



河北大学
HEBEI UNIVERSITY

密 级:

分 类 号:

学校代码: 10075

学 号: 20218027027

硕士学位论文

miR-128-1-5p 靶向 EGR3 调控 I 型超敏 反应研究

学位申请人: 张晗

指导教师: 刘中成 教授

学位类别: 理学硕士

学科专业: 微生物与生化药学

院系名称: 药学院

答辩日期: 二〇二四年五月

Classified Index:

CODE: 10075

U.D.C.:

No. 20218027027

Thesis for the Degree of Master

Research on miR-128-1-5p Targeting EGR3 to Regulate Type I Hypersensitivity

Candidate: Zhang Han

Supervisor: Prof. Liu Zhongcheng

Category of Academic Degree: Master of Science

Specialty: Microbiology and Biochemical Pharmacy

College: College of Pharmaceutical Sciences

Date of Oral Defense: May, 2024

摘 要

I 型超敏反应是一种常见的超敏反应，发病机制主要为 IgE 与肥大细胞表面的高亲和力受体 FcεRI 结合，诱导肥大细胞脱颗粒释放炎症介质。I 型超敏反应相关的治疗药物大多用于预防与控制症状，并不能够治愈疾病。miRNA 是一类参与多种生理活动的微小 RNA，可以对其靶向的 mRNA 编码蛋白过程起到负调控作用，目前已成为研究疾病发病机制与药物研发的热点。本研究对 IgE 诱导 I 型超敏反应细胞进行全转录组测序，筛选到 miR-128-1-5p 及其靶基因 EGR3，以 RBL-2H3 细胞与哮喘小鼠模型作为体外与体内实验对象，研究了 miR-128-1-5p 对 I 型超敏反应的调控作用与分子机制。主要研究内容如下：

第一部分：筛选 I 型超敏反应相关 miRNA。对 IgE 诱导 I 型超敏反应后的 RBL-2H3 细胞进行全转录组测序分析，获得了 DEmiRNA-DEmRNA 调控网络，从调控网络中选择差异下调最显著的 miR-128-1-5p，以及其靶基因 EGR3 作为研究对象。通过 qRT-PCR 对其表达水平进行验证。

第二部分：抑制/过表达 miR-128-1-5p 对 I 型超敏反应的调控作用及机制。本实验通过设计 miRNA 模拟物（mimics）与抑制剂（inhibitor）对 miR-128-1-5p 进行过表达与抑制。通过检测细胞形态、β-氨基己糖苷酶（β-Hex）与组胺释放量以及细胞凋亡情况，评价 miR-128-1-5p 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒水平调控作用。结果显示，过表达 miR-128-1-5p 后可以抑制 IgE 诱导细胞形态变化、减少 β-Hex 与组胺释放、减轻细胞凋亡。抑制 miR-128-1-5p 与过表达 miR-128-1-5p 结果相反，显著增加 RBL-2H3 细胞脱颗粒程度。

第三部分：miR-128-1-5p 靶向 EGR3 基因调控 I 型超敏反应。通过 miranda、miRWalk 与 targetscan 数据库筛选出 miR-128-1-5p 的靶基因，qRT-PCR 与 Western blot 检测结果显示，miR-128-1-5p 可负调控 EGR3 表达；双荧光素酶报告实验表明二者具有靶向关系。利用 siRNA 敲低 EGR3 基因，同时对 miR-128-1-5p 进行过表达或抑制，检测细胞脱颗粒程度。结果显示，在敲低 EGR3 的情况下，过表达 miR-128-1-5p 后对细胞脱颗粒水平有进一步改善，抑制 miR-128-1-5p 后则不会加剧细胞脱颗粒程度。并且过表达 miR-128-1-5p 后可以降低 IgE-FcεRI 下游信号分子 ERK 与 AKT 的磷酸化程度。

结果表明，miR-128-1-5p 通过靶向 EGR3 基因达到调控 I 型超敏反应的作用。

第四部分：miR-128-1-5p 在体内对 I 型超敏反应的抑制作用。使用腹腔注射 OVA 致敏小鼠，雾化吸入 OVA 激发的方法建立小鼠哮喘模型。对 mimics 进行化学结构修饰合成 agomir，通过滴鼻给药达到 miR-128-1-5p 在体内过表达作用，使用 11R-VIVIT-TFA 阻断 EGR3 信号通路，抑制 EGR3 基因表达。同时，使用地塞米松作为阳性对照药物。通过检测血清与肺泡灌洗液（BALF）中相关细胞因子水平、BALF 中细胞分类变化以及肺组织相关 RNA 与蛋白表达等指标，并结合 HE 与 Masson 染色检测肺组织病理学变化情况，综合分析 miR-128-1-5p 对小鼠哮喘的治疗作用。结果表明，miR-128-1-5p 可以降低细胞因子水平、粒细胞数量、肺组织病变程度以及纤维化面积，在体内过表达后仍可以对 EGR3 起到负调控作用。过表达 miR-128-1-5p 对小鼠哮喘具有显著的治疗效果。

综上所述，本研究通过全转录组测序筛选到 I 型超敏反应相关 miR-128-1-5p，体内、体外实验表明该 miRNA 可靶向 EGR3，调控 ERK 与 AKT 信号通路，达到抑制 I 型超敏反应的作用。实验结果首次验证了 miR-128-1-5p 对 I 型超敏反应具有调控作用，为探索该反应发病机制及深入研究 miR-128-1-5p 功能提供了实验依据。

关键词 I 型超敏反应 miR-128-1-5p EGR3

Abstract

Type I hypersensitivity is a common hypersensitivity reaction, its pathogenesis is that IgE binds to FcεRI, a high affinity receptor on the surface of mast cells, which induces mast cell degranulation to release inflammatory mediators. Most of the therapeutic drugs associated with type I hypersensitivity reactions are used to prevent and control symptoms and do not cure the disease. MiRNAs are a class of small RNAs involved in a variety of physiological activities that can negatively regulate the process of their targeted mRNA-encoded proteins. They have become a hotspot for the study of disease pathogenesis and drug development. In this study, we performed transcriptome sequencing of IgE-induced type I hypersensitivity cells. MiR-128-1-5p and its target gene EGR3 were screened. The role and molecular mechanism of miR-128-1-5p in the regulation of type I hypersensitivity reaction was investigated using RBL-2H3 cells and an asthma mouse model as in vitro and in vivo experimental subjects. The main research content is as follows:

Part I: Screening for type I hypersensitivity reaction related miRNAs. The DEmiRNA-DEmRNA regulatory network was obtained by transcriptome sequencing analysis of RBL-2H3 cells after IgE-induced type I hypersensitivity reaction. MiR-128-1-5p, which was differentially down-regulated with the largest multiplicity of down-regulation, was selected from the regulatory network, as well as its target gene, EGR3, as the object of study. Their expression levels were verified by qRT-PCR.

Part II: Regulatory effects and mechanisms of inhibition/overexpression of miR-128-1-5p on type I hypersensitivity reactions. In this experiment, miR-128-1-5p was overexpressed and inhibited by designing miRNA mimics and inhibitor. The role of miR-128-1-5p in regulating the level of degranulation of RBL-2H3 cells was evaluated by detecting cell morphology, β-aminohexosidase (β-Hex) and histamine release, and apoptosis. The results showed that overexpression of miR-128-1-5p inhibited IgE-induced cell morphology changes, reduced β-Hex and histamine release, attenuated apoptosis. Inhibition of miR-128-1-5p significantly increased the degree of degranulation in RBL-2H3 cells in contrast to overexpression of miR-128-1-5p.

Part III: MiR-128-1-5p targets EGR3 gene to regulate type I hypersensitivity. The target genes of miR-128-1-5p were screened by miranda, miRWalk and targetscan databases, and the

results of qRT-PCR and Western blot showed that miR-128-1-5p could negatively regulate the expression of EGR3, and the dual-luciferase reporter assay indicated that the two have a targeting relationship. The degree of cell degranulation was detected by knocking down the EGR3 gene using siRNA while overexpressing or inhibiting miR-128-1-5p. The results showed that overexpression of miR-128-1-5p further improved the level of cell degranulation when EGR3 was knocked down, while inhibition of miR-128-1-5p did not exacerbate the level of cell degranulation. Moreover, overexpression of miR-128-1-5p reduced the phosphorylation of IgE-FcεRI downstream signaling molecules ERK and AKT. The results suggest that miR-128-1-5p regulates type I hypersensitivity by targeting the EGR3 gene.

Part IV: MiR-128-1-5p Inhibits type I hypersensitivity in vivo. A mice asthma model was established using intraperitoneal injection of OVA-sensitized mice and nebulized inhalation of OVA-primed. Chemical structure modification of mimics was performed to synthesize agomir, which was administered by nasal drops to achieve the overexpression effect of miR-128-1-5p in vivo, and 11R-VIVIT-TFA was used to block the EGR3 signaling pathway and inhibit the expression of EGR3 gene. Meanwhile, dexamethasone was used as a positive control drug. The therapeutic effects of miR-128-1-5p on asthma in mice were comprehensively analyzed by detecting the levels of relevant cytokines in serum and alveolar lavage fluid (BALF), the changes of cell classification in BALF, the expression of relevant RNA and protein in lung tissues, as well as combining with HE and Masson staining to detect the changes in lung histopathology. The results showed that miR-128-1-5p could reduce cytokine levels, granulocyte number, lung tissue lesion degree, fibrotic area, and could still negatively regulate EGR3 after overexpression in vivo. Overexpression of miR-128-1-5p had a significant therapeutic effect on asthma in mice.

In summary, in this study, miR-128-1-5p related to type I hypersensitivity reaction was screened by transcriptome sequencing. The in vivo and in vitro experiments showed that this miRNA could target EGR3, modulate ERK and AKT signaling pathway, and inhibit type I hypersensitivity reaction. The experimental results verified for the first time that miR-128-1-5p has a regulatory effect on type I hypersensitivity reaction, which provides an experimental basis for exploring the pathogenesis of this reaction and in-depth research on the function of miR-128-1-5p.

Keywords Type I hypersensitivity reaction miR-128-1-5p EGR3

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 I 型超敏反应	1
1.1.1 I 型超敏反应的发生	1
1.1.2 I 型超敏反应相关药物	1
1.2 microRNA 的研究进展.....	1
1.2.1 全转录组测序.....	1
1.2.2 miRNA 的生物发生与作用机制	2
1.2.3 miRNA 对疾病的调控	3
1.2.4 miRNA 作为疾病生物标志物	5
1.2.5 miRNA 药物研发	5
1.3 EGR3 的研究进展.....	6
1.3.1 EGR3 与神经系统.....	7
1.3.2 EGR3 与癌症.....	8
1.3.3 EGR3 与自身免疫及炎症反应.....	8
1.3.4 EGR3 参与信号通路.....	9
1.4 研究意义.....	10
第二章 I 型超敏反应相关 MIRNA 筛选.....	12
2.1 实验试剂与仪器.....	12
2.1.1 实验材料.....	12
2.1.2 实验试剂.....	12
2.1.3 主要溶液配制.....	12
2.1.4 主要仪器设备.....	13
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 转录组测序.....	13
2.2.2 qRT-PCR	14
2.2.3 统计学分析.....	17
2.3 实验结果.....	17
2.3.1 测序数据质量控制.....	17
2.3.2 转录组数据分析.....	18
2.3.3 qRT-PCR 验证 miRNA 表达.....	23
2.4 讨论.....	24
第三章 MIR1281-5P 在体外调控 I 型超敏反应	26
3.1 实验试剂与仪器.....	26
3.1.1 实验材料.....	26

3.1.2 实验试剂.....	26
3.1.3 主要溶液配制.....	26
3.1.4 主要实验仪器.....	27
3.2 实验方法.....	27
3.2.1 qRT-PCR 检测 mimics 与 inhibitor 转染效率	27
3.2.2 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞形态的影响	28
3.2.3 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放 β -Hex 的影响	28
3.2.4 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放组胺的影响	29
3.2.5 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞凋亡的影响	29
3.2.6 统计学分析.....	29
3.3 实验结果.....	29
3.3.1 qRT-PCR 检测过表达与抑制 miR-128-1-5p 的效率	29
3.3.2 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞形态的影响	30
3.3.3 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放 β -Hex 的影响	31
3.3.4 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放组胺的影响	32
3.3.5 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞凋亡的影响	33
3.4 讨论.....	35
第四章 MiR-128-1-5p 靶向 EGR3 调控 I 型超敏反应.....	37
4.1 实验试剂与仪器.....	37
4.1.1 实验材料.....	37
4.1.2 实验试剂.....	37
4.1.3 主要溶液配置.....	38
4.1.4 主要实验仪器.....	39
4.1.5 Western Blot 抗体.....	39
4.2 实验方法.....	39
4.2.1 miR-128-1-5p 靶基因筛选.....	39
4.2.2 qRT-PCR 检测 mRNA 表达.....	39
4.2.3 qRT-PCR 检测过表达 miR-128-1-5p 后 mRNA 的表达	39
4.2.4 Western blot 检测过表达 miR-128-1-5p 后 EGR3 蛋白的表达	40

4.2.5 双荧光素酶报告基因验证 miR-128-1-5p 与 EGR3 的靶向关系	40
4.2.6 EGR3 siRNA 链的筛选.....	41
4.2.7 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞形态的影响	41
4.2.8 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放 β -Hex 的影响	42
4.2.9 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放组胺的影响	42
4.2.10 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞凋亡的影响	42
4.2.11 EGR3 参与的 KEGG 通路.....	42
4.2.12 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞后信号通路的影响	42
4.2.13 统计学分析.....	42
4.3 实验结果.....	43
4.3.1 miR-128-1-5p 靶基因筛选.....	43
4.3.2 qRT-PCR 检测过表达 miR-128-1-5p 后对 mRNA 表达的影响	44
4.3.3 Western blot 检测过表达 miR-128-1-5p 后对 EGR3 蛋白表达的影响	45
4.3.4 双荧光素酶报告基因验证 miR-128-1-5p 与 EGR3 的靶向关系	45
4.3.5 EGR3 siRNA 链的筛选.....	46
4.3.6 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞形态影响	48
4.3.7 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放 β -Hex 的影响	49
4.3.8 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放组胺的影响	49
4.3.9 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞凋亡的影响	50
4.3.10 EGR3 参与的 KEGG 通路	52
4.3.11 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导信号通路的影响.....	53
4.4 讨论.....	54
第五章 MiR-128-1-5p 在小鼠哮喘的治疗作用	59
5.1 实验试剂与仪器.....	59
5.1.1 实验材料.....	59

5.1.2 实验试剂.....	59
5.1.3 主要溶液配制.....	59
5.1.4 主要使用仪器.....	60
5.2 实验方法.....	60
5.2.1 OVA 诱导小鼠哮喘模型的建立	60
5.2.2 小鼠行为学观察.....	61
5.2.3 标本收集.....	61
5.2.4 白细胞分类计数.....	62
5.2.5 肺组织病理分析.....	62
5.2.6 ELISA 检测小鼠血清与 BALF 中细胞因子水平	62
5.2.7 qRT-PCR 检测肺组织中 miR-128-1-5p 与 EGR3 mRNA 表达	62
5.2.8 Western blot 检测肺组织中 EGR3 蛋白的表达	63
5.2.9 统计学分析.....	63
5.3 实验结果.....	63
5.3.1 小鼠行为学观察.....	63
5.3.2 BALF 中细胞分类计数	64
5.3.3 肺组织病理学结果.....	65
5.3.4 ELISA 检测结果	67
5.3.5 qRT-PCR 检测 miR-128-1-5p 与 EGR3 mRNA 表达.....	68
5.3.6 Western blot 检测 EGR3 蛋白表达	69
5.4 讨论.....	69
第六章 结论.....	73
参考文献.....	74

第一章 绪论

1.1 I型超敏反应

1.1.1 I型超敏反应的发生

超敏反应是抗原性物质进入机体产生特异性抗体，与再次进入的抗原结合导致的免疫应答，分为 I、II、III、IV 型超敏反应，其中临床最常见的是 I 型超敏反应^[1]。I 型超敏反应是免疫球蛋白 E（Immunoglobulin E，IgE）与肥大细胞或嗜碱性粒细胞等效应细胞释放组胺及炎症介质的过程，IgE 受体主要包括 FcεRI、FcεRII 以及 FcεRIII 三种类型，其中 IgE 与其高亲和力受体 FcεRI 结合是 I 型超敏反应最重要的环节之一。I 型超敏反应属于 II 型免疫反应，由辅助性 T 细胞 2（T helper 2 cell，Th2）对过敏原做出响应，促使 IgE 抗体的合成，随后 IgE 抗体与 FcεRI 结合，使细胞致敏，在随后遇到同源过敏原时被激发，促使肥大细胞释放多种炎症介质，包括组胺、蛋白酶类胰蛋白酶和糜酶、促炎脂质介质以及新合成的生长因子、细胞因子和趋化因子等^[2-5]。

1.1.2 I型超敏反应相关药物

目前临床用于治疗 I 型超敏反应的常用药物主要有糖皮质激素、抗组胺药、过敏反应介质阻释药、白三烯受体拮抗剂、免疫抑制剂等，这些药物仅能预防或改善 I 型超敏反应症状。2004 年，以 IgE-FcεRI 通路为靶点开发了靶向治疗药物奥马珠单抗，用于重度哮喘的治疗，后续人们以 IgE 为靶点还开发了抗 IgE 抗体、抗 FcεRI 抗体以及 IgE 分子类似物等多种药物^[6]，取得了良好的治疗效果，但仍不能完全治愈疾病。

1.2 microRNA 的研究进展

1.2.1 全转录组测序

转录组测序是一项可以检测组织或细胞中不同 RNA 表达量，发现新转录本的技术，转录组早期通常默认为 mRNA。随着全转录组测序技术的发展，相较于转录组测序增加了微小核糖核酸（microRNA，miRNA）、长链非编码 RNA（long noncoding RNA，lncRNA）和环状 RNA（circular RNA，circRNA）等非编码 RNA 的检测与鉴定。在基本的调控网络中，转录因子通过与基因的序列结合对其诱导或抑制，除蛋白质外，非编码 RNA 也可以从不同水平上对基因表达进行调控。miRNA 是在动物、植物和一些病

毒中发现的一类小非编码 RNA，它们对 mRNA 起到负调控作用^[7]。除了直接对 mRNA 调控外，mRNA、lncRNA、circRNA 和假基因等可以作为竞争性内源 RNA（competing endogenous RNA，ceRNA），通过 miRNA 应答元件竞争性结合同一个 miRNA，对彼此的表达水平与生物学功能进行调控。

1.2.2 miRNA 的生物发生与作用机制

自 1993 年在秀丽隐杆线虫中发现了第一个 miRNA 以来，目前在 miRBase 数据库中被注释到的成熟 miRNA 达到了 48860 个。一些具有单独启动子的 miRNA 基因可以自主转录为初级 RNA，称为 pri-miRNA，还有一些依靠其宿主基因中共同的启动子转录^[8]。大多数 miRNA 基因通过 RNA 聚合酶 II（RNA polymerase II，Pol II）被转录为包含一个或几个茎环结构的 pri-miRNA，在细胞核中被切割成为前体 miRNA（pre-miRNA），一个约 70 个核苷酸大小的茎环结构，随后通过输出蛋白 5（exportin 5，XPO5）和 Ras 相关核蛋白（Ras-related nuclear protein，RAN）输出到细胞质中^[9-11]。

在胞质中，Dicer 蛋白在靠近 pre-miRNA 茎环部分将其切割为小的双链 RNA。Argonaute（AGO）家族蛋白是一种在 RNA 沉默中起核心作用的蛋白，在 ATP 依赖性伴侣蛋白的辅助下，双链 miRNA 被装载到 AGO 蛋白中，当 AGO 蛋白恢复原始构象后，miRNA 双链中的客体链退出生成成熟的单链 miRNA^[9]。剩下的 miRNA 单链与 AGO 蛋白复合物即作为稳定的 RNA 诱导沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）发挥生物学作用，RISC 可以通过碱基配对的方式识别目标 mRNA^[12]。

miRNA 可以通过囊泡或蛋白-miRNA 复合物在细胞间进行传输。胞外的 miRNA 被包裹在囊泡中，与细胞表面受体结合，这些受体可能是四跨膜蛋白、抗原识别受体等，通过激活细胞内信号通路、膜融合或吞噬作用进入细胞质中，有选择性地靶向细胞内特定位置。大多数 miRNA 与核糖核蛋白 AGO 结合形成成熟单链 miRNA 调节 mRNA 水平。有研究发现，miRNA 还可以与低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）、高密度脂蛋白（high density lipoprotein，HDL）、核糖核蛋白等形成复合物。与 HDL 结合的 miRNA 可以通过 B 类 I 型清除受体进入细胞内调节基因表达^[13]。

在植物中，miRNA 通过精确的序列互补与 mRNA 靶标结合，从而导致 mRNA 的断裂^[14]。相反，在哺乳动物中则不需要与 mRNA 精确配对。据预测，在哺乳动物中，miRNA 可以控制 60% 以上的编码蛋白质基因的活性，并参与迄今为止所研究的几乎所

有细胞过程的调控^[15]。在动物中，miRNA 的 RISC 中 AGO 蛋白可以使 miRNA 免受降解，组织其与互补序列配对，促进在细胞内寻找与识别靶标^[16]。miRNA 种子序列与目标 mRNA 的 3' 非翻译区（3' untranslated region, 3'UTR）内的位点之间的碱基配对时，有一些 mRNA 中未配对的序列元件对靶向也有促进作用^[17]。当种子序列与 mRNA 3' UTR 区域完全互补配对时，AGO 蛋白可以直接切割 mRNA，使其特异性降解。不完全互补时，借助 miRNA 可与靶 mRNA 3'UTR 结合的特性，可以招募到特定的 mRNA，之后 AGO 蛋白中间结构域与含三核苷酸重复序列的适配子 6（trinucleotide repeat containing 6, TNRC6）结合，招募可以与 mRNA 的 7 甲基鸟嘌呤（N7-methylguanosine, m7G）帽子结合的蛋白质，抑制其翻译，或通过影响靶 mRNA 的脱腺嘌呤反应，使其多聚腺苷酸 A（polyA）尾缩短，导致 mRNA 与 polyA 结合蛋白结合受阻，影响蛋白质翻译的起始^[18]。

1.2.3 miRNA 对疾病的调控

miRNA 通过与多个靶基因相互作用参与许多重要生物过程，在心血管、癌症、过敏、神经系统、纤维化以及病毒感染等多种疾病的进展中起到关键的调控作用^[19-21]。

1.2.3.1 miRNA 与心血管疾病

miRNA 在心脏肥大、纤维化和心肌梗死等心血管疾病进展的不同方面发挥关键作用。在肌细胞纤维化过程中，miR-21 显著升高，导致心肌肥大^[22]。miR-143/145 家族可以靶向几种编码参与血管平滑肌细胞增殖和分化蛋白的 mRNA，在小鼠模型中下调导致高血压和心力衰竭^[23]。体外研究表明，miR-29 水平增加会诱导原代心肌细胞肥大，在体内敲低 miR-29 可以预防小鼠心脏压力过载，改善心脏相关疾病^[24]。

1.2.3.2 miRNA 与癌症

miRNA 在癌症中被分类为抑癌 miRNA 和致癌 miRNA，抑癌 miRNA 会在癌症中下调，致癌 miRNA 则会在癌症发生时上调，抑制其靶向的肿瘤抑制因子表达。miR-34a 是一种肿瘤抑制调控因子，在急性髓系白血病细胞中下调，导致其靶向的高迁移率族蛋白 B1（high mobility group box 1 protein, HMGB1）mRNA 和蛋白的表达升高，促进急性髓系白血病细胞凋亡^[25]。miR-155 在许多侵袭性癌症中表达上调，是一种致癌 miRNA，使其过表达后会抑制转化生长因子 β 受体 2（transforming Growth Factor- β ）的表达，促进胃癌细胞的增殖和迁移^[26]。

1.2.3.3 miRNA 与过敏性疾病

过敏性疾病中的 miRNA 也被广泛研究，在特应性皮炎、过敏性鼻炎与哮喘等 I 型超敏反应的发病机制中发挥了重要作用。

特应性皮炎（atopic dermatitis, AD）是一种复杂的慢性炎症性皮肤病，主要特征是 II 型炎症反应和 IgE 水平升高，角质形成细胞的激活在 AD 中也起着重要作用。miR-146a 通过靶向核因子 κ B（nuclear factor kappa-B, NF- κ B）通路的多个因子抑制角质形成细胞中的促炎趋化因子生成，miR-146a 缺陷小鼠在 AD 和牛皮癣模型中炎症反应都更强。研究表明，小鼠中 miR-146a 缺乏会导致 IgE 产生困难，表明 miR-146a 是小鼠产生 IgE 介导的免疫反应所必需的。然而，在患者的血清样本中观察到 miR-146a 与 IgE 水平呈负相关，可能在 IgE 升高的 AD 患者中，miR-146a 对 II 型炎症反应的影响有限^[27]。

过敏性鼻炎（rhinitis, AR）发病机制是吸入了过敏源导致的 IgE 与 Th2 升高与嗜酸性粒细胞浸润。miR-126 存在于多种组织器官的内皮细胞中，参与炎症与自身免疫的调节，与 AR 的严重程度呈正相关，不仅可以作为 AR 的生物标志物，还可以通过负调控 GATA 结合蛋白 3（GATA binding protein 3, GATA3）促进 Th2 对炎症介质的释放，加重气道炎症反应^[28, 29]。在对 AR 患者鼻粘膜的高通量测序中，构建出了一个 ceRNA 调控网络，能够富集到磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3 kinase-protein Kinase B, PI3K-AKT）与 Toll 样受体（Toll-like receptor, TLR）等与 AR 密切相关的信号通路^[30]。

哮喘是一种异质性的气道慢性疾病，与气道高反应性、支气管收缩、咳嗽、喘息等情况下的炎症有关。过敏性哮喘与过敏原特异性 IgE 水平升高有关，这种过敏原触发的免疫反应会导致 II 型细胞因子产生，嗜酸性粒细胞数量和 IgE 水平均增加。对于哮喘患者研究发现，患者肺功能参数与 miR-16 呈负相关，参与支气管平滑肌收缩的肾上腺素受体 B-2（adrenergic receptor beta 2, ADRB2）是 miR-16 的靶基因^[31]。对屋尘螨过敏性哮喘患儿血液中的 miRNA 靶点进行生物信息学分析，发现在 PI3K 和 NF- κ B 通路富集，表明 miRNA 通过这些信号途径在哮喘发病过程中起作用^[32]。

1.2.4 miRNA 作为疾病生物标志物

生物标志物是具有稳定性、敏感性与特异性的用于检测疾病的分子。miRNA 的水平变化与 II 型糖尿病、癌症、心血管等多种疾病相关，也会随生活方式的差异而变化，这表明 miRNA 不仅可以反映机体生理状态，还可以作为精准医学中靶向治疗的靶点与生物标志物^[13]。

miR-222 的水平变化可以反映胰岛素敏感性，miR-222 在胰岛素抵抗患者的脂肪细胞中显著升高，并且能够通过靶向雌激素受体蛋白调控葡萄糖的摄取^[33]，也会导致小鼠肝细胞中胰岛素抵抗^[34]。miR-223 是一种与胆固醇稳态相关的 miRNA，在动脉粥样硬化的患者与小鼠中可检测到 miR-223 水平升高，并且已经被证明可以通过调节血管平滑肌细胞的增殖与迁移来减少斑块形成^[35-37]。miR-146a、miR-155 已经被证明在过敏性疾病当中发挥重要作用。miR-146a 是一种免疫调节因子，在过敏性结膜炎与过敏性鼻炎中均检测到其水平下调^[38, 39]，可以通过抑制 NF- κ B 通路激活发挥抗炎作用。miR-155 则作为促炎因子发挥作用，使其高表达后增强了 miR-146a 敲除小鼠巨噬细胞中 NF- κ B 的活性，导致急性炎症反应^[40]。在过敏性疾病中，如过敏性哮喘、特应性皮炎，miR-155 水平升高，在促进 Th2 通路中发挥不可或缺的作用^[41, 42]。

一些 miRNA 作为生物标志物已经进入到临床试验中。miR-155 在非肌肉浸润性膀胱癌中表达显著升高，可以用于诊断与预后的预测（NCT03591367）^[43]。在血浆中也在探索可用于诊断卵巢癌与子宫内膜癌的 miRNA（NCT03776630）^[44]。除诊断外，miR-371a-3p 可用于评价放疗与药物对睾丸生殖细胞瘤的治疗作用（NCT05529251）^[45]。

1.2.5 miRNA 药物研发

miRNA 作为一种内源性物质参与机体众多机制的调控，目前已经有多种针对 miRNA 设计的药物进入临床试验阶段。第一个进入临床的药物是通过锁核酸（locked nucleic acid, LNA）技术设计的抑制 miR-122 的寡核苷酸 miravirsen，可用于治疗丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV），在已经结束的 II 期临床试验中，miravirsen 可以有效减少 HCV 的 RNA 水平，并且具有较高的耐药性^[46]。miR-155 在免疫当中起到关键作用，在多种淋巴癌中上调，利用 LNA 设计的 miR-155 抑制剂 cobomarsen，在 I 期临床

试验中显示出了对皮肤 T 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和成人 T 细胞白血病的治疗作用 (NCT02580552) [47, 48]。除了 miRNA 抑制剂, 还有一些用于增加 miRNA 水平的药物。EnGeneIC 公司开发的专利技术 EDVTM 通过基因工程将细菌分裂为纳米细胞, 表面连接可以靶向肿瘤的抗体, 细胞内包裹小分子抗肿瘤药物, 被肿瘤细胞吞噬后完成释药。TargomiRs 是将 miR-16 包裹在 EDV 纳米细胞中的一种抗癌药物, 其表面连接表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor, EGFR) 抗体, 静脉给药后可以下调 EGFR 导致癌细胞凋亡。但在已经完成的 I 期临床试验中效果并不显著, 并且出现了由于递送载体导致的不良反应 (NCT02369198) [49]。miR-29 可以负调控纤维化, 通过糖修饰与血小板衍生生长因子受体 β (platelet-derived growth factor beta receptor, PDGFBetaR) 特异性双环肽结合后的 miR-29 模拟物 remlarsen 被用于治疗瘢痕疙瘩病, 在临床试验中可以有效抑制皮肤伤口中胶原蛋白表达与纤维增生 (NCT02603224、NCT03601052), 作为治疗特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 药物已在大鼠与非人灵长类动物中评估了毒理学, 具有治疗人类 IPF 的潜力[50, 51]。目前还有一些正在进行的临床试验, 例如靶向 miR-17 的抑制剂用于治疗常染色体显性多囊肾病 (NCT05521191), 针对 miR-92a 的抑制剂 MGR-110 通过促血管生成来加速伤口愈合 (NCT03603431), 以及通过了治疗红斑性肢痛症孤儿药资格认证的 ATX01 等 (NCT05917912)。

miRNA 药物在临床试验中也有停止开发的失败案例。MRX34 是第一个作为 miRNA 的模拟物进入临床试验的, 可以通过脂质体纳米颗粒递送肿瘤抑制因子 miR-34 的模拟物控制肿瘤发展, 在一部分晚期癌症患者体内显示出抗肿瘤活性, 但是出现了 5 例与免疫反应相关的严重副作用, 并有 4 名患者因此死亡[52, 53]。通过对抗 miR-122 核酸进行修饰后治疗 HVC 的药物 RG-101 在 I 期临床中显示出了显著的治疗效果, 在 II 期临床试验中与其他抗病毒药连用的响应率达到了 100%, 但是对 miR-122 的靶基因进行分析, 发现其中包含 7 个高胆红素血症相关基因, 导致患者出现黄疸, 因此其临床试验被叫停[54, 55]。

1.3 EGR3 的研究进展

在本实验中通过转录组测序与 miRNA 的调控网络筛选到了早期生长反应因子 3 (early growth response 3, EGR3), EGR3 属于 EGR 家族。最初由有丝分裂刺激诱导后

被发现, 其编码基因定位于人染色体 8p21~23, 编码蛋白包含 387 个氨基酸, 调节着多种生物过程^[56]。EGR 家族包含一段由三个锌指序列组成的高度保守的 DNA 结合域, 可以通过与目标基因的启动子结合来调控其表达^[57]。EGR 家族有 EGR1、EGR2、EGR3 和 EGR4 四个成员, 不同成员序列间除了共同的 DNA 结合域以外, 其他部分同源性较小, 因此可以通过结合不同信号通路从而实现不同功能。目前对于家族中研究最多的是 EGR1, 不仅可以通过参与细胞的增殖、分化、侵袭、凋亡等生理过程从而调控癌症发展, 还可以作为第三信使, 放大胞外病理信号, 在心血管疾病、骨关节病、炎症性疾病、神经炎症疾病中发挥重要作用^[58, 59]。EGR2 是自身免疫疾病的调节因子, 对 EGR4 的研究则主要集中于雄性生育能力方面^[60-62]。EGR3 主要在神经元发育、自身免疫、肿瘤进展等过程中发挥作用。

1.3.1 EGR3 与神经系统

在对于突触可塑性与记忆功能相关转录因子的研究中, 大多集中在 EGR 家族当中, EGR1 在该方面的研究最为广泛, 已被作为学习过程中突触可塑性的标志物^[63]。作为一种转录因子, 许多实验也确定了 EGR3 可以调节 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)、A 型 γ 氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、活性调节细胞骨架 (activity regulated cytoskeleton, Arc) 相关基因、神经发育相关基因等参与轴突、树突发育, 对记忆、学习与神经可塑性均可产生影响^[64, 65]。研究发现, EGR3 敲除小鼠对刺激的反应性增强, 并在物体识别中发现了明显的短期记忆缺陷, 随后带来了长期记忆缺陷以及海马 CA1 区受损^[66]。低亲和力神经营养因子受体 p75 (neurotrophin receptor, NTR) 是一种多功能受体, 主要调控神经营养因子信号传导、轴突生长、少突胶质细胞和神经元存活, EGR3 可以直接与 p75NTR 基因启动子区域的 EGR 结合基序结合, 在小鼠体内缺乏 EGR3 的纺锤体中, p75NTR 的蛋白水平也有所下降, 这证明 p75NTR 是 EGR3 的生理靶标, 并可能由此调控神经营养蛋白受体信号传导^[67]。在交感神经系统发育中, EGR3 也起到至关重要的作用。EGR3 可以受到神经生长因子 (neurotrophic factor, NGF) 诱导, 对交感神经元中靶组织神经支配产生影响, 并且缺乏 EGR3 的小鼠交感神经靶组织神经支配异常现象与 NGF/Bax 双敲除 (dKO) 小鼠高度相似^[68, 69], 但仍然需要更多的遗传学方面研究来证明其在交感神经元内靶基因表达中的调控作用。

1.3.2 EGR3 与癌症

EGR3 可以直接或间接参与肿瘤的发展过程。在有研究发现,在发芽的 RTK 信号拮抗因子 1 (sprouty RTK signaling antagonist 1, Spry1) 启动子区域具有 EGR3 的结合位点,当 EGR3 表达下调同时也会抑制 Spry1 的表达,增强 T 细胞活性,从而增强免疫反应,抑制肿瘤生长进程^[70]。在裸鼠肝细胞癌模型中, EGR3 的异位表达可使 Fas 配体 (Fas ligand, FasL) 表达显著增加,从而引起促凋亡蛋白与细胞周期抑制剂表达升高,对肝细胞癌起到抑制作用^[71]。Arf-Egr-C/EBP β 通路 with 癌基因诱导细胞衰老相关,可响应 Ras 信号促进肿瘤发生、发展, EGR3 可以直接作用于通路中 C/EBP β 的启动子结合位点上,起到诱导作用,加快恶性肿瘤的发展进程^[72]。在关于雌激素与肿瘤微环境的研究中发现, EGR3 是雌激素受体 (estrogen receptor, ER) α 的下游效应基因,并且与乳腺癌侵袭相关,这表明雌激素诱导的 EGR3 可能作用于与乳腺癌侵袭、发展相关的信号通路^[73]。在之后的研究中发现 EGR3 还可以通过与下游细胞凋亡抑制基因 (myeloid cell leukemia-1, MCL1) 结合,促使其表达,从而抵抗他莫昔芬在乳腺癌中的耐药作用^[74]。在前列腺癌相关微阵列数据库中可以发现, EGR3 的 mRNA 与蛋白的表达量都有所升高,使用槲皮素-白藜芦醇有效抑制前列腺癌发生后, EGR3 在肿瘤组织中的水平显著降低。与前列腺癌密切相关的两种白细胞介素 IL-6 与 IL-8 也被进一步验证是 EGR3 的靶基因^[75-77],表明 EGR3 及其诱导的慢性炎症与前列腺癌的进展密切相关。

1.3.3 EGR3 与自身免疫及炎症反应

EGR2 与 EGR3 在免疫系统中作用相似,两者均为系统性自身免疫的重要调节因子,并且都是 FasL 表达的激活剂。FasL 通过响应 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 信号在 CD4⁺ T 细胞中上调,随后诱导细胞凋亡从而维持免疫稳态。在 T 细胞当中,活化的 T 细胞核内因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 诱导产生的 EGR2 与 EGR3 对 FasL 的表达起到关键作用^[78]。在对于 EGR2/EGR3 双敲除 (DKO) 小鼠的研究中发现, EGR2/3 DKO 小鼠出现了致命的全身免疫综合征,多个器官中出现淋巴细胞浸润,血清中炎症性细胞因子 IL-6、IL-17A、IL-17F 和 IFN- γ 水平升高,并产生了大量可以分泌 IL-17 和 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞^[79]。EGR3 还可以在 I 型干扰素的刺激下被招募到 II 型干扰素受体的启动子上使其下调,这可能与系统性红斑狼疮的发病机制相关^[80]。转化

生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 可以诱导 B 细胞凋亡, 抑制免疫球蛋白分泌, TGF- $\beta 1$ 缺陷的小鼠会发生严重的系统性自身免疫, 如核抗原抗体增加和免疫复合物沉积。在小鼠 $CD4^+$ T 细胞中过表达 EGR3 会诱导 TGF- $\beta 1$ 的产生, 并且可以增强与 TGF- $\beta 1$ 转录相关的 STAT3 磷酸化。TGF- $\beta 1$ 也是抑制迟发性超敏反应的一个关键因子, 在迟发性超敏反应模型小鼠中, EGR3 转导的 $CD4^+$ T 细胞在体内具有显著活性^[81-83]。除了作为 $CD4^+$ T 细胞反应的负调控因子, EGR3 还在 Th17 细胞发育中起到促进作用。在一定条件下, $CD4^+$ T 细胞可以分化形成 Th17 细胞, $CD4^+$ T 细胞在过表达 EGR3 后, 可以在不具备分化的条件下仍分化为 Th17 细胞, 并且产生大量 IL-17^[84]。

在淋巴细胞中 EGR2 与 EGR3 共同缺失会导致血清中的促炎细胞因子水平升高, 并且 EGR3 可以直接诱导细胞因子信号转导抑制因子 (suppressor of cytokine signaling, SOCS) 1 和 SOCS3 的表达^[79], 表明了其对于炎症具有一定调控作用。miR-874-3p 可以负调控 EGR3, 使 EGR3 过表达可以逆转 miR-874-3p 过表达后脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 诱导的肺泡上皮细胞中诱导的细胞活力增加、细胞凋亡减少、TNF- α 和 IL-1 β 水平降低等一系列炎症反应^[85]。EGR3 还可以通过与组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylase 6, HDAC6) 启动子结合, 激活 IL-27 后介导过敏反应^[86]。在使用完全弗式佐剂诱导的慢性炎症大鼠模型中, EGR3 的表达有所增加, 将其过表达后, 使大鼠机械疼痛有所缓解, 使用 NFAT 抑制 EGR3 表达后, 则减弱了机械疼痛的缓解^[87]。

1.3.4 EGR3 参与信号通路

人们发现 EGR3 参与多种信号通路, 主要包括 SOCS、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、NF- κ B 以及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK)。

SOCS 是一类能够在信号传导过程中起到阻断功能的负调控作用因子, 家族中已经发现了 8 个成员。有研究表明 EGR2/EGR3 能够直接调控 SOCS1/SOCS3 的表达, 在 EGR2/EGR3 双敲除小鼠中可以检测到 SOCS1/SOCS3 的表达减少, 上调 EGR2/EGR3 的水平则会增强 SOCS1/SOCS3 的表达^[79, 88]。随后, EGR2/EGR3 对 SOCS1/SOCS3 的上调作用还会进一步抑制信号转导及转录激活蛋白 (signal transducers and activators of

transcription, STAT) STAT1/STAT3, 从而间接影响 JAK 激酶 (janus kinase, JAK) /STAT 通路^[89]。

VEGF 是位于血管内皮细胞中的特异性肝素结合生长因子, 在健康人体内表达量偏低, 当机体产生炎症时, 其表达会升高 3-20 倍^[90]。当 VEGF 上调时, 可通过其主要信号受体 VEGFR2 和 PKC 途径诱导 EGR3 的转录激活迅速增加^[91]。反之, EGR3 也可以调节血管内皮细胞活性, 抑制其表达时, 可以抑制 VEGF 诱导的内皮细胞增殖、迁移与血管形成过程。

在 NF- κ B 信号通路中, p50/p65 二聚体是发挥主要生理作用的转录因子, EGR3 可以与 p50 和 p65 分别结合形成稳定的复合物, 但 EGR3-p50 复合物转录无活性, EGR3-p65 复合物可以激活炎症因子的启动子引起机体的炎症反应^[92]。

HDAC6 在过敏性炎症中具有重要作用, 在卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的小鼠肺中表达水平显著升高。它的启动子中含有 EGR3 的结合位点, 在抗原刺激的 RBL-2H3 细胞中, EGR3 是 HDAC6 的表达所必需的, HDAC6 被 EGR3 诱导上调后, 可通过激活 IL-27 信号介导过敏反应^[86, 93]。HDAC6 的过表达也会使 MAPK 通路的激活, 引起包括 ERK、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 信号分子表达增加, 还可以导致 NF- κ B 信号通路激活^[94, 95]。因此 EGR3 可以通过诱导 HDAC6 的表达, 激活 IL-27、ERK、NF- κ B 信号而对过敏反应进行调控, 并且 p65 还可以与 EGR3 结合生成复合物, 从而形成一条对过敏反应及其导致的炎症的正反馈通路。

1.4 研究意义

I 型超敏反应是一种主要由 IgE-Fc ϵ RI 途径介导的超敏反应, 目前药物仅能控制症状, 无法从根本上治愈该病。miRNA 可以参与多种生理活动, 对 mRNA 编码蛋白的过程起到负调控作用, 目前作为疾病的生物标志物与靶向药物收到诸多研究者的关注, 已有许多 miRNA 进入到了临床试验阶段^[46, 48-50]。

全转录组测序技术可以对细胞与组织中 RNA 的表达量进行分析, 目前包含非编码 RNA 与 mRNA 的检测与鉴定。本研究在 RBL-2H3 细胞中建立了 IgE 诱导的 I 型超敏反应模型, 进行了全转录组测序分析, 得到了 miRNA-mRNA 调控网络, 从中筛选到了差异下调最显著的 miR-128-1-5p 与其靶基因 EGR3。体内、外实验验证了 miR-128-1-5p 与

EGR3 的靶向关系以及对 I 型超敏反应的调控作用，研究结果为丰富 miR-128-1-5p 的调控网络，进一步研究该 miRNA 生物学功能奠定了实验基础。

第二章 I 型超敏反应相关 MiRNA 筛选

为了探究 I 型超敏反应中 miRNA 的调控机制, 本实验利用全转录组测序技术, 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞建立的 I 型超敏反应模型中的 miRNA 与 mRNA 表达谱进行分析, 筛选出与 I 型超敏反应相关的 miRNA, 对其靶基因及 mRNA 进行了富集分析, 为后续 miRNA 调控作用与机制研究提供实验基础。

2.1 实验试剂与仪器

2.1.1 实验材料

大鼠嗜碱性细胞白血病细胞 (Rat basophilic leukemia cell line 2H3, RBL-2H3) 购自中国科学院细胞库。

2.1.2 实验试剂

试剂	生产厂家
MEM 培养基	索莱宝生物科技有限公司
DNP-IgE	Sigma
DNP/BSA	Bioresearch
1,4 哌嗪二乙磺酸 (PIPES)	索莱宝生物科技有限公司
胎牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
Trizol Reagent	生工生物工程有限公司
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser	Takara
TB Green® Premix Ex Taq™ II	Takara

2.1.3 主要溶液配制

(1) 1mg/mL DNP/BSA

试剂	组分
DNP/BSA	1 mg
PIPES 缓冲液	1 mL
超纯水	定容至 100 mL
0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, -20℃保存。	

(2) 10×PIPES 缓冲液

试剂	组分
NaCl	6.962 g
KCl	0.373 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.081 g
PIPES	7.56 g
NaOH	0.16 g
D-Glucose	1.008 g
超纯水	定容至 100 mL
1 mol/L NaOH 调 pH=7.2, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。	

(3) PIPES 缓冲液

试剂	组分
10×PIPES 缓冲液	10 mL
1M CaCl ₂	100 μL
BSA	0.1 g
超纯水	定容至 100 mL
0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20℃保存。	

2.1.4 主要仪器设备

仪器设备	生产厂家
高速冷冻离心机	Thermo Scientific
实时荧光定量 PCR 仪	罗氏
荧光显微镜	Olympus
CO ₂ 培养箱	上海力申科学仪器有限公司
超微量分光光度计	Quawell Q5000

2.2 实验方法

2.2.1 转录组测序

2.2.1.1 IgE 诱导 I 型超敏反应

取对数生长期 RBL-2H3 细胞, 计数 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 加入培养基至 2 mL/孔, 置于培养箱中。分别设置正常组与模型组, 每组 3 个复孔。24 h 后, 吸除旧培

培养基, PBS 清洗 3 次。模型组中加入 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNP/IgE 1 mL 致敏, 正常组加等量培养基。12 h 后, 模型组加入含 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNP/BSA 的 PIPES 缓冲液 400 μL 激发, 正常组加等量的 PIPES 缓冲液。1 h 后冰浴 10 min 终止激发。使用 Trizol 按说明书操作提取细胞中总 RNA。使用超微量分光光度计检测其浓度及质量。

2.2.1.2 文库构建与上机测序

普通转录组文库构建时将总 RNA 打断至 300 bp 左右片段合成为 cDNA, 小 RNA 不需要打断, 直接使用 TruSeq Small RNA 文库制备试剂盒, 采用 PCR 扩增对文库片段进行富集、质检、定量检测, 随后采用第二代测序技术, 依靠 Illumina HiSeq 测序平台进行测序。测序由派森诺生物科技股份有限公司完成。

2.2.1.3 数据基本分析

样品经过上机后得到 FASTQ 形式的原始数据, 通过数据过滤得到高质量序列 (clean reads), 使用 HISAT2 与 miRDeep2 软件对 clean reads 与参考基因组进行比对与注释。使用 FPKM 对表达量进行标准化, 以表达量差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$, 差异显著性 $P\text{-value} < 0.05$ 为条件筛选差异表达的 miRNA 与 mRNA。

以大鼠 mRNA 的 3'UTR 序列为目标序列, 使用 miranda 数据库对差异表达 miRNA 进行靶基因预测。对预测到的差异 miRNA 的靶基因与差异表达 mRNA 进行富集分析。使用 Gene Ontology 进行 GO 富集分析, 京都基因与基因组百科全书进行 KEGG 的注释。分析时对每个条目 (term) 注释到的基因列表和基因数目进行计算, 然后通过超几何分布方法计算 P-value, 以 $P\text{-value} < 0.05$ 为标准, 找出与整个基因组背景相比, 差异基因显著富集的 term, 从而确定基因主要行使的生物学功能与参与的信号通路。

2.2.2 qRT-PCR

2.2.2.1 引物设计

引物序列见表 2-1, 其中 RT 表示在逆转录过程中使用的茎环法特异性引物, F 表示 qRT-PCR 中的上游引物, R 表示下游引物。

表 2-1 引物设计
Table2-1 Primer design

引物	序列
miR-128-1-5p	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CTCAGAC F: AATCAATCGGGGCCGTAGCAC R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
U6	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA CAAAATATG F: CCTGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
PALM	F: GGCTGAACTGGTGGTGATTGAAG R: CCGTCTGGTTCTCCTCCTTGG
CPNE5	F: TGTGGCACCATCATCCTGTCTG R: GTTCCGTCTTCATTGCTCCTGTAG
SIL1	F: GGACGGCAACATGGACATCAAG R: AAGACTTCGGGAGCAGCATAGG
EGR3	F: GCAGCGACCACCTCACTACTC R: CCCACAGAACTCACAGGCAAAG
GADPH	F: CATCCGTAAAGACCTCTAGCCAAC R: ATGGAGCCACCGATCCACA

2.2.2.2 RNA 逆转录

使用逆转录试剂盒去除基因组 DNA，在冰上配置如表 2-2 所示体系。

表 2-2 去除基因组 DNA 反应体系
Table2-2 Reaction system of removing genomic DNA

试剂	用量
5×gDNA Eraser Buffer	2 μL
gDNA Eraser	1 μL
Total RNA	2 μL
RNase Free H ₂ O	5 μL

将上述步骤获得的 RNA 进行逆转录反应，在冰上配置反应体系，表 2-3 所示体系

得到 cDNA 用于 mRNA 的 qRT-PCR 反应，表 2-4 所示体系获得 cDNA 用于 miRNA 的 qRT-PCR 反应。

表 2-3 反转录反应体系 (1)

Table2-3 Reaction system of reverse transcription (1)

试剂	用量
步骤 1 中反应液	10 μ L
Prime Script RT Enzyme Mix I	1 μ L
RT Primer Mix	1 μ L
5 $\times$ Prime Script Buffer 2	4 μ L
RNase Free H ₂ O	4 μ L
Total	20 μ L

设置 PCR 反应条件：37℃，15 min；85℃，5 sec；4℃放置，-20℃保存。

表 2-4 反转录反应体系 (2)

Table2-4 Reaction system of reverse transcription (2)

试剂	用量
步骤 1 中反应液	10 μ L
Prime Script RT Enzyme Mix I	1 μ L
Stem-loop RT Primer	0.5 μ L
5 $\times$ Prime Script Buffer 2	4 μ L
RNase Free H ₂ O	4.5 μ L
Total	20 μ L

设置 PCR 反应条件：37℃，15 min；85℃，5 sec；4℃放置，-20℃保存。

2.2.2.3 qRT-PCR 反应

按照表 2-5 配置 qRT-PCR 反应体系，全程置于冰上操作，充分混匀后短暂离心，置于 PCR 仪中进行反应。

表 2-5 qRT-PCR 反应体系
Table 2-5 Reaction system of quantitative real-time PCR

试剂	用量
SYBR PremixTaq™ II	10 μL
PCR Forward Prime	0.8 μL
PCR Reverse Primer	0.8 μL
cDNA	1 μL
ddH ₂ O	Up to 20 μL

反应条件设为：预变性：95℃，30 s。PCR 反应：95℃，5 s；60℃，30 s；72℃，30 s；55 cycle。熔解分析：95℃，15 s；55℃，15 s；95℃，15 s。

2.2.3 统计学分析

所有实验重复 3 次，使用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析，多样本数据间两两比较，结果以均数±标准差表示，P<0.05 即有统计学差异。

2.3 实验结果

2.3.1 测序数据质量控制

本实验通过全转录组测序技术筛选了 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒相关的 mRNA 与 miRNA 差异表达谱（表 2-6）。Q30 指碱基识别准确率在 99.9%以上的碱基所占百分比，一般要求 Q30 不低于 85%。结果显示所有 RNA 数据的 Q30 均大于 93.81%（图 2-1），表明测序结果符合要求。为了保证测序结果质量，将原始测序数据去除 3' 端带接头的序列和平均质量分数低于 Q20 的序列，最终得到 clean reads 进行后续分析。

表 2-6 关于 RNA-seq 的原始数据信息
Table 2-6 Raw Data Information on RNA-seq

Sample	Raw Reads No.	Clean Reads No.	W(%)	Q20(%)	Q30(%)
M1	118806158	103996266	0.000526	97.68	93.91
M2	125940422	112843098	0.000472	97.85	94.18
M3	114690994	104818712	0.000463	97.63	93.81
C1	119983254	106634640	0.000496	97.95	94.45
C2	120877214	107806382	0.000485	97.71	93.9
C3	125977046	108877202	0.00049	97.9	94.27

注：Sample: 样品名；Raw Reads No.: 原始 Reads 总数；Clean Reads No.: 高质量 Reads 总数；Bases(bp): 碱基总数；W(%): 模糊碱基所占百分比。

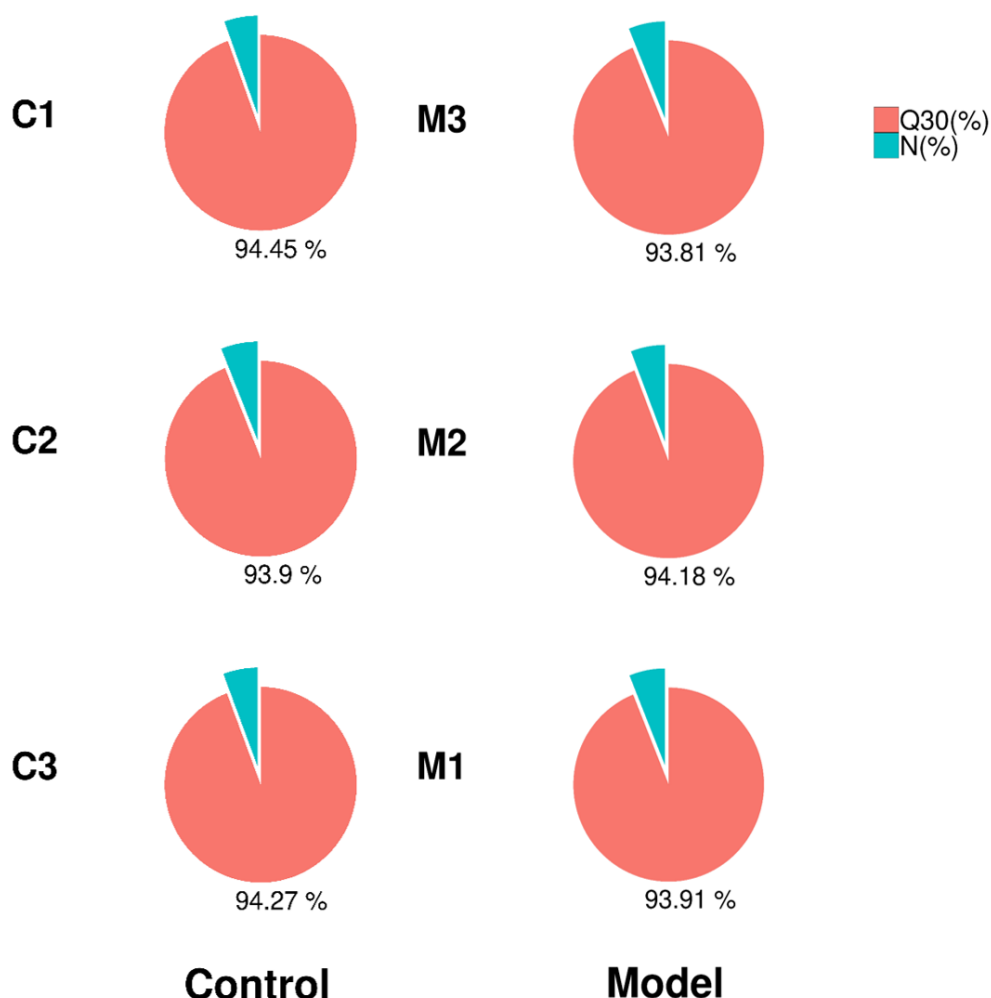


图 2-1 RNA-seq 结果准确率饼图

Figure 2-1 RNA-seq Result Accuracy Pie Chart

注：C1、C2、C3 代表正常组三个样品，M1、M2、M3 代表模型组三个样品，红色表示所有 RNA 序列中 Q30 所占百分比，绿色表示所有 RNA 序列中识别准确率低于 99.9%碱基所占百分比。

2.3.2 转录组数据分析

2.3.2.1 I型超敏反应中 RNA 差异表达分析

根据表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ ，表达差异显著性 $P\text{-value} < 0.05$ ，我们鉴定出了 5 个差异表达 miRNA 和 297 个差异表达 mRNA。其中，有 1 个 miRNA 表达上调，为 miR-542-3p，4 个 miRNA 表达下调，分别为 miR-128-1-5p、miR-1949、miR-98-3p 和 miR-152-5p（表 2-7），其中 miR-128-1-5p 的差异下调程度最高。有 169 个 mRNA 表达上调，128 个 mRNA 表达下调，表 2-8 展示了差异表达上调和下调前 10 的 mRNA。

表 2-7 模型组差异表达的 miRNA
Table 2-7 Differential Expression of miRNAs in the Model Group

miRNAID	log ₂ (Fold Change)	p-value	regulation
rno-miR-542-3p	3.156	1.49E-02	up
rno-miR-128-1-5p	-2.734	2.14E-02	down
rno-miR-1949	-1.673	2.99E-02	down
rno-miR-98-3p	-2.546	3.04E-02	down
rno-miR-152-5p	-3.163	3.82E-02	down

表 2-8 IgE 诱导组差异表达上调与下调前 10 的 mRNA
Table 2-8 mRNA of the top 10 differentially upregulated and downregulated in IgE induced groups

mRNAID	log ₂ (Fold Change)	p-value	regulation
Trib1	Inf	9.50E-07	up
Csf2	Inf	3.22E-04	up
Ccl	Inf	1.77E-02	up
Csn2	Inf	2.52E-02	up
Trim10	Inf	2.74E-02	up
RGD1561226	Inf	2.74E-02	up
Enkur	Inf	3.09E-02	up
Enc1	Inf	3.28E-02	up
Man2b2	Inf	4.23E-02	up
Flacc1	Inf	4.26E-2	up
Dcx	-Inf	4.07E-02	down
Mept113	-Inf	1.97E-03	down
Ctrc	-Inf	2.43E-03	down
AABR07054264.1	-Inf	6.59E-03	down
LOC300308	-Inf	1.41E-02	down
Iqub	-Inf	3.79E-02	down
Galr3	-Inf	2.22E-02	down
Atp6v1c2	-Inf	2.44E-02	down
Kenc2	-Inf	2.88E-02	down
Ephx3	-Inf	3.21E-02	down

注：-Inf=minimum(min); Inf=maximum(max)

为了使这些差异表达的 RNA 可视化，进行了火山图分析（图 2-2A、B），在火山图中可以观察到差异表达的 RNA 个数、上下调程度以及显著性。分层聚类热图（图 2-2C、D）将 RNA 按照表达量高低进行归类，直观地展现出不同样本间表达的分布状况，图中显示 RNA 分布具有组间差异。

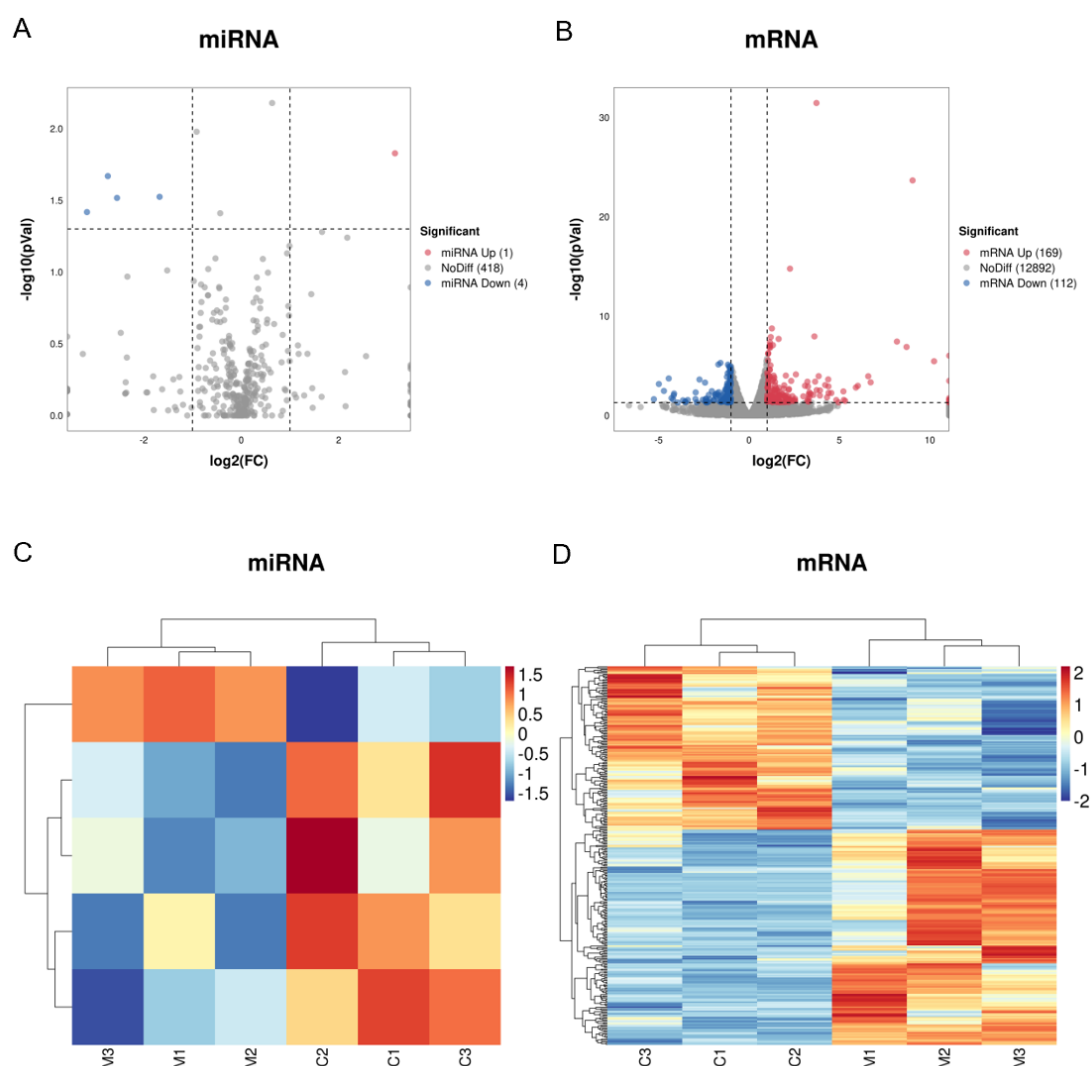


图 2-2 差异表达 RNA 分析

Figure 2-2 Differential Expression RNA Analysis

(A) 模型组与正常组差异表达 miRNA 的火山图。(B) 模型组与正常组差异表达 mRNA 的火山图。(C) 模型组与正常组差异表达 miRNA 的热图。(D) 模型组与正常组差异表达 mRNA 的热图。在火山图中，红点表示差异表达上调，蓝点表示差异表达下调，灰点表示表达没有差异，垂直虚线表示 $\log_2FC=2$ 和 -2 ，平行虚线表示 $p<0.05$ 。在分层聚类热图中，每行红色矩形表示高表达，蓝色矩形表示低表达。

2.3.2.2 I型超敏反应中差异表达基因富集分析

接下来，我们对差异表达的 mRNA 与差异表达 miRNA 的靶基因进行了 GO 和

KEGG 富集分析，分析这些基因的功能。

GO 富集分析包含生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC) 以及分子功能 (MF) 三个方面，图 2-3A、B 展示了每个部分以 p 值排序的前 10 个条目。

差异表达 miRNA 的靶基因 GO 分析共富集到 18142 个条目，包括 13314 个 BP 条目，1634 个 CC 条目和 3194 个 MF 条目。其中主要是生物发育相关的生物学过程，例如多细胞生物发育 (multicellular organism development)、系统发育 (system development)；细胞组分主要为质膜参与的细胞间联系，如质膜结合细胞投射 (plasma membrane bounded cell projection)，细胞连接 (cell junction)；主要参与的分子功能有 ATP 相关的 ATP 结合 (ATP binding)，腺苷酸结合 (adenyl nucleotide binding) 与腺嘌呤核糖核苷酸结合 (adenyl ribonucleotide binding)。

对差异表达 mRNA 共富集到 5068 个 GO 条目，其中包含 4067 个 BP 条目，409 个 CC 条目和 592 个 MF 条目，包括与超敏反应密切相关的对细胞因子的响应 (response to cytokine)、对脂多糖的响应 (response to lipopolysaccharide)，还有 RNA 生物合成相关生物学过程，如转录，DNA 模板 (transcription, DNA-templated)、RNA 生物合成过程 (RNA biosynthetic process) 等；细胞组分主要与细胞核相关如核小体 (nucleosome)、染色质 (chromatin)、染色体 (chromosome) 等；分子功能主要关于转录和翻译，例如 DNA 结合转录激活剂活性 (DNA-binding transcription activator activity)、RNA 聚合酶 II 特异性 (RNA polymerase II-specific)、蛋白二聚化活性 (protein dimerization activity) 等。

在 KEGG 分析中，我们选择了与差异表达基因相关的前 20 个通路术语用气泡图表示 (图 2-3C、D)。

差异表达 miRNA 靶基因主要富集到的 KEGG 通路有与 I 型超敏反应发生过程相关的 ABC 转运蛋白 (ABC transporters)、蛋白质的消化和吸收 (protein digestion and absorption)，还有与炎症反应相关的 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)。

差异表达 mRNA 的 KEGG 富集分析中最显著的通路为与炎症反应相关的 TNF 信号通路 (TNF signaling pathway) 和 IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)。

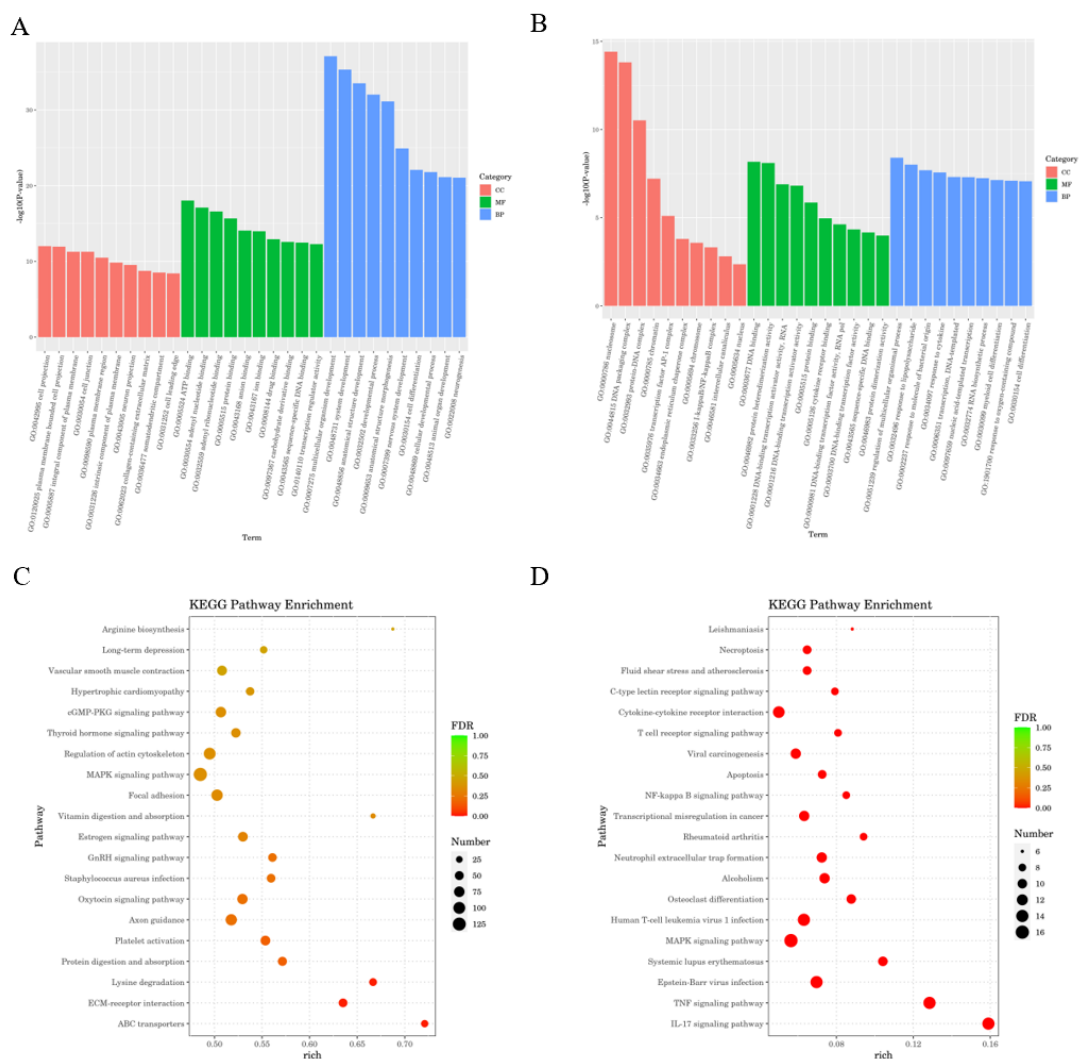


图 2-3 差异表达 mRNA 和差异表达 miRNA 靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Figure 2-3 GO and KEGG Enrichment Analysis of Differentially Expressed mRNA and miRNA Target Genes

(A) 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 富集分析。(B) 差异表达 mRNA 的 GO 富集分析。(C) 差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 富集分析。(D) 差异表达 mRNA 的 KEGG 富集分析。所有 GO 和 KEGG 富集条目的筛选基于 q 值 < 0.05 。

2.3.2.3 I 型超敏反应中差异表达 miRNA-mRNA 网络构建

利用 miranda 数据库，以大鼠 mRNA 的 3'UTR 序列为目标序列预测差异表达 miRNA (DEmiRNA) 的靶基因，与差异表达 mRNA (DEmRNA) 的重叠基因显示在韦恩图中 (图 2-4A)，共有 110 个差异 mRNA。基于以上重叠基因，与差异表达的 5 个 miRNA 构建 miRNA-mRNA 调控网络，使用 Cytoscape 软件使网络可视化 (图 2-4B)，内部彩色圆点代表 miRNA，外圈黑色圆点表示 mRNA。

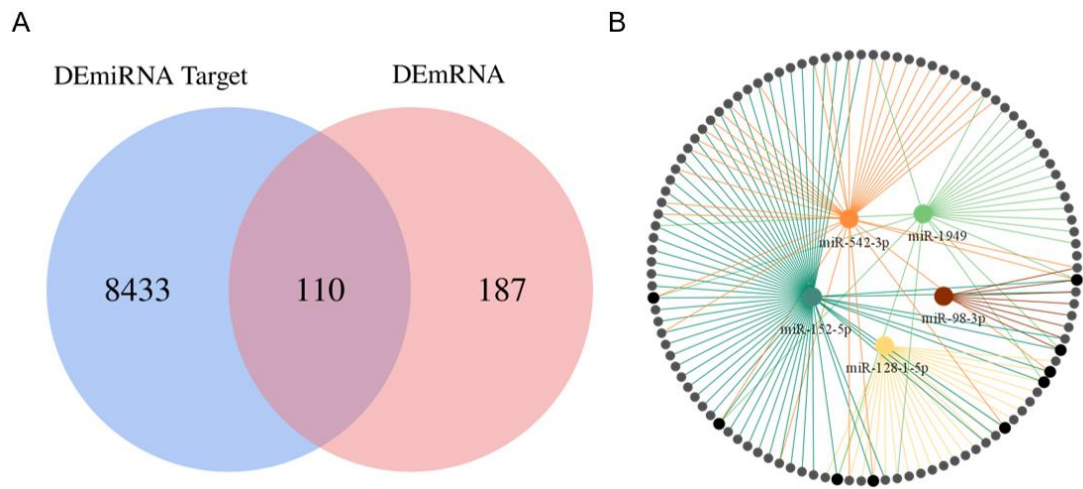


图 2-4 差异表达 miRNA-mRNA 网络构建

Figure 2-4 Construction of Differentially Expressed miRNA-mRNA Network

(A) 差异表达 miRNA 靶基因与差异表达 mRNA 的重叠。(B) miRNA-mRNA 调控网络的构建。

2.3.3 qRT-PCR 验证 miRNA 表达

对提取的 RNA 进行浓度检测，如表 2-9 所示，各组 RNAA260/A280 比值在 1.8-2.2 之间，A260/A230 比值大于 1.8，说明提取的 RNA 质量均符合要求。

表 2-9 各组 RNA 浓度及质量检测结果
Table 2-9 RNA Concentration and Quality

Sample	A260/280	A260/230	Conc. (ng/μL)
Control	2.101	2.032	484.6
Model	2.126	1.843	502.32

为了验证转录组测序结果，将结果中差异表达的 miRNA 进行 qRT-PCR 验证。结果表明，miR-128-1-5p 与 miR-98-3p 在模型组中显著下调，miR-542-3p 显著上调，与测序结果一致（图 2-5）。

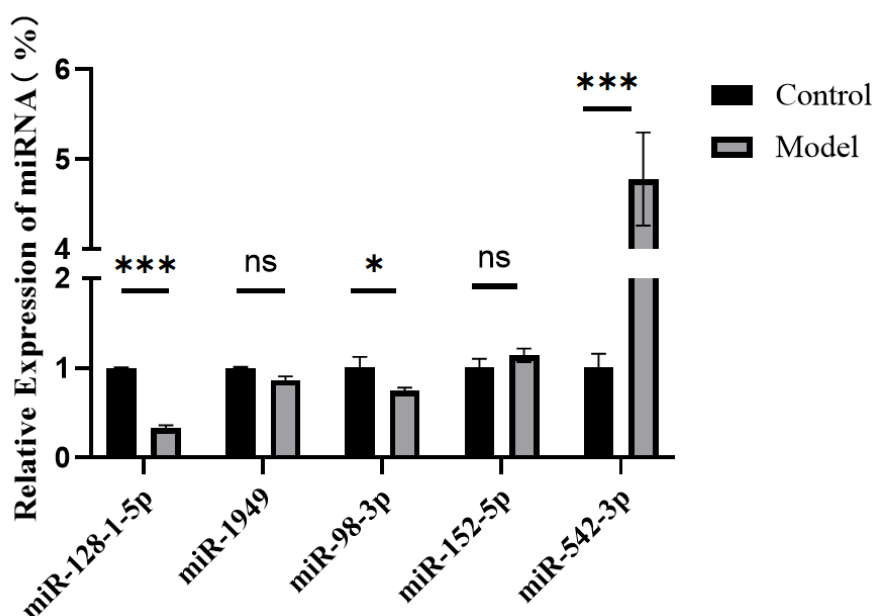


图 2-5 miRNA 表达结果
Figure 2-5 RNA expression results of miRNA

2.4 讨论

本章利用全转录组测序技术对 IgE 诱导 I 型超敏反应后 miRNA 与 mRNA 的表达变化进行了筛选与生物学分析。通过对得到的序列进行分析，Q30 的占比在 85%以上，并且聚类热图也可以观察到不同组间的基因表达可以显示出明显差异，参考其他文献中的标准^[96]，反映出测序结果质量良好，可以进行下一步分析。

经过富集分析后，miRNA 靶基因与 mRNA 富集到的 GO 条目涉及到对细胞因子的响应，KEGG 富集最显著的通路中包含 MAKP 信号通路、TNF 信号通路与 IL-17 信号通路。当 RBL-2H3 细胞表面 IgE 发生交联后，可通过 Src 家族酪氨酸激酶 Lyn-脾酪氨酸激酶（spleen tyrosine kinase, Syk）途径激活 MAPK 通路，促使花生四烯酸的释放^[97]。另一途径中同为 Src 家族酪氨酸激酶的 Fyn 的激活则会使 AKT 磷酸化，调节后续 NF- κ B 通路释放 TNF- α 等细胞因子，刺激产生局部或全身的炎症反应^[98]。I 型超敏反应也会激活 IL-17 信号通路，使下游 NF- κ B、MAPK 通路活化^[99]。富集分析的结果反映出 I 型超敏反应是一种发生机制复杂的疾病，需要进一步的探究。

miRNA 通过使 mRNA 降解或抑制其翻译，在动植物中参与了多种生物学过程，常见的 I 型超敏反应如过敏性鼻炎、过敏性哮喘、特应性皮炎等也受到 miRNA 调节。在免疫系统相关的 miRNA 中，miR-21、miR-146a、miR-155 都有深入研究，可以调节过

敏性疾病中的免疫反应和组织炎症^[100-104]。由于已知 miRNA 数量少、测序结果中表达失真等原因,得到的差异表达 miRNA 数量较 mRNA 少^[105, 106]。在模型组中,根据 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$, $P\text{-value} < 0.05$ 共筛选出 1 个上调 miRNA 与 4 个下调 miRNA。在 KEGG 分析当中,与 I 型超敏反应密切相关的 IL-17、TNF、MAPK、T 细胞受体、细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路均富集在差异上调的 mRNA 中,因此选择差异下调的 miRNA 进行分析。在下调 miRNA 的 qRT-PCR 分析结果中,miR-128-1-5p 下调程度较 miR-98-3p 更显著,因此选择 miR-128-1-5p 进行后续的验证。

目前研究发现,miR-128-1-5p 具有多种生理、病理调控功能,主要集中于肿瘤细胞与脂肪形成方面,未发现与过敏相关的研究。miR-128-1-5p 通过与 PRKCQ 的 3'UTR 区结合来抑制结直肠癌中肿瘤细胞的生长^[107]。在神经胶质瘤中发现了一组 ceRNA 调控关系 lncRNA PVT1 /miR-128-1-5p/PTBP1,通过下调 lncRNA PVT1 或上调 miR-128-1-5p 都可以抑制 PTBP1 的表达来促进细胞凋亡,并减弱神经胶质瘤细胞的增殖^[74]。miR-128-1-5p 还与体内脂肪调节有关,可通过靶向 KLF11 5' UTR 区域促进绵羊皮下脂肪生成^[108, 109]。本研究发现 miR-128-1-5p 的表达与 I 型超敏反应密切相关,为进一步研究奠定了基础。

第三章 MiR-128-1-5p 在体外调控 I 型超敏反应

通过筛选获得了 miR-128-1-5p, 为了评价其对 I 型超敏反应的调控功能, 我们通过检测细胞形态、 β -Hex 与组胺释放、细胞凋亡等细胞脱颗粒相关指标, 研究了 miR-128-1-5p 对 I 型超敏反应的调控作用。

3.1 实验试剂与仪器

3.1.1 实验材料

miR-128-1-5p 过表达序列 mimics 与阴性对照 NC mimics, miR-128-1-5p 敲低序列 inhibitor 与阴性对照 NC inhibitor 由吉玛生物技术有限公司设计与合成, 序列如下:

试剂	序列
mimics	sense: CGGGGCCGUAGCACUGUCUGA
NC mimics	sense: UUCUUCGAACGUGUCACGUTT
inhibitor	UCAGACAGUGCUACGCCCCCG
NC inhibitor	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA

3.1.2 实验试剂

试剂	生产厂家
4-硝基苯基-N-乙酰- β -D-氨基半乳糖苷	Sigma
GP-transfect-Mate	吉玛制药技术有限公司
AO/EB 试剂盒	生工生物工程有限公司
中性红染色试剂盒	生工生物工程有限公司
大鼠组胺 ELISA 试剂盒	酶联生物科技有限公司

3.1.3 主要溶液配制

(1) TritonX-100

试剂	组分
TritonX-100	0.620g
超纯水	定容至 100mL

(2) 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液

试剂	组分
柠檬酸钠	0.620 g
柠檬酸	0.487 g
超纯水	定容至 40 mL
pH=4.5	

(3) 1 mM 显色液

试剂	组分
4-硝基苯基-N-乙酰-β-D-氨基半乳糖苷	3.42 mg
柠檬酸缓冲液	定容至 10 mL
-20°C保存。	

(4) 0.1 mol/L 终止液

试剂	组分
Na ₂ CO ₃	0.429 g
NaHCO ₃	0.336 g
超纯水	定容至 40 mL
pH=10.7	

3.1.4 主要实验仪器

仪器设备	生产厂家
酶标仪	Thermo Scientific
荧光显微镜	Olympus

3.2 实验方法

3.2.1 qRT-PCR 检测 mimics 与 inhibitor 转染效率

3.2.1.1 mimics 与 inhibitor 转染

取对数生长期 RBL-2H3 细胞，使用胰蛋白酶消化后计数 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，加入 MEM 完全培养基至 2 mL/孔，置于 37°C 培养箱中。设置模拟物组：转染 mimics；模拟物阴性对照组：转染 NC mimics；抑制剂组：转染 inhibitor；抑制剂阴性对照组：转染 NC inhibitor。每组设置三个复孔。

转染前观察细胞密度，当细胞达到 60~80%汇合度时进行转染，具体步骤参照说明书，转染 4~6 h 后吸除原培养基，加入完全培养基。转染后的 24~72 h 检测 miR-128-1-5p 的表达。

3.2.1.2 qRT-PCR 检测 miR-128-1-5p 表达

1、RNA 提取

胰蛋白酶消化 3.2.1.1 中转染 36 h 后的细胞，RNA 提取同 2.2.1.1 操作。

2、逆转录

逆转录体系配置与操作步骤同 2.2.2.2。

3、qRT-PCR 体系配制

步骤同 2.2.2.3。

3.2.2 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞形态的影响

RBL-2H3 细胞计数 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中，设置空白对照组：不进行转染，不致敏激发；模型组：不进行转染，致敏激发；模拟物组：转染 mimics，致敏激发；模拟物对照组：转染 NC mimics，致敏激发；抑制剂组：转染 inhibitor，致敏激发；抑制剂对照组：转染 NC inhibitor，致敏激发。每组设置三个复孔。铺板 12 h 后进行转染，操作如 3.2.1.1 所述。转染 24 h 后除空白对照组进行致敏激发，每孔加入 500 μ L 浓度为 0.4 μ g/mL 的 DNP/IgE 进行致敏，12 h 后，加入 200 μ L 浓度为 10 μ g/mL 的 DNP/BSA 的 PIPES 缓冲液激发，1 h 后，冰浴 10 min 终止反应。每孔加入 200 μ L 中性红染液，室温孵育 5 min，随后用 PBS 冲洗 2 次，每次 1 min，置显微镜下观察拍照。

3.2.3 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放 β -Hex 的影响

细胞分组培养与致敏激发步骤同 4.2.2，激发 1 h 后，冰浴 10 min 终止反应。收集各组上清液，并用 0.5% TritonX-100 冰上裂解空白对照组细胞 10 min，作为总酶孔。12000 rpm，4℃离心 5min 后，取上清液。每组取 50 μ L 上清液与 50 μ L 1 mM 显色液加入到 96 孔板中，在 37℃下孵育 1 h，然后每孔加入 200 μ L 0.1 mol/L 终止液终止反应，置于酶标仪中测量 405 nm 处的吸光度。

$$\beta\text{-Hex} (\%) = (\text{实验组 OD} - \text{空白对照组 OD}) / (\text{总酶孔} - \text{空白对照组 OD})$$

3.2.4 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放组胺的影响

细胞分组培养与致敏激发步骤同 4.2.2，激发 1 h 后，冰浴 10 min 终止反应。取各组上清液，于 12000 rpm 4℃下离心 5 min，按组胺试剂盒说明书操作，最终在酶标仪中于 450 nm 处检测吸光度。

3.2.5 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞凋亡的影响

细胞分组培养与致敏激发步骤同 4.2.2，激发 1 h 后，冰浴 10 min 终止反应。吸除旧培养基，PBS 清洗一遍，按照 AO/EB 染色试剂盒说明操作，在荧光显微镜下观察，分别对正常细胞与凋亡细胞进行计数，计算细胞的凋亡率。

凋亡率 (%) = 凋亡细胞个数 / 正常细胞个数

3.2.6 统计学分析

所有实验数据均表示为平均值±SD。通过单向方差分析 (ANOVA) 确定统计显著性，使用 GraphPad Prism 版本 9.0 进行 T 检验。统计显著性设置为 * $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。

3.3 实验结果

3.3.1 qRT-PCR 检测过表达与抑制 miR-128-1-5p 的效率

对 3.2.1.2 中提取到的 RNA 进行浓度检测的结果见表 3-1，各组 RNA A260/A280 及 A260/A230 比值均符合标准，说明提取的 RNA 质量良好。

表 3-1 各组 RNA 浓度及质量检测结果
Table 3-1 RNA Concentration and Quality of Each Group

Sample	A260/280	A260/230	Conc. (ng/μL)
NC mimics	2.084	1.984	768.84
mimics	2.127	1.889	808.2
NC inhibitor	2.04	1.963	785.24
inhibitor	2.09	1.891	828.12

为了验证使 miR-128-1-5p 过表达与抑制所使用的 mimics 与 inhibitor 是否具有其相应作用，通过 qRT-PCR 检测各组中 miR-128-1-5p 的表达量。结果表明，分别转染了终浓度为 150 nM 的 mimics 后，可以使 miR-128-1-5p 的表达量显著增加约 84 倍，转染 inhibitor 后，可使其表达量降低至原来的 35% 左右 (图 3-1)。

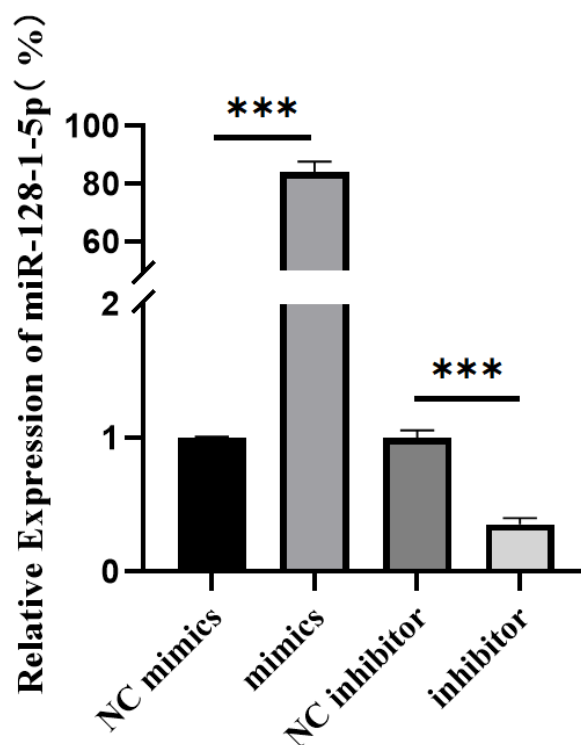


图 3-1 过表达与抑制后 miR-128-1-5p 的表达结果

Figure 3-1 Expression results of miR-128-1-5p after overexpression and inhibition

3.3.2 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞形态的影响

中性红染色后在显微镜下可以观察到（图 3-2），空白对照组细胞形态呈梭形或纺锤形，细胞完整。模型组中大多数细胞梭形消失变圆，甚至呈现多边形，个别细胞膜破裂。mimics 组在过表达 miR-128-1-5p 后，细胞变圆程度有所缓解，大多呈梭形，较模型组有明显差别。inhibitor 组在抑制 miR-128-1-5p 表达后细胞变圆程度增加，细胞边缘模糊。模拟物对照组和抑制剂对照组均与模型组细胞形态无显著差异。说明过表达 miR-128-1-5p 后可以抑制 IgE 诱导的细胞脱颗粒导致的形态变化，而抑制 miR-128-1-5p 后会加剧细胞脱颗粒导致的形态变化。

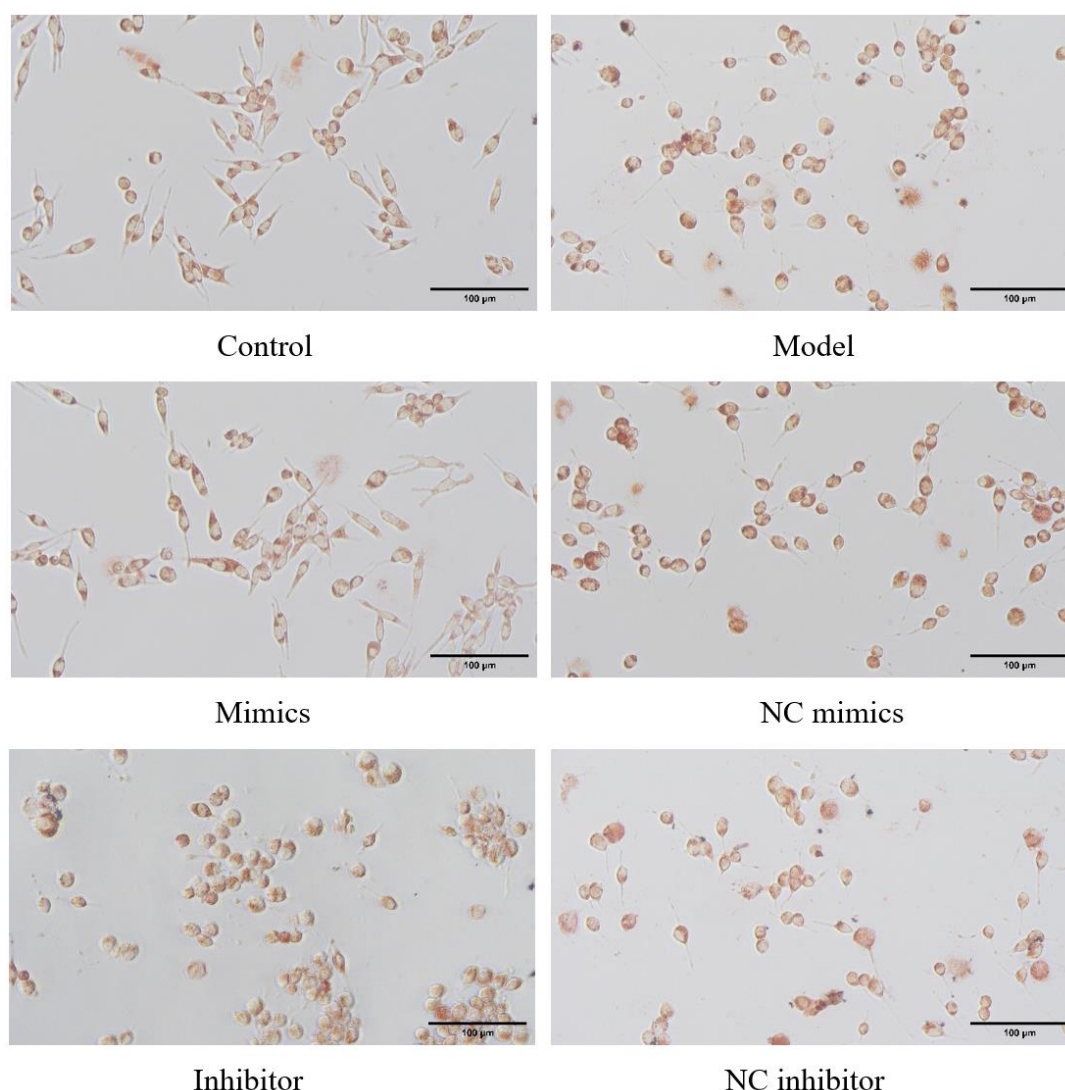


图 3-2 过表达/抑制 miR-128-1-5p 对 RBL-2H3 细胞形态影响 (bar=100μm)
Figure 3-2 Effects of overexpression/inhibition of miR-128-1-5p on the morphology of RBL-2H3 cells (bar=100μm)

3.3.3 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放 β -Hex 的影响

各组细胞释放 β -Hex 的结果见图 3-3，空白对照组细胞的 β -Hex 释放率为 28.90%，模型组细胞的 β -Hex 释放率为 48.96%，两组间具有显著差异 ($p<0.001$)。使 miR-128-1-5p 过表达后，细胞 β -Hex 释放率为 39.27%，与模型组相比具有显著差异 ($p<0.001$)。抑制 miR-128-1-5p 后，细胞 β -Hex 释放率为 60.2%，显著高于模型组 ($p<0.01$)。模拟物对照组与抑制剂对照组 β -Hex 的释放率分别为 48.87%、50.86%，与模型组释放率相

当。结果表明过表达 miR-128-1-5p 后可以降低 IgE 诱导的 RBL-2H3 细胞 β -Hex 释放率，抑制 miR-128-1-5p 后则会增加细胞 β -Hex 释放率。

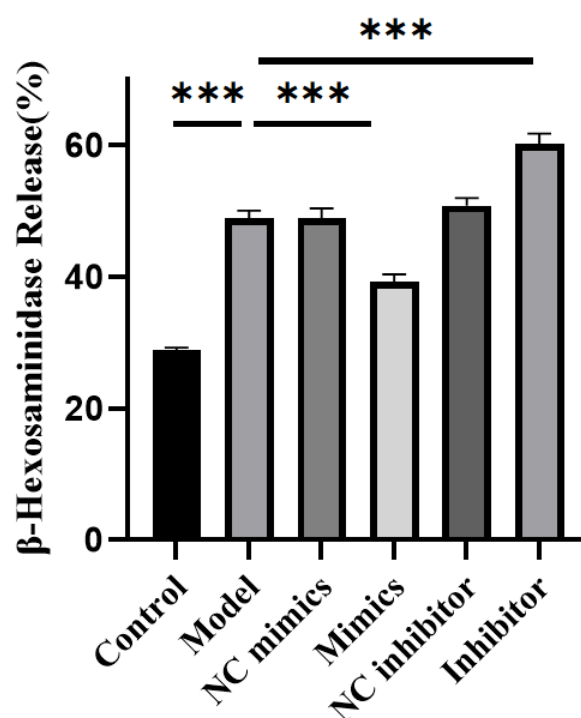


图 3-3 过表达/抑制 miR-128-1-5p 对 RBL-2H3 细胞释放 β -Hex 影响

Figure 3-3 Effects of overexpression/inhibition of miR-128-1-5p on the RBL-2H3 cell release β -Hex

3.3.4 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞释放组胺的影响

图 3-4 显示了各组细胞释放组胺的情况，空白对照组细胞的组胺释放量为 8.33 ng/mL，模型组的组胺释放量为 34.14 ng/mL，显著高于空白对照组 ($p < 0.001$)。过表达 miR-128-1-5p 后，细胞的组胺释放量为 17.50 ng/mL，显著低于模型组 ($p < 0.001$)。抑制 miR-128-1-5p 表达后，细胞的组胺释放量为 45.78 ng/mL，显著高于模型组 ($p < 0.001$)。模拟物对照组和抑制剂对照组的组胺释放量分别为 33.32 ng/mL、35.32 ng/mL，与模型组无显著差异。结果表明过表达 miR-128-1-5p 后可以降低 IgE 诱导的 RBL-2H3 细胞组胺释放量，抑制 miR-128-1-5p 后则会增加细胞的组胺释放量。

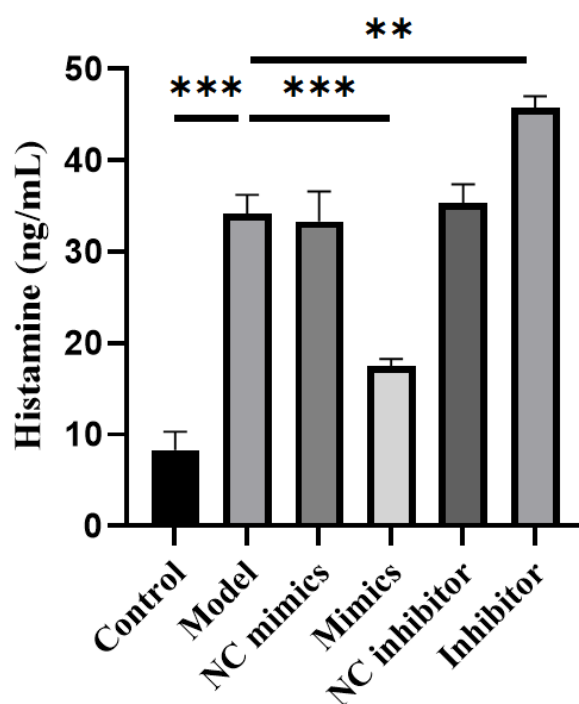


图 3-4 过表达/抑制 miR-128-1-5p 对 RBL-2H3 细胞释放组胺影响
Figure 3-4 Effects of overexpression/inhibition of miR-128-1-5p on the RBL-2H3 cell release histamine

3.3.5 过表达与抑制 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞凋亡的影响

正常细胞发绿色荧光，凋亡细胞发橙色荧光，分别对正常细胞与凋亡细胞进行计数，统计凋亡率。结果如图 3-5、图 3-6 所示，空白对照组绝大多数细胞发出亮绿色荧光，细胞呈梭形，说明细胞膜完好，计算凋亡率为 5.3%。而模型组中凋亡细胞增多，细胞肿胀变圆，说明胞膜出现破损，计算凋亡率为 29.54%，显著高于空白对照组细胞 ($p<0.001$)。过表达 miR-128-1-5p 后，细胞凋亡率为 18.89%，显著低于模型组细胞凋亡率 ($p<0.01$)。抑制 miR-128-1-5p 后，发出橘红色荧光细胞较模型组变多，凋亡率为 53.3%，显著高于模型组 ($p<0.01$)。而模拟物对照组与抑制剂对照组细胞凋亡率分别为 30.27%、33.66%，与模型组细胞凋亡率无显著差异。结果表明过表达 miR-128-1-5p 后可以减少 IgE 诱导的细胞凋亡，抑制 miR-128-1-5p 后会增加细胞凋亡。

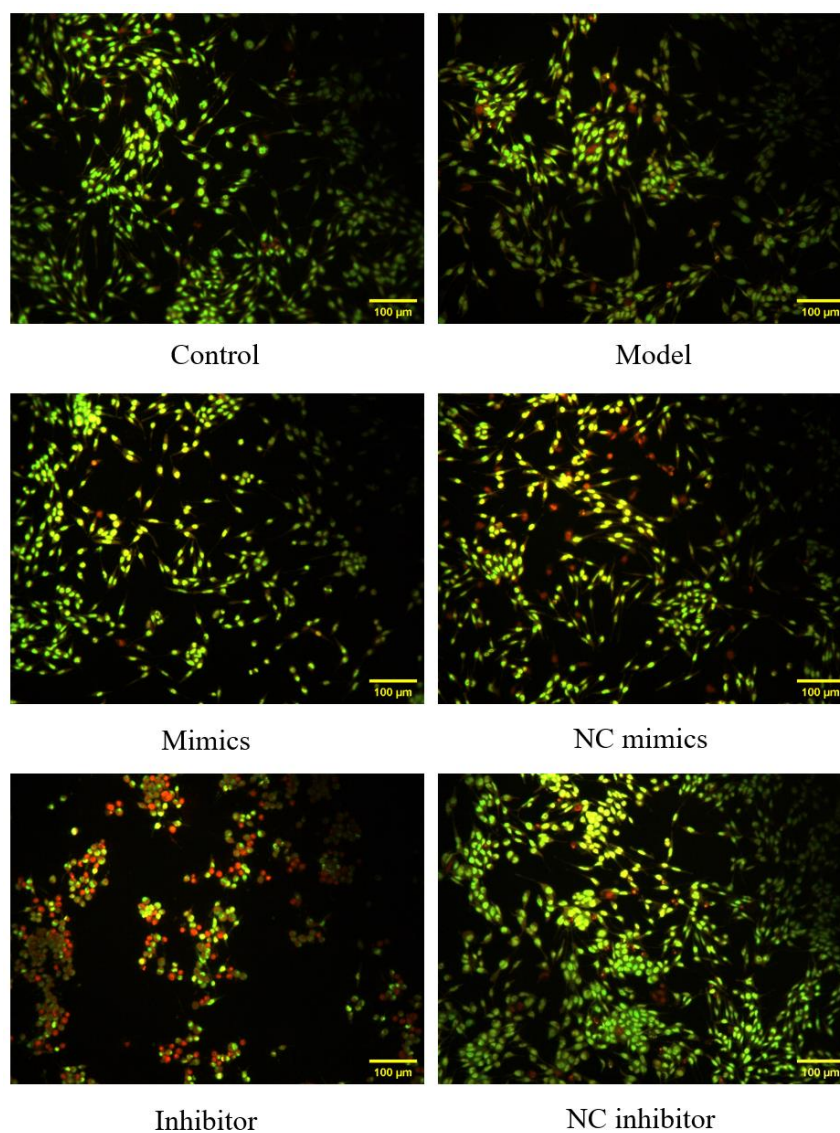


图 3-5 过表达/抑制 miR-128-1-5p 对 RBL-2H3 细胞凋亡的影响 (bar=100 μm)
Figure 3-5 Effects of overexpression/inhibition of miR-128-1-5p on the apoptosis of RBL-2H3 cells
(bar=100 μm)

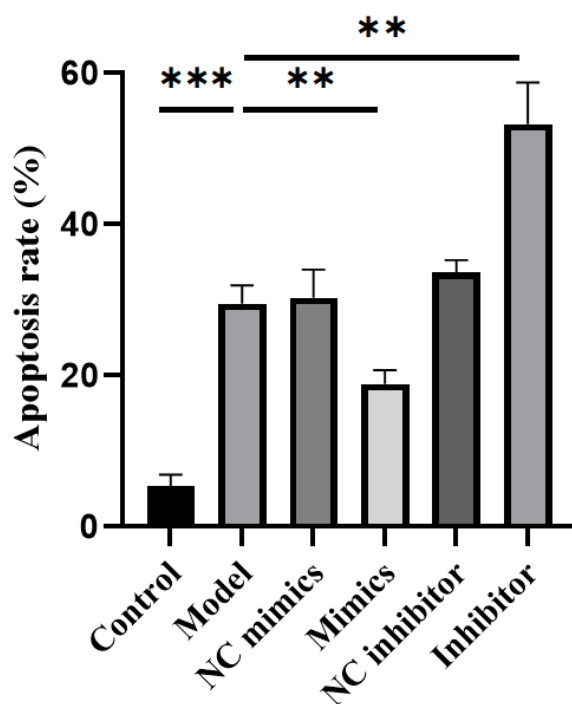


图 3-6 RBL-2H3 细胞凋亡情况统计
Figure 3-6 Statistics of RBL-2H3 cell apoptosis

3.4 讨论

miRNA 表达水平可以通过模拟物与抑制剂的瞬时转染来调节。首先设计与合成了 miR-128-1-5p 的模拟物 mimics 与抑制剂 inhibitor 以及两者的阴性对照序列。mimics 由一对双链构成，其中一条链与 miR-128-1-5p 序列相同，另一条链与其互补，当 mimics 进入细胞内时，Dicer 蛋白可以对其识别并进行切割，与 miR-128-1-5p 序列相同的链将被保留，另一条链会在细胞内降解，从而达到过表达的效果。Inhibitor 是一条与 miR-128-1-5p 碱基互补的单链，转染进入细胞后，可以与成熟的 miR-128-1-5p 进行互补配对使其降解^[110]。从结果可知，mimics 与 inhibitor 可以有效使 miR-128-1-5p 在 RBL-2H3 细胞中过表达或抑制其表达，因此可以用来进行 miR-128-1-5p 的功能研究。

RBL-2H3 细胞是体外脱颗粒最常用的细胞，其表面有高亲和力 IgE 受体，具有肥大细胞的多种生物学特性，因此本实验选择 RBL-2H3 细胞用于 I 型超敏反应的脱颗粒研究。在正常情况下，RBL-2H3 细胞呈梭形，当受到抗原或非抗原物质的刺激时，细胞会释放炎症介质，并且变圆肿胀，对其进行中性红染色后，细胞内着色不均匀，可以观察到空泡。RBL-2H3 胞质中包含多种炎症介质，在受到刺激后，可以释放组胺、 β -Hex、促炎脂质介质、细胞因子、趋化因子等等。在 IgE 诱导的脱颗粒中， β -Hex 的

释放量与组胺平行，稳定性好。因此许多研究中将组胺与 β -Hex 的释放作为肥大细胞脱颗粒的标志物^[111]。AO/EB 是一种经典的检测细胞凋亡的方法，其中 AO（吖啶橙）可以透过胞膜完整的细胞，与 DNA 结合发出绿色荧光，EB（溴乙锭）只能透过胞膜受损的细胞，与 DNA 结合发出橘红色荧光。通过对两种颜色的细胞进行计数，就可以确定凋亡细胞与正常细胞的比例，是一种直观、低成本的检测细胞凋亡的方法^[112]。

miR-128-1-5p 的过表达可以有效抑制 IgE 诱导的 RBL-2H3 细胞脱颗粒现象。抑制 miR-128-1-5p 后，则会得到与过表达相反的结果，细胞 β -Hex、组胺释放量与细胞凋亡数量均有显著升高，细胞形态也较模型组肿胀更加严重，说明抑制 miR-128-1-5p 后会进一步加剧 IgE 诱导的 I 型超敏反应。

在之前的研究中发现，miR-128-1-5p 可以通过负调控 Gadd45g 基因改善心肌细胞的凋亡^[113]，而在癌症当中则会诱导细胞凋亡，例如通过与 PRKCQ 结合促进结直肠癌细胞凋亡^[107]，这表明即使是同一种 miRNA 也会因为在不同的细胞中调控不同的靶基因而产生相反的效果。miR-128-1-5p 调控过敏导致细胞凋亡等现象还未见报道，本实验中首次验证出 miR-128-1-5p 可以抑制 IgE 诱导的细胞脱颗粒现象，可能是其调控的靶基因在细胞脱颗粒中有关键的调控作用，miR-128-1-5p 则通过与靶基因的 3' UTR 区域结合对脱颗粒起到间接的调控作用。

第四章 MiR-128-1-5p 靶向 EGR3 调控 I 型超敏反应

qRT-PCR 与 Western blot 结果表明 EGR3 与 I 型超敏反应密切相关，双荧光素酶报告结果发现 miR-128-1-5p 可靶向 EGR3 基因。在敲低 EGR3 的条件下分别过表达与抑制 miR-128-1-5p，结果表明，miR-128-1-5p 可靶向 EGR3 调控 I 型超敏反应。

4.1 实验试剂与仪器

4.1.1 实验材料

人胚肾细胞（293T）由实验室保存。

实验中使用的 EGR3 敲低序列 si-EGR3-1、si-EGR3-2、si-EGR3-3、si-EGR3-4 及其阴性对照序列 NC siRNA，EGR3 的野生型（WT）与突变型（MUT）双荧光素酶报告基因质粒以及空载体 pmirGLO 由吉玛制药技术有限公司设计、合成，序列见下表。

试剂	序列
si-EGR3-1	sense: GCAGUUUGCUAAAUCAAUUTT
si-EGR3-2	sense: CCAUUACACUCAGAUGGCUTT
si-EGR3-3	sense: GCAACAAGACCGUGACCUATT
si-EGR3-4	sense: GCUCCAUUCCAGAACACAATT
NC siRNA	sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
Egr3-miR-128-1-5p-wt	gcgcagggggccgcgcctgatctcgccctggacgTGCGGCCCCcttgctcctcttcgacgccccctat
Egr3-miR-128-1-5p-mut	gcgcagggggccgcgcctgatctcgccctggacgACGCCGGGGcttgctcctcttcgacgccccctat

4.1.2 实验试剂

试剂	生产厂家
DMEM 培养基	索莱宝生物科技有限公司
双荧光素酶报告基因检测试剂盒	吉玛制药技术有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	生工生物工程有限公司
Western 及 IP 细胞裂解液	生工生物工程有限公司
5×SDS Loading buffer	康为世纪生物科技有限公司
一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒	雅酶生物医药科技有限公司

TureColor 双色预染蛋白 Marker (常规范围)	生工生物工程有限公司
脱脂奶粉	BBI 生命科学有限公司
PVDF 转印膜	Millipore
ECL 化学发光试剂盒	成都正能生物技术有限公司

4.1.3 主要溶液配置

(1) 10×电泳缓冲液

试剂	组分
Tris base	30.3 g
甘氨酸	187.7 g
SDS	10 g
去离子水	定容至 1 L
取 100 mL 加 900 mL ddH ₂ O, 稀释成 1×再使用	

(2) 10×转膜缓冲液

试剂	组分
Tris base	29.25 g
甘氨酸	52.75 g
去离子水	定容至 1 L
取 100 mL 加 900 mL ddH ₂ O, 稀释成 1×再使用	

(3) 5% 封闭液

试剂	组分
脱脂奶粉	1.0 g
1×TBST 缓冲液	20 mL

(4) 10×TBST 洗膜液

试剂	组分
Tris base	24.28 g
NaCl	87.66 g
吐温 20	10 mL
浓 HCl 调 pH=7.5, 超纯水定容至 1 L	

4.1.4 主要实验仪器

仪器设备	生产厂家
水平摇床	北京六一仪器厂
DYCZ-24DH 型双板垂直电泳仪	北京六一仪器厂
电泳槽	北京六一仪器厂
半干转膜仪	BIO-RAD
化学发光成像仪	上海勤翔科学仪器有限公司
自动实时细胞成像检测系统	TECAN

4.1.5 Western Blot 抗体

试剂	生产厂家	作用浓度
P-ERK1/2	Affinity	1:800
ERK1/2	Affinity	1:800
P-AKT	Affinity	1:800
AKT	Affinity	1:800
EGR3	Affinity	1:500
β -actin	Bioss	1:5000
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	Bioss	1:10000

4.2 实验方法

4.2.1 miR-128-1-5p 靶基因筛选

使用 miRNA 靶基因预测的在线数据库 miranda、targetscan 与 miRWalk 寻找与 miR-128-1-5p 具有潜在结合能力的基因，取 3 个数据库预测到的靶基因与测序结果中差异表达 mRNA 交集。

4.2.2 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

取 2.2.1.1 中提取的 RNA 进行逆转录与 qRT-PCR 验证 4.2.1 中鉴定到的交集 mRNA，具体操作步骤及引物序列见 2.2.2。

4.2.3 qRT-PCR 检测过表达 miR-128-1-5p 后 mRNA 的表达

取对数生长期 RBL-2H3 细胞，计数 3×10^5 个/孔接种于六孔板中，设置模拟物组：

转染 mimics；阴性对照组：转染 NC mimics。每组设置三个复孔。转染 24 h 后，致敏激发，步骤同 3.2.2。激发 1 h 后，提取细胞总 RNA，逆转录后进行 qRT-PCR 检测，具体步骤同 2.2.2。

4.2.4 Western blot 检测过表达 miR-128-1-5p 后 EGR3 蛋白的表达

取 4.2.3 中转染 48 h 细胞，致敏激发，1 h 后，向其中加入混合好的蛋白酶抑制剂与裂解液，剧烈摇晃后置于冰上，静置 30 min 后离心，取上清液即为蛋白。使用 BCA 定量试剂盒对蛋白浓度进行检测，与 5×SDS Loading buffer 混合煮沸后于-20℃储存备用。制备 SDS-PAGE 凝胶进行电泳，根据 Marker 裁切相应位置凝胶，与 PVDF 膜、滤纸一同置于转膜仪上，采用半干法进行转膜。转膜结束后，将 PVDF 膜放入封闭液中封闭 1 h，清洗后分别置于目标蛋白与 β -actin 一抗中 4℃孵育过夜。之后洗膜 3 次，加入到二抗中孵育 1 h，再次洗膜后与 ECL 发光液充分接触，置于化学发光仪中显影，使用 Image J 进行灰度分析。

4.2.5 双荧光素酶报告基因验证 miR-128-1-5p 与 EGR3 的靶向关系

4.2.5.1 双荧光素酶报告基因质粒构建

借助 Targetscan 数据库分析 miR-128-1-5p 与 EGR3 的 3'UTR 区的结合位点，将序列进行突变，分别将结合区域野生型（WT）与突变型（MUT）的片段插入到带有荧光素酶的报告基因载体 pmirGLO 上，合成双荧光素酶野生型转染质粒、突变型转染质粒与不含序列的空载体。

4.2.5.2 双荧光素酶报告基因质粒与 mimics 共转染

取对数生长期的 293T 细胞，计数 5×10^5 个/孔接种于 24 孔板中。设置 GLO+NC mimics 组：转染空质粒载体 pmirGLO 与 NC mimics；GLO+mimics 组：转染空质粒载体 pmirGLO 与 mimics；WT+NC mimics 组：转染野生型质粒与 NC mimics；WT+mimics 组：转染野生型质粒与 mimics；MUT+NC mimics 组：转染突变型质粒与 NC mimics；MUT+mimics 组：转染突变型质粒与 mimics。每组设置三个复孔。当细胞达到 60~80% 汇合度时进行转染，具体步骤同 3.2.1.1。

4.2.5.3 双荧光素酶报告基因活性检测

将 200×萤火虫与海肾荧光素酶底物稀释至 1×的反应液，取 3.2.4.2 中转染 48 h 后的

细胞，吸除旧培养基，每孔加入 250 μ L 裂解液，置于摇床上室温裂解 1 h。

每孔取 50 μ L 细胞裂解液加到黑色 96 孔板中，加入 100 μ L 萤火虫荧光素酶反应液，震板混匀，在细胞成像监测系统中检测化学发光强度，即为萤火虫荧光素酶活力。随后每孔加入 100 μ L 海肾荧光素酶反应液，震板混匀，检测化学发光强度。

4.2.6 EGR3 siRNA 链的筛选

4.2.6.1 siRNA 转染

取对数生长期 RBL-2H3 细胞，计数 3×10^5 个/孔接种于六孔板中，补充完全培养基至 2 mL/孔，置于 37°C 培养箱中。设置阴性对照组：转染阴性对照品 NC siRNA，用于说明 si-EGR3 的特异性；实验组：分别转染 si-EGR3-1、si-EGR3-2、si-EGR3-3、si-EGR3-4。每组设置三个复孔。当细胞密度达到 60~80% 时进行转染。转染的具体步骤同 3.2.1.1。

4.2.6.2 qRT-PCR 对 EGR3 的表达进行检测

收集 4.2.6.1 中转染 36 h 的细胞进行 RNA 提取，RNA 的提取步骤同 2.2.1.1，逆转录与 qRT-PCR 的具体步骤同 2.2.2。

4.2.6.3 Western blot 检测 EGR3 蛋白的表达

收集 4.2.6.1 中转染 72 h 的细胞，按 4.2.4 中步骤提取蛋白，进行 Western blot 检测。

4.2.7 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞形态的影响

取对数生长期的 RBL-2H3 细胞，计数 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中，补充完全培养基至 2 mL/孔，置于 37°C 培养箱中。设置空白对照组：不转染任何试剂，不致敏激发；模型组：不转染任何试剂，致敏激发；阴性对照组：转染 NC si-EGR3，致敏激发；EGR3 敲低组：仅转染筛选出的 si-EGR3-4，致敏激发；si-EGR3+mimics 组：转染 si-EGR3 与 miR-128-1-5p 的模拟物，致敏激发；si-EGR3+inhibitor 组：转染 si-EGR3 与 miR-128-1-5p 的抑制剂，致敏激发。每组设置三个复孔。细胞培养 12 h 后进行转染，具体转染步骤同 3.2.1.1。转染 24 h 后进行致敏激发，激发 1h 后使用中性红染色，操作步骤同 3.2.2。

4.2.8 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放 β -Hex 的影响

细胞培养操作与分组同 4.2.7，转染 24 h 后，对细胞进行致敏激发。其他操作步骤同 3.2.3。

4.2.9 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放组胺的影响

细胞培养操作与分组同 4.2.7，转染 24 h 后，对细胞进行致敏激发。其他操作步骤同 3.2.4。

4.2.10 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞凋亡的影响

细胞培养操作与分组同 4.2.7，转染 24 h 后，对细胞进行致敏激发。其他操作步骤同 3.2.5。

4.2.11 EGR3 参与的 KEGG 通路

通过京都基因与基因组百科全书进行 KEGG 的注释。

4.2.12 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞后信号通路的影响

取对数生长期 RBL-2H3 细胞接种于 6 孔板中，密度为 1×10^6 个/孔，设置空白对照组：不转染，不致敏激发；模型组：不转染，致敏激发；模拟物组：转染 mimics，致敏激发；模拟物对照组：转染 NC mimics，致敏激发。每组设置三个复孔。12 h 后进行转染，具体步骤同 3.2.1.1，24 h 后致敏激发，步骤同 3.2.2，激发 1 h 后，按 4.2.4 中步骤提取蛋白，进行 Western blot 分析。

4.2.13 统计学分析

所有实验数据均表示为平均值 $\pm$ SD。通过单向方差分析（ANOVA）确定统计显著性，使用 GraphPad Prism 版本 9.0 进行 T 检验。统计显著性设置为 * $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。

4.3 实验结果

4.3.1 miR-128-1-5p 靶基因筛选

在 miRNA 相关数据库中检索 miR-128-1-5p 的靶基因，miranda 数据库中匹配到 1441 个靶基因，miRWalk 数据库匹配到 1877 个靶基因，targetscan 数据库中匹配到 16730 个靶基因。转录组测序结果中共有 297 个差异表达 mRNA。取四者交集后发现 5 个重叠基因（图 4-1），分别为差异表达下调的 DICER1 与差异表达上调的 PALM、CPNE5、SIK1、EGR3。由于 miR-128-1-5p 在测序结果以及后续验证中显示在模型组下调，因此其调控的基因应在模型组中上调，故选择 PALM、CPNE5、SIK1 与 EGR3 进行 qRT-PCR 验证。结果显示（图 4-2），除 PALM 无显著差异以外，其他三者均有不同程度的表达上调，与测序结果相一致，将更深一步验证是否与 miR-128-1-5p 具有靶向结合能力。

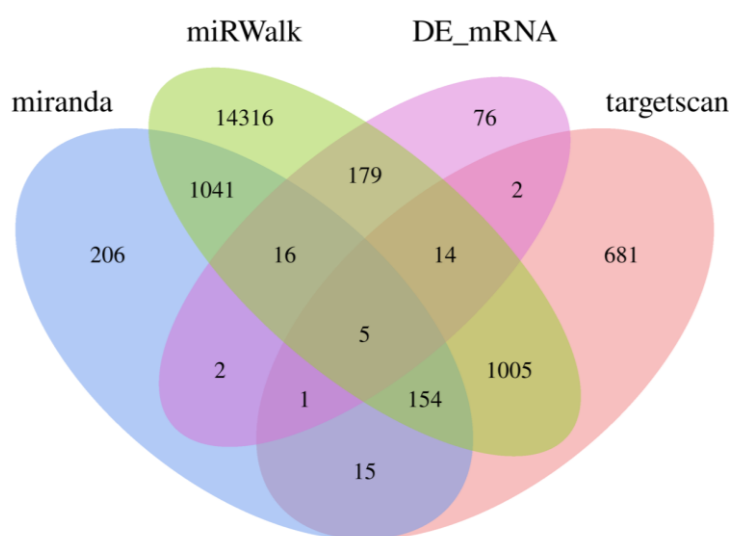


图 4-1 miR-128-1-5p 靶基因与 DE_mRNA 重叠韦恩图

Figure 4-1 Venn diagram of miR-128-1-5p target gene overlap with DE_mRNA

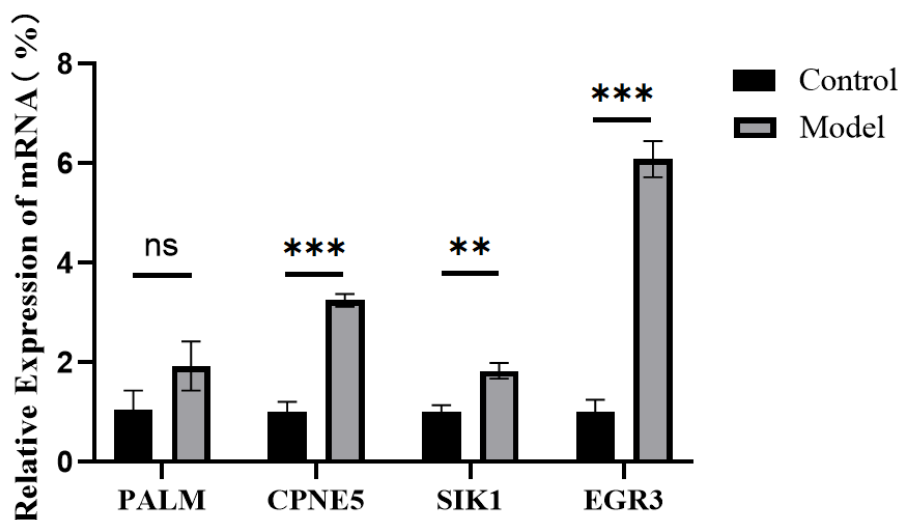


图 4-2 mRNA 表达结果

Figure 4-2 RNA expression of mRNA

4.3.2 qRT-PCR 检测过表达 miR-128-1-5p 后对 mRNA 表达的影响

将 miR-128-1-5p 过表达后, 检测 4.3.1 结果中筛选到的 CPNE5、SIK1、EGR3 mRNA 的表达。结果表明, CPNE5 与 SIK1 的 mRNA 表达并未随 miR-128-1-5p 的变化而下调, 而 EGR3 的 mRNA 表达相对于阴性对照组有显著下调, 因此选择 EGR3 进行后续验证。(图 4-3)

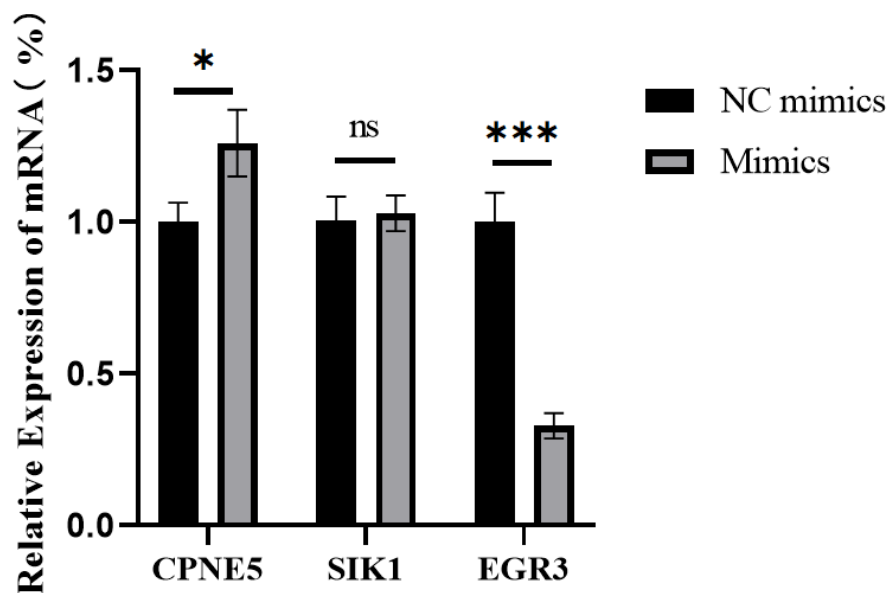


图 4-3 过表达 miR-128-1-5p 后 mRNA 的表达

Figure 4-3 mRNA expression after overexpression of miR-128-1-5p

4.3.3 Western blot 检测过表达 miR-128-1-5p 后对 EGR3 蛋白表达的影响

为了验证 miR-128-1-5p 对 EGR3 的转录是否有调控作用，我们对 miR-128-1-5p 过表达组及阴性对照组中 EGR3 蛋白含量进行检测。结果显示，当过表达 miR-128-1-5p 后，EGR3 的蛋白表达量相对于阴性对照组显著下降，表明 miR-128-1-5p 在蛋白水平对 EGR3 同样有负调控作用（图 4-4）。

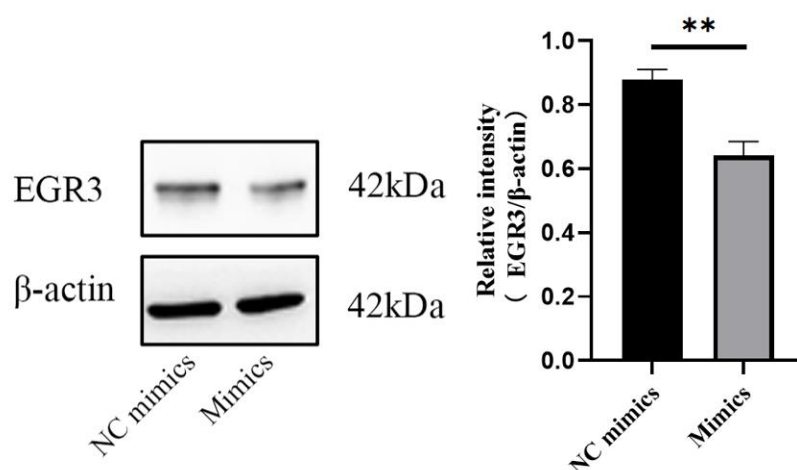


图 4-4 过表达 miR-128-1-5p 对 EGR3 蛋白表达的影响

Figure 4-4 Effect of overexpression miR-128-1-5p on EGR3 protein expression

4.3.4 双荧光素酶报告基因验证 miR-128-1-5p 与 EGR3 的靶向关系

通过数据库 Targetscan 预测 miR-128-1-5p 与 EGR3 的结合位点，分别构建了含有 miR-128-1-5p 结合位点的野生型质粒 pmirGLO-EGR3-WT，同时突变 miR-128-1-5p 结合位点构建突变型质粒 pmirGLO-EGR3-MUT（图 4-5）。扩增野生型和突变型序列，连接至 pmirGLO 载体。分别转染野生型与突变型质粒后，检测荧光强度。结果表明，转染 mimics 后，含野生型 miR-128-1-5p 结合位点的双荧光素酶报告基因质粒荧光强度显著降低（图 4-6），表明 EGR3 可与 miR-128-1-5p 进行直接结合。

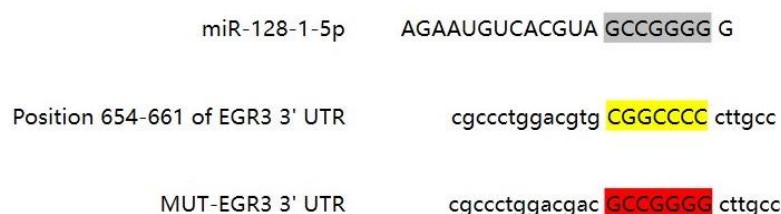


图 4-5 双荧光素酶报告基因质粒序列

Figure 4-5 Dual luciferase reporter gene plasmid sequence

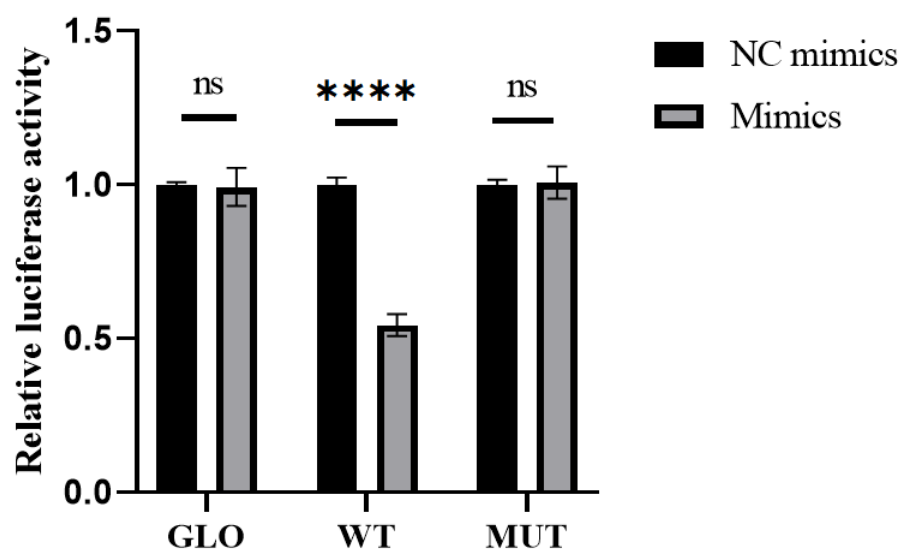


图 4-6 双荧光素酶报告基因分析结果

Figure 4-6 Analysis results of dual luciferase reporter genes

4.3.5 EGR3 siRNA 链的筛选

4.3.5.1 各组提取 RNA 浓度及质量

超微量分光光度计检测各组 RNA 浓度见表 4-1，各组 A260/A280、A260/A230 的比值均在标准范围内，证明提取的 RNA 符合要求。

表 4-1 各组 RNA 浓度及质量检测结果

Table 4-1 RNA Concentration and Quality Detection Results of Each Group

Sample	A260/280	A260/230	Conc. (ng/μL)
NC siRNA	2.092	1.585	623.4
Si-EGR3-1	2.074	1.63	490.52
Si-EGR3-2	2.098	1.959	870.32
Si-EGR3-3	2.012	1.775	603.4
Si-EGR3-4	2.115	2.111	544.88

4.3.5.2 qRT-PCR 检测各组 EGR3 mRNA 表达量

qRT-PCR 结果显示（图 4-7），以转染阴性对照 siRNA 的细胞作为对照，各条 si-EGR3 链均有不同程度的敲低效果，si-EGR3-4 敲低效果最佳。

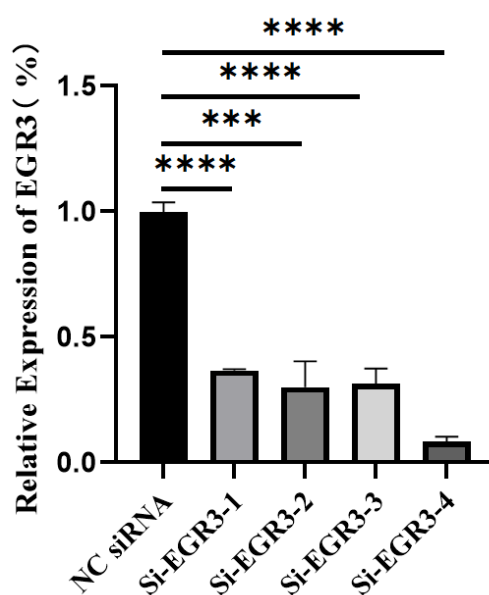


图 4-7 si-RNA 敲低 EGR3 mRNA 效率

Figure 4-7 Efficiency of si-RNA knockdown EGR3 mRNA

4.3.5.3 Western-Blot 检测各组 EGR3 蛋白表达量

通过 Western-Blot 结果（图 4-8）中可以观察到，4 条 si-EGR3 链对 EGR3 蛋白的表达均有抑制作用，si-EGR3-4 敲低效果最佳，与 qRT-PCR 结果一致。

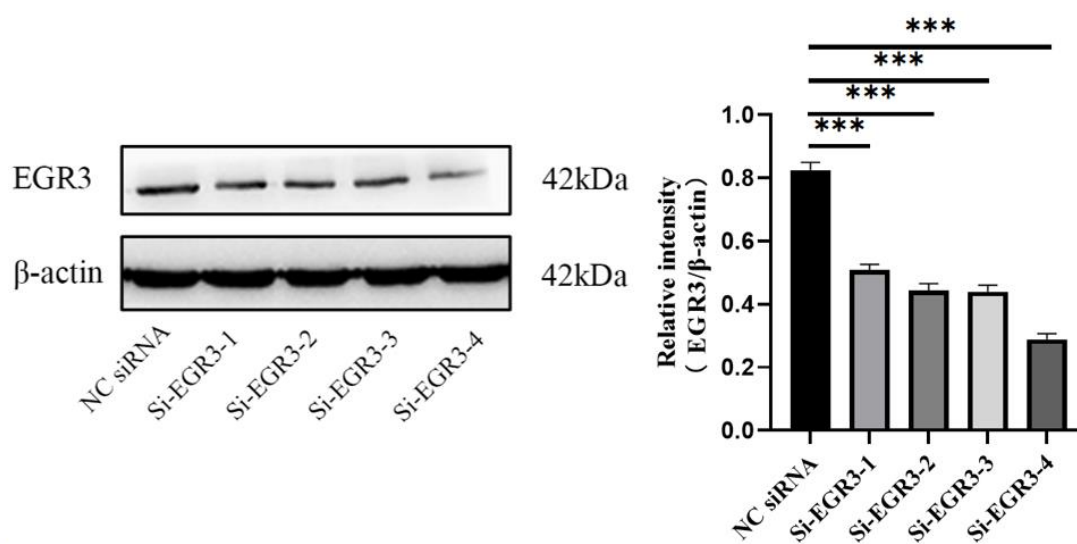


图 4-8 si-RNA 敲低 EGR3 蛋白效率

Figure 4-8 Efficiency of si-RNA knockdown EGR3 protein

4.3.6 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞形态影响

中性红染色后在显微镜下可以观察到（图 4-9），空白对照组细胞形态呈梭形或纺锤形，细胞完整。模型组中大多数细胞梭形消失变圆，甚至呈现多边形，个别细胞膜破裂。si-EGR3 组在抑制 EGR3 后，与模型组相比，细胞变圆程度减小，较模型组有明显差别。si-EGR3+inhibitor 组细胞较模型组变圆程度减小，与 si-EGR3 组细胞形态类似。si-EGR3+mimics 组细胞大多呈梭形，与 si-EGR3 组相比形态更贴近空白对照组。阴性对照组与模型组细胞形态无显著差异。说明敲低 EGR3 后可以缓解 IgE 诱导的细胞形态变化，在此基础上抑制 miR-128-1-5p 后，对细胞形态无显著影响，过表达 miR-128-1-5p 后，可以进一步对细胞肿胀程度进行缓解。

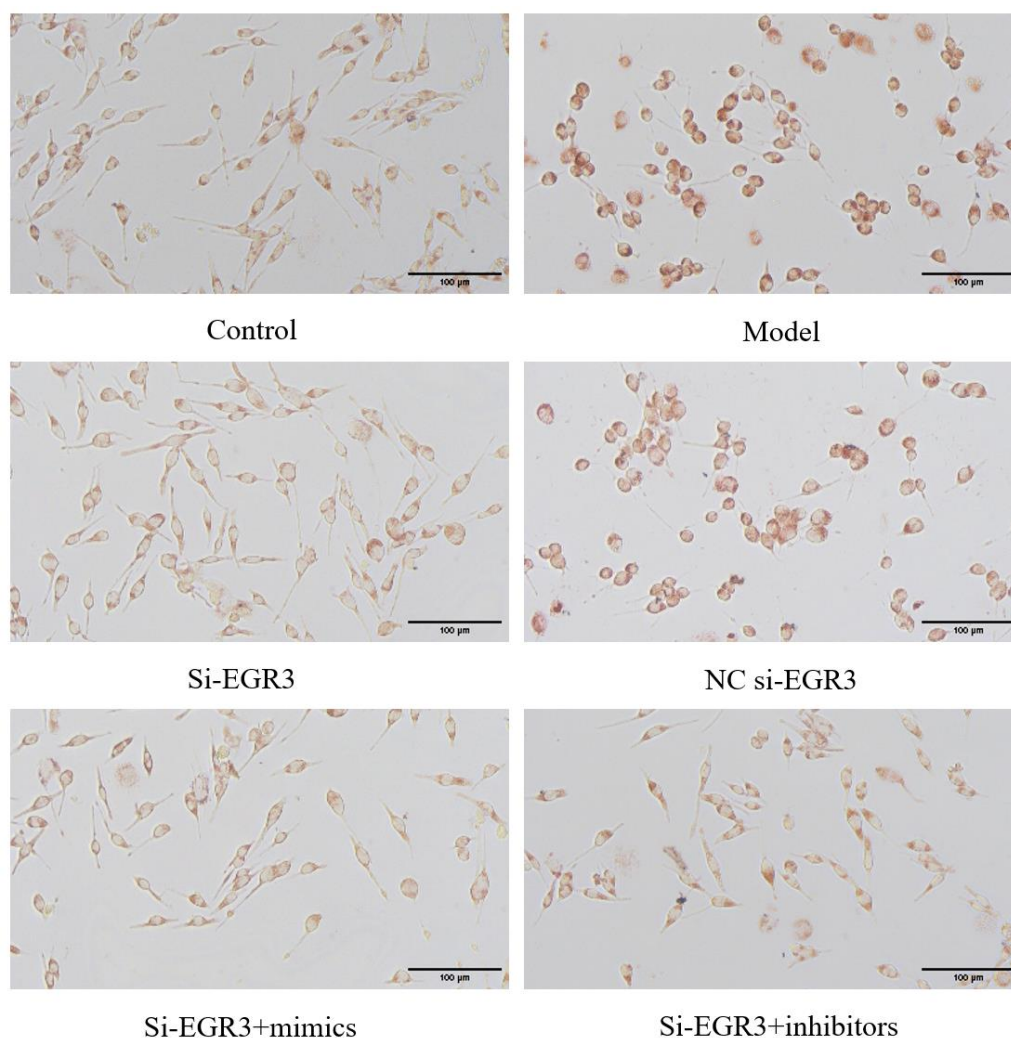


图 4-9 敲低 EGR3 后抑制/与过表达 miR-128-1-5p 对细胞形态影响 (bar=100 μm)
Figure 4-9 Inhibition/overexpression of miR-128-1-5p on cell morphology after knocking down EGR3 (bar=100 μm)

4.3.7 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放 β -Hex 的影响

各组细胞释放 β -Hex 的结果见图 4-10，空白对照组细胞的 β -Hex 释放率为 30.28%，模型组细胞的 β -Hex 释放率为 49.30%，两组间具有显著差异。抑制 EGR3 后，细胞 β -Hex 释放率为 38.68%，与模型组相比具有显著差异。si-EGR3+inhibitor 组细胞 β -Hex 释放率为 39.30%，与 si-EGR3 组水平相当。si-EGR3+mimics 组细胞 β -Hex 释放率为 31.25%，较 si-EGR3 组释放率减小。阴性对照组 β -Hex 的释放率为 48.40%，与模型组释放率相当。结果表明敲低 EGR3 后可以降低 IgE 诱导的 RBL-2H3 细胞 β -Hex 释放率，在此基础上抑制 miR-128-1-5p 后，对细胞释放 β -Hex 无显著影响，过表达 miR-128-1-5p 后，可以进一步减少 β -Hex 的释放。

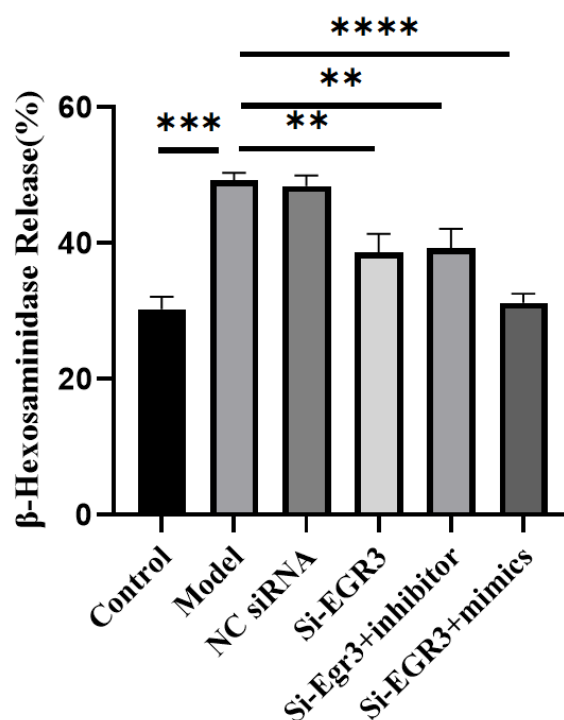


图 4-10 敲低 EGR3 后抑制/与过表达 miR-128-1-5p 对细胞释放 β -Hex 影响

Figure 4-10 Inhibition/overexpression of miR-128-1-5p on cell release β -Hex after knocking down EGR3

4.3.8 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞释放组胺的影响

图 4-11 显示了各组细胞释放组胺的情况，空白对照组细胞的组胺释放量为 11.19 ng/mL，模型组的组胺释放量为 35.09 ng/mL，显著高于空白对照组。抑制 EGR3 后，细

胞的组胺释放量为 17.17 ng/mL，显著低于模型组。si-EGR3+inhibitor 组细胞组胺释放量为 16.58 ng/mL，与 si-EGR3 组水平相当。si-EGR3+mimics 组细胞组胺释放量为 14.35 ng/mL，较 si-EGR3 组释放量减小。阴性对照组组胺的释放量为 34.99 ng/mL，与模型组释放量相当。结果表明敲低 EGR3 后可以降低 IgE 诱导的 RBL-2H3 细胞组胺释放量，在此基础上抑制 miR-128-1-5p 后，对细胞释放组胺无显著影响，过表达 miR-128-1-5p 后，可以进一步减少组胺的释放。

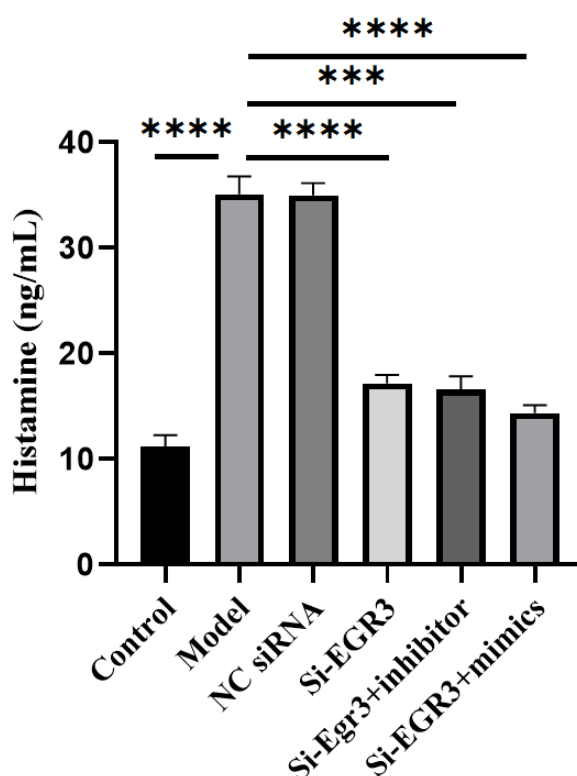


图 4-11 敲低 EGR3 后抑制/与过表达 miR-128-1-5p 对细胞释放组胺影响

Figure 4-11 Inhibition/overexpression of miR-128-1-5p on cell release histamine after knocking down EGR3

4.3.9 敲低 EGR3 后抑制与过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导细胞凋亡的影响

本实验采用 AO/EB 染色法检测细胞的凋亡状态，结果如图 4-12、图 4-13 所示。空白对照组绝大多数细胞发出亮绿色荧光，细胞呈梭形，说明细胞膜完好，计算凋亡率为 2.18%。而模型组中凋亡细胞增多，细胞肿胀变圆，说明胞膜出现破损，计算凋亡率为 33.57%，显著高于空白对照组细胞 ($p < 0.001$)。敲低 EGR3 后，细胞凋亡率为 20.4%，显著低于模型组细胞凋亡率 ($p < 0.01$)。si-EGR3+inhibitor 组细胞凋亡率为

19.64%，与 si-EGR3 组凋亡率相近。si-EGR3+mimics 组细胞凋亡率为 14.31%，显著低于模型组 ($p<0.001$)，并且较 si-EGR3 组凋亡率降低。而阴性对照组细胞凋亡率为 33.13%，与模型组细胞凋亡率无显著差异。结果表明敲低 EGR3 后可以降低 IgE 诱导的 RBL-2H3 细胞凋亡，在此基础上抑制 miR-128-1-5p 后，对细胞凋亡程度无显著影响，过表达 miR-128-1-5p 后，可以进一步减少细胞凋亡。

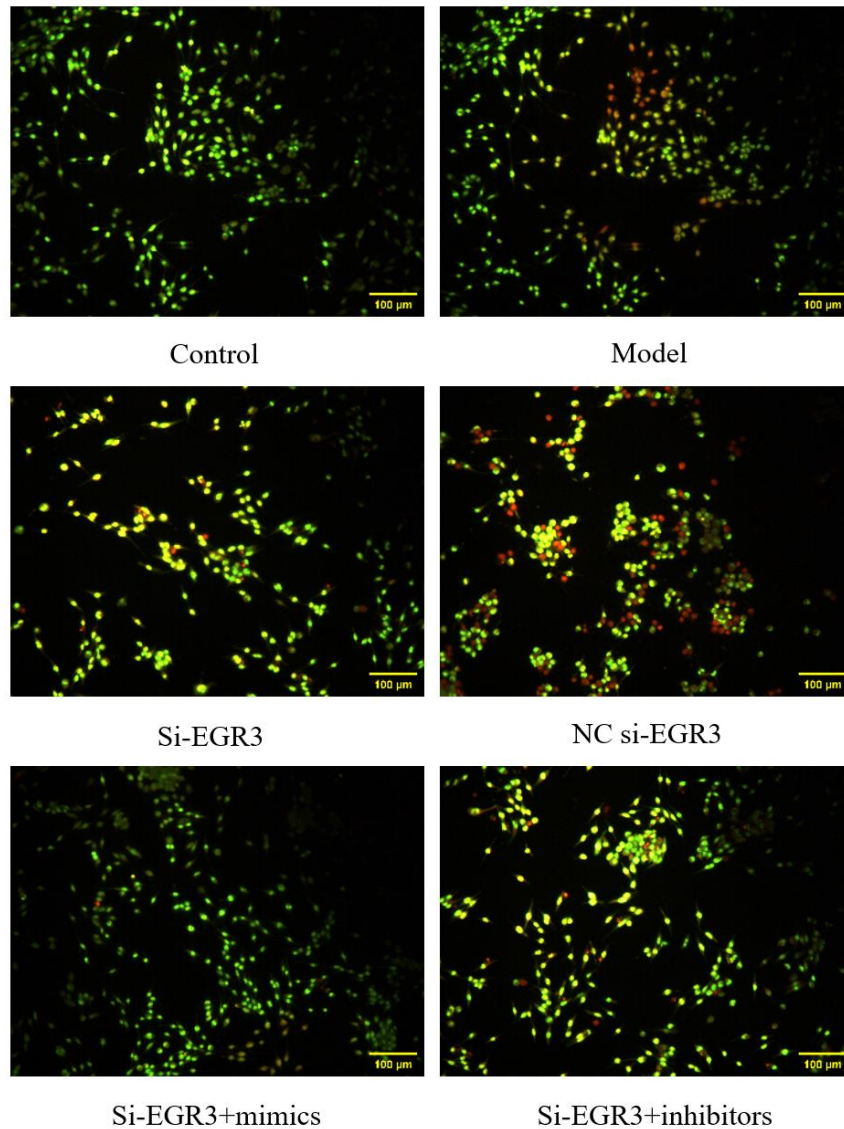


图 4-12 敲低 EGR3 后抑制/过表达 miR-128-1-5p 对细胞凋亡影响 (bar=100 μm)
Figure 4-12 Inhibition/overexpression of miR-128-1-5p on cell apoptosis after knocking down EGR3
(bar=100 μm)

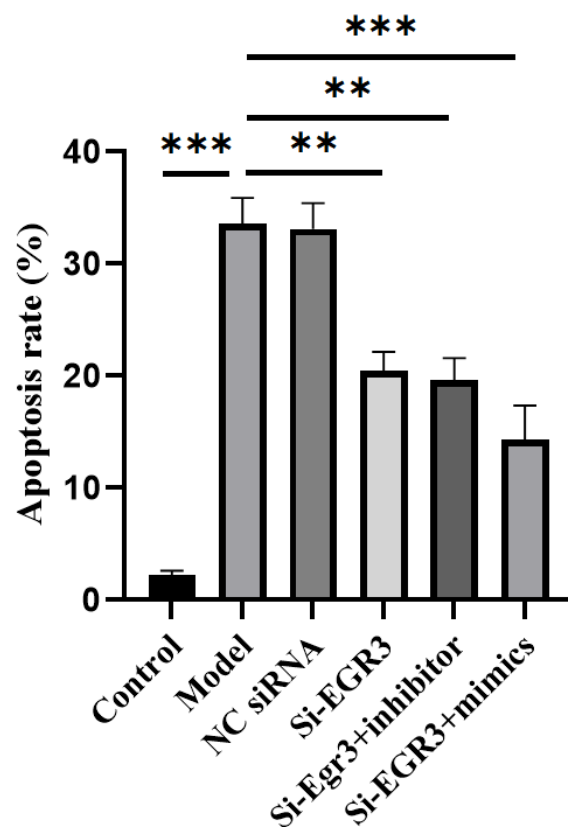


图 4-13 RBL-2H3 细胞凋亡情况统计

Figure 4-13 Statistics of RBL-2H3 cell apoptosis

4.3.10 EGR3 参与的 KEGG 通路

利用 KEGG 对 EGR3 参与信号通路进行了分析, 结果显示其参与到 C 型凝集素受体信号通路 (图 4-14), 在通路图中显示其上游是活化的 T 细胞核内因子 (nuclear factor of activating T cell, NFAT), 可以直接介导 EGR3 的表达。

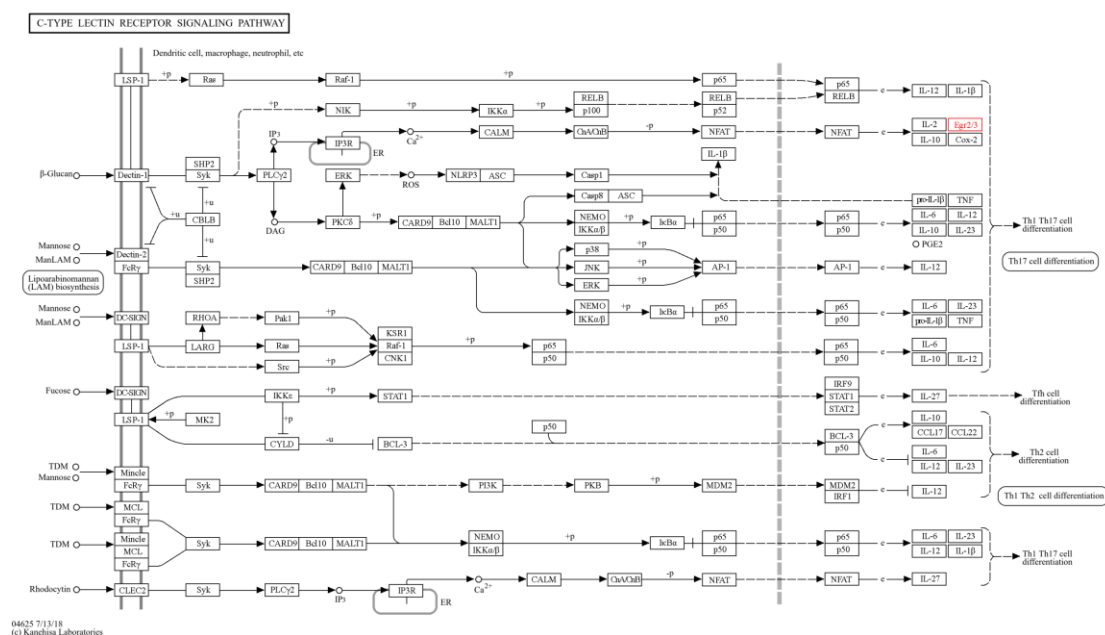


图 4-14 EGR3 的 KEGG 信号通路图
Figure 4-14 KEGG signaling pathway of EGR3

4.3.11 过表达 miR-128-1-5p 对 IgE 诱导信号通路的影响

在 I 型超敏反应中, AKT 可以介导 Ca^{2+} 的释放, 而通过 MAPK 通路的信号传导可以释放炎症因子, 导致细胞凋亡, 因此本实验检测了这两种通路的关键信号分子 AKT 和 ERK1/2 的磷酸化水平。结果表明 (图 4-15), 在诱导 I 型超敏反应后可以提高 AKT 与 ERK1/2 磷酸化, 在过表达 miR-128-1-5p 后 AKT 与 ERK1/2 磷酸化程度均显著下降。

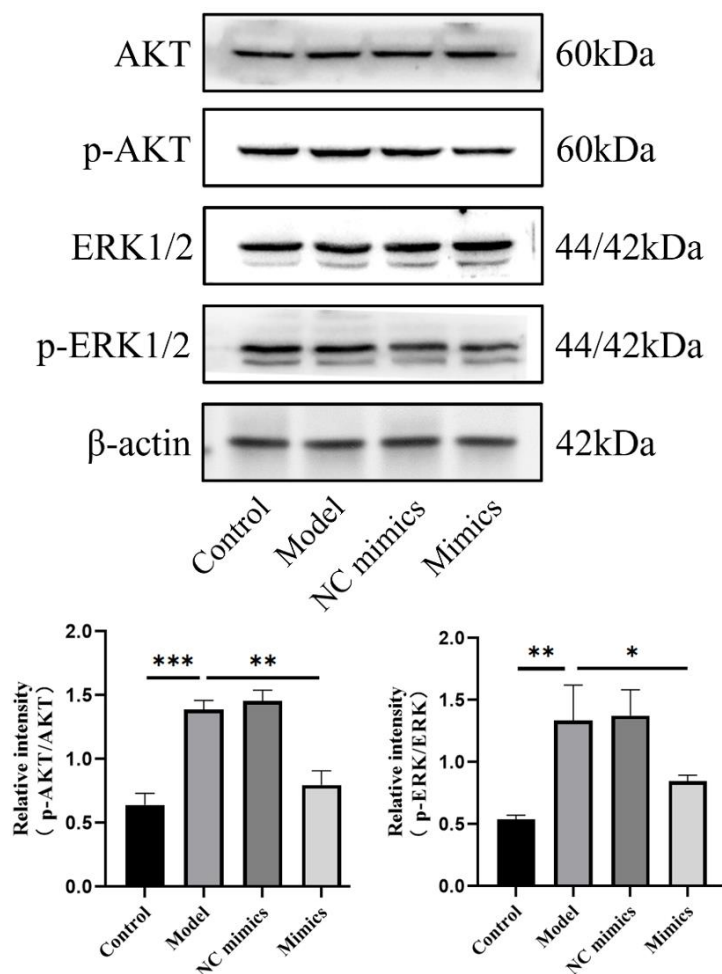


图 4-15 过表达 miR-128-1-5p 后对 p-AKT/AKT 与 p-ERK/ERK 蛋白影响

Figure 4-15 Effects of overexpression of miR-128-1-5p on p-AKT/AKT and p-ERK/ERK proteins

4.4 讨论

在之前的实验中，我们发现 miR-128-1-5p 可以对 I 型超敏反应起到抑制作用，接下来需要明确其靶基因。使用目前常用并且具有权威性的 miRNA 靶基因预测数据库 miranda、targetscan 与 miRWalk 对 miR-128-1-5p 的靶基因进行检索^[114, 115]，多个数据库得到的结果取交集能够更好的规避假阳性，减小各数据库匹配方式带来的误差，并且提高筛选到的基因与 miR-128-1-5p 靶向结合的可能性与显著性。最终预测到的靶基因与差异表达 mRNA 的 5 个重叠基因中，DICER1 在测序结果中差异下调，其他 4 个均为差异上调，分别为 PALM、CPNE5、SIK1、EGR3。由于 miRNA 对靶基因一般是负调控，因此 4 个差异上调的 mRNA 更加具备作为 miR-128-1-5p 靶标的潜力。经过 qRT-PCR 验证后，PALM mRNA 在模型组的表达无显著差异，其他 3 个 mRNA 均显著上调，

与测序结果一致，其中 EGR3 的上调倍数最多，因此选择 CPNE5、SIK1 与 EGR3 进一步验证与 miR-128-1-5p 的靶向关系。

miR-592 具有抑制卵巢癌的作用，通过 Targetscan 与 CCB 数据库筛选到其靶基因 ERBB3，两者的表达水平呈负相关，将 miR-592 过表达后显著降低 ERBB3 水平，之后的双荧光素酶报告实验确定了两者的靶向关系^[116]。因此接下来设计 miR-128-1-5p 的模拟物转染实验，CPNE5 与 SIK1 没有出现下调现象，EGR3 出现了显著下调，说明 EGR3 mRNA 的表达受到了 miR-128-1-5p 的调控。在 miR-128-1-5p 靶基因中，CPNE5 与神经系统有关，在帕金森病中表达失调，可以被 lncRNA 调控减轻神经毒性，作为预防与治疗神经退行性疾病的潜在靶点^[117]。SIK1 则主要起到抑制肿瘤发展与糖异生的作用。SIK1 作为一种肿瘤抑制剂，可以通过 TGF- β 、STAT3、mTOR 等通路抑制多种肿瘤细胞的迁移与增殖。在高葡萄糖水平下的肝细胞中检测到 SIK1 下调，并在细胞核中累积，对其进行异位表达后可以对糖异生信号通路进行调节，为糖尿病治疗提供了新的治疗手段^[118]。CPNE5 与 SIK1 均未在过敏当中被提及，EGR3 已经在之前的研究中被证明与过敏性炎症有关，因此没有对前两者与 miR-128-1-5p 的靶向关系进行更深一步的探讨。

接下来过表达 miR-128-1-5p 后检测 EGR3 蛋白的表达，结果表现出了与 mRNA 相同的趋势。当 miRNA 种子序列，即 2~8 位核苷酸与 mRNA 3'UTR 不完全互补时，一般只影响 mRNA 的翻译过程，当这段序列完全互补时，则会导致 mRNA 的降解，进而影响蛋白的翻译。这说明 miR-128-1-5p 的种子序列可能与 EGR3 3'UTR 区域是完全互补配对的，因此可以在 mRNA 与蛋白水平对 EGR3 起到负调控的作用，下一步则需验证两者间是否存在直接调控的关系。

使用双荧光素酶报告基因是检测 miRNA 与靶基因结合的常用方法^[116, 119]。双荧光素酶报告系统包含两个报告基因，一个是用于检测的萤火虫荧光素酶，另一个是作为内参的海肾荧光素酶。一般将萤火虫荧光素酶与 miRNA 靶基因结合序列串联，海肾荧光素酶与一个组成型启动子偶连，这个组成型启动子不受各种实验条件的影响。当 miRNA 与靶基因序列结合后，则会抑制萤火虫荧光素酶的强度。因此通过检测化学发光的强度，就可以确定 miRNA 与 mRNA 是否可以互补配对。Targetscan 是许多文献中提到的可以预测 miRNA 与靶基因结合位点的数据库^[120]，通过数据库我们预测到了 miR-128-1-5p 与 EGR3 的具体结合序列，将其进行突变，之后对两者进行扩增后插入到

含有荧光素酶报告基因的载体上。本实验载体选择的是 pmirGLO，可以同时表达海参荧光素酶和萤火虫荧光素酶，减少检测时的误差。转染 miR-128-1-5p 的 mimics 之后，含有野生型结合序列的荧光素酶报告基因载体的荧光强度较其对照组减弱，而含突变型结合序列的载体和空载体荧光强度较其对照组无明显变化。这说明 miR-128-1-5p 可以通过种子序列与 EGR3 直接配对。

在 I 型超敏反应中，IgE 的 Fc 片段可以与 FcεRI 的 α 亚基结合形成 IgE-FcεRI 复合物，当特异性抗原与 IgE 结合达到阈值时，会导致 IgE-FcεRI 复合物交联，快速释放生物活性介质，引发过敏性炎症^[121]。当复合物发生交联时，可以激活 Src 家族中 Lyn 与 Fyn。Lyn 能够促使 Syk 与 FcεRIγ-ITAM 结合，催化下游磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸水解生成二酰基甘油（DAG）与肌醇三磷酸（IP3），两者共同驱动钙离子的释放^[122]。在 Lyn-Syk 途径中，MAPK 信号通路也被激活，其中磷酸化的细胞外调节蛋白激酶（ERK）与其主要靶点 PLA2 结合，促使细胞释放花生四烯酸并募集白三烯与前列腺素。Fyn 的激活可以将 PI3K 募集到细胞膜上，催化形成 PIP3，导致 AKT 磷酸化，调节后续 NF-κB、AP-1 等信号通路，使细胞释放炎症因子^[123]。

有报道称，EGR3 可以与 HDAC6 的启动子直接结合，使 IL-27 水平升高导致过敏性炎症。HDAC6 作为 HDAC 家族的一员，是一种 α-微管蛋白去乙酰化酶，可以使 AKT、HSP90、β-catenin、Sam68、Hsc70、HMGN2 等底物去乙酰化，与癌症、系统性红斑狼疮、炎症、过敏、神经系统等多种疾病相关^[124]。有证据显示，HDAC6 过表达后能够显著诱导 ERK、IKKα/β 与 c-Jun 的磷酸化，增加 p65 DNA 结合活性，从而对 MAPK、NF-κB、AP-1 通路进行调控，从而调节促炎因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的表达^[94]。当 HDAC6 缺失时会抑制 AKT 在 Ser473 位点的磷酸化，导致细胞因子 IL-10 减少^[125]。在 KEGG 分析结果中，EGR3 富集到了 C 型凝集素受体信号通路，其中显示 NFAT 介导 EGR3 的发生。当磷脂酶 C（PLC）被激活后，会裂解 PIP2 释放 DAG 与 IP3，随后 IP3 与内质网膜上的受体结合，触发钙离子释放。当内质网钙库中钙离子耗尽时，会激活质膜上的钙释放激活钙调因子 1（ORAI），使其与钙传感器钙调蛋白（CAM）结合，激活钙调磷酸酶。钙调磷酸酶中的亚基 CnA 可以使 NFAT 蛋白去磷酸化，暴露出核定位序列，进入细胞核中，参与 EGR3 的表达^[126, 127]。将 miR-128-1-5p 过表达，AKT 与 ERK1/2 的磷酸化程度较模型组下降。因此 miR-128-1-5p 可能通过与 EGR3 完全互补配

对使其降解, 阻断 EGR3 与 HDAC6 的结合, 从而减少 HDAC6 的表达, 抑制 MAPK 和 AKT 信号通路从而缓解 IgE 诱导的细胞脱颗粒 (图 4-16)。

通过之前的实验, 我们已经确定 miR-128-1-5p 可以对 IgE 介导的细胞脱颗粒现象起到抑制作用。但一个 miRNA 可能通过多个靶基因起到调控作用, 因此本章在敲低 EGR3 的情况下对 miR-128-1-5p 进行抑制或过表达, 检测 miR-128-1-5p 对 IgE 介导的细胞脱颗粒现象是否仍具有调控作用。

在转染 si-EGR3 后, 细胞形态、 β -Hex 与组胺释放、细胞凋亡数量较模型组均有所缓解, 转染 miR-128-1-5p 的抑制剂后, 各项指标较 si-EGR3 组没有明显变化, 说明在缺少 EGR3 的情况下, miR-128-1-5p inhibitor 对细胞脱颗粒的调控并不明显。在转染 si-EGR3 同时转染 miR-128-1-5p mimics, 对脱颗粒各项指标较 si-EGR3 组有进一步的抑制作用, 可能是由于 si-EGR3 与 miR-128-1-5p 两者对 EGR3 起到叠加的抑制作用。在关于重度哮喘的研究中, 通过共转染实验验证了 miR-146a-3p 可通过其靶基因 MBD2 改善 Th17 分化程度。抑制 miR-146a-3p 后会增强 Th17 分化, 同时转染 miR-146a-3p inhibitor 与 si-MBD2 后较 miR-146a-3p inhibitor 组 Th17 分化程度降低; 同时转染 miR-146a-3p mimics 与 si-MBD2 较单独转染 si-MBD2 对 Th17 分化的抑制作用更强^[120]。同理可以证明 miR-128-1-5p 可以通过负调控 EGR3 的表达对 IgE 诱导的脱颗粒起到抑制作用。

但是本实验的不足之处在于, 没有对 EGR3 敲除后抑制与过表达 miR-128-1-5p 的信号通路进行检测, 并且没有设置 si-EGR3 与 mimics 和 inhibitor 的阴性对照共转染的实验组, 而是将共转染组直接与 si-EGR3 组进行对比, 不能排除转染试剂对结果造成的误差, 但是在本实验中未发现阴性对照与转染试剂对实验结果产生影响。

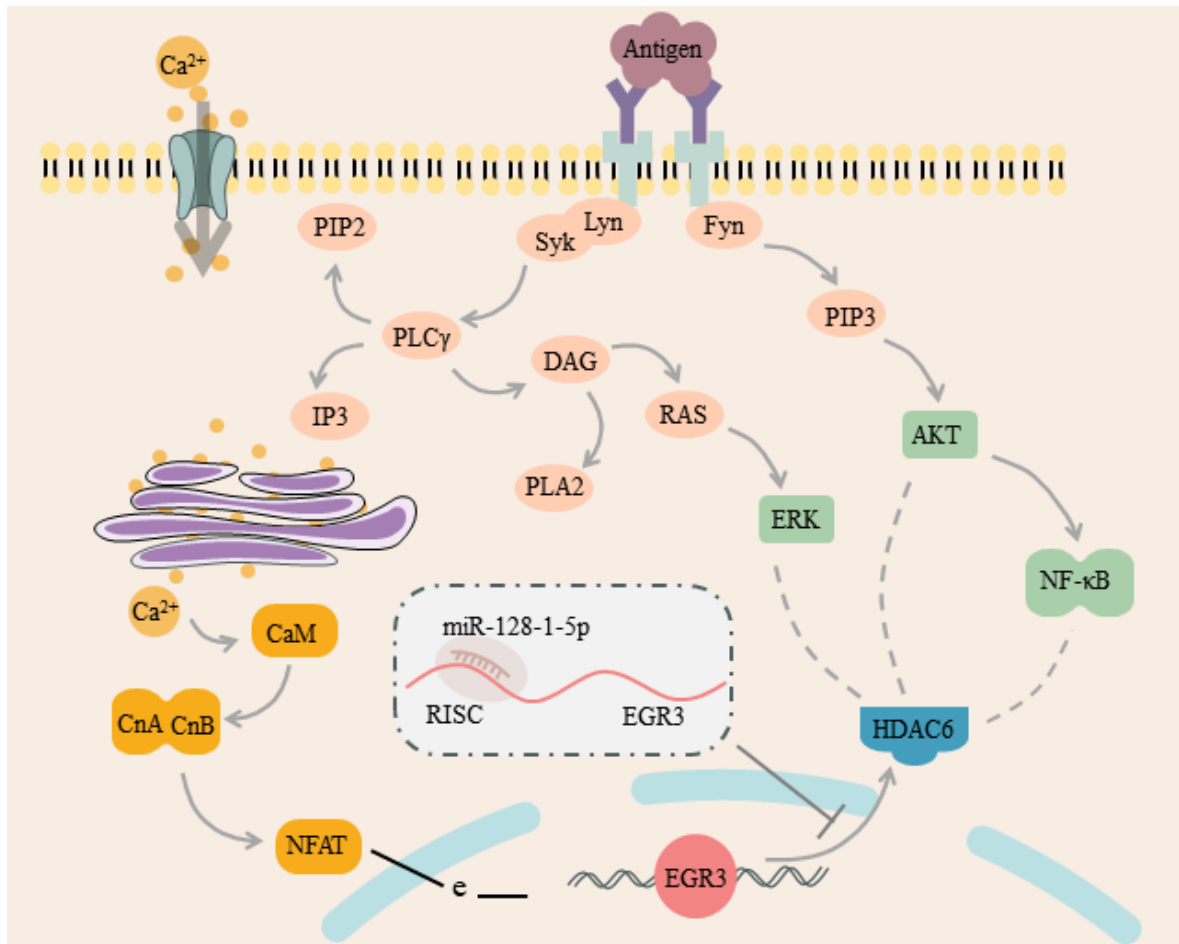


图 4-16 miR-128-1-5p 靶向 EGR3 调控 I 型超敏反应
Figure 4-16 miR-128-1-5p targeting EGR3 regulates type I hypersensitivity reaction

第五章 MiR-128-1-5p 在小鼠哮喘的治疗作用

miR-128-1-5p 可以在体外通过 EGR3 对 I 型超敏反应进行调控，本章建立了 OVA 诱导的小鼠哮喘模型，使用化学修饰后的 miRNA 模拟物 agomir 在小鼠体内使 miR-128-1-5p 过表达，腹腔注射 11R-VIVIT-TFA 在体内抑制 EGR3。通过检测 BALF 中细胞进行分类计数、肺组织病理、血清与 BALF 中细胞因子等，结果发现，miR-128-1-5p 对小鼠哮喘具有显著的治疗效果。

5.1 实验试剂与仪器

5.1.1 实验材料

SPF 级 4~6 周龄雌性昆明小鼠购自斯贝福生物技术有限公司，动物许可证号为 SCXK（京）2019-0004。动物体内过表达 miR-128-1-5p 使用的 agomir 及其对照 NC agomir 由吉玛制药技术有限公司设计、合成。

5.1.2 实验试剂

试剂	生产厂家
卵清蛋白（OVA），≥95%	上海易恩化学技术有限公司
氢氧化铝佐剂	博奥龙科技有限公司
11R-VIVIT-TFA	阿拉丁生化科技股份有限公司
地塞米松	美仑生物技术有限公司
瑞氏-吉姆萨染色液	雷根生物技术有限公司
4%多聚甲醛	碧云天生物科技有限公司
小鼠 IgE、OVA-IgE、IL-4、IL-6、 IL-13、TNF- α ELISA 试剂盒	江苏酶标生物科技有限公司
HE、Masson 染色试剂盒	Solarbio
柱式法 RNA 提取试剂盒	Takara

5.1.3 主要溶液配制

（1）OVA 致敏剂

称取 5 mg OVA 粉末加入到 10 mL 生理盐水中，0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌，与 10 mg/mL 的氢氧化铝佐剂 1: 1 混合，得到 250 μ g/mL 的 OVA 注射用致敏剂，使用时现用

现配。

(2) 2%OVA 雾化剂

称取 200 mg OVA 粉末加入到 10mL 生理盐水中，配制为 20 mg/mL 即 2%的 OVA 雾化剂。

(3) 1 mg/mL NFAT 抑制剂

将 1 mg NFAT 抑制剂溶于 1 mL 生理盐水中。0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，-20℃保存。

5.1.4 主要使用仪器

仪器设备	生产厂家
雾化器	鱼跃医疗设备股份有限公司
匀浆机	Thermo Fisher
石蜡包埋机	亚光医用电子技术有限公司
石蜡切片机	赛维尔生物科技有限公司

5.2 实验方法

5.2.1 OVA 诱导小鼠哮喘模型的建立

5.2.1.1 动物分组

将 36 只雌性小鼠随机平均分为正常组（C 组）、哮喘组（OVA 组）、阴性对照组（NC agomir 组）、miR-128-1-5p 过表达组（agomir 组）、EGR3 敲低组（NFAT inhibitor 组）、阳性药物组（地塞米松组），每组 6 只小鼠。

5.2.1.2 动物致敏

小鼠喂食不含过敏原的饮食与纯净水，适应性饲养一周。在实验的第 1、8、15 天进行致敏。除 C 组腹腔注射 200 μL 生理盐水外，其他各组腹腔注射 200 μL 含 25 μg OVA 与 1 mg 氢氧化铝的致敏剂。

5.2.1.3 动物激发

从第 21 天开始每天对小鼠进行 OVA 雾化激发。除 C 组使用生理盐水雾化外，其他各组使用 2%的 OVA 雾化剂进行激发，每次雾化 1 h，持续 10 天^[128]。

5.2.1.4 药物干预小鼠

从第 21 天开始，miR-128-1-5p 过表达组与阴性对照组通过鼻腔滴注 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的

agomir 与 NC agomir, 50 μ L/只, 每隔一天滴注一次。EGR3 抑制组通过腹腔注射 11R-VIVIT-TFA, 10 mg/kg/只, 每隔一天注射一次。对阳性药物组通过腹腔注射地塞米松注射液, 10 mg/kg/只, 每天注射一次 (图 5-1)。

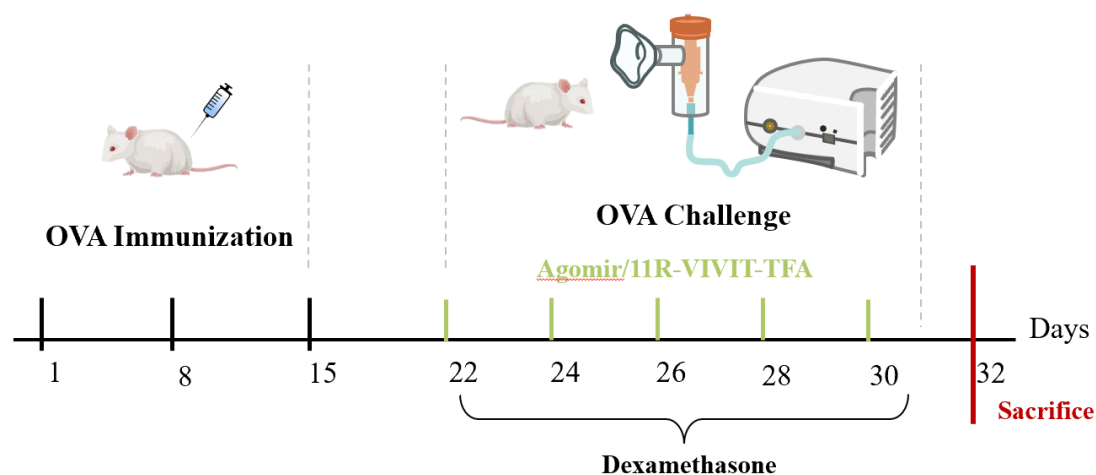


图 5-1 小鼠造膜与给药步骤

Figure 5-1 Steps of mice membrane creation and drug delivery

5.2.2 小鼠行为学观察

在雾化期间观察小鼠的活动、呼吸、大小便等情况, 记录最后一次激发后 10min 内小鼠抓鼻、挠痒等哮喘发作症状并进行评分, 评分标准: 没有抓鼻或挠痒记 0 分, 抓鼻或挠痒 1~3 次记 1 分, 4~6 次记 2 分, 7 次及以上记 3 分; 小鼠无哮喘症状记 0 分, 有轻度哮喘症状记 3 分, 出现呼吸急促、焦躁不安或静止不动症状记 6 分, 出现严重呼吸问题如点头呼吸、腹式呼吸症状记 9 分。

5.2.3 标本收集

小鼠最后一次激发后断食断水, 24 小时后用乙醚麻醉后处死。乙醚麻醉之后, 称重, 摘除眼球, 用 1.5 mL 离心管收集血液, 室温放置 2 h, 3000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min, 取上层血清, 在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。取血后将小鼠脱颈处死。小鼠气管分离, 使用直型灌胃针插管, 通过注射器向肺部缓慢注入 1 mL 预冷的 PBS, 静置 30 s 后轻轻回抽注射器, 回收率达到 80% 即视为合格, 将收集到的肺部灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 转移到 1.5 mL 离心管中, 置于冰上, 将上述操作重复三次。BALF 在 2000 rpm 4 $^{\circ}$ C 下离心 5 min, 上清液置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用, 细胞沉淀使用 PBS 重悬, 用于白细胞分类计数。收集左肺放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中用于提取 RNA 与蛋白, 右肺放置于

4%多聚甲醛中用于切片染色。

5.2.4 白细胞分类计数

取 5.2.3 中获得的细胞悬液在血细胞计数板中进行总细胞计数，取适量悬液滴加在载玻片上推开，晾干，甲醇固定 10 min。吸取适量瑞氏-吉姆萨染色液染色，15 min 后用双蒸水冲洗，置于显微镜下观察。

5.2.5 肺组织病理分析

5.2.5.1 组织包埋与切片

5.2.3 中获得的肺组织在 4%多聚甲醛中固定后进行冲洗、脱水、透明、透蜡、包埋后获得石蜡块，蜡块使用切片机制成 4 μ m 石蜡切片。

5.2.5.2 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色

将石蜡切片置于 60°C 烘箱中烤片 30 min，分别经过二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min、100%乙醇 5 min、90%乙醇 5 min、80%乙醇 5 min、70%乙醇 5 min 脱蜡，使用蒸馏水洗三次，每次 5 min。

苏木精染色 10 min，双蒸水冲洗，1%盐酸乙醇分化，双蒸水冲洗，0.6%氨水返蓝，双蒸水冲洗，伊红染色 5 min，双蒸水冲洗。进行脱水透明：通过 80%乙醇 5 s、90%乙醇 2 min、100%乙醇 2 min、二甲苯 II 5 min、二甲苯 I 5 min，使用中性数胶封片，在显微镜下观察。

5.2.5.3 马森 (Masson) 染色

石蜡切片脱蜡至水步骤同 5.2.5.2。苏木精染色 5 min，双蒸水冲洗，酸性复红液染色 5 min，冰醋酸溶液浸洗，1%磷钼酸溶液分化 5 min，苯胺蓝染色 5 min，冰醋酸溶液浸洗。脱水透明及封片步骤同 5.2.5.2。

5.2.6 ELISA 检测小鼠血清与 BALF 中细胞因子水平

将各组血清与 BALF 从 -80°C 冰箱中取出，在室温下融化，IgE、OVA-IgE、IL-4、IL-6、IL-13 以及 TNF- α 的 ELISA 试剂盒提前 20min 置于室温中平衡，按照试剂盒操作，计算浓度。

5.2.7 qRT-PCR 检测肺组织中 miR-128-1-5p 与 EGR3 mRNA 表达

每组取 40 mg 的肺组织置于 1.5 mL 无酶离心管中，使用柱式 RNA 提取试剂盒进行裂

解、盐份洗涤、沉淀、融解提取 RNA。按 2.2.2 步骤进行 RNA 逆转录与 qRT-PCR 检测。

5.2.8 Western blot 检测肺组织中 EGR3 蛋白的表达

取 5.2.3 中的肺组织，各组称取 100 mg 肺组织置于 1.5mL 离心管中加入适量蛋白酶抑制剂与裂解液混合液，匀浆，15000 rpm 4℃离心 10min，取上清液即为肺组织中蛋白。蛋白定量与 Western blot 操作步骤同 4.2.4。

5.2.9 统计学分析

所有实验数据均表示为平均值±SD。通过单向方差分析（ANOVA）确定统计显著性，使用 GraphPad Prism 版本 9.0 进行 T 检验。统计显著性设置为* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。

5.3 实验结果

5.3.1 小鼠行为学观察

每次雾化期间，哮喘组小鼠出现抓鼻、挠痒、身体蜷缩、烦躁不安、大小便失禁、点头呼吸等症状，药物干预组中上述反应均有所减轻，正常组小鼠偶尔出现抓鼻现象，无异常反应。对各组小鼠进行哮喘行为学评分如图 5-2，正常组评分为 0.67，哮喘组评分为 9.83，较正常组显著升高（ $p < 0.001$ ），agomir 组评分为 4，NFAT inhibitor 组评分为 4.5，地塞米松组为 3.5，三组相较于哮喘组均显著降低（ $p < 0.01$ 或 $p < 0.001$ ），阴性对照组评分为 10.17，与哮喘组无显著差异。

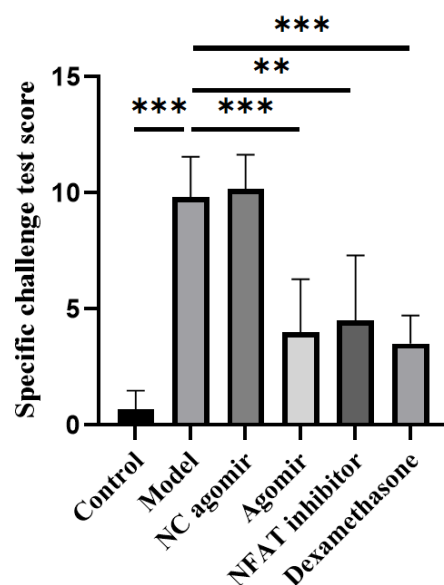


图 5-2 小鼠哮喘行为评分
Figure 5-2 Mice asthma behavior score

5.3.2 BALF 中细胞分类计数

各组 BALF 中细胞涂片的瑞氏-吉姆萨染色结果见图 5-3、5-4，哮喘组小鼠白细胞总数相对于正常组显著增多，对细胞进行分类计数，其中嗜酸性粒细胞在哮喘组中的升高最为显著，这是过敏性哮喘模型制备成功的标志之一，中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞也在哮喘组有所增加。在给药处理组中白细胞总数与各类细胞数量相较于哮喘组均有下降趋势，agomir 组与 NFAT inhibitor 组粒细胞总数、中性粒细胞与嗜酸性粒细胞数量相当，地塞米松组效果则优于这两组。

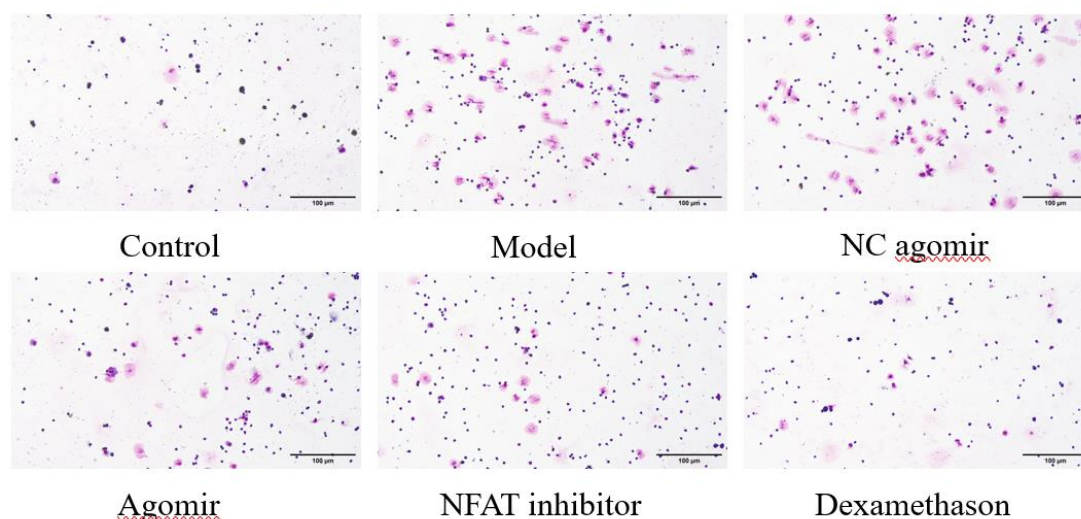


图 5-3 BALF 细胞瑞氏-吉姆萨染色 (bar=100 μm)
Figure 5-3 Wright-Giemsa staining of BALF cells (bar=100 μm)

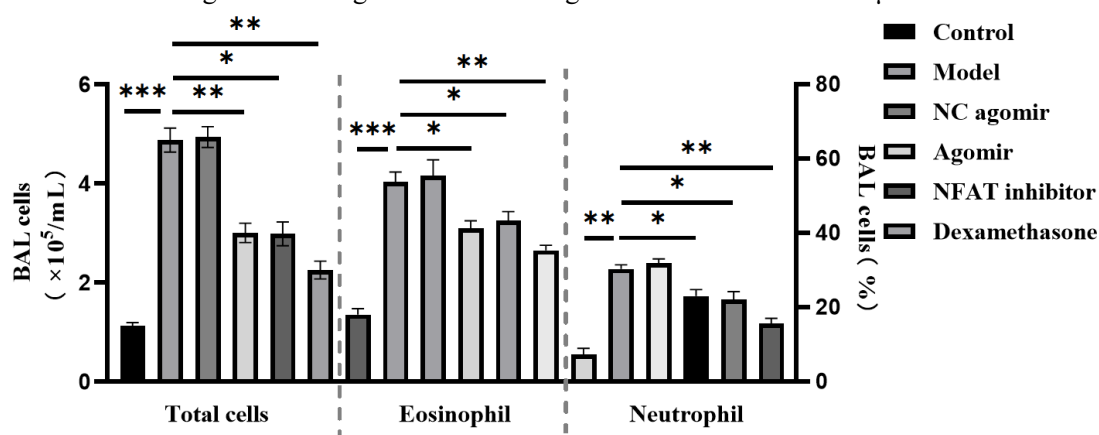


图 5-4 BALF 细胞计数
Figure 5-4 BALF cells amount

5.3.3 肺组织病理学结果

5.3.3.1 HE 染色

小鼠肺组织切片的 HE 染色结果如图 5-5 所示，正常组中各级支气管结构无明显异常，肺泡壁结构清晰，肺内结缔组织与血管均无明显异常，未见明显炎性病变。哮喘组与对照组染色结果中可以观察到肺泡壁有粒细胞浸润，肺泡腔内有少量粒细胞与巨噬细胞渗出，可见肺泡扩张，支气管上皮细胞排列不规则，胞质疏松，血管周围可见大量淋巴细胞及粒细胞浸润。Agomir 组中可见肺泡壁有少量粒细胞浸润，支气管上皮细胞脱落，管腔内可见少量坏死细胞碎片，血管周围可见少量淋巴细胞浸润。NFAT inhibitor 组中可见肺泡壁少量粒细胞浸润，肺泡腔内少量粒细胞与巨噬细胞渗出，支气管上皮细胞排列不规则，胞质疏松，血管周围可见少量粒细胞浸润。地塞米松组可见肺泡壁少量粒细胞浸润，肺泡腔可见少量粒细胞及巨噬细胞渗出，血管无明显异常。说明哮喘组与对照组出现明显病变，三个给药组中粒细胞浸润程度均降低，agomir 组与地塞米松组支气管上皮细胞脱落数量少于 NFAT inhibitor 组，地塞米松组血管结构较其他两组完整。

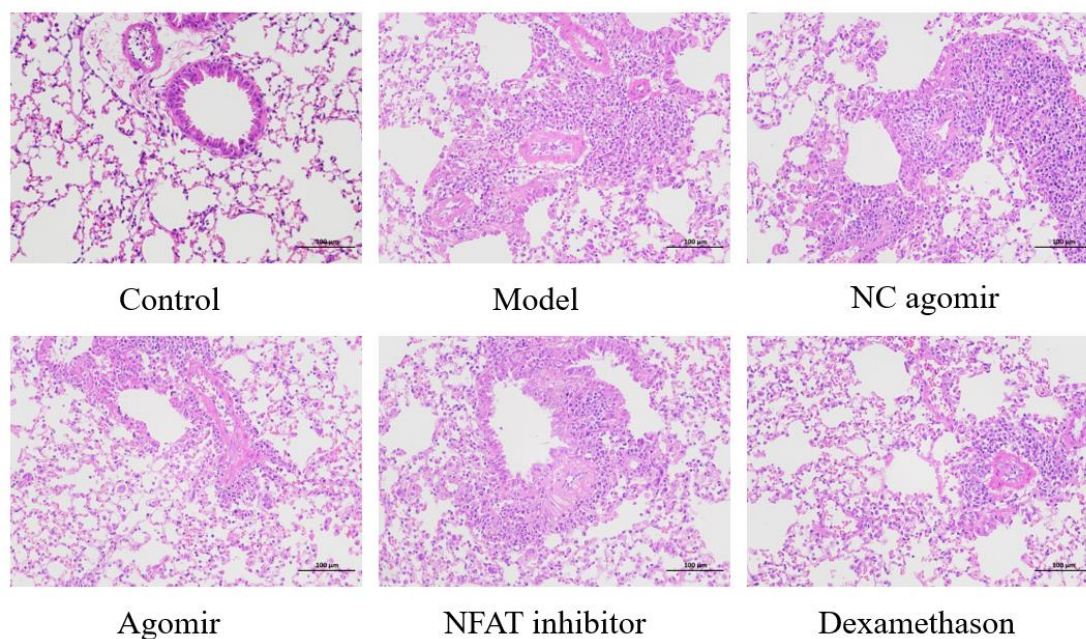


图 5-5 肺组织 HE 染色 (bar=100 μm)

Figure 5-5 HE staining of lung tissue (bar=100 μm)

5.3.3.2 Masson 染色

对小鼠肺组织切片做 Masson 染色，观察肺组织的纤维化程度。染色结果见图 5-6，对各组纤维化面积进行统计分析如图 5-7 所示。模型组与对照组的肺部纤维化面积显著高于正常组，与模型组相比，agomir、NFAT inhibitor 与地塞米松治疗组的肺组织纤维化明显减轻，给药组中地塞米松组纤维化面积最少，agomir 组次之，NFAT inhibitor 组中面积最大。

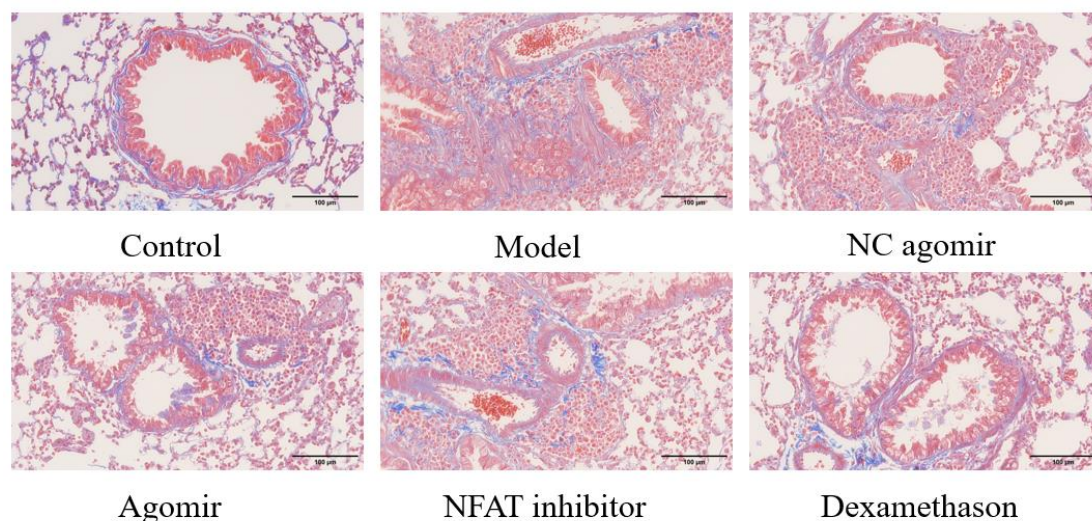


图 5-6 肺组织 Masson 染色 (bar=100 μm)
Figure 5-6 Masson staining of lung tissue (bar=100 μm)

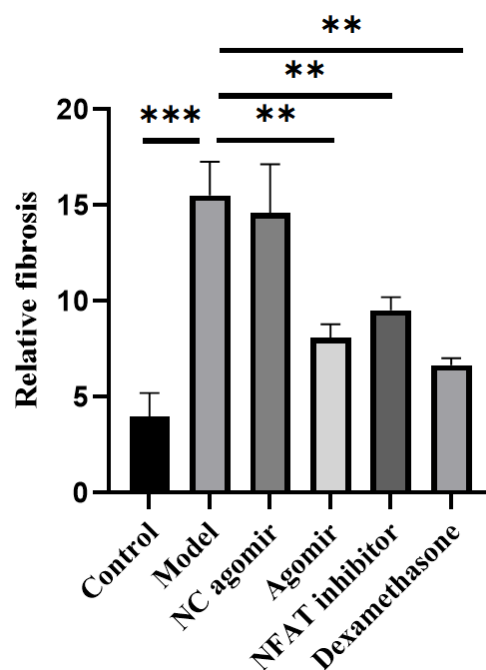


图 5-7 肺组织纤维化面积
Figure 5-7 Fibrotic area of lung tissue

5.3.4 ELISA 检测结果

取各组小鼠血清及 BALF 上清液，使用 ELISA 检测 IgE、OVA-IgE、IL-4、IL-6、IL-13 和 TNF- α 的含量，结果如图 5-8、5-9 所示。哮喘组与对照组血清与 BALF 上清液中各细胞因子含量较正常组均显著增加，给药组中细胞因子含量较哮喘组均有所下降。

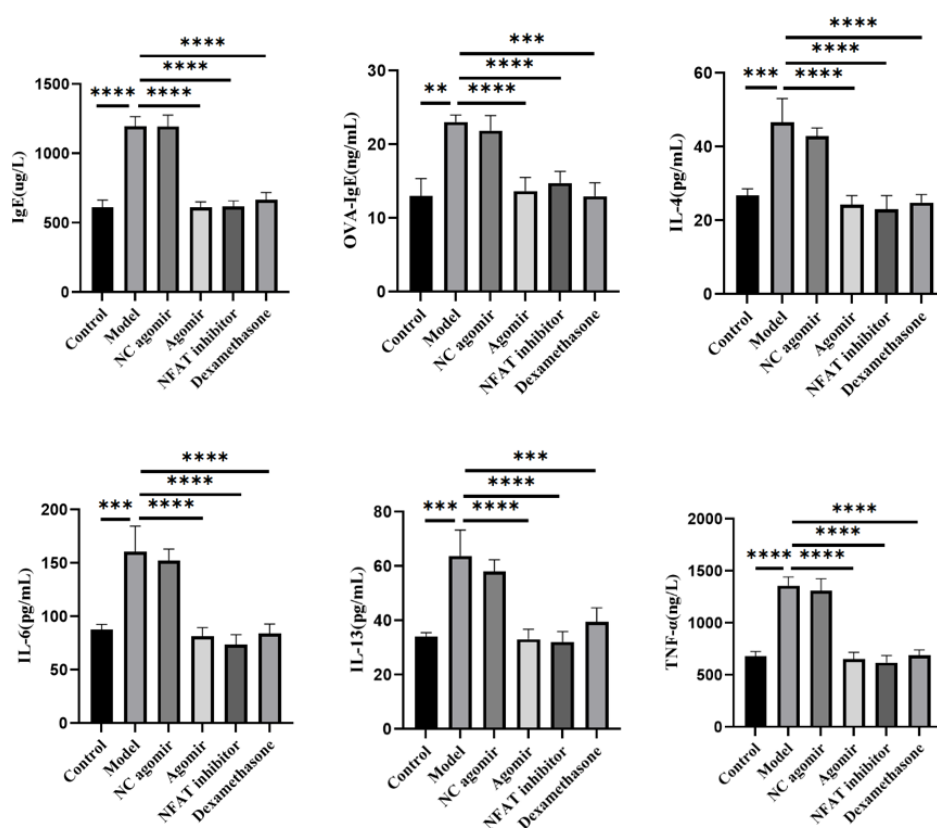


图 5-8 血清中细胞因子水平
Figure 5-8 Cytokine levels in serum

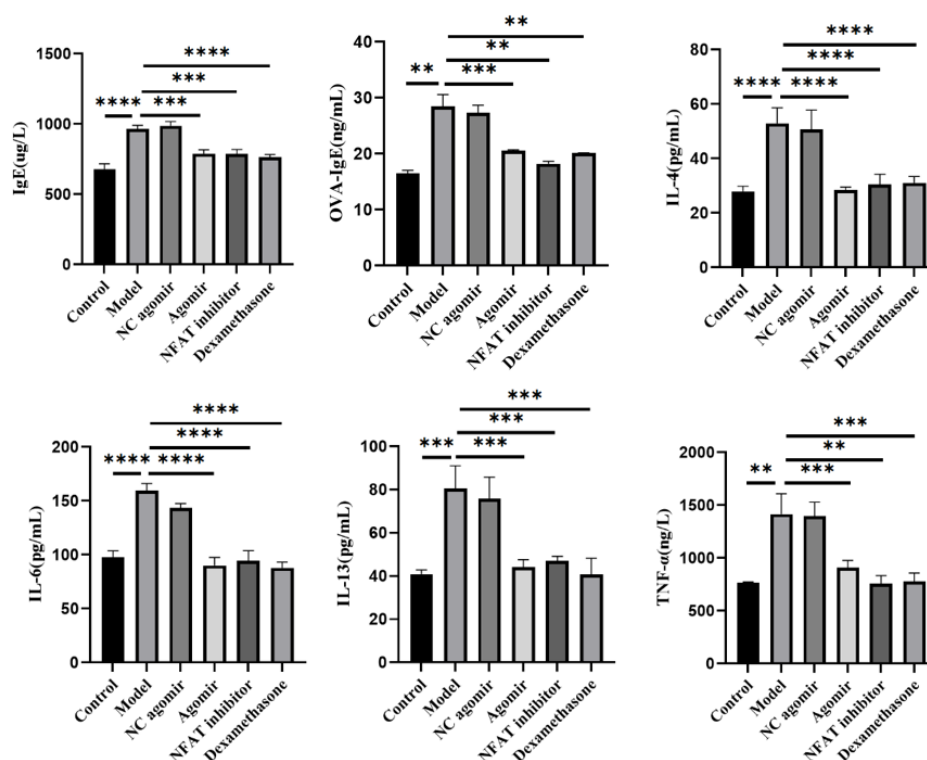


图 5-9 BALF 中细胞因子水平

Figure 5-9 Cytokine levels in BALF

5.3.5 qRT-PCR 检测 miR-128-1-5p 与 EGR3 mRNA 表达

为了验证在体内 miR-128-1-5p 是否仍能对 EGR3 起到调控作用，对两者在小鼠肺组织中的表达进行了 qRT-PCR 分析，结果见图 5-10。分析结果显示，在哮喘组中，miR-128-1-5p 水平较正常组显著下降，经过 agomir 处理后其表达有显著回升。EGR3 在哮喘组中的表达较正常组显著上调，在 NFAT inhibitor 组与 agomir 组中均可被显著下调。结果表明，经过 OVA 诱导后，miR-128-1-5p 与 EGR3 表达水平的变化趋势与细胞中一致，并且在体内 EGR3 的 mRNA 也可以被 miR-128-1-5p 负调控。

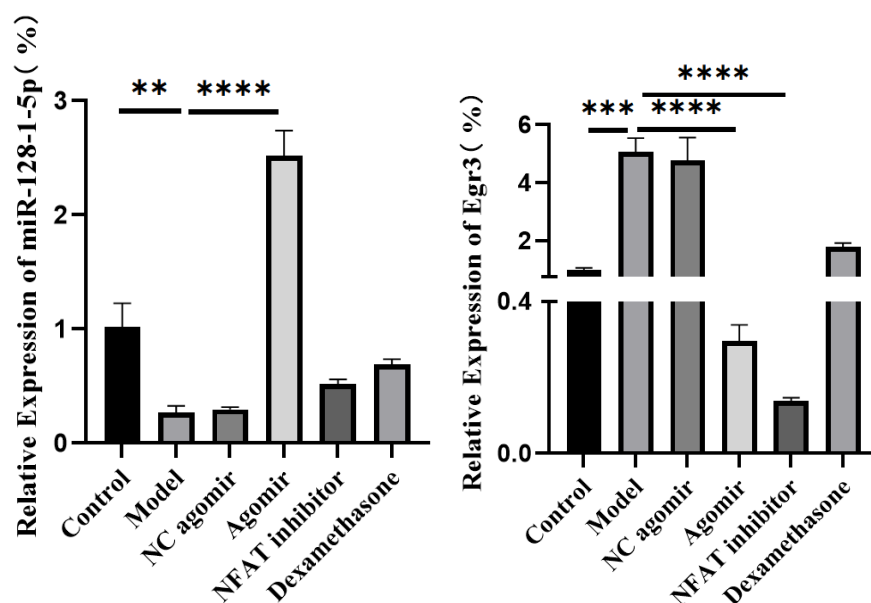


图 5-10 肺组织中 miR-128-1-5p 与 EGR3 mRNA 水平

Figure 5-10 miR-128-1-5p and EGR3 mRNA levels in lung tissue

5.3.6 Western blot 检测 EGR3 蛋白表达

通过 Western blot 检测小鼠肺组织中 EGR3 蛋白的表达量, 结果显示, EGR3 在模型组可以显著上调, 经过 miR-128-1-5p 的 agomir 与 NFAT inhibitor 诱导后可以显著下调, 说明 miR-128-1-5p 可以在体内抑制 EGR3 的蛋白表达 (图 5-11)。

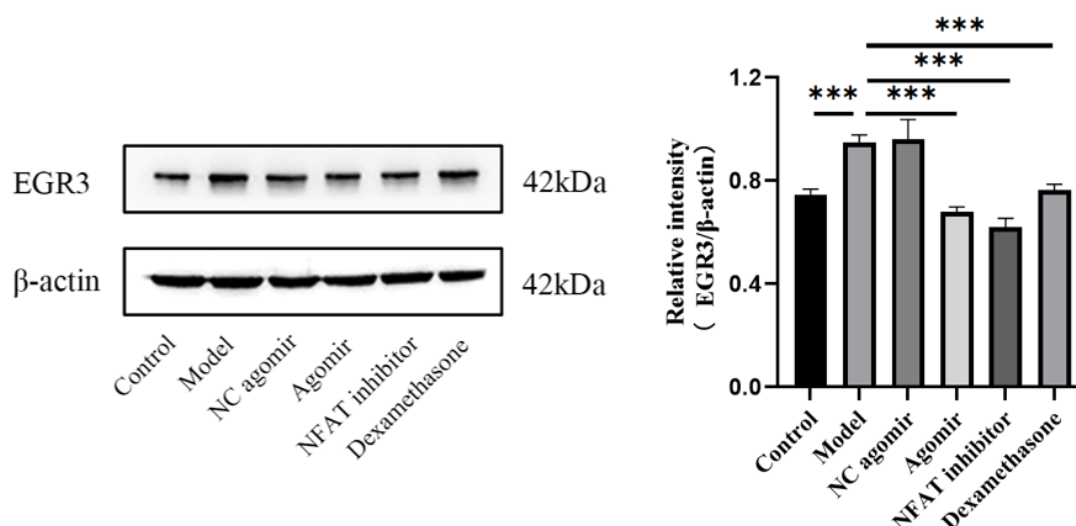


图 5-11 肺组织中 EGR3 蛋白水平

Figure 5-11 EGR3 protein levels in lung tissue

5.4 讨论

哮喘是一种典型的 I 型超敏反应, IgE 的增多与哮喘的发生、进展密切相关, 是哮

喘检测的关键指标^[129]。参考先前的研究建立了 OVA 诱导的小鼠哮喘模型^[128]，哮喘组小鼠出现了点头呼吸、焦躁不安或静止不动、大小便失禁等行为，BALF 中标志性的嗜碱性粒细胞增多，肺组织切片 HE 染色后观察到大量炎性细胞浸润、支气管上皮细胞排列不规则，Masson 染色结果中纤维化程度增加，IgE 表达增加，说明了哮喘模型建立成功。

本实验中选择 agomir 使 miR-128-1-5p 在小鼠体内过表达，使用活化的 T 细胞核因子抑制剂 11R-VIVIT-TFA 抑制 EGR3 的表达，地塞米松作为阳性治疗药物。agomir 可以模拟内源性 miRNA 构成 RISC 复合物发挥作用，比普通的 mimics 具有更高的稳定性，通过滴鼻给药实现 miR-128-1-5p 在肺部的富集^[130]。EGR3 是 FasL 表达的关键激活因子，在 NFAT 敲除小鼠中观察到了 FasL 诱导受损，当提供外源性 NFAT 时，则表现出 EGR3 依赖性 FasL 活性恢复^[131]。当细胞内钙水平升高时，钙调磷酸酶可使 NFATc1-NFATc4 亚型去磷酸化，随后进入到细胞核中触发下游靶点的表达^[127, 132]，EGR3 主要定位于细胞核中，已有研究证明 NFAT 参与了 EGR3 基因的表达^[133]。因此实验中通过腹腔注射 NFAT inhibitor 在体内抑制 EGR3 的表达。地塞米松作为一种糖皮质激素可以用于治疗自身免疫性疾病、过敏、眼部疾病和癌症等，可以通过抑制 NF- κ B 通路有效减少炎症介质释放，是目前临床常用于治疗哮喘的药物^[134]。本实验使用地塞米松作为阳性对照药物。

qRT-PCR 与 Western blot 检测结果显示 agomir 可以在体内有效过表达 miR-128-1-5p，并对 EGR3 实现负调控，并且在体内过表达 miR-128-1-5p 或抑制 EGR3 表达均可以减轻小鼠哮喘症状。

大量研究表明，IL-4、IL-13 所引起的 II 型免疫是造成过敏性哮喘的主要原因，IgE 是哮喘的治疗靶点与生物标志物，TNF- α 在许多肺部炎症中有重要作用，TNF- α 抑制剂目前被作为治疗哮喘的潜在药物，IL-6 反映了肺组织损伤与气道炎症程度^[135-137]，因此实验中通过 ELISA 检测这些细胞因子水平作为哮喘当中过敏与炎症的指标。嗜酸性粒细胞是哮喘发病中的主要促炎细胞，哮喘涉及到的支气管炎症也会造成中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数量的变化^[138]。HE 染色可以反映出细胞与组织结构信息，Masson 染色可以使胶原纤维呈蓝色，统计染蓝色的面积作为组织纤维化程度。结果显示 agomir 与 11R-VIVIT-TFA 可以治疗小鼠哮喘。

在体外实验中,我们证明了 miR-128-1-5p 可以通过靶向 EGR3 对 ERK 与 AKT 参与的信号通路起到调控作用,这两个信号因子也在哮喘中发挥重要作用。STAT-6 是哮喘的关键调节因子,ERK 可以通过磷酸化 STAT-6 的丝氨酸残基来激活 STAT-6,也可以增加 IgE 与 IL-4 等炎症介质的产生,目前有许多研究致力于通过抑制 ERK 来治疗哮喘^[139, 140]。AKT 可以使下游 NF- κ B 通路激活,也会使 Th1/Th2 分泌比例失衡造成 Th2 分泌过多的 IL-4 与 IL-10 导致炎症反应。一些 miRNA 显示出可以靶向这些通路对哮喘有治疗或预防的效果。miR-200a 与 miR-200b 能够靶向 ORMDL3 对 ERK 的磷酸化水平起到抑制作用,对这两种 miRNA 抑制后则会导致炎症因子的表达增加^[141]。FOXC1 可以激活 PI3K/AKT 通路,miR-200a 可以降低 FOXC1 表达,抑制肺组织纤维化与下游 NF- κ B 通路的活化。lncRNA RP5-857K21.7 可以作为 miR-508-3p 的海绵调节 PI3K/AKT/mTOR 通路,抑制哮喘导致的细胞凋亡^[142, 143]。因此在体内增加 miR-128-1-5p 的表达后可能仍然能够通过靶向 EGR3 调控 ERK 与 AKT,在哮喘中起到抑制作用。

EGR3 还显示出了在上皮细胞中的调控作用。在哮喘患者的支气管上皮细胞的转录组测序与脂多糖诱导的肺泡上皮细胞中均观察到了 EGR3 表达增加,并且会使肺泡上皮细胞活力下降,增加细胞凋亡^[85, 144]。气道重塑是哮喘的一种临床表现,在气道平滑肌细胞中,lncRNA ANRIL 可以通过调节 miR-7-5p/EGR3 信号传导来抑制气道重塑^[145]。因此 miR-128-1-5p 还有可能通过负调控 EGR3 对肺部的上皮细胞起到保护作用,减轻气道重塑,从而抑制哮喘的发展。

一些经典的 miRNA 作为药物已经进入到了临床实验阶段,但是其副反应也是需要克服的难题。miRNA 在体内对基因的调控广泛,并且机制复杂,对一个 miRNA 的水平进行调节往往会引起机体不可预测的反应,难以做到特异性沉默靶基因^[55]。并且 miRNA 的递送方式也是产生免疫相关不良反应的原因^[52]。实验中仅证明了 miR-128-1-5p 的 agomir 可以在小鼠体内减轻哮喘症状,对于其靶向的信号通路还需要进一步验证。miR-128-1-5p 的靶基因不止有 EGR3,因此在 agomir 给药后可能会由于靶向其他关键基因而产生副作用,由于小鼠哮喘模型的构建周期短,未能观察到小鼠不良反应的发生。本实验结果中 miR-128-1-5p 的模拟物在细胞内可以使其表达量增加数十倍,但是在体内的效果远不如体外,这可能是由于体内环境比较复杂,导致 agomir 的降解,也有可能是一部分药物未能进入到肺组织当中^[146]。若能继续丰富 miR-128-1-5p 的调控网络,

改善药物修饰方法，采用损耗小的给药途径，那么 miR-128-1-5p 的模拟物则具有作为治疗哮喘等 I 型超敏反应药物的潜力。

第六章 结论

- 1、通过全转录组技术分析得到了与 I 型超敏反应相关的 miR-128-1-5p 与 EGR3。
- 2、体内、体外实验表明，miR-128-1-5p 靶向 EGR3 抑制细胞脱颗粒，通过调控 AKT 与 ERK 信号通路，起到治疗 I 型超敏反应的作用。

参考文献

- [1] Zhang H, Wang BK, Zhang YF, et al. Nomenclature of allergy: Past and present[J]. *Transfusion Clinique Et Biologique*, 2023, 30(1): 22-24.
- [2] Vitte J, Vibhushan S, Bratti M, et al. Allergy, anaphylaxis, and nonallergic hypersensitivity: IgE, mast cells, and beyond[J]. *Medical Principles and Practice*, 2022, 31(6): 501-515.
- [3] Bilò MB, Martini M, Tontini C, et al. Anaphylaxis[J]. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 2020, 53(01): 4-17.
- [4] Shamji MH, Valenta R, Jardetzky T, et al. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease[J]. *Allergy*, 2021, 76(12): 3627-3641.
- [5] Galli SJ and Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(5): 693-704.
- [6] Maurer M, Khan DA, Komi DEA, et al. Biologics for the use in chronic spontaneous urticaria: When and which[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2021, 9(3): 1067-1078.
- [7] David PB. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97.
- [8] Oszlak F, Poling LL, Wang Z, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters[J]. *Genes & Development*, 2008, 22(22): 3172-3183.
- [9] Bartel DP. Metazoan MicroRNAs[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 20-51.
- [10] García-López J, Briño-Enríquez MA, and Mazo DJ. MicroRNA biogenesis and variability[J]. *BioMolecular Concepts*, 2013, 4(4): 367-380.
- [11] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear Export of MicroRNA Precursors[J]. *Science*, 2004, 303(5654): 95-98.
- [12] Minju H, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(8): 509-24.
- [13] Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, et al. Extracellular miRNAs: From biomarkers to mediators of physiology and disease[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 30(4): 656-673.
- [14] Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, et al. MicroRNAs: new players in IBD[J]. *Gut*, 2015, 64(3): 504-513.
- [15] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Research*, 2009, 19(1): 92-105.
- [16] Kilikevicius A, Meister G, and Corey DR. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(2): 617-634.
- [17] King VM and Borchert GM. MicroRNA expression: Protein participants in microRNA regulation[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1617: 27-23.
- [18] Matsuyama H and Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease

- pathogenesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 21(1): 132.
- [19] Vali R, Azadi A, Tizno A, et al. MiRNA contributes to neuropathic pains[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253 (4): 126893.
- [20] Diggins NL and Hancock MH. Viral miRNA regulation of host gene expression[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2023, 146: 2-19.
- [21] Liu YH, Nie HG, Ding Y, et al. MiRNA, a new treatment strategy for pulmonary fibrosis[J]. Current Drug Targets, 2021, 22(7): 793-802.
- [22] Reddy S, Hu DQ, Zhao M, et al. miR-21 is associated with fibrosis and right ventricular failure[J]. Journal of Clinical Investigation, 2017, 2(9): e91625.
- [23] Zhao W, Zhao SP, and Zhao YH. MicroRNA-143/-145 in cardiovascular diseases[J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 1-9.
- [24] Sassi Y, Avramopoulos P, Ramanujam D, et al. Cardiac myocyte miR-29 promotes pathological remodeling of the heart by activating Wnt signaling[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 1614.
- [25] Liu LR, Ren WH, Chen KS. MiR-34a promotes apoptosis and inhibits autophagy by targeting HMGB1 in acute myeloid leukemia cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(5): 1981-1992.
- [26] Qu Y, Zhang H, Sun W, et al. MicroRNA-155 promotes gastric cancer growth and invasion by negatively regulating transforming growth factor- β receptor 2[J]. Cancer Science, 2018, 109(3): 618-628.
- [27] Carreras BG, Runnel T, Plaas M, et al. microRNA-146a is linked to the production of IgE in mice but not in atopic dermatitis patients[J]. Allergy, 2018, 73(12): 2400-2403.
- [28] Jia H, Zhang R, Liang X, et al. Regulatory effects of miRNA-126 on Th cell differentiation and cytokine expression in allergic rhinitis[J]. Cellular Signalling, 2022, 99: 110435.
- [29] Jia M, Chu C, Wang M. Correlation of microRNA profiles with disease risk and severity of allergic rhinitis[J]. International Journal Of Clinical And Experimental Pathology, 2018, 11(3): 1791-1802.
- [30] Qiu CY, Cui XY, Lu MP, et al. CircRNA expression profiles and circRNA-miRNA-mRNA crosstalk in allergic rhinitis[J]. World Allergy Organization Journal, 2021, 14(6): 100548.
- [31] Yu B, Yao L, Liu C, et al. Upregulation of microRNA-16 alters the response to inhaled β -agonists in patients with asthma though modulating expression of ADRB2[J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 19(5): 4027-4034.
- [32] Dong X, Xu M, Ren Z, et al. Regulation of CBL and ESR1 expression by microRNA-22-3p, 513a-5p and 625-5p may impact the pathogenesis of dust mite-induced pediatric asthma[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 38(2): 446-456.
- [33] Shi Z, Zhao C, Guo X, et al. Differential expression of microRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ER α expression in estrogen-induced insulin resistance[J]. Endocrinology, 2014, 155(5): 1982-1990.
- [34] Ono K, Igata M, Kondo T, et al. Identification of microRNA that represses IRS-1 expression in liver[J].

- The Public Library of Science, 2018, 13(1): e0191553.
- [35] Keller T, Boeckel JN, Groß S, et al. Improved risk stratification in prevention by use of a panel of selected circulating microRNAs[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4511.
- [36] Shan Z, Qin S, Li W, et al. An endocrine genetic signal between blood cells and vascular smooth muscle cells[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2015, 65(23): 2526-2537.
- [37] Nguyen MA, Hoang HD, Rasheed A, et al. miR-223 exerts translational control of proatherogenic genes in macrophages[J]. Circulation Research, 2022, 131(1): 42-58.
- [38] Guo H, Zhang Y, Liao Z, et al. MiR-146a upregulates FOXP3 and suppresses inflammation by targeting HIPK3/STAT3 in allergic conjunctivitis[J]. Annals of Translational Medicine, 2022, 10(6): 344-344.
- [39] Zhang Y, Yang YJ, 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.
- [40] Mann M, Mehta A, Zhao JL, et al. An NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 851.
- [41] Zhou H, Li J, Gao P, et al. miR-155: A novel target in allergic asthma[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1773.
- [42] Mohammed Z, McHale C, Kubinak JL, et al. miR-155 is a positive regulator of Fc ϵ RI-induced cyclooxygenase-2 expression and cytokine production in mast cells[J]. Frontiers in Allergy, 2022, 3: 835776.
- [43] Zhang X, Zhang YX, Liu X, et al. Direct quantitative detection for cell-free miR-155 in urine: a potential role in diagnosis and prognosis for non-muscle invasive bladder cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(3): 3255-66.
- [44] Gadducci A, Cosio S. Screening for ovarian cancer in the general population: State of art and perspectives of clinical research[J]. Anticancer Research, 2022, 42(9): 4207-4216.
- [45] Ahmadi H, Jang TL, Daneshmand S, et al. MicroRNA-371a-3p as a blood-based biomarker in testis cancer[J]. Asian Journal of Urology, 2021, 8(4): 400-406.
- [46] Ottosen S, Parsley TB, Yang L, et al. In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C Virus therapeutic targeting the human factor miR-122[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(1): 599-608.
- [47] Xu WD, Feng SY, Huang AF. Role of miR-155 in inflammatory autoimmune diseases: a comprehensive review[J]. Inflammation Research, 2022, 71(12): 1501-1517.
- [48] Anastasiadou E, Seto AG, Beatty X, et al. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, slows DLBCL tumor cell growth in vitro and in vivo[J]. Clinical Cancer Research, 2021, 27(4): 1139-1149.
- [49] Zandwijk NV, Pavlakis N, Kao SC, et al. Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-

- escalation study[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(10): 1386-1396.
- [50] Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, et al. A MicroRNA-29 mimic (remlarsen) represses extracellular matrix expression and fibroplasia in the skin[J]. *Journal Of Investigative Dermatology*, 2019, 139(5): 1073-1081.
- [51] Chioccioli M, Roy S, Newell R, et al. A lung targeted miR-29 mimic as a therapy for pulmonary fibrosis[J]. *eBioMedicine*, 2022, 85: 104304.
- [52] Li WJ, Wang Y, Liu R, et al. MicroRNA-34a: Potent tumor suppressor, cancer stem cell inhibitor, and potential anticancer therapeutic[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 640587.
- [53] Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, et al. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors[J]. *Investigational New Drugs*, 2016, 35(2): 180-188.
- [54] Deng YL, Campbell F, Han K, et al. Randomized clinical trials towards a single-visit cure for chronic hepatitis C: Oral GSK2878175 and injectable RG-101 in chronic hepatitis C patients and long-acting injectable GSK2878175 in healthy participants[J]. *Journal Of Viral Hepatitis*, 2020, 27(7): 699-708.
- [55] Zhang S, Cheng Z, Wang Y, et al. The risks of miRNA therapeutics: In a drug target perspective[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021, 15: 721-733.
- [56] Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, et al. EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors[J]. *Oncogene*, 1991, 6(6): 917-28.
- [57] O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, et al. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience[J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(4): 167-73.
- [58] Wang B, Guo H, Yu H, et al. The role of the transcription factor EGR1 in cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 642547.
- [59] Zou K, Zeng Z. Role of early growth response 1 in inflammation-associated lung diseases[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2023, 325(2): 143-154.
- [60] Hadziselimovic F, Hadziselimovic NO, Demougin P, et al. EGR4 is a master gene responsible for fertility in cryptorchidism[J]. *Sexual Development*, 2009, 3(5): 253-263.
- [61] Hogarth CA, Mitchell D, Small C, et al. EGR4 displays both a cell and intracellular-specific localization pattern in the developing murine testis[J]. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(11): 3106-3114.
- [62] Morita K, Okamura T, Sumitomo S, et al. Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity[J]. *Rheumatology*, 2016, 55(2): 76-81.
- [63] Davis S, Bozon B, Laroche S. How necessary is the activation of the immediate early gene zif268 in synaptic plasticity and learning? [J]. *Behavioural Brain Research*, 2003, 142(1-2): 17-30.
- [64] Pfaffenseller B, Kapczinski F, Gallitano AL, et al. EGR3 immediate early gene and the brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder[J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2018, 12: 15.

- [65] Nie F, Zhang Q, Ma J, et al. Schizophrenia risk candidate EGR3 is a novel transcriptional regulator of RELN and regulates neurite outgrowth via the Reelin signal pathway in vitro[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2020, 157(6): 1745-1758.
- [66] Gallitano-Mendel A, Izumi Y, Tokuda K, et al. The immediate early gene early growth response gene 3 mediates adaptation to stress and novelty[J]. *Neuroscience*, 2007, 148(3): 633-643.
- [67] Gao X, Daugherty RL, Tourtellotte WG. Regulation of low affinity neurotrophin receptor (p75NTR) by early growth response (Egr) transcriptional regulators[J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2007, 36(4): 501-514.
- [68] Li L, Eldredge LC, Quach DH, et al. Egr3 dependent sympathetic target tissue innervation in the absence of neuron death[J]. *The Public Library of Science*, 2011, 6(9): e25696.
- [69] Eldredge LC, Gao XM, Quach DH, et al. Abnormal sympathetic nervous system development and physiological dysautonomia in Egr3-deficient mice[J]. *Development*, 2008, 135(17): 2949-2957.
- [70] Collins S, Waickman A, Basson A, et al. Regulation of CD4⁺ and CD8⁺ effector responses by sprouty-1[J]. *The Public Library of Science*, 2012, 7(11): e49801.
- [71] Zhang S, Xia C, Xu C, et al. Early growth response 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Fas ligand[J]. *International Journal of Oncology*, 2017, 50(3): 805-814.
- [72] Salotti J, Sakchaisri K, Tourtellotte WG, et al. An Arf-Egr-C/EBP β pathway linked to ras-induced senescence and cancer[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2023, 35(5): 866-883.
- [73] Hayashi S, Yamaguchi Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 109(3-5): 201-6.
- [74] Dahai Z, Daliang C, Famu L, et al. Lowly expressed lncRNA PVT1 suppresses proliferation and advances apoptosis of glioma cells through up-regulating microRNA-128-1-5p and inhibiting PTBP1[J]. *Brain Research Bulletin*, 2020, 163: 1-13.
- [75] Baron VT, Pio R, Jia Z, et al. Early growth response 3 regulates genes of inflammation and directly activates IL6 and IL8 expression in prostate cancer[J]. *British Journal of Cancer*, 2015, 112(4): 755-764.
- [76] Pio R, Jia Z, Baron VT, et al. Early growth response 3 (Egr3) is highly over-expressed in non-relapsing prostate cancer but not in relapsing prostate cancer[J]. *the Public Library of Science*, 2013, 8(1): e54096.
- [77] Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, et al. Quercetin-resveratrol combination for prostate cancer management in TRAMP mice[J]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2141.
- [78] Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, et al. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in fasL regulation[J]. *Immunity*, 2000, 12: 293-300.
- [79] Li S, Miao T, Sebastian M, et al. The transcription factors Egr2 and Egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T Cells[J]. *Immunity*, 2012, 37(4): 685-

- 696.
- [80] Kearney SJ, Delgado C, Eshleman EM, et al. Type I IFNs downregulate myeloid cell IFN- γ receptor by inducing recruitment of an early growth response 3/NGFI-A binding protein 1 complex that silences ifngr1 transcription[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 191(6): 3384-3392.
- [81] Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, et al. Autoimmunity associated with TGF- β 1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression[J]. *Journal Of Clinical Investigation*, 1996, 98(9): 2109-19.
- [82] Kehrl JH, Thevenin C, Rieckmann P, et al. Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA[J]. *Journal of Immunology*, 1991, 146(11): 4016-23.
- [83] Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, et al. Transcription factor early growth response 3 is associated with the TGF- β 1 expression and the regulatory activity of CD4-positive T cells in vivo[J]. *Journal of Immunology*, 2013, 191(5): 2351-9.
- [84] Parkinson RM, Collins SL, Horton MR, et al. Egr3 induces a Th17 response by promoting the development of $\gamma\delta$ T Cells[J]. *the Public Library of Science ONE*, 2014, 9(1): e87265.
- [85] Yang H, Dong Y, Zhou Y, et al. Overexpression of miR-874-3p alleviates LPS-induced apoptosis and inflammation in alveolar epithelial cell by targeting EGR3/NF- κ B[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2021, 68(2): 231-238.
- [86] Kwon Y, Kim M, Kim Y, et al. EGR3-HDAC6-IL-27 axis mediates allergic inflammation and is necessary for tumorigenic potential of cancer cells enhanced by allergic inflammation-promoted cellular interactions[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 680441.
- [87] Mitra S, Thomas SA, Martin JA, et al. EGR3 regulates opioid-related nociception and motivation in male rats[J]. *Psychopharmacology*, 2022, 239(11): 3539-3550.
- [88] Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011, 31(5): 980-5.
- [89] Liu J, Zhao F, Zhang Y, et al. C6 ceramide inhibits canine mammary cancer growth and metastasis by targeting EGR3 through JAK1/STAT3 signaling[J]. *Animals*, 2024, 14(3): 422.
- [90] Butt C, Lim S, Greenwood C, et al. VEGF, FGF1, FGF2 and EGF gene polymorphisms and psoriatic arthritis[J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2007, 8: 1.
- [91] Liu D, Evans I, Britton G, et al. The zinc-finger transcription factor, early growth response 3, mediates VEGF-induced angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2008, 27(21): 2989-98.
- [92] Wieland GD, Nehamann N, Müller D, et al. Early growth response proteins EGR-4 and EGR-3 interact with immune inflammatory mediators NF-kappaB p50 and p65[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(14): 3203-12.
- [93] Su XM, Ren Y, Li ML, et al. Performance evaluation of histone deacetylases in lungs of mice exposed

- p to ovalbumin aerosols[J].
- Journal Of Physiology And Pharmacology*
- , 2018, 69(2): 265-273.
- [94] Youn GS, Lee KW, Choi SY, et al. Overexpression of HDAC6 induces pro-inflammatory responses by regulating ROS-MAPK-NF- κ B/AP-1 signaling pathways in macrophages[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 97: 14-23.
- [95] Kwon Y, Choi Y, Kim M, et al. HDAC6-MYCN-CXCL3 axis mediates allergic inflammation and is necessary for allergic inflammation-promoted cellular interactions[J]. *Molecular Immunology*, 2024, 166: 1-15.
- [96] Kim W, Hwang S, Lee N, et al. Transcriptome and translome profiles of *Streptomyces* species in different growth phases[J]. *Scientific Data*, 2020, 7(1): 138.
- [97] Zhou ZW, Ji K., Zhu XY, et al. Natural isoflavone formononetin inhibits IgE-mediated mast cell activation and allergic inflammation by increasing IgE receptor degradation[J]. *Food & Function*, 2023, 14(6): 2857-2869.
- [98] Nguyen SMT, Rupprecht CP, Haque A, et al. Mechanisms governing anaphylaxis: Inflammatory cells, mediators, endothelial gap junctions and beyond[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 7785.
- [99] Bechara R, McGeachy MJ, Gaffen SL. The metabolism-modulating activity of IL-17 signaling in health and disease[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2021, 218(5): e20202191.
- [100] Sonkoly E, Wei T, Janson PC, et al. MicroRNAs: Novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? [J]. *the Public Library of Science ONE*, 2007, 2(7): e610.
- [101] Hermann H, Runnel T, Aab A, et al. miR-146b probably assists miRNA-146a in the suppression of keratinocyte proliferation and inflammatory responses in psoriasis[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2017, 137(9): 1945-1954.
- [102] Meisgen F, Landén NX, Wang A, et al. MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(7): 1931-1940.
- [103] Ma L, Xue HB, Wang F, et al. MicroRNA-155 may be involved in the pathogenesis of atopic dermatitis by modulating the differentiation and function of T helper type 17 (Th17) cells[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2015, 181(1): 142-149.
- [104] Moyle M, Cevikbas F, Harden JL, et al. Understanding the immune landscape in atopic dermatitis: The era of biologics and emerging therapeutic approaches[J]. *Experimental Dermatology*, 2019, 28(7): 756-768.
- [105] Ning Y, Zhang F, Li S, et al. Integrative analysis of miRNA in cartilage-derived extracellular vesicles and single-cell RNA-seq profiles in knee osteoarthritis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2023, 748: 109785.
- [106] Xu SL, Deng YS, Liu J, et al. Regulation of circular RNAs act as ceRNA in a hypoxic pulmonary hypertension rat model[J]. *Genomics*, 2021, 113(1): 11-19.
- [107] Jia Q, Liao X, Xu B, et al. MiR-128-1-5p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis via

- targeting PRKCQ in colorectal cancer[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2023, 24(1): 2226421.
- [108] Heianza Y, Xue Q, Rood J, et al. Circulating thrifty microRNA is related to insulin sensitivity, adiposity, and energy metabolism in adults with overweight and obesity: the POUNDS Lost trial[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2023, 117(1): 121-129.
- [109] Liu J, Liang Y, Qiao L, et al. MiR-128-1-5p regulates differentiation of ovine stromal vascular fraction by targeting the KLF11 5'-UTR[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2022, 80: 106711.
- [110] Diener C, Keller A, Meese E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic[J]. *Trends in Genetics*, 2022, 38(6): 613-626.
- [111] Fu S, Ni S, Wang D, et al. Berberine suppresses mast cell-mediated allergic responses via regulating FcεRI-mediated and MAPK signaling[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 71: 1-6.
- [112] Xie C, Zhou X, Liang C, et al. Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR2/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2021, 40(1): 266.
- [113] Wan X, Yao B, Ma Y, et al. MicroRNA-128-1-5p attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing Gadd45g-mediated apoptotic signaling[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 530(1): 314-321.
- [114] Ma X, Lou C, Pan J, et al. The diagnostic potential of a circRNA-miRNA network in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2023, 101(6): 671-684.
- [115] Jiang J, Feng J, Song X, et al. Hsa_circ_0015278 regulates FLT3-ITD AML progression via ferroptosis-related genes[J]. *Cancers*, 2022, 15(1): 71.
- [116] Jin Q, Zhang N, Zhan Y, et al. MicroRNA-592 inhibits the growth of ovarian cancer cells by targeting ERBB3[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2023, 22: 15330338231157156.
- [117] Yang H, Lin QX, Chen N, et al. LncRNA NR_030777 Alleviates Paraquat-Induced Neurotoxicity by Regulating Zfp326 and Cpne5[J]. *Toxicological Sciences*, 2020, 178(1): 173-188.
- [118] Wang C, Song D, Fu J, et al. SIK1 regulates CRTC2-mediated gluconeogenesis signaling pathway in human and mouse liver cells[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 580.
- [119] Jiang M, Jike Y, Liu K, et al. Exosome-mediated miR-144-3p promotes ferroptosis to inhibit osteosarcoma proliferation, migration, and invasion through regulating ZEB1[J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 113.
- [120] Duan W, Huang J, Wasti B, et al. miR-146a-3p as a potential novel therapeutic by targeting MBD2 to mediate Th17 differentiation in Th17 predominant neutrophilic severe asthma[J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2023, 23(6): 2839-2854.
- [121] Nagata Y, Suzuki R. FcεRI: A master regulator of mast cell functions[J]. *Cells*, 2022, 11(4): 622.
- [122] Li Y, Leung PSC, Gershwin ME, et al. New mechanistic advances in FcεRI-mast cell-mediated allergic signaling[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2022, 63(3): 431-446.
- [123] Gomez G, Gonzalez-Espinosa C, Odom S, et al. Impaired FcεRI-dependent gene expression and

- p>defective eicosanoid and cytokine production as a consequence of fyn deficiency in mast cells[J]. The Journal of Immunology, 2005, 175(11): 7602-7610.
- [124] Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM. The role of HDAC6 in cancer[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011, 2011: 875824.
- [125] Wang Y, Wang K, Fu J. HDAC6 mediates poly (I:C)-induced TBK1 and Akt phosphorylation in macrophages[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1776.
- [126] Luik RM, Wang B, Prakriya M, et al. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation[J]. Nature Communications, 2008, 454(7203): 538-42.
- [127] Lin Y, Song Y, Zhang Y, et al. NFAT signaling dysregulation in cancer: Emerging roles in cancer stem cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 165: 115167.
- [128] Song Y, Wang Z, Jiang J, et al. miR-181-5p attenuates neutrophilic inflammation in asthma by targeting DEK[J]. International Immunopharmacology, 2022, 112: 109243.
- [129] Habib N, Pasha MA, Tang DD. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers[J]. Cells, 2022, 11(17): 2764.
- [130] Lou L, Tian M, Chang J, et al. MiRNA-192-5p attenuates airway remodeling and autophagy in asthma by targeting MMP-16 and ATG7[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 122: 109692.
- [131] Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, et al. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation[J]. Immunity, 2000, 12(3): 293-300.
- [132] Jiang BC, Ding TY, Guo CY, et al. NFAT1 orchestrates spinal microglial transcription and promotes microglial proliferation via c-MYC contributing to nerve injury-induced neuropathic pain[J]. Advanced Science, 2022, 9(27): e2201300.
- [133] Masle-Farquhar E, Peters TJ, Miosge LA, et al. Uncontrolled CD21^{low} age-associated and B1 B cell accumulation caused by failure of an EGR2/3 tolerance checkpoint[J]. Cell Reports, 2022, 38(3): 110259.
- [134] Madamsetty VS, Moammadinejad R, Uzielienė I, et al. Dexamethasone: Insights into pharmacological aspects, therapeutic mechanisms, and delivery systems[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2022, 8(5): 1763-1790.
- [135] Han F, Li S, Yang Y, et al. Interleukin-6 promotes ferroptosis in bronchial epithelial cells by inducing reactive oxygen species-dependent lipid peroxidation and disrupting iron homeostasis[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 5279-5288.
- [136] Jie XL, Luo ZR, Yu J, et al. Pi-Pa-Run-Fei-Tang alleviates lung injury by modulating IL-6/JAK2/STAT3/IL-17 and PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway and balancing Th17 and Treg in murine model of OVA-induced asthma[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 317: 116719.
- [137] Zhang B, Zeng MN, Zhang Q, et al. Ephedrae Herba polysaccharides inhibit the inflammation of ovalbumin induced asthma by regulating Th1/Th2 and Th17/Treg cell immune imbalance[J]. Molecular Immunology, 2022, 152: 14-26.

-
-
- [138] Oppenheimer J, Hoyte FCL, Phipatanakul W, et al. Allergic and eosinophilic asthma in the era of biomarkers and biologics: similarities, differences and misconceptions[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2022, 129(2): 169-180.
- [139] Tan YY, Zhou HQ, Lin YJ, et al. FGF2 is overexpressed in asthma and promotes airway inflammation through the FGFR/MAPK/NF- κ B pathway in airway epithelial cells[J]. *Military Medical Research*, 2022, 9(1): 7.
- [140] Lee JH, Son SH, Kim NJ, et al. NJK14047 suppression of the p38 MAPK ameliorates OVA-induced allergic asthma during sensitization and challenge periods[J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2022, 31(2): 183-192.
- [141] Duan XJ, Zhang X, Li LR, et al. MiR-200a and miR-200b restrain inflammation by targeting ORMDL3 to regulate the ERK/MMP-9 pathway in asthma[J]. *Experimental Lung Research*, 2020, 46(9): 321-331.
- [142] Wang X, Xu LF, Yu Y, et al. LncRNA RP5-857K21.7 inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of airway smooth muscle cells through the miR-508-3p/PI3K/AKT/mTOR axis[J]. *Autoimmunity*, 2022, 55(1): 65-73.
- [143] Liu Y, Miao Y, Gao X, et al. MicroRNA-200a affects the proliferation of airway smooth muscle cells and airway remodeling by targeting FOXC1 via the PI3K/AKT signaling pathway in ovalbumin-induced asthmatic mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(6): 2365-2389.
- [144] Jakiela B, Soja J, Sladek K, et al. Bronchial epithelial cell transcriptome shows endotype heterogeneity of asthma in patients with NSAID-exacerbated respiratory disease[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2023, 151(4): 953-965.
- [145] Wang L, Liu X. Long noncoding RNA antisense noncoding RNA in the INK4 locus inhibition alleviates airway remodeling in asthma through the regulation of the microRNA-7-5p/early growth response factor 3 axis[J]. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2023, 11(4): e823.
- [146] Menon A, Abd-Aziz N, Khalid K, et al. miRNA: A promising therapeutic target in cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11502.