

网络出版时间: 2021-05-14 16:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1449.008.html>

miR-223 在甲型流感病毒诱导的肺上皮细胞炎症中的作用机制

刘翠翠¹, 尚立群², 段进进², 陈瑞琳², 张永庆², 杨淑梅²

摘要 目的 探究 microRNA-223 (miR-223) 对甲型流感病毒 (IAV) 诱导的肺上皮细胞 (human bronchial epithelial cells, BEAS-2B) 炎症反应、氧化应激和凋亡的作用机制。方法 RT-qPCR 检测流感患者和正常受试者血清中 miR-223 和 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) mRNA 的表达量, 并检测不同时间的 IAV 处理对 miR-223 和 NLRP3 表达量的影响; CCK-8 实验检测肺上皮细胞 BEAS-2B 的细胞活力; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测 BEAS-2B 细胞的凋亡水平; Western blot 实验检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9、Bax 和 Bcl-2 的表达水平; 活性氧 (ROS) 指示剂 DCFH-DA 检测 ROS 的水平。结果 miR-223 在流感患者血清中的表达量低于正常受试者; IAV 抑制 miR-223 并促进 NLRP3 mRNA 的表达, 且具有时间依赖性 ($P < 0.05$); 过表达 miR-223 可有效降低 IAV 诱导的 BEAS-2B 的细胞凋亡率和炎症因子的水平 ($P < 0.05$); 此外, 过表达 miR-223 还可以缓解 IAV 诱导的 BEAS-2B 的氧化应激 ($P < 0.05$); 进一步的实验提示, miR-223 抑制 TLR4 和 p65 的表达, 并抑制 NLRP3 炎症小体的表达 ($P < 0.05$)。结论 miR-223 能够缓解 IAV 诱导的肺上皮细胞的氧化应激和凋亡, 减轻细胞损伤, 其作用机制是通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路并抑制 NLRP3 炎症小体的活化来实现的。

关键词 microRNA-223; NLRP3; TLR4/NF- κ B; 肺部炎症; 甲型流感

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)06-0876-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.008

NOD 样受体蛋白 (NOD-like receptor protein, NLRP) 家族是 NLR 的重要成员, 其中 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体是由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 前体 (pro-cysteine-aspartic acid protease 1, Pro-Caspase-1) 组成的多蛋白复合体, 可将 Pro-Caspase-1 剪切为有活性的

Caspase-1, 进而剪切白细胞介素前体 (pro-interleukin, Pro-IL) 包括 Pro-IL-1 β 、Pro-IL-18 和 Pro-IL-33 形成有活性的成熟 IL-1 β 、IL-18 和 IL-33, 分泌至细胞外, 介导炎症反应和诱导免疫病理损伤^[1]。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约为 20~24 个核苷酸的內源小 RNA, 其介导的转录后调控在基因表达的控制中发挥重要作用^[2]。研究^[3]表明, 微小 RNA-223 (microRNA-223, miR-223) 能够特异性作用于 NLRP3 mRNA 的 3'-UTR 区, 从而抑制 NLRP3 的翻译表达。在病毒入侵时, 为了避免引起免疫反应, 机体会释放 miRNA 抑制 NLRP3 炎症小体的激活^[4]。目前, 关于 miR-223 在流感病毒引起的肺部损伤中作用的研究报道较少。该研究旨在探究 miR-223 对流感病毒引起的肺部损伤的作用及其机制, 为临床上流感的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 收集甲型流感患者 32 例和正常受试者 32 例的血清样本, 所有患者均知情同意, 且本研究已获国家科研伦理委员会批准。正常人肺上皮细胞 (bronchial epithelial cells, BEAS-2B) 购自中国科学院细胞库, 以及甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV, A/Puerto Rico/8/34/H1N1) (于 9~11 d 的可育 SPF 鸡蛋的尿囊内繁殖)。RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 HyClone 公司; TRIzol、反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 试剂盒购自美国 Promega 公司; BCA 蛋白质定量检测试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 兔抗鼠 NLRP3、兔抗鼠 Bax、兔抗鼠 Caspase-3、兔抗鼠 Bcl-2 和鼠抗 GAPDH 购自美国 Abcam 公司; 转染试剂 LipofectamineTM 3000 购自美国 Invitrogen 公司; PCR 引物、miR-223 mimic 以及阴性对照 NC mimic 由北京擎科生物科技有限公司设计、合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 本研究所有细胞常规培养于 RPMI 1640 培养液 (含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素及 0.1 mg/ml 链霉素), 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱, 隔天换液, 细胞融合至 80%~90% 时

2021-04-08 接收

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (编号: 2020SF-416)

作者单位: ¹ 西安市儿童医院呼吸哮喘科, 西安 710003

² 陕西省人民医院呼吸与危重症一科, 西安 710068

作者简介: 刘翠翠, 女, 副主任医师;

尚立群, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: liqun333@fox-mail.com

传代,传至第3代进行后续实验。

1.2.2 细胞处理 使用犬肾上皮细胞系 MDCK 来测定病毒的滴度,感染复数(MOI)为1。使用 IAV 病毒侵染 BEAS-2B 细胞,时间分别为 12、24、36、48 h,测定细胞活力,后选取最适处理时间(36 h)进行后续实验。使用 RT-qPCR 检测不同处理组细胞中 miR-223 或 NLRP3 的表达情况。

1.2.3 实验分组 将细胞分为未处理组、IAV 组、IAV + NC mimic 组、IAV + miR-223 mimic 组。IAV 病毒侵染的 BEAS-2B 细胞为 IAV 组;未感染 IAV 病毒的 BEAS-2B 细胞为未处理组;IAV 病毒侵染 BEAS-2B 细胞 36 h 后用 Lipofectamine™ 3000 将阴性对照 NC mimic 以及 miR-223 mimic 分别转染至 BEAS-2B 细胞中,分别为 IAV + NC mimic 组和 IAV + miR-223 mimic 组。

1.2.4 RT-qPCR 检测 mRNA 表达 TRIzol 法提取 BEAS-2B 细胞中总 RNA,进行反转录合成 cDNA。RT-qPCR 检测 miR-223 基因的 mRNA 表达, β -actin 为内参。引物序列如下:miR-223 正向序列为 5'-ACGTTAGCTACACTTGCCTT-3',反向序列为 5'-AGTCCCCGTTGCATACAAAGG-3'; β -actin 正向序列为 5'-CTCACCATGGATGATGATATCGC-3',反向序列为 5'-AGGAATCCTTCTGACCACTGC-3'。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 消化对数生长期的 BEAS-2B 细胞,接种于 25 cm^3 培养瓶中,细胞融合至 80%~90% 时进行细胞转染。48 h 后收集各组细胞,收集细胞上清液,并消化下贴壁细胞,加 RIPA 裂解液于冰上裂解 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min(离心半径 9.5 cm)。上清液用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒测定蛋白含量后,取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,130 V 恒压电泳 2 h;湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上;室温下以含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲液封闭 PVDF 膜 1 h,冲洗后分别与一抗孵育, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST 清洗膜 8 min,重复 4 次,加相应的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗,室温孵育 2 h;TBST 重复清洗膜 4 次,ECL 试剂盒检测蛋白表达。

1.2.6 细胞活力的检测 将各组细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 96 孔板中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h;向培养板中加入 IAV 病毒分别于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 12、24、36、48 h,每个分组设 3 个复孔并设空白对照,每孔加入 20 μl CCK-8 溶液,孵育 24 h;酶标仪测定 450 nm 处的 OD

值。以上实验重复 3 次,取平均值。

1.2.7 细胞凋亡率的测定 将 miR-223 mimic 以及阴性对照 NC mimic 分别转染 BEAS-2B 细胞,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 48 h;将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种在 6 孔板中。根据细胞凋亡检测试剂盒的说明,用冷的 PBS 将细胞洗涤 2 次,然后用细胞凋亡检测试剂盒中的膜联蛋白 V-FITC/PI 染色。细胞凋亡率用流式细胞仪分析。以上实验重复 3 次。

1.2.8 活性氧(reactive oxygen species,ROS)的测定 将 BEAS-2B 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h;收集细胞,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 ROS 指示剂 DCFH-DA (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 PBS 中培养 30 min。使用流式细胞仪分析荧光。实验独立重复 3 次。

1.2.9 miR-223 与 NLRP3 表达量的相关性分析 绘制散点图来判断 miR-223 与 NLRP3 表达量之间的关系形态。相关系数根据样本数据计算的 miR-223 与 NLRP3 表达量之间线性关系强度的统计量。具体计算公式: $r = \text{Cov}(x, y) / \sigma_x \sigma_y$ 。

1.3 统计学处理 采用统计软件 SPSS 20.0 对数据进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的差异用 ANOVA 方差分析进行显著性比较,两组之间的差异采用 t 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-223 在 IAV 感染的患者血清和细胞中的表达 RT-qPCR 结果显示,miR-223 在流感患者血清中的相对表达量低于正常受试者中的表达,而 NLRP3 在流感患者中的相对表达量高于正常受试者中的表达(图 1A、B)。进一步的研究表明,BEAS-2B 细胞经 IAV 处理后,细胞活力随时间降低(图 1C)。此外,用 IAV 处理 BEAS-2B 细胞后,miR-223 的相对表达量降低,而 NLRP3 的相对表达量增加,且具有时间依赖性(图 1D、E)。

2.2 过表达 miR-223 对 BEAS-2B 细胞的炎症和氧化应激的影响 与未处理组相比,IAV 处理组炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平显著升高;而将 IAV 处理的细胞转染 miR-223 mimic 后,炎症因子的水平降低($F = 5.269, P = 0.0311$,图 2A~C)。此外,与 IVA 组或 IVA + NC mimic 组相比,IAV + miR-223 mimic 组细胞内 ROS 水平显著降低($F = 7.358, P = 0.0216$,图 2D),同样细胞内 NAD^+ 的水平也明显下降($F = 15.872, P = 0.0095$,图 2E)。

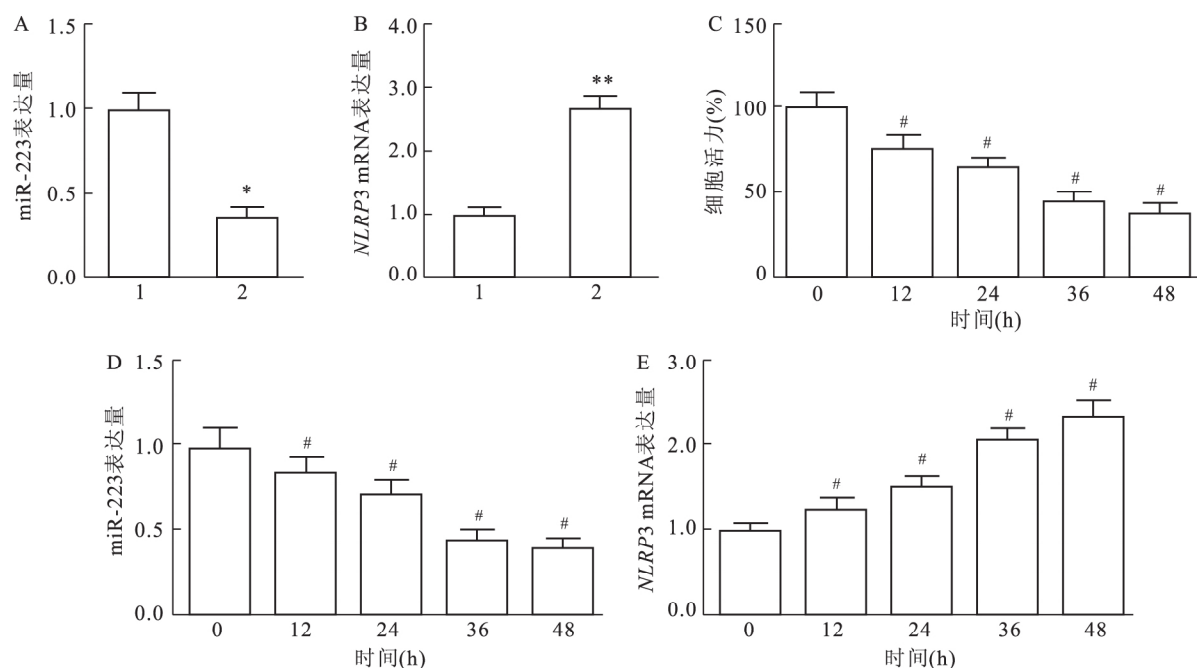


图1 miR-223在IAV感染的患者血清和细胞中的表达

A: miR-223在流感患者和正常受试者血清中的表达水平; B: *NLRP3*在流感患者和正常受试者血清中的mRNA表达水平; 1: 正常受试者; 2: 流感患者; C: IAV诱导BEAS-2B细胞的细胞活力; D: miR-223在IAV诱导的BEAS-2B细胞中的表达水平; E: *NLRP3*在IAV诱导的BEAS-2B细胞中mRNA的表达水平; 与正常受试者组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与IAV诱导0h组比较: # $P < 0.05$

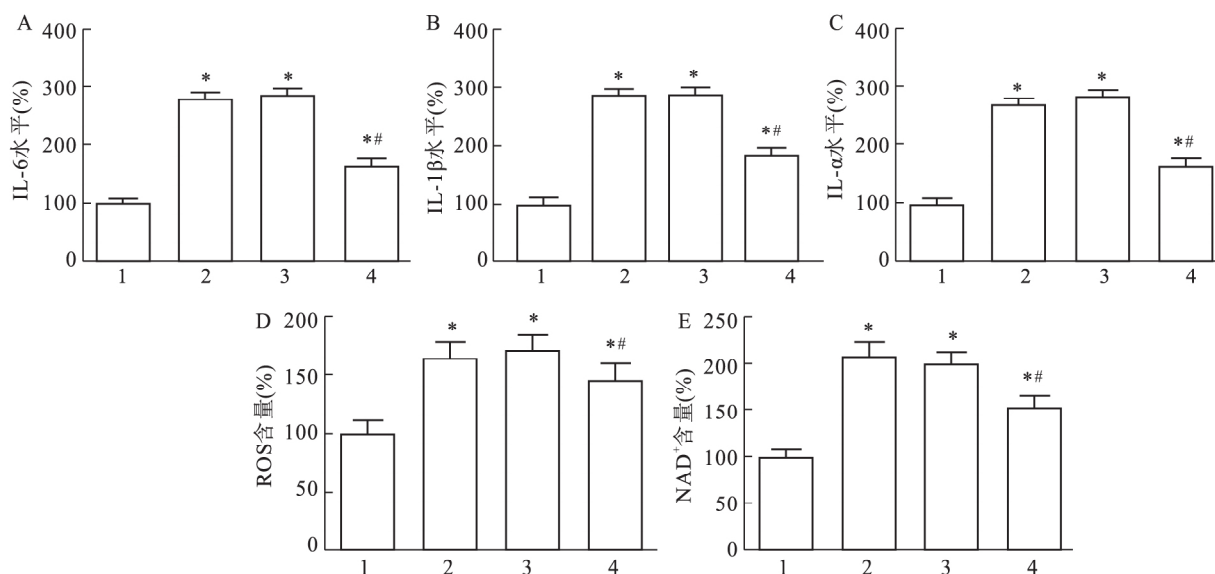


图2 过表达miR-223对BEAS-2B细胞炎症和氧化应激的影响

A: miR-223对IAV诱导的BEAS-2B细胞中IL-6水平的影响; B: miR-223对IAV诱导的BEAS-2B细胞中IL-1 β 水平的影响; C: miR-223对IAV诱导的BEAS-2B细胞中TNF- α 水平的影响; D: miR-223对IAV诱导的BEAS-2B细胞中ROS水平的影响; E: miR-223对IAV诱导的BEAS-2B细胞中NAD⁺水平的影响; 1: 未处理组; 2: IAV组; 3: IAV + NC mimic组; 4: IAV + miR-223 mimic组; 与未处理组比较: * $P < 0.05$; 与IAV + NC mimic组比较: # $P < 0.05$

2.3 过表达miR-223对BEAS-2B细胞凋亡的影响 当细胞经IAV处理后,细胞活力降低,而转染miR-223 mimic使IAV处理的细胞活力显著升高($F = 3.125, P = 0.0423$,图3A);此外,与IAV组相比,IAV + miR-223 mimic组细胞的凋亡率降低($F =$

13.687, $P = 0.0065$,图3B),且细胞中Caspase-3和Caspase-9的蛋白表达水平和凋亡相关蛋白Bax/Bal-2的比值降低($F = 5.544, P = 0.0268$,图3C ~ E)。

2.4 过表达miR-223对NLRP3的表达以及

TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达的影响 与 IAV 组相比, IAV + NC mimic 组 NLRP3 蛋白表达水平降低 ($F = 6.766, P = 0.0411$, 图 4A、B); 此外, 与 IAV 组相比, IAV + NC mimic 组 TLR4 和 p-p65 蛋白水平也显著下降 ($F = 10.264, P = 0.0087$, 图 4C、D); 通过对 32 个流感患者血清中 miR-223 和 NLRP3 表达量的

相关性分析显示, 二者表达量呈负相关 ($F = 8.967, P = 0.0254$, 图 4E)。

2.5 miR-223 保护 IAV 诱导的 BEAS-2B 免受损伤的调控机制 CCK-8 检测结果显示, 与 IAV 组相比, IAV + miR-223 mimic 组的细胞活力增加; IAV + pcDNA3.1-TLR4 组和 IAV + pcDNA3.1-NLRP3 组细

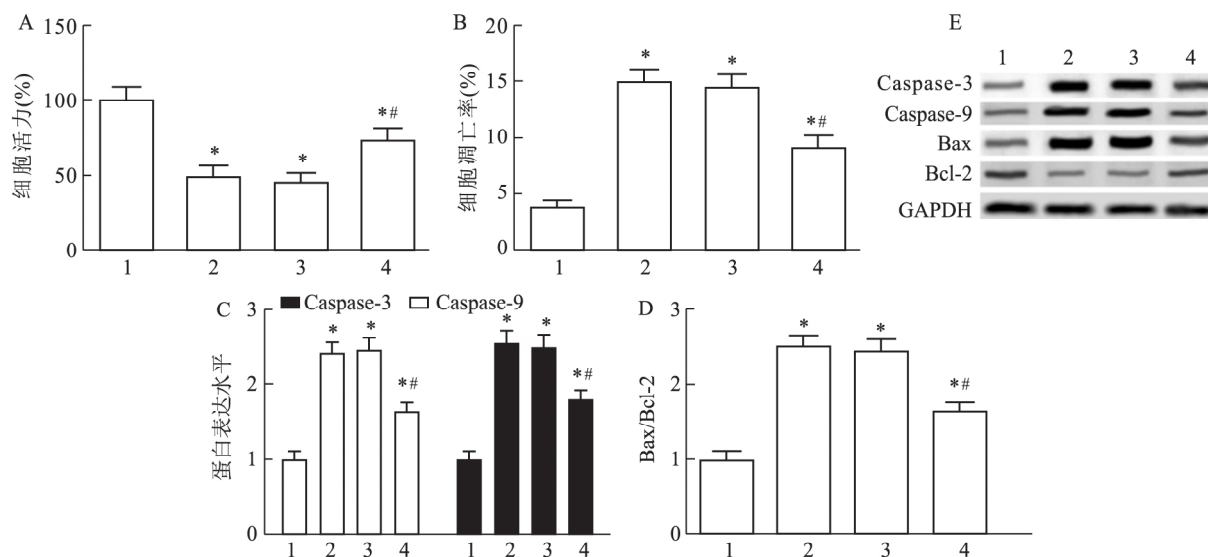


图3 过表达 miR-223 对 BEAS-2B 细胞凋亡的影响

A: miR-223 对 IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞活力的影响; B: miR-223 对 IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞凋亡率的影响; C: miR-223 对 IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平的影响; D: miR-223 对 IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞中 Bax/Bcl-2 比值的影响; E: Western blot 检测 Caspase-3、Caspase-9、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平; 1: 未处理组; 2: IAV 组; 3: IAV + NC mimic 组; 4: IAV + miR-223 mimic 组; 与未处理组比较: * $P < 0.05$; 与 IAV + NC mimic 组比较: # $P < 0.05$

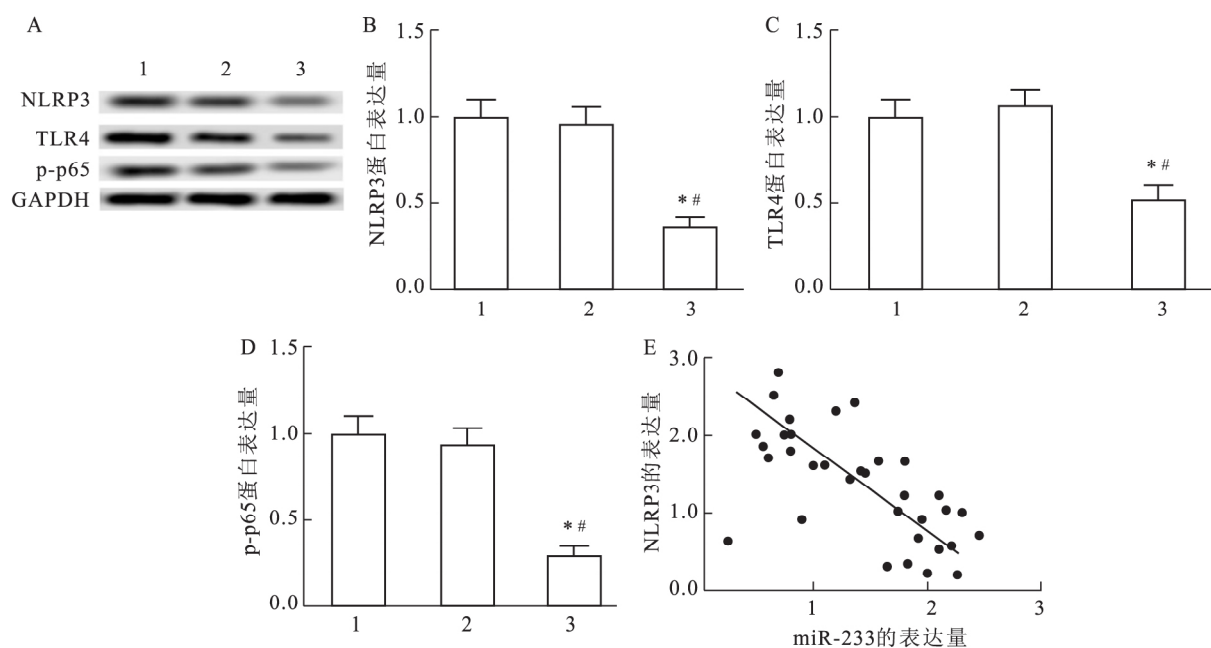


图4 过表达 miR-223 对 NLRP3 的表达以及 TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 NLRP3、TLR4 和 p65 蛋白表达水平; B: IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞中 NLRP3 的蛋白表达水平; C: IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞中 TLR4 的蛋白表达水平; D: IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞中 p-p65 的蛋白表达水平; E: miR-223 和 NLRP3 在流感患者中表达量相关性分析; 1: IAV 组; 2: IAV + NC mimic 组; 3: IAV + miR-223 mimic 组; 与 IAV 组比较: * $P < 0.05$; 与 IAV + NC mimic 组比较: # $P < 0.05$

胞活力均减弱($F = 12.364, P = 0.0268$, 图 5A), 且 IL-1 β 和 ROS 的表达水平增加, 且细胞凋亡率升高。IAV + pcDNA3.1-NLRP3 组和 IAV + miR-223 mimic + pcDNA3.1-TLR4 组 IL-1 β 、ROS 水平和细胞凋亡率显著低于 IAV + miR-223 mimic 组, 与 IAV 组无显著性差异($F = 2.168, P = 0.0487$, 图 5B ~ D); 此外, 与 IAV 组相比, IAV + miR-223 mimic 组细胞中 Caspase-3 的表达水平明显降低; IAV + pcDNA3.1-NLRP3 组和 IAV + miR-223 mimic + pcDNA3.1-TLR4 组 Caspase-3 的表达量显著高于 IAV + miR-223 mimic 组, 与 IAV 组无显著性差异($F = 11.257, P = 0.0136$, 图 5E)。

3 讨论

IAV 可引起反复流行, 造成人类高发病率和病死率^[5]。因此深入研究 IAV 的感染致病及免疫反应的机制, 对研发流感病毒疫苗和抗病毒药物具有深远意义。该研究表明 miR-223 在 IAV 感染的患者血清细胞中的表达均下调, 提示 miR-223 可能与 IAV 感染过程具有一定的相关性。miR-223 广泛参与调控细胞的生物学过程和多种病理过程, 如癌症、自身免疫性疾病和炎症性疾病^[6]。该研究表明过表达 miR-223 可抑制 IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞炎症, 这与郝俊芳等^[7]在 LPS 诱导的小鼠乳腺上皮细胞所得到的结论一致。李芸芸等^[8]指出 miR-223 可显著降低心脏缺血再灌注后心肌细胞的氧化应激

反应。此外, miR-223 还可抑制糖基化终产物诱导的人脂肪间充质干细胞凋亡^[9]。与前人的研究一致, 该研究显示过表达 miR-223 降低 IAV 诱导的 BEAS-2B 的细胞凋亡率。以上表明, IAV 感染可使 miR-223 表达下调, 过表达 miR-223 可缓解 IAV 诱导的 BEAS-2B 细胞损伤。

NLRP3 炎症小体信号通路在 IAV 感染后引起炎症反应, 并可释放炎症因子放大炎症反应^[10]。当 IAV 感染引起炎症小体激活时, 大量的炎症因子会诱导严重肺脏免疫病理损伤, 如急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征^[11]。Chung et al^[12]证实 NLRP3 炎症小体活化后释放的 IL-1 β 破坏上皮细胞, 并进一步诱导 IL-6、TNF- α 的产生, 进而诱发细胞因子引起严重的急性肺损伤。越来越多的研究^[13]表明, miR-223 能够抑制 NLRP3 炎症小体活化, 进一步抑制炎症性疾病的进展。此外, 激活 miR-223 的转录显著抑制炎症介质 NLRP3 的活化, 并降低 IL-1 β 产生来防止炎症损伤^[14]。Sha et al^[15]的研究表明, NLRP3 在 miR-223 敲除小鼠表达水平升高, 导致 IL-1 β 产生和肠道炎症易感性增加。该研究显示 miR-223 抑制了 NLRP3 的活化以及 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活, 且 TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 参与了 miR-223 对 IAV 诱导的细胞损伤的保护机制, 表明 miR-223 可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路并抑制 NLRP3 炎症小体的活化来抑制 IAV 感染造成的 BEAS-2B 细胞损伤。

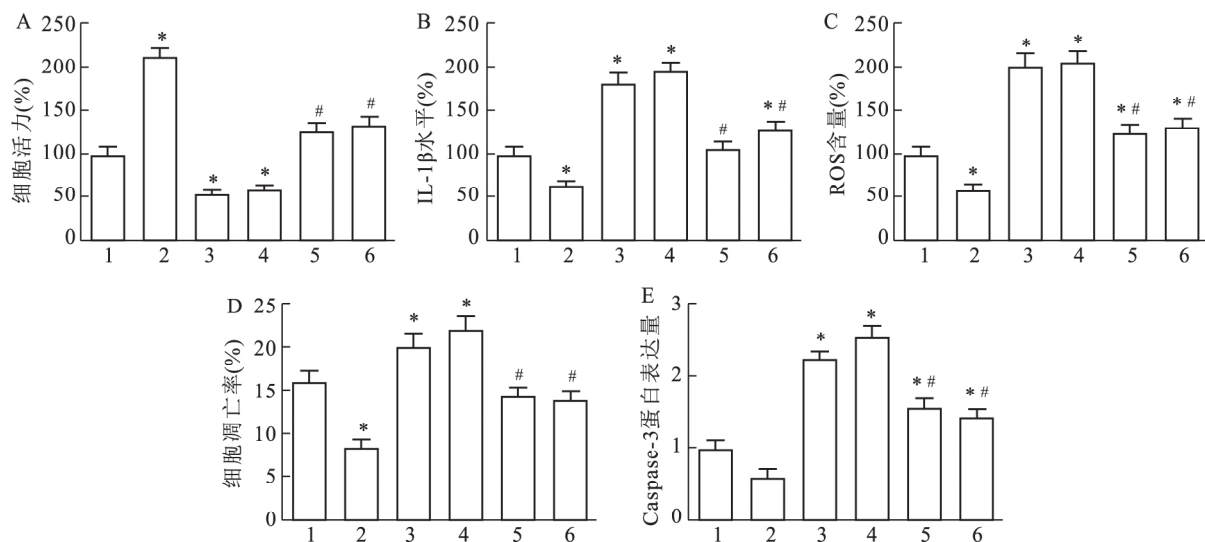


图5 TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 参与 miR-223 对 IAV 诱导的细胞损伤的保护机制

A: TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 对细胞活力的影响; B: TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 对细胞中 IL-1 β 水平的影响; C: TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 对细胞中 ROS 含量的影响; D: TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 对细胞凋亡的影响; E: TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 对细胞中 ROS 含量的影响; 1: IAV 组; 2: IAV + miR-223 mimic 组; 3: IAV + pcDNA3.1-TLR4 组; 4: IAV + pcDNA3.1-NLRP3 组; 5: IAV + miR-223 mimic + pcDNA3.1-TLR4 组; 6: IAV + miR-223 mimic + pcDNA3.1-NLRP3; 与 IAV 组比较: * $P < 0.05$; 与 IAV + pcDNA3.1-TLR4 组比较: # $P < 0.05$

参考文献

- [1] Shao B Z, Xu Z Q, Han B Z, et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2015,6:262–31.
- [2] Gaidt M M, Hornung V. The NLRP3 inflammasome renders cell death pro-inflammatory [J]. *J Mol Biol*, 2018,430(2):133–41.
- [3] Tate M D, Mansell A. An update on the NLRP3 inflammasome and influenza: the road to redemption or perdition [J]. *Curr Opin Immunol*, 2018,54:80–5.
- [4] Neudecker V, Haneklaus M, Jensen O, et al. Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Exp Med*, 2017,214(6):1737–52.
- [5] Webster R G, Govorkova E A. Continuing challenges in influenza [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014,1323(1):115–39.
- [6] Li Y, Li H, Liu S, et al. Pirfenidone ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation and fibrosis by blocking NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Immunol*, 2018,99:134–44.
- [7] 郝俊芳,黄凯,王月影,等. 炎症相关 miRNAs 在 LPS 诱导的小鼠乳腺上皮细胞炎症反应中的表达及 miR-223 真核表达载体的构建 [J]. *畜牧兽医学报*,2016,47(1):183–9.
- [8] 李芸芸,李玉琳,王绿娅,等. 微小核糖核酸-223-3p 对心脏缺血/再灌注损伤后心脏重构的影响 [J]. *心肺血管病杂志*, 2018,37(3):231–4,243.
- [9] 王哲,张殿宝,杨向红. microRNA-223 对糖基化终产物诱导人脂肪间充质干细胞凋亡和氧化应激影响的体外研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*,2017,25(1):1–6.
- [10] Kondrich J, Rosenthal M. Influenza in children [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2017,29(3):297–302.
- [11] Kuriakose T, Man S M, Malireddi R K, et al. ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways [J]. *Sci Immunol*, 2016,1(2):27–33.
- [12] Chung W C, Kang H R, Yoon H, et al. Influenza A virus NS1 protein inhibits the NLRP3 inflammasome [J]. *PloS One*, 2018,13(7):624–38.
- [13] Moriyama M, Chen I Y, Kawaguchi A, et al. The RNA- and TRIM25-Binding domains of influenza virus NS1 protein are essential for suppression of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion [J]. *J Virol*, 2016,90(8):4105–14.
- [14] Sun H J, Jin X M, Xu J, et al. Baicalin alleviates age-related macular degeneration via miR-223/NLRP3-regulated pyroptosis [J]. *Pharmacology*, 2019,105(1–2):28–38.
- [15] Sha R, Zhang B, Han X H, et al. Electroacupuncture alleviates ischemic brain injury by inhibiting the miR-223/NLRP3 pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019,25(2):4723–33.

The role and mechanism of miR-223 in bronchial epithelial cell inflammation induced by influenza A virus

Liu Cuicui¹, Shang Liquan², Duan Jinjin², et al

(¹*Dept of Respiratory and Asthma, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003;*

²*Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, Shanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068)*

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of microRNA-223 (miR-223) on the inflammatory response, oxidative stress and apoptosis of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) induced by influenza A virus (IAV). **Methods** RT-qPCR was used to detect the expression of miR-223 and *NLRP3* mRNA in sera of influenza patients and normal people, and the effect of IAV treatment at different time on the mRNA expression of miR-223 and *NLRP3* was detected; CCK-8 was used to detect the cell viability of BEAS-2B. Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit was used to detect the apoptosis level of BEAS-2B cells. The expression of apoptosis related proteins Caspase-3, Caspase-9, Bax and Bcl-2 was detected by Western blot; ROS was detected by reactive oxygen species indicator DCFH-DA. **Results** The results showed that the expression of miR-223 in the serum of influenza patients was lower than that of normal people; IAV inhibited miR-223 and promoted the mRNA expression of *NLRP3*, which was time-dependent ($P < 0.05$). Overexpression of miR-223 reduced the apoptosis rate and inflammatory factor levels of BEAS-2B induced by IAV ($P < 0.05$). In addition, overexpression of miR-223 alleviated oxidative stress of BEAS-2B induced by IAV ($P < 0.05$). Further study showed that miR-223 inhibited the expression of TLR4, p-p65 and *NLRP3* ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-223 alleviated the oxidative stress, apoptosis and reduced cell damage of pulmonary epithelial cells induced by IAV by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway and activating *NLRP3* inflammasome.

Key words microRNA-223; *NLRP3*; TLR4/NF- κ B; pulmonary inflammation; influenza A