

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.07.005

miR-10b 对滑膜成纤维细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响及分子机制 *

褚 楚¹ 穆 楠¹ 顾锦涛¹ 黄同列¹ 舒 震¹ 赵金康² 郑朝晖² 张 伟¹ 薛晓畅^{1Δ}

(1 第四军医大学药理学系生物制药学教研室 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学西京医院风湿免疫科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨 miR-10b 对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞(RA-FLS)炎症因子分泌、增殖、侵袭和迁移的影响及其分子机制。**方法:**首先,分离原代培养 FLS 细胞并进行 microarray,筛选 RA 和 OA 中差异表达的 miRNA 分子。然后,用 real-time PCR 对筛选得到的结果进行验证,进而通过生物信息学分析、细胞转染等方法明确 miR-10b 在 FLS 细胞中下调的分子机制。最后,采用 MTT 比色法、划痕实验和 Transwell 实验等检测 miR-10b 对其 FLS 细胞增殖、侵袭和迁移水平的影响。**结果:**与 OA FLS 相比,芯片筛选发现 176 条 miRNA 在 RA-FLS 中上调,204 条下调;其中,miR-10b 在 RA-FLS 细胞中受肿瘤坏死因子(TNF- α)等多种炎症因子以 NF- κ B 依赖的方式进行调控;miR-10b 的下游靶基因为 TAK1 和 TLR4,通过对这两个靶基因的调控,miR-10b 一方面可以促进 TNF- α 的分泌和 NF- κ B 的活化入核,从而激发 TNF- α →NF- κ B→miR-10b→TNF- α /NF- κ B 环路;另一方面促进 FLS 表面 TLR4 的表达以及 LPS 对于 FLS 的刺激作用,激发 LPS→NF- κ B→miR-10b→TLR4 环路。此外,miR-10b 的下调可促进 FLS 细胞的增殖、侵袭和迁移。**结论:**miR-10b 在 RA-FLS 细胞中显著下调,其通过参与信号环路的调节可影响 FLS 细胞的炎症细胞因子分泌及其增殖、侵袭和迁移。

关键词:类风湿性关节炎;microRNA;miR-10b;成纤维样滑膜细胞

中图分类号:R-33;R593.22;R392.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)07-1222-08

Effects and Molecular Mechanisms of miR-10b on the Proliferation, Invasion and Migration of Fibroblast-Like Synovial Cells*

CHU Chu¹, MU Nan¹, GU Jin-tao¹, HUANG Tong-lie¹, SHU Zhen¹, ZHAO Jin-kang², ZHENG Zhao-hui²,
ZHANG Wei¹, XUE Xiao-chang^{1Δ}

(1 Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Clinical Immunology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of microRNA (miR)-10b on the inflammatory cytokine secretion, proliferation, invasion and migration of RA-FLS and the underlying mechanisms. **Methods:** Primary FLS cells were isolated for miRNA microarray to screen differentially-expressed miRNAs between RA and OA. Then, after confirming the microarray data by real-time PCR analysis, the detailed mechanisms of miR-10b down-regulation was analyzed with bioinformatics and cell transfection methods. Finally, real-time PCR, MTT assay, cell disclosure and transwell assays were used to detect the effects of miR-10b on the cytokine production, proliferation, migration and invasion of FLS cells. **Results:** As compared with OA patients, 176 miRNAs were up-regulated, whereas 204 miRNAs were down-regulated in RA patients. Among them, miR-10b expression in RA FLS was apparently repressed by several inflammatory cytokines like TNF- α in a NF- κ B-dependent manner. Luciferase reporter assay and real-time PCR uncovered that TAK1 and TLR4 are target genes of miR-10b. As a result, miR-10b participated in FLS function regulation via these two genes. On one hand, downregulated miR-10b greatly promoted NF- κ B activation and TNF- α production through accelerating TAK1 level and then triggered TNF- α →NF- κ B→miR-10b→TNF- α /NF- κ B regulatory circuit. On the other, low level of miR-10b enhanced TLR4 expression on FLS and therefore strengthened LPS stimulation. This activated another regulatory circuit LPS→NF- κ B→miR-10b→TLR4. Finally, miR-10b significantly promoted FLS proliferation, invasion, migration and pro-inflammatory cytokines production through these two circuits. **Conclusion:** miR-10b was apparently downregulated in RA-FLS and it greatly promoted pro-inflammatory cytokine secretion, proliferation, migration and invasion of FLS through two different regulatory circuits.

Key words: Rheumatoid arthritis; microRNA; miR-10a; Fibroblast-like synoviocytes

Chinese Library Classification(CLC): R-33; 593.22; R392.32 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)07-1222-08

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373201,31000406,81273279)

作者简介:褚楚(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:自身免疫性疾病,E-mail:18706874430@163.com

Δ 通讯作者:薛晓畅,副教授,E-mail:xue_xiaochang@yahoo.com

(收稿日期:2017-12-11 接受日期:2017-12-30)

前言

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病,其病理生理特点主要分为两个时期:前期的急性炎性渗出期和后期的慢性滑膜增生期,最终导致关节骨与软骨的破坏,甚至残疾^[1]。既往的研究表明 T、B 淋巴细胞等参与的异常免疫应答反应促进了 RA 的发生发展^[2-4]。但近几年,位于滑膜衬里层的 FLS 成为研究热点。关节损伤所导致的 FLS 代偿性增生及迁移促进了 RA 中的血管翳生成和骨破坏^[5],而 FLS 释放的细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶、基质降解酶等可促使 RA 患者进入 FLS 过度增殖和迁移、骨和软骨破坏的恶性循环,最终导致残疾^[6]。因此,阐明 FLS 功能变化的调控机制,对于揭示 RA 致病机理具有重要的指导意义。

Toll 样受体(TLRs)被认为是一类重要的分子,其参与了生物体固有免疫识别^[7]。近期研究表明 TLRs 参与了 RA 发病,与骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者相比,RA 患者的 FLS 细胞中 TLR2 和 TLR4 的表达均增加^[8,9]。另外,FLS 细胞中的 NF- κ B 通路是过度活化的。然而,这些现象的机制仍有待阐明。本研究中,我们发现 miR-10b 这一非编码 miRNA^[10,11]在 FLS 中被显著下调,而其靶基因为 TLR4 和 TAK1。通过这两个基因,miR-10b 激活了 NF- κ B 通路等多个环路,从而促进 FLS 中的炎性因子分泌及其增殖、侵袭和迁移。

1 材料和方法

1.1 材料

RA 和 OA 患者关节滑膜组织由空军军医大学附属第一医院(西京医院)临床免疫科供给;FLS 细胞由 RA 和 OA 患者术后滑膜组织原代培养得到;HEK293T 细胞系购于中国科学院上海细胞库;miR-10b Mimics/Inhibitor、Taqman Gene Expression Assays 于 Ambion 公司购买;DMEM 培养基及特级胎牛血清(FBS)于 Gibco 公司购买;Dual-Luciferase 报告基因检测试剂盒于 Promega 公司购买;TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、LPS、Lipofectamine 2000、TRIzol 和小分子信号通路抑制剂 Bay11-7082、SB203580、SP600125 等均于 Invitrogen 公司购买;Transwell 小室于 Millipore 公司购买;Matrigel 于 BD 公司购买;小鼠抗 β -actin 单抗及所有二抗于北京中杉金桥公司购买;倒置显微镜为 Nikon 公司产品;实时定量 PCR 仪 7500 Fast 于 Applied Biosystems 公司购买;倒置荧光显微镜购于 Olympus 公司购买;流式细胞仪购于 Bio-red 公司购买。

1.2 方法

1.2.1 RA-FLS 细胞的原代培养 选择临床确诊的 RA 和 OA 患者,RA 患者均符合美国风湿学疾病诊断标准^[12],OA 对照组无自身免疫性疾病、传染病和癌症等其他疾病。将关节镜手术中取出的关节滑膜置于无菌 PBS 缓冲液和无血清含双抗的 DMEM 洗液中浸泡冲洗三次,剔除脂肪组织和软骨后,于消化液(含 1 mg/mL I 型胶原酶)中用无菌剪刀充分剪碎,分离培养得到原代 FLS 细胞(见图 1A);在 CO₂ 培养箱中常规培养传代至第 3 代时用流式细胞术进行纯度鉴定,流式结果显示培养至 3 代以后约有 98% 以上的细胞为 FLS 细胞(见图 1B)。3~6 代的细胞被认为可用于实验^[13]。

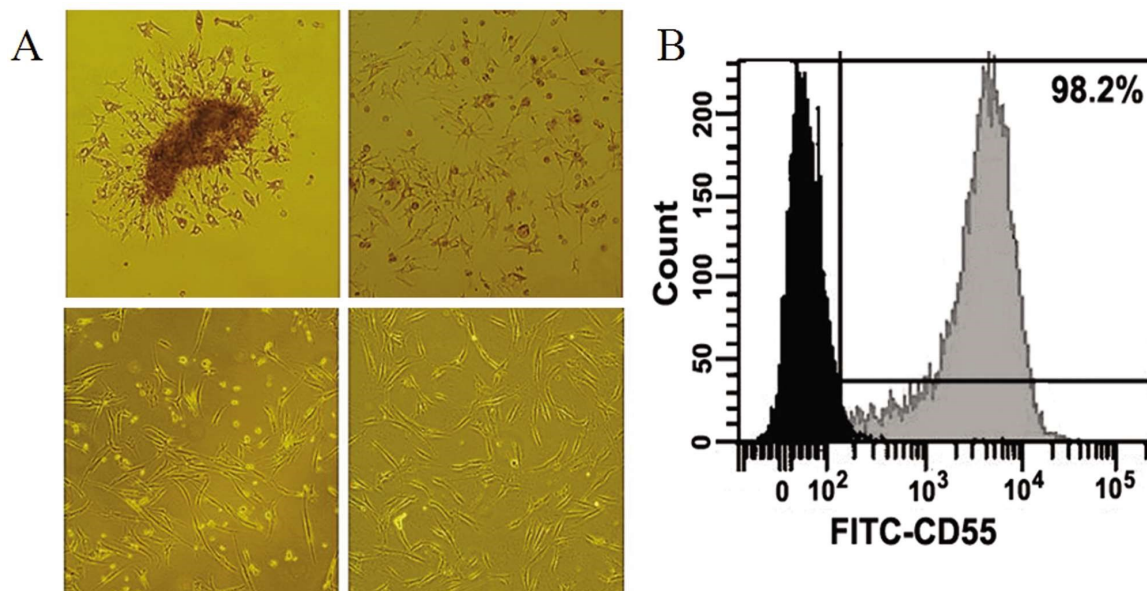


图1 原代培养 FLS 细胞的流式细胞术鉴定

Fig.1 Identification of FLS by flow cytometry

1.2.2 Real-time PCR 检测 以 RA 患者滑膜组织及原代培养的 FLS 细胞中用 1 mL TRIzol 裂解组织及细胞并提取总 RNA,定量后取 100 ng 按照 Ambion 公司的 Taqman 试剂盒说明书进行 miRNA 或基因的反转录和实时定量 PCR,miRNA 的阴性对照基因为 U6,蛋白编码基因的阴性对照为 GAPDH。Real-time PCR 的反应参数为 95 °C 30 s,95 °C 3 s,60 °C 34 s,40

个循环。目的基因的定量分析采用 $\Delta\Delta$ CT 法。

1.2.3 双荧光素酶报告基因检测 按照表 1 中的序列分别合成 miR-10b 的反向互补序列 (rcmiR-10b)(序列 1、2)、TAK1 和 TLR4 的 3' 非翻译区(3'UTR)的 miR-10b 识别序列(序列 3-6),克隆入经过 Not I (GCGGCCGC) and Xho I (CTCGAG)酶切的 psiCHECK2 双荧光素酶报告载体中,得到 psi-rcmiR-10b-WT、

psi-TAK13'UTR-WT 和 psi-TLR4 3'UTR-WT 报告载体。另外对 psi-TAK13'UTR-MUT 和 psi-TLR4 3'UTR-MUT 报告载体作为基因的 miR-10b 种子识别区 3 个连续碱基进行突变 (序列阴性对照,psi-CHECK2 空载体为空白对照。7-12) 并分别克隆入载体获得 psi-rcmiR-10b-MUT、

表 1 双荧光素酶报告载体构建所用核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences synthesized for luciferase reporter vector construction

No	Gene	Sequence
1	rcmiR-10aF	TCGAGTCGACCACAAATTCGGATCTACAGGGTAGC
2	rcmiR-10aR	GGCCGCTACCCTGTACATCCGAATTTGTGGTCGAC
3	AK1F	TCGAGTCGACTATACCAAGTTAAAGACAGGGTAGC
4	TAK1R	GGCCGCTACCCTGTCTTTAACTTGGTATAGTCGAC
5	TLR4F	TCGAGTCGACTTTTAAAGTCTGTCTCCTTACAGAGGTTGC
6	TLR4R	GGCCGCAACCTCTGTAAGGAGACAGACTTAAAGTCGAC
7	mrcmiR-10aF	TCGAGTCGACCACAAATTCGGATCTACAGCCAAGC
8	mrcmiR-10aR	GGCCGCTTGGCTGTACATCCGAATTTGTGGTCGAC
9	mTAK1F	TCGAGTCGACTATACCAAGTTAAAGACAGCCAAGC
10	mTAK1R	GGCCGCTTGGCTGTCTTTAACTTGGTATAGTCGAC
11	mTLR4F	TCGAGTCGACTTTTAAAGTCTGTCTCCTTACAGACCATGC
12	mTLR4R	GGCCGCATGGTCTGTAAGGAGACAGACTTAAAGTCGAC

Note: the initial "m" in the gene names means "mutant"; the underlined sequences are nucleotides that paired with miR-10b; the bold and double underlined letters means the mutated nucleotides.

以 3×10^4 孔的密度将 HEK293T 细胞铺于 24 孔板中,无双抗 DMEM 培养;次日待细胞贴壁后使用 Lipofectamine® 2000,按照说明书进行转染实验。将上述各种载体(800 ng)和 miR-10b Mimics/Inhibitor (50 nM)按事先分组转染各孔,每组 3 个复孔;8 h 后更换 DMEM 完全培养液进行常规培养,转染 24 h 后收集离心细胞。使用 Promega Dual-Luciferase 报告基因检测试剂盒对荧光素酶活性进行检测。

1.2.4 miR-10b 对 RA FLS 细胞增殖能力的影响 将传代至第 3 代可用于实验的 RA-FLS 细胞接种至 24 孔板,细胞处理及分组情况包括:FLS 空白对照组、TNF- α 、miR-10b Mimics、TNF- α + miR-10b Mimics、Mimics scramble、TNF- α + Mimics scramble、miR-10b Inhibitor 和 Inhibitor scramble 共 8 组。常规培养至融合度为 80 %左右进行各组转染,同时含 TNF- α 进行细胞因子的添加。待 24 h 之后用 MTT 比色法测定各组细胞增殖状况。

1.2.5 miR-10b 对 RA FLS 细胞侵袭能力的影响 将传代至第 3 代可用于实验的 RA-FLS 细胞接种至 24 孔板,细胞处理及分组情况包括:FLS 空白对照组、TNF- α 、miR-10b Mimics、TNF- α + miR-10b Mimics、Mimics scramble、TNF- α + Mimics scramble、miR-10b Inhibitor 和 Inhibitor scramble 共 8 组。常规培养至融合度为 75 %左右进行各组转染,24 h 后将细胞转移至已放入 Transwell 小室的孔中,小室在实验前已经在上层加入稀释的 100 μ L 的基质胶,每孔将已经处理的细胞以 5×10^4 孔加入,在下室中加入含 10 %FBS 的正常 DMEM,CO₂ 培养箱中正常培养 24 h 后取出,经甲醇固定 10 min,后用 0.1 %结晶紫染色 Transwell 小室固定 10 min 后于蒸馏水中迅速清洗,甲醇固定。于显微镜下随机统计 5 个视野中穿过小室的细胞数。

1.2.6 miR-10b 对 RA FLS 细胞迁移能力的影响 将传代至第

3 代可用于实验的 RA-FLS 细胞接种至 24 孔板,细胞处理及分组情况如上共 8 组。各组细胞转染 24 h 后用无菌小号移液器枪头在各个孔中划线,24 h 后拍照并计数向划痕空白处迁移的细胞。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计学分析软件进行统计学差异分析。实验结果需重复 4 次及其以上,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应采用单因素方差分析,P<0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 miR-10b 在 RA 患者滑膜组织及 FLS 细胞中呈低表达

我们使用 miRNA microarray 芯片筛选来自 RA 和 OA 患者 FLS 细胞的差异 miRNA,发现约有 380 个 miRNA 差异表达,我们选取了其中 3 个 miRNA 分子进行 real-time PCR 的验证,结果表明 miR-10b 在 RA FLS 细胞中下调(见图 2A),miR-146b 在 RA FLS 中被显著上调(见图 2B),而 let-7b-5p 则在 RA 和 OA 患者的 FLS 中表达无显著差异(见图 2C)^[4]。此结果与芯片筛选结果吻合,表明了芯片结果的可靠性。我们选取 miR-10b 进行更深入的研究。首先,我们分别选择临床症状明确的 10 例 RA 和 OA 患者滑膜组织,提取总 RNA 并进行 miR-10b 水平检测,其结果显示在 RA 患者滑膜组织中 miR-10b 表达水平显著低于 OA 患者(见图 2D);其次,我们扩大样本量,将 RA、OA 患者的 FLS 细胞进行原代分离培养并检测 miR-10b 表达情况,结果与芯片和组织检测的结果相吻合(见图 2E)。

2.2 RA 中多种炎症因子可以下调 FLS 中的 miR-10b

为了揭示 miR-10b 在 FLS 细胞中的下调机制,我们用 RA

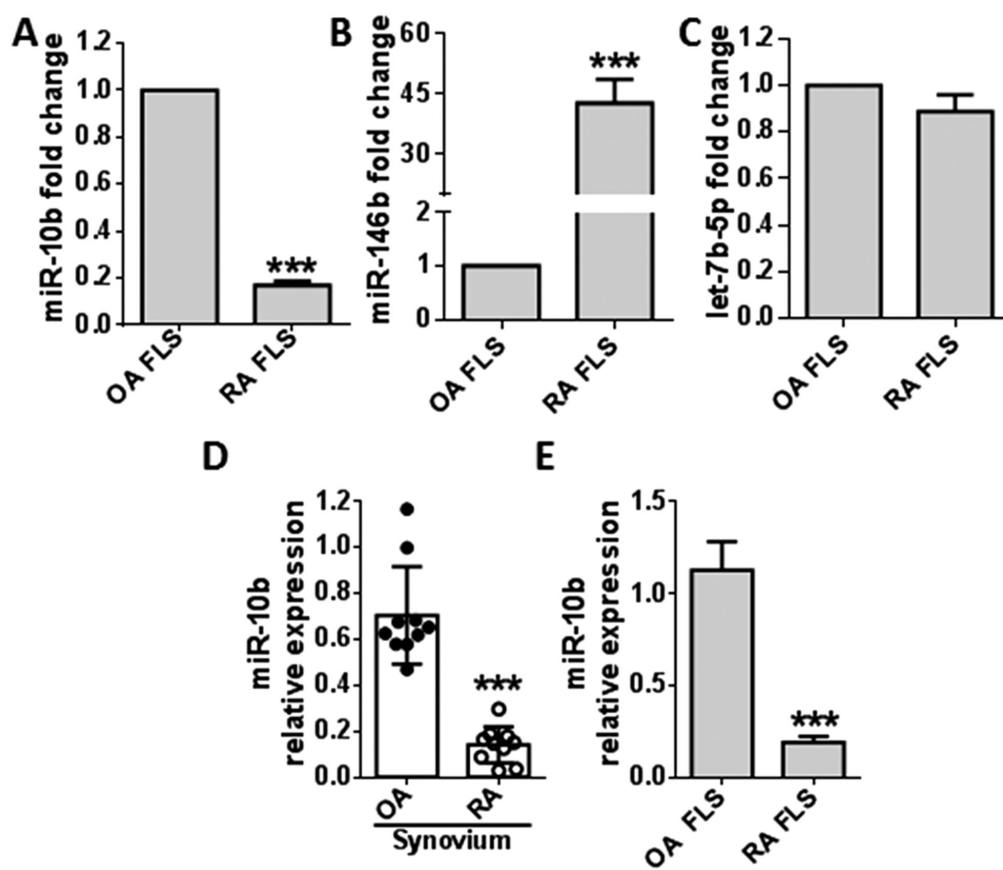


图2 miR-10b在类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞中下调

Fig.2 miR-10b is downregulated in RA-FLS cells

中常见的致病因子 II 型胶原、LPS、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等对 FLS 细胞刺激 24 h 后测定 miR-10b 的水平,结果显示这些因子均可以显著的下调 miR-10b 的水平(见图 3A)。我们选用了 RA 中最受关注的 TNF- α 进行后续研究。当选用不同浓度的 TNF- α 对 FLS 进行刺激时,我们发现 TNF- α 对于 miR-10b 的抑制作用具有明显的剂量依赖性(见图 3B)。考虑到 TNF- α 能够经过激活下游的 NF- κ B、JNK 或者 p38MAPK 信号转导通路而发挥作用。为了探讨 TNF- α 调节 miR-10b 的具体机制,我们在 TNF- α 刺激 FLS 的同时加入了三种信号通路的小分子抑制剂 Bay11-7082、SB203580 和 SP600125。结果表明只有 NF- κ B 抑制剂 Bay11-7082 显著的抵消了 TNF- α 对于 miR-10b 的下调,而 JNK 和 p38MAPK 的抑制剂作用不明显(见图 3C)。这些结果表明 TNF- α 是通过 NF- κ B 信号转导通路来下调 miR-10b 的。

2.3 TAK1 和 TLR4 是 miR-10b 的靶基因

为了深刻揭示 miR-10b 在 FLS 细胞中的功能,我们利用 miRNA 靶基因网站对 miR-10b 的潜在靶基因进行了预测,在候选靶基因中我们发现了 TAK1 和 TLR4 这两个和 NF- κ B 信号通路密切相关的基因。我们推测 miR-10b 通过调节这两个靶基因从而激活相应的信号环路,并在 RA 的迁延不愈中发挥重要作用。为了验证其预测的可靠性,我们需要采用双荧光素酶报告载体对所选的靶基因进行验证。将 psi-rcmiR-10b-WT、psi-rcmiR-10b-MUT、psi-TAK13'UTR-WT、psi-TAK13'UTR-MUT、psi-TLR43'UTR-WT 和 psi-TLR4 3'UTR-MUT 等载体与 miR-10b mimics(Pre-miR-10b)和 inhibitor(Anti-miR-10b)共转染

HEK293T 细胞,24 h 后检测荧光素酶活性。报告载体作为阴性对照,psi-CHECK2 空载体为空白对照。

结果见图 4,与对照组相比,miR-10b 能够显著抑制带有 TAK1 和 TLR4 基因 3'UTR 质粒的 RLuc 活性;与此相反 miR-10b inhibitor 则能够显著上调这些质粒的 RLuc 活性;当其质粒中的 miR-10b 种子识别序列结合位点被突变时,miR-10b mimics/inhibitor 的调控效果都消失了,表现为 RLuc 活性几乎没有发生变化。这些结果都表明 miR-10b 可以特异性地识别 TAK1 和 TLR4 基因的 3'UTR 并抑制其表达。故此,TAK1 和 TLR4 均为 miR-10b 的靶基因。

虽然我们在 HEK293T 细胞中验证了 TAK1 和 TLR4 为 miR-10b 的靶基因,那在 RA-FLS 细胞中,这种效应依然存在吗?我们用 real-time PCR 验证了 miR-10b 对 TAK1 和 TLR4 mRNA 水平的影响。结果显示 miR-10b inhibitor 可引起 TAK1 与 TLR4 的 mRNA 表达升高,而 miR-10b mimics 则具有相反作用;当 TNF- α 刺激后会引起 TAK1/TLR4 mRNA 表达量升高,且效果明显(见图 4D、E)。这进一步证实了 TAK1 与 TLR4 在 RA-FLS 细胞中是 miR-10b 的下游靶基因。

2.4 miR-10b 的下调促进了 FLS 细胞中 NF- κ B 的活化

考虑到 TAK1 和 TLR4 在 NF- κ B 信号通路的活化中占据着重要地位,而 NF- κ B 又是 RA 发生发展中的经典通路。该通路的激活不但可促进 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等一系列炎症因子的分泌从而加重 RA 的炎症反应,并且发现多种基质金属蛋白酶 MMPs 分子也有分泌,这些都加速 FLS 细胞的侵袭和

迁移以及 RA 中血管翳的形成、骨和软骨的破坏等。此外，我们拟探讨 miR-10b 是否会通过 TAK1 和 TLR4 这两个靶基 NF- κ B 通路还对促进 FLS 细胞的增殖发挥着重要作用。因此，因促进 NF- κ B 的活化入核。

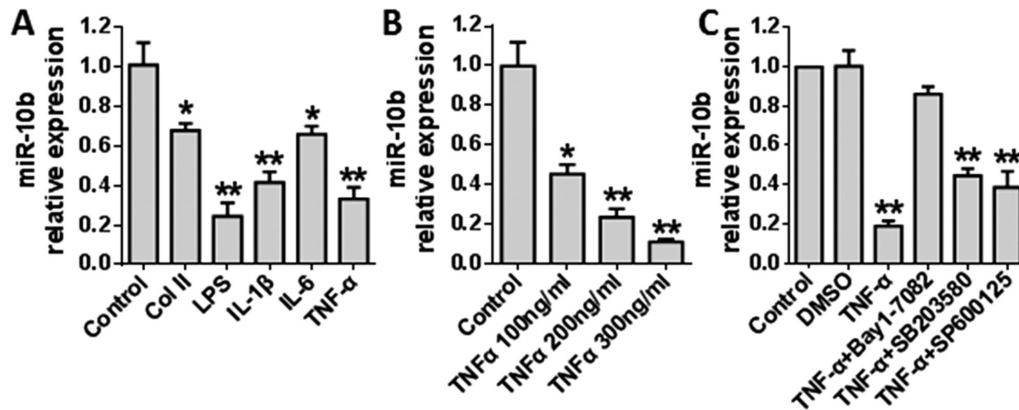


图 3 miR-10b 可被 TNF- α 以 NF- κ B 依赖性的方式下调

Fig.3 miR-10b is downregulated in RA-FLS by TNF- α in a NF- κ B-dependent manner

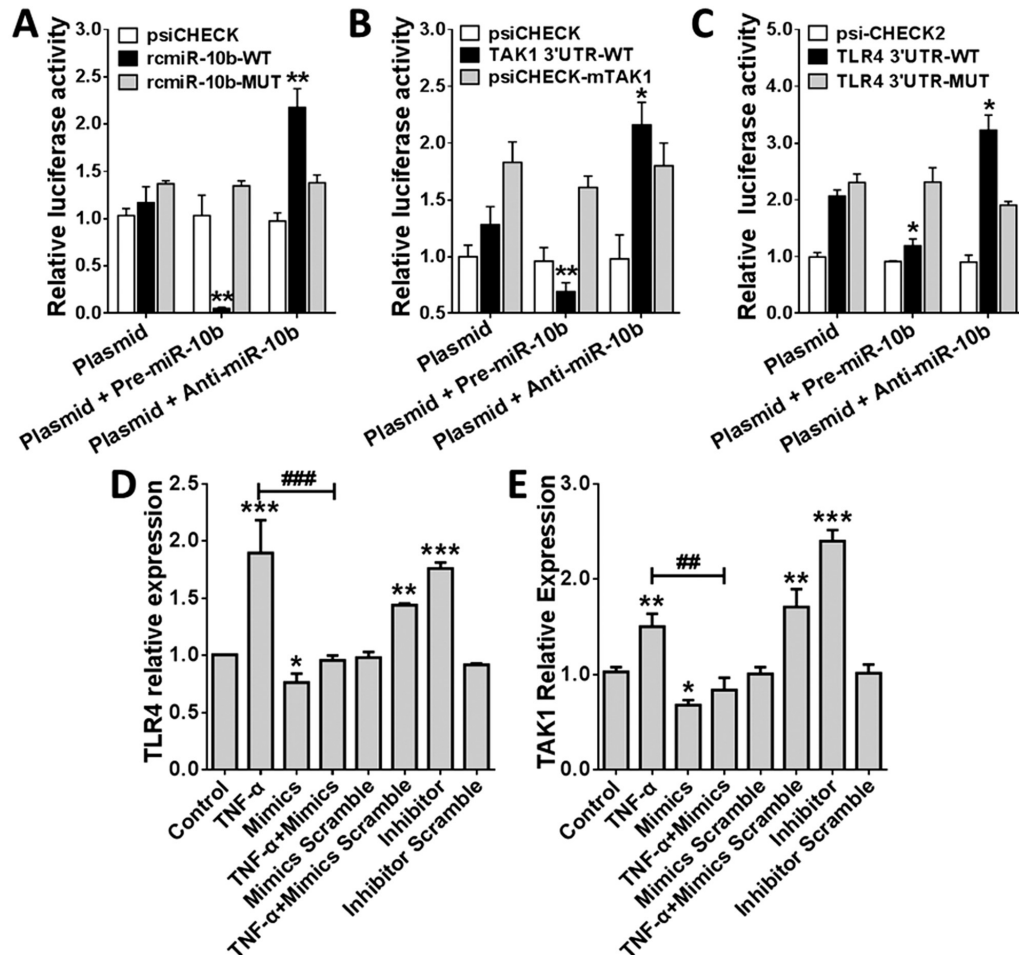


图 4 miR-10b 的靶基因是 TAK1 和 TLR4

Fig.4 TAK1 and TLR4 are target genes of miR-10b

如图 5 所示，与对照组相比，TNF- α 刺激可显著活化 NF- κ B，促进 p65 的入核。而加入 miR-10b mimics 则可以有效地逆转 TNF- α 对 NF- κ B 的活化作用，p65 的核浆分布都比较多。如果加入 miR-10b inhibitor 下调 FLS 细胞中的 miR-10b 水平，FLS 细胞中的 NF- κ B 活化水平则与 TNF- α 刺激的效果相当。这些结果都证实 miR-10b 的下调确实能够显著促进 NF- κ B 信号转导通路的活化。

可推测的是，随着 miR-10b 上调的 NF- κ B 活化，TNF- α 、IL-1 β 等炎性因子分泌水平增加，这些因子可以进一步刺激 FLS 中 miR-10b 的下调，从而激活了 TNF- α $\rightarrow$ NF- κ B $\rightarrow$ miR-10b $\rightarrow$ TNF- α /NF- κ B 环路。另一方面 miR-10b 在 FLS 中的下调可显著促进其靶基因 TLR4 的表达，后者是 LPS 的受体，因此可通过强化 LPS 对于 FLS 的刺激作用而激发 LPS $\rightarrow$ NF- κ B $\rightarrow$ miR-10b $\rightarrow$ TLR4 信号环路。因此，miR-10b 一旦被一

些致病因子(见图 3A)下调,就可以激活这两条信号环路,从而促进 RA 的发生发展。

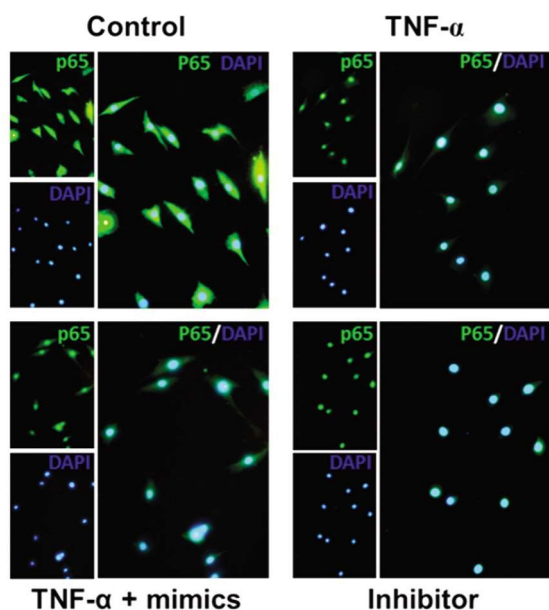


图 5 miR-10b 的下调可促进 FLS 细胞中的 NF-κB 活化

Fig.5 Downregulated miR-10b accelerates NF-κB activation in RA-FLS cells

2.5 miR-10b 对 FLS 细胞增殖能力的影响

我们进一步探讨了 miR-10b 对于 FLS 细胞的增殖水平影响,在 FLS 细胞中分别用 miR-10b mimics/inhibitor 改变其表达水平,然后在根据分组给予 TNF-α 刺激,24 h 后用 MTT 法检测细胞增殖情况。如图 6 所示,miR-10b inhibitor 能够促进其增殖,而 miR-10b mimics 显著抑制了其增殖;在用 TNF-α 刺激后,其 FLS 细胞增殖能力变强,其效果与 miR-10b inhibitor 效果相当;miR-10b mimics 能够部分抵消掉 TNF-α 对细胞增殖的影响。这些结果提示我们 miR-10b 可能至少部分介导了 TNF-α 对 FLS 的促增殖作用。

2.6 miR-10b 对 FLS 细胞侵袭能力的影响

通过对 RA 患者研究发现在关节障碍直到严重的功能丧失之前会骨和软骨的逐步破坏。而在破坏过程中,其 FLS 细胞侵袭和迁移能力的增强是一个非常必要的条件。首先,我们采用 Transwell 侵袭实验来评价 miR-10b 对 FLS 细胞侵袭能力的影响。通过比较不同分组之间相同时间内穿过基质胶的细胞数目来评价其侵袭能力。结果如图 7 所示:miR-10b inhibitor 能够增强 FLS 细胞的侵袭能力;而与此相反的是,miR-10b mimics 并不能增强细胞侵袭能力;令人惊奇的是,TNF-α 产生了与 miR-10b inhibitor 一样的效果,其结果都促进了 FLS 细胞的侵袭能力。Mimics scramble(MS)和 Inhibitor scramble(INS)则分别为 miR-10b mimics 和 inhibitor 的无关对照,两者对 FLS 的侵袭能力均没有明显的影响。由此可见,miR-10b 参与了 FLS 细胞侵袭能力的影响。

2.7 miR-10b 对 FLS 细胞迁移能力的影响

以上的结果显示 miR-10b 参与了 FLS 细胞的侵袭,那 miR-10b 对 FLS 细胞迁移能力有影响吗?我们利用划痕实验来评价 miR-10b 对 FLS 细胞迁移能力的影响。通过比较不同分组

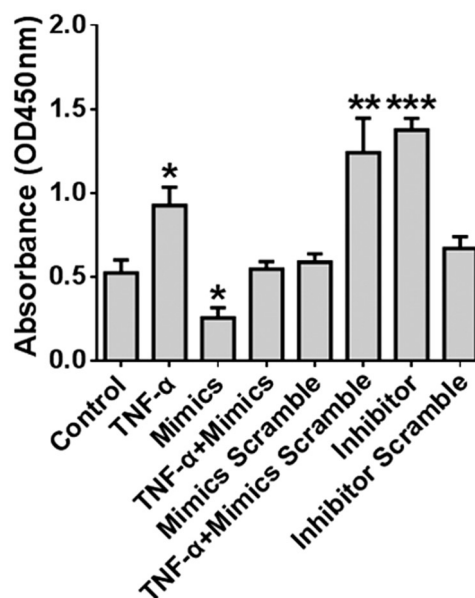


图 6 miR-10b 的下调可促进 FLS 细胞的增殖

Fig.6 Downregulated miR-10b promotes RA-FLS proliferation

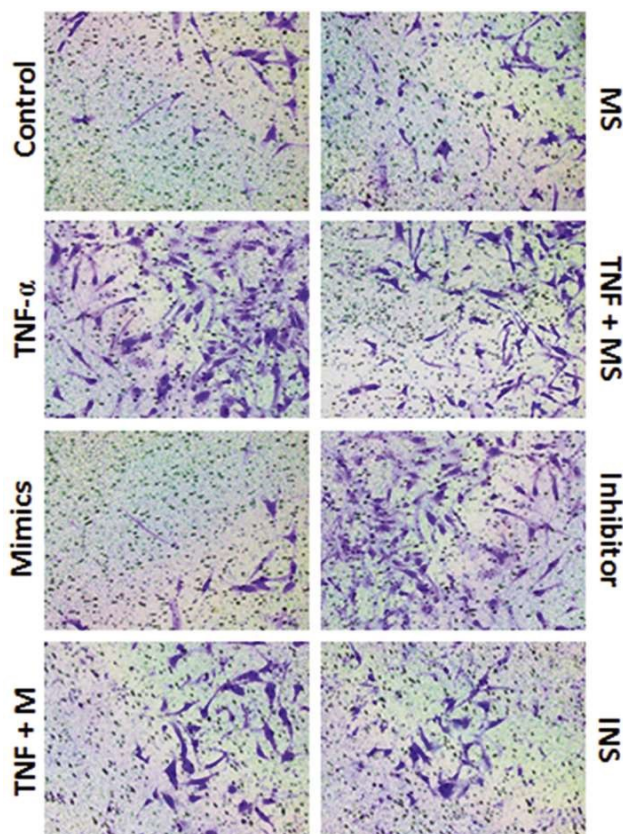


图 7 下调的 miR-10b 可促进 FLS 细胞的侵袭

Fig.7 Downregulated miR-10b promotes RA-FLS invasion

之间相同时间内发生迁移的细胞数目评价其迁移能力。如图 8 所示,miR-10b inhibitor 能够增强 FLS 细胞的迁移能力;而与此相反的是,miR-10b mimics 并不能促进细胞迁移;TNF-α 与 miR-10b inhibitor 效果一样,都促进 FLS 细胞的迁移能力。由此可见,miR-10b 表达的改变可影响 FLS 细胞迁移能力。

3 讨论

RA 在临床上的特征表现为手、足小关节对称性、侵袭性以

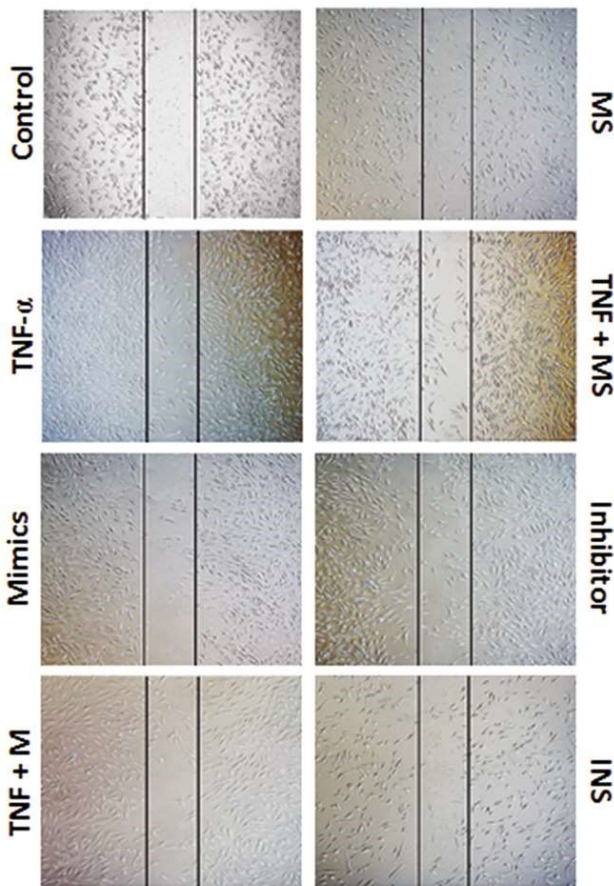


图 8 miR-10b 的下调可促进 FLS 细胞的迁移

Fig.8 Downregulated miR-10b promotes RA-FLS migration

及慢性的持续性关节炎,常伴有身体其他关节外器官受累,临床检测其血清类风湿因子为阳性,被认为是一种全身性的自身免疫性疾病,最终会导致关节变形以及功能丧失。在我国,已报道的 RA 的患病率约为 0.3%~0.4%,但是直至目前为止 RA 的发病机制仍不甚明了。构成 RA 滑膜衬里层的细胞可分为两种,分别是巨噬细胞样滑膜细胞和成纤维样滑膜细胞。FLS 是关节滑膜的重要组成部分,生理条件下 70%~80%的滑膜细胞为 FLS。研究表明 FLS 不管在 RA 在前期的关节炎及进展到严重的软骨破坏过程中都发挥着举足轻重的作用^[15,16]。

在 RA 发病进程中,FLS 细胞具有异常的增殖、凋亡特性,细胞数量急剧增加,可引发滑膜增生。此外,FLS 细胞还参与了 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等因子的分泌,促进 RA 的持续恶化。传统观点认为 FLS 与巨噬细胞、树突状细胞以及淋巴细胞等免疫细胞协同作用会破坏正常关节腔内的免疫稳态,从而导致关节与软骨的损伤。然而,不论是靶向趋化因子及其受体而阻断巨噬细胞等浸润^[17,18],还是 CD20 单抗针对 B 淋巴细胞的治疗均没有很明显的临床疗效^[19],而钙黏蛋白-11(一种调节 FLS 细胞功能的分子)缺陷小鼠则表现出滑膜层发育不全,对炎症环境无明显反应,对关节炎诱导表现出显著的耐受等,均彰显着 FLS 细胞在 RA 中的重要地位^[20]。一项针对 FLS 的 3D 培养实验显示 FLS 细胞体外培养可在 3D 球形基质上自发地形成薄层结构,产生润滑素,组织细胞外基质形成类似滑膜层的结构以支持单核巨噬细胞在其中存活。当用细胞因子刺激的时候,FLS 细胞层表现出 RA 中的滑膜增生情形。以上研究都提示

FLS 在 RA 中发挥着比我们此前想象更重要的作用^[21]。

miRNAs 是被报道在真核生物中发现的具有调控作用的一类内源性的非编码 RNA,大小约为 21~26 个核苷酸^[22]。在之前的研究中发现,miRNA 也与许多自身免疫性疾病的发病机制有关^[23]。例如,miR-126 已经被鉴定为 RA 中 PI3K/AKT 的调节剂,介导其细胞的凋亡和增殖^[24]。此外,已发现的 miR-20a 在 FLS 中有两个靶基因:TXNIP 和 ASK1,介导了其炎症因子的释放和炎症微环境的维持^[25]。而最近的一份研究报告指出 miR-19 可以通过靶向 TLR2 抑制炎症因子的释放,以此来缓解 RA 的炎症环境^[26]。上述发现提示在 RA-FLS 细胞中必然存在 miRNAs 的调控网络,直接参与了 RA-FLS 细胞的各项病理功能改变。

本研究中,我们发现 miR-10b 在 RA-FLS 中被显著下调,且这种下调可以被多种炎症因子以 NF- κ B 信号通路依赖性的方式所介导的。随后的生物信息学和双荧光素酶报告系统研究表明 TAK1 和 TLR4 是 FLS 中的两个 miR-10b 重要的靶基因。TAK1 是介导 NF- κ B 信号通路活化的重要分子,后者可促进多种炎症因子的分泌、FLS 细胞的增殖、侵袭和迁移等。TLR4 等模式识别受体介导的通路在 RA 等自身免疫性疾病中也发挥着重要作用。TLR4 被认为是 RA 的潜在治疗靶点。据报道,TLR4 在 RA-FLS 中高表达^[8,9],其可促进 RA-FLS 中 MMP3、IL-6 和 IL-8 的分泌,并影响 RA 病程的发生发展^[27]。在构建的 TLR4 缺陷的 DBA1J 小鼠中,经胶原诱导关节炎之后,其观察到小鼠发病率及患病程度都较轻^[28]。本研究中,我们阐明了 RA-FLS 中 TLR4 上调的分子机制之一,即通过炎症因子下调的 miR-10b 来实现。miR-10b 可以通过下游的 TAK1 和 TLR4 靶基因而激活 TNF- α →NF- κ B→miR-10b→TNF- α /NF- κ B 和 LPS→NF- κ B→miR-10b→TLR4 两条信号环路。这种环路的激活可能正是 RA 久治不愈的恶性循环来源之一。

当然,我们的研究中还有一些悬而未决的问题。比如 TNF- α 等单抗在临床治疗 RA 中取得了良好的效果,那么这种作用是否部分由 miR-10b 等分子介导?机体的代偿性平衡系统是否有一套上调或者回复 miR-10b 水平的信号通路?其机制如何?诸如这些问题还有待于我们的进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Burmester G R, Pope J E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2017, 389(10086): 2338-2348
- [2] Papotto P H, Reinhardt A, Prinz I, et al. Innately versatile: gamma-delta17 T cells in inflammatory and autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2017[Epub ahead of print]
- [3] Dulic S, Vasarhelyi Z, Sava F, et al. T-Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients on Long-Term Anti-TNF or IL-6 Receptor Blocker Therapy[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 6894374
- [4] Lac P, Saunders S, Tutunea-Fatan E, et al. Immune responses to peptides containing homocitrulline or citrulline in the DR4-transgenic mouse model of rheumatoid arthritis [J]. J Autoimmun, 2017[Epub ahead of print]
- [5] Kong Q Z, Guo L T, Yang J N, et al. Anti-Inflammatory Effects of TRAF-Interacting Protein in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 3906108
- [6] Sun X, Han Y, Liu Y, et al. Proliferation and apoptosis of rheumatoid

- arthritis fibroblast-like synoviocytes following signal transducer and activator of transcription 3 RNA interference delivery [J]. J Cell Biochem, 2017[Epub ahead of print]
- [7] Sabroe I, Read R C, Whyte M K, et al. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain [J]. J Immunol, 2003, 171 (4): 1630-1635
- [8] Liu Y, Yin H, Zhao M, et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2014, 47(2): 136-147
- [9] Li H, Guan S B, Lu Y, et al. MiR-140-5p inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion through targeting TLR4[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 208-214
- [10] Furer V, Greenberg J D, Attur M, et al. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases [J]. Clin Immunol, 2010, 136(1): 1-15
- [11] Virtue A, Wang H, Yang X F. MicroRNAs and toll-like receptor/interleukin-1 receptor signaling[J]. J Hematol Oncol, 2012, 5: 66
- [12] Vogt T. Rheumatoid arthritis--clinical picture and important differential diagnoses[J]. Ther Umsch, 2005, 62(5): 265-268
- [13] Zhao W, Zhang C, Shi M, et al. The discoidin domain receptor 2/anexin A2/matrix metalloproteinase 13 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66 (9): 2355-2367
- [14] Mu N, Gu J, Huang T, et al. A novel NF-kappaB/YY1/microRNA-10a regulatory circuit in fibroblast-like synoviocytes regulates inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20059
- [15] Garcia-Carbonell R, Divakaruni A S, Lodi A, et al. Critical Role of Glucose Metabolism in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes[J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(7): 1614-1626
- [16] Nair A, Kanda V, Bush-Joseph C, et al. Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast-like synovocyte responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 ligands via soluble CD14[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(7): 2268-2277
- [17] Szekecz Z, Koch A E. Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12 (1): 5-13
- [18] Roberto G M, Engel E E, Tone L G, et al. MIR-10b IS inversely correlated with higher tumor grade in osteosarcoma [J]. Clin Chim Acta, 2017[Epub ahead of print]
- [19] Kavanaugh A, Rosengren S, Lee S J, et al. Assessment of rituximab's immunomodulatory synovial effects (ARISE trial). 1: clinical and synovial biomarker results[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(3): 402-408
- [20] Assefnia S, Dakshanamurthy S, Guidry A J, et al. Cad herin-11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis: common target, common therapies[J]. Oncotarget, 2014, 5(6): 1458-1474
- [21] Kiener H P, Watts G F, Cui Y, et al. Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(3): 742-752
- [22] De Rie D, Abugessaisa I, Alam T, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(9): 872-878
- [23] Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic[J]. Nat Rev Immunol, 2016, 16(5): 279-294
- [24] Gao J, Zhou X L, Kong R N, et al. microRNA-126 targeting PIK3R2 promotes rheumatoid arthritis synovial fibroblasts proliferation and resistance to apoptosis by regulating PI3K/AKT pathway[J]. Exp Mol Pathol, 2016, 100(1): 192-198
- [25] Li X F, Shen W W, Sun Y Y, et al. MicroRNA-20a negatively regulates expression of NLRP3-inflammasome by targeting TXNIP in adjuvant-induced arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Joint Bone Spine, 2016, 83(6): 695-700
- [26] Li Z, Cai J, Cao X. MiR-19 suppresses fibroblast-like synoviocytes cytokine release by targeting toll like receptor 2 in rheumatoid arthritis[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(12): 5512-5518
- [27] Wahamaa H, Schierbeck H, Hreggvidsdottir H S, et al. High mobility group box protein 1 in complex with lipopolysaccharide or IL-1 promotes an increased inflammatory phenotype in synovial fibroblasts[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(4): R136
- [28] Pierer M, Wagner U, Rossol M, et al. Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23539

(上接第 1238 页)

- [16] Li H F, Xie X H, Zheng Y F, et al. Development of biodegradable Zn-IX binary alloys with nutrient alloying elements Mg, Ca and Sr [J]. Sci Rep, 2015, 5: 10719
- [17] Sikora-Jasinska M, Mostaed E, Mostaed A, et al. Fabrication, mechanical properties and in vitro degradation behavior of newly developed Zn Ag alloys for degradable implant applications [J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 77: 1170-1181
- [18] Bakhsheshi-Rad H R, Hamzah E, Low H T, et al. Fabrication of biodegradable Zn-Al-Mg alloy: Mechanical properties, corrosion behavior, cytotoxicity and antibacterial activities [J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 73: 215-219
- [19] Witte F. Reprint of: The history of biodegradable magnesium implants: A review[J]. Acta Biomater, 2015, 23 Suppl: S28-S40
- [20] 项荣, 丁栋博, 范亮亮, 等. 氧化锌的抗菌机制及其安全性研究进展 [J]. 中国组织工程研究, 2014, (03): 470-475
- Xiang Rong, Ding Dong-bo, Fan Liang-liang et al. Antibacterial mechanism and safety of zinc oxide[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014, (03): 470-475
- [21] Jin G, Qin H, Cao H, et al. Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium [J]. Biomaterials, 2014, 35(27): 7699-7713