

miR9-2在免疫细胞发育功能中的初步研究

林丹枫 崔东亚 韦剑辉 赵东岳*

(福建师范大学生命科学学院, 福州 350117)

摘要 该研究利用CRISPR/Cas9技术构建miR9-2(microRNA9-2)敲除小鼠, 并通过流式细胞术初步鉴定miR9-2对B细胞和T细胞的影响。通过设计成熟miR9-2(mature miR9-2)序列左右两侧sgRNA1和sgRNA2, 并连接pX459线性化载体。将体外转录后的单链sgRNA1、sgRNA2以及Cas9蛋白共同注射到受精卵的雄原核中, 以获得miR9-2敲除小鼠。通过流式分析, 观察WT(Wild-type)小鼠和杂合子(miR9-2^{+/-})小鼠相关免疫细胞的百分比和细胞数的变化情况。该研究成功构建miR9-2敲除小鼠杂合子模型。流式数据分析表明, 与WT小鼠相比, 杂合子小鼠脾脏中的总B细胞、CD4⁺和CD8⁺ T细胞数均显著下降; 与WT小鼠相比, 杂合子小鼠骨髓中总B细胞数百分比和细胞数均显著下降; 未成熟B(immature B)细胞、祖前B(pro-pre B)细胞、前B(pre B)细胞的百分比和其对应细胞数均显著下降, 而成熟B(mature B)细胞的百分比显著上升, 其细胞数则变化不大。骨髓中, miR9-2^{+/-}小鼠的CD4⁺和CD8⁺ T细胞百分比上升, 而其对应细胞数则变化不大。在胸腺中, 杂合子小鼠的DN(double negative)细胞百分比上升, 其细胞数显著下降; DP(double positive)细胞百分比和细胞数均显著下降; CD4⁺和CD8⁺ T细胞百分比均显著上升, 其细胞数均显著下降。该研究表明, miR9-2的敲除对骨髓中B细胞的发育、胸腺中T细胞的发育以及脾脏中B细胞和T细胞的成熟发育造成了一定程度的影响。

关键词 miR9-2; 基因敲除; CRISPR/Cas9; 免疫细胞; 流式分析

Preliminary Study on the Function of miR9-2 in Immune Cell Development

LIN Danfeng, CUI Dongya, WEI Jianhui, ZHAO Dongyue*

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract This study used CRISPR/Cas9 technique to construct miR9-2 (microRNA9-2) knockout mice, and the effects of miR9-2 on B and T cells were identified by flow cytometry. By designing the sequences of sgRNA1 and sgRNA2 flanking mature miR9-2, and these two sgRNAs was ligated into linearized pX459 vectors respectively. Single-stranded sgRNA1, sgRNA2 *in vitro* transcription and Cas9 proteins were injected into male prokaryotes of fertilized eggs to obtain miR9-2 gene knockout mice. The changes of percentages and cell numbers of related immune cells in WT (Wild-type) mice and heterozygous (miR9-2^{+/-}) mice were observed by flow cytometry. In this research, miR9-2^{+/-} heterozygous mice model was successfully constructed. Flow cytometry analysis showed that the cells number of total B cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in Sp (spleen) of heterozygous mice were all significantly decreased compared with WT mice. Compared with WT mice, the percentage and cell number of total B cells in BM (bone marrow) of heterozygous mice were both significantly decreased; the percentages and cells number of immature B cells, pro-pre B cells and pre B cells all decreased significantly, while the percentage of mature B cells significantly increased, and its cell number were comparable. In BM, the percentages of CD4⁺ and

收稿日期: 2022-07-11 接受日期: 2022-10-19

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81770222)和福建省自然科学基金(批准号: 2020J01174)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-22868214, E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

Received: July 11, 2022 Accepted: October 19, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81770222) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2020J01174)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868214, E-mail: mountain@fjnu.edu.cn

CD8⁺ T cells increased significantly, while their cells number were comparable in miR9-2^{+/-} mice. In Th (thymus), the percentage of DN (double negative) cells increased significantly, and its cell number decreased significantly; the percentage and absolute number of DP (double positive) cells both decreased significantly; the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells increased significantly, while their cells number both decreased significantly. The research indicated that the knockout of miR9-2 affected B cells development in BM, T cells development in Th, and maturation and development of B and T cells in Sp to some extent.

Keywords miR9-2; gene knockout; CRISPR/Cas9; immune cells; flow analysis

miRNAs(microRNAs)是一系列短小、内生的非编码RNA,长度在20~25 bp,最早于1993年在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)体内被发现并命名为*lin-4*^[1]。随后大量的报道表明,miRNA参与了细胞基因调节,包括细胞的增殖、分化以及细胞凋亡^[2]。在细胞核内,DNA双链首先被RNA聚合酶II加工形成pri-miRNAs^[3],而后再经过Drosha/Pasha酶的剪切,形成pre-miRNA^[4]。随后pre-miRNA由XPO5蛋白转运至细胞质中,经过Dicer酶的剪切最终形成成熟的miRNA^[5]。miRNA主要通过与其互补的mRNA序列上的3'端非编码区相结合,以阻止其翻译,从而调控目的基因的表达^[6]。有研究表明,部分miRNAs参与了细胞免疫调节。例如miR-181a对CD4⁺ T细胞的增殖具有调控作用,减少miR-181a的表达量能对CD4⁺ T细胞产生负调控^[7]。YAO等^[8]发现,miR-155通过抑制SOCS1信号转导抑制蛋白1从而促进Th17细胞的分化。

miR-9(microRNA-9)在小鼠上总共有3种不同的亚型,为miR9-1、miR9-2和miR9-3,分别位于3号、13号和7号染色体上^[9],它们成熟的miRNA序列都是一样的,即5'-UCU UUG GUU AUC UAG CUG UAU GA-3',但它们的前体序列有着略微的区别。近几年,miR-9作为一个热门的研究领域,大量文章报道其参与了许多细胞的调节,尤其是脑部神经细胞的发育。有报道指出,在大脑发育的不同时期,miR-9对神经前体细胞既有促进又有抑制作用^[10-11]。在肿瘤方面,有研究表明,在许多癌症病例中,miR-9的表达量通常发生了异常的变化。KUI等^[12]通过对Hodgkin lymphomas病例的研究发现,miR-9对抗肿瘤基因*PRDM1/Blimp-1*起到抑制作用。然而在免疫学方面,目前关于miR9-2在B淋巴细胞或者T淋巴细胞发育功能方面尚未报道,因此本研究拟通过CRISPR/Cas9基因编辑技术,制备miR9-2基因敲除小鼠模型。由于杂合子小鼠(miR9-2^{+/-})无法存活至8周龄以上,

因此无法获得miR9-2^{-/-}敲除小鼠。本研究通过对杂合子小鼠脾脏、骨髓及胸腺中的相关免疫细胞流式分析,确定敲除该基因是否对B细胞和T细胞的成熟发育产生影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、载体、细胞系以及小鼠 大肠杆菌Trans5感受态细胞购于TransGen Biotech全式金公司;pX459质粒购于Addgene公司;pUC19质粒购于宝生物工程(大连)有限公司;L929细胞购于美国ATCC;C57BL/6背景鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,并饲养于福建师范大学实验动物中心(动物使用许可证:SYXK:2015-0004)。动物实验经福建师范大学动物伦理与福利委员会(AEWC)批准(批准文号IACUC-20190033)。

1.1.2 主要试剂 ExTaq酶、DL1000 DNA Marker、T4 DNA Ligase、MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit、MiniBEST DNA Fragment Purification Kit、MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0以及RNase A酶购于宝生物工程(大连)有限公司;EndoFree Plasmid Mini Kit购于江苏康为世纪科技股份有限公司;LB和LA培养基采购于生工生物工程(上海)股份有限公司;T7快速体外转录试剂盒、T7核酸内切酶I、sgRNA体外转录试剂盒和Cas9体外酶切试剂盒均购于北京英盛茂业生物科技有限公司;PBS和DMEM培养基购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Trypsin-EDTA(0.25%)phenol red、Opti-MEM、Lipofectamine[®] 3000 Transfection Reagent以及Puromycin购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司;胎牛血清购于德国PAN-BIOTECH公司;抗体:B220-FITC、CD4-APC、CD8-PE、IgM-APC、CD43-PE、CD25-PE-Cy7均购于美国BD公司。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA的设计 在NCBI上搜索到pre-miR9-2序列,在其mature miR9-2区域设计sgRNA序列(<http://crispr.mit.edu>)。将设计好的sgRNA1和sgRNA2分别进行反向互补,同时在sgRNA1和sgRNA2的正向序列前端加入*Bbs*I酶切位点cacc和*U6*启动子识别位点G,在反向序列前端加入*Bbs*I酶切位点aaac,在尾端加入与G互补的碱基C,分别合成4条引物。引物如表1所示。

1.2.2 重组敲除质粒pX459的构建 使用*Bbs*I酶对pX459进行消化后连接带有*Bbs*I黏性末端的DNA片段,构建重组质粒。利用胶回收试剂盒(MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0)将经过酶切后的带有*Bbs*I黏性末端的pX459载体回收并使用Nanodrop测定质粒的浓度。将合成的sgRNA1和sgRNA2上下游两对引物利用退火反应合成DNA片段。退火程序为:95 °C, 10 min; 以2.5 °C/s的速率,温度从95 °C下降至85 °C; 以0.25 °C/s的速率,温度从85 °C下降至25 °C,然后25 °C持续5 min。待反应结束后,将合成好的两种DNA片段即sgRNA1和sgRNA2分别与经过*Bbs*I酶切回收后的pX459载体相连接,在T4 DNA连接酶的作用下,16 °C过夜连接,构建出重组质粒p-miR9-2-sg1和p-miR9-2-sg2。

1.2.3 重组质粒的转化与测序 将构建好的p-miR9-2-sg1和p-miR9-2-sg2转化至Trans5感受态细胞中,并利用带有Amp^r抗性(终浓度为0.1 mg/mL)的LA平板,筛选出带有重组质粒的细胞。使用无内毒素质粒提取试剂盒对转化后的细胞进行质粒DNA

的提取,取部分质粒送测序公司测序,剩余质粒保存于-20 °C冰箱中。将测序结果和BioEdit软件比对,以确保sgRNA1和sgRNA2已连接在pX459载体上。

1.2.4 重组质粒在细胞水平上的验证 根据Lipo 3000转染试剂盒的说明书,对p-miR9-2-sg1质粒、p-miR9-2-sg2质粒、GFP绿色荧光蛋白质粒以及不带任何质粒的空白组进行转染,37 °C、5% CO₂条件下16 h过夜培养。16 h后将孔板内的培养基替换成带有2%胎牛血清和嘌呤霉素(终浓度为8 g/mL)的DMEM。72 h后镜检观察,当孔板内的大部分细胞死亡,出现单克隆群落时,就可将培养基替换成不带嘌呤霉素的DMEM完全培养基。培养2~3天后,将单克隆细胞株扩增至新的细胞板上继续培养。3天之后,收集细胞,使用MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit提取细胞的基因组DNA。在sgRNA1和sgRNA2序列的两侧设计一对引物序列PCR扩增出DNA条带(序列如表2所示)并通过测序以验证sgRNA1和sgRNA2是否对mature miR9-2对应的PAM位点进行切割。PCR反应程序如下:95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s; 35个循环; 72 °C 5 min延伸完整; 4 °C保存。

1.2.5 T7E1酶切验证 将由miR9-2-UVPF/R引物扩增得到的DNA片段,通过95 °C预变性5 min; 94 °C变性2 s, -0.1 °C/循环的速率(200次)复性; 75 °C, 1 s, -0.1 °C/循环的速率(600次)复性; 16 °C、2 min保存的程序,将DNA片段加热变性和退火复性处理。待反应结束后,加入0.5 μL的T7E1酶,混匀,于37 °C水浴锅酶切1 h,经琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

表1 敲除miR9-2基因的sgRNA引物合成

Table 1 Primer of miR9-2-sgRNA

名称 Names	序列 Sequences
miR9-2-sg1F	5'-cac cGG GGA AGC GAG TTG TTA TCT T-3'
miR9-2-sg1R	5'-aaa cAA GAT AAC AAC TCG CTT CCC C-3'
miR9-2-sg2F	5'-cac cGC GAA AGT AAA AAC TCC TTC A-3'
miR9-2-sg2R	5'-aaa cTG AAG GAG TTT TTA CTT TCG C-3'

表2 敲除miR9-2基因验证引物

Table 2 Verification primers of miR9-2 gene knockout

名称 Names	序列 Sequences	长度 Length /bp
miR9-2-UVPF	5'-GGA GAT TAC TTG CTG GAA GGG GAA-3'	681
miR9-2-UVPR	5'-GCC TCA GAT AGG AAC AGC CCA AAT-3'	

表3 T7体外转录sgRNA引物
Table 3 Primer of T7-miR9-2-sgRNA

名称 Names	序列 Sequences
T7-miR9-2-sg1-F	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG AAG CGA GTT GTT ATC TT-3'
T7-miR9-2-sg2-F	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGA AAG TAA AAA CTC CTT CA-3'
tracr RNA-R	5'-AGC ACC GAC TCG GTG CCA CTT-3'

1.2.6 Cas9蛋白体外切割验证 利用重组质粒p-miR9-2-sg1和p-miR9-2-sg2为制备RNA转录的模板,以T7 RNA聚合酶启动子序列(TAA TAC GAC TCA CTA TAG)+sgRNA1/sgRNA2正向序列为上游引物,下游引物则是tracr RNA-R序列(表3),先PCR扩增出转录模板DNA。随后利用T7体外转录试剂盒说明将扩增出的转录模板DNA进行sgRNA体外转录。使用Cas9体外酶切试剂盒,按照说明书的方法,将扩增出的底物DNA分别与转录出的sgRNA1和sgRNA2进行体外酶切反应。酶切反应结束后,在实验组和对照组的反应液中加入5 mL的3 mol/L醋酸钠,充分混匀后加入50 mL酚氯仿异戊醇,用枪头混匀后再离心,将上清液转移至新的EP管中,再加入100 mL的无水乙醇上下轻轻颠倒混匀。离心后弃掉上清液,加入70%乙醇,洗涤沉淀物。离心1 min,弃上清液后,打开盖子,于室温下晾干10 min,加入20 mL DDW溶解。最后用凝胶电泳检测切割条带。

1.2.7 miR9-2基因敲除小鼠的构建 将转录后的sgRNA1、sgRNA2和Cas9蛋白共同显微注射到受精卵雄原核中。将受精卵孵育24 h后,再移植到代孕母鼠中。此部分工作由福建师范大学南方生物医学研究中心——实验动物中心的工作人员完成。

1.2.8 小鼠基因型的鉴定 当小鼠出生3周以后,打耳标剪鼠尾和消化鼠尾。利用miR9-2-UVPF/R引物PCR扩增出目的DNA条带,将条带送去测序。将测序结果为后双峰的DNA条带进一步通过TA克隆连接至pUC19载体上,并通过带Amp^r抗性的LA平板,筛选出含有已连接目的条带的重组质粒*E. coli*,同时摇菌测序。随后用BioEdit对测序结果分析,以确定是否得到miR9-2基因敲除小鼠。

1.2.9 小鼠脾脏、骨髓和胸腺单细胞悬液的配置 利用脱颈椎的方法处死杂合子小鼠和WT小鼠,摘取小鼠体内的脾脏和胸腺。将脾脏和胸腺分别置于70 μm孔径大小的细胞筛上,用5 mL注射器的橡胶塞头充分研磨脾脏(spleen, Sp)和胸腺(thymus, Th),

用Tip头吸取少量的WBS(wash buffer solution, 含2%血清的PBS)冲洗橡胶塞头和细胞筛,将冲洗下的细胞收集在50 mL离心管内。将收集到的脾脏和胸腺细胞离心弃上清液后,加入5 mL的红细胞裂解液,并用枪头轻轻吹吸细胞,静置裂解3 min。而后加入15 mL的WBS终止裂解,离心弃上清。用5 mL的WBS重悬裂解后的细胞,制成细胞悬液,置于冰上待用。取小鼠的两条后腿,将腿肉剔除干净。用眼科剪将骨头两端各剪开一个开口,将含有10 mL WBS溶液的注射器针头插入骨头开口处,匀速推动注射器的橡胶塞,用WBS溶液冲洗骨髓(bone marrow, BM),同时用50 mL离心管收集从骨头另一端流出的细胞悬液。待WBS冲洗骨头直至无明显骨髓残留后,将收集到的骨髓细胞离心弃上清液,加入红细胞裂解液裂红3 min,并加入15 mL WBS终止裂解。最后用5 mL WBS重悬骨髓细胞,并置于冰上冷藏待用。

1.2.10 流式分析 取EP管,加入适量的WBS,按照表4的方案配置相应的抗体,抗体与WBS的配置比例为1:400。将配置好的抗体用旋涡振荡仪混匀后,置于4 °C冰箱保存留用。取含有1×10⁶个细胞的细胞悬液置于流式管中,离心弃掉上清液,加入配置好的抗体100 μL,并重悬细胞,在4 °C冰箱里避光染色30 min。染色结束后,加入1 mL的WBS溶液,离心洗去多余的未结合上的抗体。再加入300 μL WBS,用旋涡振荡器重悬细胞,4 °C冰箱保存待上机。待上机结束后使用FlowJo(V10.6.2)软件对数据分析。

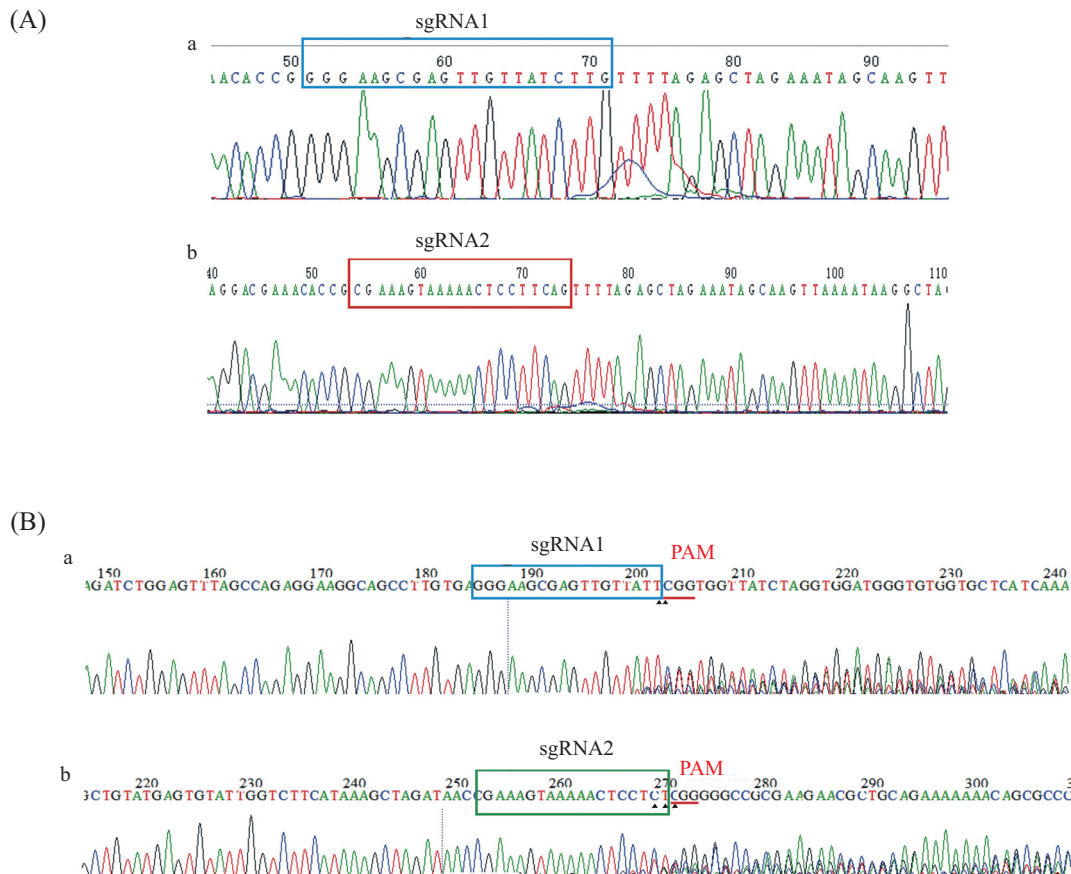
2 实验结果

2.1 重组质粒的鉴定、转染

合成后的sgRNA1和sgRNA2分别与线性化的pX459质粒连接后,转入Trans5感受态细胞中,通过Amp^r抗性平板筛选,挑选带抗性的菌落经摇菌后送菌液测序。测序结果与sgRNA1和sgRNA2序列经过比对,确定重组质粒p-miR9-2-sg1和p-miR9-2-sg2已成功构建(图1A-a和图1A-b)。利用Lipo3000将重组质粒转染

表4 抗体标记方案
Table 4 Antibody labeling scheme

细胞来源	抗体
Cell source	Antibody
Sp	B220-FITC, CD4-APC, CD8-PE
BM	B220-FITC, CD4-APC, CD8-PE, IgM-APC, CD43-PE, CD25-PE-Cy7
Th	CD4-APC, CD8-PE



A: miR9-2基因敲除重组质粒的测序: 蓝色框代表sgRNA1, 红色框代表sgRNA2序列。B: p-miR9-2-sg1和p-miR9-2-sg2在L929上的敲除验证。图中蓝色框代表了sgRNA1序列, sgRNA1缺失了C和T碱基, PAM位点由TGG突变为CGG, 下标三角形的字母代表了缺失位点或者突变位点。图中绿色框代表了sgRNA2序列, sgRNA2的碱基T突变成C, 碱基C突变成T(下标三角形的字母), 并且缺失了1个A碱基, PAM位点由AGG突变为CGG。红色下划线代表PAM位点。

A: sequencing of construct plasmids targeting miR9-2: the blue frame indicated the sequence of sgRNA1, the red frame indicated the sequence of sgRNA2. B: knockout verification of p-miR9-2-sg1 and p-miR9-2-sg2 constructed vectors in L929. The DNA sequence in the blue frame indicated the sequence of sgRNA1, which contained deletion of C and T nucleotides, PAM site TGG mutant to CGG, and the triangle letters indicated the deletion sites or mutant sites. The DNA sequence in the green frame indicated the sequence of sgRNA2, which contained T mutant to C, C mutant to T (underlined triangle letters), and a deletion of A nucleotide, PAM site AGG mutant to CGG. The red underline indicated PAM sites.

图1 miR9-2敲除重组质粒的验证

Fig.1 Verification of construct plasmids of miR9-2 knockout

L929细胞, 并通过嘌呤霉素筛选出单细胞克隆株。

2.2 敲除细胞的测序验证

通过嘌呤霉素筛选出单细胞克隆株扩增培养后, 提取基因组DNA。经过miR9-2-UVPF/R引物的扩增得到DNA片段, 将DNA片段测序。测序结果表明, 在mature miR9-2对应的sgRNA1和sgRNA2的

PAM位点附近开始出现双峰(图1B-a和图1B-b), 表明构建的两个重组质粒p-miR9-2-sg1和p-miR9-2-sg2都能对其靶序列mature miR9-2进行基因编辑。

2.3 T7E1酶切验证

将sgRNA序列前后的DNA片段扩增作为底物DNA并进行T7E1酶切验证如图2A, 扩增出的DNA片

段在T7E1酶的作用下,会被切割成约400 bp和200 bp的2个条带,而阴性对照只有1条约600 bp的条带,表明sgRNA序列能够识别和切割靶序列。

2.4 Cas9体外切割验证

利用T7体外转录试剂盒成功得到转录后的sgRNA1和sgRNA2,转录出的片段大约在130 bp左右(图2B)。在Cas9体外酶切实验中,设置了2个实验组,1个阳性对照组和1个阴性对照组。图2C表明,实验组中,体外转录的sgRNA1和sgRNA2能够识别靶序列并诱导Cas9蛋白酶将底物DNA分别切割成2条不同大小的目的条带。而阳性对照组是试剂盒中本身附带的样品,切割后得到与说明书图片上一致的条带,阴性对照组则应该是只有一条带。结果表明,设计的sgRNA1和sgRNA2识别靶序列并有效地引导Cas9蛋白对靶向位点mature miR9-2进行切割。

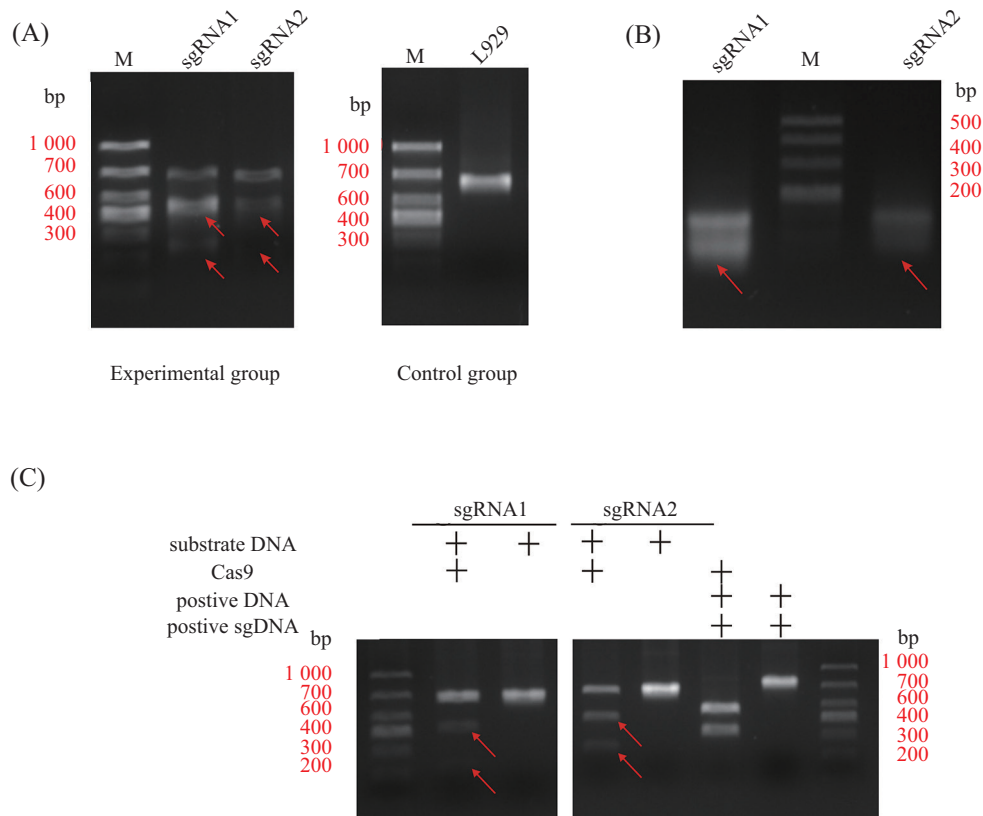
2.5 敲除小鼠的基因型鉴定

小鼠出生约21天后,进行剪尾鉴定。利用miR9-2-UVPF/R引物PCR扩增鼠尾基因组DNA,得到对应

的DNA片段。将测序结果为后双峰的DNA片段与pUC19质粒连接,进行TA克隆的鉴定验证,确认得到一只敲除mature miR9-2的杂合子(图3)。该杂合子缺失2个片段,分别为5'-TCT TTG GTT ATC TAG CTG TAT GAG TGT ATT GGT CTT CAT AAA GCT-3'和5'-ATA ACC GAA AGT AAA AAC TCC T-3'。

2.6 表型分析

miR9-2缺失杂合子(miR9-2^{+/-})出现了头部肿大的表型(图4A),且体型和体质量比WT小鼠要来的小和轻。miR9-2^{+/-}小鼠的体质量与WT小鼠体质量相比,下降了25%~30%($P=0.0004$,图4B)。对小鼠进行解剖,检查其脾脏大小和重量,发现miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏比正常小鼠要小,其重量大约是正常小鼠脾脏的50%左右($P<0.0001$,图4C)。对实验组和对照组小鼠的脾脏、骨髓和胸腺细胞进行计数,发现与WT小鼠相比,miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏细胞总数下降了60%~70%($P<0.0001$),骨髓细胞总数下降了10%~20%($P=0.0316$),胸腺细胞总数下降了

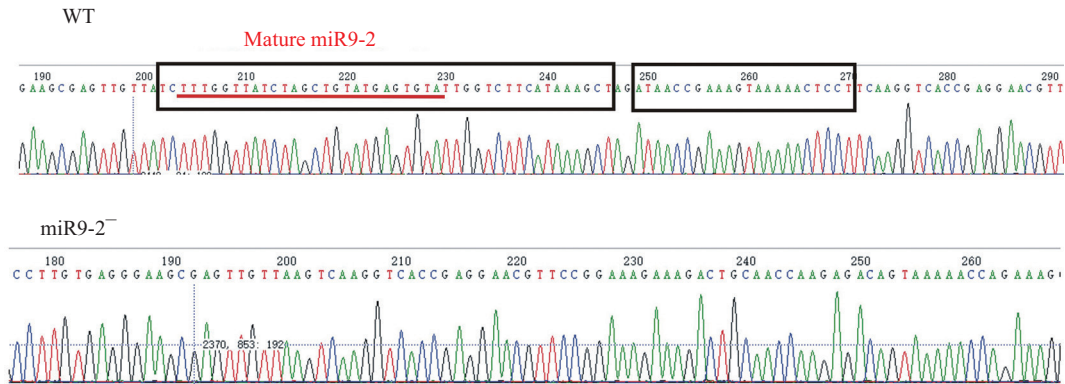


A: T7E1酶切验证。B: sgRNA1和sgRNA2的转录。C: Cas9蛋白体外酶切反应。红色箭头代表酶切反应后的片段。

A: T7E1 assay. B: the transcription of sgRNA1 and sgRNA2. C: Cas9 enzyme *in vitro* digestion reaction. Red arrows indicate fragments of enzyme.

图2 sgRNA1和sgRNA2在细胞水平上的验证

Fig.2 Verification of sgRNA1 and sgRNA2 at cell levels

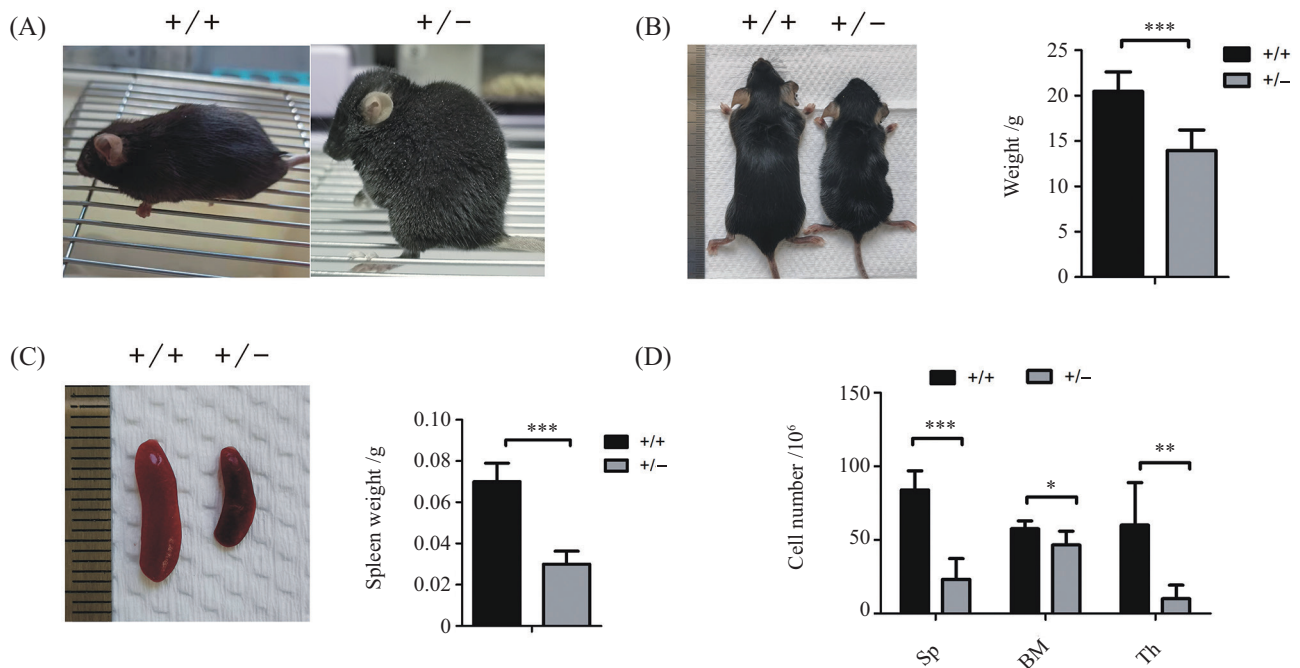


图中黑色框代表了敲除序列, 红色下划线代表成熟miR9-2序列。

The black frames indicated the knockout sequence, the red underline indicated the sequence of mature miR9-2.

图3 miR9-2基因敲除小鼠的测序

Fig.3 Sequencing of miR9-2 gene knockout in mice



A: Wild-type小鼠和miR9-2^{-/-}小鼠的表型变化; B: Wild-type小鼠和miR9-2^{-/-}小鼠的体质量变化; C: Wild-type小鼠和miR9-2^{-/-}小鼠的脾脏表型和重量变化; D: Wild-type小鼠和miR9-2^{-/-}小鼠的脾脏、骨髓、胸腺细胞数变化; * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the changes of appearance of Wild-type and miR9-2^{-/-} mice; B: the changes of body weights of Wild-type and miR9-2^{-/-} mice; C: the changes of spleen appearance and weights of Wild-type and miR9-2^{-/-} mice; D: the changes of cells number of Sp, BM and Th in Wild-type and miR9-2^{-/-} mice. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

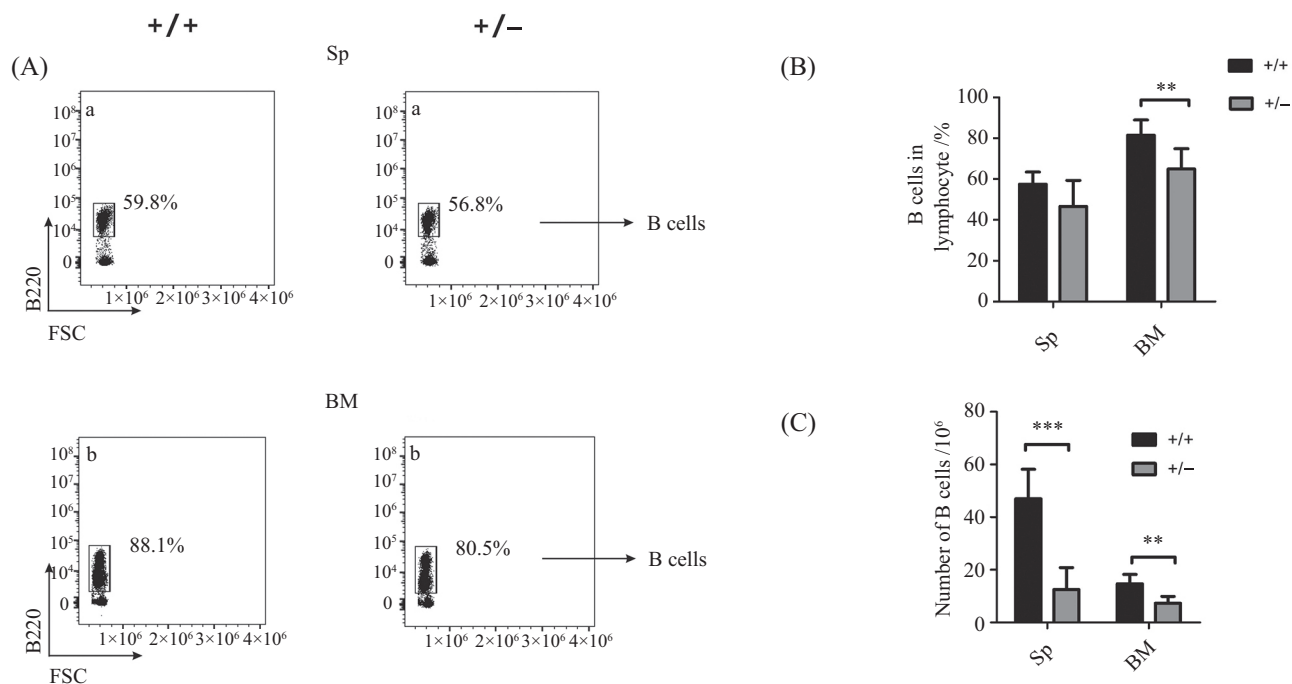
图4 Wild-type小鼠和miR9-2^{-/-}小鼠表型和细胞数的变化

Fig.4 The changes of appearance and cells number of Wild-type and miR9-2^{-/-} mice

70%~80% ($P = 0.0023$, 图4D)。

对脾脏和骨髓细胞分别进行染色, 流式数据分析表明, 与WT小鼠相比, miR9-2^{-/-}小鼠脾脏中的B细胞数下降了60%~70% ($P = 0.0001$, 图5A-a、图5B和图5C); 骨髓中, 与WT小鼠相比, miR9-2^{-/-}小鼠B细胞的百分比约从90%下降至75% ($P = 0.0080$, 图5A-b和图5B), 其B细胞总数下降了大约50% ($P = 0.0021$,

图5C)。对小鼠骨髓中不同成熟发育阶段的B细胞进行流式检测分析。数据表明, 与野生型小鼠相比, 实验组miR9-2^{-/-}小鼠的immature B细胞百分比约从15%下降至5% ($P = 0.0162$), pro-pre B细胞百分比约从40%下降至10% ($P = 0.0015$), 而mature B细胞百分比增加了约2倍 ($P = 0.0053$, 图6A-a和图6B), pro B细胞百分比变化不大 ($P = 0.6779$, 图6A-b和图6B), 而pre B细胞百分



A: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏和骨髓中B淋巴细胞流式图。B: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏及骨髓中B淋巴细胞百分比。C: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏及骨髓中B淋巴细胞数。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: FACS diagrams showing B cells population in lymphocytes of Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. B: the percentages of total B cells in lymphocytes of Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. C: bar graphs showing the cells number of total B cells in Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 Wild-type小鼠和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏和骨髓中B细胞的变化

Fig.5 Changes of B cells in Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice

比从20%下降至3%左右($P = 0.0016$, 图6A-c和图6B); immature B细胞数下降了30%~50%($P = 0.0471$), pro-pre B细胞数下降了70%左右($P = 0.0045$), mature B细胞数变化不大($P = 0.7604$), pro B细胞数下降了20%左右($P = 0.0432$), pre B细胞数下降了40%~50%($P = 0.0088$, 图6C)。

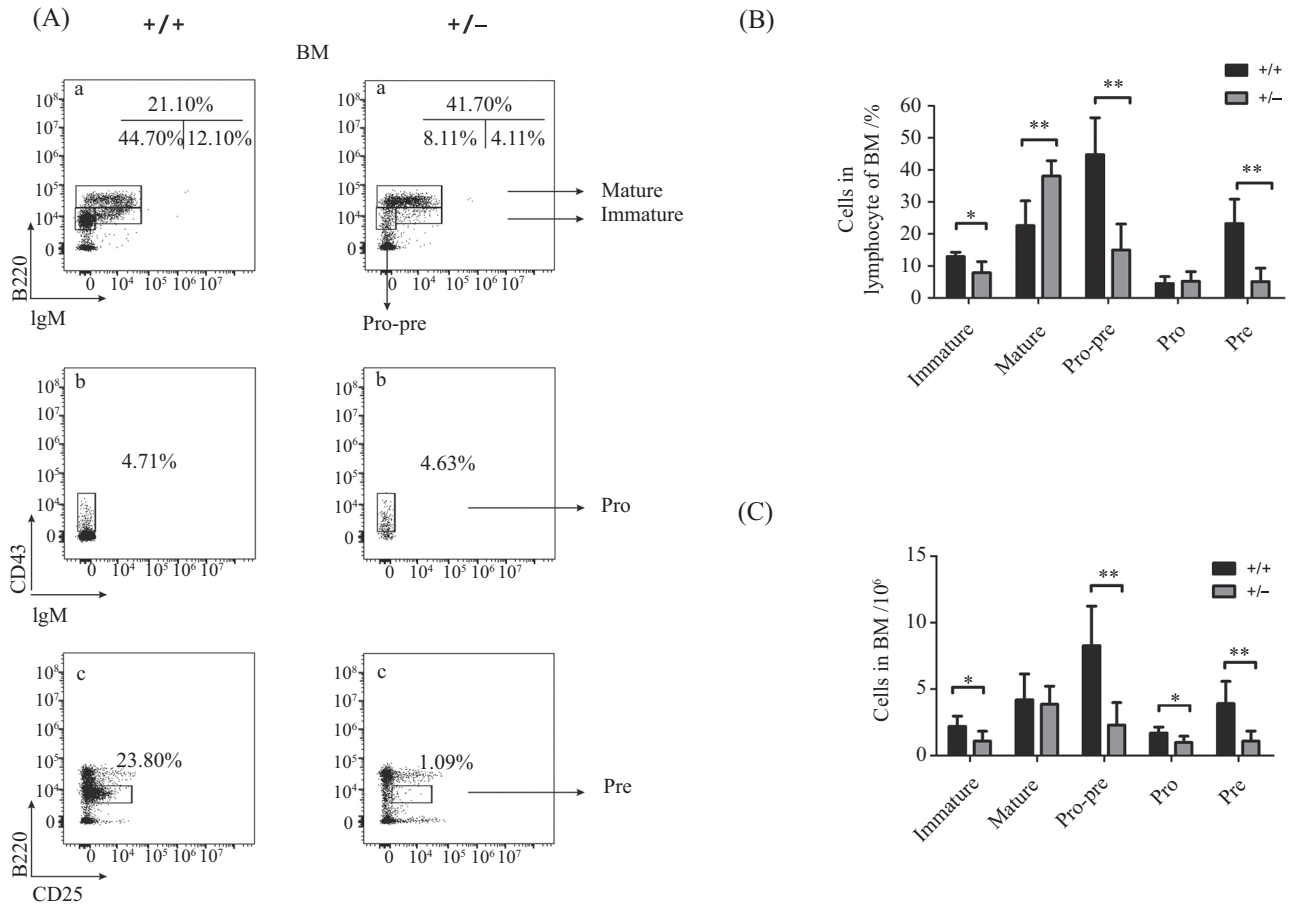
对实验组 miR9-2^{+/-}小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺和 CD8⁺ T细胞分析, 数据表明与 WT小鼠比较, miR9-2^{+/-}小鼠脾脏中 CD4⁺ T细胞数下降了60%~70%($P < 0.0001$), CD8⁺ T细胞数下降了50%~70%($P = 0.0003$, 图7A-a、图7B、图7C、图7D和图7E); 对骨髓细胞进行分析, 流式结果表明, miR9-2^{+/-}小鼠的 CD4⁺ T细胞比例上升了2~3倍($P = 0.0175$), 其细胞绝对值变化不大($P = 0.2451$, 图7A-b、图7B和图7C); CD8⁺ T细胞比例上升2~3倍($P = 0.0120$), 其细胞绝对值则变化不大($P = 0.7908$, 图7A-b、图7D和图7E)。

对实验组小鼠的胸腺细胞染色分析, 流式结果表明, 与野生型小鼠相比, miR9-2^{+/-}小鼠DN细胞的百分增加了3%~5%($P = 0.0130$), 但细胞数显

著下降($P = 0.0140$); DP细胞的百分比大约从80%下降至40%($P = 0.0324$), 其对应的细胞数下降了70%~80%($P = 0.0033$, 图8A、图8D和图8E)。CD4⁺ T细胞百分比增加了2~3倍($P = 0.0291$), 而细胞数却减少了大约50%($P = 0.0326$); CD8⁺ T细胞百分比显著增加($P = 0.0084$), 而细胞数减少了大约50%($P = 0.0485$, 图8A、图8B和图8C)。

3 结果与讨论

miRNAs是一系列短小的非编码RNA, 其通过抑制mRNA的翻译或促进mRNA的降解以达到调控靶向基因的目的。有研究表明, miRNAs参与Treg细胞的发育、稳定和调控。例如, miR10-a通过间接促进Foxp3基因的表达, 从而诱导Treg的分化^[13]。过表达miR146-a能抑制SATB1蛋白的表达, 从而为Treg细胞提供稳定的微环境以抵御Th1细胞的过度分化^[14]。有报道显示, miR-206通过诱导Kupffer细胞中M1极化以促进CD8⁺ T细胞的募集^[15]。而miRNA-15a/16-1则可以通过破坏Kupffer细胞和T细胞之间的通讯以抑制肝癌的进一步恶化^[16]。TU等^[17]发现, miR-10b



A: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠骨髓淋巴细胞中mature B细胞、immature B细胞、pro-pre B细胞、pro B细胞和pre B细胞的流式图; B: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠中mature B细胞、immature B细胞、pro-pre B细胞、pro B细胞和pre B细胞的百分比; C: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠中mature B细胞、immature B细胞、pro-pre B细胞、pro B细胞和pre B细胞的细胞数。**P*<0.05, ***P*<0.01。

A: FACS diagram of mature B cells, immature B cells, pro-pre B cells, pro B cells and pre B cells in the lymphocyte of BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice; B: bar graphs show the percentage of mature, immature, pro-pre, pro and pre B cells in lymphocytes of BM of wild-type and miR9-2^{+/-} mice; C: bar graphs show the cells number of mature, immature, pro-pre, pro and pre B cells in BM of wild-type and miR9-2^{+/-} mice. **P*<0.05, ***P*<0.01。

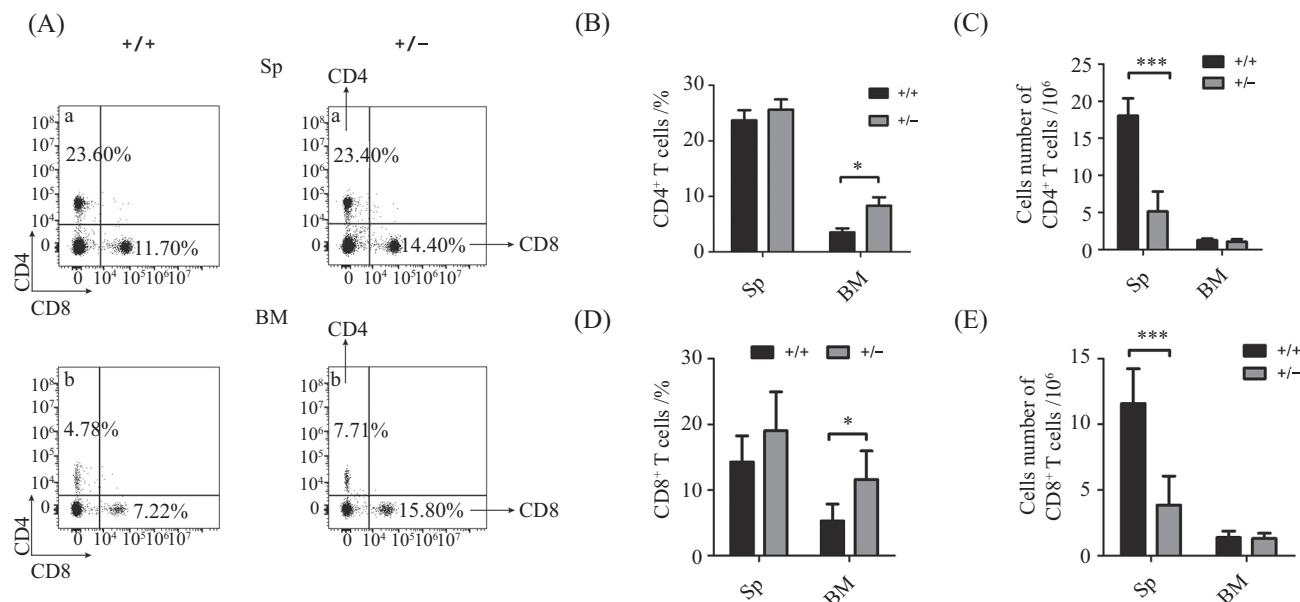
图6 Wild-type小鼠和miR9-2^{+/-}小鼠骨髓中不同B细胞发育阶段的变化

Fig.6 The changes of different development of B cells in BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice

通过对CD4⁺ T细胞亚型的调控会促使关节炎进一步发展。以上种种文献表明,很多miRNAs都直接或间接地参与了免疫细胞的调节。目前关于miR-9的报道,主要集中在肿瘤方面。许多研究表明,根据肿瘤疾病机制的不同,miR-9既可以对肿瘤起到抑制作用,也可以促进肿瘤疾病的发生,即miR-9具有双面性。例如miR-9在霍奇金淋巴瘤^[12]、子宫内膜癌^[18]或者原发性脑肿瘤疾病^[19]中起到正向调节的作用,而在宫颈癌^[20]、结肠直肠癌^[21]或者骨癌疾病^[22]中却起到了负向调节的作用。同时有研究表明,在许多肿瘤疾病中,CpG岛的超甲基化导致了miR-9的沉默,从而进一步证实miR-9具有一定的肿瘤抑制作用^[21,23-27]。通常miR-9与目的蛋白相结合并参与细胞循环。CREB蛋白是一类转录因子,主要与细

胞的增殖和分化有关。LANEVE等^[28]发现,CREB蛋白与miR-9的启动子相结合,并能诱导miR-9的表达,将CREB蛋白敲除后,miR9-2的表达量会大大下降。SENYUK等^[29]研究发现,EVI1位点能与miR9-3的启动子相结合,并对其进行甲基化,从而达到抑制miR-9的目的。

目前关于miR9-2在B和T淋巴细胞的发育功能方面尚未报道。我们成功构建出miR9-2^{+/-}杂合子小鼠但无法存活至8周龄以上,因此无法获得miR9-2^{-/-}敲除小鼠。本研究使用miR9-2^{+/-}杂合子作为模型鼠以研究该基因对B和T淋巴细胞的影响,miR9-2^{+/-}杂合子表现出头部肿大和脾脏变小,其脾脏重量约是WT小鼠的50%。通过计数发现miR9-2^{+/-}杂合子小鼠脾脏细胞数和WT小鼠相比下降了30%左右,miR9-2^{+/-}



A: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏和骨髓中CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞流式图。B: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏及骨髓中CD4⁺T淋巴细胞百分比。C: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏及骨髓中CD4⁺T淋巴细胞数。D: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏及骨髓中CD8⁺T淋巴细胞百分比。E: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏及骨髓中CD8⁺T淋巴细胞数。**P*<0.05, ****P*<0.001。

A: FACS diagrams showing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphocytes of Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. B: the percentages of CD4⁺ T cells in lymphocytes of Sp and BM of wild-type and miR9-2^{+/-} mice. C: bar graphs showing the cells number of CD4⁺ T cells in Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. D: the percentages of CD8⁺ T cells in lymphocytes of Sp and BM of wild-type and miR9-2^{+/-} mice. E: bar graphs showing the cells number of CD8⁺ T cells in Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. **P*<0.05, ****P*<0.001

图7 Wild-type小鼠和miR9-2^{+/-}小鼠的脾脏和骨髓中T细胞的变化

Fig.7 Changes of T cells in Sp and BM of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice

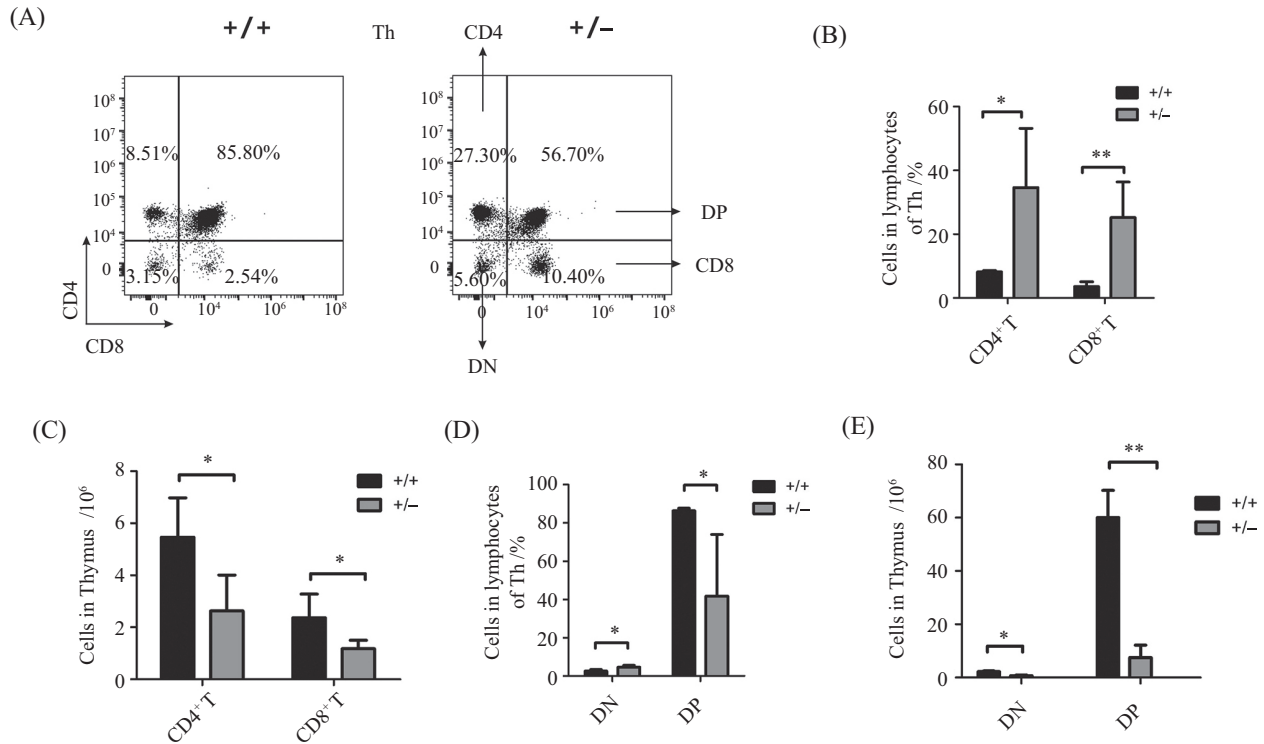
小鼠脾脏重量的减少很有可能是其脾脏细胞总数减少的主要原因。对miR9-2^{+/-}杂合子小鼠进行流式数据分析,发现与WT小鼠相比,miR9-2^{+/-}小鼠脾脏中的B淋巴细胞数下降了60%~70%,说明miR9-2对脾脏中B细胞的成熟发育有重要作用。miR9-2^{+/-}小鼠脾脏淋巴细胞中CD4⁺T细胞数下降了60%~70%,CD8⁺T细胞数下降了50%~70%,说明miR9-2对T淋巴细胞的成熟发育有重要作用。

对miR9-2^{+/-}小鼠骨髓细胞中不同发育阶段B细胞进行流式分析,结果表明miR9-2的敲除,导致了pro-pre B细胞的下降,以及进一步影响随后pro B细胞、pre B细胞和immature B细胞的成熟和发育。然而mature B细胞的百分比增加而细胞数却没有显著性变化,推测很有可能是由于mature B细胞的转运通路受到了某种阻碍,导致了mature B细胞堆积在骨髓中,因此百分比呈现增加的趋势。

对实验组小鼠的胸腺T细胞进行流式分析,结果表明,和WT小鼠比较,miR9-2的敲除导致了DN细胞的百分比增加而DP细胞的百分比减少,推测可能是由于DN细胞发育到DP细胞的阶段受到某种阻

碍从而导致了DN细胞的积累。由于DN细胞数的减少,导致了在随后的发育过程中,DP细胞、CD4⁺和CD8⁺T细胞数的减少。这些T细胞数的减少很可能是miR9-2^{+/-}小鼠胸腺总T细胞减少的主要原因。由于胸腺中CD4⁺和CD8⁺T细胞数的减少,从而导致了脾脏中CD4⁺和CD8⁺T细胞数的减少。

以上结果表明,miR9-2参与了脾脏、骨髓和胸腺中的B淋巴细胞、T淋巴细胞的发育和成熟过程,但是miR9-2是直接还是间接影响B和T淋巴细胞的成熟发育尚未清楚,有待进一步研究。miR9-2的敲除伴随着免疫调节的变化,该基因的沉默可能在器官移植过程中减少患者的免疫排斥方面起到一定的抑制作用;有报道显示,miR-9可以对肿瘤起到抑制作用,因此在生物制药方面,可针对该基因研究相应的抑制剂,通过对miR9-2的抑制从而达到抑制肿瘤的目的,同时也为淋巴肿瘤疾病的治疗提供重要线索。近年来,B细胞已经成为多种自身免疫性疾病治疗的靶向目标,而一般自身免疫性疾病的主要发病基础则是产生自身抗体的自身反应性B细胞,由此诞生了B细胞清除疗法(B cell depletion therapies,



A: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠胸腺中DN、DP、CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞流式图。B: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠胸腺中CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞百分比。C: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠的胸腺中CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞数。D: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠胸腺中DN和DP细胞百分比。E: Wild-type和miR9-2^{+/-}小鼠胸腺中DN和DP细胞数。**P*<0.05, ***P*<0.01。

A: FACS diagrams showing DN, DP, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphocyte of Th of wild-type and miR9-2^{+/-} mice. B: the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphocytes of Th of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. C: bar graphs showing the cells number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in Th of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. D: the percentages of DN and DP cells in lymphocytes of Th of wild-type and miR9-2^{+/-} mice. E: bar graphs showing the cells number of DN and DP cells in Th of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice. **P*<0.05, ***P*<0.01.

图8 Wild-type小鼠和miR9-2^{+/-}小鼠胸腺中T淋巴细胞的变化

Fig.8 Changes of T cells in Th of Wild-type and miR9-2^{+/-} mice

BCDT)。miR9-2的敲除对B细胞的发育过程产生了一定程度的影响,从根源上减少了B细胞数,因此,可针对该基因研究相应的抑制剂以达到清除B细胞的目的,同时为现有B细胞清除疗法提供新方法。

参考文献 (References)

- [1] AMBROS V, LEE RC, LAVANWAY A, et al. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans* [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(10): 807-18.
- [2] SUN E, SHI Y. MicroRNAs: small molecules with big roles in neurodevelopment and diseases [J]. *Exp Neurol*, 2015, 268: 46-53.
- [3] SAINA H K, GRIFFITHS-JONES S, ENRIGHT A J. Genomic analysis of human microRNA transcripts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(45): 17719-24.
- [4] LEE Y, AHN C, HAN J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-9.
- [5] KIM V N, HAN J, SIOMI M C. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 126-39.
- [6] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97.
- [7] PALIN A C, RAMACHANDRAN V, ACHARYA S, et al. Human neonatal naive CD4⁺ T cells have enhanced activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a [J]. *Immunol*, 2013, 190(6): 2682-91
- [8] YAO R, MA Y L, LIANG W, et al. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46082.
- [9] GRIFFITHS-JONES S. miRBase: the microRNA sequence database [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 342: 129-38.
- [10] ZHAO C, SUN G, LI S, et al. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(4): 365-71.
- [11] DELALOY C, LIU L, LEE J A, et al. MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(4): 323-35.
- [12] NIE K, GOMEZ M, LANDGRAF P, et al. MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(1): 242-52.
- [13] TAKAHASHI H, KANNO T, NAKAYAMADA S, et al. TGF- β and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(6): 587-95.
- [14] WANG S F, ZHANG X J, JU Y, et al. MicroRNA-146a feedback

- suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B [J]. *Immunol*, 2013, 191(1): 293-301.
- [15] TU J J, HAN D F, FANG Y L, et al. MicroRNA-10b promotes arthritis development by disrupting CD4⁺ T cell subtypes [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 27: 733-50.
- [16] LIU N N, CHANG C W, STEER C J, et al. MicroRNA-15a/16-1 Prevents hepatocellular carcinoma by disrupting the communication between Kupffer cells and regulatory T cells [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(2): 575-89.
- [17] LIU N N, WANG X M, STEER G J, et al. MicroRNA-206 promotes the recruitment of CD8⁺ T cells by driving M1 polarisation of Kupffer cells [J]. *BMJ*, 2022, 71(8): 1642-55.
- [18] MYATT S S, WANG J, MONTEIRO L J, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 367-7.
- [19] NASS D, ROSENWALD S, MEIRI E, et al. miR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors [J]. *Brain Pathol*, 2009, 19(3): 375-83.
- [20] HU X X, SCHWARZ J K, JR J S L, et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1441-8.
- [21] BANDRES E, AGIRRE X, BITARTE N, et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(11): 2737-43.
- [22] LUO H C, ZHANG H B, ZHANG Z Z, et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 82.
- [23] HELLER G, WEINZIERL M, NOLL C, et al. Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6): 1619-29.
- [24] RODRIGUEZ-OTERO P, ROMAN-GOMEZ J, VILAS-ZORNOZA A, et al. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family [J]. *Br J Haematol*, 2011, 155(1): 73-83.
- [25] LUJAMIO A, CALIN G A, VILLANUEVA A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(36): 13556-61.
- [26] HILDEBRANDT M A, GU J, LIN J, et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(42): 5724-8.
- [27] MINOR J, WANG X, ZHANG F, et al. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(1): 73-8.
- [28] LANEVE P, GIOIA U, ANDRIOTTO A, et al. A microcircuitry involving REST and CREB controls miR-9-2 expression during human neuronal differentiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 6895-905.
- [29] SENYUK V, ZHANG Y Y, LIU Y, et al. Critical role of miR-9 in myelopoiesis and EVI1-induced leukemogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(14): 5594-9.