

## LPS 刺激肥大细胞炎症因子分泌过程中 miRNA 的表达差异

莫珍珍<sup>1,2</sup>, 周瑶<sup>1</sup>, 徐红<sup>1</sup>, 刘峰<sup>1</sup>, 赵德育<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京儿童医院呼吸科, 江苏 南京 210008; <sup>2</sup>安徽马鞍山市十七冶医院儿科, 安徽 马鞍山 243000)

**[摘要]** 目的: 研究在细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激肥大细胞炎症因子分泌过程中 miRNA 的表达差异。方法: 肥大细胞 P815 培养后, 用 LPS(1 μg/ml) 刺激肥大细胞, 16 h 后终止反应, 通过酶联免疫吸附实验(ELISA)检测上清中肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)的水平。再收集细胞, 通过实时荧光定量 PCR 法检测 miRNA 的改变。结果: 在 LPS 刺激肥大细胞后, TNF-α、IL-6 的分泌与基础分泌量相比明显升高, 差异有统计学意义。同时在肥大细胞中干预组 miRNA-126 的表达是正常组的 1.3 倍( $P < 0.05$ ), 干预组 miRNA-155 的表达是正常组的 1.2 倍( $P < 0.05$ ), 干预组 miRNA-223 的表达是正常组的 1.7 倍( $P < 0.05$ ), 干预组 miRNA-221 的表达是正常组的 1.2 倍( $P < 0.05$ ), 干预组 miRNA-192 的表达是正常组的 1.4 倍( $P < 0.05$ )。结论: miRNA 在炎症因子 LPS 刺激肥大细胞 P815 后存在差异性表达, 而这些差异表达的 miRNA 可能与肥大细胞的功能调节存在相关性。

**[关键词]** 肥大细胞; miRNA; 炎症因子

**[中图分类号]** R392.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)10-1317-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20141005

## miRNA expression differences in inflammatory cytokines secretion in LPS-stimulated mast cells

Mo Zhenzhen<sup>1,2</sup>, Zhou Yao<sup>1</sup>, Xu Hong<sup>1</sup>, Liu Feng<sup>1</sup>, Zhao Deyu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Nanjing Children's Hospital of NJMU, Nanjing 210008;

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Ma'anshan MCC 17 Hospital, Maanshan 243000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the difference of expression of miRNAs of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mast cell secretion. **Methods:** P815 cells were stimulated by LPS (1 μg/ml) for 16 hours. The expression levels of TNF-α and IL-6 in supernatant were detected by ELISA. Real-time PCR was performed to detect the expression difference of miRNAs after the cells were recollected. **Results:** In P815 after LPS stimulation, the secretions of TNF-α and IL-6 were largely up-regulated than those of control ( $P < 0.05$ ). Five miRNAs in the intervention group were found increasingly expressed compared with those in the control group, with miRNA-126 1.3-fold, miRNA-155 1.2-fold, miRNA-223 1.7-fold, miRNA-221 1.2-fold, and miRNA-192 1.4-fold ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miRNAs were expressed differentially in mast cells after LPS stimulation. The different expressions of miRNA may be involved in mast cells function changes.

**[Key words]** mast cell; miRNA; inflammatory cytokine

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1317-1319, 1341]

肥大细胞是从造血祖细胞分化出来的免疫细胞, 常驻在皮肤真皮、消化道管壁、呼吸道管壁等全身各处的结缔组织中, 在先天性免疫和获得性免疫中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。肥大细胞在炎症因子和炎症介质的刺激下, 通过 IgE 介导, 释放其已预先合成

和新产生的介质包括组胺、白三烯、蛋白酶以及一系列细胞因子如肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白介素 4(IL-4)、IL-6 来执行其生物学功能<sup>[3]</sup>。肥大细胞在过敏性疾病如支气管哮喘、变应性鼻炎、枯草热、特应性皮炎等炎症疾病的发病中起重要作用, 是连接过敏反应诱导阶段和效应阶段的纽带。

在研究肥大细胞分泌机制的研究中, 细菌脂多糖(LPS)已作为最重要的激活剂被广泛应用。LPS 刺激肥大细胞后, 可以使其脱颗粒, 释放白三烯, 增加

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81370132); 南京市医学科技发展项目(201108012)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhaodeyu@126.com

Toll 样受体的表达<sup>[4]</sup>。

肥大细胞合成、分泌的众多炎症介质中,包括 IL-6、TNF- $\alpha$ 。TNF- $\alpha$  作为炎症反应、免疫调节中重要的细胞因子,可以诱导一系列细胞因子的合成、激酶的合成及受体的表达,被认为是炎症反应的原始递质<sup>[5]</sup>。IL-6 还可以直接活化肥大细胞和增加 IgE 合成<sup>[6]</sup>。

目前研究肥大细胞分泌过程调控的机制是过敏性疾病的研究热点之一。有研究发现多种 miRNA 对肥大细胞功能有调控作用。miRNA-146a 在肥大细胞激活后上调已被证实能够增加肥大细胞凋亡<sup>[7]</sup>。miRNA-9 可能在肥大细胞激活后显著上调,但并不影响细胞的增殖和凋亡<sup>[8]</sup>。miRNA-142-3P 可能通过调控肥大细胞脱颗粒参与肥大细胞增多症及过敏性疾病的发病<sup>[9]</sup>。

目前尚缺乏对肥大细胞分泌过程中 miRNA 变化的系统研究。本实验以肥大细胞 P815 为研究对象,采用 LPS 刺激肥大细胞引起炎症因子分泌后,检测 miRNA 在肥大细胞中的差异性表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠源性肥大细胞株 P815(中科院上海生命科学研究院),DMEM、胎牛血清、青链霉素(Gibco 公司,美国),小鼠源性 IL-6 和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国),逆转录试剂盒、Taqman 探针(Invitrogen 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与激发

P815 细胞接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶(Corning 公司,美国),于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。DMEM 完全培养基(DMEM + 10%胎牛血清 + 100  $\mu$ g/ml 青霉素 + 100  $\mu$ g/ml 链霉素),4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。于第 1 天铺 6 孔板,第 2 天细胞密度达 40%,经无血清饥饿培养 6 h 后,用 LPS (1  $\mu$ g/ml)激发,16 h 后终止反应,于 4 $^{\circ}$ C 条件下 1 500 r/min 离心 10 min 后收集上清。

#### 1.2.2 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平

用鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 ELISA 试剂盒按照操作说明检测上述实验收集的上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平。

#### 1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 miRNA 的表达差异

用 PBS 溶液冲洗细胞,常温下 1 500 r/min 离心 5 min,反复 2 遍后,收集细胞,用 TRIzol 一步法提取总 RNA,经电泳显示 28S、18S 和 5S 清晰 3 条带,测定  $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$  比值 > 1.8,定量后取

总 RNA,进行反转录反应,反应体系 15  $\mu$ l,选条件 16 $^{\circ}$ C 30 min,42 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 10 min,取 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应体系 20  $\mu$ l,反应条件 50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,循环 40 次。各样品的目的 miRNA 和内参(U6) 分别进行实时荧光定量 PCR,数据采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法进行分析。

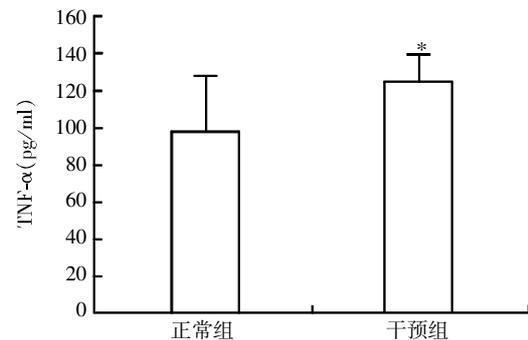
### 1.3 统计学方法

应用 SPSS20.0 进行分析,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两小样本均数之间的比较经方差齐性分析后,选  $t$  检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平

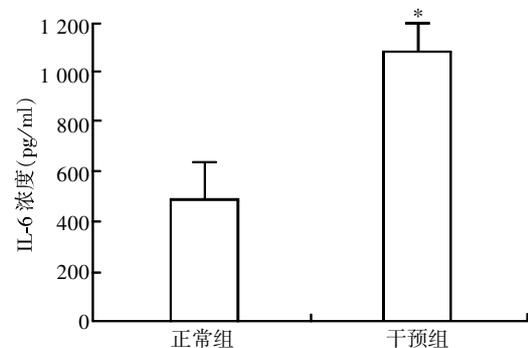
LPS 对肥大细胞 P815 干预 16 h 后,通过 ELISA 对上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的检测,显示 TNF- $\alpha$ 、IL-6 在干预组的分泌明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ,图 1,2)。



与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ , $n = 8$ 。

图 1 LPS 干预肥大细胞 P815 后上清中 TNF- $\alpha$  的浓度

Figure 1 The concentration of TNF- $\alpha$  in LPS stimulated mast cell P815 supernatant



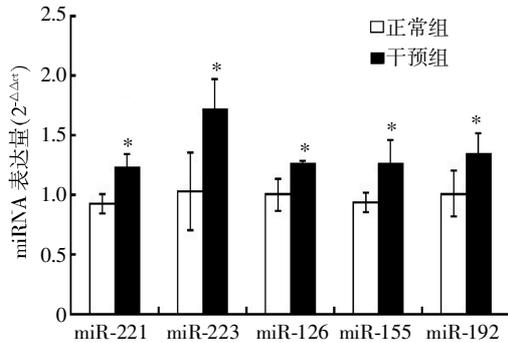
与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ , $n = 8$ 。

图 2 LPS 干预肥大细胞 P815 后上清中 IL-6 的浓度

Figure 2 The concentration of IL-6 in LPS stimulated mast cell P815 supernatant

### 2.2 miRNA 的表达差异

LPS 对肥大细胞 P815 干预 16 h 后, 通过实时荧光定量 PCR 方法检测干预组 miRNA-126、miRNA-155、miRNA-223、miRNA-221、miRNA-192 的表达分别是正常组的 1.3、1.2、1.7、1.2、1.4 倍( $P < 0.05$ , 图 3)。



与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ,  $n = 8$ 。

图 3 LPS 干预肥大细胞 P815 后细胞内 miRNA 的表达差异  
Figure 3 The expression differences of miRNA after LPS stimulated mast cell P815

### 3 讨论

有研究证实 TNF- $\alpha$ 、IL-6 作为肥大细胞释放的重要炎症因子参与过敏性疾病, 如支气管哮喘的发病。在炎症因子的干预下肥大细胞可以分泌 TNF- $\alpha$ , 而 TNF- $\alpha$  也可作用于肥大细胞引起组胺释放, 从而引起肥大细胞的自分泌循环, 是导致哮喘炎症放大的关键<sup>[10]</sup>。IL-6 可引起气道高反应性, 腺体分泌增强, 募集效应细胞, 参与气道损伤和重构, 在支气管哮喘患者的肺泡灌洗液中含量明显升高<sup>[11]</sup>。目前国外已有学者把 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-8 作为支气管哮喘标志性的炎症因子, 通过检测它们在哮喘细胞以及肺泡灌洗液中的改变, 进一步识别支气管哮喘分子机制中的基因调控。本实验中, 通过 LPS 干预肥大细胞后, 检测上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的水平, 干预组 TNF- $\alpha$  浓度是正常对照组的 1.27 倍, IL-6 浓度是正常对照组的 2.21 倍。

miRNA 是一种由长约 18~24 个左右核苷酸组成的单链非编码小分子 RNA, 分布于各种生物中, 通过结合到 mRNA 的 3'-未翻译区(3'-UTR)上的靶位点实现对靶基因 mRNA 的剪切或对靶 mRNA 翻译的阻遏, 在生物发育、繁殖、细胞分化凋亡、致病机制方面发挥重要作用, 它们的异常表现与一系列疾病的发病机制有关, 如过敏性疾病、癌症、心血管疾病等<sup>[12]</sup>。现有许多研究表明, miRNA 在先天免疫细胞和适应性细胞中也具有独特的表达谱, 在调节细胞分

化、规范和效应器功能中起到关键作用。

已有研究指出 miRNA-221 可以影响肥大细胞的许多生物学功能, 可通过抑制 p27Kip1, 影响细胞周期关键时间点来调节肥大细胞周期, 可以调控肥大细胞脱颗粒、黏附以及细胞因子合成等功能。在肥大细胞休眠期, miRNA-221 调节其细胞周期和细胞骨架的形成, 在肥大细胞受到外来刺激后, miRNA-221 可以使肥大细胞脱颗粒、释放炎症因子(IL-6、TNF- $\alpha$ )<sup>[13]</sup>。miRNA-126 可以通过抑制 spread1 和增强 ERK 信号通路活性来促进肥大细胞增殖和分泌细胞因子。在哮喘的肺组织中, 封锁 miRNA-126, 可以降低哮喘的表型, 减轻炎症及气道高反应性, 减少白细胞的募集和粘液分泌, 同时抑制炎症因子的释放<sup>[14]</sup>。

miRNA-155 在免疫细胞之一树突状细胞的分化、成熟及功能研究中起到重要调节作用<sup>[2]</sup>。miRNA-192 可以通过 P53 通路, 影响细胞周期及细胞增殖分化, 从而影响细胞功能<sup>[15]</sup>。本实验中发现 miRNA-221、miRNA-223、miRNA-126、miRNA-155、miRNA-192 在 LPS 干预后均有不同程度的升高, 与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的分泌变化具有一致性, 但两者之间是否具有必然相关性, 有待进一步研究。然而可以初步推测这些 miRNA 可能参与调节肥大细胞的分泌功能, 为后续深入研究提供目标 miRNAs。

综上所述, 在 LPS 刺激肥大细胞引起炎症因子分泌过程中 miRNA 存在差异性表达, 而这些表达差异的 miRNA 可能与细胞的功能调节有关, 从而可能在疾病的发病机制研究中有深远意义。

#### [参考文献]

- [1] 张文学. 肥大细胞的结构和功能特点[J]. 生物学教学, 2009, 34(5): 10-12
- [2] Montagner S, Orlandi EM, Merante S, et al. The role of miRNAs in mast cells and other innate immune cells[J]. Immunol Rev, 2013, 253(1): 12-24
- [3] Bradding P, Walls AF, Holgate ST, et al. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(6): 1277-1284
- [4] Konopka L, Wierzbicki M, Brzezinska-Blaszczyk E, et al. Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis stimulates rat mast cells to cysteinyl leukotriene generation and upregulates Toll-like receptor -2 and -4 expression[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(3): 803-810
- [5] Brightling C, Berry M, Amrani Y, et al. Targeting TNF- $\alpha$ : a novel therapeutic approach for asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(1): 5-10 (下转第 1341 页)