文章编号:1000-5404(2014)10-1031-05

论著

miR-144过表达慢病毒对关节炎模型小鼠滑膜组织病理进程的影响

闫演飞,康 菲,杨 波,苗 莹,董世武 (400038 重庆,第三军医大学生物医学工程系生物医学材料学教研室)

[摘要] **目的** 探讨 miR-144 过表达慢病毒对于关节炎模型小鼠滑膜组织病理进程的作用及其可能的机制。**方法** 将Ⅱ型胶原乳剂注射至 BALB/c 小鼠尾根部皮下构建由Ⅱ型胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis,CIA)小鼠模型,再以 miRNA-144 高表达慢病毒进行尾静脉注射,然后对模型小鼠滑膜组织进行免疫组化检测 Cadherin-11 和 TNF-α 的表达和分布,并用 HE 染色检测滑膜组织的病理变化特点。**结果** 模型小鼠滑膜组织表现出与类风湿性关节炎病理学进程相似的特点,miRNA-144 高表达慢病毒处理较生理盐水和空载慢病毒处理组模型小鼠的滑膜组织的炎症反应明显减轻,且 TNF-α 表达较生理盐水和空载体慢病毒处理组显著下调($P<0.05$),进一步检测 Cadherin-11 的表达亦显著降低($P<0.05$)。**结论** 机体中 miRNA-144 增加可减弱或抑制关节炎模型小鼠中滑膜组织的炎症反应,并下调其 TNF-α 的表达,且这一作用可能是 miRNA-144 抑制滑膜细胞中 Cadherin-11 的效应。

[关键词] 微小 RNA-144;类风湿性关节炎;钙粘蛋白 11;肿瘤坏死因子-α;Ⅱ型胶原
[中图法分类号] R-322;R363.25;R684.3 [文献标志码] A

Effects of miR-144 overexpression lentivirus on pathological processes of synovial tissue in arthritis mouse model

Yan Yanfei, Kang Fei, Yang Bo, Miao Ying, Dong Shiwu (Department of Biomedical Materials Science, School of Biomedical Engineering, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the role of miR-144-overexpressed lentivirus in the pathological process of synovial tissue in arthritis mouse model and its possible mechanism. Methods Type Ⅱ collagen-induced arthritis (CIA) mouse models were obtained by injecting the emulsion of type II collagen into subcutaneous tail base of BALB/c mice. Then miRNA-144 overexpression lentivirus was injected into the tail vein. The expression and distribution of cadherin-11 and TNF-α in the synovial tissue of model mice were detected through immunofluorescence staining and the pathological characteristics were studied with HE staining. Results The mouse model exhibited similar characteristics as the pathological processes of synovial tissue in rheumatoid arthritis. Compared with saline and dummy vector lentivirus-treated groups, the inflammation of the synovial tissue was significantly reduced in the miRNA-144 overexpression lentivirus-treated group, whose TNF-α expression and cadherin-11 protein expression were also significantly lower ($P<0.05$, $P<0.05$). Conclusion The increase of miRNA-144 content reduces the inflammation of synovial tissue in the CIA mouse models, and down-regulates the expression of TNF-α which may result from miRNA-144-induced cadherin-11inhibition.

[**Key words**] miRNA-144; rheumatoid arthritis; cadherin-11; TNF-α; collagen Ⅱ

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2011CB964701), the National Key Technology R&D Program(2012BAI42G01) and the National Natural Science Foundation of China (81271980). Corresponding author: Dong Shiwu, E-mail: dongshiwu@163.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2011CB964701);国家科技支撑计划(2012BAI42G01);国家自然科学基金(81271980)
[通信作者] 董世武,E-mail: dongshiwu@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0952.002.html(2014-3-28)

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是最常见的一种慢性免疫性疾病,发病原因尚未阐明,主要临床表现为全身多个关节的红肿、疼痛、变形和功能障碍,且受累关节被进行性破坏,造成严重的关节损伤(如畸形、强直),甚至导致患者残疾,严重影响其生活质量并造成沉重的家庭和社会负担[1]。RA的基本病理改变为系统性的关节滑膜层细胞炎症反应,进而引起滑膜异常增生、血管翳形成、软骨和软骨下骨质破坏[2]。既往研究表明,滑膜层中的主要细胞类型是成纤维样滑膜细胞(fibroblast like synoviocytes,FLSs),其炎症反应和过度增生是RA发病的关键环节和重要病理学标志,FLSs还可以与其微环境中的其他细胞相互作用而参与RA的炎症反应[3]。钙黏蛋白11(Cadherin-11)是FLSs特异性分泌的一种钙离子依赖性的介导嗜同性细胞-细胞间黏附的跨膜糖蛋白[4]。已有实验证明,Cadherin-11参与了RA时滑膜层细胞的炎症反应,其表达水平与关节炎模型小鼠滑膜组织炎症程度具有相关性[5],并与RA时促炎性细胞因子中最重要的TNF-α的升高有关,下调Cadherin-11可以抑制滑膜的炎症反应[6-7]。但Cadherin-11引起滑膜层细胞炎症反应的具体机制尚未完全阐明。

本课题组前期研究使用双荧光素酶报告系统对miRNA-144与Cadherin-11的关系进行鉴定,证明了miRNA-144可以特异性地靶向作用于Cadherin-11基因,通过下调Cadherin-11在间充质干细胞中的蛋白表达,抑制其向成骨细胞进行分化[8]。因此,在滑膜层特别是FLSs中,miRNA-144也可能通过抑制其靶分子Cadherin-11的表达而改变RA的滑膜炎症反应和关节软骨损伤,成为RA治疗的潜在靶点。本研究将探讨上调滑膜层FLSs中miRNA-144的水平对RA病理进程的影响,并初步探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择6~8周BALB/c小鼠(批号:19-006)24只,雌雄各半,体质量(20±2)g,均购买自第三军医大学实验动物中心。室温下笼中饲养,自由饮食,在本实验室适应性饲养1周以上方可进行实验。

1.2 主要实验试剂

注射用Ⅱ型胶原(Sigma公司)、弗氏佐剂(Freund's Adjuvant,Sigma公司)、卡介苗冻干粉(广州联泰生物技术有限公司)。药物配置方法:将Ⅱ型胶原10 mg溶解于5 mL的0.1 mol/L的醋酸溶液中,反复搅拌使其充分溶解,制成浓度为2 mg/mL的A溶液,于4 ℃冰箱中过夜;实验当天使用5 mL的佐剂溶解10 mg卡介苗冻干粉,制成浓度为2 mg/mL的B溶液。使用时将A、B两种溶液混合并用注射器反复抽吸,使混合物充分乳化,形成膏状的白色乳液(其中Ⅱ型胶原和卡介苗的浓度均为1 mg/mL),并立即使用。Cadherin-11、TNF-α单克隆抗体购自Santa Cruz公司,免疫组化和HE染色主要试剂购自碧云天公司,其他实验室常用药品购自重庆市化学试剂厂。miRNA-144高表达慢病毒颗粒由上海吉凯公司包装合成。

1.3 动物模型建立

随机选取12只小鼠将其分为3组,即正常组、佐剂组和模型组,用于检测模型建立情况;其余12只小鼠按照模型组处理方法进行,用于后续实验。3组中每组4只小鼠并保持雌雄各半的比例;正常组使用常规饲养的小鼠,不做特殊处理;对照组小鼠尾根部皮下注射不含有Ⅱ型胶原、仅有等比例0.1 mol/L醋酸和B溶液的乳化物,每只注射0.1 mL;实验组小鼠尾根部皮下注射由上述A溶液和B溶液配置成的乳化物,每只注射0.1 mL。所有动物注射操作均使用无菌器械在无菌操作台上完成,每天定时注射1次,连续注射7 d,在第8天分别再次进行腹腔注射相同药物1次,以加强药物的作用。并对所有实验组小鼠注射完成后继续饲养2周,以利于充分建立RA模型。2周后处死分组的12只小鼠,取材检测建模情况。

1.4 慢病毒载体注射

建模后用于后续实验的12只小鼠也分为3组,即盐水组,空载组和miRNA-144组,每组4只(保持雌雄各2只),处理方式分别为:向每只小鼠注射生理盐水0.1 mL、空载体慢病毒液0.1 mL和miRNA-144高表达慢病毒液0.1 mL。建模后小鼠在饲养满2周后的第1天开始进行尾静脉注射,注射完毕后继续饲养3 d再取材检测。

1.5 组织取材、免疫组化与HE染色

1.5.1 组织取材 在每只小鼠腹腔内注射1%戊巴比妥钠0.5 mL,所有小鼠在3 min内死亡。将处死的小鼠腹部向上平放在手术托盘中,消毒后肢,使用无菌手术器械剪开大腿皮肤和肌肉,更换1套无菌器械,去除附着于关节部位的肌肉、血管、神经和筋膜等组织,暴露下肢膝关节,使用大剪刀剪下整个关节,在4 ℃的无菌PBS溶液中冲洗至无血迹,切去关节的滑膜组织浸于4%多聚甲醛中固定24 h,再进行石蜡包埋和切片,切片厚度为5 μm。

1.5.2 免疫组化 本研究对于免疫组化染色样本均采用辣根过氧化物酶标记抗体法,即HRP标记抗体法。贴片后经脱蜡、酒精梯度脱水、抗原修复,然后用0.01 mol/L的PBST漂洗、浸于2%的BSA内在37℃湿盒中封闭30 min,再在标本片上滴加1∶40比例稀释的一抗,于37 ℃湿盒中孵育2 h,经漂洗后在37℃湿盒中孵育1∶100的辣根过氧化物酶二抗60 min,再次漂洗后封片,在光镜下观察并照相。

1.5.3 HE染色 将标本经脱蜡和蒸馏水浸湿后,放入苏木精水溶液中染色10 min,在酸水及氨水中分色,各10 s;用流水冲洗1 min后置入蒸馏水中5 min,再依次浸入70%和90%酒精中脱水各10 min,最后浸入酒精伊红染色液染色3 min,经无

水酒精脱水、二甲苯透明后封片固定,在光镜下观察并照相。

1.6 统计学分析

实验中获得的免疫组化照片使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行处理,以获得蛋白在该组织表达水平的相对比值。数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 RA 模型小鼠的建立及其膝关节滑膜组织的病理学观察

用于检测建模情况的 3 组小鼠分别经未做特殊处理、佐剂乳剂处理和Ⅱ型胶原处理后,其膝关节滑膜组织的病理切片在光镜下观察提示:正常组和佐剂组小鼠经不同处理后,其膝关节的滑膜组织中细胞分布均匀且排列规则,局部无炎性细胞浸润和血管翳形成,膝关节的软骨细胞排列规则、软骨组织表面光滑(图 1A、B)。模型组小鼠膝关节局部炎症反应明显,单核细胞大量增生,并有中性粒细胞和淋巴细胞的浸润,有部分组织的水肿和滑膜层细胞增生和血管翳的形成,滑膜组织中出现细胞纤维化和纤维性渗出,并有胶原纤维的沉积,关节软骨组织破坏严重(图 1C)。

2.2 RA 模型小鼠经不同处理后膝关节滑膜组织的病理学观察

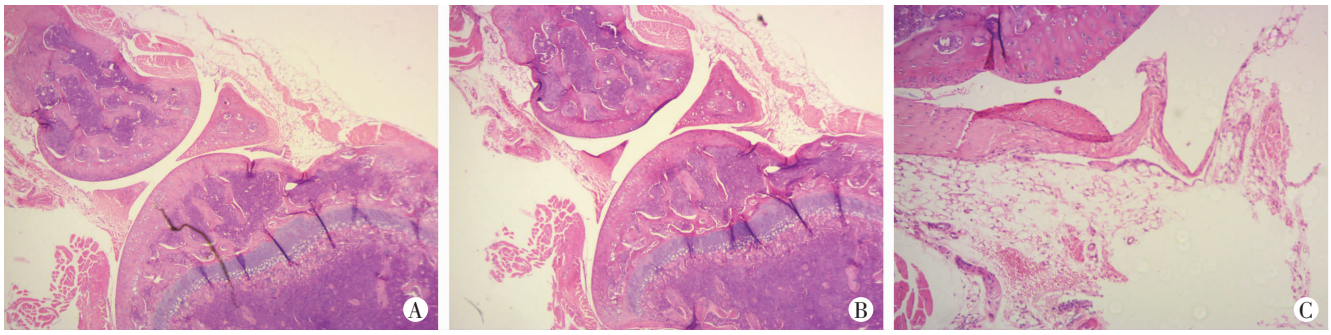
用后续实验的 3 组小鼠分别经生理盐水处理、空载慢病毒液处理和 miRNA-144 高表达慢病毒处理后,其膝关节滑膜组织的病理切片在光镜下观察提示:盐水组和空载组小鼠经处理后,膝关节的炎症反应明显,与模型组小鼠病理特点相似,炎性浸润并有滑膜细胞增生和血管翳生成,软骨组织受损(图 2A、B)。miRNA-144 组小鼠膝关节的滑膜细胞均匀分布且排列规则,局部无典型的炎症反应,软骨组织未受破坏(图 2C)。

2.3 miRNA 高表达慢病毒处理后 RA 模型小鼠膝关节滑膜组织 TNF-α 的表达和分布

RA 模型小鼠经不同的处理,膝关节石蜡切片免疫组化染色后在显微镜下显示:TNF-α 散在分布于膝关节的滑膜层中,盐水组(0.79 ± 0.05)与空载组(0.73 ± 0.07)的 RA 模型小鼠滑膜层中 TNF-α 的表达水平相接近,经检验,两组间滑膜层 TNF-α 的表达水平无显著差异($P > 0.05$);RA 模型小鼠经 miRNA(0.28 ± 0.04)高表达慢病毒处理后滑膜组织 TNF-α 表达水平较盐水组与空载组明显下降($P < 0.05$,图 3)。

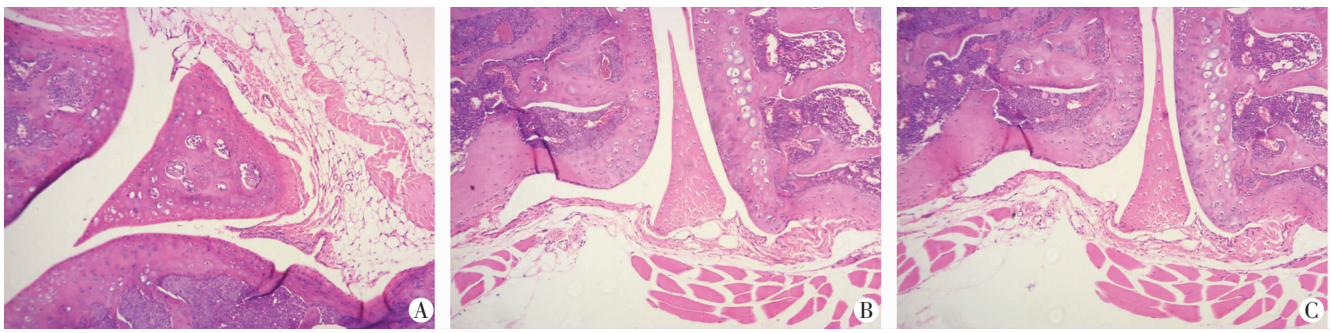
2.4 miRNA 高表达慢病毒处理后 RA 模型小鼠膝关节滑膜组织 Cadherin-11 的表达和分布

荧光显微镜下观察提示:Cadherin-11 蛋白均匀地分布于膝关节的滑膜层细胞上,细胞形态与既往报道的 FLSs 的形态一致。经生理盐水与经空载慢病毒液处理的 RA 模型小鼠滑膜层细胞中 Cadherin-11 蛋白表达水平相近,经检验,盐水组(0.45 ± 0.07)和空载组(0.36 ± 0.06)之间滑膜层细胞的 Cadherin-11 蛋白的表达水平无显著差异($P > 0.05$);但实验组(0.12 ±



A:正常组;B:佐剂组;C:模型组

图 1 各组小鼠分别经未做特殊处理、佐剂乳剂处理和Ⅱ型胶原处理后膝关节滑膜组织的病理学变化 (HE ×100)



A:盐水组;B:空载组;C:miRNA-144 组

图 2 各组小鼠分别经生理盐水、空载慢病毒液和 miRNA-144 高表达慢病毒处理后膝关节滑膜组织的病理学表现 (HE ×100)

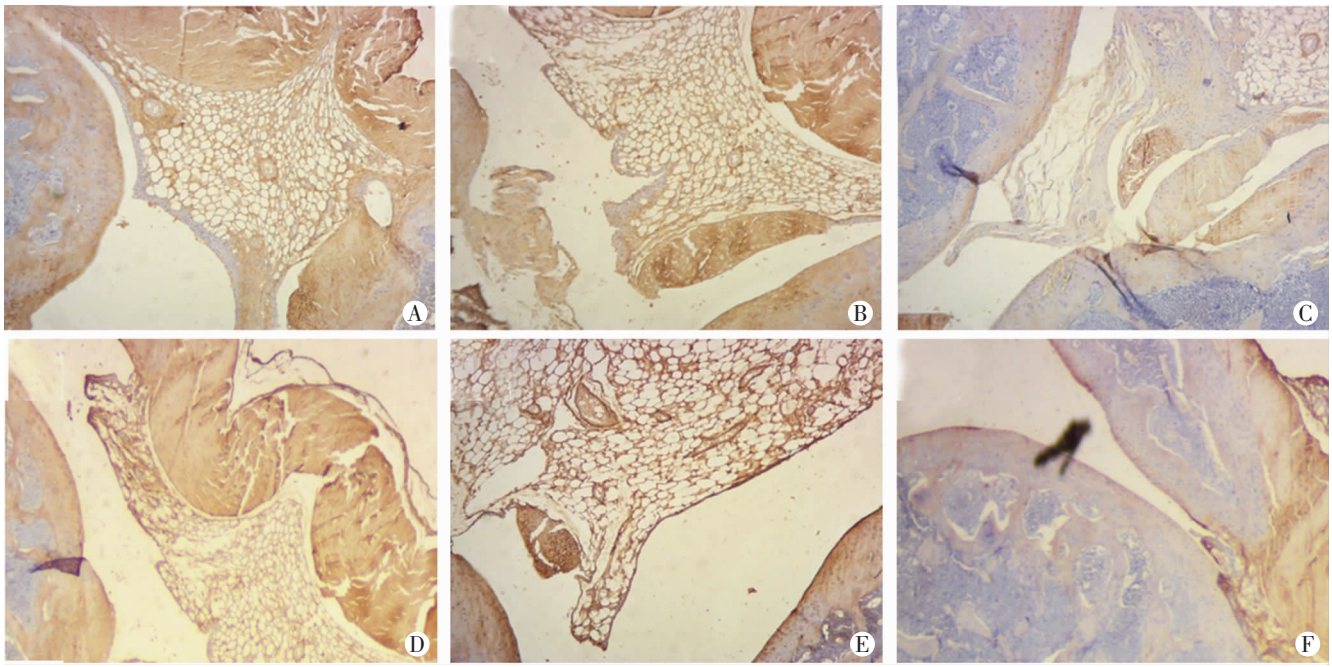


图3 各组小鼠膝关节滑膜组织 TNF-α 和 Cadherin-11 蛋白的表达与分布 （二步法 ×100）

0.03）小鼠注射 mi-RNA 高表达慢病毒后，滑膜层细胞的 Cadherin-11 蛋白表达水平较其他组明显下降，经检验，注射 mi-RNA 高表达慢病毒小鼠与其他两组小鼠之间滑膜层细胞 Cadherin-11 蛋白的表达差异显著（$P<0.05$，图3）。

3 讨论

类风湿关节炎是一种全身性自身免疫性疾病，主要特征为滑膜组织的炎症，可导致骨和软骨的破坏和变性。由于 RA 同时由多个基因调控，通过局部环境因素和随机因素共同作用，因此目前对于疾病的发病机制仍然无法阐明。多年来，人们建立了多种动物模型来探究 RA 的发病因素、致病机制以及治疗方法等，其中对于 RA 的治疗方法倾向于靶向控制 RA 患者的炎症和免疫反应。对于 RA 采用抗-TNF（infliximab，etanercept，adalimumab）、抗 IL-1（anakinra）、抗 IL-6（ocilizumab）、抗 CD20（rituximab）和抗 CTLA4（abatacept）等药物治疗是行之有效的。但调查显示，服用免疫抑制剂等可增加患者的感染和癌症的风险，且这些药物的疗效在治疗前无法评估。最终许多专家学者开始注意到 miRNA 在 RA 免疫反应中的作用。其中已经报道了在 RA 中共 12 种异常表达的 miRNA，包括 miR-146、miR-155、miR-16、miR-132、miR-146a、miR-15、miR-223、miR-133a、miR-142-3p、miR-142-5p、miR-363、miR-498[4,6,10]。因此本研究重点对 miR-144 过表达慢病毒对关节炎模型小鼠滑膜组织病理进程中的关系进行了研究。

Ⅱ型胶原较早被用于诱导自身免疫性关节炎。20 世纪 90 年代构建出由Ⅱ型胶原诱导的关节炎（collagen-induced arthritis，CIA）小鼠模型[9]。该关节炎模型是一个十分复杂的免疫过程，涉及 MHC 分子和多种细胞因子，并有Ⅱ型胶原特异性 T 细胞和 B 细胞参与。CIA 发生的主要机制较为明确，Ⅱ型胶原活化机体巨噬细胞和 T 细胞并侵入滑膜的内层，在滑膜层释放大量致炎因子和趋化因子，使中性粒细胞和淋巴细胞在滑膜组织募集，并有局部的血管翳形成；在病程的晚期，胶原酶和破骨细胞作用于滑膜、软骨和骨骼组织，最终导致软骨的严重损伤和骨骼正常结构的丧失；RA 反复发作可导致关节形变和僵直[10]。CIA 小鼠模型在临床表现、病理进程等方面与患者 RA 的发病的相似性最高；另外，该模型小鼠的构建方法较为简单，且诱导效果稳定，因此被认为是目前研究 RA 最为理想、也成为最常用的一种实验动物模型。本研究中，实验组使用Ⅱ型胶原诱导 RA 且未做特殊处理的小鼠病理改变为典型的膝关节滑膜炎性表现，关节及其周围组织中性粒细胞和淋巴细胞浸润，滑膜组织异常增生、局部有血管翳生成，软骨及软骨下的骨质损伤，提示 CIA 小鼠模型构建成功。

Cadherin-11 是在滑膜组织的主要细胞成分 FLSs

中特异性表达的分子,属于经典的Ⅱ型钙黏蛋白家族的成员,是一种钙依赖性单链跨膜糖蛋白,相对分子质量为 $120\times10^3\sim140\times10^3$[5]。研究表明,Cadherin-11参与了RA中滑膜的炎症反应和软骨的破坏过程[11],具体机制不明。但已有实验证明,Cadherin-11可能通过改变炎症反应时滑膜FLSs生成细胞外基质的能力[12],以及调节FLSs向邻近组织迁移、聚集和扩散等方式[13],在滑膜局部微环境的维持方面发挥作用,并在RA病理进程早期淋巴细胞的募集、微血管的形成和炎症反应的形成过程中有重要意义[14]。FLSs被认为是支持风湿性关节炎炎症反应的重要组织组成,miRNA-144可以特异性抑制Cadherin-11的表达,从而成为治疗RA的一个重要方面。本实验的结果进一步提示:miRNA-144高表达慢病毒可以显著地抑制RA模型小鼠滑膜组织细胞中Cadherin-11的表达,并降低主要炎性因子TNF-α的表达,且病理表现较未处理和空载体慢病毒处理组明显趋于好转。本研究正是对"miRNA-144抑制Cadherin-11表达而减轻RA炎性反应"这一假说的初步验证。

虽然本研究结果显示miRNA-144的增加可以使RA模型小鼠滑膜炎症反应的改善,但是这种效应可能是通过下调滑膜层细胞(主要是FLSs)中Cadherin-11的表达实现的,其充分和必要性仍有待进一步研究。对于炎症反应程度、滑膜细胞增生和血管翳生成程度、软骨组织受损程度等如何定量的进行分析,炎性细胞的分类及浸润程度和特点,免疫组化TNF-α、Cadherin-11的变化如何定量判断以及RA和miR-144之间的关系仍未解决。而且miRNA-144在本研究中是全身给药,作用缺乏特异性,无法判定是直接效应还是间接效应,因此仍需要下一步的体外实验进行研究。

综上所述,本研究认为,机体miRNA-144的增加可以使RA模型小鼠滑膜炎症反应的病理进程趋于缓解和好转,并降低滑膜组织局部TNF-α的表达,因此,基于"miRNA-144高表达慢病毒"策略可能会成为治疗RA的重要手段之一,但其临床应用尚需要更加深入的机制研究和大量的临床观察。

参考文献:

[1] Scott D L, Wolfe F, Huizinga T W. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-1108.

[2] van-Vollenhoven R F. Rheumatoid arthritis in 2012: Progress in RA genetics, pathology and therapy[J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(2): 70-72.

[3] 董世武, 应大君. Cadherin-11基因与成骨分化[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(11): 109-111.

[4] Kiener H P, Lee D M, Agarwal S K, *et al*. Cadherin-11 induces rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes to form lining layers *in vitro*[J]. Am J Pathol, 2006, 168(5): 1486-1499.

[5] Chang S K, Gu Z, Brenner M B. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11[J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 256-266.

[6] Lee D M, Kiener H P, Agarwal S K, *et al*. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis[J]. Science, 2007, 315(5814): 1006-1010.

[7] 王关志, 高建宝, 董世武. Cadherin-11基因与关节形成[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(15): 1155-1157.

[8] 康夏, 康菲, 杨波, 等. miRNA-144靶向调节钙粘蛋白11对间充质干细胞成骨分化的抑制效应[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(10): 922-926.

[9] Hu Y, Cheng W, Cai W, *et al*. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2013, 32(2): 161-165.

[10] Hegen M, Keith J C Jr, Collins M, *et al*. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(11): 1505-1515.

[11] Dou C, Yan Y, Dong S. Role of cadherin-11 in synovial joint formation and rheumatoid arthritis pathology[J]. Mod Rheumatol, 2013, 23(6): 1037-1044.

[12] Kiener H P, Brenner M B. Building the synovium: cadherin-11 mediates fibroblast-like synoviocyte cell-to-cell adhesion[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(2): 49-54.

[13] Noss E H, Chang S K, Watts G F, *et al*. Modulation of matrix metalloproteinase production by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after cadherin 11 engagement[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(12): 3768-3778.

[14] Valencia X, Higgins J M, Kiener H P, *et al*. Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes[J]. J Exp Med, 2004, 200(12): 1673-1679.

(**收稿**:2014-03-06;**修回**:2014-03-17)

(编辑 王 红)