

网络出版时间:2025-02-06 15:08:00 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1138.016

miR-155-5p/sirt1 信号通路 对白色念珠菌诱导川崎病模型小鼠免疫功能的影响

魏刚^{1,2,3}, 田晶⁴, 梁冬雪^{3,5}, 张凤香^{1,2,3}, 陈月^{3,5}(锦州医科大学附属第一医院¹重症医学科、⁵呼吸内科, 锦州 121000; ²辽西区域呼吸与危重症疾病诊疗中心, 锦州 121000; 锦州医科大学³第一临床医学院、⁴基础医学院, 锦州 121000)

摘要 目的 探讨 miR-155-5p/沉默信息调节因子 1(sirt1) 信号通路对白色念珠菌诱导川崎病模型小鼠免疫功能的影响。方法 将 C56BL/6 小鼠分为对照组、川崎病组、拮抗剂对照组、miR-155-5p 拮抗剂组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组, 每组 12 只。除对照组外, 其他组小鼠均通过腹腔注射白色念珠菌水溶物构建川崎病模型。建模成功后进行给药处理, 1 d 给药 1 次, 持续 7 d。qRT-PCR 检测冠状动脉中 miR-155-5p 表达; Western blot 检测冠状动脉中 sirt1 蛋白; HE 染色检测冠状动脉的病理变化; 检测小鼠胸腺指数和脾指数; 流式细胞术检测外周血中辅助性 T 细胞 17(Th17)/调节性 T 细胞(Treg); ELISA 检测小鼠血清中白细胞介素(IL)-17、IL-10 水平; 验证 sirt1 与 miR-155-5p 靶向关系。结果 与对照组比较, 川崎病组小鼠冠状动脉中有大量炎性细胞浸润, miR-155-5p 表达、Th17 比例、Th17/Treg 比例、IL-17 水平升高, sirt1 蛋白表达、胸腺指数、脾指数、Treg 比例、IL-10 水平降低(均 $P < 0.05$); 与川崎病组比较, miR-155-5p 拮抗剂组小鼠冠状动脉中炎性细胞浸润现象有所缓解, miR-155-5p 表达、Th17 比例、Th17/Treg 比例、IL-17 水平降低, sirt1 蛋白表达、胸腺指数、脾指数、Treg 比例、IL-10 水平升高(均 $P < 0.05$); si-sirt1 减弱了抑制 miR-155-5p 对川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡的促进作用以及对血管炎症的抑制作用, miR-155-5p 靶向调控 sirt1。结论 抑制 miR-155-5p 促进川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡, 抑制血管炎症的机制可能与上调 sirt1 表达有关。

关键词 miR-155-5p; 沉默信息调节因子 1; 川崎病; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞; 炎症; 免疫

中图分类号 R 725.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0307-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.017

川崎病是一种常见于 5 岁以下儿童的疾病, 可引起全身性免疫性血管炎, 主要累及中小血管, 尤其是冠状动脉^[1]。冠状动脉损伤是川崎病最严重的并发症, 包括冠状动脉瘤和冠状动脉扩张、狭窄^[2]。目前, 川崎病患者的标准治疗方法是在疾病发病的前 10 d 内单剂量静脉注射免疫球蛋白和口服阿司匹林, 这种治疗可以减少炎症并有利于降低冠状动脉病变的发生几率。然而, 高达 20% 的川崎病患者对免疫球蛋白有抵抗性, 并且有更高的发生冠状动脉病变的风险^[3]。研究^[4]显示, 川崎病的发病及病情进展与机体免疫紊乱有关。因此, 了解川崎病免疫功能的分子机制对于早期疾病检测和治疗以及确定新的治疗靶点至关重要。最近的研究^[5]发现, miR-155-5p 在川崎病患儿血清中高表达。上调沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1,

sirt1) 可改善川崎病诱发的大鼠心肌损伤^[6]; 且 miR-155-5p/sirt1 信号通路在体外高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤中发挥重要的作用^[7]。但 miR-155-5p 能否通过调控 sirt1 影响川崎病小鼠免疫功能尚不可知。因此, 该研究拟通过白色念珠菌诱导川崎病模型小鼠, 探究 miR-155-5p 对川崎病模型小鼠免疫功能的影响以及相应的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞 72 只雌雄各半的 4 周龄 SPF 级 C56BL/6 小鼠, 体质量 20~22 g, 购于广东莱迪生物医药研究院有限公司, 生产许可证号为 SCXK(粤)2022-0064。小鼠饲养于温度 21~22 °C、湿度 55%~60%、光暗循环为 12 h/12 h 的标准环境中, 可自由饮水进食。本研究获得锦州医科大学附属第一医院动物伦理委员会的批准(批准号: 20220719)。人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞购自上海乾思生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 白色念珠菌水溶物(货号:

2024-09-27 接收

基金项目: 辽宁省教育厅基本科研面上项目(编号: LJKMZ20221229)

作者简介: 魏刚, 男, 硕士研究生;

陈月, 女, 讲师, 通信作者, E-mail: 1272059073@qq.com

20221128,上海邦景实业有限公司);兔源一抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、sirt1 及二抗(货号: ab8245、ab110304、ab6721,英国 Abcam 公司);小鼠流式抗体 APC-白细胞介素(interleukin, IL)-17、FITC-CD4、PE-叉头框蛋白 p3(forkhead box p3, Foxp3)(货号: 20220203、20220506、20220109,赛默飞世尔科技有限公司);小鼠 IL-17、IL-10 ELISA 试剂盒(货号: GY-LE636、GY-LE159,上海谷研实业有限公司)。

1.1.3 主要仪器 Q5 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);DYCZ-24DN 蛋白电泳仪(北京六一仪器厂);CX53 光学显微镜(日本奥林巴斯公司);FA1204B 电子天平(浙江赛德仪器设备有限公司);Attune CytPix 流式细胞仪、MK3 酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 川崎病模型小鼠的构建 将白色念珠菌水溶物通过腹腔以 80 mg/ml,每只 8 mg 的剂量注射于小鼠体内,每天注射 1 次,连续注射 5 d。小鼠造模成功的标准为:颤抖、鼻子和嘴巴轻微红肿^[8]。

1.2.2 分组与处理 将 C56BL/6 小鼠随机分为对照组、川崎病组、拮抗剂对照组、miR-155-5p 拮抗剂组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组,每组 12 只。对照组小鼠以 0.9% 氯化钠溶液代替白色念珠菌水溶物,其它同造模过程。其他组小鼠均按照“1.2.1 项”所述构建川崎病模型。建模成功后进行给药处理,拮抗剂对照组、miR-155-5p 拮抗剂组^[9]小鼠分别尾静脉注射 300 nmol/kg antagomir NC 腺病毒液、300 nmol/kg miR-155-5p antagomir 腺病毒液;miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组小鼠尾静脉注射 300 nmol/kg miR-155-5p antagomir 腺病毒液和 50 μg/只 si-NC 腺病毒液;miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组^[10]小鼠尾静脉注射 300 nmol/kg miR-155-5p antagomir 腺病毒液和 50 μg/只 si-sirt1 腺病毒液;川崎病组、对照组小鼠需尾静脉注射等量的 0.9% 氯化钠溶液。1 d 给药 1 次,持续 7 d。

1.2.3 标本采集 处理完成后次日,称量并记录所有小鼠体质量;麻醉小鼠,收集所有小鼠的外周血用于辅助性 T 细胞 17(helper T cells 17, Th17)/调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)的检测,收集所有小鼠的眼球血经离心得血清用于 ELISA 检测;处死小鼠,分离并收集小鼠的完整胸腺和脾脏,用于胸腺指数和脾指数的检测,收集小鼠的冠状动脉,用于 qRT-PCR、Western blot、HE 检测。

1.2.4 qRT-PCR 检测冠状动脉中 miR-155-5p 表达

使用 TRIzol 试剂从小鼠冠状动脉中提取总 RNA,并通过读取 260 nm 处的光密度(optical density, OD)值来测量 RNA 的浓度。取 1 μg RNA 逆转录为 cDNA。使用这些 cDNA 作为模板,通过将 cDNA、引物及 ddH₂O 构成 20 μl 混合体系以进行 qPCR 检测反应。以 U6 为内参使用 2^{-ΔΔC_T}法计算 miR-155-5p 表达。引物序列为 U6:正向 5'-CTCGCTTCGGCAG-CACA-3',反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';miR-155-5p:正向 5'-GCGCTTAATGCTAATCGTGAT-3',反向 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'。

1.2.5 Western blot 检测冠状动脉中 sirt1 蛋白表达

RIPA 裂解缓冲液提取冠状动脉匀浆总蛋白,通过 10% SDS-PAGE 电泳分离 50 μg 蛋白,并将其转移到 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭膜 2 h,然后用以下稀释的一抗在 4 °C 下孵育过夜:GAPDH (1:5 000)、sirt1 (1:4 000)。再将膜与二抗(1:1 000)孵育 1 h,并用 ECL 试剂检测蛋白印迹,Image J 软件对蛋白片段的灰度值进行量化。

1.2.6 冠状动脉的 HE 染色检测 小鼠冠状动脉用 4% 多聚甲醛固定,然后脱水并包埋在石蜡中。制作厚度为 5 μm 的石蜡切片,将切片脱蜡,用 HE 染色,二甲苯透化,中性树脂密封切片。最后,观察冠状动脉病理形态学变化。

1.2.7 小鼠胸腺指数与脾指数的检测 分别称量小鼠的胸腺质量、脾质量,通过公式计算胸腺指数和脾指数,胸腺质量(mg)与体质量(g)的比值,即为胸腺指数;脾质量(mg)与体质量(g)的比值,即为脾指数。

1.2.8 外周血中 Th17/Treg 的检测 外周血淋巴细胞分离试剂盒用于分离小鼠外周血单个核细胞,取 100 μl 单个核细胞悬液(10⁷ 个/ml)置于流式管中,加入 APC-IL-17 和 FITC-CD4 用于标记 Th17,另取 100 μl 单个核细胞悬液加入 PE-Foxp3 和 FITC-CD4 用于标记 Treg,孵育 30 min 后,进行离心、重悬细胞等处理,最后分析外周血单个核细胞中 Th17、Treg,并计算 Th17/Treg 值。

1.2.9 小鼠血清中 IL-17、IL-10 水平的检测 按照试剂盒操作步骤检测小鼠血清中 IL-17、IL-10 水平。

1.2.10 sirt1 与 miR-155-5p 靶向关系验证 将野生型 sirt1(sirt1-WT)、突变型 sirt1(sirt1-MUT)序列分别插入 pmirGLO 荧光素酶报告基因载体中,将上述构建好的载体分别与 mimic NC 或 miR-155-5p mimic 共转染于 HEK293T 细胞。48 h 后测量荧光

素酶变化。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 SNK-*q* 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 川崎病小鼠冠状动脉中 miR-155-5p 表达、sirt1 蛋白表达 与对照组比较,川崎病组小鼠冠状动脉中 miR-155-5p 表达升高,sirt1 蛋白表达降低(均 $P < 0.05$);与川崎病组、拮抗剂对照组比较,miR-155-5p 拮抗剂组小鼠冠状动脉中 miR-155-5p 表达降低,sirt1 蛋白表达升高(均 $P < 0.05$);与 miR-155-5p 拮抗剂组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组比较,miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组小鼠冠状动脉中 miR-155-5p 表达变化差异无统计学意义($P > 0.05$),sirt1 蛋白表达降低($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。

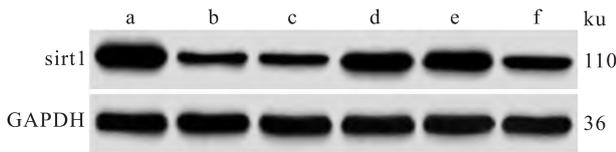


图 1 小鼠冠状动脉中 sirt1 蛋白表达的 Western blot 检测
Fig.1 Western blot detection of sirt1 protein expression in mouse coronary arteries

a: Control group; b: Kawasaki disease group; c: Antagonist control group; d: miR-155-5p antagonist group; e: miR-155-5p antagonist + si-NC group; f: miR-155-5p antagonist + si-sirt1 group.

2.2 抑制 miR-155-5p 对川崎病小鼠冠状动脉病理损伤的影响 对照组小鼠冠状动脉中几乎无炎性细胞浸润;川崎病组小鼠冠状动脉中有大量炎性细胞浸润;与川崎病组、拮抗剂对照组比较,miR-155-5p 拮抗剂组小鼠冠状动脉中炎性细胞浸润现象有所缓解;与 miR-155-5p 拮抗剂组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组比较,miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组

小鼠冠状动脉中炎性细胞浸润现象严重,见图 2。

2.3 抑制 miR-155-5p 对川崎病小鼠胸腺指数和脾指数的影响 与对照组比较,川崎病组小鼠胸腺指数和脾指数降低(均 $P < 0.05$);与川崎病组、拮抗剂对照组比较,miR-155-5p 拮抗剂组小鼠胸腺指数和脾指数升高(均 $P < 0.05$);与 miR-155-5p 拮抗剂组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组比较,miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组小鼠胸腺指数和脾指数降低(均 $P < 0.05$),见表 2。

表 1 小鼠冠状动脉中 miR-155-5p 表达、sirt1 蛋白表达比较
($n = 12, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of miR-155-5p expression and sirt1 protein expression in mouse coronary arteries ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

Group	miR-155-5p	sirt1/GAPDH
Control	1.00	1.69 ± 0.14
Kawasaki disease	2.36 ± 0.17*	0.38 ± 0.03*
Antagonist control	2.33 ± 0.15	0.40 ± 0.04
miR-155-5p antagonist	1.41 ± 0.13 ^{#Δ}	1.21 ± 0.13 ^{#Δ}
miR-155-5p antagonist + si-NC	1.43 ± 0.15	1.23 ± 0.11
miR-155-5p antagonist + si-sirt1	1.45 ± 0.12	0.75 ± 0.06 ^{▲▽}
<i>F</i> value	209.968	358.219
<i>P</i> value	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ vs Control group; [#] $P < 0.05$ vs Kawasaki disease group; ^Δ $P < 0.05$ vs Antagonist control group; [▲] $P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist group; [▽] $P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist + si-NC group.

表 2 小鼠胸腺指数和脾指数比较(mg/g, $n = 12, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of thymus index and spleen index in mice (mg/g, $n = 12, \bar{x} \pm s$)

Group	Thymus index	Spleen index
Control	3.72 ± 0.16	5.24 ± 0.19
Kawasaki disease	2.05 ± 0.13*	3.19 ± 0.14*
Antagonist control	2.01 ± 0.12	3.22 ± 0.16
miR-155-5p antagonist	3.16 ± 0.14 ^{#Δ}	4.76 ± 0.20 ^{#Δ}
miR-155-5p antagonist + si-NC	3.19 ± 0.12	4.75 ± 0.21
miR-155-5p antagonist + si-sirt1	2.43 ± 0.11 ^{▲▽}	3.88 ± 0.27 ^{▲▽}
<i>F</i> value	341.406	228.196
<i>P</i> value	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ vs Control group; [#] $P < 0.05$ vs Kawasaki disease group; ^Δ $P < 0.05$ vs Antagonist control group; [▲] $P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist group; [▽] $P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist + si-NC group.

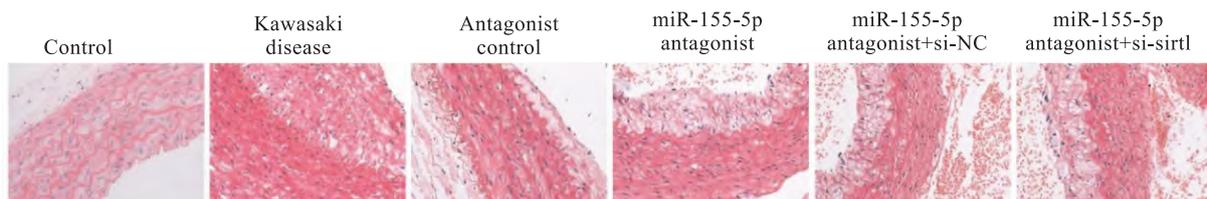


图 2 小鼠冠状动脉的 HE 染色检测结果 ×200
Fig.2 HE staining results of mouse coronary arteries ×200

2.4 抑制 miR-155-5p 对川崎病小鼠外周血中 Th17/Treg 平衡的影响 与对照组比较,川崎病组 Th17、Th17/Treg 比例升高,Treg 比例降低(均 $P < 0.05$);与川崎病组、拮抗剂对照组比较,miR-155-5p 拮抗剂组 Th17、Th17/Treg 比例降低,Treg 比例升高(均 $P < 0.05$);与 miR-155-5p 拮抗剂组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组比较,miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组 Th17、Th17/Treg 比例升高,Treg 比例降低(均 $P < 0.05$),见表 3 和图 3。

2.5 抑制 miR-155-5p 对川崎病小鼠血清中 IL-17、IL-10 水平的影响 与对照组比较,川崎病组 IL-17

水平升高,IL-10 水平降低(均 $P < 0.05$);与川崎病组、拮抗剂对照组比较,miR-155-5p 拮抗剂组 IL-17 水平降低,IL-10 水平升高(均 $P < 0.05$);与 miR-155-5p 拮抗剂组、miR-155-5p 拮抗剂 + si-NC 组比较,miR-155-5p 拮抗剂 + si-sirt1 组 IL-17 水平升高,IL-10 水平降低(均 $P < 0.05$),见表 4。

2.6 miR-155-5p 靶向调控 sirt1 sirt1 与 miR-155-5p 可结合,见图 4。miR-155-5p mimic 降低了 sirt1-WT 报告基因的荧光素酶活性($P < 0.05$),但 sirt1-MUT 报告基因的荧光素酶活性几乎未受到影响($P > 0.05$),见表 5。

表 3 小鼠外周血中 Th17、Treg 及 Th17/Treg 比例比较($n = 12, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of Th17, Treg and Th17/Treg ratio in peripheral blood of mice ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

Group	Th17 (%)	Treg (%)	Th17/Treg
Control	3.03 ± 0.12	31.88 ± 1.43	0.10 ± 0.01
Kawasaki disease	22.78 ± 1.96*	12.33 ± 0.58*	1.85 ± 0.12*
Antagonist control	23.09 ± 1.88	11.95 ± 0.46	1.93 ± 0.16
miR-155-5p antagonist	6.89 ± 0.54 ^{#Δ}	27.83 ± 1.40 ^{#Δ}	0.25 ± 0.02 ^{#Δ}
miR-155-5p antagonist + si-NC	6.93 ± 0.58	26.95 ± 1.38	0.26 ± 0.01
miR-155-5p antagonist + si-sirt1	15.57 ± 0.61 ^{▲▽}	16.16 ± 0.78 ^{▲▽}	0.96 ± 0.08 ^{▲▽}
F value	648.091	775.915	1053.554
P value	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Kawasaki disease group; Δ $P < 0.05$ vs Antagonist control group; ▲ $P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist group; ▽ $P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist + si-NC group.

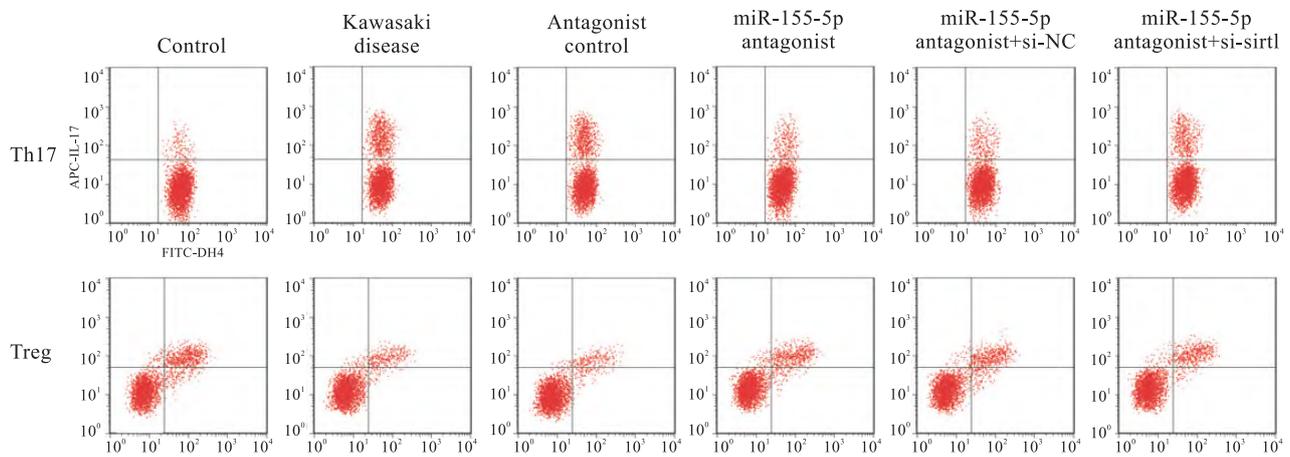


图 3 小鼠外周血中 Th17、Treg 的流式细胞术检测

Fig.3 Flow cytometry of Th17 and Treg in peripheral blood of mice

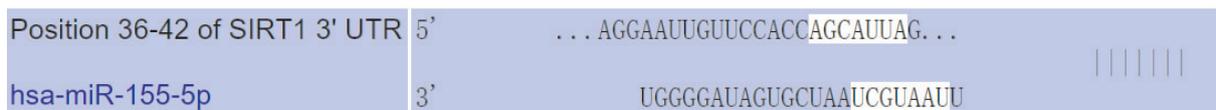


图 4 sirt1 与 miR-155-5p 的结合位点图

Fig.4 Binding sites of sirt1 and miR-155-5p

表4 小鼠血清中 IL-17、IL-10 水平比较 (pg/ml, n = 12, $\bar{x} \pm s$)Tab.4 Comparison of serum levels of IL-17 and IL-10 in mice (pg/ml, n = 12, $\bar{x} \pm s$)

Group	IL-17	IL-10
Control	18.81 ± 1.03	36.68 ± 1.75
Kawasaki disease	45.56 ± 2.04*	15.94 ± 0.68*
Antagonist control	43.92 ± 1.97	16.28 ± 0.71
miR-155-5p antagonist	25.53 ± 1.15 ^{#Δ}	30.15 ± 1.43 ^{#Δ}
miR-155-5p antagonist + si-NC	26.11 ± 1.09	29.98 ± 1.39
miR-155-5p antagonist + si-sirt1	37.76 ± 1.62 ^{▲▽}	22.36 ± 1.05 ^{▲▽}
F value	611.129	557.305
P value	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Kawasaki disease group; $\Delta P < 0.05$ vs Antagonist control group; $\Delta P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist group; $\nabla P < 0.05$ vs miR-155-5p antagonist + si-NC group.

表5 荧光素酶活性 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)Tab.5 Luciferase activity (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Group	sirt1-WT	sirt1-MUT
mimic NC	1.01 ± 0.11	1.03 ± 0.10
miR-155-5p mimic	0.29 ± 0.02	1.05 ± 0.12
t value	16.033	0.314
P value	<0.001	0.760

3 讨论

川崎病是一种以冠状动脉炎为特征的儿童全身性发热综合征。在本研究中,通过腹腔注射白色念珠菌水溶液的方式构建川崎病小鼠模型,结果发现,川崎病组小鼠冠状动脉中有大量炎性细胞浸润,表明川崎病小鼠冠状动脉病理损伤严重,符合川崎病的特征。脾、胸腺是机体重要的免疫器官,脾指数、胸腺指数可作为判定免疫系统活力的有效指标^[11]。在本研究中,川崎病组小鼠胸腺指数和脾指数低于对照组,表明川崎病小鼠免疫处于抑制状态。相关研究表明,炎症与川崎病的发病机制有关^[12],且先天免疫系统参与川崎病血管炎的发展^[13]。Th17/Treg 失衡影响川崎病的进展,表现为 Th17 活性增加,Th17 分泌的促炎因子 IL-17 水平增加,Treg 活性减少,Treg 分泌的抑炎因子 IL-10 水平降低^[14]。本研究证明了川崎病小鼠 Th17/Treg 失衡,且存在血管炎症。因此,促进川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡,抑制血管炎症可能成为治疗川崎病的有效策略之一。

研究^[15]发现,在川崎病中存在多个 miRNAs 失调的现象。如抑制 miR-155 可促进川崎病幼鼠 Th17/Treg 失衡^[16]。miR-155-5p 作为 miR-155 的成熟体之一,已有研究^[5]证明其可作为川崎病的生物标志物。本研究显示,抑制 miR-155-5p 可促进川崎

病小鼠 Th17/Treg 平衡,抑制血管炎症,提示 miR-155-5p 可能成为治疗川崎病的有效靶点。

为了进一步深入探究抑制 miR-155-5p 促进川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡,抑制血管炎症的分子机制,本研究证实了 sirt1 为 miR-155-5p 的靶基因。sirt1 已被证明在 Treg 的分化和功能中起关键作用,Treg 是帮助维持免疫耐受和预防自身免疫性疾病的关键免疫细胞,此外,其已被证明与心血管疾病密切相关^[17]。而关于 sirt1 对川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡及血管炎症的影响鲜有报道。本研究显示,川崎病组小鼠冠状动脉中 sirt1 蛋白表达低于对照组,且抑制 miR-155-5p 后,川崎病组小鼠冠状动脉中 sirt1 蛋白表达上调,推测抑制 miR-155-5p 可能通过上调 sirt1 促进川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡,抑制血管炎症。为了验证推测,本实验对川崎病小鼠同时进行尾静脉注射 miR-155-5p antagomir 腺病毒液和 si-sirt1 腺病毒液处理,结果发现,si-sirt1 减弱了抑制 miR-155-5p 对川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡的促进作用以及对血管炎症的抑制作用。证实了抑制 miR-155-5p 可能通过上调 sirt1 促进川崎病小鼠 Th17/Treg 平衡,抑制血管炎症。

参考文献

- [1] 钱翠平,黄晓碧,赵胜,等. 儿童川崎病冠状动脉损伤危险因素 Logistic 回归分析[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(3): 490-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.024.
- [1] Qian C P, Huang X B, Zhao S, et al. Regression analysis of risk factors related to coronary artery lesion in children with Kawasaki disease[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(3): 490-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.024.
- [2] Jia C, Zhuge Y, Zhang S, et al. IL-37b alleviates endothelial cell apoptosis and inflammation in Kawasaki disease through IL-1R8 pathway[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(6): 575. doi:10.1038/s41419-021-03852-z.
- [3] Kocattirk B, Lee Y, Nosaka N, et al. Platelets exacerbate cardiovascular inflammation in a murine model of Kawasaki disease vasculitis[J]. JCI Insight, 2023, 8(14): e169855. doi:10.1172/jci.insight.169855.
- [4] Liao Y, Ke B, Long X, et al. Upregulated expression of IL2RB causes disorder of immune microenvironment in patients with Kawasaki disease[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 2114699. doi:10.1155/2022/2114699.
- [5] Liu T, Jia J, Wang L, et al. Explore the mechanism of incomplete Kawasaki disease and identify a novel biomarker by weighted gene co-expression network analysis[J]. Immunobiology, 2022, 227(6): 152285. doi:10.1016/j.imbio.2022.152285.
- [6] 王浩,袁子焰,殷玥,等. 白藜芦醇激活 Sirt1/Nrf2 信号减轻川崎病诱发的心肌损伤[J]. 心脏杂志, 2019, 31(6): 633-7. doi:10.12125/j.chj.201905037.

- [6] Wang H, Yuan Z Y, Yin Y, et al. Resveratrol alleviates Kawasaki disease-induced myocardial injury by activating Sirt1/Nrf2 signaling[J]. *Chin Heart J*, 2019, 31(6): 633 - 7. doi:10.12125/j.chj.201905037.
- [7] Wang Y, Zheng Z J, Jia Y J, et al. Role of p53/miR-155-5p/sirt1 loop in renal tubular injury of diabetic kidney disease[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 146. doi:10.1186/s12967-018-1486-7.
- [8] 郑瑞利, 杨慧敏, 冯迎军, 等. miR-19a-3p 靶向上调 SOCS3 参与急性川崎病病理发展的机制研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(6): 1047 - 55. doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2023.06.013.
- [8] Zheng R L, Yang H M, Feng Y J, et al. Mechanism of miR-19a-3p targeting up-regulation of SOCS3 and participating in the pathological development of acute Kawasaki disease[J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2023, 21(6): 1047 - 55. doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2023.06.013.
- [9] Li Y, Zhang H, Li Z, et al. MicroRNA-130a-5p suppresses myocardial ischemia reperfusion injury by downregulating the HMGB2/NF- κ B axis[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 121. doi:10.1186/s12872-020-01742-4.
- [10] Su Y, Zhu C, Wang B, et al. Circular RNA FOXO3 in cardiac ischemia-reperfusion injury in heart transplantation: a new regulator and target[J]. *Am J Transplant*, 2021, 21(9): 2992 - 3004. doi:10.1111/ajt.16475.
- [11] 邓康, 方梅, 贾宁, 等. 沙冬青种子总黄酮对免疫抑制小鼠的免疫功能及体外脾淋巴细胞增殖的影响[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(8): 1066 - 72. doi:10.16656/j.issn.1673-4696.2018.0141.
- [11] Deng K, Fang M, Jia N, et al. Effect of total flavonoids from *Ampelodesmos mongolicus* on the immune function in immunosuppressed mice and splenic lymphocyte proliferation *in vitro* [J]. *Chin Vet Sci*, 2018, 48(8): 1066 - 72. doi:10.16656/j.issn.1673-4696.2018.0141.
- [12] Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, et al. Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(3): 102763. doi:10.1016/j.autrev.2021.102763.
- [13] 王璐, 顾美珍. 阿司匹林和氯吡格雷治疗川崎病的临床效果比较及对患儿凝血功能和免疫功能的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2023, 38(20): 3911 - 5. doi:10.19829/j.zgfybj.issn.1001-4411.2023.20.018.
- [13] Wang L, Gu M Z. Comparison of clinical effects of aspirin and clopidogrel in the treatment of Kawasaki disease and their effects on coagulation function and immune function of children[J]. *Matern Child Health Care China*, 2023, 38(20): 3911 - 5. doi:10.19829/j.zgfybj.issn.1001-4411.2023.20.018.
- [14] Zheng R, Xie J, Li W, et al. MiR-223-3p affects the proliferation and apoptosis of HCAECs in Kawasaki disease by regulating the expression of FOXP3[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(7): e939. doi:10.1002/iid3.939.
- [15] Cai Y, Hu W. Identifying differentially expressed genes and miRNAs in Kawasaki disease by bioinformatics analysis[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 21879. doi:10.1038/s41598-022-26608-x.
- [16] 李海洲, 张琳, 王瑾, 等. 基于 SOCS1/STAT3 信号通路探讨 miR-155 对川崎病幼鼠心肌损伤的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(12): 2004 - 9. doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2021.12.010.
- [16] Li H Z, Zhang L, Wang J, et al. Effects of miR-155 on myocardial injury in young mice with Kawasaki disease based on SOCS1/STAT3 signaling pathway[J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2021, 19(12): 2004 - 9. doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2021.12.010.
- [17] Zulkifli N D, Zulkifli N. Insight from sirtuins interactome: topological prominence and multifaceted roles of SIRT1 in modulating immunity, aging and cancer[J]. *Genomics Inform*, 2023, 21(2): e23. doi:10.5808/gi.23003.

Effect of miR-155-5p/sirt1 signaling pathway on immune function of *Candida albicans* induced Kawasaki disease model mice

Wei Gang^{1,2,3}, Tian Jing⁴, Liang Dongxue^{3,5}, Zhang Fengxiang^{1,2,3}, Chen Yue^{3,5}

(¹Dept of Critical Care Medicine, ²Dept of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000; ³Western Liaoning Regional Center for Respiratory and Critical Disease Diagnosis and Treatment, Jinzhou 121000; ⁴The First Clinical College of Medicine, ⁵School of Basic Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000)

Abstract Objective To investigate the effect of the miR-155-5p/silent information regulator 1 (sirt1) signaling pathway on the immune function of *Candida albicans* induced Kawasaki disease model mice. **Methods** C56BL/6 mice were separated into control group, Kawasaki disease group, antagonist control group, miR-155-5p antagonist group, miR-155-5p antagonist + si-NC group, and miR-155-5p antagonist + si-sirt1 group, with 12 mice in each group. Except for the control group, mice in all other groups were used to construct a Kawasaki disease model by intraperitoneal injection of water-soluble *Candida albicans*. After successful modeling, administration was performed once a day for 7 days. QRT-PCR was applied to detect the expression of miR-155-5p in coronary arteries. Western

(下转第 320 页)

liferating Cell Nuclear Antigen (Ki67), and Notch-1. Polymerase chain reaction (PCR) was used to determine the mRNA levels of the aforementioned mucins. Human gastric epithelial cells (GES-1) were induced with N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) to establish a GPL cell model. The cells were randomly divided into control, model, and COE low, medium, and high concentration GPL groups (COE at 5, 10, and 20 $\mu\text{g/ml}$). After 24 hours of corresponding interventions, changes in cell morphology were observed under an inverted microscope. Western blot was used to measure the expression of Notch-1 and Lgr5, and immunofluorescence (IF) was employed to detect Notch-1 expression. **Results** Compared to the control group, the expression of MUC2, Lgr5, Notch-1, and Ki67 in the gastric tissue of the model group rats significantly increased ($P < 0.0001$), while the expression of MUC5AC and MUC6 decreased ($P < 0.0001$). In comparison to the model group, the expressions of MUC2, Lgr5, Notch-1, and Ki67 were significantly reduced in the COE groups ($P < 0.01$), while the expression of MUC5AC and MUC6 significantly increased ($P < 0.01$). In the GES-1 model group, the cells exhibited irregular morphology, loose intercellular connections, and disorganized arrangement compared to the control group. In contrast, the cells in the COE groups displayed a more regular morphology and a more organized arrangement than those in the model group. Additionally, compared to the control group, the expression of Lgr5 and Notch-1 in the model group were significantly elevated ($P < 0.0001$), whereas after COE treatment, their expressions were markedly reduced ($P < 0.001$). **Conclusion** COE can alleviate GPL, and its mechanism may be associated with the downregulation of the Notch-1 signaling pathway, which improves gastric mucosal mucin barrier function and inhibits the abnormal proliferation of gastric mucosal stem cells.

Key words *Celastrus orbiculatus* extract; gastric precancerous lesions; Notch-1 signaling pathway; leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5; mucin

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82274355); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085MH278)

Corresponding author Zhu Yaodong, E-mail: zhuyaodong2013@163.com

(上接第 312 页)

blot was applied to detect sirt1 protein in coronary arteries. HE staining was applied to detect pathological changes in coronary arteries. Mouse thymus index and spleen index were detected. Flow cytometry was applied to detect helper T cells 17 (Th17)/regulatory T cells (Treg) in peripheral blood. ELISA was applied to detect the levels of interleukin (IL)-17 and IL-10 in mouse serum. The targeting relationship between sirt1 and miR-155-5p was validated. **Results** Compared with the control group, there was a large amount of inflammatory cell infiltration in the coronary arteries of mice in the Kawasaki disease group. The miR-155-5p expression, Th17 ratio, Th17/Treg ratio, and IL-17 level increased. The sirt1 protein expression, thymus index, spleen index, Treg ratio, and IL-10 level decreased ($P < 0.05$). Compared with the Kawasaki disease group, the inflammatory cell infiltration in the coronary arteries of mice in the miR-155-5p antagonist group was alleviated. The miR-155-5p expression, Th17 ratio, Th17/Treg ratio, and IL-17 level decreased. The sirt1 protein expression, thymus index, spleen index, Treg ratio, and IL-10 level increased ($P < 0.05$). Si-sirt1 weakened the promoting effect of miR-155-5p inhibition on Th17/Treg balance and the inhibitory effect on vascular inflammation in Kawasaki disease mice, miR-155-5p targeted and regulated sirt1. **Conclusion** The mechanism by which inhibiting miR-155-5p promotes Th17/Treg balance and inhibits vascular inflammation in Kawasaki disease mice may be related to the upregulation of sirt1 expression.

Key words miR-155-5p; silent information regulator 1; Kawasaki disease; helper T cells 17; regulatory T cells; inflammation; immunity

Fund program Basic Scientific Research Project of Liaoning Provincial Department of Education (No. LJKMZ20221229)

Corresponding author Chen Yue, E-mail: 1272059073@qq.com