

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00160

原发性胆汁性肝硬化患者单核细胞内 miR-302e 表达降低及意义

刘 晓^{1△}, 胡志德^{2,3△}, 邓安梅^{2*}, 仲人前^{1*}

1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003

2. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

3. 济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031

[摘要] **目的** 探讨 miR-302e 在原发性胆汁性肝硬化(PBC)发病机制中的可能作用。**方法** 采用荧光定量 PCR 技术检测了 10 名健康对照者和 12 名 PBC 患者的 T 细胞(CD3⁺)、B 细胞(CD19⁺)及单核细胞(CD14⁺)内 miR-302e 的相对表达量。以 100 ng/ml 的 LPS 刺激 PBC 患者、健康个体的单核细胞及转染了 miR-302e mimics 或 inhibitor 的 THP-1 细胞, 24 h 后采用 ELISA 法检测培养基内 IL-6 及 TNF- α 浓度的变化。**结果** PBC 患者外周血单核细胞内 miR-302e 的表达量较健康个体降低($P < 0.01$)。在 LPS 刺激的 THP-1 细胞中, miR-302e mimics 和 inhibitor 分别可以抑制和促进 IL-6、TNF- α 的释放($P < 0.05$)。在 LPS 刺激下, PBC 患者单核细胞释放 IL-6、TNF- α 的能力强于来自健康个体的单核细胞($P < 0.05$)。**结论** miR-302e 表达降低可能导致单核细胞对 LPS 刺激呈现高反应性, 从而参与 PBC 发病。

[关键词] 微 RNAs; 胆汁性肝硬化; 单核细胞; 炎症**[中图分类号]** R 575.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0160-05

Decreased miR-302e expression in monocytes of patients with primary biliary cirrhosis and its significance

LIU Xiao^{1△}, HU Zhi-de^{2,3△}, DENG An-mei^{2*}, ZHONG Ren-qian^{1*}

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of Laboratory Medicine, General Hospital of PLA Ji'nan Military Area Command, Ji'nan 250031, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of miR-302e in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods** The relative expression levels of miR-302e in T cells (CD3⁺), B cells (CD19⁺) and monocyte (CD14⁺) of 10 healthy controls and 12 PBC patients were detected by RT-PCR. The THP-1 cells transfected with miR-302e mimics or inhibitors and the monocytes from PBC patients and healthy controls were treated with 100 ng/ml bacteria lipopolysaccharide (LPS). Twenty-four hours later, the concentrations of IL-6 and TNF- α in the culture medium were measured by ELISA. **Results** The monocytes of PBC patients had a significantly lower miR-302e expression compared to those of healthy controls ($P < 0.01$). miR-302e inhibitors significantly enhanced the production of IL-6 and TNF- α in THP-1 cells exposed to LPS, and miR-302e mimics significantly decreased their production ($P < 0.05$). When treated with LPS, the monocytes from PBC patients produced significantly more IL-6 and TNF- α compared to those from healthy controls ($P < 0.05$). **Conclusion** Decreased miR-302e expression in monocytes of PBC patients may enhance IL-6 and TNF- α production and thus participate in the pathogenesis of PBC.

[Key words] microRNAs; biliary liver cirrhosis; monocytes; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):160-164]

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种典型的器官特异性自身免疫性疾病,以胆管内进行性非化脓性炎症反应为主要病理学特征,持续的炎症反应导致肝内胆汁淤积并最终

[收稿日期] 2011-11-26 **[接受日期]** 2012-02-10**[基金项目]** 国家自然科学基金(30972730, 81072479, 81170263), 上海市科委基金(08QH14001, 09JC1405400). Supported by National Natural Science Foundation of China (30972730, 81072479, 81170263) and Fund of Shanghai Municipal Commission for Science and Technology (08QH14001, 09JC1405400).**[作者简介]** 刘 晓, 硕士生. E-mail: roseliuxiao@hotmail.com; 胡志德, 硕士. E-mail: figo58@tom.com

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81886074, E-mail: amdeng70@163.com; Tel: 021-81874093, E-mail: rqzhong@yahoo.com

引起肝硬化和肝功能衰竭,患者多死于肝硬化或肝功能衰竭的相关并发症^[1]。PBC 的本质是自身免疫性疾病,其发病与免疫系统的功能紊乱密切相关。目前认为,在环境和遗传因素的联合作用下,正常免疫系统所固有的精细调控机制被破坏,促发了对自身抗原的免疫反应,是 PBC 发生、发展的根本原因^[2-3]。虽然 PBC 的发病机制还有诸多环节有待于进一步阐明,但在 PBC 发病机制的研究历程中,学界普遍认为:从细胞层面上讲,PBC 患者的免疫功能紊乱的根本原因是多种免疫细胞在功能、数量和表型上存在不同程度的异常;从分子层面上讲,导致异常自身免疫反应的根本机制在于免疫细胞内多种分子表达、清除和活性发生变化^[4-5]。因此,深入研究 PBC 患者免疫细胞内免疫相关分子的表达调控机制,有望为 PBC 的免疫干预提供新的理论依据或思路。

microRNA(miRNA)是近年来发现的一类在转录后水平对目的基因表达进行调控的非编码 RNA^[6]。与靶基因 mRNA 的 3'端非编码区(UTR)结合后,miRNA 可以直接抑制其翻译,或将其降解^[7]。研究表明,在机体发育、肿瘤产生、细胞凋亡等众多生理或病理过程中,miRNA 都发挥着极为重要的调控作用^[8]。近年来,miRNA 的免疫调控功能日渐引起了国内外学者的关注,基础免疫学的研究发现:miRNA 是调控免疫细胞发育、分化及免疫应答过程的重要因子^[9-10];临床免疫学研究也发现,多种自身免疫性疾病的发病机制与 miRNA 密切相关^[11]。PBC 患者肝脏内有多个 miRNA 表达异常,提示 miRNA 参与了 PBC 的发病机制,但这些肝脏内差异表达的 miRNA 在 PBC 发病机制中的地位和作用尚待进一步研究^[12]。

我们的前期研究发现,PBC 患者外周血单个核细胞(PBMC)内有多个 miRNA 表达异常,miRNA-302e 是其中较为显著的一个^[13]。本研究首先对比 PBC 患者和健康个体各种免疫细胞中 miRNA-302e 表达的差异,然后通过改变特定免疫细胞内 miRNA-302e 的表达来分析其对细胞功能的调节作用。

1 材料和方法

1.1 病例资料 12 例 PBC 患者均为第二军医大学长征医院门诊患者,符合美国肝病学会 2000 年推荐

的 PBC 诊断指南^[14]。健康对照组 10 例,均来自第二军医大学长征医院体检中心。所有患者均为初诊患者,未接受任何治疗,也未合并除 PBC 以外的其他自身免疫性疾病。所有健康个体的常规体检项目均未见异常。健康对照和 PBC 组临床特征见表 1。

表 1 受试对象的临床特征

Tab 1 Clinical characteristics of the subjects

	PBC patients (n=12)	Healthy controls (n=10)	P value
Age(year)	45.3±6.4	46.4±5.0	0.88
Gender(male/female)	2/10	3/7	0.62
AST z_B /(IU·L ⁻¹)	110±53	20±11	<0.01
ALT z_B /(IU·L ⁻¹)	100±26	19±9	<0.01
GGT z_B /(IU·L ⁻¹)	316±139	21±8	<0.01
ALP z_B /(IU·L ⁻¹)	209±45	22±4	<0.01
TBIL z_B /(IU·L ⁻¹)	89±18	20±5	<0.01

ALT: Alanine aminotransaminase; AST: Aspartate aminotransferase; GGT: Gamma-glutamyl transpeptidase; ALP: Alkaline phosphatase; TBIL: Total bilirubin

1.2 细胞分离 于晨起时抽取所有受试对象空腹静脉血 20 ml(PBC 患者血液的采集于治疗开始之前),枸橼酸钠抗凝。加入等体积的 PBS 缓冲液稀释,将稀释后血液缓慢滴加在淋巴细胞分离液上(加拿大 Cedarlane 公司),1 500×g 离心 30 min,吸出单个核细胞层,以无菌 PBS 液洗涤 2 次,即得到 PBMC,然后将部分细胞置于-80℃保存待用,另外部分细胞用于磁珠分选。采用 Miltenyi 公司的磁珠分选试剂盒分选出 CD14⁺、CD19⁺及 CD3⁺细胞,分选过程按照公司操作说明进行。分离得到的细胞经流式细胞术鉴定,纯度大于 90%以上后才置于-80℃保存待用。

1.3 细胞培养及转染 THP-1 细胞系及磁珠分选单核细胞以含 10%胎牛血清(美国 Gibco)的 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco)培养。5×10⁵个细胞铺于 12 孔板培养过夜,以 FuGENE HD 细胞转染试剂(罗氏转染试剂盒,Roche 公司)根据说明书共转染 miRNA mimics、inhibitor(上海吉玛公司),转染浓度 100 nmol/L。于转染后 48 h 进行转染效率鉴定。鉴于单核细胞内 miR-302e 的表达在 PBC 患者和健康个体中的差异显著,我们进一步分析了 miR-302e 对单核细胞功能的调控作用。众所周知,单核细胞最重要的功能是参与固有免疫应答,而固有免疫应答异常也是 PBC 的重要特征^[15]。因此,着重分析了

miR-302e 对固有免疫应答的调节作用。

1.4 miRNA 定量 PCR 根据说明书使用以 TR-Izol 试剂(Invitrogen)抽提总 RNA,包括 miRNA,定量引物见表 2。miRNA 和 mRNA 的相对表达量是通过与内参基因 U6 和 GAPDH 的 Ct 值间的差值来计算基因表达差异,即为 $2^{-\Delta\Delta Ct[16]}$,以反映目的基因在各研究组的表达水平。

表 2 miR-302e 以及内参的引物

Tab 2 Primers for miR-302e and internal control

Gene	Primer(5'→3')
miR-302e	Forward: CTCATCGCATAAGTGCTTCCAT
	Reverse: TATCGTTGTCTCGACTCCTTCAC
U6	Forward: ATTGGAACGATACAGAGAAGATT
	Reverse: GGAACGCTTCACGAATTTG

1.5 ELISA 法检测细胞因子水平 以终浓度为 100 ng/ml 的 LPS(Sigma 公司)进行刺激分离得到的单核细胞以及转染了 miRNA mimics、inhibitor 的 THP-1 细胞,并在刺激后 0、12、24 h 收集培养基上清,进行 IL-6、TNF- α 检测。IL-6、TNF- α 的检测试剂盒购自 eBioscience 公司,标准曲线的绘制及检测操作过程均按照公司提供的说明书进行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 for windows 进行统计分析,两组连续变量之间的比较采用独立样本的 *t* 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 PBC 患者各种淋巴细胞亚群内 miR-302e 的相对表达水平 结果发现:PBC 患者 PBMC 中 miR-302e 的表达约为健康个体的 30%,差异具有统计学意义(图 1A, $P < 0.01$)。为明确 PBC 患者 PBMC 中 miR-302e 的表达降低与何种细胞亚群有关,我们进一步比较了 PBC 患者 T 细胞(CD3⁺)、B 细胞(CD19⁺)和单核细胞(CD14⁺)内 miR-302e 的表达差异,结果发现:PBC 患者 B 细胞、T 细胞和单核细胞内 miR-302e 的表达均较健康个体降低(图 1B, $P < 0.05$)。作为对照,同时检测了 PBC 患者和健康个体在上述细胞亚群中 miR-302a 的表达差异,结果发现:PBC 患者 B 细胞、T 细胞和单核细胞内 miR-302a 的表达与健康对照个体间的差异无统计学意义(图 1C)。上述结果表明:miR-302e 在 B 细胞、T 细胞和单核细胞中表达降低是 PBC 的重要特征之一。

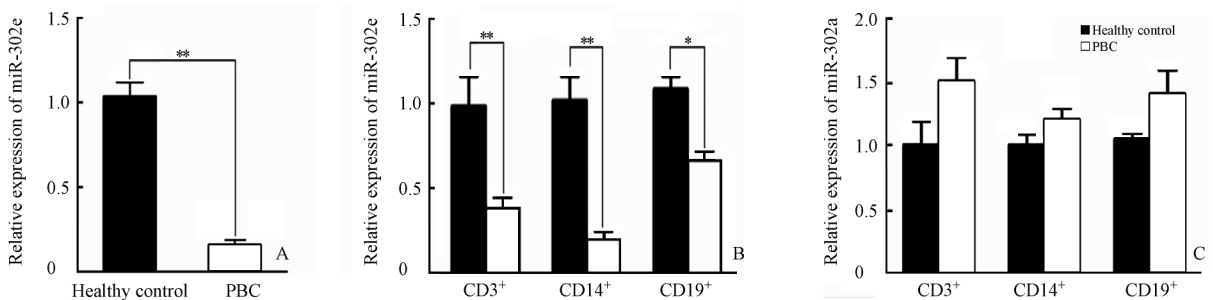


图 1 PBC 患者单核细胞内 miR-302e 表达降低

Fig 1 Decreased miR-302e expression in PBC patients

A and B: The relative expression of miR-302e in PBMCs, T cells(CD3⁺), B cells(CD19⁺) and monocytes(CD14⁺) from PBC patients and healthy controls were analyzed by RT-PCR; C: As control, the relative expression of miR-302a in T cells(CD3⁺), B cells(CD19⁺) and monocytes(CD14) from PBC patients and healthy controls. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 12$ for PBC patients, $n = 10$ for healthy controls, $\bar{x} \pm s$

2.2 miR-302e 负向调节 LPS 诱导 THP-1 细胞释放炎症因子的能力 通过将 miR-302e mimics 和 miR-302e inhibitor 转染入单核细胞系 THP-1 细胞,我们发现,胞内 miR-302e 的丰度发生了显著变化(图 2A, $P < 0.01$ 或 0.05)。以 100 ng/ml LPS 刺激 THP-1 细胞诱导 IL-6、TNF- α 的产生,而 miR-302e mimics 和 miR-302e inhibitor 则分别抑制和促

进炎症因子 IL-6、TNF- α 的产生(图 2B, P 值均小于 0.05)。这些结果表明:miR-302e 是负向调节固有免疫应答的因素之一。

2.3 PBC 患者单核细胞对 LPS 刺激呈现出高反应性 鉴于 miR-302e 具有负向调节 LPS 诱导 THP-1 细胞释放炎症因子的能力,我们检测了 PBC 患者单核细胞经 LPS 刺激前后 IL-6 及 TNF- α 的水平。以

100 ng/ml LPS 刺激 PBC 患者单核细胞, 在 0、24 h 检测 IL-6、TNF- α 水平。结果显示经 LPS 刺激后, PBC 患者单核细胞 IL-6 及 TNF- α 水平高于未经

LPS 刺激的 PBC 患者单核细胞 (图 3, P 值均小于 0.01)。这些结果表明 PBC 患者单核细胞对 LPS 刺激呈现出高反应性。

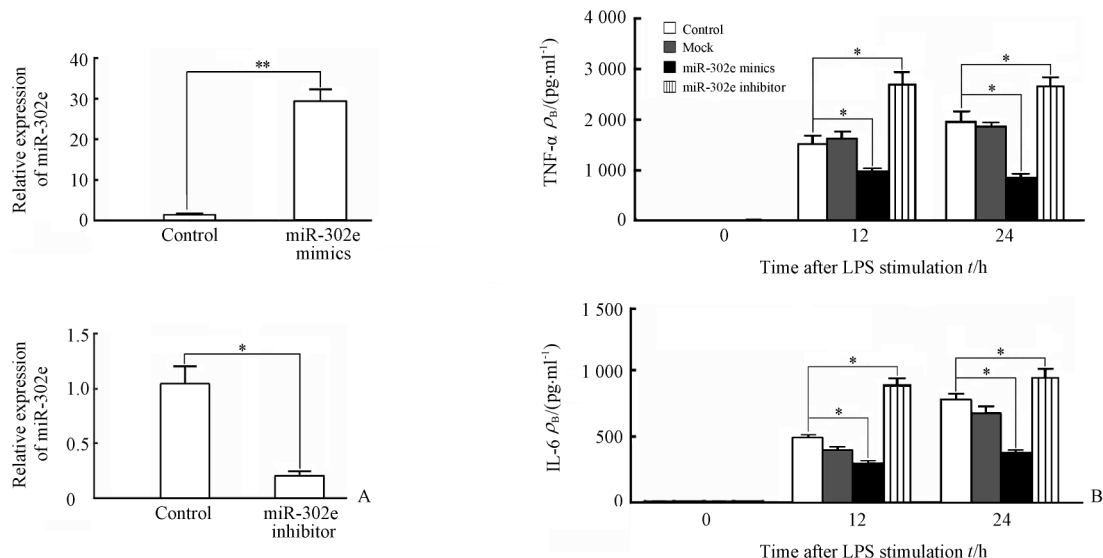


图 2 miR-302e 负向调节 LPS 诱导 THP-1 细胞释放炎症因子的能力

Fig 2 miR-302e negatively regulated IL-6 and TNF- α production triggered by LPS

A: THP-1 cells were transfected with control mimics or miR-302e mimics, control inhibitor or miR-302e inhibitor at a final concentration of 10 nmol/L. After 48 h, miR-302e expression was measured by RT-PCR. B: THP-1 cells described in A were transfected with control mimics or miR-302e mimics, control inhibitor or miR-302e inhibitor. After 48 h, the cells were treated with LPS at concentration of 100 ng/ml. The concentrations of IL-6 and TNF- α were measured by ELISA in culture medium. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

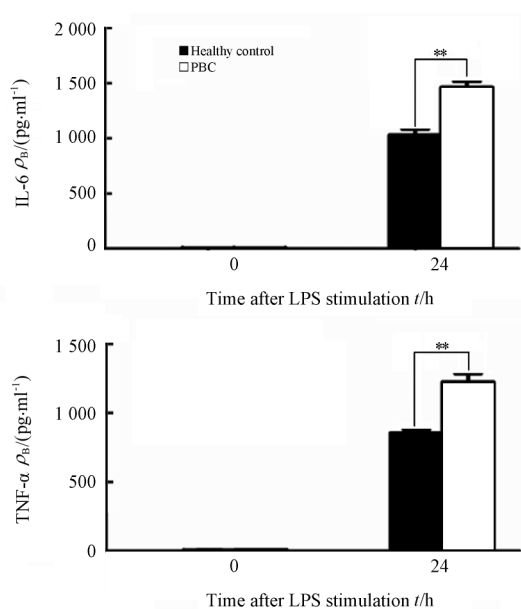


图 3 PBC 患者单核细胞受 LPS 刺激后释放较多的 IL-6、TNF- α

Fig 3 Monocytes from PBC patients produced more IL-6 and TNF- α compared with those from healthy controls

** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究发现 miR-302e 在 PBC 患者的单核细胞中表达明显降低, 而与其同源的 miR-302a 的表达则与健康对照组差异不大, 说明单核细胞内 miR-302e 表达下调是 PBC 发病的重要特征。众所周知, 参与炎症反应是单核细胞最重要的功能之一, 而以炎症反应为核心的固有免疫系统异常在自身免疫性疾病的发病机制中发挥着极为重要的作用^[17]。因此, 本研究进一步在单核细胞株 THP-1 细胞中研究了 miR-302e 的功能, LPS 刺激可以促进单核细胞释放炎症因子 IL-6 及 TNF- α , 而不管是转染外源性的 miR-302e mimics, 还是采用 miR-302e inhibitor 抑制内源性 miR-302e 的活性, 均可改变 THP-1 细胞释放 IL-6、TNF- α 的能力。因此, miR-302e 可能是调节单核细胞活化的重要因子之一。

PBC 发病可能与感染因素有关, 部分表现为尿路感染^[18]。我们以往的研究也表明, PBC 的发病可

能与衣原体感染有关^[19]。然而,目前仍不明确各种感染因素到底是引发还是促进 PBC 的因素,其中的分子机制也有待于进一步阐明^[20]。固有免疫系统是抵抗病原体感染的第一道防线,单核细胞则是固有免疫系统的重要力量,其表面的模式识别受体可以识别位于病原体表面的相对保守结构,即病原体相关分子模式(PAMP),随后在感染部位发动非特异性的炎症反应,以促进病原体的清除。在此过程中,炎症反应的强度必须予以严格控制,因为失控的炎症反应并不利于组织的损伤修复,同时可能会引发自身免疫性疾病。我们以往的研究也发现 PBC 患者血清 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 IL-23 水平均较健康对照人群显著增高^[21]。国外研究也发现 PBC 患者血清 TNF- α 水平较健康对照组明显增加^[22]。这些结果表明 PBC 的发病机制在一定程度上与炎症反应密不可分。更重要的是,有研究发现 PBC 患者外周血单核细胞在接受到 LPS、Poly I:C 等致病原相关分子模式刺激后,其产生炎症因子的能力明显强于来自健康个体的单核细胞^[16]。本研究也发现了这种现象,但在此基础上,我们还进一步发现,PBC 患者单核细胞表现出明显的“促炎”特性可能与胞内 miR-302e 的表达降低有关。这提示我们,如果修正 PBC 患者的单核细胞“促炎”特性是 PBC 潜在的治疗途径,那么 miR-302e 就是干预 PBC 单核细胞潜在的治疗靶点。

综上所述,本研究发现 PBC 患者单核细胞 miR-302e 表达下调,且这种表达下调可能是导致 PBC 患者单核细胞表现出明显“促炎”特性的原因之一。因此,miR-302e 可能是 PBC 潜在的治疗靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Kaplan M M, Gershwin M E. Primary biliary cirrhosis[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1261-1273.

[2] Lleo A, Invernizzi P, Mackay I R, Prince H, Zhong R Q, Gershwin M E. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 3328-3337.

[3] Reshetnyak V I. Concept on the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 7250-7262.

[4] Hohenester S, Oude-Elferink R P, Beuers U. Primary biliary cirrhosis[J]. *Semin Immunopathol*, 2009, 31: 283-307.

[5] Selmi C, Meda F, Kasangian A, Invernizzi P, Tian Z, Lian Z, et al. Experimental evidence on the immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7: 1-10.

[6] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.

[7] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136: 215-233.

[8] Bushati N, Cohen S M. microRNA functions[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 175-205.

[9] Lindsay M A. microRNAs and the immune response[J]. *Trends Immunol*, 2008, 29: 343-351.

[10] Rossi R L, Rossetti G, Wenandy L, Curti S, Ripamonti A, Bonnal R J, et al. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4⁺ T cells by the microRNA miR-125b[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12: 796-803.

[11] Furer V, Greenberg J D, Attur M, Abramson S B, Pillinger M H. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases[J]. *Clin Immunol*, 2010, 136: 1-15.

[12] Poupon R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update[J]. *J Hepatol*, 2010, 52: 745-758.

[13] 钱 琤. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血 T 细胞 microRNA 表达谱及其调控机制的研究[D]. 上海: 2008, 第二军医大学学位论文.

[14] Heathcote E J. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31: 1005-1013.

[15] Mao T K, Lian Z X, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari A A, et al. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2005, 42: 802-808.

[16] Schmittgen T D. Real-time quantitative PCR [J]. *Methods*, 2001, 25: 383-385.

[17] Pisetsky D S. The role of innate immunity in the induction of autoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 8: 69-72.

[18] Gershwin M E, Selmi C, Worman H J, Gold E B, Watnik M, Utts J, et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients [J]. *Hepatology*, 2005, 42: 1194-1202.

[19] Liu H Y, Deng A M, Zhang J, Zhou Y, Yao D K, Tu X Q, et al. Correlation of Chlamydia pneumoniae infection with primary biliary cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 4108-4110.

[20] Bogdanos D P, Vergani D. Bacteria and primary biliary cirrhosis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2009, 36: 30-39.

[21] Rong G, Zhou Y, Xiong Y, Zhou L, Geng H, Jiang T, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 156: 217-225.

[22] Miller L C, Kaplan M M. Serum interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha in primary biliary cirrhosis: decrease by colchicine and relationship to HLA-DR4 [J]. *Am J Gastroenterol*, 1992, 87: 465-470.