DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20220815.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20220815.1409.004.html

基于miR145-5p负反馈调控TGF-β1/Smads通路抑制巨噬细胞极化的实验研究

王晴晴[1],谌 曦[2]✉,万 磊[2],范海霞[2],刘天阳[2],李 明[2],刘 磊[2],葛 瑶[2],范文杰[1],费陈晨[1],周 倩[1]

(1.安徽中医药大学研究生院,安徽 合肥 230038;2.安徽中医药大学第一附属医院风湿科,安徽 合肥 230031)

[摘要]**目的**:探讨miR145-5p过表达对类风湿性关节炎(RA)患者滑膜巨噬细胞极化失衡的影响。**方法**:取对数生长期的人单核细胞(THP-1)诱导为成M1型巨噬细胞,将RA滑膜成纤维细胞M1型巨噬细胞与共培养成滑膜巨噬细胞。滑膜巨噬细胞分为4组:RA组(空白组)、TGF-β1组(模型组)、miR145-5p过表达组(TGF-β1+miR145-5p mimics组)、miR145-5p过表达阴性对照组(TGF-β1+miR145-5p-mimics-NC组)。空白组不做任何处理,其余3组均在培养基中TGF-β1处理诱导48 h。转染miR145-5p-mimic和miR145-5p-mimics-NC至共培养基中,ELISA法检测滑膜巨噬细胞IL-6、CD163表达。RT-qPCR检测miRNA145-5p、TGF-β1mRNA、Smad3mRNA、Smad7mRNA表达水平。WB免疫印迹法检测TGF-β1/Smads通路相关蛋白表达。**结果**:与空白组比较,模型组IL-6水平上调($P<0.01$),CD163水平下调($P<0.05$),提示TGF-β1可诱导加剧免疫炎症反应;与miR145-5p过表达阴性对照组、模型组相比,ELISA法显示miR145-5p过表达组抑炎分子CD163明显升高($P<0.01$),致炎因子IL-6表达降低($P<0.05$);PCR显示miR145-5p过表达组miR145-5p mRNA表达水平明显升高,Smad3 mRNA、TGF-β1 mRNA明显降低,Smad7 mRNA明显升高($P<0.01$);WB法显示miR145-5p过表达组抑炎蛋白Smad7明显升高,TGF-β1、Smad3蛋白明显降低($P<0.01$);transwell小室结果证实miR145-5p过表达组显著减少巨噬细胞侵袭($P<0.01$);相关性分析显示miR145-5p与Smad3负相关,与Smad7呈正相关($P<0.01$)。**结论**:miR145-5p可能通过靶向抑制Smad3蛋白,负反馈调控TGF-β1/Smads通路,抑制RA患者巨噬细胞极化,缓解免疫炎症反应。

[关键词]类风湿性关节炎;miR145-5p;TGF-β1/Smads通路;巨噬细胞极化;体外实验
[中图分类号]R593.22 [文献标识码]A [文章编号]1007-1237(2022)23-1803-07

Experimental study of TGF-β1/Smads pathway inhibition of macrophage polarization based on miR145-5P negative feedback regulation

WANG Qing-qing[1], SHEN Xi[2]✉, WAN Lei[2], FAN Hai-xia[2], LIU Tian-yang[2], LI Ming[2], LIU Lei[2], GE Yao[2], FAN Wen-jie[1], FEI Chen-chen[1], ZHOU Qian[1]

(1. *Graduate Department of Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230038, *China*; 2. *Department of Rheumatology the First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230031, *China*)

[*Foundation Project*]: *Natural Science Research Project of Colleges and Universities in Anhui Province* (*kj*2020*a*0396)

[*Author*]: *WANG Qing-qing*, *E-mail*: 2570358432@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *SHEN Xi*, *Chief Physician*, *Master's supervisor*, *E-mail*: *sx*2816902@163.*com*.

Received: 2022-06-15 *Revised*: 2022-08-12 *JHMU*, 2022;28(23):1803-1809

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To investigate the effect of miR145-5P overexpression on the polarization imbalance of synovial macrophages in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods**: Human mononuclear cells (THP-1) at logarithmic growth

[基金项目]安徽省高校自然科学研究项目(KJ2020A0396)

[作者简介]王晴晴,E-mail:2570358432@qq.com。
[通讯作者]谌曦,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:sx2816902@163.com。

[收稿日期]2022-06-15 [修回日期]2022-08-12 网络出版时间:2022-08-16 09-40-17

stage were induced into M1-type macrophages, and RA synovial fibroblasts M1-type macrophages were co-cultured into synovial macrophages. Synovial macrophages were divided into four groups :RA group (blank group), TGF-β1 group (model group) and miR145-5P overexpression group (TGF-β1+ miR145-5P mimics group) and miR145-5P overexpression negative control group (TGF-β1+ miR145-5P-mimics -NC group). The blank group did not receive any treatment, and the other three groups were induced by TGF-β1 in the medium for 48 h. Transfection miR145-5p mimic and miR145-5P-mimics-NC were added to co-culture medium, and IL-6, IL-6 and IL-6 of synovial macrophages were detected by ELISA.CD163 expression. Rt-qpcr was used to detect miR145-5p mRNA, TGF-β1mRNA, Smad3mRNA, Smad7mRNA expression level. The expression of TGF-β1/Smads pathway related proteins was detected by Western Blotting. **Results**: Compared with blank group, IL-6 level was up-regulated ($P<0.01$), and CD163 level was down-regulated in model group($P<0.05$), suggesting that TGF-β1 could induce intensified immune inflammatory response. Compared with the negative miR145-5P overexpression control group and model group, The expression of miR145-5P overexpression group molecule CD163 was significantly increased by ELISA($P<0.01$), and the expression of inflammatory factor IL-6 was decreased ($P<0.05$). PCR showed that miR145-5P mRNA expression level was significantly increased in miR145-5P overexpression group, Smad3 mRNA and TGF-β1 mRNA were significantly decreased, and Smad7 mRNA was significantly increased ($P<0.01$). WB method showed that the anti-inflammatory protein Smad7 was significantly increased, while TGF-β1 and Smad3 were significantly decreased ($P<0.01$). Transwell chamber results confirmed that miR145-5P overexpression group significantly reduced macrophage invasion ($P<0.01$). Correlation analysis showed that miR145-5P was negatively correlated with Smad3 and positively correlated with Smad7 ($P<0.01$). **Conclusion**: miR145-5P may inhibit macrophage polarization in RA patients by targeting Smad3 protein, negatively regulating TGF-β1/Smads pathway, and alleviating immune inflammation.

[**KEYWORDS**] Rheumatoid arthritis; miR145-5p; TGF-β1 / Smads pathways; Macrophage polarization; *In vitro* studies

类风湿性关节炎(rheumatiod arthritis, RA)是一种以滑膜关节侵蚀为主要病理基础的慢性疾病,其中巨噬细胞极化几乎贯穿RA发展及转归的全过程,通过抑制或消除促炎巨噬细胞的发育来重建巨噬细胞平衡将是治疗RA的有效方法[1]。TGF-β1/Smads通路已被证明与RA患者的滑膜增生相关,并被认为是RA治疗的一个重要靶点[2]。

微小RNA(microRNA,miRNA)是一种可与靶基因结合的非编码的小RNA,在调控巨噬细胞发育、增殖、凋亡中发挥重要作用[3]。RA患者的血液及滑膜中的miR145-5p表达异常,可对RA患者产生不可逆的关节损害[4]。活化的滑膜巨噬细胞在类风湿性关节炎中产生促进慢性炎症的异常调节条件中发挥着重要作用[5]。相关研究证实miR145-5p可能通过靶基因的表达来调控TGF-β1/Smads通路,对滑膜的炎症程度造成影响[6,7]。本研究通过体外实验培养滑膜巨噬细胞,分析其中miR145-5p表达水平的差异对TGF-β1/Smads通路巨噬细胞极化的影响,为RA的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人AB血清购自上海素尔生物科技有限公司;酶标仪型号RT-6000购自雷杜公司;DMEM培养基购自美国Gibco公司;电热恒温箱型号DNP-9052BS-Ⅲ购自上海三发;人白细胞介素6(IL-6)型号JYM0140Hu&、人sCD163型号JYM2022Hu&均购自武汉基因美科技有限公司;离心机型号JW3021HR安徽嘉文公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(反转录试剂盒)购自赛默飞世尔科技公司;引物合成序列购自Sangon Biotech公司;Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus(荧光染料)试剂盒购自Roche公司;荧光定量PCR仪型号PIKOREAL 96购自Thermo Scientific公司;低速迷你离心机型号TD5ATD5A购自湖南赫西仪器装备有限公司;Western一抗二抗去除液购自Beyotime公司;转染相关miR145-5p购自Ambion公司;Smad3蛋白购自abcam公司;Smad7蛋白购自Bioworld公司;TGF-β1购自abcam公司;GAPDH购自Zsbio公司。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞与滑膜成纤维细胞培养 取健康成人AB血清,用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC),用洗液(含2% FBS的PBS)洗涤,悬浮细胞并计数,取对数生长期的人单核细胞(THP-1)以接种于孔板中,加入佛波酯,培养48 h即巨噬细胞,在IFN-γRPMI1640完全培养基2 mL中24 h后即可诱导为M1型巨噬细胞。通过transwell共培养小室将RA滑膜成纤维细胞与M1型巨噬细胞共培养。

1.2.2 细胞培养、分组 滑膜巨噬细胞在DMEM完全基中,进行滑膜巨噬细胞共培养,将共培养细胞分为4组:RA组(空白组)、TGF-β1组(模型组)、TGF-β1+miR145-5p mimics(miR145-5p过表达组)、TGF-β1+miRNA-145-5p mimics-NC(miR145-5p阴

性对照组)。

1.2.3 细胞转染 共培养细胞接种于6孔板中,LPS预刺激24 h后PBS清洗2次。空白组不做任何处理,模型组、过表达组、阴性对照组培养基中加入TGF-β1处理48 h诱导(终质量浓度为10 ng/mL)。过表达组和阴性对照组在10 ng/mL的TGF-β1处理诱导48 h后,采用Lipofect-mineTM2000转染试剂说明书进行转染。将miR145-5p mimics和miRNA-145-5p mimics-NC转染至共培养细胞,转染后培养6 h,更换含10%AB血清的低糖DMEM培养基继续培养24 h,收集各组细胞。

1.2.4 ELISA法检测滑膜巨噬细胞表达 转染培养24 h后取细胞培养上清1000 g 离心20 min,取上清液。采用酶联免疫吸附法(ELISA)IL-6,CD163的浓度,用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(OD值)。

1.2.5 qRT-PCR检测miR145-5p与TGF-β1/Samd通路表达 取各组细胞加入Trizol试剂,提取总RNA,A250/A270的比值在19~201用于反转录,参照参考文献利用PCR试剂盒进行扩增[8]。miR145-5p以U6为内参,使用Relative Quantification Study,计算方法为$2^{-\triangle\triangle Ct}$。计算miR145-5p、TGF-β1mRNA和Smad3mRNA、Smad7mRNA的相对表达水平。实验用各引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

Gene	Forward primer(5′→3′)	Reverse primer(5′→3′)
β-actin	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
Smad3	AAGATCCCACCAGGATGCAA	GGTCAACTGGTAGACAGCCT
Smad7	GGGCGGTCATCATTTCAC	CCCACTGAGCGTGTCCAA
TGF-β1	GAGCTGCGTCTGCTGAG	AGGTATCGCCAGGAATTGTT
miR145-5p	ACACTCCAGCTGGGGTCCAGTTTTCCCAGGA	TGGTGTCGTGGAGTCG
miR145-5p-RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG AGGGAT	

1.2.6 Westernblot检测Smad蛋白表达 收取细胞样本(约1×10^5个细胞)或组织样本(约0.1 g左右),加入RIPA细胞裂解液600 μL(内含0.6 mmol/L PMSF)进行裂解。12 000 r/min离心15 min。参照参考文献方法[9],分别进行SDS-PAGE电泳、转膜液、封闭、一抗二抗稀释(一抗稀释比例1∶1 000、二抗稀释比例1∶20 000)、室温孵育。加入洗涤液(PBST)洗膜后,显色来检测蛋白。

1.2.7 Transwell细胞迁移实验 Transwell小室培养24 h后(37 ℃),拭去微孔膜上未穿过小室膜的细胞;室温条件下用4%多聚甲醛溶液处理细胞20 min,后染色15 min,在光学显微镜随意观察3个视野穿过Transwell小室膜的细胞数。

1.2.8 CCK8实验检测细胞生长情况 转染48 h后,胰酶消化对数期细胞分别接种于96孔板中,每孔100 μL细胞悬液,并设置只加培养液不接种细胞的空白对照组和模型组,每组设3个复孔。在孵育培养48 h后(37 ℃,5%CO_2),每孔加入10 μL CCK8,继续培养2 h,用酶标仪测定在460 nm处的吸光度。

1.3 统计学处理

采用统计学软件SPSS26.0数据分析软件及GraphPadPrism 7绘图软件处理数据。计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,相关性分析采用Spearman分析,以$P<0.05$表示差异有统计学意义。组内两两比较采用LSD-t检验,多组间数据的比较采用ANOVA,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF-β1诱导对滑膜巨噬细胞细胞表达水平的影响及miR145-5p过表达对滑膜巨噬细胞炎症因子表达的影响

实验结果显示,与空白组相比,TGF-β1组滑膜MI型巨噬细胞IL-6显著升高($P<0.01$),M2型巨噬细胞分子CD163显著降低($P<0.05$),提示TGF-β1诱导刺激可加剧炎症反应。与模型组和miR145-5p过表达阴性对照组相比,miR145-5p mimics组滑膜巨噬细胞抑炎分子CD163水平均显著升高($P<0.01$),致炎因子IL-6显著降低($P<0.05$),提示miR145-5p过表达可抑制致炎因子表达,促使M1型巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化。见表2。

表2 TGF-β1对滑膜巨噬细胞细胞中IL-6和CD163表达的影响(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of TGF-β1 on the expression of IL-6 and CD163 in synovial macrophages (n=6,$\bar{x}\pm s$)

Groups	IL-6 (ng/mL)	CD163 (pg/mL)
RA组	16.42±1.31	8 387.08±1 223.47
TGF-β1组	109.15±17.56▲▲	1 342.53±231.01▲
TGF-β1+miR145-5p mimics组	54.71±5.23*	4 205.62±402.77▲▲**
TGF-β1+miR145-5p mimics-NC组	106.31±16.38	8 081.49±1 766.91
F	78.496	56.201
P	<0.001	<0.05

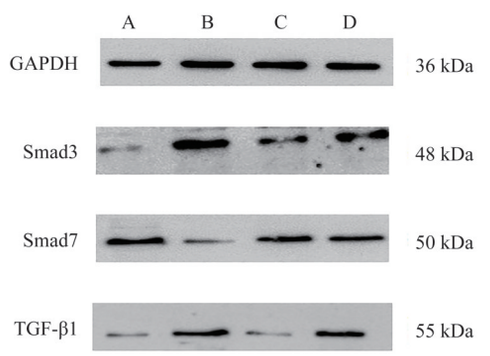
注:与空白组相比,▲P<0.05,▲▲P<0.01;与模型组、过表达阴性对照组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.2 miR145-5p过表达与TGF-β1/Smads通路基因表达关系

PCR检测结果显示,与模型组和miR145-5p过表达阴性对照组相比,miR145-5p-mimics组能明显上调共培养细胞中miR145-5p的表达水平,抑制共培养细胞中TGF-β1mRNA的表达水平,Smad3 mRNA显著降低,Smad7 mRNA显著升高(P<0.01),差异具有统计学意义,见表3。提示miR145-5p过表达可通过抑制TGF-β1、Smad3的表达,促进Smad7的表达进而调控TGF-β1/Smads通路。

2.3 miR145-5p过表达对滑膜巨噬细胞相关蛋白的影响

Western blot实验结果显示,4组的标志蛋白条带表达水平比较差异显著,见图1。miR145-5p过表达组Smad7蛋白显著高于模型组和miR145-5p过表达阴性对照组,差异具有统计学意义(P<0.01),见表4。提示miR145-5p mimics在滑膜巨噬细胞中可抑制TGF-β1、Smad3蛋白的表达,增加Smad7蛋白的表达。



A:RA组;B:模型组;C:miR145-5p过表达组;D:miR145-5p过表达阴性对照组

图1 各组滑膜巨噬细胞TGF-β1/Smads信号通路相关蛋白表达情况

Fig 1 Expression of TGF-β1/Smads signaling pathway related proteins in synovial macrophages of each group

2.4 miR145-5p过表达对RA滑膜巨噬细胞迁移的影响

CCK-8检测细胞的迁移能力,transweill小室显微镜下观察,迁移实验可见miR145-5p过表达组的穿膜细胞明显少于RA组、模型组和过表达阴性对照组(P<0.01),见图2、3。transwell小室结果表明miR145-5p过表达明显减少巨噬细胞侵袭,改善炎症反应。

表3 miR145-5p过表达对TGF-β1诱导的Smad蛋白基因的的影响(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of miR145-5P overexpression on TGF-β 1-induced Smad protein gene (n=6,$\bar{x}\pm s$)

Groups	Smad3	Smad7	TGF-β1	miR145-5p
RA组	1.03±0.49	1.00±0.23	0.99±1.06	1.02±0.60
TGF-β1组	2.43±1.45	0.49±0.46	3.07±0.26	0.61±0.80
TGF-β1+miR145-5p mimics组	1.79±0.39▲▲**	0.75±0.51▲▲**	2.20±0.74▲▲**	4.20±0.61▲▲**
TGF-β1+miR145-5p mimics-NC组	2.32±0.14	0.53±0.72	3.00±0.21	1.09±0.97
F	50.505	127.288	34.371	51.920
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与模型组、miR145-5p过表达阴性对照组相比,▲▲P<0.01,**P<0.01。

2.5 miR145-5p及M1、M2型巨噬细胞标志物与Smads蛋白表达的相关性分析

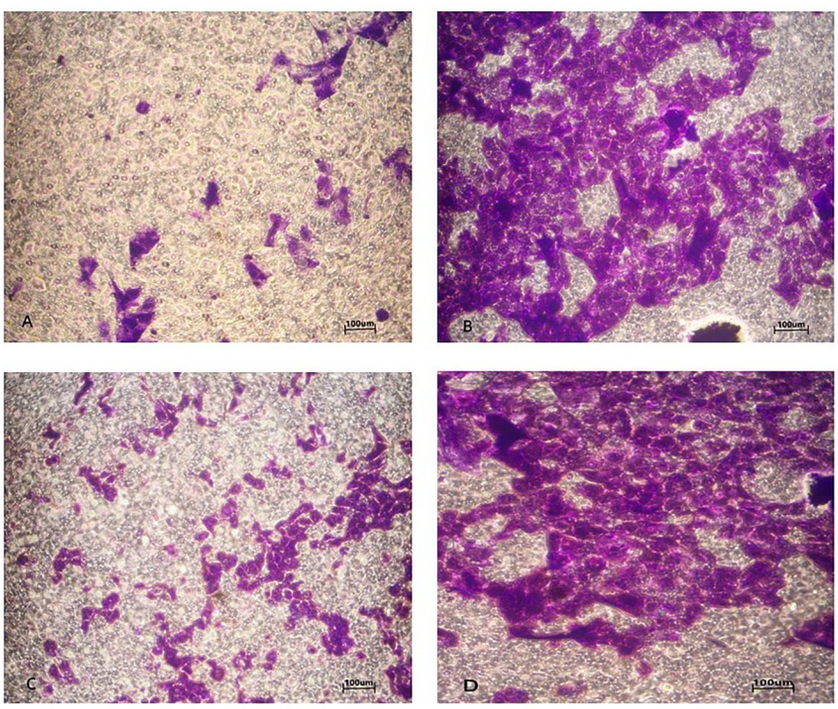
Spearman相关性分析得出,miR145-5p与Smad3呈负相关(P<0.01)、与Smad7呈正相关(P<0.01);M1型巨噬细胞IL-6与Smad3呈正相关(P<0.01)、与Smad7呈正相关(P<0.05),M2型巨噬

表4　滑膜巨噬细胞中TGF-β1/Smads通路蛋白表达情况(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Expression of TGF-β1/Smads pathway proteins in synovial macrophages (n=6,$\bar{x}\pm s$)

Groups	Smad3	Smad7	TGF-β1
RA组	0.17±0.09	0.86±0.11	0.32±0.02
TGF-β1组	0.63±0.39	0.18±0.98	0.67±0.10
TGF-β1+miR145-5p mimics组	0.20±0.50▲▲**	0.60±0.52▲▲**	0.32±0.95▲▲**
TGF-β1+miR145-5p mimics-NC组	0.58±0.45	0.48±0.29	0.55±0.11
F	154.77	40.31	29.75
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与模型组、miR145-5p过表达阴性对照组相比,▲▲P<0.01,**P<0.01。



A:RA组;B:模型组;C:miR145-5p过表达组;D:miR145-5p过表达阴性对照组

图2　显微镜视野下穿膜细胞图片(×100)

Fig 2　Picture of transmembrane cells under microscope(×100)

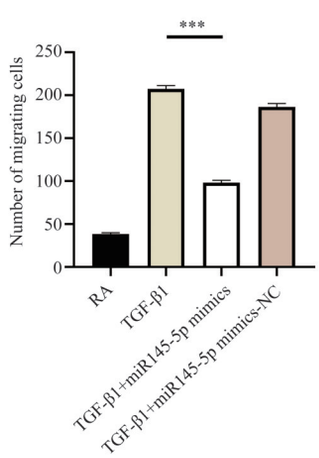


图3　显微镜视野下穿膜细胞数目

Fig 3　Number of transmembrane cells in microscopic field

细胞分子CD163与Smad3、Smad7的相关性同IL-6相反。相关性分析结果表明miR145-5p可通过抑制Smad3表达调节巨噬细胞极化,见表5。

表5　miR145-5p及巨噬细胞标志物及与Smads蛋白表达的相关性分析

Tab 5　Correlation analysis of miR145-5P and macrophage markers and Smads protein expression

指标		Smad3	Smad7
miR145-5p	r	−0.645	0.964
	P	0.004	<0.001
IL-6	r	0.832	−0.513
	P	0.001	0.004
CD163	r	−0.821	0.918
	P	0.002	0.013

3 讨论

RA是临床常见的、进行性发展的免疫性疾病。越来越多的证据表明，巨噬细胞极化在RA疾病的发展过程中发挥举足轻重的作用[10]。巨噬细胞分为两个亚群，M1型巨噬细胞极化后分泌大量促炎性细胞因子、趋化因子等激活成纤维细胞和破骨细胞，引发一系列炎症反应，造成关节软骨破坏，M2型巨噬细胞表面表达拮抗致炎分子促进组织修复和减轻炎症反应[11,12]。相关研究发现[13,14]，在RA患者和小鼠模型血液和滑膜组织中，巨噬细胞与M1和M2标记物不平衡存在于细胞的表面，滑膜中M1/M2比值增加，促进了破骨细胞的形成，并增强免疫应答。因此干预巨噬细胞M1型向M2型转变，使M1/M2恢复动态平衡状态，有利于促进RA滑膜炎症的修复。

转化生长因子-β（TGF-β）为多效能生长因子，可刺激细胞外基质的分泌与沉积，在诱导细胞凋亡、骨的形成、调节血细胞生成及免疫应答等风湿免疫疾病方面起着重要的调节作用。Sun等[15]发现TGF-β1在RA患者滑膜巨噬细胞的高表达具有特异性，TGF-β1在滑膜巨噬细胞的高表达可促进RA患者中M1型致炎因子表达，从而促进其发生炎症反，导致RA患者病情的复发和发展。Zhu等[16]研究证实TGF-β1在RA患者的成纤维细胞样滑膜细胞（FLSs）和滑膜液中表达较高，TGF -β1增强RA的迁移和侵袭。本次实验，采用TGF-β1诱导刺激滑膜巨噬细胞，以未经TGF-β1诱导刺激的滑膜巨噬细胞作为对照，ELISA法检测结果显示，模型组M1型巨噬细胞IL-6分泌水平升高，M2型巨噬细胞分子CD163分泌水平降低，说明TGF-β1刺激可加剧了滑膜巨噬细胞炎症反应，这也与之前的相关研究结果相符。

TGF-β1通过募集炎性因子、细胞增殖等形式作用于巨噬细胞及免疫细胞等，使下游Smads蛋白家族活化，TGF-β1/Smads通路已被证明是改善RA滑膜增生的一个重要靶点[17]。SMAD蛋白是TGF-β细胞内信号传导重要下游通路，经TGF-β受体-Ⅰ磷酸化（TβRI）后，与受体调节型蛋白SMAD3形成异构体复合物，磷酸化并激活下游的Smad3诱导向间充质上质转化，促进RA病理。Smad3基因多态性可能导致TGF/Smad信号通路的干扰，而该信号通路通过多重机制影响T细胞的反应和基因表达[18]，这可能导致抑制反式生长因子（TGF）-β介诱导Treg细胞，以及诱导Th1和Th17的发育。Smad7是抑制型蛋白而，Smad7能引起TβRI降解，从而阻断Smad3磷酸化，抑制TGF-β1传导，阻止炎症对关节持续造成损伤，延缓RA疾病进展。Smad7缺失可能刺激Th细胞分化和自身抗体的产生，从而促进自身免疫性关节炎进展，增强NF-κB激活、Th1/Th17分化和滑膜炎症[19]。因此，降低Smad3蛋白表达、增加Smad7蛋白表达可能是延缓RA关节滑膜炎症的关键步骤。

miRNA可通过与靶基因的互补配对，在转录后调节基因表达进而调控调控下游Smad蛋白的表达，在RA发展机制中发挥重要作用。miR145-5p作为miRNA家族成员之一，近年来研究miR145-5p表达对RA的影响愈加深入。明建松等[20]成功建立胶原诱导的小鼠模型，发现miR145-5p抑制了CIA小鼠的关节炎症。Qiu等[21]通过慢病毒介导的miR145过表达分离和敲除重组病毒，发现miR145增强了TGF-β/Smad通路，导致星状细胞的激活。本研究PCR结果显示miR145-5p过表达组相比其他三组而言，miR145-5p mRNA表达明显升高，Smad3mRNA表达明显降低，Smad7mRNA表达明显升高。ELISA结果显示miR145-5p过表达组抑制M2型巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化，降低降低M1型致炎因子表达，增加M2型抑炎因子表达；transwell小室结果显示miR145-5p过表达明显减少巨噬细胞侵袭。以上证据都表明miR145-5p过表达能调节巨噬细胞极化平衡。

Paradowska等[22]基于ROC分析，认为Smad3可能是类风湿性关节炎临床实验和诊断的重要生物标志物。Yu等[23]利用双荧光素酶报告基因分析，Smad3、TGF-β1炎症通路的关键元素是miR145的靶点。Yu等[24]利用在线预测法证实Smad3是miR145与3‘-UTR结合的直接靶基因，过表达miR145显著抑制了Smad3mRNA和蛋白的表达，部分地抑制破骨细胞分化。此次实验通过WB对RA患者TGF-β1/Smads通路相关蛋白表达水平进行分析，结果发现miR145-5p过表达组Smad3降低，Smad7升高，M1型致炎因子表达下降，M2型抑炎因子表达升高。同时相关性分析显示miR145-5p与Smad3呈负相关，M1、M2型巨噬细胞极化标志物与Smad3、Smad7相关性也和PCR、WB结果相佐证。

综上所述，本研究得到以下结论：miR145-5p过表达可能通过负反馈调控Smad3蛋白，抑制TGF-β1/Smads通路炎症因子的表达，抑制M2型巨噬细胞向M1型转变，从而维持巨噬细胞极化动态平衡，可能是RA的临床实验和治疗新的靶点。

作者贡献度说明：

王晴晴：进行细胞试验、记录分析数据、撰写论文；谌曦：设计试验，并对论文提出指导意见；万磊、范海霞、刘天阳、李明、刘磊、葛瑶：参与实验内容及收集数据；范文杰、费陈晨、周倩：标本采集。

所有作者声明无利益冲突。

参考文献

1 成宇,丁梦蕾,叶蓓,等.缺氧环境中RA滑膜成纤维细胞促进巨噬细胞向M2极化[J].现代免疫学,2019,39(4):265-270.

2 Wang SQ, Wang S, Li HB, et al. Inhibition of the TGF-β/Smads signaling pathway attenuates pulmonary fibrosis and induces anti-proliferative effect on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis [J] . Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(5): 1835-1845.

3 Zhu Y, Zhang X, Yang KK, et al. Macrophage-derived apoptotic vesicles regulate fate commitment of mesenchymal stem cells via miR155 [J] . Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 323.

4 Oka S, Furukawa H, Shimada K, et al. Plasma miRNA expression profiles in rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease [J] . BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1): 21.

5 Fukui S, Iwamoto N, Takatani A, et al. M1 and M2 monocytes in rheumatoid arthritis: A contribution of imbalance of M1/M2 monocytes to osteoclastogenesis [J] . Front Immunol, 2017, 8: 1958.

6 Chen Y, Wang X, Yang M, et al.miR-145-5p increases osteoclast numbers *in vitro* and aggravates bone erosion in collagen-induced arthritis by targeting osteoprotegerin [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 5292-5300.

7 Hong BK, You SY, Yoo SA, et al. MicroRNA-143 and -145 modulate the phenotype of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis [J]. Exp Mol Med, 2017, 49(8): e363.

8 郭淑芳,姜婷婷.下调miR-217抑制类风湿性关节炎患者外周血单个核细胞炎症反应的实验研究[J].中国免疫学杂志,2020,36(8):933-938

9 Sang YL . Current knowledge for the western blot normalization.[J]. J Med Oncol Ther, 2018, 3(1): 3-6.

10 Zhou X ,Huang DD, Wang RK, et al. Targeted therapy of rheumatoid arthritis *via* macrophage repolarization. [J]. Drug delivery, 2021, 28(1) :2447-2459.

11 Quero LL, Hanser E, Manigold T, et al. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype[J].Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 245.

12 Iwasaki M, Kamiya K, Murata S, et al. Involvement of M1/M2 macrophages in the pathomechanisms of intralymphatic histiocytosis associated with rheumatoid arthritis[J]. J dermatol, 2019, 46(1): e42-e43.

13 Tardito S, Martinelli G, Soldano S ,et al. Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: A systematic review [J]. Autoimmun Rev, 2019, 18 (11) : 102397.

14 Kim H, Back JH, Han G, et al. Extracellular vesicle-guided *in situ* reprogramming of synovial macrophages for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Biomaterials, 2022, 286: 121578.

15 Sun WK, Yi MM, Bai Y ,et al. Correlations between the polymorphism of +869T/C in TGF-β1 and rheumatoid arthritis [J]. J Musculoskelet Neuronal Int, 2019, 19 (1): 127-132.

16 Zhu DJ, Zhao JJ, Lou AJ, et al. Transforming growth factor β1 promotes fibroblast-like synoviocytes migration and invasion *via* TGF-β1/Smads signaling in rheumatoid arthritis [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 459 (1-2) : 141-150.

17 Geng Q, Wei QF, Wang SJ ,et al. Physcion 8-O-β-glucopyranoside extracted from Polygonum cuspidatum exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects on MH7A rheumatoid arthritis-derived fibroblast-like synoviocytes through the TGF-β/MAPK pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(2): 745-754.

18 Paradowska-Gorycka A, Romanowska-Próchnicka K, Haladyj E, et al. Association of the Smad3 and *NFATc2* gene polymorphisms and their serum levels with susceptibility to rheumatoid arthritis in Polish cohorts [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 179(3): 444-453.

19 Zhou GM, Sun XL, Qin QX, et al. Loss of Smad7 promotes inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2537.

20 明建松,王晓雪,杨梦晨,等.MiR-145-5p对胶原诱导的关节炎小鼠关节炎症的影响[J].天津医科大学学报,2019,25(2):115-118.

21 Qiu JL, Zhang GF, Chai YN ,et al. Ligustrazine attenuates liver fibrosis by targeting miR-145 mediated TGF-β/Smad signaling in an animal model of biliary atresia[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2022.381 (3) :257-265

22 Paradowska GA, Anna W, Romanowska PK, et al. Th17/Treg-related transcriptional factor expression and cytokine profile in patients with rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2020, 11: 572858-572858

23 Yu C, Liu Y, Sun L, et al. Chronic obstructive sleep apnea promotes aortic remodeling in canines through miR-145/Smad3 signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(23): 37705.

24 Yu FY, Xie CQ, Sun JT, et al. Overexpressed miR-145 inhibits osteoclastogenesis in RANKL-induced bone marrow-derived macrophages and ovariectomized mice by regulation of Smad3 [J]. Life Sci, 2018, 202: 11-20.

[**本文编辑**] 邹 洲 宋睿璞 朱 昊