

生理层流剪切力对未成熟树突状细胞 microRNA 表达谱的影响^{*}

董 蓉¹, 薛 慧¹, 杨 晖¹, 龙金华², 胡祖权¹, 张春林³, 姚伟娟⁴, 曾 柱^{1* *}

(1. 贵阳医学院 生物与工程学院 生物技术教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省肿瘤医院 头颈肿瘤科, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院 基础医学院 生物学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 北京大学 基础医学院 血液流变学研究中心, 北京 100083)

[摘 要] 目的: 探讨生理层流剪切力对未成熟树突状细胞(imDCs) microRNA 表达谱的影响。方法: 用锥板剪切系统加载 10 dyn/cm² 的剪切力作用于 imDCs 1 h, 对照组不加载剪切力, 基因芯片技术检测 microRNA 的表达变化并对其结果进行生物信息学分析。结果: 与对照组相比, imDCs 在层流剪切力作用后有 25 个 microRNAs 表达发生变化, 变化倍数 > 1.5, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 生物信息学分析显示这些变化的 microRNA 的靶基因主要参与免疫功能调控和细胞对流体剪切力应答相关的信号通路。结论: 层流剪切力能够影响 imDCs microRNA 的表达谱, 说明物理因素(剪切力)可能参与了机体的免疫功能调控。

[关键词] 树突状细胞; 流体剪切力; microRNA; 基因芯片; 生物信息学; 基因表达谱

[中图分类号] Q6-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)06-0800-05

The Effect of Physiological Laminar Flow-Derived Shear Stress on the microRNA Profiles of Immature Dendritic Cells

DONG Rong¹, XUE Hui¹, YANG Hui¹, LONG Jinhua², HU Zuquan¹,
ZHANG Chunlin³, YAO Weijuan⁴, ZENG Zhu¹

(1. Teaching Division of Bio-technology, School of Biology and Engineering, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Head and Neck Oncology, Guiyang Tumor Hospital, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Teaching Division of Biology, School of Basic Medicine, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Hemorheology Center, School of Basic Medicine, Peking University, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of laminar flow-derived shear stress on the microRNA expression profiles of immature dendritic cells (imDCs). **Methods:** The cultured imDCs were loaded with 10dyn/cm² laminar flow shear stress for 1 h in cone-and-plate device and control group was not loaded. microRNAs were isolated and investigated by genome-wide microarray, and then the results were analyzed with bioinformatics. **Results:** The data showed that the expression levels of 25 microRNAs in imDCs were changed by shear stress (fold change > 1.5, $P < 0.05$). Further analysis with bioinformatics indicated that the target genes were mainly involved in regulation of immune function and the signaling pathway of cellular response to shear stress. **Conclusion:** The microRNA expression profiles of imDCs can be affected by shear stress, which suggests that physical factors (shear stress) may be involved in the regulation of immune response.

[Key words] dendritic cells; laminar flow-derived shear stress; microRNA; genome-wide microarray; bioinformatics; gene expression profile

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金(11162003, 31260227, 31170886); 教育部科学技术研究重点项目(210196); 贵州省优秀青年科技人才支持计划(2011-24); 贵州省社会发展科技攻关项目[黔科合SY字(2011)3065]; 贵州省省长专项基金[黔省专合字(2009)-79]; 贵州省科学技术基金[黔科合J字2008-2274和(2013)2058]; 贵阳市科学技术项目(2010-筑科农合同字第1-社-12); 贵州省留学回国人员科技活动基金(2013-8)

^{**} 通信作者 E-mail: zengzhu100@sina.com

网络出版时间: 2014-11-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20141119.1306.021.html>

多数细胞都具有感知生理水平的流体剪切力并对其进行应答的能力,不同的细胞以不同的方式对流体剪切力作出应答,并产生不同的生物学效应^[1-2]。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是一种特化的抗原提呈细胞,具有强大的抗原摄取和处理能力,能够在二级淋巴组织与幼稚的 T 细胞相互作用并向其呈递抗原,从而诱导适应性免疫应答或耐受。DCs 从功能上可分为未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, imDCs)和成熟树突状细胞(mature dendritic cells, mDCs)^[3]。imDCs 从外周血跨血管内皮迁移到外周组织,在外周组织获取抗原分化成熟并向二级淋巴迁移,任何环节出现功能紊乱都将直接影响免疫应答的结果^[4]。在 DCs 的整个生命过程中,DCs 始终处于来自血流或淋巴流的剪切力(物理因素)的作用下,但 DCs 如何对流体剪切力做出应答及其机理尚不清楚。microRNA(miRNA)是长度为 21~23 个核苷酸的一类非编码 RNA,通过与靶 mRNA 互补结合,降解靶 mRNA 或抑制其转录从而实现其对靶蛋白的转录后调控^[5-7]。microRNA 参与了多种生理过程,在肿瘤的发生发展、免疫细胞的发育分化、抗体产生和炎性介质的释放等过程中发挥重要的作用^[8-11]。在免疫应答启动过程中发挥关键作用的 DCs 的分化、成熟和功能也受到 microRNA 的调控^[12]。本研究主要探索流体剪切力作用后 imDCs 的 microRNA 表达谱的变化,从基因调控水平来探讨 imDCs 对剪切力应答及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

人全基因组基因芯片购于 Affymetrix,检测工作委托上海其名生物有限公司完成。FITC 或 PE 标记的鼠抗人抗体 CD1a、CD11c、CD40、CD80、CD86 和 HLA-DR 购自 Biolegend 公司,重组人粒巨集落刺激因子(Recombinant Human Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor, rhGM-CSF)、重组人白介素-4(Recombinant Human Interleukin 4, rhIL-4)购自 Propertech 公司,Trizol LS 购于 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用淋巴细胞分离液分离健康捐献者的外周血浓缩白细胞获得单个核细胞,经贴壁法获得单核细胞,用含 CD3、CD7、CD19、CD45RA、

CD56 和 IgE 的鸡尾酒抗体的免疫磁珠(Miltenyi Biotec)通过阳性选择去除 T 细胞、NK 细胞、B 细胞、中性粒细胞和树突状细胞等非单核细胞,获得高纯度(95%以上)的 CD14⁺单核细胞。收集 5×10^8 个 CD14⁺单核细胞,分别加入含 5 mg/L rhGM-CSF 和 10 mg/L rhIL-4,终浓度分别为 150 μ g/L、100 μ g/L,在含 20% FBS 的 1640 培养基中诱导培养至第 5 天,收集悬浮细胞即为 imDCs。imDCs 表型用 FITC 或 PE 标记的鼠抗人抗体 CD1a、CD11c、CD40、CD80、CD86 和 HLA-DR 分析其表达量。细胞存活率用台盼蓝染色检测。

1.2.2 细胞处理 获得的 imDCs 自然沉降 1 h,放置于锥板剪切系统,加载 10 dyn/cm² 的剪切力作用 1 h。

1.2.3 RNA 提取 剪切力处理结束后,立即用 Trizol LS 裂解细胞,冰上静置 5 min,加入三氯甲烷,剧烈震荡 15 s,冰上静置 5 min 后,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,将上清移至新的离心管,加入等量的异丙醇,冰上静置 10 min,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,75% 乙醇洗涤,4℃,12 000 r/min 离心 5 min,DEPC (Diethylpyrocar-bonate) 处理水溶解 RNA。凝胶电泳检测 RNA 的完整性,紫外分光光度仪检测 RNA 的纯度。

1.2.4 microRNA 表达谱检测 用 microRNA3.0 (Affymetrix) 检测 microRNA 的表达谱,1 μ g 总 RNA 用 poly(A) polymerase 和 ATP 的作用下给 microRNA 加上 ploy(A),按 Flash Tag Biotin HSR Ligation 标记,将标记好的 microRNA 与芯片杂交,然后洗脱未杂交的分子,把芯片放在 affymetrix 的扫描仪中,然后点击 affymetrix Launcher 中的 AGCCScan Control,点击工具栏中的 Star 进行芯片扫描生成数据。

1.2.5 microRNA 的 qRT-PCR 为验证 microRNA 芯片的结果,本实验选择 2 个 microRNAs ((microRNA-532-3p, microRNA-665) 用实时定量 PCR (qRT-PCR) 鉴定。实验组和对照组分别为 3 次独立重复试验,取 1 μ g 总 RNA 在 poly(A) polymerase(New England Biolab) 和 ATP 的作用下使 microRNA 加上 ploy(A),按照说明书逆转录成 cDNA。SYBR mix (Angilent) 对 cDNA 进行 qPCR 实验,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算 microRNA 的表达变化倍数,U6 作为内参。

1.2.6 microRNA 靶基因预测和富集 Tagetscan 软件预测 MicroRNA 的靶基因,然后用 IncoMAP

进行富集分析。

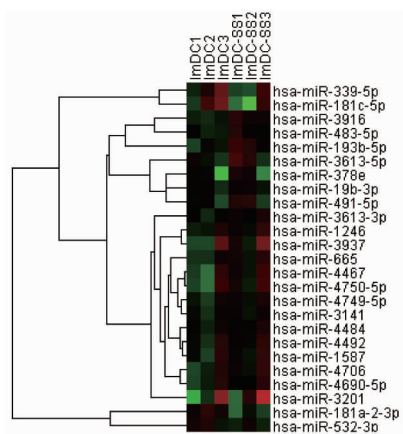
1.3 数据分析

P 值筛选法筛选表达变化的 microRNA 基因, t 检验的 $P < 0.05$ 为表达差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表达变化的 microRNAs

流体剪切力处理 imDCs 后,与未剪切的相比,有 25 个 microRNAs 的表达发生变化,变化倍数 (FC) > 1.5 ,与对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);2 个基因上调,23 个基因下调;变化倍数最大的是 microRNA-4467,FC = 3.85。表达变化的 25 个 microRNAs 的聚类热图见图 1。



imDC:对照组,imDC-ss:剪切力处理组。绿色表示低表达的分子,红色表示高表达,FC > 1.5 , $P < 0.05$

图 1 剪切力处理后表达变化的 microRNAs 聚类热图

Fig. 1 The hot map of differentially expressed miRNAs after induced by shear stress

2.2 RT-qPCR 鉴定表达变化的 microRNA

qRT-PCR 的结果显示 2 个 microRNAs 的变化趋势与 microRNA 芯片的结果一致,如图 2。

2.3 microRNAs 靶基因的预测及富集

用 Targetscan 软件对表达变化的 microRNAs 靶基因进行预测,其靶基因数目超过 3 000 个,然后对这些靶基因进行富集分析。KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路分析发现,这些信号通路主要与免疫应答相关 (例如吞噬、Toll 样受体信号通路,参与的 microRNA 两个以上, $P < 0.05$,图 3a)。GO 功能分析发现这些基因与力学信号转导、细胞跨膜迁移及免疫相关 (例如 GT-Pase 活化等,参与的 microRNA 两个以上, $P < 0.05$,图 3b)。将 microRNAs 参与信号通路的相关

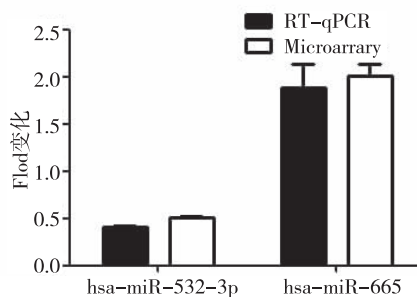


图 2 qRT-PCR 和 microarray 中表达变化的 microRNAs

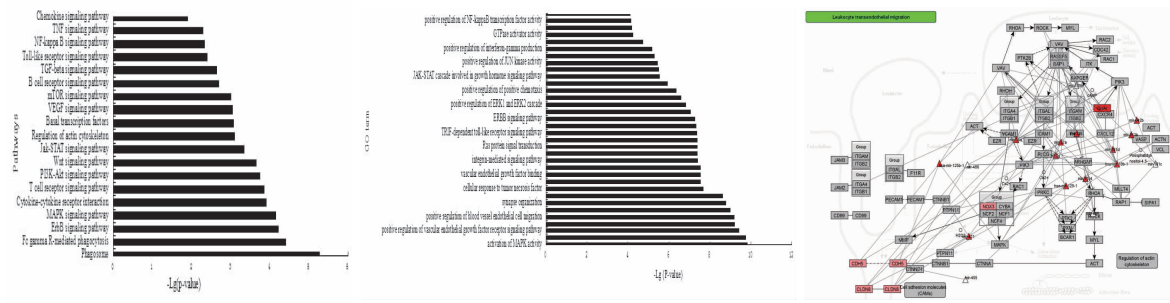
Fig. 2 Differentially expressed miRNAs of microarray and qRT-PCR

的网络图可视化,文中仅展示淋巴细胞迁移相关的信号网络,如图 3c。

3 讨论

大多数细胞都能对流体剪切力作出应答,白细胞对流体剪切力的形态学应答与其他细胞不同。McIntire 课题组首先报道,循环中的白细胞对剪切力主要表现出形态学的变化、中性粒细胞通过回缩伪足来对短时间的生理剪切力产生应答,这一过程直接影响到中性粒细胞的迁移能力^[13-14]。另外,流体剪切力能够影响单核细胞参与的炎症反应过程,并且能够影响其细胞因子的表达^[15-16]。但是,DCs 作为连接固有免疫和适应性免疫的桥梁,其对流体剪切力作出的应答情况目前还是未知的。

microRNA 参与了多种生理过程,在肿瘤的发生发展、免疫细胞的发育分化、抗体产生和炎性介质的释放等过程中发挥重要的作用^[8-11]。有研究发现,microRNA 在细胞对流体剪切力的应答中发挥着重要作用,同时剪切力诱导的 microRNA-663 上调在内皮细胞的炎症反应过程中发挥重要作用,流体剪切力诱导的 microRNA-132 上调能够通过调控 mTOR 信号通路调控细胞的分化^[17-19]。在剪切力作用于白细胞的研究中,剪切力大小和作用时间的选择视研究目的的不同而不同,从 0.75 ~ 10 dyn/cm² 都有报道,0.75 dyn/cm² 作用 15min 能够使 70% 白细胞的跨膜迁移能力增加^[20-21],7.5 ~ 10 dyn/cm² 剪切力作用 30 ~ 60 min 能够活化白细胞的整合素以及改变单核细胞的细胞因子的表达^[22-23]。有研究发现离心能够改变白细胞对流体剪切力做出的应答^[24]。因此,本研究选择 10 dyn/cm² 的剪切力作用于 imDCs 1 h。在整个实验过程中采用自然沉



注:a 为 KEGG 信号通路图,b 为 GO 的功能图,c 为 microRNA 参与的信号通路的网络图(正方形为基因,红色三角形为上调 microRNA,白色的三角形为下调的 microRNA)

图 3 表达变化的 microRNAs KEGG 信号通路分析和 GO 功能分析

Fig. 3 Analysis of KEGG signal pathway and GO function for differentially expressed microRNA

降,避免离心过程对实验结果的影响。

在本研究中,剪切力作用后有 25 个 microRNAs 的表达发生变化,2 个下调,其余的 23 个上调。基因芯片结果的聚类分析发现 microRNAs 的靶基因主要参与调控细胞对外界刺激的应答、细胞骨架、细胞迁移和免疫应答等信号通路等。有学者证实:流体剪切力能够下调 GPCR 的活性,且中性粒细胞的 GPCR 活性可能对流体剪切力较为敏感^[25]。本研究发现了变化的 microRNA-378e、665、491 参与 GPCR 以及其下游的 PI3K 相关的信号通路,并且 microRNA-378e、665、491 参与了细胞骨架的重组,这与流体剪切力能诱导 T 细胞的细胞骨架的重组相符^[26]。另外,上述 microRNAs 还参与细胞迁移(如趋化因子和淋巴细胞跨膜迁移等)、吞噬、细胞因子的分泌,以及 T 细胞活化(通过 NF- κ B、Jak-STAT 和 MAPK 等信号转导通路)等过程。

总之,本研究发现流体剪切力能够诱导 DCs 的 microRNA 的表达变化,涉及 DCs 的多个功能的调控,支持本课题组提出的免疫学学生物学(immu-mechanobiology)或力学免疫学(mechanoimmunology)的观点^[27],这对于深入理解 DCs 的生物学行为和基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗的临床效率来说具有重要意义。

4 参考文献

[1] Chen AK, Latz MI, Sobolewski P, et al. Evidence for the role of G-proteins in flow stimulation of dino flagellate bioluminescence[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007(5):2020-2027.
[2] Fu Y, Hou Y, Fu C, et al. A novel mechanism of gamma/delta T-lymphocyte and endothelial activation by shear

stress: the role of ecto-ATP synthase beta chain[J]. Circ Res, 2011(4):410-417.

[3] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine[J]. Nature, 2007(9):419-426
[4] Benencia F, Sprague L, McGinty J, et al. Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination[J]. J Biomed Biotechnol, 2012(12):425-476.
[5] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, and Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight[J]. Nat Rev Genet, 2008(2):102-114.
[6] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004(2):281-197.
[7] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004(7):522-531.
[8] Homey B. MicroRNA: a new level of immune regulation[J]. Hautarzt, 2007(6):553-554.
[9] Koval'chuk LV, Gankovskaia LV, and Akimova EA. Role of microRNA in regulation of innate immunity mechanisms[J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2009(3):100-104.
[10] Liston A, Linterman M, Lu LF. MicroRNA in the adaptive immune system, in sickness and in health[J]. J Clin Immunol, 2010(3):339-446.
[11] Lu LF, and Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system[J]. Immunology, 2009(3):291-298.
[12] Turner ML, Schnorfeil FM, Brouck T. MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function[J]. J Immunol, 2011(8):3911-3917.
[13] Dewitz TS, Hung TC, Martin RR, et al. Mechanical trauma in leukocytes[J]. J Lab Clin Med, 1977(4):728-736.

- [14] Moazzam F, DeLano FA, Zweifach BW, et al. The leukocyte response to fluid stress[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997(10):5338–5343.
- [15] Pribila JT, Quale AC, Mueller KL, et al. Integrins and T cell-mediated immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2004(22):157–180.
- [16] Shankar JE, Ashlesh KM, Naresh M, et al. Hydrodynamic regulation of monocyte inflammatory response to an intracellular pathogen[J]. *PLoS One*, 2011(1):e14492.
- [17] Shunichi F, Geert WS. Regulation of CD18 expression on neutrophils in response to fluid shear stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003(23):13152–13157.
- [18] Ni CW, Qiu H, Jo H. MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011(5):762–769.
- [19] Qi L, Zhang Y. The microRNA 132 regulates fluid shear stress-induced differentiation in periodontal ligament cells through mTOR signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014(2):433–445.
- [20] Guy C, Vera S, Ronen A. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines[J]. *Nat Immunol*, 2001(6):515–522.
- [21] Michael J. Mitchell, Michael RK. Shear-induced resistance to neutrophil activation via the formyl peptide receptor[J]. *Biophys J*, 2012(8):1804–1814.
- [22] Shankar JE, Ashlesh KM, Naresh M, et al. Hydrodynamic regulation of monocyte inflammatory response to an intracellular pathogen[J]. *PLoS One*, 2011(1):14492.
- [23] Fukuda S, Schmid-Sch? nlein GW. Centrifugation attenuates the fluid shear response of circulating leukocytes[J]. *J Leukoc Biol*, 2002(1):133–139.
- [24] Boon RA, Hergenreider E, Dimmeler S. Atheroprotective mechanisms of shear stress-regulated microRNAs[J]. *Thromb Haemost*, 2012(4):616–620.
- [25] Makino A, Prossnitz ER, B? nemann M, et al. G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006(6):1633–1639.
- [26] Brown WS, Khalili JS, Rodriguez-Cruz TG, et al. Cytoskeletal association in T cell through changes in cell spreading and I-mediated resistance to shear stress B-Raf regulation of integrin $\alpha 4\beta$ [J]. *J Biol Chem*, 2014(33):23141–23531.
- [27] Wang J, L? u D, Mao D, et al. Mechanomics: an emerging field between biology and biomechanics[J]. *Protein & Cell*, 2014(7):518–531.

(2014-09-08 收稿, 2014-10-10 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅

医学名词术语使用规范

名词、术语应统一, 不要一义多词或一词多义。妇产科学、耳鼻咽喉科学、血液病学、呼吸病学、内分泌学、眼科学和外科学的名词已由医学名词审定委员会审定公布, 应严格执行, 其它尚未审定者, 目前以下列 2 个主题词索引为准: (1)《医学主题词注释字顺表中文索引》(中国医学科学院医学信息研究所); (2)《中医药主题词表》(中国中医研究院图书情报研究所)。在这 2 个主题词表中找不到者, 则以人民卫生出版社出版的《英汉医学词汇》、化学工业出版社出版的《药名词汇》和科学出版社出版的各学科名词审定本为准。如“发烧”应改为“发热”, “红血球”应改为“红细胞”, “血色素”应改为“血红蛋白”, “剖腹产术”应改为“剖宫产术”等。国内尚无统一译名的, 参考以上词典慎重拟定, 并在译名后加括号加注外文, 在医学名词审定委员会正式公布后, 应立即严格遵照执行。

《贵阳医学院学报》编辑部