

miR-19b 对巨噬细胞 ABCA1 表达的影响

吕运成^{1,2}, 彭超³, 姚峰¹, 唐艳艳¹, 张熠³, 徐菁², 刘政海², 唐朝克¹

(1. 南华大学医学院心血管疾病研究所; 2. 南华大学临床应用解剖研究室, 湖南衡阳 421001; 3. 南华大学附属第一医院临床研究所)

摘要: **目的** 观察 miR-19b 对巨噬细胞 ABCA1 表达的影响。 **方法** 在 THP-1 源性巨噬细胞中转染 miR-19b 模拟物 (mimic) 和抑制物 (inhibitor), 荧光定量 PCR 检测 ABCA1 mRNA, Western blot 检测 ABCA1 蛋白水平。 **结果** 转染 miR-19b mimic 后, 巨噬细胞 ABCA1 mRNA 及蛋白水平均显著下调; 转染 miR-19b inhibitor 后 ABCA1 蛋白则明显上调, 但 ABCA1 mRNA 无变化。 **结论** miR-19b 下调巨噬细胞 ABCA1 的表达。

关键词: miR-19b; ABCA1; 巨噬细胞

中图分类号: R541.4 **文献标识码:** A

miR-19b Regulates the Expression of Macrophage ABCA1

LV Yuncheng, PENG Chao, YAO Feng, et al

(Institute of Cardiovascular Research, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the impact of miR-19b on the expression of macrophage ABCA1. **Methods** The protein and mRNA levels of ABCA1 were detected by Western blot and quantitative real time PCR (qRT-PCR) respectively in THP-1 macrophage transfected with miR-19b mimic and inhibitor. **Results** The protein and mRNA levels of ABCA1 were obviously downregulated in THP-1 macrophage transfected with miR-19b mimic. The protein level of ABCA1 was evidently upregulated in THP-1 macrophage transfected with miR-19b inhibitor, while ABCA1 mRNA level had no significantly alternation. **Conclusion** miR-19b regulates the expression of macrophage ABCA1.

Key words: miR-19b; ABCA1; macrophage

miR-19b 为一种内生性的 microRNA, 在哺乳动物体内存在两种亚型 (miR-19b-1 与 miR-19b-2), 分别由 13 号常染色体和 X 染色体产生, 但两者序列完全相同。miR-19b 在心肌细胞、单核细胞及血管内皮细胞中均有表达, 在人和鼠 As 斑块中过量表达^[1-3]。高脂饮食上调 miR-19b 表达, 促进皮下和内脏脂肪的沉积^[4]。这些研究初步提示 miR-19b 可参与调控脂质代谢, 与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的进展密切相关。

生物信息学分析发现 miR-19b 可靶向结合三磷

酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 3' 非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR), 且二者结合的自由能较低。人 ABCA1 3' UTR 存在三个 miR-19b 结合位点, 鼠 ABCA1 3' UTR 存在两个结合位点。这就提示 miR-19b 可靶向调控细胞内 ABCA1 表达, 而 ABCA1 介导脂质流出对抑制巨噬细胞内脂质蓄积和 AS 进展起着关键作用^[5]。本研究将采用 Western blot、荧光定量 PCR 等技术检测 miR-19b 对 THP-1 源性巨噬细胞 ABCA1 的 mRNA 及蛋白水平的影响, 证实 miR-19b 是否调控巨噬细胞 ABCA1 的表达。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人单核细胞株 THP-1 购自中国科学院上海生

收稿日期: 2013-10-22

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (编号 14JJ2091); 湖南省教育厅资助科研项目 (12C0339)。

作者简介: 吕运成, 在读博士生, 讲师, 研究方向: 动脉粥样硬化的病因及发病学, E-mail: anthony0723@163.com. 通讯作者唐朝克, 博士, 教授, 研究方向: 动脉粥样硬化的病因及发病学, E-mail: tangchaok@qq.com.

物化学与细胞生物研究所细胞库。RPMI1640 培养基购自 Solarbio 公司,胎牛血清购自杭州四季清生物公司,牛血清白蛋白购自上海生工。佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 购自北京诺博莱德公司。miR-19b mimic/inhibitor 及 ribo-FECTTMCP 转染试剂盒均购自广州锐博公司。ABCA1 抗体购自 ABCam 公司, β -actin 抗体购自武汉博士德公司。Trizol 及反转录试剂盒均购自 Invitrogen 公司。荧光定量 PCR 试剂盒购自康为世纪公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养与转染

THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中静置培养。将 THP-1 细胞种植到六孔板, 用 160 nM PMA 孵育细胞 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞。实验前制备 miRNA 转染复合液: miR-19b mimic 为 250 μ L buffer + 4 μ L mimic + 25 μ L reagent + 1721 μ L 无血清培养液 (mimic 终浓度为 40 nM), miR-19b inhibitor 为 250 μ L buffer + 8 μ L inhibitor + 25 μ L reagent + 1717 μ L 无血清培养液 (inhibitor 终浓度为 80 nM)。弃去旧培养液后加入转染复合液, 转染 48h 后收集细胞。

1.3 Western blot

收集处理后的细胞, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 4 °C 离心 10 min, 弃去沉淀。以 4:1 加入 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液, 100 °C 加热 10 min。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 12V 恒压半干转膜 45 min 后, 丽春红染色 5 min 观察转膜效果。5% 脱脂牛奶封闭 2h, 按 1:1000 加入羊抗人 ABCA1 一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 1:1000 加入辣根过氧化物酶标记的小鼠抗羊二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 用 Tanon 5500 免疫荧光检测系统激发荧光, Tanon MP 软件摄取图像, Tanon CAL 软件分析获取各条带的光密度值。

1.4 荧光定量 PCR

用 trizol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA, 用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA, 用 Light-Cycler480 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR, 反应体系为 50 μ L, 含 2 $\times$ UltraSYBR Mixture 25 μ L、上下游引物各 1 μ L、cDNA 2 μ L, buffer 21 μ L。95 °C 预变性 10 min 后, 再按 95 °C 15 s、60 °C 1 min 共 40 个循环。收集 60 °C 时的荧光信号。人 ABCA1 引物为, 5'-GGTTTGGAGATGCTTATACAAT AGTTGT-3' 和 5'-CCCGGAAACGCAAGTC C-3'。 β -actin 的表达

用作内参照。

1.5 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行统计分析。实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 miR-19b 对巨噬细胞 ABCA1 蛋白水平的影响

将 THP-1 巨噬细胞分为 3 组: (1) 空白对照组, 培养液中不加任何其他物质; (2) miR-19b mimic 组; 培养液中加入 40 nM/L miR-19b mimic; (3) miR-19b inhibitor 组; 培养液中加入 80 nM/L miR-19b inhibitor。miR-19b mimic 组 ABCA1 蛋白表达较空白对照组明显降低。miR-19b inhibitor 组 ABCA1 蛋白表达与空白对照组比较明显上调。这就表明 miR-19b 可抑制巨噬细胞 ABCA1 蛋白的表达 (图 1)。

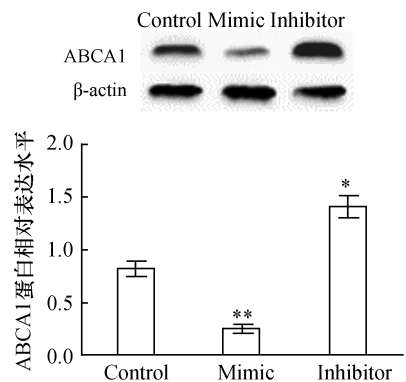


图 1 转染 miR-19b mimic 及其 inhibitor 24 h 后 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 mRNA 蛋白表达的变化 与对照组比较, * : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$ ($n = 3$)

2.2 miR-19b 对巨噬细胞 ABCA1 mRNA 水平的影响

将 THP-1 巨噬细胞分组如上。miR-19b mimic 组 ABCA1 mRNA 水平较空白对照组明显降低。miR-19b inhibitor 组 ABCA1 mRNA 水平与空白对照组比较无变化。这就表明 miR-19b 可下调巨噬细胞 ABCA1 mRNA 的水平 (图 2)。

3 讨 论

巨噬细胞 ABCA1 的表达水平受到胞内各种调控因子的严密调控^[6-7]。本研究采用 Western blot 和荧光定量 PCR 检测了 miR-19b 对巨噬细胞 ABCA1

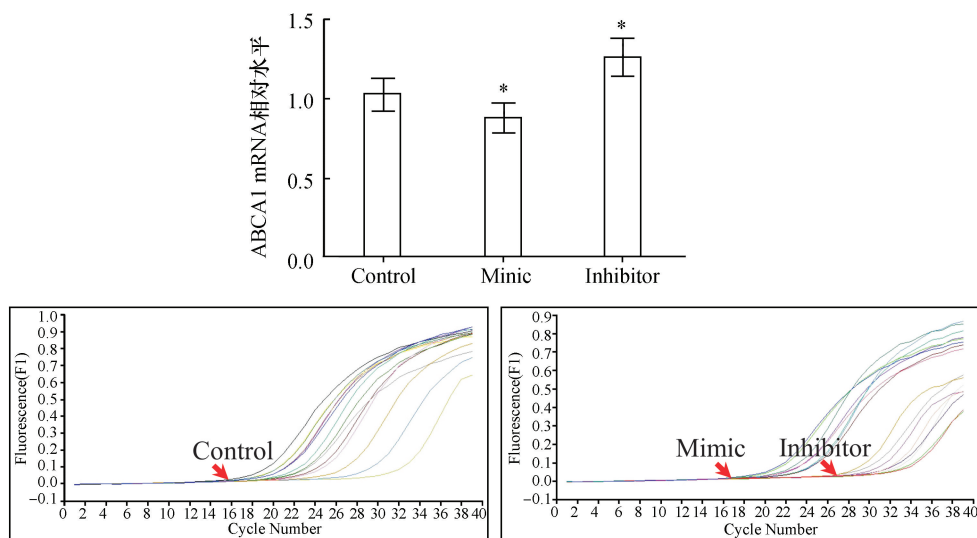


图2 转染 miR-19b mimic 及其 inhibitor 24h 后 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 mRNA 表达的变化 与对照组比较, *: $P < 0.05$ ($n = 3$)

蛋白及其 mRNA 水平的影响,结果发现 miR-19b 显著抑制巨噬细胞 ABCA1 的表达。

MiR-19 在转录后水平抑制巨噬细胞 ABCA1 的表达。我们在前期的生物信息学分析中发现 miR-19b 可直接靶向作用 ABCA1 3'UTR,且二者结合的自由能较低,这就提示 miR-19b 可在生理或者病理条件下调控 ABCA1 的表达。本研究在人源性 THP-1 巨噬细胞中转染 miR-19b mimic 与 inhibitor,从而增强或抑制 miR-19b 的功能,结果发现 ABCA1 蛋白及其 mRNA 水平均下调。这些结果与生物信息学预测分析一致,并且在体外细胞水平证实了 miR-19b 对 ABCA1 表达的调控作用。

miR-19b 下调巨噬细胞 ABCA1 的表达对 As 的发生发展具有重要意义。ABCA1 在介导巨噬细胞内脂质流出及 HDL 生成中起着关键作用^[8]。抑制 ABCA1 的表达与功能导致巨噬细胞内脂质蓄积和胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)受阻,从而导致血管壁脂质沉积和 As 的发生发展。已有研究表明 miR-19b 在人 As 斑块中高表达,而在正常动脉壁上无表达。这就提示 miR-19b 抑制 ABCA1 表达参与了 As 发生发展的过程。

本研究初步证实了 miR-19b 调控巨噬细胞 ABCA1 的表达,但是 miR-19b 对 ABCA1 的具体调控机制、体内验证 miR-19b 的调控作用及其对巨噬细胞脂质流出和 As 发生发展的影响有待进一步研究。总之,全面揭示 miR-19b 对 ABCA1 的调控作用及其机制,使其有望成为调控 RCT 及防治 AS 的新靶点。

参考文献:

- [1] Bidzhikov K, Gan L, Denecke B, et al. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans [J]. *Thromb Haemost and Haemostasis*, 2012, 107(4): 619-625.
- [2] Han H, Wang YH, Qu GJ, et al. Differentiated miRNA expression and validation of signaling pathways in apoE gene knockout mice by cross-verification microarray platform [J]. *Exp Mol Med*. 2013, 45(e13): 1-10.
- [3] 胡孜阳, 罗建方, 钟诗龙, 等. 应用基因芯片初步分析主动脉夹层与正常主动脉微小 RNA 的差异表达 [J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40(5): 406-410.
- [4] Romao JM, Jin WW, He ML, et al. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet [J]. *PLoS One*, 2013, 7(7): 1-10.
- [5] Pennings M, Meurs I, Ye Dan, et al. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development [J]. *FEBS Lett*. 2006, 580: 5588-5596.
- [6] 唐朝克. 以 ABCA1 为靶点防治动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(11): 879-884.
- [7] Lv YC, Yin K, Fu YC, et al. Posttranscriptional regulation of ATP-binding cassette transporter A1 in lipid metabolism [J]. *DNA Cell Biol*. 2013, 32(7): 348-358.
- [8] Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR, et al. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42: 1717-1726.