

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.015

## S100A4 siRNA 对佐剂性关节炎大鼠炎症及细胞因子的影响\*

柏干苹, 李景怡, 张荣华, 王 勇, 方勇飞<sup>△</sup>

(第三军医大学西南医院风湿科, 重庆 400038)

**摘要:**目的 研究 S100A4 siRNA 对关节炎大鼠炎症及细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$  和血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响。方法 建立大鼠佐剂性关节炎模型, 造模后第 11 天给模型干扰组大鼠关节腔内注射 S100A4 siRNA 片段。观察各组大鼠关节炎指数(AI)的变化及踝关节的病理变化; ELISA 检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 的表达变化。结果 模型干扰组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 表达水平均比模型组降低 ( $P < 0.05$ ); AI 值及踝关节病理积分与模型组比较显著下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 抑制 S100A4 基因表达, 能显著降低致炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及促血管生成因子 VEGF 的表达, 减轻关节滑膜的病理损伤。

**关键词:** RNA, 小分子干扰; 大鼠; 关节炎, 实验性; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 白细胞介素 1 $\beta$ ; S100A4

中图分类号: R593.22

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)31-4162-03

### The effect of S100A4 siRNA on the inflammation and expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ in adjuvant arthritis rats\*

Bai Ganping, Li Jingyi, Zhang Ronghua, Wang Yong, Fang Yongfei<sup>△</sup>

(Department of Rheumatology, Southwest Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of S100A4 siRNA on the expression of serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and VEGF in adjuvant arthritis rats. **Methods** Adjuvant arthritis rat models were established and were randomly divided into model group and interfere group. On Day 11, rats in interfere group were injected with S100A4 siRNA fragment in articular cavity. Arthritis index (AI) changes and pathological changes of ankle joint were observed. The levels of serum TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , VEGF were detected by ELISA. **Results** Compared with that of model group, the levels of serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and VEGF were reduced significantly in interfere group ( $P < 0.05$ ); variances of AI and pathological scores in interfere group were diminished significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Inhibition of the expression of S100A4 gene can significantly reduce the expression of inflammatory factor TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and angiogenesis factor VEGF, and improve the pathological injury of synovial membrane.

**Key words:** RNA, small interfering; rats; arthritis, experimental; tumor necrosis factor-alpha; interleukin-1 beta; S100A4

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的基本病理变化是慢性滑膜炎, 其显著特征是滑膜明显增生, 炎性细胞浸润以及血管翳的形成。浸润的 T 淋巴细胞、单核细胞和滑膜细胞引起并维持着滑膜炎。研究显示, RA 滑膜成纤维细胞 (synovial fibroblasts, SFs) 具有转化细胞特征, 在连续培养中这些成纤维细胞表现出高增殖率、接触抑制缺失、组成性表达细胞因子 mRNA 和锚定非依赖性细胞生长等一些新的特性, 这种转化特性在 RA 的发生、发展中发挥着 T 细胞依赖途径所不可解释的重要作用<sup>[1-2]</sup>。SFs 的生长及病理学行为在许多方面类似于肿瘤组织的特性。S100A4 蛋白为 S100 蛋白家族成员之一, 其与肿瘤生物学特性的相关性已毋庸置疑, 由于 SFs 的生长及病理学行为在许多方面类似于肿瘤组织的特性, S100A4 与 RA 的关系越来越受到人们的关注。有文献报道, 在 RA 增殖的 SFs 中发现 S100A4 mRNA 表达增高, 细胞外 S100A4 可调节基质金属蛋白酶 (MMP) 的产生, 甚至 RA 患者血浆中 S100A4 水平增高<sup>[3]</sup>。虽然滑膜成纤维细胞在关节炎中的作用已得到肯定, 但其功能的分子机制仍不明确。为明确 S100A4 在 RA 滑膜炎中的作用, 本研究运用 RNA 干扰技术观察 S100A4 siRNA 对佐剂性关节炎大鼠炎症及细胞因子的影响,

探讨 S100A4 参与关节炎的机制。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验动物: SD 大鼠 24 只, 雌雄各半, 清洁级, 体重 160~200 g, 由第三军医大学动物实验中心提供, 饲养于本院中心实验室动物房。试剂: siRNA 片段由锐博生物技术有限公司合成, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$  及血管内皮生长因子 (VEGF) ELISA 试剂盒购自 R&D 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 干扰片段设计与干扰效果检测** 根据大鼠 S100A4 基因序列合成如下干扰片段, S100A4 siRNA-1: 5'-GUG ACA AGU UCA AGC UCA Att-3' (正义链); S100A4 siRNA-1: 5'-UUG AGC UUG AAC UUG UCA Ctt-3' (反义链)。将上述片段以脂质体 2000 转染体外分离培养大鼠关节炎滑膜细胞, 同时设置无关对照转染组, 观察转染效率, 同时采用蛋白免疫印迹 (Western blot) 方法检测干扰效果。

**1.2.2 大鼠佐剂性关节炎模型的建立与分组** 给予 SD 大鼠右后足跖皮内注射完全弗氏佐剂 100  $\mu$ L 致感染, 制成佐剂型关节炎大鼠模型 (AA 模型)<sup>[4]</sup>, 每天观察炎性肿胀情况至第 28 天, 成功造模 16 只。16 只 AA 模型大鼠分 2 组: 模型组、模型

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30971206)。 作者简介: 柏干苹 (1969-), 副主任医师, 博士, 主要从事风湿病临床及基础研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 18696620885; E-mail: fangyongfei@qq.com。

干扰组,各 8 只;另 8 只健康 SD 大鼠为正常组。致感染后第 11 天始隔天给模型干扰组 SD 大鼠的关节腔内注射脂质体包裹的 S100A4 siRNA 各 0.1 mL,共 5 次。继续观察实验大鼠炎性肿胀情况,并于造模后第 25 天行水合氯醛腹腔麻醉,取材进行后续实验。

**1.2.3 计算关节炎指数(AI)** 参照文献[4]进行大鼠的足爪炎症计分。每只足爪的 AI 评分标准:0=正常;1=踝关节出现红斑和轻微肿胀;2=踝关节到跖关节或掌关节出现红斑和轻微肿胀;3=踝关节到跖趾关节或掌关节出现红斑和中度肿胀;4=踝关节到趾关节出现红斑和重度肿胀。每只大鼠最多评12分。

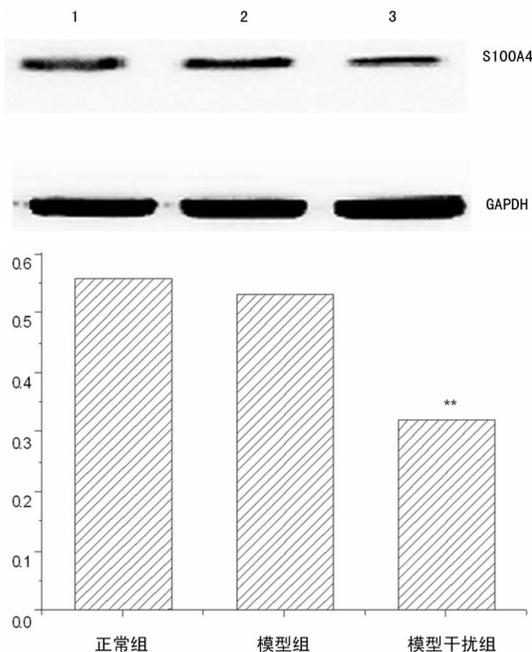
**1.2.4 HE 染色观察踝关节病理变化** 取双侧踝关节,经固定、脱水、包埋、切片等处理,HE 染色后光镜下观察组织切片病理改变。根据文献[5]进行半定量评分,0分:关节具有正常结构,如关节间隙、软骨、骨和滑膜组织等;1分:关节组织中有纤维形成和轻度关节炎,并有滑膜增生、血管数量增加以及小的炎性细胞灶,无软骨和骨侵蚀破坏;2分:关节有软骨侵蚀破坏和轻度关节炎,大量炎性细胞浸润,滑膜增生和血管翳形成,无骨和关节结构破坏;3分:有严重血管翳形成,广泛软骨、骨和关节结构破坏。

**1.2.5 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 表达水平** 造模后 25 d 取各组血清,采用 ELISA 方法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 水平的变化情况。具体步骤参照 ELISA 试剂盒说明书进行。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间均数比较采用方差分析,采用 LSD 法进行组间两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 S100A4 干扰片段转染效率及干扰效果** 以带荧光标记的无关干扰对照片段转染大鼠滑膜细胞,荧光显微镜观察显示转染效率约 95%,转染 48 h 后 Western blot 检测显示,S100A4 siRNA 对目的基因蛋白的干扰效率约 60%,见图 1。



\*\* :  $P < 0.05$ , 与正常组比较。

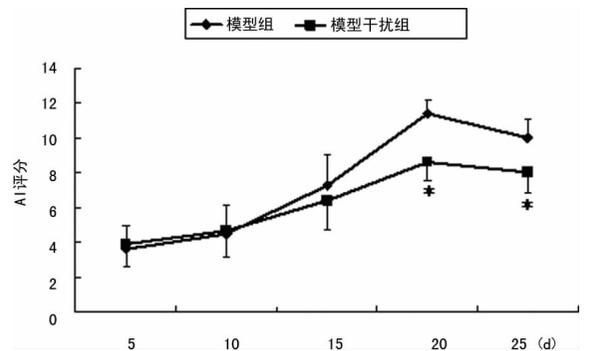
图 1 S100A4 siRNA 对目的基因蛋白的干扰效果

**2.2 大鼠的足趾肿胀度及 AI 的变化** 大鼠致炎后第 2 天,模型组及模型干扰组大鼠均出现注射局部红肿,皮肤温度升高,足肿胀;第 3~4 天足趾肿胀达高峰,继发性炎症反应于致炎后 10 d 左右出现,表现为对侧和前足肿胀且进行性加重,血管周围炎症、红斑和结节;第 21 天达高峰,病变从足趾波及四肢关节,且症状较原发时加重,大鼠出现活动及摄食减少、体质量下降、倦怠嗜卧等表现,足趾红肿、增厚,局部皮肤温度升高。正常组无异常变化。从炎症出现后,每隔 5 d 进行 AI 评分,结果显示正常组评分均为 0 分,模型组及模型干扰组 AI 评分均高于正常组,但出现继发性炎症反应后模型干扰组评分低于模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 2、3。



A: 正常组; B: 模型组; C: 模型干扰组。

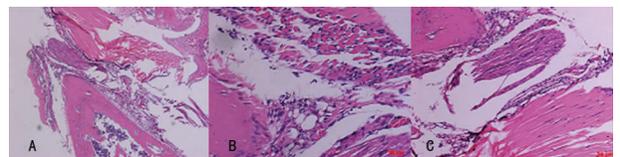
图 2 大鼠足爪肿胀情况



\* :  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

图 3 AI 评分结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**2.3 关节组织的病理学变化** 正常组大鼠双侧踝关节组织学结构正常。模型组滑膜可见不同程度的水肿、炎细胞浸润,滑膜衬里层增厚,细胞层次增多,排列紊乱,滑膜下层纤维组织增生,有肉芽组织形成,部分滑膜增生向关节腔突出,关节间隙增宽,软骨损伤,骨小梁变细;模型干扰组病理改变如炎细胞浸润、滑膜增生、软骨破坏程度等均较模型组减轻,模型组踝关节病理积分明显高于模型干扰组 ( $P < 0.05$ ),见图 4。

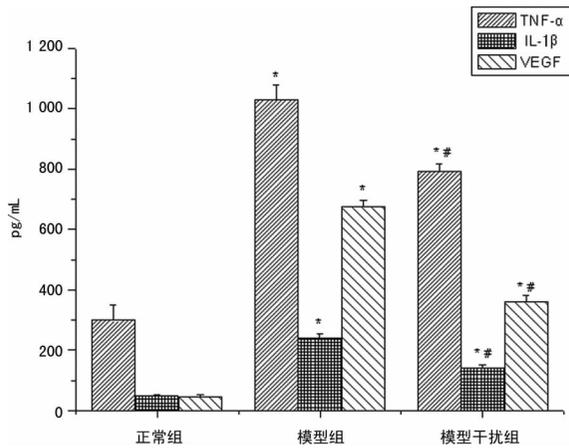


A: 正常组; B: 模型组; C: 模型干扰组。

图 4 大鼠踝关节病理变化

**2.4 各组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 表达水平的变化** ELISA 检测结果显示,模型干扰组大鼠细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 均较模型组有所降低,差异有统计学意义 ( $P <$

0.05), 见图 5。



\*:  $P < 0.05$ , 与正常组比较; #:  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

图 5 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 表达的变化

### 3 讨论

许多研究证实,滑膜成纤维细胞在形态学及生物活性上发生了转变,包括信号级联和凋亡反应分子的变化以及黏附分子和基质降解酶的变化等,使之在不需要外界不断刺激条件下就处于稳定活化状态,不仅直接和间接参与骨与软骨的侵蚀,而且参与调节 RA 关节中炎症的播散、血管翳结构的维持等病理过程,在 RA 的发生、发展及病情迁延中具有重要的作用。因此,在 RA 复杂的细胞网络中,滑膜成纤维细胞不仅仅是个旁观者,而是一个活跃的主动参与者<sup>[6-7]</sup>。

演变的滑膜细胞、浸润增殖的炎性细胞等,分泌大量的促炎性细胞因子,这些细胞因子是引起炎症免疫、蛋白质水解、细胞募集和增殖的重要媒介,能激发关节局部炎症反应和急性应答。多项研究认为,滑膜成纤维细胞是滑膜炎症的重要发起者,可分泌一系列不同的细胞因子对单核/巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、基质细胞和骨细胞发挥多效性作用<sup>[8-9]</sup>。其能够应答并产生的炎症介质包括:IL-1、4、6、8、10、12、13、15、17、18、21, TNF- $\alpha$ 、TGF $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、iNOS,并且能够上调 COX2 和 PGE2,而这些高水平的细胞因子又与滑膜细胞增殖有关。同时滑膜成纤维细胞能释放许多重要的促血管生成细胞因子和生长因子,如成纤维细胞生长因子(FGF)、VEGF、血管生成素 I (Ang I)、IL-18 等<sup>[10]</sup>,说明滑膜成纤维细胞在血管翳的生成和关节炎的进程中都具有重要促进作用。

由于滑膜成纤维细胞的生长及病理学行为在许多方面类似于肿瘤组织的特性,而 S100A4 蛋白与肿瘤生物学特性的相关性已毋庸置疑,因此 S100A4 与 RA 的关系越来越受到人们的关注。S100A4 为 S100 蛋白家族成员之一,参与细胞异常增生、细胞恶变、瘤细胞的运动性增强、细胞间的黏附力降低、浸润力增强、促新生血管生长等几乎包括瘤细胞发生、发展的整个病理过程,与恶性肿瘤的侵袭和转移有着密不可分的联系。S100A4 在 RA 滑膜成纤维细胞、RA 患者血浆中的水平增高,甚至与疾病活动度、放射学改变有密切关系均已得到证实,但其功能的分子机制仍不明确<sup>[11-12]</sup>。本研究成功建立 SD 大鼠佐剂性关节炎模型,予关节腔内注射 S100A4 siRNA 片段后,发现关节的炎性肿胀有所减轻,检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 VEGF 的表达均较模型组降低。HE 染色显示,模型组滑膜组织中有

大量炎性细胞浸润,滑膜组织增生明显,关节间隙变窄,部分关节软骨破坏。注射 S100A4 siRNA 片段后,炎性细胞浸润及滑膜增生现象减轻,进一步证明 S100A4 参与滑膜的异常增殖及关节炎的过程。抑制 S100A4 基因表达,能显著降低致炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及促血管生成因子 VEGF 的表达,显著减轻关节滑膜的病理损伤。提示 S100A4 可能在关节滑膜炎的发生、发展过程中发挥了重要作用。

在慢性炎症复杂的细胞网络中,细胞因子起着关键的协同联合作用,他们作为一个整体(协作组)行使功能或参与细胞-细胞接触依赖性的相互作用。滑膜炎可视为滑膜衬里层中多个细胞在细胞因子的驱使下短暂地组成功能性亚单位,在细胞外基质趋化梯度影响下所体现的迁移效应。在这个网络中,S100A4 对滑膜成纤维细胞增殖的影响以及对 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  产生的影响究竟在滑膜的慢性炎症中扮演者怎样的角色不得而知,二者的因果关系亦尚未明确,但本研究为进一步研究滑膜成纤维细胞的活化特性提供了新的依据,也为 RA 发病机制的研究及新的治疗靶点研究提供了新的线索。

### 参考文献:

- [1] Noss EH, Brenner MB. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Rev*, 2008, 223: 252-270.
- [2] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid Arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [3] Klingelhöfer J, Senolt L, Baslund B, et al. Up-regulation of metastasis promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(3): 779-789.
- [4] 李培培, 解国雄, 宋珊珊, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(5): 453-457.
- [5] Lubberts E, van den Bersselaar L, OppersWalgreen B, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine Collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B Ligand/osteoprotegerin balance [J]. *J Immunol*, 2003, 170(5): 2655-2662.
- [6] 栗占国, 张奉春, 鲍春德. 类风湿关节炎[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 46.
- [7] Leech MT, Morand EF. Fibroblasts and synovial immunity [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(4): 565-569.
- [8] Milman N, Karsh J, Boot RA. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(16/17): 1309-1314.
- [9] Le Goff B, Blanchard F, Berthelot JM, et al. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2010, 77(3): 201-205.

控因素、调控通路尚未研究清楚<sup>[18]</sup>。因此,还需在以后的研究中继续探索。

综上所述,本实验采用分子克隆技术成功构建了 miR-424 的慢病毒载体,并构建了基于宫颈癌 HeLa 细胞的高效转染系统,并证实了被 miR-424 慢病毒感染后的宫颈癌 HeLa 细胞株表现出增殖抑制,为下一步研究 miR-424 在宫颈癌中的作用靶点以及对其进行功能研究和体外实验奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259-269.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [3] Lee JW, Choi CH, Bae DS, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2535-2542.
- [4] Fassan M, Baffa R, Palazzo JP, et al. MicroRNA expression profiling of male breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(4): R58.
- [5] Liu Q, Fu H, Sun F, et al. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(16): 5391-5404.
- [6] Forrest AR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, et al. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation[J]. *Leukemia*, 2010, 24(2): 460-466.
- [7] Kawahigashi Y, Mishima T, Mizuguchi Y, et al. MicroRNA profiling of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines[J]. *J Nippon Med Sc*, 2009, 76(4): 188-197.
- [8] Pallasch CP, Patz M, Claus R et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood*, 2009, 114(15): 3255-3264.
- [9] Imig J, Motsch N, Zhu JY, et al. microRNA profiling in

Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(5): 1880-1893.

- [10] Rentoft M, Fahlen J, Coates PJ, et al. miRNA analysis of formalin-fixed squamous cell carcinomas of the tongue is affected by age of the samples [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(1): 61-69.
- [11] Wang YX, Zhang XY, Zhang BF, et al. Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis[J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(1): 50-54.
- [12] 卿毅. 放射线抵抗宫颈癌细胞株 DNA 损伤修复基因表达谱的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2009.
- [13] Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(11): 4141-4154.
- [14] Chow TF, Mankaruos M, Scorilas A, et al. The miR-17-92 cluster is over expressed in and has an oncogenic effect on renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 2010, 183(2): 743-751.
- [15] Wang X, Tang S, Le SY et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2557.
- [16] Sarkar S, Dey BK, Dutta A. MiR-322/424 and-503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A[J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(13): 2138-2149.
- [17] Xu J, Li Y, Wang F, et al. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(8): 976-987.
- [18] 刘梅, 贺平, 罗志华, 等. MiRNA 与肿瘤[J]. *西部医学*, 2012, 24(5): 1022-1024.

(收稿日期: 2014-05-10 修回日期: 2014-07-22)

(上接第 4164 页)

- [10] Strunk J, Rumbaur C, Albrecht K, et al. Linking systemic angiogenic factors (VEGF, angiogenin, TIMP-2) and Doppler ultrasound to anti-inflammatory treatment in rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(3): 270-273.
- [11] Oslejsková L, Grigorian M, Hulejová H, et al. Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease ac-

tivity of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2009, 48(12): 1590-1594.

- [12] Erlandsson MC, Forslind K, Andersson SE, et al. Metastatin S100A4 is increased in proportion to radiographic damage in patients with RA[J]. *Rheumatology*, 2012, 51(5): 932-940.

(收稿日期: 2014-04-08 修回日期: 2014-07-22)

# 欢迎投稿

# 欢迎订閱