

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.02.002

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191216.1549.012.html>(2019-12-17)

MicroRNA-126 通过 IRS-1/AKT/ERK 调控 CD4⁺T 细胞功能的分子机制研究^{*}

胡 燕,王小妹[△]

(湖南中医药大学第一附属医院医学检验与病理中心,长沙 410000)

[摘要] **目的** 利用基因芯片技术和实时荧光定量 PCR 技术,结合 Targets scan 软件和 Western blot 技术,初步探讨微小 RNA-126(miR-126)调控 CD4⁺T 细胞功能的分子机制。**方法** 提取野生型小鼠(对照组)和 miR-126 基因敲减小鼠(miR-126 敲减组)脾淋巴细胞总 RNA,送基因芯片测序,筛选出差异常表达基因;运用 Targets scan 和 miR-Walk 软件预测 miR-126 可能作用的靶分子,经筛选后将胰岛素受体底物-1(IRS-1)作为 miR-126 的靶分子;进一步利用实时荧光定量 PCR 检测两组小鼠脾 CD4⁺CD62L⁺T 细胞中 IRS-1 的水平变化,Western blot 技术检测两组小鼠脾淋巴细胞蛋白激酶 B(AKT)和细胞外调节蛋白激酶(ERK)及其磷酸化水平。**结果** 基因芯片分析筛选出大量差异表达的基因,与对照组比较,IRS-1 的表达上调 2.700 5 倍。Target scan 和 miR-Walk 软件预测 miR-126 可与 IRS-1 的 3'非翻译区(3'UTR)结合,提示 IRS-1 是 miR-126 作用的靶分子。PCR 显示 miR-126 敲减组小鼠 CD4⁺T 细胞中 IRS-1 的表达明显上调($P < 0.05$),Western blot 显示 miR-126 敲减组小鼠 CD4⁺T 细胞中 AKT、ERK 及其磷酸化水平明显增加($P < 0.05$)。**结论** MiR-126 通过 IRS-1/AKT/ERK 信号通路调控 CD4⁺T 细胞的功能。

[关键词] miR-126;基因敲除技术;抗原,CD4;胰岛素受体底物-1

[中图分类号] R392.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)02-0178-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the mechanism of microRNA-126 regulating the function of CD4⁺T cells through IRS-1/AKT/ERK pathways^{*}

HU Yan, WANG Xiaomei[△]

(Center for Medical Laboratory and Pathology, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the underlying mechanism of microRNA-126 (miR-126) regulating the function of CD4⁺T cells by micro-Array, real-time PCR, Targets scan software and Western blot. **Methods** The total RNA of spleen lymphocytes in the wild type mice (the control group) and miR-126 knock-down mice (the miR-126KD group) was extracted and sequenced by NimbleGene expression profiling, and the differentially expressed genes were screened. The target genes of miR-126 were predicted by Targets scan and miR-Walk software. Then insulin receptor substrate-1 (IRS-1) was selected as the target gene of miR-126, and the expression of IRS-1 in CD4⁺T cells of the two groups was detected by real-time PCR. At last, the relative expression of phosphorylation of AKT and ERK in CD4⁺T cells of the two groups was detected by Western blot. **Results** Gene expression profile analysis revealed a large number of differentially expressed genes. Compared with the control group, IRS-1 was up-regulated by 2.700 5 times. Targets scan and miR-Walk software predicted that miR-126 could bind with the 3'-untranslated regions (3'UTR) of IRS-1, suggesting that IRS-1 was the target gene of miR-126. Real-time PCR showed that the expression of IRS-1 of CD4⁺T cells in the miR-126KD group was up-regulated significantly ($P < 0.05$), the phosphorylation of AKT and

^{*} 基金项目:湖南省教育厅项目(13C688)。 作者简介:胡燕(1986—),主管检验师,硕士,主要从事分子免疫学研究。 [△] 通信作者, E-mail:523661992@qq.com。

ERK of CD4⁺ T cells in the miR-126KD group significantly increased by Western blot ($P < 0.05$).

Conclusion MiR-126 can regulate the function of CD4⁺ T cells through IRS-1/AKT/ERK pathways.

[Key words] miR-126; gene knockout techniques; antigens, CD4; insulin receptor substrate-1

微小 RNA(miRNA, miR)-126 是近年来报道的 miRNAs 家族成员之一,其作用受到人们广泛关注。2002 年,LAGOS-QUINTANA 等^[1]首先报道了 miR-126,发现其位于人 9 号染色体 EGFL 基因 7 号内含子中,主要在心血管内皮细胞中高表达。因此,早期关于 miR-126 的研究大多集中于 miR-126 可调控血管发生和心血管疾病等方面。近年来,有文献报道 miR-126 可调控免疫细胞的发育和功能。在特定疾病状态下如急性和慢性布鲁菌感染中,miR-126 在 CD8⁺ T 细胞中明显下调,且与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的传递、细胞因子的分泌及细胞吞噬密切相关^[2]。类似的,在慢性淋巴细胞白血病中,miR-126 在 B 淋巴细胞中低表达,而淋巴细胞低表达 miR-126 则导致 p85 β 基因明显下调,MAPK 信号通路受到抑制,提示 miR-126 参与了慢性淋巴细胞白血病的进展^[3]。而在儿童急性哮喘中,miR-126、白细胞介素(IL)-4 及辅助性 T 细胞(Th)17 细胞的比例明显上升,提示 miR-126 与机体免疫自稳的调节有关^[4]。在前期实验中,本课题组利用 miRNA 海绵体(miRNA-Sponge, miR-Sp)技术建立了 miR-126 基因敲减小鼠模型,发现 miR-126 基因敲减小鼠脾内 CD4⁺ T 细胞的活性明显增强并可促使其向 Th1 细胞分化^[5]。然而 miR-126 影响 CD4⁺ T 细胞功能的分子机制目前并不明确。因此,本课题组利用基因芯片技术和 Targets scan 软件预测并结合 Western blot 技术,探讨 miR-126 调控 CD4⁺ T 细胞功能可能的分子机制,为免疫应答及临床相关疾病发生机制提供前期实验依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

超级清洁级 8~10 周龄野生型小鼠(对照组, $n = 28$)和 miR-126 基因敲减小鼠(miR-126 敲减组, $n = 32$),由广州赛业生物科技有限公司制作提供。

1.1.2 试剂和仪器

细胞培养液 DMEM 购自美国 Hyclone 公司;分析纯级氯仿、异丙醇、无水乙醇、4%多聚甲醛购自重庆川东化工公司;Trizol 购自日本 Takara 公司;聚偏氟乙烯(PVDF)膜、RIPA 裂解液电化学发光(ECL)试剂显色液购自北京天根生化科技有限公司;兔抗鼠细

胞外调节蛋白激酶(ERK)、p-ERK、p-蛋白激酶 B(AKT)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购自英国 Abcam 公司;免疫磁珠分选试剂购自加拿大 STEMCELL 技术公司。激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)、流式仪(美国贝克曼公司)、Western blot 电泳槽。

1.2 方法

1.2.1 基因芯片检测及分析

提取对照组和 miR-126 敲减组小鼠脾淋巴细胞总 RNA,EP 管封存,干冰运输,送至上海康成生物公司进行基因表达谱芯片检测与分析。

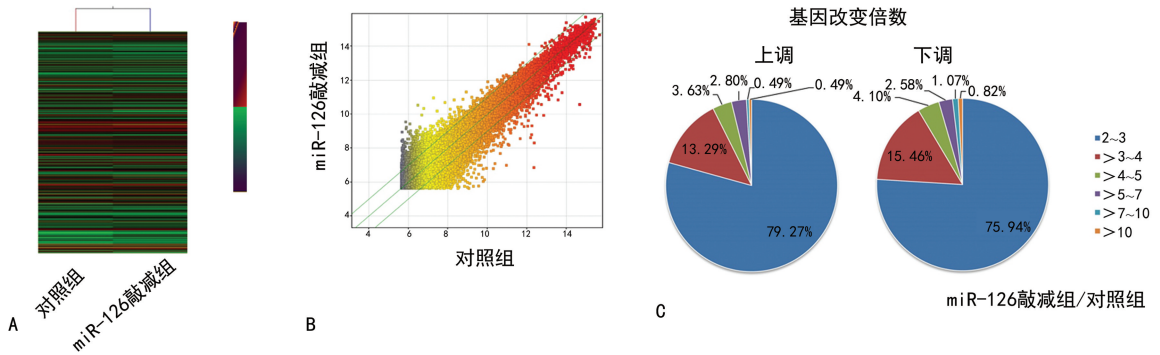
1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)探针法检测胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)的表达

1.2.2.1 脾脏单个核细胞悬液的制备及细胞分选

断颈处死小鼠,75%乙醇浸泡 3 min,无菌条件下取脾脏,加入磷酸盐缓冲液(PBS)10 mL,置于 200 目无菌细胞筛上碾磨,过滤 2 次,1 200 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入 3 mL 红细胞裂解液裂解红细胞,静置 5 min,1 200 r/min 离心 10 min,弃去上清液,PBS 重悬,1 200 r/min 离心 10 min,弃去上清液,重复洗涤 1 次,PBE 重悬细胞。取重悬细胞悬液,每 1×10^7 个细胞加 10 μ L CD4⁺ T 细胞 Biotin-抗体 Cocktail II,混匀,4 $^{\circ}$ C,20 min;加 30 μ L PBE,每 1×10^7 个细胞 20 μ L 抗 Biotin MicroBeads,混匀,4 $^{\circ}$ C,30 min;添加 PBE 至 10 mL,过滤,1 200 r/min 离心 10 min;弃去上清液,弹匀,加 500 μ L PBE(可依细胞数据多加)混匀,加入 LS Column,一次加完,流完后用 PBE 洗 LS Column 2~3 次,收集流出的液体,即为 CD4⁺ T 细胞,1 200 r/min 离心 10 min;弃去上清液,弹匀,每 1×10^7 个细胞加 90 μ L PBE 重悬;每 1×10^7 个细胞加 10 μ L CD62L(L-selectin) MicroBeads,混匀,4 $^{\circ}$ C,30 min;添加 PBE 至 10 mL,1 200 r/min 离心 10 min;弃去上清液,弹匀,每 1×10^8 个细胞加 500 μ L PBE(依细胞数量按比例添加)混匀,加入 MS Column,一次加完,流完后,用 PBE 洗 MS Column 2~3 次,流出的为 CD4⁺ CD62⁻ T 细胞;将 MS Column 置于离心管上,加 2 mL PBE,迅速推动柱芯将 CD4⁺ CD62⁺ T 细胞冲洗下来。

1.2.2.2 总 RNA 的提取

将分选后的 1×10^7 CD4⁺ CD62L⁺ T 细胞加入 1 mL Trizol,反复吸打;再将匀浆样品在室温(15~30 $^{\circ}$ C)放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离;将匀浆



A: 基因表达谱层次聚类图; B: 基因表达谱散点图; C: 基因表达差异饼状图。

图 1 两组 CD4⁺ T 细胞的基因表达差异

样品于 2~8 °C 10 000 r/min 离心 10 min, 取澄清的匀浆液进行下一步操作; 每使用 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 室温放置 3 min; 2~8 °C 10 000 r/min 离心 15 min。样品分为 3 层: 黄色有机相为底层, 无色水相为上层, 以及中间层, RNA 主要在水相中。用异丙醇沉淀水相中的 RNA。每使用 1 mL Trizol 加入 0.5 mL 异丙醇, 室温放置 10 min; 2~8 °C 10 000 r/min 离心 10 min, 离心后在管侧和管底出现胶状沉淀, 弃去上清液; 用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀。每使用 1 mL Trizol 至少加 1 mL 75% 乙醇。2~8 °C 不超过 7 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 室温放置干燥 RNA 沉淀, 5~10 min 即可。加入 25~200 μ L 无 RNase 的水, 用枪头吸打几次, 55~60 °C 放置 10 min 使 RNA 溶解, -80 °C 保存备用。使用 BioMate3S 紫外分光亮度计测定 RNA 浓度和纯度, 紫外透射光下观察并拍照。

1.2.2.3 RT-PCR 检测 IRS-1 表达

免疫磁珠分选两组小鼠脾 CD4⁺ CD62L⁺ T 细胞。一部分细胞的 RNA 进行反转录, 直接用 RT-PCR 法检测 IRS-1 的表达; 另一部分细胞用抗 CD3 (2 μ g/mL) 抗体、抗 CD28 (2 μ g/mL) 抗体、IL-2 (50 IU/mL)、刀豆球蛋白 A (ConA, 5 μ g/mL) 刺激活化, 具体步骤如下: 计数细胞个数, 铺 96 孔板, 保证每孔细胞数目在 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个。准备 2 块 96 孔板, 1 块用抗 CD3 (2 μ g/mL) 抗体包被, 4 °C 过夜, 再加入抗 CD28 (2 μ g/mL)、IL-2 (50 IU/mL); 另 1 块加入 ConA (5 μ g/mL), 都在 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素及 1 mmol/L L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 的培养基中刺激培养, 37 °C 培养 72 h, 并于 72 h 后收集细胞, 用 RT-PCR 法检测 IRS-1 的表达。其中 IRS-1 上游引物: 5'-UTR GGG GTC TGC TAC GGT TTG-3', 下游引物: 5'-GGT ATT GGT CTC ACG GTT-3'。

1.2.3 Western blot 技术

免疫磁珠分选两组小鼠脾 CD4⁺ CD62L⁺ T 细胞, 加入细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, Bradford 法对蛋白定量, 加入适量电泳上样缓冲液, 沸水中加

热 10 min, 在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 半干转移仪转膜 (14 V, 80 min) 至 PVDF 膜上, 以 3% 的 BSA 封闭, 37 °C, 2 h 后, 加入兔抗鼠 ERK、p-ERK、p-AKT、NF- κ B、p-NF- κ B 一抗 (1 : 200), 4 °C 过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。加 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1 : 4 000), 37 °C 反应 1 h。PBST 充分洗膜 3 次, 每次 15 min。用 ECL 试剂对膜进行处理, 再曝光仪拍片记录, 以 GAPDH 为内参, 分析结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 和 GraphPad PrismTM (Graphpad Software Inc) 软件进行数据分析, 计数资料以频数或百分率表示, 比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因表达差异

对照组和 miR-126 敲减组脾淋巴细胞基因表达谱芯片结果显示有大量基因的表达发生改变。在所有上调和下调表达 2 倍以上的 mRNA 中, 上调表达 3 倍以上的占 20.73%, 下调表达 3 倍以上的占 24.06%, 见图 1。

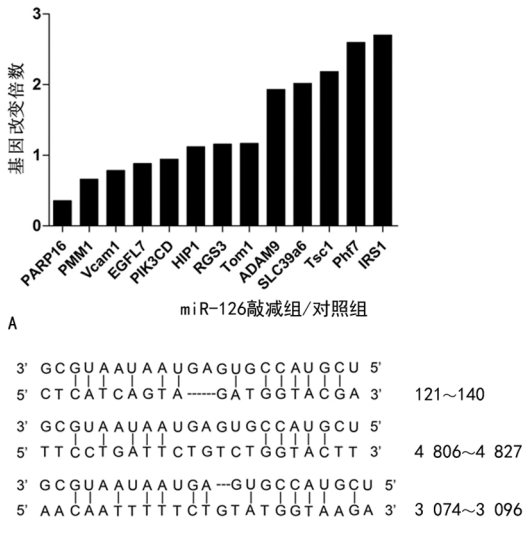
表 1 miR-126 作用的部分靶分子

序列号	靶基因	miR-126 敲减组/对照组
BC014731	PARP16	0.357 2
AK013805	PMM1	0.659 4
AK016465	Vcam1	0.783 3
AK139377	EGFL7	0.881 1
AK149935	PIK3CD	0.942 6
AK220182	HIP1	1.119 8
AF215669	RGS3	1.156 9
AK004063	TOM1	1.167 3
AK161778	ADAM9	1.931 1
BC054780	SLC39a6	2.016 0
AJ271912	TSC1	2.183 0
BC049113	Phf7	2.596 0
AK141842	IRS-1	2.700 5

2.2 筛选 miR-126 拟作用的靶分子

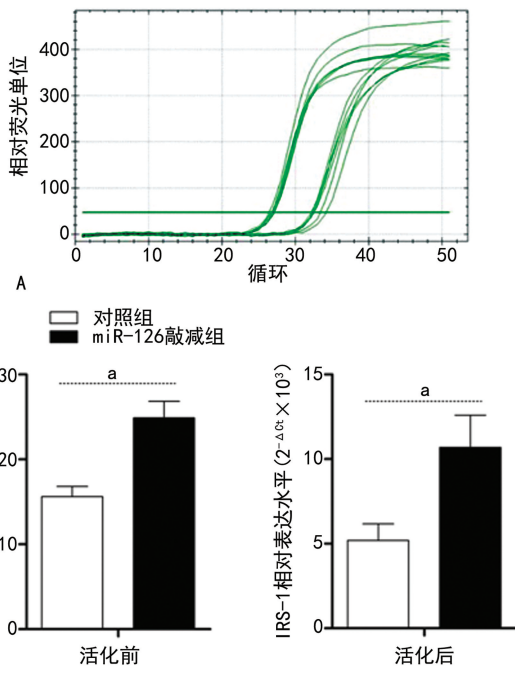
运用 Targets scan 和 miR-Walk 预测 miR-126 的

靶分子,与对照组比较,miR-126 敲减组 IRS-1 表达上调 2.700 5 倍,见表 1。调取鼠 IRS-1 基因序列,使用 Target Scan 软件对其 3'UTR 区与 miR-126 进行序列比对分析,结果发现 miR-126 能与 IRS-1 的 3'非翻译区(3'UTR)结合,结果提示 IRS-1 可能是 miR-126 作用的靶分子,见图 2。



A:靶分子的表达差异柱形图;B:miR-126 与小鼠 IRS-1 3'UTR 结合的位点。

图 2 miR-126 作用的部分靶分子的表达差异



A:IRS-1 的扩增曲线;B:CD4⁺T 细胞活化前和活化后 IRS-1 的相对表达水平柱形图;^a:*P*<0.05。

图 3 miR-126 调控 IRS-1 的表达

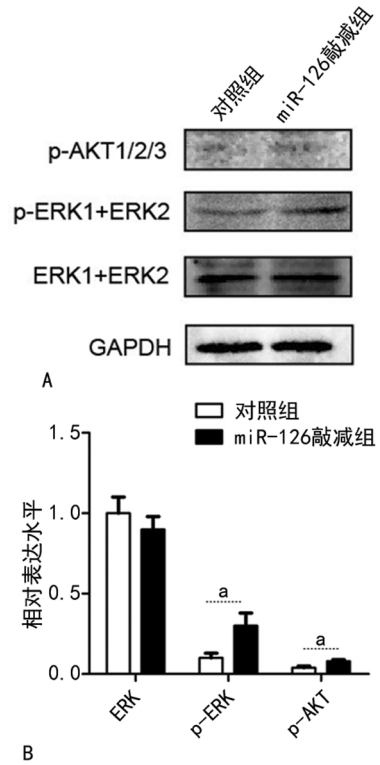
2.3 miR-126 对 IRS-1 表达的调控

分选出两组小鼠脾 CD4⁺T 细胞后,用 PT-PCR 检测 CD4⁺T 细胞 IRS-1 的表达,结果发现 miR-126 敲减组 IRS-1 的表达明显上调,且活化后的 CD4⁺T

细胞 IRS-1 的表达上调更明显(*P*<0.05),见图 3。

2.4 miR-126 敲减后对 AKT 和 ERK 磷酸化水平的影响

用 Western blot 技术检测两组小鼠 CD4⁺T 细胞中 ERK、p-ERK、p-AKT 的水平,结果发现 miR-126 敲减组 p-ERK 和 p-AKT 的表达均明显上调(*P*<0.05),见图 4。



A:Western blot 蛋白条带;B:AKT 和 ERK 及磷酸化水平灰度值的比值柱形图;^a:*P*<0.05。

图 4 miR-126 敲减后对 AKT 和 ERK 及磷酸化水平的影响

3 讨 论

众所周知,AKT、ERK 等信号通路的有效转导对于免疫细胞的发育和功能发挥是必不可缺的,IRS-1 在这些信号传递中充当中介作用^[6-7]。信号传递通过 IRS-1 传到下游的磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)与磷脂酰肌醇 1-激酶、AKT 等酶实现信号转导^[8]。早在 1992 年就有文献报道,在胸腺细胞的发育过程中,IRS-1 参与 AKT 信号通路的调控,进而影响 T 细胞的发育。LYKKEN 等^[9]报道,miR-191 可直接调控 IRS-1 的表达,从而影响 JAK、STAT5 信号通路的传递,进而调控幼稚 T 淋巴细胞、记忆性 T 细胞、调节性 T 细胞的分化。最新研究还发现 IRS-1 在 T 幼淋巴细胞中高表达,改变了 STAT 信号通路的传递,参与了 T 淋巴细胞白血病的进程^[10]。此外,在肥胖诱导的炎症模型中,共培养脂肪细胞和巨噬细胞,IRS-1 和 AKT-1 的磷酸化水平明显增加,提示 IRS-1 可能通过调控 IRS-1 影响 AKT 的信号传递,进而影响巨

噬细胞的功能^[11]。这些研究结果表明,IRS-1 可作用于多种相关信号通路调控免疫细胞的分化和功能。

在前期研究中,本课题组已经证实 miR-126 敲减后明显增强了 CD4⁺ T 细胞的增殖、活化功能,并促使其向 Th1 细胞分化^[5]。本研究进一步发现 miR-126 敲减后,在脾 CD4⁺ T 细胞中 IRS-1 的表达明显上调,AKT/ERK 磷酸化水平明显增加,这提示 miR-126 可通过 IRS-1/AKT 信号通路来调控 CD4⁺ T 的细胞增殖、活化功能。有趣的是,在本课题组近期研究中还发现,在胸腺 CD4⁺ 单阳性细胞的发育过程中,miR-126 敲减后也可通过调控 IRS-1 的表达,影响 ERK 信号传递,进而影响胸腺细胞的分化^[12]。众所周知,IRS-1/AKT/ERK 信号通路的传递对于胸腺 CD4⁺ 单阳性细胞的发育和 T 细胞及 T 细胞亚群的增殖与传代是最佳的、最有利的转导方式^[13]。因此,这两个结论表面看似矛盾,其实并不相悖。且由于 miRNA 分子具有调控靶分子的复杂性、精准性,以及 IRS-1 的精准性和可作用于多种信号通路的复杂性,可共同作用于免疫细胞的分化和功能。然而,miR-126 作用于 CD4⁺ T 细胞的分化和功能的具体分子机制仍待后续研究阐明。

综上所述,本研究显示 miR-126 敲减后可通过上调 IRS-1 的表达,增强 AKT/ERK 信号途径的信号传递,进而增强 CD4⁺ T 细胞的功能,为后续深入研究 miR-126 分子在免疫细胞发育和功能中的调控作用提供了前期实验基础。

参考文献

- [1] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, YALCIN A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(9):735-739.
- [2] BUDAK F, BAL S H, TEZCAN G, et al. MicroRNA expression patterns of CD8⁺ T cells in acute and chronic brucellosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11):e0165138.
- [3] GUINN D, LEHMAN A, FABIAN C, et al. The regulation of tumor-suppressive microRNA, miR-126, in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(4):778-787.
- [4] TIAN M, JI Y, WANG T, et al. Changes in circulating microRNA-126 levels are associated with immune imbalance in children with acute asthma[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2018, 32:2058738418779243.
- [5] 崔盼盼, 胡燕, 陶弋婧, 等. miR-126 敲减增强小鼠 CD4⁺ T 细胞体内活性并促进其向 Th1 细胞分化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(3), 347-351.
- [6] TOMASETTI M, MONACO F, MANZELLA N, et al. MicroRNA-126 induces autophagy by altering cell metabolism in malignant mesothelioma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24):36338-36352.
- [7] ROUIGARI M, DEHBASHI M, GHAEDI K, et al. Targetome analysis revealed involvement of MiR-126 in neurotrophin signaling pathway: a possible role in prevention of glioma development[J]. *Cell J*, 2018, 20(2):150-156.
- [8] FANG S, MA X, GUO S, et al. MicroRNA-126 inhibits cell viability and invasion in a diabetic retinopathy model via targeting IRS-1[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4):4311-4318.
- [9] LYKKEN E A, LI Q J. The microRNA miR-191 supports T cell survival following common γ chain signaling[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(45):23532-23544.
- [10] SHI Z, YU J, SHAO H, et al. Exploring the molecular pathogenesis associated with T-cell prolymphocytic leukemia based on a comprehensive bioinformatics analysis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1):301-307.
- [11] LOPEZ-VAZQUEZ A, GARCIA-BANUELOS J J, GONZALEZ-GARIBAY A S, et al. IRS-1 pY612 and Akt-1/PKB pT308 phosphorylation and antiinflammatory effect of diindolylmethane in adipocytes cocultured with macrophages [J]. *Med Chem*, 2017, 13(8):727-733.
- [12] HU L, XU H, LU J, et al. MicroRNA-126 deficiency affects the development of thymus CD4⁺ single-positive cells through elevating IRS-1[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2018, 177(3):207-218.
- [13] NGUYEN T P, BAZDAR D A, MUDD J C, et al. Interferon- α inhibits CD4 T cell responses to interleukin-7 and interleukin-2 and selectively interferes with Akt signaling[J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97:1139-1146.