

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.09.028

◆ 校庆约稿 ◆



张全波

专家简介

张全波(1979-),男,博士,留美博士后,教授,博士研究生导师,川北医学院附属医院院长助理、医务部副部长。2003年毕业于川北医学院,2011年毕业于四川大学获博士学位。四川省卫健委第十四批学术技术带头人,获四川省医学科技奖二等奖1项,南充市科技奖一等奖1项。主要从事老年慢性疾病临床及基础研究,痛风性关节炎免疫调节机制研究。以项目负责人主持国家自然科学基金项目2项,四川省科技厅、教育厅及南充市科技局项目共6项,INT J ONCOL 等杂志审稿人,在 Arthritis Rheumatol、Dis Esophagus 等国际、国内专业期刊发表论文50余篇。

miR-182-5p 和自噬在外周血单个核细胞和 THP-1 细胞 痛风性关节炎模型炎症反应中的研究

黄玉琴^{1,2,5}, 谢艳^{1,2}, 李涛^{1,2}, 黄倩^{1,2}, 青玉凤^{1,3}, 郑建雄^{1,3,4}, 张全波^{1,2}

(川北医学院附属医院,1. 高尿酸血症与痛风研究所;2. 老年科;3. 风湿免疫科;4. 川北医学院临床医学系;5. 仪陇县人民医院,四川南充 637000)

【摘要】目的: 探讨 miR-182-5p 及自噬参与原发性痛风性关节炎发生的可能机制。**方法:** 采用尿酸盐(MSU)晶体刺激健康男性外周静脉血建立痛风炎症模型,在 0、1、2、4、6、8 h 分离血浆及提取外周血单个核细胞(PBMCs)。培养 THP-1 细胞,给予 MSU 晶体刺激建立痛风炎症模型,分别在 0、3、6、9、12 h 时间点收集细胞及上清液。实时荧光定量 PCR 检测 PBMC 和 THP-1 中 IL-1 β mRNA、linc00173、linc00963、miR-182-5p 和 LC3-2 mRNA 水平;Western Blot 技术检测 IL-1 β 蛋白和 LC3-2 蛋白表达水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)技术检测血浆和上清液中 IL-1 β 蛋白浓度。**结果:** MSU 刺激健康男性外周血后 PBMCs 中 IL-1 β mRNA 水平在 1、2、4、6、8 h 较 0 h 增高($P < 0.05$),血浆 IL-1 β 蛋白浓度水平在 1、2、4、6 h 较 0 h 增高($P < 0.05$),PBMCs 中 IL-1 β 蛋白水平在 2、4、6、8 h 较 0 h 增高($P < 0.05$)。PBMCs 中 linc00173 水平在 1、2、4 h 较 0 h 增高($P < 0.05$),linc00963 水平在 1、2 h 较 0 h 增高($P < 0.05$),miR-182-5p 水平在 4 h 较 0 h 降低($P > 0.05$),在 8 h 较 0 h 增高($P < 0.05$)。PBMCs 中 LC3-2 mRNA 水平在 4、6、8 h 较 0 h 增高($P < 0.05$);LC3-2 蛋白水平在 6、8 h 较 0 h 增高($P < 0.05$)。MSU 刺激 THP-1 细胞:THP-1 细胞中 IL-1 β mRNA 水平和上清液 IL-1 β 蛋白浓度在 3、6、9、12 h 较 0 h 增高($P < 0.05$),THP-1 细胞 IL-1 β 蛋白水平在 9、12 h 较 0 h 增高($P < 0.05$)。linc00173 水平在 9、12 h 较 0 h 增高($P < 0.05$),miR-182-5p 水平在 6 h 较 0 h 增高($P < 0.05$)。LC3-2 mRNA 水平在 6、9、12 h 较 0 h 增高($P < 0.05$),LC3-2 蛋白水平在 12 h 较 0 h 增高($P < 0.05$)。**结论:** miR-182-5p 可能与 linc00173 和 linc00963 相互作用,通过调控自噬参与痛风炎症反应。

【关键词】 关节炎;痛风性;miR-182-5p;自噬

【中图分类号】 R589.7 **【文献标志码】** A

Study of miR-182-5p and autophagy in inflammatory response of peripheral blood mononuclear cells and THP-1 cells in gouty arthritis model

HUANG Yu-qin^{1,2,5}, XIE Yan^{1,2}, LI Tao^{1,2}, HUANG Qian^{1,2}, QING Yu-feng^{1,3}, ZHENG Jian-xiong^{1,3,4}, ZHANG Quan-bo^{1,2}

(1. Research Center of Hyperuricemia and Gout; 2. Department of Geriatrics; 3. Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 4. Department of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College; 5. Yilong People's Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81974250);南充市科技项目(20SXQT0308)

作者简介: 黄玉琴(1987-),女,硕士,主治医师。E-mail:597388121@qq.com

通讯作者: 张全波。E-mail:quanbozhang@126.com

【Abstract】 Objective: To investigate the possible role of miR-182-5p and autophagy in the pathogenesis of primary gouty arthritis. **Methods:** 24 ml(4ml/tube) of peripheral venous blood from 5 healthy controls were selected separately and administered with monosodium urate(MSU) crystals. Plasma and peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were isolated at 0,1,2,4,6 and 8 h respectively. The THP-1 was stimulated with MSU crystal for 0,3,6,9 and 12 h. Then cells and supernatants were collected. The expression of IL-1 β mRNA, linc00173, linc00963, miR-182-5p and LC3-2 mRNA were detected by RT-qPCR. The concentration of IL-1 β in the supernatant by ELISA. The protein expression levels of LC3-2 and IL-1 β by Western-blot. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the protein concentration of IL-1 β in plasma and supernatant. **Results:** The levels of IL-1 β mRNA in PBMCs after MSU stimulation of the peripheral blood of healthy males were significantly higher at 1,2,4,6 and 8 h compared with 0 h ($P < 0.05$). The plasma IL-1 β protein concentration levels were significantly higher at 1,2,4 and 6 h compared with 0h ($P < 0.05$), and the protein levels of IL-1 β in PBMCs were significantly higher at 2,4,6 and 8 h compared with 0 h ($P < 0.05$). The levels of linc00173 in PBMCs were significantly increased at 1,2 and 4 h compared with 0 h ($P < 0.05$), and the levels of linc00963 were significantly increased at 1 and 2 h compared with 0 h ($P < 0.05$), and the levels of miR-182-5p were decreased at 4 h compared with 0 h ($P > 0.05$), but increased at 8 h compared with 0 h ($P < 0.05$). LC3-2 mRNA levels in PBMCs were significantly increased at 4,6 and 8 h compared with 0 h ($P < 0.05$), and LC3-2 protein levels were significantly increased at 6 and 8 h compared with 0 h ($P < 0.05$). IL-1 β mRNA levels and supernatant IL-1 β protein concentrations after MSU stimulation of THP-1 cells were significantly higher at 3,6,9 and 12 h compared with 0 h ($P < 0.05$), and IL-1 β protein levels in THP-1 cells were significantly higher at 9 and 12 h compared with 0 h ($P < 0.05$). The level of linc00173 was significantly increased at 9 and 12 h compared with 0 h ($P < 0.05$), and the level of miR-182-5p was significantly increased at 6 h compared with 0 h ($P < 0.05$). LC3-2 mRNA levels were significantly higher at 6,9 and 12 h compared with 0 h ($P < 0.05$), and LC3-2 protein levels were significantly higher at 12 h compared with 0 h ($P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-182-5p may interact with linc00173 and linc00963, and participate in gout inflammation by regulating autophagy.

【Key words】 Arthritis; Gouty; MiR-182-5p; Autophagy

痛风是机体持续高尿酸水平和尿酸盐(monosodium urate, MSU)晶体析出并沉积于关节、肌腱和/或其他组织器官中而引起组织损伤的一组临床综合征。急性痛风性关节炎(acute gout, AG)是MSU晶体沉积在骨关节、皮下及软组织中引起的急性和极度疼痛的一种严重表型炎症反应。研究证实,痛风的急性炎症反应与 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)4-核因子(nuclear factor, NF)- κ B 信号通路被激活,促进白细胞介素(IL)-1 β 等炎症因子释放密切相关^[1]。自噬是一个进化保守的,通过包绕隔离细胞质成分,包括受损的或功能减退的细胞器及错误折叠的蛋白质及大分子物质,并与溶酶体融合水解膜内成分的现象^[2]。研究^[3]发现原发性急性痛风性关节炎患者自噬通量增加、自噬被激活,提示自噬在调控痛风患者炎症反应过程中具有重要意义。

MiRNAs 是一个短的、小的、非编码 RNAs 家族。近年来研究发现,miRNA 可作为一种竞争性内源性 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)与 LncRNA 相互作用,参与靶基因的表达调控,并在多种疾病的发生发展中发挥重要的作用^[4]。最近,miR-182 在各种炎症性疾病中被发现。如 miR-182-5p 通过调节 TLR4/NF- κ B 信号通路来抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的炎症反应^[5],通过靶向 TLR4 抑制氧化低密度脂蛋白诱导的氧化应激^[6]。在小鼠关节炎模型中,使用 miR-182 拮抗剂可显著降低炎症和组织破坏的组织学评分^[7]。然而,miR-182-5p

在痛风中的作用仍然鲜为人知。综合数据库和芯片分析的结果,本研究通过对急性期痛风患者、间歇期痛风患者及健康对照者(各 5 例)的 PBMCs 全基因组表达芯片分析挑选出差异最显著的 miR-182-5p,再挑选出具有 miR-182-5p 识别序列的 linc00173 和 linc00963,拟通过模拟体内痛风发作过程,探讨 miR-182-5p 与自噬及痛风性关节炎可能存在的关联。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器及试剂 LightCycler[®] 96 PCR 仪(Roche 公司,瑞士),人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司),反转录试剂盒(Takara 公司,日本),实时荧光定量 PCR 试剂盒(Takara 公司,日本),Trizol 提取总 RNA 试剂盒(Invitrogen 公司,美国),低温高速离心机 5417R(Eppendorf 公司,美国),紫外分光光度计(Thermo fisher 公司,美国),RPMI 培养基(Thermo 公司,美国),胎牛血清(浙江天杭生物,中国),人白介素 1 β 检测试剂盒(USCN 公司,中国),GAPDH rabbit mAb(美国 Cell Signaling 公司),LC3-2 rabbit mAb(美国 Cell Signaling 公司),IL-1 β rabbit mAb(美国 Cell Signaling 公司),miR-182-5p primer(美国 GeneCopoeia 公司),U6 内参(美国 GeneCopoeia 公司),All-in-one TM miRNA qRT-PCR Detection Kit(美国 GeneCopoeia 公司),GAPDH 内参及自噬相关基因引物(上海生工生物工程有限公司,中

国)。

1.1.2 引物设计及合成 根据相关基因的 CDS 序

列,基因引物由上海生工生物工程公司设计及合成,基因序列。见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	片段大小(bp)	基因引物序列	
GAPDH	101	F:5' ATCGCCCACTTGATTTTGG3'	R:5' -GGATTGGTCGTATTGGGCG-3'
linc00173	117	F:5' -GACTCTCCAGGCAGGCACAT-3'	R:5' -ATCGTGAGTGCTCGGCTCAG-3'
linc00963	148	F:5' -AGGCCACTCTGCTACTGACC-3'	R:5' -CATGGGCTTCCAAGTCCGAT-3'
IL-1 β	132	F:5' -ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	R:5' -GTCGGAGATTCTAGTCTGGA-3'
LC3-2	145	F:5' -AAGGGCTTACAGCTCAATG-3'	R:5' -CTGGGAGGCATAGACCATGT-3'

IL-1 β :白细胞介素 1 β ;LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3。

1.2 方法

1.2.1 MSU 刺激健康男性外周静脉血 抽取 5 例健康男性外周静脉血 24 mL(4 mL/管),肝素钠抗凝,使用浓度为 100 μ g/mL MSU 刺激后置于含 5 % CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育,按照 0、1、2、4、6、8 h 不同时间点分离血浆及提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)进行下一步实验。

1.2.2 细胞培养 人髓系白血病单核细胞(THP-1)购自于 American Type Culture Collection,用含 10 % 胎牛血清的 RPMI 培养基培养,置于 37 $^{\circ}$ C 5 % CO₂ 培养箱中培养,视细胞生长情况 24 ~ 48 h 更换培养基,当细胞生长于培养皿中密度达到 70 ~ 80 % 时,1 200 rpm 离心 5 min 后弃去上清液,将重悬细胞按 1:3 的体积比传代。

1.2.3 THP-1 细胞痛风炎症造模 将 THP-1 细胞接种于 6 cm 培养皿内(细胞约 3.6×10^6 个/皿),待细胞融合至 70 ~ 80 % 时,用 100 ng/mL 佛波脂(37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 培养 48 h)诱导 THP-1 细胞成为贴壁的巨噬细胞。待细胞贴壁后弃培养基,加入新的含有 100 μ g/mL MSU 的培养基并置于含 5 % CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 0、3、6、9、12 h 后,收集细胞培养上清液 500 μ L,3 000 rpm 离心 10 min,留上清,弃沉淀。培养皿细胞用 PBS 液清洗 3 次,3 min/次,清除 MSU 后得巨噬细胞进行下一步实验。

1.2.4 RNA 的提取及检测 采用 Trizol 法提取 PBMC/THP-1 细胞中总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 浓度,选取吸光度为 1.8 ~ 2.0 用于反转录合成 cDNA。RT-qPCR 总体积为 20 μ L。反应体系:10 μ L Power SYBR Green PCR Master Mix,7.4 μ L 去离子水,正向及反向引物各 0.3 μ L,2 μ L cDNA。反应条件为:第一步:95 $^{\circ}$ C 30 s 1 个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 34 s 40 个循环。第二步:95 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15 s 1 个循环。每份标本均设 2 个复孔,反

应结束后作溶解曲线。以目的基因的 Ct 值减去内参的 Ct 值为 Δ Ct, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示目的基因 mRNA 表达的高低。采用 All-in-one 试剂盒进行反转录 miR-182-5p 为 cDNA,以 U6 为内参。PCR 反应体系:2 \times All-in-one qPCR Mix 10 μ L, All-in-one TM qPCR Primer(2 μ M) 2 μ L, Universal Adaptor PCR Primer 2 μ L, RNase free water 4.0 μ L, First-stand cDNA 2.0 μ L, 将上述 20 μ L 反应体系加入 96 孔 PCR 板中。在 LightCycler[®] 96 PCR 仪上按照 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 1 个循环;变性 95 $^{\circ}$ C 10 min,退火 60 $^{\circ}$ C 20 min,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,共 45 个循环。U6 作为内参照, Δ Ct = (目的基因 - 内参对照 U6) 的 Ct 值。目的基因序列相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.2.5 酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测 THP-1 培养基中及人上清液 IL-1 β 蛋白浓度 按照 USCN 公司生产的人 IL-1 β 酶 ELISA 试剂盒说明书使用, A 值用 SPSS 软件绘出标准曲线,计算各样本的值。

1.2.6 蛋白免疫印迹法(Western Blot) MSU 刺激 THP-1 和 PBMC 细胞后的 LC3、IL-1 β 蛋白水平的表达 向 THP-1 和 PBMC 细胞中加入含有 1 % PMSF 的 RIPA(强效)裂解液,取上清液,用 BCA 法进行蛋白定量。严格按照 Western Blot 方法操作,ELC 显色。用 Image J 软件对图片中条带的灰度值进行分化计算目的基因蛋白条带与 GAPDH 蛋白条带灰度值的相对比值,各组实验重复 5 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0、GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSU 刺激健康男性外周血 PBMCs

2.1.1 MSU 刺激后不同时间点 IL-1 β 表达水平比

较 经 MSU 刺激 0、1、2、4、6、8 h 后,6 组 IL-1 β mRNA 表达水平、IL-1 β 蛋白浓度及 IL-1 β 蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义 ($F = 88.559$ 、 351.325 、 51.086 , $P < 0.001$),且 1、2、4、6、8 h IL-1 β mRNA 水平均高于 0 h ($P < 0.05$),1、2、4、6 h IL-1 β 蛋白浓度均高于 0 h ($P < 0.01$),2、4、6、8 h IL-1 β 蛋白表达水平均高于 0 h ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 MSU 刺激后不同时间点 IL-1 β 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	RT-qPCR	ELISA	Western blot
0 h	0.06 \pm 0.02	13.7 \pm 10.3	0.13 \pm 0.06
1 h	16.15 \pm 2.51 $^{\Delta}$	295.0 \pm 47.6 $^{\#}$	0.20 \pm 0.04
2 h	22.63 \pm 3.94 $^{\Delta}$	337.8 \pm 96.1 $^{\Delta}$	0.32 \pm 0.01 $^{\#}$
4 h	4.93 \pm 1.81 $^{\#}$	2293.6 \pm 204.5 $^{\Delta}$	0.46 \pm 0.06 $^{\#}$
6 h	4.63 \pm 0.76 $^{\#}$	1551.2 \pm 143.5 $^{\Delta}$	0.70 \pm 0.07 $^{\Delta}$
8 h	3.54 \pm 0.43 *	34.1 \pm 45.8	0.51 \pm 0.04 $^{\#}$
<i>F</i> 值	88.559	351.325	51.086
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ 、 $^{\#}P < 0.01$ 、 $^{\Delta}P < 0.001$,与 0 h 相比。

2.1.2 MSU 刺激后不同时间点 linc00173、linc00963、miR-182-5p 及 LC3-2 mRNA 表达水平比较 经 MSU 刺激 0、1、2、4、6、8 h 后,6 组 linc00173、linc00963、miR-182-5p 及 LC3-2 mRNA 表达水平比较,差异有

统计学意义 ($F = 16.985$ 、 40.858 、 3.676 、 12.547 , $P < 0.05$),且 1、2、4 h linc00173 水平高于 0 h ($P < 0.05$),1、2 h linc00963 水平高于 0 h ($P < 0.01$),8 h miR-182-5p 水平高于 0 h ($P < 0.05$),4、6、8 h LC3-2 mRNA 表达水平高于 0 h ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 MSU 刺激后不同时间点 linc00173、linc00963、miR-182-5p 及 LC3-2 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	linc00173	linc00963	miR-182-5p	LC3-2
0 h	0.002 \pm 0.001	0.022 \pm 0.005	0.012 \pm 0.003	0.006 \pm 0.003
1 h	0.004 \pm 0.001 *	0.045 \pm 0.010 $^{\#}$	0.011 \pm 0.003	0.008 \pm 0.003
2 h	0.006 \pm 0.001 $^{\Delta}$	0.106 \pm 0.025 $^{\Delta}$	0.013 \pm 0.004	0.012 \pm 0.004
4 h	0.003 \pm 0.002 *	0.030 \pm 0.008	0.009 \pm 0.003	0.015 \pm 0.004 $^{\#}$
6 h	0.001 \pm 0.000	0.019 \pm 0.007	0.014 \pm 0.003	0.015 \pm 0.005 $^{\#}$
8 h	0.001 \pm 0.000	0.015 \pm 0.003	0.020 \pm 0.004 *	0.020 \pm 0.007 $^{\Delta}$
<i>F</i> 值	16.985	40.858	3.676	12.547
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.05	<0.01

* $P < 0.05$ 、 $^{\#}P < 0.01$ 、 $^{\Delta}P < 0.001$,与 0 h 相比。

2.1.3 MSU 刺激后不同时间 LC3-2 蛋白表达水平比较 经 MSU 刺激 0、1、2、4、6、8 h 后,6 组 LC3-2 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义 ($F = 6.643$, $P < 0.05$),且 6、8 h 表达水平高于 0 h ($P < 0.01$)。见表 4 及图 1。

表 4 MSU 刺激后不同时间点 LC3-2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
LC3-2	0.56 \pm 0.26	0.49 \pm 0.23	0.61 \pm 0.23	0.81 \pm 0.20	1.09 \pm 0.45 *	1.36 \pm 0.18 *	6.643	<0.05

* $P < 0.01$,与 0 h 相比。

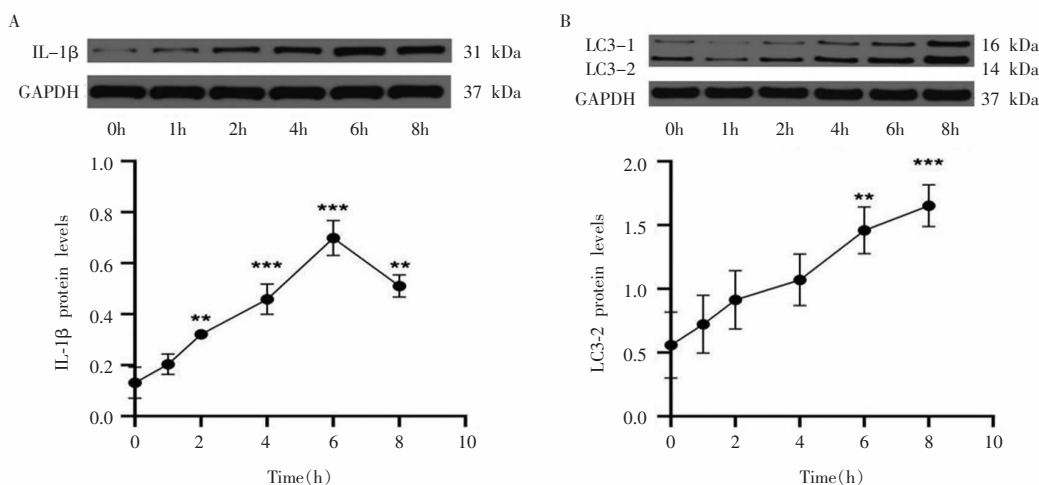


图 1 MSU 晶体刺激健康男性 PBMCs 后 IL-1 β 蛋白和 LC3-2 蛋白水平

A. MSU 晶体刺激 PBMCs 后,Western Blot 检测 IL-1 β 蛋白随着时间的变化的变化趋势;B. MSU 晶体刺激 PBMCs 后,Western Blot 检测 LC3-2 蛋白随着刺激时间的变化的变化趋势。*** $P < 0.001$,与 0 h 相比; ** $P < 0.01$,与 0 h 相比。

2.2 MSU 刺激 THP-1 细胞

2.2.1 MSU 刺激后不同时间 IL-1 β 表达水平比较

经 MSU 刺激 0、3、6、9、12 h 后,5 组 IL-1 β mRNA 表达水平、IL-1 β 蛋白浓度及 IL-1 β 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义 ($F = 14.792, 54.072, 7.806, P < 0.01$),且 3、6、9、12 h IL-1 β mRNA 水平及 IL-1 β 蛋白浓度高于 0 h ($P < 0.05$),9、12 h IL-1 β 蛋白水平高于 0 h ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 MSU 刺激后不同时间点 IL-1 β 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	RT-qRCR	ELISA	Westernblot
0 h	3.21 \pm 3.52	16.2 \pm 12.6	0.12 \pm 0.07
3 h	24.11 \pm 20.23 *	953.8 \pm 216.2 Δ	0.14 \pm 0.04
6 h	35.56 \pm 22.42 *	1188.1 \pm 308.2 Δ	0.22 \pm 0.04
9 h	121.84 \pm 56.97 #	1221.7 \pm 308.2 Δ	0.28 \pm 0.09 *
12 h	208.16 \pm 103.04 Δ	1688.3 \pm 187.0 Δ	0.43 \pm 0.12 #
F 值	14.792	54.072	7.806
P 值	<0.001	<0.001	<0.01

* $P < 0.05$ 、# $P < 0.01$ 、 $\Delta P < 0.001$,与 0 h 相比。

2.2.2 MSU 刺激后不同时间 linc00173、linc00963、miR-182-5p 及 LC3-2 mRNA 表达水平比较

经 MSU 刺激 0、3、6、9、12 h 后,5 组 linc00173、miR-182-5p 及 LC3-2 表达水平比较,差异有统计学意义 ($F = 4.084, 2.885, 21.173, P < 0.05$),且 9、12 h linc00173 水平高于 0 h ($P < 0.05$),6 h miR-182-5p

低于 0 h ($P < 0.05$),6、9、12 h LC3-2 mRNA 水平高于 0 h ($P < 0.01$);5 组 linc00963 表达水平比较,差异无统计学意义 ($F = 0.904, P = 0.477$)。见表 6。

表 6 MSU 刺激后不同时间点 linc00173、linc00963、miR-182-5p 及 LC3-2 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	linc00173	linc00963	miR-182-5p	LC3-2
0 h	0.002 \pm 0.001	0.040 \pm 0.042	0.020 \pm 0.017	0.240 \pm 0.085
3 h	0.006 \pm 0.006	0.023 \pm 0.029	0.018 \pm 0.010	0.449 \pm 0.100
6 h	0.012 \pm 0.014	0.008 \pm 0.004	0.041 \pm 0.025 *	0.821 \pm 0.355 #
9 h	0.023 \pm 0.021 *	0.026 \pm 0.026	0.014 \pm 0.008	1.348 \pm 0.652 Δ
12 h	0.037 \pm 0.029 #	0.030 \pm 0.035	0.016 \pm 0.013	2.081 \pm 0.459 Δ
F 值	4.084	0.904	2.885	21.173
P 值	<0.05	0.477	<0.05	<0.001

* $P < 0.05$ 、# $P < 0.01$ 、 $\Delta P < 0.001$,与 0 h 相比。

2.2.3 MSU 刺激后不同时间 LC3-2 蛋白表达水平比较

经 MSU 刺激 0、3、6、9、12 h 后,5 组 LC3-2 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义 ($F = 4.157, P < 0.05$)。见表 7 及图 2。

表 7 MSU 刺激后不同时间点 LC3-2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	F 值	P 值
LC3-2	0.64 \pm 0.08	0.82 \pm 0.18	0.88 \pm 0.24	1.01 \pm 0.16	1.28 \pm 0.14 *	4.157	<0.05

* $P < 0.05$,与 0 h 相比。

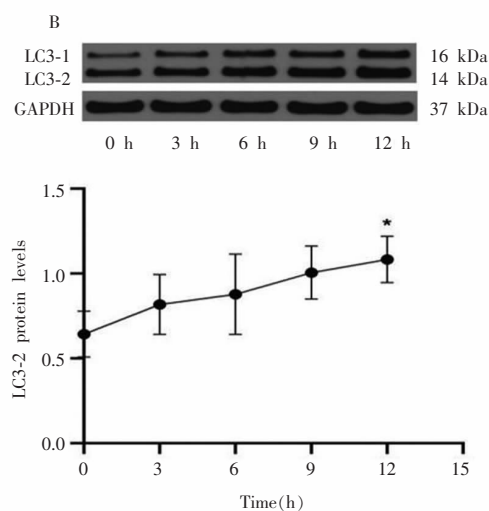
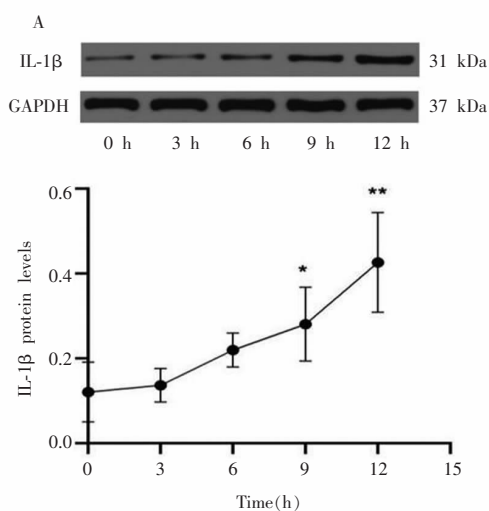


图 2 MSU 晶体刺激 THP-1 细胞 IL-1 β 蛋白和 LC3-2 蛋白水平

A. MSU 晶体刺激 THP1 细胞后,Western Blot 检测 IL-1 β 蛋白随着刺激时间的变化趋势;B. MSU 晶体刺激 THP1 细胞后,Western Blot 检测 LC3-2 蛋白随着刺激时间的变化趋势。* $P < 0.05$,与 0 h 相比;** $P < 0.01$,与 0 h 相比。

3 讨论

痛风是由于体内嘌呤代谢异常和/或尿酸排泄异常导致的,当尿酸超过血液饱和浓度并沉积在关节滑液中形成 MSU 时,会诱发急性关节炎发作。急

性痛风性关节炎是由免疫细胞和 MSU 之间的相互作用引起的炎症反应^[8]。痛风发作的机制尚未完全了解,但普遍认为中性粒细胞和巨噬细胞在其中起着至关重要的作用。MSU 刺激巨噬细胞表面的 TLR 激活 NF- κ B 信号通路产生炎症小体,然后,

MSU 通过促进细胞内 K^+ 外排激活 NLRP3 炎症小体从而诱导 IL-1 β 的产生^[9]。然而,自噬可降低 NLRP3 的蛋白表达减慢炎症反应^[10],自噬的丧失激活炎症小体介导的 IL-1 β 分泌^[11],表明自噬具有抑制炎症的能力。近年来,随着对非编码 RNA 的深入研究发现占转录组 98% 的非编码 RNA 的突变可能是导致疾病发生的“罪魁祸首”,甚至可能是某些疾病临床预后的标记分子。研究^[12]表明,miR-182-5p 与自噬相关基因相互作用参与疾病发展。中性粒细胞和巨噬细胞在痛风的发生中起重要作用,可能通过 miR-182-5p 介导痛风的炎症过程。

本研究发现,MSU 刺激健康男性 PBMCs 后,经 RT-qPCR、Elisa、Western blot 检测发现,IL-1 β 在不同时间点都有所升高,且随着刺激时间的延长有下降趋势,提示 MSU 已经诱导出炎症,且可能存在负反馈调节。miR-182-5p 在 8 h 明显升高,linc00173 和 linc00963 均在 2 h 达到最大值,随后下降,表明 miR-182-5p 可能参与了痛风炎症的调节,在痛风模型中下调 IL-1 β mRNA 水平的同时还下调了 linc00173 和 linc00963 的表达,但具体调控机制不详。miR-182 是 miR-183 簇的一员,在多种疾病中发挥重要作用和影响,如 miR-182 间皮瘤通过靶向叉头盒 O1 (Forkhead box O1, FOXO1) 增殖和侵袭^[13]。miR-182 通过调节 FOXO3 增加非小细胞肺癌细胞的抗辐射性^[14]。miR-182-5p 是酒精性肝炎中表达最高的 miRNA,miR-182-5p 的过度表达导致胆汁细胞中炎症介质的上调^[15]。

先天免疫途径在痛风的发病机制中起着关键作用,尤其是 NLRP3 型炎症小体的激活,导致 IL-1 β 和其他促炎细胞因子的释放。然而,自噬参与了 NLRP3 的降解。自噬通过抑制 NLRP3 炎症小体减轻线粒体潮湿所致的急性肺损伤^[16]。紫甘薯色素通过增强细胞自噬减弱了 NLRP3 炎症小体的活性,最终延缓了内皮细胞的衰老,从而改善了心血管并发症^[17]。研究发现,miR-182-5p 过表达增加了促炎基因诱导,启动了巨噬细胞增加自噬^[18]。本研究观察到,LC3-2 mRNA 和蛋白随着刺激时间的延长有所增加,提示自噬可能参与抑制 MSU 诱导的致炎因子的释放,并可能受 miR-182-5p 的调节,可能是痛风患者自发缓解的机制。

Hu 等^[19]发现,lncRNA ANRIL 通过 ceRNA 机制与 miRNA-122-5p 结合从而激活 NLRP3 炎症小体并加速尿酸诱导的炎症的发展。本研究首先确定了 linc00173、linc00963、miR-122-5p 和自噬与痛风相关。尽管没有清楚地证明它们在痛风中存在 ceRNA 机制,但大量研究表明 miRNA 可以与 lncRNA 或

mRNA 相互作用。因此,可以合理假设 ceRNA 的机制可能在痛风中发生。首先,综合数据库和芯片分析的结果,挑选出了痛风患者中差异最显著的 miR-182-5p,在挑选出具有 miR-182-5p 识别序列的 linc00173 和 linc00963。其次,通过功能学细胞实验进一步证实了它们在痛风中确实存在差异表达。这也是本小组未来要重点研究的内容。

此外,通过比较 THP-1 细胞经 MSU 刺激后上述指标的变化,结果发现,miR-182-5p、linc00173、linc00963 和 LC3-2 mRNA 都出现了不同的改变。虽然和健康男性 MSU 刺激结果变化趋势不完全一致,但更进一步说明痛风患者 ncRNA 和自噬存在异常,其在痛风炎症反应过程中发挥了重要的作用。而变化趋势不一致可能为 THP-1 为悬浮单核细胞,诱导为巨噬细胞需要佛波酯的干预,佛波酯对细胞存在一定毒性作用;THP-1 长期体外培养可能改变细胞活力。

综上,miR-182-5p 及自噬在痛风中起着重要作用,可能作为痛风关键病理过程的中央调节剂,用于痛风的诊断、治疗及预测临床结局,但目前尚不清楚其在痛风的发生及自发缓解中的具体机制,miR-182-5p 和自噬的特定作用仍然需要大量挖掘。

参考文献

- [1] Cronstein BN, Sunkureddi P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis [J]. *J Clin Rheumatol*, 2013, 19(1): 19–29.
- [2] Mizushima N. Autophagy: process and function [J]. *Genes & Development*, 2007, 21(22): 2861.
- [3] Qing Y, Zhou J, Zhang Q, et al. Association of TLR4 Gene rs2149356 polymorphism with primary gouty arthritis in a case-control study [J]. *Plos One*, 2013, 8(5): e64845.
- [4] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353–358.
- [5] Zhu M, Li Y, Sun K, et al. MicroRNA-182-5p inhibits inflammation in LPS-treated RAW264.7 cells by mediating the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(12): 5725–5734.
- [6] Qin S, Peng D, Lu J, et al. MiR-182-5p inhibited oxidative stress and apoptosis triggered by oxidized low-density lipoprotein via targeting toll-like receptor 4 [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 6630–6637.
- [7] Stittrich A, Haftmann C, Sgouroudis E, et al. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes [J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(11): 1057–1062.
- [8] Deng WM, Yang ZJ, Yue H, et al. Disulfiram suppresses NLRP3 inflammasome activation to treat peritoneal and gouty inflammation [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 15(2): 8–17.
- [9] So Alexander K, Martinon Fabio. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets [J]. *Nature reviews. Rheumatology*, 2017, 13(11): 639–647.
- [10] Han X, Sun S, Sun Y, et al. Small molecule-driven NLRP3 inflam-

- mation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy; implications for Parkinson disease [J]. *Autophagy*, 2019, 15 (11):1860 – 1881.
- [11] Santeford A, Wiley L, Park S, *et al.* Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease [J]. *Autophagy*, 2016, 12(10):1876 – 1885.
- [12] Liguori M, Nuzziello N, Licciulli F, *et al.* Combined microRNA and mRNA expression analysis in pediatric multiple sclerosis: an integrated approach to uncover novel pathogenic mechanisms of the disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(1):66 – 79.
- [13] Suzuki R, Amatya V, Kushitani K, *et al.* miR-182 and miR-183 Promote Cell Proliferation and Invasion by Targeting FOXO1 in Mesothelioma [J]. *Frontiers in Oncology*, 2018, 8(4):46.
- [14] Chen G, Yu L, Dong H, *et al.* MiR-182 enhances radioresistance in non-small cell lung cancer cells by regulating FOXO3 [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(2):137 – 143.
- [15] Blaya D, Coll M, Rodrigo-Torres D, *et al.* Integrative microRNA profiling in alcoholic hepatitis reveals a role for microRNA-182 in liver injury and inflammation [J]. *Gut*, 2016, 65(9):1535 – 1545.
- [16] Peng W, Peng F, Lou Y, *et al.* Autophagy alleviates mitochondrial DAMP-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. *Life Sciences*, 2021, 26(5):1133 – 1188.
- [17] Sun C, Diao Q, Lu J, *et al.* Purple sweet potato color attenuated NLRP3 inflammasome by inducing autophagy to delay endothelial senescence [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5):5926 – 5939.
- [18] Gregory DJ, Kramnik I, Kobzik L. Protection of macrophages from intracellular pathogens by miR-182-5p mimic-a gene expression meta-analysis approach [J]. *The FEBS journal*, 2018, 285(2):244 – 260.
- [19] Hu J, Wu H, Wang D, *et al.* LncRNA ANRIL promotes NLRP3 inflammasome activation in uric acid nephropathy through miR-122-5p/BRCC3 axis [J]. *Biochimie*, 2019, 157:102 – 110.