

下调 miR-92a 通过调控 PIAS3 抑制 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞炎症介质分泌和脂质蓄积

胡威威, 陈丽曼, 刘智芬

(河北医科大学附属哈励逊国际和平医院老年病一科, 河北省衡水市 053000)

[关键词] RAW264.7 细胞; 氧化型低密度脂蛋白; miR-92a; 炎症介质; 脂质蓄积

[摘要] **目的** 探讨下调 miR-92a 对氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导 RAW264.7 细胞炎症介质分泌和脂质蓄积的影响及其机制。**方法** 以不同浓度 (0、25、50、100 mg/L) 的 ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞 24 h 或以 100 mg/L ox-LDL 分别处理 RAW264.7 细胞 0、12、24 h 后, 采用定量实时聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 ox-LDL 对 miR-92a 表达的影响。建立 miR-92a 低表达的 RAW264.7 细胞株, 并给予 100 mg/L ox-LDL 处理后, 用 qRT-PCR、油红 O 染色、一氧化氮 (NO) 荧光探针 (DAF-FMDA) 和 Western blot 检测下调 miR-92a 表达对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞中炎症因子诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素 6 (IL-6) 和 IL-1 β 表达、脂质蓄积以及信号转导子和转录激活子 3 (STAT3) 信号通路相关蛋白 p-STAT3、STAT3 蛋白表达的影响。建立活化 STAT3 蛋白抑制分子 (PIAS3) 和 miR-92a 低表达的 RAW264.7 细胞株, 并给予 100 mg/L ox-LDL 处理后, 观察沉默 PIAS3 表达对 ox-LDL 作用下 miR-92a 低表达的 RAW264.7 细胞中炎症因子、脂质蓄积以及 STAT3 信号通路的影响。TargetScan 软件预测和双荧光素酶报告实验验证 miR-92a 和 PIAS3 的靶向关系。**结果** 随着 ox-LDL 作用时间和浓度的增加, RAW264.7 细胞中 miR-92a 表达升高; 双荧光素酶报告实验验证 PIAS3 是 miR-92a 的靶基因。采用 ox-LDL 处理后 RAW264.7 细胞中 miR-92a、iNOS、IL-6、IL-1 β 、p-STAT3 表达升高, NO 释放增多和细胞内脂滴升高, 而 PIAS3 的表达下降。这种调控作用可被 anti-miR-92a 所抑制; 而沉默 PIAS3 后, anti-miR-92a 的这一抑制作用得以恢复。**结论** 下调 miR-92a 可通过调控 PIAS3 抑制 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞炎症介质分泌和脂质蓄积。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Down-regulation of miR-92a inhibits ox-LDL induced secretion of inflammatory mediators and lipid accumulation in RAW264.7 cells by regulating PIAS3

HU Weiwei, CHEN Liman, LIU Zhifen

(Department of Geriatrics, Harrison International Peace Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Hengshui, Hebei 053000, China)

[KEY WORDS] RAW264.7 cell; oxidized low density lipoprotein; miR-92a; inflammatory mediator; lipid accumulation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of down-regulation of miR-92a on the secretion of inflammatory mediators and lipid accumulation induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in RAW264.7 cells and its mechanism. **Methods** RAW264.7 cells were treated with ox-LDL of different concentrations (0, 25, 50, 100 mg/L) for 24 hours or with 100 mg/L ox-LDL for 0, 12 and 24 hours respectively. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the effect of ox-LDL on the expression of miR-92a. A RAW264.7 cell line with low expression of miR-92a was established and treated with 100 mg/L ox-LDL. Effects of down-regulation of miR-92a expression on expressions of inflammatory factors inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β , lipid accumulation and expressions of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) signal pathway-related proteins p-STAT3 and STAT3 in RAW264.7 cells induced by ox-LDL, were detected by qRT-PCR, oil red O staining, nitric oxide (NO) fluores-

[收稿日期] 2018-06-07

[修回日期] 2018-08-09

[基金项目] 衡水市科技计划项目 (15018)

[作者简介] 胡威威, 硕士, 主治医师, 研究方向为老年心血管病, E-mail 为 y2521790542@163.com。通信作者刘智芬, 硕士, 副主任医师, 研究方向为老年心血管病, E-mail 为 liuzhifende@163.com。

cence probe (DAF-FMDA) and Western blot. A RAW264.7 cell line with low expressions of protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3) and miR-92a was established and treated with 100 mg/L ox-LDL. The effects of silencing PIAS3 expression on inflammatory factors, lipid accumulation and STAT3 signaling pathway were observed in RAW264.7 cells with low expression of miR-92a induced by ox-LDL. TargetScan software prediction and dual luciferase reporting experiment were used to verify the target relationship between miR-92a and PIAS3. **Results** With the increase of the action time and concentration of ox-LDL, the expression of miR-92a was increased in RAW264.7 cells. The dual luciferase reporting experiment confirmed that PIAS3 was the target gene of miR-92a. After ox-LDL treatment, the expressions of miR-92a, iNOS, IL-6, IL-1 β and p-STAT3 were increased, NO release and intracellular lipid droplets were increased in RAW264.7 cells, while the expression of PIAS3 was decreased. This regulatory effect could be inhibited by anti-microRNA-92a, and the inhibition of anti-microRNA-92a could be restored after PIAS3 silence. **Conclusion** Down-regulation of miR-92a can inhibit ox-LDL induced secretion of inflammatory mediators and lipid accumulation in RAW264.7 cells by regulating PIAS3.

血管壁炎症反应和巨噬细胞胆固醇过量蓄积是引起动脉粥样硬化的两大关键因素^[1-2]。巨噬细胞除可蓄积胆固醇外,还可通过摄入大量氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱发炎症反应,引起血管内皮损伤,加快动脉粥样硬化的发生^[3]。因此,如何抑制巨噬细胞炎症介质分泌和胆固醇积累是防治动脉粥样硬化的重要策略。微小RNA(micro RNA, miRNA, miR)是一类内生基因编码的单链非编码RNA,可通过与靶标mRNA的3'UTR发生不完全配对进而抑制靶基因的翻译或降解,参与包括巨噬细胞炎症反应和脂质蓄积等在内的生理活动^[4-5]。近年来有研究^[6-7]发现,miR-92a是动脉粥样硬化的潜在标志物,其在动脉粥样硬化斑块和胆固醇血症中表达上调,在小鼠体内特异性阻断miR-92a表达可降低内皮炎症损伤,提示其可能在ox-LDL诱导巨噬细胞RAW264.7细胞炎症介质分泌和脂质蓄积过程中发挥着重要作用,但miR-92a是如何参与调控RAW264.7细胞炎症介质分泌和脂质蓄积的并不清楚。因此,本研究旨在阐明miR-92a对ox-LDL诱导RAW264.7细胞炎症介质分泌和脂质蓄积的影响,并探讨其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠RAW264.7巨噬细胞购于中国科学院(上海)细胞中心;胎牛血清购于杭州四季青公司;DMEM培养基、TRIzol试剂和Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司;miR-92a模拟物、miR-92a抑制剂和相应对照以及活化STAT3蛋白抑制分子(protein inhibitor of activated STAT3, PIAS3) siRNA干扰序列(5'-GGGACCCUUCUACAAAACTT-3')和

对照序列(5'-UAGCGACUAAACACAUCAAU-3')购于上海吉玛公司;PIAS3、信号转导子和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription-3, STAT3)、磷酸化STAT3(phosphorylated STAT3, p-STAT3)一抗购于美国Cell Signaling Technology公司;GAPDH抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗购于中杉金桥有限公司;油红O染色试剂和ox-LDL购于广州奕源生物公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)荧光探针(DAF-FM DA)购于上海碧云天公司;胰蛋白酶和RNA提取试剂盒购于美国Gibco公司;BCA蛋白含量测定试剂盒购于Hyclone-Pierce公司;PCR试剂盒购于Finnzymes公司;双荧光素酶活性检测试剂盒和逆转录试剂盒购自美国Promega公司。

1.2 细胞培养及处理

采用含有100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基于细胞培养箱内培养RAW264.7细胞,培养箱条件:5%CO₂、37℃,湿度为95%。待细胞快铺满培养瓶底时,加入胰蛋白酶消化传代。取6孔细胞板,接种长势良好的第4代RAW264.7细胞,以每毫升10⁵个细胞的浓度每孔接种100 μ L。置于培养箱内常规培养24 h后,加入0、25、50、100 mg/L的ox-LDL处理细胞,24 h后收集各处理组细胞,采用定量实时聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测miR-92a表达。用100 mg/L ox-LDL分别处理不同时间(0、12、24 h)后,再检测细胞中miR-92a表达;以添加100 mg/L ox-LDL的细胞为ox-LDL组,未加ox-LDL而加入等量培养液的细胞作为对照,记为vehicle组。

1.3 细胞转染

转染前1天,将对数生长期的RAW264.7细胞以每孔100 μ L(浓度为10⁸/L)接种到24孔细胞板上,于培养箱中培养24 h。参照转染试剂Lipofectamine 2000说明书将miR-92a抑制剂(anti-miR-

92a;工作浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$) 和阴性对照抑制剂 (anti-NC;工作浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$) 转至 RAW264.7 细胞中。转染 6 h 后,更换培养液,加入 100 mg/L ox-LDL 或等体积的培养液处理 24 h 后,收集细胞,采用 qRT-PCR 检测 miR-92a 的表达,分别记为 anti-miR-92a+ox-LDL 组、anti-miR-92a+vehicle 组、anti-NC+ox-LDL 组、anti-NC+vehicle 组。miR-92a 模拟物和 PIAS3 siRNA 干扰序列 (siPIAS3) 及其相应的阴性对照模拟物 (NC) 和对照 siRNA 干扰序列 (scrambled) 的转染过程与转染 miR-92a 抑制剂相似,分别记为 miR-92a 组、siPIAS3 组、NC 组和 scrambled 组。

1.4 qRT-PCR 检测

采用 TRIzol 法提取总 RNA 后,参照逆转录试剂盒合成模板链 cDNA。取 cDNA 0.4 μL ,加入上下游引物各 0.8 μL ,SYBR Premix Ex Taq 10 μL 和双蒸水 8 μL 组成 20 μL 反应体系,置于 PCR 仪上按照设定的反应条件进行扩增。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 60 s,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分别以 U6 和 GAPDH 为内参计算目的基因的表达。所有引物均有上海吉玛公司合成。引物序列见表 1。

表 1. PCR 扩增引物序列

Table 1. PCR amplification primer sequences

| 基因 | 引物序列(5'-3') |
|--------------|----------------------------|
| miR-92a | 上游:TCAGTGGGAAGTGCTATCAGG |
| | 下游:GAGAGTGGAGTGCTGCTTCCAA |
| IL-6 | 上游:ACAACCACGGCCTTCCCTACTT |
| | 下游:CACGATTTCCCAGAGAACATGTG |
| IL-1 β | 上游:TGCTGTGTGACGTTCCCATTA |
| | 下游:CAGCACGAGGCTTTTGTGTG |
| iNOS | 上游:CTCAGCCCAACAATACAAG |
| | 下游:CTACAGTTCCGAGCGTCA |
| U6 | 上游:GTGCTCGCTTCGGCAGCA |
| | 下游:CAAAATATGGAACGCTTC |
| GAPDH | 上游:TCCATGACAACCTTTGGCATTG |
| | 下游:TCACGCCACAGCTTTCCA |

1.5 NO 含量检测

收集各待测组细胞,以适当的密度接种至 6 孔细胞板上,常规培养 24 h 后,加入 DAF-FMDA 工作液(浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$)常温反应 25 min 后,以磷酸缓冲液洗涤,上流式细胞仪检测 NO 相对荧光强度。计算公式为:NO 含量=(测定孔 RFU_{最高}-RFU_{最低})-

(空白孔 RFU_{最高}-RFU_{最低})[RFU:相对荧光值(relative fluorescence unit)]。

1.6 油红 O 染色

收集各待测组细胞,磷酸缓冲液洗涤后,加入 50%异丙醇对细胞进行固定;3~5 min 后,加油红 O 工作液染色 10~15 min。去离子冲洗后,经盐酸酒精分色和氨水返蓝后,封片,显微镜下观察拍照,染为红色的即为脂质。

1.7 双荧光素酶报告实验

TargetScan 在线靶基因预测软件预测到 miR-92a 与 PIAS3 3'-UTR 存在结合位点。为了证实 miR-92a 与 PIAS3 是否存在靶向关系,构建野生型 (Wt-PIAS3) 和突变型 (Mut-PIAS3) 的 PIAS3 的 3'-UTR 荧光素酶报告载体。实验设为 4 组:与 Mut-PIAS3 共转染的 miR-92a 组和 NC 组,与 Wt-PIAS3 共转染的 miR-92a 组和 NC 组。按照如上分组参照“1.3”中的方法处理细胞。培养 48 h 后,收集细胞,参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒的说明书步骤检测各组细胞中双荧光素酶的活性。

1.8 Western blot 检测

收集各待测组细胞,以磷酸缓冲液洗涤细胞后,加入 RIPA 裂解细胞提取总蛋白。蛋白定量后,取适量蛋白至 SDS-PAGE 凝胶中电泳。待蛋白分离后,结束电泳转至 PVDF 膜。以封闭液封闭 1.5 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入一抗孵育 24 h。再于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下加二抗孵育 2 h。洗膜后,加入 ECL 显影。凝胶成像系统拍照分析。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示实验数据,2 组间比较采用独立样本 t 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,方差齐性采用 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ox-LDL 呈时间和浓度依赖诱导 RAW264.7 细胞 miR-92a 表达

不同浓度 (25、50、100 mg/L) ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞 24 h 后,qRT-PCR 检测细胞中 miR-92a 表达水平发现,与 0 mg/L ox-LDL 处理组相比均明显升高($P<0.05$)。以 100 mg/L ox-LDL 分别处理细胞 12、24 h 后,qRT-PCR 检测细胞中 miR-92a 表达水平较 vehicle 组明显升高,而在 0 h 作用时间下,miR-92a 表达水平无明显改变(图 1)。

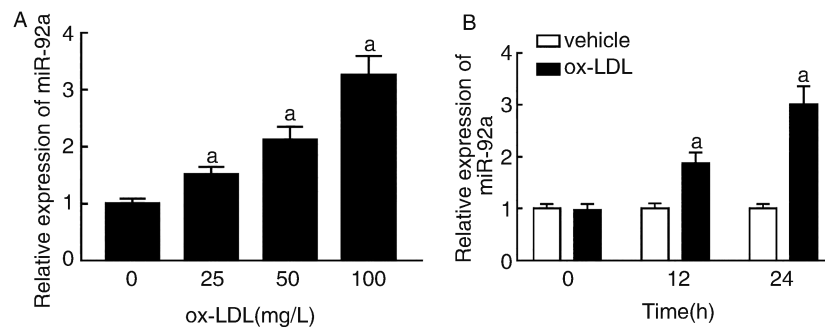


图1. ox-LDL对RAW264.7细胞miR-92a表达的影响 A为不同浓度ox-LDL处理RAW264.7细胞后miR-92a表达水平;a为 $P<0.05$,与0 mg/L ox-LDL组相比。B为100 mg/L ox-LDL处理RAW264.7细胞不同时间后miR-92a表达水平;a为 $P<0.05$,与同一时间下vehicle组相比。

Figure 1. Effect of ox-LDL on miR-92a expression in RAW264.7 cells

2.2 下调miR-92a抑制ox-LDL诱导RAW264.7细胞的炎症介质分泌

转染anti-miR-92a后RAW264.7细胞miR-92a的表达水平较anti-NC+vehicle组明显降低($P<0.05$),给予ox-LDL处理后,在转染anti-miR-92a细胞中miR-92a表达水平较anti-NC+ox-LDL组明显下降($P<0.05$)。此外,在未加ox-LDL处理时,下调miR-92a表达未能影响NO的释放;但加入ox-LDL处理后,anti-NC+ox-LDL组NO释放有明显差异,并

且下调miR-92a表达使NO释放明显低于anti-NC+ox-LDL组($P<0.05$)。同时,只转染anti-miR-92a的细胞中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)和IL-1 β mRNA表达较anti-NC+vehicle组未见明显改变($P>0.05$),而加入ox-LDL后,iNOS、IL-6和IL-1 β mRNA表达较anti-NC+vehicle组均明显升高($P<0.05$);而下调miR-92a表达能够明显抑制这种改变(图2)。

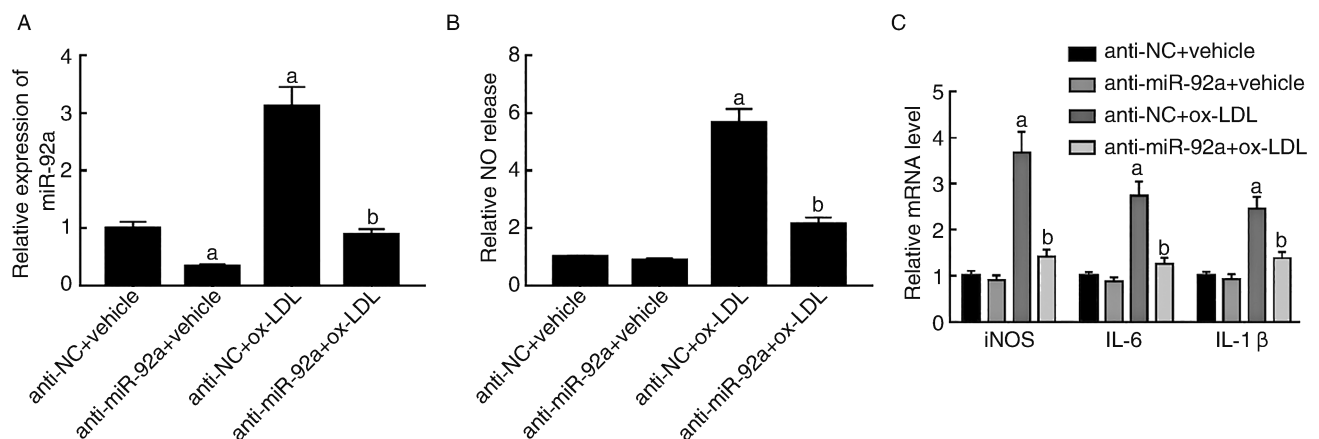


图2. 下调miR-92a对ox-LDL诱导RAW264.7细胞炎症介质分泌的影响 A为转染anti-miR-92a及联合ox-LDL后细胞miR-92a的表达;B为转染anti-miR-92a及联合ox-LDL后细胞NO的相对释放量;C为转染anti-miR-92a及联合ox-LDL后细胞iNOS、IL-6、IL-1 β 的mRNA表达。a为 $P<0.05$,与anti-NC+vehicle组相比;b为 $P<0.05$,与anti-NC+ox-LDL组相比。

Figure 2. Effect of down-regulating miR-92a on the secretion of inflammatory mediators induced by ox-LDL in RAW264.7 cells

2.3 下调miR-92a抑制ox-LDL诱导RAW264.7细胞的脂质蓄积

油红O染色结果显示,100 mg/L ox-LDL处理RAW264.7细胞24 h后,细胞内存在大量的红色脂滴,符合泡沫细胞的形态学特征。与anti-NC+vehicle组比较,只转染anti-miR-92a未影响细胞的脂质蓄积情况,而ox-LDL处理后细胞中红色脂滴阳性细胞所占百分比显著升高($P<0.05$);同时,下调细胞中miR-92a抑制了ox-LDL引起细胞内脂滴升高($P<0.05$;图3)。

vehicle组比较,只转染anti-miR-92a未影响细胞的脂质蓄积情况,而ox-LDL处理后细胞中红色脂滴阳性细胞所占百分比显著升高($P<0.05$);同时,下调细胞中miR-92a抑制了ox-LDL引起细胞内脂滴升高($P<0.05$;图3)。

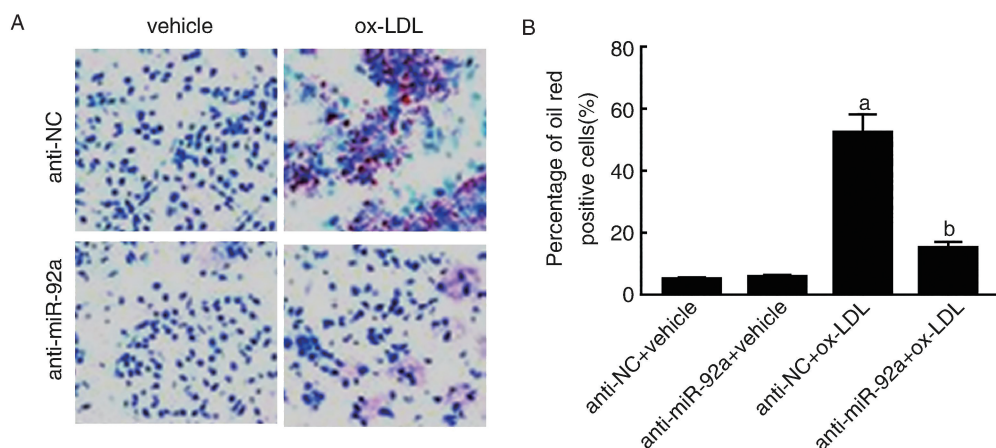


图 3. 下调 miR-92a 对 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞脂质蓄积的影响 A 为油红 O 染色结果,放大倍数为 300;B 为各组细胞中脂滴阳性细胞所占百分比。a 为 $P<0.05$,与 anti-NC+vehicle 组相比;b 为 $P<0.05$,与 anti-NC+ox-LDL 组相比。

Figure 3. Effect of down-regulating miR-92a on the lipid accumulation induced by ox-LDL in RAW264.7 cells

2.4 PIAS3 是 miR-92a 的靶基因

通过 TargetScan 软件预测发现 PIAS3 3'UTR 含有与 miR-92a 互补的核苷酸序列,结果见图 4A。双荧光素酶报告基因实验检测结果显示,与 Mut-PIAS3 共转染的 miR-92a 组和 NC 组间荧光素酶活性无明显差异 ($P>0.05$),但与 Wt-PIAS3 共转染的

miR-92a 组荧光素酶活性明显低于 NC 组 ($P<0.05$)。采用 Western blot 进一步检测细胞中 PIAS3 蛋白的表达情况,结果见图 4C 和 4D。结果显示,转染 miR-92a 模拟物细胞中 PIAS3 蛋白表达与 NC 组相比明显降低 ($P<0.05$);反之,转染 miR-92a 抑制物则有较高的 PIAS3 蛋白表达(图 4)。

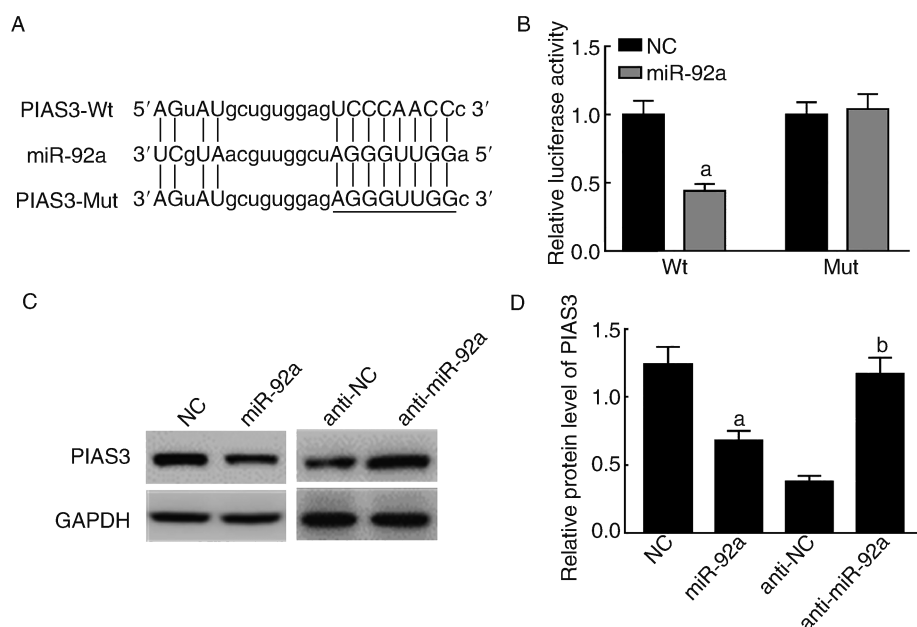


图 4. miR-92a 对 PIAS3 的靶向调控作用 A 为互补核苷酸序列配对序列;B 为荧光素酶活性;C 为 Western blot 检测 PIAS3 蛋白表达;D 为 PIAS 蛋白相对表达水平。a 为 $P<0.05$,与 NC 组相比;b 为 $P<0.05$,与 anti-NC 组相比。

Figure 4. Targeted regulation of miR-92a on PIAS3

2.5 下调 miR-92a 通过靶向 PIAS3 抑制 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞炎症介质分泌和脂质蓄积

采用 100 mg/L ox-LDL 处理后 RAW264.7 细胞中 PIAS3 的表达较 vehicle 组明显降低 ($P<0.05$),

这种抑制作用可被 anti-miR-92a 恢复;而沉默 PIAS3 后,anti-miR-92a 促进 RAW264.7 细胞中 PIAS3 表达的作用受到抑制。ox-LDL 可诱导细胞中炎症因子 IL-6、IL-1 β 表达和红色脂滴阳性细胞所占的百分比

增加,这种诱导作用可被 anti-miR-92a 所抑制,而沉默 PIAS3 后,anti-miR-92a 对 ox-LDL 诱导的 IL-6、

IL-1 β 表达和红色脂滴的抑制作用得以恢复(图 5)。

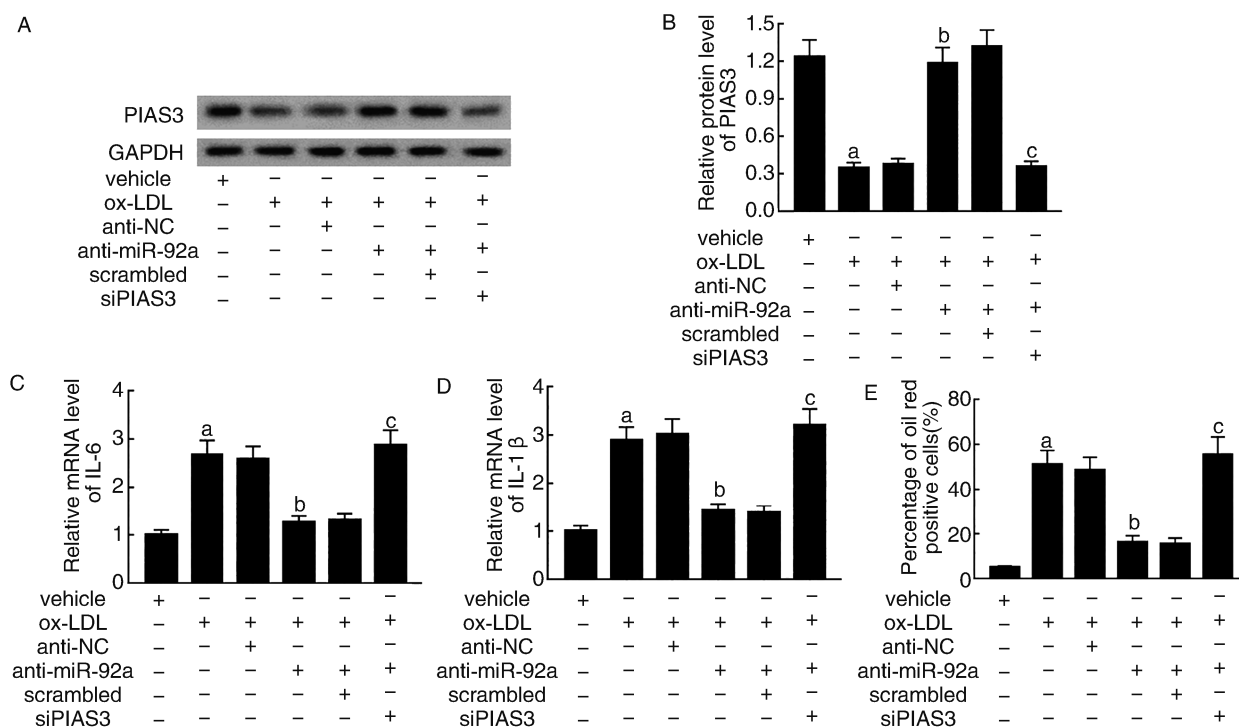


图 5. 下调 miR-92a 通过靶向 PIAS3 抑制 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞炎症介质分泌和脂质蓄积 A 为 Western blot 检测 PIAS3 蛋白表达;B 为 PIAS3 蛋白相对表达水平;C 为 IL-6 mRNA 相对表达水平;D 为 IL-1 β mRNA 相对表达水平;E 为红色脂滴阳性细胞所占百分比。a 为 $P<0.05$,与 vehicle 组相比;b 为 $P<0.05$,与 anti-NC 组相比;c 为 $P<0.05$,与 scrambled 组相比。

Figure 5. Down-regulation of miR-92a inhibits ox-LDL induced secretion of inflammatory mediators and lipid accumulation in RAW264.7 cells by targeting PIAS3

2.6 下调 miR-92a 能够抑制 PIAS3 下游 STAT3 信号通路

100 mg/L ox-LDL 可诱导 RAW264.7 细胞中 PIAS3 下游 STAT3 信号通路蛋白 p-STAT3 表达升高,这种诱导作用可被 anti-miR-92a 所抑制,而沉默 PIAS3 后,anti-miR-92a 对 RAW264.7 细胞的这一作用恢复。然而,STAT3 蛋白在经 ox-LDL、anti-miR-92a 或 PIAS3 干扰后与 vehicle 组相比均无明显改变 ($P>0.05$;图 6)。

3 讨论

当 ox-LDL 过多时可活化巨噬细胞激活 iNOS 基因,产生炎症细胞因子 NO,同时可引起巨噬细胞产生 IL-6 和 IL-1 β 等促炎细胞因子,进而加重炎症反应和细胞损伤^[8-9];ox-LDL 不仅是一种促炎因子,还可携带胆固醇积存于动脉壁上,促使动脉硬化的发生^[10]。本研究以不同浓度(0、25、50、100 mg/L)的

ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞 24 h 和 100 mg/L ox-LDL 分别处理 RAW264.7 细胞 0、12、24 h 后,结果发现,ox-LDL 可呈时间和浓度依赖地诱导 RAW264.7 细胞 miR-92a 的表达,同时 RAW264.7 细胞中 NO 释放和脂滴增多,iNOS、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达升高。采用 miR-92a 抑制剂下调 miR-92a 表达后,ox-LDL 诱导的上述作用明显受到抑制。miR-92a 是 miR-17-92 家族成员,与血管内皮细胞的形成密切相关,在冠状动脉病变、血管内皮损伤和肿瘤等病理生理过程中发挥着重要作用^[11-13]。有研究^[14]发现,miR-92a 与急性心肌梗死发病相关,冠状动脉支架手术后,心肌细胞中 miR-92a 表达增强,抑制 miR-92a 表达可通过抑制 I 型胶原、减少细胞凋亡和抑制炎症而改善心功能。此外,miR-92a 还介导了脂质代谢过程^[15];例如在高脂饮食饲养的大鼠中,miR-92a^{-/-}小鼠对肥胖有抵抗力,抑制 miR-92a 表达可降低胆固醇水平^[16]。研究结果提示,miR-92a 在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症介质分泌

和脂质蓄积中发挥着重要作用。

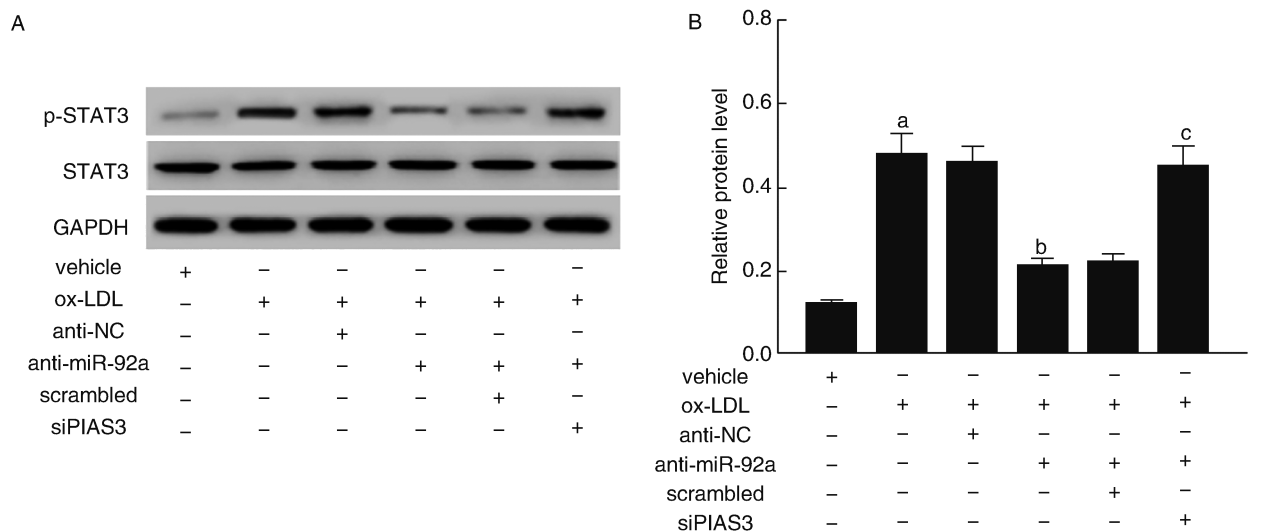


图 6. 下调 miR-92a 对 PIAS3 下游 STAT3 信号通路的影响

A 为 Western blot 检测 p-STAT3 蛋白表达; B 为 p-STAT3 蛋白相对表达水平。a 为 $P < 0.05$, 与 vehicle 组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 anti-NC 组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 scrambled 组相比。

Figure 6. Effect of down-regulating miR-92a on STAT3 signaling pathway of PIAS3 downstream

本研究采用 TargetScan 软件预测 PIAS3 可能是 miR-92a 的靶基因, PIAS3 3'-UTR 与 miR-92a 有互补区域, 采用双荧光素酶报告实验证实 miR-92a 可抑制 PIAS3 3'-UTR 的转录活性。同时 miR-92a 过表达可引起 PIAS3 表达下降, 反之则上升。为了探讨 PIAS3 在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症介质分泌和脂质蓄积中的作用, 采用 RNA 干扰技术沉默 PIAS3 表达后, 发现 miR-92a 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症介质分泌和脂质蓄积的抑制作用明显恢复。有研究^[17-18]指出, PIAS3 可介导炎症转录因子核因子 κ B 的表达, 进而参与多种组织或细胞的炎症因子分泌。PIAS3 是 STAT3 蛋白抑制分子, 敲低 PIAS3 可抑制 STAT3 表达, 影响多种组织或细胞的生理病理过程^[19]。STAT3 信号通路是 PIAS3 下游的重要通路, 其在巨噬细胞介导的炎症反应和脂质蓄积过程中发挥着重要作用。抑制 STAT3 信号通路的激活可有效抑制脂多糖诱导的巨噬细胞中炎症介质如 NO、IL-1 β 和 IL-6 的产生; 反之, 则促进巨噬细胞炎症反应和胆固醇代谢^[20]; 提示 PIAS3 在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症介质分泌和脂质蓄积中发挥着重要作用。miR-92a 是否通过 STAT3 信号通路参与调控 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症介质分泌和脂质蓄积过程? 带着这一疑问, 我们进一步探讨沉默 PIAS3 联合 anti-miR-92a、ox-LDL 处理后细胞中 STAT3 和 p-STAT3 表达情况。结果发现, ox-LDL 处理后细胞中 p-STAT3 表达升高, anti-miR-92a

可以抑制 ox-LDL 的这一作用, 而沉默 PIAS3 后, 这一作用得以解除。然而, STAT3 蛋白在经 ox-LDL、anti-miR-92a 或 PIAS3 干扰后无明显改变; 提示下调 miR-92a 能够抑制 PIAS3 下游 STAT3 信号通路, 进而参与 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症介质分泌和脂质蓄积过程。

总之, 本研究证实 miR-92a 在 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞中表达上调, 下调其表达可靶向上调 PIAS3, 进而激活其下游 STAT3 信号通路, 在 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞炎症介质分泌和脂质蓄积过程中发挥抑制作用。这一结果为 miR-92a 在动脉粥样硬化发生中的作用提供了新的证据。

[参考文献]

- [1] Bories GFP, Leitinger N. Macrophage metabolism in atherosclerosis[J]. FEBS Lett, 2017, 591(19): 3042-3060.
- [2] Allahverdian S, Chehroudi AC, Mcmanus BM, et al. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis[J]. Circulation, 2015, 131(3): e25-e33.
- [3] Yurdagül A, Green J, Albert P, et al. Alpha 5 beta 1 integrin signaling mediates oxidized low-density lipoprotein-induced inflammation and early atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(7): 1362-1391.
- [4] Zhang X, Ye J, Liang X, et al. Effect of microRNA-155 on inflammatory response and lipid uptake of macrophages and its mechanism[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2017, 33(8):

- 1079-1086.
- [5] Xie N, Cui H, Banerjee S, et al. miR-27a regulates inflammatory response of macrophages by targeting IL-10[J]. *J Immunol*, 2014, 193(1): 327-334.
- [6] Huang Y, Tang S, Jiyan C, et al. Circulating miR-92a expression level in patients with essential hypertension: a potential marker of atherosclerosis[J]. *J Hum Hypertens*, 2016, 31(3): 200-205.
- [7] Loyer X, Potteaux S, Vion AC, et al. Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice[J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 434-443.
- [8] Huang H, Koelle P, Fendler M, et al. Induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by ox-LDL inhibits macrophage derived foam cell migration[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235(1): 213-222.
- [9] Ratheesh M, Svenia JP, Asha S, et al. Anti-inflammatory effect of a novel formulation of coconut inflorescence sap against ox-LDL induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells by modulating TLR-NF- κ B signaling pathway[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2017, 27(8): 615-621.
- [10] Ikhlef S, Berrougui H, Kamtchueng Simo O, et al. PPAR γ -LXR α -ABCA1 pathway[J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(11): 1614-1629.
- [11] Rong X, Jia L, Hong L, et al. Serum miR-92a-3p as a new potential biomarker for diagnosis of Kawasaki disease with coronary artery lesions[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2017, 10(1): 1-8.
- [12] Daniel JM, Penzkofer D, Teske R, et al. Editor's choice: Inhibition of miR-92a improves re-endothelialization and prevents neointima formation following vascular injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(4): 564-572.
- [13] Fu F, Jiang W, Zhou L, et al. Circulating exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p predict pathologic stage and grade of colorectal cancer[J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(2): 221-232.
- [14] Zhang C, Wu W, Wang C, et al. Expression and function of miR-92a in ventricular remodeling after PCI treatment of acute myocardial infarction[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(2): 1158-1165.
- [15] Simionescu N, Carnuta MG, Fuior EV, et al. Targeting lipid metabolism-related genes by in vivo inhibition of MIR-486 and MIR-92A lowers plasma cholesterol levels in hyperlipidemic hamsters[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 263: e34-e35.
- [16] Penzkofer D, Seeger T, Bonauer A, et al. Abstract 16492: MiR-92a controls metabolism and obesity[J]. *Circulation*, 2013, 128(22): A16492.
- [17] Liu Y, Bridges R, Wortham A, et al. NF- κ B repression by PIAS3 mediated RelA SUMOylation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37636-e37643.
- [18] Albrecht U, Yang X, Asselta R, et al. Activation of NF- κ B by IL-1 β blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human γ -fibrinogen gene[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(9): 1866-1878.
- [19] Lee JH, Kim C, Sethi G, et al. Brassinin inhibits STAT3 signaling pathway through modulation of PIAS-3 and SOCS-3 expression and sensitizes human lung cancer xenograft in nude mice to paclitaxel[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 6386-6405.
- [20] Yang D, Liu S, Chen Y, et al. Three pathways assess anti-inflammatory response of epicatechin with lipopolysaccharide-mediated macrophage RAW264.7 cells[J]. *J Food Biochem*, 2015, 39(3): 334-343.
- (此文编辑 曾学清)