

论著·基础研究

miR-322-5p 靶向 Akt3 抑制 Th17 分化对干扰素 β 干预实验性自身免疫性脑脊髓炎的影响

金书欣^{1,2}, 吴婷³, 蔡飞扬^{1,2}, 雷蕴轩^{1,2}, 席晔斌¹, 陈广洁¹

1. 上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025; 2. 上海市免疫学研究所, 上海 200025; 3. 上海交通大学医学院附属仁济医院生殖医学科胚胎实验室, 上海 200127

[摘要] **目的**·探讨 miR-322-5p 靶向 Akt3 抑制 Th17 分化对干扰素 β (interferon- β , IFN- β) 干预实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 的影响。**方法**·建立 EAE 小鼠模型, 设 IFN- β 干预组和 PBS 对照组。流式染色比较 2 组 Th17 的比例变化; RNA 芯片检测 2 组小鼠 miRNA 的差异表达, 筛选出 miR-322-5p 做进一步研究; 软件预测 miR-322-5p 的靶基因为 *Akt3*; IFN- β 干预后和过表达 miR-322-5p 后检测 *Akt3* 的表达水平; 双荧光素酶报告实验验证 miR-322-5p 和 *Akt3* 的直接靶向关系; 体外实验观察 Akt3 对 Th17 细胞分化的影响。**结果**·IFN- β 干预组的 EAE 小鼠 Th17 比例均显著降低, miR-322-5p 的表达显著升高, 而 *Akt3* 的表达明显降低; 过表达 miR-322-5p 能显著抑制 *Akt3* 的表达, 双荧光素酶报告实验显示 *Akt3* 是 miR-322-5p 的直接靶基因, 且 Akt3 对 Th17 的体外分化有明显促进作用。**结论**·IFN- β 可通过影响 miR-322-5p 靶向 *Akt3*, 进而抑制 Th17 分化来缓解 EAE 的疾病进程。

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 干扰素 β ; miRNA; Th17 分化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.08.005 **[中图分类号]** R392.32 **[文献标志码]** A

Effect of miR-322-5p on inhibiting Th17 differentiation by targeting Akt3 in experimental autoimmune encephalomyelitis interfered by interferon- β

JIN Shu-xin^{1,2}, WU Ting³, CAI Fei-yang^{1,2}, LEI Yun-xuan^{1,2}, XI Ye-bin¹, CHEN Guang-jie¹

1. Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Institute of Immunology, Shanghai 200025, China; 3. Embryo Laboratory of Reproductive Medicine, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of miR-322-5p which targets Akt3 on Th17 differentiation in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) interfered by interferon- β (IFN- β). **Methods**·The effect of IFN- β on EAE mice which were randomly divided into IFN- β group and PBS group was examined. The percents of Th17 in the two groups were compared by fluorescence activated cell sorting. The miRNA array was made to find different miRNAs between those two groups. MiR-322-5p was screened for further research. The target gene of miR-322-5p was predicted using softwares and the common predicted target gene *Akt3* was got. The expression of *Akt3* was detected after IFN- β intervention and miR-322-5p overexpression. The target relationship between *Akt3* and miR-322-5p was verified by luciferase reporter assay. At last, the effect of Akt3 on Th17 differentiation was explored *in vitro*. **Results**·Compared to PBS group, the percent of Th17 was significantly downregulated, the expression of miR-322-5p was significantly upregulated and *Akt3* was significantly downregulated in IFN- β group. The expression of *Akt3* was obviously decreased after overexpressing miR-322-5p. Luciferase reporter assay showed that *Akt3* was directly targeted by miR-322-5p. The percent of Th17 differentiation was greatly promoted by Akt3 *in vitro*. **Conclusion**·IFN- β significantly ameliorates the severity of EAE by affecting miR-322-5p which can inhibit Th17 differentiation by targeting *Akt3*.

[Key words] experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE); interferon- β (IFN- β); miRNA; Th17 differentiation

多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是一种以中枢神经系统白质炎性脱髓鞘为主要病理特点的自身免疫性疾病, 其发病原因到目前为止尚未完全明确。越来越多的研究^[1-2]表明 MS 是以特异性致敏的 CD4⁺T 细胞介导为主, 中枢神经系统内小血管周围出现单个核细胞浸润及白质炎

性脱髓鞘病变为主要特点的自身免疫性疾病。大多数患者主要表现为反复发作的神经功能障碍, 多次缓解复发, 最终因感觉和运动缺陷导致残疾^[3]。实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 是对实验动物进行髓鞘蛋白免疫构建的疾病模型, 在病

[基金项目] 国家自然科学基金 (81771731) (National Natural Science Foundation of China, 81771731)。

[作者简介] 金书欣 (1994—), 女, 技术员, 硕士; 电子信箱: jinshuxin888@163.com。

[通信作者] 陈广洁, 电子信箱: guangjie_chen@163.com。



理、生理、免疫等诸多方面与人类 MS 具有相同的特征, 是目前国际公认的研究 MS 免疫病理学机制和实验性治疗的理想动物模型^[4-5]。

Th17 细胞是近年来发现的一群以分泌白细胞介素 17 (interleukin 17, IL-17)、IL-21 和 IL-22 为特点, 具有多种生物学活性的细胞亚群^[6]。其分泌的 IL-17 可在组织局部诱导 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、趋化因子以及基质金属蛋白酶等的分泌, 并介导巨噬细胞的招募、活化和迁移等过程。越来越多的研究^[7]证据表明 Th17 细胞是 EAE 的主要致病细胞。

干扰素 β (interferon- β , IFN- β) 是一种天然存在于机体内的蛋白质, 具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节的作用, 也是美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的首个用于 MS 治疗的药物。已有研究^[8-9]表明, IFN- β 治疗 MS 的作用机制包括抑制抗原提呈、促进细胞凋亡、调节细胞因子和趋化因子的分泌等; 但是, IFN- β 对 MS 的治疗机制还有待进一步研究。

miRNA 是一种调控基因表达水平的非编码单链小分子 RNA, 成熟的 miRNA 是一种长度为 20 ~ 24 个核苷酸的微小 RNA, 是进化中相对保守的非编码 RNA^[10], 其一条核苷酸链能与 RNA 诱导的基因沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合形成非对称的 RISC 复合物。该非对称 RISC 复合物能够与靶 mRNA 结合, 从而使目的基因沉默^[11]。研究^[12]发现, miRNA 参与 MS 的多个发病阶段, 提示 miRNA 对 MS 的疾病进程有重大影响。

鉴于上述的研究背景, 本研究旨在观察 IFN- β 干预后 EAE 小鼠 miRNA 的变化, 并试图筛选出差异表达 miRNA, 进一步预测并验证其靶基因, 探索 IFN- β 干预是否通过影响 miRNA 的变化而抑制 Th17 分化来缓解 EAE, 进一步探讨 IFN- β 干预 MS 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6 小鼠, 雄性, 6 ~ 8 周龄, 体质量为 20 ~ 23 g, 由中国科学院实验动物中心提供, 饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部屏障环境内 [生产许可证号为 SCXK (沪) 2018-0007, 使用许可证号为 SYXK (沪) 2018-0027]; 小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 细胞系由上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系王宏林实验室馈赠。

1.1.2 主要试剂 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白肽段

(MOG_{35~55}), 由上海吉尔生化有限公司合成; 百日咳毒素 (pertussis toxin, PT) 购于 List Biological Laboratories 公司; 热灭活结核分枝杆菌 (tuberculosis, TB) 购于 Difco Laboratories 公司; TRIzol、SYBR Green master mix 试剂盒、脂质体转染试剂 lipofectamine 3000 (Lipo3000), 购于 Invitrogen 公司; Prime Script RT reagent kit 购于 TaKaRa 公司; RPMI 1640 培养液、Opti-MEM 培养基、胎牛血清 (FBS), 购于 Gibco 公司; 兔抗鼠 Akt3、GAPDH 单克隆抗体, 二抗, 购于 CST 公司; RIPA 裂解液 (强)、Western blotting 显影液、青霉素和链霉素, 购于碧云天公司; 抗小鼠 CD4-FITC 抗体、抗小鼠 IFN- γ -BV421 抗体、抗小鼠 IL-17A-PE 抗体, 购于 Biolegend 公司; 细胞刺激混合物试剂盒 (添加蛋白转运抑制剂) [Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)] (500 \times)、抗小鼠 CD3 抗体、抗小鼠 CD28 抗体、抗小鼠 IFN- γ 抗体、抗小鼠 IL-4 抗体, 购于 eBioscience 公司; IL-6、TGF- β 、IL-23, 购于 R&D 公司; 抗小鼠 CD4⁺T 细胞磁珠、MS 分选柱购于美天旎公司; cDNA 扩增酶 KOD-201 购于 TOYOBO 公司; 限制性内切酶 *Xho* I、*Not* I 和 T4 连接酶购于 NEB 公司; psi-CHECK2 质粒购于优宝生物公司; 凝胶回收试剂盒、无内毒素小量质粒提取试剂盒 (Endo-free Plasmid Mini Kit II) 购于 Omega 公司; 双荧光素酶报告基因检测系统购于 Promega 公司; Akt 抑制剂 SC79 购于 CSNpharm 公司; miR-322-5p 模拟物 (mimics) 购于吉玛公司。

1.1.3 主要仪器和设备 循环气流垂直洁净工作台 CA-1390-1 (上海上净), CO₂ 培养箱 (Thermo 公司), 移液器、低温超速离心机、高速台式离心机 (Eppendorf 公司), 流式细胞仪 FACS Canto II (BD 公司), ABI 7900 real-time PCR 仪 (ABI 公司), NanoDrop ND-1000 (NanoDrop 公司), PCR 仪 (Bio-RAD C1000 Thermo Cycher 公司), 垂直电泳仪、转膜仪 (Bio-RAD), 全自动凝胶成像系统 (Tanon 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 EAE 模型建立及分组 在不完全弗氏佐剂中加入 TB 配成完全弗氏佐剂 (complete freund adjuvant, CFA), TB 终浓度为 5 mg/mL; MOG_{35~55} 肽段用 PBS 配成 10 mg/mL; CFA 和 MOG_{35~55} 溶液按 1:1 充分乳化。于免疫诱导当日 (第 0 天), 每只小鼠尾静脉注射 200 μ L 终浓度为 1 μ g/mL 的 PT, 并在其左右两侧的背部中下部位分别皮下注射 100 μ L 的 MOG_{35~55} 抗原乳化液; 于第 2 天, 每只小鼠再次尾静脉注射 200 μ L PT 以加强免疫; 将建模小鼠随机分成 2 组 (IFN- β 干预组和 PBS 对照组), 干预组小鼠从第 3 天开始隔天皮下注射 100 μ L 含 1×10^4 U 的 IFN- β

溶液直至处死当日, 对照组小鼠给予同等剂量的无菌 PBS 溶液。

1.2.2 EAE 的临床评分标准 EAE 的临床评分标准为: 0 分, 不发病; 1 分, 尾部无力; 2 分, 后肢受累、无力、跛行; 3 分, 双后肢完全瘫痪; 4 分, 前肢受累, 双后肢瘫痪; 5 分, 濒临死亡状态或死亡。

1.2.3 磁珠标记分选 CD4⁺T 细胞 配制 MACS 缓冲液 (pH 7.2 PBS, 含 0.5% 牛血清白蛋白、2 mmol/L EDTA), 4 ℃ 下保存备用; 脾脏单个核细胞计数后, 310×g 离心 10 min, 弃去上清; 按每 10⁷ 个细胞 90 μL 的量加入 MACS 缓冲液重悬细胞, 按每 10⁷ 个细胞 10 μL 的量加入抗小鼠 CD4⁺T 细胞磁珠, 混匀细胞, 4 ℃ 避光孵育 10 min; 将 MS 柱放在磁架上, 下面放 15 mL 离心管装过滤液体; 在 MS 柱内加入 1 mL MACS 缓冲液润柱, 将已结合有磁珠的细胞加入 MS 柱内, 再加入 3 mL MACS 缓冲液过柱, 重复 3 次; 待液体流完, 将 MS 柱移到一个新的 15 mL 离心管上, 一次性加入 5 mL MACS 缓冲液, 立即用内芯将 CD4⁺T 细胞推至 15 mL 离心管中, 即为 CD4⁺T 细胞。

1.2.4 RNA 的提取和 real-time RCR 取 1×10⁶ 个细胞用 500 μL TRIzol 裂解, 提取总 RNA, 反转录成 cDNA。使用 SYBR Green master mix 进行 real-time PCR, 以 β-actin 为内参测定 *Akt3* mRNA 表达情况。引物序列见表 1。

1.2.5 miR-322-5p 表达水平检测 取 1×10⁶ 个细胞用 500 μL TRIzol 裂解, 提取总 RNA, 使用 *U6* 和 miR-322-5p 反转录引物, 用反转录试剂盒反转录成 cDNA。使用 SYBR Green master mix 进行 real-time PCR, 以 *U6* 为内参测定 miR-322-5p 的 mRNA 表达情况。引物序列见表 1。

表 1 反转录及 real-time PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences of reverse transcription and real-time PCR

PCR 引物	引物序列 (5'→3')
<i>U6</i> RT	TTCACGAATTTGCGTGTTCAT
<i>U6</i> -F	TCGCTTCGGCAGCACATA
<i>U6</i> -R	TTCACGAATTTGCGTGTTCAT
miR-322-5p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGCACTGGATACGACTCCAAA
miR-322-5p-F	GCGCGCAGCAGCAATTTCATGT
miR-322-5p-R	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
β-actin-F	TTCAACACCCCAGCCATGT
β-actin-R	GTGGTACGACCAGAGGCATACA
<i>Akt3</i> -F	CAAGCCGTAGCCGACCGATTG
<i>Akt3</i> -R	GGTTGTAGACGCATCCATCTCTCTTC

1.2.6 miR-322-5p 脂质体转染 在 24 孔细胞培养板中每孔加入 5×10⁴ 个 NIH3T3 细胞, 在 500 μL 高糖 DMEM

培养液中, 37 ℃、5% CO₂ 培养 12 h, 使细胞的融合率达 70% ~ 90%。准备 5 个 1.5 mL EP 管, 将转染细胞分为 NC 组、miR-322-5p 组、miR-322-5pI 组、NCI 组。设 a 为 Opti-MEM 50 μL+Lipo3000 1 μL, b 为 Opti-MEM 50 μL+NC mimics 100 nmol/L, c 为 Opti-MEM 50 μL+miR-322-5p mimics 100 nmol/L, d 为 Opti-MEM 50 μL+miR-322-5p inhibitor 100 nmol/L, e 为 Opti-MEM 50 μL+NC inhibitor 100 nmol/L。

分别将 a 和 b、a 和 c、a 和 d、a 和 e 以 1:1 的比例混合, 避免剧烈振荡, 室温放置 20 min。在 NC 组、miR-322-5p 组、miR-322-5pI 组、NCI 组 NIH3T3 中分别滴加 a 和 b、a 和 c、a 和 d、a 和 e 的混合液, 37 ℃、5% CO₂ 下培养 4 ~ 6 h。弃去培养基, 换入新高糖 DMEM 培养液 500 μL, 37 ℃、5% CO₂ 下培养 48 h。收集细胞, 1 200×g 离心 3 min, 弃上清。加入 700 μL PBS 吹打混匀, 1 200×g 离心 3 min, 弃上清。加入 500 μL TRIzol, 反复吹打 20 次, 提取总 RNA 或 -20 ℃ 保存。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 PCR 扩增克隆小鼠 *Akt3* 基因 3' 非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR), 经限制性内切酶 *Xho* I 和 *Not* I 酶切后, 插入荧光素酶报告基因载体 psi-CHECK2, 重组质粒经酶切、PCR 和测序鉴定, 构建含有 *Akt3* 基因 3'-UTR 的报告基因质粒 psi-CHECK2-*Akt3*-3'-UTR。

NIH3T3 细胞接种于 24 孔板中, 融合度在 70% ~ 90% 时, 脂质体共转染 miR-322-5p mimics/NC mimics, 每组设 3 个复孔。转染 48 h 后, 采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行检测。萤火虫荧光素酶活性与内参海肾荧光素酶活性的比值即为 psi-CHECK2-*Akt3*-3'-UTR 报告基因质粒的相对荧光素酶活性。实验重复 3 次后进行统计分析。

1.2.8 Western blotting 分析 收集 2×10⁵ ~ 5×10⁵ 个细胞, 加入 RIPA 蛋白裂解液, 抽提细胞全蛋白。10%SDS-PAGE 电泳分离蛋白后, 湿转法将蛋白转到 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉室温震荡封闭 1 h, TBST 洗膜, 兔抗鼠 *Akt3* 或 GAPDH 单克隆抗体 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后, 加入 HRP 标记的抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 加 ECL 发光液进行化学发光显影, 凝胶成像仪对蛋白条带进行观察, 获取图像, 并对图像进行灰度分析 (ImageJ 软件), 记录灰度值, 计算目的蛋白与内参蛋白的灰度比值。实验重复 3 次后进行统计分析。

1.2.9 Th17 细胞的体外分化及流式细胞术检测 分选得到 CD4⁺T 细胞。在 96 孔圆底板中每孔加入 0.15×10⁶ 个细胞, 加入 Th17 细胞分化所需的细胞因子或抗体: CD3 抗体 5 μg/mL、CD28 抗体 2 μg/mL、IFN-γ 抗体 10 μg/

mL、IL-4 抗体 10 μ g/mL、TGF- β 2.5 ng/mL、IL-6 20 ng/mL、IL-23 20 ng/mL, Akt 激动剂组再加入 20 nmol/L SC79, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养 3 ~ 5 d, 流式染色, 检测 Th17 细胞分化的比例。

在 EAE 发病初期和高峰期分别处死小鼠, 取出脾脏和中枢神经系统, 分别分离单个核细胞, 用 RPMI1640 完全培养液重悬。用细胞刺激混合物试剂盒刺激细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4 ~ 5 h。CD4 是 Th17 表面标志, IL-17A 是 Th17 胞内标志, 表面染色加入抗小鼠 CD4-FITC 抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min; 胞内染色加入抗小鼠 IL-17A-PE 抗体, 室温避光孵育 30 min, 最后用 2% 多聚甲醛固定, 流式细胞术检测 Th17 细胞的比例。

1.3 统计学方法

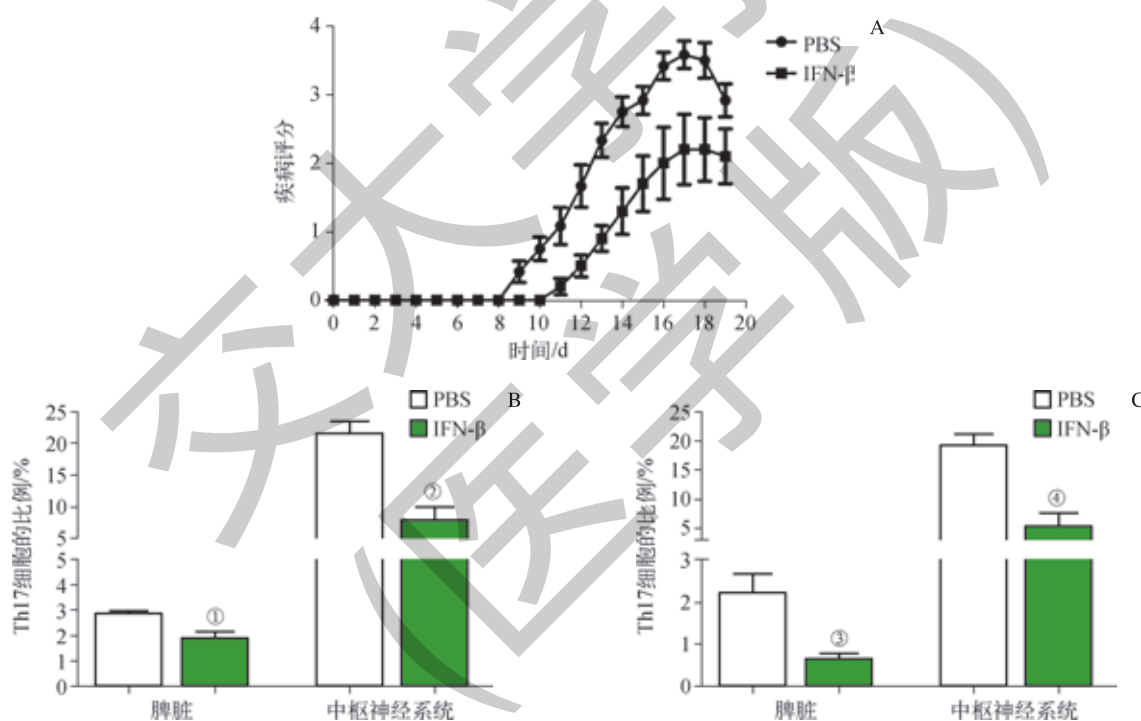
采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。组间比

较行 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAE 小鼠发病情况及 Th17 的比例变化

EAE 建模之后, 每日观察小鼠的发病情况, 并进行疾病评分。结果 (图 1A) 显示, PBS 组小鼠自免疫后第 8 天开始发病, 疾病严重度加重较快, 在第 17 天左右达到疾病高峰期; 而 IFN- β 干预组小鼠起病时间延迟且疾病严重度明显降低, 提示 IFN- β 干预能够明显延迟 EAE 的发病时间并显著缓解 EAE 的疾病严重度。流式细胞术检测结果 (图 1B、1C) 显示, 在 EAE 发病初期和高峰期, 与 PBS 对照组相比, IFN- β 干预组小鼠脾脏和中枢神经系统中的 Th17 比例均显著下降, 提示 IFN- β 干预能够显著抑制 EAE 小鼠体内 Th17 的分化。



注: A. EAE 疾病评分 ($n=5$); B. EAE 发病初期脾脏和中枢神经系统中 Th17 的比例 ($n=4$); C. EAE 高峰期脾脏和中枢神经系统中 Th17 的比例 ($n=4$).
^① $P=0.029$, ^② $P=0.003$, ^③ $P=0.037$, ^④ $P=0.000$, 与 PBS 对照组比较

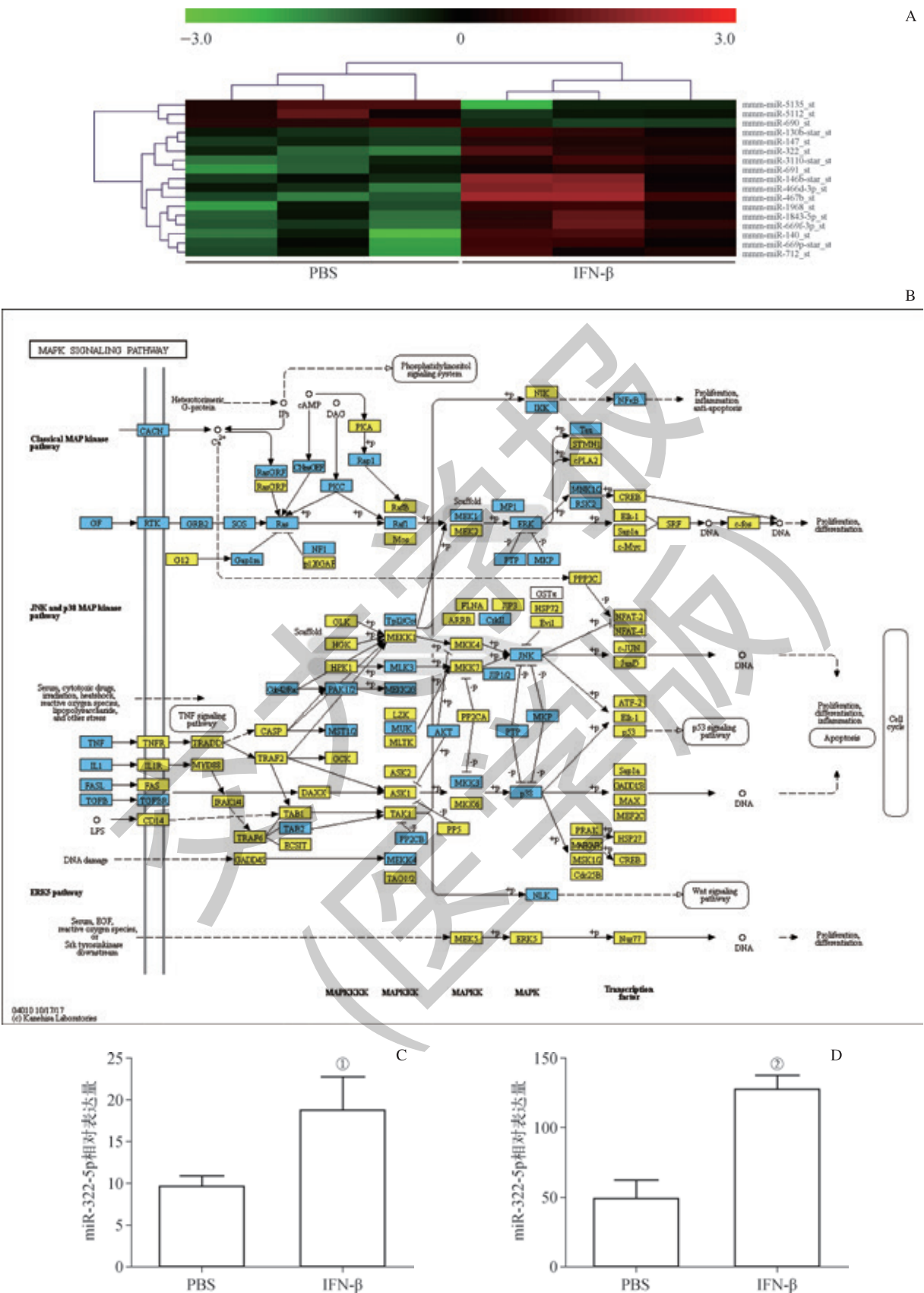
图 1 IFN- β 干预组与 PBS 对照组 EAE 小鼠发病情况及 Th17 比例变化

Fig 1 Disease scores of EAE and change of percentages of Th17 between IFN- β group and PBS group

2.2 EAE 小鼠 miR-322-5p 表达变化

利用 EAE 高峰期 IFN- β 干预组和 PBS 对照组小鼠的脾脏 CD4⁺T 细胞进行 RNA 测序。结果显示 (图 2A), 与 PBS 对照组相比, IFN- β 干预组存在 17 个差异 miRNA, 其中 14 个 miRNA 上调, 3 个 miRNA 下调。本研究选择与细胞分化相关的 MAPK 信号通路 (图 2B), 通路中的

蓝框显示差异 miRNA 的预测靶基因; 经统计发现, miR-322-5p 与蓝框中的预测靶基因相关性最大, 且 miR-322-5p 的上调倍数为 3.23, 因此选择 miR-322-5p 作进一步研究。结果显示 (图 2C、2D), 在 EAE 发病初期和高峰期, 与 PBS 对照组相比, IFN- β 干预组 miR-322-5p 表达量均显著升高。



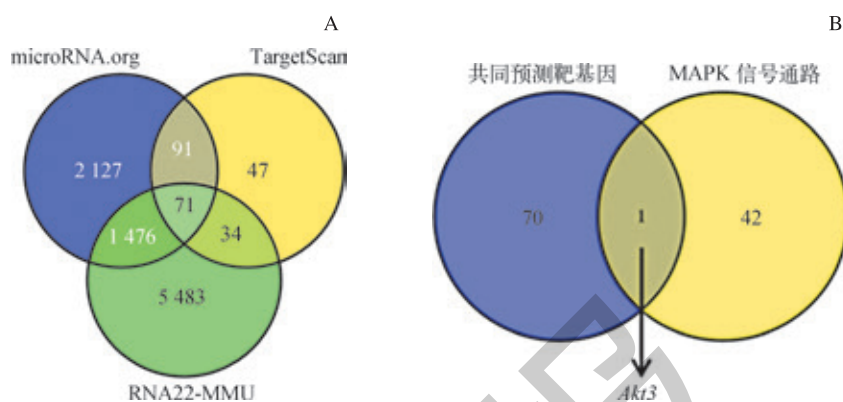
注: A. 2 组差异 miRNA 表达谱; B. MAPK 信号通路 (蓝框中的基因是差异 miRNA 的预测靶基因); C. EAE 发病初期 miR-322-5p 表达; D. EAE 发病高峰期 miR-322-5p 表达。* $P=0.023$, * $P=0.010$, 与 PBS 对照组比较

图 2 IFN- β 干预组与 PBS 对照组 EAE 小鼠 miR-322-5p 表达变化
Fig 2 Change of expression of miR-322-5p between IFN- β group and PBS group

2.3 预测 miR-322-5p 的靶基因

如图 3 所示: 图 3A 显示 venn 分析 microRNA.org、TargetScan 和 RNA22-MMU 这 3 种 miRNA 靶点预测数据

库中 miR-322-5p 的共同预测靶基因是 71 种, 图 3B 显示这 71 种共同预测靶基因与 MAPK 信号通路存在 1 种共同预测靶基因 *Akt3*。



注: A. 3 种靶基因预测软件共同预测到 71 种靶基因; B. 71 种共同预测靶基因和 MAPK 信号通路有 1 种共同预测靶基因 *Akt3*

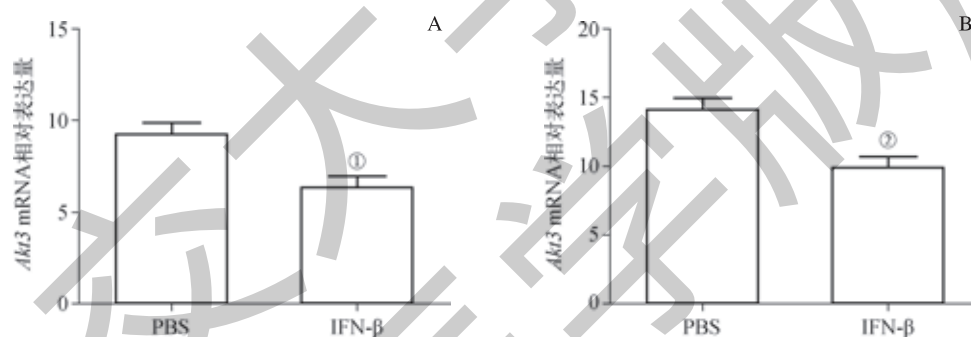
图 3 miR-322-5p 的靶基因预测分析

Fig 3 Analysis of the predicted target gene of miR-322-5p

2.4 2 组 EAE 小鼠 *Akt3* mRNA 的表达变化

在发病初期和高峰期, 与 PBS 对照组相比, IFN- β 干

预组 *Akt3* mRNA 表达均显著降低 (图 4)。



注: A. EAE 发病初期; B. EAE 高峰期。① $P=0.007$, ② $P=0.008$, 与 PBS 对照组比较

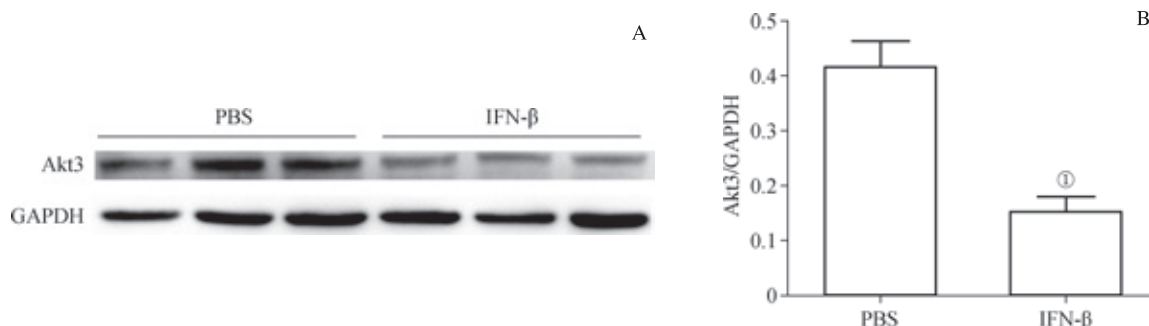
图 4 EAE 小鼠 *Akt3* mRNA 表达变化

Fig 4 Change of expression of *Akt3* mRNA between IFN- β group and PBS group

2.5 2 组 EAE 小鼠 *Akt3* 蛋白表达变化

Western blotting 结果 (图 5) 显示, 与 PBS 对照组相

比, IFN- β 干预组 *Akt3* 蛋白表达量显著降低 ($P=0.004$)。



注: A. Western blotting 检测; B. 蛋白表达量的组间比较。① $P=0.004$, 与 PBS 对照组比较

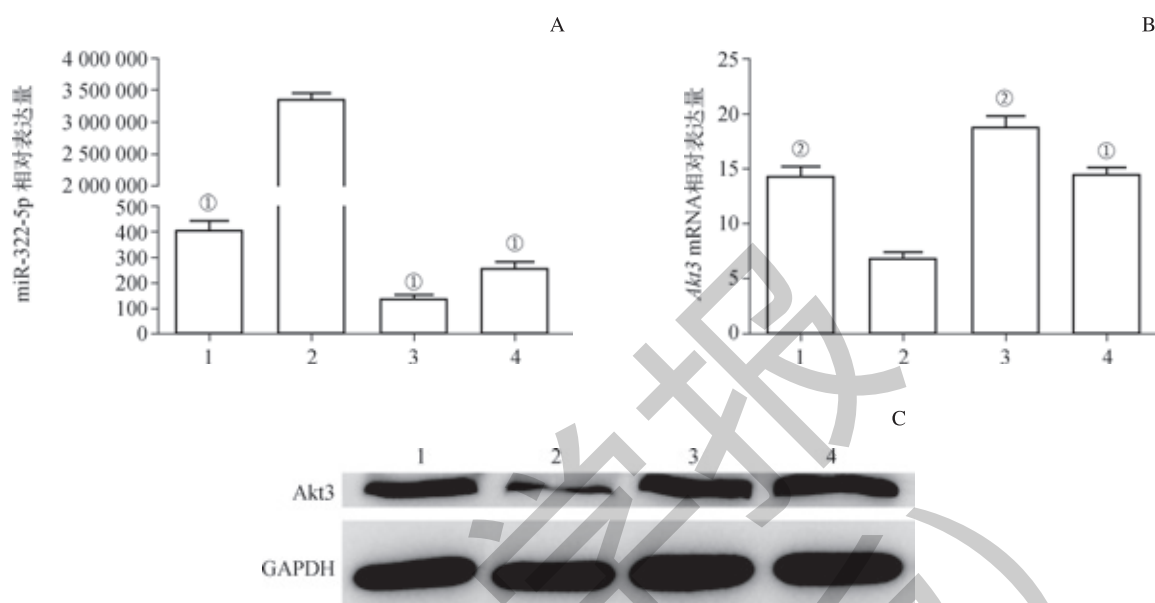
图 5 IFN- β 干预组与 PBS 对照组 EAE 小鼠 *Akt3* 蛋白表达变化

Fig 5 Change of protein expression of *Akt3* between IFN- β group and PBS group

2.6 miR-322-5p 脂质体转染 NIH3T3 后 *Akt3* 的表达情况

在 NIH3T3 细胞系中体外脂质体转染 NC mimics、miR-322-5p mimics、miR-322-5p inhibitor、NC inhibitor, 结

果显示: 过表达 miR-322-5p 后, *Akt3* 的 mRNA 水平显著降低, 抑制 miR-322-5p 导致 *Akt3* 的表达明显升高; 过表达 miR-322-5p 后 *Akt3* 的蛋白表达水平显著降低 (图 6)。



注: A. miR-322-5p 表达; B. *Akt3* mRNA 表达; C. Western blotting 检测 *Akt3* 蛋白表达。1. NC 组; 2. miR-322-5p 组; 3. miR-322-5p 抑制剂组; 4. NC 抑制剂组。① $P=0.000$, ② $P=0.002$, 与 miR-322-5p 组比较

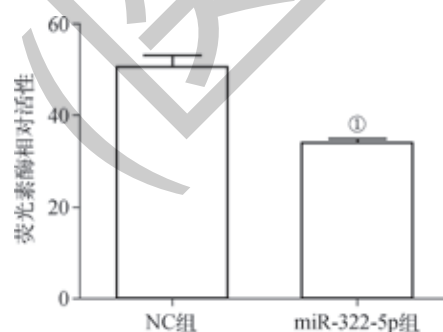
图 6 NIH3T3 细胞系过表达或抑制 miR-322-5p 时 *Akt3* 表达变化

Fig 6 Expression of *Akt3* overexpressed or inhibited by miR-322-5p in NIH3T3

2.7 miR-322-5p 与 *Akt3* 的直接靶向关系

将 NC mimics、miR-322-5p mimics 和 psi-CHECK2-*Akt3*-3'-UTR 报告基因质粒分别共同转染到 NIH3T3 中, 检测萤火虫荧光素酶活性与内参海肾荧光素酶活性的比

值, 结果 (图 7) 显示, 转染 miR-322-5p mimics 的细胞裂解液中萤火虫荧光素酶活性与内参海肾荧光素酶活性的比值显著降低, 表明 *Akt3* 是 miR-322-5p 的直接靶基因。



注: ① $P=0.003$, 与 NC 组比较

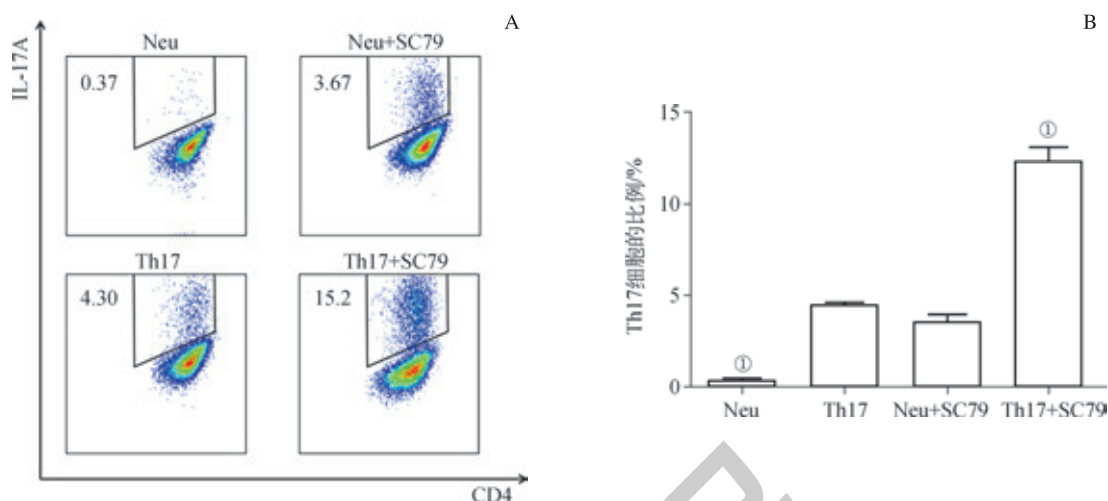
图 7 miR-322-5p 与 *Akt3* 的直接靶向关系

Fig 7 Target relationship between miR-322-5p and *Akt3*

2.8 Akt 激动剂对 Th17 细胞体外分化的影响

流式细胞术检测结果 (图 8) 显示, 加入 SC79 后

Th17 细胞的体外分化比例明显提高, 表明 Akt 激动剂能够显著促进 Th17 细胞的体外分化。



注: A. 流式细胞术检测 Th17 细胞的体外分化; B. 统计图。Neu 组仅加入 CD3 抗体和 CD28 抗体; Th17 组加入了 Th17 细胞分化所需的抗体和细胞因子。
① $P=0.000$, 与 Th17 组比较

图 8 Akt 激动剂 (SC79) 对 Th17 细胞体外分化的影响

Fig 8 Effect of Akt activator (SC79) on Th17 differentiation *in vitro*

3 讨论

MS 是一种以中枢神经系统白质炎症脱髓鞘为主要病理特点的自身免疫性疾病, EAE 是国际公认的研究 MS 发病机制的理想动物模型。越来越多的证据表明 Th 细胞亚群, 尤其是 Th17 细胞, 是 MS/EAE 的主要致病细胞^[13]。IFN- β 是第一种经过美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于治疗 MS 的药物。自 20 世纪 90 年代以来, 国外进行了多次 IFN- β 的临床试验, 结果表明 IFN- β 不仅可以降低复发缓解型 MS 患者的急性发作次数, 而且能够有效延迟复发缓解型和继发缓解型 MS 患者的病程进展^[14]。本研究观察了 IFN- β 干预后 Th17 的比例变化, 结果显示, IFN- β 干预后 Th17 的比例在脾脏和中枢神经系统中均显著下降, 提示 IFN- β 干预可抑制 Th17 从而缓解 EAE, 但是 IFN- β 抑制 Th17 分化的作用机制尚不清楚。

miRNA 对基因的转录后表达调控是 21 世纪的一个突破性科学发现。miRNA 是一类长 19 ~ 24 个核苷酸的高度保守的非编码单链小 RNA 分子, 其通过靶向 mRNA 的 3'-UTR, 降解 mRNA 或者抑制翻译。miRNA 在 MS 的疾病进程中发挥关键作用, 研究 miRNA 可为探究 MS 致病机制和相关治疗靶点提供重要的理论依据。同时, 很多研究^[15-16]发现 miRNA 与细胞分化之间存在诸多联系, miRNA 能够参与 Th17 细胞的分化。已有研究^[17]发现 MS 患者的 miR-26a 表达降低, 使得受 miR-26a 负调控的 IL-6 表达升高, 从而促进 Th17 细胞的产生, 打破了 Th17/Treg 的平衡。miR-301a 通过靶向作用于信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 活化蛋白的抑制蛋白, 也可以促进 Th17 细胞的分化^[18]。miR-21 通过靶向 Smad 蛋白家族成员

7 (SMAD-7) 促进 Th17 细胞的分化进而加重 EAE 的病情^[19]。因此, 我们利用 RNA 芯片检测来研究 IFN- β 组和 PBS 组之间的差异表达 miRNA, 并探讨其对 Th17 分化的影响。芯片检测结果显示, 与 PBS 对照组相比, IFN- β 干预组有 14 个 miRNA 上调, 3 个 miRNA 下调。考虑到 MAPK 信号通路在细胞分化方面的重要影响^[20-21], 本课题将差异 miRNA 与通路中涉及的预测靶基因作统计分析, 最终选择与 MAPK 信号通路中的预测靶基因相关性最大且上调倍数较高的 miR-322-5p 作为研究对象; 利用 3 种靶基因预测软件预测到 miR-322-5p 有 71 种共同靶基因, 将这 71 种基因与 MAPK 信号通路作维恩分析, 只有 1 种 (*Akt3*) 共同预测靶基因。

在后续实验中, 首先在 EAE 模型中验证 miR-322-5p 表达情况, 同时观察 *Akt3* 的 mRNA 表达情况, 结果显示 miR-322-5p 与 *Akt3* 的 mRNA 存在负调控关系; 继而进一步测定 *Akt3* 的蛋白表达情况, 结果显示 IFN- β 干预组中 *Akt3* 的蛋白表达量也显著降低。体外实验中, 利用细胞系 NIH3T3 过表达 miR-322-5p 后测定 *Akt3* 的 mRNA 和蛋白表达情况, 结果显示 miR-322-5p 能够显著抑制 *Akt3* 的表达; 进一步用双荧光素酶报告实验验证 miR-322-5p 与 *Akt3* 的靶向关系, 实验结果证明了 *Akt3* 是 miR-322-5p 的直接靶基因。上述实验结果提示 IFN- β 干预可提高 miR-322-5p 的表达水平, 且 miR-322-5p 可直接抑制 *Akt3* 的表达水平。

Akt3 是 Akt 的一种亚型。Akt 又称蛋白激酶 B (PKB), 是我们熟知的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 一共包含 3 种亚型: *Akt1*、*Akt2* 和 *Akt3*^[22]。活化的 Akt 通过磷酸化作用, 可参与下游多种信号通路, 进而调节细胞功能。已有

研究^[23-24]表明 Akt3 主要表达在脑部, 对于维持大脑的正常发育至关重要。但是目前为止, Akt3 仍然是 Akt 中研究最少的一种亚型。MS 病灶区域主要集中在中枢神经系统, Akt3 参与了 Akt 的组成进而影响到细胞的生命活动, 因此我们想进一步探究其对细胞分化是否产生影响。在体外分化 Th17 的条件下加入 Akt 激动剂 (SC79)^[25], 发现 SC79 能够显著促进 Th17 的分化比例从 4.30% 增加到 15.20%, 结果提示 Akt3 可以促进 Th17 的分化。上述结果说明 IFN- β 干预后 Akt3 的表达下降可以抑制 Th17 的分化。

综上所述, 本研究寻找到 IFN- β 干预 EAE 后显著升高的 miR-322-5p, 初步探究发现其可靶向 *Akt3*, 进一步抑制 Th17 的分化, 进而对 EAE 的疾病进程产生影响。该研究可为临床上研究 MS 治疗提供新的理论依据, miR-322-5p 有望成为 MS 新的治疗靶点。但是对于 miR-322-5p 是否通过其他信号通路对 MS 产生影响, 还有待进一步研究和探索。另外, 由于 miRNA 的表达具有时空特异性, MS 具有缓解复发的特征, 因此根据 MS 患者的不同病程进行针对性干预治疗显得尤为重要, 也是未来将 miRNA 作为临床治疗靶点时需要着重考虑的问题。

参 考 文 献

- [1] Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(9): 545-558.
- [2] Leist TP, Comi G, Cree BA, et al. Effect of oral cladribine on time to conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with a first demyelinating event (ORACLE MS): a phase 3 randomised trial[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(3): 257-267.
- [3] Tully M, Shi R. New insights in the pathogenesis of multiple sclerosis: role of acrolein in neuronal and myelin damage[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 20037-20047.
- [4] Correale J, Gaitán MI, Ysraelit MC, et al. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment[J]. Brain, 2017, 140(3): 527-546.
- [5] Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice[J]. J Vis Exp, 2014(86): 51275.
- [6] Liang X, Wei G, Jin C, et al. The flavonoid kurarinone inhibits clinical progression of EAE through inhibiting Th1 and Th17 cell differentiation and proliferation[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62: 227-236.
- [7] Su P, Chen S, Zheng YH, et al. Novel function of extracellular matrix protein 1 in suppressing Th17 cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2016, 197(4): 1054-1064.
- [8] Zhang X, Markovic-Plese S. Interferon- β inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2010, 112(7): 641-645.
- [9] Severa M, Rizzo F, Giacomini E, et al. IFN- β and multiple sclerosis: cross-talking of immune cells and integration of immunoregulatory networks[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(2): 229-239.
- [10] Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1509: 1-10.
- [11] Podshivalova K, Salomon DR. MicroRNA regulation of T-lymphocyte immunity: modulation of molecular networks responsible for T-cell activation, differentiation, and development[J]. Crit Rev Immunol, 2013, 33(5): 435-476.
- [12] Wu T, Chen G. miRNAs Participate in MS pathological processes and its therapeutic response[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 1-9.
- [13] Zhang H, Qi Y, Yuan Y, et al. Paeoniflorin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibition of dendritic cell function and Th17 cell differentiation[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41887.
- [14] Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis[J]. CNS Drugs, 2011, 25(6): 491-502.
- [15] Li B, Wang X, Choi IY, et al. miR-146a modulates autoreactive Th17 cell differentiation and regulates organ-specific autoimmunity[J]. J Clin Invest, 2017, 127(10): 3702-3716.
- [16] 吴婷, 陈广洁. miRNA 调控 Th 细胞分化的研究进展[J]. 现代免疫学, 2015, 2015(4): 334-337.
- [17] Zhang R, Tian A, Wang J, et al. miR26a modulates Th17/Treg balance in the EAE model of multiple sclerosis by targeting IL6[J]. Neuromolecular Med, 2015, 17(1): 24-34.
- [18] Mycko MP, Cichalewska M, Machlanska A, et al. microRNA-301a regulation of a T-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(20): E1248-E1257.
- [19] Weiner HL, Kumaradevan S, Cunha RPA, et al. MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Clin Invest, 2015, 125(3): 1069-1080.
- [20] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 600-604.
- [21] Zhao Q, Cheng W, Xi Y, et al. IFN- β regulates Th17 differentiation partly through the inhibition of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Mol Immunol, 2018, 93: 20-30.
- [22] Levenga J, Wong H, Milstead RA, et al. AKT isoforms have distinct hippocampal expression and roles in synaptic plasticity[J]. Elife, 2017, 6: e30640.
- [23] Bergeron Y, Bureau G, Laurier-Laurin MÉ, et al. Genetic deletion of Akt3 induces an endophenotype reminiscent of psychiatric manifestations in mice[J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 102.
- [24] Jansen LA, Mirzaa GM, Ishak GE, et al. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia[J]. Brain, 2015, 138(6): 1613-1628.
- [25] Jo H, Mondal S, Tan D, et al. Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(26): 10581-10586.

[收稿日期] 2019-02-03

[本文编辑] 吴 洋