

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.01.007

5-氮杂胞苷对 T 淋巴细胞 Jurkat miR-126 及 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 表达的影响*

贾宏林¹ 张 茹¹ 梁晓鹰² 杨 清³ 姜孝芳^{4Δ}

(1 新疆医科大学中医学院 新疆 乌鲁木齐 830000; 2 新疆医科大学第四附属医院 新疆 乌鲁木齐 830000;

3 新疆医科大学第六附属医院 新疆 乌鲁木齐 830000; 4 新疆医科大学中心实验室 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的:探究甲基化酶抑制剂 5-氮杂胞苷(5-azacytidin, 5-aza)对 T 淋巴细胞(Jurkat)miR-126、Th1/Th2、Th17/Treg 细胞亚群及因子 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 和 Foxp3 的调控作用。**方法:**采用不同浓度 5-aza 干预 T 淋巴细胞,24 h、48 h 后检测其对细胞增殖抑制作用;实时荧光定量 PCR、Western Blot 检测 5-aza 干预后 miR-126 表达水平以及 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 和 Foxp3 的 mRNA 及蛋白表达水平;流式细胞术检测 5-aza 干预后 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞亚群分化比例。**结果:**甲基化酶抑制剂干预 T 淋巴细胞后,细胞抑制率随 5-aza 浓度增大及作用时间延长呈递增趋势($P<0.01$);细胞抑制率在 24 h、48 h,低、中、高浓度下分别为(14.73±0.93)%、(32.67±8.40)%、(60.87±5.78)%以及(18.98±0.73)%、(39.80±8.42)%、(64.11±6.04)%;抑制率在 24 h 与 48 h 之间无差异($P>0.05$)。甲基化酶抑制剂干预后 miR-126 表达降低($P<0.01$);IFN- γ 蛋白表达降低($P<0.05$)、Th1 细胞亚群数目降低($P<0.01$);GATA3 mRNA 和蛋白表达升高($P<0.05$)、Th2 细胞亚群数目增加($P<0.01$);ROR- γ 蛋白表达降低($P>0.05$)、Th17 细胞亚群数目降低($P<0.05$);Foxp3 mRNA 和蛋白表达升高($P>0.05$)、Treg 细胞亚群数目增加($P<0.05$)。**结论:**甲基化酶抑制剂可以下调 Jurkat 细胞 miR-126 基因表达;下调 Th1、Th17 细胞亚群分化,上调 Th2、Treg 细胞亚群分化;调控细胞因子 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 和 Foxp3 的表达。

关键词:变应性鼻炎;T 淋巴细胞;DNA 甲基化;5-氮杂胞苷;miR-126;Th 细胞

中图分类号:R-33;R765 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)01-43-09

Effects of 5-azacytidine on Expression of Jurkat miR-126 and IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 in T Lymphocytes*

JIA Hong-lin¹, ZHANG Ru¹, LIANG Xiao-ying², YANG Qing³, JIANG Xiao-fang^{4Δ}

(1 School of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 2 The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 3 The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 4 Central Laboratory of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulatory effects of methylase inhibitor 5-azacytidin (5-aza) on miR-126, Th1/Th2, Th17/Treg cell subsets and cytokines IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 in T lymphocytes (Jurkat). **Methods:** T lymphocytes were treated with different concentrations of 5-aza. The inhibitory effects of 5-aza on T lymphocytes proliferation were measured at 24 h and 48 h after treatment. Real-time quantitative PCR and Western Blot were used to detect the expression level of miR-126 and the mRNA and protein expression levels of IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 after 5-aza intervention; Flow cytometry was used to detect the differentiation ratio of Th1/Th2 and Th17/Treg cell subsets after 5-aza treatment. **Results:** The cytostatic rate increased with increasing 5-aza concentration and duration of action after methylation enzyme inhibitor intervention on T lymphocytes ($P<0.01$). The cell inhibitory rates were (14.73±0.93)%, (32.67±8.40)%, (60.87±5.78)% and (18.98±0.73)%, (39.80±8.42)%, (64.11±6.04)% at 24 h, 48 h, low, medium and high concentrations, respectively. There was no difference in inhibition between 24 h and 48 h ($P>0.05$). The expression of miR-126 decreased after methylase inhibitor intervention ($P<0.01$); The expression of IFN- γ protein decreased ($P<0.05$), the number of Th1 cell subsets decreased ($P<0.01$); GATA3 mRNA and protein expression increased ($P<0.05$), the number of Th2 cell subsets increased ($P<0.01$); The expression of ROR- γ protein was decreased ($P>0.05$), the number of Th17 cell subsets decreased ($P<0.05$); Foxp3 mRNA and protein expression increased ($P>0.05$), the number of Treg cell subsets increased ($P<0.05$). **Conclusions:** Methylase inhibitors could down-regulate miR-126 gene expression in Jurkat cells. The down-regulation of subpopulation differentiation of Th1 and Th17 cells, up-regulation of subpopulation differentiation of Th2 and Treg cells, and expression of cytokines IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 were regulated by methylase inhibitors.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81760182)

作者简介:贾宏林(1993-),女,硕士研究生,研究方向:呼吸道变应性疾病的基础研究,E-mail: 654016000@qq.com

Δ 通讯作者:姜孝芳(1980-),女,高级实验师,硕士生导师,研究方向:呼吸道变应性疾病的基础研究,E-mail: xinjiangjxf@163.com

(收稿日期:2021-07-23 接受日期:2021-08-18)

Key words: Allergic rhinitis; T lymphocytes; DNA methylation; 5-aza; miR-126; Th cell

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R765 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)01-43-09

前言

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是免疫球蛋白(IgE)介导、鼻黏膜嗜酸性粒细胞(EOS)浸润和 Th2 细胞因子分泌增加的变应性炎症性疾病,症状以鼻痒、鼻塞、流涕、打喷嚏为主要表现。发病机制复杂,CD4⁺T 淋巴细胞 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞分化失衡是 AR 发生发展的基础。MicroRNA (miRNA)是非编码单链 RNA 小分子,参与信号转导、细胞增殖、分化以及凋亡等过程^[1],是基因表达的基本调控机制之一。miR-126 参与炎症、自身免疫和器官衰竭等调控过程^[2-4],是 miRNAs 家族中重要一员。过敏性呼吸系统疾病中 miR-126 表达异常,抑制 miR-126 表达可减轻嗜酸性粒细胞在气道内的聚集^[5],在 AR 发生发展过程中发挥重要作用^[6]。

5-氮杂胞苷(5-azacytidin, 5-aza)是一种环状核苷类似物的 DNA 甲基化酶抑制剂,可与高增殖细胞 DNA 或 RNA 结合并消耗 DNMT1,诱导甲基化发生改变^[7],从而参与信号转导、调控细胞周期以及调控癌细胞的发生发展^[8]。有研究发现 5-aza 通过调节 Th 细胞表达来调控炎症反应,缓解 AR 大鼠过敏性鼻炎症状^[9];同时 5-aza 作为甲基化酶抑制剂可以通过调节甲基化来调节 miRNA 的表达^[10]。本课题组通过筛选 AR 患者 miRNA

差异基因,发现 miR-126 的表达差异明显,故本实验以 T 淋巴细胞 Jurkat 为研究对象,初步探究 5-aza 对 miR-126 表达水平、Th1/Th2、Th17/Treg 细胞亚群及因子 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 和 Foxp3 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

Jurkat 细胞株(人外周血白血病 T 细胞)购自中科院细胞库;胎牛血清购自 BI 公司;RPMI-164 培养基购于 Hyclone 公司。5-aza(A2385)购自美国 Sigma 公司;逆转录试剂盒 miScript II RT Kit (218161)、荧光定量试剂盒 miScript SYBR Green PCR kit (1046470)、miScript miRNA-126 Primer Assay (MS00003430)、Hs-RNU6 miScript primer assay (MS00033740)购于 QIAGEN 公司;CCK-8 细胞毒性检测试剂盒、IFN- γ (BM4939)、GATA3(PB0195)一抗购于武汉博士德公司,均以 1:500 稀释;ROR- γ (DF3196)、Foxp3(AF6544)一抗购于 Affinity 公司,均以 1:500 稀释;GAPDH 抗体(ab8245, 1:10000 稀释)购于 abcam 公司;辣根酶标记山羊抗兔 IgG(ZB-2301, 1:50000 稀释)购于中杉金桥公司;实验所需引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息表

Table 1 Detailed Information about Primer Sequence

Primer	Sequence (5' to 3')
GAPDH FORWARD	GACCTGACCTGCCGCTA
GAPDH REVERSE	AGGAGTGGGTGTCGCGCTGT
FOXP3 FORWARD	GCACGGCAGTTCTCCAGATG
FOXP3 REVERSE	GACATGGCAAGAGGCAGCAGAG
GATA-3 FORWARD	CACCACCTACCCGCCCTACG
GATA-3 REVERSE	GTTACACACTCCCTGCCTTCTG
IFN- γ FORWARD	ATCCAAGTGATGGCTGAAGTGTCTG
IFN- γ REVERSE	GGCAGGACAACCATTACTGGGATG
ROR- γ FORWARD	GCTAGGTGCAGAGCTTCAGG
ROR- γ REVERSE	TGTTCTCATGACTGAGCCTTGG

1.2 实验仪器与设备

酶标仪(Thermo, 美国),蛋白免疫印迹电泳设备(Bio-Rad, 美国),凝胶成像系统(全氏金, 中国),倒置显微镜(Leica, 美国),实时荧光定量 PCR 仪器(Applied Biosystems, 美国),流式细胞仪(贝克曼, 美国)。

1.3 Jurkat 细胞增殖及毒性检测

正常培养 Jurkat 细胞,待细胞融合度达到 80%~90%时进行细胞计数,按照每孔 5×10^4 个细胞/100 μ L 完全培养基接种于 96 孔板中;当细胞生长至对数期时,进行 5-aza 干预。实验分

组为空白组(有培养基无细胞)、对照组(有培养基有细胞)以及实验组(药物干预组);实验组 5-aza 给药浓度分别为 0.1、0.25、1、5、10、25、50、100 mol/mL,每组设五个复孔。分别细胞培养 24h 及 48h,取 10 μ L CCK-8 溶液分别加入空白组、对照组和实验组,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度,计算细胞抑制率。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 mRNA 表达

Jurkat 细胞提前一天接种于六孔板中,每孔 5×10^5 个细胞;当细胞生长至对数期时,按照实验分组进行甲基化酶抑制剂干

预。干预 24h 后,TRIzol 裂解液提取各组 RNA,Nanodrop 2000 测定 RNA 浓度。按照逆转录试剂盒说明书操作,MyCycler™ Thermal Cycler 中进行逆转录反应,反应条件为:37℃,15 min;85℃,5s;4℃,∞。将所得逆转录产物进行 cDNA 扩增,反应体系为 2× Master Mix 10 μL、10× PCR Universal Primer 2 μL、10× PCR Primer Assay 2 μL、cDNA 模板 2 μL、灭菌水补充至 20 μL。扩增反应采用两步法 PCR 扩增标准程序:95℃ 15 min、94℃ 15s、55℃ 30s、70℃ 34s;循环数:40。扩增结果根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各 mRNA 相对表达量。

1.5 Western Blot 检测蛋白表达水平

Jurkat 细胞提前一天接种于六孔板中,每孔 5×10^5 个细胞;当细胞生长至对数期时,按照实验分组进行甲基化酶抑制剂干预。干预 24 h 后,RIPA 细胞裂解液裂解各组细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。预设蛋白变性后浓度为 20 μg/L,蛋白样本与 loading buffer 以 1:4 体积混合,ddH₂O 补充体积

至 20 μL,100℃变性 10 分钟。样品通过 SDS-PAGE 电泳及转膜过程将目标蛋白移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h,TBST 洗膜,每次 5 分钟;按照 marker 分子量裁剪目标蛋白,4℃水平摇床孵育一抗过夜。一抗回收,TBST 洗膜,每次 10 分钟,洗三次;二抗室温摇床封闭 1h;二抗回收,TBST 洗膜,每次 10 分钟,洗三次。显影曝光,使用 Image J 软件进行灰度定量分析。

1.6 流式细胞仪检测 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞比例

Jurkat 细胞提前一天接种于六孔板中,每孔 5×10^5 个细胞;当细胞生长至对数期时,按照实验分组进行甲基化酶抑制剂干预,干预 24h 后收集细胞悬液。每个样本管分别加入 100 μL 细胞悬液,向样本管加入相应体积:Th1/Th2/Th17:CD4,CD183,CD196;Treg:CD4,CD127,CD25 流式抗体,室温避光孵育 15-30 分钟。PBS 洗涤细胞,离心后弃上清,加入 500 μL PBS 洗液上机检测。流式抗体试剂克隆号、染色通道、货号见表 2。

表 2 流式抗体试剂及型号信息

Table 2 Flow Antibody Reagents and Model Information

Designation	Clone Code	Article Number
FITC Mouse Anti-Human CD4	RPA-T4	555346
BD Pharmingen™ PE-Cy™5 Mouse Anti-Human CD183(CXCR3)	1C6/CXCR3	551128
PE Mouse Anti-Human CD196 (CCR6)	11A9	559562
PE Mouse Anti-Human CD127	HIL-7R-M21	557938
BB515 Mouse Anti-Human CD25	2A3	564467
PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD4	SK3	557852

1.7 统计学分析

采用 SPSS25.0 和 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析,统计结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用非配对独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。实验均重复三次,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CCK-8 检测 5-aza 对 Jurkat 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示,甲基化酶抑制剂干预 T 淋巴细胞 24 h 和 48 h 后,细胞抑制率随 5-aza 浓度增大及作用时间延长呈递增趋势($P<0.01$,图 1-A~B);细胞抑制率在 24 h、48 h,低、中、高浓度下分别为 $(14.73 \pm 0.93)\%$ 、 $(32.67 \pm 8.40)\%$ 、 $(60.87 \pm 5.78)\%$ 以及 $(18.98 \pm 0.73)\%$ 、 $(39.80 \pm 8.42)\%$ 、 $(64.11 \pm 6.04)\%$ (表 2);24 h 抑制率与 48 h 抑制率之间无差异($P>0.05$,图 1-C)。

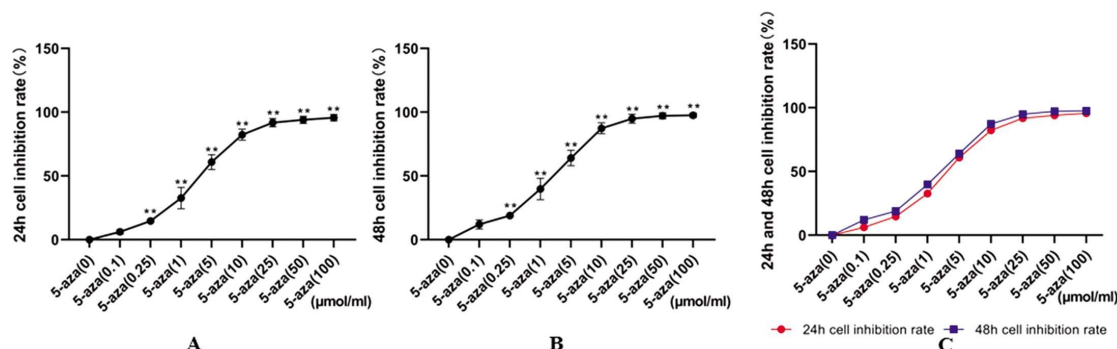


图 1 不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of 5-aza at different concentrations on the viability of Jurkat cells

注:图 A,不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞 24 h 的影响;图 B,不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞 48 h 的影响;图 C,不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞 24 h 与 48 h 影响的比较。实验重复三次,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; * $P<0.05$ VS. 对照组, ** $P<0.01$ VS. 对照组。

Note: Fig. A The effects of 5-aza at different concentrations on Jurkat cells for 24 h; Fig. B Effects of 5-aza at different concentrations on Jurkat cells for 48 h; Fig. C Comparison of the effects of 5-aza at different concentrations on Jurkat cells for 24 h and 48 h. The experiment was repeated three times, and the statistical results were expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$ vs. control group, ** $P<0.01$ vs. control group.

表 3 不同浓度的 5-aza 作用于 Jurkat 细胞抑制率(%)

Table 3 Jurkat cell inhibition rate of 5-aza with different concentrations (%)

Drug concentration($\mu\text{mol/mL}$)	0.1	0.25	1	5	10	25	50	100
24h inhibition rate(%)	6.13	14.72**	32.70**	60.89**	82.35**	91.82**	94.02**	95.70**
48h inhibition rate(%)	12.03	18.98**	39.80**	64.11**	87.36**	94.93**	97.16**	97.60**

Note: * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group, the difference was statistically significant.

2.2 低、中、高浓度 5-aza 对 Jurkat 细胞形态的影响

选取低、中、高三浓度的 5-aza 干预六孔板中 Jurkat 细胞 24 h, 其细胞形态在 40 倍镜下的观察如图 2。从图中可以观察

到, 正常组 Jurkat 细胞成晶莹剔透圆形, 部分聚集成团状; 5-aza 作用后, 细胞部分回缩; 随着 5-aza 浓度增大, 部分细胞回缩增强甚至裂解。

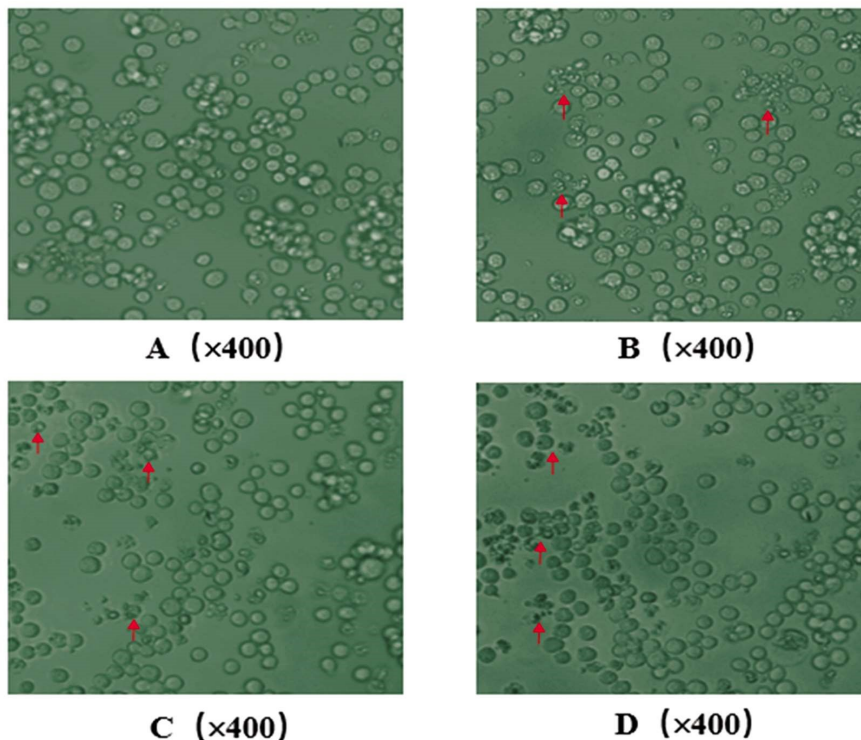


图 2 低、中、高浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞活力的影响(400 倍)

Fig. 2 Effects of low, medium and high concentrations of 5-aza on Jurkat cell viability

注: A, 正常组 Jurkat 细胞状态; B, 低浓度 5-aza 作用 Jurkat 细胞的状态影响;

C, 中浓度 5-aza 作用 Jurkat 细胞的状态影响; D, 高浓度 5-aza 作用 Jurkat 细胞的状态影响。

Note: A, Jurkat cell status in normal group; B, Effect of low concentration of 5-aza on the state of Jurkat cells;

C, Effect of 5-aza at medium concentration on the state of Jurkat cells; D, Effect of high concentration of 5-aza on state of Jurkat cells.

2.3 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 miR-126 表达的影响

通过 RT-qPCR 检测不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞后 miR-126 的表达情况(表 4)。如图 3-A 所示, 5-aza 干预后 miR-126 表达水平升高($P < 0.05$), 随着浓度升高表达降低, 且在高浓度作用下表达水平与对照组相比明显降低($P < 0.01$)。

2.4 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 mRNA 表达的影响

通过 RT-qPCR 检测低、中、高浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞后 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞因子 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 mRNA 的表达情况(表 5)。如图 3-B-E 所示, 5-aza 干预 T 淋巴细胞后, 在低浓度下, IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 mRNA 的表达增加($P > 0.05$); 随着 5-aza 浓度的升高, IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 mRNA 的表达随之增加($P < 0.05$)。

2.5 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 蛋白表达的影响

通过 Western Blot 检测低、中、高 5-aza 干预 Jurkat 细胞后 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞因子 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 蛋白的表达情况(表 6)。如图 4A-E 所示, IFN- γ 蛋白在 5-aza 作用下表达降低, 随着 5-aza 浓度升高蛋白表达升高($P < 0.05$); GATA3 蛋白在高浓度 5-aza 作用下表达升高($P < 0.05$); ROR- γ 蛋白在 5-aza 作用下表达升高($P < 0.05$), 随着 5-aza 浓度升高蛋白表达降低; Foxp3 蛋白在 5-aza 作用下表达降低($P < 0.05$), 随着 5-aza 浓度升高蛋白表达升高。

2.6 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞比例的影响

通过流式细胞术检测 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的细胞比例

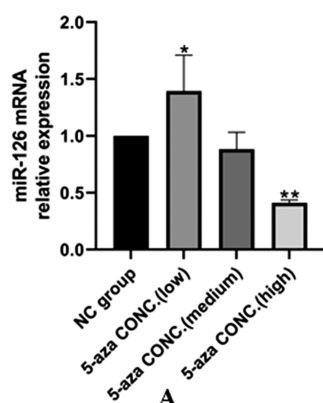


图 3-A 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 miR-126 表达的影响

Fig. 3-A Effects of 5-Aza intervention on miR-126 expression in Jurkat cells

注:miR-126 相对表达量。U6 作为内参,实验重复三次,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; * $P < 0.05$ VS. 对照组, ** $P < 0.01$ VS. 对照组。

Note: Relative expression level of miR-126. U6 was used as the internal reference. The experiment was repeated three times, and the statistical results were expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group.

(表 7)。如图 5A~D 所示,甲基化酶抑制剂干预后,Th1 细胞亚群比例相对于正常组表达下降($P < 0.01$);Th2 细胞亚群在 5-aza 干预后比例升高 ($P < 0.01$);Th17 细胞亚群相对于正常组比例降低($P < 0.05$);Treg 细胞亚群在 5-aza 干预后比例升高,在高浓度时差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

AR 是世界上常见的变应性疾病,全球患病率逐年上升^[11],

影响全球至少 10%~40%成年人和 2%~25%儿童^[12],极大影响人们生活质量并且消耗社会医疗资源^[13]。在 AR 反应中起核心作用的是 CD4⁺T 淋巴细胞,通过活化鼻粘膜中浸润的炎性细胞,激发炎性介质的释放,使患者出现变应性症状。根据 Th0 分泌的细胞因子不同可分为 Th1、Th2、Th17 以及调节性 T 细胞 (Treg)四个亚群。Th1 参与细胞免疫,IFN- γ 作为特异性细胞因子可以调节嗜酸性粒细胞的分化和募集作用,抑制 Th2 类细胞因子产生;本实验中 5-aza 干预 T 淋巴细胞后 Th1 细胞亚群比例降低,IFN- γ 蛋白表达降低,提示甲基化酶抑制剂通过下调 Th1 参与细胞免疫。Th2 参与体液免疫,特异性转录因子 GATA-3 可诱导 Th2 细胞因子 IL-4 的产生,促进 Th2 再生;本实验中 5-aza 作用于 T 淋巴细胞后 Th2 细胞亚群增加, GATA3 mRNA 和蛋白表达增加,提示甲基化酶抑制剂通过上调 Th2 细胞及因子 GATA3 参与细胞免疫。ROR- γ 是 Th17 细胞特异性转录因子,能够促进炎症因子 IL-17 细胞因子表达,从而诱发变应性炎症^[14];本实验中 Th17 细胞亚群比例在 5-aza 干预后呈下降趋势,ROR- γ 的蛋白表达也呈下降趋势,提示甲基化酶抑制剂可通过下调 Th17 细胞表达减少炎症因子的表达。Treg 细胞可抑制 Th0 细胞向 Th2 分化,下调气道变态性炎症反应^[15], Foxp3 是其特异性转录因子,可上调 Th1 细胞因子,在 Treg 细胞中高表达^[16];本实验中 Foxp3 mRNA 和蛋白表达在 5-aza 干预后呈上升趋势,Treg 细胞亚群比例也在甲基化酶抑制剂作用下呈上升趋势,提示甲基化酶抑制剂上调 Treg 细胞及因子 Foxp3 表达。AR 发病的关键在于 Th2>Th1、Th17>Treg 反应,因此,增加 Th1、Treg,减少 Th2、Th17 细胞因子表达可能成为未来治疗 AR 的有效靶点。

表 4 不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞后 miR-126 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 4 miR-126 expression levels in Jurkat cells after 5-aza intervention with different concentrations ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Normal group	5-aza CONC.(low)	5-aza CONC.(medium)	5-aza CONC.(high)
miR-126	1.0415 $\pm$ 0.36948	1.3935 $\pm$ 0.15334*	0.884 $\pm$ 0.11654	0.4176 $\pm$ 0.1908**

Note: * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group, the difference was statistically significant.

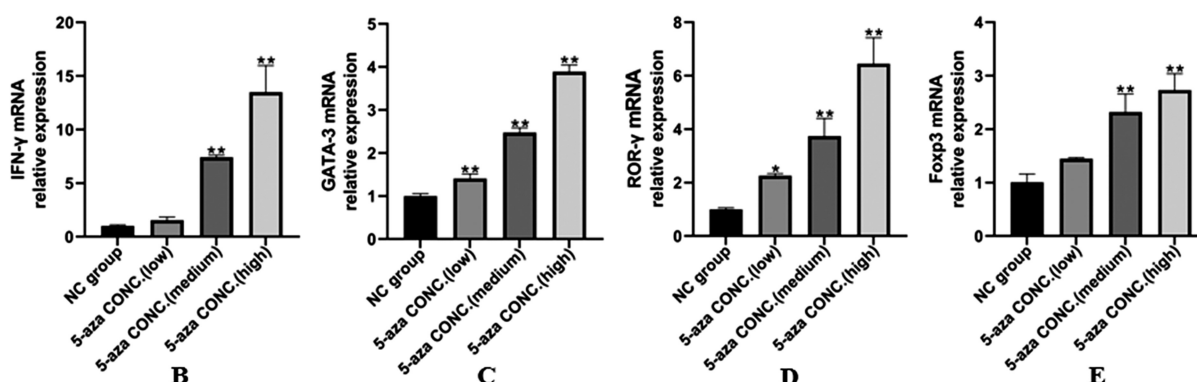
图 3-B~E 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 表达的影响

Fig. 3 B~E Effects of 5-aza on the expression of IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 in Jurkat cells

注:IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 和 Foxp3 mRNA 的相对表达量,GAPDH 作为内参,实验重复三次,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; * $P < 0.05$ VS. 对照组, ** $P < 0.01$ VS. 对照组。

Note: IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 mRNA, relative expression of GAPDH as internal, experiment repeated three times, the statistical results with $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group.

表 5 不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 5 mRNA expression levels of Jurkat cells treated with 5-aza at different concentrations ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Normal group	5-aza CONC.(low)	5-aza CONC.(medium)	5-aza CONC.(high)
IFN- γ	1.00 $\pm$ 0.11	1.54 $\pm$ 0.31	7.43 $\pm$ 0.18**	13.50 $\pm$ 2.47**
GATA3	1.00 $\pm$ 0.06	1.41 $\pm$ 0.10**	2.48 $\pm$ 0.11**	3.89 $\pm$ 0.16**
ROR- γ	1.00 $\pm$ 0.06	2.26 $\pm$ 0.08*	3.74 $\pm$ 0.66**	6.45 $\pm$ 0.697**
Foxp3	1.01 $\pm$ 0.15	1.45 $\pm$ 0.02	2.32 $\pm$ 0.34**	2.73 $\pm$ 0.31**

Note: * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group, the difference was statistically significant.

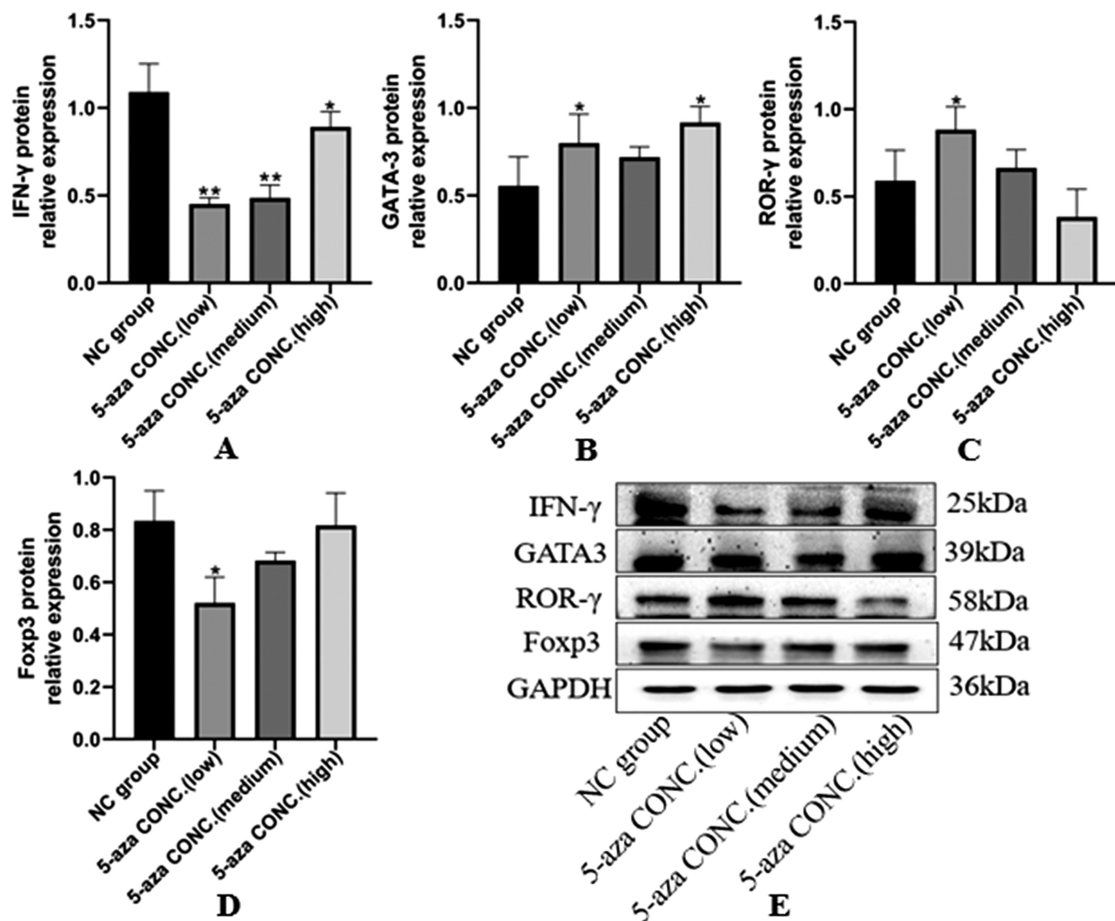


图 4A~E 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 蛋白表达的影响

Fig. 4A~E Effects of 5-aza Interventions on Expression of IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 in Jurkat Cells

注: IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 蛋白相对表达量,内参是 GAPDH,实验重复三次,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示;

* $P < 0.05$ VS. 对照组, ** $P < 0.01$ VS. 对照组。

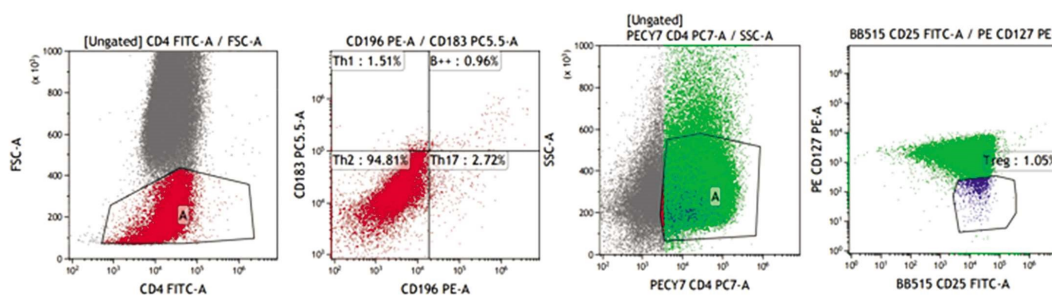
Note: The relative expression levels of IFN- γ , GATA3, ROR- γ and Foxp3 proteins, with GAPDH as the internal reference, were repeated for three times, and the statistical results were expressed as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group.

表 6 不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

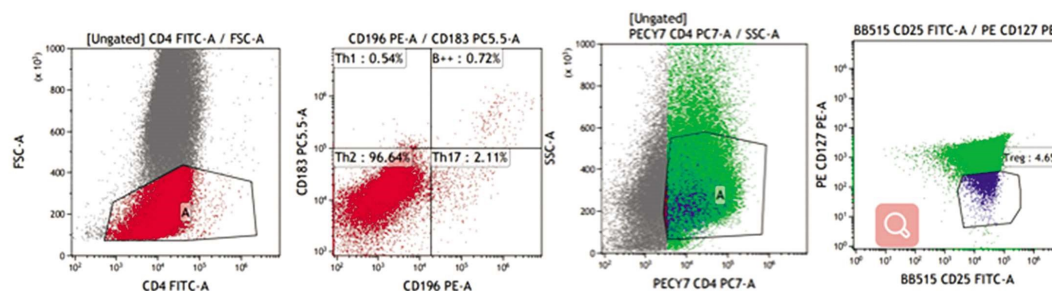
Table 6 Intervention of 5-aza with Different Concentrations on Protein Expression in Jurkat Cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Normal group	5-aza CONC.(low)	5-aza CONC.(medium)	5-aza CONC.(high)
IFN- γ	1.09 $\pm$ 0.16	0.45 $\pm$ 0.04**	0.49 $\pm$ 0.07**	0.89 $\pm$ 0.09*
GATA3	0.56 $\pm$ 0.17	0.80 $\pm$ 0.17*	0.72 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.09*
ROR- γ	0.60 $\pm$ 0.17	0.88 $\pm$ 0.13*	0.67 $\pm$ 0.10	0.38 $\pm$ 0.16
Foxp3	0.84 $\pm$ 0.12	0.52 $\pm$ 0.10*	0.68 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.13

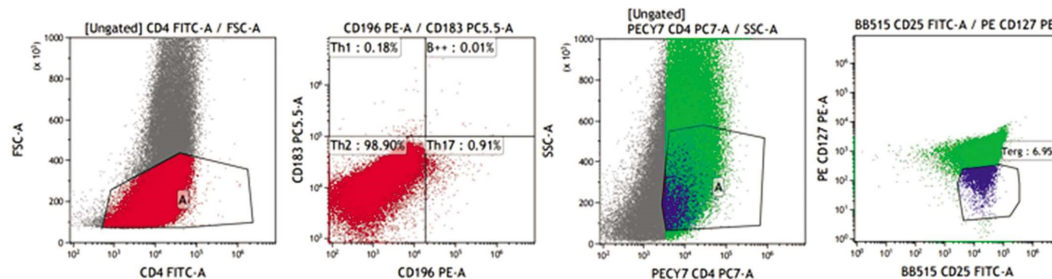
Note: * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group, the difference was statistically significant.



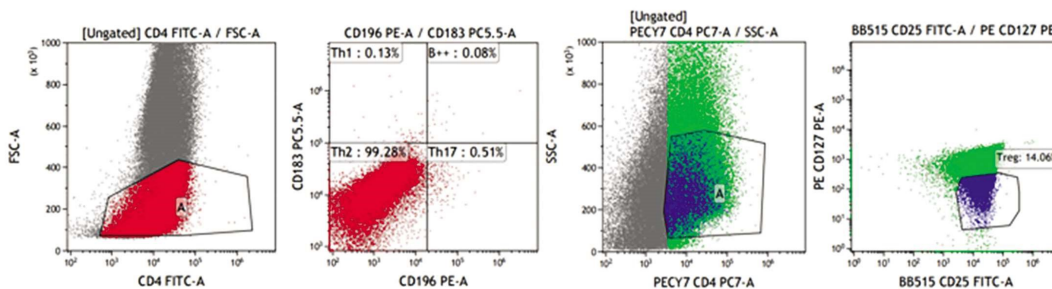
A: Th1/Th2 and Th17/Treg cell ratios in the Normal group



B: Th1/Th2 and Th17/Treg cell ratios in the 5-aza CONC.(low) group



C: Th1/Th2 and Th17/Treg cell ratios in the 5-aza CONC.(medium) group



D: Th1/Th2 and Th17/Treg cell ratios in the 5-aza CONC.(high) group

图 5A~D 5-aza 干预 Jurkat 细胞对 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞比例的影响的影响

Fig. 5A~D Effects of 5-aza Intervention on Th1/Th2 and Th17/Treg Cell Ratios in Jurkat Cells

表 7 不同浓度 5-aza 干预 Jurkat 细胞 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞比例($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 7 Intervention Ratios of Th1/Th2 and Th17/Treg cells in Jurkat cells with different concentrations of 5-aza ($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	Normal group	5-aza CONC.(low)	5-aza CONC.(medium)	5-aza CONC.(high)
Th1	1.77±0.52	0.35±0.04**	0.15±0.04**	0.08±0.17**
Th2	92.35±4.14	96.40±1.72	99.03±0.29**	99.48±0.19**
Th17	4.20±3.19	2.58±1.51	0.83±0.25*	0.35±0.16*
Treg	1.26±0.70	3.47±1.68	6.15±1.61	8.49±5.62*

Note: * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group, the difference was statistically significant.

miRNA 调控和 DNA 甲基化是表观遗传学重要的调控机制。miRNA 是一类 20-25 个核苷酸长的非编码 RNA 小分子，

通过与 RNA 诱导沉默复合体(RISC)结合,调节靶 mRNA3'-UTR 辨别位点,降解或抑制其靶 mRNA 翻译^[17],在整个进化过程中

高度保守^[14,18]。研究表明,miRNA 是 CD4⁺ T 细胞分化的重要调节因子,其缺失影响了 CD4⁺ 单阳性细胞的发育^[19]。miR-126 不仅参与 CD4⁺ T 淋巴细胞发育和功能的调控^[20],也可以通过 PI3K/Akt 通路调控 CD4⁺ Treg 细胞因子 Foxp3 的诱导和功能^[21]; miR-126 在呼吸道感染小鼠肺组织中表达升高^[22]; miR-126 可间接增加 T 细胞中 GATA-3 表达,促进 Th2 反应^[23],在哮喘患者的血清外泌体和哮喘小鼠的肺组织中均有高表达^[24]; miR-126 表达下调可通过负调控 GATA-3 表达减弱 Th2 反应,抑制 Th2 细胞释放炎性介质,改善气道炎症反应和降低气道高反应性^[25,26]。本实验中 5-aza 作用于 Jurkat 细胞后,miR-126 表达降低,相反 GATA3 表达升高,miR-126 与 GATA3 表现出负调控关系,与此前研究一致。同时,miRNA 与 DNA 甲基化调控存在相互作用^[27]。miRNA 表达水平与 DNA 甲基化功能密切相关;DNA 甲基化机制也受到 miRNAs^[28]的翻译后调节。肿瘤患者中 miR-126 甲基化增加导致其表达下降,DNMT1 可以下调肿瘤细胞中 miR-126 的表达^[29];CD4⁺ T 细胞中 miR-126 通过靶向 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1)调控 DNA 甲基化^[30]。本实验中 5-aza 干预 T 淋巴细胞后 miR-126 表达下调,提示甲基化酶抑制剂可以调控 miR-126 的表达。因此,miRNA 与 DNA 甲基化存在相互调控作用,与此前研究一致。

DNA 甲基化是通过 DNA 甲基转移酶(DNMTs)的催化,将甲基基团从 S-腺苷氨酸转移到胞嘧啶残基的第五个碳上,形成 5-甲基胞嘧啶,在不改变 DNA 序列的前提下调控基因表达,产生可遗传性改变^[31]。已有研究表明 DNA 甲基化通过调控 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群因子表达,参与类风湿关节炎早期炎症的发生发展^[32]。此外,Nestor 对 CD4⁺ T 淋巴细胞全基因组进行甲基化分析,发现 DNA 甲基化之间存在差异^[33];Yang 对美国非裔儿童健康对照组和哮喘组进行甲基化表达分析,结果显示 186 个基因 DNA 甲基化产生显著差异^[34];Erlean 对比哮喘和健康患者鼻上皮细胞的 DNA 甲基化表达,发现甲基化存在差异^[35]。AR 存在基因组甲基化状态的改变,高甲基化使得基因转录沉默,低甲基化促进转录发生。本实验中不同浓度甲基化酶抑制剂干预 T 淋巴细胞后,CD4⁺ 细胞因子的 mRNA 和蛋白水平以及 Th 细胞亚群的数目表达发生改变,但 IFN- γ 和 ROR- γ mRNA 和其蛋白表达相反,可能是转录修饰水平上发生了改变。因此,5-aza 作为甲基化酶抑制剂可以调控 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 和 Foxp3 的表达。

综上,甲基化酶抑制剂干预 T 淋巴细胞后,miR-126 表达降低;Th2 和 Treg 细胞亚群比例增多、Th1 和 Th17 细胞亚群比例减少;其细胞因子 IFN- γ 、GATA3、ROR- γ 、Foxp3 的表达受到甲基化酶抑制剂影响。因此,表观遗传下的 miRNA 以及 DNA 甲基化可以作为 AR 和气道敏感反应的有效切入点,有待今后进一步探索。但对于甲基化酶抑制剂的安全浓度以及 miR-126 和 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞亚群因子的调控关系还未阐明,需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] K. Specjalski, E. Jassem. MicroRNAs: Potential Biomarkers and Targets of Therapy in Allergic Diseases?[J]. Arch Immunol Ther Ex, 2019, 67(4): 213-223
- [2] W. Liu, L. Li, Y. Rong, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126 [J]. Acta Biomater, 2020, (103): 196-212
- [3] X. Bi, X. Lv, D. Liu, et al. METTL3-mediated maturation of miR-126-5p promotes ovarian cancer progression via PTEN-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Cancer Gene Ther, 2020
- [4] B. Jiang, Y. Tang, H. Wang, et al. Down-regulation of long non-coding RNA HOTAIR promotes angiogenesis via regulating miR-126/SCEL pathways in burn wound healing[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1): 61
- [5] 许长娣,周瑶,赵德育,等.肺炎支原体肺炎患儿外周血及小鼠模型 miRNAs 差异表达[J].安徽医科大学学报, 2018, 53(04): 567-570
- [6] R.P. Panganiban, K.A. Lambert, M.H. Hsu, et al. Isolation and profiling of plasma microRNAs: Biomarkers for asthma and allergic rhinitis[J]. Methods, 2019, 152: 48-54
- [7] C. Kordella, E. Lamprianidou, I. Kotsianidis. Mechanisms of Action of Hypomethylating Agents: Endogenous Retroelements at the Epicenter [J]. Front Oncol, 2021, 11
- [8] K. Agrawal, V. Das, P. Vyas, et al. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic [J]. Pharmacol Therapeut, 2018, 188: 45-79
- [9] 梁晓鹰,姜孝芳,单彩霞,等.甲基化酶抑制剂对变应性鼻炎大鼠 Th1/Th2 细胞及相关因子的影响 [J]. 国际免疫学杂志, 2021, 44 (01): 35-40
- [10] A. Ramassone, S. Pagotto, A. Veronese, et al. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2)
- [11] K.B. Leth-Moller, T. Skaaby, A. Linneberg. Allergic rhinitis and allergic sensitisation are still increasing among Danish adults [J]. Allergy, 2020, 75(3): 660-668
- [12] Y. Zhang, L. Zhang. Increasing Prevalence of Allergic Rhinitis in China[J]. Allergy Asthma Immun, 2019, 11(2): 156-169
- [13] H.B. Li, S. Chen, L. Cheng, et al. Chinese guideline on sublingual immunotherapy for allergic rhinitis and asthma [J]. Journal of Thoracic Disease, 2019, 11(12): 4936-4950
- [14] Y.H. Jia, Y.Y. Wei. Modulators of MicroRNA Function in the Immune System[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2357
- [15] Y.Y. Luo, Y.Q. Deng, Z.Z. Tao, et al. Regulatory effect of microRNA-135a on the Th1/Th2 imbalance in a murine model of allergic rhinitis [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2014, 8 (4): 1105-1110
- [16] B.S. Park, G.U. Hong, J.Y. Ro. Foxp3 (+)-Treg cells enhanced by repeated low-dose gamma-irradiation attenuate ovalbumin-induced allergic asthma in mice[J]. Radiat Res, 2013, 179(5): 570-83
- [17] Y. Su, B. Sun, X. Gao, et al. Chitosan Hydrogel Doped with PEG-PLA Nanoparticles for the Local Delivery of miRNA-146a to Treat Allergic Rhinitis[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(10): 907
- [18] L.F.R. Gebert, I.J. MacRae. Regulation of microRNA function in animals[J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2019, 20(1): 21-37
- [19] F. Chu, Y. Hu, Y. Zhou, et al. MicroRNA-126 deficiency enhanced the activation and function of CD4 (+)T cells by elevating IRS-1 pathway [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2018, 191(2): 166-179
- [20] Y. Zhang, P.Y. Yang, T. Sun, et al. miR-126 and miR-126*repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit breast cancer metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(3):

- 284-294
- [21] A.D. Qin, Z.K. Wen, Y. Zhou, et al. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4 (+) Foxp3 (+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2013, 17(2): 252-264
- [22] D. Ariel, D. Upadhyay. The role and regulation of microRNAs in asthma[J]. Curr Opin Allergy Cl, 2012, 12(1): 49-52
- [23] R.P. Panganiban, Y.L. Wang, J. Howrylak, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5): 1423-1432
- [24] M. Zhao, Y.P. Li, X.R. Geng, et al. Expression Level of MiRNA-126 in Serum Exosomes of Allergic Asthma Patients and Lung Tissues of Asthmatic Mice[J]. Curr Drug Metab, 2019, 20(10): 799-803
- [25] C. McClure, L. Brudecki, D.A. Ferguson, et al. MicroRNA 21 (miR-21) and miR-181b couple with NFI-A to generate myeloid-derived suppressor cells and promote immunosuppression in late sepsis [J]. Infect Immun, 2014, 82(9): 3816-3825
- [26] O.A. Svitich, V.V. Sobolev, L.V. Gankovskaya, et al. The role of regulatory RNAs (miRNAs) in asthma [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2018, 46(2): 201-205
- [27] A. Fuso, T. Raia, M. Orticello, et al. The complex interplay between DNA methylation and miRNAs in gene expression regulation [J]. Biochimie, 2020, 173: 12-16
- [28] M.R. Karimzadeh, P. Pourdavoud, N. Ehtesham, et al. Regulation of DNA methylation machinery by epi-miRNAs in human cancer: e-merging new targets in cancer therapy [J]. Cancer Gene Therapy, 2020, 28(3-4): 157-174
- [29] S. Gaetani, F. Monaco, F. Alessandrini, et al. Mechanism of miR-222 and miR-126 regulation and its role in asbestos-induced malignancy [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2020, 121: 105700
- [30] S. Zhao, Y. Wang, Y.S. Liang, et al. MicroRNA-126 Regulates DNA Methylation in CD4+T Cells and Contributes to Systemic Lupus Erythematosus by Targeting DNA Methyltransferase 1 [J]. Arthritis Rheum-Us, 2011, 63(5): 1376-1386
- [31] R. Feil, M.F. Fraga. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(2): 97-109
- [32] Q. Wang, P. Wang, H. Zhou, et al. 5-Azacytidine specifically inhibits the NIH-3T3 PCD process induced by TNF-alpha and cycloheximide via affecting BCL-XL[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(2): 1501-1510
- [33] Expression of Concern: Association of FcepsilonR1beta polymorphisms with risk of asthma and allergic rhinitis: Evidence based on 29 case-control studies[J]. Biosci Rep, 2020, 40(7)
- [34] I.V. Yang, B.S. Pedersen, A.H. Liu, et al. The nasal methylome and childhood atopic asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(5): 1478-1488
- [35] P. McErlean, S. Favoreto, Jr., F.F. Costa, et al. Human rhinovirus infection causes different DNA methylation changes in nasal epithelial cells from healthy and asthmatic subjects [J]. BMC Med Genomics, 2014, 7: 37

• 重要信息 •

《现代生物医学进展》2022 年封面设计说明

新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19),简称“新冠肺炎”,是由指 2019 新型冠状病毒感染导致的肺炎。自 2019 年 12 月以来,湖北省武汉市部分医院陆续发现了多例有华南海鲜市场暴露史的不明原因肺炎病例,证实为 2019 新型冠状病毒感染引起的急性呼吸道传染病。截至 2021 年 12 月 27 日 24 时,据 31 个省(自治区、直辖市)和新疆生产建设兵团报告,我国现有确诊病例 2275 例(其中重症病例 12 例),累计治愈出院病例 94575 例,累计死亡病例 4636 例,累计报告确诊病例 101486 例,现有疑似病例 3 例。目前,防治该疾病的手段主要有隔离、接种疫苗和环境消毒,对于患者,目前还有注射新冠单克隆中和抗体这一新措施,《现代生物医学进展》高度关注新冠肺炎防治,继去年以重拳抗击新冠作为封面之后,今年以注射治疗新冠肺炎为寓意,设计了该封面,期盼广大医务、科研工作者能够早日战胜新冠肺炎。

《现代生物医学进展》编辑部