

邢利鹏, 朱嘉豪, 胡芳馨, 等. 特异性敲除肠道 miR-146a 对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 197-204.  
XING Lipeng, ZHU Jiahao, HU Fangxin, et al. Effect of specific knockout of intestinal miR-146a on the intestinal microbiota of mice[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 197-204.

# 特异性敲除肠道 miR-146a 对小鼠肠道菌群的影响

邢利鹏<sup>✉</sup>, 朱嘉豪, 胡芳馨, 陈 婷, 罗君谊, 孙加节, 张永亮, 习欠云<sup>✉</sup>

(华南农业大学 动物科学学院/国家生猪种业工程技术中心/广东省动物营养调控重点实验室, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】miR-146a 作为抑炎因子, 仍然不清楚其是否参与宿主与微生物间的互作, 进而影响肠道稳态, 因此本文旨在研究 miR-146a 对小鼠肠道菌群的影响。【方法】以肠道 miR-146a 特异性敲除小鼠 (CKO 鼠) 及对照小鼠 (Flox 鼠) 为研究对象, 利用 16S rRNA 高通量测序法检测 2 组空肠段的微生物菌群分布。【结果】测序共获得 1 134 个用于物种分类的 OTUs, 包括 37 门、80 纲、161 目、198 科、261 属、117 种的细菌; Flox 组和 CKO 组小鼠的空肠微生物中共有 46 个相同的 OTUs; 各组肠道微生物中厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidota、疣微菌门 Verrucomicrobiota、变形菌门 Proteobacteria 和脱硫杆菌门 Desulfobacterota 是优势菌门; 2 组肠道微生物群落组成整体相似, 但 CKO 组梭状芽孢杆菌纲 Clostridia 的平均相对丰度高于 Flox 组 ( $P=0.067$ ), 毛螺菌目 Lachnospirales 平均相对丰度显著高于 Flox 组 ( $P<0.05$ ), 其他层级组成无显著差异。【结论】miR-146a 敲除可改变宿主肠道梭状芽孢杆菌纲和毛螺菌目微生物的含量, 为研究 miR-146a 通过改变宿主肠道微生物丰度来影响肠道健康状况提供参考。

关键词: miR-146a; 小鼠; 肠道; 特异性敲除; 微生物

中图分类号: S511; S502

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0197-08

## Effect of specific knockout of intestinal miR-146a on the intestinal microbiota of mice

XING Lipeng<sup>✉</sup>, ZHU Jiahao, HU Fangxin, CHEN Ting, LUO Junyi, SUN Jiajie, ZHANG Yongliang, XI Qianyun<sup>✉</sup>

(College of Animal Science, South China Agricultural University/National Pig Seed Industry Engineering Technology Center/  
Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Nutrition Regulation, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】It is still unclear whether miR-146a, as an anti-inflammatory factor, is involved in the interaction between host and microbes, and then affects intestinal homeostasis. Therefore, this study aims to investigate the effect of miR-146a on the intestinal flora of mice. 【Method】Intestinal miR-146a-specific knockout mice (CKO mice) and control mice (Flox mice) were used as research subjects, and the 16S rRNA high-throughput sequencing method was used to detect the distribution of microflora in the jejunum of the two groups. 【Result】Through sequencing, we obtained a total of 1 134 OTUs for species classification, including 37 phyla, 80 classes, 161 orders, 198 families, 261 genera and 117 species of bacteria. There were a total of 46 identical OTUs in the jejunal microbes of the Flox group and CKO group. Firmicutes, Bacteroidota, Verrucomicrobiota, Proteobacteria and Desulfobacterota were the dominant bacteria in gut microbes of each

收稿日期: 2022-02-03 网络首发时间: 2023-01-02 16:52:14

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail//44.1110.S.20221230.1355.006.html>

作者简介: 邢利鹏, 硕士研究生, 主要从事肌肉对脂肪生成调控研究, E-mail: [1101271181@qq.com](mailto:1101271181@qq.com); 通信作者: 习欠云, 教授, 博士, 主要从事外泌体、miRNA 调控以及肌肉与脂肪互作研究, E-mail: [xqy0228@163.com](mailto:xqy0228@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金 (31872435, 32072814, 31802156, 31802032)

group. The gut microbial community compositions of the two groups were generally similar, while the average abundance of Clostridia in the CKO group was higher than that in the Flox group ( $P=0.067$ ), and the average abundance of Lachnospirales in the CKO group was significantly higher than that in the Flox group ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the composition of other levels. 【Conclusion】 Knockout of miR-146a can alter the contents of Clostridia and Lachnospirales microorganisms in the host gut, which provides a reference for studying how miR-146a affects gut health by altering host gut microbes.

**Key words:** miR-146a; Mouse; Intestine; Specific knockout; Microbe

肠道微生物与动物的健康关系密切。动物肠道内微生物的种类多、数量大。这群微生物与宿主互利共生,因其组成和分布的不同,发挥的功能也不同。肠道微生物不仅可以在机体代谢过程中提供底物、酶和能量,同时其代谢产物如脂肪酸等对机体上皮细胞生长与分化有促进作用,此外还参与合成维生素以及各种离子吸收。肠道微生物与宿主在肠道黏膜表面的交流促进了免疫系统的形成,从而构建了重要的生物及免疫屏障<sup>[1]</sup>。随着相关研究的不断发展,肠道微生物不仅在维持机体健康中发挥作用,还参与了许多疾病的进程。Qin 等<sup>[2]</sup>于 2012 年进行了肠道微生物与 II 型糖尿病的宏基因组关联分析,研究结果表明在糖尿病患者与非糖尿病患者的中国人群中,肠道微生物组成发生改变,II 型糖尿病患者产丁酸细菌种类减少。一项对人类和小鼠微生物菌群的研究表明肥胖个体具有更高的从饮食中获取能量的能力<sup>[3]</sup>,其原因是肥胖与 2 种主要细菌分支相对丰度的差异有关,肥胖个体厚壁菌门 Firmicutes 的相对丰度增加,拟杆菌门 Bacteroidota 的丰度减少。此外,一项通过宏基因组分析比较同卵双胞胎和异卵双胞胎及其母亲的微生物群的研究,也支持了微生物多样性减少会促进热量收集的结论<sup>[4]</sup>。最近的研究同样表明,微生物基因计数低的个体有更多的全身炎症、肥胖、胰岛素抵抗和血脂异常<sup>[5]</sup>。

MicroRNAs(miRNAs)是一类长度为 18~25 核苷酸的非编码小 RNA 分子,通过与靶基因 mRNA 结合,导致其翻译抑制或降解,在细胞增殖、分化以及其他生物过程中发挥关键作用<sup>[6]</sup>。其中 miR-146a 作为近些年来 miRNAs 的研究热点之一,其研究最早由 Taganov 等<sup>[7]</sup>报道,通过鉴定脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的人单核细胞系 THP-1 中 miRNA 表达谱发现,其中 miR-146、miR-132 和 miR-155 表达显著升高,且 LPS 介导的 miR-146a 表达的上调是以 NF- $\kappa$ B 依赖的方式发生的。随着 miR-146a 研究的深入,发现其还与癌症相关。

结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 是最常见的癌症之一。2018 中国癌症统计报告显示:我国结直肠癌发病率、病死率在全恶性肿瘤中分别位居第 3 位、第 5 位<sup>[8]</sup>。研究发现 miR-146a 作为结肠炎症和相关肿瘤发生的主要负调控因子,调节 IL-17 反应,其高表达量与大概率延长结肠癌患者生存时间的表征相关,同时 miR-146a 缺陷的小鼠易患结肠炎相关和散发的 CRC,并呈现出 IL-17 信号的增强<sup>[9-10]</sup>。早在 1974 年 Reddy 等<sup>[11]</sup>对无菌大鼠与普通大鼠每周注射 10 mg/kg 1, 2-二甲基胍,连续注射 20 周,发现无菌大鼠无一患病,而常规大鼠有 17% 患上结直肠癌,表明肠道菌群对结直肠癌有调控作用。微生物群可以通过炎性介质 (如肿瘤坏死因子、NF- $\kappa$ B、白细胞介素和干扰素等)、微生物代谢物 (如肠道微生物源脱氧胆酸、丁酸等) 以及环境因素 (如饮食因素、身体不活动、环境污染物等) 等影响结直肠癌的进程<sup>[12]</sup>。

那么 miR-146a 作为抑炎因子,是否参与宿主与微生物间的互作,进而影响肠道菌群的稳态?本文以 miR-146a 条件性敲除小鼠为模型,通过采用 16S rRNA 高通量测序技术,研究 miR-146a 对小鼠肠道菌群分布以及种类等方面的影响,以期 miR-146a 与微生物互作的研究提供有益的数据支持。

## 1 研究方法

### 1.1 试验动物繁育

miR-146a 肠道特异性敲除小鼠 (Conditional knockout mice, CKO 鼠) 由赛业 (广州) 生物科技有限公司制备,简单来说,应用 CRISPR-Cas9 技术在 *miR-146a* 基因外显子 1 两端插入 *Flox* 序列,经 PCR 可鉴定出基因组插入 *Flox* 序列的阳性鼠为对照组鼠 (Flox 鼠);为繁育 CKO 鼠,将 Flox 鼠与 *villus-Cre* 工具鼠进行杂交,其原理是 *villin-Cre* 基因只在肠道中表达 Cre 酶活性,Cre 酶可将 2 个 *Flox* 序列中间的片段剪切,从而达到敲除的目的,具体繁育方法见下文。小鼠为普通 SPF 级,均购自

广东省医学实验动物中心(广东佛山)。

CKO 鼠的制备: 首先将 F0 代 *Flox<sup>+/+</sup>* 纯合小鼠与 *villin-Cre* 小鼠杂交, 获得 F1 代 *Flox<sup>+/-</sup>Cre<sup>+</sup>* 小鼠。接着把 F1 代 *Flox<sup>+/-</sup>Cre<sup>+</sup>* 小鼠再与 F0 代 *Flox<sup>+/+</sup>* 纯合小鼠杂交, 获得 F2 代 *Flox<sup>+/+</sup>Cre<sup>+</sup>* 鼠, 即 CKO 鼠。

试验开始前进行小鼠基因型鉴定, 取同一只小鼠的少量耳朵或尾巴组织对 *Flox*(使用 *Flox* 引物) 和 *Cre*(使用 *villus-Cre* 引物)(表 1) 2 个基因位点的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, *Flox* 鼠的 *Flox* PCR 产物为单一 206 bp 条带, *Cre* PCR 产物无明显条带; CKO 鼠的 *Flox* PCR 产物为单一 206 bp 条带, *Cre* PCR 产物为单一 120 bp 条带。将基因鉴定后的公鼠分为 *Flox* 组与 CKO 组各 4 只, 单笼饲养, 保证充足的饮水与饲料。

## 1.2 样品采集

将 6 周龄小鼠颈椎脱臼处死, 用镊子配合手术剪沿腹中线剖开腹部, 分离出空肠段, 再用剪刀纵切铺平, 用盖玻片刮出黏膜, 转移至离心管用于后续 16S rRNA 测序, 组织部分转移至新的离心管用于后续 RNA 提取。

## 1.3 RNA 提取和 qRT-PCR

使用 EZB 通用型 RNA 提取试剂盒(海方生物)提取组织总 RNA, 并使用分光光度计(Nanodrop 2000, ThermoFisher)测定 RNA 浓度。取 1  $\mu\text{g}$  total RNA, 使用 EZB 4×EZscript Reverse Transcription Mix II 逆转录试剂盒进行逆转录, mRNA 使用 Oligo(dT)18 引物进行逆转录, miR-146a-5p 使用特异性茎环引物(mmu-miR-146a-5p RT: GTCGTATCCAGT GCGTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATA CGACAACCCA) 逆转录。得到的 cDNA 稀释 5 倍, 保存在  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱待用。

qRT-PCR 使用 EZB 2×Color SYBR Green qPCR Master Mix 进行目的基因 *miR-146a-5p*(使用 mmu-miR-146a-5p 引物) 和内参基因 *U6*(使用

mmu-U6 引物)(表 1) 表达水平检测, 基因表达结果使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法统计。

## 1.4 16S rRNA 测序

1.4.1 基因组 DNA 的提取 样品总基因组 DNA 用 CTAB/SDS 法提取后在 10 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳检测 DNA 的质量浓度和纯度, 最后用无菌水将 DNA 质量浓度稀释至 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

1.4.2 扩增子一代 不同区域的 16S rRNA/18S rRNA/*ITS* 基因用特异性引物(16S V4、18S V4、*ITS1*, 表 1) 进行扩增。参照 Phusion<sup>®</sup>High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs) 说明书进行 PCR 反应。

1.4.3 PCR 产物定量和鉴定 将等量的 1×上样缓冲液与 PCR 产物混合, 在 20 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳检测并用 Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen) 进行 PCR 产物纯化。

1.4.4 文库制备和测序 按照 TruSeq<sup>®</sup>DNA PCR-Free Sample Preparation Kit(Illumina) 说明书生成测序文库, 并添加索引代码。使用 Qubit<sup>®</sup>2.0 荧光计(Thermo Science) 和安捷伦生物分析仪 2100 系统对文库质量进行评估。随后在 Illumina NovaSeq 平台上对文库进行测序, 获得了 250 bp 的成对末端阅读序列。

## 1.5 数据统计分析

对原始数据进行处理, 得到有效数据(Clean data), 基于有效数据进行 OTUs(Operational taxonomic units) 聚类 and 物种分类分析。根据 OTUs 聚类结果, 对每个 OTU 的代表序列做物种注释, 同时对 OTUs 进行丰度、Alpha 和 Beta 多样性计算等分析。为进一步挖掘分组样本间的群落结构差异, 选用 *t* 检验等统计分析方法对分组样本的物种组成和群落结构进行差异显著性检验。用 Tax4Fun 软件对生态样本中的微生物群落进行功能预测分析。

表 1 定量与测序引物序列

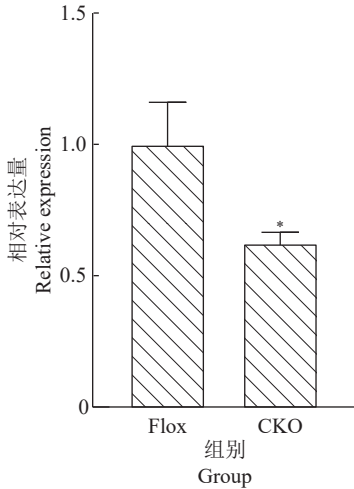
Table 1 Quantitation and sequencing primer sequences

引物名称 Primer name	正向序列(5'→3') Forward sequence	反向序列(5'→3') Reverse sequence
<i>Flox</i>	CTGCTCTTGCTGACGTGAAGAA	TTCCTAGAGTGACCCAGTTCTACATG
<i>villin-Cre</i>	ACGAAGTTATTAGTGCCCTCGAC	CGGCTCTTAAAGCAATGGTC
mmu-U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTACGAATTTGCGT
mmu-miR-146a-5p	GGGTGAGAACTGAATTCCA	CAGTGCGTGTCGTGGAGT
16S V4	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
18S V4	GCGGTA-ATTCCAGCTCCA	AATCCRAGAATTTACCTCT
<i>ITS1</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	GCTGCGTTCTCATCGATGC

## 2 结果与分析

### 2.1 肠道 miR-146a 敲除小鼠的鉴定

提取 Flox 组和 CKO 组小鼠空肠组织的 RNA, 对 2 组空肠组织的 miR-146a-5p 进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果表明, CKO 组小鼠空肠组织的 miR-146a-5p 表达与 Flox 组相比显著降低 (图 1)。



图中数据为平均值±标准误, “\*”表示与 Flox 组差异显著 ( $P < 0.05$ ,  $t$  检验)

Data in the figure are means±standard errors, “\*” indicates significant difference from the Flox group ( $P < 0.05$ ,  $t$  test)

图 1 各组小鼠空肠组织 miR-146a-5p 定量结果

Fig. 1 Quantitative results of miR-146a-5p in mouse jejunum tissue of each group

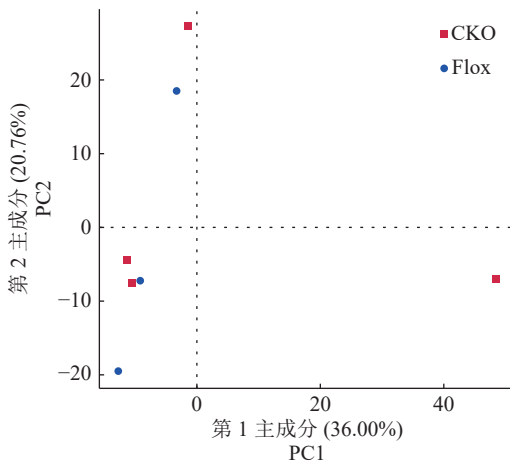
表 2 各组小鼠空肠微生物 Alpha 多样性的测定结果<sup>1)</sup>

Table 2 Determination results of Alpha diversity of jejunum microbes in mice of each group

组别 Group	Good coverage	Shannon	Ace	Chao1	Observed_species
Flox	0.999	4.15±0.74	366.52±118.48	364.10±113.22	334.00±113.33
CKO	0.999	3.94±0.49	404.74±132.54	399.60±134.56	380.75±130.35

1) 表中数据为平均值±标准误

1) Data in the table are means ± standard errors



图中每个点代表 1 个样本

Each dot in the figure represents a sample

图 2 各组小鼠空肠微生物 Beta 多样性分析

Fig. 2 Analysis of Beta diversity of jejunum microbes in mice of each group

### 2.2 小鼠空肠微生物群落 OTUs 分析

以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs, 共得到 1 134 个 OTUs, Flox 组、CKO 组分析共得到 46 个相同的 OTUs, 但由于 CKO 组间偏差较大, 2 组之间并不存在显著差异。根据注释到的结果, 所有样本在不同等级上的种类数量依次为界 (Kingdom): 2; 门 (Phylum): 37; 纲 (Class): 80; 目 (Order): 161; 科 (Family): 198; 属 (Genus): 261; 种 (Species): 117。

### 2.3 小鼠空肠微生物 Alpha 多样性分析

样本内的微生物群落的丰富度和多样性用 Alpha 多样性分析, 分析结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 各组的 Good coverage 指数均为 0.999, 说明测序数据覆盖 99.9% 的微生物, 覆盖度较好。CKO 组的 Shannon 指数低于 Flox 组, Ace、Chao1、Observed\_species 指数高于 Flox 组, 但差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 小鼠空肠微生物 Beta 多样性分析

通过分析图 2 中的不同样本点的距离来判断个体或群体间的差异, 样本的群落组成越相似, 则它们在主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 图中的距离越接近。

由图 2 可知, PCA 显示 Flox 组和 CKO 组中各样本的组内偏差较大, 其微生物群落组成相似。

### 2.5 小鼠空肠微生物门水平物种分布以及有差异的物种分析

各组小鼠肠道微生物在门水平上, 厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidota、疣微菌门 Verrucomicrobiota、变形菌门 Proteobacteria、脱硫杆菌门 Desulfobacterota 丰度大于 1%(图 3)。

CKO 组厚壁菌门、疣微菌门相对丰度与 Flox 组相比分别高 38.24%、44.44%, 而拟杆菌门相对丰度比 Flox 组低 31.25%, 但均差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

从不同层级的物种丰度出发, 通过常规的  $t$  检验可以得到差异物种。在纲水平上, CKO 组和 Flox 组中梭状芽孢杆菌纲 Clostridia 的平均相对丰度分别为 7.32% 和 2.23%, 2 组间差异不显著 ( $P = 0.067$ ); 在目水平上, 毛螺菌目 Lachnospirales 在 CKO 组和 Flox 组中的平均相对丰度分别为 1.40% 和 0.50%,

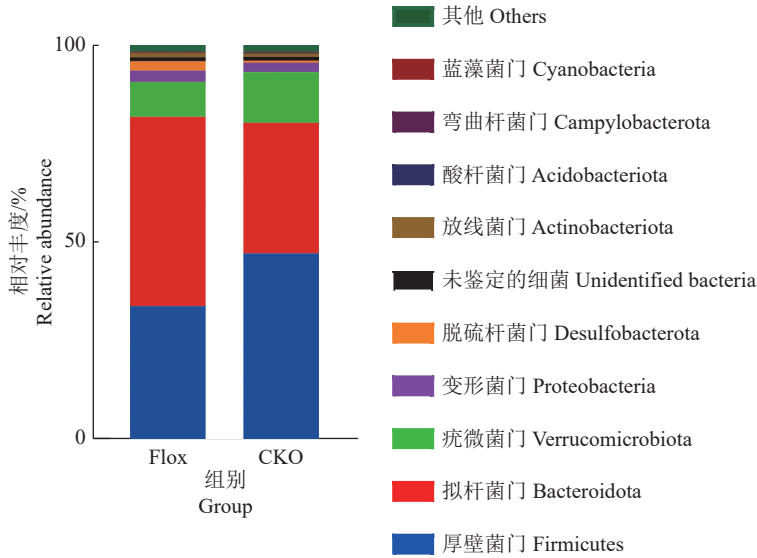


图 3 各组小鼠空肠微生物门水平组成

Fig. 3 The composition of the jejunum microbial phyla in mice of each group

该物种在 2 组间的差异显著 ( $P=0.0135$ )。

### 2.6 Tax4Fun 功能预测的 KEGG 通路分析

各组样本 Tax4Fun 预测到的功能主要集中在细胞进程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾

病、代谢、有机体系统以及其他未分类的功能, 其中与膜运输、遗传信息翻译、复制和修复、碳水化合物代谢、氨基酸代谢以及核苷酸代谢方面相关的基因相对丰度较高 (图 4)。

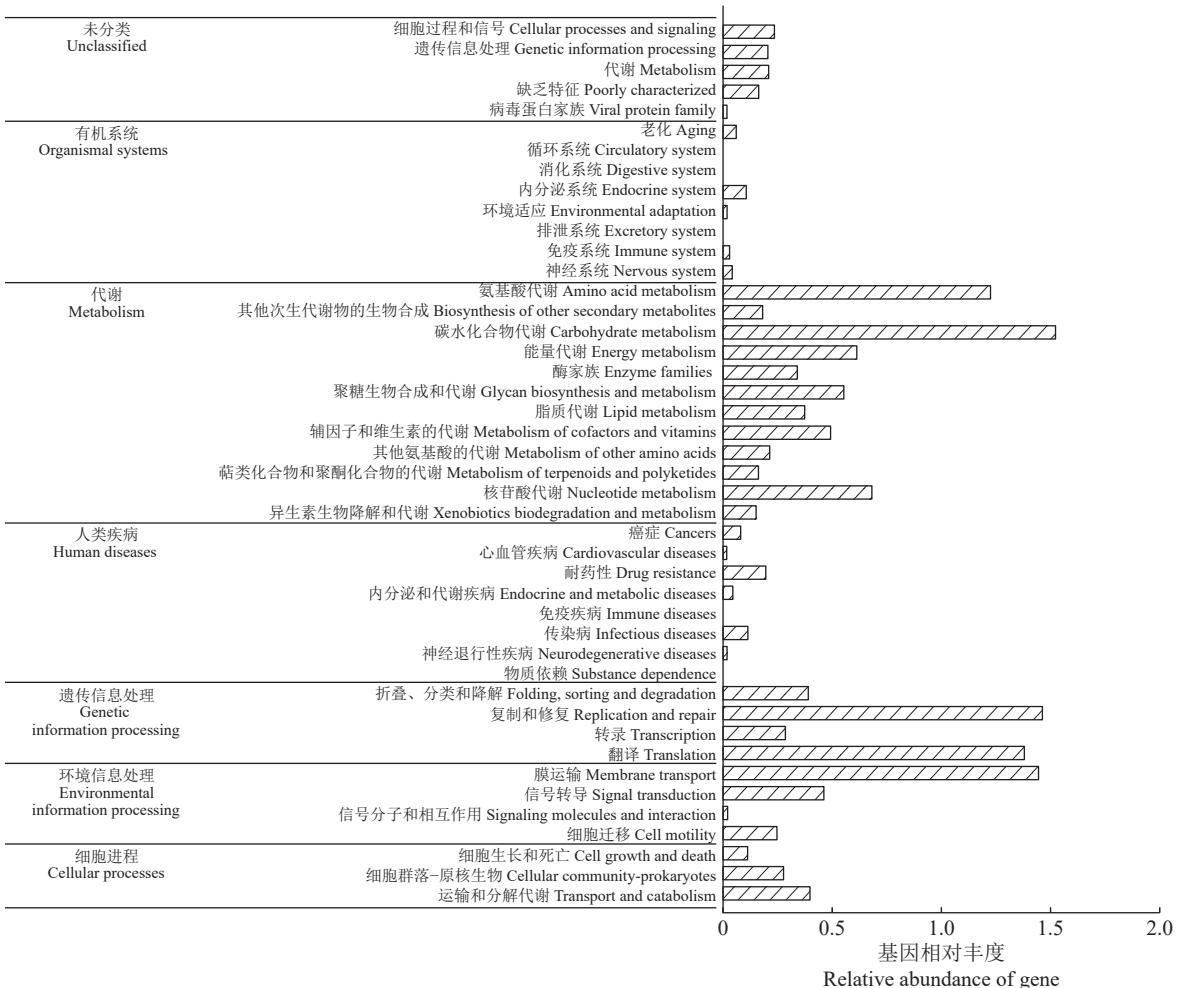


图 4 Tax4Fun 功能预测的 KEGG 通路分析

Fig. 4 KEGG pathway analysis through Tax4Fun function prediction

## 2.7 KEGG 通路 Level 1 相对丰度分析

以 Level 1 相对丰度柱形图 (图 5) 为例, 2 组间

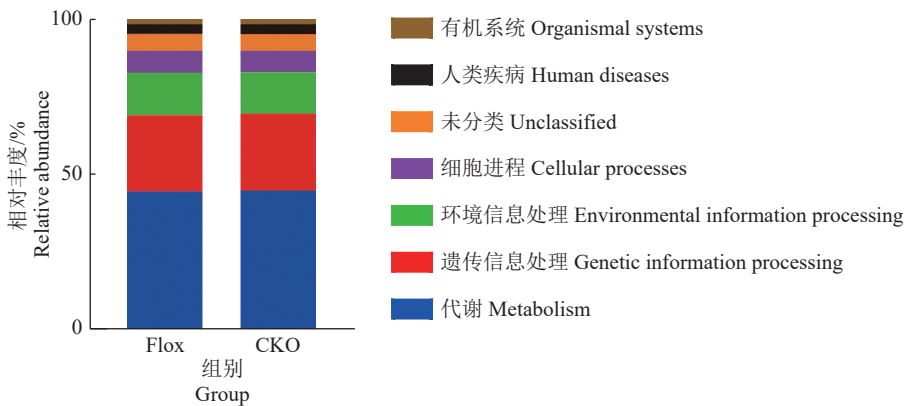


图 5 KEGG 通路 Level 1 相对丰度的分析

Fig. 5 Analysis of the relative abundance of Level 1 in the KEGG pathway

## 3 讨论与结论

微生物与宿主健康息息相关, 例如肠道微生物多样性与长期体质量增加呈负相关, 而与纤维摄入量呈正相关<sup>[13]</sup>。随着生猪养殖规模的不断扩大, 封闭式猪舍越来越多, 存在通风不顺畅的因素, 导致封闭式猪舍内部存在大量的微生物、粉尘、内毒素等, 会形成微生物气溶胶。微生物气溶胶浓度过高, 就会影响生猪健康<sup>[14]</sup>。近来李喜阳等<sup>[15]</sup>通过对腹泻和健康断奶仔猪肠道微生物比较发现, 在门水平上, 腹泻组厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和 Myxococcota 的相对丰度显著高于健康组, 而拟杆菌门的相对丰度显著低于健康组; 在属水平上, 腹泻组中罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri*、*Marvinbryantia*、消化球菌属 *Peptococcus*、Subgroup\_10 和 *Bryobacter* 的相对丰度显著高于健康组, 说明仔猪肠道菌群的结构改变可能是仔猪发生腹泻的重要原因。越来越多的研究表明, 不仅肠道微生物群的组成能调控宿主的代谢活动, 单个微生物的代谢产物也可以作为信号分子在宿主的代谢中发挥重要作用。微生物可以通过分泌代谢产物向宿主的上皮细胞发出信号, 如食物中不能被消化吸收的多糖在微生物糖苷酶的作用下生成短链脂肪酸 (如乙酸、丙酸和丁酸), 其可作为胃肠道上皮细胞的直接能源, 还可通过体循环来调控宿主代谢<sup>[16]</sup>; 丙酸盐和醋酸盐可运输到肝脏来调控糖代谢和脂代谢进而抑制糖尿病与肥胖的发生, 且醋酸盐还可以通过激活白色脂肪细胞中的 G 蛋白偶联受体 41 来调节能量平衡<sup>[17]</sup>; 常规传统方法与分子鉴定结果表明太子参内生细菌 RPB-32 为芽孢杆菌 *Bacillus* sp.。与空白对照组相比, 给予内生菌代谢

的预测功能无显著差异, 主要集中在代谢、遗传信息处理与环境信息处理上。

提取物的乙酸乙酯中剂量组、乙酸乙酯高剂量组、正丁醇低剂量组、正丁醇中剂量组及正丁醇高剂量组小鼠肠道乳酸菌数量显著增加, 正丁醇中剂量组的小鼠肠道肠球菌和正丁醇高剂量组的小鼠肠道肠杆菌数量显著减少。初步判断太子参内生芽孢杆菌 RPB-32 代谢物 (BM) 对肠道微生物组成有显著作用, 并可能对机体糖脂降解、抗感染和抗炎等方面有改善作用<sup>[18]</sup>; 大豆异黄酮的保健功能主要归功于其肠道代谢产物 S-雌马酚。S-雌马酚是豆类食品在肠道内经特定微生物代谢后产生的一种高度稳定小分子, 其与雌激素的结构和功能高度相似, 能与  $\beta$ -雌激素 (ER- $\beta$ ) 受体结合, 具有防治更年期综合征、心血管疾病和多种雌激素依赖性癌症的功能<sup>[19]</sup>。

此外 miRNA 可通过特有的作用方式影响宿主肠道微生物。有研究<sup>[20]</sup>报道, 生姜外泌体样纳米颗粒 (Ginger exosome-like nanoparticle, GELN) 优先被乳酸杆菌科以 GELN 脂质依赖性方式吸收, 并含有靶向鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) 中各种基因的 miRNA。其中, GELN mdo-miR-7267-3p 靶向 LGG 单加氧酶 *ycnE* 产生更多的吲哚-3-甲醛 (Indole-3-carbaldehyde, I3A), GELN-RNAs 或 I3A 是芳烃受体的配体, 诱导 IL-22 的产生, 而 IL-22 与屏障功能改善有关。GELN-RNA 可以通过 IL-22 依赖性机制改善小鼠结肠炎。Guo 等<sup>[21]</sup>发现, 口服 miRNA-10a-5p 可显著防止体质量增加, 并改善高脂日粮喂养小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性, 但破坏了颤螺菌属 *Oscillospira*、瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 和毛螺菌科 *Lachnospiraceae* 的昼夜波动。miRNA 不仅存在于细胞外囊泡中, 在小鼠和人类粪便样本中含量也丰富。宿主肠道上皮细

胞(Intestinal epithelial cells, IEC)和Hoxp<sup>+</sup>细胞是粪便 miRNA 的主要来源,这些 miRNA 可以进入细菌,如具核梭杆菌 *Fusobacterium nucleatum* 和大肠埃希菌 *Escherichia coli*, 特异性调节细菌基因转录,并影响细菌生长。IEC-miRNA 缺陷(Dicer1<sup>ΔIEC</sup>)小鼠表现出肠道微生物群紊乱和结肠炎加剧,而野生型小鼠粪便 miRNA 移植可恢复缺陷小鼠粪便微生物结构并改善结肠炎。这些发现既确定了粪便 miRNA 塑造肠道微生物群的生理作用,也确定了操纵微生物组的潜在策略<sup>[22]</sup>。

miR-146a 作为一个抑炎因子,在脊髓损伤大鼠中的表达低于对照组,而 TLR/NF-κB 信号通路相关基因和炎性细胞因子表达上调,在注射 agomiR-146 后,TLR/NF-κB 信号通路中的炎症基因和细胞因子(IL-6 和 IL-8)明显下调<sup>[23]</sup>。与此类似,在急性痛风性关节炎大鼠模型中,miR-146a 高表达组能显著改善关节肿胀指数、关节功能障碍指数和关节炎指数。同时,miR-146a 的高表达明显抑制滑膜组织中 TLR4、MyD88、相关炎症因子和 NF-κB 的表达<sup>[24]</sup>。新生儿坏死性小肠结肠炎(Neonatal necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿重症监护病房最常见的胃肠道急症,病死率达 30%。近年来,多项研究表明,早在 NEC 发病前数天至数周,NEC 患儿已经发生肠道菌群失调且革兰阴性杆菌丰富度增多,即生态失调早于 NEC 发病<sup>[25]</sup>。以上证据说明肠道微生物菌群失调会导致肠道炎症,而 miR-146a 作为抑炎因子在许多炎症进程中发挥调控作用。

本研究中,肠道 miR-146a 特异性敲除能显著提高毛螺菌目 Lachnospirales 菌群的表达丰度。Zeng 等<sup>[26]</sup>为了验证长期饲喂高脂料(High-fat, HF)会加速炎症过程和改变肠道菌群组成的假说,将 C57BL/6 小鼠分别饲喂高脂(45% 能量)和低脂(Low-fat, LF, 10% 能量)饲料 36 周。研究结束时,HF 组的体质量比 LF 组重 35%,喂食 HF 饮食的小鼠血浆瘦素、IL6 和 TNF-α 浓度也升高,表明存在慢性炎症,提取粪便 DNA 进行 16S rRNA 测序,发现与 LF 组相比,HF 组厚壁菌门、毛螺菌科以及毛螺菌科/链球菌科比例显著升高,而这些细菌与代谢紊乱、糖尿病和结肠癌的发展有关。在他们的另一项有关非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)跟肥胖饮食关联的研究发现,晚期脂肪肝发展与喂养 HF 饮食小鼠的肝脏炎症、结肠继发性胆汁酸及其相关细菌水平升高同时发生,其中包括梭状芽孢杆菌纲和毛螺菌科的丰度增加<sup>[27]</sup>。关于早期肠道微生物与特应性皮炎(Atopic

dermatitis, AD) 之间的关系的研究,缺乏机制的了解和确定的结果,研究者调查了 12 例 6 月龄 AD 婴儿和 12 例健康婴儿肠道微生物区系的多样性和组成,发现 AD 患儿梭状芽孢杆菌的相对丰度与 AD 发病年龄相关,与血液中嗜酸性粒细胞百分比呈负相关<sup>[28]</sup>。也有报道证明与健康组相比,从 NEC 早产儿粪便样本中分离到更多的酪酸梭菌和新生儿梭状芽孢杆菌,并且这些菌具有更高的存活率与耐气性<sup>[29]</sup>。上述资料提示,miR-146a 可能作用于肠道微生物,进而调节肠道的发育与功能,但其具体机制还需作进一步研究探讨。

综上所述,本研究利用 miR-146a 肠道特异性敲除模型,首次研究了宿主 miR-146a 敲除对肠道微生物的影响,结果表明 miR-146a 敲除可改变宿主肠道微生物的含量,即显著增加毛螺菌目 Lachnospirales 的平均相对丰度( $P < 0.05$ ),同时梭状芽孢杆菌纲 Clostridia 的平均相对丰度有增加趋势( $P = 0.067$ ),为进一步研究 miR-146a 通过影响宿主肠道微生物来调节肠道炎症进程提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] OLSZAK T, AN D, ZEISSIG S, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function[J]. *Science*, 2012, 336(6080): 489-493.
- [2] QIN J, LI Y, CAI Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.
- [3] TURNBAUGH P J, LEY R E, MAHOWALD M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [4] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [5] LE CHATELIER E, NIELSEN T, QIN J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 541-546.
- [6] BARTEL D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [7] TAGANOV K D, BOLDIN M P, CHANG K, et al. NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中国结直肠癌诊疗规范 2020 版[J]. *中华消化外科杂志*, 2020, 19(6): 563-588.
- [9] 曾长青, 黄良祥, 郑羽, 等. miR-146a 在结肠癌中的表达及意义[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(3): 396-400.

- [10] GARO L P, AJAY A K, FUJIWARA M, et al. MicroRNA-146a limits tumorigenic inflammation in colorectal cancer[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2419.
- [11] REDDY B S, WEISBURGER J H, NARISAWA T, et al. Colon carcinogenesis in germ-free rats with 1, 2-dimethylhydrazine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine[J]. *Cancer Research*, 1974, 34(9): 2368-2372.
- [12] 孔垂秀. 综述微生物群与结直肠癌的关系研究[J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(23): 3839-3842.
- [13] MENNI C, JACKSON M A, PALLISTER T, et al. Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain[J]. *International Journal of Obesity*, 2017, 41(7): 1099-1105.
- [14] 温新水. 封闭式猪舍内微生物气溶胶对生猪的影响[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2019(12): 56.
- [15] 李喜阳, 王中齐, 梁璐, 等. 腹泻和健康断奶仔猪肠道微生物比较分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021(17): 83-88.
- [16] CLARKE G, STILLING R M, KENNEDY P J, et al. Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ[J]. *Molecular Endocrinology*, 2014, 28(8): 1221-1238.
- [17] BAOTHMAN O A, ZAMZAMI M A, TAHER I, et al. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2016, 15: 108.
- [18] 王俊丽, 欧阳湖, 谢虹雅, 等. 太子参内生细菌 RPB-32 的分类鉴定及其代谢物对小鼠肠道微生物群落的影响[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(2): 502-515.
- [19] 李海亮, 邓颖, 王欣, 等. 肠道微生物代谢产物: S-雌马酚与人类健康关系研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(3): 362-367.
- [20] TENG Y, REN Y, SAYED M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(5): 637-652.
- [21] GUO Y, ZHU X, ZENG S, et al. miRNA-10a-5p alleviates insulin resistance and maintains diurnal patterns of triglycerides and gut microbiota in high-fat diet-fed mice[J]. *Mediators of Inflammation*, 2020, 2020: 8192187. doi: 10.1155/2020/8192187.
- [22] LIU S, CUNHA A P D, REZENDE R M, et al. The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(1): 32-43.
- [23] LV Z, CAO X, GUO Y, et al. Effects of miR-146a on repair and inflammation in rats with spinal cord injury through the TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(11): 4558-4563.
- [24] CHEN X, GAO Q, ZHOU L, et al. MiR-146a alleviates inflammation of acute gouty arthritis rats through TLR4/MyD88 signal transduction pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(21): 9230-9237.
- [25] 王英豪, 戴立英. 新生儿坏死性小肠结肠炎与肠道微生物群落关系的研究进展[J]. *安徽医药*, 2021, 25(12): 2346-2350.
- [26] ZENG H, ISHAQ S L, ZHAO F, et al. Colonic inflammation accompanies an increase of  $\beta$ -catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 35: 30-36.
- [27] ZENG H, LARSON K J, CHENG W, et al. Advanced liver steatosis accompanies an increase in hepatic inflammation, colonic, secondary bile acids and Lactobacillaceae/Lachnospiraceae bacteria in C57BL/6 mice fed a high-fat diet[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 78: 108336.
- [28] LEE E, LEE S, KANG M, et al. Clostridia in the gut and onset of atopic dermatitis via eosinophilic inflammation[J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2016, 117(1): 91-92.
- [29] SCHONHERR-HELLEC S, KLEIN G L, DELANNOY J, et al. Clostridial strain-specific characteristics associated with necrotizing enterocolitis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(7): e02428-17.

【责任编辑 庄 延】