

# miR - 22 靶向抑制 NLRP3 基因对冠心病内皮细胞炎症损伤的保护作用

胡 波<sup>1</sup> 张晓刚<sup>2</sup> 李德才<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 miR-22 靶向 NLRP3 基因对冠心病内皮细胞炎症损伤的影响。方法 构建动脉粥样硬化(AS)大鼠模型,分离大鼠原代冠状动脉内皮细胞,培养并鉴定,用同型半胱氨酸(HCY)对细胞共孵育 24 h,进行冠心病应激细胞分组。双荧光素酶报告基因验证 miR-22 和 NLRP3 的靶向关系。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测心肌组织和各组细胞中 miR-22 和 NLRP3、caspase-1 水平。MTT 法检测细胞活力。Hochest 33258 染色检验细胞凋亡。ELISA 检测白介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 和 IL-18 炎症因子表达。结果 与正常组大鼠相比,AS 组大鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)、Ca<sup>2+</sup> 水平均明显升高( $P < 0.01$ ); AS 组大鼠心肌组织中 miR-22 水平显著降低, NLRP3、caspase-1 mRNA 及 NLRP3、caspase-1 蛋白水平显著上调( $P < 0.05$ )。NLRP3 证实为 miR-22 的靶基因。与空白对照组细胞相比,miR-22 mimic 组的 NLRP3、caspase-1 mRNA 及 NLRP3、caspase-1 蛋白水平下降,细胞活力增强,细胞凋亡率下降,IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 炎症因子表达水平下调,IL-10 表达水平上调( $P < 0.05$ ); 而 miR-22 inhibitor 组的 NLRP3、caspase-1 mRNA 及 NLRP3、caspase-1 蛋白水平上调,细胞活力降低,细胞凋亡率上升,IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 炎症因子表达水平上升,IL-10 表达水平下降( $P < 0.05$ )。结论 miR-22 通过靶向抑制 NLRP3 基因,减少冠心病大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡及下调促炎症因子的表达,发挥对大鼠心肌微血管内皮细胞的保护作用。

**关键词** 冠心病; miR-22; NLRP3 基因; 内皮细胞; 炎症因子  
中图分类号 R 195  
文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2018)05 - 0668 - 08  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.05.003

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)是一种多因素共同作用的冠状动脉性心脏病疾病,由于脂质代谢异常引起动脉内膜脂类物质

的堆积进而诱发动脉粥样病变<sup>[1-2]</sup>,近年来冠心病的发病率呈上升的趋势,并且在年龄上越来越趋向于年轻化<sup>[3]</sup>。炎症反应是心脏疾病中的一项重要机制,该反应会使动脉粥样硬化斑块趋于不稳定,进而可能导致斑块破裂,促进冠心病的发生发展<sup>[4-6]</sup>。该研究<sup>[7]</sup>显示许多 microRNA(miRNA)分子可以调控糖脂代谢、平滑肌细胞增殖以及血管炎症反应,在冠心病的发病机制中扮演着关键性的作用。Jazbutyte et al<sup>[8]</sup>发现 miR-22 靶向骨诱导因子(mimecan/osteoglycin, OGN),可促进心脏成纤维细胞的迁移,诱导心肌细胞衰老。NOD 样受体蛋白 3(NLRP-3)炎性小体是一种影响组织损伤、代谢应激、感染和炎症过程的复合体<sup>[9]</sup>。该研究旨在探讨 miR-22 靶向调控 NLRP3 基因对冠心病内皮细胞炎症损伤的影响,寻求一种新的方法来治疗冠心病。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康纯种 SD 雄性大白鼠 24 只,体重(240 ± 60) g,鼠龄 3 ~ 4 月,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证编号:HNASKLJ20100330,饲养在带不锈钢盖底的塑料笼内,每笼 6 只,自由饮水。室内温度 25 °C,湿度 65%,饮水为普通自来水,饲料和水均可由大鼠自行随意摄取。饲养一周适应环境,以降低环境变更引起的应激反应。本次实验通过绵阳四〇四医院伦理协会审核,同时动物实验严格遵循《赫尔辛基宣言》。

**1.2 病理模型的构建及分组** 参照沈丽等<sup>[10]</sup>的方法制备冠状动脉粥样硬化模型,适应性喂养一周后,正常组喂基础饲料和普通自来水,AS 组以高脂饲料(2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、3% 猪油、0.2% 丙基硫氧嘧啶和 94.3% 的基础饲料)喂养,在高脂饲料的基础上加维生素 D3 粉剂(1.25 × 10<sup>6</sup> U/kg 饲料)喂养,实验开始时于右下肢肌肉注射维生素 D3 粉剂(3 × 10<sup>6</sup> U/kg 体重),每隔 30 d 重复一次。正常组和 AS 组各 12 只。

**1.3 血脂和血钙的检测** 实验 3 个月后,各组动物

2018 - 02 - 28 接收  
基金项目:四川省绵阳市应用技术与开发项目(编号:15S-ZC-13);四川省卫计委课题(编号:17PJ019)  
作者单位:<sup>1</sup> 四川绵阳四〇四医院心内科 绵阳 621000  
<sup>2</sup> 重庆医科大学附属第一医院心内科 渝中 630014  
作者简介:胡 波 男 医学硕士 副主任医师;  
张晓刚 男 医学博士 主任医师 硕士生导师,责任作者,  
E-mail: rkuz33168194@163.com

禁食过夜,在戊巴比妥钠腹腔麻醉下,分离腹主动脉,在肾动脉分叉处下方,剪开腹主动脉,插入穿刺针,以注射器采集动脉血,3 000 r/min 离心 5 min,分离血浆,取 1 ml 检测血脂和血钙。使用 Abbott Aeroset TM 生物化学分析仪(美国亚培公司)检测各组大鼠血浆总胆固醇(total cholesterol,TC)、三酰甘油(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDLc)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDLc)和  $Ca^{2+}$  的表达情况。实验重复 3 次,数据取平均值。

**1.4 冠状动脉内皮细胞的分离、培养及鉴定** 取近心端冠状动脉,将取出的冠状动脉放入盛有 PBS 和肝素的器皿中浸泡 5 min,防止血液凝固。无菌 PBS 冲洗 3 次,将其置于 75% 酒精中浸泡 15 s,用眼科剪将动脉组织剪碎为 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块,加入 0.2% II 型胶原酶 3 ml,37 °C 水浴消化 6 min,再加入等体积 0.25% 胰酶,37 °C 水浴消化 5 min。消化结束后,加入 3 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化。弃上清液,将所得细胞充悬于完全培养液,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞孵育箱中孵育,6 h 后换液,弃去未贴壁细胞,待细胞生长至 80% 融合,吸弃原培养液,PBS 冲洗 3 遍。向瓶内加入 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液,轻轻晃动培养瓶,使消化液流遍所有细胞表面。将培养瓶置于显微镜下观察,待大部分细胞收缩变圆时,立即加入 10% 胎牛血清培养液终止消化。用移液器轻轻吹打使细胞脱壁。吸取细胞悬液并离心,用完全培养液重悬,混合均匀。调整到合适的密度后接种传代。含置于 37 °C 恒温的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,每 3 d 换一次培养液。通过免疫细胞化学法,将细胞吹打,使用 PBS 洗涤,加入一抗孵育过夜。次日,PBS 清洗 3 次,加入二抗,在 37 °C 的条件下孵育 30 min,DAB 显色,光镜下观察记录。原代冠状动脉内皮细胞在培养 24 h 后,在倒置显微镜下进行观察。

**1.5 细胞转染及分组** 待处理的大鼠冠状动脉内皮细胞与 0.25 mmol/L 的同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)共孵育 24 h,造冠心病模型。针对有效促进大鼠 miR-22 基因表达的靶序列合成其过表达 RNA 的 DNA Oligo,并制成双链 DNA。与 Age I 和 EcoR I 双酶切后的 Pgsil-gfp 载体连接、转化、PCR 法筛选阳性克隆,提取质粒,酶切并测序。合成 miR-22 的过表达物(miR-22 mimic)、抑制物(miR-22 inhibitor)及 NLRP3 基因失活(si NLRP3),利用脂质体进行包装,待第 3 代冠状动脉内皮细胞生长

至 80% 时开始转染,将脂质体一定比例稀释后加入细胞培养基共培养 24 h,构成空白对照组(不转染的细胞)、阴性对照组(转染不相干序列)、miR-22 mimic 组(转染 miR-22 的过表达物)、miR-22 inhibitor 组(转染 miR-22 的抑制物)、miR-22 inhibitor + si NLRP3 组(转染 miR-22 并失活 NLRP3 基因)。

**1.6 双荧光素酶报告系统检测** 采用生物信息学软件 <http://www.microrna.org> 预测 miR-22 与 NLRP3 的靶向关系及 miR-22 与 NLRP3 3' UTR 的结合位点。合成含 miR-22 结合位点的 NLRP3 3' UTR 启动子区序列,构建 NLRP3 3' UTR 野生型(WT)质粒(NLRP3 3' UTR-WT)。并在该质粒基础上,突变结合位点,构建 NLRP3 3' UTR 突变型(MUT)质粒(NLRP3 3' UTR-MUT)。按购买的质粒提取试剂盒(美国 Promega 公司)的方法步骤进行。将对数生长的 293T 细胞接种于 96 孔板中,在细胞密度约 70% 时,Lipofectamine 2000 转染,将 NLRP3-3' UTR-WT 质粒和 miR-22 mimic 质粒混匀后共转染于 293T 细胞,同时设 NLRP3-3' UTR-WT + NC(NLRP3 3' UTR 野生型质粒转染无义对照序列)组、NLRP3-3' UTR-MUT + NC(NLRP3 3' UTR 突变型质粒转染无义对照序列)组和 NLRP3-3' UTR-MUT + miR-22 mimic(NLRP3 3' UTR 突变型质粒转染 miR-22 mimic 质粒)组分别转染于 293T 细胞。培养箱培养 6 h 后,更换含 10% FBS 培养基继续培养 48 h 后,化学发光法检测荧光素酶活性。实验重复 3 次,数据取平均值。

**1.7 实时荧光定量 PCR 检测 miR-22、NLRP3、caspase-1 mRNA 的表达水平** 采用 TRIzol(美国 Invitrogen 公司)的一步法对组织和细胞总 RNA 进行提取,并通过紫外分析技术及甲醛变性电泳检测对获得高质量 RNA 进行证实。取 1 μg RNA,用 AMV 逆转录酶逆转录得到 cDNA。PCR 引物由美国 Invitrogen 公司设计和合成,以 β-actin 作为内参。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 40 s,60 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,40 个循环,72 °C 再延伸 10 min。产物经琼脂糖凝胶进行电泳,用 OpticonMonitor 3 软件(美国 BioRad 公司)分析 PCR 结果。手动将阈值选定在各对数扩增曲线平行上升的最低点,获得各反应管的 Ct 值,数据采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行分析,2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示实验组与对照组目的基因表达的倍比关系,公式如下: ΔΔCt = [Ct(目的基因) - Ct(参照基因)]<sub>实验组</sub> - [Ct(目的基因) - Ct(参照基因)]<sub>对照组</sub>。实验重复 3 次,数据取平均值。

**1.8 Western blot 检测 NLRP3、caspase-1 蛋白表达情况** 提取各组大鼠心肌组织和各组细胞蛋白,按 BCA 试剂盒(武汉博士德公司)说明书测定蛋白浓度,将提取的蛋白加入上样缓冲液后在 95 °C 煮 10 min,每孔上样 30 μg,10% 聚丙烯酰胺凝胶(武汉博士德公司)电泳分离蛋白,电泳电压 80 V 转 120 V,湿转,转膜电压 100 mV,时间 45 ~ 70 min,PVDF 转膜,5% BSA 室温封闭 1 h,加入兔抗鼠一抗 NLRP3(1 : 1 000 稀释)、caspase-1(1 : 1 000 稀释)均购自美国 Cell Signaling 公司,抗鼠一抗 β-actin(1 : 3 000 稀释)购自美国 BD 公司 4 °C 过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 5 min 相应的羊抗兔二抗(上海妙通生物科技有限公司)室温孵育 1 h,洗膜,洗 3 次,每次 5 min,化学发光试剂显影。β-actin 作为内参。Bio-rad Gel Doc EZ 成像仪(GEL DOC EZ IMAGER,美国 Bio-rad 公司)显影。目的条带采用 Image J 软件进行灰度值分析。实验重复 3 次,数据取平均值。

**1.9 MTT 法检验细胞活性** 将 2 ~ 3 代 CMEC 细胞悬液按一定浓度稀释细胞数后以  $5 \times 10^4$  每孔密度接种于 96 孔板中,每组设 6 个平行孔。待细胞达 80% 融合后,按上述实验分组处理细胞,复氧结束后,再加入 MTT 液(美国 Sigma 公司) 20 μl,置于 37 °C 培养箱孵育 4 h,弃 MTT 溶液,每孔加入二甲基亚砷(美国 Sigma 公司) 150 μl,摇床振荡 10 min 后于酶标仪 490 nm 波长处检测每孔吸光度(OD)值。实验重复 3 次,取平均 OD 值。细胞存活率 = (试验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / 空白组 OD 值。实验重复 3 次,数据取平均值。

**1.10 Hoechst 33258 染色检验细胞凋亡** 使用 0.25% 胰酶 - 0.02% EDTA 消化处于对数生长期的细胞,离心后的细胞置于完全培养液中重悬,在 24 孔板中以 500 μl ( $6 \times 10^5$  / 孔) 密度接种于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境中孵育。待细胞贴壁融合后,取出盖玻片,PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,然后 PBS 洗 3 次,每次 5 min。Hoechst 33258 工作液 25 °C 染色 5 min,蒸馏水冲净晾干。在倒置荧光显微镜下观察,随机选择高倍镜视野 5 个/组,固缩、浓集、细胞核变亮认为是凋亡细胞核,统计阳性细胞数。凋亡率等于阳性细胞数与总细胞数之比。实验重复 3 次,数据取平均值。

**1.11 ELISA 检测白介素(interleukin, IL) -1β、IL-6、IL-10 和 IL-18 水平** 0.25% 胰酶 - 0.02% EDTA 消化对数生长期细胞,离心后的细胞用完全培养液重悬,以 500 μl ( $6 \times 10^5$  / 孔) 密度接种于 24 孔板,37

°C、5% CO<sub>2</sub> 环境中孵育。待细胞贴壁融合后,收集细胞上清液。上清液保存于 -20 °C 的环境中,按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清中的 IL-1β、IL-6、IL-10 和 IL-18 的浓度。实验重复 3 次,数据取平均值。

**1.12 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组之间的比较采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析,两两比较采用最小显著差法(LSD法),服从正态分布的计量资料两组之间的比较采用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 大鼠的血脂和血钙的浓度变化** 检测大鼠的血脂和血钙的浓度结果显示:与正常组大鼠比较,AS 组大鼠血清 TC、TG、LDLC 水平均明显升高(P < 0.05),HDLc 差异无统计学意义。与正常组比较,AS 组大鼠血清中 Ca<sup>2+</sup> 浓度明显升高(P < 0.05)。见表 1。

**2.2 大鼠心肌组织中 miR-22 和 NLRP3、caspase-1 mRNA 表达水平** 经实时荧光定量 PCR 法检测大鼠心肌组织中 miR-22 水平和 NLRP3、caspase-1 mRNA 表达情况,两组大鼠 miR-22 水平和 NLRP3、caspase-1 mRNA 表达水平存在显著差异(t = 26.84、64.01、50.59, P < 0.05)。与正常组比较 AS 组大鼠心肌组织中 miR-22 水平显著下调,而 NLRP3 和 caspase-1 mRNA 表达水平显著上调(P < 0.05)。见图 1。

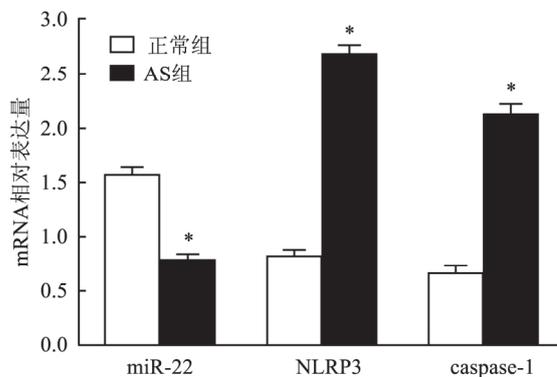


图 1 大鼠心肌组织中 miR-22 和 NLRP3、caspase-1 mRNA 表达水平与正常组比较: \* P < 0.05

**2.3 大鼠心肌组织中 NLRP3、caspase-1 蛋白表达水平** Western blot 法检测各组大鼠心肌组织中

表1 各组大鼠血清血脂和血钙水平 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | TC            | TG           | LDLC         | HDLC        | Ca <sup>2+</sup> |
|-----|---------------|--------------|--------------|-------------|------------------|
| 正常  | 4.19 ± 0.25   | 1.09 ± 0.21  | 1.01 ± 0.18  | 2.35 ± 0.20 | 2.66 ± 0.29      |
| AS  | 15.38 ± 0.56* | 4.04 ± 0.16* | 6.01 ± 0.32* | 2.41 ± 0.27 | 3.34 ± 0.34*     |
| t 值 | 91.71         | 24.18        | 40.98        | 0.49        | 5.57             |

与正常组比较: \* P < 0.05

NLRP3、caspase-1 蛋白表达水平,各组间 NLRP3、caspase-1 蛋白表达水平差异有统计学意义 (t = 120.70、50.21, P < 0.05)。与正常组比较,AS 组的 NLRP3、caspase-1 蛋白表达显著上调,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 2。

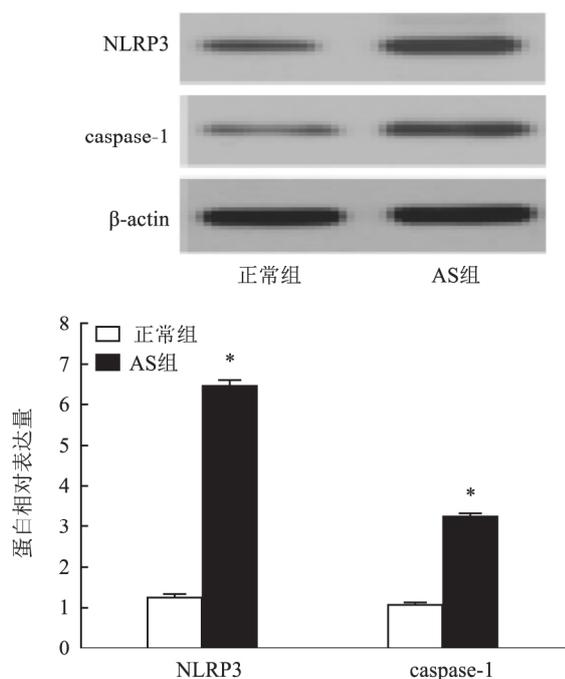


图2 大鼠心肌组织蛋白表达水平  
与正常组比较: \* P < 0.05

**2.4 双荧光素酶报告系统检测** 生物信息学软件 <http://www.microrna.org> 预测 miR-22 与 NLRP3 有靶向关系 (图 3A)。293T 细胞内共转染 NLRP3-3'UTR-WT 质粒和 miR-22 模拟物质粒,结果显示,野生型中,与 NLRP3-3'UTR-WT + NC 组比较, NLRP3-3'UTR-WT + miR-22 mimic 组荧光素酶活性显著降低 (t = 5.26, P < 0.05)。而突变型中,与 NLRP3-3'UTR-MUT + NC 组比较,共转染 NLRP3-3'UTR-MUT + miR-22 mimic 质粒后,荧光素酶活性差异无统计学意义 (图 3B)。

**2.5 冠状动脉内皮细胞形态观察及鉴定** 原代 CMECs 培养 24 h 后,倒置显微镜下进行观察,可见

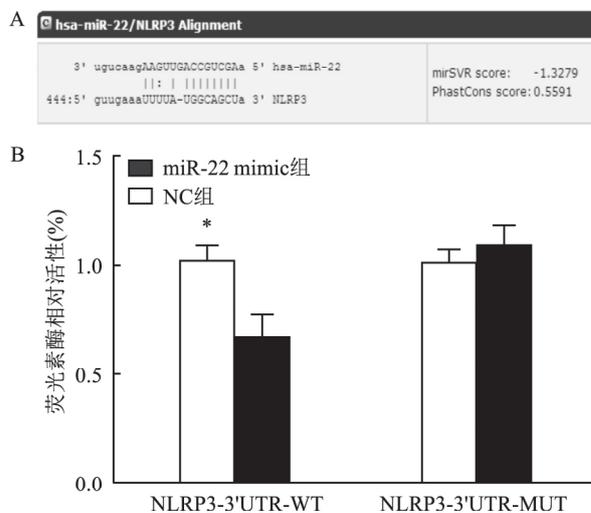


图3 miR-22 与 NLRP3 的靶向关系验证

A: 在线软件预测靶向关系图; B: 荧光素酶活性实验验证结果; 与 NLRP3-3'UTR-WT 中的 NC 组比较: \* P < 0.05

细胞呈单层鹅卵石状生长,小而短梭形,胞体具有较好的折光度。贴壁细胞数量随着细胞培养天数增加越来越多,细胞开始伸展并呈梭形贴壁生长。培养至 5~7 d 时,细胞呈多角形或梭形 (图 4)。传代细胞 3~4 h 后可生长至融合状态,细胞形态与原代培养细胞相同,呈现典型“铺路石样结构”。同时免疫细胞化学法显示内皮细胞的特异分子标志 CD34、CD105、Tie-2 因子呈强阳性,CD31、vW 因子呈阳性。

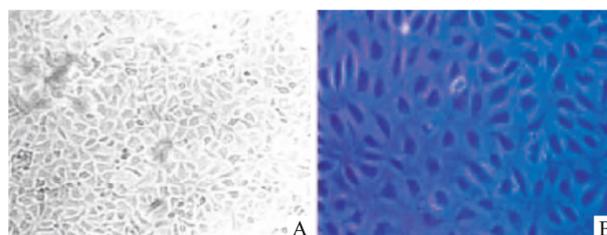


图4 CMECs 形态观察 ×200

A: 细胞培养 24 h 时形态; B: 细胞培养至第 7 天时形态

**2.6 各组细胞中 miR-22 和 NLRP3、caspase-1 mRNA 表达水平** 实时荧光定量 PCR 结果显示:与空白对照组比较,miR-22 mimic 组 miR-22 水平显著上升,NLRP3、caspase-1 的 mRNA 表达水平显著下

降;而 miR-22 inhibitor 组的 miR-22 水平显著下降, NLRP3、caspase-1 的 mRNA 表达水平显著上升,差异有统计学意义 ( $F = 86.53, 258.10, 440.60, P < 0.05$ )。空白对照组、阴性对照组和 miR-22 inhibitor + si NLRP3 组各指标差异无统计学意义。见图 5。

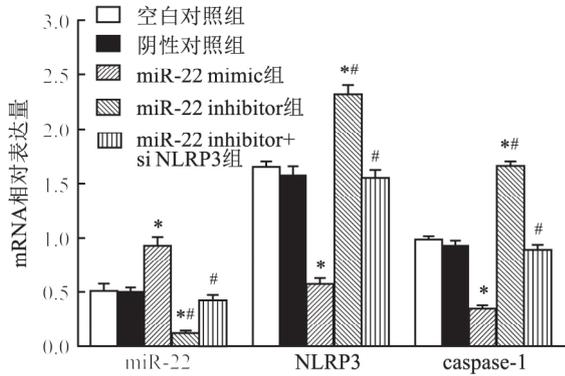


图 5 各组细胞实时荧光定量 PCR 检测结果

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 miR-22 mimic 组比较: #  $P < 0.05$

### 2.7 各组细胞中 NLRP3、caspase-1 蛋白表达水平

Western blot 法检测各组细胞中 NLRP3、caspase-1 蛋白表达水平 结果显示:与空白对照组比较,miR-22 mimic 组 NLRP3、caspase-1 的蛋白表达水平显著下降;而 miR-22 inhibitor 组的 NLRP3、caspase-1 的蛋白表达水平显著上升,差异有统计学意义 ( $F = 125.50, 41.75, P < 0.05$ )。空白对照组、阴性对照组和 miR-22 inhibitor + si NLRP3 组各指标差异无统计学意义。见图 6。

2.8 各组细胞活性 MTT 法检测各组内皮细胞活性 结果显示:空白对照组和阴性对照组细胞活性差异无统计学意义。与空白对照组比较,miR-22 mimic 细胞活性显著升高;miR-22 inhibitor 组细胞活性则显著降低 ( $P < 0.05$ )。空白对照组、阴性对照组和 miR-22 inhibitor + si NLRP3 组细胞活性差异无统计学意义。见图 7。

2.9 Hochest 33258 染色结果 Hochest 33258 染色结果显示:细胞进行冠心病应激后,出现细胞核不完整,核固缩,染色质浓集和凋亡小体等典型的凋亡特征。空白对照组和阴性对照组比较细胞凋亡情况差异无统计学意义。与空白对照组比较,miR-22 mimic 组细胞核不完整的细胞明显减少,细胞凋亡率明显下降;而 miR-22 inhibitor 组细胞出现大量凋亡细胞,细胞核不完整的细胞明显增加,细胞凋亡率明显上升 ( $P < 0.05$ )。miR-22 inhibitor + si NLRP3 组的

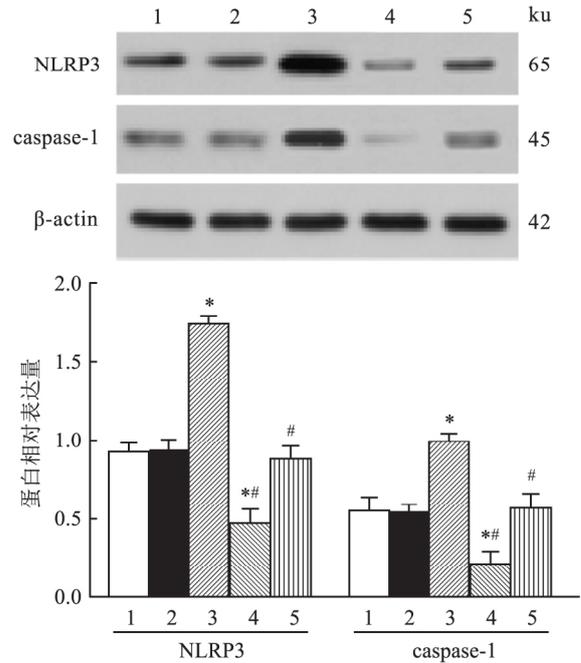


图 6 各组细胞蛋白条带图和各组蛋白表达水平

1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: miR-22 mimic 组; 4: miR-22 inhibitor 组; 5: miR-22 inhibitor + si NLRP3 组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 miR-22 mimic 组比较: #  $P < 0.05$

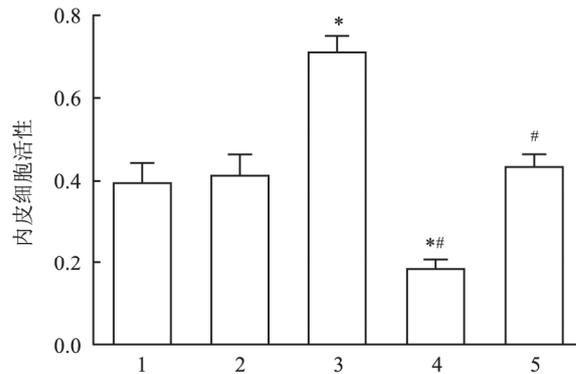


图 7 MTT 法检测各组内皮细胞的细胞活性

1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: miR-22 mimic 组; 4: miR-22 inhibitor 组; 5: miR-22 inhibitor + si NLRP3 组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 miR-22 mimic 组比较: #  $P < 0.05$

凋亡率与空白对照组和阴性对照组差异无统计学意义。见图 8。

2.10 细胞炎症因子表达水平 经 ELISA 法检验表明:与空白对照组和阴性对照组比较,miR-22 mimic 组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 分泌量明显降低,IL-10 分泌显著升高;而 miR-22 inhibitor 组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 分泌量明显增加,而 IL-10 分泌显著下调 ( $P < 0.05$ )。空白对照组和阴性对照组及 miR-22 inhibitor + si NLRP3 组之间比较,IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 和 IL-18 分泌量差异无统计学意义。见表 2。

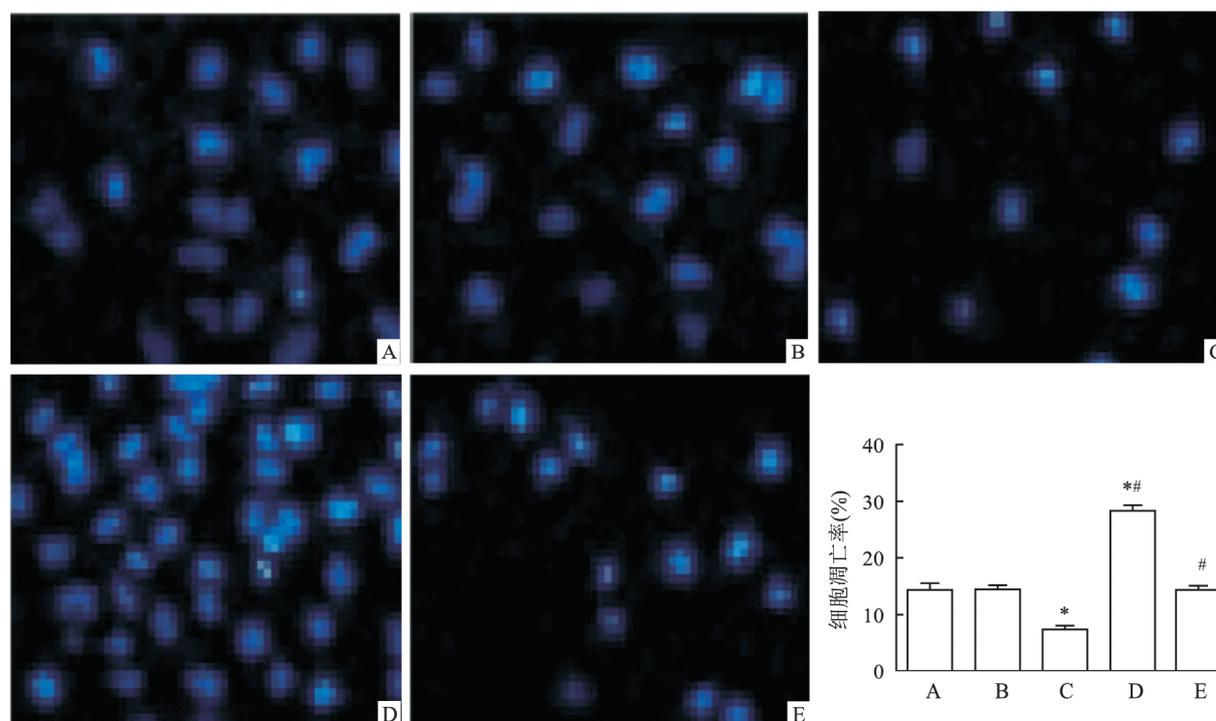


图8 各组细胞的凋亡染色图检测 ×200

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: miR-22 mimic 组; D: miR-22 inhibitor 组; E: miR-22 inhibitor + si NLRP3 组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 miR-22 mimic 组比较: #  $P < 0.05$

表2 各组细胞炎症因子表达水平 (pg/ml  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                          | IL-1 $\beta$        | IL-6                | IL-10               | IL-18                |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 空白对照                        | 9.12 $\pm$ 0.37     | 43.14 $\pm$ 4.86    | 50.32 $\pm$ 3.75    | 79.36 $\pm$ 5.05     |
| 阴性对照                        | 9.18 $\pm$ 0.89     | 42.88 $\pm$ 4.14    | 50.18 $\pm$ 4.21    | 78.85 $\pm$ 4.77     |
| miR-22 mimic                | 3.57 $\pm$ 0.22*    | 21.54 $\pm$ 2.49*   | 79.63 $\pm$ 4.66*   | 23.47 $\pm$ 2.19*    |
| miR-22 inhibitor            | 17.34 $\pm$ 1.73* # | 84.33 $\pm$ 5.25* # | 21.49 $\pm$ 3.15* # | 184.65 $\pm$ 4.32* # |
| miR-22 inhibitor + si NLRP3 | 9.11 $\pm$ 0.62     | 43.05 $\pm$ 4.84    | 49.88 $\pm$ 3.96    | 79.42 $\pm$ 3.98     |
| F 值                         | 83.44               | 79.99               | 80.14               | 588.10               |

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 miR-22 mimic 组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

据 2010 全球疾病负担报告分析, 冠心病是当今影响全球死亡病例与入院治疗人群的主要原因之一。本研究显示 miR-22 通过靶向抑制 NLRP3 基因, 减少冠心病大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡及下调促炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 的表达, 从而发挥对大鼠心肌微血管内皮细胞的保护作用。

首先, 本实验结果显示, 与正常组比较, AS 组大鼠心肌组织中 miR-22 水平显著下调, 而 NLRP3 和 caspase-1 表达水平显著上调。NLRP3 炎性体是目前结构和功能最为明确的炎性体之一, 也是 NLR 家族的重要成员之一, 主要由 NLRP3、caspase-1 和凋亡相关微粒蛋白 (ASC) 组成。NLRP3 炎性体在动

物动脉粥样硬化 (AS) 斑块中被激活, 并且在冠心病患者主动脉中存在着过度表达, 其表达水平与冠心病的严重程度相关<sup>[11]</sup>。经过双荧光素酶检测报告验证, NLRP3 是 miR-22 的靶向基因。与空白对照组比较, miR-22 mimic 组 NLRP3、caspase-1 的表达水平显著下降, 而 miR-22 inhibitor 组的 NLRP3、caspase-1 的表达水平显著上升。本研究结果显示 miR-22 过表达可增强冠心病大鼠心肌微血管内皮细胞活力, 并使细胞凋亡率下降。因此, miR-22 可靶向抑制 NLRP3, 减少冠心病大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡。

与此同时, NLRP3 炎性小体在冠状动脉粥样硬化炎症机制中发挥重要作用, 被激活的 NLRP3 炎性小体, 诱发 caspase-1 活化, 进而促进白介素 1 $\beta$  前体

(pro-IL-1 $\beta$ ) 及 pro-IL-18 的成熟和分泌<sup>[12]</sup>。动脉硬化过程中,磷酸钙结晶激活 caspase-1,巨噬细胞中释放炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-1 $\alpha$ ,促进动脉粥样硬化斑块形成<sup>[13]</sup>。与本研究结果一致,本研究显示 miR-22 mimic 组的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 炎症因子表达水平下调。目前所知的 IL-1 家族一共包括了 11 个成员,IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 receptor agonist (IL-1Ra)、IL-18、IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1F10 与 IL-33<sup>[14]</sup>。IL-1 $\beta$  通过结合 IL-1 受体 1,是重要的炎症信号之一<sup>[15]</sup>。由此,可得出结论,miR-22 通过靶向抑制 NLRP3 基因下调促炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 的表达,减轻细胞炎症损伤。

综上所述,本研究显示 miR-22 通过靶向抑制 NLRP3 基因,减少冠心病大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡,下调促炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-18 的表达,从而保护大鼠心肌微血管内皮细胞,减少内皮细胞炎症损伤。这一发现或许会为冠心病的临床治疗提供一个新的研究方向。然而,该发现尚未得到临床数据的支持,因此接下来将进一步研究 miR-22 应用于冠心病的临床治疗的作用与分子机制。

### 参考文献

- [1] Nakajima T, Honda T, Domon H, et al. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease[J]. *J Periodontol Res*, 2010, 45(1): 116-22.
- [2] 陈佳楠,姚霞,周涵. 冠心病治疗方法的研究进展[J]. *按摩与康复医学*, 2016, 7(11): 8-9.
- [3] 郑雯婕. 冠心病危险因素与预后相关性的研究[J]. *系统医学*, 2016, 1(11): 39-41.
- [4] Madjid M, Willerson J T. Inflammatory markers in coronary heart disease[J]. *Br Med Bull*, 2011, 100: 23-38.
- [5] Duvis H E, de Jonge P, Penninx B W, et al. Depressive symptoms, health behaviors, and subsequent inflammation in patients with coronary heart disease: prospective findings from the heart and soul study[J]. *Am J Psychiatry*, 2011, 168(9): 913-20.
- [6] Bot M, Carney R M, Freedland K E, et al. Inflammation and treatment response to sertraline in patients with coronary heart disease and comorbid major depression[J]. *J Psychosom Res*, 2011, 71(1): 13-7.
- [7] Liu X, You L, Zhou R, et al. Significant association between functional microRNA polymorphisms and coronary heart disease susceptibility: a comprehensive meta-analysis involving 16484 subjects[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5692-702.
- [8] Jazbutyte V, Fiedler J, Kneitz S, et al. MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart[J]. *Age (Dordr)*, 2013, 35(3): 747-62.
- [9] Satoh M, Tabuchi T, Itoh T, et al. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2014, 126(3): 233-41.
- [10] 沈丽,卢维晟,姚俊宇,等. 不同方法建立动脉粥样硬化大鼠模型的比较[J]. *心脏杂志*, 2005, 17(1): 18-20.
- [11] 贺琼. NLRP3 炎症体与冠心病的相关性研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2013, 29(17): 2614-6.
- [12] 赵健. 冠心病患者外周血单核细胞 NLRP3 炎症小体 mRNA 表达的研究[D]. 大连:大连医科大学, 2012.
- [13] Usui F, Shirasuna K, Kimura H, et al. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 162-8.
- [14] Sedimbi S K, Hägglöf T, Karlsson M C. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(24): 4795-808.
- [15] Joosten L A, Netea M G, Dinarello C A. Interleukin-1 $\beta$  in innate inflammation, autophagy and immunity[J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(6): 416-24.

## The protective effect of miR-22 on the inflammation-induced injury of endothelial cells in coronary heart disease through targeting NLRP3

Hu Bo<sup>1</sup>, Zhang Xiaogang<sup>2</sup>, Li Decai<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Cardiology, 404 Hospital of Sichuan, Mianyang 621000; <sup>2</sup>Dept of Cardiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Yuzhong 630014)

**Abstract Objective** To explore the effect of miR-22 on the inflammation-induced injury of endothelial cells (ECs) in coronary heart disease (CHD) through targeting NLRP3. **Methods** The rat model of atherosclerosis (AS) was constructed. Rat primary coronary artery endothelial cells were isolated, cultured and identified. Homocysteine (HCY) was used to co-incubate 24 h for coronary heart disease then cells were grouped. The target gene of miR-22 was predicted and identified with the dual-luciferase reporter gene assay. miR-22 expression, NLRP3 and caspase-1 expression were detected by qRT-PCR and Western blot. Cell viability was detected by MTT. Cell

apoptosis was determined by using Hoechst 33258. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and IL-18 levels were detected by ELISA.

**Results** AS rats exhibited higher TC, TG, LDLC and Ca<sup>2+</sup> concentrations than normal rats ( $P < 0.01$ ). And miR-22 was down-regulated in AS rats, while NLRP3 and caspase-1 were up-regulated ( $P < 0.05$ ). NLRP3 was identified as the target gene of miR-22. Compared with the blank group, miR-22 was increased, NLRP3 and caspase-1 were decreased in the miR-22 mimic group. NLRP3 and caspase-1 were enhanced in the miR-22 inhibitor group. The miR-22 overexpression showed higher cell viability, decreased apoptotic cells, reduced IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 levels and elevated IL-10 level ( $P < 0.05$ ). The inhibition of miR-22 reduced cell viability, induced cell apoptosis, up-regulated IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-18 levels and down-regulated IL-10 level ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** miR-22 plays a protective role in myocardial microvascular endothelial cells by targeting the NLRP3 gene, reducing the apoptosis of myocardial microvascular endothelial cells and decreasing the expression of proinflammatory cytokines in rats with coronary heart disease.

**Key words** coronary heart disease; miR-22; NLRP3 gene; endothelial cells; inflammation factors

(上接第 667 页)

## Effect of resveratrol inhibits the proliferation of cervical cancer cells with autophagy *in vitro*

Sun Chuanming<sup>1,2</sup>, Fang Wenxiu<sup>2</sup>, Zhou Rongsheng<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

<sup>2</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology, The Third People's Hospital of Hefei City, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the inhibitory effect of resveratrol(Res) on the proliferation and autophagy of human cervical carcinoma HeLa cells and its mechanism. **Methods** *In vitro* cultivation of cervical carcinoma HeLa cells which were divided into control group( with the only added medium being RPMI-1640), Res treated group( in which Res was added with concentrations of 5  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$ ). The rates of the inhibitory effect on the proliferation of each group of HeLa cells were determined by MTT method, the apoptosis of HeLa cells after being treated with different concentrations of Res was determined by Hoechst 33258, the expression of LC3 A/B in HeLa cells after being treated with different concentrations of Res was determined by immunofluorescence method, the expression of proteins p62 and Beclin-1 related autophagy was determined by Western blot method. **Results** Compared with control group, the rates of inhibitory effect on the proliferation in HeLa cells which were treated by Res with different concentrations of 5  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$  increased gradually ( $P < 0.01$ ); the apoptosis in HeLa cells increased significantly. Under the fluorescence microscope, more green fluorescence of LC3 A/B were distributed in cytoplasm of HeLa cells after being treated by Res with different concentrations of 30  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$ ; 48 hours later Res treated HeLa cells, the expression of p62 decreased gradually with the increase of the concentration of Res, while the expression of Beclin-1 increased gradually. **Conclusion** Res *in vitro* can inhibit the proliferation of HeLa cells and induce apoptosis, and its mechanism may be related to the autophagy enhancement of HeLa cells.

**Key words** cervical carcinoma; resveratrol; proliferation; autophagy; apoptosis