

· 论著 ·

微小 RNA-146a 调控肺泡巨噬细胞中白细胞介素 -1 受体相关激酶 1 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的表达

黄萍 刘芬 曾振国 黄彩雪 邵强 夏亮 揭克敏 钱克俭

【摘要】 目的 观察转染微小 RNA-146a (miR-146a) 对肺泡巨噬细胞中白细胞介素 -1 受体相关激酶 1 (IRAK-1) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6) 表达的影响, 为探讨 miR-146a 对肺泡巨噬细胞炎症反应的调控机制奠定基础。方法 将体外培养大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 分为 miR-146a 模拟物 (mimic) 组和阴性对照组, 分别加入 50 nmol/L Pre-miR miR-146a 前体和 Cy3 标记的 Pre-miR 阴性对照进行转染, 转染 24 h 后收集细胞, 采用实时荧光定量逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测细胞中 miR-146a、IRAK-1 mRNA、TRAF-6 mRNA 的表达, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测细胞中 IRAK-1 和 TRAF-6 的蛋白表达。结果 miR-146a mimic 组 miR-146a 表达较阴性对照组上调了 (24.55 ± 6.14) 倍 ($t = -6.643, P = 0.003$)。细胞中 IRAK-1 和 TRAF-6 的 mRNA 表达分别为阴性对照组的 (1.16 ± 0.10) 倍 ($t = 2.701, P = 0.054$) 和 (1.19 ± 0.16) 倍 ($t = 2.032, P = 0.112$)。而 IRAK-1 和 TRAF-6 的蛋白表达分别为阴性对照组的 73.0% ($t = -9.353, P = 0.001$) 和 64.1% ($t = -6.839, P = 0.002$)。结论 miR-146a mimic 能成功转染肺泡巨噬细胞 NR8383; miR-146a 过表达后, 能有效下调肺泡巨噬细胞中 IRAK-1 和 TRAF-6 的表达, 其机制可能是在蛋白翻译水平的抑制。

【关键词】 微小 RNA-146a; 白细胞介素 -1 受体相关激酶 1; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; 肺泡巨噬细胞; 炎症反应

The effect of transfected microRNA-146a on expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in alveolar macrophages Huang Ping*, Liu Fen, Zeng Zhenguo, Huang Caixue, Shao Qiang, Xia Liang, Jie Kemin, Qian Kejian. * State Drug Clinical Trial Agency, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China
Corresponding author: Qian Kejian, Email: qkj0607@sohu.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of transfected microRNA-146a (miR-146a) on expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF-6) in alveolar macrophages, and to explore the regulatory mechanism of miR-146a in the inflammatory response of alveolar macrophages. **Methods** Alveolar macrophages NR8383 were cultured and divided into two groups: transfected miR-146a mimic group was transfected 50 nmol/L Pre-miR miR-146a precursors and the negative control group was transfected Cy3-labeled Pre-miR negative control. Cells were collected at 24 hours after transfection. The miR-146a and the mRNA expression of IRAK-1 and TRAF-6 were detected by real-time fluorescent quantitation reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the protein expression of IRAK-1 and TRAF-6 was assayed by Western Blot. **Results** Compared with negative control group, the expression of miR-146a was upregulated by (24.55 ± 6.14) fold compared with miR-146a mimic group ($t = -9.353, P = 0.001$). The mRNA expressions of IRAK-1 and TRAF-6 in miR-146a mimic group were upregulated by (1.16 ± 0.10) fold ($t = 2.701, P = 0.054$) and (1.19 ± 0.16) fold ($t = 2.032, P = 0.112$), respectively, compared with that of negative control group, but the protein levels of IRAK-1 and TRAF-6 were decreased by 73.0% ($t = -9.353, P = 0.001$) and 64.1% ($t = -6.839, P = 0.002$), respectively. **Conclusions** miR-146a mimic was successfully transfected into the alveolar macrophage NR8383. The overexpression of miR-146a in alveolar macrophages can down-regulate the expression of IRAK-1 and TRAF-6 in protein translation levels, and its mechanism may be related with inhibition of protein translation.

【Key words】 MicroRNA-146a; Interleukin-1 receptor-associated kinase 1; Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; Alveolar macrophage; Inflammation

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.05.003

基金项目: 国家自然科学基金 (81060152); 国家自然科学基金 (81160233); 国家自然科学基金青年基金项目 (81101410)

作者单位: 330006 江西, 南昌大学第一附属医院, 国家药物临床试验机构 (黄萍), 重症医学科 (刘芬、曾振国、黄彩雪、邵强、夏亮、钱克俭); 南昌大学医学院生物化学与分子生物学教研室 (揭克敏)

通信作者: 钱克俭, Email: qkj0607@sohu.com

本课题组前期研究结果显示, 在脂多糖 (LPS) 刺激的肺泡巨噬细胞 NR8383 中, 微小 RNA-146a (miR-146a) 表达明显上调, 并与炎症因子肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) mRNA 表达呈负相关; 而过表达肺泡巨噬细胞 miR-146a 后, 炎症因子 TNF- α 表达明显下调, 但具体的机制尚不明确^[1-3]。白细胞介素 -1

受体相关激酶 1 / 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (IRAK-1 / TRAF-6) 是炎症通路 Toll 样受体 / 核转录因子 κ B (TLR / NF- κ B) 中两个非常重要的接头蛋白^[4]。Bhaumik 等^[5]研究发现,在人成纤维细胞中过表达 miR-146a/b 可下调 IRAK-1 的蛋白表达,从而抑制白细胞介素(IL-6、IL-8)的释放。Hou 等^[6]研究发现,在疱疹病毒感染的巨噬细胞中,上调 miR-146a 时 TRAF-6、IRAK-1 和 IRAK-2 的蛋白表达下降,从而抑制了 I 型干扰素的产生。然而,在肺泡巨噬细胞中,上调 miR-146a 是否能够影响 IRAK-1 / TRAF-6 的表达尚未见报道。故本实验采用体外转染 miR-146a 模拟物(mimic)上调肺泡巨噬细胞中 miR-146a 表达的方法,观察其对 IRAK-1 / TRAF-6 表达的影响,为探讨 miR-146a 对肺泡巨噬细胞炎症反应的调控机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料:大鼠 NR8383 肺泡巨噬细胞购于中国科学院细胞库;TRIzol (Invitrogen, 美国);Ham F-12K 培养基(Sigma-Aldrich, 美国);胎牛血清(HyClone, 美国);CyTM3 标记的 Pre-miRTM 阴性对照,Pre-miRTM miR-146a 前体(ABI, 美国);TaqMan[®] MicroRNA 逆转录试剂盒,TaqMan[®] MicroRNA 检测试剂盒(ABI, 美国);PrimeScript[®] 逆转录试剂盒,SYBR[®] 荧光染料试剂 II (大连宝生物工程有限公司);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Amersham Pharmacia biotech, 德国);抗 IRAK-1 抗体,抗 TRAF-6 抗体(Abcam, 美国);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG,抗 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。氯仿、异丙醇及无水乙醇等均为国产分析纯。

1.2 细胞培养:将肺泡巨噬细胞 NR8383 培养于含 15%胎牛血清的 Ham F-12K 培养基中,置于大气压下,37 °C、5%CO₂ 温湿培养箱中培养。2~3 d 更换培养液 1 次,细胞密度达 80%~90% 时传代 1 次。

1.3 细胞分组及处理:将体外培养的 NR8383 细胞重悬并计数,按 1.5×10^6 个 / 孔的密度接种于 6 孔板,实验分为 miR-146a mimic 组和阴性对照组,每组设 2 个复孔,分别加入 50 nmol/L Pre-miRTM miR-146a 前体和 CyTM3 标记的 Pre-miRTM 阴性对照进行转染。

1.4 检测指标及方法:转染 24 h 后收集细胞,采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测细胞 miR-146a、IRAK-1 和 TRAF-6 的 mRNA 表达;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测

细胞 IRAK-1 和 TRAF-6 的蛋白表达。

1.4.1 细胞总 RNA 的提取和检测:用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。所得细胞总 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳定性检测 RNA 的纯度,紫外分光光度计测定总 RNA 的吸光度(A)值,定量测定提取 RNA 的浓度。

1.4.2 miR-146a 表达测定:采用 TaqMan miRNA 逆转录试剂盒和特异 miRNA 茎环引物逆转录 RNA,按照 TaqMan[®] MicroRNA 检测试剂盒说明书操作,检测 miR-146a mRNA 表达。选取 U6 snRNA 作为内参照,miR-146a 相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$} 法计算。

1.4.3 IRAK-1、TRAF-6 的 mRNA 表达测定:采用逆转录试剂盒逆转录 RNA,按照 SYBR[®]PCR 试剂盒说明书操作,检测 IRAK-1、TRAF-6 的 mRNA 表达,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
β -actin	上游引物:TACTGCCCTGGCTCCTAGCA
	下游引物:TGGACACTGAGGCCAGGATAG
TRAF-6	上游引物:AGGCTACAATACGCCCTCACC
	下游引物:GCTACACGCCCTGCATCAGTA
IRAK-1	上游引物:CTGCCTCCACCTTCCTCTCC
	下游引物:CTCTGGGCTTGGCTTGATGG

注:PCR 为聚合酶链反应, β -actin 为 β -肌动蛋白,TRAF-6 为肿瘤坏死因子受体相关因子 6,IRAK-1 为白细胞介素 -1 受体相关激酶 1

实时定量 PCR 反应体系:逆转录 cDNA 2 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 0.8 μ L,SYBR[®] 荧光染料试剂 II (2 \times) 10 μ L,ROX 染料(50 \times) 0.4 μ L,加灭菌蒸馏水至 20 μ L。反应条件:95 °C 30 s、95 °C 5 s、57 °C 20 s、72 °C 27 s,40 个循环。选取 β -actin 作为内参基因,各组 mRNA 相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$} 法计算。

1.4.4 Western Blot 检测 IRAK-1、TRAF-6 的蛋白表达:提取细胞总蛋白后,采用 BCA 法测定蛋白浓度,将其调至同一浓度,完成聚丙烯酰胺凝胶电泳(每孔加样 20 μ L)、转膜、封闭后,孵育一抗,用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)稀释抗体,兔抗 IRAK-1(1 : 2 000)、兔抗 TRAF-6 (1 : 1 000)、鼠抗 β -actin(1 : 3 000),混匀后覆盖于膜上,4 °C 孵育过夜,TBST 缓冲液摇床漂洗 3 次;孵育二抗,用 TBST 缓冲液稀释抗体,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG(1 : 4 000),混匀后覆盖于膜上,37 °C 孵育 1~2 h,TBST 缓冲液漂洗 3 次,暗室内曝光、显影并定影,进行胶片扫描,通过 Quantity One 软件进行数据分析。以 β -actin 蛋白作为内参,各组目的条带与内参条带的灰度比值作为蛋白的相对表

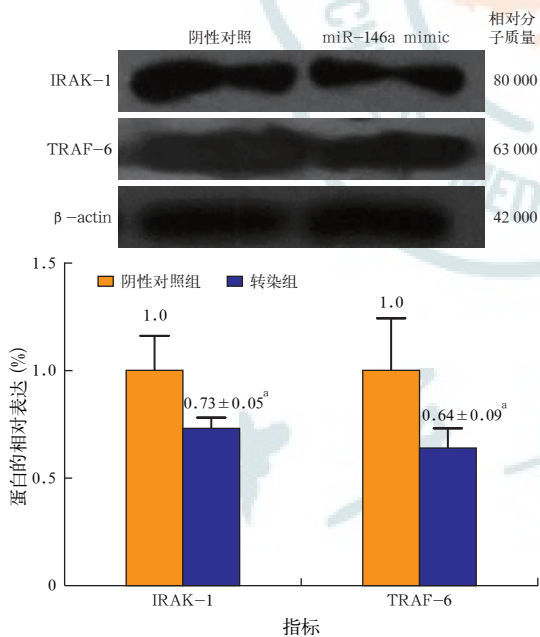
定量,每样本至少检测 3 次并取其均值。

1.5 统计学处理: 采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本比较采用独立样本 *t* 检验,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 转染 miR-146a mimic 后 miR-146a 的表达: 转染 50 nmol/L 的 miR-146a mimic 入 NR8383 细胞 24 h 后,miR-146a 的表达量明显上调,为阴性对照组的 (24.55 ± 6.14)倍($t = -6.643, P = 0.003$)。证明 miR-146a mimic 能够成功转染肺泡巨噬细胞 NR8383,上调细胞内 miR-146a 表达,模型构建成功。

2.2 上调 miR-146a 对 IRAK-1 蛋白和 TRAF-6 蛋白表达的影响(图 1): 转染组 IRAK-1 和 TRAF-6 的蛋白表达条带较对照组窄小。转染组 IRAK-1 和 TRAF-6 的蛋白表达水平均下降,IRAK-1 蛋白表达为阴性对照组的 73.0% ($t = -9.353, P = 0.001$),TRAF-6 蛋白表达为阴性对照组的 64.1% ($t = -6.839, P = 0.002$),差异均有统计学意义。

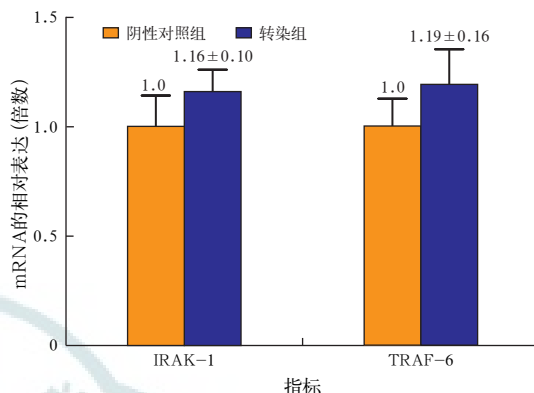


注:miR-146a 为微小 RNA-146a,IRAK-1 为白细胞介素 -1 受体相关激酶 1,TRAF-6 为肿瘤坏死因子受体相关因子 6; 与对照组比较,^a $P < 0.01$

图 1 转染 miRNA-146 模拟物入大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 后对 IRAK-1 和 TRAF-6 蛋白表达的影响

2.3 上调 miR-146a 对靶基因 IRAK-1 mRNA 和 TRAF-6 mRNA 表达的影响(图 2): 转染 50 nmol/L 的 miR-146a mimic 24 h 后,转染组 IRAK-1 和 TRAF-6 的 mRNA 表达均上调,IRAK-1 mRNA 为阴

性对照组的 (1.16 ± 0.10)倍($t = 2.701, P = 0.054$),TRAF-6 mRNA 为阴性对照组的 (1.19 ± 0.16)倍($t = 2.032, P = 0.112$),差异均无统计学意义。



注:miR-146a 为微小 RNA-146a,IRAK-1 为白细胞介素 -1 受体相关激酶 1,TRAF-6 为肿瘤坏死因子受体相关因子 6

图 2 转染 miR-146a 模拟物入大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 后对靶基因 IRAK-1 mRNA 和 TRAF-6 mRNA 表达的影响

3 讨论

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)发生时,肺泡巨噬细胞可通过 TLR / NF- κ B 信号通路产生大量炎症介质^[7],包括分泌炎症趋化因子募集中性粒细胞于肺部,释放早期炎症介质 TNF- α 等,促进炎症的级联放大,形成“瀑布”反应^[8-9]。革兰阴性(G⁻)菌细胞壁成分 LPS 通过活化肺泡巨噬细胞 TLR4,使之与髓样分化抗原 88 (MyD88) 结合并活化 IRAK-1 和 TRAF-6,使 NF- κ B 发生核移位,并引发炎症反应^[10-13]。可见,IRAK-1 和 TRAF-6 也是 TLR/ NF- κ B 信号转导通路中两个重要的信号转导蛋白。

Taganov 等^[14]通过突变试验和荧光素酶报告基因试验证实,在人单核细胞白血病细胞(THP-1)中,IRAK-1、TRAF-6 是 miR-146a 的两个靶基因。miR-146a 是一种内源性非编码的小 RNA,主要通过识别靶基因 mRNA 的 3'-UTR,从而导致靶基因的降解或者抑制靶基因的翻译表达^[15-17],在固有免疫反应的调控中具有重要作用^[18-21]。Pauley 等^[22]研究发现,上调 THP-1 细胞 miR-146a 后可负性调控炎症介质的释放。Perry 等^[23]用 IL-1 β 刺激人肺泡上皮细胞,能够诱导 miR-146a 表达上调,从而负性调节 IL-8 的产生。而本课题组前期研究已证实,LPS 刺激肺泡巨噬细胞 NR8383 后,细胞中 miR-146a 表达上调,并与炎症因子 TNF- α mRNA 表达呈负相关^[2]。为明确 miR-146a 在肺泡巨噬细胞炎症反应中的抗炎机制,本实验通过体外转染 miR-146a mimic 入肺泡巨噬细胞 NR8383 后,发现 miR-146a 表达量

明显升高,证明 miR-146a mimic 能够成功转染肺泡巨噬细胞 NR8383,同时也发现其靶基因 TRAK-1、TRAF-6 的 mRNA 表达水平并没有明显变化,而 TRAK-1、TRAF-6 的蛋白表达水平明显下降,推测 miR-146a 可能是在蛋白翻译水平上抑制了靶蛋白 IRAK-1 和 TRAF-6 的表达。

既往大量研究证实,通过阻断或减少 TLR4 信号通路中的某些信号分子,是抑制过度炎症反应有效的方法。Kawai 等^[24]发现,MyD88 敲除的小鼠能减少 LPS 所致 TNF- α 等炎症因子的释放,提高小鼠对 LPS 的耐受。Sato 等^[25]研究发现,敲除生长因子 - β 活化激酶 1(TAK1)能下调 LPS 所致 NF- κ B 的活化和炎症因子的释放。故我们推测,在肺泡巨噬细胞中下调 IRAK-1 和 TRAF-6 的表达可能影响炎症因子的释放。本研究为后期进一步探讨 miR-146a 对肺泡巨噬细胞炎症反应的调控机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘芬,曾振国,丁成志,等. 微小 RNA-146a 在脂多糖诱导肺泡巨噬细胞中的表达 [J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(9): 540-542.
- [2] 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, 2012, 21(7): 709-712.
- [3] 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.
- [4] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. Cell, 2010, 140(6): 805-820.
- [5] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8 [J]. Aging (Albany NY), 2009, 1(4): 402-411.
- [6] Hou J, Wang P, Lin L, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2 [J]. J Immunol, 2009, 183(3): 2150-2158.
- [7] Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, et al. NF- κ B regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Shock, 2000, 13(2): 85-91.
- [8] García-Ramallo E, Marques T, Prats N, et al. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation [J]. J Immunol, 2002, 169(11): 6467-6473.
- [9] 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 [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290(1): L51-58.
- [10] Lee JY, Hwang DH. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors [J]. Mol Cells, 2006, 21(2): 174-185.
- [11] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. Nature, 2000, 406(6797): 782-787.
- [12] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways [J]. Semin Immunol, 2004, 16(1): 3-9.
- [13] Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses [J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(2): 240-273.
- [14] 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 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [15] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [16] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.
- [17] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655.
- [18] Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response [J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(4): 514-520.
- [19] Williams AE, Perry MM, Moschos SA, et al. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer [J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36(Pt 6): 1211-1215.
- [20] Lindsay MA. microRNAs and the immune response [J]. Trends Immunol, 2008, 29(7): 343-351.
- [21] Koval'chuk LV, Gankovskaia LV, Akimova EA. Role of microRNA in regulation of innate immunity mechanisms [J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2009(3): 100-104.
- [22] 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.
- [23] Perry MM, Williams AE, Tsitsiou E, et al. Divergent intracellular pathways regulate interleukin-1 β -induced miR-146a and miR-146b expression and chemokine release in human alveolar epithelial cells [J]. FEBS Lett, 2009, 583(20): 3349-3355.
- [24] Kawai T, Adachi O, Ogawa T, et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin [J]. Immunity, 1999, 11(1): 115-122.
- [25] Sato S, Sanjo H, Takeda K, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses [J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1087-1095.

(收稿日期: 2013-11-29)

(本文编辑: 李银平)

·读者·作者·编者·

本刊关于临床试验和伦理的一般要求

临床试验注册号应是从 WHO 认证的一级临床试验注册中心获得的全球唯一的注册号。临床试验注册号排印在摘要结束处。以“临床试验注册”(Trial registration)为标题(字体、字号与摘要的其他小标题相同),写出注册机构名称和注册号。前瞻性临床试验研究的论著摘要应含有 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trial; <http://www.consort-statement.org/home>)列出的基本要素。医学伦理问题及知情同意须遵循医学伦理基本原则。当论文的主体是以人为研究对象时,作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准。提供该委员会的批准文件(批准文号著录于论文中)及受试对象或其亲属的知情同意书。