

miR-223-3p 靶向调控 Rbpj 转录因子对葡萄膜炎大鼠 Th1 和 Th17 细胞分化的影响

周梦贤¹, 屈如意¹, 殷学伟¹, 郭励劼², 邱岩³, 郭大东⁴

引用:周梦贤,屈如意,殷学伟,等. miR-223-3p 靶向调控 Rbpj 转录因子对葡萄膜炎大鼠 Th1 和 Th17 细胞分化的影响. 国际眼科杂志 2022;22(5):769-774

基金项目:国家自然科学基金(No.81873163);山东省自然科学基金项目(No.ZR2020KC024)

作者单位:¹(250014)中国山东省济南市,山东中医药大学;²(100069)中国北京市,首都医科大学;³(250002)中国山东省济南市,山东中医药大学第二附属医院;⁴(250002)中国山东省济南市,山东省中西医结合眼病防治重点实验室 山东省高校中西医结合眼病防治技术(强化)重点实验室 山东中医药大学眼科研究所

作者简介:周梦贤,女,在读硕士研究生,研究方向:眼科疾病分子诊断研究及纳米生物技术临床检验诊断中的应用。

通讯作者:郭大东,博士,教授,实验中心主任,研究方向:眼科疾病分子诊断研究及纳米生物技术临床检验诊断中的应用. dadongene@163.com

收稿日期:2021-06-04 修回日期:2022-03-31

摘要

目的:探讨 miR-223-3p 对 Notch 信号通路转录因子 Rbpj 表达的调控作用以及对实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)大鼠 Th1、Th17 细胞分化水平的影响。

方法:用双荧光素酶表达报告系统探讨 miR-223-3p 对 Rbpj 基因表达的调控作用。将 24 只雌性 Lewis 大鼠随机分为 EAU 模型组、正常对照组(NC 组)和空白对照组(BC 组),每组 8 只。EAU 模型组注射含光感受器间维生素 A 结合蛋白(IRBP)、结核菌素和完全弗氏佐剂的乳糜液以诱导葡萄膜炎,BC 组注射等体积的不含 IRBP 多肽的乳糜液,NC 组注射等体积的无菌生理盐水。免疫后 12d,无菌分离三组大鼠的脾脏、淋巴结和眼组织,实时荧光定量 PCR(Q-PCR)检测 miR-223-3p 和 Rbpj 基因的表达水平;酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测 Rbpj、IFN- γ 、IL-17 蛋白的表达水平;流式细胞仪检测三组大鼠不同组织中 Th1 和 Th17 细胞的表达水平。

结果:双荧光素酶检测结果证实 Rbpj 是 miR-223-3p 调控的靶基因。免疫后 12d,相比于 NC 组,EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 miR-223-3p 相对表达水平分别为 0.33 ± 0.29 、 0.11 ± 0.12 、 0.18 ± 0.11 ,均呈下调表达(均 $P<0.05$);Rbpj mRNA 水平均呈上调表达,分别为 3.00 ± 0.06 、 1.52 ± 0.12 、 3.01 ± 0.34 (均 $P<0.05$);BC 组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 miR-223-3p 和 Rbpj mRNA 水平与 NC 组相比均无差异($P>0.05$)。ELISA 检测结果发现,免疫后 12d 的 EAU 模型组大鼠各组织中 Rbpj、IFN- γ 、IL-17 蛋白表达水平均明显高于 NC 组(均 $P<0.05$),BC 组大鼠各

组织中 Rbpj、IFN- γ 、IL-17 蛋白表达水平与 NC 组相比均无差异($P>0.05$)。流式细胞仪检测结果显示,免疫后 12d,EAU 模型组各组织的 Th1 和 Th17 细胞比例均显著高于 NC 组(均 $P<0.05$)。BC 组与 NC 组各组织 Th1 和 Th17 细胞比例无明显变化(均 $P>0.05$)。

结论:miR-223-3p 可负调控 Notch 信号通路转录因子 Rbpj 的表达。EAU 大鼠中 miR-223-3p 的下调表达可升高 Rbpj 基因和蛋白的表达水平,促进 Th1 和 Th17 细胞的分化以及提高相关分子 IFN- γ 和 IL-17 的表达水平,进而影响葡萄膜炎的发生发展。

关键词:miR-223-3p;Rbpj;实验性自身免疫性葡萄膜炎;Th1;Th17;IFN- γ ;IL-17

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.5.14

Study on the effect of miR - 223 - 3p regulating transcription factor Rbpj on the differentiation of Th1 and Th17 cells in rats with experimental autoimmune uveitis

Meng-Xian Zhou¹, Ru-Yi Qu¹, Xue-Wei Yin¹, Li-Jie Guo², Yan Qiu³, Da-Dong Guo⁴

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81873163); Natural Science Foundation of Shandong Province (No.ZR2020KC024)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Capital Medical University, Beijing 100069, China; ³The Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China; ⁴Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Eye Disease Prevention and Treatment Technology (Enhanced) in Universities of Shandong Province; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Da - Dong Guo. Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Eye Disease Prevention and Treatment Technology (Enhanced) in Universities of Shandong Province; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China. dadongene@163.com

Received: 2021-06-04 Accepted: 2022-03-31

Abstract

• AIM: To investigate the regulatory effect of miR-223-3p on the expression of transcription factor Rbpj and on the differentiation of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune uveitis (EAU) rats.

• METHODS: The regulatory role of miR-223-3p in Rbpj gene expression was investigated by a dual luciferase expression reporter system. In the present study, 24 female Lewis rats were randomly divided into EAU model group, normal control (NC) group and blank control (BC) group, and each group included 8 rats. The EAU model group was injected with interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) emulsion containing Mycobacterium tuberculosis H37RA and complete Freund's adjuvant to induce uveitis, while the NC group was injected with an equal volume of emulsion without IRBP peptide. The rats in the BC group received the same volume of sterile saline solution. At 12d after immunization, the spleen, lymph node and eye tissues in both groups were aseptically isolated, and the expression levels of miR-223-3p and Rbpj RNAs were detected by real-time quantitative PCR (Q-PCR); Meanwhile, the expression levels of Rbpj, IFN- γ and IL-17 proteins were detected by ELISA, and the levels of Th1 and Th17 cell lineages in each tissue from each groups were detected by flow cytometry.

• RESULTS: The results of dual fluorescein assay indicated that Rbpj was the target gene which regulated by miR-223-3p. At 12d after immunization, compared with NC group, the relative expression levels of miR-223-3p in spleen, lymph node and eye tissues from EAU model rats were 0.33 ± 0.29 , 0.11 ± 0.12 and 0.18 ± 0.11 , respectively, accompanied by the down-regulated expression, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$); Rbpj mRNA levels were 3.00 ± 0.06 , 1.52 ± 0.12 and 3.01 ± 0.34 , respectively, and were all up-regulated, while the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Moreover, the differences in miR-223-3p and Rbpj mRNA levels in spleen, lymph node and eye tissues of rats in the blank control group were not statistically significant compared with those in the NC group ($P > 0.05$); ELISA results revealed that the expression levels of RBPJ, IFN- γ and IL-17 proteins in all tissues from EAU rats at 12d after immunization were significantly higher than those in the NC group (all $P < 0.05$), and there was no statistically significant difference in the expression levels of Rbpj, IFN- γ and IL-17 protein in all tissues of rats in the blank control group compared with the NC group ($P > 0.05$); Meanwhile, flow cytometry results showed that the proportions of Th1 and Th17 cell lineages in all tissues from EAU model group were significantly higher than those from the NC group at 12d after immunization, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Furthermore, there was no significant change in the proportion of Th1 and Th17 cells in each tissue in the BC and NC groups (all $P > 0.05$).

• CONCLUSION: The miR-223-3p can negatively regulate the expression of the transcription factor Rbpj of Notch

signaling pathway. The down-regulated miR-223-3p expression in EAU rats can increase the expression levels of Rbpj gene and protein, and aggravate the differentiation of Th1 and Th17 cells and the expression levels of related molecules IFN- γ and IL-17, which in turn affect the development of uveitis.

• KEYWORDS: miR-223-3p; Rbpj; experimental autoimmune uveitis; Th1; Th17; IFN- γ ; IL-17

Citation: Zhou MX, Qu RY, Yin XW, *et al.* Study on the effect of miR-223-3p regulating transcription factor Rbpj on the differentiation of Th1 and Th17 cells in rats with experimental autoimmune uveitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(5): 769-774

0 引言

葡萄膜炎是一种累及到虹膜、睫状肌和脉络膜的临床常见眼内炎症,严重威胁视力,高达35%患者可能会导致视力受损^[1]。既往研究表明,自身免疫性葡萄膜炎的主要致炎细胞群有Th1和Th17细胞,两者的细胞比例与葡萄膜炎病程发展密切相关^[2-3]。IFN- γ 、IL-17分别是Th1、Th17标志性细胞因子,在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)中发挥了重要的致炎作用^[4]。Notch信号可通过调控细胞分化和调节炎症反应来维持机体的免疫平衡,并通过诱导初始CD4⁺T细胞分化为Th1、Th17,从而影响Th细胞之间的比例平衡,进而在葡萄膜炎的病理进程中发挥作用^[5]。MicroRNA(miRNA)是一组为18~24个核苷酸长度的非编码RNA分子,主要通过与其靶基因的3'UTR结合,以完全或不完全配对的形式降解靶基因的mRNA,或者通过抑制靶基因的翻译,进而调控细胞凋亡、增殖及分化等生理活动^[6-8]。研究发现,miR-223-3p能通过抑制转录因子FOXO3的表达促进EAU小鼠中树突状细胞驱动的Th17细胞反应^[9]。此外,EAU大鼠虹膜、睫状体和外周血淋巴细胞中均发现与NF- κ B信号通路相关的miR-223-3p呈下调表达^[10-12],提示miR-223-3p与葡萄膜炎的发生发展关系密切,miR-223-3p有可能成为治疗葡萄膜炎新的作用靶点。Rbpj作为Notch信号通路中一种重要的转录因子,在Notch信号通路的活化中发挥重要作用。生物信息学预测分析表明,Notch信号通路转录因子Rbpj可能为miR-223-3p调控的靶基因,然而miR-223-3p调控Rbpj的表达在葡萄膜炎病理机制中的作用尚不清楚。本研究拟通过双荧光素酶表达报告分析系统,检测荧光强度表达的变化情况,明确miR-223-3p对Rbpj基因的调控作用;实时荧光定量PCR(quantitative PCR, Q-PCR)检测EAU大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中miR-223-3p和Rbpj基因的表达情况,ELISA检测Rbpj、IFN- γ 、IL-17蛋白的表达水平变化,流式细胞仪检测Th1、Th17细胞水平变化,以初步阐释miR-223-3p对Notch信号通路转录因子Rbpj表达的调控作用以及对葡萄膜炎大鼠Th1、Th17细胞分化的影响,为寻找葡萄膜炎新的治疗靶点、丰富临床基础理论提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用24只6~8周龄健康雌性Lewis大

鼠(北京维通利华公司,北京),体质量 160~180g。本研究符合动物伦理学,并经伦理委员会审批通过。

1.1.2 主要试剂及仪器 高纯度质粒抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司);报告基因检测试剂盒、miRNA 转染试剂盒(上海吉满生物科技有限公司);胰蛋白酶、DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司);FITC-CD4(北京博奥森生物技术有限公司);PE-IFN- γ , PE-IL-17(美国 eBioscience 公司);Ficoll 淋巴细胞分离液(北京索莱宝公司);RNA 组织/细胞快速提取试剂盒(济南思科捷公司);cDNA 逆转录试剂盒、2 \times SYBR Green I 试剂盒(南京诺维赞公司);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司);大鼠 EILSA(Rbpj、IFN- γ 和 IL-4)试剂盒(上海江莱生物技术有限公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);LightCycler[®] 480Q-PCR 仪(美国 Roche 公司);多功能酶标仪(美国 Perkin - Elmer 公司);流式细胞仪(美国 BD FACSVerseTM)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 把大鼠随机分为正常对照组(NC 组)、葡萄膜炎模型组(EAU 组)和空白对照组(BC 组),每组各 8 只。预先制备含光感受器间维生素 A 结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)、完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、结核分枝杆菌 H37RA(tuberculin, TB)的无菌 PBS 乳糜液,EAU 模型组大鼠在躯干上皮下、后肢两足垫及腹壁两侧各点分别均匀注射 200 μ L 以诱导葡萄膜炎,BC 组大鼠于相同部位分别注射等体积的不含 IRBP 的 TB+CFA 乳糜液,NC 组同法注射等体积的无菌生理盐水。各组大鼠不同处理条件干预后第 12d,按照 5%苯巴比妥溶液(按 50mg/kg 体质量的比例)腹腔注射麻醉处死大鼠,迅速分离各大鼠脾脏、淋巴结和眼组织用于以下实验研究。

1.2.2 双荧光素酶检测 miR-223-3p 调控 Rbpj 基因 应用生物信息软件预测 miR-223-3p 与 Rbpj 基因的结合位点;将 Rbpj 基因的 3' UTR 序列及其突变体克隆到双荧光素酶报告基因载体中,构建野生型及突变型重组双荧光素酶报告质粒载体,采用 PCR 及基因测序方法鉴定载体是否构建成功。将构建好的野生型和突变型双荧光素酶报告载体,通过 mimic+Rbpj 野生型, mimics NC+Rbpj 野生型, mimic+Rbpj 突变型, mimics NC+Rbpj 突变型进行共转染,转染后 48h 以空白细胞裂解液作为参比,测定相对光单位(relative light unit, RLU)值。

1.2.3 Q-PCR 检测大鼠脾脏和淋巴结及眼组织中 miR-223-3p 与 Rbpj 基因的表达 免疫后 12d,各组大鼠随机各选取 3 只,分离脾脏、淋巴结和眼组织,用 RNA 组织/细胞快速提取试剂盒提取 miRNA 和总 RNA, K5600 光度计检测 RNA 的纯度和浓度(A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.1)。将提取的 miRNA 和总 RNA 逆转录成 cDNA,采用 Q-PCR 技术检测 miR-223-3p、Rbpj 基因的表达水平,其中 U6 为 miR-223-3p 的内参, GAPDH 为 Rbpj 基因的内参。U6 的反转录引物为 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTCAT-3', miR-223-3p 反转录引物为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG GGG TA-3'。miR-223-3p、Rbpj、U6 和 GAPDH 的 PCR 引物序列见表 1。Q-PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5s,循环 1 次;

95 $^{\circ}$ C 20s, 57 $^{\circ}$ C 25s, 60 $^{\circ}$ C 25s, 循环 45 次。Q-PCR 检测结束后,按照 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算 miR-223-3p、Rbpj 基因表达情况,并进行统计分析。实验重复 3 次。

1.2.4 ELISA 检测大鼠脾脏和淋巴结及眼组织中 Rbpj 与 IFN- γ 和 IL-17 蛋白的表达水平 免疫后 12d,每组大鼠随机各选取 2 只,分别收取各组大鼠的脾脏、淋巴结和眼组织,放入无菌 EP 管中,然后加入 400 μ L RIPA 裂解液和 4 μ L PMSF,待充分混匀后电动匀浆 5min,使组织裂解完全。将样品管插入冰中,超声波细胞粉碎机超声 20min,高速离心机离心 8000r/min, 4 $^{\circ}$ C 10min 后,收取上清液。BCA 法测定各组蛋白浓度, ELISA 试剂盒检测 Rbpj、IFN- γ 和 IL-4 蛋白的表达水平。实验重复 3 次。

1.2.5 流式细胞仪检测大鼠脾脏和淋巴结及眼组织中 Th1 和 Th17 细胞水平 免疫后 12d,每组大鼠随机各选取 3 只,取各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织研磨后用 40 μ m 细胞筛网过滤,尼龙毛富集 T 淋巴细胞,然后用大鼠淋巴细胞分离液进一步纯化得到 T 淋巴细胞,加入 4 μ L 细胞刺激混合剂(包含 cocktail 刺激液和 Golgistop 蛋白转运抑制剂),振荡器涡旋 10s 充分混匀。先用 FITC-CD4 进行细胞表面染色,然后对细胞行固定破膜,然后分别用 PE-IFN- γ 和 PE-IL-17 进行胞内染色,振荡器涡旋 10s 充分混匀。染色结束后用细胞洗涤液清洗 2 次细胞,离心去上清。最后每管加 300 μ L PBS 重悬细胞,滤网过滤,流式细胞仪检测各组大鼠 Th1、Th17 细胞表达水平并分析结果。实验重复 3 次。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS21.0 进行分析。计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,经 Levene 检验方差齐,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-233-3p 调控 Rbpj 基因 双荧光素酶报告基因表达分析结果显示,与正常对照组相比,miR-233-3p 对 Rbpj 基因野生型的值有较显著的下调表达,然而对其预测靶基因位点进行突变后,突变型载体中的 RLU 值表达水平未见明显改变(图 1)。由此可见,miR-223-3p 可明显调控带有 Rbpj 基因片段 3' UTR 基因的表达,Rbpj 为 miR-223-3p 调控的靶基因。

2.2 EAU 大鼠脾脏和淋巴结及眼组织中 miR-233-3p 与 Rbpj 基因的表达水平 Q-PCR 检测发现,BC 组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 miR-233-3p、Rbpj 基因的表达水平与 NC 组大鼠相比无明显变化(均 $P>0.05$);与 NC 组大鼠相比,免疫后 12d,miR-223-3p 在 EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中的表达水平分别为 0.33 \pm 0.29、0.11 \pm 0.12、0.18 \pm 0.11 呈显著下调表达(均 $P<0.05$);Rbpj mRNA 水平均呈上调表达,分别为 3.00 \pm 0.06、1.52 \pm 0.12、3.01 \pm 0.34,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 2。

2.3 Rbpj 和 IFN- γ 及 IL-17 蛋白的表达水平 ELISA 检测结果显示,BC 组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj、IFN- γ 和 IL-17 蛋白的表达水平与 NC 组大鼠相比无明显变化(均 $P>0.05$);相比于 NC 组大鼠,免疫后 12d 的 EAU 模型组大鼠的脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj、IFN- γ 和 IL-17 蛋白水平均呈明显的上调表达,且差异具有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 3。

表1 miR-223-3p、Rbpj、U6 和 GAPDH 引物序列

基因	引物序列
miR-223-3p	上游引物 5'-GCG CGT GTC AGT TTG TCA AA-3'
	下游引物 5'-AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT-3'
Rbpj	上游引物 5'-TGT CCT TGC CCC GGT CAC TCC T-3'
	下游引物 5'-TCG GCC TCT ACA TCC CCA AAC CAC-3'
U6	上游引物 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAAT-3'
	下游引物 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTCAT-3'
GAPDH	上游引物 5'-CAC GGC AAG TTC AAC GGC ACA GT-3'
	下游引物 5'-AGC GGA AGG GGC GGA GAT GAT-3'

表2 免疫后 12d 三组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 miR-223-3p、Rbpj 基因的表达水平

$\bar{x} \pm s$

组别	miR-223-3p			Rbpj mRNA		
	脾脏	淋巴结	眼组织	脾脏	淋巴结	眼组织
NC 组	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0
EAU 模型组	0.33±0.29 ^a	0.11±0.12 ^b	0.18±0.11 ^b	3.00±0.06 ^b	1.52±0.12 ^b	3.01±0.34 ^b
BC 组	1.1±0.01	1.01±0.02	0.99±0.01	1.03±0.02	0.98±0.01	0.98±0.03

注:EAU 模型组;注射含光感受器间维生素 A 结合蛋白(IRBP)、结核菌素和完全弗氏佐剂的乳糜液以诱导葡萄膜炎;BC 组;注射等体积的不含 IRBP 多肽的乳糜液;NC 组;注射等体积的无菌生理盐水。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NC 组。

表3 免疫后 12d 三组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj、IFN- γ 和 IL-17 蛋白的表达水平

($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	Rbpj 蛋白			IFN- γ 蛋白			IL-17 蛋白		
	脾脏	淋巴结	眼组织	脾脏	淋巴结	眼组织	脾脏	淋巴结	眼组织
NC 组	32.51±0.02	31.36±0.04	44.50±0.04	27.9±0.02	31.2±0.04	28.56±1.47	9.37±0.01	9.61±0.04	9.24±0.44
EAU 组	49.69±0.02 ^b	61.85±0.01 ^b	65.77±0.01 ^a	50.9±0.03 ^a	52.19±0.01 ^b	62.99±0.06 ^b	12.24±0.01 ^b	13.29±0.03 ^b	11.99±0.01 ^b
BC 组	30.46±0.02	29.98±0.03	43.45±0.04	26.87±0.01	32.13±0.03	29.79±0.58	8.97±0.04	9.47±0.03	9.18±0.14

注:EAU 模型组;注射含光感受器间维生素 A 结合蛋白(IRBP)、结核菌素和完全弗氏佐剂的乳糜液以诱导葡萄膜炎;BC 组;注射等体积的不含 IRBP 多肽的乳糜液;NC 组;注射等体积的无菌生理盐水。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NC 组。

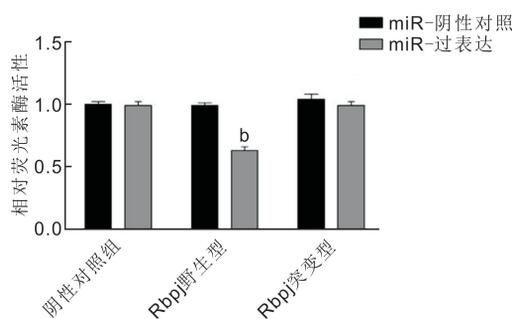


图1 miR-223-3p 与质粒载体转染靶细胞后 Rbpj 的表达水平
^b $P < 0.01$ vs miR-阴性对照组。

2.4 大鼠脾脏和淋巴结及眼组织中 Th1 与 Th17 细胞水平

免疫后 12d, 流式细胞仪分别检测三组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th1、Th17 细胞水平, 发现 BC 组大鼠与 NC 组大鼠相比, 各组织中 Th1 和 Th17 细胞水平差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与 NC 组相比, EAU 模型组大鼠各组织中 Th1 和 Th17 细胞水平明显升高, 见表 4, 图 2、3。

3 讨论

葡萄膜炎是一类眼科常见、以眼内炎症为特征的自身免疫性疾病, 常伴有眼疼、畏光、前房积脓和玻璃体混浊等。目前, 葡萄膜炎的发病机制尚不完全清楚, 临床治疗主要依赖激素和免疫抑制剂, 复发率高, 长期使用易产生药物依赖性, 导致严重的并发症, 其诊疗已属于世界性难

题。研究发现, Th1、Th17 细胞是诱导葡萄膜炎发病的关键因素, Th1 和 Th17 细胞因子主要介导促炎作用, Th1 和 Th17 与其分泌的标志性细胞因子 IFN- γ 、IL-17 共同参与了葡萄膜炎的发生发展^[13]。葡萄膜炎的免疫调节涉及多条信号通路, 其中 Notch 信号通路是维持机体免疫平衡的重要信号通路, 在细胞因子的刺激下可调控初始 CD4⁺ T 细胞分化为 Th1、Th17 等效应细胞进而影响 Th 细胞之间的比例平衡, 并影响葡萄膜炎的病理过程^[14-15]。转录因子 Rbpj 是 Notch 信号通路活化过程中所必须的, 在哺乳动物中已发现的 4 种受体 Notch1~4 均可通过关键性转录因子 Rbpj 调节下游基因的表达, 敲除 Rbpj 即可阻断全部 Notch 信号通路^[16-17]。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类短片段的内源性非编码 RNA 分子, 能直接结合特定的 mRNA 靶分子的 3' 端非翻译区而使其降解并抑制蛋白质的合成, 从而以负反馈调节方式发挥免疫调控作用^[18]。越来越多的证据表明, miRNAs 可通过调节 Th 细胞分化在自身免疫性疾病的发病机制中发挥重要作用。Chen 等^[19] 研究发现, miR-223-3p 在实验性自身免疫性心肌炎小鼠中的表达明显低于正常小鼠。miR-223-3p 可抑制 NLRP3 炎症小体的表达, 促进树突状细胞(dendritic cell, DC) 向耐受性 DC 表型分化。miR-223-3p 通过抑制抗原递呈树突状细胞的功能, 有效诱导调节性 T 细胞(Treg) 的产生, 提示 miR-223-3p 参与诱导耐受性树突状细胞的表型并调节自身免

表 4 免疫后 12d 三组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th1、Th17 细胞水平

($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	脾脏		淋巴结		眼组织	
	Th1 细胞水平	Th17 细胞水平	Th1 细胞水平	Th17 细胞水平	Th1 细胞水平	Th17 细胞水平
NC 组	0.65±0.13	0.73±0.06	0.49±0.15	0.84±0.04	0.63±0.08	1.05±0.16
EAU 模型组	2.29±0.17 ^b	4.34±0.18 ^b	2.23±0.18 ^b	4.55±0.12 ^b	2.83±0.07 ^b	4.77±0.19 ^b
BC 组	0.68±0.04	0.72±0.06	0.45±0.12	0.83±0.03	0.62±0.05	1.03±0.06

注:EAU 模型组:注射含光感受器间维生素 A 结合蛋白(IRBP)、结核菌素和完全弗氏佐剂的乳糜液以诱导葡萄膜炎;BC 组:注射等体积的不含 IRBP 多肽的乳糜液;NC 组:注射等体积的无菌生理盐水。^b $P < 0.01$ vs NC 组。

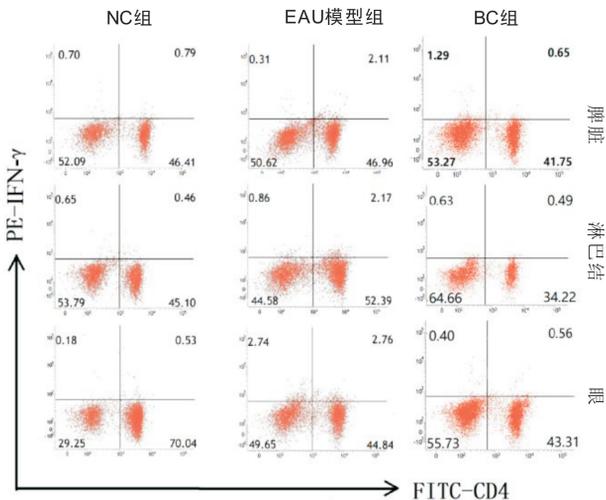


图 2 流式细胞仪检测不同条件处理后第 12d 各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织细胞中 Th1 细胞水平变化。

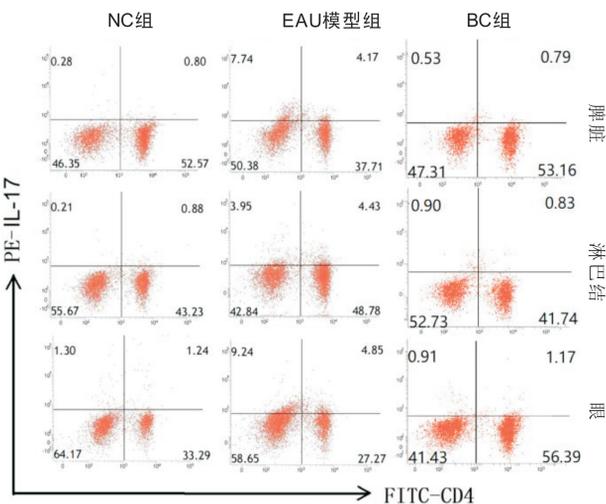


图 3 流式细胞仪检测不同条件处理后第 12d 各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织细胞中 Th17 细胞水平变化。

疫性心肌炎的耐受性;Shi 等^[20]发现,miR-219a-5p 通过抑制 Th1/Th17 介导的免疫反应抑制肠道炎症的发展进程,提示 miR-219a-5p 可能是肠道炎症治疗的新靶点;Cruz 等^[21]证实,miR-27 在小鼠 T 细胞中的过表达可抑制调节性 T(Treg)细胞的分化,导致 Treg 功能紊乱,进而造成小鼠免疫耐受功能障碍。

目前,国内外多名学者围绕 miRNAs 在葡萄膜炎病理机制中的作用开展了相关的研究。Zhang 等^[22]研究表明,miR-182-5p 对 EAU 小鼠 TAF15 的调控,可通过抑制 STAT3 磷酸化来负性调节 Th17 细胞的发育,从而发挥治

疗葡萄膜炎的作用。Muhammad 等^[23]研究证实,脾脏组织产生的 miR-155 可抑制黑皮质素 5 受体依赖的抑制性巨噬细胞(suppressor macrophages),加剧了 EAU 的发展在实验性自身免疫性前葡萄膜炎(experimental autoimmune anterior uveitis,EAAU)的研究中,Hsu 等^[10]发现 miRNA 的动态变化会促进核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的活化,进而激活下游 Th1 和 Th17 特异性细胞因子和效应 T 细胞,最终引起光感受器细胞凋亡,进一步研究发现,与 NF- κ B 信号通路相关的 miR-223-3p、miR-146a-5p、miR-155-5p 和 miR-147b 在葡萄膜炎大鼠虹膜、睫状体中呈现低水平表达,而 miR-182-5p、miR-183-5p 和 miR-9-3p 呈现高水平表达。Wei 等^[9]研究发现,miR-223-3p 能通过抑制转录因子 FOXO3 的表达促进 EAU 小鼠中树突状细胞驱动的 Th17 细胞反应,上述研究提示 miR-223-3p 有可能成为治疗葡萄膜炎新的作用靶点。

生物信息学预测分析和本研究均表明,Notch 信号通路的转录因子 Rbpj 基因为 miR-223-3p 调控的靶基因。Q-PCR 结果显示,与 NC 组相比,免疫 12d 后的 EAU 大鼠的眼、脾和淋巴结组织中 miR-223-3p 显著下调,然而其调控的靶基因 Rbpj 的表达明显升高。ELISA 检测结果发现,EAU 模型组大鼠各组织 Rbpj、IFN- γ 和 IL-17 蛋白表达水平均明显高于 NC 组,流式检测表明 EAU 模型组 Th1 和 Th17 细胞比例明显升高,提示 Th1 和 Th17 细胞比例失衡与机体的免疫微环境改变有关,失衡的 Th1 和 Th17 与葡萄膜炎的发生发展密切相关。

综上所述,我们发现 miR-223-3p 可负调控 Notch 信号通路转录因子 Rbpj 的表达,EAU 大鼠中 miR-223-3p 的下调表达可提高 Rbpj 基因和蛋白的表达水平,影响 Th1 和 Th17 细胞的分化及相关分子 IFN- γ 和 IL-17 的表达水平,进而影响葡萄膜炎的发生发展。本研究初步阐释了 miR-223-3p 对 Notch 信号通路转录因子 Rbpj 表达的调控作用以及对葡萄膜炎大鼠 Th1、Th17 细胞分化及 IFN- γ 和 IL-17 的影响,对寻找葡萄膜炎新的治疗靶点、丰富临床基础理论具有重要意义。

参考文献

- 1 Krishna U, Ajanaku D, Denniston AK, et al. Uveitis: a sight-threatening disease which can impact all systems. *Postgrad Med J* 2017; 93(1106):766-773
- 2 Li XH, Liang DC, Shao H, et al. Adenosine receptor activation in the Th17 autoimmune responses of experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunol* 2019;339:24-28
- 3 Greco A, de Virgilio A, Ralli M, et al. Behçet's disease: new insights into pathophysiology, clinical features and treatment options. *Autoimmun*

Rev 2018;17(6):567-575

4 李光达, 李筱荣, 袁立飞, 等. IL-17、IFN- γ 在大鼠自体免疫性葡萄膜炎视网膜的表达及其意义. *眼科新进展* 2011; 31(11): 1008-1011

5 Tindemans I, Peeters MJW, Hendriks RW. Notch signaling in T helper cell subsets: instructor or unbiased amplifier? *Front Immunol* 2017; 8:419

6 Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 2019;234(5):5451-5465

7 Moein S, Vaghari - Tabari M, Qujeq D, et al. MiRNAs and inflammatory bowel disease: an interesting new story. *J Cell Physiol* 2019;234(4):3277-3293

8 向菁, 康丽华, 管怀进. LncRNA 在眼科疾病发生发展中的作用机制研究进展. *眼科新进展* 2017;37(6):579-582

9 Wei YK, Chen SS, Sun DM, et al. miR - 223 - 3p promotes autoreactive Th17 cell responses in experimental autoimmune uveitis (EAU) by inhibiting transcription factor FOXO3 expression. *FASEB J* 2019;33(12):13951-13965

10 Hsu YR, Chang SW, Lin YC, et al. Expression of microRNAs in the eyes of lewis rats with experimental autoimmune anterior uveitis. *Mediators Inflamm* 2015;2015:457835

11 Guo DD, Li J, Liu ZF, et al. Characterization of microRNA expression profiling in peripheral blood lymphocytes in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflamm Res* 2015;64(9):683-696

12 Pockar S, Globocnik Petrovic M, Peterlin B, et al. MiRNA as biomarker for uveitis - A systematic review of the literature. *Gene* 2019; 696:162-175

13 钱丽丽, 徐亚茹, 胡芳, 等. Th1、Th17 细胞相关因子在实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠中的表达及作用. *眼科新进展* 2015;35(10): 918-920

14 Li QF, Zhang H, Yu L, et al. Down-regulation of Notch signaling

pathway reverses the Th1/Th2 imbalance in tuberculosis patients. *Int Immunopharmacol* 2018;54:24-32

15 Yin XW, Liu B, Wei HX, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the WEI CD4⁺/CD8⁺, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflamm Res* 2019; 68(9):761-774

16 Siebel C, Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol Rev* 2017;97(4):1235-1294

17 Chen ELY, Thompson PK, Zúñiga-Pflücker JC. RBPJ-dependent Notch signaling initiates the T cell program in a subset of *Thymus* - seeding progenitors. *Nat Immunol* 2019;20(11):1456-1468

18 Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J* 2018; 285(20): 3695-3716

19 Chen LQ, Hou XY, Zhang MM, et al. microRNA-223-3p modulates dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune myocarditis by targeting the NLRP3 inflammasome. *Mol Immunol* 2020; 117:73-83

20 Shi Y, Dai SL, Qiu CY, et al. microRNA - 219a - 5p suppresses intestinal inflammation through inhibiting Th1/Th17-mediated immune responses in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 2020;13(2): 303-312

21 Cruz LO, Hashemifar SS, Wu CJ, et al. Excessive expression of miR-27 impairs Treg-mediated immunological tolerance. *J Clin Invest* 2017;127(2):530-542

22 Zhang LS, Sun P, Zhang Y, et al. miR - 182 - 5p inhibits the pathogenic Th17 response in experimental autoimmune uveitis mice via suppressing TAF₁₅. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 529(3): 784-792

23 Muhammad F, Trivett A, Wang D, et al. Tissue-specific production of MicroRNA-155 inhibits melanocortin 5 receptor-dependent suppressor macrophages to promote experimental autoimmune uveitis. *Eur J Immunol* 2019;49(11):2074-2082