

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

刘芬 曾振国 聂成 丁成志 邵强 卿城 钱克俭

【摘要】 目的 观察转染微小 RNA-146a (miR-146a) 对大鼠肺泡巨噬细胞炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响, 探讨转染 miR-146a 对肺泡巨噬细胞炎症反应的调控作用。方法 体外培养大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383, 分别以 25、50、100 nmol/L Cy^{TM3} 标记的 Pre-miRTM 阴性对照转染细胞, 选择转染效率最高的浓度作为实验浓度。将 NR8383 细胞分成两组, 转染组转染 50 nmol/L Pre-miRTM miR-146a 前体, 对照组转染 50 nmol/L Cy^{TM3} 标记的 Pre-miRTM 阴性对照, 采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测转染后细胞内 miR-146a 的 mRNA 表达。用脂多糖 (LPS) 1 mg/L 刺激细胞 6 h 后, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定细胞培养上清液内 TNF- α 蛋白表达, 采用 RT-qPCR 检测细胞内 TNF- α mRNA 表达。结果 以 50 nmol/L Cy^{TM3} 标记的 Pre-miRTM 阴性对照转染细胞效率最高, 约为 80%。与对照组 (作为 1) 相比, 转染组细胞内 miR-146a 的 mRNA 表达上调了 (24.55 \pm 6.14) 倍 ($P < 0.01$)。LPS 刺激后, 转染组细胞上清液 TNF- α 蛋白含量 (ng/L) 较对照组明显下降 (211.5 \pm 30.4 比 616.6 \pm 42.3, $P < 0.01$), 细胞内 TNF- α mRNA 表达下调了 (47 \pm 6)% ($P < 0.05$)。结论 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 能抑制 LPS 诱导肺泡巨噬细胞的炎症反应。

【关键词】 微小 RNA-146a; 肺泡巨噬细胞; 肿瘤坏死因子- α

Effect of transfection of microRNA-146a on expression of tumor necrosis factor- α in alveolar macrophages

LIU Fen, ZENG Zhen-guo, NIE Cheng, DING Cheng-zhi, SHAO Qiang, QING Cheng, QIAN Ke-jian. Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

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

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of transfected microRNA-146a (miR-146a) on expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in alveolar macrophages, and to analyze its regulatory mechanism in the inflammatory response of alveolar macrophages. **Methods** Cy^{TM3} labeled with 25, 50, 100 nmol/L of Pre-miRTM, respectively, were transfected into rat alveolar macrophages NR8383 cultured in vitro. The highest transfection efficiency was selected to be the experimental concentration. NR8383 cells were divided into two groups: transfected group was transfected with 50 nmol/L Pre-miRTM miR-146a precursor, and control group with 50 nmol/L Cy^{TM3} labeled Pre-miRTM as the negative control. The mRNA expression of miR-146a of cells was detected by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). Then cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 1 mg/L) for 6 hours. The production of TNF- α protein in the supernatant of cells was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of TNF- α mRNA of cells was detected by RT-qPCR. **Results** Transfection rate was highest in the 50 nmol/L Cy^{TM3} labeled Pre-miRTM cells, and it reached 80%. Compared with control group (set at 1), the expression of miR-146a increased by (24.55 \pm 6.14) folds in transfected alveolar macrophages ($P < 0.01$). After the cells were stimulated with LPS, the production of TNF- α protein (ng/L) in the supernatant of cell was decreased from 616.6 \pm 42.3 to 211.5 \pm 30.4 ($P < 0.01$), and the expression of TNF- α mRNA was decreased by (47 \pm 6)% ($P < 0.05$) in transfected alveolar macrophages when compared with that of the control. **Conclusions** Transfection alveolar macrophages with miR-146a precursors could down-regulate the expression of TNF- α . It is therefore suggests that up-regulation of miR-146a can inhibit inflammatory responses as induced by LPS, in alveolar macrophages.

【Key words】 MicroRNA-146a; Alveolar macrophages; Tumor necrosis factor- α

许多研究发现,微小 RNA-146a(miR-146a)参与了机体的固有免疫反应,在 Toll 样受体 / 核转录

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.06.005

基金项目:国家自然科学基金(81060152);国家自然科学基金(811160233);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重症医学科

通信作者:钱克俭,Email:qkj0607@sohu.com

因子- κ B(TLRs/NF- κ B)通路中具有重要的调控作用^[1-2]。本课题组前期研究发现,脂多糖(LPS)在诱导肺泡巨噬细胞产生炎症因子的同时,也诱导了 miR-146a 表达的升高,并且 miR-146a 与炎症因子呈负相关^[3-4],miR-146a 表达水平上升后,炎症因子的释放减少^[5],推测 miR-146a 可能参与了肺泡巨噬

细胞炎症反应的调控。为了进一步明确 miR-146a 在肺泡巨噬细胞炎症反应中的调控作用, 本实验通过体外转染 Pre-miRTM miR-146a 前体, 上调肺泡巨噬细胞内 miR-146a 的表达, 观察其对炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响, 进一步探讨 miR-146a 在炎症反应中的调控作用。

1 材料与方 法

1.1 材料:大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 购于中国科学院细胞库; 胎牛血清由美国 HyClone 公司提供, Ham F-12K 培养基、LPS (E.coli 0111:B4) 为美国 Sigma-Aldrich 公司产品; Pre-miRTM miR-146a 前体、CyTM3 标记的 Pre-miRTM 阴性对照、TaqMan[®] miRNA 逆转录试剂盒、TaqMan[®] 聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒、TaqMan[®] RNA 测定试剂盒为美国 ABI 公司产品, 大鼠 TNF- α 定量酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司), TRIzol (美国 Invitrogen 公司), PrimeScript[®] 逆转录 (RT) 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II PCR 检测试剂盒 (大连宝生物工程有限公司)。氯仿、异丙醇及无水乙醇等均为国产分析纯。

1.2 细胞培养:NR8383 细胞接种于含 15% 胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1.5 g/L 碳酸氢钠的 Ham F-12K 培养基, 大气压下 37 °C、5% CO₂ 温湿培养箱中培养, 2~3 d 换液 1 次, 3~4 d 传代 1 次。

1.3 细胞优化转染效率:6 孔板每孔接种 1.5×10^6 个细胞, 每孔 2 ml, 使细胞生长面积达到 50%, 放置培养箱内培养 90 min 后, 分别加入 3 个浓度的阴性对照转染细胞, 终浓度分别为 25、50、100 nmol/L, 每组设 2 个复孔, 再培养 6 h, 收集细胞去掉培养基, 再加入新鲜完全培养基重悬细胞后, 接种培养板, 放置培养箱内贴壁 1 h 后于倒置荧光显微镜下观察, 采用绿色荧光激发 CyTM3, 发射出红橙光, 计算细胞转染效率。选取转染效率最高的浓度转染 miR-146a 前体进行下一步的功能研究。

1.4 实验分组及处理:将转染好的细胞按每孔 1.5×10^6 个接种至 6 孔板, 每孔 2 ml, 实验分两组, 每组 5 个复孔。转染组培养基中加入 50 nmol/L 浓度的 Pre-miRTM miR-146a 前体进行转染; 对照组培养基中加入 50 nmol/L CyTM3 标记的 Pre-miRTM 阴性对照进行转染。培养 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) 检测细胞内 miR-146a 的表达倍数。两组细胞转染后继续培养 24 h 再加入 1 mg/L 终浓度的 LPS 处理细胞 6 h, 离心收集细胞团块和细胞上清液, 保存于 -80 °C 冰

箱, 分别用于细胞总 RNA 提取和 ELISA 检测。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 TNF- α 蛋白含量测定:收集各组细胞的培养上清液, 按照 ELISA 试剂盒操作说明书步骤检测 TNF- α 蛋白含量。

1.5.2 RNA 提取:采用 TRIzol 法提取细胞内总 RNA, 通过紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性及纯度。

1.5.3 TNF- α mRNA 表达测定:应用 RT 试剂盒反转录 RNA, 反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保存。采用 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 57 °C 20 s, 2 °C 27 s, 40 个扩增循环。选取 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参基因, TNF- α mRNA 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.5.4 miR-146a mRNA 表达测定:应用 RT 试剂盒反转录 RNA, 反应条件: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min。应用 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 40 个扩增循环。使用 ABI 7500 定量 PCR 仪进行扩增和检测。所有操作按试剂盒说明书进行, 操作均在冰上完成。U6 snRNA 作为内参照, miR-146a 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.6 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, 数据以均数 \pm 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 倒置荧光显微镜下观察细胞转染效率 (图 1):转染 CyTM3 标记的 Pre-miRTM 阴性对照进入 NR8383 细胞 6 h 后, 绿色荧光下激发, 可见成功转染的细胞发出红橙光, 25 nmol/L 转染效率为 70%, 50 nmol/L 转染效率为 80%, 100 nmol/L 时转染效率为 50%。表明用 50 nmol/L 时转染细胞效率最高。

2.2 转染 NR8383 细胞后 miR-146a 的 mRNA 表达 (图 2):转染组 miR-146a mRNA 表达较对照组上调了 (24.55 ± 6.14) 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明应用 50 nmol/L 浓度的 Pre-miRTM miR-146a 前体转染细胞后 miR-146a 的表达量明显升高。

2.3 上调 miR-146a 对 LPS 诱导 TNF- α 表达的影响 (图 2):转染组 TNF- α 蛋白表达较对照组明显下降 (ng/L: 211.5 ± 30.4 比 616.4 ± 42.3 , $P < 0.01$)。转染组 TNF- α mRNA 表达较对照组下调了 $(47 \pm 6)\%$ ($P < 0.05$)。表明过表达 miR-146a 能下调 LPS 诱导的 NR8383 细胞 TNF- α 的表达。

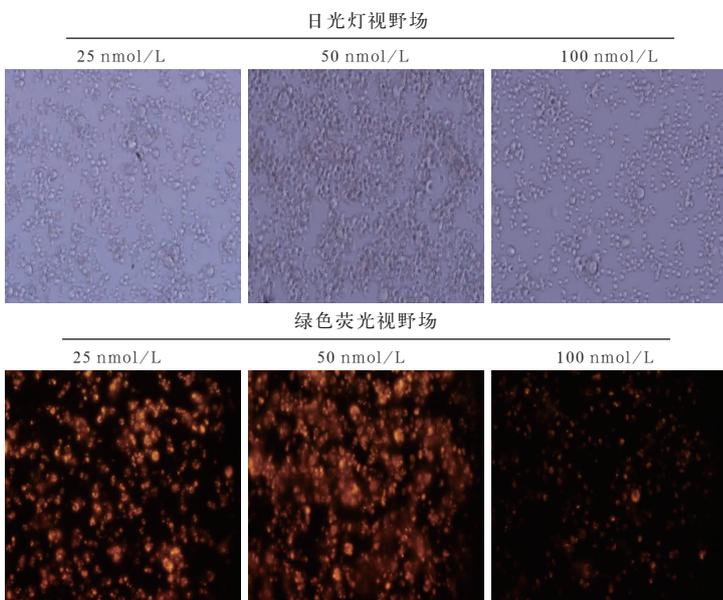
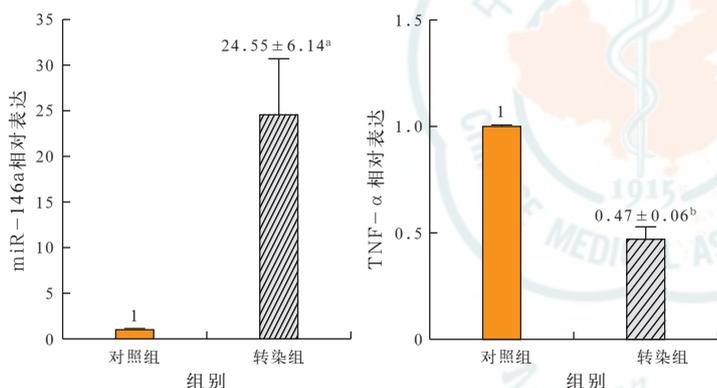


图 1 倒置荧光显微镜下观察不同浓度 Cy³ 标记的 Pre-miRTM 阴性对照转染大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 的转染情况 成功转染的细胞呈红橙光, 50 nmol/L 时转染细胞最多, 其次为 25 nmol/L、100 nmol/L 时 高倍放大



注: miR-146a: 微小 RNA-146a, LPS: 脂多糖, TNF-α: 肿瘤坏死因子-α, 对照组: NR8383 细胞转染 50 nmol/L 浓度的 Cy³ 标记的 Pre-miRTM 阴性对照, 转染组: NR8383 细胞转染 50 nmol/L 浓度的 Pre-miRTM miR-146a 前体; 与对照组比较, ^aP < 0.01, ^bP < 0.05

图 2 不同转染方法转染大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 后对 miR-146a 及 LPS 诱导 TNF-α 表达的影响

3 讨论

肺泡巨噬细胞是肺组织中最多的非实质性细胞^[6], 是肺组织固有免疫系统的第一道防线, 过度释放的炎症因子导致肺内炎症“瀑布”反应, 是引起急性肺损伤 / 急性呼吸窘迫综合征 (ALI/ARDS) 的关键原因^[7-8]。TNF-α 是导致肺部炎症反应级联放大的始发因子和肺组织损伤的效应因子。因此, 本实验选取肺泡巨噬细胞来构建炎症反应模型, 并通过检测细胞 TNF-α 的表达情况来验证模型是否成功, 以及判断炎症的反应程度^[9]。本研究发现, LPS 刺激肺泡巨噬细胞后, TNF-α mRNA 及蛋白表达明显上升,

证明炎症反应模型可靠。

miRNAs 为小的内源性非编码 RNA, 约 22 个核苷酸长度, 在进化中高度保守^[10]。在胞质中 miRNAs 与其介导基因沉默途径中的效应分子 Argonaute 等蛋白分子结合形成 miRNA 诱导沉默复合物, 通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区 (3'UTR), 从而抑制蛋白的翻译或促进靶基因的降解^[11-12]。现已研究证实 miRNA 与炎症反应密切相关^[1], 其中 miR-146a 是目前研究的热点。

Pre-miRTM miR 前体是一类小的经化学修饰的双链 RNAs, 它包含一条与已知的成熟目的 miRNA 相同的单链 RNA, 当 Pre-miRTM miR-146a 前体转入细胞后, 可以通过内源性 miRNA 加工通路生成成熟的 miR-146a。本实验通过转染 Pre-miRTM miR-146a 前体到肺泡巨噬细胞后发现, miR-146a 的 mRNA 表达上调了 (24.55 ± 6.14) 倍, 并且观察到上调 miR-146a 后能明显抑制 TNF-α 的蛋白表达, 表明 miR-146a 能抑制 LPS 诱导肺泡巨噬细胞的炎症反应。

miRNAs 主要是通过识别靶基因 mRNA 的 3'UTR, 从而抑制蛋白的翻译或促进靶基因的降解, 本实验研究已证实 miR-146a 能抑制 TNF-α 的蛋白表达, 然而作用机制尚不明确。miR-146a 是直接作用于 TNF-α mRNA, 还是作用于 TNF-α 蛋白生成通路中的其他因子, 还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9: 514-520.
- [2] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-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.
- [3] 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. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 540-542.
- [4] 曾振国, 李勇, 刘芬, 等. MicroRNA-146a 在脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞中表达的动态变化. 中华急诊医学杂志, 2011, 20: 134-136.
- [5] 曾振国, 龚洪翰, 李勇, 等. 附注射液对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a 表达的影响. 中国危重病急救医学, 2012, 24: 166-169.
- [6] Etensohn DB, Jankowski MJ, Redondo AA, et al. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. 2. Safety and results of repeated BAL, and use in the assessment of intrasubject variability. Chest, 1988, 94: 281-285.
- [7] Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, et al. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. J Immunol, 2002, 169: 6467-6473.

- [8] 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.
- [9] Steffel J, Latini RA, Akhmedov A, et al. Rapamycin, but not FK-506, increases endothelial tissue factor expression: implications for drug-eluting stent design. *Circulation*, 2005, 112: 2002-2011.
- [10] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136: 642-655.
- [11] Farh KK, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 2005, 310: 1817-1821.
- [12] 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.

(收稿日期: 2013-03-04)

(本文编辑: 李银平)

· 科研新闻速递 ·

急性肺损伤在不同性别、种族间的发生情况

既往研究表明,不同性别和种族间急性肺损伤(ALI)患者的病死率不尽相同,但目前并无研究表明它们之间存在相关性。为此,美国研究人员进行了一项多中心队列研究,旨在了解ALI发病率和病死率是否与年龄及种族相关。研究对象为存在ALI发病风险的5201例患者。结果发现:ALI的发病率为5.9%;患者院内总病死率为5.0%,其中ALI患者病死率为24.4%。男性患者较女性患者更容易发生ALI(6.9%比4.7%, $P=0.001$),而不同性别的ALI患者病死率并无显著差异(男性27.6%,女性18.5%, $P=0.08$);当去除混杂因素后,不同性别患者ALI的发病率并无显著差异。黑人患者较白人患者更容易出现肺炎、脓毒症、休克及重症表现,但是黑人患者较少进展为ALI(4.5%比6.5%, $P=0.014$);当去除混杂因素后,这种统计学上的显著差异依然存在(优势比为0.66,95%可信区间为0.45~0.96)。研究结果表明,当去除混杂因素后,ALI的发生和结局在不同性别及种族的高危患者间无显著差异;而尽管黑人患者症状较重,但其较少进展为ALI。

罗红敏,胡森,编译自《Chest》,2013,143(4):901-909

哮喘-慢性阻塞性肺疾病重叠综合征患者的流行病学调查

目前尚不清楚同时患有慢性阻塞性肺疾病(COPD)和哮喘(哮喘-COPD重叠综合征)患者的流行病学情况,为此,最近意大利研究人员进行了一项流行病学调查研究,旨在了解COPD、哮喘、哮喘-COPD重叠综合征患者的流行病学情况。研究人员采用问卷调查的形式收集了20~44岁($n=5163$)、45~64岁($n=2167$)、65~84岁($n=1030$)的意大利普通人群的相关资料并进行了相关分析。结果发现,65岁以下人群哮喘或COPD的发病率为13%,65岁以上人群的发病率为21%。随着年龄的增长,哮喘的发病率逐渐降低(8.2%~1.6%),而COPD的发病率逐渐增高(3.3%~13.3%)。各年龄组人群哮喘-COPD重叠综合征的发病率分别为1.6%(20~44岁)、2.1%(45~64岁)、4.5%(65~84岁)。与仅患有哮喘或COPD的患者相比,哮喘-COPD重叠综合征患者更容易出现呼吸系统症状及肺功能损害,而且其住院率更高($P<0.01$)。该研究结果表明,哮喘与COPD在普通人群中并不少见,其中有一部分患者同时患有哮喘和COPD,这类患者临床症状更加严重,因此需要得到更多的关注。

罗红敏,胡森,编译自《PLoS One》,2013,8(5):e62985

阿奇霉素维持治疗对感染恶化的非囊性纤维化

支气管扩张患者的效果:一项随机对照试验

大环内酯类抗菌药物已被证明对囊性纤维化(CF)和弥漫性泛细支气管炎有益,早期的研究结果也表明大环内酯类抗菌药物同样可使非CF支气管扩张患者获益。最近荷兰学者进行了一项多中心随机双盲对照临床研究,旨在评价阿奇霉素维持治疗在非CF支气管扩张患者中的效果。该研究纳入2008年4月至2010年9月荷兰14家医院收治83例在上一年度合并3次或更多次下呼吸道感染的非CF支气管扩张门诊患者,研究干预为阿奇霉素或安慰剂维持治疗(250 mg/d)12个月。研究的主要终点指标为12个月治疗期间的感染加重数;次要终点指标包括肺功能、痰细菌学、炎症标志物、副作用、症状评分和生活质量等。该研究有43例(52%)接受阿奇霉素治疗,40例(48%)接受安慰剂。在研究结束时,阿奇霉素组病情加重患者中位数为0(四分位数间距为1),而安慰剂组为2(四分位数间距为2),差异有统计学意义($P<0.001$);32例(80%)安慰剂处理和20例(46%)阿奇霉素治疗的患者至少出现1次病情加重[风险比为0.29,95%可信区间(95%CI)为0.16~0.51]。随着时间的推移,第一秒用力呼气容积(预测百分比)的变化情况在两组间存在明显差异($P=0.047$),阿奇霉素组每3个月同比增长1.03%,安慰剂组则跌幅0.10%。阿奇霉素组有40%发生胃肠道不良反应,安慰剂组有5%[腹痛相对危险度(RR)为7.44,95%CI为0.97~56.88;腹泻RR为8.36,95%CI为1.10~63.15],但两组均无需停止研究治疗。阿奇霉素治疗的个体中大环内酯类抗菌药物的耐药率为88%,安慰剂组则为26%。该临床研究显示,日常使用阿奇霉素治疗12个月,与安慰剂相比,成人非CF支气管扩张患者感染加重发生率较低,使得患者有更好的生活质量,并可能影响生存,但对抗菌药物耐药性的影响需要加以考虑。

喻文,胡森,编译自《JAMA》,2013,309(12):1251-1259