

· 论著 ·

微小 RNA-141 对人单核细胞合成高迁移率族蛋白 B1 的调控作用

张振辉 陈晓辉 江子欣 陈伟燕 熊旭明

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-141(miR-141)对人单核细胞株 THP-1 高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)表达的调控作用。方法 体外培养 THP-1 细胞,化学合成人 miR-141 的拟似物和抑制剂。用脂质体 Lipofectamine RNAi MAX 转染 miR-141 的拟似物或抑制剂进入 THP-1 细胞,转染 48 h 后分别用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 HMGB1 的 mRNA 和蛋白表达。结果 转染 100 nmol/L miR-141 拟似物后,可提高 THP-1 细胞 miR-141 的表达水平(35.33 ± 7.24 比 1.21 ± 0.20 , $t = -8.408$, $P = 0.010$);转染 100 nmol/L miR-141 抑制剂后,可抑制 THP-1 细胞 miR-141 的表达水平(0.55 ± 0.12 比 1.09 ± 0.05 , $t = 7.473$, $P = 0.002$)。与相应对照组比较,THP-1 细胞在过表达 miR-141 后, HMGB1 的 mRNA 和蛋白表达明显下调(mRNA: 0.43 ± 0.06 比 0.97 ± 0.08 , $t = 9.760$, $P = 0.001$; 蛋白: 0.63 ± 0.12 比 1.00 ± 0.11 , $t = 2.991$, $P = 0.040$);而抑制 THP-1 细胞中 miR-141 后, HMGB1 的 mRNA 和蛋白表达均明显上调(mRNA: 2.13 ± 0.11 比 1.16 ± 0.13 , $t = -9.977$, $P = 0.001$; 蛋白: 1.78 ± 0.04 比 0.96 ± 0.09 , $t = -13.778$, $P = 0.000$)。结论 miR-141 能调控人单核细胞 HMGB1 的表达水平,提示 miR-141 在调控免疫细胞的炎症反应过程中具有重要的作用。

【关键词】 微小 RNA; 炎症因子; 高迁移率族蛋白 B1

Role of microRNA-141 in the regulation of synthesis of high mobility group protein B1 in THP-1 cells
ZHANG Zhen-hui, CHEN Xiao-hui, JIANG Zi-xin, CHEN Wei-yan, XIONG Xu-ming. Department of Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China
Corresponding author: XIONG Xu-ming, Email: xiongxuming9@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of microRNA-141 (miR-141) on expression of high mobility group protein B1 (HMGB1) in human monocytes THP-1 cell line. **Methods** THP-1 cells were transfected with miR-141 mimic or inhibitor (100 nmol/L) for 48 hours with lipofectamine RNAi MAX. The levels of miR-141 and HMGB1 mRNA in the THP-1 cells were detected by real-time fluorescence quantitation reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and HMGB1 protein was determined with Western blotting. **Results** The levels of miR-141 could be up regulated (35.33 ± 7.24 vs. 1.21 ± 0.20 , $t = -8.408$, $P = 0.010$) or down regulated (0.55 ± 0.12 vs 1.09 ± 0.05 , $t = 7.473$, $P = 0.002$) after being transfected with 100 nmol/L miR-141 mimic or inhibitor for 48 hours by lipofectamine RNAi MAX in THP-1, and the level of HMGB1 mRNA and protein decreased (mRNA: 0.43 ± 0.06 vs. 0.97 ± 0.08 , $t = 9.760$, $P = 0.001$; protein: 0.63 ± 0.12 vs. 1.00 ± 0.11 , $t = 2.991$, $P = 0.040$) or increased (mRNA: 2.13 ± 0.11 vs. 1.16 ± 0.13 , $t = -9.977$, $P = 0.001$; protein: 1.78 ± 0.04 vs. 0.96 ± 0.09 , $t = -13.778$, $P = 0.000$) simultaneously compared with the control group. **Conclusion** miR-141 is involved in regulation of inflammation through HMGB1 gene and protein pathway, suggesting that miR-141 plays an important role in regulating immune cells during the inflammatory response.

【Key words】 microRNA; Inflammatory factor; High mobility group protein B1

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种内源性非编码 RNA 分子,由 21 ~ 25 个核苷酸组成^[1-3]。研究显示,miRNAs 可通过参与调控多种致炎基因表达,从而影响炎性细胞增殖、分化及炎症因子的产生和释放等,参与脓毒症的发病过程^[4-5]。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)为重要的晚期炎症因子,参与了

免疫细胞炎症因子的合成和释放^[6-10],并在脓毒症的延迟性致死效应中发挥了重要作用^[11-14]。尽管目前对 HMGB1 在脓毒症过程中的表达调控机制有了充分认识,但 HMGB1 是否受 miRNA 的调控目前仍缺乏报道。我们应用生物信息学软件匹配,发现微小 RNA-141(miR-141)有可能直接作用于 HMGB1,参与 HMGB1 的表达调控。因此,本研究通过体外合成 miR-141 的拟似物(mimic)和抑制剂(inhibitor),采用细胞转染方法,在人单核细胞株 THP-1 细胞内上调或下调 miR-141 的表达,观察细胞中 HMGB1 的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.10.007

基金项目: 广东省自然科学基金(10151018201000018, S2012010008701, S2012010008971)

作者单位: 510260 广东,广州医科大学附属第二医院重症医学科
通信作者: 熊旭明, Email: xiongxuming9@126.com

mRNA 及蛋白表达变化, 阐明 miR-141 与 HMGB1 的关系, 以期进一步完善 HMGB1 的调控机制。

1 材料与与方法

1.1 细胞株及实验试剂: 人单核细胞株 THP-1 购自上海细胞库。DMEM 细胞培养基、Opti-MEM 细胞转染培养基、胎牛血清均购自美国 GIBCO 公司; HMGB1、内参照蛋白三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) 抗体购自美国赛信通公司; 细胞转染试剂脂质体 Lipofectamine RNAi MAX、RNA 抽提裂解液 TRIzol、荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及传代方法: 将 THP-1 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱静置培养。该细胞株属人类单核细胞株, 在培养液中呈簇集状悬浮生长, 细胞密度控制在 1 × 10⁶/mL, 每 2 天换液 1 次, 每 4 天传代 1 次。

1.2.2 实验分组: 将实验细胞分为 miR-141 拟似物转染组(miR-141 转染组)、miR-141 拟似物转染对照组(miR-141 转染对照组)、miR-141 抑制剂转染组(miR-141 抑制组)、miR-141 抑制剂转染对照组(miR-141 抑制对照组)。

1.2.3 寡核苷酸序列设计与合成: miR-141 拟似物根据其成熟体序列(miRNA 数据库, 登记号: MIMAT 0000432)合成。miR-141 抑制剂用 miR-141 成熟体的反向互补序列, 并对所有碱基进行 2' 甲氧修饰。RNA 的阴性对照序列为与哺乳动物基因组无同源性的序列, 由上海吉玛公司设计与合成。所有 PCR 引物均由上海英骏生物公司合成(表 1)。

1.2.4 细胞转染: miRNA 的单独转染采用转染试剂 Lipofectamine RNAi MAX (按说明书操作)。主要步骤: 6 孔板中 THP-1 细胞更换新鲜的 RPMI 1640 培养基(不含胎牛血清和抗菌药物), 每孔 2 mL; 将 miRNA 稀释于 200 μL Opti-MEM 培养基中, 每管加入 8 μL Lipofectamine RNAi MAX, 室温放置 15 min; 将 RNAi MAX 与 miRNA 的稀释液加入到各孔细胞中, 混匀后培养箱中培养 48 h, 再按实验需要处理细胞。miRNA 的终浓度为 100 nmol/L。

1.2.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测 HMGB1 mRNA 表达: 细胞总 RNA 提取按 TRIzol 试剂盒说明书操作; 使用逆转录反应试剂盒, 对反应产物进行 PCR 扩增, 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行操作, 普通基因使用 18S 作为内参照, miRNA 采用 U6 作为内参照。获得循环阈值(Ct)后, 应用比较 Ct 法进行

表 1 寡核苷酸序列

基因名称	寡核苷酸序列
hsa-miR-141 拟似物	正义链: 5'-UAACACUGUCUGGUAAGAUGG-3' 反义链: 5'-AUCUUUACCAGACAGUGUUAUU-3'
hsa-miR-141 抑制剂	5'-CCAUCUUUACCAGACAGUUA-3'
miRNA 拟似物 阴性对照	正义链: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 反义链: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
miRNA 抑制剂 阴性对照	5'-CAGUACUUUGUGUAGUACAA-3'
18S- QPCR	正义链: 5'-ACCGCAGCTAGGAATAATGGA-3' 反义链: 5'-GCCTCAGTCCGAAAACCA-3'
HMGB1- QPCR	正义链: 5'-TTCAAGGAAGAGAAAACAACAA-3' 反义链: 5'-ATGGCAGGTATTATTAAGGAGG-3'
U6 RT 引物	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'
U6-PCR 引物	正义链: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' 反义链: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'
hsa-miR-141 RT 引物	5'-GTCGTATGTTGGCGTGTGCTGGAGTCC GCAATTGCACTGGATACCTCTCCATAA-3'
hsa-miR-14 PCR 引物	正义链: 5'-GCCTGTAGCTTTTCTACT-3' 反义链: 5'-CACGGCGTTCGTCGAGT-3'

注: hsa-miR-141 为人微小 RNA-141, QRCT 为荧光聚合酶链反应, HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1, RT 为逆转录

相对定量, 目标基因的相对定量用 2^{-ΔΔCt} 计算。

1.2.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 HMGB1 蛋白表达: 收集细胞悬液, 离心去上清液, 在细胞沉淀中加入蛋白裂解液, BCA 法进行蛋白定量后用于凝胶电泳(恒压电泳, 电泳时间根据 Marker 位置确定); 恒流 276 mA 转膜 2.5 h; 室温封闭 1 h; 一抗 4 °C 孵育过夜; 二抗室温孵育 1 h; 用化学发光试剂盒显影 X 线片, 洗片机冲洗胶片, 扫描仪扫描胶片后用 Bio-Rad 的胶片灰度分析软件分析。

1.3 统计学分析: 使用 SPSS 15.0 统计软件, 所有计量资料以均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 寡核苷酸转染效率: 图 1 结果显示, 用脂质体 Lipofectamine RNAi MAX 转染体外合成的 miRNA 拟似物阴性对照序列(用 Dy547 荧光标记)能顺利进入 THP-1 细胞。

2.2 过表达或抑制 miR-141 的效率验证: 在转染 100 nmol/L miR-141 拟似物后, THP-1 细胞 miR-141 表达水平较对照组明显增加(35.33 ± 7.24 比 1.21 ± 0.20, *t* = -8.408, *P* = 0.010)。转染 100 nmol/L miR-141 抑制剂后, miR-141 表达水平较对照组明显下降(0.55 ± 0.12 比 1.09 ± 0.05, *t* = 7.473, *P* = 0.002)。

2.3 过表达 miR-141 对 HMGB1 的 mRNA 和蛋白水平的影响: THP-1 细胞转染 100 nmol/L miR-141 拟似物 48 h 后, 与对照组比较, HMGB1 的 mRNA 表

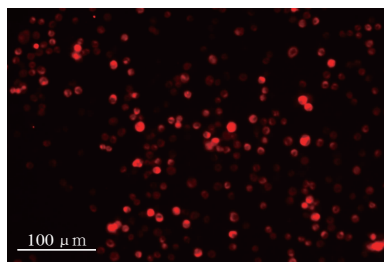
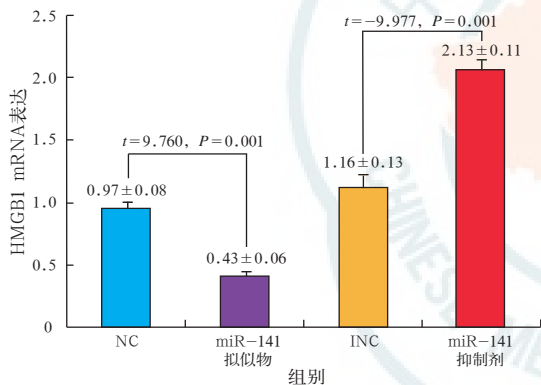


图 1 微小 RNA(miRNA)转染 THP-1 细胞的转染效率 采用 100 nmol/L 脂质体 Lipofectamine RNAi MAX 转染体外合成的 miRNA 拟似物阴性对照序列(用 Dy547 荧光标记)至 THP-1 细胞,48 h 后荧光显微镜下可观察到 miRNA 成功转染至细胞中,着红色部分为细胞质,其内或旁边的黑色空泡(未着红色)部分为细胞核

达水平明显下降,提示过表达 miR-141 能下调 HMGB1 的 mRNA 水平(图 2),同时也能下调 HMGB1 的蛋白水平(图 3)。



注:RT-PCR 为实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应,THP-1 为人单核细胞株,miR-141 为微小 RNA-141,HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1,NC 和 INC 分别为 miR-141 拟似物和 miR-141 抑制剂的阴性对照

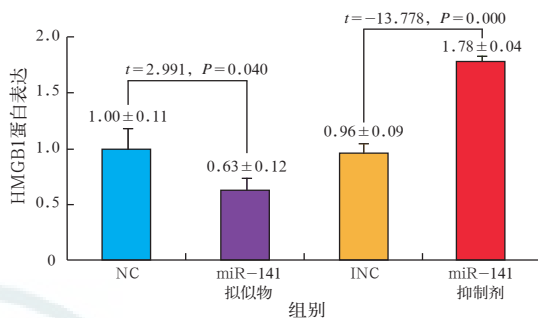
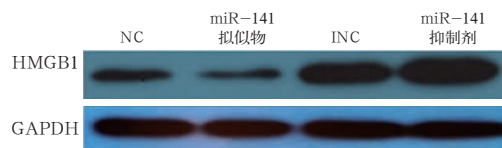
图 2 RT-PCR 检测 THP-1 细胞转染 miR-141 拟似物或抑制剂 100 nmol/L 48 h 后的 HMGB1 mRNA 表达水平

2.4 抑制 miR-141 对 HMGB1 的 mRNA 和蛋白水平的影响:THP-1 细胞转染 100 nmol/L miR-141 抑制剂 48 h 后,与对照组比较,HMGB1 的 mRNA 表达水平明显升高,提示使用 miR-141 抑制剂下调 miR-141 后,能上调 HMGB1 的 mRNA 水平(图 2),同时也能使 HMGB1 的蛋白水平上调。

3 讨论

近年来研究发现,HMGB1 是一种重要的脓毒症“晚期炎症因子”,可作为脓毒症防治研究的一个潜在分子靶点^[11-14]。HMGB1 发挥着促炎以及调节神经细胞轴突生长、肿瘤转移、动脉粥样硬化和血管损伤后再狭窄等多种病理生理效应^[15-19]。

miRNAs 可通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端非编



注:Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验,THP-1 为人单核细胞株,miR-141 为微小 RNA-141,HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1,GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶,NC 和 INC 分别为 miR-141 拟似物和 miR-141 抑制剂的阴性对照

图 3 Western blotting 检测 THP-1 细胞转染 miR-141 拟似物或抑制剂 100 nmol/L 48 h 后的 HMGB1 蛋白表达水平

码区(3'UTR),并与之结合阻止翻译或导致 mRNA 降解,从而抑制靶基因表达^[1-3]。Taganov 等^[4]以脂多糖诱导 THP-1 细胞后用 miRNA 芯片筛选发现,miR-146a、miR-155 和 miR-132 的表达上调;对 miR-146a 的进一步研究发现,脂多糖诱导的细胞内 miR-146a 水平升高,可抑制白细胞介素-1 受体相关激酶 1(IRAK-1)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)合成,下调核转录因子-κB(NF-κB)活性以抑制 Toll 样受体 4/ 白细胞介素-1(TLR4/IL-1)信号途径,从而抑制炎症反应。Bhaumik 等^[20]研究发现,在人成纤维细胞中,通过过表达 miR-146a/b 可下调 IRAK-1,从而抑制白细胞介素(IL-6、IL-8)释放。以上研究表明,部分 miRNA 是通过在转录后水平下调炎症因子信号通路靶点来调控炎症失衡的。HMGB1 作为脓毒症的重要炎症介质,在脓毒症发病中起重要作用^[21-26],miRNA 能否通过调控 HMGB1 水平,进而影响炎症反应的强度,目前仍缺乏报道。

有研究显示,miR-141 参与了调节肿瘤细胞生长迁移、肝纤维化过程,以及血管内皮细胞增殖等反应^[27-30]。本实验应用生物信息学软件,寻找可能作用于 HMGB1 靶点的 miRNA,结果提示,miR-141 有可能与 HMGB1 mRNA 序列中 3'UTR 非编码区结合, HMGB1 可能是 miR-141 的作用靶点,因此本实验用体外化学合成 miR-141 的拟似物和抑制剂进行细胞实验,采用分子生物学中的功能获取和功能缺失实验,验证 HMGB1 与 miR-141 的关系。实验首先

通过细胞转染的方法,将合成的携带荧光标记的 miRNA 拟似物对照片段导入 THP-1 细胞中,结果发现导入的效果良好,miRNA 均匀分布于 THP-1 细胞的胞质中,提示体外合成的 miRNA 寡核苷酸能够通过脂质体转染的方法导入 THP-1 细胞,在细胞质中发挥效应,且具有很高的转染效率。进而,我们将化学合成的 miR-141 拟似物和抑制剂采用同样的转染方法导入 THP-1 细胞中,在转染 48 h 后收集细胞,检测细胞内 miR-141 的变化,结果显示 miR-141 表达水平明显升高或下降,证实采用该方法能够成功过表达或抑制细胞内的 miR-141 水平。

本实验结果显示,THP-1 细胞过表达 miR-141 后,HMGB1 mRNA 表达下调;而使用 miR-141 抑制剂后,HMGB1 mRNA 表达上调,其不仅在 mRNA 水平受影响,在蛋白水平也发生了一致的变化,提示过表达 miR-141 能减少 HMGB1 蛋白在细胞内的合成,而下调 miR-141 能增加 HMGB1 蛋白的合成。证实通过改变细胞内 miR-141 的水平,能直接调控 HMGB1 的 mRNA 和蛋白表达变化。

综上,miR-141 能调控单核细胞 HMGB1 的表达水平,提示 miR-141 在调控免疫细胞炎症反应过程中有重要作用。关于 miR-141 能否调控免疫细胞及其他炎症因子释放、对免疫细胞存活的影响及除 HMGB1 外的作用靶点则需进一步研究证实。

参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431: 350-355.
- [3] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136: 642-655.
- [4] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ 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] Jing Q, Huang S, Guth S, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, 2005, 120: 623-634.
- [6] 许长涛,姚咏明,李为民,等.高迁移率族蛋白 B1 对小鼠调节性 T 细胞 Toll 样受体 4 表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15: 167-170.
- [7] Tong H, Tang Y, Chen Y, et al. HMGB1 activity inhibition alleviating liver injury in heatstroke. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013, 74: 801-807.
- [8] 张笑天,姚咏明,黄立峰,等.烫伤后高迁移率族蛋白 B1 对树突状细胞分泌细胞因子的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15: 163-166.
- [9] Zhang XJ, Luan ZG, Ma XC. shRNAs targeting high-mobility group box-1 inhibit E-selectin expression via homeobox A9 in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep*, 2013, 7: 1251-1256.
- [10] 谭向龙,王世斌,姚咏明,等.高迁移率族蛋白 B1 在大鼠肝脏热缺血/再灌注损伤中的作用. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16: 168-170.
- [11] Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L. HMGB-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock*, 2006, 25: 4-11.
- [12] 李银平,乔佑杰,武子霞,等.血必净注射液对脓毒症大鼠高迁移率族蛋白 B1 的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19: 239-241.
- [13] Chen X, Li W, Wang H. More tea for septic patients? —Green tea may reduce endotoxin-induced release of high mobility group box 1 and other pro-inflammatory cytokines. *Med Hypotheses*, 2006, 66: 660-663.
- [14] 朱虹,蔡佩佩,尹小燕,等.高迁移率族蛋白 B1 在脓毒症大鼠急性肺损伤中的作用. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 253-254.
- [15] Sapojnikova N, Maman J, Myers FA, et al. Biochemical observation of the rapid mobility of nuclear HMGB1. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1729: 57-63.
- [16] Li W, Sama AE, Wang H. Role of HMGB1 in cardiovascular diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6: 130-135.
- [17] Pérez-Carrion MD, Ceña V. Knocking Down HMGB1 Using Dendrimer-Delivered siRNA Unveils Its Key Role in NMDA-Induced Autophagy in Rat Cortical Neurons. *Pharm Res*, 2013, 30: 2584-2595.
- [18] Chuangui C, Peng T, Zhentao Y. The expression of high mobility group box 1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18: 1021-1027.
- [19] Tang CH, Keng YT, Liu JF. HMGB-1 induces cell motility and α 5 β 1 integrin expression in human chondrosarcoma cells. *Cancer Lett*, 2012, 322: 98-106.
- [20] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)*, 2009, 1: 402-411.
- [21] Li W, Li J, Sama AE, et al. Carbenoxolone Blocks Endotoxin-Induced Protein Kinase R (PKR) Activation and High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Release. *Mol Med*, 2013, 19: 203-211.
- [22] 徐迎雪,类维富,王焕亮,等.不同剂量利多卡因对脓毒症大鼠小肠 HMGB1 表达的影响. *中华麻醉学杂志*, 2011, 31: 1133-1135.
- [23] Diener KR, Al-Dasooqi N, Lousberg EL, et al. The multifunctional alarmin HMGB1 with roles in the pathophysiology of sepsis and cancer. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91: 443-450.
- [24] 姚咏明,鄢小建,董宁,等.脓毒症大鼠高迁移率族蛋白-1 对组织 Toll 样受体 2 基因表达的影响. *中华创伤杂志*, 2003, 19: 13-16.
- [25] Yang M, Cao L, Xie M, et al. Chloroquine inhibits HMGB1 inflammatory signaling and protects mice from lethal sepsis. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86: 410-418.
- [26] Seo ES, Oh BK, Pak JH, et al. Acteoside improves survival in cecal ligation and puncture-induced septic mice via blocking of high mobility group box 1 release. *Mol Cells*, 2013, 35: 348-354.
- [27] 刘大全,李东华,刘洪斌. MiR-141 增强人血管内皮细胞增殖及迁移能力. *基础医学与临床*, 2010, 30: 801-806.
- [28] 洪琴,张成俊,谢汝佳,等.大鼠肝纤维化过程中 miR-141 表达的变化. *贵阳医学院学报*, 2013, 38: 19-23.
- [29] 申发娟,苏娟,张庆瑜,等.上调 miR-200a、miR-141 表达对胃癌癌细胞生长的体外研究. *天津医药*, 2013, 41: 517-580.
- [30] Du Y, Xu Y, Ding L, et al. Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth. *J Gastroenterol*, 2009, 44: 556-561.

(收稿日期:2013-08-16)
(本文编辑:李银平)