

• 论著 •

微小 RNA-101 和微小 RNA-125a-5p 在脂多糖诱导人 THP-1 巨噬细胞自噬中的调控作用

许婕灵 张振辉 江慧琳 林珮仪 陈晓辉

510260 广东广州, 广州医科大学附属第二医院急诊科(许婕灵、江慧琳、林珮仪、陈晓辉),
重症医学科(张振辉)

通讯作者: 陈晓辉, Email: cxhgz168@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.04.009

【摘要】目的 探讨脂多糖(LPS)诱导人THP-1巨噬细胞自噬过程中微小RNA-101和微小RNA-125a-5p(miR-101、miR-125a-5p)的调控作用。**方法** 体外培养人白血病单核细胞THP-1,用佛波醇(PMA, 50 μg/L)诱导THP-1细胞48 h分化成巨噬细胞,以0、250、500、1 000 μg/L梯度LPS刺激细胞12 h,以转染试剂脂质体Lipofectamine RNAiMAX介导miRNA模拟物(miR-mimic)转染细胞,荧光显微镜下观察miRNA的转染效率。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测培养上清液中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的释放量;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞内自噬相关蛋白ATG4D、Beclin1、LC3Ⅱ的蛋白表达;采用定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测miR-101和miR-125a-5p的表达。**结果** ① 250、500、1 000 μg/L LPS刺激THP-1巨噬细胞12 h后,TNF-α和MCP-1释放量较未用LPS刺激细胞显著升高[TNF-α(ng/L): 1 336.1±18.5、1 340.6±24.8、1 364.5±14.9比47.6±4.4, MCP-1(ng/L): 996.3±51.3、934.6±84.3、974.2±69.5比21.3±6.5, 均P<0.01],但3个剂量组间无统计学差异。250、500、1 000 μg/L LPS刺激细胞12 h后,细胞内ATG4D、Beclin1、LC3Ⅱ蛋白表达均较未用LPS刺激细胞明显上调(ATG4D的t值分别为8.103、38.410、52.020, P值分别为0.015、0.001、<0.001; Beclin1的t值分别为3.026、5.328、3.482, P值分别为0.047、0.034、0.037; LC3Ⅱ的t值分别为3.836、6.200、4.665, P值分别为0.018、0.003、0.010),以500 μg/L LPS的效果最为明显。用500 μg/L LPS刺激细胞12 h后,细胞内miR-101、miR-125a-5p的表达均较未用LPS刺激细胞显著下调[miR-101($2^{-\Delta Ct}$): 0.68±0.08比1.95±0.26, t=8.047, P=0.001; miR-125a-5p($2^{-\Delta Ct}$): 0.23±0.06比1.69±0.42, t=5.975, P=0.004]。② 荧光显微镜下显示miRNA转染效率较高。Western Blot结果显示,在细胞内分别过表达miR-101或miR-125a-5p后均可引起ATG4D、Beclin1、LC3Ⅱ蛋白表达一定程度的下调;但同时过表达miR-101和miR-125a-5p两个miRNAs时,ATG4D、Beclin1、LC3Ⅱ的蛋白表达下调更为显著(与阴性对照组比较t值分别为14.550、5.855、14.180, P值分别为0.005、0.014、<0.001)。**结论** miR-101、miR-125a-5p能抑制LPS诱导THP-1巨噬细胞自噬,其机制可能是通过靶向调节ATG4D完成。

【关键词】 微小RNA; 自噬; 巨噬细胞; 脂多糖

基金项目: 广东省自然科学基金(S2012010008971, S2013010014887); 广东省产业技术研究与开发资金计划项目(2012B031800233); 广东省广州市医学重点学科建设项目(2013-16)

The regulatory effect of miR-101 and miR-125a-5p on autophagy in lipopolysaccharide derived THP-1 macrophages Xu Jieling, Zhang Zhenhui, Jiang Huilin, Lin Peiyi, Chen Xiaohui

Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China (Xu JL, Jiang HL, Lin PY, Chen XH); Department of Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China (Zhang ZH)

Corresponding author: Chen Xiaohui, Email: cxhgz168@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of micro-RNAs (miR-101 and miR-125a-5p) in autophagy of lipopolysaccharide (LPS) derived human THP-1 macrophages. **Methods** Human monocytic leukemia cell line THP-1 was cultured *in vitro*, and it was differentiated into macrophages after being induced with phorbol (50 μg/L) for 48 hours. THP-1 macrophages were stimulated with LPS in 0, 250, 500, 1 000 μg/L respectively for 12 hours. miR-mimic was transfected into THP-1 macrophages as induced by Lipofectamine RNAiMAX, and the transfection efficiency of miRNA was determined with fluorescence microscopy. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and monocyte chemotaxis protein-1 (MCP-1) in the supernatants of culture. Western Blot was used to detect the protein expressions of autophagy proteins ATG4D, Beclin1, and LC3Ⅱ. The

expression levels of miR-101 and miR-125a-5p were determined by quantitative reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** ① The releasing levels of TNF- α and MCP-1 induced by LPS with 250, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ were significantly increased as compared the cells without LPS stimulation [TNF- α (ng/L): $1\,336.1 \pm 18.5$, $1\,340.6 \pm 24.8$, $1\,364.5 \pm 14.9$ vs. 47.6 ± 4.4 ; MCP-1 (ng/L): 996.3 ± 51.3 , 934.6 ± 84.3 , 974.2 ± 69.5 vs. 21.3 ± 6.5 , all $P < 0.01$], but no significant differences were found among the three LPS stimulation groups. The protein expressions of ATG4D, Beclin1 and LC3 II were up-regulated in the presence of different LPS concentrations (0, 250, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$) for 12 hours in THP-1 macrophages (when compared with the cells without LPS stimulation, t value of ATG4D was 8.103, 38.410, 52.020, P value was 0.015, 0.001, < 0.001 ; t value of Beclin1 was 3.026, 5.328, 3.482, P value was 0.047, 0.034, 0.037; t value of LC3 II was 3.836, 6.200, 4.665, P value was 0.018, 0.003, 0.010), and the optimal concentration was 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ LPS. When THP-1 macrophages were stimulated with 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ LPS for 12 hours, the expression levels of miR-101 and miR-125a-5p were down-regulated significantly as compared with the cells without LPS stimulation [$\text{miR-101 } (2^{-\Delta\Delta C_t})$: 0.68 ± 0.08 vs. 1.95 ± 0.26 , $t = 8.047$, $P = 0.001$; $\text{miR-125a-5p } (2^{-\Delta\Delta C_t})$: 0.23 ± 0.06 vs. 1.69 ± 0.42 , $t = 5.975$, $P = 0.004$]. ② The higher transfection efficiency was showed under fluorescence microscope. Western Blot results showed the protein expressions of ATG4D, Beclin1 and LC3 II were down-regulated as induced by an over-expression of miR-101 or miR-125a-5p in THP-1 macrophages, and more obviously down regulated by co-transfected with miR-101 and miR-125a-5p (compared with negative control group, t value was 14.550, 5.855, 14.180, P value was 0.005, 0.014, < 0.001). **Conclusion** miR-101 and miR-125a-5p can inhibit the autophagy in LPS challenged THP-1 macrophages, and the potential mechanism might be related to target regulation of ATG4D.

【Key words】 micro-RNA; Autophagy; Macrophage; Lipopolysaccharide

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (S2012010008971, S2013010014887); Guangdong Industrial Technology Research and Development Fundation Program (2012B031800233); Guangzhou Key Medical Discipline Program of Guangdong Province (2013–16)

脓毒症发病机制主要涉及炎症、内皮细胞损伤、微循环障碍、凝血功能障碍、免疫抑制、细胞凋亡、基因多态性、神经-内分泌-免疫网络等^[1–6]。研究表明,自噬参与了脓毒症的发病过程^[7–9],但其作用机制仍存在争议。微小RNA(miRNA)参与了免疫细胞功能和细胞自噬的调控^[10–11]。本研究通过体外培养人白血病单核细胞THP-1,经佛波醇(PMA)诱导分化为THP-1巨噬细胞后,用脂多糖(LPS)刺激THP-1巨噬细胞以模拟急性炎症反应细胞模型,采用转染法在细胞内过表达miR-101和miR-125a-5p,观察自噬相关蛋白的表达变化,探讨miRNA对LPS诱导细胞自噬的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂:人白血病单核细胞THP-1购自中国科学院上海细胞库;LPS(美国Sigma公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京达科为生物有限公司)。RNA寡核苷酸序列由广州莱德联康公司设计并合成。

1.2 研究方法

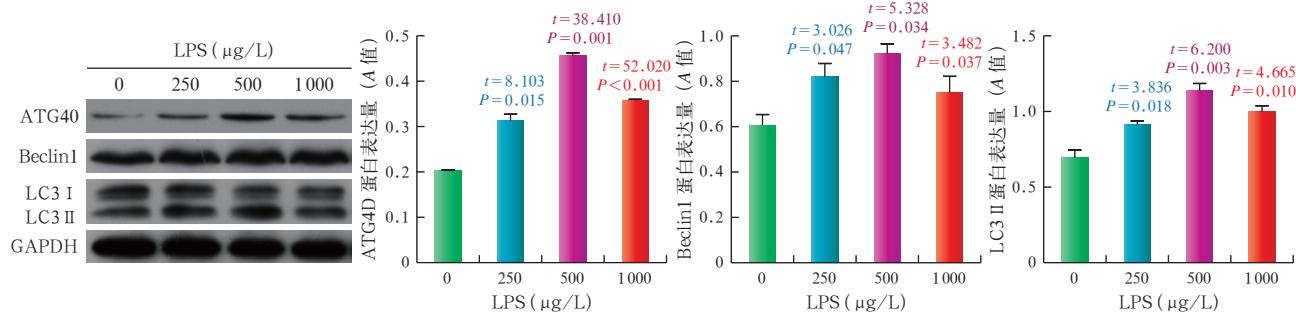
1.2.1 细胞培养及THP-1巨噬细胞的诱导:将THP-1细胞静置于37℃、5%CO₂培养箱中,采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养细胞。将

THP-1细胞以 $1 \times 10^9/\text{L}$ 的密度接种于6 cm培养皿中,用PMA(50 $\mu\text{g}/\text{L}$)诱导THP-1细胞48 h分化为巨噬细胞,用0、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ LPS梯度刺激THP-1巨噬细胞12 h模拟急性炎症反应细胞模型。

1.2.2 TNF- α 和 MCP-1 水平测定: LPS刺激12 h后取细胞培养上清液,按照ELISA试剂盒说明书检测上清液中TNF- α 和MCP-1水平。

1.2.3 定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测miRNA的表达:细胞总RNA提取按TRIzol试剂盒说明书操作,取1 μL RNA样品经50倍稀释后,测定吸光度(A)值,琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性,使用茎环法进行反转录,采用qPCR法检测miR-125a-5p和miR-101的表达。以U6作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因表达量。

1.2.4 转染试剂脂质体Lipofectamine RNAiMAX介导miRNA模拟物(miRNA-mimic)转染THP-1巨噬细胞:在miRNA中加入125 μL 无RNA酶的焦碳酸二乙酯(DEPC),得到miRNA母液,用Opti-MEM试剂稀释后加THP-1巨噬细胞,终浓度为50 nmol/L。将细胞分为阴性对照组(转染对实验无影响的阴性对照序列)、miRNA-101转染组、miRNA-125a-5p转染组及miRNA-101+miRNA-125共转染组。在转染4 h后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞1~



THP-1 为人白血病单核细胞, ATG4D、Beclin1、LC3 II 为自噬相关蛋白, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶;

t 值和 P 值为各剂量 LPS 刺激组与 0 μg/L LPS 组比较的统计结果

图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测不同剂量脂多糖(LPS)刺激 THP-1 巨噬细胞 ATG4D、Beclin1、LC3 II 表达的变化

2 次,于荧光显微镜下观察 miRNA 转染情况。以蓝色荧光激发羟基荧光素(FAM)标记的小干扰 RNA(siRNA),成功转染细胞的细胞质中有散在分布的绿色荧光;于同一视野下切换为白光,观察所有贴壁细胞,并与绿色荧光对照。

1.2.5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测自噬相关蛋白的表达:收集细胞样品,用 Lowry 法测定蛋白浓度,经凝胶电泳、转膜、5% 脱脂牛奶室温封闭,顺序加入一抗孵育过夜、洗膜,二抗孵育、洗膜,电化学发光(ECL)试剂激发荧光、曝光、显影、定影后进行图像分析。蛋白表达量以定影后目标条带 A 值与内参条带 A 值的比值表示。

1.3 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较用 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞炎性因子的释放情况(表 1):250、500、1 000 μg/L LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h 后,细胞上清液中 TNF-α、MCP-1 水平较未用 LPS 刺激细胞显著上升(均 $P < 0.01$),但 LPS 3 个剂量组间比较无明显差异。

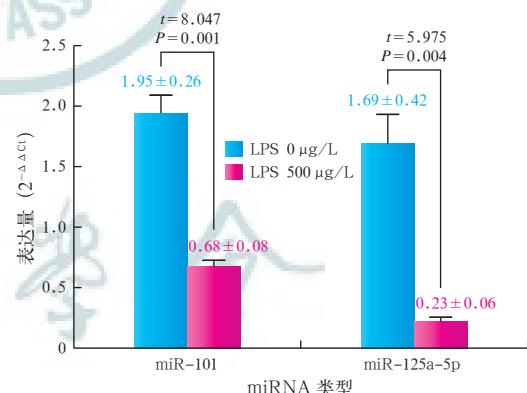
表 1 不同剂量脂多糖(LPS)刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h 后 TNF-α 和 MCP-1 的释放量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(孔)	TNF-α (ng/L)	MCP-1 (ng/L)
LPS 0 μg/L 组	3	47.6 ± 4.4	21.3 ± 6.5
LPS 250 μg/L 组	3	1 336.1 ± 18.5 ^a	996.3 ± 51.3 ^a
LPS 500 μg/L 组	3	1 340.6 ± 24.8 ^a	934.6 ± 84.3 ^a
LPS 1 000 μg/L 组	3	1 364.5 ± 14.9 ^a	974.2 ± 69.5 ^a

注:THP-1 为人白血病单核细胞,TNF-α 为肿瘤坏死因子-α,MCP-1 为单核细胞趋化蛋白-1;与 LPS 0 μg/L 组比较,^a $P < 0.01$

2.2 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞自噬相关蛋白表达的变化(图 1):250、500、1 000 μg/L LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h 后,自噬相关蛋白 ATG4D、Beclin1、LC3 II 表达均较未用 LPS 刺激细胞明显上调,其中以 500 μg/L 时效果最明显(均 $P < 0.05$)。说明 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞后,细胞自噬增强,以 500 μg/L 时最为显著。

2.3 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 miRNA 表达的变化(图 2):以 500 μg/L LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h 后,miR-101、miR-125a-5p 的表达均较未用 LPS 刺激细胞显著下降(均 $P < 0.01$)。



注:LPS 为脂多糖, THP-1 为人白血病单核细胞, miR-101 为微小 RNA-101, miR-125a-5p 为微小 RNA-125a-5p

图 2 500 μg/L LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h 后 miR-101 和 miR-125a-5p 的表达变化

2.4 miRNA 转染结果(图 3):荧光显微镜下显示,miRNA 转染 4 h 后 miRNA 已经成功转入细胞内,细胞质内呈绿色荧光(图 3A);同一视野下切换为白光后可见到较高的转染效率(图 3B),表明通过脂质体 Lipofectamine RNAiMAX 介导 THP-1 巨噬细胞的转染成功。

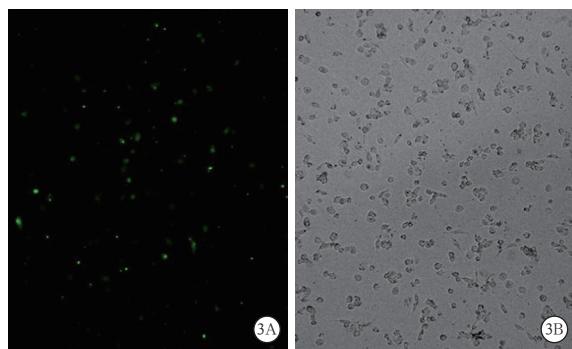


图3 荧光显微镜下观察微小 RNA (miRNA) 转染 THP-1 巨噬细胞 4 h 后的转染情况。以蓝色荧光激发羟基荧光素 (FAM) 标记的小干扰 RNA (siRNA), 成功转染细胞的细胞质中有散在分布的绿色荧光。荧光显微镜下显示 miRNA 成功转入细胞内 (A); 于同一视野下切换为白光后, 观察细胞贴壁情况可见转染效率较高 (B) 低倍放大

2.5 miRNA 转染对自噬相关蛋白表达水平的影响 (图4): miRNA 转染 24 h 后, 以 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h, 与阴性对照组相比, miR-101 或 miR-125a-5p 转染均可使 ATG4D、Beclin1、LC3 II 表达明显下调, 以 miR-101 和 miR-125a-5p 共转染组变化显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明 miR-101 与 miR-125a-5p 均能抑制 LPS 诱导 THP-1 巨噬细胞中自噬相关蛋白的表达, 且两者具有协同作用。

3 讨论

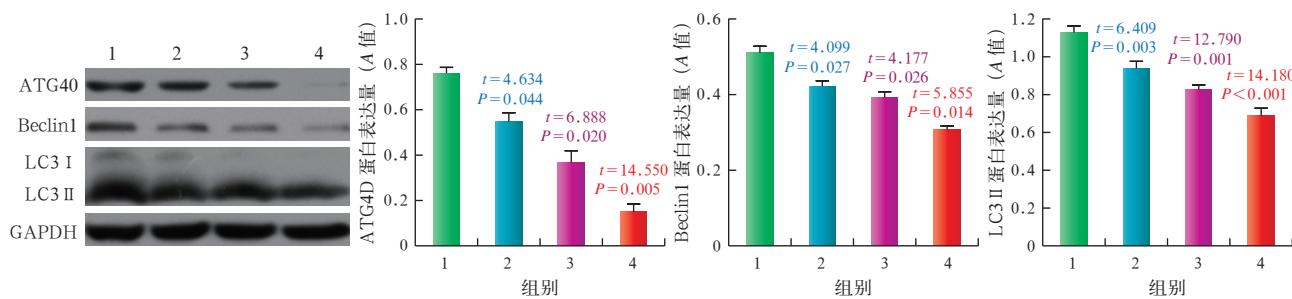
研究发现, 自噬参与了 LPS 激活的巨噬细胞炎症反应^[12], 并在炎症反应过程中起重要作用^[13]。LC3、Beclin1 是主要的自噬相关蛋白^[14], 其中 LC3 是酵母 ATG8 在哺乳动物中的同源物, 包括 LC3A、LC3B、LC3C 亚型, 以 3 种形式存在于细胞中, 即 LC3 前体、LC3 I、LC3 II^[15]。ATG4D 属于内切酶 ATG4 家族中的一员, 是自噬体生物合成途径中的关键调节组件之一^[16]。自噬发生过程中, LC3 前体经过 ATG4D 剪切后成为胞质可溶性的 LC3 I, 与

磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合成为 LC3 II, 然后结合到自噬小体膜上, 参与自噬小体的装配, 促进自噬小体的成熟^[17-18]。目前认为 LC3 II 含量的多少可代表自噬活性强弱。Beclin1 是 ATG6 的同源物^[19], 是与人体细胞自噬形成相关的重要蛋白之一。

LC3 II、Beclin1 蛋白表达是评价自噬水平的重要手段。本研究结果显示, LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h 后自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II 表达上调, 提示 LPS 刺激后细胞自噬增强, 同时自噬调节蛋白 ATG4D 的表达水平也明显增加, 证实 ATG4D 在 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞导致自噬增强的过程中作用显著; LPS 为 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, 自噬相关蛋白表达上调的幅度最为明显, 提示上调细胞自噬水平的程度与 LPS 剂量有关; 同时也证实在 LPS 诱导细胞释放炎性因子导致炎症反应增强的同时, 细胞的自噬水平是增强而不是减弱的。

大量研究表明, miRNA 对细胞自噬的调控具有重要作用, 如 miR-30a、miR-376b、miR-519a 可调控 Beclin1, miR-376b 可调控 ATG4, miR-204 可调控 LC3B^[11, 20-21]; miR-101 是细胞自噬的强抑制剂^[22]。在肝癌细胞中, miR-101 靶向调节自噬基因 ATG4D 并使其表达下调, 从而抑制自噬^[23]。本研究通过 miRNA 靶基因分析软件预测, miR-125a-5p 也可能靶向调节 ATG4D, 故本研究探讨 miR-101、miR-125a-5p 对 LPS 诱导 THP-1 巨噬细胞自噬的调控作用。

本研究显示, LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞 12 h 后 miR-101 和 miR-125a-5p 表达较未用 LPS 刺激细胞显著下调, 表明 LPS 诱导 miR-101、miR-125a-5p 的表达下调与细胞自噬增强的关系密切; 通过脂质体 Lipofectamine RNAiMAX 介导这两个 miRNA 转染 THP-1 巨噬细胞 4 h 后显示转染效率较高, 表明



1 为阴性对照组, 2 为 miR-101 转染组, 3 为 miR-125a-5p 转染组, 4 为 miR-101 和 miR-125a-5p 共转染组;
LPS 为脂多糖, THP-1 为人白血病单核细胞, ATG4D、Beclin1、LC3 II 为自噬相关蛋白, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶;
 t 值和 P 值为各剂量 LPS 刺激组与 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ LPS 组比较的统计结果

图4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测微小 RNA (miRNA) 转染对 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞自噬相关蛋白表达的影响

THP-1 巨噬细胞转染成功。转染 24 h 后 Western Blot 分析结果显示, miR-101 或 miR-125a-5p 转染后细胞 ATG4D 表达均较阴性对照组明显下调, 说明 miR-101 或 miR-125a-5p 过表达均可导致 ATG4D 表达明显下调; 而在 THP-1 巨噬细胞中同时过表达 miR-101 和 miR-125a-5p 这两个基因后, ATG4D 下调程度更为显著, 说明 miR-101、miR-125a-5p 有协同作用, miR-101、miR-125a-5p 转染引起 ATG4D 显著变化的同时也引起了 Beclin1、LC3 II 蛋白发生类似变化, 证明 miR-101、miR-125a-5p 对 LPS 诱导的 THP-1 巨噬细胞的整体自噬水平有抑制作用。

综上所述, miR-101、miR-125a-5p 能下调 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞后自噬相关蛋白的表达水平, 即抑制了 LPS 诱导的自噬效应, 其机制可能是通过靶向调节 ATG4D 实现的。

参考文献

- [1] Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, et al. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis [J]. *Intensive Care Med*, 2010, 36 (8): 1286–1298. DOI: 10.1007/s00134-010-1893-6.
- [2] 齐海宇, 肖红丽, 阴赫宏, 等. 内毒素血症急性肝损伤的特点及致病机制 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (2): 144–146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.020.
- [3] Qi HY, Xiao HL, Yin CH, et al. The characteristics and pathogenesis of acute liver injury induced by endotoxin [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2014, 21 (2): 144–146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.020.
- [4] Chai X, Guo Y, Jiang M, et al. Oestrogen sulfotransferase ablation sensitizes mice to sepsis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7979. DOI: 10.1038/ncomms8979.
- [5] 韩宇, 高传玉, 秦秉玉, 等. 抗凝治疗对脓毒症凝血和炎症指标的影响及其意义 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (2): 102–105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.005.
- [6] Han Y, Gao CY, Qin BY, et al. The effect of anticoagulant therapy on coagulation and inflammation markers in sepsis patients and its significance [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (2): 102–105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.005.
- [7] 贺能英, 严启滔, 郭振辉. 脓毒症的免疫反应与炎症 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (6): 435–438. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.004.
- [8] He NY, Yan QT, Guo ZH. Immune response and inflammation in sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (6): 435–438. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.004.
- [9] 张平平, 王庆树, 李志军, 等. 血必净注射液对脓毒症患者凝血功能的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (3): 198–200. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.010.
- [10] Zhang PP, Wang QS, Li ZJ, et al. Effects of Xuebijing injection on blood coagulation in patients with sepsis [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2014, 21 (3): 198–200. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.010.
- [11] Tang Z, Ni L, Javidiparsijani S, et al. Enhanced liver autophagic activity improves survival of septic mice lacking surfactant proteins A and D [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2013, 231 (2): 127–138. DOI: 10.1620/tjem.231.127.
- [12] Carchman EH, Rao J, Loughran PA, et al. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 53 (6): 2053–2062. DOI: 10.1002/hep.24324.
- [13] Gutierrez MG, Vazquez CL, Munoz DB, et al. Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7 (7): 981–993. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00527.x.
- [14] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-κB-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. DOI: 10.1073/pnas.0605298103.
- [15] 张振辉, 熊旭明, 江子欣, 等. miR-129 和 miR-142-3p 对人单核细胞凋亡与自噬的作用研究 [J]. 中国急救医学, 2014, 34 (1): 62–66. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2014.01.015.
- [16] Zhang ZH, Xiong XM, Jiang ZX, et al. The regulatory effect of miR-129 and miR-142-3p on autophagy and apoptosis in THP-1 cell [J]. *Chin J Crit Care Med*, 2014, 34 (1): 62–66. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2014.01.015.
- [17] 曹丽丹. 自噬在巨噬细胞介导的炎症中的作用及其机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [18] Cao LJ. Autophagy participates in LPS-stimulated inflammation in macrophage and its mechanisms [D]. Suzhou: Suzhou University, 2012.
- [19] 何贤辉, 何健, 欧阳东云. 细胞自噬与炎症反应相互作用的研究进展 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2013, 34 (2): 125–128. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9965.2013.02.001.
- [20] He XH, He J, Ouyang DY. Advances in the interaction of autophagy with inflammatory response [J]. *J Jinan Univ (Nat Sci Med Ed)*, 2013, 34 (2): 125–128. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9965.2013.02.001.
- [21] Tanida I. Autophosome formation and molecular mechanism of autophagy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14 (11): 2201–2214. DOI: 10.1089/ars.2010.3482.
- [22] Slobodkin MR, Elazar Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy [J]. *Essays Biochem*, 2013, 55 : 51–64. DOI: 10.1042/bse0550051.
- [23] Kyostila K, Syrja P, Jagannathan V, et al. A missense change in the ATG4D gene links aberrant autophagy to a neurodegenerative vacuolar storage disease [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11 (4): e1005169. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005169.
- [24] Nakatogawa H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy [J]. *Essays Biochem*, 2013, 55 : 39–50. DOI: 10.1042/bse0550039.
- [25] Frankel LB, Lund AH. MicroRNA regulation of autophagy [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33 (11): 2018–2025. DOI: 10.1093/carcin/bgs266.
- [26] Wirawan E, Lippens S, Vandendriessche BT, et al. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond [J]. *Autophagy*, 2012, 8 (1): 6–17. DOI: 10.4161/auto.8.1.16645.
- [27] Kim Y, Lee J, Ryu H. Modulation of autophagy by miRNAs [J]. *BMB Rep*, 2015, 48 (7): 371–372. DOI: 10.5483/BMBRep.2015.48.7.121.
- [28] Wang P, Liang J, Li Y, et al. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39 (7): 1279–1291. DOI: 10.1007/s11064-014-1310-6.
- [29] Frankel LB, Wen J, Lees M, et al. microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy [J]. *EMBO J*, 2011, 30 (22): 4628–4641. DOI: 10.1038/emboj.2011.331.
- [30] Xu Y, An Y, Wang Y, et al. miR-101 inhibits autophagy and enhances cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29 (5): 2019–2024. DOI: 10.3892/or.2013.2338.

(收稿日期: 2015-10-13)

(本文编辑: 孙茜, 李银平)