

miR-142-5p 靶向调控 TGF- β 2 促进人巨噬细胞凋亡

李玉东, 杨清泉, 张明磊, 王 星, 刘 慧, 李聪聪

(郑州大学附属南阳中心医院特需病房一病区, 河南省南阳市 473000)

[关键词] 动脉粥样硬化; 靶基因; miR-142-5p; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 探讨 miR-142-5p 在动脉粥样硬化组织中的表达及对巨噬细胞凋亡的作用。**方法** 构建动脉粥样硬化大鼠模型, qRT-PCR 检测动脉粥样硬化组织中 miR-142-5p 的表达水平。50 μ g/L 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激人巨噬细胞、血管平滑肌细胞(VSMC)、内皮细胞 24 h 后, 提取细胞 RNA, qRT-PCR 检测细胞中 miR-142-5p 的表达水平。靶基因预测软件预测 miR-142-5p 的靶基因, 双荧光素酶报告基因鉴定靶基因的正确性。细胞转染 miR-142-5p mimic、mimic control、miR-142-5p inhibitor、inhibitor control, Western blot 和 qRT-PCR 检测 miR-142-5p 对靶基因的调控作用, 流式细胞仪检测 miR-142-5p 和靶基因对巨噬细胞凋亡的作用。**结果** miR-142-5p 在动脉粥样硬化组织中表达上调, 与正常组织相比差异显著($P < 0.01$)。血管平滑肌细胞和内皮细胞经 ox-LDL 刺激后 miR-142-5p 的表达水平与刺激前没有明显变化, 而巨噬细胞经 ox-LDL 刺激后 miR-142-5p 的表达水平较刺激前明显升高($P < 0.01$)。预测 miR-142-5p 的靶基因为转化生长因子 β 2(TGF- β 2)。miR-142-5p mimic 与 TGF- β 2 共转染后荧光素酶活性最低; miR-142-5p mimic 组 TGF- β 2 蛋白和 mRNA 的表达水平与 mimic control 组相比明显下降, miR-142-5p inhibitor 组 TGF- β 2 蛋白和 mRNA 的表达水平与 inhibitor control 组相比明显升高($P < 0.01$); miR-142-5p mimic 组细胞凋亡率明显高于 mimic control 组, TGF- β 2 siRNA 组细胞凋亡率明显高于 siRNA control 组($P < 0.01$)。**结论** miR-142-5p 在动脉粥样硬化中过度表达, miR-142-5p 通过下调靶基因 TGF- β 2 促进人巨噬细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

MiR-142-5p target regulating TGF- β 2 promotes human macrophage apoptosis

LI Yu-Dong, YANG Qing-Quan, ZHANG Ming-Lei, WANG Xing, LIU Hui, LI Cong-Cong

(Special Wards, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan 473000, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Target gene; MiR-142-5p; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression of miR-142-5p in atherosclerosis tissues and its effect on human macrophage apoptosis. **Methods** Rat atherosclerosis model was constructed, qRT-PCR was used to detect the expression of miR-142-5p in atherosclerotic tissues. 50 μ g/L ox-LDL stimulated human macrophage, vascular smooth muscle cell, endothelial cell for 24 h, qRT-PCR was used to detect the expression of miR-142-5p in the cells. Target gene prediction software was used to predict the target gene of miR-142-5p, dual luciferase reporter gene was used to identify the target gene. Cells were transfected with miR-142-5p mimic, mimic control, miR-142-5p inhibitor, inhibitor control into macrophage, Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of miR-142-5p on target gene, the effect of miR-142-5p and target gene on the apoptosis of macrophages was detected by flow cytometry. **Results** MiR-142-5p expression was up-regulated in atherosclerotic tissues compared with normal tissue, and the difference was significant ($P < 0.01$). After stimulation with ox-LDL, the levels of miR-142-5p in vascular smooth muscle cells and endothelial cells did not change significantly compared with before stimulation, but the level of miR-142-5p in the macrophages was significantly higher than that before stimulation ($P < 0.01$). Predicting the target gene of miR-142-5p was transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2). The luciferase activity was the lowest after transfection with miR-142-5p mimic and TGF- β 2. The expression of TGF- β 2 protein and mRNA in miR-142-5p mimic group was significantly decreased compared with mimic control group ($P < 0.01$), the expression of TGF- β 2 protein and mRNA in miR-142-5p inhibitor group was significantly higher than that in inhibitor control group ($P < 0.01$), the apoptosis rate of miR-142-5p mimic group was significantly higher than that of mimic control group ($P < 0.01$), the apoptosis rate of TGF- β 2 siRNA group was significantly higher than that of siRNA con-

trol group ($P<0.01$). **Conclusion** MiR-142-5p was over expressed in atherosclerosis tissues, and miR-142-5p could promote the apoptosis of human macrophages by regulating the target gene TGF- β 2.

动脉粥样硬化是动脉壁上沉积了类似于小米样的脂类,使动脉的管腔变窄,弹性减弱^[1]。动脉粥样硬化的发生与多种疾病有关,高血压、糖尿病、肥胖、高血脂等都可以引起动脉粥样硬化的发生^[2]。动脉粥样硬化严重威胁着人类的生命健康。

microRNA(miRNA)是具有调控功能的由20~24个核苷酸组成的非编码RNA。miRNA广泛存在于组织和器官中,参与组织胚胎发育、调控细胞生长、组织分化等过程,在疾病的发生过程中具有重要作用^[3-4]。miRNA调控动脉粥样硬化过程中内皮细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)的功能变化在动脉粥样硬化过程中发挥重要作用^[5]。在动脉粥样硬化形成过程中,巨噬细胞是泡沫细胞形成的主要来源,在动脉粥样硬化斑块形成过程中发挥主要作用。有研究表明,miR-142-5p参与癌症的发生和发展^[6]。为了探讨miR-142-5p在动脉粥样硬化中的作用,本研究通过构建大鼠动脉粥样硬化模型探讨miR-142-5p在动脉粥样硬化中的表达水平,并研究miR-142-5p对巨噬细胞凋亡的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和细胞

雄性载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})大鼠20只,30日龄,体重28~32g,由郑州大学动物实验中心提供。人巨噬细胞THP-1、血管平滑肌细胞、内皮细胞EC-304均购自上海复祥生物科技有限公司。

1.2 主要仪器和试剂

CO₂培养箱、倒置显微镜购自美国Thermo公司;超净工作台购自吴江市金禾净化设备厂;氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)购自北京协生生物科技有限公司;转化生长因子 β 2(transforming growth factor- β 2,TGF- β 2)单克隆抗体、 β -actin单克隆抗体购自美国Thermo公司;荧光素酶检测试剂盒购自上海前尘生物科技有限公司;反转录试剂盒购自上海名劭生物科技有限公司。

1.3 动脉粥样硬化大鼠模型的构建

ApoE^{-/-}大鼠20只随机分为实验组和对照组,每组10只。实验组大鼠用含1%胆固醇和15%猪油的高脂饲料饲喂,对照组用正常饲料喂养。两组大鼠饮水不限,喂养4周。麻醉大鼠后,取实验组大

鼠的动脉粥样硬化组织和对照组的正常动脉组织。

1.4 细胞培养

-80℃保存的人巨噬细胞THP-1、血管平滑肌细胞、内皮细胞EC-304经37℃融化后,加入含有10%FBS的DMEM细胞生长液,800 r/min离心后接种到细胞培养瓶中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。人巨噬细胞THP-1是悬浮细胞,待细胞生长达到传代汇合度时,转移细胞悬浮液到离心管中,1000 r/min离心10 min,用细胞生长液悬浮细胞后接种到细胞瓶中继续培养。血管平滑肌细胞、内皮细胞EC-304的细胞传代用0.25%胰蛋白酶消化,1000 r/min离心10 min,加入PBS洗涤2次,种植到细胞培养瓶中,在37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.5 qRT-PCR检测miR-142-5p表达水平

采集动脉粥样硬化组织和正常动脉组织,剪碎,用匀浆器充分匀浆,加入1 mL Trizol,冰上裂解5 min,加入200 μ L氯仿,剧烈震荡15 s,12000 r/min离心10 min,用移液枪吸取上层至新的EP管中,加入等体积的异丙醇,上下温和颠倒20次,室温下静置10 min,12000 r/min离心10 min,弃上清液,加入75%乙醇溶液,充分混匀,4℃、12000 r/min离心10 min,弃上清液,室温下风干,加入适量的DEPC水。人巨噬细胞THP-1、血管平滑肌细胞、内皮细胞EC-304经50 μ g/L ox-LDL刺激24 h后收集细胞,加入Trizol裂解,提取组织RNA,经反转录试剂盒说明书反转录合成cDNA。按照荧光定量PCR检测试剂盒说明书分析miR-142-5p的表达水平。

1.6 细胞转染

人巨噬细胞THP-1经传代后,收集细胞,加入不含胎牛血清的DMEM细胞生长液,37℃孵育1 h以提高转染效率。将miR-142-5p mimic、mimic control、miR-142-5p inhibitor、inhibitor control、TGF- β 2 siRNA、siRNA control与不完全培养基混匀,室温下放置5 min。将转染试剂和不完全培养基混合,室温下孵育20 min。将这两种混合液再次混合,加入到收集的细胞中,37℃、5%CO₂培养箱中培养6 h,更换为含有胎牛血清的细胞生长液继续培养。

1.7 miR-142-5p靶基因预测

根据靶基因预测库The miRBase(<http://www.mirbase.org/>)、TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)、PicTar(<http://pictar.mdc-berlin.de/>)预测miR-142-5p的靶基因,结果发现miR-142-5p的靶基

因可能是 TGF- β 2。分别构建野生型 TGF- β 2 荧光素酶报告基因载体 (wt TGF- β 2) 和突变型 TGF- β 2 荧光素酶报告基因载体 (mut TGF- β 2), 将这两种质粒 wt-TGF- β 2 和 mut-TGF- β 2 分别与 miR-142-5p mimic、mimic control 混合后共同转染到巨噬细胞 THP-1 中, 37℃、CO₂ 培养箱中培养 48 h。收集的细胞经 PBS 洗涤后, 根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.8 Western blot 检测 TGF- β 2 表达水平

收集人巨噬细胞 THP-1, 加入适量的细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 4℃、12000 r/min 离心 15 min, 将蛋白上清液转移到 EP 管中。根据 BCA 蛋白浓度检测试剂盒说明书检测提取的蛋白浓度。将蛋白样品与 Loading buffer 充分混合, 100℃煮沸 5 min。将变性蛋白样品加入到 SDS 蛋白凝胶上样孔中, 每孔加入 50 μ L 蛋白样品。常规方法垂直电泳。取出蛋白凝胶, 按照滤纸、PVDF 膜、蛋白凝胶、滤纸的顺序于 4℃转膜过夜。PVDF 膜经封闭液封闭后, 依次与一抗、二抗孵育, 在暗室中曝光, 分析蛋白表达水平。

1.9 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集巨噬细胞 THP-1, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 取 1 mL 细胞悬液, 收集细胞, 加入结合缓冲液 200 μ L, 吹打混匀, 加入 5 μ L 的 PI 和 Annexin V, 避光条件下孵育反应 20 min, 加入 300 μ L 缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.10 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据比较用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-142-5p 在组织和细胞中的表达

miR-142-5p 在动脉粥样硬化组织中表达上调, 与正常组织相比差异显著 ($P < 0.01$)。血管平滑肌细胞和内皮细胞 EC-304 经 ox-LDL 刺激后 miR-142-5p 的表达水平与刺激前没有明显变化, 而巨噬细胞 THP-1 经 ox-LDL 刺激后 miR-142-5p 的表达水平较刺激前明显升高, 差异显著 ($P < 0.01$; 图 1)。

2.2 靶基因预测及鉴定情况

根据靶基因预测软件 The miRBase (<http://www.mirbase.org/>)、TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)、PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 预测 miR-142-5p 的靶基因为 TGF- β 2 (图 2A)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-142-5p mimic

与 wt TGF- β 2 共转染后荧光素酶活性最低 (图 2B)。

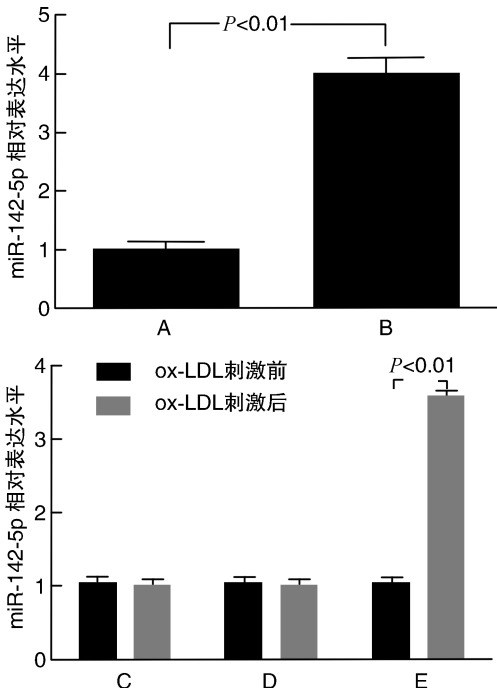


图 1. miR-142-5p 在组织和细胞中的表达 A 为正常组织, B 为动脉粥样硬化组织, C 为内皮细胞 EC-304, D 为血管平滑肌细胞, E 为巨噬细胞 THP-1。

Figure 1. Expression of miR-142-5p in tissues and cells

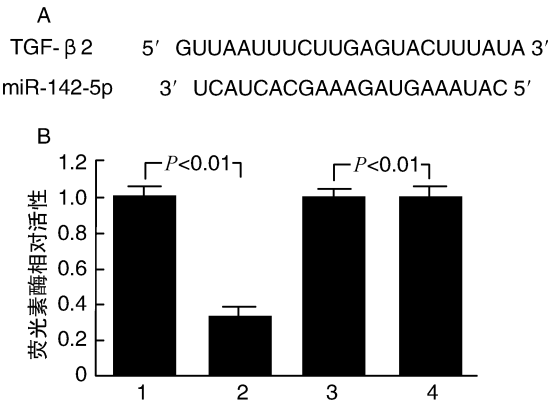


图 2. miR-142-5p 靶基因预测及荧光素酶基因鉴定 A 为靶基因预测结果, B 为荧光素酶报告基因鉴定靶基因; 1 为 mimic control + wt-TGF- β 2, 2 为 miR-142-5p mimic + wt-TGF- β 2, 3 为 mimic control + mut-TGF- β 2, 4 为 miR-142-5p mimic + mut-TGF- β 2。

Figure 2. MiR-142-5p target gene prediction and luciferase gene identification

2.3 miR-142-5p 对靶基因 TGF- β 2 蛋白及 mRNA 表达的影响

miR-142-5p mimic 组 TGF- β 2 蛋白和 mRNA 的

表达水平与 mimic control 组相比明显下降 ($P < 0.01$), miR-142-5p inhibitor 组 TGF- β 2 蛋白和 mRNA 的表达水平与 inhibitor control 组相比明显升高 ($P < 0.01$; 图 3)。

2.4 miR-142-5p 通过 TGF- β 2 基因调控巨噬细胞凋亡
miR-142-5p mimic 组细胞凋亡率明显高于 mimic control 组 ($P < 0.01$), TGF- β 2 siRNA 组细胞凋亡率明显高于 siRNA control 组 ($P < 0.01$; 图 4)。

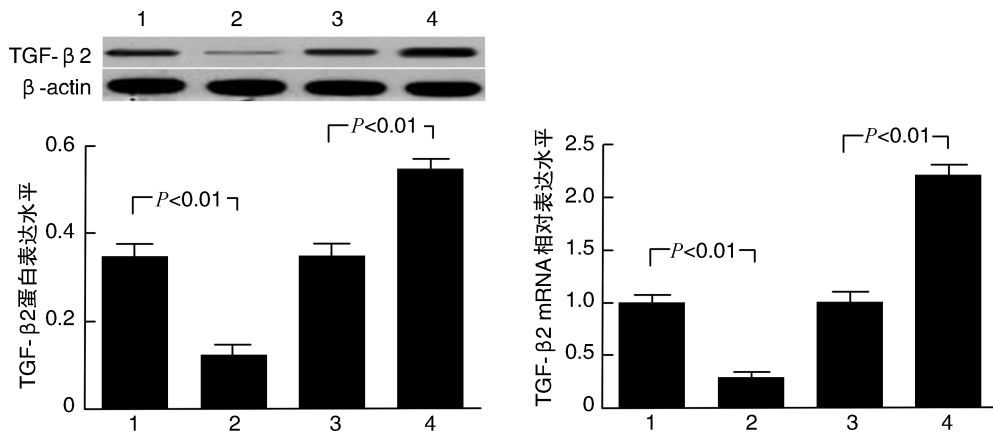


图 3. miR-142-5p 对 TGF- β 2 蛋白及 mRNA 的表达调控

1 为 mimic control 组, 2 为 miR-142-5p mimic 组, 3 为 inhibitor control 组, 4 为 miR-142-5p inhibitor 组。

Figure 3. Regulation of miR-142-5p on expression of TGF- β 2 protein and mRNA

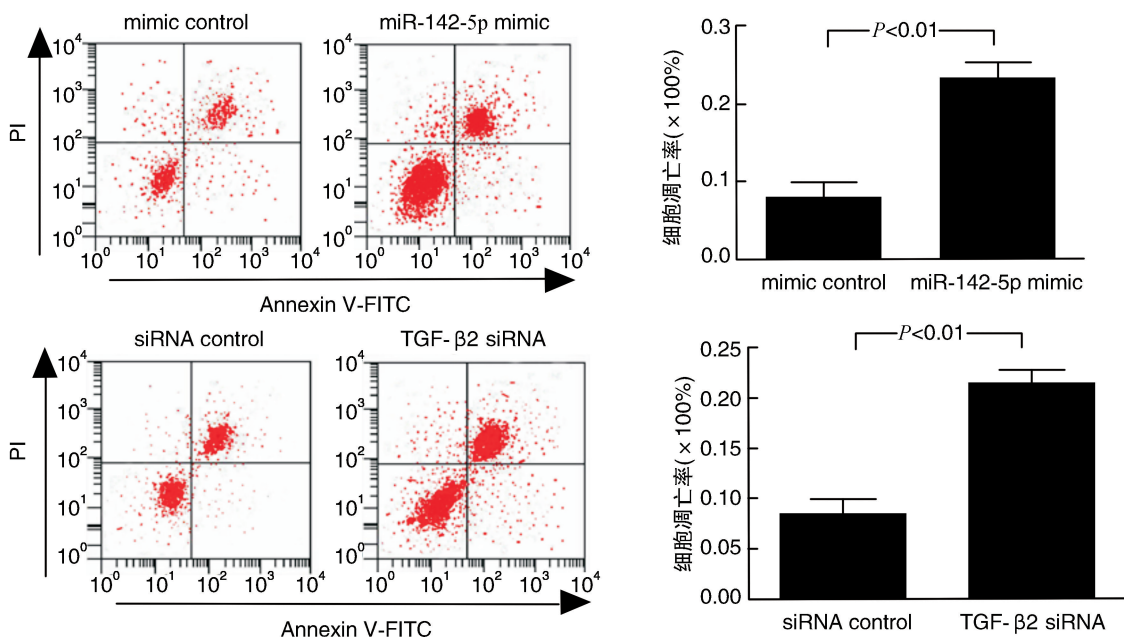


图 4. miR-142-5p 和 TGF- β 2 基因对巨噬细胞凋亡的影响

Figure 4. Effect of miR-142-5p and TGF- β 2 gene on the apoptosis of macrophages

3 讨论

动脉粥样硬化是一种常见的血管病,参与多种心血管疾病的发生^[7]。动脉粥样硬化的发病率和死亡率呈逐年上升的趋势。在动脉粥样硬化过程中,动脉内膜脂质不断积累,纤维组织增生,血管弹性减弱,官腔变窄,最后可能堵塞动脉腔,进而引起

组织和器官的缺血^[8]。

miRNA 参与调控多种生命机体的活动,可以通过靶基因作用于细胞,影响组织和器官的功能^[9]。

有研究表明,动脉粥样硬化发生时,miRNA 参与内皮细胞功能的发挥、血管平滑肌细胞的增殖和迁移、巨噬细胞吞噬功能的发挥^[10-11]。miR-19a 通过调控靶基因 ABAC1 促进动脉粥样硬化的发生。

miR-155、miR-145、miR-29a 在动脉硬化发生过程中都具有重要作用^[12-14]。本研究中,以雄性 ApoE^{-/-}大鼠为研究对象,通过高脂饲料喂养成功构建了动脉粥样硬化大鼠模型,qRT-PCR 检测发现 miR-142-5p 在动脉粥样硬化组织中过度表达。

内皮细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞参与动脉粥样硬化的发生。ox-LDL 在动脉粥样硬化发生过程中具有诱导作用^[15-16]。ox-LDL 广泛存在于人体内,可以将胆固醇运输到全身各处的细胞中^[17-18]。巨噬细胞吸收 ox-LDL 携带的胆固醇,黏附在动脉壁上,进一步发展为动脉粥样硬化^[19-20]。本研究中,以人巨噬细胞 THP-1、血管平滑肌细胞、内皮细胞 EC-304 为对象,用 50 μg/L ox-LDL 刺激细胞 24 h,qRT-PCR 检测发现刺激后的巨噬细胞中 miR-142-5p 的表达水平升高。miR-142-5p 的表达增高,巨噬细胞凋亡增多。为了进一步研究 miR-142-5p 对巨噬细胞凋亡的作用机制,利用靶基因预测软件预测 miR-142-5p 的靶基因可能是 TGF-β2。构建双荧光素酶报告基因载体,证实 TGF-β2 是 miR-142-5p 的靶基因。Western blot 和 qRT-PCR 检测发现,促进 miR-142-5p 的表达,TGF-β2 的 mRNA 和蛋白表达水平都明显下降,这提示 miR-142-5p 负调控靶基因 TGF-β2。流式细胞仪检测发现,抑制 TGF-β2 后巨噬细胞凋亡率升高,这说明 miR-142-5p 负调控靶基因 TGF-β2 作用于巨噬细胞的凋亡。

综上所述,miR-142-5p 在动脉粥样硬化中过表达。在细胞水平,用 ox-LDL 刺激不同的细胞后,miR-142-5p 在动脉粥样硬化巨噬细胞中过表达。miR-142-5p 可以通过负调控 TGF-β2 基因促进巨噬细胞凋亡,参与动脉粥样硬化的发生。这为进一步研究动脉粥样硬化的发病机制奠定了基础,为诊断和治疗动脉粥样硬化提供了新思路。

[参考文献]

- [1] 陈润泰,傅玉才,王伟. 血管新生对动脉粥样硬化斑块稳定性影响的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(3): 311-315.
- [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] Lu LF, Gasteiger G, Yu IS, et al. A single miRNA-mRNA interaction affects the immune response in a context-and cell-type-specific manner[J]. Immunity, 2015, 43(1): 52-64.
- [4] Nucera S, Giustacchini A, Boccalatte F, et al. MiRNA-126 orchestrates an oncogenic program in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer cell, 2016, 29(6): 905-921.
- [5] Yu X, Zhang L, Wen G, et al. Upregulated sirtuin 1 by miRNA-34a is required for smooth muscle cell differentiation from pluripotent stem cells[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(7): 1 170-180.
- [6] Tang L, Shen H, Li X, et al. MiR-125a-5p decreases after long non-coding RNA HOTAIR knockdown to promote cancer cell apoptosis by releasing Caspase 2[J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2137.
- [7] 李淑玲,马春,杨丽华. 黄连解毒汤对颈动脉粥样硬化作用的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3): 746-747.
- [8] 王婷,潘旭东,马爱军,等. miR-126 在 ApoE^{-/-}小鼠颈动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(4): 296-298.
- [9] 白广平,李俊,陈国辉,等. miRNA-93 调控细胞信号转导与转录激活因子 3 信号通路影响喉癌细胞机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(5): 446-448.
- [10] Chamorro-Jorganes A, Lee M Y, Araldi E, et al. VEGF-induced expression of miR-17-92 cluster in endothelial cells is mediated by ERK/ELK1 activation and regulates angiogenesis[J]. Circ Res, 2016, 118(1): 38-47.
- [11] Sahoo S, Meijles DN, Al Ghouleh I, et al. MEF2C-MYOC and leiomodin1 suppression by miRNA-214 promotes smooth muscle cell phenotype switching in pulmonary arterial hypertension[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0153780.
- [12] 王兴波,曹运长. miR-155 在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(12): 2 185-190.
- [13] Zhang YN, Xie BD, Sun L, et al. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the 'normal region' of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(6): 1 049-061.
- [14] Wang S, Zan J, Wu M, et al. MiR-29a promotes scavenger receptor A expression by targeting QKI (quaking) during monocyte-macrophage differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(1): 1-6.
- [15] 柳磊,时飒,李鸿珠,等. 激活多巴胺 I 类受体对氧化性低密度脂蛋白诱导的人单核细胞 THP-1 分泌 NO/NOS 的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(3): 274-277.
- [16] 杜宁辉,杨志明,杨慧宇. 血管紧张素(1-7)对氧化低密度脂蛋白诱导大鼠主动脉内皮细胞损伤的作用机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(8): 833-837.
- [17] 施凤飞,魏伟,汪玉成,等. 24-乙酰泽泻醇 A 对氧化型低密度脂蛋白诱导巨噬细胞脂代谢因子 ABCA1、CD36 及炎症因子 CD147、MMP-9 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(1): 7-12.
- [18] Bugueno IM, Khelif Y, Seelam N, et al. Porphyromonas gingivalis differentially modulates cell death profile in ox-LDL and TNF-β pre-treated endothelial cells [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0154590.
- [19] Zheng HD, Cui DJ, Quan XJ, et al. Lp-PLA2 silencing protects against ox-LDL-induced oxidative stress and cell apoptosis via Akt/mTOR signaling pathway in human THP1 macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(4): 1 017-023.
- [20] Li E, Wang T, Wang F, et al. FGF21 protects against ox-LDL induced apoptosis through suppressing CHOP expression in THP1 macrophage derived foam cells [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2015, 15(1): 80.

(此文编辑 文玉珊)