

miR-17 在动脉粥样硬化中下调 ATG7 蛋白水平 抑制巨噬细胞的自噬功能

林庚海 阮发晖 陈劲松 庄金龙 范伟伟

摘要 **目的** 在动脉粥样硬化患者的血液中检测自噬相关 miRNA 的水平变化,探究差异 miRNA 是否参与巨噬细胞的自噬过程,并影响巨噬细胞的凋亡及炎症表达。**方法** 在动脉粥样硬化患者的血液中,用荧光定量 PCR 的方法检测 miRNA 的水平。在转染 miR-17 后,通过蛋白质免疫印迹的方法检测巨噬细胞中 ATG7 蛋白以及自噬标志物 LC3 II 表达。同时,使用 MTT 实验检测转染 miR-17 后双氧水诱导巨噬细胞凋亡的改变,通过荧光定量 PCR 检测炎症因子水平探究转染 miR-17 后巨噬细胞的炎症表达。**结果** 在动脉粥样硬化患者的血液中,miR-17 的水平特异升高。而转染 miR-17 后,巨噬细胞中 miR-17 靶向蛋白 ATG7 和自噬标志物 LC3 II 表达下降。miR-17 在巨噬细胞中的升高同时促进了双氧水诱导的细胞凋亡,并增强了 TNF- α 等炎症因子的表达。**结论** miR-17 水平在动脉粥样硬化患者的血液中特异升高,并在巨噬细胞通过靶向 ATG7 介导细胞自噬水平降低,进而增强巨噬细胞的炎症表达并促进其凋亡。

关键词 miR-17 自噬 ATG7 蛋白 巨噬细胞 动脉粥样硬化

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.016

Reduction of ATG7 Level by miR-17 Inhibits Macrophage Autophagy in Atherosclerosis. Lin Genghai, Ruan Fahui, Chen Jinsong, et al. The Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Fujian 363000, China

Abstract **Objective** To measure the levels of autophagy related miRNAs in the serum of atherosclerosis patients, and investigate whether these miRNAs is involved in the autophagy in macrophage and further affects the cytokine expression and apoptosis of macrophage. **Methods** The levels of autophagy related miRNAs in the serum of atherosclerosis patients were analyzed by real-time quantitative PCR. The expression of ATG7 and LC3 II measured by Western blotting after transfecting macrophage with miR-17. Moreover, the damage of macrophage induced by H₂O₂ was analyzed by MTT assay and the cytokine expression of macrophage was further measured by real-time quantitative PCR. **Results** miR-17 level was specifically up-regulated in serum of atherosclerosis patients. Additionally, the expression miR-17 targeted protein, ATG7 and the marker of autophagy, LC3 II was reduced in macrophage after miR-17 transfection. Moreover, miR-17 enhanced the cytokine expression and promoted the apoptosis of macrophage induced by H₂O₂. **Conclusion** In serum of atherosclerosis patients, the level of miR-17 was fund specifically up-regulated. And elevated level of miR-17 in macrophage reduced the expression of ATG7 to inhibit autophagy, which sequentially enhanced the cytokine expression and promote the macrophage apoptosis.

Key words miR-17; Autophagy; ATG7; Macrophage; Atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)可以导致冠心病、脑梗死、外周血管病等疾病发生,是发达国家和许多发展中国家人口死亡的主要原因^[1,2]。预计到2020年,心血管疾病,特别是动脉粥样硬化将成为世界疾病总负担的主要来源之一。在动脉粥样硬化发生、发展过程中,巨噬细胞(macrophage)、平滑肌细胞和血管内皮细胞扮演着重要角色^[3]。在动脉粥样硬化斑块的形成过程中,单核细胞移动到血管壁的内皮

下膜并转化成巨噬细胞,其随后吞噬加氧低密度脂蛋白后变成泡沫细胞^[4]。而泡沫细胞是动脉粥样硬化病变的标志,其积聚形成斑块的破裂被认为是急性心血管事件的主要原因^[5]。

自噬(autophagy)是进化过程中一项重要功能,主要负责细胞内蛋白质和细胞器,如线粒体的降解^[6]。根据报道,自噬可防止损伤性巨噬细胞凋亡和有缺陷的淋巴细胞增多,并且自噬性缺陷增强了晚期动脉粥样硬化斑块的总坏死体积^[7]。另外,自噬性缺陷在一定程度上导致炎症性过度活化,进一步促进了动脉粥样硬化进展^[8]。因此可以推测,促进巨噬细胞的自噬功能可能会有效减少动脉粥样硬化斑

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81601223)

作者单位:363000 漳州,厦门大学附属东南医院

通讯作者:范伟伟,电子信箱:fww2142008458@gmail.com

块体积,并延缓急性心血管事件的发生。但是,对于动脉粥样硬化过程中,巨噬细胞的自噬功能是如何被调节的目前还不是很清楚。

microRNA(miRNA)是生物体内一类重要的非编码微小 RNA^[9]。miRNA 通过与 mRNA 的 3'非编码区互补配对进而抑制基因的转录后表达^[10]。最近的研究证明,miR-106b,miR-93 和 miR-376a 能够通过改变细胞内关键自噬蛋白水平进而调节自噬活性^[11,12]。另外,miR-17 和 miR-137,也被发现可以影响自噬相关蛋白 (autophagy-related protein, ATG) 的表达^[13,14]。而在巨噬细胞中,miRNA 可以通过调节免疫相关基因导致其炎症表达的变化,但是对于 miRNA 是否能在动脉粥样硬化中调节巨噬细胞的自噬还未得到证实。

本研究发现,在动脉粥样硬化的患者血液中,miR-17 的水平有显著升高。而 miR-17 可以通过减少 ATG7 蛋白的表达水平抑制巨噬细胞的自噬功能,并进一步促进了巨噬细胞的凋亡和炎症因子的释放。

材料与方法

1. 动脉粥样硬化的患者血液样本与 miRNA 抽提:实验中,动脉粥样硬化的患者($n=21$)与健康对照($n=25$)的血液样本采集于厦门大学附属东南医院。miRNA 抽提采用天根公司的 miRNA 提取分离试剂盒。

2. 巨噬细胞培养:巨噬细胞取材于成年大鼠腹腔,在接种细胞 2h 后,弃除细胞培养液,并使用 Eagle 培养液冲洗细胞两次,随后补充新鲜 Eagle 培养液置于 37℃ 的 CO₂ 湿箱中培养。

3. 药物处理和转染:miRNA 转染使用 siIMPORTER(Millipore)将 mi-17(10nmol/L)导入巨噬细胞,转染后培养 24h 进行药物处理实验。在诱导自噬的实验中,雷帕霉素(med chem express)处理巨噬细胞的浓度分别为 0、100 和 500nmol/L,处理时间为 20h。在凋亡诱导的实验中,双氧水浓度为 100μmol/L,刺激时间为 6h。而细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导巨噬细胞的浓度为 50ng/ml,时间为 6h。

4. 蛋白质免疫印迹:巨噬细胞在细胞裂解液(碧云天)处理后,总蛋白通过聚丙烯酰胺电泳分析。在转膜后,孵育成熟形式的半胱天冬酶-3 抗体(cleaved-caspase 3, Cell Signaling Technology, #9661, 1:1000)、ATG7 抗体(美国 Sigma 公司, A2856,

1:1000)以及 LC3 II 抗体(Cell Signaling Technology, #12741, 1:1000)4℃ 过夜。第 2 天,二抗室温孵育 2h 后显色。

5. 实时荧光定量 PCR:在使用 Trizol 抽提 RNA 之后,通过随机引物(美国 Promega 公司)和反转录酶(美国 Promega 公司)将 RNA 反转为 cDNA,肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、IL-6 以及 IL-18 的 mRNA 通过 SYBR Green 法进行荧光实时定量,而 miRNA 则使用 Taqman 探针法(美国 Invetrogen 公司试剂盒)进行定量分析。TNF-α 的引物为:正向 5'-CTACGAGACCAAGTGCAATCC-3';反向 5'-AATCGCCAGCCAATTCTCTTT-3'。IL-1β 的引物为:正向 5'-GTACATAAAATCTGGGGTTCTGGG-3';反向 5'-AGTCTTAAAGCAAGGAACAACGTATTT-3';IL-6 的引物为:正向 5'-CTACGAGACCAAGTGCAATCC-3';反向 5'-AATCGCCAGCCAATTCTCTTT-3'。IL-18 的引物为:正向 5'-GTACATAAAATCTGGGGTTCTGGG-3';反向 5'-AGTCTTAAAGCAAGGAACAACGTATTT-3'。β-actin 的引物为:正向 5'-CCTCGCCTTGCCGATCCG-3';反向 5'-ATGCCGGAGCCGTTGTCTG-3'。

6. MTT 细胞凋亡检测:在双氧水处理 72h 后,将巨噬细胞培养液置换为磷酸缓冲液,并加入 MTT 试剂 37℃ 孵育 6h。之后加入 DMSO 溶解细胞产生的结晶,并通过酶标仪检测各个样品的 570nm 吸收值,计算巨噬细胞的存活率。

7. 统计学方法:所有数据以均数±标准误($\bar{x} \pm s$)形式表示,采用 GraphPad Prism 5.0 进行统计学分析。两组之间的比较使用 *t* 检验(student's *t* test)。多组之间的比较使用单因素方差分析(one-way ANOVA)或者双因素方差分析(two-way ANOVA),事后分析采用分别采用 Tukey's 法或者 Bonferroni 法进行两组两组的比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. miR-17 的水平在动脉粥样硬化的患者血液中显著升高:为了探究 miRNA 是否可以在动脉粥样硬化过程中影响细胞的自噬功能,笔者首先检测了病人血液中自噬相关的 miRNA 的表达。其中 miR-376a 可以通过靶向 ATG4C 和 BECN1 抑制细胞自噬功能,miR-106b 和 miR-93 通过影响 ATG16L1 蛋白调节内皮细胞的自噬水平,miR-17 和 miR-137 的主要功能为抑制自噬相关蛋白-7(ATG7)的表

达^[12-14]。实验结果显示,相对于对照组,动脉粥样硬化的患者血液中 miR-17 的水平有显著的上调,而

miR-106b、miR-137、miR-376a 和 miR-93 的水平则没有显著改变(图1)。

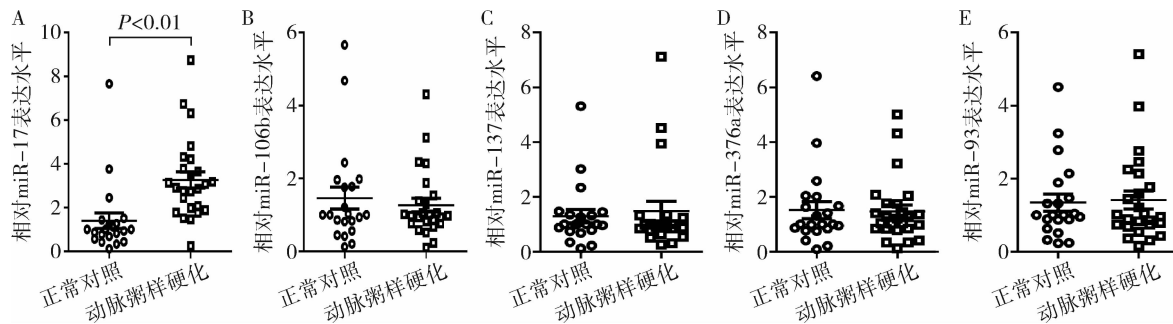


图1 动脉粥样硬化患者血液中自噬相关的 miRNA 表达

2. miR-17 通过下调 ATG7 蛋白的表达水平抑制巨噬细胞的自噬功能:根据报道,miR-17 可以在胶质瘤细胞中调节 ATG7 蛋白的表达进而影响自噬功能^[14]。为了探究 miR-17 是否可以同样在巨噬细胞中调节自噬水平,笔者将 miR-17 导入巨噬细胞中并同时使用雷帕霉素诱导细胞自噬。如图2中 A、B 所示,雷帕霉素的处理(0、100 和 500nmol/L)可以浓度依赖地上调巨噬细胞中 ATG7 蛋白的水平,同时

反映自噬水平的标志蛋白 LC3 II 也显著上调(图2中 A、C)。然而在转入 miR-17 的巨噬细胞中,ATG7 蛋白的表达显著降低(图2中 A、B),而雷帕霉素的处理导致 LC3 II 相对于 LC3 I 的表达上调也被抑制(图2中 A、C)。以上结果提示 miR-17 可以下调巨噬细胞中 ATG7 蛋白的表达水平,从而降低细胞的自噬水平。

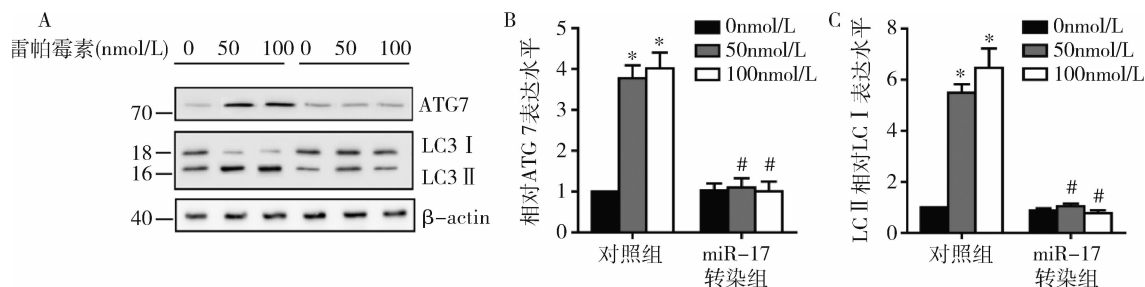


图2 miR-17 下调 ATG7 蛋白水平并抑制巨噬细胞自噬

与 0nmol/L 组比较, * $P=0.000$; 与对应的对照组比较, # $P=0.000$

3. miR-17 的升高促进巨噬细胞的凋亡和炎症因子的表达:自噬功能的改变被认为会影响巨噬细胞的存活能力和炎症表达。为了进一步验证 miR-17 是否会调节巨噬细胞的功能,笔者在 miR-17 转染的巨噬细胞中检测了其凋亡的变化和炎症因子表达的水平。在 MTT 的实验中,给予巨噬细胞 100μmol/L 的双氧水刺激,可以显著诱导巨噬细胞的损伤(图3B)。同时,凋亡的标志物——cleaved-caspase 3 也在期间表达上升(图3B)。然而,在 miR-17 转染的巨噬细胞中,双氧水处理介导的凋亡细胞则进一步的增加,成熟形式的半胱天冬酶-3 的水平也相对于对照组细胞有所增高(图3),提示 miR-17 可以增强巨噬细胞的凋亡。

另外,笔者使用 LPS 模拟动脉粥样硬化中的炎症环境,诱导巨噬细胞的激活。结果显示,在给予巨噬细胞 LPS 处理之后,炎症相关因子——TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 以及 IL-18 的 mRNA 水平显著上升(图4)。而在 miR-17 转染的巨噬细胞中,LPS 导致的这4种炎症相关因子的表达被进一步增强^[4]。这一结果提示 miR-17 可以增强巨噬细胞的炎症表达。

讨 论

在动脉粥样硬化过程中,巨噬细胞凋亡形成不稳定斑块以及炎症性过度活化极大地促进了病程的发展和急性心血管事件的发生。巨噬细胞的自噬启动可以有效减少斑块体积,并降低炎症表达水平^[3]。然而,关于动脉粥样硬化过程中巨噬细胞的自噬功能

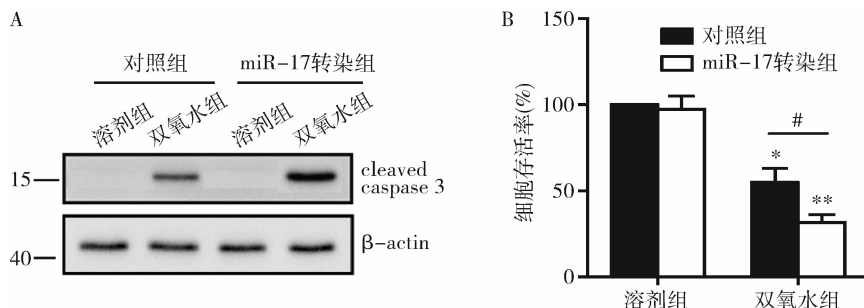


图 3 miR-17 的升高促进巨噬细胞的凋亡

与溶剂组比较, * $P < 0.01$, ** $P = 0.000$; 与对照组比较, # $P = 0.000$

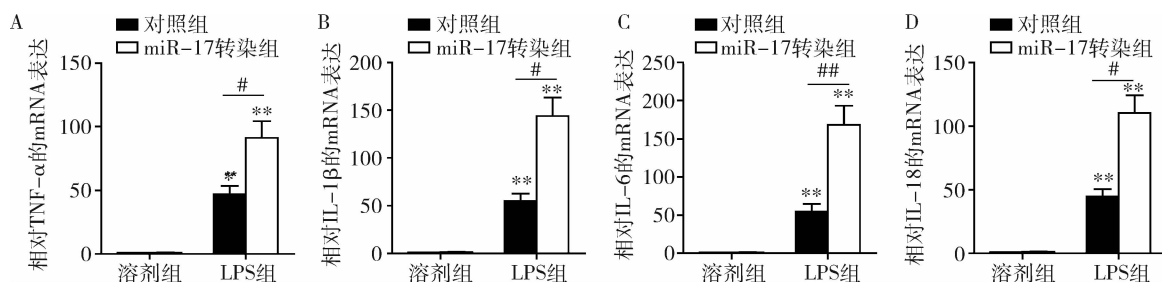


图 4 miR-17 的升高促进巨噬细胞炎症因子的表达

与溶剂组比较, * $P < 0.01$, ** $P = 0.000$; 与对照组比较, # $P < 0.01$, ## $P = 0.000$

的调节机制并不是很清楚。在本次实验中,笔者发现动脉粥样硬化患者血液中 miR-17 的水平有显著上升。同时 miR-17 可以通过下调 ATG7 蛋白水平抑制巨噬细胞的自噬功能,进而促进巨噬细胞的凋亡以及炎症水平的进一步增强。这些结果提示 miR-17 可作为血液中潜在的标志物对巨噬细胞的自噬功能进行检测,同时靶向巨噬细胞中的 miR-17 也可能在临床上有效延缓动脉粥样硬化的发展,并减少急性心血管事件的发生。

外泌体是细胞中衍生的囊泡,可以被细胞分泌至血液,尿液或细胞的培养基中^[15]。最近的研究已经证明,巨噬细胞能够产生外泌体,并将其将蛋白质或 miRNA 分泌至胞外或者穿梭到微环境内的相邻细胞中^[16, 17]。在笔者的实验中,miR-17 在动脉粥样硬化患者血液中有显著上调,然而 miR-17 是否通过外泌体由巨噬细胞分泌至血液中仍是未知。因此,在后续实验中验证血液中 miR-17 的来源并揭示其中机制,对于研究 miRNA 表达和巨噬细胞功能具有重要意义。

在巨噬细胞中,自噬的重要功能已经被揭示。文献报道,抑制巨噬细胞的自噬功能会提高 NADPH 氧化酶的活性,进而介导巨噬细胞的氧化损伤^[7]。另外,在自噬缺陷的小鼠中,炎症刺激会促进炎症小体

的组装,从而促进白介素 1β 等相关炎症因子的释放^[18]。这些结果提示,miR-17 很有可能通过调节巨噬细胞的自噬水平,进而影响 NADPH 氧化酶活性以及炎症小体的组装,从而促进了巨噬细胞的凋亡和炎症表达的增强,为后续实验提供了理论依据。

在本研究中,笔者在巨噬细胞中存在 miR-17 对于 ATG7 的负向调控,从而抑制其自噬水平,并促进巨噬细胞的凋亡和炎症表达,对于理解巨噬细胞在动脉粥样硬化发生、发展过程中的功能具有重要意义。

参考文献

- Gidron Y, Kupper N, Kwaijtaal M, *et al.* Vagus-brain communication in atherosclerosis-related inflammation: a neuroimmunomodulation perspective of CAD [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 195(2):e1-9
- Kim JS, Caplan LR. Clinical Stroke Syndromes [J]. *Front Neurol Neurosci*, 2016, 40:72-92
- Shao BZ, Han BZ, Zeng YX, *et al.* The roles of macrophage autophagy in atherosclerosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(2):150-156
- Chen SG, Xiao J, Liu XH, *et al.* Ibrilipim increases ABCA1/G1 expression by the LXRA signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(10):1343-1349
- Qian YN, Luo YT, Duan HX, *et al.* Adhesion molecule CD146 and its soluble form correlate well with carotid atherosclerosis and plaque instability [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(5):438-445

(下转第 164 页)

Lp - PLA₂ 诊断。临床诊断中,血清学指标更为全面,但检验效能较低,若结合超声造影 QontraXt 参数分析诊断脑卒中,不仅能尽可能避免现今超声造影主观性过强的弊端,且在一定程度上弥补了血清学相关指标的较低敏感度和超声造影 QontraXt 参数分析不够全面的缺陷,提高脑卒中诊断的特异性和敏感度。

本实验尚有不足之处,脑卒中组与控制组样本量较小,其他血清学相关指标仍有讨论的必要。因而笔者认为可以进一步扩大脑卒中和非脑卒中的随访人数,尽量控制随访期间其他因素的影响,分析结果将更为准确。针对血清学相关指标,本研究仅讨论了4项,故可以增加血清学相关指标的分析,进一步证实笔者的结论。

综上所述,血清学相关指标联合超声造影 QontraXt 参数对脑卒中的诊断能力高于单独运用血清学相关指标、超声造影 QontraXt 参数,可作为诊断脑卒中的早期临床参考指标之一,预测脑卒中发生风险,提高患者生活质量。

参考文献

- 1 易兴阳,陈存木,池丽芬,等. 颈动脉粥样硬化与进展性缺血性脑卒中的关系 [J]. 中华神经科杂志, 2006, 6: 388 - 391
- 2 Varetto G, Gibello L, Castagno C, *et al.* Use of contrast - enhanced ultrasound in carotid atherosclerotic disease: limits and perspectives [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:293163
- 3 Kakkos S, Griffin M, Nicolaides A, *et al.* Size of juxtaluminal hypoechoic area in ultrasound images of asymptomatic carotid plaques predicts the occurrence of stroke [J]. J Vasc Surg, 2013, 57(3):609 - 618
- 4 边立忠,张冬梅,柳梅. 缺血性脑卒中患者血清炎症细胞因子水平的变化和意义 [J]. 临床医学工程, 2012, 5: 712 - 713

(上接第 65 页)

- 6 Luo Y, Lu S, Zhou P, *et al.* Autophagy: An Exposing Therapeutic Target in Atherosclerosis [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2016, 67(3):266 - 274
- 7 Liao X, Sluimer JC, Wang Y, *et al.* Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis [J]. Cell Metab, 2012, 15(4):545 - 553
- 8 Razani B, Feng C, Coleman T, *et al.* Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression [J]. Cell Metab, 2012, 15(4):534 - 544
- 9 Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(5):376 - 385
- 10 Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA regulation of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118(4):703 - 720
- 11 Meenhuis A, van Veelen PA, de Looper H, *et al.* MiR - 17/20/93/106 promote hematopoietic cell expansion by targeting sequestosome 1 - regulated pathways in mice [J]. Blood, 2011, 118(4):916 - 925
- 12 Korkmaz G, Tekirdag KA, Ozturk DG, *et al.* MIR376A is a regulator of starvation - induced autophagy [J]. PLoS One, 2013, 8(12):e82556

- 5 王娜. 血清胆红素水平与可溶性 CD40L 水平及颈动脉粥样硬化斑块的相关性研究 [D]. 山西医科大学, 2008
- 6 Hillman M, Meinard L, Rizzotti A, *et al.* Inflammation, High - sensitivity C - reactive protein, and persistent patent ductus arteriosus in preterm infants [J]. Rev Esp Cardiol: Engl Ed, 2015, 69(1):84 - 85
- 7 Caslake EM, Packard C, Robertson M, *et al.* Lipoprotein - associated phospholipase A(2), inflammatory biomarkers, and risk of cardiovascular disease in the Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER) [J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1):28 - 34
- 8 García De Guadiana - Romualdo L, Español - Morales I, Cerezuela - Fuentes P, *et al.* Value of lipopolysaccharide binding protein as diagnostic marker of infection in adult cancer patients with febrile neutropenia: comparison with C - reactive protein, procalcitonin, and interleukin 6 [J]. Support Care Cancer, 2015, 23(7):2175 - 2182
- 9 Mearthur B, Abdel M, Taunton M, *et al.* Seronegative infections in hip and knee arthroplasty: periprosthetic infections with normal erythrocyte sedimentation rate and C - reactive protein level [J]. Bone Joint J, 2015, 97 - B(7):939 - 944
- 10 Koole D, Heyligers J, Moll F, *et al.* Intraplaque neovascularization and hemorrhage: markers for cardiovascular risk stratification and therapeutic monitoring [J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2012, 13(10):635 - 639
- 11 Gumanova N, Teplova N, Ryabchenko A, *et al.* Serum nitrate and nitrite levels in patients with hypertension and ischemic stroke depend on diet: a multicenter study [J]. Clin Biochem, 2015, 48(1 - 2):29 - 32
- 12 Karlinski M, Bembek J, Grabska K, *et al.* Routine serum C - reactive protein and stroke outcome after intravenous thrombolysis [J]. Acta Neurol Scand, 2014, 130(5):305 - 311
- 13 蔡秋琼,陈明,江怡,等. 超声造影 QontraXt 评价颈动脉斑块新生血管与缺血性脑卒中的关系 [J]. 中国临床医学影像杂志, 2016, 11: 770 - 773

(收稿日期:2017 - 03 - 01)

(修回日期:2017 - 04 - 04)

- 13 Zeng Y, Huo G, Mo Y, *et al.* MIR137 regulates starvation - induced autophagy by targeting ATG7 [J]. J Mol Neurosci, 2015, 56(4):815 - 821
- 14 Comincini S, Allavena G, Palumbo S, *et al.* microRNA - 17 regulates the expression of ATG7 and modulates the autophagy process, improving the sensitivity to temozolomide and low - dose ionizing radiation treatments in human glioblastoma cells [J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(7):574 - 586
- 15 Thery C, Zitvogel L, and Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(8):569 - 579
- 16 Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, *et al.* Membrane - derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell - to - cell communication [J]. Leukemia, 2006, 20(9):1487 - 1495
- 17 Yang M, Chen J, Su F, *et al.* Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion - potentiating microRNAs into breast cancer cells [J]. Mol Cancer, 2011, 10:117
- 18 Saitoh T, Fujita N, Jang MH, *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin - induced IL - 1 beta production [J]. Nature, 2008, 456(7219):264 - 268

(收稿日期:2017 - 04 - 29)

(修回日期:2017 - 04 - 29)