论 著

CCR5 siRNA对类风湿关节炎大鼠滑膜细胞增殖周期的影响

王友强[1]，兰由玉[2]，张　为[1]，姚　娟[1]，邹兴静[1]，刘　伟[2]
1.西南医科大学附属中医医院 检验科（泸州 646000）；2.西南医科大学附属医院 风湿免疫科（泸州 646000）

【摘 要】目的 利用小干扰RNA（siRNA）抑制CC趋化因子受体5（CCR5）的表达，以探讨CCR5 siRNA对类风湿关节炎（RA）大鼠滑膜细胞增殖与细胞周期的影响及其可能机制。**方法** 采用胶原诱导法构建RA大鼠模型，分离和培养RA大鼠滑膜细胞，通过Lipofectamine 2000将CCR5 siRNA和NC siRNA载体转染入细胞以判断其转染效率。并将体外培养的滑膜细胞分为4组：RA组（RA大鼠滑膜细胞）、RA+NC组（加入脂质体包裹的NC siRNA）、RA+mock组（加入脂质体）、RA+siRNA组（加入脂质体包裹的CCR5 siRNA）。利用RNA干扰技术抑制RA大鼠滑膜细胞CCR5的表达后，再用qRT-PCR和Western Blot检测各组滑膜细胞CCR5、细胞周期相关基因（*Cyclin D1*、*Cyclin E1*、*Cyclin B1*）mRNA和蛋白表达情况；MTT检测各组滑膜细胞增殖情况；PI单染检测滑膜细胞细胞周期分布情况。**结果** 与RA组比较，RA+siRNA组CCR5 mRNA表达水平（1.16 ± 0.21）比（1.85 ± 0.61）、CCR5蛋白水平（0.19 ± 0.01）比（0.44 ± 0.05）均明显降低（$P < 0.05$）；RA+siRNA组Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1 mRNA水平（1.32 ± 0.01）、（1.23 ± 0.26）、（1.33 ± 0.05）分别较RA组（1.52 ± 0.06）、（1.68 ± 0.08）、（1.94 ± 0.07）显著降低（$P < 0.05$）；RA+siRNA组Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1蛋白水平（0.88 ± 0.03）、（1.46 ± 0.13）、（1.56 ± 0.13）分别较RA组（1.38 ± 0.03）、（1.98 ± 0.12）、（2.13 ± 0.08）明显降低（$P < 0.05$）；与RA组比较，RA+siRNA组RA大鼠滑膜细胞G0/G1期比例（70.27 ± 1.06）%较（59.26 ± 0.59）%上升（$P < 0.05$），S期比例（14.10 ± 0.82）%较（23.94 ± 1.71）%降低（$P < 0.05$），并且滑膜细胞生长明显受抑，而RA+mock、RA+NC组无明显差别（$P > 0.05$）。**结论** *CCR5*基因沉默可抑制滑膜细胞的生长，使G0/G1期滑膜细胞比例增加，S期细胞比例减少，还可通过调节细胞周期相关基因*Cyclin D1*、*Cyclin E1*、*Cyclin B1*的表达来调节细胞周期的分布，进而影响滑膜细胞的增殖。

【关键词】类风湿关节炎；CCR5；基因沉默；滑膜细胞；细胞增殖；细胞周期
【中图分类号】 R593　　**文献标志码** A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.02.005

Effect of CCR5 siRNA on proliferation and cell cycle of synoviocytes in rats with rheumatoid arthritis

WANG Youqiang[1], *LAN Youyu*[2], *ZHANG Wei*[1], *YAO Juan*[1], *ZOU Xingjing*[1], *LIU Wei*[2]
1.*Department of Laboratory Medicine, the Affiliated T.C.M Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*; 2.*Department of Rheumatology and Immunology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*

【Abstract】Objective To explore the effect of CCR5 siRNA on the proliferation and cell cycle of synoviocytes in rats with rheumatoid arthritis (RA) and its possible mechanism by inhibiting the expression of CCR5 with small interfering RNA (siRNA). **Methods** An RA rat model was constructed by collagen induction method. Synoviocytes of the RA rats were isolated and cultured, in which CCR5 siRNA and negative control (NC) siRNA vectors were then transfected by Lipofectamine 2000 to determine the transfection efficiency. The synoviocytes cultured in vitro were divided into four groups: RA group (synoviocytes of RA rats), RA+NC group (with liposome-encapsulated NC siRNA), RA+mock group (with liposome), and RA+siRNA group (with liposome-encapsulated CCR5 siRNA). After the expression of CCR5 in the synoviocytes of RA rats was inhibited by RNA interference technology, qRT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of CCR5 and cell cycle-related genes (*Cyclin D1*, *Cyclin E1*, and *Cyclin B1*) in each group. The proliferation and cell cycle distribution of synoviocytes in each group were determined by MTT and PI staining, respectively. **Results** Compared with the RA group, the RA+siRNA group showed significantly reduced CCR5 mRNA level (1.16 ± 0.21 vs 1.85 ± 0.61) and CCR5 protein level (0.19 ± 0.01 vs 0.44 ± 0.05) ($P < 0.05$). The mRNA levels of *Cyclin D1*, *Cyclin E1*, and *Cyclin B1* in the RA+siRNA group (1.32 ± 0.01, 1.23 ± 0.26, and 1.33 ± 0.05, respectively) were significantly decreased as compared with those in the RA group (1.52 ± 0.06, 1.68 ± 0.08, and 1.94 ± 0.07, respectively) ($P < 0.05$). The protein levels of *Cyclin D1*, *Cyclin E1*, and *Cyclin B1* in the RA+siRNA group (0.88 ± 0.03, 1.46 ± 0.13, and 1.56 ± 0.13, respectively) were significantly lower

基金项目：国家自然科学基金（81902169）；西南医科大学校级课题（2019ZQN038）
第一作者简介：王友强，硕士，副主任技师。
通信作者：兰由玉，博士，主治医师。E-mail：153477590 @qq.com
引用本文：王友强，兰由玉，张为，等.CCR5 siRNA对类风湿关节炎大鼠滑膜细胞增殖周期的影响[J].西南医科大学学报，2022，45（2）：112-117.
DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2022.02.005.

than those in the RA group (1.38 ± 0.03, 1.98 ± 0.12, and 2.13±0.08, respectively) ($P < 0.05$). Compared with the RA group, the RA+siRNA group showed an increased G0/G1 phase ratio of synoviocytes (70.27% ± 1.06% vs 59.26% ± 0.59%, $P < 0.05$) and a decreased S phase ratio of synoviocytes (14.10% ± 0.82% vs 23.94% ± 1.71%, $P < 0.05$), as well as significantly inhibited growth of synoviocytes, but there were no significant differences in the RA+mock and RA+NC groups ($P > 0.05$). **Conclusion** CCR5 gene silencing can inhibit the growth of synoviocytes, manifesting as increasing the G0/G1 phase ratio of synoviocytes and decreasing the S phase ratio. The cell cycle distribution can be regulated by regulating the expression of cell cycle-related genes (Cyclin D1, Cyclin E1, and Cyclin B1), thus affecting the proliferation of synoviocytes.

【Key words】 Rheumatoid arthritis; CCR5; Gene silencing; Synoviocytes; Cell proliferation ; Cell cycle

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种全身性炎症性免疫性疾病,其患病率约为1%,可导致关节的滑膜增生和关节破坏,最终出现关节畸形,功能丧失和生活质量下降[1]。成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synovial cells, FLS)是关节滑膜组织中的主要细胞,FLS的过度增生和滑膜血管翳形成是RA滑膜炎发展的关键因素,并且还表现出细胞增殖与凋亡失调[2-3],FLS释放多种细胞因子加速了RA关节的破坏[4-5]。细胞周期进程的失调可导致FLS的过度生长,RA中细胞周期相关基因的异常表达可影响FLS的细胞周期进程[2,6]。

CC趋化因子受体5(CC Chemokine Receptor 5, CCR5)是一种G蛋白偶联受体,与相应的促炎性趋化因子结合后在RA等炎症性免疫性疾病中有着重要的作用[7-8]。CCR5与免疫和炎症反应有关,其高效拮抗剂可减少胶原诱导的关节炎小鼠模型中的关节炎症[9]。并且有研究发现CCR5在RA中明显升高,并与RA的发生发展有关[10-11]。小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术[12],主要是一种利用siRNA靶向沉默目标基因表达的技术。目前RA的具体发病机制仍不清楚,CCR5在其中的作用机制报道甚少,因此本研究拟通过RNA干扰技术抑制RA大鼠滑膜细胞CCR5的表达,以探讨*CCR5*基因沉默对RA大鼠滑膜细胞增殖及细胞周期的影响,以便于进一步探寻RA的发病机制及可能的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 *实验动物* SPF级Wistar雄性大鼠30只,体重(171 ± 8)g,购买于西南医科大学实验动物中心,实验通过了西南医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 *材料* 脂质体Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司),弗氏完全佐剂(CFA)(美国Sigma公司),Trizol Reagent(日本Takara公司),逆转录试剂盒(美国Promega公司),MTT(美国Solarbio公司),PI染色液(上海如吉生物科技发展有限公司),CCR5抗体、兔抗鼠Cyclin D1、兔抗鼠Cyclin E1、兔抗鼠Cyclin B1(英国Abcam公司),二抗(兔抗羊IgG)(英国Abcam公司),GAPDH(美国Invitrogen公司),PCR试剂盒(日本Takara公司),CCR5 siRNA(3条)和NC siRNA(1条)序列由GeneChem公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 *siRNA载体构建* 将事先设计好的大鼠CCR5 siRNA(3条)和NC siRNA(1条)序列(见表1)经处理后构建成pU6-siRNA-GFP载体(均由GeneChem公司完成),再通过Lipofectamine 2000将载体转入大鼠滑膜细胞,操作按照说明书进行。转染完成48 h后检测细胞CCR5 mRNA的水平以判断各条siRNA的转染效率,我们前期的研究[13]已经明确选取了效率最佳的一条(CCR5 siRNA-2)进行后续实验。

表1 CCR5 siRNA序列

Table 1 CCR5 siRNA sequences

siRNA	序列(5′-3′)
CCR5 siRNA-1	CAGGGCUGUAAGGCUCATCUUd(TT)
CCR5 siRNA-2	CAGGGAUCUAUCACAUUGGUUd(TT)
CCR5 siRNA-3	CAGCAAGUCAAUCCUGAUCGUd(TT)
CCR5 siRNA-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUd(TT)

1.2.2 *RA大鼠模型构建* SPF级Wistar雄鼠30只适应性饲养1周后随机分为2组:Control组10只、RA组20只。用胶原蛋白诱导法[14]构建RA大鼠模型,具体方法为:将Ⅱ型胶原蛋白充分溶解于浓度为0.1 mmol/L的醋酸溶液中,然后再将相同剂量的弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)充分与上述混合液一起混匀,最后放置在冰浴中待其完全乳化;用注射器在Wistar雄鼠尾根部多处注射,同样的方法再于1周后重复操作一次;Control组的Wistar雄鼠可以在同样的时间、同样的部位仅注射Ⅱ型胶原蛋白0.2 mg。采用关节炎症指数(arthritis index, AI)评分法评估RA大鼠模型是否构建成功,AI大于或等于4分提示造模成功,四肢评分标准见表2,每隔5 d观察一次。

表2 AI评分标准

Table 2 Arthritis Index score

评分	肢体表现
0	无关节红肿
1	足小趾关节红肿
2	趾、跖部均红肿
3	踝关节以下均红肿
4	包括踝关节全部红肿

1.2.3 滑膜细胞的分离与培养　用6 g/L的Ⅱ型胶原酶处理滑膜组织，37 ℃、5% CO_2培养箱中消化3 h；再将细胞团用2.5 g/L的胰蛋白酶消化5 min；离心弃上清，将得到的细胞重新悬浮于含1.5 mL/L胎牛血清、1×10^5 U/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养基中，置37 ℃、5% CO_2条件下培养3～5 d使用台盼蓝初步判断细胞的存活率，若存活率大于95%，可供后续实验使用。第7 d，经2.5 g/L的胰酶-EDTA消化传代细胞，取3代的细胞用于后续实验。

1.2.4 滑膜细胞的转染　在转染前24 h，将待转染的大鼠滑膜细胞以2×10^5个/mL的密度铺于6孔板内；每孔添加500 uL不含抗生素的完全培养液，放入37℃、5% CO_2培养箱内孵育24 h后，待细胞汇合达50%即可用于转染。本研究将细胞分为4组：RA组（RA大鼠滑膜细胞）、RA+NC组（加入脂质体包裹的NC siRNA）、RA+mock组（加入脂质体）、RA+siRNA组（加入脂质体包裹的CCR5 siRNA）。转染前更换细胞培养基（37 ℃预温），用250 μL不含血清培养基OPti-MEM稀释100 pmol mock、siRNA（终浓度50 nM）及5 μL liPofectamin 2000，轻轻混匀并室温孵育5 min后加入6孔板中轻摇，常温放置20 min；再在6孔板中添加含10%血清的细胞培养基，于37 ℃，5% CO_2放置6～8 h后，换完全培养基，持续放置48 h后获取细胞。

1.2.5 CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1 mRNA及蛋白水平测定　各组滑膜细胞用Trizol法提取总RNA，并按照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA，再以GAPDH为内参基因，将cDNA进行PCR扩增，引物序列，见表3。滑膜细胞以2 × 10^5个/mL的浓度平铺于6孔板培养72 h，加入蛋白裂解液提取蛋白，再利用10% SDS分离胶与浓缩胶电泳分离、转膜，滴加稀释的一抗兔抗鼠CCR5、兔抗鼠Cyclin D1、兔抗鼠Cyclin E1、兔抗鼠Cyclin B1，4 ℃孵育过夜；加入二抗37 ℃振荡孵育1 h后用化学发光仪检测。

表3 引物序列

Table 3　Primer sequences

引物名称		序列(5′-3′)
CCR5	Forward	AGAAGAAGAGGCACAGG
	Reverse	AAAGGCATAGATGACAGG
Cyclin D1	Forward	CTGCGAGCCATGCTGAAGACGGAGGACACC
	Reverse	CCCAACAACTTGCTGTCCTACTACCGCCTC
Cyclin E1	Forward	CAGTCAGCCTTGGGATGATGATTC
	Reverse	TCCTCCAGACCTCTTCTCTATTGC
Cyclin B1	Forward	GGTGGAACTGGATGAGCCTGA
	Reverse	TGTTTCCATTGGGCTTGGAGA
GAPDH	Forward	ACCCCTTCATTGACCTCAACTA
	Reverse	ATTGGGGGTAGGAACACGGAA

1.2.6 MTT检测细胞增殖情况　选取对数生长期的滑膜细胞以2 × 10^5个/mL的密度100 μL平铺于96孔板，每组各有3个相同的孔。在37 ℃、5% CO_2条件下过夜，待细胞逐渐贴壁，24 h后换液，分别在相同条件下培育后的第0、24、48和72 h时添加5 mg/mL的MTT 20 μL再培育4h，弃上清，每孔加入DMSO 150 μL，震荡10 min。酶标仪分别测定第0、24、48和72 h时各孔吸光值（A490）值，并作好记录，以3孔的平均值为最终结果。

1.2.7 PI单染检测细胞周期　将快速生长期的滑膜细胞铺于6孔板，其密度为1.2×10^5个/mL，每孔2 mL，培养24 h后，每组设置3个复孔。用不含EDTA的胰酶消化、收集细胞，2 500 rpm/min离心5 min。PBS洗涤× 2次，离心收集细胞，加3mL 70%酒精处理，4 ℃静置一夜。第二天，离心，去除上清液，添加PI染色液，4 ℃避光30min。染色结束后，用细胞滤网过滤，流式细胞仪上样，在大于575 nm下检测PI，计算细胞周期百分比。

1.2.8 统计学分析　用SPSS 21.0分析所得数据，计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，两样本均数比较t检验，多组间比较采用单因素方差分析，数据正态性检验采用Kolmogorov-Smirnov法，呈正态分布的数据多组间比较使用One way AVONA分析。$P < 0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA大鼠模型鉴定

在给大鼠注射弗氏完全佐剂（CFA）8 h后，RA组大鼠在注射一侧足趾部位出现红肿等关节炎症的表现，24 h后出现足踝部肿胀。10 d后RA模型大鼠表现出多关节炎，具体为前肢或对侧肢体甚至耳、尾均有前面所述的炎症反应的表现。皮毛暗沉，有部分褪毛现象，体重下降，食欲减退，活动量减少，甚至有脱皮、溃疡和结节。10 d时RA组大鼠AI（1.31 ± 0.63）较5 d时（0.98± 0.54）明显升高（$P < 0.05$）；分别与10 d（1.45 ± 0.58）、15 d（5.06 ± 1.29）时AI比较，25 d时AI（7.22 ± 1.23）进一步增高（$P < 0.05$），且AI随着时间的增加而升高，见图1。而Control组大鼠无关节炎症等表现。由此可见RA大鼠模型构建成功。

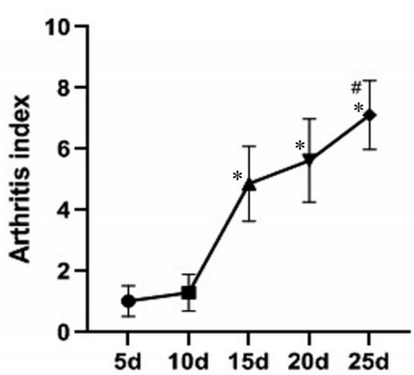


图1 RA组大鼠关节炎指数（AI）

Figureure 1　The Arthritis Index of RA group

注：*表示与10 d时比较$P < 0.05$；#表示与15 d时比较$P < 0.05$

2.2 siRNA转染效率

转染大鼠滑膜细胞48 h后，qRT-PCR测定CCR5 mRNA表达水平，由图2可知，与CCR5 siRNA-NC组相比，3条siRNA序列转染后均可引起CCR5 mRNA明显下降（$P<0.05$），其中CCR5 siRNA-2序列转染效率较CCR5 siRNA-1和CCR5 siRNA-3更高。因此本研究选用CCR5 siRNA-2序列为最终实验所用序列，进行后续研究。

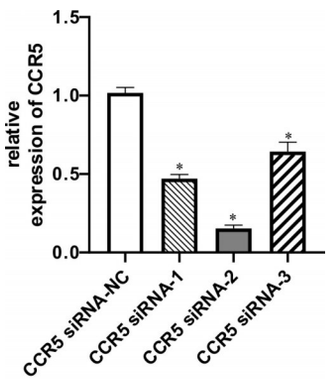


图2 CCR5 siRNA序列转染效率

Figureure 2 CCR5 siRNA transfection efficiency

注：qRT-PCR检测不同CCR5 siRNA序列转染效率；*表示与CCR5 siRNA-NC组相比$P<0.05$（$n=3$）

2.3 沉默 *CCR5* 对CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1 mRNA水平的影响

各组RA大鼠滑膜细胞CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1 mRNA表达水平如图3A、3B所示：与RA组相比，RA+siRNA组CCR5 mRNA表达水平（1.16 ± 0.21）较（1.85 ± 0.61）明显下降（$P<0.05$），进一步验证了CCR5 siRNA转染是有效的，见图3A；图3B提示，RA+siRNA组Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1 mRNA水平（1.32 ± 0.01）、（1.23 ± 0.26）、（1.33 ± 0.05）分别较RA组（1.52 ± 0.06）、（1.68 ± 0.08）、（1.94 ± 0.07）显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）；而RA+NC组、RA+mock组较RA组无明显变化（$P>0.05$）。

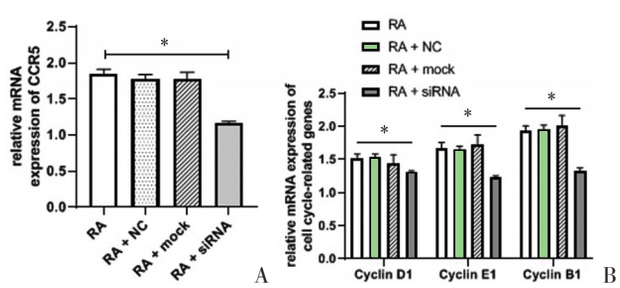


图3 CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1 mRNA水平比较

Figureure 3 The mRNA expression of CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1

注：A：CCR5在各组细胞mRNA表达水平比较；B：Cyclin D1、Cyclin E1和Cyclin B1在各组细胞中mRNA表达水平比较（*表示与RA组比较$P<0.05$）

2.4 沉默 *CCR5* 对CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1蛋白水平的影响

各组RA大鼠滑膜细胞CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1蛋白表达水平如图4A、4B所示：与RA组相比，RA+siRNA组CCR5蛋白水平（0.19 ± 0.01）较（0.44 ± 0.05）明显下降（$P<0.05$），见图4A；由图4B可知，RA+siRNA组Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1蛋白水平（0.88 ± 0.03）、（1.46 ± 0.13）、（1.56 ± 0.13）分别较RA组（1.38 ± 0.03）、（1.98 ± 0.12）、（2.13 ± 0.08）显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）；而RA+NC组、RA+mock组较RA组无明显变化（$P>0.05$）。

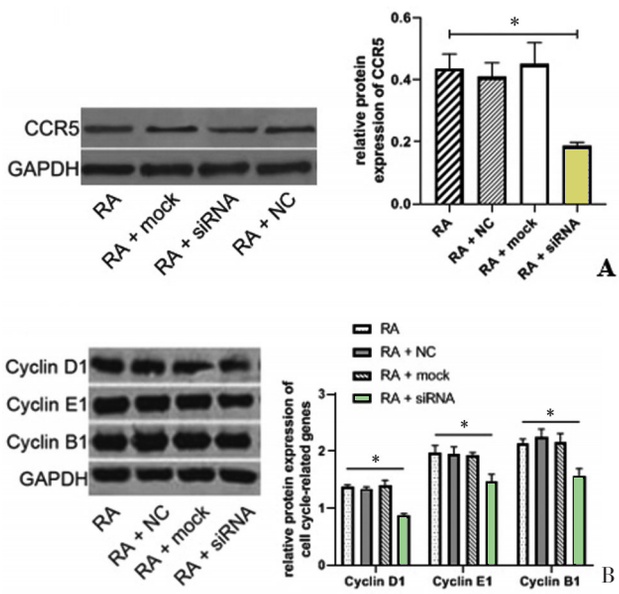


图4 CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1蛋白水平比较

Figureure 4 The protein expression of CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1

注：A：CCR5在各组细胞中蛋白表达水平比较；B：Cyclin D1、Cyclin E1和Cyclin B1在各组细胞中蛋白表达水平比较（*表示与RA组比较$P<0.05$）

2.5 *CCR5* 基因沉默对RA大鼠滑膜细胞增殖的影响

本研究采用MTT协助判断沉默 *CCR5* 对RA大鼠滑膜细胞增殖情况的影响，见图5。与RA组相比，RA+siRNA组滑膜细胞出现明显生长抑制，且随时间增长其抑制效果逐渐增大（$P<0.05$），而RA+mock组、RA+NC组无特别变化（$P>0.05$）。

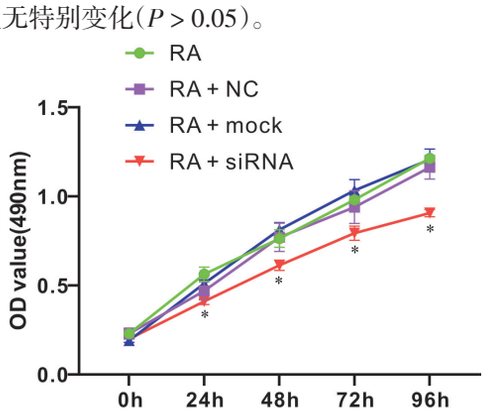


图5 各组RA大鼠滑膜细胞增殖情况比较

Figureure 5 The synoviocytes proliferation of each group

注：*表示与RA组比较，$P<0.05$

2.6 沉默*CCR5*对RA细胞周期分布的影响

PI单染测定细胞周期分布情况，见图6。与RA组对比，RA+siRNA组RA大鼠滑膜细胞G0/G1期比例（70.27 ± 1.06）%较（59.26 ± 0.59）%上升，S期比例（14.10 ± 0.82）%较（23.94 ± 1.71）%降低（$P < 0.05$），而RA + mock、RA + NC组无明显变化（$P > 0.05$）。

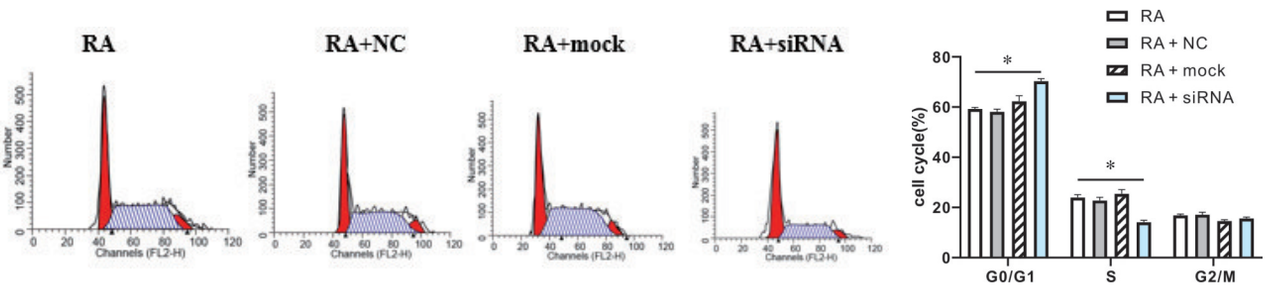


图6 各组RA大鼠滑膜细胞细胞周期分布情况比较

Figureure 6 The cell cycle distribution of each group

注：*表示与RA组比较，$P < 0.05$

3 讨论

RA发病机理受多种因素的影响，包括遗传、表观遗传学和环境因素以及免疫紊乱和细胞因子等因素[15-16]。活化的RA-FLS表现出与肿瘤细胞相似的增殖特征，其肿瘤样增殖特性可导致滑膜增生发展，逐渐出现软骨的侵蚀及关节破坏[3,17]。RA-FLS具有激活细胞周期和抗细胞凋亡的特性，从而可导致细胞增殖[18]。同时，细胞周期又控制着细胞生长或凋亡的潜力[6,19]。

细胞周期分为DNA合成前期（G1期），DNA合成期（S期），DNA合成后期（G2期）和分裂期（M期），大多数细胞处于G0/G1期[20]。细胞周期的正确进展取决于细胞周期蛋白的表达水平以及细胞周期蛋白依赖性激酶（Cdks）的激活[21]。本研究发现，CCR5 siRNA干预后RA大鼠滑膜细胞的生存能力受到抑制，G0/G1期滑膜细胞比例增大，S期细胞的比例减少，提示沉默CCR5可明显抑制滑膜细胞的生长，并影响细胞周期的分布。有还研究发现，通过调节细胞周期调节因子将细胞周期阻滞在G1到S相转变，即G1停滞，即可抑制FLS的增殖[22]。细胞周期从G1到S期的进展还受Cyclin D和Cyclin E及其同系激酶CDK 2，CDK 4和CDK 6的调节[22]，且可通过诱导细胞周期停滞在G0 / G1期来抑制RA-FLS的增殖[23]。

此外，CCR5沉默可抑制CCR5的表达，还可调节细胞周期相关基因的表达，相应地，CCR5、Cyclin D1、Cyclin E1和Cyclin B1的表达均降低。细胞周期调节剂是控制RA-FLS分裂和增殖的强制因素，可先后作用于Cyclin D、pRB和Cyclin E，进而加速RA-FLS的DNA合成和增殖[6]。其中cyclin D1在RA的滑膜细胞增殖和凋亡中起了重要作用[24]。细胞周期相关蛋白的异常表达与RA的疾病进展有关[19]。Cyclin D1和Cyclin E1是细胞周期的调节因子[25]，主要调控G1/S期转化，其中Cyclin D1的主要功能在于促进细胞增殖，而Cyclin E是G1晚期的重要调控因子；Cyclin B1是细胞周期中G2/M阶段的主要介质[26]，主要与M期的完成有关。

4 结论

本研究结果显示，沉默CCR5可抑制滑膜细胞的生长，使G0/G1期滑膜细胞比例增加，S期细胞比例减少，还可通过调节与细胞周期相关的基因表达来影响细胞周期的分布，进而抑制滑膜细胞的增殖。本研究为CCR5基因沉默作为RA治疗的潜在靶点提供了实验依据，但还需进一步大规模的研究阐明RA滑膜细胞中CCR5的潜在机制。

（利益冲突：无）

参 考 文 献

[1] CORAS R, MURILLO-SAICH JD, GUMA M. Circulating pro- and anti-inflammatory metabolites and its potential role in rheumatoid arthritis pathogenesis[J]. Cells, 2020, 9(4): 827-858.

[2] ZHU SL, HUANG JL, PENG WX, *et al*. Inhibition of smoothened decreases proliferation of synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(2): 214-222.

[3] DU HY, ZHANG X, ZENG YC, *et al*. A novel phytochemical, DIM, inhibits proliferation, migration, invasion and TNF-α induced inflammatory cytokine production of synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients by targeting MAPK and AKT/mTOR signal pathway[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1620-1633.

[4] HAO L, WAN YY, XIAO JH, *et al*. A study of Sirt1 regulation and the effect of resveratrol on synoviocyte invasion and associated joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 5099-5106.

[5] FANG QH, ZHOU C, NANDAKUMAR KS. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis[J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020:1-20.

[6] KANESHIRO K, SAKAI Y, SUZUKI K, *et al*. Interleukin-6 and tumour necrosis factor-α cooperatively promote cell cycle regulators and proliferate rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells[J]. Scand J Rheumatol, 2019, 48(5): 353-361.

[7] ELEMAM NM, HANNAWI S, MAGHAZACHI AA. Role of chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis[J]. Immunotargets Ther, 2020, 9: 43-56.

[8] HOSSEINI RN, KAVIANI S, VASEI M, *et al*. Generation of

CCR5-ablated human induced pluripotent stem cells as a therapeutic approach for immune-mediated diseases[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol,2019,18(3): 310-319.
[9] ANSARI MA, NADEEM A, BAKHEET SA, *et al*. Chemokine receptor 5 antagonism causes reduction in joint inflammation in a collagen-induced arthritis mouse model[J]. Molecules, 2021, 26(7): 1839-1848.
[10] LINDNER E, NORDANG GBN, MELUM E, *et al*. Lack of association between the chemokine receptor 5 polymorphism CCR5delta32 in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis[J]. BMC Med Genet,2007,8(33):1-5.
[11] DUTTA R, LUNZER MM, AUGER JL, *et al*. A bivalent compound targeting CCR5 and the mu opioid receptor treats inflammatory arthritis pain in mice without inducing pharmacologic tolerance[J]. Arthritis Res Ther,2018,20(1): 154-164.
[12] 宋国婧,王永福. 小干扰RNA技术治疗自身免疫性疾病应用展望[J]. 中国疗养医学,2019,28(3): 253-256.
[13] LAN YY, WANG YQ, LIU Y. CCR5 silencing reduces inflammatory response, inhibits viability, and promotes apoptosis of synovial cells in rat models of rheumatoid arthritis through the MAPK signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18748-18762.
[14] 张倩,何东初. 痹症宁对CIA模型大鼠血清炎症因子及关节滑膜中MMP-3、MMP-9表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(4): 32-35.
[15] YANG YS, DONG QM, LI RH. Matrine induces the apoptosis of fibroblast-like synoviocytes derived from rats with collagen-induced arthritis by suppressing the activation of the JAK/STAT signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(2): 307-316.
[16] SCHERER HU, HÄUPL T, BURMESTER GR. The etiology of rheumatoid arthritis[J]. J Autoimmun,2020,110: 102400-102415.
[17] 郭雄飞,王挺,汤立新. miR-29a对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖和凋亡的影响[J]. 基础医学与临床,2020,40(1): 9-15.
[18] MOKUDA S, MIYAZAKI T, ITO Y, *et al*. The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Sci Rep,2015,5: 9795-9808.
[19]TARANTO E, LEECH M. Expression and function of cell cycle proteins in rheumatoid arthritis synovial tissue[J]. Histol Histopathol,2006,21(2): 205-211.
[20] MICHAEL VV, ALISA KE. Cell cycle implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Front Biosci, 2000, 5: D594-D601.
[21] MARTÍNEZ-ALONSO D, MALUMBRES M. Mammalian cell cycle cyclins[J]. Semin Cell Dev Biol,2020,107: 28-35.
[22] PARK C, KIM GY, JUNG JH, *et al*. Pectenotoxin-2 induces G1 arrest of the cell cycle in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis[J]. Int J Mol Med,2011,27(6): 783-787.
[23] YAN J, CHEN Y, HE C, *et al*. Andrographolide induces cell cycle arrest and apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Cell Biol Toxicol,2012,28(1): 47-56.
[24] WANG H, JIA XZ, SUI CJ, *et al*. Effects of thapsigargin on the proliferation and survival of human rheumatoid arthritis synovial cells[J]. ScientificWorldJournal,2014,2014: 1-7.
[25] POZNER A, TEROOATEA TW, BUCK-KOEHNTOP BA. Cell-specific kaiso (ZBTB33) regulation of cell cycle through cyclin D1 and cyclin E1[J]. J Biol Chem, 2016, 291(47): 24538-24550.
[26] HUANG L, PENG Y, ZHONG GZ, *et al*. PBRM1 suppresses bladder cancer by cyclin B1 induced cell cycle arrest[J]. Oncotarget,2015,6(18): 16366-16378.

(2020-12-20收稿;2021-12-26修回)

西南医科大学获批建设代谢性血管疾病四川省重点实验室

2022年1月14日,从四川省科学技术厅获悉我校代谢性血管疾病实验室已正式获批建设四川省重点实验室。目前,学校已拥有医学电生理学教育部重点实验室1个,核医学与分子影像等四川省重点实验室3个,中药活性筛选及成药性评价等泸州市重点实验室16个,本次获批建设的代谢性血管疾病四川省重点实验室为学校第4个四川省重点实验室。

代谢性血管疾病四川省重点实验室将依托西南医科大学附属医院,以表观遗传学调控与代谢性血管疾病、固有免疫—炎症与代谢性血管疾病、代谢性血管疾病的流行病学与防控体系建设为研究方向,瞄准国内外前沿课题、关键科学问题,探索代谢性血管疾病发病机制的新理论体系,开发新的代谢性疾病以及相关血管病变预防、早期诊断及治疗新方法,培养创新型人才,实现基础到临床的转化,将代谢和血管疾病有机结合进行系统研究。实验室由中国工程院院士董尔丹担任学术委员会主任,张春祥教授、徐勇教授、万沁教授担任学术带头人,徐勇教授担任主任。

未来,西南医科大学附属医院和实验室将按照四川省重点实验室管理的要求以及“开放、流动、联合、竞争”的原则,加强规范管理和安全运行,坚持高标准建设目标,努力将代谢性血管疾病四川省重点实验室建设成为开展基础研究与应用基础研究、凝聚培养高层次和青年人才、促进国内外合作与学术交流的高水平科技创新基地,为推动四川省乃至全国代谢性血管疾病基础研究、临床诊断与治疗水平,增强泸州区域医药健康服务辐射能力,全面融入成渝双城经济圈,建设成渝双城经济圈高品质生活宜居地和医疗救治第三极,推动泸州和学校的高质量发展提供强有力的科技和人才支撑。