

# MicroRNA155 通过下调清道夫受体表达抑制巨噬细胞泡沫化形成

尚菲<sup>1</sup>, 曾德意<sup>1</sup>, 杨慧<sup>2</sup>, 黄琳燕<sup>1</sup>, 刘捷<sup>1</sup>, 吕晓飞<sup>1</sup>, 关永源<sup>1</sup>, 周家国<sup>1\*</sup>

(1.中山大学中山医学院,药理教研室//心脑血管研究中心,广东广州 510080; 2.广东省医学科学院//广东省人民医院医学研究中心,广东广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨 microRNA-155(miR-155)对巨噬细胞泡沫化过程的影响及机制。【方法】实时定量 PCR 检测 miR-155 的表达,Western Blot 方法检测巨噬细胞 A 类清道夫受体 SR-A 和 B 型清道夫受体 CD36 的表达,激光共聚焦显微镜观察 miR-155 对 THP-1 结合、摄取 DiI 标记氧化型低密度脂蛋白(DiI-oxLDL)能力的影响。【结果】80 μg/mL 的氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)时间依赖性地诱导巨噬细胞 miR-155 表达上调。过表达 miR-155 抑制 SR-A 和 CD36 的表达,同时巨噬细胞结合、摄取 DiI-oxLDL 的能力明显降低。而反义-miR-155 则明显上调 SR-A 和 CD36 的表达,同时巨噬细胞结合、摄取 DiI-oxLDL 的能力明显增强。【结论】MiR-155 通过降低巨噬细胞 SR-A 和 CD36 的表达抑制巨噬泡沫细胞的形成。

**关键词:** miR-155; 动脉粥样硬化; THP-1 巨噬细胞; 清道夫受体; 泡沫化

中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2012)02-0156-07

## MicroRNA-155 Inhibits Macrophagic Foam Cell Formation through Downregulating Expression of Scavenger Receptors

SHANG Fei<sup>1</sup>, ZENG De-yi<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>2</sup>, HUANG Ling-yan<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, LV Xiao-fei<sup>1</sup>,  
GUAN Yong-yuan<sup>1</sup>, ZHOU Jia-guo<sup>1\*</sup>

(1.Department of Pharmacology//Cardiac & Cerebrovascular Research Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2.Guangdong Academy of Medical Sciences// Medical Research Center of Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the effect of microRNA-155 (miR-155) on macrophagic foam cell formation. 【Methods】 Real-time RT-PCR was used to test the expression of microRNA-155. Western blot was used to determine the expression of scavenger receptors SR-A and CD36 in THP-1 macrophages. Receptor-specific binding and uptake of DiI-labeled ox-LDL (DiI-oxLDL) were examined by laser scanning confocal microscope. 【Results】 In THP-1 cells, 80 μg/mL oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced up-regulation of miR-155 in a time-dependent manner. Ad-miR-155 transfection decreased the expression of SR-A and D36, and the uptake and binding of THP-1 cell with DiI-oxLDL. In contrast, miR-155 inhibitor increased the expression of SR-A and CD36, and the uptake and binding of THP-1 cell with DiI-oxLDL. 【Conclusion】 MicroRNA-155 inhibits macrophagic foam cell formation through decreasing the expression of SR-A and CD36.

**Key words:** microRNA-155; atherosclerosis; THP-1 cell; foam cell; Scavenger receptor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(2): 156-162]

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性心血管疾病,严重威胁人类健康。尽管动脉粥样硬化是一个多因素参与的复杂病理过程,但血液

中的单核细胞迁移至内皮下分化为巨噬细胞后吞噬脂质,特别是氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL),进而形成泡沫细胞仍

收稿日期:2011-11-18

基金项目:国家自然科学基金(30873060, 30973536);全国百篇优秀博士论文专项基金(200773);中央高校基本科研业务费专项资金(09ykpy81)

作者简介:尚菲,硕士研究生,研究方向:动脉粥样硬化防治新靶标, E-mail: shangfeisysu@126.com; \* 通信作者:周家国,教授,博士生导师,研究方向:心血管疾病防治新靶点, E-mail: zhoutjg@mail.sysu.edu.cn

然是关键环节。巨噬细胞吞噬脂质主要通过细胞膜上的清道夫受体(scavenger receptors, SRs)完成。其中,A类清道夫受体(scavenger receptor A, SR-A)和B型清道夫受体 CD36 (cluster of differentiation36, CD36) 在巨噬细胞摄取各种修饰型低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)过程中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。近年来研究表明,微小 RNA(microRNA)参与调控了心血管系统的多种功能,其表达异常与多种心血管疾病的发生和发展密切相关<sup>[2]</sup>。MicroRNA-155(miR-155)是一个典型的多功能microRNA,已有资料表明,miR-155在免疫反应、炎症、肿瘤发生等过程中发挥了重要的作用<sup>[3]</sup>。最近的研究显示 miR-155在巨噬细胞泡沫化过程中表达上调<sup>[4]</sup>,但其对巨噬细胞泡沫化和动脉粥样硬化形成的作用尚不清楚。本研究探讨了 miR-155对 THP-1巨噬细胞泡沫化过程的影响及其可能机制,以评估 miR-155是否可作为防治动脉粥样硬化的新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

人类单核细胞株 THP-1 细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所);RPMI1640 细胞培养基、胎牛血清、青/链双抗(GIBCOBRL公司);佛波酯(PMA)、油红 O、Hoechst33258、蛋白酶抑制剂 cocktail(Sigma公司);SR-A 和 CD36 抗体(R&D公司);HRP 标记的驴抗山羊 IgG (Santa Cruz 公司);1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate(DiI)荧光探针(Probe公司);其余试剂均为进口或国产分析纯产品。

CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Precision 公司);SW-CJ-IF 超净工作台(江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司);倒置显微镜(重庆光学仪器厂);激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);超速离心机(美国 Beckman 公司);酶联免疫仪(美国 MJ RESEARCH 公司);小型垂直电泳和电转装置、荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 Ad-miR-155 和 Ad-anti-miR-155 腺病毒载体构建

腺病毒载体的构建参照文献报道的方法<sup>[5]</sup>。Ad-miR-155 (5'-TCGAGCCCCTATCACGATTAGCA

TTAATTCAAGAGATTAATGCTAATCGTGATAGGGGA-3')和 Ad-anti-miR-155 (5'-CTAGTCCCCTATC ACGATTAGCATTAATCTCTTGAATTAATGCTAATC GTGATAGGGGC-3')的制备按照 AdMax(Microbix)和 pSilencer™ adeno 1.0-CMV (Ambion) systems 说明书进行。病毒经 HEK293A 细胞进行包装、扩增后,CsCl 纯化,含 100 mL/L 甘油的 20 mmol/L Tris 缓冲液透析,于-70℃保存。腺病毒滴度测定按照 Adeno-X Rapid Titer kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) 试剂盒说明书进行。实验中以 Ad-LacZ 转染组作为对照。

### 1.3 Ox-LDL 和 DiI-oxLDL 的制备

Ox-LDL 的制备按文献报道的方法<sup>[6]</sup>,采用硫酸铜氧化法,简述如下:健康人血浆购自中山大学附属第一医院血液科,采用密度梯度离心的方法,制备 LDL。将 LDL 于 4℃透析 24 h,期间换液 3 次。在 37℃下用终浓度为 5 μmol/L 的 CuSO<sub>4</sub> 氧化 24 h。接着分别用含 200 μmol/L EDTA 和不含 EDTA 的 PBS 4℃下分别透析 24 h 和 48 h。用 Bradford 法测定蛋白含量。在无菌条件下采用 0.45 μm 滤膜过滤除菌,4℃避光保存,一周内用完。

DiI-oxLDL(1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetra-methylindocyanide perchlorate (DiI)-labeled oxLDL)的制备方法如下<sup>[7-9]</sup>,采用密度梯度离心的方法,制备 LDL,用一定量的无脂蛋白血清调节 LDL 浓度至 1 mg/mL,每毫升 LDL 中加入 5 μL 浓度为 30 mg/mL 的 DiI 储存液,37℃避光孵育 18 h,使 LDL 转变为 DiI-LDL。经密度梯度离心提取 DiI-LDL,PBS 透析 48 h,期间换液 3 次。加入终浓度为 5 μmol/L 的 CuSO<sub>4</sub>,37℃氧化 24 h,然后分别用含 200 μmol/L EDTA 和不含 EDTA 的 PBS 分别透析 24、48 h。采用 0.45 μm 滤膜过滤除菌,4℃避光保存,一周内用完。

### 1.4 细胞培养和实验分组

THP-1 细胞株由中国科学院上海细胞生物学研究所提供,用含 100 mL/L 小牛血清,1%双抗的 RPMI1640 培养基,置于体积分数 5% CO<sub>2</sub>,37℃的细胞培养箱内培养。将细胞按 1×10<sup>6</sup> 密度接种于 35 mm 培养皿中,以 100 ng/mL 的 PMA 刺激 THP-1 细胞 48 h 后诱导其分化成巨噬细胞。实验分组如下:在观察过表达 miR-155 对巨噬细胞的影响时分为 6 组:空白对照组、Ad-LacZ 组、ox-LDL+Ad-LacZ 组、ox-LDL+Ad-miR-155 (25 MOI)组、ox-

LDL+Ad-miR-155 (50 MOI) 组、ox-LDL+Ad-miR-155(100 MOI)组;在观察抑制 miR-155 对巨噬细胞的影响时分为 4 组:Ad-LacZ 组、Ad-anti-miR-155(50 MOI)组、ox-LDL+Ad-LacZ 组、ox-LDL+Ad-anti-miR-155(50 MOI)组。

### 1.5 实时定量 PCR 检测 ox-LDL 对 miR-155 表达的影响

参照操作手册,用 Trizol 法抽提总 RNA。2  $\mu\text{g}$  总 RNA 逆转录至终体积为 20  $\mu\text{L}$ , 采用 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法检测 miR-155 的表达。用 miR-155 特异性的具有茎环样结构的引物 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTC-CGAGGTATTCGCAC TGGATACGACCCCCTA-3' 合成互补的 DNA, 检测 miR-155 的表达。定量多聚酶链反应(qPCR)引物设计, 正向引物:5'-CTGTTAATGCTAATCGTGAT AG-3';反向引物:5'-GCAGGGTCCGAGGT-3'。核内小分子 RNA U6 作为内参,引物设计如下,正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';反向引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 反应体系包括:1  $\mu\text{L}$  RT 逆转录产物,10  $\mu\text{L}$  SYBR Green PCR Master Mix 和 500 nmol/L 正向以及反向引物。反应采用 MyiQ 单色实时 PCR 检测系统(Bio-Rad),先 95  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 然后进行 40 个循环(95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 min)。U6 做为内参,采用 2- $\Delta\Delta\text{CT}$  法分析基因相对表达量。

### 1.6 Western Blot 检测 SR-A 和 CD36 蛋白表达情况

总蛋白的提取:用冰浴的 PBS 洗涤细胞 3 遍, 加入 RIPA 裂解液 100  $\mu\text{L}$ , 冰上裂解 30 min。刮下并收集细胞,4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min( $r=9.5$  cm)离心 10 min, 吸取上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量,-80 $^{\circ}\text{C}$  保存。Western Blot 检测 SR-A 和 CD36 蛋白表达:以 60  $\mu\text{g}$  蛋白每泳道上样, 经 8% SDS-PAGE 电泳分离, 电转移蛋白至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 一抗 (SR-A, 1:4 000; CD36, 1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 二抗 (HRP 标记的驴抗山羊 IgG 1:4 000; 1:2 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。ECL 化学发光法检测蛋白表达, 以  $\beta$ -actin 为内参, 计算蛋白表达的相对变化。

### 1.7 激光共聚焦显微镜观察 miR-155 对巨噬细胞结合、摄取 DiI-oxLDL 能力的影响

按文献报道的方法进行<sup>[10]</sup>, 主要步骤简述如

下:病毒转染 24 h 后,加入 ox-LDL 处理细胞 48 h。随后各组分别加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DiI-oxLDL, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育细胞 2 h (反映巨噬细胞结合 DiI-oxLDL 能力)或 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育细胞 4 h (反映巨噬细胞摄取 DiI-oxLDL 能力), 经 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min 后, 加入终浓度 5 mg/L 的 Hoechst33258 避光染色 5 min, PBS 洗涤 3 次后, 激光共聚焦显微镜下 (600 $\times$ ) 观察拍摄。各组随机选取 5 个视野, 运用 confocal 自带 Fluorescence View 软件测定视野内所有细胞的细胞内平均荧光强度并计算平均值。

### 1.8 数据分析和统计

所有实验结果用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用 SPSS 13.0 进行统计学分析, 多组资料比较采用方差分析, 两两比较采用  $t$  检验,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 Ox-LDL 诱导巨噬细胞 miR-155 表达上调

实时定量 PCR 结果显示, 在 THP-1 细胞, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ox-LDL 可以诱导 miR-155 的表达上调。Ox-LDL 作用后 2 h, miR-155 表达开始增加, 6 h 达到最高。尽管 8 h 开始有所降低, 但 ox-LDL 作用后一直到 72 h, miR-155 表达仍维持在较高表达水平(图 1)。

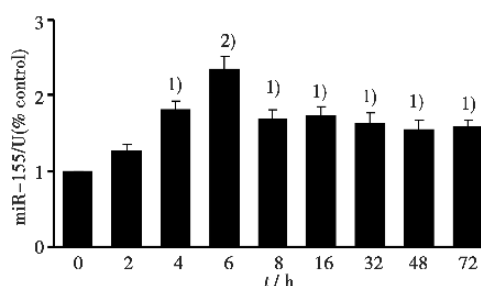


图 1 Ox-LDL 诱导了 THP-1 细胞中 miR-155 的表达  
Fig.1 Ox-LDL induced miR-155 expression in THP-1 cells

Ox-LDL: 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=4\sim 10$ ; 1)  $P<0.05$ , 2)  $P<0.01$  vs. 0 h

### 2.2 过表达 miR-155 抑制巨噬细胞结合、摄取 DiI-oxLDL

为明确 ox-LDL 诱导 miR-155 表达上调的功

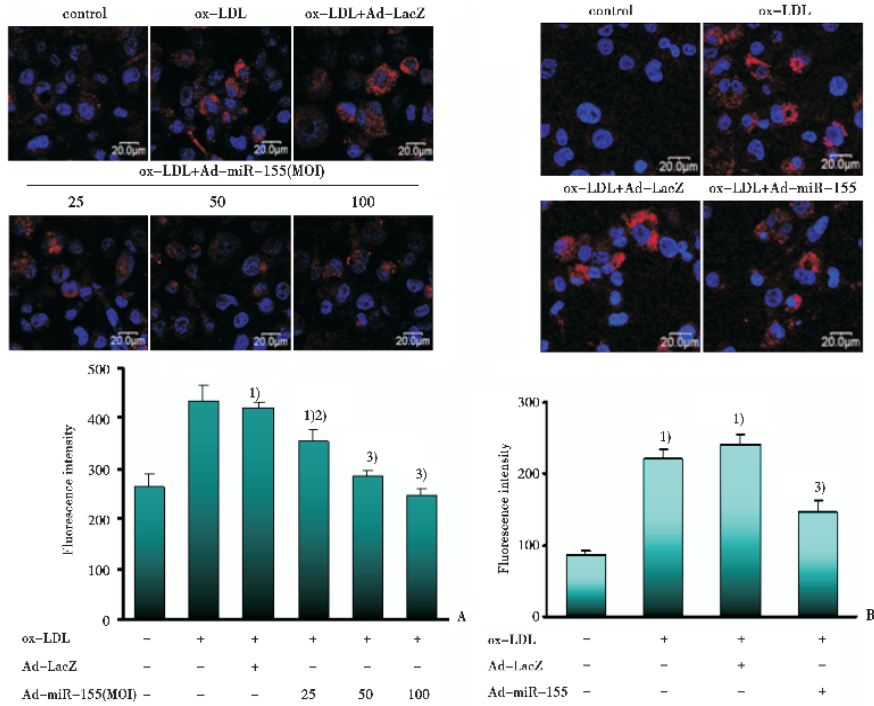


图 2 MiR-155 抑制 THP-1 细胞结合和摄取 DiI-oxLDL

Fig.2 MiR-155 inhibited uptake and binding of DiI-oxLDL in THP-1 cells

Cells were induced with 100 ng/mL PMA for 48 h, then incubated with Ad-lacZ or Ad-miR-155 (25–100 MOI) for 24 h and ox-LDL (80 μg/mL) for another 48 h. Macrophages were then subjected to DiI-oxLDL for 4 h at 37 °C or 2 h at 4 °C to detect uptake and binding. ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ) 1)  $P < 0.05$  vs. control 2)  $P < 0.05$ , 3)  $P < 0.01$  vs. ox-LDL only group A; uptake of DiI-oxLDL,  $\times 600$ ; B; Binding of DiI-oxLDL,  $\times 600$

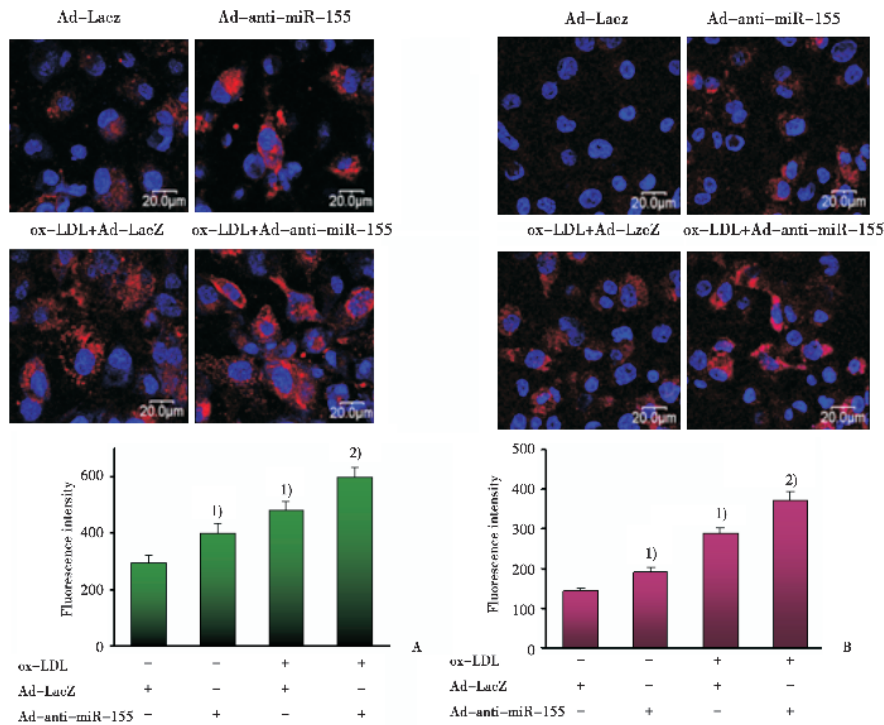


图 3 反义-miR-155 促进 THP-1 细胞结合和摄取 DiI-oxLDL

Fig.3 Ad-anti-miR-155 promoted uptake and binding of DiI-oxLDL in THP-1 cells

Cells were induced with 100 ng/mL PMA for 48 h, then incubated with Ad-lacZ or Ad-anti-miR-155 (50 MOI) for 24 h and ox-LDL (80 μg/mL) for another 48 h. Macrophages were then subjected to DiI-oxLDL for 4 h at 37 °C or 2 h at 4 °C to detect uptake and binding. ( $\bar{x} \pm s, n=5$ . 1)  $P < 0.05$  vs. control, 2)  $P < 0.05$  vs. ox-LDL + Ad-lacZ. A; uptake of DiI-oxLDL,  $\times 600$ ; B; Binding of DiI-oxLDL,  $\times 600$

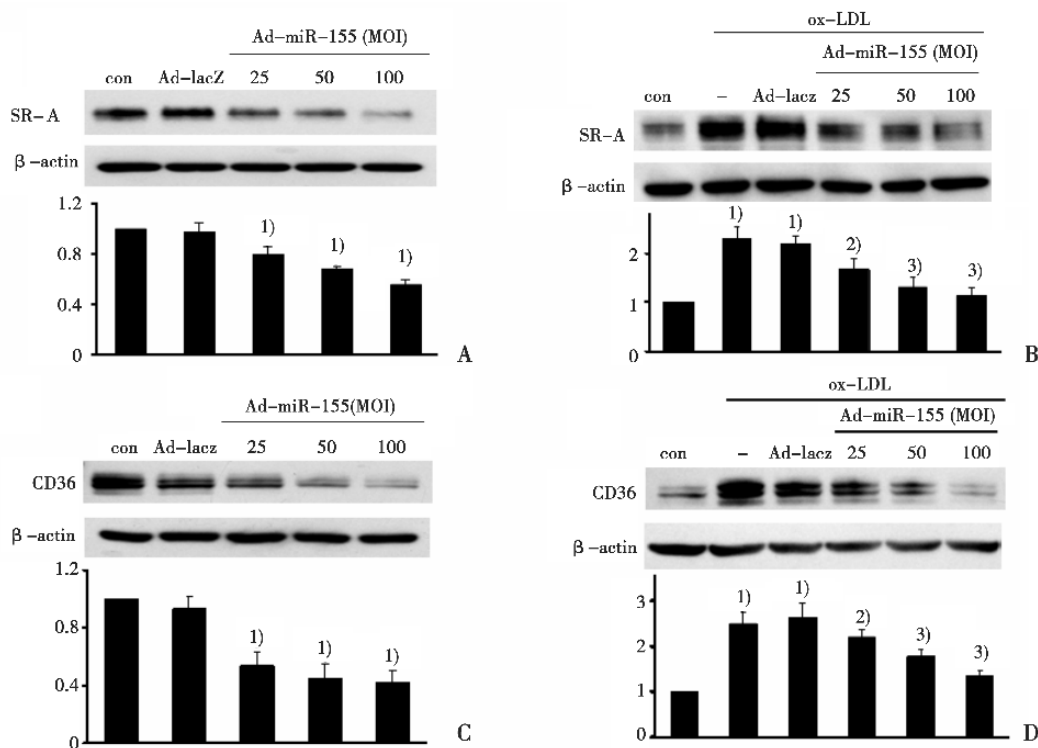


图 4 MiR-155 抑制 SR-A 和 CD36 的表达

Fig.4 MiR-155 inhibited the expression of SR-A and CD36 in THP-1 cells

Cells were induced with 100 ng/mL PMA for 48 h, then incubated with Ad-lacZ or Ad-miR-155 (25–100 MOI) for 24 h and ox-LDL (80  $\mu$ g/mL) for another 48 h. Western blot was used to analyze the expressions of SR-A and CD36,  $\beta$ -actin as control.  $\bar{x} \pm s, n=6$ . 1)  $P < 0.05$  vs. control, 2)  $P < 0.05$ , 3)  $P < 0.01$  vs. ox-LDL only group.

能,我们观察了腺病毒转染 miR-155(Ad-miR-155)后对巨噬细胞结合和摄取 DiI-oxLDL 的影响。结果显示,与对照组相比,ox-LDL 处理细胞 48 h 后,巨噬细胞摄取 DiI-oxLDL 的能力明显增加。Ox-LDL 处理后细胞内的平均荧光强度从对照组的  $262 \pm 25$  增加至  $433 \pm 29$  ( $n=6, P < 0.05$ )。Ad-miR-155 转染可明显抑制巨噬细胞摄取 DiI-oxLDL 的能力。Ad-miR-155 不同滴度(25 MOI, 50 MOI, 100 MOI)转染后,细胞内平均荧光强度分别降至  $353 \pm 22$  ( $n=6, P < 0.05$ ),  $285 \pm 11$  ( $n=5, P < 0.01$ ) 和  $247 \pm 12$  ( $n=6, P < 0.01$ )。而 Ad-LacZ 转染无作用(图 2A)。

同时我们观察到,ox-LDL 处理细胞 48 h 后,巨噬细胞结合 DiI-oxLDL 的能力亦明显增加。Ox-LDL 处理后细胞内的平均荧光强度从对照组的  $84 \pm 6$  增加至  $221 \pm 12$  ( $n=6, P < 0.05$ )。Ad-miR-155 转染(50 MOI)可明显抑制巨噬细胞与 DiI-oxLDL 的结合,Ad-miR-155 转染使细胞内的平均荧光强度降至  $146 \pm 16$  ( $n=6, P < 0.01$ ) (图 2B)。

### 2.3 抑制 miR-155 促进巨噬细胞结合、摄取 DiI-oxLDL

为进一步明确 miR-155 对巨噬细胞结合和摄取 DiI-oxLDL 的影响。我们研究了腺病毒转染反义-miR-155 (Ad-anti-miR-155) 的作用。图 3A 显示,Ad-anti-miR-155 转染(50 MOI)后,基础状态和 ox-LDL 刺激后的巨噬细胞摄取 DiI-oxLDL 的能力均明显增强。Ad-anti-miR-155 作用后,基础状态下,细胞内的平均荧光强度从 Ad-LacZ 转染组的  $292 \pm 26$  增加至明显增加  $402 \pm 34$  ( $n=5, P < 0.05$ )。Ox-LDL 处理后,细胞内平均荧光强度较对照组增加 ( $481 \pm 33$  vs.  $292 \pm 26, n=5, P < 0.05$ )。Ad-anti-miR-155 转染可进一步增强 oxLDL 的作用,使细胞内平均荧光强度增加至  $559 \pm 34$  ( $n=5, P < 0.05$ )。另一方面,巨噬细胞结合 DiI-LDL 的能力也明显增加。在基础状态下和和 ox-LDL 刺激后,Ad-anti-miR155 转染分别使巨噬细胞内的平均荧光强度从  $142 \pm 7$  增加至  $190 \pm 10$  ( $n=5, P < 0.05$ ) 以及从  $289 \pm 13$  增加至  $372 \pm 24$  ( $n=5, P <$

0.05)(图 3B)。

#### 2.4 过表达 miR-155 降低了 SR-A 和 CD36 的表达

由于巨噬细胞摄取脂质主要通过膜上的清道夫受体完成,因此,我们进一步分析了腺病毒转染 miR-155 (Ad-miR-155) 后对巨噬细胞 SR-A 和 CD36 表达的影响。结果发现,随 Ad-miR-155 转染滴度的增加,SR-A 和 CD36 的表达逐渐降低。MiR-155 不仅抑制基础状态下 SR-A 和 CD36 的表达,而且逆转 ox-LDL 诱导的 SR-A 和 CD36 蛋白表达

的上调(图 4A,图 4B)。

#### 2.5 抑制 miR-155 上调 SR-A 和 CD36 的表达

进一步我们观察了抑制 miR-155 对巨噬细胞清道夫受体表达的影响。Western Blot 结果显示,与对照组相比,转染 Ad-anti-miR155(50 MOI)可显著增加基础状态下巨噬细胞中 SR-A 和 CD36 的表达,差异具有统计学意义( $n=6, P < 0.05$ )(图 5A)。加入 ox-LDL 刺激巨噬细胞后,SR-A 和 CD36 的表达上调。预先转染 Ad-anti-miR155 (50 MOI),可进一步增加 SR-A 和 CD36 的表达上调( $n=6, P < 0.05$ )(图 5B)。

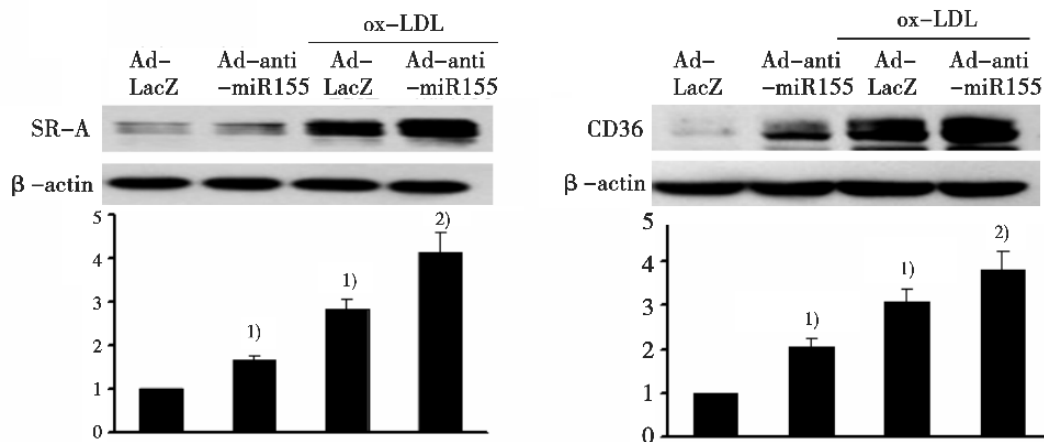


图 5 反义-miR-155 促进了 SR-A 和 CD36 的表达

Fig.5 Ad-anti-miR-155 promoted the expression of SR-A and CD36 in THP-1 cells

Cells were induced with 100 ng/mL PMA for 48 h, then incubated with Ad-LacZ or Ad-anti-miR-155 (50 MOI) for 24 h and ox-LDL (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for another 48 h. Western blot was used to analyze the expressions of SR-A and CD36,  $\beta$ -actin as control.  $\bar{x} \pm s, n=6$ . 1)  $P < 0.05$  vs. control, 2)  $P < 0.05$  vs. ox-LDL+LacZ

### 3 讨论

MicroRNA 是一类长约 18~24 个核苷酸的非编码小分子 RNA,通过与特异性靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区结合,抑制其翻译或使其降解,从而调控目的基因的表达。MicroRNA 在细胞增殖、凋亡、分化,胚胎发育和免疫应答等过程中发挥着重要的作用,与机体多种疾病尤其是心血管疾病的发生发展密切相关<sup>[11]</sup>。如在心血管组织中特异性高表达的 miR-1、miR-133 和 miR-208 等,其表达异常均可导致心脏发育缺陷<sup>[12]</sup>。

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,其发生发展过程中,是否也受到了 microRNA 的调控,成为近年来的研究热点<sup>[13]</sup>。MiR-155 位于非编码基因 Bic 内,在血液细胞中高表达。已有研究表明

miR-155 参与调控 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和树突状细胞的分化,从而影响机体的免疫功能。在单核巨噬细胞,一些促炎因子如 TNF $\alpha$ , LPS 等可通过 NF- $\kappa$ B 信号通路上调 miR-155 的表达。提示 miR-155 可能参与调控了机体的炎症反应过程。已往研究发现,在 ox-LDL 刺激的巨噬细胞中,miR-125a-5p、miR-146 和 miR-155 等的表达上调<sup>[4]</sup>。但 miR-155 是否影响巨噬泡沫细胞的形成,尚不清楚。

最近, Huang 等<sup>[14]</sup>发现 ox-LDL 诱导 miR-155 上调可能参与了巨噬泡沫细胞的形成,抑制 miR-155 表达可抑制巨噬细胞内脂质的聚集。该作用与 LOX-1, CD36 和 CD68 的表达上调有关。但 miR-155 对细胞膜上清道夫受体的功能以及对基础状态下巨噬细胞摄取脂质的影响,尚不明了。为了进一步阐明 miR-155 在巨噬泡沫细胞形成中的作用,本研究中,我们从过表达和下调 miR-155 表达

两个不同的角度,探讨了 miR-155 对基础状态下和 ox-LDL 处理后的巨噬细胞结合和摄取脂质的能力以及细胞膜上清道夫受体表达的影响。我们发现 ox-LDL 可以诱导巨噬细胞 miR-155 表达上调。由于巨噬细胞吞噬大量脂质形成泡沫细胞是动脉粥样硬化形成的关键环节,因此我们通过转染 miR-155 和反义 miR-155 病毒,上调或抑制巨噬细胞上 miR-155 的表达,观察其对细胞结合和摄取 DiI-oxLDL 能力的影响。结果发现,无论是基础状态还是 ox-LDL 处理后,过表达 miR-155 均可明显抑制巨噬细胞对 DiI-oxLDL 的结合和摄取;而抑制 miR-155 则促进巨噬细胞结合和摄取 DiI-oxLDL。这些结果说明 miR-155 表达的上调可抑制巨噬泡沫细胞的形成。已知巨噬细胞对脂质的结合和摄取主要是通过膜上的清道夫受体 SR-A 和 CD36 等实现的,所以我们进一步分析了 miR-155 对 SR-A 和 CD36 蛋白表达的影响。我们的结果显示过表达 miR-155,不仅抑制基础状态下 SR-A 和 CD36 的表达,而且逆转了 ox-LDL 诱导的 SR-A 和 CD36 的表达上调;而抑制 miR-155 则明显上调 SR-A 和 CD36 的表达。这些结果表明 miR-155 通过下调 SR-A 和 CD36 的表达,影响巨噬细胞对脂质的结合、摄取,从而抑制巨噬细胞泡沫化过程。但 miR-155 影响 SR-A 和 CD36 表达的具体机制,尚不清楚。我们的资料提示 ox-LDL 作用于巨噬细胞,一方面通过激活氧化应激系统等信号通路,促进巨噬泡沫细胞的形成。同时亦可激活抑制泡沫化形成的机制(如上调 miR-155 表达等)。ox-LDL 最终影响巨噬细胞泡沫化形成取决于上述两种因素的相互作用。

总之,本研究发现 miR-155 可通过下调巨噬细胞上清道夫受体如 SR-A 和 CD36 等的表达,抑制巨噬泡沫细胞的形成。提示 miR-155 可能是防治巨噬细胞泡沫化,进而防治动脉粥样硬化的新靶点。

#### 参考文献:

- [1] Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (51): 49982-49988.
- [2] 孙吉,陈小平. microRNA 与心血管病的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011(3): 192-199.
- [3] Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(6): 497-505.
- [4] Chen T, Huang Z, Wang L, et al. MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 131-139.
- [5] Yan G, You B, Chen SP, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1- $\alpha$  1 [J]. *Circ Res*, 2008, 103(6): 591-597.
- [6] Redgrave TG, Roberts DC, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation [J]. *Anal Biochem*, 1975, 65(1-2): 42-49.
- [7] Tribble DL, Krauss RM, Lansberg MG, et al. Greater oxidative susceptibility of the surface monolayer in small dense LDL may contribute to differences in copper-induced oxidation among LDL density subfractions [J]. *J Lipid Res*, 1995, 36(4): 662-671.
- [8] Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, et al. Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy [J]. *Arteriosclerosis*, 1981, 1(3): 177-185.
- [9] Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 720-727.
- [10] Ricci R, Sumara G, Sumara I, et al. Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis [J]. *Science*, 2004, 306(5701): 1558-1561.
- [11] Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases [J]. *FEBS J*, 2011, 278(10): 1619-1633.
- [12] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-317.
- [13] 陈妍梅,李浪. microRNA 与动脉粥样硬化炎症反应 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010(8): 662-664.
- [14] Huang RS, Hu GQ, Lin B, et al. MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages [J]. *J Investig Med*, 2010, 58(8): 961-967.