

lncRNA CASC2 通过调控 miR-218-5p 表达对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞炎症反应及迁移与侵袭的影响

李梅¹, 蒋锦梅¹, 欧大明¹, 黄丽芳¹, 谢立虎¹, 张济²

摘要 **目的** 探讨长链非编码 RNA 肿瘤易感候选基因 2 (CASC2) 对类风湿关节炎 (RA) 滑膜成纤维细胞炎症反应、迁移及侵袭的影响及其机制。**方法** 收集 45 例 RA 患者滑膜组织和 18 例健康对照者滑膜组织, 采用 qRT-PCR 检测滑膜组织中 CASC2 和 miR-218-5p 的表达水平。ENCORI 在线软件预测和双荧光素酶报告实验分析 CASC2 和 miR-218-5p 的靶向相互作用。将 CASC2 过表达质粒及 miR-218-5p mimic 转染至人 RA 滑膜成纤维细胞系 MH7A 中, qRT-PCR 检测细胞中 CASC2 和 miR-218-5p 表达水平; CCK-8 检测细胞的增殖水平; ELISA 检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平; Transwell 检测细胞迁移和侵袭能力; Western blot 检测基质金属酶 (MMP)-2 和 MMP-9 蛋白表达水平。**结果** RA 患者滑膜组织中 CASC2 表达水平较健康对照者滑膜组织减少 ($P < 0.05$), 而 miR-218-5p 表达水平则增加 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验结果显示, CASC2 与 miR-218-5p 之间存在靶向调控关系。过表达 CASC2 可抑制 RA 滑膜成纤维细胞 MH7A 的增殖活性, 降低细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 减弱细胞迁移及侵袭能力, 下调细胞中 miR-218-5p 及 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平。然而, 转染 miR-218-5p mimic 可逆转 CASC2 过表达对 MH7A 细胞增殖、迁移与侵袭及炎症反应的抑制作用。**结论** CASC2 在 RA 患者滑膜组织中低表达, 其过表达可抑制 RA 滑膜成纤维细胞炎症反应及迁移与侵袭能力, 其作用机制可能与靶向负调节 miR-218-5p 表达相关。

关键词 类风湿关节炎; 滑膜成纤维细胞; lncRNA CASC2; miR-218-5p; 炎症反应; 迁移与侵袭

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1229-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.010

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一

2022-05-25 接收

基金项目: 湖南省卫生健康委科研立项课题 (编号: 202103100054)

作者单位: 南华大学衡阳医学院附属第一医院¹ 风湿免疫科、² 风湿免疫实验室, 衡阳 421001

作者简介: 李梅, 女, 硕士, 主治医师;

蒋锦梅, 女, 硕士, 主治医师, 责任作者, E-mail: 1056370281@qq.com

种慢性炎症性自身免疫系统疾病, 临床病理表现为以类纤维细胞样化和膜细胞增殖浸润, 可导致滑膜增生和关节损害^[1-2]。有研究^[3-4]报道, lncRNA 不仅在 RA 患者外周血或滑膜组织中表达异常, 还能参与调控 RA 滑膜细胞炎症、增殖、迁移和侵袭。新的研究^[5]显示, lncRNA CASC2 (简称 CASC2) 在 RA 患者血浆中表达水平较低, 且过表达 CASC2 可促进人 RA 滑膜成纤维细胞凋亡。同时, 也有研究^[6]发现, miR-218-5p 在 RA 患者关节滑膜组织及骨性关节炎患者软骨组织中高表达。但 CASC2 在 RA 滑膜组织中的表达情况及其是否可通过靶向调节 miR-218-5p 参与 RA 进程的调控, 目前还未知。因此, 该研究旨在检测 CASC2 及 miR-218-5p 在 RA 患者滑膜组织中的表达水平, 并探讨 CASC2 对 RA 滑膜成纤维细胞炎症反应、迁移、侵袭中的影响, 以期对 RA 靶向治疗提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂 人 RA 滑膜成纤维细胞系 MH7A 来源于日本 Tsukuba 公司。RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自上海 TBD 公司; CASC2 过表达质粒 (pcDNA3.1-CASC2) 及其空载质粒 (pcDNA3.1-) 购自武汉天一辉远生物公司; miR-218-5p 模拟物 (mimic) 和阴性对照 (mimic-NC) 购自广州锐博公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1 β 试剂盒购自美国 Biovalue 公司; 基质胶购自美国 Corning 公司; CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白质检测试剂盒和双荧光素酶报告基因试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Lipofectamine 2000 试剂盒购自美国 Introvigen 公司; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自日本 TaKaRa 公司; GoTaq qPCR Master Mix 试剂盒购自美国 Promega 公司; GAPDH 抗体、MMP-2 抗体、MMP-9 抗体购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗购自武汉博士德生物

工程有限公司;引物由武汉金凯瑞生物工程有限公司提供。

1.1.2 临床组织标本 45例RA滑膜组织收集于2019年2月—2020年7月在我院进行膝关节滑膜切除术或膝关节置换手术的RA患者。同期18例健康滑膜组织取自无急性或慢性关节异常病史的非RA患者膝关节组织。所有患者均签署知情同意书,本研究获得本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染及分组 RA滑膜成纤维细胞MH7A用含10%的血清的RPMI-1640培养基进行培养,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中。根据实验需要,将细胞MH7A以5×10⁵个细胞/孔铺在6孔板中,当细胞密度达到70%~80%时,将细胞分为空白对照组(blank)、空载组(Vector,转染空载质粒)、CASC2过表达组(CASC2,转染CASC2过表达质粒)、CASC2+mimic-NC组(共转染CASC2过表达质粒和mimic-NC)和CASC2+miR-218-5p mimic组(共转染CASC2过表达质粒和miR-218-5p mimic)。采用Lipofectamine 2000将CASC2过表达质粒、空载质粒pcDNA3.1、miR-218-5p mimic及mimic-NC转染至MH7A中,6h后更换新鲜的完全培养基,继续放入培养箱48h。

1.2.2 qRT-PCR检测lncRNA CASC2和miR-218-5p表达 使用TRIzol试剂提取滑膜组织及转染48h后的MH7A细胞中总RNA。使用PrimeScript RT试剂盒将RNA逆转录成cDNA,并使用GoTaq qPCR Master Mix试剂盒进行PCR扩增。将10μl qPCR混合物及每种引物0.5μl混合均匀,配制成最终的20μl反应混合物。用于扩增的热循环参数如下:94℃变性2min;94℃20s,58℃20s,72℃30s,40个循环;25℃5min终止反应,构建溶解曲线并在62℃和95℃之间进行分析,采用2^{-ΔΔCt}法计算CASC2和miR-218-5p相对于对照基因GAPDH或U6的表达水平。所用qPCR引物参照表1所示。

表1 qPCR引物

基因	引物(5'-3')
CASC2	For: GAGGAGCCATCCGCACATCACA
	Rev: AGCTTAGACTGTAAGCTGCTCTC
GAPDH	For: CCCACATGGCCTCCAAGGAGT
	Rev: GTGTACATGGCAACTGTGAGG
miR-218-5p	For: CGAGTGCATTTGTGCTTGATCT
	Rev: TAATGGTGAACGCCTAACGCT
U6	For: CTCGCTTCGGCAGCACATAT
	Rev: TGGAAACGCTTCACGAATTTG

1.2.3 CCK-8检测细胞增殖能力 取对数生长期MH7A细胞,调整细胞浓度为2×10⁴个/ml,以100μl/孔接种于96孔板中,放入培养箱中24h,按照上述方法使用Lipofectamine 2000进行不同分组细胞转染,培养6h后更换新鲜培养基继续孵育24、48、72h。在各个时间点提前4h每孔加入10μl CCK-8工作液,置于培养箱4h后采用酶标仪测定450nm处的吸光度(optical density, OD)值,以OD值来评判不同分组的细胞增殖情况。

1.2.4 ELISA检测 收集转染后不同分组的MH7A细胞上清液,根据TNF-α、IL-6和IL-1β试剂盒说明书分别检测上清液中TNF-α、IL-6和IL-1β水平。

1.2.5 Transwell检测细胞迁移、侵袭能力 消化转染后的MH7A细胞,用基础培养基调整细胞浓度为2.5×10⁵个/ml,以100μl/孔接种于上室中,下室加入700μl含10%FBS的完全培养基。置于培养箱中24h。弃培养基,取出小室用PBS清洗1次,加入固定液固定15min,再用结晶紫染色15min,擦除膜上方未穿过的细胞,晾干后使用显微镜观察迁移细胞情况并拍照记录。细胞侵袭实验需要提前在上室中平铺1mg/ml的基质胶,其他实验步骤同上。

1.2.6 Western blot检测MMP-2和MMP-9蛋白表达 消化收集各组细胞,使用RIPA缓冲液冰上充分裂解30min,然后以12000r/min离心15min,收集上清液,再使用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白质含量。取25μg蛋白经沸水浴变性后,采用SDS-PAGE分离蛋白,再将蛋白转移到硝酸纤维素(PVDF)膜上,经5%脱脂奶室温封闭2h,加入MMP-2、MMP-9和GAPDH一抗在4℃下孵育过夜。去除抗体,经TBST洗涤3次(5min/次),将膜与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗在室温下孵育1h,经TBST洗涤3次后,滴加ECL显影液显色。目的蛋白相对表达量以目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值表示。

1.2.7 荧光素酶报告基因验证miR-218-5p生物信息学在线软件ENCORI预测CASC2与miR-218-5p靶向结合位点。设计并合成含miR-218-5p结合位点的CASC2野生型(Wt)和突变型(Mut)片段,并将其插入双荧光素酶报告基因载体,获得含有CASC2 Wt-3'-UTR和Mut-3'-UTR重组质粒。使用Lipofectamine 2000将miR-218-5p mimic及其阴性对照(mimic NC)与CASC2 Wt-3'-UTR或Mut-3'-UTR共转染至293T细胞中,48h后收集细胞,按照双荧

光素酶报告基因检测试剂盒说明书分别检测海肾萤光素酶活性 (renilla luciferase, RLU) 和萤火虫萤光素酶活性, 相对荧光素酶活性 = 萤火虫萤光素酶活性/海肾萤光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 所有实验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间采用 Student's *t* 检验进行统计学分析, 多组分析采用单因素方差分析进行检测。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 患者滑膜组织中 CASC2 和 miR-218-5p 表达水平 qRT-PCR 检测结果显示, 在 RA 患者滑膜组织中 CASC2 的表达水平低于健康对照者, 而 miR-218-5p 表达水平则高于健康对照者, 差异性均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

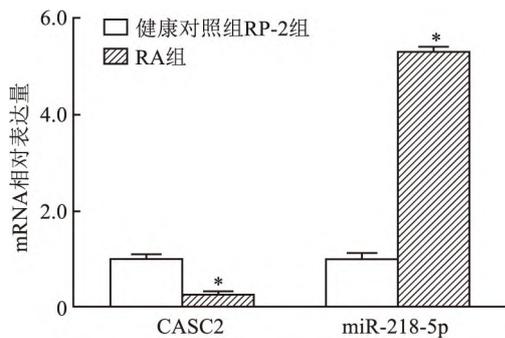


图1 CASC2 和 miR-218-5p 在 RA 患者滑膜组织中表达与健康对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 CASC2 是 miR-218-5p 靶基因 生物信息学在线软件 ENCORI 预测显示 CASC2 与 miR-218-5p 间存在靶向结合位点 (图 2A)。实验结果显示, 与 miR-NC 组比较, miR-218-5p mimic 可以降低 CASC2-Wt 荧光素酶活性 ($P < 0.05$), 而对 CASC2-Mut 荧光素酶活性无影响 (图 2B)。qRT-PCR 实验数据 (图 3) 显示, 与 blank 组比较, CASC2 组细胞中 CASC2 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 miR-218-5p 表达水平降低 ($P < 0.05$)。

2.3 CASC2 过表达对 MH7A 细胞增殖的影响

qRT-PCR 检测结果显示, Vector、CASC2、CASC2 + mimic-NC、CASC2 + miR-218-5p mimic 组细胞中 miR-218-5p 相对表达量分别为 (1.01 ± 0.07)、(0.16 ± 0.13)、(0.17 ± 0.11) 和 (0.77 ± 0.08), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Vector 组比较, CASC2 组细胞中 miR-218-5p 表达水平降低 ($P <$

0.05); 与 CASC2 组比较, CASC2 + miR-218-5p mimic 组细胞中 miR-218-5p 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 CASC2 + mimic-NC 组差异无统计学意义。CCK-8 结果 (如表 2) 显示, 在 24、48、72 h 时间点, 与 Vector 组比较, CASC2 组细胞增值率降低 ($P < 0.05$); 与 CASC2 组比较, CASC2 + miR-218-5p mimic 组细胞增值率升高 ($P < 0.05$), 而 CASC2 + mimic-NC 组差异无统计学意义。

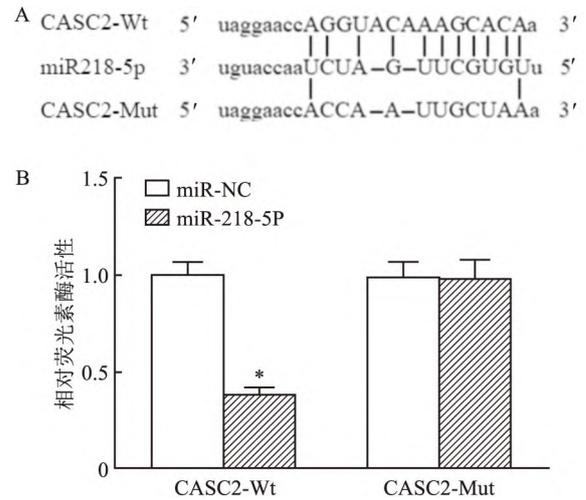


图2 CASC2 与 miR-218-5p 在 MH7A 细胞系中的调控关系

A: CASC2 序列中含有与 miR-218-5p 互补的核苷酸序列; B: 双荧光素酶报告基因实验; 与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$

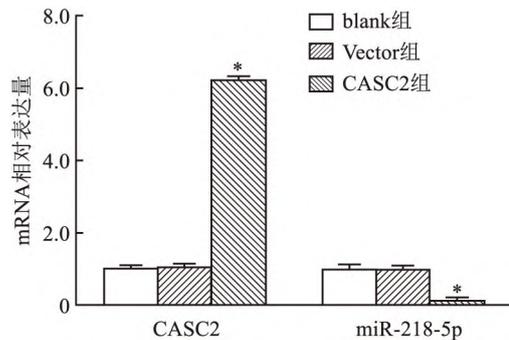


图3 各组细胞中 CASC2 和 miR-218-5p 表达水平与 blank 组或 Vector 组比较: * $P < 0.05$

表2 CASC2 过表达对 MH7A 细胞增殖影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
Vector	0.77 ± 0.06	1.12 ± 0.03	1.42 ± 0.03
CASC2	0.41 ± 0.02 *	0.71 ± 0.05 *	0.92 ± 0.05 *
CASC2 + mimic-NC	0.43 ± 0.04	0.71 ± 0.08	0.93 ± 0.09
CASC2 + miR-218-5p mimic	0.70 ± 0.03 #	1.00 ± 0.04 #	1.25 ± 0.03 #
F 值	60.081	42.211	55.142

与 Vector 组比较: * $P < 0.05$; 与 CASC2 组或 CASC2 + mimic-NC 组比较: # $P < 0.05$

2.4 CASC2 过表达对 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响 ELISA 结果(表 3)显示,与 Vector 组比较,CASC2 组炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平降低 ($P < 0.05$);与 CASC2 组比较,CASC2 + miR-218-5p mimic 组炎症因子水平 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 升高 ($P < 0.05$),而 CASC2 + mimic-NC 组差异无统计学意义。

表 3 CASC2 过表达对 MH7A 炎症反应的影响 ($n = 3, \text{pg/ml}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Vector	25.41 \pm 3.12	10.87 \pm 3.22	50.43 \pm 2.27
CASC2	15.43 \pm 4.11 *	5.25 \pm 2.19 *	30.58 \pm 5.88 *
CASC2 + mimic-NC	14.58 \pm 2.25	5.17 \pm 3.58	31.57 \pm 4.59
CASC2 + miR-218-5p mimic	20.58 \pm 5.78 #	9.15 \pm 1.83 #	45.11 \pm 2.17 #
F 值	4.653	3.125	17.939

与 Vector 组比较: * $P < 0.05$;与 CASC2 组或 CASC2 + mimic-NC 组比较: # $P < 0.05$

2.5 CASC2 过表达对 MH7A 细胞迁移和侵袭的影响 如图 4 所示,与 Vector 组比较,CASC2 组细胞迁移与侵袭数量明显减少 ($P < 0.05$);与 CASC2 组比较,CASC2 + miR-218-5p mimic 组细胞迁移与侵袭数量明显增加 ($P < 0.05$),而 CASC2 + mimic-NC 组差异无统计学意义。

2.6 CASC2 过表达对 MH7A 细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平的影响 如图 5 所示,与 Vector 组比较,CASC2 组细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$);与 CASC2 组比较,CASC2 + miR-218-5p mimic 组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显增加 ($P < 0.05$),而 CASC2 + mimic-NC 组差异无统计学意义。

3 讨论

RA 是一种侵袭性、慢性自身免疫性疾病。RA 滑膜成纤维细胞的异常激活是 RA 发生和发展的关键因素,并且 RA 滑膜成纤维细胞在一定炎症环境下会表现出类似肿瘤细胞的特性^[7]。RA 滑膜成纤维细胞能分泌许多炎症因子、促血管生成的细胞因子和生长因子,促进炎症发生和血管增生^[8],最终导致关节损坏。因此,探究 RA 发生的分子机制,寻找可行的分子靶点对 RA 的治疗非常重要。

已有研究^[9]证实:lncRNA 可作为 RA 的生物学标志物,参与 RA 滑膜成纤维细胞增殖、炎症反应、迁移和侵袭等过程。CASC2 在多种肿瘤发生发展的过程中扮演着抑癌基因的角色,例如 Li et al^[10]研究发现促进 CASC2 表达可以抑制胃癌细胞的增殖、

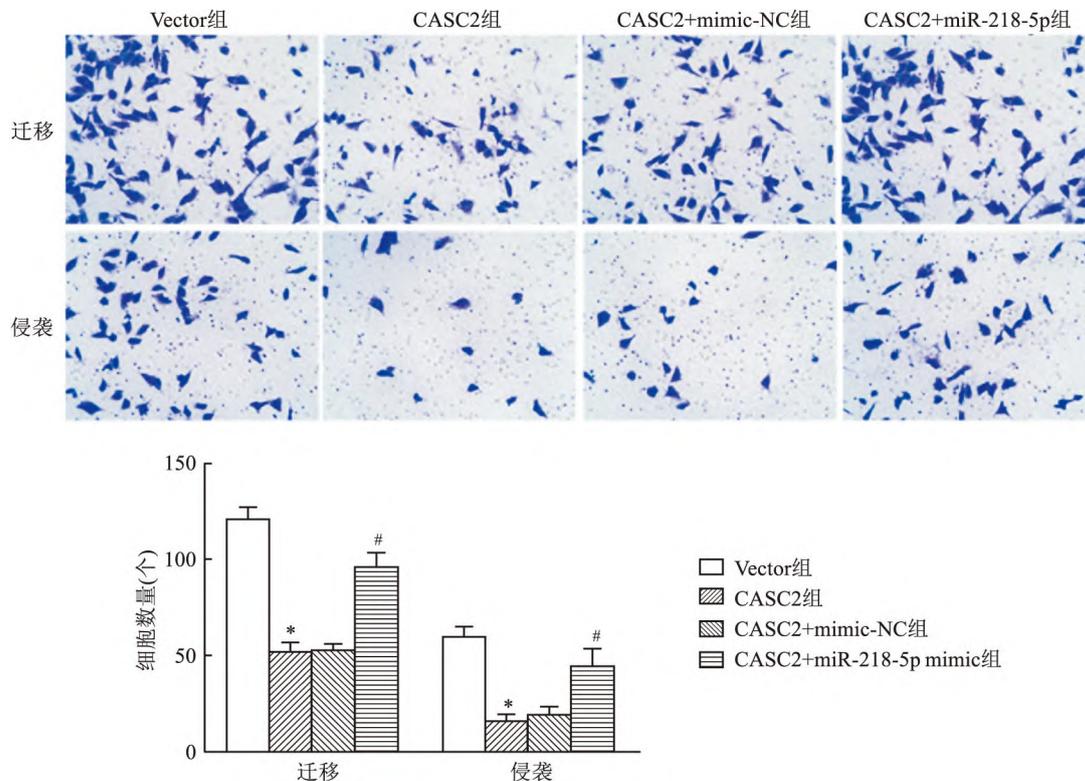


图 4 CASC2 过表达对 MH7A 细胞迁移与侵袭的影响 $\times 200$

与 Vector 组比较: * $P < 0.05$;与 CASC2 组或 CASC2 + mimic-NC 组比较: # $P < 0.05$

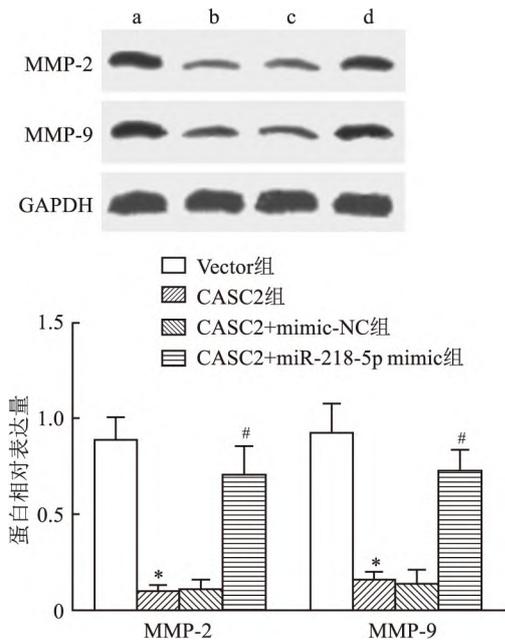


图5 CASC2过表达对MH7A细胞MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响

a: Vector组; b: CASC2组; c: CASC2 + mimic-NC组; d: CASC2 + miR-218-5p mimic组; 与Vector组比较: * $P < 0.05$; 与CASC2组或CASC2 + mimic-NC组比较: # $P < 0.05$

迁移和侵袭。刘露等^[11]研究报道CASC2在神经胶质瘤细胞中过表达后可以抑制肿瘤发展。而关于CASC2在RA中的功能和作用机制的报道有限,并且其在滑膜组织中的表达情况尚未可知。Liu et al^[7]研究显示CASC2在RA患者血浆中表达下调,且过表达CASC2可促进人RA滑膜成纤维细胞凋亡,其机制可能与下调IL-17水平相关。Sun et al^[12]研究称,CASC2在OA患者软骨细胞中表达下调,其过表达可促进LPS暴露下软骨细胞的凋亡。由此可见,CASC2可能是治疗RA的潜在靶点。本研究显示RA患者滑膜组织中CASC2的低表达。实验结果显示,过表达CASC2可以抑制MH7A细胞的增殖能力,降低炎症因子水平,减弱细胞迁移及侵袭能力,下调MMP-2和MMP-9蛋白表达水平,可见CASC2可以作为治疗RA的潜在靶标。

miR-218-5p在多种肿瘤中发挥着抑癌的作用,例如Yang et al^[13]研究表明,miR-218-5p通过靶向SHMT1抑制肺腺癌的进展。也有研究^[14]发现miR-218-5p会导致癌症症状加剧,miR-218-5p在肺鳞状细胞癌组织和细胞中低表达,使肌动蛋白、胞外基质蛋白表达量增加,促进癌细胞的迁移与侵袭。目前,关于miR-218-5p在RA中作用机制的报道不多,Chen et al^[15]研究发现miR-218-5p在RA患者关节

滑膜组织高表达,沉默其表达可抑制RA滑膜成纤维细胞的增殖。本研究显示在RA患者滑膜组织中miR-218-5p高表达,降低其表达可以抑制RA滑膜成纤维细胞MH7A的增殖活性,降低炎症因子水平,减弱细胞迁移及侵袭能力,下调MMP-2和MMP-9蛋白表达水平。除此之外,本研究通过双荧光素酶报告证实CASC2与miR-218-5p之间存在靶向调控关系,miR-218-5p过表达可逆转CASC2过表达对RA滑膜成纤维细胞MH7A的增殖、炎症反应、迁移与侵袭的抑制作用。这一研究结果表明,CASC2靶向miR-218-5p影响细胞MH7A的增殖、炎症反应、迁移与侵袭。

综上所述,CASC2在RA患者滑膜组织中低表达,促进其表达可抑制RA滑膜成纤维细胞炎症反应及迁移与侵袭能力,其作用机制可能与靶向负调节miR-218-5p表达相关。这些发现可以为RA的靶向治疗提供参考靶点。

参考文献

- [1] Li G, Ying L, Meng F, et al. Tanshinone IIA promotes the apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by up-regulating lncRNA GAS5 [J]. Biosci Rep, 2018, 38(5): BSR20180626.
- [2] 和雅,王燕,卢华清,等. 微RNA-124a靶向AKT2基因调控类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖迁移和侵袭的作用机制研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2019(11): 724-30.
- [3] 刘健,万磊,孙玥,等. 类风湿关节炎患者外周血单核细胞lncRNA差异表达谱研究[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(2): 10-5.
- [4] 贾超,李树岗,范秋玉,等. lncRNA Gm15621通过调控miR-133a/SOCS2轴抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞炎症[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(3): 263-9.
- [5] Liu C, Guo X, Bai S, et al. lncRNA CASC2 downregulation participates in rheumatoid arthritis, and CASC2 overexpression promotes the apoptosis of fibroblast like synoviocytes by downregulating IL-17[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(5): 2131-7.
- [6] Liao H, Zhang Z, Liu Z, et al. Inhibited microRNA-218-5p attenuates synovial inflammation and cartilage injury in rats with knee osteoarthritis by promoting sclerostin[J]. Life Sci, 2021, 267: 118893.
- [7] Liu Y, Pan Y F, Xue Y Q, et al. uPAR promotes tumor-like biologic behaviors of fibroblast-like synoviocytes through PI3K/Akt signaling pathway in patients with rheumatoid arthritis [J]. Cell Mol Immunol, 2018, 15(2): 171-81.
- [8] 章敏,高梅,陈镜宇,等. 类风湿性关节炎血管增生的机制研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(4): 649-52.
- [9] 任舒婷,彭辉勇,王胜军. 长链非编码RNA(lncRNA)与类风湿性关节炎关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(3): 278-81.

- [10] Li P, Xue W J, Feng Y, et al. Long non-coding RNA CASC2 suppresses the proliferation of gastric cancer cells by regulating the MAPK signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(8): 3522-9.
- [11] 刘露, 杨福兵, 朱明建, 等. LncRNA CASC2 靶向 miR-634 表达抑制神经胶质瘤细胞的生物学行为[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(16): 1976-80, 1986.
- [12] Sun Y, Kang S, Pei S, et al. MiR93-5p inhibits chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by targeting lncRNA CASC2 [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21(1): 26.
- [13] Yang Q, Li J, Hu Y, et al. MiR-218-5p suppresses the killing effect of natural killer cell to lung adenocarcinoma by targeting SHMT1 [J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(6): 500-8.
- [14] Kumamoto T, Seki N, Mataka H, et al. Regulation of TPD52 by antitumor microRNA-218 suppresses cancer cell migration and invasion in lung squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5): 1870-80.
- [15] Chen M, Li M, Zhang N, et al. Mechanism of miR-218-5p in autophagy, apoptosis and oxidative stress in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts is mediated by KLF9 and JAK/STAT3 pathways [J]. *J Investig Med*, 2021, 69(4): 824-32.

Effects of lncRNA CASC2 on the inflammation, migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblasts by regulating the expression of miR-218-5p

Li Mei¹, Jiang Jinmei¹, Ou Daming¹, Huang Lifang¹, Xie Lihu¹, Zhang Ji²

(¹Dept of Rheumatology and Immunology, ²Lab of Rheumatology and Immunology

The First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001)

Abstract Objective To investigate the effects effect of lncRNA CASC2 on inflammation, migration and invasion of rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblasts by regulating the expression of miR-218-5p and its mechanism.

Methods 45 cases of RA synovial tissue and 18 cases of normal synovial tissue were collected, and qRT-PCR was used to detect the expression of CASC2 and miR-218-5p in the synovial tissue. ENCORI prediction and dual luciferase reporting experiments analyzed the targeting between CASC2 and miR-218-5p. RA synovial fibroblast MH7A were transfected with pcDNA3.1-CASC2 and miR-218-5p mimic, the expression of CASC2 and miR-218-5p was detected by qRT-PCR; CCK-8 was used to detect cell proliferation; ELISA was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in the supernatant of cells; Transwell was used to detect migration and invasion of cells; Western blot was used to detect expression of matrix metalloenzymes MMP-2 and MMP-9. **Results** Compared with normal synovial tissue, RA synovial tissue showed significantly down-regulated expressions of CASC2 ($P < 0.05$) and up-regulated expressions of miR-1236-3p ($P < 0.05$). The dual luciferase reporter showed that CASC2 was target genes of miR-218-5p. Overexpression of CASC2 significantly suppressed cell proliferation, reduced the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the supernatant and migration and invasion, lowered the levels of miR-218-5p and protein expression of MMP-2 and MMP-9 in RA synovial fibroblast MH7A. However, transfecting miR-218-5p mimic could reverse the situation. **Conclusion** RA synovial tissue showed significantly down-regulated expressions of CASC2, overexpression of CASC2 suppressed inflammation, migration and invasion of RA fibroblasts by regulating the expression of miR-218-5p.

Key words rheumatoid arthritis; synovial fibroblasts; lncRNA CASC2; miR-218-5p; inflammation; migration and invasion