

miR-125b-5p 修饰脐带间充质干细胞介导 JAK2/STAT3 信号通路对系统性红斑狼疮的免疫调节作用

武志慧¹, 丁丽丽¹, 胡明智¹, 王永福², 王慧², 张伟¹, 孙晓林¹

摘要 目的 研究 miR-125b-5p 修饰脐带间充质干细胞 (UC-MSCs) 介导 JAK2/STAT3 信号通路对系统性红斑狼疮 (SLE) 的免疫调节作用。方法 UC-MSCs 的分离、培养及鉴定;密度梯度离心法分离 SLE 患者外周血单个核细胞 (PBMCs), 实时荧光定量 PCR 检测与各组 UC-MSCs 共培养 48 h 后的 PBMCs 中干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 17A (IL-17 A)、叉头状转录因子 3 (Foxp 3) 基因的相对表达量; Western blot 检测治疗后 MRL/lpr 小鼠肾组织中 Janus 激酶 2 (JAK2)、磷酸化 Janus 激酶 2 (p-JAK2)、信号转导与转录激活因子 3 (STAT3)、磷酸化信号转导与转录激活因子 3 (p-STAT3)、白细胞介素 18 (IL-18) 蛋白的相对表达量。结果 与 PBMCs 组相比, UC-MSCs + miR-125b-5p 组、UC-MSCs + miR-NC 组、UC-MSCs 组的 IFN- γ 、IL-17 A 的表达和辅助性 T 细胞 17 (Th 17)/调节性 T 细胞 (Treg) 的细胞比例显著下调 ($P < 0.01$), UC-MSCs + miR-125b-5p 组、UC-MSCs + miR-NC 组的辅助性 T 细胞 1 (Th 1)/辅助性 T 细胞 2 (Th 2) 细胞比例下调 ($P < 0.05$); 与 MRL/lpr 小鼠未处理组相比, UC-MSCs + miR-125b-5p 组治疗后的 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3 (s 705)/STAT3、IL-18 的表达水平显著下调 ($P < 0.01$); UC-MSCs + miR-NC 组、UC-MSCs 组治疗后的 MRL/lpr 小鼠肾组织中 IL-18 的表达水平显著下调 ($P < 0.01$)。结论 miR-125b-5p 基因修饰 UC-MSCs 后, 对调节 SLE 患者 PBMCs 中 Th2 细胞亚群分化以及 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-JAK 2/JAK 2、p-STAT 3 (s 705)/STAT 3、IL-18 的表达起到了协同作用。miR-125b-5p 基因修饰的 UC-MSCs 可能通过介导 JAK2/STAT3 通路对 SLE 起到免疫调节作用。

关键词 基因修饰; 脐带间充质干细胞; 系统性红斑狼疮; JAK2/STAT3 信号通路

中图分类号 R 392; R 443 + .8; R 593.2

2022-09-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81860294, 81860295); 内蒙古自治区自然科学基金 (编号: 2019MS08055, 2021MS08045); 内蒙古自治区科技计划项目 (编号: 201802089, 2019GG052)

作者单位: 包头医学院第一附属医院¹ 中心实验室 (内蒙古自治区自体免疫学重点实验室)、² 风湿免疫科, 包头 014010

作者简介: 武志慧, 女, 硕士研究生;
孙晓林, 女, 博士, 主管检验师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yolo_1010@126.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)01-0028-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.006

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种以多系统受累及多种自身抗体阳性为主要特点的慢性自身免疫性疾病^[1], SLE 的具体发病机制仍不明确^[2], 大多传统疗法只能控制病情, 且存在感染、恶性肿瘤等副作用, 临床上急需新的治疗手段^[3]。脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs) 是一种具有多向分化潜能强大的组织修复和免疫调节功能的单胚层多能干细胞^[4], 在体内外均能调节免疫细胞功能^[5], 但移植治疗的 UC-MSCs 不适应缺氧、凋亡因子等恶劣的宿主微环境, 导致 UC-MSCs 在宿主体内的存活率及迁移效率极低, 因此其修复组织和调节免疫的功能显著下降^[6]。

微 RNA (microRNA, miRNA) 是一种长度约 22 个核苷酸的非编码 RNA, 在多种细胞功能中发挥关键作用^[7]。MRL-MpJFasIpr (MRL/lpr) 小鼠的 Fas 基因发生突变, 出现 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞凋亡缺陷, 导致全身淋巴结肿大、侵袭性关节炎、肾小球肾炎、血管炎、高 γ 球蛋白血症和抗 dsDNA 抗体的产生, 与人类 SLE 有相似的症状表现, 是常见的 SLE 动物模型之一^[8]。miR-125 在 SLE 患者中表达降低^[9], 且 miR-125b 与狼疮肾炎 (lupus nephritis, LN) 呈负相关^[10], 提示 miRNA 可影响 UC-MSCs 的治疗效果。Janus 激酶/信号转导与转录激活因子 (Janus activated kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 信号通路参与免疫细胞的激活和分化^[11], 其在 SLE 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中表达, 并参与转录调控、免疫应答等多个方面^[12], MSCs 可能通过介导 JAK/STAT 信号通路对 SLE 起到一定的治疗作用^[13]。鉴于 miRNA 在 SLE 及 UC-MSCs 中的重要作用, 该研究探讨 miR-125b-5p 修饰 UC-MSCs 在 SLE 中的具体作用机制及免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本及细胞 脐带取自内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院妇产科健康足月胎儿。本研究得到了本院医学伦理委员会的批准及患者的知情同意。

1.1.2 血液样本 本研究在2019—2020年间,于内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院收集7例处于疾病活动期的SLE女性患者外周血液样本,年龄在30~65(37.4 ± 14.1)岁,所有患者均符合1997年美国风湿病学SLE分类标准^[14],且处于疾病活动期,系统性红斑狼疮疾病活动性指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)评分 ≥ 8 分^[15]。

1.1.3 动物来源 16~18周龄雄性MRL/lpr小鼠,体质量20g,共20只,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,MRL/lpr小鼠符合动物实验伦理要求,饲养于包头医学院第一附属医院中心实验室动物房内,设施符合实验动物环境及设备标准的要求。自由觅食,每周更换垫料。实验分5组,每组4只MRL/lpr小鼠,分为miR-125b-5p转染UC-MSCs治疗组(UC-MSCs + miR-125b-5p组),miRNA阴性对照转染UC-MSCs治疗组(UC-MSCs + miR-NC组),UC-MSCs治疗组(UC-MSCs组),PBS对照组以及未处理MRL/lpr小鼠组(Control组)。

1.1.4 实验材料 DMEM/F12(1:1)培养基、OPTI培养基、胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;人外周血淋巴细胞分离液购自灏洋生物制品科技有限公司;TRIzol、RIPA裂解液、增强的化学发光(ECL)显影剂购自美国Thermo Fisher Scientific公司,ReverTra Ace qPCR RT Kit试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix试剂盒购自日本东洋纺公司;兔抗小鼠IL-18、p-JAK、JAK单克隆抗体以及辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗购自美国Abcam公司;p-STAT(s 705、s 727)、STAT单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 UC-MSCs的分离及培养 在无菌条件下,用含双抗的PBS反复洗涤人脐带组织至无残血,剔

除脐动静脉,留下华通胶样组织,取0.5 cm × 0.5 cm大小的组织块,在含有300~500 ml的10%(体积分数)胎牛血清的培养皿中剪碎至1~2 mm³大小,倒置于37℃、饱和湿度、5%(体积分数)CO₂培养箱中培养4 h,加入3~4 ml DMEM/F12(1:1)培养基。每3~4 d换液1次,待细胞90%融合时,清除脐带组织,用胰酶消化及完全培养基终止消化,将皿内全部液体移至15 ml离心管内,1 200 r/min离心5 min,按1:2进行传代培养,第2代UC-MSCs用于后续实验。

1.2.2 UC-MSCs表面标志物及诱导分化潜能检测

取第2代UC-MSCs,分别加入鼠抗人CD 11c、CD 34、CD 44、CD 45、CD 90、CD 105单克隆抗体,流式细胞仪检测其表面标志蛋白的表达。取60%~70%融合的第2代UC-MSCs,更换诱导分化培养液,每3~4 d换液1次,培养21 d后用茜素红、油红O染色,显微镜下观察UC-MSCs向成脂细胞和成骨细胞的诱导分化能力^[16]。

1.2.3 miR-125b mimics/inhibitor转染UC-MSCs

将第2代UC-MSCs细胞以 $(0.5 \sim 2) \times 10^5$ 个/孔的密度接种于24孔板,置于37℃含5% CO₂细胞培养箱中培养24 h。待细胞生长到80%融合时进行转染。转染时弃去旧培养基,用PBS润洗2遍,每孔加入1.5 ml OPTI培养基。在50 μl OPTI培养基中加入3 μl RNAiMAX,另在50 μl OPTI培养基中加入1 μl miRNA(miR-125b-5p或miR-NC储存液)。将稀释后的RNAiMAX和miRNA等体积混合形成转染复合液,室温孵育5 min,以100 μl/孔加入转染复合液。于37℃含5%(体积分数)CO₂细胞培养箱中培养。

1.2.4 UC-MSCs与SLE患者PBMCs共培养

采取密度梯度离心法分离SLE患者PBMCs:将2 ml全血移入15 ml离心管中,加入等体积的PBS稀释混匀,在其上层缓慢加入淋巴细胞分离液,2 000 r/min离心20 min,提取中间薄层乳白色细胞悬液加入到含有5 ml PBS的离心管中,1 500 r/min离心7 min,弃上清液,再加PBS混匀,1 500 r/min离心4 min,弃上清液。取第2代UC-MSCs,以 2×10^5 /孔的密度接种于24孔板,转染完成后,加入密度为 1×10^6 /孔的PBMCs,进行直接共培养48 h。实验分4组,分别为:miR-125b-5p转染UC-MSCs与PBMCs共培养组(UC-MSCs + miR-125b-5p + PBMCs组),

miRNA 阴性对照转染 UC-MSCs 与 PBMCs 共培养组 (UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组), UC-MSCs 与 PBMCs 共培养组 (UC-MSCs + PBMCs 组) 以及未处理的 SLE 患者 PBMCs 组 (PBMCs 组)。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测相关基因的表达 用 TRIzol 试剂获取细胞总 RNA, 使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 检测各组 SLE 患者 PBMCs 中干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 17A (IL-17A)、叉头状转录因子 3 (Foxp3) 的表达, 使用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 用特异引物和 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒, 在定量 PCR 反应扩增仪进行定量检测, 最后结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析。IFN- γ 、IL-4、IL-17A、Foxp3 的引物序列, 见表 1。

表 1 miR-125b-5p、IL-4、IL-17A、IFN- γ 、Foxp3 基因引物序列

引物名称	碱基序列(5'-3')
IFN- γ	上游: TGACTTGAATGTCCAACGCAAAGC 下游: CGACCTCGAAACAGCATCTGACTC
IL-4	上游: ACAGCAGTTCACAGGCACAAG 下游: CGTACTCTGGTTGGCTTCCTTCAC
IL-17A	上游: CGGACTGTGATGCTCAACCTGAAC 下游: GGTCTCATTCGCGTGGAGATTTC
FoxP3	上游: GCTGTGCTGGAGAAGGAGAAG 下游: CGGATGATGCCACAGATGAAGC

1.2.6 Western blot 测 MRL/lpr 小鼠肾组织相关蛋白的表达 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中取出 MRL/lpr 小鼠肾组织, 称量约 $0.6\sim 0.8\text{ g}$ 肾组织置于含有液氮的研钵中, 充分研磨后, 转移至含有组织裂解液的 EP 管内, 完全裂解后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心机 $10\ 220\text{ r/min}$ 离心 5 min , 上清液为提取的蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 每份样本取 $50\ \mu\text{g}$ 蛋白, 加适量 5 loading buffer 于 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内变性 10 min , 经 SDS-PAGE (10%) 凝胶电泳, 湿转法转膜, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉或 5% BSA (TBST 配) 室温封闭 1 h 后加入一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 翌日, TBST 洗膜 3 次后加

入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 ($1:10\ 000$ 稀释), 于摇床上室温孵育 2 h , TBST 洗膜 3 次, 配置 ECL 显影液, 将 PVDF 膜放入 X 线片暗盒内显影, 通过 Image J 软件分析条带灰度值, 计算蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各組间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较用 LSD- t 法, 方差齐时采用 LSD- t 检验, 方差不齐时采用 Tamhane 检验。非正态分布的数据用中位数 (最小值, 最大值) 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 单因素方差分析 (当 $P < 0.05$ 时, 采用 bonferroni 方法进行校正)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 miR-125b-5p 修饰 UC-MSCs 对 SLE 患者 T 淋巴细胞亚群分化的影响 各组 PBMCs 中 IFN- γ 的表达, 见表 2, 图 1 A。UC-MSCs + miR-125b-5p + PBMCs 组、UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组、UC-MSCs + PBMCs 组与 PBMCs 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。各组 PBMCs 中 IL-4 的表达, 见表 2, 图 1 B, 结果表明 UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组可能受 miR-NC 的调节作用, 对 SLE 患者 PBMCs 中 IL-4 表达具有下调趋势。而 miR-125b-5p 转染的 UC-MSCs 对 IL-4 基因水平具有上调趋势, 但差异无统计学意义, miR-125b-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th2 的表达无调节作用。

各组 PBMCs 中 Th1/Th2 细胞比例, 见表 2, 图 1 C。UC-MSCs + miR-125b-5p + PBMCs 组、UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组与 PBMCs 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Th1/Th2 细胞比例降低。

各组 PBMCs 中 IL-17A 的表达, 见表 3、图 2 A。UC-MSCs + miR-125b-5p + PBMCs 组、UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组、UC-MSCs + PBMCs 组与 PBMCs 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

各组 PBMCs 中 Foxp3 的表达, 见表 3、图 2 B。

表 2 各组 PBMCs 中 IFN- γ 、IL-4 基因的相对表达量及 Th1/Th2 细胞比例的变化 [$\bar{x} \pm s$, 中位数 (最小值, 最大值), $n = 7$]

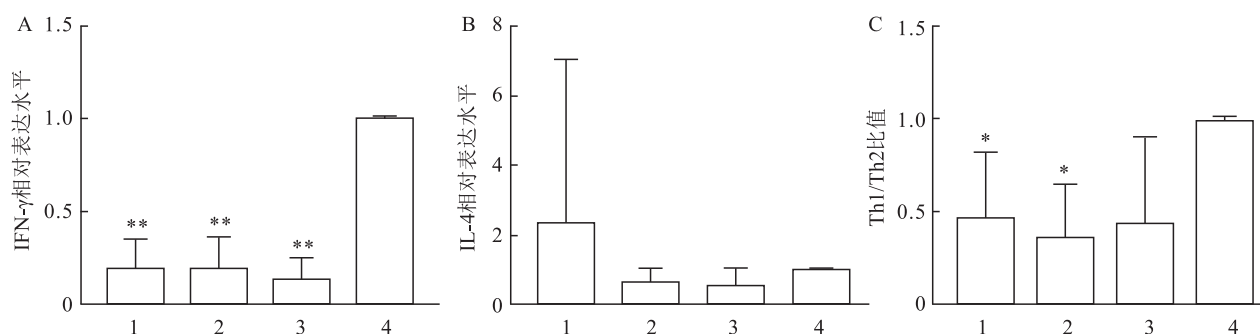
指标	UC-MSCs + miR-125b-5p 组	UC-MSCs + miR-NC 组	UC-MSCs 组	PBMCs 组	F 值	P 值
Th1 (%)	$0.191 \pm 0.160^{**}$	$0.193 \pm 0.170^{**}$	$0.134 \pm 0.115^{**}$	1.005 ± 0.008	72.405	0.000
Th2 (%)	0.521 (0.11, 12.99)	0.495 (0.23, 1.02)	0.301 (0.12, 1.59)	1.011 (1.0, 1.04)		0.068
Th1/Th2	$0.467 \pm 0.351^*$	$0.361 \pm 0.291^*$	0.437 ± 0.467	0.991 ± 0.021	5.447	0.005

与 PBMCs 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表3 各组 PBMCs 中 IL-17A、Foxp3 基因的相对表达量及 Th17/ Treg 细胞比例的变化($\bar{x} \pm s, n=7$)

指标	UC-MSCs + miR-125b-5p 组	UC-MSCs + miR-NC 组	UC-MSCs 组	PBMCs 组	F 值	P 值
Th17 (%)	0.209 ± 0.177 **	0.198 ± 0.160 **	0.180 ± 0.157 **	1.020 ± 0.134	58.158	0.000
Treg (%)	2.697 ± 2.911	1.581 ± 0.949	1.528 ± 1.030	1.023 ± 0.026	1.338	0.285
Th17/Treg	0.179 ± 0.223 **	0.166 ± 0.133 **	0.141 ± 0.134 **	0.997 ± 0.026	56.828	0.000

与 PBMCs 组比较; ** $P < 0.01$

图1 各组 PBMCs 中 IFN- γ 、IL-4 基因的相对表达量及 Th1/Th2 细胞比例的变化

A: IFN- γ 基因的相对表达水平; B: IL-4 基因的相对表达水平; C: Th1/Th2 细胞比值; 1: UC-MSCs + miR-125b-5p + PBMCs 组; 2: UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组; 3: UC-MSCs + PBMCs 组; 4: PBMCs 组; 与 PBMCs 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

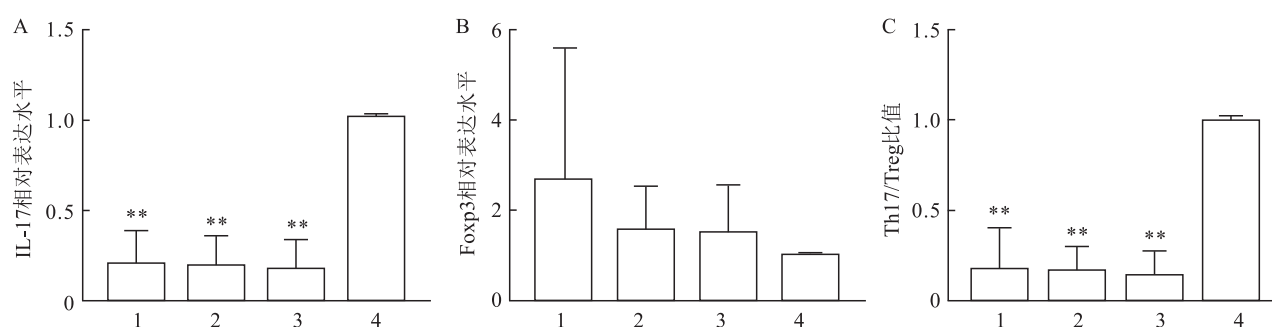


图2 各组 PBMCs 中 IL-17A、Foxp3 基因的相对表达量及 Th17/ Treg 细胞比例的变化

A: IL-17A 基因的相对表达水平; B: Foxp3 基因的相对表达水平; C: Th17/Treg 细胞比值; 1: UC-MSCs + miR-125b-5p + PBMCs 组; 2: UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组; 3: UC-MSCs + PBMCs 组; 4: PBMCs 组; 与 PBMCs 组比较: ** $P < 0.01$

各组分别与 PBMCs 组进行组间比较, 差异无统计学意义, 结果表明 miR-125b-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Treg 细胞的表达无调节作用。

各组 PBMCs 中 Th17/Treg 细胞比例, 见表 3, 图 2C。UC-MSCs + miR-125b-5p + PBMCs 组、UC-MSCs + miR-NC + PBMCs 组、UC-MSCs + PBMCs 组与 PBMCs 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), Th17/Treg 细胞比例降低。

2.2 Western blot 法检测 miR-125b-5p 修饰 UC-MSCs 对 MRL/lpr 小鼠肾组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、IL-18 蛋白表达的影响 各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-JAK2/JAK2 的相对表达水平, 见图 3。结果表明, 过表达 miR-125b-5p 的 UC-

MSCs 可使 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-JAK2/ JAK2 比值降低, 说明 miR-125b-5p 转染 UC-MSCs 能对 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-JAK2/ JAK2 的表达在蛋白水平上起到调节作用。

各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-STAT3 (s705)/ STAT3 的相对表达水平, 见图 4。过表达 miR-125b-5p 的 UC-MSCs 可使 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-STAT3 (s705)/ STAT3 比值降低。

各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-STAT3 (s727)/ STAT3 的相对表达水平, 见图 5。miR-125b-5p 修饰的 UC-MSCs 对 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-STAT3 (s727)/ STAT3 的表达无调节作用。

各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中 IL-18 的相对表达

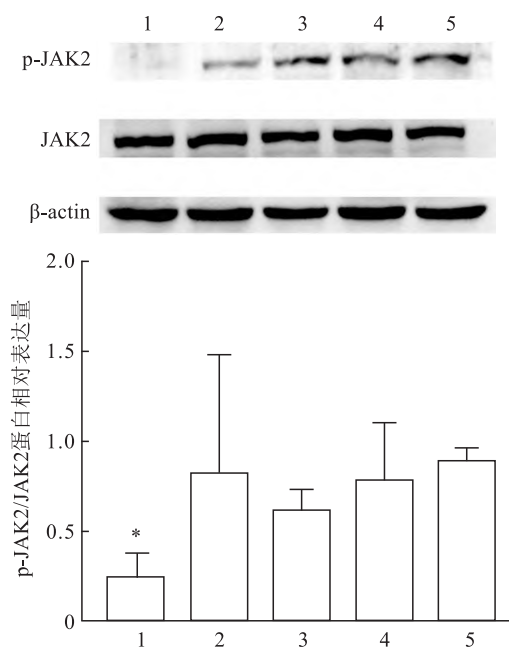


图3 各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-JAK2/ JAK2 蛋白的相对表达量

1: UC-MSCs + miR-125b-5p 组; 2: UC-MSCs + miR-NC 组; 3: UC-MSCs 组; 4: PBS 组; 5: 对照组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

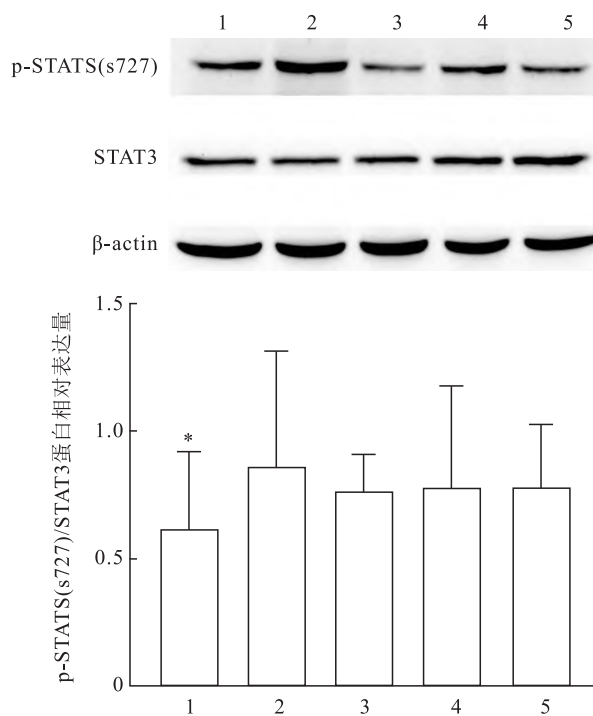


图5 各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中

p-STAT3(s727) / STAT3 蛋白的相对表达量

1: UC-MSCs + miR-125b-5p 组; 2: UC-MSCs + miR-NC 组; 3: UC-MSCs 组; 4: PBS 组; 5: 对照组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

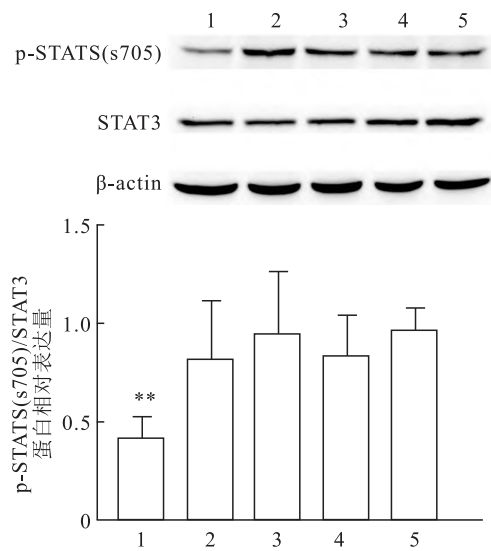


图4 各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-STAT3(s705) / STAT3 蛋白的相对表达量

1: UC-MSCs + miR-125b-5p 组; 2: UC-MSCs + miR-NC 组; 3: UC-MSCs 组; 4: PBS 组; 5: 对照组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

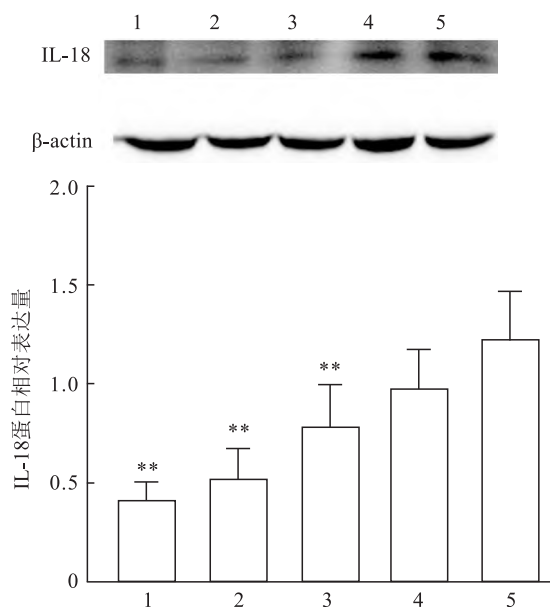


图6 各组 MRL/lpr 小鼠肾组织中 IL-18 蛋白的相对表达量

1: UC-MSCs + miR-125b-5p 组; 2: UC-MSCs + miR-NC 组; 3: UC-MSCs 组; 4: PBS 组; 5: 对照组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

水平,见图6。UC-MSCs + miR-125b-5p 组、UC-MSCs + miR-NC 组、UC-MSCs 组均抑制 MRL/lpr 小鼠肾组织中 IL-18 的表达,能对 MRL/lpr 小鼠肾组织中 IL-18 的表达在蛋白水平上起到调节作用,但 miR-

125b-5p 并未加强 UC-MSCs 对 IL-18 的表达的调节作用。

3 讨论

在动物体内及体外研究中,UC-MSCs 可减轻 MRL/lpr 小鼠肾损害^[17]并能降低外周血 CD4⁺ T 细胞凋亡率^[18],并有多中心临床研究提示 UC-MSCs 移植治疗 SLE 患者具有一定的有效性^[4],但研究^[19]显示 UC-MSCs 输注后,只有极少量的 UC-MSCs 能迁移到靶组织,导致临床治疗效果欠佳。有研究表明,miR-125b 在 SLE 患者外周血 PBMCs 中表达明显下调^[20],且与 LN 呈负相关。本实验通过 miR-125b 基因修饰 UC-MSCs 治疗 SLE,探索 SLE 的具体发病机制及 miR-125b 基因修饰 UC-MSCs 的治疗效果,以期为临床治疗 SLE 提供新思路。

T 淋巴细胞亚群在自身免疫性疾病及炎症性疾病中发挥着重要作用^[21],可分化为 Th1、Th2、Th3、Th9、Th17、Treg、Th22、滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)、细胞毒性 T 细胞(CTL)等^[22],Th1 细胞主要通过产生 IFN- γ 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等诱导巨噬细胞、NK 细胞、B 细胞、CD8⁺ T 细胞活化来促进细胞介导的炎症反应^[23],Th2 细胞释放 IL-4、IL-5 等细胞因子吸引并激活嗜酸性粒细胞和肥大细胞,从而导致炎症因子的触发和释放^[24]。Th17 可产生 IL-17A、IL-6、TGF- β 等具有促炎效应,且与 SLE 的疾病活动度呈正相关^[25],Treg 细胞的分裂功能缺陷在维持免疫稳态和免疫耐受性中起着关键作用^[26],其中 Th1、Th2、Th17、Treg 的细胞稳态以及 Th1/Th2、Th17/Treg 的比例变化在 SLE 的发病机制中起着重要作用^[25, 27]。已有研究^[17]显示,UC-MSCs 移植治疗 MRL/lpr 小鼠可以显著下调 24 h 尿蛋白和抗 dsDNA 抗体的水平,纠正 Th17/Treg 失衡。本研究显示,UC-MSCs 和 miR-125b-5p 转染的 UC-MSCs 均在基因水平上下调了 SLE 患者 PBMCs 中 IFN- γ 、IL-17A 的表达,对 SLE 患者 PBMCs 中 Th1、Th17 的免疫失衡起到调节作用,并在基因水平上改善了 SLE 患者 Th1/Th2、Th17/Treg 的免疫失衡,但 UC-MSCs + miR-NC 组可下调促炎性 Th1 的表达,对抑炎性 Th2 的表达具有下调趋势,而 UC-MSCs + miR-125b-5p 组可显著下调 Th1 的表达、轻度上调 Th2 的表达。二者虽然在基因水平上对 SLE 患者 PBMCs 中 Th1/Th2 的免疫失衡状态起到调节作用,但 UC-MSCs + miR-125b-5p 组的调节作用对于改善机体的免疫失衡更有益。提示 miR-125b-5p

基因修饰 UC-MSCs 后,对 SLE 患者 PBMCs 中 Th2 细胞亚群分化的调节起到了协同作用。

JAK/STAT 信号通路作为许多细胞因子的共用通路,能受不同细胞外因子调控产生特异细胞生物学效应^[28-30],并能影响基因的表达^[31-32]。在类风湿性关节炎(RA)患者 PBMCs 中,多种细胞因子诱导 JAK/STAT 通路发生磷酸化,降低 PBMCs 中 JAK、STAT1、STAT3、STAT4 和 STAT5 的磷酸化水平可对 RA 起到治疗作用^[33]。在 SLE 患者 PBMCs 中 JAK2 的表达水平显著升高,并影响 JAK2 mRNA 及白细胞共同抗原 CD45(PTPRC)mRNA 的表达^[12]。由此可见,在自身免疫性疾病患者 PBMCs 中 JAK/STAT 信号通路发挥着至关重要的作用,本研究发现 UC-MSCs 和 miR-125b-5p 转染的 UC-MSCs 均在基因水平上对 SLE 患者 PBMCs 中 Th1、Th17、Th1/Th2、Th17/Treg 的免疫失衡起到调节作用,而这种调节作用可能是通过 JAK/STAT 信号通路来发挥作用。

MSCs 分泌的细胞因子可通过 JAK/STAT 信号通路对靶细胞产生调节作用^[34-35],同时,细胞因子或细胞表面受体可激活 MSCs 的 JAK/STAT 信号通路,促进 MSCs 释放骨形态发生蛋白,从而促进 MSCs 成骨分化^[36-37],而 JAK/STAT 信号通路在 MSCs 归巢能力及存活能力中也具有相应调节作用^[38-39]。以上研究表明 MSCs 与 JAK/STAT 信号通路之间相互作用。在 SLE 患者中提取的 BM-MSCs 表现出明显的衰老特征,JAK-STAT 信号通路可能在 SLE BM-MSCs 的抗衰老中起关键作用^[40],BM-MSCs 移植治疗可激活 JAK/STAT 信号通路,上调耐受性树突状细胞的数量,减弱抗原呈递能力,对 SLE 起到免疫调节作用^[4],本研究显示 UC-MSCs 对 SLE 患者 PBMCs 中 T 淋巴细胞亚群的免疫调节作用很有可能是通过介导 JAK2/STAT3 信号通路来发挥作用,且 miR-125b-5p 修饰 UC-MSCs 后对 Th2 具有上调趋势,提示 miR-125b-5p 可能协同 UC-MSCs 通过介导 JAK2/STAT3 信号通路调节 SLE 的免疫失衡。在体外实验中,干扰素 γ 激活 UC-MSCs 的 JAK2/STAT 信号通路,选择性抑制 SLE 患者体内细胞毒性 T 细胞增殖,起到免疫调节作用^[41]。由此可见,MSCs 的多种功能都是通过 JAK/STAT 信号通路发挥作用,而 miR-125b 又与 JAK/STAT 信号通路之间存在相互作用,例如,Tian et al^[42] 研究表明 miR-

125b 可通过靶向 STAT3 途径抑制人皮肤鳞状细胞癌的细胞增殖并促进其细胞凋亡, miR-125 可协同 JAK-STAT 信号通路促进星形胶质细胞分化^[43]。本研究采用 Western blot 检测 miR-125b-5p 修饰 UC-MSCs 对 MRL/lpr 小鼠肾组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、IL-18 蛋白表达的影响, 结果显示, miR-125b-5p 修饰 UC-MSCs 可显著下调 MRL/lpr 小鼠肾组织中 p-JAK2/p-STAT3(s705) 的表达水平, 而 UC-MSCs 对 p-JAK2/p-STAT3(s705) 的下调作用不明显, 提示 miR-125b-5p 可加强 UC-MSCs 对 p-JAK2/p-STAT3(s705) 的下调作用, p-STAT3(s705) 极有可能是 miR-125b-5p 的作用位点。

IL-18 是 IL-1 细胞因子家族的成员, 不但参与免疫反应, 而且还在炎症通路中具有关键作用^[44], 例如, 抑制 JAK/STAT 信号通路会大大降低血清中 IL-18 水平, 改善严重炎症和脓毒症的临床不良结局^[45], 抑制 IL-18 表达水平及 JAK2/STAT3 过度激活可改善 SAP 相关的肝损伤^[46], IFN- γ 可激活 STAT-1 磷酸化来抑制 IL-18 诱导的黑色素生成, 调节炎症或紫外线诱导的色素变化^[47]。在小鼠实验中, IL-18 可根据不同细胞因子及效应细胞调节 Th1 或 Th2 型的免疫应答^[48], 激活 JAK/STAT 信号通路会诱发 RA 发生炎症反应, 而 RA 患者血清中 IL-18 水平升高, IL-18 可激活 NF κ B 通路诱发 RA 患者发生炎症反应, 服用来氟米特后 RA 患者血清中 IL-18 处于较低水平, 阻断 JAK 途径, 可观察到 RA 滑膜成纤维细胞中 IL-18 的生物活性降低了 52%。本研究同样观察到 UC-MSCs 及 miR-125b-5p 修饰的 UC-MSCs 均显著下调 MRL/lpr 小鼠肾组织中 IL-18 的表达, 且 miR-125b-5p 修饰的 UC-MSCs 的下调作用最显著, 提示 miR-125b-5p 基因修饰 UC-MSCs 后, 可能通过介导 JAK2/STAT3 信号通路抑制了 IL-18 的表达, 并对 UC-MSCs 调节 SLE 的免疫失衡起到协同作用。

参考文献

- [1] Islam M A, Khandker S S, Kotyla P J, et al. Immunomodulatory effects of diet and nutrients in systemic lupus erythematosus (SLE): a systematic review [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1477.
- [2] Li R, Meng X, Chen B, et al. Gut microbiota in lupus: a butterfly effect [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2021, 23(4): 27.
- [3] Capecchi R, Puxeddu I, Pratesi F, et al. New biomarkers in SLE: from bench to bedside [J]. *Rheumatology*, 2020, 59(Suppl5): v12-8.
- [4] Yuan X, Qin X, Wang D, et al. Mesenchymal stem cell therapy induces FLT3L and CD1c(+) dendritic cells in systemic lupus erythematosus patients [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2498.
- [5] Liao L L, Looi Q H, Chia W C, et al. Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 112.
- [6] Can A, Celikkan F T, Cinar O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(12): 1351-82.
- [7] Rupaimoole R, Slack F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-22.
- [8] Legorreta-Haquet M V, Flores-Fernández R, Blanco-Favela F, et al. Prolactin levels correlate with abnormal B cell maturation in MRL and MRL/lpr mouse models of systemic lupus erythematosus-like disease [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 287469.
- [9] Zhang C, Wang X, Chen Y, et al. The down-regulation of hsa_circ_0012919, the sponge for miR-125a-3p, contributes to DNA methylation of CD11a and CD70 in CD4(+) T cells of systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Sci*, 2018, 132(21): 2285-98.
- [10] So B Y F, Yap D Y H, Chan T M. MicroRNAs in lupus nephritis: role in disease pathogenesis and clinical applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10737.
- [11] Mathias L M, Stohl W. Systemic lupus erythematosus (SLE): emerging therapeutic targets [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2020, 24(12): 1283-302.
- [12] Qian D, Liu L, Zhu T, et al. JAK2 and PTPRC mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Rheumatol*, 2020, 39(2): 443-8.
- [13] Yang Q, Liu Y, Chen G, et al. An overview of the safety, efficiency, and signal pathways of stem cell therapy for systemic lupus erythematosus [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 2168595.
- [14] Smith E L, Shmerling R H. The American college of rheumatology criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: strengths, weaknesses, and opportunities for improvement [J]. *Lupus*, 1999, 8(8): 586-95.
- [15] Bombardier C, Gladman D D, Urowitz M B, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE [J]. *Arthritis Rheum*, 1992, 35(6): 630-40.
- [16] 胡明智, 张晶莹, 杨国安, 等. miR-1-5p 修饰脐带间充质干细胞对系统性红斑狼疮 T 淋巴细胞亚群的免疫调节 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(31): 4928-38.
- [17] Chun W, Tian J, Zhang Y. Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates systemic lupus erythematosus and upregulates B10 cells through TGF- β 1 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 512.

- [18] Huang S, Wu S, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells induced CD4 + T cell apoptosis in treatment of lupus mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1-4): 30-5.
- [19] Fu X, Liu G, Halim A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784.
- [20] Cao W, Qian G, Luo W, et al. miR-125b is downregulated in systemic lupus erythematosus patients and inhibits autophagy by targeting UVRAG [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 791-7.
- [21] Ho A W, Kupper T S. T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 490-502.
- [22] Read K A, Powell M D, Sreekumar B K, et al. *In vitro* differentiation of effector CD4(+) T helper cell subsets [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1960: 75-84.
- [23] Li M, Yang C, Wang Y, et al. The expression of P2X7 receptor on Th1, Th17, and regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis and its correlations with active disease [J]. *J Immunol*, 2020, 205(7): 1752-62.
- [24] Selvaraja M, Abdullah M, Arip M, et al. Elevated interleukin-25 and its association to Th2 cytokines in systemic lupus erythematosus with lupus nephritis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0224707.
- [25] Oster C, Wilde B, Specker C, et al. BTLA expression on Th1, Th2 and Th17 effector T-cells of patients with systemic lupus erythematosus is associated with active disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4505.
- [26] Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: new insights from single cell analysis [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102376.
- [27] Álvarez-Rodríguez L, Martínez-Taboada V, Calvo-Alén J, et al. Altered Th17/Treg ratio in peripheral blood of systemic lupus erythematosus but not primary antiphospholipid syndrome [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 391.
- [28] Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, et al. JAK/STAT cytokine signaling at the crossroad of NK cell development and maturation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2590.
- [29] Bellamri N, Viel R, Morzadec C, et al. TNF- α and IL-10 control CXCL13 expression in human macrophages [J]. *J Immunol*, 2020, 204(9): 2492-502.
- [30] Ogiya D, Liu J, Ohguchi H, et al. The JAK-STAT pathway regulates CD38 on myeloma cells in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications [J]. *Blood*, 2020, 136(20): 2334-45.
- [31] Liu S, Xie X, Lei H, et al. Identification of key circRNAs/lncRNAs/miRNAs/mRNAs and pathways in preeclampsia using bioinformatics analysis [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1679-93.
- [32] Dong Z, Chen Y, Yang C, et al. STAT gene family mRNA expression and prognostic value in hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 7175-91.
- [33] Palmroth M, Kuuliala K, Peltomaa R, et al. Tofacitinib suppresses several JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis *in vivo* and baseline signaling profile associates with treatment response [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 738481.
- [34] Yi J, Chen Z, Xu F, et al. IL-27 promotes human placenta-derived mesenchymal stromal cell ability to induce the generation of CD4(+)IL-10(+)IFN- γ (+) T cells *via* the JAK/STAT pathway in the treatment of experimental graft-versus-host disease [J]. *J Immunol*, 2019, 202(4): 1124-36.
- [35] Liu Q, Chen X, Liu C, et al. Mesenchymal stem cells alleviate experimental immune-mediated liver injury *via* chitinase 3-like protein 1-mediated T cell suppression [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 240.
- [36] Zhang B, Yang L, Zeng Z, et al. Leptin potentiates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the activation of JAK/STAT signaling [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(8): 498-510.
- [37] 武文婧, 傅稼耀, 魏玉, 等. JAK2/STAT3 通路在雌激素缺乏相关骨髓间充质干细胞衰老中的作用初探 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2020, 30(5): 288-94.
- [38] Mirfakhraie R, Ardakani MT, Hajifathali A, et al. Highlighting the interaction between immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and signaling pathways contribute to graft versus host disease management [J]. *Transpl Immunol*, 2022, 71: 101524.
- [39] Popielarczyk T L, Huckle W R, Barrett J G. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells home *via* the PI3K-Akt, MAPK, and Jak/Stat signaling pathways in response to platelet-derived growth factor [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(17): 1191-202.
- [40] Ji J, Wu Y, Meng Y, et al. JAK-STAT signaling mediates the senescence of bone marrow-mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(3): 208-15.
- [41] Wang D, Feng X, Lu L, et al. A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(8): 2234-45.
- [42] Tian K, Liu W, Zhang J, et al. MicroRNA-125b exerts antitumor functions in cutaneous squamous cell carcinoma by targeting the STAT3 pathway [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25: 12.
- [43] Eitan C, Hornstein E. Astro-logics with microRNAs [J]. *EMBO J*, 2015, 34(9): 1143-4.
- [44] 徐莉, 张玲玲, 魏伟. 炎症小体参与自身免疫性疾病的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(9): 1479-82.
- [45] Verweyen E, Holzinger D, Weinlage T, et al. Synergistic signaling of TLR and IFN α / β facilitates escape of IL-18 expression from endotoxin tolerance [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(5): 526-39.
- [46] Li M, Zhang X, Wang B, et al. Effect of JAK2/STAT3 signaling

- pathway on liver injury associated with severe acute pancreatitis in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 2013–21.
- [47] Zhou J, Ling J, Wang Y, et al. Cross-talk between interferon-gamma and interleukin-18 in melanogenesis [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2016, 163: 133–43.
- [48] Pecaric-Petkovic T, Didichenko S A, Kaempfer S, et al. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33 [J]. *Blood*, 2009, 113(7): 1526–34.

Immunomodulatory effect of miR-125b-5p modified umbilical cord mesenchymal stem cells mediated JAK2/STAT3 signaling pathway on systemic lupus erythematosus

Wu Zhihui¹, Ding Lili¹, Hu Mingzhi¹, Wang Yongfu², Wang Hui², Zhang Wei¹, Sun Xiaolin¹

(¹Central Laboratory, Key Laboratory of Autoimmunology,

²Dept of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010)

Abstract Objective To investigate the immunomodulatory effects of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) modified by miR-125b-5p through JAK2/STAT3 pathway on systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** UC-MSCs were isolated and cultured under aseptic conditions; Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from SLE patients by density gradient centrifugation. The relative expressions of IL-17A, Foxp3, IFN- γ , IL-4 genes in PBMCs cultured with UC-MSCs for 48 h were detected by RT-qPCR; The relative expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 and IL-18 proteins in kidney tissues of MRL/lpr mice were detected by western blot. **Results** Compared with the PBMCs culture group, the expression of IFN- γ and IL-17A and the proportion of Th17/Treg cells were significantly down-regulated in UC-MSCs + miR-125b-5p group, UC-MSCs + miR-NC group and UC-MSCs group ($P < 0.01$), the expression of the proportion of Th1/Th2 cells ($P < 0.05$) was down-regulated in UC-MSCs + miR-125b-5p group and UC-MSCs + miR-NC group; Compared with the untreated group of MRL/lpr mice, the relative expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 and IL-18 proteins in kidney tissues of MRL/lpr mice were significantly down-regulated in UC-MSCs + miR-125b-5p group ($P < 0.01$), and the relative expressions of IL-18 proteins was significantly down-regulated in UC-MSCs + miR-NC group and UC-MSCs group ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-125b-5p plays a synergistic role in UC-MSCs, which regulates the differentiation of Th2 cells in PBMCs of SLE patients and the relative expressions of p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, and IL-18 proteins in kidney tissues of MRL/lpr mice. UC-MSCs modified by miR-125b-5p may play immunomodulatory effect on SLE by JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words gene modification; umbilical cord mesenchymal stem cells; systemic lupus erythematosus; JAK2/STAT3 signal pathway