

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.33.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 33-0035-05

临床研究 · 论著

miRNA-185 和 DNA 甲基转移酶 1 在妊娠合并 系统性红斑狼疮患者 T 细胞中的表达及其意义 *

刘恩令¹, 刘铮², 周玉秀³, 李君¹, 张冬红¹, 蔡朝辉¹, 王立群¹, 陈梅¹, 郑寰宇¹

(1. 河北医科大学附属唐山市工人医院 妇产科, 河北 唐山 063000; 2. 天津医科大学
总医院 风湿免疫科, 天津 300052; 3. 河北医科大学附属唐山市工人医院
风湿免疫科, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 探讨 miRNA-185 和 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 在妊娠合并系统性红斑狼疮 (SLE) 患者 T 细胞中的表达及在发病中的作用。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹检测 DNMT1 mRNA 和蛋白的表达, 核转染后 72 h 检测甲基化敏感性基因的水平。并与健康人群比较, 分析其表达差异及意义。**结果** 结果显示, miRNA-185 在妊娠合并 SLE 患者的 CD4⁺T 细胞中上调 ($P < 0.05$), 其过表达与 DNMT1 mRNA 水平呈负相关。在健康人 CD4⁺T 细胞中, miRNA-185 的过表达会导致 DNA 低甲基化、CD11a 和 CD70 基因编码的上调。抑制 SLE 患者的 CD4⁺T 细胞中 miRNA-185 的表达, 会起到 DNA 甲基化逆转作用。**结论** miRNA-185 能靶向作用于 DNMT1, 并导致系统性红斑狼疮患者妊娠期间 CD4⁺T 细胞的 DNA 低甲基化。miRNA-185 可能是 SLE 干预治疗的潜在治疗靶点。

关键词: 系统性红斑狼疮; 妊娠; CD4⁺T 细胞; miRNA-185; DNA 甲基转移酶 1; 表达

中图分类号: R593.24

文献标识码: A

Expression and significance of miRNA-185 in T cells of pregnant patients with systemic lupus erythematosus*

En-ling Liu¹, Zheng Liu², Yu-xiu Zhou³, Jun Li¹, Dong-hong Zhang¹,
Zhao-hui Cai¹, Li-qun Wang¹, Mei Chen¹, Huan-yu Zheng¹

(1. The department of Obstetrics and Gynecology, Tangshan Gongren Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of Rheumatology and Immunology, General Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 3. The department of Rheumatology and Immunology, Tangshan Gongren Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate expression of miRNA-185 and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) in T cells of pregnant patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and potential clinical significance. **Methods** Expression of miRNA-185 and DNMT1 in T cells was measured by qRT-PCR and Western blot. Methylation level of T cells in SLE patients was determined. **Results** Expression of miRNA-185 was upregulated significantly in CD4⁺T cells from patients, which was negatively correlated with DNA methyltransferase 1 (DNMT1) mRNA levels. Overexpression of miRNA-185 in CD4⁺T cells from healthy donors led to the DNA hypomethylation and up-regulation of CD11a and CD70 genes. Inhibition of miRNA-185 expression in CD4⁺T cells from patients with SLE caused reverse effects. Target prediction analysis and dual luciferase reporter assays confirmed that DNMT1

收稿日期: 2017-12-20

* 基金项目: 河北省科技厅重点研究项目 (No: 162777190)

was a direct target of miRNA-185. **Conclusions** This study indicates that miRNA-185 contributes to DNA hypomethylation in CD4⁺T cells of pregnant patients with SLE by targeting DNMT1, which may represent a potential therapeutic target for SLE.

Keywords: systemic lupus erythematosus; pregnancy; CD4⁺T; miRNA-185; DNA methyltransferase 1; expression

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种常发于生育年龄妇女, 影响多个器官的慢性自身免疫性疾病^[1]。SLE 主要在女性群体中发病, 更常见于非洲裔女性^[2]。生育年龄女性妊娠可导致流产、胎死宫内和宫内发育迟缓等, 但经过孕前评估、孕期检测和免疫抑制治疗等措施, 妊娠的结局可明显改善^[3]。遗传, 种族, 激素和环境因素等都会影响到 SLE 的发生发展, 发病机制为一种恶性循环的自身抗原暴露, 产生自身抗体, 导致慢性炎症和组织损伤^[4-6]。越来越多的研究证实, 表观遗传因素, 特别是 CD4⁺T 细胞中异常的 DNA 甲基化模式, 在 SLE 的发展中起着至关重要的作用^[7], 最近的研究表明, miRNA-185 可以直接靶向作用于 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1), 从而导致全基因组甲基化 (Genome DNA methylation, GDM) 的减少和调控胶质瘤细胞中启动子-超甲基化基因的表达^[8]。然而, miRNA-185 如何通过调控 DNMT1 的表达和基因组 DNA 甲基化, 从而影响 SLE 的发生发展的机制尚未有系统的探讨。本研究的主要目的是阐明 miRNA-185 及 DNA 甲基转移酶 1 在 SLE 患者的 T 细胞的表达, 并探讨其意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选择 30 例患有 SLE 的妊娠女性患者为实验组, 平均 (31.90 ± 10.72) 岁。对照组为 30 例健康女性的志愿者, 平均 (31.21 ± 11.40) 岁。对照组与实验组的年龄, 性别和种族等均具有可比性, 且均经河北医科大学附属唐山市工人医院伦理委员会批准和知情同意。所有患者都符合美国风湿病学会的 SLE 分类标准。用 SLE 疾病活动指数 (SLEDAI) 评估 SLE 活性。所有参与者都来自中国汉族人群。合并感染者被排除在研究之外。收集所有受试者外周血样本, 用含有 A 型枸橼酸葡萄糖的采血管采集。

1.2 T 细胞的分离、培养和转染

通过密度梯度离心分离外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 通过磁珠

阳性选择分离法分离 CD4⁺T 细胞, 通过流式细胞术 [平均纯度 (95.5 ± 1.21%)] 进行纯度评估。分离得到的细胞在无血清培养基中培养。转染过程按照试剂盒的说明书进行操作, 使用人 T 细胞 Nucleofector 试剂盒和 Amaxa 核转染技术 (V-24 程序), 用 FAM 标记的 miRNA 瞬时转染 CD4⁺T 细胞。核转染后 48 h 分析 DNMT1 mRNA 和蛋白的表达, 核转染后 72 h 检测甲基化敏感性基因的水平。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测 CD4⁺T 细胞中 miRNA-185 和 DNMT1 基因的表达

使用 Trizol 试剂按照说明书从细胞系中提取总 RNA。使用 PrimeScript RT Master Mix 和 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 试剂盒分别进行 mRNA 和 miRNA 的逆转录和实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)。所有反应都进行 3 组平行试验。通过 U6 和 β -肌动蛋白对 miRNA 进行定量。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对表达水平。引物如下: DNMT1, 正向 5'-CGGTTCTT CCTCCTGGAGAATGTCA-3', 反向 5'-CACTGATAGC CCATGCGGACCA-3'; β -肌动蛋白, 正向 5'-GCACC ACACCTTCTACAATGAGC-3', 反向 5'-GGATAGCACA GCCTGGATAGCAAC-3'。miRNA-185 和 U6 的引物购自上海 Genepharma 公司。

为验证 DNMT1 是否是 miRNA-185 的直接靶标, 构建含有 DNMT1 3'-UTR 中 miRNA-185 的潜在结合位点的萤光素酶报告基因。分成 miRNA-185 模拟物、miRNA-185 抑制剂和阴性对照组, 然后将构建载体与 miRNA-185 模拟物 miRNA-185 抑制剂或阴性对照一起共转染到 CD4⁺T 细胞中, 并在转染后 48 h 测量萤光素酶活性。

1.4 蛋白质印迹检测 miRNA-185 和 DNMT1 蛋白的表达

将细胞在补充有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液中在冰上裂解 30 min。10 000 r/min, 4℃离心 10 min 至裂解液澄清。通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量的蛋白质并通过转移电泳将分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。在含有 0.1% Tween-20 的

Tris 中用 5% (W/V) 脱脂牛奶封闭硝酸纤维素膜。将膜与一抗反应过夜, 与共价结合有 HRP 的二抗在室温条件下反应 1 h。用 ECL 技术观察条带。抗 DNMT1 抗体、抗 CD11a 抗体、抗 CD70 抗体和抗 β -肌动蛋白抗体均购自美国 Abcam 公司。使用 Quantity One 软件定量相对表达水平。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行 t 检验或方差分析, 方差分析的两两比较用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 妊娠合并 SLE 患者的 CD4⁺T 细胞中 miRNA-185 表达与 DNMT1 的相关性

两组患者的 CD4⁺T 细胞中 miRNA-185 表达水平差异有统计学意义 ($t = 3.732, P = 0.0036$), 实验组高

于对照组, 见图 1A。而 DNMT1 的结果正好相反 ($t = 4.016, P = 0.002$), 见图 1B。此外, Pearson 相关分析显示, miRNA-185 的表达量与 DNMT1 表达量呈负相关 ($r = -0.8432, P = 0.0000$), 见图 1C。

2.2 miRNA-185 对 DNMT1 的靶向性

miRNA-185 模拟物组 miRNA-185 表达高于其他两组 ($F = 3.021, P = 0.015$), 见图 2A; miRNA-185 抑制剂组 miRNA-185 表达低于其他两组 ($F = 3.932, P = 0.0027$), 见图 2B。实验结果表明, miRNA-185 能够抑制携带野生型 3'-UTR 的 DNMT1 报告基因载体的活性。蛋白质印迹结果显示, miRNA-185 的过表达会降低 DNMT1 的蛋白水平 ($P < 0.05$), 而敲除 miRNA-185 则促进 DNMT1 蛋白水平的提高 ($P < 0.05$), 见图 2C 和 2D。

2.3 miRNA-185 的表达与全基因组 DNA 甲基化和 CD11a 和 CD70 表达的相关性

经过转染带有 miRNA-185 模拟物或阴性对照的

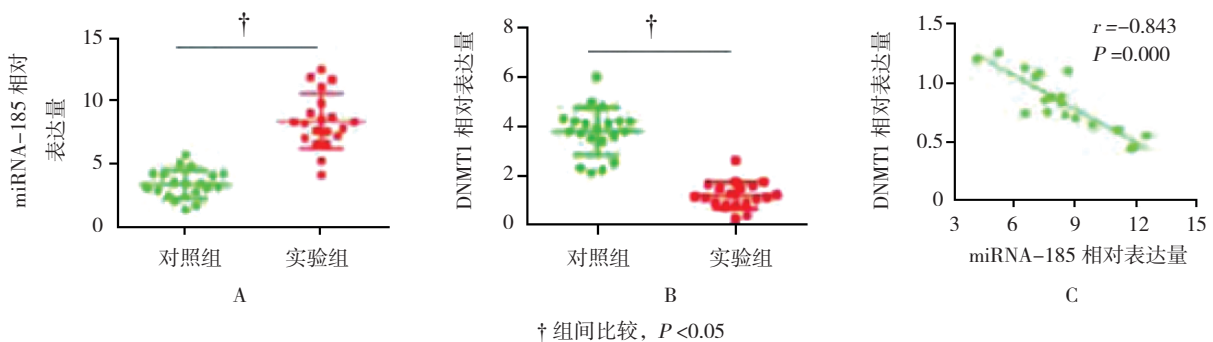


图 1 妊娠合并 SLE 患者的 CD4⁺T 细胞中 miRNA-185 和 DNMT1 mRNA 表达的相关性

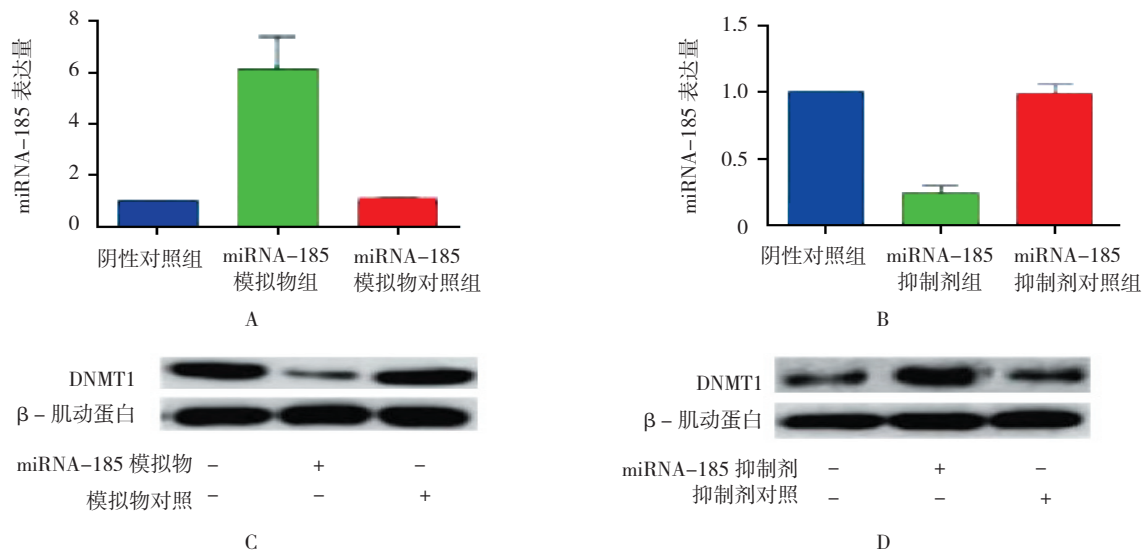


图 2 miRNA-185 对 DNMT1 的靶向性

CD4⁺T 细胞,然后再转染 72 h 后测定 DNA 甲基化水平、CD11a 和 CD70 的 mRNA 和蛋白质水平。如图 3A 所示,miRNA-185 的上调降低全基因组 DNA 甲基化水平,并且增加 CD11a 和 CD70 的 mRNA (见图 3B) 和蛋白质表达水平 (见图 3C)。另外,本研究采用亚硫酸氢

盐测序来确定用 miRNA-185 转染 CD4⁺T 细胞后 CD70 和 CD11a 启动子的甲基化状态,结果发现,CD11a 和 CD70 启动子的甲基化水平降低 (见图 3D),这与两种基因的 mRNA 和蛋白表达增加一致。

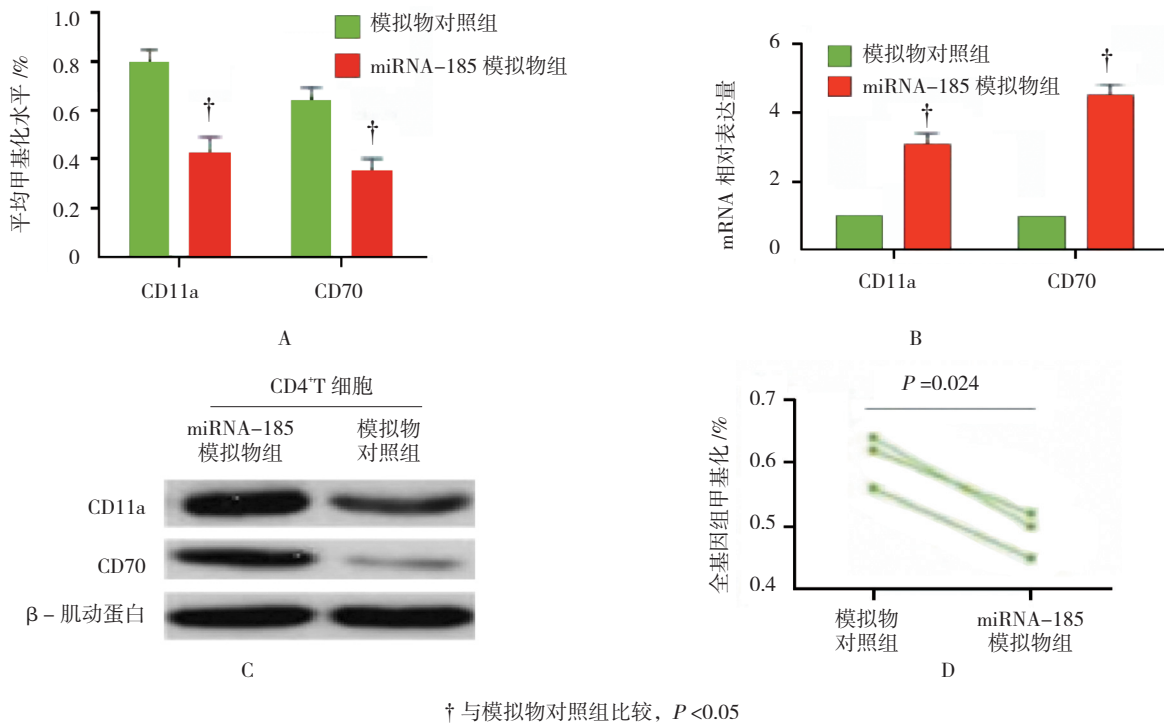


图 3 miRNA-185 的表达与 CD11a 和 CD70 表达的相关性

3 讨论

系统性红斑狼疮是累及多系统、多脏器的自身免疫性疾病,常导致多脏器损伤,而孕期可相互影响,妊娠可加重系统性红斑狼疮,导致脏器损伤加重,而狼疮可导致不良妊娠结局,甚至母婴死亡的危险^[9]。而导致狼疮患者母婴不良结局的机制尚不清楚。DNA 甲基化是染色质结构的基本决定因素,对基因表达具有有效的抑制作用。最近研究表明,T 细胞 DNA 去甲基化在 SLE 的发病机制中起着重要的作用^[10]。用胍苯达嗪、普鲁卡因酰胺、5-氮胞苷 (5-azaC) 等 DNA 甲基化抑制剂处理鼠或人 T 细胞后,可以诱发狼疮样综合征,而停用该药物后,症状逐渐消退^[11-12],证明 T 细胞 DNA 低甲基化可能在 SLE 发病中起作用。DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 是基因组甲基化状态和强度的关键调节因子。目前,已经确定 3 种具有催化活性的 DNMT,即 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B^[13]。DNMT1 是基础性表达基因,在 DNA 复制期间负责 DNA 甲基化的正常进行。本研究通过检测妊娠合并 SLE 患者

的 T 细胞样本,发现 miRNA-185 在 CD4⁺ 细胞中表达上调。从机制上看,miRNA-185 与 SLE 中的 DNA 低甲基化有关,通过直接抑制 DNMT1 的表达参与 SLE 的发病机制。

在本研究中笔者还发现,来自健康对照的 CD4⁺T 细胞中 miRNA-185 的过表达会导致全基因组 DNA 和 CD11a 和 CD70 基因启动子甲基化程度下调,其他相关基因的上调。如果敲除 SLE 患者的 CD4⁺T 细胞中的 miRNA-185,会提高 DNMT1 的表达,可降低甲基化敏感性基因的表达。综合整个实验结果发现,或许可以认为干预 miRNA-185 的表达水平,从而为 SLE 提供有效的干预治疗方案。

总之,妊娠合并 SLE 患者的 CD4⁺T 细胞中 miRNA-185 的表达量增加,并且与 DNMT1 的表达呈负相关,miRNA-185 可直接降低 DNMT1 的表达水平,从而导致 DNA 的低甲基化和甲基化敏感性基因的过度表达,介导 SLE 的发病机制。因此,本研究为 SLE 的干预治疗提供了新的策略,从而为进一步改善此类

患者的预后提供理论依据。

参 考 文 献:

- [1] KHANIUKOV O, YEHUDINA Y, KALASHNYKOVA O, et al. Management of patients with systemic lupus erythematosus in the pre-pregnancy and antenatal periods: challenges and solutions[J]. Georgian Med News, 2018, 280(9): 54-61.
- [2] HIRAKI L T, FELDMAN C H, LIU J, et al. Prevalence, incidence, and demographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis from 2000 to 2004 among children in the US Medicaid beneficiary population[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(8): 2669-2676.
- [3] NAHAL S K, SELMI C, GERSHWIN M E. Safety issues and recommendations for successful pregnancy outcome in systemic lupus erythematosus[J]. J Autoimmun, 2018, 93(9): 16-23.
- [4] MAK A, TAY SH. Environmental factors, toxicants and systemic lupus erythematosus[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(9): 16043-16056.
- [5] REKVIG O P, VAN DER VLAG J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved[J]. Semin Immunopathol, 2014, 36(3): 301-311.
- [6] APARNA M, MARTIN H, LUIS E. MUÑOZ. Clearance deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE[J]. Front Immunol, 2016, 7(8): 35-45.
- [7] BALLESTAR E, ESTELLER M, RICHARDSON BC. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2006, 176(12): 7143-7147.
- [8] ZHANG Z, TANG H, WANG Z, et al. MiR-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma[J]. Mol Cancer, 2011, 10(9): 124-130.
- [9] MING K, GUO S M, SHANG WF, et al. Pregnancy outcomes in Chinese patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a retrospective study of 109 pregnancies[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159364.
- [10] EGGER G, LIANG G, APARICIO A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy[J]. Nature, 2004, 429(6990): 457-463.
- [11] ZHOU Y, LU Q. DNA methylation in T cells from idiopathic lupus and drug-induced lupus patients[J]. Autoimmun Rev, 2008, 7(5): 376-383.
- [12] OELKE K, LU Q, RICHARDSON D, et al. Overexpression of CD70 and overstimulation of IgG synthesis by lupus T cells and T cells treated with DNA methylation inhibitors[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(6): 1850-1860.
- [13] SAWALHA A H. Epigenetics and T-cell immunity[J]. Autoimmunity, 2008, 41(4): 245-252.

(王荣兵 编辑)