

uPAR在类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中的功能及机制

刘 岩¹, 潘云峰^{1*}, 方霖楷¹, 郭 欣², 吴云婷¹

(1. 中山大学附属第三医院风湿免疫科, 广东 广州 510630; 2. 广东省第二人民医院风湿免疫科, 广东 广州 510310)

摘要: 【目的】采用 RNA 干扰(RNAi)技术阻断类风湿关节炎(RA)成纤维样滑膜细胞(FLS)尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uPAR)基因的表达,探讨 uPAR 基因沉默后对 RA-FLS 功能产生的影响及有关机制。【方法】收集行关节置换术或滑膜清理术的 RA 患者的滑膜组织,组织块法培养 RA-FLS。通过阳离子脂质体转染的方法,转染体外合成的特异性 uPAR-siRNA;利用荧光定量 PCR 法和 Western blotting 法检测 uPAR 沉默效果;CCK8 法检测细胞增殖抑制率;流式细胞技术检测细胞周期改变;Transwell 趋化小室测定细胞的迁移能力;Western blotting 技术分析沉默 uPAR 基因对 RA-FLS 中 PI3K/AKT 通路的影响。【结果】uPAR-siRNA 能有效阻断 RA-FLS 中 uPAR 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达。沉默 uPAR 基因后,细胞 48、72、96 h 增殖抑制率分别为 (17.51 ± 2.27)%、(28.62 ± 4.82)%、(22.91 ± 5.78)%,显著高于对照组 ($P < 0.05$);uPAR-siRNA 干扰后,被阻滞于 G₀/G₁ 期的细胞增加,而 S 和 G₂/M 期的细胞减少;Transwell 趋化小室结果显示:与对照组相比,特异性干扰组的 RA-FLS 迁移细胞数(35 ± 11)相比空白对照组(138 ± 21)和 NC-siRNA 组(136 ± 19)明显减少($P < 0.05$);转染后的 RA-FLS 相对于对照组,PI3K、AKT、GSK3 β 的磷酸化水平显著降低($P < 0.05$)。【结论】uPAR 在 RA-FLS 的增殖、周期及迁移中起重要作用,这可能与其对 PI3K/AKT 通路的激活有关。

关键词: uPAR; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; RNA 干扰; 增殖; 迁移; PI3K/AKT

中图分类号: R593

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)02-0200-07

Effects and Mechanisms of uPAR Expression in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes

LIU Yan¹, PAN Yun-feng^{1*}, FANG Lin-kai¹, GUO Xin², WU Yun-ting¹

(1. Department of Rheumatology and Immunology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Department of Rheumatology and Immunology, The Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510310, China)

Abstract: 【Objective】 To observe the effects and mechanism of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS). 【Methods】 Tissues were collected from RA patients with joint replacement surgery or arthroscopy and RA-FLS were obtained by tissue culture. Chemically synthesized small interference RNA (siRNA) specifically targeting uPAR gene was transfected into RA-FLS by cationic liposome. The interference efficiency of uPAR-siRNA on the production of uPAR mRNA and protein was determined by RT-qPCR and Western blotting respectively. The proliferative inhibition rate was examined by CCK8 assay. Flow cytometry was adopted to determine the change of cell cycle distribution. The migration of RA-FLS was examined by Transwell assay. Western blotting was performed to detect the influence of uPAR on PI3K/AKT signal pathway. 【Results】 Transfection of uPAR-siRNA significantly decreased the mRNA and protein expression of uPAR gene. The proliferative inhibition rate was obviously higher in the uPAR-siRNA group than the control groups ($P < 0.05$) after transfection for 48 h (17.51 ± 2.27)%, 72 h (28.62 ± 4.82)%, 96 h (22.91 ± 5.78)%. Flow cytometry assay showed accumulation of cells in the G₀/G₁ phase and the number of RA-FLS in the S and G₂/M decreased; Transwell migration assay demonstrated the RA-FLS through the transwell membrane in uPAR-siRNA group (35 ± 11) were lesser than the NC-siRNA group (136 ± 19) ($P < 0.05$) and the blank control group (138 ± 21) ($P < 0.05$). After transfected with uPAR-siRNA, the phosphorylation of PI3K/AKT/GSK3 β decreased

收稿日期: 2013-11-14

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B031800363)

作者简介: 刘岩, 硕士, 研究方向: 风湿免疫, E-mail: liuyan_fs@163.com; * 通信作者: 潘云峰, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: panyunfeng@medmail.

com.cn

significantly. 【Conclusion】 uPAR may play a role in the regulation of proliferation, cell cycle and migration of RA-FLS through activation of PI3K/AKT/ GSK3 β signal pathway.

Key words: uPAR; arthritis/rheumatoid; fibroblast-like synoviocyte; RNA interference; proliferation; migration; PI3K/AKT

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2014, 35(2): 200-206]

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以慢性进行性关节破坏为主的全身炎症性自身免疫病, 基本病理表现为慢性滑膜炎, 衬里层的成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocyte, FLS) 是介导滑膜炎反应、血管翳形成和关节破坏的主要效应细胞。近年来研究发现, RA-FLS 在慢性炎症中激活后, 具有不完全的类肿瘤细胞特性^[1], 如增殖程度增加、逃脱接触抑制、迁移侵袭能力增强等。尿激酶型纤溶酶原激活物受体 (urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR), 是细胞表面的一种多功能受体, 广泛存在于内皮细胞、成纤维细胞及多种恶性肿瘤细胞表面。其配体尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 与 uPAR 结合后, 主要通过两种方式发挥作用: ① uPAR 和 uPA 的结合可激活细胞表面的纤溶酶原转化为纤溶酶, 活化基质金属蛋白酶 (MMP), 降解多种基质蛋白, 加速细胞的转移和侵袭; ② 二者与其他跨膜蛋白结合, 活化细胞内信号分子, 例如酪氨酸与丝氨酸蛋白激酶、Src、信号转导和转录激活 (STAT) 等, 通过激活下游多种信号蛋白来调节细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和侵蚀。研究发现, uPAR 在类风湿关节炎和骨关节炎等炎性关节病的滑膜组织^[2]、滑液^[3]甚至血浆^[4]中的表达均高于正常, 以 RA 患者中升高最明显。体外培养的细胞实验证实类风湿关节炎和骨关节炎等炎性关节病的多种细胞均能合成和表达 uPAR, 尤其在 RA 患者的滑膜衬里层细胞最为显著^[5]。但是 uPAR 在 RA-FLS 的功能改变上究竟起着怎样的作用, 它又是通过何种途径发挥这些功能则机制不明。本文利用 siRNA 干扰技术对此问题进行了初步探讨, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 标本采集

本实验所有滑膜标本均取自 2011 年 3 月至 2013 年 10 月中山大学附属第三医院行膝关节滑膜清理术或膝关节置换术的患者, 共 8 例, 其中女

性 6 例, 男性 2 例。平均年龄 48.2 ($S = 8.7$) 岁, 平均病程 110.6 ($S = 37.5$) 月。RA 诊断符合 1987 年美国风湿病协会 (ACR) 修订的诊断标准。获取滑膜组织后无菌环境保存并立即送至实验室进行原代培养。

1.2 试剂与材料

胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及高糖 DMEM 无血清培养基购自美国 Hyclone 公司; RNAiso Plus (RNA 提取液)、PrimeScript[®] RT reagent Kit、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II Kit 均购自 Takara 宝生生物公司; 总蛋白提取试剂盒为北京天根生化科技有限公司购得; uPAR 一抗购自美国 Santa Cruz, p-PI3K 购自美国 Millipore, p-Akt、p-GSK3 β 一抗均购自 Cell Signaling; GAPDH 一抗、标记二抗购自北京博奥森生物技术有限公司; 细胞增殖与毒性试剂盒 (CCK8) 为广州晶欣生物科技有限公司产品; 无血清培养基 Opti-MEM、脂质体 Lipofectamine[®] RNAiMAX 为 invitrogen 公司产品; 所需 uPAR-siRNA、阴性对照 NC-siRNA、GAPDH-siRNA、荧光标记 siRNA 双链由上海吉玛公司合成; 碘化丙啶 (PI) 和 Rnase A 购自上海江莱生物技术有限公司; Transwell24 孔板购自美国 Corning 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的分离培养 无菌条件下获取 RA 滑膜组织, 剔除脂肪、血管及纤维组织, PBS 缓冲液冲洗 2~3 次后, 将其反复锐性剪碎至约 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 小块, 将组织块移至培养瓶中平铺均匀, 加入适量含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。根据细胞培养情况, 每 2~3 天换液 1 次。细胞生长覆盖率 > 80% 时, 用胰酶消化法传代, 培养至 3~6 代用于以下实验。

1.3.2 siRNA 转染 RA-FLS 细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL。细胞融合度达到 70%~80% 时转染体外合成的小分子 siRNA, siRNA 终浓度为 40 nmol/L。依据不同实验方法设立不同分组。特异性小分子 uPAR-siRNA 序列: 正义链 5'-GCCGUUACCUCGAAUGCAUTT-3'; 反义

链 5'-AUGCAUUCGGUAACGGCTT-3'。阴性对照 NC-siRNA 序列: 正义链 5'-UUCUCCGAACGUG UCACGUTT-3'; 反义链: 5'-ACGUGACACGUUCG GAGAATT-3'。转染 24 h 后收集细胞, 提取总 RNA 进行荧光定量 PCR, 检测有关 mRNA 含量。或行换液处理, 继续培养至 48 h 时收集细胞, 提取总蛋白, 行 Western blotting 操作, 检测有关蛋白的表达情况。

1.3.3 Real time-qPCR 法检测 uPAR mRNA 的表达 转染 24 h 后收集细胞, RNAiso Plus 提取总 RNA, 紫外分光光度计检测总 RNA 含量。按 PrimeScript® RT reagent Kit 试剂盒说明书进行反转录, 反转录的 cDNA 按 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书进行两步法 PCR 反应操作, 检测 uPAR mRNA 的表达。引物序列如下: GAPDH 正义链 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', 反义链 5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'; uPAR 正义链 5'-TGTAAGACCAACGGGGATTGC-3', 反义链 5'-AGCCAGTCCGATAGCTCAGG3'。ABI 7000 荧光定量 PCR 扩增仪上进行反应, 反应结束后分析各样本 Ct 值, 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行目标基因的相对定量。

1.3.4 Western blotting 分析相关蛋白表达 转染 48 h 后收集 RA-FLS, 总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, BCA 法蛋白定量, 各组取等量蛋白混匀上样缓冲液, 100 °C 水浴变性 5 min。经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 湿转法电转印到 PVDF 膜, 5% BSA 封闭后加入 I 抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, II 抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜处理, 浸泡于 ECL 发光液 2 min 后, 于凝胶自动成像系统曝光。用 Alpha View SA 软件进行分析, 读取吸光度 A。使用目的蛋白条带光密度值与 GAPDH 蛋白光密度值的比值表示相对定量。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞生长抑制情况 将处于对数生长期的 RA-FLS 细胞以 $2.5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 细胞融合度达到 50% 时按以上方法进行转染。实验分: ①空白对照组: 仅加正常培养液和 RA-FLS; ②溶剂对照组: 加入转染试剂、正常培养液和 RA-FLS; ③阴性对照组: RA-FLS 转染非特异性 NC-siRNA; ④uPAR-siRNA 组: RA-FLS 转染 uPAR-siRNA。转染 24 h 后换液, 并于转染 24、48、72、96 h 后, 每孔加入 CCK8 液 10 μL , 37 °C 继续孵育 3 h, 在分光光度计

450 nm 波长处检测吸光度(A)值, 计算各样本与仅加培养基的无细胞孔 A 值的差值 ΔA 。计算公式: 细胞增殖抑制率(%) = $(1 - \Delta A_{\text{实验组}} / \Delta A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的 RA-FLS 以 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL。贴壁后同步化培养 12 h。按以上方法进行转染。设只加培养基和 RA-FLS 的空白对照组, 阴性对照 NC-siRNA 组和目的基因 uPAR-siRNA 组。转染 24 h 后换液, 加入含 20% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 24 h。收集细胞, 将细胞制成单细胞悬液, 预冷 PBS 洗涤 2 次后小心吸弃残余液体, 沿管壁缓慢加入预冷 70% 乙醇 1 mL 重悬细胞, 4 °C 固定过夜。取出固定的样品, PBS 洗涤 2 次后, 加入 500 μL PBS 重悬细胞, 再加入 5 μL RNaseA, 37 °C 放置 20 min。离心后吸弃上清, 加入 95 μL PBS 重悬细胞, 并加入 5 μL 1 mg/mL 的 PI 溶液冰上避光染色 20 min。加入 600 μL 含 0.1% BSA 的 PBS, 轻柔混匀, 300 目尼龙网过滤除杂质, 移至流式管中, 上机检测。检测结果使用 Modifit 分析软件分析。细胞增殖活性由增殖指数 (proliferation index, PI) 描述, PI 值越高, 细胞增殖越明显。PI = $(G_2/M + S) \text{ 期细胞数} / (G_2/M + S + G_0/G_1) \text{ 期细胞数} \times 100\%$ 。

1.3.7 Transwell 小室趋化实验 在 24 孔板中放入微孔径 8.0 μm 的 Transwell 小室, 下室放入 600 μL 含 10% FBS (作为趋化因子) 的 DMEM。采集已用上述方法转染 48 h 的 RA-FLS, 用无血清 DMEM 洗涤 2 次, 重悬于无血清的 DMEM 中, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 取 100 μL 悬液加至上室, 37 °C、体积分数为 5% CO_2 恒温培养箱中继续孵育 20 h。用棉签轻擦去 Transwell 膜上的细胞, 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 5 min, 放于显微镜下观察。在每张膜的中轴线上随机选取 5 个视野, 计数膜下细胞, 5 个视野平均数的多少表示侵袭力大小。

1.4 统计学处理

所有数据用 SPSS17.0 统计软件处理, 定量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组样本比较用 *t* 检验, 多个样本均数比较采用 One-Way ANOVA 分析, 两两比较使用 LSD 法。如果数据为非正态性分布, 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RA-FLS 细胞培养及鉴定

光学显微镜下观察,组织贴壁后 2 ~ 3 d 可见细长型细胞从组织边缘爬出,逐渐增多呈放射状(图 1A)。1~2 周后渐覆盖瓶底 70%~80%。3 代后细胞类型逐渐纯化,细胞呈长梭型,胞核卵圆形居中,形态与 FLS 相符(图 1B)。流式细胞术检测细胞表面标记 CD55 表达,结果显示培养第 3 代 RA-FLS 细胞表面 CD55 阳性表达率达 93.2%(图 2)。

2.2 转染 siRNAs 后对 RA-FLS uPAR mRNA 和蛋白表达的影响

荧光定量 PCR 技术检测 RA-FLS 转染

uPAR-siRNA 后 uPAR mRNA 表达,Ct 经过 GAPDH 标准化处理后,特异性的 uPAR-siRNA 对 mRNA 的干扰效率为 $(84.0 \pm 3.8)\%$,与空白对照和阴性对照相比差异有统计学意义 $(1.16 \pm 0.24$ vs 1.00 ± 0.00 or $0.16 \pm 0.04)$ 。Western blotting 检测显示,转染 uPAR-siRNA 48 h 后,uPAR 蛋白表达明显下降,沉默效率相对于空白对照组为 $(89.35 \pm 11.12)\%$ ($P < 0.05$),较阴性对照组为 $(90.44 \pm 9.91)\%$ ($P < 0.05$)。NC-siRNA 对 uPAR 基因表达无明显影响(图 3)。

2.3 CCK8 法检测细胞增殖

CCK-8 法显示转染 uPAR-siRNA 的细胞增殖曲线在转染后 48 h 显著降低,随后缓慢上升。空白对照组、仅加转染试剂组和 NC-siRNA 组的增

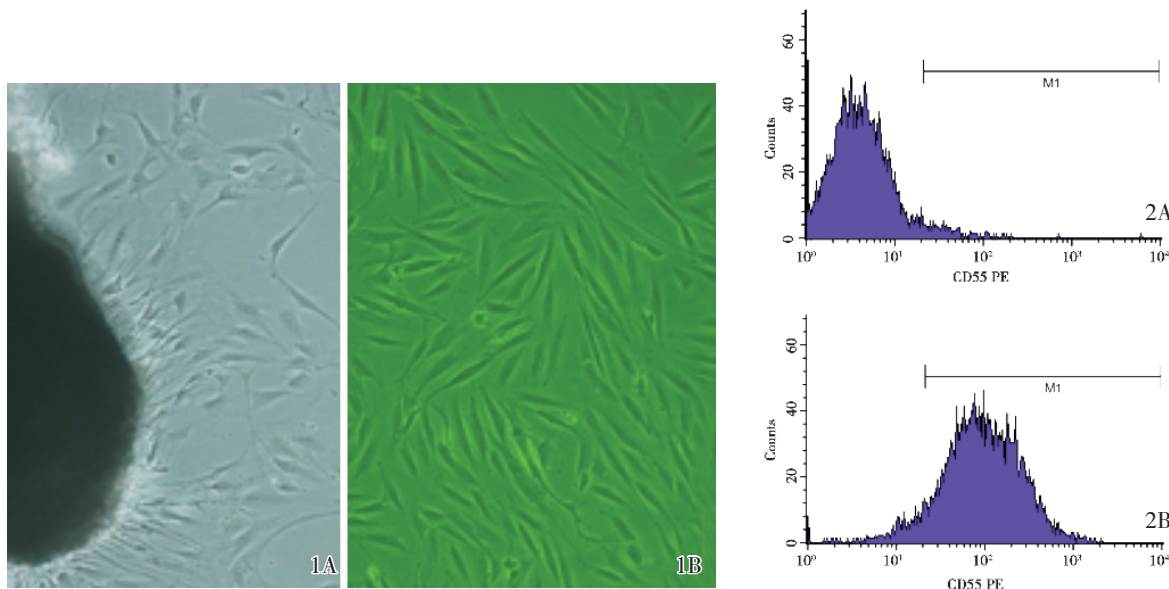


图 1 光学显微镜下 RA-FLS 细胞形态

Fig.1 Morphology of RA-FLS observed under optical microscope

A: Primary cells scratched from the tissues; B: Passage 3 RA-FLS. $\times 100$

图 2 流式细胞术检测第三代 RA-FLS 表面 CD55 表达

Fig.2 CD55 expression of passage 3 RA-FLS detected by flow cytometry

A: blank control; B: CD55 positive RA FLS

表 1 siRNA 转染不同时间后 RA-FLS 细胞增殖抑制率

Table 1 The proliferative inhibition of RA-FLS after uPAR-siRNA transfection

(%, $\bar{x} \pm s, n = 4$)

Group	Proliferative inhibition rate			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Blank control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Transfection reagent	-2.15 ± 5.84	3.16 ± 2.95	3.54 ± 2.08	0.16 ± 4.20
NC-siRNA	-2.55 ± 6.51	6.95 ± 2.86	6.90 ± 4.44	3.03 ± 4.95
uPAR-siRNA	2.90 ± 3.73	17.51 ± 2.27	28.62 ± 4.82	22.91 ± 5.78

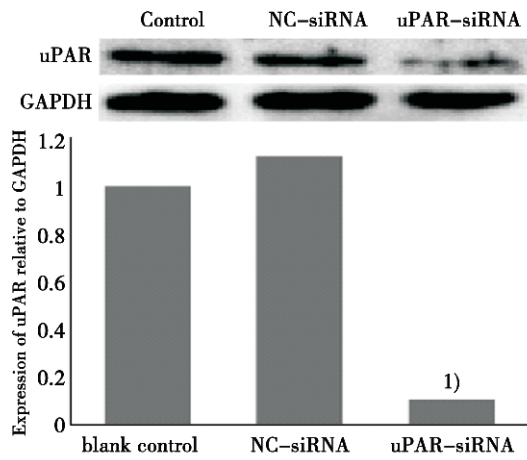


图 3 转染 siRNA 48 h 后各空白对照组、NC-siRNA 组、uPAR-siRNA 组 uPAR 的蛋白表达

Fig.3 Western blot analyses of uPAR expression in blank control cells, NC-siRNA transfectants and uPAR-siRNA transfectants

1) $P < 0.05$ vs blank control and NC-siRNA group

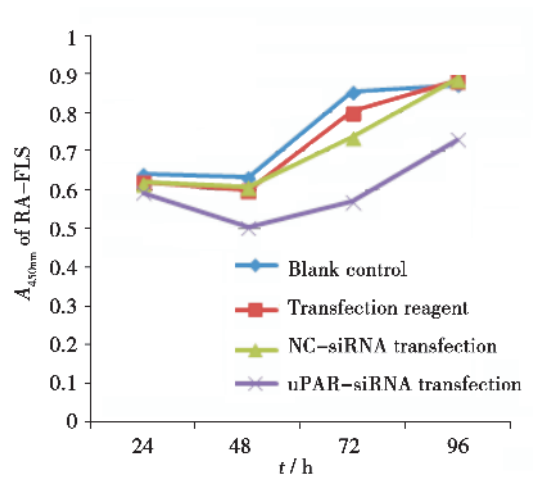


图 4 siRNA 转染后 RA-FLS 增殖曲线

Fig.4 Cell growth curves of RA-FLS treated with si-RNA

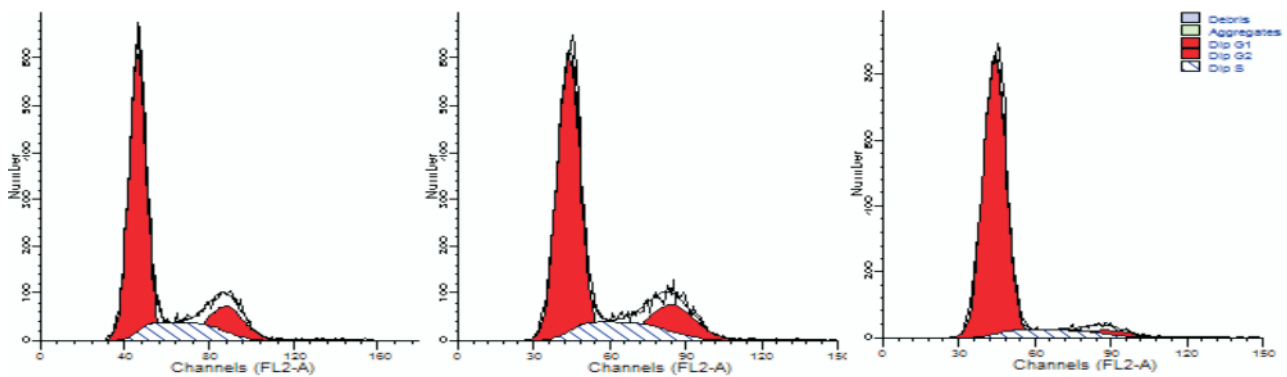


图 5 流式细胞术检测转染 48 h 后 RA-FLS DNA 分布图

Fig.5 Flow cytometry detected the DNA distribution of RA-FLS

A: Blank control; B: NC-siRNA transfection; C: uPAR-siRNA transfection

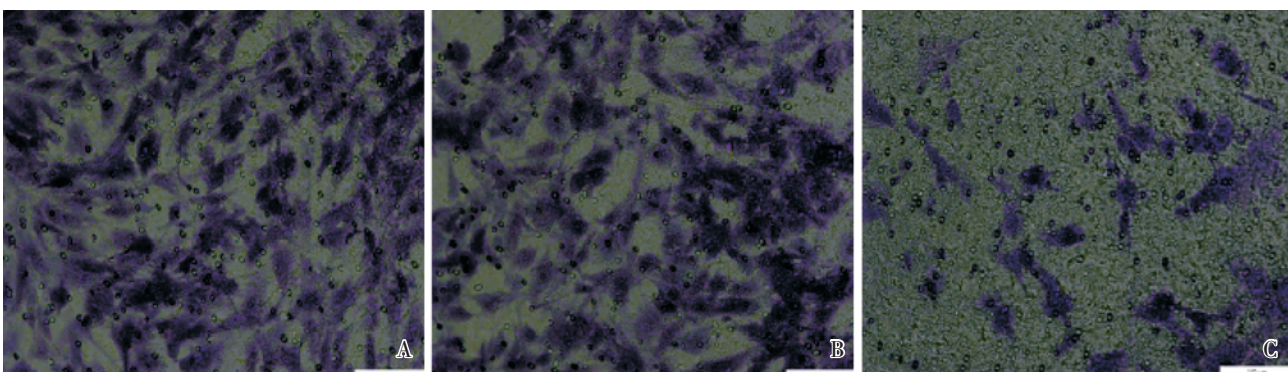


图 6 镜下观察 Transwell 膜下 RA-FLS

Fig.6 RA-FLS under transwell membrane

A: Blank control; B: NC-siRNA transfection; C: uPAR-siRNA transfection; $\times 100$

殖曲线呈平稳上升态,明显高于 uPAR-siRNA 组,该差异在转染后 72 h 最为显著(图 4)。uPAR-siRNA 组的增殖抑制率在转染后 48、72、96 h 分别增至 $(17.51 \pm 2.27)\%$ 、 $(28.62 \pm 4.82)\%$ 、 $(22.91 \pm 5.78)\%$,相比对照组群差异有统计学意义($P < 0.05$)。空白对照组、仅加转染试剂组和 NC-siRNA 组细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$;表 1)。

2.4 流式细胞术检测细胞周期

转染 48 h 后,uPAR-siRNA 组细胞 $G_2/M+S$ 期所占的百分比为 $(13.60 \pm 4.31)\%$,明显低于空白对照组 $(27.49 \pm 5.00)\%$ 和 NC-siRNA 组 $(28.99 \pm 4.45)\%$ ($P < 0.05$)。RA-FLS 被阻滞于 G_0/G_1 期,进入 DNA 合成阶段的细胞数减少(图 5)。

2.5 Transwell 趋化实验检测细胞迁移

在 100 倍显微镜下观察膜下细胞,可见 uPAR-siRNA 组的穿膜细胞明显少于对照组(图 6)。计数膜下细胞,uPAR-siRNA 组 (35 ± 11) 个相对于空白对照组 (138 ± 21) 个和 NC-siRNA 组 (136 ± 19) 个,迁移能力分别降低了 74.82% 和 74.51%,差异有统计学意义 $P < 0.05$ 。

2.6 Western blotting 检测转染 siRNA 后,AKT 通路相关蛋白表达

RA-FLS 转染 uPAR-siRNA 48 h 后,AKT 通路相关磷酸化蛋白的表达条带(图 7)。对条带灰度行半定量分析,结果显示 uPAR-siRNA 组蛋白 p-PI3K,p-AKT,p-GSK3 β 较 NC-siRNA 组和正常对照组显著降低($P < 0.05$)。

3 讨 论

uPAR,又名 CD87,是一种单链糖蛋白,在 Ser282 和 Gly283 位点通过糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜表面,具有丝氨酸蛋白水解酶活性。uPAR 在细胞膜表面结合 uPA 和 prouPAR,后,不但能使无活性的 prouPAR 转化为有活性的 uPA,也可以使 uPA 的活性明显增加。uPA/uPAR 复合体促使纤溶酶原转化为纤溶酶,显著降解细胞外基质和基底膜成分,同时还可以活化前金属蛋白酶,激活和释放胞外基质中的胶原酶原、细胞因子、生长因子,共同参与细胞外基质的降解过程。此外,由于缺少跨膜区域,uPAR 与 uPA 结合后需要在其他信号分子的协助下才能向细胞内传递信号,如整合素(integrin)、玻连蛋白(vitronectin)

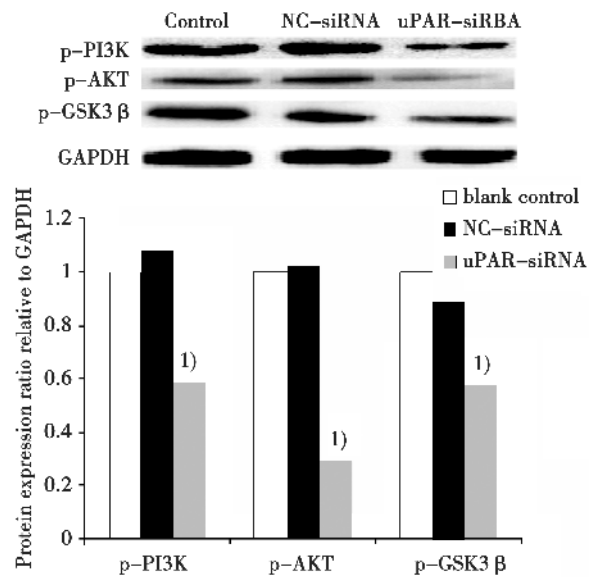


图 7 转染 siRNA 48 h 后 RA-FLS 中 p-PI3K、p-AKT 和 p-GSK3 β 的表达

Fig.7 Expression of p-PI3K, p-AKT, p-GSK3 β in RA-FLS after transfection siRNA for 48 h

1) $P < 0.05$ vs NC-siRNA group and blank control

等。因此,与这些跨膜蛋白有关的胞内信号分子必然也会受到 uPA/uPAR 系统的影响,例如酪氨酸与丝氨酸蛋白激酶、Src、黏着斑激酶(FAK)、Rac、细胞外信号调节激酶(ERK)/促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)等,继而激活下游信号传递通路,调节细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭。

过去十几年中,uPA 和 uPAR 系统的研究在肿瘤领域已深入到信号通路水平。人们发现,在前列腺癌^[6]等多种恶性肿瘤中,uPAR 均可以影响细胞的增殖、分化、迁移、侵袭,且该功能与 AKT、ERK 等通路的激活明显相关。在恶性胶质瘤细胞^[7]研究发现,uPAR 介导的 AKT 通路的活化在促进肿瘤内的血管形成方面也有重要作用。RA-FLS 是滑膜中的特殊细胞群,在慢性炎症的刺激下具有类肿瘤细胞特性。uPAR 在 RA-FLS 中是否也有类似功能? Serrati 等^[8]研究发现,uPAR/uPA 系统在 RA-FLS 中处于激活状态,并与细胞的增殖和侵袭相关。在 SCID 小鼠的体内研究中,抑制 uPAR/uPA 系统,能明显改善 RA-FLS 对软骨的破坏。由此可见,尿激酶型纤溶酶原激活系统与 RA 的疾病进展密切相关,但该种相关性是通过何种机制介导的,至今未见报道。

本研究利用 siRNA 技术,特异性的干扰 RA-

FLS中 uPAR mRNA 的表达后发现,RA-FLS 的增殖能力显著降低。为了探索 uPAR 基因沉默抑制细胞增殖的机制,我们进一步采用流式细胞术检测 uPAR 的表达对细胞周期的影响。结果显示 uPAR 基因被抑制后细胞 G₀/G₁ 期比例增加,S 期和 G₂/M 期比例减少,细胞被阻滞于 G₀/G₁ 期,说明 uPAR 对细胞分裂周期有促进作用。随后的 Transwell 迁移实验证实,uPAR 基因沉默后,RA-FLS 的迁移能力被显著抑制。考虑到 PI3K/AKT 通路在细胞存活、增殖、迁移和侵袭方面的作用,为了深入探索 uPAR 对 RA-FLS 增殖、周期、迁移的机制,本课题研究了干扰 uPAR 后,RA-FLS 中 AKT 通路信号分子的改变,Western blotting 技术显示,PI3K、AKT 及下游 GSK 的磷酸化水平相比对照组明显降低。本课题组前期研究证实,在 RA-FLS 中 Wnt/ β -catenin 通路、核因子 KB(nuclear factor-kappa B,NF-KB)通路、AKT 通路都与 RA-FLS 的生物学特性有关^[9-11]。已有研究证实^[12],RA-FLS 的跨膜蛋白整合素能激活 PI3K/AKT 信号通路,考虑到 uPAR 在结构上可以与整合素结合为复合体调节胞内信号,可以推测 uPAR 对 RA-FLS 的作用机制很可能与 AKT 通路的活化相关。而此次实验结果也证实了该假设的成立。

总之,本研究结果提示,uPAR 参与 RA-FLS 增殖、周期和迁移能力的改变,且该种调控与 PI3K/AKT 通路相关。至于 PI3K/AKT 通路对 uPAR 的转录和表达有何影响,二者间是否存在正反馈关系,仍有待进一步研究。同时,本实验也表明,uPAR 基因蛋白,可能成为 RA 治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.
- [2] 杨春花,黄烽. 类风湿关节炎中尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体蛋白和基因的表达 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2000, 4(3): 159-161.
Yang CH, Huang F. Protein and gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Rheumatol*, 2000, 4(3): 159-161.
- [3] Belcher C, Fawthrop F, Bunning R, et al. Plasminogen activators and their inhibitors in synovial fluids from normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis knees [J]. *Ann Rheum Dis*, 1996, 55(4): 230-236.
- [4] Slot O, Br nner N, Lochter H, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor in plasma of patients with inflammatory rheumatic disorders; increased concentrations in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1999, 58(8): 488-492.
- [5] Guiducci S, Del Rosso A, Cinelli M, et al. Rheumatoid synovial fibroblasts constitutively express the fibrinolytic pattern of invasive tumor-like cells [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, 23(3): 364-372.
- [6] Nalla AK, Gorantla B, Gondi CS, et al. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(9): 599-613.
- [7] Malla R, Gopinath S, Alapati K, et al. Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13731.
- [8] Serrati S, Margheri F, Chill  A, et al. Reduction of in vitro invasion and in vivo cartilage degradation in a SCID mouse model by loss of function of the fibrinolytic system of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(9): 2584-2594.
- [9] Xiao CY, Pan YF, Guo XH, et al. Expression of β -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Scand J Rheumatol*, 2011, 40(1): 26-33.
- [10] Guo X, Pan Y, Xiao C, et al. Fractalkine stimulates cell growth and increases its expression via NF- κ B pathway in RA-FLS [J]. *Int J Rheum Dis*, 2012, 15(3): 322-329.
- [11] 郭欣,胡爱玲,方霖楷,等. RICTOR 对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞活力的影响 [J]. *中国病理生理学杂志*, 2013, 29(3): 526-530.
Guo X, Hu AL, Fang LK, et al. Effect of RICTOR expression on cell viability in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2013, 29(3): 526-530.
- [12] Hashiramoto A, Murata M, Kawazoe T, et al. Heat shock protein 90 maintains the tumour-like character of rheumatoid synovial cells by stabilizing integrin-linked kinase, extracellular signal-regulated kinase and protein kinase B [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50(5): 852-861.

(编辑 刘清海)