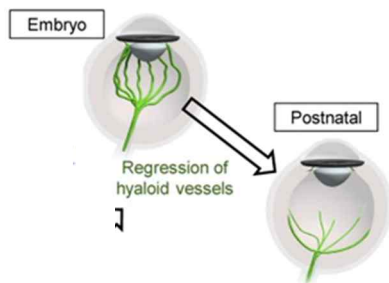


# miR-125a-5p attenuates macrophage-mediated vascular dysfunction by targeting Ninjurin1 **응답**

4.29.24' 공혜인

**Q1. Postnatal angiogenesis 단계, 성체, 그리고 diabetic retina에서 Ninj1의 역할이 어떻게 다른가?**

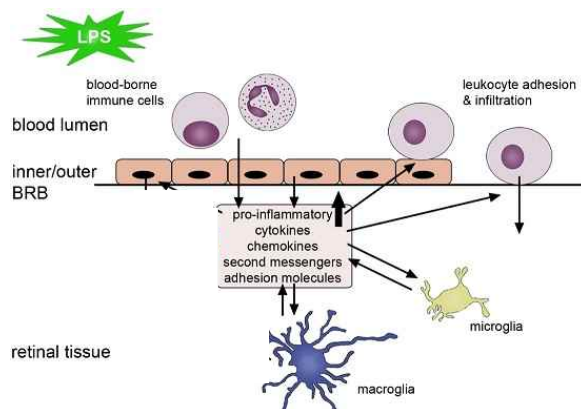
## 1. Postnatal angiogenesis



*Developmental regression of hyaloid vasculature is triggered by neurons(2016)*

Embryo 상태의 hyaloid vessel은 각막을 포함한 retina 전반에 산소와 영양분을 공급합니다. 그리고 태어난 이후(postnatal 때) **leukocyte의 Ninj1에 의해서 retina로의 recruitment가 일어나면서 hyaloid vessel의 degradation이 일어나게 됩니다.** (이 hyaloid vessel의 degradation을 hyaloid atrophy라고 이 논문에서 명명하고 있습니다.) 이 hyaloid vessel의 degradation을 leukocyte가 mediate하면서 시신경 유두로부터 retinal vessel의 형성이 유도됩니다.

## 2. 성체



*MMP-3 Deficiency Alleviates Endotoxin-Induced Acute Inflammation in the Posterior Eye Segment(2016)*

성체 때 LPS 등으로 인해서 leukocyte에서 activation이 일어나면 leukocyte의 Ninj1에 의해 retina로의 recruitment가 일어난다는 현상은 postnatal angiogenesis 때와 동일하게 일어납니다. 하지만 이로 인해 성체 retina에서 leukocyte에서 Ninj1과 inflammatory mediator가 발현되면서 leukocyte recruitment로 인한 cell-to cell adhesion과 retina에서 염증이 더 유도됨을 확인할 수 있습니다.

### 3. Diabetes

Diabetes일 때는 leukocyte의 Ninj1에 의해 retina로의 recruitment가 일어나지만 diabetes가 정상보다 Ninj1 발현이 더 증가한 상태이기 때문에 정상보다 retina의 leukocyte recruitment 정도가 더 높습니다. 따라서 diabetes에선 inflammatory mediator의 발현이 정상보다 높은 상황입니다. 이 inflammatory mediator로 인해 retina에서 염증이 더 심화되고 결국 diabetic ischemia reperfusion으로 인해 손상된 retina의 허혈성 조직이 회복되지 않고 오히려 악화되는 결과로 이어집니다.

## Q2. P13k/Akt pathway와 관련된 receptor의 발현을 통해 Ninj1의 receptor와의 결합 여부를 판단할 수 있는가?

Macrophage activation 이후 macrophage의 Ninj1 protein 발현과 동시에 p13k/Akt pathway 관련 receptor(ex. VEGFR, HGFR)의 발현이 증가한다는 것은 figure4에서 eye lystate 대상으로 한 RT-PCR과 Ninj1과 macrophage의 co-immunostaining을 통해서 확인했습니다. 그러나 receptor와 Ninj1을 직접 co immunostaining을 진행하지 않아 Ninj1이 receptor에 직접 결합했다는 증거가 없으며, macrophage에서 Ninj1과 receptor의 발현이 증가되었을 때, p13k, Akt pathway 관련 인자들의 발현이 증가했는지 또한 확인하지 않았기 때문에 Ninj1이 receptor와 결합했다는 간접적인 증거가 없습니다. 따라서 macrophage에서 Ninj1이 receptor와 결합을 하는지 확인할 수는 없었습니다.

## Q3. Endothelial cell과 pericyte에서 Ninj1 발현을 어떻게 구분했는가? ninj1을 blocking 하는 방법이 어떻게 다른가?

참조 논문 중 51 번 논문인 'Matsuki M, Kabara M, Saito Y, Shimamura K, Minoshima A, Nishimura M, et al. Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes' 논문에 따르면 pericyte 와 endothelial cell 을 기존에 존재했던 protocol(Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration(2007)의 protocol 을 참조)를 사용했습니다. Pericyte 는 NG2 marker 에 양성을 띠고, endothelial cell 은 CD146 marker 에 양성을 띠니다. 이 특성을 이용해서 anti-NG2, CD146 MicroBead 와 total aortic cell 을 함께 incubation 한 다음 magnetic cell sorting system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 이용해 각각 NG2 marker 양성인 pericyte 와 CD146 양성인 endothelial cell 을 total aortic cell 들로부터 분리할 수 있었습니다.

이렇게 isolation된 cell 중 pericyte cell에는 GFP(green fluorescent protein)을 transfect시키고 aortic ring과 incubation을 진행한 후에 liberase DL (Dispase Low) 로 isolation을 진행했습니다. 그리고 FACs로 살아있는 pericyte를 확인했으며 그 살아 있는 pericyte가 단독으로 배양되었던 것 이랑 neovessel(형성되는 혈관)즉, aortic ring과 같이 배양되었을 때의 pericyte를 microarray (3D Gene Mouse Oligo Chip 24K (Toray Industries Inc, Tokyo, Japan))로 각각의 Ninj1 발현량을 확인했습니다.

그리고 immunocytochemical analysis에서 Ninj1 antibody(Bioss, Woburn, MA, USA)로 Ninj1을 staining했고 rhodamine-labeled lectin (red)로 capillary endothelial tubes staining해서 muscle의 endothelial cell에서 Ninj1의 발현을 확인했습니다.

이번에 발표한 논문은 macrophage의 Ninj1을 miRNA를 통해 억제한 것과 다르게 이 논문에선 endothelial cell과 pericyte에서 모두 Ninj1 siRNA를 통해 Ninj1을 blocking을 하였으며 혈관 형성에 pericyte 보다 endothelial cell에 Ninj1 siRNA를 transfect 시켰을 때 더 혈관 형성이 적어 나중에 추가 실험으로 endothelial cell에 Ninj1 overexpressing vector를 transfect하여 동일한 실험을 진행하였습니다.

참조 논문 중 45번 논문인 Wang X, Qin J, Zhang X, Peng Z, Ye K, Wu X, et al. Functional blocking of Ninjurin1 as a strategy for protecting endothelial cells in diabetes mellitus. Clin Sci (Lond). 2018 은 유료 논문으로 전환되어서 전문을 보진 못했습니다.

하지만 34 번 논문인 Tissue-Specific and Genetic Regulation of Insulin Sensitivity-Associated Transcripts in African Americans(2016)에 따르면 PMA treated THP-1 macrophage 의 Ninj1 을 shRNA 를 통해 억제했습니다. 그러나 shRNA 에 대한 protocol 은 supplement 에 있으나 웹페이지에 계속 접근이 되지 않아 supplement 는 보지 못했습니다.

#### Q4. 왜 miRNA를 target으로 Ninj1 neutralizing을 하려고 했는가?

Ninj1 Antagonist를 인공적으로 만들어낼 때 Antibody나 neutralizing peptide 그리고 siRNA는 Ninj1만 targeting 하게 개발하기 매우 힘듭니다. 하지만 miRNA는 성체내에 이미 존재하는 miRNA이기 때문에 부작용이 생길 확률이 적습니다. 처음에 Ninj1의 억제제로서 존재하지만 시간이 지나면서 miRNA 발현이 감소하고, 성체 때는 miRNA 뿐만 아니라, MMP9, glycine과 같은 다른 protein 억제제에 의해 Ninj1이 억제되기도 합니다. 하지만 Atherosclerosis, Diabetic Ischemia Reperfusion과 같은 질병에서 Ninj1의 발현이 비정상적으로 높아져, 기존의 생체내에 존재하는 억제제로 최대한 억제할 수 있는 역치를 넘게 되는 경우, 기존에 생체내에서 Ninj1을 억제했던 miRNA를 injection 할 경우 Ninj1 발현을 부작용 없이 효과적으로 감소시킬 수 있습니다.

## **Q5. 왜 성체 7week C56BL/6 mice에서 macrophage의 Ninj1 발현과 inflammation 상황을 본 것인가?**

우선 성체 상태에서 STZ로 diabetic retina(DR)을 유도했을 때, 몸무게가 크게 감소한 모습을 볼 수 있어 fetal 상황에서 STZ로 diabetic retina를 유도하는 것은 fetal에게 치명적일 수 있고, fetal에선 retinal vascular가 아직 완전히 만들어지지 않았기 때문에 macrophage의 Ninj1으로 인한 recruitment로 인해 발생하는 inflammation에 의한 retina의 혈관 손상 정도를 확인하기 어렵기 때문에 성체 7week C56BL/6 mice를 대상으로 macrophage의 Ninj1 발현과 inflammation 상황을 본 것입니다.

## **Q6 LPS는 어떻게 mice로 injection이 되었는가?**

이 논문에서 LPS injection에 관한 방법은 본문과 supplement에서 모두 나와있지 않았습니다.