

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.04.001
文章编号: 1005-8982 (2021) 04-0001-08

关节疾病专题·论著

MicroRNA-335-5p对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞的影响*

姜炜¹, 沈晔¹, 龙小琴²

(湖州市第三人民医院 1. 检验科, 2. 风湿免疫科, 浙江 湖州 313000)

摘要: 目的 探讨microRNA-335-5p(miR-335-5p)对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞(RASFs)增殖、侵袭和凋亡的影响。**方法** 选取2018年3月—2019年3月湖州市第三人民医院收治的50例类风湿性关节炎(RA)患者和50例接受关节置换手术的关节外伤患者的滑膜组织标本,并分离培养RASFs。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测滑膜组织和RASFs中miR-335-5p和DKK1的表达,荧光素酶报告基因检测评估miR-335-5p对DKK1荧光素酶活性的影响。将miR-335-5p模拟物、si-DKK1和pcDNA-DKK1转染RASFs,分别通过ELISA比色法、Transwell法和流式细胞术检测细胞增殖、侵袭和凋亡情况。**结果** 与正常组织和RASFs相比,miR-335-5p在RA组织和RASFs中下调($P < 0.05$),而DKK1在RA组织和RASFs中上调($P < 0.05$)。荧光素酶报告基因检测显示,miR-335-5p可特异性结合DKK1的3'UTR,抑制其荧光素酶活性($P < 0.05$)。此外,miR-335-5p可降低DKK1的表达($P < 0.05$)。过表达miR-335-5p或敲除DKK1可抑制RASFs的增殖和侵袭,诱导RASFs凋亡($P < 0.05$)。而过表达DKK1可逆转miR-335-5p对RASFs的影响($P < 0.05$)。**结论** miR-335-5p可通过直接靶向DKK1的表达,抑制RASFs的增殖和侵袭,诱导其凋亡。

关键词: 关节炎, 类风湿; microRNA-335-5p/microRNAs; 滑膜; 成纤维细胞; DKK1

中图分类号: R684.3;R593.22

文献标识码: A

The effects of microRNA-335-5p on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*

Wei Jiang¹, Ye Shen¹, Xiao-qin Long²

(1. Department of Laboratory Medicine, The Third People's Hospital of Huzhou, Huzhou, Zhejiang 313000;

2. Department of Rheumatology and Immunology, The Third People's Hospital of Huzhou, Huzhou, Zhejiang 313000)

Abstract: Objective To analyze the effects of microRNA-335-5p (miR-335-5p) on the proliferation, invasion and apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASFs). **Methods** Synovial tissue samples were collected from 50 patients with rheumatoid arthritis (RA) and 50 patients with joint trauma who underwent joint replacement surgery from March 2018 to March 2019, and the synovial fibroblasts were isolated and cultured. The expressions of miR-335-5p and Dickkopf-1 (DKK1) in synovial tissue and cells were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Luciferase reporter assay was used to evaluate the effect of miR-335-5p on luciferase activity of DKK1. RASFs were transfected with miR-335-5p mimics, si-DKK1 and pcDNA-DKK1, and cell proliferation, invasion and apoptosis were detected by BrdU assay, transwell assay and flow cytometry, respectively. **Results** Compared with the control tissues and cells, miR-335-5p was significantly down-regulated in RA tissues and RASFs ($P < 0.05$), while DKK1 was significantly up-regulated in RA tissues and RASFs

收稿日期: 2020-08-17

* 基金项目: 湖州市科技局公益性项目 (No: 2019GYB25)

($P < 0.05$). Dual-luciferase reporter assay showed that miR-335-5p could specifically bind to the 3'- untranslated regions (3'-UTR) of DKK1 gene and significantly inhibit the luciferase activity ($P < 0.05$). In addition, miR-335-5p significantly reduced DKK1 expression ($P < 0.05$), and overexpression of miR-335-5p or DKK1 knockout suppressed the proliferation and invasion of RASFs and induced RASFs apoptosis ($P < 0.05$). Furthermore, overexpression of DKK1 reversed the effects of miR-335-5p on RASFs ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-335-5p can directly target the expression of DKK1 to inhibit the proliferation and invasion of RASFs and to induce RASFs apoptosis.

Keywords: rheumatoid arthritis; miR-335-5p; rheumatoid arthritis synovial fibroblasts; DKK1

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的炎症性疾病, 影响全球超过1%的人口, 主要表现为炎症、滑膜炎、关节软骨及骨损伤, 若不及时治疗, 40%~70%患者最终会发展为残疾^[1-2]。病程较长的患者除累及关节外, 还可并发肺间质性疾病、心血管疾病等^[3-4], 这将大大增加患者的疾病负担和社会负担, 因此应尽早诊断和充分治疗^[5]。近年来, microRNAs (miRNAs) 在 RA 发病机制中发挥重要作用的报道越来越多^[6-7]。miRNA 与靶向 mRNA 的 3'-非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 结合, 通过负调控基因表达, 导致 mRNA 降解或相应蛋白下调。XU 等^[8]报道 miR-650 可以通过靶向 Akt2, 抑制类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞 (rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, RASFs) 的增殖、迁移和侵袭。最近一项研究结果表明, miR-126 通过 PI3K-Akt 信号通路, 影响 RASFs 增殖和凋亡^[7]。DKK1 是一种 Wnt 信号通路抑制剂, 被认为是关节重塑的主要调节因子^[8]。据报道, RA 患者病情严重程度与血清 DKK1 水平呈正相关^[9]。RA 患者血清 DKK1 水平较高, 进一步破坏关节, 提示 DKK1 在 RA 发病机制中具有重要作用^[10]。本研究通过分析 miR-335-5p 在 RA 发病机制中的作用, 探讨其与 DKK1 的作用机制, 为 RA 的治疗提供新的策略。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选取 2018 年 3 月—2019 年 3 月在湖州市第三人民医院实施关节手术的 50 例 RA 患者的滑膜组织标本 (RA 组)。其中, 男性 32 例, 女性 18 例; 年龄 35~68 岁, 平均 (50.3 ± 7.5) 岁。所有患者符合美国风湿病学会疾病分类标准^[11]。选取同期本院行关节置换手术的非 RA 患者 50 例, 取其滑膜组织标本 (对照组)。其中, 男性 26 例, 女性 24 例; 年龄 33~65 岁,

平均 (48.5 ± 6.4) 岁。排除标准: 严重高血压、糖尿病等基础疾病; 传染病和癌症; 严重心、肝、肾损伤等系统性疾病; 合并感染、免疫类疾病。本研究经医院伦理委员会批准, 符合《赫尔辛基宣言》的指导方针和原则。所有参与者签署书面知情同意书。

1.2 细胞系和细胞培养

采集的滑膜组织在 37℃ 条件下, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 2 h。将消化后的滑膜组织离心得到 RASFs。RASFs 置于改良后的 DMEM 培养基中, 辅以 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。转染前 24 h, 将融合度为 75% 的细胞接种于 6 孔板中培养。

1.3 主要试剂及仪器

1.3.1 主要试剂 改良后的 DMEM 培养基、Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂盒和 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 10% 胎牛血清 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Cell Proliferation ELISA, BrdU 试剂盒 (美国 Roche Applied Science), microRNA 检测试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司), Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (北京宝赛生物技术有限公司), 基质凝胶 (美国 BD Biosciences 公司), RIPA 裂解缓冲液和 BCA 蛋白分析试剂盒 (江苏碧云天生物技术研究所), 蛋白酶抑制剂 (上海罗氏制药有限公司), 荧光素酶检测试剂盒 (美国 Promega 公司), miR-335-5p 模拟物 (miR-335-5p)、miR-335-5p 阴性对照 (miR-NC)、DKK1 siRNA (si-DKK1, 5'-TGATAGCCCTGTACAATGCTGCT-3')、siRNA 阴性对照 (si-NC)、miR-335-5p 模拟物和 pcDNA 载体 (miR-335-5p+pcDNA)、miR-335-5p 模拟物和 pcDNA-DKK1 (miR-335-5p+pcDNA-DKK1) 均购自上海基因制药有限公司。

1.3.2 主要仪器 RNA 逆转录系统 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), ABI PRISM 7500 序列检测系

统(美国ABI公司),流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),Fusion FX5图像分析系统(法国Vilber公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞转染 将DKK1 cDNA插入pcDNA3.1载体生成DKK1过表达质粒。参照Lipofectamine RNAiMAX转染试剂盒说明书进行操作,根据细胞转染情况将细胞分为miR-335-5p组(将miR-335-5p模拟物转染到RASFs细胞系中)、miR-NC组(将miR-335-5p阴性对照转染到RASFs细胞系中)、si-DKK1组(将DKK1 siRNA转染到RASFs细胞系中)、si-NC组(将siRNA阴性对照转染到RASFs细胞系中)、miR-335-5p+pcDNA组(将miR-335-5p模拟物和pcDNA载体转染到RASFs细胞系中)、miR-335-5p+pcDNA-DKK1组(将miR-335-5p和DKK1过表达质粒转染到RASFs细胞系中)。具体步骤如下:①转染前1天,将RASFs细胞按 1×10^6 个/孔的密度接种于6孔板;②转染当天将Lipofectamine RNAiMAX转染试剂与opti-MEM培养液及合成的miR-335-5p模拟物、miR-NC或si-DKK1均匀混合,室温孵育5~10 min后加入细胞培养液中;③转染48 h后,胰酶消化细胞,PBS冲洗1次,保存备用。

1.4.2 ELISA 比色法 采用ELISA比色法检测miR-335-5p模拟物和si-DKK1对RASFs细胞增殖的影响。按照Cell Proliferation ELISA, BrdU试剂盒说明书进行操作,检测细胞增殖情况。将RASFs细胞按 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,在完全培养基中生长过夜。去除培养基,在37℃条件下用miR-335-5p模拟物或si-DKK1转染细胞48 h,再用BrdU标记液处理16 h。随后去除培养基,固定细胞,变性。细胞在抗BrdU-POD溶液中孵育90 min,洗涤3次去除抗体偶联物。TMB底物孵育15 min后,在405 nm和490 nm的吸光度下测定免疫复合物的OD值。

1.4.3 RNA提取和实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 参照Trizol试剂盒说明书进行操作,从细胞系和临床样本中提取总RNA。采用260 nm和280 nm的紫外吸收光谱(A260/280)检测RNA。使用逆转录系统将RNA逆向转录为cDNA。采用ABI PRISM 7500序列检测系统和microRNA检测试剂盒检测miR-335-5p水平。扩增体系:2 μ l cDNA、0.4 μ l正

向引物、0.4 μ l反向引物、7.2 μ l H₂O₂和10 μ l SYBR。扩增条件:25℃、10 min,48℃、30 min,95℃、5 min,U6作为实验内参。采用SYBR® Green荧光染色检测DKK1 mRNA相对表达量,GAPDH作为实验内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	引物序列	长度/bp
miR-335-5p	F: 5'-UGUUUUGAGCGGGGUCAAGAGC-3'	23
	R: 5'-CUCUCAUUUGCUAUUAUCA-3'	19
DKK1	F: 5'-CCTTGAAGCTCGGTTCTCAATTCC-3'	23
	R: 5'-CAATGGTCTGCTACTTATTCCCG-3'	23
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17
	R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'	20
GAPDH	F: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCTATTG-3'	24
	R: 5'-CCTGGAAGATGGTATGGGATT-3'	22

1.4.4 流式细胞术 使用Annexin V-FITC/PI试剂盒检测细胞凋亡情况。将RASFs细胞按 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,PBS洗涤2次,重悬于缓冲液中。取 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 个重悬的细胞,200 r/min离心5 min,弃上清液,加入195 μ l Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。采用流式细胞仪进行测量,以区分凋亡细胞(Annexin V阳性和PI阴性)和坏死细胞(Annexin V阳性和PI阳性)。

1.4.5 Transwell法 采用预先涂有包含细胞外基质蛋白的基质凝胶Transwell室(孔径8 mm)进行Transwell基质凝胶侵袭实验,以确定细胞的侵袭性。常规胰蛋白酶消化细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml。取200 μ l细胞悬液加入Transwell上室,并将600 μ l含10%胎牛血清的DMEM培养基加入下室。在37℃、5% CO₂环境下孵育6 h。取出小室,PBS洗涤2次,用棉签将上室细胞擦去,将穿透的细胞固定在甲醇中,0.1%结晶紫染色,30%冰醋酸漂洗细胞膜,最后在540 nm处检测洗涤液,计算细胞数量。所有实验重复3次。

1.4.6 Western blotting 将RASFs细胞用冷的PBS洗涤2次,然后用RIPA裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂提取总蛋白。采用BCA蛋白分析试剂盒对蛋白进行定量分析。取50 μ g总蛋白上样,经10% SDS-PAGE分离并转移到PVDF膜上,在37℃条件

下用5%脱脂乳封闭1 h,加入一抗DKK1(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)在4℃条件下孵育过夜,TBS洗涤PVDF膜3次,10 min/次。加入羊抗兔二抗(1:1 000)室温孵育2 h,TBS洗涤3次,10 min/次。采用Fusion FX5图像系统进行分析。

1.4.7 荧光素酶报告基因检测 将RASFs细胞接种于24孔板中,转染前孵育24 h,待细胞融合达60%时,将miR-335-5p模拟物和miR-NC分别与DDK1 3'-UTR野生型或突变型重组质粒共转染。转染48 h后,参照荧光素酶检测试剂盒说明书进行操作,采用*Renilla luciferase*报告基因检测荧光素酶活性。所有实验重复3次。

1.5 统计学方法

数据分析采用SPSS 21.0和GraphPad Prism 7.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DKK1 mRNA在滑膜组织和RASFs中的表达

qRT-PCR反应结果显示,RA组、对照组患者滑膜组织中DKK1 mRNA相对表达量分别为(4.82 ± 0.30)和(1.21 ± 0.11),经*t*检验,差异有统计学意义($t=61.881, P=0.000$),RA组高于对照组。此外,在RASFs细胞系中,RA组、对照组患者DKK1

mRNA相对表达量分别为(6.51 ± 0.42)和(1.50 ± 0.13),经*t*检验,差异有统计学意义($t=62.414, P=0.000$),RA组高于对照组。

2.2 敲除DKK1对RASFs细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

qRT-PCR和Western blotting检测结果表明,si-DKK1组、si-NC组DKK1 mRNA相对表达量分别为(0.37 ± 0.03)和(1.12 ± 0.15),经*t*检验,差异有统计学意义($t=25.263, P=0.000$),si-DKK1组低于si-NC组。si-DKK1组、si-NC组DKK1蛋白相对表达量分别为(0.41 ± 0.04)和(1.01 ± 0.10),经*t*检验,差异有统计学意义($t=40.281, P=0.000$),si-DKK1组低于si-NC组。

ELISA比色法结果显示,si-DKK1组、si-NC组RASFs细胞增殖能力(OD值)分别为(0.51 ± 0.05)和(1.55 ± 0.16),经*t*检验,差异有统计学意义($t=20.873, P=0.000$),si-DKK1组低于si-NC组。体外侵袭实验结果表明,si-DKK1组、si-NC组RASFs细胞侵袭能力(OD值)分别为(1.01 ± 0.12)和(2.52 ± 0.22),经*t*检验,差异有统计学意义($t=16.474, P=0.000$),si-DKK1组低于si-NC组。

si-DKK1组与si-NC组RASFs细胞促凋亡蛋白(Bax、FAS、BIM、Cleaved Caspase-3)和细胞凋亡率比较,经*t*检验,差异有统计学意义($P < 0.05$),si-DKK1组高于si-NC组。见表2和图1、2。

表2 两组RASFs促凋亡蛋白和细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	FAS	BIM	Cleaved Caspase-3	细胞凋亡率/%
si-DKK1组	1.12 ± 0.11	1.03 ± 0.10	1.15 ± 0.20	1.11 ± 0.13	30.24 ± 0.31
si-NC组	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.32 ± 0.03	10.25 ± 0.16
<i>t</i> 值	15.297	13.910	8.113	13.240	128.130
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 DKK1是miR-335-5p的直接作用靶基因

qRT-PCR反应结果显示,RA组、对照组患者滑膜组织中miR-335-5p相对表达量分别为(0.50 ± 0.05)和(1.00 ± 0.10),经*t*检验,差异有统计学意义($t=27.970, P=0.000$),RA组低于对照组。RA组、对照组患者RASFs中miR-335-5p相对表达量分别为(0.25 ± 0.03)和(1.01 ± 0.11),经*t*检验,差异有统计学意义($t=40.281, P=0.000$),RA组低于对照组。

生物信息学预测显示,DKK1基因的3'-UTR包含了一个miR-335-5p靶序列(见图3)。在RASFs细胞系中,miR-335-5p组与miR-NC组荧光素酶活性比较,经*t*检验,差异有统计学意义($P < 0.05$),miR-335-5p组低于miR-NC组(见表3)。

qRT-PCR和Western blotting检测结果表明,miR-335-5p组与miR-NC组DKK1 mRNA和蛋白相对表达量比较,经*t*检验,差异有统计学意义($P < 0.05$),miR-335-5p组低于miR-NC组。见表3和图4。

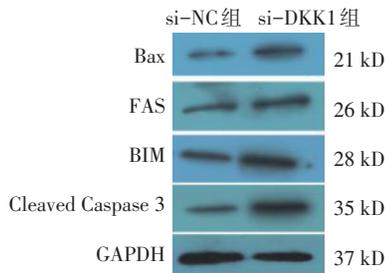


图1 促凋亡蛋白在RASFs中的表达

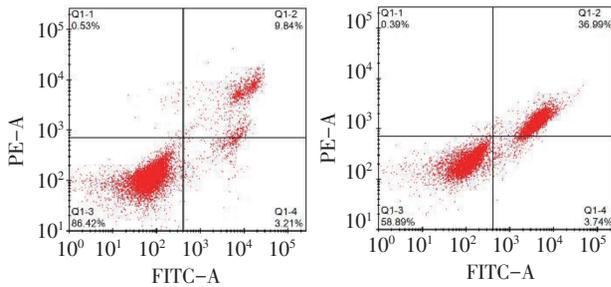


图2 敲除DKK1对RASFs凋亡的影响



图3 3'-UTR的miR-335-5p靶序列

表3 两组RASFs荧光素酶活性和DKK1相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光素酶活性	DKK1 mRNA	DKK1 蛋白
miR-335-5p组	0.41 ± 0.05	0.42 ± 0.05	0.51 ± 0.05
miR-NC组	0.94 ± 0.10	1.02 ± 0.11	1.12 ± 0.13
<i>t</i> 值	25.965	27.198	23.988
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

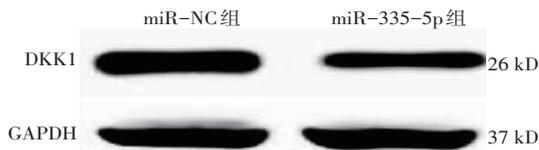


图4 两组RASFs的DKK1表达

2.4 过表达miR-335-5p对RASFs增殖、侵袭和凋亡的影响

在RASFs中, miR-335-5p组与miR-NC组miR-335-5p相对表达量比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p组高于miR-NC组。ELISA比色法结果显示, miR-335-5p组与miR-NC组RASFs增殖能力比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p组低于miR-NC组。Transwell法结果表明, miR-335-5p组与miR-NC组

RASFs细胞侵袭能力比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p组低于miR-NC组。miR-335-5p组与miR-NC组RASFs凋亡率比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p组高于miR-NC组。见表4和图5。

表4 两组RASFs细胞miR-335-5p及细胞增殖、侵袭和凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-335-5p	增殖能力	侵袭能力	细胞凋亡率/%
miR-335-5p组	12.15 ± 1.15	0.53 ± 0.04	1.01 ± 0.10	31.02 ± 2.15
miR-NC组	1.00 ± 0.10	1.80 ± 0.20	2.52 ± 0.12	10.11 ± 1.12
<i>t</i> 值	62.675	34.105	27.198	23.988
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

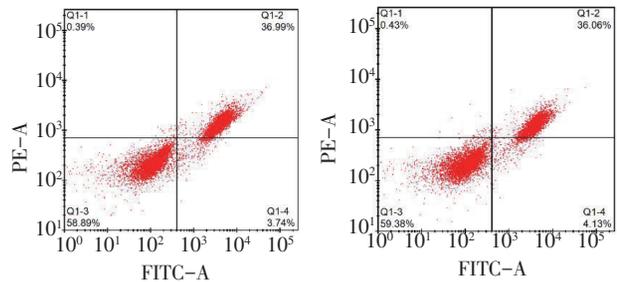


图5 过表达miR-335-5p对RASFs凋亡的影响

2.5 上调DKK1减弱miR-335-5p过表达对RASFs的影响

为证实miR-335-5p是否通过直接下调DKK1影响RASFs,将miR-335-5p模拟物和pcDNA-DKK1共转染RASFs。miR-335-5p+pcDNA组与miR-335-5p+pcDNA-DKK1组DKK1 mRNA和蛋白相对表达量比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p+pcDNA组较低(见表5和图6)。ELISA比色法结果显示, miR-335-5p+pcDNA组与miR-335-5p+pcDNA-DKK1组RASFs增殖能力比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p+pcDNA组增殖能力较低。Transwell法结果表明, miR-335-5p+pcDNA组与miR-335-5p+pcDNA-DKK1组RASFs细胞侵袭能力比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p+pcDNA组侵袭能力较低。miR-335-5p+pcDNA组与miR-335-5p+pcDNA-DKK1组细胞凋亡率比较,经*t*检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-335-5p+pcDNA组细胞凋亡率较高(见表5和图7)。

表 5 两组 RASFs 的 DKK1 及细胞增殖、侵袭和凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	DKK1 mRNA	DKK1 蛋白	增殖能力	侵袭能力	细胞凋亡率/%
miR-335-5p+pcDNA 组	1.00 ± 0.11	0.51 ± 0.05	0.70 ± 0.08	0.91 ± 0.09	30.12 ± 3.05
miR-335-5p+pcDNA-DKK1 组	2.25 ± 0.24	1.12 ± 0.13	1.80 ± 0.10	2.11 ± 0.10	10.03 ± 1.14
t 值	25.933	23.988	47.047	48.854	33.794
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



图 6 两组 RASFs 中的 DKK1 表达

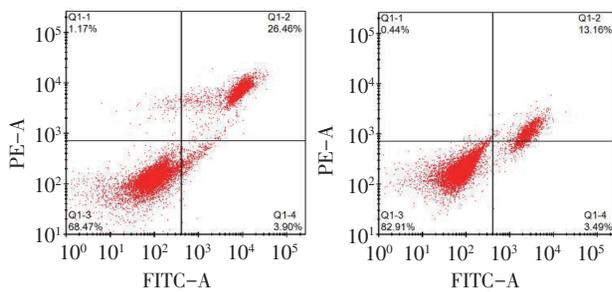


图 7 上调 DKK1 减弱 miR-335-5p 过表达对 RASFs 的影响

3 讨论

RA 是一种病因不明的自身免疫性疾病，其特征在于慢性炎症和免疫细胞的滑膜浸润，目前对其发病机制尚未完全了解。RA 的初始阶段与先天性和适应性免疫系统改变相关，从而产生针对各种分子的自身抗体。RA 发病机制中涉及的关键细胞、介质及机制的研究可以为开发新的、精准治疗疾病的抗风湿药提供依据^[12]。既往研究报道，DKK1 通过促进 RANKL 诱导破骨细胞形成，直接影响成骨细胞分化，间接促进骨破坏^[8]。在 RA 模型中，DKK1 在 RASFs 体外表达，受到糖皮质激素代谢的严格调控，并支持 Wnt 信号抑制其在 RA 骨破坏中的作用^[13]。JUAREZ 等^[14]研究发现，在 RA 早期检测到 DKK1 差异表达，提示 DKK1 表达增加可能是 RA 进展的关键事件，并发生在疾病早期。DKK1 抑制 Wnt 信号可能是早期 RA 患者 RASFs 影响骨破坏的一个途径。本研究发现，DKK1 在 RA 组织和细胞中的表达明显升高。沉默 DKK1 可以抑制

RASFs 的增殖和侵袭，并促进 RASFs 的凋亡。可见，DKK1 在 RA 发病机制中扮演重要作用。

研究表明，miRNAs 在多个生物过程中发挥多功能作用，如细胞增殖、分化、凋亡、迁移、炎症，以及异常先天免疫反应期间的侵袭，使其成为治疗众多自身免疫性疾病的潜在靶点^[15-16]。越来越多的证据表明，miRNAs 与 RA 的发生、发展关系密切^[17]。既往报道表明，RA 患者 RASFs 中 miR-522、miR-338-5p、miR-29a 等的相对表达量发生改变，提示其在 RA 发病机制中起到 RA 激动剂或抑制因子的作用^[18-20]。TSENG 等^[21]采用下一代测序技术分析 RASFs 中转录组与 miRNA 的差异表达谱，鉴定出众多 miRNA 异常表达，其中 miR-335-5p 相对表达量显著降低。因此，miRNA 表达的改变可作为 RA 治疗的潜在标志物。本研究同样发现，RASFs 中 miR-335-5p 相对表达量降低，提示 miR-335-5p 可能与 RA 的发病机制有关。

通常 miRNAs 通过作用不同的靶点介导多个生物学过程，调控其下游 mRNA 靶基因的表达^[22-23]。多项研究表明，miR-335-5p 可靶向多种 mRNA，如 miR-335-5p 通过靶向 ICAM-1 抑制甲状腺癌细胞的侵袭和转移^[24]；miR-335-5p 通过靶向 BCL2L2 提高顺铂对卵巢癌细胞的敏感性^[25]；miR-335-5p 通过下调 LDHB 抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[26]；miR-335-5p 通过靶向 c-jun-N 末端激酶 3 抑制 β-淀粉样蛋白积累，减轻认知障碍^[27]；脓毒症小鼠模型中，miR-335-5p 通过靶向和抑制 FASN 并激活 AMPK/ULK1 信号通路从而减轻炎症反应^[28]。本研究通过生物信息学预测显示，DKK1 3'UTR 包含了一个 miR-335-5p 靶序列。在 RASFs 中，荧光素酶报告基因检测进一步证实 DKK1 是 miR-335-5p 的直接靶点。与对照组相比，转染 miR-335-5p 模

拟物的 RASFs 中 DKK1 mRNA 和蛋白相对表达量降低。过表达 miR-335-5p 可以显著抑制 RASFs 的增殖和侵袭,并促进 RASFs 的凋亡。此外,过表达 DKK1 显著逆转了 miR-335-5p 对 RASFs 的作用。可见,miR-335-5p 通过促进 RASFs 凋亡,在 RA 中发挥保护作用,延缓疾病进展。

综上所述,本研究探讨 miR-335-5p 及其靶基因 *DKK1* 对 RASFs 的影响,并阐明了 RA 可能的病理机制。虽然 miR-335-5p 和 *DKK1* 有望成为 RA 的有效治疗靶点,但是其完整的作用机制仍需进一步研究。

参 考 文 献 :

- [1] CATRINA A I, SVENSSON C I, MALMSTRÖM V, et al. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(2): 79-86.
- [2] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [3] RADNER H, LESPERANCE T, ACCORTT N A, et al. Incidence and prevalence of cardiovascular risk factors among patients with rheumatoid arthritis, psoriasis, or psoriatic arthritis[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2017, 69(10): 1510-1518.
- [4] 朱健伟,李玉娟.血清 microRNA-200c 与类风湿关节炎相关间质性肺疾病的相关性分析[J].*中国现代医学杂志*, 2020, 30(6): 115-119.
- [5] 祝静,晏波,蒋瑶,等.女性类风湿关节炎患者 miR-146a、miR-23b 的表达及雌激素对其的影响[J].*川北医学院学报*, 2020, 35(4): 637-641.
- [6] XU X Y, CHEN H Y, ZHANG Q, et al. miR-650 inhibits proliferation, migration and invasion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by targeting AKT2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 535-541.
- [7] 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.
- [8] DIARRA D, STOLINA M, POLZER K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling[J]. *Nat Med*, 2007, 13(2): 156-163.
- [9] WANG S Y, LIU Y Y, YE H, et al. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2011, 38(5): 821-827.
- [10] de ROOY D P, YEREMENKO N G, WILSON A G, et al. Genetic studies on components of the Wnt signalling pathway and the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(5): 769-775.
- [11] ARNETT F C, EDWORTHY S M, BLOCH D A, et al. The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3): 315-324.
- [12] CALABRESI E, PETRELLI F, BONIFACIO A F, et al. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(2): 175-184.
- [13] HARDY R, JUAREZ M, NAYLOR A, et al. Synovial DKK1 expression is regulated by local glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(5): R226.
- [14] JUAREZ M, MCGETTRICK H M, SCHEEL-TOELLNER D, et al. DKK1 expression by synovial fibroblasts in very early rheumatoid arthritis associates with lymphocyte adhesion in an in vitro flow co-culture system[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18: 14.
- [15] CHEN C H, TANG J H, XU S, et al. miR-30a-5p inhibits proliferation and migration of lung squamous cell carcinoma cells by targeting FOXD1[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020(9): 1-14.
- [16] SHI B X, MA C, LIU G L, et al. miR-106a directly targets LIMK1 to inhibit proliferation and EMT of oral carcinoma cells [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 1-12.
- [17] HUANG Y, SHEN X J, ZOU Q, et al. Biological functions of microRNAs: a review[J]. *J Physiol Biochem*, 2011, 67(1): 129-139.
- [18] WANG X, SI X W, SUN J Y, et al. miR-522 modulated the expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases partly via targeting suppressor of cytokine signaling 3 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(4):405-415.
- [19] SUN Y, SUN X H, LIU Z X, et al. miR-338-5p suppresses rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation and invasion by targeting ADAMTS-9[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(2): 195-202.
- [20] LIU J X, FEI D, XING J, et al. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 173-181.
- [21] TSENG C C, WU L Y, TSAI W C, et al. Differential expression profiles of the transcriptome and mirna interactome in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis revealed by next generation sequencing[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2019, 9(3): 98.
- [22] MEGHA S, BASU U, KAV N N V. Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs[J]. *Plant Cell Environ*, 2018, 41(1): 1-15.
- [23] ALQURASHI N, HASHIMI SM, ALOWAIDI F, et al. miR-496, miR-1185, miR-654, miR-3183 and miR-495 are downregulated

- in colorectal cancer cells and have putative roles in the mTOR pathway[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(2):1657-1668.
- [24] LUO L, XIA L, ZHA B S, et al. miR-335-5p targeting ICAM-1 inhibits invasion and metastasis of thyroid cancer cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 983-990.
- [25] LIU R N, GUO H L, LU S F. miR-335-5p restores cisplatin sensitivity in ovarian cancer cells through targeting BCL2L2[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(9): 4598-4609.
- [26] ZHANG D, YANG N. miR-335-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer through downregulating LDHB[J]. *J BUON*, 2019, 24(3): 1128-1136.
- [27] WANG D, FEI Z F, LUO S, et al. miR-335-5p inhibits β -Amyloid ($A\beta$) accumulation to attenuate cognitive deficits through targeting c-jun-N-terminal kinase 3 in Alzheimer's disease[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2020, 17(1): 93-101.
- [28] GAO X L, LI J Q, DONG Y T, et al. Upregulation of microRNA-335-5p reduces inflammatory responses by inhibiting FASN through the activation of AMPK/ULK1 signaling pathway in a septic mouse model[J]. *Cytokine*, 2018, 110: 466-478.
- (童颖丹 编辑)
- 本文引用格式:** 姜伟, 沈晔, 龙小琴. MicroRNA-335-5p 对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(4): 1-8.
- Cite this article as:** JIANG W, SHEN Y, LONG X Q. The effects of microRNA-335-5p on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(4): 1-8.