

• 论著 •

微小 RNA-146a 在脂多糖诱导肺泡巨噬细胞中的表达

刘芬 曾振国 丁成志 邵强 李勇 钱克俭

【摘要】 目的 观察脂多糖(LPS)诱导对 NR8383 肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a(miRNA-146a)表达的影响。方法 将体外培养的肺泡巨噬细胞株 NR8383 分成 LPS 刺激组和磷酸盐缓冲液(PBS)对照组,培养 6 h 后,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测细胞 miRNA-146a 的表达。结果 LPS 刺激组细胞培养上清液中 TNF- α 含量(ng/L)较 PBS 对照组明显升高(650.26 ± 40.53 比 6.23 ± 1.76 , $P < 0.01$),细胞 miRNA-146a 表达水平较 PBS 对照组上调了约(5.33 ± 0.81)倍($P < 0.01$)。结论 LPS 刺激后,miRNA-146a 在 NR8383 细胞中表达增高,其可能参与了 NR8383 肺泡巨噬细胞的炎症反应调控。

【关键词】 微小 RNA-146a; 肺泡巨噬细胞; 炎症反应

Expression of microRNA-146a in lipopolysaccharide challenged alveolar macrophages in vitro LIU Fen, ZENG Zhen-guo, DING Cheng-zhi, SHAO Qiang, LI Yong, QIAN Ke-jian. Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Corresponding author: QIAN Ke-jian, Email: qkj0607@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of microRNA-146a (miRNA-146a) in NR8383 alveolar macrophages treated with lipopolysaccharids (LPS). **Methods** NR8383 alveolar macrophages were divided into two groups: LPS treated group and phosphate buffer saline (PBS) control group, and they cultured for 6 hours. The production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the supernatant of cells was determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of miRNA-146a of cells was detected by real-time polymerase chain reaction (PCR). **Results** Compared with PBS control group, the TNF- α content (ng/L) in LPS treated group was significantly increased (650.26 ± 40.53 vs. 6.23 ± 1.76 , $P < 0.01$), and miRNA-146a in LPS treated group increased by about (5.33 ± 0.81) folds ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of miRNA-146a was increased in LPS treated NR8383 cells, and miRNA-146a may be involved in the modulation inflammatory response of the NR8383 alveolar macrophage.

【Key words】 MicroRNA-146a; Alveolar macrophage; Inflammatory response

肺泡巨噬细胞是肺泡腔内常驻的吞噬细胞,是肺组织天然免疫系统的第一道防线,肺泡巨噬细胞的活化可释放多种前炎症因子和炎症介质,而过度的炎症因子会产生免疫损伤,最终可导致急性肺损伤的发生^[1-2]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA,可通过识别靶基因 mRNA 的 3'端非编码区(3'UTR),并与之结合阻止其翻译或使 mRNA 降解来抑制靶基因的表达。人们通过生物信息学手段发现,人类有 1/3 以上的蛋白编码基因受 miRNAs 调节^[3]。最近的研究表明,在人单核细胞株白血病细胞(THP-1)中,miRNA-146a 可以调控炎症反应^[4-5]。但 miRNA 的表达具有细胞和种属的特异性^[6]。因此,为了明确

miRNA-146a 在肺泡巨噬细胞中的表达情况,本实验中选取 NR8383 肺泡巨噬细胞作为研究对象,用脂多糖(LPS)刺激 NR8383 细胞株,采用实时聚合酶链反应(real-time PCR)检测 miRNA-146a 的表达情况,分析探讨其与肺泡巨噬细胞炎症的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料:大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 (购于中国科学院细胞库);Ham F-12K 培养基(Sigma-Aldrich,美国);胎牛血清(HyClone,美国);LPS(E. coli, O111:B4, Sigma-Aldrich, 美国);大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司);TRIzol (Invitrogen, 美国);TaqMan[®] MicroRNA 逆转录试剂盒, TaqMan[®] Universal PCR 检测试剂盒, TaqMan[®] MicroRNA 检测试剂盒(ABI, 美国)。氟仿、异丙醇及无水乙醇等均为国产分析纯。

1.2 细胞培养:NR8383 细胞培养于含 15%胎牛血清、1.5 g/L 碳酸氢钠、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 Ham F-12K 培养基中,置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.09.009

基金项目:国家自然科学基金项目(81060152);江西省自然科学基金项目(2009GZY0215)

作者单位:330006 江西,南昌大学第一附属医院重症医学科(刘芬、曾振国、丁成志、邵强、钱克俭),肿瘤科(李勇)

通信作者:钱克俭,Email:qkj0607@sohu.com

中。2~3 d 更换 1 次培养液,3~4 d 传代 1 次。

1.3 细胞处理及分组:按 1×10^6 个/ml 将 NR8383 细胞接种于 6 孔板,每孔 2 ml。实验分为两组:
①LPS 刺激组:培养基中加入终浓度 $1 \mu\text{g/ml}$ LPS;
②磷酸盐缓冲液(PBS)对照组:培养基中加入与 LPS 溶液等体积的 PBS。两组均培养 6 h 后离心收集培养上清液和细胞沉淀,上清液于 -80°C 保存用于 ELISA 检测,细胞沉淀用于提取总 RNA。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 TNF- α 含量测定:采用 ELISA 检测细胞培养上清液中 TNF- α 含量,按照 ELISA 试剂盒使用说明书进行操作。

1.4.2 miRNA-146a 表达测定:用 TRIzol 提取细胞沉淀中的总 RNA。所得总 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 的完整性和纯度,紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度及纯度。采用逆转录试剂盒进行反转录;反应条件: 16°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min。采用 real-time PCR 测定。按 TaqMan[®] MicroRNA 检测试剂盒说明书操作。 $20 \mu\text{l}$ 的反应体系包括: $1.00 \mu\text{l}$ 的探针、 $1.33 \mu\text{l}$ 的逆转录产物。在 ABI 7300 定量 PCR 仪上扩增和检测,反应条件: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 60 s,40 个扩增循环。选取 U6 snRNA 作为内参照,miRNA-146a 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 17.0 统计软件,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本比较采用 t 检验,方差不齐时采用近似 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学改变(图 1):正常 NR8383 细胞株生长特性为混合型,在培养基中部分贴壁,部分悬浮生长。与 PBS 对照组细胞相比,LPS 刺激 6 h 后,细胞贴壁能力下降,贴壁细胞减少,细胞间隙加大,悬浮细胞增多,细胞生长较缓慢。

2.2 LPS 对细胞培养上清液中 TNF- α 含量的影响(表 1):LPS 刺激 6 h 后 NR8383 细胞培养上清液中 TNF- α 水平显著高于 PBS 对照组($P < 0.01$)。

表 1 LPS 刺激 NR8383 细胞后培养上清液中 TNF- α 含量及 miRNA-146a 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TNF- α 含量(ng/L)	miRNA-146a 表达
对照组	5	6.23 ± 1.76	1.00 ± 0.00
LPS 组	5	$650.26 \pm 40.53^*$	$5.33 \pm 0.81^*$

注:LPS:脂多糖,NR8383:肺泡巨噬细胞株,TNF- α :肿瘤坏死因子- α ;与对照组比较,* $P < 0.01$

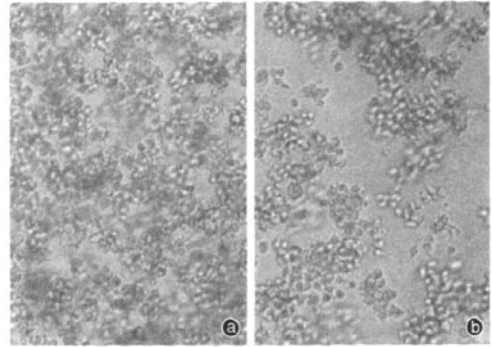


图 1 倒置相差显微镜下直接观察肺泡巨噬细胞 NR8383 的形态学改变 磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(a)培养 6 h 后细胞部分贴壁,部分悬浮生长;脂多糖(LPS)刺激组(b)培养 6 h 后细胞贴壁能力下降,贴壁细胞减少,细胞间隙加大,悬浮细胞增多,细胞生长缓慢 $\times 100$

2.3 LPS 对 NR8383 细胞 miRNA-146a 表达的影响(表 1):与 PBS 对照组比较,LPS 刺激组 6 h 后 NR8383 细胞 miRNA-146a 表达水平上调了(5.33 ± 0.81)倍($P < 0.01$)。

3 讨论

LPS 为革兰阴性菌外壁的主要成分,可以通过单核/巨噬细胞表面的 Toll 样受体 4(TLR4)来活化核转录因子- κB (NF- κB),从而诱导包括 TNF- α 在内的大量前炎症介质和细胞因子表达^[7-8]。在本实验中,LPS 刺激 NR8383 肺泡巨噬细胞后细胞培养上清液中 TNF- α 水平明显增高。最近的研究表明,有多种 miRNAs 参与了固有免疫反应,如 miRNA-146a、miRNA-155、miRNA-9 等^[9-10]。在这些 miRNAs 中,对 miRNA-146a 的研究尤显突出。Taganov 等^[4]研究发现 LPS 刺激 THP-1 细胞可使 NF- κB 依赖的 miRNA-146a 升高,并且通过荧光素酶报告基因试验和突变试验证实,TLR4 信号通路中 NF- κB 上游的两个重要基因,即白细胞介素-1 受体相关激酶 1(IRAK1)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)是 miRNA-146a 的靶基因。且在转染 miRNA-146a 模拟物后,THP-1 细胞可以下调由 LPS 导致的炎症因子升高^[5]。但 miRNA 的表达具有细胞和种属特异性^[6]。本研究显示,采用 LPS 刺激 NR8383 细胞也能使 TNF- α 和 miRNA-146a 的表达水平上调,因此推测 miRNA-146a 参与了 NR8383 细胞炎症反应的调控作用。研究结果提示,有必要进一步探讨 miRNA-146a 对 NR8383 细胞炎症反应调控的具体机制和过程,为抑制肺泡巨噬细胞炎症反应提供一条新途径。

参考文献

- [1] Goya T, Abe M, Shimura H, et al. Characteristics of alveolar macrophages in experimental septic lung. *J Leukoc Biol*, 1992, 52:236-243.
- [2] Lomas-Neira J, Chung CS, Perl M, et al. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290:L51-58.
- [3] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120:15-20.
- [4] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappa B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:12481-12486.
- [5] 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. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88:205-212.
- [6] Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15:200-205.
- [7] 王进, 杨光田, 乔礼芬, 等. 醒脑静注射液对内毒素诱导大鼠肺泡巨噬细胞核转录因子- κ B 激活和细胞因子产生的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15:212-215.
- [8] 刘芬, 曾振国, 江榕, 等. 高容量血液滤过减轻脂多糖诱导犬急性肺损伤. *基础医学与临床*, 2008, 28:841-845.
- [9] Tsitsiou E, Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9:514-520.
- [10] 杜林林, 马中富. MicroRNA 与免疫反应及脓毒症. *中国危重病急救医学*, 2009, 21:501-503.

(收稿日期:2010-07-31)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

血清 K^+ 含量可作为衡量失血性休克时组织缺氧程度的潜在指标

最近,巴西学者通过研究失血性休克猪血清 K^+ 的变化,发现失血性休克早期血 K^+ 含量上升,其上升与血流动力学变化直接相关,且与组织缺氧指标联系密切。研究人员选取 8 只猪制备控制性失血性休克模型,开始时以 50~70 ml/min 速度抽血,使平均动脉压(MAP)在 10 min 内降至 60 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa);然后调整抽血速率,使 MAP 每 2~4 min 降低 10 mm Hg。MAP 为 60、50、40、30、20、10 mm Hg 时,采集动脉血和混合静脉血标本,分析血液中血氧饱和度、氧分压、二氧化碳分压(PCO₂)、血 K^+ 、乳酸、碳酸氢盐、血红蛋白、pH 值、剩余碱等指标。学者们发现,在失血性休克早期,所有动物血清 K^+ 含量明显升高,其升高水平与血流动力学的变化一致;MAP 为 60、50、40、30、20 mm Hg 时高钾血症($K^+ > 5$ mmol/L)的发生率分别为 12.5%、12.5%、62.5%、87.5%、100.0%。血 K^+ 含量与血中乳酸、混合静脉血氧饱和度、pH 值、PCO₂ 密切相关(相关系数分别为 0.82、0.87、0.83 和 0.82)。研究人员认为,在失血性休克时血 K^+ 含量在一定程度上反映了机体组织的缺氧程度。

刘先奇,编译自《J Trauma》,2010,68:1335-1341;胡森,审校

静脉注射硫化氢不能改善失血性休克猪的存活率

以往研究提示低温可改善失血性休克患者的生存率,吸入硫化氢可降低小鼠和兔的体温并降低其新陈代谢。曾有假说称静脉注射硫化氢可以降低体温及氧耗量,从而改善失血性休克猪的生存率,近日英国学者就此假说进行了实验。他们以器官损伤指标(如丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸磷酸激酶(CPK)、肌酐和肌钙蛋白等)对实验结果进行评价,并通过监测蛋白硫醇的水平观察硫化氢在体内的代谢。研究人员对失血性休克猪进行限制性补液,使其平均动脉压维持在 30 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)左右,在此基础上实验组($n=8$)静脉输入硫化氢 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,对照组($n=8$)静脉输入安慰剂 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。研究结果显示,两组动物 24 h 存活率未见明显差异,心率均有所增加;对照组动物在失血性休克代偿期心排量得到更好的维持。两组动物在失血性休克及补液复苏期的体温及氧耗量未见明显差异;器官损伤指标及蛋白硫醇均显著增高,但两组间差异无统计学意义。研究者认为,静脉输注硫化氢不能降低失血性休克动物的体温及氧耗量,对其存活率也无明显影响。

方涛,编译自《Shock》,2010-06-22(电子版);胡森,审校

失血性休克引起的炎症反应可影响 Toll 样受体 9 在骨髓源性细胞和实质细胞中的信号转导

美国学者研究发现,由创伤性失血性休克导致的炎症反应可最终发展为多器官功能障碍。关于创伤性失血性休克途径诱发炎症的机制尚未明确。研究人员假设 DNA 传感器 Toll 样受体 9(TLR9)在创伤性失血性休克后的炎症信号反应中发挥作用。研究者利用小鼠建立了一个 TLR9 的无功能突变模型,证明 TLR9 在双侧股骨骨折的失血性休克模型中可作用于原始细胞中的操纵因子导致肝细胞损伤;研究中发现循环血液中 DNA 含量和组织的损伤程度呈正相关。嵌合体小鼠实验结果表明,骨髓细胞和实质细胞中的 TLR9 在其介导的肝和组织损伤过程中发挥重要作用。同样,骨髓衍生细胞及实质细胞中 TLR9 在其介导的肝及组织损伤、创伤性失血性休克引起的全身炎症反应中发挥了重要作用。研究者认为,DNA 的释放可能对于重伤后的炎症反应起到一个驱动作用,并可作为组织损伤的标志。

李娟,编译自《Shock》,2010,34:75-82;胡森,审校