



(扫描二维码查看原文)

· 论著 ·

微小 RNA-146a 靶向沉默三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 调控 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出

幸世峰, 孙理华, 骆小梅

【摘要】 背景 抑制巨噬细胞脂质蓄积(泡沫化)和炎症因子释放是防治动脉粥样硬化(AS)的重要途径。微小 RNA(miR)-146a 是否通过三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)等膜蛋白以三磷酸腺苷(ATP)为能源将细胞内游离胆固醇转运到细胞膜表面,进而减少细胞内胆固醇蓄积尚未知。**目的** 探讨微小 RNA(miR)-146a 是否通过靶向沉默 ABCA1 调控 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出。**方法** 本次实验时间为 2018 年 12 月—2020 年 6 月。培养 THP-1 细胞(人单核细胞株)并经佛波酯(PMA)诱导分化为巨噬细胞,其吞噬脂质形成巨噬细胞源性泡沫细胞。将巨噬细胞源性泡沫细胞分为空白对照组,培养液中不加任何其他试剂;阳性对照组,培养液中加入肝 X 受体激动剂 T0901317;阴性对照组,培养液中加入 ABCA1 小干扰 RNA(siRNA);模拟物组,培养液中加入 miR-146a mimics;抑制剂组,培养液中加入 miR-146a inhibitors;采用液体闪烁计数法检测胆固醇流出效率。将巨噬细胞源性泡沫细胞分别接种到 6 孔板并培养至生长对数期,按照要求分别加入 In-NC(NC 组)、miR-146a mimics(模拟物组)、miR-146a inhibitors(抑制剂组)、miR-146a mimics+核因子 κ B(NF- κ B)抑制剂(模拟物+PDTC 组)、miR-146a inhibitors+NF- κ B 抑制剂(抑制剂+PDTC 组),分别采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)和 Western blotting 法检测 NF- κ B 通路 p50、p65 及 ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量。将巨噬细胞源性泡沫细胞接种于培养瓶内,汇合度达到 80% 后分别转染 miR-146a mimics(模拟物组)、miR-146a inhibitors(抑制剂组)及 In-NC(NC 组),采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测正常细胞、坏死细胞及凋亡细胞水平。采用荧光素酶报告基因检测 miR-146a 与 ABCA1 结合情况。**结果** 阳性对照组胆固醇流出效率高于空白对照组,阴性对照组和模拟物组胆固醇流出效率低于阳性对照组,抑制剂组胆固醇流出效率高于空白对照组、阴性对照组和模拟物组($P < 0.05$)。模拟物组正常细胞水平低于 NC 组,抑制剂组正常细胞水平高于 NC 组和模拟物组($P < 0.05$);模拟物组坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞水平高于 NC 组,抑制剂组坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞水平低于 NC 组和模拟物组($P < 0.05$)。模拟物组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量高于 NC 组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量低于

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2018D01C308)

830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆医科大学第五附属医院心血管内科

通信作者:幸世峰, E-mail: xinjiangren826@sohu.com

- [14] POZNYAK A, GRECHKO A V, POGGIO P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1835. DOI: 10.3390/ijms21051835.
- [15] YAMAMOTO T, XIE J, LI Z Z, et al. Effect of uric acid control on serum creatinine [J]. *J Clin Rheumatol*, 2019, 25(7): 279-283. DOI: 10.1097/RHU.0000000000000850.
- [16] MARGOLIS G, GAL-OZ A, KHOURY S, et al. Relation of subclinical serum creatinine elevation to adverse in-hospital outcomes among myocardial infarction patients [J]. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2018, 7(8): 732-738. DOI: 10.1177/2048872617716389.
- [17] LARA-GUZMÁN O J, GIL-IZQUIERDO Á, MEDINA S, et al. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 1-11. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.017.
- [18] SCHNEIDER C, COLL B, JICK S S, et al. Doubling of serum creatinine and the risk of cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease and type 2 diabetes mellitus: a cohort study [J]. *Clin Epidemiol*, 2016, 8: 177-184. DOI: 10.2147/CLEP.S107060.
- [19] KASHIMA S, INOUE K, MATSUMOTO M, et al. Low serum creatinine is a type 2 diabetes risk factor in men and women: the Yuport Health Checkup Center cohort study [J]. *Diabetes Metab*, 2017, 43(5): 460-464. DOI: 10.1016/j.diabet.2017.04.005.
- [20] GASECKA A, SIWIK D, GAJEWSKA M, et al. Early biomarkers of neurodegenerative and neurovascular disorders in diabetes [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(9): E2807. DOI: 10.3390/jcm9092807.

(收稿日期: 2021-03-01; 修回日期: 2021-04-19)

(本文编辑: 李越娜)

NC 组 ($P < 0.05$) ; 模拟物 +PDTC 组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于模拟物组, ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于模拟物组 ($P < 0.05$)。抑制剂组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于 NC 组, ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于 NC 组 ($P < 0.05$) ; 抑制剂 +PDTC 组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量高于抑制剂组, ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量低于抑制剂组 ($P < 0.05$)。SDM2+miR-146a 组和 SDM1/SMD2+miR-146a 组 ABCA1 3' UTR 活性与 WT+Con-miR 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 miR-146a 可通过抑制 ABCA1 表达而抑制巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出, 从而导致 AS 发生发展, 而 NF- κ B 可以减轻 miR-146a 对 ABCA1 表达的抑制作用。

【关键词】 动脉粥样硬化; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 微小 RNA-146a; NF- κ B

【中图分类号】 R 543.5 【文献标识码】 A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.110

幸世峰, 孙理华, 骆小梅. 微小 RNA-146a 靶向沉默三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 调控 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29 (5) : 63-69. [www.syxnf.net]

XING S F, SUN L H, LUO X M. MicroRNA-146a targets ABCA1 and regulates intracellular cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29 (5) : 63-69.

MicroRNA-146a Targets ABCA1 and Regulates Intracellular Cholesterol Efflux in THP-1 Macrophage-derived Foam Cells

XING Shifeng, SUN Lihua, LUO Xiaomei

Department of Cardiovascular, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Corresponding author: XING Shifeng, E-mail: xinjiangren826@sohu.com

【Abstract】 **Background** Inhibiting lipid accumulation (foaming) of macrophages and the release of inflammatory factors are important way to prevent and treat atherosclerosis (AS). Whether MicroRNA (miR) -146a uses ATP as an energy source to transport free cholesterol in cells to the surface of cell membranes through membrane proteins such as ABCA1, which can significantly reduce the accumulation of cholesterol in cells is still unknown. **Objective** To explore whether miR-146a targets ABCA1 and regulates intracellular cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells. **Methods** The experiment time is from December 2018 to June 2020. Culture THP-1 cells (human monocyte cell line) and differentiate into macrophages induced by phorbol ester (PMA), which engulf lipids to form macrophage-derived foam cells. Divide the macrophage-derived foam cells into a blank control group, without any other reagents in the culture medium; positive control group, add liver X receptor agonist T0901317 to the culture medium; negative control group, add ABCA1 small interference to the culture medium RNA (siRNA); mimic group, miR-146a mimics was added to the culture solution; inhibitor group, miR-146a inhibitor was added to the culture solution; liquid scintillation counting method was used to detect the efficiency of cholesterol efflux. Inoculate macrophage-derived foam cells into six-well plates and culture them to the logarithmic growth phase. Add In-NC (NC group), miR-146a mimics (mimic group), miR-146a inhibitor (inhibitor group), miR-146a mimics+NF- κ B inhibitor (mimic+PDTC group), miR-146 inhibitor+NF- κ B inhibitor (inhibitor+PDTC group), real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to detect the relative expression of mRNA and protein of p50 and p65 in the NF- κ B pathway. The macrophage-derived foam cells were inoculated into the culture flask, and after the confluence reached 80%, they were transfected into miR-146a mimics (mimic group), miR-146a inhibitor (inhibitor group) and In-NC (NC group). Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry was used to detect the levels of normal cells, necrotic cells and apoptotic cells. The luciferase reporter gene was used to detect the binding of miR-146a to ABCA1. **Results** The cholesterol efflux efficiency of the positive control group was higher than that of the blank control group, the cholesterol efflux efficiency of the negative control group and the simulant group was lower than that of the positive control group, and the cholesterol efflux efficiency of the inhibitor group was higher than that of the blank control group, negative control group and simulant group ($P < 0.05$). There were fewer normal cells in the mimic group than in the control group, and more normal cells in the inhibitor group than in the NC group and mimic group ($P < 0.05$); the levels of necrotic cells, late apoptotic cells, and early apoptotic cells in the mimic group were higher than those in the NC group ($P < 0.05$). The levels of necrotic cells, late apoptotic cells, and early apoptotic cells in the inhibitor group were lower than those in the NC group and the mimic group ($P < 0.05$). The relative expressions of mRNA and protein of p50 and p65 in the NF- κ B pathway of the mimic group were higher than that of the NC group, and the relative expression of mRNA and protein of ABCA1 was lower than that of the NC group ($P < 0.05$); the relative expressions of mRNA and protein of p50 and p65 of the mimic+PDTC group were lower than those of the mimic group, and the relative expression of mRNA and protein of ABCA1 was higher than that of the mimic group

($P < 0.05$)。The relative expression of mRNA and protein of p50 and p65 in the NF- κ B pathway of the inhibitor group were lower than those of the NC group, and relative expression of mRNA and protein of ABCA1 was higher than that of NC group ($P < 0.05$); the relative expression of mRNA and protein of p50 and p65 in the NF- κ B pathway of the inhibitor+PDTC group were higher than those of the inhibitor group, and the relative expression of mRNA and protein of ABCA1 was lower than that of the inhibitor group ($P < 0.05$)。There was no significant difference in ABCA1 3' UTR activity between SDM2+miR-146a group and SDM1/SMD2+miR-146a group and WT+Con-miR group ($P > 0.05$)。Conclusion miR-146a can inhibit the cholesterol efflux of macrophage derived foam cells by inhibiting ABCA1 expression, resulting in the development of AS, and NF- κ B can reduce the inhibition of miR-146a on ABCA1 expression.

【Key words】 Atherosclerosis; ATP-binding cassette transporter A1; MicroRNA-146a; NF-kappa B

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是影响人群健康的重大疾病。新疆是 AS 高发区域, 故该地区的 AS 防控面临着严峻的挑战^[1]。研究表明, AS 是一种免疫介导的动脉管壁慢性炎症, 其发病机制十分复杂^[2]。血管壁炎症激活被认为是 AS 发生、发展的关键因素, 其中巨噬细胞扮演着关键角色: 一方面巨噬细胞来源的泡沫细胞是 AS 斑块脂质条纹期的标志; 另一方面, 巨噬细胞来源的泡沫细胞在各种促炎因子的刺激下, 可分泌大量促炎因子、趋化因子及其他因子, 进一步加剧斑块内巨噬细胞聚集、脂质蓄积和基质降解^[3]。因此, 抑制巨噬细胞脂质蓄积 (泡沫化) 和炎症因子释放是防治 AS 的重要途径^[4]。

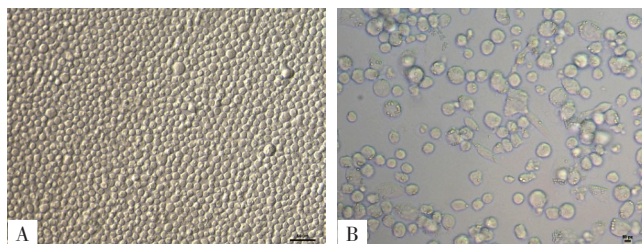
巨噬细胞胆固醇代谢稳态失衡是泡沫细胞形成过程中的主要特征。胆固醇流出对减少细胞内胆固醇蓄积、抑制泡沫细胞形成和防治 AS 发生具有重要意义^[5]。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 等膜蛋白是以三磷酸腺苷 (ATP) 为能源, 将细胞内游离胆固醇转运到细胞膜表面, 能有效减少细胞内的胆固醇蓄积。而 ABCA1 又受多种因子调节, 其中核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路是其最重要的调节途径。在 AS 部位和纤维斑块部位均发现了激活的 NF- κ B, 而正常血管很少或没有表达 NF- κ B, 证实 NF- κ B 在 AS 的发生、发展过程中起重要作用。既往研究发现, AS 越严重, 则微小 RNA (miR)-146a 表达水平越高, 说明 miR-146a 表达调控与 AS 发生存在因果关系^[6]。miR-146a 是 miR-146 家族一员, 是先天性和适应性免疫中细胞分化和细胞功能的重要调节剂, 其受到脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激后可通过抑制 NF- κ B 依赖性的两种衔接蛋白——IL-1 受体相关激酶 1 (IL-1 receptor-associated kinase 1, IRAK-1) 和 TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor related factor 6, TRAF6) 而在巨噬细胞中起到炎症制动作用^[7]。但泡沫细胞 miR-146a 表达上调是否对 ABCA1 表达有抑制作用及是否导致胆固醇逆向转运减少而参与 AS 形成的发病机制目前尚不清楚。本研究拟通过使用 miR-146a mimics 及 miR-

146a inhibits 转染 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞, 观察 miR-146a 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响, 以探讨 miR-146a 在 AS 发生发展中的作用机制, 以期为 AS 的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 THP-1 细胞培养及巨噬细胞源性泡沫细胞模型建立 本次实验时间为 2018 年 12 月—2020 年 6 月。将 THP-1 细胞 (人单核细胞株) 放置在含 10 mmol/L HEPES、10% 胎牛血清、青霉素、链霉素的 RPMI-1640 细胞培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养。待细胞到达对数生长期时 (培养 24~36 h), 采用完全培养基调整细胞浓度为 5×10^5 个/孔并接种于 6 孔板中, 加入含终浓度为 100 ng/ml 的佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 的基础培养基 2 ml。培养 24 h 后观察细胞贴壁、形态变化并拍照。THP-1 细胞呈单个圆形悬浮, 密度约为 5×10^6 /ml, 分布均匀, 折光度较好。经 PMA 诱导后单个圆形、悬浮细胞逐渐形成梭形或不规则形状, 并有伪足形成的贴壁细胞, 即分化为巨噬细胞 (见图 1)。再采用含 50 μ g/ml 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 的无血清培养基培养 48 h, 使其吞噬脂质形成巨噬细胞源性泡沫细胞。

1.2 胆固醇流出检测方法 将巨噬细胞源性泡沫细胞分为空白对照组, 培养液中不加任何其他试剂; 阳性对照组, 培养液中加入 10 μ mol/L 肝 X 受体激动剂 T0901317; 阴性对照组, 培养液中加入 100 nmol/L ABCA1 小干扰 RNA (siRNA); 模拟物组, 培养液中



注: A 为佛波酯 (PMA) 诱导前; B 为 PMA 诱导后

图 1 PMA 诱导 THP-1 细胞分化前后

Figure 1 Before and after differentiation of THP-1 cells induced by PMA

加入 40 nmol/L miR-146a mimics; 抑制剂组, 培养液中加入 40 nmol/L miR-146a inhibits。采用液体闪烁计数法检测胆固醇流出效率: THP-1 细胞经 PMA 诱导分化为巨噬细胞后, 加入 3H 标记的胆固醇 (0.5 μ Ci/ml) 共同孵育、标记 24 h, 后采用 RPMI 1640 培养液再培养 24 h。采用液体闪烁液裂解细胞, 收集培养液和裂解的细胞中 3H 标记的胆固醇含量, 并以每分钟流出计数 (counts per minute, CPM) 表示。胆固醇流出效率 = 细胞内 CPM / (细胞内 CPM + 培养液中 CPM) × 100%。

1.3 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术 将巨噬细胞源性泡沫细胞以 1 × 10⁶ 的密度接种于培养瓶内, 汇合度达到 80% 后分别转染 miR-146a mimics (模拟物组)、miR-146a inhibits (抑制剂组) 及 In-NC (NC 组)。48~72 h 后采用胰酶消化收集细胞, 固定, 采用 Annexin V-APC 和 7-AAD (江苏凯基生物技术股份有限公司) 双染细胞。37 °C 温浴 30 min 后, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 离心 5 min, 去胰蛋白酶。采用稀释缓冲液重悬细胞, 调节细胞悬液浓度至 5 × 10⁵ 个/ml。取 195 μ l 细胞悬液, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 混合, 室温下反应。加入 10 μ l 碘化丙啶 (PI, 20 μ g/ml), 反应 10 min 后上机检测各细胞水平。

1.4 实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 将巨噬细胞源性泡沫细胞分别以 5 × 10⁵ 个 / 孔接种到 6 孔板并培养至生长对数期, 按照要求分别加入 In-NC (NC 组)、miR-146a mimics (模拟物组)、miR-146a inhibits (抑制剂组)、miR-146a mimics + NF-κ B 抑制剂 (模拟物 + PDTC 组)、miR-146a inhibits + NF-κ B 抑制剂 (抑制剂 + PDTC 组), 然后经 Li-pofectamine 2000 转染试剂瞬时转染至细胞中, 转染 24 h 后加入 Trizol 消化各组细胞, 按照 TRIzol Reagent (Invitrogen 公司, USA) 说明书提取总 RNA, 紫外分光光度计测定其浓度和纯度。采用 TransScript® One-Step RT-PCR 和 TransScript® miRNA First-Strand cDNA Synthesis (北京全式金生物工程有限公司) 试剂盒进行反转录反应, 严格按照试剂盒说明书进行操作。再行荧光定量 PCR 扩增基因片段, 反应条件: 95 °C 预变性 20 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 70 °C 延伸 10 s, 共 45 个循环。以 β-actin 作为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 NF-κ B 通路 p65、p50 及 ABCA1 的 mRNA 相对表达量, 引物序列见表 1。

1.5 Western blotting 法 巨噬细胞源性泡沫细胞转染 48 h 后采用含 0.1% PMSF 的 RIPA 裂解液消化、收集各组细胞, 提取细胞蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。每组取 50 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白电泳转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。使用 ABCA1、NF-κ B 和 β-actin 一抗 (1 : 500

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	正向序列 (5'-3')	反向序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
NF-κ B 通路 p50	ATAGGCAAGGTCAGGCTG	AAATGCTGGAGTCTGGG	132
NF-κ B 通路 p65	GTTCGGTTCACCTCGGCA	CCTTACGTCATCCCTGAGC	152
ABCA1	CAACATGGACATCCTGAAGCCAA	TCAAATGTAAGTGGTAGCCTTGCA	161
β-actin	GTCTTTGCGGATGTCCAC	TTAGTTCGGTTACACCCCTTT	106

注: NF-κ B= 核因子 κ B, ABCA1= 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1

稀释), 4 °C 孵育过夜; 再加入标记 IRDye800 的二抗 (1 : 2 000 在 PBS 中稀释), 4 °C 孵育过夜。采用 TBST 洗涤后, 红外荧光成像系统 (Rockland) 扫描分析 NF-κ B 通路 p65、p50 及 ABCA1 的蛋白相对表达量。
1.6 3' UTR 荧光素酶报告基因检测 通过 RT-PCR 从巨噬细胞源性泡沫细胞 RNA 中扩增 ABCA1 3' UTR 片段, 并定向克隆到 psiCHECKTM-2 载体 (Promega) 中的海肾荧光素酶开放阅读框的下游, 该载体还包含组成型表达的萤火虫荧光素酶基因。通过 Target Scan (http://www.targetscan.org/vert_72/) 在线软件预测得出, 人的 ABCA1 3' UTR 具有两个 miR-146a 结合位点: 位点 2 在物种之间高度保守, 位点 1 仅在人类和灵长类动物中保守, 见图 2。为了评估 miR-146a 对人 ABCA1 3' UTR 的影响, 本研究使用了报告基因表达质粒与 miR-146a 共转染的 293T 细胞, 并分别转染阴性对照模拟物——Con-miR (Con-miR 组) 及不同浓度 (10 nmol/L 和 20 nmol/L) miR-146a (10 nmol/L miR-146a 组和 20 nmol/L miR-146a 组)。之后使用 Multisite-Quickchange (Stratagene 公司) 在 ABCA1 的 3' UTR 内预测 miR-146a 位点的区域中进行定点突变, 构建两个位点的突变载体 (SDM1 和 SDM2), 并通过测序确认所构建载体序列的准确性。将野生型 (WT) 3' UTR 荧光素酶报告载体分别用 Li-pofectamine 2000 转染试剂转染 Con-miR (WT+Con-miR 组) 和 miR-146a (WT+miR-146a 组), 将 1 μ g 的 SDM1 和 / 或 SDM2 3' UTR 荧光素酶报告载体分别用 Li-pofectamine 2000 转染试剂转染 miR-146a (分为 SDM1+miR-146a 组、SDM2+miR-146a 组、SDM1/SDM2+miR-146a 组)。使用 Dual-Glo 荧光素酶测定系统 (Promega) 测量荧光素酶活性, 将海肾荧光素酶活性标准化为相应的萤火虫荧光素酶活性。

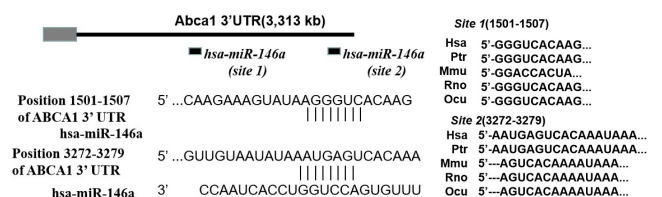


图 2 miR-146a 与 ABCA1 3' UTR 结合情况
Figure 2 Predicted annealing of miR-146a to the ABCA1 3' UTR

1.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据处理。上述实验数据均独立重复 4 次,符合正态分布的实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-146a 对巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出效率的影响 空白对照组胆固醇流出效率为 (21.38 ± 8.94)%,阳性对照组为 (58.63 ± 7.31)%,阴性对照组为 (14.55 ± 5.72)%,模拟物组为 (17.08 ± 4.13)%,抑制剂组为 (56.03 ± 5.88)%。五组胆固醇流出效率比较,差异有统计学意义 ($F=8.43, P=0.02$);阳性对照组胆固醇流出效率高于空白对照组,阴性对照组和模拟物组胆固醇流出效率低于阳性对照组,抑制剂组胆固醇流出效率高于空白对照组、阴性对照组和模拟物组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 miR-146a 对巨噬细胞源性泡沫细胞生物学行为的影响 各组正常细胞、坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞水平比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);模拟物组正常细胞水平低于 NC 组,抑制剂组正常细胞水平高于 NC 组和模拟物组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);模拟物组坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞水平高于 NC 组,抑制剂组坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞水平低于 NC 组和模拟物组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2、图 3。

2.3 抑制 NF- κ B 通路对 miR-146a 及 ABCA1 表达的影响 各组 NF- κ B 通路 p50、p65 及 ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);模拟物组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量高于 NC 组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量低于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);抑制剂 + PDTC 组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于模拟物组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于模拟物组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。抑制剂组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于 NC 组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);抑制剂 + PDTC 组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量高于抑制剂组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量低于抑制剂组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 三组正常细胞、坏死细胞、凋亡细胞水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$, $n=4$)

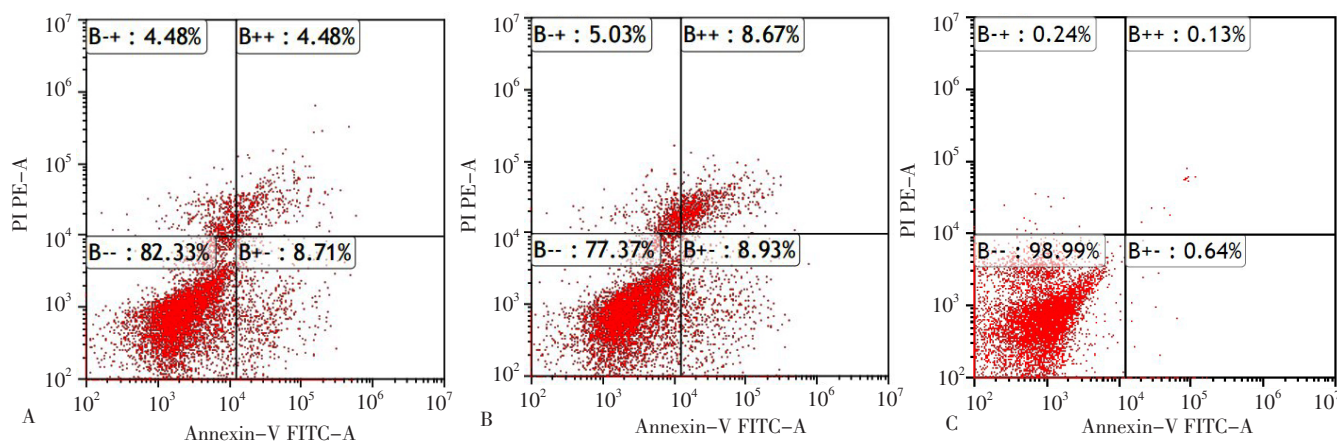
Table 2 Comparison of levels of normal cells, necrotic cells and apoptotic cells among the three groups

组别	正常细胞	坏死细胞	晚期凋亡细胞	早期凋亡细胞
NC 组	83.28 \pm 2.62	4.56 \pm 1.20	4.49 \pm 0.14	8.72 \pm 1.25
模拟物组	78.37 \pm 8.22 ^a	5.13 \pm 2.06 ^a	8.69 \pm 2.15 ^a	9.07 \pm 1.52 ^a
抑制剂组	98.63 \pm 7.28 ^{ab}	0.25 \pm 0.05 ^{ab}	0.13 \pm 0.06 ^{ab}	0.59 \pm 0.07 ^{ab}
F 值	2.13	5.61	6.17	5.22
P 值	0.04	0.01	0.01	0.01

注:与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$;与模拟物组比较, ^b $P < 0.05$

义 ($P < 0.05$);模拟物 + PDTC 组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于模拟物组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于模拟物组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。抑制剂组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于 NC 组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);抑制剂 + PDTC 组 NF- κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量高于抑制剂组,ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量低于抑制剂组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

2.4 miR-146a 靶向结合 ABCA1 3' UTR 情况 Con-miR 组 ABCA1 3' UTR 活性为 (100.18 ± 6.12),10 nmol/L miR-146a 组为 (53.27 ± 10.18),20 nmol/L miR-146a 组为 (60.18 ± 8.37);三组 ABCA1 3' UTR 活性比较,差异有统计学意义 ($F=5.16, P=0.030$);10 nmol/L miR-146a 组和 20 nmol/L miR-146a 组 ABCA1 3' UTR 活性低于 Con-miR 组,20 nmol/L miR-146a 组 ABCA1 3' UTR 活性低于 10 nmol/L miR-146a 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。WT+Con-miR 组 ABCA1 3' UTR 活性为 (100.03 ± 5.28),WT+miR-146a 组为 (70.18 ± 8.33),



注: A 为 NC 组, B 为模拟物组, C 为抑制剂组; PI= 碘化丙啶

Figure 3 Apoptosis of macrophage-derived foam cells by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry

表3 各组 NF-κ B 通路 p50、NF-κ B 通路 p65、ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 3 Comparison of the mRNA and protein relative expression levels of NF-κ B pathway p50, NF-κ B pathway p65 and ABCA1 in each group

组别	NF-κ B 通路 p50 mRNA	NF-κ B 通路 p50 蛋白	NF-κ B 通路 p65 mRNA	NF-κ B 通路 p65 蛋白	ABCA1 mRNA	ABCA1 蛋白
NC 组	1.08 ± 0.15	1.02 ± 0.05	1.07 ± 0.13	1.03 ± 0.08	1.14 ± 0.21	1.08 ± 0.20
模拟物组	3.02 ± 0.28 ^a	4.16 ± 0.52 ^a	2.78 ± 0.25 ^a	2.84 ± 0.34 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.31 ± 0.08 ^a
模拟物 +PDTC 组	1.43 ± 0.21 ^b	2.08 ± 0.17 ^b	1.11 ± 0.13 ^b	1.02 ± 0.11 ^b	0.95 ± 0.24 ^b	1.13 ± 0.24 ^b
抑制剂组	0.41 ± 0.08 ^a	0.85 ± 0.11 ^a	0.61 ± 0.09 ^a	0.63 ± 0.02 ^a	1.68 ± 0.21 ^a	1.73 ± 0.33 ^a
抑制剂 +PDTC 组	0.82 ± 0.12 ^c	1.53 ± 0.25 ^c	0.98 ± 0.09 ^c	1.03 ± 0.13 ^c	1.22 ± 0.18 ^c	1.27 ± 0.23 ^c
F 值	5.21	3.07	6.29	3.15	3.62	5.22
P 值	0.02	0.02	0.01	0.03	0.03	0.01

注: 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$; 与模拟物组比较, ^b $P < 0.05$; 与抑制剂组比较, ^c $P < 0.05$

SDM1+miR-146a 组为 (82.37 ± 11.27), SDM2+miR-146a 组为 (117.35 ± 6.58), SDM1/SMD2+miR-146a 组为 (124.10 ± 9.57); 各组 ABCA1 3' UTR 活性比较, 差异有统计学意义 ($F=6.52$, $P=0.01$); WT+miR-146a 组和 SDM1+miR-146a 组 ABCA1 3' UTR 活性低于 WT+Con-miR 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SDM2+miR-146a 组和 SDM1/SMD2+miR-146a 组 ABCA1 3' UTR 活性与 WT+Con-miR 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

细胞胆固醇水平的调控包括胆固醇摄取、内源性合成和外排之间的平衡。既往研究表明, 脂质稳态紊乱可导致多种疾病, 包括 AS、代谢综合征、2 型糖尿病及阿尔茨海默病等^[8]。巨噬细胞胆固醇代谢稳态失衡贯穿泡沫细胞形成的整个过程, 而胆固醇流出是调节巨噬细胞胆固醇动态平衡的关键环节, 对减少细胞内胆固醇蓄积、防止泡沫细胞形成和 AS 发生具有重要意义。研究表明, 抑制巨噬细胞脂质蓄积 (泡沫化) 和炎症因子释放是防治 AS 的重要途径^[4, 9]。本研究通过 ox-LDL 诱导巨噬细胞形成泡沫细胞, 为后续实验研究提供了基础。

研究表明, 高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 及其主要载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1) 在去除细胞中多余胆固醇及其向肝脏运输过程中起关键作用, 这一过程称为胆固醇逆向运输^[10]。当多余的胆固醇来自动脉斑块中的泡沫细胞时, 胆固醇逆向运输被认为是 HDL 抗 AS 的基础^[11]。ABCA1 和 ATP 结合盒转运蛋白 G1 (ABCG1) 可促进胆固醇从包括巨噬细胞在内的外周细胞中流出, 此外 ABCA1 还负责启动肝脏中的 HDL 形成, 如 Tangier 病 (一种以血浆 HDL 较低为特征的疾病) 的发生与 ABCA1 基因突变密切相关^[12]。miR-146a 是一个典型的多功能 miR, 可在其下游基因的介导下参与免疫、炎症、肿瘤等多种生理病理过程^[13-15]。研究发现, 动脉硬化病变越严重, miR-146a 表达水平越高^[7]。但泡沫细胞中 miR-146a 与

ABCA1 的关系尚不清楚。本研究结果表明, miR-146a 可通过抑制 ABCA1 表达而抑制其介导的胆固醇流出。

本研究进一步分析了 miR-146a 对巨噬细胞源性泡沫细胞生物学行为的影响, 结果发现 miR-146a mimics 促进了巨噬细胞源性泡沫细胞的凋亡, 提示 miR-146a 对巨噬细胞源性泡沫细胞的生物学进展具有重要调控作用。研究发现, NF-κ B 是 miR-146a 参与 AS 的最重要信号通路之一, 其在 LPS、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNF-α)、白介素 1β (interleukin 1β, IL-1β) 诱导的 miR-146a 转录过程中起关键作用^[16]。本研究结果显示, 模拟物 +PDTC 组 NF-κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于模拟物组, ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于模拟物组; 抑制剂 +PDTC 组 NF-κ B 通路 p50、p65 的 mRNA、蛋白相对表达量低于抑制剂组, ABCA1 的 mRNA、蛋白相对表达量高于抑制剂组, 提示 miR-146a 对 NF-κ B 存在依赖性。

研究证实, ABCA1 的 3' UTR 长于其他与 AS 相关的基因, 是多个 miR 的靶标^[17]。如 miR-122 能靶向沉默 ABCA1, 在小鼠和非人类的灵长类动物中的沉默降低了胆固醇的合成及肝脏脂肪酸、血浆胆固醇水平, 并增加肝脏脂肪酸 β-氧化^[18-19]。与 miR-122 相反, miR-758 在不同组织和细胞类型中广泛表达, 其对 ABCA1 的作用影响了细胞胆固醇稳态^[20]。本研究结果发现, ABCA1 3' UTR 具有两个 miR-146a 结合位点, 其中 1 个位点消除了 miR-146a 对 ABCA1 3' UTR 活性的抑制作用。

综上所述, miR-146a 可通过抑制 ABCA1 表达而抑制巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出, 从而导致 AS 发生发展, 而 NF-κ B 可以减轻 miR-146a 对 ABCA1 表达的抑制作用。后续应研究 miR-146a 的有效调控方法, 进而为防止脂质在血管壁蓄积及治疗 AS 提供新的靶点。

作者贡献: 幸世峰和骆小梅进行文章的构思与设计; 孙理华进行研究的实施与可行性分析, 数据收集、整理、

分析, 论文的修订; 幸世峰进行结果分析与解释, 撰写论文; 骆小梅负责文章的质量控制及审校, 并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] ROGER V L, GO A S, LLOYD-JONES D M, et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2011, 123 (4): e209–217. DOI: 10.1161/CIR.0b013e3182009701.
- [2] LIBBY P, RIDKER P M, HANSSON G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2011, 473 (7347): 317–325. DOI: 10.1038/nature10146.
- [3] TIWARI R L, SINGH V, BARTHWAL M K. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis [J]. *Med Res Rev*, 2008, 28 (4): 483–544. DOI: 10.1002/med.20118.
- [4] WEBER C, NOELS H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options [J]. *Nat Med*, 2011, 17 (11): 1410–1422. DOI: 10.1038/nm.2538.
- [5] 路倩, 陈五军, 尹凯, 等. 动脉粥样硬化中胆固醇外流的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39 (4): 319–326. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00301.
- LU Q, CHEN W J, YIN K, et al. Research advances of cholesterol efflux in atherosclerosis [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2012, 39 (4): 319–326. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00301.
- [6] TAGANOV K D, BOLDIN M P, CHANG K J, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. *PNAS*, 2006, 103 (33): 12481–12486. DOI: 10.1073/pnas.0605298103.
- [7] LI X, JI Z, LI S, et al. miR-146a-5p antagonized AGEs- and P-g-LPS-induced ABCA1 and ABCG1 dysregulation in macrophages via IRAK-1 downregulation [J]. *Inflammation*, 2015, 38 (5): 1761–1768. DOI: 10.1007/s10753-015-0153-x.
- [8] SUZUKI K, KAWAKAMI Y, YAMAUCHI K. Impact of TLR 2, TLR 4-activation on the expression of ABCA1 and ABCG1 in raw cells [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2017, 47 (4): 436–446.
- [9] KOTARO H, HIROMICHI W, KENGO A, et al. Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 269: 236–244. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.013.
- [10] RADER D J, ALEXANDER E T, WEIBEL G L, et al. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50 (suppl): S189–194. DOI: 10.1194/jlr.r800088-jlr200.
- [11] TALL A R. Role of ABCA1 in cellular cholesterol efflux and reverse cholesterol transport [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (5): 710–711. DOI: 10.1161/01.atv.0000068683.51375.59.
- [12] STOCCHI L, GIARDINA E, VARRIALE L, et al. Can tangier disease cause male infertility? A case report and an overview on genetic causes of male infertility and hormonal axis involved [J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 123 (1): 43–49. DOI: 10.1016/j.ymgme.2017.11.009.
- [13] HOU Z H, HAN Q J, ZHANG C, et al. miR146a impairs the IFN- γ -induced anti-HBV immune response by downregulating STAT1 in hepatocytes [J]. *Liver Int*, 2014, 34 (1): 58–68. DOI: 10.1111/liv.12244.
- [14] GU S X, LI X, HAMILTON J L, et al. MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc [J]. *Gene*, 2015, 555 (2): 80–87. DOI: 10.1016/j.gene.2014.10.024.
- [15] KUMARASWAMY E, WENDT K L, AUGUSTINE L A, et al. BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function [J]. *Oncogene*, 2015, 34 (33): 4333–4346. DOI: 10.1038/onc.2014.363.
- [16] MACIEL R A P, REMPEL L C T, BOSQUETTI B, et al. p-cresol but not p-cresyl sulfate stimulate MCP-1 production via NF- κ B p65 in human vascular smooth muscle cells [J]. *J Bras Nefrol*, 2016, 38 (2): 153–160. DOI: 10.5935/0101-2800.20160024.
- [17] MARQUART T J, ALLEN R M, ORY D S, et al. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters [J]. *PNAS*, 2010, 107 (27): 12228–12232. DOI: 10.1073/pnas.1005191107.
- [18] 杨红霞, 高亚, 蒋恒波, 等. EGCG通过 miR-33a上调 ABCA1表达减少巨噬细胞脂质蓄积 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32 (9): 1279–1284. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.09.018.
- YANG H X, GAO Y, JIANG H B, et al. EGCG upregulated ABCA1 expression by decreasing miR-33a generation to reduce lipid accumulation of macrophage-derived foam cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2016, 32 (9): 1279–1283, 1284. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.09.018.
- [19] ZHANG H J, BRIAN D L, GEORGE M, et al. Pitavastatin differentially modulates MicroRNA-associated cholesterol transport proteins in macrophages [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (7): e0159130. DOI: 10.1371/journal.pone.0159130.
- [20] YAO Y, LI Q, GAO P, et al. Glucagon-like peptide-1 contributes to increases ABCA1 expression by downregulating miR-758 to regulate cholesterol homeostasis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497 (2): 652–658. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.126.

(收稿日期: 2020-12-05; 修回日期: 2021-03-25)

(本文编辑: 谢武英)