

# 红景天苷调控 miR-20a-5p/TIMP2 轴对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖和迁移的影响

朱光昭<sup>1</sup>,方璐<sup>2</sup>,严婕<sup>1</sup>,李琴<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨红景天苷调控 miR-20a-5p/金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP2)轴对人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(HFLS-RA)功能和活化的影响。方法 以 HFLS-RA 细胞为研究对象,将 HFLS-RA 细胞分为肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )组、对照组、红景天苷组、miR-20a-5p 抑制物阴性对照(inhibitor NC)组、miR-20a-5p 抑制物组、红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物阴性对照(mimic NC)组、红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 HFLS-RA 细胞中 miR-20a-5p 表达;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HFLS-RA 细胞上清液中白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6 水平;细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(Edu)染色检测 HFLS-RA 细胞增殖;划痕实验检测 HFLS-RA 细胞迁移;免疫印迹实验(Western blot)检测 HFLS-RA 细胞中 TIMP2、细胞周期素 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶(MMP)-9 蛋白表达;双荧光素酶验证 miR-20a-5p 与 TIMP2 的关系。结果 与对照组比较,TNF- $\alpha$  组 miR-20a-5p 表达、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平、吸光度(OD<sub>450</sub>)值、Edu 阳性细胞率、划痕愈合率及 CyclinD1、MMP-9 蛋白上调,TIMP2 蛋白下调( $P < 0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组相比,红景天苷组 miR-20a-5p 表达、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平、OD<sub>450</sub> 值、Edu 阳性细胞率、划痕愈合率及 CyclinD1、MMP-9 蛋白下调,TIMP2 蛋白上调( $P < 0.05$ );与 inhibitor NC 组、TNF- $\alpha$  组相比比较,miR-20a-5p 抑制物组 miR-20a-5p 表达、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平、OD<sub>450</sub> 值、Edu 阳性细胞率、划痕愈合率及 CyclinD1、MMP-9 蛋白下调,TIMP2 蛋白上调( $P < 0.05$ );与红景天苷 + mimic NC 组、红景天苷组相比,红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组 miR-20a-5p 表达、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平、OD<sub>450</sub> 值、Edu 阳性细胞率、划痕愈合率及 CyclinD1、MMP-9 蛋白表达升高,TIMP2 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。miR-20a-5p 与 TIMP2 存在靶向调控关系。结论 红景天苷可能通过调控 miR-20a-5p/TIMP2 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应。

**关键词** 红景天苷;miR-20a-5p;金属蛋白酶组织抑制剂-2;类风湿关节炎;成纤维样滑膜细胞;增殖;迁移

2024-02-21 接收

基金项目:青海省卫生健康委重点课题(编号:2022-wjzd-04)

作者单位:<sup>1</sup> 青海省中医院风湿病科,西宁 810000

<sup>2</sup> 青海大学医学部,西宁 810016

作者简介:朱光昭,女,硕士研究生;

李琴,女,主任医师,责任作者,E-mail:fangj7811@163.

com

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)05-0803-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.009

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是受影响关节的进行性炎症损伤,从而导致致骨破坏、骨侵蚀和残疾的一种疾病<sup>[1]</sup>。大量研究<sup>[2]</sup>表明,成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)增殖、迁移异常是 RA 的标志性特征。随着疾病的进展,关节中发生免疫细胞浸润,激活人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(human rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells, HFLS-RA)并促进炎症因子的分泌<sup>[3]</sup>。目前,临床上经常使用非甾体抗炎药、糖皮质激素等药物治疗 RA,但长期使用上述药物存在多种副作用<sup>[4]</sup>。因此,有效预防或缓解 RA 疾病的进展已成为临床关注的焦点。红景天苷具有抗氧化、抗炎等特性。已有研究<sup>[5]</sup>报道,红景天苷可抑制肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 增殖。但具体机制尚不完全明确。相关研究<sup>[6]</sup>显示,上调 miR-20a-5p 表达可促进宫颈癌细胞增殖;RA 患者经甘露糖醛酸治疗后金属蛋白酶组织抑制剂 2(tissue inhibitor of metalloproteinase 2, TIMP2)表达水平增加<sup>[7]</sup>。且 miR-20a-5p 与 TIMP2 存在靶向结合关系。但红景天苷能否通过调控 miR-20a-5p/TIMP2 轴抑制 HFLS-RA 增殖和迁移未见文献报道。因此,该研究主要探究红景天苷对 HFLS-RA 增殖和迁移的影响以及其作用的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** HFLS-RA 细胞(上海通派生物公司)。

**1.1.2 试剂与仪器** 红景天苷(货号:Tb-1005,纯度 $\geq 98\%$ )(上海如吉生物公司);miR-20a-5p 模拟物及其阴性对照(mimic NC)、miR-20a-5p 抑制物及其阴性对照(inhibitor NC)(广州基迪奥生物公司);人白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

试剂盒(上海吉泰依科赛生物公司,货号:EH017-45、EH017-56);细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(美国 MCE 公司,货号:HY-K0301);5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)染色试剂盒(上海东寰生物公司,货号:C0085S);兔源一抗细胞周期素 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9、TIMP2、GAPDH 及二抗(英国 Abcam 公司,货号:ab16663、ab76003、ab230511、ab8245、ab6721)。ST-360 型酶标仪购自上海科华实验系统有限公司;Ti2-U 型荧光显微镜购自日本尼康公司;CX53 型光学显微镜购自日本奥林巴斯公司;165-8001 型蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组** HFLS-RA 细胞分为 TNF- $\alpha$  组、对照组、红景天苷组、inhibitor NC 组、miR-20a-5p 抑制物组、红景天苷 + mimic NC 组、红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组。除对照组 HFLS-RA 细胞正常培养不做任何处理外,其他组均需利用 20 ng/ml TNF- $\alpha$  处理以诱导体外 RA 模型<sup>[8]</sup>,各组药物处理如下:TNF- $\alpha$  组(20 ng/ml TNF- $\alpha$  处理 24 h)、红景天苷组<sup>[9]</sup>(20 ng/ml TNF- $\alpha$  和 50  $\mu$ mol/L 红景天苷共同处理 24 h)、inhibitor NC 组(20 ng/ml TNF- $\alpha$  处理的同时转染 inhibitor NC 24 h)、miR-20a-5p 抑制物组(20 ng/ml TNF- $\alpha$  处理 24 h 的同时转染 miR-20a-5p inhibitor NC 24 h)、红景天苷 + mimic NC 组(20 ng/ml TNF- $\alpha$  和 50  $\mu$ mol/L 红景天苷共同处理 24 h 的同时转染 mimic NC 24 h)、红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组(20 ng/ml TNF- $\alpha$  和 50  $\mu$ mol/L 红景天苷共同处理 24 h 的同时转染 miR-20a-5p mimic 24 h)。

**1.2.2 检测 miR-20a-5p 表达** 在 TRIzol 试剂中裂解以提取各组 HFLS-RA 细胞总 RNA。以逆转录形成的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。通过  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法以 U6 作为内参标准化 miR-20a-5p 表达。序列为:U6:正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3',反向 5'-CGCTTACGAATTTGCGTGT-3'; miR-20a-5p:正向 5'-UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG-3',反向 5'-CUACCUGCACUAUAAGCACUUUA-3'。

**1.2.3 上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平的检测** 根据试剂盒说明书步骤检测上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平。

**1.2.4 HFLS-RA 细胞增殖的 CCK-8 法检测** 将 HFLS-RA 细胞( $2 \times 10^5$  个/ml)接种到 96 孔板中并进行各组相应处理后,加 10  $\mu$ l/孔的 CCK-8 孵育 2 h。450 nm 处测量吸光度(optical density, OD)值。

## 1.2.5 HFLS-RA 细胞增殖的 EdU 染色检测

HFLS-RA 细胞( $2 \times 10^5$  个/ml)接种到 96 孔板中,经 50  $\mu$ mol/L EdU 处理 2 h 后,再对细胞进行 4% 多聚甲醛、阿波罗染色、DAPI 染色处理,观察并统计细胞染色情况,并计算 EdU 阳性细胞率(%) = 染色呈 EdU 阳性细胞数目/总细胞数目  $\times 100\%$ 。

**1.2.6 HFLS-RA 细胞迁移的划痕实验检测** 接种于 6 孔板中的 HFLS-RA 细胞( $1 \times 10^6$  个/孔)汇合度达到 100% 后,用 10  $\mu$ l 的无菌移液管尖在细胞层上制造划痕。用 PBS 洗涤细胞碎片后,孵育细胞 24 h 后,观察并统计划痕愈合率变化。

**1.2.7 TIMP2、CyclinD1、MMP-9 蛋白的检测** RIPA 缓冲液裂解 HFLS-RA 细胞,离心并收集上清液。上清液的蛋白质浓度通过 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠法检测。通过 SDS-PAGE 分离 30  $\mu$ g 蛋白质,电转移至聚偏二氟乙烯膜,进行封闭处理 1 h,在 4  $^{\circ}$ C 下将膜与 TIMP2(1:4 000)、CyclinD1(1:5 000)、MMP-9(1:6 000)、GAPDH(1:2 000)孵育过夜,再与二抗(1:6 000)孵育 1 h。化学发光试剂确定蛋白印迹,Image J 软件分析条带灰度值。

**1.2.8 靶向关系验证** 构建 TIMP2 的突变型(MUT)和野生型(WT)荧光素酶报告质粒,分别命名为 TIMP2-MUT、TIMP2-WT。将 TIMP2-MUT、TIMP2-WT 分别与 miR-20a-5p 模拟物或 mimic NC 共转染于 HFLS-RA。48 h 后检测荧光素酶活性。

**1.3 统计学处理** 使用 GraphPad Prism 9.0 版进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析及事后 SNK- $q$  检验用于多组间比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 红景天苷对 HFLS-RA 细胞中 miR-20a-5p 表达及 TIMP2 蛋白表达的影响** 与对照组相比,TNF- $\alpha$  组 miR-20a-5p 表达上调,TIMP2 蛋白表达下调( $P < 0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组相比,红景天苷组 miR-20a-5p 表达下调,TIMP2 蛋白表达上调( $P < 0.05$ );与 inhibitor NC 组、TNF- $\alpha$  组相比,miR-20a-5p 抑制物组 miR-20a-5p 表达下调,TIMP2 蛋白表达上调( $P < 0.05$ );与红景天苷 + mimic NC 组、红景天苷组相比,红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组 miR-20a-5p 表达上调,TIMP2 蛋白表达下调( $P < 0.05$ )。见图 1。

**2.2 红景天苷对各组 HFLS-RA 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平的影响** 与对照组相比,TNF- $\alpha$  组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平上调( $P < 0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组相比,红

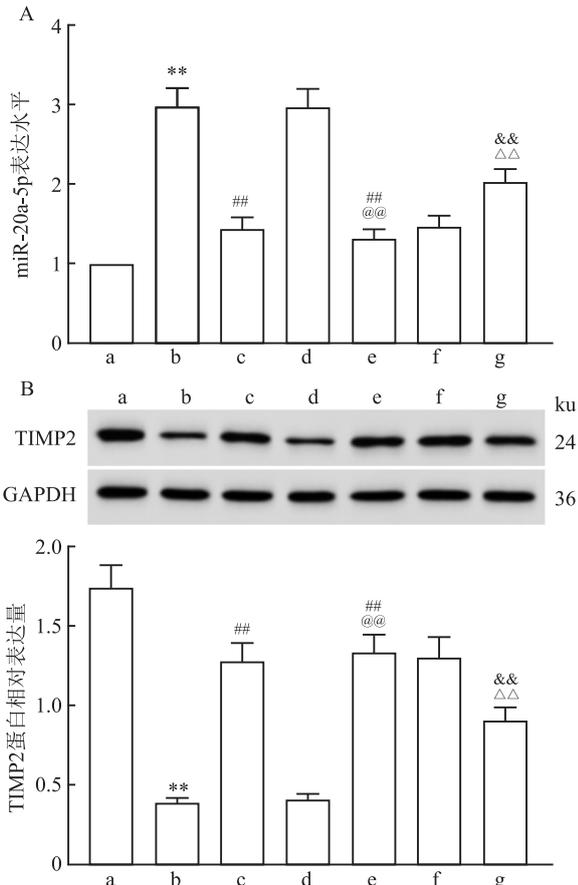


图1 各组 HFLS-RA 细胞中 miR-20a-5p 表达及 TIMP2 蛋白表达

A: qRT-PCR 检测 HFLS-RA 细胞中 miR-20a-5p 表达; B: Western blot 检测各组 HFLS-RA 细胞中 TIMP2 蛋白表达; a: 对照组; b: TNF- $\alpha$  组; c: 红景天苷组; d: inhibitor NC 组; e: miR-20a-5p 抑制物组; f: 红景天苷 + mimic NC 组; g: 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与红景天苷组比较: &&  $P < 0.01$ ; 与 inhibitor NC 组比较: @@@  $P < 0.01$ ; 与红景天苷 + mimic NC 组比较: △△△  $P < 0.01$

景天苷组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平下调 ( $P < 0.05$ ); 与 inhibitor NC 组、TNF- $\alpha$  组相比, miR-20a-5p 抑制物组 HFLS-RA 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与红景天苷组、红景天苷 + mimic NC 组比较, 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组 HFLS-RA 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.3 红景天苷对 HFLS-RA 细胞增殖的影响

与对照组相比, TNF- $\alpha$  组 OD<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率上调 ( $P < 0.05$ ); 与 TNF- $\alpha$  组相比, 红景天苷组 OD<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率下调 ( $P < 0.05$ ); 与 inhibitor NC 组、TNF- $\alpha$  组相比, miR-20a-5p 抑制物组 OD<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率下调 ( $P < 0.05$ ); 与红景天苷 + mimic NC 组、红景天苷组相比, 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组 OD<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率上调 ( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 2。

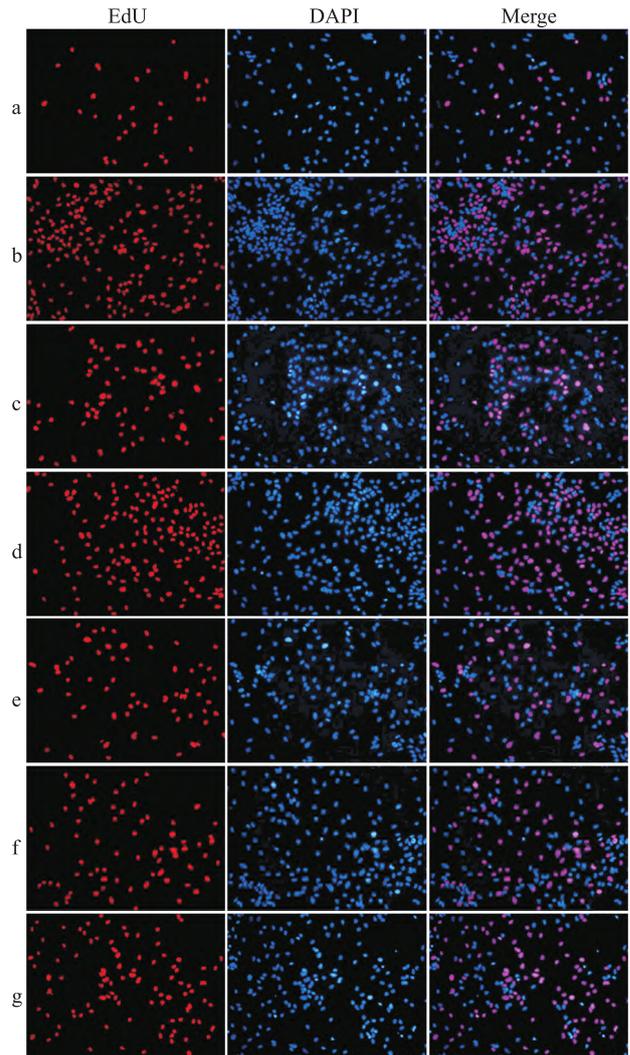


图2 EdU 染色检测 HFLS-RA 细胞增殖 ×200

a: 对照组; b: TNF- $\alpha$  组; c: 红景天苷组; d: inhibitor NC 组; e: miR-20a-5p 抑制物组; f: 红景天苷 + mimic NC 组; g: 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组

表1 各组 HFLS-RA 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平变化比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	IL-1 $\beta$ (pmol/L)	IL-6 (nmol/L)
对照	35.58 ± 1.29	1.93 ± 0.12
TNF- $\alpha$	121.22 ± 5.45 **	9.54 ± 0.46 * *
红景天苷	71.65 ± 3.03 ##	3.73 ± 0.16 ##
inhibitor NC	119.94 ± 5.33	9.69 ± 0.51
miR-20a-5p inhibitor	63.36 ± 2.85 ## @@@	3.25 ± 0.14 ## @@@
红景天苷 + mimic NC	69.94 ± 2.86	3.84 ± 0.19
红景天苷 + miR-20a-5p mimic	97.75 ± 4.11 && △△△	6.78 ± 0.25 && △△△
F 值	409.50	657.90
P 值	<0.001	<0.001

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与红景天苷组比较: &&  $P < 0.01$ ; 与 inhibitor NC 组比较: @@@  $P < 0.01$ ; 与红景天苷 + mimic NC 组比较: △△△  $P < 0.01$

表2 各组 HFLS-RA 细胞 OD<sub>450</sub> 值、EdU 阳性细胞率变化比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	OD <sub>450</sub> 值	EdU 阳性细胞率 (%)
对照	0.57 ± 0.05	25.87 ± 1.24
TNF-α	1.09 ± 0.13**	66.36 ± 2.95**
红景天苷	0.78 ± 0.07##	38.84 ± 1.83##
inhibitor NC	1.08 ± 0.12	65.95 ± 2.87
miR-20a-5p inhibitor	0.69 ± 0.06###@	33.71 ± 1.68###@
红景天苷 + mimic NC	0.79 ± 0.07	37.65 ± 1.79
红景天苷 + miR-20a-5p mimic	0.94 ± 0.08&&△△	51.12 ± 2.05&&△△
F 值	30.18	330.90
P 值	<0.001	<0.001

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 TNF-α 组比较: ## $P < 0.01$ ; 与红景天苷组比较: && $P < 0.01$ ; 与 inhibitor NC 组比较: @ $P < 0.01$ ; 与红景天苷 + mimic NC 组比较: △△ $P < 0.01$

2.4 红景天苷对 HFLS-RA 细胞迁移的影响

与对照组相比较, TNF-α 组划痕愈合率上调 ( $P < 0.05$ ); 与 TNF-α 组相比, 红景天苷组划痕愈合率下调 ( $P < 0.05$ ); 与 inhibitor NC 组、TNF-α 组相比, miR-20a-5p 抑制物组划痕愈合率下调 ( $P < 0.05$ ); 与红景天苷组、红景天苷 + mimic NC 组比较, 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组 HFLS-RA 细胞划痕愈

合率升高 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

2.5 红景天苷对 HFLS-RA 中 CyclinD1、MMP-9 蛋白的影响 与对照组相比, TNF-α 组 CyclinD1、MMP-9 蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ ); 与 TNF-α 组相比, 红景天苷组 CyclinD1、MMP-9 蛋白表达下调 ( $P < 0.05$ ); 与 inhibitor NC 组、TNF-α 组相比, miR-20a-5p 抑制物组 CyclinD1、MMP-9 蛋白表达下调 ( $P < 0.05$ ); 与红景天苷 + mimic NC 组、红景天苷组相比, 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组 CyclinD1、MMP-9 蛋白上调 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

2.6 miR-20a-5p 靶向调控 TIMP2 miR-20a-5p 与 TIMP2 有结合位点, 见图 5。miR-20a-5p 模拟物和 TIMP2-WT 共转染组荧光素酶活性低于 mimic NC 和 TIMP2-WT 共转染组 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表3 荧光素酶活性 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	TIMP2-WT	TIMP2-MUT
mimic NC	1.03 ± 0.11	1.19 ± 0.17
miR-20a-5p 模拟物	0.32 ± 0.03	1.17 ± 0.15
t 值	15.253	0.216
P 值	<0.001	0.833

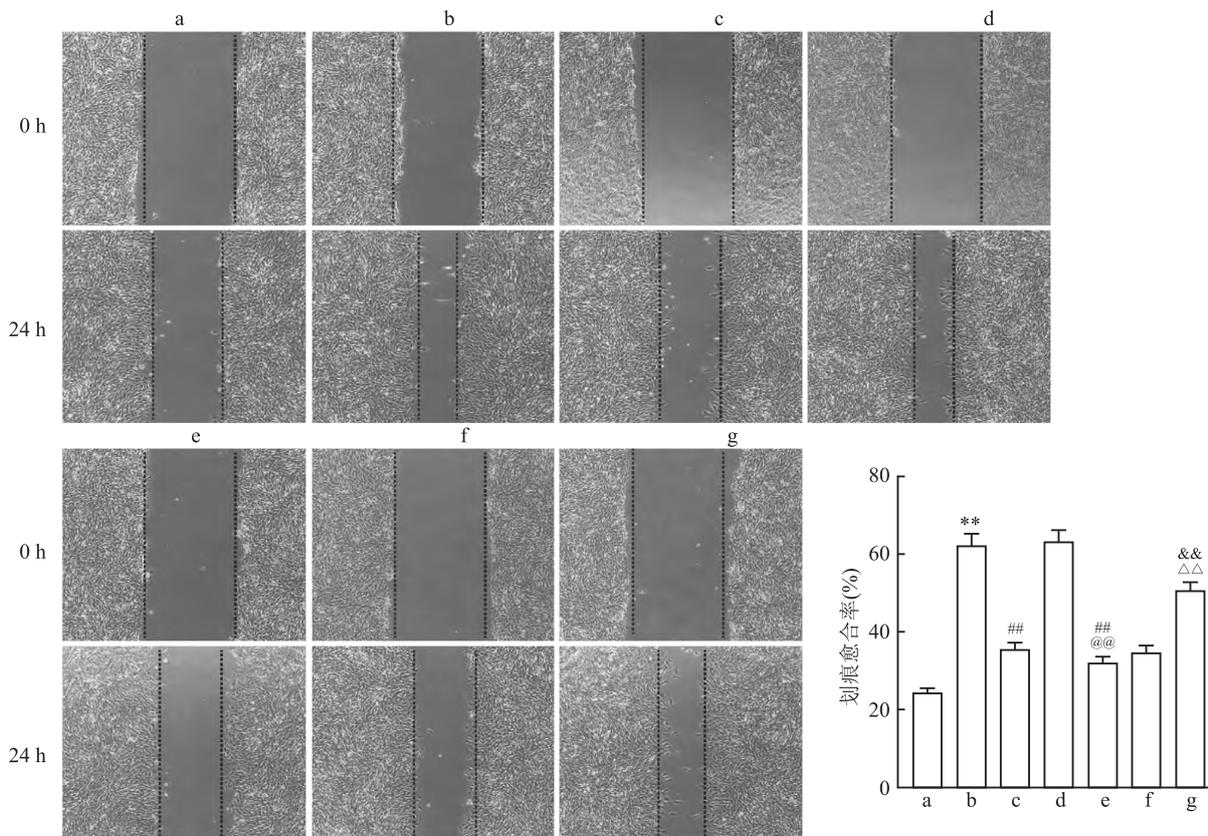


图3 划痕实验检测 HFLS-RA 细胞迁移 ×40

a: 对照组; b: TNF-α 组; c: 红景天苷组; d: inhibitor NC 组; e: miR-20a-5p 抑制物组; f: 红景天苷 + mimic NC 组; g: 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 TNF-α 组比较: ## $P < 0.01$ ; 与红景天苷组比较: && $P < 0.01$ ; 与 inhibitor NC 组比较: @ $P < 0.01$ ; 与红景天苷 + mimic NC 组比较: △△ $P < 0.01$

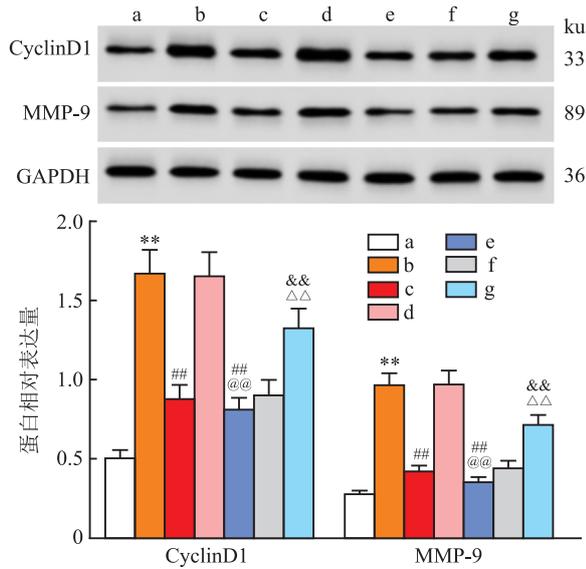


图4 Western blot检测HFLS-RA细胞中CyclinD1、MMP-9蛋白表达

a: 对照组; b: TNF- $\alpha$  组; c: 红景天苷组; d: inhibitor NC 组; e: miR-20a-5p 抑制物组; f: 红景天苷 + mimic NC 组; g: 红景天苷 + miR-20a-5p 模拟物组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与红景天苷组比较: &&  $P < 0.01$ ; 与 inhibitor NC 组比较: @@  $P < 0.01$ ; 与红景天苷 + mimic NC 组比较: ΔΔ  $P < 0.01$



图5 miR-20a-5p与TIMP2结合位点图

### 3 讨论

临床上, RA 是最普遍的严重慢性炎症性自身免疫性疾病, 伴随着疼痛, 肿胀和滑膜关节损伤, 给患者及其家人的生活带来极大的不便。HFLS-RA 细胞作为人类 RA 过程中的主要效应细胞之一, 其病理变化在慢性持续性炎症和关节破坏中起关键作用<sup>[10]</sup>。HFLS-RA 细胞在 RA 病理过程中具有异常增殖和迁移的特征, 此外, HFLS-RA 还可分泌多种促炎细胞因子(如 IL-1 $\beta$ 、IL-6), 诱导炎症细胞浸润, 最终导致进行性关节破坏和功能障碍<sup>[11]</sup>。因此, 抑制 HFLS-RA 增殖、迁移和过度产生炎症细胞因子可能是 RA 治疗的一种有效的策略。红景天苷是红景天的生物活性成分, 具有抗炎、抗癌和免疫调节的作用。据文献<sup>[12]</sup>报道, 红景天苷可通过抑制炎症抑制

骨关节炎的发展; 红景天苷可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖与迁移<sup>[13]</sup>。在该研究中, 实验使用 TNF- $\alpha$  刺激的 HFLS-RA 在体外模拟 RA 的发展, 结果显示, 红景天苷可降低 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平, 抑制细胞增殖及迁移能力, 并抑制增殖相关蛋白 CyclinD1 及迁移相关蛋白 MMP-9 表达, 表明红景天苷可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应, 提示红景天苷可能成为治疗 RA 的有效药物之一。

近年来关于红景天苷通过调控 miRNA 表达来影响疾病进展的研究有很多。如红景天苷通过上调 miR-103-3p 表达抑制非小细胞肺癌细胞增殖和迁移<sup>[14]</sup>。该研究表明, 在 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞中 miR-20a-5p 呈高表达, 下调 miR-20a-5p 可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应, 此外, 红景天苷可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞中 miR-20a-5p 表达, 推测红景天苷抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应可能是通过抑制 miR-20a-5p 实现的。为了验证上述推测是合理的, 该实验用 miR-20a-5p 模拟物进行了回复实验, 结果显示, miR-20a-5p mimic 减弱了红景天苷对 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应的抑制作用, 研究表明红景天苷通过抑制 miR-20a-5p 表达抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应。

miRNA 可通过与靶基因的 3'-UTR 结合参与疾病的发生和进展。为了进一步探究红景天苷调控 miR-20a-5p 表达抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应的分子机制, 该研究表明 TIMP2 为 miR-20a-5p 的靶基因。TIMP2 是最丰富的 TIMP 家族成员, 其在正常和患病哺乳动物组织中普遍存在, 对于维持组织稳态至关重要。已有研究<sup>[15]</sup>表明, 增加 TIMP2 表达可抑制 FLS 的体外增殖、迁移, 进而改善 RA。研究表明 TIMP2 是 RA 的保护因子。该研究表明, 在 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞中 TIMP2 蛋白呈低表达状态; 抑制 miR-20a-5p 后, TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 中 TIMP2 蛋白升高, 且红景天苷可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞中 miR-20a-5p 表达, 促进 TIMP2 蛋白表达, 表明红景天苷可能通过调控 miR-20a-5p/TIMP2 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应。

综上所述, 红景天苷抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HFLS-RA 细胞增殖、迁移及炎症反应的分子机制可能与调控 miR-20a-5p/TIMP2 有关。

## 参考文献

- [1] Dai L P, Xu X D, Yang T T, et al. SPTBN1 attenuates rheumatoid arthritis synovial cell proliferation, invasion, migration and inflammatory response by binding to PIK3R2 [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2022,10(12):1-12.
- [2] Nygaard G, Firestein G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020,16(6):316-33.
- [3] Zhang C, Ma K, Yang Y, et al. Glaucocalyxin A suppresses inflammatory responses and induces apoptosis in TNF- $\alpha$ -induced human rheumatoid arthritis *via* modulation of the STAT3 pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2021,341(1):109451-8.
- [4] Xu Z, Shang W, Zhao Z, et al. Curcumin alleviates rheumatoid arthritis progression through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Bioengineered*, 2022,13(5):12899-911.
- [5] 郑洋洋. 红景天苷对 TNF- $\alpha$  诱导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调控作用及其意义 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.
- [6] Liao W, He J, Disoma C, et al. Hsa\_circ\_0107593 suppresses the progression of cervical cancer *via* sponging hsa-miR-20a-5p/93-5p/106b-5p [J]. *Front Oncol*, 2021,10(1):590627-39.
- [7] Gaafar N A G, Aslani M, Aghazadeh Z, et al. The oral administration effect of drug mannuronic acid (M2000) on gene expression of matrix and tissue inhibitor of metalloproteinases in rheumatoid arthritis patients [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2020,17(5):704-10.
- [8] 孟庆良, 孟婉婷, 卞华, 等. 大黄素对 TNF- $\alpha$  诱导的类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响 [J]. *中成药*, 2021,43(2):480-4.
- [9] 郑洋洋, 代东雪, 潘志, 等. 红景天苷对 TNF- $\alpha$  诱导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的抑制作用及其意义 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017,43(3):485-90.
- [10] Wu C, Wei J, Ge S, et al. Effects of swertiamarin, gentiopicrin and sweroside on cell apoptosis and expression of Bcl-2 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chin Med J*, 2021,46(1):406-11.
- [11] Pan L, Sun Y, Jiang H, et al. Total saponins of radix clematis regulate fibroblast-like synoviocyte proliferation in rheumatoid arthritis *via* the LncRNA OIP5-AS1/miR-410-3p/Wnt7b signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022,2022:8393949.
- [12] Chen D, Lu D, Liu H, et al. Pharmacological blockade of PCAF ameliorates osteoarthritis development *via* dual inhibition of TNF- $\alpha$ -driven inflammation and ER stress [J]. *EBioMedicine*, 2019,50(1):395-407.
- [13] 蔡翔, 何亚男, 李伶华, 等. 红景天苷调节 miR-26a-5p/JAG1/Notch-1 信号轴对瘢痕疙瘩成纤维细胞生物学功能的影响 [J]. *河北医药*, 2023,45(9):1291-6.
- [14] Zhu X, Liu D, Wang Y, et al. Salidroside suppresses nonsmall cell lung cancer cells proliferation and migration *via* microRNA-103-3p/Mzb1 [J]. *Anticancer Drugs*, 2020,31(7):663-71.
- [15] Wang J, Tie N, Li H, et al. Inhibitory effect of tetramerized single-chain variable fragment of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies on the proliferation, activation, and secretion of cytokines of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis *in vitro* co-culture system [J]. *Inflammation*, 2020,43(6):2245-55.

## Effects of salidroside on proliferation and migration of fibroblastoid synovial cells in rheumatoid arthritis by regulating miR-20a-5p/TIMP2 axis

Zhu Guangzhao<sup>1</sup>, Fang Lu<sup>2</sup>, Yan Jie<sup>1</sup>, Li Qin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Rheumatology, Qinghai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xining 810000;

<sup>2</sup>Medical College of Qinghai University, Xining 810016)

**Abstract Objective** To investigate effect of salidroside on the function and activation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte (HFLS-RA) by regulating the miR-20a-5p/tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP2) axis. **Methods** HFLS-RA cells were used as the research object. HFLS-RA cells were separated into control group, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) group, salidroside group, inhibitor NC group, miR-20a-5p inhibitor group, salidroside + mimic NC group, and salidroside + miR-20a-5p mimic group. qRT-PCR was applied to detect the expression of miR-20a-5p in HFLS-RA cells; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 in the supernatant of HFLS-RA cells; cell counting kit-8 (CCK-8) method and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining were applied to detect HFLS-RA cell proliferation; scratch experiment was applied to detect HFLS-RA cell migration; Western blot was applied to detect the expression of TIMP2, CyclinD1, and matrix metalloproteinase (MMP)-9 proteins in HFLS-RA cells; double luciferase was applied to verify the relationship between miR-20a-5p and TIMP2. **Results** Compared with the control

网络出版时间:2024-05-06 14:29:36 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240429.1132.010

## 过表达 sFRP3 对小鼠原代心肌成纤维细胞活化增殖的影响

江舜祥<sup>1</sup>, 涂彬<sup>1</sup>, 宋凯<sup>1</sup>, 何缓缓<sup>1</sup>, 陶辉<sup>2</sup>, 曹炜<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 Wnt 信号通路调控剂分泌型卷曲相关蛋白 3 (sFRP3) 在小鼠心肌成纤维细胞 (CFs) 活化增殖中的作用。方法 购入 1~3 d 的小鼠乳鼠, 行手术对心脏取材, 消化后分离 CFs 进行培养。细胞贴壁生长后使用转化生长因子 (TGF- $\beta$ 1) 刺激构建 CFs 活化增殖模型; 确认模型构建成功后分别向实验组和对照组细胞转染 sFRP3 过表达质粒和空载质粒 24~48 h。通过 Western blot、qRT-PCR 的方法在分子层面对 sFRP3、Periostin (POSTN)、I 型胶原 (Collagen I) 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达进行检测; 使用 MTT 法、CCK-8 法和 EdU 染色法检测细胞增殖能力的改变。结果 在 TGF- $\beta$ 1 刺激构建的 CFs 活化增殖模型中, 相较于对照

组, 模型组 sFRP3 蛋白及 mRNA 表达下降, 活化增殖相关蛋白 PCNA、POSTN 和 Collagen I 表达上调。另外, 在质粒转染 sFRP3 过表达组的 CFs 中, PCNA、POSTN 和 Collagen I 蛋白及 mRNA 表达相较于空载组下降。MTT、CCK-8 与 EdU 实验表明, 质粒转染 sFRP3 过表达组的 CFs 增殖活性较空载组明显下降。结论 过表达 sFRP3 明显抑制 CFs 活化增殖, 提示 sFRP3 可能是参与调控 CFs 活化增殖的关键基因。

**关键词** sFRP3; 心肌成纤维细胞; 心肌纤维化; 活化; 增殖

**中图分类号** R 331.3; R 322.1; R 361

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0809-06  
**doi**: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.010

2024-02-20 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目 (编号: 202104j0702-0037); 安徽省高校优秀青年科研项目 (编号: 2023AH-030116); 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2021A0313)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第二附属医院胸外科, 合肥 230601

<sup>2</sup> 安徽医科大学第二附属医院麻醉与围手术期医学科, 合肥 230601

作者简介: 江舜祥, 男, 硕士研究生;

曹炜, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 13514964858@qq.com

心肌纤维化是一种慢性间质性心脏病, 它几乎发生在所有形式的心脏病终末期, 同时它也是各类心血管疾病的共同病理生理过程的一种<sup>[1]</sup>; 过度的心肌纤维化可引起心肌收缩力改变等一系列心脏功能改变<sup>[2]</sup>。心肌纤维化主要是以心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 的过度增殖及细胞外基质的过度累积作为病理学特征<sup>[3-4]</sup>; CFs 作为这一过程的靶细胞, 其活化增殖过程一直是近些年来深入研究心肌纤维化过程中的重点<sup>[5]</sup>。

group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6, OD<sub>450</sub> value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and the expression of CyclinD1 and MMP-9 proteins in the TNF- $\alpha$  group increased, the expression of TIMP2 protein decreased ( $P < 0.05$ ); compared with the TNF- $\alpha$  group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6, OD<sub>450</sub> value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and CyclinD1 and MMP-9 proteins expression decreased, the expression of TIMP2 protein increased in salidroside group ( $P < 0.05$ ); compared with the TNF- $\alpha$  group and inhibitor NC group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6, OD<sub>450</sub> value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and the expression of CyclinD1 and MMP-9 proteins in the miR-20a-5p inhibitor group decreased, the expression of TIMP2 protein increased ( $P < 0.05$ ); compared with the salidroside group and the salidroside + mimic NC group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6, OD<sub>450</sub> value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and the expression of CyclinD1 and MMP-9 proteins in the salidroside + miR-20a-5p mimic group increased, the expression of TIMP2 protein decreased ( $P < 0.05$ ). There was a targeted regulatory relationship between miR-20a-5p and TIMP2. **Conclusion** Salidroside may inhibit TNF- $\alpha$ -induced HFSLs-RA cell proliferation, migration and inflammatory response by regulating miR-20a-5p/TIMP2.

**Key words** salidroside; miR-20a-5p; tissue inhibitor of metalloproteinase-2; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocyte; proliferation; migration