

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.13.004

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20190530.1344.007.html(2019-5-31)

miR-146a 对血小板免疫炎症功能的影响*

徐吉淋^{1,2}, 王路乔³, 梁倩⁴, 杨人强^{2△}

(1. 长江航运总医院心血管内科, 武汉 430019; 2. 南昌大学第二附属医院心血管内科, 南昌 330006; 3. 昆明医科大学第一附属医院心血管内科, 昆明 650031; 4. 南昌大学第二附属医院分子中心, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨 miR-146a 对血小板免疫炎症功能的影响。**方法** 体外培养双分化潜能的 K562 细胞, 佛波酯诱导其向巨核细胞系分化, 分别导入 miR-146a 模拟物和阻遏物。ELISA 检测白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达水平; Western blot 及 RT-PCR 检测转染细胞后 Toll 样受体 4(TLR4)、核因子(NF)- κ B 蛋白和 mRNA 的表达水平; 通过荧光素酶报告基因法验证 IL-1 受体相关激酶 1(IRAK1) 是否含有 miR-146a 的靶位点, 观察 miR-146a 对靶基因 IRAK1 的影响。**结果** 过表达 miR-146a 后, 细胞上清中 IL-6、TNF- α 水平降低, TLR4 蛋白表达明显升高, NF- κ B mRNA 和蛋白表达明显降低。抑制 miR-146a 后, 细胞上清中 IL-6、TNF- α 水平升高, TLR4 蛋白表达明显降低, NF- κ B mRNA 和蛋白表达明显升高。双荧光素酶报告实验证实 Pmir-Report-WT-IRAK1 和 miR-146a mimic 共转染组的荧光素酶报告基因活性明显受到抑制, miR-146a 过表达可抑制 IRAK1 蛋白表达, 而对 IRAK1 mRNA 表达无影响。**结论** miR-146a 可能通过 IRAK1 作用于 TLR4/NF- κ B 信号通路, 从而调控血小板免疫炎症。

[关键词] 微 RNA-146a; Toll 样受体 4/核因子- κ B; 血小板; 免疫炎症**[中图分类号]** R743**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)13-2175-05**Impact of miR-146a on immune inflammation function of platelets***XU Jilin^{1,2}, WANG Luqiao³, LIANG Qian⁴, YANG Renqiang^{2△}

(1. Department of Cardiovascular Medicine, General Hospital of Yangtze River Shipping, Wuhan, Hubei 430019, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650031, China; 4. Molecular Center, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of miR-146a on the immune inflammation function of platelets. **Methods** The dual differentiation potential K562 cells were cultured in vitro and induced to differentiate to megakaryocytic cell line by phorbol ester. miR-146a mimic and miR-146a repressor were transfected respectively. The expression levels of IL-6 and TNF- α were detected by ELISA, RT-PCR and Western blot were used to detect TLR4 and NF- κ B protein and mRNA levels. Then whether IRAK1 containing the targeted point of miR-146a was verified by luciferase reporter gene method (CALUX) and the impact of miR-146a on targeted gene IRAK1 was observed. **Results** The expression levels of IL-6 and TNF- α in the cellular supernatant decreased after over-expressing miR-146a; the TLR4 protein level significantly increased, while the NF- κ B mRNA and protein levels significantly decreased. After inhibiting miR-146a, the levels of IL-6 and TNF- α in the cellular supernatant increased and the TLR4 protein level significantly decreased, while the NF- κ B mRNA and protein levels significantly increased. The dual CALUX experiment verified that the CALUS activity in the Pmir-Report-WT-IRAK1 and miR-146a co-transfection group was significantly suppressed and miR-146a over-expression could suppress the IRAK1 protein expression level without impact on IRAK1 mRNA level. **Conclusion** miR-146a acts on the TLR4/NF- κ B signaling pathway possibly by IRAK1, thus regulates platelet immune inflammation.

[Key words] miR-146a; TLR4/NF- κ B; platelet; immune inflammation

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81160027, 81860073); 云南省教育厅科研基金项目(2018JS206); 昆明医科大学第一附属医院博士启动基金项目(2017BS006)。 作者简介: 徐吉淋(1989-), 住院医师, 硕士, 主要从事心血管冠心病研究。 △ 通信作者, E-mail: yangrenqiangcn@163.com。

血小板的激活和各种血小板因子的释放是触发急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的始动和核心环节。最近的研究发现,血小板的激活不仅能促进血栓形成,还能激活机体免疫炎症反应^[1-2]。血小板表面存在 Toll 样受体 4(TLR4)、CD40L、P-selectin 等免疫分子。TLR4 的表达在活化和非活化的血小板之间不同,活化的血小板 TLR4 表达明显升高^[3-4]。TLR4 在 ACS 患者单核细胞中过表达,并且这些过表达的 TLR4 通过 TLR4/核因子(NF)- κ B 信号通路调控免疫炎症反应^[5-6]。近年有研究表明,血小板、巨核细胞中存在大量有功能的 NF- κ B 家族成员,并且它们和血小板免疫炎症密切相关,具体机制有待进一步研究^[7]。miR-146 是第一个被发现在免疫系统中具有调节作用的 miRNA,其能诱导巨核细胞增生分化^[8],并且在小鼠成熟巨核细胞中表达增加^[9]。在血小板生成过程中,巨核细胞中线粒体、核糖体等细胞器及多种不同细胞因子的 pre-mRNA 转移到血小板,因此 miRNA 通过影响巨核细胞中 mRNA 的合成进一步影响血小板功能^[9]。本文研究 miR-146a 对巨核细胞裂解产生的血小板免疫炎症功能的影响,为抑制血小板免疫炎症的治疗提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人慢性粒细胞白血病细胞 K562 由南昌大学第二附属医院分子中心馈赠;高糖 1640 培养基,胎牛血清(FBS,以色列 BI 公司);miR-146a mimic、miR-146a inhibitor、mimic-NC、inhibitor-NC、miR-146a/U6 的 RT-qPCR 引物(吉玛公司);lipofectmine 2000(全式金公司);TLR4 一抗(美国 Proteintech 公司),NF- κ B 一抗(美国 Abcam 公司), β -actin 一抗、鼠二抗、兔二抗(中杉金桥公司);白细胞介素(IL)-6 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA 试剂盒[优尔生(usc-nk)];RT-PCR、qPCR 试剂盒(Tiangen 公司);佛波酯(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及巨核细胞模型建立 常规培养 K562 细胞,按照前期实验摸索条件,复制 K562 细胞向巨核细胞分化模型,待细胞处于对数增殖期时,加入佛波酯(DMSO 溶解,终浓度为 10 ng/mL)诱导 72 h,离心收集诱导后细胞,培养基重悬,接种于新的培养皿中用于后续细胞转染实验。

1.2.2 细胞形态分析 收集诱导前后 K562 细胞离心涂片,在光镜下观察诱导前后细胞形态变化并拍照。

1.2.3 流式细胞术检测表面标志分子 用流式细胞仪检测诱导前后 K562 细胞 CD61 和 CD41 阳性血小板百分率。三色流式细胞分析法详细操作步骤参考

文献^[5]。

1.2.4 转染佛波酯诱导分化 诱导后细胞增殖至 80%左右汇合时进行 siRNA 转染。按照转染试剂操作指南操作,分别导入 miR-146a mimic、miR-146a inhibitor、mimic-NC、inhibitor-NC 等。

1.2.5 荧光定量检测 miR-146a 水平 收集细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。反转录合成第 1 链 cDNA,PCR 扩增。miR-146a:上游引物 5'-TA-ATCGTGTGAGAACTGAATTC-3',下游引物 5'-TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT-3';U6:上游引物 5'-ATTGGAACGATA CAGAGAAGATT-3',下游引物 5'-GGAACGCT TCACGAATTTG-3'。具体步骤参照荧光定量试剂盒说明书。扩增条件:95 °C 15 min 1 个循环;95 °C 10 s,60 °C 32 s 40 个循环。每个标本均做 3 个复孔,结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对基因分析。

1.2.6 ELISA 测定 IL-6、TNF- α 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测培养上清液中 IL-6、TNF- α 水平,结果经酶标仪读数,在标准曲线上进行定量分析。

1.2.7 Western blot 检测 TLR4、NF- κ B 蛋白表达 收集转染 3 d 后的细胞悬浮液离心(1 000 r/min 离心 5 min),PBS 洗涤 3 次;加入 50 μ L \times Loading Buffer 漩涡振荡充分裂解细胞,置沸水中煮 10 min,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳后将其转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,脱脂牛奶封闭 2 h,双蒸水洗膜 5 min \times 3 次,加入稀释好的一抗 4 °C 摇床孵育 36~48 h,TBST 洗涤 10 min \times 3 次。加入二抗常温孵育 1.5 h,TBST 洗涤 10 min \times 3 次。加入显影液曝光,以 β -actin 作为内参照。

1.2.8 RT-PCR 检测 NF- κ B、IL-1 受体相关激酶 1 (IRAK1)水平 收集细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。反转录合成第 1 链 cDNA,PCR 扩增。具体步骤参照 RT-PCR 试剂盒说明书。NF- κ B、IRAK1 引物序列见表 1。PCR 反应条件:预变性 94 °C 5 min;变性 94 °C 30 s,退火 58 °C 30 s,延伸 72 °C 60 s,循环 30 次;总延伸 72 °C 7 min。IRAK1 退火温度 56.8 °C,NF- κ B 退火温度 57.8 °C。

表 1 引物系列

名称	引物	长度
β -actin	5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'	285 bp
	5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'	
NF- κ B	5'-CCAACAGATGGCCATACCT-3'	174 bp
	5'-AACCTTTGTGTGCCACAT-3'	
IRAK1	5'-CCTGGATCAACCGCAACG-3'	242 bp
	5'-GGTCTGGGAGCTGGAAAA-3'	

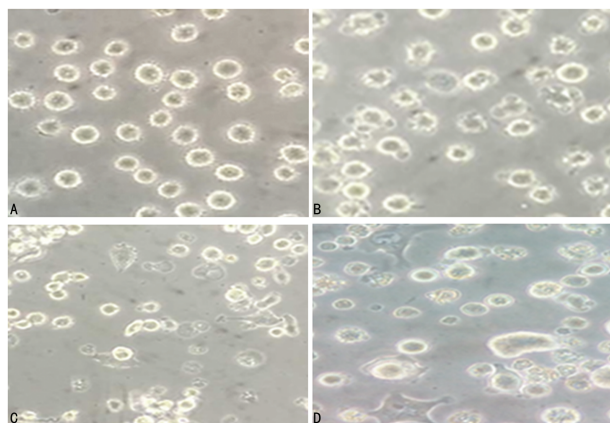
1.2.9 靶基因预测 利用 3 种常用的靶基因预测软件(TargetScan、PicTar、miRanda)预测 miR-146a 可

能作用的靶基因,结合 miR-146a 在调控血小板免疫炎症过程中的作用,在预测结果交集中筛选出 IRAK1 基因为潜在的靶基因;通过荧光素酶报告基因法验证 IRAK1 是否含有 miR-146a 的靶位点;通过检测过表达或抑制表达 miR-146a 后细胞中靶基因 mRNA 及蛋白表达的变化,从而确定 miR-146a 与靶基因的对应关系。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,所有实验重复 3 次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学变化 K562 细胞经佛波酯诱导后,随着时间的延长细胞逐渐变形,到 72 h 时细胞变化最明显,呈现出巨核细胞特点:细胞形态为圆形或椭圆形,边缘不规则,染色质呈粗颗粒状,排列紧密,核仁不甚清晰,出现空泡及伪足等,见图 1。



A: 诱导 0 h; B 诱导 24 h; C: 诱导 48 h; D: 诱导 72 h
图 1 佛波酯诱导 K562 细胞的形态变化 (×100)

2.2 表面标志物 CD41 和 CD61 表达水平 K562 细胞表面几乎不表达 CD41 和 CD61,而佛波酯诱导 72 h 后,流式细胞术检测细胞表面 CD41 和 CD61 的阳性率分别高达 38.7% 和 46.45%,见图 2。

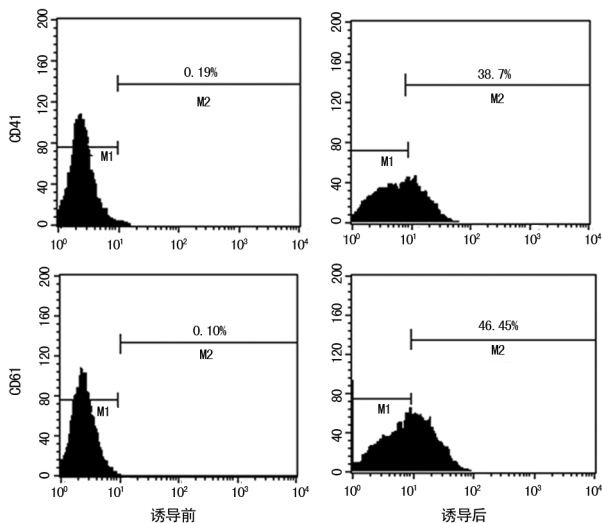
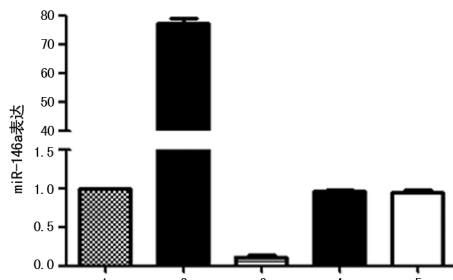


图 2 佛波酯诱导 K562 细胞前后 CD41、CD61 表达变化

2.3 siRNA 转染效率的测定 与 mimic-NC 组相比,miR-146a mimic 组 miR-146a 的表达明显升高(约 77.5 倍);与 inhibitor-NC 组相比,miR-146a inhibitor 组 miR-146a 表达下降(约 7.5 倍),见图 3。



1: Control; 2: miR-146a mimic; 3: miR-146a inhibitor; 4: mimic-NC; 5: inhibitor-NC

图 3 转染 siRNA 48 h 后各组 miR-146a 水平变化

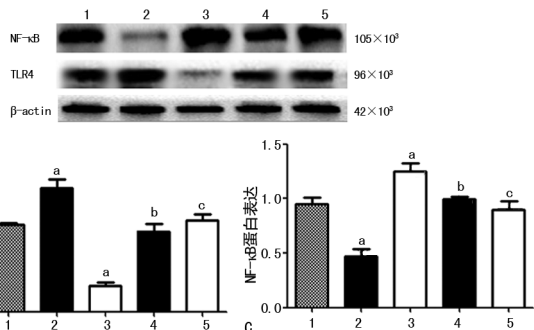
2.4 miR-146a 对 IL-6、TNF-α 水平的影响 与 mimic-NC 组相比, miR-146a mimic 组细胞上清液中 IL-6、TNF-α 水平明显降低($P < 0.05$);与 inhibitor-NC 组相比, miR-146a inhibitor 组细胞上清液中 IL-6、TNF-α 水平明显升高($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组细胞 IL-6、TNF-α 水平 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IL-6	TNF-α
Control 组	99.460 ± 2.407	143.100 ± 6.130
miR-146a mimic 组	12.950 ± 1.446 ^{ab}	31.500 ± 5.783 ^{ab}
mimic-NC 组	105.900 ± 10.130	135.000 ± 5.631
miR-146a inhibitor 组	581.600 ± 47.450 ^{ac}	600.500 ± 76.910 ^{ac}
inhibitor-NC 组	107.900 ± 6.022	132.300 ± 9.043

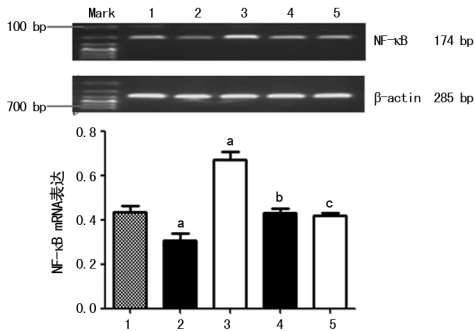
^a: $P < 0.05$, 与 Control 组比较; ^b: $P < 0.05$ 与 mimic-NC 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 inhibitor-NC 组比较

2.5 miR-146a 对 TLR4、NF-κB 蛋白表达的影响 转染 72 h 后提取总蛋白质行 Western blot,结果显示 miR-146a mimic 组中 TLR4 蛋白表达明显升高,NF-κB 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。转染 48 h 后提取总 RNA 行 RT,结果显示: miR-146a mimic 可降低 NF-κB mRNA 表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。



1: Control; 2: miR-146a mimic; 3: miR-146a inhibitor; 4: mimic-NC; 5: inhibitor-NC; ^a: $P < 0.05$, 与 Control 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 miR-146a mimic 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 miR-146a inhibitor 组比较

图 4 各组细胞 TLR4、NF-κB 蛋白表达



1:Control;2:miR-146a mimic;3:miR-146a inhibitor;4:mimic-NC;5:inhibitor-NC;^a: $P < 0.05$,与 Control 组比较;^b: $P < 0.05$,与 miR-146a mimic 组比较;^c: $P < 0.05$,与 miR-146a inhibitor 组比较

图 5 各组细胞 NF-κB mRNA 表达

2.6 验证靶基因 双荧光素酶报告基因实验结果显示,共转染 Pmir-Report-WT-IRAK1-3'UTR 载体与 miR-146a mimic,在细胞内 miR-146a 与 IRAK1 3'UTR 相结合,使得载体荧光素酶不表达,荧光素酶活性受到明显抑制;而将此共转染体系中更换为 mimic-NC 或 Pmir-Report-MUT-IRAK1-3'UTR 载体,则荧光素酶表达不受影响,荧光强度无明显变化,见图 6。hsa-miR-146a 可以与 IRAK1 的 3'UTR 相结合,IRAK1 是 hsa-miR-146a 的靶基因。进一步的生物学实验表明 hsa-miR-146a 过表达能降低 IRAK1 蛋白表达而不影响 IRAK1 mRNA 表达,阻遏 hsa-miR-146a 的表达则提高了 IRAK1 的蛋白表达,IRAK1 mRNA 表达也无明显变化,见图 7、8。hsa-miR-146a 在转录后水平抑制 IRAK1 表达,再次证实 IRAK1 是 hsa-miR-146 作用的靶基因。

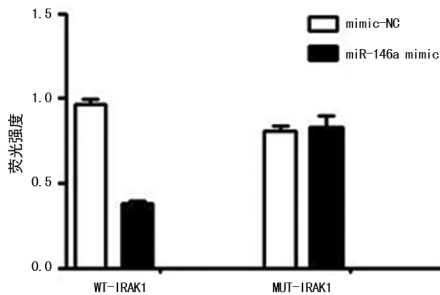


图 6 双荧光素酶报告基因交叉转染后对荧光素酶活性的影响

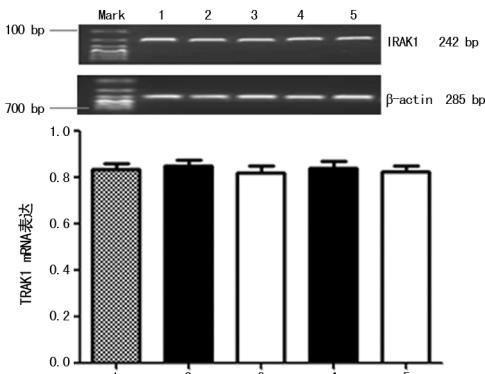
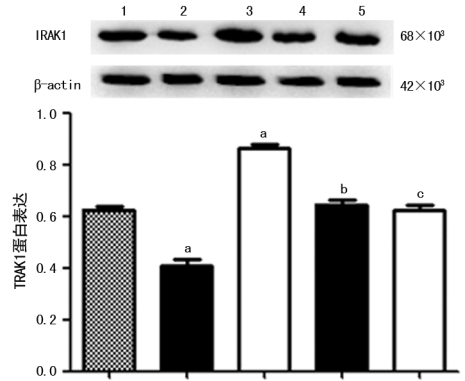


图 7 各组细胞 IRAK1 mRNA 表达



1:Control;2:miR-146a mimic;3:miR-146a inhibitor;4:mimic-NC;5:inhibitor-NC;^a: $P < 0.05$,与 Control 组比较;^b: $P < 0.05$,与 miR-146a mimic 组比较;^c: $P < 0.05$,与 miR-146a inhibitor 组比较

图 8 各组细胞 IRAK1 蛋白表达

3 讨论

激活的血小板自身能分泌多种炎症因子,如 IL-1 β 、IL-3、IL-6、TNF- α ^[10]。此外,血小板激活后通过与血管内皮、循环中的白细胞相互作用,释放多种促炎分子^[4,11-12]。因此,血小板的免疫炎性反应不仅参与动脉粥样斑块破裂及血栓形成,还贯穿在动脉粥样硬化的形成及发展的整个慢性炎性反应过程中^[13-14]。研究血小板的免疫炎性反应,对冠状动脉粥样硬化性心脏病的预防和治疗有着深远意义。然而血小板体外存活时间短,保存困难,容易激活,体外研究困难。K562 细胞是一种双分化潜能的人慢性粒细胞白血病细胞,在国际上被通用于研究巨核细胞的分化研究。本实验成功复制了体外用佛波酯诱导 K562 细胞构建巨核细胞/血小板模型^[15],通过转染 miR-146a siRNA 成功上调或下调了 miR-146a 水平。上调 miR-146a 表达后,TLR4 蛋白明显升高,NF- κ B mRNA 和蛋白降低,细胞上清 IL-6、TNF- α 水平明显降低。下调 miR-146a 表达后,TLR4 蛋白明显降低,NF- κ B mRNA 和蛋白明显升高,细胞上清 IL-6、TNF- α 水平明显升高。IRAK1 是 TLR4/NF- κ B 信号通路中的一关键分子,多个生物信息学软件都预测到 IRAK1 是 miR-146a 的一个靶基因,通过双荧光素酶报告基因证明在血小板中 miR-146a 可以靶向作用于 IRAK1,并通过 Western blot 和 RT-PCR 检测证明血小板中 miR-146a 也能在转录后水平调控 IRAK1 的表达。从而表明 miR-146a 可通过 TLR-4/NF- κ B 炎症通路抑制血小板的炎性反应,并且其可能机制是通过作用 TLR4/NF- κ B 信号通路中关键靶点 IRAK1,负性调节此通路,减弱该通路下游 NF- κ B 介导的 IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达。目前研究的 miR-146a 抗炎的经典途径之一是 miR-146a 通过靶向作用于 IRAK1、TRAF6,负向调控 TLR4/NF- κ B 信号通路,抑制该通路下游 NF- κ B 介导的炎症因子的表达^[16-17]。上述经

典途径与本研究结果完全一致。然而,也有研究表明 miR-146a 可促进动脉粥样硬化的炎症,加重冠状动脉粥样硬化性心脏病^[18-19]。因此,需要进一步研究 miR-146a 在血小板免疫炎症及冠状动脉粥样硬化性心脏病中的作用机制。

参考文献

- [1] PIRCHER J, CZERMAK T, EHRlich A, et al. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1523.
- [2] HERTER J M, ROSSAINT J, ZARBOCK A. Platelets in inflammation and immunity [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 12(11):1764-1775.
- [3] RIVADENEYRA L, CARESTIA A, ETULAIN J, et al. Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB[J]. *Thromb Res*, 2014, 133(2):235-243.
- [4] IBA T, LEVY J H. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis[J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(2):231-241.
- [5] HUANG J, YANG Q, HE L, et al. Role of TLR4 and miR-155 in peripheral blood mononuclear cell - mediated inflammatory reaction in coronary slow flow and coronary arteriosclerosis patients [J]. *J Clin Lab Anal*, 2018, 32(2):210-215.
- [6] GURSES K M, KOCYIGIT D, YALCIN M U, et al. Enhanced platelet toll-like receptor 2 and 4 expression in acute coronary syndrome and stable angina pectoris [J]. *Am J Cardiol*, 2015, 116(11):1666-1671.
- [7] PAUL M, KEMPARAJU K, GIRISH K S. Inhibition of constitutive NF- κ B activity induces platelet apoptosis via ER stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(4):1471-1477.
- [8] EDELSTEIN L C, MCKENZIE S E, SHAW C, et al. MicroRNAs in platelet production and activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(s1):340-350.
- [9] LINDSAY C R, EDELSTEIN L C. MicroRNAs in platelet physiology and function[J]. *Sem Thromb Hemost*, 2016, 42(3):215-222.
- [10] KAPUR R, SEMPLE J W. The nonhemostatic immune functions of platelets[J]. *Sem Hematol*, 2016, 53:S2-6.
- [11] KARPMAN D, STÄHL A L, ARVIDSSON I, et al. Complement interactions with blood cells, endothelial cells and microvesicles in thrombotic and inflammatory conditions [M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2015.
- [12] HERR N, MAULER M, BODE C, et al. Intravital microscopy of leukocyte-endothelial and platelet-leukocyte interactions in mesenteric veins in mice [J]. *J Visual Exp Jove*, 2015, 2015(102):e53077.
- [13] CHI Y S, LIU Y N, ATKINSON T, et al. Molecular imaging of platelet-endothelial interactions and endothelial von willebrand factor in early and mid-stage atherosclerosis[J]. *Cir Card Imag*, 2016, 8(7):e2765.
- [14] DUCHENE J, VON H P. Platelet-derived chemokines in atherosclerosis [J]. *Hämostaseologie*, 2015, 35(2):137-141.
- [15] 王路乔, 徐吉淋, 黄清昱, 等. miR-146a 调控血小板免疫活化功能[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(11):1221-1225.
- [16] TAGANOV K D, BOLDIN M P, CHANG K, 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.
- [17] WANG X P, LUORENG Z M, ZAN L S, et al. Bovine miR-146a regulates inflammatory cytokines of bovine mammary epithelial cells via targeting the TRAF6 gene [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(9):7648.
- [18] SHEN J, ZHANG M, SUN M, et al. The relationship of miR-146a gene polymorphism with carotid atherosclerosis in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Thromb Res*, 2015, 136(6):1149-1155.
- [19] CHENG H S, BESLA R, LI A, et al. Paradoxical suppression of atherosclerosis in the absence of microRNA-146a [J]. *Cir Res*, 2017, 121(4):354-367.

(收稿日期:2019-01-10 修回日期:2019-03-28)