

## miR-7 基因敲减对 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应的影响

陈慧子<sup>1,2</sup>, 郭萌萌<sup>1,2</sup>, 赵娟娟<sup>1,2</sup>, 岳东旭<sup>1,2</sup>, 丁涛<sup>1,2</sup>, 陈超<sup>1,2</sup>, 徐林<sup>1,2</sup>

(1. 贵州省基因检测与治疗特色重点实验室, 遵义 563000; 2. 遵义医学院 免疫学教研室暨贵州省生物治疗人才基地, 遵义 563000)

**摘要:** 观察 *miR-7* 基因敲减(knockdown, KD)对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应的影响, 并初步探讨其机制。分别用 0、50、100、200 ng/mL LPS 刺激野生型(wild type, WT)小鼠骨髓来源巨噬细胞 12 h, 经实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, Real-time PCR)检测发现, 随着 LPS 刺激浓度的增加, 巨噬细胞中 *miR-7* 的表达水平逐渐升高, 且在 100 ng/mL LPS 浓度刺激下 *miR-7* 表达最显著( $P < 0.01$ )。用 100 ng/mL LPS 处理 *miR-7* KD 小鼠和 WT 小鼠骨髓来源巨噬细胞 12 h, 镜检观察到巨噬细胞形态均由圆形变为长梭形, 并伸出长长的伪足。应用流式细胞术检测巨噬细胞表面 CD80 和 CD86 分子的表达情况, 结果显示, LPS 作用后, *miR-7* KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞表面 CD80 和 CD86 的比例较 WT 小鼠显著上调( $P < 0.05$ )。Real-time PCR 和 ELISA 结果显示, *miR-7* KD 小鼠巨噬细胞在 LPS 刺激后, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达显著增加( $P < 0.05$ )。Western blotting 检测结果显示, LPS 刺激后, 与对照组相比, *miR-7* KD 小鼠巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 的蛋白水平显著升高( $P < 0.01$ )。以上数据显示, *miR-7* 基因 KD 可显著增强 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应, 可能与 NF- $\kappa$ B 信号通路的传递增强有关, 提示 *miR-7* 在巨噬细胞炎症过程中发挥重要的调控作用。

**关键词:** 微小 RNA-7; 基因敲减; 巨噬细胞; 炎症

**中图分类号:** R392.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2019)03-0195-07

炎症是由包括巨噬细胞在内的多种固有免疫细胞响应外部刺激, 如病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)、损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)而触发的<sup>[1]</sup>, 经过一系列信号转导机制激活 NF- $\kappa$ B 等关键转录因子, 最终产生大量促炎细胞因子、趋化因子, 在清除病毒和细菌感染中发挥重要的作用<sup>[2-3]</sup>。有研究显示, 炎症在包括自身免疫性疾病、肿瘤等多种疾病发生中具有重要作用<sup>[4]</sup>。因此, 对巨噬细胞等固有免疫细胞的炎症反应调控机制的研究, 对于阐明炎症及其相关疾病的发生机制具有重要意义。

miRNA 是一类非蛋白质编码小分子单链 RNA, 在转录及转录后水平发挥负调控基因表达的功能<sup>[5]</sup>。近 10 年来, miRNA 作为许多生物学过程中的关键基因调控因子而成为人们广泛关注的热

点<sup>[6-7]</sup>。有研究表明, miRNA 在炎症和免疫反应中起着至关重要的作用<sup>[8-9]</sup>。如 miR-181a 通过靶向小鼠巨噬细胞中的 IL-1 $\alpha$  来抑制炎症反应<sup>[10]</sup>。相反, miR-26b 通过靶向 PTEN 激活 NF- $\kappa$ B 通路促进 LPS 诱导的牛肺泡巨噬细胞炎症反应<sup>[11]</sup>。miR-7 作为 miRNA 分子家族中的重要成员, 也参与炎症相关疾病的发生过程<sup>[12-13]</sup>。然而, miR-7 是否参与巨噬细胞等固有免疫细胞的炎症反应仍未见报道。本研究拟利用课题组前期构建的 *miR-7* 基因敲减(knockdown, KD)小鼠模型<sup>[14-15]</sup>, 体外观察 *miR-7* 基因 KD 对 LPS 诱导的小鼠骨髓来源巨噬细胞炎症反应的影响, 为深入探究 *miR-7* 基因在巨噬细胞炎症调节和炎症相关疾病发生机制中的调控作用提供前期实验基础。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 6~10 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57BL/6 背景野生型(wild type, WT)小鼠(购于南京大学模式动物研究所)和 *miR-7* KD 小鼠, 均饲养于遵义医学院生物医学中心 SPF 级动物实验室。实验过程通过遵义医学院实验动物使用伦理委员会批准(2013016)。

**收稿日期:** 2018-12-18

**基金项目:** 国家自然科学基金(31760258); 贵州省高层次创新人才计划(黔科合人才[2016]4031 号); 遵义医学院优秀青年人才计划项目(15ZY-001)

**作者简介:** 陈慧子(1990—), 女, 硕士生, 主要从事分子免疫学研究

**通信作者:** 徐林(E-mail: xulinzhouya@163.com)

**1.2 主要试剂及仪器** RNAiso<sup>TM</sup> Plus、实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, Real-time PCR)试剂(TaKaRa 公司), 分析纯级氯仿、异丙醇、无水乙醇(重庆川东化工公司), 抗小鼠 F4/80- FITC、CD11b-藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、CD80-花青素[(phycoerythrin, PE)/cy5]、CD86-别藻青蛋白(allophycocyanin, APC)等流式荧光抗体和 ELISA 试剂盒(eBioscience 公司), LPS(Sigma 公司), GM-CSF(PeproTech 公司), DMEM 低糖培养液(Hyclone 公司), FCS(Gibco 公司), 兔抗鼠 GAPDH、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65 抗体和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗、免疫印迹化学发光检测试剂盒(七海复泰生物科技有限公司), 高速离心机、生物安全柜和 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司), FCM(Beckman Coulter 公司), IX-51 倒置显微镜(Olympus 公司), C1000<sup>TM</sup> Thermal cycler 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

**1.3 小鼠骨髓来源巨噬细胞的诱导、培养** 用断颈脱臼法处死小鼠, 将小鼠置于 75%酒精中浸泡 3~5 min; 在无菌超净台上剥离出股骨和胫骨, 剪掉骨头两端, PBS 轻柔冲洗骨髓腔, 200 目滤网过滤, 以 290×g 离心 10 min, 弃上清, 弹匀沉淀; 加入适量红细胞裂解液, 4℃静置 5 min, PBS 洗涤 2 次; 用含 10% FCS 和 20 ng/mL GM-CSF 的 DMEM 低糖培养液重悬细胞, 将细胞浓度调整至 2×10<sup>6</sup> 个/mL, 接种于 6 孔板内(2 mL/孔); 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 3~4 d 后观察细胞贴壁情况并进行第 1 次换液, 继续培养至第 7 天, 得到小鼠骨髓来源巨噬细胞。

**1.4 LPS 刺激巨噬细胞** 分别使用浓度为 0、50、100、200 ng/mL 的 LPS 处理 WT 小鼠骨髓来源巨噬细胞 12 h, 收集各组细胞, 进行后续的总 RNA 提取。

**1.5 流式细胞术检测巨噬细胞表面分子的表达** 分别收集 LPS 作用前、作用后 12 h 的 WT 小鼠和 *miR-7* KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞并制成单细胞悬液, PBS 洗涤 1 次, 以 290×g 离心 10 min, 弃上清, 200  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 各组加入抗小鼠 F4/80-FITC、CD80-PE/cy5、CD86-APC 荧光抗体各 1  $\mu$ L, 4℃避光孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次, PBS 重悬细胞后用 FCM 检测。

**1.6 Real-time PCR 检测细胞内炎症因子和 *miR-7***

**mRNA 水平** 收集各组细胞, 按照 TRIzol 说明书提取细胞总 RNA, 使用 *miR-7* 和 *U6* 的反转录引物(表 1)、反转录试剂盒中的 Oligo dT Primer 和 Random 6 mers 引物, 将总 RNA 反转录为 cDNA。反转录反应的条件为: 42℃ 15 min, 85℃ 5 s。之后, 利用 Real-time PCR 试剂, 使用 *miR-7* 及 *U6* 的 Real-time PCR 引物检测各组细胞的 *miR-7* 水平。Real-time PCR 的反应条件为: 95℃ 10 min, 95℃ 30 s, 60℃ 6 s, 共 40 个循环。以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 计算相对表达量。*U6* 为 *miR-7* 的内参, *GAPDH* 为 *IL-1 $\beta$* 、*IL-6* 和 *TNF- $\alpha$*  mRNA 的内参(表 2)。

表 1 RT-PCR 引物设计与合成

基因	反转录引物序列
<i>miR-7</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT- TCGCACTGGATACGACACAACA
<i>U6</i>	CGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG- CACTGGATACGACAAAATA

表 2 Real-time PCR 引物设计与合成

基因	Real-time PCR 引物序列
<i>miR-7</i>	正义链 CGGCGGTGGAAGACTAGTGATT
	反义链 ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
<i>U6</i>	正义链 AGAGAAGATTAGCATGGCCCCTG
	反义链 ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	正义链 GAGCTTCAGGCAGGCAGTAT
	反义链 TTGTTTCATCTCGGAGCCTGTA
<i>IL-6</i>	正义链 AGACAAAGCCAGAGTCCTTCAG
	反义链 GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	正义链 TGTCTACTGAACCTCGGGGTG
	反义链 CTGCTCCTCCACTTGGTGGTT
<i>GAPDH</i>	正义链 TCCATGACAACCTTGGCATTG
	反义链 TCACGCCACAGCTTTCCA

**1.7 ELISA 检测血清中炎症因子水平** 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。设置样品孔、标准品孔、空白对照孔, 3 复孔; 用 400  $\mu$ L 1×洗涤缓冲液洗涤 2 次所有微量孔; 加入 100  $\mu$ L 样品稀释液于标准孔内, 倍比稀释标准品; 加入 100  $\mu$ L 样

品稀释液于空白对照孔；加入 50  $\mu\text{L}$  样品稀释液于样品孔内，加入对应的样本 50  $\mu\text{L}$ ；均加入 50  $\mu\text{L}$  生物素标记物，于室温 200 r/min 摇床上孵育 2 h；洗板数次；均加入 100  $\mu\text{L}$  抗生蛋白链菌素-HRP，于室温 200 r/min 摇床上孵育 1 h；洗板 5~6 次；加入 100  $\mu\text{L}$  四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)底物溶液，室温下避光孵育数分钟；均快速加入 100  $\mu\text{L}$  终止液；15 min 内使用酶标仪检测各微量孔光密度 $[D(450\text{ nm})]$ 。

**1.8 Western blotting 检测细胞内 NF- $\kappa\text{B}$  p65 和 p-NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达情况** 收集细胞，用凯基全蛋白提取试剂盒提取巨噬细胞总蛋白，二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量，加适量  $5\times$ 电泳上样缓冲液，沸水煮沸 5 min，使蛋白质变性，取上清并分装备用；SDS-PAGE 电泳 1 h；250 mA 转聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜 1.5 h，5%脱脂奶粉封闭 2 h，置于兔抗鼠 GAPDH、NF- $\kappa\text{B}$  p65 和 p-NF- $\kappa\text{B}$  p65(1:1 000)抗体中 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜，用 PBST 洗膜 10 min，重复 3 次；置 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2 000)中室温孵育 2 h，PBST 洗膜 10 min，重复 3 次；加等量显示剂 A 液和 B 液，曝光显色，以 GAPDH 作为内参分析结果。

**1.9 统计学处理** 数据采用 Graphpad Prism 7 软件进行统计分析。所有实验均重复 3 次，数据以  $\bar{x}\pm s$  表示，组间比较采用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 LPS 作用下 WT 小鼠骨髓来源巨噬细胞中 miR-7 基因的表达** Real-time PCR 结果显示，随着 LPS 浓度的增加，WT 小鼠骨髓来源巨噬细胞中 miR-7 基因的表达不断升高，且在 100 ng/mL LPS 刺激时的表达上调最为显著( $P < 0.01$ ，图 1)。因此，后续实验将用 100 ng/mL LPS 处理巨噬细胞。

**2.2 miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞中 miR-7 基因的表达** Real-time PCR 结果显示，miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞中 miR-7 基因的表达水平较 WT 小鼠显著下降( $P < 0.01$ )。(图 2)

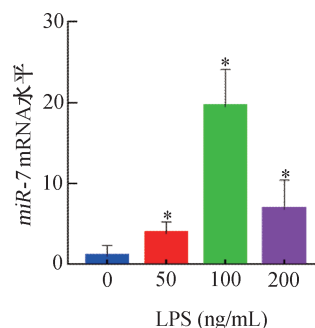


图 1 LPS 刺激 WT 小鼠骨髓来源巨噬细胞中 miR-7 基因的表达

注：与 0 ng/mL LPS 组比较，\*  $P < 0.01$

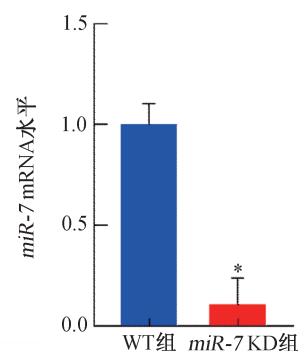


图 2 miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞中 miR-7 基因的表达

注：与 WT 组比较，\*  $P < 0.01$

**2.3 LPS 作用下小鼠骨髓来源巨噬细胞的形态及表面分子的变化** 显微镜下发现，在 LPS 的刺激活化下，miR-7 KD 小鼠和 WT 小鼠骨髓来源巨噬细胞均由未活化时的圆形变为长梭形，并伸出长长的伪足(图 3A)；FCM 检测结果显示，LPS 作用后，miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞表面 CD80 和 CD86 的比例较 WT 小鼠显著上调( $P < 0.05$ ，图 3B、图 3C)。

**2.4 LPS 作用下 miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞炎症因子的表达变化** Real-time PCR 结果显示，在 LPS 作用下，miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平较 WT 小鼠显著升高( $P < 0.05$ ，图 4A)；ELISA 检测培养上清也得到类似结果( $P < 0.01$ ，图 4B)。

**2.5 LPS 作用下 miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  p65 和 p-NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白的表达变化** Western blotting 结果显示，miR-7 KD 小鼠骨髓来源巨噬细胞在 LPS 刺激后 NF- $\kappa\text{B}$  p65 和 p-NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白水平均显著高于 WT 小鼠( $P < 0.01$ )。(图 5)

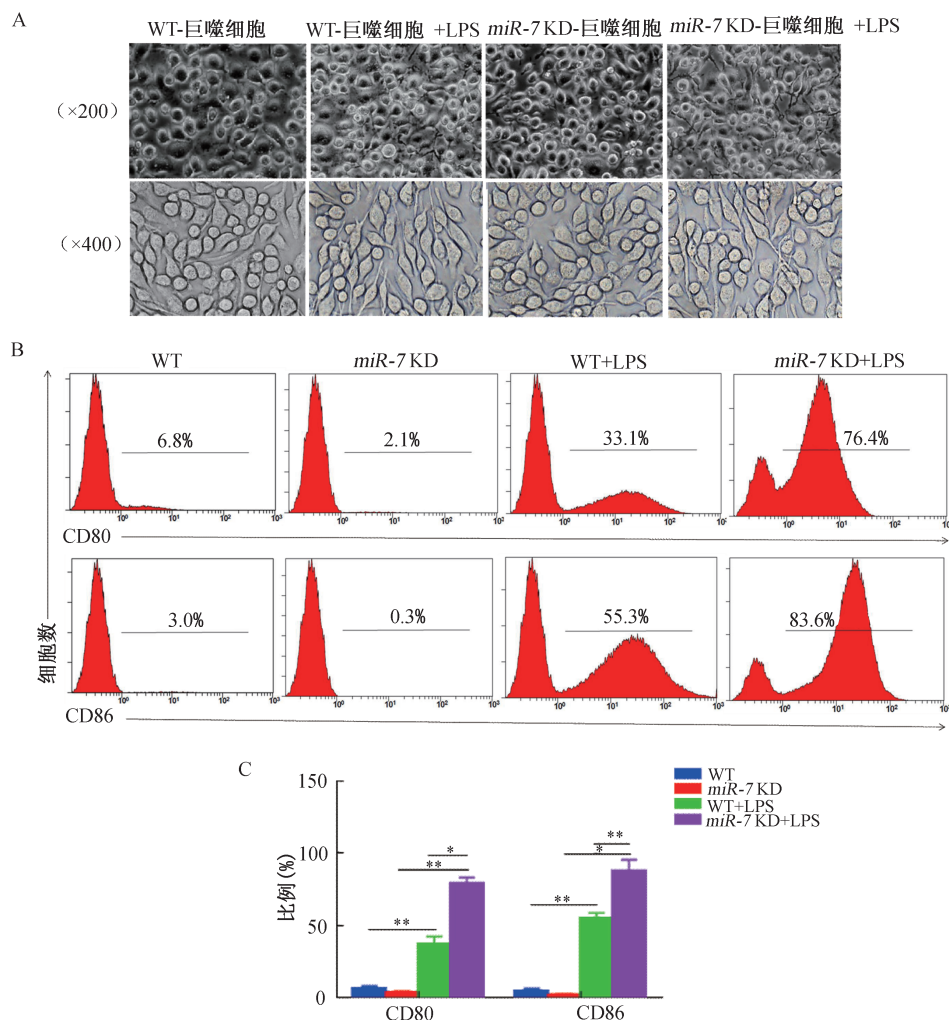


图3 LPS刺激后小鼠骨髓来源巨噬细胞的形态及表面分子的变化

注：A. 骨髓来源巨噬细胞的形态；B. 流式细胞术检测 LPS 刺激后骨髓来源巨噬细胞表面分子 CD80、CD86 的比例变化；C. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

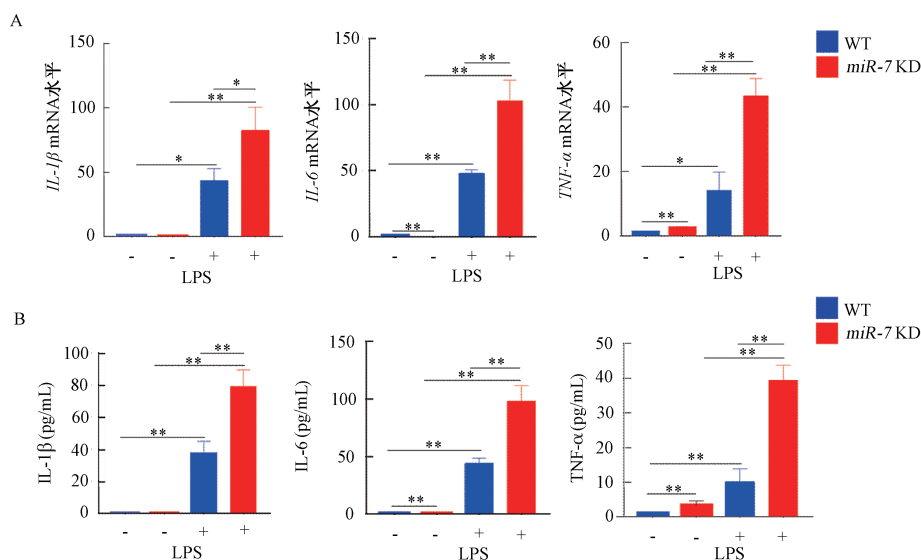


图4 LPS刺激后miR-7 KD小鼠骨髓来源巨噬细胞炎症因子表达的变化

注：A. Real-time PCR 检测 LPS 刺激后骨髓来源巨噬细胞中 *IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 水平；B. ELISA 检测 LPS 刺激后骨髓来源巨噬细胞培养上清液中 *IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* 的蛋白水平。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$



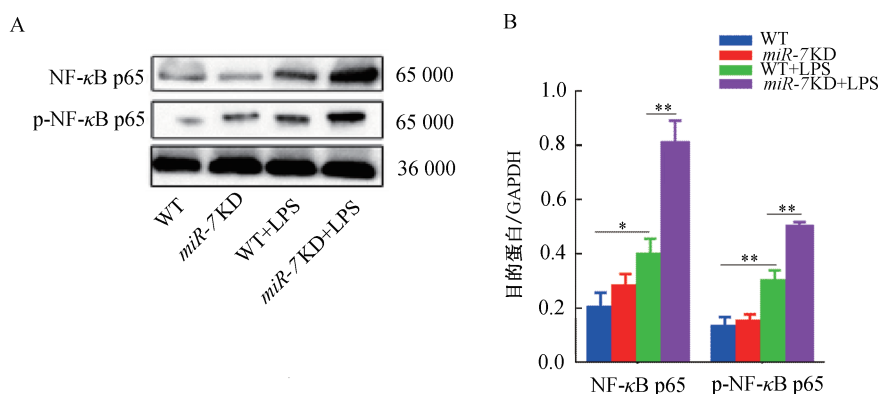


图5 LPS刺激后miR-7 KD小鼠骨髓来源巨噬细胞中NF-κB p65和p-NF-κB p65蛋白的表达

注：A. Western blotting检测LPS刺激后骨髓来源巨噬细胞中NF-κB p65和p-NF-κB p65蛋白的表达水平；B. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

目前对miR-7基因的研究主要集中在其调控肿瘤发生、迁移及侵袭方面<sup>[16-18]</sup>。近年来，发现miR-7基因在免疫炎症过程中也发挥重要的调控作用<sup>[19]</sup>。最近，我们也发现，miR-7基因KD可通过NF-κB等信号途径明显影响LPS诱导的急性肺损伤的病理发展过程<sup>[20]</sup>。本研究发现，在LPS刺激下，巨噬细胞中miR-7基因表达明显升高；miR-7基因KD后，尽管巨噬细胞的形态未发生显著改变，但炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达显著升高；同时，表面分子CD80和CD86的比例明显增加。提示miR-7基因KD后显著增强了巨噬细胞的炎症反应。类似地，我们在最近研究中发现，在LPS诱导的急性脑组织损伤中，miR-7基因KD可明显增加小胶质细胞的活性<sup>[21]</sup>。这些研究提示，miR-7基因对巨噬细胞的炎症反应具有重要的调控作用。

NF-κB是一种核转录因子，转录因子RelA/p65是NF-κB复合物中的重要亚基，其在炎症过程中具有关键作用<sup>[22]</sup>。有研究显示，miRNA分子可通过调控NF-κB信号通路参与免疫炎症过程<sup>[23]</sup>。如Boldin等<sup>[24]</sup>报道miR-146a通过抑制NF-κB和激活蛋白1(activator protein 1, AP1)信号传导在各种免疫细胞中起抗炎调节剂的作用。miR-155通过介导NF-κB信号通路减弱AP诱导的肝脏炎症<sup>[25]</sup>。Mann等<sup>[26]</sup>在最近的研究中发现，miR-155和miR-146a形成独特的调节网络，通过调节NF-κB的活性来精确调控巨噬细胞炎症反应过程。相反，miR-221通过靶向A20促进NF-κB通路从而促进炎症的发生<sup>[27]</sup>。在本研究中，我们进一步发

现miR-7基因KD后，巨噬细胞中磷酸化NF-κB的水平明显增加，这与我们最近的研究结果一致，提示miR-7基因KD对巨噬细胞炎症反应的影响可能与NF-κB信号途径传递变化有关。然而，miR-7基因调控巨噬细胞炎症反应的确切靶分子机制仍有待后续研究探讨。

综上所述，本研究发现，miR-7基因在LPS诱导的巨噬细胞炎症反应中明显上调，其KD增强了巨噬细胞的炎症反应，可能与NF-κB信号通路传递有关，提示miR-7基因在巨噬细胞炎症反应过程中发挥重要的调控作用，这为进一步探究miR-7基因在巨噬细胞炎症调节和炎症相关疾病发生机制中的作用提供了前期实验基础。

### 参考文献

- [1] Yap YA, Marino E. An insight into the intestinal web of mucosal immunity, microbiota, and diet in inflammation[J]. Front Immunol, 2018,9:2617.
- [2] Nanini HF, Bernardazzi C, Castro F, et al. Damage-associated molecular patterns in inflammatory bowel disease: From biomarkers to therapeutic targets[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(41): 4622-4634.
- [3] Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future[J]. Int Immunopharmacol, 2018,59:391-412.
- [4] Martinez-Quiles N, Goldbach-Mansky R. Updates on autoinflammatory diseases[J]. Curr Opin Immunol, 2018, 55: 97-105.
- [5] Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses[J]. FEBS J, 2018, 285(20): 3695-3716.
- [6] Saliminejad K, Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5451-5465.

- [7] Kehl T, Backes C, Kern F, *et al.* About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 107167-107175.
- [8] O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. MicroRNA regulation of inflammatory responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30:295-312.
- [9] Moein S, Vaghari-Tabari M, Qujeq D, *et al.* MiRNAs and inflammatory bowel disease: An interesting new story[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3277-3293.
- [10] Xie WD, Li MN, Xu NH, *et al.* miR-181a regulates inflammation responses in monocytes and macrophages[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58639.
- [11] Zhang L, Huang CQ, Guo YJ, *et al.* MicroRNA-26b modulates the NF- $\kappa$ B pathway in alveolar macrophages by regulating PTEN[J]. *J Immunol*, 2015, 195(11): 5404-5414.
- [12] Ballegaard V, Ralfkiaer U, Pedersen KK, *et al.* MicroRNA-210, MicroRNA-331, and MicroRNA-7 are differentially regulated in treated HIV-1-infected individuals and are associated with markers of systemic inflammation[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2017, 74(4): e104-e113.
- [13] Dong YF, Chen ZZ, Zhao Z, *et al.* Potential role of microRNA-7 in the anti-neuroinflammation effects of nicorandil in astrocytes induced by oxygen-glucose deprivation [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13: 60.
- [14] 朱顺飞,李永菊,陈超,等. MicroRNA-7 基因敲减小鼠模型的鉴定[J]. *遵义医学院学报*, 2014, 37(6):582-586; 590.
- [15] 李永菊,周涯,陈超,等. pG-miR-7-Sponge 转基因小鼠载体的构建及鉴定[J]. *遵义医学院学报*, 2014, 37(2):156-160.
- [16] Zhao J, Tao Y, Zhou Y, *et al.* MicroRNA-7: A promising new target in cancer therapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 103.
- [17] Kabir TD, Ganda C, Brown RM, *et al.* A microRNA-7/growth arrest specific 6/TYRO3 axis regulates the growth and invasiveness of sorafenib-resistant cells in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 216-231.
- [18] Cui YX, Bradbury R, Flamini V, *et al.* MicroRNA-7 suppresses the homing and migration potential of human endothelial cells to highly metastatic human breast cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(1): 89-101.
- [19] Zhou Y, Lu M, Du RH, *et al.* MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11: 28.
- [20] Zhao J, Chen C, Guo M, *et al.* MicroRNA-7 deficiency ameliorates the pathologies of acute lung injury through elevating KLF4[J]. *Front Immunol*, 2016, 7:389.
- [21] 岳东旭,赵娟娟,胡琳,等. 微小 RNA-7 基因敲减对 LPS 诱导的脑部炎症的影响[J]. *现代免疫学*, 2018, 38(5):366-371.
- [22] Tang BF, Li XC, Ren YL, *et al.* MicroRNA-29a regulates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in murine macrophages through the Akt1/ NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 360(2): 74-80.
- [23] Wang Z, Wang P, Wang Z, *et al.* MiRNA-548c-5p downregulates inflammatory response in preeclampsia via targeting PTPRO[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):11149-11155.
- [24] Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, *et al.* MiR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(6):1189-1201.
- [25] Yuan K, Zhang X, Lv L, *et al.* Fine-tuning the expression of microRNA-155 controls acetaminophen-induced liver inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40:339-346.
- [26] Mann M, Mehta A, Zhao JL, *et al.* An NF- $\kappa$ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 851.
- [27] Zhao DJ, Zhuang N, Ding Y, *et al.* MiR-221 activates the NF- $\kappa$ B pathway by targeting A20[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(1): 11-18.

## Effect of *miR-7* knockdown on LPS-induced macrophage inflammation in murine

CHEN Hui-zi<sup>1,2</sup>, GUO Meng-meng<sup>1,2</sup>, ZHAO Juan-juan<sup>1,2</sup>, YUE Dong-xu<sup>1,2</sup>, DING Tao<sup>1,2</sup>, CHEN Chao<sup>1,2</sup>, XU Lin<sup>1,2</sup> (1. *Special Key Laboratory of Gene Detection and Therapy, Zunyi 563000, China*; 2. *Department of Immunology and Biotherapy Base Talent, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China*)

**Abstract:** To study the effect of *miR-7* knockdown (KD) on LPS-induced macrophage inflammation in murine and its molecular mechanism, bone marrow-derived macrophages from wild type (WT) mice were stimulated with 0, 50, 100, 200 ng/mL LPS for 12 h. The relative expression of *miR-7* in macrophages was evaluated by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). The result showed that the expression of *miR-7* in macrophages gradually increased with the increase of LPS concentration and the 100 ng/mL was the most effective ( $P < 0.01$ ). Bone marrow-derived macrophages from both WT mice

(下转第 216 页)