

时萍,陶野,王晨静,等. 塞来昔布调节 miR-129-5p/HMGB1 抑制 TNF- α 诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子分泌 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 82-89.

Shi P, Tao Y, Wang CJ, et al. Celecoxib regulates miR-129-5p/HMGB1 to inhibit TNF- α -induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cell inflammatory cytokine secretion [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 82-89.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.012

塞来昔布调节 miR-129-5p/HMGB1 抑制 TNF- α 诱导 类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子分泌

时萍,陶野,王晨静,李欣,柳艳平,曹玉*

(青岛大学附属医院,山东 青岛 266001)

【摘要】 目的 探讨塞来昔布对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导类风湿关节炎 (RA) 成纤维样滑膜细胞 (FLSs) MH7A 炎症因子分泌的影响及其机制。**方法** 以 0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理 MH7A 细胞 24 h 后,采用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力以筛选无毒性作用浓度;采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blot 法分别检测 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中炎症因子白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 水平和微小 RNA (miR)-129-5p 表达水平以及高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 表达水平;双荧光素酶报告基因实验检测 miR-129-5p 和 HMGB1 的靶向关系;转染 miR-129-5p mimics 或 HMGB1-siRNA 至 MH7A 细胞中,观察 miR-129-5p 过表达或下调 HMGB1 表达对 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响;另外,将 miR-129-5p inhibitor 转染至 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞中,观察 miR-129-5p 低表达对 10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用下 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响。**结果** 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活性差异无统计学意义 ($P>0.05$),但 20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活性明显降低 ($P<0.05$)。在 TNF- α 诱导下,2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布可呈浓度依赖性抑制 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平和细胞中 HMGB1 蛋白表达并促进 miR-129-5p 表达;miR-129-5p 可与 HMGB1 靶向结合,且 miR-129-5p 可负向调控 HMGB1 蛋白表达;miR-129-5p 过表达或下调 HMGB1 表达后,TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显降低 ($P<0.05$);并且,miR-129-5p 低表达可明显逆转 10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布对 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平抑制作用。**结论** 塞来昔布可抑制 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌,其作用机制可能与调控 miR-129-5p/HMGB1 有关。

【关键词】 类风湿关节炎;炎症因子;塞来昔布;微小 RNA-129-5p;高迁移率族蛋白 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0082-08

Celecoxib regulates miR-129-5p/HMGB1 to inhibit TNF- α -induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cell inflammatory cytokine secretion

SHI Ping, TAO Ye, WANG Chenjing, LI Xin, LIU Yanping, CAO Yu*

(Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of celecoxib on the secretion of MH7A inflammatory factor in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis (RA) induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Methods** MH7A

[作者简介] 时萍 (1975—), 女, 本科, 研究方向: 药物试验。E-mail: sp82911767@163.com

[通信作者] 曹玉 (1974—), 男, 博士, 主任药师, 研究方向: 药物试验。E-mail: Jidi1767@126.com

cells were treated with 0, 2.5, 5, 10, 20 or 40 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib for 24 h before detecting cell viability by MTT assay to screen non-toxic concentration. Enzyme-linked immunosorbent assay, real-time fluorescent quantitative PCR, and Western blot were used to detect levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , microRNA (miR)-129-5p, and high mobility group box-1 protein (HMGB1) in the supernatant of TNF- α -induced MH7A cells treated with 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib. A double-luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between miR-129-5p and HMGB1, and transfection of miR-129-5p mimics or HMGB1 siRNA into MH7A cells was performed to observe the effect of miR-129-5p overexpression or downregulation of HMGB1 expression on TNF- α -induced inflammatory factor secretion in MH7A cells. In addition, an miR-129-5p inhibitor was transfected into MH7A cells induced by TNF- α to observe the effect of low miR-129-5p expression on TNF- α -induced secretion of inflammatory factors in MH7A cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib.

Results Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, the activity of MH7A cells treated with 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib exhibited no significant difference ($P>0.05$). However, the activity of MH7A cells decreased significantly after 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib treatment ($P<0.05$). Under induction by TNF- α , 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib inhibited IL-6 and IL-1 β levels in the supernatant of MH7A cells, as well as expression of HMGB1 protein, and promoted the expression of miR-129-5p in a concentration-dependent manner. miR-129-5p can target and bind to HMGB1 to negatively regulate its expression. After overexpression of miR-129-5p or downregulation of HMGB1 expression, levels of IL-6 and IL-1 β in the supernatant of MH7A cells induced by TNF- α were significantly decreased ($P<0.05$). Low expression of miR-129-5p significantly reversed the inhibitory effects of 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib on TNF- α -induced IL-6 and IL-1 β levels in the supernatant of MH7A cells. **Conclusions** Celecoxib can inhibit TNF- α -induced inflammatory factor secretion by MH7A cells, and its mechanism may be related to the regulation of miR-129-5p/HMGB1.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; inflammatory factor; celecoxib; miR-129-5p; high mobility group box-1 protein

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病程漫长和致残率高的自身免疫性疾病,以关节滑膜炎、软骨和骨质破坏为主要病理特征,可导致关节畸形与功能障碍^[1]。近年来,因我国老龄化人口增多,RA 发病率有明显升高趋势,给人们身体健康和生活质量带来很大威胁^[2]。成纤维样滑膜细胞(fibroblast like synoviocytes, FLSs)是滑膜炎增生导致 RA 发生的重要细胞,其异常增生可释放大量致炎因子,引起关节受损^[3]。因此,如何有效抑制 FLSs 炎症因子的分泌对 RA 治疗具有重要意义。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类细胞内重要的基因调控因子,其异常表达与包括 RA 在内的多种疾病发生发展密切相关。miR-129-5p 是 miRNAs 家族成员,据报道在 RA-FLSs 中表达下调,且发挥着抑制 RA-FLSs 增殖和诱导凋亡的作用^[4]。研究发现,miR-129-5p 可通过靶向调控高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 抑制炎症反应减轻脊髓损伤^[5],而 HMGB1 在 FLSs 炎症因子的分泌过程中发挥着重要的促进作用^[6]。由此猜测,miR-129-5p 可能通过靶向调控 HMGB1 介导 FLSs 炎症反应。塞来昔布是一种高选择性环氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂和非甾体类抗炎药,常用来缓解 RA 临床症状^[7],但其抗 RA 炎症

的作用机制尚不完全清楚。有研究发现,塞来昔布可通过抑制 HMGB1 表达减轻癫痫发生后的神经炎症损伤^[8]。那么,塞来昔布是否通过调控 miR-129-5p 从而影响 HMGB1 表达来发挥抗 RA 的作用? 因此,本研究以人 RA-FLSs 细胞系 MH7A 为研究对象,采用肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导及塞来昔布干预后观察 miR-129-5p 和 HMGB1 表达变化,初步探讨 miR-129-5p/HMGB1 在塞来昔布抗 RA 中的潜在作用。

1 材料和方法

1.1 细胞

人 RA-FLSs 细胞系 MH7A (批号:201203) 购于上海冠导生物工程有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青霉素链霉素溶液、TRIzol 试剂、总蛋白质提取试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司(批号:201216、201110、201209、210120、210109、200204);塞来昔布、脂质体 2000、人白细胞介素(interleukin, IL)-6 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、人 IL-1 β ELISA 试剂盒、实时荧光定量 PCR

(real time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒和双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司(批号:201225、201106、201003、201212、201219、210101); miR-129-5p mimics、miR-129-5p inhibitor、mimics-NC、inhibitor-NC、HMGB1-siRNA、NC-siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成。凝胶成像仪 Miulab GIS-500(批号:180524)购自北京乾明基因技术有限公司;实时荧光定量 PCR 仪(批号:200426)购自翌圣生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

使用含 100 U/mL 青霉素链霉素双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内常规培养 MH7A 细胞。

1.3.2 MTT 法检测 MH7A 细胞活力

将对数生长期的 MH7A 细胞接种至 96 孔板上,常规培养贴壁后,每孔加入 100 μL 终浓度为 0、2.5、5、10、20 和 40 μmol/L 塞来昔布,并设 3 个平行孔;孵育 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液(浓度为 5 g/L);孵育 4 h 后,弃培养基并向每孔中加入二甲亚砜 150 μL;摇床震荡使结晶物充分溶解后,采用酶标仪在波长 492 nm 处检测各孔 MH7A 细胞吸光度值。实验重复次数为 3。

1.3.3 ELISA 法检测 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平

实验分为(1)对照组:不做处理;(2)诱导组:加入 20 ng/mL TNF-α 100 μL^[9]; (3)诱导+(2.5、5 和 10 μmol/L) 塞来昔布组:分别加入 2.5、5 和 10 μmol/L 塞来昔布 100 μL 预处理 1 h 后再加入 20 ng/mL TNF-α 100 μL,每组设置 3 个复孔。将对数生长期的 MH7A 细胞接种至 96 孔板上,于培养箱内常规培养;待细胞贴壁后,根据上述分组处理细胞 24 h 后,收集各组细胞上清液,严格按照 IL-6 和 IL-1β ELISA 试剂盒说明书检测 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平。实验重复次数为 3。

1.3.4 RT-qPCR 检测 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达水平

收集按照 1.3.3 中实验分组处理结束后的各组 MH7A 细胞,按照 TRIzol 试剂说明书提取 MH7A 细胞总 RNA 后,使用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及完整性;将 RNA 行逆转录合成 cDNA 后,以此为模板,按照 RT-qPCR 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 扩增;将 U6 作为内参照,2^{-ΔΔCt} 法计算 MH7A

细胞中 miR-129-5p 表达水平。其中,扩增程序:95℃ 预变性 6 min 后,转入 38 个循环阶段 95℃ 15 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s。由上海生工生物工程股份有限公司合成的引物序列如下:miR-129-5p 上游 5'-GTGCTTATAGTGCAGGTA-3',下游 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'; U6 上游 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游 5'-CGCTTCACGAA TTTGCGTGTCA-3'。实验重复次数为 3。

1.3.5 Western blot 检测 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达

收集按照 1.3.3 中实验分组处理结束后的各组 MH7A 细胞,根据总蛋白提取试剂盒说明书抽提 MH7A 细胞总蛋白后,采用二奎咻甲酸法检测总蛋白浓度;将变性后的蛋白样品行 SDS-PAGE 分离后,转膜;以 5% 脱脂奶粉封闭膜 1.5 h 后,加入稀释 2000 倍的 HMGB1 抗体和 GAPDH 抗体 4℃ 孵育过夜;次日,加入稀释 5000 倍的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h;经化学发光剂显影曝光后,以 GAPDH 作为内参照,采用 Image J 软件分析 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达水平。实验重复次数为 3。

1.3.6 细胞转染

将对数生长期的 MH7A 细胞接种至 6 孔细胞板上,常规培养至 65%~75% 融合度时,参照脂质体说明书进行瞬时转染;其中,将仅转染 mimics-NC、miR-129-5p mimics、inhibitor-NC、miR-129-5p inhibitor 的 MH7A 细胞分别记为 mimics-NC 组、miR-129-5p mimics 组、inhibitor-NC 组、miR-129-5p inhibitor 组;将转染 mimics-NC、miR-129-5p mimics、NC-siRNA、HMGB1-siRNA 且经 20 ng/mL TNF-α 处理的 MH7A 细胞分别记为诱导+mimics-NC 组、诱导+miR-129-5p mimics、诱导+NC-siRNA 组和诱导+HMGB1-siRNA 组;将转染 inhibitor-NC、miR-129-5p inhibitor 且经 20 ng/mL TNF-α 和 10 μmol/L 塞来昔布处理的 MH7A 细胞分别记为诱导+药物+inhibitor-NC 组、诱导+药物+miR-129-5p inhibitor 组,每个处理组均设 3 个复孔。在转染 6 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h 后收集各组细胞及上清液,参照上述方法检测 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达、HMGB1 蛋白表达及细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验

采用生物信息学软件预测到 HMGB1 3' UTR 与 miR-129-5p 之间存在互补的结合位点;将 HMGB1

3' UTR 与 miR-129-5p 结合位点序列和定点突变后的序列克隆重组至 psiCHECK-2 载体上,分别构建 psiCHECK-2-HMGB1 野生型 (HMGB1-wt) 载体和 psiCHECK-2-HMGB1 突变型 (HMGB1-mut) 载体。参照脂质体 2000 说明书将 HMGB1-wt、HMGB1-mut 载体分别与 miR-129-5p mimics、miR-129-5p inhibitor 及相应阴性对照共转染至 MH7A 细胞中;转染 48 h 后,参照荧光素酶活性检测试剂盒说明书检测 MH7A 细胞荧光素酶活性。实验重复次数为 3。

1.4 统计学方法

计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,运用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,正态性检验采用 Shapiro-Wilk 方法,数据均符合正态分布,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 塞来昔布对 MH7A 细胞活力的影响

经 0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后, MH7A 细胞活力分别为 (0.68 ± 0.05)、(0.71 ± 0.05)、(0.66 ± 0.03)、(0.62 ± 0.03)、(0.58 ± 0.03) 和 (0.50 ± 0.02)。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$),但 20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活力明显降低($P<0.05$)。

2.2 塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响

与对照组比较,诱导组 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显升高($P<0.05$);与诱导组比较,诱导+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组、诱导+5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组和诱导+10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显降低($P<0.05$),且呈塞来昔布浓度依赖性(见表 1)。

表 1 各组细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 1 Comparison of IL-6 and IL-1 β levels in cell supernatant of each group

组别 Groups	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	35.52 $\pm$ 3.05	48.75 $\pm$ 4.26
诱导组 Induction group	97.46 $\pm$ 6.18 [*]	125.63 $\pm$ 9.55 [*]
诱导+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 Induction+2.5 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib group	85.68 $\pm$ 5.02 [#]	116.58 $\pm$ 7.36 [#]
诱导+5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 Induction+5 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib group	72.68 $\pm$ 4.35 [#]	91.07 $\pm$ 6.21 [#]
诱导+10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 Induction+10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib group	55.75 $\pm$ 3.23 [#]	70.56 $\pm$ 6.10 [#]
<i>F</i>	264.281	190.652
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the induction group, [#] $P<0.05$.

2.3 塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞中 miR-129-5p 和 HMGB1 表达的影响

与对照组比较,诱导组 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达水平明显降低,而 HMGB1 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与诱导组比较,诱导+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组、诱导+5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组和诱导+10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达水平明显升高,而 HMGB1 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),且塞来昔布浓度越高变化越明显(见图 1 和表 2)。

2.4 miR-129-5p 与 HMGB1 靶向关系的验证

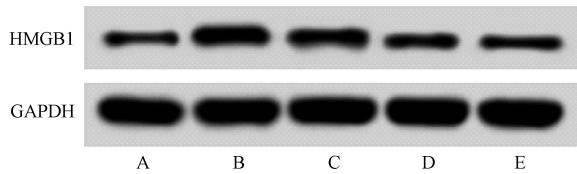
Targetscan Human 软件预测到 HMGB1 3' UTR 中存在能够与 miR-129-5p 互补的结合位点。与相应阴性对照比较, miR-129-5p mimics 可使转染 HMGB1-Wt 载体质粒的 MH7A 细胞荧光素酶活性明显降低,而 miR-129-5p inhibitor 可使其荧光素酶活性明显升高($P<0.05$);同时, miR-129-5p mimics 能使 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达水平明显降低,而 miR-129-5p inhibitor 则使 HMGB1 蛋白表达水平明显升高(见图 2 和表 3)。

2.5 miR-129-5p 过表达对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响

与对照组比较,诱导组细胞中 miR-129-5p 表达水平明显降低,而细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显升高($P<0.05$);与诱导组比较,诱导+mimics-NC 组上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$);与诱导+mimics-NC 组比较,诱导+miR-129-5p mimics 组 miR-129-5p 表达水平明显升高,而 IL-6、IL-1 β 水平明显降低($P<0.05$)(见表 4)。

2.6 下调 HMGB1 表达对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响

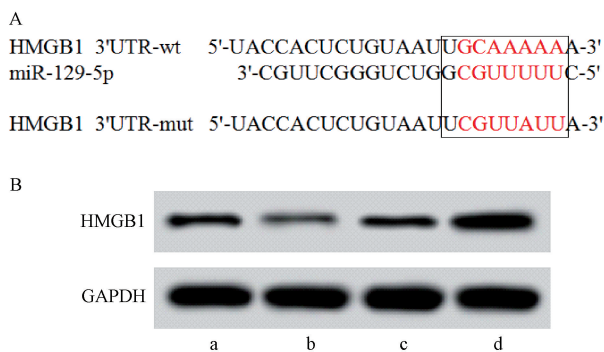
与对照组比较,诱导组细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平均明显升



注:A:对照组;B:诱导组;C:诱导+2.5 μmol/L 塞来昔布组;D:诱导+5 μmol/L 塞来昔布组;E:诱导+10 μmol/L 塞来昔布组。

图 1 Western blot 检测 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达
Note. A, Control group. B, Induction group. C, Induction+2.5 μmol/L celecoxib group. D, Induction+5 μmol/L celecoxib group. E, Induction+10 μmol/L celecoxib group.

Figure 1 Western blot detection of HMGB1 protein expression in MH7A cells



注:A:miR-129-5p 与 HMGB1 3' UTR 结合位点;B:Western blot 检测 miR-129-5p 对 HMGB1 蛋白表达的影响。a:mimics-NC 组; b: miR-129-5p mimics 组; c: inhibitor-NC 组; d: miR-129-5p inhibitor 组。

图 2 miR-129-5p 与 HMGB1 靶向关系的验证

Note. A, miR-129-5p and HMGB1 3' UTR binding site. B, Western blot to detect the effect of miR-129-5p on the expression of HMGB1 protein. a, mimics-NC group. b, miR-129-5p mimics group. c, inhibitor-NC group. d, miR-129-5p inhibitor group.

Figure 2 Verification of the targeting relationship between miR-129-5p and HMGB1

表 2 各组细胞中 miR-129-5p 和 HMGB1 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Comparison of miR-129-5p and HMGB1 protein expression levels in cells of each group

组别 Groups	miR-129-5p	HMGB1/GAPDH
对照组 Control group	1.00±0.00	0.20±0.02
诱导组 Induction group	0.23±0.03 [*]	0.56±0.04 [*]
诱导+2.5 μmol/L 塞来昔布组 Induction+2.5 μmol/L celecoxib group	0.28±0.03 [#]	0.45±0.03 [#]
诱导+5 μmol/L 塞来昔布组 Induction+5 μmol/L celecoxib group	0.36±0.04 [#]	0.33±0.03 [#]
诱导+10 μmol/L 塞来昔布组 Induction+10 μmol/L celecoxib group	0.55±0.06 [#]	0.24±0.03 [#]
F	630.193	212.840
P	<0.001	<0.001

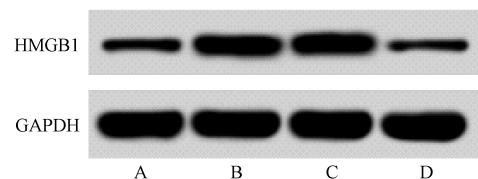
注:与对照组相比, * $P<0.05$;与诱导组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the induction group, [#] $P<0.05$.

高($P<0.05$);与诱导组相比较,诱导+NC-siRNA 组 HMGB1 蛋白表达水平和 IL-6、IL-1 β 水平差异均无统计学意义($P>0.05$);但诱导+HMGB1-siRNA 组 HMGB1 蛋白表达水平和 IL-6、IL-1 β 水平较诱导+NC-siRNA 组均明显降低($P<0.05$)(见图 3 和表 5)。

2.7 miR-129-5p 低表达可逆转 10 μmol/L 塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞的影响

与诱导组比较,诱导+药物组细胞中 miR-129-5p 表达水平明显升高,而细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显降低($P<0.05$);诱导+药物+inhibitor-NC 组和诱导+药物组比较上述各指标差异均无统计学意义($P>0.05$);与诱导+药物+inhibitor-NC 组比较,诱导+药物+miR-129-5p inhibitor 组细胞中 miR-129-5p 表达水平明显降低,而细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显升高($P<0.05$)(见图 4 和表 6)。



注:A:对照组;B:诱导组;C:诱导+NC-siRNA 组;D:诱导+HMGB1-siRNA 组。

图 3 Western blot 检测各组细胞中 HMGB1 蛋白表达

Note. A, Control group. B, Induction group. C, Induction+NC-siRNA group. D, Induction+HMGB1-siRNA group.

Figure 3 Western blot detects the expression of HMGB1 protein in each group of cells

表 3 各组细胞荧光素酶活性及 HMGB1 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Table 3 Comparison of cell luciferase activity and HMGB1 protein expression level in each group

组别 Groups	荧光素酶活性 Luciferase activity		HMGB1/GAPDH
	HMGB1-wt	HMGB1-mut	
mimics-NC 组 mimics-NC group	1.00±0.00	1.00±0.00	0.22±0.03
miR-129-5p mimics 组 miR-129-5p mimics group	0.26±0.02 [*]	0.94±0.08	0.09±0.02 [*]
inhibitor-NC 组 inhibitor-NC group	0.95±0.07	1.02±0.09	0.21±0.03
miR-129-5p inhibitor 组 miR-129-5p inhibitor group	1.72±0.12 [#]	0.96±0.08	0.57±0.03 [#]
<i>F</i>	650.117	2.297	497.323
<i>P</i>	<0.001	0.096	<0.001

注:与 mimics-NC 组相比, ^{*} $P<0.05$;与 inhibitor-NC 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with mimics-NC group, ^{*} $P<0.05$. Compared with inhibitor-NC group, [#] $P<0.05$.

表 4 各组细胞中 miR-129-5p 表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Table 4 Comparison of the expression level of miR-129-5p in the cells of each group and the level of IL-6 and IL-1 β in the cell supernatant

组别 Groups	miR-129-5p	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	1.00±0.00	33.85±3.25	46.85±5.02
诱导组 Induction group	0.21±0.02 [*]	99.52±6.45 [*]	128.47±8.96 [*]
诱导+mimics-NC 组 Induction+mimics-NC group	0.23±0.03	103.25±8.02	131.56±8.84
诱导+miR-129-5p mimics 组 Induction+miR-129-5p mimics group	0.86±0.08 [#]	62.38±5.26 [#]	75.84±5.62 [#]
<i>F</i>	752.341	270.682	286.632
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导+mimics-NC 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the induction+mimics-NC group, [#] $P<0.05$.

表 5 各组细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Table 5 Comparison of HMGB1 protein expression level in cells of each group and IL-6 and IL-1 β levels in cell supernatant

组别 Groups	HMGB1/GAPDH	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	0.20±0.03	35.08±3.11	49.05±4.35
诱导组 Induction group	0.55±0.04 [*]	98.23±6.27 [*]	129.68±10.02 [*]
诱导+NC-siRNA 组 Induction+NC-siRNA group	0.57±0.04	102.28±9.67	131.18±9.86
诱导+HMGB1-siRNA 组 Induction+HMGB1-siRNA group	0.18±0.03 [#]	68.86±4.12 [#]	80.26±6.64 [#]
<i>F</i>	329.520	218.992	221.669
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导+NC-siRNA 组相比, [#] $P<0.05$ 。

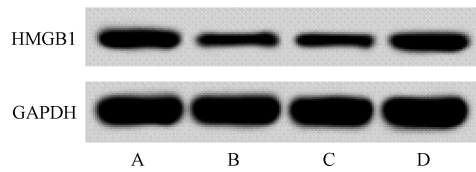
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the induction+NC-siRNA group, [#] $P<0.05$.

表 6 各组细胞中 miR-129-5p 和 HMGB1 蛋白表达水平以及细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Table 6 Comparison of the expression levels of miR-129-5p and HMGB1 protein in each group of cells and the levels of IL-6 and IL-1 β in the cell supernatant

组别 Groups	miR-129-5p	HMGB1/GAPDH	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
诱导组 Induction group	1.00±0.00	0.57±0.05	96.48±6.13	128.48±10.02
诱导+药物组 Induction + drug group	2.08±0.12 [*]	0.25±0.03 [*]	54.75±3.28 [*]	67.56±5.35 [*]
诱导+药物+inhibitor-NC 组 Induction+drug+inhibitor-NC group	2.11±0.10	0.24±0.03	55.60±3.47	69.15±6.03
诱导+药物+miR-129-5p inhibitor 组 Induction+drug+miR-129-5pinhibitor group	0.75±0.06 [#]	0.48±0.03 [#]	72.12±4.50 [#]	94.48±6.85 [#]
<i>F</i>	651.471	190.385	170.465	137.859
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与诱导组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导+药物+inhibitor-NC 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the induction group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the induction+drug+inhibitor-NC group, [#] $P<0.05$.



注:A:诱导组;B:诱导+药物组;C:诱导+药物+inhibitor-NC组;D:诱导+药物+miR-129-5p inhibitor组。

图4 Western blot 检测各组细胞中 HMGB1 蛋白表达

Note. A, Induction group. B, Induction+drug group. C, Induction+drug+inhibitor-NC group. D, Induction+drug+miR-129-5p inhibitor group.

Figure 4 Western blot detection of HMGB1 protein expression in each group of cells

3 讨论

塞来昔布是一种能够缓解关节炎症症状的抗炎药,可通过特异性抑制 COX-2 活性使炎症前列腺素生成减少,进而起到抗炎止痛的作用^[10]。近年来,有研究指出,塞来昔布可通过抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路活性减轻软骨组织炎症损伤发挥抗骨关节炎的作用^[11];然而,塞来昔布对 RA-FLSs 炎症的影响及其作用机制并不清楚。滑膜炎是 RA 典型的病理特征,而 TNF- α 诱导的滑膜细胞促炎因子 IL-6 和 IL-1 β 等的分泌是该过程发生的重要因素^[12];因此, TNF- α 常被用作 FLSs 炎症因子分泌的诱导剂^[13-15]。本研究以 20 ng/mL TNF- α 刺激后发现,人 RA-FLSs MH7A 细胞上清液中促炎因子 IL-6、IL-1 β 水平和 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达水平明显升高,miR-129-5p 表达水平明显降低,而塞来昔布可剂量依赖性的降低 IL-6、IL-1 β 和 HMGB1 表达水平,增加 miR-129-5p 表达水平。上述结果表明 HMGB1 及 miR-129-5p 参与 RA 滑膜炎的发生,二者有作为疾病潜在治疗靶点的潜能,而塞来昔布抗 RA 滑膜炎的作用机制可能与调控 miR-129-5p 和 HMGB1 蛋白表达有关。

miR-129-5p 是 miRNAs 家族成员,被报道在 RA-FLSs 中表达下调,且可通过调控胰岛素样生长因子 1 受体 (Insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)/Src/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)/早期生长应答 1 (early growth response 1, Egr-1) 信号通路调控 RA 细胞增殖和凋亡^[4]。还有研究表明,miR-129-5p-TTK 是控制早期 RA 进展的潜在 RNA 调节途径^[16]。

CircASH2L 通过抑制 miR-129-5p / 同源域相互作用蛋白激酶 2 (homeodomain interacting protein kinase 2, HIPK2) 轴来促进 RA-FLS 细胞的生长,运动和炎症^[17]。富含 miR-129-5p 的人滑膜间充质干细胞外泌体 (HS-MSC-Exo) 显著降低了软骨细胞的炎症反应和细胞凋亡^[18]。本研究发现,miR-129-5p 过表达可显著抑制 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞炎症因子分泌,提示,miR-129-5p 在 RA 滑膜炎过程中发挥着重要的抑制作用,其过表达可能是改善 RA 滑膜炎的重要策略。有研究指出,miR-129-5p 过表达可通过靶向 HMGB1 减轻炎症反应改善心力衰竭大鼠心功能和缺血再灌注后的神经损伤^[18-19]。本研究双荧光素酶报告基因实验证实,miR-129-5p 可与 HMGB1 靶向结合, HMGB1 是 miR-129-5p 的靶基因。HMGB1 是细胞核内一种非组蛋白,在细胞活性、凋亡和缺血/缺氧等异常情况下可被释放至核外,激活下游相关因子启动级联式炎症反应,与包括 RA 在内的多种免疫类疾病发生发展密切相关^[20]。在 RA 患者关节液和关节滑膜中 HMGB1 存在异常高表达,且 HMGB1 可通过促进炎症因子 TNF- α 和 IL-17A 等促进滑膜炎^[21-23]。本研究发现 HMGB1 表达沉默可抑制 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平。研究结果从反面证实, HMGB1 在 RA 滑膜炎过程中发挥着重要的促进作用。此外,本研究还发现 miR-129-5p 表达沉默可逆转塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌和 HMGB1 蛋白表达的抑制作用,结果提示,塞来昔布可通过上调 miR-129-5p 表达引起其靶基因 HMGB1 表达降低进而发挥抗 RA 滑膜炎的作用。

综上所述,塞来昔布可抑制 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌,其作用机制可能与激活 miR-129-5p/HMGB1 有关。然而,塞来昔布抗 RA 滑膜炎的作用机制可能还与其它基因或通路有关,还需后续进一步探讨。

参考文献:

- [1] 王思捷, 廖淑珍, 招春飞, 等. 间充质干细胞源外泌体治疗类风湿性关节炎动物模型和临床研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 109-112.
- [2] 白雪, 付瑞嘉, 乐世俊, 等. 雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 265-275.
- [3] 熊翱, 熊仁平, 彭艳, 等. 脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.

- [4] Zhang Y, Yan N, Wang X, et al. MiR-129-5p regulates cell proliferation and apoptosis via IGF-1R/Src/ERK/Egr-1 pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(12): 1–10.
- [5] Wan G, An Y, Tao J, et al. MicroRNA-129-5p alleviates spinal cord injury in mice via suppressing the apoptosis and inflammatory response through HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(3): 1–15.
- [6] 周亚欧, 龚震, 李通, 等. 高迁移率族蛋白 1 联合白细胞介素-1 β 及脂多糖对类风湿关节炎患者成纤维样滑膜细胞增殖及炎症因子分泌的影响 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2016, 20(7): 437–440.
- [7] 刘奕兵, 王超. 塞来昔布对老年膝骨性关节炎患者炎症因子、骨代谢和血液流变学指标的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(19): 4713–4715.
- [8] Morales-Sosa M, Orozco-Suárez S, Vega-García A, et al. Immunomodulatory effect of Celecoxib on HMGB1/TLR4 pathway in a recurrent seizures model in immature rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2018, 170(1): 79–86.
- [9] 吕邵娃, 崔杰, 段继新, 等. 类叶牡丹提取物对 TNF- α 诱导的人类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞因子的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(2): 143–148.
- [10] 郑志远, 卑明健, 张柳. COX-2 选择性抑制剂在骨关节炎中作用的研究进展 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2019, 22(2): 182–186.
- [11] 陈小青, 林金丁, 张华昆, 等. 塞来昔布对骨关节炎大鼠模型抗炎镇痛作用研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(10): 1315–1317.
- [12] 蔡辉, 姚茹冰, 王圆圆. 单味中药及有效成分对类风湿关节炎炎性细胞因子 TNF- α 的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(12): 5–8.
- [13] Zhang C, Chang J, Wu W, et al. Activation of GPR43 suppresses TNF- α -induced inflammatory response in human fibroblast-like synoviocytes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 684(1): 108297–108297.
- [14] Brandstetter B, Dalwigk K, Platzer A, et al. FOXO₃ is involved in the tumor necrosis factor-driven inflammatory response in fibroblast-like synoviocytes [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(5): 648–658.
- [15] Zhang Y, Wang S, Dong H, et al. LAIR-1 shedding from human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis following TNF- α stimulation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 192(2): 193–205.
- [16] Cheng Q, Chen X, Wu H, et al. Three hematologic/immune system-specific expressed genes are considered as the potential biomarkers for the diagnosis of early rheumatoid arthritis through bioinformatics analysis [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 18–28.
- [17] Li X, Qu M, Zhang J, et al. CircASH2L facilitates tumor-like biologic behaviours and inflammation of fibroblast-like synoviocytes via miR-129-5p/HIPK₂ axis in rheumatoid arthritis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 302–312.
- [18] Qiu M, Liu D, Fu Q. MiR-129-5p shuttled by human synovial mesenchymal stem cell-derived exosomes relieves IL-1 β induced osteoarthritis via targeting HMGB1 [J]. *Life Sci*, 2021, 269(1): 118987–118997.
- [19] Xiao N, Zhang J, Chen C, et al. MiR-129-5p improves cardiac function in rats with chronic heart failure through targeting HMGB1 [J]. *Mamm Genome*, 2019, 30(9–10): 276–288.
- [20] Li XQ, Chen FS, Tan WF, et al. Elevated microRNA-129-5p level ameliorates neuroinflammation and blood-spinal cord barrier damage after ischemia-reperfusion by inhibiting HMGB1 and the TLR3-cytokine pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 205–216.
- [21] Kaur I, Behl T, Bungau SG, et al. Exploring the therapeutic promise of targeting HMGB1 in rheumatoid arthritis [J]. *Life Sci*, 2020, 258(1): 1–11.
- [22] 张玉萍, 姚茹冰, 蔡辉. HMGB1 对类风湿关节炎作用的研究进展 [J]. *现代医学*, 2015, 43(9): 1203–1204.
- [23] Benedetti G B, Bonaventura P, Lavocat F, et al. IL-17A and TNF- α increase the expression of the antiapoptotic adhesion molecule amigo-2 in arthritis synoviocytes [J]. *Front Immunol*, 2016, 27(7): 254–262.

[收稿日期] 2021–12–08