

microRNA-125b调控心肌梗死后炎症的作用及其在不同心脏组成细胞中的调控作用

蓝 景¹ 占贞贞^{2*} 吴漫涯¹ 郭 杏¹ 罗小玲^{1*}

(¹广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021, ²同济大学附属东方医院, 上海 200120)

摘要 该研究旨在探究小鼠微小RNA-125b(miR-125b, miR-125b)调控心肌梗死后, 内源性危险因子即高迁移率族蛋白1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)释放诱导的炎症反应及其在3种心脏主要组成细胞中调控作用的比较。首先建立小鼠心梗模型, 检测心梗早期miR-125b及炎症细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、白细胞介素-6(interleukin-6, *IL-6*)、白细胞介素-12(interleukin-12, *IL-12*)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)的表达变化并观察心梗后miR-125b过表达对心功能的影响; 用免疫组织化学和免疫荧光方法检测小鼠心肌梗死后内源性HMGB1的释放, 并合成重组小鼠HMGB1(recombinant mouse high mobility group box-1 protein, rmHMGB1)蛋白进行体外实验研究。选择心梗后参与疾病病程调控的3种主要心脏组成细胞类型心肌细胞系H9C2、成纤维细胞系10T1/2以及原代巨噬细胞进行研究。构建miR-125b过表达腺病毒及对对照腺病毒载体体外感染H9C2和10T1/2细胞及体内感染心梗后心脏组织; 合成miR-125b模拟物miR-125b mimic或对照模拟物control mimic转染小鼠原代巨噬细胞; 心梗后感染腺病毒的心脏组织予CD11b阳性细胞磁珠分选出巨噬细胞。通过qPCR和ELISA技术检测细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的表达水平。Western blot方法检测炎症反应核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路中P65、C-Jun氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)、P38以及细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的磷酸化水平。结果显示, 小鼠心梗早期心肌组织中miR-125b表达增加, 同一时期心肌组织检测到, 内源性HMGB1释放以及大量炎症细胞因子产生; miR-125b过表达促进心梗后巨噬细胞中生成炎症细胞因子; rmHMGB1重组蛋白可以诱导心肌H9C2细胞、成纤维细胞10T1/2以及原代巨噬细胞中炎症细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 表达水平不同程度变化, 但是过表达miR-125b仅对rmHMGB1刺激原代巨噬细胞产生炎症细胞因子有选择性正向调控作用, 其原因可能与巨噬细胞中P65的磷酸化水平变化有关。该研究结果表明, miR-125b正调控心肌梗死后巨噬细胞中内源性HMGB1诱导的炎症反应, 对rmHMGB1诱导心肌细胞及成纤维细胞炎症反应无显著调控作用。

关键词 miR-125b; 心肌梗死; 炎症反应; HMGB1; 巨噬细胞

microRNA-125b Promotes HMGB1-Induced Inflammation Post Myocardial Infarction through Selectively Targeting Macrophages

Lan Jing¹, Zhan Zhenzhen^{2*}, Wu Manyi¹, Guo Xing¹, Luo Xiaoling^{1*}

收稿日期: 2016-08-04 接受日期: 2016-11-03

国家自然科学基金(批准号: 81373146、81370433)和上海市“创新行动计划”基础研究领域项目(批准号: 14JC1405200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-61569870, E-mail: zhanzz@tongji.edu.cn; Tel: 0771-53261250, E-mail: 1044203798@qq.com

Received: August 4, 2016 Accepted: November 3, 2016

This work supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81373146, 81370433) and Basic Research Program of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Grant No.14JC1405200)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-61569870, E-mail: zhanzz@tongji.edu.cn; Tel: +86-771-53261250, E-mail: 1044203798@qq.com

网络出版时间: 2016-12-21 15:07:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161221.1507.002.html>

¹Tumor Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;²Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China)

Abstract Myocardium inflammation triggered by damage associated molecular patterns (DAMPs), such as HMGB1, is a key progress in pathogenesis of myocardial infarction (MI). However, the molecular mechanisms involved remain obscure. This study is to investigate the role of miR-125b on inflammation post-MI. Firstly, the expression of miR-125b and inflammatory cytokines including *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *TNF- α* were detected in the early MI, meanwhile, the levels of endogenous HMGB1 released were detected by immunohistochemical staining and immunofluorescence. Furthermore, recombinant mouse HMGB1 (rmHMGB1) were constructed. miR-125b overexpression adenovirus and control adenovirus vector were constructed to infect H9C2 myocardial cells and 10T1/2 fibroblast cells *in vitro* as well as heart tissue after MI *in vivo*; miR-125b mimic or control mimic were compounded to transfect primary-isolated macrophages from mice. CD11b magnetic bead was performed to select cardiac macrophages post MI. The levels of cytokines *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *TNF- α* were detected via the qPCR and ELISA. The phosphorylation levels of NF- κ B P65, MAPK JNK, MAPK P38 and MAPK ERK in inflammatory response were detected by western blot. The results showed that the expression of miR-125b were upregulated in the early MI, while endogenous HMGB1 released and a mass of cytokines produced in myocardial tissue. overexpressed-miR-125b promoted the production of inflammatory cytokines in cardiac macrophages after MI; the expression levels of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *TNF- α* induced by rmHMGB1 varied in H9C2 myocardial cells, 10T1/2 fibroblasts and the primary macrophages, but overexpressed-miR-125b only played a selective up-regulation role on the production of inflammatory cytokines in the macrophages, the reason might be related to the activation of P65 in macrophages. The results revealed that miR-125b positively regulated the inflammatory response induced by endogenous HMGB1 in macrophages after MI, but it didn't have significant role on inflammation in myocardial cells and fibroblasts.

Keywords miR-125b; myocardial infarction; inflammatory response; HMGB1; macrophage

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是指冠状动脉供血急剧减少或中断,使相应的心肌严重而持续性缺血所致的心肌缺血坏死^[1]。心肌梗死会导致梗死闭塞部位的远端心肌持续的坏死,梗死部位与冠状动脉供血区域一致,且多发生于左心室。梗死后,心肌细胞缺血缺氧坏死释放的内源性危险因子即损伤相关模式分子(damage-associated molecular patterns, DAMPs)在心肌梗死后炎症反应中发挥着重要的作用;梗后发现,DAMPs表达核因子高迁移率族蛋白1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)并调节基因转录^[2]。HMGB1是存在于真核细胞核内的蛋白质,能跟DNA结合,在细胞坏死或者适当损伤刺激下能主动或被动地释放到胞外演变为重要的促炎细胞因子,并作为一种DAMP与相关受体结合,启动相关信号通路而激活核转录因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)诱

导炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、白细胞介素-6(interleukin-6, *IL-6*)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)等的表达^[3-4]。目前已发现,在哺乳类细胞内,存在着多条并行的MAPKs信号通路,包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、C-Jun氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)、P38这3个亚家族^[5]。NF- κ B家族成员中最常见的是P65/P50二聚体,P65/P50可被HMGB1等介质刺激释放后作为转录因子促进多种参与炎症反应分子的转录和表达^[4,6],这类分子其中包括效应酶、黏附分子和细胞因子(如TNF、*IL-6*等)。

梗死后早期主要是炎症反应^[7],梗死面积影响细胞因子毒性的产生。梗死后炎症反应阶段涉及多种细胞的参与。已知梗死后,通过细胞死亡和细胞碎片等损伤诱使DAMPs、细胞因子及中性粒细胞等渗入缺血早期的梗死区域,产生高水平活性氧和

蛋白酶加剧心脏损伤,随后巨噬细胞被招募至心肌以除去各种碎片和凋亡的中性粒细胞;巨噬细胞参与炎症反应及修复过程,随着病程进展上述结果可导致心肌组织纤维化瘢痕形成和心脏重塑以保护心脏功能^[1]。所以在心肌梗死病程中,心肌细胞、巨噬细胞、成纤维细胞是心脏组织参与疾病调控的主要细胞类型。

microRNA(miRNA)是一类内源性的非编码单链RNA,含19~22个核苷酸,能够通过与靶mRNA 3'UTR(3' untranslated regions)特异性地结合而导致靶mRNA降解或抑制其翻译,从而对基因转录后进行调控^[8]。已有报道一些miRNA对炎症有调控作用,miR-125b也已经被大量研究证实能够抑制肿瘤发生以及影响多种细胞的增值和凋亡等过程。但miR-125b在梗后炎症调控方面的研究尚未开展。本研究利用重组小鼠HMGB1(recombinant mouse high mobility group box-1 protein, rmHMGB1)作为胞外炎性介质诱导炎症反应,模拟研究体内miR-125b对心肌梗后主要参与疾病病程调控的3种心脏组成细胞的炎症调控作用的比较。

1 材料与方法

1.1

1.1.1 主要试剂 RPMI-1640培养基、DMEM培养基均购自美国Cellgro公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液、胎牛血清购自美国Gibco公司;rmHMGB1购自美国CUSBIO公司;ELISA试剂盒购自美国R&D公司;细胞裂解液购自美国CST公司;BCA蛋白质定量试剂盒购自美国Thermo公司;Opt-MEM无血清培养基购自美国Gibco公司;SiRNA购自上海吉玛制药技术有限公司;转染试剂INTERFERin购自法国Polyplus公司;RNA提取试剂盒购自上海Fastagen公司;反转录试剂盒PrimeScript RT Reagent Kit及扩增试剂盒均购自日本TaKaRa公司;SYBR Green染料购自日本TOYOBO公司;抗鼠磷酸化JNK、P65、P38、ERK抗体及抗鼠 β -actin抗体均购自美国CST公司;硫乙醇酸盐培养基购自德国Merck KGaA公司;兔抗HMGB1多克隆抗体购自美国Epitomics公司;CD11磁珠购自德国Miltenyi Biotec公司。

1.1.2 细胞系及原代细胞 实验所用细胞包括心肌细胞系H9C2(中国科学院上海生命科学研究院细胞库)、成纤维胚胎细胞系10T1/2(上海市东方医院

俞作仁教授课题组惠赠)以及原代巨噬细胞。原代巨噬细胞来源: C57BL/6野生型小鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证编号: 2008001661374)腹腔注射硫乙醇酸盐培养基2 d后予RPMI-1640培养基腹腔灌洗,收集灌洗液后进一步离心重悬并铺板培养后获得。本研究所有小鼠实验均按照同济大学实验动物伦理委员会所制定的伦理标准进行。

1.2 实验方法

1.2.1 miR-125b mimic及对照组(control mimic) 引物序列由上海博锐生物科技有限公司设计合成(表1),miR-125b和内参U6、GAPDH及IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 引物由上海吉玛制药技术有限公司完成(表2)。腺病毒介导的miR-125b过表达重组载体及空白腺病毒的构建包装由和元生物技术(上海)股份有限公司完成。

1.2.2 体内心梗模型 选择C57BL/6野生型雄性小鼠,分别设置心梗组及假手术组($n \geq 6$),麻醉后暴露心脏,结扎冠状动脉左前降支建立心肌梗死模型,心肌梗死术后3、5 d(3D-MI、5D-MI)组及假手术组(sham组)取每组正常心脏组织和心梗边缘区心脏组织以提取总RNA或者予4%多聚甲醛固定备用。另设置control-腺病毒组、miR-125b-腺病毒组($n \geq 6$),心梗建立同时给予心脏组织腺病毒感染,拟监测心功能及行心脏组织细胞分选。

1.2.3 心脏彩超监测心功能 设置control-腺病毒组(control-Ad组)、miR-125b-腺病毒组(miR-125b-Ad组)及假手术组(sham组)($n \geq 6$),建立小鼠心梗-腺病毒感染模型后,心脏彩超监测各组14、28 d的左心室射血指数(left ventricular ejection fraction, LVEF)及左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)值。

1.2.4 免疫组化 心肌梗死术后5 d,取2组正常心脏组织和心梗边缘区心脏组织, HMGB1免疫组化染色按照试剂盒说明书进行,小鼠心肌组织常规石蜡包埋,石蜡切片,4 μ m切片,常规脱蜡,高温修复后的组织分别加入一抗Fas(1:150)、FasL(1:150)及HMGB1于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗涤后孵育二抗,37 $^{\circ}$ C孵育2 h, PBS再次洗涤,最后DAB显色。显微镜观察组化染色,每组选取3张切片,每张切片在梗死区域及边缘、非梗死区随机选取6个高倍视野(400 $\times$),取阳性结果平均值统计分析判断免疫组化染色强度的差异。

表1 miR-125b mimic及空白对照合成引物序列

Table 1 The sequence of synthetic miR-125b mimics and control mimics primers

名称	序列
Name	Sequence
mmu-miR-125b-5p mimics	Sense: 5'-UCC CUG AGA CCC UAA CUU GUG A-3'
	Antisense: 5'-ACA AGU UAG GGU CUC AGG GAU U-3'
Control mimics	Sense: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'
	Antisense: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'

表2 qPCR中引物的序列

Table 2 The sequence of primers in qPCR

名称	序列
Name	Sequence
<i>mIL-1β</i>	F: 5'-GGT GTG TGA CGT TCC CAT TAG AC-3'
	R: 5'-CAT GGA GAA TAT CAC TTG TTG GTT GA-3'
<i>mIL-6</i>	F: 5'-TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC-3'
	R: 5'-TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC-3'
<i>mIL-12 p70</i>	F: 5'-TGC CTT GGT AGC ATC TAT GAG G-3'
	R: 5'-CGC AGA GTC TCG CCA TTA TGA T-3'
<i>mTNF-α</i>	F: 5'-AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA-3'
	R: 5'-GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG-3'
<i>mGAPDH</i>	F: 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3'
	R: 5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3'
<i>miR-125b</i>	F: 5'-GAA TCC CTG AGA CCC TAA C-3'
	R: 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
<i>U6</i>	F: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'
	R: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'

1.2.5 心梗后心脏组织HMGB1免疫荧光 取心梗后3 d[包括心梗(3D-MI)及假手术组(sham)]小鼠心脏组织, OTC包埋, 冰冻、切片, 晾干后冰丙酮固定, 予3% BSA于37 ℃湿盒中封闭2 h, 然后予HMGB1抗体(1:100)4 ℃孵育过夜, PBS漂洗后, 与按比例稀释的二抗于37 ℃湿盒中孵育50 min, PBS漂洗, 含PBS的50%甘油封片, 荧光显微镜拍摄, 取同个部位切片对比, 每张切片随机取5个视野。

1.2.6 体外细胞感染及转染 选择H9C2、10T1/2细胞系五代以内细胞, 原代巨噬细胞铺板后细胞密度40%~60%。转染前1 d以对数生长期的细胞接种于6孔板或12孔板。腺病毒感染H9C2、10T1/2细胞, 设置miR-125b过表达组和对照组(control组)。感染前予含10%胎牛血清的DEME完全培养基换液, 感染体系6孔板为1 mL、12孔板为500 μL。原代巨噬细胞以miR-125b mimic和control mimic转染; 配制转染液: 1.5 mL的EP管中依次加入200 μL Opt-MEM无血清培养基、对应的siRNA, 经过离心、混匀、再离

心, 加入转染试剂INTERFERin, 离心、混匀, 室温静置10 min。转染前按6孔板1 mL和12孔板500 μL的体系予含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基换液, 转染; miRNA终浓度为10 nmol/L; 6~8 h后换液。均置于37 ℃、5% CO₂的培养箱中培养孵育48 h。

1.2.7 CD11b阳性细胞磁珠分选单核/巨噬细胞 control-腺病毒组、miR-125b-腺病毒组及假手术组模型建立后, 取各组心梗后腺病毒感染3 d小鼠心脏组织, 消化成细胞悬液后, 按照CD11b阳性细胞磁珠分选说明分离出单核巨噬细胞, 拟提总RNA检测细胞因子。

1.2.8 qPCR检测 总RNA提取按Trizol试剂步骤进行, 并测定RNA浓度。DNA变性条件为42 ℃ 2 min, 85 ℃ 15 s, 4 ℃保存。按照PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒步骤反转录成cDNA, 反转录条件为37 ℃ 15 min, 然后85 ℃ 15 s, 4 ℃保存。按SYBR Green Real-time PCR Master Mix说明书步骤进行扩增。qPCR(表2为相对应的引物)条件为95 ℃

预变性10 min; 然后以95 °C变性15 s, 60 °C退火60 s, 72 °C延伸25 s, 运行40个循环。各组qPCR均设3孔。根据熔解曲线判断qPCR反应的特异性, 根据标准曲线及荧光曲线的 C_t 值计算定量结果, 相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算。

1.2.9 ELISA检测 收集各miR-125b过表达实验组(miR-125b mimic或miR-125b腺病毒组)和相对应的对照组(control mimic或control腺病毒组)刺激后的细胞上清液, 按照ELISA试剂盒说明步骤检测各细胞因子D值, 按相应的标准曲线方程计算各细胞因子水平。

1.2.10 Western blot检测 收集巨噬细胞各实验组和对照组刺激后的6孔板细胞, 2×10^6 细胞/孔, 去除上清后, 加入适量的含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 取各组细胞总蛋白质60 μ g, 与上样缓冲液混合, 煮沸10 min, 进行10% SDS-PAGE, 转NC膜, 室温下脱脂牛奶封闭90 min, 分别与P-JNK抗体、P-P65抗体、P-P38抗体、P-ERK抗体在4 °C孵育过夜, 然后与荧光标记的抗体作用, 室温孵育2 h, 曝光。

1.2.11 统计学分析 每个实验重复3次, 使用Graphpad 5.0统计软件处理数据。miR-125b及各细胞因子相对表达量各组间比较应用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心梗早期miR-125b、炎症细胞因子水平以及HMGB1水平的变化

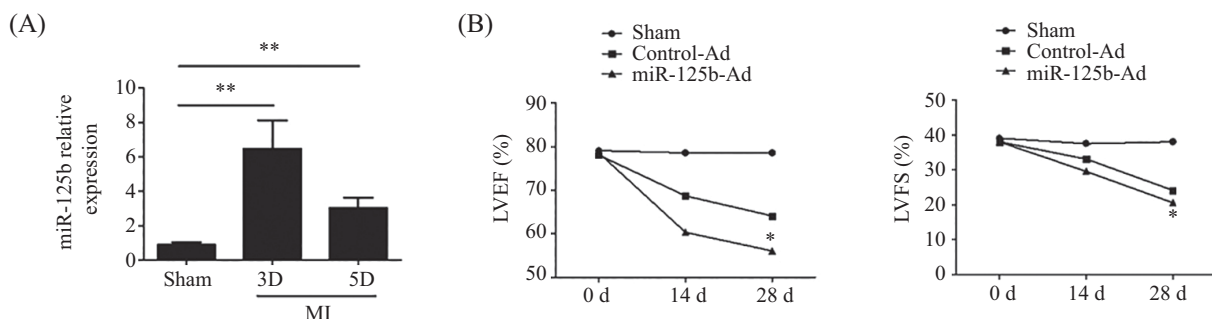
为了解miR-125b对心梗后炎症反应的影响, 首先进行小鼠冠状动脉左前降支结扎建立心梗模型,

取心梗后第3 d及第5 d心梗边缘心肌组织检测miR-125b水平。结果显示, 心梗边缘心肌组织中, miR-125b表达较假手术组明显增加, 在心梗第3 d接近高峰(图1A), 提示miR-125b可能参与心梗早期炎症的调控。进一步构建miR-125b过表达及对照腺病毒载体, 在建立心梗模型的同时给予心脏组织感染miR-125b过表达腺病毒或对照腺病毒, 检测各组术后14、28 d小鼠心功能指标LVEF及LVFS值, 结果显示, miR-125b过表达小鼠LVEF及LVFS值较对照组均明显下降, miR-125b过表达组心梗14 d后LVEF及LVFS值比对照组分别下降 $(12.1 \pm 2.8)\%$ 和 $(10.6 \pm 1.5)\%$, 28 d后, LVEF及LVFS值比对照组分别下降 $(12.5 \pm 2.4)\%$ 和 $(14.6 \pm 3.6)\%$, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1B)。

为明确miR-125b对心梗后炎症的调控作用, 首先, 在心梗第3、5 d模型中验证心梗前后炎症细胞因子水平的变化, 结果显示, 与相应的对照组比较心梗早期梗死边缘组织炎症细胞因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-12$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA水平明显上调(图2A)。同期, 在梗死边缘区检测到内源性危险分子HMGB1的释放, 心梗第5 d免疫组化显示梗死边缘区细胞间隙中可见较多染色阳性呈棕黄色或棕褐色颗粒的HMGB1蛋白(图2B); 心梗第3 d心肌组织免疫荧光可见标记红色荧光的HMGB1阳性信号增加, 说明心梗后心梗边缘组织HMGB1含量增加(图2C)。

2.2 miR-125b对rmHMGB1诱导H9C2心肌细胞的炎症反应的影响

心肌细胞是心梗发生后病程进展的主要细胞



A: 小鼠心梗术后第3、5 d的心梗组及假手术组取心脏组织, qPCR分析miR-125b水平, $**P < 0.01$; B: 小鼠心梗手术同时注射过表达miR-125b、control腺病毒感染心脏组织, 心脏彩超监测2组及假手术组14、28 d心功能指标LVEF及LVFS值变化, $*P < 0.05$, 与control-腺病毒组比较。

A: the levels of miR-125b from the separated heart tissues were detected by qPCR at day 3 or 5 after MI, $**P < 0.01$; B: overexpressed miR-125b adenovirus and control adenovirus infected heart tissue after MI in mice, then the cardiac functions from the two groups and the sham group at 14, 28 d after MI were performed, $*P < 0.05$ compared with control-Ad group.

图1 小鼠心梗后miR-125b水平及过表达miR-125b心梗小鼠心功能变化

Fig.1 The levels of miR-125b and the cardiac functions in mice with miR-125b overexpression after MI

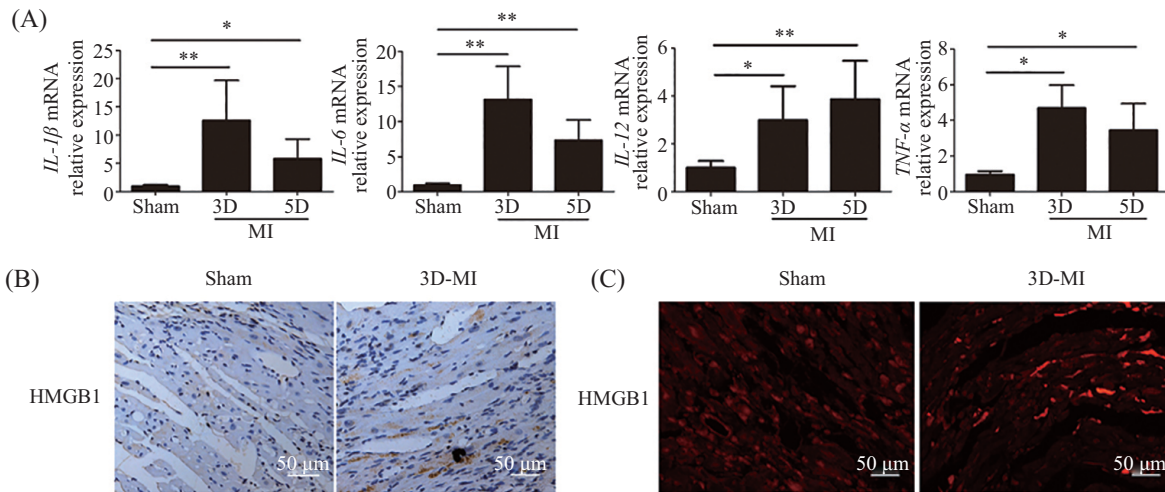


图2 小鼠心梗早期梗死边缘组织炎症细胞因子水平及内源性HMGB1释放
A: qPCR检测心梗第3、5 d实验组(3D-MI、5D-MI)及假手术组炎症细胞因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-12$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA水平变化, $*P<0.05$, $**P<0.01$; B: 心梗术后3 d取实验组和对照组正常心脏组织和心梗边缘区心脏组织行HMGB1免疫组化检测HMGB1的释放; C: 心梗术后3 d取实验组和假手术组心梗边缘区心脏组织行HMGB1免疫荧光检测HMGB1水平。

A: the levels of $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-12$ and $TNF-\alpha$ mRNA at day 3, 5 after MI, $*P<0.05$, $**P<0.01$; B: HMGB1 release in the normal cardiac tissue and the edge tissue from the experimental group or the control group at day 3 after MI was detected through immunohistochemical; C: HMGB1 release in the normal cardiac tissue and the edge tissue from the experimental group or the control group at day 3 after MI was detected through immunofluorescence.

图2 小鼠心梗早期梗死边缘组织炎症细胞因子水平及内源性HMGB1释放

Fig.2 The levels of inflammatory cytokines and the release of endogenous HMGB1 in peri-infarction heart tissue of MI

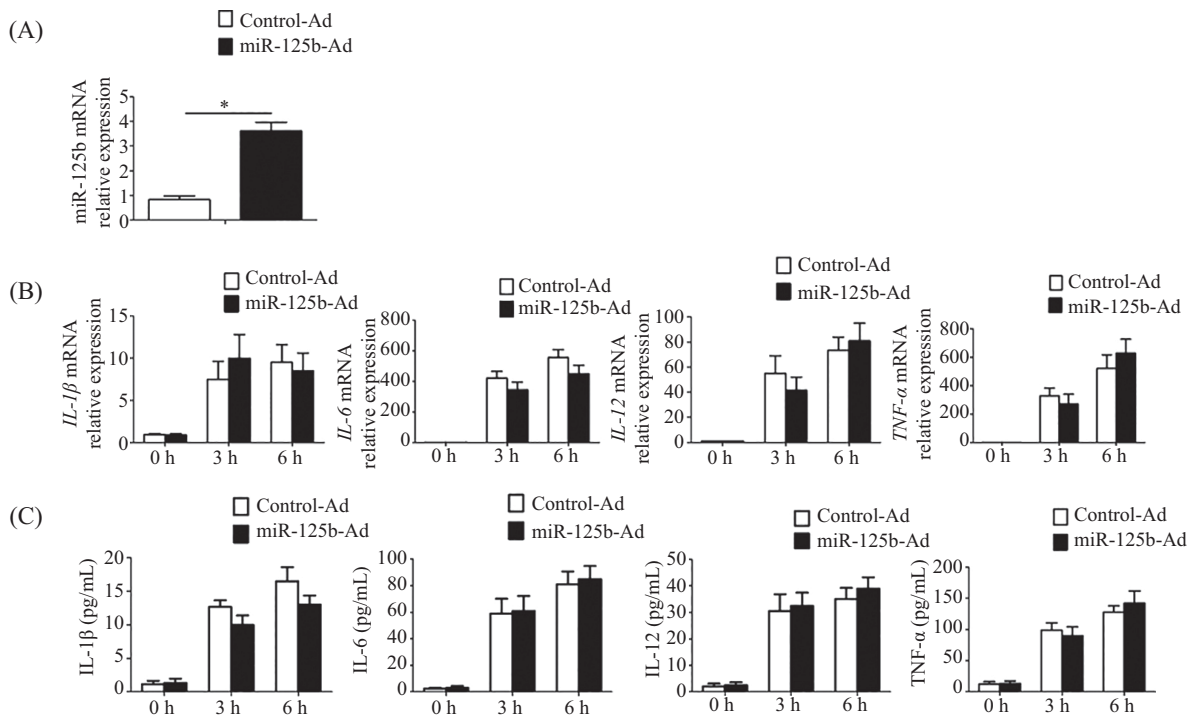
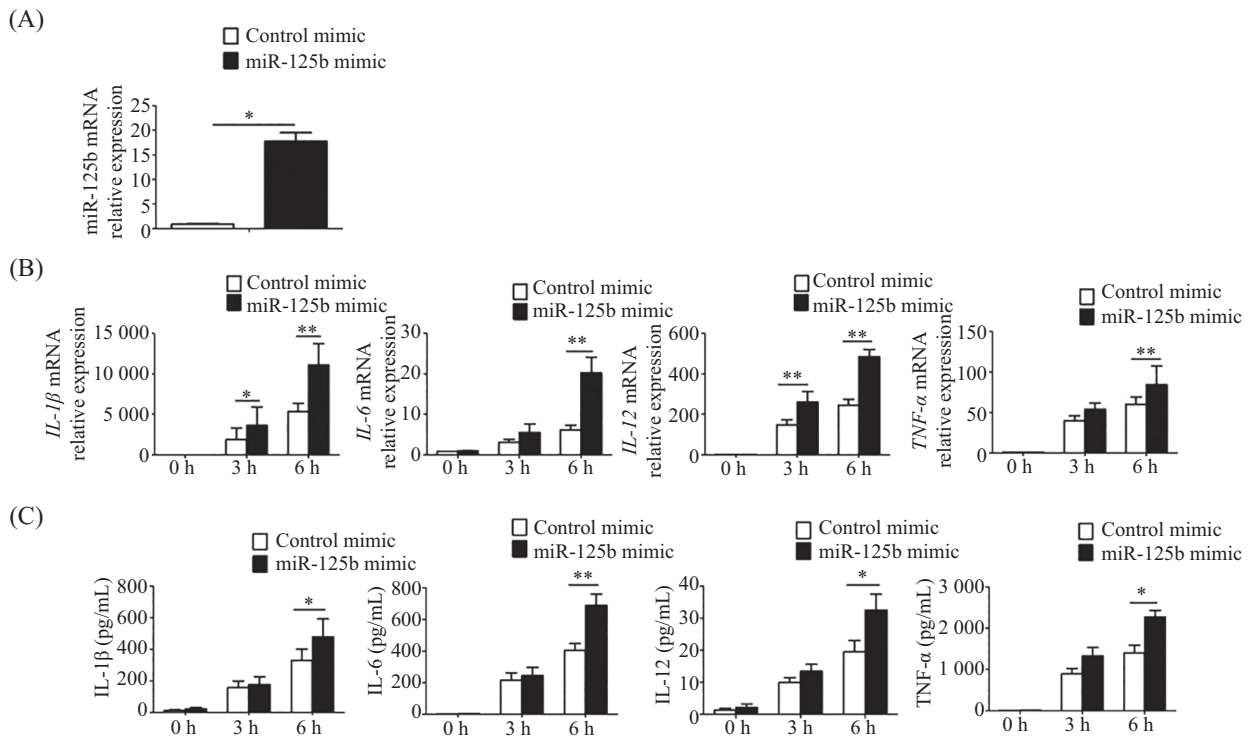


图3 miR-125b过表达对rmHMGB1诱导心肌细胞生成的炎症细胞因子水平的影响
A: H9c2细胞感染过表达miR-125b腺病毒和control-腺病毒48 h后, 以rmHMGB1(0.5 μ g/mL)刺激细胞0、3、6 h, qPCR检测miR-125b水平, $*P<0.05$; B: qPCR检测rmHMGB1诱导产生的细胞因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-12$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA水平; C: 上清液细胞因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-12$ 、 $TNF-\alpha$ 含量。

A: H9c2 cells were transfected with the overexpressed miR-125b-Ad or control-Ad for 48 h, miR-125b levels were measured by q-PCR after stimulation with rmHMGB1 (0.5 μ g/mL) for 0, 3, 6 h, $*P<0.05$; B: $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-12$ and $TNF-\alpha$ mRNA levels were measured by qPCR; C: the levels of $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-12$ and $TNF-\alpha$ were measured by ELISA.

图3 miR-125b过表达对rmHMGB1诱导心肌细胞生成的炎症细胞因子水平的影响

Fig.3 The effect of overexpressed-miR-125b on the levels of inflammatory cytokines produced by rmHMGB1-stimulated fibroblasts



A: 原代巨噬细胞转染miR-125b mimic和control mimic 48 h后, 以rmHMGB1刺激0、3、6 h, qPCR检测鉴定miR-125b表达效率, $*P<0.05$; B: qPCR检测诱导产生的细胞因子IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α mRNA表达水平, $*P<0.05$, $**P<0.01$; C: ELISA检测诱导分泌的细胞因子IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α含量, $*P<0.05$ 。

A: primary macrophages were transfected with the miR-125b mimic or control mimic for 48 h, miR-125b levels were measured by qPCR, $*P<0.05$; B: IL-1β, IL-6, IL-12 and TNF-α mRNA levels were measured by qPCR, $*P<0.05$; C: the productions of IL-1β, IL-6, IL-12 and TNF-α were measured by ELISA, $*P<0.05$ 。

图4 miR-125b过表达対rmHMGB1诱导巨噬细胞生成的炎性细胞因子水平的影响

Fig.4 The effect of overexpressed-miR-125b on the levels of inflammatory cytokines produced by rmHMGB1-stimulated macrophages

类型, 为了研究过表达miR-125b对心梗炎症反应的影响, 以H9C2心肌细胞体外模拟心梗组织发生环境, 实验组与对照组分别感染miR-125b过表达腺病毒及对照腺病毒后以rmHMGB1刺激0、3、6 h。结果显示, miR-125b的表达水平在实验组显著高于空白对照组(图3A); 且miR-125b过表达心肌细胞中炎性细胞因子IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α mRNA(图3B)水平及上清液蛋白含量(图3C)与对照组相比无明显变化; 说明miR-125b对rmHMGB1诱导H9C2心肌细胞的炎症反应无明显调控作用。

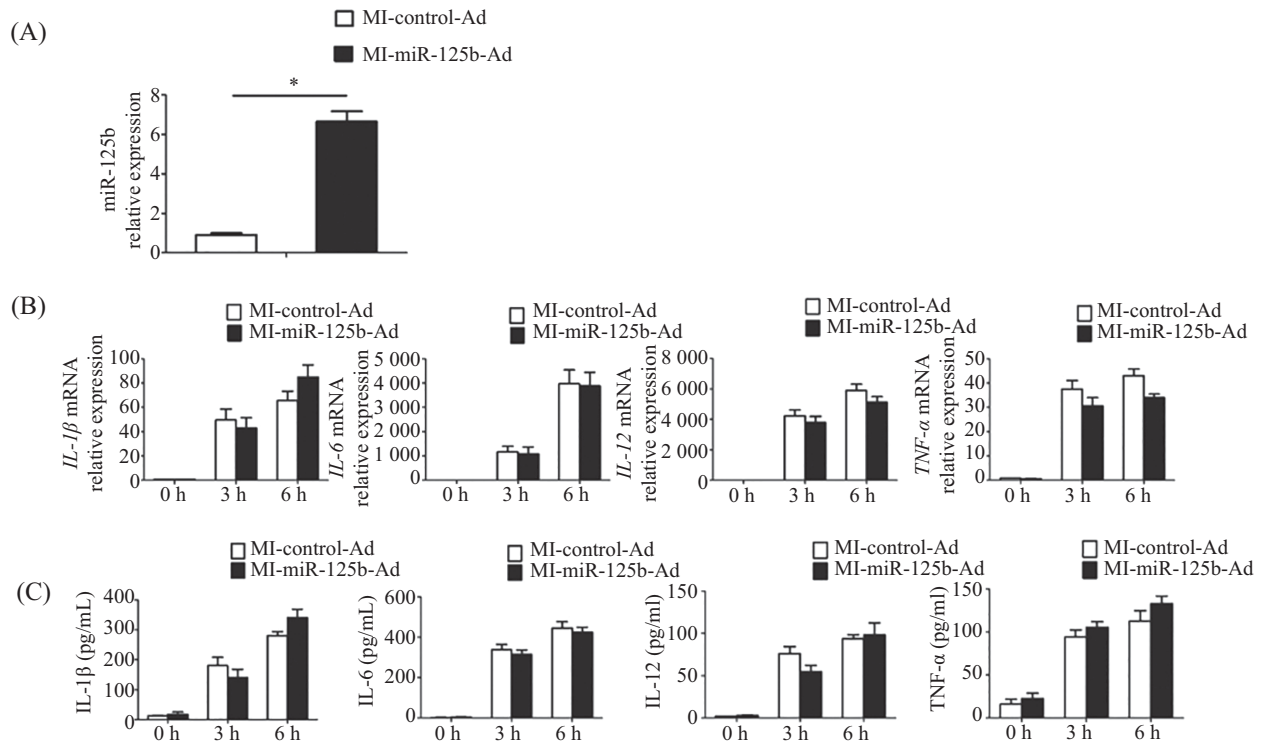
2.3 miR-125b对rmHMGB1诱导巨噬细胞的炎症反应的影响

巨噬细胞是炎症免疫应答的主要反应细胞, 是心梗后炎症反应需要了解检测的细胞类型。为了检测过表达miR-125b的巨噬细胞对心梗后炎症反应的影响, 原代巨噬细胞过表达miR-125b后以rmHMGB1刺激0、3、6 h, mRNA水平结果证明, miR-125b在

miR-125b mimic组表达量明显高于对照组(图4A); 在过表达miR-125b组中, 巨噬细胞诱导产生的细胞因子IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α mRNA水平(图4B)和蛋白水平(图4C)均显著上调, 以IL-6最为明显。

2.4 miR-125b对rmHMGB1诱导小鼠成纤维细胞的炎症反应的影响

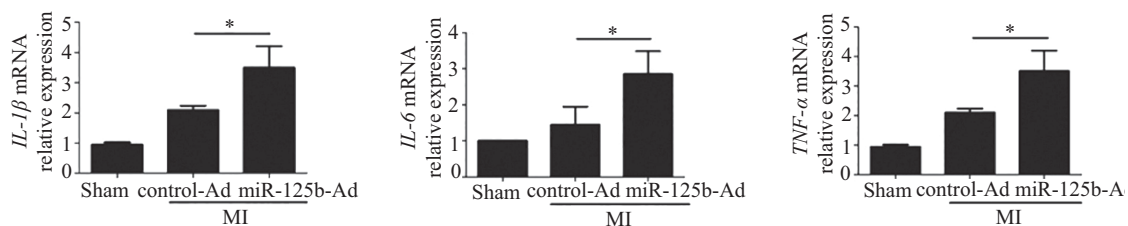
纤维细胞作为心肌组织的一类主要细胞参与心梗病程调控, 成纤维细胞在心脏损伤后修复过程中有一定的影响, 因此研究成纤维细胞在心梗早期炎症反应中的调控作用尤为重要。miR-125b过表达腺病毒及对照腺病毒分别感染10T1/2成纤维细胞后实验组miR-125b过表达, 表达量可至对照组3倍以上(图5A); 转染后以rmHMGB1刺激0、3、6 h, 结果显示, miR-125b过表达成纤维细胞中炎性细胞因子IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α mRNA(图5B)水平及上清液蛋白含量(图5C)与对照组比无明显变化, 表明miR-125b对rmHMGB1诱导小鼠成纤维细胞的炎症



A: 成纤维细胞10T1/2予感染miR-125b-腺病毒组与control-腺病毒组48 h后, 以rmHMGB1刺激0、3、6 h, qPCR结果表明, 实验组miR-125b表达水平明显高表达于对照组, $*P < 0.05$; B: qPCR检测诱导的细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-12和TNF- α mRNA表达量; C: ELISA检测诱导分泌的细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-12和TNF- α 含量。

A: fibroblasts 10T1/2 were transfected with the overexpressed miR-125b-Ad or control-Ad for 48 h, after stimulation with rmHMGB1 (0.5 μ g/mL) for 0, 3, 6 h, the levels of miR-125b measured by qPCR in the experimental group were higher than the control one, $*P < 0.05$; B: IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α mRNA levels were measured by qPCR; C: the secretion levels of IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α were measured by ELISA.

图5 miR-125b过表达对rmHMGB1诱导成纤维细胞生成的炎性细胞因子表达水平的影响
Fig.5 The effect of overexpressed-miR-125b on the levels of inflammatory cytokines produced by rmHMGB-stimulated fibroblasts



心肌梗-腺病毒体内模型建立后第3 d, 心肌组织单细胞悬液分离CD11b阳性细胞并用qPCR检测其细胞因子IL-1 β 、IL-6及TNF- α mRNA水平。
 $*P < 0.05$ 。

CD11b positive cells were isolated from heart tissue at day 3 post MI and were detected for the mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α by qPCR.
 $*P < 0.05$ 。

图6 小鼠心梗后miR-125b过表达对心脏巨噬细胞产生的炎性细胞因子表达水平的影响

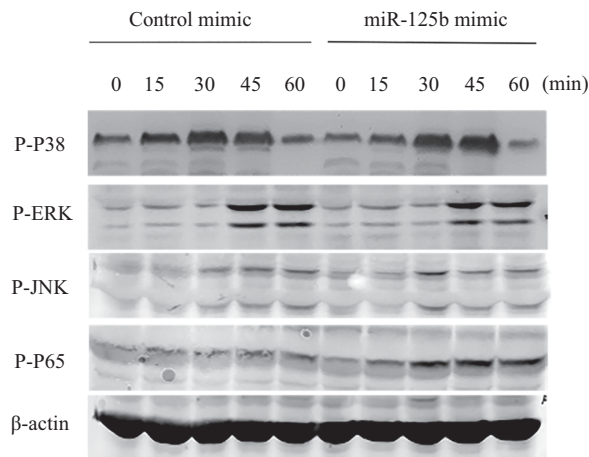
Fig.6 The effect of overexpressed-miR-125b on the levels of inflammatory cytokines produced by macrophages infiltrated in heart tissue after MI in mice

反应无明显调控作用。

2.5 miR-125b过表达对小鼠心梗后心肌组织浸润巨噬细胞产生炎性细胞因子的影响

为在体内进一步研究miR-125b对心梗后心肌

组织浸润巨噬细胞产生炎性细胞因子的作用, 取心梗第3 d心肌组织制备单细胞悬液, 并采用磁珠分选分离CD11b阳性单核巨噬细胞, qPCR结果(图6)显示, miR-125b过表达显著促进心梗后心肌组织浸润



原代巨噬细胞转染miR-125b mimic与control mimic 48 h后以rmHMGB1刺激0、15、30、45、60 min, Western blot检测MAPK、NF- κ B信号通路相关分子P65、JNK、ERK及P38磷酸化水平。

Primary macrophages were transfected with the miR-125b mimic or control mimic for 48 h, and the phosphorylation levels of P65, JNK, ERK and P38 were detected by Western blot after stimulation with rmHMGB1 (0.5 μ g/mL) for 0, 15, 30, 45, 60 min.

图7 miR-125b过表达对rmHMGB1诱导巨噬细胞NF- κ B及MAPK信号通路中重要分子磷酸化的影响

Fig.7 The effect of overexpressed-miR-125b on the phosphorylation levels of the important molecules in NF- κ B and MAPK signaling pathways in rmHMGB1-stimulated macrophages

CD11b阳性巨噬细胞产生细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 。

2.6 miR-125b过表达对rmHMGB1诱导原代巨噬细胞的NF- κ B炎症信号通路的影响

为进一步探究miR-125b过表达原代巨噬细胞促进炎症细胞因子表达的相关信号通路,原代巨噬细胞转染miR-125b mimic与control mimic 48 h后,以rmHMGB1分别刺激0、15、30、45、60 min, Western blot技术检测MAPK、NF- κ B信号通路相关分子P65、JNK、ERK及P38的磷酸化变化。结果显示,转染过表达miR-125b后,以rmHMGB1分别诱导原代巨噬细胞发生的炎症反应中,在蛋白质水平,仅P65的磷酸化与对照组比明显增强。此结果说明,在miR-125b过表达原代巨噬细胞参与的炎症免疫应答中,NF- κ B信号通路被激活后促进P65活化,但ERK、JNK及P38 MAPK信号通路未发现有明显改变(图7)。

3 讨论

心肌梗死后,心脏需要进行一系列的代偿修复过程,炎症反应是较早期的病理过程。已有研究表明,心脏组织损伤的修复过程涉及巨噬细胞、成纤维细胞、心肌细胞、炎症因子等;心肌梗死后早期炎症对于心脏预后具有重要作用,早期心肌组织缺血缺氧导致细胞损伤、凋亡、坏死,坏死的细胞

招募各种炎症细胞,如中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等,各种炎症细胞可分泌多种细胞因子,如MCP-1、TGF- β 、IL-1、IL-6、TNF- α 等,多种细胞因子可促进成纤维细胞增殖,并且分化为肌成纤维细胞,引起心肌纤维化、心脏重塑^[10]。心肌梗死后,炎症反应是心脏修复和疤痕形成必不可少的过程,炎症细胞是调节心梗后炎症反应的重要免疫细胞类型。本研究证实,在小鼠心梗后,早期应答为炎症反应,而在内源性危险信号分子HMGB1触发作用下,巨噬细胞在miR-125b调控的炎症反应中作为较主要的炎症反应细胞并产生大量的炎症细胞因子;心脏组织的另外组成细胞成纤维细胞和心肌细胞等在miR-125b的炎症调控阶段中无明显反应,说明在HMGB1触发的炎症信号机制中,成纤维细胞和心肌细胞作用较不显著,而巨噬细胞在miR-125b选择性调控心梗后的炎症免疫应答中起着至关重要的作用;在一定程度上,炎症细胞因子活化对于心梗后心脏重构和转归有不可或缺的影响,因此,miR-125b对心梗炎症的发现以及其间接通过巨噬细胞的影响可以为心肌梗死预后的发展提供指导性的方向。机体需要炎症反应来清除坏死组织,但炎症反应时间延长、范围过大及反应过度活跃会导致额外的损伤。心梗后早期,miR-125b诱使免疫应答细胞—巨噬细胞产生更多的炎症细胞因子,炎症反应增强,可进一步扩大心梗后心肌缺血损伤。本研究对心梗

后miR-125b过表达小鼠的心功能监测及体内分选的巨噬细胞产生的细胞因子水平的验证说明, miR-125b对心梗后炎症修复后期有不利影响;但炎症反应适度地增强可加快及加强炎症反应到心肌纤维化的发生过程;再者,最近报道, miR-125b可促进心肌纤维化^[11](从上述的角度出发)miR-125b提高心梗后组织的修复能力。综上提出假说,即miR-125b通过调控巨噬细胞的炎症免疫应答增强炎症反应并进一步促进心肌细胞纤维化及成纤维细胞增殖分化。在此意义上,对心梗后心脏组织的修复有重要意义。心梗后炎症的发展程度对预后的影响及其机制相对复杂,利与弊需要更多体内实验深入研究来权衡证实。

NF- κ B信号已被证实调控细胞因子IL-6和MCP-1的水平, Louisa等^[12]研究的与血管炎性并发症相关的糖尿病模型研究中, miR-125b过表达下调其靶因子suv39h1从而抑制其炎症启动子,导致炎症因子IL-6及炎症趋化因子MCP-1水平上调促进炎症反应。有研究也表明,在糖尿病脉管系统中,炎症因子的增加涉及促炎反应信号通路NF- κ B的激活^[12]。Thiemermann^[13]报道炎症调节因子的激活可抑制NF- κ B信号通路而减少心肌缺血损伤和梗死面积。本研究中,原代巨噬细胞在miR-125b上调后细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的转录水平相应上调,已知miRNA通过与靶mRNA特异性的结合而导致靶mRNA降解或抑制其翻译,从而对基因转录调控。因此,可猜想miR-125b抑制与炎症调控相关的某个特定靶因子有关,激活P65/NF- κ B信号通路进而促进了IL-6等相关细胞因子的转录表达,促进了炎症反应。再者,对变化趋势明显的巨噬细胞进行Western blot检测,结果揭示, miR-125b过表达促进了P65的磷酸化,可进一步认为, miR-125b促进炎症反应是通过P65/NF- κ B信号通路,而ERK、P38及JNK/MAPK信号通路没有参与此过程;但具体的直接的靶因子还不清楚;本研究中,细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的转录水平均有上调,而且在此过程P65/NF- κ B通路明显被激活,因此, miR-125b其潜在的靶分子可以从IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的炎症通路中的上游因子甚至有可能从其信号转导相交集的转录因子NF- κ B的上游转录因子中筛选,并进一步验证。有文献报道,动物非脂肪组织(如肌肉组织)和巨噬细胞中P65的活化促进炎症因子IL-1 β 、IL-6

等的表达^[14];结合本研究结果,炎症细胞因子IL-6的明显上调及P65磷酸化的增强,符合之前相关通路的研究发现。心肌细胞系H9C2和小鼠成纤维细胞系10T1/2在本研究无明显调控的结果有可能与多方面因素有关;本研究使用的炎症介质rmHMGB1为小鼠体外重组合成,大鼠H9C2等心肌细胞对其刺激是否敏感还未证实;本研究的体内实验有其局限性,且进一步证明靶mRNA及多方机制还有待深入,但目前已知过表达的miR-125b的心肌细胞和成纤维细胞对rmHMGB1诱发的炎症免疫应答无明显调控作用。

综上所述,本研究发现, miR-125b选择性正向调控rmHMGB1诱导原代巨噬细胞的炎症反应,为miR-125b影响炎症免疫应答的作用靶点及相关机制的深入研究提供了更多新方向。

参考文献 (References)

- 1 Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 2012; 110(1): 159-73.
- 2 Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 2012; 94(2): 276-83.
- 3 Loukili N, Rosenblatt-Velin N, Li J, Clerc S, Pacher P, Feihl F, *et al.* Peroxynitrite induces HMGB1 release by cardiac cells *in vitro* and HMGB1 upregulation in the infarcted myocardium *in vivo*. *Cardiovasc Res* 2011; 89(3): 586-94.
- 4 Zhang F, Fan X, Bai Y, Lu J, Zheng M, Chen J, *et al.* miR-125b regulates procalcitonin production in monocytes by targeting Stat3. *Microbes Infect* 2016; 18(2): 102-8.
- 5 Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol* 2014; 26 (3): 237-45.
- 6 Li MJ, Li F, Xu J, Liu YD, Hu T, Chen JT. rhHMGB1 drives osteoblast migration in a TLR2/TLR4- and NF-kappaB-dependent manner. *Biosci Rep* 2016; 36(1): e00300.
- 7 Ibarra-Lara Mde L, Sanchez-Aguilar M, Soria E, Torres-Narvaez JC, Del Valle-Mondragon L, Cervantes-Perez LG, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) downregulate the expression of pro-inflammatory molecules in an experimental model of myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol* 2016; 94(6): 634-42.
- 8 Churov AV, Oleinik EK, Knip M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential. *Autoimmun Rev* 2015; 14(11): 1029-37.
- 9 Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, *et al.* Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007; 179(8): 5082-9.
- 10 Danenberg HD. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation* 2002; 106(5): 599-605.

- 11 Nagpal V, Rai R, Place AT, Murphy SB, Verma SK, Ghosh AK, *et al.* MiR-125b is critical for fibroblast-to-myofibroblast transition and cardiac fibrosis. *Circulation* 2016; 133(3): 291-301.
- 12 Villeneuve LM, Kato M, Reddy MA, Wang M, Lanting L, Natarajan R. Enhanced levels of microRNA-125b in vascular smooth muscle cells of diabetic db/db mice lead to increased inflammatory gene expression by targeting the histone methyltransferase Suv39h1. *Diabetes* 2010; 59(11): 2904-15.
- 13 Thiemermann C. Inhibition of the activation of nuclear factor kappa B to reduce myocardial reperfusion injury and infarct size. *Cardiovasc Res* 2004; 63(1): 8-10.
- 14 Gao Z, Zhang J, Henagan TM, Lee JH, Ye X, Wang H, *et al.* P65 inactivation in adipocytes and macrophages attenuates adipose inflammatory response in lean but not in obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 308(6): E496-505.