离心管、EP 管	美国 Axygen 公司
3mm、4mm 研磨珠(无核酶)	武汉赛维尔科技有限公司
4%多聚甲醛(含 DEPC)	武汉博士德公司
原位杂交检测试剂盒(含探针)	武汉博士德公司
DAPI 染色液	北京索莱宝公司
抗荧光淬灭封片剂	武汉博士德公司
原位杂交 2 $\times$ SSC 缓冲液	武汉博士德公司
原位杂交专用 0.5M PBS 缓冲液	武汉博士德公司
3%柠檬酸	上海国药原料

## 1.2.3 临床研究标本

### 1.2.3.1 研究对象

本研究获得南昌大学第二附属医院伦理委员会的认可。以 2015 年发表的变应性鼻炎诊断和治疗指南<sup>[49]</sup>作为 AR 的诊断标准，共收集 28 名临床研究对象，其中变应性鼻炎患者 13 例，非变应性鼻炎患者 15 例为对照组。本实验中所有研究对象的鼻黏膜组织均采自南昌大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科病房患者，且所有研究对象都签署生物样本知情同意书。

### 1.2.3.2 研究对象的纳入与排除标准

纳入标准如下：纳入的 AR 患者的临床表现和体征都符合标准即鼻塞、鼻痒、打喷嚏、清水样涕等症状出现至少 2 个，每天症状持续时间或累计时间在 1h 以上，伴或不伴有眼红、眼痒、流泪等症状；且患者鼻黏膜水肿呈苍白色，附着大量清水样分泌物；皮肤变应原检测呈阳性和/或血清特异性 IgE 阳性。

排除标准如下：排除患有其他疾病的患者，如慢性鼻窦炎、鼻息肉、分泌性中耳炎、过敏性哮喘等；排除已历经免疫治疗的患者及 1 月内服用过糖皮质激素、抗组胺类药物的患者。

### 1.2.3.3 标本收集

在得到 AR 患者以及对照组患者的知情同意之后，术中获得患者下鼻甲黏膜，并置入装有 RNA keeper 的冻存管中，随后将 RNA 保存液吸取出来，将采集到的组织样品转移至 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。另外部分标本置入含 DEPC 的 4% 多聚甲醛中固定。

## 1.2.4 实验动物

实验过程中所需的雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达动物实验有限公司（6-8 周）。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 构建小鼠变应性鼻炎模型

#### (1) 造模过程

卵清蛋白和氢氧化铝是我们构建变应性鼻炎小鼠模型的主要试剂。于造模期间的第2、9、16天向AR组小鼠腹腔注射200 $\mu$ l卵清蛋白/氢氧化铝混合液进行初步致敏,然后从第21天开始连续7天经鼻腔给予卵清蛋白(ovalbumin, OVA)溶液20 $\mu$ l,其中每只小鼠每侧鼻腔给予10 $\mu$ l,建立小鼠变应性鼻炎模型。NC组小鼠用等量的生理盐水和相同的给药方式进行给药。

#### (2) 收集鼻黏膜标本

异氟烷麻醉小鼠,脱臼处死,分离小鼠头部皮肤,将眼科剪垂直先插入一侧鼻孔,剪开鼻背,同样方法剪开另一侧,向上掀起鼻骨,暴露小鼠鼻中隔及鼻腔,取鼻中隔黏膜尽快置放于含DEPC的4%多聚甲醛中进行固定,用于后续FISH实验。

### 1.3.2 鼻黏膜组织总RNA的提取

(1) 先用75%的酒精擦拭操作台,从-20 $^{\circ}$ C取出冷冻的冰板置于操作台保持冰上操作。

(2) 准备提取RNA的材料和试剂:提前准备好10 $\mu$ l、200 $\mu$ l、1000 $\mu$ l的无核酶移液器枪头,1.5ml无核酶EP管,Trizol试剂、氯仿、异丙醇、无水乙醇、RNase-free水。因部分人组织块较大,还需用高温灭菌的眼科剪剪取约40mg组织。

(3) 取对应组织数量的干净1.5ml无核酶EP管,按照组织来源对应做好标记,然后使用移液枪吸取加入1ml Trizol,并将所有需提取RNA的组织块转移到相应的EP管中,最后于每个EP管中加入一颗4mm研磨珠和两颗3mm研磨珠用于研磨。

(4) 打开组织研磨仪,EP管配平放置于适配器中,调整操作主界面快捷选择栏,设定频率为60Hz,时间为60秒,然后关闭安全锁,点击启动键开始研磨组织。研磨结束后,按同样的操作重复研磨一次。

(5) 取出研磨好的 EP 管，室温静置 5min，然后转移至低温高速离心机，以 10000rpm 离心 3min 后，弃去组织碎渣，并将 Trizol 液体转移至新的 1.5ml EP 管中并做好标记。

(6) 向上述液体中继续加入 200 $\mu$ l 氯仿，盖紧管盖，上下剧烈震荡 1min 使其充分混匀，然后室温静置 5min。

(7) 4 $^{\circ}$ C、12000rpm 离心 15min，此时溶液分为 3 层：上层无色水相层、中间白色薄膜层和底部红色氯仿相层，而 RNA 主要存在于无色水相层。

(8) 接下来，使用无核酶枪头吸取上层水相（约 450 $\mu$ l）转移至另一新的无核酶 EP 管中，同时加入约 450 $\mu$ l 的异丙醇，上下颠倒充分混匀后室温静置 10min。

(9) 4 $^{\circ}$ C、13000rpm 离心 10min，弃上清液，保留沉淀。

(10) 向 EP 管中加入 1ml 无水乙醇，温和弹击震荡 EP 管，悬浮沉淀。4 $^{\circ}$ C、13000rpm 离心 5min，弃上清。

(11) 继续加入 1ml 无水乙醇，重复上一步骤。把离心管盖子打开弃上清，并置于超净台中晾至约 5min，使酒精挥发干净。

(12) 提前预热无核酶水至 55 $^{\circ}$ C，加入 30 $\mu$ l 无核酶水溶解 RNA 沉淀，弹匀后瞬时离心 30s。

(13) 最后应用 NanoDropOneC 紫外分光光度计检测仪测定各样品 RNA 浓度及 OD260/OD280 值，并做好记录，因 RNA 易降解，测定结束后需将样品保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

### 1.3.3 RNA 逆转录合成 cDNA

(1) 按照全式金逆转录试剂盒及茎环引物说明书，逆转录 1 $\mu$ gRNA，首先根据各样品 RNA 的浓度计算逆转录时所需 RNA 的体积，然后根据各试剂组分于冰上配置 RNA 逆转录反应体系：

miRNA 逆转录体系：

成分	用量
Total RNA	1 $\mu$ g
miR-223 Bulge-Loop RT primer (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
U6 RT primer (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
2 $\times$ ES Reaction Mix	10 $\mu$ l

EasyScript RT/RI Enzyme Mix	1 $\mu$ l
gDNA remover	1 $\mu$ l
RNase free Water	to 20 $\mu$ l

(2) 将总 RNA 及以上各试剂组分置于冰上，待溶解后于 4℃、10000rpm 离心 30s，将试剂集中到管底。

(3) 按照上述体系及计算出的 RNA 体积补加 RNase free water 至 20 $\mu$ l，吹打混匀后将管壁液体离心至管底，并将 EP 管放入 PCR 仪中，同时设置逆转录反应程序：

miRNA 逆转录程序：

反应温度	时间
42℃	60 min
70℃	10 min
85℃	5 s
4℃	$\infty$

(4) 将反应结束得到的 cDNA 置于-20℃冰箱保存。

### 1.3.4 实时荧光定量 PCR

#### 1.3.4.1 设计引物

U6、miR-223-3p 的引物序列：

基因名称	基因序列
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
miR-223-3p	F: 5'-GCGCTGTCAGTTTGT-3'
	R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

#### 1.3.4.2 物品准备

(1) 溶解引物：将由上海生工合成的普通 mRNA 引物 10000rpm，4℃，离心 2min，使得干粉集中到管底。按照管壁上所示的量加入对应的 RNase free Water，使其稀释到 100 $\mu$ mol，进一步稀释到 10 $\mu$ mol。miR-223-3P 及 U6 引物由广州锐博生合成，根据说明书要求向管中添加 150 $\mu$ l RNase free Water，使其稀释到 5 $\mu$ mol

U6。

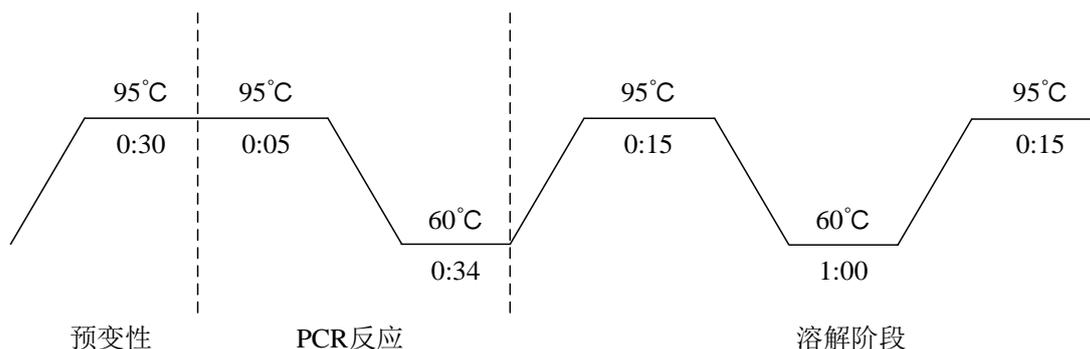
(2) 本实验应用 Takara 公司的 RT-PCR 试剂盒 TB Green Premix Ex Tag<sup>TM</sup> II (Ti RNaseH Plus)测定 PCR 产物的扩增。将 TB Green、ROX Reference Dye 以及 cDNA 从-20℃冰箱取出置于冰上溶解, 1000 rpm 瞬时离心 30sec, 使试剂聚集在管底。cDNA 在使用前一般用无核酶水稀释 10 倍, 检测 miRNA 时一般用无核酶水稀释 100 倍。

#### 1.3.4.3 冰上配置 qPCR 反应体系

(1) 根据试剂盒说明书在冰板上配置反应体系, 每样品每基因设置 3 个复孔, 荧光定量 PCR 反应体系如下:

试剂	用量
TB Green Premix Ex Taq II (2×)	10 μl
Forward Primer (10μM)	0.8 μl
Reverse Primer (10μM)	0.8 μl
ROX Reference Dye (50×)	0.4 μl
cDNA	2 μl
RNase free Water	6 μl

(2) 体系配置完成后, 先向 PCR 板中加 DNA 模板 2μl, 再加入混合体系 18μl, 然后用一次性透明封板膜封板, 3500rpm 离心 5min 后置入 PCR 仪, 并设置反应程序进行荧光定量检测, 如下:



### 1.3.5 荧光原位杂交

#### 1.3.5.1 组织切片制备

(1) 鼻黏膜组织脱水、透明：我们将取下的鼻黏膜组织置于盛满 4% 多聚甲醛的 1.5ml 离心管中进行固定 24h，然后用 PBS 小心清洗已固定好的组织，依次浸没在 30%、50% 和 70% 酒精 20min，85% 乙醇和 95% 乙醇 1h，无水乙醇 30min。接下来于 1/2 乙醇+1/2 二甲苯中透明 30min，二甲苯 I 浸泡 8min，二甲苯 II 浸泡 8min。

(2) 鼻黏膜组织石蜡包埋：将鼻粘膜浸入已加热融化的石蜡中 3 次，每次 30min。然后将鼻黏膜放入盛有蜡液的模具中，组织切面与底部平行，待冷却凝固。

(3) 鼻黏膜组织切片：切片机切片，厚约 5 $\mu$ m，小心将切片转移到展片台内 40 $^{\circ}$ C 的清水上，待切片褶皱消失后进行使用黏附载玻片捞片，然后置入烘箱中 60 $^{\circ}$ C 烘烤 45min，待用。

#### 1.3.5.2 切片样本处理

(1) 脱蜡、复水：取切片先后置于二甲苯 I 液和二甲苯 II 液中进行脱蜡，各 15min，然后依次移入无水乙醇 I 5min，无水乙醇 II 5min，95% 乙醇 5min，75% 乙醇 5min，自来水洗酒精约 2min。

(2) 将切片置于 1 $\times$ 柠檬酸盐缓冲液中煮沸 20min。

(3) 消化：切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶，均匀覆盖组织，37 $^{\circ}$ C 消化酶解 10min。

(4) 0.5M PBS 洗 3 次，每次 5min。

(5) 先后将切片浸泡于 70% 乙醇 3min，85% 乙醇 3min，100% 乙醇 3min 进行脱水，晾干。

(6) 于杂交盒底部加 20ml 20% 甘油以保持湿度。向置于杂交盒中的切片滴加适量预杂交液完全覆盖组织，然后将湿盒转移至恒温箱于 37 $^{\circ}$ C 条件下预杂交 2-4 小时。

(7) 吸取多余的预杂交液体，往切片上滴加含 miR-223-3P 探针的杂交液完全覆盖组织，恒温箱 60 $^{\circ}$ C 条件下杂交孵育过夜。

(8) 清洗杂交液：揭掉原位杂交专用盖玻片，37 $^{\circ}$ C 左右水温的 2 $\times$ SSC 洗涤

5min (2 次); 0.5×SSC 洗涤 15min (1 次); 0.2×SSC 洗涤 15min (1 次)。

(9) BSA 封闭: 滴加封闭液, 湿盒 37℃ 孵育 30min。甩去多余液体, 不洗。

(10) 滴加生物素化鼠抗地高辛, 湿盒 37℃ 孵育 1 小时后, 0.5M PBS 洗 4 次, 每次 5min。

(11) 滴加 FITC-SABC: 湿盒 37℃ 孵育 45min。0.5M PBS 洗 3 次, 每次 5min。

(12) 染核: 滴加 DAPI 均匀覆盖组织, 于暗室避光孵育 3min。

(13) PBS 洗涤后自然晾干, 滴加抗荧光淬灭封片剂封片, 尽量避免出现气泡。

(14) 荧光显微镜下观察和采集图像。FITC 的激发波长为 490nm, 经 FITC 标记探针所结合的核酸发出绿色荧光。

### 1.3.6 统计学分析

所有实验至少进行三次以上, 并且以平均值±标准差表示。使用 SPSS26.0 及 Prism 7.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料采用 T 检验进行两两比较, 多组均数之间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为统计学意义。

## 1.4 实验结果

### 1.4.1 RT-qPCR 检测 miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜中的表达

为了验证正常鼻黏膜和 AR 鼻黏膜标本中 miR-223-3p 的表达情况, 分别提取人和小鼠鼻黏膜中的 RNA, 使用 RT-qPCR 检测对照组和 AR 组鼻黏膜样本中 miR-223-3p 的水平。结果显示, 与对照组相比, AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中的 miR-223-3p 相对表达量增加, 且差异具有统计学意义, 如图 1.1 所示。

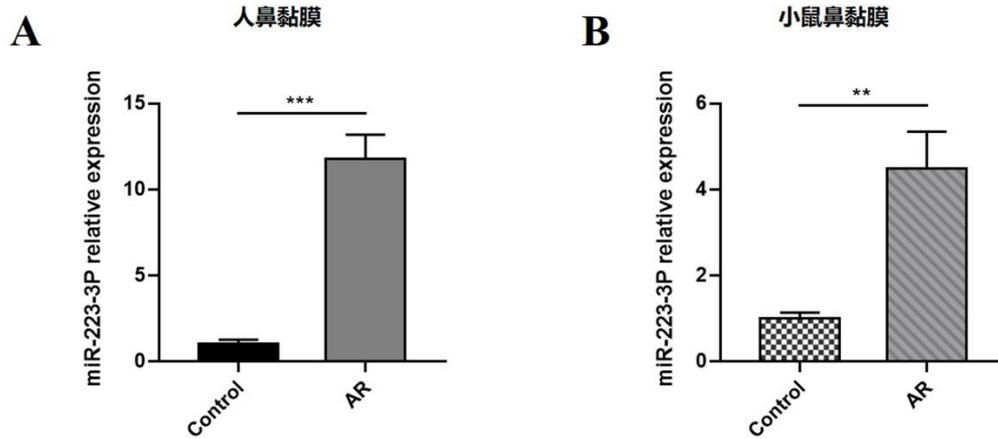


图 1.1 RT-qPCR 检测 miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜中的表达。(A) AR 患者和对照组鼻黏膜中 miR-223-3p 的比较；(B) AR 小鼠和对照小鼠鼻黏膜中 miR-223-3p 的比较 (miR-223-3p 以 U6 作为内参,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ )。

#### 1.4.2 FISH 检测 miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠中的表达及分布情况

通过荧光原位杂交进一步了解 miR-223-3p 在 AR 患者和 AR 小鼠及相应对照组鼻黏膜组织中的表达和分布情况, 我们采用携带荧光素 FITC 的 miR-223-3p 探针显示 miR-223-3p 的定位。结果如图 1.2 所示, miR-223-3p 在 AR 鼻黏膜组织中的荧光信号表达明显高于对照组, 与 RT-qPCR 检测结果一致, 且荧光信号主要定位于胞质中。

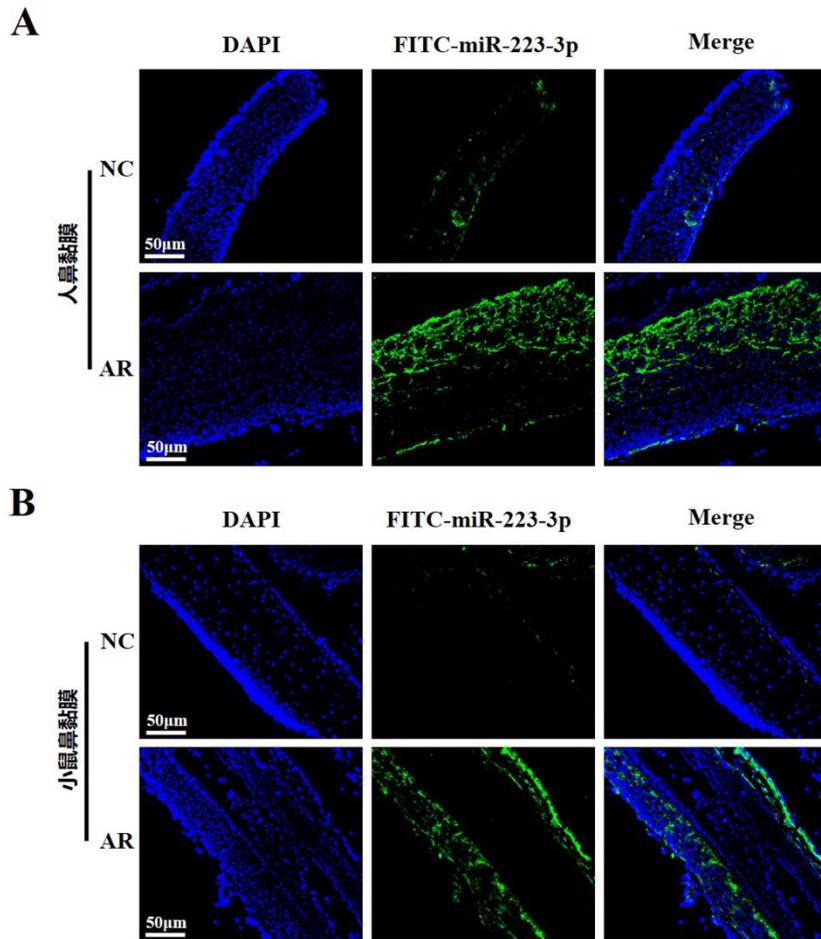


图 1.2 FISH 检测 miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜组织中的表达及分布情况。(A) miR-223-3p 在 AR 患者和对照组鼻黏膜中的表达与分布情况；(B) miR-223-3p 在 AR 小鼠和对照组鼻黏膜中的表达与分布情况。

## 1.5 讨论

AR 是一种较常见的疾病，患者几乎跨越所有年龄段，同时 AR 涉及多种炎症细胞及复杂的分子信号级联，其发生与遗传和环境等多种因素密切相关，近年来 AR 患病率不但不降反而呈现逐年上升的趋势，因此对 AR 的机制进一步深入研究对寻找有效的治疗靶点和开发新的临床治疗策略具有重要意义。

从恶性肿瘤到代谢性疾病再到自身免疫性疾病或是炎症性疾病，都表明 miRNA 表达的失调与多种人类疾病有关。以往的研究显示，AR 患者的鼻黏膜或

血液标本中 miRNAs 表达丰度存在差异，来自 AR 儿童脐带血样本的单核细胞低表达 miR-21 且与脐带血中 IgE 的升高相关，由此 miR-21 被认为是 AR 的早期预测因子。前期研究已证明，miR-155 在症状明显的 AR 受试者中水平更高。在 AR 疾病中，多种 miRNA 已被证实是具有抗炎或抑炎作用的免疫调节因子，如 miR-146a 通过靶向 STAT5b 增强变应性鼻炎中调节性 T 细胞分化 and 功能<sup>[50]</sup>，miR-106b 通过体外靶向早期生长反应蛋白 2 负性调节树突状细胞的促过敏特性和 Th2 细胞极化<sup>[51]</sup>，miR-155 的上调对 ILC2 发育和功能起到促进作用，从而加重 AR 的过敏性炎症。以上研究表明，miRNA 可作为诊断生物标志物和治疗靶点的潜在用途。

迄今为止，miR-223-3p 在其它炎症细胞功能和炎症性疾病中被广泛研究。研究显示，miR-223-3p 在哮喘小鼠模型肺组织中表达上调，而且在敲除 miR-223 后加重了 OVA 诱导的中性粒细胞哮喘小鼠模型中的气道炎症<sup>[52]</sup>，借用囊泡将 miR-223 传递到小鼠肺中后可减轻由 LPS 引发的肺部炎性反应<sup>[45]</sup>。另有研究表明，类风湿关节炎患者血清和外周血单个核细胞中的 miR-223-3p 显著高于对照组<sup>[53,54]</sup>，上调 miR-223-3p 可通过不同途径改善类风湿关节炎<sup>[55,56]</sup>。近期一项临床研究同样显示，miR-223-3p 在 AR 患儿的血清中也呈高表达状态<sup>[57]</sup>。然而，关于 miR-223-3p 在 AR 中的作用尚不完全了解。本章节我们旨在探讨 miR-223-3p 在 AR 中的表达水平及分布情况。我们通过 RT-qPCR 和 FISH 实验发现，相较于正常对照组，miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜中的表达水平升高，且其表达位置主要在胞质。但是 miR-223-3p 在 AR 中的作用尚不清楚，还有待进一步研究。

## 1.6 结论

MiR-223-3p 在 AR 鼻黏膜组织中表达升高，且主要在胞质中表达。

## 第 2 章 miR-223-3p 通过调控嗜酸性粒细胞的脱颗粒作用 影响变应性鼻炎炎症

### 2.1 引言

大量研究报道 miR-223 在炎症中起关键作用。在上一章节中,我们发现 miR-223-3p 在 AR 患者和小鼠的鼻黏膜中表达更高,因此在本章节中,我们进一步探索 miR-223-3p 在 AR 中的作用。

EOS 作为炎症反应的主要效应细胞在 AR 中扮演了重要的角色,一项研究显示鼻腔分泌物 EOS 可能是持续性哮喘的预测因素<sup>[58]</sup>,与轻度患者和健康对照组相比,中重度 AR 患者血液和鼻腔中的活化 (CD44<sup>+</sup>与 CD69<sup>+</sup>) 和致病性 (CD101<sup>+</sup>与 CD274<sup>+</sup>) EOS 以及血液 EOS 祖细胞的数量均增加。此外,AR 患者血液中活化和致病的 EOS 水平与总鼻症状评分、血清 ECP 和嗜酸性粒细胞过氧化物酶 EPX 水平呈正相关<sup>[59]</sup>。EOS 脱颗粒是指激活的 EOS 在不同的条件下被激活后,细胞颗粒毒性蛋白、细胞因子、趋化因子和脂质介质等产物释放造成组织损伤及功能障碍。脱颗粒是 EOS 功能的关键,文献报道<sup>[60]</sup>在鼻炎、鼻息肉和其它上呼吸道粘膜疾病患者的组织活检中常可见沉积的游离细胞外 EOS 颗粒,在炎症条件下 EOS 会被激活分泌颗粒蛋白,在这里我们也比较了 AR 患者、AR 小鼠和对照组鼻黏膜中 ECP、EPO、MBP 的水平,发现其在 AR 组的水平明显更高。根据 Thomas X 等人<sup>[31]</sup>的说法,miR-223-3p 在嗜酸性粒细胞的分化过程中上调,抑制 miR-223-3p 使得嗜酸性粒细胞祖细胞过度增殖。另有研究指出,miR-223-3p 的水平与 AR 患儿血液中 ECP 的水平、EOS 数目和临床严重程度相关。因此,我们提出 miR-223-3p 是否通过影响 EOS 释放介质即脱颗粒进而影响 AR 炎症,并对此进行进一步研究。

本章节中,先通过 miR-223-3p mimics 和 inhibitor 改变嗜酸性粒细胞株 EOL-1 中 miR-223-3p 的表达,观察活化后细胞颗粒蛋白的变化。然后我们进一步干预 miR-223-3p 在小鼠体内的表达,采用苏木素-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色、免疫荧光、电镜和酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

等实验方法，在动物模型层面探讨 miR-223-3p 调控嗜酸性粒细胞功能的作用及其对 AR 过敏性炎症的影响。

## 2.2 实验材料

### 2.2.1 实验主要仪器

仪器名称	生产厂家
超净工作台	苏洁净化设备有限公司
电子天平	上海奥豪斯仪器有限公司
多功能酶标仪	美国 Thermo 公司
超纯水仪	美国密李博公司
超低温冰箱 (-80℃)	美国 Thermo 公司
低温冰箱 (4℃、-20℃)	青岛海尔公司
移液枪	德国 eppendorf 公司
1ml 无菌注射器	上海碧迪医疗器械有限公司
组织研磨仪	武汉赛维尔科技有限公司
低温高速离心机	美国 Thermo 公司
摇床	上海一恒实验设备有限公司
NanoDropOneC 紫外分光光度计	美国 Thermo 公司
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
普通 PCR 仪	美国 Thermo 公司
超薄切片机	德国 Leica 公司
透射电子显微镜	日本 HITACHI 公司
石蜡包埋机	武汉俊杰电子有限公司
涡旋震荡仪	常州越新仪器制造有限公司
石蜡切片机	上海徠卡仪器有限公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯公司
全自动脱水机	武汉俊杰电子有限公司
流式细胞仪	美国 BD 公司

低温高速离心机	美国 Thermo 公司
荧光显微镜	日本奥林巴斯公司
微波炉	格兰仕微波炉电器有限公司
载玻片、盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
烤箱	上海福玛实验仪器有限公司

### 2.2.2 实验主要试剂

试剂名称	生产厂家
胎牛血清 FBS	北京全式金公司
细胞培养基	武汉普诺赛公司
磷酸盐缓冲液 PBS	北京 Solarbio 公司
细胞冻存液	北京 Solarbio 公司
<b>RFect 小核酸转染试剂</b>	<b>常州百代生物公司</b>
Mmu-miR-223-3p antagomir	广州锐博公司
Mmu-miR-223-3p agomir	广州锐博公司
Hsa-miR-223-3p mimics	广州锐博公司
Hsa-miR-223-3p inhibitor	广州锐博公司
Trizol	美国 Thermo Fisher 公司
RNase-free 水	北京全式金公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
逆转录试剂盒	北京全式金公司
miR-223-3p 逆转录及 PCR 引物	广州锐博公司
U6 逆转录及 PCR 引物	广州锐博公司
其他引物	上海生工生物公司
荧光定量试剂盒	日本 Takara 公司
无核酶枪头(10 $\mu$ l、200 $\mu$ l、1000 $\mu$ l)	武汉赛维尔科技有限公司
离心管、EP 管	美国 Axygen 公司
3mm、4mm 研磨珠(无核酶)	武汉赛维尔科技有限公司
4%细胞组织固定液	武汉赛维尔科技有限公司

---

TBS 缓冲液干粉	武汉赛维尔科技有限公司
BSA	北京 Solarbio 公司
MBP 抗体	美国 affinity 公司
荧光二抗	英国 Abcam 公司
注射用氢氧化铝	美国 Thermo 公司
卵清蛋白 (OVA)	美国 sigma 公司
红细胞裂解液	北京 Solarbio 公司
丙酮、醋酸铀-枸橼酸铅	中国西陇化工
钨酸	美国 Merck 公司
电镜固定液、二甲苯	武汉赛维尔科技有限公司
中性树脂、盐酸、苏木素染液	武汉赛维尔科技有限公司
EDTA (PH8.0)抗原修复液	武汉百仟度生物
EDTA(PH9.0)抗原修复液	武汉百仟度生物
柠檬酸 (PH6.0)抗原修复液	武汉百仟度生物
DAPI 染色液	北京 Solarbio 公司
抗荧光淬灭封片剂	武汉百仟度生物
I 型胶原蛋白酶	美国 worthington 公司

---

### 2.2.3 主要试剂的配制

#### (1) 配制 Hsa-miR-223-3p mimics/inhibitor 溶液

所购买的人 miR-223-3p mimics/inhibitor 为 5 nmol/管的冻干粉末, 按照说明书要求, 先将试剂于 4℃离心机 10000rpm 离心 3min, 然后于超净台小心加入 250μl 无菌无核酶水使其溶解成 20μM 储存液, 分装后保存于-20℃冰箱, 避免反复冻融。

#### (2) 配制 mmu-miR-223-3p agomir/antagomir 溶液

所购买小鼠 miR-223-3p 激动剂 (miR-223-3p agomir) 和 miR-223-3p 拮抗剂 (miR-223-3p antagomir) 为 5 nmol/管的冻干粉末, 按照要求开盖之前先 10000rpm 离心 3min, 使干粉全部置于管底。加入 100μl 无菌无核酶水使其完全溶解后, 冻存于-20℃冰箱保存备用。

#### (3) 配制 I 型胶原酶溶液

所购买的 I 型胶原酶为 100mg 的干粉,小心开盖向其中加入 1ml 无菌 PBS,将其配成 100mg/ml 的母液后分装冻存于-20℃冰箱,使用时需将其继续稀释配成 1mg/ml 的工作液。

#### (4) 配制致敏试剂

根据小鼠的数目计算卵清蛋白、氢氧化铝和无菌生理盐水的所需量,每只动物需注射 200 $\mu$ l OVA 腹腔注射混合液,其中每 200 $\mu$ l 生理盐水含 100 $\mu$ g OVA 和 4mg 氢氧化铝。

#### (5) 配制激发试剂

根据小鼠的数目计算卵清蛋白和无菌生理盐水的所需量,每只动物需滴鼻 20 $\mu$ l OVA 溶解液,其中每 20 $\mu$ l 生理盐水含 600 $\mu$ g OVA,需现用现配和混匀后使用。

### 2.2.4 实验动物和实验细胞株

雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达动物实验有限公司(6-8 周);人嗜酸性粒细胞株 EOL-1 来自中科院上海细胞库。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 细胞培养

#### 2.3.1.1 细胞复苏

(1) 使用装有 75%酒精的喷壶喷洒超净台台面,用纱布擦拭干净后,将细胞操作所需的 15ml 离心管、50ml 离心管、培养瓶、巴氏吸管、试管架等耗材置于超净台中,另外将污物盒和废液罐放于远离上述实验用品的超净台中,打开紫外灯进行照射消毒杀菌,至少 30min。

(2) 提前配置新鲜完全培养基,50ml 完全培养基包含 45ml 1640 培养基和 5ml 胎牛血清。取无菌 25cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶,加入适量提前配置好的完全培养基。

(3) 从液氮罐中取出所需的 EOL-1 细胞,将冻存管置于提前调整好温度的 37℃ 恒温水浴箱中,水浴 2min 使其快速解冻。

(4) 用巴士吸管转移充分解冻的 EOL-1 细胞至 15ml 离心管中,1000rpm

离心 5min 后收集细胞沉淀。向上述沉淀中加入 3ml 完全培养基重悬细胞，同时将细胞悬液转移到已含有适量完全培养基的 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中，摇匀后用显微镜观察细胞状态。

(5) 将培养瓶置入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

### 2.3.1.2 细胞传代

(1) 每天需观察细胞的生长状态，如果细胞培养基清亮，显微镜下细胞亮而饱满则表示细胞状态良好，当培养瓶中的细胞密度达 80%-90%时，需进行细胞传代。

(2) 喷洒 75%的酒精消毒擦拭超净台台面，将操作所需的相应耗材放入超净台中，打开紫外灯照射消毒至少 30min。

(3) 消毒完成后，用无菌巴氏吸管将细胞培养瓶中的细胞悬液转移到 15ml 离心管中，1000rpm，常温离心 5min。

(4) 离心结束后，吸弃浑浊上清液，并向细胞沉淀中加入适量提前配制好的完全培养基，轻柔吹打混匀。

(5) 先将上述细胞悬液按照 1: 2 比例转移到 2 个新培养瓶中，再继续向每个 25cm<sup>2</sup> 培养瓶补加适量新鲜完全培养基，盖紧培养瓶盖后在瓶底标记好日期、细胞名称、操作者姓名。

(6) 将培养瓶里的细胞摇匀后继续将培养瓶放入细胞培养孵箱中培养。

### 2.3.1.3 细胞冻存

(1) 显微镜下观察细胞的状态，选取细胞密度高、状态良好的细胞进行冻存保种。

(2) 将巴氏吸管、冻存管、试管架、15ml 离心管等耗材放入超净台中，紫外灯照射 30min。

(3) 将需冻存细胞的细胞悬液转移到 15ml 离心管中，1000 rpm 离心 5 min 后，吸弃上清，保留细胞沉淀。

(4) 根据细胞沉淀的量，用巴氏吸管吸取适量 4℃ 保存的冻存液用来重悬上述细胞，吹打混匀后，按 1ml/管将细胞悬液分装于各个冻存管中，并标记好冻存日期、细胞名称、操作者姓名等。

(5) 将分装好的细胞冻存管贴好封口膜，然后置于-80 度冰箱保存，24h 后将其转移至液氮中保存。

## 2.3.2 细胞药物处理和转染

### 2.3.2.1 细胞药物处理

(1) 准备好实验所需的耗材和试剂并置于已擦拭干净的超净台中，打开紫外灯照射 30min。

(2) 称取 0.1gOVA 放入装有 10ml 无菌 PBS 的 50ml 离心管中。消毒完成后穿戴好无菌手套，使用 0.22 $\mu$ m 一次性针头式滤器对上述液体进行过滤除菌。

(3) 取状态良好的细胞 1000rpm 离心 5min，弃旧培养基后加入适量新鲜完全培养基充分混匀细胞，然后吸取 10 $\mu$ l 重悬液至细胞计数玻片，利用细胞计数仪进行计数。

(4) 按每个孔接种  $5 \times 10^5$  个细胞的密度将细胞接种于六孔板中，向其中加入适量无菌的 OVA 溶液和 CCL11 同时补加完全培养基至 2ml，最终使 OVA 浓度稀释成 0.1% OVA。

### 2.3.2.2 miR-223-3p mimics 和 miR-223-3p inhibitor 转染

(1) 将实验所需紫外灯照射超净台台面 30min。

(2) 显微镜下观察细胞，选取状态良好的细胞准备进行转染实验。

(3) 将 4 $^{\circ}$ C 保存的 1640 培养基、分装血清置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中复温，将 Rfect 小核酸转染试剂进行离心，使得试剂聚集于管底。

(4) 紫外照射完成后，喷洒酒精消毒细胞培养瓶表面并置于超净台中，用巴氏吸管收集瓶中的细胞悬液于 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min 后弃上清保留细胞白色沉淀，然后向离心管内继续添加适量完全培养基重悬细胞，并利用细胞计数仪进行计数。

(5) 调整细胞浓度为  $10^6$  个/ml，按  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞量将细胞接种于六孔板中，每孔的总体积为 2ml。

(6) 配置转染液：准备 4 个无菌的 1.5ml EP 管，分别标记 miR-223-3p mimics、miR-223-3p inhibitor、mimics-NC、inhibitor-NC，向每个 EP 管中加入 250 $\mu$ l 无血清培养基和对应的 miR-223-3p mimics 5 $\mu$ l、miR-223-3p inhibitor 8 $\mu$ l、mimics-NC 5 $\mu$ l、inhibitor-NC 8 $\mu$ l。

(7) 另取 1 个新的 EP 管向其中加入 1ml 无血清培养基和 40 $\mu$ l Rfect，轻轻混匀后室温孵育 5min。

(8) 孵育 5min 后, 将 RFect 稀释液分别分装到前面 4 个 EP 管中, 使得 minics 稀释液、inhibitor 稀释液与 RFect 稀释液混合 (总体积 500 $\mu$ l), 充分混匀后, 继续室温孵育 20min。

(9) 将 500 $\mu$ l 混合物添加到对应的孔内, 轻轻晃动培养板, 摇匀, 并将六孔板置于孵箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 48h-72h。

### 2.3.3 细胞免疫荧光

(1) 收集处理好的 EOL-1 细胞, 1000rpm 离心 5min 后, 加入 1ml PBS 洗涤 2 次, 离心后分别收集细胞沉淀于 1.5ml 离心管中。

(2) 加入 1ml 4% 多聚甲醛吹打混匀细胞后室温固定 30min, 期间每隔 5min 再混匀细胞悬液使得细胞与固定液充分接触。

(3) 固定结束后 1000rpm 离心 5min, 弃固定液, PBS 洗涤 2 次, 离心收集细胞沉淀。

(4) 加入 0.5% TritonX-100 1ml, 混匀后室温破膜 20min, 期间每隔 5min 再混匀细胞悬液使得细胞与液体充分接触。

(5) 离心收集细胞沉淀, PBS 洗涤 2 次。

(6) 加入 1ml BSA 混匀细胞后, 室温封闭 1h。期间每隔 5min 再混匀细胞悬液使得细胞充分接触 BSA。

(7) 1000rpm 离心 5min, 弃上清后加入一抗 (1: 250), 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。

(8) 离心收集细胞沉淀, PBS 洗涤 2 次后, 继续用 BSA 封闭 1h。

(9) 离心弃上清, 加入荧光标记的二抗, 室温孵育 2h。

(10) 离心弃二抗稀释液, PBS 洗涤 2 次后, 加入 DAPI 染液, 室温避光孵育 15min。

(11) PBS 洗涤 2 次后, 将细胞转移到 96 孔板中荧光显微镜下观察并采集图像。

### 2.3.4 建立小鼠变应性鼻炎模型及干预 miR-223-3p

(1) 实验动物分组

将小鼠随机分为: 正常对照组 (NC 组)、变应性鼻炎未干预组 (AR 组)、变应性鼻炎 miR-223-3p 上调组 (miR-223-3p agomir 组) 和变应性鼻炎 miR-223-

3p 下调组 (miR-223-3p antagomir 组), 每组均含小鼠 8 只。

### (2) 造模流程

卵清蛋白和氢氧化铝是我们构建变应性鼻炎小鼠模型的主要试剂。于造模期间的第 2、9、16 天向 AR 组、miR-223-3p agomir 组和 miR-223-3p antagomir 组小鼠腹腔注射 200 $\mu$ l 卵清蛋白/氢氧化铝混合液进行初步致敏, 然后从第 21 天开始连续 7 天经鼻腔给予卵清蛋白溶液 (含 600 $\mu$ gOVA) 20 $\mu$ l, 其中每只小鼠每侧鼻腔给予 10 $\mu$ l, 建立小鼠变应性鼻炎模型。NC 组小鼠用等量的生理盐水和相同的给药方式进行给药。

### (3) 药物干预

对于 miR-223-3p agomir 组和 miR-223-3p antagomir 组小鼠, 于变应性鼻炎制备的第 19, 20, 22, 24, 26 天在麻醉状态下经鼻腔滴入 20 $\mu$ l miR-223-3p agomir 和 antagomir。

## 2.3.5 标本的收集

### (1) 采集小鼠外周血

造模结束后准备器械收集标本, 因血液触碰到胡须易溶血, 因此采血前需先修剪小鼠胡须。小鼠吸入异氟烷麻醉后, 用左手大拇指、食指抓住小鼠双耳及颈部皮肤, 无名指抓紧背部皮肤, 同时小拇指固定尾部, 使头面部皮肤紧绷, 然后将小鼠侧卧, 食指尽量将小鼠周围皮肤向颈后拉, 使其左侧眼球突出, 同时将小鼠头朝下, 将采血侧眼球对准离心管正上方, 右手用眼科弯镊快速夹取眼球取血, 采血完毕立即用纱布压迫止血。将采集的外周血室温静置 1 小时后, 再于 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 3 小时, 3000rpm, 离心 10 分钟, 收集、分装上清后置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

### (2) 收集小鼠鼻黏膜

具体操作步骤详见第 1 章 1.3.2。

## 2.3.6 细胞和组织总 RNA 的提取

### (1) 提取细胞 RNA

① 从细胞培养箱中取出已处理的各组细胞, 用巴氏吸管吸取细胞悬液转移至 15ml 离心管中, 1000rpm 离心 5min 后吸弃上清液, 保留细胞沉淀。

② 向细胞沉淀中加入 1ml 预冷的 PBS 重悬细胞, 并将其转移到无核酶的

1.5ml EP 管中，离心后吸尽 PBS 加入 1ml Trizol 裂解液，移液枪吹打均匀，室温静置 5min。

③ 往上述 EP 管中继续加入 200 $\mu$ l 氯仿，上下快速震荡 15s 使氯仿和 RNA 裂解液充分混匀，然后室温静置 5min。

④ 接下来 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm, 离心 10min 后，小心吸取上层透明水相(约 400 $\mu$ l) 转入新的无核酶 EP 管中，然后加入等量的异丙醇，吹打混匀后室温静置 10min。

⑤ 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm, 继续离心 10min, 小心倒弃上清后加入 1ml 无水乙醇，盖紧 EP 管盖，轻弹管壁使离心得到的沉淀浮起，然后继续于低温高速离心机离心 10min。

⑥ 重复上一步骤，进一步洗脱管壁上残留的异丙醇。

⑦ 弃上清，保持 EP 管盖打开，室温下晾干 5min，待酒精挥发干净后加入 30 $\mu$ l 提前预热至 55 $^{\circ}$ C 的无核酶水来溶解 RNA。

⑧ 利用 NanoDropOneC 超微量紫外分光光度计测定所提 RNA 的浓度和纯度，并置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

#### (2) 提取鼻黏膜组织 RNA

小鼠鼻黏膜的量较少，因此在提取 RNA 之前不必称取粘膜，直接用来提 RNA。具体实验步骤见 1.3.2。

### 2.3.7 RNA 逆转录合成 cDNA

(1) miRNA 具体实验步骤详见第 1 章 1.3.3。但普通 mRNA 逆转录体系有所不同，同样使用全式金逆转录试剂盒逆转录 1 $\mu$ gRNA，冰上配置 RNA 逆转录反应体系，如下：

成分	用量
Total RNA	1 $\mu$ g
Random primer	1 $\mu$ l
2 $\times$ ES Reaction Mix	10 $\mu$ l
EasyScript RT/RI Enzyme Mix	1 $\mu$ l
gDNA remover	1 $\mu$ l
RNase free Water	to 20 $\mu$ l

(2) 体系配制完成后, 盖紧管盖, 轻弹管壁数次将各逆转录组分充分混匀, 然后离心将管壁液体甩到管底。

(3) 将 EP 管放入 PCR 仪中, 同时设置逆转录反应程序, 如下:

反应温度	时间
25℃	10 min
42℃	30 min
85℃	5 s
4℃	∞

(4) 将反应结束得到的 cDNA 置于-20℃冰箱保存。

### 2.3.8 实时荧光定量 PCR

具体实验步骤详见第 1 章 1.3.4。

### 2.3.9 小鼠鼻粘膜 HE 染色

(1) 鼻黏膜组织脱水、透明、石蜡包埋、切片具体步骤详见第 1 章 1.3.5。

(2) 切片脱蜡、水化: 取烤干的切片先后置于二甲苯 I 液和二甲苯 II 液中进行脱蜡, 各 15min, 然后依次移入无水乙醇 I 5min, 无水乙醇 II 5min, 95%乙醇 5min, 75%乙醇 5min, 自来水洗酒精约 2min。

(3) 苏木素染色细胞核: 将切片投入苏木素 3-5min 后, 自来水洗去多余的染液; 然后移入 1% 盐酸酒精分化液中分化 5s, 自来水洗 3min; 再用弱氨水返蓝 5s, 自来水洗。

(4) 伊红染色细胞质: 将切片移入伊红染液中染色 5min, 水洗去掉伊红多余染液。

(5) 切片脱水、透明、封片: 用滤纸吸去切片上多余的水分, 然后依次移入无水乙醇中 3 次, 每次 5min; 脱水完成后用二甲苯 I 液、二甲苯 II 液浸泡 5min; 最后封片。

### 2.3.10 小鼠鼻黏膜组织免疫荧光

(1) 鼻黏膜组织脱水、透明、石蜡包埋、切片等具体步骤见第 1 章 1.3.5。

(2) 将切好的石蜡切片置于 65℃ 的烤箱中烘烤 2h。

(3) 将切片依次放入二甲苯 I 脱蜡 15min, 二甲苯 II 脱蜡 15min, 无水乙醇 I 浸泡 5min, 无水乙醇 II 浸泡 5min, 85% 酒精浸泡 5min, 75% 酒精浸泡 5min, 然后用蒸馏水洗 3 次, 每次 2min。

(4) 抗原修复: 将切片浸没于 PH9.0 的 EDTA 抗原修复缓冲液中, 微波炉内中火至沸后, 室温缓慢冷却, 再次中低火至微微沸腾, 待自然冷却。此过程中应注意缓冲液过度蒸发, 切勿干片。

(5) 自然冷却后将上述切片置于 PH7.4 的 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。

(6) 滤纸吸去切片上标本外多余的水分, 并用组化笔圈住切片上的组织, 然后用 3%BSA 覆盖组织, 室温封闭 30min。

(7) 根据说明书按比例配置所需的一抗(兔抗 MBP 多克隆抗体, 1: 100), 封闭完成后仔细甩掉封闭液, 然后滴加一抗, 将切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。注: 湿盒内可加少量水防止抗体蒸发。

(8) 一抗孵育结束后, 用 PBS 在脱色摇床上晃动洗涤切片 3 次, 每次 5min。稍甩干后向圈内组织滴加与一抗相应种属的荧光二抗, 室温避光孵育 1h。

(9) 二抗孵育结束后, 依然用 PBS 在脱色摇床上晃动洗涤切片 3 次, 每次 5min。用滤纸擦拭干净圈周围的 PBS 液体后, 向圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10min。

(10) 切片置于 PBS 中晃动洗涤 3 次, 每次 5min。

(11) 甩干切片上的液体后, 滴加抗荧光淬灭封片剂封片。

(12) 使用倒置荧光显微镜观察切片并采集图像。

### 2.3.11 小鼠鼻粘膜电镜观察

(1) 冰板上分离鼻粘膜组织后用手术刀将组织快速切成 1mm×1mm×1mm 左右的组织块, 然后将组织转移到装有 2.5% 戊二醛固定液的 1.5ml 避光离心管内, 4℃ 固定 4h。

(2) 小心吸掉 2.5% 戊二醛固定液, 并用预冷 PBS 漂洗组织块 10min×3 次。

(3) 加入 1% 饿酸固定 2 小时。

(4) PBS 漂洗组织块 3 次后, 酒精梯度脱水, 50% 乙醇、70% 乙醇各浸泡

10min, 然后吸出酒精, 并加入纯丙酮静置 15min。

(5) 用丙酮和树脂混合液 (1: 1) 室温浸透组织块 2h。

(6) 用丙酮和树脂混合液 (1: 2) 室温过夜浸透组织块。

(7) 用 100% 包埋剂浸透组织块 3h。

(8) 60℃ 条件下聚合 48h, 制成包埋块。

(9) 利用超薄切片机将样品切成 50nm 的薄片, 并将其置于铜网上, 2% 醋酸铀、柠檬酸铅依次染色, 透射电镜下观察并采集图像。

## 2.3.12 流式细胞术检测外周血及鼻黏膜中的 EOS 比例

### 2.3.12.1 小鼠外周血流式

(1) 准备材料: 抗凝管、红细胞裂解液、15ml 离心管、PBS、锡箔纸、70 $\mu$ m 过滤器、抗体。实验过程中所需的流式染色溶液 stain buffer 配制: PBS+1%FBS

(2) 向装有小鼠抗凝全血的抗凝管中加入抗体 (5 $\mu$ l PE anti-mouse siglec-f、5 $\mu$ l Percp anti-mouse CD45、5 $\mu$ l FITC anti-mouse CD11b), 另外将单染一种抗体的 NC 组外周血细胞作为对照管, 即 3 种荧光抗体 3 个单染对照管, 以上全部冰上避光孵育 30min。

(3) 1 倍体积的新鲜全血, 加入 3 倍体积的红细胞裂解液, 即 100 $\mu$ l 新鲜全血加入 300 $\mu$ l 红细胞裂解液, 轻轻涡旋或颠倒混匀。

(4) 冰上避光放置 10min, 其间轻轻涡旋混匀两次, 红细胞裂解后, 溶液应该是清亮透明的。

(5) 收集细胞: 4℃, 450g 离心 5min 以沉淀白细胞, 小心吸弃上清液。

(6) 向白细胞沉淀中加入两倍体积的红细胞裂解液, 轻轻涡旋充分重悬白细胞。

(7) 4℃, 450g 离心 5min 沉淀白细胞, 小心吸弃上清液

(8) 加入 stain buffer 1ml, 2000rpm/min, 离心 3min, 洗涤两次。

(9) 最后加入 300 $\mu$ l stain buffer 重悬细胞, 并转移到流式管, 上流式细胞仪检测。

### 2.3.12.2 鼻粘膜组织流式

(1) 准备材料: 剪刀、镊子、注射器内芯、70 $\mu$ m 过滤器、红细胞裂解液、离心管。

(2) 胶原酶 I 已配成 100mg/ml 的母液, 使用时将其进一步配成 1mg/ml 的工作液。

(3) 获取鼻黏膜组织, 将组织剪成 1-2mm 的碎片。

(4) 用 10ml 1640 培养基重悬细胞碎片, 然后将所有物质转移到 50ml 离心管中, 室温 1200rpm 离心 6min, 吸弃上清液。

(5) 裂解红细胞: 用红细胞裂解液冰上裂解 5min, 4℃, 1000rpm, 离心 5min, 弃上清, 用 PBS 洗涤。

(6) 用配置好的胶原酶 I 消化组织块。用大于组织量 30~50 倍的胶原酶液在 37℃ 条件下消化组织 4h, 期间需每隔 30min 摇动一次。在消化过程中, 如发现组织块已分散而失去块的形状, 经摇动即可成为絮状悬液, 则可取出少量液体在显微镜下观察, 可见分散的单个细胞和少量的细胞团, 可认为组织已消化充分。

(7) 加入 10ml 含 10%FBS 的 1640 培养基终止消化, 移液枪混合均匀, 随后将悬浮液通过 70μm 细胞过滤器, 以去除细胞团, 滤液收集于 50ml 离心管中。

(8) 以 1200rpm/min 的速度离心 5min, 弃上清, 保留细胞沉淀, 随后用 PBS 洗涤一次。

(9) 离心收集细胞沉淀, stain buffer 重悬, 细胞计数仪计数后调整细胞密度为  $10^6$ /ml。

(10) 吸 300μl 细胞悬液至流式管中, 每管加入适量特异性抗体 (PE anti-mouse siglec-f、5μl Percp anti-mouse CD45、5μl FITC anti-mouse CD11b), 另外将单染一种抗体的 NC 组鼻黏膜细胞作为对照管, 即 3 种荧光抗体 3 个单染对照管, 以上全部冰上避光孵育 30min。

(11) 用适量的 stain buffer 洗涤细胞两次, 小心吸取上清。

(12) 300μl stain buffer 重悬细胞, 上流式细胞仪检测。

### 2.3.13 ELISA 检测

(1) 提前 20min 从 4℃ 冰箱取出检测试剂盒平衡至室温。同时从 -80℃ 冰箱取出待检测的样品。对于小鼠血清样本, 采用样本稀释液将其稀释 2 倍。

(2) 稀释标准品: 先将标准品冻干粉管 12000rpm 高速离心 3min, 然后轻轻打开管盖, 加入 1ml 标准品稀释液吹打混匀 (10ng/ml) 并静置 10min。

(3) 配制标准品: 取 7 支新的 1.5ml 离心管, 依次标记 5、2.5、1.25、0.625、

0.312、0.156ng/ml, 向每管加入 300 $\mu$ l 标准品稀释液。从标准品稀释原液取出 300 $\mu$ l 加入到 5 ng/ml 的管内, 混匀后, 再从该管内取出 300 $\mu$ l 加入到 2.5ng/ml 的管内, 以此类推直至 0.156 ng/ml 管。标准品稀释液作为阴性对照使用。

(4) 从试剂盒中取出实验板条, 根据实验所需孔数拆卸未用板条和干燥剂重新放回铝箔袋内并置 4 $^{\circ}$ C 保存。

(5) 分别将标本或不同浓度的标准品加入相应孔中(100 $\mu$ l/孔), 其中 0ng/ml 孔加标准品稀释液, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 90min。

(6) 用双蒸水 25 $\times$  洗涤液稀释成 1 $\times$  洗涤液。

(7) 提前用抗体稀释液配制 1 $\times$  生物素化抗体 (1:100), 初次孵育结束后, 倒出板条内的液体, 加入 350 $\mu$ l 1 $\times$  洗涤液洗板, 间隔 1min 后, 洗板第二次。

(8) 加入配制好的 1 $\times$  生物素化抗体工作液, 每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 60min。

(9) 提前用酶结合稀释液配制 1 $\times$  酶结合物工作液, 避光放置。

(10) 孵育结束后洗板 3 次, 然后加入 100 $\mu$ l 酶结合工作液, 37 $^{\circ}$ C 条件下避光孵育 30min。

(11) 孵育完成后, 按上述方法洗板 5 次。

(12) 向每孔内加入 100 $\mu$ l TMB 显色工作液 (包括空白孔), 37 $^{\circ}$ C 孵箱中避光孵育 20min。

(13) 从孵箱取出板条, 加入 100 $\mu$ l 终止液, 10min 内酶标仪检测 OD 值。

### 2.3.14 统计学分析

所有实验至少进行三次以上, 并且以平均值 $\pm$ 标准差表示。使用 SPSS26.0 及 Prism 7.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料采用 T 检验进行两两比较, 多组均数之间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为统计学意义。

## 2.4 实验结果

### 2.4.1 ECP、MBP、EPO 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜中表达增高

采用 RT-qPCR 检测 AR 患者和小鼠鼻黏膜中 EOS 颗粒蛋白 ECP、MBP、

EPO 的水平, 结果如图所示, 与对照组相比, AR 患者 (图 2.1 A-C) 和 AR 小鼠 (图 2.1 D-F) 鼻黏膜中 ECP、MBP、EPO 的 mRNA 水平均升高。因此, 接下来进一步探讨 miR-223-3p 与 EOS 之间的关系作用。

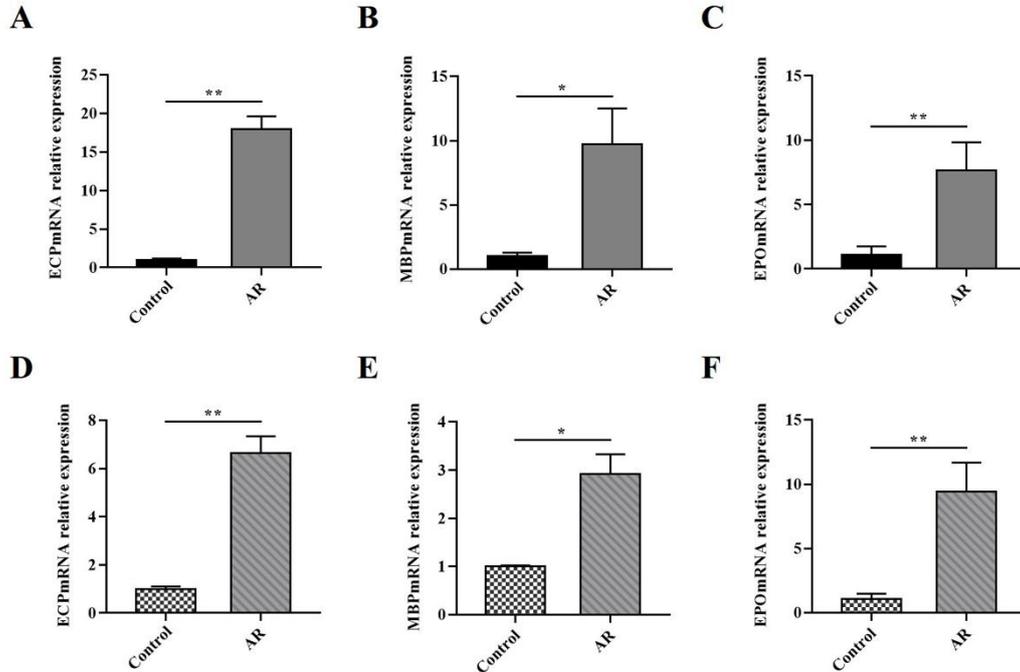


图 2.1 RT-qPCR 检测鼻黏膜组织中 ECP、MBP、EPO mRNA 的表达水平。(A-C) AR 患者和对照组鼻黏膜中 ECP、MBP、EPO mRNA 的比较; (D-F) AR 小鼠和对照组小鼠鼻黏膜中 ECP、MBP、EPO mRNA 的比较 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )。

## 2.4.2 OVA 和 CCL11 刺激后 miR-223-3p 和颗粒蛋白表达增加

根据文献报道<sup>[61]</sup>, OVA 和 CCL11 可刺激活化嗜酸性粒细胞, 因此我们使用 OVA 和 CCL11 刺激 EOL-1 48h, 并采用 RT-qPCR 来检测细胞中 miR-223-3p、ECP、MBP、EPO mRNA 表达水平。结果发现, OVA 处理的细胞相较于未处理细胞, 其 miR-223-3p、ECP、MBP、EPO mRNA 表达水平均升高, 见图 2.2, 因此后续实验均使用 OVA 来刺激细胞。

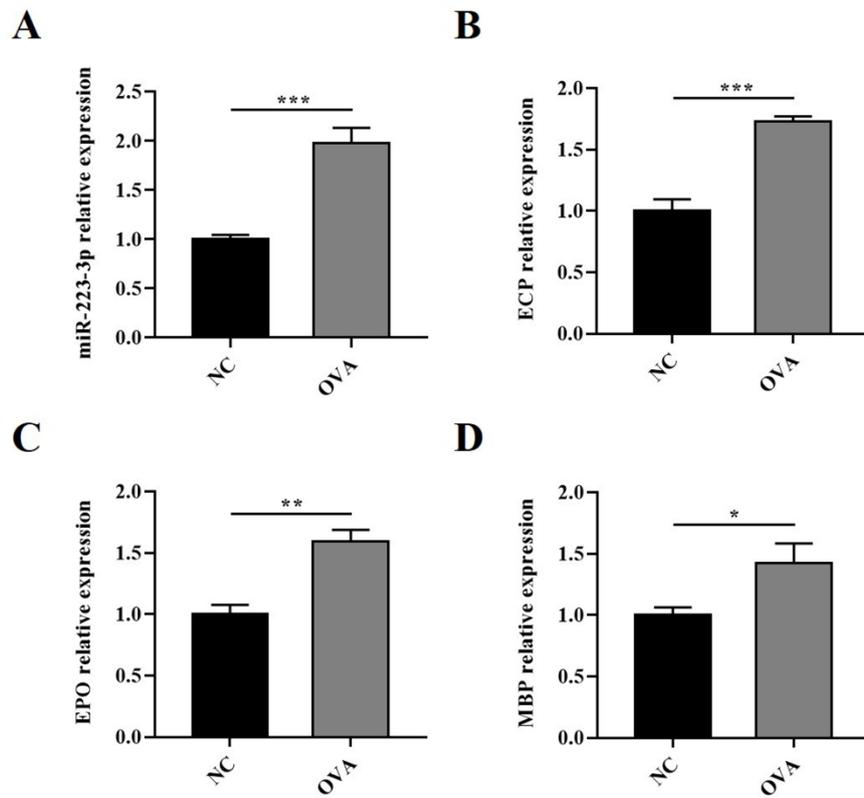


图 2.2 RT-qPCR 检测 OVA 和 CCL11 刺激后 EOL-1 中 miR-223-3p、ECP、MBP、EPOmRNA 的表达水平 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

### 2.4.3 miR-223-3p 对 OVA 刺激后细胞中 ECP、EPO、MBP 的影响

#### 2.4.3.1 RT-qPCR 检测 miR-223-3p 对 OVA 刺激后细胞中 ECP、EPO 的影响

为探讨 miR-223-3p 对嗜酸性粒细胞脱颗粒作用的影响，我们首先通过转染 miR-223-3p mimics 和 miR-223-3p inhibitor 来改变细胞内 miR-223-3p 的表达水平，再将上述细胞用 OVA 和 CCL11 刺激 48h，并 RT-qPCR 检测 miR-223-3p 对 ECP、EPO 表达的影响。结果发现，相对于 mimics-NC+OVA 组，OVA+mimics 组上调 miR-223-3p 后促进了 ECP、EPO 表达水平；反之，OVA+inhibitor 组下调 miR-223-3p 后抑制了 ECP、EPO 的表达，如图 2.3 所示。

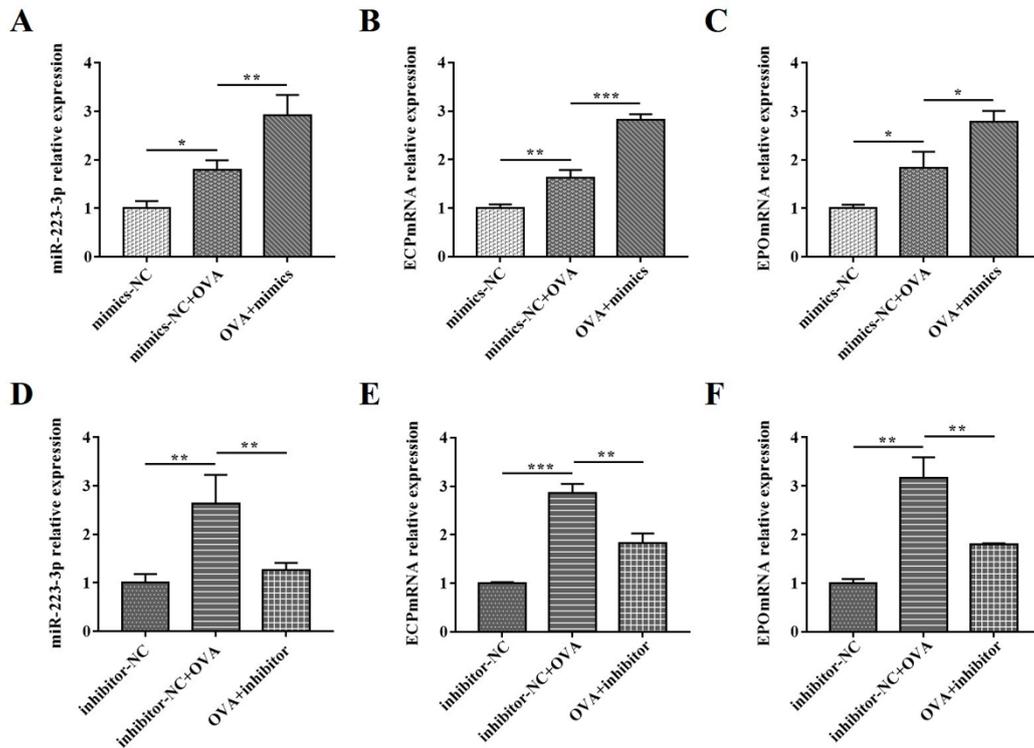


图 2.3 RT-qPCR 检测 miR-223 mimics (A) 和 miR-223 inhibitor (D) 转染后 EOL-1 细胞的 miR-223-3p 表达水平。RT-qPCR 检测不同 miR-223-3p 表达水平的 EOL-1 细胞经 OVA 和 CCL11 处理后细胞中 ECP (B、E)、EPO (C、F) mRNA 表达水平 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

#### 2.4.3.2 免疫荧光检测 miR-223-3p 对 OVA 刺激后细胞中 MBP 的影响

同样采用 miR-223-3p mimics 和 miR-223-3p inhibitor 上调或下调 miR-223-3p 的表达, 经 OVA、CCL11 刺激后, 免疫荧光检测 MBP。结果显示, 与对照组相比, 经 OVA 刺激后, OVA 组的 MBP 荧光表达量更高, 且 OVA+mimics 组在上调 miR-223-3p 后增强了 MBP 的表达; 相反, OVA+inhibitor 组降低 miR-223-3p 的水平后则减弱了 MBP 的表达, 见如图 2.4 所示。

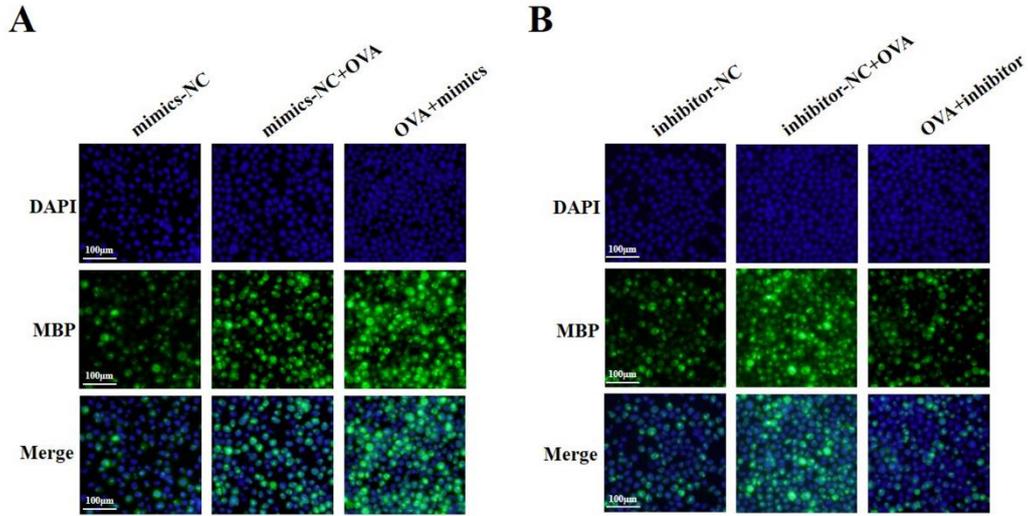


图 2.4 免疫荧光检测上调 (A) 和下调 (B) miR-223-3p 后 EOL-1 细胞中 MBP 的表达

#### 2.4.3.3 ELISA 检测 miR-223-3p 对 OVA 刺激后细胞培养上清中 ECP、EPO、MBP 分泌的影响

在用 miR-223-3p mimics 和 miR-223-3p inhibitor 处理细胞后，用 OVA 药物进一步处理，离心收集细胞培养板中的上清液用于 ELISA 检测。结果发现，上调 miR-223-3p 的表达可促进 EOL-1 细胞分泌 ECP、EPO 和 MBP；降低 miR-223-3p 的表达则可以抑制上述因子的分泌，见图 2.5。以上结果表明，miR-223-3p 能够促进 EOS 脱颗粒作用。

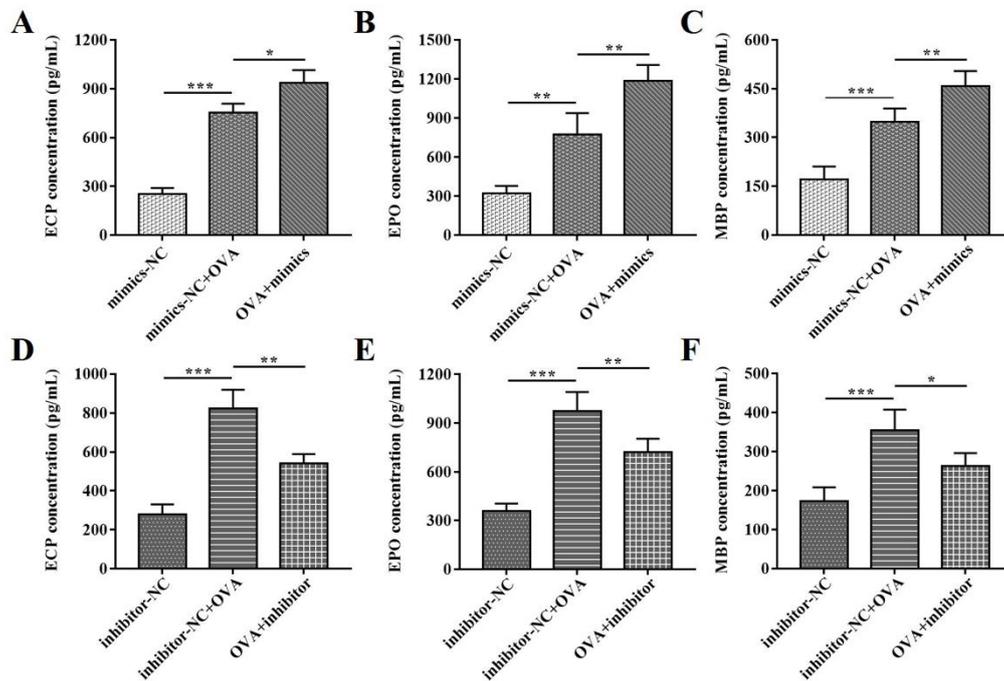


图 2.5 使用 miR-223-3p mimics (A-C) 和 inhibitor (D-F) 后, ELISA 检测经 OVA 和 CCL11 刺激 48h 后的 EOL-1 细胞培养上清中 ECP、MBP、EPO 的蛋白分泌量 (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )。

#### 2.4.4 miR-223-3p 在各组实验小鼠中的表达情况

接下来, 我们构建小鼠变应性鼻炎模型进一步在动物中探讨 miR-223-3p 的作用。首先分别从 Control 组、AR 组、miR-223-3p agomir 组和 miR-223-3p antagomir 组中获取各组小鼠鼻黏膜并提取组织总 RNA, 然后采用 RT-qPCR 检测鼻黏膜中 miR-223-3p 的表达情况。实验结果显示, AR 组小鼠鼻黏膜中 miR-223-3p 的水平高于对照组, 而在经鼻腔给予 miR-223-3p agomir 后鼻黏膜 miR-223-3p 的表达升高, 给予 miR-223-3p antagomir 后, miR-223-3p 的表达降低, 如图 2.6 所示。由此可见, miR-223-3p 在小鼠变应性鼻炎模型中的变化与 AR 患者鼻黏膜标本大致一致, 而且 miR-223-3p 基因能够成功过表达或抑制。

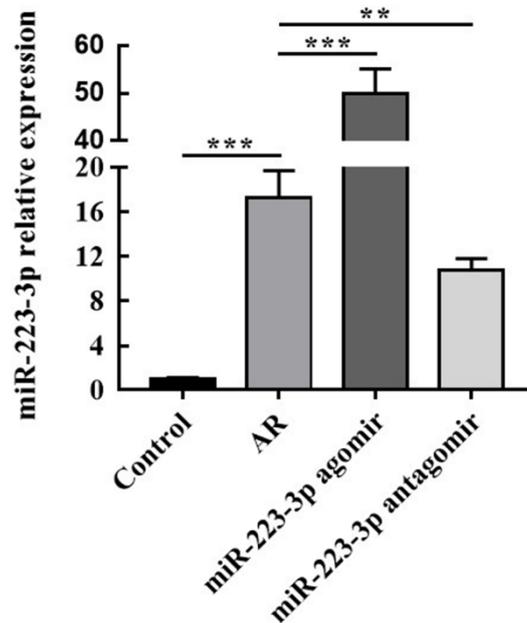


图 2.6 应用 agomir 和 antagomir 后 RT-qPCR 检测各组小鼠鼻黏膜中 miR-223-3p 的表达 (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

## 2.4.5 miR-223-3p 对 AR 小鼠鼻黏膜组织形态学的影响

### 2.4.5.1 鼻黏膜 HE 染色

为进一步探讨 miR-223-3p agomir 和 antagomir 处理对小鼠鼻黏膜病理学的影响，我们采用 HE 染色观察各标本的形态变化。从图 2.7 可以看出，Control 组小鼠鼻黏膜上皮结构完整，纤毛排列较整齐，组织内几乎未见嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润；AR 组小鼠鼻黏膜上皮纤毛连续性欠缺，部分破损、凝集、脱离，有明显的腺体组织增生，粘膜间可见较多嗜酸性粒细胞浸润；miR-223-3p agomir 小鼠鼻黏膜上皮肿胀明显，粘膜下层有明显增厚、水肿，其间可见大量嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润；miR-223-3p antagomir 组可见粘膜上皮排列欠整齐，组织未见明显水肿，其间可见少许嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润。由此可见，与 AR 组相比，miR-223-3p agomir 可加重鼻黏膜的破坏及嗜酸性粒细胞的浸润。

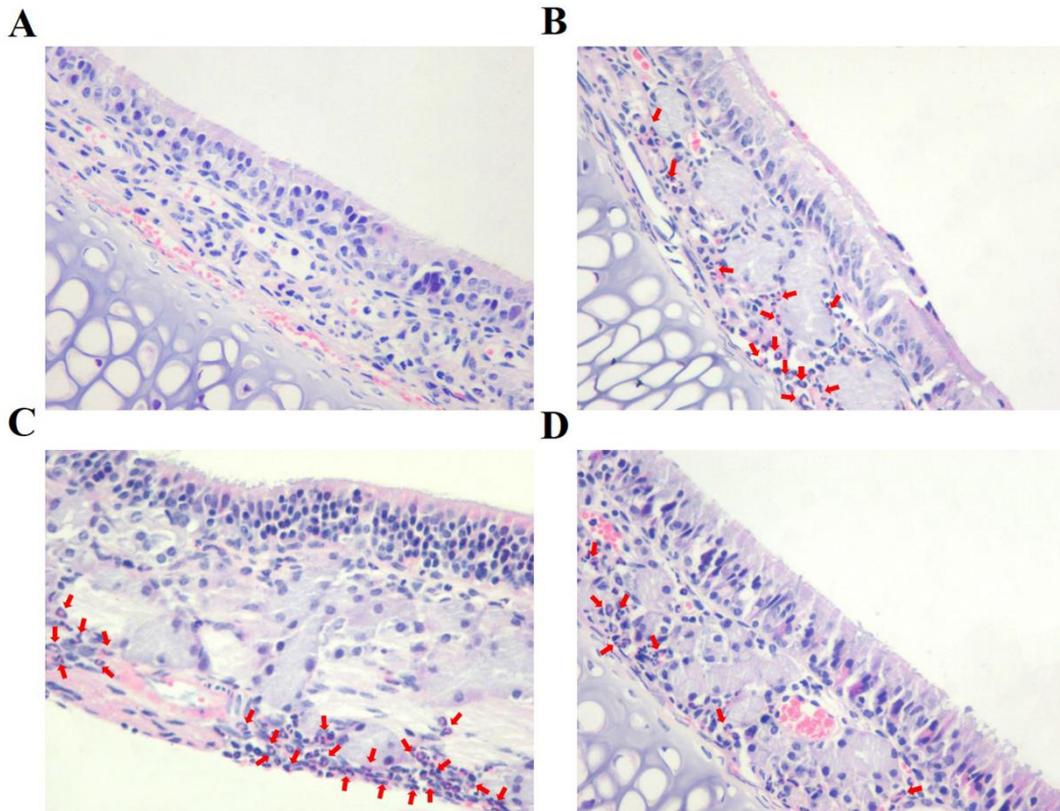


图 2.7 小鼠鼻黏膜 HE 染色。(A) 正常对照 (Control) 组; (B) AR 组; (C) miR-223-3p agomir 组; (D) miR-223-3p antagomir 组。

#### 2.4.5.2 鼻黏膜电镜

为了进一步了解不同组别动物之间的鼻黏膜病理差异，我们在实验过程中利用电镜对小鼠的鼻黏膜组织纤毛超微结构进行观察，结果如图 2.8 所示。可以看出，对照组鼻黏膜上皮细胞管腔面纤毛排列整齐，粗细较为均匀，而 AR 组鼻黏膜上皮腔面可见纤毛有脱落、排列紊乱倒伏、数量较为稀疏。与 AR 组相比，miR-223-3p agomir 处理组的鼻黏膜纤毛脱落更为明显、排列更为紊乱，可见大量脱落的纤毛及细胞碎片；而 miR-223-3p antagomir 组的鼻黏膜纤毛较整齐，少量出现倒伏。由此可见，抑制 miR-223-3p 可减轻鼻黏膜的损伤。

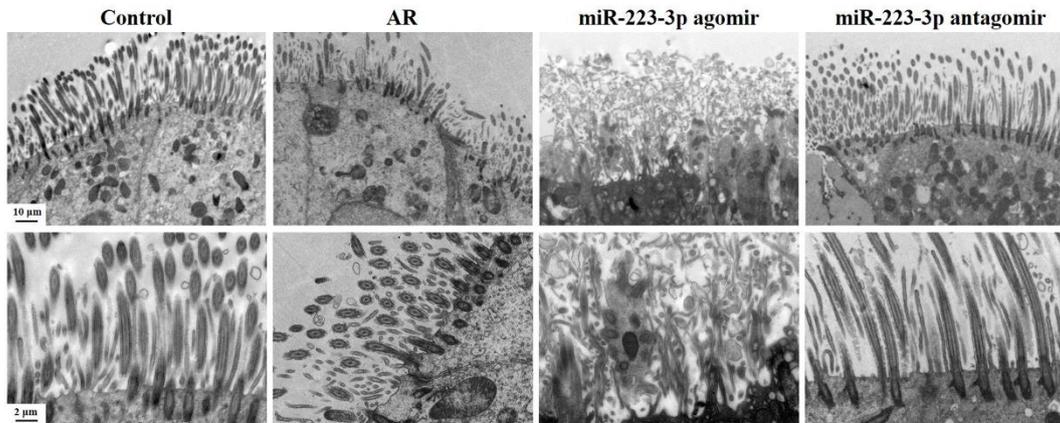
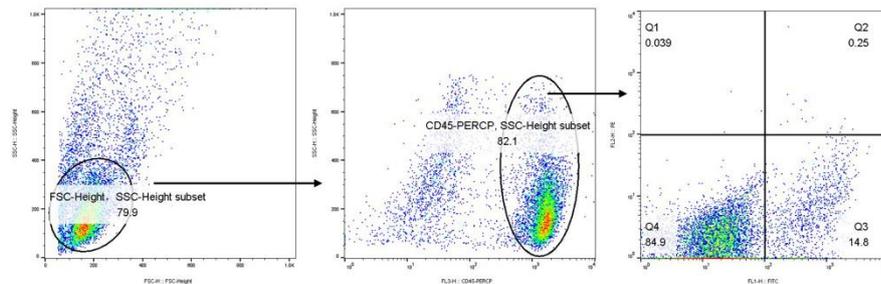


图 2.8 小鼠鼻黏膜电镜结果

#### 2.4.6 miR-223-3p 减少 AR 小鼠鼻黏膜和外周血中 EOS 的比例

以上结果显示 miR-223-3p 能够加重 AR 小鼠鼻黏膜的损伤，鉴于 miR-223-3p 在体外实验中对 EOS 脱颗粒的促进作用，我们进一步验证 miR-223-3p 能否增强 EOS 的脱颗粒功能进而促进 AR 炎症，因此采用流式细胞术进一步检测小鼠鼻黏膜和外周血中的 EOS 比例。结果显示，上调 miR-223-3p 增加了外周血和鼻黏膜中 EOS 比例（图 2.9）。

A



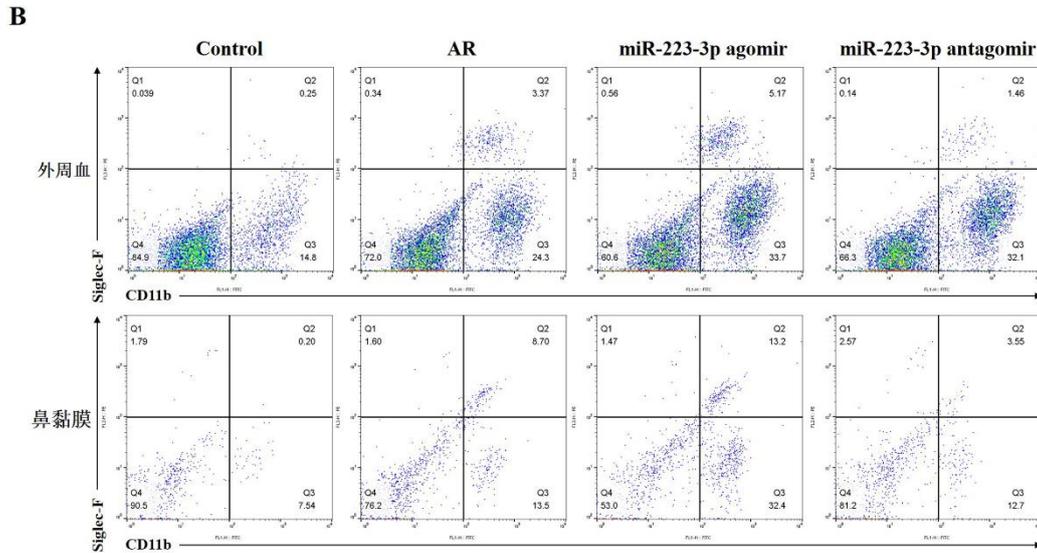


图 2.9 小鼠外周血和鼻黏膜中的 EOS 的数量变化。(A) EOS 的门控策略；(B) 流式细胞术分析各组小鼠外周血和鼻黏膜中的 EOS 数量变化。

### 2.4.7 免疫荧光检测 AR 小鼠鼻黏膜中 MBP 的变化

采用免疫荧光标记 MBP 进一步验证嗜酸性粒细胞在鼻黏膜中的浸润情况，结果如图 2.10 所示。与 AR 组相比，上调 miR-223-3p 后增强了鼻黏膜中 MBP 的荧光表达量，即增加了 EOS 在鼻黏膜中的浸润。相反，应用抑制剂后减弱了 MBP 的荧光表达量。

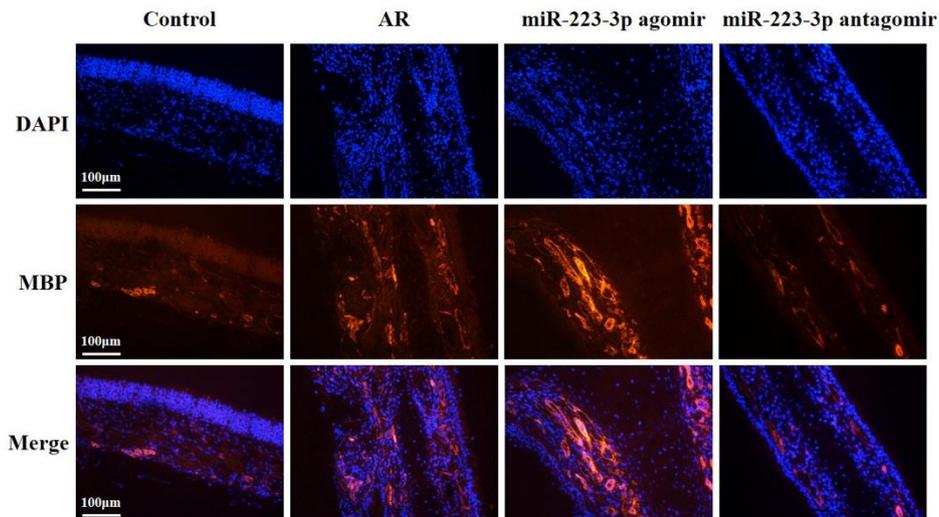


图 2.10 免疫荧光检测各组小鼠鼻黏膜中 MBP 的表达

### 2.4.8 RT-qPCR 和 ELISA 检测 AR 小鼠鼻黏膜或血清中 EPO、ECP、MBP 的变化

我们也进一步检测了 AR 小鼠鼻黏膜和血清中 EOS 颗粒蛋白，RT-qPCR 结果显示，应用 agomir 上调 miR-223-3p 后增加了小鼠鼻黏膜中 ECP、MBPmRNA 的表达（图 2.11 A-B）；ELISA 结果也显示相同趋势，与 AR 组相比，过表达 miR-223-3p 后提高了血清中 EPO 和 ECP 的分泌水平（图 2.11 C-D）。

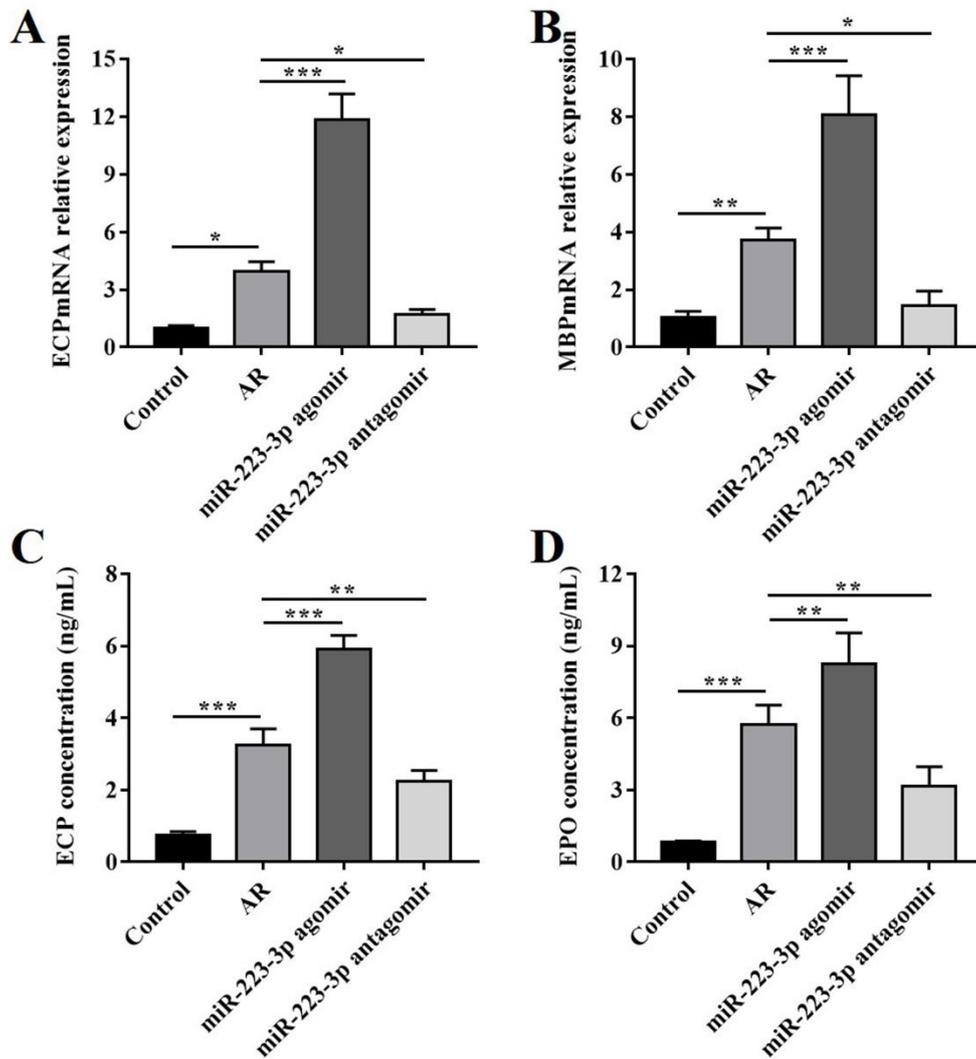


图 2.11 RT-qPCR 和 ELISA 检测 AR 小鼠鼻黏膜或血清中 EPO、ECP、MBP 的变化。（A-B）RT-qPCR 检测小鼠鼻黏膜中 ECP、MBPmRNA 的表达水平；（C-D）ELISA 检测小鼠血清中 EPO、ECP 蛋白分泌量（\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ）。

## 2.5 讨论

以往报道表明 miRNA 在 AR 的发展中起重要作用, 而 miR-223-3p 作为一种受多种转录因子调控的多功能 miRNA, 已发现在哮喘、嗜酸性食管炎、特异性皮炎中高表达。在上一章节中我们已经证实 miR-223-3p 在 AR 鼻黏膜中同样上调, 因此本章我们进一步探讨了 miR-223-3p 在 AR 中的作用。

多项研究表明 miR-223-3p 具有调节免疫细胞增殖、分化和极化的作用。如 miR-223-3p 在人类单核细胞-巨噬细胞分化过程中显著下调, 并调控巨噬细胞极化<sup>[62,63]</sup>。miR-223-3p 通过与特定靶点结合调节树突状细胞的分化和功能<sup>[64,65]</sup>, 其也可通过促进辅助 T 细胞如 Th1 或 Th17 增殖来调节 T 细胞增殖和分化, 进而调节炎症性疾病<sup>[66,67]</sup>。以往研究也显示, miR-223-3p 在粒细胞分化和活化过程中起关键作用, 敲除 miR-223 增加了小鼠骨髓中中性粒细胞的数目及成熟度, 使其表现出对激活刺激高度敏感的特性<sup>[68]</sup>。miR-223-3p 在这些细胞表达的相应变化可调节细胞各种功能并减弱或加剧相关的组织炎症。

EOS 是与过敏反应显著相关的粒细胞, 在不同程度上参与包括 AR 在内的炎症疾病的发病机制, 而 EOS 的效应功能与其细胞毒性颗粒蛋白密切相关, 包括 EPO、ECP、MBP 和 EDN, 它们通常被作为 EOS 活化的标志物来进行研究。在不同刺激下 EOS 可发生脱颗粒, 并迅速和选择性地分泌颗粒预制蛋白造成组织损伤。已有研究证实, 豚鼠哮喘模型中上皮细胞的损伤<sup>[69]</sup>和儿童哮喘恶化<sup>[70]</sup>的严重程度就与这些颗粒蛋白或 EOS 完整颗粒的释放相关。此外, 颗粒蛋白还具有免疫调节作用, 如 MBP 可刺激中性粒细胞和肥大细胞的活化, EDN 可激活树突状细胞并促进 T 细胞活化, 进一步促进炎症进展。以上研究表明, EOS 的脱颗粒功能与过敏性炎症密切相关。

研究显示 miR-223 在 IgE 介导的肥大细胞中上调, 且其可通过靶向肥大细胞中的胰岛素样生长因子 1 受体 IGF-1R 抑制肥大细胞脱颗粒<sup>[28]</sup>。相关研究已证实, miR-223 是嗜酸性粒细胞祖细胞增殖的调节剂, 在 EOS 的分化过程中 miR-223 上调, 敲低 miR-223 会导致嗜酸性粒细胞祖细胞过度增殖和成熟延迟<sup>[31]</sup>。因此, 进一步了解 miR-223 对 EOS 的调节作用对寻找 EOS 疾病的新治疗靶点具有重要意义。据文献报道, miR-223 在 AR 血清中的水平与 ECP 和嗜酸性粒细胞数目密切相关<sup>[57]</sup>, 因此我们也通过 RT-qPCR 检测了 AR 患者和小鼠鼻黏膜中 ECP、MBP 和 EPO mRNA 的水平, 结果显示 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中 ECP、

MBP、EPO mRNA 的表达水平均高于对照组,再根据上一章节中我们已证实 miR-223-3p 在 AR 粘膜组织中上调,因此我们提出 miR-223-3p 通过调控 EOS 的脱颗粒功能进而影响 AR 炎症这一假设并进行验证。

为验证这一假设,我们体外利用 EoL-1 细胞系用作模型细胞系。EoL-1 已被用作研究嗜酸性粒细胞功能的模型细胞系<sup>[71,72]</sup>。该细胞系与人类原代嗜酸性粒细胞的相似性和可比性已经确定<sup>[73]</sup>。我们首先应用 OVA 和 CCL11 刺激 EOL-1 细胞,发现经刺激后细胞中 miR-223-3p 的表达增加,且 EOS 颗粒蛋白的 mRNA 表达水平也升高,因此后续细胞实验都采用 OVA 和 CCL11 来激活人 EOL-1 细胞系。然后我们进一步在上调或下调 miR-223-3p 的细胞中加入 OVA 和 CCL11,实验结果发现,miR-223-3p 增加了 OVA 和 CCL11 介导的颗粒蛋白的表达和分泌,而 miR-223-3p 抑制剂则可以降低这些介质的表达。根据上述实验结果我们得出,miR-223-3p 可以增强 OVA 和 CCL11 介导的嗜酸性粒细胞脱颗粒。接下来我们在构建小鼠 AR 模型的同时应用 miR-223-3p agomir 和 antagomir,观察 miR-223-3p 对 EOS 及 AR 炎症的影响。结果也发现,miR-223-3p 提高了 EOS 在鼻黏膜中的浸润及 EOS 颗粒蛋白在组织和血清中的水平,而且在上调 miR-223-3p 后加重了小鼠鼻黏膜的损伤。在 Lu 等<sup>[31]</sup>的研究报告中描述 miR-223<sup>+/+</sup>和 miR-223<sup>-/-</sup>小鼠体内外周血中 EOS 没有差异,但在我们的研究中 miR-223-3p 增加了 EOS 在炎症组织中的数目,这可能是小鼠所处炎症研究背景下所致。综合以上细胞和动物实验结果,我们证明 miR-223-3p 可以促进 EOS 脱颗粒作用进而影响 AR 炎症,但 miR-223-3p 调控 EOS 影响 AR 的具体机制仍不清楚。

## 2.6 结论

MiR-223-3p 通过促进 EOS 脱颗粒进而加重 AR 炎症反应。

## 第3章 基于生物信息学预测并验证 miR-223-3p 靶基因 FBXW7 及其在 AR 中的表达

### 3.1 引言

MiRNA 主要通过降解靶 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译,进而调控目的蛋白在疾病中的表达来发挥作用。在上一章节中,我们已经证明 miR-223-3p 可以促进嗜酸性粒细胞分泌颗粒蛋白进而加重变应性鼻炎,但 miR-223-3p 在 AR 中发挥作用的具体机制仍不清楚。生物信息学方法在预测 miRNA 和 mRNA 之间的相互作用方面准确性较高,具有一定的指导意义。因此,为进一步探究 miR-223-3p 在 AR 中发挥作用的具体机制,我们先通过生物信息学方法预测 miR-223-3p 的靶基因,再通过双荧光素酶报告对其进一步验证,最后检测 miR-223-3p 靶基因在 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中的表达情况。

本章节中首先从 miRTarBase、miRDB、TargetScan、miRmap 和 DIANA-microT 五个数据库中获取并下载 miR-223-3p 靶基因列表,利用在线韦恩图工具取交集后获取较为可信的靶基因。然后通过双荧光素酶报告验证 miR-223-3p 与筛选获得的靶基因的结合,并上调或下调 EOL-1 细胞中 miR-223-3p 后观察靶基因的变化进行进一步验证,最后进一步检测 miR-223-3p 靶基因在 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中的表达。

### 3.2 实验材料

#### 3.2.1 实验主要仪器

仪器名称	生产厂家
超净工作台	苏洁净化设备有限公司
超纯水系统	美国密李博公司
超低温冰箱 (-80℃)	美国 Thermo 公司

低温冰箱 (4℃、-20℃)	青岛海尔公司
移液枪	德国 eppendorf 公司
组织研磨仪	武汉赛维尔科技有限公司
电泳仪、电泳槽、转膜装置	美国 Bio-rad 公司
低温高速离心机	美国 Thermo 公司
摇床	上海一恒实验设备有限公司
ChemiDoc XRS+化学发光成像系统	美国 Bio-Rad 公司
涡旋震荡仪	常州越新仪器制造有限公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯公司
低温高速离心机	美国 Thermo 公司

### 3.2.2 实验主要试剂

试剂名称	生产厂家
胎牛血清 FBS	北京全式金公司
细胞培养基	武汉普诺赛公司
磷酸盐缓冲液 PBS	北京 Solarbio 公司
RFect 小核酸转染试剂	常州百代生物公司
Mmu-miR-223-3p agomir	广州锐博公司
Mmu-miR-223-3p antagomir	广州锐博公司
Hsa-miR-223-3p mimics	广州锐博公司
Hsa-miR-223-3p inhibitor	广州锐博公司
Trizol	美国 Thermo Fisher 公司
RNase-free 水	北京全式金公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
逆转录试剂盒	北京全式金公司
miR-223-3p 引物	广州锐博公司
U6 逆转录及 PCR 引物	广州锐博公司
荧光定量试剂盒	日本 Takara 公司
甲醇	国药集团化学试剂有限公司

无核酶枪头 (10 $\mu$ l、200 $\mu$ l、1000 $\mu$ l)	武汉赛维尔科技有限公司
离心管、EP 管	美国 Axygen 公司
3mm、4mm 研磨珠 (无核酶)	武汉赛维尔科技有限公司
TBS 缓冲液干粉	武汉赛维尔公司
脱脂奶粉	武汉博士德公司
甘氨酸、SDS、Tris	北京 Solarbio 公司
RIPA 裂解液	北京普利来公司
BCA 蛋白定量试剂盒	北京碧云天公司
6 $\times$ 蛋白 loading buffer	北京全式金公司
一抗稀释液	北京 Solarbio 公司
辣根过氧化物酶标记的鼠、兔抗体	武汉博士德公司
蛋白 maker	美国 Thermo Fisher 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
甘氨酸、SDS、Tris	北京 Solarbio 公司
30% 聚丙烯酰胺	北京 Solarbio 公司
过硫酸铵、TEMED	武汉博士德公司
GAPDH 抗体	英国 Abcam 公司
FBXW7 抗体	武汉三鹰公司
注射用氢氧化铝	美国 Thermo 公司
卵清蛋白 (OVA)	美国 sigma 公司

### 3.2.3 主要试剂的配制

#### (1) 10 $\times$ 电泳缓冲液

Tris base	30.2g
Glycine	187.7g
SDS	10g

注：加入 1L 双蒸水溶解，置于磁力搅拌器上充分搅拌，使用时稀释成 1 $\times$ 工作液。

#### (2) 10 $\times$ 转膜缓冲液

Tris base	58g
Glycine	29g
SDS	3.7g

注：加入 1L 双蒸水溶解，置于磁力搅拌器上充分搅拌，使用时 1L 工作液里包含 700ml 蒸馏水、100ml 10×转膜缓冲液、200ml 甲醇。

(3) 10%分离胶

1M Tris (PH 8.8)	8.5ml
30% Acr-Bis (29:1)	7.5ml
双蒸水	6ml
10%过硫酸铵 (AP)	225μl
10% SDS	225μl
TEMED	9μl

(4) 5%浓缩胶

30% Acr-Bis (29:1)	1.0ml
1M Tris (PH 6.8)	0.75ml
双蒸水	4.1ml
10% SDS	60μl
10%过硫酸铵 (AP)	60μl
TEMED	6μl

(5) 配制 TBST 溶液

取一小袋 TBS 粉剂，按要求加入 2L 双蒸水，同时吸取 2ml Tween-20，充分搅拌均匀，常温放置备用。

(6) 配制 10%过硫酸铵

取一 50ml 离心管用锡箔纸作避光处理，称取 5g 过硫酸铵加入离心管内，并向其中添加双蒸水至 50ml，待完全溶解后于 4℃冰箱保存。

### 3.2.4 实验动物和实验细胞株

实验所需细胞和动物参照 2.2.4。

### 3.3 实验方法

#### 3.3.1 生物信息学预测 miR-223-3p 靶基因

(1)从以下五个数据库预测 miR-223-3p 靶基因:

数据库名称	数据库网址
miRTarBase	<a href="http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php">http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php</a>
miRDB	<a href="http://mirdb.org/">http://mirdb.org/</a>
TargetScan	<a href="http://www.targetscan.org/vert_71/">http://www.targetscan.org/vert_71/</a>
mirmap	<a href="https://mirmap.ezlab.org/">https://mirmap.ezlab.org/</a>
DIANA-microT	<a href="http://www.microrna.gr/microT">http://www.microrna.gr/microT</a>

(2)打开各数据库网址下载各数据库所预测的 miR-223-3p 靶基因列表。

(3)打开线上韦恩图工具网址 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), 并将下载的靶基因列表上传, 最后取五个数据库预测结果的交集。

#### 3.3.2 荧光素酶报告

(1) 该实验过程中所需的质粒均由上海汉恒公司构建。将 293T 细胞提前接种于六孔板中, 待细胞密度达 60%-70%开始转染。

(2) 将 100 $\mu$ l 的 DMEM 与 2 $\mu$ g FBXW7-3UTR-WT、FBXW7-3UTR-MUT 及 150pmol hsa-miR-223-3p/Negative Control mimics (NC mimics) 充分混匀后室温放置 (溶液 A), 然后将 7.5 $\mu$ l TransIntro EL 转染试剂加入到已稀释好的质粒中, 充分混匀, 室温放置 15min。

(3) 转染前 PBS 清洗细胞 1 次, 并更换新鲜无血清培养基, 之后将转染混合物加入, 混匀, 置入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。

(4) 转染 6h 后换取新鲜培养基, 继续置入细胞培养箱中培养。

(5) 转染 48h 后去除细胞培养基, 用 1 $\times$ PBS 小心润洗两次, 加入适量 1 $\times$  Cell Lysis Buffer, 室温充分裂解 10 分钟后, 刮取细胞于 1.5ml 离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 12000 $\times$ g 离心 10 分钟, 取上清 (细胞裂解物) 备用。

(6) 将 100 $\mu$ l 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent 加入到 96 孔板中, 再小心吸取 20 $\mu$ l 细胞裂解物至反应板中, 水平震荡混匀, 于酶标仪中检测萤火

虫荧光素酶报告基因的活性，此值为内参值。之后吸取 100 $\mu$ l 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent II 加入到上述反应板中，水平震荡混匀，于酶标仪中检测海肾荧光素酶报告基因的活性，此即为报告基因发光值。

### 3.3.3 细胞转染

具体实验步骤详见第2章 2.3.2。

### 3.3.4 组织 RNA 的提取

具体实验步骤详见第1章 1.3.2。

### 3.3.5 RNA 逆转录合成 cDNA

具体实验步骤详见第1章 1.3.3。

### 3.3.6 实时荧光定量 PCR

具体实验步骤详见第1章 1.3.4。

### 3.3.7 蛋白免疫印迹反应

#### 3.3.7.1 提取细胞总蛋白

(1) 从细胞孵育箱中取出已处理好的细胞，巴氏吸管吹打混匀细胞悬液，将细胞转移到 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min，小心吸去上清收集细胞沉淀。

(2) 加入预冷的 PBS1ml，吹打混匀后将其转移到 1.5ml 离心管中，继续 1000rpm 离心 5min，弃上清保留细胞沉淀。

(3) PBS 重复清洗一次，步骤如上。

(4) 尽量吸尽多余的 PBS，加入适量已配制好的 RIPA 裂解液（每 1ml RIPA 裂解液中加入 10 $\mu$ l PMSF），移液枪吹打混匀后，用漩涡震荡仪继续震荡 20s，然后冰上放置 20min，每隔 5min 重复震荡一次。

(5) 12000rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，收集细胞裂解上清液。

### 3.3.7.2 提取组织总蛋白

(1) 按照每 10mg 组织加入 100 $\mu$ l RIPA 裂解液的比例, 向每个样本中加入适量已配制好的 RIPA, 并加入一颗 4mm 研磨珠和两颗 3mm 研磨珠用于研磨。

(2) 打开组织研磨仪, 1.5ml EP 管配平放置于适配器中, 调整操作主界面快捷选择栏, 设定频率为 60HZ, 时间为 60 秒, 然后关闭安全锁, 点击启动键开始研磨组织。研磨结束后, 按同样的操作重复研磨一次。如果研磨仍不充分, 可考虑再重复研磨。

(3) 研磨结束后, 冰上放置 20min, 使组织得到充分裂解。

(4) 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 离心 10min 后, 收集组织裂解上清液, 注意勿吸到沉淀。

### 3.3.7.3 BCA 法测定蛋白样品浓度

(1) 按照试剂盒说明书稀释标准品, 配备浓度为 2 $\mu$ g/ $\mu$ l、1 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.125 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.0625 $\mu$ g/ $\mu$ l 和 0 $\mu$ g/ $\mu$ l 的标准品。之后将其加到 96 孔板对应的孔中。

(2) 稀释待测样品: 向 96 孔板对应的样品孔中先加入 18 $\mu$ l 1 $\times$ PBS, 再加入 2 $\mu$ l 样品, 将待测样品稀释 10 倍。

(3) 配制 BCA 工作液: 每个样本需 BCA 工作液 200 $\mu$ l, 每个测定的样本做 3 个平行反应。根据标准品样本数和待测蛋白样本数计算 BCA 工作总量, 再将 BCA-A 液和 BCA-B 液按照 50: 1 的体积比配制好 BCA 工作液, 上下颠倒充分混匀。

(4) 向每孔加入 200 $\mu$ l BCA 工作液, 盖上 96 孔板盖, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

(5) 用酶标仪检测 562nm 下每个样品和 BSA 标准品的吸光值, 根据数值绘制标准曲线和计算待测蛋白的浓度。

### 3.3.7.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

(1) 清洗实验所需的玻璃板, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱烘干, 擦拭制胶架和海绵垫使其保持干净整齐, 之后将干燥的玻璃板两端对齐后垂直放入制胶夹中卡紧, 再将制胶夹垂直卡在制胶架上准备灌胶。

(2) 按前面所述的配方配 10% 的分离胶, 加入 TEMED 后用巴氏吸管快速吹匀, 并沿玻璃板一侧开始灌胶, 待胶面上升到绿带连线高度时停止灌胶。之后将无水乙醇缓慢加入进行压胶, 室温静置 30min 后可观察到胶和乙醇之间有一

条较明显的直线，说明下层胶已凝固。

(3) 倒掉胶上面的无水乙醇，倒置制胶架加快酒精挥发干净。

(4) 按前面所述的配方配 5% 的浓缩胶，加入 TEMED 后用巴氏吸管快速混匀，然后立即快速灌胶将玻璃板剩余空间灌满，并将清洗干净的梳子水平插入到浓缩胶中，室温静置 30min 左右。

(5) 待浓缩胶凝固后，从制胶架上取下玻璃板用清水清洗干净，并安装于电泳槽内，加入新配制的 1× 电泳液后，垂直缓慢地将梳子向上拔出。

(6) 根据测得的蛋白浓度计算蛋白样品的混样体积，然后向其中加入适量的 6× 蛋白上样缓冲液，使其终浓度稀释成 2×，混合完成后 100℃ 水浴 10min。

(7) 用 20μl 微量移液枪吸取各组蛋白样品贴壁加入相对应的样品孔中，然后对应好正负极后连接电泳仪，并调节电压模式以恒压 80V 开始电泳，待 Marker 分散开后，重新调整电压为 120V 再继续电泳，直到溴酚蓝跑到底部时终止电泳。

#### 3.3.7.5 转膜

(1) 按前面所述方法配制 1× 转膜液后将其倒入转膜盆中，然后将转膜夹和滤纸浸泡在转膜液中。用切胶板撬去胶上的小玻璃板后，根据 marker 分子量标识切取所需蛋白分子对应区域的凝胶并平铺于滤纸上。

(2) 剪切与胶适当大小的 PVDF 膜置于甲醇中，待膜激活后用镊子将其覆盖于胶上，并观察膜与胶之间是否有气泡。待膜上的气泡全部擀去后，轻轻在膜上盖上滤纸。

(3) 合上转膜夹，并将其转移至转膜槽中，使夹的黑面对应槽的黑面，夹的白面则对应槽的红面。然后将转膜槽放入电泳槽中，在加满转膜液后将电泳槽置于含有冰袋的水盆中。

(4) 连接电泳仪，设置转膜时间，以 260mA 恒流转膜 90min。

#### 3.3.7.6 封闭

转膜结束后，将所有的 PVDF 膜置于 5% 的脱脂牛奶中，室温封闭 2h。

(1) 封闭完成后，用 1×TBST 清洗 PVDF 膜 2min，结合 Marker 标识的分子量和目标蛋白的分子量进行裁膜。

(2) 按照说明书所示比例用一抗稀释液配制适量的一抗，之后将 PVDF 膜置于相对应的一抗中，于 4℃ 孵育过夜。

(3) 将孵育完一抗的 PVDF 膜置于 1×TBST 中清洗 3 次，每次 10min。

- (4) 以 1: 10000 的比例配制二抗, 将膜置于二抗中室温孵育 70min。
- (5) 用 1×TBST 清洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10min。

#### 3.3.7.7 抗体孵育

(1) 封闭完成后, 用 1×TBST 清洗 PVDF 膜 2min, 结合 Marker 标识的分子量和目标蛋白的分子量进行裁膜。

(2) 按照说明书所示比例用一抗稀释液配制适量的一抗, 之后将 PVDF 膜置于相对应的一抗中, 于 4℃ 孵育过夜。

(3) 将孵育完一抗的 PVDF 膜置于 1×TBST 中清洗 3 次, 每次 10min。

(4) 以 1: 10000 的比例配制二抗, 将膜置于二抗中室温孵育 70min。

(5) 用 1×TBST 清洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10min。

#### 3.3.7.8 蛋白检测

取 ECL 试剂中的 A 液和 ECL 试剂中的 B 液进行等体积混匀, 将配制好的 ECL 显色液滴加到 PVDF 膜上, 使得两者充分接触反应。设置蛋白曝光时间, 快速将 PVDF 膜置于凝胶成像系统中进行显影。

### 3.3.8 免疫组化

(1) 将石蜡切片置于 65℃ 烘箱中烘片 2h 后, 依次将切片放入二甲苯 I 20min, 二甲苯 II 20min, 无水乙醇 I 10min, 无水乙醇 II 10min, 95% 酒精 5min, 90% 酒精 5min, 80% 酒精 5min, 70% 酒精 5min。PBS 清洗三次, 每次 5 min。

(2) 切片置于柠檬酸 PH 6.0 或 EDTA PH 9.0 和 8.0 的缓冲液中微波修复, 中火 8 分钟, 降温 8 分钟后中低火 7 分钟后断电。

(3) 自然冷却后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。

(4) PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 甩干后 3% BSA 封闭 30 min。

(5) 去除 BSA 液, 每张切片加入约 50 μl 稀释的一抗覆盖组织, 4℃ 过夜孵育。

(6) PBS 洗 3 次, 每次 5 min。

(7) 去除 PBS 液, 每张切片加 100 μl 相应种属的二抗, 常温孵育 50min。

(8) PBS 洗 3 次, 每次 5min。

(9) 去除 PBS 液，每张切片加 100  $\mu$ l 新鲜配制 DAB 溶液，显微镜控制显色。

(10) 显色完全后，自来水冲洗，苏木素复染，1% 盐酸酒精分化约 1s，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗。

(11) 无水乙醇脱水，二甲苯透明。

(12) 中性树胶封固。

### 3.3.9 统计学分析

所有实验至少进行三次以上，并且以平均值  $\pm$  标准差表示。使用 SPSS26.0 及 Prism 7.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料采用 T 检验进行两两比较，多组均数之间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$  为统计学意义。

## 3.4 实验结果

### 3.4.1 生物信息学预测 miR-223-3p 的靶基因

为预测 miR-223-3p 靶基因，我们从 miRTarBase、miRDB、TargetScan、miRmap 和 DIANA-microT 五个数据库中获取并下载 miR-223-3P 靶基因列表，取交集后获得 4 个 miR-223-3p 较为可信的靶基因，分别为 IL6ST、FBXW7、FOXO1、NFIA（图 3.1 A）。为了进一步验证上述预测结果，我们用 miR-223-3p mimics 转染 EOL-1 细胞，RT-qPCR 检测上述靶基因的表达。结果所示，与对照组相比，上调 miR-223-3p 可以抑制 EOL-1 中 IL6ST、FBXW7、FOXO1、NFIA 基因表达，其中 miR-223-3p 对靶基因 FBXW7 的抑制作用最为显著，因此我们进一步将 FBXW7 作为研究对象（图 3.1 B）。

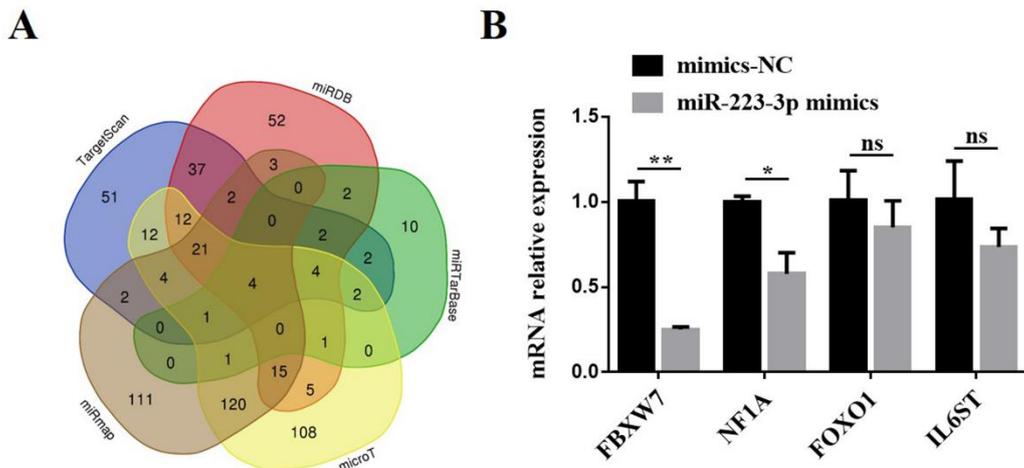


图 3.1 生物信息学预测 miR-223-3p 潜在的靶基因。(A) 利用 miRTarBase、miRDB、TargetScan、miRmap 和 DIANA-microT 五个数据库分别预测 miR-223-3p 可能的靶基因，并取交集；(B) RT-qPCR 检测 miR-223-3p 过表达后，交集内的靶基因 mRNA 表达水平的改变 (\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ )。

### 3.4.2 双荧光素酶报告验证 miR-223-3p 靶向结合 FBXW7 3'UTR

为进一步验证 miR-223-3p 和 FBXW7 的结合关系，我们首先在 targetscan 数据库中预测 miR-223-3p 与 FBXW7 基因 3'UTR 区域之间的结合位点，结果显示 FBXW7 基因 3'UTR 和 miR-223-3p 共有 3 个保守结合位点 (图 3.2 A)。接下来将结合靶点突变质粒 (由上海汉恒公司构建) 运用于双荧光素酶实验并分析两者的靶向关系，实验结果显示与 NC mimics 组相比，过表达 miR-223-3p 能够显著下调 FBXW7 野生型 3'UTR 的荧光素酶活性，而突变型 3'UTR 的荧光素酶活性无显著差异，说明 miR-223-3p 能特异结合 FBXW7-3'UTR (图 3.2 B)。

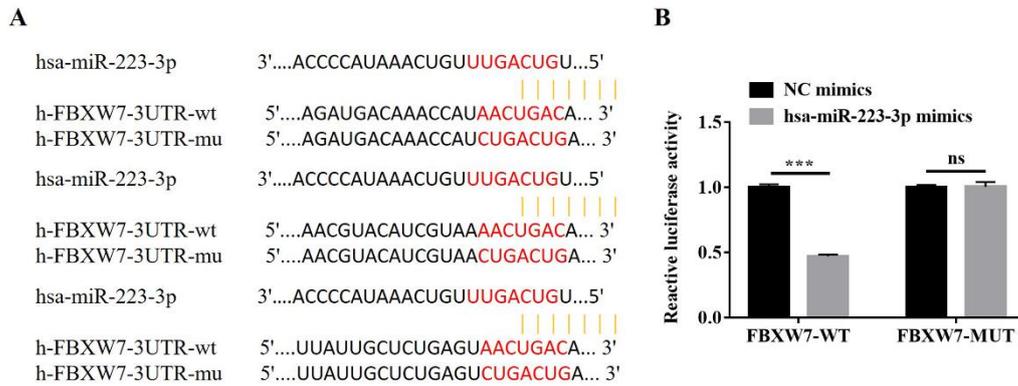


图 3.2 miR-223-3p 与 FBXW7 3'UTR 结合位点预测及双荧光素酶报告验证。(A) TargetScan 数据库预测 miR-223-3p 与 FBXW7 结合位点；(B) 双荧光素酶报告实验验证 miR-223-3p 靶向结合 FBXW7 3'UTR (\*\*\*) $P < 0.001$ 。

### 3.4.3 改变 miR-223-3p 观察 EOL-1 细胞中靶基因 FBXW7 的表达

为进一步说明两者之间的靶向关系,我们在利用 miR-223 mimics 和 miR-223 inhibitor 转染 EOL-1 细胞后,提取细胞总蛋白,应用蛋白免疫印迹反应(western blot)检测 FBXW7 的表达水平。结果发现,过表达 miR-223-3p 降低了 FBXW7 蛋白表达水平;而下调 miR-223-3p 表达增加 FBXW7 蛋白的表达水平,以上实验进一步证明了 miR-223-3p 可调控 FBXW7 的变化,如图 3.3 所示。

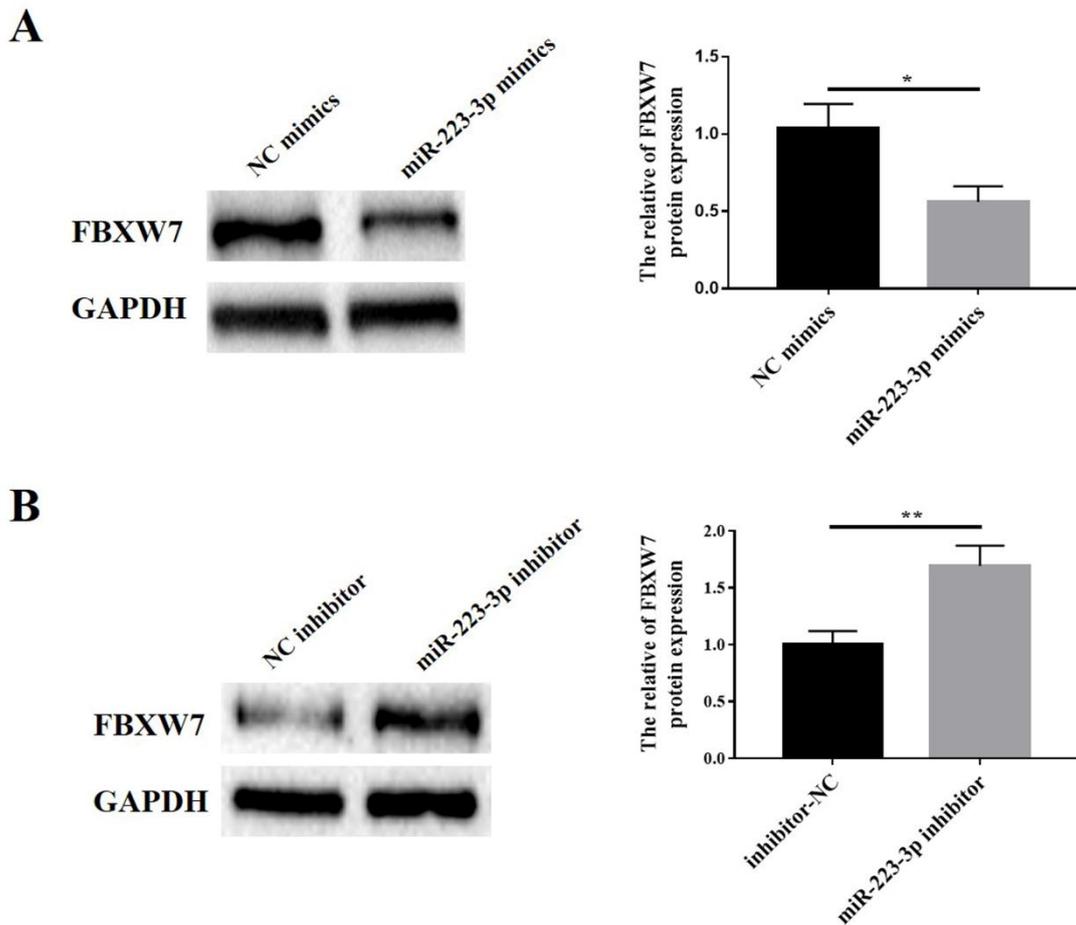


图 3.3 改变 miR-223-3p 观察 EOL-1 细胞中靶基因 FBXW7 的表达。(A) western blot 检测应用 miR-223-3p mimics 后细胞中 FBXW7 的表达；(B) western blot 检测应用 miR-223-3p inhibitor 后细胞中 FBXW7 的表达 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )。

### 3.4.4 FBXW7 在 AR 患者和 AR 小鼠中的表达情况

之前实验已经证实 miR-223-3p 在 AR 中上调，但是 FBXW7 在 AR 中的表达情况未知，因此我们利用 RT-qPCR、western blot 检测 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中 FBXW7 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果发现 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中 FBXW7 的蛋白和 mRNA 水平低于对照组（图 3.4 A-B）。接下来进一步用免疫组化实验观察 AR 患者及对照组鼻黏膜中 FBXW7 的表达，结果仍显示 AR 组鼻黏膜中 FBXW7 的表达更低，见图 3.4 C。

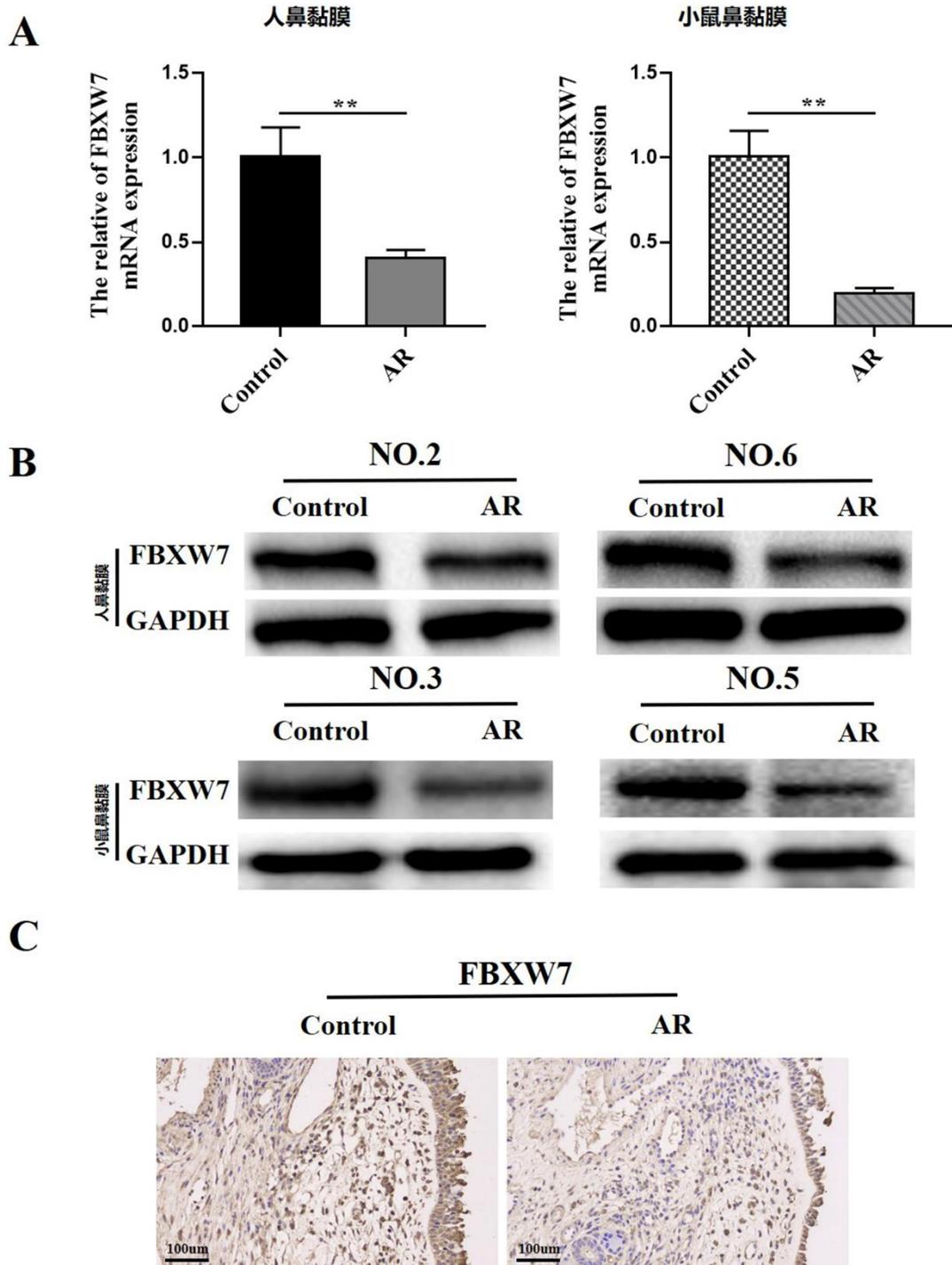


图 3.4 FBXW7 在 AR 患者和 AR 小鼠中的表达情况。(A) RT-qPCR 检测 AR 患者和小鼠鼻黏膜中 FBXW7 的水平；(B) western blot 检测 AR 患者和小鼠鼻黏膜中 FBXW7 的表达；(C) 免疫组化检测 AR 患者和正常粘膜组织中 FBXW7 的表达 (\*\* $P < 0.01$ )。

### 3.5 讨论

本研究的前两部分已证实 miR-223-3p 在 AR 鼻黏膜组织中表达升高,上调 miR-223-3p 的表达可通过促进 EOS 脱颗粒进而影响 AR 炎症。因此,本章我们将进一步探讨 miR-223-3p 在 AR 中发挥作用的具体机制。首先通过各数据库预测到 FBXW7 可能是 miR-223-3p 的靶基因,然后利用 targetscan 数据库预测到 miR-223-3p 与 FBXW7 基因之间存在结合位点,随后双荧光素酶报告实验结果发现,过表达 miR-223-3p 能够显著下调 FBXW7 野生型 3'UTR 的荧光素酶活性,而突变型 3'UTR 的荧光素酶活性无显著差异,证实了 miR-223-3p 与 FBXW7 3'UTR 的靶向结合。然后在细胞中进一步验证两者的关系,结果发现,miR-223-3p mimics 降低了 EOL-1 细胞中 FBXW7 的表达水平,而抑制 miR-223-3p 则增加了 FBXW7 在细胞中的表达。以上实验结果证明了 FBXW7 为 miR-223-3p 的靶基因。

目前,大量文献报道了 FBXW7 在癌症方面的作用,但是近来的研究表明 FBXW7 在炎症中也发挥调节作用。因此接下来我们进一步检测了 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜中 FBXW7 的表达情况,结果发现 FBXW7 在 AR 患者和小鼠鼻黏膜组织中的表达均降低。根据以上实验结果,我们证明了 miR-223-3p 可以调控 FBXW7 的表达水平,且 FBXW7 在 AR 鼻黏膜中降低。但 FBXW7 在 AR 中的作用目前仍然未知。

### 3.6 结论

- (1) miR-223-3p 可以通过靶向 FBXW7 3'UTR 调控 FBXW7 基因表达。
- (2) FBXW7 在 AR 鼻黏膜中低表达。

## 第4章 miR-223-3p 通过调控 FBXW7 基因介导变应性鼻炎嗜酸性粒细胞脱颗粒功能

### 4.1 引言

FBXW7 是 E3 泛素连接酶复合物的一个亚基,能够靶向多种蛋白进行降解。FBXW7 已被证实是一种关键的肿瘤抑制因子,在肿瘤方面的研究较为广泛。但近年来的研究显示,FBXW7 也在免疫调节和炎症反应中发挥一定作用。众所周知,NF- $\kappa$ B 信号通路是参与炎症的最重要通路之一,FBXW7 已被证明与 NF- $\kappa$ B 信号传导和炎症有关。Meng 等人<sup>[39]</sup>的研究显示,FBXW7 可通过泛素介导降低 I $\kappa$ B $\alpha$  表达,导致肠上皮细胞中 NF- $\kappa$ B-p65 活化和肠道炎症。相比之下,Balamurugan 等<sup>[37]</sup>的报告显示,FBXW7 通过靶向 Toll 样受体 4 (TLR4) 抑制巨噬细胞炎症,揭示了 FBXW7 在炎症信号通路中的关键作用。

前两章节实验中,我们首先得出了 miR-223-3p 在 AR 鼻黏膜组织中高表达,然后证明了 miR-223-3p 能够促进嗜酸性粒细胞脱颗粒并加重 AR 炎症。而在上一章节中,我们已经证实 FBXW7 为 miR-223-3p 的靶基因,且 FBXW7 在 AR 鼻黏膜组织中低表达,但 FBXW7 在 AR 中的作用仍不清楚。因此,本章我们将进一步探讨 miR-223-3p 是否可以通过调控 FBXW7 的表达影响嗜酸性粒细胞的脱颗粒作用,进而影响 AR 炎症。我们先通过慢病毒转染稳定过表达 EOL-1 细胞中 FBXW7 的表达,观察其对 OVA 刺激的细胞表达 MBP 的影响,然后我们进一步在加入 miR-223-3p mimics 的细胞中过表达 FBXW7,观察 FBXW7 是否可以逆转 miR-223 上调对 EOL-1 细胞活化的作用。同时我们也将对小鼠施用腺相关病毒介导的 sh-FBXW7 使该基因下调,在动物模型中探讨 FBXW7 对 AR 炎症的影响;同时利用 miR-223-3p antagomir 下调 miR-223-3p 后观察 FBXW7 是否能逆转 miR-223-3p 对小鼠 AR 模型炎症的影响。

## 4.2 实验材料

### 4.2.1 实验主要仪器

实验所需仪器同第 2 章和第 3 章。

### 4.2.2 实验主要试剂

实验所需仪器同第 2 章和第 3 章。

### 4.2.3 主要试剂的配制

主要试剂的具体配制参照第 2 章和第 3 章。

### 4.2.4 实验动物和实验细胞株

实验所需细胞和动物参照前面章节。

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 细胞培养

细胞培养的步骤具体见 2.3.1。

### 4.3.2 OE-FBXW7 慢病毒转染细胞

(1) 该实验过程中用于稳转细胞的 FBXW7 过表达慢病毒 (OE-FBXW7) 由上海汉恒公司构建。

(2) 取生长状态良好的 EOL-1 细胞, 将其接种于六孔板中, 每孔约  $2 \times 10^5$  个细胞。

(3) 根据预实验结果, EOL-1 细胞的 MOI 值为 30, 根据病毒量计算公式算出实验组孔和对照病毒孔转染时应加的病毒量。转染时每孔内含 1ml 的液体, 包含慢病毒和细胞悬液。将完成转染操作的细胞置入培养箱中培养 12-24h, 中途

需注意观察细胞的状态，若状态较差应及时换液。

(4) 待更换新鲜培养基后，将细胞继续移入 5% CO<sub>2</sub>，37℃ 细胞培养箱中培养 72h，于荧光显微镜下观察荧光表达情况和转染效果，之后正常换液、传代处理，待细胞状态佳，荧光强度较强时，选择用 2μg/ml 的嘌呤霉素进行筛选，直至细胞荧光在 90% 以上。

(5) 给予细胞传统换液和传代处理，使得细胞扩增，提取对照组和实验组的细胞总 RNA 和总蛋白，分析目的基因的过表达效果。

### 4.3.3 RT-qPCR 实验

#### 4.3.3.1 细胞和组织总 RNA 的提取

具体实验步骤见第 1 章 1.3.2 和第 2 章 2.3.6。

#### 4.3.3.2 RNA 逆转录合成 cDNA

具体实验步骤见第 1 章 1.3.3。

#### 4.3.3.3 实时荧光定量 PCR

具体实验步骤见第 1 章 1.3.4。

### 4.3.4 蛋白免疫印迹反应

#### 4.3.4.1 提取细胞和组织总蛋白

具体实验步骤见第 3 章 3.3.7.1 和 3.3.7.2。

#### 4.3.4.2 BCA 法测定蛋白样品浓度

具体实验步骤见第 3 章 3.3.7.3。

#### 4.3.4.3 SDS-PAGE 凝胶电泳

具体实验步骤见第 3 章 3.3.7.4。

#### 4.3.4.4 转膜

具体实验步骤见第 3 章 3.3.7.5。

#### 4.3.4.5 封闭

具体实验步骤见第 3 章 3.3.7.6。

#### 4.3.4.6 抗体孵育

具体实验步骤见第 3 章 3.3.7.7。

#### 4.3.4.7 蛋白检测

具体实验步骤见第 3 章 3.3.7.8。

### 4.3.5 细胞免疫荧光

具体实验步骤见第 2 章 2.3.3。

### 4.3.6 建立小鼠变应性鼻炎模型及干预 miR-223-3p 和 FBXW7

(1) sh-NC、sh-FBXW7-1、sh-FBXW7-2、sh-FBXW7-3 质粒均由上海汉恒生物科技有限公司合成并制备成腺病毒。将所有合成好的腺相关病毒置于-80℃冰箱保存，避免反复冻融。在构建小鼠变应性鼻炎模型之前，先将腺相关病毒介导的 shFBXW7 应用于动物，筛选干扰效果最佳的 shFBXW7。

(2) 实验动物分组：将小鼠随机分为变应性鼻炎未干预组（AR 组）、变应性鼻炎 miR-223 下调组（miR-223-3p antagomir 组）、变应性鼻炎 FBXW7 下调组（AAV-sh-FBXW7 组）和变应性鼻炎 miR-223-3p antagomir+ AAV-sh-FBXW7 组，每组均含小鼠 8 只。

(3) 造模过程：小鼠变应性鼻炎的构建过程见第三章 3.3.6。

(4) 药物干预：对 miR-223-3p antagomir 组和 miR-223-3p antagomir+ AAV-sh-FBXW7 组的小鼠，变应性鼻炎制备的第 19，20，22，24，26 天在麻醉状态下经鼻腔滴入 20μl miR-223-3p antagomir；另外对 miR-223-3p antagomir+ AAV-sh-FBXW7 组的小鼠，在小鼠变应性鼻炎构建前 1 个月，先将干扰效果最佳的 AAV-sh-FBXW7 局部滴鼻 100μl，由于剂量较大，需分次滴入。

### 4.3.7 HE 染色

具体实验步骤见第 2 章 2.3.9。

### 4.3.8 组织免疫荧光

具体实验步骤见第 2 章 2.3.10。

### 4.3.9 ELISA 实验

具体实验步骤见第 2 章 2.3.13。

### 4.3.10 统计学分析

所有实验至少进行三次以上，并且以平均值±标准差表示。使用 SPSS26.0 及 Prism 7.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料采用 T 检验进行两两比较，多组均数之间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$  为统计学意义。

## 4.4 实验结果

### 4.4.1 FBXW7 过表达慢病毒感染细胞后验证 FBXW7 表达

将构建好的 FBXW7 过表达慢病毒和对照病毒感染 EOL-1 细胞，在经嘌呤霉素筛选后提取细胞总 RNA 和总蛋白，然后用 RT-qPCR 和 western blot 从 mRNA 和蛋白层面检测慢病毒的转染效果，实验结果如图 4.1 所示，与对照病毒相比较，过表达病毒组细胞的 FBXW7 mRNA 和蛋白水平相对更高。

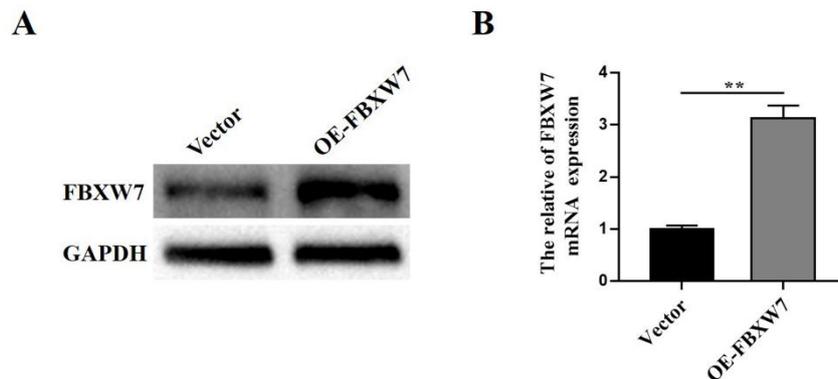


图 4.1 FBXW7 过表达慢病毒感染细胞后验证 FBXW7 表达。Western blot (A) 和 RT-qPCR (B) 检测 FBXW7 过表达慢病毒转染组中 FBXW7 的表达情况 (\*\* $P < 0.01$ )。

#### 4.4.2 过表达 miR-223-3p 同时上调 FBXW7 后观察细胞 MBP 变化

前期实验已得出 EOL-1 细胞在 OVA 和 CCL11 刺激后, miR-223-3p 出现上调,而在前一章节中我们也证实 FBXW7 是 miR-223-3p 的靶基因,并且上调 miR-223-3p 后 FBXW7 表达下调,与之相反的是,下调 miR-223-3p 后 FBXW7 表达上调。因此,我们进一步假设 miR-223-3p 通过调控 FBXW7 的表达来调控嗜酸性粒细胞脱颗粒。为了证实这一猜想,我们首先在过表达 miR-223-3p 的 EOL-1 细胞中进一步上调 FBXW7 的水平,再应用 OVA 和 CCL11 进行刺激,采用 western blot 检测 FBXW7 的表达情况;再用细胞免疫荧光观察 MBP 蛋白的表达情况。结果表明在过表达 miR-223-3p 的 EOL-1 细胞中,FBXW7 表达水平下调,细胞炎症水平上调;进一步上调 FBXW7,miR-223-3p 的表达水平依然上调,而 FBXW7 的表达水平恢复,且细胞的炎症水平下降(见图 4.2)。

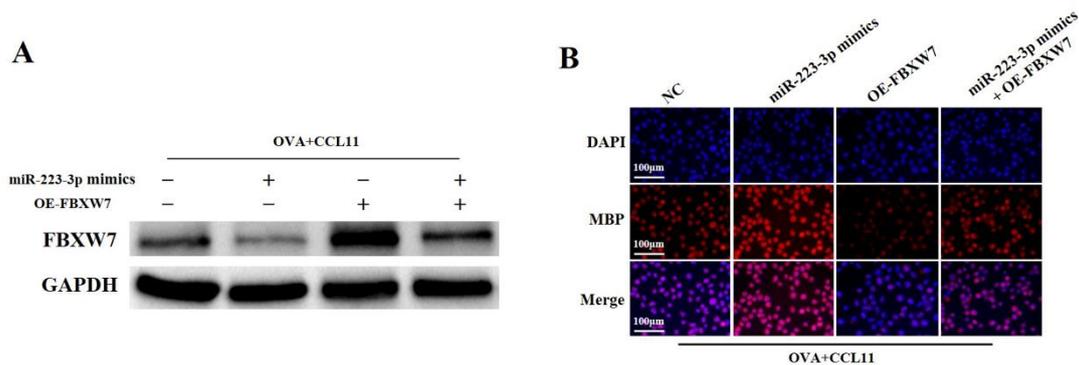


图 4.2 过表达 EOL-1 细胞中 miR-223-3p 的同时上调 FBXW7, 观察 FBXW7 和 MBP 的变化。(A) western blot 检测 EOL-1 细胞内 FBXW7 的表达; (B) 免疫荧光检测细胞内 MBP 的荧光表达情况。

#### 4.4.3 腺相关病毒介导的 shRNA 下调 FBXW7 表达效果的筛选

将合成的 3 个 sh-FBXW7 腺相关病毒和 sh-NC 对照病毒经鼻腔滴入,完成病毒滴入一个月后,收集小鼠鼻黏膜标本,应用 RT-qPCR 和 western blot 检测 FBXW7 在体内的表达情况。实验结果如图 4.3 所示,sh-FBXW7-2 腺相关病毒降低 FBXW7 mRNA 和蛋白水平的效果最佳,因此将腺相关病毒介导的 sh-FBXW7-2 应用于后续实验。

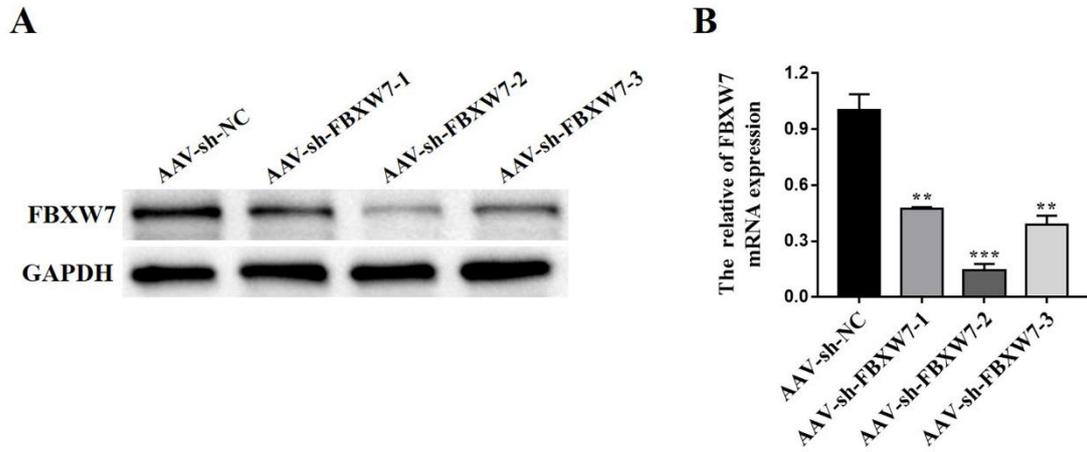


图 4.3 腺相关病毒介导的 shRNA 筛选。Western blot (A) 和 RT-qPCR (B) 检测 FBXW7 干扰腺相关病毒转染组中 FBXW7 的表达情况 (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

#### 4.4.4 下调 miR-223-3p 同时沉默 FBXW7 后观察 AR 小鼠炎症情况

##### 4.4.4.1 Western blot 检测各组实验小鼠中 FBXW7 的表达水平

在应用干扰病毒的基础上，采用 OVA 和氢氧化铝构建小鼠 AR 模型，同时加入 miR-223-3p antagomir 抑制 miR-223-3p 的表达，造模结束后采用 western blot 检测各小鼠鼻黏膜中 FBXW7 的表达情况。结果显示，下调 miR-223-3p 表达后，小鼠鼻黏膜中 FBXW7 表达水平上调；而在病毒干扰 FBXW7，且同时下调 miR-223-3p 的情况下，逆转了鼻黏膜组织中 FBXW7 蛋白的表达水平，见图 4.4。

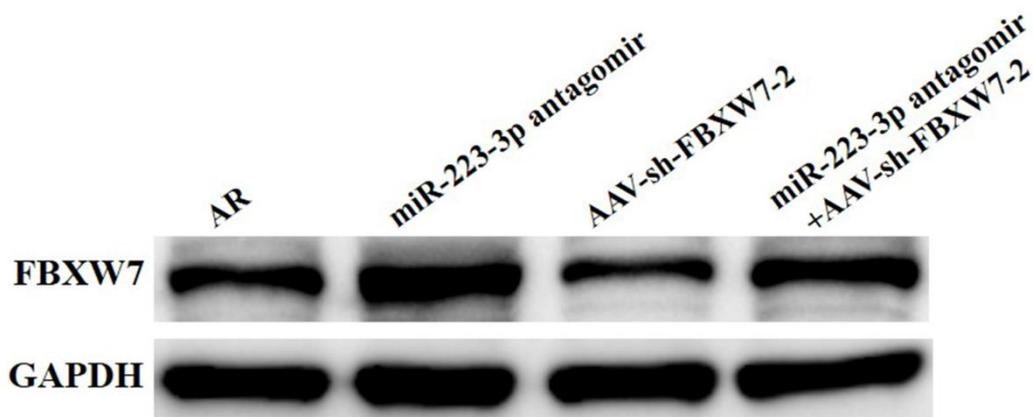


图 4.4 下调 miR-223-3p 的同时沉默 FBXW7 表达，Western blot 检测各组实验小鼠中 FBXW7 的表达水平。

#### 4.4.4.2 HE 染色观察小鼠鼻黏膜的组织病理形态

接下来我们应用 HE 染色观察鼻黏膜的组织病理形态，实验结果如图 4.5 所示。相较于 AR 组，AAV-sh-FBXW7-2 组小鼠鼻黏膜上皮肿胀和纤毛破损、脱落明显，其间可见大量嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润；而在干扰 FBXW7 的情况下，同时采用 miR-223-3p antagomir 抑制 miR-223-3p 的体内水平后，FBXW7 的水平得到恢复，观察其鼻黏膜组织未见明显水肿，其间少许嗜酸性粒细胞浸润，炎症趋向恢复状态，提示下调 FBXW7 可促进小鼠 AR 炎症，而 miR-223-3p antagomir 对 FBXW7 的提升使得炎症减轻。

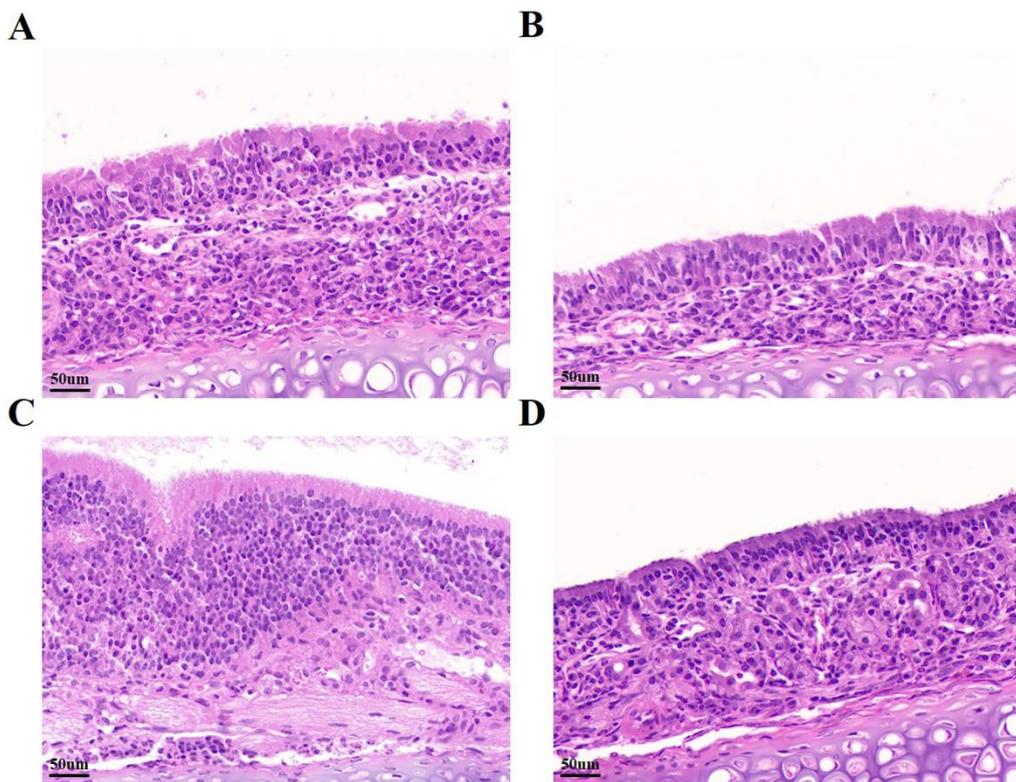


图 4.5 HE 染色观察小鼠鼻黏膜的组织病理形态。(A) AR 组；(B) miR-223-3p antagomir 组；(C) AAV-sh-FBXW7-2 组；(D) miR-223-3p antagomir + AAV-sh-FBXW7-2 组。

#### 4.4.4.3 组织免疫荧光染色

随后使用免疫荧光标记鼻黏膜中 MBP 来分析鼻黏膜中嗜酸性粒细胞的浸润情况，结果如图 4.6 所示。干扰 FBXW7 增强了 MBP 荧光表达量的表达，而同时下调 miR-223-3p 后又恢复了 MBP 的荧光表达。

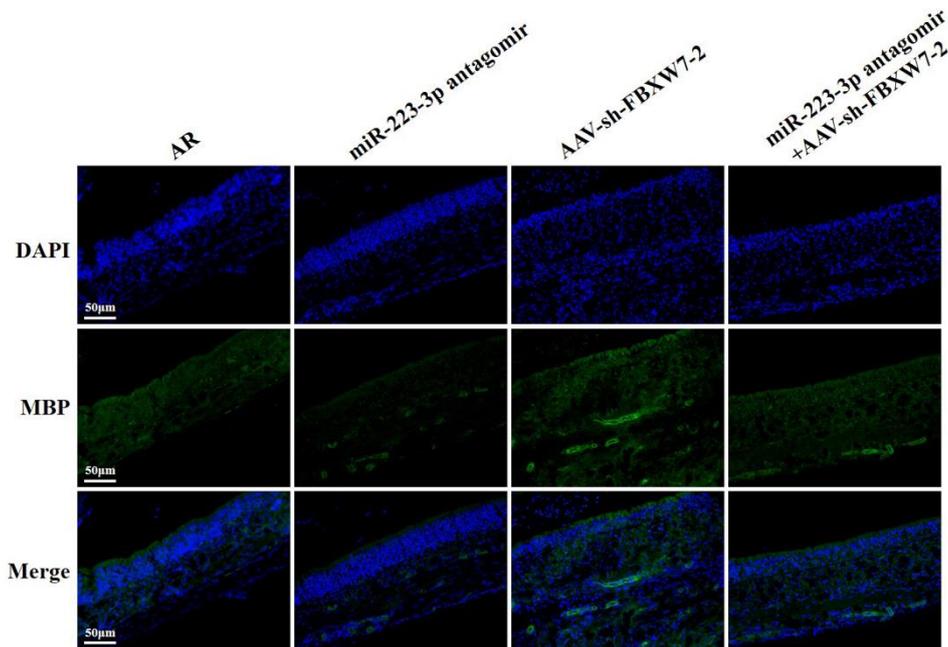


图 4.6 鼻黏膜组织免疫荧光染色

#### 4.4.4.4 RT-qPCR 和 ELISA 检测鼻黏膜或血清中 ECP 和 EPO 水平

最后通过 RT-qPCR 和 ELISA 检测血清中 ECP、EPO 的浓度及鼻黏膜中 ECP、EPOmRNA 的水平。结果显示，FBXW7 低表达后，增加了鼻黏膜中 ECP、EPOmRNA 水平和血清中 ECP、EPO 分泌；进一步下调 miR-223-3p 后，组织中 ECP、EPOmRNA 水平降低（图 4.7 A-B），同时 ELISA 显示血清中 ECP、EPO 分泌量也减少（图 4.7 C-D）。以上结果表明，沉默 FBXW7 促进了嗜酸性粒细胞颗粒蛋白的分泌，而下调 miR-223-3p 后能够减少 FBXW7 降低所导致的颗粒蛋白增加，进而减轻 AR 炎症。

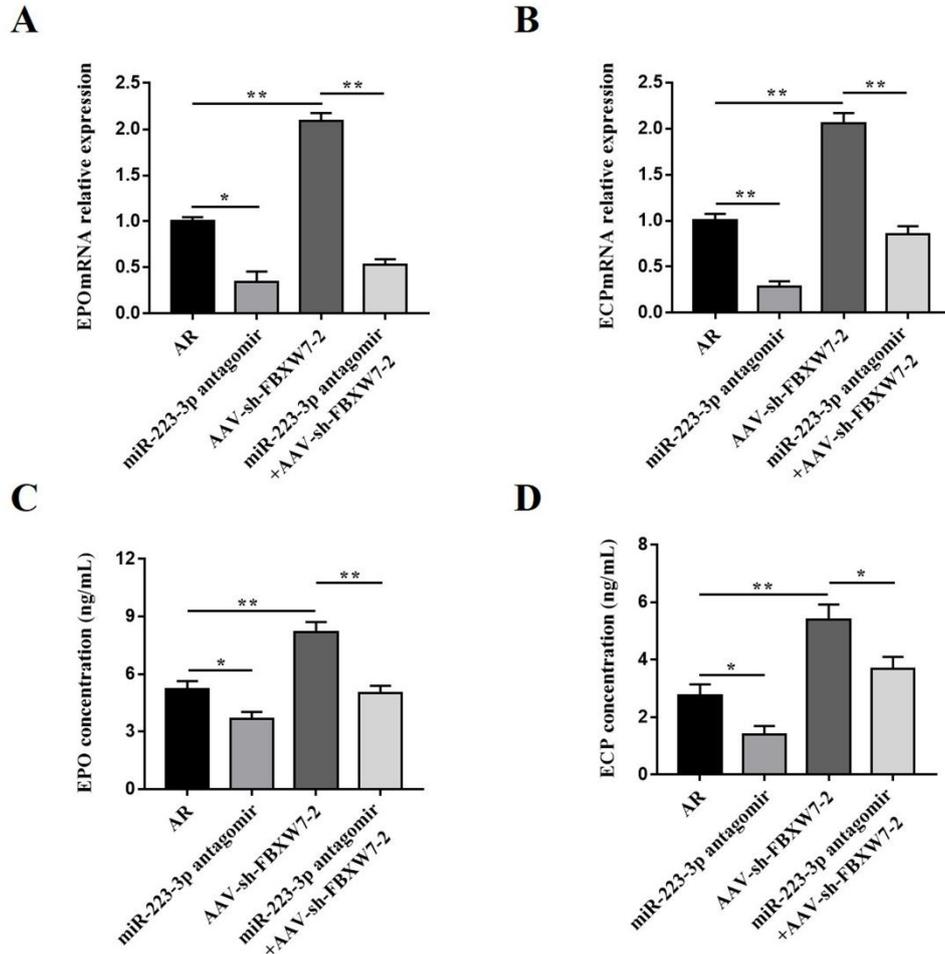


图 4.7 RT-qPCR 和 ELISA 检测鼻黏膜或血清中 ECP 和 EPO 水平。(A-B) RT-qPCR 检测小鼠鼻黏膜中 ECP、EPOmRNA 的表达水平；(C-D) ELISA 检测小鼠血清中 EPO、ECP 蛋白的分泌量 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )。

## 4.5 讨论

FBXW7 是 F-box 蛋白家族的成员，作为 E3 SCF 型泛素连接酶复合物的底物识别组分起作用。现有的研究表明，F-box 蛋白参与调节炎症，如 F-box 蛋白 FBXL19 选择性调节 ST2 的泛素化和降解，以限制 IL-33 诱导的肺部炎症<sup>[74]</sup>；FBXO15 可选择性调节心磷脂合酶 1 的泛素化和降解，导致急性肺炎中心磷脂降低和线粒体功能受损<sup>[75]</sup>。多种蛋白质被认为是 FBXW7 E3 泛素连接酶的靶标，如 Notch、TGIF、KLF5、c-MYC、Cyclin E 和 c-JUN<sup>[33]</sup>，其中 Notch 和 KLF5 分

别在肺上皮和气道上皮的分化过程中具有调节作用，而 Li 等人<sup>[76]</sup>的研究中进一步证实 FBXW7 可通过改变 Notch 和 KLF5 表达水平影响包括纤毛细胞和杯状细胞在内的气道上皮细胞类型的比例，这些气道细胞类型的不平衡是许多疾病的基础，如哮喘和慢性阻塞性肺病，提示了 FBXW7 在气道疾病中的重要调节作用。Suehiro 等人的研究已证实 SRY 相关高迁移率族盒蛋白 12 (Sox12) 通过增强 FBXW7 介导的 GATA3 降解来抑制 Th2 细胞分化，并减轻 HDM 诱导的过敏性哮喘炎症<sup>[38]</sup>。Song 等人也发现 FBXW7 通过 p38 途径促进泛素化介导的凋亡信号调节激酶 1 (ASK1) 降解，进而降低脂多糖 LPS 诱导的支气管上皮细胞通透性和炎症细胞因子释放，表明 FBXW7 在体外 LPS 诱导的支气管上皮细胞上皮屏障损伤中起保护作用<sup>[77]</sup>。以上研究表明 FBXW7 在气道炎症中也具有调节作用，但 FBXW7 在 AR 中的作用仍未知。前期实验我们证明了 miR-223-3p 能够促进嗜酸性粒细胞脱颗粒并加重 AR 炎症，而在上一章节中我们已证实 FBXW7 为 miR-223-3p 的靶基因，且 FBXW7 在 AR 鼻黏膜组织中低表达，因此我们提出 miR-223-3p 通过调控 FBXW7 表达来影响 EOS 的脱颗粒功能进而影响 AR 炎症这一假设，并进行验证。

为验证这一猜想，我们首先在应用 OVA 与 CCL11 刺激正常 EOL-1 细胞和过表达 miR-223-3p 的 EOL-1 细胞，结果发现在过表达 miR-223-3p 的 EOL-1 细胞中 FBXW7 表达水平降低，细胞中 MBP 表达上调；进一步上调 FBXW7，FBXW7 的表达水平恢复，且细胞中 MBP 水平下降。接下来我们进一步在动物实验中进行验证，我们首先在应用干扰病毒的基础上，采用 OVA 和氢氧化铝构建小鼠 AR 模型，同时加入 miR-223-3p antagomir 抑制 miR-223-3p 的表达。结果发现，沉默 FBXW7 后增加了小鼠鼻黏膜中 ECP、EPO mRNA 和 MBP 表达水平，同时血清中 ECP 和 EPO 的分泌也增加；进一步下调 miR-223-3p 的表达，可以抑制因 FBXW7 沉默所导致的炎症水平升高。综上所述，miR-223-3p 可通过调控 FBXW7 表达来影响 EOS 的脱颗粒功能进而影响 AR 炎症。

## 4.6 结论

MiR-223-3p 通过调控 FBXW7 表达促进 EOS 的脱颗粒功能，进而加重 AR 炎症。

## 总 结

本文主要就 miR-223-3p 在 AR 中的作用及其对嗜酸性粒细胞的脱颗粒功能影响机制展开研究。

### 主要结论

(1) miR-223-3p 在 AR 患者和 AR 小鼠鼻黏膜组织中表达升高, 且主要在胞质中表达。

(2) miR-223-3p 通过促进 EOS 脱颗粒进而加重 AR 炎症反应。

(3) miR-223-3p 可以通过靶向 FBXW7 3'UTR 调控 FBXW7 基因表达, 且 FBXW7 在 AR 鼻黏膜中低表达。

(4) miR-223-3p 通过调控 FBXW7 表达促进 EOS 的脱颗粒功能进而加重 AR 炎症。

### 不足之处

(1) 细胞实验中只对 FBXW7 进行了过表达, 未进行沉默。

(2) 细胞实验中采用 EOL-1 细胞来研究 EOS 的功能, 未进行人原代嗜酸性粒细胞研究验证。

(3) 动物实验中只对 FBXW7 进行了沉默, 未进行过表达。

### 研究展望

(1) 磁珠分选外周血人原代嗜酸性粒细胞, 并在体外、体内实验中分别对 FBXW7 沉默与过表达, 进一步完善 miR-223-3p 和 FBXW7 表达对 EOS 脱颗粒作用的研究。

## 致谢

岁月辗转成歌，时光流逝如花！窗外的春雨淅淅沥沥，湖边的柳枝抽出了新芽，南昌的天气也没有了以往的凄冷，日子一天天变得温暖起来，一切似乎都在提醒着我南大医学院的硕博求学生涯已步入尾声。回首过去，往事像一个个跳动的音符在我脑海中激荡徘徊，六年前的入学之景仿如昨日。一路走来，跌跌撞撞，曲曲折折，有过悲伤，有过喜悦，有过图书馆里论文写作时的专心致志，有过临床上患者接诊时的争分夺秒，有过实验室中课题实施时的废寝忘食，有过操场上压力释放时的酣畅淋漓。如今，这一切都化作满满的收获和成长，成为我一生中不可多得的财富。而这些成长与进步都离不开那些在这段时光岁月出现的人们，感谢你们曾经给予的指引、鼓励和帮助，给你们道以最真挚的谢意。

首先，我要衷心地感谢我的恩师刘月辉教授。博士三年，您无论是在学术研究还是在临床实践，亦或是在为人处世上都给予学生诸多耐心指导和悉心关爱。作为耳鼻喉科的“带头人”，您以渊博的学识、高尚的医德、严谨的作风和精湛的临床技术为我们树立了师者榜样和医务人员该有的医德、医风及医术。科研上，您苦心孤诣、深稽博考、求真务实、以身作则，对我们高标准、高要求，为我们科研态度、科研思维的培养奠定了坚实的基础。每周一的科研交流会上，您都以打破砂锅问到底的精神督促我们鞭辟入里、入木三分学术氛围的形成。临床上，您对医疗技术精益求精，以炉火纯青的临床能力获得患者的高度信赖，以热情周到的服务态度赢得了群众的有口皆碑，每次跟您上手术台都让受益匪浅。课题上，无论是课题方向选定、研究内容梳理，还是实验方案设计都倾注了您的大量心血，正是您的一次次严格把关，学生的课题研究才得以顺利完成。在此，由衷地感谢老师，感谢您一直的培养教育和关怀备至！

其次，我要特别感谢我的硕士导师朱新华教授。六年之前，当我面临考研调剂、内心充满迷茫和焦虑之时，是朱老师的知遇之恩给予我求学的机会，并为我打开了学术探索之门，这一份恩情，值得我一生铭记！朱老师严谨认真、实事求是的科研态度，别具匠心、推陈出新的创新思维，扎实求实、得心应手的技术能力，锲而不舍、笔耕不辍的科研素养，展现了科研人员的学者风范，是我一生学习的榜样。硕士三年，每当我彷徨无助、不知所措时，总有您在身前为我拨云见日、指点迷津；每当我被一次次实验失败打击得垂头丧气、心灰意冷时，总有您在身边为我加油鼓劲、排忧解难；每当我思想有所松懈、心慵意懒时，总有您在身后鞭策策蹇、朝督暮责，正是您的言传身教以及对我的鼓励和督促，我才收获了长足的发展和进步。谨借此机会，向朱老师表达深深的感谢！

真诚地感谢耳鼻喉科刘红兵教授、徐红教授、张少容教授等教授，李俐华老师、谢雯老师、柳佳丽等老师，感谢您们在课题开题、中期检查、实验成果汇报以及每周的科研交流中给予的真知灼见，对我完善课题设计、梳理研究思路、改

## 致谢

进实验方法等方面提供了莫大的指导和帮助；感谢刘建国师兄、廖冰师兄、彭海森师兄等师兄，汪美群师姐、田小燕师姐、王芝师姐等师姐，感谢你们在临床实践中的传帮带扶，正是你们的无私援助，我才能在这么短的时间内了解科室业务，掌握临床技能，实现快速上手；感谢朱亚琼、郭丽青、付衍鹏等同窗，牟欣琪、沈光剑、袁家胜等师弟师妹，感谢你们在平时的学习、生活中对我的关心和鼓励，一路有你们的陪伴，我的学习之路才不会那么孤单落寞。

衷心地感谢二附院分子实验中心的全体老师和同学，是你们为我开启了实验大门，并提供了优质的实验基础平台和学术交流环境，正是在这样平台和环境中，我的各项实验才能有条不紊地如期进行，我实验过程中遇到的种种问题也都能在大家的齐心协力下完美解决，我课题的研究成果离不开你们的鼎力支持。特别要感谢实验室中易轩、黄瑞祯、张庆坤等师弟师妹，你们总是在我最无助的时候伸出援助之手，你们总是在我错过饭点之后为我留下热腾腾的饭菜，你们总是主动留下来陪我一起最后一个实验室走，实验室奋斗三载，遇见你们，我的人生何其幸也！

由衷地感谢我的母校——南昌大学江西医学院，面对严峻的疫情形势，为我们提供了一个优美和谐、秩序井然、学术氛围浓厚的学习生活环境，让我们在这座象牙塔中潜心修学，不断提高和成长。感谢国家自然科学基金对本研究工作的资助，你们提供的物质基础是本项目开展的先决条件。感谢所有本文参考文献中的作者们，是你们的潜精研思，让我对变应性鼻炎领域有了深刻的了解，你们的理论研究成果为我的课题选题与实验设计夯实了基础，并进而促进了论文的成稿，感谢你们对本研究方向所做出的杰出贡献！

特别要感谢我的父母，你们不辞辛劳、勤勤恳恳地哺育我成长，给予我受教育的机会，从本科到硕士再到博士，你们一直都毫无保留地对我付出关爱和鼓励，你们对我所作出的各种选择总是无条件的信任和支持，你们永远是最坚强的后盾、最温暖的港湾，你们的殷切希望为我的人生之路提供了源源不断的动力，我爱你们！感谢与我同甘共苦、相濡以沫的爱人刘江伟先生，异地七载，这段岁月实属不易，然而正是这种艰难方显这份感情的弥足珍贵。感谢你一直以来在生活上对我无微不至的关心照顾，在学习上对我醍醐灌顶般的指导和帮助，漫漫求学路，感谢有你的一路相随相伴！

最后，衷心地感谢百忙之中参加论文评阅和答辩委员会的各位专家、老师，感谢您们提出的宝贵建议！

岁月如歌，人生如潮，愿在潮起潮落的跌宕人生中，一路且歌且行！

伍书红  
2022年05月

## 参考文献

- [1] Greiner A N, Hellings P W, Rotiroti G, et al. Allergic rhinitis[J]. *Lancet*, 2011, 378(9809): 2112-2122.
- [2] Brożek J L, Bousquet J, Agache I, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 140(4): 950-958.
- [3] D'amato G, Chong-Neto H J, Monge Ortega O P, et al. The effects of climate change on respiratory allergy and asthma induced by pollen and mold allergens[J]. *Allergy*, 2020, 75(9): 2219-2228.
- [4] Bao Y, Chen J, Cheng L, et al. Chinese Guideline on allergen immunotherapy for allergic rhinitis[J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2017, 9(11): 4607-4650.
- [5] Maurer M, Zuberbier T. Undertreatment of rhinitis symptoms in Europe: findings from a cross-sectional questionnaire survey[J]. *Allergy*, 2007, 62(9): 1057-1063.
- [6] Van De Veen W, Akdis M. Tolerance mechanisms of allergen immunotherapy[J]. *Allergy*, 2020, 75(5): 1017-1018.
- [7] Lan F, Zhang N, Bachert C, et al. Stability of regulatory T cells in T helper 2-biased allergic airway diseases[J]. *Allergy*, 2020, 75(8): 1918-1926.
- [8] Boonpiyathad T, Sokolowska M, Morita H, et al. Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy[J]. *Allergy*, 2019, 74(5): 976-985.
- [9] Golebski K, Layhadi J A, Sahiner U, et al. Induction of IL-10-producing type 2 innate lymphoid cells by allergen immunotherapy is associated with clinical response[J]. *Immunity*, 2021, 54(2): 291-307.e297.
- [10] Muniz V S, Baptista-Dos-Reis R, Neves J S. Functional extracellular eosinophil granules: a bomb caught in a trap[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2013, 162(4): 276-282.
- [11] Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 570.
- [12] Acharya K R, Ackerman S J. Eosinophil granule proteins: form and function[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(25): 17406-17415.
- [13] Kita H, Bochner B S. *Biology of Eosinophils*[M]. *Biology of Eosinophils*, 2013.
- [14] Denburg J A, Keith P K. Eosinophil progenitors in airway diseases: clinical implications[J]. *Chest*, 2008, 134(5): 1037-1043.
- [15] Foster P S, Rosenberg H F, Asquith K L, et al. Targeting eosinophils in asthma[J]. *Current Molecular Medicine*, 2008, 8(6): 585-590.
- [16] Spencer L A, Bonjour K, Melo R C, et al. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines[J].

- Frontiers in Immunology, 2014, 5: 496.
- [17] Ambros V, Bartel B, Bartel D P, et al. A uniform system for microRNA annotation[J]. RNA, 2003, 9(3): 277-279.
- [18] Morey C, Avner P. Employment opportunities for non-coding RNAs[J]. FEBS Letters, 2004, 567(1): 27-34.
- [19] O'connell R M, Taganov K D, Boldin M P, et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(5): 1604-1609.
- [20] Cobb B S, Hertweck A, Smith J, et al. A role for Dicer in immune regulation[J]. Journal of Experimental Medicine, 2006, 203(11): 2519-2527.
- [21] Chen R F, Huang H C, Ou C Y, et al. MicroRNA-21 expression in neonatal blood associated with antenatal immunoglobulin E production and development of allergic rhinitis[J]. Clinical and Experimental Allergy, 2010, 40(10): 1482-1490.
- [22] Shaoqing Y, Ruxin Z, Guojun L, et al. Microarray analysis of differentially expressed microRNAs in allergic rhinitis[J]. Am J Rhinol Allergy, 2011, 25(6): e242-246.
- [23] Suojalehto H, Toskala E, Kilpeläinen M, et al. MicroRNA profiles in nasal mucosa of patients with allergic and nonallergic rhinitis and asthma[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2013, 3(8): 612-620.
- [24] Teng Y, Zhang R, Liu C, et al. miR-143 inhibits interleukin-13-induced inflammatory cytokine and mucus production in nasal epithelial cells from allergic rhinitis patients by targeting IL13Rα1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 457(1): 58-64.
- [25] Zhang Q B, Zhu D, Dai F, et al. MicroRNA-223 Suppresses IL-1β and TNF-α Production in Gouty Inflammation by Targeting the NLRP3 Inflammasome[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 637415.
- [26] Neudecker V, Haneklaus M, Jensen O, et al. Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome[J]. Journal of Experimental Medicine, 2017, 214(6): 1737-1752.
- [27] Gao H, Deng H, Xu H, et al. MicroRNA-223 promotes mast cell apoptosis by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016, 11(6): 2171-2176.
- [28] Wang Q, Zhao D Y, Xu H, et al. Down-regulation of microRNA-223 promotes degranulation via the PI3K/Akt pathway by targeting IGF-1R in mast cells[J]. PloS One, 2015, 10(4): e0123575.
- [29] Gomez J L, Chen A, Diaz M P, et al. A Network of Sputum MicroRNAs Is Associated with Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2020, 202(1): 51-64.
- [30] Neudecker V, Brodsky K S, Clambey E T, et al. Neutrophil transfer of miR-223 to lung epithelial cells dampens acute lung injury in mice[J]. Science Translational Medicine, 2017, 9(408).

- [31] Lu T X, Lim E J, Besse J A, et al. MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation[J]. *Journal of Immunology*, 2013, 190(4): 1576-1582.
- [32] Wang L, Ye X, Liu Y, et al. Aberrant regulation of FBW7 in cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(8): 2000-2015.
- [33] Welcker M, Clurman B E. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation[J]. *Nature Reviews: Cancer*, 2008, 8(2): 83-93.
- [34] Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, et al. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(1): 342-354.
- [35] Zhang C, Chen F, Feng L, et al. FBXW7 suppresses HMGB1-mediated innate immune signaling to attenuate hepatic inflammation and insulin resistance in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Molecular Medicine*, 2019, 25(1): 29.
- [36] Zhao J, Xiong X, Li Y, et al. Hepatic F-Box Protein FBXW7 Maintains Glucose Homeostasis Through Degradation of Fetuin-A[J]. *Diabetes*, 2018, 67(5): 818-830.
- [37] Balamurugan K, Sharan S, Klarmann K D, et al. FBXW7 $\alpha$  attenuates inflammatory signalling by downregulating C/EBP $\delta$  and its target gene Tlr4[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1662.
- [38] Suehiro K I, Suto A, Suga K, et al. Sox12 enhances Fbw7-mediated ubiquitination and degradation of GATA3 in Th2 cells[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021, 18(7): 1729-1738.
- [39] Meng Q, Wu W, Pei T, et al. miRNA-129/FBW7/NF- $\kappa$ B, a Novel Regulatory Pathway in Inflammatory Bowel Disease[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 731-740.
- [40] Li H, Liang Y, Lai X, et al. Genetic Deletion of Fbw7 in the mouse intestinal epithelium aggravated dextran sodium sulfate-induced colitis by modulating the inflammatory response of NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 498(4): 869-876.
- [41] He J, Song Y, Li G, et al. Fbxw7 increases CCL2/7 in CX3CR1hi macrophages to promote intestinal inflammation[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(9): 3877-3893.
- [42] Xu J, Xiao X, Yang D. In Vitro Methods for Analyzing miRNA Roles in Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Metastasis[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1733: 159-171.
- [43] Lim L P, Glasner M E, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes[J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1540.
- [44] Jiao P, Wang X P, Luoreng Z M, et al. miR-223: An Effective Regulator of Immune Cell Differentiation and Inflammation[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(9): 2308-2322.
- [45] Zhang D, Lee H, Wang X, et al. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation[J]. *Thorax*, 2019, 74(9): 865-874.
- [46] Ogando J, Tard águila M, D áz-Alderete A, et al. Notch-regulated miR-223 targets the aryl hydrocarbon receptor pathway and increases cytokine production in macrophages from rheumatoid arthritis patients[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20223.

- [47] Yang Z, Lin S D, Zhan F, et al. LncRNA GAS5 alleviates rheumatoid arthritis through regulating miR-222-3p/Sirt1 signalling axis[J]. *Autoimmunity*, 2021, 54(1): 13-22.
- [48] Li Y, Zhou D, Ren Y, et al. Mir223 restrains autophagy and promotes CNS inflammation by targeting ATG16L1[J]. *Autophagy*, 2019, 15(3): 478-492.
- [49] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断和治疗指南(2015年,天津)[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016(1): 19.
- [50] Zhang Y, Yang Y, Guo J, et al. miR-146a enhances regulatory T-cell differentiation and function in allergic rhinitis by targeting STAT5b[J]. *Allergy*, 2022, 77(2): 550-558.
- [51] Tang H, Jiang H, Zheng J, et al. MicroRNA-106b regulates pro-allergic properties of dendritic cells and Th2 polarisation by targeting early growth response-2 in vitro[J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28(2): 866-874.
- [52] Xu W, Wang Y, Ma Y, et al. MiR-223 plays a protecting role in neutrophilic asthmatic mice through the inhibition of NLRP3 inflammasome[J]. *Respiratory Research*, 2020, 21(1): 116.
- [53] Taha M, Shaker O G, Abdelsalam E, et al. Serum a proliferation-inducing ligand and MicroRNA-223 are associated with rheumatoid arthritis: diagnostic and prognostic implications[J]. *Molecular Medicine*, 2020, 26(1): 92.
- [54] Dunaeva M, Blom J, Thurlings R, et al. Circulating serum miR-223-3p and miR-16-5p as possible biomarkers of early rheumatoid arthritis[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2018, 193(3): 376-385.
- [55] Lu M C, Yu C L, Chen H C, et al. Increased miR-223 expression in T cells from patients with rheumatoid arthritis leads to decreased insulin-like growth factor-1-mediated interleukin-10 production[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014, 177(3): 641-651.
- [56] Huang Y, Lu D, Ma W, et al. miR-223 in exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells ameliorates rheumatoid arthritis via downregulation of NLRP3 expression in macrophages[J]. *Molecular Immunology*, 2022, 143: 68-76.
- [57] Ruan G, Wen X, Yuan Z. Correlation between miR-223 and IL-35 and their regulatory effect in children with allergic rhinitis[J]. *Clinical Immunology*, 2020, 214: 108383.
- [58] Murayama N, Murayama K. Nasal Discharge Eosinophils in Childhood Asthma Patients as a Predictive Factor for Persistent Asthma[J]. *Mediators of Inflammation*, 2018, 2018: 2563978.
- [59] Chen Y, Yang M, Deng J, et al. Elevated Levels of Activated and Pathogenic Eosinophils Characterize Moderate-Severe House Dust Mite Allergic Rhinitis[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 8085615.
- [60] Neves J S, Weller P F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2009, 21(6): 694-699.
- [61] Shamri R, Young K M, Weller P F. PI3K, ERK, p38 MAPK and integrins regulate CCR3-mediated secretion of mouse and human eosinophil-associated RNases[J]. *Allergy*, 2013, 68(7): 880-889.
- [62] Li C, Xu M M, Wang K, et al. Macrophage polarization and meta-inflammation[J].

- Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2018, 191: 29-44.
- [63] Liu G, Abraham E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2013, 33(2): 170-177.
- [64] Chen L, Hou X, Zhang M, et al. MicroRNA-223-3p modulates dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune myocarditis by targeting the NLRP3 inflammasome[J]. *Molecular Immunology*, 2020, 117: 73-83.
- [65] Tang H C, Lai Y Y, Zheng J, et al. miR-223-3p Inhibits Antigen Endocytosis and Presentation and Promotes the Tolerogenic Potential of Dendritic Cells through Targeting Mannose Receptor Signaling and Rhob[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 1379458.
- [66] Satoorian T, Li B, Tang X, et al. MicroRNA223 promotes pathogenic T-cell development and autoimmune inflammation in central nervous system in mice[J]. *Immunology*, 2016, 148(4): 326-338.
- [67] Fulci V, Scappucci G, Sebastiani G D, et al. miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis[J]. *Human Immunology*, 2010, 71(2): 206-211.
- [68] Johnnidis J B, Harris M H, Wheeler R T, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1125-1129.
- [69] Erjefält J S, Korsgren M, Nilsson M C, et al. Association between inflammation and epithelial damage-restitution processes in allergic airways in vivo[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 1997, 27(11): 1344-1355.
- [70] Muniz-Junqueira M I, Barbosa-Marques S M, Junqueira L F, Jr. Morphological changes in eosinophils are reliable markers of the severity of an acute asthma exacerbation in children[J]. *Allergy*, 2013, 68(7): 911-920.
- [71] Jung Y. Comparative Analysis of Dibutyric cAMP and Butyric Acid on the Differentiation of Human Eosinophilic Leukemia EoL-1 Cells[J]. *Immune Network*, 2015, 15(6): 313-318.
- [72] Akkaya I, Oylumlu E, Ozel I, et al. NLR4 Inflammasome-Mediated Regulation of Eosinophilic Functions[J]. *Immune Network*, 2021, 21(6): e42.
- [73] Mayumi M. EoL-1, a human eosinophilic cell line[J]. *Leukemia and Lymphoma*, 1992, 7(3): 243-250.
- [74] Zhao J, Wei J, Mialki R K, et al. F-box protein FBXL19-mediated ubiquitination and degradation of the receptor for IL-33 limits pulmonary inflammation[J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(7): 651-658.
- [75] Chen B B, Coon T A, Glasser J R, et al. E3 ligase subunit Fbxo15 and PINK1 kinase regulate cardiolipin synthase 1 stability and mitochondrial function in pneumonia[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(2): 476-487.
- [76] Li R, Zhang Y, Garg A, et al. E3 ubiquitin ligase FBXW7 balances airway cell fates[J]. *Developmental Biology*, 2022, 483: 89-97.
- [77] Song J, Kang J, Wei L V, et al. FBXW7 regulates epithelial barrier impairment in human bronchial epithelial cells in vitro by targeting apoptosis signal-regulating kinase1 via the p38 pathway[J]. *Biocell*, 2021, 45(3): 723-731.

## 攻读学位期间的研究成果

### 已发表论文:

1. **Wu S**, Tang S, Peng H, et al. Effects of lentivirus-mediated CCR3 RNA interference on the function of mast cells of allergic rhinitis in mice[J]. International Immunopharmacology, 2020, 78: 106011. (IF=4.932)
2. Tian X, Liu Y, **Wu S**, et al. miR-144 delivered by nasopharyngeal carcinoma-derived EVs stimulates angiogenesis through the FBXW7/HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A axis[J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2021, 24: 1000-1011. (IF=8.886)
3. Tian X, Liu Y, **Wu S**, et al. lncRNA SNHG8 promotes aggressive behaviors of nasopharyngeal carcinoma via regulating miR-656-3p/SATB1 axis[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 131: 110564. (IF=6.529)
4. Zhu Y, Ye F, **Wu S**, et al. MicroRNA-155-5p regulates the Th1/Th2 cytokines expression and the apoptosis of group 2 innate lymphoid cells via targeting TP53INP1 in allergic rhinitis[J]. International Immunopharmacology, 2021, 101: 108317. (IF=4.932)

### 待发表论文:

1. MiR-223-3p regulates the eosinophils degranulation and enhances the inflammation in allergic rhinitis by targeting FBXW7. (Under Review)

## 综述

### 坏死性凋亡在嗜酸性粒细胞脱颗粒与气道过敏性炎症中的作用研究

伍书红（综述） 刘月辉（审校）

**摘要：**坏死性凋亡是一种独立于 caspases 的细胞程序性死亡方式，介于坏死和凋亡之间。坏死性凋亡的关键因素是受体相互作用蛋白激酶 RIPK1 与混合谱系激酶结构域样蛋白 MLKL。过敏性气道炎症的显著特点是多种炎症细胞的聚集，并以嗜酸性粒细胞最为显著。嗜酸性粒细胞局部脱颗粒释放毒性颗粒蛋白引起组织损伤，导致炎症加重。坏死性凋亡在许多炎症疾病中都扮演着重要角色，抑制坏死性凋亡目前被认为是一种很有前途的治疗策略。本文就坏死性凋亡的分子机制及其与嗜酸性粒细胞脱颗粒及呼吸道过敏性炎症的关系作一综述。

**关键词：**坏死性凋亡；嗜酸性粒细胞；过敏性炎症；脱颗粒

### Research on the role of necroptosis in eosinophil degranulation and airway allergic inflammation

**Abstract:** Necroptosis is a way of programmed cell death independent of caspases, and lies between necrosis and apoptosis. The key factor of necroptosis is the receptor-interacting protein kinase RIPK1 and the mixed-lineage kinase domain-like protein MLKL. The distinctive feature of allergic airway inflammation is the aggregation of a variety of inflammatory cells, and the eosinophils are the most prominent. Toxic granule protein released by local degranulation of eosinophils can cause tissue damage and increase inflammation. Necroptosis plays an important role in many inflammatory diseases, and inhibition of necroptosis is considered to be a promising treatment strategy. In this paper, the molecular mechanism of necroptosis, the relationship between necroptosis and eosinophil degranulation and allergic inflammation of the respiratory tract were reviewed.

**Key words:** Necroptosis; Eosinophils; Allergic inflammation; Degranulation

## 引言

细胞死亡对于组织稳态的发展和维持至关重要,长期以来,细胞凋亡一直被认为是体内平衡、发育和疾病过程中细胞程序性死亡的唯一形式。然而最近坏死性凋亡也被认为是细胞程序性死亡方式之一,与细胞凋亡不同,坏死性凋亡的细胞形态特征表现为细胞肿胀、质膜通透性丧失及膜破裂,释放损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP)。受体相互作用蛋白激酶 RIPK1 和它们的作用靶点,混合谱系激酶结构域样蛋白 MLKL,是启动坏死性凋亡的必要条件<sup>[1]</sup>。至今为止坏死性凋亡在许多疾病中都扮演着重要角色,包括缺血再灌注损伤、炎症、神经变性、感染性疾病、自身免疫性疾病和癌症。

呼吸道过敏性疾病主要包括变应性鼻炎和哮喘等,是以大量炎症细胞浸润为显著特征的 Th2 炎症反应,而嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)是该类疾病中最重要的效应细胞之一<sup>[2]</sup>。活化的 EOS 脱颗粒,释放细胞毒性介质嗜酸性粒细胞过氧化物酶(eosinophil peroxidase, EPO)、主要碱性蛋白(eosinophil major basic protein, MBP)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(eosinophil cation protein, ECP)和嗜酸性粒细胞衍生的神经毒素(eosinophil-derived neurotoxin, EDN)等,参与对气道粘膜屏障的破坏,从而促进气道变应性疾病的发生。

本综述将讨论坏死性凋亡的分子机制及其在嗜酸性粒细胞脱颗粒及呼吸道过敏性炎症的作用。

## 1. 嗜酸性粒细胞的特征

EOS 自 1879 年由 Paul Ehrlich 首次描述以来,一直活跃在多种疾病中,比如哮喘、鼻炎、鼻窦炎等,但关于嗜酸性粒细胞在这些疾病中的功能及相关机制仍尚不清楚。EOS 来源于骨髓造血干细胞,在骨髓中发育成熟后释放到外周血液中进行流通。一般情况下,EOS 在外周血中停留的时间较短,在某些因素作用下如在白细胞介素 5(IL-5)和 eotaxin 趋化因子的刺激下,它们被激活进入局部组织发挥作用。

细胞质晶体颗粒是嗜酸性粒细胞的主要特征,人嗜酸性粒细胞颗粒含有四种主要蛋白质:EPO、MBP、ECP 和 EDN。嗜酸性粒细胞的其它突出特征还包括颗粒内含有 Charcot-Leyden 结晶蛋白(Galectin-10)。此外嗜酸性粒细胞也是各种细胞因子、趋化因子、生长因子和脂质介质的来源,它们在嗜酸性粒细胞活

化后分泌, 引发、扩大和维持局部炎症反应和重塑反应, 参与疾病的病理发展过程<sup>[3]</sup>。

## 2. 嗜酸性粒细胞在炎症中的作用

气道过敏性疾病是多种因素相互作用, 相互影响的疾病, 它们的病程相对复杂, 涉及不同的炎症细胞, 不同的炎症介质, 细胞与细胞之间及细胞与介质之间又相互串扰, 形成复杂的信号级联。嗜酸性粒细胞看似一个简单的个体, 然而它能表达支持生长、粘附、趋化、脱颗粒功能的表面受体, 与上皮细胞、肥大细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞等相互作用。肥大细胞活化产生或释放自身分泌的嗜酸性粒细胞存活因子 IL-5、GM-CSF、IL-3、TNF- $\alpha$ <sup>[4,5]</sup>可以诱导嗜酸性粒细胞趋化和激活。上皮细胞通过不同的模式识别受体识别环境中存在的病原体相关分子模式, 诱导上皮细胞释放上皮源性细胞因子 IL-33、IL-25 和 TSLP, 进而产生 TH2 细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13<sup>[6,7]</sup>。其中, IL-5 诱导 EOS 的分化、活化及在炎症部位的积聚, 最终导致组织重塑。上皮细胞表达的黏附分子 ICAM-1 介导了嗜酸性粒细胞在气道的延迟性凋亡, 增强了其在气道的长期浸润<sup>[8]</sup>, Charcot-Leyden 晶体 (CLC) 是嗜酸性粒细胞脱颗粒后形成的 Galectin-10 蛋白晶体, Charcot-Leyden 晶体可激活 NLRP3 炎性体引起人类巨噬细胞中的 IL-1 $\beta$  炎症<sup>[9]</sup>, CLC 刺激上皮细胞诱导产生 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 进而引起中性粒细胞募集、活化, 引发中性粒细胞发生中性粒细胞细胞外诱捕网形成 NETosis<sup>[10]</sup>。

嗜酸性粒细胞在骨髓中由多能干细胞分化、发育成熟后释放入血, 其从血液到组织的过程是循环中的嗜酸性粒细胞和活化的内皮细胞之间的连续相互作用, 依靠细胞因子、趋化因子、粘附分子选择素、整合素及其配体介导完成<sup>[11]</sup>。研究表明, 大多数炎症疾病、寄生虫感染及嗜酸性粒细胞相关性疾病中均出现血液或局部组织中嗜酸性粒细胞数量增多, 提示嗜酸性粒细胞祖细胞的增加是疾病中局部嗜酸性粒细胞数目增加的要害, 而目前用于减少血液和组织中嗜酸性粒细胞数量的糖皮质激素显示了有效的疗效, 但是激素的使用具有潜在的副作用, 因此一定程度上限制了其的治疗使用。值得注意的是, 人源化的 IL-5 特异性抗体显著减少了支气管粘膜中的嗜酸性粒细胞, 哮喘患者的病变组织中仍然存在游离的嗜酸性粒细胞颗粒, 而且疾病炎症状态没有改善<sup>[12]</sup>, 嗜酸性粒细胞炎症组织常含有大量完整的颗粒, 这些颗粒在嗜酸性粒细胞胞外, 提示

这些颗粒可能在疾病的发病机制中起作用，提示关注嗜酸性粒细胞的脱颗粒功能至关重要。

## 2.1 嗜酸性粒细胞脱颗粒功能在哮喘中的作用

哮喘是最常见的慢性气道炎症性疾病之一，慢性气道炎症、气道重塑、气道高反应性为其主要临床特征。致敏个体在变应原激发后，测定组织<sup>[13]</sup>、肺泡灌洗液<sup>[14]</sup>或者诱导痰<sup>[15]</sup>中的相关炎症细胞，发现增加明显的是气道嗜酸性粒细胞。嗜酸性粒细胞是过敏性哮喘的主要效应细胞，它们通过上皮细胞、TH2细胞、2型固有淋巴细胞释放的细胞因子和趋化因子进入肺部和气道，释放促炎细胞因子、细胞毒颗粒蛋白参与疾病的病理状态。哮喘豚鼠模型中游离颗粒的释放与过敏原激发引起的上皮细胞损伤密切相关。颗粒蛋白 MBP 或 ECP 可损伤呼吸道合胞病毒感染的气道上皮细胞<sup>[16]</sup>。减少嗜酸性粒细胞可减轻小鼠模型哮喘的进展<sup>[17]</sup>。哮喘患者肺内嗜酸性粒细胞蛋白的释放与肺部重塑和气道高反应性存在明显的联系。气管内直接滴注 MBP 会导致动物对吸入乙酰甲胆碱的气道反应性显著增加，并引发支气管的短暂收缩，显示了嗜酸性粒细胞在气道高反应性发病机制中的直接作用<sup>[18]</sup>。哮喘完全缓解的患者的血液中 EOS 数目低于活动性哮喘患者，且其支气管 EPX 免疫阳性率更低，根据气道 EOS 的激活可以区分哮喘完全缓解患者、临床哮喘缓解患者及活动性哮喘患者，表明 EOS 在哮喘支气管高反应性的临床表现和严重程度中的重要性<sup>[19,20]</sup>。粒细胞胞外陷阱不仅包括胞外网状 DNA 结构，还包括各种胞内蛋白质。最近的一项研究表明嗜酸性粒细胞胞外陷阱 EETs 由嗜酸性粒细胞特有的一些颗粒蛋白修饰。其中，EETs 增加了杯状细胞增生、粘液分泌、炎症细胞浸润和 2 型细胞因子的表达，嗜酸性粒细胞颗粒蛋白 EPX 增强了 EETs 和神经内分泌细胞之间的相互作用，加重患者哮喘的严重程度<sup>[21]</sup>。另一项研究显示小鼠哮喘实验模型中浸润气道的嗜酸性粒细胞会在支气管肺泡灌洗液和肺组织中形成嗜酸性粒细胞胞外陷阱 EET，而且嗜酸性粒细胞过氧化物酶 EPO 与来自哮喘小鼠的肺泡灌洗液和肺组织中的胞外 DNA 共定位，加剧过敏性哮喘肺功能障碍<sup>[22]</sup>。此外，其它研究中同样发现中性粒细胞胞外陷阱 NETs 增加了树突状细胞 DC 的募集，进而加重感染相关性哮喘<sup>[23,24]</sup>。以上提示粒细胞胞外陷阱在哮喘进展中起着重要作用。

支气管哮喘有效治疗方法包括吸入皮质类固醇（ICS）和短效  $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂（SABA）。据报道，ECP 可反映气道炎症的程度，通过测量血清 ECP

水平有助于评估 ICS 治疗对儿童哮喘的疗效<sup>[25,26]</sup>。

## 2.2 嗜酸性粒细胞脱颗粒功能在鼻炎中的作用

变应性鼻炎是一种常见疾病，EOS 在鼻粘膜组织病理变化和变应性鼻炎病理生理过程中发挥着重要作用。经变应原激发后，鼻黏膜局部 EOS 聚集，而且血液中循环的嗜酸性粒细胞增加与组织局部 EOS 的增加有关<sup>[27]</sup>，提示过敏原的吸入能够刺激骨髓生成更多祖细胞，活化的 EOS 脱颗粒释放具有细胞毒性的颗粒物质<sup>[28]</sup>，参与鼻黏膜的组织病理改变。L-3、IL-5 和 GM-CSF 的存在可促进组织中嗜酸性粒细胞的存活，而这些细胞因子也可以由嗜酸性粒细胞自身产生，形成正反馈回路，进一步促进炎症发展。EOS 分泌的 MBP、ECP、EPO、EDN 可能与基底膜蛋白多糖和透明质酸结合，导致细胞解聚和上皮脱落，这些蛋白质还可以作用于细胞膜，导致细胞死亡，引发上皮屏障功能障碍。上皮屏障功能障碍在过敏性气道炎症的发病机制中起着关键作用。在变应性鼻炎和哮喘患者已观察到鼻上皮屏障破坏<sup>[29]</sup>。Steelant 等<sup>[30]</sup>报道 HDM 诱导的 AR 患者鼻上皮屏障功能受损，鼻黏膜通透性增加。另外最近一篇研究报道 MUC1 基因缺陷加重了上皮功能障碍进而加剧了 AR 炎症<sup>[31]</sup>。嗜酸性粒细胞衍生的神经毒素 EDN 可能会使粘膜神经失活。嗜酸性粒细胞表达的 5-脂氧合酶是 LTC<sub>4</sub> 的重要来源，而 LTC<sub>4</sub> 和 ECP 是有效的腺体促分泌剂，导致鼻黏膜水肿及变应性鼻炎特征性的水样清涕，加重血管充血及鼻塞症状。研究发现，与中度变应性鼻炎患者和健康对照组相比，从中度至重度患者获得的血液嗜酸性粒细胞具有更高的 ECP 和 EPX 以及促进 Th<sub>2</sub> 反应的潜力<sup>[32]</sup>。其中部分 AR 患者会恶化或发展为哮喘，与没有哮喘症状的患者相比，出现哮喘样症状的患者的血清 ECP 和血清 EPO 显著更高，因此血清嗜酸性粒细胞颗粒蛋白在一定程度上可预测变应性鼻炎的哮喘风险<sup>[33]</sup>。

## 3. 嗜酸性粒细胞脱颗粒的机制

脱颗粒是 EOS 的一种显著功能，即将细胞内的内含物释放到细胞外环境中。嗜酸性粒细胞脱颗粒形式分为零碎性脱颗粒、胞外分泌和细胞溶解性脱颗粒<sup>[34]</sup>。经典的胞吐过程是颗粒直接与细胞质膜融合，释放颗粒的全部内容物。该机制在体内少见。零碎性脱颗粒，是一种进行性的释放，颗粒内容物通过膜结合的囊泡

运输到细胞表面。细胞溶解引起细胞膜破裂崩解导致完整颗粒的释放,这些颗粒在细胞外空间以游离嗜酸性粒细胞颗粒 (cell free eosinophil granules, CFEGS) 的形式积累<sup>[35,36]</sup>。已有报道在过敏性哮喘、鼻息肉、嗜酸性食管炎、异位性皮肤炎患者组织中发现了 CFEGS 的存在<sup>[37-39]</sup>,而且这些 CFEGS 可以直接分泌内容物,包括嗜酸性粒细胞阳离子蛋白、EPX、核糖核酸酶和细胞因子,因此,不难推测出释放出的 CFEGS 可以继续提起到促炎症、免疫调节的作用。

## 4. 嗜酸性粒细胞的坏死性凋亡

### 4.1 坏死性凋亡的途径

坏死性凋亡是一种受调控的细胞死亡形式。与细胞凋亡不同,坏死性凋亡的细胞形态特征为细胞肿胀、质膜通透性丧失及膜破裂<sup>[40]</sup>。受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (RIPK1)、RIPK3 和混合谱系激酶域样假激酶 (MLKL),是坏死性凋亡的关键参与者,而 MLKL 在介导质膜破裂后将大量释放 DAMP 到细胞外环境中,激活先天免疫系统引发体内外强烈炎症反应<sup>[41,42]</sup>。RIPK1 是坏死性凋亡途径中的第一个激酶<sup>[43,44]</sup>。Polykratis 等人的研究表明,表达 RIPK1 激酶失活形式的小鼠在体内免受 TNF 诱导的坏死性凋亡,证明 RIPK1 的激酶活性对坏死性凋亡至关重要<sup>[45]</sup>。与 RIPK1 类似,RIPK3 同样被确定为死亡受体诱导的坏死性凋亡的关键调节因子,RIPK3 的激酶失活突变无法诱导 RIPK3 细胞的坏死性凋亡<sup>[46-48]</sup>。RIPK1 的激酶活性构象导致 RIPK3 的激活和自磷酸化,而 RIPK3 介导的 MLKL 激酶样结构域磷酸化又是坏死性凋亡途径的下一个关键步骤<sup>[49]</sup>,可导致 MLKL N 末端的基序暴露,触发 MLKL 向质膜的易位,质膜内的磷酸肌醇磷酸酯与 MLKL 上暴露的基序相互作用,进而导致质膜破裂<sup>[50]</sup>。

### 4.2 坏死性凋亡与呼吸道炎症

由 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 介导的坏死性凋亡是一种可导致组织炎症和组织破坏的调节性坏死,坏死性凋亡已被证明在不同疾病和不同组织中引起炎症。在哮喘加重期,坏死性凋亡标志物 RIPK3 和 pMLKL 水平增加<sup>[51]</sup>。应用坏死性凋亡的特定抑制剂 Necrostatin-1 (Nec-1) 可显著降低颗粒物 PM 诱导上皮细胞分泌 IL-6、IL-8,同时肺组织病理变化也显示施用 Nec-1 可显著减少气道炎症和粘液过度产生,表明坏死性凋亡参与了 PM 引起的肺部炎症发病机制<sup>[52]</sup>。另一项

研究利用气道上皮细胞 (AEC) 特异性 Fas8 相关死亡域 (FADD) 缺陷的小鼠构建屋尘螨 HDM 诱导的哮喘模型后, 与对照小鼠相比, FADD 缺陷小鼠表现出严重的过敏性气道炎症, 然而在抑制 RIPK1 激酶活性或缺乏 RIPK3 的情况下都阻止了 HDM 诱导的 FADD 缺陷小鼠肺部过敏性炎症的过度激活, 表明 AEC 坏死性凋亡极大地增强了炎症反应, 即在屋尘螨诱发的过敏性炎症小鼠模型中, 气道上皮细胞坏死性凋亡会导致哮喘恶化<sup>[53,54]</sup>。研究报道肺气肿和慢性阻塞性肺病很可能是由异常细胞死亡导致气道炎症、重塑和肺气肿造成的, Lu Z 等<sup>[55]</sup>的研究显示在香烟烟雾 (CS) 诱导的实验性 COPD 小鼠的肺中检测到增加的坏死性凋亡相关的 mRNA 和蛋白质, 而 RIPK3 或 MLKL 缺失可防止急性 CS 暴露后的气道炎症, 说明抑制坏死性凋亡可减轻 CS 诱导的气道炎症、气道重塑和肺气肿, 可见坏死性凋亡在炎症中的关键作用, 并提出将针对坏死性凋亡途径的干预加入到哮喘疾病的治疗计划中<sup>[56]</sup>。与其它炎症疾病相比较, 目前关于坏死性凋亡是否能促进变应性鼻炎的发生、发展及慢性化尚不清楚, 有待进一步研究。

### 4.3 坏死性凋亡与 EOS 溶解性脱颗粒

由于 DAMP 的释放, 坏死性凋亡被认为是一种高度促炎的细胞死亡模式, 文献报道坏死性凋亡能够促进巨噬细胞和树突状细胞的活化<sup>[57,58]</sup>, 进而增加促炎细胞因子的水平, 引发急慢性炎症性疾病。嗜酸性粒细胞溶解为一种非凋亡形式的死亡, 当嗜酸性粒细胞失去膜的完整性并留下游离细胞颗粒时, 嗜酸性粒细胞脱颗粒发生, 这种形式的脱颗粒常见于人类过敏性气道和皮肤疾病。变应原诱导的嗜酸性粒细胞的细胞溶解是人类上呼吸道中颗粒蛋白释放的主要机制<sup>[59]</sup>。文献报道在不同嗜酸性粒细胞相关疾病的炎症组织中发现完整或聚集的细胞外嗜酸性粒细胞颗粒<sup>[60-62]</sup>, 表明体内发生嗜酸性粒细胞溶解, 它与儿童哮喘恶化的严重程度有关<sup>[63]</sup>, 支持了嗜酸性粒细胞溶解脱颗粒对嗜酸性粒细胞相关疾病发展起关键作用的观点。

Ueki S 等人的研究表明, 激活的人类嗜酸性粒细胞可以经历细胞外 DNA 陷阱细胞死亡 (ETosis), 细胞溶解释放游离的嗜酸性粒细胞颗粒, 并且指出该过程是由 NADPH 氧化酶依赖性和半胱天冬酶非依赖性细胞死亡介导。通过 EETosis 释放的嗜酸性粒细胞颗粒, 仍然保留嗜酸性粒细胞阳离子颗粒蛋白, 当用 CC 趋化因子配体 11 (eotaxin-1) 刺激时仍可以激活分泌颗粒蛋白<sup>[64]</sup>。在暴露于 GM-CSF 后, 结合粘附受体如 CD44、CD11b、CD18 或 CD15 可诱导人中性粒细胞坏

死性凋亡, 细胞表现为空泡化<sup>[65]</sup>。与此类似, 最近一篇研究显示 EOS 在黏附后, 触发活性氧 ROS 的产生, 胞质呈现明显的空泡化形态变化, 最终导致 EOS 溶解释放出内容物, 这是一种在炎症条件下在体内和体外均可观察到的现象<sup>[66]</sup>。而这种黏附诱导的 EOS 溶解被认为是坏死性凋亡, 因为其死亡过程受 RIPK3 和 MLKL 调节, 随后 RIPK3-MLKL 复合物又进一步激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 3'-激酶 (PI3K), 所有这些分子成分都是随后细胞溶解所必需的。

## 5. 前景展望

坏死性凋亡与坏死具有相似的形态学特征, 但其细胞死亡方式为可调控的非 caspase 依赖性的程序性细胞死亡, 即在 caspase 抑制的条件下, 死亡受体与配体的结合可触发坏死性凋亡。坏死性凋亡的诱导与阻截涉及机体自我稳定、正常发育及多种疾病的发展与变化。坏死性凋亡的调节涉及一系列分子的表达与活化, caspase 家族及 RIP1、RIP3 在此过程中发挥了重要的作用。

近几年的研究表明, 通过使用抑制坏死性凋亡的药物或利用基因敲除技术破坏坏死性凋亡途径可减轻动物体内各种系统中诱导的炎症, 证实了坏死性凋亡在炎症中的关键作用。坏死性凋亡在许多疾病状况中发挥作用, 抑制坏死性凋亡目前被认为是一种有前途的治疗策略。

## 参考文献

- [1] Hogan S P, Rosenberg H F, Moqbel R, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2008, 38(5): 709-750.
- [2] Weller P F, Spencer L A. Functions of tissue-resident eosinophils[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(12): 746-760.
- [3] Possa S S, Leick E A, Prado C M, et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma[J]. *Frontiers in pharmacology*, 2013, 4: 46.
- [4] Levi-Schaffer F, Temkin V, Malamud V, et al. Mast cells enhance eosinophil survival in vitro: role of TNF- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[J]. *The Journal of Immunology*, 1998, 160(11): 5554-5562.
- [5] Shakoory B, Fitzgerald S M, Lee S A, et al. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology[J]. *Journal of interferon & cytokine research*, 2004, 24(5): 271-281.
- [6] Esnault S, Rosenthal L A, Wang D S, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) as a bridge between infection and atopy[J]. *International journal of clinical and experimental pathology*,

- 2008, 1(4): 325.
- [7] Hong H, Liao S, Chen F, et al. Role of IL - 25, IL - 33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation[J]. *Allergy*, 2020, 75(11): 2794-2804.
- [8] Fulkerson P C, Rothenberg M E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond[J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2013, 12(2): 117-129.
- [9] Rodríguez-Alcázar J F, Ataíde M A, Engels G, et al. Charcot–Leyden crystals activate the NLRP3 inflammasome and cause IL-1 $\beta$  inflammation in human macrophages[J]. *The Journal of Immunology*, 2019, 202(2): 550-558.
- [10] Gevaert E, Delemarre T, De Volder J, et al. Charcot-Leyden crystals promote neutrophilic inflammation in patients with nasal polyposis[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2020, 145(1): 427-430. e4.
- [11] Broide D, Sriramarao P. Cellular adhesion in inflammation[J]. *Middleton's Allergy Principles and Practice*, 2008, 1: 149-165.
- [12] Flood-Page P T, Menzies-Gow A N, Kay A B, et al. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway[J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2003, 167(2): 199-204.
- [13] Beasley R, Roche W R, Roberts J A, et al. Cellular Events in the Bronchi in Mild Asthma and After Bronchial Provocation[J]. *The American review of respiratory disease*, 1989, 139(3): 806-817.
- [14] Djukanović R, Feather I, Gratziau C, et al. Effect of natural allergen exposure during the grass pollen season on airways inflammatory cells and asthma symptoms[J]. *Thorax*, 1996, 51(6): 575-581.
- [15] Gauvreau G M, Watson R M, O'BYRNE P M. Kinetics of allergen-induced airway eosinophilic cytokine production and airway inflammation[J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1999, 160(2): 640-647.
- [16] Kato M, Ishioka T, Kita H, et al. Eosinophil granular proteins damage bronchial epithelial cells infected with respiratory syncytial virus[J]. *International archives of allergy and immunology*, 2012, 158(Suppl. 1): 11-18.
- [17] Lee J J, Dimina D, Macias M M P, et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils[J]. *Science*, 2004, 305(5691): 1773-1776.
- [18] Gundel R H, Letts L G, Gleich G J. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates[J]. *The Journal of clinical investigation*, 1991, 87(4): 1470-1473.
- [19] Broekema M, Timens W, Vonk J M, et al. Persisting remodeling and less airway wall eosinophil activation in complete remission of asthma[J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2011, 183(3): 310-316.
- [20] Rank M A, Ochkur S I, Lewis J C, et al. Nasal and pharyngeal eosinophil peroxidase levels in adults with poorly controlled asthma correlate with sputum eosinophilia[J]. *Allergy*, 2016, 71(4): 567-570.

- [21] Lu Y, Huang Y, Li J, et al. Eosinophil extracellular traps drive asthma progression through neuro-immune signals[J]. *Nature Cell Biology*, 2021: 1-13.
- [22] Cunha A A, Porto B N, Nuñez N K, et al. Extracellular DNA traps in bronchoalveolar fluid from a murine eosinophilic pulmonary response[J]. *Allergy*, 2014, 69(12): 1696-1700.
- [23] Radermecker C, Sabatel C, Vanwinge C, et al. Locally instructed CXCR4 hi neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps[J]. *Nature immunology*, 2019, 20(11): 1444-1455.
- [24] Toussaint M, Jackson D J, Swieboda D, et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation[J]. *Nature medicine*, 2017, 23(11): 1384-1384.
- [25] Guo C L, Sun X M, Wang X W, et al. Serum eosinophil cationic protein is a useful marker for assessing the efficacy of inhaled corticosteroid therapy in children with bronchial asthma[J]. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 2017, 242(4): 263-271.
- [26] Jiang X G, Yang X D, Lv Z, et al. Elevated serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-8, and ECP can be involved in the development and progression of bronchial asthma[J]. *Journal of Asthma*, 2018, 55(2): 111-118.
- [27] Wood L J, INMAN M D, WATSON R M, et al. Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects[J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1998, 157(1): 99-105.
- [28] Wu W, Chen Y, Hazen S L. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues: implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(36): 25933-25944.
- [29] Zhang N, Van Crombruggen K, Gevaert E, et al. Barrier function of the nasal mucosa in health and type - 2 biased airway diseases[J]. *Allergy*, 2016, 71(3): 295-307.
- [30] Steelant B, Farr éR, Wawrzyniak P, et al. Impaired barrier function in patients with house dust mite-induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 137(4): 1043-1053.
- [31] Zhou L B, Zheng Y M, Liao W J, et al. MUC1 deficiency promotes nasal epithelial barrier dysfunction in subjects with allergic rhinitis[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2019, 144(6): 1716-1719. e5.
- [32] Chen Y, Yang M, Deng J, et al. Elevated Levels of Activated and Pathogenic Eosinophils Characterize Moderate-Severe House Dust Mite Allergic Rhinitis[J]. *Journal of immunology research*, 2020, 2020:1-14.
- [33] Nielsen L P, Peterson C G B, Dahl R. Serum eosinophil granule proteins predict asthma risk in allergic rhinitis[J]. *Allergy*, 2009, 64(5): 733-737.
- [34] Neves J S, Weller P F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology[J]. *Current opinion in immunology*, 2009, 21(6): 694-699.
- [35] Fukuda T, Ackerman S J, Reed C E, et al. Calcium ionophore A23187 calcium-dependent cytolytic degranulation in human eosinophils[J]. *The Journal of Immunology*, 1985, 135(2):

- 1349-1356.
- [36] Erjefält J S, Andersson M, Greiff L, et al. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils[J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 1998, 102(2): 286-294.
- [37] Erjefält J S, Persson C G A. New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils[J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2000, 161(6): 2074-2085.
- [38] Saffari H, Hoffman L H, Peterson K A, et al. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis[J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2014, 133(6): 1728-1734.
- [39] Uller L, Andersson M, Greiff L, et al. Occurrence of apoptosis, secondary necrosis, and cytolysis in eosinophilic nasal polyps[J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2004, 170(7): 742-747.
- [40] Galluzzi L, Kepp O, Trojel - Hansen C, et al. Non - apoptotic functions of apoptosis - regulatory proteins[J]. *EMBO reports*, 2012, 13(4): 322-330.
- [41] Seong S Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(6): 469-478.
- [42] Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies[J]. *Ageing research reviews*, 2015, 24: 29-39.
- [43] Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins[J]. *Nature chemical biology*, 2008, 4(5): 313-321.
- [44] Xie T, Peng W, Liu Y, et al. Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins[J]. *Structure*, 2013, 21(3): 493-499.
- [45] Polykratis A, Hermance N, Zelic M, et al. Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo[J]. *The Journal of Immunology*, 2014, 193(4): 1539-1543.
- [46] Cho Y S, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1112-1123.
- [47] He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1100-1111.
- [48] Zhang D W, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis[J]. *Science*, 2009, 325(5938): 332-336.
- [49] Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3[J]. *Molecular cell*, 2014, 54(1): 133-146.
- [50] Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, et al. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates[J]. *Cell reports*, 2014, 7(4): 971-981.
- [51] Cerps S C, Menzel M, Persson I M, et al. Interferon- $\beta$  deficiency at asthma exacerbation promotes MLKL mediated necroptosis[J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 1-8.

- [52] Xu F, Luo M, He L, et al. Necroptosis contributes to urban particulate matter-induced airway epithelial injury[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 46(2): 699-712.
- [53] Oikonomou N, Schuijs M J, Chatzigiagkos A, et al. Airway epithelial cell necroptosis contributes to asthma exacerbation in a mouse model of house dust mite-induced allergic inflammation[J]. *Mucosal Immunology*, 2021: 1-12.
- [54] Simpson J, Loh Z, Ullah M A, et al. Respiratory syncytial virus infection promotes necroptosis and HMGB1 release by airway epithelial cells[J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2020, 201(11): 1358-1371.
- [55] Lu Z, Van Eeckhoutte H P, Liu G, et al. Necroptosis Signalling Promotes Inflammation, Airway Remodelling and Emphysema in COPD[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2021.
- [56] Garnish S E, Tovey Crutchfield E C, Murphy J M, et al. Add necroptosis to your asthma action plan[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2021, 99(8): 800-802.
- [57] Orozco S L, Daniels B P, Yatim N, et al. RIPK3 activation leads to cytokine synthesis that continues after loss of cell membrane integrity[J]. *Cell reports*, 2019, 28(9): 2275-2287.
- [58] Martin S J. Cell death and inflammation: the case for IL - 1 family cytokines as the canonical DAMP s of the immune system[J]. *The FEBS journal*, 2016, 283(14): 2599-2615.
- [59] Erjefalt J S, Greiff L, Andersson M, et al. Allergen-induced eosinophil cytolysis is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1999, 160(1): 304-312.
- [60] Erjefält J S, Korsgren M, Nilsson M C, et al. Association between inflammation and epithelial damage - restitution processes in allergic airways in vivo[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 1997, 27(11): 1344-1355.
- [61] Persson C G, Erjefalt J S. " Ultimate activation" of eosinophils in vivo: lysis and release of clusters of free eosinophil granules (Cfegs)[J]. *Thorax*, 1997, 52(6): 569.
- [62] Saffari H, Hoffman L H, Peterson K A, et al. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis[J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2014, 133(6): 1728-1734.
- [63] Muniz - Junqueira M I, Barbosa - Marques S M, Junqueira Jr L F. Morphological changes in eosinophils are reliable markers of the severity of an acute asthma exacerbation in children[J]. *Allergy*, 2013, 68(7): 911-920.
- [64] Ueki S, Melo R C N, Ghiran I, et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans[J]. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2013, 121(11): 2074-2083.
- [65] Wang X, He Z, Liu H, et al. Neutrophil necroptosis is triggered by ligation of adhesion molecules following GM-CSF priming[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 197(10): 4090-4100.
- [66] Radonjic-Hoesli S, Wang X, de Graauw E, et al. Adhesion-induced eosinophil cytolysis requires the receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3)-mixed lineage kinase-like (MLKL)

signaling pathway, which is counterregulated by autophagy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 140(6): 1632-1642.