

miR-136-5p调控白细胞介素17刺激星形胶质细胞后A20蛋白的表达

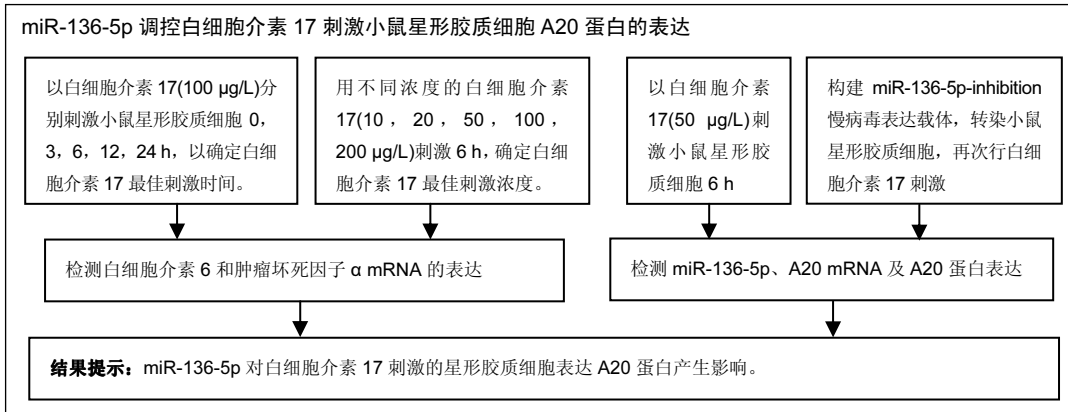
· 研究原著 ·

施雄智, 宗少晖, 何基琛, 彭小明, 高云兵, 邓贵营(广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科, 广西壮族自治区南宁市 530021)

引用本文: 施雄智, 宗少晖, 何基琛, 彭小明, 高云兵, 邓贵营. miR-136-5p 调控白细胞介素17 刺激星形胶质细胞后A20 蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(16):2587-2592.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.16.022 ORCID: 0000-0002-0360-3080(施雄智)

文章快速阅读:



施雄智, 男, 1989 年生, 广西壮族自治区防城港市人, 广西医科大学在读硕士, 主要从事脊柱外科学方面的研究。

通讯作者: 宗少晖, 博士, 教授, 博士生导师, 广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科, 广西壮族自治区南宁市 530021

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2017)16-02587-06
稿件接受: 2017-04-06

文题释义:

星形胶质细胞: 是哺乳动物脑内分布最广泛的一类细胞, 也是胶质细胞中体积最大的一种。用经典的金属浸镀技术(银染色)显示此类胶质细胞呈星形, 从胞体发出许多长而分支的突起, 伸展充填在神经细胞的胞体及其突起之间, 起支持和分隔神经细胞的作用。细胞突起的末端常膨大形成脚板(footplate)或称终足(endfoot), 有些脚板贴附在邻近的毛细血管壁上, 因此这些脚板又被称为血管足或血管周足, 靠近脑脊髓表面的脚板则附着在软膜内表面, 彼此连接构成胶质界膜(glia limitans)。

A20: 为一种经典的免疫负向调控蛋白。调控转录因子核因子 kB 的活化就有 A20 的参与, 其主要是发挥去泛素化及 E3 泛素连接酶的功能, 而 A20 蛋白缺陷的小鼠(A20^{-/-})会自发的产生严重的炎症性疾病, 并在围产期死亡。在人类单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP) 分析发现, 多种自身免疫性疾病的发生与 A20 基因有着密切联系, 例如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎性肠病等等多种自身免疫性疾病, 这提示人类自身免疫稳态的维持需要 A20 的参与。

摘要

背景: 研究表明, miRNA 在脊髓的发育、脊髓可塑性和脊髓损伤后的病理改变中均发挥着至关重要的调节作用。

目的: 分析 miR-136-5p 调控白细胞介素 17 刺激小鼠星形胶质细胞对 A20 蛋白表达的影响。

方法: 体外培养 C57BL/6 小鼠星形胶质细胞并进行免疫荧光染色鉴定。用白细胞介素 17(100 µg/L)分别刺激小鼠星形胶质细胞 0, 3, 6, 12, 24 h, 行 RT-PCR 检测白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α mRNA 的相对表达量, 以确定白细胞介素 17 最佳刺激时间, 用不同质量浓度的白细胞介素 17(10, 20, 50, 100, 200 µg/L)刺激 6 h, 行 RT-PCR 检测白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达量以确定白细胞介素 17 最佳刺激浓度。采用白细胞介素 17(50 µg/L)刺激小鼠星形胶质细胞 6 h 后, 行 RT-PCR 检测星形胶质细胞产生的 miR-136-5p 及 A20 mRNA 的表达含量, 并用 Western blot 检测 A20 蛋白的表达水平。此外, 构建 miR-136-5p 表达抑制(miR-136-5p-inhibition)的慢病毒表达载体, 转染小鼠星形胶质细胞, 再次行白细胞介素 17 刺激并检测 miR-136-5p、A20 mRNA 及 A20 蛋白表达水平。

结果与结论: ①白细胞介素 17 刺激小鼠星形胶质细胞 6 h 后, miR-136-5p-inhibition 抑制组与空白组相比, miR-136-5p 表达显著降低($P < 0.05$); ②经白细胞介素 17(50 µg/L)刺激 6 h 后, 各组内 A20 mRNA 及 A20 蛋白的表达较刺激前明显降低($P < 0.05$); miR-136-5p-inhibition 抑制组的 A20 mRNA 及 A20 蛋白表达与空白组相比显著升高($P < 0.05$), 空白对照组与转染阴性对照组比较蛋白相对表达量没有显著性差异($P > 0.05$); ③结果提示, miR-136-5p 对白细胞介素 17 刺激的星形胶质细胞表达 A20 蛋白可产生影响。

关键词:

组织构建; 组织工程; 星形胶质细胞; miR-136-5p; 白细胞介素 17; A20; 国家自然科学基金

主题词:

细胞因子类; 病毒; 转染; 组织工程; 微 RNAs

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81560351)

Shi Xiong-zhi, Studying for master's degree, Department of Spine Osteopathia, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Zong Shao-hui, M.D., Professor, Doctoral supervisor, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

miR-136-5p effect on A20 expression in interleukin-17-stimulated astrocytes

Shi Xiong-zhi, Zong Shao-hui, He Ji-chen, Peng Xiao-ming, Gao Yun-bing, Deng Gui-ying (Department of Spine Osteopathia, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: miRNA plays a critical regulatory role in the development and plasticity of spinal cord, and pathological changes after spinal cord injury.

OBJECTIVE: To study the effect of miR-136-5p on the A20 expression in mouse astrocytes stimulated by interleukin-17 (IL-17).

METHODS: C57BL/6 mouse astrocytes were cultured *in vitro*, identified by immunofluorescence staining, and then stimulated by 100 $\mu\text{g/L}$ IL-17 for 0, 3, 6, 12 and 24 hours, respectively. The relative mRNA expression levels of IL-6 and tumor necrosis factor- α were detected by RT-PCR to determine the optimal stimulation time of IL-17. The mouse astrocytes were respectively stimulated by 10, 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/L}$ IL-7 for 6 hours, and similarly, the relative mRNA expression levels of IL-6 and tumor necrosis factor- α were detected to determine the optimal concentration of IL-17. At 6 hours after IL-17 (50 $\mu\text{g/L}$) stimulation, the mRNA expression levels of miR-136-5p and A20 in mouse astrocytes were detected by RT-PCR, and the protein expression level of A20 was detected by western blot assay. In addition, the lentiviral expression vector (miR-136-5p-inhibition) was constructed and transfected into the mouse astrocytes that were also stimulated by IL-7 to detect the expression levels of miR-136-5p, A20 mRNA and A20 protein.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the blank control group, the expression level of miR-136-5p in the miR-136-5p-inhibition group was significantly decreased after 6-hour IL-17 stimulation ($P < 0.05$). The expression levels of A20 mRNA and protein in each group were significantly decreased after 6-hour IL-17 (50 $\mu\text{g/L}$) stimulation ($P < 0.05$). The expression levels of A20 mRNA and protein in the miR-136-5p-inhibition group were significantly higher than those in the blank control group ($P < 0.05$), while there were no significant differences in the expression level of A20 protein between blank control and negative groups ($P > 0.05$). To conclude, miR-136-5p makes certain effect on the expression of A20 protein in astrocytes after IL-17 stimulation.

Subject headings: Cytokines; Viruses; Transfection; Tissue Engineering; MicroRNAs

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81560351

Cite this article: Shi XZ, Zong SH, He JC, Peng XM, Gao YB, Deng GY. miR-136-5p effect on A20 expression in interleukin-17-stimulated astrocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(16):2587-2592.

0 引言 Introduction

脑组织中星形胶质细胞是至关重要的细胞之一, 其也是数量最多的胶质细胞, 在生理条件下, 星形胶质细胞在脑组织中具有营养和支持的作用, 因此, 星形胶质细胞扮演着必不可少的角色。在病理条件下, 早期促炎因子的释放依赖于中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞聚集^[1-4]。星形胶质细胞作为中枢神经系统损伤的最初效应者, 其释放的大量促炎细胞因子及趋化因子具有调控疾病的病理生理过程的作用^[5-7]。

近年来, 人们对Th17/白细胞介素17的研究日益深入, 发现人类许多炎症性疾病经常伴随着过量白细胞介素17产生, 特别在各种自身免疫性疾病, 例如哮喘、多发性硬化、炎性肠病、银屑病和类风湿性关节炎等疾病中白细胞介素17表达水平明显升高, 有证据表明, 星形胶质细胞受到白细胞介素17的刺激后可产生大量的炎症因子与趋化因子, 加重实验性自身免疫性脑脊髓炎的病变^[8-13]。刘晓梅等^[14]研究表明, 小鼠产生实验性自身免疫性脑脊髓炎病变后的星形胶质细胞, 特别是受到Th17细胞侵袭产生白细胞介素17刺激后可释放多种炎症因子和趋化因子, 实验性自身免疫性脑脊髓炎病变过程明显加重。A20蛋白不仅在多种固有免疫细胞中表达, 在T细胞和B细胞中也有表达并且A20蛋白具有调节固有免疫应答的功能, 参与着机体适应性免疫应答的过程^[15-17]。因此, 调控A20的调节功能, 进而可调控炎症因

子或递质的产生, 从而改善炎症性疾病的病理进程。

大量研究表明, miRNA在脊髓的发育、脊髓可塑性和脊髓损伤后的病理改变中均发挥着至关重要的调节作用, 甚至一些miRNA可能成为脊髓损伤后, 有效的可干预的治疗性靶点^[18-20]。但是, miR-136-5p调控白细胞介素17刺激下在星形胶质细胞内对A20蛋白产生作用的影响尚不明确。因此, 研究也有利于初步了解miR-136-5p在中枢神经系统损伤发生、发展过程中所起的作用及作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 以细胞为观察对象的体外平行对照实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年12月至2016年9月在广西医科大学医学实验中心完成。

1.3 材料

实验动物和细胞: 新生0-2 d的C57BL/6乳鼠由广西医科大学动物实验中心提供。C57BL/6小鼠原代星形胶质细胞, 由本实验室自行制备。

主要试剂: DMEM/F12 培养基、胎牛血清、0.25%胰酶(美国Gibco公司); A20及 β -actin抗体(美国abcam公司); Trizol试剂(日本TaKaRa公司); 反转录试剂盒(美国TaKaRa公司); 荧光定量试剂盒(日本TaKaRa公司); 免疫组织化学试剂盒(免疫荧光染色)(武汉博士德公司); DAPI细胞核荧光染料(碧云天生物技术公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠星形胶质细胞的体外分离及原代、传代培养 参照文献[14, 21-22]的方法, 取新生0-2 d的C57BL/6小鼠, 用体积分数75%乙醇浸泡3 min后, 进行断头处理, 在无菌条件下用眼科剪剪开头颅骨, 小心的取下双侧大脑皮质, 在显微镜下剥除脑膜, 将取出的大脑皮质置于装有DMEM/F12培养基的无菌培养皿中。而再用DMEM/F12培养基冲洗3次, 用眼科剪将大脑皮质剪成乳糜状, 用0.25%的胰酶37 °C消化10 min, 终止消化使用含有体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养液进行, 转移至离心管, 800 r/min离心10 min, 除去上清液, 再用DMEM/F12培养液离心洗涤两次, 最后加入适量DMEM/F12培养液, 用吸管反复轻柔吹打成单细胞悬液, 置入37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中培养, 24 h后半量换液。以后每隔两三天更换1次培养液, 同时在倒置显微镜下观察细胞生长情况, 待细胞生长至80%-90%融合时, 进行消化和1:3传代培养, 选取生长良好的第3-5代细胞进行后续实验。

1.4.2 小鼠星形胶质细胞的鉴定 胶质原纤维是由胶质纤维酸性蛋白组成的, 其是星形胶质细胞所特殊具有。因此, 鉴定星形胶质细胞可以通过抗胶质纤维酸性蛋白抗体免疫荧光染色。选取第3代的星形胶质细胞以 $1.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度种植于12孔板, 而孔内预先放置有PLD包被的盖玻片。置入37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱孵育4 d, 然后再行胶质纤维酸性蛋白免疫荧光染色。显微镜下观察染色情况, 用中性树胶封固后显微镜下观察并拍照。

1.4.3 白细胞介素17的最佳刺激浓度及时间的确定 ①选取第3代的小鼠星形胶质细胞以 $1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度种植于6孔板培养3 d后, 分别用白细胞介素17刺激0, 3, 6, 12, 24 h立即提取细胞的总RNA, RT-PCR检测白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α mRNA的表达量; ②根据细胞最佳刺激时间, 进行细胞最佳刺激浓度的测定。再次将第3代小鼠星形胶质细胞以 $1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度种植于6孔板培养3 d后, 分别给予细胞10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素17刺激, 然后提取细胞的总RNA, RT-PCR检查白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的mRNA表达量。

1.4.4 miR-136-5p表达抑制的慢病毒载体的构建与滴度的测定 小鼠miR-136-5p的序列查找与miR-136-5p-inhibition的设计由吉凯生物公司完成。重组的LV-miR-136-5p-inhibition和LV-control慢病毒表达载体由吉凯公司合成, 并经测序进行验证。将3种质粒: GV280载体质粒、pHelper 1.0载体质粒、pHelper 2.0 载体质粒转染HEK 293T细胞, 以获得LV-miR-136-5p-inhibition慢病毒悬液, 然后进行慢病毒滴度测定, 制备完成后重组慢病毒在-80 °C下保存。

1.4.5 LV-miR-136-5p-inhibition慢病毒悬液感染星形胶质细胞 病毒转染前1 d, 用0.25%胰酶消化处于对数生长期的细胞并计数, 将细胞接种至12孔细胞培养板, 每孔接

种 4×10^5 个细胞。置于37 °C、体积分数5% CO₂培养箱培养。培养1 d后, 按照感染复数(MOI)5, 10, 20, 50, 100分别感染C57BL/6小鼠星形胶质细胞, 无血清培养基饥饿培养24 h后, 然后加入DMEM/F12培养液继续培养48 h后, 荧光显微镜观察荧光细胞数量, 以评估慢病毒的感染效果, 未转染组不加入慢病毒悬液, 其他与转染组处理相同。

1.4.6 荧光显微镜观察病毒转染效率 将各组细胞避光孵育48 h后, 用4 °C的PBS清洗3次后消化收集细胞, 涂片后使用荧光显微镜下观察荧光细胞数量。每组均设3个复管, 并重复3次。

1.4.7 RT-PCR检测小鼠星形胶质细胞miR-136-5p及A20 mRNA的表达水平 总RNA的分离和提取方法, 按照Trizol试剂盒的说明书进行RNA提取, 而后在紫外荧光光度计ND-1000进行吸光度 $A_{260/280}$ 和 $A_{260/230}$ 的比值的测定以确定样品总RNA的纯度和浓度。分别取提取纯化后的总RNA各500 ng进行反转录, U6作为内参。实时定量反应, 42 °C 60 min, 70 °C 5 min, 进行实时定量PCR反应, 2 \times SYBR Green qPCR Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正向引物1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的反向引物1 μL , 加水至总体积为20 μL , 然后各样品的目的miRNA和内参U6分别在ABI 7500上进行检测。实验重复3次, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.4.8 Western blot检测小鼠星形胶质细胞A20蛋白的表达水平 各组细胞在6孔板中处理培养6 h后, 分别加入含有0.1 mmol/L PMSF的蛋白裂解液1 mL, 4 °C下裂解30 min。收集各组细胞裂解液在4 °C下12 000 r/min离心10 min后收集上清液, BCA法测定蛋白含量后行SDS-PAGE电泳, 半干法转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉37 °C封闭1 h, 加一抗(A20), 4 °C孵育过夜, TBST洗脱5 min \times 3次, Dylight 680标记的荧光二抗(1:500)常温下孵育2 h, TBST洗脱5 min \times 3次, ECL化学发光显像, Image J软件测定灰度值。 β -actin作为内参照, 每个样本重复3次。

1.5 主要观察指标 ①小鼠星形胶质细胞的培养与鉴定结果; ②小鼠星形胶质细胞最佳刺激时间和浓度; ③miR-136-5p表达抑制的慢病毒表达载体的构建与测序鉴定结果; ④慢病毒表达载体(LV-miR-136-5p-inhibition)感染星形胶质细胞效率; ⑤各组小鼠星形胶质细胞miR-136-5p及A20 mRNA的表达水平变化; ⑥各组小鼠星形胶质细胞A20蛋白的表达水平变化。

1.6 统计学分析 各组实验数据采用SPSS19.0统计软件包进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。各组间计量资料采用单因素完全随机方差分析(ANOVA), 并采用LSD- t 检验进行两两比较。

2 结果 Results

2.1 小鼠星形胶质细胞的培养与鉴定 提取的小鼠原代星形胶质细胞经连续传代培养后在倒置显微镜下观察, 细胞形状呈不规则形, 胞浆丰富, 核浆较少, 胞体分支较多,

细胞核呈椭圆形, 常在胞体一侧。用兔抗胶质纤维酸性蛋白多克隆抗体进行细胞免疫化学染色及免疫荧光染色鉴定, 可见星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白的表达位于胞浆。根据阳性细胞率(阳性细胞数/总细胞数) $\times 100\%$, 统计3个视野, 分别计数阳性细胞的个数和细胞总数, 计算出胶质纤维酸性蛋白阳性率可达95%以上。

2.2 小鼠星形胶质细胞最佳刺激时间和浓度 为了确定白细胞介素17的最佳刺激时间, 选用100 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素17分别刺激3, 6, 12, 24 h后行RT-PCR检测白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的mRNA表达量。结果如表1所示, 白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的mRNA丰度在3 h开始上升, 6 h显著升高并到达峰值, 12 h以后稍有下降, 24 h仍明显高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。因此, 认为6 h为小鼠星形胶质细胞最佳刺激时间。

为确定白细胞介素17的最佳刺激浓度, 分别选取10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素17刺激6 h后行RT-PCR检测白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的mRNA表达量。结果如表2所示, 在10 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度时, 白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的mRNA丰度开始上升, 剂量增加到20 $\mu\text{g/L}$ 时, 白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α mRNA丰度显著升高, 在剂量增加到200 $\mu\text{g/L}$ 时, mRNA的表达量依然缓慢上升。由于在50–200 $\mu\text{g/L}$ 之间, mRNA的表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。因此, 认为50 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素17为最佳刺激浓度。

2.3 miR-136-5p表达抑制的慢病毒表达载体的构建与测序鉴定 实验构建了miR-136-5p表达抑制(LV-miR-136-5p-inhibition)的慢病毒表达载体。经测序验证, 核酸序列与LV-miR-136-5p-inhibition序列完全一致。表明, LV-miR-136-5p-inhibition慢病毒表达载体构建成功。小鼠miR-136-5p反向互补序列: CCA TCA TCA AAA CAA ATG GAG T。

合成oligo信息:

NO.	5'	STEM	3'
mmu-miR-136-5p-inhibition-a	AAT TCA AAA A	ACT CCA TTT GTT TTG ATG ATG G	
mmu-miR-136-5p-inhibition-b	Ccg g	CCA TCA TCA AAA CAA ATG GAG T	TTT TTg

2.4 慢病毒表达载体(LV-miR-136-5p-inhibition)感染星形胶质细胞效率 转染小鼠星形胶质细胞后72 h, 加入嘌呤霉素筛选2周后, 分别统计各组(阴性转染组和抑制组)不同视野下发荧光的细胞数, 并计算转染效率, 结果见表3, 转染效率达92%以上可用于下一步实验。表3表明, 两个转染组的转染效率相比, 差异无显著性意义。因此, 得出, 2组荧光转染效率差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.5 各组小鼠星形胶质细胞miR-136-5p及A20 mRNA的表达水平变化 以50 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素17刺激各组小鼠星形胶质细胞6 h, 与空白组相比, miR-136-5p-inhibition

抑制组的miR-136-5p表达量显著降低, 差异有显著性意义(1.015 ± 0.035 , 0.160 ± 0.019 , $P < 0.05$), 而阴性组与空白组之间miR-136-5p表达量无明显差异(1.016 ± 0.055 , 1.015 ± 0.035 , $P > 0.05$)。各组内小鼠星形胶质细胞经50 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素17刺激6 h后, 与刺激前相比A20 mRNA表达显著降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。各组小鼠星形胶质细胞经白细胞介素17刺激后, 抑制组A20 mRNA表达量与空白组相比明显升高, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 然而阴性组与空白组之间A20 mRNA表达量差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表4。

2.6 各组小鼠星形胶质细胞A20蛋白的表达水平变化 为进一步验证PCR结果, 进行了Western blot检测。各组内小鼠星形胶质细胞经50 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素17刺激6 h后, 与刺激前相比A20蛋白表达显著降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。各组小鼠星形胶质细胞经白细胞介素17刺激后, 抑制组A20蛋白表达量与空白组相比明显升高, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 然而阴性组与空白组之间A20蛋白表达量差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表5。

3 讨论 Discussion

MicroRNAs(miRNAs)是在真核生物中的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA, 其长为20–25个核苷酸的大小。一系列核酸酶剪切和加工较长的初级转录物, 从而产生了成熟的miRNAs, 随后成熟的miRNAs组装进RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)中, 并通过碱基互补配对的方式识别靶mRNA, 根据互补程度的不同引导RISC降解靶mRNA或者阻遏靶mRNA的翻译。许多研究表明miRNA参与了各式各样的调节途径, 包括生长发育、病毒防御、造血、器官形成、细胞的增殖和凋亡、脂肪代谢等等各种生理病理过程^[18, 23-25]。

研究发现, 中枢神经系统的生长发育及神经系统疾病发生、发展的病理过程中存在着许多miRNA的参与, 例如阿尔茨海默病、帕金森综合征、亨廷顿舞蹈病等多种神经系统性疾病。黄江湖等^[26]研究发现miR-21可能通过调节控制促凋亡基因的表达, 从而在大鼠急性脊髓损伤中发挥抗凋亡的作用。陈琨等^[27]发现miR-152在脊髓损伤全过程中其表达水平持续增加, 表明其在中枢神经系统生长发育及脊髓损伤病理过程中发挥着重要作用。刘晓梅等^[14]人体内实验揭示, miR-873的过表达能够使实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠炎性因子、趋化因子及p-NF- $\kappa\text{B}/\text{p65}$ 的产生增多, 同时A20蛋白的表达是被抑制的; 免疫组织化学观察到小鼠脊髓的炎性细胞浸润及损伤明显加重; 反之, 沉默 miR-873的表达后, 上述炎性因子、趋化因子及p-NF- $\kappa\text{B}/\text{p65}$ 的生成均与miR-873过表达结果相反, 并且脊髓中炎性细胞的浸润及损伤也明显减轻。因此, 有理由认为伴随着脊髓损伤后多种基因表达水平发生改变, miRNA表达水平也随之出现异常, 这也证明了在脊髓损伤的病理

表 1 白细胞介素 17 刺激小鼠星形胶质细胞不同时间白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α mRNA 相对表达情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 1 The relative mRNA expression levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in mouse astrocytes at different time points after interleukin-17 stimulation

细胞因子	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
白细胞介素 6	1.015 \pm 0.104	1.802 \pm 0.526 ^a	7.510 \pm 0.080 ^a	2.553 \pm 0.074 ^a	3.955 \pm 0.308 ^a
肿瘤坏死因子 α	1.139 \pm 0.270	1.502 \pm 0.320	18.926 \pm 0.007 ^a	2.653 \pm 0.240 ^a	7.460 \pm 0.066 ^a

表注: 与 0 h 组比较: ^a $P < 0.01$ 。表 2 不同质量浓度白细胞介素 17 刺激小鼠星形胶质细胞白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α mRNA 相对表达情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 2 The relative mRNA expression levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in mouse astrocytes after stimulated by different concentrations of interleukin-17

细胞因子	白细胞介素 17 质量浓度					
	0 μ g/L	10 μ g/L	20 μ g/L	50 μ g/L	100 μ g/L	200 μ g/L
白细胞介素 6	1.009 \pm 0.112	3.151 \pm 0.526 ^a	5.252 \pm 0.320 ^a	7.458 \pm 0.099 ^a	7.479 \pm 0.408 ^a	7.590 \pm 0.420 ^a
肿瘤坏死因子 α	1.074 \pm 0.040	8.383 \pm 0.080 ^a	13.131 \pm 0.007 ^a	14.182 \pm 0.154 ^a	15.232 \pm 0.083 ^a	15.548 \pm 0.002 ^a

表注: 与 0 μ g/L 组比较, ^a $p < 0.01$ 。表 3 miR-136-5p 转染效率的计算 ($n=3$)

Table 3 Transfection efficiency of miR-136-5p

组别	视野 1	视野 2	视野 3	转染效率($\bar{x}\pm s, \%$)
阴性转染组	95	91	90	92.00 \pm 2.64
抑制组	92	96	92	93.33 \pm 2.30

表注: 2 组荧光转染效率差异无显著性意义($P > 0.05$)。表 5 白细胞介素 17 刺激前后小鼠星形胶质细胞内 A20 蛋白的相对表达情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 The relative protein expression level of A20 in mouse astrocytes before and after interleukin-17 stimulation

组别	A20 蛋白	
	无白细胞介素 17 刺激	白细胞介素 17 刺激
空白组	0.787 \pm 0.012	0.401 \pm 0.028 ^b
阴性组	0.803 \pm 0.025	0.388 \pm 0.013 ^b
抑制组	1.374 \pm 0.021 ^a	0.677 \pm 0.039 ^{ab}

表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与无白细胞介素 17 刺激比较, ^b $P < 0.01$ 。过程中 miRNA 发挥着至关重要的作用^[14, 18, 26-32]。

A20 为一种经典的免疫负向调控蛋白。调控转录因子核因子 κ B 的活化就有 A20 的参与, 其主要是发挥去泛素化及 E3 泛素连接酶的功能, 而 A20 蛋白缺陷的小鼠 (A20^{-/-}) 会自发的产生严重的炎症性疾病, 并在围产期死亡。在人类单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 分析发现, 多种自身免疫性疾病的发生与 A20 基因有着密切联系, 例如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎性肠病等等多种自身免疫性疾病, 这提示人类自身免疫稳态的维持需要 A20 的参与^[15]。越来越多的研究证明 A20 基因在免疫调节方面的有着至关重要的作用, A20 不仅参与了多种自身免疫性疾病和炎性疾病的发生、发展的病理过程, 同时也在肿瘤和病毒诱导的免疫耐受以及淋巴细胞肿瘤的发生

表 4 白细胞介素 17 刺激前后小鼠星形胶质细胞内 A20 mRNA 的相对表达情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 The relative mRNA expression level of A20 in mouse astrocytes before and after interleukin-17 stimulation

组别	A20 mRNA	
	无白细胞介素 17 刺激	白细胞介素 17 刺激
空白组	1.007 \pm 0.124	0.419 \pm 0.013 ^b
阴性组	0.998 \pm 0.070	0.444 \pm 0.044 ^b
抑制组	1.452 \pm 0.051 ^a	0.729 \pm 0.060 ^{ac}

表注: 与空白组比较: ^a $P < 0.01$; 与无白细胞介素 17 刺激比较: ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

发展中发挥重要作用, 有理由认为免疫应答的强度和维持时间可能受 A20 表达及其活性改变的影响^[33-35]。因此, 为了适应各种的免疫应答需要, 通过调控 A20 的表达来影响机体的免疫应答状态, 以适应各种免疫应答的需要, 必将是 A20 作为免疫治疗靶分子的潜在价值所在。

作者对 miR-136-5p 研究发现, 通过使用 miR-136-5p-inhibition 慢病毒转染的小鼠星形胶质细胞, 使细胞内 miR-136-5p 含量降低, 从而检测小鼠星形胶质细胞在白细胞介素 17 刺激下 miR-136-5p 的表达情况, 以进一步探讨 miR-136-5p 是否可以调控白细胞介素 17 刺激下小鼠星形胶质细胞 A20 蛋白的表达。研究结果显示: 在白细胞介素 17 刺激下 miR-136-5p-inhibition 抑制组的小鼠星形胶质细胞, 与空白组相比 miR-136-5p 相对表达量显著下调, A20 蛋白表达量均显著升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。综上所述, 作者认为 miR-136-5p 对白细胞介素 17 刺激的星形胶质细胞表达 A20 蛋白发挥了调控效应。

致谢: 向广西医科大学医学实验中心提供帮助的技术人员表示感谢。

作者贡献: 实验设计为第一作者和通讯作者, 实施为全体作者, 第一作者成文, 通讯作者评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 汪伟. 神经元-星形胶质细胞相互调控在神经病理性痛及镇痛中的作用[D]. 第四军医大学, 2011.
- [2] Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci.* 2013;333(1-2): 76-87.
- [3] Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(8):626-640.
- [4] Pierson E, Simmons SB, Castelli L, et al. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol Rev.* 2012;248(1): 205-215.
- [5] 张志军. 脊髓星形胶质细胞中 CXCL1 参与神经病理性疼痛调节的机制研究[D]. 苏州大学, 2012.
- [6] Miyoshi K, Obata K, Kondo T, et al. Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J Neurosci.* 2008; 28(48): 12775-12787.
- [7] Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, et al. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol.* 2006; 2(4):259-269.
- [8] 施沛青, 朱书, 钱友存. IL-17 的信号传导及功能研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(4): 345-357.
- [9] 钱丽丽, 胡明慧, 贾秀志, 等. IL-17 在急性神经炎症中的神经保护作用与机制[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(7): 553-556.
- [10] 王倩, 胡金伟, 马秀敏等. Th17 细胞与自身免疫性疾病关系的研究进展[J]. 现代免疫学, 2015, 35(6): 524-526+506.
- [11] Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008;453(7198): 1051-1057.
- [12] O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth CJ, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol.* 2009;10(6): 603-609.
- [13] Wong CK, Ho CY, Ko FW, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol.* 2001;125(2): 177-183.
- [14] Liu X, He F, Pang R, et al. Interleukin-17 (IL-17)-induced MicroRNA 873 (miR-873) contributes to the pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Targeting A20 Ubiquitin-editing Enzyme. *J Biol Chem.* 2014;289(42): 28971-28986.
- [15] 夏梦, 刘书逊. 树突状细胞中 A20 的表达参与机体免疫稳态的维持[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(1): 42.
- [16] Vereecke L, R Beyaert G, van Loo. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol.* 2009; 30(8):383-391.
- [17] Song XT, Evel-Kabler K, Shen L, et al. A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression. *Nat Med.* 2008;14(3):258-265.
- [18] 陈建敏, 杨拯, 梁楠, 等. 脊髓损伤相关的 microRNA 研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(7):635-639.
- [19] Jee MK, Jung JS, Choi JI, et al. MicroRNA 486 is a potentially novel target for the treatment of spinal cord injury. *Brain.* 2012; 135(Pt 4): 1237-1252.
- [20] Tang G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(2): 106-114.
- [21] Ma X, Reynolds SL, Baker BJ, et al. IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes. *J Immunol.* 2010; 184(9): 4898-4906.
- [22] 曾俊. 柯萨奇病毒感染星形胶质细胞及细胞因子变化研究[D]. 汕头大学, 2010.
- [23] Bak M, Silahatoglu A, Møller M, et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA (New York, N.Y.).* 2008;14(3): 432-444.
- [24] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116(2):281-297.
- [25] Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. (New York, N.Y.) *J Autoimmun.* 2009; 32(3-4):189-194.
- [26] 黄江湖. MicroRNA-21 在急性脊髓损伤中的作用及川芎嗪的抗凋亡作用机制研究[D]. 中南大学, 2013.
- [27] 陈琨. 小鼠脊髓损伤后 microRNA-152 对神经元突起再生作用和机制的研究[D]. 第四军医大学, 2014.
- [28] 陈金国. microRNA-124a 在大鼠损伤脊髓中的表达及与钙蛋白酶 1 的相关分析[D]. 福建医科大学, 2013.
- [29] 程细高. miR-140-5P 参与调控颈椎软骨终板退变[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2014, 54(5):1-5.
- [30] 卫肖. miR-27b 对大鼠 H9C2 心肌细胞中 MCP-1 表达的抑制作用[D]. 郑州大学, 2014.
- [31] 吴兴净, 张永涛, 郭雄, 等. miR-125a-3p 和 miR-17-5p 在激素性股骨头坏死中的作用[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2015, 36(2): 210-214.
- [32] Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, et al. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell.* 2007; 27(3): 435-448.
- [33] 李扬秋. A20 的免疫调节作用及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(4):851-856.
- [34] 王静, 倪秀雄. 锌指蛋白 A20 的结构特点及其对树突状细胞成熟和凋亡的影响[J]. 海峡药学, 2012, 24(5):8-10.
- [35] Coornaert B, Baens M, Heynincx K, et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol.* 2008; 9(3): 263-271.