



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R593.22

U D C 616-092

密 级 公开

博士学位论文

NF- κ B-miR-10a 环路和 DDR2-miR-103a 通路在类风湿性关节炎中的作用及机制研究

穆 楠

学 号 1412014519

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 药 学

二级学科(专业) 微生物与生化药学

研 究 方 向 非编码 RNA 与类风湿性关节炎

指 导 教 师 张英起 教授

培 养 单 位 药学院生物制药学教研室

二〇一七年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
ABSTRACT	5
前 言	7
文献回顾	9
正 文	30
第一部分 NF- κ B/YY1/miR-10A 正反馈环路在 FLS 细胞介导的 RA 滑膜炎症中的作用及机制	30
1 实验材料	31
1.1 主要试剂	31
1.2 常用缓冲液	33
1.3 主要仪器	34
2 方法	35
2.1 成纤维细胞样滑膜细胞的原代培养	35
2.2 组织/细胞总 RNA 的提取	36
2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)	37
2.4 蛋白免疫印迹 (Western blot assay)	40
2.5 染色质免疫共沉淀 (ChIP)	41
2.6 双荧光素酶报告基因	45
2.7 免疫荧光实验	47
2.8 BrdU 增殖实验	48
2.9 Transwell 侵袭实验	48
2.10 细胞划痕实验	49
2.11 统计学分析	49
3 结果	49
3.1 miR-10a 在 RA 患者滑膜组织和 RA FLS 细胞中低表达	49
3.2 TNF- α 和 IL-1 β 均能够引起 RA FLS 细胞中 miR-10a 的下调, 并且这一作用依赖于 NF- κ B 通路	51
3.3 TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调由 YY1 直接参与	53
3.4 TNF- α /IL-1 β 或活化的 p65 可促进 YY1 的表达和其在细胞核内的分布	57

3.5 IRAK4、TAK1 和 BTRC 是 miR-10a 的靶基因	58
3.6 低表达的 miR-10a 能够促进 NF- κ B 的活化并加剧下游炎性细胞因子的产生	60
3.7 miR-10a 通过激活 NF- κ B 通路影响 RA FLS 细胞的增殖、侵袭和迁移能力	63
4 讨论	65
第二部分 DDR2-H19-MiR-103A 通路在 RA 炎症反应诱发的骨重塑进程中的作用及机制	68
1 实验材料	70
1.1 主要试剂	70
1.2 常用缓冲液	72
1.3 主要仪器	72
2 方法	73
2.1 小鼠 CIA 模型的制备	73
2.2 Agomir 给药方案及检查	73
2.3 相关载体的构建	74
2.4 体外转录实验	77
2.5 RNA pull-down 实验	79
2.6 qRT-PCR 检测	80
2.7 ChIP 实验	81
2.8 H19 的 FISH 检测	82
2.9 人 PBMCs 分离	83
2.10 诱导人 PBMCs 向破骨细胞分化	83
2.11 TRAP 染色	84
2.12 统计学分析	84
3 结果	85
3.1 LncRNA H19 在 RA 患者滑膜细胞中高表达, 并且具有 DDR2 依赖性	85
3.2 DDR2 通过激活 c-Myc 调控 H19 的表达	87
3.3 H19 在 RA FLS 细胞的胞浆和胞核均有分布	90
3.4 H19 通过“吸附”miR-103a, 并促使其降解	91
3.5 IL-15/DKK1 是 miR-103a 的靶基因	94
3.6 IL-15 可促进 PBMCs 向破骨细胞分化	95
3.7 上调 miR-103a 的表达, 可延缓 CIA 小鼠的发病进程及骨质破坏	96
4 讨论	99

小 结	102
参考文献	103
附 录	120
个人简历和研究成果	121
致 谢	123

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
CIA	Collagen-Induced Arthritis	胶原诱导的关节炎
DDR2	Discoindin Domain Receptor 2	盘状结构域受体 2
DDT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
ECM	Extracellular Matrix	细胞外基质
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FISH	Fluorescence in Situ Hybridization	荧光原位杂交
FLS	Fibroblast-Like Synoviocytes	成纤维细胞样滑膜细胞
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor	粒细胞集落刺激因子
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
HE	Hematoxylin-Eosin Staining	苏木精-伊红染色
IL	Interleukin	白细胞介素
IL-1 RA	IL-1 Receptor Antagonist	白细胞介素 1 受体拮抗剂
IKK	Inhibitor of NF- κ B Kinase	NF- κ B 激酶抑制剂
IRFs	Interferon-Regulating Factors	干扰素调控因子
LncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	丝裂原活化蛋白激酶
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
MKK	MAPK Kinases	MAPK 激酶

MMPs	Matrix Metalloproteinases	基质金属蛋白酶
ncRNA	Non-Coding RNA	非编码 RNA
NF- κ B	Nuclear Kactor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	核因子活化 B 细胞 κ 轻链 增强子
OA	Osteoarthritis	骨关节炎
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	外周血单核细胞
RA	Rheumatoid Arthritis	类风湿性关节炎
RANK	Receptor Activator of NF- κ B	NF- κ B 的激活受体
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand	NF- κ B 的激活受体配体
siRNA	Small Interfering RNA	小干扰 RNA
TGF β	Transforming Growth Factor β	转化生长因子 β
TIMPs	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases	组织金属蛋白酶抑制剂
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α	肿瘤坏死因子 α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生长因子

NF- κ B-miR-10a 环路和 DDR2-miR-103a 通路在类风湿性关节炎中的作用及机制研究

博士研究生：穆楠

导师：张英起 教授

辅导教师：张伟 教授

薛晓畅 副教授

第四军医大学药学院生物制药学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（NO.81373201, NO. 81273279, NO. 81302560）

中文摘要

类风湿性关节炎（Rheumatoid Arthritis, RA）是一种发病机制不明的全身性自身免疫疾病，主要以慢性、侵袭性、进行性、全身性关节炎为临床特征。可导致患者关节畸变、活动受限甚至功能丧失，严重影响生活质量，具有较强的致残性。目前认为持续的滑膜炎和关节邻近骨、软骨损伤是 RA 的两大关键致病因素。因此，深入研究参与 RA 滑膜炎维持和关节邻近骨、软骨破坏的信号转导通路及其调控机制，揭示其中的关键分子与主要环节，对于进一步理解 RA 的致病机理、改进临床治疗策略具有重要的理论意义与指导价值。

成纤维细胞样滑膜细胞（Fibroblast-Like Synovial cells, FLS）是滑膜组织的主要组成部分，RA 炎症诱发 FLS 细胞增生形成的血管翳附着于关节邻近骨、软骨表面，是 RA 关节邻近骨、软骨破坏的结构基础。RA FLS 细胞产生的大量炎症因子及蛋白酶类物质，直接参与了 RA 滑膜增生及中晚期的关节邻近骨、软骨破坏。因此发现并解析调控 RA FLS 细胞功能发挥的关键分子及信号通路，可为 RA 中晚期骨破坏致病机制的阐明提供重要的理论支撑。

本研究中，我们以 RA FLS 细胞在 RA 致病进程中的功能研究为切入点，一方

面,我们发现在 RA FLS 细胞中,存在 TNF- α /NF- κ B/YY1/miR-10a/NF- κ B 正反馈调节环路,miR-10a 在其中扮演了关键分子的角色,通过影响 miR-10a,能够有效影响 FLS 细胞 IL-1 β 、TNF- α 和 MMPs 等炎性因子的产生,继而缓解 RA 的持续炎症反应。另一方面,结合课题组之前提出的 Collagen II-DDR2-MMPs-Collagen II 恶性环路的理论,我们发现在 RA FLS 细胞中,存在 DDR2-H19-miR-103a-IL-15/DKK1 这一恶性调节通路,直接参与了 RA 炎性环境诱发的关节骨重塑进程,加剧了 RA 患者关节微环境中破骨细胞的分化,打破了关节局部原有的“成骨-破骨平衡”,是 RA 关节邻近骨、软骨损伤的直接参与者。

通过本研究,我们提出并证实了 TNF- α /IL-1 β /NF- κ B/YY1/miR-10a/NF- κ B 正反馈调节环路在 RA FLS 细胞介导的 RA 炎性环境维持中的作用及其调控机制;并在课题组之前研究的基础上,提出并证实了 DDR2-H19-miR-103a-IL-15/DKK1 通路在 RA FLS 细胞介导的 RA 关节骨重塑进程中的作用,初步阐明了上述通路的作用机制。进一步完善和拓展了 DDR2 在 RA 关节邻近骨、软骨损伤进程中的重要作用,初步探讨了以 miR-10a、DDR2 和 miR-103a 作为 RA 治疗新靶点的可能性。

关键词: 类风湿性关节炎, FLS 细胞, NF- κ B 通路, miR-10a, DDR2, miR-103a

The study of the function and mechanism of NF- κ B-miR-10a loop and DDR2-miR-103a pathway in rheumatoid arthritis

Candidate for doctor: Mu Nan

Supervisor: Prof. Zhang Yingqi

Tutor: Prof. Zhang Wei

Associate Prof. Xue Xiaochang

Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy

The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China

Sponsored Programs: This work was supported by grants from the Natural Science
Foundation of China (No. 81373201, 81273279, 81302560)

Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA), is a kind of severe and systemic autoimmune diseases. The main clinical manifestation of RA is chronic, aggressive and progressive joint inflammation. If patients with RA do not receive reasonable treatment in time, it will ultimately cause joint distortion, and moving restriction, even lead to permanent disability. Nowadays, it has been reported that the persistent inflammation of synovial tissue and the damage of bone/cartilage are two major pathogenic factors of RA. Therefore, it is urgent to get better understanding of the mechanism and regulatory network of synovial inflammation and bone/cartilage destruction in RA, especially the key molecules and main pathways in those pathological processes. The answer of these problems may not only help laying theoretical foundations in deeper understanding of this disease, but also provide potential clinical strategies of RA treatment.

The pannus, which attaches to the joint cartilage surface, is the basic structure in patients with RA. And the proliferation of synovial tissue will cause over secreted MMPs and protein enzymes to degrade the bone and cartilage. Fibroblasts synovial cells (FLS) is the main component of synovial tissue, which produces a large number of inflammatory factors and protein enzymes in the whole pathological process of RA. So if the key molecules and signaling pathways of RA FLS were found, it will be conducive to clarify the mechanism of synovial inflammation and bone/cartilage destruction.

In this study, we aimed to investigate the biological changes of RA FLS. On the one hand, we found that there is a positive feedback loop in RA FLS, which is TNF- α /NF- κ B/YY1/miR-10a/NF- κ B loop. MiR-10a is the key molecule in the loop, and higher miR-10a expression will cause less production of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF- α and MMPs and relieve sustained inflammation of RA. On the other hand, we found another vicious regulation pathway in RA FLS, which is DDR2-H19-miR-103a-IL-15/DKK1 pathway. It is directly involved in the bone remodeling process induced by RA inflammatory environment, which increases the osteoclast differentiation in RA.

The effects and mechanism of TNF- α /NF- κ B/YY1/miR-10a/NF- κ B positive feedback loop was found and proved gradually through the investigation of the thesis. And we also proposed and proved the effects of DDR2-H19-miR-103a-IL-15/DKK1 pathway in bone remodeling process of RA. In addition, the possibility to make miR-10a, DDR2 or miR-103a as potential therapeutic targets in RA treatment was also evaluated in our study.

Key words: Rheumatoid Arthritis, FLS, NF- κ B pathway, miR-10a, DDR2, miR-103a

前 言

类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 是一种发病原因不明的常见关节炎症性病变。其特点为慢性、进行性的系统性全身关节炎症, 并伴随滑膜的过度增生和全身关节侵蚀性炎症反应。普遍的观点认为 RA 病程分为滑膜炎、关节破坏、功能障碍、关节残障四个阶段, 其中滑膜炎和关节破坏阶段是影响 RA 病程及患者预后的关键。现有的治疗手段包括抗炎治疗、免疫抑制剂、炎性因子的单克隆抗体、滑膜切除术等, 虽然能够极大程度的缓解病情, 减轻患者的负担, 但是均不能阻止病程的发展, 患者最终难以逃脱关节残疾的厄运。部分患者通过关节置换手术, 能够恢复一定的关节功能, 但绝大多数患者仍在持续的关节疼痛与关节残疾的阴影中如度日如年。因此, 深入研究参与 RA 滑膜炎维持和关节邻近骨、软骨破坏的信号转导通路及其调控机制, 阐明其中的关键分子与主要环节, 对于进一步理解 RA 的致病机理、改进临床治疗策略具有重要的理论意义与指导价值。

人体基因组中 98-99% 的基因组为非编码序列 (不翻译为蛋白质), 而约 93% 的基因组会发生转录, 所以大量转录后的 RNA 为非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)。近年来发现的 ncRNA 种类越来越多, 而 microRNA (miRNA) 和 long non-coding RNA (LncRNA) 是 ncRNA 的重要组成部分。已有研究表明, miRNA 和 LncRNA 参与一系列重要的生理、病理进程, 包括胚胎发育、肿瘤、炎症、细胞增殖/凋亡/死亡/分化、自噬以及三大营养物质的代谢等。

miRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 于 1993 年首先在线虫中发现, 随后的研究发现其广泛存在于生物体内。目前在人体中已发现 2500 多种成熟体形式的 miRNA 分子。miR-10a 是我们课题组前期利用 miRNA 表达谱芯片筛选得到的在 RA 滑膜组织中低表达的 miRNA 之一, 并且这种低表达是由 NF- κ B 通路活化所介导的; 另有文献报道, 下调的 miR-10a 又可增强 NF- κ B 的活化。提示在成纤维细胞样滑膜细胞 (FLS) 中存在着 miR-10a-NF- κ B 正反馈调节机制, 该机制有望调节多种炎症因子的过度分泌以及 RA FLS 细胞的增殖、侵袭能力, 在 RA 滑膜炎的维持中发挥重要作用。

盘状结构域受体 2 (Discoindin Domain Receptor 2, DDR2) 是一个酪氨酸蛋白激酶受体 (配体为 II 型胶原, Collagen II), 是我们课题组于 1999 年首次通过差异筛选方法发现的在 RA 滑膜组织和 RA FLS 细胞中呈现高表达的蛋白分子, 并在国际上首次提出并证实了 Collagen II-DDR2-Collagen II 恶性环路的理论, 该环路直接参与了 RA 引起的关节邻近骨、软骨损伤。相关研究成果已发表在 *J Cell Biochem*, *Mol Cell Biochem*, *J Autoimmun*, *Arthritis Rheumatology*, *Journal of Bone and Mineral Research* 等杂志上。

尽管我们创新性的提出并证实了 DDR2 在 RA 关节邻近骨、软骨损伤中的重要作用, 并初步对上述作用的机制进行了研究, 提示 DDR2 具有很好的药用靶标前景。但我们之前主要围绕受 DDR2 活化影响的 MMP1、MMP13 等 MMPs 类分子及其调控机制开展了研究。RA 炎症反应能够募集大量的免疫细胞, 在关节腔内蓄积了高浓度的各类细胞因子及炎症因子, 使得 RA 炎症诱发的骨重塑病理进程十分复杂。RA 病理条件下, FLS 细胞功能的改变对“成骨-破骨平衡”的影响意义重大, DDR2 在“成骨-破骨平衡”中的作用及调控机制仍有待于进一步阐明。鉴于 ncRNA 广泛的生理、病理调控范围以及在 RA 病理过程中的重要作用, 我们设想是否有 ncRNA 参与了 DDR2 介导的 RA 关节软骨损伤呢?

我们利用 LncRNA 和 miRNA 芯片对 DDR2 活化及未活化的 FLS 细胞进行了差异筛选。LncRNA H19 和 miR-103a 是我们利用 Agilent 公司的 LncRNA 和 miRNA 表达谱芯片对 FLS 及 FcDDR2 转染后的 FLS (DDR2 能够发生自主磷酸化激活) 进行差异筛选得到的异常表达 ncRNA。但是, H19 与 miR-103a 是否参与了 DDR2 介导的 RA 关节软骨损伤呢? DDR2 调控 H19 与 miR-103a 的分子机制又是什么呢? 目前尚不清楚。

我们分别以 miR-10a-NF- κ B 正反馈调节环路和 DDR2-H19-miR-103a 通路为切入点, 通过相关分子生物学、细胞生物学实验, 探讨上述两条途径在 RA 滑膜炎维持及 RA 滑膜炎诱发的骨重塑进程中的作用及其调控机制, 从而明确 DDR2、miR-10a、H19、miR-103a 等分子在 RA 病程中扮演的角色, 既能为 RA 致病机制的阐明提供理论支撑, 又能为寻找更为有效的药物治疗靶点提供新思路。

文献回顾

一、类风湿性关节炎与成纤维细胞样滑膜细胞

类风湿性关节炎（RA）是一种全身性自身免疫疾病，以慢性、进行性、侵袭性关节炎为主要表现。如果没有及时接受正规治疗，随着病程的逐渐发展，可导致整个关节的畸形、关节功能丧失，具有极高的致残率，严重影响患者的生活质量（1）。自 20 世纪 60 年代以来（1970 年后），特别是 RA 诊断及分类标准制定后，欧美等西方国家率先进行了 RA 流行病学调查，近年来亚洲国家也进行了这方面的研究。结果显示，全球不同人种均有患病，女性发病率是男性的 2.5 倍，该病可发生在任何年龄，而高发年龄在 40-50 岁，发病率维持在在 0.01% - 0.05% 之间，患病率在 0.18% - 1.07% 之间，其发病具有一定的种族差异性，印第安人高于白种人，白种人高于亚洲黄种人（1-4）。

遗传背景在 RA 的易感性中扮演着重要角色，RA 患者一级亲属的患病率比普通人群高 1.5 倍，单卵双胞胎共患病的概率为 12%-15%，而双卵双胞胎则为 3.5%。提示除环境因素外，遗传因素在 RA 的发病中起着决定性作用。通过双卵双胞胎的研究提示，RA 的遗传率可高达 50%-60%（5）。RA 作为一种由多种因素诱发的全身性自身免疫性疾病，是在易感基因的背景下，由一种或多种环境因素，联合自身免疫异常等作用，共同联合作用产生的。这些因素包括感染（EB 病毒、细小病毒 B19、支原体、变形杆菌等）、内分泌（雌激素、雄激素、下丘脑-垂体-肾上腺轴等）、性别、吸烟和环境（寒冷、潮湿及职业性暴露等）等均可在 RA 的发生、发展中发挥一定的作用（1, 6-8）。

滑膜（Synovium）是 RA 受累的首要部位。通过对比 RA 患者与其他关节炎患者及正常人的滑膜形态及功能，让我们对 RA 的认识更为深刻，同时在临床研究中，滑膜活检的应用使得 RA 病理机制的研究达到了分子水平。正常滑膜可分为两层：向内朝向关节腔的部分是一层不连续的内膜衬里层，一般由 1-2 层细胞组成，无明显基膜；另一方的衬里下层由血管、淋巴管、神经及脂肪组织构成。内膜衬里层由两种不同细胞组成，分别为成纤维细胞样滑膜细胞（即 B 型滑膜细胞，FLS）和巨

噬细胞样滑膜细胞（即 A 型滑膜细胞）。B 型滑膜细胞主要合成细胞外基质，包括胶原、纤维连接蛋白、透明质酸及其他具有润滑功能的分子。A 型滑膜细胞则具有吞噬功能，可表达单核-巨噬细胞的各种表面标记。RA 患者滑膜组织复杂的结构变化是一个动态过程，是整合了多种分子信号（趋化因子、黏附因子、细胞因子及生长因子等）和细胞活动（凋亡、增殖、细胞迁移等）的结果。A 型和 B 型滑膜细胞增多、衬里层变厚，衬里下层可见单核细胞浸润。内膜衬里层是炎症因子和蛋白酶的主要来源，与活化的软骨细胞和破骨细胞一起参与了关节的破坏（图 0-1）。增生的滑膜绒毛状突起向关节腔方向伸出，侵袭软骨和关节邻近骨，这些增生的组织被称为血管翳（pannus）。衬里下层的组织水肿、血管增生和细胞增多导致关节的严重水肿。同时，RA 患者的滑膜中聚集着大量 T、B 淋巴细胞、浆细胞、树突状细胞及自然杀伤细胞，弥漫分布在整個衬里下层和淋巴小结（9）。

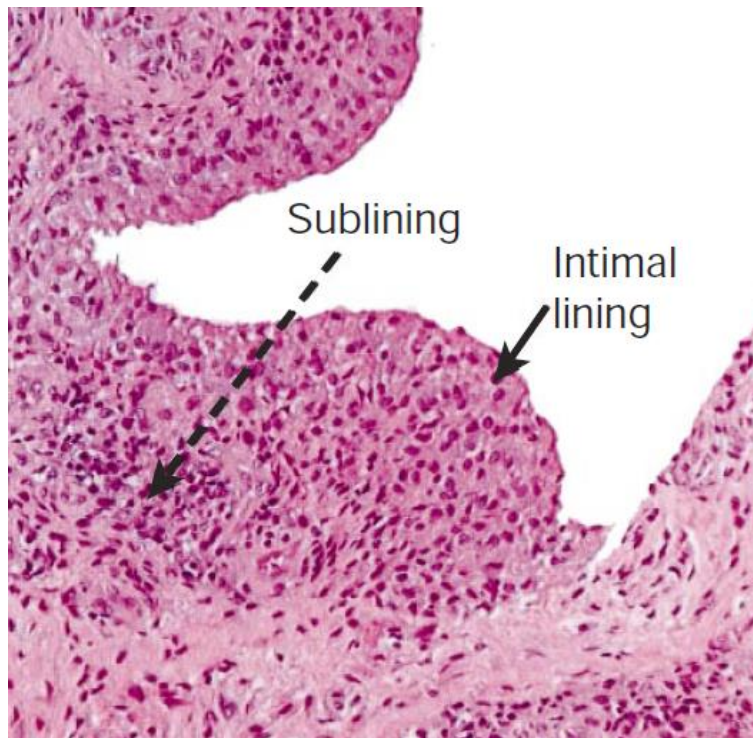


图0-1 RA滑膜组织结构 (*Nature*. 2003; 423(6937): 356-61.)

正常人关节腔内可有少量滑液，起润滑关节面的作用。在 RA 患者关节腔内，因滑膜微血管渗透性增加，滑液显著增多，其主要细胞成分为中性粒细胞，除此之外还可见淋巴细胞、巨噬细胞、NK 细胞和成纤维细胞。滑液中的多形核细胞可被免疫复合物和细胞碎片等激活，进而脱颗粒、产生氧化代谢产物、代谢花生四烯酸，并释放多种蛋白酶和细胞因子，进一步参与 RA 炎症和关节损伤（10）。

RA 诱发的关节损伤与滑膜的功能改变、细胞外基质的破坏及“成骨-破骨平衡”的异常密切相关。增生的滑膜需要新生血管来供养，因此新生血管主要出现在滑膜炎的早期。与肿瘤新生血管类似，滑膜组织增生最终将超过血管的生成能力，滑液中氧气张力较低，并与乳酸水平升高相关。组织的局部缺氧可有效刺激滑膜组织的血管生成和多种促血管生成因子的产生，如血管内皮生长因子（Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF）、IL-8、血管生成素-1 的表达。多种抗血管生成的治疗在动物模型中均可有效减轻 RA 关节炎。前炎性细胞因子可诱导毛细血管及毛细血管后小静脉表达特异性受体，从而调控炎症细胞向滑膜组织迁移。E、P 选择素可介导白细胞移动，血管黏附分子-1 及细胞间黏附分子-1 可调节白细胞运动并使细胞进入组织，在 RA 滑膜内皮，上述黏附分子均高表达，白细胞进入滑膜后，可通过表面受体黏附于基质，其生存及增殖受所在细胞因子的环境调控（11）。

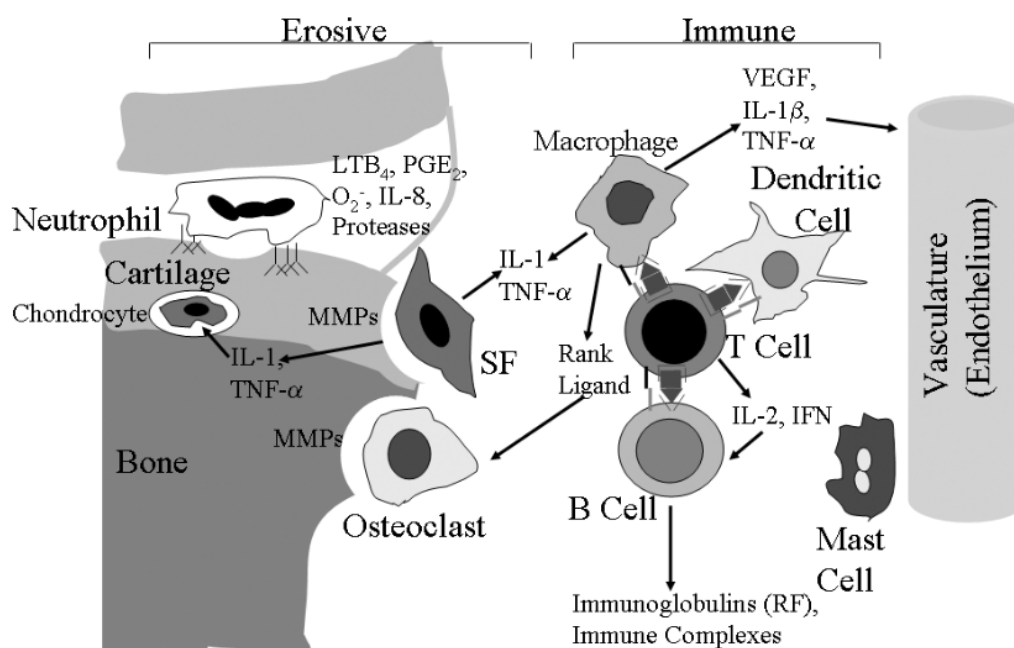


图 0-2 RA 滑膜组织病理机制

(*Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2006; 64(1-2): 20-24.)

血管翳中具有较强侵袭能力的滑膜细胞、被细胞因子激活的软骨细胞及多形核细胞在 IL-1、TNF- α 、IL-17 及免疫复合物的刺激下，这些细胞可释放大量破坏性酶类，导致软骨破坏。基质金属蛋白酶（Matrix Metalloproteinases, MMPs）（包括胶原酶、明胶酶及基质溶解素）、丝氨酸蛋白酶（胰蛋白酶、糜蛋白酶）及组织蛋白

酶等多种酶类直接参与了关节细胞外基质的降解。破坏早期表现为可逆性蛋白多糖的丢失，这一进程由细胞因子的分解代谢作用、基质溶解素和人蛋白聚糖酶的产生引起，到疾病晚期，软骨被大量降解，损伤已成为永久性损伤，无法逆转（11, 12）。局灶性骨侵袭也是 RA 的特征性表现之一，在疾病早期即可出现。由于软骨下骨及皮质骨的破坏，具有较高的致残率。RA 也可导致炎症关节周围的骨量丢失及全身性骨量减少，增加四肢及中轴骨的骨折风险。软骨破坏与局灶性骨侵袭的细胞及分子机制各异：滑膜细胞、软骨细胞及中性粒细胞是前者发病的过程中主要的效应细胞；而后者主要由巨噬细胞前体来源的破骨细胞引起（11）。NF- κ B 的激活受体（Receptor Activator of NF- κ B, RANK）及其配体（Receptor Activator of NF- κ B Ligand, RANKL）构成了 RA 中调节骨质吸收的重要平衡。TNF- α 、IL-1 和 IL-17 等细胞因子可促进 RANKL 在 T 细胞及成纤维样滑膜细胞中的表达。有趣的是，抗 TNF- α 治疗可减缓 RA 骨侵蚀的进展，但患者临床症状改善可能并不明显，提示 RA 炎症及骨破坏可能存在不同的调控机制。（图 0-2）

成纤维细胞样滑膜细胞（FLS, B 型滑膜细胞）主要分布于滑膜的内膜衬里层，正常情况下 FLS 细胞主要参与关节结构的维持、分泌滑液及维持细胞外基质的稳定。但是在 RA 的发生、发展进程中，FLS 细胞的功能及生物学行为发生了显著且长期的改变。这些变化并不是应对炎症早期刺激的瞬时反应，而是伴随 FLS 细胞功能的变化，甚至在炎症消退后仍然存在（13）。因此，FLS 细胞在 RA 致病进程中扮演着“主动参与者”，而不是“受害者”的角色。

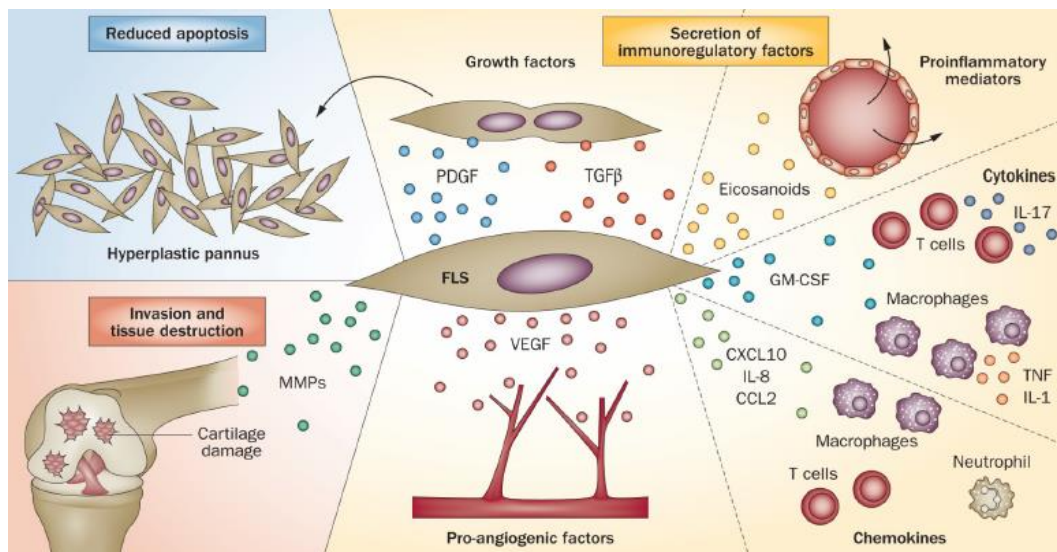


图 0-3 FLS 细胞在 RA 中的作用 (*Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9(1): 24-33.)

RA 炎症可诱导 FLS 细胞加速血管翳的生成、进一步加剧炎症及参与软骨、骨的破坏。近年来的研究表明, FLS 细胞在 RA 发生、发展中的作用远远超出了上述三个方面。(图 0-3)

RA FLS 细胞最典型特征是参与滑膜血管翳的生成, 并构成了过度增生滑膜的主体。尽管一部分再分化及迁移的间充质干细胞参与进来, 但是这一典型特征的根源是 FLS 细胞“增殖-凋亡平衡”被破坏。尽管现有的研究没有直接的证据表明 FLS 细胞的增殖能力大幅提升, 但是 RA FLS 细胞在体外的克隆形成能力大大高于骨关节炎 (Osteoarthritis, OA) FLS 细胞的克隆形成能力 (14, 15)。相反的, FLS 抗凋亡的能力在许多研究中被多种方法验证。包括扫描电镜和免疫组织化学等 (16)。有趣的是 RA FLS 在体外培养中可呈现出更强的抗凋亡作用, 特别是在 FLS 细胞失去了细胞因子和滑膜微环境之后, 这一现象显得尤为突出 (17)。同时, 在一些凋亡诱导因子的刺激下, 比如氧自由基、氮氧化物和细胞因子等, RA FLS 细胞的抗凋亡能力进一步被加强, 并且呈现出“类肿瘤”样的功能, 比如迁移能力增强、细胞交流被抑制、黏附依赖性的增殖减少以及侵袭能力和在体的迁移能力等 (18)。

RA FLS 细胞另一个重要的病理特征是比较强的侵袭性, 这直接导致组织破坏的产生。正常情况下, FLS 细胞调控细胞外基质和滑液的构成, RA 病理条件下, FLS 细胞能够分泌大量的细胞外基质组分, 比如 MMPs, 同时还有基质降解酶抑制剂, 如组织金属蛋白酶抑制剂 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases, TIMPs)。此外, RA FLS 还能够释放胶原酶 (MMP1 和 MMP13)、基质溶素 (MMP3)、蛋白聚糖酶 (ADAMTS4 和 ADAMTS5) 和组织蛋白酶。上述分子在打破维持组织结构的蛋白酶-抑制剂平衡中发挥了关键作用 (19, 20)。蛋白酶类产物与高表达的黏附分子发挥协同作用, 如 Cadherin-11, 共同参与细胞外基质和软骨的重吸收。FLS 细胞对于软骨的损伤同样在炎症导致的关节炎小鼠模型上得到了验证, Cadherin-11 缺失的小鼠, 软骨的侵蚀较弱 (21)。FLS 细胞还被认为在 RA 引发的骨损伤中发挥重要作用, FLS 分泌的 RANKL 可直接促进破骨细胞分化 (22)。RA 患者 FLS 细胞的高度侵袭性部分由早期炎症因子刺激引起, 如 IL-1、TNF- α 。同时, 这种高度侵袭性在体外实验中得以保留, 在小鼠模型中也能观察到 (23, 24)。因此, RA FLS 细胞的侵袭性与其自身及 RA 的炎性微环境均有关联。

RA FLS 细胞的第三个重要特征是其病理条件下, 能够产生大量的细胞因子、

趋化因子及促血管生成因子。RA FLS 通过分泌细胞因子或与免疫细胞的直接相互作用发挥免疫调节功能。IL-1 和 TNF- α 刺激的 FLS 细胞是 IL-6 的主要来源, 而 IL-6 则是在体内和体外均被确证过对 RA 有效的生物治疗靶标 (25)。IL-6 与其他细胞因子, 如 IL-18、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF), 一起被认为是激活 RA 关节固有免疫和获得性免疫的“燃料”。IL-1 受体拮抗剂 (IL-1 receptor antagonist, IL-1Ra)、转化生长因子 β (Transforming Growth Factor β , TGF- β) 则表现出抗炎的作用。同时, RA FLS 还可以产生大量的生长因子、趋化因子、前列腺素、白三烯以及血管内皮生长因子等 (19, 26)。这些因子构成的网络, 在关节内通过自分泌和旁分泌等途径, 活化 FLS 细胞, 继而募集更多的炎性细胞到关节腔内。同时, IL-1 和 TNF- α 等外来的刺激, 在 RA 早期炎症中, 同样能够使 FLS 细胞被激活, 并且 TNF- α 诱发的自毒素在 RA 关节炎模型中至关重要, 利用 TNF- α 转基因小鼠, 在 FLS 细胞中与 TNF- α 刺激相关的自毒素及信号通路很好的被发现 (27)。然而, 细胞外微环境的变化不能够完全阐释 FLS 细胞在 RA 早期炎症中的改变, 体外原代培养的 FLS 能够在传代之后依然保持持续高水平的细胞因子分泌 (18), 上述研究结果表明 FLS 细胞内在的变化和细胞外因素的干预, 共同塑造了 RA FLS 细胞在 RA 炎症中的三大特征。

RA 患者 FLS 细胞病理行为学的改变与 RA FLS 细胞内多种分子及信号通路的变化直接相关。目前, 相当多的研究表明, 大量的信号通路在 RA 中被 FLS 细胞表面的细胞因子受体激活, 特别是那些炎症因子受体和 Toll 样受体。这些受体的活化使 FLS 细胞对 RA 关节炎微环境更为敏感, 同时也使 FLS 细胞对这一微环境做出相应的改变。此外, 这些信号通路被 FLS 细胞所处的 RA 炎性微环境激活后, 同时也被其自身内在的变化所持续激活 (28, 29)。丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) 通路、NF- κ B 通路和细胞凋亡通路被认为是参与调控 RA FLS 细胞侵袭和异常行为的主要信号通路。(图 0-4)

由于可被炎性细胞因子受体和 Toll 样受体激活, MAPK 信号通路是 RA FLS 细胞中研究最多的信号通路。MAPK 通路的细胞信号转导分为三级: 最顶层 MAP3Ks; 中间层 MKKs; 末端层面包含了三类 MAPK, 分别是 ERKs (如 MAPK15)、p38 MAPK (如 MAPK14) 和 JNKs (如 MAPK8 和 MAPK10)。一旦 MKKs 被磷酸化激活, MAPKs 能够将信号从胞浆传递到细胞核内, 继而引发其他重要转录因子的活化

(30)。

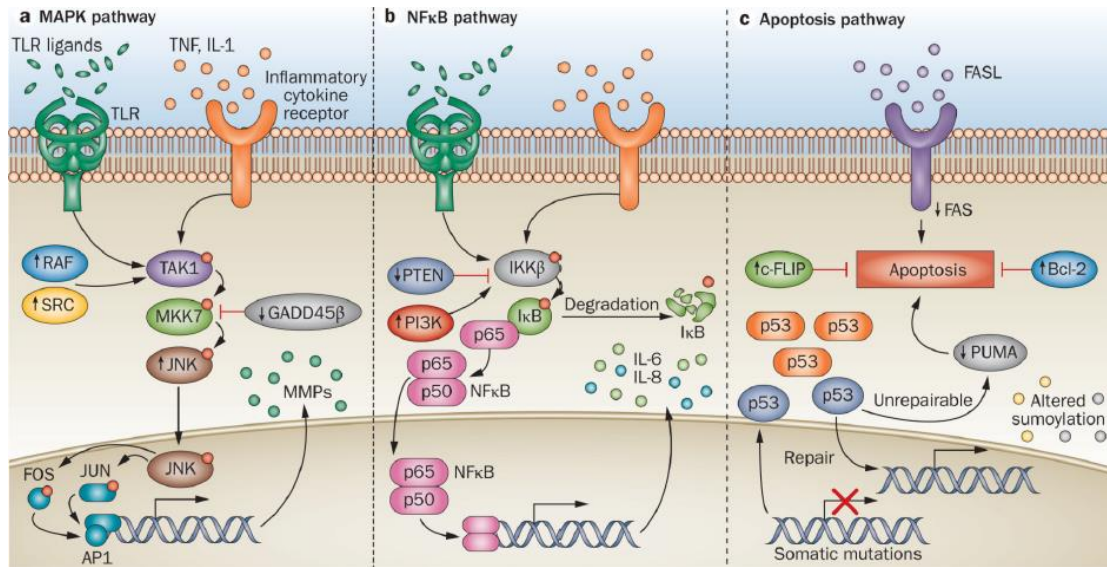


图 0-4 调控 RA FLS 细胞侵袭和异常行为的主要信号通路

(Nat Rev Rheumatol. 2013; 9(1): 24-33.)

转录因子 AP1 是 RA FLS 细胞的 MAPK 通路被活化后激活的重要转录因子之一，它是磷酸化 JUN 和 FOS 亚基的异源二聚体，能够与多种 MMPs 的启动子区结合，直接参与调控 FLS 细胞的侵袭能力。在众多能够磷酸化 JUN 的分子中，JNKs 可能是最高效的。据报道，JNK 的小分子抑制剂 SP600125 能够显著降低大鼠 RA 模型中 MMPs 的水平，并阻止关节破坏 (31)。同时，敲低 MKK7 之后，RA FLS 细胞 JNKs 的活性显著降低，上游能够激活 MKK7-JNK-AP1 轴的是 TAK1 (也被称为 MAP3K7) (32)。

其他在 RA 患者滑膜组织中被活化，并能够介导 FLS 细胞侵袭的是 MAPKs 11-14 (也被称作 p38 MAPK 亚基 β , γ , δ 和 α) (33)。抑制 p38 α 和 p38 β 的活性后，RA FLS 细胞分泌的细胞因子减少(34)，这些激酶的上游被 MKK3、MKK6 和 MKK4 调控 (35, 36)，活性区突变的 MKK3 或 MKK6 可使 FLS 细胞产生的 MMPs 和炎症因子被抑制 (35)。但是出人意料的是，使用 p38 MAPK 抑制剂治疗 RA 时却能够激活巨噬细胞介导的早期炎症反应，并且这一反应压制了 p38 MAPK 抑制剂对 FLS 细胞的影响 (37, 38)。尽管如此，敲除小鼠的 MKK3 或 MKK6，避开使用 p38 MAPK 抑制剂的限制，可以发现对 RA 动物模型具有较好的治疗效果，提示抑制 MKK3 或 MKK6 在以 FLS 细胞为治疗靶细胞的 RA 治疗中，具有一定的潜在价值 (36)。

此外,许多能够促进 RA FLS 细胞 MAPK 通路活化的分子也被大量研究。比如 Src、BRAF 和 RasGRF1 等,这些分子在 RA FLS 细胞中高表达,并呈现活化状态,通过影响 JUN、JNK1 和 JNK2,激活 MAPKs、促进 MMPs 的产生,导致 RA FLS 细胞 MMPs 的水平较 OA FLS 细胞 MMPs 的水平高出许多 (39-43)。GADD45 β 是 MKK7 的天然抑制剂,它在 RA FLS 细胞和 RA 组织中低表达,这使得 RA FLS 细胞中 MKK7 和 JNKs 活性增强,动物模型也表明,GADD45 β 的缺乏,固有免疫和炎症引发的效应更为显著 (44);但是 GADD45 β 的降低却能够缓解胶原诱导的关节炎模型,而这一模型是基于获得性免疫 (45)。因此,MKK7 在小鼠体内的活性,是由效应细胞 (FLS 细胞) 和淋巴细胞间的平衡所决定的。

NF- κ B 信号通路是介导 RA 早期炎性细胞因子过分泌的主要调控途径,它能够被 IL-1、TNF- α 和 Toll 样受体信号激活,在 FLS 细胞中,NF- κ B 的活性依赖于胞浆中 IKK β 的情况,而不是 IKK α (46)。IKK β 活化可导致 I κ B (NF- κ B 抑制因子) 家族磷酸化,I κ B 与胞浆中的 NF- κ B 亚基形成复合物,使其处于未活化状态。I κ B 磷酸化后,能够被蛋白酶体系统识别并降解,使 NF- κ B 处于游离状态,并有机会向细胞核内移动,继而调控下游炎性基因的转录 (47)。通过 IKK β 小分子抑制剂 (48) 或转染活性区突变 I κ B (49),可抑制胞浆中游离的 NF- κ B 产生,这将减少 RA FLS 细胞的活化和恶性增生。

在 RA FLS 众多改变中,促进 NF- κ B 活化的因素同时可引起磷酸肌醇的产生。比如,RA FLS 细胞被炎性因子活化后,PTEN 在滑膜的表达量降低 (50);较 OA 滑膜组织,PI3K δ 这一主要在骨髓来源细胞中高表达的分子,在 RA 滑膜组织中同样也高表达;尽管目前还没有证据表明 PI3K δ 与被 NF- κ B 激活 FLS 细胞相关,但是 PI3K δ 能够影响 FLS 细胞的生存、死亡和增殖等功能 (51)。

IKK ϵ 、TBK1 (TANK 结合激酶 1) 与 IKK α 和 IKK β 同源,但在 FLS 细胞中,它们不仅仅能够使 I κ B 磷酸化的激酶,还能通过使 IRFs(interferon-regulating factors) 磷酸化,如 IRF3 和 IRF7,调控固有免疫对干扰素的相应。IKK ϵ 主要表达于 RA 患者滑膜内层,IKK ϵ 依赖于 JNKs 的活化,使 JUN 磷酸化并诱发 MMPs 的过分泌 (52)。虽然这些是在早期炎症反应中显著的特性,但是在 RA 动物模型中,I 型干扰素可被 FLS 细胞内的 IKK ϵ 或 TBK1 诱导,并抑制早期炎症反应 (53)。基于此,同时抑制或单独抑制 IKK ϵ /TBK1 应该会降低在滑膜中具有保护性作用的 I 型干扰素

水平。此外，小鼠 IRF7 基因缺失后，关节炎模型的发病进程和严重程度明显增加（54）。这一结果同样是上述观点的有力支持。

引起 RA FLS 细胞侵袭性增加和细胞因子过分泌的异常信号通路，一方面能够提高抗凋亡分子的表达水平，如 Bcl-2 在 RA 患者滑液中高表达（16）；另一方面，可以降低或改变凋亡相关受体的活性，如 TNFRSF6（TNF receptor superfamily member 6）（17, 55）和 TNFRSF10A（56）；凋亡减少后，还会诱导 RA 滑膜细胞整合素的产生（57）。此外，本身凋亡相关通路在 RA FLS 细胞中的不足也有文献报道，特别是 p53 通路的异常（58）。细胞损伤后，p53 信号通路引起细胞周期阻滞来进行 DNA 损伤修复，如果损伤过于严重，则会引起细胞凋亡。尽管 p53 蛋白本身在 RA 患者 FLS 细胞及滑膜组织中高表达，但是由于下游分子的突变和功能区的失活，致使 p53 不能诱发 RA FLS 细胞的凋亡（58, 59）。据报道，这种 p53 信号转导的阻滞，能够被上调 PUMA（Bcl-2-binding component 3）逆转（60）。此外，p53 通路失活，不仅能够促进 FLS 细胞的生存，体内和体外实验结果均显示 FLS 细胞的侵袭能力也被加强（23）。

另有文献报道，凋亡相关通路在 RA FLS 细胞中活性不足（61）。FLICE-inhibitory protein (FLIP)通过阻断 Caspase 8 与 FADD 的相互作用，抑制 Fas-介导的凋亡，而 RA FLS 细胞中高表达的 FLIP 可有 TNF- α 诱导产生（61）。

RA FLS 细胞整体蛋白泛素化水平的提高，也被认为是其凋亡减少的重要原因（17）。RA 患者滑膜内层 SUMO-1 表达水平较高（62），而 RA FLS 细胞中 SENP1（用于移除 SUMO-1 的酶）的表达水平较高（63）。与 p53 通路的异常类似，RA FLS 细胞泛素化水平的升高，不仅能够对抗细胞凋亡，还能够通过促进 MMP-1 的表达，加剧 FLS 细胞的侵袭（63）。

FLS 细胞在 RA 病理进程中具有双重功能。一方面能够通过炎症微环境产生免疫应答；另一方面还能够依赖较强的侵袭能力和抗凋亡能力，加剧滑膜恶性增生，参与对软骨、骨的损伤。通过抑制免疫反应，FLS 细胞的效应功能可以部分的被 RA 现有的治疗药物阻断。可以预见在不久的将来，联合治疗药物（调节免疫+调节 FLS 细胞功能）会成为 RA 治疗的新方向，通过使用一些靶向性药物，联合治疗的优势将比现有的单纯免疫治疗更有利于保护患者的关节功能（64）。

二、DDR2 与 RA

盘状结构域受体 2 (Discoindin Domain Receptor 2, DDR2) 是一个酪氨酸蛋白激酶受体 (其配体为 II 型胶原, Collagen II), 于 1993 年被 Johnson 等人在筛选乳腺癌细胞中异常表达的受体酪氨酸激酶 (Receptor Tyrosine Kinase, RTKs) 时发现 (65)。RTKs 是最大的一类酶联受体, 属单次跨膜受体家族, 大都由多样的胞外配体结合结构域 (与配体进行识别) 和保守的胞内激酶结构域 (介导下游信号转导) 构成, 配体与其结合后, 可通过其胞内的激酶区结构域, 将这一信号向下游转导, 通过级联放大调控细胞的相关生物学功能。DDR2 具有典型的 RTKs 结构: 分别由胞内激酶结构域 (Kinase Domain)、跨膜结构域 (Transmembrane Domain) 和胞外配体结合结构域三个结构域组成 (66, 67)。整个胞外区的功能就是与其配体的识别和结合, 并在结合后发生二聚化, 将信号向胞内激酶结构域传递。(图 0-5)

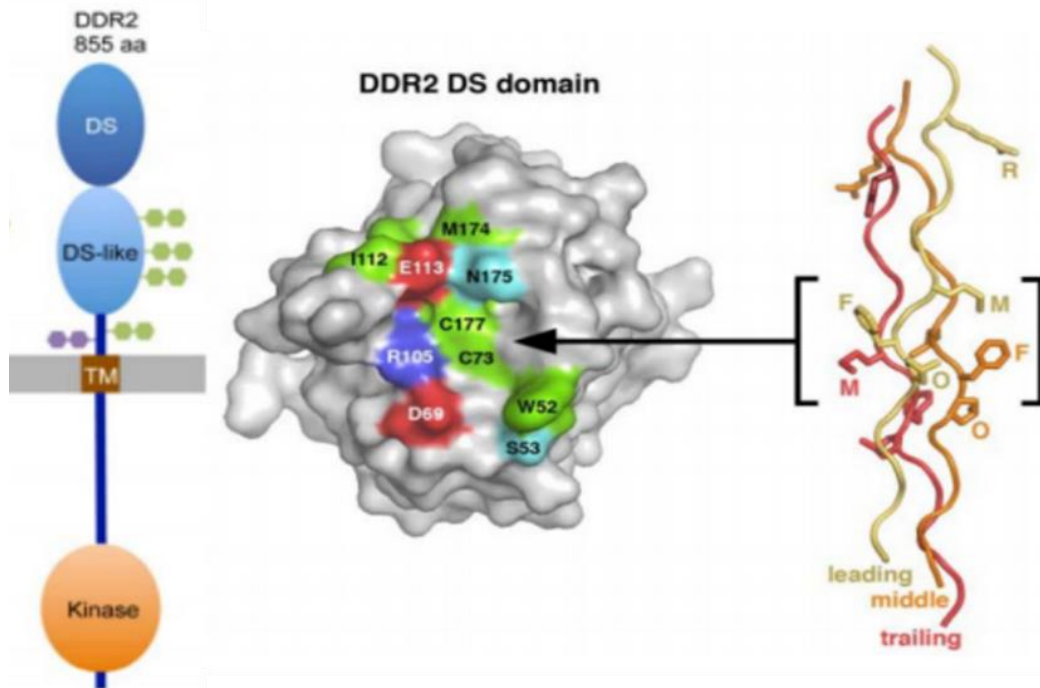


图 0-5 DDR2 的结构及与胶原的结合模拟 (*J Biol Chem.* 2008; 83(11):6861-8)

近期的研究表明: 在不同的细胞背景和疾病病理条件下, DDR2 介导的下游信号通路具有极大的差异。比如, 在正常生理条件下, 乳腺上皮细胞和平滑肌细胞中, DDR2 可激活 ERK1/2 通路, 介导进一步的下游信号活化 (68, 69); 在胰腺癌细胞中, DDR2 则是通过影响 JNK 的活性, 调节下游信号 (70); 在成骨细胞分化过程中, DDR2 能够通过 p38/MAPK 通路对成骨相关转录因子 Runx2 调节, 影响成骨细胞分化与软骨细胞发育 (71); 在乳腺癌细胞中, DDR2 可促进 EMT 驱动因子 SNAIL1

的稳定，并进一步促进体内乳腺癌细胞的侵袭和转移 (72, 73)。(图 0-6)

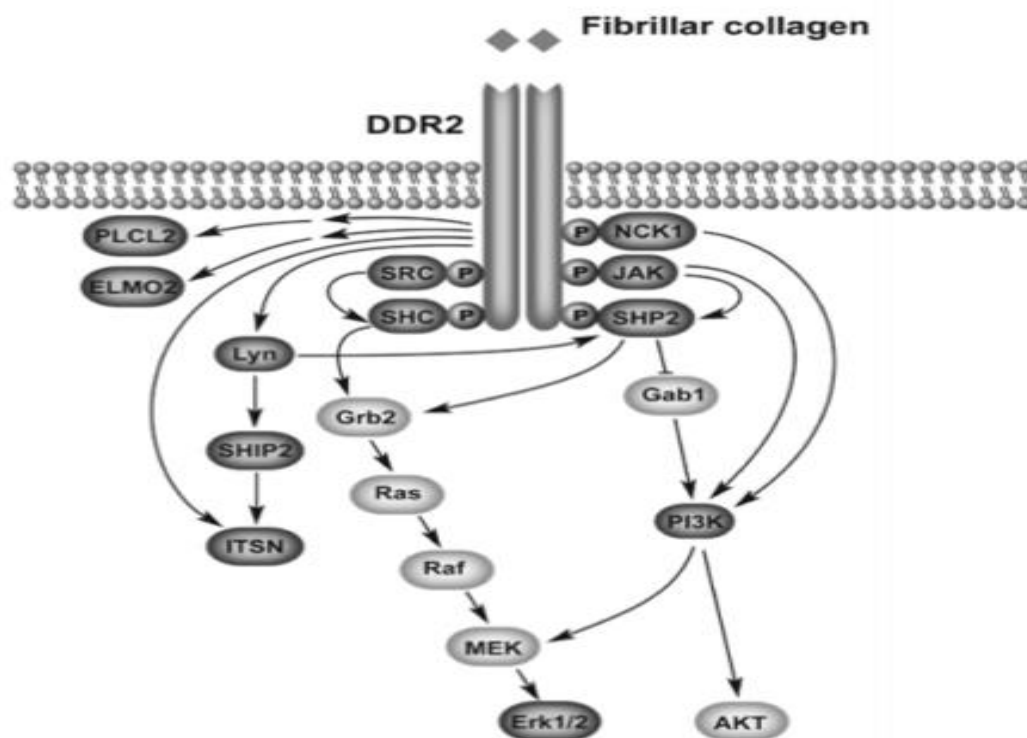


图 0-6 DDR2 介导的信号通路 (*J Thorac Oncol.* 2014; 9(6): 900-4)

目前针对 DDR2 在 RA 中的信号转导通路研究所知甚少，对其在细胞中的功能及在一些病理过程中的作用认识也十分有限。

1999 年我校基础医学部生物化学与分子生物学教研室王吉村博士首次通过差异筛选的方法发现，DDR2 在 RA 滑膜组织和 FLS 细胞中呈高表达 (74)，在此基础上，多年来课题组围绕 DDR2 在 RA 中晚期关节软骨损伤进程中的功能与机制已经进行了一系列的研究，并在国际上首次提出并证实了 DDR2 在 RA FLS 细胞介导的 RA 关节软骨损伤进程中发挥的重要作用。主要包括：① DDR2 在 RA 滑膜细胞中表达升高，并且呈持续活化状态，II 型胶原是其主要配体；② 利用免疫共沉淀结合质谱分析技术获得了能够与 DDR2 相互作用的分子钙依赖性磷脂结合蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2)；③ 在国际上创新性地提出并证实了 Collage II-DDR2-Annexin A2-MMP-13-Collage II 环路在介导 RA 关节软骨破坏中发挥的重要作用；④ 利用 DDR2(-/-)突变小鼠 CIA 模型，对上述环路的功能及调控机制进行了系统验证；同时，Annexin A2 干扰腺病毒能够显著缓解模型动物的关节软骨损伤。相关研究成果已发表在诸多国际期刊上 (75-79)。

尽管我们创新性的提出并证实了 DDR2 在 RA 关节邻近骨、软骨损伤中的重要作用,并初步对上述作用的机制进行了研究,提示 DDR2 具有很好的药用靶标前景。但我们之前主要围绕受 DDR2 活化影响的 MMP1、MMP13 等 MMPs 类分子及其调控机制开展了研究。RA 炎症反应能够募集大量的免疫细胞,在关节腔内蓄积了高浓度的各类细胞因子及炎症因子,使得 RA 炎症诱发的骨重塑病理进程十分复杂。RA 病理条件下,FLS 细胞功能的改变对“成骨-破骨平衡”的影响意义重大,DDR2 在“成骨-破骨平衡”中的作用及调控机制仍有待于进一步阐明。

三、microRNA (miRNAs)与成纤维细胞样滑膜细胞

microRNAs (miRNAs) 是一类具有基因表达调控功能的非编码 RNA,能够特异性识别编码基因的 3' UTR 区而调控靶基因的表达。单个 miRNA 分子可以识别数个靶基因,而每个靶基因也可以同时被众多 miRNA 分子识别。因此,miRNA 分子可以通过“一对多”和“多对一”识别并精细调控 80% 以上的人类基因并参与生命过程中一系列的重要进程 (80-83)。近年来的研究表明,miRNAs 广泛参与了 RA 的发生、发展,与 RA 炎症环境和关节软骨破坏关系密切 (84)。

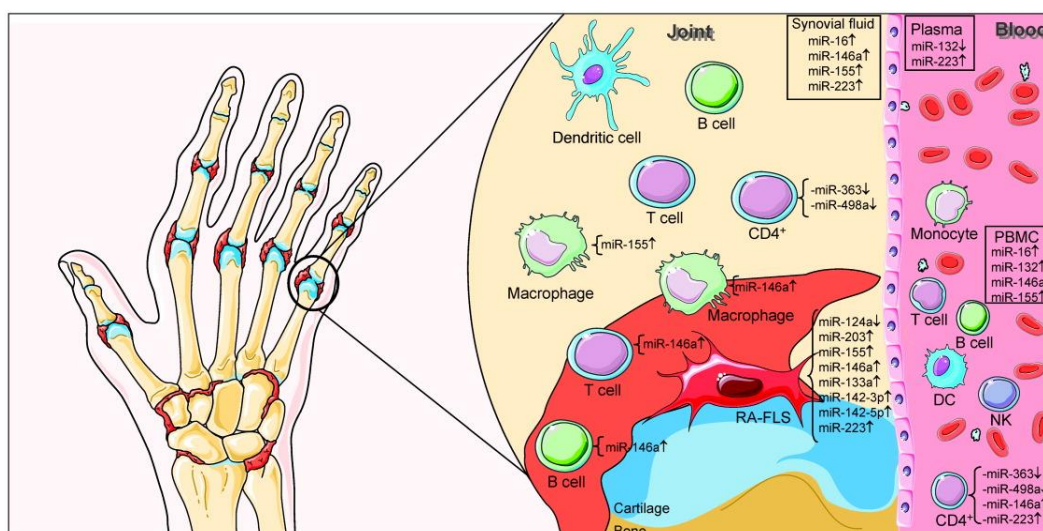


图 0-7 RA 中异常表达 miRNAs 的组织分布情况

(*Arthritis Rheum.* 2012; 64(1): 11-20)

2007 年在一项关于 RA 患者血清学研究的的文章中,作者发现 miRNAs 可能在 RA 病理进程中扮演一定的角色 (85),这是最早的关于 RA 中 miRNAs 的研究。随后的三篇文章表明,一些 miRNAs (miR-16、miR-132、miR-146a 和 miR-155) 在 RA 患者循环系统 (86) 或关节滑膜组织中异常表达 (87, 88)。从那之后,许多与

RA 相关的 miRNAs 被发现 (89)。(图 0-7, 图 0-8)

在众多与 RA 相关的 miRNAs 当中, miR-146a 和 miR-155 是最早被研究的。因为, miR-146a 和 miR-155 被认为参与了固有免疫细胞和获得性免疫细胞的发育, 并且在许多炎症环境和微生物组分刺激下表达量会升高。同时, 许多免疫介导的疾病中, miR-146a 和 miR-155 同样也呈现高表达 (90, 91)。miR-155 在 RA FLS 细胞中呈现持续高表达, 并且受 TNF- α 诱导影响 (92)。除了促炎症作用外, miR-155 还可以通过调节 MMP1 和 MMP3 影响 RA FLS 细胞破坏软骨的能力 (88, 92)。尽管与预期的结果类似, 炎症反应对 miR-155 缺失鼠的影响降低, 但 miR-155 的缺失对组织破坏的影响却没有明显的改善 (93, 94)。有趣的是, miR-146a 在 RA FLS 细胞中也高表达, 受 LPS 和 IL-1 β 诱导影响 (88), 但是大量研究结果显示 miR-146a 是一个针对免疫细胞的炎症负向调控因子 (95)。这一明显的矛盾可能是由于 miRNAs 的功能存在细胞类型的差异, miR-146a 在免疫细胞中的功能不能简单的移植到 FLS 细胞中, 另外, 由于 miR-146a 在 RA FLS 细胞中的靶基因和功能尚不明确, 因此其对 FLS 细胞的影响还不得而知。

miR-203、miR-221、miR-222 和 miR-323-3p 也在 RA FLS 细胞中高表达 (96, 97)。这与在肿瘤研究中的发现相符, miR-203 能够促进黑色素瘤细胞的增殖和侵袭能力 (98); miR-221 和 miR-222 能够促进转移肿瘤细胞的迁移 (99, 100)。下调 miR-221 能引起 RA FLS 细胞凋亡、抑制炎性因子的表达, 同时还能降低 FLS 细胞的迁移和侵袭能力 (101)。上述发现提示在 RA FLS 细胞中存在 miRNAs 的调控网络, 直接参与了 RA FLS 细胞的各项病理功能改变。

miR-22、miR-34a、miR-124a、miR-152 和 miR-375 在 RA FLS 细胞中低表达。野生型 p53 能够与 MIR-22 的启动子区结合, 促进其转录, 继而抑制 CYR61 的表达, CYR61 能够调控一些血管生成、炎症及基质重塑基因的表达 (102); 同时, 通过自分泌或旁分泌的形式, CYR61 可参与对 miR-22 的抑制, 促进血管翳的生成, 形成一条恶性环路 (103)。RA FLS 细胞持续的恶性增殖, 与高表达的 XIAP、CDK2 和 MCP1 有关, 而上述分子又是 miR-34 和 miR-124a 的靶基因 (104, 105)。与肿瘤中的研究类似, 与健康人样品对比, 大多数 RA 患者的 MIR124A 基因启动子发生了甲基化。miR-152 和 miR-375 在 FLS 细胞中的低表达, 可以通过 DNMT1 和 FZD8 基因激活 Wnt 信号通路 (106-108)。

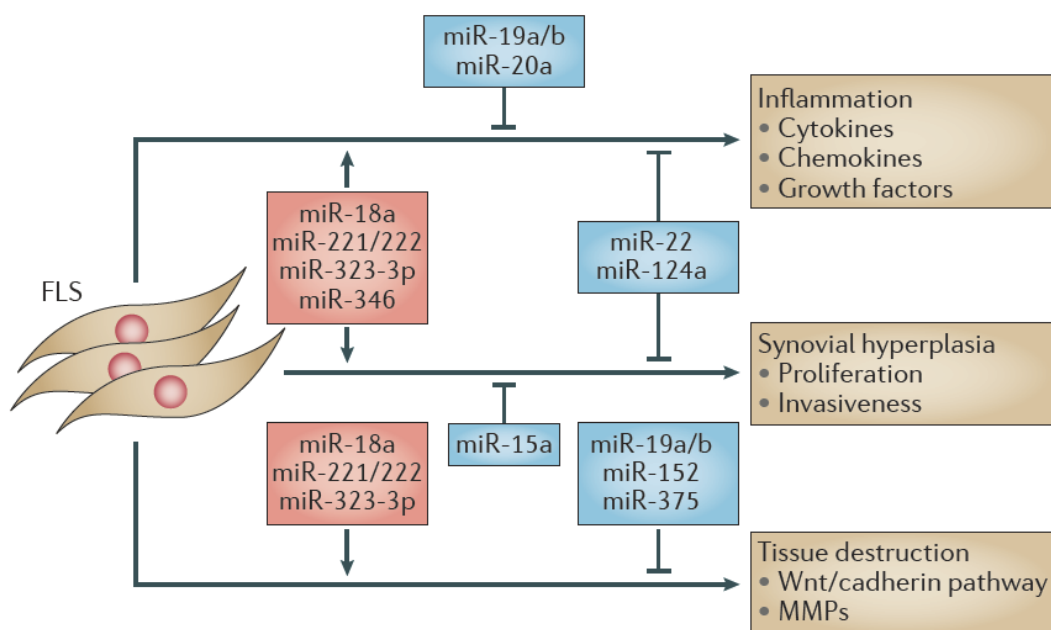


图 0-8 参与影响 RA FLS 细胞病理改变的 miRNAs

(*Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(4):211-20.)

miR-17-92 家族是一个全局性凋亡调节子，因此许多研究团队都发现这一家族中的 miRNAs 在 RA 病理进程中发生了改变。然而，这一家族 miRNAs 在 RA FLS 细胞的病理改变进程中却不是发挥协同作用的 (109)。比如 miR-18a 在 FLS 细胞中高表达，miR-19a/b、miR-20a 和 miR-30a-3p 却低表达。炎症诱导的 miR-18a 通过 NF- κ B 通路参与软骨损伤和关节慢性炎症，同时 miR-18a 又能通过抑制 TNFAIP3，进一步活化 NF- κ B，加剧炎症反应，形成一条正反馈调节环路 (110)。相反地，炎症反应能够通过 Toll 样受体 2 (TLR2) 和 4 (TLR4) 降低 miR-19a/b 的表达，下调的 miR-19a/b 又能负向调控 TLR2，导致 IL-6 和 MMP3 分泌水平的升高 (111)。RA FLS 细胞中下调的 miR-20a 和 miR-30a-3p 能够分别上调它们的靶基因 MAP3K5 和 TNFSF13B，创造出一个有利于 T 细胞和 B 细胞生存的微环境 (112, 113)。

四、miRNAs 在 RA 炎症反应及相关细胞因子调控中的作用

在 RA 的发生、发展进程中，有一张极其复杂的细胞因子调控网络，直接参与并影响整个 RA 的病理进程。广泛的细胞因子通路通过控制炎症反应进程，直接控制 RA 的病理进程。从目前的研究来看，许多分泌型的细胞因子及与它们表达有关的基因，均能够被 miRNAs 广泛调控。(图 0-9)

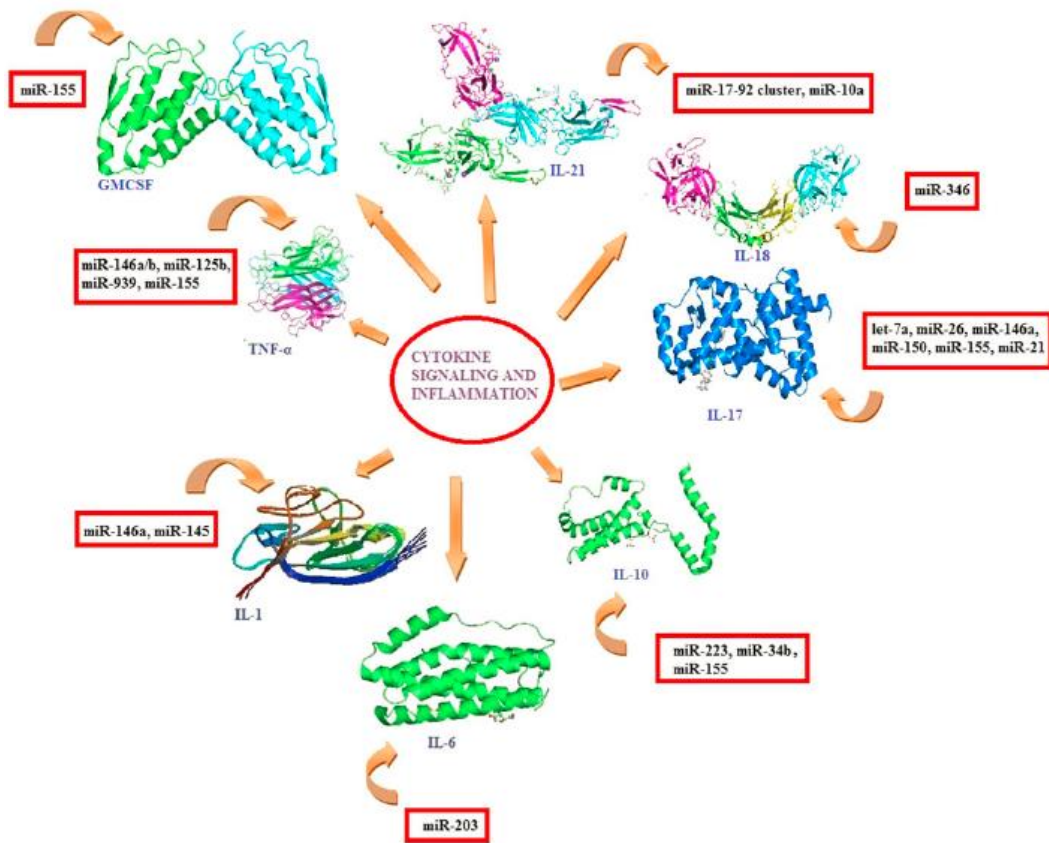


图 0-9 已报道的在 RA 中受 miRNAs 调控的细胞因子网络

(*Med Res Rev.* 2016; 36(3): 425-39.)

更确切的讲，miRNAs 能够参与 RA 全过程（早期、急性期和晚期）的细胞因子调控，并且这种调控方式还是以“时期特异性”的方式进行的（114）。(图 0-10)

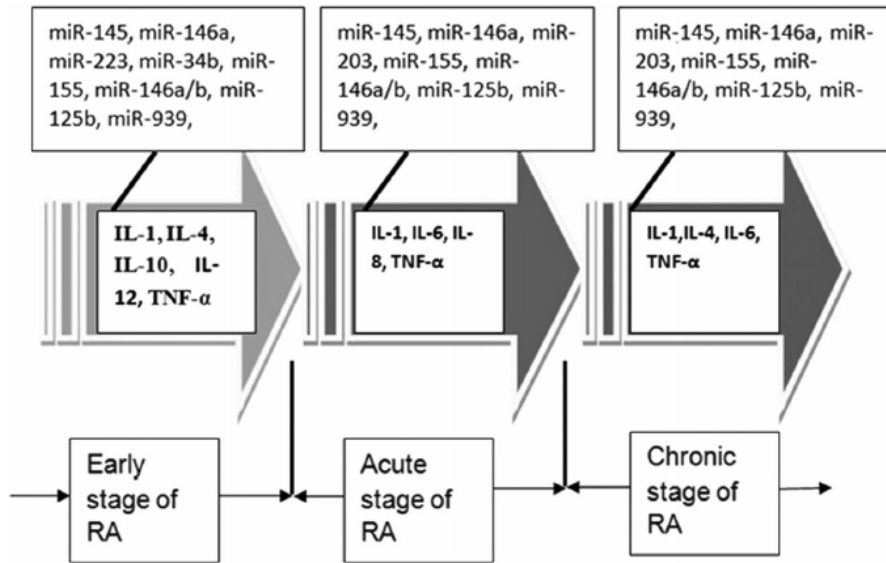


图 0-10 miRNAs 对 RA 相关细胞因子的调控具有“时期特异性”

(*Med Res Rev.* 2016; 36(3): 425-39.)

1. TNF- α

TNF- α 是一个十分具有影响力的细胞因子, 能够激活很多类型的细胞。它以可溶型的方式被多种细胞分泌至胞外 (如单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、T 细胞和成纤维细胞等), 并含有三种完全相同的亚基。众所周知, 新合成的或前体形式的 TNF- α 是一种膜结合蛋白, 需要丝氨酸金属蛋白酶对其膜结合区进行切割。这一切割过程使得 TNF- α 变成可溶的形式, 并顺利分泌至胞外 (115)。在 RA 中, 持续高水平的分泌型 TNF- α , 被认为是促进炎症反应的罪魁祸首。因此 Li P 和 Schwarz EM 构建了 TNF- α 转基因鼠关节炎模型, 并以此模型研究 TNF- α 在关节炎中的作用(116)。据报道, 许多 miRNAs 直接参与了 RA 中 TNF- α 的表达调控。Abou-Zeid A 等人的研究表明, 较 OA 患者, miR-146a 在 RA 患者中显著升高, 并且与 TNF- α 的水平呈正相关 (117)。同时, Nakasa T 等人发现, 成熟形式的 miR-146a 和 miR-146a/b 前体均在 RA 滑膜组织中高表达, 并且这种变化在 TNF- α 和 IL-1 β 刺激后的 FLS 细胞张尤为明显 (87)。除此之外, miR-346 也被认为参与维持 TNF- α 的释放和其 mRNA 的稳定性; LPS 刺激 RA FLS 细胞后, miR-125b 和 miR-939 表达升高, 并能够直接作用于 TNF- α mRNA 的 3' UTR 区, 但并不影响成熟 TNF- α 的表达 (118)。通过对 RA 患者外周血细胞中 miR-146a、miR-155、miR-132、miR-16 及 let-7a 等 miRNAs 的研究, Pauley KM 等人发现 miR-146a 在 TNF- α 产物的调控中十分重要 (86)。以 miR-155 的表达和 RA 中高水平 TNF- α 、IL-1 β 的关系为切入点, Li X 等人认为 miR-155 通过抑制 SOCS1, 能够上调 TNF- α 和 IL-1 β 的水平 (119)。

2. IL-1

IL-1 家族是于 20 世纪 40 年代早期被发现的重要早期炎症因子之一, 具有极强的趋化因子、炎性反应蛋白、黏附分子及其他细胞因子诱导效果。在众多 IL-1 家族成员中, IL-1 α 和 IL-1 β 是最主要的成员。事实上, IL-1 也是以 IL-1 α 和 IL-1 β 集合形式发挥功能的 (120)。IL-1 α 和 IL-1 β 介导的细胞因子和调控机制要比 TNF- α 复杂的多, 但是, 它们是通过细胞膜表面的受体介导信号转导的。Kuno K 和 Matsushima K 发现了 IL-1 家族在 RA 病理进程中的作用(121), 同时 IL-1 β 的合成被认为与 IL-1 α 有关。此外, 在固有免疫细胞中, IL-1 β 的生物学活性与 NF- κ B 通路相关, IL-1 β 发挥固有免疫和炎症“发动者”的作用 (122)。基于上述观点, IL-1 β 在 RA 病理进程中具有广泛的作用。在 IL-1 α 和 IL-1 β 当中, 许多研究发现 miRNAs 参与了 RA IL-1 β

的表达调控。miR-146a/b 控制着 TNF- α 诱导后的 RA FLS 细胞中 IL-1 β 的水平(87)。miR-146a 高表达不仅仅存在于 RA 的发病进程中, 同样也存在与其他骨相关疾病, 如 OA。基于此, 研究者用 IL-1 β 刺激软骨细胞后, miR-146a 的水平显著升高(123); 同时, 在其他由炎症介导的骨疾病当中, 也可以看到 IL-1 β 受 miR-146a 调控的报道。比如, 软骨细胞中, 低表达的 miR-101 能够阻止 IL-1 β 诱导的细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 降解; 同时, miR-145 可以通过靶向 Smad 3, 这一在维持软骨细胞平衡中至关重要的转录因子, 影响 IL-1 β 诱导的 ECM 降解(124, 125)。

3. IL-6

IL-6 是由单核细胞、巨噬细胞、T 细胞和 FLS 细胞分泌的多效性炎性细胞因子, 是调节一些免疫功能所必需的。IL-6 在 RA 患者的血清中呈现高水平的丰度, 在 RA 这一炎症反向性异常的疾病中, 常常诱发“细胞因子风暴”(126)。据报道, miRNAs 能够影响不同的炎症条件下 IL-6 的表达, 当然也包含 RA 的炎症反应。Stanczyk J 等人发现, RA 中上调的 miR-203 通过 NF- κ B 通路, 直接影响 MMP1 和 IL-6 的表达水平(96)。然而, 除了这篇文章之外, 在 RA 中, 目前还没有 miRNAs 直接影响 IL-6 的报道。考虑到 IL-6 在 RA 炎症反应中的重要作用, 未来关于 miRNAs 在 IL-6 诱导的炎性环境中的调控机制研究应该会有很多。

4. IL-10

IL-10 是一个分子量为 37kDa 的同源二聚体, 可以在 RA 患者滑膜组织中被检测到, 主要由巨噬细胞、单核细胞、B 细胞和 T 细胞产生。IL-10 的首要生物学功能是限制和阻滞早期炎症因子的产生, 阻止免疫细胞, 如中性粒细胞、单核/巨噬细胞以及树突状细胞的抗原呈递。因此, 重组 IL-10 被用来治疗 RA(127)。注射重组 IL-10 后, RA 患者并没有呈现良好的治疗效果, 同时也没有发现明显的不良反应。进一步的临床试验结果令人沮丧, 重组 IL-10 带给 RA 患者的主要是一些边缘效应, 并没有显著的改善病情的疗效。目前, IL-10 治疗与抗 TNF- α 治疗联合, 以期能够有更好的缓解 RA 病理改变的效果(128, 129)。miRNAs 对 IL-10 的影响已有很多文献报道。miR-223 能够下调 RA 患者 T 细胞中, IGF-1 介导的 IL-10 表达; miR-223 和 miR-34b 在 RA 患者 T 细胞中高表达, 但只有 miR-223 与类风湿因子的水平呈正相关, 基于此, 研究人员认为 RA 患者 T 细胞中 miRNAs 的异常水平与 RA 的病理进程有关(130)。此外, miR-155 在炎性基本中呈现异常的高表达, Quinn

SR 等人的研究发现 Ets2 能够增强 miR-155 启动子的转录活性，并且这一作用主要发生在 LPS 诱发的 miR-155 异常表达中，进一步的研究发现 IL-10 能够抑制 LPS 诱发的 Ets2 mRNA 和蛋白表达的升高（131）。

5. IL-17

IL-17 家族是由 CD4⁺ T 细胞产生的早期炎症细胞因子家族，这一细胞因子家族包含了 6 个成员，其中 IL-17A 和 IL-17F 的生物学功能及其在早期炎症反应中的相应被大量研究（132）。研究显示，IL-17 能够被多种细胞因子诱导表达，如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、G-CSF、TGF- β 等。在 RA 中，已有一些 miRNAs 与 IL-17 的文献研究。Niimoto T 等人的研究发现，在产生 IL-17 的 T 细胞中，let-7a、miR-26、miR-146a/b、miR-150 和 miR-155 这六种 miRNAs 表达升高，其中 miR-146a 在 RA 患者增生的滑膜组织中高表达，并在表达高水平 IL-17 的患者均呈现较严重的 RA 病理改变（133）。据此，可以认为 IL-17 在炎性自身免疫性疾病中具有重要作用。另外一项发表在 *Nature Medicine* 杂志上的研究也表明，IL-17 通过抑制 miR-23b 的表达，支撑自身免疫性疾病的病理改变（134）。在 RA 中，低表达的 miR-21 还被认为与 IL-17、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等早期炎症因子的表达相关（135）。

6. IL-18

IL-18 是 IL-1 细胞因子超家族的一员，是一个早期炎症细胞因子，在固有免疫和获得性免疫反应的调控中具有重要作用。它常常在自身免疫性疾病的慢性炎症中高表达（136）。所以，高表达水平的 IL-18 能够在 RA 患者滑膜中检测到，并贯穿整个炎症周期，能够调控 IL-18 的 miRNAs 亦有许多研究。近期，Alsaleh G 等人发现，在 LPS 刺激后的 RA FLS 细胞中，miR-346 可以通过调控布鲁顿氏酪氨酸激酶，继而影响 IL-18 的表达（137）。

7. IL-21

IL-21 能够调控许多免疫细胞，如 NK 细胞，并维持 CD8⁺ 记忆 T 细胞在一定数量，同时，在体液免疫应答中，IL-21 控制着 B 细胞活化、分化和死亡，并能够激活 Th17 细胞。过量的 IL-21 与许多自身免疫性疾病有关。滤泡辅助性 T 细胞 (TFH) 在一些自身免疫性疾病中被激活，区别在于 IL-6 和 IL-21 介导的 STAT 信号通路，加之 IL-6 和 IL-21 还能够调节 Bcl-6 的表达。现有研究表明，miR-17-92 簇能够影响 Bcl-6 表达和 TFH 细胞的分化，但是，miR-10a 能够负向调控 T 细胞中的 Bcl-6

表达 (138)。

8. 粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF)

GM-CSF 是 T 细胞、巨噬细胞、NK 细胞和内皮细胞产生的早期炎症因子, 也被称为造血生长因子, 用于激活外周血单核细胞和粒细胞。GM-CSF 在 RA 的炎症反应发展中亦十分重要 (138)。有研究表明, 通过 Mir155^{-/-}小鼠的在体试验发现, 在自身免疫疾病条件下, miR-155 能够上调 GM-CSF 衍生的树突状细胞, 并具有促进炎症因子产生的功能 (139)。miR-155 也因此有望成为调控自身免疫性疾病的一个治疗靶点。

综上, 现有研究结果表明, miRNAs 介导的调控网络, 在 RA 的发生、发展进程中意义重大, 被发现的许多 miRNAs 已经被证实在 RA 相关的细胞因子调控及炎症反应调控中具有重要作用。但是, 针对 RA 相关 miRNAs 的研究仍处于初期阶段, 有太多没有解决的问题需要阐明。好的方面是, miRNAs 在患者的血液和尿液中具有稳定的稳定性, 这使得 miRNAs 成为潜在的 RA 分子标志。然而, 一个 miRNA 能够靶向调控多个基因, 它们可以是在病理进程中具有重要作用的分子, 也可以是引起其它副反应的效应分子。或许在不远的将来, miRNA 会先成为用于诊断 RA 的分子标志。

五、IL-15 在 RA 病理进程中的作用

IL-15 是一个 14-15kDa 的糖蛋白, 它的成熟体包含了 114 个氨基酸, 属于含有 4 个 α 螺旋的细胞因子家族, 其中包括 IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、G-CSF 和 GM-CSF 等。IL-15 以两种亚基的形式存在, 一种是包含有 21 个氨基酸的短信号肽, 主要分布于胞质和胞核, 不能分泌; 另一种是包含了 44 个氨基酸的长信号肽, 分布于内质网和高尔基体, 能够分泌 (140)。

IL-15 具有刺激 CD4⁺CD8⁺、CD4⁻CD8⁻ T 细胞增殖和维持 CD8⁺CD44^{hi} 记忆 T 细胞的功能 (141)。IL-15 还能够促进 Th17 和 Th1 细胞增殖, 这在许多自身免疫性疾病中对 IL-17 和 IFN- γ 的产生十分重要 (142, 143)。此外, IL-15 抑制 B 细胞增殖, 并在调节巨噬细胞成熟中至关重要。它不仅能够增强巨噬细胞的吞噬活性, 还能诱导 IL-1、TNF- α 、MCP-1 和 IL-8 的产生 (144)。同时, IL-15 对 NK 细胞和树突状细胞也有影响。它对 NK 细胞的生存、活性及功能活性也很重要 (145); 并通过上

调共刺激因子和 $\text{IFN-}\gamma$ ，活化 CD8^+ 细胞和 NK 细胞，继而增强树突状细胞功能 (146, 147)。IL-15 亦可通过影响肥大细胞增殖，增强中性粒细胞的吞噬、抑制其凋亡 (146)。(图 0-11)

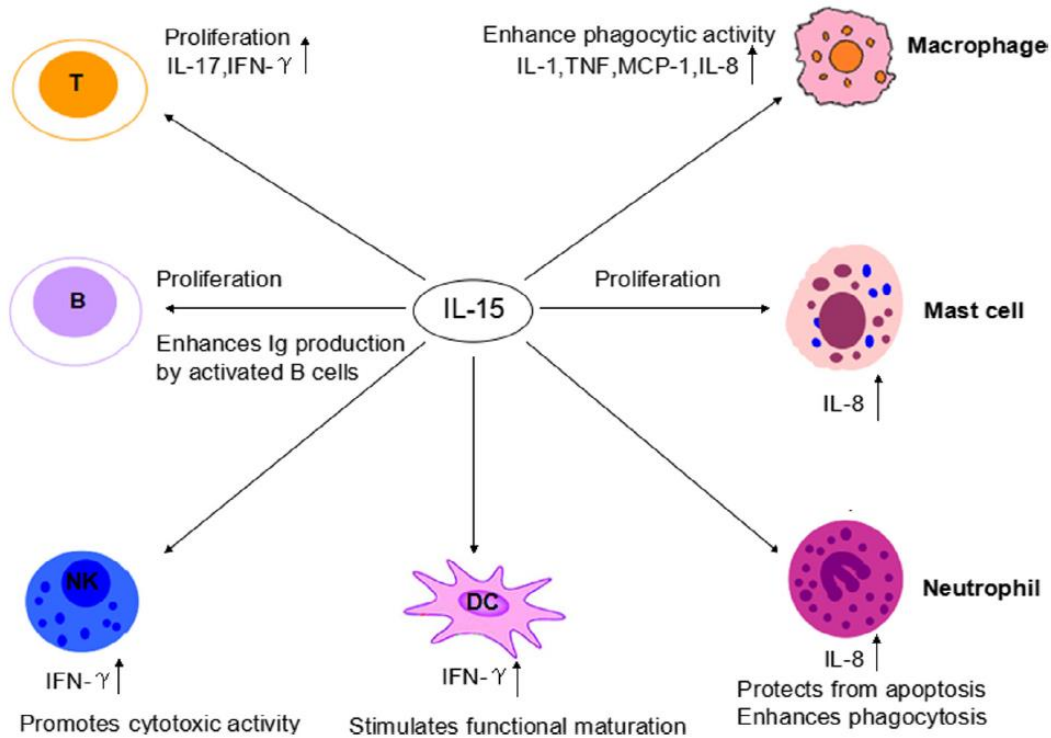


图 0-11 IL-15 在免疫系统中的生物学功能

(*Hum Immunol.* 2015;76(11):812-8.)

据报道，IL-15 在 RA 滑膜组织和患者血清中的水平较高，并与 RA 的活动程度密切相关 (148, 149)。尽管目前 RA 的病理机制尚不十分清楚，但 T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞、肥大细胞、滑膜细胞和粒细胞等均被发现在 RA 的病理进程中具有一定的功能，其中 T 细胞对 RA 炎症反应的影响尤为突出 (150)。

高水平的 IL-15 能够诱导 T 细胞活化和增殖，这很可能是 IL-15 在 RA 病程中的关键作用。在小鼠动物模型中，皮下注射 IL-15 可诱发注射部位产生炎性渗透，并引起 T 淋巴细胞聚集 (148)。同时，在移植了 RA 滑膜组织的严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠体内，注射 IL-15 会诱发大量的 T 细胞聚集 (151)。由 IL-15 缺陷鼠/IL-15 转基因鼠来源的单核细胞/巨噬细胞被用于进行 CD4^+ T 细胞增殖试验，结果显示， CD4^+ T 细胞的增殖依赖于单核细胞/巨噬细胞分泌的 IL-15 (152)。

目前，对于骨髓在 RA T 细胞活化和增殖中作用的研究数量十分有限。RA 患者骨髓含有的 CD3^+ T 细胞的数量是 OA 患者骨髓中的 2 倍， CD3^+ CD4^+ : CD3^+ CD8^+ 比值

在 RA 患者骨髓中升高,提示 CD3 CD4 细胞聚集。RA 患者的 T 细胞较 OA 患者 T 细胞会表达更高水平的早期炎性因子;与 OA 患者相比,高水平的 IL-15 同样可以在 RA 患者骨髓来源的血清中检测到。尽管体外试验表明,IL-15 可同时诱导 CD3 CD4 和 CD3 CD8 细胞的增殖,但 RA 患者来源的 CD3 CD4 细胞的增殖指数仍高于 OA 患者来源的该型细胞。上述结果提示 RA 患者体内高水平的 IL-15 可作为 T 细胞的活化剂和促增殖引物 (153)。

CRB-15 是一种 IL-15 Fc 融合蛋白,在胶原诱导的关节炎模型(Collagen-Induced Arthritis, CIA)中,可以与 IL-15 受体(IL-15R)结合,但不激活细胞内下游的信号转导。进一步的研究表明,CRB-15 不仅能够缓解滑膜炎症、骨和软骨损伤,还能够降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 等炎性细胞因子的水平,并降低自体反应 T 细胞的免疫应答(154)。给予 DBA/1 小鼠 IL-15R α 注射后, CIA 模型组血清中 IL-6、IFN- γ 的水平,较未注射组低(155)。在大鼠佐剂诱导的关节炎模型中,IL-15R β 的 siRNA 可减少模型动物 TNF- α 和 IL-1 β 的水平,并降低 MMP3 的转录,继而环境软骨和骨的损伤(156)。总所周知, TNF- α 是 RA 炎症反应早期出现的重要细胞因子,但 IL-15 可能比 TNF- α 出现的还要早;同时, TNF- α 可刺激滑膜细胞产生可溶性的 IL-15(157),而 IL-15 可以诱导巨噬细胞以细胞-细胞接触的方式产生 TNF- α (158);抑制佐剂诱导的关节炎大鼠模型中 IL-15R 表达后,炎性细胞因子的表达水平显著下降,其中包括 TNF- α 的水平(159)。与野生型小鼠相比,IL-15R α -/-小鼠的 IFN- γ 和 IL-17 产物的水平显著下降(160),Andersson AK 等利用抗体中和 IL-15 后,体外培养的滑膜细胞 TNF- α 水平下降了 51%, IL-6 下降了 37%, IL-1 β 下降了 82% (161)。这一结果进一步验证了 IL-15 在 RA 早期炎症反应中的作用。

除此之外,在 RA 发生、发展的进程中,IL-15 与其他炎性细胞因子一起,还可以诱发不可逆的慢性关节损伤。

RA 滑膜炎症反应可以募集大量的单核细胞和巨噬细胞,构成了 RA 滑膜组织中破骨细胞的主要来源。最新的研究表明 RA FLS 细胞在 RA 破骨细胞形成的过程中扮演了“营养细胞”的角色(162, 163), RA FLS 与外周血单核细胞(PBMCs)共培养,可诱导 PBMCs 分化成破骨细胞(164, 165)。上述结果提示, RA FLS 细胞的分泌产物加速了关节微环境中破骨细胞的生成。而 IL-15 是一个多效性促炎症细胞因子,另有文献报道, RA FLS 分泌产生的 IL-15 可促进诱导单核细胞向破骨细胞的分化,进而加剧 RA 关节邻近骨、软骨的损伤(166, 167)。

正 文

第一部分 NF- κ B/YY1/miR-10a 正反馈环路在 FLS 细胞介导的 RA 滑膜炎症中的作用及机制

引 言

类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 是一种全身性自身免疫病, 主要以慢性、进行性、侵袭性、致残性关节病变为临床表现。随病情的发展, 关节的炎症反应会导致关节软骨、邻近骨损伤的发生, 最终造成关节畸形和功能完全丧失, 严重影响患者的生活质量, 具有极高的致残率。现有研究表明: RA FLS 细胞增生形成的并攀爬于关节邻近骨、软骨表面的血管翳是 RA 关节邻近骨、软骨损伤的结构基础, 滑膜组织中大量存在的胶原酶和蛋白酶类物质是造成 RA 关节邻近骨、软骨破坏的物质基础。成纤维细胞样滑膜细胞是滑膜组织的主要组成部分, 在 RA 病理进程中, RA FLS 可产生大量的炎症因子及蛋白酶类物质, 直接参与了 RA 滑膜增生和中晚期的关节软骨破坏, 因此发现并解析调控 RA FLS 功能发挥的关键分子和信号通路, 对进一步阐明 RA 的致病机制意义重大。

miR-10a 是我们前期利用 miRNA 芯片筛选, 并经实时定量 PCR 实验验证在 RA 滑膜组织中低表达的 miRNAs 之一; 同时, 体外培养的 RA FLS 细胞在 TNF- α /IL-1 β 刺激下, miR-10a 亦被下调, 且这种 miR-10a 下调作用是由 NF- κ B 的活化所介导 (可被 NF- κ B 抑制剂阻断)。生物信息学分析提示, TAK1 (MAP3K7), BTRC (β TrCP) 和 IRAK4 是 miR-10a 的潜在靶基因。它们均是 NF- κ B 通路中重要的调控因子。据此, 我们认为在 RA FLS 细胞中存在 TNF- α /NF- κ B/miR-10a/NF- κ B 正反馈调节环路, 这一恶性环路在 TNF- α /IL-1 β 等炎性因子的持续作用下, 不间断地维持 NF- κ B 通路的活化, 并介导相关细胞因子分泌, 维持 RA 滑膜炎性环境。本部分实验的目的是进一步明确上述环路在 RA 炎性环境维持中的作用, 并揭示其中的分子调控机制, 为 RA 炎性环境的维持提供新的理论支撑和潜在的药物治疗靶点。

1 实验材料

1.1 主要试剂

1.1.1 主要试剂和试剂盒

名 称	来 源
胎牛血清	Gibco, Thermo Fisher Scientific 公司
DMEM 培养液	Gibco, Thermo Fisher Scientific 公司
Hank's 平衡盐缓冲液	Gibco, Thermo Fisher Scientific 公司
各类规格细胞培养板	Corning 公司
60mm, 100mm 细胞培养皿	Corning 公司
TRIzol Reagent	Ambion, Thermo Fisher Scientific 公司
Lipofectamine® 2000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific 公司
I 型胶原酶	Sigma-Aldrich 公司
蛋白酶抑制剂	Roche 公司
PVDF 膜	Roche 公司
X 光胶片	Thermo Fisher Scientific 公司
TaqMan® MicroRNA 探针	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific 公司
TaqMan® 2×Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific 公司
TaqMan® MicroRNA RT Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific 公司
<i>mir Vana</i> TM miRNA inhibitor	Ambion, Thermo Fisher Scientific 公司
<i>mir Vana</i> TM miRNA mimic	Ambion, Thermo Fisher Scientific 公司
PrimeScript TM RT Master Mix	Takara 公司
Fast SYBG® Green Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Thermo Fisher Scientific 公司
增强型 ECL 发光试剂盒	Thermo Fisher Scientific 公司
Matrigel TM Basement Membrane Matrix	BD Biosciences 公司
Dual-Luciferase TM Reporter Assay System	Promega 公司
SP600125, SB203580	TOCRIS 公司

Bay11-7082, CHX	Sigma-Aldrich 公司
Triton X-100	MP Biomedicals 公司
37% 甲醛	Sigma-Aldrich 公司
Transwell 小室	Millipore 公司
所有限制性内切酶	New England Biolabs 公司
DNA 连接酶 (Solution I)	Takara 公司
BrdU 检测试剂盒	Roche 公司
重组人 TNF- α , IL-1 β	Peprtech 公司
染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒	Millipore 公司
人 IL-6, IL-8 ELISA 试剂盒	eBioscience 公司
核蛋白提取试剂盒	Thermo Fisher Scientific 公司
所有引物、寡核苷酸序列	上海生工生物
siRNA	上海吉玛生物
其他分析纯有机试剂 (甲醇、乙醇、丙酮等)	天津化学试剂厂
其他实验室常规试剂、耗材等	西安辉瑞生物、宝信生物、木子生物

1.1.2 抗体

名 称	用途与稀释比例	来源及货号
TAK1 (MAP3K7)	WB, 1:2000	Epitomics, 3752-1
BTRC (β -Trecp)	WB, 1:1000	Cell signal, 11984
IRAK4	WB, 1:1000	Cell signal, 4363
p65	WB, 1:1000; IF, 1:100	Cell signal, 8242
YY1	WB, 1:2000; ChIP, 1:200	Abcam, ab109237
β -actin	WB, 1:3000	CMCTAG, AT0001
Histon-H3	WB, 1:1000	Cell signal, 4499
Goat anti-Mouse IgG	WB, 1:5000	CWBIO, CW0102
Goat anti-Rabbit IgG	WB, 1:5000	CWBIO, CW0103

Alexa 488-conjugated	IF, 1:1000	Invitrogen, A21206
DAPI 染料	IF, 5 μ g/mL	Sigma Aldrich, 32670

1.2 常用缓冲液

2 \times SDS Loading Buffer:

0.5 mol/L Tris-HCl (pH6.8)	2 mL	
甘油	2 mL	
20% SDS (w/v)	2 mL	
β -巯基乙醇	1 mL	
0.1% 溴酚蓝 (w/v)	0.5 mL	
双蒸水	2.5 mL	共 10 mL

5 \times SDS Loading Buffer:

1 mol/L Tris-HCl (pH6.8)	1.25 mL
SDS (十二烷基硫酸钠)	0.5 g
溴酚蓝 (BPB)	25 mg
甘油	2.5 mL

用去离子水溶解后定容至 5 mL 备用。按 500 μ L/支分装，室温保存备用。用前加 25 μ L 的 β -巯基乙醇到每管。加入 β -巯基乙醇后室温保存 1 个月。

SDS-PAGE 分离胶配方表

各组分名称	分离胶浓度			
	T=8%	T=10%	T=12%	T=15%
4 \times 分离胶缓冲液 (mL)	1.25	1.25	1.25	1.25
H ₂ O (mL)	2.37	2.03	1.7	1.2
30%丙烯酰胺 (mL)	1.33	1.67	2	2.5
10%过硫酸铵(AP) (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED (mL)	0.005	0.005	0.005	0.005
总体积 (mL)	5.005	5.005	5.005	5.005

4 \times 分离胶缓冲液 (100 mL)

Tris 18.17 g 溶解于适量双蒸水，用 HCl 调节 pH 至 8.8，加 10% SDS 4 mL，用双蒸水定容至 100 mL，4 $^{\circ}$ C 保存。

30%丙烯酰胺储存液:

取 29.2 g 丙烯酰胺，0.8 g N, N-甲叉双丙烯酰胺，双蒸水溶解定容至 100 mL，过滤后置于棕色瓶中，4 $^{\circ}$ C 保存 (30 d)。

SDS-PAGE 浓缩胶配方表:

	浓缩胶浓度 T= 5%
4×浓缩胶缓冲液 (mL)	0.5
30%丙烯酰胺 (mL)	0.33
H ₂ O (mL)	1.13
10%过硫酸铵(AP) (mL)	0.04
TEMED (mL)	0.004
总体积 (mL)	2.004

4×浓缩胶缓冲液 (100 mL)

Tris 6.06 g 溶解于适量双蒸水, 用 HCl 调节 pH 至 6.8, 加 10% SDS 4 mL, 用双蒸水定容至 100 mL, 4℃ 保存。

1×SDS-PAGE 电泳缓冲液 (1 L, pH 8.3):

Tris 3 g 甘氨酸 14.4 g SDS 1 g

加双蒸水至 1 L 溶解。现用现配

转移缓冲液 (1 L):

Tris 3.03 g 甘氨酸 14.42 g 加适量双蒸水溶解, 加 200 mL 甲醇, 双蒸水定容至 1 L。现用现配

TBS 缓冲液 (1 L):

NaCl 8.8 g 1 M Tris-HCl (pH 7.4) 121.14 g/mol 20 mL 定容至 1 L

TBST 缓冲液 (1 L):

向 TBS 缓冲液 (1 L) 中加 0.5 mL Tween 20 充分溶解即可。

封闭液 (抗体稀释液):

3% BSA (TBST 配制, 并需要过滤后使用, 4℃ 保存)

1.3 主要仪器

名 称	生产厂家
倒置荧光显微镜	Olympus IX73
实时荧光定量 PCR 仪	Applied Biosystems 7500 Fast
二氧化碳细胞培养箱	Thermo Fisher Scientific
倒置显微镜	Nikon

PCR 仪	Bio-Rad
台式低温高速离心机	Eppendorf
多功能酶标仪	BioTek
微量移液器	Eppendorf
台式高速离心机	珠海黑马医学仪器
台式 mini 离心机	珠海黑马医学仪器
垂直/水平电泳槽	Bio-Rad
转膜电泳槽	Bio-Rad
直流电源	北京六一仪器厂
超净工作台	苏州净化设备厂
恒温培养箱	SANYO
恒温摇床	上海智诚仪器厂
低温冰箱	Thermo Fisher Scientific
水平/垂直摇床	海门其林贝尔
纯水仪	Millipore
凝胶成像系统	Alpha-Innotech
制冰机	SANYO
高压灭菌锅	SANYO
电子天平	上海天平仪器厂
恒温震荡器	太仓实验设备厂
恒温水浴锅	上海智诚
实验室冰箱	青岛海尔

2 方法

2.1 成纤维细胞样滑膜细胞的原代培养

实验中使用的 RA 患者滑膜细胞，来自我校第一附属医院（西京医院）临床免疫科。滑膜组织除了来自临床免疫科外，还来自西京医院骨科和唐都医院骨科。

A. 将利用关节镜活检取得的新鲜滑膜组织浸泡在预冷的 Hank's 平衡盐缓冲液中，

- 利用冰盒，保持低温，迅速运输至实验室
- B. 于超净工作台内去除脂肪组织和可能存在的软骨，并用 Hank's 缓冲液洗涤 3-4 次，用含有双抗（青霉素/链霉素）的 DMEM 培养液洗涤 3 次
 - C. 根据获取组织的量加入适量 I 型胶原酶（约 1-1.5 mL, 1 mg/mL, 用 Hank's 缓冲液配制），以刚刚浸润组织为宜
 - D. 用眼科剪充分剪碎组织，并注意无菌操作，防止污染
 - E. 补充 I 型胶原酶至 5 mL，将组织团块充分重悬，均匀铺于 100 mm 培养皿底部，于二氧化碳培养箱内常规培养 6-8 h
 - F. 待组织块贴壁后，小心将胶原酶吸出，并沿皿壁加入 5-8 mL 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液，终止消化，小心转移培养皿至培养箱中，继续培养
 - G. 48 h 后观察生长情况，酌情换液
 - H. 培养至 2-3 代时，可观察到纯度较高的 FLS 细胞，原代培养 3-8 代的 FLS 细胞可用于后续实验

2.2 组织/细胞总 RNA 的提取

从细胞/组织当中提取总 RNA(整个过程需在超净台内操作，并佩戴手套、口罩，防止 RNA 酶污染样品):

- A. 弃去细胞培养液，用预冷的无菌 PBS 洗涤细胞两次；组织的话则无需此步骤
- B. 加入 1 mL/孔 TRIzol Reagent（六孔板），并于室温震荡并吹打细胞 5 min；如果是组织，则需根据组织块大小加入 TRIzol，一般每 1 cm³ 组织加入 1 mL TRIzol，并根据情况进行研磨或匀浆
- C. 将上述含有细胞或组织的 TRIzol 转移至事先用 DEPC 水处理过的 1.5 mL EP 管中
- D. 按照 TRIzol 加入量的 1/5 加入三氯甲烷，室温下充分混匀，静置 10 min
- E. 4℃，12000×g 离心 20 min 小心转移上清至新的 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中
- F. 加入等体积的异丙醇，室温静置 10 min，后-20℃静置 1 h
- G. 4℃，12000×g 离心 10 min
- H. 弃去上清，加入 1 mL 无水乙醇洗涤沉淀
- I. 4℃，12000×g 离心 10 min

- J. 弃去上清，重复步骤 I 和 J
- K. 弃去上清，室温静置，待沉淀干燥
- L. 加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀，即得总 RNA 溶液，可取少许进行定量。（一般取 100 ng 总 RNA 反转录反应和后续实验）

2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

取总 RNA 100 ng 用于 qRT-PCR 检测，根据检测基因类型的不同，使用的试剂及反应条件亦不相同。

2.3.1 miRNA 检测

利用 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 进行反转录反应，反应体系如下：

Component	
Master Mix	7.00 μL
Specific RT Primer	3.00 μL
Total RNA (<100 ng)	5.00 μL
Total	15.00 μL

上述体系中，Master Mix 组分如下：

Component	Master Mix Volume/15 μL reaction
dNTP mix (100 mM total)	0.15 μL
Multiscribe RT enzyme (50 U/ μL)	1.00 μL
10 \times RT buffer	1.5 μL
RNase Inhibitor (20 U/ μL)	0.19 μL
Nuclease free water	4.16 μL
Total	7.00 μL

全部混合操作在冰上进行，并防止反复冻融样品。加样完成后在 PCR 仪上完成反应，条件如下：

Step Type	Time (minutes)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4

反转录结束后 cDNA 样本可在 -20°C 保存备用，也可直接按照下表准备 qRT-PCR 反应：

PCR reaction mix component	Volume per reaction (μL)
TaqMan® 2 \times Universal PCR Master Mix	10.0

TaqMan® PCR 引物	1.00
Nuclease free water	7.67
Product from RT reaction	1.33
Total	20.00

qRT-PCR 条件如下:

Step Type	Time	Temperature (°C)
HOLD	10 min	95
40 cycles	15 sec	95
	60 sec	60

2.3.2 mRNA 检测

利用 Takara 的 PrimeScript™ RT Master Mix 进行反转录反应, 反应体系如下:

Component	
5×Master Mix	4.00 μL
Nuclease free water	11.00 μL
Total RNA (<500 ng)	5.00 μL
Total	20.00 μL

全部混合操作在冰上进行, 并防止反复冻融样品。加样完成后在 PCR 仪上完成反应, 条件如下:

Step Type	Time	Temperature (°C)
HOLD	15 min	37
HOLD	5 sec	85
HOLD	∞	4

反转录结束后 cDNA 样本用去离子水稀释 20 倍后, 在 -20°C 保存备用, 也可直接按照下表准备 qRT-PCR 反应:

PCR reaction mix component	Volume per reation (μL)
2×Fast SYBG® Green Master Mix	10.0
mRNA 上、下游引物 (10 μM)	2.00
稀释后的 cDNA	2.00
Nuclease free water	6.00
Total	20.00

qRT-PCR 条件如下:

Step Type	Time	Temperature (°C)
HOLD	20 sec	95
40 cycles	3 sec	95
	30 sec	60
溶解曲线	缓慢升温和缓慢降温	

miRNA 和 mRNA 的 qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析, 换算等对应的

变化倍数，miRNA 用 ncRNA U6B 做内参，mRNA 用 β -actin 做内参。

相关 mRNA 的引物序列如下所示，全部引物由上海生工生物合成。

Gene name	Primers sequence
β -actin	Forward: 5'-CTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-3' Reverse: 5'-CGCAACTAAGTCATAGTCCGCC-3'
YY1 (NM_003403)	Forward: 5'-AGAAGAGCGGCAAGAAGAGTT-3' Reverse: 5'-CAACCACTGTCTCATGGTCAATA-3'
IRAK-4 (NM_001145258)	Forward: 5'-CCTGACTCCTCAAGTCCAGAA-3' Reverse: 5'-ACAGAAATGGGTCGTTTCATCAAA-3'
TAK1 (NM_003188)	Forward: 5'-AGCCTGATGACTCGTTGTTG-3' Reverse: 5'-TAATGGCTCATCTGCTCCTG-3'
BTRC (NM_003939)	Forward: 5'-CCAGACTCTGCTTAAACCAAGAA-3' Reverse: 5'-GGGCACAATCATACTGGAAGTG-3'
MCP-1 (NM_002982)	Forward: 5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3' Reverse: 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-3'
IL-6 (NM_000600)	Forward: 5'-CCCTGAGAAAGGAGACATGTAAC-3' Reverse: 5'-CCTCTTTGCTGCTTTCACACATG-3'
IL-8 (NM_000584)	Forward: 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATTTTC-3' Reverse: 5'-TGGCAAACCTGCACCTTCAC-3'
IL-1 β (NM_000576)	Forward: 5'-TTCGACACATGGGATAACGAGG-3' Reverse: 5'-TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG-3'
MMP-1 (NM_002421)	Forward: 5'-GCTAACAAATACTGGAGGTATGATG-3'

Reverse: 5'-ATTTTGGGATAACCTGGATCCATAG-3'

Forward: 5'- TCCTGATGTGGGTGAATACAATG -3'

MMP-13 (NM_002427)

Reverse: 5'- GCCATCGTGAAGTCTGGTAAAAT -3'

2.4 蛋白免疫印迹 (Western blot assay)

2.4.1 总蛋白/细胞核蛋白提取和定量

总蛋白利用 RIPA 裂解液, 使用前按照每 10 mL 裂解液加入 1 片蛋白酶/磷酸酶抑制剂的比列加入相关抑制剂, 分装后于-20℃保存。使用时根据细胞团块体积加入等体积的裂解液, 冰上裂解 1 h, 期间每隔 10 min 混匀一次, 之后 4℃ 16000×g 离心 10 min, 收集裂解上清, 即为总蛋白提取液。

核蛋白提取利用 Thermo 的核蛋白提取试剂盒 (#78833), 步骤如下:

- A. 用胰酶消化细胞, 500×g 离心 5 min 收集细胞团, 用 PBS 缓冲液洗涤一次
- B. 按照细胞体积加入适量 CER I。 CER I : CER II : NER=200 : 11 : 100 μL
- C. 将加入 CER I 后的细胞悬液不断混悬均匀, 冰上孵育 10 min
- D. 加入预冷的 CER II, 混合均匀, 冰上孵育 1 min
- E. 混合吹吸细胞, 4℃ 16000×g 离心 5 min
- F. 收集上清至预冷的干净 EP 管中, 即为胞浆蛋白
- G. 用预冷 NER 重悬步骤 E 中的沉淀, 不断在冰上吹吸不溶物, 每 10 min 一次, 共 40 min
- H. 4℃ 16000×g 离心 10 min, 收集上清, 即为核蛋白产物
- I. CER I 和 NER 实验前应加入相应浓度的蛋白酶抑制剂

BCA 定量采用 Thermo 公司的 BCA 定量试剂盒 (#23225), 步骤如下:

- A. 按照下表中的方法稀释 BSA 标准品至 8 个不同浓度

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000μg/mL)

<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u> <u>(μL)</u>	<u>Volume and Source of BSA</u> <u>(μL)</u>	<u>Final BSA Concentration</u> <u>(μg/mL)</u>
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

- B. 根据待测样本及标准品所需检测的样品数，制备 BCA 检测工作液。BCA 检测工作液为 BCA 反应 A 液和 B 液的混合物，混合比例为 50:1
- C. 将待测样品/标准品和 BCA 检测工作液按照 1:8 的体积比，即 25 μL : 200 μL ，分别加入至各个检测孔中（用 96 孔板进行）
- D. 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 30 min，用酶标仪在 562 nm 处进行吸光值测定，绘制标准曲线，计算待测样品蛋白浓度。用 RIPA 裂解液调整样品浓度至 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

2.4.2 Western blot

- A. 向准备好的蛋白样品中加入等体积的 2 \times Loading Buffer，若样本量较少，则加入适量的 5 \times Loading Buffer，使最终样品浓度不低于 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，沸水浴中变性 10 min，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用
- B. 取准备好的蛋白样品 10 μL ，进行 SDS-PAGE 电泳，分离胶为 10%，浓缩胶为 5%，120 v 恒压电泳 70 min
- C. 剥离凝胶，适当标记；用甲醇活化 PVDF 膜，并和凝胶一起浸泡于转膜缓冲液，继续活化 15 min
- D. 用加厚滤纸、海绵、凝胶和 PVDF 膜组装转膜设备
- E. 300 mA 恒流转移 70 min，全程冰浴
- F. 结束后根据分子量大小对 PVDF 膜进行裁剪，于含有 3% BSA 的封闭液中进行封闭，室温 1.5 h
- G. 分别用对应浓度的抗体与 PVDF 膜进行孵育。孵育条件为垂直摇床，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜（时间不小于 12 h）
- H. TBST 洗涤三次，10 min/次，脱色摇床转速不低于 80 rpm/min
- I. 分别用对应浓度的 HRP 标记的二抗与膜进行孵育。孵育条件为室温 20-40 min（环境温度 15-28 $^{\circ}\text{C}$ ）
- J. TBST 洗涤三次，10 min/次，脱色摇床转速不低于 80 rpm/min
- K. 暗室 ECL 发光显影。结束后用扫描仪扫描结果。

2.5 染色质免疫共沉淀（ChIP）

ChIP 实验利用 Millipore 公司的 EZ-Chip 试剂盒（#17-371），具体步骤如下：

- A. 体内交联和裂解

1. 加入 550 μL 37%的甲醛（或者 1.5 mL 新鲜 18.5%甲醛）到 20 mL 培养液进行交联，缓慢混匀。室温孵育 10 min
2. 将 2 mL 预冷 1 \times PBS 均分于不同 EP 管。加入 5 μL Protease Inhibitor Cocktail II 到每个含有 1 mL 1 \times PBS 的 EP 管中，置于冰上
3. 加入 2 mL 10 \times Glycine（甘氨酸）到每个培养皿中，中和未反应的甲醛
4. 混合均匀，室温孵育 5 min，将培养皿置于冰上
5. 加入 20 mL 预冷的 1 \times PBS 洗涤细胞，移除 PBS，并重复上述洗涤一次
6. 加入 2 mL 预冷的含有 Protease Inhibitor Cocktail II 的 PBS。（步骤 3 制备的）
7. 用细胞刮刀，刮下细胞，收集与 EP 管，700 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，富集细胞
8. 离心时配制裂解液。将 5 μL Protease Inhibitor Cocktail II 加入到 1 mL SDS 裂解液。
9. 转移离心上清，用 1 mL 包含 Protease Inhibitor Cocktail II 的 SDS 裂解液重悬细胞团。
10. 等分上述裂解液 300-400 μL 至小号 EP 管

B. 超声剪切 DNA

1. 于冰上超声剪切细胞裂解液，超声条件为：
超声 10 sec，间隔 8 sec，共计 10 min，功率 200 W
超声是保持裂解液冰冷状态
2. 结束后，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，转速在 10000 $\times g$ 至 12000 $\times g$ 之间，去除不溶物
3. 取 5 μL 超声后的裂解产物，进行琼脂糖凝胶电泳，分析超声剪切情况
4. 转移上清至 EP 管，分装成 100 μL /管的组分

C. 交联的蛋白质/DNA 免疫沉淀

1. 根据免疫沉淀的样本数量，准备足够的含有将 Protease Inhibitor 的 Dilution Buffer。
2. 准备一支 EP 管，含有 100 μL 超声后的交联染色质（section B step 5），冰上融化。
3. 加入 900 μL 含有 Protease Inhibitor Cocktail II 的稀释液到每个含有 100 μL 染色质的 EP 管。
4. 加入 60 μL Protein G Agarose 对于每次 IP

5. 吸取 Protein G Agarose 前先混合均匀
 6. 此步骤意在清除蛋白/DNA 非特异的结合于 Protein G Agarose。
 7. 如果是多组 IP, 需要根据比例加入 Protein G Agarose。
 8. 4°C 旋转孵育 1 h
 9. 富集琼脂糖, 3500×g 离心 1 min
 10. 吸取 10 μL (1%) 上清作为 Input, 4°C 保存, 直到 Section D, Step 1。
 11. 收集剩余上清, 按照 1 mL/管分装于 EP 管, 不考虑琼脂糖沉淀。
 12. 向上清加入 IP 抗体
 - a. 阳性对照, Anti-RNA Polymerase II, 1 μg/管
 - b. 阴性对照, Normal Mouse IgG, 1 μg/管
 - c. 目的抗体, 1-10 μg/管
 13. 4°C 旋转孵育过夜
 14. 向每管加入 100 μL Protein G Agarose, 4°C 旋转孵育 1 h
 15. 富集琼脂糖, 4000×g 离心 1 min, 转移上清。
 16. 洗涤 Protein G Agarose-抗体/染色质复合物, 用 1 mL 下列预冷的缓冲液重悬小珠, 旋转孵育 5 min, 4000×g 离心 2 min, 小心移除上清。按照下列步骤洗涤小珠。
 - a. 低盐洗液 (Low Salt Immune Complex Wash Buffer), 洗涤 1 次
 - b. 高盐洗液 (High Salt Immune Complex Wash Buffer), 洗涤 1 次
 - c. LiCl 洗液 (LiCl Immune Complex Wash Buffer), 洗涤 1 次
 - d. TE Buffer, 洗涤 2 次
- D. 洗脱蛋白/DNA 复合物
1. 为 IP 样品准备洗脱液, 包括 Input 样品。(Section C, step7); 每管样品准备 200 μL 洗脱液
 2. 向 Input 样品加入 200 μL 洗脱液, 静置于室温, 直到 Section E
 3. 向含有抗体/琼脂糖复合物的样品中加入 100 μL 洗脱液, 轻弹试管混匀
 4. 室温孵育 15 min
 5. 富集琼脂糖, 4500×g 离心 1 min, 转移上清至新的 EP 管
 6. 重复 step 4-6, 合并上清 (总体积=200 μL)

E. 反向交联蛋白/DNA 复合物与 free DNA

1. 对所有 EP 管 (IPs 和 Input), 加入 8 μ L 5 M NaCl, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 h
2. 加入 1 μ L RNase A, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min
3. 4 μ L 0.5 M EDTA, 8 μ L 1 M Tris-HCl, 1 μ L Proteinase K, 45 $^{\circ}$ C 孵育 1 h

F. DNA 纯化

1. 将 DNA 结合柱和收集管一对一安装好
2. 加入 1 mL Bind Reagent A 每 200 μ L DNA 样品 (IPs 和 Inputs), 混合均匀
3. 转移 600 μ L 上述液体至结合柱, 离心 30s, 13000 \times g
4. 废弃液体, 如果 step 2 中产生沉淀, 不会影响这一步骤
5. 将柱子装回收集管, 转移 600 μ L 液体至柱子, 重复 step 4-6.
6. 加入 500 μ L Wash Reagent B 到 DNA 结合柱
7. 离心 30s, 13000 \times g, 废弃液体
8. 将柱子装回收集管, 空柱子, 离心 30s, 15000 \times g
9. 废弃液体和收集管, 装载新的收集 EP 管
10. 加入 50 μ L Elution Buffer C, 离心 30s, 15000 \times g
11. 废弃结合柱, 得到纯化的 DNA, 可进行分析, 也可-20 $^{\circ}$ C 保存。

G. PCR 分析

按照① 无 DNA 组; ② Anti-mouse IgG 组; ③ Anti-RNA poly II 组; ④ Anti-YY1 组; ⑤ Input; 的分组, 每个样品三个复孔, 一个 GAPDH 内参, 内参引物 0.8 μ L/孔的方法, 进行 qRT-PCR 反应, 其他步骤参照 mRNA 检测的 qRT-PCR 进行, 反应产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳分析并拍照

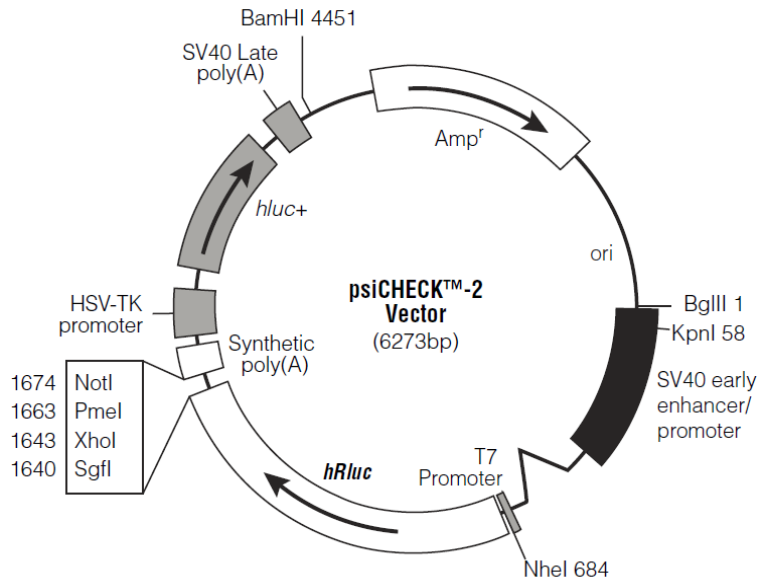
YY1 结合位点的 PCR 引物如下:

Gene name	Primers sequence
YY1BS1	Forward: 5'-GGGGAGGTGTGGGGAGG-3'
	Reverse: 5'-AGGTGGCTAGGCGAGTTCATATG-3'
YY1BS1	Forward: 5'-GCTTGGGTTGCTGGTG GTAG-3'
	Reverse: 5'-CCAGACTCTCAGC TTAGTAAATTCACG-3'

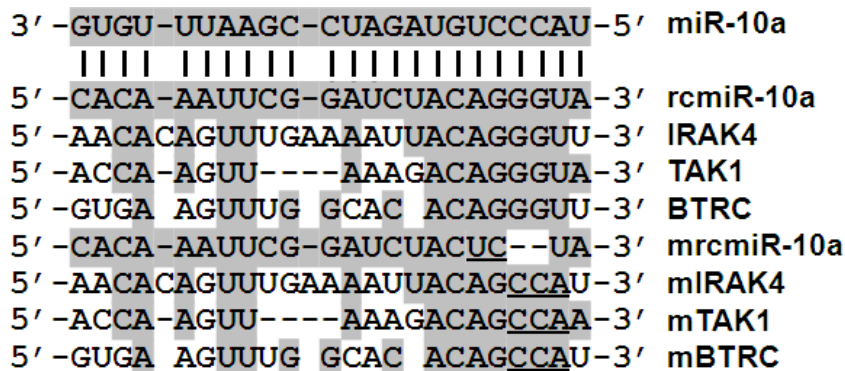
2.6 双荧光素酶报告基因

2.6.1 miRNA 报告基因载体构建

miRNA 靶基因验证的双荧光素酶报告基因载体选用 Promega 公司的专用载体 psi-CHECK-2, 其详细图谱如下:



为了构建 psiCHECK-rcmiR-10a-WT, psiCHECK-IRAK4-3' UTR-WT, psiCHECK-TAK1-3'UTR-WT 和 psiCHECK-BTRC-3'UTR-WT 载体, 我们引入 *Not I* 和 *Xho I* 两个酶切位点, 并按照生物信息学预测的 miR-10a 的结合位点, 设计并合成了两条 (每个载体两条) 反向互补的寡核苷酸序列, 后经过退火反应形成含有酶切位点的双链 DNA, 将上述双链 DNA 插入至 psi-CHECK-2 空载体即可得到相应的报告基因载体。结合位点突变载体的构建方式与此类似, 突变策略如下图所示:



2.6.2 其他报告基因载体构建

为了构建 pGL-miR-10a-YY1 和 pGL-miR-10a-YY1 Mut 质粒,我们选取 miR-10a 转录起始位点上游 1500 bp 的潜在启动子区(其中含有两个潜在的 YY1 结合位点),引入 *Kpn I* 和 *Xho I* 两个酶切位点,将这一段序列以全基因合成的方式获得,并克隆至 pGL3-basic 载体中,即得到上述目标质粒。

2.6.3 转染和检测

HEK293T 细胞购自中科院上海细胞库;pCMV-p65 质粒由我校遗传与发育生物学教研室韩骅教授赠送;pCMV-YY1 质粒购自 Origene 公司;si-YY1, si-NC 购自上海吉玛生物。

- A. HEK293T 与转染前一天按照 3×10^6 /孔的密度铺于 24 孔板中,并去除双抗进行培养
- B. 待细胞贴壁牢靠,或融合度至 70%作用时进行转染,操作步骤参照 Lipofectamine[®] 2000 说明书进行
- C. 八种 psi-CHECK 类质粒的导入量为 800 ng/孔;miR-10a mimic/inhibitor 的终浓度为 30 nM;pGL 类质粒的导入量为 400 ng/孔;pCMV 类质粒的导入量为 200 ng/孔;si-YY1 的终浓度为 100 nM
- D. 由于本实验分组较多再次不在叙述,具体参照结果部分相关数据
- E. 转染后 6 h 更换含有 10% FBS 的培养液常规培养,24 h 后收集细胞进行荧光素酶活性检测,每组 3 个复孔,每个孔检测 3 次
- F. 检测试剂盒为 Promega 公司的 E1910 试剂盒,方法如下:
 1. 将 1 倍体积的 5 \times 被动裂解液 (PLB) 加到 4 倍体积的灭菌蒸馏水中,混合均匀。4 $^{\circ}$ C 保存,时间 \leq 1 个月
 2. 用 LAR II 液体溶解冻干粉 Luciferase Assay Substrate, 迅速避光分装, -70 $^{\circ}$ C 保存,时间 \leq 1 年,避免反复冻融
 3. 将一定量的 50 \times Stop & Glo[®] Substrate 加入到所需要量的 Buffer 中,使终浓度成为 1 倍浓度
 4. 用 1 \times PBS 洗涤去除培养液的待测细胞 1 次,按照 100 μ L/孔(24 孔板)的体积向待测细胞中加入 1 \times PLB 室温裂解 15 min

5. 16000×g 4℃离心 10 min, 收集上清
 6. 事先在 EP 管中准备 10μL 配制好的 LAR II, 给仪器设置好程序, 后将收集的上清取 5 μL 加入 EP 管中, 上机检测虫荧光素酶活性, 向观测管中加入 10 μL 配制好的 1×Stop & Glo®, 上机检测海肾荧光素酶活性, 做好记录
- si-YY1 和 si-NC 的序列如下

Gene name	Primers sequence
siYY1	Sense: 5'-CAGUCAACUAACCUGAAAUTT-3'
	Antisense: 5'-AUUUCAGGUUAGUUGACUGTT-3'
siNC	Sense: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	Antisense: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

2.7 免疫荧光实验

细胞准备: 按照实验分组, 提前处理细胞, 并选取生长状态良好的细胞进行实验

- A. 实验前, 应将细胞爬片与小玻片上进行培养
- B. 去除培养液, 无菌 1×PBS 洗涤一次, 加入分析纯甲醇室温固定 10 min
- C. 无菌 PBS 洗涤三次, 5 min/次
- D. 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 室温通透 15 min
- E. 无菌 PBS 洗涤三次, 5 min/次
- F. 用含 1% BSA 的 PBS 室温封闭 1-2 h (15-28℃)
- G. 加入用上述封闭液稀释的 p65 抗体, 湿盒中 4℃孵育过夜 (时间不少于 12 h)
- H. 无菌 PBS 洗涤三次, 5 min/次
- I. 用 1:1000 稀释的 Alexa 488-conjugated 二抗室温孵育 30-60 min (15-28℃)
- J. 无菌 PBS 洗涤三次, 5 min/次
- K. DAPI 室温染色 5 min
- L. 无菌 PBS 洗涤三次, 5 min/次
- M. 10%甘油封片, 荧光显微镜下观察并拍照

2.8 BrdU 增殖实验

- A. 准备细胞：将待测细胞（转染后 24h、TNF- α /IL-1 β 处理等）按照 5000/孔接种于 96 孔板，100 μ L/孔，培养 24 h 后进行后续实验
- B. BrdU 标记：按照 10 μ L/孔加入 BrdU 标记溶液（每 100 μ L 培养液加入 10 μ L BrdU，终浓度为 10 μ M），二氧化碳培养箱孵育 3 h
- C. 移除标记的培养液，按照 200 μ L/孔加入 FixDenat，室温孵育 30 min（15-28 $^{\circ}$ C）
- D. 移除 Fixdenat 液，按照 100 μ L/孔加入 anti-BrdU-POD 工作液，室温孵育 90 min（15-28 $^{\circ}$ C）
- E. 移除上述液体，用 PBS 洗涤三次 300 μ L/孔
- F. 按照 100 μ L/孔加入底物（Substrate solution），室温孵育 15-30 min（15-28 $^{\circ}$ C），待颜色变化即可进行吸光值检测
- G. 370 nm 处检测，对照波长为 492 nm

2.9 Transwell 侵袭实验

试剂准备：Matrigel 提前 16 h 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱，融化为液体后备用，避免反复冻融；实验中用到的移液器头全部提前预冷（-20 $^{\circ}$ C）；用 DMEM 培养液配制 10 g/L 的 BSA，充分溶解后，经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤，4 $^{\circ}$ C 保存备用

细胞准备：按照实验分组，提前处理细胞，并选取生长状态良好的细胞进行实验

- A. 用 50 mg/L Matrigel（无血清、无双抗 DMEM 按照 1:8 的体积比稀释）包被 Transwell 小室上层底面（8 μ m 孔径），室温风干 1 h 后，37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 至完全固化
- B. 按照 50 μ L/孔加入提前配制的 10 g/L BSA 溶液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min
- C. 将经过处理并已经饥饿培养 12 h 以上的细胞常规消化，无菌 PBS 洗涤 2 次，调整细胞密度，用含有 0.1% FBS 的培养液重悬，并按照 5×10^4 /孔（24 孔板）接种于 Transwell 小室的上层，下层中加入 500 μ L/孔正常含 10% FBS 的培养液，并避免产生气泡
- D. 二氧化碳培养箱，常规培养 24 h
- E. 取出 Transwell 小室，PBS 洗涤一次，用棉签擦去上层的细胞及液体，95% 乙醇固定 10 min，擦干，用 0.1% 结晶紫染色 10 min，去离子水洗净

F. 于倒置显微镜下取 10 个随机视野计取阳性细胞数，求取平均值

2.10 细胞划痕实验

细胞准备：按照实验分组，提前处理细胞，并选取生长状态良好的细胞进行实验

- A. 将经过处理的细胞用胰酶消化，无菌 PBS 洗涤 2 次，调整细胞密度，并按照 1×10^6 /孔接种于 12 孔板
- B. 待细胞完全贴壁后，更换培养液为含 1% FBS 的培养液，持续培养 24h
- C. 用小号移液器头在培养板底部划直线，并对细胞造成伤害
- D. 用 DMED 洗涤三次，去除被损伤的细胞残渣
- E. 于倒置显微镜下取随机视野拍照，即为 0 h，并记录拍照位置
- F. 用含 0.1% FBS 的培养液常规培养细胞，24 h 后于倒置显微镜下于同一位置观察细胞情况，并拍照记录

2.11 统计学分析

所有结果以 mean \pm SD 的形式表示，实验至少重复 3 次以上，利用 Student's *t*-test 进行统计学分析。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学差异，用“*”表示； $p < 0.01$ ，用“**”表示； $p < 0.001$ ，用“***”表示。所有数据和图片用 GraphPad Prism 5 software 进行分析和绘制。

3 结果

3.1 miR-10a 在 RA 患者滑膜组织和 RA FLS 细胞中低表达

为了获得在 RA FLS 细胞病理改变进程中具有重要作用的 miRNAs 分子，我们提取了 OA 和 RA 患者 FLS 细胞 (n=3) 的总 RNA，并利用 miRNA microarray 对上述样品进行差异筛选。RA 和 OA 患者各 3 例，均为女性，年龄在 55-60 岁，并且均为初诊的 RA 或 OA 患者，没有经过任何药物治疗，尤其是抗炎治疗。

miRNA microarray 检测由上海康成生物公司完成，选择的芯片为丹麦 Exiqon 公司的 miRCURY™ LNA Array (v.18.0) 芯片。

结果显示，与 OA FLS 细胞相比，RA FLS 细胞中，共有 380 个 miRNAs 发生了改变，其中 miR-10a 是下调较为显著的 miRNAs 之一。图 1-1 A 为全部异常表达

miRNAs 的散点图；图 1-1 B 为异常表达前十的 miRNAs 聚类图。

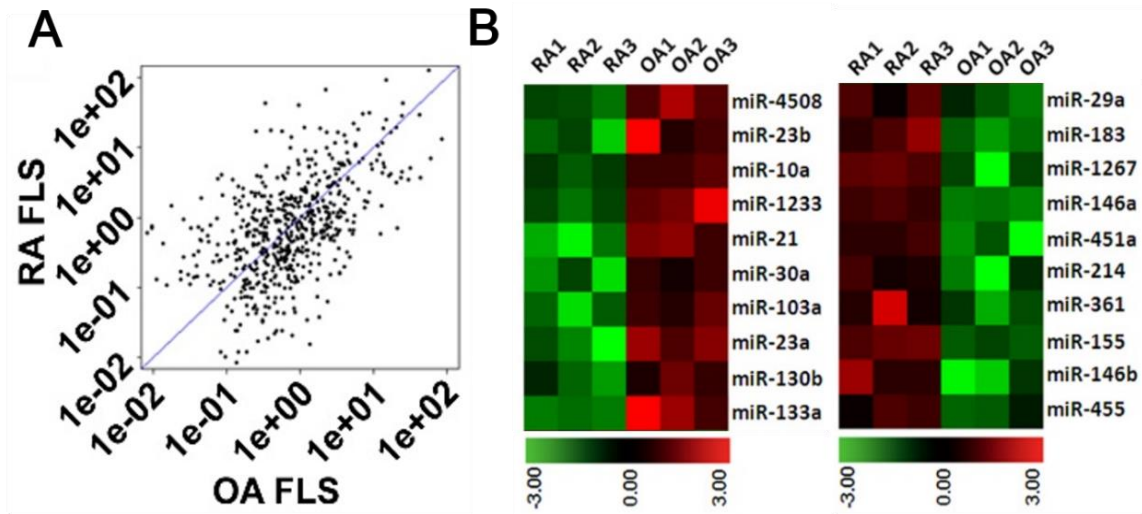


图1-1 RA FLS细胞中异常表达miRNAs的差异筛选 (n=3)

为了对芯片筛选结果进行验证,我们分别重新收集了 10 例 OA 和 RA 患者滑膜组织, 并利用 qRT-PCR 对下调 miRNAs 中的 miR-10a 和 miR-103a 进行验证。如图 1-2 所示, miR-10a 和 miR-103a 在 RA 患者滑膜组织中均呈现低表达, 这一结果与芯片筛选结果相符 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

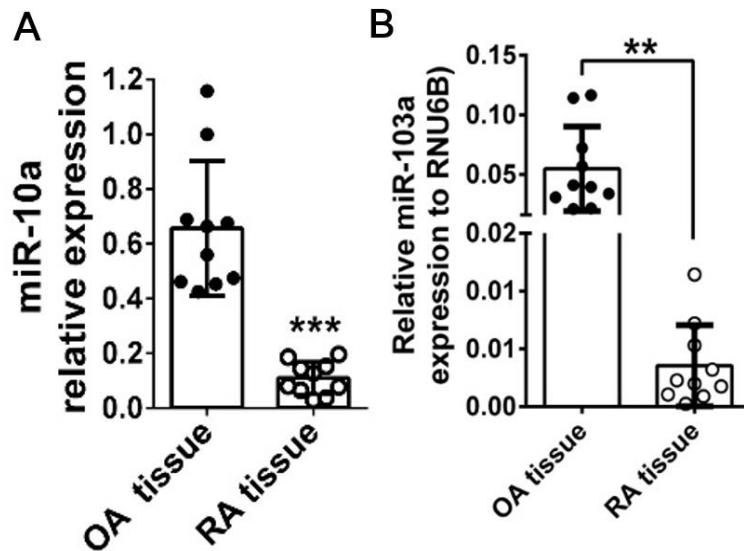


图1-2 RA和OA滑膜组织中, miR-10a和miR-103a的表达水平 (n=10)

随后, 我们又在 RA FLS 细胞中对 miR-10a 的表达进行了验证, 结果显示, 较 OA FLS 细胞, RA FLS 细胞中的 miR-10a 下调 3-5 倍。(图 1-3, *** $p < 0.001$)

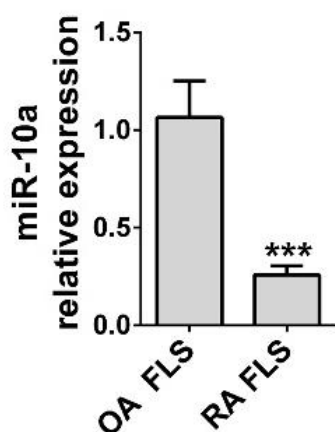


图1-3 RA和OA FLS细胞中，miR-10a的表达水平 (n=3)

3.2 TNF- α 和 IL-1 β 均能够引起 RA FLS 细胞中 miR-10a 的下调，并且这一作用依赖于 NF- κ B 通路

考虑到炎症因子在 RA 炎症环境维持中的重要作用，我们分别用人重组 TNF- α (10 ng/mL)和 IL-1 β (10 ng/mL) 对原代培养的 RA FLS 细胞进行刺激，24 h 后，利用 qRT-PCR 检测 FLS 细胞中 miR-10a 的水平，结果显示 TNF- α 和 IL-1 β 均能够引起 FLS 细胞中 miR-10a 的下调 (图 1-4 A, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。为了进一步验证上述现象，我们分别检测了 TNF- α 和 IL-1 β 处理后 3 h、6 h、12 h 和 24 h 不同时间点时，RA FLS 细胞中 miR-10a 的表达情况，结果表明 TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调具有一定的时间依赖性 (图 1-4 B 和 C, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

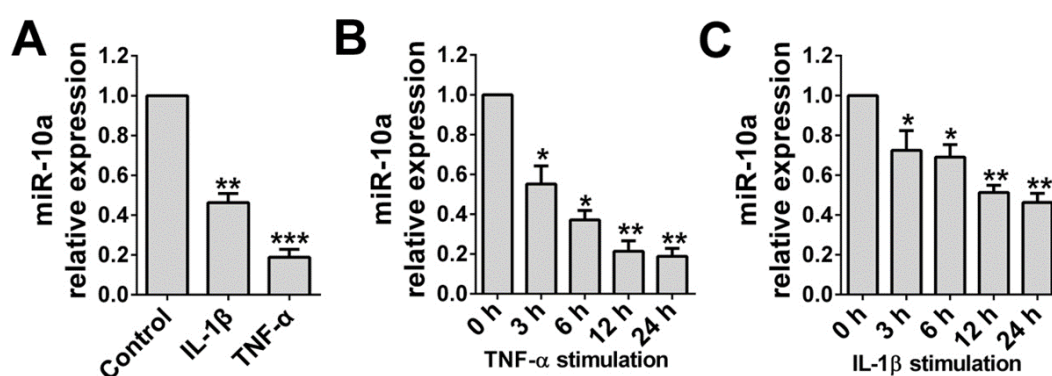


图1-4 TNF- α /IL-1 β 对RA FLS细胞中miR-10a表达水平的影响 (n=3)

考虑到 TNF- α /IL-1 β 对 RA FLS 细胞的影响，主要是通过激活 FLS 细胞中 NF- κ B 通路，继而介导其下游多种炎症因子的分泌。因此，我们推测：TNF- α /IL-1 β 诱发的 RA FLS 细胞的 miR-10a 表达下降，可能也与 NF- κ B 通路的活化有关。

为了验证上述想法,我们分别用 Bay 11-7082 (NF- κ B 抑制剂, 5 μ M)、SP600125 (JNK 抑制剂, 10 μ M)和 SB203580 (MAPK 抑制剂, 10 μ M)对 RA FLS 细胞进行预处理,以此分别阻断 NF- κ B、JNK 和 MAPK 通路的信号转导,随后再用 TNF- α /IL-1 β 刺激细胞,于 24 h 后收取细胞,检测 miR-10a 的表达水平。结果显示,用 Bay 11-7082 阻断 NF- κ B 通路信号后, TNF- α /IL-1 β 诱发的 miR-10a 低表达被逆转(图 1-5 A 和 B);而阻断 JNK 和 MAPK 通路的信号转导后,对 TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调则无显著影响(图 1-5 A 和 B)。这一结果表明,RA FLS 细胞中, TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调依赖于 NF- κ B 通路的活化,与 JNK 和 MAPK 通路无关。(图 1-5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

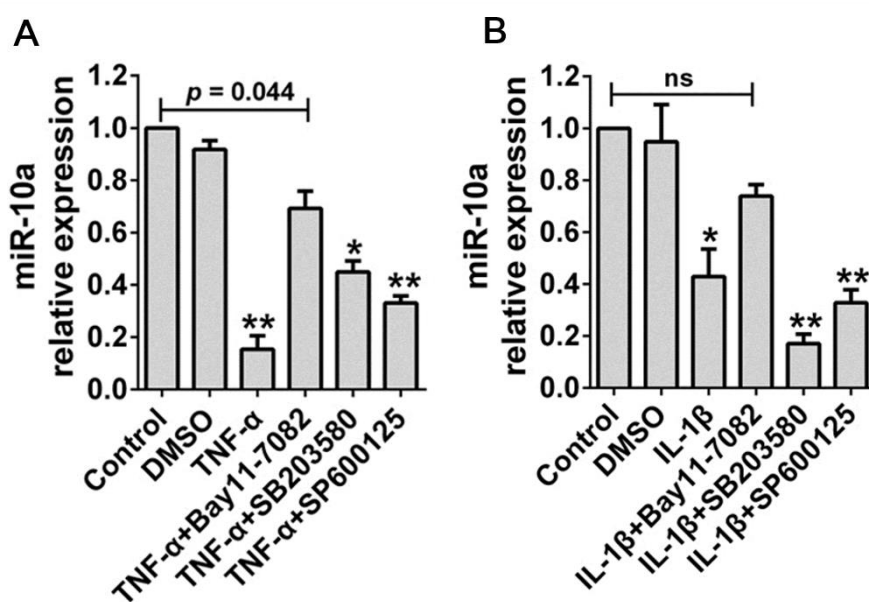


图1-5 Bay 11-7082, SP600125和SB203580对TNF- α /IL-1 β 引起miR-10a下调的影响 (n=3)

众所周知, NF- κ B 通路的活化过程中, 最为核心的部分就是 p65 亚基向细胞核内的转移, 继而调控下游相关基因的转录活性, 介导下游信号的产生。基于此, NF- κ B 信号通路的活化是不需要新生蛋白合成的, 而仅仅是关键蛋白的磷酸化、去磷酸化以及细胞亚定位发生了改变, 基于此, 为了研究明确是 NF- κ B (p65) 直接参与了 miR-10a 的下调, 还是其下游其他分子影响了 miR-10a 的水平, 我们用蛋白合成抑制剂 CHX (5 μ g/mL)对 RA FLS 细胞进行 1 h 的处理, 阻断 FLS 细胞的蛋白合成, 随后再用 TNF- α /IL-1 β 刺激细胞 24 h, 继而检测 miR-10a 的表达水平。

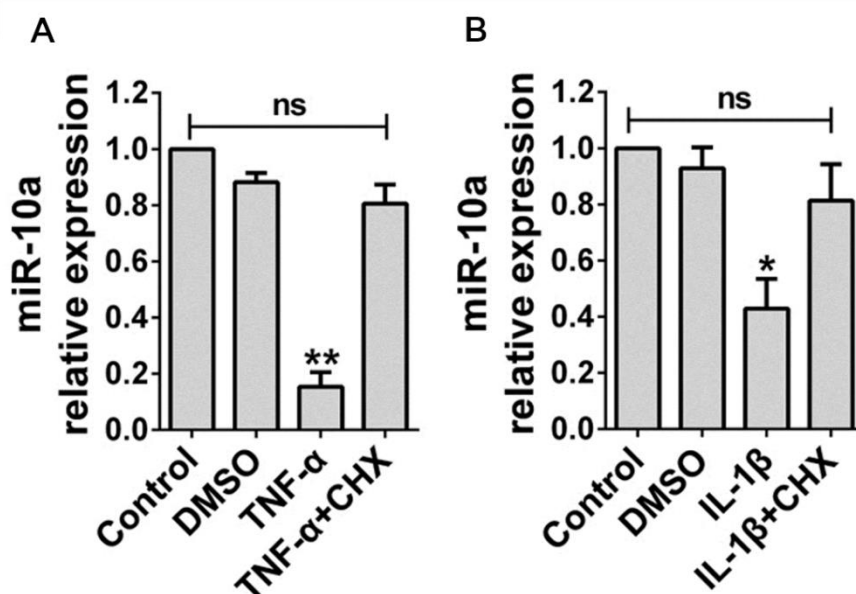


图1-6 CHX对TNF- α /IL-1 β 介导的miR-10a改变的影响 (n=3)

结果显示, 经 CHX 预处理后, 无论 TNF- α 还是 IL-1 β 均不能够再引起 miR-10a 的显著下调 (图 1-6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$), 提示我们: 虽然 TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调依赖于 NF- κ B 通路, 但是真正调控 miR-10a 表达水平的不是 NF- κ B 通路 (p65) 本身, 而是其下游的某个分子。

3.3 TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调由 YY1 直接参与

既然 TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调, 不是由 NF- κ B 直接引起的, 那么肯定有其他在 NF- κ B 活化后新和成的蛋白参与了对 miR-10a 的调控。因此, 我们对 miR-10a 转录起始位点上游-1500bp 潜在的启动子区进行生物信息学分析, 结果发现多个转录因子结合位点, 其中两个转录因子 Yin Yang 1 (YY1) 的结合位点引起了我们的注意。(图 1-7)

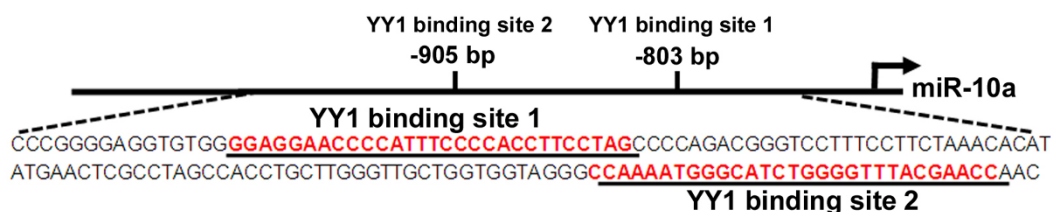


图1-7 miR-10a转录起始位点上游的YY1结合位点

YY1 不仅具有广泛的细胞分布, 还具有负向调控的功能。不仅如此, 据报道, 它位于 NF- κ B 通路下游, 能够接受 NF- κ B 活化影响, p65 的核转位能够增强其转录

活性 (*Mol Cell Biol.* 2007; 27(12): 4374-87)。此外, YY1 具有调控 miRNA 的功能, 并介导了 NF- κ B 对 miR-29 的调控(*Cancer Cell.* 2008; 14(5): 369-81)。那么, YY1 在 RA FLS 细胞和滑膜组织中有没有活性呢?

如图 1-8 所示, 在 TNF- α /IL-1 β 刺激下, RA FLS 细胞中 YY1 的 mRNA 水平成显著上升 (图 1-8 A, *** $p < 0.001$); 较 OA 滑膜组织, RA 患者滑膜组织中 YY1 的表达水平也呈现较高的阳性率, 且分布于衬里层 (图 1-8 B)。上述结果提示: YY1 可能就是我们要找到的那个引起 miR-10a 下调的关键分子。

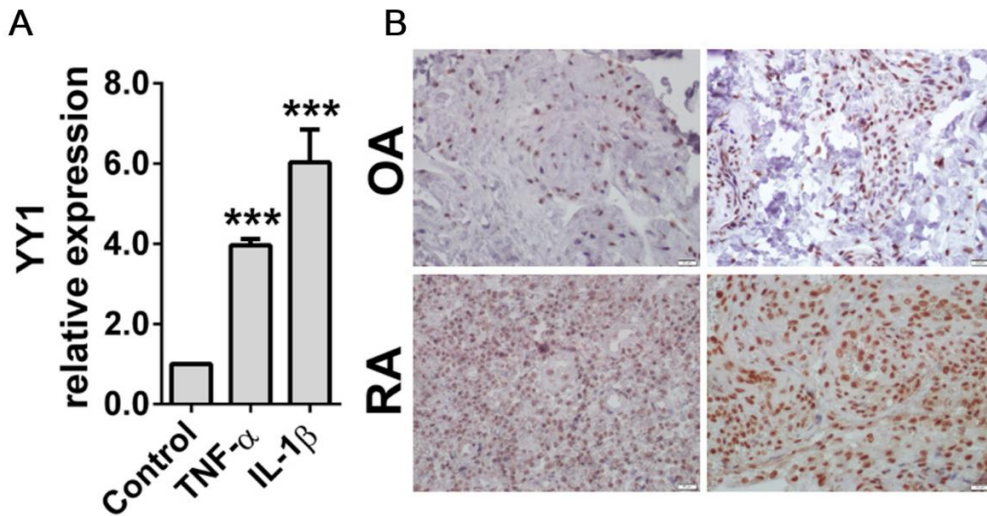


图1-8 YY1在RA FLS细胞和滑膜组织中的表达情况 (n=5)

为了进一步验证 YY1 对 miR-10a 的影响, 我们设计并合成了 YY1 的 si-RNA, 将 RA FLS 细胞中的 YY1 水平敲低后, 再给予 TNF- α /IL-1 β 处理, 随后检测 miR-10a 的水平, 以此评价 YY1 对 TNF- α /IL-1 β 引起 miR-10a 下调的影响。

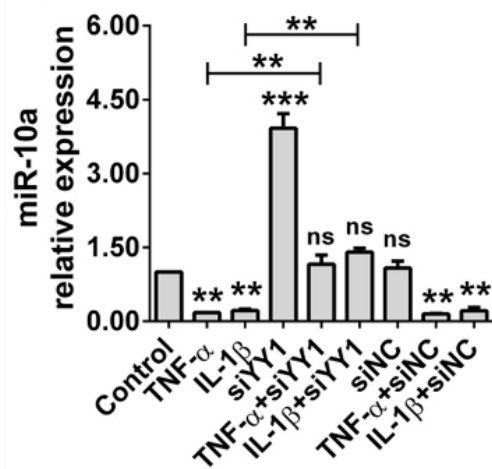


图1-9 si-YY对TNF- α /IL-1 β 引起miR-10a下调的影响 (n=5)

结果显示: si-YY1 (100nM)可显著上调 miR-10a 的表达水平 (4 倍左右), 提示 YY1 可能对 miR-10a 具有抑制效果; 同时, 敲低 YY1 水平后, TNF- α /IL-1 β 不能再引起 miR-10a 表达水平的下调, 提示 YY1 介导了 TNF- α /IL-1 β 诱发的 miR-10a 的下调。(图 1-9, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

为了明确 YY1 对 miR-10a 的调控作用, 我们从预测到的 YY1 结合位点入手, 将 miR-10a 转录起始位点上游-1500bp 的序列进行全合成, 并克隆至 pGL3-basic 载体中, 成为 pGL-miR-10a-YY1 报告基因载体。将上述报告基因载体分别和 pCMV-p65、pCMV-YY1、si-YY1 等按照图 1-10 中的分组, 共转至 HEK293T 细胞中, 24 h 后收集细胞, 检测荧光素酶活性。

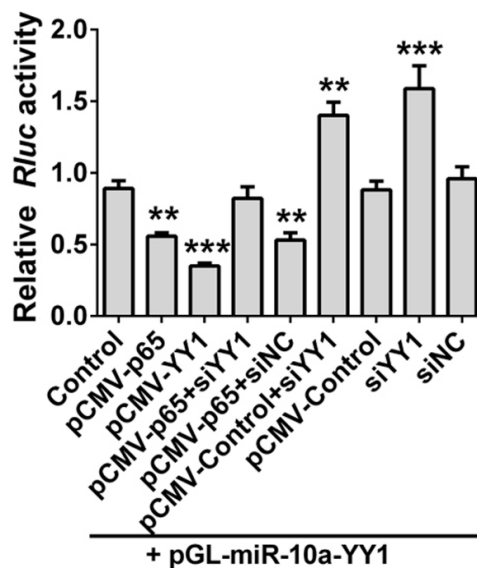


图1-10 p65/YY1/si-YY1对miR-10a的启动子活性的影响

结果显示, pCMV-p65 和 pCMV-YY1 均能够抑制 miR-10a 启动子的转录活性, 这也从侧面证实了 NF- κ B 通路对 miR-10a 的影响; 而 si-YY1 不仅能够逆转 pCMV-p65 对 miR-10a 启动子的抑制, 还能增强 miR-10a 启动子的活性, 这表明 p65 对 miR-10a 启动子的影响实际上是通过 YY1 发挥的, 而不是 p65 的直接作用, 跟我们的推测相符 (图 1-10, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。同时, 结合文献报道中 p65 对 YY1 的直接激活作用, 我们认为 TNF- α /IL-1 β 引起的 miR-10a 下调由 YY1 直接参与, 而这一进程由 p65 介导。

随后, 我们进一步完善了双荧光素酶报告基因实验。我们将 pGL-miR-10a-YY1 质粒按照图 1-7 中预测的结合位点进行突变, 并构建了 BS 1 M、BS 2 M 和 BS 1+2 M 三个突变型质粒 (BS 1 M, 结合位点 1 突变; BS 2M, 结合位点 2 突变; BS 1+2 M,

双位点突变), 将上述质粒分别和 pCMV-YY1、si-YY1 共转至 HEK293T 细胞, 24 h 后收集细胞, 检测荧光素酶活性。

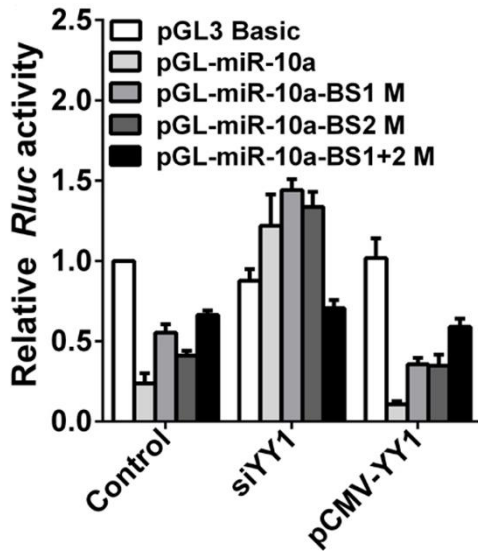


图1-11 YY1对miR-10a的启动子活性的影响

结果显示: 两个 YY1 结合位点突变后, YY1 对 miR-10a 启动子的活性影响消失; 而对两个位点的单突变结果证实了上述结果, 并且通过单独突变我们发现, 这两个 YY1 结合位点均对 miR-10a 的启动子活性具有调控作用, 而不是一强一弱或是仅有一个位点有效。(图 1-11)

为了进一步确证 YY1 对 miR-10a 启动子的影响, 我们采用染色质免疫共沉淀实验, 用 YY1 抗体“钓取”miR-10a 的启动子片段。

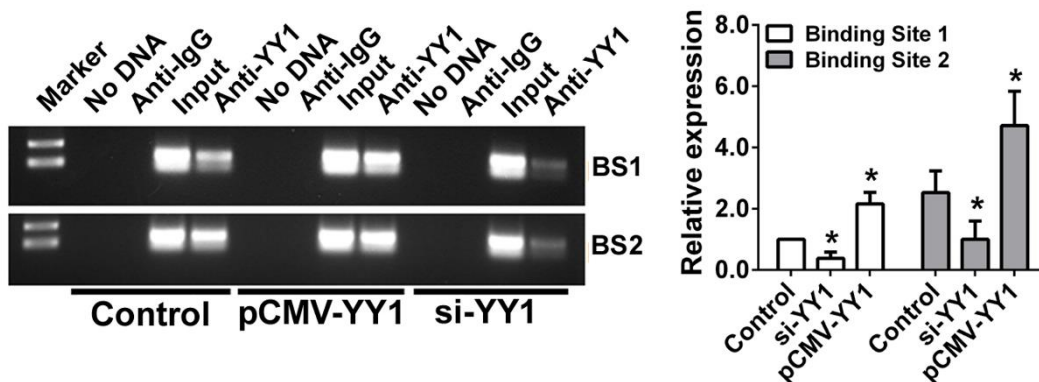


图1-12 ChIP实验验证YY1对miR-10a的启动子活性的影响

结果显示: 用 YY1 抗体“钓取”的 DNA 片段中确实含有 miR-10a 启动子区的片段, 并且随着 YY1 表达的升高或降低, 该片段的多少亦随之发生改变。表明 YY1 的的确确能够通过图 1-7 中的两个结合位点对 miR-10a 进行转录活性调控, 并且这

两个位点均具有调控活性。(图 1-12, * $p < 0.05$)

3.4 TNF- α /IL-1 β 或活化的 p65 可促进 YY1 的表达和其在细胞核内的分布

上述结果已证实 YY1 能够直接抑制 miR-10a 启动子的转录活性, 但是 TNF- α /IL-1 β 刺激或者说 NF- κ B 的活化能否引起 YY1 表达的升高呢? 如果可以, 这些升高的 YY1 真的就能够进入细胞核吗?

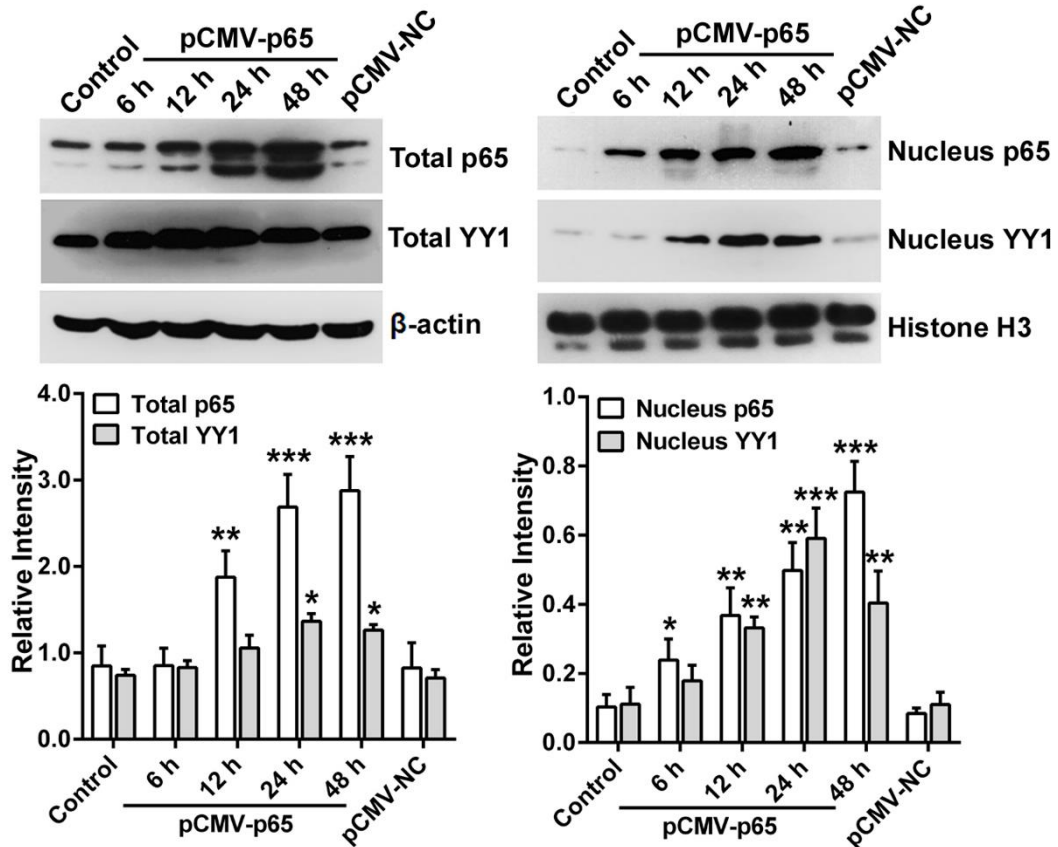


图1-13 pCMV-p65对p65、YY1表达和分布的影响 (n=3)

为了回答这些问题, 我们在 HEK293T 细胞中, 首先利用 pCMV-p65 质粒, 上调 p65 的表达水平, 随后分别提取细胞总蛋白和细胞核蛋白, 对其中的 p65 和 YY1 表达水平进行 Western blot 检测。结果显示, pCMV-p65 转染后, 细胞内总 p65、YY1 的表达量和细胞核内 p65, YY1 的表达量均升高(图 1-13, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), 提示 p65 确实能够正向调控 YY1 的表达, 并且能够引起细胞核内具有转录调控活性的 YY1 的表达升高。

与此同时, 我们为了评价 TNF- α /IL-1 β 刺激, 以及 NF- κ B 活化状态对 YY1 表达水平的影响, 我们分别用 TNF- α 、IL-1 β 、TNF- α +Bay11-7082、IL-1 β +Bay11-7082

处理细胞，24 h 后提取总蛋白，对 YY1 表达水平进行检测。

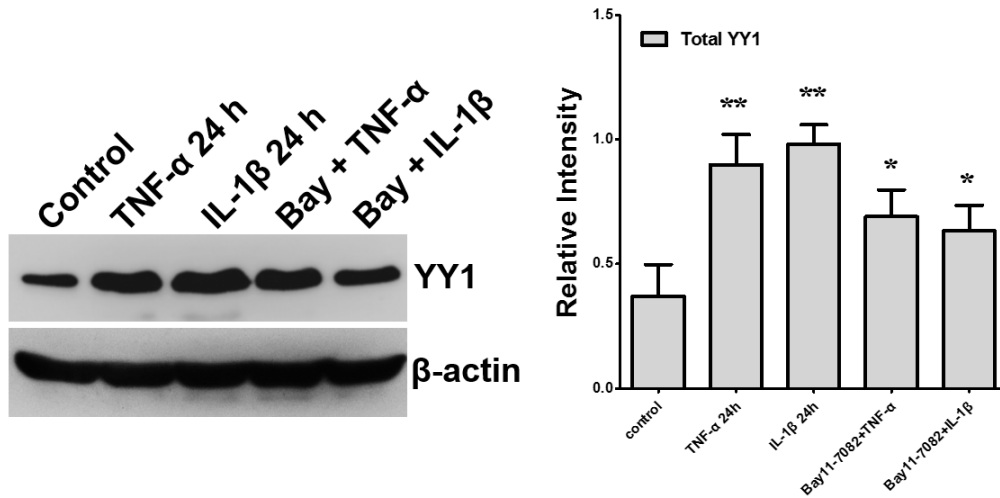


图1-14 TNF- α /IL-1 β 及NF- κ B活化状态对YY1表达水平的影响 (n=3)

结果显示：TNF- α /IL-1 β 刺激能够引起 YY1 表达的升高，而使用 Bay11-7082 后，可部分逆转这一现象（图 1-14，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ）。提示 TNF- α /IL-1 β 引起的 YY1 表达升高确实是通过 p65 的细胞核转移实现的。

3.5 IRAK4、TAK1 和 BTRC 是 miR-10a 的靶基因

前面的实验结果表明，RA FLS 细胞中 TNF- α /IL-1 β 可通过引起 NF- κ B 通路活化，p65 发生核定位增加，增强 YY1 的转录活性，随后 YY1 通过与 miR-10a 启动子区的结合位点结合，抑制 miR-10a 的转录，引起 miR-10a 下调。那么下调的 miR-10a 具有什么样的生物学功能呢？它对 RA FLS 的炎症病理学改变有什么影响呢？

总所周知，miRNAs 功能的发挥，主要依赖于它能够与目标靶基因的 mRNA 的 3' UTR 发生结合，并促使靶基因 mRNA 的降解或不能够翻译成蛋白质，继而实现相应的生物学功能。我们利用生物学分析的手段对 miR-10a 的靶基因进行预测，并从中选择与 NF- κ B 密切相关的基因进行研究。

IRAK4、TAK1 和 BTRC 便是我们最终选择的 miR-10a 潜在靶基因。IRAK4 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶，是介导 Toll 样受体和 IL-1 受体通路活化的重要信号转导媒介；TAK1 和 BTRC 则是两个负向调控因子，在 TNF- α /IL-1 β 刺激下，调控 I κ B 的降解。

为了对预测结果进行验证，我们分别将含有 IRAK4、TAK1 和 BTRC mRNA 3' UTR 序列的寡核苷酸片段克隆至 psi-CHECK2 双荧光素酶报告基因载体，并同时构

建对应结合位点突变的报告基因质粒。将上述双荧光素酶报告基因质粒分别与 miR-10a mimic 或 inhibitor 转染至 HEK293T 细胞中, 24 h 后收集细胞, 进行双荧光素酶活性分析, 根据结果评价 miR-10a 对 IRAK4、TAK1 和 BTRC mRNA 3' UTR 的调控活性。

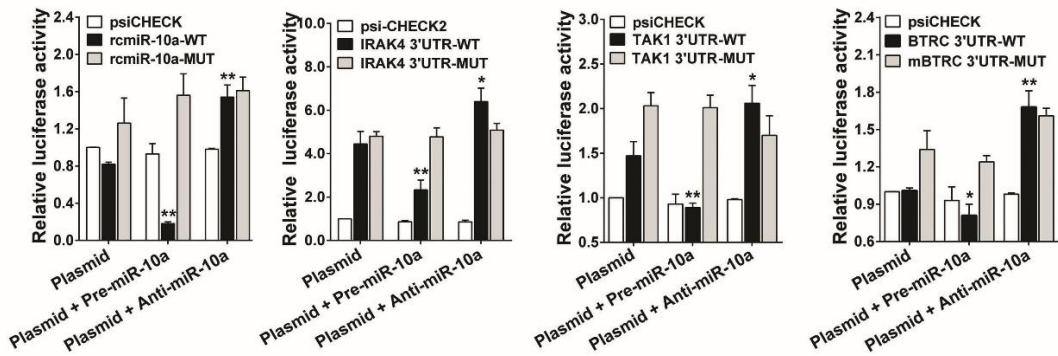


图1-15 miR-10a对IRAK4、TAK1和BTRC mRNA 3' UTR的影响

结果显示:与对照质粒相比,miR-10a mimic 能够显著抑制含有 IRAK4 ($p<0.01$)、TAK1 ($p<0.01$)和 BTRC ($p<0.05$) mRNA 3' UTR 质粒的 *RLuc* 活性;相反地,miR-10a inhibitor 能够上调 IRAK4 ($p<0.05$)、TAK1 ($p<0.05$)和 BTRC ($p<0.05$) mRNA 3' UTR 质粒的 *RLuc* 活性;当报告基因质粒中的结合位点被突变时,miR-10a mimic/inhibitor 的效果均消失了,与对照组相比,*RLuc* 活性几乎没有变化。这一结果表明 miR-10a 能够与 IRAK4、TAK1 和 BTRC mRNA 3' UTR 发生结合,并影响其活性。(图 1-15)

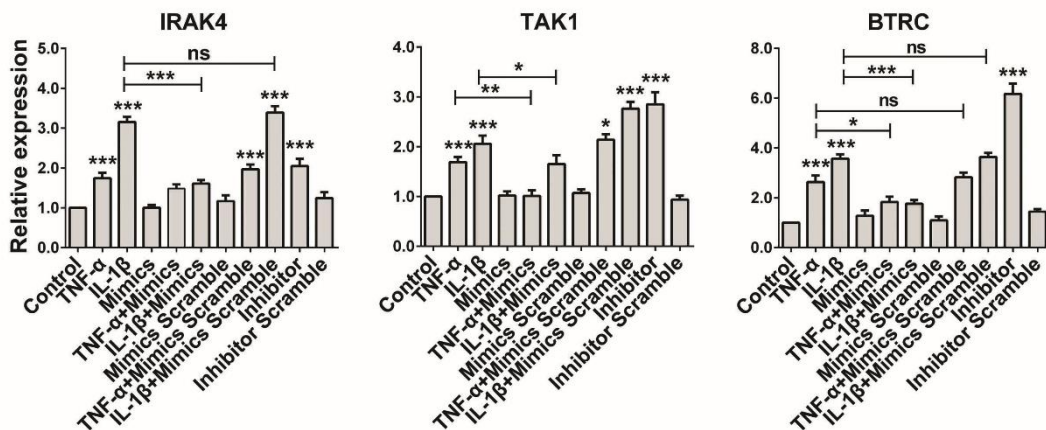


图1-16 miR-10a对IRAK4、TAK1和BTRC mRNA的影响 (n=3)

那么在 RA FLS 细胞中, miR-10a 能否影响 IRAK4、TAK1 和 BTRC 呢? 首先我们用 qRT-PCR 的方法,对 TNF- α /IL-1 β 刺激后,或转染了 miR-10a mimic/inhibitor 的 RA FLS 细胞中 IRAK4、TAK1 和 BTRC 的 mRNA 进行了检测。具体分组按照图

1-16 中的进行。

结果显示：miR-10a inhibitor 可引起 IRAK4、TAK1 和 BTRC 的 mRNA 表达升高，甚至超过了 TNF- α /IL-1 β 对其的影响；当 TNF- α /IL-1 β 与 miR-10a mimic 联合使用时，FLS 细胞中 IRAK4、TAK1 和 BTRC 的 mRNA 水平几乎没有变化。（图 1-16，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ）

随后，我们按照同样分组，对 RA FLS 细胞中 IRAK4、TAK1 和 BTRC 蛋白水平进行了检测。

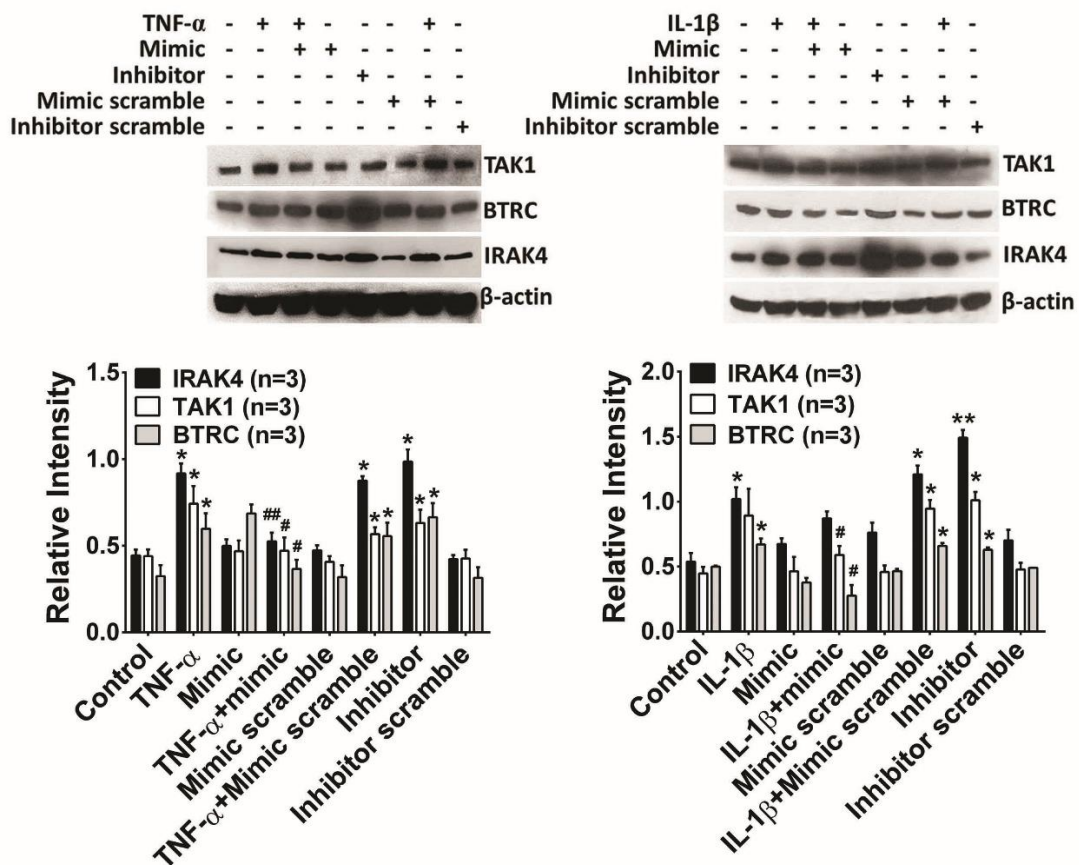


图1-17 miR-10a对IRAK4、TAK1和BTRC蛋白水平的影响（n=3）

与 mRNA 的结果类似：miR-10a inhibitor 可引起 IRAK4、TAK1 和 BTRC 的蛋白表达升高，甚至超过了 TNF- α /IL-1 β 对其的影响；当 TNF- α /IL-1 β 与 miR-10a mimic 联合使用时，FLS 细胞中 IRAK4、TAK1 和 BTRC 的蛋白水平几乎没有变化。（图 1-17，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ）

3.6 低表达的 miR-10a 能够促进 NF- κ B 的活化并加剧下游炎性细胞因子的产生

既然 IRAK4、TAK1 和 BTRC 均是在 NF- κ B 通路中及其重要的信号传递分子，

据此,我们在之前的结果之上提出假说: miR-10a 可通过影响 IRAK4、TAK1 和 BTRC 的表达,继而促进 NF- κ B 通路的活化和 p65 的细胞核转位。为了验证这一设想 miR-10a inhibitor 被转染至 RA FLS 细胞中,24 h 后,利用免疫荧光染色观看 p65 在细胞中的定位情况(图 1-18)。

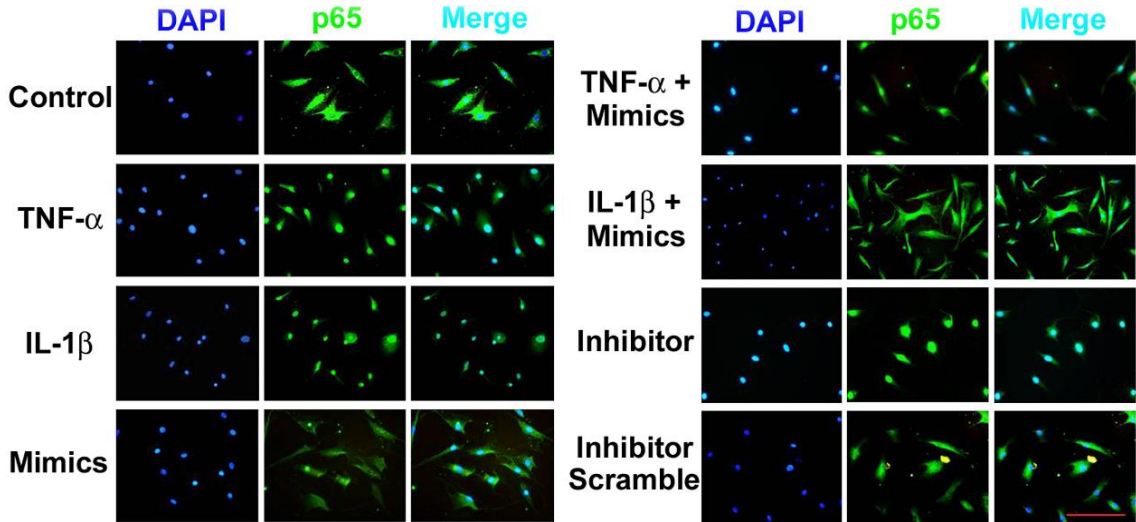


图1-18 p65在RA FLS细胞中的表达及分布 (bar=100 μ m)

结果显示: miR-10a inhibitor 能够加剧 NF- κ B 的活化和 p65 的细胞核转移,而 miR-10a mimic 能够部分阻断 TNF- α /IL-1 β 诱发的 NF- κ B 的活化和 p65 的细胞核转移(图 1-18)。

由于 miR-10a 能够高效的活化 NF- κ B,并促进 p65 的细胞核转移,我们便检测了 NF- κ B 下游调控的一些炎症因子的表达水平。

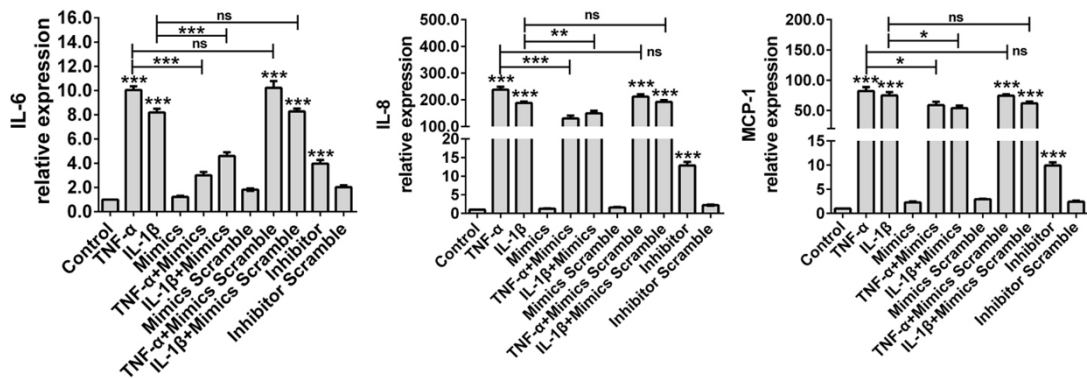


图1-19 miR-10a对IL-6、IL-8和MCP-1 mRNA的影响 (n=3)

结果显示: TNF- α /IL-1 β 能够促进 IL-6、IL-8 及 MCP1 等炎症因子 mRNA 表达水平的升高,而 miR-10a mimic 能够阻断这一效应。(图 1-19, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

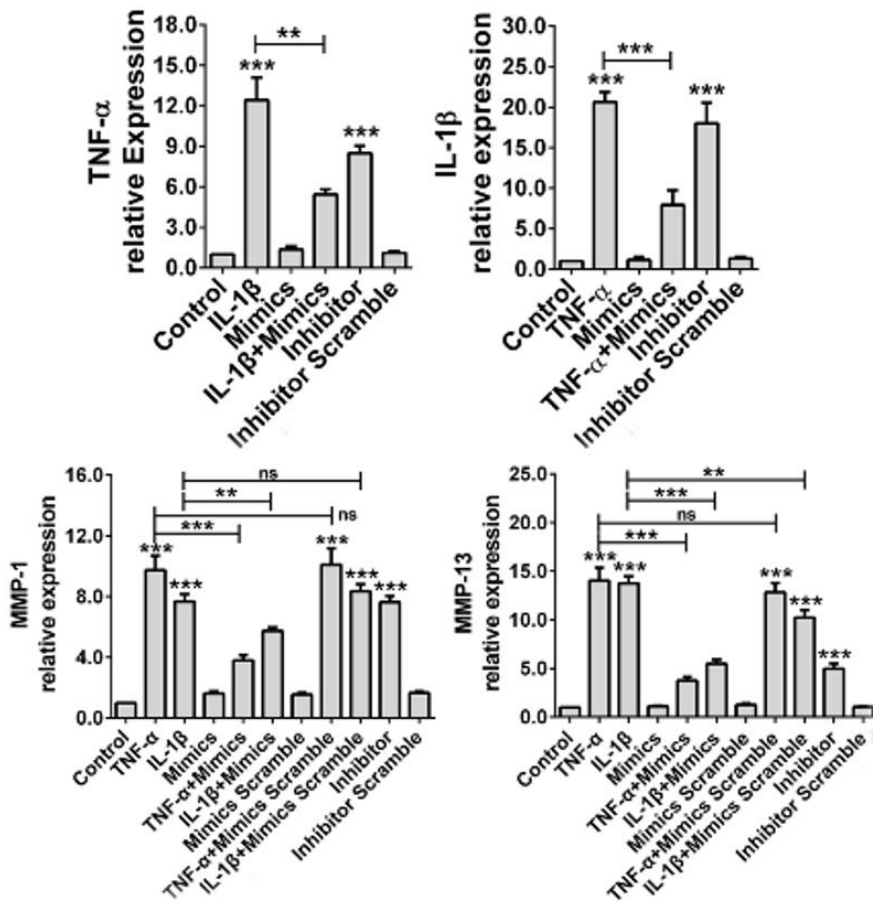


图1-20 miR-10a对TNF- α 、IL-1 β 、MMP-1和MMP-13 mRNA的影响 (n=3)

不仅如此, TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 同样也能被 miR-10a mimic/inhibitor 影响; 此外, 在 RA 中能降解滑膜组织细胞外基质的 MMP1 和 MMP13 同样也受到 miR-10a mimic/inhibitor 的调控。(图 1-20, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

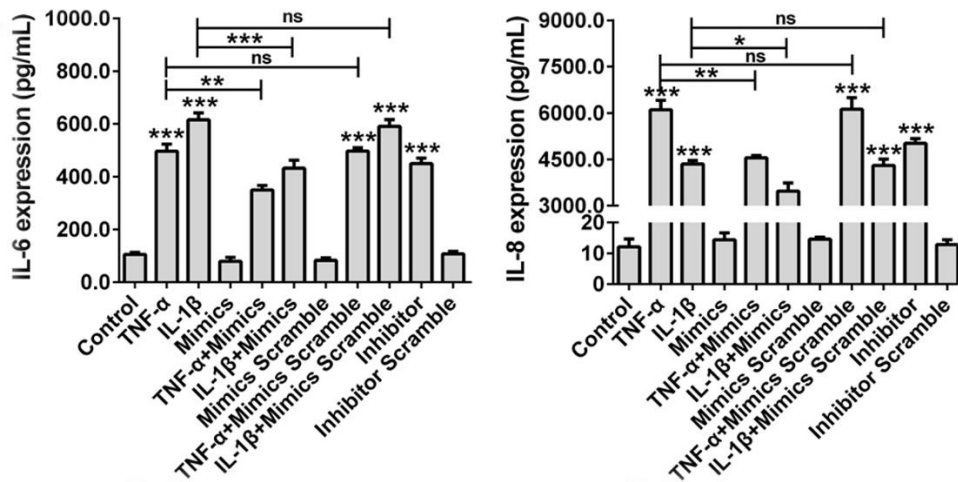


图1-21 miR-10a对RA FLS细胞产生的IL-6、IL-8的影响 (n=3)

随后, 我们利用 ELISA 试剂盒, 对 RA FLS 细胞培养上清中的 IL-6 和 IL-8 浓度进行测定。结果趋势与 mRNA 的检测结果类似, TNF- α /IL-1 β 能够促进 RA FLS 细胞产生 IL-6 和 IL-8, 而转染了 miR-10a mimic 之后, TNF- α /IL-1 β 诱导产生的 IL-6/IL-8 被部分阻断; 较对照组, 单独敲低 RA FLS 细胞中 miR-10a 的表达即可诱导 IL-6/IL-8 的分泌。(图 1-21, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.7 miR-10a 通过激活 NF- κ B 通路影响 RA FLS 细胞的增殖、侵袭和迁移能力

RA FLS 细胞的增殖能力及抗凋亡能力的改变, 与 RA 患者血管翳的形成和滑膜的恶性增生密切相关; 而 FLS 对软骨的侵蚀和对关节邻近骨的损伤, 则依赖于其在病理条件下迁移、侵袭能力的改变。重要的是, 上述 RA FLS 细胞功能学的改变, 均可受到 TNF- α /IL-1 β 等炎性因子的影响。那么, miR-10a 是否参与了对 RA FLS 细胞功能的影响呢?

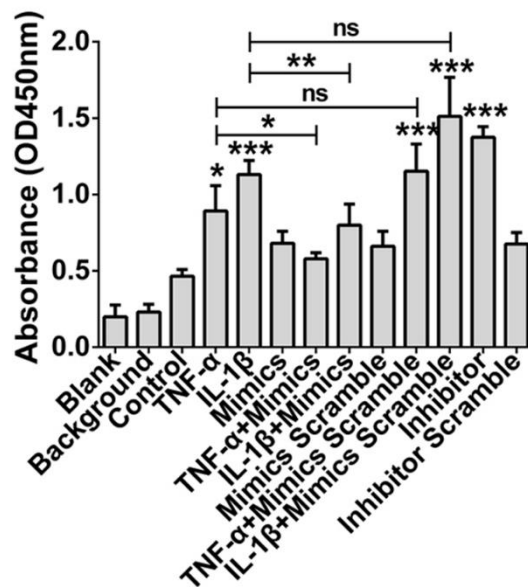


图1-22 miR-10a对RA FLS增殖能力的影响 (n=3)

在 RA FLS 细胞中, 我们分别利用 miR-10a mimic/inhibitor 改变 miR-10a 的表达水平, 并根据分组给予 TNF- α /IL-1 β 刺激, 24 h 后, 利用 BrdU 增殖实验, 评价不同组 FLS 细胞增殖能力的变化。结果显示: TNF- α /IL-1 β 可诱导 FLS 细胞的增殖; miR-10a mimic 能够抵消部分 TNF- α /IL-1 β 对 FLS 细胞增殖能力的影响; miR-10a inhibitor 也能够促进 FLS 细胞的增殖, 并且效果与 TNF- α /IL-1 β 相当。(图 1-22, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

通过前面的实验我们发现 TNF- α /IL-1 β 诱导 FLS 细胞中 miR-10a 的下调，能够引起 MCP-1、MMP-1 和 MMP-13 mRNA 表达的升高，提示 miR-10a 可能参与了 RA FLS 细胞介导的软骨损伤。但是，FLS 细胞要参与软骨损伤，侵袭和迁移能力的增强是一个必要条件。

因此，我们设计了 Transwell 侵袭实验，来评价 miR-10a 对 FLS 细胞侵袭能力的影响。分组如下：

- A. Control 组 B. IL-1 β 组 C. TNF- α +miR-10a mimic 组 (TNF- α +M 组)
 D. IL-1 β +miR-10a mimic 组 (IL-1 β +M 组)
 E. TNF- α +miR-10a mimic scramble 组 (TNF- α +MS 组)
 F. IL-1 β +miR-10a mimic scramble 组 (IL-1 β +MS 组)
 G. miR-10a mimic 组 (M 组) H. miR-10a mimic scramble 组 (MS 组)
 I. miR-10a inhibitor 组 (I 组) J. miR-10a inhibitor scramble 组 (IS 组)

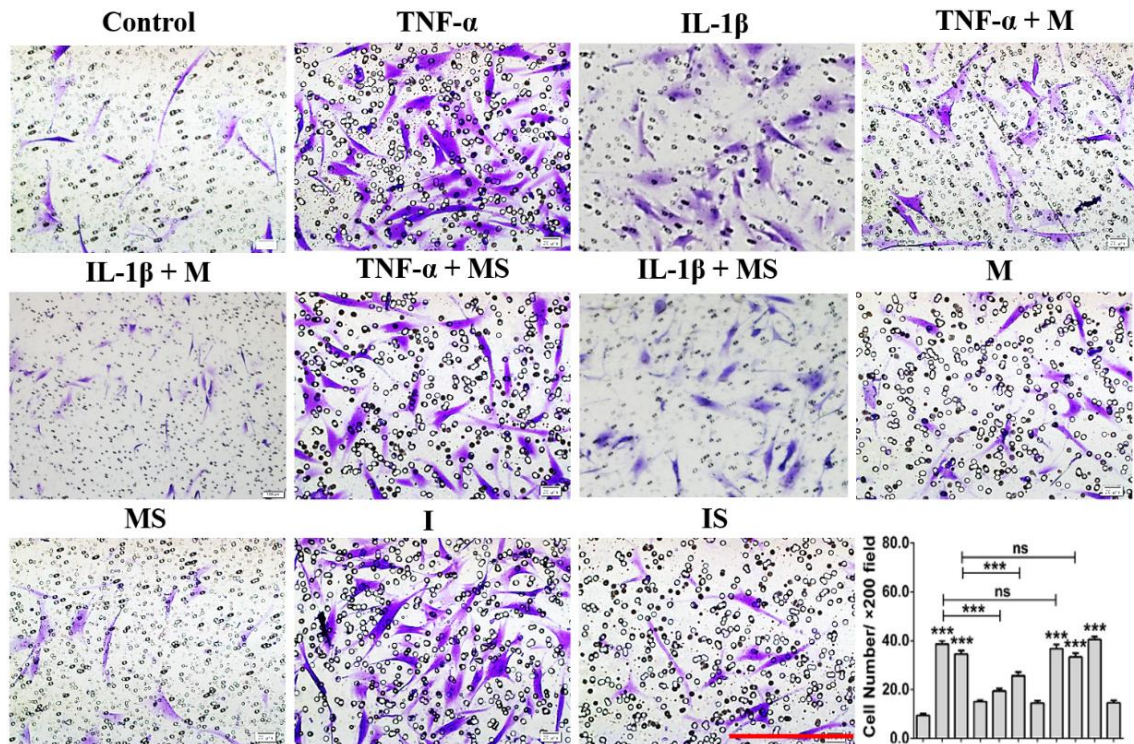


图1-23 miR-10a对RA FLS侵袭能力的影响 (bar=100 μ m)

通过对比在相同时间内穿过基质胶 FLS 细胞数目的多少，我们发现：TNF- α /IL-1 β 可促进 FLS 细胞的侵袭能力；而 miR-10a mimic 可阻滞这一影响；单独转染 miR-10a inhibitor 后，FLS 细胞的侵袭能力同样增强(图 1-23, *** $p < 0.001$)。

上述结果提示: miR-10a 参与了 TNF- α /IL-1 β 对 FLS 细胞侵袭能力的影响, 并且低表达的 miR-10a 能够促进 FLS 细胞的侵袭。

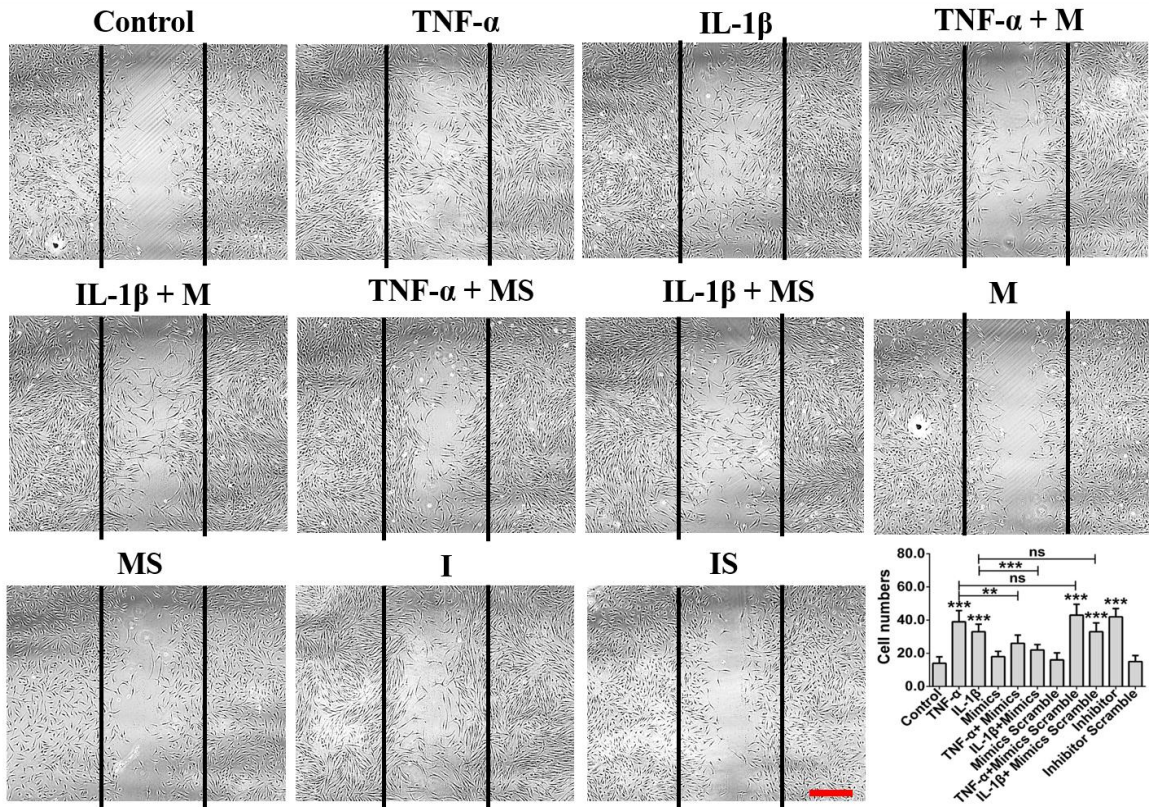


图1-24 miR-10a对RA FLS迁移能力的影响 (bar=100 μ m)

按照 Transwell 侵袭实验的分组, 划痕实验被用来评价 FLS 细胞迁移能力的改变。通过对比在相同时间内发生迁移 FLS 细胞数目的多少, 我们发现: TNF- α /IL-1 β 可促进 FLS 细胞的迁移能力; 而 miR-10a mimic 可抵消这一影响; 单独转染 miR-10a inhibitor 后, FLS 细胞的迁移能力同样增强 (图 1-24, *** $p < 0.001$)。上述结果提示: miR-10a 参与了 TNF- α /IL-1 β 对 FLS 细胞迁移能力的影响, 并且低表达的 miR-10a 能够促进 FLS 细胞的迁移。

4 讨论

TNF- α 和 IL-1 β 是两个至关重要的前炎性细胞因子, 能够介导强烈的炎症反应和调节机体免疫功能。异常的 TNF- α /IL-1 β 水平能够影响 NF- κ B 信号通路的活性, 继而造成广泛的病理影响。如糖尿病、肿瘤、骨质疏松症、自身免疫性疾病以及炎

症性肠病。TNF- α 、IL-1 β 及其对应受体 TNFR1、IL-1R 在 RA 患者滑膜组织和滑膜细胞中均呈现较高水平的表达，对 RA 慢性炎症的维持和 RA 造成的持续性炎性损伤至关重要。

作为滑膜组织内膜衬里层最主要的细胞类型，FLS 细胞是滑液分泌及关节腔微环境维持的中坚力量。RA FLS 参与了滑膜的恶性增生、炎性因子分泌、骨和软骨损伤等多个 RA 致病进程，TNF- α /IL-1 β 等炎性因子可诱发 FLS 细胞增殖并参与营造 RA 早期的滑膜炎性微环境，产生细胞因子募集更多的免疫细胞至关节局部，并通过分泌 IL-6、IL-8 和 MMPs 类的细胞因子，加剧并维持滑膜炎性环境，伺机造成软骨、骨的破坏。

近年来，miRNAs 在基因表达调控和疾病致病机制的研究中显得异常活跃，在 RA 中也有许多异常表达的 miRNAs 被报道，诸如 miR-146a, miR-155 和 miR-124a 等 miRNAs 已被证明在 RA 的病理进程中具有重要的生物学功能和调控网络。考虑到不同版本的 miRNA 芯片数据和可能潜在的种族差异，我们课题组前期也针对来自于 RA 和 OA 患者的 FLS 细胞进行了差异筛选，试图从中找到有意义的 miRNAs。

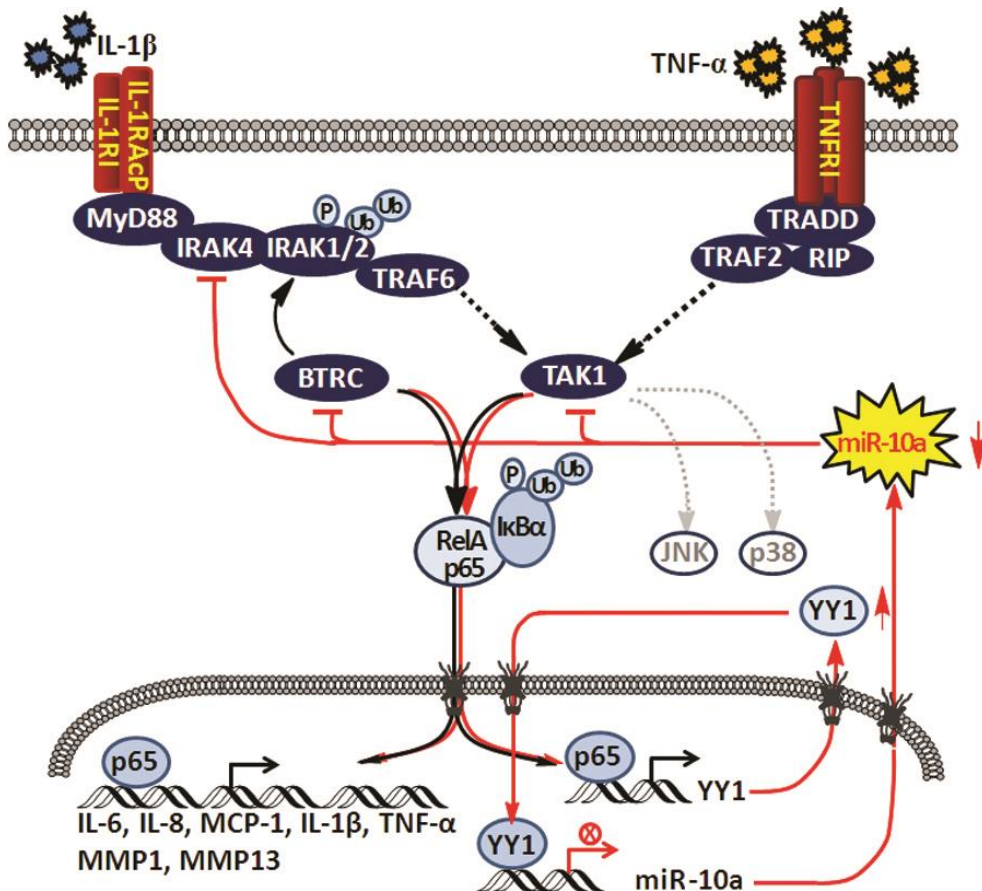


图1-25 TNF- α /IL-1 β /NF- κ B/YY1/miR-10a/NF- κ B正反馈调节环路

较 OA FLS, miR-10a 在 RA FLS 细胞中下调了 3-5 倍左右。经过查阅文献, 我们发现 miR-10a 在许多自身免疫性疾病中均有一定的作用, 如系统性红斑狼疮和炎症性肠病, 在炎症性肠病中, miR-10a 通过调控 IL-12/IL-23p40, 参与 Th1/Th17 细胞的免疫应答。但是, 目前还没有 miR-10a 在 RA 中功能的研究。

本研究中, 我们发现 TNF- α /IL-1 β 能够下调 FLS 细胞中 miR-10a 的表达, 并且这一作用依赖于 NF- κ B 通路的活化, 进而促进其下游负向转录因子 YY1 的表达来实现。FLS 细胞中低水平的 miR-10a 反向又能通过对 IRAK4、TAK1 和 BTRC 的调控, 引起 NF- κ B 通路的活化, 诱发 IL-6、IL-8、MCP-1、MMP1 和 MMP13 等细胞因子的产生, 这些细胞因子均是 RA 病理进程中尤为重要的参与者, 对 RA 炎性环境的维持和骨、软骨的损伤十分重要。通过这些细胞因子, miR-10a 能够促进 FLS 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

综上所述, 本部分研究提示: 在 RA FLS 细胞中, 存在 TNF- α /NF- κ B/YY1/miR-10a/NF- κ B 这一正反馈调节环路, miR-10a 在其中扮演了关节分子的角色, 通过影响 miR-10a, 能够有效影响 FLS 细胞 IL-1 β 、TNF- α 和 MMPs 等炎症因子的产生, 缓解 RA 炎症反应。miR-10a 有望成为调控上述正反馈环路的开关, 成为 RA 抗炎治疗的新靶点。

第二部分 DDR2-H19-miR-103a 通路在 RA 炎症反应诱发的骨重塑进程中的作用及机制

引 言

类风湿性关节炎（RA）是一种全身性自身免疫病，发病机制不明。主要以慢性、进行性、侵袭性、致残性关节病变为临床表现。伴随着病情的发展，可导致关节邻近骨、软骨的损伤，最终造成关节畸形，甚至关节功能的丧失，严重影响患者的生活质量，具有极高的致残率。

现有研究表明：成纤维细胞样滑膜细胞（FLS）是滑膜组织的主要组成部分，在 RA 病理进程中，RA FLS 可产生大量的炎症因子及蛋白酶类物质，FLS 细胞增生形成并攀爬于软骨表面的血管翳是 RA 关节邻近骨、软骨损伤的结构基础，而直接参与 RA 滑膜增生及中晚期的关节软骨破坏的关节局部大量存在的胶原酶和蛋白酶类物质。

盘状结构域受体 2（Discoindin Domain Receptors, DDR2）是一个酪氨酸蛋白激酶受体（配体为 II 型胶原），是我们课题组于 1999 年首次通过差异筛选的方法发现的在 RA 滑膜组织和 RA FLS 细胞中呈高表达的蛋白分子，并在国际上首次证实了 DDR2 在 RA FLS 细胞介导的 RA 关节软骨损伤进程中发挥重要作用。虽然我们创新性的提出并证实了 DDR2 在 RA 关节邻近骨、软骨损伤中的重要作用，并初步对上述作用的机制进行了研究。但我们之前主要围绕受 DDR2 活化影响的 MMP1、MMP13 等 MMPs 类分子及相关调控机制开展了相关研究工作。RA 炎症反应能够募集大量的免疫细胞，在关节腔内蓄积了高浓度的各类细胞因子及炎症因子，使得 RA 炎症诱发的骨重塑病理进程十分复杂。RA 病理条件下，FLS 细胞功能的改变对“成骨-破骨平衡”的影响意义重大，DDR2 在“成骨-破骨平衡”中的作用及调控机制仍有待于进一步阐明。

Long noncoding RNA (LncRNA) 是长度大于 200nt 的非编码 RNA，具有 mRNA 样结构但是不能编码蛋白质。近期的研究表明它们能够在转录、转录后或翻译水平

影响基因的表达调控,广泛参与各类疾病的发生、发展,比如恶性肿瘤、代谢系统疾病、遗传发育及心血管系统疾病等。LncRNA 在 RA 病理进程中的研究远不如上述疾病,目前仅有一篇发表在 2003 年的 *Am J Pathol* 杂志上的文章,报道了目前唯一一个与 RA 相关的 LncRNA H19。Kinne RW 等人的研究表明 LncRNA H19 在 RA 患者滑膜组织中表达量高于 OA 患者滑膜组织,并定位于滑膜的衬里层(主要是 FLS 细胞)。但是碍于当时的技术和研究手段,该研究小组未就 H19 的功能及调控机制进行更深入的探讨。鉴于非编码 RNA 广泛的生理、病理调控范围以及在 RA 病理过程中的重要作用,我们设想是否有非编码 RNA 参与了 DDR2 介导了 RA 关节软骨损伤呢?

LncRNA H19 和 miR-103a 是我们筛选得到的在 DDR2 活化后的 FLS 细胞中异常表达的非编码 RNA。生物信息学分析显示 H19 可作为竞争性内源 RNA 吸附 miR-103a,而 miR-103a 可直接作用于 IL-15/DKK1 的 3' UTR 影响其翻译。IL-15 作为重要的前炎性细胞因子,在 RA 滑膜炎症的发生、发展进程中具有重要作用,特别是近年的研究表明其中破骨细胞分化进程中亦有显著的效果;而 DKK1 则是 Wnt 通路的抑制剂,Wnt 通路在骨的形成进程中具有重要作用。因此,我们认为,在 RA FLS 细胞中存在着 DDR2-H19-miR-103a 通路,在胶原持续作用下,该通路介导了 FLS 细胞 IL-15/DKK1 的过度分泌,导致关节微环境的“成骨-破骨平衡”被破坏,直接参与了 RA 关节邻近骨、软骨的破坏。那么,该通路在 RA 滑膜细胞侵袭及关节软骨破坏中发挥的作用是什么?其具体的调控机制又是什么呢?

本部分研究以 DDR2-H19-miR-103a 通路的功能研究为突破口,综合利用生物信息学、原位杂交、RNA pull-down 等技术,系统研究 DDR2-H19-miR-103a 通路在 RA 关节邻近骨、软骨破坏进程中发挥的作用及其调控机制,为 DDR2 介导的 RA 关节邻近骨、软骨损伤的作用机制提供新认识,为开发防治 RA 关节邻近骨、软骨损伤的新药奠定理论基础。

1 实验材料

1.1 主要试剂

1.1.1 主要试剂和试剂盒

与第一部分所用试剂相同的部分在此不再赘述

名 称	来 源
α -MEM 培养液	Gibco, Thermo Fisher Scientific 公司
鸡 II 型胶原 (细胞实验)	Sigma-Aldrich 公司
牛 II 型胶原 (动物实验)	Chondrex 公司
完全弗氏佐剂	Chondrex 公司
miRNA agomir	广州锐博生物
miRNA antagomir	广州锐博生物
LncRNA Smart Silencer	广州锐博生物
LncRNA FISH probe	广州锐博生物
Streptavidin Agarose	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific 公司
Q5® High-Fidelity PCR 酶	New England Biolabs 公司
Ficoll-Paque™ PREMIUM	GE 公司
重组人 IL-15	R&D Systems
重组人 RANKL	R&D Systems
重组人 M-CSF	R&D Systems
RNase inhibitor	碧云天生物
Proteinase	碧云天生物
DTT	碧云天生物
RNase-free BSA	Sigma-Aldrich 公司
Yeast tRNA	Sigma-Aldrich 公司
EDTA 脱钙液	武汉博士德生物
PrimeScript™ RT reagent Kit	Takara 公司
TRAP 染色试剂盒	Sigma-Aldrich 公司
定点突变试剂盒	New England Biolabs 公司

体外转录试剂盒	Epicentre 公司
质粒提取、胶回收试剂盒	QIAGEN 公司
LncRNA FISH 试剂盒	广州锐博生物
人 IL-15 ELISA 试剂盒	eBioscience 公司
小鼠 IL-15/IL-15R ELISA 试剂盒	eBioscience 公司
人 DKK1 ELISA 试剂盒	R&D 公司
小鼠 DKK1 ELISA 试剂盒	Abcam 公司
LncRNA Smart Silencer	广州锐博生物

h-H19 Smart Silencer 的靶序列为:

CCAACATCAAAGACACCAT; CCCGTCCCTTCTGAATTTA;
CGTGACAAGCAGGACATGA; CCACGGAGTCGGCACACTAT;
CTCCATCTTCATGGCCACCC; CACCTTGGCAAGTGCCTGTG;

1.1.2 抗体

与第一部分所用抗体相同的部分在此不再赘述

名 称	用途与稀释比例	来源及货号
IL-15	WB, 1:1000	Abcam, ab109082
Argonaute 2	WB, 1:1000	Cell signal, 2897
c-Myc	ChIP, 1:200	Cell signal, 13987
IL-15	Neutralization, 0.5 µg/mL	R&D, MAB247
DKK1	WB, 1:2000	Abcam, ab109416

1.1.3 其他

SPF 级 DBA/1(H-2^g)小鼠和 ⁶⁰Co 鼠繁殖料, 购自北京华阜康生物科技有限公司;
FcDDR2 质粒由宁夏医科大学赵薇教授提供, FcDDR2 病毒及对照病毒由广州复能
基因有限公司包装; 全部引物和基因的合成由上海生工生物有限公司完成。

1.2 常用缓冲液

与第一部分所用缓冲液相同的部分在此不再赘述

细胞裂解液 (10 mL): 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 μ L; 200 mM NaCl, 117 mg; 2.5 mM MgCl₂, 2.5 μ L; 60 U mL⁻¹ RNase inhibitor, 15 μ L (40 U/ μ L); 1 mM DTT, 1.5425 mg; protease inhibitor, 10 μ L; 4°C 保存

低盐缓冲液 (10 mL): 0.1% SDS, 100 μ L; 1% Triton X-100, 100 μ L; 2 mM EDTA, 40 μ L; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 μ L; 150 mM NaCl, 87.75 mg; 4°C 保存

高盐缓冲液 (10 mL): 0.1% SDS, 100 μ L; 1% Triton X-100, 100 μ L; 2 mM EDTA, 40 μ L; 20 mM Tris-HCl pH 8.0 (1 M Tris-HCl pH 8.0, 200 μ L); 500 mM NaCl, 292.5 mg; 4°C 保存

NT 2 buffer (50 mL): 2.5 mL 1M Tris, pH 7.4; 7.5 mL 1 M NaCl; 50 μ L 1 M MgCl₂; 25 μ L NP 40; 47.5 mL RNase-DNase-Free Water; 4°C 保存

TE buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; 4°C 保存

封闭液 (10 mL): 0.1 mg RNase-free BSA; 5 mg Yeast tRNA; 10 mL RNase-DNase-Free Water; -70°C 保存

1 M Tris-HCl, pH 7.4; 1 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 M MgCl₂; 0.5 M EDTA, pH 8.0; 均购自碧云天生物

1.3 主要仪器

与第一部分所用仪器相同的部分在此不再赘述

名称	生产厂家
激光扫描共聚焦显微镜	Olympus
Inveon Micro-CT/PET	Siemens
硬组织切片机	Leica
手持电动匀浆器	IKA
旋转培养器	海门其林贝尔
超速大容量离心机	Beckman Coulter

2 方法

2.1 小鼠 CIA 模型的制备

SPF 级 DBA/1(H-2^q)小鼠和 ⁶⁰Co 鼠繁殖料,购自北京华阜康生物科技有限公司,并有我校实验动物中心代为饲养。选取 6-8 周龄的 DBA/1 小鼠进行实验,实验前仔细检查小鼠体重、毛色及有无寄生虫污染。

- A. 将高纯度的牛 II 型胶原(Chondrex 公司,2 mg/mL)与完全弗氏佐剂(含 4 mg/mL 结核分枝杆菌)从冰箱取出,冰上融化
- B. 按照每只 50 μ L 胶原+50 μ L 佐剂=100 μ L 的注射量,计算共需的胶原和佐剂量,并尽量多准备些胶原和佐剂
- C. 将 5 mL 无菌注射器去除针头和活塞,链接医用三通阀,按照计算好的体积,将等体积牛 II 型胶原和完全弗氏佐剂加入至 5 mL 注射器中
- D. 于冰上用手持电动匀浆器持续匀浆 5 min,转速 16000 rpm/min。根据液体总量上下调整匀浆器转头,保证匀浆均匀,并可延长匀浆时间至 10 min
- E. 匀浆结束后将乳剂滴加至含水烧杯中,若乳剂成颗粒团状漂浮于水中,并可长时间维持不扩散,则乳化效果较好;若乳剂入水后立即散开,或在短时间内散开,则效果欠佳,此时可进行第二轮匀浆,直至乳化效果达到要求为止
- F. 将乳化好的乳剂于冰上放置或 4 $^{\circ}$ C 保存备用
- G. 用 3%水合氯醛,按照 10 μ L/g 的剂量对 DBA/1 小鼠进行麻醉,随后按照 100 μ L/只的剂量注射乳剂进行免疫,注射位置为距鼠尾根部 1-2 cm 的皮内,进针角度 15-30 $^{\circ}$,深度约 50-80 mm。若扎穿鼠尾,则免疫失败。
- H. 同时取对照组 DBA/1 小鼠于同样部位注射 100 μ L 生理盐水
- I. 注射完成后密切观看动物状态,为防止水合氯醛过量导致的呼吸抑制,可将动物置于 40 $^{\circ}$ C 左右的加热板上,待动物完全苏醒后,常规培养

2.2 Agomir 给药方案及检查

首次免疫 21 天后陆续开始有动物发病,选取病程相似的小鼠进行编组,自发病之日起开始给予 Agomir。给药途径:踝关节腔内给药,每次 10 μ L,5 nmol/次,4 天一次,连续 4 周。Agomir NC 剂量:5 nmol/次,4 天一次,自发病开始连续 4 周。

诱导成功后每 4 天对各组动物进行关节指数评分，并拍照；诱导成功后 4 周，采用 microCT 的手段观察动物关节损伤情况，随后处死小鼠，将关节部位用多聚甲醛进行固定，48 h 后更换固定液为 EDTA 脱钙液，每 3 天更换一次脱钙液，连续脱钙 4 周后进行石蜡包埋。同时，每组动物取 3 只进行滑膜组织总 RNA 和蛋白的提取。

2.3 相关载体的构建

Homo H19 全长 2660bp, Gene ID: 283120; 五个外显子区, 2322bp。序列如下:

```
GGGAGGGGGTGGGATGGGTGGGGGGTAACGGGGGAACTGGGGAAGTGGGGAACCGAGGGGCAACC
AGGGGAAGATGGGGTGCTGGAGGAGAGCTTGTGGGAGCCAAGGAGCACCTTGGACATCTGGAGTCTG
GCAGGAGTGATGACGGGTGGAGGGGCTAGCTCGAGGCAGGGCTGGTGGGGCCTGAGGCCAGTGAGG
AGTGTGGAGTAGGCCGCCAGGCATCGTCAGACAGGGCGACATCAGCTGGGGACGATGGGCCTGAGC
TAGGGCTGAAAAGAAGGGGGAGCCAGGCATTCATCCCGTCACTTTTGGTTACAGGACGTGGCAGCTG
GTTGGACGAGGGGAGCTGGTGGGCAGGGTTTATGCCAGGGCCTGGGCAACGGAGGTGTAGCTGGCA
GCAGCGGGCAGGTGAGGACCCATCTGCCGGGCAGGTGAGTCCCTCCCTCCCCAGGCCTCGCTTCCC
CAGCCTTCTGAAAAGAAGGAGGTTTAGGGGATCGAGGGCTGGCGGGGAGAAGCAGACACCCTCCCAGC
AGAGGGGCAGGATGGGGGCAGGAGAGTTAGCAAAGGTGACATCTTCTCGGGGGGAGCCGAGACTGCG
CAAGGCTGGGGGGTTATGGGCCCGTCCAGGCAGAAAAGAGCAAGAGGGCAGGGAGGGGAGCACAGGG
GTGGCCAGCGTAGGGTCCAGCACGTGGGGTGGTACCCAGGCCTGGGTGAGACAGGACAGGACAGG
GGACACAGGACAGAGGGGTCCCGAGCTGCCACCTCACCCACCGCAATTCATTTAGTAGCAGGCACAGG
GGCAGCTCCGGCACGGCTTTCTCAGGCCTATGCCGGAGCCTCGAGGGCTGGAGAGCGGGAAGACAGG
CAGTGCTCGGGGAGTTGCAGCAGGACGTCACCAGGAGGGCGAAGCGGCCACGGGAGGGGGGCCCCG
GGACATTGCGCAGCAAGGAGGCTGCAGGGGCTCGGCCTGCGGGCGCCGGTCCACGAGGCACTGCGG
CCCAGGGTCTGGTGCAGGAGAGGGGCCACAGTGGACTTGGTGACGCTGTATGCCCTCACCGCTCAGCCC
CTGGGGCTGGCTTGGCAGACAGTACAGCATCCAGGGGAGTCAAGGGCATGGGGCGAGACCAGACTAG
GCGAGGGCGGGCGGGGCGGAGTGAATGAGCTCTCAGGAGGGAGGATGGTGACGGCAGGGGTGAGGAG
CGCAGCGGGCGGCGAGCGGGAGGCACTGGCCTCCAGAGCCCGTGGCCAAGGGCGGGCCTCGCGGGCG
GCGACGGAGCCGGGATCGGTGCCTCAGCGTTCGGGCTGGAGACGAGGCCAGGTCTCCAGCTGGGGTG
GACGTGCCACCAGCTGCCGAAGGCCAAGACGCCAGGTCCGGTGGACGTGACAAGCAGGACATGACA
TGGTCCGGTGTGACGGCGAGGACAGAGGAGGCGCGTCCGGCCTTCCCTGAACACCTTAGGCTGGTGGG
GCTGCGGAAGAAGCGGGTCTGTTTCTTACTTCTCCACGGAGTCGGCACACTATGGCTGCCCTCTGG
GCTCCCAGAACCCACAACATGAAAGAAATGGTGCTACCCAGCTCAAGCCTGGGCCTTTGAATCCGGAC
ACAAAACCCCTTAGCTTGGAAATGAATATGCTGCACCTTACAACCACTGCACTACCTGACTCAGGAATC
GGCTCTGGAAGGTGAAGCTAGAGGAACCAGACCTCATCAGCCCAACATCAAAGACACCATCGGAACA
GCAGCGCCCGCAGCACCCACCCCGCACCGGGCGACTCCATCTTCATGGCCACCCCTGCGGCGGACGGT
TGACCACCAGCCACCACATCATCCAGAGCTGAGCTCCTCCAGCGGGATGACGCCGTCCCCACCACCT
CCCTCTTCTTTTTTATCCTTCTGTCTCTTTGTTTCTGAGCTTTCCTGTCTTTCTTTTTTCTGAGAGAT
TCAAAGCCTCCACGACTCTGTTTCCCCCGTCCCTTCTGAATTTAATTTGCACTAAGTCATTTGCACTGGT
TGGAGTTGTGGAGACGGCCTTGAGTCTCAGTACGAGTGTGCGTGAGTGTGAGCCACCTTGGCAAGTGC
CTGTGACAGGGCCCGCCGCCCTCCATCTGGGCCGGGTGACTGGGCGCCGGCTGTGTGCCCGAGGCCTC
ACCCTGCCCTCGCTAGTCTGGAAGCTCCGACCGACATCACGGAGCAGCCTTCAAGCATTCCATTACGC
CCCATCTCGCTCTGTGCCCTCCCCACCAGGGCTTCAGCAGGAGCCCTGGACTCATCATCAATAAACAC
TGTTACAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

2.3.1 pEGFP-H19 和 pcDNA-H19 的制备:

引入 *Hind* III 和 *Sac* II 两个酶切位点，将 Homo H19 全长交上海生工进行全基因合成，后将其克隆至 pEGFP-N1 载体中，即得 pEGFP-H19。用 *Hind* III 和 *Bam*HI 对 pEGFP-H19 进行双酶切，将小片段克隆至 pcDNA 3.1 (+) 载体中，即得 pcDNA-H19。

2.3.2 psi-CHECK-2×miR-103a,

psi-CHECK-2×mmiR-103a,psi-CHECK-4×miR-103a 和 psi-CHECK-4×mmiR-103a 的制备:

以 *Not* I 和 *Xho* I 为酶切位点, 按照下列序列设计和成相关寡核苷酸序列, 经退火反应后, 得目的双链 DNA 片段, 插入至 psi-CHECK-2 空载体中, 即得 psi-CHECK-2×miR-103a、psi-CHECK-2×mmiR-103a、psi-CHECK-4×miR-103a 和 psi-CHECK-4×mmiR-103a。随后通过测序进行验证。

psi-CHECK-2×miR-103a

Foward: 5'-TCGAGTCGACTCATAGCCCTGTACAATGCTGCTTCGACTCATAGCCCTGTACAATGCTGCTGC-3'

Reverse: 5'-GGCCGCAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAGTCGAAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAGTCGAC-3'

psi-CHECK-2×mmiR-103a

Foward: 5'-TCGAGTCGACTCATAGCCCTGTACAATCGACCTTCGACTCATAGCCCTGTACAATCGACCTGC-3'

Reverse: 5'-GGCCGCAGGTCGATTGTACAGGGCTATGAGTCGAAGGTCGATTGTACAGGGCTATGAGTCGAC-3'

psi-CHECK-4×miR-103a

Foward: 5'TCGAGTCGACTCATAGCCCTGTACAATGCTGCTTCGACTCATAGCCCTGTACAATGCTGCTTCGACTCATAGCCCTGTACAATGCTGCTGC-3'

Reverse: 5'-GGCCGCAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAGTCGAAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAGTCGAAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAGTCGAC-3'

psi-CHECK-4×mmiR-103a

Foward: 5'-TCGAGTCGACTCATAGCCCTGTACAATCGACCTTCGACTCATAGCCCTGTACAATCGACCTTCGACTCATAGCCCTGTACAATCGACCTGC-3'

Reverse: 5'-GGCCGCAGGTCGATTGTACAGGGCTATGAGTCGAAGGTCGATTG

TACAGGGCTATGAGTCGAAGGTCGATTGTACAGGGCTATGAGTCGAAGGTCGA
TTGTACAGGGCTATGAGTCGAC-3'

2.3.3 psi-IL-1、psi-mIL-15 质粒的制备:

psi-IL-15 质粒及 psi-mIL-15 质粒的构建方法参照第一部分实验的操作步骤进行。

2.3.4 pGL-H19 promoter 质粒及 pGL-H19 promoter MUT 质粒的制备:

以人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞的基因组 DNA 为模板, 引入 *Kpn* I 和 *Hind* III 两个酶切位点, 利用 PCR 反应, 获取 homo H19 转录起始位点上游-1500bp 的潜在启动子区。

PCR 引物如下:

Forward: 5'-CGGGGTACCATCACGTCCGGCCGGCGGTA-3'

Reverse: 5'-GGGAAGCTTTCACCCTGCTCCTCGGTCCTAGCC-3'

PCR 反应体系如下:

PCR reaction mix component	Volume per reaction (μL)
Q5 High-Fidelity 2×Master Mix	25.0
10 μM Forward Primer	2.50
10 μM Reverse Primer	2.50
Template DNA	10.00 (4 μg)
Nuclease free water	10.00
Total	50.00

PCR 反应条件如下:

Step Type	Temperature (°C)	Time
HOLD	98	30 sec
35 cycles	98	10 sec
	68	30 sec
	72	60 sec
HOLD	72	2 min
HOLD	4	∞

将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检验 PCR 反应效果。确认片段大小后进行双酶切, 插入至 pGL-3 basic 载体中, 可得 pGL-H19 promoter 质粒。

为了获取 pGL-H19 promoter MUT 质粒, 选择 NEB 公司的 Q5® 定点突变试剂盒, 对 pGL-H19 promoter 质粒进行定点突变。

H19 promoter MUT 引物:

Forward: 5'-CTACCAGTATGTGCAGGGGCGCTGGC-3'

Reverse: 5'-ACGTTCTGGGGGCCAGCTGCGGG-3'

PCR 反应体系如下:

PCR reaction mix component	Volume per reaction (μL)
Q5 Hot Start 2 \times Master Mix	25.0
10 μM Forward Primer	2.50
10 μM Reverse Primer	2.50
Template DNA	1.00 (100 ng)
Nuclease free water	19.00
Total	50.00

PCR 反应条件如下:

Step Type	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time
HOLD	98	30 sec
25 cycles	98	10 sec
	64	30 sec
	72	3.5 min
HOLD	72	2 min
HOLD	4	∞

PCR 反应结束后按照下表组装反应进行酶切

	Volume	Final CONC.
PCR product	1 μL	
2 \times KLD Reaction Buffer	5 μL	1 \times
10 \times KLD Enzyme Mix	1 μL	1 \times
Nuclease free water	3 μL	

混合均匀, 室温 (15°C - 25°C) 孵育 5 min

取上述混合物 5 μL 转化至 50 μL DH5 α 感受态菌中, 待次日挑取单克隆即得 pGL-H19 promoter MUT 质粒

2.4 体外转录实验

利用 Epicentre 公司的 AmpliScribeTM T7-FlashTM Biotin-RNA Transcription Kit 获取 Biotin 标记的 H19。开始前准备: 将 pcDNA-H19 用 *Nde* I 进行酶切, 经过胶回收后的线性双链 DNA 即为转录模板。

2.4.1 准备模板:

转录模板需要是线性双链 DNA (钝头或 5'突出), 如果 3'突出则会因为非特异

起始，产生干扰转录本。产率低或短于预期转录本，表明模板含有 RNA 酶或其他成分，需要如下操作：

1. 加入 Proteinase K 至 100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，SDS 至 0.5%
 2. 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30-60 min
 3. 用等体积 TE-saturated phenol/chloroform 萃取
 4. 乙醇沉淀
 5. 小心吸去上清，用 70% 乙醇洗涤沉淀
 6. 用 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in RNase-Free TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) 重悬
- 模板效率：每 1 μg Control DNA 模板能够在 60min 的反应时间内，产生大于 180 μg （长度大于 1.4 kb）的 Biotin-RNA。影响因素：a. 模板质量；b. 模板大小；c. 转录效率

模板 DNA 量与反应时间的关系：

Table 1. Yield of Biotin-RNA (in μg) from varying amounts of control template DNA from a standard 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 μl AmpliScribe™ T7-Flash™ Biotin-RNA Transcription Kit reaction over time. Results may vary depending on the template used.

		Incubation Time (minutes)			
		30	60	120	240
Template DNA	50 ng	5 – 10 μg	15 – 25 μg	30 – 40 μg	60 – 70 μg
	100 ng	15 – 20 μg	35 – 45 μg	70 – 80 μg	130 – 140 μg
	500 ng	60 – 70 μg	140 – 150 μg	> 180 μg	> 180 μg
	1.0 μg	125 – 135 μg	> 180 μg	> 180 μg	> 180 μg

2.4.2 进行反应

反应组合：在室温下组合 AmpliScribe T7-Flash Biotin-RNA 转录反应，低于 22 $^{\circ}\text{C}$ 可能产生不溶沉淀。

保持 RNase-Free 环境：a. 一直佩戴手套操作，并勤于更换；b. 戴着手套拿放 kit 中的任何试剂；c. 不使用时，将 kit 中的试剂密封紧密，所有操作过程中含有 RNA 的管子也要密封紧密

标准 AmpliScribe T7-Flash Biotin-RNA 转录反应：

1. 冰上融化 AmpliScribe T7-Flash RNA Polymerase，其余室温融化
2. 将 AmpliScribe T7-Flash 10X Reaction Buffer 在使用前充分混匀

Note: 如果发现 AmpliScribe T7-Flash 10X Reaction Buffer 中含有沉淀，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育，

直到沉淀消失，将 Buffer 保持在室温

3. 按照下表比例在室温下组合反应

x μ l	RNase-Free water
50 ng – 1 μ g	linearized template DNA
2 μ l	AmpliScribe T7-Flash 10X Reaction Buffer
8 μ l	NTP / Biotin-UTP PreMix
2 μ l	100 mM DTT
0.5 μ l	RiboGuard RNase Inhibitor
2 μ l	AmpliScribe T7-Flash Enzyme Solution
20 μ l	Total reaction volume

4. 37°C 孵育进行反应，根据表 1 中的时间，可获得最大产量

5. 可选项: 如果需要去除 DNA 模板, 可向 20 μ L 标准反应体系中加入 1 μ L (1 MBU) of RNase-Free DNase I 于 37°C 孵育 15min

2.4.3 Biotin-RNA 的纯化:

铵基乙酸法:

1. 向得到的标准反应体系中加入 1 倍体积 5 M 铵基乙酸 (20 μ L)
2. 冰上孵育 10-15 min
3. 4°C 16000 \times g 离心 15 min
4. 用 70% 乙醇洗涤沉淀
5. Biotin-RNA 可保存于 -20°C-70°C, 用 TE buffer 溶解保存

2.5 RNA pull-down 实验

2.5.1 Bio-miR-103a 细胞内“钓取”H19

细胞裂解液: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 200 mM NaCl; 2.5mM MgCl₂; 60 U mL⁻¹ RNase inhibitor; 1 mM DTT; protease inhibitor

低盐缓冲液: 0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH8.0; 150 mM NaCl

高盐缓冲液: 0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; 500 mM NaCl

操作步骤:

1. 将合成好的 Biotin 标记的 miRNA (50 nM) 转染 FLS 细胞, 24h 后收取细胞, PBS

洗涤一次

2. 用细胞裂解液（100 μ L）冰上裂解上述细胞，30 min；离心，吸取上清
3. 取 50 μ L 作为 Input，其余裂解物与 streptavidin agrose beads 进行孵育，4 $^{\circ}$ C 3 h。为了排除非特异结合，结合前，用 1% RNase-free BSA 和 0.5 mg/mL yeast tRNA 对 beads 进行封闭。（BSA 室温 1 h；tRNA 室温 30 min）
4. 用冰上预冷的细胞裂解液洗涤两次；用低盐缓冲液洗 3 次；高盐缓冲液洗涤 1 次
5. Trizol 纯化 RNA 进行后续 qRT-PCR 实验

2.5.2 Bio-H19 体外“钓取”miRNA

实验前准备：

将体外转录好的 Bio-H19 进行冰上复温；200 μ L streptavidin agrose beads，1000 \times g 室温离心 3 min 收集，用 1% RNase-free BSA 和 0.5 mg/mL yeast tRNA 对 streptavidin agrose beads 进行封闭；用 30 μ g Bio-H19 与 streptavidin agrose beads 进行孵育，4 $^{\circ}$ C 3 h。

操作步骤：

1. 移除培养上清，消化细胞，4 $^{\circ}$ C 500 \times g 离心 5 min 收集细胞，PBS 洗涤 1 次
2. 用 2 mL PBS 重悬细胞，取 400 μ L 细胞作为 Input，溶解于 1 mL TRIzol 中
3. 向剩余细胞中加入 500 μ L 细胞裂解液，冰上裂解 1 h
4. 4 $^{\circ}$ C 16000 \times g 离心 5 min 收集上清，加入至与 Bio-H19 孵育完成的 streptavidin agrose beads 当中，4 $^{\circ}$ C 结合过夜
5. 用预冷细胞裂解液洗涤 2 次，低盐低盐缓冲液洗 3 次；高盐缓冲液洗涤 1 次，NT2 Buffer 洗涤 3 次
6. 用 1 mL TRIzol 提取总 RNA 进行 qRT-PCR 检测

2.6 qRT-PCR 检测

2.6.1 miRNA 检测

与第一部分实验类似，在此不再赘述

2.6.2 mRNA 检测

与第一部分实验类似，在此不再赘述

相关 mRNA 的引物序列如下所示，全部引物由上海生工生物合成。

Gene name	Primers sequence
Human H19	Forward: 5'-GCACCTTGGACATCTGGAGT-3'
	Reverse: 5'-TTCTTTCCAGCCCTAGCTCA-3'
Human IL-15	Forward: 5'-GGGAACCATAGATTTGTGCAGC-3'
	Reverse: 5'-ACTTTGCAACTGGGGTGAAC-3'
Human DKK1	Forward: 5'-GCCTCAGGATTGTGTTGTGC-3'
	Reverse: 5'-ATCCGGCAAGACAGACCTTC-3'
Human c-Myc	Forward: 5'-CCCTCCACTCGGAAGGACTA-3'
	Reverse: 5'-GCTGGTGCATTTTCGGTTGT-3'
Mouse H19	Forward: 5'-AATGGTGCTACCCAGCTCAT-3'
	Reverse: 5'-TCAGAACGAGACGGACTTAAAGAA-3'
Mouse IL-15	Forward: 5'-CGCCCAAAGACTTGCAGTG-3'
	Reverse: 5'-CTTTCCTGACCTCTCTGAGCTG-3'
Mouse DKK1	Forward: 5'-CCAACGCGATCAAGAACCTG-3'
	Reverse: 5'-GGTAGGGCTGGTAGTTGTCA-3'

2.7 ChIP 实验

pCMV-c-Myc 购自 Origene 公司，si-cMyc，si-DDR2 购自广州锐博生物。具体实验方法与第一部分实验相同，再次不在赘述。相关引物和 siRNA 序列如下：

Gene name	Primers sequence
c-Myc BS 1	Forward: 5'-GCCGGCGGTAGTTGGCA-3'
	Reverse: 5'-CTAGCACAGGATCCGGTCGTG-3'

c-Myc BS 2	Forward: 5'-GCCCTCTGTGCCATCCGAGT-3'
	Reverse: 5'-CCCAGACCACTGTCTCCCCTC-3'
si-cMyc	Target sequence: GGTCAGAGTCTGGATCACC
si-DDR2	Target sequence: AGCCATCCAGGCTGATAC

2.8 H19 的 FISH 检测

试剂准备:

1. 在 24 孔板中, 准备 RA FLS 细胞爬片
2. 将 H19 lncRNA Probe Mix 存储液 (20 μ M), 恢复至室温
3. 将 18S 内参探针存储液 (20 μ M), 恢复至室温
4. 将适量封闭液 (Blocking Solution) 和预杂交稀释液 (Pre-hybridization Buffer) 按照 1:99 的体积比混匀
5. 将适量封闭液和杂交稀释液 (Hybridization Buffer) 按照 1:99 的体积比混匀
6. 通透液: 含 0.5% Triton X-100 的 PBS (10 mL PBS, 50 μ L Triton X-100)
7. 杂交洗液 I (4 \times SSC, 0.01% Tween-20)
8. 杂交洗液 II (2 \times SSC)
9. 杂交洗液 III (1 \times SSC)

操作步骤:

- A. 用 PBS 洗涤待测细胞 1 次, 5 min
- B. 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min
- C. 加入预冷的通透液, 4 $^{\circ}$ C 5 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min
- D. 加入 200 μ L 预杂交液, 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min
- E. 将杂交液预热至 37 $^{\circ}$ C, 避光, 将 2.5 μ L 20 μ M H19 Probe Mix 存储液或 18S 内参探针存储液加至杂交液
- F. 弃去 D 步骤中的预杂交液, 加入 100 μ L 步骤 E 中配制的含有对应探针的杂交液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜 (约 16 h)
- G. 42 $^{\circ}$ C, 杂交洗液 I 洗涤 3 次, 每次 5 min, 注意避光
- H. 42 $^{\circ}$ C, 杂交洗液 II 洗涤 1 次, 注意避光

- I. 42℃, 杂交洗液 III 洗涤 1 次, 注意避光
- J. PBS 洗涤 1 次, 5 min
- K. DAPI 避光染色 10 min
- L. PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加封片液 (无色指甲油), 固定于载玻片上, 共聚焦显微镜下观察、拍照

2.9 人 PBMCs 分离

利用 GE 公司的 Ficoll-Paque™ PREMIUM (1.077 g/mL) 分离液进行人 PBMCs 的分离。

操作步骤:

- A. 将 2 mL 健康人全血置于 15 mL 抗凝离心管中, 加入等体积 Hank's 平衡盐洗液, 共 4 mL, 混匀
- B. 取新的 15 mL 离心管, 加入 3 mL Ficoll-Paque™ PREMIUM, 并小心沿管壁加入稀释后的全血
- C. 室温 400×g 离心 40 min, 可见明显分层
- D. 将最上层上清小心吸出, 弃去
- E. 小心将含有单核细胞的薄层吸出, 转移至新离心管中, 并尽量不要吸到 Ficoll-Paque™ PREMIUM 层
- F. 根据获得的单核细胞体积数, 加入等体积的 Hank's 平衡盐缓冲液 (约 6 mL), 至离心管中洗涤 1 次
- G. 室温 400×g/min 离心 20 min
- H. 弃上清, 用 6 mL Hank's 平衡盐缓冲液重悬细胞, 室温 400×g 离心 10 min
- I. 弃上清, 用含有 10% FBS 的 α -MEM 培养液重悬细胞, 调整密度至 1×10^6 左右, 接种于 24 孔板中, 常规培养, 16 h 后用 PBS 洗掉未贴壁细胞, 即得 PBMCs

2.10 诱导人 PBMCs 向破骨细胞分化

实验分组如下:

- i. M-CSF+RANKL
- ii. M-CSF+RANKL+IL-15
- iii. M-CSF+RANKL+20% RA FLS 培养液

iii. M-CSF+RANKL+20% RA FLS 培养液+anti-IL-15 (IL-15 中和抗体)

- A. 用 100 ng/mL M-CSF 对分离得到的 PBMCs 进行初步诱导 3 天, 使其成为前破骨细胞
- B. 按照不同分组, 处理细胞 M-CSF 浓度减少至 25 ng/mL; RANKL 浓度 30 ng/mL; IL-15 浓度 10 ng/mL; anti-IL-15 浓度 0.5 μ g/mL
- C. 常规培养 15 天, 对细胞进行 TRAP 染色, 根据染色结果评价 IL-15 及 RA FLS 细胞培养液对 PBMCs 分化的影响

2.11 TRAP 染色

- A. PBS 洗涤细胞 1 次, 4%多聚甲醛室温固定 5 min, PBS 洗涤 3 次
- B. 制备 Fixative Solution: 2.5 mL Citrate Solution + 6.5 mL 丙酮 + 800 μ L 37% 甲醛, 棕色玻璃瓶, 拧紧瓶盖保存
- C. 预热足量的去离子水至 37 $^{\circ}$ C
- D. 将 Fixative Solution 恢复至室温, 200 μ L/孔加入至 24 孔板中的待染色细胞中, 室温孵育 30 sec, 去离子水洗涤 3 次, 并保持湿润
- E. 取 50 μ L Fast Garnet Base Solution 和 50 μ L Sodium Nitrite Solution, 混匀 30 sec, 室温静置 2 min
- F. 按照下列配方制备染色液:

预热至 37 $^{\circ}$ C 的去离子水	4.5 mL
Step E 中的混合液	100 μ L
Naphtol AS-BI Phosphate Solution	50 μ L
Acetate Solution	200 μ L
Tartrate Solution	100 μ L
- G. 按照 200 μ L/孔将上述染色液加入至各孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h
- H. 去离子水洗涤 5 次, 显微镜下观察染色情况并拍照

2.12 统计学分析

所有结果以 mean \pm SD 的形式表示, 实验至少重复 3 次以上, 利用 Student's *t*-test 进行统计学分析。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学差异, 用“*”表示; $p < 0.01$, 用“**”表示; $p < 0.001$, 用“***”表示。所有数据和图片用 GraphPad Prism 5 software 进行

分析和绘制。

3 结果

3.1 LncRNA H19 在 RA 患者滑膜细胞中高表达，并且具有 DDR2 依赖性

我们利用 FcDDR2 慢病毒（DDR2 能够发生自主磷酸化激活）和对照病毒，感染了 RA FLS 细胞（ $n=3$ ），并提取总 RNA，利用 LncRNA microarray 对上述样品进行差异筛选，以期发现在 RA FLS 细胞中受 DDR2 活化影响的 LncRNA 分子。选用 Agilent 公司的 LncRNA 表达谱芯片进行差异 LncRNA 分子的筛选。结果显示较对照组，FcDDR2 慢病毒感染组共有 46 个 LncRNA 上调，31 个 LncRNA 下调（图 2-1 A）。H19 是上调较为显著的 LncRNA 之一。

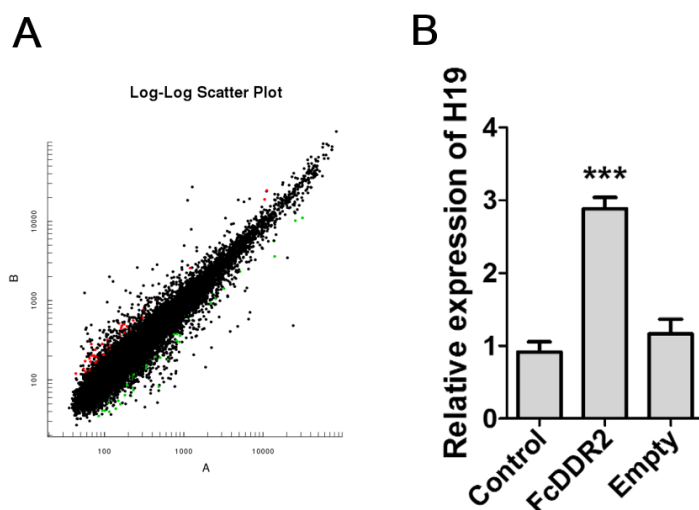


图2-1 RA FLS细胞中受DDR2活化影响的LncRNAs的差异筛选（ $n=3$ ）

为了对筛选结果进行验证，我们又收取了 3 例 RA FLS 细胞，用 FcDDR2 感染 RA FLS 细胞 48h 后，采用 qRT-PCR 的方法对 H19 的表达进行验证，结果显示，FcDDR2 能够引起 FLS 细胞中 H19 表达的升高 3 倍左右，与 LncRNA 芯片结果一致（图 2-2 B, *** $p < 0.001$ ）。

LncRNA microarray 检测由北京博奥生物有限公司完成，使用的芯片为美国 Agilent 公司的全基因组表达谱芯片(v.4.0)。

随后，我们又在 RA 患者滑膜组织和 FLS 细胞中对 H19 的表达进行了验证，结果显示，与 OA 患者滑膜组织和 FLS 细胞相比，RA 患者滑膜组织和 FLS 细胞中的

H19 上调了 3-6 倍。(图 2-2 A 和 B)

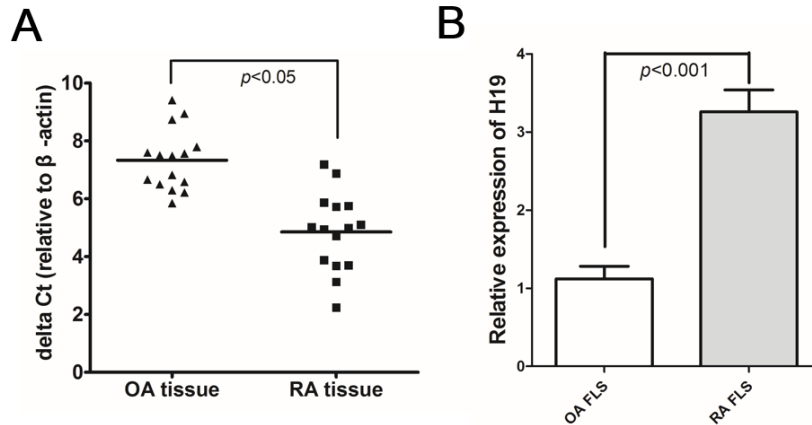


图2-2 H19在滑膜组织和FLS细胞中的表达情况（滑膜组织n=15，细胞n=3）

为了进一步评价 DDR2 活化及 RA 炎性环境对 H19 表达的影响，分别按照下列各分组处理 RA FLS 细胞，① FLS；② Collagen II ($8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)；③ Collagen II + si-DDR2 (100 nM)；④ TNF- α (10 ng/mL)；⑤ IL-1 β (10 ng/mL)；⑥ Collagen II + si-NC (100 nM)；转染 24h 后，采用 qRT-PCR 检测 H19 的表达。结果显示，Collagen II 活化 DDR2 后能引起 H19 表达升高，干涉 DDR2 后，Collagen II 刺激不能引 H19 表达升高。因此，Collagen II 可通过激活 DDR2 引起 FLS 细胞中 H19 表达升高（图 2-3 A 和 B, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ）。

但是，考虑到 RA FLS 细胞中 Collagen II 的受体不仅有 DDR2，还有整合素等，因此，为了排除其他通路对实验的影响，我们先利用 FcDDR2 慢病毒感染 FLS 细胞，使 DDR2 发生自主磷酸化，36 h 后，再给予 si-DDR2 转染，转染 24 h 后，TRIzol 收取细胞，提取总 RNA，qRT-PCR 检测 H19 的表达水平。

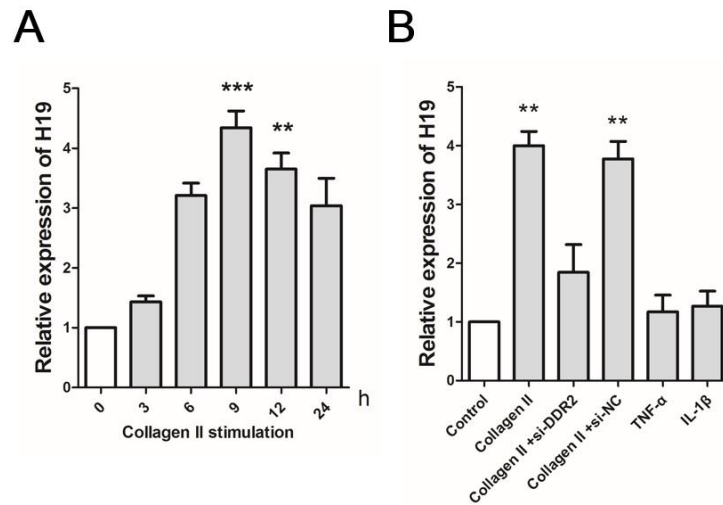


图2-3 Collagen II可通过活化DDR2上调FLS细胞中H19的表达 (n=3)

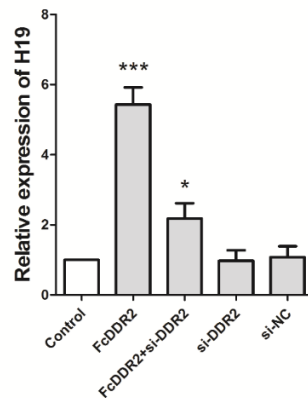


图2-4 Collagen II上调FLS细胞中H19的表达具有DDR2依赖性 (n=3)

结果显示: 与 Collagen II 类似, FcDDR2 可以显著上调 RA FLS 细胞中 H19 的表达 (5-6 倍左右), 而使用 siRNA 干涉 DDR2 的蛋白总量后, FcDDR2 对 H19 的影响下降了 50% 以上, 提示 Collagen II 上调 FLS 细胞中 H19 的表达具有 DDR2 依赖性。(图 2-4, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

3.2 DDR2 通过激活 c-Myc 调控 H19 的表达

为了阐明 DDR2 活化后对 H19 表达调控的分子机制, 我们对 H19 的启动子进行了转录因子结合位点的分析, 发现 H19 转录起始位点上游-1500bp 范围内含有 2 个 c-Myc 的结合位点 (图 2-5)。

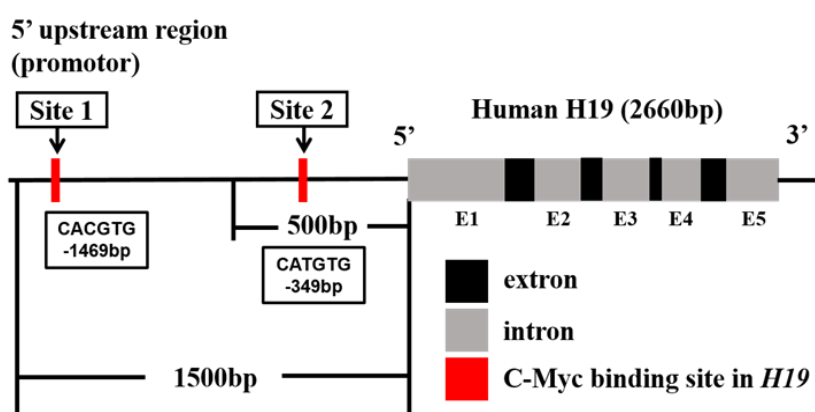


图 2-5 生物信息学分析显示，H19 转录起始位点上游有 2 个 c-Myc 的结合位点

我们用 FcDDR2 病毒感染 FLS 细胞，活化 DDR2，以空白病毒感染的 FLS 细胞作对照，利用 Western Blot 检测 DDR2 活化对 c-Myc 的影响。结果显示：c-Myc 在 FcDDR2 感染后的 FLS 细胞中高表达（图 2-6, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ）。

上述结果提示：Collagen II 可通过激活 DDR2 进一步使 RA FLS 细胞中 c-Myc 的表达水平增加，这一结果也佐证了 RA FLS 细胞病理条件下“类肿瘤样”的生长状态及抗凋亡能力的增强；此外，DDR2 对 p38/MAPK 通过的影响甚为广泛，以至于活化后的 DDR2 可以影响 c-Myc 的表达。但是，这一过程详尽的调控机制尚有待于进一步阐明。

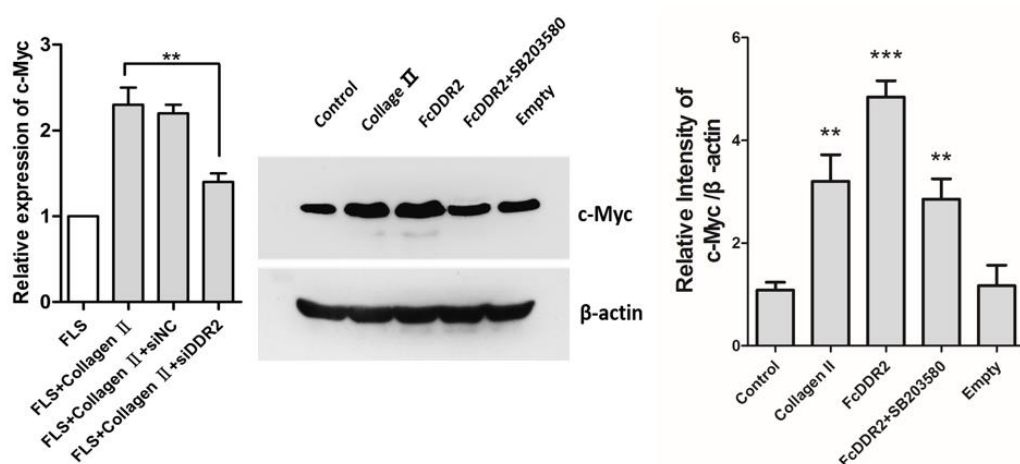


图 2-6 FcDDR2 对 c-Myc 表达的影响 (n=3)

我们利用 PCR 反应，从 Hela 细胞基因组 DNA 中，成功获得了 H19 转录起始位点上游-1500bp 的潜在启动子区（图 2-7），将其克隆至 pGL3 basic 双荧光素酶报告基因载体中，并利用定点突变试剂盒，构建结合位点 2 突变的 pGL-H19 MUT 质

粒。

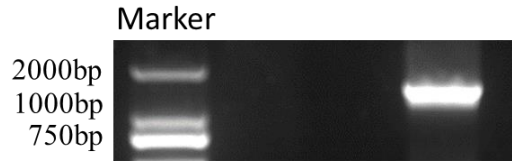


图 2-7 PCR 获得的 H19 转录起始位点上游-1500bp 的潜在启动子区

将上述报告基因载体分别和 pCMV-c-Myc、si-c-Myc 等按照图 2-8 中的分组，共转至 HEK293T 细胞中，24 h 后收集细胞，检测荧光素酶活性。

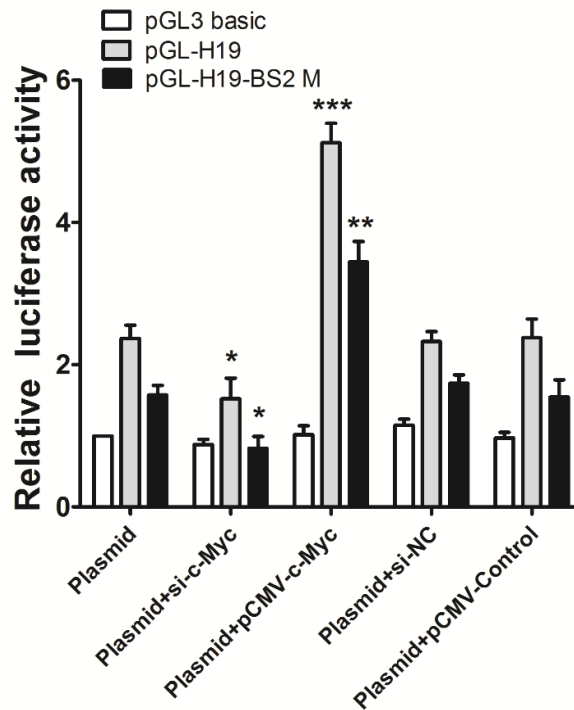


图 2-8 c-Myc 可通过 H19 启动子区上的结合位点，促进 H19 转录活性

结果显示：c-Myc 可通过与 H19 启动子区其两个结合位点结合，促进 H19 的转录活性；并且突变其中的一个结合位点后，这一调控减弱，但仍有统计学意义，提示两个结合位点均能够调控 H19 的转录，而不是一强一弱或是仅有一个位点有效。（图 2-8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ）

为了进一步确证 c-Myc 对 H19 启动子的影响，我们采用染色质免疫共沉淀实验，用 c-Myc 抗体“钓取”H19 的启动子片段。

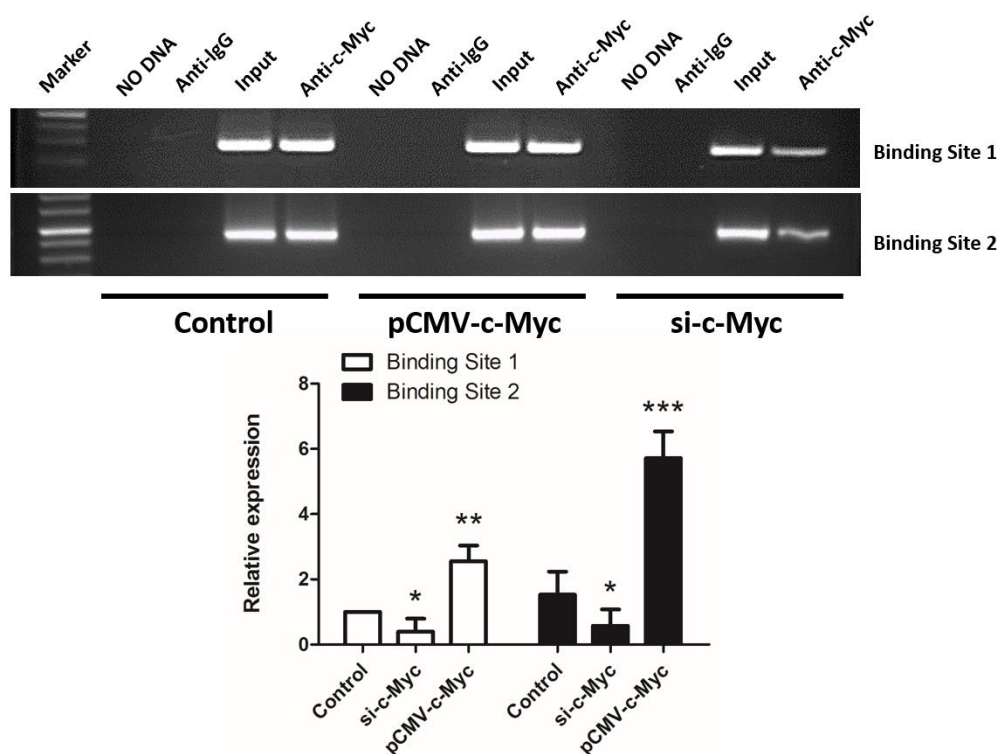


图 2-9 ChIP 实验验证 c-Myc 对 H19 的启动子活性的影响

结果显示:用 c-Myc 抗体“钩取”的 DNA 片段中确实含有 H19 启动子区的片段,并且随着 c-Myc 表达的升高或降低,该片段的多少亦随之发生改变。表明 c-Myc 的确能够通过图 2-5 中的两个结合位点对 H19 进行转录活性调控,并且这两个位点均具有调控活性。(图 2-9, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.3 H19 在 RA FLS 细胞的胞浆和胞核均有分布

通过上述实验,我们发现 H19 在 RA 滑膜组织和 FLS 细胞中高表达,并受 Collagen II 刺激和 DDR2 活化的影响,这与 Kinne RW 等人的研究结果相符。但是, H19 在 RA 发生、发展进程中的功能是什么?其下游信号通路又有哪些呢?

为了回答上述问题,首先要对 H19 的细胞亚定位进行研究。我们利用荧光原位杂交 (FISH) 对 H19 在 RA FLS 细胞中的定位和分布情况进行探索。选择主要定位于胞浆的 18S RNA 作为阳性对照,从广州锐博生物有限公司设计、订购了 H19 和 18S RNA 的特异性荧光探针。同时,我们以原代培养且生长状态良好的 RA FLS 细胞作为研究对象,按照 5×10^4 /孔的密度,爬片于 24 孔板培养板中,分别用 18S RNA 和 H19 特异性 FISH 荧光探针对其进行标记,随后与激光共聚焦显微镜下观察 18S 和 H19 在 RA FLS 细胞中的表达及分布情况。

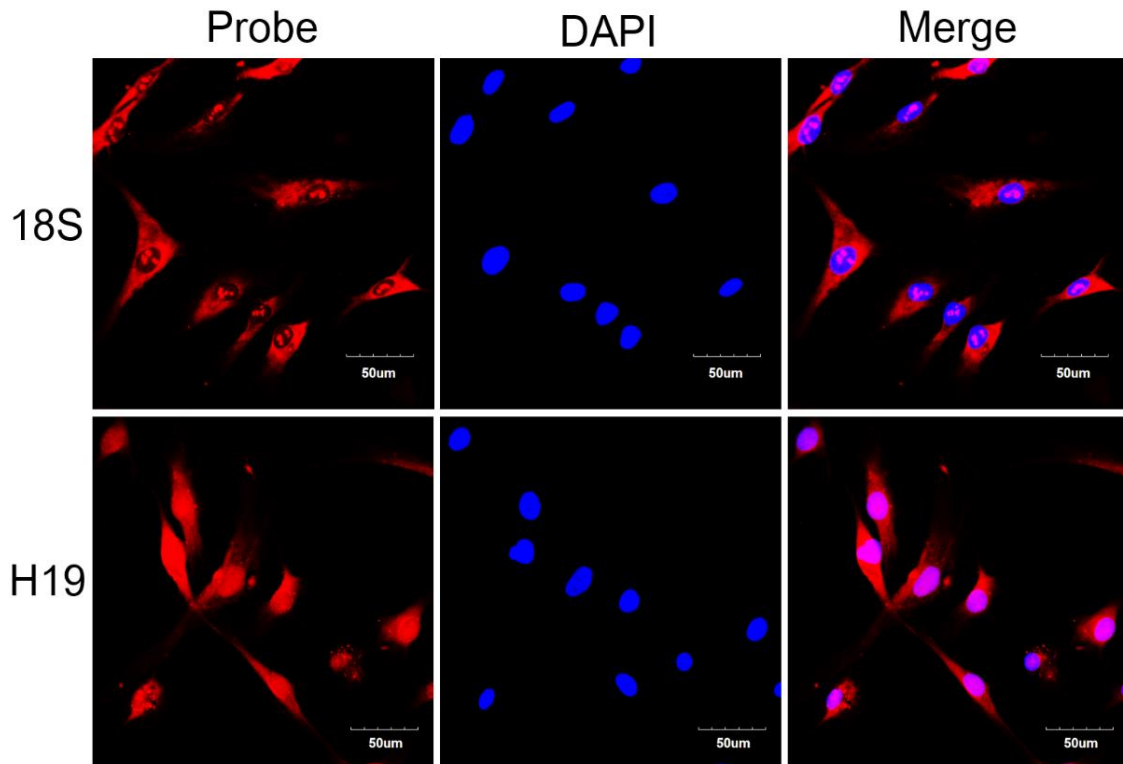


图 2-10 H19 在 RA FLS 细胞中的分布情况

结果显示：H19 主要广泛分布在 RA FLS 细胞内，可见其在胞浆和细胞核内均匀表达和分布；而对照 18S RNA 则主要分布于胞浆中，细胞核内少有分布(图 2-10)。

3.4 H19 通过“吸附” miR-103a，并促使其降解

通过查阅文献后，我们发现，H19 能够发挥类似 miRNA“海绵”的功能，吸附目的 miRNAs 继而影响其功能。其中包括 Let7 家族等重要的 miRNAs 就能受 H19 的影响。考虑到 H19 在 RA FLS 细胞中具有胞浆定位的特征，这也为其“海绵”样吸附作用奠定了基础。进一步的生物信息学分析显示，H19 外显子区 1617-1644 部分含有 miR-103a 的结合位点（图 2-11），提示 H19 能够结合 miR-103a。

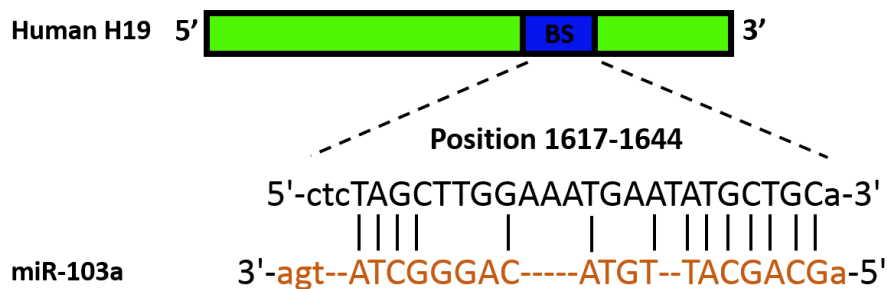


图 2-11 H19 外显子区含有 miR-103a 的结合位点

进一步的报告基因实验结果显示：H19 能够影响 psi-miR-103a 报告基因质粒的海肾荧光素酶活性的表达，同时随着含有 miR-103a 序列的增加，H19 对 4×psi-miR-103a 质粒的作用强度显著高于 psi-miR-103a 和 2×psi-miR-103a 质粒（图 2-12 A, * $p<0.05$ ）。另一方面，我们将 H19 外显子的全长序列，克隆至 pGL3 basic 载体，构建成 pGL-H19 WT 质粒，随后利用定点突变试剂盒将 miR-103a 结合位点部位进行突变，建成 pGL-H19 MUT 质粒，分别将上述质粒和 miR-103a mimic 或 miR-21 mimic (在 H19 外显子上无结合位点)对照共转至 HEK293T 细胞，探讨其对 pGL-H19 WT 和 pGL-H19 MUT 荧光素酶活性的影响。

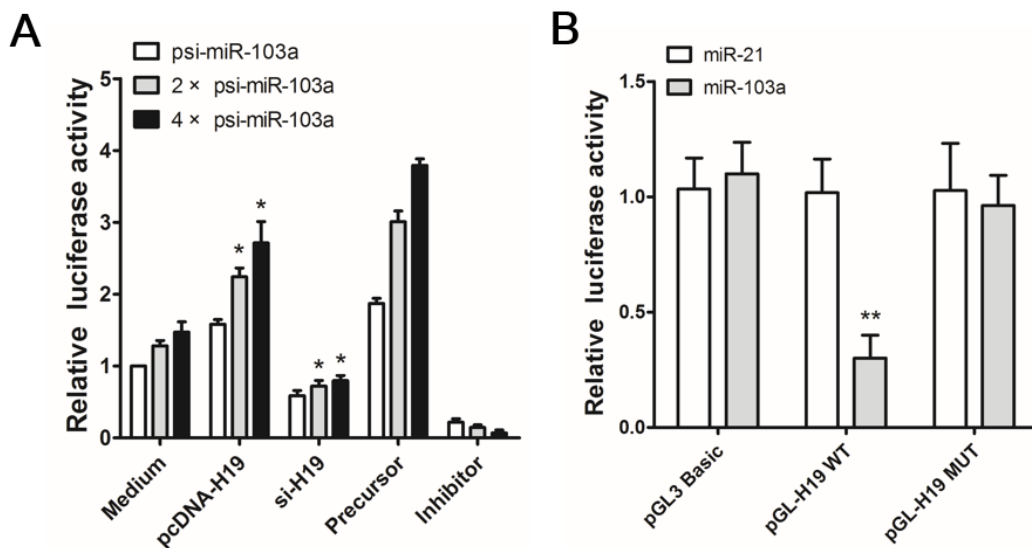


图 2-12 双荧光素酶报告基因实验验证 H19 与 miR-103a 的结合

结果显示：miR-103a 能够降低 pGL-H19 WT 质粒的荧光素酶活性，而结合位点突变后的 pGL-H19 MUT 质粒的荧光素酶活性则不受影响；在 H19 上没有结合位点的 miR-21, 则对 pGL-H19 WT 和 pGL-H19 MUT 质粒的荧光素酶活性均不能构成影响。（图 2-12 B, ** $p<0.01$ ）

生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验的结果初步验证了 H19 能够与 miR-103a 进行直接结合，为了进一步验证上述结果，我们进行了两方面的实验。

一方面，我们利用体外转录获得了 Biotin 标记的 H19 全长序列，Bio-H19，及 miR-103a 结合位点突变的 Bio-H19 MUT，利用 RNA pull down 技术，从 RA FLS 细胞的细胞裂解产物中“钓取”能与之结合的 RNA，通过 PCR 检测，确定其中是否包含 miR-103a。

如图 2-13 A 所示, Bio-H19 的产物中含有 miR-103a, 而 Bio-Con 和 Bio-H19 MUT 的产物中均不能检测的 miR-103a; 同时, 无论 Bio-H19、Bio-Con 还是 Bio-H19 MUT 的 PCR 产物中, 均不能检测到 miR-21。

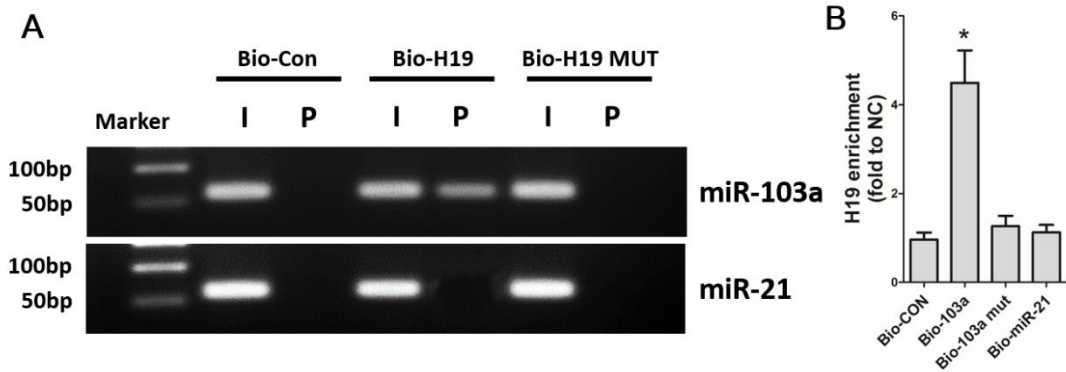


图 2-13 RNA pull down 验证 H19 与 miR-103a 的结合

另一方面, 我们合成了 Biotin 标记的 miR-103a 即 Bio-miR-103a, 以及结合位点突变的 Bio-miR-103a MUT, 同时还有对照 Biotin 标记的 miR-21, Bio-miR-21。将上述寡核苷酸, 分别转染至 RA FLS 细胞中, 24h 后, 将细胞裂解物过 streptavidin agrose beads, 将洗脱产物提取 RNA 后, 进行 PCR 检测, 用以期从中能够“拉”到 FLS 细胞中的 H19。结果显示: Bio-miR-103a 的 pull down 洗脱物中含有 H19 组分, 而 Bio-miR-103a MUT 和 Bio-miR-21 的 pull down 洗脱物中则无法检测到 H19。提示 H19 能够与 miR-103a 发生直接结合, 并且确实是通过图 2-11 中的结合位点进行结合的。(图 2-12 B, * $p < 0.05$)

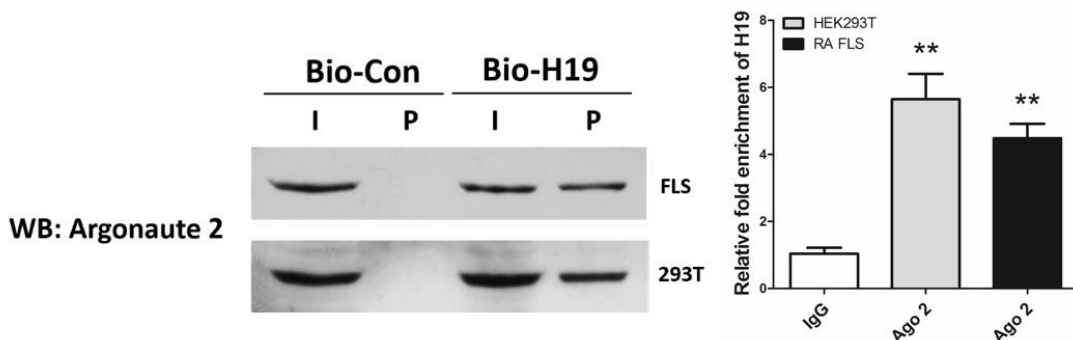


图 2-14 H19 与 miR-103a 的结合可介导 miR-103a 的降解

那么 H19 与 miR-103a 的结合会对 miR-103a 产生什么影响呢? H19 能否通过 miR-103a 发挥生物学功能呢? 考虑到无论 miRNA 对 LncRNA 的影响, 还是 LncRNA 对 miRNA 的影响, 均是由 RNA 结合蛋白参与的生物学效应, 其中 Argonaute 2 是

参与 RNA 降解的重要 RNA 结合蛋白。我们首先检测了 H19-miR-103a 复合物中是否含有 Argonaute 2。如图 2-14 A 所示,无论在 RA FLS 细胞还是 HEK293T 细胞中, H19-miR-103a 复合物中局部可检测到 Argonaute 2 的参与,提示, H19-miR-103a 复合物可被细胞降解, H19 与 miR-103a 可促使 miR-103a 降解。进一步的 pull down 实验表明, Ago 2 能够与 H19 结合,并参与 H19 介导的靶 RNA 降解。(图 2-14 B, ** $p < 0.01$)

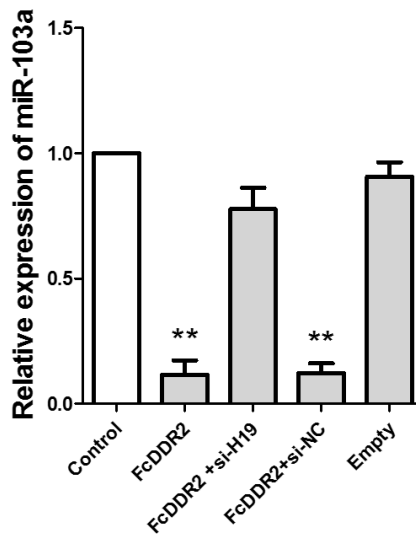


图 2-15 DDR2 通过 H19 调节 miR-103a 的表达 (n=3)

为了进一步验证上述结果,我们利用 siRNA 下调 RA FLS 细胞中 H19 的水平,同时利用 FcDDR2 慢病毒活化 DDR2,随后检测 miR-103a 的变化。结果显示: FcDDR2 慢病毒能够显著下调 miR-103a 的表达(图 2-15 $p < 0.01$);但是下调 H19 的表达后, FcDDR2 对 miR-103a 的影响被逆转,提示 H19 介导了 FcDDR2 对 miR-103a 的影响(图 2-15)。

3.5 IL-15/DKK1 是 miR-103a 的靶基因

如前所述, miRNAs 功能的发挥,主要依赖于它能够与目标靶基因的 mRNA 的 3' UTR 发生结合,并促使靶基因 mRNA 的降解或不能够翻译成蛋白质,继而实现相应的生物学功能。我们利用生物学分析的手段对 miR-103a 的靶基因进行预测,并从中选择与 RA 关节软骨破坏相关的基因进行下一步实验。IL-15/DKK1 便是我们最终选择的 miR-103a 潜在靶基因。

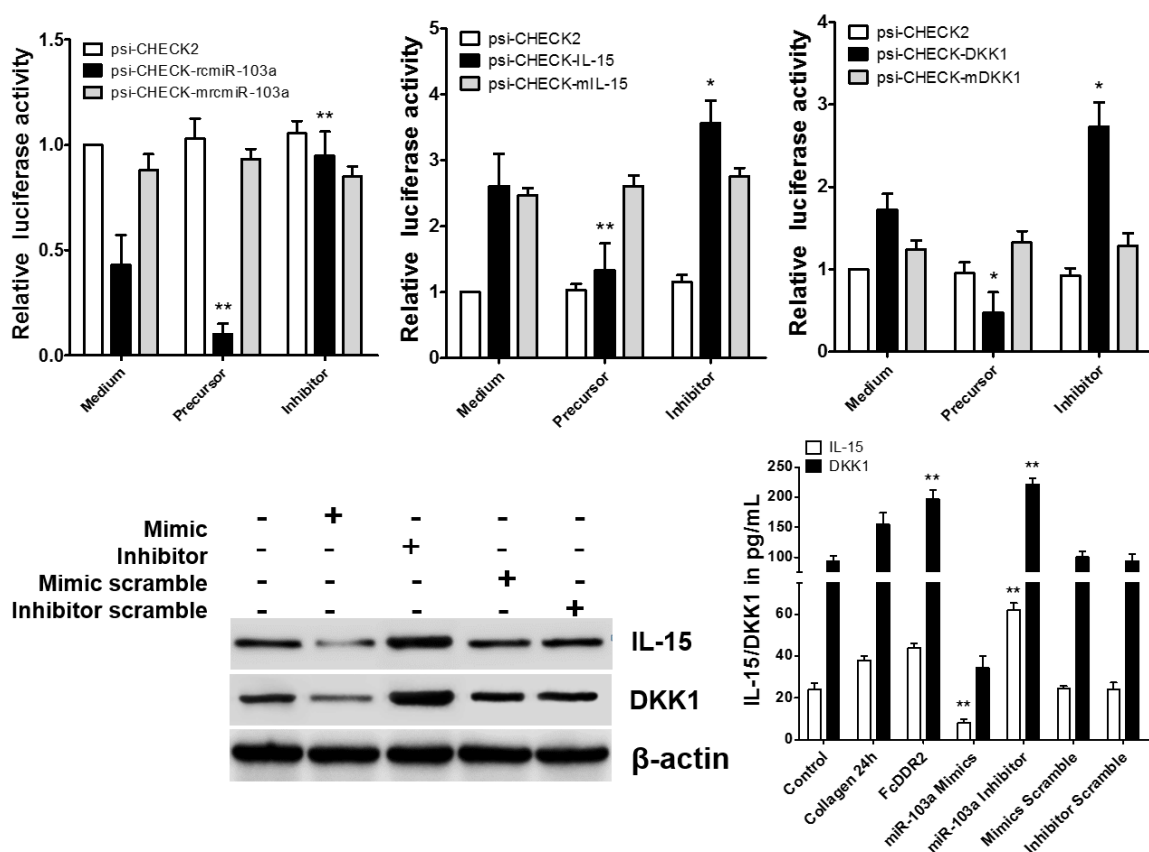


图 2-16 miR-103a 可影响 IL-15/DKK1 的表达水平

为了对预测结果进行验证，我们将含有 IL-15/DKK1 mRNA 3' UTR 序列的寡核苷酸片段克隆至 psi-CHECK2 双荧光素酶报告基因载体，并同时构建对应结合位点突变的报告基因质粒。将上述双荧光素酶报告基因质粒分别与 miR-103a mimic 或 inhibitor 转染至 HEK293T 细胞中，24 h 后收集细胞，进行双荧光素酶活性分析，根据结果评价 miR-103a 对 IL-15/DKK1 mRNA 3' UTR 的调控活性。

与对照质粒相比，miR-103a mimic 能够显著抑制含有 IL-15/DKK1 ($p < 0.01$ / $p < 0.05$) mRNA 3' UTR 质粒的 *RLuc* 活性；相反地，miR-103a inhibitor 能够上调 IL-15/DKK1 ($p < 0.05$) mRNA 3' UTR 质粒的 *RLuc* 活性；当报告基因质粒中的结合位点被突变时，miR-103a mimic/inhibitor 的效果均消失了，与对照组相比，*RLuc* 活性几乎没有变化。这一结果表明 miR-103a 能够与 IL-15/DKK1 mRNA 3' UTR 发生结合，并影响其活性（图 2-16）。进一步的 Western Blot 和 ELISA 实验进一步验证了上述结果。提示 IL-15/DKK1 是 miR-103a 的靶基因。

3.6 IL-15 可促进 PBMCs 向破骨细胞分化

RA 滑膜炎症反应可以募集大量的单核细胞和巨噬细胞，构成了 RA 滑膜组织

中破骨细胞的主要来源。最新的研究表明 RA FLS 细胞在 RA 破骨细胞形成的过程中扮演了“营养细胞”的角色，据报道，RA FLS 与外周血单核细胞（PBMCs）共培养，可诱导 PBMCs 分化成破骨细胞。而 IL-15 是一个多效性促炎症细胞因子，另有文献报道，RA FLS 分泌产生的 IL-15 可促进诱导单核细胞向破骨细胞的分化，进而加剧 RA 关节邻近骨、软骨的损伤。为了验证上述发现，我们也进行了相关实验。

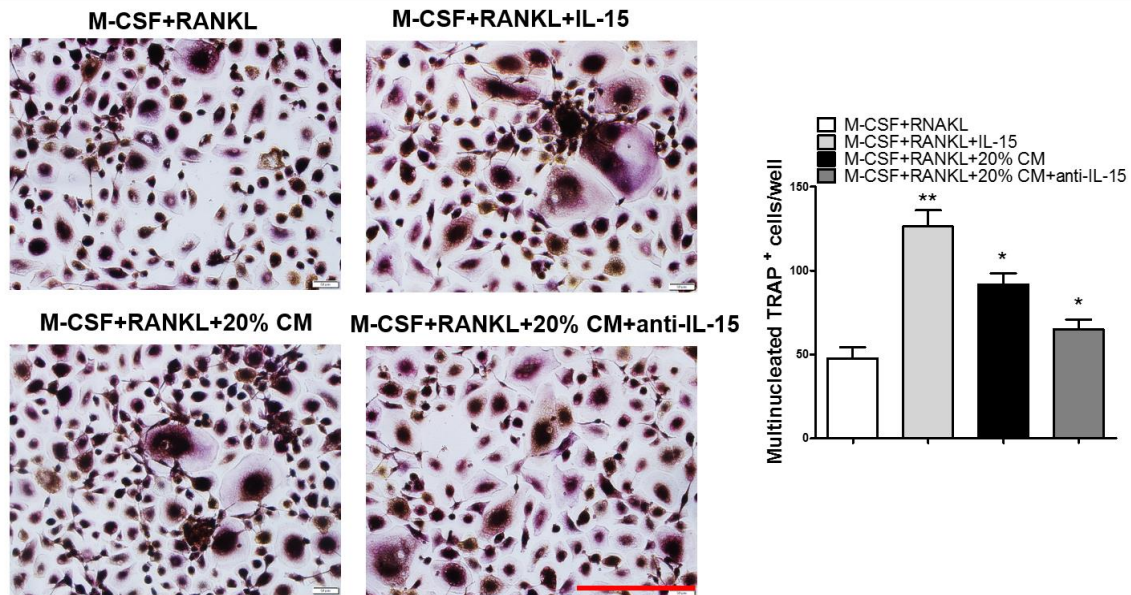


图 2-17 IL-15 对 PBMCs 向破骨细胞分化的影响 (bar=200 μm)

实验分组如下：

- i. M-CSF+RANKL
- ii. M-CSF+RANKL+IL-15
- iii. M-CSF+RANKL+20% RA FLS 培养液
- iii. M-CSF+RANKL+20% RA FLS 培养液+anti-IL-15 (IL-15 中和抗体)

结果显示：IL-15 可促进 M-CSF+RANKL 诱导的 PBMCs 向破骨细胞的分化 ($p<0.01$)；而在 20% RA FLS 培养液的作用下，同样也能促进 M-CSF+RANKL 诱导的 PBMCs 向破骨细胞的分化 ($p<0.05$)；当用 IL-15 中和抗体处理 20% RA FLS 培养液用，FLS 培养液的促分化作用消失 ($p<0.05$)。上述结果提示：IL-15 介导了 FLS 细胞对 PBMCs 向破骨细胞的分化 (图 2-17)。

3.7 上调 miR-103a 的表达，可延缓 CIA 小鼠的发病进程及骨质破坏

通过前面的实验，我们已证实 DDR2 活化可引起 RA FLS 细胞 c-Myc 表达升高，导致 H19 的转录活性增加，H19 可通过与 miR-103a 结合，促使 miR-103a 降解，继

而诱发 IL-15/DKK1 的过度分泌，而 RA FLS 细胞产生的 IL-15 对 PBMCs 向破骨细胞分化的进程有促进作用。但是，miR-103a 到底对 RA 动物模型有没有影响呢？

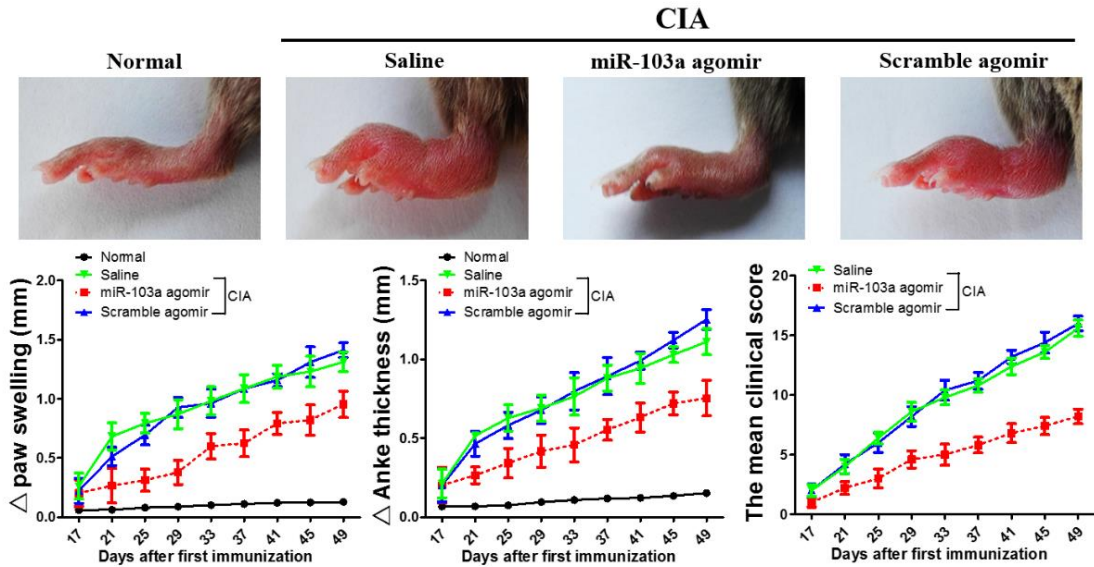


图 2-18 上调 miR-103a 能够缓解 CIA 小鼠的发病进程

我们从广州锐博公司购买了 miR-103a agomir，一种经过化学修饰的 miR-103a mimic，能够更稳定的存在，适于动物实验的使用。在 CIA 小鼠模型中，我们利用踝关节局部注射给药的方式，上调小鼠关节局部的 miR-103a 表达，评价 miR-103a 在 CIA 小鼠病程及关节骨损伤过程中的作用。

如图 2-18 所示，较对照组，miR-103a 上调后，能够显著缓解模型小鼠足部的肿胀程度、足趾厚度及临床评分的情况，相对缓解了 CIA 小鼠的疾病进程。

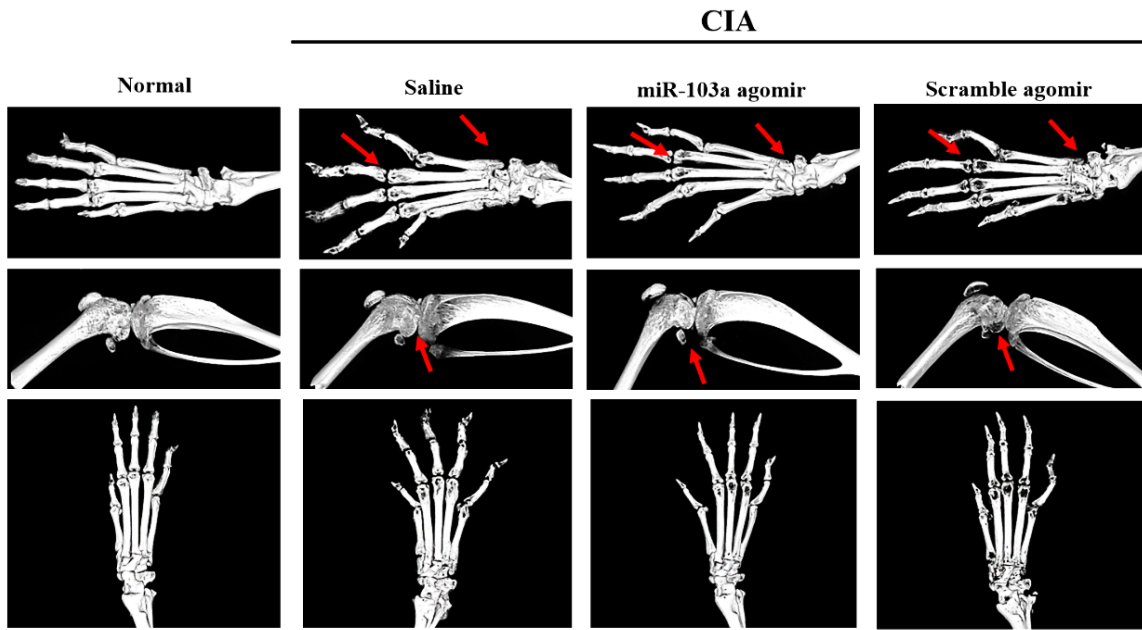


图 2-19 上调 miR-103a 能够缓解 CIA 小鼠的骨质破坏

进一步的 microCT 结合 3D 立体重建的结果显示：上调 miR-103a 表达后，CIA 小鼠足部小关节、踝关节和膝关节的骨损伤被显著缓解，特别是踝关节的破坏，如图 2-19 所示，较 Saline 组和 Scramble agomir 组，miR-103a agomir 小鼠踝关节的骨质破坏程度较轻，骨质表明光滑、有光泽，而对照组小鼠关节骨质稀疏，甚至出现镂空，个别小鼠已完全丧失后肢的活动能力。

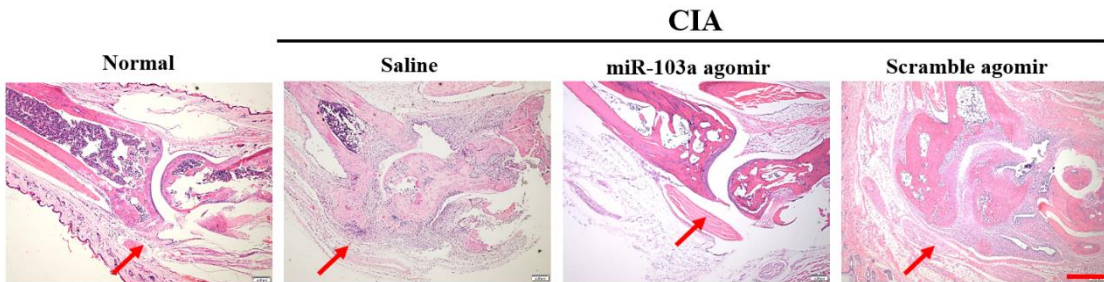


图 2-20 小鼠踝关节 HE 染色结果 (bar=400 μm)

HE 染色结果显示：较正常小鼠，注射生理盐水和 Scramble agomir 的 CIA 模型小鼠踝关节结构已被严重破坏，关节功能受限（图 2-20 Saline/Scramble agomir）；注射 miR-103a agomir 的 CIA 模型小鼠踝关节结构良好，关节局部有少量炎细胞浸润，及滑膜增生（图 2-20 miR-103a agomir）。提示 miR-103a 能够缓解 CIA 模型小鼠的关节软骨损伤。

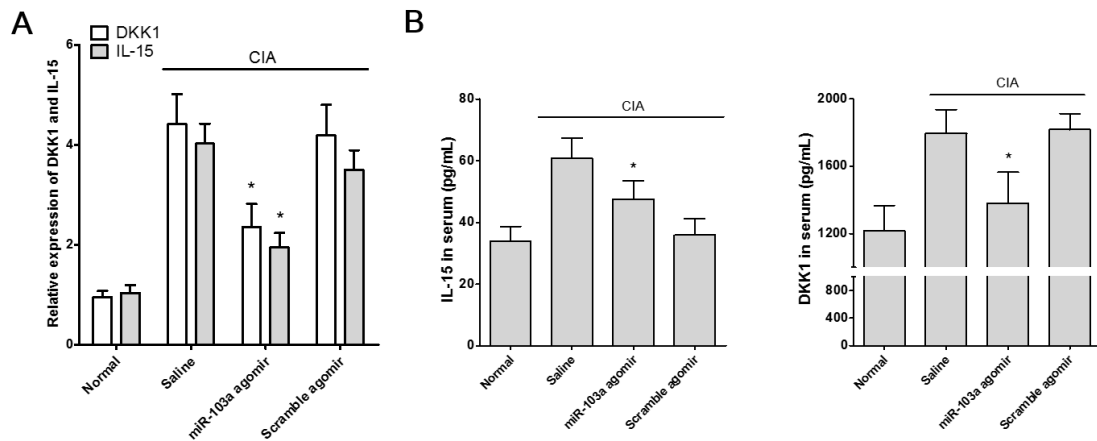


图 2-21 小鼠踝关节滑膜组织及血清中 IL-15/DKK1 的表达情况

qRT-PCR 和 ELISA 的结果显示, 较生理盐水或 Scramble agomir 处理的 CIA 模型小鼠, 局部注射 miR-103a agomir 的小鼠踝关节组织中 IL-15/DKK1 的 mRNA 表达水平显著降低 (图 2-21 A), 同时血清中 IL-15/DKK1 的含量亦呈现了不同程度的减少 (图 2-21 B)。

4 讨论

DDR2 是一个酪氨酸蛋白激酶受体 (配体为 II 型胶原), 是我们课题组于 1999 年首次通过差异筛选的方法发现的在 RA 滑膜组织和 RA FLS 细胞中呈高表达的蛋白分子, 并在国际上首次证实了 DDR2 在 RA FLS 细胞介导的 RA 关节软骨损伤过程中发挥重要作用。近年来, 课题组围绕 DDR2 在 RA 中晚期关节软骨损伤进程中的功能与机制已经进行了一系列的研究, 主要包括: ① DDR2 在 RA 滑膜细胞中高表达并且呈持续活化状态, II 型胶原是其活化的主要配体; ② 利用免疫共沉淀结合质谱分析技术获得了能够与 DDR2 相互作用的分子钙依赖性磷脂结合蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2); ③ 在国际上创新性地提出并证实了 Collage II-DDR2-Annexin A2-MMP-13-Collage II 环路在介导 RA 关节软骨破坏中发挥的重要作用; ④ 利用 DDR2(-/-)突变小鼠 CIA 模型, 对上述环路的功能及调控机制进行了系统验证; 同时, Annexin A2 干扰腺病毒能够显著缓解模型动物的关节软骨损伤。相关研究成果已发表在诸多国际期刊上。

虽然我们创新性的提出并证实了 DDR2 在 RA 关节邻近骨、软骨损伤中的重要

作用，并初步对上述作用的机制进行了研究。但我们之前主要围绕受 DDR2 活化影响的 MMP1、MMP13 等 MMPs 类分子及相关调控机制开展了相关研究工作。RA 炎症反应能够募集大量的免疫细胞，在关节腔内蓄积了高浓度的各类细胞因子及炎症因子，使得 RA 炎症诱发的骨重塑病理进程十分复杂。RA 病理条件下，FLS 细胞功能的改变对“成骨-破骨平衡”的影响意义重大，DDR2 在“成骨-破骨平衡”中的作用及调控机制仍有待于进一步阐明。

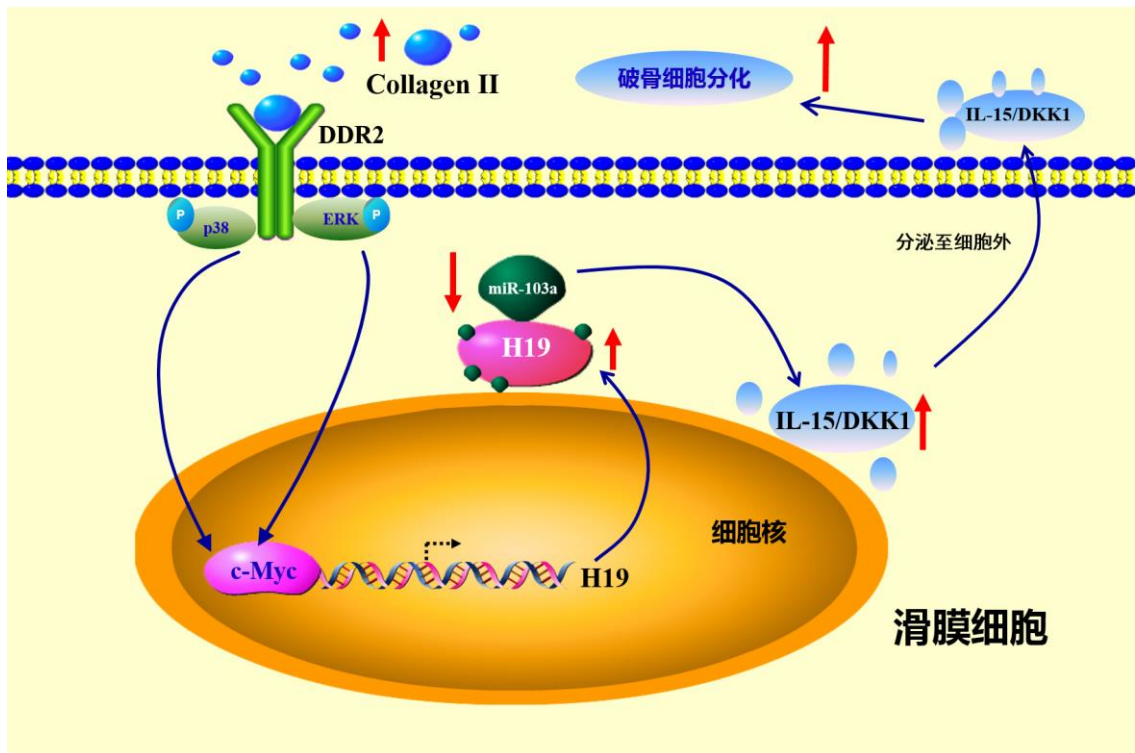


图2-22 DDR2-H19-miR-103a通路对RA FLS细胞介导的破骨细胞分化的影响

本部分研究中，我们在前期研究的基础及相关预实验的结果之上，提出了如下假说：在 RA FLS 细胞中，H19 和 miR-103a 表达水平的变化受 DDR2 活化的影响，DDR2 活化后可引起 MAPK/p38 或 ERK 通路活化，促进 c-Myc 的转录激活，c-Myc 通过与 H19 的启动子区结合促进了 H19 的转录，而 H19 可通过“吸附”作用下调 miR-103a 的功能，加剧 IL-15/DKK1 的表达及过分泌，继而引起成骨细胞分化减少，单核细胞来源的破骨细胞增加，打破关节腔内原有的“成骨-破骨平衡”，直接加剧 RA 关节邻近骨、软骨的破坏。其中 H19 和 miR-103a 在 DDR2-H19-miR-103a-IL-15/DKK1 通路中扮演了关键调控分子的角色（图 2-19）。

综上所述，本部分研究提示：在 RA FLS 细胞中，存在

DDR2-H19-miR-103a-IL-15/DKK1 这一恶性调节通路，直接参与了 RA 炎性环境诱发的关节骨重塑进程，加剧了关节微环境中破骨细胞的分化，打破关节局部原有的“成骨-破骨平衡”，是 RA 关节邻近骨、软骨损伤的直接参与者。结合我们课题组之前提出的 Collagen II-DDR2-MMPs-Collagen II 恶性环路，本研究是对该环路的完善和补充，是对 DDR2 在 RA 致病机制研究中的拓展。通过本研究，为下一步开发以 DDR2 为靶点的 RA 新药提供了有利的理论支撑。

小 结

1. 提出并证实了 TNF- α /IL-1 β /NF- κ B/YY1/miR-10a/NF- κ B 正反馈调节环路在 RA FLS 细胞介导的 RA 炎性环境维持中的作用
2. 阐明了上述正反馈环路的调控机制
3. 在课题组之前研究的基础上，提出并证实了 DDR2-H19-miR-103a-IL-15/DKK1 通路在 RA FLS 细胞介导的 RA 关节骨重塑进程中的作用
4. 初步阐明了上述通路的作用机制
5. 完善和拓展了 DDR2 在 RA 关节邻近骨、软骨损伤进程中的重要作用
6. 初步验证了以 miR-10a、DDR2 和 miR-103a 为 RA 治疗靶点的可能性

参考文献

1. 栗占国, 张奉春, 鲍春德主编, 《类风湿性关节炎》, 人民卫生出版社, 2009 年第 1 版。
2. Drosos AA. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2004; 3 Suppl 1: S20-2.
3. Symmons DP, Barrett EM, Bankhead CR, Scott DG, Silman AJ. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol.* 1994; 33(8): 735-9.
4. Hochberg MC, Spector TD. Epidemiology of rheumatoid arthritis: update. *Epidemiol Rev.* 1990; 12: 247-52.
5. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30(11): 1205-13.
6. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2006; 36(3): 182-8.
7. Shichikawa K, Inoue K, Hirota S, Maeda A, Ota H, Kimura M, et al. Changes in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Kamitonda, Wakayama, Japan, 1965-1996. *Ann Rheum Dis.* 1999; 58(12): 751-6.
8. Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(3): 625-31.
9. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003; 423(6937): 356-61.
10. Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001; 45(1): 101-6.
11. Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravallesse EM. Rheumatic diseases: the effects

- of inflammation on bone. *Immunol Rev.* 2005; 208: 228-51.
12. Abeles AM, Pillinger MH. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2006; 64(1-2): 20-4.
 13. Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000; 2(5): 361-7.
 14. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest.* 1995; 96(3): 1631-8.
 15. Imamura F, Aono H, Hasunuma T, Sumida T, Tateishi H, Maruo S, et al. Monoclonal expansion of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(11): 1979-86.
 16. Matsumoto S, Müller-Ladner U, Gay RE, Nishioka K, Gay S. Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Rheumatol.* 1996; 23: 1345-52.
 17. Meinecke I, Cinski A, Baier A, Peters MA, Dankbar B, Wille A, et al. Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(12): 5073-8.
 18. Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1781-90.
 19. Kumkumian GK, Lafyatis R, Remmers EF, Case JP, Kim SJ, Wilder RL. Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol.* 1989; 143(3): 833-7.
 20. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem.* 1991; 266(4): 2017-20.
 21. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science.* 2007; 315(5814):

- 1006-10.
22. Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(11): 2523-30.
 23. Pap T, Aupperle KR, Gay S, Firestein GS, Gay RE. Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(3): 676-81.
 24. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 1996; 149(5): 1607-15.
 25. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest.* 1989; 83(2): 585-92.
 26. Palmer CD, Mutch BE, Page TH, Horwood NJ, Foxwell BM. Bmx regulates LPS-induced IL-6 and VEGF production via mRNA stability in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 370(4): 599-602.
 27. Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, Sevastou I, Nikolaidou-Katsaridou N, Zhao Z, et al. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med.* 2012; 209(5): 925-33.
 28. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010; 233(1): 233-55.
 29. Stanczyk J, Ospelt C, Gay RE, Gay S. Synovial cell activation. *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18(3): 262-7.
 30. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002; 98(5600): 911-2.
 31. Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, et al. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 2001; 108(1): 73-81.

32. Yoshizawa T, Hammaker D, Boyle DL, Corr M, Flavell R, Davis R, et al. Role of MAPK kinase 6 in arthritis: distinct mechanism of action in inflammation and cytokine expression. *J Immunol.* 2009; 183(2): 1360-7.
33. Korb A, Tohidast-Akrad M, Cetin E, Axmann R, Smolen J, Schett G. Differential tissue expression and activation of p38 MAPK alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(9): 2745-56.
34. Westra J, Limburg PC, de Boer P, van Rijswijk MH. Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63(11): 1453-9.
35. Inoue T, Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of p38 MAPK by MAPK kinases 3 and 6 in fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 2005; 174(7): 4301-6.
36. Guma M, Hammaker D, Topolewski K, Corr M, Boyle DL, Karin M, et al. Antiinflammatory functions of p38 in mouse models of rheumatoid arthritis: advantages of targeting upstream kinases MKK-3 or MKK-6. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(9): 2887-95.
37. Cohen SB, Cheng TT, Chindalore V, Damjanov N, Burgos-Vargas R, Delora P, et al. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(2): 335-44.
38. Genovese MC, Cohen SB, Wofsy D, Weinblatt ME, Firestein GS, Brahn E, et al. A 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study of the efficacy of oral SCIO-469, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011; 38(5): 846-54.
39. Shahrara S, Castro-Rueda HP, Haines GK, Koch AE. Differential expression of the FAK family kinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial tissues. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(5): R112.
40. Pap T, Nawrath M, Heinrich J, Bosse M, Baier A, Hummel KM, et al. Cooperation

- of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(9): 2794-802.
41. Weisbart RH, Chan G, Heinze E, Mory R, Nishimura RN, Colburn K. BRAF drives synovial fibroblast transformation in rheumatoid arthritis. *J Biol Chem.* 2010; 285(45): 34299-303.
42. Abreu JR, de Launay D, Sanders ME, Grabiec AM, van de Sande MG, Tak PP, et al. The Ras guanine nucleotide exchange factor RasGRF1 promotes matrix metalloproteinase-3 production in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(4): R121.
43. Han Z, Boyle DL, Aupperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS. Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291(1): 124-30.
44. Svensson CI, Inoue T, Hammaker D, Fukushima A, Papa S, Franzoso G, et al. Gadd45beta deficiency in rheumatoid arthritis: enhanced synovitis through JNK signaling. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(11): 3229-40.
45. Luo Y, Boyle DL, Hammaker D, Edgar M, Franzoso G, Firestein GS. Suppression of collagen-induced arthritis in growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 β -deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(10): 2949-55.
46. Aupperle K, Bennett B, Han Z, Boyle D, Manning A, Firestein G. NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol.* 2001; 166(4): 2705-11.
47. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1(4): a000034.
48. Okazaki Y, Sawada T, Nagatani K, Komagata Y, Inoue T, Muto S, et al. Effect of nuclear factor-kappaB inhibition on rheumatoid fibroblast-like synoviocytes and collagen induced arthritis. *J Rheumatol.* 2005; 32(8): 1440-7.
49. Zhang HG, Huang N, Liu D, Bilbao L, Zhang X, Yang P, et al. Gene therapy that inhibits nuclear translocation of nuclear factor kappaB results in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2000;

- 43(5): 1094-105.
50. Pap T, Franz JK, Hummel KM, Jeisy E, Gay R, Gay S. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res.* 2000; 2(1): 59-64.
51. Bartok B, Boyle DL, Liu Y, Ren P, Ball ST, Bugbee WD, et al. PI3 kinase δ is a key regulator of synoviocyte function in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2012; 180(5): 1906-16.
52. Sweeney SE, Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of c-Jun phosphorylation by the I kappa B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 2005; 174(10): 6424-30.
53. Crow MK. Type I interferon in organ-targeted autoimmune and inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12 Suppl 1: S5.
54. Sweeney SE, Corr M, Kimbler TB. Role of interferon regulatory factor 7 in serum-transfer arthritis: regulation of interferon- β production. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(4): 1046-56.
55. Wakisaka S, Suzuki N, Takeba Y, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Takeno M, et al. Modulation by proinflammatory cytokines of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 1998; 114(1): 119-28.
56. Audo R, Calmon-Hamaty F, Baeten D, Bruyer A, Combe B, Hahne M, et al. Mechanisms and clinical relevance of TRAIL-triggered responses in the synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(4): 904-13.
57. Korb A, Pavenst ält H, Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis.* 2009; 14(4): 447-54.
58. Han Z, Boyle DL, Shi Y, Green DR, Firestein GS. Dominant-negative p53 mutations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(6): 1088-92.
59. Firestein GS, Nguyen K, Aupperle KR, Yeo M, Boyle DL, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J*

- Pathol. 1996; 149(6): 2143-51.
60. Cha HS, Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. PUMA regulation and proapoptotic effects in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(2): 587-92.
61. Schedel J, Gay RE, Kuenzler P, Seemayer C, Simmen B, Michel BA, et al. FLICE-inhibitory protein expression in synovial fibroblasts and at sites of cartilage and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(6): 1512-8.
62. Franz JK, Pap T, Hummel KM, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama Y, et al. Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(3): 599-607.
63. Maciejewska-Rodrigues H, Karouzakis E, Strietholt S, Hemmatazad H, Neidhart M, Ospelt C, et al. Epigenetics and rheumatoid arthritis: the role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression. *J Autoimmun.* 2010 ; 35(1): 15-22.
64. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9(1): 24-33.
65. Johnson JD1, Edman JC, Rutter WJ. A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(12): 5677-81.
66. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010; 141(7): 1117-34.
67. Carafoli F, Hohenester E. Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1834(10): 2187-94.
68. Hilton HN, Stanford PM, Harris J, Oakes SR, Kaplan W, Daly RJ, et al. KIBRA interacts with discoidin domain receptor 1 to modulate collagen-induced signalling. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1783(3): 383-93.
69. Lu KK, Trcka D, Bendeck MP. Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src. *Cardiovasc Pathol.* 2011; 20(2): 71-6.
70. Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Svoboda R, Wheelock MJ, Johnson KR. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from

- integrins and discoidin domain receptor 1. *J Cell Biol.* 2008; 180(6): 1277-89.
71. Zhang Y, Su J, Yu J, Bu X, Ren T, Liu X, et al. An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(3): 604-17.
72. Toy KA, Valiathan RR, Núñez F, Kidwell KM, Gonzalez ME, Fridman R, et al. Tyrosine kinase discoidin domain receptors DDR1 and DDR2 are coordinately deregulated in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 150(1): 9-18.
73. Ren T, Zhang W, Liu X, Zhao H, Zhang J, Zhang J, et al. Discoidin domain receptor 2 (DDR2) promotes breast cancer cell metastasis and the mechanism implicates epithelial-mesenchymal transition programme under hypoxia. *J Pathol.* 2014; 234(4): 526-37.
74. 王吉村, 药立波, 吕后山, 刘新平, 邓艳春, 孙铁铮等。类风湿性关节炎滑膜细胞中蛋白酪氨酸激酶的 RNA 表达水平分析。《解放军医学杂志》, 2001; 26(2): 5-8。
75. Su J, Yu J, Ren T, Zhang W, Zhang Y, Liu X, et al. Discoidin domain receptor 2 is associated with the increased expression of matrix metalloproteinase-13 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem.* 2009; 330(1-2): 141-52.
76. Zhang W, Ding T, Zhang J, Su J, Yu J, Li J, et al. Fusion expression of DDR2 extracellular domain in insect cells and its purification and function characterization. *J Cell Biochem.* 2007; 102(1): 41-51.
77. Zhang W, Ding T, Zhang J, Su J, Li F, Liu X, et al. Expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2) extracellular domain in pichia pastoris and functional analysis in synovial fibroblasts and NIT3T3 cells. *Mol Cell Biochem.* 2006; 290(1-2): 43-53.
78. Wang J, Lü H, Liu X, Deng Y, Sun T, Li F, et al. Functional analysis of discoidin domain receptor 2 in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2002; 19(3): 161-8.
79. Zhao W, Zhang C, Shi M, Zhang J, Li M, Xue X, et al. The discoidin domain receptor 2/annexin A2/matrix metalloproteinase 13 loop promotes joint destruction

- in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66(9): 2355-67.
80. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000; 403(6772): 901-6.
81. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*. 2003; 113(1): 25-36.
82. Xu P, Vernooij SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*. 2003; 13(9): 790-5.
83. Kawasaki H, Taira K. Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells. *Nature*. 2003; 423(6942): 838-42.
84. Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2012; 64(1): 11-20.
85. Bhanji RA, Eystathioy T, Chan EK, Bloch DB, Fritzler MJ. Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. *Clin Immunol.* 2007; 125(3): 247-56.
86. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(4): R101.
87. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(5): 1284-92.
88. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(4): 1001-9.
89. Duroux-Richard I, Presumey J, Courties G, Gay S, Gordeladze J, Jorgensen C, et al. MicroRNAs as new player in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2011; 78(1): 17-22.

90. Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol.* 2010; 136(1): 1-15.
91. Lu LF, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology.* 2009; 127(3): 291-8.
92. Long L, Yu P, Liu Y, Wang S, Li R, Shi J, et al. Upregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 296139.
93. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(27): 11193-8.
94. Blüml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(5): 1281-8.
95. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(33): 12481-6.
96. Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, Filer A, Raza K, Kolling C, et al. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(2): 373-81.
97. Pandis I, Ospelt C, Karagianni N, Denis MC, Reczko M, Camps C, et al. Identification of microRNA-221/222 and microRNA-323-3p association with rheumatoid arthritis via predictions using the human tumour necrosis factor transgenic mouse model. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(10): 1716-23.
98. Chang X, Sun Y, Han S, Zhu W, Zhang H, Lian S. MiR-203 inhibits melanoma invasive and proliferative abilities by targeting the polycomb group gene BMI1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 456(1): 361-6.
99. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma

- through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(3): 867-75.
100. Shah MY, Calin GA. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer. *Genome Med.* 2011; 3(8): 56.
101. Yang S, Yang Y. Downregulation of microRNA -221 decreases migration and invasion in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep.* 2015; 12(2): 2395-401.
102. Lin J, Huo R, Xiao L, Zhu X, Xie J, Sun S, et al. A novel p53/microRNA-22/Cyr61 axis in synovial cells regulates inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66(1): 49-59.
103. Zhang Q, Wu J, Cao Q, Xiao L, Wang L, He D, et al. A critical role of Cyr61 in interleukin-17-dependent proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(12): 3602-12.
104. Niederer F, Trenkmann M, Ospelt C, Karouzakis E, Neidhart M, Stanczyk J, et al. Down-regulation of microRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(6): 1771-9.
105. Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, et al. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(5): 1294-304.
106. Zhou Q, Long L, Shi G, Zhang J, Wu T, Zhou B. Research of the methylation status of miR-124a gene promoter among rheumatoid arthritis patients. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 524204.
107. Miao CG, Yang YY, He X, Huang C, Huang Y, Qin D, et al. MicroRNA-152 modulates the canonical Wnt pathway activation by targeting DNA methyltransferase 1 in arthritic rat model. *Biochimie.* 2014; 106: 149-56.
108. Miao CG, Shi WJ, Xiong YY, Yu H, Zhang XL, Qin MS, et al. miR-375 regulates the canonical Wnt pathway through FZD8 silencing in arthritis synovial fibroblasts. *Immunol Lett.* 2015; 164(1): 1-10.
109. Philippe L, Alsaleh G, Bahram S, Pfeffer S, Georgel P. The miR-17 ~ 92 Cluster: A

- Key Player in the Control of Inflammation during Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2013; 4: 70.
110. Trenkmann M, Brock M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Huber LC. Tumor necrosis factor α -induced microRNA-18a activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through a feedback loop in NF- κ B signaling. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(4): 916-27.
111. Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibilia J, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 2012; 188(1): 454-61.
112. Philippe L, Alsaleh G, Pichot A, Ostermann E, Zuber G, Frisch B, et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72(6): 1071-9.
113. Alsaleh G, François A, Philippe L, Gong YZ, Bahram S, Cetin S, et al. MiR-30a-3p negatively regulates BAFF synthesis in systemic sclerosis and rheumatoid arthritis fibroblasts. *PLoS One.* 2014; 9(10): e111266.
114. Sharma AR, Sharma G, Lee SS, Chakraborty C. miRNA-Regulated Key Components of Cytokine Signaling Pathways and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Med Res Rev.* 2016; 36(3): 425-39.
115. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature.* 1997; 385(6618): 729-33.
116. Li P, Schwarz EM. The TNF- α transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 2003; 25(1): 19-33.
117. Abou-Zeid A, Saad M, Soliman E. MicroRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factor- α and disease activity. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011; 15(11):807-12.
118. Semaan N, Frenzel L, Alsaleh G, Suffert G, Gottenberg JE, Sibilia J, et al. miR-346 controls release of TNF- α protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization. *PLoS One.* 2011; 6(5): e19827.
119. Li X, Tian F, Wang F. Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets

- SOCS1 and upregulates TNF- α and IL-1 β in PBMCs. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(12): 23910-21.
120. Virtue A, Wang H, Yang XF. MicroRNAs and toll-like receptor/interleukin-1 receptor signaling. *J Hematol Oncol.* 2012; 5: 66.
121. Kuno K, Matsushima K. The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol.* 1994; 56(5): 542-7.
122. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013; 39(6): 1003-18.
123. Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, Ishikawa M, Deie M, Adachi N, et al. Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(4): 1035-41.
124. Dai L, Zhang X, Hu X, Zhou C, Ao Y. Silencing of microRNA-101 prevents IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14(6): R268.
125. Yang B, Kang X, Xing Y, Dou C, Kang F, Li J, et al. Effect of microRNA-145 on IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett.* 2014; 588(14): 2344-52.
126. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 Suppl 2: S2.
127. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 2003; 55(2): 241-69.
128. Maini RN, Taylor PC. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med.* 2000; 51: 207-29.
129. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 683-765.
130. Lu MC, Yu CL, Chen HC, Yu HC, Huang HB, Lai NS. Increased miR-223 expression in T cells from patients with rheumatoid arthritis leads to decreased insulin-like growth factor-1-mediated interleukin-10 production. *Clin Exp Immunol.* 2014; 177(3): 641-51.

131. Quinn SR, Mangan NE, Caffrey BE, Gantier MP, Williams BR, Hertzog PJ, et al. The role of Ets2 transcription factor in the induction of microRNA-155 (miR-155) by lipopolysaccharide and its targeting by interleukin-10. *J Biol Chem.* 2014; 289(7): 4316-25.
132. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect.* 2013; 2(9): e60.
133. Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010; 11: 209.
134. Zhu S, Pan W, Song X, Liu Y, Shao X, Tang Y, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK- α . *Nat Med.* 2012; 18(7): 1077-86.
135. Dong L, Wang X, Tan J, Li H, Qian W, Chen J, et al. Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Cell Mol Med.* 2014; 18(11): 2213-24.
136. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol.* 2003; 73(2): 213-24.
137. Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, Juncker T, Frenzel L, Gottenberg JE, et al. Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 2009; 182(8): 5088-97.
138. Park HJ, Kim DH, Lim SH, Kim WJ, Youn J, Choi YS, et al. Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity. *Immune Netw.* 2014; 14(1): 21-9.
139. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity.* 2010; 33(4): 607-19.
140. Bergamaschi C, Jalah R, Kulkarni V, Rosati M, Zhang GM, Alicea C, et al. Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha in vivo. *J Immunol.* 2009; 183(5): 3064-72.

141. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(8): 595-601.
142. Miyazaki T, Liu ZJ, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, et al. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell.* 1995; 81(2): 223-31.
143. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007; 204(8): 1849-61.
144. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemoattractant protein 1 production in human monocytes. *Blood.* 1997; 90(7): 2804-9.
145. Mrózek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1996; 87(7): 2632-40.
146. González-Álvarez I, Ortiz AM, Alvaro-Gracia JM, Castañeda S, Dáz-Sánchez B, Carvajal I, et al. Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLoS One.* 2011; 6(12): e29492.
147. Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol.* 2001; 167(3): 1179-87.
148. McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 1996; 2(2): 175-82.
149. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2006; 25(4): 448-52.
150. Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2007; 25(5 Suppl 46): S4-11.
151. Oppenheimer-Marks N, Brezinschek RI, Mohamadzadeh M, Vita R, Lipsky PE.

- Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells in vitro and in the SCID mouse–human rheumatoid arthritis model in vivo. *J Clin Invest.* 1998; 101(6): 1261-72.
152. Rückert R, Brandt K, Ernst M, Marienfeld K, Csernok E, Metzler C, et al. Interleukin-15 stimulates macrophages to activate CD4+ T cells: a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunology.* 2009; 126(1): 63-73.
153. Kuca-Warnawin E, Burakowski T, Kurowska W, Prochorec-Sobieszek M, Radzikowska A, Chorazy-Massalska M, et al. Elevated number of recently activated T cells in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: a role for interleukin 15? *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(1): 227-33.
154. Ferrari-Lacraz S, Zanelli E, Neuberg M, Donskoy E, Kim YS, Zheng XX, et al. Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2004; 173(9): 5818-26.
155. Ruchatz H, Leung BP, Wei XQ, McInnes IB, Liew FY. Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol.* 1998; 160(11): 5654-60.
156. Zhang T, Bai X, Mao X. Systemic delivery of small interfering RNA targeting the interleukin-2/15 receptor β chain prevents disease progression in experimental arthritis. *PLoS One.* 2013; 8(11): e78619.
157. Harada S, Yamamura M, Okamoto H, Morita Y, Kawashima M, Aita T, et al. Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(7): 1508-16.
158. McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 1997; 3(2): 189-95.
159. Wang D, Deng X, Leng X, Mao X. Interleukin-15 receptor-directed immunotoxins attenuate disease severity in rat adjuvant arthritis. *Mol Immunol.* 2010; 47(7-8):

- 1535-43.
160. Djaafar S, Pierroz DD, Chicheportiche R, Zheng XX, Ferrari SL, Ferrari-Lacraz S. Inhibition of T cell-dependent and RANKL-dependent osteoclastogenic processes associated with high levels of bone mass in interleukin-15 receptor-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(11): 3300-10.
161. Andersson AK, Feldmann M, Brennan FM. Neutralizing IL-21 and IL-15 inhibits pro-inflammatory cytokine production in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2008; 68(1): 103-11.
162. Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, Kawaguchi H, Tanaka S, Nishikawa T, et al. A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240: 279–86.
163. Itonaga I, Fujikawa Y, Sabokbar A, Murray DW, Athanasou NA. Rheumatoid arthritis synovial macrophage-osteoclast differentiation is osteoprotegerin ligand-dependent. *J Pathol.* 2000; 192: 97–104.
164. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 1998; 152: 943–51.
165. Lee HY, Jeon HS, Song EK, Han MK, Park SI, Lee SI, et al. CD40 ligation of rheumatoid synovial fibroblasts regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis: evidence of NF-kappaB-dependent, CD40-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1747–58.
166. Okabe I, Kikuchi T, Mogi M, Takeda H, Aino M, Kamiya Y, et al. IL-15 and RANKL Play a Synergistically Important Role in Osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.* 2017; 118(4): 739-47.
167. Park MK, Her YM, Cho ML, Oh HJ, Park EM, Kwok SK, et al. IL-15 promotes osteoclastogenesis via the PLD pathway in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2011; 139(1-2): 42-51.

附 录

个人简历和研究成果

姓名：穆楠 性别：男
民族：汉族 出生年月：1989.07
籍贯：河北曲阳 政治面貌：中共党员（2009.12）
研究方向：非编码 RNA 功能与类风湿性关节炎致病机制

受教育经历：

2007.09-2011.06 第四军医大学药学院 药物制剂专业 本科
2011.09-2017.06 第四军医大学药学院 生物制药学教研室 硕-博连读
导师：张英起 教授

在校期间获奖情况：

2011年9月至今，连续五年获得“优秀学员”
2015年5月，参加全国第二十次中华医学会风湿病学学术会议，题为《RA FLS 细胞中 miR-10a 与 NF- κ B 信号通路的相互调节作用及机制研究》的论文，获大会“优秀壁报奖”
2015年12月，获第四军医大学优秀博士学位论文课题资助，资助金额：2万元。
(NO. 2015D01)
2016年12月，获第四军医大学“博士二等奖学金”
2016年12月，被评为“优秀学员骨干”

主要研究成果

1. 已发表文章：

1. **Mu N**, Gu J, Huang T, Zhang C, Shu Z, Li M, Hao Q, Li W, Zhang W, Zhao J, Zhang Y, Huang L, Wang S, Jin X, Xue X, Zhang W, Zhang Y. A novel NF- κ B/YY1/microRNA-10a regulatory circuit in fibroblast-like synoviocytes regulates inflammation in rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2016; 6:20059. (IF=5.578)
2. **Mu N**, Liu N, Hao Q, Xu Y, Li J, Li W, Wu S, Zhang C, Su H. Inhibition of mouse

- SP2/0 myeloma cell growth by the B7-H4 protein vaccine. *BMB Rep.* 2014; 47(7): 399-404. (IF=2.595)
3. Huang TL*, Mu N*, Gu JT*, Shu Z, Zhang K, Zhao JK, Zhang C, Hao Q, Li WN, Zhang WQ, Liu NN, Zhang Y, Zhang W, Xue XC, Zhang YQ. DDR2-CYR61-MMP1 Signaling Pathway Promotes Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis through Regulating Migration and Invasion of Fibroblast-Like Synoviocytes. *J Bone Miner Res.* 2017; 32(2): 407-418. (IF=6.832, 共同第一作者)
 4. Jintao Gu*, Shuo Liu*, Nan Mu*, Tonglie Huang, Wangqian Zhang, Zhen Shu, Cun Zhang, Qiang Hao, Weina Li, Xiaochang Xue, Wei Zhang, and Yingqi Zhang. A Novel Concatemer Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) With Enhanced Activity Against Radiation-induced Intestinal Injury. *Journal of Controlled Release.* 2017. pii: S0168-3659(17)30592-8. (已接收, IF=7.441, 共同第一作者)
 5. Zhao W, Zhang C, Shi M, Zhang J, Li M, Xue X, Zhang Z, Shu Z, Zhu J, Mu N, Li W, Hao Q, Wang Z, Gong L, Zhang W, Zhang Y. The DDR2-Annexin A2-MMP13 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66(9):2355-2367. (IF=7.871)
 6. Huang T, Zhang K, Sun L, Xue X, Zhang C, Shu Z, Mu N, Gu J, Zhang W, Wang Y, Zhang Y, Zhang W. Body protective compound-157 enhances alkali-burn wound healing in vivo and promotes proliferation, migration, and angiogenesis in vitro. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2485-2499. (IF=3.028)
 7. Feng GD, Xue XC, Gao ML, Wang XF, Shu Z, Mu N, Gao Y, Wang ZL, Hao Q, Li WN, Li M, Zhang C, Zhang W, Zhang YQ. Therapeutic Effects of PADRE-BAFF Autovaccine on Rat Adjuvant Arthritis. *Biomed Res Int.* 2014: 854954. (IF=2.706)
 8. Shu Z, Li J, Mu N, Gao Y, Huang T, Zhang Y, Wang Z, Li M, Hao Q, Li W, He L, Zhang C, Zhang W, Xue X, Zhang Y. Expression, purification and characterization of galectin-1 in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* 2014 Apr 6; 99C: 58-63. (IF=1.695)
 9. 刘楠楠, 赵薇, 穆楠, 田菲, 薛晓畅, 颜真, 张伟; 类风湿性关节炎成纤维样滑膜(FLS)细胞中DDR2相互作用分子的筛选鉴定及其对FLS细胞侵袭能力的影响。生物技术通讯, 2015(3), 305-310.
 10. 赵薇, 张昭, 黄同列, 穆楠, 田菲, 张伟; 重组质粒 pFLAG-CMV2-FcDDR2 的构建及应用。细胞与分子免疫学杂志, 2015(9), 1234-1237.
 11. 赵薇, 穆楠, 舒震, 张昭, 张伟; 类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞中膜联蛋白 A2 磷酸化修饰增强基质金属蛋白酶 9 的活性。细胞与分子免疫学杂志, 2015(10), 1363-1364.
 12. 许倡涛, 刘毅, 朱迪, 辛超, 杜志超, 穆楠, 陶凌; TXNIP 介导的 NLRP3 炎症小体激活在心肌微血管内皮细胞缺氧/复氧损伤中的作用。心脏杂志, 2015(5), 510-515.

2. 投稿中的文章:

1. Nan Mu, Jintao Gu, Xiaochang Xue, Nannan Liu, Zhen Shu, Kuo Zhang, Tonglie Huang, Chu Chu, Wangqian Zhang, Li Gong, Dakuan Gao, Lei Shang, Yingqi Zhang, Qingdong Guo. PRL-3 is a potential glioma prognostic marker and promotes glioma progression by activating the Erk1/2 and PI3K pathways. *Neuro Oncology.* (一审修回, IF=7.371)
2. The DDR2-H19-miR-103 axle promote bone remodeling by enhancing the IL-15/DKK1 expression of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* (整理投稿中)

致 谢

指缝很宽，时间太瘦，悄悄从指缝间溜走。终于在第四军医大学学习、生活的第十个年头，迎来了我研究生阶段学习的结束。一路的艰辛、一路的风景、一路的收获、一路的感恩。

回首 2011 年 5 月，依稀记着初次踏入导师张英起教授办公室时的情景，当时我被导师渊博的学识和洒脱的性格吸引。他对科研敏锐的眼光和独到的见解时常能抓住问题的核心。几年来，导师的鼓励和点评不断激励着我。同时，导师作为科室领导和学科带头人，他悉心营造了团结奋发的工作环境和严谨踏实的科研作风，不仅为我的学业和成长提供良好的平台和强有力的支撑，还为今后走上工作岗位的我树立了榜样。衷心感谢他对我帮助和关心。

感谢我的辅导老师张伟教授，他从选题、实验设计、思路整理以及结果分析等方面均倾注了大量的时间和心思在我的课题中。正是他手把手的言传身教、身先士卒的埋头于科研和实验室工作，使我的科研能力和水平得以全面提升，为今后的学习和工作打下了坚实基础。

感谢我的辅导老师薛晓畅副教授，他细致严谨的研究态度和发散的科研思维，为我的课题顺利开展和完成，提供和不可或缺的帮助。

非常荣幸的作为生物技术中心的一员，我的研究离不开李萌副教授、张存副教授、郝强讲师、李维娜讲师、黄同列讲师、包春杰老师、王增禄老师、赵宁老师、刘节老师、张阔讲师、王舒宁讲师、张旺倩讲师的热情关心和帮助。同时，教研室的舒震博士后、刘硕博士、王琪硕士、李佳林硕士、高源博士、马晓雯博士、顾锦涛博士、王昭维硕士、高凯丽硕士、赵丽娟硕士、刘军硕士、褚楚硕士、陶波龙硕士和何磊硕士与我共同度过了难忘的几年，特别是顾锦涛博士、褚楚硕士、刘军硕士和舒震博士后的援助是我课题完成的主要支持。

感谢学校其他帮助过我的师长、同学和朋友，也是你们的付出使我得以走到今天。

家人的关心和支持使得我没有了后顾之忧，感谢他们数年来的理解和支持，这本论文也将是送给他们最好的礼物。

向前一步，再向前一步，不管前面是苦涩是甜蜜，是困顿是豁然，但只有向前一步才是新的一步，才可以接近理想。我已经准备收拾好行囊，乘风破浪，踏上新的征程。