

文章编号 1006-8147(2019)02-0115-04

论 著

MiR-145-5p 对胶原诱导的关节炎小鼠关节炎症的影响

明建松^{1,2}, 王晓雪¹, 杨梦晨¹, 汤可¹, 袁玉华¹

(1.天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; 2.天津港口医院检验科, 天津 300456)

摘要 目的:探讨 miR-145-5p 对胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠关节变化的影响。方法:采用牛Ⅱ型胶原免疫 DBA/1 小鼠诱导 CIA, 对关节指数评分及足跖肿胀程度进行比较, 成模后随机分为 agomiR-145-5p 组和 agomiR-NC 组进行干扰, 采用足爪 micro-CT 摄片, 踝关节病理检查评分及石蜡切片、HE 染色进行处理, 并通过免疫组化方法(IHC)检测踝关节中金属蛋白酶-1(MMP-1)、金属蛋白酶-3(MMP-3)、金属蛋白酶-9(MMP-9)、金属蛋白酶-13(MMP-13)、白细胞介素 17(IL-17)和金属蛋白酶 17(ADAM17)的表达。结果:成功建立 CIA 小鼠模型, 与 agomiR-NC 组相比, agomiR-145-5p 组 micro-CT 分析显示骨侵蚀更严重, 组织病理学显示滑膜炎减轻, 免疫组化结果显示 MMP-3、MMP-9、MMP-13 和 IL-17 水平升高, MMP-1 水平无差异, ADAM17 水平降低($P<0.05$)。结论:成功建立 CIA 小鼠模型, 并发现 miR-145-5p 加重关节破坏的同时部分抑制了 CIA 小鼠的关节炎症。

关键词 类风湿关节炎; microRNA; 胶原诱导关节炎模型

中图分类号 R684.3

文献标志码 A

Effects of miR-145-5p on joint inflammation in collagen-induced arthritis mice

MING Jian-song^{1,2}, WANG Xiao-xue¹, YANG Meng-chen¹, TANG Ke¹, YUAN Yu-hua¹

(1. Department of Clinical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Port Hospital, Tianjin 300456, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of miR-145-5p on joint changes in collagen-induced arthritis (CIA) mice. **Methods:** The CIA was induced by immunization of bovine type II collagen in DBA/1 mice, and the joint index scores and degree of paw swelling were compared. After the model was formed, they were randomly divided into agomiR-145-5p group and agomiR-NC group to perform interference. Foot micro-CT radiographs, ankle pathology score, paraffin sections, and HE staining were measured. IHC was used to detect the expression of MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13, IL-17 and ADAM17 in the ankle joint. **Results:** The CIA mouse model was successfully established. Compared with the agomiR-NC group, bone erosion was more severe in the agomiR-145-5p group. Histopathology showed synovial inflammation was reduced, and immunohistochemistry showed MMP-3 and MMP-9, MMP-13 and IL-17 levels increased, MMP-1 levels were not different, and ADAM17 levels decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** We have successfully established a CIA mouse model and found that miR-145-5p could aggravate joint destruction while partially inhibiting joint inflammation in CIA mice.

Key words rheumatoid arthritis; microRNA; collagen-induced arthritis model

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的慢性并累及多个关节的自身免疫性疾病, 它的发病机理是一种涉及到多种细胞、细胞因子和免疫活性物质的复杂过程, 其发病机制尚不完全清楚。近几年发现 microRNA 参与免疫应答反应, 可能在 RA 的疾病进展中发挥重要作用。前期实验发现, miR-145-5p 在 RA 中与对照组骨关节炎(OA)滑膜组织和滑膜细胞相比, 在 RA 外周血单个核细胞(PBMC)、滑膜组织和成纤维细胞样滑膜细胞(FLS)中 miR-145-5p 水平显著增加^[1]。通过调节 ADAM17 的表达, miR-145-5p 调节 RA-FLS 的增殖、细胞周

期进程和炎性细胞因子的表达; 通过下调 Ets-1, miR-145-5p 模拟上调 IL-17 水平和基质金属蛋白酶 MMP-3, MMP-9 和 MMP-13 的表达。现结合胶原诱导的关节炎 CIA 小鼠模型, 增强 miR-145-5p 表达, 观察 CIA 小鼠关节变化情况, 分析 miR-145-5p 在 CIA 中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 DBA/1 小鼠 36 只, 雄性, 8 周龄左右, SPF (Specific Pathogen Free, 无特定病原体)级, 体质量(20±2)g, 由北京华阜康公司提供, 标准饲料喂养, 自由饮水、饮食, 适应性饲养 7 d, 进行实验。动物于天津医科大学总医院饲养。本研究经天津医科大学动物护理与使用委员会批准。

作者简介 明建松(1987-), 男, 硕士在读, 研究方向: 病原生物学; 通信作者: 袁玉华, E-mail: yyhxxx39@sina.com。

1.2 试剂 牛Ⅱ型胶原(液)及弗氏完全佐剂购于美国 chondrex 公司, agomiR-145-5p 购于中国广东 Ribobio 公司, 小鼠麻醉剂水合氯醛购于美国 sigma 公司。将冻干的牛Ⅱ型胶原蛋白在 4℃下在 0.05 mol/L 乙酸中过夜溶解, 在弗氏完全佐剂中乳化至最终浓度为 2 mg/mL。

1.3 CIA 小鼠模型建立 取 36 只 8 周龄, 雄性 DBA/1 小鼠, 适应性饲养 2~3 d 之后, 随机分组选出 10 只小鼠作为 miRNA 阴性对照(miR-NC)组, 其余作为模型构建组, 进行初次免疫。按照每只 100 μ L 牛Ⅱ型胶原进行根部皮下注射, 注射部位为距尾根部 2 cm 至 0.5 cm 区间, miR-NC 组按同样方法注射等体积的生理盐水。初次免疫 21 d 后, 进行加强免疫, 模型构建组每只小鼠腹腔注射 100 μ L 牛Ⅱ型胶原, miR-NC 组同样方法注射等体积生理盐水。

1.4 成模小鼠免疫及分组给药 加强免疫后, 每天观察记录小鼠精神状态及关节肿胀情况, 筛选出发病时间相近的关节炎指数大于 4 分的发病小鼠 20 只, 随机分为 agomiR-145-5p 组及 agomiR 空载体 (agomiR-NC) 组, 每组 10 只, 在初次免疫后第 30 天将等体积的 agomiR-145-5p 和 agomiR-NC 进行鼠尾静脉注射, 之后每隔 3 d 注射 1 次, 共进行 3 周。

1.5 关节评分观察及 CIA 小鼠足趾肿胀程度比较 加强免疫后, 隔天观察诱导小鼠关节肿胀情况; 于小鼠分组治疗后, 每天进行关节炎评分, 记录关节炎指数(AI), 相加得总评分^[2]。

1.6 micro-CT 扫描 小鼠膝关节和踝关节在固定后进行 micro-CT 扫描重建。

1.7 病理分析及免疫组化检测 用 10%水合氯醛 (0.04 mL/10 g) 麻醉小鼠后, 处死所有小鼠。取小鼠踝关节进行固定、脱水、透明, 并用石蜡包埋切片, 进行 HE 染色, 镜下观察小鼠关节病变情况。通过对小鼠踝关节组织切片进行免疫组化染色, 检测 MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13、IL-17 和 ADAM17 的表达。

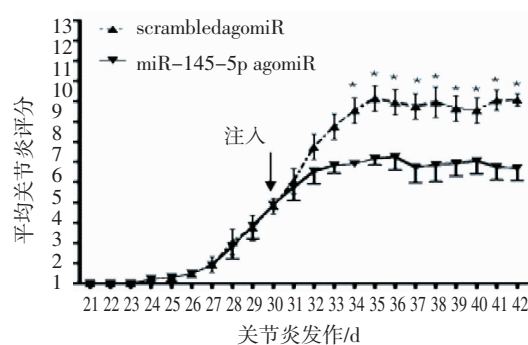
1.8 统计学分析 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对样本 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 模型建立及关节炎评分指数变化情况 对 DBA/1 建模, 约 85% 小鼠成功建立 CIA 模型, 足部出现关节炎症状。对小鼠四肢进行评分记和。与 agomiR-NC 组比较, agomiR-145-5p 组的小鼠在给药后第 4 天关节炎评分指数开始相对下降 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 小鼠足部变化 miR-NC 组小鼠足部呈正常

粉红色, 足掌、踝、掌指及指关节均无肿胀。发病小鼠足掌增厚、多关节红肿, 行走不便, 急性期受累足不能负重。胶原诱导成功小鼠足厚度、足体积较 miR-NC 组小鼠高。agomiR-145-5p 治疗后部分减轻了小鼠足部的肿胀和发红(图 2)。



* $P < 0.05$

图 1 CIA 小鼠的关节炎评分

Fig 1 Arthritis scores for CIA mice

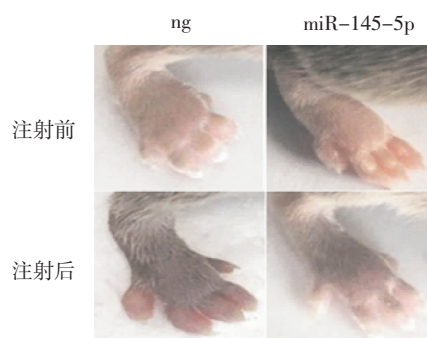


图 2 注射前后 CIA 小鼠的后爪

Fig 2 Hind paws of CIA mice before and after injection

2.3 HE 染色观察 miR-145-5p 对 CIA 小鼠关节软骨损伤的治疗效果 HE 染色结果如图 3 所示, 与 miR-NC 组比较, agomiR-145-5p 组小鼠膝关节滑膜组织明显增生肥厚, 滑膜周围结缔组织中有大量淋巴细胞和少量中性粒细胞浸润, 有丰富的血管翳形成, 关节软骨及软骨下骨侵蚀破坏严重。与 agomiR-NC 组比较, agomiR-145-5p 组滑膜增生显著降低, 骨破坏显著增强 ($P < 0.05$) (图 4)。

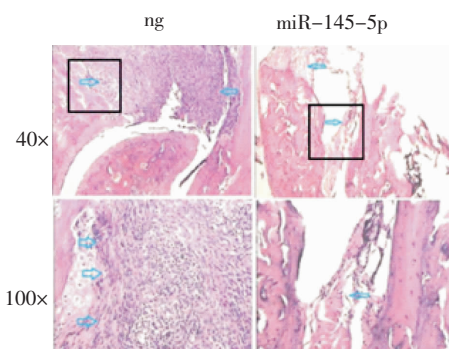
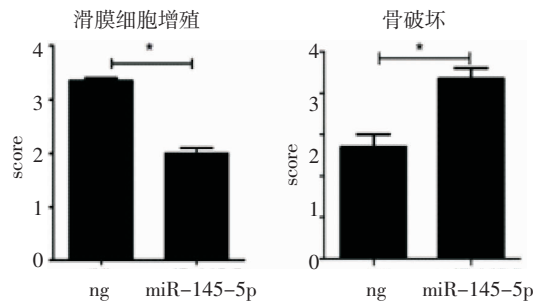


图 3 来自 CIA 小鼠后爪切片的 HE 染色

Fig 3 Hematoxylin and eosin staining of sections from the hind paws of CIA mice



* $P < 0.05$

图4 CIA小鼠的组织病理学评分

Fig 4 Histopathological scores of CIA mice

2.4 micro-CT扫描评价 miR-145-5p 治疗对 CIA 小鼠关节损伤的影响 与 miR-NC 组比较, agomiR-145-5p 组与 agomiR-NC 组都表现出踝关节的骨侵蚀;与 agomiR-NC 组相比较, agomiR-145-5p 组骨侵蚀更严重(图 5)。

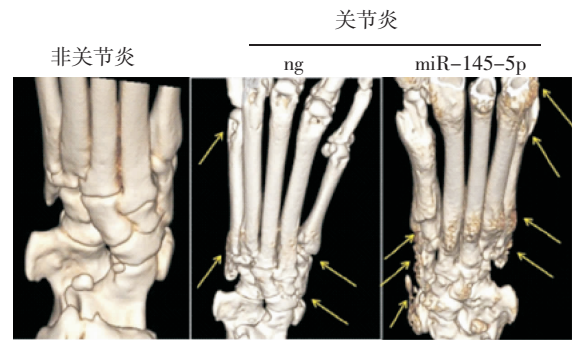


图5 骨破坏的比较

Fig 5 Comparison of bone destruction

2.5 免疫组化检测 与 agomiR-NC 组相比较, agomiR-145-5p 组小鼠的后踝中 MMP-3, MMP-9, MMP-13 和 IL-17 蛋白水平增加, MMP-1 水平没有差异, ADAM17 蛋白减少(图 6)。

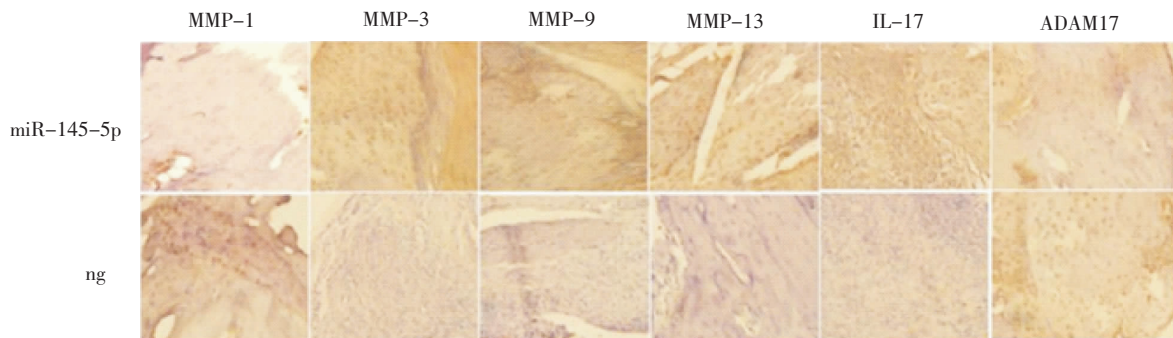


图6 CIA小鼠的MMP-1,MMP-3,MMP-9,MMP-13,IL-17和ADAM17的免疫组化检测

Fig 6 Immunohistochemistry (IHC) and quantification of MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13, IL-17, and ADAM17 in CIA mice

3 讨论

为进一步明确 miR-145-5p 在 RA 关节软骨损伤中的作用,本实验选用造模成功率高的 DBA/1 小鼠,通过 II 型胶原和完全弗氏佐剂混合尾部皮下注射的方法制备 CIA 小鼠模型,初次免疫后 4 周,小鼠出现足爪红肿、活动受限等 RA 相关症状,由此可见本实验所建立的 CIA 模型是成功的。通过关节评分、micro-CT 分析、病理分析及免疫组化检测等相关实验发现 miR-145-5p 加重关节破坏的同时部分抑制了 CIA 小鼠的关节炎症,同时发现与 agomiR-NC 组相比较, agomiR-145-5p 组小鼠的后踝中 MMP-3, MMP-9, MMP-13 和 IL-17 蛋白水平升高, MMP-1 水平没有差异, ADAM17 蛋白水平降低。

ADAM17 是一种 TNF-转换酶,被鉴定为切割 TNF- α 前结构域的酶,并且被认为是在炎症反应期间负责释放 TNF- α 的主要蛋白酶^[3]。另外,据报道 ADAM17 通过激活 EGFR / PI3K / AKT 途径促进神经胶质瘤细胞的增殖和侵袭^[4]。本实验相关实验的

结果证实 ADAM17 促进 FLS 增殖并且还表明 ADAM17 减少 RA-FLS 中的 TNF- α 产生。此外,敲减 ADAM17 减少 TNF- α 产生并增加 miR-145-5p 以及 IL-17 和 MMPs 的表达,这可能表现为 miR-145 / ADAM17 / TNF- α 的反馈环。据报道,FLT1, TLR4, TGFB2 和 APRIL 分别与炎症反应有关,涉及 RA 中的细胞增殖、细胞周期、炎性细胞浸润和血管生成^[5-8]。今后需要进一步研究 miR-145-5p 是否可以降低 ADAM17, FLT1, TLR4, TGFB2 和 APRIL 的表达,从而抑制炎症反应。

IL-17 主要由 Th17 细胞释放, Th17 细胞是一种特殊类型的人类辅助性 T 细胞^[9]。这种细胞因子在炎症和包括 RA 在内的自身免疫性疾病的发展中起着至关重要的作用^[10]。研究表明, IL-17 诱导 RA 中 MMP-3, MMP-9 和 MMP-13 的产生^[11-12]。众所周知, RA 患者的骨和软骨破坏部分由 MMP 活化的滑膜细胞和软骨细胞构成^[13]。此外, Ets-1 被报道为 Th17 分化的负调节因子。 miR-145 过表达导致 RA-FLS 中 IL-17, MMP-3, MMP-9 和 MMP-13 水平升高与

Ets-1 水平降低的相关性,以及 RA-FLS 中 Ets-1 调节 IL-17 的机制仍需进一步深入研究。

即使 CIA 小鼠模型中关节炎被部分抑制,施用 miR-145-5p 也会加重骨破坏,说明 miR-145-5p 可能调节多种信号通路,例如 miR-146a 和 miR-155 与炎症反应和 RA 疾病呈正相关,但在关节破坏中起负面作用^[14-15]。这项研究证实了 RA 中 miR-145-5p 介导的基因调节的复杂性,为后续研究提供了参考。

参考文献:

- [1] 闫琛. miR-145-5p 在类风湿关节炎中的表达及功能研究[D].天津医科大学,2017
- [2] Bakharevski O, Stein-Oakley A N, Thomson N M, et al. Collagen induced arthritis in rats. Contrasting effect of subcutaneous versus intradermal inoculation of type II collagen[J]. J Rheumatol, 1998, 25(10):1945
- [3] Shen H, Li L, Zhou S, et al. The role of ADAM17 in tumorigenesis and progression of breast cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37:15359
- [4] Siney E J, Holden A, Casselden E, et al. Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 Mediate Migration and Differentiation in Glioblastoma Sphere-Forming Cells[J]. Mol Neurobiol, 2016, 54(5):3893
- [5] Nagatani K, Itoh K, Nakajima K, et al. Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes express BCMA and are stimulated by APRIL[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(11):3554
- [6] Lefebvre J S, Lévesque T, Picard S, et al. Extra domain A of fibronectin primes leukotriene biosynthesis and stimulates neutrophil migration through activation of Toll-like receptor 4[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(6):1527
- [7] Mori J, Patel VB, AboAlrob O, et al. Angiotensin 1-7 ameliorates diabetic cardiomyopathy and diastolic dysfunction in db/db mice by reducing lipotoxicity and inflammation[J]. Circ Heart Fail, 2014, 7(2): 327
- [8] Pizzo R J, Azadniv M, Guo N, et al. Phenotypic, genotypic, and functional characterization of normal and acute myeloid leukemia-derived marrow endothelial cells[J]. Exp Hematol, 2016, 44(5):378
- [9] Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential[J]. Clin Sci, 2012, 122(11):487
- [10] Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity[J]. Nat Immunol, 2017, 18(6):612
- [11] Varas A, Valencia J, Lavocat F, et al. Blockade of bone morphogenetic protein signaling potentiates the pro-inflammatory phenotype induced by interleukin-17 and tumor necrosis factor- α combination in rheumatoid synoviocytes[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17:192
- [12] Li G, Zhang Y, Qian Y, et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- κ B/HIF-1 α pathway[J]. Mol Immunol, 2013, 53(3):227
- [13] Lubberts E, Joosten L A, van de Loo F A, et al. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction[J]. Inflamm Res, 2002, 51(2):102
- [14] Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, et al. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease[J]. Immunology, 2014, 142(1): 32
- [15] Zhang X, Li D, Li M, et al. MicroRNA-146a targets PRKCE to modulate papillary thyroid tumor development[J]. Int J Cancer, 2014, 134(2): 257

(2018-06-19 收稿)