

MicroRNA-146a 调控肺泡巨噬细胞炎症反应的机制

张建国 陈晓娟 丁成志 邵强 曾振国 刘芬 钱克俭

microRNA 是一类大小约 22 个核苷酸长度的内源性非编码小分子 RNA^[1], 主要通过识别并结合靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区, 在转录后水平抑制蛋白的翻译或促进靶基因的降解^[2-3]。有研究发现微小 RNA 参与肺内炎症反应的调控^[4], miR-146a 是其中较有代表性的一个。本课题组前期研究发现, 用 LPS 刺激肺泡巨噬细胞, miR-146a 的表达水平升高, 并且升高程度与 TNF- α mRNA 呈负相关^[5]; 转染 miR-146a 能下调 LPS 诱导肺泡巨噬细胞 TNF- α 的表达^[6], 表明 miR-146a 能抑制 LPS 诱导肺泡巨噬细胞的炎症反应。本实验拟进一步探讨 miR-146a 调控肺泡巨噬细胞炎症反应的机制, 为体内试验提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 (上海中国科学院细胞库); LPS (*E. coli* 0111; B4); Pre-miRTM miR-146a 前体、CyTM3 标记的 Pre-miRTM 阴性对照 (美国 ABI 公司); 大鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司); PrimeScript[®] 逆转录试剂盒、SYBR 荧光染料试剂 II (SYBR[®] Premix Ex Taq^M II) PCR 检测试剂盒 (大连宝生物工程公司); 抗 IRAK-1 抗体, 抗 TRAF-6 抗体、抗 NF- κ B p65 抗体 (美国 abcam 公司)。

1.2 实验分组及处理

将体外培养的 NR8383 细胞按每孔 1.5×10^6 个接种至 6 孔板, 每孔 2 mL, 每组 2 个复孔。转染组转染 50 nmol/L 的 Pre-miRTM miR-146a 前体, 对照组转染 50 nmol/L 的 CyTM3 标记的 Pre-miRTM 阴性对照, 摇匀后继续培养 24 h, 随后加入 $1 \mu\text{g/mL}$ 终质量浓度的 LPS 处理细胞 6 h, 离心收集细胞和上清液, -80°C 保存。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 免疫荧光法观察 NF- κ B p65 核移位情况 将细胞爬

片放置于 24 孔板; 甲醇丙酮固定细胞, 0.5% TritonX-100 PBS 透化细胞; 再放入含 10% 驴血清的 PBS 中 4°C 封闭; 孵育一抗: 用 0.5% TritonX-100 PBS 稀释兔抗 NF- κ B p65 (1:50), 常温下孵育 4 h 后漂洗; 孵育二抗: 用 10% 驴血清的 PBS 稀释 Alexa Flour 488 驴抗兔绿色荧光标记二抗 (1:200), 室温下孵育 20 min 后漂洗; 用 Dapi 染核, 滴加防荧光猝灭剂、固定封片, 在 Olympus IS71 倒置荧光显微镜下拍照分析。

1.3.2 ELISA 检测 TNF- α 蛋白含量 收集细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒操作说明书步骤操作检测 TNF- α 蛋白含量。

1.3.3 RT-qPCR 检测 IRAK-1、TRAF-6 及 TNF- α mRNA 表达

采用 TRIzol 法提取细胞内总 RNA, 通过紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性及纯度。按照 PrimeScript[®] 逆转录试剂盒说明书操作, 所有操作均在冰上完成。10 μL 的逆转录反应体系: PrimeScript 缓冲液 2 μL , PrimeScript 逆转录酶复合物 10.5 μL , 多聚胸腺嘧啶引物 0.5 μL , 随机的 6 核苷酸引物 0.5 μL , 总 RNA 500 ng, 加无核酶水至总体积 10 μL 。反应条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s。20 μL 的 PCR 反应体系包括: cDNA 2 μL , 上游引物 0.8 μL , 下游引物 0.8 μL , SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 10 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , 无核酶水 6 μL 。反应条件: 95°C 30 min, 40 个扩增循环 (95°C 5 s, 57°C 20 s, 72°C 27 s)。选取 β -actin 作为内参, 检测 IRAK-1 mRNA、TRAF-6 mRNA 及 TNF- α mRNA 的表达, 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。引物序列及长度见表 1。

表 1 PCR 引物序列及扩增目的 DNA 片段长度
Table 1 Sequences of PCR primers and the length

| 基因名称 | 寡核苷酸序列 (5'→3') | 产物长度 (bp) |
|----------------|-----------------------------|-----------|
| β -actin | 上游引物: TACTGCCCTGGCTCCTAGCA | 101 |
| | 下游引物: TGCACACTGAGCCAGGATAG | |
| TNF- α | 上游引物: GGCAGCCTGTCCCTGAAGAG | 172 |
| | 下游引物: GTAGCCACGTCGTAGCAAACC | |
| TRAF6 | 上游引物: AGGTACAATACGCCCTCACC | 291 |
| | 下游引物: GCTACACGCTGCATCACTA | |
| IRAK1 | 上游引物: CTGCCTCCACCTTCCTCTCC | 140 |
| | 下游引物: CTCTGGCCTTGGCTGTATGG | |

1.3.4 IRAK-1、TRAF-6、NF- κ B p65 蛋白表达 收集细胞, 离心, 弃上清, 提取总蛋白或分别提取胞核蛋白、浆

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.04.017

基金项目: 国家自然科学基金 (81060152); 国家自然科学基金青年基金 (81101410)

作者单位: 276003 山东省临沂, 临沂市人民医院重症医学科 (张建国、陈晓娟); 南昌大学第一附属医院重症医学科 (丁成志、邵强、曾振国、刘芬、钱克俭)

通信作者: 钱克俭, Email: qkj0607@sohu.com

蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。完成聚丙烯酰胺凝胶电泳(每孔加样 20 μL)、转膜、封闭,孵育一抗,兔抗 IRAK-1 (1:2000)、兔抗 TRAF-6 (1:1000)、兔抗 NF-κB p65 (1:500) 和鼠抗 β-actin (1:3000) /兔抗 Lamin B1 (1:1000), 4 ℃ 孵育过夜,漂洗 3 次;孵育二抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG (1:4000), 37 ℃ 孵育 1-2 h,漂洗 3 次,暗室内曝光、显影并定影,行 X 胶片扫描,通过 Quantity One 软件进行数据分析,检测 IRAK-1、TRAF-6 及胞浆 NF-κB p65 蛋白以 β-actin 作为内参,细胞核内 NF-κB p65 蛋白以 Lamin B1 作为内参。

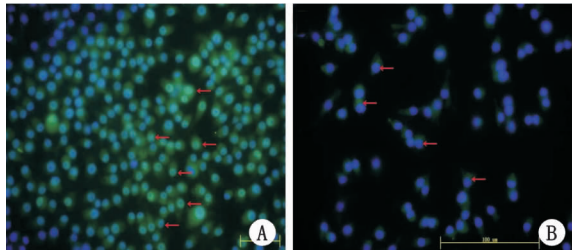
1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两样本比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 miR-146a 对 LPS 诱导的 NR8383 细胞 NF-κB p65 核移位的影响

2.1.1 免疫荧光法观察细胞 NF-κB p65 核移位的变化 倒置荧光显微镜下观察到 NF-κB p65 呈绿色荧光, Dapi 染核后呈蓝色荧光。与对照组比较,观察到转染组 NF-κB p65 胞核中表达减少,胞浆中增多。见图 1。



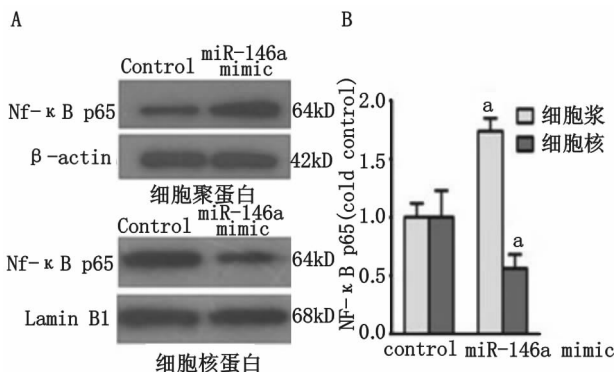
A: LPS 诱导的对照组 NR8383 细胞; B: 转染 miR-146a 组 NR8383 细胞

图 1 过表达 miR-146a 对 LPS 诱导的 NR8383 细胞 NF-κB p65 核移位的影响 (×400)

2.1.2 Western blotting 检测细胞浆和细胞核内 NF-κB p65 蛋白的表达变化 与各自对照组比较,转染组细胞核中 NF-κB p65 蛋白含量降低至 (0.56 ± 0.12) 倍, $P < 0.05$; 胞浆中增加为 (1.74 ± 0.11) 倍, $P < 0.05$ 。见图 2。

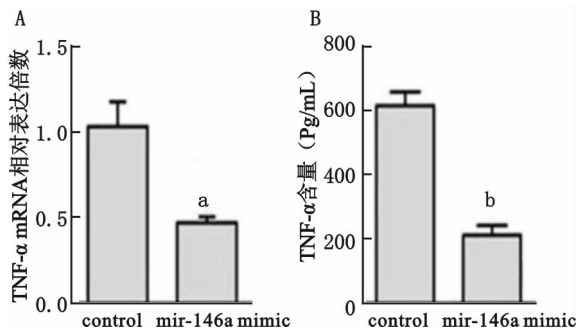
2.2 过表达 miR-146a 对 LPS 刺激的 NR8383 细胞 TNF-α 表达的影响

与对照组相比较, RT-qPCR 检测 NR8383 细胞转染 miR-146a 后 TNF-α mRNA 表达下调至 (0.47 ± 0.06) 倍 ($P < 0.05$); ELISA 检测 TNF-α 蛋白表达也明显下降 (211.5 ± 30.39) pg/mL vs. (616.6 ± 42.28) pg/mL, $P < 0.01$ 。见图 3。



A: western blotting 检测过表达 miRNA-146a 后 NR8383 细胞中 NF-κB p65 蛋白表达 B: Quantity One 软件对 A 图条带进行灰度值分析。与对照组比较, $^a P < 0.05$

图 2 过表达 miR-146a 对 LPS 诱导的 NR8383 细胞 NF-κB p65 蛋白的表达影响



A: RT-qPCR 检测过表达 miRNA-146a 后 NR8383 细胞中 TNF-α mRNA 表达变化; B: ELISA 检测过表达 miRNA-146a 后 NR8383 细胞中 TNF-α 蛋白表达变化; 与各自对照组比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$

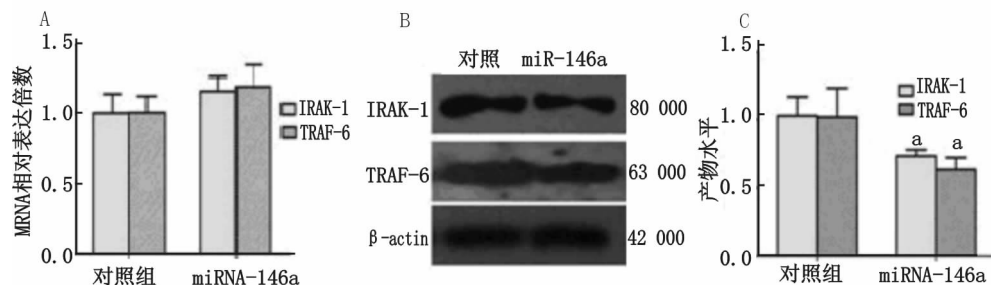
图 3 过表达 miRNA-146a 对 LPS 诱导的 NR8383 细胞 TNF-α 表达的影响

2.3 过表达 miR-146a 对 LPS 刺激的 NR8383 细胞 IRAK-1 和 TRAF-6 蛋白表达的影响

与对照组比较,过表达 miR-146a 后,转染组 IRAK-1 mRNA 增加为 (1.16 ± 0.1) 倍, TRAF-6 mRNA 增加为 (1.19 ± 0.16) 倍,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);转染组 IRAK-1 蛋白下降为 (0.73 ± 0.05) 倍, TRAF-6 蛋白下降为 (0.64 ± 0.09) 倍,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

miR-146a 是第一个被发现能够调节免疫系统的微小 RNA,当机体存在有感染、肿瘤时 miR-146a 表达上调^[7-9],上调人单核细胞白血病细胞 (THP-1 细胞) 的 miR-146a 后将负性调控炎症因子的释放^[10]。研究证实在 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞炎症反应中 miR-146a 表达上调;本研究发现过表达 miR-146a 后,用 LPS 刺激肺泡巨噬细胞, NF-κB 核移位受到抑制, TNF-α mRNA 表达下降,上清液中 TNF-α 蛋白含量也明显下降,提示 miR-146a 能够抑制 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞炎症反应。



A: RT-qPCR 检测过表达 miRNA-146a 后 NR8383 细胞中 IRAK-1 和 TRAF-6 mRNA 的表达变化; B: Western blotting 检测过表达 miRNA-146a 后 NR8383 细胞中 IRAK-1 和 TRAF-6 蛋白的表达变化; C: Quantity One 软件对 B 图条带进行灰度值分析, 与对照组比较, $^a P < 0.05$

图 4 过表达 miRNA-146a 对 NR8383 细胞 IRAK-1 和 TRAF-6 表达的影响

笔者进一步实验发现, 过表达 miR-146a 后, IRAK-1 mRNA 和 TRAF-6 mRNA 表达量无明显变化, 而 IRAK-1 和 TRAF-6 蛋白表达下降。Taganov 等^[11] 研究发现 LPS 刺激 THP-1 细胞后, miR-146a 表达上调, 并通过突变试验和荧光素酶报道基因试验证实, miR-146a 的靶基因是 TLRs/NF- κ B 通路中的两个接头蛋白编码基因 IRAK-1 和 TRAF-6。TLRs/NF- κ B 是经典的炎症信号通路, 当 LPS 刺激肺泡巨噬细胞, 可与细胞膜表面 TLR4 结合, 导致 IRAK-1 自身磷酸化, 继而活化 TRAF-6, 使其与转化生长因子 β 活化激酶 1 (TAK1) 及 TAK1 的结合蛋白 (TAB) 形成复合物, 导致 I κ B 磷酸化和降解, 最终使 NF- κ B 移位进入核内, 启动相关基因转录翻译生成 TNF- α 炎症因子^[12-13]。有研究表明过表达 IRAK-1 能够使 HEK293 细胞和 THP-1 细胞中 NF- κ B 呈剂量依赖性增加, 同时 TNF- α 也增加, 而敲除 IRAK-1 基因能降低 LPS 诱导的 THP-1 细胞^[14-15] 炎症反应; 同样过表达或者敲除 TRAF-6 也产生相同的作用。

参考文献

[1] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. Cell, 2009, 136 (4): 642-655.

[2] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. Cell, 2005, 120 (1): 15-20.

[3] 熊旭明, 张振辉, 江子欣, 等. MicroRNA-29a 在脂多糖诱导人单核细胞凋亡中的作用和机制 [J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22 (1): 40-45.

[4] Moschos SA, Williams AE, Perry MM, et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following Lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids [J]. BMC Genomics, 2007, 17 (8): 240.

[5] 曾振国, 龚洪翰, 李勇, 等. 脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞中 microRNA-146a 与 TNF- α 的相关性研究 [J]. 中华急诊医学杂志

志, 2012, 21 (7): 709-712.

[6] 刘芬, 曾振国, 聂成, 等. 转染微小 RNA-146a 对肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 表达的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (6): 335-338.

[7] Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Tregcell-mediated regulation of Th1 responses [J]. Cell, 2010, 142 (6): 914-929.

[8] Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, et al. NF-kappa B control of T cell development [J]. Nat Immunol, 2014, 15 (1): 15-25.

[9] 曾振国, 邵强, 李勇, 等. 白藜芦醇对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a 表达的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23 (1): 30-33.

[10] Pauley KM, Satoh M, Pauley BA, et al. Formation of GW/P bodies as marker for microRNA-mediated regulation of innate immune signaling in THP-1 cells [J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88 (2): 205-212.

[11] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103 (33): 12481-12486.

[12] Li CH, Liu J, An M, et al. Bacterial lipoprotein-induced tolerance is reversed by overexpression of IRAK-1 [J]. Immunol Cell Biol, 2012, 90 (3): 314-320.

[13] Kanarek N, Ben-Neriah Y. Regulation of NF-kappaB by ubiquitination and degradation of the IkkappaBs [J]. Immunol Rev, 2012, 246 (1): 77-94.

[14] Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses [J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22 (2): 240-273.

[15] Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK [J]. Immunol Rev, 2012, 246 (1): 95-106.

(收稿日期: 2014-09-16)

(本文编辑: 何小军)