



过程中巨噬细胞极化的变化规律,为临床设计以巨噬细胞为干预靶点治疗炎症性疾病的治疗策略提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 光感受器间维生素 A 结合蛋白(IRBP)(上海生工公司);结核分枝杆菌(TB)(Difco 公司,美国);完全弗式佐剂(CFA)(Sigma 公司,美国);miR-223-3p 慢病毒(吉满生物科技,上海);高纯度质粒抽提试剂盒(TIANGEN,北京);报告基因检测试剂盒(吉满生物科技,上海);大鼠组织单核细胞分离液试剂盒(Solarbio 公司,北京);藻红蛋白(PE)CD86(eBioscience 公司,美国);PE-CD206(圣克鲁斯生物技术有限公司,上海);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天公司,上海);NLRP3、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素 10(IL-10)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(江莱生物技术有限公司,上海);RNA 提取试剂盒(思科捷公司,济南);逆转录试剂盒(诺唯赞生物科技股份有限公司,南京);LightCycler 480 实时荧光定量 PCR(Q-PCR)仪(Roche 公司,美国);多功能酶标仪(Perkin-Elmer 公司,美国);流式细胞仪(BD FACSVerser™流式细胞仪,美国)。

**1.2 实验动物分组及处理** 将 48 只健康 Lewis 雌性大鼠(鼠龄 6~8 周,体重 160~180 g,Charles River 维通利华公司,北京)随机分为正常对照(NC)组、实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)组和 miR-223-3p 慢病毒组,每组 16 只。EAU 组和 miR-223-3p 慢病毒组大鼠腹部两侧、颈背部、两足底分别注射 200  $\mu$ L 含 IRBP、CFA 和 TB 的乳糜液以诱导 EAU 模型,NC 组大鼠在相同部位注射 200  $\mu$ L 只含 CFA、TB 的混合液(无 IRBP 多肽),miR-223-3p 慢病毒组大鼠双玻璃体内分别注射 8  $\mu$ L 携带 miR-223-3p 的慢病毒。大鼠饲养于 24  $^{\circ}$ C、相对湿度 60% 的环境中,并保持充足的食物和水,12 d 后取材。

**1.3 双荧光素酶表达报告系统检测 miR-223-3p 调控 NLRP3 基因** 根据生物信息学预测 miR-223-3p 与 NLRP3 基因的结合位点的信息,将 NLRP3 基因的 3' UTR 序列及其突变体克隆到双荧光素酶报告基因载体中,构建野生型(WT)及突变型(MT)重组双荧光素酶报告质粒载体,采用 PCR 及基因测序方法鉴定载体是否构建成功。将构建好的野生型和突变型重组双荧光素酶报告载体,通过 mimic(miR 过表达)+NLRP3 野生型,mimics NC(miR 过表达阴性对照)+NLRP3 野生型,mimic+NLRP3 突变型,mimics NC+NLRP3 突变型进行共转染,转染后 48 h 以空白细胞裂解液为对照,观察报告基因相对荧光值(RLU)变化,明确 miR-223-3p 对 NLRP3 的调控作用。

**1.4 Q-PCR 检测各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 miR-223-3p、NLRP3、诱导型一氧化氮合酶和精氨酸酶-1 的基因表达水平** 造模 12 d 后,分别取各组大鼠的眼、脾脏和淋巴结组织,经 RNA 提取和反转录后进行 Q-PCR 检测。U6 为 miR-223-3p 的内参,GAPDH 为 NLRP3、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶-1(Arg-1)的内参。U6 反转录引物序列为 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3',miR-223-3p 反转录引物序列为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGGGTAA-3'。U6 上游引物序列:5'-GCTTCGGCAGCATATACTAAAAT-3',下游引物序列:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3';miR-223-3p 上游引物序列:5'-GCGCGTGTTCAGTTTGTCAAA-3',下游引物序列:5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3';GAPDH 上游引物序列:5'-CACGGCAAGTTCACGGCAGCT-3',下游引物序列:5'-AGCGGAAGGGGCGGAGATGAT-3';NLRP3 上游引物序列:5'-TCTTTGCGGCTATGTACTATCTGC-3',下游引物序列:5'-CTTCTTGGCCTTGCTTTCACTTC-3';iNOS 上游引物序列:5'-CTTCGCGGCAGCCTGTGAGACG-3',下游引物序列:5'-ATCCAGGTGTTCCCCAGGTAGG-3';Arg-1 上游引物序列:5'-CGGCTTGCGAGATGTGG-3',下游引物序列:5'-TAGCCGGGGTGAATACTGG-3'。Q-PCR 反应条件设置为:95  $^{\circ}$ C、5 min,反应循环 1 次;95  $^{\circ}$ C、20 s,57  $^{\circ}$ C、25 s,60  $^{\circ}$ C、25 s,循环 45 次。每组实验重复扩增 3 次。Q-PCR 实验结束后,以 NC 组为对照(1.00 $\pm$ 0.00),通过  $E=2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算 mRNA 的相对表达水平。

**1.5 ELISA 检测各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-10 的蛋白表达水平** 造模 12 d 后,取各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织,用组织剪剪碎并在液氮条件下研磨成粉末后,根据组织的重量,加入 350~800  $\mu$ L 的 RIPA 裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF)混合液(RIPA:PMSF=100:1)使蛋白溶解,然后组织匀浆机低温条件下研磨 5 min 使蛋白充分裂解,超声波细胞粉碎机超声 10 min,8000 r $\cdot$ min $^{-1}$  离心 10 min 去除泡沫,收集上清液即可得到所需蛋白样品。BCA 法检测各组大鼠以上各组织样品的蛋白浓度,ELISA 试剂盒分别检测各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-10 的蛋白表达水平。每组实验重复三次,取平均值,并进行统计学分析。

**1.6 流式细胞术检测各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 M1、M2 巨噬细胞极化水平** 造模 12 d 后,分别取各组大鼠的眼、脾脏和淋巴结组织,用 1640 细胞培养基充分研磨,经过滤、离心、分离后得到所需单核细胞悬液,转移至 6 孔板,每孔加 15  $\mu$ L 双抗,放入 37  $^{\circ}$ C、含体积分数 5% CO $_2$  的培养箱中孵育 4 h,胰蛋白酶消化后得到贴壁细胞(单核细胞)。首先用 FITC-F4/80 和 APC-CD11b 抗体进行细胞表面染色 30 min,将细胞固定破膜 1 h 后,然后用 PE-CD206 和 PE-CD86 进行细胞内染色,流式清洗剂清洗细胞



后离心,去上清,最后加入 500  $\mu$ L PBS 将细胞重悬,经滤网过滤后将得到的细胞悬液置于流式管中,然后用流式细胞仪检测各组织中 M1、M2 型巨噬细胞极化水平及 M1/M2 巨噬细胞比例变化。

**1.7 统计学分析** 数据均用均值  $\pm$  标准差表示,采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析,组内比较采用单因素方差分析 (ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异 (LSD-*t*) 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

**2.1 双荧光素酶基因检测报告** 与 NC 组相比,WT 组 miR-233-3p 对 NLRP3 基因野生型有较明显的下调表达( $P<0.01$ ),但 MT 组对预测的靶基因位点进行突变后,突变型载体中的 RLU 值表达水平与 NC 组相比未发生显著改变( $P>0.05$ ) (图 1)。因此,miR-233-3p 可明显调控带有 NLRP3 基因片段 3'UTR 基因的表达,NLRP3 为 miR-233-3p 调控的靶基因。

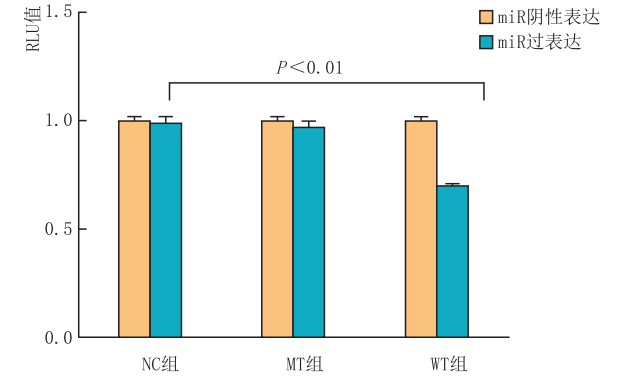


图 1 各组 miR-233-3p 与质粒载体转染靶细胞后 NLRP3 表达水平

**2.2 各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 miR-233-3p、NLRP3、Arg-1 和 iNOS 的 mRNA 表达水平** Q-PCR检测结果显示,与 NC 组(均为  $1.00 \pm 0.00$ )相比,造模 12 d 后,EAU 组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 miR-233-3p 表达水平均显著降低,而 NLRP3 和 iNOS 的 mRNA 表达水平均显著升高,Arg-1 的 mRNA 表达水平均显著降低(均为  $P<0.05$ )。与 EAU 组相比,造模 12 d 后,miR-233-3p 慢病毒组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 NLRP3 和 iNOS 的 mRNA 表达水平均降低,而 Arg-1 的 mRNA 表达水平均升高(均为  $P<0.05$ ) (见表 1)。

**2.3 各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 NLRP3、TNF- $\alpha$ 、IL-10 的蛋白表达水平** ELISA 检测结果显示,与 NC 组相比,造模 12 d 后,EAU 组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 TNF- $\alpha$  和 NLRP3 的蛋白表达水平均升高,而 IL-10 的蛋白表达水平均降低(均为  $P<0.05$ );与 EAU 组相比,造模 12 d 后,miR-233-3p 慢病毒组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 TNF- $\alpha$  和 NLRP3 的蛋白表达水平均降低,而 IL-10 的蛋白表达水平均明显升高(均为  $P<0.05$ ) (见表 2)。

表 1 造模 12 d 后各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 miR-233-3p、NLRP3、Arg-1 和 iNOS 的 mRNA 表达

组别	脾脏/倍	淋巴结/倍	眼组织/倍
EAU 组			
miR-233-3p	0.36 $\pm$ 0.32	0.15 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
NLRP3	4.02 $\pm$ 1.71	3.04 $\pm$ 1.04	7.19 $\pm$ 0.76
iNOS	1.54 $\pm$ 0.19	20.21 $\pm$ 0.94	1.62 $\pm$ 0.06
Arg-1	0.72 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.18
miR-233-3p 慢病毒组			
NLRP3	0.77 $\pm$ 0.20 *	1.20 $\pm$ 0.08 ***	1.30 $\pm$ 0.05 ***
iNOS	0.23 $\pm$ 0.03 ***	7.57 $\pm$ 1.52 ***	0.44 $\pm$ 0.27 **
Arg-1	1.33 $\pm$ 0.24 *	2.40 $\pm$ 0.69 *	2.04 $\pm$ 0.69 *

注:与 EAU 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

表 2 造模 12 d 后各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 IL-10、TNF- $\alpha$  和 NLRP3 的蛋白表达

组别	脾脏	淋巴结	眼组织
NC 组			
IL-10/(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	7.67 $\pm$ 0.26	2.86 $\pm$ 0.40	3.38 $\pm$ 0.21
TNF- $\alpha$ /(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	1.43 $\pm$ 0.51	2.41 $\pm$ 0.12	1.48 $\pm$ 0.03
NLRP3/(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	102.67 $\pm$ 2.49	165.00 $\pm$ 5.89	112.00 $\pm$ 8.60
EAU 组			
IL-10/(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	4.39 $\pm$ 0.26###	1.16 $\pm$ 0.08##	0.90 $\pm$ 0.22###
TNF- $\alpha$ /(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	2.78 $\pm$ 0.37#	4.32 $\pm$ 1.83###	3.66 $\pm$ 0.49##
NLRP3/(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	292.67 $\pm$ 5.91###	189.00 $\pm$ 10.71#	386.00 $\pm$ 26.98###
miR-233-3p 慢病毒组			
IL-10/(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	7.88 $\pm$ 0.31 ***	4.28 $\pm$ 0.08 ***	2.74 $\pm$ 0.82 *
TNF- $\alpha$ /(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	1.96 $\pm$ 0.23 *	1.85 $\pm$ 0.12 ***	1.13 $\pm$ 0.4 **
NLRP3/(ng $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	140.23 $\pm$ 16.93 ***	101.37 $\pm$ 4.26 ***	63.00 $\pm$ 9.29 ***

注:与 NC 组相比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ,### $P<0.001$ ;与 EAU 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

**2.4 各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 M1、M2 型巨噬细胞极化水平** 流式细胞仪检测结果显示(见图 2、图 3、表 3),与 NC 组相比,造模 12 d 后,EAU 组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 M1 型巨噬细胞极化

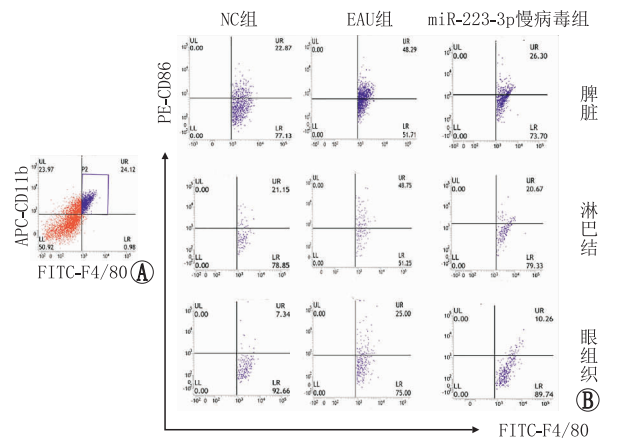


图 2 流式细胞仪检测各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 M1 型巨噬细胞水平变化 A: 右上象限为 F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> 细胞;B: 右上象限为 F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> 巨噬细胞(M1 型巨噬细胞)。

水平均显著升高,而 M2 型巨噬细胞极化水平则均降低,M1/M2 巨噬细胞比例均升高(均为  $P < 0.05$ );与 EAU 组相比,造模 12 d 后,miR-223-3p 慢病毒组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 M1 型巨噬细胞极化水平均降低,而 M2 型巨噬细胞极化水平均升高,M1/M2 型巨噬细胞比例均恢复平衡(均为  $P < 0.05$ )。

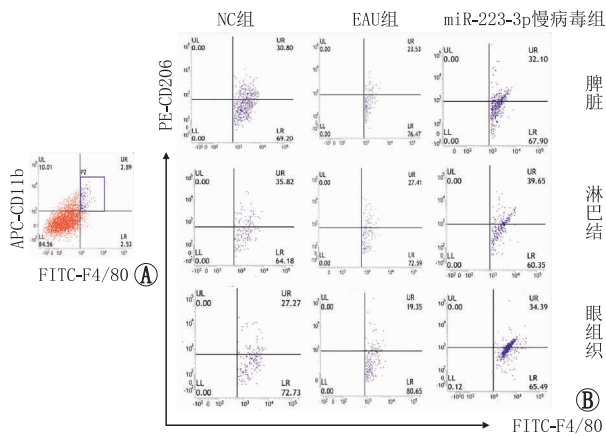


图3 流式细胞仪检测各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 M2 型巨噬细胞水平变化 A: 右上象限为 F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>细胞;B: 右上象限为 F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>巨噬细胞(M2 型巨噬细胞)。

表3 各组大鼠眼、脾脏和淋巴结组织中 M1 和 M2 型巨噬细胞水平以及 M1/M2 巨噬细胞比例变化

组别	M1 水平/%	M2 水平/%	M1/M2 比例变化
NC 组			
脾脏	5.51 ± 0.37	5.63 ± 0.45	0.98 ± 0.02
淋巴结	2.46 ± 0.09	3.48 ± 0.34	0.71 ± 0.08
眼组织	0.57 ± 0.22	1.61 ± 0.16	0.34 ± 0.10
EAU 组			
脾脏	12.04 ± 0.26 <sup>###</sup>	0.93 ± 0.32 <sup>###</sup>	14.40 ± 4.23 <sup>#</sup>
淋巴结	4.28 ± 0.20 <sup>###</sup>	2.17 ± 0.44 <sup>#</sup>	2.04 ± 0.38 <sup>##</sup>
眼组织	1.77 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.89 ± 0.09 <sup>##</sup>	2.01 ± 0.19 <sup>###</sup>
miR-223-3p 慢病毒组			
脾脏	7.67 ± 1.94 <sup>*</sup>	5.94 ± 0.17 <sup>*</sup>	1.28 ± 0.29 <sup>**</sup>
淋巴结	3.22 ± 0.06 <sup>**</sup>	6.96 ± 0.41 <sup>**</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>***</sup>
眼组织	0.98 ± 0.24 <sup>**</sup>	4.35 ± 0.45 <sup>***</sup>	0.23 ± 0.07 <sup>***</sup>

注:与 NC 组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与 EAU 组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

3 讨论

葡萄膜炎是临床常见、严重危害眼健康的常见疾病,眼睛血管层的炎症是葡萄膜炎最常见的病理学表现。最近,miRNAs 在自身免疫性疾病和炎症性疾病中的作用越来越受到关注<sup>[7]</sup>。研究发现,miR-223-3p 与多种炎症和免疫反应有关,可作为评估盆腔炎和阿尔茨海默病疾病严重程度的生物标志物<sup>[8-9]</sup>。MiR-223-3p 在巨噬细胞、血小板、肝细胞和心肌细胞等多种细胞中表达,并通过多个靶向基因调节细胞活动<sup>[3]</sup>,在多种疾病发病期间的炎症或免

疫反应中发挥重要作用。已知 miR-223-3p 参与调节多个关键信号通路,如 NLRP3 炎症小体、NF-κB、MAPK、PI3K/AKT、RPS6KB1/HIF-1α 信号通路。NLRP3 炎症小体是一种细胞溶质蛋白复合物,由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和 caspase-1 组成<sup>[10]</sup>,作为固有免疫的组分在免疫防御中发挥重要作用。有研究发现<sup>[11]</sup>,miR-223-3p 与 NLRP3 的 3' 非翻译区片段相互作用并抑制其表达,与多种自身炎症性疾病有关,这与我们的双荧光素酶表达报告系统的实验结果一致。miR-223-3p 通过负调节急性慢性肝损伤中 NLRP3 炎症小体的水平,使单核细胞、早期活化的巨噬细胞的浸润减少,从而防止炎症的发生<sup>[12]</sup>。在一项动物研究中<sup>[13]</sup>,miR-223-3p 抑制 NLRP3 炎症小体的表达,促进树突状细胞向耐受性树突状细胞极化并可以防止小鼠发生自身免疫性心肌炎。因此我们推测,miR-223-3p 调控 NLRP3 炎症小体可能与葡萄膜炎的发生发展有关。本研究通过建立大鼠 EAU 模型发现造模 12 d 后,与 NC 组相比,EAU 组大鼠体内 miR-223-3p 基因表达水平显著降低,而 NLRP3 的 mRNA 和蛋白表达水平升高,与 FAU 组相比,miR-223-3p 慢病毒组 NLRP3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,提示 miR-223-3p 可以负向调控 NLRP3 炎症小体的表达从而影响葡萄膜炎炎症进程,与既往研究结果相符。

巨噬细胞是组织内稳态和炎症反应中的关键细胞,执行重要的组织特异性功能<sup>[14]</sup>。巨噬细胞根据其所处环境表现出不同的表型,两种主要的表型包括 M1 极化促炎表型和 M2 极化抗炎表型。巨噬细胞的典型 M1 型是由脂多糖(LPS)、C 反应蛋白(CRP)以及 Th1 型细胞因子引起的<sup>[15]</sup>。而巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、Th2 型细胞因子能够使巨噬细胞向替代途径 M2 型极化<sup>[15]</sup>。M1 型巨噬细胞的特点是能够分泌 CD86、TNF-α、iNOS 和白细胞介素-1β(IL-1β)等促炎因子来介导急性炎症反应<sup>[16]</sup>。随着炎症的发展,M2 型巨噬细胞分泌 IL-10 和转化生长因子 β(TGF-β)等抗炎介质来对抗炎症、促进组织修复和血管生成,其特征就在于 CD206 标记的表达和 Arg-1 的产生<sup>[16-18]</sup>。近年的研究发现,NLRP3 炎症小体也可以通过介导巨噬细胞极化来促进炎症的进程。有研究表明,氧化三甲胺(TMAO)通过 NLRP3 炎症小体的激活来增强 M1 型巨噬细胞的极化<sup>[19]</sup>。为了验证 EAU 模型中 NLRP3 炎症小体对巨噬细胞极化的影响,本实验从 mRNA、蛋白、细胞三个层面展开了研究发现,与 NC 组相比,造模后 12 d 的 EAU 大鼠各组织 iNOS mRNA、TNF-α 蛋白和巨噬细胞表面 CD86 的表达水平升高,而 Arg-1 mRNA、IL-10 蛋白和巨噬细胞表面 CD206 的表达水平降低。MiR-223-3p 慢病毒组 NLRP3 炎症小体表达水平降低从而逆转以上炎症性相关因子的表达水平,恢复 M1/M2 巨噬细胞极化平衡,提示 NLRP3 炎症小体可

能诱导 M1 型巨噬细胞的极化,并增加促炎细胞因子的分泌来影响葡萄膜炎的发展进程。与本研究机制相似的是,Zhang 等<sup>[20]</sup>发现,在牙周组织中,正畸力刺激的人牙周韧带细胞通过激活 M1 型巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体可促进 M1 型巨噬细胞极化,增加 IL-1 $\beta$  的产生,从而启动 RR(牙根吸收)的发生。Ye 等<sup>[21]</sup>发现,在大脑中动脉栓塞模型中用 MCC950(NLRP3 炎症小体的选择性抑制剂)治疗 3 d 后,巨噬细胞从促炎 M1 型转化为组织修复抗炎 M2 型。另外 IL-37 也可以抑制 M1 型巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体的激活,将巨噬细胞的极化从促炎 M1 型转移到有益的抗炎 M2 型,从而治疗颞下颌关节炎<sup>[22]</sup>,与本研究结果一致,说明 NLRP3 炎症小体成分的激活对 M1 型巨噬细胞极化有很大的促进作用。

本研究首先通过双荧光素酶检测证实了 NLRP3 是 miR-223-3p 调控的靶基因,并且与 NC 组相比,EAU 组大鼠 miR-223-3p 基因表达水平降低,与 NLRP3 mRNA 表达呈负相关,说明 miR-223-3p 可以通过负调控 NLRP3 影响炎症进程。其次,EAU 组大鼠 M1/M2 比例失衡(升高),推测可能与 NLRP3 的表达密切相关。因此,我们向 EAU 大鼠玻璃体内注射 miR-223-3p 慢病毒,通过提高 EAU 大鼠体内 miR-223-3p 的表达水平来抑制 NLRP3 炎症小体的激活,发现 M2 型巨噬细胞极化水平和抗炎因子表达升高从而减轻炎症反应达到治疗葡萄膜炎的作用。总之,提高 miR-223-3p 的表达水平可降低 NLRP3 炎症小体的表达并使相关炎症信号通路受到抑制,可能是开发自身免疫性葡萄膜炎新型治疗的策略之一。

## 参考文献

- [1] PRETEM M, DAMMACCO R, FATONE M C, RACANELLI V. Autoimmune uveitis: clinical, pathogenetic, and therapeutic features[J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(2):125-136.
- [2] LERMAN M A, RABINOVICH C E. The future is now: biology for non-infectious pediatric anterior uveitis[J]. *Pediatr Drugs*, 2015, 17(4):283-301.
- [3] ZHANG M W, SHEN Y J, SHI J, YU J G. MiR-223-3p in cardiovascular diseases: a biomarker and potential therapeutic target[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 7:610561.
- [4] FUNES S C, RIOS M, ESCOBAR-VERA J, KALERGIGIS A M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. *Immunology*, 2018, 154(2):186-195.
- [5] MUOZ J, AKHAVAN N S, MULLINS A P, ARJMANDI B H. Macrophage polarization and osteoporosis: a review[J]. *Nutrients*, 2020, 12(10):2999.
- [6] WANG N, LIANG H W, ZEN K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance[J]. *Front Immunol*, 2014, 28(5):614.
- [7] ZHANG Q B, ZHU D, DAI F, HUANG Y Q, ZHENG J X, TANG Y P, et al. MicroRNA-223 suppresses IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production in gouty inflammation by targeting the NLRP3 inflammasome[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 16(12):637415.
- [8] YERUVA L, MYERS G S A, SPENCER N, CREASY H H, ADAMS N E, MAURELLI A T, et al. Early microRNA expression profile as a prognostic biomarker for the development of pelvic inflammatory disease in a mouse model of chlamydial genital infection. [J]. *mBio*, 2014, 5(3):e1241-14.
- [9] AHARON A, SPECTOR P, AHMAD R S, HORRANY N, SABACH A, BRENNER B, et al. Extracellular vesicles of Alzheimer's disease patients as a biomarker for disease progression[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(10):4156-4169.
- [10] ZHANG B C, LI Z, XU W, XIANG C H, MA Y F. Luteolin alleviates NLRP3 inflammasome activation and directs macrophage polarization in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(1):265-273.
- [11] CALVENTE C J, PILAR H D, TAMEDA M, JOHNSON C D, FELDSTEIN A E. MicroRNA 223 3p negatively regulates the NLRP3 inflammasome in acute and chronic liver injury[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(2):653-663.
- [12] CHEN L Q, HOU X Y, ZHANG M M, ZHENG Y, ZHENG X H, YANG Q Y, et al. MicroRNA-223-3p modulates dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune myocarditis by targeting the NLRP3 inflammasome[J]. *Mol Immunol*, 2020, 117(1):73-83.
- [13] ORECCHIONI M, GHOSHEN Y, PRAMOD A B, LEY K. Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages[J]. *Front Immunol*, 2019, 24(10):1084.
- [14] ARABPOUR M, SAGHAZADEN M, REZAEI N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97:107823.
- [15] MARTIZNE F O, GORDON S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [J]. *Fl000prime Rep*, 2014, 6:13.
- [16] CHISTIakov D A, BOBRYshev Y V, NIKIFOROV N G, ELIZOVA N V, SOBENIN L A, OREKHOV A N. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: the associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes[J]. *Int J Cardiol*, 2015, 184:436-445.
- [17] FERNANDES T L, GOMOLL A H, LATTERMANN C, HERMANDEZ A J, BUENO D F, AMANO M T. Macrophage: a potential target on cartilage regeneration[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:111.
- [18] WU K P, YUAN Y, YU H H, DAI X, WANG S, SUN Z X, et al. The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates GVHD by inducing M1 macrophage polarization in mice-ScienceDirect[J]. *Blood*, 2020, 136(4):501-515.
- [19] ZHANG J, LIU X Q, WAN C Y, DAI X, WANG S, SUN Z X, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 $\beta$  production in inflammatory root resorption[J]. *Blood*, 2020, 136(4):501-515.
- [20] YE Y Z, JIN T, ZHANG X, ZENG Z, YE B X, WANG J C, et al. Meisoindigo protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and regulating microglia/macrophage polarization via TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13:553-553.
- [21] LUO P, PENG S S, YAN Y, JI P, XU J. IL-37 inhibits M1-like macrophage activation to ameliorate temporomandibular joint inflammation through the NLRP3 pathway[J]. *Rheumatology*, 2020, 59(10):3070-3080.



# Effect of miR-223-3p regulating the expression of Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome on the balance of M1/M2 macrophage polarization in rats with autoimmune uveitis

QU Ruyi<sup>1</sup>, ZHOU Mengxian<sup>1</sup>, PENG Yuan<sup>1</sup>, YIN Xuewei<sup>1</sup>, GUO Dadong<sup>2</sup>

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China  
2. Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Shandong Academy of Eye Disease Prevention and Therapy, Jinan 250002, Shandong Province, China

**Corresponding author:** GUO Dadong, E-mail: dadonggene@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of miR-223-3p regulating the expression level of Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome on the balance of M1/M2 macrophage polarization in experimental autoimmune uveitis (EAU) rats. **Methods** The regulatory effect of miR-223-3p on the expression of NLRP3 inflammasome was first investigated by a dual luciferase reporter plasmid vector. Then, 48 healthy female Lewis rats were randomly divided into a normal control (NC) group, an EAU group and a miR-223-3p lentivirus group, with 16 rats in each group. Rats in the EAU group and the miR-223-3p lentivirus group were administered with inter-photoreceptor retinoid binding protein (IRBP) chylous effusion to induce the EAU model, and the vitreous body of both eyes of each rat in the miR-223-3p lentivirus group was injected with 8  $\mu$ L lentivirus carrying miR-223-3p. The rats were sacrificed under anesthesia after 12 d of modeling, and the eyes, spleens, and lymph node tissues were isolated. Next, real-time quantitative PCR was performed to determine the expression levels of miR-223-3p, NLRP3, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Arginase-1 (Arg-1) in the eyes, spleens and lymph nodes of rats in each group; enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the protein levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-10 (IL-10) and NLRP3 in the eyes, spleens and lymph node tissues of rats in each group. Meanwhile, the levels of M1 and M2 macrophages in the eyes, spleens and lymph nodes of each group were further determined by flow cytometer. **Results** The results of the dual luciferase assay confirmed that NLRP3 was the target gene regulated by miR-223-3p. Compared with the NC group, the expression levels of miR-223-3p in the eyes, spleens, and lymph nodes of rats in the EAU group were decreased 12 d after modeling (all  $P < 0.05$ ), while the expression levels of messenger ribonucleic acid (mRNA) in NLRP3 and iNOS were increased (both  $P < 0.05$ ); the M1 macrophage-associated factors iNOS mRNA and TNF- $\alpha$  protein expression levels were increased (both  $P < 0.05$ ), while the M2 macrophage-associated factors Arg-1 mRNA and IL-10 protein expression levels were decreased (both  $P < 0.05$ ). Compared with the EAU group, the expression levels of the NLRP3 mRNA and inflammasome, iNOS mRNA and TNF- $\alpha$  protein were decreased, while Arg-1 mRNA and IL-10 protein expression levels were increased in the eyes, spleens and lymph node tissues of rats in the miR-223-3p lentivirus group after 12 d (all  $P < 0.05$ ). The measurement of the flow cytometer showed that the level of M1 macrophage polarization in the EAU group was increased than that in the NC group 12 d after modeling, while the level of M2 macrophage polarization decreased, and the ratio of M1/M2 macrophages increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the EAU group, the polarization level of M1 macrophages was decreased, while the polarization level of M2 macrophages was increased in the miR-223-3p lentivirus group after 12 d (both  $P < 0.05$ ), and the ratio of M1/M2 macrophages was gradually restored to balance. **Conclusion** Macrophage polarization is imbalanced in EAU rats; elevating miR-223-3p level can inhibit the NLRP3 inflammasome expression, which inhibits inflammation-related signaling pathways, reduces the M1 macrophage polarization level and increases the M2 macrophage polarization level, thereby exerting a regulatory effect on the balance of macrophage polarization in rats with uveitis.

**[Key words]** miR-223-3p; Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome; uveitis; macrophage polarization