·实验研究·

miR-146 在湿性 ARMD 中抑制 IL-6 表达的研究

郝 义[1],孙 笑[1],刘玉秋[1],赵 允[2],王 禹[1]

作者单位:[1](113006)中国辽宁省抚顺市眼病医院;[2](200031)中国上海市,上海生命科学研究院
作者简介:郝义,主治医师,研究方向:眼科学基础。
通讯作者:王禹,硕士,主任医师,研究方向:眼科学基础. 13941353588@163.com
收稿日期:2016-08-01 修回日期:2017-03-14

Expression of IL-6 inhibited by miR-146 in the wet age-related macular degeneration

Yi Hao[1], Xiao Sun[1], Yu-Qiu Liu[1], Yun Zhao[2], Yu Wang[1]

[1]Fushun Ophthalmology Hospital, Fushun 113006, Liaoning Province, China; [2]Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China
Correspondence to: Yu Wang. Fushun Ophthalmology Hospital, Fushun 113006, Liaoning Province, China. 13941353588@163.com
Received:2016-08-01 Accepted:2017-03-14

Abstract

• AIM: To discuss the correlation between the expression of miR-146 and aging retinal pigment epithelium (RPE), and to study the relationship between miR-146 and expression of IL-6 in RPE, especially in age-related macular degeneration (ARMD).

• METHODS: The expressions of miR-146 and IL-6 were examined in RPE in mice aged from 2mo to 24mo by qRT-PCR. Then, the expressions of miR-146 and IL-6 in RPE of wet ARMD patient were examined also. Finally, the effect of overexpression of miR-146a in APRE-19 cell line on expression of IL-6 was checked.

• RESULTS: MiR-146 was positive correlated with age, and the expression of IL-6 had no change in aging RPE. However, the expression of miR-146 decreased and IL-6 increased in RPE of ARMD. In cultured APRE-19 cells, overexpression of miR-146 inhibited the expression of IL-6 induced by TNF-α.

• CONCLUSION: Our results suggest that there is a biological correlation among the development of ARMD, expression of IL-6 and miR-146 in aging RPE. It also suggests that, on the one hand, regulation between IL-6 and miR-146 may be important for the clinical treatment, on the other hand, both IL-6 and miR-146 can be potential molecular markers for diagnosing ARMD.

• KEYWORDS: miR-146; IL-6; aging; wet age-related macular degeneration

Citation: Hao Y, Sun X, Liu YQ, *et al*. Expression of IL-6 inhibited by miR-146 in the wet age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi* (*Int Eye Sci*) 2017;17(4):631-634

摘要

目的:探讨 miR-146 表达与眼球衰老的相关性,以及年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)发生过程中 miR-146 与炎症因子表达的相关性及其可能的机制。

方法:分离鼠龄为 2~24mo 的小鼠 RPE,采用 qRT-PCR 的方法检测 RPE 中 miR-146a/b 和 IL-6 mRNA 的表达水平。检测来自于 ARMD 患者眼球中 miR-146a 及 IL-6 mRNA 的表达水平。在 ARPE-19 细胞系中检测 miR-146a 过表达对 IL-6 基因表达水平的影响。

结果:miR-146 的表达在自然衰老的小鼠 RPE 中与年龄呈现正相关,而 IL-6 无变化。在 ARMD 患者中,miR-146a mRNA 表达水平下降,IL-6 mRNA 表达水平上升。在人 ARPE-19 细胞中的实验表明,miR-146a 过表达抑制了由 TNF-α 所诱导的 IL-6 的表达。

结论:在湿性 ARMD 中,miR-146a 与 IL-6 mRNA 表达水平有可能与 ARMD 的发生呈相关性,暗示 IL-6 和 miR46a 有可能作为生物分子标志物在未来的 ARMD 诊断中发挥作用。

关键词:miR-146;IL-6;衰老;湿性老年性黄斑变性
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.4.10

引用:郝义,孙笑,刘玉秋,等. miR-146 在湿性 ARMD 中抑制 IL-6 表达的研究. 国际眼科杂志 2017;17(4):631-634

0 引言

人体组织、器官内细胞的老化会造成包括年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)在内的多种老年性疾病的发生[1-2]。研究表明,ARMD 可能是由局部组织损伤导致血-视网膜屏障破坏以及循环系统中炎症因子的释放所导致的一种持续性的慢性炎症疾病[3-4]。研究同时表明,MicroRNA(miRNA 或 miRs,微小 RNA)可以通过调控多种基因的 mRNA 水平在机体的衰老过程中发挥作用[5-7]。miRNA 表达在机体中存在组织特异性[8],其中的 miR-146 家族的 miR-146a 是与年龄相关的、涉及血管重塑的生物标志物[9-17],可受到白细胞介素-1β(Interleukin-1β, IL-1β)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF-α)诱导,并负调控 IL-6 和 IL-8 的表达。但是,miR-146a 在眼球衰老,特别是视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)衰老过程中的角色以及其与 ARMD 的生物学相关性仍然未知。本研究检测了 miR-146a/b 在小鼠 RPE 中表达水平与年龄的相关性,以及在湿性 ARMD 患者中 miR-146a 与 IL-6

表达的负相关性,发现在 ARPE-19 细胞中,miR-146a 可以抑制 IL-6 的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 选用 15 只 C57BL/6J 雄性小鼠(购自上海南方模式动物中心),在 SPF 级实验室(specific pathogen Free,SPF,无特定病原体)中,小鼠饲养在 21℃,12h 亮、12h 暗循环条件下。小鼠可以自由进食和饮水。饲养 2、8、12、18、24mo 小鼠各 3 只,摘除眼球并分离 RPE。人体眼球摘自 75 岁晚期 ARMD 患者(该患者因外伤需要摘除眼球,并同意进行科学实验)。DME/F12 培养基(Sigma 公司,D9785),人类 PRE 细胞系(ARPE-19 细胞系)购自 ATCC(编号:CLR-2302)。Lipofectamine RNAi MAX(Invitrogen 公司,13778075)。miR-146a 及对照类似物由上海 GenePharma 公司合成。对照类似物为:顺义链:5'-pfUsfUfCfUfCfCGAAfCGfUGfUfCAfCsGfUsTsT-3';反义链:5'-Chol-sAsfCGfUGAfCAfCGfUfUfCGGAGAAsTsT-3'(f:2'-deoxy-2'-fluro nucleotides,胆固醇;p:磷酸基团,磷硫酰连接)。miR-146a 类似物:顺义链:5'-p-fUsGAGAAfCfUGAAfUfUfCfCAfUGGGsfUsfU-3';反义链:5'-CholsfCsfCfCAfUGGAAfUfUfCAGfUfUfCfUfCAsfUsfU-3'。miR-146b 类似物:顺义链:5'-p-fUsGAGAGfCfUGAGfUfUfCfCAfUGGGsfUsfU-3';反义链:5'-CholsfCsfCfCAfUAGAGfUfUfCAGfUfUfCfUfCAsfUsfU-3'。mRNA 及 miRNA 定量 RT-PCR 引物:IL-6:5'-CAC ACA GAC AGC CAC TCA CC-3' 及 5'-TTT TCT GCC AGT GCC TCT TT-3';对于 miR-146a 及 miR-146b 的引物购自于 Quanta Biosciences。肿瘤坏死因子 TNF-α 购自 Sigma(产品编号:T0157)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠和人体 RPE 组织的制备 视网膜组织收集于 2、8、12、18、24mo 雄性小鼠各 3 只,由二氧化碳过量处死后,立即摘除眼球。根据参考文献所描述的实验方法摘取双侧眼球,沿边缘切开,将睫状体和晶状体摘除,分离 RPE[18]。摘自 75 岁晚期 ARMD 患者的眼球采用同样方法分离 RPE,并进一步分离 ARMD 病变区域及周围区域。

1.2.2 ARPE-19 细胞的培养、miRNA 类似物的转染及 TNF-α 处理 人 ARPE-19 细胞系培养在 DME/F-12 培养基中,在其中添加 100mL/L FBS。根据文献描述的方法对人 ARPE-19 细胞进行 miRNA 类似物转染[19]:将 4μL 20μmol 的 miRNA 类似物或者对照类似物与 4μL 的 Lipofectamine RNAi MAX 分别加入 50μL optiMEM 之中。在转染 6 孔板之前将 Lipofectamine 与 miRNA 类似物混合 5min 并静置 25min。转染 72h 之后,采用终浓度为 10ng/mL 的 TNF-α 处理人 ARPE-19 细胞。处理 24h 后,收取细胞,分别提取总 mRNA。

1.2.3 RNA 分离纯化及 qRT-PCR 来自于组织或 ARPE-19 细胞的总 RNA 采用 TRIzol 试剂根据产品说明书描述的方法进行分离纯化:在样品中加入 1 个体积的异丙醇并在制备 RNA 之前在-80℃中放置 15min。mRNA 和 miRNA 定量 RT-PCR(qRT-PCR)采用 qScript™ cDNASynthesis 及 microRNA Quantification System 试剂盒进行。在反应混合物包括:10ng 模板,正向引物及反向引物各 0.8μL,10μL 2×qPCR Mix,ROX 0.4μL,采用无 RNA 酶的 DEPC 水定容至 20μL。采用 LightCycler(Roche 公司)PCR 仪进行标准 PCR 反应。每次实验均至少重复 3 次。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。研究中测试的数据经 W 检验呈正态分布,同时采用 Levene 法对每组数据的平均值之间进行方差齐性检验。各个月龄的 RPE 中 miR-146a, miR-146b 及 IL-6 表达水平分别与对照组(2 月龄)的相应表达水平进行 P 值检测。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-146 在小鼠 RPE 中的表达与年龄呈正相关 采用分离自不同月龄小鼠的 RPE,提取 mRNA,进一步采用 qRT-PCR 的方法检测在 RPE 中 miR-146a/b 及 IL-6 表达水平变化。结果显示,与 2mo 小鼠为对照,在鼠龄为 8 月龄的样品中,miR-146 的表达开始增加。在 18 月龄及 24 月龄的样品中 miR-146,特别是 miR-146a 的表达有显著增加(图 1),为 2 月龄小鼠表达量的 8.2 倍和 23.5 倍,差异具有统计学意义($P<0.001$)。而 miR-146b 在 18 月龄及 24 月龄的样品中为 2 月龄小鼠的 3.1 倍和 5.3 倍,差异具有统计学意义($P_{18\text{月龄}}<0.05$, $P_{24\text{月龄}}<0.001$)。同时,未见 IL-6 在 RPE 中的表达与年龄呈现相关性(图 1)。

2.2 湿性 ARMD 患者中 miR-146a 表达特异性减少,IL-6 表达特异性增加 来自晚期湿性 ARMD 患者眼球的 ARMD 区域及同一眼球的非 ARMD 区域的 qRT-PCR 检测结果表明,与正常部位相比,ARMD 区域的 miR-146a 表达较低(图 2)。正常部位的 miR-146a 表达水平是 ARMD 区域的 14.5 倍。结果同时显示,相比于正常区域,患者眼球的 ARMD 区域内 IL-6 表达水平较高,为正常部位的 20 倍(图 2)。由于在小鼠实验中的结果表明,与 miR-146a 相比,miR-146b mRNA 水平变化相对不明显,所以没有针对 miR-146b 进行进一步检测。结果显示,在病灶中 IL-6 表达明显高于旁侧,而 miR-146 的表达明显低于旁侧。

2.3 在人 ARPE-19 细胞中,miR-146 可以抑制 IL-6 的表达 采用 TNF-α 处理人 ARPE-19 细胞,可以有效诱导 IL-6 表达水平上调。在此条件下,对照 miRNA 类似物不能抑制 IL-6 表达,但是 miR-146a 过表达可以有效地抑制 IL-6 的表达(图 3)。与对照相比,miR-146a 可以将由 TNF-α 所诱导的 IL-6 表达水平由 5 倍降至 0.3 倍。在 ARPE-19 细胞系中 TNF-α 可以有效诱导 IL-6 的表达。但是,miR-146 的过表达可以有效抑制 IL-6 的表达水平。

3 讨论

ARMD 是一种典型的年龄相关的视网膜退行性疾病[20]。虽然 ARMD 的发生受到个体差异、环境因素、遗传因素等多种因素的影响,但总体来说,ARMD 的发生伴随着个体年龄的增加其发病的几率呈现显著的上升趋势[2],同时由于社会老龄化的加剧,人群中 ARMD 发病的比例也呈现上升趋势。已有的病理学调查表明,年龄在 75 岁以上的人,至少一只眼出现早期 ARMD 的发病率为 24%,出现晚期 ARMD 的发生率为 8%。由于 ARMD,特别是湿性 ARMD,严重地影响了人们的生活质量,因此也越来越受到人们的重视。

miRNA 自从被发现以来,其在机体中的重要作用已经越来越多受到重视[5]。同时,研究也表明,众多的 miRNA 不仅仅在正常的发育早期及癌症的发生发展过程中起到重要作用,同时也与机体多个组织、器官的老化

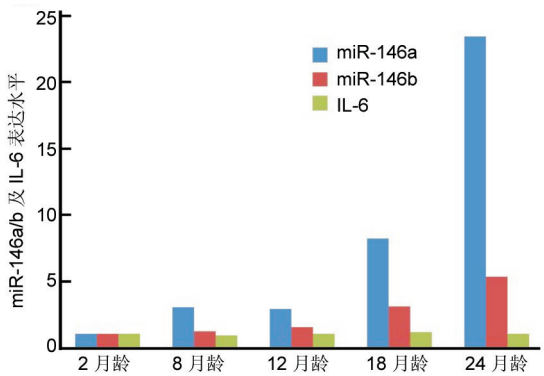

图 1 miR-146 在 RPE 中的表达与年龄呈正相关,而未见 IL-6 与年龄的相关性。

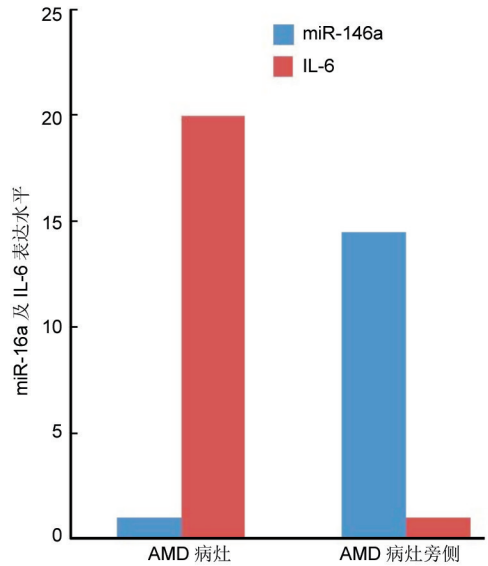

图 2 湿性 ARMD 中 miR-146 及 IL-6 基因表达水平的测定。

过程密切相关,在机体衰老过程中呈现显著的上调或下调的变化。因此,其中的很多种 miRNA 已经被确定为细胞、组织或机体衰老的调节因子或标志物[7-8]。已有研究表明,在眼的衰老过程中,miR-34a 的表达在视网膜上皮细胞中随着年龄的增加在初期存在显著上升,但后期有逐渐稳定并略有下降[9]。但直至目前为止,miRNA 与眼睛衰老之间的关系,特别是在 ARMD 中扮演的角色还不是很清楚。miR-146 作为 miRNA 的一种,已经被发现在多个组织器官中与衰老有关。特别是其中的 miR-146a 在衰老的人成纤维细胞、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)和人小梁网细胞(human trabecular meshwork cell,HTM Cell)中最显著地上调 miRNA[10,16-17]。但是,它是否同样在眼衰老过程中起作用,目前还未知。

白细胞介素是机体炎症反应中的重要因子。研究发现,在湿性 ARMD 患者中脉络膜新生血管中存在巨噬细胞、淋巴细胞及中性粒细胞,而 IL-6 和 IL-12 等因子在房水中的水平与湿性 ARMD 密切相关[21-22]。miR-146 可以由细菌脂多糖(LPS)和炎性细胞因子 IL-1β 和 TNF-α 诱导表达,同时 miR-146 可以在上皮细胞中负调控 IL-6 和 IL-8 的表达[23-24]。

虽然炎症在 ARMD 发生发展过程中起到重要作用,而且 miR-146 表达与年龄相关并调控炎症因子的表达,

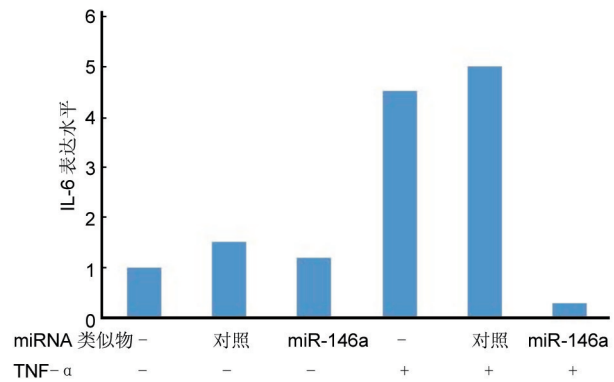

图 3 在 ARPE-19 细胞系中 miR-146 抑制了 TNF-α 诱导的 IL-6 基因表达。

但是 miR-146 是否与眼衰老过程有关以及其在 ARMD 过程中是否调控炎症因子(如 IL-6)的表达在国内外的研究中还未见报道。为此,本研究检测 miR-146 在眼球衰老,特别是视网膜色素上皮细胞(RPE)衰老过程中的角色,其与 ARMD 的生物学相关性以及在 RPE 细胞中 miR-146 对 IL-6 表达的调控作用。我们的结果显示,与在其他组织中的结果相类似[7],在 RPE 中 miR-146 的表达同样与年龄呈现相关性。随着年龄的逐步增加,miR-146a/b,特别是其中 miR-146a 在衰老的 RPE 中的表达逐渐增加,与年龄呈现正相关,显示了 miR-146a 在 RPE 中的重要性。因此,我们也在后续的实验中将研究重点集中在 miR-146a。同时,来自小鼠的实验结果也表明,炎症因子 IL-6 的表达在小鼠正常衰老的眼球中无变化(图 1)。但是,临床的样本显示,在湿性 ARMD 区域,IL-6 的表达远高于非 V 区域,而同时在湿性 ARMD 区域中,miR-146a 的表达远低于非 ARMD 区域(图 2),显示 miR-146a 在 ARMD 中的表达与 IL-6 呈现负相关。考虑到在小鼠 RPE 正常衰老过程中 IL-6 不表达,而 miR-146a 的表达与年龄呈正相关,暗示在衰老过程及慢性炎症引起的 ARMD 中,miR-146a 的表达受到了抑制,从而不能有效抑制炎症因子的产生,进而造成了 ARMD 的发生发展。在人 APRE-19 细胞系中的实验结果验证了在 RPE 中 miR-146a 与 IL-6 表达的相关性,即 miR-146a 可以特异性抑制由 TNF-α 所诱导的 IL-6 的表达(图 3)。在生理条件下及 ARMD 病变中,何种因子对 miR-146 的表达起到决定作用仍然是未知的,需要在未来的实验中进行深入研究。

总之,我们的研究发现在小鼠模型中 miR-146a 在 RPE 中显示与年龄相关的表达上调。而在湿性 ARMD 中 miR-146a 的表达较低,同时 IL-6 的表达呈现高表达。在人 APRE-19 细胞系中,炎症因子 TNF-α 诱导的 IL-6 的表达可以被 miR-146a 所抑制。我们的实验数据提示 miR-146a 与 IL-6 和湿性 ARMD 的发生呈现负相关。这些结果暗示 IL-6 及 miR46a 有可能作为生物分子标志物在未来的 ARMD 诊断中发挥作用。

参考文献

1 Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, *et al*. Inflamm-aging: An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-254

2 Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, *et al*. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol*

2004;122(5):564-572
3 Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-information in the aging retina. *Prog Retin Eye Res* 2009;28(5):348-368
4 Nussenblatt RB, Ferris F. Age-related macular degeneration and the immune response: implications for therapy. *Am J Ophthalmol* 2007;144(4):618-626
5 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2): 281-297
6 Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005;132(21):4653-4662
7 Smith-Vikos T, Slack FJ. MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci* 2012;125(1):7-17
8 Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, *et al*. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 2003;421(6919):182-187
9 Smit-McBride Z, Forward KI, Nguyen AT, *et al*. Age-dependent increase in miRNA-34a expression in the posteriorpole of the mouse eye. *Mol Vis* 2014;20(6):1569-1578
10 Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S,*et al*. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging* (*Albany NY*) 2009;1(4):402-411
11 Moschos SA, Williams AE, Perry MM, *et al*. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics* 2007;8(2):240
12 Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, *et al*. NF-kappa B dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(33):12481-12486
13 Perry MM, Moschos SA, Williams AE, *et al*. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* 2008;180(8):5689-5698
14 Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, *et al*. Differential regulation of microRNA-146a andmicroRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells byinterleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma. *Mol Vis* 2013;19(3):737-750
15 Olivieri F, Lazzarini R, Recchioni R, *et al*. MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling. *Age* 2013;35(4):1157-1172
16 Olivieri F, Rippo MR, Monsurrò V, *et al*. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev* 2013;12(4):1056-1068
17 Li G, Luna C, Qiu J, *et al*. Modulation of inflammatory markers by miR-146a during replicative senescence intrabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(6):2976-2985
18 Zhao Y, Hong DH, Pawlyk B, *et al*. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):3965-3970
19 Hanus J, Zhang H, Wang Z,*et al*. Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis* 2013;4:e965
20 Zhang Z, Zhang Y, Sun XX, *et al*. microRNA-146ainhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2015;14:5
21 Grossniklaus HE, Green WR. Histopathologic and ultrastructural finding of surgically excised choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1988;116(6):745-749
22 Jonas JB, Tao Y, Neumaier M. *et al*. Cytokine concentration in aqueous humour of eues with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2012;90(5):381-388
23 Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, *et al*. NF-kappaB dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(33):12481-12486
24 Perry MM, Moschos SA, Williams AE, *et al*. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* 2008;180(8):5689-5698