

miR-1-5p 修饰脐带间充质干细胞对系统性红斑狼疮 T 淋巴细胞亚群的免疫调节

<https://doi.org/10.12307/2021.132>

投稿日期: 2020-08-13

送审日期: 2020-08-14

采用日期: 2020-09-26

在线日期: 2021-02-09

中图分类号:

R459.9; R318; R593.24+1

文章编号:

2095-4344(2021)31-04928-11

文献标识码: A

胡明智¹, 张晶莹², 杨国安³, 庞春艳³, 张伟³, 王永福³, 孙晓林³

文章快速阅读:

方法:

未处理的脐带间充质干细胞、miR-1-5p 转染的脐带间充质干细胞、miR-NC 转染的脐带间充质干细胞分别与系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞进行共培养。

检测:

(1) 实时荧光定量 PCR 检测系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中 IL-17A、Foxp3、IFN- γ 、IL-4 的表达; (2) 流式细胞术检测系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中 Th17、Treg、Th1、Th2 淋巴细胞亚群的分化情况。

文章特点一

- △ miR-1-5p 修饰的脐带间充质干细胞对系统性红斑狼疮 Treg 细胞具有免疫调节作用, 过表达 miR-1-5p 可以促进系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中 Treg 细胞的分化和增殖。
- △ miR-1-5p 通过上调 Treg 细胞的表达调节 Th17/Treg 的免疫失衡, 同时也调节 Th1/Th2 的免疫失衡。

文题释义:

miR-1: miRNA 是一类高度保守的小分子非编码 RNA, miRNA 通过降解特定的 mRNA 或抑制翻译过程, 参与转录后水平基因表达的调控, 进而调节细胞的增殖、分化、凋亡等生物学过程。越来越多的研究证明, miR-1 与肿瘤的发生、发展过程密切相关, miR-1 在许多肿瘤细胞中存在异常表达, 并参与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡。miR-1 也被认为是一种肌肉特异性 miRNA, 最早被发现存在于心肌和骨骼肌中表达, 有研究发现其在皮肤炎中呈低表达。

免疫调节: 脐带间充质干细胞具有免疫调节的生物学特性, 表现为对 T 淋巴细胞亚群(Th1/Th2/Th17/Treg)分化的调节, 维持其免疫平衡。

摘要

背景: 近年来有很多关于基因修饰间充质干细胞治疗疾病的研究, 包括自身免疫性疾病的治疗。已发现多种 miRNA 在自身免疫性疾病中异常表达, 其中 miR-1 在系统性红斑狼疮中呈低表达, miR-1-3p 是与系统性红斑狼疮易感基因相关的 miRNA 之一。

目的: 研究 miR-1-5p 修饰脐带间充质干细胞对系统性红斑狼疮 T 淋巴细胞亚群的免疫调节作用。

方法: 选取疾病活动期 30~60 岁系统性红斑狼疮女性患者和健康体检者各 8 例, 实时荧光定量 PCR 检测两组外周血单个核细胞中的 miR-1-5p 表达水平; 无菌条件下采集足月顺产或剖宫产新生儿脐带进行脐带间充质干细胞的分离培养, 利用脂质体法, 按浓度梯度为 5, 7, 10, 15 nmol/L 的 Red Fluorescent Control miRNA 分别转染脐带间充质干细胞 24, 48, 72 h, 流式细胞术检测不同浓度梯度和时间梯度下 miR-1-5p 转染效率; 密度梯度离心法分离系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞, 与 miR-1-5p 转染的脐带间充质干细胞共培养, 分为 miR-1 转染脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞共培养组, miRNA 阴性对照转染脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞共培养组, 未转染脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞共培养组, 外周血单个核细胞单独培养组。共培养 48 h, 实时荧光定量 PCR 检测各组外周血单个核细胞中 IL-17A、Foxp3、IFN- γ 、IL-4 基因的相对表达量; 流式细胞术检测各组外周血单个核细胞中 Th17、Treg、Th1、Th2 细胞的分化情况。

结果与结论: ①与健康对照组相比, miR-1-5p 在系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中的表达显著下调($P < 0.05$); ②当 miR-1-5p 浓度为 10 nmol/L、转染时间为 48 h 时, 转染效率最高; ③与外周血单个核细胞组相比, miR-1-5p 转染脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞共培养组 Foxp3 的表达增加, Treg 细胞比例显著升高, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 与外周血单个核细胞组相比, 其他 3 个共培养组 Th17/Treg 比值在基因表达水平上是下降的, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 但流式检测各组 Th17/Treg 细胞比值, 差异无显著性意义($P > 0.05$); 与外周血单个核细胞组相比, miR-1-5p 转染脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞共培养组 Th1/Th2 比值在基因表达水平上是下降的, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 但流式检测各组 Th1/Th2 细胞比值, 差异无显著性意义($P > 0.05$); ④结果显示, miR-1-5p 修饰的脐带间充质干细胞对系统性红斑狼疮 Treg 细胞具有免疫调节作用, 过表达 miR-1-5p 可以促进系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中 Treg 细胞的分化和增殖。miR-1-5p 通过上调 Treg 细胞表达调节 Th17/Treg 的免疫失衡, 同时也调节 Th1/Th2 的免疫失衡。

关键词: 干细胞; 脐带间充质干细胞; miR-1; 系统性红斑狼疮; T 淋巴细胞; Treg 细胞; Th1; Th2; 免疫调节

缩略语: 脐带间充质干细胞: umbilical cord-mesenchymal stem cells, UC-MSCs; 外周血单个核细胞: peripheral blood mononuclear cells, PBMCs; 辅助性 T 细胞 1: T helper cell 1, Th1; 辅助性 T 细胞 2: T helper cell 2, Th2; 辅助性 T 细胞 17: T helper cell 17, Th17; 调节性 T 细胞: regulatory T cells, Tregs; 干扰素 γ : interferon- γ , IFN- γ ; 白细胞介素 4: interleukin-4, IL-4; 白细胞介素 17A: Interleukin-17A, IL-17A

包头医学院第一附属医院,¹风湿免疫科, 包头医学院风湿免疫研究所,²重症医学科, 内蒙古自治区包头市 014010;³自体免疫学重点实验室, 内蒙古自治区包头市 014010

第一作者: 胡明智, 女, 1993 年生, 天津市人, 汉族, 2017 年山西医科大学毕业, 硕士, 目前主要从事自身免疫性疾病的研究。

通讯作者: 孙晓林, 博士, 主管检验师, 自体免疫学重点实验室, 内蒙古自治区包头市 014010

<https://orcid.org/0000-0003-1989-9901> (胡明智)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81860294), 项目负责人: 孙晓林; 国家自然科学基金项目(81860295), 项目负责人: 张伟; 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08055), 项目参与人: 孙晓林; 内蒙古自治区科技计划项目(201802089), 项目参与人: 孙晓林; 内蒙古自治区科技计划项目(2019GG052), 项目负责人: 王永福

引用本文: 胡明智, 张晶莹, 杨国安, 庞春艳, 张伟, 王永福, 孙晓林. miR-1-5p 修饰脐带间充质干细胞对系统性红斑狼疮 T 淋巴细胞亚群的免疫调节 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(31):4928-4938.



Immunomodulatory effects of umbilical cord-mesenchymal stem cells modified by miR-1-5p on T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus

Hu Mingzhi¹, Zhang Jingying², Yang Guoan³, Pang Chunyan³, Zhang Wei³, Wang Yongfu³, Sun Xiaolin³

¹Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Institute of Rheumatology of Baotou Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Department of Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ³Key Laboratory of Autoimmunology, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China
Hu Mingzhi, Master, Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Institute of Rheumatology of Baotou Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: Sun Xiaolin, MD, Laboratorian-in-charge, Key Laboratory of Autoimmunology, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: In recent years, there were lots of researches on the treatment of diseases by gene modified mesenchymal stem cells, including the treatment of autoimmune diseases. Various miRNAs have been found to be abnormally expressed in autoimmune diseases, among which miR-1 is low-expressed in polymyositis, and miR-1-3p is one of the miRNAs related to systemic lupus erythematosus susceptibility genes.

OBJECTIVE: To investigate the immunoregulatory effect of miR-1-5p modified umbilical cord-mesenchymal stem cells on T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus.

METHODS: The expression level of miR-1-5p in the two groups was detected by real-time fluorescence quantitative PCR in eight patients aged 30–60 years with active systemic lupus erythematosus and eight healthy subjects. Umbilical cord-mesenchymal stem cells were isolated and cultured from umbilical cord of newborns delivered at term or cesarean section under aseptic conditions. Using the liposome method, the umbilical cord-mesenchymal stem cells were transfected with Red Fluorescent Control with a concentration gradient of 5, 7, 10, and 15 nmol/L for 24, 48, and 72 hours. Transfection efficiency of miR-1-5p was determined by flow cytometry at different concentration gradients and time gradients. Peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus patients were isolated by density gradient centrifugation and co-cultured with umbilical cord-mesenchymal stem cells which were transfected with miR-1-5p, and divided into four groups: umbilical cord-mesenchymal stem cells transfected with miR-1 and co-cultured with peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients, umbilical cord-mesenchymal stem cells transfected with miRNA negative control and co-cultured with peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients, umbilical cord-mesenchymal stem cells co-cultured with peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients, and peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients without treatment group. The co-culture was conducted for 48 hours. The relative expression levels of IL-17A, Foxp3, IFN- γ and IL-4 genes in each group were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Flow cytometry was used to detect the differentiation of Th17, Treg, Th1 and Th2 cells in peripheral blood mononuclear cells of each group.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) miR-1-5p was significantly down-regulated in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients compared with healthy controls ($P < 0.05$). (2) The transfection efficiency was highest when the concentration of miR-1-5p was 10 nmol/L and the transfection time was 48 hours. (3) Compared with the peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients without treatment group, the expression of Foxp3 in umbilical cord-mesenchymal stem cells transfected with miR-1-5p and co-cultured with peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients group was increased; the proportion of Treg cells was significantly increased; and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients without treatment group, Th17/Treg ratio decreased in the other three co-culture groups, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Th17/Treg cell ratio detected by flow cytometry in each group was not significantly different ($P > 0.05$). Compared with the peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients without treatment group, the Th1/Th2 ratio in the umbilical cord-mesenchymal stem cells transfected with miR-1-5p and co-cultured with PBMC of systemic lupus erythematosus patients group decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, the Th1/Th2 cell ratio of each group detected by flow cytometry was not significantly different ($P > 0.05$). (4) The results showed that the umbilical cord-mesenchymal stem cells modified by miR-1-5p had an immunoregulatory effect on Treg cells of systemic lupus erythematosus, and overexpression of miR-1-5p could promote the differentiation and proliferation of Treg cells of systemic lupus erythematosus patients. miR-1-5p regulates the immune imbalance of Th17/Treg and Th1/Th2 by up-regulating the expression of Treg cells.

Key words: stem cells; umbilical cord-mesenchymal stem cells; miR-1; systemic lupus erythematosus; T lymphocytes; Treg cells; Th1; Th2; immunoregulation

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81860294 (to SXL), No. 81860295 (to ZW); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, No. 2019MS08055 (to SXL); Science and Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region, No. 201802089 (to SXL), No. 2019GG052 (to WYF)

How to cite this article: HU MZ, ZHANG JY, YANG GA, PANG CY, ZHANG W, WANG YF, SUN XL. Immunomodulatory effects of umbilical cord-mesenchymal stem cells modified by miR-1-5p on T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(31):4928-4938.

0 引言 Introduction

系统性红斑狼疮是一种以T细胞功能异常、B细胞产生大量自身抗体为特征的多系统受累和器官损害为特征的自身免疫性疾病，目前系统性红斑狼疮的发病机制尚不完全清楚^[1]。越来越多的证据表明，T细胞稳态的失衡在系统性红斑狼疮的发展中起着至关重要的作用，有研究指出辅助性T细胞1(T helper cell 1, Th1)和辅助性T细胞2(T helper cell 2, Th2)以及辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)和调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)比例的失衡是系统性红斑狼疮发病机制的基础^[2-3]。已有大量研究证实在系统性红斑狼疮中Th1/Th2、Th17/Treg的比值升高，平衡受到破坏，导致促炎反应增强^[4-6]。初始CD4⁺T细胞经刺激后可分化为Th1、Th2、Th17、Treg等细胞亚群，Th1可分泌干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)并参与细胞免疫，Th2可分泌白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)并参与体液免疫^[7]。Th17可分泌白

细胞介素17A(interleukin-17A, IL-17A)，并在系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的发生发展中起着关键作用^[8]。Treg细胞具有免疫抑制功能，在诱导和维持自身免疫耐受中发挥重要作用，Treg细胞的减少和功能障碍与系统性红斑狼疮的发生发展密切相关^[9]。

间充质干细胞是一群具有多向分化潜能和免疫调节功能的多能干细胞。脐带间充质干细胞(umbilical cord-mesenchymal stem cells, UC-MSCs)具有来源充足、取材方便、培养简单等特点，在临床研究上较骨髓间充质干细胞更具有伦理学 and 安全性优势^[10]。有研究发现UC-MSCs可以在系统性红斑狼疮患者的体内和体外上调Treg细胞水平，下调Th17细胞水平^[11]。近年来有很多关于基因修饰间充质干细胞治疗多种疾病的研究，发现其在放射性肝损伤^[12]、骨组织修复^[13]、神经系统疾病中的治疗作用^[14]。

miRNA属于非编码小分子RNA，在进化上高度保守，

与机体的免疫调节密切相关^[15]。miR-1 最初被发现表达于心肌和骨骼肌细胞, 因此被认为是一种肌肉特异性 miRNA。hsa-miR-1-1 和 hsa-miR-1-2 两种 miRNAs 组成 hsa-miR-1 家族^[16-17]。miR-1 在细胞核和细胞质中进行生物合成, 编码 miRNA 的基因在细胞核中转录生成初始 miRNA(primary miRNA, pri-miRNA), 初始 miRNA 被 RNase III 内切酶加工成前体 miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA), 前体 miRNA 在细胞质中转化为成熟的 miRNA^[18]。近年来多项研究发现, miR-1 在许多肿瘤中存在异常表达, 如胃癌^[19]、肺癌^[20]、肝癌^[21]、膀胱癌等癌症中^[22], miR-1 的表达均下调, 发挥抑癌基因的作用。LIU 等^[23]研究发现 miR-1 可以通过抑制 CLTC1 基因, 调节肿瘤巨噬细胞的吞噬功能。TIAN 等^[24]研究发现急性哮喘患儿外周血中 miR-1 的表达水平明显低于非哮喘患儿, 推测 miR-1 表达下调可能导致 Th1/Th2 细胞比例失衡, 在诱导免疫反应中发挥重要作用。

目前已发现多种 miRNA 在自身免疫性疾病中异常表达, 其中 miR-1 在多发肌炎中呈低表达^[25], miR-1-3p 是与系统性红斑狼疮易感基因相关的 miRNA 之一^[26]。因此, 作者推测 miR-1 可能在系统性红斑狼疮的治疗中发挥作用, 文中选择 hsa-miR-1-5p(NCBI Gene ID: 4603, GenBank Accession: NM_001080416) 序列为 ACA UAC UUC UUU AUA UGC CCA U 进行研究。该研究利用 hsa-miR-1-5p mimic 转染 UC-MSCs, 探索 hsa-miR-1-5p 过表达是否能提高 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮 T 淋巴细胞亚群的免疫调控作用, 对系统性红斑狼疮的治疗起到协同作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 6 月至 2020 年 1 月在包头医学院第一附属医院中心实验室完成。

1.3 材料 新生儿脐带由包头医学院第一附属医院妇产科提供, 足月顺产或剖宫产健康产妇, 产妇及家属知情同意。选取包头医学院第一附属医院风湿免疫科处于疾病活动期的 30-60 岁系统性红斑狼疮女性患者和健康体检者各 8 例, 系统性红斑狼疮的诊断均符合美国风湿病学会 ACR 1997 年推荐的系统性红斑狼疮分类标准。所有患者经过知情同意后获取外周血标本, 该研究获得包头医学院第一附属医院医学伦理委员会批准。

该研究选取了处于疾病活动期的系统性红斑狼疮疾病患者: 补体 C3 正常值范围 0.8-1.55 g/L, 选取的 8 例患者小于正常值, 补体低下; 血沉正常值范围: < 15-20 mm/h, 选取的 8 例患者大于正常值, 血沉加快; C-反应蛋白正常值范围: ≤ 10 mg/L, 选取的 8 例患者大于正常值, 大部分患者轻度升高; 抗 ds-DNA 正常值范围: 0-100 IU/mL, 选取的 8 例患者明显高于正常值; 选取的 8 例患者抗核抗体 (ANA) 呈阳性, 均处于疾病活动期。

实验试剂与仪器: DMEM/F12 培养基、OPTI 培养基、胎牛血清、双抗、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液购自美国 Gibco 公司;

CD105-FITC、CD90-FITC、CD44-PE、CD34-PE、CD11c-PE、CD45-FITC5、同型对照流式抗体购自 BD 公司; 钙盐染色液、油红 O 染色液购于索莱宝科技有限公司; 人外周血淋巴细胞分离液购自灏洋生物制品科技有限公司; mirVana™ miRNA Mimic、miR-1 positive control、Lipofectamine® RNAiMAX Reagent、Red Fluorescent Control、Trizol Reagent 购自 Themor Fisher 公司; PMA/Ionomycin mixture(250X)(佛波酯/离子霉素混合物)、BFA/Monensin Mixture(250X)(布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物) 购自联科生物; 细胞内固定和破膜缓冲液组合、Foxp3/转录因子染色液组合试剂盒、CD4 单克隆抗体、CD25 单克隆抗体、FOXP3 单克隆抗体、IL-17A 单克隆抗体、IFN-γ 单克隆抗体、IL-4 单克隆抗体购自 eBioscience 公司; miRNA 第一链 cDNA 合成(茎环法)试剂盒购自上海生工; RT-PCR kit 试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自东洋纺生物科技有限公司; 定量 PCR 反应扩增仪 (ABI 公司)。

1.4 方法

1.4.1 UC-MSCs 的分离培养 无菌条件下, 取健康足月顺产或剖宫产新生儿脐带组织, 在超净台内用含两性霉素 B 的 PBS 反复洗涤去除残血, 并剔除脐动静脉, 留下 Wharton 胶样组织。用组织剪将其剪碎至 1 mm³ 大小, 接种于含有 DMEM/F12(含体积分数为 10% 胎牛血清, 1% 双抗) 培养基的培养皿中, 置于 37 ℃、体积分数为 5%CO₂ 孵箱内培养, 每三四天换液 1 次, 待细胞长至 90% 融合时, 胰蛋白酶消化传代培养, 取 2 代 UC-MSCs 用于后续实验。

1.4.2 流式细胞术鉴定 UC-MSCs 取第 2 代 UC-MSCs, 胰酶消化制成单细胞悬液, 分别加入鼠抗人 CD105、CD90、CD44、CD34、CD11c、CD45 单克隆抗体各 4 μL, 室温避光孵育 30 min, 洗涤并重悬于 PBS 中, 用流式细胞仪检测其表面标志蛋白的表达。

1.4.3 UC-MSCs 分化能力检测 取 60%-70% 融合的长势良好的第 2 代 UC-MSCs, 更换诱导分化培养液, 每 3 d 换液 1 次, 培养 21 d 后进行染色。

向成骨细胞诱导分化: 移除培养基, 用 PBS 洗 2 次, 用茜素红 S 染色液滴染 2 min, 稍水洗后 McGee-Russell 分化液迅速分化数秒, Mayer 苏木精染色液浅染细胞核 2 min, PBS 浸洗重复 3 次, 1 mL PBS 覆盖细胞, 显微镜下观察。

向成脂细胞诱导分化: 移除培养基, 用 PBS 洗 2 次, 加 ORO Fixative 固定液固定 20 min, 蒸馏水洗 2 次, 60% 异丙醇浸洗 5 min, 弃去 60% 异丙醇加入配好的 ORO Stain 10 min, 弃去染色液, 水洗 3 次, 加入 Mayer 苏木精染色液复染核 2 min, 弃去染色液后水洗 3 次, 加 ORO Buffer 1 min 后弃去, 1 mL PBS 覆盖细胞, 显微镜下观察。

1.4.4 miR-1-5p 转染效率测定 取第 2 代 UC-MSCs 接种于 24 孔板, 待细胞融合至 60%-80% 进行转染, 转染前用 OPTI 培养基润洗 2 遍, 每孔按 3 μL Lipofectamine® RNAiMAX Reagent 和 50 μL OPTI 培养基混合稀释, 每孔分别按浓度梯度为 5, 7, 10, 15 nmol/L 的 Red Fluorescent Control miRNA 和 50 μL OPTI 培养基混合稀释, 将稀释后的 Red Fluorescent Control miRNA

脐带间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源：人脐带组织

原代培养方法：组织块贴壁法

基础培养基：DMEM/F12 培养基

添加材料：体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青霉素、链霉素

原代培养时间：原代细胞培养 4 d 开始换液，每隔三四天换液 1 次，培养约 15 d 开始传代

细胞传代：细胞融合至 80%–90%，用胰酶消化传代，3–5 d 传 1 代，共传 2 代

细胞鉴定：流式细胞仪检测人脐带间充质干细胞高表达 CD44、CD90、CD105(阳性率大于 95%)，低表达 CD11c、CD34、CD45(阳性率小于 1%)；同时进行成脂、成骨诱导，培养证实具有多向分化能力

伦理学批准：该实验经过包头医学院第一附属医院医学伦理委员会批准

加入稀释后的 Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (1 : 1 比例)，室温孵育 5 min，将 RNA- 脂质体混合物加入 24 孔板对应孔中，按 24，48，72 h 的时间梯度进行转染。通过流式细胞仪检测不同浓度梯度和时间梯度下的转染效率。

1.4.5 UC-MSCs 与外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 共培养 用密度梯度离心法分离系统性红斑狼疮患者 PBMCs：将 2 mL 全血与 2 mL PBS 等体积混匀后，缓慢加入淋巴细胞分离液上层，在 2 000 r/min 条件下离心 20 min，吸管吸取离心后的中间白膜层加入到离心管中，加 PBS 吹打混匀，1 500 r/min 离心 7 min，弃上清，再加 PBS 吹打混匀，1 000 r/min 离心 4 min，弃上清。取第 2 代 UC-MSCs，以 2×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板，在最佳转染效率下进行转染，以 1×10^6 /孔的密度加入 PBMCs 与之进行直接共培养 48 h。实验分组：miR-1-5p 转染 UC-MSCs 与 PBMCs 共培养组 (UC-MSCs+miR-1 组)，miRNA 阴性对照转染 UC-MSCs 与 PBMCs 共培养组 (UC-MSCs+miR-NC 组)，UC-MSCs 与 PBMCs 共培养组 (UC-MSCs 组) 以及 PBMCs 组。

1.4.6 实时荧光定量 PCR 检测相关基因的表达 用 TRIzol 试剂获取细胞总 RNA，检测 miR-1-5p 在系统性红斑狼疮患者、健康人群 PBMCs 以及 UC-MSCs 中的表达，使用 miRNA 第一链 cDNA 合成 (茎环法) 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA；检测各组系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Foxp3、IL-17A、IFN- γ 、IL-4 的表达，使用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA，用特异引物和 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒于定量 PCR 反应扩增仪进行定量检测，最后结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析相对表达。miR-1-5p、IL-17A、Foxp3、IFN- γ 、IL-4 的引物序列，见表 1。

1.4.7 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群的分化情况 利用佛波酯 / 离子霉素混合物刺激 PBMCs，布雷非德菌素 A / 莫能霉素混合物阻断细胞内因子的分泌，收集共培养的 PBMCs，DPBS 洗涤 2 次后，用 CD4、CD25 单抗对细胞表面进行标记染色，4 ℃ 避光孵育 30 min；DPBS 洗涤 1 次，离心弃上清，加入固定破膜液并涡旋混匀，4 ℃ 避光孵育 30 min，

表 1 | miR-1-5p、IL-17A、Foxp3、IFN- γ 、IL-4 基因引物序列

Table 1 | Primer sequences of miR-1-5p, IL-17A, Foxp3, IFN- γ , and IL-4 genes

基因名称	基因引物序列	退火温度 (℃)	基因片段大小 (bp)
miR-1-5p	上游 GCG CGC GAC ATA CTT CTT TAT AT	60	60
	下游 GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GA		
IL-17A	上游 CGG ACT GTG ATG GTC AAC CTG AAC	60	118
	下游 GGT CCT CAT TGC GGT GGA GAT TC		
Foxp3	上游 GCT GGT GCT GGA GAA GGA GAA G	60	92
	下游 CGG ATG ATG CCA CAG ATG AAG C		
IFN- γ	上游 TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC C	60	135
	下游 CTG GGA TGC TCT TCG ACC TC		
IL-4	上游 ACA GCA GTT CCA CAG GCA CAA G	60	115
	下游 CGT ACT CTG GTT GAT TTC CTT CAC		
U6	上游 AGA GAA GAT TAG CAT GGC CCC TG	60	99
	下游 GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GA		
β -actin	上游 TGG ACT TCG AGC AAG AGA TG	60	137
	下游 GAA GGA AGG CTG GAA GAG TG		

加入透化液，1 300 r/min 离心 5 min 弃上清；在剩余体积的透化液中重悬沉淀，加入 1 μ L Foxp3、IL-17A、IFN- γ 、IL-4 单抗进行胞内标记染色，室温避光孵育 30 min；加入透化液，1 300 r/min 离心 5 min 弃上清，将细胞重悬于 400 μ L 流式染色液中，流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群的分化情况，其中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 代表 Treg 细胞亚群，CD4⁺IL-17⁺ 代表 Th17 细胞亚群，CD4⁺IFN- γ ⁺ 代表 Th1 细胞亚群，CD4⁺IL-4⁺ 代表 Th2 细胞亚群。

1.5 主要观察指标 ① miR-1-5p 在健康人群和系统性红斑狼疮患者外周血 PBMCs 中的表达；② 脐带间充质干细胞在显微镜下的形态、表面抗原鉴定及成骨成脂诱导后的分化情况；③ 流式细胞术检测 miR-1-5p 的转染效率；④ Q-PCR 检测 miR-1-5p 在转染后 UC-MSCs 中的表达；⑤ Q-PCR 检测各组系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 IL-17A、Foxp3、IFN- γ 、IL-4 的表达；⑥ 流式细胞术检测各组系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Th1/Th2/Th17/Treg 细胞的比例。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析，符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)，组间多重比较用 LSD- t 法， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 miR-1-5p 的表达下调 收集 8 例系统性红斑狼疮患者和 8 例健康对照人群的 PBMCs，采用 qRT-PCR 检测 miR-1-5p 的表达，结果显示：miR-1-5p 在系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中的表达显著低于健康对照人群 ($P < 0.05$)，见图 1。

2.2 UC-MSCs 的形态特征和生长规律 组织爬片法培养 7 d 后，倒置显微镜下可观察到组织周围有单个的短梭形或多角形细胞散落分布。培养 12 d 后可观察到细胞形成群落，并逐渐开始呈放射状密集生长，15 d 后细胞融合可达 80%–90%，90% 以上为形态相对均一的长梭形细胞，呈平行排列生长或旋涡状生长。传代后的细胞增殖迅速，4 d 后细胞融合可达

90%以上,符合间充质干细胞的形态特征和生长规律,见图2。

2.3 UC-MSCs 表面标志抗原鉴定 流式细胞仪检测第2代 UC-MSCs 表面标志蛋白, CD34、CD45 及 CD11c 阴性表达, CD105、CD90 及 CD44 阳性表达, 见图3。

2.4 UC-MSCs 的诱导分化能力 UC-MSCs 成骨诱导分化后, 细胞形态逐渐由长梭形变为多角形, 且胞体增大, 镜下可见钙化结节, 茜素红染色后钙化结节呈橘红色; UC-MSCs 成脂诱导分化后, 细胞形态逐渐由长梭形变为短梭型、椭圆形或圆形, 镜下可见大小不一的折光性很强的空泡形成, 油红O染色后细胞内可见大量被染成鲜红色的脂滴, 见图4。

2.5 miRNA Mimic 转染效率 以 Lipofectamine® RNAiMAX Reagent 为载体, 倒置显微镜下观察转染 miR-1-5p 基因的 UC-MSCs 形态无明显变化。BLOCK-iT™Alexa Fluor™ Red Fluorescent Control 为专门用于测定转染效率的 miRNA mimic, 转染 UC-MSCs 后, 通过流式细胞仪检测其自带红光, 记录转染效率。实验结果发现, 当 BLOCK-iT™Alexa Fluor™ Red Fluorescent Control 浓度为 10 nmol/L、转染时间为 48 h 时, 转染效率最高, 见图5。该转染条件可作为目的基因 miR-1-5p 的最佳转染条件。

2.6 Q-PCR 检测 miR-1-5p 在 UC-MSCs 中的表达 采用 Q-PCR 法检测 miR-1-5p 转染 UC-MSCs 中的 miR-1-5p 表达水平, 结果显示, 与未经转染的 UC-MSCs 相比, 转染后 UC-MSCs 中 miR-1-5p 的表达显著升高 ($P < 0.05$), 表明 miR-1-5p 已成功转染 UC-MSCs, 并在其中表达, 见图6。

2.7 Q-PCR 检测过表达 miR-1-5p 的 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮患者 T 淋巴细胞亚群分化的影响 由于 Th17/Treg、Th1/Th2 平衡在系统性红斑狼疮中起着重要作用, 采用转染效率最高的条件即 10 nmol/L miR-1-5p 转染 UC-MSCs 24 h 后与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养 48 h, 收集 PBMCs, Q-PCR 检测共培养后各组系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 IL-17A、Foxp3、IFN- γ 、IL-4 的基因表达, 并进一步分析 Th17/Treg、Th1/Th2 细胞比例。

各组 PBMCs 中 IL-17A 的表达, 见表2, 图7A。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较, P 值分别为 0.138, 0.126, 0.056, 差异无显著性意义; UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较, P 值分别为 1.000, 0.991, 差异无显著性意义; UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较, P 值为 1.000, 差异无显著性意义。结果表明 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th17 的表达没有调节作用。

各组 PBMCs 中 Foxp3 的表达, 见表2, 图7B。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较, P 值分别为 0.006, 0.158, 0.056; UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较, P 值分别为 0.061, 0.173, 差异无显著性意义; UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较, P 值为 0.516, 差异无显著性意义。UC-MSCs+miR-1 组与 PBMCs 组相比, Foxp3 的表达增加, $P=0.006 < 0.05$, 差异有显著性意义, 表明 miR-1-5p

表2 | 各组外周血单个核细胞中 IL-17A、Foxp3 基因的相对表达量及 Th17/Treg 细胞比例的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 | Relative expression of interleukin-17A (IL-17A) and Foxp3 and the ratio of T helper cell 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) in peripheral blood mononuclear cells in each group

指标	UC-MSCs+ miR-1 组	UC-MSCs+ miR-NC 组	UC-MSCs 组	PBMCs 组	F 值	P 值
IL-17A	0.30±0.20	0.23±0.21	0.20±0.14	1.02±0.01	17.699	0.001
Foxp3	3.39±0.99 ^a	2.02±0.84	2.45±0.84	1.04±0.04	4.800	0.035
Th17/Treg	0.10±0.09 ^b	0.12±0.08 ^b	0.08±0.03 ^b	0.98±0.03	150.473	0.000

表注: 与 PBMCs 组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。IL-17A: 白细胞介素 17A; Th17: 辅助性 T 细胞 17; Treg: 调节性 T 细胞; PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

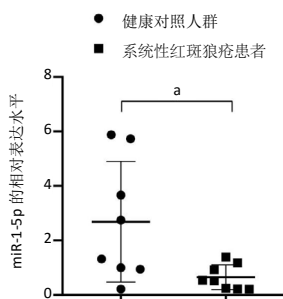
转染 UC-MSCs 具有促进系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Foxp3 表达的免疫调节作用, 未转染的 UC-MSCs 对 Foxp3 的调节作用不明显, miR-1-5p 可能加强了 UC-MSCs 对 Foxp3 表达的调节作用, 促进 Treg 细胞的分化。

统计基因水平各组 PBMCs 中 Th17/Treg 细胞比例, 见表2, 图7C。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较, P 值均 < 0.01 , 差异有非常显著性意义; UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较, P 值分别为 0.745, 0.688, 差异无显著性意义; UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较, P 值为 0.473, 差异无显著性意义。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组相比, Th17/Treg 细胞比例均降低, 表明未转染的 UC-MSCs 和 miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 均对系统性红斑狼疮患者外周血 PBMCs 中 Th17/Treg 细胞比例在基因水平起到调节作用, 改善了系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Th17/Treg 在基因水平的免疫失衡状态, 但 miR-1-5p 没有加强 UC-MSCs 对 Th17/Treg 细胞比例的调节作用。

各组 PBMCs 中 IFN- γ 的表达, 见表3, 图8A。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较, P 值分别为 0.106, 0.137, 0.046; UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较, P 值分别为 1.000, 0.993, 差异无显著性意义; UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较, P 值为 1.000, 差异无显著性意义。

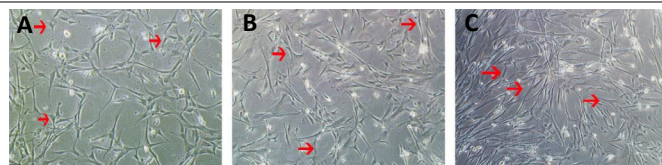
各组 PBMCs 中 IL-4 的表达, 见表3, 图8B。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较, P 值分别为 0.962, 0.169, 0.985, 差异无显著性意义; UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较, P 值分别为 0.835, 0.889, 差异无显著性意义; UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较, P 值为 0.999, 差异无显著性意义。结果表明 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th2 的表达没有调节作用。

统计基因水平各组 PBMCs 中 Th1/Th2 细胞比例, 见表3, 图8C。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs



图注：与健康对照组相比，^a $P < 0.05$ (8次独立实验的统计结果)

图1 | 系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中 miR-1-5p 的表达下调
Figure 1 | Down-regulation of miR-1-5p expression in peripheral blood mononuclear cells isolated from systemic lupus erythematosus patients



图注：图中 A 红色箭头所示为原代脐带间充质干细胞，呈短梭形或多角形；B 红色箭头所示为第 1 代脐带间充质干细胞，呈短梭形、多角形或长梭形；C 红色箭头所示为第 2 代脐带间充质干细胞，呈长梭形

图2 | 脐带间充质干细胞的形态观察 (×100)

Figure 2 | Morphological observation of umbilical cord-mesenchymal stem cells (×100)

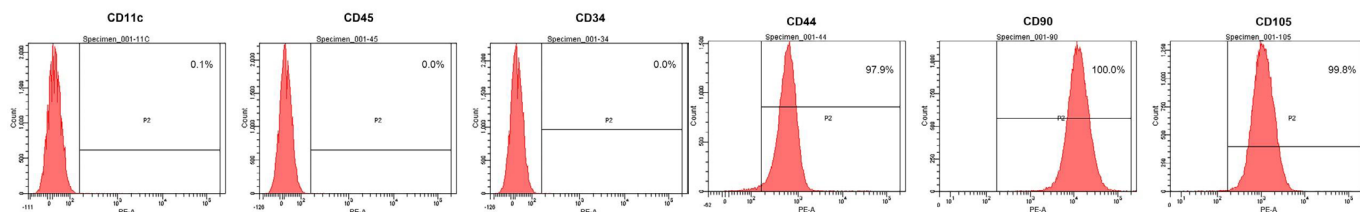
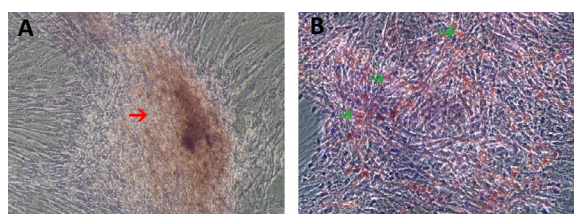


图3 | 脐带间充质干细胞表面标志蛋白的表达

Figure 3 | Expression of surface markers of umbilical cord-mesenchymal stem cells

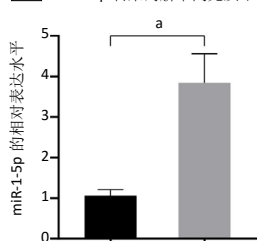


图注：图中 A 为茜素红染色成骨诱导培养的脐带间充质干细胞出现橘红色钙化结节，如红色箭头所示；B 为油红 O 染色成脂诱导培养的脐带间充质干细胞出现鲜红色脂滴，如绿色箭头所示

图4 | 脐带间充质干细胞的成骨和成脂诱导分化 (×100)

Figure 4 | Adipogenic and osteogenic induction and differentiation of umbilical cord-mesenchymal stem cells (×100)

■ 未转染的脐带间充质干细胞组
■ miR-1-5p 转染的脐带间充质干细胞组



图注：与未转染的脐带间充质干细胞组相比，^a $P < 0.05$ ($n=3$)

图6 | miR-1-5p 在脐带间充质干细胞中的表达

Figure 6 | Expression of miR-1-5p in umbilical cord-mesenchymal stem cells

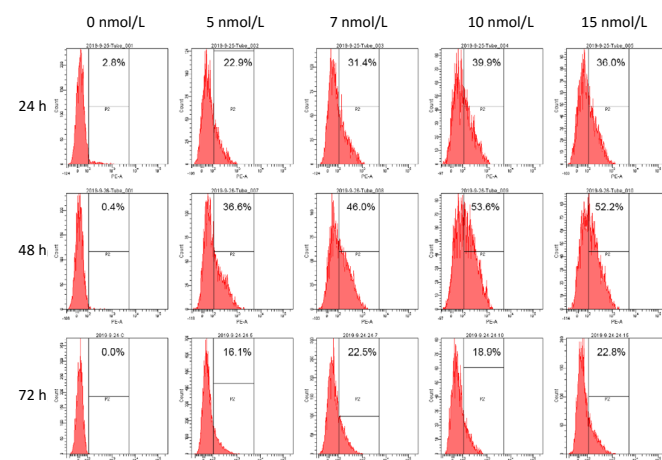


图5 | 流式检测 BLOCK-IT™ Alexa Fluor™ Red Fluorescent Control 在 0, 5, 7, 10, 15 nmol/L 浓度梯度下转染 24, 48, 72 h 的转染效率

Figure 5 | Transfection efficiency of BLOCK-IT™ Alexa Fluor™ Red Fluorescent Control evaluated through flow cytometry analysis under the concentrations of 0, 5, 7, 10, and 15 nmol/L for 24, 48, and 72 hours

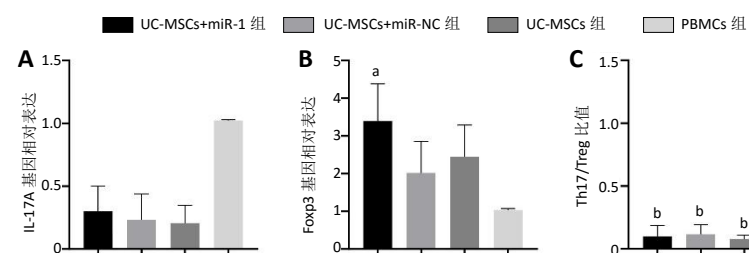


图7 | 各组外周血单个核细胞中 IL-17A(A)、Foxp3(B) 基因的相对表达量及 Th17/Treg 细胞比例 (C) 的变化

Figure 7 | Relative expression of interleukin-17A (IL-17A) (A), FOXP3 (B) gene and Th17/Treg ratio (C) in peripheral blood mononuclear cells of each group

图注：与 PBMCs 组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；UC-MSCs+miR-1 组：miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养；UC-MSCs+miR-NC 组：miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养；UC-MSCs 组：未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养；PBMCs 组：未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。IL-17A：白细胞介素 17A；Th17：辅助性 T 细胞 17；Treg：调节性 T 细胞；PBMCs：外周血单个核细胞；UC-MSCs：脐带间充质干细胞

表3 | 各组外周血单个核细胞中 IFN- γ 、IL-4 基因的相对表达量及 Th1/Th2 细胞比例的变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 | Relative expression of interferon - γ (IFN - γ), interleukin-4 (IL-4) and the ratio of T helper cell 1 (Th1)/T helper cell 2 (Th2) in peripheral blood mononuclear cells of each group

指标	UC-MSCs+ miR-1 组	UC-MSCs+ miR-NC 组	UC-MSCs 组	PBMCs 组	F 值	P 值
IFN- γ	0.30 $\pm$ 0.17	0.25 $\pm$ 0.21	0.22 $\pm$ 0.12 ^a	1.01 $\pm$ 0.01	19.162	0.001
IL-4	2.09 $\pm$ 1.85	0.43 $\pm$ 0.18	0.63 $\pm$ 0.83	1.01 $\pm$ 0.02	1.589	0.267
Th1/Th2	0.26 $\pm$ 0.24 ^a	0.57 $\pm$ 0.28	0.79 $\pm$ 0.54	0.99 $\pm$ 0.03	2.791	0.109

表注：与 PBMCs 组相比，^a $P < 0.05$ ；UC-MSCs+miR-1 组：miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养；UC-MSCs+miR-NC 组：miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养；UC-MSCs 组：未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养；PBMCs 组：未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。IFN- γ ：干扰素 γ ；IL-4：白细胞介素 4；Th1：辅助性 T 细胞 1；Th2：辅助性 T 细胞 2；PBMCs：外周血单个核细胞；UC-MSCs：脐带间充质干细胞

组分别与 PBMCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.025，0.153，0.470；UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.273，0.081，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较， P 值为 0.435，差异无显著性意义。UC-MSCs+miR-1 组与 PBMCs 组相比，Th1/Th2 细胞比例降低， $P=0.025 < 0.05$ ，差异有显著性意义，表明 miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Th1/Th2 细胞比例在基因水平起到调节作用，未转染的 UC-MSCs 对 Th1/Th2 细胞比例的调节作用不明显，miR-1-5p 可能加强了 UC-MSCs 对 Th1/Th2 细胞比例的调节作用，改善了系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Th1/Th2 在基因水平的免疫失衡状态。

2.8 流式细胞术检测过表达 miR-1-5p 的 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮患者 T 淋巴细胞亚群分化的影响 采用 10 nmol/L miR-1-5p 转染 UC-MSCs 24 h 后与患者 PBMCs 共培养 48 h，收集 PBMCs，通过流式细胞术检测共培养后各组系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Th17、Treg、Th1、Th2 细胞的分化情况及 Th17/Treg、Th1/Th2 细胞比例的变化。

2.8.1 各组 PBMCs 中 Th17 细胞的分化情况 Th17 细胞流式检测图，见图 9，Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率，见表 4，图 10A。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.418，0.902，0.494，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.490，0.897，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较， P 值为 0.574，差异无显著性意义。结果表明 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th17 细胞的分化没有调节作用。

2.8.2 各组 PBMCs 中 Treg 细胞的分化情况 Treg 细胞流式检测图，见图 11，Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率，见表 4，图 10B。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.049，0.075，0.185；UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.830，0.478，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较， P

值为 0.619，差异无显著性意义。UC-MSCs+miR-1 组 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率高于 PBMCs 组， $P=0.049 < 0.05$ ，差异有显著性意义，表明 miR-1-5p 转染 UC-MSCs 具有促进系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Treg 细胞分化的免疫调节作用，未转染的 UC-MSCs 对 Treg 细胞的调节作用不明显，miR-1-5p 可能加强了 UC-MSCs 对 Treg 细胞的调节作用，促进 Treg 细胞分化，这与 Q-PCR 的检测结果相一致。

2.8.3 各组 Th17/Treg 细胞比例 见表 4，图 10C。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.865，0.905，0.894，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.759，0.950，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较， P 值为 1.000，差异无显著性意义。结果表明 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th17/Treg 细胞比例没有影响。

2.8.4 各组 PBMCs 中 Th1 细胞的分化情况 Th1 细胞流式检测图，见图 12，Th1 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率，见表 5，图 13A。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.447，0.697，0.610，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.708，0.800，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较， P 值为 0.903，差异无显著性意义。结果表明 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th1 细胞的分化没有调节作用。

2.8.5 各组 PBMCs 中 Th2 细胞的分化情况 Th2 细胞流式检测图，见图 14，Th2 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率，见表 5，图 13B。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.595，0.886，0.730，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.697，0.851，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较， P 值为 0.840，差异无显著性意义。结果表明 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th2 细胞的分化没有调节作用。

2.8.6 各组 Th1/Th2 细胞比例 见表 5，图 13C。UC-MSCs+miR-1 组、UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组分别与 PBMCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.731，0.340，0.982，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-1 组分别与 UC-MSCs+miR-NC 组、UC-MSCs 组进行组间比较， P 值分别为 0.200，0.748，差异无显著性意义；UC-MSCs+miR-NC 组与 UC-MSCs 组比较， P 值为 0.329，差异无显著性意义。结果表明 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对 Th1/Th2 细胞比例没有影响。

2.9 生物相容性 脐带间充质干细胞具有低免疫原性，不刺激淋巴细胞增殖，可避免免疫排斥反应^[27]。有研究将人脐带间充质干细胞移植治疗 MRL/lpr 小鼠，显示出良好的治疗效果，且未见明显的移植物抗宿主反应^[28-30]。课题组利用 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 移植治疗 MRL/lpr 小鼠后，均未出现皮肤溃疡、腹泻、精神不振、体质量下降等表现，与其他研究报道一致。

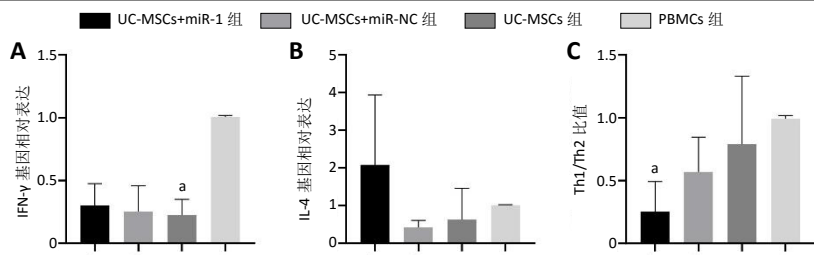


图 8 | 各组外周血单个核细胞中 IFN- γ (A)、IL-4(B) 基因的相对表达量及 Th1/Th2 细胞比例 (C) 的变化

Figure 8 | Relative expression of interferon- γ (IFN- γ) (A) and interleukin-4 (IL-4) (B) genes and the ratio of T helper cell 1 (Th1)/T helper cell 2 (Th2) (C) in each group

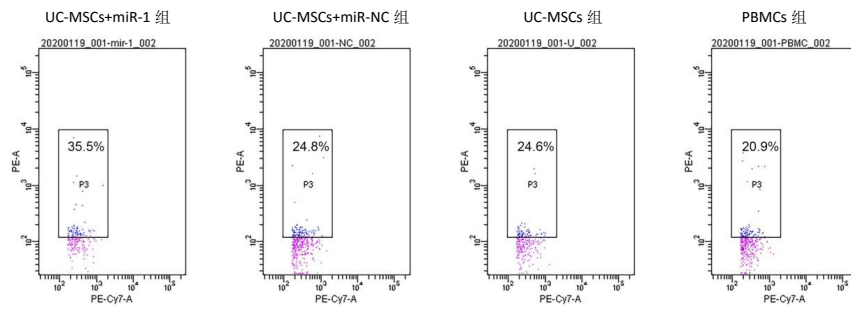


图 9 | 各组外周血单个核细胞中辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞) 流式检测图

Figure 9 | Flow cytometric analysis of T helper cell 17 (Th17 cells) in peripheral blood mononuclear cells of each group

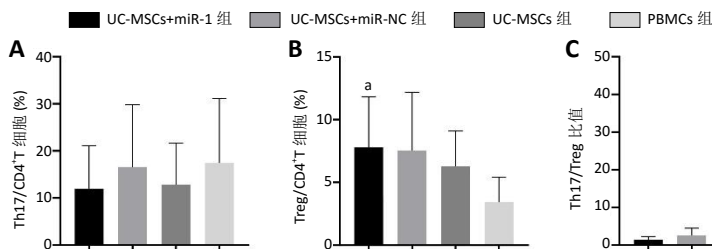


图 10 | 各组外周血单个核细胞中 Th17 细胞 (A)、Treg 细胞 (B) 的分化情况及 Th17/Treg 细胞比例 (C) 的变化

Figure 10 | Differentiation of T helper cells 17 (Th17 cells) (A) and regulatory T cells (Treg cells) (B) and the changes in the ratio of Th17/Treg cells (C) in peripheral blood mononuclear cells in each group

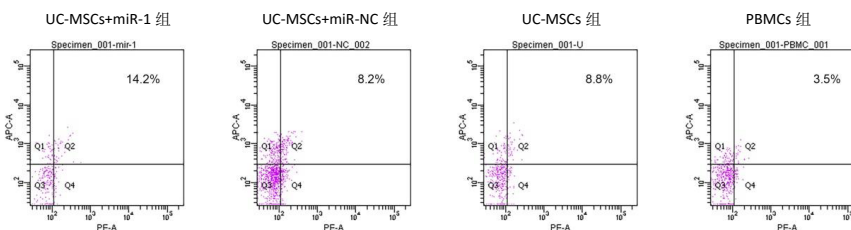


图 11 | 各组外周血单个核细胞中调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 流式检测图

Figure 11 | Flow cytometric detection of regulatory T cells (Treg cells) in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus in each group

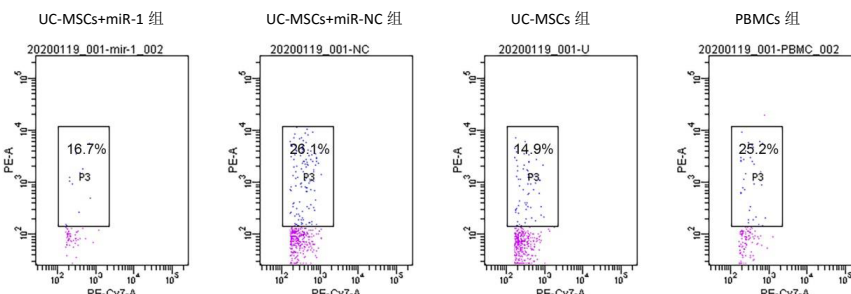


图 12 | 各组外周血单个核细胞中辅助性 T 细胞 1(Th1 细胞) 流式检测图

Figure 12 | Flow cytometric analysis of T helper cell 1 (Th1 cell) in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus in each group

图注: 与 PBMCs 组相比, $^aP < 0.05$; UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。IFN- γ : 干扰素 γ ; IL-4: 白细胞介素 4; Th1: 辅助性 T 细胞 1; Th2: 辅助性 T 细胞 2; PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

图注: UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

图注: 与 PBMCs 组相比, $^aP < 0.05$; UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。Th17: 辅助性 T 细胞 17; Treg: 调节性 T 细胞; PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

图注: UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

图注: UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

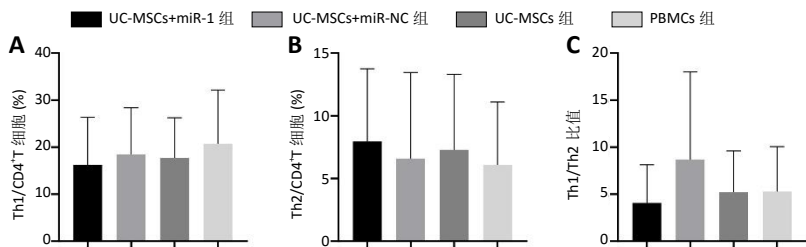


图 13 | 各组外周血单个核细胞中 Th1 细胞 (A)、Th2 细胞 (B) 分化情况及 Th1/Th2 细胞比例 (C) 的变化

Figure 13 | Changes in the differentiation of T helper cells 1 (Th1 cells) (A) and T helper cells 2 (Th2 cells) (B) and the ratio of Th1/Th2 cells (C) in peripheral blood mononuclear cells in each group

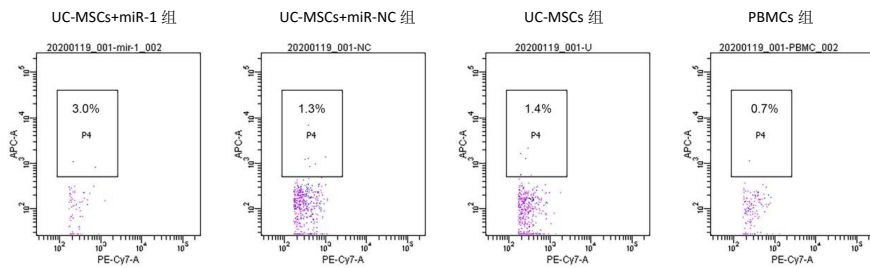


图 14 | 各组外周血单个核细胞中辅助性 T 细胞 2(Th2 细胞) 流式检测图

Figure 14 | Flow cytometric analysis of T helper cells 2 (Th2 cells) in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus of each group

表 4 | 各组外周血单个核细胞中 Th17、Treg 细胞的分化情况及 Th17/Treg 细胞比例的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 | Differentiation of T helper cell 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg cells) and changes in Th17/Treg cell proportions in peripheral blood mononuclear cells in each group

指标	UC-MSCs+ miR-1 组	UC-MSCs+ miR-NC 组	UC-MSCs 组	PBMCs 组	F 值	P 值
Th17(%)	11.98±9.13	16.62±13.18	12.84±8.80	17.44±13.72	0.337	0.798
Treg(%)	7.80±4.01 ^a	7.35±4.89	6.30±2.80	3.45±1.98	1.769	0.185
Th17/Treg	1.44±0.88	2.62±1.90	2.26±2.01	14.76±27.19	1.293	0.304

表注: 与 PBMCs 组相比, ^a $P < 0.05$; UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。Th17: 辅助性 T 细胞 17; Treg: 调节性 T 细胞; PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

3 讨论 Discussion

间充质干细胞是来源于发育早期中胚层的一群具有自我更新、增殖、多向分化潜能的干细胞。间充质干细胞具有低免疫原性, 可促进组织损伤修复, 通过与细胞直接接触或分泌可溶性因子调节免疫反应, 因此在血液系统疾病、神经系统疾病、心血管疾病以及自身免疫性疾病的治疗中显示出巨大的潜力^[31-32]。ZHOU 等^[33]通过荟萃分析发现骨髓间充质干细胞可能会成为治疗系统性红斑狼疮的一种有效手段。WANG 等^[34]的多中心临床研究利用脐带间充质干细胞移植治疗活动期和难治性系统性红斑狼疮, 对 40 例活动期系统性红斑狼疮患者进行 12 个月的随访, SLEDAI 评分在随访 3, 6, 9, 12 个月时明显下降, 血清白蛋白和补体 C3 水平在移植治疗后升高, 6 个月时达到峰值, 血清抗核抗体和抗双链 DNA 抗体均下降, 随访 3 个月时差异有显著性意义, 说明同种异

图注: UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。Th1: 辅助性 T 细胞 1; Th2: 辅助性 T 细胞 2; PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

图注: UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

表 5 | 各组外周血单个核细胞中 Th1、Th2 细胞分化情况及 Th1/Th2 细胞比例的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 | Differentiation of T helper cells 1 (Th1 cells) and T helper cells 2 (Th2 cells) and the changes in Th1/Th2 cell proportion in peripheral blood mononuclear cells in each group

指标	UC-MSCs+ miR-1 组	UC-MSCs+ miR-NC 组	UC-MSCs 组	PBMCs 组	F 值	P 值
Th1(%)	16.26±10.08	18.46±9.88	17.75±8.50	20.75±11.42	0.209	0.889
Th2(%)	7.95±5.79	6.59±6.87	7.30±6.01	6.09±5.02	0.112	0.952
Th1/Th2	4.08±4.04	8.69±9.30	5.21±4.40	5.29±4.76	0.658	0.588

表注: UC-MSCs+miR-1 组: miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs+miR-NC 组: miR-NC 转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; UC-MSCs 组: 未转染的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养; PBMCs 组: 未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 单独培养。Th1: 辅助性 T 细胞 1; Th2: 辅助性 T 细胞 2; PBMCs: 外周血单个核细胞; UC-MSCs: 脐带间充质干细胞

体脐带间充质干细胞移植治疗系统性红斑狼疮患者的临床疗效满意, 有较好的安全性和有效性。此外, 间充质干细胞移植治疗系统性红斑狼疮的并发症也有较好的效果。GU 等^[35]在一项单中心临床试验中, 利用骨髓间充质干细胞或脐带间充质干细胞治疗 81 例疾病活动期的难治性狼疮肾炎患者, 进行 12 个月的定期随访, 结果显示 60.5% 的患者病情得到缓解, 肾功能明显改善, SLEDAI 评分在治疗后明显降低。LI 等^[36]对 35 例患有难治性血细胞减少症的系统性红斑狼疮患者进行间充质干细胞移植治疗, 结果显示大多数患者的血细胞计数在治疗后有显著改善, 提示间充质干细胞对累及血液系统的系统性红斑狼疮患者有治疗作用。该文章为基于基因修饰的脐带间充质干细胞治疗系统性红斑狼疮患者的基础性研究, 为间充质干细胞在临床治疗上的应用提供实验依据和理论基础。

miRNAs 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 通过与目标 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-UTR) 结合使 RNA 降解或抑制蛋白翻译, 在转录后水平调控基因的表达^[37]。miRNAs 调节大约 90% 的蛋白质编码基因, 并在各种生物学过程中发挥核心作用, 包括细胞的分化、增殖、凋亡以及免疫稳态的维持。目前研究较深入的是 miRNAs 在肿瘤和自身免疫性疾病中的作用, 已经发现系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征、系统性硬化症等自身免疫性疾病中 miRNA 的表达水平变化^[38]。如 LIU 等^[39] 研究发现系统性红斑狼疮患者 CD3⁺T 细胞中 miRNA-410 的表达水平低于健康对照组, miRNA-410 通过直接靶向系统性红斑狼疮患者 CD3⁺T 细胞中的 STAT3 基因, 抑制 STAT3 磷酸化, 从而调控 STAT3 的失活。LI 等^[40] 研究发现 miR-153-3p 在系统性红斑狼疮患者中表达上调, 过表达 miR-153-3p 削弱了 UC-MSCs 在 MRL/lpr 小鼠中的治疗作用。由此可见, 不同的 miRNA 在系统性红斑狼疮中的作用不同。miR-1 最早被发现特异性表达于心肌细胞和骨骼肌细胞, 通过靶向组蛋白去乙酰化酶 4 促进肌肉分化, 在控制骨骼肌细胞增殖和分化方面起到重要作用^[41], 同时 miR-1 也在胚胎干细胞和心肌细胞的发育中发挥重要作用, 它与肌钙蛋白、Nkx2.5、血清反应因子等许多转录因子的表达有关, 参与心脏疾病的发生发展^[42]。大量研究已经证明 miR-1 和许多肿瘤的发生发展密切相关, 但 miR-1 在自身免疫性疾病中的研究相对较少, 近年来 miR-1 在特发性炎症性肌病中的异常表达逐渐被发现, PARKES 等^[43] 研究证实特发性炎症性肌病中增加的炎症细胞因子通过激活 NF- κ B 通路, 下调 miR-1 的表达, 从而抑制成肌细胞分化。该研究结果显示, 系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 miR-1-5p 的表达与健康对照组相比显著降低。因此作者推测, 是否可以通过 miR-1-5p 修饰脐带间充质干细胞, 加强其对系统性红斑狼疮的免疫调节作用。

Th17 细胞具有促炎效应, 在系统性红斑狼疮患者中 Th17 细胞比例较高, 且一般与疾病活动性呈正相关^[44]。Treg 细胞已经被证实维持免疫稳态和预防自身免疫性疾病中起着重要作用, Treg 细胞的分化或功能缺陷与包括系统性红斑狼疮在内的多种人类自身免疫性疾病有关^[45]。该实验结果显示, UC-MSCs 和 miR-1-5p 转染的 UC-MSCs 分别与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养后, 均在基因水平显著上调了 Th17/Treg 细胞比例, 提示 UC-MSCs 和 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 均可以调节系统性红斑狼疮患者 Th17/Treg 的免疫失衡。另外, 该研究中 q-PCR 结果显示, miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养组和未处理的系统性红斑狼疮 PBMCs 组相比, Foxp3 基因的表达显著上调, 而未经 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养组和未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 组相比, Foxp3 基因的表达趋势虽有上调, 但差异无显著性意义。以上结果也表明, miR-1-5p 基因修饰 UC-MSCs 后, 对系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Treg 细胞亚群分化的调节起到了协同作用。流式细胞术结果也显示, miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 与

系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养组和未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 组相比, Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例显著上调, 与 q-PCR 实验结果一致, 说明 miR-1-5p 可以通过修饰 UC-MSCs, 上调系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Treg 细胞比例, 加强对 Th17/Treg 细胞比例失衡的免疫调节作用。

系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Th1 表达上调, 导致 Th1/Th2 免疫失衡, 在其发病机制中起着重要的作用。该研究通过 q-PCR 法分析发现, miR-1-5p 转染 UC-MSCs 与系统性红斑狼疮患者 PBMCs 共培养组和未处理的系统性红斑狼疮患者 PBMCs 组相比, Th1/Th2 细胞比例显著降低, 未经修饰的 UC-MSCs 对 Th1/Th2 细胞比例有下调作用, 但差异无显著性意义, 说明 miR-1-5p 可能加强了 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮患者 Th1/Th2 比例失衡的调节作用, 在基因水平改善了系统性红斑狼疮患者 Th1/Th2 的免疫失衡状态。流式检测结果显示, UC-MSCs 和 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 Th1/Th2 细胞比例均有下调趋势, 但各组 Th1/Th2 细胞比例差异无显著性意义, 考虑与转录翻译过程、蛋白的半衰期和合成速度等诸多影响因素有关^[46]。

JAK/STAT 信号通路的失调与多种自身免疫性疾病有关, 过去已有很多研究证实, 系统性红斑狼疮的发病机制与 JAK/STAT3 信号通路的激活有关, Foxp3 基因对 Treg 细胞的发育至关重要, 在炎症条件下, STAT3 可以通过与 Foxp3 启动子结合, 减弱其表达, 从而抑制 Treg 细胞的分化^[47-49]。该研究已经证实 UC-MSCs 经 miR-1-5p 修饰后, 加强了其对系统性红斑狼疮患者 Treg 细胞的免疫调节作用, 可以促进 Treg 细胞的分化和增殖, 但其机制尚不明确。有研究表明 miRNA 可以通过靶向调控 STAT3 基因的表达而参与系统性红斑狼疮的发病^[39, 50], ZUO 等^[51] 研究证实 miR-1 的启动子区含有 STAT 结合位点, LI 等^[52] 研究发现 miR-1-3p 通过靶向 ETS1 基因的表达, 调控多发性硬化患者 Th17 细胞的分化。因此, miR-1-5p 是否通过与 STAT3 mRNA 的 3'-UTR 区结合, 调控 JAK/STAT3 信号通路, 影响 Treg 细胞的分化和增殖, 或通过作用于靶基因影响 Th17 细胞分化, 进而调节 Th17/Treg 的免疫失衡是下一步要深入研究的内容。

综上所述, 作者发现系统性红斑狼疮患者 PBMCs 中 miR-1-5p 的表达下调, miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮患者 Treg 细胞具有免疫调节作用。过表达 miR-1-5p 可以促进系统性红斑狼疮患者 Treg 细胞的分化和增殖, miR-1-5p 通过上调 Treg 细胞的表达, 调节 Th17/Treg 的免疫失衡, 同时也调节 Th1/Th2 的免疫失衡。这些结果均提示 miR-1-5p 修饰的 UC-MSCs 对系统性红斑狼疮患者 T 淋巴细胞亚群具有免疫调节作用, 为治疗系统性红斑狼疮提供了新思路。但 miR-1-5p 促进系统性红斑狼疮患者 Treg 细胞分化, 以及调节 Th17/Treg 和 Th1/Th2 失衡的机制有待深入研究。

致谢: 感谢包头医学院第一附属医院中心实验室提供的帮助。

作者贡献: 实验设计为孙晓林, 实验实施、资料收集为胡明智和张晶莹, 实验评估为鹿春艳、张伟、杨国安、王永福。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目 (81860294,

81860295)”“内蒙古自治区自然科学基金项目 (2019MS08055)”及“内蒙古自治区科技计划项目 (201802089, 2019GG052)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合包头医学院第一附属医院的相关伦理要求, 医院伦理批号: 2019 伦理审查第 (40) 号。

知情同意问题: 实验所用脐带标本来源于健康产妇, 并签订知情同意书, 由包头医学院第一附属医院产科收集; 外周血标本来源于包头医学院第一附属医院风湿免疫科系统性红斑狼疮患者和健康体检者, 并签订知情同意书, 由包头医学院第一附属医院中心实验室收集。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过包头医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名 - 非商业性使用 - 相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] HIDALGO Y, NÚÑEZ S, FUENZALIDA MJ, et al. Thymic B Cells Promote Germinal Center-Like Structures and the Expansion of Follicular Helper T Cells in Lupus-Prone Mice. *Front Immunol.* 2020;11:696.

[2] CHAN RW, LAI FM, LI EK, et al. Imbalance of Th1/Th2 transcription factors in patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45(8):951-957.

[3] CHEN M, CHEN X, WAN Q. Altered frequency of Th17 and Treg cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(11):e13012.

[4] GUIMARÃES PM, SCAVUZZI BM, STADTLOBER NP, et al. Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1/Th2 dualism lupus: cytokine profiles. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(9):824-831.

[5] TALAAT RM, MOHAMED SF, BASSYOUNI IH, et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine.* 2015;72(2):146-153.

[6] ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ L, MARTÍNEZ-TABOADA V, CALVO-ALÉN J, et al. Altered Th17/Treg Ratio in Peripheral Blood of Systemic Lupus Erythematosus but Not Primary Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol.* 2019;10:391.

[7] MARTINO DJ, BOSCO A, MCKENNA KL, et al. T-cell activation genes differentially expressed at birth in CD4+ T-cells from children who develop IgE food allergy. *Allergy.* 2012;67(2):191-200.

[8] DOLFF S, BIJL M, HUITEMA MG, et al. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2011; 141(2):197-204.

[9] LA CAVA A. Tregs in SLE: an Update. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(2):6.

[10] EL OMAR R, BEROUD J, STOLTZ JF, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(5):523-544.

[11] WANG D, HUANG S, YUAN X, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(5):423-431.

[12] ZHANG J, ZHOU S, ZHOU Y, et al. Hepatocyte growth factor gene-modified adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate radiation induced liver damage in a rat model. *PLoS One.* 2014;9(12):e114670.

[13] XU WL, ONG HS, ZHU Y, et al. In Situ Release of VEGF Enhances Osteogenesis in 3D Porous Scaffolds Engineered with Osterix-Modified Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 2017;23(9-10):445-457.

[14] FOROUZANFAR F, AMIN B, GHORBANI A, et al. New approach for the treatment of neuropathic pain: Fibroblast growth factor 1 gene-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells. *Eur J Pain.* 2018;22(2):295-310.

[15] XIAO C, NEMAZEE D, GONZALEZ-MARTIN A. MicroRNA control of B cell tolerance, autoimmunity and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020;64:102-107.

[16] WU Y, PU N, SU W, et al. Downregulation of miR-1 in colorectal cancer promotes radioresistance and aggressive phenotypes. *J Cancer.* 2020;11(16):4832-4840.

[17] TOWNLEY-TILSON WH, CALLIS TE, WANG D. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(8):1252-1255.

[18] KURA B, KALOCAYOVA B, DEVAUX Y, et al. Potential Clinical Implications of miR-1 and miR-21 in Heart Disease and Cardioprotection. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):700.

[19] HAN C, ZHOU Y, AN Q, et al. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET. *Tumour Biol.* 2015;36(9):6715-6723.

[20] NASSER MW, DATTA J, NUOVO G, et al. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 2018;293(33):12945.

[21] DATTA J, KUTAY H, NASSER MW, et al. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 2008;68(13):5049-5058.

[22] YOSHINO H, CHIYOMARU T, ENOKIDA H, et al. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer.* 2011; 104(5):808-818.

[23] LIU C, WANG J, ZHANG X. The involvement of MiR-1-clathrin pathway in the regulation of phagocytosis. *PLoS One.* 2014;9(6):e98747.

[24] TIAN M, ZHOU Y, JIA H, et al. The Clinical Significance of Changes in the Expression Levels of MicroRNA-1 and Inflammatory Factors in the Peripheral Blood of Children with Acute-Stage Asthma. *Biomed Res Int.* 2018;2018:7632487.

[25] ZILAH E, ADAMECZ Z, BODOKI L, et al. Dysregulated expression profile of myomiRs in the skeletal muscle of patients with polymyositis. *EJIFCC.* 2019;30(2): 237-245.

[26] NAVARRO QUIROZ E, NAVARRO QUIROZ R, PACHECO LUGO L, et al. Integrated analysis of microRNA regulation and its interaction with mechanisms of epigenetic regulation in the etiology of systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218116.

[27] MORADIAN TEHRANI R, VERDI J, NOUREDDINI M, et al. Mesenchymal stem cells: A new platform for targeting suicide genes in cancer. *J Cell Physiol.* 2018; 233(5):3831-3845.

[28] ZHANG Y, XIA Y, NI S, et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates pneumonitis of MRL/lpr mice. *J Thorac Dis.* 2014;6(2):109-117.

[29] GU Z, AKIYAMA K, MA X, et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Lupus.* 2010;19(13):1502-1514.

[30] 蔡心珍, 倪军, 李邹, 等. 脐带间充质干细胞对 MRL/lpr 小鼠免疫炎性易栓状态的调节作用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2015,23(6):1697-1701.

[31] KOT M, BAJ-KRZYWORZEKA M, SZATANEK R, et al. The Importance of HLA Assessment in “Off-the-Shelf” Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Based-Therapies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5680.

[32] ZHAO S, WEHNER R, BORNHÄUSER M, et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev.* 2010;19(5):607-614.

[33] ZHOU T, LI HY, LIAO C, et al. Clinical Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cells for Systemic Lupus Erythematosus. *Stem Cells Int.* 2020;2020:6518508.

[34] WANG D, LI J, ZHANG Y, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(2):R79.

[35] GU F, WANG D, ZHANG H, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation for lupus nephritis patients refractory to conventional therapy. *Clin Rheumatol.* 2014;33(11):1611-1619.

[36] LI X, WANG D, LIANG J, et al. Mesenchymal SCT ameliorates refractory cytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48(4):544-550.

[37] ZHOU C, ZHAO X, DUAN S. The role of miR-543 in human cancerous and noncancerous diseases. *J Cell Physiol.* 2021;236(1):15-26.

[38] CHEN JQ, PAPP G, SZODORAY P, et al. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2016;15(12):1171-1180.

[39] LIU D, ZHANG N, ZHANG X, et al. MiR-410 Down-Regulates the Expression of Interleukin-10 by Targeting STAT3 in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(1):303-315.

[40] LI D, LI X, DUAN M, et al. MiR-153-3p induces immune dysregulation by inhibiting PELL1 expression in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2020;53(4):201-209.

[41] CHEN JF, MANDEL EM, THOMSON JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006;38(2):228-233.

[42] DUAN L, XIONG X, LIU Y, et al. miRNA-1: functional roles and dysregulation in heart disease. *Mol Biosyst.* 2014;10(11):2775-2782.

[43] PARKES JE, DAY PJ, CHINOY H, et al. The role of microRNAs in the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;27(6):608-615.

[44] LI D, GUO B, WU H, et al. Interleukin-17 in systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *Autoimmunity.* 2015;48(6):353-361.

[45] VALENCIA X, YARBORO C, ILLEI G, et al. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007;178(4):2579-2588.

[46] 孙雯, 俞建, 时毓民, 等. 中药槐耳调节哮喘缓解期儿童外周血单个核细胞 Th1/Th2 平衡的基因及蛋白水平研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009,24(7):915-917.

[47] DE LA VARGA MARTÍNEZ R, RODRÍGUEZ-BAYONA B, AÑEZ GA, et al. Clinical relevance of circulating anti-ENA and anti-dsDNA secreting cells from SLE patients and their dependence on STAT-3 activation. *Eur J Immunol.* 2017;47(7):1211-1219.

[48] EGWUAGU CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2009;47(3):149-156.

[49] ALUNNO A, PADJEN I, FANOURIAKIS A, et al. Pathogenic and Therapeutic Relevance of JAK/STAT Signaling in Systemic Lupus Erythematosus: Integration of Distinct Inflammatory Pathways and the Prospect of Their Inhibition with an Oral Agent. *Cells.* 2019;8(8):898.

[50] LUO X, ZHANG L, LI M, et al. The role of miR-125b in T lymphocytes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2013;31(2): 263-271.

[51] ZUO H, WENG K, LUO M, et al. A MicroRNA-1-Mediated Inhibition of the NF-κB Pathway by the JAK-STAT Pathway in the Invertebrate *Litopenaeus vannamei*. *J Immunol.* 2020;204(11):2918-2930.

[52] LI L, MA X, ZHAO YF, et al. MiR-1-3p facilitates Th17 differentiation associating with multiple sclerosis via targeting ETS1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020; 24(12):6881-6892.