

·基础研究·

长链非编码RNA GAPLINC对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖表型的影响

莫碧瑶, 肖璐, 詹宇威, 杨洋, 刘莉, 林书典
(海南医学院附属海南医院//海南省人民医院风湿免疫科, 海南海口, 570311)

摘要:【目的】探讨长链非编码RNA GAPLINC对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)增殖表型的影响。【方法】收集2022年1月至2022年12月于海南医学院附属海南医院行滑膜清理术或膝关节置换术的4例RA患者及3例创伤性关节炎废弃滑膜组织,分离培养并鉴定FLS细胞。通过qPCR法检测RA组和创伤组滑膜细胞内LncRNA GAPLINC表达水平。利用siRNA干扰技术靶向敲低GAPLINC表达,通过EdU法检测各组细胞增殖水平、流式细胞术检测各组细胞的细胞周期分布情况。通过qPCR法与WB法检测细胞周期调控蛋白cyclin D1、PCNA及周期抑制蛋白P21的表达水平。【结果】本研究通过qPCR验证发现,RA组LncRNA GAPLINC表达水平明显高于创伤组($P<0.05$);特异性siRNA对GAPLINC的干扰效率为 $(85.96\pm 1.76)\%$ ($P<0.05$)。敲低GAPLINC后,EdU细胞增殖实验显示,与空白对照组 $(6.02\pm 0.48)\%$ 、溶剂对照组 $(6.32\pm 1.48)\%$ 和阴性对照组 $(6.12\pm 1.51)\%$ 相比,GAPLINC干扰组S期细胞占 $(2.89\pm 1.53)\%$,较各对照组明显降低($P<0.05$)。利用流式细胞术检测各组细胞周期分布,结果显示GAPLINC干扰组PI值,即S+G2/M期细胞所占的百分比为 $(14.92\pm 5.34)\%$,明显低于空白对照组 $(29.68\pm 8.48)\%$ 、溶剂对照组 $(28.97\pm 6.82)\%$ 、阴性对照组 $(31.13\pm 5.13)\%$ ($P<0.05$)。敲低GAPLINC后,与增殖表型正相关的基因Cyclin D1和PCNA的mRNA和蛋白水平均下降($P<0.05$),而与增殖表型负相关的基因p21表达上调($P<0.05$)。【结论】LncRNA GAPLINC在RA-FLS细胞中高表达,敲低GAPLINC表达后,能显著降低RA-FLS细胞增殖活性,抑制细胞周期转化,提示LncRNA GAPLINC可能影响RA-FLS细胞增殖表型,导致滑膜异常增生,参与RA疾病的进展。

关键词:长链非编码RNA;类风湿关节炎;滑膜增生;成纤维样滑膜细胞;细胞增殖

中图分类号:R593.22;R363 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2023)05-0792-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0510

Effect of LncRNA GAPLINC on the Cell Proliferation of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes

MO Bi-yao, XIAO Lu, ZHAN Yu-wei, YANG Yang, LIU Li, LIN Shu-dian

(Department of Rheumatology, Hainan Affiliated Hospital of Hainan Medical University// Hainan General Hospital, Haikou 570311, China)

Correspondence to: LIN Shu-dian; E-mail: linsd0110@163.com

Abstract:【Objective】To investigate the effect of LncRNA GAPLINC on the cell proliferation of RA-FLSs.【Methods】RA-FLSs were cultured from synovial specimens. The expression of LncRNA GAPLINC in RA-FLSs and trauma-FLSs groups was detected by qPCR. GAPLINC suppression was transfected by siRNA and the inhibition efficiency was detected by qPCR. Flow cytometry was adopted to determine the change of cell growth and cell cycle distribution.【Results】The expression of LncRNA GAPLINC was significantly higher in RA-FLSs than that of the trauma-FLSs ($P<0.05$). Trans-

收稿日期:2023-05-24

基金项目:海南省自然科学基金青年基金(820QN385),海南省省级临床医学中心建设项目(琼卫医函[2021]276号)

作者简介:莫碧瑶,第一作者,主治医师,研究方向:免疫性疾病、类风湿关节炎;E-mail:961200385@qq.com;林书典,通信作者,主任医师,研究方向:免疫性疾病,E-mail:linsd0110@163.com

fection of GAPLINC-siRNA significantly decreased the expression of LncRNA GAPLINC. GAPLINC silence in RA-FLSs revealed significant inhibition in cell proliferation which was showed by the reduced cell number in S phase ($P<0.05$). Moreover, flow cytometry assay showed GAPLINC-siRNA treatment group had an accumulation of cells in the G0/G1 phase and decreased RA-FLSs in the S and G2/M phase ($P<0.05$). After GAPLINC knockdown, mRNA and protein levels of Cyclin D1 and PCNA, which were positively correlated with proliferative phenotype, were decreased ($P<0.05$), while p21, which was negatively correlated with proliferative phenotype, was up-regulated ($P<0.05$). [Conclusions] The mRNA expression of GAPLINC was higher in RA-FLSs compared with trauma-FLSs, which was statistically significant ($P<0.05$). The silence of LncRNA GAPLINC could significantly inhibit RA-FLSs cell growth and suppress the cell cycle transformation, which suggests that GAPLINC may play a role in the regulation of proliferation of RA-FLSs, leading to synovial hyperplasia and contributing to RA progression.

Key words: long non-coding RNA; rheumatoid arthritis; synovial hyperplasia; fibroblast-like synoviocytes; cell proliferation.

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(5): 792-800]

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是我国及世界范围内最常见的一种致残性关节炎, 其患病率占全球总人口数的 0.5%–1%, 但病因和发病机制尚未完全明确^[1-3]。现有研究表明, 关节滑膜是 RA 免疫炎症活动的主要靶点, 其中成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLSs) 是介导滑膜炎症和关节破坏的主要效应细胞。与健康者的滑膜细胞不同, RA-FLSs 在慢性炎症中被激活后, 处于“持续活化”状态, 具有不完全的“类肿瘤细胞”生长特性, 可表现为过度增殖^[4-6]。RA-FLS 细胞增殖表型的异常改变是 RA 滑膜病理进展的核心环节, 其原因和机制始终是 RA 发病机理研究的重点。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸的新型非编码 RNA, 是近年免疫性疾病发病机理研究中的热点。研究表明, LncRNA 能够从表观遗传学调控、转录调控、转录后调控和蛋白质代谢多个层面调控基因的表达和影响细胞表型^[7]。LncRNA GAPLINC (gastric adenocarcinoma associated, positive CD44 regulator, GAPLINC) 是 2014 年在肿瘤组织上新发现的一个长链非编码 RNA, 定位于人类染色体 18p11.31, 在多种恶性肿瘤细胞 (胃癌、结直肠癌、胆管癌等) 中异常高表达并通过不同的作用机制调控肿瘤细胞的增殖、抗凋亡、侵袭和迁移^[8-10]。结合 LncRNA GAPLINC 在肿瘤细胞中的作用及 RA-FLSs “类肿瘤细胞”样生长特性, 本课题组率先在 RA 领域探究 LncRNA GAPLINC 在 RA-FLS 细胞中的表达及对 RA-FLS 细胞增殖表型的影响。

1 材料与方法

1.1 标本采集

本实验研究对象为来源于人体的成纤维样滑膜细胞。所有滑膜标本均来源于人体废弃关节组织。取自 2022 年 1 月至 2022 年 12 月于海南医学院附属海南医院行膝关节滑膜清理术或膝关节置换术的患者。其中, RA 患者 4 例 (其中女性 3 例、男性 1 例), 平均年龄 59 (S=5) 岁, 平均病程 10 (S=3) 年, 诊断符合 1987 年美国风湿病协会 (ACR) 修订的诊断标准, RA 疾病活动度评分 (DAS28 评分) 均大于 3.2 分, 处于中度 (3.2~5.1 分) 或重度疾病活动度 (> 5.1 分)。创伤性关节炎 (Traumatic Arthritis, TA) 患者 3 例 (其中女性 2 例、男性 1 例), 均为外伤所致, 平均年龄 54 (S=6) 岁, 排除感染、肿瘤及其他结缔组织病等相关疾病 (见表 1)。标本采集经海南医学院附属海南医院临床医学研究伦理委员会审批同意, 并取得患者的知情同意。

1.2 实验试剂和仪器

1.2.1 主要实验试剂 胎牛血清 FBS (Gibco, 美国), 高糖 DMEM 培养液 (Invitrogen Life Technologies, 美国), 0.25% 胰蛋白酶–0.02% EDTA 消化液 (吉诺, 杭州), RANiso Plus (Takara, 日本), PrimeScript® RT reagent Kit 及 SYBR® Premix Ex Taq™ Kit (Takara, 日本), LncRNA GAPLINC 及 GAPDH 等引物序列 (英潍捷基, 上海), 脂质体 Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (英潍捷基, 上海), LncRNA GAPLINC-siRNA 及阴性对照组 NC-

表1 入组患者临床资料
Table 1 Clinical data of enrolled patients

	Gender	Age/year	Course of disease/year	CRP/(mg/L)	ESR/(mm/h)	RA-DAS2 Score
RA patient 1	female	57	7	12.41	120	5.04
RA patient 2	female	63	12	42.72	54	5.84
RA patient 3	female	65	15	32.38	108	5.55
RA patient 4	male	52	8	43.42	67	5.36
TA patient 1	female	47	-	3.83	27	-
TA patient 2	female	53	-	2.47	22	-
TA patient 3	male	62	-	4.52	26	-

siRNA等合成siRNA(生工生物工程,上海),Triton-X100(杰特伟,广州),EdU细胞增殖流式检测试剂盒(锐博生物,广州),细胞周期检测试剂盒(凯基生物,南京),抗vimentin、cyclin D1、PCNA、P21抗体(proteintech,美国),Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary抗体(Abiowell,中国),BCA蛋白定量试剂盒(Abiowell,中国)

1.2.2 主要实验仪器 超净工作台(SW-CJ-1FD,苏州),CO₂培养箱(HF151,上海),倒置显微镜(Nikon TS100,日本),PCR扩增仪(AB GeneAmp 9700,美国),荧光定量PCR仪器(ABI 7500 Fast,美国),台式离心机(湘智TDZ5-WS,上海),小型高速离心机(eppendorf centrifuge5424,德国),低温超速离心机(Beckman Coulter Avanti J26XP),流式细胞仪(BD FACSCanto,美国),流式细胞仪(BD FACS-Calibur,美国),电泳仪、电泳槽、转膜仪(北京六一,中国),化学发光成像系统(勤翔,中国)

1.3 实验方法

1.3.1 滑膜细胞培养 准备含0.2%胶原酶I和10%FBS的DMEM高糖培养液作为消化液,37℃预热。将人滑膜标本用镊子夹出,依次放到装有PBS的和装有无血清DMEM高糖培养液的培养皿(PBS和DMEM中添加2%双抗)中清洗。用剪子把滑膜剪成小块,放入1.5 mL离心管中加入少量PBS剪碎。将剪碎的滑膜组织加入到胶原酶消化液中消化1~2 h。178 ×g离心5 min,吸出胶原酶消化液并弃掉,向含有滑膜细胞的沉淀中加入含10%FBS的DMEM高糖培养液润洗,178 ×g离心5 min,保留细胞沉淀,继续用含10%FBS和2%双抗的DMEM高糖培养液重悬之后直接接种到培养皿中,放置于含体积分数5% CO₂的37℃恒温培养箱中培养观察。

定时监测细胞生长情况,每2~3 d更换新鲜的培养液。至细胞贴壁生长覆盖率>80%时,采取胰蛋白酶消化法进行传代,后续实验研究采用第3~6代细胞。

1.3.2 流式细胞术鉴定滑膜FLS细胞 用胰酶将第3代滑膜细胞消化下来,取1×10⁶/100 μL滑膜细胞至1.5 mL EP管中,加入1 mL PBS洗涤细胞,89 ×g离心5 min,弃上清,再加1 mL PBS洗涤1次,267 ×g离心5 min,弃上清。用200 μL PBS重悬细胞沉淀,分别加入5 μL相应的流式抗体(CD90-PE、CD68-PE、CD55-PE),混匀,室温避光孵育30 min,加入1 mL PBS洗涤细胞1次,267 ×g离心5 min,弃上清。用200 μL PBS重悬细胞沉淀,上机检测。

1.3.3 免疫荧光法(IF法)鉴定滑膜FLS细胞 将第3代滑膜细胞接种在细胞培养板中的载玻片上。取出细胞爬片,PBS润洗2~3次,将爬片用40 g/L多聚甲醛固定30 min,PBS润洗5 min × 3次加入0.3%曲拉通,37℃30 min通透。PBS冲洗3 min × 3次;5%BSA 37℃封闭60 min;PBS冲洗3 min × 3次;孵育一抗:滴加适当稀释的一抗(vimentin)4℃过夜。PBS冲洗5 min × 3次;孵育二抗:滴加50~100 μL抗-Rabbit-IgG标记荧光抗体,37℃孵育90 min,PBS冲洗5 min × 3次;DAPI工作液37℃染核10 min,PBS冲洗5 min × 3次;缓冲甘油封片。避光保存,或到荧光显微镜下观察。采像为荧光显微镜电脑采像,图片为200至400倍。结果判定:阳性信号为vimentin(绿)色荧光,蓝色为核染信号。

1.3.4 qPCR法检测LncRNA GAPLINC表达 培养Truma-FLSs和RA-FLSs,提取各组细胞总RNA并进行分析。RNA提取、后续具体检测及计算方法详见课题组前期已发表文献^[11-15],引物序列见附表1。

1.3.5 siRNA 转染 RA-FLS 细胞及效率检测 取对数生长期的 RA-FLS 细胞以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板,每孔 2 mL。当细胞融合度达到 60%~70% 时转染体外合成的小分子 si-GAPLINC。取无血清培养基 Opti-MEM 100 μL + 脂质体 Lipofectamine® RNAiMAX 5 μL 配置溶液 A;取无血清培养基 Opti-MEM 100 μL + siRNA 5 μL 配置溶液 B;待溶液 A、B 室温孵育 5 min 后,将溶液 A 与溶液 B 混合,室温孵育 10 min 后,加入相应的含有细胞和培养基的 6 孔板中,每孔溶液总体积为 2 mL, siRNA 终浓度为 50 nmol/L。转染 6~8 h 后,可更换培养液,置于恒温 CO_2 培养箱中根据实验需求继续培养 48 h。当六孔板或培养瓶内细胞融合度达到 90% 时,收集细胞提取 RNA,采用 qPCR 法检测干扰效率。合成 siRNA 序列见附表 2。

1.3.6 EdU 实验检测各组细胞增殖水平 依据实验设立不同分组:①空白对照组(培养液+RA-FLS);②溶剂对照组(培养液+Lipofectamine+RA-FLS);③阴性 siRNA 对照组(培养液+Lipofectamine+NC-siRNA+RA-FLS);④GAPLINC-siRNA 干扰组(培养液+Lipofectamine+GAPLINC-siRNA+RA-FLS)。取对数生长期的 RA-FLS 细胞以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板,24 h 后每组细胞分别予不同处理,置于培养箱中继续培养 48 h。处理结束后,设置 1 个不加 EdU 培养基的对照组,以进行流式检测数据的染料背景分析,其余每孔予稀释 EdU 溶液(细胞培养液与 EdU 液按 1 000:1 配制)1 mL,培养箱孵育 2 h。收集各孔细胞至流式管中,经 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min,2 mg/mL 甘氨酸中和 5 min, PBS 洗涤,0.5% TritonX-100 渗透剂室温孵育 10 min, PBS 洗涤后,加入配置好的 1X Apollo® 染色反应液,重悬细胞,避光、室温孵育 10 min 后,用 0.5% TritonX-100 渗透剂洗涤 1 次, PBS 洗涤 1 次,加入 300 μL PBS 重悬细胞上机。采用 BD FACSCanto 流式细胞仪检测处于 S 期的细胞水平,通过 FlowJo 7.6 软件计算 S 期细胞所占比值的情况,反映细胞增殖水平。

1.3.7 流式细胞术检测各组细胞周期分布 按照实验需要建立检测模型,设立不同分组:①空白对照组;②溶剂对照组;③阴性 siRNA 对照组;④GAPLINC-siRNA 干扰组。将 RA-FLS 细胞以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板,每孔细胞分别予不同处理并培养 48 h,收集各孔细胞,将细胞制成单细

胞悬液,预冷 PBS 洗涤 1 次,加入体积分数为 70% 冷乙醇 1 mL 固定细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。染色前用 PBS 洗去固定液,按细胞周期检测试剂盒(凯基,南京)说明书,将 RNase A:PI 工作液按 1:9 体积配置 PI/RNase A 染色工作液,每孔细胞加入 500 μL ,室温避光孵育 60 min。PBS 洗涤 1 次,移至流式管中上机。采用 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测细胞周期,检测结果使用 Modifit 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。 $\text{PI} = (\text{S} + \text{G2/M}) / (\text{S} + \text{G2/M} + \text{G0/G1})$ 期细胞数。

1.3.8 qPCR 法检测各组 cyclin D1、P21、PCNA mRNA 表达量 按照实验需要建立检测模型,设立不同分组:①阴性 siRNA 对照组(si-NC 组);②GAPLINC-siRNA 干扰组。将 RA-FLS 细胞以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板,每孔细胞分别予不同处理并培养 48 h,收集各孔细胞,向细胞中加入 1 mL Trizol,提取 RNA,按荧光定量 PCR 法步骤检测 GAPLINC、cyclin D1、P21、PCNA 在细胞中的表达。

1.3.9 Western blotting 法检测各组细胞周期蛋白 cyclin D1、P21、PCNA 表达量 按照实验需要建立检测模型,设立不同分组:①阴性 siRNA 对照组(si-NC 组);②GAPLINC-siRNA 干扰组。转染细胞 48 h 后,提取细胞总蛋白,上样,室温电泳(恒压 80 V,约 0.5 h;110V,约 1.5 h)。置于冰水浴,转膜(恒流 300 mA, cyclin D1 约 55 min, P21 约 60 min, PCNA 约 55 min)。5% 脱脂牛奶封闭 2 h,置于室温,一、二抗分别孵育 1.5 h、1 h,每次孵育后用 1 \times PBST 洗 3 次,每次 15 min。添加 ECL 工作液,显影曝光。用 ImageJ 软件分析曝光图像,读取各条带的灰度值,计算各样本的目的蛋白与内参对照 GAPDH 的灰度值比值进行目的蛋白的相对定量。

1.3.10 统计分析 所有数据用 SPSS 20.0 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单因素方差分析。非正态性分布数据,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。当 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

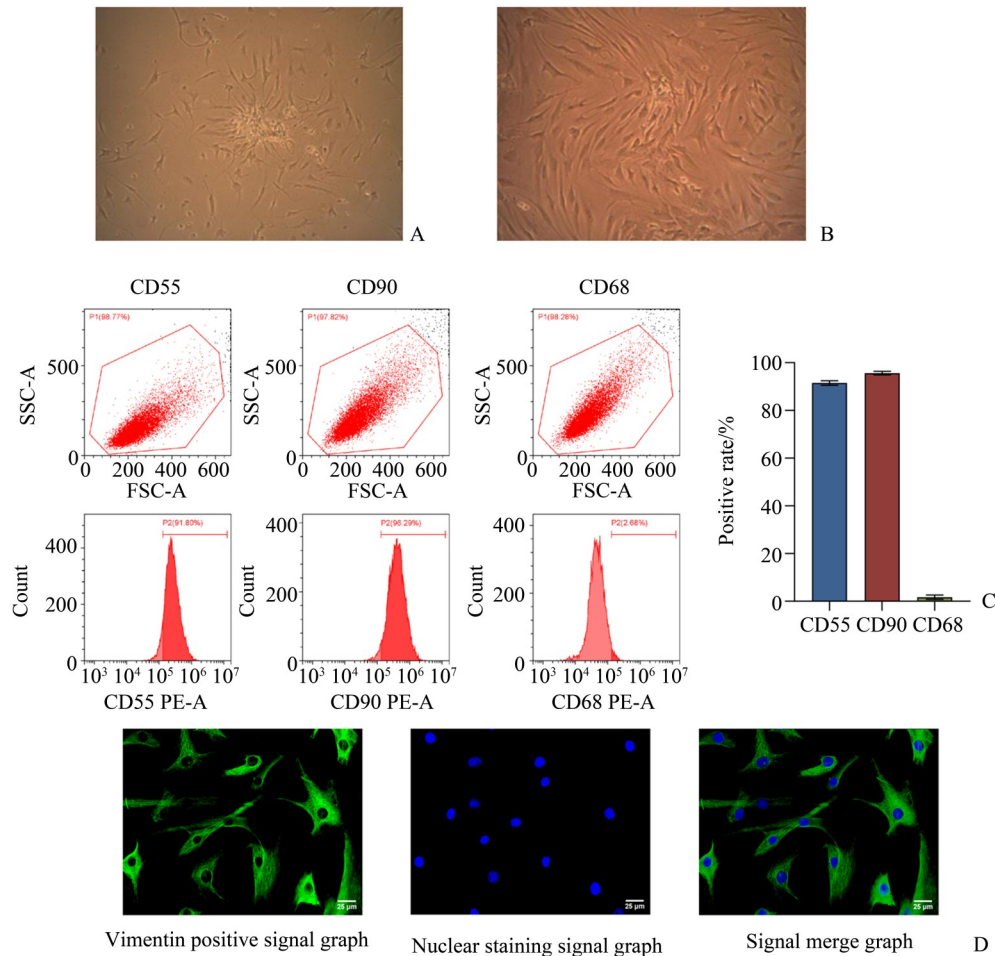
2 结果

2.1 FLS 细胞培养及鉴定

采用酶消化法进行细胞培养及传代,长至第 3 代后以长梭形的成纤维样滑膜细胞为主(图 1A)。

采用流式细胞术鉴定 FLS 细胞表面标记 CD55、CD90、CD68,结果显示第3代细胞表面 CD55、CD90 阳性表达率高达 91.53%、95.62%,而 CD68(巨噬细胞特有标记)表达量仅为 1.69%,证实经传代方法

纯化可获得较高纯度的 FLS 细胞(图 1B)。波形蛋白(Vimentin)阳性为成纤维样细胞的特异性标志,进一步通过 IF 法验证,结果显示波形蛋白免疫荧光染色为阳性,提示为成纤维样细胞(图 1C)。



The morphology of RA-FLSs were observed under the light microscope: A: Primary fibroblast-like synoviocytes of RA cultured from synovial tissues; B: The RA-FLSs at passages 3 have elongated spindle morphology. The cell characterization of RA-FLS cell: C: Flow cytometry graph showed the surface markers CD55、CD90、CD68 expression rate of RA-FLS at passages. D: Identification of Vimentin protein by immunofluorescence method.

图1 滑膜 FLS 细胞培养与鉴定

Fig. 1 Culture and identification of synovial FLS cells

2.2 qPCR 检测 LncRNA GAPLINC 的表达

培养 Truma-FLSs 和 RA-FLSs,通过 qPCR 技术检测 RA 组和创伤组 FLS 细胞中 LncRNA GAPLINC 表达水平。结果显示,RA 组 LncRNA GAPLINC 表达水平明显高于创伤组,差异具有统计学意义($t=4.390, P=0.0482$; 附图 1)。

2.3 转染 siRNAs 后 RA-FLS 细胞 LncRNA GAPLINC 表达情况

取对数生长期的 RA-FLS 细胞转染 si-GAPLINC,通过 qPCR 技术检测转染后 LncRNA

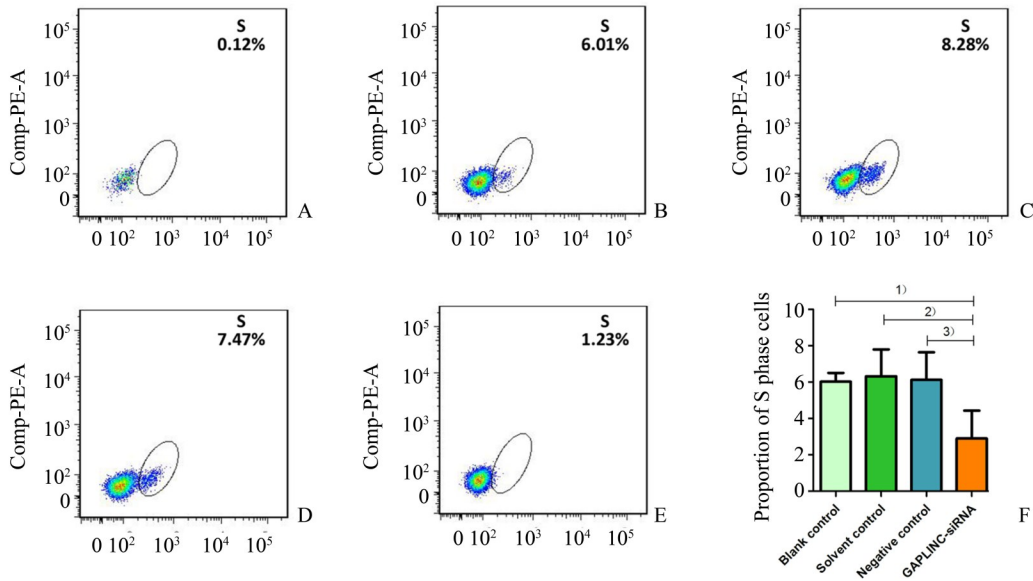
GAPLINC 表达水平。结果显示,与阴性对照组(si-NC)相比, GAPLINC-siRNA 组对 LncRNA GAPLINC 的干扰效率为 $(85.96 \pm 1.76)\%$,差异有统计学意义($t=84.61, P<0.001$; 附图 2)。表明特异性 GAPLINC-siRNA 双链干扰效果佳,满足实验需求,可用于后续功能实验。

2.4 EdU 实验检测各组细胞增殖水平

转染 48h 后,使用流式细胞术检测细胞增殖水平,结果显示,空白对照组、溶剂对照组、阴性 siRNA 对照组、GAPLINC-siRNA 干扰组 S 期平均水平

分别为(6.02±0.48)%、(6.32±1.48)%、(6.12±1.51)%、(2.89±1.53)%。经方差分析,4组间差异有统计学意义($N=4$, $F=6.041$, $P=0.0095$);采用 bonferroni 法作两两比较,发现 GAPLINC 干扰组与

空白对照组($P=0.0364$)、溶剂对照组($P=0.0206$)、阴性 siRNA 对照组($P=0.0048$)比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)表明干扰 GAPLINC 后,RA-FLS 细胞增殖活力明显下降(图2)。



A: Background control group without EdU; B: Blank control group; C: Solvent control group; D: Negative control group; E: GAPLINC-siRNA group; F: The histogram of the S phase cell ratio in each group. ¹⁾ $P<0.05$ vs Blank control group, ²⁾ $P<0.05$ vs Solvent control group, ³⁾ $P<0.01$ vs Negative control group.

图2 EdU细胞增殖流式检测各处理组S期细胞所占比值

Fig. 2 The ratio of s-phase cells in each treatment group detected by Flow cytometry

2.5 流式细胞术检测各组细胞周期分布

转染48 h后,通过流式细胞术检测各组PI值,即S+G2/M期细胞所占的百分比。结果显示,GAPLINC-siRNA组平均PI值为(14.92±5.34)%,明显低于空白对照组(29.68±8.48)%、溶剂对照组(28.97±6.82)%、阴性对照组(31.13±5.13)%,经方差分析,4组间差异有统计学意义($N=4$, $F=5.272$, $P=0.0150$);采用 bonferroni 法作两两比较,发现 GAPLINC 干扰组与空白对照组($P=0.026$)、溶剂对照组($P=0.018$)、阴性 siRNA 对照组($P=0.0047$)比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。说明干扰 LncRNA GAPLINC 表达后 RA-FLS 细胞被阻滞于 G0/G1 期,进入 DNA 合成阶段的细胞数明显减少(图3)。

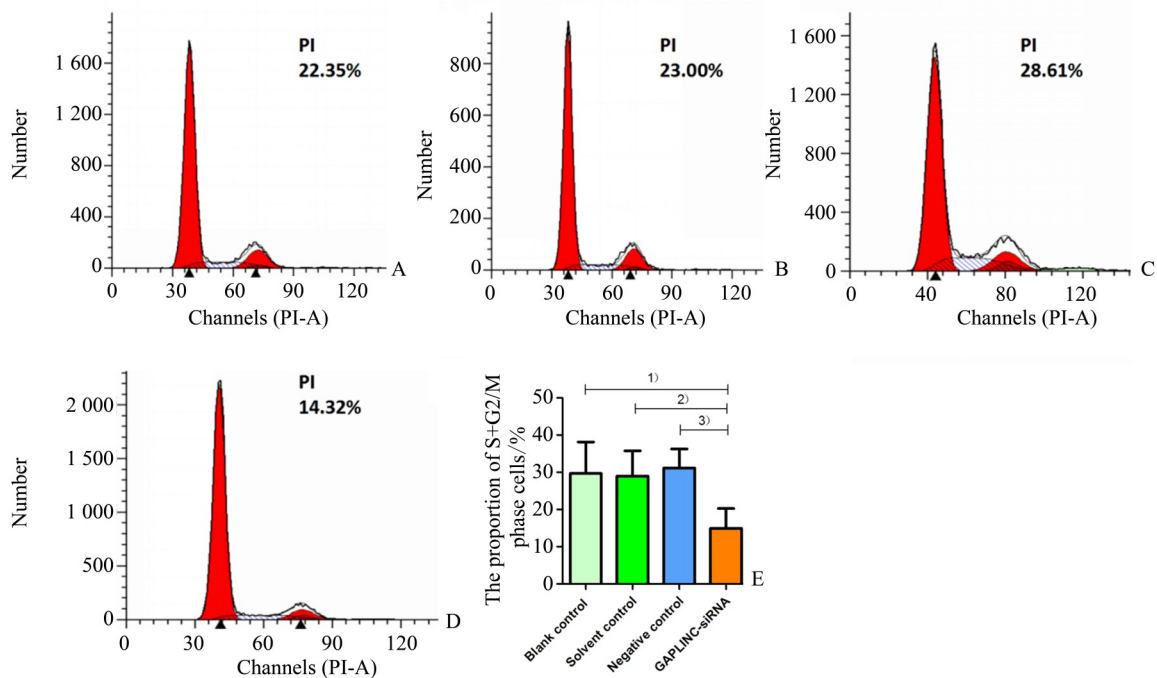
2.6 qPCR 和 WB 法检测 cyclin D1、PCNA、p21 表达水平

利用 qPCR 和 Western blot 检测敲低 GAPLINC 后增殖相关基因的 mRNA、蛋白表达情况。qRT-PCR 结果显示,在 mRNA 水平上,GAPLINC-siRNA 组的 cyclin D1 ($t=17.08$, $P<0.0001$) 和 PCNA ($t=$

25.57, $P<0.0001$) 的表达水平较 si-NC 组下降, P21 ($t=10.32$, $P=0.0005$) 的表达水平较 si-NC 组上升,差异均具有统计学意义(图4)。WB 结果显示,在蛋白水平上,GAPLINC-siRNA 组的 cyclin D1 ($t=11.57$, $P=0.0003$) 和 PCNA ($t=39.80$, $P<0.0001$) 的表达水平较 si-NC 组下降, P21 的表达水平较 si-NC 组上升($t=12.17$, $P=0.0003$),差异均具有统计学意义(图5)。提示敲低 GAPLINC 后,与增殖表型正相关的基因 Cyclin D1 和 PCNA 的 mRNA 和蛋白水平均下降,而与增殖表型负相关的基因 p21 表达上调,以上结果提示 GAPLINC 可能正向调控增殖相关基因。

3 讨论

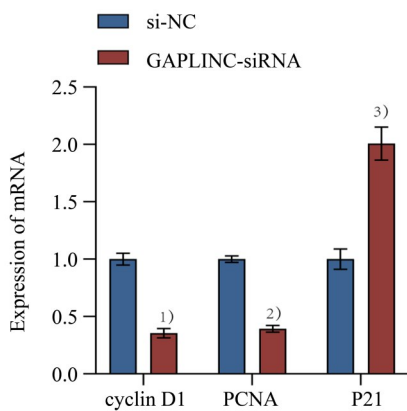
近年来,随着表观遗传学的发展和 RNA 芯片、RNA 测序等新兴技术的成熟,长链非编码 RNA (LncRNA) 作为基因组中基因调节的新领域,受到研究者的广泛关注,被认为可能是肿瘤、炎症、免疫



A: Blank control group; B: Solvent control group; C: Negative control group; D: GAPLINC-siRNA group; E: The histogram of the S+G2/M phase cell ratio in each group. ¹⁾ $P < 0.05$ vs Blank control group, ²⁾ $P < 0.05$ vs Solvent control group, ³⁾ $P < 0.01$ vs Negative control group.

图3 流式细胞术检测各处理组细胞周期分布情况

Fig. 3 The cell cycle distribution in each treatment group detected by Flow cytometry



¹⁾ $P < 0.0001$ vs si-NC group, ²⁾ $P < 0.0001$ vs si-NC group, ³⁾ $P < 0.001$ vs si-NC group.

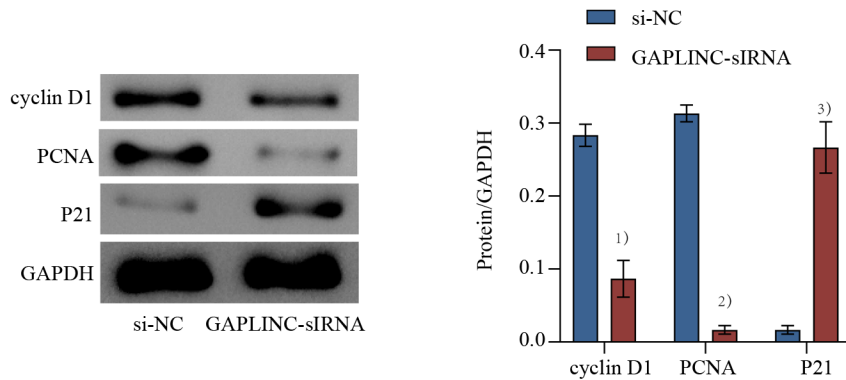
图4 qPCR法检测各组 cyclin D1、P21、PCNA mRNA 表达量情况

Fig. 4 The mRNA expression levels of cyclin D1, P21 and PCNA in each group were detected by qPCR

等疾病潜在的生物学标记物或新兴治疗靶点^[16-19]。

LncRNA GAPLINC 是 2014 年新发现的一个功能性长链非编码 RNA, 在 PubMed 网站检索已发表的相关论文, 显示大部分研究集中在肿瘤领域, 其被证实可促进多种肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移、抗

凋亡等表型改变^[20]; 仅 2 篇与血管内皮细胞功能相关; 1 篇与巨噬细胞功能相关。Hu 等^[21]发现, LncRNA GAPLINC 在胃癌细胞中表达明显升高, GAPLINC 高表达的患者癌肿更大, 淋巴结转移发生率更高, 生存时间更短。利用 siRNA 干扰胃癌细胞中 GAPLINC 的表达, 肿瘤细胞的增殖和侵袭能力受到明显抑制, 细胞凋亡比例增加。Liu 等^[22]发现 LncRNA GAPLINC 可通过调节凋亡蛋白的水平而促进胃癌细胞增殖, 延长细胞生存时间。Yang 等^[23]发现, LncRNA GAPLINC 在直肠癌细胞高表达, 敲低 GAPLINC 的表达, 目标细胞的增殖和侵袭能力受到了显著的抑制。Wang 等^[24]利用 qRT-PCR 测得 GAPLINC 在人肝门部胆管癌组织和 QBC939 细胞中显著升高, 干扰 GAPLINC 的表达能够抑制胆管癌 QBC939 细胞的增殖和迁移。综上, LncRNA GAPLINC 在多种肿瘤细胞中高表达并通过 ceRNA 等模式起到促癌作用, 其表达量与肿瘤患者临床疾病特征、预后相关, 被视为有潜在应用价值的分子靶点。基于 RA-FLS“类肿瘤样”细胞特性, 我们率先在 RA 领域探究 GAPLINC 在滑膜 FLS 细胞中的表达及对细胞增殖表型的影响。



¹⁾ $P < 0.001$ vs si-NC group, ²⁾ $P < 0.0001$ vs si-NC group, ³⁾ $P < 0.001$ vs si-NC group.

图5 Western blotting法检测各组cyclin D1、P21、PCNA蛋白表达量情况

Fig. 5 The protein expressions of cyclin D1, P21 and PCNA in each group were detected by Western blotting

本研究使用的是人滑膜组织体外培养的FLS细胞,传代三次后细胞形态较均一,经流式细胞术鉴定显示,第3代FLS细胞表面CD55、CD90表达率高达90.0%以上,IF法示细胞内Vimentin蛋白免疫荧光染色为阳性,表明目标细胞纯度较高,使实验数据更有针对性和说服力;同时,实验结果也在一定程度上反映某些分子水平或功能的异常是否会因为细胞脱离体内炎症环境以及细胞传代而发生改变。在本研究中,我们首先通过qPCR验证发现,LncRNA GAPLINC在RA-FLS细胞中高表达。利用成熟的siRNA干扰技术敲低RA-FLS细胞,干扰效率高达85%以上,证实干扰效果佳,可用于后续功能研究。

在细胞增殖检测方法中,DNA合成检测是目前最准确可靠的方式,常用的方法有EdU法、BrdU法等。EdU(5-Ethynyl-2-deoxyuridine)是一种胸腺嘧啶核苷类似物,能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶(T)渗入正在复制的DNA分子中,在细胞水平更准确地反映DNA复制活性。通过EdU实验发现,相比各对照组,GAPLINC-siRNA组RA-FLS细胞处于S期的细胞水平明显降低,从DNA复制水平反映了干扰GAPLINC后细胞增殖能力下降。RA-FLS细胞通过有丝分裂的方式进行增殖,而细胞增殖通过细胞周期实现。细胞周期分为间期和有丝分裂期,细胞间期又常划分为休眠期(G0),DNA合成前期(G1),DNA合成期(S),DNA合成后期(G2)。利用细胞内DNA能够和荧光染料(如碘化丙啶PI)结合的特性,我们进一步采用流式细胞术检测细胞各个时期的DNA分布。结果显示,敲低GAPLINC后RA-FLS细胞阻滞于G0/G1期比例显著增加,S

期和G2/M期比例减少,证实LncRNA GAPLINC能加速RA-FLS细胞分裂周期转化。随后,我们进一步通过qPCR及Western blot法检测敲低GAPLINC后增殖相关基因的表达情况,结果显示,敲低GAPLINC后,与增殖表型正相关的基因Cyclin D1和PCNA的mRNA和蛋白水平均下降,而与增殖表型负相关的基因p21表达上调,提示LncRNA GAPLINC可能正向调控增殖相关基因,从基因转录-mRNA-蛋白质层面说明其对RA-FLS细胞增殖的影响。

综上,我们发现LncRNA GAPLINC在RA-FLS细胞中高表达,敲低GAPLINC能影响RA-FLS细胞增殖功能。但是,LncRNA GAPLINC通过何种作用机制参与到RA-FLS调控增殖表型的改变,还有待继续探讨。在既往研究中,GAPLINC主要通过Sponge机制竞争性结合miRNA提高下游靶基因的表达水平,或募集多梳抑制复合体到特定的位点进行甲基化修饰、沉默染色质或基因片段,或激活细胞内信号通路来调控基因的表达等多种机制起到促癌作用。由于细胞类型、局部微环境以及上下游调节因子等方面存在差异,具体调控机制也有很大不同^[8,25]。LncRNA GAPLINC调控RA-FLS细胞增殖表型的机制仍需要进一步探索。

总之,本研究从细胞DNA复制水平、细胞周期转化、基因转录表达等不同层面证实了LncRNA GAPLINC对RA-FLS细胞增殖的影响,提示LncRNA GAPLINC可能成为阻断RA滑膜病理性增生的一个潜在分子靶点。



附图表

Appendix figure and table

参考文献

- [1] Fraenkel L, Bathon JM, England BR, et al. 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2021, 73(7): 924-939.
- [2] Smolen JS, Aletaha D, Barton A, et al. Rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18001.
- [3] Li ZG. A new look at rheumatology in China--opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(5): 313-317.
- [4] 牛红青, 赵向聪, 赵文鹏, 等. 滑膜成纤维细胞代谢改变与类风湿关节炎[J]. *中华内科杂志*, 2019, (1): 69-73.
NIU HQ, ZHAO XC, ZHAO WP, et al. Metabolic changes of synovial fibroblasts and rheumatoid arthritis[J]. *Chin J Intern Med*, 2019, (1): 69-73.
- [5] Nygaard G, Firestein GS. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(6): 316-333.
- [6] Yoshitomi H. Regulation of immune responses and chronic inflammation by fibroblast-Like synoviocytes [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1395.
- [7] Statello L, Guo CJ, Chen LL, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 96-118.
- [8] 杨明金, 徐艺, 林轩, 等. 长链非编码RNA GAPLINC与恶性肿瘤的研究进展[J]. *中国癌症防治杂志*, 2019, 11(05): 434-437.
YANG MJ, XU Y, LIN X, et al. Research progress of long non-coding RNA GAPLINC and tumor[J]. *Chin J Oncol Prev Treat*, 2019, 11(5): 434-437.
- [9] Zhou YS, Xu SW, Guan CH, et al. The regulatory effect of GAPLINC in malignant tumors and its relationship with the prognosis of patients [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2019, 48(11): 902-905.
- [10] Liu W, Xu J, Zhang C. Clinical usefulness of gastric adenocarcinoma predictive long intergenic noncoding RNA in human malignancies: A meta-analysis [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(6): 152387.
- [11] Wang M, Chen Y, Bi X, et al. LncRNA NEAT1_1 suppresses tumor-like biologic behaviors of fibroblast-like synoviocytes by targeting the miR-221-3p/uPAR axis in rheumatoid arthritis[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 111(3): 641-653.
- [12] Mo BY, Guo XH, Yang MR, et al. Long non-coding RNA GAPLINC promotes tumor-like biologic behaviors of fibroblast-like synoviocytes as microRNA sponging in rheumatoid arthritis patients[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 702.
- [13] 刘梦, 刘岩, 杨梦如, 等. IL-22对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(6): 852-857.
LIU M, LIU Y, YANG MR, et al. Effects of IL-22 on apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2016, 37(6): 852-857.
- [14] 刘岩, 潘云峰, 方霖楷, 等. uPAR在类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中的功能及机制[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2014, 35(2): 200-206.
LIU Y, PAN YF, FANG LK, et al. Effects and Mechanisms of uPAR Expression in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2014, 35(2): 200-206.
- [15] Bi X, Guo XH, Mo BY, et al. LncRNA PICSAR promotes cell proliferation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes by sponging miRNA-4701-5p in rheumatoid arthritis[J]. *Ebiomedicine*, 2019, 50: 408-420.
- [16] Elazazy O, Midan HM, Shahin RK, et al. Long non-coding RNAs and rheumatoid arthritis: Pathogenesis and clinical implications[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 246: 154512.
- [17] 宋月莹, 郑程, 王俊杰, 等. 类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞表观遗传学研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2022, (4): 271-275.
SONG YY, ZHENG C, WANG JY, et al. Advances in epigenetics of fibroblastoid synovial cells in rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Rheumatol*, 2022, (4): 271-275.
- [18] 刘佳, 李玉翠, 张升校, 等. 长链非编码RNA参与类风湿关节炎发病机制的研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2023, (1): 49-54.
LIU J, LI YC, ZHANG SX, et al. Research progress of long non-coding RNA involved in pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Rheumatol*, 2023, (1): 49-54.
- [19] Yao ZT, Yang YM, Sun MM, et al. New insights into the interplay between long non-coding RNAs and RNA-binding proteins in cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(2): 117-140.
- [20] Chi Y, Wang D, Wang J, et al. Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers [J]. *Cells*, 2019, 8(9):1-44.
- [21] Hu Y, Wang J, Qian J, et al. Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(23): 6890-6902.
- [22] Liu L, Zhao X, Zou H, et al. Hypoxia promotes gastric cancer malignancy partly through the HIF-1 α dependent transcriptional activation of the long non-coding RNA GAPLINC [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 420.
- [23] Yang P, Chen T, Xu Z, et al. Long noncoding RNA GAPLINC promotes invasion in colorectal cancer by targeting SNAI2 through binding with PSF and NONO [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42183-42194.
- [24] Wang XP, Song J, Liu GT, et al. Upregulation of gastric adenocarcinoma predictive long intergenic non-coding RNA promotes progression and predicts poor prognosis in perihilar cholangiocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3964-3972.
- [25] Lao MX, Xu HS. Involvement of long non-coding RNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(8): 941-950.