

miR-448 对支气管上皮细胞微环境调控的实验研究

张艺

(咸宁市中心医院 湖北科技学院附属第一医院 湖北咸宁 437000)

【摘要】基于支气管上皮细胞在气道微环境中的核心作用,对miR-448在巨噬细胞外泌体介导的炎症信号传递过程进行了研究。通过CSE刺激建立体外模型,提取外泌体并检测miR-448表达水平,阐述其对上皮细胞增殖、迁移及炎症因子分泌的影响。结合qPCR、WB、ELISA及双荧光素酶实验,介绍了miR-448与TLR4/MyD88/NF- κ B信号及IRF8靶点之间的关系。研究表明,miR-448可通过上调炎症通路并抑制IRF8表达重塑上皮细胞微环境,为气道慢性炎症的分子机制解析提供了新的证据。

【关键词】miR-448; 支气管上皮细胞; 外泌体; 炎症因子

Experimental study on miR-448 regulation of the microenvironment of bronchial epithelial cells

Zhang Yi

(Xianning Central Hospital, Hubei University of Science and Technology Affiliated First Hospital, Xianning, Hubei 437000)

[Abstract] Based on the core role of bronchial epithelial cells in the airway microenvironment, the inflammatory signaling process mediated by miR-448 in macrophage exosomes was studied. Establish an in vitro model through CSE stimulation, extract extracellular vesicles, and detect the expression level of miR-448 to elucidate its effects on epithelial cell proliferation, migration, and secretion of inflammatory factors. The relationship between miR-448 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling and IRF8 targets was introduced through qPCR, WB, ELISA, and dual luciferase assays. The research results indicate that miR-448 can reshape the epithelial cell microenvironment by upregulating the inflammatory pathway and inhibiting IRF8 expression, providing new evidence for the molecular mechanism analysis of chronic airway inflammation.

[Key words] miR-448; Bronchial epithelial cells; Extracellular vesicles; inflammatory factors

引言

支气管上皮细胞在炎症反应和组织修复中具有关键作用,其微环境稳定性直接影响慢性气道疾病发展。miRNA在炎症调控中的作用受到关注,其中miR-448在免疫细胞分泌及炎症信号中的功能尚缺乏研究。本研究围绕miR-448在巨噬细胞外泌体介导的信号传递作用,结合CSE模型与分子实验,揭示其对支气管上皮细胞微环境的调控机制,并通过信号通路和靶基因验证阐明其在炎症反应中的特征,为气道疾病分子干预提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

BEAS-2B 支气管上皮细胞、人源肺泡巨噬细胞及 HEK-293T 细胞购自国家细胞资源库,采用 RPMI-1640 或 DMEM 培养基,含 10%胎牛血清及 1%青链霉素。miR-448 模拟物与抑制物由 GenePharma 合成,转染用 Lipofectamine3000。ELISA 用于检测 IL-6、TNF- α , qPCR 试剂购自 Takara。抗体包括 CD9、CD63、CD81、TLR4、MyD88、

NF- κ B、IRF8。细胞在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中维持,实验前检测无支原体污染^[1]。

1.2 CSE 制备与处理

CSE 以标准方法开展制备,真空泵把市售香烟主流烟雾抽进无血清的培养基,体积比比 1: 10。所得溶液经 0.22 μ m 滤膜过滤,测定吸光度保证浓度一致,制备之后 30 分钟内应用,巨噬细胞和 BEAS-2B 细胞分别被暴露于不同的浓度梯度,以开展外泌体分离及功能实验。

1.3 外泌体提取与鉴定

细胞培养液先以 300g 离心 10 分钟除去死细胞,再以 2000g 离心 20 分钟除去碎片,最后以 10000g 离心 30 分钟除去大颗粒,上清液用 120000g 进行超速离心 70 分钟来沉淀外泌体。经 PBS 重悬后再次开展超速离心,把悬液置于-80 $^{\circ}$ C 存放,采用透射电镜观察其形态,纳米颗粒跟踪分析检测粒径, WB 检测 CD9、CD63、CD81 作为标志物,通过重复实验验证提取纯度跟稳定性。

1.4 分子生物学检测方法

总 RNA 用 Trizol 法提取,miRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。qPCR 检测 miR-448、IRF8 及炎症因子,内参为 U6 或 β -actin。蛋白经 RIPA 裂解提取,BCA 定量,SDS-PAGE

分离转膜，孵育一抗和 HRP 二抗，ECL 显影^[2]。ELISA 检测 IL-6、TNF- α 。CCK-8 检测细胞增殖，Transwell 检测迁移，双荧光素酶实验在 HEK-293T 细胞中进行。

1.5 统计学处理

实验均再次重复了三次，数据用均值与标准差加减的形式呈现，两组对比运用双尾 Student' s t 检验，针对多组比较，采用单因素方差分析后进行 Tukey 事后检验，正态性及方差齐性经 Shapiro - Wilk 和 Levene 检验得以验证，采用 GraphPad Prism9.0 进行统计学分析，把显著性水平设成 P<0.05，全部数据均留存原始资料，经两人核对，保证结果的可靠与可重复^[3]。

2 结果分析

2.1 miR-448 在巨噬细胞外泌体中的表达变化

为明确 CSE 刺激对巨噬细胞外泌体 miR-448 表达的影响，分别收集对照组及不同浓度 CSE 处理（1%、5%、10%）24h 后培养上清，通过超速离心提取外泌体并进行 qPCR 检测。miRNA 相对表达量计算采用公式： $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{U6})_{实验组} - (Ct_{target} - Ct_{U6})_{对照组}$ 。结果显示，随着 CSE 浓度增加，miR-448 在外泌体中的水平呈浓度依赖性升高，5%及 10%组差异显著（P<0.05）。为保证可靠性，实验均重复三次并取平均值。具体检测结果见表 1。

表 1 CSE 刺激对巨噬细胞外泌体 miR-448 表达水平的影响（均值 \pm SD，n=3）

组别	ΔCt 值 (miR-448 - U6)	$\Delta \Delta Ct$ 值	相对表达量 ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
对照组	5.12 \pm 0.21	0	1.00 \pm 0.00
1%CSE 组	4.87 \pm 0.18	-0.25	1.19 \pm 0.06
5%CSE 组	4.35 \pm 0.20	-0.77	1.71 \pm 0.09*
10%CSE 组	3.92 \pm 0.16	-1.2	2.29 \pm 0.12*

注：*P<0.05 vs 对照组

表 1 结果表明，CSE 可显著诱导巨噬细胞外泌体 miR-448 的表达上调，且在较高浓度下效应更为显著。这提示 miR-448 可能作为 CSE 介导巨噬细胞与支气管上皮细胞间信号传递的重要分子，为后续机制验证提供依据。

2.2 miR-448 对支气管上皮细胞增殖与迁移的影响

为明确 miR-448 对支气管上皮细胞功能的影响，分别

转染 mimic 与 inhibitor 至 BEAS-2B 细胞，设对照组。CCK-8 检测 72h 内细胞活力，克隆形成实验评估增殖，Transwell 实验观察迁移。结果显示，mimic 组在 24h、48h、72h 细胞活力增强，克隆数增加，inhibitor 组下降。迁移实验中，mimic 组迁移细胞数增多，inhibitor 组减少（P<0.05）。实验结果见表 2 及图 1。

表 2 miR-448 对 BEAS-2B 细胞增殖与迁移的影响

组别	24h 细胞活力 (OD450)	48h 细胞活力 (OD450)	72h 细胞活力 (OD450)	克隆数 (个/视野)	迁移细胞数 (个/视野)
对照组	0.42 \pm 0.03	0.68 \pm 0.04	0.91 \pm 0.05	52 \pm 6	84 \pm 7
mimic 组	0.51 \pm 0.04*	0.83 \pm 0.05*	1.12 \pm 0.06*	79 \pm 8*	126 \pm 10*
inhibitor 组	0.36 \pm 0.02*	0.55 \pm 0.03*	0.74 \pm 0.04*	34 \pm 5*	59 \pm 6*

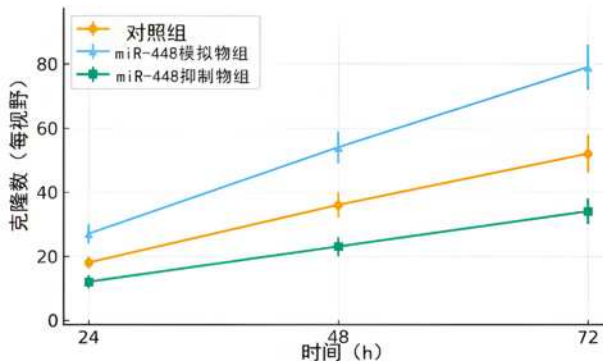


图 1 克隆形成曲线图

表 2 与图 1 结果表明，miR-448 在支气管上皮细胞中可显著促进增殖及迁移功能，抑制其表达则产生相反效应，提示 miR-448 可能通过微环境调控加速上皮细胞修复或炎症扩展过程。

2.3 miR-448 对炎症因子表达的调控作用

为探讨 miR-448 在炎症因子调控中的作用，分别转染 mimic 与 inhibitor 至 BEAS-2B 细胞，设对照组。24h 后收集上清，ELISA 检测 IL-6 与 TNF- α ，qPCR 验证 mRNA 水平。结果显示，mimic 组 IL-6 与 TNF- α 显著升高，inhibitor 组下降（P<0.05），与 mRNA 趋势一致。具体结果见表 3。

表3 miR-448对BEAS-2B细胞炎症因子表达水平的影响

组别	IL-6 浓度 (pg/mL)	TNF-α 浓度 (pg/mL)	IL-6 mRNA 相对表达量	TNF-α mRNA 相对表达量
对照组	145.2 ± 12.6	102.7 ± 9.8	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
mimic 组	212.5 ± 15.4*	156.3 ± 11.2*	1.68 ± 0.12*	1.53 ± 0.10*
inhibitor 组	97.6 ± 8.7*	71.4 ± 7.2*	0.62 ± 0.05*	0.58 ± 0.06*

表3结果表明,miR-448在支气管上皮细胞中能够显著调控炎症因子表达,过表达时IL-6与TNF-α均上调,抑制时则下调,提示miR-448在炎症反应放大与微环境稳态重塑中发挥关键作用。

2.4 miR-448作用的信号通路机制验证

为验证miR-448在炎症反应中的作用机制,检测转染

mimic与inhibitor后的BEAS-2B细胞中TLR4/MyD88/NF-κB蛋白表达,并结合双荧光素酶实验分析其与IRF8的关系。WB结果显示,mimic组TLR4、MyD88及p-NF-κB升高,inhibitor组下降(P<0.05)。双荧光素酶实验表明miR-448可结合IRF8 3' UTR并下调其转录活性。结果见表4,示意图见图2。

表4 miR-448对TLR4/MyD88/NF-κB信号通路关键蛋白表达的影响

组别	TLR4 相对表达量	MyD88 相对表达量	p-NF-κB 相对表达量	IRF8 荧光素酶活性 (相对比值)
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
mimic 组	1.72 ± 0.14*	1.65 ± 0.12*	1.83 ± 0.15*	0.58 ± 0.07*
inhibitor 组	0.63 ± 0.06*	0.59 ± 0.05*	0.66 ± 0.07*	1.41 ± 0.10*

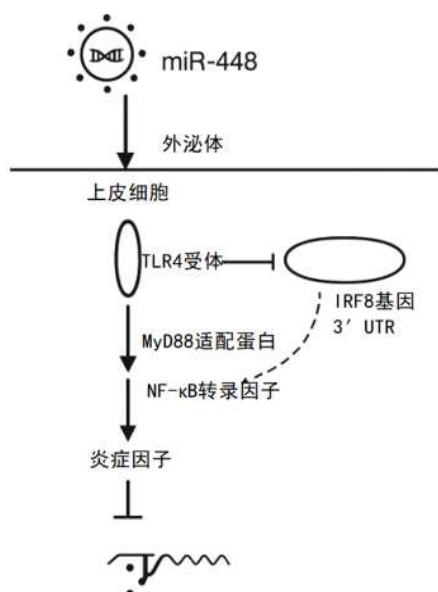


图2 信号通路示意图

靶向抑制IRF8表达,从而形成“外泌体miR-448—TLR4/MyD88/NF-κB—IRF8”调控轴。图2可知,miR-448通过外泌体进入上皮细胞后,上调TLR4/MyD88/NF-κB信号,同时结合IRF8 3' UTR抑制其转录,最终影响炎症因子表达。

3.结语

miR-448在支气管上皮细胞微环境中的作用呈现为借助外泌体传递,极大影响炎症因子水平、细胞增殖与迁移能力,并将TLR4/MyD88/NF-κB通路及IRF8靶向抑制作为核心机制,建立完整的调控链条,该结果给阐明气道慢性炎症的分子基础提供了证据,也表明miR-448存在潜在的诊断治疗意义。未来有必要在动物模型与临床样本中进一步证实其功能特点,并探索与其余信号通路的相互作用机制,以推动针对性干预策略的出台。

表4结果表明,miR-448在BEAS-2B细胞中通过增强TLR4/MyD88/NF-κB通路激活,促进炎症反应,同时直接

参考文献:

[1]余宏伟,张一斌,杨如妃,等.miR-448对肺腺癌A549细胞的放疗增敏作用及其机制[J].山东医药,2024,64(26):5-9+21.
 [2]王梅,谭金枚.circPRKCI靶向miR-448对高脂高糖诱导胰岛β细胞损伤的影响[J].河北医药,2023,45(20):3045-3049+3055.
 [3]裴正浩,王耿泽,景小松.miR-448/RTN4轴调控结肠癌细胞对5-氟尿嘧啶耐药性的机制研究[J].实用癌症杂志,2023,38(09):1403-1409.

项目名称:miR-448通过TLR4/MyD88信号通路调控COPD支气管上皮细胞微环境的机制研究。