

研究论文

过表达miR-498通过下调STAT3抑制类风湿性关节炎患者Th17细胞分化

项海燕¹, 潘峰^{2,*}, 鄢巨振³, 洪理泉², 张腊红², 刘玉华², 冯晓², 蔡成松²

杭州师范大学附属医院¹静配中心; ²医学检验科; ³肾病风湿免疫科, 杭州 310015

摘要: 本文旨在探讨微小RNA-498 (miR-498)影响类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中Th17细胞分化的作用机制。从50例RA患者和50例对照人群中分别收集外周血, 分离PBMCs。流式细胞术检测CD4⁺IL-17⁺ T (Th17)细胞或者CD4⁺ FOXP3⁺ T (Treg)细胞比例, 并分析Th17/Treg比值。Real-time PCR检测细胞中miR-498和STAT3基因表达, Western blot检测STAT3的蛋白表达, ELISA检测外周血血清或细胞上清中IL-17的浓度。荧光素酶报告基因实验验证miR-498靶向结合STAT3的3'非翻译(3'untranslated region, 3'UTR)。miR-498 mimic或和pcDNA-STAT3瞬时转染CD4⁺ T细胞, 进一步考察miR-498影响Th17细胞分化的机制。结果显示, RA患者的PBMCs中, Th17细胞比例显著高于对照, 且Th17/Treg比值也显著高于对照($P < 0.05$)。miR-498低表达而STAT3高表达于RA患者的PBMCs中, 且RA患者血清中的IL-17浓度显著高于对照($P < 0.05$)。在转染野生型STAT3报告基因质粒的细胞中转染miR-498 mimic/inhibitor后, 荧光酶活性、STAT3的基因和蛋白表达均明显改变($P < 0.05$), 但是在转染突变型STAT3报告基因质粒的细胞中转染miR-498 mimic/inhibitor, 上述指标没有显著变化($P > 0.05$)。此外, miR-498 mimic转染CD4⁺ T细胞后, 显著降低Th17细胞比例, 且细胞分泌IL-17的水平减少($P < 0.05$), 而与pcDNA-STAT3共转染CD4⁺ T细胞后, Th17细胞比例明显提高, 细胞分泌IL-17的水平增加($P < 0.05$)。以上结果提示, 在RA患者CD4⁺ T细胞中, 过表达miR-498靶向下调STAT3, 进而抑制Th17细胞分化。

关键词: 微小RNA-498; STAT3; Th17 细胞分化; 类风湿性关节炎

中图分类号: R392; R593

Upregulation of miR-498 suppresses Th17 cell differentiation by targeting STAT3 in rheumatoid arthritis patients

XIANG Hai-Yan¹, PAN Feng^{2,*}, YAN Ju-Zhen³, HONG Li-Quan², ZHANG La-Hong², LIU Yu-Hua², FENG Xiao², CAI Cheng-Song²

¹Pharmacy Intravenous Admixture Service; ²Department of Clinical Laboratory; ³Department of Nephrology and Rheumatology, The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China

Abstract: To investigate the effect and mechanism of miR-498 on Th17 cell differentiation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in rheumatoid arthritis (RA) patients, peripheral blood samples were collected from RA patients and healthy controls, respectively. The proportion of CD4⁺IL-17⁺ T cells (Th17 cells) or CD4⁺FOXP3⁺ T cells (Tregs) in T cells and the Th17/Treg ratio were identified by the flow cytometer. The STAT3 and miR-498 expression were measured by Western blot and real-time PCR, respectively. ELISA was used to detect IL-17 concentrations. Luciferase assay was performed to confirm that miR-498 directly targeted the 3' untranslated region (3'UTR) of STAT3 in CD4⁺ T cells. The effect of miR-498 on Th17 cell differentiation was explored by transfection of miR-498 mimic and/or pcDNA-STAT3 into CD4⁺ T cells. In PBMCs of RA patients, the Th17/CD4⁺ T cell ratio was signifi-

Received 2017-07-20 Accepted 2018-01-22

This work was supported by the Project of Science and Technology Development Plan of Hangzhou City, Zhejiang Province, China (No. 20150733Q17).

*Corresponding author. Tel: +86-571-88358011; E-mail: Panfeng135@163.com

cantly increased, while the Tregs/CD4⁺ T cell ratio was obviously decreased, leading to a higher Th17/Treg ratio. The results showed a reduced miR-498 expression and an increased STAT3 protein expression in PMBCs, and an increased IL-17 concentration in serum of RA patients. In cells transfected with wild-type-STAT3-LU, miR-498 mimic significantly reduced the luciferase activity, STAT3 gene and protein expression, and miR-498 inhibitor had an opposite function. While the miR-498 mimic/inhibitor had no effect on the luciferase activity and STAT3 expression in cells transfected with mutant-STAT3-LU. CD4⁺ T cells transfected with miR-498 mimic had a lower Th17/CD4⁺ T cell ratio and IL-17 concentration, however, transfection of pcDNA-STAT3 reversed the effect of miR-498 mimic on Th17/CD4⁺ T cell ratio and IL-17 concentration. These results suggest that overexpression of miR-498 suppresses Th17 cell differentiation by targeting STAT3 in RA patients.

Key words: miR-498; STAT3; Th17 cell differentiation; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以多关节炎为主要表现的慢性自身免疫性疾病。虽然 RA 的病因和发病机制还不清楚,但目前所知 CD4⁺ T 细胞分化为不同的功能性 Th 细胞亚群,导致机体炎症反应是 RA 发病的中心环节^[1]。Th17 细胞是一种新发现的不同于 Th1、Th2、Treg 细胞的 CD4⁺ T 细胞的独立亚型,以高分泌细胞因子 IL-17 为特征,在机体促炎症反应机制中发挥重要功能,可促进多种自身免疫疾病的发展^[2]。大量研究显示,RA 患者体内存在较高的 Th17 细胞数量,抑制 Th17 细胞分化可减轻 RA^[3,4]。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约为 21~25 个核苷酸的非编码单链小 RNA,参与转录后基因表达调控,成熟的 miRNA 在细胞生长、增殖、分化、凋亡中起重要调节作用。有研究显示,miR-498 在 RA 患者关节积液的 CD4⁺ T 细胞中下调^[5],但是对 Th17 细胞分化的研究尚未见报道。本研究旨在探索 miR-498 在 RA 患者外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PMBCs) 中的表达,并在体外实验进一步探讨 miR-498 影响 Th17 细胞分化可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 外周血样本 本研究经杭州师范大学附属医院伦理委员会批准后,募集健康志愿者和 RA 患者各 50 例,均知情同意。分别无菌抽取新鲜外周血液样本,放置于无热源和内毒素的试管中。一部分用于提取 PMBCs,另一部分离心后收集血清样本保存在 -70 °C 以检测 IL-17 的浓度。

1.2 PMBCs 及 CD4⁺ T 细胞分离 Ficoll-Hypaque 密度梯度法 (Amersham Pharmacia Biotech, 瑞典) 从 50 例 RA 患者和 50 例健康志愿者外周血中分离 PMBCs。细胞经过台盼蓝 (Sigma, 美国) 计数及活

力测定后,只有存活率 > 98% 才可进行下一步实验。获得的 PMBCs 用完全培养基 RPMI-1640 (Gibco, 美国),包含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。CD4⁺ T 细胞从 PMBCs 中分离,利用单克隆抗人 CD4 抗体结合到磁珠 (Miltenyi Biotech, 德国) 进行分离,细胞纯度 > 90%。

1.3 流式细胞术检测 PMBCs (50 例 RA 和 50 例对照) 中 Treg 和 Th17 细胞比例^[6]

Th17 细胞分析:取 PMBCs 悬浮于完全培养基 (含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640),于 37 °C、5% CO₂ 孵育 5 h,然后将细胞与人 APC-anti-CD3 抗体和 FITC-anti-CD4 抗体 (eBioscience, 美国) 孵育,清洗,固定,透性化处理 (Cytotfix/Cytoperm, BD 公司,美国)。最后细胞用 PE-anti-IL-17A 抗体或者同型对照 (PE-IgG1, eBioscience, 美国) 染色。Treg 细胞分析:人 FITC-anti-CD4 单抗和 APC-anti-CD25 单抗与 PMBCs 孵育,清洗,固定,通透后,用 PE-anti-FOXP3 或 PE-IgG2a 抗体染色。CellQuest 软件 (BD, 美国) 对流式细胞仪上的数据进行收集和分析处理。

1.4 Real-time PCR 检测 miR-498 和 STAT3 表达

RNA 抽提试剂盒抽提 PMBCs (50 例 RA 和 50 例对照) 中总 RNA,并将总 RNA 进行反转录为 cDNA。采用 3 步法 PCR 程序,U6 作为内参。引物序列如下:miR-498:上游:5'-TTTCAAGCCAGGGGGCGTTTTTC-3',下游:5'-GCTTCAAGCTCTGGAGGTGCTTTTC-3'; STAT3:上游:5'-GAAGCCGACCCAGGTGC-3',下游:5'-GTCACGTCTC-TGCAGCTTCT-3'。反应结束后确认扩增曲线和熔解曲线,根据 2^{-ΔΔCt} 计算 miR-498 和 STAT3 的相对表达量。

1.5 Western blot 检测 STAT3 表达 细胞裂解液对 PMBCs (50 例 RA 和 50 例对照) 进行裂解,离心后保留上清。采用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,23

V 电压 4 °C 条件下湿转 12 h，脱脂奶粉室温封闭 60 min 后加入 β-actin 一抗或 STAT3 一抗，4 °C 孵育 12 h，TBST 漂洗后加入二抗，室温孵育 1 h，TBST 漂洗后显色，胶片曝光。

1.6 ELISA 检测 IL-17 含量 分离的血清 (50 例 RA 和 50 例对照) 或细胞培养液上清，应用 IL-17 细胞因子的 ELISA 试剂盒 (eBioscience, San Diego, CA, USA) 检测细胞因子的含量，操作过程严格按照说明书进行。

1.7 CD4⁺ T 细胞转染 MiR-498 mimic/inhibitor、pre-NC/NC、pcDNA-STAT3/siRNA-STAT3 和 pcDNA/si-control 转染使用 Lipofectamine™2000 试剂盒。miR-498 mimic/inhibitor 转染患者 CD4⁺ T 细胞方法参照文献^[7]，转染成功后，在 CD4⁺ T 细胞培养基中添加 Th17 分化诱导剂，包含 anti-CD3 抗体 (1 μg/mL)、anti-CD28 抗体 (1 μg/mL)、IL-1β (20 ng/mL)、IL-6 (20 ng/mL)、IL-23 (20 ng/mL)、IFN-α 中和抗体 (2 g/mL) 以及 IL-4 中和抗体 (2 g/mL)，培养 72 h。采用流式细胞术和 ELISA 分别检测 Th17 细胞比例和 IL-17 的分泌。

1.8 荧光素酶实验 将含 miR-498 可能作用靶点 STAT3-3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3'UTR) 和将 miR-498 可能作用靶点突变的 STAT3-3'UTR 连接到荧光素报告质粒上，分别命名为野生型 (STAT3-WT) 和突变型 STAT3 (STAT3-Mut)。将荧光素酶报告载体 (STAT3-WT 和 STAT3-Mut) 分别与 miR-498 mimic 或 inhibitor 共转染 CD4⁺ T 细胞，同时转染海肾荧光素酶质粒，参照 Lipofectamine™2000 说明书。Promega 双荧光素酶活性检测试剂盒检测细胞荧光酶活性。转染后的细胞采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测 STAT3 的基因和蛋白表达。

1.9 统计学处理 数据资料采用 mean ± SD，统计学分析采用 SPSS13.0 进行处理。两两比较采用

非配对独立样本 *t* 检验和卡方检验，3 组及 3 组以上采用的是 ANOVA 分析。以 *P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Th17细胞及Treg细胞在RA患者PBMCs中的比例

采集 RA 患者及正常人的基本信息数据如下表 (表 1)。收集 RA 患者和健康人群的外周血，分离 PBMCs，流式细胞术检测 Th17 细胞及 Treg 细胞在 RA 患者 PBMCs 中的比例。结果显示，RA 患者 PBMC 中 Th17 细胞 (CD4⁺IL-17⁺ T 细胞) 的比例高于正常人 (图 1A, *P* < 0.05)，但是 Treg 细胞 (CD4⁺FOXP3⁺ T 细胞) 的比例低于正常人 (图 1B, *P* < 0.05)。此外，RA 患者体内的 Th17/Treg 比值显著高于正常人 (图 1C, *P* < 0.05)。结果表明，RA 患者体内 Th17 细胞数量及 Th17/Treg 比值显著高于正常人。

2.2 RA患者PBMCs中miR-498和STAT3的表达

Real-time PCR 检测 PBMCs 中的 miR-498 水平，结果显示 miR-498 在 RA 患者 PBMCs 中的表达明显低于对照 (图 2A)。Western blot 检测 PBMCs 中的 STAT3 蛋白水平，结果显示 STAT3 在 RA 患者 PBMCs 中表达明显高于对照 (图 2B)。此外，ELISA 试剂盒检测 RA 患者外周血清中 IL-17 的水平，结果显示 IL-17 在 RA 患者外周血清中的含量高于正常人 (图 2C)。因此，miR-498 在 RA 患者 PBMCs 中表达下调，且和 STAT3 表达相反，同时 RA 患者血清中 IL-17 的含量较高。

2.3 过表达miR-498抑制Th17细胞分化

为了验证 miR-498 对 Th17 细胞分化的影响，我们利用 miR-498 mimic 转染 CD4⁺ T 细胞以过表达细胞中的 miR-498，细胞转染 pre-NC 作为对照组。流式细胞术结果显示，Th17 细胞比例在 miR-498 mimic 转染后明显减少 (图 3A)。IL-17 含量在 miR-

表1. RA患者及正常人的基本信息

Table 1. General information of RA patients and healthy controls

	RA patients (n = 50)	Healthy controls (n = 50)
Age (year)	52.3 (32–71)	51.5 (35–70)
Gender (male/female)	40/10	41/9
Course of disease (year)	9.5 (1–22)	-
RF (positive/negative)	33/17	-
ESR (average) (mm/h)	53.7 (30–78)	8.5 (5–18)
CRP (average) (mg/L)	65.4 (25–147)	3.1 (1–7)
DAS28 (average)	5.9 (4.6–7.0)	-

RF: rheumatoid factor; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C reactive protein; DAS28: 28-joint disease activity score.

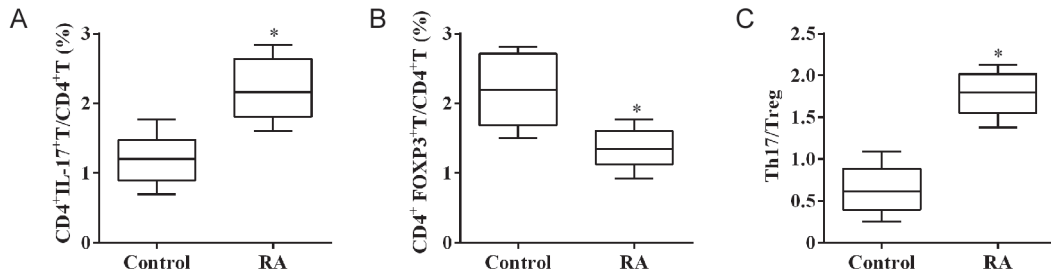


图 1. RA患者PBMCs中Th17细胞和Treg细胞与CD4⁺ T细胞的比例
 Fig. 1. The percentage of Th17 cells or Treg cells in CD4⁺ T cells from PBMCs of RA patients. *A*: The percentage of CD4⁺IL-17⁺ T cells in CD4⁺ T cells isolated from RA patients or healthy volunteers. *B*: The percentage of CD4⁺FOXP3⁺ T cells in CD4⁺ T cells isolated from RA patients or healthy volunteers. *C*: The Th17/Treg ratio in RA patients or healthy volunteers. Mean ± SD, *n* = 50. **P* < 0.05 compared with control group.

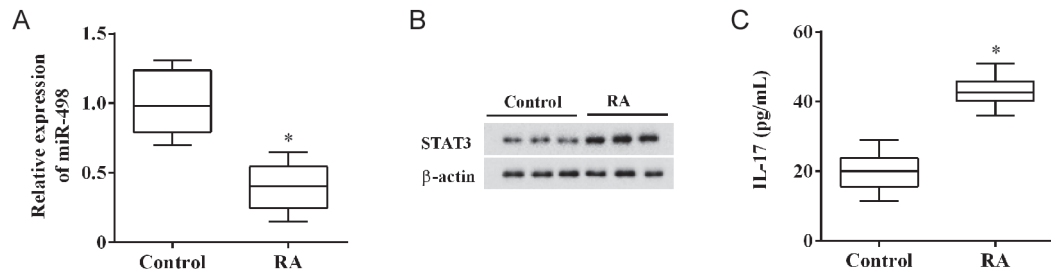


图 2. RA患者PBMCs中miR-498表达降低、STAT3蛋白表达升高且外周血清中IL-17水平升高
 Fig. 2. The downregulated miR-498 expression and upregulated STAT3 in PBMCs as well as an increased IL-17 concentration in serum of RA patients. *A*: The mRNA expression of miR-498 in PBMCs obtained from RA patients or healthy volunteers. *B*: The protein levels of STAT3 in PBMCs obtained from RA patients or healthy volunteers. *C*: The IL-17 concentration in serum obtained from RA patients or healthy volunteers. Mean ± SD, *n* = 50. **P* < 0.05 compared with control group.

498 mimic 转染的细胞上清中也明显低于对照组 (图 3B)。数据结果表明, 过表达 miR-498 抑制 Th17 细胞分化及 IL-17 的分泌。

2.4 验证miR-498靶向STAT3的3'UTR

前面的实验结果显示, miR-498 与 STAT3 的表达相反, 同时我们用生物信息学分析软件 Target-Scan 预测分析发现 miR-498 可以靶向 STAT3 的 3'UTR。因此, 我们构建了 STAT3-WT 和 STAT3-Mut 荧光素酶报告基因质粒 (图 4A), 验证 miR-498 是否靶向 STAT3 的 3'UTR。在 CD4⁺ T 细胞中, 一方面, 过表达 miR-498 (miR-498 mimic) 明显抑制野生型 STAT3 的 3'UTR 区活性, 表现为荧光活性明显低于对照组, 过表达 miR-498 同时还抑制了 STAT3 mRNA 和蛋白的表达, 但是对突变型 STAT3 的 3'UTR 区活性没有影响 (图 4B)。另一方面, 干扰 miR-498 (miR-498 inhibitor) 上调野生型 STAT3 的 3'UTR 区活性, 表现为荧光活性明显高于对照组, 干扰 miR-498 同时上调 STAT3 的 mRNA 和蛋白表

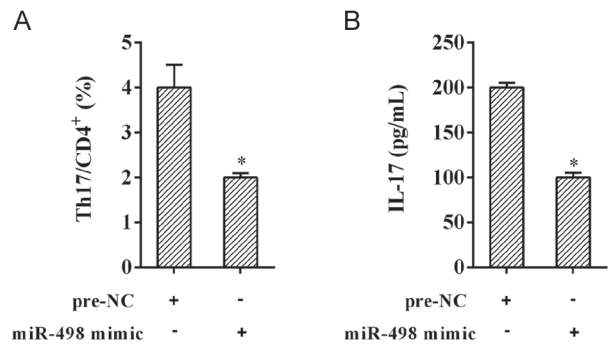


图 3. 过表达miR-498抑制Th17细胞分化
 Fig. 3. Overexpression of miR-498 inhibits Th17 cell differentiation. *A*: The percentage of Th17 cells in CD4⁺ T cells following transfection with pre-NC or miR-498 mimic. *B*: IL-17 levels in CD4⁺ T cells following transfection with pre-NC or miR-498 mimic. Mean ± SD, *n* = 3. **P* < 0.05 compared with pre-NC-transfected cells.

达, 但是对突变型 STAT3 的 3'UTR 区活性依旧没有显著影响 (图 4C)。这些结果说明, 在 CD4⁺ T 细

胞中，miR-498可靶向调节STAT3的表达。

2.5 miR-498通过调节STAT3抑制Th17细胞分化

如前文所述，过表达miR-498可以抑制Th17细胞分化，且miR-498可靶向调节STAT3的表达。据报道，高表达STAT3有利于Th17细胞分化。因此，我们推测过表达miR-498可以通过调节STAT3抑制Th17细胞分化。进一步通过共转miR-498 mimic和pcDNA-STAT3来探索miR-498是否通过调节STAT3抑制Th17细胞分化。如图5A所示，RA患者的CD4⁺T细胞转染miR-498 mimic后，Th17细胞比例明显低于对照组，而共转miR-498 mimic和pcDNA-STAT3后的，该比例明显高于其对照组，

说明过表达STAT3可以逆转过表达miR-498对Th17细胞分化的抑制作用。此外，细胞上清中的IL-17浓度结果显示，在转染miR-498 mimic的细胞中，IL-17浓度低于对照组，而共转miR-498 mimic和pcDNA-STAT3后的，IL-17浓度明显高于其对照组，说明过表达STAT3可以逆转过表达miR-498对IL-17浓度的抑制作用。然而，RA患者的CD4⁺T细胞转染miR-498 inhibitor后，Th17细胞比例明显高于对照组，而共转miR-498 inhibitor和si-STAT3后的，该比例明显低于其对照组，说明干扰STAT3可以逆转miR-498 inhibitor对Th17细胞分化的促进作用。此外，细胞上清中的IL-17浓

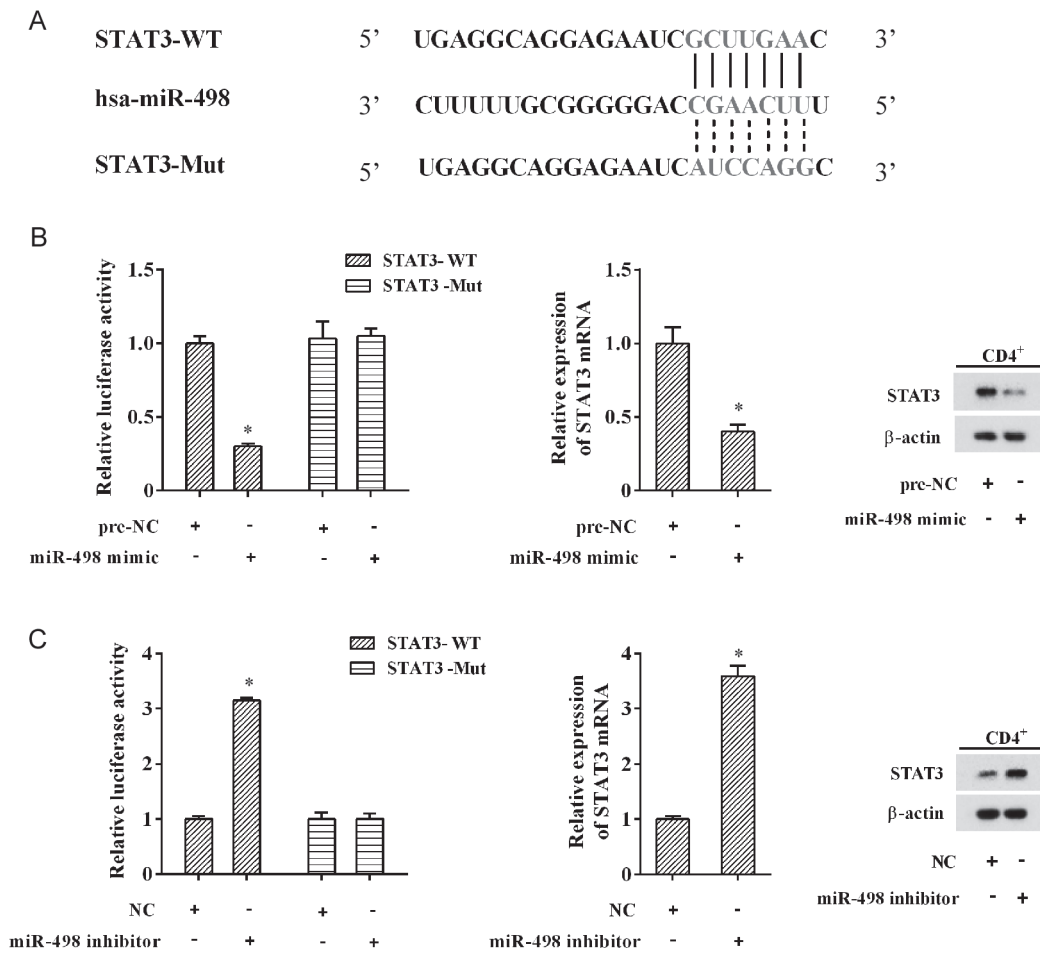


图 4. 验证miR-498对STAT3的调节

Fig. 4. Confirmation of the interaction between miR-498 and STAT3. *A*: Potential binding sites of miR-498 and STAT3 predicted by bioinformatical analysis. *B*: The relative luciferase activity in CD4⁺ T cells co-transfected with miR-498 mimic/pre-NC and vector of WT or mutant STAT3 (STAT3-WT or STAT3-Mut). The mRNA and protein levels of STAT3 in CD4⁺ T cells co-transfected with miR-498 mimic or pre-NC. *C*: The relative luciferase activity in CD4⁺ T cells co-transfected with miR-498 inhibitor/NC and STAT3-WT or STAT3-Mut. The mRNA and protein levels of STAT3 in CD4⁺ T cells co-transfected with miR-498 inhibitor or NC. Mean ± SD, *n* = 3. **P* < 0.05 compared with pre-NC or NC-transfected cells.

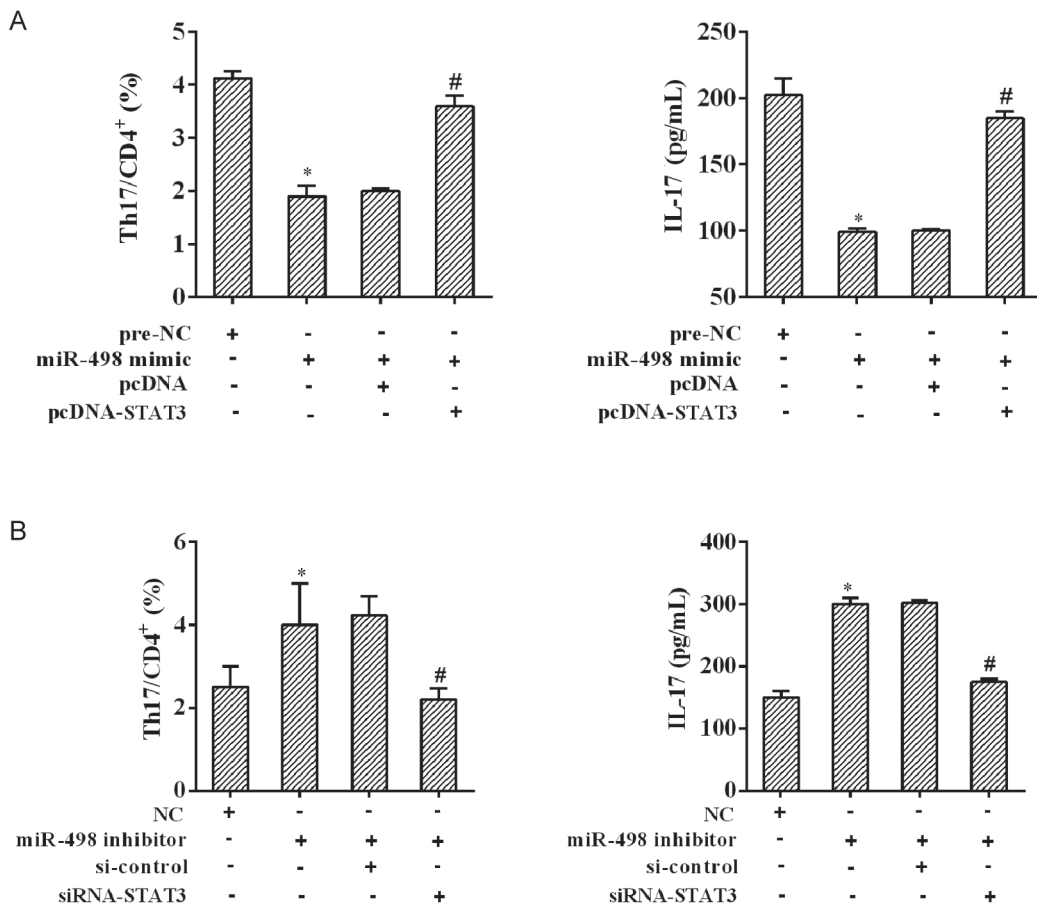


图 5. 过表达miR-498通过STAT3抑制Th17细胞分化

Fig. 5. Overexpression of miR-498 inhibits Th17 cell differentiation via targeting STAT3. *A*: The percentage of Th17 cells in CD4⁺ cells and IL-17 levels following transfection with pre-NC, miR-498 mimic, miR-498 mimic+pcDNA and miR-498 mimic+pcDNA-STAT3. *B*: The percentage of Th17 cells in CD4⁺ cells and IL-17 levels following transfection with NC, miR-498 inhibitor, miR-498 inhibitor+si-control and miR-498 inhibitor+siRNA-STAT3. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ compared with pre-NC or NC-transfected cells; # $P < 0.05$ compared with miR-498 mimic+pcDNA or miR-498 inhibitor+si-control-transfected cells.

度结果显示, 在转染 miR-498 inhibitor 的细胞中, IL-17 浓度高于对照组, 而共转 miR-498 inhibitor 和 si-STAT3 后的, IL-17 浓度明显低于其对照组, 说明干扰 STAT3 可以逆转 miR-498 inhibitor 对 IL-17 浓度的促进作用 (图 5B)。这些结果表明, 过表达 miR-498 可以通过调节 STAT3 抑制 Th17 细胞分化。

3 讨论

RA 是一类常见的病因复杂的自身性免疫疾病^[8]。Th17 细胞是一群分泌 IL-17 的 CD4⁺ T 细胞, 功能上不同于 Th1 细胞和 Th2 细胞。目前认为 Th17 细胞与自身免疫性疾病的发生和发展密切相关。Th17 细胞及其分泌的 IL-17 细胞因子在 RA 的发病过程中有重要的作用^[9]。本研究组前期研究结果显示,

RA 患者体内的树突细胞可诱导 Th17 细胞分化^[7]。Th17/Treg 细胞比例失衡参与 RA 发病机制, RA 患者体内 Th17 和 Treg 细胞表达失衡, Treg 细胞比例降低, Th17 细胞比例升高^[10], 与本文的结果一致 (图 1)。此外, 本研究结果显示, RA 患者外周血血清中 IL-17 的含量高于正常人 (图 2C), 这已被大量文献所证实^[11, 12]。

信号传导与转录激活因子家族 (signal transducers and activators of transcription, STATs) 的成员之一 STAT3, 可被胞外细胞因子、生长因子等多肽类配体激活, 在胚胎的早期发育、皮肤重建、免疫反应等生理过程中发挥重要作用。研究显示, STAT3 对 Th17 细胞分化有着关键的作用, 上调 STAT3 促进 Th17 细胞分化, 下调 STAT3 抑制 Th17 细胞分化^[13, 14]。有

研究报道, miR-20b 通过靶向 STAT3 抑制 Th17 细胞分化^[15]。STAT3 蛋白水平在 RA 患者的 PBMCs 中呈现高表达, 而 miR-498 在 RA 患者的 PBMCs 中呈现低表达(图 2A 和 2B)。通过软件分析, 我们发现 miR-498 可以靶向结合 STAT3 的 3'UTR 区。本研究进一步通过荧光素酶报告基因实验证实了 miR-498 可以靶向 CD4⁺ T 细胞中的 STAT3 (图 4)。

miR-498 是一种抑癌 miRNA, 可调节多种与肿瘤生长、侵袭、转移调节有关的抑癌基因或蛋白, 从而调控多种肿瘤的发生和发展^[16, 17]。有研究报道, miR-498 在 RA 患者关节积液的 CD4⁺ T 细胞中下调^[5], 但是在 RA 患者 PBMCs 分离的 CD4⁺ T 细胞中, 虽然 miR-498 的表达均值低于对照组, 但是二者之间无统计学的显著性差异, 而本研究检测结果与之不一致, miR-498 在 RA 患者的 PBMCs 中呈现低表达, 显著低于对照组(图 2A)。该文献检测了 20 例患者样本和 22 例对照样本, 而本研究检测了各 50 例 RA 患者和对照样本, 其主要原因可能是 miR-498 表达在不同的样本变异较大, 本文通过大量的样本数据证明了 miR-498 在 RA 患者外周血中表达显著下调。接下来, 我们对 CD4⁺ T 细胞进行过表达 miR-498 处理, 即 CD4⁺ T 细胞转染 miR-498 mimic, 结果表明过表达 miR-498 抑制 Th17 细胞分化, 同时减少 IL-17 分泌(图 3)。进一步探索过表达 miR-498 抑制 Th17 细胞分化是否通过调节 STAT3, 我们对 CD4⁺ T 细胞进行共转 miR-498 mimic 和 pcDNA-STAT3, 结果显示, 过表达 STAT3 可以逆转过表达 miR-498 对 Th17 细胞分化的抑制作用和 IL-17 因子分泌(图 5)。

本研究结果显示, miR-498 在 RA 患者的 PBMCs 中低表达, STAT3 高表达, 同时 miR-498 可靶向调节 STAT3。过表达 miR-498 可抑制 Th17 细胞分化和 IL-17 细胞因子分泌, 而过表达 STAT3 可以逆转该抑制作用。综上所述, 本研究表明过表达 miR-498 可以通过靶向 STAT3 抑制 Th17 细胞分化。

参考文献

- 1 Tong Y (仝岩), Ren W, Zhao H, Sun L, Zhao Z. Analysis of CD4⁺ T cell subsets in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志) 2013; 29(8): 854–857 (in Chinese with English abstract).
- 2 Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27(1): 485–517.
- 3 Ye L, Jiang B, Deng J, Du J, Xiong W, Guan Y, Wen Z, Huang K, Huang Z. IL-37 alleviates rheumatoid arthritis by suppressing IL-17 and IL-17-triggering cytokine production and limiting Th17 cell proliferation. *J Immunol* 2015; 194(11): 5110–5119.
- 4 Huang B (黄博), Li J. Research progress on relationship of Th17 cells differentiation regulatory and rheumatoid arthritis. *Acta Med Sin* (华夏医学) 2016; 29(2): 181–184 (in Chinese with English abstract).
- 5 Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, Fang Y, Zhang J, Zhang J, Fu X, Liu H, Lu L, Wu Y. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4⁺ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(3): R81.
- 6 Pan F, Xiang H, Yan J, Hong L, Zhang L, Liu Y, Feng X, Cai C. Dendritic cells from rheumatoid arthritis patient peripheral blood induce Th17 cell differentiation via miR-363/integrin α /TGF- β axis. *Scand J Immunol* 2017; 85(6): 441–449.
- 7 Xuan J, Guo SL, Huang A, Xu HB, Shao M, Yang Y, Wen W. MiR-29a and miR-652 attenuate liver fibrosis by inhibiting the differentiation of CD4⁺ T cells. *Cell Struct Funct* 2017; 42(2): 95–103.
- 8 Mesut O. Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens. *Int J Gen Med* 2013; 6: 383–386.
- 9 Roeleveld DM, Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine* 2015; 74(1): 101–107.
- 10 Dong L, Wang X, Tan J, Li H, Qian W, Chen J, Chen Q, Wang J, Xu W, Tao C. Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Cell Mol Med* 2014; 18(11): 2213–2224.
- 11 Jain M, Attur M, Furer V, Todd J, Ramirez R, Lock M, Lu QA, Abramson SB, Greenberg JD. Increased plasma IL-17F levels in rheumatoid arthritis patients are responsive to methotrexate, anti-TNF, and T cell costimulatory modulation. *Inflammation* 2015; 38(1): 180–186.
- 12 Al-Saadany HM, Hussein MS, Gaber RA, Zaytoun HA. Th-17 cells and serum IL-17 in rheumatoid arthritis patients: Correlation with disease activity and severity. *Egyptian Rheumatologist* 2016; 38(1): 1–7.
- 13 Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007; 282(13): 9358–9363.
- 14 Tripathi SK, Chen Z, Larjo A, Kanduri K, Nousiainen K, T Ä, Ricañoponce I, Hrdlickova B, Tuomela S, Laajala E.

- Genome-wide analysis of STAT3-mediated transcription during early human Th17 cell differentiation. *Cell Rep* 2017; 19(9): 1888–1901.
- 15 Zhu E, Wang X, Zheng B, Wang Q, Hao J, Chen S, Zhao Q, Zhao L, Wu Z, Yin Z. miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting ROR γ t and STAT3. *J Immunol* 2014; 192(12): 5599–5609.
- 16 Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Arias JI, Menéndez P, Andrés-León E, Yanowsky K, Llana-Folgueras A, Miñambres R, Martínez-Delgado B. MicroRNA deregulation in triple negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression. *Oncotarget* 2016; 7(15): 20068–20079.
- 17 Islam F, Gopalan V, Law S, Tang JC, Chan KW, Lam AK. MiR-498 in esophageal squamous cell carcinoma: clinicopathological impacts and functional interactions. *Hum Pathol* 2017; 62: 141–151.