doi:10.11659/jjssx.04E020017

·基础研究·

microRNA-144 影响成纤维样滑膜细胞增殖的机制研究

钱 进,龚子臣,张义娜,郑 伟,康 夏 (西部战区总医院骨科,四川 成都 610000)

[摘 要] **目的** 探讨 microRNA-144(mir-144)通过调控 MDM4 对炎症环境中成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖和表达谱的影响。**方法** 从 C57BL/6 小鼠中提取原代 FLS 和软骨细胞,免疫荧光染色和蛋白印迹检测 MDM4 在 FLS 中的蛋白表达情况,BrdU 法和 CCK-8 法检测 MDM4 对 FLS 增殖的调控作用,双荧光素酶报告质粒检测 mir-144 与 MDM4 的靶向关系,实时荧光定量 PCR 检测 mir-144 对 FLS 表达谱的影响,Tunel 法检测 mir-144 对软骨细胞凋亡的影响。**结果** MDM4 在 IL-1β 刺激的 FLS 中高表达,mir-144 表达下调;mir-144 能够结合 MDM4 的 3'UTR 端。MDM4 调控 FLS 的增殖,mir-144 可显著抑制 FLS 的增殖,过表达 MDM4 可拮抗此抑制作用。mir-144 过表达可降低 FLS 中 MMP-9、TNF-α 和 IL-6 的表达水平。mir-144 过表达的 FLS 分泌物可抑制软骨细胞的凋亡。**结论** mir-144 可通过调控 MDM4 抑制 FLS 在炎症环境中的增殖。

[关键词] 关节炎;microRNA;MDM4;成纤维样滑膜细胞;增殖

[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-04-04

Mechanism of microRNA-144 regulating the proliferation of fibroblast-like synoviocytes

QIAN Jin, GONG Zi-chen, ZHANG Yi-na, ZHENG Wei, KANG Xia (Department of Orthopedics, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu Sichuan 610000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of microRNA-144 (mir-144) on the proliferation and expression profile of fibroblast-like synoviocytes (FLS) in an inflammatory environment through regulating MDM4. **Methods** Primary FLS and chondrocytes were isolated from C57BL/6 mice. Immunofluorescence staining and Western blot were performed to test the protein expression of MDM4 in FLS. BrdU and CCK-8 methods were used to detect the regulation of MDM4 on FLS proliferation. Dual-luciferase assay was used to detect the targeting relationship between mir-144 and MDM4. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the effect of mir-144 on FLS expression profile. Tunel method was used to detect the effect of mir-144 on the apoptosis of chondrocytes. **Results** The level of MDM4 was upregulated and mir-144 was downregulated in FLS stimulated by IL-1β. mir-144 could bind to the 3'UTR region of MDM4. MDM4 could regulate the proliferation of FLS, and mir-144 could significantly inhabit the proliferation of FLS, but the overexpression of MDM4 could antagonize this inhibitory effect. Overexpression of mir-144 could reduce the expression levels of MMP-9, TNF-α and IL-6 in FLS. FLS secretion of mir-144 overexpression could inhibit the apoptosis of chondrocytes. **Conclusion** mir-144 can inhibit the proliferation of FLS in inflammatory environment through regulating MDM4.

Keywords: osteoarthritis; microRNA; MDM4; fibroblast-like synoviocytes; proliferation

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种可发生于全身各个关节的进行性退化性疾病,高发于老年人。据统计,65 岁以上老年人中影像学检查有骨关节炎表现的比例高达 60%,80 岁以上老年人有骨关节炎的比例高达 80%[1],且骨关节炎具有不可逆转性和高致残性等特点,因此在老龄化加剧的时代会带来沉重的经济负担和社会负担。骨关节炎主要是以滑膜炎症、软骨退化为特征的病变。近年来滑膜病变在骨关节炎中的致病作用日益受到重视,成纤维样滑膜细胞(fibro-like synoviocyte,FLS)是关节滑膜的主要细胞成分,其在骨关节炎发病过程中会出现增殖以及细胞因子表达谱改变等特征,导致纤维化程度加重、软骨细胞凋亡、软骨退化等病变,加重疾病进展,但目前尚不清楚骨关节炎环境下 FLS 增殖的调控机制。既往研究发现,在增殖活跃的 FLS 中 MDM4 表达增高,但其是否调控了 FLS 的增殖尚待进一步研究[2-3]。另一方面,microRNA-144(mir-144)广泛参与各种细胞的增殖[4-6],也调控骨关节炎中软骨细胞的凋亡[7],生物信息学分析发现 MDM4 可能是 mir-144 的靶基因。因此,本研究假设 mir-144 可能通过调控 MDM4 的表达影响 FLS 的增殖,探讨 mir-144 与 MDM4 之间的调控关系以及两者在炎症环境下对 FLS 和软骨细胞的调控作用,现报告如下。

[基金项目] 国家自然科学基金(81601940)

[通信作者] 康 夏,E-mail:kxpaper@sina.com;郑 伟,E-mail:zhengweipaper@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

从 C57BL/6 小鼠中直接提取原代 FLS 和软骨细胞,agomir-144、agomir 阴性对照(negative control,NC)、antagomir-144、antagomir NC、mir-144 mimics 及其阴性对照、MDM4 荧光素酶报告质粒及过表达质粒由上海吉马公司设计并合成。DMEM 培养基(BI 公司,货号:01-052-1ACS),胎牛血清(BI 公司,货号:04-001-1A),INVI DNA RNA Transfection Reagent (Invigentech,货号:IV1216150),TRIzol 裂解液(Invitrogen,货号:15596026),cDNA 逆转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific,货号:K1622),SYBR Green PCR 试剂盒(Thermo Fisher Scientific,货号:4309155),双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega,货号:N1610),CCK-8 试剂盒(日本同仁,货号:CA1210-100),MDM4 抗体(Abcam,货号:ab49993),GAPDH 抗体(CST,货号:5174),Hoechst 33342(碧云天,货号:C1029),IL-1β(Biolegend,货号:575102),BrdU 细胞增殖检测试剂盒(Biolegend,货号:14246),Tunel 凋亡检测试剂盒(罗氏,货号:12156792910)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞提取 将 10 ~ 12 周的 C57BL/6 小鼠滑膜组织取下后剪碎,放入 0.1% 的Ⅳ型胶原酶中,在 37 ℃摇床中消化 60 min。然后在振荡器上震荡 90 s,将组织悬液以 300 g 离心 5 min,弃上清,将细胞转移至细胞培养瓶中,于 37 ℃、5% CO_2 孵育箱中培养。将培养后的细胞分为 IL-1β 刺激组和对照组。在体外模拟骨关节炎环境中,IL-1β 刺激组培养基中加入 IL-1β(5 ng/mL)刺激 12 h,对照组加入 PBS,然后收集细胞进行后续检测。

1.2.2 细胞转染 将原代细胞转移至 6 孔板中,融合度达到 70% ~80% 后,按照 INVI DNA RNA Transfection Reagent 说明书将 agomir-144、agomir NC、antagomir-144、antagomir NC 和 MDM4 过表达质粒转染至 FLS 中,或将 mir-144 mimics 和 MDM4 荧光素酶报告质粒转染至 293 细胞中。在抑制 MDM4 表达的实验中,用相同方法转染 MDM4-siRNA 或其对照 siRNA(scRNA)至原代 FLS 中。

1.2.3 双荧光素酶报告系统检测 收集对数期生长的 293 细胞,铺于 96 孔板,每孔约 5 000 个细胞,约 24 h 细胞贴壁后,转染 mimics NC + MDM4 Wt、mir-144 mimics + MDM4 Wt、MDM4 Wt 或 mimics NC + MDM4 Mut、mir-144 mimics + MDM4 Mut、MDM4 Mut,按照双荧光素酶报告试剂盒说明检测细胞裂解液中萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性比值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 用 TRIzol 试剂提取总 RNA,然后按照说明书方法使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit 逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 按照 SYBR Green 试剂说明书方法进行。mir-144 的内参为 U6,其余目标 mRNA 的内参为 GAPDH。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGATTTGCGT
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Cyclin D1	GTCTTCCCGCTGGCCATGAACTAC	GGAAGCGTGTGAGGCGGTAGTAGG
CDK2	AGTACTGCCATCCGAGAGA	GAATGCCAGTGAGAGCAGAG
MMP-9	TTGACAGCGACAAGAAGTGG	GGCACAGTAGTGGCCGTAG
TNF-α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCCCAGAGAAC

1.2.5 蛋白印迹检测 用 RIPA 裂解液提取细胞中的总蛋白,SDS-PAGE 胶以 80 V 恒压处理 2 h 分离蛋白,并用湿转法以 80 V 恒压处理 90 min 转移至 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭 1 h,加入一抗 MDM4(1∶1 000)、GAPDH(1∶1 000)4 ℃过夜,然后洗去多余一抗,加入二抗山羊抗小鼠 IgG(1∶2 000)室温封闭 1 h,最后用 ECL 显影剂曝光。

1.2.6 细胞免疫荧光组化 将处理后的细胞用 4 ℃预冷的 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗去甲醛后加入 0.5% Triton X-100 处理 10 min,然后 PBS 漂洗,滴加含 10% 驴血清的 5% BSA 封闭液,在 37 ℃下封闭 1 h,孵育一抗 MDM4(1∶100);然后洗去多余一抗,室温避光孵育二抗驴抗小鼠 Alexa Flour 647(1∶200),洗去多余二抗,滴加 Hoechst 33342(1∶1 000),室温避光孵育 15 min,洗去多余 Hoechst 33342。

1.2.7 细胞增殖检测 BrdU 检测法:在检测 MDM4 对细胞增殖的影响时,分别在 IL-1β 刺激组和对照组中转染 scRNA 或 MDM4-siRNA;而在检测 MDM4 对 miRNA-144 介导细胞增殖的影响时,分为 agomir NC 组、agomir NC + MDM4 过表达质粒组、agomir-144 组及 agomir-144 + MDM4 过表达质粒组,其中未转染 MDM4 过表达质粒时转染空质粒作为对照。在收样前 2 h 加入 BrdU 溶液(0.5 μL/mL)继续孵育。然后将处理后的细胞用细胞刮刮下,转移至 1.5 mL EP 管,离心弃上清,按照 Phase-Flow BrdU 检测试剂盒说明书进行后续步骤,最后通过流式细胞技术检测 BrdU 阳性细胞比例。CCK-8 法:分别转染 scRNA

(scRNA-NC 组),转染 scRNA 后用 IL-1β 刺激(scRNA-IL1β 组),转染 MDM4-siRNA(siMDM4-NC 组)以及转染 MDM4-siRNA 后用 IL-1β 刺激(siMDM4-IL1β 组),其中没有用 IL-1β 刺激的组用等量 PBS 替代。将处理后的细胞更换为 100 μL 培养基,然后每孔加入 10 μL CCK-8 检测试剂,孵育 2 h 后通过分光光度仪检测 450 nm 波长处吸光度值。

1.2.8 细胞凋亡检测 Tunel 法:将处理后的细胞用细胞刮刮下后转移至 1.5 mL EP 管,离心弃上清,按照罗氏 Tunel 凋亡检测试剂盒说明书步骤处理细胞,最后通过流式细胞技术检测 Tunel 阳性细胞比例。

1.2.9 间接共培养检测 按照前述方法将转染后的 FLS 培养 48 h,弃上清,更换为无血清培养基继续培养 24 h,然后收集培养基,按照 1∶1 比例加入到培养软骨原代细胞的培养基中,培养 48 h 后收样。

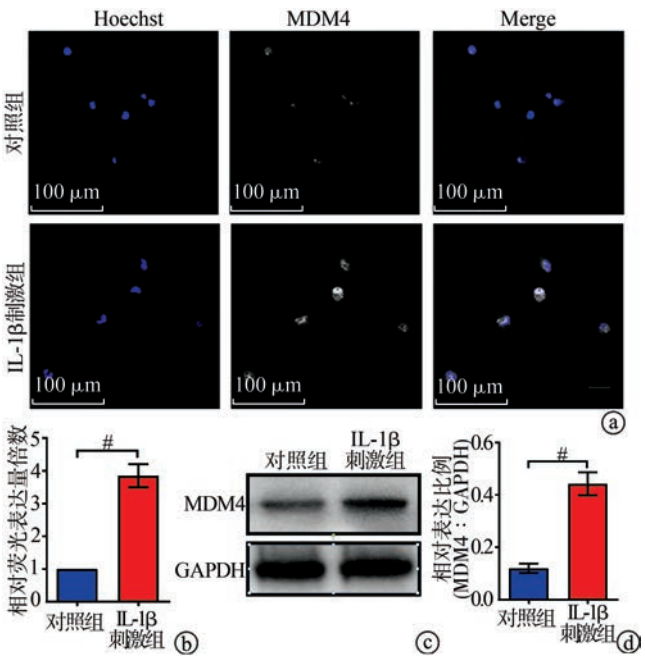
1.3 统计学方法

采用 Prism 软件进行相关分析。结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用学生 t 检验。单因素方差分析(ANOVA)用于 2 组以上两两比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 炎症环境促进 MDM4 在 FLS 的中表达

通过 IL-1β 刺激原代 FLS 模拟炎症环境,然后检测 IL-1β 刺激组与对照组中 MDM4 的表达情况,结果显示,IL-1β 显著促进细胞核中 MDM4 的蛋白表达(图 1a),平均荧光强度明显增高(图 1b)。收集 2 组细胞进行蛋白印迹检测发现,IL-1β 制激组中 MDM4 蛋白表达量上调(图 1c、d)。

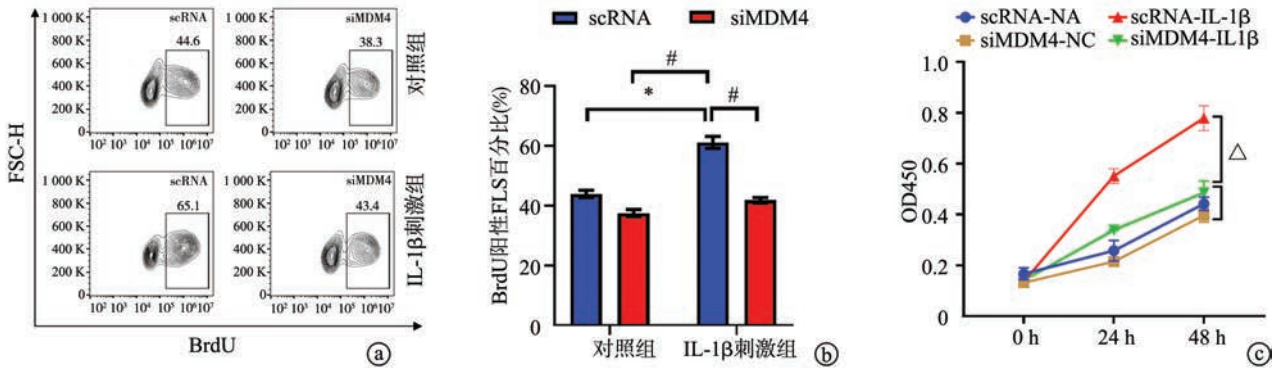


a:细胞免疫荧光组化法检测 MDM4 在 FLS 中的表达及细胞内定位;b:MDM4 荧光表达强度的定量分析;c:蛋白印迹检测 MDM4 的蛋白表达水平;d:MDM4 和 GAPDH 蛋白表达灰度值比值 #:$P<0.01$

图 1 MDM4 在 IL-1β 刺激的 FLS 中表达增高

2.2 MDM4 促进 FLS 在炎症环境中的增殖

流式细胞术检测结果显示,IL-1β 处理后 BrdU 阳性 FLS 比例显著升高。在 IL-1β 刺激组中,用 siRNA 干预 MDM4 表达后,BrdU 阳性 FLS 比例显著降低;而在对照组中,用 siRNA 干预 MDM4 后,BrdU 阳性 FLS 比例无显著统计学差异($P>0.05$),见图 2a、b。CCK-8法检测结果显示,IL-1β 刺激后可显著提高 FLS 的增殖能力,而使用 siRNA 抑制 MDM4 表达后 FLS 的增殖能力显著下降,与 siMDM4-NC 组水平相当。同时 siRNA 处理后并不能影响 scRNA-NC 组中 FLS 的增殖(图 2c)。



a:流式细胞技术检测不同刺激情况下 BrdU 阳性 FLS 比例;b:BrdU 阳性 FLS 比例的定量分析;c:CCK-8 法检测不同刺激条件下各时间点 FLS 的吸光度值 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$;△:$P<0.001$

图 2 MDM4 调控 IL-1β 刺激的 FLS 的增殖能力

2.3 MDM4 是 mir-144 的靶基因

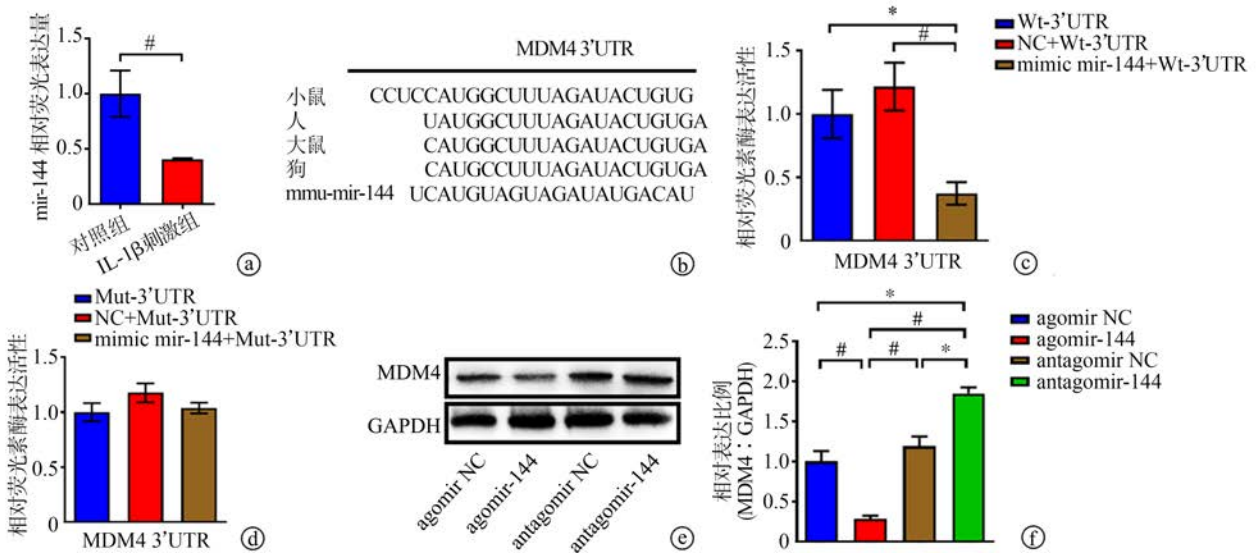
实时荧光定量 PCR 检测结果显示,IL-1β 显著降低 mir-144 的表达水平(图 3a)。生物信息学分析(TargetScan.org)显示,MDM4 3'UTR 端与 mir-144 存在结合位点(图3b)。进一步通过双荧光素酶报告系统检测显示,mimic mir-144 明显抑制了含有 MDM4 Wt 序列质粒的荧光素酶活性(图 3c);而对含有 MDM4 Mut序列质粒的荧光素酶活性无显著影响(图3d)。蛋白印迹检测显示,mir-144 过表达会抑制 FLS 中 MDM4 蛋白的表达,而抑制 mir-144 后,MDM4 蛋白表达升高(图 3e、f)。

2.4 mir-144 通过调控 MDM4 的表达影响 FLS 的增殖

为进一步验证 mir-144 通过 MDM4 调控 FLS 在炎症环境中的增殖,本研究转染了 agomir-144 及 MDM4 过表达质粒,然后用 IL-1β 刺激体外模拟炎症环境。BrdU 增殖检测提示,agomir-144 能显著抑制 FLS 的增殖;过表达 MDM4 可以促进 FLS 的增殖,同时能够逆转 agomir-144 对 FLS 增殖的抑制作用(图 4a、b)。增殖标志物 Cyclin D1 和 CKD2 的 mRNA 表达水平增高,与 BrdU 结果吻合(图 4c、d)。

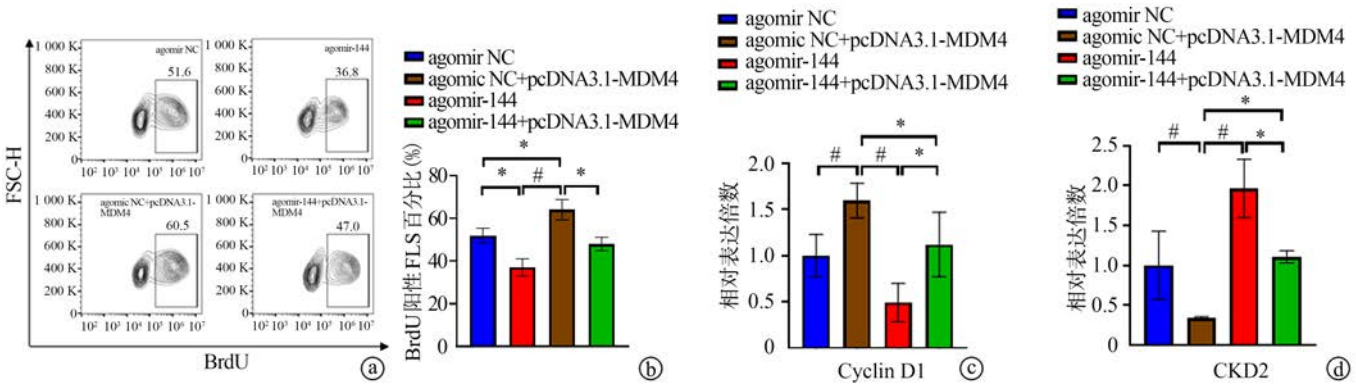
2.5 mir-144 抑制 FLS 介导的软骨细胞凋亡

实时荧光定量 PCR 结果显示,mir-144 过表达组中 MMP-9、IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 表达水平均降低(图 5a ~ c)。通过用 FLS 的培养基刺激软骨细胞,Tunel 凋亡实验显示,mir-144 过表达组培养基处理的软骨细胞凋亡显著下降,而 mir-144 抑制组培养基处理的软骨细胞凋亡显著增高(图 5d、e)。



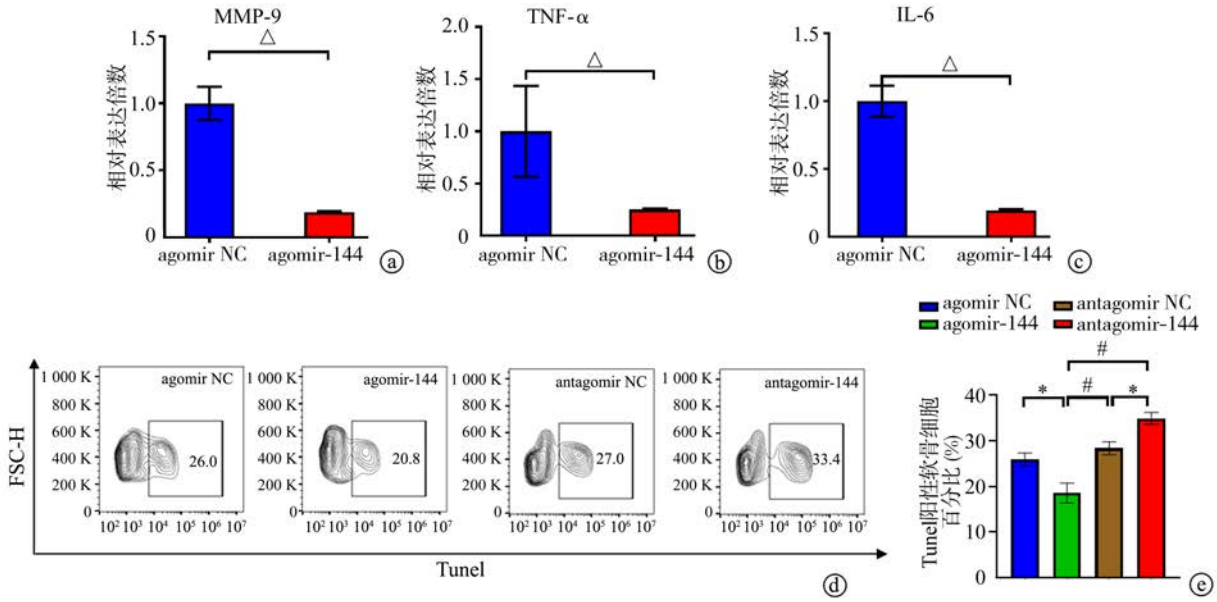
a:实时荧光定量 PCR 检测 FLS 中 mir-144 的 RNA 表达水平;b:MDM4 3'UTR 端和 mir-144 的预测结合位点;c、d:双荧光素酶报告系统检测 mir-144 与 Wt、Mut MDM4 3'UTR 端的荧光强度比值;e:蛋白印迹检测 MDM4 的蛋白表达水平;f:MDM4 和 GAPDH 蛋白表达灰度值比值 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 3 MDM4 是 mir-144 的靶基因



a:流式细胞技术检测 IL-1β 刺激下 mir-144 干预以及过表达 MDM4 情况下 BrdU 阳性 FLS 比例;b:各组 BrdU 阳性 FLS 比例的定量分析;c、d:实时荧光定量 PCR 检测 IL-1β 处理的 FLS 中 Cyclin D1、CKD2 的 mRNA 表达水平 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 4 mir-144 通过调控 MDM4 抑制 FLS 的增殖



a、b、c:IL-1β 处理后 FLS 细胞中 MMP-9、TNA-α、IL-6 的 mRNA 表达水平;d:流式细胞术检测在不同组的 FLS 条件培养基刺激下,软骨细胞中 Tunel 阳性的细胞比例;e:对(d)的定量分析 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$;△:$P<0.001$

图 5 mir-144 通过调控 FLS 的表达谱抑制软骨细胞凋亡

3 讨论

滑膜病变对骨关节炎及类风湿关节炎的病情进展具有重要的调控作用,骨关节炎患者的滑膜中会出现巨噬细胞、辅助性 T 细胞等多种炎症细胞浸润,IL-17、TNF-α 等炎症因子表达也明显增高[8-13]。在这些炎症细胞和炎症因子的刺激下,FLS 会出现增殖、侵袭性增强等变化,并释放多种炎症因子及金属基质蛋白酶,导致软骨破坏、软骨细胞凋亡等,最终加重骨关节炎的病情进展[11]。IL-1β 是体外模拟关节炎环境的经典炎症因子[12]。本研究使用 IL-1β 刺激 FLS 后,其增殖能力明显增强,提示炎症环境能够促进 FLS 的增殖,这与上述研究结果相符。

目前研究发现 FLS 的增殖受多条通路的调控,Wnt/β-catenin 通路、NF-kappaB 通路、SPRY1 等均参与其中[14-16]。MDM4 是一个原癌基因,能够抑制 P53 蛋白的抑癌作用,其在多种肿瘤中高表达[17]。MDM4 高表达与多种细胞的增殖密切相关[18-21]。研究表明在类风湿关节炎患者的滑膜组织中,MDM4 的表达与 FLS 的增殖呈正相关,但是 MDM4 是否调控 FLS 的增殖及其在骨关节炎中的作用尚待进一步研究。本研究发现体外炎症环境下 FLS 细胞核中的 MDM4 蛋白表达水平显著增高,抑制 MDM4 的表达后,FLS 的增殖明显降低;而在非炎症环境中,抑制 MDM4 后 FLS 的增殖能力无明显改变,说明 MDM4 主要是在炎症环境中调控 FLS 的增殖,而在正常环境中对其增殖无显著影响。本研究发现 MDM4 在正常 FLS 中的表达水平偏低,因此认为 MDM4 对正常环境中 FLS 的增殖调控作用不明显,这可能是因为其蛋白表达未被激活。这一发现证明 MDM4 特异性调控炎症环境中的 FLS,并对 FLS 的细胞学行为具有重要的影响。

有研究表明,microRNA 对 FLS 及 MDM4 均有重要的调控作用,mir-155、mir-495、mir-101-3p 等均可调控 FLS 的增殖和炎症因子的释放[22-24]。另一方面,mir-661 可以通过下调 MDM4 的表达而激活 P53,mir-1307可以通过调控 MDM4 介导乳腺癌细胞的顺铂耐药,mir-128 可以通过抑制 MDM4 的表达诱导胰腺癌细胞的凋亡[25-27]。这些研究均提示 microRNA 是参与滑膜炎症和 MDM4 表达的重要调控因子。此外,mir-144可通过调控巨噬细胞影响类风湿关节炎的病情进展。本研究也发现炎症环境中 mir-144 在 FLS 中的表达下降,结合生物信息学分析发现,MDM4 是 mir-144的靶基因之一;不仅如此,与 MDM4 的 siRNA 作用类似,mir-144 也可以通过调控 MDM4 的表达抑制 FLS 在炎症环境中的增殖,说明 mir-144 是 FLS 在炎症环境中的一个关键的调控因素,MDM4 是其重要靶点之一,两者对 FLS 的增殖均起到了重要的调控作用。

由于 MDM4 可促进多种金属基质蛋白酶的释放,而 mir-144 调控了 MMP-9、TNF-α 和 IL-6 等多种炎症因子的表达[28-31],这些因子可直接诱导软骨细胞凋亡并破坏软骨。因此本研究进一步检测了 mir-144 是否影响这些因子的表达,结果发现 mir-144 过表达后,FLS 中与软骨破坏密切相关的因子(MMP-9、TNF-α 和

IL-6)水平均明显下降,而软骨细胞凋亡亦受到抑制,提示 mir-144 能够改变 FLS 的表达谱,进而改善软骨细胞的凋亡。

综上所述,本研究发现 MDM4 是 mir-144 的靶基因,两者的相互平衡对 FLS 的增殖及表达谱具有重要的调控作用,且 mir-144 能够通过抑制 FLS 的增殖和降低软骨破坏相关因子的表达改善软骨细胞的凋亡,mir-144 和 MDM4 可能成为骨关节炎治疗的新靶点,在动物体内和人标本中进一步进行验证有助于深入了解 mir-144 通过调控 MDM4 在骨关节炎 FLS 细胞学行为中的意义及潜在的临床转化应用价值。

[参考文献]

[1] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎. 实用骨科学[M]. 第 3 版. 北京:人民军医出版社,2005.

[2] Hou CF,Wang D,Zhang LH. MicroRNA34a3p inhibits proliferation of rheumatoid arthritis fibroblastlike synoviocytes[J]. Mol Med Rep,2019,20(3):2563 - 2570. doi:10.3892/mmr.2019.10516.

[3] Xu NW,Wang YJ,Li DW,et al. MDM4 overexpression contributes to synoviocyte proliferation in patients with rheumatoid arthritis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2010,401(3):417 - 421. doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.069.

[4] Yin YQ,Cai JJ,Meng FD,et al. MiR-144 suppresses proliferation,invasion,and migration of breast cancer cells through inhibiting CEP55[J]. Cancer Biol Ther,2018,19(4):306 - 315. doi:10.1080/15384047.2017.1416934.

[5] Han SC,Zhu JM,Zhang YL. miR-144 potentially suppresses proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting RUNX1[J]. Med Sci Monit Basic Res,2018,24:40 - 46. doi:10.12659/msmbr.907333.

[6] Ren YF,Zhang TH,Zhong S,et al. miR-144 suppresses proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells via direct regulation of mTOR expression[J]. Oncol Lett,2018,15(1):1163 - 1169. doi:10.3892/ol.2017.7364.

[7] Song J,Kang YH,Yoon S,et al. HIF-1α:CRAT:miR-144-3p axis dysregulation promotes osteoarthritis chondrocyte apoptosis and VLCFA accumulation[J]. Oncotarget,2017,8(41):69351 - 69361. doi:10.18632/oncotarget.20615.

[8] Rinaldi N,Willhauck M,Weis D,et al. Loss of collagen type IV in rheumatoid synovia and cytokine effect on the collagen type-IV gene expression in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis[J]. Virchows Arch,2001,439(5):675 - 682. doi:10.1007/s004280100432.

[9] Liu YS,Peng H,Meng Z,et al. Correlation of IL-17 level in synovia and severity of knee osteoarthritis[J]. Med Sci Monit,2015,21:1732 - 1736. doi:10.12659/msm.893771.

[10] 黄 剑,卓廉士,王永渝,等. 电针对膝骨性关节炎家兔模型白介素-1β 和肿瘤坏死因子-α 的影响[J]. 针刺研究,2007,32(2):115 - 118. doi:10.1016/0368 - 1874(84)83298 - 0.

[11] Angiolilli C,Grabiec AM,Ferguson BS,et al. Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression[J]. Ann Rheum Dis,2016,75(2):430 - 438. doi:10.1136/annrheumdis-2014 - 205635.

[12] Yang GJ,Wang YS,Chen Y,et al. UFL1 attenuates IL-1beta-induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes[J]. Int Immunopharmacol,2020,81:106278. doi:10.1016/j.intimp.2020.106278.

[13] Bastiaansen-Jenniskens YM,Wei W,Feijt C,et al. Stimulation of fibrotic processes by the infrapatellar fat pad in cultured synoviocytes from patients with osteoarthritis:a possible role for prostaglandin f2α[J]. Arthritis Rheum,2013,65(8):2070 - 2080. doi:10.1002/art.37996.

[14] Dinesh P,Kalaiselvan S,Sujitha S,et al. MiR-145-5p mitigates dysregulated Wnt1/beta-catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. Int Immunopharmacol,2020,82:106328. doi:10.1016/j.intimp.2020.106328.

[15] Lee WS,Yasuda S,Kono M,et al. MicroRNA-9 ameliorates destructive arthritis through down-regulation of NF-kappaB1-RANKL pathway in fibroblast-like synoviocytes[J]. Clin Immunol,2020,212:108348. doi:10.1016/j.clim.2020.108348.

[16] Jiang F,Zhou HY,Zhou LF,et al. MicroRNA-421 promotes inflammatory response of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by targeting SPRY1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(19):8186 - 8193. doi:10.26355/eurrev_201910_19125.

[17] Jiang KH,Sun F,Zhu JG,et al. miR-33a inhibits cell growth in renal cancer by downregulation of MDM4 expression[J]. Mol Genet Genomic Med,2019,7(8):e833. doi:10.1002/mgg3.833.

[18] Francoz S,Froment P,Bogaerts S,et al. Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(9):3232 - 3237. doi:10.1073/pnas.0508476103.

[19] Liu T,Zhang HL,Yi S,et al. Mutual regulation of MDM4 and TOP2A in cancer cell proliferation[J]. Mol Oncol,2019,13(5):1047 - 1058. doi:10.1002/1878 - 0261.12457.

[20] Migliorini D,Lazzerini Denchi E,Danovi D,et al. Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development[J]. Mol Cell Biol,2002,22(15):5527 - 5538. doi:10.1128/mcb.22.15.5527 - 5538.2002.

[21] Zhang Q,He XY,Chen L,et al. Synergistic regulation of p53 by Mdm2 and Mdm4 is critical in cardiac endocardial cushion morphogenesis during heart development[J]. J Pathol,2012,228(3):416 - 428. doi:10.1002/path.4077.

[22] Wang JW,Yang HM,Ma H,et al. MiR-495 inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis rats via Wnt signaling pathway[J]. Panminerva Med,2020. doi:10.23736/S0031 - 0808.20.03855 - 0.

[23] Wang YX,Feng TY,Duan SS,et al. miR-155 promotes fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis by targeting FOXO3a[J]. Exp Ther Med,2020,19(2):1288 - 1296. doi:10.3892/etm.2019.8330.

[24] Wei QF,Lv F,Zhang HJ,et al. MicroRNA-101-3p inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis by targeting PTGS2[J]. Biosci Rep,2020,40(1):BSR20191136. doi:10.1042/BSR20191136.

doi:10.11659/jjssx.01E020111

·基础研究·

2种大鼠青光眼滤过手术模型在结膜抗瘢痕研究中的应用比较

朱晓燕[1],胡 倩[1],李 东[1],李 浩[1],朱小敏[2],谢 琳[2] (1.贵州省人民医院眼科,贵州 贵阳 550002;2.重庆医科大学附属第三医院眼科,重庆 401120)

[摘 要] **目的** 比较前房穿刺法和植管法建立的2种大鼠青光眼滤过手术模型,并观察术后眼压和结膜滤过泡情况及术后结膜瘢痕形成过程。**方法** 将30只SD大鼠分为穿刺组和植管组,其中穿刺组15只15眼采用穿刺法,植管组15只15眼采用植管法。分别于术前及术后3 d、1周、2周、4周检测大鼠眼压,观察手术区结膜及角膜组织的充血水肿情况、前房情况及滤过泡形态变化,并记录滤过泡维持时间及生存率;术后4周分别摘取2组大鼠眼球制作石蜡切片,行HE染色、苦味酸狼红染色观察结膜切口的愈合情况及瘢痕形成。**结果** 2组术后3 d眼压均明显低于术前;2组平均眼压比相比,仅术后1周差异具有统计学意义($P<0.05$),术后3 d、2周、4周差异均无统计学意义($P>0.05$)。穿刺组术后1周滤过泡形态扁平,术后2周几乎观察不到;植管组术后1周滤过泡隆起较穿刺组明显,术后2周滤过泡逐渐局限,结膜组织包裹PE管末端,术后4周仅观察到滤过区结膜组织包裹PE管末端。穿刺组滤过泡维持时间为3~5 d,平均(3.5±0.64)d;植管组为10~14 d,平均(12.5±1.85)d。滤过术后1周植管组滤过泡的生存率(26.25±3.25)%高于穿刺组的(10.50±1.86)%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。术后4周组织切片染色显示,2组手术区结膜组织均可见大量胶原组织沉积,而植管组术区结膜组织明显较厚。**结论** 大鼠前房穿刺法与植管法均可成功建立青光眼滤过手术动物模型,且植管法更有利于观察滤过泡形态及瘢痕形成,可用于青光眼术后抗瘢痕相关研究。

[关键词] 青光眼;滤过性手术;瘢痕;动物模型;大鼠

[中图分类号] R779.6 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-01-26

Application and comparison of two rat glaucoma filtering models in the conjunctival anti-scarring study

ZHU Xiao-yan[1], HU Qian[1], LI Dong[1], LI Hao[1], ZHU Xiao-min[2], XIE Lin[2] (1. Department of Ophthalmology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang Guizhou 550002, China; 2. Department of Ophthalmology, Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China)

Abstract: Objective To compare the establishments of two different models of glaucoma filtering surgery in rats by the anterior chamber puncturation and catheterization, and observe the postoperative intraocular pressure, conjunctival filtering blebs and postoperative conjunctival scar formation process. **Methods** Totally 30 SD rats were divided into the puncturation group and catheterization group, 15 rats with 15 eyes were included in the puncturation group and 15 rats with 15 eyes were included in the catheterization group. Intraocular pressure

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81600729)

[通信作者] 谢 琳,E-mail:xielin795@yahoo.com

[25] Han HC, Wang LS, Xu J, et al. miR-128 induces pancreas cancer cell apoptosis by targeting MDM4[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(6): 5017-5022. doi:10.3892/etm.2018.6047.

[26] Wang XY, Zhu JW. Mir-1307 regulates cisplatin resistance by targeting Mdm4 in breast cancer expressing wild type P53[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(6): 676-683. doi:10.1111/1759-7714.12607.

[27] Hoffman Y, Bublik DR, Pilpel Y, et al. miR-661 downregulates both Mdm2 and Mdm4 to activate p53[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(2): 302-309. doi:10.1038/cdd.2013.146.

[28] Rosenberger CM, Podyminogin RL, Diercks AH, et al. miR-144 attenuates the host response to influenza virus by targeting the TRAF6-IRF7 signaling axis[J]. PLoS Pathog, 2017, 13(4): e1006305. doi:10.1371/journal.ppat.1006305.

[29] Li DM, Wang X, Lan X, et al. Down-regulation of miR-144 elicits proinflammatory cytokine production by targeting toll-like receptor 2 in nonalcoholic steatohepatitis of high-fat-diet-induced metabolic syndrome E3 rats[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 402(C): 1-12. doi:10.1016/j.mce.2014.12.007.

[30] Hu YW, Hu YR, Zhao JY, et al. An agomir of miR-144-3p accelerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94997. doi:10.1371/journal.pone.0094997.

[31] Zhang LL, Wang K, Wu QZ, et al. Let-7 inhibits the migration and invasion of extravillous trophoblast cell via targeting MDM4[J]. Mol Cell Probes, 2019, 45: 48-56. doi:10.1016/j.mcp.2019.05.002.

(编辑:左艳芳)