

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.15.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 15-0038-08

实验研究·论著

抑制LINC00667表达对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、迁移、侵袭的影响*

孟庆良¹, 马俊福¹, 高青杰², 崔家康¹

(1.河南省中医院, 河南 郑州 450002; 2.河南中医药大学, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 探究长链非编码RNA(LncRNA) LINC00667对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)增殖、迁移、侵袭的影响及其机制。**方法** 复制类风湿关节炎(RA)模型大鼠, SPF级Wistar大鼠分离踝关节滑膜组织, 用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测RA-FLS中LINC00667和miR-19a-3p的表达。在RA-FLS中分别转染si-NC(si-NC组)、si-LINC00667(si-LINC00667组)、miR-NC(miR-NC组)、miR-19a-3p模拟物(miR-19a-3p组)、si-LINC00667与anti-miR-NC(si-LINC00667+anti-miR-NC组)、si-LINC00667与anti-miR-19a-3p(si-LINC00667+anti-miR-19a-3p组)。CCK-8法检测各组转染后RA-FLS的增殖抑制率。Transwell法检测RA-FLS迁移、侵袭。Western blotting检测E钙黏蛋白(E-cadherin)、N钙黏蛋白(N-cadherin)表达。双萤光素酶报告验证LINC00667和miR-19a-3p的靶向关系。**结果** RA模型组滑膜组织中LINC00667表达量约为正常组的270%, miR-19a-3p表达量约为正常组的36%($P < 0.05$)。转染成功后, si-LINC00667组RA-FLS的增殖抑制率、E-cadherin蛋白相对表达量高于si-NC组($P < 0.05$), si-LINC00667组迁移、侵袭细胞数、N-cadherin蛋白相对表达量低于si-NC组($P < 0.05$)。LINC00667靶向miR-19a-3p, miR-19a-3p组RA-FLS的增殖抑制率、E-cadherin蛋白相对表达量高于miR-NC组($P < 0.05$), miR-19a-3p组迁移、侵袭细胞数、N-cadherin蛋白相对表达量低于miR-NC组($P < 0.05$)。si-LINC00667+anti-miR-19a-3p组RA-FLS的增殖抑制率、E-cadherin蛋白相对表达量低于si-LINC00667+anti-miR-NC组($P < 0.05$), si-LINC00667+anti-miR-19a-3p组迁移、侵袭细胞数、N-cadherin蛋白相对表达量高于si-LINC00667+anti-miR-NC组($P < 0.05$)。**结论** 抑制miR-19a-3p通过靶向LINC00667, 抑制RA-FLS的增殖、迁移、侵袭, LINC00667或可用作诊断和治疗RA的靶点。

关键词: 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; LINC00667; miR-19a-3p; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R593.22

文献标识码: A

Effects of inhibition of LINC00667 expression on proliferation, migration and invasion of fibroblastic synovial cells in rheumatoid arthritis*

Meng Qing-liang¹, Ma Jun-fu¹, Gao Qing-jie², Cui Jia-kang¹

(1. Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046, China)

Abstract: Objective To explore the effects and mechanisms of long chain non-coding RNA (lncRNA) LINC00667 on the proliferation, migration and invasion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RA-FLS).

收稿日期: 2023-01-20

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No:81874456); 河南省中医药科学研究重大专项课题(No:20-21ZYD05); 河南省自然科学基金青年项目(No:232300420270); 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研课题(No:2021JDZX2079); 河南省中医院博士基金项目(No:2021BSJJ02)

Methods The model was established in SPF Wistar rats, the synovial tissue of ankle joint was isolated, and the expression of LINC00667 and miR-19a-3p in RA-FLS was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Transfect si-NC, si-LINC00667, miR-NC, miR-19a-3p simulant, si-LINC00667 and anti-miR-NC, si-LINC00667 and anti-miR-19a-3p in RA-FLS, and divide them into si-NC group, si-LINC00667 group, miR-NC group, miR-19a-3p group, si-LINC00667 + anti-miR-NC group and si-LINC00667 + anti-miR-19a-3p group. CCK-8 method was used to detect the proliferation inhibition rate of RA-FLS after different transfections, Transwell method was used to detect cell migration and invasion, and Western blotting was used to detect the expression of E-cadherin and N-cadherin. Double luciferase report verified the targeting relationship between LINC00667 and miR-19a-3p. **Results** The expression of LINC00667 in synovial tissue of RA model group was 270% of that of normal group, and the expression of miR-19a-3p was 36% that of normal group ($P < 0.05$). After successful transfection, the inhibition rate of RA-FLS and the expression of E-cadherin protein in the si LINC00667 group were higher than those in the si-NC group, and the number of migration and invasion cells and the expression of N-cadherin protein were lower than those in the si-NC group ($P < 0.05$). LINC00667 targeted miR-19a-3p. The inhibition rate of RA-FLS and the expression of E-cadherin protein in miR-19a-3p group were higher than those in miR-NC group, while the number of migration and invasion cells and the expression of N-cadherin protein in miR-19a-3p group were lower than those in miR-NC group ($P < 0.05$). The inhibition rate of RA-FLS and the expression of E-cadherin protein in si-LINC00667 + anti-miR-19a-3p group were lower than those in si-LINC00667 + anti-miR-NC group, while the number of migration and invasion cells and the expression of N-cadherin protein in si-LINC00667 + anti-miR-NC group were higher than those in si-LINC00667 + anti-miR-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** LINC00667 can promote the proliferation, migration and invasion of RA-FLS by targeting miR-19a-3p.

Keywords: arthritis, rheumatoid; synoviocytes, fibroblast-like; LINC00667; miR-19a-3p; proliferation; migration; invasion

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种影响全身滑膜、关节的慢性炎症疾病, 持续的炎症会破坏骨和软骨^[1]。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 在 RA 的发生、发展中起重要作用^[2]。作为促进关节退化的炎症细胞因子和分解代谢酶的主要来源, 类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (RA-FLS) 在慢性炎症环境中被激活时也表现出接触抑制逃逸、锚定非依赖性生长, 以及迁移和侵袭能力增加等类似肿瘤的行为^[3-4]。其刺激 RA 的进展并最终破坏关节。非编码 RNA 在 RA 发展中起重要作用的自身免疫和炎症反应^[5-6]。LINC00667 位于染色体 18p11.31, 是一种新发现的长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA)。LINC00667 是多种类型肿瘤的促癌因子, 如肾母细胞瘤^[7]、非小细胞肺癌^[8]、肝癌^[9]。LINC00667 可通过吸附 microRNA-130a-3p (miR-130a-3p) 调节雄激素受体表达来加剧肝细胞癌的进展^[9]。YANG 等^[10]证明 LINC00667 在非小细胞肺癌中作为癌基因通过吸附 miR-143-3p 充当竞争性内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 促进肿瘤生长。本团队前期研究发现, 正常组与模型组大鼠滑膜组织间 LINC00667 表达有差异, 生物信息学分析显示

LINC00667 与 miR-19a-3p 存在结合位点, 但 LINC00667 在 RA-FLS 调控中的作用尚不明确。从机制上讲, LncRNA 可以通过抑制某些 miRNA 释放下游 mRNA 发挥作用^[11]。miR-19a-3p 是一种癌症相关的 miRNA, 属于 miR-17-92 簇家族^[12]。有研究表明, miR-19a-3p 在 RA 患者和其相关间质性肺病患者中均低表达^[13]。本研究旨在评估 LINC00667 的作用, 以及 LINC00667 对 RA-FLS 增殖、迁移、侵袭及靶标 miR-19a-3p 的调节, 以期阐明 LINC00667 在 RA 中作用, 并可能为新的治疗方案提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: SPF 级雌性 Wistar 大鼠 20 只, 体重 (200 ± 20) g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (鲁) 20190003。实验期间饲养于河南省中医院动物实验中心, 室温 (22 ± 2) °C, 自由进食和饮水。实验试剂: 免疫源性牛 II 型胶原、完全弗氏佐剂、TRIzol 试剂、Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (美国 Invitrogen 公司), Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assay (美国 Applied Biosystems 公司),

SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR Kit (日本 TaKaRa 公司), 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) (日本 Dojindo 公司), pGL3 载体、Dual-Luciferase Reporter Assay kit (美国 Promega 公司)。

1.2 模型复制

将大鼠随机分为正常组和 RA 模型组, 每组 10 只。在超净台无菌环境中, 将牛 II 型胶原和完全弗氏佐剂按 1:1 比例在冰浴下混匀。在大鼠适应环境 3 d 后进行模型复制, 在模型组尾根部皮下注射 0.15 mL 胶原乳剂, 正常对照组尾根部注射 0.15 mL 生理盐水^[14]。在首次免疫 7 d 后于对侧尾根部皮下注射 0.1 mL 胶原乳剂加强免疫。在首次免疫 10 d 后选择双后肢关节肿胀大鼠为实验取材对象。

1.3 细胞分离培养与转染

在加强免疫 3 d 后取材, 剥离大鼠踝关节组织, 取出滑膜, 4 ℃ 无菌条件下保存^[15]。将滑膜组织切碎成大约 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块, 并在 37 ℃ 下进行胰蛋白酶消化 2 h。在 3 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 在含有 10% 胎牛血清和抗生素 (100 u/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 的 DMEM 培养基中, 保持在 37 ℃、5% CO₂ 的加湿环境下生长。传代 3 ~ 5 次的用于后续实验。

在 RA-FLS 中分别转染 si-NC、si-LINC00667、miR-NC、miR-19a-3p 模拟物、si-LINC00667 与 anti-miR-NC、si-LINC00667 与 anti-miR-19a-3p, 并作为 si-NC 组、si-LINC00667 组、miR-NC 组、miR-19a-3p 组、si-LINC00667 + anti-miR-NC 组和 si-LINC00667 + anti-miR-19a-3p 组。根据试剂盒说明书的方案, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂将上述质粒转染到 RA-FLS 中 48 h, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 测定转染效率。

1.4 qRT-PCR 检测 LINC00667 和 miR-19a-3p 表达

使用 TRIzol 提取组织、培养细胞的总 RNA 以检测 RNA 表达。使用 Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 将 RNA 逆转录为 cDNA。整个反应体系使用 20 μL RNA。反应条件: 95 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 45 s。使用 ABI7500 实时 PCR 系统将每个 PCR 反应进行 35 个循环。对于 miR-19a-3p 表达的检测, 应用 Applied Biosystems

TaqMan MicroRNA Assay 方案进行逆转录, SYBR Prime Script TM miRNA RT-PCR Kit 用于检测 miRNA 表达。RNA 表达水平通过 2^{-ΔΔCt} 方法计算。GAPDH 或 U6 作为内参。LINC00667 正向引物: 5'-TGTGCG AGAAAGCCTACCTG-3', 反向: 5'-GCCTGCATCAA AAAGTCGGG-3'; GAPDH 正向引物: 5'-GGAGCGA GATCCCTCCAAAAT-3', 反向: 5'-GGCTGTTGTCAT ACTTCTCATGG-3'; miR-19a-3p 正向引物: 5'-GGG GGGGTGTGCAAATCT-3', 反向: 5'-GTGCGTGTCTGT GGAGTCG-3'; U6 正向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAG CACA-3', 反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率

细胞抑制率根据 CCK-8 试剂盒说明在 96 孔板中通过 CCK-8 测定。指定转染质粒处理的 RA-FLS (1 × 10³ 个细胞/孔) 于 37 ℃、5% CO₂ 下培养, 48 h 时加入 CCK-8 试剂, 保持 4 h。通过酶标仪在 450 nm 处测量光密度 OD 值计算增殖抑制率。增殖抑制率 (%) = 100% - 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 × 100%。

1.6 Transwell 法检测细胞迁移、侵袭

迁移: 转染 48 h 后, 将 2 × 10⁴ 个 RA-FLS 加入含有 100 μL 无血清培养基的 Transwell 上室, 然后在下室加入 10% 胎牛血清培养基, 培养 24 h 后, 将通过孔迁移的细胞固定并用结晶紫染色, 在显微镜下观察迁移细胞并计数。侵袭: 在 Transwell 上室涂布 Matrigel 胶, 后续步骤同迁移。

1.7 Western blotting 检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达

采用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解缓冲液裂解 RA-FLS, 制备总蛋白。总蛋白通过 SDS-PAGE 分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上。采用 5% 脱脂牛奶封闭后, 用一抗孵育膜: 抗 E-cadherin (1:1 000)、抗 N-cadherin (1:1 000) 和抗 GAPDH (1:2 000) 在 4 ℃ 条件下过夜。与特异性抗体孵育后, 将印迹与二抗一起孵育, 并通过增强的化学发光液进行观察。GAPDH 为内参。

1.8 LINC00667 和 miR-19a-3p 的双荧光素酶报告实验

采用生物信息学软件 starbase 对 LINC00667 和 miR-19a-3p 的互补序列进行预测。使用 PCR 扩增 LINC00667 中 miR-19a-3p 的结合位点野生型 (WT) 序列或突变 (MUT) 序列。将其分别克隆到 pGL3 载

体中以产生 WT-LINC00667、MUT-LINC00667 报告质粒。然后使用 Lipofectamine 2000 转染试剂, 用报告质粒与 miR-NC 或 miR-19a-3p 模拟物分别共转染 RA-FLS。在转染 48 h 后收集细胞, 使用 Dual-Luciferase Reporter Assay kit 按照说明步骤测定细胞的荧光素酶活性。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组与模型组 LINC00667 和 miR-19a-3p 表达的比较

正常组与模型组滑膜中 LINC00667 mRNA 和 miR-19a-3p mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 模型组滑膜中 LINC00667 mRNA 相对表达量高于正常组, miR-19a-3p mRNA 相对表达量低于正常组。见表 1。

表 1 正常组与模型组 LINC00667 和 miR-19a-3p 表达的比较 (*n* = 10, $\bar{x} \pm s$)

分组	LINC00667 mRNA	miR-19a-3p mRNA
正常组	0.99 ± 0.10	0.97 ± 0.11
模型组	2.67 ± 0.30	0.35 ± 0.08
<i>t</i> 值	24.126	19.429
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.2 转染后各组 LINC00667 和 miR-19a-3p 表达的比较

RA-FLS 转染后, si-NC 组与 si-LINC00667 组 LINC00667 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); si-LINC00667 组 LINC00667 mRNA 相对表达量低于 si-NC 组 (见表 2)。RA-FLS 转染后, 各组 miR-19a-3p mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); si-LINC00667 组

miR-19a-3p mRNA 相对表达量高于 si-NC 组 (*P* < 0.05), miR-19a-3p 组 miR-19a-3p mRNA 相对表达量高于 miR-NC 组 (*P* < 0.05), anti-miR-19a-3p 组 miR-19a-3p mRNA 低于 anti-miR-NC 组 (*P* < 0.05) (见表 3)。

表 2 转染后各组 LINC00667 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LINC00667 mRNA
si-NC 组	1.00 ± 0.00
si-LINC00667 组	0.24 ± 0.03
<i>t</i> 值	76.000
<i>P</i> 值	0.000

表 3 转染后各组 miR-19a-3p 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-19a-3p mRNA
si-NC 组	1.00 ± 0.00
si-LINC00667 组	3.66 ± 0.12 ^①
miR-NC 组	1.00 ± 0.00
miR-19a-3p 组	2.56 ± 0.17 ^②
anti-miR-NC 组	1.00 ± 0.00
anti-miR-19a-3p 组	0.40 ± 0.06 ^③
<i>F</i> 值	589.903
<i>P</i> 值	0.000

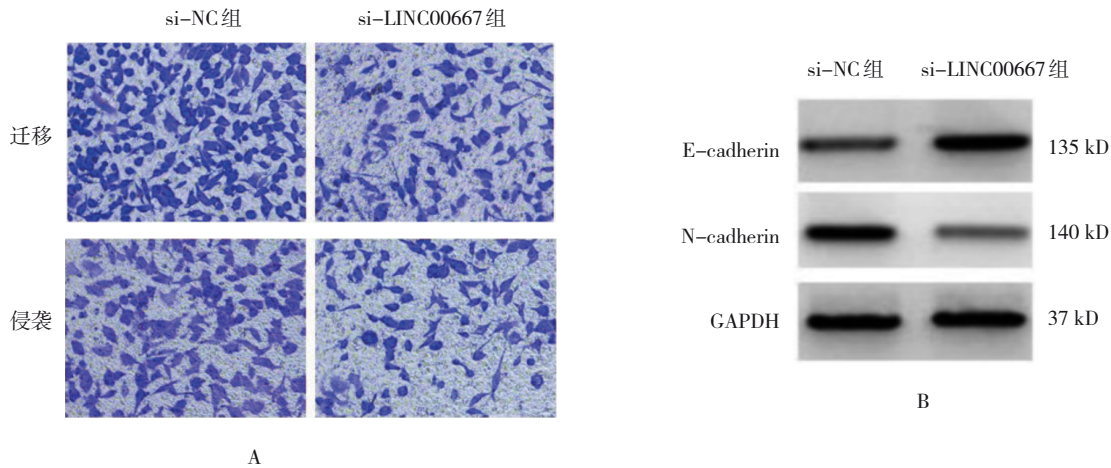
注: ①与 si-NC 组比较, *P* < 0.05; ②与 miR-NC 组比较, *P* < 0.05; ③与 anti-miR-NC 组比较, *P* < 0.05。

2.3 抑制 LINC00667 对 RA-FLS 增殖、迁移、侵袭的影响

抑制 LINC00667 后, si-LINC00667 组 RA-FLS 的增殖抑制率与 si-NC 组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); si-LINC00667 组高于 si-NC 组。在迁移、侵袭细胞数方面, si-LINC00667 组与 si-NC 组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); si-LINC00667 组低于 si-NC 组。si-LINC00667 组 E-cadherin 蛋白和 N-cadherin 蛋白相对表达量与 si-NC 组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); si-LINC00667 组 E-cadherin 蛋白相对表达量高于 si-NC 组, N-cadherin 蛋白相对表达量低于 si-NC 组。见表 4 和图 1。

表 4 抑制 LINC00667 对 RA-FLS 增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
si-NC 组	0.00 ± 0.00	170.78 ± 9.81	137.44 ± 8.21	0.24 ± 0.02	0.77 ± 0.07
si-LINC00667 组	46.25 ± 1.68	80.22 ± 2.66	58.56 ± 3.83	0.69 ± 0.05	0.22 ± 0.02
<i>t</i> 值	82.589	26.729	26.121	25.069	22.664
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



A:抑制 LINC00667 对 RA-FLS 迁移、侵袭数的影响(结晶紫染色 $\times 200$); B:抑制 LINC00667 后 RA-FLS 中 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达。

图 1 抑制 LINC00667 对 RA-FLS 迁移、侵袭的影响

2.4 miR-19a-3p 靶向 LINC00667 结果

采用软件 starbase 进行预测 LINC00667 和 miR-19a-3p 的互补序列。WT-LINC00667 与 miR-19a-3p 和 miR-NC 共转染比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 MUT-LINC00667 与 miR-19a-3p 和 miR-NC 共转染比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2 和表 5。

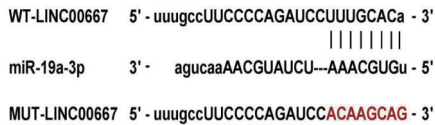


图 2 LINC00667 和 miR-19a-3p 的互补序列

2.5 miR-19a-3p 对 RA-FLS 增殖、迁移、侵袭的影响

在 RA-FLS 的增殖抑制率、迁移、侵袭细胞数方

表 5 miR-19a-3p 靶向 LINC0066 的双荧光素酶报告

($\bar{x} \pm s$)		
组别	WT-LINC00667	MUT-LINC00667
miR-19a-3p 组	0.43 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.06
miR-NC 组	0.99 $\pm$ 0.08	0.95 $\pm$ 0.06
t 值	17.808	1.414
P 值	0.000	0.176

面,miR-19a-3p 组与 miR-NC 组比较,两组差异均具有统计学意义($P < 0.05$);miR-19a-3p 组 RA-FLS 的增殖抑制率高于 miR-NC 组,迁移、侵袭细胞数低于 miR-NC 组。miR-19a-3p 组与 miR-NC 组 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);miR-19a-3p 组 E-cadherin 蛋白相对表达量高于 miR-NC 组,N-cadherin 蛋白相对表达量低于 miR-NC 组。见表 6 和图 3。

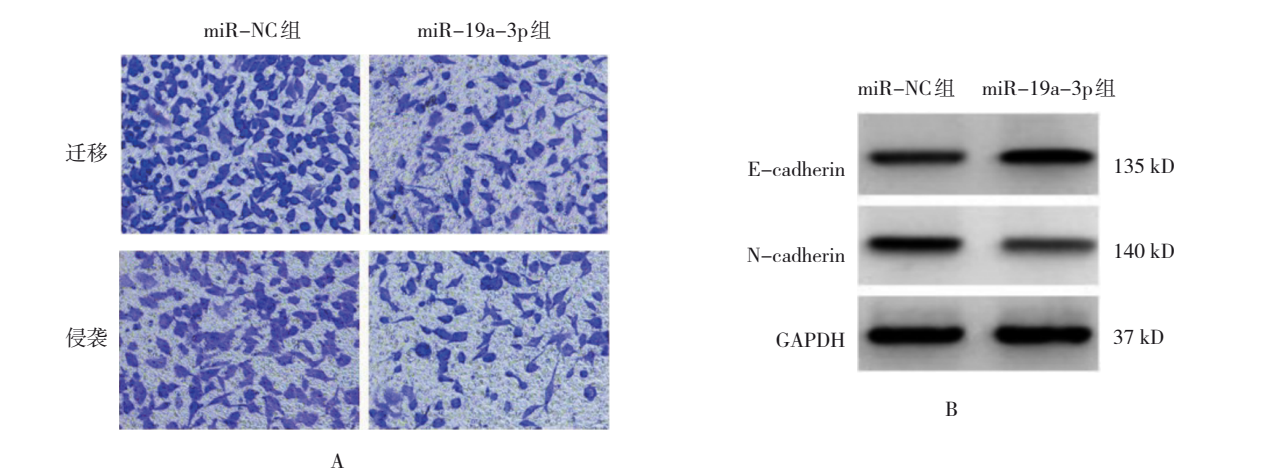
表 6 miR-19a-3p 对 RA-FLS 增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
miR-NC 组	0.00 $\pm$ 0.00	168.22 $\pm$ 8.47	133.11 $\pm$ 11.01	0.23 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.06
miR-19a-3p 组	34.22 $\pm$ 1.61	103.11 $\pm$ 5.47	72.56 $\pm$ 4.81	0.49 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.04
t 值	63.764	19.373	15.119	15.600	17.473
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.6 抑制 miR-19a-3p 对抑制 LINC00667 处理的 RA-FLS 增殖、迁移、侵袭的影响

si-LINC00667 + anti-miR-19a-3p 组在 RA-FLS 抑制率、迁移、侵袭细胞数方面与 si-LINC00667 + anti-

miR-NC 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);si-LINC00667 + anti-miR-19a-3p 组 RA-FLS 的抑制率较 si-LINC00667 + anti-miR-NC 组降低,迁移、侵袭细胞数较 si-LINC00667 + anti-miR-NC 组增加。si-



A:miR-19a-3p对RA-FLS迁移、侵袭数的影响(结晶紫染色×200); B:miR-19a-3p对RA-FLS中E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响。

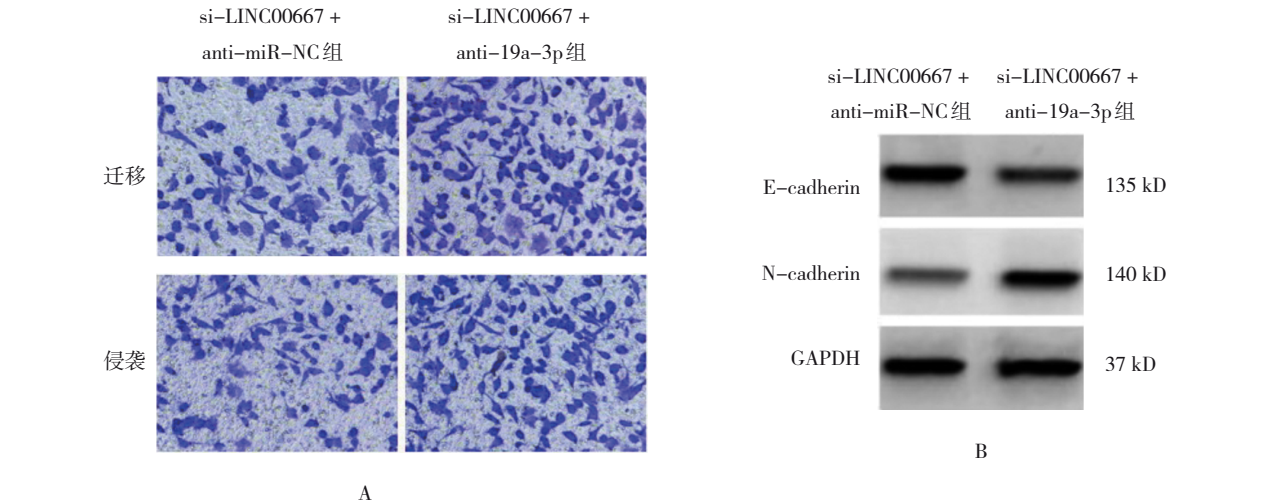
图3 miR-19a-3p对RA-FLS迁移、侵袭及E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响

LINC00667 + anti-miR-19a-3p组与si-LINC00667 + anti-miR-NC组E-cadherin蛋白及N-cadherin蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),si-LINC00667 + anti-miR-19a-3p组E-cadherin蛋白

相对表达量较si-LINC00667 + anti-miR-NC组降低,N-cadherin蛋白相对表达量较si-LINC00667 + anti-miR-NC组升高。见表7和图4。

表7 抑制miR-19a-3p对抑制LINC00667处理的RA-FLS增殖、迁移、侵袭的检测 ($\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	E-cadherin	N-cadherin
si-LINC00667 + anti-miR-NC组	46.61 ± 1.93	78.22 ± 4.18	57.78 ± 3.15	0.68 ± 0.05	0.23 ± 0.03
si-LINC00667 + anti-miR-19a-3p组	23.94 ± 1.80	134.56 ± 9.84	106.89 ± 8.44	0.35 ± 0.04	0.56 ± 0.05
<i>t</i> 值	25.770	15.810	16.354	15.461	16.978
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



A:抑制miR-19a-3p对抑制LINC00667处理的RA-FLS迁移、侵袭数的影响(结晶紫染色×200); B:抑制miR-19a-3p对抑制LINC00667处理的RA-FLS中E-cadherin、N-cadherin蛋白表达。

图4 抑制miR-19a-3p对抑制LINC00667处理的RA-FLS迁移、侵袭及E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响

3 讨论

RA是一种慢性自身免疫性疾病,滑膜成纤维细胞通过肿瘤样增殖、迁移、侵袭和炎症在软骨和骨破坏中发挥关键作用^[16]。本研究结果显示LINC00667在RA模型组中高表达。既往研究表明,LINC00667作为致癌基因促进癌症发展,LINC00667在胆管癌组织和细胞中高表达,通过抑制miR-200c-3p上调丙酮酸脱氢酶激酶1促进胆管癌细胞增殖、迁移及侵袭^[17]。LINC00667通过吸附miR-4319来促进鼻咽癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间充质转化的恶性表型^[18]。本研究通过敲低LINC00667进行功能丧失实验,结果发现抑制LINC00667导致FLS增殖、迁移、侵袭的抑制。此外,通过Western blotting检测到LINC00667对蛋白表达的影响。E-Cadherin是一类经典的钙黏蛋白,可作为黏附连接体,维持上皮组织的稳定,E-cadherin的表达被抑制会破坏上皮细胞间的黏连结构^[19]。N-Cadherin属于I类钙黏蛋白,其表达的上调与细胞增殖迁移呈正相关^[20]。有研究结果表明,抑制LINC00667通过促进上皮标志物E-cadherin的表达,抑制间充质标志物N-cadherin表达,抑制转移过程^[16]。因此,本研究结果显示LINC00667在RA-FLS中发挥促进增殖、迁移、侵袭的作用。

有研究发现,LncRNA具有多个miRNA识别结合位点,可以通过充当miRNA竞争性内源性RNA(ceRNA)执行其功能。LncRNA与miRNA之间相互作用,并在各种癌症和人类发育中受到广泛关注^[21]。通过生物信息学分析,本研究发现LINC00667在miR-19a-3p上具有部分结合位点,表明它们之间可能存在ceRNA关系。miR-19a-3p参与调控多种癌症,其通过调节多发性骨髓瘤中的FBXO32表达作为癌基因发挥作用^[22],结直肠癌细胞中沉默miR-19a-3p抑制细胞的上皮-间质转化、侵袭、迁移和增殖^[23]。CHEN等^[12]报道了通过转染miR-19a-3p模拟物过表达miR-19a-3p可有效抑制RA-FLS增殖并促进凋亡。本研究qRT-PCR结果证实miR-19a-3p在RA模型中下调,与之前的研究结果一致。功能丧失实验表明,抑制LINC00667促进RA-FLS中miR-19a-3p的表达。萤光素酶报告基因进一步证实了LINC00667与miR-19a-3p的直接结合能力。而miR-19a-3p过表达抑制了RA-FLS的增殖、迁移及

侵袭,提示miR-19a-3p可以抑制RA-FLS的增殖与侵袭。拯救实验显示,抑制LINC00667处理的RA-FLS增殖、迁移、侵袭的影响能被抑制miR-19a-3p所逆转,表明LINC00667通过调节miR-19a-3p促进RA-FLS的增殖、迁移和侵袭。

因此,本研究结果表明抑制miR-19a-3p通过靶向LINC00667,抑制RA-FLS的增殖、迁移、侵袭,LINC00667或可用作诊断和治疗RA的靶点,揭示其在RA疾病发展中的作用机制,可为RA的治疗提供新思路。

参考文献:

- [1] SUGIURA T, KAMINO H, NARIAI Y, et al. Screening of a panel of low molecular weight compounds that inhibit synovial fibroblast invasion in rheumatoid arthritis[J]. J Immunol, 2020, 205(12): 3277-3290.
- [2] KARAMI J, ASLANI S, TAHMASEBI M N, et al. Epigenetics in rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes as an emerging paradigm in the pathogenesis of the disease[J]. Immunol Cell Biol, 2020, 98(3): 171-186.
- [3] 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): 171-181.
- [4] BI X, GUO X H, MO B Y, et al. LncRNA PICSAR promotes cell proliferation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes by sponging miRNA-4701-5p in rheumatoid arthritis[J]. EBioMedicine, 2019, 50: 408-420.
- [5] WANG J H, YAN S S, YANG J H, et al. Non-coding RNAs in rheumatoid arthritis: from bench to bedside[J]. Front Immunol, 2020, 10: 3129.
- [6] QU W, JIANG L, HOU G H. Circ-AFF2/miR-650/CNP axis promotes proliferation, inflammatory response, migration, and invasion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. J Orthop Surg Res, 2021, 16(1): 165.
- [7] LIU P, CHEN S F, HUANG Y Y, et al. LINC00667 promotes Wilms' tumor metastasis and stemness by sponging miR-200b/c/429 family to regulate IKK- β [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(6): 1382-1393.
- [8] YANG H Z, YANG W C, DAI W Q, et al. LINC00667 promotes the proliferation, migration, and pathological angiogenesis in non-small cell lung cancer through stabilizing VEGFA by EIF4A3[J]. Cell Biol Int, 2020, 44(8): 1671-1680.
- [9] QIN Z X, LIU X H, LI Z J, et al. LncRNA LINC00667 aggravates the progression of hepatocellular carcinoma by regulating androgen receptor expression as a miRNA-130a-3p sponge[J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 387.
- [10] YANG Y B, LI S S, CAO J, et al. RRM2 regulated by

- LINC00667/miR-143-3p signal is responsible for non-small cell lung cancer cell progression[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 9927-9939.
- [11] HUANG Y, WANG X W, ZHENG Y R, et al. Construction of an mRNA-miRNA-lncRNA network prognostic for triple-negative breast cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(1): 1153-1175.
- [12] CHEN Y Y, WANG W C, CHEN Y, et al. MicroRNA-19a-3p promotes rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting SOCS3[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(7): 11624-11632.
- [13] YUAN H, JIAO L, YU N, et al. Histone deacetylase 3-mediated inhibition of microRNA-19a-3p facilitates the development of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 549656.
- [14] 崔家康, 姜泉, 唐晓颇, 等. 清热化瘀凝胶对II型胶原诱导性关节炎大鼠炎症细胞因子表达的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(1): 84-87.
- [15] 董宝铁, 李泓, 高伟, 等. miR-214-5p 靶向 SEMA4 C 基因调控类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和侵袭的分子机制[J]. *河北医药*, 2021, 43(9): 1307-1311.
- [16] WANG J, WANG Y, ZHANG H, et al. Identification of a novel microRNA-141-3p/Forkhead box C1/ β -catenin axis associated with rheumatoid arthritis synovial fibroblast function in vivo and in vivo[J]. *Theranostics*, 2020, 10(12): 5412-5434.
- [17] LI J L, GUAN C H, HU Z T, et al. Yin yang 1-induced LINC00667 up-regulates pyruvate dehydrogenase kinase 1 to promote proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma cells by sponging miR-200c-3p[J]. *Hum Cell*, 2021, 34(1): 187-200.
- [18] LIAO B, YI Y, ZENG L, et al. LINC00667 sponges miR-4319 to promote the development of nasopharyngeal carcinoma by increasing FOXQ1 expression[J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 632813.
- [19] MENDONSA A M, NA T Y, GUMBINER B M. E-cadherin in contact inhibition and cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(35): 4769-4780.
- [20] LOH C Y, CHAI J Y, TANG T F, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1118.
- [21] JOHNSON S J, COOPER T A. Overlapping mechanisms of lncRNA and expanded microsatellite RNA[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2021, 12(1): e1634.
- [22] LI Y, GAO S, XUE W J, et al. miR-19a-3p functions as an oncogene by regulating FBXO32 expression in multiple myeloma[J]. *Balkan Med J*, 2021, 38(1): 43-49.
- [23] YU F B, SHENG J, YU J M, et al. MiR-19a-3p regulates the Forkhead box F2-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway and affects the biological functions of colorectal cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(6): 627-644.
- (张西倩 编辑)

本文引用格式: 孟庆良, 马俊福, 高青杰, 等. 抑制 LINC00667 表达对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、迁移、侵袭的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(15): 38-45.

Cite this article as: MENG Q L, MA J F, GAO Q J, et al. Effects of inhibition of IC06LINC00667 expression on proliferation, migration and invasion of fibroblastic synovial cells in rheumatoid arthritis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(15): 38-45.