

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01053

· 论 著 ·

miR-144 靶向 NF- κ B 受体活化因子配体蛋白调控树突状细胞分泌细胞因子

郭 猛[△], 刘 芳[△], 宋少华, 郑玉廷, 张 磊, 邹 游, 郭闻渊, 丁国善, 傅志仁, 王正昕*

第二军医大学长征医院器官移植科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨 miRNA-144 对树突状细胞(dendritic cells, DCs)成熟过程中细胞因子分泌的影响及机制。**方法** 通过对本实验室前期工作中获得的 DCs 成熟过程中 miRNA 芯片结果进行数据挖掘, 筛选得到 DCs 成熟过程中显著下调的 miRNA (miR)-144, 并使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激体外培养的 DCs 进行验证; 检测 miR-144 转染 DCs 后相关细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-23)的改变及信号通路(NF- κ B、MAPK)活化情况; 使用 TargetScan 预测 miR-144 的作用靶点并通过双荧光报告系统验证; 进一步构建靶蛋白过表达 DC2.4 细胞系并检测 miR-144 拟似物转染该细胞系后细胞因子 TNF- α mRNA 的分泌情况。**结果** 体外培养的 DCs 经 LPS 刺激成熟后 miR-144 的表达下调($P < 0.01$)。miR-144 拟似物转染 DCs 后, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-23 mRNA 表达均出现下调($P < 0.05$, $P < 0.01$), NF- κ B 磷酸化水平下降。通过信息学分析发现 miR-144 的潜在靶点为 NF- κ B 受体活化因子配体蛋白基因(RANKL)并通过双荧光报告系统证明了该结论。在 RANKL 过表达 DC2.4 细胞系中转染 miR-144 拟似物后, TNF- α mRNA 的表达不受影响。**结论** miR-144 靶向 RANKL 调控 DCs 细胞因子分泌。

[关键词] miRNA-144; NF- κ B 受体活化因子配体蛋白; 树突状细胞; 细胞因子**[中图分类号]** R 392.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)10-1053-07

Regulatory effect of miR-144 on cytokine secretion in dendritic cells by targeting receptor activator of NF- κ B ligand

GUO Meng[△], LIU Fang[△], SONG Shao-hua, ZHENG Yu-ting, ZHANG Lei, ZOU You, GUO Wen-yuan, DING Guo-shan, FU Zhi-ren, WANG Zheng-xin*

Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of miRNA-144 on cytokine secretion by dendritic cells (DCs) during their maturation and the related mechanism. **Methods** miRNA chip results showed markedly down-regulated miRNA-144 during DCs maturation. The miR-144 level was also observed in DCs before and after treatment with lipopolysaccharide(LPS). The changes of related cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-23) and the activation of signaling pathway(NF- κ B and MAPK) were detected in DCs after the transfection of miR-144. TargetScan was used to predict the target spot of miR-144 and double fluorescence reporting system was used for verification. Furthermore, we established DC2.4 cell line stably overexpressing the target gene, and detected the TNF- α secretion after transfecting miR-144 mimics. **Results** The miR-144 expression was significantly down-related in DCs stimulated with LPS($P < 0.01$). After the miR-144 mimics were transfected into DCs, expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-23 mRNA were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and NF- κ B phosphorylation level was reduced as well. Bioinformatics analysis hinted that receptor activator of NF- κ B ligand gene (RANKL) was the potential target of miR-144, which was also validated by double fluorescence reporting system. Moreover, transfecting miR-144 mimics into DC2.4 cells stably overexpressing RANKL resulted in no change of TNF- α mRNA expression. **Conclusion** miR-144 can regulate DCs cytokine secretion by targeting RANKL.

[Key words] miRNA-144; receptor activator of NF- κ B ligand; dendritic cells; cytokines

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10):1053-1059]

抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)是连接抗原和淋巴细胞的桥梁, 而树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为专职抗原提呈细胞, 具有强大的捕获、加工和提呈抗原功能, 并能够刺激初始 T 细

[收稿日期] 2014-02-27 **[接受日期]** 2014-05-02**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270551), 上海市科委国际合作课题(11410708700). Supported by National Natural Science Foundation of China (81270551) and Shanghai Committee of Science and Technology Foundation for International Cooperation (11410708700).**[作者简介]** 郭 猛, 硕士, 研究实习员. E-mail: guo918meng@163.com; 刘 芳, 硕士. E-mail: lf94200267@163.com[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885746, E-mail: wangzhxk@hotmail.com

胞增殖和 T 细胞依赖性抗体的形成,在感染、肿瘤、自身免疫及移植等免疫相关性疾病的发生、发展中发挥关键的作用^[1]。DCs 在介导免疫应答过程中,一方面通过提供黏附辅佐分子、细胞因子启动抗原刺激信号对 T 细胞的活化,因此阻断这些分子可以抑制细胞的活化;另一方面,DCs 也可通过抑制性的分子或受体如细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4、B7-H1 (PD-L1)、B7-H4 等负相调控或抑制 T 细胞免疫反应^[2-3];适当调节或干预这些协同刺激信号,在移植免疫排斥以及自身免疫性疾病的治疗及改善疾病症状方面取得了一定的效果^[4]。因此研究 DCs 在分化成熟过程中相关分子的改变,进而寻找发生排斥反应时在 DCs 中起主导作用的关键分子,对延长移植物的存活时间、诱导免疫耐受的形成以及防止排斥反应的发生具有重要意义。

MicroRNA(miRNA)是细胞内一类表达丰富、非编码的高度保守的 RNA 片段,长度一般为 18~25 nt,可以通过结合靶基因的 mRNA 的 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'UTR)抑制基因的表达。而 miRNA 对免疫细胞的调控机制研究更是近年来免疫学研究的热点^[5-8],一系列的 miRNA 参与免疫反应的调控,包括 T/B 细胞的发育分化、抗体类型的转换、单核/中性粒细胞的增殖、炎症因子的释放被广泛报道。尽管如此,miRNA 对 DCs 功能的调控作用研究较少,仅仅局限于个别“明星”miRNA 的作用研究,例如 miRNA(miR)-155 被鉴定出在 DCs 成熟中发挥重要作用^[9],miR-30b 被发现可以通过靶向 Notch1 调控 DCs 分化^[10]。我们通过分析本实验室前期 DCs 成熟前后差异性表达的 miRNA 的芯片数据,筛选出多个表达下调的 miRNA,其中 miR-144 下调显著,提示 miR-144 分子在 DCs 成熟过程中可能是重要的负调控因子(MIAME: E-MEXP-2110)^[11]。基于此,本研究旨在进一步探讨 miR-144 对 DCs 分泌细胞因子的影响及机制。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器 清洁级 C57BL/6 雄性小鼠购自第二军医大学免疫学研究所[许可证号:SYXK(沪)2010-0101],均为 6~8 周龄,体质量为 15~20 g,按标准饮食、分笼饲养于第二军医大学基础部免疫学教研室动物实验室。FAST200 RNA 抽提试剂盒购

自上海飞捷生物技术有限公司,一步法反转录试剂盒、SYBR RT-PCR 试剂盒、KOD plus 酶、T4 连接酶、*Hind* III 与 *Kpn* I 内切酶购自日本 TaKaRa 公司, Luciferase 双荧光素酶报告检测试剂盒购自美国 Promega 公司, NF- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) ELISA 检测试剂盒购自上海凯博生化试剂有限公司, BCA 法蛋白浓度检测试剂盒购自美国 Thermo 公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, G418 与 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国 Sigma 公司, 蛋白质印迹分析所用抗体购自美国 Santa Cruz 公司, RNA 转染试剂 INTERFERin-HTS、DNA 转染试剂 jetPRIME 购自 Polyplus 公司, ABI Step-one 实时定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,全自动数码凝胶图像分析系统购自上海天能科技有限公司。DC2.4 细胞系购自江阴康众康民生物医药技术有限公司, HEK-293 细胞系为本室保存株。

1.2 细胞培养、转染与刺激 颈椎脱位法处死小鼠,无菌状态下分离股骨和胫骨,冲出骨髓并离心收集。用 Tris-NH₄Cl 破除红细胞, RPMI 1640 培养液洗涤 3 次后离心收集细胞。调整细胞密度为 2.5×10^9 /L,置于 6 孔板内并加入 rmGM-CSF(10 ng/mL)和 IL-4(10 ng/mL)。37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 48 h 吸除培养液及悬浮细胞,保留贴壁细胞;继续培养至第 5 天换半液,第 7 天吹打收集细胞,即可获得纯度大于 95% 的小鼠原代 DCs。

RNA 的转染使用 INTERFERin-HTS,按产品说明书推荐步骤操作。miR-144 拟似物与抑制物由上海吉玛制药技术有限公司合成, RANKL 的干扰 RNA(siRANKL)由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。DCs 在转染 48 h 后用 LPS 刺激使细胞成熟, LPS 工作浓度为 1 000 ng/mL。

1.3 细胞因子表达检测 细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-23 以及分泌蛋白 RANKL 的 RNA 表达水平使用实时定量 PCR(qRT-PCR)检测,所用引物均来源于哈佛大学 PrimerBank 数据库(<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>)。用 TRIzol 法抽提细胞总 RNA, Fast200 试剂盒抽提总 mRNA。qRT-PCR 使用 SYBR RT-PCR 试剂盒并在 ABI Step-one 实时定量 PCR 仪上完成。相对定量采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算, mRNA 的检测用 GAPDH 作为内参

照,miRNA 的检测用 U6 作为内参照。RANKL 蛋白表达水平使用 ELISA 定量。

1.4 蛋白印迹分析检测信号通路活化 通过蛋白印迹分析检测 NF- κ B(p65)与 MAPK(ERK、JNK、p38)信号通路活化情况。 2×10^6 个 DCs 分别用 LPS(1 000 ng/mL)刺激 1、2 h 后加入 300 μ L M-PER蛋白抽提试剂裂解,4 $^{\circ}$ C、5 000 $\times g$ 离心 15 min,将上清转移至干净 EP 管内,按照 BCA 法蛋白浓度检测试剂盒说明书进行蛋白定量,调整各组样品蛋白浓度达到一致,加入等量上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴煮沸 5 min,冷却后上样;用 12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质;用转膜系统将蛋白转移至硝酸纤维素膜上;常温下用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h;TBST 洗脱 2 次;加入 1:1 000 稀释的第一抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗脱 3 次;加入辣根过氧化物酶偶联的第二抗体孵育 1 h;TBST 洗脱 3 次;将发光检测试剂中的 A 液和 B 液等体积混匀,于凝胶成像分析仪上进行检测。

1.5 miRNA 靶点预测与 3'UTR 报告基因分析 miR-144 的靶基因预测使用在线软件 Targetscan 6.2(<http://www.targetscan.org>)。预测 miR-144 的所有潜在靶点后,导入 KEGG pathway 数据库中 与 TLR4/NF- κ B 通路涉及的所有基因进行比对,筛选出潜在靶基因。使用 PCR 扩增 RANKL mRNA 的 3'UTR 序列并连接到 p-MIR 质粒(购自 Invitrogen 公司),得到 RANKL 3'UTR 的 Firefly 荧光素酶报告基因;进一步在 1 058~1 065 与 679~685 位点两端设计引物,使用 KOD 酶一步法扩增出位点删除质粒。HEK293 细胞共转 80 ng RANKL 3'UTR 荧光素酶报告基因质粒,40 ng pRL-TK-Renilla 荧光素酶内参质粒(购自 Invitrogen 公司),以及 miRNA 或对照(终浓度为 20 nmol/L)。转染 24 h 后,用双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光活性。最终数据为 Firefly 荧光值与内参 Renilla 荧光值的比值。

1.6 稳定过表达 RANKL 的 DC2.4 细胞系构建 在 RANKL 编码序列(conding sequence,CDS)两端设计引物,引入酶切位点 *Hind* III 与 *Kpn* I,连接至 pcDNA3.1 质粒上,挑单克隆测序成功后,获得 RANKL 的表达质粒。使用 DNA 转染试剂 jetPRIME 将表达质粒转染 DC2.4 细胞系,48 h 后使用 500 ng/mL 的 10%FBS RPMI 1640 培养液筛

选阳性克隆,4 周后用克隆环随机挑取 20 个克隆,接种于 96 孔板中培养,24 h 后 ELISA 检测培养上清,选取 RANKL 分泌量最高的细胞株。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用 One-way ANOVA,多组之间两两比较采用最小显著差数法(LSD法)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 DCs 成熟前后 miR-144 表达的变化 通过检测 DCs 成熟前后 miR-144 的表达变化,发现 miR-144 在成熟 DCs 中发生了下调(成熟前:1.022 \pm 0.010,成熟后:0.243 \pm 0.002; $P < 0.01$)。

2.2 miR-144 对 DCs 细胞因子产生的影响 在小鼠 DCs 中转染 miR-144 拟似物及其抑制物后使用 LPS 刺激,检测细胞因子的 mRNA 水平,结果显示在转染 miR-144 拟似物后,*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* 以及 *IL-23* mRNA 均下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),而对应的 miR-144 抑制物则可以上调这些细胞因子的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$,图 1A~1D)。KEGG pathway 数据库显示这些细胞因子的表达都位于转录因子 NF- κ B 或 MAPK 通路下游,进一步检测 LPS 刺激后 DCs 中 ERK、JNK、p38、p65 的磷酸化情况,结果显示 miR-144 高表达后抑制了 NF- κ B 通路中 p65 的磷酸化,而对 MAPK 通路无影响(图 1E)。

2.3 miR-144 作用靶点的预测 上述结果表明 miR-144 可能对 TLR4/NF- κ B 途径中的活化因子起到了负调控作用。通过 TargetScan 预测 miR-144 靶点,发现 miR-144 在 TLR4/NF- κ B 途径中只有 1 个靶向基因 RANKL,并且 miR-144 在 RANKL 3'UTR 区域有两个潜在作用位点(图 2A)。将 RANKL 3'UTR 区域克隆至 pMIR 荧光素报告质粒,之后进行双荧光报告系统检测,结果显示 miR-144 拟似物可以下调荧光素酶($P < 0.01$,图 2B),而 miR-144 抑制物可以上调荧光素酶($P < 0.01$,图 2C),提示 miR-144 可以靶向 RANKL。为了探究 miR-144 究竟是作用于 RANKL 的哪个位点发挥负调控作用,分别删除 RANKL 3'UTR-pMIR 质粒中的 1 058~1 065 与 679~685 位点,发现去除 1 058~1 065 的结合位点后,miR-144 对于 RANKL 3'UTR 仍有作用($P < 0.01$,图 2D),而去

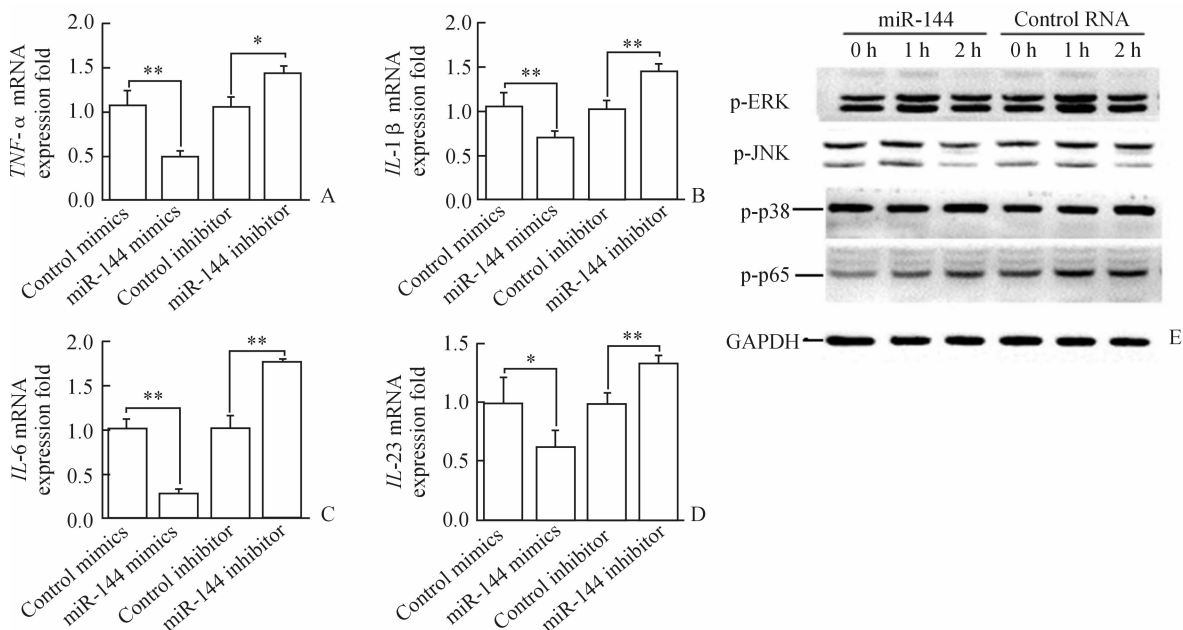


图 1 miR-144 对树突状细胞 (DCs) 细胞因子产生的影响

Fig 1 Effect of miR-144 on cytokine production in dendritic cells (DCs)

A-D: *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* and *IL-23* mRNA expression levels in DCs after transfection with miR-144 mimics or inhibitor; E: Phosphorylation levels of MAPK and NF-κB in DCs after transfection with miR-144 mimics. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

除 679 ~ 685 的结合位点后, miR-144 无法发挥对 *RANKL* 的负调控作用(图 2E)。因此, 我们认为 miR-144 通过靶向 *RANKL* 3' UTR 区域的 679 ~ 685 结合位点发挥负向调控作用。

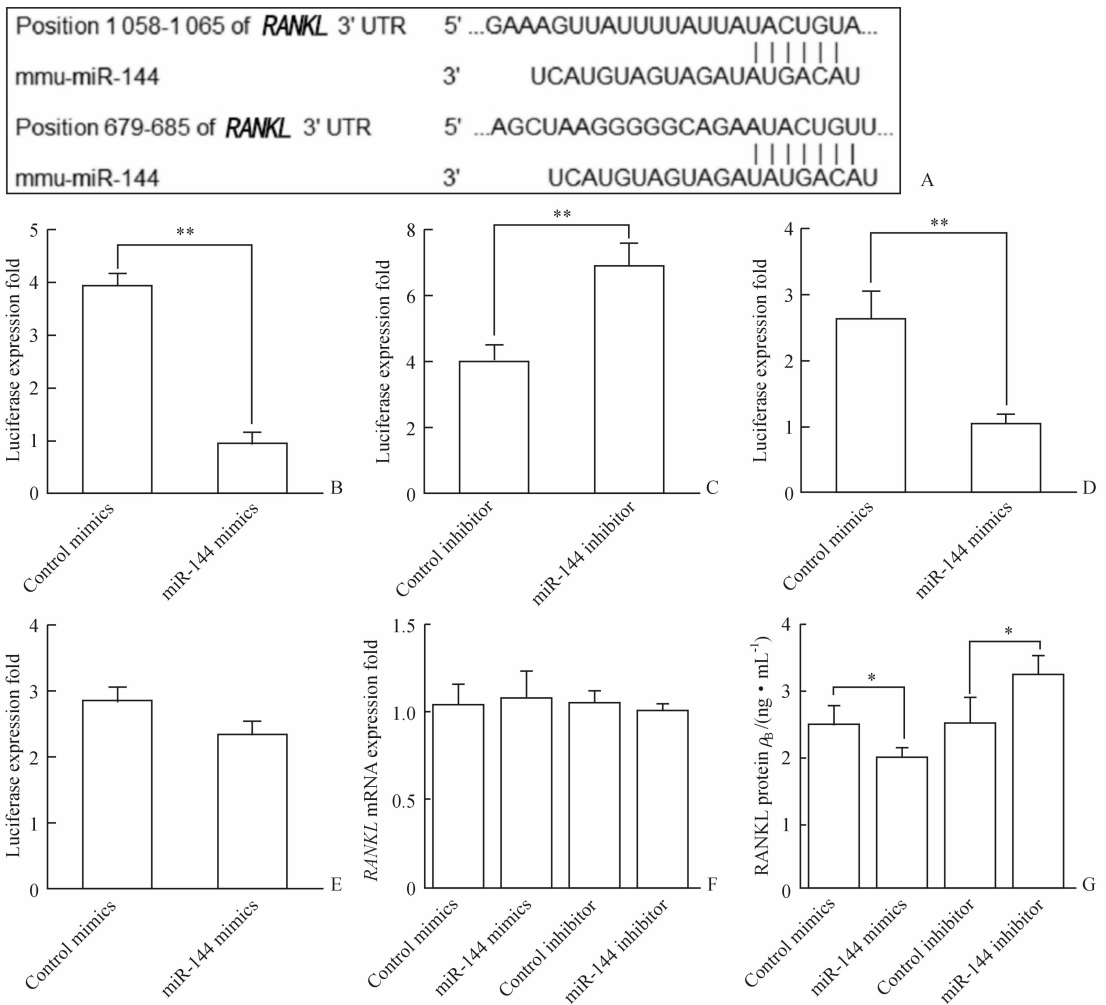
miRNA 主要通过和靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合物(RISC)降解 mRNA, 或者形成发卡结构阻碍 mRNA 进入翻译复合物从而阻碍其翻译两条途径发挥作用。为了探究 miR-144 对 *RANKL* 的负向调控作用是何种方式, 我们将 miR-144 拟似物或抑制物及相应阴性对照 RNA 转染 DCs 后使用 LPS 刺激其成熟, qRT-PCR 检测细胞中 *RANKL* mRNA 水平, 同时 ELISA 检测培养上清中的 *RANKL* 蛋白水平。结果显示, miR-144 不降解 *RANKL* mRNA(图 2F), 而通过抑制 *RANKL* mRNA 的翻译来实现负调控作用($P < 0.05$, 图 2G)。

2.4 miR-144 靶向 *RANKL* 影响 DCs 细胞因子分泌 为了验证 miR-144 通过靶向 *RANKL* 影响 DCs 的细胞因子分泌, 将 miR-144 拟似物与 siRANKL 分别转染小鼠 DCs, 结果显示 siRANKL 与 miR-144 效果类似, 可以抑制 LPS 刺激后 *TNF-α* mRNA 的表达量($P < 0.01$, 图 3A)。miR-144 抑制物转染 DCs 后会介导 *TNF-α* mRNA 的上调($P < 0.01$), 而 siRANKL 与 miR-144 抑制物共转后会阻

止这种趋势($P < 0.05$, 图 3B)。在稳定过表达 *RANKL* 的 DC2.4 细胞系中转染 miR-144 拟似物后用 LPS 刺激细胞, 结果显示 *TNF-α* mRNA 的表达量不受影响(图 3C)。与此对照瞬时转染空载体的 DC2.4 细胞系在转染 miR-144 拟似物后, *TNF-α* mRNA 表达下调($P < 0.01$, 图 3D)。

3 讨论

miRNA 作为一种机体的精细调节方式, 已经被多次报道在移植排斥中发挥重要作用^[8,12]。2009 年, Anglicheau 等^[13]报道了人肾脏移植后 miRNA 表达谱的变化与急性排斥的关系, 通过对 33 例肾脏移植(12 例急性排斥)肾脏活检标本进行 miRNA 表达谱检测, 发现 miRNA 可作为急性排斥的生物学标记物; 2001 年 Scian 等^[14]应用 microRNA 芯片检测肾脏移植慢性失功患者的纤维化间质和肾小管活检组织 miRNA 变化, 发现 56 个 miRNAs 中的 5 个(miR-142-3p, miR-204, miR-107, miR-211, miR-32)有非常明显的改变($P < 0.001$), 且与尿液中的 miRNAs 改变相符, 认为这些 miRNAs 的变化可作为尿液无创伤的预判慢性排斥的生物标记物。2012 年 Asaoka 等^[15]发现小肠移植后的活检组织病理切片 miRNA 可以作为判断排斥以及抗排斥治疗的标记

图 2 miR-144 可以靶向 *RANKL* 在树突状细胞 (DCs) 中发挥作用Fig 2 miR-144 targets *RANKL* in dendritic cells (DCs)

A: *RANKL* might be the molecular target of miR-144. Shown is a sequence alignment of miR-144 and its target sites in 3'-UTR of *RANKL*, which was downloaded from TargetScan; B: miR-144 mimics downregulated luciferase activity compared with control group; C: miR-144 inhibitor upregulated luciferase activity compared with control group; D: 1 058-1 065 of *RANKL* 3'UTR deletion did not cause luciferase activity change compared with in B; E: 679-685 of *RANKL* 3'UTR deletion caused miR-144 no longer impact *RANKL* expression; F: miR-144 mimics or inhibitor cannot trigger *RANKL* degradation; G: miR-144 mimics or inhibitor impacted *RANKL* protein synthesis. *RANKL*: Receptor activator of NF- κ B ligand. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

物。这些结果表明 miRNA 很可能参与了移植排斥反应过程,但确切机制尤其 miRNA 对排斥反应中抗原提呈细胞的影响值得进一步研究。

移植免疫学的研究表明,DCs 在移植排斥过程以及移植损伤中发挥着重要的作用^[16]。因此本研究中通过挖掘实验室已有的 miRNA 芯片数据结果,分析了 DCs 成熟过程中 miRNA 的变化,发现 miR-144 在 DCs 活化后发生显著下调。在移植术后,一方面缺血造成的细胞坏死会导致大量危险信号的释放^[17],另一方面,补体与异源的细胞表面糖

链触发级联反应,所产生的裂解片段和复合物将作用于抗原提呈细胞。这些信号将通过模式识别受体使抗原提呈细胞发生活化,开始摄取和提呈抗原,同时释放大量的细胞因子,加强获得性免疫应答,促进 B 细胞活化加重体液排斥^[18]并参与 T 细胞增殖分化^[19]。而 DCs 作为一类功能最强的抗原提呈细胞,在识别和提呈抗原、启动免疫应答、诱导移植排斥反应中起着重要的作用。一方面,DCs 分泌 TNF- α 促进自身成熟与抗原提呈,另一方面产生的细胞因子 IL-23、IL6、IL-1 β 直接调控着 T 细胞的分化与发育^[20-21]。

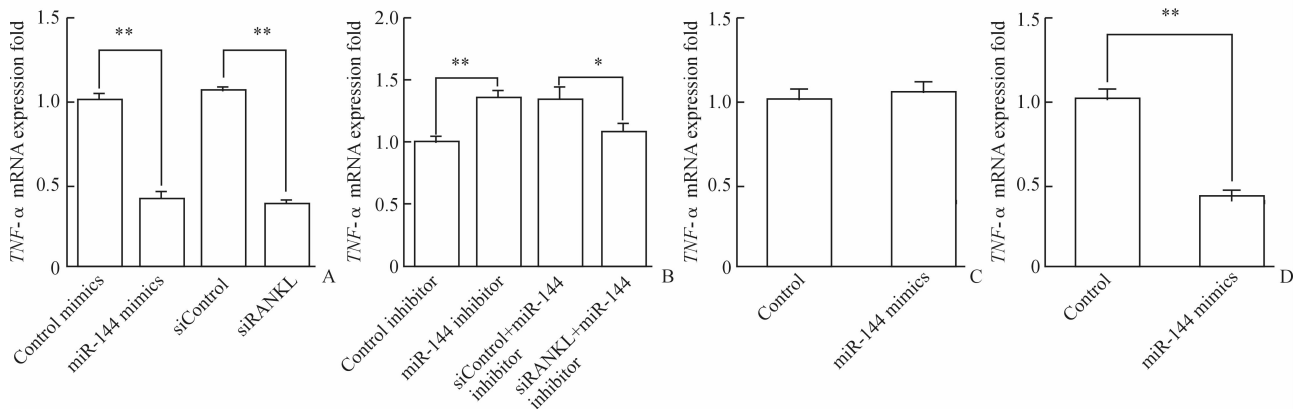


图 3 miR-144 通过靶向 RANKL 影响 DCs 细胞因子分泌

Fig 3 miR-144 impacted cytokine production by targeting RANKL

A: siRNA of RANKL (siRANKL) functioned similarly with miR-144; B: siRANKL can recuse the upregulation of TNF-α mRNA caused by miR-144 inhibitor; C: miR-144 mimics cannot trigger TNF-α mRNA downregulation in DC2.4 cell lines with stable RANKL overexpression; D: As control for C, miR-144 can still downregulate TNF-α mRNA in DC2.4 cell lines after transient transfection with empty vector. RANKL: Receptor activator of NF-κB ligand. * P<0.05, ** P<0.01. n=3, x±s

本研究发现, miR-144 可以靶向 DCs 中 RANKL 的 mRNA, 从而下调分泌性 RANKL 的表达。RANKL 可以与 RANK 结合, 促进 NF-κB 的活化, 引起下游众多细胞因子的表达。在 DCs 成熟的过程中, RANKL 会被释放到周围的微环境中帮助 DCs 活化。之前有研究报道, miR-144 在心脏发生缺血再灌注损伤后也会发生下调, miR-144 下调后抑制了 Akt、GSK3β 与 MAPK 途径, 同时促进了 mTOR 途径的活化, 加重了心脏损伤^[22]。本研究则发现 miR-144 在 DCs 成熟中也发生显著下调, 因此我们推测, 在器官发生缺血再灌注后, 发生损伤的器官在早期会释放趋化因子募集大量的固有免疫细胞参与损伤和炎症的发生, 在这一过程中未成熟 DCs 接受抗原或炎性介质刺激后可分化为成熟 DCs, 这时候 miR-144 的下调除了加重组织损伤之外, 同时有助于 DCs 释放更多的 RANKL 帮助自身活化。而 RANKL 的上调也促进了固有免疫细胞分泌包括 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-23 在内的多种细胞因子, 这些细胞因子一方面促进了 DCs 的成熟与抗原提呈能力, 另一方面促进了 T 细胞的成熟与分化, 导致缺血再灌注损伤的加重。

综上所述, 我们通过分析实验室已有的 miRNA 芯片数据, 筛选到了靶向 RANKL 的 miR-144, 该 miRNA 可以抑制 DCs 细胞因子的分泌。本研究揭示了 miRNA 在异源性移植物与受体免疫系统作用后如

何发挥精确调控作用的分子机制, 也为 miRNA 作为防治移植排斥反应的潜在治疗靶点提供了首要数据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Gutmacher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation[J]. J Clin Invest, 2007, 117:1119-1127.
- [2] Pruitt S K, Boczkowski D, de Rosa N, Haley N R, Morse M A, Tyler D S, et al. Enhancement of anti-tumor immunity through local modulation of CTLA-4 and GITR by dendritic cells[J]. Eur J Immunol, 2011; 41:3553-3563.
- [3] Guo G, Shang Y, Zhu G, Bao X, Xu S, Chen Y. The expression and distribution of immunomodulatory proteins B7-H1, B7-DC, B7-H3, and B7-H4 in rheumatoid synovium[J]. Clin Rheumatol, 2012, 31:271-281.
- [4] Athanasiadis Y, de Wit D, Kumar V, Moore J E, Sharma A. Reply to: Costa DC et al. The use of subconjunctival triamcinolone acetonide (SCTA) in the management of corneal endothelial graft rejection[J]. Eye (Lond), 2009, 23:744-745.
- [5] Taganov K D, Boldin M P, Chang K J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate im-

- immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:12481-12486.
- [6] Perry M M, Moschos S A, Williams A E, Shepherd N J, Larner-Svensson H M, Lindsay M A. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 β -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2008, 180:5689-5698.
- [7] Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12:861-869.
- [8] Cullen B R. MicroRNAs as mediators of viral evasion of the immune system[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14: 205-210.
- [9] Dueck A, Eichner A, Sixt M, Meister G. A miR-155-dependent microRNA hierarchy in dendritic cell maturation and macrophage activation[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588:632-640.
- [10] Su X, Qian C, Zhang Q, Hou J, Gu Y, Han Y, et al. miRNomes of haematopoietic stem cells and dendritic cells identify miR-30b as a regulator of Notch1[J]. *Nat Commun*, 2013, 4:2903.
- [11] Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F, An H, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2 [J]. *J Immunol*, 2009, 183:2150-2158.
- [12] Baumjohann D, Ansel K M. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13:666-678.
- [13] Anglicheau D, Sharma V K, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106:5330-5335.
- [14] Scian M J, Maluf D G, David K G, Archer K J, Suh J L, Wolen A R, et al. MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA [J]. *Am J Transplant*, 2011, 11:2110-2122.
- [15] Asaoka T, Sotolongo B, Island E R, Tryphonopoulos P, Selvaggi G, Moon J, et al. MicroRNA signature of intestinal acute cellular rejection in formalin-fixed paraffin-embedded mucosal biopsies [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12:458-468.
- [16] Ge F, Yuan S, Su L, Shen Z, He A, Huang T, et al. Alteration of innate immunity by donor IL-6 deficiency in a presensitized heart transplant model [J]. *PLoS One*, 2013, 8:e77559.
- [17] Bagul A. Ischaemic/reperfusion injury: role of infliximab [J]. *World J Transplant*, 2012, 2:35-40.
- [18] Jiang S Y, Zou Y Y, Wang J T. p38 mitogen-activated protein kinase-induced nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell activity is required for neuroprotection in retinal ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Vis*, 2012, 18:2096-2106.
- [19] Devey L R, Richards J A, O'Connor R A, Borthwick G, Clay S, Howie A F, et al. Ischemic preconditioning in the liver is independent of regulatory T cell activity [J]. *PLoS One*, 2012, 7:e49647.
- [20] Shan M, Cheng H F, Song L Z, Roberts L, Green L, Hacken-Bitar J, et al. Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema [J]. *Sci Transl Med*, 2009, 1:4ra10.
- [21] Takahashi S, Fukuda M, Mitani A, Fujimura T, Iwamura Y, Sato S, et al. Follicular dendritic cell-secreted protein is decreased in experimental periodontitis concurrently with the increase of interleukin-17 expression and the *RANKL/Opg* mRNA ratio [J]. *J Periodontol Res*, 2014, 49:390-397.
- [22] Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone R A, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning [J]. *Basic Res Cardiol*, 2014, 109:423.