

李木楠, 李双双, 孟凡爽, 等. 抑制 *miR-29a-3p* 表达对小鼠巨噬细胞凋亡的影响及机制[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(1): 64-69.

抑制 *miR-29a-3p* 表达对小鼠巨噬细胞凋亡的影响及机制

李木楠^{1,2}, 李双双¹, 孟凡爽¹, 韩 鹏¹, 张文慧^{1,2}, 张林波^{1,2}

(1 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】研究 *miR-29a-3p* 下调表达对小鼠巨噬细胞凋亡及相关基因表达的影响, 为探讨结核病发病机制、研发新的诊断与治疗方法提供依据。【方法】将重组抑制载体 pEZX-AM02-miR-29a-3p 转染 RAW264.7 细胞, 24、36 和 48 h 荧光显微镜观察转染效率, Real time-PCR 法检测 *miR-29a-3p* 及凋亡相关基因 *caspase3*、*caspase7*、*caspase8*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 和 *Bax* 的表达水平, 流式细胞术检测 RAW264.7 细胞的凋亡率。【结果】重组抑制载体转染后, 细胞内 *miR-29a-3p* 表达水平明显下降; 而 *caspase7*、*caspase8*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 和 *Bax* 等基因的表达出现不同程度的上调; 流式细胞术分析发现随着转染时间延长, 细胞凋亡率增加, 且 36 h 凋亡率最高。【结论】pEZX-AM02-miR-29a-3p 重组载体可抑制小鼠巨噬细胞中 *miR-29a-3p* 的表达, 通过靶向上调 *caspase7*、*caspase8*、*Bcl-2* 和 *Mcl-1* 等基因的表达促进巨噬细胞的凋亡。

关键词: *miR-29a-3p*; 抑制载体; 巨噬细胞; 细胞凋亡; 靶基因
中图分类号: S854.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)01-0064-06

Mechanism and influence of down-regulation of *miR-29a-3p* expression on apoptosis in mouse macrophage

LI Munan^{1,2}, LI Shuangshuang¹, MENG fanshuang¹, HAN Peng¹, ZHANG Wenhui^{1,2}, ZHANG Linbo^{1,2}

(1 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2 Engineering Research Center for Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Changchun 130118, China)

Abstract: 【Objective】To study the influence of down-regulation of *miR-29a-3p* expression on apoptosis in mouse macrophage and expression of apoptosis-associated genes, and provide references for investigating the pathogenesis mechanism of mycobacterium tuberculosis (MTB) and developing new diagnosis and treatment methods. 【Method】The recombinant inhibitor vector pEZX-AM02-miR-29a-3p was transfected into RAW264.7 cells. Transfection efficiency was observed through fluorescence microscopy, the expression levels of *miR-29a-3p* and apoptosis-associated genes *caspase3*, *caspase7*, *caspase8*, *Bcl-2*, *Mcl-1* and *Bax* were detected by RT-PCR, and the apoptosis rates of RAW264.7 cells were detected by flow cytometry at 24, 36, 48 h after transfection. 【Result】After transfected with pEZX-AM02-miR-29a-3p recombinant inhibitor vector, *miR-29a-3p* expression in RAW264.7 cells decreased significantly, while the target genes *caspase7*, *caspase8*, *Bcl-2*, *Mcl-1* and *Bax* were up-regulated at different levels. The results of flow cytometry indicated that the apoptosis rates increased as the transfection time progressed and reached the peak at 36 h. 【Conclusion】The

收稿日期: 2017-04-11 优先出版时间: 2017-12-29
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20171229.1131.010.html>
作者简介: 李木楠 (1990—), 女, 硕士研究生, E-mail: 951623271@qq.com; 通信作者: 张文慧 (1977—), 女, 副教授, 博士, E-mail: whz.jl@qq.com; 张林波 (1973—), 男, 教授, 博士, E-mail: cczlb@126.com
基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (20130101105JC, 20140204018YY); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目 (2016-177JJKH20170304KJ); 吉林农业大学博士科研启动基金 (2015015)

expression of *miR-29a-3p* in mouse macrophage are inhibited by transfecting with pEZX-AM02-miR-29a-3p, which promotes the apoptosis of macrophage by up-regulating the expression of target genes, suah as *caspase7*, *caspase8*, *Bcl-2* and *Mcl-1*.

Key words: *miR-29a-3p*; inhibitor vector; macrophage; cell apoptosis; target gene

微小 RNA(microRNA, miRNA) 是一类长度约为 20~25 个核苷酸的非编码 RNA^[1], miRNA 可与靶 mRNA 分子的 3'非翻译区 (3'UTR) 结合, 抑制 mRNA 的翻译, 以抑制靶蛋白的表达, 进而影响细胞的生长、发育、凋亡等过程^[2]。结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) 感染所引起的一种人畜共患传染病。MTB 为胞内寄生菌, 主要宿主是巨噬细胞。巨噬细胞具有吞噬与消化异物的功能, 是抵抗呼吸道传播疾病免疫反应中最早的效应细胞, 是机体抗细菌感染的首道防线^[3]。MTB 进入肺部后, 肺泡巨噬细胞可通过模式识别受体对 MTB 进行识别、结合、吞噬, 激活细胞内免疫反应, 发挥抗结核作用来清除感染。MTB 也可以通过自身结构或分泌蛋白、酶等抵抗宿主细胞的免疫杀伤, 从而在巨噬细胞中存活^[4-6]。研究发现 MTB 入侵巨噬细胞后, miRNA 参与了机体抗结核感染的过程^[7]。Das 等^[8]用 H37Rv 和 H37Ra 侵染 THP-1 巨噬细胞后, THP-1 细胞中 *miR-29a-3p* 表达量升高, miRNA 表达微阵列显示分别上调了 1.86 和 1.56 倍, 吉林农业大学病原微生物与免疫学科研发团队前期试验发现用 H37Rv、H37Ra 和 BCG 侵染巨噬细胞后, *miR-29a-3p* 表达出现不同程度的上调^[9], 由此推测 *miR-29a-3p* 在一定程度上参与了 MTB 的侵染过程^[8-10]。

本研究利用 Target Scan、miRDB、PicTar 等生物信息学软件查找 *miR-29a-3p* 靶基因并设计引物, 通过转染 pEZX-AM02-miR-29a-3p 载体抑制小鼠巨噬细胞中 *miR-29a-3p* 的表达, 观察转染后巨噬细胞凋亡率及相关靶基因表达水平的变化, 探讨 *miR-29a-3p* 在巨噬细胞抗 MTB 感染机制中的作用, 为揭示结核病发病机制提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、Trizol 试剂、GeneMark 无内毒素质粒抽提试剂盒、pEZX-AM02-miR-29a-3p 抑制载体及阴性对照、反转录引物、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、*miR-29a-3p* 引物及内参基因为 *RNU6*、转染试剂 EndoFectin™-Max 购于 GeneCopoeia; 靶基因引物由上海生工合成; <http://xuebao.scau.edu.cn>

Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒购于康润公司。B31614 高速冷冻离心机 (德国贝克曼); Infinite 2000 酶标仪 (TECAN); DL-CJ-2ND 超净台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); NU-5500E CO2 恒温培养箱 (NUAIR 上海压缩机有限公司); AX10 荧光倒置显微镜 (德国卡尔蔡司); ETC811 PCR 仪 (东胜创新生物科技有限公司); Mx3000P 荧光定量 PCR 仪 (安捷伦科技有限公司); C6 流式细胞仪 (美国 BD)。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞培养 RAW 246.7 细胞由吉林农业大学病原微生物与免疫学科研发团队冻存, 37 ℃ 水浴复苏后接种于 DMEM 完全培养基 (含体积分数 10% 的 FBS), 在 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 显微镜下观察细胞状态和培养基颜色, 适时更换培养液, 取对数生长期的细胞接种于 6 孔细胞培养板。

1.2.2 抑制载体转化 将 pEZX-AM02-miR-29a-3p 抑制载体及阴性对照载体转化于大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 涂布于含氨苄抗性的 LB 培养基平板上, 37 ℃ 条件下过夜培养后, 从平板上挑取菌落至氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 条件下摇床培养, 第 3 天取菌液 10 mL 按试剂盒说明书提取质粒, 酶标仪检测质粒纯度和浓度, 提取的质粒用于细胞转染。

1.2.3 载体转染 采用脂质体瞬时转染法, 当细胞生长达到对数生长期时, 以 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集细胞、重悬、计数, 将浓度调整为 2×10⁵ mL⁻¹ 接种于 6 孔细胞培养板, 于培养箱内培养, 待细胞汇合度达到 70%~80% 时进行转染。按照转染试剂说明书操作, 试验组细胞转染 pEZX-AM02-miR-29a-3p, 抑制载体对照组细胞转染 pEZX-AM02, 转染试剂对照组只添加转染试剂, 空白对照组细胞不做任何处理, 每组 3 个重复。携带红色荧光蛋白报告基因的 pEZX-AM02 载体, 转染进细胞并成功表达会在显微镜下出现红色荧光, 可于倒置荧光显微镜下观察细胞生长与质粒转染情况。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 RAW 246.7 细胞在转染 24、36 和 48 h 后, 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。将总 RNA (1 μg) 逆转录为 miRNA 反应所需

的 cDNA, 反应程序为 37 ℃ 60 min, 85 ℃ 5 min。将细胞总 RNA(1 μg) 反转录为 cDNA, 反应程序为两步法: 第 1 步 65 ℃ 5 min; 第 2 步 42 ℃ 60 min, 85 ℃ 5 min。miRNA 反应以通用引物为上游引物及 All-in-One™ miRNA qPCR primer 为实时定量 miRNA 特异引物, 使用 SYBR 法扩增 *miR-29a-3p*

片段, 以 *RNU6B* 作为内参。miRNA 反应以 β -actin 作为内参。反应条件为: 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 15 s, 重复 40 个循环。 C_t 值根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法处理得到基因的相对表达量, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。基因及引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列
Tab. 1 Sequences of gene primers

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>caspase3</i>	TCTGACTGGAAAGCCGAAAC	GCAAGCCATCTCCTCATCA
<i>caspase7</i>	AAACCCTGTTAGAGAAACCCAA	TAAGCAAAGAGGAAGTCGGC
<i>caspase8</i>	GCTGCCCTCAAGTTCCTGT	GATTGCCTTCCTCCAACATC
<i>Bcl-2</i>	GGTGGAGGAACCTTTCAGGG	ACATCTCCCTGTTGACGCTC
<i>Bax</i>	ATGCGTCCACCAAGAAGC	CAGTTGAAGTTGCCATCAGC
<i>Mcl-1</i>	TGTAAGGACGAAACGGGACT	CAAAAGCCAGCAGCACATT

1.2.5 检测细胞凋亡率 转染细胞培养至 24、36 和 48 h, 用流式细胞术检测凋亡率。将培养箱中转染的细胞板取出, 去上清液后加入 PBS 溶液洗涤 1 次, 用胰酶消化使贴壁细胞悬浮, 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃培养基用 4 ℃ 预冷的 PBS 溶液洗细胞 2 次, 用 250 μL 1×Binding Buffer 重新悬浮细胞, 调节其浓度为 1×10⁶ mL⁻¹, 取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加入 5 μL Annexin V/Alexa Fluor 647, 室温避光孵育 5 min 后加入 20 μg·mL⁻¹ 的碘化丙啶溶液 10 μL, 避光室温反应 15 min, 在反应管中加 400 μL PBS 溶液, 进行流式细胞仪分析。

1.3 数据处理

Alexa Fluor 647/PI 双染试剂盒检测正常细胞、死亡细胞、晚期凋亡及早期凋亡所占的比例; 将 Alexa Fluor 647+/PI-判断为早期凋亡, Alexa Fluor

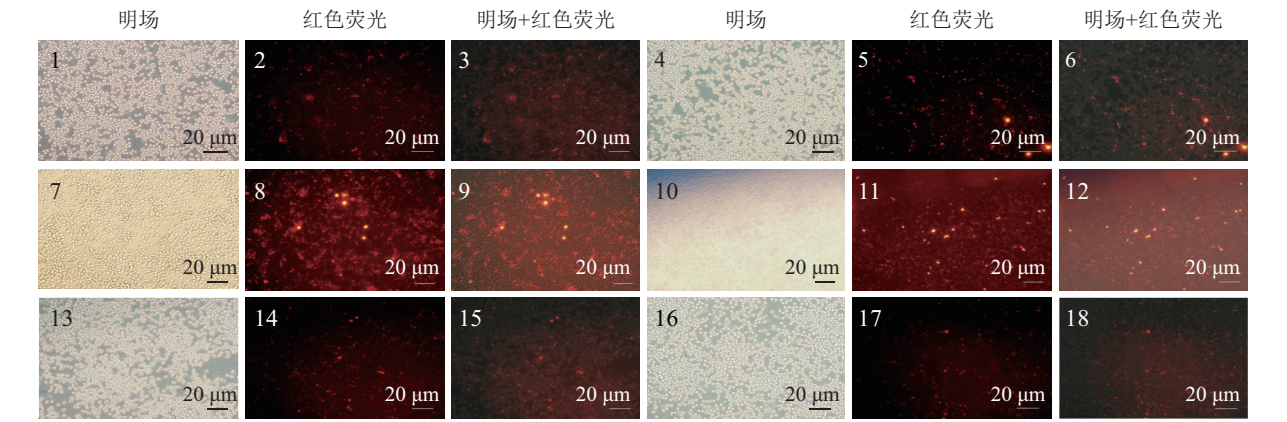
647+/PI+判断为晚期凋亡, 以上 2 种凋亡率相加即总凋亡率。分别检测各试验组 24、36 和 48 h 的细胞凋亡率, 结果以平均数 $\pm$ 标准差表示。

利用流式细胞仪 CFlow Plus 软件分析结果。荧光定量 PCR 及流式分析结果所有数据均采用 GraphPad Prism 6 统计软件进行方差分析及 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 pEZX-AM02-miR-29a-3p 载体转染

携带红色荧光蛋白报告基因的 pEZX-AM02 载体, 转染进细胞并成功表达会发出红色荧光。利用荧光显微镜观察细胞内荧光蛋白的表达情况, 发现对照抑制载体 pEZX-AM02 和 pEZX-AM02-miR-29a-3p 抑制载体都成功转入细胞, 并在细胞内成功表达 (图 1), 从图 1 可以看出 36 h 转染效果最佳, 效率最高。



1~3 为 24 h 的抑制载体对照 (pEZX-AM02); 4~6 为 24 h 的 pEZX-AM02-miR-29a-3p 载体; 7~9 为 36 h 的抑制载体对照 (pEZX-AM02); 10~12 为 36 h 的 pEZX-AM02-miR-29a-3p 载体; 13~15 为 48 h 的抑制载体对照 (pEZX-AM02); 16~18 为 48 h 的 pEZX-AM02-miR-29a-3p 载体

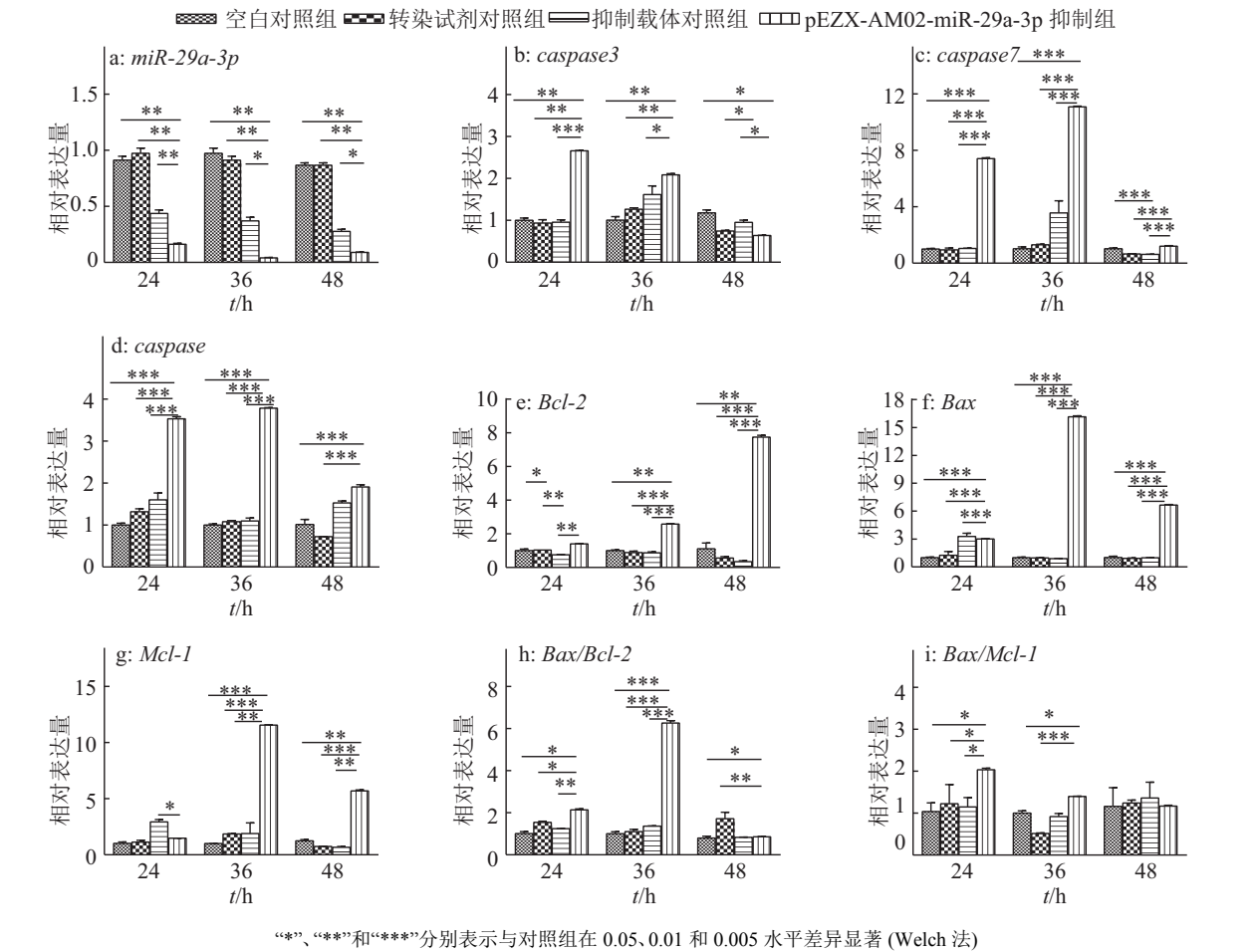
图 1 miRNA 抑制对照以及 pEZX-AM02-miR-29a-3p 转染 RAW264.7 细胞

Fig. 1 RAW264.7 cells tranfected with miRNA inhibitor control or pEZX-AM02-miR-29a-3p

2.2 *miR-29a-3p* 与靶基因的表达

转染 24、36 和 48 h 不同处理组凋亡相关基因的表达见图 2。与空白对照组、转染试剂对照组及抑制载体对照组相比, 转染 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 载体后, *miR-29a-3p* 表达量降低, 24、36 和 48 h 表达量分别为 0.16 ± 0.01 、 0.04 ± 0.01 和 0.09 ± 0.01 。与空白对照组、转染试剂对照组及抑制载体对照组相比, pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *miR-29a-3p* 的靶基因 *caspase3*、*caspase7*、*caspase8*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 等都随着转染时间的延长, 发生了不同程度的变化且差异显著。与其他各对照组相比, 转染 24、36 h 时 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *caspase3* 相对表达量升高, 48 h 相对表达量降低, 24、36 和 48 h 的相对表达量分别为 2.66 ± 0.02 、 2.09 ± 0.05 和 0.64 ± 0.01 。与其他各对照组相比, 转染 24、36 和 48 h 时 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *caspase7* 相对表达量升高, 24、36 和 48 h 分别为 7.41 ± 0.10 、 11.08 ± 0.08 和 1.20 ± 0.06 。与其他各对照组相比, 转染 24、36 h 时 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *caspase8* 相对表达量升高, 转染 48 h 时, 与转染试剂对照组及抑制载体对照组相

比 *caspase8* 相对表达量升高, *caspase8* 在转染 24、36 和 48 h 的相对表达量分别为 3.53 ± 0.08 、 3.78 ± 0.03 和 1.91 ± 0.09 。与其他各对照组相比, 在转染 36、48 h 时 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *Bcl-2* 相对表达量升高, 在转染 24 h 时与抑制载体对照组相比 *Bcl-2* 相对表达量升高, 24、36 和 48 h 的相对表达量分别为 1.41 ± 0.02 、 2.58 ± 0.05 和 7.75 ± 0.19 。与空白对照组、转染试剂对照组相比, 转染 24 h 时 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *Bax* 相对表达量升高; 与其他各对照组相比, 在转染 36、48 h 时 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *Bax* 相对表达量升高, 24、36 和 48 h 的相对表达量分别为 3.00 ± 0.08 、 16.15 ± 0.17 和 6.65 ± 0.14 。在转染 24 h 时, 与抑制载体对照组相比, pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *Mcl-1* 相对表达量降低, 与空白对照组、转染试剂对照组相比 *Mcl-1* 相对表达量不变; 与其他各对照组相比, 在转染 36、48 h 时 pEZX-AM02-*miR-29a-3p* 抑制载体组中 *Mcl-1* 相对表达量升高, 24、36 和 48 h 的相对表达量分别为 1.48 ± 0.01 、 11.55 ± 0.08 和 5.69 ± 0.14 。与空白对照组、抑制载体对照组相比, 转染 24 h 时 pEZ-



“*”、“**”和“***”分别表示与对照组在 0.05、0.01 和 0.005 水平差异显著 (Welch 法)

图 2 不同处理组凋亡相关基因 24、36 和 48 h 的表达

Fig. 2 The expression of genes related to apoptosis in different groups at 24, 36 and 48 h after transfection

<http://xuebao.scau.edu.cn>

AM02-miR-29a-3p 抑制载体组中 *Bax/Bcl-2* 相对表达量升高, 在转染 36 h 时与其他各对照组相比相对表达量升高, 在转染 48 h 时与转染试剂对照组相比相对表达量降低, 与空白对照组、抑制载体对照组相比相对表达量不变, 24、36 和 48 h 的相对表达量分别为 2.13 ± 0.08 、 6.26 ± 0.20 和 0.86 ± 0.03 。在转染 24 h 时 pEZ-AM02-miR-29a-3p 抑制载体组中 *Bax/Mcl-1* 相对表达量较其他各对照组高, 在转染 48 h 时 *Bax/Mcl-1* 相对表达量与其他各对照组相近, 24、36、48 h 的相对表达量分别为 2.03 ± 0.06 、 1.40 ± 0.02 和 1.17 ± 0.03 。转染后 24~48 h, pEZ-AM02-miR-29a-3p 抑制载体组中 *caspase7*、*caspase8*、*Bax*、*Mcl-1* 及 *Bax/Bcl-2* 相对表达量均呈

现先升高后降低的趋势, 36 h 达到最高水平。在巨噬细胞中抑制 *miR-29a-3p* 表达后, *miR-29a-3p* 可通过靶向提高 *caspase7*、*caspase8*、*Bax*、*Mcl-1* 等基因的相对表达量来调控细胞凋亡水平。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

凋亡早期变化在细胞膜表面, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 由膜内暴露在外表面, Annexin V 可以结合到 PS。由流式分析图 (图 3) 及数据分析图 (图 4) 可知, 检测 pEZ-AM02-miR-29a-3p 载体转染 RAW264.7 细胞后得出 Annexin V 与 PS 结合增强, PS 暴露增加, 凋亡率升高, 且 24、36 和 48 h 细胞凋亡率分别为 $23.47\%\pm2.06\%$ 、 $76.47\%\pm5.26\%$ 和 $51.90\%\pm1.01\%$, 均比阴性抑制载体对照组凋亡率高

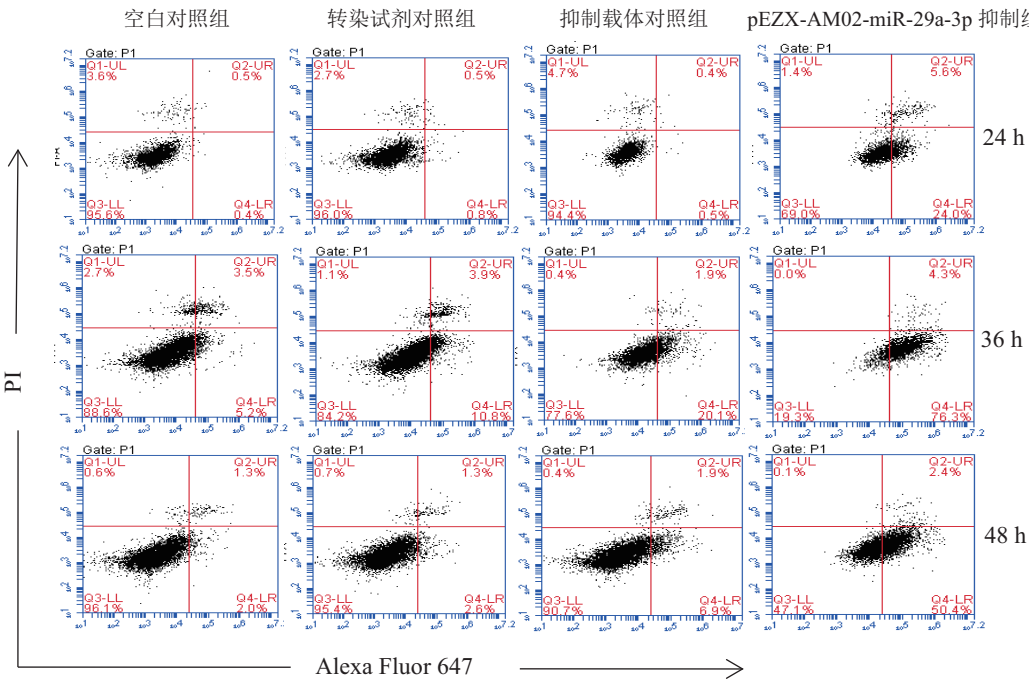


图 3 流式细胞术检测巨噬细胞凋亡
Fig. 3 Macrophages apoptosis detected by flow cytometry

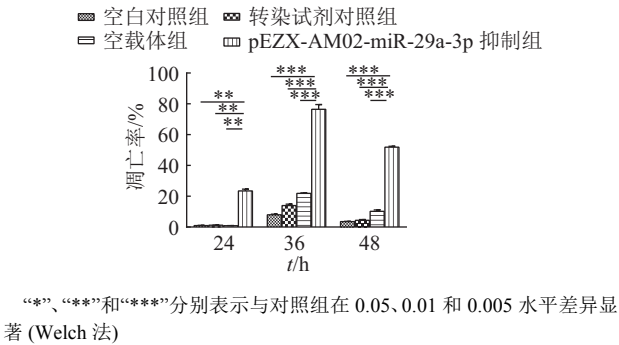


图 4 巨噬细胞凋亡率
Fig. 4 Macrophages apoptosis rate

且差异极显著 ($P<0.01$)。其中 pEZ-AM02-miR-29a-3p 载体转染 RAW264.7 后 36 h 的凋亡率为最高。

3 讨论与结论

本试验中 pEZ-AM02-miR-29a-3p 抑制载体转染 RAW264.7 细胞后, 于转染 24、36 和 48 h 后荧光定量 PCR 检测发现抑制小鼠巨噬细胞中 *miR-29a-3p* 的表达, 且 36 h 时 *miR-29a-3p* 表达量最低, 与之对应, 流式细胞术检测到细胞凋亡率升高, 且 36 h 时细胞凋亡率最高, 为促凋亡作用。另外 *miR-29a-3p* 的靶基因中促凋亡基因 *caspase3*、*caspase7*、*caspase8* 及凋亡关键基因 *Bax* 表达量出现不同程度的升高。虽然其中抑凋亡基因 *Bcl-2* 与 *Mcl-1* 也检测到升高, 但是这 2 个基因是通过与 *Bcl-2* 家族的促凋亡基因相互作用而影响着凋亡作用的。

Bax/Mcl-1 与 *Bax/Bcl-2* 表达量变化也相对升高, 且 *Bax/Bcl-2* 表达量变化趋势与流式细胞术结果一致, 为促凋亡作用, 且 36 h 促凋亡作用最强。caspase 酶是半胱氨酸天冬氨酸酶, 与细胞凋亡密切相关, 其中 *caspase8* 为启动者, *caspase3*、*caspase7* 为执行者。它们能够调节细胞的生长、发育和免疫应答, 尤其是一些不正常细胞的凋亡。MTB 侵入巨噬细胞后, 会引起 caspase 酶活化, 同时也会引起其他部分基因发生变化。不同毒力的 MTB 感染巨噬细胞后, 引起细胞凋亡的程度会不同。毒力株主要以 TNF- α 和 caspase 酶等通路抑制细胞凋亡。结核分枝杆菌毒力株感染巨噬细胞后, 可通过 *Mcl-1* 和 *Bcl-2* 家族的促凋亡基因结合, 从而抑制 *Bcl-2* 家族促凋亡基因活性, 抑制细胞凋亡, 使 MTB 存活。MTB 感染巨噬细胞以后, *Bcl-2* 和 *Bax* 会大量表达, *Bcl-2* 和 *Bax* 两者的比例会影响凋亡结果, *Bcl-2* 的表达量高会利于细胞存活, 而 *Bax* 表达量高则会促进凋亡, 另外 *Mcl-1* 能够抑制部分的促凋亡基因表达, 如 *Bak* 和 *Bax*, 从而抑制巨噬细胞凋亡^[11-14]。Sharbati 等^[10]用鸟型分枝杆菌亚种感染人源单核细胞巨噬细胞后 *miR-29a-3p* 表达量上升, *caspase3*、*caspase7* 等表达下调, 马烽^[15]发现 *miR-29a-3p* 可以通过靶向抑制 IFN- γ 的表达影响并控制细胞受到细菌感染的免疫反应。

结核分枝杆菌作为结核病的致病菌, 其本身的存活与宿主免疫反应息息相关, 而研究证实 miRNAs 参与了结核分枝杆菌通过多种机制逃逸巨噬细胞的免疫杀伤, 如抑制巨噬细胞凋亡、抑制溶酶体水解酶降解酸化、抑制吞噬体成熟、干扰抗原呈递、避免反应氧和反应氮产物的毒性反应、抑制自噬等, 使 MTB 在体内复制^[16-17]。其中巨噬细胞的凋亡作用可以有效控制 MTB 的散播及生长, 对 MTB 的清除具有重要意义。而 miRNA 可通过靶向关键基因, 调控凋亡或信号转导的过程, 进而影响宿主细胞对 MTB 的清除。本试验为阐述 *miR-29a-3p* 在 MTB 感染巨噬细胞过程中的作用提供了一定的试验依据, 也为靶向调控治疗结核病、筛选新的结核病诊断标志物奠定了一定的理论基础。

本研究表明, pEZX-AM02-miR-29a-3p 载体抑制小鼠巨噬细胞中 *miR-29a-3p* 的表达; 抑制 *miR-29a-3p* 表达可通过靶向上调 *caspase7*、*caspase8*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 等基因的表达促进巨噬细胞的凋亡。

参考文献:

[1] GRIFFITHS-JONES S, GROCOCK R J, VAN DON-GEN S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: <http://xuebao.scau.edu.cn>

140-144.

[2] O'CONNELL R M, RAO D S, CHAUDHURI A A, et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(2): 111-22.

[3] FENTON M J, VERMEULEN M W. Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes [J]. Infect Immun, 1996, 64(3): 683-690.

[4] AUGENSTREICH J, ARBUES A, SIMEONE R, et al. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis[J]. Cell Microbiol, 2017, 19(7): e12726.

[5] GUPTA A, KAUL A, TSOLAKI A G, et al. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation[J]. Immunobiology, 2012, 217(3): 363-374.

[6] LIU M, WU L, XIANG X, et al. *Mycobacterium tuberculosis*, effectors interfering host apoptosis signaling[J]. Apoptosis, 2015, 20(7): 883-891.

[7] 包孟, 付玉荣, 伊正君. 微小 RNA 在机体抗结核免疫及结核诊断中的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(12): 918-921.

[8] DAS K, SAIKOLAPPAN S, DHANDAYUTHAPANI S. Differential expression of miRNAs by macrophages infected with virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Tuberculosis, 2013, 93(Suppl): 47-50.

[9] 李金妹. 不同分枝杆菌侵染对巨噬细胞免疫相关基因及 microRNAs 表达的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.

[10] SHARBATI J, LEWIN A, KUTZLOHROFF B, et al. Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis infection[J]. Plos One, 2011, 6(6): e20258.

[11] 董伟杰, 李微, 刘丹霞, 等. 不同毒力结核分枝杆菌感染对巨噬细胞 *caspase-3* 及 *Bcl-2* 表达的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2013(4): 302-306.

[12] SLY L M, HINGLEYWILSON S M, REINER N E, et al. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic *Bcl-2* family member *Mcl-1*[J]. J Immunol, 2003, 170(1): 430-437.

[13] KOZIEL J, MACIAGGUDOWSKAN A, MIKOLAJCZYK T, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors[J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5210.

[14] 刘云霞, 张万江. 结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012(6): 617-622.

[15] 马烽. microRNA 介导的 IL-10 与 IFN- γ 表达的转录后调控机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.

[16] 杨静, 董剑. miRNA 与结核分枝杆菌感染的研究进展[J]. 重庆医学, 2015(8): 1132-1134.

[17] RAJARAM M V, NI B, DODD C E, et al. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis[J]. Semin Immunol, 2014, 26(6): 471-485.