

LncRNA MIR22HG 通过海绵吸附 miR-22-5p 对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、凋亡和炎症反应的影响

杨舟 林书典 詹宇威 肖璐 符克英 黄小蝶

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA (LncRNA) MIR22HG 对类风湿关节炎 (RA) 成纤维样滑膜细胞 (FLSs) 增殖、凋亡和炎症反应的影响及其分子机制。方法 收集在本院接受治疗的 37 例 RA 患者及 30 例关节创伤患者的滑膜组织样本, 采用 qRT-PCR 检测滑膜组织中 MIR22HG 和 miR-22-5p 表达水平。体外分离、培养和鉴定人 RA-FLSs, 将 MIR22HG siRNA 干扰质粒 (si-MIR22HG) 及其阴性对照质粒 (si-NC) 和 miR-22-5p inhibitor 及其阴性对照 (inhibitor-NC) 分别或同时转染至 RA-FLSs 中, qRT-PCR 检测细胞中 MIR22HG 和 miR-22-5p 表达水平; CCK-8 检测各组细胞增殖活性; Annexin V-FITC/PI 检测各组细胞凋亡率; ELISA 检测各组细胞上清液中肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-6 水平; Western blot 检测各组细胞中 Bcl-2、Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 MIR22HG 与 miR-22-5p 之间的靶向关系。结果 与关节创伤患者比较, RA 患者滑膜组织中 MIR22HG 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 miR-22-5p 表达水平降低 ($P < 0.05$)。干扰 MIR22HG 可抑制 RA-FLSs 增殖活性, 降低细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平及细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 提高细胞凋亡率, miR-22-5p 及 Bax、Cleaved caspase-3 等蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。然而, 抑制 miR-22-5p 表达可逆转 MIR22HG 基因沉默对 RA-FLSs 增殖、凋亡和炎症的影响 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验显示, miR-22-5p 是 MIR22HG 潜在的下游靶 miRNA。结论 MIR22HG 在 RA 患者关节滑膜组织中高表达, 其可能通过靶向下调 miR-22-5p 表达促进 RA-FLSs 增殖及炎症反应, 并抑制细胞凋亡。

关键词 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; LncRNA MIR22HG; miR-22-5p; 细胞增殖; 细胞凋亡; 炎症反应

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0405-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.010

2023-02-27 接收

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目 (编号: 820MS128); 海南省省级临床医学中心建设项目 [编号: 琼卫医函(2021)75号]

作者单位: 海南省人民医院, 海南医学院附属海南医院风湿免疫科, 海口 570311

作者简介: 杨舟, 女, 硕士, 副主任医师;

林书典, 男, 博士, 主任医师, 责任作者, E-mail: yuier3558@163.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性炎症性自身免疫性疾病, 其主要特征是滑膜增生和关节滑膜炎, RA 可导致骨骼损伤、软骨损伤和关节外疾病等, 最终可导致患者严重残疾^[1]。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLSs) 是滑膜组织中最常见的细胞之一, 其在 RA 滑膜增生、滑膜炎症和关节破坏中发挥重要作用。RA-FLSs 异常活化增殖可入侵关节软骨, 并通过产生促炎细胞因子、趋化因子和基质降解分子从而促进滑膜炎症和关节破坏。因此, 靶向 RA-FLSs 已成为一种有效的 RA 治疗方法^[2]。早期诊断和正确治疗对提高 RA 患者的生活质量至关重要。然而, 目前 RA 的早期诊断和治疗仍然是一个挑战, 为此需要新的生物标志物来改善 RA 的诊断和治疗。长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是一种超过 200 个核苷酸的非编码 RNA 转录本, 其可参与细胞增殖、凋亡、侵袭和炎症反应的调控^[3]。已有研究^[4]显示, LncRNA MIR22HG 在 RA 患者外周血单个核细胞中 (PBMCs) 中高表达, 其是诊断和监测 RA 进展的潜在生物标志物。然而, LncRNA MIR22HG 在 RA 患者关节滑膜组织中的表达水平及其影响 RA 进展的分子机制目前均不明确。为此, 本研究探讨 MIR22HG 在 RA 患者滑膜组织中的表达及其对 RA-FLSs 增殖、凋亡和炎症反应的影响, 并探讨其分子机制, 以期对 RA 找到有效的诊断和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 MIR22HG siRNA 干扰质粒 (si-MIR22HG)、siRNA 干扰阴性质粒 (si-NC)、mimics-NC、miR-22-5p mimics、inhibitor-NC 和 miR-22-5p inhibitor 均购自广州锐博生物技术有限公司; Prime-Script RT reagent Kit、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit、TB Green Fast qPCR Mix 和 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green Kit 均购自美国 Bio-Rad 公司; 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 ELISA 试剂盒均购自武汉默沙克生物科技有限公司; BCA 蛋白检测试

剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; ECL 化学发光检测试剂盒购自上海联迈生物工程有限公司; 兔多抗 Bcl-2 抗体、兔多抗 Bax 抗体、兔多抗 Cleaved case-pase-3 抗体、GAPDH 抗体、兔单抗 Vimentin 抗体、FITC 标记的兔单抗 CD14 抗体、FITC 标记的小鼠单抗 CD68 抗体、FITC 标记的小鼠单抗 CD55 抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 均购自英国 Abcam 公司; FITC 标记的山羊抗兔 IgG 和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。NU-5841 型 CO₂ 培养箱购自美国 Nuaire 公司; 680 型酶标仪、CFX96 型荧光定量 PCR 仪和 Gel Doc XR 凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad 公司; DMIL LED 型倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司; FACSCalibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 临床标本收集 纳入 2020 年 1 月—2021 年 6 月在海南省人民医院接受治疗的 37 例初发病例 RA 患者的滑膜组织样本作为 RA 组,另收集 30 例接受关节置换手术的关节创伤患者的滑膜组织样本作为对照组。所有 RA 患者均符合美国风湿病学会 (ACR) 提出的标准^[5]。严重肝肾功能障碍患者、使用免疫抑制剂的患者和孕妇均被排除在研究范围之外。本研究经海南省人民医院伦理委员会批准 (医伦研 [2021]233 号),所有患者均签署知情同意书。

1.3 滑膜组织 RA-FLSs 分离、培养和鉴定 取 RA 患者的滑膜组织样本,在无菌条件下清洗并剔除多余组织, PBS 清洗后剪碎滑膜组织,将其均匀涂布于培养瓶底部,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞融合度达到 80% ~ 90% 时,加入 0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代培养,取第 3 代处于对数生长期的细胞进行 RA-FLSs 鉴定^[6]: ① 免疫荧光检测 Vimentin 蛋白表达情况: PBS 清洗细胞 2 次,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗后加入 0.5% Triton X-100,室温通透 20 min,再加入 2% 牛血清白蛋白,室温封闭 30 min,加入 Vimentin 抗体 (1 : 300) 4 °C 孵育过夜。次日,加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 500),室温孵育 2 h, PBS 清洗后加入 DAPI 染核 10 min,封片后置于荧光显微镜下观察。② 流式细胞术检测 RA-FLSs 表面标志物 CD14、CD68 和 CD55 表达情况: PBS 清洗细胞 2 次,分别加入 FITC-CD14 抗体 (1 : 500)、FITC-CD68 抗体 (1 : 100) 和 FITC-CD55 抗体 (1 : 100) 室温避光孵育 30 min, PBS 清洗

后置于流式细胞仪上检测。

1.4 细胞分组和转染 取鉴定成功的 RA-FLSs,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期的 RA-FLSs,将细胞以 5×10^5 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞融合度为 80% ~ 90% 时,采用 Lipofectamine 2000 分别进行以下 2 个转染实验: ① 将细胞分为 blank 组 (空白对照,不进行转染)、si-NC 组 (转染空载质粒 pcDNA3.1) 和 si-MIR22HG 组 (转染 MIR22HG 干扰质粒)。② 将细胞分为 si-NC 组、si-MIR22HG 组、inhibitor-NC 组 (转染 miR-22-5p 抑制物阴性对照)、miR-22-5p inhibitor 组 (转染 miR-22-5p 抑制物)、si-MIR22HG + inhibitor-NC 组 (共转染 MIR22HG 干扰质粒和 miR-22-5p 抑制物阴性对照) 和 si-MIR22HG + miR-22-5p inhibitor 组 (共转染 MIR22HG 干扰质粒和 miR-22-5p 抑制物)。转染 6 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h 后收集转染成功的细胞用于后续实验。

1.5 qRT-PCR 法检测滑膜组织及细胞中 MIR22HG 和 miR-22-5p 表达水平 采用 Trizol 试剂提取滑膜组织及各组细胞中的总 RNA,再采用 PrimeScript RT reagent Kit 或 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 将总 RNA (1.0 μg) 逆转录为 cDNA,再分别采用 TB Green Fast qPCR Mix 和 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green Kit 进行实时荧光定量 PCR 反应。引物序列: MIR22HG, F: 5'-CGGACG-CAGTGATTTGCT-3', R: 5'-GCTTTAGCTGGGTCAGG-ACA-3'; GAPDH, F: 5'-TGCTAGCTGGCATCAT-3', R: 5'-TGCTAGCTGGCATGCCCGATCGATC-3'; miR-22-5p, F: 5'-ACACTCCAGCTGGGAGTTCTTCAGTGGCA-A-3', R: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGGCAA-TTCAGTTGAGTAAAGCTT-3'; U6, F: 5'-GCTTCGGC-AGCACATATACTAAAAT-3', R: 5'-CGCTTCACGAA-TTTCGCTGTCAT-3'。95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环。MIR22HG 以 GAPDH 作为内参, miR-22-5p 以 U6 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 MIR22HG 和 miR-22-5p 的相对表达水平。

1.6 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性 取对数生长期的 RA-FLSs,将细胞密度调整为 2×10^4 个/ml,取 100 μl/孔接种于 96 孔板中,置于培养箱中培养 24 h 后按照要求进行细胞分组与转染,继续培养 24、48 和 72 h 后,相应时间点取出细胞培养板,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,37 °C 培养 4 h,随后使用酶

标仪测定各孔在 450 nm 处的光密度(optical density, OD)值,用 OD 值表示各组细胞的增殖活性。

1.7 ELISA 法检测各组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平 收集转染后的各组细胞,1 000 r/min 离心 10 min,收集细胞上清液,根据 ELISA 试剂盒操作说明检测各组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

1.8 Annexin V-FITC/PI 法检测各组细胞凋亡率

收集转染后的各组细胞,将其重悬于 200 μ l PBS 中,加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI,轻轻混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,再加入 300 μ l PBS,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。右下象限为 Annexin V-FITC 阳性/PI 阴性,表示早期凋亡细胞;右上象限为 Annexin V-FITC 阳性/PI 阳性,表示晚期凋亡细胞;左上象限为 Annexin V-FITC 阴性/PI 阳性,表示坏死细胞;左下象限为 Annexin V-FITC 阴性/PI 阴性,表示活细胞。细胞凋亡率 = 早期细胞凋亡率 + 晚期细胞凋亡率。

1.9 Western blot 法检测各组细胞中 Bcl-2、Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平 收集转染后的各组细胞,使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA Buffer 从各组细胞中提取总蛋白,采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,将等量的蛋白质通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h 后,分别加入 Bcl-2 抗体(1:1 000)、Bax 抗体(1:1 000)、Cleaved caspase-3 抗体(1:1 000)和 GAPDH 抗体(1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,然后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000),室温孵育 1 h。最后,使用 ECL 化学发光检测试剂盒对蛋白印迹进行可视化,并通过 Image J 软件进行密度分析,以 GAPDH 作为内参,计算各蛋白的相对表达水平。

1.10 双荧光素酶报告基因实验 设计并合成含有 miR-22-5p 结合位点的 MIR22HG 野生型(Wt)和突变型(MUT)片段,将其插入双荧光素酶报告载体 pmirGLO 中,使用 Lipofectamine 2000 将重组质粒(MIR22HG-WT 或 MIR22HG-MUT)与 mimics-NC 或 miR-22-5p mimics 共转染至 293T 细胞中,48 h 后收集细胞,使用荧光素酶检测试剂盒检测双荧光素酶活性。利用萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值来计算相对荧光素酶活性。

1.11 统计学处理 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。两组间比较采用独

立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),事后两两比较采用 SNK- q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滑膜组织中 MIR22HG 表达水平 与对照组比较,RA 组滑膜组织中 MIR22HG 表达水平升高($P < 0.05$)。见图 1。

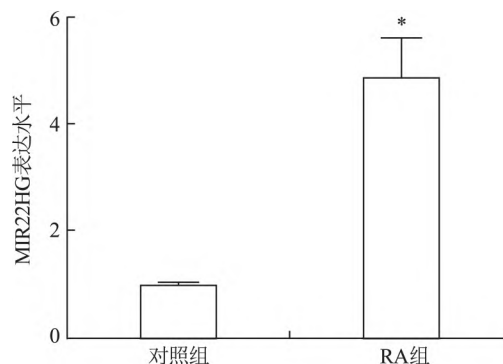


图1 滑膜组织中 MIR22HG 表达水平
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 RA-FLSs 鉴定 滑膜细胞呈梭状,细胞中央的细胞核呈椭圆形或卵圆形;且细胞中 CD14 和 CD68 呈阴性,CD55 和 Vimentin 呈阳性,说明分离的细胞是 RA-FLSs。见图 2。

2.3 转染后各组 RA-FLSs 中 MIR22HG 表达水平

与 blank 组和 si-NC 组比较,si-MIR22HG 组细胞中 MIR22HG 表达水平降低($F = 304.819$, $P < 0.05$),说明 si-MIR22HG 转染成功。见图 3。

2.4 干扰 MIR22HG 对 RA-FLSs 增殖、凋亡及炎症因子的影响 与 blank 组和 si-NC 组比较,si-MIR22HG 组转染后 24 h ($F = 9.014$, $P < 0.05$)、48 h ($F = 18.736$, $P < 0.05$) 和 72 h ($F = 21.080$, $P < 0.05$) 细胞增殖活性均降低,见图 4A; si-MIR22HG 组细胞上清液中 TNF- α ($F = 8.367$, $P < 0.05$)、IL-1 β ($F = 19.391$, $P < 0.05$) 和 IL-6 ($F = 26.070$, $P < 0.05$) 水平均降低,见图 4B; si-MIR22HG 组细胞凋亡率($F = 326.160$, $P < 0.05$)及 Bax($F = 18.980$, $P < 0.05$)和 Cleaved caspase-3 ($F = 50.199$, $P < 0.05$)蛋白表达水平均升高,而 Bcl-2 蛋白表达水平降低($F = 70.204$, $P < 0.05$),见图 4C~F。

2.5 MIR22HG 与 miR-22-5p 之间的靶向关系 qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,RA 组滑膜组织中 miR-22-5p 表达水平降低($P < 0.05$),见图 5A。与 blank 组和 si-NC 组比较,si-MIR22HG 组细胞中

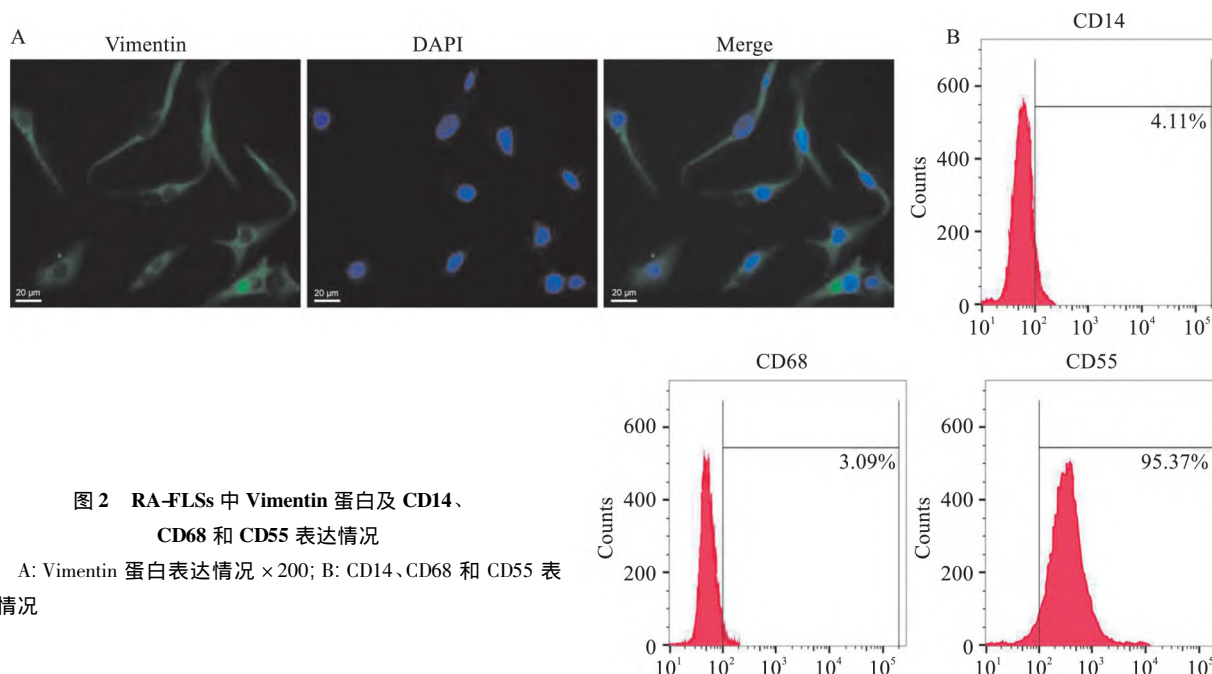


图2 RA-FLSs 中 Vimentin 蛋白及 CD14、CD68 和 CD55 表达情况

A: Vimentin 蛋白表达情况 ×200; B: CD14、CD68 和 CD55 表达情况

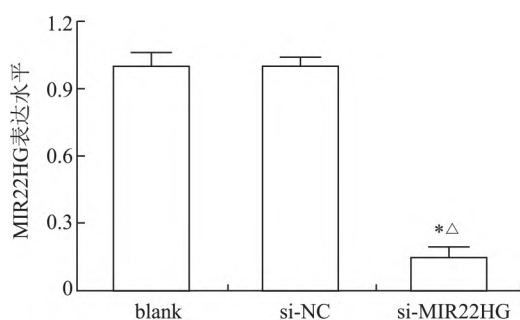


图3 各组 RA-FLSs 中 MIR22HG 表达水平

与 blank 组比较: * $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: $\Delta P < 0.05$

miR-22-5p 表达水平升高 ($F = 46.403$, $P < 0.05$) ,见图 5B。StarBase 在线数据库预测结果显示 MIR22HG 序列中含有与 miR-22-5p 互补的结合位点 ,见图 5C。双荧光素酶报告基因实验结果显示 ,miR-22-5p mimics 可抑制 MIR22HG-WT 组的相对荧光素酶活性 ($P < 0.05$) ,而 MIR22HG-MUT 组的相对荧光素酶活性无显著差异 ($P > 0.05$) ,见图 5D。提示 miR-22-5p 是 MIR22HG 潜在的下游靶点。

2.6 共转染后各组 RA-FLSs 中 miR-22-5p 表达水

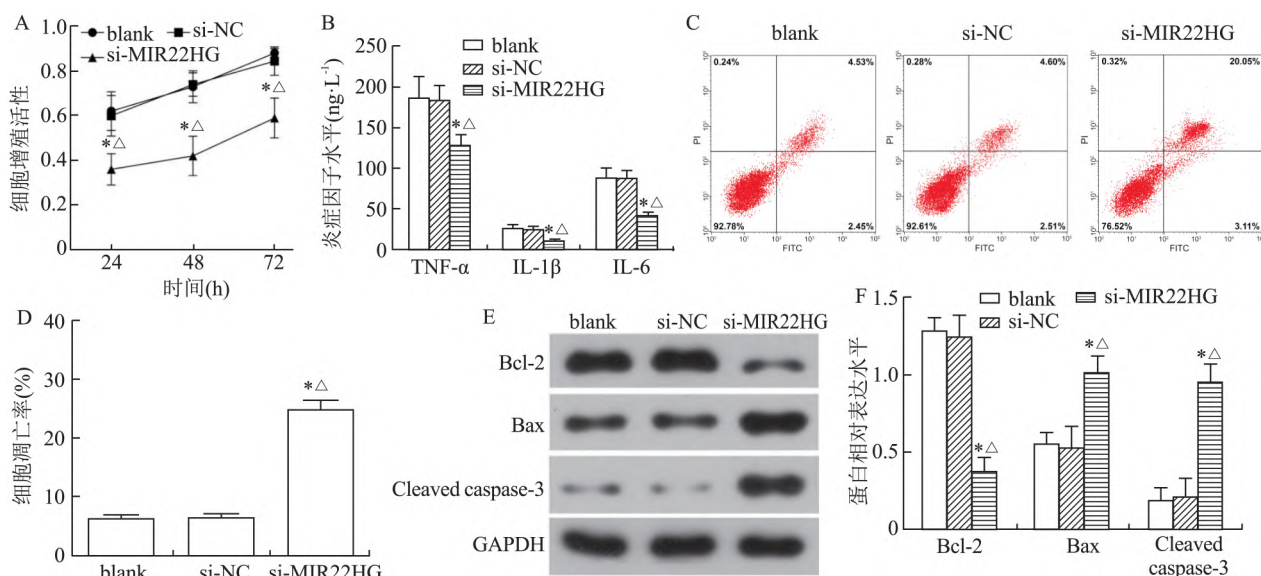


图4 各组 RA-FLSs 增殖活性、炎症因子水平及凋亡水平

A: 细胞增殖活性; B: 炎症因子水平; C: 细胞凋亡率; D: C 图细胞凋亡率统计分析结果; E: Bcl-2、Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达; F: E 图蛋白表达情况统计分析结果; 与 blank 组比较: * $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: $\Delta P < 0.05$

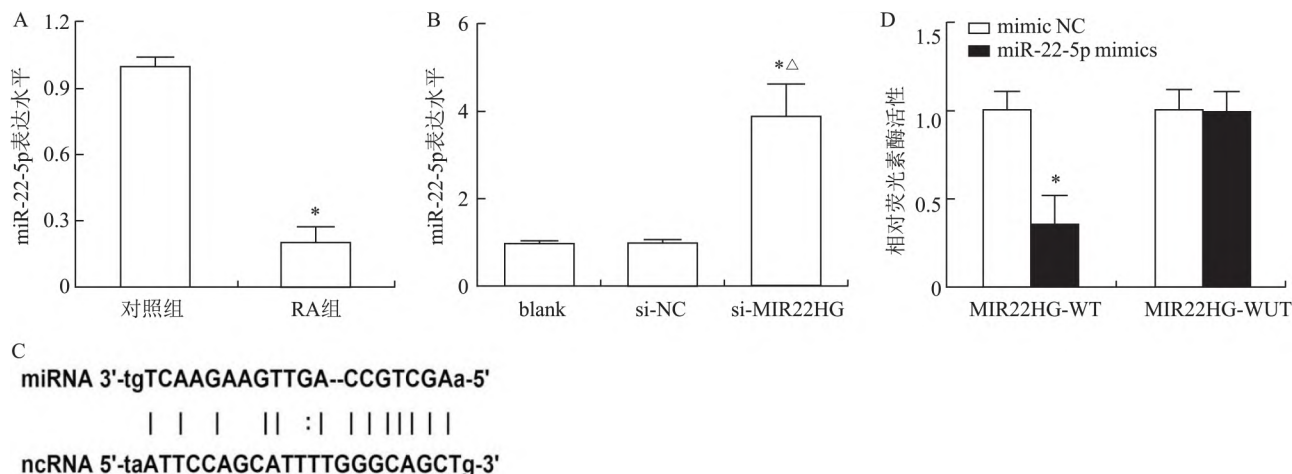


图5 MIR22HG与miR-22-5p之间的靶向关系

A: 滑膜组织中 miR-22-5p 表达水平; B: RA-FLSs 中 miR-22-5p 表达水平; C: MIR22HG 与 miR-22-5p 之间互补的结合位点; D: 双荧光素酶报告基因实验; 与 mimics-NC 组比较: * $P < 0.05$

平与 si-NC 组比较, si-MIR22HG 组细胞中 miR-22-5p 表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 inhibitor-NC 组比较, miR-22-5p inhibitor 组细胞中 miR-22-5p 表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 si-MIR22HG 组和 si-MIR22HG + inhibitor-NC 组比较, si-MIR22HG + miR-22-5p inhibitor 组细胞中 miR-22-5p 表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图 6。

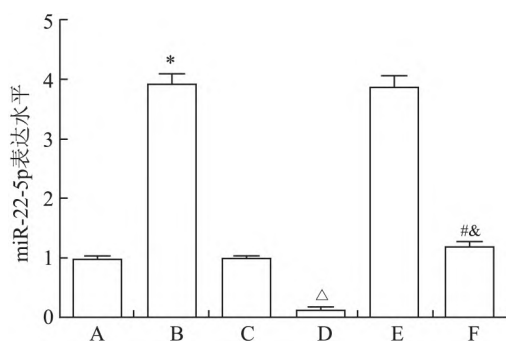


图6 各组 RA-FLSs 中 miR-22-5p 表达水平

A: si-NC 组; B: si-MIR22HG 组; C: inhibitor-NC 组; D: miR-22-5p inhibitor 组; E: si-MIR22HG + inhibitor-NC 组; F: si-MIR22HG + miR-22-5p inhibitor 组; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 inhibitor-NC 组比较: Δ $P < 0.05$; 与 si-MIR22HG 组比较: # $P < 0.05$; 与 si-MIR22HG + inhibitor-NC 组比较: & $P < 0.05$

2.7 共转染对 RA-FLSs 增殖、凋亡及炎症因子的影响 与 si-NC 组比较, si-MIR22HG 组细胞增殖活性及细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均降低 ($P < 0.05$), 而细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 inhibitor-NC 组比较, miR-22-5p inhibitor 组细胞增殖

活性及细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均升高 ($P < 0.05$), 而细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$); 与 si-MIR22HG 组和 si-MIR22HG + inhibitor-NC 组比较, si-MIR22HG + miR-22-5p inhibitor 组细胞增殖活性及细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均升高 ($P < 0.05$), 而细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

RA 是一种常见的慢性自身免疫性疾病, 以滑膜增生和关节滑膜炎为主要特征。如果不及时治疗, 最终会导致关节畸形和功能丧失, 严重影响患者的生活质量, 甚至导致死亡^[7]。研究^[8]显示, RA-FLSs 在滑膜增生、关节炎症和软骨破坏中发挥关键作用, 其可分泌多种趋化因子、炎症因子、金属蛋白酶和组织蛋白酶, 从而导致骨骼和软骨破坏。因此, 靶向 RA-FLSs 是一种潜在的 RA 治疗策略。目前, RA 的治疗方法主要集中在缓解疾病的抗风湿药物, 如甲氨蝶呤和来氟米特等, 这些药物可以减少炎症和渐进性损伤, 但存在严重毒性^[9]。因此, 寻找具有高效性和安全性的 RA 诊断和治疗药物迫在眉睫。

MicroRNAs (miRNAs) 是一种内源性的小非编码 RNA, 长度约为 22 个核苷酸, 其可通过与目标 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-UTR) 的序列进行碱基配对, 在转录后水平调控基因的表达。研究^[10]显示, miRNAs 在 RA 的调控机制中发挥重要作用。lncRNAs 是一种长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA, 也是一种重要的竞争性内源性 RNA。lncRNAs

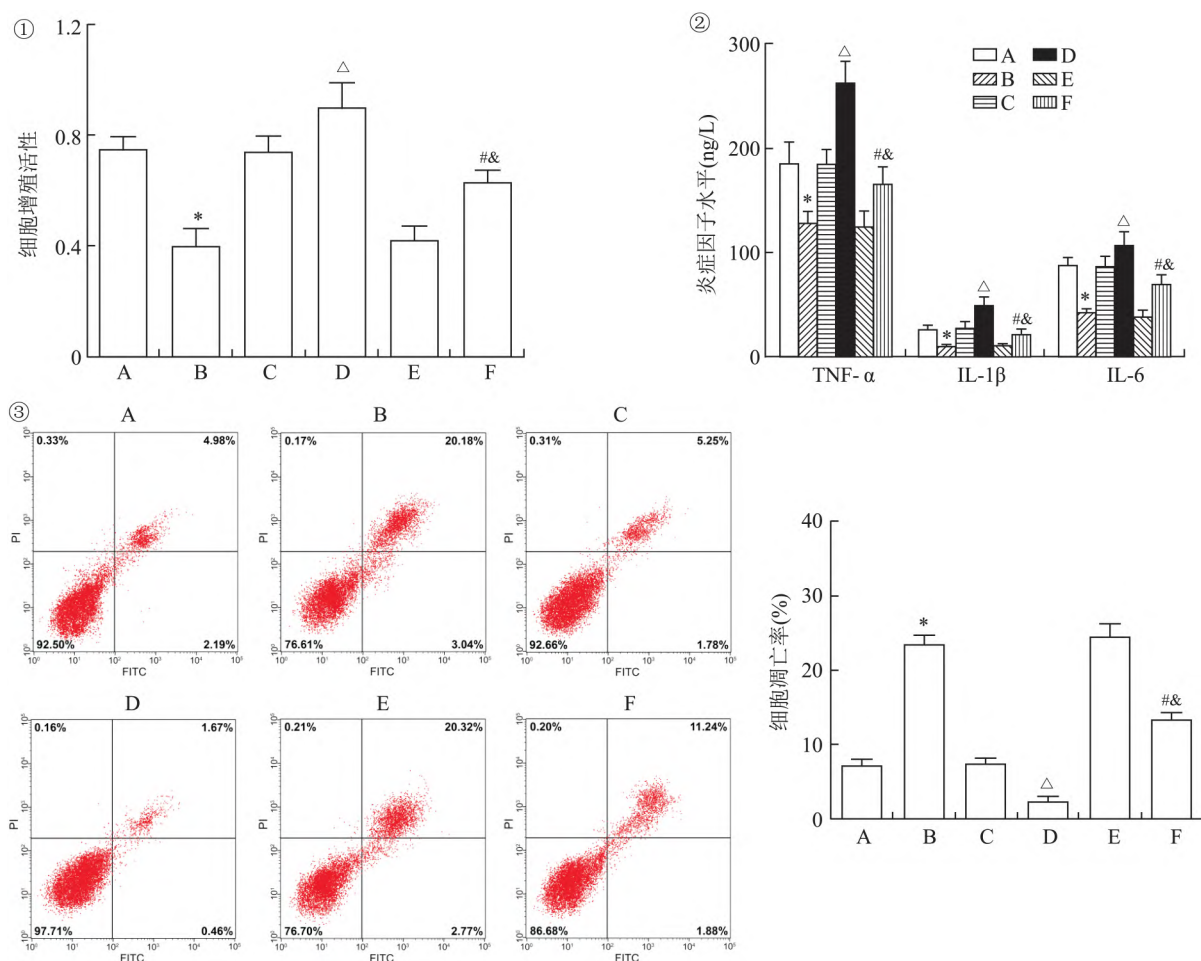


图7 各组 RA-FLSs 增殖活性、炎症因子水平及凋亡水平

①: 细胞增殖活性; ②: 炎症因子水平; ③: 细胞凋亡率; A: si-NC 组; B: si-MIR22HG 组; C: inhibitor-NC 组; D: miR-22-5p inhibitor 组; E: si-MIR22HG + inhibitor-NC 组; F: si-MIR22HG + miR-22-5p inhibitor 组; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 inhibitor-NC 组比较: [△] $P < 0.05$; 与 si-MIR22HG 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 si-MIR22HG + inhibitor-NC 组比较: [&] $P < 0.05$

可通过碱基对互补性隔离 miRNA,使其远离靶 mRNA,从而起到 miRNA 海绵吸附的作用。lncRNAs 在各种癌症、妇科疾病和自身免疫性疾病中发挥重要作用,其被认为是癌症的潜在诊断生物标志物^[11]。lncRNA MIR22HG 位于 17p13.3 号染色体,是一种新近发现的 lncRNA。MIR22HG 最早发现与肝细胞癌有关。Liu et al^[12] 研究发现 MIR22HG 通过衍生 miR-22 并靶向 HMGB1 抑制肝癌细胞侵袭。Dong et al^[13] 研究证实 MIR22HG 在肝细胞癌中低表达,且 MIR22HG 低表达与微血管浸润、肿瘤包被及 TNM 分期密切相关。此外,敲除 MIR22HG 后,肝癌细胞的增殖能力下降。Jin et al^[14] 研究显示,lncRNA MIR22HG 衍生的 miR-22-5p 通过抑制 HDAC2 活性增加组蛋白乙酰化来增强肝癌的放射敏感性。Cui et al^[15] 研究发现,MIR22HG 在子宫内膜癌中低表达,且 MIR22HG 可通过下调 miR-141-3p/DAPK1 轴

抑制子宫内膜癌细胞的增殖能力,并促进其凋亡。然而,MIR22HG 在 RA 中的作用及其潜在机制尚不清楚。本探究探讨了 MIR22HG 在 RA 滑膜组织中的表达情况及其对 RA-FLSs 增殖、凋亡和炎症反应的影响,结果显示,MIR22HG 在 RA 滑膜组织中高表达。通过细胞实验发现,干扰 MIR22HG 可抑制 RA-FLSs 增殖及炎症反应,并促进细胞凋亡。为进一步探讨 MIR22HG 影响 RA-FLSs 增殖、凋亡和炎症反应的分子机制。利用生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验发现 miR-22-5p 是 MIR22HG 潜在的下游靶 miRNA。qRT-PCR 结果显示,miR-22-5p 在 RA 患者滑膜组织中低表达,且干扰 MIR22HG 后,RA-FLSs 中 miR-22-5p 表达水平明显升高,说明 MIR22HG 可靶向下调 miR-22-5p 表达。抑制 miR-22-5p 表达后 RA-FLSs 增殖活性及炎症因子水平均明显升高,而细胞凋亡率明显降低,MIR22HG 基因

沉默对 RA-FLSs 增殖、凋亡和炎症的影响均有所缓解,说明 MIR22HG 促进 RA-FLSs 增殖及炎症反应,并抑制细胞凋亡的分子机制可能与下调 miR-22-5p 表达有关。

综上所述,LncRNA MIR22HG 在 RA 患者关节滑膜组织中高表达,其可能通过靶向下调 miR-22-5p 表达促进 RA-FLSs 增殖及炎症反应,并抑制细胞凋亡。因此,LncRNA MIR22HG 可能成为 RA 重要的分子治疗靶点和生物标志物。然而,本研究的局限性在于结果大多都是在体外实验的基础上得出的,需进行动物体内实验进一步验证。

参考文献

- [1] Han J J, Wang X Q, Zhang X A. Functional interactions between lncRNAs/circRNAs and miRNAs: insights into rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 810317.
- [2] 宋月莹,郑程,王俊杰,等. 类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞表观遗传学研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2022, 26(4): 271-5.
- [3] Huang G D, Liao P, Huang Y H, et al. MIR22HG regulates the proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and apoptosis in colorectal carcinoma[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2021, 36(9): 783-92.
- [4] Wen J, Liu J, Jiang H, et al. LncRNA expression profiles related to apoptosis and autophagy in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(8): 1642-54.
- [5] Aggarwal R, Rider L G, Ruperto N, et al. 2016 American college of rheumatology/european league against rheumatism criteria for minimal, moderate, and major clinical response in adult dermatomyositis and polymyositis: an international myositis assessment and clinical studies group/paediatric rheumatology international trials organisation collaborative initiative[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(5): 792-801.
- [6] 吴洁,杨学华,马玲,等. miR-26a-5p 通过 JAK2/STAT3 信号通路对人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(2): 460-8.
- [7] 李梅,蒋锦梅,欧大明,等. 白术多糖对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(4): 552-7.
- [8] Hosoya T, Shukla N M, Fujita Y, et al. Identification of compounds with glucocorticoid sparing effects on suppression of chemokine and cytokine production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 607713.
- [9] Lin Y, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 880-923.
- [10] 松涛,孙京涛,魏瑄. miR-23b-3p 靶向 XIAP 调控类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和凋亡的机制研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(7): 1310-5.
- [11] Wu H, Chen S, Li A, et al. LncRNA expression profiles in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: emerging biomarkers and therapeutic targets[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 792884.
- [12] Liu L, Zhang D, Wu D. 748 Long non-coding RNA miR22HG represses hepatocellular carcinoma cell invasion by deriving miR-22 and targeting HMGB1[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): S1045-6.
- [13] Dong Y, Yan W, Zhang S L, et al. Prognostic values of long non-coding RNA MIR22HG for patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69): 114041-9.
- [14] Jin Q, Hu H, Yan S, et al. LncRNA MIR22HG-derived miR-22-5p enhances the radiosensitivity of hepatocellular carcinoma by increasing histone acetylation through the inhibition of HDAC2 activity[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 572585.
- [15] Cui Z, An X, Li J, et al. LncRNA MIR22HG negatively regulates miR-441-3p to enhance DAPK1 expression and inhibits endometrial carcinoma cells proliferation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 223-8.

Effects of lncRNA MIR22HG on proliferation, apoptosis and inflammatory response of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by sponge adsorption of miR-22-5p

Yang Zhou, Lin Shudian, Zhan Yuwei, Xiao Lu, Fu keying, Huang Xiaodie
(Dept of Rheumatology, Affiliated Hainan Hospital of Hainan Medical University,
Hainan General Hospital Hainan General Hospital, Haikou 570311)

Abstract Objective To explore the effects of long non-coding RNA (LncRNA) MIR22HG on proliferation, apoptosis and inflammatory response of rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLSs) and its molecular mechanism. **Methods** Synovial tissue samples were collected from 37 RA patients and 30 joint trauma patients in our hospital, and the expression levels of MIR22HG and miR-22-5p in synovial tissue were detected by qRT-PCR. RA-FLSs in human was isolated, cultured and identified *in vitro*. MIR22HG siRNA interference plasmid

网络出版时间: 2023-03-07 15:52:09 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20230307.1347.011.html>

白藜芦醇促进肥胖小鼠骨骼肌中 FNDC5 降解的机制

虞芳梅¹, 曹琼琼¹, 徐冬梅¹, 龙月明¹, 周恒¹, 桂丽², 鲁云霞¹

摘要 目的 研究白藜芦醇通过诱导自噬促进肥胖小鼠骨骼肌组织中纤连蛋白Ⅲ型结构域包含 5 (FNDC5) 降解的机制。方法 将 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为标准饮食 (SCD) 组、高脂 (HFD) 组及高脂 + 白藜芦醇 (HFD + RES) 组, HFD + RES 组在 HFD 的同时胃饲白藜芦醇 (400 mg/kg · d), 共持续 20 周。测定体质量、血清甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白, HE 染色检测骨骼肌的病理学变化。免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 分析和纤连蛋白Ⅲ型结构域包含 5 (FNDC5)、沉默信息调节因子 (SIRT) 1、SIRT2、微管相关蛋白 1 轻链 3α (LC3)、选择性自噬接头蛋白 (p62)、Bcl-2 同源结构域蛋白抗体 (Beclin-1)、噬相关 5 同源物 (ATG5)、噬相关 7 同源物 (ATG7) 的表达。结果 HFD 组小鼠体质量增高, 血清 TG、TC 和 LDL-C 水平显著升高,

HDL-C 水平下降; 骨骼肌纤维间出现脂肪沉积; SIRT1、SIRT2 和 LC3 的蛋白表达水平降低, 而 FNDC5 和 p62 的蛋白表达升高。FNDC5 的表达水平升高, SIRT1、SIRT2、LC3、Atg7 和 Beclin-1 的基因表达水平降低。RES 组可逆转 HFD 的效应, 增加 SIRT1、SIRT2 和自噬相关基因的表达。结论 白藜芦醇可减少骨骼肌 FNDC5 表达的效应, 其机制可能与其增加 SIRT1 和 SIRT2 的表达, 进而促进自噬和 FNDC5 的降解有关。

关键词 白藜芦醇; SIRT1; SIRT2; 骨骼肌; FNDC5; 自噬

中图分类号 R 963; R 363

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)03-0412-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.011

2023-02-26 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1808085MH233)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院¹ 生物化学与分子生物学教研室、² 综合实验室, 合肥 230032

作者简介: 虞芳梅, 女, 硕士研究生;

鲁云霞, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: luyunxia@ahmu.edu.cn

高热量饮食引起的肥胖已造成全球肥胖人数从 1975 年的不到 1% 增加到 2016 年的 6%~8%^[1]。骨骼肌是人体最大的能量代谢和内分泌器官, 肥胖可造成脂肪在骨骼肌组织中的积累和肌萎缩^[2]。纤连蛋白Ⅲ型结构域包含 5 (fibronectin type III domain-containing 5, FNDC5) 可被切割形成肌肉因子鸢尾素, 肥胖可通过增加 FNDC5 的表达来退行性地

(si-MIR22HG) and its negative control plasmid (si-NC), miR-22-5p inhibitor and its negative control (inhibitor-NC) were transfected into RA-FLSs respectively or simultaneously. The expression levels of MIR22HG and miR-22-5p were detected by qRT-PCR. CCK-8 was used to detect the proliferation activity of cells in various groups. Annexin V-FITC/PI was used to detect the apoptosis rates of cells in various groups. ELISA was used to detect the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the supernatant of cells in various groups. Western blot was used to detect the protein expression levels of Bcl-2, Bax and Cleaved caspase-3 of cells in various groups. The targeting relationship between MIR22HG and miR-22-5p was verified by dual luciferase reporter gene assay. **Results** Compared with joint trauma patients, the expression level of MIR22HG in synovial tissues of RA patients increased ($P < 0.05$), while the expression level of miR-22-5p decreased ($P < 0.05$). Interference with MIR22HG inhibited the proliferation activity of RA-FLSs, decreased the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in cell supernatant and the protein expression level of Bcl-2 in cells ($P < 0.05$), and increased the apoptosis rate, the expression level of miR-22-5p and the protein expression levels of Bax and Cleaved caspase-3 ($P < 0.05$). However, inhibition of miR-22-5p expression reversed the effects of MIR22HG gene silencing on proliferation, apoptosis and inflammation of RA-FLSs ($P < 0.05$). Dual luciferase reporting assay showed that miR-22-5p was a potential downstream miRNA target of MIR22HG. **Conclusion** MIR22HG is highly expressed in synovial tissues of RA patients, and it may promote the proliferation and the inflammatory response of RA-FLSs and inhibit cell apoptosis by down regulating the expression of miR-22-5p.

Key words rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocyte; LncRNA MIR22HG; miR-22-5p; cell proliferation; cell apoptosis; Inflammatory response