

引用本文:李家江,王守鹏,张兆川,等.微小RNA-146a靶向调控 Krüppel 样转录因子 7 对强直性脊柱炎 T 细胞炎症反应及自噬的影响[J].安徽医药,2022,26(8):1611-1614.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.08.029.

◇临床医学◇



微小 RNA-146a 靶向调控 Krüppel 样转录因子 7 对强直性脊柱炎 T 细胞炎症反应及自噬的影响

李家江,王守鹏,张兆川,赵腾

作者单位:枣庄矿业集团枣庄医院骨科,山东 枣庄 277100

摘要: **目的** 探讨微小 RNA-146a(miR-146a)是否通过靶向调控 Krüppel 样转录因子 7(KLF7)的表达而影响强直性脊柱炎病人 T 细胞炎症反应及自噬。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测强直性脊柱炎病人 T 细胞与健康人 T 细胞中 miR-146a 的表达量;分别将 anti-miR-NC、anti-miR-146a、pcDNA3.1、pcDNA3.1-KLF7 转染至强直性脊柱炎病人 T 细胞;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-17(IL-17)、白细胞介素-23(IL-23)的水平;双荧光素酶报告实验验证 miR-146a 与 KLF7 的靶向结合关系;蛋白质印迹法(Western blotting)检测 KLF7、自噬相关基因 5(ATG5)、Beclin-1 的表达量。**结果** 与健康人 T 细胞比较,强直性脊柱炎病人 T 细胞中 miR-146a 的表达量升高[(1.00±0.08)比(2.74±0.13), $t=53.54$, $P<0.05$];与 anti-miR-NC 组比较,anti-miR-146a 组 IL-6[(823.17±14.10)ng/L 比(372.31±11.03)ng/L]、IL-17[(901.00±16.29)ng/L 比(428.39±12.34)ng/L]、IL-23[(886.38±15.11)ng/L 比(401.61±11.75)ng/L]的水平降低($t=43.62, 40.06, 43.87$, $P<0.05$), ATG5[(0.33±0.03)比(0.79±0.07)]、Beclin-1[(0.42±0.04)比(0.91±0.08)]蛋白水平升高($t=10.46, 9.49$, $P<0.05$);双荧光素酶报告实验证实 miR-146a 可靶向结合 KLF7;转染 pcDNA3.1-KLF7 可明显降低 IL-6[(823.17±14.10)ng/L 比(477.37±12.01)ng/L]、IL-17[(901.00±16.29)ng/L 比(558.67±13.16)ng/L]、IL-23[(886.38±15.11)ng/L 比(531.69±12.75)ng/L]的水平($t=32.34, 28.31, 31.07$, $P<0.05$),提高 ATG5[(0.32±0.03)比(0.60±0.06)]、Beclin-1[(0.44±0.04)比(0.78±0.07)]的表达水平($t=7.23, 7.30$, $P=0.002$)。**结论** 抑制 miR-146a 表达可通过靶向 KLF7 而抑制强直性脊柱炎病人 T 细胞炎症反应及促进细胞自噬。

关键词: 脊柱炎,强直性; 微小 RNA-146a; Krüppel 样转录因子 7; T 细胞; 炎症; 自噬

Effect of miR-146a on T cell inflammatory response and autophagy in patients with ankylosing spondylitis by targeting KLF7 expression

LI Jiajiang, WANG Shoupeng, ZHANG Zhaochuan, ZHAO Teng

Author Affiliation: Department of Orthopedics, Zaozhuang Hospital, Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong 277100, China

Abstract: **Objective** To investigate whether miR-146a affects T cell inflammation and autophagy in patients with ankylosing spondylitis by regulating the expression of KLF7. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-146a in T cells from patients with ankylosing spondylitis and healthy human T cells. anti-miR-NC, anti-miR-146a, pcDNA3.1, and pcDNA3.1-KLF7 were transfected into T cells of patients with ankylosing spondylitis, respectively. ELISA was used to detect the levels of IL-6, IL-17 and IL-23. The dual luciferase reporting experiment verified the targeted binding relationship between miR-146a and KLF7. The expression levels of KLF7, ATG5 and Beclin-1 were detected by Western blotting. **Results** Compared with healthy human T cells, the expression of miR-146a in T cells of patients with ankylosing spondylitis increased significantly [(1.00±0.08) vs. (2.74±0.13), $t=53.54$, $P<0.05$]. Compared with the anti-miR-NC group, the levels of IL-6 [(823.17±14.10)ng/L vs. (372.31±11.03)ng/L], IL-17 [(901.00±16.29)ng/L vs. (428.39±12.34)ng/L], and IL-23 [(886.38±15.11)ng/L vs. (401.61±11.75)ng/L] in the anti-miR-146a group were significantly reduced ($t=43.62, 40.06, 43.87$, $P<0.05$), and the levels of ATG5 [(0.33±0.03) vs. (0.79±0.07)] and Beclin-1 [(0.42±0.04) vs. (0.91±0.08)] proteins were significantly increased ($t=10.46, 9.49$, $P<0.05$). Double luciferase reporting experiments confirmed that miR-146a could target KLF7. Transfection of pcDNA3.1-KLF7 could significantly reduce the levels of IL-6 [(823.17±14.10) vs. (477.37±12.01)ng/L], IL-17 [(901.00±16.29)ng/L vs. (558.67±13.16)ng/L], IL-23 [(886.38±15.11) vs. (531.69±12.75)ng/L], $t=32.34, 28.31, 31.07$, $P<0.05$], and increase the expression levels of ATG5 [(0.32±0.03) vs. (0.60±0.06)] and Beclin-1 [(0.44±0.04) vs. (0.78±0.07)], $t=7.23, 7.30$, $P=0.002$. **Conclusion** Inhibition of miR-146a expression can inhibit T cell inflammatory response in patients with ankylosing spondylitis and promote cell autophagy by targeting KLF7.

Key words: Spondylitis, ankylosing; MiRNA-146a; Krüppel-like factor; T cells; Inflammation; Autophagy

强直性脊柱炎是临床常见的一种炎症性疾病,免疫炎症、细胞自噬等均可能参与强直性脊柱炎发生及发展过程,研究表明细胞炎症因子可参与自身免疫性疾病等多种疾病的发生及发展过程^[1-2]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种非编码单链RNA分子,并可通过碱基互补与靶基因结合从而抑制其转录、翻译过程,研究表明miRNA在强直性脊柱炎病人T细胞中表达异常并可能参与强直性脊柱炎发生及发展过程^[3-4]。因而探究miRNA在强直性脊柱炎病人T细胞炎症反应及自噬中的作用具有重要意义。研究表明强直性脊柱炎病人外周血中微小RNA-146a(microRNA-146a, miR-146a)表达上调,但关于其在强直性脊柱炎发生过程中的作用机制尚未可知^[5]。通过生物信息学分析显示Krüppel样转录因子7(Krüppel-like factor, KLF7)可能是miR-146a的靶基因,研究表明KLF7可促进大鼠坐骨神经运动功能恢复,并可在神经损伤修复过程中发挥重要调控作用^[6]。因此,本研究主要探究miR-146a对强直性脊柱炎病人T细胞炎症反应及自噬的影响,探讨其对KLF7的靶向调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 收集枣庄矿业集团枣庄医院收治的强直性脊柱炎病人18例为研究对象(2016年2月至2017年10月),所有病人均符合强直性脊柱炎诊断标准^[7],其中男10例,女8例,年龄(28.67 ± 6.32)岁。选取同期于枣庄矿业集团枣庄医院体检的健康志愿者24例为对照组,其中男14例,女10例,年龄(30.25 ± 4.12)岁。两组性别($\chi^2=0.03, P=0.857$)、年龄($t=0.98, P=0.333$)比较,差异无统计学意义。抽取两组研究对象的外周静脉血10 mL,置于含有EDTA-二钾抗凝试管中,应用人淋巴细胞分离液分离收集外周血单核细胞,采用T细胞磁珠分离T细胞。

所有病人知情且签署同意书。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司; Lipofectamine2000、Trizol试剂购自美国Invitrogen公司; PCR试剂盒购自大连宝生物公司; anti-miR-146a、anti-miR-NC、miR-146a mimics、miR-NC购自广州锐博生物科技有限公司; 白细胞介素(IL)-6、IL-17、IL-23检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司; 兔抗人KLF7抗体购自北京百奥莱博科技有限公司; 兔抗人自噬相关基因5(ATG5)、Beclin-1抗体购自美国Santa Cruz公司; HRP标记的山羊抗兔二抗购自武汉艾美捷科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 强直性脊柱炎病人T细胞接种于96孔板(5×10^4 个/孔),分别将anti-miR-NC、anti-miR-146a、pcDNA3.1、pcDNA3.1-KLF7转染至T细胞,分别记作anti-miR-NC组、anti-miR-146a组、pcDNA3.1组、pcDNA3.1-KLF7组。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中miR-146a的表达水平 采用Trizol法提取细胞中的总RNA,参照反转录试剂盒将总RNA合成cDNA,以cDNA为模板进行qRT-PCR反应,按照实时荧光定量PCR试剂盒配置反应体系。miR-146a以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-146a相对表达量。

1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测IL-6、IL-17、IL-23的水平 收集各组细胞培养上清液,采用ELISA法检测IL-6、IL-17、IL-23的水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 双荧光素酶报告基因检测 miR-146a的靶基因 starBase 预测显示KLF7的3' UTR含有miR-146a的互补序列,分别构建野生型载体WT-KLF7与突变型载体MUT-KLF7,分别将WT-KLF7、MUT-KLF7与miR-NC、miR-146a mimics共转染至T细胞,检测细胞相对荧光素酶活性。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blotting)检测KLF7、ATG5、Beclin-1蛋白表达 收集各组强直性脊柱炎病人T细胞,提取细胞总蛋白,检测蛋白浓度,SDS-PAGE分离蛋白,转膜,封闭2 h,加入一抗稀释液与孵育二抗稀释液,室温孵育1 h,应用Image J软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0统计学软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示且均符合正态分布,两组间比较采用独立样本 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

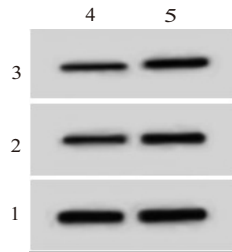
2.1 miR-146a在强直性脊柱炎病人T细胞中的表达 与健康人T细胞比较,强直性脊柱炎病人T细胞中miR-146a的表达量升高[(1.00 ± 0.08)比(2.74 ± 0.13), $t=53.54, P < 0.001$]。

2.2 抑制miR-146a对强直性脊柱炎病人T细胞炎症反应的影响 与anti-miR-NC组比较,anti-miR-146a组IL-6、IL-17、IL-23的水平降低($P < 0.001$),见表1。

2.3 抑制miR-146a对强直性脊柱炎病人T细胞自噬的影响 与anti-miR-NC组比较,anti-miR-146a组ATG5、Beclin-1蛋白水平升高($P < 0.001$),见图1,表2。

表1 抑制 miR-146a 对强直性脊柱炎患者 T 细胞炎症反应的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-146a	IL-6/(ng/L)	IL-17/(ng/L)	IL-23/(ng/L)
anti-miR-NC	3	0.99±0.07	823.17±14.10	901.00±16.29	886.38±15.11
anti-miR-146a	3	0.27±0.03	372.31±11.03	428.39±12.34	401.61±11.75
<i>t</i> 值		16.38	43.62	40.06	43.87
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—Beclin-1; 3—自噬相关基因 5(ATG5); 4—anti-miR-NC; 5—anti-miR-146a。

图1 ATG5、Beclin-1 蛋白的表达

表2 抑制 miR-146a 对强直性脊柱炎患者 T 细胞自噬的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	ATG5	Beclin-1
anti-miR-NC	3	0.33±0.03	0.42±0.04
anti-miR-146a	3	0.79±0.07	0.91±0.08
<i>t</i> 值		10.46	9.49
<i>P</i> 值		0.000	0.001

2.4 miR-146a 靶向 KLF7 starBase 预测显示 KLF7 的 3' UTR 含有 miR-146a 的互补序列, 见图 2。miR-146a 过表达可降低 WT-KLF7 的荧光素酶活性 ($P<0.001$), 而对 MUT-KLF7 的荧光素酶活性无明显影响 ($P=0.775$), 见表 3。与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-146a 组 KLF7 蛋白水平升高 [(0.89 ± 0.07) 比 (0.37 ± 0.04) , $t=11.17$, $P<0.001$], 见图 3。

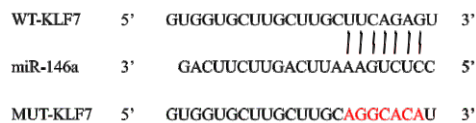


图2 KLF7 的 3' UTR 含有 miR-146a 的互补序列

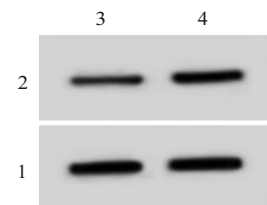
2.5 过表达 KLF7 对强直性脊柱炎病人 T 细胞炎症反应及自噬的影响 与 pcDNA3.1 组比较, pcDNA3.1-KLF7 组 IL-6、IL-17、IL-23 的水平降低 ($P<0.001$), ATG5、Beclin-1 蛋白水平升高 ($P=0.002$), 见图 4, 表 4。

表4 过表达 KLF7 对强直性脊柱炎患者 T 细胞炎症反应及自噬的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	KLF7	IL-6/(ng/L)	IL-17/(ng/L)	IL-23/(ng/L)	ATG5	Beclin-1
pcDNA3.1	3	0.38±0.04	823.17±14.10	901.00±16.29	886.38±15.11	0.32±0.03	0.44±0.04
pcDNA3.1-KLF7	3	1.03±0.08	477.37±12.01	558.67±13.16	531.69±12.75	0.60±0.06	0.78±0.07
<i>t</i> 值		12.59	32.34	28.31	31.07	7.23	7.30
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002

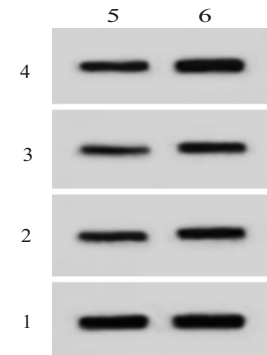
表3 miR-146a 过表达对 WT-KLF7 及 MUT-KLF7 荧光素酶活性的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	WT-KLF7	MUT-KLF7
miR-NC	3	0.98±0.07	0.97±0.08
miR-146a	3	0.29±0.03	0.99±0.08
<i>t</i> 值		15.69	0.31
<i>P</i> 值		0.000	0.775



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—Krüppel 样转录因子 7(KLF7); 3—anti-miR-NC; 4—anti-miR-146a。

图3 anti-miR-NC 组与 anti-miR-146a 组 Krüppel 样转录因子 7 蛋白表达



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—Beclin-1; 3—自噬相关基因 5(ATG5); 4—Krüppel 样转录因子 7(KLF7); 5—pcDNA3.1; 6—pcDNA3.1-KLF7。

图4 pcDNA3.1 组与 pcDNA3.1-KLF7 组 KLF7、ATG5、Beclin-1 蛋白的表达

3 讨论

miRNA 可通过调控靶基因表达从而影响强直性脊柱炎病人 T 细胞凋亡及自噬等生物学过程, 自

噬引发的自身免疫耐受可预防自身免疫疾病的发生^[8-10]。研究表明降低 miR-146a 的表达量可延缓强直性脊柱炎的发展进程^[11]。相关报道指出 miR-146a 可参与骨髓间充质干细胞成骨分化、血小板免疫炎症反应等多种炎症反应过程^[12-13]。本研究结果显示强直性脊柱炎病人 T 细胞中 miR-146a 的表达量升高,提示 miR-146a 在强直性脊柱炎发生及发展过程中可能发挥重要调控作用。

促炎因子与抗炎因子比例失衡是促进强直性脊柱炎发生的重要原因之一,研究表明 IL-6、IL-17、IL-23 水平升高可促进炎症反应的发生从而加重疾病进展^[14-15]。本研究结果显示抑制 miR-146a 表达后,强直性脊柱炎病人 T 细胞炎症因子 IL-6、IL-17、IL-23 水平降低,提示抑制 miR-146a 表达可抑制强直性脊柱炎病人 T 细胞炎症反应。自噬异常与各种疾病发生及发展有关,ATG5 与 Beclin-1 属于自噬的标志物,其表达增强可作为评估自噬水平升高的标志物^[16]。本研究结果显示抑制 miR-146a 表达后强直性脊柱炎病人 T 细胞 ATG5、Beclin-1 蛋白水平升高,说明 miR-146a 可抑制强直性脊柱炎病人 T 细胞自噬水平。提示 miR-146a 在强直性脊柱炎病人 T 细胞自噬过程中发挥重要调控作用。

通过生物信息学软件预测 KLF7 可能是 miR-146a 的靶基因,本研究证实 miR-146a 可靶向结合 KLF7。研究表明抑制 KLF7 表达可促使视网膜功能、中枢神经功能障碍的发生,还可参与炎症反应的发生过程^[17-19]。本研究结果显示 KLF7 过表达后,强直性脊柱炎病人 T 细胞 IL-6、IL-17、IL-23 的水平降低,ATG5、Beclin-1 蛋白水平升高,说明 KLF7 过表达可抑制强直性脊柱炎病人 T 细胞炎症反应,并促进细胞自噬的发生。提示 miR-146a 可能通过靶向 KLF7 基因而参与炎症反应及自噬过程从而在强直性脊柱炎发生过程中发挥调控作用。

综上所述,强直性脊柱炎病人 T 细胞中 miR-146a 表达上调,抑制 miR-146a 表达可能通过上调 KLF7 的表达从而抑制强直性脊柱炎病人 T 细胞炎症反应,并促进细胞自噬的发生,可为强直性脊柱炎的诊断及治疗提供新方向。

参考文献

[1] CICCIA F, HAROON N. Autophagy in the pathogenesis of ankylosing spondylitis[J]. Clin Rheumatol, 2016, 35(6): 1433-1436.
[2] DEVECI H, TURK AC, OZMEN ZC, et al. Serum Interleukin-23/17 levels in ankylosing spondylitis patients treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a prospective cohort study[J]. J

Interferon Cytokine Res, 2019, 39(9): 572-576.
[3] CIECHOMSKA M, BONEK K, MERDAS M, et al. Changes in MiRNA-5196 expression as a potential biomarker of anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis patients[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018, 66(5): 389-397.
[4] LI Z, WONG SH, SHEN J, et al. The role of micrnas in ankylosing spondylitis[J/OL]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(14): e3325.DOI: 10.1097/MD.0000000000003325.
[5] 姜芳, 许敏, 郑锡铭. 强直性脊柱炎患者外周血 miR-146a、miR-155、miR-181a、miR-223 的表达分析[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(5): 766-769.
[6] 胡光亮, 王子健, 鲁一村, 等. 腺病毒 KLF7 对大鼠脊髓损伤 TrkA 及 TrkB 表达的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2017, 38(2): 9-12.
[7] 王睿铸, 胡彦君, 智勇, 等. 强直性脊柱炎的早期诊断体会[J]. 中国药物与临床, 2014, 14(4): 470-471.
[8] ZHANG X, JIS, CAI GQ, et al. H19 Increases IL-17A/IL-23 Releases via regulating VDR by interacting with miR675-5p/miR22-5p in ankylosing spondylitis[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19(1): 393-404.
[9] QIN X, ZHU B, JIANG T, et al. miR-17-5p Regulates heterotopic ossification by targeting ANKH in ankylosing spondylitis[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 18(1): 696-707.
[10] 王亚寒, 罗建平, 王小刚, 等. 微小 RNA-148a-3p 对强直性脊柱炎患者 T 细胞自噬及炎症应答的影响及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(12): 2265-2268.
[11] 吴系美, 李博, 余若男, 等. 英夫利昔单抗治疗强直性脊柱炎的疗效及对 miR-146a 表达的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(7): 701-703.
[12] 匡威, 谭家莉, 张红梅, 等. miR146a 参与炎症条件下骨髓间充质干细胞成骨分化的降低及其机制研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2011, 27(11): 643-645.
[13] 徐吉琳, 王路乔, 梁倩, 等. miR-146a 对血小板免疫炎症功能的影响[J]. 重庆医学, 2019, 48(13): 2175-2179.
[14] 蔡慧颖, 钟华. 强直性脊柱炎患者外周血 TNF- α 、IL-17、IL-23 的表达[J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(18): 3340-3342.
[15] 李珂, 张庆猛, 李恒, 等. 强直性脊柱炎与非炎性髋关节疾病行人工全髋关节置换术的围手术期炎症指标比较[J]. 中国修复重建外科杂志, 2015, 29(10): 1199-1203.
[16] 罗雄燕, 刘青松, 杨冈, 等. 自噬基因在系统性红斑狼疮患者 T 细胞中表达的检测[J]. 中华风湿病学杂志, 2018, 22(6): 381-385.
[17] 李文媛, 王莹, 郭素芬, 等. KLF7 联合脂肪源性干细胞对脊髓损伤大鼠运动功能的影响及其机制[J]. 山东医药, 2017, 57(44): 5-8.
[18] 王翠喆, 哈晓丹, 李伟, 等. KLF4、KLF7 在大鼠网膜脂肪组织中的表达与炎症的相关性研究[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(3): 204-209.
[19] 王莹, 李文媛, 赵艳晶, 等. KLF7 对小鼠脱细胞异体神经支架移植后运动功能的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(3): 385-390.

(收稿日期:2020-08-18,修回日期:2020-10-07)