

· 实验研究 ·

miR-155 对溃疡性结肠炎患者外周血 Th17 细胞分化及功能的影响

黄晓丽, 王平, 葛建新, 印睿, 刘冠歧, 王国品

南通大学附属南京江北人民医院消化内科, 江苏 南京 210048

摘要: **目的** 探讨 miR-155 在溃疡性结肠炎(UC)中对外周血 Th17 细胞的分化及功能的调控作用,阐明 miR-155 在 UC 中的作用机制。**方法** 选取 2016 年 6 月至 2017 年 6 月住院的活动性 UC 患者 16 例,免疫磁珠分选出外周血 CD4⁺T 细胞,分为对照组、miR-155 组及 miR-155 抑制组,分别进行培养及干预后,流式细胞仪测定 Th17 细胞的比例,RT-PCR 测定细胞 miR-155-3p 的表达,ELISA 测定培养上清白细胞介素(IL)-17A 及 IL-6 水平。**结果** 各组细胞干预及培养 24 h 后,Th17 细胞的比例[(16.73 ± 4.41)% vs (5.69 ± 1.78)%]及 miR-155-3p 的表达水平[(1.97 ± 0.56) vs (0.89 ± 0.33)],miR-155 组均显著高于对照组($P < 0.01$),miR-155 抑制组 Th17 细胞的比例、miR-155-3p 的表达水平明显低于对照组[(2.03 ± 0.78)% vs (5.69 ± 1.78)%, (0.57 ± 0.16) vs (0.89 ± 0.33)], $P < 0.01$ 。miR-155 组培养上清中 IL-17A 和 IL-6 水平也显著高于对照组和 miR-155 抑制组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** miR-155 主要通过促进 Th17 细胞的分化及功能,参与对 CD4⁺T 淋巴细胞的调控,在 UC 发病机制中发挥着重要的作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; miR-155; Th17 细胞; 白细胞介素

中图分类号: R 574.62 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)12-1707-04

Effect of miR-155 on Th17 cell differentiation and function in peripheral blood of patients with ulcerative colitis

HUANG Xiao-li, WANG Ping, GE Jian-xin, YIN Rui, LIU Guan-qi, WANG Guo-pin

Department of Gastroenterology, Nanjing Jiangbei People's Hospital Affiliated to Nantong University, Nanjing, Jiangsu 20048, China

Corresponding author: WANG Guo-pin, E-mail: wgp620114@163.com

Abstract: Objective To investigate the role of miR-155 in the differentiation and function of Th17 cells in peripheral blood of patients with ulcerative colitis (UC) to clarify the mechanism of miR-155 in UC. **Methods** Sixteen patients with active UC from June 2016 to June 2017 were enrolled. By immunomagnetic beads, CD4⁺T lymphocytes were isolated from mononuclear cells from the peripheral blood of UC patients and were divided into three groups: control group, miR-155 group and miR-155 inhibition group. The proportion of Th17 cells was detected by flow cytometry, the expression of miR-155-3p in cells was determined by RT-PCR, and the levels of interleukin (IL)-17A and IL-6 in supernatant of cultured peripheral CD4⁺T lymphocytes were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** After Th17 cells being cultured and intervened for 24 hours, the proportion of Th17 cells [(16.73 ± 4.41)% vs (5.69 ± 1.78)%] and the expression of miR-155 (1.97 ± 0.56 vs 0.89 ± 0.33) significantly increased in miR-155 group compared with control group ($P < 0.01$), and the proportion of Th17 cells [(2.03 ± 0.78)% vs (5.69 ± 1.78)%] and the expression level of miR-155-3p (0.57 ± 0.16 vs 0.89 ± 0.33) in miR-155 inhibition group were significantly lower than those in control group ($P < 0.01$). The levels of IL-17A and IL-6 in the cultured supernatant in miR-155 group were also significantly higher than those in control group and in miR-155 inhibition group (all $P < 0.01$). **Conclusion** miR-155 is involved in the regulation of CD4⁺T lymphocytes by promoting the differentiation and function of Th17 cells and plays an important role in the pathogenesis of UC.

Key words: Ulcerative colitis; miR-155; T helper cells; Interleukin

Fund program: Nanjing Medical Science and technology development project (ykk15238)

溃疡性结肠炎(UC)是一种多见于年轻人的慢性非特异性免疫性肠道疾病,其发病机制未完全阐明,动物实验及临床研究均认为 Th17 细胞参与 UC 的发病^[1-2]。miR-155 是一种内源性非编码小核糖核酸分子,参与淋巴细胞的增殖、分化和活化^[3],其在 UC 的外周血及结肠黏膜组织中高表达^[4],但 miR-155 在 UC 中的作用机制尚不清楚。本研究主要通过提取 UC 患者外周血,分离出 CD4⁺T 细胞体外转染培养,观察 miR-155 对 Th17 细胞的分化及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 6 月至 2017 年 6 月入住南京江北人民医院消化内科的活动性溃疡性结肠炎患者 16 例,所有患者入院后次日晨空腹,用真空肝素抗凝管抽取患者新鲜外周静脉血 10 ml 用于实验。入选标准:(1)年龄 18~45 岁;(2)肠镜及病理检查确诊为溃疡性结肠炎;(3)疾病分期 Sutherland 疾病活动指数(DAI)≥3 分为疾病活动期。排除标准:(1)合并有自身免疫性疾病,如自身免疫性肝病、糖尿病、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、强直性脊柱炎等自身免疫性疾病;(2)有癌症家族史;(3)有器官移植病史;(4)近 3 个月服用激素、免疫抑制剂及生物制剂等药物;(5)合并有其他肠道疾病。本研究获得南京江北人民医院伦理委员会同意,所有参与本研究的患者其标本采集均获患者知情同意并签署同意书。

1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,人淋巴细胞分离液购于 TBD 公司;12-肉豆蔻酸-13 乙酸-佛波醇酯(PMA)购自美国 Sigma 公司,布雷菲德菌素 A(BFA)购自美国 ENZO 生命科学公司,离子霉素(IONO)购自碧云天生物公司,破膜剂购自美国 BD 公司,microRNA 提取和测定试剂盒购自天根生物公司,人 CD4⁺T 细胞磁珠分选试剂盒购自德国 Miltenyi 生物技术公司,抗人 CD4 APC 及抗人白细胞介素(IL)-17 PE 购自美国 eBioscience 公司。IL-17A 和 IL-6 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购于购自上海蕴涵生物公司,miR-155 及内参 U6 引物由 GeneCopeia 公司提供,Hsa-miR-155-3p-minic 和 Hsa-miR-155-3p-inhibitor 购于锐博生物公司,Midi&mini 磁珠分选器及 LD 分选柱购自德国 Miltenyi 公司,流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司),7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.3 细胞的分离、培养及转染 采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,磁珠分选法分选出 CD4⁺T 细胞,流式细胞仪检测细胞的纯度,

0.2% 台酚蓝鉴定活细胞数及细胞活性比例。将分离的细胞调整为 $2 \times 10^6/\text{ml}$,分为对照组、miR-155 组、miR-155 抑制物组。miR-155 组加入 50 nmol/L miR-155 + 脂质体 2000,miR-155 抑制物组加入 50 nmol/L miR-155 抑制物 + 脂质体 2000,转染 5 h 后,用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、2 mmol/L 的谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。miR-155 模拟体与 miR-155 抑制物的序列分别 5'-UUA AUG CUA AUC GUG AUA GGG GUC CCU AUC ACG AUU AGC AUU AAU U-3' 和 5'-ACC CCU AUC ACG AUU AGC AUU AA-3'。

1.4 流式检测各组培养细胞中 Th17 的比例 将上述培养后的各组细胞 $300 \times \text{g}$ 离心 5 min,取沉淀细胞用 10% FCS 培养基 500 μl 重悬后,加入 PMA(50 ng/ml)和 IONO(750 ng/ml)刺激剂后混匀,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱孵育 1 h,后加入 BFA(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)充分混合后培养箱孵育 4 h。离心后加入破膜固定液 200 μl ,洗脱后加入 1 μl 的 PE-IL-17 抗体,4 ℃避光孵育 40 min 后上流式细胞仪检测。

1.5 qRT-PCR 测定 miR-155-3p 表达 按照 microRNA 提取试剂盒步骤说明提取细胞中 microRNA,反转录合成 cDNA,建立 qPCR 反应体系。hsa-miR-155-3P(55 bp)引物序列:上游引物 5'-ACA CTC CAG CTG GGC TCC TAC ATA TTA GCA-3',下游引物 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG TGT TAT G-3'。U6(94 bp)引物序列:上游引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。PCR 反应步骤:95 ℃变性 10 min;40 个循环(95 ℃,10 s;退火,20 s;72 ℃,31 s)。PCR 反应退火温度为 60 ℃。扩增反应结束后,从 72 ℃缓慢加热到 95 ℃,以建立 PCR 产物的熔解曲线。每个标本均设置 3 个复孔,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.6 ELISA 测定细胞培养上清液中 IL-17A 和 IL-6 水平 取细胞培养上清,按照 IL-17A 和 IL-6 ELISA 试剂盒进行操作检测。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析并进行多重比较,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血提取 CD4⁺T 淋巴细胞的比例及细胞存活率 外周血分离提取 CD4⁺T 细胞后,流式细

胞仪测定 CD4⁺T 细胞的比值各组均高于 95%。台盼兰染色计数细胞的活性均大于 90%,各组的细胞数量、活性及 CD4⁺T 细胞的比例之间无统计学差异($P>0.05$)。见表 1、图 1。

2.2 各组不同条件转染培养后流式细胞仪检测 Th17 细胞的比例 三组细胞转染培养后 Th17 细胞的比例,miR-155 组显著高于对照组及 miR-155 抑制组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 2、表 2。

2.3 各组细胞 miR-155-3p 的表达 三组细胞转染培养后 miR-155-3p 的表达,miR-155 组显著高于对照组及 miR-155 抑制组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

表 1 外周血分离提取 CD4⁺T 细胞后细胞计数、活性及比例的测定结果 ($n=16,\bar{x}\pm s$)

组别	细胞数(个)	细胞活性(%)	CD4 ⁺ T 细胞比例(%)
对照组	358.00±10.36	93.50±2.00	95.24±4.06
miR-155 组	363.00±13.93	94.00±1.60	98.74±1.48
miR-155 抑制组	360.00±17.76	93.25±2.31	96.85±3.38
F 值	0.259	0.463	2.490
P 值	0.774	0.636	0.107

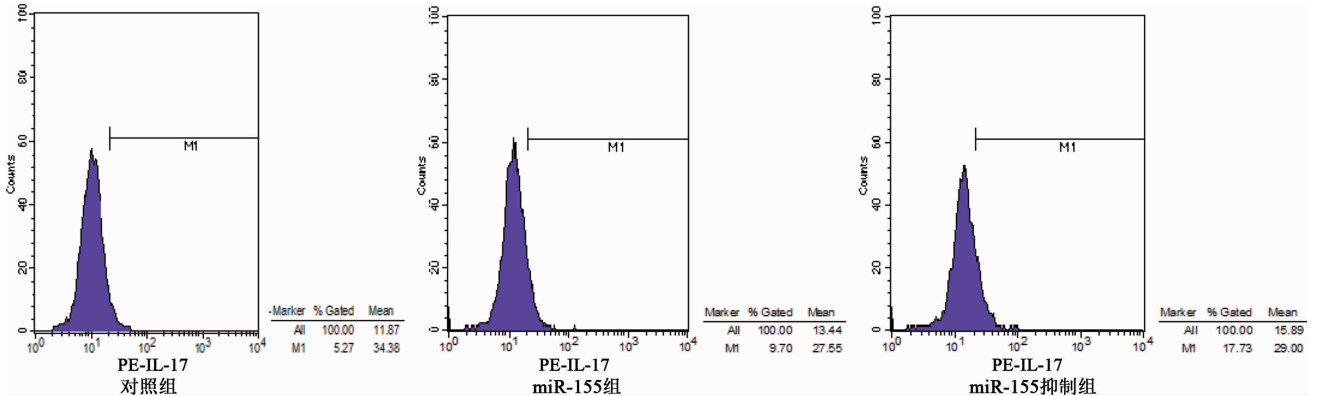


图 2 各组培养后 Th17 细胞的流式图

3 讨论

microRNA 是一类长度约为 18~24 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA,可通过抑制下游靶基因的表达^[5],参与免疫细胞的增殖和分化过程^[6-7],参与慢性炎症反应的发生和发展^[8]。miR-155 位于人类 21 号染色体的非编码转录区第三个外显子内,在活化的 B 细胞、T 细胞、单核/巨噬细胞中均有高表达,在 miR-155 基因敲除小鼠中,T、B 细胞和树突状细胞的功能均被破坏,说明 miR-155 在淋巴细胞的发育及免疫反应过程中起到不可或缺的作用^[9-10]。多个研究发现 miR-155 在 UC 患者的外周血及结肠组织中高表达^[11-12],这与前期研究的结果一致,提示 miR-155 在 UC 的发病机制中起着重要的作用。

Th17 细胞是 CD4⁺T 细胞的一种新型的亚群,主

要分泌 IL-17、IL-6 等细胞因子,在自身免疫性或感染性疾病中发挥促炎性作用。IL-17 是 Th17 细胞分泌的特征性的细胞因子,具有强烈的致炎性,能够增加细胞的渗透性并促进其他前炎性细胞因子的产生。在多种细胞如上皮细胞、内皮细胞及成纤维细胞上都有丰富的 IL-17 受体(IL-17R),IL-17 与 IL-17R 结合可诱导这些细胞产生多种前炎性细胞因子^[13]。IL-6 是 Th17 细胞分泌的一种重要的炎症反应调节因子,直接参与局部的炎性反应损伤过程^[14],其还可与 IL-23 协同诱导 Th17 细胞的分化。IL-17 及 IL-6 在 UC 的发病机制中发挥着重要的作用。动物实验研究发现,药物刺激 IL-17 分泌后可以加重小鼠结肠炎症^[15]。前期的工作发现 UC 患者结肠黏膜组织及外周血清中 IL-17A 及 IL-6 水平明显高于正常对照组,miR-155 在 UC 患者结肠组织和外周血中异常表达,

表 2 各组转染培养后 Th17 细胞比例、miR-155-3p 表达以及上清中 IL-17A 及 IL-6 水平 ($n=16,\bar{x}\pm s$)

组别	Th17 细胞比例(%)	miR-155-3p 表达	IL-17A 水平 (ng/L)	IL-6 水平 (ng/L)
对照组	5.69±1.78	0.89±0.33	74.15±16.96	110.95±22.23
miR-155 组	16.73±4.41 ^b	1.97±0.56 ^b	147.11±27.44 ^b	200.72±34.97 ^b
miR-155 抑制组	2.03±0.78 ^{bd}	0.57±0.16 ^{ad}	51.18±16.88 ^{ad}	80.57±16.50 ^{ad}
F 值	152.100	47.133	45.456	47.080
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 miR-155 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

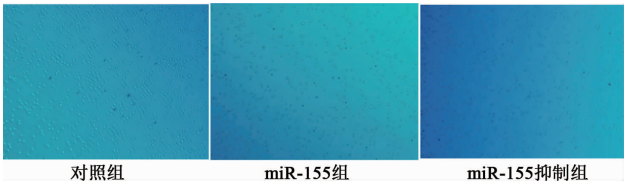


图 1 外周血分离提取 CD4⁺T 细胞后台盼兰染色

并与结肠炎严重程度成正比^[4]。

笔者进一步研究 miR-155 对 Th17 细胞的分化调节作用。本实验结果显示, miR-155 模拟物转染 CD4⁺T 细胞培养后, Th17 细胞的比例较对照组明显增高, 细胞培养上清中的 IL-17A 及 IL-6 的浓度明显上升; 而 miR-155 抑制物转染 CD4⁺T 细胞培养后, Th17 细胞的比例较对照组明显降低, 细胞培养上清中的 IL-17A 及 IL-6 的浓度明显上升, 提示 miR-155 可以促进 Th17 细胞的分化, 并促进其产生 IL-17A 及 IL-6 炎性因子, 加重 UC 炎性损伤。动物实验也发现 miR-155 缺陷小鼠通过降低 Th1/Th17 反应来减轻肠道炎症反应^[16], 有研究认为 miR-155 调控 Th17 细胞的靶基因是通过抑制 SOCS1 的表达, 促进 JAK/STAT 信号通路, 从而增强 Th17 细胞的功能^[17-18]。也有研究认为 miR-155 是通过靶向抑制 EST1 表达来促进 IL-23、IL-17、IL-6 介导 Th17 细胞通路起作用的^[19]。

综上所述, 在 UC 中, miR-155 通过促进 Th17 细胞的分化并分泌 IL-17A 及 IL-6 等炎性因子, 发挥其致病作用。miR-155 有望成为一种靶向治疗 IBD 的潜在途径。

参考文献

[1] Huang XL,Zhang X,Fei XY,et al. Faecalibacterium prausnitzii supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation[J]. World J Gastroenterol,2016,22(22):5201-5210.

[2] Lin X,Sun Q,Zhou L,et al. Colonic epithelial mTORC1 promotes ulcerative colitis through COX-2-mediated Th17 responses[J]. Mucosal Immunol,2018,11(6):1663-1673.

[3] Almeahadi KA,Tsilioni I,Theoharides T. Increased Expression of miR-155p5 in Amygdala of children with autism spectrum disorder [J]. Autism Res,2019 Sep 10.

[4] 李芳,夏菲,张东波,等. miR-155 在溃疡性结肠炎患者直肠黏膜和外周血单个核细胞中的表达及意义[J]. 中国临床研究,2017,30(7):869-873.

[5] Lu TX,Rothenberg ME. MicroRNA [J]. J Allergy Clin Immunol,2018,141(4):1202-1207.

[6] Thai TH,Calado DP,Casola S,et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155 [J]. Science,2007,316(5824):604-608.

[7] Johnnidis JB,Harris MH,Wheeler RL,et al. Regulation of progenitor

cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223 [J]. Nature,2008,451(7182):1125-1129.

[8] Hu R,Kagele DA,Huffaker TB,et al. miR-155 promotes T follicular helper cell accumulation during chronic, low-grade inflammation [J]. Immunity,2014,16;41(4):605-619.

[9] Rodriguez A,Vigorito E,Clare S,et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function [J]. Science,2007,316(5824):608-611.

[10] O'Connell RM1,Kahn D,Gibson WS,et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development[J]. Immunity,2010,33(4):607-619.

[11] Takagi T,Naito Y,Mizushima K,et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis[J]. J Gastroenterol Hepatol,2010,25(Suppl 1):S129-S133.

[12] Archanioti P,George T,Ioannis P,et al. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease[J]. Journal of Crohn's and Colitis,2012,6(9):900-904.

[13] Das Sarma J,Ciric B,Marek R,et al. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neuroinflammation,2009,6:14.

[14] Hovhannisyan Z,Tretman J,Littman DR,et al. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases[J]. Gastroenterology,2011,140(3):957-965.

[15] Zhang M,Zhou Q,Dorfman RG,et al. Butyrate inhibits interleukin-17 and generates Tregs to ameliorate colorectal colitis in rats [J]. BMC Gastroenterol,2016,16(1):84.

[16] Hohenberger M,Cardwell LA,Oussedik E,et al. Interleukin-17 inhibition:role in psoriasis and inflammatory bowel disease [J]. J Dermatolog Treat,2018,29(1):13-18.

[17] Singh UP,Murphy AE,Enos RT,et al. miR-155 deficiency protects mice from experimental colitis by reducing T helper type 1/type 17 responses [J]. Immunology,2014,143(3):478-489.

[18] Yao R,Ma YL,Liang W,et al. MicroRNA-155 modulates treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1 [J]. PLoS One,2012,7(10):e46082.

[19] Wang D,Tang M,Zong P,et al. MiRNA-155 regulates the Th17/treg ratio by targeting SOCS1 in severe acute pancreatitis [J]. Front Physiol,2018,9:686.

[20] Hou J,Hu X,Chen B,et al. miR-155 targets Est-1 and induces ulcerative colitis via the IL-23/17/6-mediated Th17 pathway [J]. Pathol Res Pract,2017,213(10):1289-1295.

收稿日期:2019-09-13 修回日期:2019-10-02 编辑:王宇