

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-09-0890-05

miR-146b 对人单核细胞株 THP-1 细胞 COX2 表达的影响及可能机制

杨铭¹, 陆林², 吴方¹

(上海交通大学医学院附属瑞金医院 1.老年病科,2.心血管科,上海市 200025)

[关键词] miR-146b; 人单核细胞株 1; p38 分裂素原活化蛋白激酶; 环氧化酶 2; 慢病毒

[摘要] 目的 探讨微小 RNA-146b(miR-146b)对人单核细胞株(THP-1)细胞 p38 分裂素原活化蛋白激酶(p38MAPK)表达的影响。方法 血管紧张素 II(Ang II)刺激 THP-1 建立细胞模型,慢病毒感染 pre-miR-146b-3p 或 anti-miR-146b-3p 进入 THP-1 细胞中,检测 p38MAPK 与环氧化酶 2(COX2)表达的变化。转入 p38MAPK siRNA,检测 p38MAPK 与 COX2 表达的变化。结果 Ang II 刺激 THP-1 细胞 p38MAPK 与 COX2 表达升高,pre-miR-146b-3p 可以放大这种增高效应,当转染 p38MAPK siRNA 后,能逆转 pre-miR-146b-3p 升高 COX2 的趋势($P<0.01$)。结论 在 Ang II 刺激的 THP-1 细胞中,miR-146b 可能通过 p38MAPK 调控 COX2 表达水平,在心血管疾病的诊治中发挥重要作用。

[中图分类号] R4

[文献标识码] A

Lentiviral-mediated microRNA-146b regulates COX2 expression by p38MAPK

YANG Ming¹, LU Lin², WU Fang¹

(1. Department of Geriatrics, 2. Department of Cardiology, Affiliated Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[KEY WORDS] miR-146b; THP-1; p38MAPK; COX2; Lentivirus

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of microRNA-146b (miR-146b) on the expression of p38 Mitogen-Activated protein kinase(p38MAPK) in human acute monocytic leukemia cell line(THP-1). **Methods** Cell model was established by angiotensin II (Ang II) stimulation. Pre-miR-146b-3p or anti-miR-146b-3p were transfected by lentivirus and the expression of p38MAPK and COX2 were detected. p38MAPK siRNA was transfected and the expression of p38MAPK and cyclooxygenase(COX2) in THP-1 cells were detected. **Results** The expression of p38MAPK and COX2 was increased in THP-1 cells stimulated by Ang II and pre-miR-146b-3p could amplify the effect. p38MAPK siRNA decreased the ability of pre-miR-146b-3p to increase levels p38MAPK and COX2. The difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** miR-146b may regulate COX2 expression by p38MAPK in Ang II stimulated THP-1 cells, and may play an important role in the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases.

微小 RNA(microRNA, miR)是一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 小分子。它通过靶向识别 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)并与之结合,促进 mRNA 降解或抑制其转录,调节转录后基因表达,发挥蛋白质的调节功能^[1]。其中 miR-146 是一个多功能 miRNA,研究显示 miR-146 在动脉粥样硬化^[2]、动脉瘤^[3]、急性冠状动脉综合征^[4]中含量均显著升高,且与内皮细胞衰老之间关系密

切^[5],提示 miR-146 在心血管疾病中发挥着重要调控作用。人类 miR-146 包括 miR-146a 和 miR-146b 两种形式。然而目前关于 miR-146 的研究多集中在 miR-146a 上,关于 miR-146b 所知较少。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是细胞内的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,存在于机体大多数细胞内,是真核细胞将细胞外信号转导到细胞内从而引发细胞相应反应

[收稿日期] 2016-12-17

[修回日期] 2017-03-07

[基金项目] 上海市自然科学基金(16ZR1430900)

[作者简介] 杨铭,硕士研究生,研究方向为老年心血管疾病,E-mail 为 mingy15296@163.com。通讯作者吴方,硕士,主任医师,研究方向为老年心血管疾病,E-mail 为 wufangrjh@163.com。

的一类重要信号系统。它能响应各种胞外和胞内刺激而被激活,在包括增殖、分化、转化、炎症以及凋亡等多种细胞生物学过程中发挥关键性作用^[6-7]。MAPK 4 个主要亚族为细胞外信号调节激酶、氨基末端激酶、p38 分裂素原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38MAPK)和细胞外信号调节激酶 5。其中 p38MAPK 信号通路在炎症、细胞凋亡等反应中发挥重要作用。之前的研究已经证实 miR-146 能够抑制促炎通路 MAPK,并形成调控内皮细胞炎症反应的负反馈调节回路^[8]。然而具体 MAPK 的亚族与 miR-146 之间的关系尚未完全清楚。

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸代谢途径的重要限速酶,存在 COX1 和 COX2 两种亚型,其中 COX2 是一种诱导型酶,以往的研究发现,COX2 通过 MAPK 信号通路参与动脉血栓生成^[9]。本课题组前期研究显示,在大鼠颈动脉血栓模型中,COX2 和 p38MAPK 同步变化,COX2 可受 p38MAPK 调控^[10]。

多种心脑血管疾病与肾素-血管紧张素系统的激活相关。肾素-血管紧张素系统活化产生的血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 可以通过调控生长因子、细胞因子和黏附分子等使动脉粥样硬化斑块形成的风险增加,从而加速心脑血管疾病的进展^[11]。本研究通过采用 Ang II 刺激 THP-1 细胞,通过慢病毒载体转入 miR-146b 建立细胞模型,探讨 miR-146b 与 p38MAPK 之间的相互作用关系,以及最终对于 COX2 分子的影响,为 miRNA 预测并治疗心脑血管疾病的临床应用提供思路与理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

人单核细胞株 THP-1 购自中国科学院上海细胞生物研究所。目的基因 miRNA 慢病毒(包括 anti-miR-146b-3p 和 pre-miR-146b-3p)、p38MAPK siRNA 购自上海吉满制药技术有限公司。RNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司。SYBRGreen I 购自日本 Takara 公司。Ang II、p38MAPK、COX2 引物来源生工。LipofectamineTM RNAiMAX 购自美国 Invitrogen 公司。Western blot 所用一抗 COX2(兔抗大鼠多克隆抗体)、p38MAPK(兔抗大鼠单克隆抗体)、P-p38MAPK(兔抗大鼠单克隆抗体)和抗兔二抗均购自 Cell Signaling 公司。

1.2 THP-1 细胞培养

THP-1 细胞株培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,将细胞以 1×10^5 个/孔铺到 24 孔板中。培养的细胞随机分为 2 组:①Ang II 组($n=3$):加入终浓度为 100 nmol/L Ang II;②对照组($n=3$):加入等量 PBS。培养 15 min 后提取细胞 mRNA,待检测 p38MAPK 与 COX2 mRNA 表达的变化。

1.3 慢病毒感染 THP-1 细胞

将细胞分为 4 组:pre-miR-146b-3p 组($n=3$)、anti-miR-146b-3p 组($n=3$)、慢病毒阴性对照组($n=3$)、空白对照组($n=3$)。将细胞以 1×10^5 个/孔铺到 24 孔板中,使细胞在慢病毒感染时的数量为 2×10^5 个/孔左右。按照慢病毒感染说明书操作,MOI 值为 100,感染 48 h 后荧光显微镜下观察感染效率。

1.4 p38MAPK siRNA 转染 THP-1 细胞

将细胞以 1×10^5 个/孔铺到 24 孔板中,无抗生素培养基孵育 24 h。用 50 μ L Opti-MEM 稀释 siRNA(感染细胞的终浓度为 50 nmol/L),轻轻吹 3~5 次混匀。用 50 μ L Opti-MEM 稀释 1.0 μ L lipofectamineTM2000,轻轻吹 3~5 次混匀,室温下静置 5 min。混合转染试剂和 siRNA 稀释液,轻轻吹 3~5 次混匀,室温下静置 20 min。转染复合物加入到 24 孔细胞板中,100 μ L/孔,前后轻摇细胞板混合均匀。细胞板置于 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养箱中培养 18~48 h。转染 4~6 h 后更换新鲜培养基($n=3$)。

1.5 RT-qPCR 检测 THP-1 细胞 p38MAPK 与 COX2 mRNA 的相对表达

收集各组细胞,Trizol 法提取总 RNA。按 Real Master Mix(SYBR Green)说明书配置反应体系。引物序列见表 1。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。反应在 ABI PRISM 7500 定量荧光仪上进行,应用比较 Ct 法进行相对定量,p38MAPK 与 COX2 mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示($n=3$)。

表 1. 引物序列
Table 1. Primer sequences

基因	序列
p38MAPK	上游 5'-TCCAAGGGCTACACCAAATC-3'
	下游 5'-TGTTCCAGGTAAGGGTGAGC-3'
COX2	上游 5'-CCCACCCATGTCAAAACCGA-3'
	下游 5'-CCGGGTACAATCGCACTTATACT-3'
GAPDH	上游 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'
	下游 5'-GGGTCATTGATGGCAACAATA-3'

1.6 蛋白印迹分析

蛋白上样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜 80 V 恒压湿转 2 h, 5% 脱脂牛奶 TBST 溶液常温封闭 2 h, 加一抗于 4℃ 下转盘过夜, 第 2 天常温下二抗孵育 1 h, DAB 显色。

1.7 统计学处理

利用 ImageJ 软件进行灰度分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组与对照组间数据采用 SPSS 12.0 行两样本均数比较 t 检验, 不同实验组间比较采用单因

素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 Ang II 刺激 THP-1 细胞 p38MAPK 与 COX2 表达升高

与 PBS 组比较, Ang II 刺激后可见 THP-1 细胞 miR-146b、p38MAPK 与 COX2 mRNA 的相对表达量均显著增高 ($P < 0.01$; 图 1)。

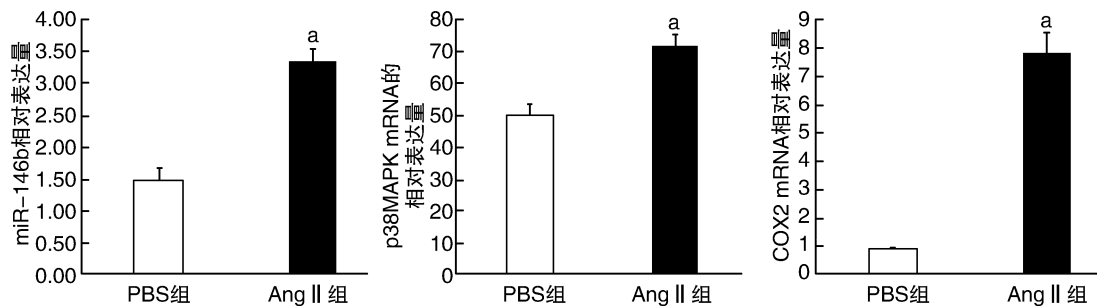


图 1. Ang II 刺激下 THP-1 细胞不同因子的相对表达量 ($n=3$) a 为 $P < 0.01$, 与 PBS 组比较。

Figure 1. Relative expression of different factors in THP-1 cells stimulated by Ang II ($n=3$)

2.2 慢病毒感染 THP-1 细胞

慢病毒感染 48 h 后, pre-miR-146b-3p 组、anti-

miR-146b-3p 组以及慢病毒阴性对照均可见明显荧光(图 2)。

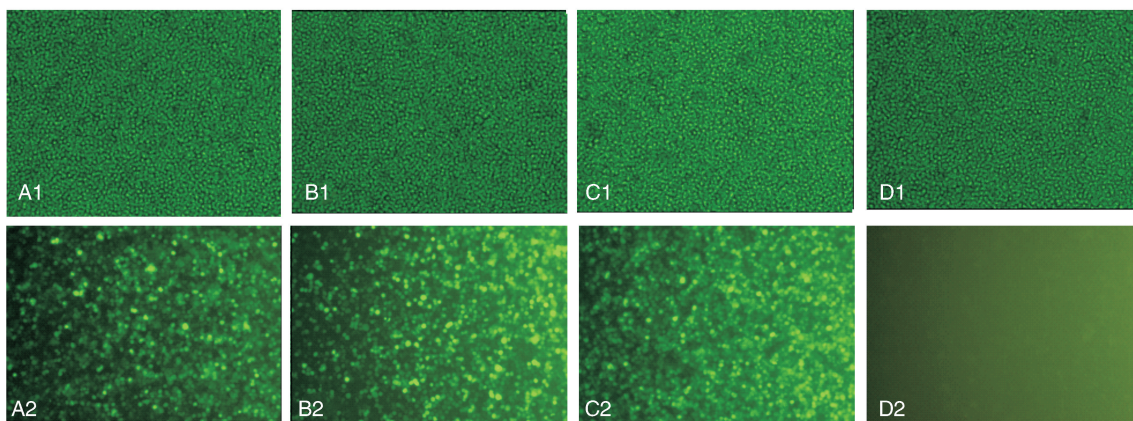


图 2. 病毒转染 THP-1 细胞 48 h 后 GFP 的表达 ($n=3, 10\times$) A1~D1 为普通光学显微镜下观察; A2~D2 为荧光显微镜下观察。A 为 pre-miR-146b-3p 组; B 为 anti-miR-146b-3p 组; C 为慢病毒阴性对照组; D 为空白对照组。

Figure 2. Expression of GFP after 48 hours of lentiviral transfection of THP-1 cells ($n=3, 10\times$)

2.3 慢病毒 pre-miR-146b-3p 感染 THP-1 细胞 p38MAPK 与 COX2 表达进一步升高

慢病毒感染 THP-1 细胞 48 h 后 Ang II 刺激下检测 THP-1 细胞 p38MAPK 与 COX2 mRNA 的相对表达量。与慢病毒阴性对照组相比, pre-miR-146b-

3p 组 p38MAPK 与 COX2 mRNA 的相对表达量均显著增高 ($P < 0.01$)。而 anti-miR-146b-3p 组与慢病毒阴性对照组两者 mRNA 相对表达量均无明显变化(图 3A)。p38MAPK 与 COX2 蛋白的表达与 mRNA 的表达趋势相一致(图 3B、C)。

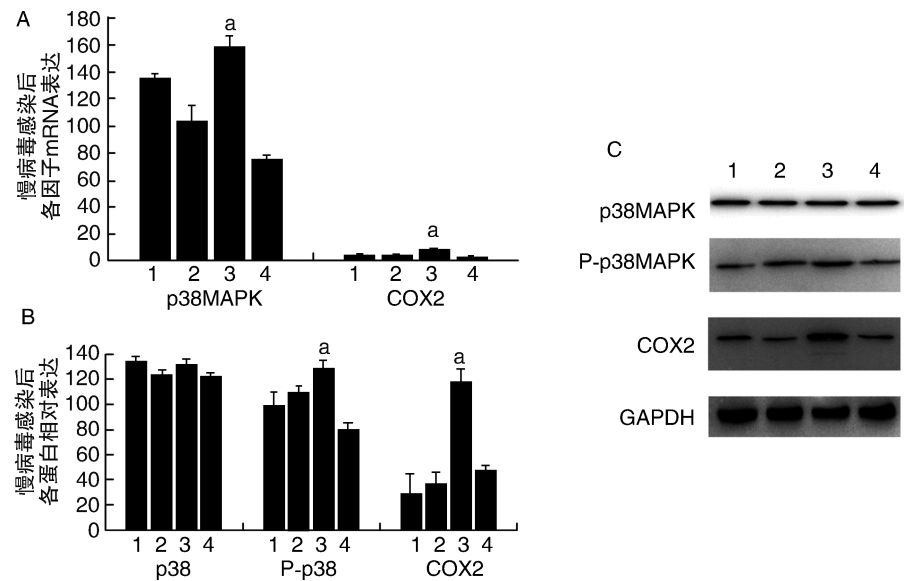


图 3. 慢病毒转染 THP-1 细胞 48 h 后 Ang II 刺激下 THP-1 细胞 p38MAPK 与 COX2 的相对表达量($n=3$) A 为 p38MAPK 与 COX2 mRNA 的相对表达量; B、C 为 p38MAPK 与 COX2 蛋白的相对表达量。1 为空白对照组; 2 为慢病毒阴性对照组; 3 为 pre-miR-146b-3p 组; 4 为 anti-miR-146b-3p 组。a 为 $P<0.01$, 与阴性对照组比较。

Figure 3. Relative expression of P38MAPK and COX2 in THP-1 cells stimulated by Ang II after 48 hours of lentiviral transfection of THP-1 cells($n=3$)

2.4 p38MAPK siRNA 抑制 pre-miR-146b-3p 介导的 p38MAPK 与 COX2 升高

与空白对照组相比,使用 p38MAPK siRNA 之后, pre-miR-146b-3p 感染的 THP-1 细胞在 AngII刺激下,

p38MAPK 与 COX2mRNA 的相对表达量均降低($P<0.01$)。而 siRNA 阴性对照组两者 mRNA 相对表达量均无明显变化(图 4A)。p38MAPK 和 COX2 蛋白的表达与 mRNA 的表达趋势相一致(图 4B、C)。

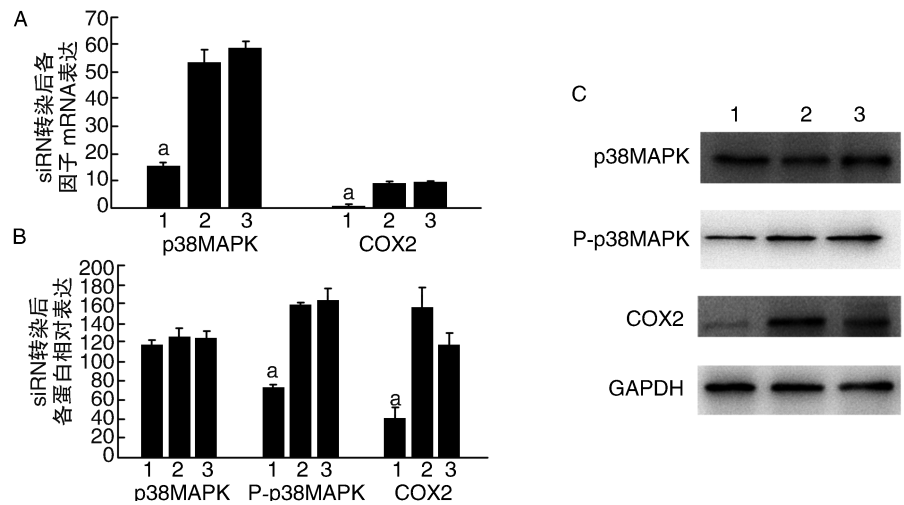


图 4. p38MAPK siRNA 转染 THP-1 细胞后 p38MAPK 与 COX2 的相对表达量($n=3$) A 为 p38MAPK 与 COX2 mRNA 的相对表达量; B、C 为 p38MAPK 与 COX2 蛋白的相对表达量。1 为 pre-miR-146b-3p+p38MAPK siRNA+Ang II 组; 2 为 pre-miR-146b-3p+siRNA 阴性对照+Ang II 组; 3 为 pre-miR-146b-3p+对照+Ang II 组。a 为 $P<0.01$, 与其它组比较。

Figure 4. Relative expression of P38MAPK and COX2 after transfection of THP-1 cells with P38MAPK siRNA($n=3$)

3 讨论

慢病毒技术具有感染细胞种类多、感染效率

高、片段可以稳定整合到宿主基因组中、容易建立稳定感染的细胞株等优点。利用慢病毒感染 miRNA 的前体或其成熟体相对应序列的双链结构,

可以对目标 miRNA 的表达进行上下调控。本实验利用慢病毒技术将 pre-miR-146b-3p 与 anti-miR-146b-3p 导入 Ang II 刺激的 THP-1 细胞,调控 miR-146b 的表达,结果提示 miR-146b 能够促进 p38MAPK 与 COX2 表达升高,且 miR-146b 促进 COX2 升高的作用可能通过 p38MAPK 介导。

之前的研究已经证实,在多种细胞中,Ang II 能够显著活化细胞中的 p38MAPK,使其磷酸化水平增加,且同时能增加 COX2 的表达^[12]。本实验采用 Ang II 刺激 THP-1 细胞,检测 p38MAPK 与 COX2 表达,结果显示两者 mRNA 表达均显著升高,与之前的结果相符(图 1)。在采用慢病毒感染 THP-1 细胞后,采用 Ang II 刺激,结果显示 pre-miR-146b-3p 组 p38MAPK 与 COX2 的相对表达量进一步增高,而 anti-miR-146b-3p 与对照组相比无显著差异(图 3),提示虽然在 Ang II 刺激下 THP-1 细胞 p38MAPK 与 COX2 表达升高,而 miR-146b 能够扩大这种效应,与之相反,anti-miR-146b-3p 抑制 miR-146b 的表达则未显示出明显的影响,提示 miR-146b 的过表达可调控 p38MAPK 与 COX2 表达升高。在此基础上加入 p38MAPK siRNA 抑制 p38MAPK 表达之后,可见无论是 p38MAPK 或 COX2,其相对表达量均显著受到抑制,提示 miR-146b 很可能是通过 p38MAPK 发挥调控作用,从而引起 COX2 表达水平升高。

研究已经证实 miR-146 能够抑制促炎通路 MAPK,并形成调控内皮细胞炎症反应的负反馈调节回路^[8]。而一系列药理实验也提示 MEK-1/2 与 JNK-1/2 可以调控 IL-1b 介导的 miR-146b 表达,提示 MAPK 家族与 miR-146b 之间存在着相互作用关系^[13]。本研究结果提示在 Ang II 刺激的 THP-1 细胞中,miR-146b 可能通过 p38MAPK 发挥调控作用,引起 COX2 表达水平升高。而 COX2 是花生四烯酸代谢途径的重要限速酶,其表达在抗动脉粥样硬化的发生和发展中有重要作用^[14]。miR-146b 通过 p38MAPK 调控 COX2 表达,提示 miR-146b 可能在心血管疾病的诊治中发挥重要作用,但此假设还需要更多试验证实。

综上所述,本研究通过慢病毒感染 miR-146b 前体,揭示在 Ang II 刺激的 THP-1 细胞中,miR-146b 可能通过 p38MAPK 调控 COX2 表达水平,提示 miR-146b 可能通过调控 p38MAPK 在心血管疾病的诊治中发挥重要作用。

[参考文献]

[1] 唐 惠,刘益洲,肖文超,等. ABCA1 表达的 microRNA

转录后水平调控[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24 (5): 517-523.

- [2] Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, et al. MiR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the tampere vascular study [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1): 211-217.
- [3] Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm[J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(5): e000745.
- [4] Guo M, Mao X, Ji Q, et al. MiR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome[J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88(5): 555-564.
- [5] Olivieri F, Lazzarini R, Recchioni R, et al. MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling[J]. *Age (Dordr)*, 2013, 35(4): 1 157-172.
- [6] Kuper C, Beck FX, Neuhofer W, et al. Toll-like receptor 4 activates NF- κ B and MAPK kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX2 in renal medullary collecting duct cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(1): F38-46.
- [7] 孙慧琳,黄志秋,曾海龙,等. p38MAPK-eNOS-N0 信号通路在人脐静脉内皮细胞凋亡中的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(6): 561-565.
- [8] Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(7): 949-966.
- [9] Tang J, Xiao W, Li Q, et al. A cyclooxygenase-2 inhibitor reduces vascular wall thickness and ameliorates cognitive impairment in a cerebral small vessel diseases rat model [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2015, 12(7): 704-710.
- [10] 陈晓南,曹久妹,王红艳,等. 环氧化酶-2 在大鼠动脉血栓中的表达及意义[J]. 诊断学理论与实践, 2012, 11(6): 600-604.
- [11] Wang RX, Zha J, Xu ZR. Associations of blood pressure level with carotid intima-media thickness and plaque among middle-aged and elderly Chinese hypertensives[J]. *Chin J Cardio*, 2013, 41 (3): 256-261.
- [12] Rohde E, Schallmoser K, Reinisch A, et al. Pro-angiogenic induction of myeloid cells for therapeutic angiogenesis can induce mitogen-activated protein kinase p38-dependent foam cell formation[J]. *Cytotherapy*, 2011, 13 (4): 503-512.
- [13] Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways[J]. *Embo Mol Med*, 2013, 5(7): 1 017-034.
- [14] Barua RS, Sharma M, Dileepan KN. Cigarette smoke amplifies inflammatory response and atherosclerosis progression through activation of the HIR-TLR2/4-COX2 axis[J]. *Front Immunol*, 2015, 9(6): 572.

(此文编辑 朱雯霞)