

miR-301a 调节小鼠巨噬细胞中炎症因子的表达

窦琳, 黄秀清, 沈涛, 李林芳, 黎健

(北京医院 国家老年医学中心 卫生部老年医学重点实验室, 北京市 100730)

[关键词] miR-301a; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 6; 单核细胞趋化蛋白 1; NF- κ B 抑制因子

[摘要] **目的** 探讨 miR-301a 对巨噬细胞炎症因子表达水平的影响, 从 microRNA 角度阐明动脉粥样硬化的发病机制, 为动脉粥样硬化的防治提供新的思路。**方法** 高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠建立动脉粥样硬化模型, 收集小鼠主动脉血管, 利用 real-time PCR 检测组织中 miR-301a 的表达水平; 利用脂质体在 RAW264.7 细胞中转染 miR-301a mimic 和 miR-301a inhibitor, 用 real-time PCR 检测细胞中 miR-301a 水平, 并检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的表达水平, 用 Western blot 检测 NF- κ B 抑制因子 (NKRF) 蛋白水平, 用免疫荧光染色检测 p65 细胞定位。**结果** 在高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉血管壁组织中 miR-301a 的表达水平升高; 在 RAW264.7 细胞中过表达 miR-301a 可抑制 NKRF 蛋白水平, 促进 p65 细胞核定位, 升高细胞中 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的 mRNA 表达; 在 RAW264.7 细胞中低表达 miR-301a 可升高 NKRF 蛋白水平, 促进 p65 细胞质定位, 减少细胞中 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的 mRNA 表达。**结论** 在高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉血管壁组织中 miR-301a 表达水平升高; 在 RAW264.7 细胞中 miR-301a 通过调节 NKRF 的表达影响 p65 活性进而调控 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的 mRNA 表达, 提示 microRNA 在动脉粥样硬化发病的炎症机制中具有重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

MiR-301a regulates the expression of inflammatory factors in macrophages

DOU Lin, HUANG Xiu-Qing, SHEN Tao, LI Lin-Fang, LI Jian

(Beijing Hospital & National Center of Gerontology & The MOH Key Laboratory of Geriatrics, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] MiR-301a; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-6; Monocyte chemoattractant protein-1; NF- κ B repressing factor

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of miR-301a on the expression of inflammatory factors in macrophages, from the perspective of microRNA to clarify the pathogenesis of atherosclerosis, then provide a new way of prevention and treatment of atherosclerosis. **Methods** ApoE^{-/-} mice was fed with high fat diet to establish atherosclerosis model, the expression of inflammatory factors in the artery were analyzed by real-time PCR. MiR-301a mimic and miR-301a inhibitor were transfected into RAW264.7 cells, the expression of inflammatory factors was analyzed by real-time PCR, the protein level of NF- κ B repressing factor (NKRF) was measured by Western blot, the cellular location of p65 was determined by immunofluorescence. **Results** The level of miR-301a was increased in arteries of ApoE^{-/-} mice. Overexpression of miR-301a decreased the protein levels of NKRF and increased the mRNA levels of inflammatory factors, p65 was located in nucleus in the RAW264.7 cells transfected with miR-301a mimic. Inhibition of miR-301a increased the protein levels of NKRF and decreased the mRNA levels of inflammatory factors, p65 was located in cytoplasm in the RAW264.7 cells transfected with miR-301a inhibitor. **Conclusion** MiR-301a regulates the mRNA expression of TNF- α , IL-6 and MCP-1 in RAW264.7 cells via targeting NKRF to regulate the cellular location of p65.

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, 系统性和/或局部的炎症参与了从动脉粥样硬化起始到斑块破裂的全过程^[1-2]。氧化应激、高血压和吸烟等危险

因素均可导致血管内皮细胞损伤, 加速脂质在血管壁上沉积, 促使单核细胞向受损内皮迁移黏附转化为巨噬细胞。活化的促炎性巨噬细胞 (M1 型巨噬细胞)

[收稿日期] 2017-01-17

[修回日期] 2017-02-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81600618); 北京医院博士启动基金项目 (BJ-2015-106)

[作者简介] 窦琳, 博士, 助理研究员, 主要从事糖脂代谢紊乱研究, E-mail 为 doulin_2002@163.com。通讯作者黎健, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事糖尿病和动脉粥样硬化发病机制研究, E-mail 为 lijian@bjhmoh.cn。

可分泌多种炎症因子,例如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), 这些炎症因子能够进一步放大炎症反应,进而加速动脉粥样硬化的发病过程^[3-6]。因此,减少巨噬细胞释放炎症因子是减缓动脉粥样硬化发病进程的手段之一。

microRNA 是一簇长度为 21~23 个核苷酸、单链非编码小分子 RNA。它们能够利用其种子序列特异地结合到其靶基因 3'-UTR 上,在转录后水平负调控下游靶基因蛋白表达^[7]。microRNA 广泛表达于各种组织器官中,在细胞和组织器官发育功能中发挥重要作用^[8]。microRNA 同糖脂代谢紊乱和炎症的发生密切相关,并参与调控巨噬细胞的功能^[7,9-10]。miR-301a 参与调控多种生物学和病理过程,例如细胞发育和分化、炎症反应、细胞凋亡和癌症发生^[11]。在胰腺癌中,miR-301a 表达升高,通过负调节 NF- κ B 抑制因子 (NF- κ B repressing factor, NKRf) 基因激活 NF- κ B 信号通路^[10]。miR-301a 在糖尿病心肌病中表达水平降低,通过直接结合在 Kv4.2 的 3'-UTR 上调节其蛋白水平,参与调控糖尿病心肌病的发生^[12]。本研究旨在探讨 miR-301a 调节巨噬细胞炎症因子表达的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要材料来源

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 购自中国医学科学院细胞库。Trizol 试剂和 H-DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;SYBR Green 荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司;NKRf 和 GAPDH 抗体购自 Proteintech 公司;p65 一抗购自 CST 公司;HRP 标记山羊抗兔二抗购自中杉金桥公司;化学发光液购自 Millipore 公司;化学合成 miR-301a mimic 和 miR-301a inhibitor 及其阴性对照片段均由上海吉玛科技有限公司完成。

1.2 小鼠动脉粥样硬化模型的建立

8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠和相同基因背景 8 周龄雄性 C57BL/6J 野生型小鼠各 5 只,均购自北京大学医学部实验动物部。所有动物均给予高脂饲料(21%脂肪、19.5%酪蛋白和 1.25%胆固醇) 16 周。小鼠禁食 12 h,眼球取血后,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉,仰卧位固定,迅速打开胸腔暴露心脏,在生理压力下(100 mmHg)先用 PBS

经左心室进行全身灌流,冲出循环系统中的血液,迅速分离心脏和自心脏起始至髂动脉分支处的整条主动脉,提取动脉血管壁组织总 RNA 进行检测。

1.3 RAW264.7 细胞的培养

RAW264.7 细胞用含 10%胎牛血清的 H-DMEM 培养基于 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养,每 2 天更换培养液一次,细胞达 80%~90%丰度时,用 0.25%胰蛋白酶消化,转染前 24 h 将细胞接种于 6 孔板中,待细胞 50%汇合后,按说明书分别稀释阴性对照(negative control, NC)、inhibitor 阴性对照(inhibitor negative control, NCI)、miR-301a mimic 和 miR-301a inhibitor,按转染试剂试剂盒说明书进行转染,48 h 后收集细胞总蛋白和总 RNA 进行检测。

1.4 miR-301a 表达的检测

转染后 48 h,使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,取 1 μ g RNA 逆转录合成 cDNA,用 SYBR Green 荧光定量试剂盒和荧光定量 PCR 仪行 PCR。采用 Δ Ct 法处理结果,计算相对表达量,即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。miR-301a 反转录引物序列为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG CTT TG-3', U6 反转录引物序列为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAT ATG-3'。miR-301a PCR 引物序列为 5'-GCG AGC AGT GCA ATA CTA TTG T-3', U6 PCR 引物序列为 5'-GCC CTC GTG AAG CGT TC-3', Universe primer PCR 引物序列为 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。

1.5 miR-301a 对巨噬细胞炎症因子表达的影响观察

应用 miR-301a mimic、miR-301a inhibitor 及其阴性对照分别转染 RAW264.7 细胞 48 h 后,收集细胞,Trizol 提取总 RNA,用 Random primer 反转录引物反转录 1 μ g RNA;反转录产物采用 SYBR Green 荧光定量试剂盒和荧光定量 PCR 仪进行 PCR,检测 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达。PCR 引物序列:TNF- α Forward 为 5'-CAC AGA AAG CAT GAT CCG CG-3', TNF- α Reverse 为 5'-ACTG ATG AGA GGG AGG CCA T-3'; IL-6 Forward 为 5'-AGC CAG AGT CCT TCA GAG AGA-3', IL-6 Reverse 为 5'-TGG TCT TGG TCC TTA GCC AC-3'; MCP-1 Forward 为 5'-GTC TGT GCT GAC CCC-3', MCP-1 Reverse 为 5'-AAG GCA TCA CAG TCC GAG TC-3'; 18 s Forward 为 5'-GGA AGG GCA CCA CCA GGA GT-3', 18 s Reverse 为 5'-TGC AGC CCC GGA CAT CTA AG-3'。

1.6 miR-301a 对 NKRf 蛋白水平的影响观察

分别应用 miR-301a mimic、miR-301a inhibitor 及

其阴性对照转染 RAW264.7 细胞 48 h 后,收集细胞,用细胞裂解液提取细胞总蛋白,Western blot 检测 NKRF 和 GAPDH 蛋白水平。使用 10% SDS-PAGE 电泳分离 30 μ g 蛋白,300 mA 恒流转印至 PVDF 膜上,使用 1 : 1000 NKRF 和 GAPDH 抗体于 4℃ 孵育过夜, TBS-T 洗膜 3 次;使用 1 : 5000 HRP 标记山羊抗兔二抗,室温孵育 2 h, TBS-T 洗膜 3 次;使用化学发光液检测条带。

1.7 miR-301a 对 NF- κ B 细胞内蛋白定位的影响观察

将 RAW264.7 细胞直接接种于盖玻片,分别应用 miR-301a mimic、miR-301a inhibitor 及其阴性对照进行转染 48 h 后,使用 4% 多聚甲醛于 37℃ 固定 15 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;用 3% BSA/PBS 室温封闭 10 min;用 1% BSA/PBS 以 1 : 50 稀释的 p65 一抗于 4℃ 过夜孵育; PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 1% BSA/PBS 稀释的二抗(1 : 50)于 37℃ 湿盒避光温育 1 h, PBS 避光下洗 3 次;使用 Hoechst 染核室温孵育

10 min, PBS 避光下洗 2 次;蒸馏水洗 1 次;用甘油稀释的防淬剂封片,指甲油封片;使用激光共聚焦荧光显微镜观察。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,采用 *t* 检验和单因素方差分析进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ApoE^{-/-}小鼠血管中 miR-301a 的表达升高

收集正常小鼠和高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠主动脉血管,提取总 RNA,检测 miR-301a 表达水平。与正常小鼠相比, ApoE^{-/-}小鼠主动脉血管中 miR-301a 表达水平明显升高;炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达水平也升高(图 1)。由此推测,miR-301a 可能同巨噬细胞炎症因子表达增多相关。

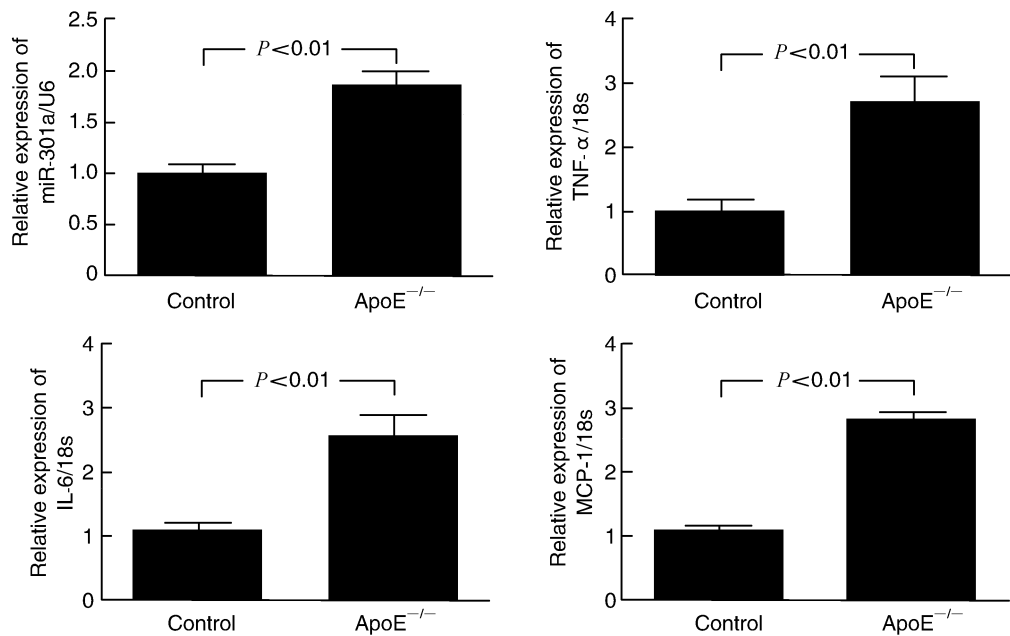


图 1. ApoE^{-/-}小鼠主动脉血管中 miR-301a 表达升高(n=5)

Figure 1. The expression of miR-301a was increased in the arteries of ApoE^{-/-} mice(n=5)

2.2 巨噬细胞中过表达 miR-301a 促进炎症因子表达

为了进一步确定 miR-301a 对巨噬细胞炎症因子表达的影响,在 RAW264.7 细胞中利用脂质体转染 miR-301a mimic 48 h,结果显示,miR-301a 表达水平明显升高,NKRF 蛋白水平降低,NF- κ B 中 p65 亚基定位于细胞核内,巨噬细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 表达水平升高(图 2)。由此推测,

miR-301a 过表达能够促进巨噬细胞炎症因子表达。

2.3 巨噬细胞中沉默 miR-301a 抑制炎症因子表达

在 RAW264.7 细胞中利用脂质体转染 miR-301a inhibitor 48 h,结果显示,miR-301a 表达水平明显降低,NKRF 蛋白水平升高,NF- κ B 中 p65 亚基定位于细胞质内,巨噬细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达水平降低(图 3)。由此推测,miR-301a 低表达能够抑制巨噬细胞炎症因子表达。

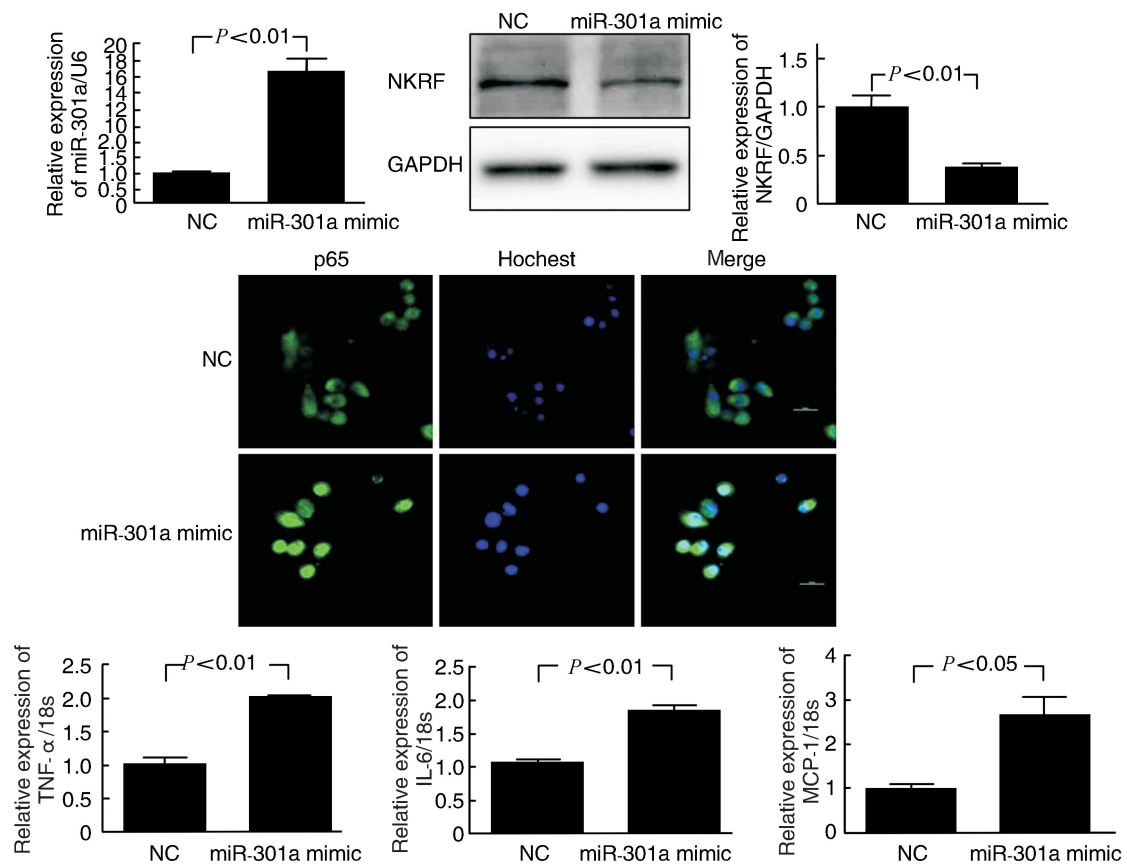


图 2. 巨噬细胞中过表达 miR-301a 促进炎症因子表达 ($n=3$)

Figure 2. The expression of inflammatory factors in macrophages transfected with miR-301a mimic ($n=3$)

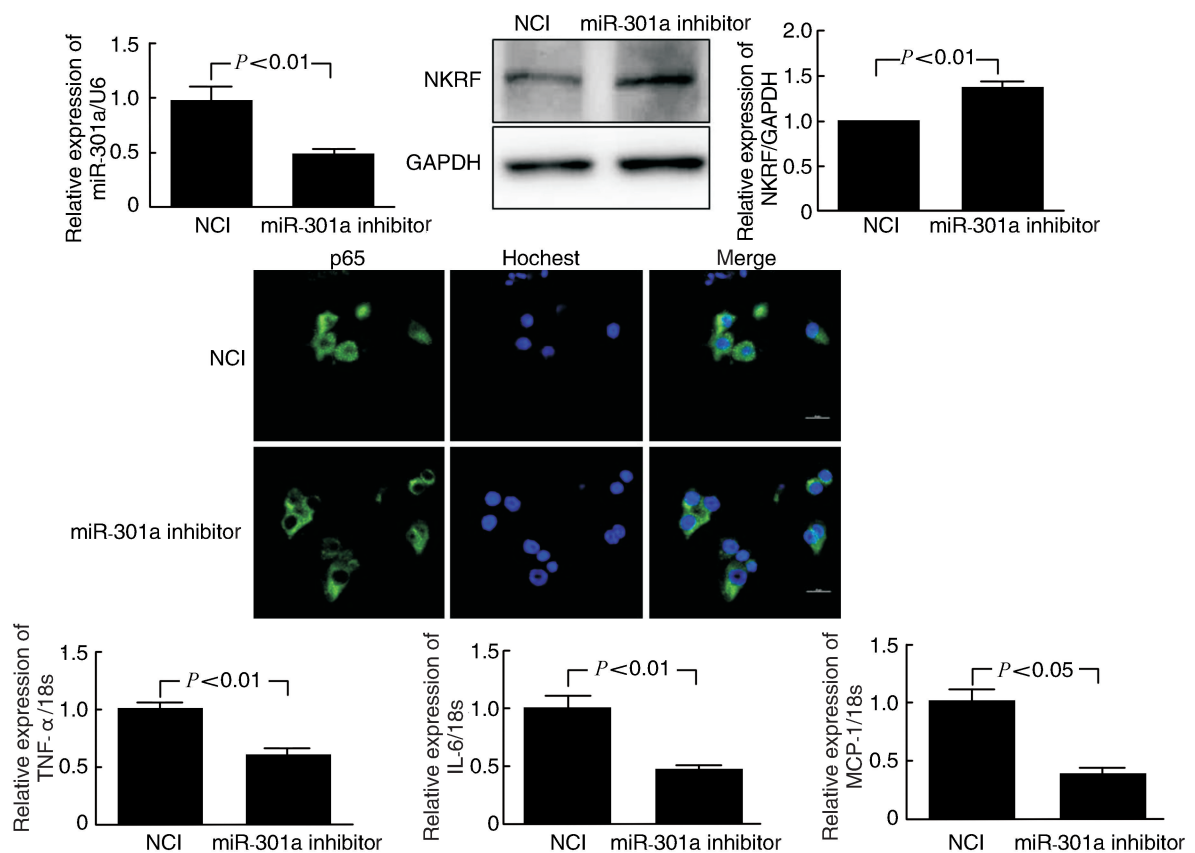


图 3. 巨噬细胞中沉默 miR-301a 抑制炎症因子表达 ($n=3$)

Figure 3. The expression of inflammatory factors in macrophages transfected with miR-301a inhibitor ($n=3$)

3 讨 论

巨噬细胞在动脉粥样硬化病程的发展中起关键作用。M1 型巨噬细胞能够分泌多种炎症因子,造成慢性炎症反应,损伤血管内皮功能。本研究中,通过高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠建立动脉粥样硬化模型,收集主动脉血管,检测发现 miR-301a 表达升高;由于动物体内影响因素复杂,为了进一步确定 miR-301a 在巨噬细胞中的作用,利用脂质体转染的方法在 RAW264.7 细胞中过表达和低表达 miR-301a。结果发现,过表达 miR-301a 能够促进巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达;反之,沉默 miR-301a 能够降低这三种炎症因子的表达。由此推测,miR-301a 可能同巨噬细胞炎症因子表达增多相关。

microRNA 作为一种转录后水平调节的小分子 RNA,能够调控多种基因蛋白表达。microRNA 在各种疾病的进展中发挥重要作用。前期文献报道,miR-301a 在胰腺癌、肝癌、肺癌和乳腺癌中表达升高。本实验室前期研究表明,miR-301a 通过调节下游靶基因 PTEN 影响小鼠肝细胞胰岛素敏感性^[13]。NKRF 也是 miR-301a 的下游靶基因之一。NKRF 是 NF- κ B 的负调控因子^[10]。研究发现,在肿瘤细胞中 miR-301a 能够通过调节 NKRF 进而影响 NF- κ B 活性。NF- κ B 信号通路是炎症反应中重要的信号通路。被激活的 NF- κ B 能够转位进入细胞核,从而促进促炎因子的表达,例如 TNF- α 和 IL-6 等。TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 等炎症因子参与动脉粥样硬化发病过程。本研究发现,在巨噬细胞中过表达 miR-301a 能够抑制靶基因 NKRF 蛋白表达,NKRF 阻碍 p65 入核从而抑制 NF- κ B 活性。NKRF 对 p65 蛋白表达没有影响。NF- κ B 活化促进下游炎症因子表达。动脉粥样硬化患者血清中 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 水平显著增加。高水平的炎症因子损伤血管内皮功能,促进血管内皮细胞分泌黏附因子,募集更多的单核细胞黏附在受损处,导致血管粥样病变的发展。

本研究发现,在巨噬细胞中过表达 miR-301a 能够促进炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的分泌。这可能为动脉粥样硬化的治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Dong Y, Fernandes C, Liu Y, et al. Role of endoplasmic reticulum stress signalling in diabetic endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2017, 14(1): 14-23.
- [2] 谭艳美, 孟磊, 汪江波, 等. 巨噬细胞极化与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(2): 207-212.
- [3] Taleb S. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2016, 109(12): 708-715.
- [4] Bertrand MJ, Tardif JC. Inflammation and beyond: new directions and emerging drugs for treating atherosclerosis[J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2016, 22(1): 1-26.
- [5] de Gaetano M, Crean D, Barry M, et al. M1- and M2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 275.
- [6] 李红蓉, 刘红利, 马柳一. 动脉粥样硬化进程中单核/巨噬细胞的行为变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(12): 1 291-296.
- [7] Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016, 30(5): 665-676.
- [8] Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, et al. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction[J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2 728-736.
- [9] Fernandez-Valverde SL, Taft RJ, Mattick JS. MicroRNAs in beta-cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications[J]. *Diabetes*, 2011, 60(7): 1 825-831.
- [10] Lu Z, Li Y, Takwi A, et al. MiR-301a as an NF-kappaB activator in pancreatic cancer cells[J]. *EMBO J*, 2011, 30(1): 57-67.
- [11] Ma F, Zhang J, Zhong L, et al. Upregulated microRNA-301a in breast cancer promotes tumor metastasis by targeting PTEN and activating Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Gene*, 2014, 535(2): 191-197.
- [12] Panguluri SK, Tur J, Chapalamadugu KC, et al. MicroRNA-301a mediated regulation of Kv4.2 in diabetes: identification of key modulators[J]. *PloS one*, 2013, 8(4): e60545.
- [13] Dou L, Wang S, Sui X, et al. MiR-301a mediates the effect of IL-6 on the AKT/GSK pathway and hepatic glycogenesis by regulating PTEN expression[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(4): 1 413-424.

(此文编辑 文玉珊)