

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20241029004

雷藤舒调控滑膜关节相关长链非编码 RNA2 在胶原诱导性关节炎小鼠中的作用机制研究

许林帅¹, 金晔华¹, 朱小霞², 常 岑¹, 何秉恒³

1. 上海中医药大学附属光华医院风湿科(上海 200052); 2. 复旦大学附属华山医院风湿免疫科(上海 200040); 3. 上海交通大学医学院附属同仁医院康复科(上海 200336)

【摘要】 目的 探讨滑膜关节相关长链非编码 RNA2(WAKMAR2)对胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠滑膜炎的影响及雷藤舒(T8)的干预作用机制。方法 将小鼠随机分为正常组(WT组)、CIA 模型组(CIA 组)、过表达空载体组(CIA-NC 组)、过表达慢病毒组(CIA-LV 组)、T8 给药组(CIA+T8 组)、过表达空载体后的 T8 给药组(CIA-NC+T8 组)、过表达慢病毒后的 T8 给药组(CIA-LV+T8 组), 每组 8 只。除正常组外, 其余组构建小鼠 CIA 模型, 并在 CIA-LV 组、CIA-LV+T8 组小鼠膝关节腔注射 WAKMAR2 过表达慢病毒, 连续注射 3 周, 每周注射 1 次; CIA 组只进行羟丙基甲基纤维素(HPMC)灌胃; CIA+T8 组、CIA-NC+T8 组、CIA-LV+T8 组均进行 T8 灌胃, 灌胃自第 28 天开始, 为期 4 周。通过活体成像确定病毒转染效率; 通过酶联免疫吸附分析(ELISA)检测各组小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)的含量; 使用小动物计算机断层扫描仪(Micro-CT)观察小鼠足爪关节的骨破坏程度; 通过实时逆转录 PCR 检测滑膜关节 WAKMAR2 和微小 RNA-4478(miR-4478)的表达; 通过 Western blot 检测 E2F 转录因子 1(E2F1)和 p53 蛋白的表达。结果 ①活体成像结果显示 WAKMAR2 过表达慢病毒注射后在小鼠膝关节部位高表达; ②与 CIA 组和 CIA-NC 组相比, CIA-LV 组小鼠的一般情况及关节炎指数明显改善, 血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的表达明显降低, WAKMAR2 mRNA 表达升高, miR-4478 mRNA 表达降低, E2F1 和 p53 的蛋白表达均明显升高; ③与 CIA+T8 组和 CIA-NC+T8 组相比, CIA-LV+T8 组的关节炎指数明显改善, 血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的表达明显降低, WAKMAR2 mRNA 表达升高, miR-4478 mRNA 表达降低, E2F1 和 p53 的蛋白表达均明显升高。结论 过表达 WAKMAR2 可改善 CIA 小鼠关节滑膜炎微环境, 可作为治疗类风湿性关节炎(RA)的潜在靶点。T8 可通过调控 WAKMAR2/miR-4478/E2F1/p53 轴降低 CIA 小鼠的炎症水平。该结果为 RA 的治疗策略提供了新的研究方向, 并为 T8 的临床应用奠定了理论基础。

【关键词】 类风湿性关节炎; 胶原诱导性关节炎; 雷藤舒; 雷公藤; 作用机制; 中药研究

Mechanistic study on regulation of wide-interacting nude-associated matrix-associated region 2 by 5R-5-hydroxytriptolide (LLDT-8) in collagen-induced arthritis mice

XU Linshuai¹, JIN Yehua¹, ZHU Xiaoxia², CHANG Cen¹, HE Bingheng³

1. Department of Rheumatology, Guanghua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200052; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040; 3. Rehabilitation Department, Tongren Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074234)

[作者简介] 许林帅, 男, 硕士研究生, 主要从事中医药防治风湿病研究工作

[通信作者] 何秉恒, 住院医师; E-mail: hhebingheng@126.com

Abstract: Objective This study investigates the effect of wide-interacting nude-associated matrix-associated region 2 (WAKMAR2) on synovial inflammation and bone destruction in collagen-induced arthritis (CIA) mice, as

well as the mechanism of intervention by 5R-5-hydroxytriptolide (LLDT-8, T8). **Methods** The mice were randomly divided into the normal group (WT group), the CIA model group (CIA group), the overexpression empty vector group (CIA-NC group), the overexpression lentivirus group (CIA-LV group), the T8 administration group (CIA+T8 group), the T8 administration group after overexpression empty vector (CIA-NC+T8 group), and the T8 administration group after overexpression lentivirus (CIA-LV+T8 groups), 8 in each group. Except for the normal group, the CIA models of mice were constructed in the other groups, and WAKMAR2-overexpressing lentivirus was injected into the knee joint cavity of mice in CIA-LV group and CIA-LV+T8 group. The virus was injected continuously for 3 weeks, once a week. The CIA group only received intragastric administration of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). The CIA+T8 group, the CIA-NC+T8 group and the CIA-LV+T8 group all received T8 gavage. The gavage began on the 28th day and lasted for 4 weeks. *In vivo* imaging was used to determine viral transfection efficiency. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), and interleukin-6 (IL-6) in mouse blood was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay. The degree of joint bone destruction in mouse paws was observed using Micro-CT. Real-time quantitative PCR was used to measure the expression of WAKMAR2 and microRNA-4478 (miR-4478). Western blot was used to detect the expression of E2F1 and p53 proteins. **Results** ① *In vivo* imaging demonstrated high expression of WAKMAR2 after lentiviral injection in the knee joints of mice. ② Compared to the CIA group and CIA-NC group, the CIA-LV group showed significant improvement in general condition and arthritis inflammation index, with decreased expression of TNF- α , IL-1, and IL-6 in serum, increased mRNA levels of WAKMAR2, decreased mRNA levels of miR-4478, and elevated protein expression of E2F transcription factor 1 (E2F1) and p53. ③ Compared to CIA+T8 group and CIA-NC+T8 group, CIA-LV+T8 group showed significant improvement in general condition and arthritis inflammation index, with decreased expression of TNF- α , IL-1, and IL-6 in serum, increased mRNA levels of WAKMAR2, decreased mRNA levels of miR-4478, and elevated protein expression of E2F1 and p53. **Conclusions** Overexpression of WAKMAR2 can improve the synovial inflammation microenvironment in CIA mice and may serve as a potential target for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). T8 can inhibit inflammation levels in CIA mice by regulating the WAKMAR2/miR-4478/E2F1/p53 axis. These findings provide new directions for RA treatment strategies and establish a theoretical foundation for future clinical applications.

Keywords: rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; 5R-5-hydroxytriptolide; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; mechanism of action; Chinese materia medica research

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)以关节滑膜增生、软骨破坏和软骨下骨侵蚀为主要病理改变的慢性全身性自身免疫性疾病,其中以滑膜炎症为主要病理改变^[1]。中国的RA患病率为0.32%~0.36%,且女性多于男性^[2],如未适当治疗,其高致残率严重影响患者的生活质量^[3]。目前,RA发病机制尚不完全明确,遗传易感因素、环境因素及免疫系统失调等均可导致RA发病。常见治疗RA的药物包括非甾体类消炎药(NSAIDs)、改善病情的抗风湿药物(DMARDs)、糖皮质激素(GC)及生物制剂等,但不良反应较多,易产生耐药性^[4]。

中医药作为补充和替代医学的重要组成部分,近年来,在世界范围内已被广泛应用于多种慢性疾病的预防和控制^[5]。中药具有多成分、多靶点、多通路的特点,广泛运用于关节炎的临床治疗^[6]。雷藤舒又称(5R)-5-羟基雷公藤内酯醇(5R-5-hydroxytriptolide, LLDT-8, 简称T8)是由中国科学院上海药物研究所从雷公藤中提取分离、修饰优化得到的一种全新结构的二萜类化合物^[7],其在保留了免疫抑制活性的同时毒副作用大大降低,使T8安全有效运用于临床成为可能,有望成为治疗RA的新

型免疫抑制剂^[8]。

课题组前期研究^[8]发现,滑膜关节相关长链非编码RNA2(WAKMAR2)在RA滑膜成纤维细胞(RA-FLS)中表达降低。过表达WAKMAR2可以抑制RA-FLS的增殖和侵袭,减少基质金属蛋白酶(MMP)及炎症因子的表达,并增强T8抑制RA-FLS增殖的能力,进一步降低MMP-1、MMP-3及白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)的表达。同时,WAKMAR2过表达和T8处理均可减弱微小RNA-4478(miR-4478)对E2F转录因子1(E2F1)和p53的表达抑制作用,并逆转miR-4478对RA-FLS的影响^[8]。然而,WAKMAR2在体内的作用及T8的具体机制尚不清楚,因此有必要进一步研究WAKMAR2及T8在RA发生发展中的作用。因此,本研究将通过构建胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠模型,探讨WAKMAR2在CIA小鼠中的作用及T8的干预机制,为进一步研究WAKMAR2在RA发病机制及T8在RA中的作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 56只无特定病原体(SPF)级雄性

DBA/1J 小鼠, (20±2)g, 7~8 周龄, 购于上海斯莱克实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2022-0004。动物饲养及实验均在上海中医药大学动物实验中心 SPF 级动物房(温度 21~24 °C, 湿度 50%~60%, 明/暗周期 12 h/12 h)开展, 实验动物使用许可证号: SYXK(沪)2020-0009。实验遵循上海中医药大学动物伦理委员会审批的试验方案, 伦理编号为 PZSHUTCM210108007。

1.1.2 病毒构建 选用上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建的慢病毒载体, 元件顺序为: Ubi-MCS-SV40-firefly_Luciferase-IRES-Puromycin, 载体名称为 CV146(干扰 WAKMAR2 基因, 同时表达荧光素酶), 便于后续小鼠体内过表达慢病毒转染效率的观察。

1.1.3 药物与试剂 T8 的分子量为 376.39, 由中国科学院上海生物化学研究所药物化学教研室提供, 纯度为 99%。T8 药物制备: 1 mg 的 T8 溶于 20 mL 的 0.2% 羟丙基甲基纤维素(HPMC)溶液, 振荡搅拌 1 h 以上, 使其充分溶解, 给药浓度为 0.05 g/L。p53 抗体、E2F1 抗体(批号分别为 21891-1-AP、12171-1-AP), 武汉三鹰生物技术有限公司; IL-1、IL-6、TNF- α 酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(批号分别为 PI301、PI326、PT512), 上海碧云天生物技术股份有限公司; 逆转录试剂盒(批号 RR037a), 日本 Takara 公司。

1.1.4 主要仪器 活体成像仪、Micro-CT 扫描机(型号分别为 In Vivo-Xtreme、SKYSCAN 1276), 德国 Bruker 公司; Western blot 电泳转膜仪(型号: PowerPac TMHC), 美国 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪(型号: 7900HT Fast), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 酶标仪(型号: Molecular spectra M5), 美国 Molecular Devices 公司; 荧光正置显微镜(型号: BX53), 日本 Olympus 公司。

1.2 造模、分组与干预

1.2.1 CIA 模型构建 适应性饲养 1 周后, 进行第一次免疫, 于当天进行 II 型胶原乳化剂的制备及注射。将小鼠放入固定的鼠笼内, 用体积分数 75% 酒精清洁小鼠尾部, 在距小鼠尾根部 2 cm 的地方皮下注射 0.1 mL 的胶原乳化液。在第一次免疫 21 d 后进行二次免疫, 将 3 g/L 的 II 型胶原与不完全佐剂(IFA)按 1:1 的比例进行混合后完全乳化。对 CIA 小鼠自第 21 天开始进行 3 d/次关节炎指数评分, 并严格参照评分标准(表 1), 小鼠每只足爪的关节炎指数评分为 0~4 分。

表 1 关节炎指数评分标准

评分	指征
1分	单个点轻度软骨破坏
2分	局部的轻到中度软骨破坏
3分	一定范围的软骨侵蚀
4分	广泛的软骨破坏

1.2.2 分组与干预 在第一次免疫前随机取 8 只小鼠作为正常组(WT 组), 其余 48 只小鼠构建 CIA 模型及处理组, 并以每组 8 只随机分为 CIA 模型组(CIA 组)、过表达空载体组(CIA-NC 组)、过表达慢病毒组(CIA-LV 组)、T8 给药组(CIA+T8 组)、过表达空载体后的 T8 给药组(CIA-NC+T8 组)、过表达慢病毒后的 T8 给药组(CIA-LV+T8 组)。除正常组外, 其余组构建小鼠 CIA 模型, 并在 CIA-LV 组、CIA-LV+T8 组小鼠膝关节腔注射 WAKMAR2 过表达慢病毒, 病毒连续注射 3 周, 每周注射 1 次; CIA 组只进行 HPMC 灌胃; CIA+T8 组、CIA-NC+T8 组、CIA-LV+T8 组均进行 T8 灌胃, 灌胃自第 28 天开始, 为期 4 周。

1.2.3 取材与处理 于第 58 天处理小鼠, 用异氟烷麻醉小鼠后摘眼球取血置于 1.5 mL 离心管并放于 4 °C 冰箱保存; 取小鼠的膝关节, 剔除肌肉、皮肤等周围组织; 取小鼠双侧膝关节滑膜, 放液氮快速冷冻后, -80 °C 冰箱保存留用。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 小鼠活体成像实验 为明确小鼠体内合适的膝关节腔注射浓度和剂量, 随机抽取 2 只小鼠, 采用带有荧光素酶的过表达慢病毒注射小鼠单侧膝关节腔, 寻找转染效率最好的浓度; 每周 1 次, 连续注射 3 周, 第 3 周后在苯巴比妥全麻下, 对小鼠进行活体成像检测, 观察病毒的表达情况。

1.3.2 酶联免疫吸附分析(ELISA) 试剂盒从 4 °C 冰箱取出, 室温放置 20 min; 制备不同浓度梯度标准品, 混匀后放置 10 min, 即用即配; 于每孔内加入 100 μ L 的显色底物, 室温避光孵育 30 min; 加入 100 μ L 的终止液, 混匀板孔内所有试剂, 颜色逐渐由蓝变黄; 利用酶标仪检测样品吸光度; 测定 570 nm 波长下的光密度(OD), 并进行统计分析。

1.3.3 Western blot 实验 使用 10% Novex Tris-甘氨酸预制胶(Tris-Glycine)。组装电泳槽并加 1 \times 电泳缓冲液至液面平齐, 确保液体覆盖样品孔。移除梳子后, 加入 1.5 μ L 蛋白 Marker 及各蛋白样品 20 μ L。切取胶块并浸入纯水中, 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜活化后, 将膜按“三明治”顺序夹紧进行转膜。体积分

数 5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 60 min;一抗(p53 抗体、E2F1 抗体)孵育过夜;洗膜 5 次,每次 5 min;二抗孵育 1 h,再洗膜 5 次。增强型化学发光试剂(ECL)显色,自动成像,保存并用 ImageJ 软件分析。

1.3.4 实时逆转录 PCR(RT-qPCR) 使用 RNA 提取试剂盒处理滑膜组织获得 RNA,反转录获得 cDNA,进行 RT-qPCR 检测 WAKMAR2、miR-4478 的 mRNA 水平,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各 mRNA 相对表达量。引物序列详见表 2。

表 2 引物序列

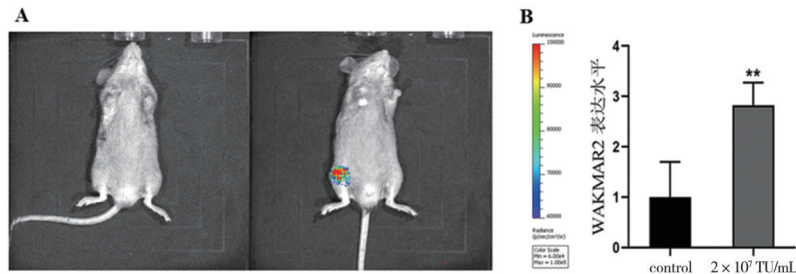
基因	引物序列
WAKMAR2	上游:5'-GGCCTCAGTGAGGTAATCG-3'
	下游:5'-CATACCACTACACTCCAGC-3'
miR-4478	上游:5'-AGGGCTAGTGGAAGACCT-3'
	下游:5'-CCTTCCTGATCGGGACATCG-3'
GAPDH	上游:5'-AACTTGGCATGTGGAAGG-3'
	下游:5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'

注:WAKMAR2为滑膜关节相关长链非编码RNA2基因,miR-4478为微小RNA-4478基因,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 9.3.0 软件进行数据的统计分析和绘图。其中符合正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组之间比较采用 LSD-*t* 检验,两组间计量资料的比较采用两独立样本的 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内病毒转染效率检测 体外研究测定过表达 WAKMAR2 滴度为 4×10^8 TU/mL。将携带荧光 Luc 的慢病毒载体注射小鼠膝关节,进行慢病毒注射量的摸索。活体成像结果显示,当关节病毒用量 $>2\times 10^7$ TU/mL 时即可成功在小鼠膝关节内表达,见图 1A。通过 RT-qPCR 检测小鼠膝关节 WAKMAR2 表达量,与对照组(control)相比, 2×10^7 TU/mL 的 WAKMAR2 注射组 WAKMAR2 的表达量明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1B。



注:WAKMAR2为滑膜关节相关长链非编码RNA 2,control为对照组。A为小鼠活体成像图,左图小鼠膝关节注射磷酸盐缓冲溶液,右图小鼠膝关节注射过表达慢病毒;B为慢病毒转染前后 WAKMAR2 相对表达情况。* $P<0.01$; $n=3, \bar{x}\pm s$ 。

图 1 病毒转染效率检测

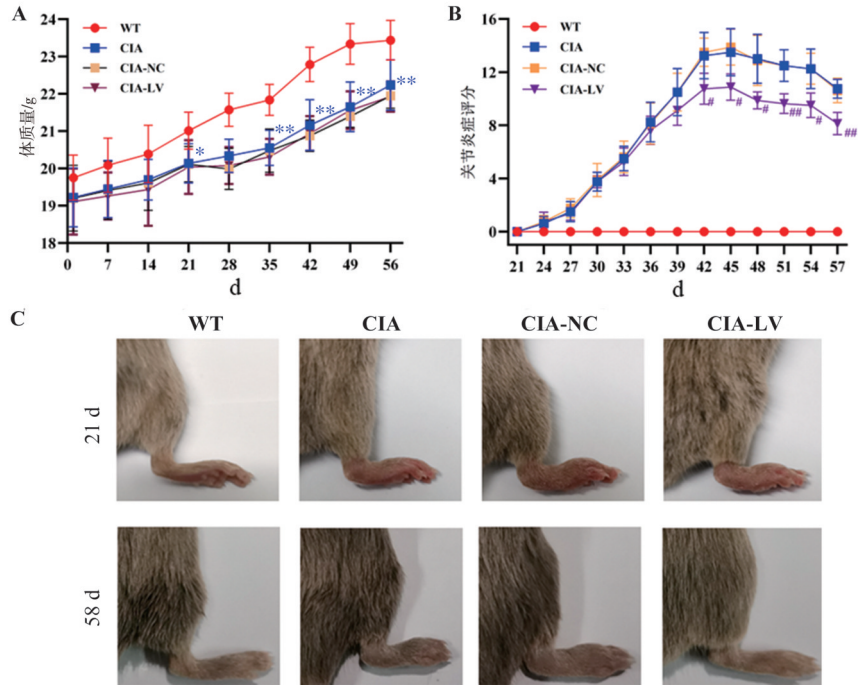
2.2 过表达 WAKMAR2 对 CIA 小鼠一般情况及关节炎指数的影响 与 WT 组相比,CIA 组小鼠毛发欠光泽呈灰暗色,部分有竖毛现象,精神萎靡不振,下肢有跛行甚至拖行现象,活动量明显减少,进食量也减少。CIA-NC 组与 CIA 组小鼠状况相似,均精神不振。CIA-LV 组小鼠毛发光泽润滑程度较好,有跛行但程度较轻,精神状态较好,活动量及进食量有改善。

与 WT 组相比,CIA 组的体质量在造模后呈现下降趋势,21 d 后体质量下降明显,差异具有统计学意义($P<0.05$);与 CIA 组和 CIA-NC 组相比,CIA-LV 组体质量下降,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2A。WT 组未见关节炎表现,CIA 组、CIA-NC 组与 CIA-LV 组的关节炎指数评分自第 21 天逐渐上升,在第 42 天至 45 天达到顶峰,之后缓慢下降。与 CIA 组相比,CIA-NC 组小鼠关节炎评分相似,差异无统

计学意义($P>0.05$)。与 CIA 组比较,CIA-LV 组小鼠的关节炎指数从第 42 天开始明显降低且差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2B。各组足爪肿胀情况见图 2C。

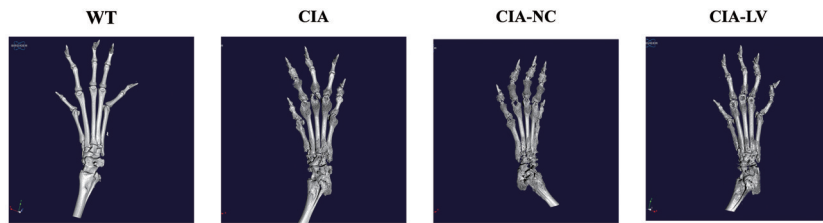
2.3 过表达 WAKMAR2 对 CIA 小鼠关节组织形态的影响 对各组小鼠足爪关节 Micro-CT 扫描分析发现,WT 组小鼠足爪骨组织表面光滑完整,未发现骨侵蚀现象,CIA 组小鼠踝关节、足爪关节均出现严重的骨破坏,在各个关节处均出现明显的侵蚀。CIA-NC 组小鼠足爪关节骨侵蚀状况与 CIA 组无明显差异,均出现足爪关节的变形;而 CIA-LV 组小鼠虽然同样出现足爪关节侵蚀,但程度较 CIA 组与 CIA-NC 组明显减轻,见图 3。

2.4 过表达 WAKMAR2 对 CIA 小鼠血清炎症因子的影响 采用 ELISA 检测 IL-1、IL-6、TNF- α 的表达



注:WT为正常组,CIA为胶原诱导性关节炎模型组,CIA-NC为过表达空载体组,CIA-LV为过表达慢病毒组。A为过表达WAKMAR2对小鼠体质量的影响,B为各组关节炎评分比较,C为各组小鼠足爪肿胀度。与WT比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与CIA比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,n=6, $\bar{x} \pm s$ 。

图2 过表达WAKMAR2对CIA小鼠体质量及关节炎、肿胀度的影响

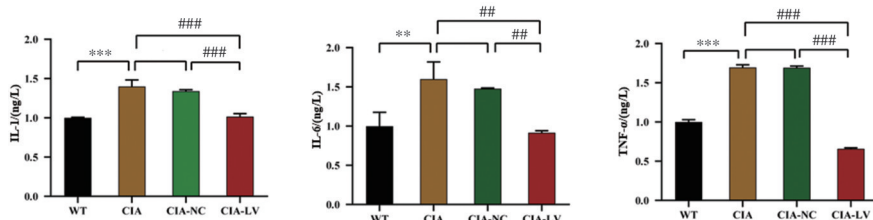


注:WT为正常组,CIA为胶原诱导性关节炎模型组,CIA-NC为过表达空载体组,CIA-LV为过表达慢病毒组。

图3 小鼠足爪关节Micro-CT扫描图

水平,见图4。与WT组相比,CIA组的IL-1、IL-6、TNF- α 的表达水平显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与CIA组相比,CIA-NC组IL-1、IL-6、TNF- α 的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$);与CIA组

和CIA-NC组相比,CIA-LV组IL-1、IL-6、TNF- α 的表达水平显著下降($P < 0.05$),提示过表达WAKMAR2后,CIA小鼠的炎症水平降低。



注:WT为正常组,CIA为胶原诱导性关节炎模型组,CIA-NC为过表达空载体组,CIA-LV为过表达慢病毒组。IL为白细胞介素,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α 。与WT比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与CIA比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;n=6, $\bar{x} \pm s$ 。

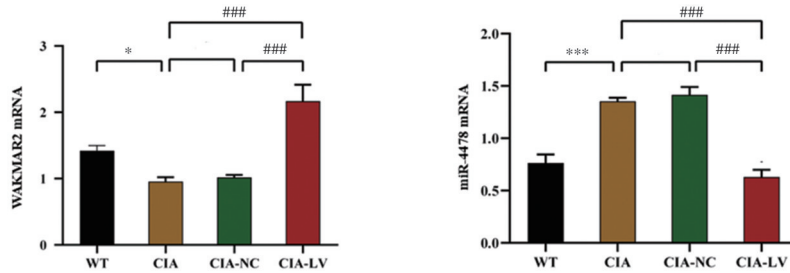
图4 各组小鼠血清炎症因子表达情况

2.5 过表达WAKMAR2对下游基因miR-4478、E2F1、p53表达的影响 采用RT-qPCR测定CIA模

型小鼠滑膜中WAKMAR2、miR-4478的表达,见图5。与WT组相比,CIA组中WAKMAR2表达降低($P <$

0.05), miR-4478 表达升高 ($P<0.05$), 差异有统计学意义; 与 CIA 组和 CIA-NC 组相比, WAKMAR2 在 CIA-LV 组内高表达, 差异有统计学意义 ($P<0.05$);

同时与 CIA 组和 CIA-NC 组相比, CIA-LV 组 miR-4478 表达降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

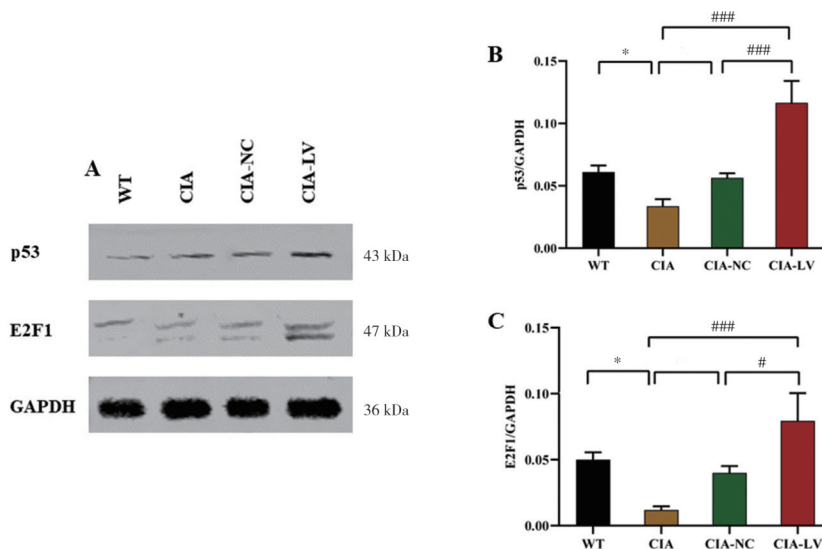


注: WT 为正常组, CIA 为胶原诱导性关节炎模型组, CIA-NC 为过表达空载体组, CIA-LV 为过表达慢病毒组。WAKMAR2 为滑膜关节相关长链非编码 RNA2, miR-4478 为微小 RNA-4478。与 WT 组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; 与 CIA 组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$; $n=6, \bar{x}\pm s$ 。

图 5 小鼠膝关节滑膜组织中 WAKMAR2 和 miR-4478 的 mRNA 表达

采用 Western blot 检测滑膜组织 E2F1、p53 的表达。结果显示, 与 WT 组相比, CIA 组中 E2F1、p53 的蛋白表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与

CIA 组和 CIA-NC 组相比, CIA-LV 组中 E2F1、p53 的蛋白表达明显升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 6。



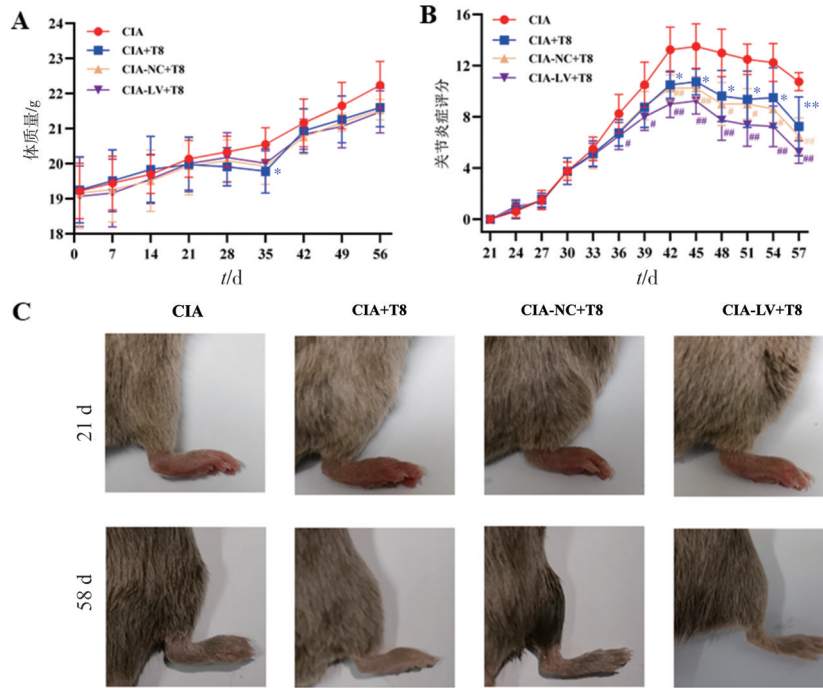
注: WT 为正常组, CIA 为胶原诱导性关节炎模型组, CIA-NC 为过表达空载体组, CIA-LV 为过表达慢病毒组。p53 为 p53 蛋白, E2F1 为 E2F 转录因子 1 蛋白, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A 为蛋白条带图, B 为 p53 的蛋白表达情况, C 为 E2F1 的蛋白表达情况。与 WT 比较, * $P<0.05$; 与 CIA 相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$; $n=6, \bar{x}\pm s$ 。

图 6 小鼠膝关节滑膜组织中 E2F1 和 p53 表达情况

2.6 T8 通过 WAKMAR2 对 CIA 小鼠一般情况及关节炎症指数的影响 与 CIA 组相比, CIA+T8 组与 CIA-NC+T8 组小鼠状况相似, 毛发偏暗, 饮食有所增加。CIA-LV+T8 组小鼠毛发光泽润滑程度较好, 有跛行但程度较轻, 精神状态较好, 活动量及进食量均有改善。与 CIA 组相比, CIA+T8 组和 CIA-NC+T8 组、CIA-LV+T8 组小鼠体质量从第 35 天出现显著下降 ($P<0.05$), 见图 7A。各组小鼠关节炎症评分在第 42 天达到顶峰, 之后开始缓慢下降。在第 36、39 天节点上, 与 CIA 组相比, CIA-

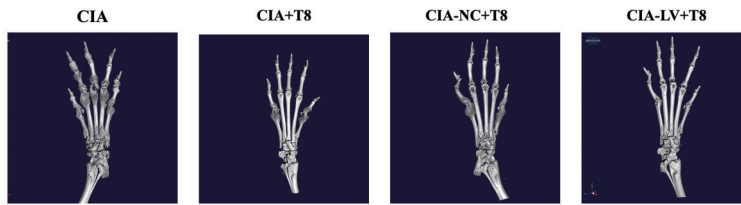
LV+T8 组关节炎评分下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其余各组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。自第 42 天开始, 与 CIA 组相比, CIA+T8 组、CIA-NC+T8 组、CIA-LV+T8 组关节炎评分均有明显下降, 且有统计学差异 ($P<0.05$)。见图 7B、图 7C。

2.7 T8 通过 WAKMAR2 对 CIA 小鼠关节组织形态的影响 CIA+T8 组与 CIA-NC+T8 组小鼠足爪关节骨侵蚀状况相当, 均出现足爪关节侵蚀; 而 CIA-LV+T8 组小鼠虽然同样出现足爪关节侵蚀, 但程度较 CIA+T8 组与 CIA-NC+T8 组明显减轻。见图 8。



注: CIA 为胶原诱导性关节炎模型组, CIA+T8 为 T8 给药组, CIA-NC+T8 为过表达空载体后的 T8 给药组, CIA-LV+T8 为过表达慢病毒后的 T8 给药组。A 为 T8 作用后对小鼠体质量变化的影响; B 为 T8 作用后各组关节炎症评分比较; C 为 T8 作用后各组小鼠足爪肿胀度。与 CIA 比较, * $P < 0.05$; 与 CIA+T8 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 6, \bar{x} \pm s$ 。

图 7 T8 作用后小鼠一般情况

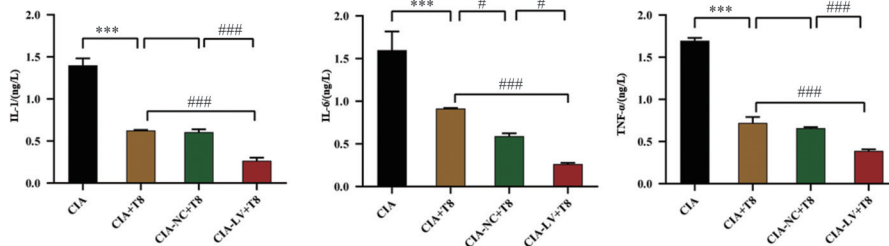


注: CIA 为胶原诱导性关节炎模型组, CIA+T8 为 T8 给药组, CIA-NC+T8 为过表达空载体后的 T8 给药组, CIA-LV+T8 为过表达慢病毒后的 T8 给药组。

图 8 T8 作用后小鼠足爪关节 Micro-CT 扫描图

2.8 T8 通过 WAKMAR2 对 CIA 小鼠血清炎症因子的影响 与 CIA 组相比, CIA+T8 组 IL-1、IL-6、TNF- α 的表达均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与

CIA+T8 组和 CIA-NC+T8 组相比, CIA-LV+T8 组 IL-1、IL-6、TNF- α 的表达进一步下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 9。

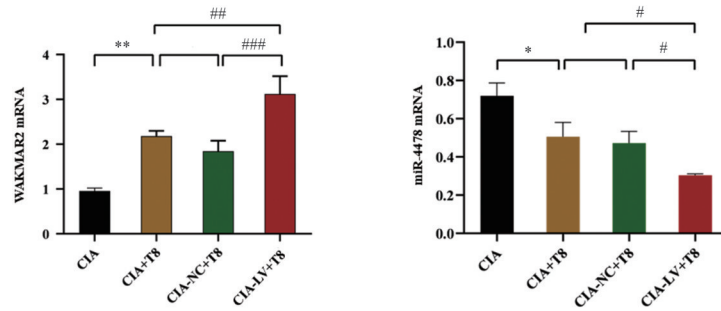


注: CIA 为胶原诱导性关节炎模型组, CIA+T8 为 T8 给药组, CIA-NC+T8 为过表达空载体后的 T8 给药组, CIA-LV+T8 为过表达慢病毒后的 T8 给药组。IL 为白细胞介素, TNF- α 为肿瘤坏死因子 α 。与 CIA 组比较, *** $P < 0.001$; 与 CIA+T8 组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; $n = 6, \bar{x} \pm s$ 。

图 9 T8 作用后各组小鼠血清炎症因子表达情况

2.9 T8 通过 WAKMAR2 对下游基因 miR-4478 表达的影响 采用 RT-qPCR 测定 T8 作用后 CIA 小鼠滑膜中 WAKMAR2、miR-4478 的表达,见图 10。与 CIA 组相比,WAKMAR2 在 CIA+T8 组中的表达均显著增加($P<0.05$);与 CIA+T8 组、CIA-NC+T8 组相比,CIA-

LV+T8 组的 WAKMAR2 表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 CIA 组相比,miR-4478 在 CIA+T8 组中的表达均显著下降($P<0.05$);与 CIA+T8 组、CIA-NC+T8 组相比,CIA-LV+T8 组的 miR-4478 表达进一步下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。



注: CIA 为胶原诱导性关节炎模型组, CIA+T8 为 T8 给药组, CIA-NC+T8 为过表达空载体后的 T8 给药组, CIA-LV+T8 为过表达慢病毒后的 T8 给药组。WAKMAR2 为滑膜关节相关长链非编码 RNA 2, miR-4478 为微小 RNA-4478。与 CIA 相比, * $P<0.05$, 与 CIA+T8 组相比, ** $P<0.01$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; $n=6, \bar{x}\pm s$ 。

图 10 T8 作用后小鼠膝关节滑膜组织中 WAKMAR2 和 miR-4478 的 mRNA 表达

3 讨论

RA 是一种典型的慢性自身免疫性疾病, 以关节滑膜炎与骨破坏为特征^[9], 临床表现为关节疼痛、肿胀、僵硬, 严重时导致不可逆的关节损伤、畸形甚至残疾^[10]。RA 的发病机制尚不明确, 其发生主要与环境、遗传以及免疫失调有关^[11]。尽管自身免疫和全身免疫失调是 RA 的基本病理过程, 但主要病理变化集中在关节滑膜衬里层, 其中成纤维细胞的致病作用使其成为炎性关节疾病的关键治疗靶点^[12-13]。

lncRNAs 作为 miRNAs 的前体或竞争性内源 RNA, 作为分子海绵通过吞噬目标 miRNAs 改变 miRNA 的数量来调节其靶基因表达^[13], 还可调节细胞生物学过程, 如增殖、凋亡、转移、代谢和炎症^[14-15], 研究^[16-17]表明, lncRNA 在多种自身免疫性疾病的发病机制中发挥重要作用, 如多发性硬化症、系统性红斑狼疮、I 型糖尿病和 RA。目前虽有多篇报道证实 RA 中 lncRNA 的异常表达与 MMPs、核因子 κ B (NF- κ B) 及 T 细胞等有关^[18-20], 然而, lncRNA 在 RA 中的具体机制仍不清楚。

本研究前期对 T8 处理的人 RA-FLS 细胞进行 lncRNA 芯片表达谱检测, 发现数条差异表达的 lncRNA, 其中 WAKMAR2 的差异表达倍数最为显著^[10]。WAKMAR2 原名为 LOC100130476, 是位于 6q23.3 的 lncRNA, 存在反义的转录方向, 与

TNFAIP3 基因体和启动子部分存在重叠^[21-22]。LOC100130476 与食管鳞癌和胃贲门腺癌的侵袭、转移以及患者预后紧密相关, LOC100130476 在肾癌中低表达, 其基因启动子区域高甲基化是造成基因表达沉默的机制之一, 5-Aza-dC 可以逆转 LOC100130476 启动子区域的异常甲基化并提高其表达水平^[23]。研究^[23]表明, LOC100130476 在胃贲门腺癌组织、食管癌细胞系和原发的食管鳞癌组织中表达明显降低, 其上调可抑制癌细胞的增殖和侵袭, 但目前的研究主要集中在肿瘤疾病方面。课题组前期研究发现过表达 WAKMAR2 后 FLS 细胞分泌的 MMP-1 及 MMP-3 明显降低, 说明其能抑制 FLS 细胞侵袭, 机制与减少 MMPs 的分泌从而降低细胞外基质的分解有关; FLS 细胞可以自发产生 IL-6, 在其他细胞因子的刺激下产生 IL-1 等细胞因子, 过表达 WAKMAR2 后, IL-1 及 IL-6 的表达减少, 说明 WAKMAR2 具有抑制炎症因子分泌的功能^[24]。

雷公藤, 又名黄藤根、黄药、断肠草等, 味苦、辛, 性凉, 有大毒, 归心、肝经。现代药理学研究^[25]表明其主要有效成分包括二萜类、三萜类、生物碱类、黄酮类等, 具有免疫抑制、抗炎、抗血管生成、抑制骨破坏等作用。T8 是一种基于雷公藤内酯醇进行结构修饰后得到的全新衍生物。T8 可抑制 II 型胶原诱导的 DBA/1J 小鼠体内淋巴细胞增殖及 γ 干扰素 (IFN- γ)、IL-2 的分泌, 并抑制信号转导和转录激活因子 (STAT) 1、T 盒转录因子 (T-bet)、IL-12 β

和 STAT4 等的表达,抑制巨噬细胞炎性蛋白-1 α (Mip-1 α)、巨噬细胞炎性蛋白-1 β (Mip-1 β)、调节 T 细胞正常表达和分泌(RANTES)、IFN- γ 诱导蛋白 10 (IP-10)等趋化因子的转录;T8 还可调节外周血单个核细胞(PBMC)、滑液单个核细胞(SFMC)中 T 细胞及其细胞因子分布格局,抑制关节腔内 FLS 增殖,对 RA 免疫系统有调节作用。^[26]

此外,T8 对 RA-FLS 中 lncRNAs 表达有一定影响^[27]。WAKMAR2 是 RA-FLS 肿瘤样表型的负调控因子,T8 可上调 RA-FLS 中 WAKMAR2 表达,而 WAKMAR2 可海绵 miR-4478,并阻止 miR-4478 与靶基因 *E2F1* 的相互作用。p53 是一种肿瘤抑制因子,通过调节细胞周期限制细胞的增殖和存活^[28],E2F1 可激活 p53 转录^[29]。miR-4478 抑制 E2F1 和 p53 的表达,并促进 RA-FLS 的肿瘤样表型。WAKMAR2 的沉默阻断了 T8 对 RA-FLS 的治疗作用,LLDT-8 和 WAKMAR2 抑制 RA-FLS 中 miR-4478 的表达,WAKMAR2 和 T8 的表达增强均减弱 miR-4478 对 E2F1 和 p53 表达的抑制作用,并减弱 miR-4478 对 RA-FLS 的保护作用。

关节炎评分结果显示,CIA-LV 组小鼠关节炎明显缓解,关节红肿症状明显减轻。自第 30 天开始 CIA 组与 CIA-NC 组炎症指数评分明显高于 CIA-LV 组。因此,过表达 WAKMAR2 能够较好地减轻 CIA 模型小鼠关节红肿等临床症状。CIA-LV+T8 组小鼠关节炎得到明显缓解,关节红肿症状减轻,CIA+T8 组较 CIA 组有明显改善。WAKMAR2 与 T8 均能减轻 CIA 小鼠关节炎,过表达 WAKMAR2 与 T8 联用,能够得到更好的效果。

Micro-CT 扫描小鼠足爪,可以清晰地观察到 CIA-LV 组小鼠虽然同样出现足爪关节侵蚀,但程度较 CIA 组与 CIA-NC 组明显减轻。CIA-LV+T8 组小鼠虽然同样出现足爪关节侵蚀,但程度较 CIA+T8 组与 CIA-LV 组明显减轻。

为了明确 T8 干预 WAKMAR2 过表达小鼠对其体内炎症因子的影响,检测小鼠血清中的 TNF- α 、IL-1、IL-6 表达,结果显示 CIA-LV 组中的炎症因子表达较 CIA 组与 CIA-NC 组减少,提示过表达 WAKMAR2 可通过减少炎症因子的生成,减轻滑膜炎症与骨侵蚀。CIA-LV+T8 组可以抑制小鼠体内炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的表达,因此通过过表达 WAKMAR2 与 T8 联用能够减少小鼠体内炎症因子分泌,减缓小鼠关节炎症状。

通过 RT-qPCR 实验检测小鼠关节滑膜组织中 WAKMAR2 表达,发现 WAKMAR2 在 CIA-LV 组高表达,说明过表达 WAKMAR2 的 CIA 模型构建成功。lncRNAs 可以海绵 miRNAs 或作为竞争内源 RNAs 发挥作用,从而隔离 miRNAs 并改变下游靶基因的表达。体内研究进一步证实,CIA-LV 组关节滑膜炎减轻,并伴随 miR-4478 的表达降低,E2F1 及 p53 的蛋白表达上升。CIA-LV+T8 组关节滑膜炎减轻,伴随 miR-4478 的表达降低。因此,T8 可能通过调控 WAKMAR2/miR-4478/E2F1/p53 轴来抑制 CIA 小鼠滑膜炎并延缓骨破坏。总之,本研究从体内更深入地阐明 T8 与过表达 WAKMAR2 治疗 RA 的作用机制,为 RA 的治疗提供新的靶点,推进 T8 在 RA 治疗中的临床应用。

参考文献:

- [1] SCOTT D L, WOLFE F, HUIZINGA T W J. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [2] ALAMANOS Y, DROSOS A A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(3): 130-136.
- [3] REVEILLE J D. Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future [J]. *J Rheumatol Suppl*, 2005, 72: 10-13.
- [4] FENG W, LIU J, ZHANG D, et al. Revealing the efficacy-toxicity relationship of Fuzi in treating rheumatoid arthritis by systems pharmacology [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23083.
- [5] MOSIHUZZAMAN M. Herbal medicine in healthcare—an overview [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(6): 807-812.
- [6] 钱爱, 黄传兵, 李明, 等. 基于多元数据挖掘探析专利中药复方治疗痛风性关节炎的用药规律 [J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(12): 16-21.
- [7] WANG L, XU Y, FU L, et al. (5R)-5-hydroxytriptolide (LLDT-8), a novel immunosuppressant in clinical trials, exhibits potent antitumor activity via transcription inhibition [J]. *Cancer Lett*, 2012, 324(1): 75-82.
- [8] ZHOU R, ZHANG F, HE P, et al. (5R)-5-hydroxytriptolide (LLDT-8), a novel triptolide analog mediates immunosuppressive effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(13-14): 1895-1903.
- [9] CATRINA A I, SVENSSON C I, MALMSTRÖM V, et al. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis [J]. *Nature Rev Rheumatol*, 2017, 13(2): 79-86.
- [10] MATTEO A D, BATHON J M, EMERY P. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10416): 2019-2033.
- [11] SMOLEN J S, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18001.
- [12] PATEL R, FILER A, BARONE F, et al. Stroma: fertile soil for inflammation [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2014, 28(4):

- 565-576.
- [13] KUROWSKA-STOLARSKA M, ALIVERNINI S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? [J]. RMD Open, 2017, 3 (2) : e000527.
- [14] LI Z, WANG Y, HU R, et al. LncRNA B4GALT1-AS1 recruits HuR to promote osteosarcoma cells stemness and migration via enhancing YAP transcriptional activity[J]. Cell Prolif, 2018, 51 (6) : e12504.
- [15] FENG J, ZHOU Q, YI H, et al. A novel lncRNA n384546 promotes thyroid papillary cancer progression and metastasis by acting as a competing endogenous RNA of miR-145-5p to regulate AKT3[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6) : 433.
- [16] FRANK-BERTONCELJ M, TRENKMANN M, KLEIN K, et al. Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14852.
- [17] GOMEZ-CABRERO D, ALMGREN M, SJÖHOLM L K, et al. High-specificity bioinformatics framework for epigenomic profiling of discordant twins reveals specific and shared markers for ACPA and ACPA-positive rheumatoid arthritis [J]. Genome Med, 2016, 8(1): 124.
- [18] LIU Y, ARYEE M J, PADYUKOV L, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31 (2): 142-147.
- [19] PIANTA A, ARVIKAR S L, STRLE K, et al. Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints[J]. J Clin Invest, 2017, 127(8) : 2946-2956.
- [20] GASQUE P, BANDJEE M C J, REYES M M, et al. Chikungunya pathogenesis: From the clinics to the bench[J]. J Infect Dis, 2016, 214(suppl 5) : S446-S448.
- [21] HERTER E K, LI D, TOMA M A, et al. WAKMAR2, a long noncoding RNA downregulated in human chronic wounds, modulates keratinocyte motility and production of inflammatory chemokines[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(6) : 1373-1384.
- [22] DEVOS M, MOGILENKO D A, FLEURY S, et al. Keratinocyte expression of A20/TNFAIP3 controls skin inflammation associated with atopic dermatitis and psoriasis [J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(1): 135-145.
- [23] GUO W, DONG Z, SHI Y, et al. Methylation-mediated downregulation of long noncoding RNA LOC100130476 in gastric cardia adenocarcinoma[J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33(5) : 497-508.
- [24] ZHOU X, XIE D, HUANG J, et al. Therapeutic effects of (5R)-5-hydroxytriptolide on fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via lncRNA WAKMAR2/miR-4478/E2F1/p53 axis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 605616.
- [25] 宋晓笛,高畅.雷公藤的药理作用、毒性及减毒策略研究进展[J].赣南医学院学报,2023, 43(10): 987-992, 1004.
- [26] ZHOU R, TANG W, HE P, et al. (5R)-5-hydroxytriptolide inhibits the immune response of human peripheral blood mononuclear cells [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9 (1) : 63-69.
- [27] GUO S, LIU J, JIANG T, et al. (5R)-5-Hydroxytriptolide (LLDT-8) induces substantial epigenetic mediated immune response network changes in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11155.
- [28] GIONO L E, MANFREDI J J. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(1): 13-20.
- [29] PAN H, YIN C, DYSON N J, et al. Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors[J]. Mol Cell, 1998, 2(3) : 283-292.

编辑:岳备

收稿日期:2024-10-29