doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.17.001

・基础研究・

miR-203 下调 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路诱导 M2 型巨噬细胞极化 *

李登1沙明磊2陈磊1赵圣1邵怡1

(1上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080;2上海交通大学附属第一人民医院老年科 上海 200080)

摘要 目的:验证 miR-203 通过与 TLR4 mRNA 的 3'-UTR 特异性结合下调 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路诱导 M2 型巨噬细胞极 化。方法:通过 miRanda 软件预测 TLR4 mRNA 3'-UTR 存在 miR-203 结合位点。根据 TLR4 mRNA 3'-UTR 序列设计目的基因片 段以及突变型目的基因片段,以 pmirGLO 为载体构建双荧光素酶报告基因野生型载体(pmirGLO-TLR4 3'-UTR)及其突变型载体 (pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR)。将 293T 细胞 共转染 pmirGLO-TLR4 3'-UTR 质粒或 pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR 质粒及 mmu-miR-203-3p mimics 或 mimic NC,通过双荧光素酶报告基因系统验证 miR-203 可以与 TLR4 mRNA 的 3'-UTR 特异性结合, 通过 Real-time PCR 及 Western blot 验证小鼠巨噬细胞 RAW264.7 转染了 mmu-miR-203-3p mimics, mimic NC 后, M1 型巨噬细胞 markers (iNOS, TNF- α , CCL-3, IL-23), M2 型巨噬细胞 markers (Arg-1, CX3CR1, IL-4, MRC, IL-10, Ym-1)及 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路的表达。使用 TLR4 抑制剂 TAK-242 抑制小鼠巨噬细胞 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路后,转染 mmu-miR-203-3p mimics 示 mimic NC,再次检测 M1, M2 型巨噬细胞 markers 及 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路的表达。结果:双荧光素酶报告基因系统显 示 293T 细胞转染了 pmirGLO-TLR4 3'-UTR 质粒及 mmu-miR-203-3p mimics 后, 其相对荧光素酶活性Δ CT 较转染了 pmirG-LO-mut-TLR4 3'-UTR 质粒或者 mimic NC 均有显著降低,其差异达到统计学意义(P<0.05)。Real-time PCR 及 Western blot 显示转 染了 mmu-miR-203-3p mimics 的小鼠巨噬细胞 M1 型巨啮细胞 markers (iNOS, TNF- α , CCL-3, IL-23) 表达减少, M2 型巨噬细胞 markers (Arg-1, CX3CR1, IL-4, MRC, IL-10, Ym-1) 表达增加,同时伴有 TLR4-Myd88-NF- κ B 信号通路表达下调,而通过给予 TAK-242 抑制了 mmu-miR-203-3p mimics 下调 TLR4-Myd88-NF- κ B 信号通路及诱导 M2 型巨噬细胞板化的作用。结论:miR-203 与 TLR4 mRNA 的 3'-UTR 特异性结合下调 TLR4-Myd88-NF- κ B 信号通路诱导 M2 型巨噬细胞板化的作用。结论:miR-203

关键词:miR-203;RAW264.7;双荧光素酶报告基因系统;巨噬细胞极化;TLR4-Myd88-NF-κB

中图分类号:R-33;Q78;R692;R329.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)17-3201-08

miR-203 Regulating M2 Macrophage Polarization Via Inhibition of TLR4-Myd88-NF-κB Signaling Pathway*

LI Deng¹, SHA Ming-lei², CHEN Lei¹, ZHAO Sheng¹, SHAO Yi¹

(1 Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;
 2 Department of Gerontology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To verify that miR-203 plays a significant role in promoting M2 macrophage polarization through targeting 3'-UTR of TLR4 mRNA and therefore inhibiting TLR4-Myd88-NF- κB signaling. **Methods:** We speculated the specific binding of miR-203 and 3'-UTR of TLR4 mRNA by miRanda software. And we constructed plasmid pmirGLO-TLR4 3'-UTR and its mutant plasmid pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR based on the sequence of 3'-UTR of TLR4 mRNA. Cell line 293T was co-transfected with plasmids pmirGLO-TLR4 3'-UTR or pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR and mmu-miR-203-3p mimics or mimic NC. Dual-luciferase reporter assay system was used to detect the specific binding of miR-203 and 3'-UTR of TLR4 mRNA. The expressions of M1 macrophage markers (iNOS, TNF-α, CCL-3, IL-23), M2 macrophage markers (Arg-1, CX3CR1, IL-4, MRC, IL-10 and Ym1) were detected by Real-time PCR. And the expression of TLR4-Myd88-NF-κB signaling was detected by Real-time PCR and Western blot. The antagonist of TLR4, TAK-242, was used to further confirmed the role of miR-203 in regulating M2 macrophage polarization and inhibiting the TLR4-Myd88-NF-κB signaling pathway. **Results:** The Relative luciferase activity was significantly lower in 293T cells co-transfected with pmirGLO-TLR4 3'-UTR plasmid or mimic NC. Real-time PCR and Western blot revealed that the expressions of M1 macrophage markers (iNOS, TNF-α, CCL-3, IL-23) were significantly decreased and the expressions of M2 macrophage markers (Arg-1, CX3CR1, IL-4, MRC, IL-10 and Ym1) were signifi-

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81200504);上海交通大学医工交叉项目[多学科交叉项目培育(医工)](YG2016MS20)

作者简介:李登(1991-),硕士研究生,主要研究方向:泌尿外科学,电话:15800538135,E-mail:lideng1991@hotmail.com

[△] 通讯作者: 邵怡, 电话: 13661633372, E-mail: drshaoyi@163.com

⁽收稿日期:2018-03-15 接受日期:2018-03-31)

cantly increased in mouse macrophage RAW264.7 transfected with mmu-miR-203-3p mimics when compared with control group or mouse macrophage RAW264.7 transfected with mimic NC, accompanied by downregulation of TLR4-Myd88-NF-κB signaling. And this phenomenon was abrogated by the inhibiting of TLR4-Myd88-NF-κB signaling pathway in mouse macrophages RAW264.7 treated with TAK-242. **Conclusion:** Taken together, miR-203 could promote M2 macrophages polarization through directly targeting 3'-UTR of TLR4 mRNA and therefore inhibiting the TLR4-Myd88-NF-κB signaling pathway.

Key words: miR-203; RAW264.7; Dual-luciferase reporter assay system; Macrophage polarization; TLR4-Myd88-NF-κB Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R692; R329 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)17-3201-08

前言

肾纤维化是所有终末期肾病共同的病理特征之一^[1]。研究 表明,免疫微环境在肾纤维化的形成和发展过程中发挥了重要 作用,调节免疫微环境可能是改变肾纤维化病程的重要途径。 巨噬细胞的表型改变在免疫微环境的调节中起到了重要的作 用^[2],在损伤早期阶段耗竭巨噬细胞对组织具有保护作用,而在 损伤恢复阶段耗竭巨噬细胞则延迟损伤的恢复^[3]。巨噬细胞这 种矛盾的作用可以通过巨噬细胞极化后不同蛋白质的表达来 解释^[34]。

MicroRNA(miRNA)是一种内源性的短链非编码 RNA,能 够通过碱基互补配对与 mRNA 的 3' 非翻译区(untranslated region,UTR)特异性结合,通过抑制 mRNA 翻译或者促进其降解 来调控特定基因的表达^[5]。巨噬细胞的极化同样受 miRNA 的 调 控 。有 文 献 报 道 miR-155, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-146a, miR-146b 等均具有调节巨噬细胞极化的作用^[6]。 miR-203 已被证实可以通过 TGF-β1 相关信号通路调控肝星状 细胞^[7,8]、骨骼肌细胞^[9]、胚胎干细胞的增殖及分化^[10],参与包括 心肌^[11]、肝脏^[7]等多种组织器官的纤维化。我们通过 miRanda 软 件预测在 TLR4 mRNA 3'-UTR 的第 1109-1117 个碱基位置可 能存在与 miR-203 完全或不完全互补配对的结合位点。而 TLR4 信号通路已被证实在巨噬细胞极化过程中发挥着重要的 作用^[12]。本研究拟验证 miR-203 是否可以与 TLR4 mRNA 3'-UTR 特异性结合,抑制 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路,诱导 M2 型巨噬细胞极化。

1 材料与方法

1.1 细胞株,质粒构建

1.1.1 细胞株 人肾上皮细胞 293T 及小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由本实验室保存,用 DMEM 培养基(含 10 % 胎牛 血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素) 于 5 % CO₂,37 ℃条件下传代培养。

1.1.2 质粒构建 通过 miRanda 软件预测在 TLR4 mRNA 3'-UTR 的第 1109-1117 个碱基位置可能存在与 miR-203 完全 或不完全互补配对的结合位点。以此设计合成含有与 miR-203 存在互补结合位点的 63 个碱基序列的目的基因片段以及突变 型目的基因片段,并在目的片段的 5' 端和 3' 端分别加入了 Sacl 和 Xhol 两个限制性内切酶位点(见表 1)。双荧光素酶报 告基因载体(pmirGLO 载体)购自美国 Promaga 公司。将合成的 两种目的基因片段,分别克隆到 pmirGLO 双荧光素酶报告基 因载体,构建双荧光素酶报告基因野生型载体(pmirGLO-TLR4 3'-UTR)及其突变型载体(pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR)。质粒构 建委托上海吉满公司完成。mmu-miR-203-3p mimics 及 mimic NC 委托上海吉满公司设计与合成,mmu-miR-203-3p mimics 的序列为正向:5'-GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG-3';反 向:5'-CUAGUGGUCCUAAACAUUUCAC-3'。

Table 1 Sequences of target gene			
Sequence name	Sequence fragment(5'-3')		
TLR4 3'-UTR(Forward)	CAGTCAGCATGAACACT-		
	GAATATATAATGT <u>CATTTCA</u> CAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT ${f C}$		
TLR4 3'-UTR(Reverse)	TCGAGATACACAACACACAACACA-		
	CACTGTGAAATGACATTATATATTCAGTGTTCATGCTGACTG GAGCT		
TLR4-mut-3'-UTR(Forward)	CAGTCAGCATGAACACT-		
	GAATATATAATGT <u>GTAAAGT</u> CAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT C		
TLR4-mut-3'-UTR(Reverse)	TCGAGATACACAACACACAACACA-		
	CACTGACTTTACACATTATATATTCAGTGTTCATGCTGACTG GAGCT		

表1 目的基因序列

1.2 试剂与仪器

DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);青链霉素(上海碧云天生物技术公司);0.25 %胰蛋 白酶(上海碧云天生物技术公司);PCR 引物(上海生工生物工程 有限公司);Lipofectamine[™] 3000 (美国 Invitrogen 公司);OP- TI-MEM 培养基(美国 Invitrogen 公司);荧光素酶报告基因检测 试剂盒 E1910 (美国 Promaga 公司);SYBR Premix Ex Taq [™]II (宝生物工程(大连)有限公司);PrimeScript RT reagent Kit 逆转 录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司);总 RNA 提取试剂 Trizol (美国 Invitrogen 公司);RIPA 细胞裂解液(上海碧云天生物 技术有限公司);Anti-TLR4 抗体 (美国 Abcam 公司);Anti-Myd88 抗体(美国 CST 公司);Anti- NF-κB 抗体(美国 CST 公 司);Anti- p-NF-κB 抗体 (美国 CST 公司);Anti- GAPDH 抗体 (美国 CST 公司);低温高速离心机 3K30 型(德国 Sigma 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); 电转仪 (美国 Bio-Rad 公司);多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 转染

1.3.1 **质粒转染** 培养瓶中 293T 细胞密度达 70%左右,使用 0.25%胰酶消化细胞并计数,以 24孔板为例,按 1×10⁵/well 的 细胞密度,将细胞接种到 24孔细胞培养板上,使用含 10%胎 牛血清,不含抗生素培养基培养。对于每孔细胞,取 25 μL OP-TI-MEM 培养基稀释 1 μL Lipofectamine[™] 3000 并充分混匀,取 50 μL OPTI-MEM 培养基稀释 1 μg pmirGLO-TLR4 3'-UTR 质粒或 pmirGLO- mut-TLR4 3'-UTR 质粒及 2 μL P3000[™] 试剂 并充分混匀,在每管已稀释的 Lipofectamine[™] 3000 试剂中,加 入稀释的 DNA (1:1 比例),轻轻混匀后于室温孵育 5 min。加入 DNA- 脂质体复合物至细胞中。37℃孵育细胞 2~4 天后分析 转染细胞。

1.3.2 microRNA 转染 培养瓶中 293T 细胞及 RAW264.7 细胞密度达 70 %左右,使用 0.25 %胰酶消化细胞并计数,以 24 孔板为例,按 1× 10⁵/well 的细胞密度,将细胞接种到 24 孔细胞培养板上,使用含 10 %胎牛血清,不含抗生素培养基培养。对于每孔细胞,取 25 μL OPTI-MEM 培养基稀释 1 μL Lipofectamine[™] 3000 并充分混匀,取 25 μL OPTI-MEM 培养基稀释 1 μg mmu-miR-203-3p mimics 或者 mimic NC 并充分混匀,在每

管已稀释的 Lipofectamine[™] 3000 试剂中,加入稀释的 mmu-miR-203-3p mimics 或者 mimic NC (1:1 比例),轻轻混匀 后于室温孵育 5 min。加入 RNA- 脂质体复合物至细胞中。37 ℃孵育细胞 2~4 天后分析转染细胞。

1.4 双荧光素酶报告基因系统

检测荧光素酶活性时,在室温,避光的条件下进行,将细胞 接种至 96 孔板后,转染 2~3 天,弃去旧的细胞培养液,用 100 μ L PBS 洗 1 遍,用去离子水将试剂盒中的 5× PLB 稀释成 1× PLB,使用前放到常温,每孔加 50 μ L 稀释好的 1× PLB,摇床 常温条件下摇 15 min,进行裂解。在白色不透光的 96 孔酶标板 中每孔加裂解完成的细胞上清液 10 μ L,加入 100 μ L 预先混 好的 LAR II,2 s 后测数据,每孔添加 100 μ L 预先混好的 Stop&Glo Reagent,静止 2 s 后,再次测数据。根据测得的萤火 虫荧光素酶活性值 F(Firely Luciferase)及海肾荧光素酶活性值 R(Renilla Luciferase),计算得出相对荧光素酶活性Δ CT=F/R。

1.5 Real-time PCR

Trizol 法提取细胞总 RNA, 用紫外分光光度计测定 OD260/280为1.8~2.0,证实其纯度符合反应要求。以总 RNA 为模板,以 Oligo d(T)18为引物逆转录合成第一链 cDNA,用特 异性引物扩增 M1 型巨噬细胞 markers (iNOS, TNF-α, CCL-3, IL-23),M2 型巨噬细胞 markers (Arg-1, CX3CR1, IL-4, MRC, IL-10, Ym-1)。引物序列见表 2。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 45 s,55 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 30 s, 共循环 30次,最后 72 ℃延伸 5 min。使用 2^{+4 CT}法分析最终数据。

Table 2 Sequences of primers				
Sequence name	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')		
iNOS	GGAATCTTGGAGCGAGTTGT	GCAGCCTCTTGTCTTTGACC		
TNFα	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG		
IL-23	CAGCAGCTCTCTCGGAATCT	TGGATACGGGGGCACATTATT		
CCL-3	GCCCTTGCTGTTCTTCTCTG	GATGAATTGGCGTGGAATCT		
Arg-1	GCAGAGGTCCAGAAGAATGG	AGCATCCACCCAAATGACAC		
CX3CR1	TCCCTTCCCATCTGCTCAG	ACAATGTCGCCCAAATAACAGG		
IL-4	TCTGTAGGGCTTCCAAGGTG	ATCGAAAAGCCCCGAAAGAGT		
IL-10	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	TCCTGAGGGTCTTCAGCTTC		
Yml	TTCTTGTCACAGGTCTGG	CCTTAGCCCAACTGGTATAGT		
MRC	GGAGGCTGATTACGAGCAGT	CATAGGAAACGGGAGAACCA		
TLR4	CCTGATGACATTCCTTCT	AGCCACCAGATTCTCTAA		
Myd88	GCCAGAGTGGAAAGCAGTGT	TATCGTTGGGGCAGTAGCAG		
NF-ĸB	TAACAGCAGGACCCAAGGAC	AGCCCCTAATACACGCCTCT		
GAPDH	ATCATCCCTGCATCCACT	ATCCACGACGGACACATT		

表 2 引物序列

1.6 Western blot

用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次后加入细胞裂解液,提取细胞 蛋白,BCA 法测定并调整蛋白浓度,进行电泳及转膜,50 g/L 脱 脂奶粉封闭 2 h 后 TBST 洗膜 3 次(10 min/次),并按照说明书 要求滴加一抗、二抗,进行化学发光反应,对所显影的蛋白条带 用 ImageJ 检测其灰度值,与内参进行校对及统计学分析。

1.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 6 进行统计学分析,均值采用均数±标准差(Mean± SD)表示。两个样本的比较采用独立样本 t 检验,*P<0.05 具有统计学意义上的差异;#P>0.05 不具有统计学

意义上的差异。

2 结果

2.1 双荧光素酶报告基因系统

人肾上皮细胞 293T 共转染质粒 pmirGLO-TLR4 3'-UTR 或 pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR 及 mmu-miR-203-3p mimics 或 mimic NC 后,在多功能酶标仪上检测萤火虫与海肾荧光素酶 活性,并计算二者相对荧光素酶活性△ CT,结果显示,293T 细 胞共转染 pmirGLO-TLR4 3'-UTR 质粒及 mmu-miR-203-3p mimics 后,其相对荧光素酶活性△ CT 为 1.806± 0.1550,而共 转染了 pmirGLO-TLR4 3'-UTR 质粒及 mimic NC、pmirGLOmut-TLR4 3'-UTR 质粒及 mmu-miR-203-3p mimics、pmirGLOmut-TLR4 3'-UTR 质粒及 mimic NC 的相对荧光素酶活性△ CT 分别为 2.996± 0.2287、2.751± 0.1820、2.554± 0.1987,可见与 其他组相比,293T 细胞共转染了 pmirGLO-TLR4 3'-UTR 质粒 及 mmu-miR-203-3p mimics 后其相对荧光素酶活性△ CT 显著 降低,其差异达到统计学意义(P<0.05,见表 3)。

表 3 双荧光素酶报告基因系统

Table 3 Dual-luciferase reporter assay system					
Group	Ν	\triangle CT(Mean± SD)	P value		
pmirGLO-TLR4 3'-UTR+miR-203-3p mimics	6	1.806 ± 0.1550			
pmirGLO-TLR4 3'-UTR+mimic NC	6	2.996 ± 0.2287	0.0015*		
pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR+miR-203-3p mimics	6	2.751 ± 0.1820			
pmirGLO-mut-TLR4 3'-UTR+mimic NC	6	2.554 ± 0.1987	0.4816#		

2.2 mmu-miR-203-3p 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 向 M2 型 巨噬细胞极化

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 转染 mmu-miR-203-3p mimics、 mimic NC 后, Real-time PCR 检测发现转染 mmu-miR-203-3p mimics 与转染 mimic NC 及对照组相比,小鼠巨噬细胞 RAW264.7 M1型巨噬细胞 markers iNOS, TNF-α, CCL-3, IL-23 表达明显下降, M2型巨噬细胞 markers Arg-1, CX3CR1, IL-4, IL-10,Ym1,MRC 表达明显升高,其差异具有统计学意义(P<0. 05)。而转染了 mimic NC 的小鼠巨噬细胞与对照组相比,M1、 M2 型巨噬细胞 markers 表达未见明显差异(P>0.05),提示 mmu-miR-203-3p mimics 可以诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 向 M2 型巨噬细胞极化,抑制其向 M1 型巨噬细胞极化(见图 1, 图 2)。





2.3 mmu-miR-203-3p 抑制小鼠巨噬细胞 RAW264.7TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路的表达

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 转染 mmu-miR-203-3p mimics 及 mimic NC 后, Real-time PCR 及 Western blot 检测其 TLR4, Myd88, NF- κ B mRNA 及 TLR4, Myd88, NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋 白质的表达,发现与转染了 mimic NC 及对照组相比,转染了 mmu-miR-203-3p mimics 的小鼠巨噬细胞中 TLR4, Myd88, NF- κ B mRNA 及 TLR4, Myd88, NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白质的 表达显著降低,其差异具有统计学意义 (P<0.05),而转染了 mimic NC 的小鼠巨噬细胞与对照组相比,其 TLR4, Myd88, NF- κ B mRNA 及 TLR4, Myd88, NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白质的 表达未见明显差异(P>0.05),提示 mmu-miR-203-3p mimics 抑 制巨噬细胞 TLR4-Myd88-NF- κ B 信号通路的表达(见图3)。

2.4 TAK-242 抑制 mmu-miR-203-3p mimics 介导的 TLR4-

Myd88-NF-κB 信号通路下调及 M2 型巨噬细胞极化

分别用 mmu-miR-203-3p mimics、TAK-242 及 mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 处理小鼠巨噬细胞RAW264.7, Real-time PCR 及 Western blot 检测 TLR4, Myd88, NF-κB mRNA 及 TLR4, Myd88, NF-κB和 p-NF-κB蛋白质的表达,发现与对 照组相比,转染了 mmu-miR-203-3p mimics 及使用 TAK-242 处理的小鼠巨噬细胞中 TLR4, Myd88, NF-κB mRNA 及 TLR4, Myd88, NF-κB和 p-NF-κB蛋白质的表达均显著降低 (P<0.05),同时伴有 M1型巨噬细胞 markers iNOS, TNF- α , CCL-3, IL-23表达下调, M2型巨噬细胞 markers Arg-1, CX3CR1, IL-4, IL-10, Ym1, MRC表达上调, 其差异具有统计学 意义 (P<0.05), 而将转染 mmu-miR-203-3p mimics 与 mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 处理的小鼠巨噬细胞相比, 其 TLR4, Myd88, NF-κB mRNA 及 TLR4, Myd88, NF-κB和 p-NF-κB 蛋白质的表达未见明显差异(P>0.05),且两组之间 M1、M2 型巨噬细胞 markers 的表达亦未见明显差异(P>0.05), 提示 TAK-242 抑制了 mmu-miR-203-3p mimics 所介导的 TLR4-Myd88-NF-кВ 信号通路下调及 M2 型巨噬细胞极化(见 图 4、图 5、图 6)。



图 2 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 转染 mmu-miR-203-3p mimics 及 mimic NC 后 M2 型巨噬细胞 markers 的相对表达(对照组的平均值设为 1) Fig.2 The relative mRNA expressions of M2 markers in RAW264.7 cells transfected with mmu-miR-203-3p mimics or mimic NC (The value of control was set at 1)



图 3 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 转染 mmu-miR-203-3p mimics 及 mimic NC 后 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路的表达(A: TLR4, Myd88, NF-κB, p-NF-κB 蛋白质的相对表达;B: TLR4, Myd88, NF-κB mRNA 的相对表达, 对照组的平均值设为 1)

Fig. 3 The relative expression of TLR4-Myd88-NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 cells transfected with mmu-miR-203-3p mimics or mimic NC (A: the relative expressions of TLR4, Myd88, NF- κ B, p-NF- κ B protein; B: the relative expressions of TLR4, Myd88, NF- κ B mRNA, the value of control was



图 4 mmu-miR-203-3p mimics、TAK-242 及 mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路 的表达(A: TLR4, Myd88, NF-κB, p-NF-κB 蛋白质的相对表达; B: TLR4, Myd88, NF-κB mRNA 的相对表达, 对照组的平均值设为 1) Fig. 4 The relative expression of TLR4-Myd88-NF-κB signaling pathway in RAW264.7 cells treated with mmu-miR-203-3p mimics, TAK-242 or mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 (A: the relative expressions of TLR4, Myd88, NF-κB, p-NF-κB protein; B: the relative expressions of TLR4, Myd88, NF-κB mRNA, the value of control was set at 1)



图 5 mmu-miR-203-3p mimics、TAK-242 及 mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后 M1 型巨噬细胞 markers 的相对 表达(对照组的平均值设为 1)

Fig. 5 The relative mRNA expressions of M1 markers in RAW264.7 cells treated with mmu-miR-203-3p mimics, TAK-242 or mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 (The value of control was set at 1)

3 讨论

巨噬细胞表型改变在肾纤维化的形成和发展中发挥了重要作用,调节巨噬细胞极化可能是改变肾纤维化进程的重要途径。研究表明,根据巨噬细胞的差异表达模式可以将巨噬细胞 大致分为两类:经典激活的 M1 型巨噬细胞和替代性活化 M2 型巨噬细胞。M1 型巨噬细胞的特征是高表达促炎细胞因子、增加活性氧和活性氮水平。而 M2 型巨噬细胞具有抵抗炎症反应,促进组织重构和维持稳态的能力^[4,13]。M1 型巨噬细胞能够 分泌 TNF-α、IL-1β、CCL2 等多种促炎细胞因子加剧炎症反应 从而促进肾脏纤维化的发生;而 M2 型巨噬细胞能够分泌 IL-10 等细胞因子抑制炎症反应从而减轻组织纤维化^[14,15]。

巨噬细胞的极化受 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路的调控。 在巨噬细胞表面鉴定了六种 TLRs,包括 TLR1,TLR2,TLR4, TLR5,TLR6 和 TLR10。每个 TLRs 由配体结合区域,跨膜区和 TIR 结构域组成^[16]。与配体结合后,TLRs 形成二聚体,TIR 结构 域相互靠近并与 MyD88 相互作用^[17]。MyD88 通过与 IL-1R 相 关激酶(IRAK)家族成员结合导致 IRAK 的磷酸化,磷酸化的 IRAK 将肿瘤坏死因子受体相关因子 -6(TRAF6)吸引到细胞 膜上^[18,19]。而 TRAF6 则会吸引 TAK 复合体,导致TAK1 IκB 激



图 6 mmu-miR-203-3p mimics、TAK-242 及 mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后 M2 型巨噬细胞 markers 的相对 表达(对照组的平均值设为 1)

Fig. 6 The relative mRNA expressions of M2 markers in RAW264.7 cells treated with mmu-miR-203-3p mimics, TAK-242 or mmu-miR-203-3p mimics+TAK-242 (The value of control was set at 1)

酶(IKK)复合物激活^[20],IKK 可以磷酸化抑制性 IκB 亚基,其与 非活性巨噬细胞胞质中的 NF-κB 转录因子的活化相关。IκB 的 磷酸化导致其在蛋白酶体中的降解。因此,游离的 NF-кB 被运 送到细胞核,在细胞核内激活炎症,免疫反应和细胞生长相关 基因的转录^[21]。由 NF-κB 依赖性途径产生的促炎细胞因子可以 反复激活 NF-кB,并形成正反馈调节,快速增强组织中的炎症 反应。另外,NF-кB可以激活 IкB 基因,这种机制限制了 NF-кB 过度转运进入细胞核并表现出负反馈,从而防止了过度炎症反 应的发生。在大多数情况下,TLRs/NF-кB 信号通路将巨噬细胞 转化为 M1 表型,以响应微生物侵袭。Braga 等人研究发现 TLR4 通过 Myd88 信号通路促进 M1 型巨噬细胞极化,从而加 重纤维化程度^[22]。而 Tian 等人也发现 TLR4 配体 HMGB1 能够 通过诱导巨噬细胞向 M1 表型转化,加重小鼠单侧输尿管结扎 后肾小管间质纤维化的形成^[12]。TLR4的表达受 miRNA 调控。 Taganov 首先报道 miR-146a 可以通过靶向抑制 TLR4 下游衔 接分子 IRAK1 和 TRAF6 的表达,进而抑制 TLR4 信号通路, 调控自身免疫反应^[23]。Wendlandt 等人研究发现 miR-200b 和 miR-200c 能够下调 TLR4 信号通路中关键接头分子 MyD88 的 表达,同时能够抑制 NF-κB 及其下游信号分子 IL-6, CXCL9, TNF-α 的激活^[24]。Zhou 等人发现在胰腺癌中树突状细胞的 TLR4 信号通路受到肿瘤来源的外泌体中 miR-203 的调控,同 时伴随着细胞因子如 TNF-α, IL-12 表达的下降。而 TNF-α 是 树突状细胞成熟所必需的,成熟的树突状细胞可以增强抗原呈 递的能力,IL-12则有利于Th1细胞分化,增强细胞免疫。可见 miR-203 与巨噬细胞的分化及免疫反应密切相关[25]。

本研究通过 miRanda 软件预测在 TLR4 mRNA 3'-UTR 的 第 1109-1117 个碱基位置可能存在与 miR-203 完全或不完全 互补配对的结合位点,并利用双荧光素酶报告基因系统验证 miR-203 可以与 TLR4 mRNA 3'-UTR 特异性结合,进一步将小 鼠巨噬细胞 RAW264.7 转染 mmu-miR-203-3p mimics 及 mimic NC,发现 miR-203 可以诱导 M2 型巨噬细胞极化,同时抑制 TLR4-Myd88-NF-кB 信号通路的表达。而当使用 TLR4 抑制剂 TAK-242 抑制小鼠巨噬细胞 RAW264.7 TLR4-Myd88-NF-кB 信号通路后,miR-203 下调 TLR4-Myd88-NF-кB 信号通路,诱 导 M2 巨噬细胞极化的作用被抑制,提示 miR-203 通过下调 TLR4-Myd88-NF-кB 信号通路诱导 M2 型巨噬细胞极化。

综上所述,本研究验证 miR-203 可以与 TLR4 mRNA 的 3'-UTR 特异性结合,下调 TLR4-Myd88-NF-κB 信号通路的表 达,诱导 M2 型巨噬细胞极化,这一信号通路的发现为我们进 一步探索 miRNA 在 TLR4 及其相关信号通路表达失调所致的 疾病中所起的作用及利用 miRNA 治疗肾纤维化及其相关的炎 症反应提供了新的思路。

参考文献(References)

- Liu Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics[J]. Kidney Int, 2006, 69(2): 213-217
- [2] Bolisetty S, Zarjou A, Hull TD, et al. Macrophage and epithelial cell H-ferritin expression regulates renal inflammation [J]. Kid ney Int, 2015, 88(1): 95-108

- [3] Lee S, Huen S, Nishio H, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(2): 317-326
- [4] Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling [J]. J Pathol, 2013, 229(2): 176-185
- [5] Gomez IG, Nakagawa N, Duffield JS. MicroRNAs as novel therapeutic targets to treat kidney injury and fibrosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 310(10): F931-944
- [6] Wu XQ, Dai Y, Yang Y, et al. Emerging role of microRNAs in regulating macrophage activation and polarization in immune response and inflammation[J]. Immunology, 2016, 148(3): 237-248
- [7] Song Y, Zhan L, Yu M, et al. TRPV4 channel inhibits TGF-β1-induced proliferation of hepatic stellate cells [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101179
- [8] Hu D, Hu Y, Xu W, et al. miR-203 inhibits the expression of collagenrelated genes and the proliferation of hepatic stellate cells through a SMAD3-dependent mechanism [J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (2): 1248-1254
- [9] Luo W, Wu H, Ye Y, et al. The transient expression of miR-203 and its inhibiting effects on skeletal muscle cell proliferation and differentiation[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1347
- [10] Nissan X, Denis JA, Saidani M, et al. miR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification[J]. Dev Biol, 2011, 356(2): 506-515
- [11] He Q, Wang CM, Qin JY, et al. Effect of miR-203 expression on myocardial fibrosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21 (4): 837-842
- [12] Tian S, Zhang L, Tang J, et al. HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(1): F69-75
- [13] Wang Y, Chang J, Yao B, et al. Proximal tubule-derived colony stimulating factor-1 mediates polarization of renal macrophages and dendritic cells, and recovery in acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2015, 88(6): 1274-1282

- [14] Cao Q, Wang Y, Harris DC. Macrophage heterogeneity, phenotypes, and roles in renal fibrosis[J]. Kidney Int Suppl, 2014, 4(1): 16-19
- [15] Zhang MZ, Wang X, Wang Y, et al. IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2017, 91 (2): 375-386
- [16] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335-376
- [17] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7 (5): 353-364
- [18] Motshwene PG, Moncrieffe MC, Grossmann JG, et al. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4[J]. J Biol Chem, 2009, 284(37): 25404-25411
- [19] Ye H, Arron JR, Lamothe B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling[J]. Nature, 2002, 418(6896): 443-447
- [20] Woronicz JD, Gao X, Cao Z, et al. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK[J]. Science, 1997, 278(5339): 866-869
- [21] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-κB signaling [J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42: 443-468
- [22] Braga TT, Correa-Costa M, Guise YF, et al. MyD88 signaling pathway is involved in renal fibrosis by favoring a TH2 immune response and activating alternative M2 macrophages [J]. Mol Med, 2012, 18: 1231-1239
- [23] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12481-12486
- [24] Wendlandt EB, Graff JW, Gioannini TL, et al. The role of microRNAs miR-200b and miR-200c in TLR4 signaling and NF-κB activation[J]. Innate Immun, 2012, 18(6): 846-855
- [25] Zhou M, Chen J, Zhou L, et al. Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203 [J]. Cell Immunol, 2014, 292(1-2): 65-69