

· 实验研究 ·

骨髓来源树突状细胞 miR-338-3p 对实验性自身免疫性葡萄膜炎 Th17 细胞活化的影响

杨超 韦燕凯 魏瑞华 粘红

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 300384

通信作者:粘红, Email:nianhong@126.com

【摘要】 目的 探讨骨髓来源树突状细胞(BMDCs)中微小 RNA-338-3p(miR-338-3p)对实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)光感受器细胞间维生素 A 类结合蛋白 1-20(IRBP₁₋₂₀)特异性 Th17 细胞的调控。方法 分离野生型 C57BL/6 小鼠股骨和胫骨,冲洗骨髓腔得到骨髓细胞,利用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白细胞介素(IL)-4 定向诱导分化为 BMDCs。诱导培养第 5 天,将未成熟的 BMDCs 分为 miR-338-3p 拟似物转染组和拟似物阴性对照组,分别转染 miR-338-3p 拟似物和拟似物阴性对照。转染后 24 h,加入 100 ng/ml 脂多糖刺激 BMDCs 成熟。采用实时荧光定量 PCR 检测 BMDCs 中 miR-338-3p 及 IL-6、IL-23、IL-1 β mRNA 表达。采用 IRBP₁₋₂₀、弗氏不完全佐剂(IFA)及结核分枝杆菌 H37Ra 主动免疫小鼠诱导 EAU 模型,免疫后第 13 天,分离 EAU 小鼠脾脏及淋巴结 T 细胞,分别将 miR-338-3p 拟似物转染组和拟似物阴性对照组 BMDCs 与 T 细胞在含有 IRBP₁₋₂₀ 的培养基中共培养,Th17 细胞条件诱导,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测共培养上清液中 IL-17 质量浓度;实时荧光定量 PCR 检测共培养细胞中维甲酸相关核孤儿受体 γ t(ROR γ t)、IL-17 mRNA 相对表达量;流式细胞仪检测共培养细胞中 IL-17⁺ 细胞比率。此外,为进一步验证 BMDCs 中 miR-338-3p 对 Th17 细胞的调控作用,分别将 miR-338-3p 抑制剂或抑制剂阴性对照转染的 BMDCs 与 EAU 小鼠脾脏及淋巴结 T 细胞共培养,ELISA 法检测共培养上清液中 IL-17 质量浓度。结果 miR-338-3p 拟似物转染组 BMDCs 中 miR-338-3p 相对表达量较拟似物阴性对照组明显升高,差异有统计学意义($t=6.861, P=0.002$)。miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 ROR γ t、IL-17 mRNA 相对表达量分别为 1.34 ± 0.16 和 1.33 ± 0.16 ,明显高于阴性对照组的 1.00 ± 0.01 和 1.00 ± 0.01 ,差异均有统计学意义($t=3.632, P=0.022$; $t=3.681, P=0.021$);ELISA 检测结果显示,miR-338-3p 拟似物转染组共培养上清液中 IL-17 质量浓度为 $(5\ 941.00\pm 452.40)$ pg/ml,明显高于拟似物阴性对照组的 $(4\ 299.00\pm 348.30)$ pg/ml,差异有统计学意义($t=4.979, P=0.008$),miR-338-3p 抑制剂转染组共培养上清液中 IL-17 质量浓度为 $(3\ 092.00\pm 200.90)$ pg/ml,明显低于抑制剂阴性对照组的 $(4\ 063.00\pm 131.50)$ pg/ml,差异有统计学意义($t=7.005, P=0.002$);流式细胞仪检测结果显示,miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 IL-17⁺ 细胞比例为 $(8.03\pm 1.35)\%$,明显高于拟似物阴性对照组的 $(4.52\pm 0.73)\%$,差异有统计学意义($t=3.968, P=0.017$)。miR-338-3p 拟似物转染组 BMDCs 中 IL-6、IL-23 和 IL-1 β mRNA 相对表达量分别为 2.23 ± 0.21 、 2.21 ± 0.56 和 2.32 ± 0.43 ,明显高于拟似物阴性对照组的 1.00 ± 0.06 、 1.00 ± 0.07 和 1.01 ± 0.15 ,差异均有统计学意义($t=10.290, P=0.001$; $t=3.747, P=0.020$; $t=5.280, P=0.006$)。结论 miR-338-3p 过表达可以增强 BMDCs 中 Th17 细胞极化相关因子 IL-6、IL-23 和 IL-1 β 的表达,促进 IRBP₁₋₂₀ 特异性 Th17 细胞活化。

【关键词】 辅助性 T 细胞 17, 免疫; 实验性自身免疫性葡萄膜炎; 微小 RNA 338-3p; 骨髓来源树突状细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(81970793、81770901); 天津市临床重点学科(专科)建设项目(TJLCZDXKT003)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200608-00404

Enhanced effect of microRNA-338-3p in bone marrow-derived dendritic cells on IRBP₁₋₂₀-specific T helper 17 cells activation in experimental autoimmune uveitis

Yang Chao, Wei Yankai, Wei Ruihua, Nian Hong

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Ocular Disease, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Nian Hong, Email: nianhong@126.com

[Abstract] Objective To investigate the role of microRNA-338-3p (miR-338-3p) in regulating the generation and function of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)₁₋₂₀-specific T helper 17 (Th17) cells in experimental autoimmune uveitis (EAU). **Methods** Bone marrow cells were flushed from the femurs and tibiae of wild-type C57BL/6 mice and cultured in the presence of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) to differentiate into bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). On day 5 after induction, immature BMDCs were collected and divided into miR-338-3p mimics transfection group and mimics negative control transfection group, then transfected with miR-338-3p mimics or negative mimics according to grouping. Twenty-four hours after transfection, the BMDCs were stimulated with 100 ng/ml of lipopolysaccharide to mature. Relative expression levels of miR-338-3p, IL-6, IL-23 and IL-1 β mRNA in BMDCs of the two groups were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The EAU model was established with IRBP₁₋₂₀, incomplete Freund adjuvant and mycobacterium tuberculosis (H37Ra) in mice. On day 13 after modeling, T cells were isolated from the mice spleen or draining lymph nodes and co-cultured with miR-338-3p mimics or negative control mimics-transfected BMDCs under Th17-polarizing conditions. Concentration of IL-17 in the supernatant was detected by ELISA. Relative expression levels of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ (ROR γ t) and IL-17 mRNA were analyzed by qRT-PCR. The proportion of IL-17⁺ cells among T cells co-cultured with BMDCs was assessed by flow cytometry. To further verify the role of miR-338-3p in dendritic cells on Th17 cells, BMDCs transfected with miR-338-3p inhibitor or control inhibitor were co-cultured with T cells isolated from spleen or draining lymph nodes of EAU mice. Concentration of IL-17 in the supernatant was detected by ELISA. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experiment Animals by State Science and Technology Commission. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Tianjin Medical University (No. TJYY2019110117). **Results** Relative expression level of miR-338-3p in BMDCs was significantly increased in the miR-338-3p mimics transfection group than the mimics negative control group ($t=6.861, P=0.002$). In T cells co-cultured with miR-338-3p mimics-transfected BMDCs, the relative expression levels of ROR γ t and IL-17 mRNA were 1.34 ± 0.16 and 1.33 ± 0.16 , which were significantly higher than 1.00 ± 0.01 and 1.00 ± 0.01 in the mimics negative control group ($t=3.632, P=0.022; t=3.681, P=0.021$). ELISA showed that the concentration of IL-17 in the supernatant was (5941.00 ± 452.40) pg/ml in the miR-338-3p mimics transfection group, which was significantly higher than (4299.00 ± 348.30) pg/ml in the mimics negative control group ($t=4.979, P=0.008$), and IL-17 concentration in the supernatant was (3092.00 ± 200.90) pg/ml in the miR-338-3p inhibitor transfection group, which was lower than (4063.00 ± 131.50) pg/ml in the inhibitor negative control group ($t=7.005, P=0.002$). The proportion of IL-17⁺ cells among T cells was $(8.03\pm 1.35)\%$ in the miR-338-3p mimics transfection group, which was significantly higher than $(4.52\pm 0.73)\%$ in the mimics negative control group ($t=3.968, P=0.017$). The relative expression levels of IL-6, IL-23, and IL-1 β mRNA were $2.23\pm 0.21, 2.21\pm 0.56, 2.32\pm 0.43$, respectively in the miR-338-3p mimics transfection group, which were significantly higher than $1.00\pm 0.06, 1.00\pm 0.07, 1.01\pm 0.15$ in the mimics negative control group ($t=10.290, P=0.001; t=3.747, P=0.020; t=5.280, P=0.006$). **Conclusions** Overexpression of miR-338-3p in BMDCs can promote the IRBP₁₋₂₀-specific Th17 cell response by increasing the expression of Th17-polarizing cytokines including IL-6, IL-1 β and IL-23.

[Key words] Th17 cells/immunology; Experimental autoimmune uveitis; MicroRNA 338-3p; Bone marrow-derived dendritic cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81970793, 81770901); Tianjin Clinical Key Discipline Project (TJLCZDXKT003)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200608-00404

自身免疫性葡萄膜炎是一类易复发、难治性眼内炎性疾病,控制不当可导致视力损伤,甚至致盲^[1]。实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)小鼠是自身免疫性葡萄膜炎的经典动物模型,其与人类葡萄膜炎在临床表现及分子机制上具有很大的相似性,在研究自身免疫性葡萄膜炎的发病机制中扮演重要角色^[2]。目前研究认为 Th17 细胞、

白细胞介素(interleukin, IL)-23/IL-17 通路是自身免疫性葡萄膜炎发生的重要机制^[3-6]。Th17 细胞分化依赖于抗原提呈细胞的刺激和微环境中细胞因子的调控,而树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为专职抗原提呈细胞,可诱导 T 细胞活化,同时分泌 IL-6、IL-23 和 IL-1 β 等细胞因子,促进 Th17 细胞的增生分化^[7-8]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类约 22 个核苷酸

的短链非编码 RNA,可以在转录后水平调控基因表达^[9]。近年来,研究发现 miRNA 可以通过调控 DCs 影响 Th17 细胞的反应^[10-12]。miR-338-3p 是一种高度保守的 miRNA,具有免疫调控作用^[13-15]。然而,miR-338-3p 对 Th17 细胞的调控作用尚未见报道。本课题组前期研究结果显示,miR-338-3p 在 EAU 小鼠脾脏细胞中表达明显升高。进一步分析 GSE144081 数据集发现,miR-338-3p 在 DCs 中的表达丰度明显高于 CD4⁺T 细胞。因此,本研究拟探讨骨髓来源 DCs (bone marrow-derived DCs, BMDCs) 中 miR-338-3p 对 EAU IRBP₁₋₂₀ 特异性 Th17 细胞活化的影响以及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 8~10 周龄健康雌性 C57BL/6J 小鼠,体质量(20.1±1.3)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验前排除眼部疾病及其他异常。实验动物的饲养及操作符合国家科学技术委员会《实验动物管理条例》的规定,并获得天津医科大学动物管理及使用委员会的批准(批文号:TJYY2019110117)。

1.1.2 主要试剂及仪器 miR-338-3p 拟似物、拟似物阴性对照、miR-338-3p 抑制剂、抑制剂阴性对照(上海吉玛生物科技有限公司);胎牛血清、RPMI-1640 培养基(美国 HyClone 公司);重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、重组小鼠细胞因子 IL-4、重组小鼠细胞因子 IL-23 和小鼠 IL-17 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);IRBP₁₋₂₀ 多肽片段、实时荧光定量 PCR 引物(上海生物工程股份有限公司);结核分枝杆菌 H37RA(美国 Difco 公司);弗氏不完全佐剂(incomplete Freund adjuvant, IFA)、佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、布雷菲尔得菌素 A(brefeldin A, BFA)、钙离子霉素(美国 Sigma 公司);固定剂、破膜剂、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的大鼠抗小鼠 IL-17 流式抗体(FITC-IL-17)、巯基化藻红蛋白(sulphydryl phycoerythrin, PE)标记的大鼠抗小鼠 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)流式抗体(PE-IFN- γ)(美国 Biolegend 公司);Lipofectamine 2000、逆转录试剂盒、SYBR Green 2 倍 Master Mix(美国 Thermo 公司)。7900HTFAST 实时荧光定量 PCR 仪(爱普拜斯应用生物系统贸易上海有限公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMDCs 的制备 断颈法处死小鼠,于无菌操作台分离出股骨和胫骨,置于含 RPMI-1640 培养基的皿中,用 1 ml 无菌注射器吸取 RPMI-1640 培养基反复冲洗骨髓腔,直至骨髓腔发白;将冲洗下来的骨髓细胞悬液经无菌棉花柱过滤,以除去残留的骨碎片及肌肉组织,滤液于 4 °C 条件下,离心半径 16.8 cm,1 264 r/min,离心 8 min,弃去上清液,用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞;将细胞以 1×10^6 /ml 密度接种于 24 孔板,加入终浓度 10 ng/ml GM-CSF 及 IL-4 诱导骨髓细胞向 DCs 分化;培养第 3 天半量换液,补充细胞因子,继续培养至第 5 天得到未成熟的 BMDCs。

1.2.2 EAU 模型的建立及 T 细胞的提取 小鼠腹腔内注射 350 ng 百日咳毒素后 2 h,于单后足和躯干部皮下注射 100 μ l 含有 150 μ g IRBP₁₋₂₀、0.8 mg 结核分枝杆菌 H37RA 和 IFA 的乳化剂,建立 EAU 模型;于造模后第 13 天,断颈法处死小鼠,取脾脏及腩窝淋巴结研磨,将研磨液经棉花柱过滤得到脾脏及淋巴结单细胞悬液;将细胞悬液加入尼龙柱密封,于 37 °C 培养箱中培养 1 h 后,用完全培养基冲洗尼龙柱,收集冲洗下的细胞悬液得到 T 细胞。

1.2.3 BMDCs 的转染及其与 T 细胞的共培养 收集诱导培养第 5 天的 BMDCs,分为 miR-338-3p 拟似物转染组、拟似物阴性对照组、miR-338-3p 抑制剂转染组和抑制剂阴性对照组;用 RPMI-1640 培养基分别将 miR-338-3p 拟似物、拟似物阴性对照、miR-338-3p 抑制剂、抑制剂阴性对照及 Lipofectamine 2000 稀释,常温下孵育 5 min,将 miR-338-3p 拟似物、拟似物阴性对照、miR-338-3p 抑制剂和抑制剂阴性对照稀释液分别与 Lipofectamine 2000 稀释液混合,常温下静置 20 min,分别加入各组 BMDCs 中,培养 6 h 后补充完全培养基;转染 24 h,加入终质量浓度 100 ng/ml 的脂多糖刺激各组 BMDCs,培养 24 h 后收集细胞,一部分 BMDCs 用于提取总 RNA,另一部分 BMDCs 以 1×10^5 /孔分别接种于 24 孔板,在含有 10 μ g/ml IRBP₁₋₂₀ 的完全培养基中与分离的脾脏及淋巴结 T 细胞共培养,并加入终质量浓度为 20 ng/ml 的 IL-23(Th17 细胞极化条件),培养 48 h,收集培养上清液及细胞用于后续研究。

1.2.4 ELISA 法检测培养上清液中 IL-17 质量浓度 取各组共培养上清液,根据小鼠 IL-17 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-17 质量浓度。取酶标板孔用 IL-17 捕获抗体常温包被过夜,封闭液常温封闭 1 h;实验孔加入 10 倍稀释的样本 100 μ l,标准品孔加入梯度稀释的标准品 100 μ l,常温孵育 2 h,弃去液体,清洗 5 次;每

孔加入稀释的 IL-17 检测抗体 100 μl, 常温孵育 2 h, 弃去液体, 清洗 5 次; 每孔加入 100 μl 稀释的辣根过氧化物酶, 常温孵育 30 min, 弃去液体, 清洗 5 次; 每孔加入 100 μl 四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 显色液, 室温孵育 10~20 min; 每孔加 50 μl 终止液, 测定 450 nm 处吸光度 (A) 值, 用 540 nm 处 A 值进行校正; 根据标准品浓度和 A 值绘制标准曲线, 得出标准曲线直线回归方程, 计算样本 IL-17 质量浓度。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测 BMDCs 中 miR-338-3p、IL-23、IL-1β、IL-6 mRNA 和共培养细胞中 IL-17、RORγt mRNA 相对表达量 采用 Trizol 法提取 miR-338-3p 拟似物转染组和拟似物阴性对照组 BMDCs 以及共培养细胞总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 各基因引物序列见表 1, 进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火及延伸 1 min, 40 个循环。以 GAPDH 为内参照, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 BMDCs 中 IL-23、IL-1β、IL-6 mRNA 以及共培养细胞中 IL-17、RORγt mRNA 相对表达量。另取 miR-338-3p 拟似物转染组和拟似物阴性对照组 BMDCs 检测 miR-338-3p 相对表达量, 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 62 °C 退火及延伸 40 s, 40 个循环。以 U6 为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 2 个组 BMDCs 中 miR-338-3p 相对表达量。

表 1 各基因 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

基因	引物序列 (5'-3')	扩增长度 (bp)
IL-17	F: CCTGGCGGCTACAGTGAAG R: TTTGGACACGCTGAGCTTTG	57
RORγt	F: CCTCAGCGCCCTGTGTTTT R: GCATGCAGCTTTTGCCTGTT	58
IL-23	F: CATAGCTGCCCGGTCTTT R: GGCACTAAGGCTCAGTCAGA	57
IL-1β	F: AGTTGACGGACCCAAAAGA R: GGACAGCCCAGGTCAAAGG	57
IL-6	F: CCACGGCCTTCCCTACTTC R: TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA	61
GAPDH	F: CATGGCCTTCCGTGTTCTTA R: CGCGCACGTACAGATCCA	55

注: PCR: 聚合酶链式反应; IL: 白细胞介素; RORγt: 维甲酸相关核儿受体 γt; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; F: 正向引物; R: 反向引物
Note: PCR: polymerase chain reaction; IL: interleukin; RORγt: retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γt; GAPDH: glyceraldehyde phosphated dehydrogenase; F: forward primer; R: reverse primer

1.2.6 流式细胞仪检测共培养细胞中 Th17 细胞百分比 取收集的 miR-338-3p 拟似物转染组和拟似物阴性对照组细胞, 用含有 50 ng/ml PMA、1 μg/ml BFA

和 1 μg/ml 钙离子霉素的 RPMI-1640 完全培养基于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中刺激 4 h; 更换为破膜固定液, 于 4 °C 条件下避光过夜; 用 2.4G2 封闭细胞表面 Fc 受体; 加入 FITC-IL-17、PE-IFN-γ 抗体, 于 4 °C 避光条件下孵育 2 h; 洗涤细胞, 流式细胞仪检测 IL-17⁺ 细胞百分比。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.1 统计学软件进行统计分析。测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 mean±SD 表示。各组间测量指标差异比较采用独立样本 t 检验。采用双侧检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 拟似物阴性对照组与 miR-338-3p 拟似物转染组 BMDCs 中 miR-338-3p 相对表达量比较

实时荧光定量 PCR 结果显示, 与拟似物阴性对照组相比, miR-338-3p 拟似物转染组 BMDCs 中 miR-338-3p 相对表达量明显升高, 差异有统计学意义 (t = 6.861, P = 0.002) (表 2)。

表 2 2 个组 BMDCs 中 miR-338-3p 相对表达量比较 (mean±SD)

Table 2 Comparison of relative expression level of miR-338-3p in BMDCs between the two groups (mean±SD)

组别	样本量	miR-338-3p 相对表达量
拟似物阴性对照组	3	1.00±0.03
miR-338-3p 拟似物转染组	3	1 750.00±254.90
t 值		6.861
P 值		0.002

注: (独立样本 t 检验) BMDCs: 骨髓来源树突状细胞; miR: 微小 RNA

Note: (Independent samples t-test) BMDCs: bone marrow-derived dendritic cells; miR: microRNA

2.2 拟似物阴性对照组与 miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 RORγt、IL-17 mRNA 相对表达量比较

miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 RORγt、IL-17 mRNA 相对表达量分别为 1.34±0.16 和 1.33±0.16, 明显高于拟似物阴性对照组的 1.00±0.01 和 1.00±0.01, 差异均有统计学意义 (t = 3.632, P = 0.022; t = 3.681, P = 0.021) (图 1)。

2.3 各组细胞共培养上清液中 IL-17 质量浓度比较

miR-338-3p 拟似物转染组共培养上清液中 IL-17 质量浓度为 (5 941.00±452.40) pg/ml, 明显高于拟似物阴性对照组的 (4 299.00±348.30) pg/ml, 差异有统计学意义 (t = 4.979, P = 0.008) (图 2); miR-338-3p 抑

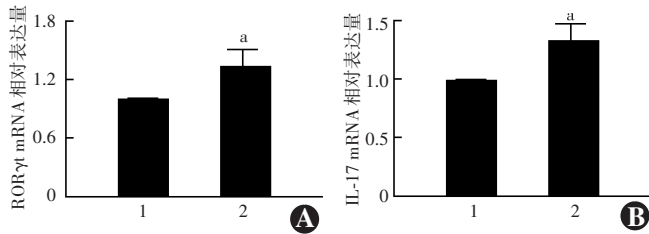


图 1 拟似物阴性对照组与 miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 RORγt、IL-17 mRNA 相对表达量比较 A: 各组 RORγt mRNA 相对表达量比较 B: 各组 IL-17 mRNA 相对表达量比较 与拟似物阴性对照组相比, ^a*P*<0.05 (独立样本 *t* 检验, *n*=3) 1: 拟似物阴性对照组; 2: miR-338-3p 拟似物转染组 RORγt: 维甲酸相关孤儿受体 γt; IL: 白细胞介素

Figure 1 Comparison of the relative expression levels of RORγt and IL-17 mRNA in co-cultured cells between the two groups A: RORγt B: IL-17 Compared with the mimics negative control group, ^a*P*<0.05 (Independent samples *t*-test, *n*=3) 1: mimics negative control group; 2: miR-338-3p mimics transfection group RORγt: retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt; IL: interleukin

抑制剂转染组共培养上清液中 IL-17 质量浓度为 (3 092.00±200.90) pg/ml, 明显低于抑制剂阴性对照组的 (4 063.00±131.50) pg/ml, 差异有统计学意义 (*t* = 7.005, *P* = 0.002) (图 3)。

2.4 拟似物阴性对照组和 miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 IL-17⁺ 细胞百分比比较

miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 IL-17⁺ 细胞百分比为 (8.03±1.35)%, 明显高于拟似物阴性对照组的 (4.52±0.73)%, 差异有统计学意义 (*t* = 3.968, *P* = 0.017) (图 4)。

2.5 拟似物阴性对照组与 miR-338-3p 拟似物转染组 BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β mRNA 相对表达量比较

miR-338-3p 拟似物转染组 BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β mRNA 相对表达量分别为 2.23±0.21、2.21±0.56 和 2.32±0.43, 明显高于拟似物阴性对照组的 1.00±0.06、1.00±0.07 和 1.01±0.15, 差异均有统计学意义 (*t* = 10.290, *P* = 0.001; *t* = 3.747, *P* = 0.020; *t* = 5.280, *P* = 0.006) (图 5)。

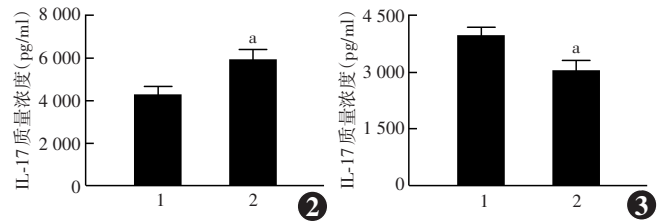


图 2 拟似物阴性对照组和 miR-338-3p 拟似物转染组细胞共培养上清液中 IL-17 质量浓度比较 与拟似物阴性对照组相比, ^a*P*<0.01 (独立样本 *t* 检验, *n*=3) 1: 拟似物阴性对照组; 2: miR-338-3p 拟似物转染组 IL: 白细胞介素 图 3 抑制剂阴性对照组和 miR-338-3p 抑制剂转染组细胞共培养上清液中 IL-17 质量浓度的比较 与抑制剂阴性对照组相比, ^a*P*<0.01 (独立样本 *t* 检验, *n*=3) 1: 抑制剂阴性对照组; 2: miR-338-3p 抑制剂转染组 IL: 白细胞介素

Figure 2 Comparison of IL-17 concentration in co-cultured supernatant between the two groups Compared with the mimics negative control group, ^a*P*<0.01 (Independent samples *t*-test, *n*=3) 1: mimics negative control group; 2: miR-338-3p mimics transfection group IL: interleukin

Figure 3 Comparison of IL-17 concentration in co-cultured supernatant between the two groups Compared with the inhibitor negative control group, ^a*P*<0.01 (Independent samples *t*-test, *n*=3) 1: inhibitor negative control group; 2: miR-338-3p inhibitor transfection group IL: interleukin

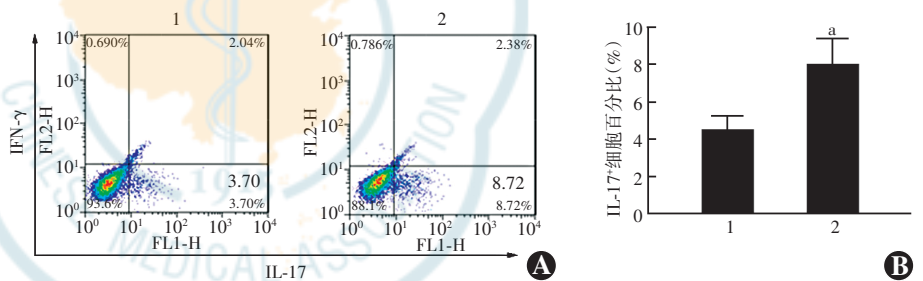


图 4 拟似物阴性对照组与 miR-338-3p 拟似物转染组共培养细胞中 IL-17⁺ 细胞百分比比较 A: 各组共培养细胞流式散点图 B: 各组共培养细胞中 IL-17⁺ 细胞百分比比较 与拟似物阴性对照组相比, ^a*P*<0.05 (独立样本 *t* 检验, *n*=3) 1: 拟似物阴性对照组; 2: miR-338-3p 拟似物转染组 IFN-γ: γ-干扰素; IL: 白细胞介素

Figure 4 Comparison of IL-17⁺ cells percentage in the co-cultured cells between the two groups A: Flow cytometry scatter plots of the co-cultured cells in the two groups B: Comparison of IL-17⁺ cells percentage in the co-cultured cells between the two groups Compared with the mimics negative control group, ^a*P*<0.05 (Independent samples *t*-test, *n*=3) 1: mimics negative control group; 2: miR-338-3p mimics transfection group IFN-γ: interferon-γ; IL: interleukin

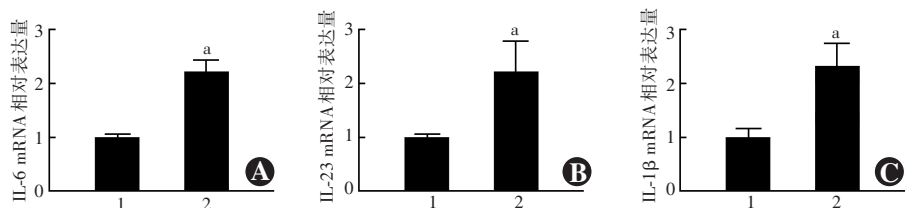


图 5 拟似物阴性对照组与 miR-338-3p 拟似物转染组 BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β mRNA 相对表达量比较 A: 各组 IL-6 mRNA 相对表达量比较 B: 各组 IL-23 mRNA 相对表达量比较 C: 各组 IL-1β mRNA 相对表达量比较 与拟似物阴性对照组相比, ^a*P*<0.05 (独立样本 *t* 检验, *n*=3) 1: 拟似物阴性对照组 2: miR-338-3p 拟似物转染组 IL: 白细胞介素

Figure 5 Comparison of the relative expression levels of IL-6, IL-23, IL-1β mRNA in BMDCs between the two groups A: IL-6 B: IL-23 C: IL-1β Compared with the mimics negative control group, ^a*P*<0.05 (Independent samples *t*-test, *n*=3) 1: mimics negative control group; 2: miR-338-3p mimics transfection group IL: interleukin

3 讨论

Th17 细胞是一类 CD4⁺T 细胞亚群,特异性表达转录因子 ROR γ t,通过分泌 IL-17 等炎性细胞因子促进自身免疫性疾病的发生和发展^[16-17]。研究表明,自身免疫性葡萄膜炎患者体内 Th17 细胞活性增强,血清中 IL-17 水平上升,靶向抑制 Th17 细胞可以缓解患者眼部炎症^[18-20]。因此,深入研究 Th17 细胞的相关调控机制对自身免疫性葡萄膜炎的防治具有重要意义。目前多个研究团队揭示 T 细胞内源性通路影响 Th17 细胞反应^[21-23],而来自固有免疫细胞的外源信号对 Th17 细胞活性的影响及机制尚不清楚。Ifegan 等^[10]研究表明,敲除 miR-223 的 DCs 中 IL-6、IL-23 和 IL-1 β 分泌减少,导致 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞方向分化减少,从而缓解了实验性自身免疫性脑脊髓炎的症状,提示 miRNA 可以调控 DCs 介导的 Th17 细胞反应,参与自身免疫性疾病的发生和发展。本研究中观察了 miR-338-3p 对 EAU 中 IRBP₁₋₂₀ 特异性 Th17 细胞活化以及 BMDCs 促炎性细胞因子表达的影响,结果表明 miR-338-3p 可能通过促进 BMDCs 中 IL-6、IL-1 β 和 IL-23 等基因的表达来增强 IRBP₁₋₂₀ 特异性 Th17 细胞中 ROR γ t 的表达及 IL-17 的产生。

编码 miR-338-3p 的基因位于凋亡相关酪氨酸激酶的第 7 个内含子中,最初发现其在中枢神经系统发育中发挥作用^[24]。近年来,大量研究表明 miR-338-3p 在肿瘤的发生中扮演重要角色。miR-338-3p 被证实可在胃癌、骨肉瘤、卵巢癌等多种肿瘤组织中表达下调,且可以通过影响 MAPK、PI3K/AKT 等细胞内信号通路抑制肿瘤细胞的生长^[25-27]。最近,miR-338-3p 被证实可在寻常型天疱疮、重症肌无力和肌萎缩侧索硬化症等多种自身免疫性疾病外周血单个核细胞中表达升高,并且与疾病严重程度相关^[28-30]。此外,Xu 等^[15]的最新研究表明在寻常型天疱疮中,miR-338-3p 可以通过靶向 RUNX1 来抑制 FOXP3 的表达,从而减少 CD4⁺T 细胞向调节性 T 细胞分化。然而,miR-338-3p 在 EAU 中对 Th17 细胞的作用尚未见报道。本研究结果表明,miR-338-3p 过表达的 BMDCs 能够促进 Th17 细胞中 ROR γ t 以及 IL-17 mRNA 表达,提示 DCs 中 miR-338-3p 可以促进 IRBP₁₋₂₀ 特异性 Th17 细胞反应。流式细胞术分析结果显示,miR-338-3p 拟似物转染组细胞共培养中 Th17 细胞比例明显高于拟似物阴性对照组,进一步表明 miR-338-3p 过表达的 BMDCs 能够促进 IRBP₁₋₂₀ 特异性 Th17 细胞分化。此外,miR-338-3p 拟似物转染组细胞共培养上清液中 IL-17 质量浓度明

显高于拟似物阴性对照组,而 miR-338-3p 抑制剂转染组细胞共培养上清液中 IL-17 质量浓度较抑制剂阴性对照组明显降低,表明 BMDCs 中 miR-338-3p 能够正向调控 IL-17 蛋白水平的表达。以上结果均提示 miR-338-3p 可能参与 EAU 的发病。

Th17 细胞的分化依赖于局部细胞因子环境。研究表明,IL-6 可以抑制 T 细胞中 Foxp3 的表达,解除 ROR γ t 抑制,从而促进 Th17 细胞分化;IL-1 β 促进 Th17 细胞的早期分化;而 IL-23 维持 Th17 细胞的稳定,是产生致病性 Th17 细胞的关键细胞因子^[31]。DCs 是专职抗原提呈细胞,活化的 DCs 能够分泌 IL-6、IL-23 和 IL-1 β 等多种细胞因子,指导 CD4⁺T 细胞亚群分化,调控抗原特异性免疫反应^[32-33]。有研究表明,miRNA 能够通过调控 DCs 促炎性或抑炎性细胞因子的分泌从而影响 Th17 细胞的活性^[34]。例如,克罗恩病患者 DCs 中 miR-29 的减少导致 IL-23 水平升高,促进了 Th17 细胞中 ROR γ t 和 IL-17 mRNA 的表达^[35]。此外,Kurowska-Stolarska 等^[12]研究表明 miR-34a^{-/-} DCs 分泌 IL-6、IL-1 β 、IL-23 减少,导致抗原特异性 Th17 细胞产生减少,从而缓解了抗原诱导的关节炎。而 miR-155 过表达能够抑制 DCs 中 IL-6、IL-1 β 的分泌,促进 IL-10 的表达,抑制白塞病患者 CD4⁺T 细胞中 IL-17 的产生^[36]。本研究结果显示,与拟似物阴性对照组相比,转染 miR-338-3p 拟似物的 BMDCs 中 IL-6、IL-1 β 和 IL-23 mRNA 的表达水平明显升高,表明 miR-338-3p 可能通过 DCs 创造了有利于 Th17 细胞活化的微环境。

综上所述,本研究结果表明 miR-338-3p 可能通过促进 BMDCs 分泌 Th17 细胞极化相关细胞因子来增强 IRBP₁₋₂₀ 特异性 Th17 细胞的活性,进而影响 EAU 的发生和发展。然而,本研究仅在体外探讨了 BMDCs 中 miR-338-3p 对 Th17 细胞的调控作用及部分机制,而在体环境复杂,DCs 中 miR-338-3p 如何影响 EAU 中致病性 Th17 细胞的活化以及 miR-338-3p 是通过何种胞内通路影响 Th17 细胞的活性仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wildner G, Diedrichs-Möhring M. Resolution of uveitis [J]. Semin Immunopathol, 2019, 41 (6) : 727-736. DOI: 10. 1007/s00281-019-00758-z.
- [2] Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye [J]. J Clin Invest, 2010, 120(9) : 3073-3083. DOI: 10. 1172/JCI42440.
- [3] Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, et al. Th17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1 [J]. Nat Med, 2007, 13(6) : 711-718. DOI: 10. 1038/nm1585.
- [4] Luger D, Silver PB, Tang J, et al. Either a Th17 or a Th1 effector

- response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category [J]. *J Exp Med*, 2008, 205 (4) : 799–810. DOI: 10.1084/jem.20071258.
- [5] Pepple KL, Lin P. Targeting interleukin-23 in the treatment of noninfectious uveitis [J]. *Ophthalmology*, 2018, 125 (12) : 1977–1983. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.05.014.
- [6] Zhong Z, Su G, Kijlstra A, et al. Activation of the interleukin-23/interleukin-17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 80 : 100866 [2021-09-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32422390>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100866.
- [7] Santana MA, Esquivel-Guadarrama F. Cell biology of T cell activation and differentiation [J]. *Int Rev Cytol*, 2006, 250 : 217–274. DOI: 10.1016/S0074-7696(06)50006-3.
- [8] Ganguly D, Haak S, Sisirak V, et al. The role of dendritic cells in autoimmunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (8) : 566–577. DOI: 10.1038/nri3477.
- [9] Gebert L, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20 (1) : 21–37. DOI: 10.1038/s41580-018-0045-7.
- [10] Ifergan I, Chen S, Zhang B, et al. Cutting edge: microRNA-223 regulates myeloid dendritic cell-driven Th17 responses in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2016, 196 (4) : 1455–1459. DOI: 10.4049/jimmunol.1501965.
- [11] Yan L, Hu F, Yan X, et al. Inhibition of microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th17/Treg immune response [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94 (9) : 1063–1079. DOI: 10.1007/s00109-016-1414-3.
- [12] Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Melchor EG, et al. MicroRNA-34a dependent regulation of AXL controls the activation of dendritic cells in inflammatory arthritis [J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8 : 15877 [2020-05-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28639625>. DOI: 10.1038/ncomms15877.
- [13] Liu Q, Cui F, Wang M, et al. Increased expression of microRNA-338-3p contributes to production of Dsg3 antibody in pemphigus vulgaris patients [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18 (1) : 550–556. DOI: 10.3892/mmr.2018.8934.
- [14] Magni S, Buoli Comani G, Elli L, et al. miRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in celiac disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2014, 109 (10) : 1662–1674. DOI: 10.1038/ajg.2014.203.
- [15] Xu M, Liu Q, Li S, et al. Increased expression of miR-338-3p impairs Treg-mediated immunosuppression in pemphigus vulgaris by targeting RUNX1 [J]. *Exp Dermatol*, 2020, 29 (7) : 623–629. DOI: 10.1111/exd.14111.
- [16] Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181 (1) : 8–18. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.03.044.
- [17] Chen YH, Lightman S, Calder VL. CD4⁺ T-cell plasticity in non-infectious retinal inflammatory disease [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (17) : 9584 [2021-09-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34502490>. DOI: 10.3390/ijms22179584.
- [18] Chi W, Zhu X, Yang P, et al. Upregulated IL-23 and IL-17 in Behçet patients with active uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49 (7) : 3058–3064. DOI: 10.1167/iovs.07-1390.
- [19] Na SY, Park MJ, Park S, et al. Up-regulation of Th17 and related cytokines in Behçet's disease corresponding to disease activity [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2013, 31 (3 Suppl 77) : 32–40.
- [20] Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, et al. Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF- α therapy in uveitis patients with Behçet's disease [J/OL]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14 (3) : R99 [2020-05-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546542>. DOI: 10.1186/ar3824.
- [21] Wei Y, Chen S, Sun D, et al. miR-223-3p promotes autoreactive Th17 cell responses in experimental autoimmune uveitis (EAU) by inhibiting transcription factor FOXO3 expression [J/OL]. *FASEB J*, 2019, 33 (12) : 13951–13965 [2020-05-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31645142>. DOI: 10.1096/fj.201901446R.
- [22] Lu W, You R, Yuan X, et al. The microRNA miR-22 inhibits the histone deacetylase HDAC4 to promote T (H) 17 cell-dependent emphysema [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16 (11) : 1185–1194. DOI: 10.1038/ni.3292.
- [23] Zhang Z, Xue Z, Liu Y, et al. MicroRNA-181c promotes Th17 cell differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 70 : 305–314. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.03.011.
- [24] Kos A, Olde Loohuis NF, Wiczorek ML, et al. A potential regulatory role for intronic microRNA-338-3p for its host gene encoding apoptosis-associated tyrosine kinase [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7 (2) : e31022 [2020-05-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363537>. DOI: 10.1371/journal.pone.0031022.
- [25] Guo B, Liu L, Yao J, et al. miR-338-3p suppresses gastric cancer progression through a PTEN-AKT axis by targeting P-REX2a [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12 (3) : 313–321. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0507.
- [26] Jia F, Zhang Z, Zhang X. MicroRNA-338-3p inhibits tumor growth and metastasis in osteosarcoma cells by targeting RUNX2/CDK4 and inhibition of MAPK pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (4) : 6420–6430. DOI: 10.1002/jcb.27929.
- [27] Zhang R, Shi H, Ren F, et al. MicroRNA-338-3p suppresses ovarian cancer cells growth and metastasis: implication of Wnt/catenin beta and MEK/ERK signaling pathways [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38 (1) : 494 [2020-05-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31842953>. DOI: 10.1186/s13046-019-1494-3.
- [28] Lin N, Liu Q, Wang M, et al. Usefulness of miRNA-338-3p in the diagnosis of pemphigus and its correlation with disease severity [J/OL]. *PeerJ*, 2018, 6 : e5388 [2020-05-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30083474>. DOI: 10.7717/peerj.5388.
- [29] Kong X, Wang J, Cao Y, et al. The long noncoding RNA MALAT-1 functions as a competing endogenous RNA to regulate MSL2 expression by sponging miR-338-3p in myasthenia gravis [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (4) : 5542–5550. DOI: 10.1002/jcb.27838.
- [30] De Felice B, Annunziata A, Fiorentino G, et al. miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients [J]. *Neurogenetics*, 2014, 15 (4) : 243–253. DOI: 10.1007/s10048-014-0420-2.
- [31] Song X, Gao H, Qian Y. Th17 differentiation and their pro-inflammation function [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 841 : 99–151. DOI: 10.1007/978-94-017-9487-9_5.
- [32] Tai Y, Wang Q, Korner H, et al. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2018, 9 : 642 [2020-05-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29997500>. DOI: 10.3389/fphar.2018.00642.
- [33] Guo K, Zhang X. Cytokines that modulate the differentiation of Th17 cells in autoimmune uveitis [J/OL]. *J Immunol Res*, 2021, 2021 : 6693542 [2021-09-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33816637>. DOI: 10.1155/2021/6693542.
- [34] Zhou H, Wu L. The development and function of dendritic cell populations and their regulation by miRNAs [J]. *Protein Cell*, 2017, 8 (7) : 501–513. DOI: 10.1007/s13238-017-0398-2.
- [35] Brain O, Owens BM, Pichulik T, et al. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release [J]. *Immunity*, 2013, 39 (3) : 521–536. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.08.035.
- [36] Zhou Q, Xiao X, Wang C, et al. Decreased microRNA-155 expression in ocular Behçet's disease but not in Vogt Koyanagi Harada syndrome [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (9) : 5665–5674. DOI: 10.1167/iovs.12-9832.

(收稿日期:2020-10-20 修回日期:2021-09-29)

(本文编辑:张宇)

