

## 敲除 miR-223 促进血管炎症和动脉粥样硬化的发生

韩迎春, 李扬, 张继超, 李玉琳, 杜杰

(首都医科大学附属北京安贞医院北京市心肺血管疾病研究所血管生物研究室, 北京市 100029)

[专家简介] 杜杰, 教育部“长江学者”特聘教授, 国家基金委杰出青年, 北京市海外聚集高层次人才。先后承担和主持国家重点研发计划项目、国家基金委杰出青年基金、重点课题基金、重大课题基金及科技部重大国际合作基金, 参与中国及美国心血管前瞻领域研究计划策划及评审工作。原创性成果发表于《Circulation》《Cardiovascular Research》《Arterioscler Thromb Vasc Biol》及《Hypertension》等心血管领域国际权威期刊。目前逐步建立了完善的基因组学、代谢组、蛋白组学及分子病因研究团队和平台; 创立了首都医科大学附属安贞医院精准医学中心临床分子诊断中心, 并担任中心主任; 成立了京津冀心血管疾病精准医学联盟, 推动了三地乃至全国心血管疾病基础医学与精准诊疗技术的发展; 获批科技部精准医学研究专项“基于组学特征谱的心脑血管疾病分子分型的研究”。



[关键词] miR-223; 白细胞介素6; 血管炎症; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究 miR-223 对血管炎症和动脉粥样硬化的影响, 为临床动脉硬化性疾病提供新的诊疗方向。方法 miR-223 敲除鼠与 ApoE 敲除鼠 (ApoE KO) 繁殖制备 miR-223/ApoE 双敲鼠 (miR-223/ApoE DKO); 检测小鼠血浆脂质水平; 处死取材后检测主动脉根部及血管全长的斑块含量; 通过免疫组化检测斑块的炎症细胞浸润; 转录组学测序分析血管中炎症相关基因的表达; 结合 microRNA 靶基因数据库寻找并验证其可能的靶基因。结果 miR-223/ApoE 双敲鼠主动脉根部及血管全长斑块量显著增加 ( $P < 0.05$ )。免疫组化染色显示, 主动脉根部炎症细胞浸润增加; 血管转录组学测序发现炎症相关基因血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1)、白细胞介素 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 等在双敲鼠中显著上调。通过靶基因数据库筛选, 发现白细胞介素 6 (IL-6) 是 miR-223 的靶基因并且在双敲鼠的血管中表达显著上调; 使用 miR-223 模拟物刺激成纤维细胞, 显著抑制了 IL-6 的表达。结论 miR-223 抑制靶基因 IL-6 的表达降低炎症反应, 敲除 miR-223 显著升高血管炎症水平促进动脉粥样硬化的进展。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

### miR-223 deficiency aggravates vascular inflammation and atherosclerosis

HAN Yingchun, LI Yang, ZHANG Jichao, LI Yulin, DU jie

(Department of Vascular Biology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Disease, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] miR-223; IL-6; vascular inflammation; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of miR-223 on vascular inflammation and atherosclerosis, and to provide a new therapeutic target for clinical arteriosclerosis. **Methods** The miR-223 knockout mice and ApoE knockout mice (ApoE KO) were crossbred to prepare miR-223/ApoE double knockout mice (miR-223/ApoE DKO). The plasma lipid levels of 8-month-old mice were measured. Plaque content in the aortic root and the entire length of the blood vessel were analyzed; Immunohistochemical staining was adapted to detect inflammatory cell infiltration in the plaque; Transcriptomics sequencing was used to analyze the expression of inflammation-related genes in the blood vessel; Screening the microRNA target gene database to find and validate possible target genes. **Results** Atherosclerosis in aortic root of miR-223/ApoE DKO mice were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical staining showed that more inflammatory cells infiltrated in aortic root of DKO mice; Vascular transcriptomics sequencing revealed that expression of inflammatory

[收稿日期] 2019-12-02

[修回日期] 2020-01-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81800218); 国家自然科学基金国际 (地区) 合作与交流项目 (81861128025)

[作者简介] 韩迎春, 博士, 讲师, 研究方向为心血管疾病发病机制, E-mail 为 hanyinchun.wfl@163.com。通信作者杜杰, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为心血管重构疾病病理生理, E-mail 为 jiedubj@126.com。

genes such as vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) were up-regulated in DKO mice; Through screening of target genes from database, IL-6 was found to be a potential target gene of miR-223 and its expression was significantly up-regulated in DKO mice; 3T3 cells were transfected with miR-223 mimics and the expression of interleukin-6 (IL-6) was significantly down-regulated. **Conclusions** miR-223 inhibits the expression of target gene IL-6 and reduces the inflammatory response. Knockout miR-223 significantly increases the level of vascular inflammation and promotes the progression of atherosclerosis.

动脉粥样硬化心血管疾病是全球死亡事件的主要原因<sup>[1]</sup>。随着人口老龄化的增加及饮食习惯的改变,动脉粥样硬化性疾病的发病率逐年升高<sup>[2]</sup>。动脉粥样硬化是冠心病<sup>[3]</sup>、心肌梗死、中风等重大心血管事件共同的病理基础,因此探究动脉粥样硬化形成机制及调控的关键分子,发现潜在的治疗靶点,有利于缓解疾病进展和降低重大心血管事件发生率。动脉粥样硬化是血管的慢性炎症反应,内皮细胞在炎症、氧化应激、高胆固醇等刺激下损伤并释放多种趋化因子,单核巨噬细胞进入内皮下吞噬脂质形成泡沫细胞,凋亡的泡沫细胞及平滑肌细胞进一步加重炎症反应,导致内皮下斑块面积增加,脂质坏死核增大,动脉粥样硬化加剧<sup>[4]</sup>。microRNA (miR) 是一种含有 21 个核苷酸的短链 RNA,主要能与靶基因的 5'UTR 区结合或者抑制靶基因的蛋白翻译,从而调控靶基因的表达,是重要的基因转录后调控方式。多种 microRNA 参与调控动脉粥样硬化的病理过程<sup>[5-9]</sup>。miR-223 是已报道的重要的炎症相关 microRNA<sup>[10]</sup>,主要由炎症细胞产生,可通过外泌体的形式进入血管平滑肌细胞,影响平滑肌细胞增殖及血管的再狭窄<sup>[11]</sup>。miR-223 在人冠状动脉斑块及 ApoE 敲除 (ApoE KO) 小鼠的血管中显著升高<sup>[12]</sup>,提示其与动脉粥样硬化的相关性,但 miR-223 敲除对小鼠动脉粥样硬化的影响及机制尚无明确报道。因此本研究主要利用 miR-223/ApoE 双敲 (miR-223/ApoE DKO) 小鼠,研究 miR-223 对动脉粥样硬化的影响及探明其可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS) 为 GIBCO 公司产品;血浆生化检测试剂盒购于中生北控有限公司;油红 O 染料购于索莱宝公司;免疫组化一抗抗 Mac2 购于 Santa Cruz 公司,抗 SM22 购于 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记 IgG 为北京中杉金桥生物技术有限公司产品;Trizol 试剂购于 Thermol Fisher 公司产品;qPCR 试剂购于 TAKARA

公司;miR-223 模拟物 (mimic) 和对照 mimic 由广州锐博合成;miR-223 探针购于 Thermol Fisher 公司。

### 1.2 小鼠饲养和繁育

实验分为 miR-223/ApoE DKO 小鼠和 ApoE KO 小鼠 (每组样本数见结果图表中)。ApoE 敲除 (ApoE KO) 鼠购自北京华卓康生物科技有限公司,miR-223 敲除鼠购自美国 Jackson Laboratory 公司,并由北京华卓康生物科技有限公司进行 miR-223/ApoE 双敲 (miR-223/ApoE DKO) 鼠繁育。实验所用 ApoE 敲除鼠及 miR-223/ApoE 双敲鼠均饲养于北京市心肺血管疾病研究所 SPF 级环境动物房。维持饲料购于北京华卓康生物科技有限公司。所有操作均根据首都医科大学实验动物管理委员会规定的实验流程进行。

### 1.3 血浆生化指标检测

小鼠非禁食条件下采血,肝素抗凝,4 °C 4 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆样品检测。血浆胆固醇和甘油三酯试剂盒购于中生北控公司。

### 1.4 取材

小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥麻醉,沿腹中线切开皮肤及皮下薄膜,暴露出内脏。PBS 灌流心脏后取主动脉全长,取材后立即冻存用于蛋白及 RNA 提取。另外,形态学的心脏和主动脉全长用 4% 多聚甲醛固定 4 h,蔗糖脱水后 OCT 包埋冷冻保存。

### 1.5 流出道及主动脉油红 O 染色

冰冻切片或者主动脉全长经过 4% 多聚甲醛固定 10 min,60% 异丙醇浸泡 10 min,油红 O 染色 30 min 后,异丙醇漂洗掉浮色,拍照定量。

### 1.6 免疫组化

组化染色使用血管冰冻切片,一抗 Mac2 或 SM22 4 °C 过夜,酶标二抗及 DAB 显色。

### 1.7 RNA 提取

使用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,转录组学测序及分析由华大基因完成;脾脏 miR-223 的检测通过 miR-223 探针完成。

### 1.8 组织 miR-223 qPCR 检测

收集脾脏组织,将组织放入研钵中加适量液氮研磨,组织研碎后加入 1 mL Trizol,提取总 RNA。按

照 miRNA RT-PCR Detection Kit 试剂盒进行反转录合成 cDNA, 得到样品通过 TaqMan MicroRNA Assay 检测 miR-223 的表达。Stem-loop 序列: CCU GGC CUC CUG CAG UGC CAC GCU CCG UGU AUU UGA CAA GCU GAG UUG GAC ACU CCA UGU GGU AGA GUG UCA GUU UGU CAA AUA CCC CAA GUG CGG CAC AUG CUU ACC AG。

### 1.9 细胞转染

3T3 细胞培养至 60% ~ 70% 融合, 使用转染试剂(Introvgen, iMAX) 转染终浓度 100 nmol/L 的对照 mimic 或 miR-223 mimic, 24 h 后收取细胞。

### 1.10 统计学方法

实验数据均采用 Prism5 软件作图及统计分析。首先进行正态分布检验, 符合正态分布数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组之间的比较采用非配对 *t* 检验, 不符合正

态分布的数据两组之间比较使用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 敲除 miR-223 促进 ApoE KO 小鼠动脉粥样硬化进展

与 ApoE KO 小鼠比较, miR-223/ApoE DKO 小鼠 miR-223 含量几乎检测不到, 证实 miR-223 敲除成功(图 1A)。miR-223/ApoE DKO 小鼠和 ApoE KO 小鼠普通饲料喂饲 6 个月, 与 ApoE KO 小鼠比较, DKO 小鼠主动脉全长斑块油红 O 染色面积增多(图 1B), 根部斑块面积染色显著增加 [ $(3.23 \pm 0.52) \times 10^4 \mu\text{m}^2$  比  $(5.97 \pm 0.72) \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ](图 1C 和 D), 提示敲除 miR-223 加重了动脉粥样硬化。

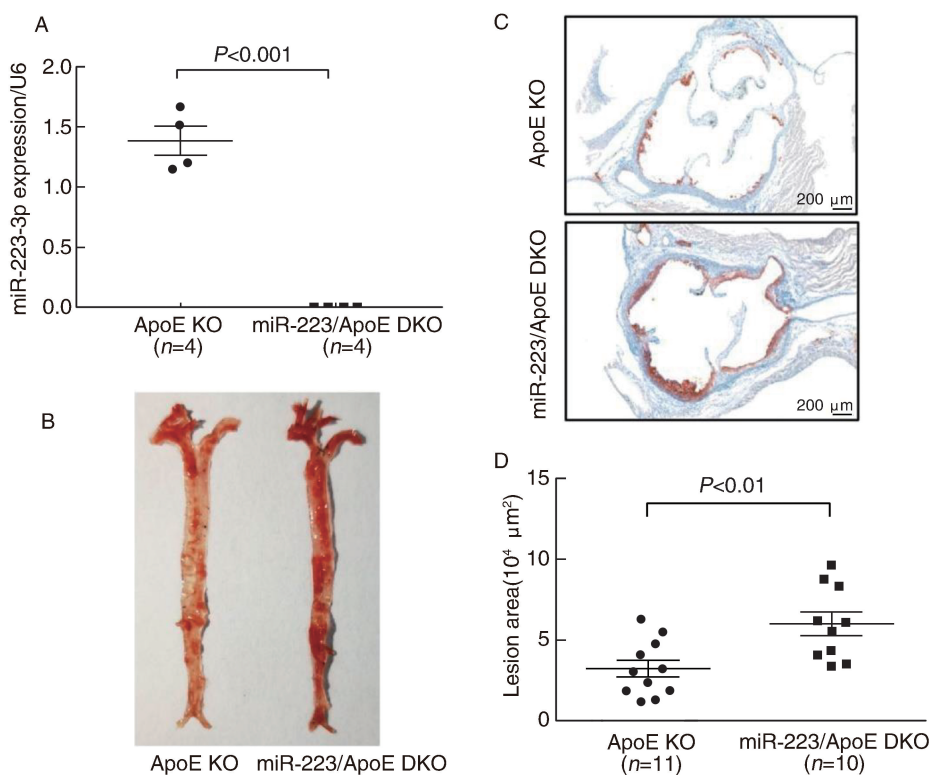


图 1. ApoE KO 小鼠和 miR-223/ApoE DKO 小鼠动脉粥样硬化情况的比较 A 为检测脾脏 miR-223-3p 水平。B 为主动脉全长油红 O 染色结果。C 和 D 为流出道(根部)冰冻切片油红 O 染色结果及定量。

Figure 1. Atherosclerosis lesion areas of ApoE KO and miR-223/ApoE DKO mice

### 2.2 敲除 miR-223 不影响血浆胆固醇及甘油三酯水平

血浆脂质水平是影响动脉粥样硬化进展的关键因素, 因此检测了 miR-223/ApoE DKO 小鼠及 ApoE KO 小鼠的非禁食血浆生化指标。结果显示, miR-223/ApoE DKO 小鼠呈现高胆固醇血症, 血浆

胆固醇水平为  $514.8 \pm 21.42$  mg/dL, 但与 ApoE KO 小鼠( $517.7 \pm 33.11$  mg/dL) 比较差异无显著性(图 2A)。两组小鼠的血浆甘油三酯水平差异也无显著性( $72.7 \pm 7.0$  比  $68.6 \pm 4.8$  mg/dL)(图 2B)。因此, miR-223 并不影响小鼠血浆胆固醇及甘油三酯水平。

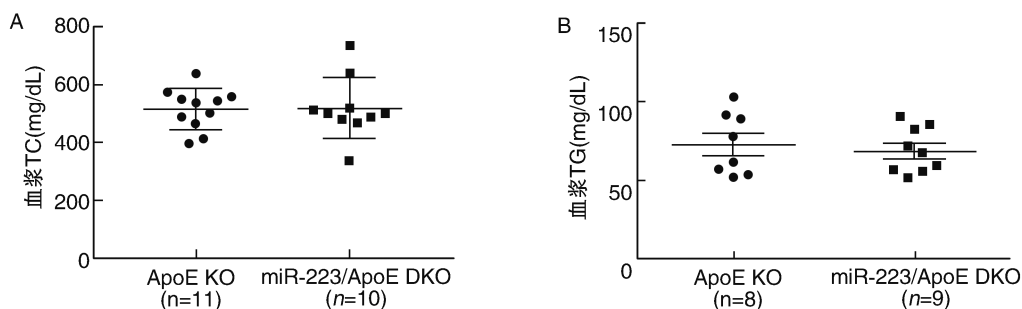


图 2. ApoE KO 小鼠和 miR-223/ApoE DKO 小鼠血浆脂质水平 A 为非禁食状态下血浆 TC 水平。B 为禁食状态下血浆 TG 水平。

Figure 2. Plasma lipids of ApoE KO and miR-223/ApoE DKO mice

### 2.3 miR-223/ApoE DKO 小鼠血管炎症水平升高

miR-223 主要由免疫细胞产生,是调节炎症反应的关键 microRNA<sup>[12]</sup>。因此,进一步检查 miR-223 敲除对血管炎症的影响。通过斑块免疫组化染色,发现 DKO 小鼠斑块中 Mac2 染色增加,提示炎症细胞浸润增多(图 3)。同时,分离血管组织进行转录组学测序,基因表达量用 FPKM 衡量(每 100 万条

Reads 中,对基因的每 1 000 个 Base 而言,比对该 1 000 个 base 的 Reads 数)。结果显示与炎症相关的多种基因如血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1)、趋化因子 Ccl-3、趋化因子 Ccl-4、白细胞介素 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 等在 DKO 小鼠血管中显著上调(图 4)。这些结果提示,miR-223 敲除促进了血管炎症水平,这可能是导致动脉粥样硬化加重的原因。

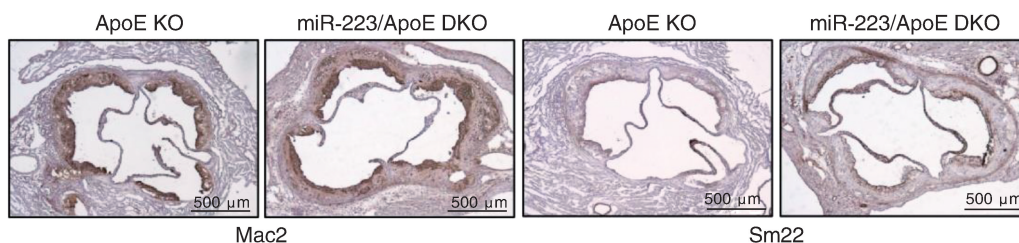


图 3. ApoE KO 和 miR-223/ApoE DKO 小鼠炎症细胞标志物 Mac2 及平滑肌标志物 SM22 染色结果的比较(免疫组化)

Figure 3. Comparison of staining results of mac2 and SM22 in ApoE Ko and miR-223/ApoE DKO mice (immunohistochemistry)

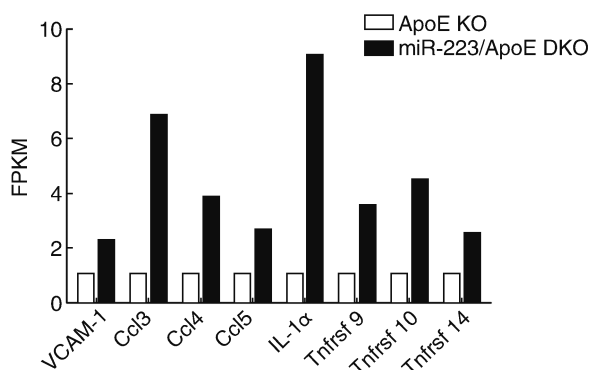
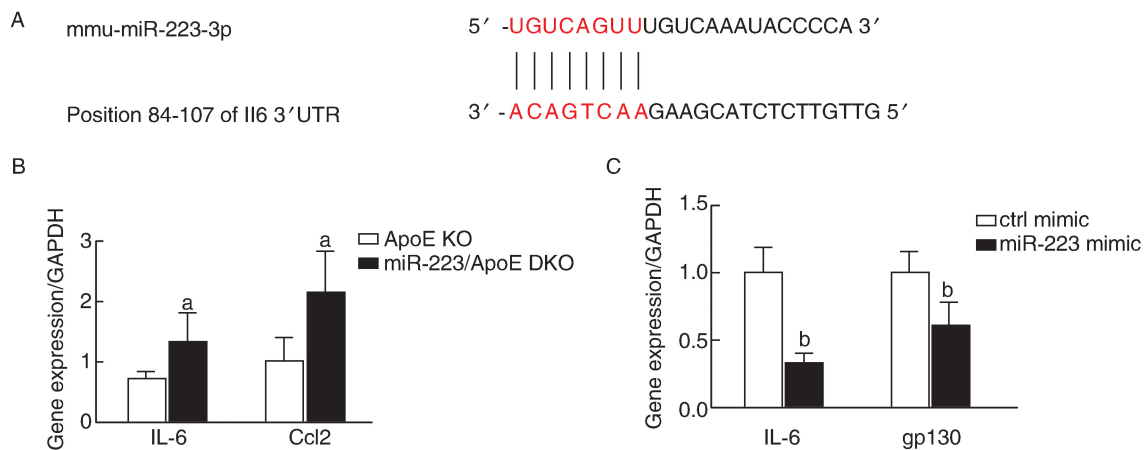


图 4. ApoE KO 和 miR-223/ApoE DKO 小鼠血管转录组学测序数据分析炎症相关基因表达(n=3)

Figure 4. Analysis of the expression of inflammation related genes based on the data of vascular transcriptome sequencing in ApoE KO and miR-223/ApoE DKO mice(n=3)

### 2.4 miR-223 可能通过靶基因 IL-6 调控血管炎症及动脉粥样硬化进展

为了寻找 miR-223 影响动脉粥样硬化的靶基因,搜索 miR-223 的靶基因数据库及相关文献,发现白细胞介素 6 (IL-6) 是 miR-223 的靶基因,有 8 个互补碱基(图 5A)。通过对血管进行 qPCR 检测,发现 DKO 小鼠血管组织中 IL-6、Ccl2 的表达显著升高(图 5B)。体外用对照模拟物(Ctrl mimic)或 miR-223 模拟物(miR-223 mimic)转染 3T3 细胞 24 h,IL-6 及 miR-223 另一个潜在靶基 gp130 都显著降低(图 5C)。这些结果均提示,miR-223 可能通过靶基因 IL-6 调控血管炎症、升高的 Ccl2 促进炎症细胞浸润,加速动脉粥样硬化进展。



**图 5. miR-223 靶基因寻找及验证** A 为通过 miRDB 数据库预测 miR-223-3p 与靶基因 IL-6 的结合位点。B 为小鼠血管 IL-6 及 Ccl2 的 mRNA 水平 ( $n=5$ ), a 为  $P<0.05$ , 与 ApoE KO 组比较。C 为 100 nmol/L miR-223 模拟物或对照模拟物处理 3T3 细胞 24 h 后, qPCR 检测 IL-6 及 gp130 的 mRNA 表达, 每组 3 个复孔, b 为  $P<0.05$ , 与 ctrl mimic 比较。

**Figure 5. Screening and identifying miR-223 target gene**

### 3 讨论

本研究利用 miR-223/ApoE 敲除鼠, 结合转录组学数据分析等手段, 证实 miR-223 敲除可能通过升高靶基 IL-6 促进动脉粥样硬化进展。

microRNA 是最大的一类转录后调控因子, 30% 的人类基因受 microRNA 调控。多种 microRNA 参与调控动脉粥样硬化病理进展的各个环节, 包括内皮炎症、平滑肌表型转化、巨噬细胞极化等等<sup>[13]</sup>。miR-223 是一个炎症相关的 microRNA, 主要由骨髓来源的细胞产生<sup>[14]</sup>。虽然血管原位细胞如内皮细胞、平滑肌细胞几乎不产生 miR-223, 骨髓来源的 miR-223 可通过外泌体等形式进入血管细胞, 从而调控血管稳态。如中性粒细胞来源的 miR-223 可靶向肺血管内皮细胞 PARP-1, 抑制炎症反应<sup>[10]</sup>; HDL 可携带 miR-223 转移到内皮细胞, 靶向 ICAM-1 和 CSF2 抑制炎症<sup>[15]</sup>。已有研究显示 miR-223 在人的冠状动脉斑块及 ApoE KO 小鼠的血管中显著升高, 但 miR-223 敲除对动脉粥样硬化的影响还未得到明确的验证。

本研究明确了 miR-223/ApoE DKO 小鼠血浆胆固醇及甘油三酯水平无显著改变, DKO 小鼠动脉粥样硬化明显加重。免疫组化、血管细胞流式分析及血管转录组学分析均显示, DKO 小鼠的血管炎症水平升高。通过对 miR-223 靶基因的筛选及验证, 明确 IL-6 是 miR-223 的靶基因之一。多项研究已证实 IL-6 在动脉粥样硬化中是上游的关键炎症因子, 能活化内皮细胞, 促进淋巴细胞增殖和分化<sup>[16-17]</sup>。携带 IL-6 受体突变的人群冠心病风险降低<sup>[18]</sup>。因

此, miR-223 可能通过升高靶基因 IL-6 促进血管炎症及动脉粥样硬化进展。与本研究的结果一致, 有课题组报道运用 miR-223 抑制剂显著增加了 ApoE KO 小鼠的动脉粥样硬化水平, 机制是可能通过影响平滑肌 IGF1R 的表达调控平滑肌增殖和动脉粥样硬化进展<sup>[11]</sup>。因此, miR-223 可能通过多种分子机制, 如炎症反应、平滑肌细胞增殖等, 协同调控动脉粥样硬化的发生发展。

另外, 本研究在寻找并验证 miR-223 的靶基因的实验中, 发现体外给予 miR-223 模拟物可抑制 IL-6 的受体 gp130 表达。有报道证实 gp130 也是 miR-223 的靶基因<sup>[19]</sup>, 因此 miR-223 可能通过靶向 IL-6 及受体 gp130 进而抑制 IL-6 介导的促炎通路。目前的研究结果尚不清楚, miR-223 是否依赖对 IL-6 通路的抑制而发挥抗动脉粥样硬化的作用。在后续的研究中, 需进一步利用 IL-6 通路抑制剂 (IL-6 中和抗体或 IL-6R 抑制剂) 验证阻断 IL-6 通路能否逆转 miR-223 敲除对动脉粥样硬化的促进作用。

综上, 本研究明确了 miR-223 对动脉粥样硬化的影响, 推测 miR-223 可能通过影响促炎因子 IL-6 的表达从而调控动脉粥样硬化的发生。因此, miR-223 对动脉粥样硬化有潜在的治疗作用, 值得进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2016》概要[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(6): 521-530.
- [2] Yla-Herttuala S, Bentzon JF, Daemen M, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques: an update[J]. Eur Heart

- J, 2013, 34(42): 3251-3258.
- [3] Cheruvu PK, Finn AV, Gardner C, et al. Frequency and distribution of thin-cap fibroatheroma and ruptured plaques in human coronary arteries: A pathologic study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(10): 940-949.
- [4] Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93: 1317-1542.
- [5] Eken SM, Jin H, Chernogubova E, et al. MicroRNA-210 enhances fibrous cap stability in advanced atherosclerotic lesions[J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 633-644.
- [6] Haemmig S, Feinberg MW. MicroRNAs as harbingers of high-risk carotid artery atherosclerotic disease? [J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 596-598.
- [7] Yang F, Chen Q, He S, et al. MiRNA-22 is a novel mediator of vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and neointima formation [J]. *Circulation*, 2018, 137(17): 1824-1841.
- [8] Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in cardiovascular disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(23): 2577-2584.
- [9] Andreou I, Sun X, Stone PH, et al. Mirnas in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture [J]. *Trend Molecul Med*, 2015, 21(5): 307-318.
- [10] Neudecker V, Brodsky KS, Clambey ET, et al. Neutrophil transfer of mir-223 to lung epithelial cells dampens acute lung injury in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(408): 5360.
- [11] Shan Z, Qin S, Li W, et al. An endocrine genetic signal between blood cells and vascular smooth muscle cells; role of microRNA-223 in smooth muscle function and atherogenesis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(23): 2526-2537.
- [12] Taïbi F, Meuth V, Massy ZA, et al. Mir-223: An inflammatory oncomir enters the cardiovascular field [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(7): 1001-1009.
- [13] Lu D, Thum T. Rna-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(11): 661-674.
- [14] 孙娅娉, 张俊峰. Mir-223 在心血管疾病中的研究进展 [J]. *心脏杂志*, 2019, 31(1): 89-93.
- [15] Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, et al. Hdl-transferred microRNA-223 regulates icam-1 expression in endothelial cells[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3292.
- [16] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(10): a016295.
- [17] Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: A review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy[J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22(3): 147-151.
- [18] Boekholdt SM, Stroes ES. The interleukin-6 pathway and atherosclerosis[J]. *Lancet*, 2012, 379(9822): 1176-1178.
- [19] Wang X, Ding YY, Chen Y, et al. MiR-223-3p alleviates vascular endothelial injury by targeting IL6ST in Kawasaki disease[J]. *Front Pediatr*, 2019, 7: 288.

(此文编辑 朱雯霞)