

· 论著 ·

微小 RNA-132 在脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应中的表达变化

刘芬 江榕 李勇 曾振国 赵宁 夏亮 聂成 钱克俭

【摘要】目的 观察脂多糖(LPS)诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应后微小 RNA-132(miR-132)的动态变化,以初步探讨 miR-132 在肺泡巨噬细胞炎症反应中的作用。**方法** 将体外去热源培养的大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 分为空白对照组和以终浓度 1 mg/L LPS 刺激 3、6、12 及 24 h 组,分别收集各时间点上清液及细胞,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上清液中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 和 IL-6)的含量,采用实时定量聚合酶链反应(PCR)检测细胞中 miR-132 的表达。**结果** 与空白对照组相比,LPS 刺激大鼠肺泡巨噬细胞后 3 h 上清液中 TNF- α 含量 (ng/L: 364.83 \pm 46.29 比 34.07 \pm 8.62, $P < 0.01$)、IL-1 β 含量 (ng/L: 153.83 \pm 43.67 比 32.33 \pm 10.62, $P < 0.05$)、IL-6 含量 (ng/L: 183.85 \pm 43.52 比 42.62 \pm 11.21, $P < 0.05$) 即明显升高,随时间延长均逐渐升高至 12 h 达峰值 (TNF- α : 605.09 \pm 57.13, IL-1 β : 377.09 \pm 28.55, IL-6: 558.04 \pm 77.45, 均 $P < 0.01$), 24 h 时均有所下降 (TNF- α : 281.95 \pm 41.61, IL-1 β : 263.17 \pm 51.36, IL-6: 438.74 \pm 79.94), 但仍显著高于空白对照组 (均 $P < 0.01$)。LPS 刺激后 3 h, miR-132 表达水平较空白对照组上调了 (1.12 \pm 0.11) 倍 ($P = 0.995$), 6、12、24 h miR-132 表达较空白对照组分别上调了 (5.98 \pm 0.65)、(7.64 \pm 0.53) 和 (8.92 \pm 0.83) 倍 (均 $P < 0.01$)。**结论** LPS 诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应后, miR-132 表达随时间延长逐步上调,其可能参与调控大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应。

【关键词】 微小 RNA-132; 脂多糖; 肺泡巨噬细胞; 炎症反应

The expression changes in microRNA-132 in the lipopolysaccharide-induced inflammation of rat alveolar macrophages Liu Fen*, Jiang Rong, Li Yong, Zeng Zhenguo, Zhao Ning, Xia Liang, Nie Cheng, Qian Kejian. *Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Corresponding author: Qian Kejian, Email: qkj0607@sohu.com

【Abstract】 Objective To observe the kinetic changes in microRNA-132 (miR-132) expression in rat alveolar macrophages after lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation, and to investigate initially on the role of miR-132 in alveolar macrophages inflammatory response. **Methods** The rat alveolar macrophages NR8383 cultured without pyrogen in vitro were divided into blank control group and LPS (1 mg/L) stimulated 3, 6, 12, 24 hours groups. Culture supernatants and cell pellets were collected at each time point respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assay the production changes in tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (IL-1 β and IL-6) in the supernatant. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of miR-132 in the cells. **Results** After stimulating rat alveolar macrophages with LPS, the production of TNF- α (ng/L: 364.83 \pm 46.29 vs. 34.07 \pm 8.62, $P < 0.01$), IL-1 β (ng/L: 153.83 \pm 43.67 vs. 32.33 \pm 10.62, $P < 0.05$) and IL-6 (ng/L: 183.85 \pm 43.52 vs. 42.62 \pm 11.21, $P < 0.05$) were all increased significantly at 3 hours post LPS stimulation compared with blank control group, reached the peak at 12 hours (TNF- α : 605.09 \pm 57.13, IL-1 β : 377.09 \pm 28.55, IL-6: 558.04 \pm 77.45, all $P < 0.01$), and descended at 24 hours (TNF- α : 281.95 \pm 41.61, IL-1 β : 263.17 \pm 51.36, IL-6: 438.74 \pm 79.94) but the levels remained significantly higher than blank control group (all $P < 0.01$). The expression of miR-132 started to rise at 3 hours after LPS stimulation compared with blank control group [(1.12 \pm 0.11) folds, $P = 0.995$], and presented a gradual increasing trend at 6, 12, 24 hours [(5.98 \pm 0.65), (7.64 \pm 0.53), (8.92 \pm 0.83) folds, all $P < 0.01$]. **Conclusion** The expression of miR-132 increased gradually over time after LPS-induced inflammation of rat alveolar macrophages, suggesting that miR-132 may be involved in regulation of rat alveolar macrophages inflammatory response.

【Key words】 MicroRNA-132; Lipopolysaccharide; Alveolar macrophage; Inflammatory response

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.02.005

基金项目:国家自然科学基金(81101410);国家自然科学基金(81160233);江西省自然科学基金(20122BAB205002)

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

通信作者:钱克俭,Email: qkj0607@sohu.com

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类能够在转录后水平调控基因表达的内源性非编码 RNA。近年来研究发现, miRNAs 参与了机体免疫及炎症反应的调节^[1-3], 其中 miRNA-132 (miR-132) 与炎症反应密切相关^[4-7], 但 miR-132 是否参与肺泡巨噬细胞

炎症反应未见报道。本研究以大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 为研究对象,观察并分析 miR-132 在脂多糖(LPS)诱导的炎症反应中的动态变化,为进一步探讨 miR-132 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 主要实验材料:大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 (购于中国科学院细胞库);LPS (E. Coli, O111:B4, Sigma-Aldrich, 美国);Ham F-12K 培养基(Sigma-Aldrich, 美国);胎牛血清(Gibco, 美国);大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL-1 β 、IL-6) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司);TRIzol (Invitrogen, 美国);PrimeScript 逆转录试剂盒和 SYBR 实时荧光定量试剂盒(TaKaRa, 大连);逆转录实时定量聚合酶链反应 (PCR)引物(Invitrogen, 美国)。

1.2 细胞培养用品去致热源处理:培养 NR8383 细胞所使用的培养瓶、6 孔板、离心管、巴斯德吸管、移液管均为无致热源一次性无菌产品。枪头、小离心管 (EP 管) 经过 30% 双氧水浸泡过夜,双蒸水漂洗 3 遍,包装后 121 °C 高压灭菌 30 min,烘干后使用。非一次性实验器材 (主要是玻璃器皿) 200 °C 烘烤 4 h 后使用。

1.3 细胞培养:NR8383 细胞培养于含 1.5 g/L 碳酸氢钠、15% 去 LPS 胎牛血清的 Ham F-12K 完全培养基,置于大气压下 37 °C、5%CO₂ 的温湿培养箱中培养,2~3 d 更换培养基 1 次,3~4 d 传代 1 次。细胞培养过程中均使用经去致热源处理的耗材。

1.4 细胞分组及处理:将细胞按 1×10^6 个 /mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL。实验分为空白对照组和 LPS 刺激 3、6、12、24 h 组。LPS 刺激组在培养基中加入终浓度为 1 mg/L 的 LPS,分别于各时间点收集上清液及细胞备检。

1.5 上清液中炎症因子浓度测定:采用 ELISA 法测定上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白浓度,按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行检测。

1.6 细胞 miR-132 表达测定

1.6.1 总 RNA 提取:用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度。

1.6.2 逆转录:采用 PrimeScript 逆转录试剂盒和特异 miRNA 茎环引物进行逆转录(引物序列见表 1)。10 μ L 反应体系包括:5 \times 逆转录缓冲液 2 μ L,逆转录酶 0.5 μ L,特异 miRNA 茎环引物(2 μ mol/L) 0.5 μ L,

总 RNA 1 μ g,无核酶水加至 10 μ L。反应条件:42 °C 15 min,85 °C 5 s。

表 1 miR-132、U6 的 RT 及实时定量 PCR 引物序列

名称	引物序列
miR-132	RT 引物:5'-GTCGTATCCACTGCAGGCTCCGAG TATTCGCACTGGATACGACCGACCA-3' PCR 上游引物:5'-GCCGCTAACAGTCTACAGCCAT-3' PCR 下游引物:5'-GTGCAGGCTCCGAGGT-3'
U6	RT 引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3' PCR 上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' PCR 下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

注:miR-132 为微小 RNA-132,RT 为逆转录,PCR 为聚合酶链反应

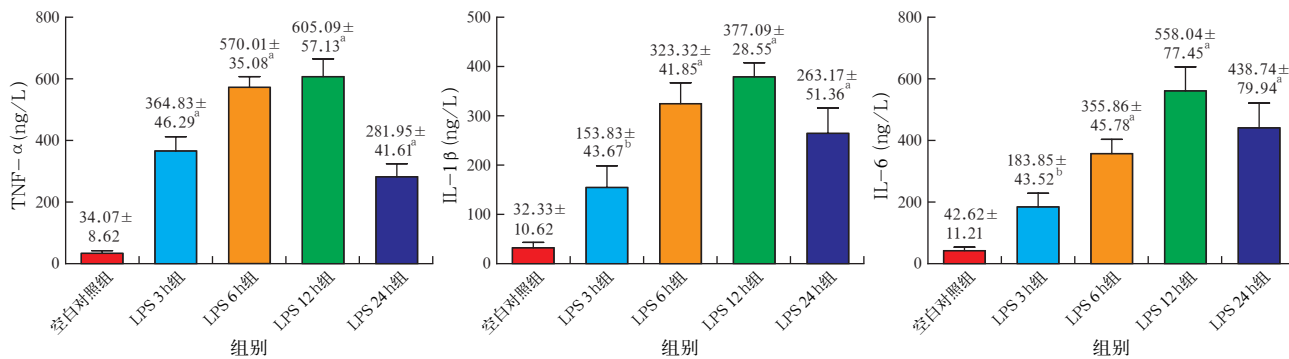
1.6.3 实时定量 PCR:采用 SYBR 实时荧光定量试剂盒进行实时定量 PCR 反应。20 μ L 的反应体系包括:2 \times SYBR 荧光染料试剂 10 μ L,PCR 上游引物 (10 μ mol/L) 0.8 μ L,下游引物 (10 μ mol/L) 0.8 μ L,50 \times ROX 染料 0.4 μ L,逆转录产物 2.0 μ L,无核酶水 6.0 μ L。引物序列见表 1。在定量 PCR 仪上扩增和检测,反应条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个扩增循环。以 U6 snRNA 为内参照,miR-132 的相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$} 方法计算。

1.7 统计学处理:采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,不同时间点多个均数比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,则进一步采用 Dunnett *t* 检验对 LPS 刺激各组与空白对照组的均数进行比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

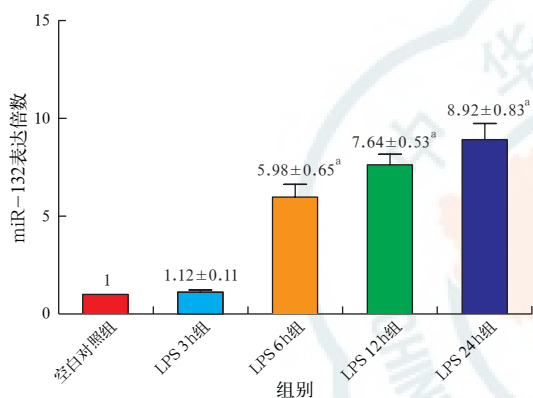
2.1 LPS 刺激 NR8383 后不同时间点上清液炎症因子的表达变化(图 1):与空白对照组相比,在 LPS 刺激后 3 h TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 即明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),随着刺激时间延长均逐渐升高至 12 h 达到峰值,24 h 有所下降,但仍显著高于空白对照组 (均 $P < 0.01$)。表明终浓度为 1 mg/L LPS 的刺激能够诱导 NR8383 细胞上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达,成功诱导了大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应。

2.2 LPS 刺激 NR8383 后不同时间点细胞 miR-132 的表达变化(图 2):LPS 刺激后 3 h,miR-132 的表达水平较空白对照组上调了 (1.12 \pm 0.11) 倍,差异无统计学意义 ($P = 0.995$);6、12、24 h miR-132 的表达较空白对照组分别上调了 (5.98 \pm 0.65)、(7.64 \pm 0.53) 和 (8.92 \pm 0.83) 倍 (均 $P < 0.01$)。表明 LPS 刺激后 6 h 开始诱导大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 中 miR-132 的表达上调,并呈逐步增高趋势。



注:LPS 为脂多糖,TNF-α 为肿瘤坏死因子 -α,IL-1β 为白细胞介素 -1β,IL-6 为白细胞介素 -6;与空白对照组比较,^aP<0.01,^bP<0.05

图 1 LPS 刺激大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 后不同时间点上清液中炎症因子的表达变化



注:miR-132 为微小 RNA-132;与空白对照组比较,^aP<0.01

图 2 LPS 刺激大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 后不同时间点细胞 miR-132 的表达变化

3 讨论

肺泡巨噬细胞在脓毒症肺损伤炎症反应中发挥着重要的作用,它在受到脓毒症主要致病原因之一的 LPS 刺激作用下,可通过细胞表面 Toll 样受体 4 (TLR4)活化核转录因子 -κB(NF-κB)启动细胞炎症反应,从而诱导多种促炎因子如 TNF-α、IL-1β、IL-6 大量表达,但炎症因子生成过度 and 调节失控最终可导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发生^[8-11]。本研究采用 LPS 成功诱导了大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应,并观察到在炎症反应早期 TNF-α、IL-1β、IL-6 大量表达,与 Ren 等^[12]的研究结果相符。

近年来由于对 miRNAs 研究的深入,为脓毒症肺损伤炎症反应的调控提供了新机制。miRNAs 是一类能够在转录后水平调控基因表达的内源性非编码 RNA,通过与靶基因 mRNA 特定位点结合而诱发该 mRNA 的降解或抑制蛋白翻译表达^[13-15]。近年来研究发现,miRNAs 参与机体内炎症过程的调节。王中华等^[16]观察到在腹腔注射 LPS 诱导的脓毒症小鼠模型中,肝组织 miR-155 相对表达量在注射 LPS

后升高,提示 miR-155 在脓毒症炎症反应导致的肝损伤机制中起重要作用;张振辉等^[17]研究发现,转染 miR-141 的拟似物或抑制剂进入人急性单核细胞白血病细胞株 THP-1 后,能调控晚期炎症因子高迁移率族蛋白 B1(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;本课题组前期的研究观察到,转染 miR-146a 能下调肺泡巨噬细胞炎症因子 TNF-α 的表达,表明 miR-146a 能调控细胞的炎症反应^[18]。Taganov 等^[19]利用芯片筛选 miRNA 表达谱发现,在 LPS 处理的 THP-1 中,miR-146a/b、miR-132 和 miR-155 的表达明显上调;Nahid 等^[20]研究发现,TLR2 的配体肽聚糖(PGN)分别刺激 THP-1 细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、初级巨噬细胞后,miR-132 迅速而显著上调;Maharshak 等^[21]在炎性肠病患者的病变肠组织中检测到 miR-132 水平比正常肠组织更高。上述研究表明 miR-132 与炎症反应密切相关,而 miR-132 在急性肺损伤(ALI)炎症反应中的作用尚未见报道。

本研究观察到,LPS 刺激 NR8383 细胞后使 miR-132 表达上调,且随时间延长呈持续上升,在 LPS 刺激 24 h 时细胞 miR-132 表达处于高峰水平;LPS 刺激 NR8383 细胞后,TNF-α、IL-1β、IL-6 亦均呈上升趋势,在 12 h 达到高峰,而在 24 h 出现下降,分析炎症因子表达下降的原因可能与 miR-132 的表达上调有关。因此推测,miR-132 可能调控了大鼠肺泡巨噬细胞的炎症反应。这提示 miR-132 有望成为脓毒症肺损伤治疗的新靶点。然而,miR-132 对炎症因子表达的影响及其调控机制尚需通过转染实验进一步研究。

参考文献

[1] 杜林林,马中富. MicroRNA 与免疫反应及脓毒症[J]. 中国危重病急救医学,2009,21(8):501-503.

- [2] Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(20):2985-2996.
- [3] Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(1):15-26.
- [4] Shaked I, Meerson A, Wolf Y, et al. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase [J]. Immunity, 2009, 31(6):965-973.
- [5] Strum JC, Johnson JH, Ward J, et al. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1 [J]. Mol Endocrinol, 2009, 23(11):1876-1884.
- [6] 王攀, 戚丽华, 刘雪林, 等. miR-132 的生物学功能 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(4):562-564, 583.
- [7] Nakahama T, Hanieh H, Nguyen NT, et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the microRNA-132/212 cluster promotes interleukin-17-producing T-helper cell differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(29):11964-11969.
- [8] Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes [J]. Cell Signal, 2001, 13(2):85-94.
- [9] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 2000, 342(18):1334-1349.
- [10] 左祥荣, 曹权, 阙军, 等. 白藜芦醇对内毒素性急性肺损伤小鼠核转录因子 κ B 及炎症反应的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(1):16-19.
- [11] 李志军, 蔡宛如. 炎症因子在内毒素性急性肺损伤发病机制中的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2012, 32(14):1084-1089.
- [12] Ren W, Hu L, Hua F, et al. Myeloid differentiation protein 2 silencing decreases LPS-induced cytokine production and TLR4/MyD88 pathway activity in alveolar macrophages [J]. Immunol Lett, 2011, 141(1):94-101.
- [13] 石夏荣, 俞吉安. MicroRNA 特征与功能 [J]. 上海交通大学学报, 2004, 38(5):829-833.
- [14] 熊霞辉, 陈梅红. MicroRNA 参与的调控网络 [J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(4):367-370.
- [15] Ying SY, Chang DC, Lin SL. The MicroRNA [J]. Methods Mol Biol, 2013, 936:1-19.
- [16] 王中华, 梁艳冰, 唐皓, 等. 微小 RNA-155 在脓毒症小鼠肝脏内的表达变化及作用研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(3):154-157.
- [17] 张振辉, 陈晓辉, 江子欣, 等. 微小 RNA-141 对人单核细胞合成高迁移率蛋白 B1 的调控作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(10):604-607.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Nahid MA, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, et al. Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212 [J]. J Immunol, 2013, 190(3):1250-1263.
- [21] Maharshak N, Shenhar-Tsarfaty S, Aroyo N, et al. MicroRNA-132 modulates cholinergic signaling and inflammation in human inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(7):1346-1353.

(收稿日期:2013-11-25)

(本文编辑:李银平)

·读者·作者·编者·

本刊常用的不需要标注中文的缩略语(二)

每搏量(stroke volume, SV)

心排血量(cardiac output, CO)

心排血指数(cardiac index, CI)

脉搏(经皮)血氧饱和度(percutaneous oxygen saturation, SpO₂)

中心静脉血氧饱和度

(central venous blood oxygen saturation, ScvO₂)

左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)

左室舒张期末容积

(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)

左室收缩期末容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)

乳酸清除率(lactate clearance rate, LCR)

氧合指数(oxygenation index, PaO₂/FiO₂, OI)

体质量指数(body mass index, BMI)

血红蛋白(hemoglobin, Hb)

肌钙蛋白 T(troponin T, cTnT)

肌酐清除率(creatinine clearance rate, CCr)

丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)

天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)

总胆红素(total bilirubin, TBil)

直接胆红素(direct bilirubin, DBil)

间接胆红素(indirect bilirubin, IBil)

血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)

N末端 B 型钠尿肽前体

(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)

降钙素原(procalcitonin, PCT)

活化部分凝血活酶时间

(activated partial thromboplastin time, APTT)

凝血酶原时间(prothrombin time, PT)

凝血酶时间(thrombin time, TT)

人白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen DR, HLA-DR)

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)

支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)

磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)

改良经皮扩张气管切开术(modified percutaneous dilative tracheostomy, MPDT)

高频振荡通气(high frequency oscillatory ventilation, HFOV)

呼气末正压(positive end-expiratory pressure, PEEP)

脉搏指示连续心排量监测

(pulse index continuous cardiac output, PiCCO)

体外膜肺氧合(extra corporeal membrane oxygenation, ECMO)