



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 Q7

U D C 616-092

密 级 公开

博士学位论文

**CYR61 介导 DDR2 过分泌 MMP1 的分子
机制及其在 RA 滑膜细胞侵袭中的作用研究**

黄同列

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 生物学

二级学科(专业) 生物化学与分子生物学

研 究 方 向 类风湿性关节炎发病机理

指 导 教 师 张英起 教授

培 养 单 位 药学系生物制药学教研室

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____ 日期：_____

保护知识产权明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____ 导师签名：_____ 日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
ABSTRACT	7
前 言	11
文献回顾	13
正 文	29
第一部分 CYR61 在 RA 滑膜组织中的表达状态分析	29
1 实验材料	30
2 实验方法	34
3 实验结果	40
4 讨论	44
第二部分 DDR2 活化对 CYR61 的表达调控及其分子机制研究	47
1 实验材料	47
2 实验方法	50
3 实验结果	68
4 讨论	76
第三部分 CYR61 对 MMP1 的表达调控及其对 RA 滑膜细胞侵袭功能的影响	79
1 实验材料	79
2 实验方法	82
3 实验结果	111
4 讨论	131
第四部分 CYR61 对 CIA 大鼠关节软骨破坏的影响	133
1 实验材料	133
2 实验方法	135
3 实验结果	141
4 讨论	147
小 结	149
参考文献	151
附 录	161
个人简历和研究成果	163
致 谢	165

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
APS	ammonium persulfate	过硫酸铵
AVSD	atrioventricular septal defect	房室隔缺陷
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CIA	collagen induced arthritis	胶原诱导性关节炎
CYR61	cysteine-rich 61	富半胱氨酸 61
d	day	天
DDRs	discoidin domain receptor	盘状结构域受体
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸（钠盐）
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FLS	fibroblast-like synoviocyte	成纤维样滑膜细胞
h	hour	小时
HE	hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
HIF	hypoxia-inducing factor	低氧诱导因子
HRE	hypoxia response element	低氧反应元件
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSPGs	heparan sulfate proteoglycans	硫酸肝素蛋白多糖
IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein	胰岛素样生长因子结合蛋白

kD	kilodalton	千道尔顿
MAPK	mitogen activated protein kinases	促分裂素原活化蛋白激酶
min	minute	分钟
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
MMPs	matrix metalloproteinases	基质金属蛋白酶
NOV	nephroblastoma overexpressed	肾母细胞瘤过度表达基因
NSCLC	non-small-cell lung cancer	非小细胞肺癌
OA	osteoarthritis	骨性关节炎
PAGE	polyacrylamine gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PMSF	phenylmethyl sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏氟乙烯
RA	rheumatoid arthritis	类风湿性关节炎
RF	rheumatoid factor	类风湿因子
RTK	receptor tyrosine kinase	酪氨酸激酶受体
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TBS	tris-buffered saline	Tris 缓冲液
TEMED	N,N,N,'N'-tetramethyl ethylene diamine	N,N,N,'N'-四甲基乙二胺
Tris	N-tris (hydroxymethyl) aminomethane	N-(羟甲基)氨基甲烷
TSR	thrombospondin type I repeat	I型血小板反应蛋白
VCAM	vascular cell adhesion molecule	血管细胞粘附分子
WISP	Wnt-induced secreted protein	Wnt 诱导分泌蛋白

CYR61 介导 DDR2 过分泌 MMP1 的分子机制及其 在 RA 滑膜细胞侵袭中的作用研究

博士研究生：黄同列

导 师：张英起 教 授

辅 导 教 师：张 伟 副 教 授

第四军医大学药学系生物制药学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金面上项目（NO.81273279）

中文摘要

类风湿性关节炎（RA）是一种以关节致残性病变为主的自身免疫性疾病。与其他类型关节炎的区别在于，RA 受累关节的主要病理表现为炎性细胞浸润、持续性滑膜炎、血管翳形成、滑膜组织异常增生以及软骨和骨的进行性破坏等。RA 发病早期 T 细胞依赖性自身免疫导致关节腔内发生炎性渗出，进入慢性期后非 T 细胞依赖性滑膜过度增生、侵袭破坏关节软骨和软骨下骨是 RA 晚期关节软骨破坏的重要原因。因此，深入研究 RA 关节软骨破坏相关的信号转导过程，探寻其中的重要环节和关键信号转导分子，对于更好地防治 RA 有着极其重要的意义。

我们前期的实验研究发现，在 RA 滑膜成纤维样细胞中存在一种特殊的、具有受体酪氨酸蛋白激酶活性的盘状结构域受体 DDR2 且呈高表达状态；它以胶原为配体，通过同源二聚化使其胞内区第 471 位酪氨酸残基发生磷酸化修饰，处于持续活化状态，促进 MMP1 和 MMP13 的大量分泌，参与 RA 关节软骨破坏；体外表达纯化的 DDR2 受体胞外区蛋白可与 DDR2 竞争性结合 II 型胶原，抑制 RA FLS 分泌 MMP1，在 CIA 大鼠模型中观察到可溶性的 DDR2 可改善关节软骨的破坏。因此，我们提出在 RA 滑膜组织增生侵袭破坏软骨的进程中可能存在这样一个恶性循环：

在异常的自身免疫状态下，软骨脱落的 II 型胶原激活滑膜成纤维样细胞中的 DDR2 受体，从而诱导滑膜成纤维样细胞过表达 MMPs；DDR2 受体在胶原强大而持续的作用下持续活化，使得滑膜成纤维样细胞不断地分泌 MMPs，这些持续分泌的 MMPs 对骨和软骨产生严重的破坏；然而，被破坏的软骨又可进一步释放大量的胶原物质，随即成为 MMPs 的诱导因素，如此反复，周而复始。

然而从膜受体 DDR2 活化到胞内效应分子 MMPs 的过度分泌，其中详细的作用机制及关键信号转导分子尚不清楚。CYR61 是我们利用 Agilent Human 1A 基因表达谱芯片对 II 型胶原刺激前后 RA 滑膜成纤维样细胞进行差异分析获得的基因，为了深入探讨 CYR61 在 DDR2-MMPs 通路中扮演的角色及其对 RA 关节软骨破坏的作用，我们进行以下实验研究：

首先，我们利用 Real-time PCR、Western-blot 以及免疫组化等实验技术系统分析 DDR2、CYR61 以及 MMPs 在 RA 滑膜组织中的表达水平和表达分布，评价 CYR61 在 RA 发生、发展的临床意义；其次，应用 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹观察上调或者下调 DDR2 的活化水平对 CYR61 表达水平的影响并通过 EMSA、双荧光素酶报告基因、Real-time PCR 和蛋白免疫印迹等方法阐明 DDR2 调控 CYR61 表达的分子机制，从而揭示 II 型胶原-DDR2-CYR61 通路的存在；接着，以过表达腺病毒 Ad-CYR61 和 CYR61 siRNA 为研究工具，采用 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹方法验证 CYR61 对下游效应分子 MMPs 的影响，同时，综合运用生物信息学、双荧光素酶报告系统、染色质免疫共沉淀以及凝胶迁移实验等实验方法，深入探讨 CYR61 调控 MMPs 表达的具体分子机制；然后，使用 Transwell 和细胞划痕实验检测关键分子 CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞侵袭迁移功能的影响；最后，通过构建 Wistar 大鼠 CIA 模型，给予干涉腺病毒 shCYR61 局部治疗，阻断动物关节局部 CYR61 的表达，来评估腺病毒 shCYR61 对 CIA 大鼠关节软骨损伤的治疗效果。

通过以上实验研究我们获得了下列结果：① Real-time PCR 结果显示，RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 以及 MMP1、MMP9、MMP13 的 mRNA 表达水平均高于 OA 患者滑膜组织，DDR2 与 CYR61 mRNA 的表达水平呈正相关，CYR61 与 MMP1 mRNA 的表达水平呈正相关。② 蛋白免疫印迹结果同样显示，RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的蛋白表达水平均显著高于 OA 患者滑膜组织。免疫组化结果显示，DDR2、MMP1 均表达于滑膜衬里层，DDR2 与 MMP1 在 RA 滑膜组织

中的表达水平高于 OA; CYR61 则泛表达于多种组织中, RA 滑膜及滑膜下结缔组织中 CYR61 的表达水平高于 OA。③ 利用 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹观察上调或者下调 DDR2 的活化水平对 CYR61 表达水平的影响, 结果显示 II 型胶原刺激 DDR2 活化能够促进 CYR61 的表达, 干涉 DDR2 抑制 CYR61 的 mRNA 和蛋白表达水平。④ EMSA 和双荧光素酶报告基因结果显示 II 型胶原诱导 DDR2 活化可增强转录因子 AP-1 在 CYR61 启动子区域的结合活性, 从而诱导 CYR61 转录活性升高, 促进 CYR61 的表达。⑤ CYR61 能够调控转录因子 ETS1 转录水平和蛋白水平的表达。⑥ 双荧光素酶报告基因、ChIP 和 EMSA 实验结果显示, 转录因子 ETS1 通过与 MMP1 基因转录起始位点上游-122~-102 bp 启动子序列直接结合, 增强 MMP1 的转录活性, 促进 MMP1 的表达。⑦ Transwell 和细胞划痕实验结果表明, CYR61 能够促进 FLS 细胞侵袭迁移功能。⑧ 动物实验结果显示, 干涉 CYR61 的表达能够明显降低关节炎的发生率和关节炎指数评分, 显著改善关节软组织肿胀程度; ⑨ X 射线和 Micro-CT 检查结果提示, 干涉腺病毒 shCYR61 对 CIA 大鼠关节软骨破坏具有良好的治疗效果; ⑩ 组织病理学检查结果发现阻断 CYR61 的表达能够减少炎性细胞的浸润。

本研究中我们首次证实了 CYR61 作为 DDR2-MMPs 通路中的关键信号转导分子在介导 DDR2 过分泌 MMPs 及促进 RA FLS 细胞侵袭迁移和关节软骨损伤过程中发挥重要作用。该研究结果完善和补充了 DDR2-MMPs 通路中关键环节和关键信号转导分子, 为进一步阐明 RA 中晚期病变的发病机制及新的药物靶点的开发提供了新思路。

关键词: 类风湿性关节炎, 滑膜成纤维样细胞, DDR2, CYR61, MMP1

The role of CYR61 in DDR2-MMPs signal pathway and the mechanism of induction of RA synovial cell invasion and cartilage erosion by CYR61

Candidate for doctor: Huang Tonglie

Supervisor: Prof. Zhang Yingqi

Tutor: Associate prof. Zhang Wei

Department of biopharmaceutics, School of pharmacy, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: Natural Science Foundation of China grant (NO.81273279)

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease mainly affecting the joints, and leading to tissue destruction and functional disability. In contrast with other types of inflammatory arthritis, the principal histopathological properties of RA include: persistent synovitis, the hyperplasia of synovium, excessive infiltration of inflammatory cells, pannus formation, and the progressive destruction of cartilage and bone. In the early stages of RA, T cell-dependent autoimmunity leads to inflammatory exudation in articular cavity. But, when it comes to the chronic phase, non-T cell-dependent hyper-proliferation and invasiveness of synovial tissue are found to be responsible for the destruction of joint cartilage in the later stages of RA. Therefore, further research on signal transduction process associated with RA articular cartilage damage and exploring the key signal transduction molecules, is of great implication to better prevention and treatment of RA.

Our previous studies found that DDR2, a special receptor tyrosine kinase in RA FLS, was highly expressed in RA FLS. As a collagen acceptor, DDR2 is activated to form a

constitutive homologous-dimerizing state for phosphorylation of the tyrosine 471 residue of the intracellular domain. Consequently, it up-regulates matrix metalloproteinases expression in cellular matrix, which participate in RA articular cartilage destruction. And the following work has established that an extracellular domain of DDR2 could compete with DDR2 for binding to type II collagen resulting in inhibiting MMP1 secretion from RA FLS. In CIA rats, we recently observed that fusion expression of DDR2 extracellular domain could ameliorate articular cartilage destruction. Hence, we hypothesized that there may exist a vicious cycle among the processes of the hyperplasia of synovium, invasion, and cartilage destruction in RA. When in a state of abnormal autoimmune, DDR2 could be activated by the type II collagen generated from cartilage, and that caused MMPs to over-express in synoviocytes; the strong and constant stimulation stemmed from collagen resulted in sustained DDR2 activation and continued secretion of MMPs by synoviocytes. The MMPs promote cartilage degradation, and the damaged cartilage can release more collagens. These collagens can further act as MMP-inducing factors, and these steps are cyclically repeated. However, the molecular mechanisms that underlie processes from DDR2 activation to excessive secretion of MMPs are incompletely understood. FLS express high levels of CYR61. Our objective is to clarify the role of CYR61 in DDR2-MMPs signal pathway and evaluate its biological functions in synovium invasion of RA. We have done several experiments as following.

To begin with, we used Real-time PCR, Western-blot and Immunohistochemistry to analysis the expression and distribution of DDR2, CYR61 and MMPs, with which the clinical significant of CYR61 in RA development could be evaluated. Then, we tested the effect of DDR2 activation on CYR61 expression by Real-time PCR and Western-blot experiments. Meanwhile, we elucidated the molecular mechanism of the CYR61 expression regulated by DDR2 to reveal the existence of collagen II-DDR2-CYR61 pathway by the application of Electrophoretic mobility shift assay and Dual luciferase reporter assay. Next, we examined the influence of CYR61 on MMPs by Real-time PCR and Western-blot. And to deeply explore the molecular mechanism of MMPs expression mediated by CYR61, we used a comprehensive application of Bioinformatics, Dual

luciferase reporter assay, Chromatin immunoprecipitation and Electrophoretic mobility shift assay. In addition, Transwell and Scratch assay were employed to detect the effect of CYR61 on FLS invasion and cell migration. Finally, to verify the role of CYR61 in cartilage and bone destruction, we then established CIA animal model. We blocked the CYR61 expression by local injection of Ad-shCYR61 and assessed therapeutic efficacy of Ad-shCYR61 on joint and cartilage destruction in CIA rats.

The conclusions can be gotten through the above experimental results as follows.

① We found that the mRNA expression of DDR2, CYR61, MMP1, MMP9 and MMP13 in RA synovial tissues were higher than OA synovial tissues. And the results of Real-time PCR also indicated that DDR2 expression level is positively correlated with CYR61 expression level. CYR61 expression level shows positive correlation with MMP1 expression level. ② The results of Western-blot and Immunohistochemistry showed that the protein expression of DDR2, CYR61 and MMP1 in RA synovial tissues were higher than OA synovial tissues. While DDR2 and MMP1 were distributed mainly in the synovial lining layer, CYR61 was widely expressed in various types of tissues. ③ By using Ad-DDR2 and siDDR2, we confirmed that collagen II promoted CYR61 expression through DDR2 activation. Blocking DDR2 expression suppressed the mRNA and protein expression of CYR61. ④ We next demonstrated that collagen II induced DDR2 activation increases protein binding to the AP-1 element in the CYR61 promoter by the application of EMSA. The results of Dual luciferase reporter assay suggested that activated-DDR2 raise the transcriptional activity of CYR61 promoter, so that the CYR61 expression level enhanced. ⑤ Furthermore, CYR61 modulated the expression of transcriptional factor ETS1. ⑥ ETS1 could increase MMP1 transcriptional activity through directly binding to MMP1 promoter region by employing Dual luciferase reporter assay, Chromatin immunoprecipitation and Electrophoretic mobility shift assay. ⑦ The Transwell assay indicated that CYR61 up-regulation could enhance the invasion of the RA FLS, and the invasion was suppressed by CYR61 down-regulation. The Scratch assay showed that overexpression of CYR61 promoted the RA FLS migration. ⑧ Animal experiments showed that the cumulative incidence of arthritis and arthritis scores might be

reduced by CYR61 silencing. Ad-shCYR61 could significantly ameliorate swelling dimension of joints. ⑨ With the help of Micro-CT, we observed that Ad-shCYR61 achieved good curative effect on joint and cartilage destruction in CIA rats. ⑩ The pathological results indicated that interference expression of CYR61 could decrease inflammation reactions.

In this study, we demonstrate that DDR2 activation can increase protein binding to the AP-1 element in the CYR61 promoter and promote CYR61 expression, which then upregulate MMP1 expression mediated by ETS1, and further promote the proliferation and invasion of RA FLS and aggravate cartilage destruction. These findings suggest that CYR61 may serve as a new drug target for the clinical treatment of RA.

Key words: Rheumatoid arthritis, Fibroblast-like synoviocytes, Discoidin Domain Receptor 2, matrix metalloproteinases, Cysteine-rich 61

前 言

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是一种以关节滑膜炎和关节侵袭破坏为特征的慢性全身性自身免疫性疾病，全世界约有 3~6 千万人罹患该病。关节滑膜炎持续反复发作，致使患者关节内软骨和骨的破坏，出现关节功能障碍，甚至残废。由于发病机理还不清楚，传统的治疗手段包括抗炎及免疫制剂都只能缓解病情，不能终止疾病进展。仅有少数患者通过人工关节置换手术可部分恢复关节功能，而大部分患者却只能忍受疼痛和残疾度过余生，生活质量受到严重影响^[1]。

因此，研究 RA 关节软骨破坏相关的信号转导过程，探寻其中的重要环节和关键信号转导分子，对于深入剖析类风湿性关节炎的发生发展过程具有重要的理论意义和临床指导价值。

现有研究表明：RA 关节软骨破坏主要是由滑膜组织分泌的基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）和过度增殖的滑膜细胞造成的，脱落的 II 型胶原可直接诱导中性粒细胞和滑膜细胞分泌胶原酶，而胶原酶在病变晚期对骨和软骨的破坏具有重要意义。

我们在前期的实验研究发现，在 RA 滑膜成纤维样细胞中存在一种特殊的、具有受体酪氨酸蛋白激酶（receptor tyrosine kinase, RTK）活性的盘状结构域受体 2（discoidin domain containing receptor 2, DDR2）且呈高表达状态^[2]。它以胶原为配体，通过同源二聚化使其胞内区第 471 位酪氨酸残基发生磷酸化修饰，处于持续活化状态，促进 MMP1、MMP13 的大量分泌，参与 RA 关节软骨破坏^[3]。体外表达纯化的 DDR2 受体胞外区蛋白可与 DDR2 竞争性结合 II 型胶原，抑制 RA FLS 分泌 MMP1^[4]，在 CIA 大鼠模型中观察到可溶性的 DDR2 可改善关节软骨的破坏^[5]。因此，我们提出在 RA 滑膜组织增生侵袭破坏软骨的进程中可能存在这样一个恶性循环：在异常的自身免疫状态下，软骨脱落的 II 型胶原激活滑膜成纤维样细胞中的 DDR2 受体，从而诱导滑膜成纤维样细胞过表达 MMPs；DDR2 受体在胶原强大而持续的作用下持续活化，使得滑膜成纤维样细胞不断地分泌 MMPs，这些持续分泌的 MMPs 对骨和软骨产生严重的破坏；然而，被破坏的软骨又可进一步释放大量的胶原物质，随即

成为 MMPs 的诱导因素，如此反复，周而复始。

然而从膜受体 DDR2 活化到胞内效应分子 MMPs 的过度分泌，其中详细的作用机制及关键信号转导分子尚不清楚。富半胱氨酸 61(cysteine-rich 61, CYR61)是我们利用 Agilent Human 1A 基因表达谱芯片对正常滑膜细胞及 RA 滑膜细胞进行差异分析获得的基因。那么 CYR61 到底在 DDR2-MMPs 通路中扮演何种角色呢？该通路在 RA 滑膜细胞侵袭及关节软骨破坏中发挥的作用和机制是什么呢？对于上述问题的回答有利于我们更进一步的阐明 RA 中晚期病变的发病机制，更有利于我们能寻找到切实有效的药物靶点而治疗类风湿性关节炎。

综上所述，本研究拟在前期工作基础上，以关键分子 CYR61 的功能研究为突破口，综合利用过表达、RNAi、基因转染、EMSA 及染色质免疫共沉淀等技术系统研究 CYR61 在 DDR2-MMPs 通路中发挥的作用及其介导 RA 滑膜细胞侵袭和软骨破坏的机制，初步阐明该分子在 DDR2-MMPs 通路中的作用及功能，即为 RA 软骨破坏机制提出新的认识，又可发现新的药物靶位。

文献回顾

第一部分 类风湿性关节炎发病机制的研究进展

类风湿性关节炎（RA）是一种具有慢性、进行性、侵袭性关节滑膜炎病理特征的全身性自身免疫病，倘若不经过正规有效的治疗，病情将逐渐恶化，最终导致关节畸变，出现功能障碍，具有较高的致残率。RA 的致病因素包括遗传、环境以及感染等因素，这些因素相互交织在一起，共同作用于人体免疫系统，最终导致机体免疫功能的紊乱。因此，广泛深入地认识这些因素及其相互作用在 RA 发生发展过程中的作用，对于有效地防治 RA 具有极其重要的意义。

1.1 自身抗原和抗体

研究显示，RA 患者的滑膜组织中存在大量异位生发中心样结构，B 细胞浸润明显，提示自身反应性 B 细胞参与 RA 的发病机制。在 RA 患者中，成熟 B 细胞在 RA 相关抗原刺激下分化成为短寿命浆细胞或进入生发中心，从而导致记忆性自身反应性 B 细胞和长命浆细胞的产生，并产生 RA 相关的自身抗体^[6-8]。这些自身抗体和对应的抗原组成免疫复合物，通过激活靶细胞表面 Fc 受体（如 FcRIII）或作用于补体（尤其是 C5a），从而激活免疫细胞内 MEK 激酶级联反应或刺激酪氨酸磷酸化免疫受体途径的活化，进而产生补体或抗体介导的吞噬和超敏反应，最终引起 RA 的组织损伤。

1.2 T 淋巴细胞

关于 T 淋巴细胞在 RA 中的作用曾经有两种截然不同的观点：一种认为滑膜中大量存在的 T 细胞只是旁观细胞，并不参与 RA 的炎症过程；另一种则认为 RA 是一种由克隆性 T 细胞介导的均质性自身免疫性疾病。事实证明，T 淋巴细胞，尤其是 CD4⁺ T 淋巴细胞在 RA 发病中的确起着非常重要的作用^[9]，这一理论已经从以下多方面研究中得到了证据：浸润滑膜的细胞中 40% 为 T 淋巴细胞；滑膜组织或滑液中存在 T 细胞来源的细胞因子；T 细胞依赖性关节炎模型的建立；主要组织相容性

复合体 (MHC) II 类基因与 RA 发病和疾病严重性之间存在的密切相关性; 靶定 T 细胞治疗使 RA 症状和体征得到改善等。导致 RA 发病的最可能原因是 T 淋巴细胞遇到相应的抗原刺激后发生了活化, 并且在随即的整个病理生理过程中, T 淋巴细胞可与介导免疫反应和组织破坏的其他细胞发生相互作用, 致使炎症反应持续并引起骨质破坏。

1.3 B 淋巴细胞

虽然 B 淋巴细胞在类风湿性关节炎中的作用不像 T 细胞那样研究的比较详尽明朗, 但 B 细胞具有的多种免疫功能无疑使之成为炎症过程中不可或缺的重要组成部分。B 细胞在 RA 中可能发挥的作用包括: 作为抗原递呈细胞处理和递呈抗原肽供 T 细胞识别, 参与 T 细胞的活化, 分泌 TNF- α 等促炎症细胞因子, 产生类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 等自身抗体。RF 的存在对于维持 B 细胞的活化及参与免疫复合物激活补体而使炎症反应持续存在具有重要作用。已发现高滴度的 RF 与关节病变的侵袭性、关节外器官受累的发生率以及死亡和致残相关联。近来研究结果显示, 抗 CD20 单抗应用于去除 B 淋巴细胞可明显缓解 RA 症状, 证实了 B 细胞在 RA 发病机制中所起到的重要作用^[10]。在对成熟 B 细胞的致病作用进行深入研究的同时, 动物实验中获得的数据表明 B 细胞中有一个特殊亚群, 能够分泌 IL-10。IL-10 作为免疫负调节因子, 可发挥免疫调节作用。在动物实验中, anti-CD40 抗体可诱导产生 IL-10 的 B 细胞分化, 将 anti-CD40 抗体刺激后的 B 细胞转输给胶原诱导关节炎小鼠可防止或减轻关节炎^[11]。

1.4 巨噬细胞

巨噬细胞在类风湿性关节炎发病机制中的扮演着重要的角色, 在 RA 患者滑膜和血管翳处均存在大量处于活化状态的巨噬细胞, 其与 RA 病情严重程度密切相关。巨噬细胞主要以两种形式存在: 滑膜内衬层 A 型滑膜细胞与间质内弥散分布的巨噬细胞。处于活化状态的巨噬细胞可高表达主要组织相容性复合体 II 类分子 (MHC II), 同时能够分泌多种趋化因子、促炎因子、生长因子和基质金属蛋白酶 (MMPs), 介导白细胞的粘附和迁移、炎症反应的启动和持续、细胞外基质的降解和新生血管的形成, 具备广泛的促炎效应和组织破坏能力。选择性抑制巨噬细胞活化可能是治疗

局部和全身炎症、防止不可逆性关节破坏的有效措施。

1.5 滑膜成纤维样细胞

类风湿性关节炎是一种慢性、炎症性、系统性的自身免疫性疾病，累及周身的关节炎及血管翳的形成为其基本病理特征。理论上，血管翳中的免疫病理成分可分为免疫和侵蚀两部分（图 0-1）：免疫部分由 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞组成，主要介导抗原递呈、免疫球蛋白产生、细胞因子的产生；侵蚀部分由毗邻软骨和骨并能直接促进其被侵蚀和破坏的软骨细胞及滑膜成纤维样细胞（fibroblast-like synovial cells, FLS）组成。

FLS 不仅在正常的胚胎发生发挥着重要的功能，而且在关节功能成熟与维护中起着关键性的作用。许多研究证实，RA FLS 在形态和生物活性上都发生了明显的变化，主要表现为信号级联和细胞凋亡反应相关分子的改变以及黏附分子的表达和基质金属蛋白酶活性的变化等，使之不需要在外界条件的持续刺激下就可处于稳定活化状态，RA FLS 不仅可通过直接或间接的方式参与骨和软骨的破坏过程，而且还可介导调控 RA 患者关节的炎症扩散、血管翳结构的维持等病理生理过程，对 RA 的发展进程及病情迁延都具有重要的影响。有研究显示 RA FLS 能够对滑膜组织中的巨噬细胞和淋巴细胞产生重要的影响，例如 RA FLS 可刺激滑膜单核巨噬细胞的活化并在破骨细胞样细胞分化方面起着一定的作用。Zhu 等^[12]研究发现单核/巨噬细胞高表达的细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 CD147 能增强 FLS 的侵袭力和 MMP 的产生，在 RA 的软骨和骨破坏中具有重要意义。Hamann 等^[13]的研究发现滑膜巨噬细胞和成纤维细胞的协同作用可通过 CD55 和 CD97 的交联，即细胞-细胞间的直接作用来完成。Salmon 等^[14]的研究提示，体外分离培养的滑膜 T 淋巴细胞在短时间内即进入凋亡进程，然而将其与滑膜成纤维样细胞进行共培养时发现 T 淋巴细胞的凋亡受到抑制；Lindhout 等^[15]研究进一步证实源自 RA 患者的滑膜成纤维样细胞不但可以抑制 T 淋巴细胞的凋亡，还能阻止 B 淋巴细胞进入凋亡程序。此外，RA FLS 也可分泌促血管生成因子、VEGF 等多种细胞因子，促进血管内皮细胞的生长和血管新生。

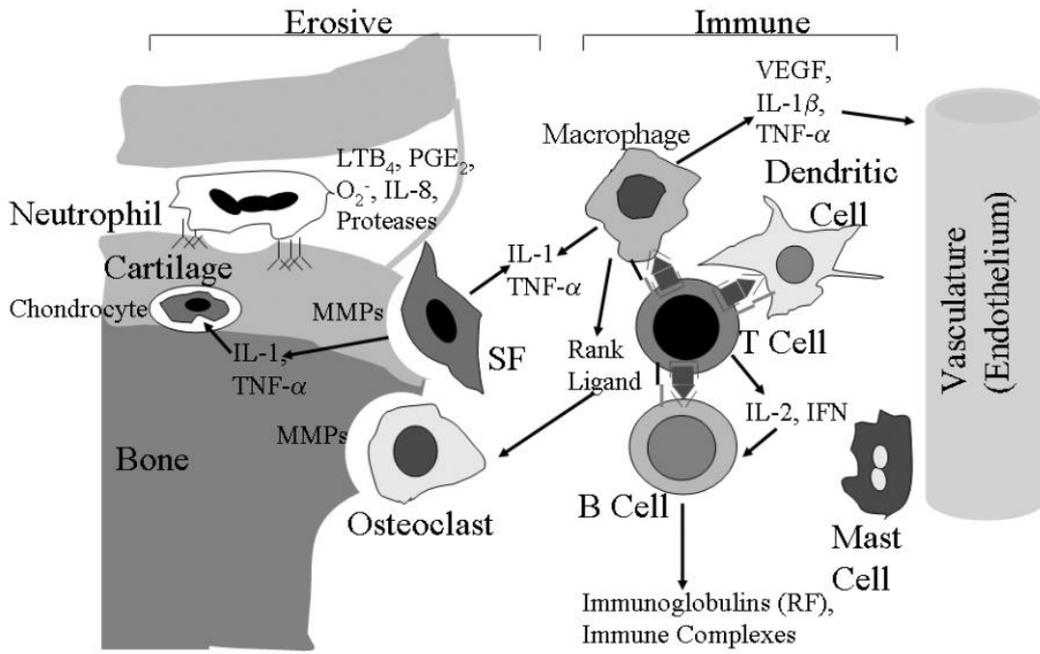


图 0-1 类风湿关节炎血管翳中的免疫及病理机制示意图

引自: Abeles AM. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2006; 64: 20-24.

第二部分 DDR2 的研究进展

2.1 概述

受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTKs) 是最大的一类单次跨膜酶联受体, 可与相应配体结合后, 使靶蛋白的酪氨酸残基磷酸化, 通过细胞内信号级联放大, 最终引起一系列细胞的综合性应答。RTKs 家族编码的蛋白具有相似的结构, 包括: 含有配体结合位点的细胞外结构域、单次跨膜结构域和含有酪氨酸蛋白激酶活性的细胞内结构域。根据细胞外结构域特点, RTKs 家族可分为 20 个亚家族。RTKs 介导的信号通路调控重要的细胞进程, 如细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、细胞迁移和细胞周期^[16]。

盘状结构域受体 (discoidin domain receptors, DDRs) 属于 RTKs 类酶联受体, Johnson 等^[17]于 1993 年在筛选乳腺癌细胞 RTKs 过程中发现。因其胞外区含有一个类似于凝集素盘状结构, 而被命名为盘状结构域受体。目前, DDRs 家族含有两个成员, 即 DDR1 和 DDR2。两种 DDRs 均以胶原为配体, 通过同源二聚化使其胞内区酪氨酸残基发生低水平、持久的自主磷酸化, 进而激活下游信号通路, 调节细胞迁移、增殖、分化和细胞凋亡。此外, 胶原与 DDR2 结合可通过调节 MMP 表达和活性影响细胞外基质重塑, 并且同样具有 II 型胶原结合整合素受体后产生的效应。DDR2 表达及功能失调将引起人体多种疾病的发生, 如肿瘤、纤维化疾病以及类风湿性关节炎。

2.2 DDR2 结构特点

人类 DDR2 基因定位于染色体 1q23.3, 含有 19 个外显子, 其中第 4~19 个外显子为编码外显子。细胞外结构域由第 4~11 个外显子编码, 第 12 个外显子编码跨膜结构域, 第 13、14 个外显子编码胞内近膜结构域, 其余外显子主要编码酪氨酸激酶结构域 (图 0-2)。目前, 没有文献报道 DDR2 具有相关的拼接异构体。

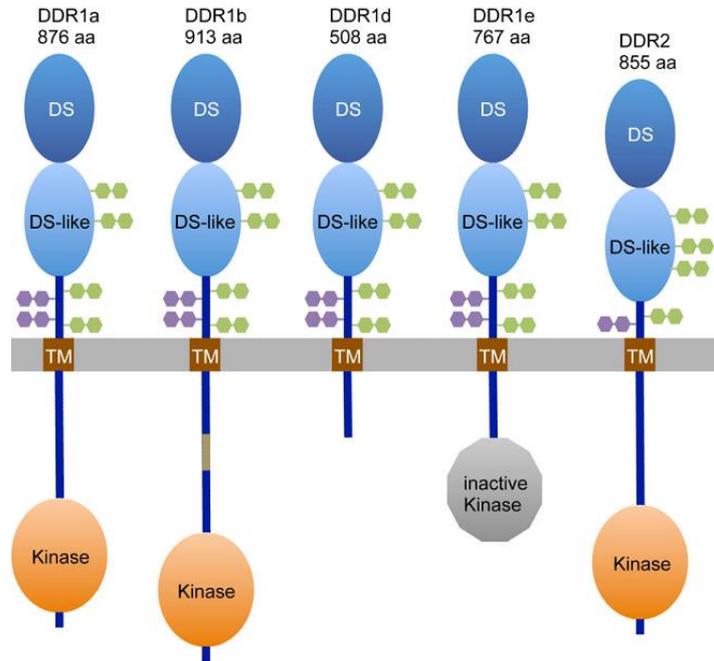


图 0-2 DDRs 结构示意图

引自: Brigit. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014; 310: 39-87.

2.3 表达分布特点

DDR2 广泛表达于胚胎发育阶段和成人个体的不同组织, 如骨骼、心肌、肾脏、肺、神经系统和免疫系统。目前, 尚没有文献系统的分析不同组织中 DDR2 的细胞定位情况。在不同类型细胞中, DDR2 的表达受不同转录因子的调控, 例如, 缺氧或高压氧状态下, 大鼠心脏平滑肌细胞中 DDR2 启动子区 Myc-Max DNA 结合活性增强, 诱导 DDR2 表达水平升高^[18]; 在成骨细胞分化过程中, 转录因子 ATF4 与 DDR2 启动子区 CCAAT 增强子结合位点结合, 促进 DDR2 转录; 肝损伤可促进肝星状细胞的 DDR2 mRNA 表达水平上调^[19]。Sekiya 等^[20]发现 microRNA-29 b 可抑制 DDR2 mRNA 的表达, 由于 microRNA-29 b 下游靶基因是 I 型胶原, 故 I 型胶原的表达与 DDR2 的表达可能存在一定的关联。

2.4 DDR2 参与的信号通路

虽然已有大量文献报道 DDR2 与肿瘤细胞的增殖和转移密切相关, 但是关于胶原刺激 DDR2 活化后参与调控的细胞信号转导通路知之甚少。有研究表明^[21], DDR2

活化可激活下游重要的信号元件，如 SHC、SRC、JAK、ERK1/2 和 PI3K。此外，Hammerman 等^[22]发现 DDR2 活化可促进 STAT5 磷酸化水平。DDR2 与其他细胞表面受体例如整合素受体和其他 RTKs 之间同样存在 Crosstalk 现象，使得下游信号转导网络呈多样化。Iwai LK 等^[23]通过磷酸化蛋白质组学分析，获得 45 个 I 型胶原刺激 DDR2 活化后下游信号效应分子，除了先前研究发现的 ERK1 和 PI3K 外，还发现 Lyn、SHP-2、SHIP-2 和 PLCL2 等一些新的蛋白底物，进一步研究发现这些效应分子是 DDR2 通路特异性激活的下游信号分子，而非胶原刺激整合素受体诱导产生。另有研究表明^[19]，DDR2 活化能够促进 p38 MAPK 磷酸化水平，通过调节转录因子 Runx2 转录活性，从而促进成骨细胞分化。本课题组通过免疫共沉淀结合 SDS-PAGE 方法，在 RA FLS 中筛选获得 8 个能与 II 型胶原活化的 DDR2 相互作用的分子，通过深入研究发现 II 型胶原可刺激 DDR2 活化，活化的 DDR2 可与钙依赖性磷脂结合蛋白 Annexin A2 相互结合，促进 Annexin A2 磷酸化，进而通过转录因子 p38 调控 MMP13 的表达，增强 FLS 的侵袭能力，导致关节软骨损伤^[24]。

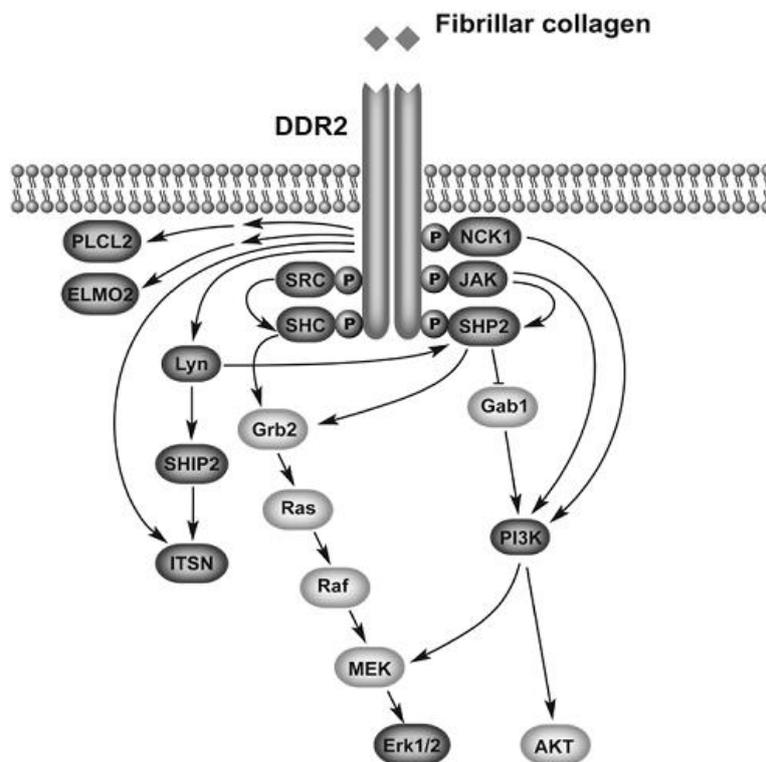


图 0-3 DDR2 参与的信号通路示意图

引自：Leo S. Payne. *J Thorac Oncol.* 2014; 9 (6): 900-904.

2.5 DDR2 与疾病

2.5.1 纤维增生性疾病

DDR2 在组织器官纤维化的病理生理学过程中起着重要的作用。研究发现^[25], 博来霉素致肺纤维化可诱导肺上皮细胞产生 I 型胶原, I 型胶原能够刺激成纤维细胞表达 DDR2, 从而加快肺纤维化进程。DDR2 在肝脏疾病中的作用显得更加复杂, DDR2 基因敲除小鼠在慢性肝损伤的条件下, 比野生型小鼠更容易发生炎症反应及肝纤维化^[26], 提示 DDR2 在慢性损伤的情况下可降低罹患肝纤维化风险。另一方面, 在急性肝损伤情况下, DDR2 可调节肝星状细胞活性, 促进增殖和侵袭, 导致肝纤维化的发生^[27]。而 Luo 等^[28]进一步实验证实, 在大鼠实验性酒精肝纤维化模型中, DDR2 表达增强且与胶原沉积和细胞外基质重建相关, 干涉 DDR2 的表达可明显降低酒精诱导的肝损伤和肝纤维化程度。

2.5.2 肿瘤

许多肿瘤的进程通常伴随着一种或多种 RTKs 的异常表达与激活, 因此目前有许多针对 RTKs 的肿瘤靶向治疗策略。与其他 RTKs 类似, DDRs 通过与不同类型的胶原结合调节肿瘤细胞功能, 在肿瘤进程的不同阶段都发挥着重要的作用。简言之, DDRs 在众多的肿瘤中呈高表达状态, 如肺癌、乳腺癌、脑瘤、食道癌、头颈癌、肝癌、前列腺癌和淋巴瘤等^[29], DDRs 表达失调, 导致肿瘤的形成。然而, DDRs 参与调控肿瘤发生的具体分子机制尚不明确。研究人员发现^[22]在鳞状细胞癌患者肿瘤标本中存在 DDR2 基因突变, 突变范围遍及整个基因编码区。近来研究结果显示^[30], 在侵袭性乳腺癌患者中 DDR2 表达量较高, 而乳腺癌细胞中过表达 DDR2, 能够促进肿瘤的侵袭转移。Zhang 等^[31]认为 I 型胶原可刺激 DDR2 活化, 激活细胞内 ERK2, 促进 EMT 相关转录因子 SNAIL1 磷酸化, 磷酸化的 SNAIL1 在细胞核内聚集, 防止蛋白质泛素化引发的蛋白降解, 正是 DDR2 对 SNAIL1 稳态调控促进了乳腺癌细胞的侵袭和转移。

2.5.3 关节炎

针对骨性关节炎的治疗, 迄今除了缓解疼痛外, 尚没有有效的药物来控制病情

的发展。越来越多的证据表明，DDR2 有希望成为治疗该疾病的新的药物靶点。Lin 等^[19]发现上调 DDR2 的表达，能够促进软骨细胞分泌 MMP13，降解细胞外基质，使关节软骨变性。此后，研究发现 DDR2 和 MMP13 无论是在不同类型骨性关节炎动物模型关节内，还是在骨性关节炎患者软骨处都呈现表达增高的现象^[32, 33]。Xu 等^[34]研究结果显示，降低 DDR2 表达水平可明显缓解骨性关节炎动物模型软骨变性程度。因此，DDR2 高表达被认为是骨性关节炎发生早期的一个重要标志，可作为药物靶标治疗骨性关节炎。

我们前期的实验研究发现，在 RA 滑膜成纤维样细胞中存在一种特殊的、具有受体酪氨酸蛋白激酶（receptor tyrosine kinase, RTK）活性的盘状结构域受体 DDR2 且呈高表达状态^[2]。它以胶原为配体，通过同源二聚化使其胞内区第 471 位酪氨酸残基发生磷酸化修饰，处于持续活化状态，促进 MMP1、MMP13 的大量分泌，参与 RA 关节软骨破坏^[3]。体外表达纯化的 DDR2 受体胞外区蛋白可与 DDR2 竞争性结合 II 型胶原，抑制 RA FLS 分泌 MMP1^[4]，在 CIA 大鼠模型中观察到可溶性的 DDR2 可改善关节软骨的破坏^[5]。因此，我们课题组在国际上首先提出并证实了 II 型胶原-DDR2-MMP-1/MMP-13-II 型胶原环路在介导类风湿性关节炎关节软骨破坏中发挥重要作用，即在 RA 滑膜组织增生侵袭破坏软骨的进程中可能存在这样一个恶性循环：在异常的自身免疫状态下，软骨脱落的 II 型胶原激活滑膜成纤维样细胞中的 DDR2 受体，从而诱导滑膜成纤维样细胞过表达 MMPs；DDR2 受体在胶原强大而持续的作用下持续活化，使得滑膜成纤维样细胞不断地分泌 MMPs，这些持续分泌的 MMPs 对骨和软骨产生严重的破坏；然而，被破坏的软骨又可进一步释放大量的胶原物质，随即成为 MMPs 的诱导因素，如此反复，周而复始。

第三部分 CYR61 的研究进展

3.1 概述

CCN 家族包括 CYR61/CCN1、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF/CCN2)、肾母细胞瘤过度表达基因 (nephroblastoma overexpressed, NOV/CCN3)、Wnt 诱导分泌蛋白 1 (Wnt-induced secreted protein 1, WISP/CCN4)、WISP2/CCN5 和 WISP2/CCN6 等 6 个成员。CCN 家族编码的蛋白具有相似的结构(图 0-4), 包括氨基酸的信号肽和 4 个高度保守的同源结构域——胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor-binding protein, IGFBP) 结构域、von Willebrand 因子 (von Willebrand factor type C repeat, vWC) 结构域、I 型血小板反应蛋白 (thrombospondin type I repeat, TSR) 结构域和富含半胱氨酸的羧基末端 (carboxyl-terminal, CT) 结构域。

CYR61/CCN1 是 CCN 家族中最具代表性的成员之一, 人类 CYR61 基因定位于染色体 1p22.3, 由 5 个外显子和 4 个内含子构成, 其开放阅读框编码 381 个氨基酸, 其中包括由二硫键进行连接的 38 个高度保守的半胱氨酸。CYR61 蛋白属于分泌型蛋白, 其相对分子质量为 42 kDa, 在多种组织中均有表达, 如胚胎、肾脏、心脏、肝脏、胰腺、肺和骨骼肌等。目前, 研究表明 CYR61 可直接结合于整合素受体或硫酸肝素蛋白多糖 (Heparan sulfate proteoglycans, HSPGs), 参与细胞粘附、迁移、增殖、凋亡、衰老和细胞分化等过程, 在肿瘤形成、软骨和骨生成、创伤愈合、血管性疾病、纤维化疾病、糖尿病视网膜病变和类风湿性关节炎中起到至关重要的作用^[35]。

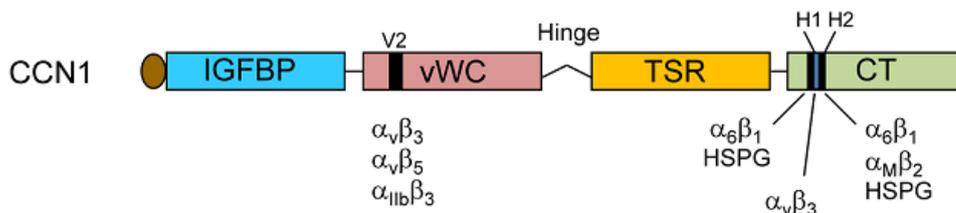


图 0-4 CYR61 结构域及受体结合位点示意图

引自: Lester F. Lau. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(19): 3149-3163.

3.2 CYR61 的受体及其参与的细胞信号通路

CYR61 除了可与整合素受体结合之外， 还可通过结合 HSPGs 发挥细胞生物学作用。Kireeva 等^[36]首次证实 CYR61 可与整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 直接结合调控内皮细胞粘附和迁移。后续研究表明，CYR61 可通过与不同受体（HSPGs、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 和 $\alpha_D\beta_2$ ）特异性的结合^[37-41]，激活细胞内多条信号转导通路，诱发下游目的基因的转录表达，从而介导不同的细胞生物学功能。目前研究证实，CYR61 主要参与的细胞信号转导途径（图 0-5）有 Wnt 信号通路、NF- κ B 信号通路、Akt 信号通路以及受体酪氨酸激酶介导的通路等^[35]。

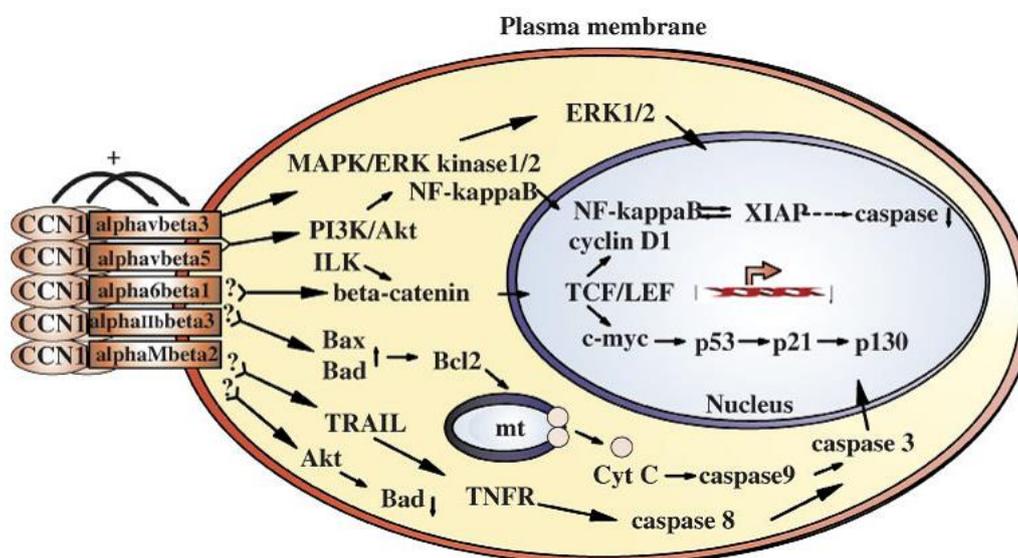


图 0-5 CYR61 介导的细胞信号转导通路示意图

引自: Ying Chen. *J Cell Biochem.* 2007; 100(6): 1337-1345.

3.3 CYR61 的生物学作用

3.3.1 胚胎发育

在胚胎发育过程中，CYR61 主要表达于间充质干细胞凝集的部位和新生血管，且在背主动脉、鳃弓以及脐动脉也有分布，这有助于促进子宫血管向胚胎生长。它的表达分布与骨骼、心血管以及神经系统的发育密不可分。基因靶向敲除 CYR61 将导致小鼠胚胎无法存活。大约有 30% CYR61 基因敲除胚胎在第八天时无法形成绒毛尿囊融合并在第九天死亡，而其余的胚胎在妊娠中期由于胎盘血管功能不全，胚胎

血管完整性缺失以及严重的心脏房室隔缺损（atrioventricular septal defect, AVSD）等原因死亡。虽然 CYR61^{+/-}嵌合体小鼠的存活率得到了提升，但仍有 20% 小鼠出现永久性原发孔型房间隔缺损。研究发现，AVSD1 基因突变可能是人类无症状性 AVSD 的重要致病因素，该基因突变同时可诱发原发孔型房间隔缺损。由于 CYR61 与 AVSD1 基因均定位于染色体 1p21-31，因此有研究者认为 CYR61 基因是人类 AVSD 的潜在致病基因。

3.3.2 细胞粘附、迁移、增殖及细胞凋亡

CYR61 可通过非共价方式与细胞表面和细胞外基质紧密的结合，这种相互结合状态可被可溶性肝素置换出来^[42]。进而，研究人员发现^[43]CYR61 可促进多种贴壁细胞粘附，诱导粘附信号的产生。在人皮肤成纤维细胞中，CYR61 可与 $\alpha_6\beta_1$ -HSPGs 受体结合支持细胞粘附，并引起黏着斑复合物的形成，活化 FAK-paxillin-Rac 信号通路，诱发细胞骨架蛋白重组以及与细胞运动密切相关的丝状伪足和片状伪足的形成^[44]。研究发现，CYR61 可刺激成纤维细胞^[45]、平滑肌细胞^[46]、内皮细胞^[47]和某些癌细胞的迁移^[48, 49]。虽然 CYR61 不能诱导自身 DNA 的合成，但是在成纤维细胞和内皮细胞中它可通过整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 协同其他促有丝分裂生长因子增强生长因子诱导的 DNA 合成^[46, 50]。也许正是 CYR61 这种生物学活性，促进生长因子诱导的前列腺癌细胞 PC-3^[51]、卵巢癌细胞^[52]和滑膜细胞的增殖^[53]。Leu SJ 等^[47]研究发现 CYR61 可结合整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 促进内皮细胞的存活，进一步研究结果显示，CYR61 可介导 Akt 信号通路抑制肺上皮细胞凋亡^[54]，通过上调 XIAP 表达抑制乳腺癌细胞系 MCF7 细胞凋亡^[55]。

3.3.3 创伤愈合

在人体中，组织炎症反应和损伤修复过程往往伴随着 CYR61 的表达升高。理论上，创伤愈合过程可大致分为局部炎症反应、肉芽组织形成和组织修复重建等 3 个彼此有别而又相互重叠的阶段。每个阶段都必须受到严格的调控才能达到最佳的愈合效果。在皮肤创伤愈合过程中，CYR61 高表达于肉芽组织的肌纤维母细胞^[56]。研究表明，当肉芽组织中肌纤维母细胞不断增殖，CYR61 最终将积累至一个较高的水平以驱动肌纤维母细胞自身进入衰老，而 CYR61 基因突变的转基因小鼠体内，由于

CYR61 无法与受体 $\alpha_6\beta_1$ -HSPGs 结合, 因此无法诱导肌纤维母细胞衰老, 最终加剧纤维化进程^[57], 若创伤皮肤局部给予 CYR61 蛋白治疗, 可调控肌纤维母细胞衰老, 从而遏制纤维化。此外, CYR61 的表达量不仅在心肌梗死后心肌细胞重塑过程中急剧上升^[58], 而且在血管损伤^[45]、骨折愈合的过程中显著升高^[59]。抗体特异性阻断 CYR61 表达可抑制骨折愈合^[60]。

3.3.4 血管生成

小鼠胚胎发育过程中, CYR61 在内皮细胞中强表达, 提示 CYR61 在血管生长中可能具有重要的作用^[61]。事实上, 研究人员通过角膜微囊袋模型证实 CYR61 具有较强的血管生成活性^[62], 随后在家兔下肢缺血模型中得到进一步确认^[63]。CYR61 的血管生成活性主要归因于其与内皮细胞表面的整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 结合, 促进内皮细胞粘附、迁移、增殖、存活和小管形成^[47]。整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 结合位点特异性突变的 CYR61 蛋白丧失血管生成活性^[64]。除了直接作用于内皮细胞, CYR61 还可调控血管生成因子的表达, 如 VEGF-A 和 VEGF-C^[65, 66]。此外, CYR61 还可通过整合素受体募集 CD34 阳性的内皮祖细胞, 增强内皮细胞增殖和新生血管的形成^[67]。

3.4 CYR61 与疾病

3.4.1 肿瘤

CYR61 像是一张双刃剑, 在肿瘤形成过程中具有双重效应。Leu SJ 等^[47]发现, CYR61 是人体内的一种强大的血管生成诱导因子, 血管生成为肿瘤的生长提供了充足的营养。随即, CYR61 在人胃腺癌细胞中被证实具有促进肿瘤的生长和增强肿瘤血管生成的生物学功能^[62]。此外, 研究表明 CYR61 能够促进肿瘤细胞增殖, 侵袭, 生存和转移^[49, 68, 69]。在后续报道中, 研究人员发现过量表达 CYR61 可以促进乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞以及鳞状癌细胞裸鼠移植瘤的生长, 而干涉 CYR61 的表达可以抑制前列腺癌细胞和胰腺癌细胞裸鼠移植瘤的生长。临床研究结果显示, CYR61 的表达与包括乳腺癌^[70]、前列腺癌^[71]、神经胶质瘤^[72]、胃腺癌^[73]和鳞状细胞癌^[74]等多种肿瘤的大小、恶性程度、分级分期及预后具有显著的关联性, 进一步揭示了 CYR61 在肿瘤发生、发展中发挥着重要作用。

然而, CYR61 同时也具备诱导细胞凋亡和细胞衰老的生物学功能, 通过诱导细胞凋亡和衰老抑制肿瘤形成起始阶段, 肿瘤细胞的转化。例如, CYR61 在发挥促进前列腺癌细胞增殖功能的同时, 在免疫监视分子 TRAIL 的作用下加剧肿瘤细胞的凋亡^[75]。同样有趣的是, p53 基因突变的前列腺癌细胞中 CYR61 呈高表达状态, 但是在表达野生型 p53 基因的前列腺癌细胞 CYR61 表达水平较低。这一结果, 验证了 CYR61 与 p53 共同促进了肿瘤细胞凋亡或衰老的假说, 只有 p53 基因突变的细胞才能耐受 CYR61 的高水平表达^[76]。许多研究报道为 CYR61 抑制肿瘤生长的说法提供了强有力的证据。临床标本中, 非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 的 CYR61 表达水平显著低于正常肺组织。高表达 CYR61 的 NSCLC 细胞移植瘤小鼠产生的肿瘤明显小于亲本细胞移植瘤小鼠^[77]。CYR61 通过上调 p53、p21 及 p130/pRb 的表达, 从而抑制 NSCLC 细胞增殖^[78], 提示 CYR61 可能通过 p53 和 pRb 依赖性通路诱导细胞的衰老。同样, CYR61 可通过 p53 调节肝癌细胞的增殖能力^[79]。此外, 子宫内膜腺癌细胞过表达 CYR61 能够降低细胞的生长水平, 加剧细胞凋亡^[80], 且黑色素瘤细胞中 CYR61 的表达有利于降低肿瘤的生长和转移风险, 增加肿瘤细胞凋亡的几率^[81]。因此, CYR61 在肿瘤发生中的作用是细胞类型和背景依赖性的, 并且取决于是否易感于 CYR61 诱导的细胞凋亡或衰老, 或者与血管生成因子是否受到限制密切相关。

3.4.2 血管性疾病

CYR61 不仅高表达于动脉粥样硬化患者病变部位, 而且在球囊血管成形术后再狭窄的血管平滑肌细胞中呈高表达状态^[82]。无论是通过 RNAi 干涉 CYR61 的表达还是 FOXO3a 介导的转录抑制都将减少球囊血管成形术后血管内膜增生的发生, 过表达 CYR61 则能逆转这一效应^[83]。球囊损伤后, CYR61 可募集 CD34 阳性的内皮祖细胞至内皮细胞层, 促进内皮细胞分化, 从而达到再内皮化^[84]。在氧化诱导的大鼠视网膜膜病变模型中, 慢病毒过表达 CYR61 或将高表达 CYR61 的定向造血干细胞注入玻璃体腔都将对损伤血管修复产生积极的影响^[85]。这些研究证实了 CYR61 在血管损伤修复过程中发挥着重要的作用。

3.4.3 糖尿病视网膜病变

Babic AM 等^[62]研究首次报道 CYR61 对大鼠角膜新生血管的形成具有明显促进作用, 这为后续 CYR61 参与眼部疾病新生血管的形成提供了重要的理论依据。晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 在体内积聚导致糖尿病并发症包括糖尿病视网膜病变, Hughes JM 等^[86]在糖尿病患者视网膜中证实 CYR61 是 AGE 的下游效应分子, 进一步研究发现, AGE 诱导的 CYR61 可能通过参与大鼠视网膜周细胞的脱离和失巢凋亡, 推动糖尿病视网膜病变进程, 提示未来 CYR61 可能作为重要的药物靶标用于治疗糖尿病视网膜病变。Kuiper EJ 等^[87]通过玻璃体腔注射 VEGF 发现, 包括 CYR61 在内的多种细胞外基质蛋白表达升高, 同时体外实验证实视网膜内皮细胞 VEGF 的刺激能够诱导 CYR61 的表达。缺氧通过 HIF-1 α 与 c-Jun/AP-1 调节 CYR61 启动子转录活性诱导 CYR61 的产生^[88], CYR61 可以促进脉络膜视网膜内皮细胞 RF/6A 的增殖, 迁移和小管形成, 并与 VEGF 协同参与视网膜新生血管, 在增殖性糖尿病视网膜病变的发病机制中扮演着重要的角色^[89]。近期研究表明, CYR61 在脉络膜视网膜血管内皮细胞中可通过与整合素受体 α V β 3 结合, 激活 FAK-PI3K/Akt -IKK/NF- κ B 细胞内信号通路, 诱导糖尿病视网膜病变中关键因子 MCP-1 的生成^[90]。

3.4.4 类风湿性关节炎

CYR61 作为一种生长因子诱导的即刻早期基因产物, 参与细胞粘附、增殖与分化过程。Zhang Q 等^[53]早期研究发现, 在 RA FLS 中 CYR61 通过 p38 MAPK-NF- κ B 信号通路调节炎性因子 IL-17 的表达促进 FLS 细胞增殖, 沉默 CYR61 的表达抑制 IL-17 刺激产生的 FLS 增殖效应。随后, 研究发现 CYR61 可作为前炎性因子通过结合整合素受体 α V β 5, 激活 Akt/NF- κ B 信号通路诱导 IL-6 生成, 促进 Th 17 细胞分化参与 RA 病变过程^[91]。CYR61 在 RA 发病过程中发挥重要作用, 而研究显示 SIRT-1/FoxO3a 信号通路对 CYR61 诱导表达至关重要, 辛伐他汀上调 SIRT-1 的表达, 促进 SIRT-1/FoxO3a 转录结合, 从而抑制 CYR61 的表达^[92]。通过对 CYR61 表达转录后调控的进一步研究, 研究人员发现在 RA FLS 中野生型 p53 基因可结合于 miR-22 启动子区激活 miR-22 的转录, miR-22 又可下调 CYR61 的表达^[93]。另有研究发现, CYR61 可通过 IL-1 β 和 TNF- α 非依赖途径诱导 IL-8 的产生, 给予 CIA 动物模型抗 CYR61 单抗治疗可明显降低 MIP-2 的表达, 减少中性粒细胞浸润, 削减炎症反应程

度。因此，CYR61 被认为是一种前炎症因子，参与 RA 的炎症反应及组织损伤。

正 文

第一部分 CYR61 在 RA 滑膜组织中的表达状态分析

引 言

类风湿性关节炎是一种病因不明、发病机制不清的慢性自身免疫性疾病，其病理生理过程主要包括两个时期：急性炎性渗出期和慢性滑膜增生期。在滑膜增生侵蚀破坏周围组织的过程中，具有“类肿瘤样”特征的滑膜细胞在增殖侵袭和分泌胶原酶破坏关节软骨的病理进程中发挥着重要作用。因此，深入研究 RA 关节软骨破坏相关的信号转导过程，探寻其中的重要环节和关键信号转导分子，对于更好地防治 RA 有着极其重要的意义。

现有研究表明：过度增殖的滑膜细胞和滑膜组织过度分泌的基质金属蛋白酶是 RA 关节软骨破坏的主要原因^[94]，脱落的 II 型胶原可直接诱导中性粒细胞和滑膜细胞分泌胶原酶，而胶原酶在病变晚期对骨和软骨的破坏具有重要意义。前期实验我们证实了 II 型胶原-DDR2-MMP1/MMP13-II 型胶原环路在介导类风湿性关节炎关节软骨破坏中发挥重要作用^[2]，但详细的作用机制及此过程中的关键分子有待深入研究。

为了进一步明确 II 型胶原-DDR2-MMP1/MMP13-II 型胶原环路中关键信号转导分子，我们利用 Agilent Human 1A 基因表达谱芯片对 II 型胶原刺激与否的 RA 滑膜细胞进行了差异分析，获得了 1250 个高调基因，其中高调 20 倍以上的基因 17 个，CYR61 就是其中之一。CYR61 是 CCN 家族具代表性的成员，可通过直接结合于整合素受体或硫酸肝素蛋白，参与细胞粘附、迁移、增殖、凋亡、衰老和细胞分化等过程，在肿瘤形成、软骨和骨生成、创伤愈合、血管性疾病、纤维化疾病、糖尿病视网膜病变中起到至关重要的作用。而近来研究表明，它还参与 RA 的发病及组织损伤过程^[53]，为进一步评价 CYR61 与 RA 发生发展的关系，我们在临床 RA 患者滑膜组织标本中进行了一系列的检测，来评价其临床意义。

首先，我们通过 Real-time PCR 检测 DDR2、CYR61 以及 MMPs 在 RA 滑膜组织

中的 mRNA 表达水平；进而利用 Western-blot 观察 DDR2、CYR61 以及 MMPs 在 RA 滑膜组织中的蛋白表达水平；最后，采用组织病理学和免疫组化方法比较 OA 和 RA 患者滑膜组织中基因的表达水平和表达分布情况。综合以上实验研究，评价 CYR61 在 RA 发生、发展中的临床意义。

1 实验材料

1.1 滑膜组织

OA 和 RA 患者滑膜组织分别由西京医院骨科和西京医院临床免疫科提供。

1.2 主要试剂

异丙醇	上海化学试剂有限公司
氯仿	上海化学试剂有限公司
甲醇	西安化学试剂厂
BSA	北京鼎国生物工程公司
甘氨酸	华美生物工程公司
SDS	华美生物工程公司
丙烯酰胺	华美生物工程公司
Tween-20	华美生物工程公司
RIPA 细胞裂解液	碧云天生物技术研究所以
PMSF	碧云天生物技术研究所以
DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥生物技术有限公司
鼠抗人 β -actin 单克隆抗体	北京康为世纪生物科技有限公司
HRP 标记的羊抗兔二抗	北京康为世纪生物科技有限公司
HRP 标记的兔抗鼠二抗	北京康为世纪生物科技有限公司
RNAiso Plus	日本 Takara 公司
PrimeScript TM RT reagent kit	日本 Takara 公司
SYBR [®] Premix Ex Taq TM II	日本 Takara 公司
TEMED	德国 Serva 公司
β -巯基乙醇	美国 Sigma 公司

Tris 碱	美国 Sigma 公司
感光胶片	美国 Kodak 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	美国 Thermo 公司
ECL 化学发光显色液	美国 Thermo 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
预染蛋白 Marker	美国 Fermentas 公司
鼠抗人 DDR2 单克隆抗体	美国 R&D 公司
兔抗人 MMP1 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 CYR61 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司

1×PBS 溶液

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
溶于 1000 mL 蒸馏水, pH7.4, 高压灭菌	

30%丙烯酰胺

丙烯酰胺	29 g
甲叉丙烯酰胺	1 g
加入去离子水溶解后定容至 100 mL, 装于棕色瓶中, 避光保存	

10%过硫酸氨

过硫酸氨	1g
去离子水	10 mL
现配现用	

4×分离胶缓冲液

Tris	18.17 g
调节 pH 值至 8.8	
10%SDS	4 mL

加水定容至 100 mL, 4℃ 保存

4×浓缩胶缓冲液

Tris 6.06 g

调节 pH 值至 6.8

10%SDS 4 mL

加水定容至 100 mL, 4℃ 保存

1.0 M Tris-HCl

Tris 12.1 g

去离子水 60 mL

调节 pH 值至 6.86, 定容至 100 mL

5×SDS-PAGE 凝胶电泳上样缓冲液

1 M Tris-HCl pH6.86 2.5 mL

β-巯基乙醇 350 μL

SDS 1.0 g

甘油 5 mL

溴酚兰 适量

加水定容至 10 mL

6% 浓缩胶配制

4×浓缩胶缓冲液 2.5 mL

30%丙烯酰胺 2 mL

H₂O 5.3 mL

10%APS 200 μL

TEMED 5 μL

总体积 5 mL

10×蛋白电泳缓冲液

甘氨酸 144 g

Tris 30 g

SDS	10 g
加水定容至 1000 ml	
1×蛋白转膜缓冲液	
甘氨酸	14.4 g
Tris	3.03 g
甲醇	200 mL
加水定容至 1000 ml	
亮绿染色液	
亮绿	0.1 g
甲醇	50 mL
冰醋酸	10 mL
加水定容至 100 ml	
10×TBS	
Tris	24.2 g
NaCl	80 g
调节 pH 值至 7.6，加水定容至 1000ml	
1×TBST	
TBS	1000 mL
Tween-20	1 mL
3%BSA	
牛血清白蛋白	5 g
1×TBST	100 mL

不同浓度 SDS-PAGE 分离胶配制

Gel%	8%	10%	12%	15%	18%
4×分离胶缓冲液	1.25 mL				

30%丙烯酰胺	1.33 mL	1.67 mL	2.00 mL	2.50 mL	3.00 mL
ddH ₂ O	2.37 mL	2.03 mL	1.70 mL	1.20 mL	0.70 mL
10%APS	50 μL				
TEMED	5 μL				
总体积	5 mL				

1.3 主要仪器

FA1604S 型电子天平	上海天平仪器厂
PHS-3C 型精密 pH 计	上海雷磁仪器厂
TH-2C 恒温振荡器	江苏太仓实验设备厂
5415C 台式离心机	德国 Eppendorf 公司
高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
生化培养箱	日本 SANYO 公司
制冰机	日本 SANYO 公司
IX70 倒置显微镜	日本 Olympus 公司
Lambda UV/VIS 分光光度计	美国 PE 公司
C1000 实时 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
Western-blot 转印仪	美国 Bio-Rad 公司
Milli-Q ^{UF} 纯水器	美国 Millipore 公司
GS-15R 高速台式冷冻离心机	美国 Beckman 公司
SPECTRAMax-PLUS 型酶标仪	美国 Molecular Devices 公司

2 实验方法

2.1 Real-time PCR 观察 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMPs mRNA 的表达水平

2.1.1 组织总 RNA 的提取

1) 组织从-80 °C 冰箱取出后立即于预冷的 RNAiso Plus 试剂 (每 50~100 mg 组织加

1 mL RNAliso Plus) 里用组织匀浆器进行匀浆;

- 2) 将匀浆样品置于室温 5 min, 以使核酸蛋白复合物完全分离;
- 3) 匀浆液中加 1/5 体积的氯仿, 颠倒混匀 10 次, 室温静置 10 min, 4 °C, 12000 rpm, 离心 20 min;
- 4) 转上层水相于另一干净的 Eppendorf 管中, 加入等体积异丙醇, 颠倒混匀数次, 室温孵育 10 min 后, 12000 rpm, 4 °C, 离心 15 min;
- 5) 使用移液器小心吸弃上清, 加冰预冷的 75% 乙醇, 4 °C, 12000 rpm, 离心 10 min;
- 6) 弃上清, 将 Eppendorf 管倒扣, 空气干燥 5~10 min;
- 7) 溶于 20 μ L DEPC 处理水中;
- 8) 定量时将上述溶于 DEPC 处理水中的总 RNA 进行适量稀释后, 采用紫外分光光度计进行 RNA 定量, 检测前先用 100 μ L 去离子水做空白读数以去除背景, 其后进行样品检测, 读取 OD₂₆₀ 值及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值, 计算 RNA 浓度。

2.1.2 反转录合成 cDNA

- 1) 依照下列反转录体系依次加入液体:

组分	体积
5×Primescript™ Buffer	6.0 μ L
Primescript™ RT Enzymemix I	1.5 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	1.5 μ L
Random 6 mers (50 μ M)	1.5 μ L
Total RNA	6.0 μ L
RNase Free H ₂ O	13.5 μ L
Total	30 μ L

- 2) 反转录 PCR 仪参数设置:

温度	时间
37°C	15 min
85°C	15 s
4°C	∞

2.1.3 实时定量 PCR

- 1) 合成 DDR2、CYR61、MMP1、MMP2、MMP9 及 MMP13 基因片段特异性引物，同时以 β -actin 为内参照

基因名称	Genebank NO.	引物序列
DDR2	NM_001554.4	Forward: AAACAGGTGCTGGATGGAAA
		Reverse: GAGTGGTCGGTGACTGGAAT
CYR61	BC052998.2	Forward: GCAGCGTTTCCCTTCTACAG
		Reverse: TGAGTCCCATCACCCACAC
MMP1	BC013875.2	Forward: TGAGGGTCAAGCAGACATCA
		Reverse: TGGGAGAGTCCAAGAGAATGG
MMP2	BC002576.2	Forward: AGTTTCCATTCCGCTTCCAG
		Reverse: CGGTCGTAGTCCTCAGTGGT
MMP9	NM_004994.2	Forward: CCAACTACGACACCGACGAC
		Reverse: TGGAAGATGAATGGAACTGG
MMP13	NM_002427.3	Forward: TATGACTATGCGTGGCTGGA
		Reverse: CCATTTGTGGTGTGGGAAGT

- 2) 依照下列反转录体系依次加入液体：

组分	体积
SYBR Premix EX Taq TM II(2 \times)	10 μ L
上游引物(10 μ M)	0.8 μ L
下游引物(10 μ M)	0.8 μ L
ROX Reference DYE II(50 \times)	0.4 μ L
反转录制备的 cDNA	2.0 μ L
RNase free H ₂ O	6.0 μ L
Total	20 μ L

- 3) 实时定量 PCR 仪参数设置如下：

步骤	温度	时间	循环数
变性	95℃	3 min	1×
变性	95℃	5 s	
退火	60℃	30 s	40×
延伸	72℃	30 s	
延伸	72℃	5 min	1×

2.2 Western-blot 检测 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 蛋白的表达水平

2.2.1 组织总蛋白的制备

取少量临床收集到的滑膜组织标本，用经高压灭菌的剪刀将其尽量剪碎后，置于 1 mL 规格匀浆器底部，加入 400 μ L RIPA 细胞裂解液（含 PMSF）于冰上进行匀浆。组织被充分研碎后静置于冰水混合物中裂解 30min，裂解过程中用 1 mL 注射器反复抽吸 10~20 次使之裂解充分，4 $^{\circ}$ C 离心，12000 rpm，20 min。小心吸取上清转移入新的 Eppendorf 管保存。以蛋白标准品为参照，采用 BCA 法提取的组织蛋白进行定量，调整蛋白浓度至 5 μ g/ μ L，加入 5 \times 蛋白上样缓冲液，于沸水中煮 10 分钟，12000 rpm 离心 5 min，以备 SDS-PAGE 电泳用。

2.2.2 SDS-PAGE 电泳

安装电泳模具，按照聚丙烯酰胺凝胶配制方法，依次配制 12% 分离胶和 6% 浓缩胶，取 10 μ L 蛋白样品上样，调整电压为 90 V，待样品到达分离胶界面时，调整电压为 120 V 直至电泳结束，以预染蛋白 Marker 作为参照，切取含有目的蛋白的凝胶（具体实验步骤参照《分子克隆实验指南》，第三版）。

2.2.3 免疫印迹测定蛋白表达水平

- 1) SDS-PAGE 结束后记录胶的大小，剪取大小适中的 1 张 PVDF 膜和 4 张滤纸，置于含预冷转移缓冲液的转移电泳槽内平衡 5~10 min；
- 2) 按顺序依次安装电转移装置模具：阴极垫板—海绵—2 张滤纸—凝胶—PVDF 膜—2 张滤纸—海绵—阳极垫板，将电转移装置放于冰盒内；
- 3) 接通电源，恒流 300 mA，转移 1.5 h；

- 4) 电转移结束后,用镊子夹取 PVDF 膜,浸置于亮绿染色液中进行染色,确认转膜成功后,用双蒸水洗涤 PVDF 膜上的染料 2~3 次;
- 5) 用含 3% BSA 的 TBST 浸泡 PVDF 膜,室温封闭 2 h;
- 6) 弃去封闭液,分别加入鼠抗人 DDR2 (1:500 稀释)、MMP1 (1:1000 稀释) 单克隆抗体和兔抗人 CYR61 多克隆抗体 (1:500 稀释),4 °C 孵育过夜, TBST 摇洗 3 次,每次 10 min;
- 7) 分别加入 HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗 (1:3000 稀释) 和兔抗鼠 IgG 二抗 (1:3000 稀释),室温孵育 40 min, TBST 摇洗 3 次,每次 10 min;
- 8) 将底物显色液滴加于 PVDF 膜上,室温避光显色 1~2 min 后,用镊子夹取 PVDF 膜至预先铺有保鲜膜的发光板中,于暗室中进行 ECL 发光,胶片曝光采图。

2.2.4 免疫印迹检测内参照

操作步骤同上,一抗为鼠抗人 β -actin 单克隆抗体,稀释度为 1:1000,二抗为 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 抗体,稀释度为 1:3000。

2.3 HE 染色分析 OA 和 RA 患者滑膜组织病理学变化

- 1) 取材:取临床上诊断明确的 OA 和 RA 患者滑膜组织;
- 2) 固定:将滑膜组织用生理盐水冲洗后,立即浸入中性福尔马林固定液中进行固定,时间约为 30~50 min;
- 3) 脱水:50%酒精 → 70%酒精 → 80%酒精 → 95%酒精 → 100%酒精 → 100%酒精,每级 0.5 h;
- 4) 透明:1/2 二甲苯+1/2 无水乙醇 (2 h) → 纯二甲苯 (1.5 h) → 纯二甲苯 (1.5 h);
- 5) 浸蜡:将处理的样品置于 1/2 石蜡+1/2 二甲苯中,40 °C 烘箱 40 min,再放入石蜡 I 30 min、石蜡 II 40 min;
- 6) 包埋:先将恒温箱的温度提升至 60 °C,换纯蜡 3 次,每次 1~2 h,将蜡块模具置于 45~60 °C 的烫板上,放入样品并摆放好位置,将样品标签正面朝外置于底部,补足石蜡;
- 7) 切片:将固定好的石蜡块安装于切片机的夹物台上,将石蜡块与刀口之间调整至合适的角度和位置,用右手摇动转轮使蜡块被切成蜡带的同时,左手持毛笔把蜡带提起,蜡带长度达 20~30 cm 时,右手持另一支毛笔将蜡带轻轻

的挑起，避免卷曲并牵引成带，平放在蜡带盒上，将靠刀面的较光滑的一面向下，较皱的一面向上，拿单面刀片切取一小段蜡片，置于载玻上加一滴水，采用显微镜观察切片是否良好；

- 8) 粘片：将粘贴剂滴加于薄玻片上，取切片浮置于粘贴剂上，然后置于烘片台上，使切片展开烫平，以蜡片不现皱纹为度，将切片依次排好，最后用滤纸吸除多余水分，并用记号笔在载玻片上编号，放入 37 °C 温箱中烘干过夜；
- 9) 脱蜡与染色：纯二甲苯（10~20 min）→ 纯二甲苯（5~10 min）→ 1/2 二甲苯+1/2 纯酒精 → 无水乙醇 → 95% 酒精 → 85% 酒精 → 70% 酒精 → 50% 酒精 → 自来水冲洗 10 s → 切片放入苏木精中染色 10~30 min → 自来水流水冲洗 15 min 使切片颜色变蓝；10) 分化和漂洗：将切片置于 1% 盐酸乙醇液中浸洗褪色，约 2~10 s，观察至切片变红，颜色较浅终止，用自来水流水冲洗切片使其恢复蓝色；
- 10) 分化和漂洗：将切片置于 1% 盐酸乙醇液中浸洗褪色，约 2~10 s，观察至切片变红，颜色较浅终止，用自来水流水冲洗切片使其恢复蓝色；
- 11) 脱水 I 和复染：切片依次浸入 50% 酒精（3~5 min）→ 70% 酒精（3~5 min）→ 80% 酒精（3~5 min），于切片上滴加 0.5% 伊红酒精溶液复染 1~3 min；
- 12) 脱水 II 和透明：用 95% 乙醇将切片中多余的红色洗去，然后无水乙醇中浸洗 3~5 min，进而用吸水纸去除残余的乙醇，最后将切片置于二甲苯 I、II 中各浸洗 3~5 min；
- 13) 封藏：将染色完成的切片取出，避免二甲苯干燥，迅速使用移液器将树胶滴加在组织上，盖上盖玻片，待凝固后通过显微镜观察 HE 染色结果。

2.4 免疫组织化学比较 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的表达及分布差异

- 1) 标本染色前处理：石蜡切片脱蜡和水化后，用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min；
- 2) 抗原修复：高压灭菌锅高温高压 15 min 对组织抗原进行相应的修复，用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min；
- 3) 酶消化：每张切片加 1 滴或 50 μ L 3% 过氧化氢溶液，室温下孵育 10 min，以阻断内源性过氧化物酶的活性，用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min；

- 4) 血清封闭: 加 50 μL 非免疫性动物血清, 室温封闭 10 min;
- 5) 一抗孵育: 加 50 μL 的一抗稀释液 (1:200 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min;
- 6) 二抗孵育: 加 50 μL 生物素标记的二抗, 室温下孵育 30 min, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min;
- 7) 链霉亲和素-过氧化物酶封闭: 加 50 μL 链霉亲和素-过氧化物酶溶液, 室温封闭 30 min, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min;
- 8) 显示: 加 100 μL 新鲜配制的 DAB 显色液, 显微镜下控制显色程度, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min;
- 9) 衬染: 苏木素复染, PBS 冲洗分化返蓝;
- 10) 脱水、透明、封化: 梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱干燥保存;
- 11) 采用显微镜观察结果并拍摄。

2.5 统计学处理

运用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 Student's *t* 检验分析, Pearson 相关性分析检验两种基因间的相关程度, 所有实验均重复 3 次, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 Real-time PCR 观察 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMPs mRNA 的表达水平

收集诊断明确的 OA 和 RA 膝关节滑膜组织样本各 30 例。分别提取组织总 RNA, 通过 Real-time PCR 实验观察 OA 与 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 以及 MMPs 的表达水平。结果 (图 1-1) 显示, 与 OA 相比, RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 以及 MMP1、MMP9、MMP13 的 mRNA 表达水平较高, 两者间存在明显的统计学差异 ($P < 0.001$); 而 MMP2 mRNA 表达水平 (图 1-1 D) 没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

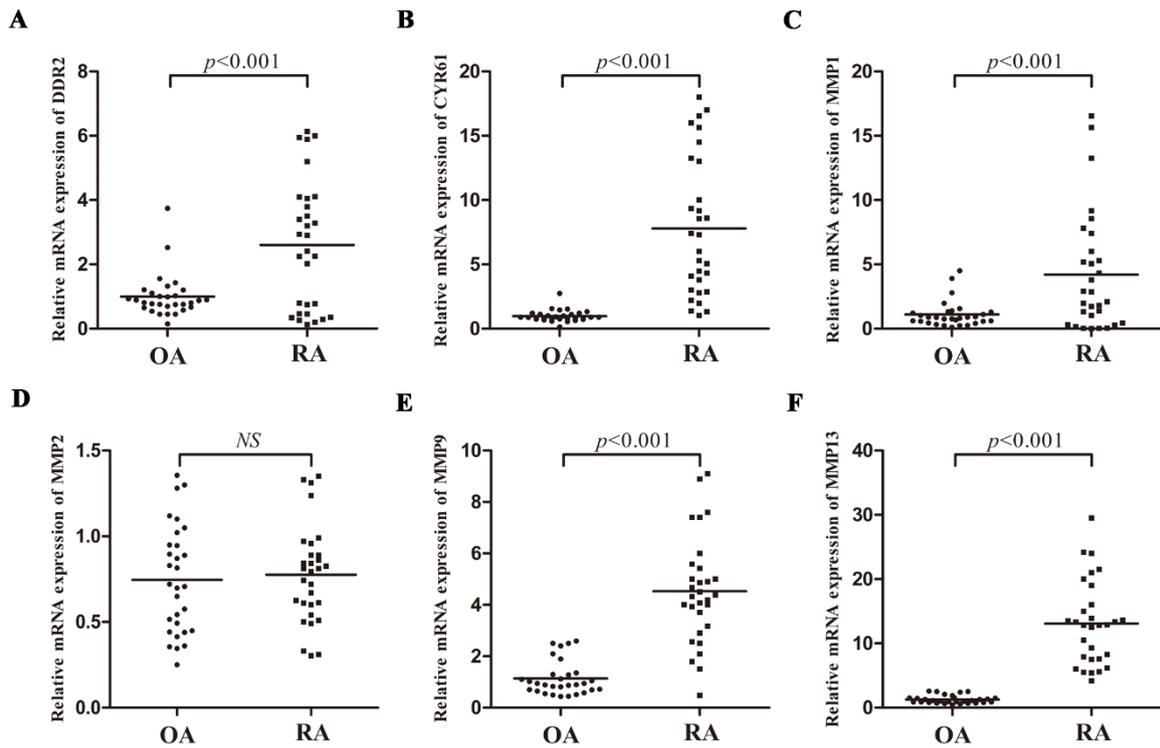


图 1-1 Real-time PCR 观察 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMPs 的表达水平

3.2 DDR2、CYR61 与 MMP1 基因表达相关性分析

通过 SPSS Pearson 相关性分析，我们发现 DDR2 与 CYR61 mRNA 的表达水平呈正相关（图 1-2 A），相关系数为 0.5732；而 CYR61 与 MMP1 mRNA 的表达水平呈正相关（图 1-2 B），相关系数为 0.8738，数据分析未发现 CYR61 与其他 MMP 分子 mRNA 的表达水平具有相关性。

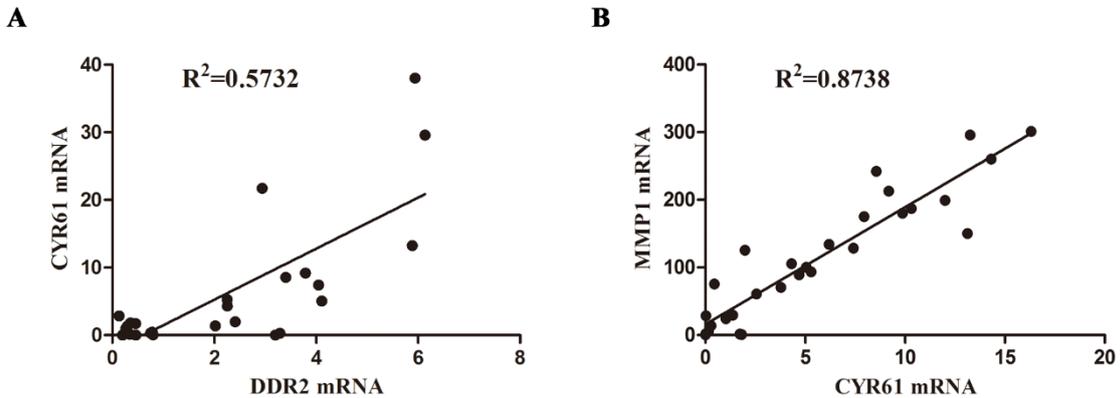


图 1-2 SPSS Pearson 法分析 DDR2、CYR61 与 MMP1 基因表达的相关性

3.3 Western-blot 检测 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 蛋白的表达水平

收集诊断明确的 OA 和 RA 膝关节滑膜组织样本各 6 例，分别提取组织总蛋白。通过 Western-blot 实验检测滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的蛋白表达水平。结果（图 1-3 A）显示，与 OA 相比，RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的蛋白表达水平较高。通过灰度扫描分析发现，OA 与 RA 滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的蛋白表达水平具有明显的统计学差异 (** $P < 0.01$)。

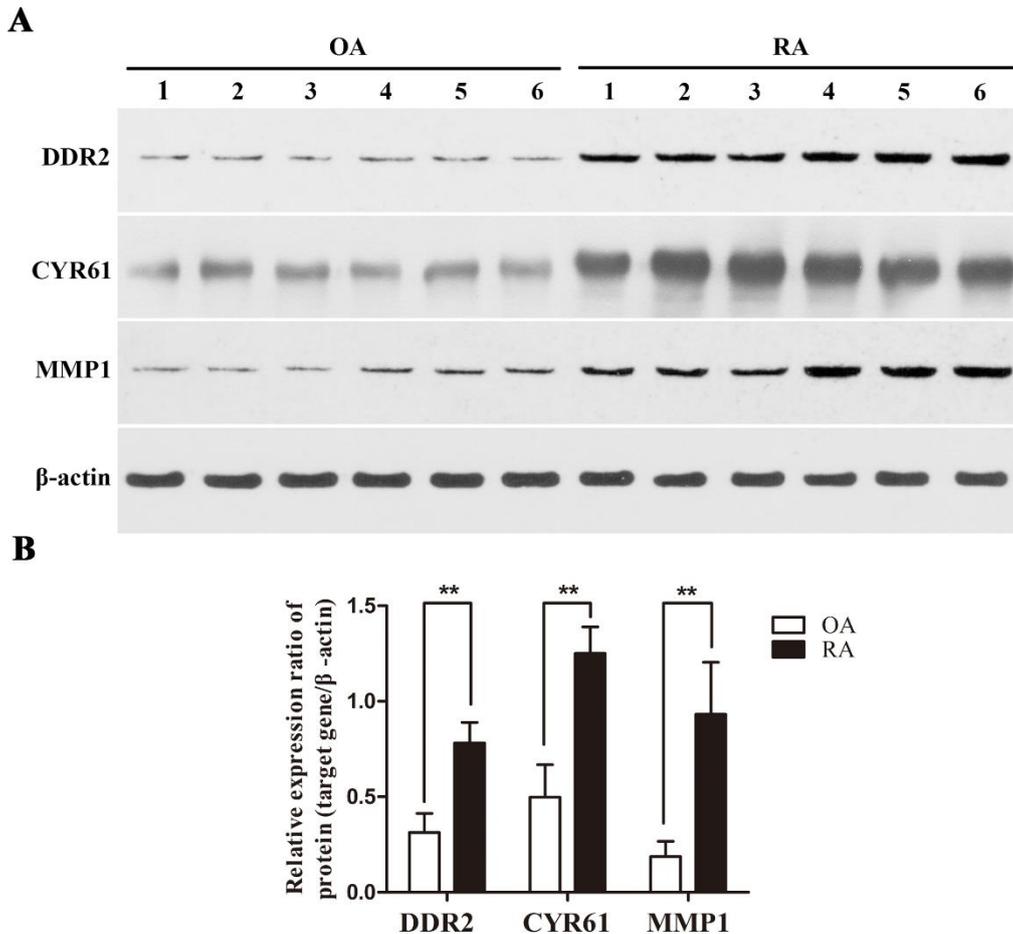


图 1-3 Western-blot 检测 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 蛋白的表达水平

3.4 HE 染色分析 OA 和 RA 患者滑膜组织病理学变化

通过 HE 染色对 OA 和 RA 患者滑膜组织进行组织病理学检查，观察滑膜层数、滑膜下结缔组织中细胞构成和血管状态等关节炎和滑膜炎组织病变情况。我们发现，与 OA 患者滑膜组织相比，RA 患者滑膜组织由多层细胞排列组成，为增生样改变，滑膜下结缔组织中大量炎性细胞浸润，以及伴有小血管充血和扩张（图 1-4）。

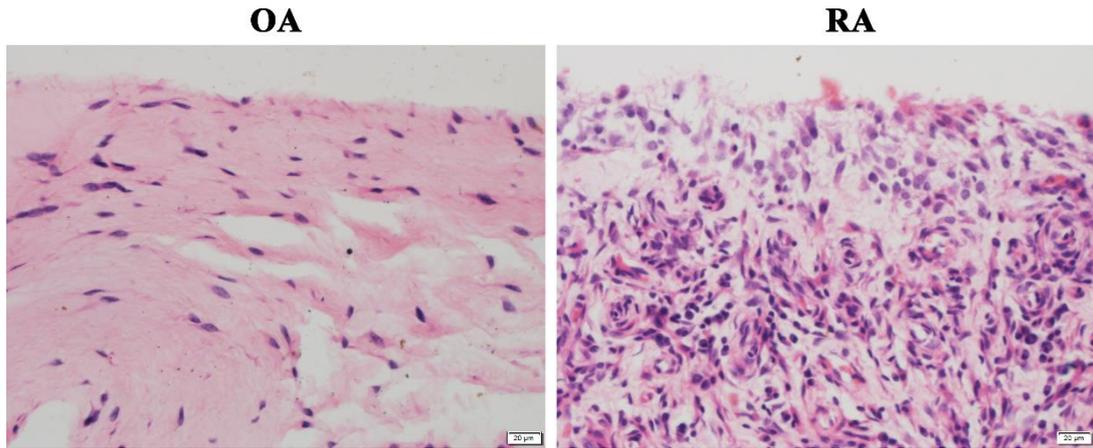


图 1-4 HE 染色分析 OA 和 RA 患者滑膜组织病理学变化 (40×)

3.5 免疫组织化学技术比较 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的表达及分布差异

利用免疫组织化学技术比较 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的表达及分布差异。结果 (图 1-5) 我们发现, DDR2、MMP1 均表达于滑膜衬里层, DDR2 与 MMP1 在 RA 滑膜组织中的表达水平高于 OA; CYR61 则泛表达于多种组织中, RA 滑膜及滑膜下结缔组织中 CYR61 的表达水平高于 OA。

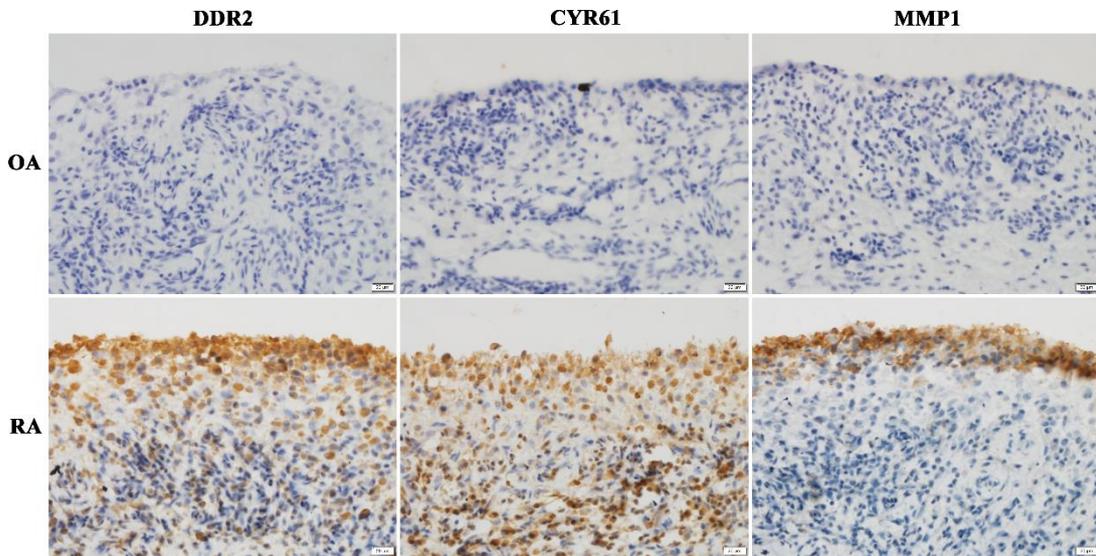


图 1-5 免疫组织化学技术比较 OA 和 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的表达及分布差异 (40×)

4 讨论

我们课题组在国际上首先提出并证实了 II 型胶原-DDR2-MMP-1/MMP-13-II 型胶原环路在介导类风湿性关节炎关节软骨破坏中发挥重要作用^[2], 主要证据包括: ① DDR2 在 RA 滑膜细胞中高表达并且呈持续活化状态^[95]; ② RA 滑膜细胞持续分泌高水平的 MMP-1、MMP-13^[3]; ③ 体外表达纯化的 DDR2 受体胞外区蛋白可以阻断 II 型胶原与 DDR2 的结合并可抑制 RA 滑膜细胞分泌 MMP-1^[4]; ④ DDR2 可通过调节 AP-1、RUNX2 的转录激活作用来调控 MMP 的表达; ⑤ DDR2 介导 II 型胶原诱导的 MMP-13 的表达^[3]; ⑥ MEK 通路参与 RA 滑膜细胞中 II 型胶原诱导的 MMP-13 的表达; ⑦ MEK 通路参与 DDR2 诱导的 MMP-13 的转录; ⑧ 在 CIA 大鼠关节炎模型中观察到可溶性的 DDR2 可改善关节软骨的破坏; ⑨ 在细胞水平和动物水平上证实了 RA 滑膜成纤维样细胞中 ANXA2 的磷酸化修饰能够介导 DDR2 过分泌 MMPs, 从而促进 RA 晚期关节骨破坏的发生^[24]。

为了进一步明确 II 型胶原-DDR2-MMP1/MMP13-II 型胶原环路中关键信号转导分子, 我们利用 Agilent Human 1A 基因表达谱芯片获得了在 RA 滑膜组织中高表达的基因 CYR61。通过大样本量的系统观察, 明确 CYR61 与 RA 关节软骨破坏的相关性, 将为后续分子机制和治疗性研究提供重要的临床证据。

利用我们前期建立的 RA 病人滑膜组织标本库, 选取临床资料完整的 RA 病人滑膜组织标本和 OA 病人滑膜组织标本各 30 例, 通过 Real-time PCR 观察这些标本中 DDR2、CYR61 和 MMPs 的 mRNA 表达水平, 结果发现 RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 以及 MMP1、MMP9、MMP13 的 mRNA 表达水平均高于 OA 患者滑膜组织。通过 SPSS Pearson 相关性分析, 我们在发现 DDR2 与 CYR61 mRNA 的表达水平呈正相关的同时, 观察到 CYR61 与 MMP1 mRNA 的表达水平呈正相关, 这为下一步阐明 CYR61 在 DDR2-MMPs 通路中扮演着何种角色提供了重要的依据。蛋白免疫印迹结果同样显示, RA 患者滑膜组织中 DDR2、CYR61 及 MMP1 的蛋白表达水平均显著高于 OA 患者滑膜组织。为了进一步验证 DDR2、CYR61 以及 MMP1 是否在 RA 滑膜组织中高表达, 我们采用免疫组织化学技术分析比较 RA 和 OA 滑膜组织中基因的表达水平和表达分布, DDR2、MMP1 均表达于滑膜衬里层, DDR2 与 MMP1 在 RA 滑膜组织中的表达水平高于 OA; CYR61 则泛表达于多种组织中, RA 滑膜及滑

膜下结缔组织中 CYR61 的表达水平高于 OA。通过以上实验研究系统评价了 CYR61 在 RA 发生、发展中的临床意义。

第二部分 DDR2 活化对 CYR61 的表达调控 及其分子机制研究

引 言

前期实验,我们在 RA 滑膜组织中对 CYR61 的表达状态进行大样本系统分析,系统评价其与 RA 发生、发展的相关性,明确了 CYR61 对 RA 关节软骨破坏的临床意义。为了进一步深入研究 CYR61 在 DDR2-MMPs 通路中的作用,我们首先从 DDR2-CYR61 入手,探讨 DDR2 对 CYR61 分子表达的影响及调控的分子机制。以原代分离培养的 RA 滑膜成纤维样细胞为研究对象,分别通过腺病毒过表达和 siRNA 干涉的实验手段来修饰 DDR2 的表达,同时给予 II 型胶原刺激使其活化,利用 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹观察上调或者下调 DDR2 的活化水平对 CYR61 表达水平的影响;进而,采用 EMSA 分析 DDR2 活化对 CYR61 核心启动子区域转录因子 AP-1 结合活性的影响;然后,利用双荧光素酶报告基因系统探究转录因子 AP-1 对 DDR2 活化诱导的 CYR61 转录活性升高的影响;最终,通过 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹实验检测干涉转录因子 AP-1 对 CYR61 表达水平的影响。从而,揭示 II 型胶原-DDR2 -CYR61 通路的存在及 DDR2 调控 CYR61 表达可能的分子机制,明确 CYR61 在 DDR2 -MMPs 通路中扮演的角色,为 RA 发病机制研究提供新的认识。

1 实验材料

1.1 实验用组织、细胞及质粒

选择临床诊断明确的 RA 患者,将关节镜手术中取出的滑膜组织置于无菌 PBS 缓冲液中低温运输;人胚肾细胞 HEK293、大肠杆菌 DH 5 α 、质粒 pcDNA3.1(-)-DDR2 为本实验室保存;骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和穿梭质粒 pDC316- mCMV-EGFP 购自深圳百恩维生物技术有限公司;pGL3-CYR61 启动子质粒购自广州复能基因有限公司。

1.2 主要试剂

异丙醇	上海化学试剂有限公司
氯仿	上海化学试剂有限公司
甲醇	西安化学试剂厂
BSA	北京鼎国生物工程公司
甘氨酸	华美生物工程公司
SDS	华美生物工程公司
丙烯酰胺	华美生物工程公司
Tween-20	华美生物工程公司
RIPA 细胞裂解液	碧云天生物技术研究所以
PMSF	碧云天生物技术研究所以
化学发光法 EMSA 检测试剂盒	碧云天生物技术研究所以
鼠抗人 β -actin 单克隆抗体	北京康为世纪生物科技有限公司
HRP 标记的二抗	北京康为世纪生物科技有限公司
<i>Nhe</i> I 限制性内切酶	日本 Takara 公司
<i>Hind</i> III 限制性内切酶	日本 Takara 公司
RNAiso Plus	日本 Takara 公司
PrimeScript TM RT reagent kit	日本 Takara 公司
SYBR [®] Premix Ex Taq TM II	日本 Takara 公司
TEMED	德国 Serva 公司
FBS	美国 Gibco 公司
β -巯基乙醇	美国 Sigma 公司
Tris 碱	美国 Sigma 公司
II 型胶原	美国 Sigma 公司
胶原酶	美国 Sigma 公司
感光胶片	美国 Kodak 公司
琼脂糖凝胶回收试剂盒	美国 Omega 公司
质粒提取试剂盒	美国 Omega 公司

RPMI 细胞培养基	美国 Hyclone 公司
DMEM 细胞培养基	美国 Hyclone 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	美国 Thermo 公司
ECL 化学发光显色液	美国 Thermo 公司
核蛋白提取试剂盒	美国 Thermo 公司
Dual-Luciferase®报告基因检测试剂盒	美国 Promega 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
预染蛋白 Marker	美国 Fermentas 公司
Lipofectamine® 2000 细胞转染试剂	美国 Invitrogen 公司
鼠抗人 DDR2 单克隆抗体	美国 R&D 公司
鼠抗人 CD90 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
鼠抗人 4G10 单克隆抗体	美国 Millipore 公司
Protein A/G PLUS-Agarose	美国 Santa Cruz 公司
兔抗人 c-Fos 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
兔抗人 c-Jun 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
兔抗人 CYR61 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司

1.3 主要仪器

FA1604S 型电子天平	上海天平仪器厂
PHS-3C 型精密 pH 计	上海雷磁仪器厂
TH-2C 恒温震荡器	江苏太仓实验设备厂
5415C 台式离心机	德国 Eppendorf 公司
高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
生化培养箱	日本 SANYO 公司
制冰机	日本 SANYO 公司
IX70 倒置显微镜	日本 Olympus 公司
E1000 荧光显微镜	日本 Nikon 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
Lambda UV/VIS 分光光度计	美国 PE 公司

C1000 实时 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
Western-blot 转印仪	美国 Bio-Rad 公司
Milli-Q ^{UF} 纯水器	美国 Millipore 公司
GloMax® 20/20 发光检测仪	美国 Promega 公司
GS-15R 高速台式冷冻离心机	美国 Beckman 公司
SPECTRAMax-PLUS 型酶标仪	美国 Molecular Devices 公司

2 实验方法

2.1 RA 滑膜成纤维样细胞原代培养

- 1) 将 25 mg VIII 型胶原蛋白酶溶于 50 mL RPMI 细胞培养基, 经 0.22 μm 滤器过滤, 配置成浓度为 0.5 mg/mL 的组织消化液;
- 2) 在 150 mm 玻璃培养皿中, 用冰预冷 PBS 缓冲液漂洗组织中的血液成分;
- 3) 将组织转移至新的 150 mm 玻璃培养皿, 观察组织, 其中含有滑膜、脂肪、纤维膜以及少量骨或软骨成分, 滑膜位于关节囊内侧, 呈粉色或棕黄色, 有时覆有一层绒毛, 极易与呈黄色或白色脂肪组织和纤维组织区别;
- 4) 鉴别滑膜组织并用手术剪将其剥离至新的玻璃培养皿;
- 5) 将剥离的滑膜组织用无菌手术剪剪碎成 1 mm³ 大小组织块, 将剪碎的组织块转移至上述含有胶原蛋白酶的组织消化液中;
- 6) 37 °C 恒温培养箱中孵育 90 min, 期间每 15 min 晃动一次培养瓶;
- 7) 用吸管将消化的组织经 70 μm 细胞滤器转移入 50 mL 离心管中, 以除去悬浮在表面的脂肪组织和未消化的组织块, 吸取 5~10 mL 含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基漂洗细胞滤器数次;
- 8) 250 g 离心 10 min;
- 9) 去除上清, 用 15 mL 含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基清洗细胞, 250 g 离心 10 min, 台盼蓝染色后用血球计数板统计存活细胞数;
- 10) 用含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 将细胞悬液转移至 75 cm² 细胞培养瓶中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育;
- 11) 次日, 吸弃未贴壁细胞并用含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基漂洗贴壁细胞, 至

此产生原代细胞，添加入 15~20 mL 完全培养基，置于 37 °C，5% CO₂ 细胞培养箱中培养，每周换液两次；

- 12) 通常，原代分离培养 10~14 d 后贴壁细胞层汇合度能够达到 90%；
- 13) 吸弃细胞培养上清，用 5 mL 胰酶-EDTA 消化液漂洗细胞层以除去血清，继而添加 10 mL 胰酶-EDTA 消化液，置于 37 °C 细胞培养箱中消化 5 min 或直至细胞收缩变圆将要从培养瓶底部脱落；
- 14) 加 10 mL 含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基反复吹打细胞培养瓶，以使细胞完全脱落，转移细胞悬液至离心管中；
- 15) 250 g 离心 5 min 收集细胞，用 10 mL 含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基重悬细胞，重复离心一次，重悬细胞并分装至 3 个 75 cm² 细胞培养瓶中；
- 16) 培养至 3 代以后通过流式细胞术进行纯度鉴定，3~9 代成纤维样滑膜细胞可用于后续实验。

2.2 腺病毒 Ad-DDR2 的包装及其感染效率鉴定

2.2.1 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 腺病毒载体构建

2.2.1.1 PCR 扩增目的基因 DDR2

- 1) 设计合成 DDR2 cDNA 克隆引物并引入 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点。

基因名称	引物序列
DDR2	Forward: CTAGCTAGCATGATCCTGATTCCAGAA
	Reverse: CCCAAGCTTTACTCGTCGCCTTGTTGA

注：下划线标注为酶切位点；粗体标注为基因序列。

- 2) 以 pcDNA3.1(-)-DDR2 质粒为模板，按以下组分制备 PCR 反应体系：

组分	体积
5×Fastpfu buffer	10 μL
dNTP Mix(2.5 mM)	4 μL
正向引物 (10 μM)	2 μL
反向引物 (10 μM)	2 μL
Fast <i>pfu</i> polymerase	1 μL
模板 DNA (100 ng/μL)	1 μL

ddH ₂ O	30 μ L
Total	50 μ L

3) 按以下条件设置反应程序进行 PCR 反应:

步骤	温度	时间	循环数
变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	1 \times
变性	95 $^{\circ}$ C	20 s	
退火	55 $^{\circ}$ C	30 s	30 \times
延伸	72 $^{\circ}$ C	2 min	
延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1 \times

将所有PCR产物行1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果。

2.4.1.2 PCR产物纯化、回收

- 1) 在紫外灯下小心迅速地将DNA片段切下并尽量去除多余的凝胶，称取凝胶块的重量，按照1 g/mL质量体积比加入Binding Buffer (XP2)，将混合物置于55~65 $^{\circ}$ C 水浴中孵育7 min或直至凝胶完全溶解；
- 2) 将HiBindTM DNA柱套入一个干净的2 mL收集管中，吸取700 μ L上述溶解液至其中，室温条件下，12000 rpm，离心1 min；
- 3) 弃穿过液，将HiBindTM DNA柱重新套入收集管中，将剩余的DNA/琼脂糖溶解液加入柱中，重复步骤2；
- 4) 吸取300 μ L Binding Buffer至HiBindTM DNA柱中，室温，12000 rpm，离心1 min；
- 5) 弃穿过液，将柱子重新套入收集管中，加700 μ L SPW Wash Buffer至HiBindTM DNA柱中，室温，12000 rpm，离心1 min；
- 6) 弃穿过液，加700 μ L SPW Wash Buffer至HiBindTM DNA柱中重复步骤5；
- 7) 弃穿过液，将HiBindTM DNA柱重新套入收集管中，室温，13000 rpm，离心2 min 以去除柱中残余的酒精成分；
- 8) 将HiBindTM DNA柱套入一个干净的1.5 mL离心管中，打开盖子室温挥发5 min，吸取30~50 μ L洗脱液滴加于吸附柱膜中央，室温，13000 rpm，离心,1 min，收集穿过液。

2.4.1.3 载体pDC316-mCMV-EGFP及目的基因DDR2双酶切

1) 载体 pDC316-mCMV-EGFP 酶切体系如下:

组分	体积
质粒 pDC316-mCMV-EGFP	1 μ g
10 \times Buffer	2 μ L
10 \times BSA	2 μ L
<i>Nhe</i> I	1 μ L
<i>Hind</i> III	1 μ L
dd H ₂ O	up to 20 μ L

DDR2 目的基因酶切体系如下:

组分	体积
PCR 回收产物	14 μ L
10 \times Buffer 2	2 μ L
10 \times BSA	2 μ L
<i>Nhe</i> I	1 μ L
<i>Hind</i> III	1 μ L

酶切反应在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2 h。按照前述方法, 分别回收载体酶切大片段和目的基因酶切产物。

2.4.1.4 载体pDC316-mCMV-EGFP及目的基因DDR2体外连接反应

连接反应体系如下:

组分	体积
目的基因	6 μ L
pDC316-mCMV-EGFP 大片段	2 μ L
10 \times DNA Ligase Buffer	1 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L

连接反应在 16 $^{\circ}$ C 水浴反应过夜。

2.4.1.5 DH 5 α 感受态大肠杆菌的制备

- 1) 取宿主菌 DH5 α 接种入 5 mL 无抗性的 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养过夜;
- 2) 按 1: 50 接种入 50 mL LB 培养液中, 37 °C 振荡培养 1.5-3 h 至中对数生长期 (OD₅₅₀=0.5);
- 3) 培养物置于冰上冷却后, 4°C, 5000 rpm 离心 5 min, 弃上清;
- 4) 细胞悬浮于 1/2 培养体积的 100 mmol/L 冰冷 CaCl₂ 中, 冰浴 20 min;
- 5) 4°C, 5000 rpm 离心 5 min, 弃上清;
- 6) 细胞悬浮于 1/15 培养体积的 100 mmol/L 冰冷 CaCl₂, 分装后贮存于 -70 °C 冰箱。

2.4.1.6 热激法转化重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2

- 1) 取 10 μ L 上述连接产物加入 100 μ L DH 5 α 感受态细菌中, 于冰上混匀后孵育 30 min; 42 °C 水浴热休克 90 s, 立即取出置于冰上孵育 2 min; 将混合物与 400 μ L 无抗性的 LB 培养基混匀, 置于 37 °C 恒温摇床中, 250 rpm/min, 孵育 1 h; 用移液器吸取 200 μ L 转化产物加入含 100 μ g/mL Ampicillin 的 LB 培养板中, 涂布均匀后倒置于 37 °C 生化培养箱中, 孵育过夜;
- 2) 挑取单菌落接种于 LB 培养液 (含 5 mL, 100 μ g/mL Ampicillin) 中, 置于恒温摇床, 37 °C, 250 rpm, 培养过夜。

2.4.1.7 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 的提取与鉴定

- 1) 收集菌液, 10000 rpm, 室温离心 1 min;
- 2) 去除菌液加 250 μ L Solution I/RNase A, 重悬菌体, 充分混匀;
- 3) 加 250 μ L Solution II, 上下颠倒 Eppendorf 管 4~6 次, 动作温和, 室温静置 2 min;
- 4) 加 125 μ L 冰预冷 Buffer N3, 温和混匀数次直至白色絮状物形成, 4 °C, 12000 rpm 离心 10 min;
- 5) 小心吸取上清, 转移入干净的 1.5 mL 离心管中, 加入 1/10 体积 ETR solution, 在 Eppendorf 管底部形成蓝色沉淀;
- 6) 将上层液体转移至新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 加 1/2 体积无水乙醇, 温和颠倒 6~7 次, 室温放置 1~2 min;
- 7) 将 700 μ L 混合液转移至 HiBind™ DNA Mini Column, 12000 rpm, 室温离心 1 min;
- 8) 500 μ L HB Buffer 洗柱, 12000 rpm, 室温离心 1 min;
- 9) 弃穿过液, 加 700 μ L DNA Wash Buffer, 12000 rpm, 室温离心 1 min, 弃穿过液, 重复洗涤一遍;

- 10) 弃穿过液，13000 rpm，空转 2 min；
- 11) 将柱子转移入干净的 1.5 mL Eppendorf 管中，向吸附柱膜中央滴入 30~50 Endoxin-Free Elution Buffer，13000 rpm，室温洗脱 1 min；
- 12) 将提取的去内毒素重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2，进行 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切（方法同前述），酶切产物加入 10×Loading buffer，行 1% 琼脂糖凝胶电泳；
- 13) 将酶切鉴定符合预期结果的重组质粒样本交由上海生工生物工程有限公司进行测序。

2.2.2 同源重组产生重组腺病毒

- 1) 取对数生长期的 HEK293 细胞，按照 5×10^5 /孔细胞密度接种于含有 10%FBS 的 DMEM 培养基的 6 孔细胞培养板中，置于 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养；
- 2) 待细胞融合度达 80~90%时，将细胞培养基更换为 Optic-MEM 无血清培养基。同时，将 4 μg 骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和 1 μg 穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 溶于 250 μL Optic-MEM 无血清培养基配制成 A 液，将 10 μL Lipofectamine® 2000 溶于 250 μL Optic-MEM 无血清培养基配制成 B 液，混匀室温静置 5 min；
- 3) 将 AB 液混合，静置 20 min 后，将转染混合液逐滴加入 6 孔细胞培养板中，轻轻混匀，置于 37 °C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育；
- 4) 转染 6 h 后将培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；
- 5) 待细胞长满后常规消化传代，接种于含有 5%FBS 的 DMEM 培养基的 25 cm² 细胞培养瓶中继续培养；
- 6) 待细胞长满后常规消化传代，接种于含有 5%FBS 的 DMEM 培养基的 75 cm² 细胞培养瓶中继续培养，每天观察细胞出毒迹象；
- 7) 当细胞收缩变圆逐渐从瓶底脱落，细胞形态呈葡萄状时进行收毒；
- 8) 将出毒的细胞置于 -70 °C 冰箱和 37 °C 水浴锅中反复冻融三次，室温，3000 rpm，离心 5 min，收集上清液，即为病毒母液（P1）。

2.2.3 病毒扩增与纯化

- 1) 取对数生长期的 HEK293 细胞，按照 5×10^6 /孔细胞密度接种于含有 10%FBS 的

DMEM 培养基的 75 cm² 培养瓶中，置于 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养；

- 2) 待细胞融合度达 80~90%时，取 2 mL P2 代毒种加入培养瓶内，继续 24 h，通过显微镜下观察细胞病变情况；
- 3) 当细胞收缩变圆逐渐从瓶底脱落，细胞形态呈葡萄状时进行收毒，将出毒的细胞置于-70 °C冰箱和 37 °C水浴锅中反复冻融三次，室温，3000 rpm，离心 5 min，收集上清液；
- 4) 采用上述方法将毒种接种于 4 个新的 75 cm² 培养瓶中，待细胞出现 CPE 现象时收毒；
- 5) 将病毒上清加入接种有 1.8×10⁸ 个 HEK293 细胞 4 个转瓶中，待细胞融合度达 80~90%时，按 10 mL/转瓶（MOI 约为 1）接种第 2 步收获的病毒上清，待细胞出现 CPE 现象时收集病变细胞混悬液；
- 6) 室温，3000 rpm，离心 10 min，用 Tris 缓冲液重悬细胞沉淀，置于-70 °C冰箱和 37 °C水浴锅中反复冻融三次，6000 rpm，离心 5 min，取上清，经 DNase 酶消化后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，最后进行柱纯化。

2.2.4 病毒生物学滴度测定

常规培养 HEK293 细胞，待细胞融合度达 80~90%时，消化细胞并进行细胞，按 1×10⁴cell/孔细胞密度将 HEK293 细胞接种于 96 孔板，每孔含有 90 μL 培养基，用含有 5%FBS 的 DMEM 培养基 10 倍梯度稀释上述纯化的病毒（如下图），每个病毒浓度设立 4 个平行复孔，感染 48 h 后，通过荧光显微镜观察并计算每孔荧光细胞数量。一般情况下，在最高病毒稀释度 m 的孔中可观察 N（N<10）个荧光细胞，同时计算平行复孔中荧光细胞的数量，求取平均值 a，则病毒滴度为 a×10^m/mL（m 为稀释度），若 N>10，则需继续稀释。

滴定量	1μL	0.1μL	0.01μL	0.001μL	0.0001μL
病毒液	5or10	10	10	10	10
DMEM 完全培养基	45or90	90	90	90	90
上样量	10	10	10	10	10

2.2.5 腺病毒 Ad-DDR2 感染 FLS 效率鉴定

2.2.5.1 腺病毒 Ad-DDR2 感染 FLS

- 1) 将 RA FLS 接种于 100 mm 细胞培养皿, 待细胞融合度达约 80% 时, 按照 MOI=0、10、25 和 50 不同滴度加入腺病毒;
- 2) 病毒感染 FLS 细胞 6 h 后, 更换为含有 20% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 48 h;
- 3) 荧光显微镜观察腺病毒 Ad-DDR2 的表达情况, 根据荧光强度, 初步确定腺病毒感染 FLS 的效率及最佳感染滴度。

2.2.5.2 细胞总蛋白的提取与定量

- 1) 收集腺病毒感染 FLS 细胞, 0.25% 胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心, 1000 rpm, 5 min, 预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上;
- 2) 根据细胞沉淀量向 Eppendorf 管中加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液, 冰水混合物中裂解 30 min, 期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解;
- 3) 4 °C 离心, 12000 rpm, 20 min, 小心吸取上清, 即为细胞总蛋白;
- 4) 取 1.2 mL 蛋白标准配制液加入到蛋白标准(30 mg BSA)中, 充分溶解配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液;
- 5) 取适量 25 mg/mL 蛋白标准溶液, 稀释至终浓度为 0.5 mg/mL;
- 6) 根据实际使用量将试剂 A 与试剂 B 按 50:1 比例配制成 AB 混合液;
- 7) 分别按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 体积将标准蛋白及待测样品加入 96 孔板中, 用标准品稀释液补足至 20 μ L, 每个浓度设置 4 个平行复孔;
- 8) 先取 2 μ L FLS 细胞总蛋白稀释 10 倍, 加入 96 孔细胞培养板中, 再加入 200 μ L 上述配制的 AB 混合液;
- 9) 置于 37 °C 生化培养箱中孵育 30 min, 立即取出, 通过酶标仪检测 570 nm 波长条件下每孔溶液的吸光度值;
- 10) 根据不同浓度标准蛋白吸光度值, 绘制蛋白浓度标准曲线, 得出蛋白浓度与吸光度值关系的方程式: $y=a+bx$;
- 11) 将待测样品吸光度值代入上述方程式中, 求得蛋白浓度。

2.2.5.3 Western-blot 检测腺病毒 Ad-DDR2 感染 FLS 后基因表达水平

- 1) 调整蛋白浓度: 根据各样品的浓度, 用 RIPA 细胞裂解液将所有样品浓度稀释至 5 μ g/ μ L, 加入 1/5 体积的 5 \times 蛋白 Loading buffer, 于沸水中煮 10 min, 以备

SDS-PAGE 电泳;

- 2) SDS-PAGE 电泳: 安装电泳模具, 按照聚丙烯酰胺凝胶配制方法, 依次配制 12% 分离胶和 6% 浓缩胶, 取 10 μL 蛋白样品上样, 调整电压为 90 V, 待样品到达分离胶界面时, 调整电压为 120 V 直至电泳结束, 以预染蛋白 Marker 作为参照;
- 3) 电转: SDS-PAGE 结束后记录胶的大小, 剪取大小适中的 1 张 PVDF 膜和 4 张滤纸, 置于含预冷转移缓冲液的转移电泳槽内平衡 5~10 min, 按顺序依次安装电转移装置模具: 阴极垫板—海绵—2 张滤纸—凝胶—PVDF 膜—2 张滤纸—海绵—阳极垫板, 将电转移装置放于冰盒内, 恒流 300 mA, 电转移 1.5 h;
- 4) 封闭: 电转移结束后, 用镊子夹取 PVDF 膜置于含 3% BSA 的 TBST 中, 摇床上室温封闭 2 h;
- 6) 一抗孵育: 弃去封闭液, 分别用 DDR2 (1:200 稀释) 和 β -actin (1:2000 稀释) 一抗与含有目的蛋白的 PVDF 膜孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结合过夜;
- 7) 二抗孵育: TBST 摇洗 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记二抗 (1:3000 稀释), 室温孵育 45 min;
- 8) ECL 发光: TBST 摇洗 3 次, 每次 10 min, 按照 1:1 比例配制适量 ECL 发光液, 用滤纸吸去 PVDF 膜上多余水分, 滴加 ECL 发光液, 用保鲜膜覆盖后, 暗室中发光显影, 胶片曝光采图;
- 9) 扫描显影结果, 通过灰度分析, 确定腺病毒 Ad-DDR2 最适的感染滴度。

2.3 DDR2 活化对 CYR61 表达水平的影响

2.3.1 Real-time PCR 检测 DDR2 活化对 CYR61 表达水平的影响

2.3.1.1 细胞处理

- 1) 取对数生长期 FLS, 将细胞接种于 4 个 100 mm 细胞培养皿中, 待细胞融合度达约 80% 时, 取其中 2 个培养皿细胞, 加入腺病毒 Ad-DDR2 感染, 另外 2 个培养皿细胞则加入腺病毒 Ad-EGFP 感染, 6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h;
- 2) 胶原包被: 将用 0.2% 醋酸溶解的终浓度为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ II 型胶原溶液, 按照 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的浓度, 包被于细胞培养皿内, 超净台内风干;
- 3) 常规消化 FLS, 将经腺病毒 Ad-DDR2 感染的细胞分别接种至有 II 型胶原包被和

无 II 型胶原包被的新细胞培养皿中，经腺病毒 Ad-EGFP 感染的细胞采取同样的方法接种，继续置于 37 °C 孵箱中培养 12 h。

2.3.1.2 细胞总 RNA 提取

- 1) 加入冰预冷的 RNAiso Plus 试剂，室温裂解 5 min，转移入经 DEPC 处理过的 Eppendorf 管中；
- 2) 加 1/5 体积的氯仿，颠倒混匀 10 次，室温静置 10 min，4 °C，12000 rpm，离心 20 min；
- 3) 转上层水相于另一干净的 Eppendorf 管中，加入等体积异丙醇，颠倒混匀数次，室温孵育 10 min 后，12000 rpm，4 °C，离心 15 min；
- 4) 使用移液器小心吸弃上清，加冰预冷的 75% 乙醇，4 °C，12000 rpm，离心 10 min；
- 5) 弃上清，将 Eppendorf 管倒扣，空气干燥 5~10 min；
- 6) 溶于 20 μ L DEPC 处理水中；
- 7) 用紫外分光光度计进行 RNA 定量。

2.3.1.3 反转录合成 cDNA

- 1) 依照下列反转录体系依次加入液体：

组分	体积
5 \times Primescript TM Buffer	6.0 μ L
Primescript TM RT Enzymemix I	1.5 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	1.5 μ L
Random 6 mers (50 μ M)	1.5 μ L
Total RNA	6.0 μ L
RNase Free H ₂ O	13.5 μ L
Total	30 μ L

- 2) 反转录 PCR 仪参数设置：

温度	时间
37°C	15 min
85°C	15 s
4°C	∞

2.3.1.4 实时定量 PCR

- 1) 合成 CYR61 基因片段特异性引物，同时以 β -actin 为内参照

基因名称	Genebank NO.	引物序列
CYR61	BC052998.2	Forward: GCAGCGTTTCCCTTCTACAG
		Reverse: TGAGTCCCATCACCCACAC

- 2) 依照下列反转录体系依次加入液体:

组分	体积
SYBR Premix EX Taq TM II(2 \times)	10 μ L
上游引物(10 μ M)	0.8 μ L
下游引物(10 μ M)	0.8 μ L
ROX Reference DYE II(50 \times)	0.4 μ L
反转录制备的 cDNA	2.0 μ L
RNase free H ₂ O	6.0 μ L
Total	20 μ L

- 3) 实时定量 PCR 仪参数设置如下:

步骤	温度	时间	循环数
变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	1 \times
变性	95 $^{\circ}$ C	5 s	
退火	60 $^{\circ}$ C	30 s	40 \times
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1 \times

2.3.2 Western-blot 观察 DDR2 活化对 CYR61 表达水平的影响

2.3.2.1 细胞处理

方法同 2.3.1.1

2.3.2.2 细胞总蛋白的提取

- 1) 收集腺病毒感染 FLS 细胞，0.25%胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心，1000 rpm，5 min，预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上；
- 2) 根据细胞沉淀量向 Eppendorf 管中加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液，冰水混合物中裂解 30 min，期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解；
- 3) 4 °C 离心，12000 rpm，20 min，小心吸取上清，即为细胞总蛋白，采用 BCA 法对各组细胞总蛋白进行定量，调整至一致浓度后，将蛋白等分为三份，其中两份分别用 Western-blot 检测 DDR2 和 CYR61 表达水平（方法同 2.2.5.3），另外一份用于后续免疫亲和沉淀 DDR2 相互作用分子，行 Western-blot 检测 DDR2 磷酸化水平；
- 4) 用含有 PMSF 的预冷 PBS 洗涤 Protein A/G PLUS-Agarose 3 次（1 mL/次，5000 rpm，离心 2 min），去除上清；
- 5) 向预洗过的 Protein A/G PLUS-Agarose（20 μ L/管）加入收集的蛋白裂解液 4 °C 预吸附 1 h；
- 6) 1000 rpm，4 °C 离心 3 min 收集上清，转移入新的 Eppendorf 管中，加入 DDR2 抗体 10 μ g，4 °C 孵育过夜；
- 7) 每管加入 30 μ L 经 PBS 洗涤的 Protein A/G PLUS-Agarose，4 °C 孵育 3 h；
- 8) 1000 rpm，4 °C 离心 3 min，去除上清，沉淀用含有 PMSF 预冷的 PBS 轻柔洗涤 3 次；
- 9) 去除上清，加入等体积 2 \times 蛋白 Loading buffer，沸水煮 10 min；
- 10) 离心取上清行 SDS-PAGE 电泳，通过 Western-blot 检测免疫亲和沉淀获得的 DDR2 蛋白的磷酸化水平（方法同 2.2.5.3）。

2.4 siDDR2 的筛选与干涉效率鉴定

- 1) DDR2 干扰小 RNA 的设计与合成：根据 DDR2 CDS 区序列，分别设计三对 siRNA，交由上海吉玛制药技术有限公司进行化学合成，siDDR2 序列如下：

序列名称	干涉序列
siDDR2①	Forward: GUCCACAGCUGCCAAAUAUTT Reverse: AUAUUUGGCAGCUGUGGACTT

siDDR2 ^②	Forward: GGCCACACGAAACUGUUUATT Reverse: UAAACAGUUUCGUGUGGCCTT
siDDR2 ^③	Forward: GUCCCUCAUCCAAGAAAUTT Reverse: AUUUCUUGGAAUGAGGGACTT

- 2) 取对数生长期的 FLS, 接种于 5 个 100 mm 细胞培养皿中, 实验分为五个处理组: a、FLS 空白对照组; b、siDDR2^①转染组; c、siDDR2^②转染组; d、siDDR2^③转染组; e、Mock 脂质体对照组;
- 3) 待细胞融合度达 80%时, 将细胞培养基更换为 Optic-MEM 无血清培养基。同时, 将 200 pmol siRNA 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 A 液, 将 10 μ L Lipofectamine[®] 2000 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 B 液, 混匀室温静置 5 min;
- 4) 将 AB 液混合, 静置 20 min 后, 将转染混合液逐滴加入细胞培养皿中, 轻轻混匀, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育;
- 5) 转染 6 h 后将培养基更换为含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h;
- 6) 收集细胞, 0.25%胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心, 1000 rpm, 5 min, 预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上;
- 7) 加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液, 冰水混合物中裂解 30 min, 期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解;
- 8) 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000 rpm, 20 min, 小心吸取上清, 即为细胞总蛋白;
- 9) BCA 蛋白定量, 调整蛋白浓度后行 Western-blot 鉴定 siDDR2 的干涉效率, 从而筛选有效的干涉目的基因 DDR2 表达的 siRNA 片段。

2.5 siDDR2 对 CYR61 表达水平的影响

- 1) 取对数生长期 FLS, 将细胞接种于 100 mm 细胞培养皿中, 实验分为以下六个实验组: ① FLS; ② FLS +II 型胶原; ③ siNC/ FLS; ④ siNC/ FLS+II 型胶原; ⑤ siDDR2/FLS; ⑥ siDDR2/ FLS+II 型胶原。待细胞融合度达约 80%时, 取 2 个培养皿细胞加入 siDDR 进行转染, 2 个培养皿细胞加入无关干扰 siRNA 进行转染, 6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h;
- 2) 胶原包被: 将用 0.2% 醋酸溶解的终浓度为 2 μ g/ μ L II 型胶原溶液, 按照 8 μ g/cm²

的浓度，包被于细胞培养皿内，超净台内风干；

- 3) 常规消化 FLS，将经 siDDR2 转染的细胞分别接种至有 II 型胶原包被和无 II 型胶原包被的新细胞培养皿中，将经无干扰 siRNA 转染的细胞采取同样的方法接种，将正常培养 FLS 接种于 II 型胶原包被的细胞培养皿中，继续置于 37 °C 孵箱中培养 12 h；
- 4) 将各实验组细胞分为两份，其中一份提取细胞总 RNA，反转录合成 cDNA 后，行 Real-time PCR 检测 siDDR2 对 CYR61 mRNA 表达水平的影响(方法同 2.3.1)；另一份提取细胞总蛋白，BCA 蛋白定量后，行 Western-blot 检测 siDDR2 对 CYR61 蛋白表达水平的影响（方法同 2.3.2）。

2.6 EMSA 分析 DDR2 活化对转录因子 AP-1 结合活性的影响

- 1) 根据生物信息学分析预测的转录因子 AP-1 结合位点的序列设计探针，交由上海生工生物工程有限公司合成，并在探针的 3'端进行生物素标记，探针序列如下：

引物名称	引物序列
生物素标记 AP-1 探针	Forward: AAATATTCCTGACTCAGAGACACAC Reverse: GTGTGTCTCTGAGTCAGGAATATTT

- 2) EMSA 样品制备：取对数生长期的 FLS，接种于 100 mm 细胞培养皿中，待细胞融合度达 80%时，将细胞培养基更换为 Optic-MEM 无血清培养基。同时，将 200 pmol siRNA 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 A 液，将 10 μ L Lipofectamine® 2000 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 B 液，混匀室温静置 5 min；将 AB 液混合，静置 20 min 后，将转染混合液逐滴加入细胞培养皿中，轻轻混匀，置于 37 °C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育；转染 6 h 后将培养基更换为含 20% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；常规消化 FLS，将经 siDDR2 转染的细胞接种至有 II 型胶原包被的新细胞培养皿中，继续置于 37 °C 孵箱中培养 12 h，参照核蛋白提取试剂盒说明书步骤，提取细胞核蛋白；
- 3) EMSA 胶的配制：使用常规的制备蛋白电泳胶的模具，制胶前将模具冲洗干净，确保没有 SDS 残留。按照以下配方配制 20 mL 4% 聚丙烯酰胺凝胶：

组分	体积
10×TBE buffer	1 mL

40% 丙烯酰胺	2 mL
80% 甘油	625 μ L
10% 过硫酸铵	150 μ L
TEMED	10 μ L
ddH ₂ O	16.2 mL
Total	20 mL

4) 按照以下顺序依次加入各种试剂:

组分	体积
Nuclease-free water	5 μ L
5 \times EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液	2 μ L
细胞核蛋白	2 μ L
标记好的探针	1 μ L
Total	10 μ L

室温结合反应 20 min, 分别加入 10 \times EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液, 立即上样;

- 5) 电泳: 用 0.5 \times TBE 缓冲液作为电泳液, 按照 10 V/厘米的电泳预电泳 10 min, 把混合了上样缓冲液的样品加入到上样孔内, 100 V, 电泳 45 min;
- 6) 转膜: 使用 BioRad 的湿法电转膜装置, 以 0.5 \times TBE 缓冲液作为转膜液, 恒流 380 mA, 电转移 1 h;
- 7) 交联: 电转移后, 用镊子夹取尼龙膜, 置于一干燥的滤纸上, 使用超净台内紫外灯, 距离膜 10 cm 左右交联 15 min;
- 8) 封闭: 将交联过的含有样品的尼龙膜, 放入 15 mL 封闭液中, 水平摇床上缓慢摇动 15 min;
- 9) 取出尼龙膜, 放入 15 mL 含有 7.5 μ L Streptavidin-HRP Conjugate 的封闭液中, 水平摇床上缓慢摇动 15 min;
- 10) 将尼龙膜转移至另一装有 15 mL 洗涤液的容器内, 水平摇床上缓慢洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次;
- 11) 检测平衡液中平衡 5 min;
- 12) 用镊子夹取尼龙膜至预先铺有保鲜膜的发光板中, 于暗室中进行 ECL 发光, 胶

片曝光采图。

2.7 c-Jun siRNA 的筛选与干涉效率鉴定

1) c-Jun 干扰小 RNA 的设计与合成: 根据 c-Jun CDS 区序列, 分别设计三对 siRNA, 交由上海吉玛制药技术有限公司进行化学合成, siRNA 序列如下:

序列名称	干涉序列
si-Jun①	Forward: GAAAGUCAUGAACCACGUUTT Reverse: AACGUGGUUCAUGACUUUCTT
si-Jun②	Forward: CGAUCUCAUUCAGUAUUAATT Reverse: UUAAUACUGAAUGAGAUCGTT
si-Jun③	Forward: GCUGAUUACUGUCAAAUAAATT Reverse: UUUAUUGACAGUAAUCAGCTT

- 2) 取对数生长期的 FLS, 接种于 5 个 100 mm 细胞培养皿中, 实验分为五个处理组: a、FLS 空白对照组; b、si-Jun①转染组; c、si-Jun②转染组; d、si-Jun③转染组; e、Mock 脂质体对照组;
- 3) 待细胞融合度达 80% 时, 将细胞培养基更换为 Optic-MEM 无血清培养基。同时, 将 200 pmol siRNA 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 A 液, 将 10 μ L Lipofectamine® 2000 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 B 液, 混匀室温静置 5 min;
- 4) 将 AB 液混合, 静置 20 min 后, 将转染混合液逐滴加入细胞培养皿中, 轻轻混匀, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育;
- 5) 转染 6 h 后将培养基更换为含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h;
- 6) 收集细胞, 0.25% 胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心, 1000 rpm, 5 min, 预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上;
- 7) 加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液, 冰水混合物中裂解 30 min, 期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解;
- 8) 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000 rpm, 20 min, 小心吸取上清, 即为细胞总蛋白;
- 9) BCA 蛋白定量, 调整蛋白浓度后行 Western-blot 鉴定 si-Jun 的干涉效率, 从而筛选有效的干涉目的基因 c-Jun 表达的 siRNA 片段。

2.8 双荧光素酶报告基因检测 c-Jun siRNA 对 CYR61 启动子转录活性的影响

- 1) 取处于对数生长期的FLS细胞，接种至24孔细胞培养板中，待细胞融合度达80%左右；
- 2) 分别将200 pmol c-Jun siRNA与pGL3-CYR61 promoter (100 ng) 和phRL-TK (5 ng) 共转FLS细胞，每个实验组设立4个复孔；
- 3) 转染48 h后，弃培养上清，PBS洗两遍后，将100 μ L 1 \times PLB细胞裂解液加入细胞培养孔中，在室温轻缓晃动培养板 15 min，把裂解液转移到检测试管中，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm，离心10 min，将上清转移至新的Eppendorf管中；
- 4) 避光条件下，将0.2 mL Stop & Glo[®] Substrate加入10 mL Stop & Glo[®]缓冲液中，配制成1 \times Stop & Glo[®]反应溶液，低温保存备用；
- 5) 先取5 μ L细胞裂解液，加入10 μ L Luciferase Assay Buffer II，快速混匀，立即放入荧光照度计检测萤火虫荧光素酶活性，记录数值1，再加入10 μ L Stop & Glo反应溶液，快速混匀后检测海肾荧光素酶活性，记录数值2；
- 6) 根据每孔报告基因的数据（数值1/数值2），求取各实验组平均值、标准差。

2.9 c-Jun siRNA 对 CYR61 表达水平的影响

2.9.1 Real-time PCR 检测 c-Jun siRNA 对 CYR61 表达水平的影响

2.9.1.1 细胞处理

- 1) 取对数生长期 FLS，将细胞接种于 4 个 100 mm 细胞培养皿中，待细胞融合度达约 80%时，取其中 2 个培养皿细胞，分别加入无关对照 siRNA 和 c-Jun siRNA 转染，6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；
- 2) 常规消化 FLS，FLS 细胞分别接种至有 II 型胶原包被的新细胞培养皿中，正常培养的 FLS 采取同样的方法接种，继续置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中培养 12 h。

2.9.1.2 细胞总 RNA 提取

方法同 2.3.1.2

2.9.1.3 反转录合成 cDNA

- 1) 依照下列反转录体系依次加入液体：

组分	体积
5 \times Primescript TM Buffer	6.0 μ L
Primescript TM RT Enzymemix I	1.5 μ L

Oligo dT Primer (50 μ M)	1.5 μ L
Random 6 mers (50 μ M)	1.5 μ L
Total RNA	6.0 μ L
RNase Free H ₂ O	13.5 μ L
Total	30 μ L

2) 反转录 PCR 仪参数设置:

温度	时间
37°C	15 min
85°C	15 s
4°C	∞

2.9.1.4 实时定量 PCR

1) 依照下列反转录体系依次加入液体:

组分	体积
SYBR Premix EX Taq TM II(2 \times)	10 μ L
上游引物(10 μ M)	0.8 μ L
下游引物(10 μ M)	0.8 μ L
ROX Reference DYE II(50 \times)	0.4 μ L
反转录制备的 cDNA	2.0 μ L
RNase free H ₂ O	6.0 μ L
Total	20 μ L

2) 实时定量 PCR 仪参数设置如下:

步骤	温度	时间	循环数
变性	95°C	3 min	1 \times
变性	95°C	5 s	40 \times
退火	60°C	30 s	

延伸	72℃	30 s	
延伸	72℃	5 min	1×

2.9.2 Western-blot 观察 c-Jun siRNA 对 CYR61 表达水平的影响

2.9.2.1 细胞处理

方法同 2.9.1.1

2.9.2.2 细胞总蛋白的提取

- 1) 收集腺病毒感染 FLS 细胞，0.25%胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心，1000 rpm，5 min，预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上；
- 2) 根据细胞沉淀量向 Eppendorf 管中加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液，冰水混合物中裂解 30 min，期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解；
- 3) 4 °C 离心，12000 rpm，20 min，小心吸取上清，即为细胞总蛋白，采用 BCA 法对各组细胞总蛋白进行定量，调整至一致浓度后行 Western-blot 检测 c-Jun siRNA 对 CYR61 表达水平的影响（方法同 2.2.5.3）。

2.10 统计学处理

运用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 Student's *t* 检验分析，所有实验均重复 3 次，实验结果以 $x \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 RA 滑膜成纤维样细胞的原代培养与鉴定

通过相差显微镜观察（图 2-1 A），我们发现离体滑膜组织经剪切、消化后，在完全培养基培养条件下，成纤维样细胞逐渐从组织块周围爬出，组织块混杂有呈圆形的巨噬细胞。细胞传代后滑膜成纤维样细胞伸展呈细长形，有的呈椭圆形或多角形，并伴随有胞质突起，偶尔可见滑膜成纤维样细胞具有树突状或星状等细胞形态，此时仍可见有较多的滑膜巨噬细胞，与滑膜成纤维样细胞相比滑膜巨噬细胞显得更圆、更小，两类细胞可被明显区分。细胞传至第三代时，呈典型梭形，贴壁牢固，滑膜巨噬细胞的数量明显减少。经消化传至第四代，滑膜成纤维样细胞得到进一步纯化，细胞形态规则，状态良好，偶见巨噬细胞存在。通过流式细胞术进行鉴定（图

2-1 B&C), 可见第四代细胞中, 表面抗原 CD90 阳性的细胞数量大于 95%, 与第一代相比, 滑膜成纤维样细胞纯度得到了较大提高, 可用于后续实验研究。

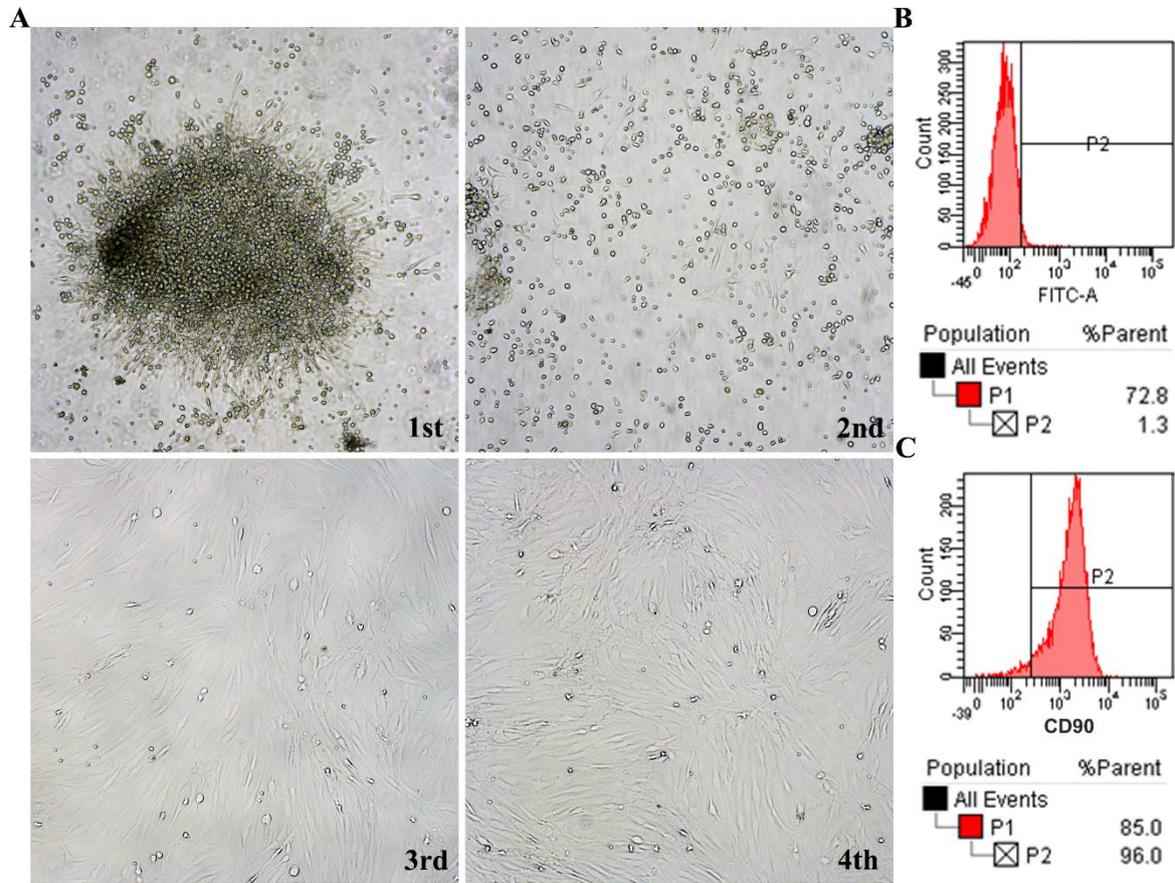


图 2-1 RA 滑膜成纤维样细胞的原代培养与鉴定

3.2 DDR2 对 CYR61 的表达调控

3.2.1 腺病毒 Ad-DDR2 的包装及其感染效率鉴定

3.2.1.1 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 腺病毒载体构建

3.2.1.1.1 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 酶切鉴定结果

pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 质粒大提后, 用 *Nhe* I 和 *Hind* III 做双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果 (图 2-2) 显示, pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 重组质粒, 双酶切后产生 2568 bp 左右目的片段, 与预期结果相符。

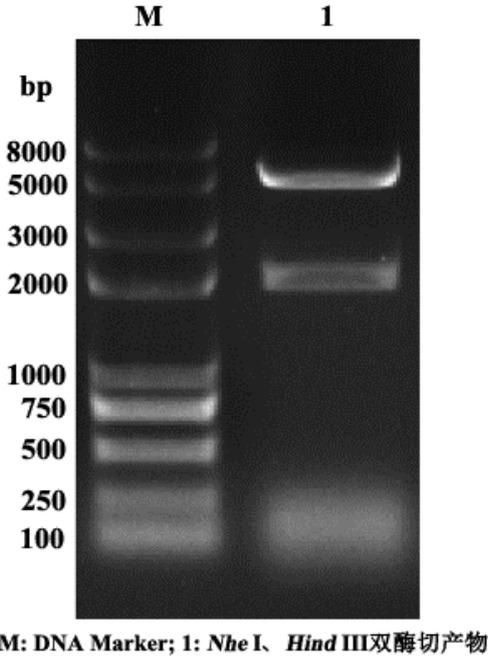


图 2-2 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 质粒酶切鉴定结果

3.1.1.1.2 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 测序结果

将酶切鉴定符合预期结果的重组质粒样本交由上海生工生物工程有限公司进行测序，序列正确，如图（图 2-3）所示。

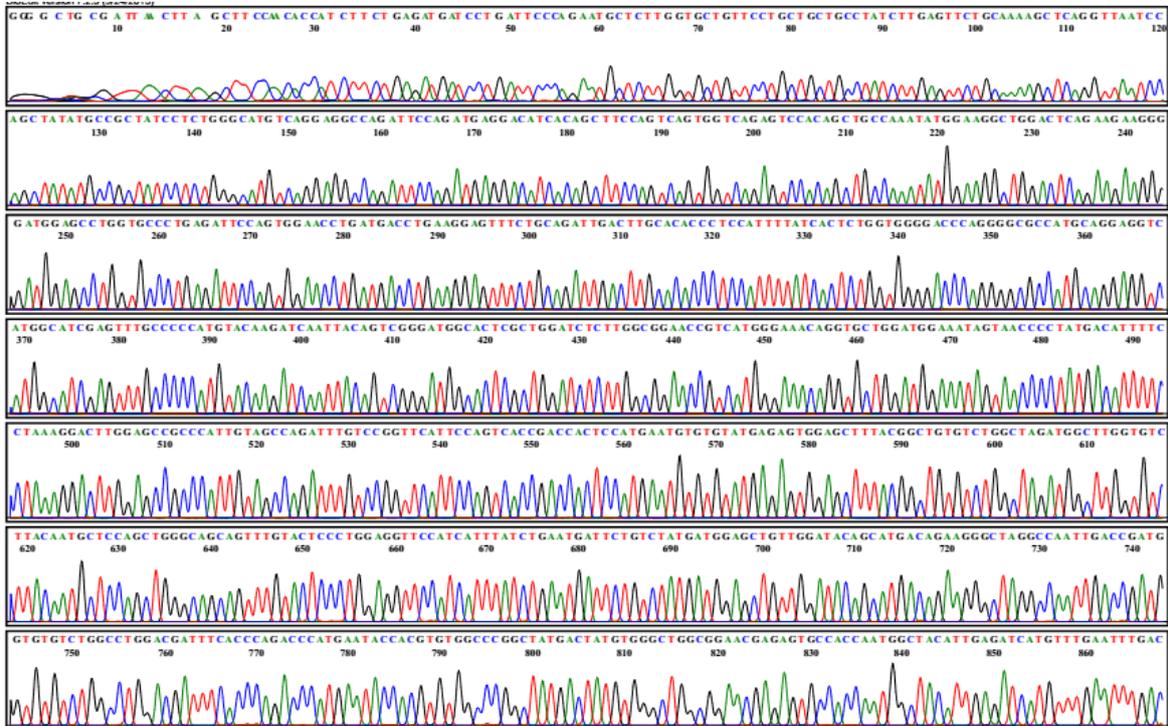


图 2-3 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-DDR2 测序图谱

3.2.1.2 腺病毒 Ad-DDR2 感染 FLS 效率鉴定

将 RA FLS 接种于 24 孔板，待细胞融合度达 90% 左右时，按照 MOI 值分别为 10、25 和 50 加入不同体积腺病毒 Ad-DDR2 毒液；感染 24 h 后，更换含 20% FBS 的 DMEM 完全培养基常规培养液继续培养 48 h；分别通过荧光显微镜（图 2-4 A）和 Western-blot（图 3-4 B&C），观察 Ad-DDR2 的表达水平（曝光时间 30 s）。随着 MOI 值升高，腺病毒感染 FLS 细胞数量逐渐增多，DDR2 蛋白表达量相应增加。当 MOI=50 时，腺病毒感染效率达到 95% 以上，DDR2 蛋白表达量达到未感染前 2 倍以上。根据各实验组荧光强度以及蛋白表达水平，初步确定腺病毒 Ad-DDR2 感染 FLS 的最适滴度为 MOI=50。

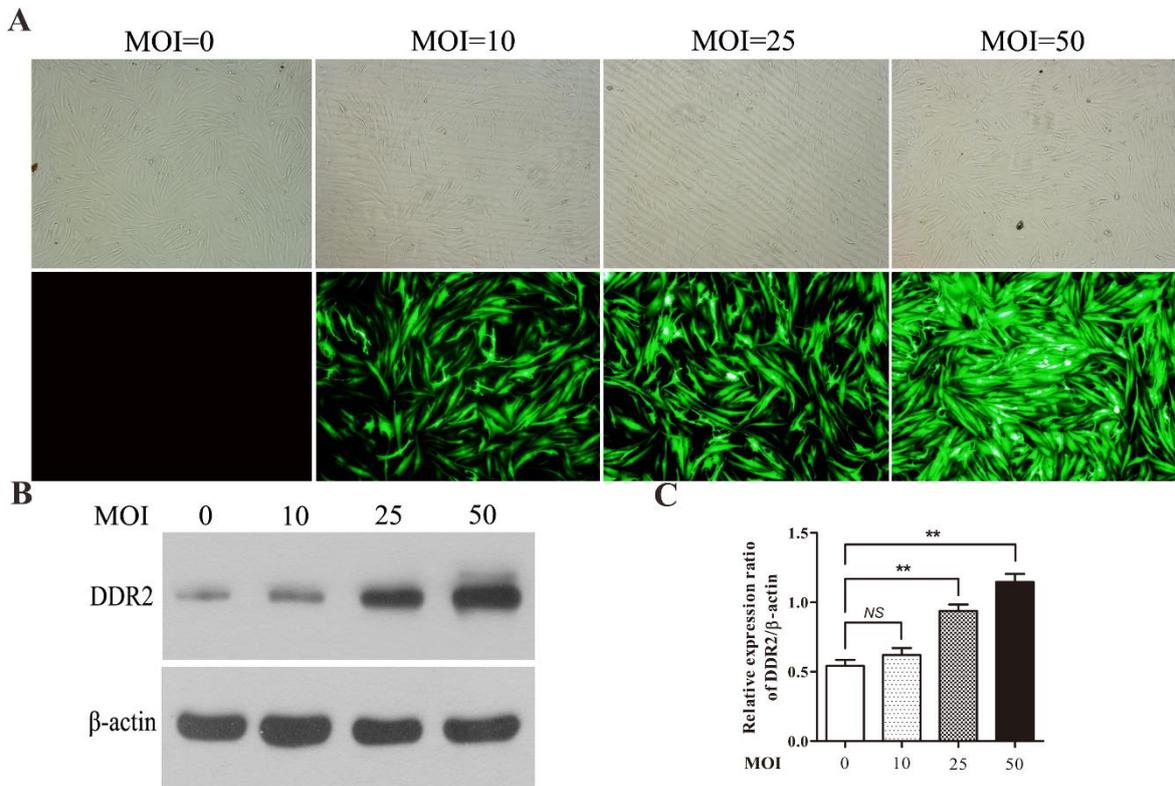


图 2-4 腺病毒 Ad-DDR2 感染 FLS 效率鉴定

3.2.2 DDR2 活化对 CYR61 表达水平的影响

此实验分为以下四个实验组：① FLS；② FLS+II 型胶原；③ Ad-DDR2/ FLS；④ Ad-DDR2/ FLS+II 型胶原。首先用腺病毒 Ad-DDR2 感染 RA FLS 细胞，常规培养 48 h，以无关病毒感染为阴性对照，确认靶基因上调后，将 RA FLS 细胞消化下来，用无血清 DMEM 洗液重悬后，接种于包被有 II 型胶原的细胞培养皿，继续培养 12 h。

继而，将各实验组细胞分为两份，其中一份用于细胞总 RNA 的提取，进行 Real-time PCR 检测（图 2-5 A）；另外一份用于提取总蛋白，以 β -actin 为内参，行 Western-blot 检测（曝光时间 30 s）（图 2-5 B、C&D）。结果显示，II 型胶原刺激，无法提高 DDR2 的表达量却可以促进 DDR2 磷酸化，DDR2 的活化进一步增强 CYR61 的表达水平。

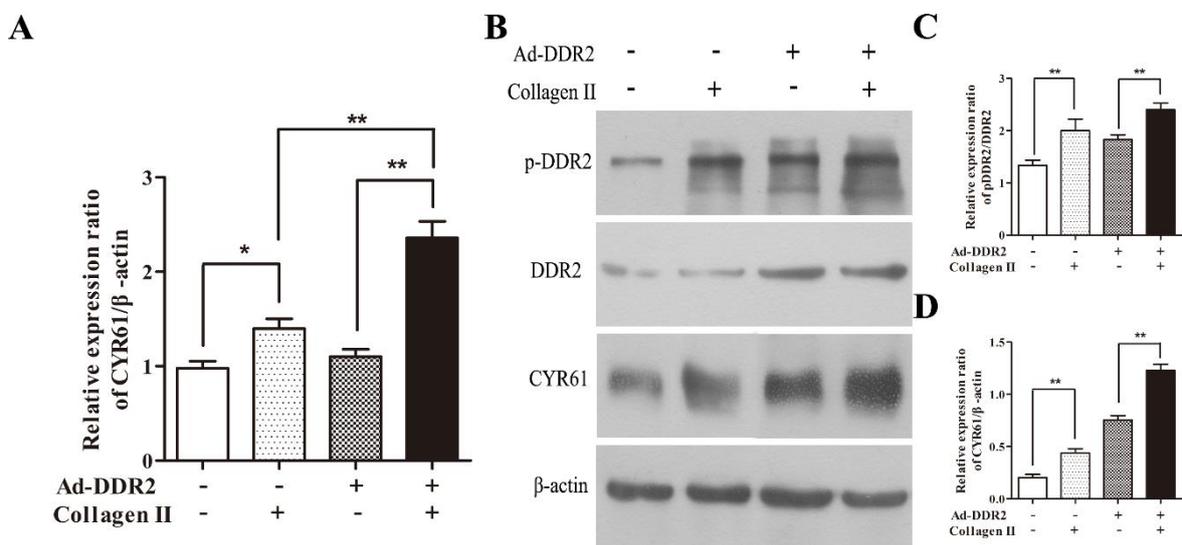


图 2-5 Real-time 和 Western-blot 检测 DDR2 活化对 CYR61 表达水平的影响

3.2.3 siDDR2 的筛选与干涉效率鉴定

根据 DDR2 CDS 区序列，分别设计合成 3 对 DDR2 干扰小 RNA，以 LipoTM 2000 为介质转染 RA FLS 细胞，同时以荧光对照干扰小 RNA 为参照，确定各组干扰小 RNA 的转染效率。经 Western-blot 分析 siDDR2 在 RA FLS 细胞中的干涉效率（曝光时间 2 min）。结果（图 2-6 A&B）显示，3 对 DDR2 干扰小 RNA 都具有较理想的沉默 DDR2 基因表达的功能，其中 3 号 siDDR2 干涉效率最强，故选之进行后续实验研究。

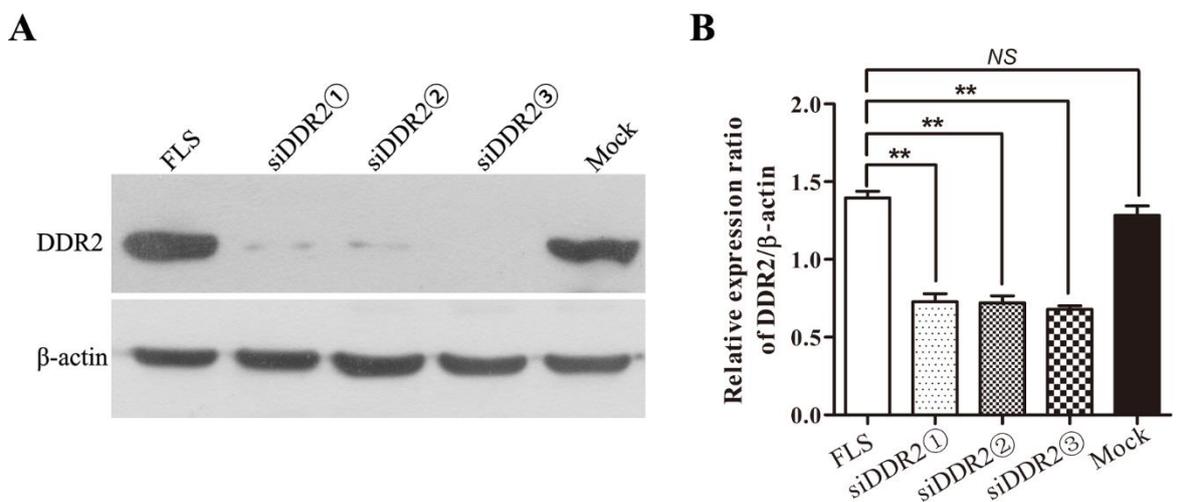
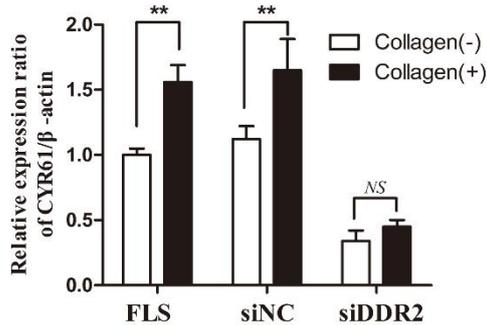


图 2-6 Western-blot 检测 siDDR2 的干涉效率

3.2.4 siDDR2 对 CYR61 表达水平的影响

本实验分为以下六个实验组：① FLS；② FLS +II 型胶原；③ siNC/ FLS；④ siNC/ FLS+II 型胶原；⑤ siDDR2/FLS；⑥ siDDR2/ FLS+II 型胶原。首先用 siDDR2 转染 RA FLS 细胞，常规培养 48 h，以荧光对照干扰小 RNA 为阴性对照，通过荧光显微镜观察，确认 siRNA 转染成功后，将 RA FLS 细胞消化下来，用无血清 DMEM 洗液重悬后，接种于包被有 II 型胶原的细胞培养皿，继续培养 12 h。继而，将各实验组细胞分为两份，其中一份用于细胞总 RNA 的提取，进行 Real-time PCR 检测（图 2-7 A）；另外一份用于提取总蛋白，以 β -actin 为内参，行 Western-blot 检测（图 2-7 B A）。结果显示，II 型胶原能够促进 CYR61 的表达；干扰 DDR2 能够抑制 CYR61 的表达，即使通过 II 型胶原刺激，由于 DDR2 被阻断，无法回复 CYR61 的表达，表明 DDR2 活化参与 CYR61 的表达调控。

A



B

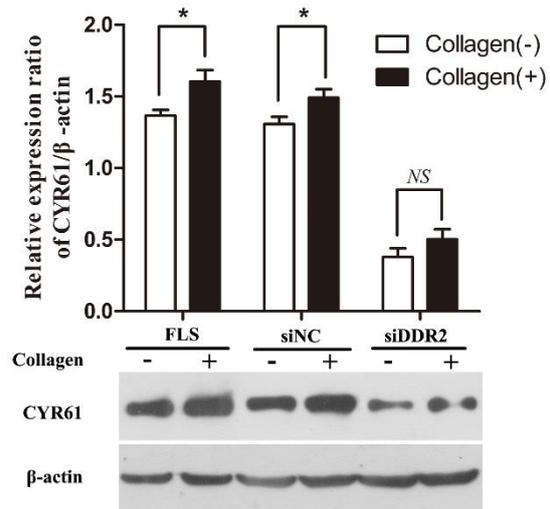


图 2-7 Real-time PCR 和 Western-blot 检测 siDDR2 对 CYR61 表达水平的影响

3.3 DDR2 调控 CYR61 表达的分子机制

3.3.1 EMSA 分析 DDR2 活化对转录因子 AP-1 结合活性的影响

EMSA 凝胶迁移实验是一种研究 DNA 与蛋白质相互作用的常用技术，当核转录因子 AP-1 二聚体与合成的 CYR61/AP-1 启动子探针结合后，其复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率将小于未结合转录因子的 DNA，从而检测转录复合物与 CYR61 启动子的结合活性。结果(图 2-8 A)显示，II 型胶原刺激能够促进转录复合物与 CYR61 启动子的结合，siRNA 干扰 DDR2 的表达却使复合物丧失结合活性；为了进一步证

实转录复合物确为转录因子 AP-1 二聚体，我们将 EMSA 胶回收，通过 Western-blot 检测，结果（图 2-8 B）显示转录复合物中有 c-Fos 与 c-Jun 的存在。综上所述表明，DDR2 活化增强转录因子 AP-1 在 CYR61 启动子区结合活性，这为 II 型胶原诱导的 DDR2 活化参与转录因子 AP-1 介导的 CYR61 调控提供了直接的证据。

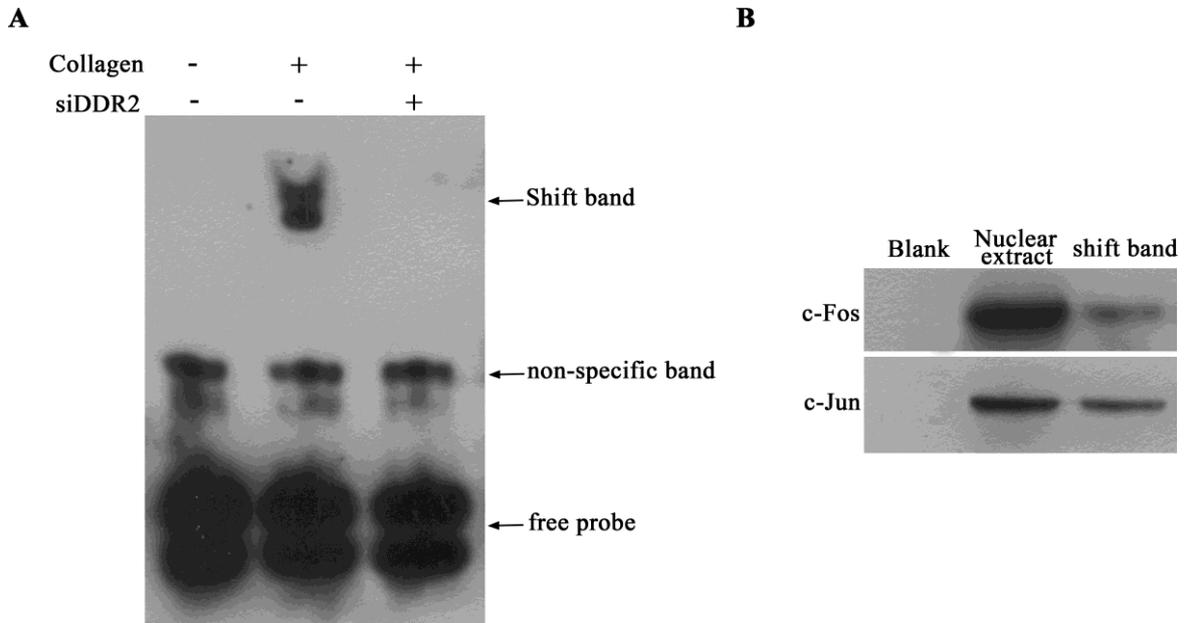


图 2-8 EMSA 分析 DDR2 活化对转录因子 AP-1 结合活性的影响

3.3.2 c-Jun siRNA 的筛选与干涉效率鉴定

根据 c-Jun CDS 区序列，分别设计合成 3 对 c-Jun siRNA，以 LipoTM 2000 为介质转染 RA FLS 细胞，同时以荧光对照干扰小 RNA 为参照，确定各组干扰小 RNA 的转染效率。经 Western-blot 分析 c-Jun siRNA 在 RA FLS 细胞中的干涉效率。结果（图 2-9 A&B）显示，3 对 DDR2 干扰小 RNA 都具有较理想的沉默 c-Jun 基因表达的功能，其中 3 号 c-Jun siRNA 干涉效率最强，故选之进行后续实验研究。

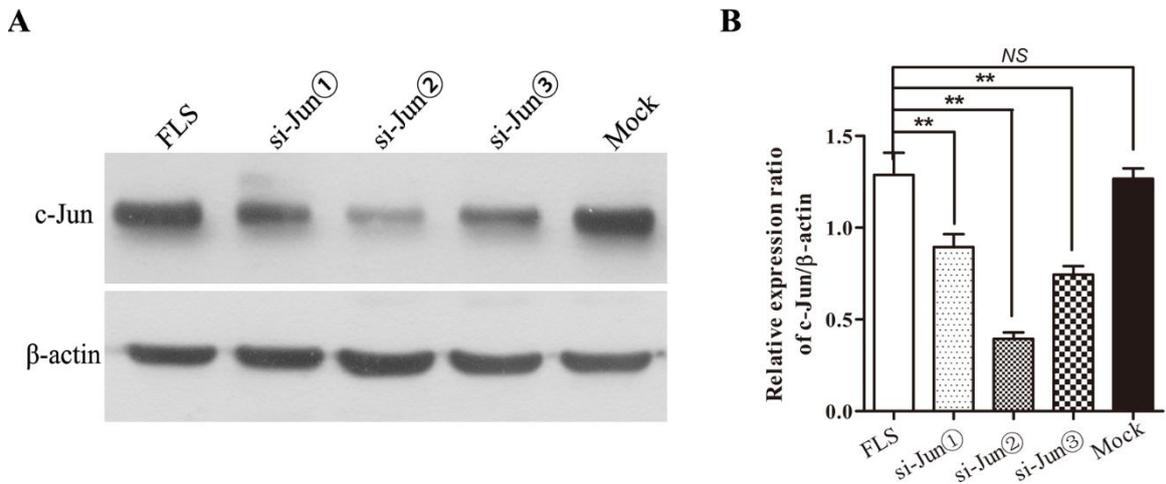


图 2-9 Western-blot 检测 c-Jun siRNA 的干涉效率

3.3.3 c-Jun siRNA 对 CYR61 启动子转录活性的影响

为了证实 DDR2 活化参与转录因子 AP-1 介导的 CYR61 表达调控, 分别将 c-Jun siRNA 与 pGL3-MMP1 promoter 和 phRL-TK 共转 FLS, 通过双荧光素酶报告基因实验验证 c-Jun siRNA 在 DDR2 活化的条件下, 对 CYR61 启动子转录活性的影响。结果 (图 2-10) 表明 II 型胶原刺激 DDR2 活化后, CYR61 启动子活性升高, 与未经 II 型胶原刺激的 CYR61 启动子活性相比, 具有明显的统计学差异 (** $P < 0.01$); FLS 转染 c-Jun siRNA 后, 即使给予 II 型胶原刺激, 相对荧光素酶活性较低, 与只给予 II 型胶原刺激的 FLS CYR61 启动子转录活性相比具有显著性的差异 (** $P < 0.01$)。以上结果表明, DDR2 活化参与转录因子 AP-1 介导的 CYR61 表达调控。

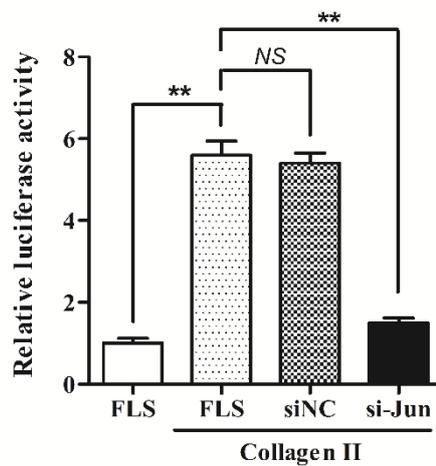
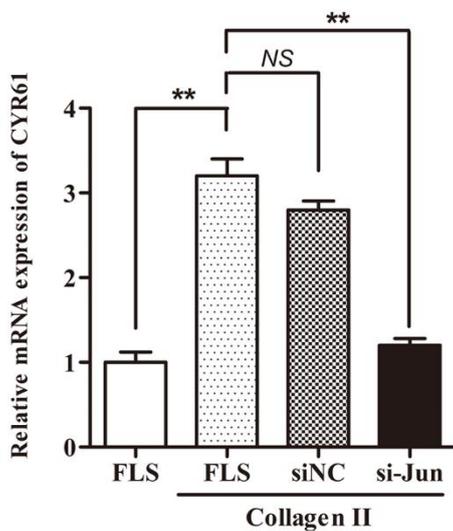


图 2-10 双荧光素酶报告基因检测 c-Jun siRNA 对 CYR61 启动子转录活性的影响

3.3.4 c-Jun siRNA 对 CYR61 表达水平的影响

本实验分为以下四个实验组：① FLS；② FLS +II 型胶原；③ siNC/ FLS+II 型胶原；④ si-Jun/ FLS+II 型胶原。首先用 c-Jun siRNA 转染 RA FLS 细胞，常规培养 48 h，以荧光对照干扰小 RNA 为阴性对照，通过荧光显微镜观察，确认 siRNA 转染成功后，将 RA FLS 细胞消化下来，用无血清 DMEM 洗液重悬后，接种于包被有 II 型胶原的细胞培养皿，继续培养 12 h。继而，将各实验组细胞分为两份，其中一份用于细胞总 RNA 的提取，进行 Real-time PCR 检测（图 2-11 A）；另外一份用于提取总蛋白，以 β -actin 为内参，行 Western-blot 检测（图 2-11 B）。结果显示，干扰 c-Jun 能够抑制 CYR61 的表达，即使通过 II 型胶原刺激，也无法回复 CYR61 的表达，表明通过 siRNA 干扰 c-Jun 的表达，阻断转录 AP-1 二聚体复合物的形成，能够抑制 II 型胶原诱导的 CYR61 表达。

A



B

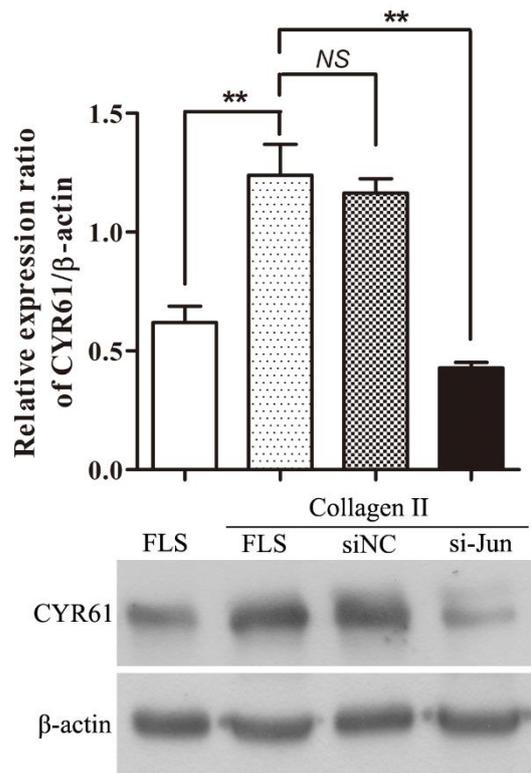


图 2-11 Real-time PCR 和 Western-blot 检测 c-Jun siRNA 对 CYR61 表达水平的影响

4 讨论

滑膜细胞包括滑膜巨噬细胞和滑膜成纤维样细胞。其中 FLS 占据了滑膜细胞总量的 70% 以上，其不仅在正常的胚胎发生发挥着重要的功能，而且在关节功能成熟

与维护中起着关键性的作用。在 RA 病变关节中, FLS 的细胞形态具有核大、苍白和核仁突出等转化细胞的特征; 而其细胞生物学行为表现为与肿瘤相关的多条信号通路的异常激活, 使得滑膜组织在 RA 病程中“类肿瘤样”异常增殖增厚包裹关节软骨干扰其正常代谢以及过分泌 MMPs 加剧软骨破坏。因此, 在 RA 晚期的病理进程中除了炎症、免疫紊乱等致病因素外, “类肿瘤样”RA FLS 亦参与关节软骨破坏。

研究表明, 在滑膜层滑膜成纤维细胞高表达血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)^[96]和细胞表面抗原 CD55^[97], 然而体外培养的滑膜成纤维样细胞只有 15%~25% 细胞 VCAM-1 表达呈阳性, 只有 35% 细胞 CD55 表达呈阳性^[98]。这些结果提示原代培养的细胞中含有去分化的滑膜成纤维样细胞, 亦或者滑膜组织中混杂有另一种类型的成纤维细胞, 而通过流式细胞仪分析体外培养滑膜成纤维样细胞表面抗原的表达, 研究人员发现 CD13、CD44 和 CD59 呈高表达^[99], 但是这些分子同样表达于滑膜巨噬细胞, 因此也无法用于滑膜成纤维样细胞的鉴定。表面抗原 CD90 (Thy-1), 特异性的表达于滑膜面滑膜成纤维样细胞^[100], 且在原代培养细胞中阳性率较高, 故本实验选取 CD90 抗体用于分析滑膜成纤维样细胞的纯度较为可靠。我们以原代分离培养的 RA 滑膜成纤维样细胞为研究对象, 分别通过腺病毒过表达和 siRNA 干涉的实验手段来修饰 DDR2 的表达, 同时给予 II 型胶原刺激使其活化, 利用 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹观察上调或者下调 DDR2 的活化水平对 CYR61 表达水平的影响, 结果显示 II 型胶原刺激 DDR2 活化能够促进 CYR61 的表达, 干涉 DDR2 抑制 CYR61 的 mRNA 和蛋白表达水平。有研究表明, 许多刺激因素能够诱导转录因子 AP-1 调节 CYR61 启动子转录活性^[101, 102], 因此我们采用 EMSA 分析 DDR2 活化对 CYR61 核心启动子区域转录因子 AP-1 结合活性的影响, 结果发现 II 型胶原诱导 DDR2 活化增强转录因子 AP-1 在 CYR61 启动子区域的结合活性; 利用双荧光素酶报告基因系统探究转录因子 AP-1 对 DDR2 活化诱导的 CYR61 转录活性升高的影响; 最终, 通过 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹实验检测干涉转录因子 AP-1 对 CYR61 表达水平的影响。从而, 揭示 II 型胶原-DDR2 -CYR61 通路的存在及 DDR2 调控 CYR61 表达可能的分子机制, 明确 CYR61 在 DDR2 -MMPs 通路中扮演的角色, 为 RA 发病机制研究提供新的认识。

第三部分 CYR61 对 MMP1 的表达调控及其对 RA 滑膜 细胞侵袭功能的影响

引 言

先前的研究工作，我们证实了 II 型胶原刺激 DDR2 活化通过增强转录因子 AP-1 复合体的结合活性，促进 CYR61 启动子的转录活性，从而诱导 CYR61 的表达。那么受 DDR2 活化诱导的 CYR61，能否对下游的效应分子 MMPs 的表达具有调控作用，具体分子机制又是什么呢？为了阐明 CYR61 对 MMPs 的影响，我们首先通过腺病毒过表达 CYR61 观察 MMPs 转录水平和翻译水平的变化，寻找与 CYR61 具有表达相关性的 MMPs 分子；接着，利用 siRNA 技术干涉 CYR61 的表达，同时给予 II 型胶原刺激使 DDR2 活化，采用 Real-time PCR 和蛋白免疫印迹方法验证 CYR61 对下游效应分子 MMPs 的影响；然后，综合运用生物信息学、双荧光素酶报告系统、染色质免疫共沉淀以及凝胶迁移实验等实验方法，深入探讨 CYR61 调控 MMPs 表达的具体分子机制；最后，使用 Transwell 和细胞划痕实验检测关键分子 CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞侵袭功能的影响。通过以上实验设计，最终证实 II 型胶原-DDR2-CYR61-MMPs 通路的存在，阐明 CYR61 对 MMPs 的调控机制，为 RA 发病机理的研究奠定基础，又可发现新的药物靶位。

1 实验材料

1.1 实验用组织、细胞及质粒

选择临床诊断明确的 RA 患者，将关节镜手术中取出的滑膜组织置于无菌 PBS 缓冲液中低温运输；人胚肾细胞 HEK293、293T，大肠杆菌 DH 5 α 为本实验室保存；质粒 pMD18-T-CYR61 购自北京义翘神州生物技术有限公司；骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和穿梭质粒 pDC316- mCMV-EGFP 购自深圳百恩维生物技术有限公司；pGL3-MMP1 启动子质粒购自广州复能基因有限公司。

1.2 主要试剂

异丙醇	上海化学试剂有限公司
氯仿	上海化学试剂有限公司
甲醇	西安化学试剂厂
BSA	北京鼎国生物工程公司
甘氨酸	华美生物工程公司
SDS	华美生物工程公司
丙烯酰胺	华美生物工程公司
Tween-20	华美生物工程公司
RIPA 细胞裂解液	碧云天生物技术研究所以
PMSF	碧云天生物技术研究所以
化学发光法 EMSA 检测试剂盒	碧云天生物技术研究所以
结晶紫染色液	北京索莱宝科技有限公司
鼠抗人 β -actin 单克隆抗体	北京康为世纪生物科技有限公司
HRP 标记的二抗	北京康为世纪生物科技有限公司
<i>Nhe</i> I 限制性内切酶	日本 Takara 公司
<i>Hind</i> III 限制性内切酶	日本 Takara 公司
RNAiso Plus	日本 Takara 公司
PrimeScript TM RT reagent kit	日本 Takara 公司
SYBR [®] Premix Ex Taq TM II	日本 Takara 公司
TEMED	德国 Serva 公司
Matrigel 基质胶	美国 BD 公司
FBS	美国 Gibco 公司
Tris 碱	美国 Sigma 公司
胶原酶	美国 Sigma 公司
II 型胶原	美国 Sigma 公司
β -巯基乙醇	美国 Sigma 公司
感光胶片	美国 Kodak 公司

琼脂糖凝胶回收试剂盒	美国 Omega 公司
质粒提取试剂盒	美国 Omega 公司
Transwell 小室	美国 Corning 公司
RPMI 细胞培养基	美国 Hyclone 公司
DMEM 细胞培养基	美国 Hyclone 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	美国 Thermo 公司
ECL 化学发光显色液	美国 Thermo 公司
核蛋白提取试剂盒	美国 Thermo 公司
Dual-Luciferase®报告基因检测试剂盒	美国 Promega 公司
Lipofectamine® 2000 细胞转染试剂	美国 Invitrogen 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
ChIP 试剂盒	美国 Millipore 公司
预染蛋白 Marker	美国 Fermentas 公司
鼠抗人 MMP1 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 ETS1 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
兔抗人 CYR61 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
鼠抗人 Histone H3 单克隆抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司

1.3 主要仪器

FA1604S 型电子天平	上海天平仪器厂
PHS-3C 型精密 pH 计	上海雷磁仪器厂
TH-2C 恒温振荡器	江苏太仓实验设备厂
JY88-II 超声波细胞破碎仪	北京中兴伟业仪器有限公司
5415C 台式离心机	德国 Eppendorf 公司
高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
制冰机	日本 SANYO 公司
IX70 倒置显微镜	日本 Olympus 公司
E1000 荧光显微镜	日本 Nikon 公司
生化培养箱	日本 SANYO 公司

Lambda UV/VIS 分光光度计	美国 PE 公司
C1000 实时 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
Western-blot 转印仪	美国 Bio-Rad 公司
Milli-Q ^{UF} 纯水器	美国 Millipore 公司
GloMax® 20/20 发光检测仪	美国 Promega 公司
GS-15R 高速台式冷冻离心机	美国 Beckman 公司
SPECTRAmax-PLUS 型酶标仪	美国 Molecular Devices 公司

2 实验方法

2.1 腺病毒 Ad-CYR61 的包装及其感染效率鉴定

2.1.1 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 腺病毒载体构建

2.1.1.1 PCR 扩增目的基因 CYR61

1) 设计合成 CYR61 cDNA 克隆引物并引物中加入 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点。

基因名称	引物序列
CYR61	Forward: CTAG <u>GCTAGCGCC</u> ACCATGAGCTCCCGCATCGCCAGG
	Reverse: CCCA <u>AAGCTTT</u> TAGTCCCTAAATTTGTGAATG

注：下划线标注为酶切位点；粗体标注为基因序列。

2) 以 pMD18-T-CYR61 质粒为模板，按以下组分制备 PCR 反应体系：

组分	体积
5×Fastpfu buffer	10 μL
dNTP Mix(2.5 mM)	4 μL
正向引物 (10 μM)	2 μL
反向引物 (10 μM)	2 μL
Fast <i>pfu</i> polymerase	1 μL
模板 DNA (100 ng/μL)	1 μL
ddH ₂ O	30 μL
Total	50 μL

3) PCR 反应参数设置如下：

步骤	温度	时间	循环数
变性	95℃	3 min	1×
变性	95℃	20 s	
退火	55℃	30 s	30×
延伸	72℃	2 min	
延伸	72℃	5 min	1×

将所有PCR产物行1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果。

2.1.1.2 PCR产物纯化、回收

- 1) 在紫外灯下小心迅速地将DNA片段切下并尽量去除多余的凝胶，称取凝胶块的重量，按照1 g/mL质量体积比加入Binding Buffer (XP2)，将混合物置于55~65 °C 水浴中孵育7 min或直至凝胶完全溶解；
- 2) 将HiBind™ DNA柱套入一个干净的2 mL收集管中，吸取700 μL上述溶解液至其中，室温条件下，12000 rpm，离心1 min；
- 3) 弃穿过液，将HiBind™ DNA柱重新套入收集管中，将剩余的DNA/琼脂糖溶解液加入柱中，重复步骤2；
- 4) 吸取300 μL Binding Buffer至HiBind™ DNA柱中，室温，12000 rpm，离心1 min；
- 5) 弃穿过液，将柱子重新套入收集管中，加700 μL SPW Wash Buffer至HiBind™ DNA柱中，室温，12000 rpm，离心1 min；
- 6) 弃穿过液，加700 μL SPW Wash Buffer至HiBind™ DNA柱中重复步骤5；
- 7) 弃穿过液，将HiBind™ DNA柱重新套入收集管中，室温，13000 rpm，离心2 min 以去除柱中残余的酒精成分；
- 8) 将HiBind™ DNA柱套入一个干净的1.5 mL离心管中，打开盖子室温挥发5 min，吸取30~50 μL洗脱液滴加于吸附柱膜中央，室温，13000 rpm，离心,1 min，收集穿过液。

2.1.1.3 载体pDC316-mCMV-EGFP及目的基因CYR61双酶切

- 1) 载体 pDC316-mCMV-EGFP 酶切体系如下：

组分	体积
质粒 pDC316-mCMV-EGFP	1 μg
10×Buffer	2 μL

10×BSA	2 μL
<i>Nhe</i> I	1 μL
<i>Hind</i> III	1 μL
dd H ₂ O	up to 20 μL

CYR61 目的基因酶切体系如下：

组分	体积
PCR 回收产物	14 μL
10×Buffer 2	2 μL
10×BSA	2 μL
<i>Nhe</i> I	1 μL
<i>Hind</i> III	1 μL

酶切反应在 37℃ 水浴反应 2 h。按照前述方法，分别回收载体酶切大片段和目的基因酶切产物。

2.1.1.4 载体 pDC316-mCMV-EGFP 及目的基因 CYR61 体外连接反应

连接反应体系如下：

组分	体积
目的基因	6 μL
pDC316-mCMV-EGFP 大片段	2 μL
10×DNA Ligase Buffer	1 μL
T4 DNA Ligase	1 μL

连接反应在 16 °C 水浴反应过夜。

2.1.1.5 DH 5α 感受态大肠杆菌的制备

- 1) 取宿主菌 DH5α 接种入 5 mL 无抗性的 LB 培养液中，37 °C 振荡培养过夜；
- 2) 按 1: 50 接种入 50 mL LB 培养液中，37 °C 振荡培养 1.5-3 h 至中对数生长期 (OD₅₅₀=0.5)；
- 3) 培养物置于冰上冷却后，4°C，5000 rpm 离心 5 min，弃上清；
- 4) 细胞悬浮于 1/2 培养体积的 100 mmol/L 冰冷 CaCl₂ 中，冰浴 20 min；
- 5) 4°C，5000 rpm 离心 5 min，弃上清；

6) 细胞悬浮于 1/15 培养体积的 100 mmol/L 冰冷 CaCl_2 ，分装后贮存于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。

2.1.1.6 热激法转化重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61

- 1) 取 10 μL 上述连接产物加入 100 μL DH 5 α 感受态细菌中，于冰上混匀后孵育 30 min; $42\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴热休克 90 s, 立即取出置于冰上孵育 2 min; 将混合物与 400 μL 无抗性的 LB 培养基混匀，置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床中，250 rpm/min，孵育 1 h; 用移液器吸取 200 μL 转化产物加入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin 的 LB 培养板中，涂布均匀后倒置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 生化培养箱中，孵育过夜;
- 2) 挑取单菌落接种于 LB 培养液（含 5 mL，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin）中，置于恒温摇床， $37\text{ }^\circ\text{C}$ ，250 rpm，培养过夜。

2.1.1.7 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 的提取与鉴定

- 1) 收集菌液，10000 rpm，室温离心 1 min;
- 2) 去除菌液加 250 μL Solution I/RNase A，重悬菌体，充分混匀;
- 3) 加 250 μL Solution II，上下颠倒 Eppendorf 管 4~6 次，动作温和，室温静置 2 min;
- 4) 加 125 μL 冰预冷 Buffer N3，温和混匀数次直至白色絮状物形成， $4\text{ }^\circ\text{C}$ ，12000 rpm，离心 10 min;
- 5) 小心吸取上清至新的 Eppendorf 管中，加入 1/10 体积 ETR solution，在 Eppendorf 管底部形成蓝色沉淀;
- 6) 将上层液体转移至新的 1.5 mL Eppendorf 管中，加 1/2 体积无水乙醇，温和颠倒 6~7 次，室温放置 1~2 min;
- 7) 将 700 μL 混合液转移至 HiBindTM DNA Mini Column，12000 rpm，室温离心 1 min;
- 8) 500 μL HB Buffer 洗柱，12000 rpm，室温离心 1 min;
- 9) 弃穿过液，加 700 μL DNA Wash Buffer，12000 rpm，室温离心 1 min，弃穿过液，重复洗涤一遍;
- 10) 弃穿过液，13000 rpm，空转 2 min;
- 11) 将柱子转移入干净的 1.5 mL Eppendorf 管中，向吸附柱膜中央滴入 30~50 Endoxin-Free Elution Buffer，13000 rpm，室温洗脱 1 min;
- 12) 将提取的去内毒素重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61，进行 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切（方法同前述），酶切产物加入 10 \times Loading buffer，行 1% 琼脂糖凝胶电泳;
- 13) 将酶切鉴定符合预期结果的重组质粒样本交由上海生工生物工程有限公司进行

测序。

2.1.2 同源重组产生重组腺病毒

- 1) 取对数生长期的 HEK293 细胞，按照 5×10^5 /孔细胞密度接种于含有 10%FBS 的 DMEM 培养基的 6 孔细胞培养板中，置于 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养；
- 2) 待细胞融合度达 80~90%时，将细胞培养基更换为 Optic-MEM 无血清培养基。同时，将 4 μg 骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和 1 μg 穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 溶于 250 μL Optic-MEM 无血清培养基配制成 A 液，将 10 μL Lipofectamine® 2000 溶于 250 μL Optic-MEM 无血清培养基配制成 B 液，混匀室温静置 5 min；
- 3) 将 AB 液混合，静置 20 min 后，将转染混合液逐滴加入 6 孔细胞培养板中，轻轻混匀，置于 37 °C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育；
- 4) 转染 6 h 后将培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；
- 5) 待细胞长满后常规消化传代，接种于含有 5%FBS 的 DMEM 培养基的 25 cm² 细胞培养瓶中继续培养；
- 6) 待细胞长满后常规消化传代，接种于含有 5%FBS 的 DMEM 培养基的 75 cm² 细胞培养瓶中继续培养，每天观察细胞出毒迹象；
- 7) 当细胞收缩变圆逐渐从瓶底脱落，细胞形态呈葡萄状时进行收毒；
- 8) 将出毒的细胞置于-70 °C 冰箱和 37 °C 水浴锅中反复冻融三次，室温，3000 rpm，离心 5 min，收集上清液，即为病毒母液 (P1)。

2.1.3 病毒扩增与纯化

- 1) 取对数生长期的 HEK293 细胞，按照 5×10^6 /孔细胞密度接种于含有 10%FBS 的 DMEM 培养基的 75 cm² 培养瓶中，置于 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养；
- 2) 待细胞融合度达 80~90%时，取 2 mL P2 代毒种加入培养瓶内，继续 24 h，通过显微镜下观察细胞病变情况；
- 3) 当细胞收缩变圆逐渐从瓶底脱落，细胞形态呈葡萄状时进行收毒，将出毒的细胞置于-70 °C 冰箱和 37 °C 水浴锅中反复冻融三次，室温，3000 rpm，离心 5 min，

收集上清液；

- 4) 采用上述方法将毒种接种于 4 个新的 75 cm² 培养瓶中，待细胞出现 CPE 现象时收毒；
- 5) 将病毒上清加入接种有 1.8×10⁸ 个 HEK293 细胞 4 个转瓶中，待细胞融合度达 80~90% 时，按 10 mL/转瓶 (MOI 约为 1) 接种第 2 步收获病毒上清，待细胞出现 CPE 现象时收集病变细胞混悬液；
- 6) 室温，3000 rpm，离心 10 min，用 Tris 缓冲液重悬细胞沉淀，置于 -70 °C 冰箱和 37 °C 水浴锅中反复冻融三次，6000 rpm，离心 5 min，取上清，经 DNase 酶消化后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，最后进行柱纯化。

2.1.4 病毒生物学滴度测定

常规培养 HEK293 细胞，待细胞融合度达 80~90% 时，消化细胞并进行细胞计数，按 1×10⁴ cell/孔细胞密度将 HEK293 细胞接种于 96 孔板，每孔含有 90 μL 培养基，用含有 5% FBS 的 DMEM 培养基 10 倍梯度稀释上述纯化的病毒 (如下图)，每个病毒浓度设立 4 个平行复孔，感染 48 h 后，通过荧光显微镜观察并计算每孔荧光细胞数量。一般情况下，在最高病毒稀释度 m 的孔中可观察 N (N<10) 个荧光细胞，同时计算平行复孔中荧光细胞的数量，求取平均值 a，则病毒滴度为 a×10^m/mL (m 为稀释度)，若 N>10，则需继续稀释。

滴定量	1μL	0.1μL	0.01μL	0.001μL	0.0001μL
病毒液	5or10	10	10	10	10
DMEM 完全培养基	45or90	90	90	90	90
上样量	10	10	10	10	10

2.1.5 腺病毒 Ad-CYR61 感染 FLS 效率鉴定

2.1.5.1 腺病毒 Ad-CYR61 感染 FLS

- 1) 将 RA FLS 接种于 100 mm 细胞培养皿，待细胞融合度达约 80% 时，按照 MOI=0、10、25 和 50 不同滴度加入腺病毒；
- 2) 病毒感染 FLS 细胞 6 h 后，更换为含有 20% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 48 h；
- 3) 荧光显微镜观察腺病毒 Ad-CYR61 的表达情况，根据荧光强度，初步确定腺病毒感染 FLS 的效率及最佳感染滴度。

2.1.5.2 细胞总蛋白的提取与定量

- 1) 收集腺病毒感染 FLS 细胞, 0.25%胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心, 1000 rpm, 5 min, 预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上;
- 2) 根据细胞沉淀量向 Eppendorf 管中加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液, 冰水混合物中裂解 30 min, 期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解;
- 3) 4 °C 离心, 12000 rpm, 20 min, 小心吸取上清, 即为细胞总蛋白;
- 4) 取 1.2 mL 蛋白标准配制液加入到蛋白标准(30 mg BSA)中, 充分溶解配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液;
- 5) 取适量 25 mg/mL 蛋白标准溶液, 稀释至终浓度为 0.5 mg/mL;
- 6) 根据实际使用量将试剂 A 与试剂 B 按 50:1 比例配制成 AB 混合液;
- 7) 分别按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 体积将标准蛋白及待测样品加入 96 孔板中, 用标准品稀释液补足至 20 μ L, 每个浓度设置 4 个平行复孔;
- 8) 先取 2 μ L FLS 细胞总蛋白稀释 10 倍, 加入 96 孔细胞培养板中, 再加入 200 μ L 上述配制的 AB 混合液;
- 9) 置于 37 °C 生化培养箱中孵育 30 min, 立即取出, 通过酶标仪检测 570 nm 波长条件下每孔溶液的吸光度值;
- 10) 根据不同浓度标准蛋白吸光度值, 绘制蛋白浓度标准曲线, 得出蛋白浓度与吸光度值关系的方程式: $y=a+bx$;
- 11) 将待测样品吸光度值代入上述方程式中, 求得蛋白浓度。

2.1.5.3 Western-blot 检测腺病毒 Ad-CYR61 感染 FLS 后基因表达水平

- 1) 调整蛋白浓度: 根据各样品的浓度, 用 RIPA 细胞裂解液将所有样品浓度稀释至 5 μ g/ μ L, 加入 1/5 体积的 5 \times 蛋白 Loading buffer, 于沸水中煮 10 min, 以备 SDS-PAGE 电泳;
- 2) SDS-PAGE 电泳: 安装电泳模具, 按照聚丙烯酰胺凝胶配制方法, 依次配制 12% 分离胶和 6% 浓缩胶, 取 10 μ L 蛋白样品上样, 调整电压为 90 V, 待样品到达分离胶界面时, 调整电压为 120 V 直至电泳结束, 以预染蛋白 Marker 作为参照;
- 3) 电转: SDS-PAGE 结束后记录胶的大小, 剪取大小适中的 1 张 PVDF 膜和 4 张滤纸, 置于含预冷转移缓冲液的转移电泳槽内平衡 5~10 min, 按顺序依次安装电转移装置模具: 阴极垫板—海绵—2 张滤纸—凝胶—PVDF 膜—2 张滤纸—海绵

—阳极垫板，将电转移装置放于冰盒内，恒流 300 mA，电转移 1.5 h；

- 4) 封闭：电转移结束后，用镊子夹取 PVDF 膜置于含 3% BSA 的 TBST 中，摇床上室温封闭 2 h；
- 5) 一抗孵育：弃去封闭液，分别用 CYR61 (1:500 稀释) 和 β -actin (1:2000 稀释) 一抗与含有目的蛋白的 PVDF 膜孵育，4 °C 结合过夜；
- 6) 二抗孵育：TBST 摇洗 3 次，每次 10 min，加入 HRP 标记二抗 (1:3000 稀释)，室温孵育 45 min；
- 7) ECL 发光：TBST 摇洗 3 次，每次 10 min，按照 1:1 比例配制适量 ECL 发光液，用滤纸吸去 PVDF 膜上多余水分，滴加 ECL 发光液，用保鲜膜覆盖后，暗室中发光显影，胶片曝光采图；
- 8) 扫描显影结果，通过灰度分析，确定腺病毒 Ad-CYR61 最适的感染滴度。

2.2 过表达 CYR61 对 MMP1 表达水平的影响

2.2.1 Real-time PCR 检测 Ad-CYR61 对 MMPs 表达水平的影响

2.2.1.1 细胞处理

取对数生长期 FLS，将细胞接种于 3 个 100 mm 细胞培养皿中，待细胞融合度达约 80% 时，取其中 1 个培养皿细胞，加入腺病毒 Ad-CYR61 感染，另外 1 个培养皿细胞则加入腺病毒 Ad-EGFP 感染，6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；

2.2.1.2 细胞总 RNA 提取

- 1) 加入冰预冷的 RNAiso Plus 试剂，室温裂解 5 min，转移入经 DEPC 处理过的 Eppendorf 管中；
- 2) 加入 1/5 体积的氯仿，颠倒混匀 10 次，室温静置 10 min，4 °C，12000 rpm，离心 20 min；
- 3) 转上层水相于另一干净的 Eppendorf 管中，加入等体积异丙醇，颠倒混匀数次，室温孵育 10 min 后，12000 rpm，4 °C，离心 15 min；
- 4) 使用移液器小心吸弃上清，加冰预冷的 75% 乙醇，4 °C，12000 rpm，离心 10 min；
- 5) 弃上清，将 Eppendorf 管倒扣，空气干燥 5~10 min；
- 6) 溶于 20 μ L DEPC 处理水中；
- 7) 用紫外分光光度计进行 RNA 定量。

2.2.1.3 反转录合成 cDNA

1) 依照下列反转录体系依次加入液体:

组分	体积
5×Primescript™ Buffer	6.0 μL
Primescript™ RT Enzymemix I	1.5 μL
Oligo dT Primer (50 μM)	1.5 μL
Random 6 mers (50 μM)	1.5 μL
Total RNA	6.0 μL
RNase Free H ₂ O	13.5 μL
Total	30 μL

2) 反转录 PCR 仪参数设置:

温度	时间
37°C	15 min
85°C	15 s
4°C	∞

2.2.1.4 实时定量 PCR

1) 合成 MMP1、2、9、13 基因片段特异性引物, 同时以 β-actin 为内参照

基因名称	Genebank NO.	引物序列
MMP1	BC013875	Forward: TGAGGGTCAAGCAGACATCA
		Reverse: TGGGAGAGTCCAAGAGAATGG
MMP2	BC002576	Forward: AGTTTCCATTCCGCTTCCAG
		Reverse: CGGTCGTAGTCCTCAGTGGT
MMP9	NM_004994	Forward: CCAACTACGACACCGACGAC
		Reverse: TGGAAGATGAATGGAACTGG
MMP13	NM_002427	Forward: TATGACTATGCGTGGCTGGA

Reverse: CCATTTGTGGTGTGGGAAGT

2) 依照下列反转录体系依次加入液体:

组分	体积
SYBR Premix EX Taq™ II(2×)	10 μL
上游引物(10 μM)	0.8 μL
下游引物(10 μM)	0.8 μL
ROX Reference DYE II(50×)	0.4 μL
反转录制备的 cDNA	2.0 μL
RNase free H ₂ O	6.0 μL
Total	20 μL

3) 实时定量 PCR 仪参数设置如下:

步骤	温度	时间	循环数
变性	95°C	3 min	1×
变性	95°C	5 s	
退火	60°C	30 s	40×
延伸	72°C	30 s	
延伸	72°C	5 min	1×

2.2.2 Western-blot 观察 DDR2 活化对 CYR61 表达水平的影响

2.2.2.1 细胞处理

取对数生长期 FLS, 将细胞接种于 3 个 100 mm 细胞培养皿中, 待细胞融合度达约 80% 时, 取其中 1 个培养皿细胞, 加入腺病毒 Ad-CYR61 感染, 另外 1 个培养皿细胞则加入腺病毒 Ad-EGFP 感染, 6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h;

2.2.2.2 细胞总蛋白的提取

1) 收集腺病毒感染 FLS 细胞, 0.25% 胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心,

1000 rpm, 5 min, 预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上;

- 2) 根据细胞沉淀量向 Eppendorf 管中加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液, 冰水混合物中裂解 30 min, 期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解;
- 3) 4 °C 离心, 12000 rpm, 20 min, 小心吸取上清, 即为细胞总蛋白, 采用 BCA 法对各组细胞总蛋白进行定量, 行 Western-blot 检测 CYR61 对 MMP1 表达水平的影响 (方法同 2.1.5.3)。

2.3 siCYR61 的筛选与干涉效率鉴定

- 1) CYR61 干扰小 RNA 的设计与合成: 根据 CYR61 CDS 区序列, 分别设计三对 siRNA, 交由上海吉玛制药技术有限公司进行化学合成, siCYR61 序列如下:

序列名称	干涉序列
siCYR61①	Forward: GGCAGACCCUGUGAAUAUATT Reverse: UAUUAUCACAGGGUCUGCCTT
siCYR61②	Forward: GGAGUUAACAAGAAACAAUTT Reverse: AUUGUUUCUUGUUAACUCCTT
siCYR61③	Forward: GCGAGAUGUUCUCCAAGAATT Reverse: UUCUUGGAGAACAUCUCGCTT

- 2) 取对数生长期的 FLS, 接种于 5 个 100 mm 细胞培养皿中, 实验分为五个处理组: a、FLS 空白对照组; b、siCYR61①转染组; c、siCYR61②转染组; d、siCYR61③转染组; e、Mock 脂质体对照组;
- 3) 待细胞融合度达 80% 时, 将细胞培养基更换为 Optic-MEM 无血清培养基。同时, 将 200 pmol siRNA 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 A 液, 将 10 μ L Lipofectamine® 2000 溶于 500 μ L Optic-MEM 无血清培养基配制成 B 液, 混匀室温静置 5 min;
- 4) 将 AB 液混合, 静置 20 min 后, 将转染混合液逐滴加入细胞培养皿中, 轻轻混匀, 置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育;
- 5) 转染 6 h 后将培养基更换为含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h;
- 6) 收集细胞, 0.25% 胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心, 1000 rpm, 5 min, 预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上;

- 7) 加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液，冰水混合物中裂解 30 min，期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解；
- 8) 4 °C 离心，12000 rpm，20 min，小心吸取上清，即为细胞总蛋白；
- 9) BCA 蛋白定量，调整蛋白浓度后行 Western-blot 鉴定 siCYR61 的干涉效率，从而筛选有效的干涉目的基因 CYR61 表达的 siRNA 片段。

2.4 siCYR61 对 MMP1 表达水平的影响

- 1) 取对数生长期 FLS，将细胞接种于 100 mm 细胞培养皿中，实验分为以下六个实验组：① FLS；② FLS +II 型胶原；③ siNC/ FLS；④ siNC/ FLS+II 型胶原；⑤ siCYR61/FLS；⑥ siCYR61/ FLS+II 型胶原。待细胞融合度达约 80%时，取 2 个培养皿细胞加入 siDDR 进行转染，2 个培养皿细胞加入无关干扰 siRNA 进行转染，6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；
- 2) 胶原包被：将用 0.2% 醋酸溶解的终浓度为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ II 型胶原溶液，按照 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的浓度，包被于细胞培养皿内，超净台内风干；
- 3) 常规消化 FLS，将经 siCYR61 转染的细胞分别接种至有 II 型胶原包被和无 II 型胶原包被的新细胞培养皿中，将经无关干扰 siRNA 转染的细胞采取同样的方法接种，将正常培养 FLS 接种于 II 型胶原包被的细胞培养皿中，继续置于 37 °C 孵箱中培养 12 h；
- 4) 将各实验组细胞分为两份，其中一份提取细胞总 RNA，反转录合成 cDNA 后，行 Real-time PCR 检测 siCYR61 对 MMPs mRNA 表达水平的影响(方法同 2.2.1)；另一份提取细胞总蛋白，BCA 蛋白定量后，行 Western-blot 检测 siCYR61 对 MMP1 蛋白表达水平的影响（方法同 2.2.2）。

2.5 生物信息学分析 MMP1 启动子区转录因子结合位点

使用 NCBI 建立的核苷酸数据库在线资源 GenBank，获取人 MMP1 启动子序列，将人 MMP1 启动子的全部序列拷贝到 Genomatix 网站在线分析软件中，预测 MMP1 启动子的可能转录因子结合部位。

2.6 CYR61 与候选转录因子表达相关性分析

2.6.1 CYR61 过表达对候选转录因子表达水平的影响

2.6.1.1 Real-time PCR 检测 Ad-CYR61 对候选转录因子表达水平的影响

2.6.1.1.1 细胞处理

取对数生长期 FLS，将细胞接种于 3 个 100 mm 细胞培养皿中，待细胞融合度达约 80% 时，取其中 1 个培养皿细胞，加入腺病毒 Ad-CYR61 感染，另外 1 个培养皿细胞则加入腺病毒 Ad-EGFP 感染，6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；

2.6.1.1.2 细胞总 RNA 提取

- 1) 加入冰预冷的 RNAiso Plus 试剂，室温裂解 5 min，转移入经 DEPC 处理过的 Eppendorf 管中；
- 2) 加 1/5 体积的氯仿，颠倒混匀 10 次，室温静置 10 min，4 °C，12000 rpm，离心 20 min；
- 3) 转上层水相于另一干净的 Eppendorf 管中，加入等体积异丙醇，颠倒混匀数次，室温孵育 10 min 后，12000 rpm，4 °C，离心 15 min；
- 4) 使用移液器小心吸弃上清，加冰预冷的 75% 乙醇，4 °C，12000 rpm，离心 10 min；
- 5) 弃上清，将 Eppendorf 管倒扣，空气干燥 5~10 min；
- 6) 溶于 20 μ L DEPC 处理水中；
- 7) 用紫外分光光度计进行 RNA 定量。

2.6.1.1.3 反转录合成 cDNA

- 1) 依照下列反转录体系依次加入液体：

组分	体积
5 \times Primescript TM Buffer	6.0 μ L
Primescript TM RT Enzymemix I	1.5 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	1.5 μ L
Random 6 mers (50 μ M)	1.5 μ L

Total RNA	6.0 μ L
RNase Free H ₂ O	13.5 μ L
Total	30 μ L

2) 反转录 PCR 仪参数设置:

温度	时间
37°C	15 min
85°C	15 s
4°C	∞

2.6.1.1.4 实时定量 PCR

1) 合成 ETS1、MZF 和 GATA3 基因片段特异性引物, 同时以 β -actin 为内参照

基因名称	Genebank NO.	引物序列
ETS1		Forward: GGAGCAGCCAGTCATCTTTC
		Reverse: GGTCCCGCACATAGTCCTT
MZF		Forward: CTTCCACCAGAGCACCAAG
		Reverse: ATCGCCAGCCTCACAATAAC
GATA3		Forward: CTCATTAAGCCCAAGCGAAG
		Reverse: ATTGGCATTTCCTCCTCCAG

2) 依照下列反转录体系依次加入液体:

组分	体积
SYBR Premix EX Taq TM II(2 \times)	10 μ L
上游引物(10 μ M)	0.8 μ L
下游引物(10 μ M)	0.8 μ L
ROX Reference DYE II(50 \times)	0.4 μ L
反转录制备的 cDNA	2.0 μ L

RNase free H ₂ O	6.0 μL
Total	20 μL

3) 实时定量 PCR 仪参数设置如下:

步骤	温度	时间	循环数
变性	95°C	3 min	1×
变性	95°C	5 s	
退火	60°C	30 s	40×
延伸	72°C	30 s	
延伸	72°C	5 min	1×

2.6.1.2 Western-blot 观察 Ad-CYR61 对转录因子 ETS1 表达水平的影响

2.6.1.2.1 细胞处理

取对数生长期 FLS，将细胞接种于 3 个 100 mm 细胞培养皿中，待细胞融合度达约 80% 时，取其中 1 个培养皿细胞，加入腺病毒 Ad-CYR61 感染，另外 1 个培养皿细胞则加入腺病毒 Ad-EGFP 感染，6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；

2.6.1.2.2 细胞总蛋白的提取

- 1) 收集腺病毒感染 FLS 细胞，0.25% 胰蛋白酶、0.01% EDTA 消化后于室温离心，1000 rpm，5 min，预冷 PBS 洗涤 3 遍后置冰上；
- 2) 根据细胞沉淀量向 Eppendorf 管中加入适量含有 PMSF 的细胞裂解液，冰水混合物中裂解 30 min，期间用 1 mL 注射器反复吹打使之充分裂解；
- 3) 4 °C 离心，12000 rpm，20 min，小心吸取上清，即为细胞总蛋白，采用 BCA 法对各组细胞总蛋白进行定量，行 Western-blot 检测 CYR61 过表达对转录因子 ETS1 表达水平的影响（方法同 2.1.5.3）。

2.6.2 CYR61 干涉对候选转录因子表达水平的影响

- 1) 取对数生长期 FLS，将细胞接种于 3 个 100 mm 细胞培养皿中，待细胞融合度达约 80% 时，取其中 1 个培养皿细胞，加入 siCYR61 进行转染，另外 1 个培养皿细

胞则加入无关干扰 siRNA 进行转染，6 h 后更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；

- 2) 将各实验组细胞分为两份，其中一份提取细胞总 RNA，反转录合成 cDNA 后，行 Real-time PCR 检测 siCYR61 对候选转录因子 mRNA 表达水平的影响（方法同 2.2.1）；另一份提取细胞总蛋白，BCA 蛋白定量后，行 Western-blot 检测 siCYR61 对转录因子 ETS1 蛋白表达水平的影响（方法同 2.1.5.3）。

2.7 双荧光素酶报告基因检测转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子转录活性的影响

- 1) 取处于对数生长期的 HEK293T 细胞，接种至 24 孔细胞培养板中，待细胞融合度达 70% 左右；
- 2) 分别将不同含量的 pCMV-ETS1 (0 ng、12.5 ng、25 ng、50 ng、100 ng) 与 pGL3-MMP1 promoter (100 ng) 和 phRL-TK (5 ng) 共转 HEK293T 细胞，每个实验组设立 4 个复孔；
- 3) 转染 48 h 后，弃培养上清，PBS 洗两遍后，将 100 μ L 1 \times PLB 细胞裂解液加入细胞培养孔中，在室温轻缓晃动培养板 15 min，把裂解液转移到检测试管中，12000 rpm 离心 10 min；
- 4) 避光条件下，将 0.2 mL Stop & Glo[®] Substrate 加入 10 mL Stop & Glo[®] 缓冲液中，配制成 1 \times Stop & Glo[®] 反应溶液，低温保存备用；
- 5) 先取 5 μ L 细胞裂解液，加入 10 μ L Luciferase Assay Buffer II，快速混匀，立即放入荧光光度计检测萤火虫荧光素酶活性，记录数值 1，再加入 10 μ L Stop & Glo 反应溶液，快速混匀后检测海肾荧光素酶活性，记录数值 2；
- 6) 根据每孔报告基因的数据（数值 1/数值 2），求取各实验组平均值、标准差。

2.8 MMP1 启动子区截短体构建

2.8.1 PCR 扩增 MMP1 启动子区各截短体基因片段

- 1) 根据生物信息学预测的 MMP1 启动子区转录因子 ETS1 可能的结合位点，分别设计合成克隆引物并引物中加入 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点。

引物名称	引物序列
截短体 F1	Forward: CTAGCTAGCGATAGACTCATATCAAGGGAAACAA

	Reverse: <u>CCCAAGCTT</u> ACTGGCCTTTGTCTTCTTTCTC
截短体 F2	Forward: CTAGCTAGCTGCCAGGCTGATCTTGA
	Reverse: <u>CCCAAGCTT</u> ACTGGCCTTTGTCTTCTTTCTC
截短体 F3	Forward: CTAGCTAGCCAAATAATCTGCTAGGAGTCACCA
	Reverse: <u>CCCAAGCTT</u> ACTGGCCTTTGTCTTCTTTCTC
截短体 F4	Forward: CTAGCTAGCATATATACAGAGGGAGCTTCCTAGC
	Reverse: <u>CCCAAGCTT</u> ACTGGCCTTTGTCTTCTTTCTC

注：下划线标注为酶切位点；粗体标注为基因序列。

2) 以pGL3-MMP1 promotor质粒为模板，按以下组分制备PCR反应体系：

组分	体积
5×Fastpfu buffer	10 μL
dNTP Mix(2.5 mM)	4 μL
正向引物 (10 μM)	2 μL
反向引物 (10 μM)	2 μL
Fast <i>pfu</i> polymerase	1 μL
模板DNA (100 ng/μL)	1 μL
ddH ₂ O	30 μL
Total	50 μL

3) 按以下条件设置反应程序进行 PCR 反应：

步骤	温度	时间	循环数
变性	95°C	3 min	1×
变性	95°C	20 s	
退火	55°C	30 s	30×
延伸	72°C	2 min	
延伸	72°C	5 min	1×

将所有PCR产物行1 % 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果。

2.8.2 PCR 产物纯化、回收

- 1) 在紫外灯下小心迅速地将DNA片段切下并尽量去除多余的凝胶，称取凝胶块的重量，按照1 g/mL质量体积比加入Binding Buffer (XP2)，将混合物置于55~65 °C水浴中孵育7 min或直至凝胶完全溶解；
- 2) 将HiBind™ DNA柱套入一个干净的2 mL收集管中，吸取700 μL上述溶解液至其中，室温条件下，12000 rpm，离心1 min；
- 3) 弃穿过液，将HiBind™ DNA柱重新套入收集管中，将剩余的DNA/琼脂糖溶解液加入柱中，重复步骤2；
- 4) 吸取300 μL Binding Buffer至HiBind™ DNA柱中，室温，12000 rpm，离心1 min；
- 5) 弃穿过液，将柱子重新套入收集管中，加700 μL SPW Wash Buffer至HiBind™ DNA柱中，室温，12000 rpm，离心1 min；
- 6) 弃穿过液，加700 μL SPW Wash Buffer至HiBind™ DNA柱中重复步骤5；
- 7) 弃穿过液，将HiBind™ DNA柱重新套入收集管中，室温，13000 rpm，离心2 min以去除柱中残余的酒精成分；
- 8) 将HiBind™ DNA柱套入一个干净的1.5 mL离心管中，打开盖子室温挥发5 min，吸取30~50 μL洗脱液滴加于吸附柱膜中央，室温，13000 rpm，离心,1 min，收集穿过液。

2.8.3 载体 pGL3-basic 及各截短体目的片段双酶切

- 1) 载体 pGL3-basic 酶切体系如下：

组分	体积
质粒 pGL3-basic	1 μg
10×Buffer	2 μL
10×BSA	2 μL
<i>Nhe</i> I	1 μL
<i>Hind</i> III	1 μL
dd H ₂ O	up to 20 μL

各截短体目的片段酶切体系如下：

组分	体积
PCR 回收产物	14 μ L
10 \times Buffer 2	2 μ L
10 \times BSA	2 μ L
<i>Nhe</i> I	1 μ L
<i>Hind</i> III	1 μ L

酶切反应在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2 h。按照前述方法，分别回收载体酶切大片段和目的基因酶切产物。

2.8.4 载体 pGL3-basic 及各截短体目的片段体外连接反应

连接反应体系如下：

组分	体积
截短体目的片段	6 μ L
pGL3-basic 大片段	2 μ L
10 \times DNA Ligase Buffer	1 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L

连接反应在 16 $^{\circ}$ C 水浴反应过夜。

2.8.5 热激法转化重组质粒

- 1) 取 10 μ L 上述连接产物加入 100 μ L DH 5 α 感受态细菌中，于冰上混匀后孵育 30 min；42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 90 s，立即取出置于冰上孵育 2 min；将混合物与 400 μ L 无抗性的 LB 培养基混匀，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中，250 rpm/min，孵育 1 h；用移液器吸取 200 μ L 转化产物加入含 100 μ g/mL Ampicillin 的 LB 培养板中，涂布均匀后倒置于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱中，孵育过夜；
- 2) 挑取单菌落接种于 LB 培养液（含 5 mL，100 μ g/mL Ampicillin）中，置于恒温摇床，37 $^{\circ}$ C，250 rpm，培养过夜。

2.8.6 含有 MMP1 启动子区截短体的重组质粒提取与鉴定

- 1) 收集菌液，10000 rpm，室温离心 1 min；
- 2) 去除菌液加 250 μ L Solution I/RNase A，重悬菌体，充分混匀；

- 3) 加 250 μL Solution II, 上下颠倒 Eppendorf 管 4~6 次, 动作温和, 室温静置 2 min;
- 4) 加 125 μL 冰预冷 Buffer N3, 温和混匀数次直至白色絮状物形成, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm 离心 10 min;
- 5) 小心吸取上清, 转移入干净的 1.5 mL 离心管中, 加入 1/10 体积 ETR solution, 在 Eppendorf 管底部形成蓝色沉淀;
- 6) 将上层液体转移至新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 加 1/2 体积无水乙醇, 温和颠倒 6~7 次, 室温放置 1~2 min;
- 7) 吸取 700 μL 上述混合液加入 HiBindTM DNA Mini Column, 室温, 12000 rpm, 离心 1 min;
- 8) 弃穿过液, 加 500 μL HB Buffer 洗柱, 室温, 12000 rpm, 离心 1 min;
- 9) 弃穿过液, 加 700 μL DNA Wash Buffer, 室温, 12000 rpm, 离心 1 min, 弃穿过液, 重复洗涤一遍;
- 10) 弃穿过液, 13000 rpm, 空转 2 min;
- 11) 将柱子转移入干净的 1.5 mL Eppendorf 管中, 向吸附柱膜中央滴入 30~50 Endoxin-Free Elution Buffer, 13000 rpm, 室温洗脱 1 min;
- 12) 将提取的含有 MMP1 启动子区截短体的重组质粒, 进行 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切 (方法同前述), 酶切产物加入 10 \times Loading buffer, 行 1% 琼脂糖凝胶电泳;
- 13) 将酶切鉴定符合预期结果的重组质粒样本交由上海生工生物工程有限公司进行测序。

2.9 转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子区截短体转录活性的影响

- 1) 取处于对数生长期的 HEK293T 细胞, 接种至 24 孔细胞培养板中, 待细胞融合度达 70% 左右;
- 2) 分别将 4 个含有不同 MMP1 启动子区序列的重组质粒 (100 ng) 与 pCMV-ETS1 (100 ng) 和 phRL-TK (5 ng) 共转 HEK293T 细胞, 每个实验组设立 4 个复孔;
- 3) 转染 48 h 后, 弃培养上清, PBS 洗两遍后, 将 100 μL 1 \times PLB 细胞裂解液加入细胞培养孔中, 在室温轻缓晃动培养板 15 min, 把裂解液转移到检测试管中, 12000 rpm, 离心 10 min;
- 4) 避光条件下, 将 0.2 mL Stop & Glo[®] Substrate 加入 10 mL Stop & Glo[®] 缓冲液中,

配制成1×Stop & Glo®反应溶液，低温保存备用；

- 5) 先取5 μL细胞裂解液，加入10 μL Luciferase Assay Buffer II，快速混匀，立即放入荧光照度计检测萤火虫荧光素酶活性，记录数值1，再加入10 μL Stop & Glo反应溶液，快速混匀后检测海肾荧光素酶活性，记录数值2；
- 6) 根据每孔报告基因的数据（数值1/数值2），求取各实验组平均值、标准差。

2.10 MMP1 启动子区突变体构建

- 1) 通过化学合成获得 MMP1 启动子突变序列，同时在序列两端分别引入 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点：

突变体 M1 (GGAA 删除)：

CTAGCTAGCCAAGTGATTCCAAATAATCTGCTAGGAGTCACCATTCTAATG
ATTGCCTAGTCTATTCATAGCTAATCAAGAGGATGTTATAAAGCATGAGTCA
GACAGCCTCTGGCTTTCTGGAAGGGCAAGGACTCTATATATACAGAGGGAG
CTTCCTAGCTGGGATATTGGAGCAGCAAGAGGCTGGGAAGCCATCACTTAC
CTTGCACTGAGAAAGAAGACAAAGGCCAGTAAGCTTCCC

突变体 M2 (GGAA 突变)：

CTAGCTAGCCAAGTGATTCCAAATAATCTGCTAGGAGTCACCATTCTAATG
ATTGCCTAGTCTATTCATAGCTAATCAAGAGGATGTTATAAAGCATGAGTCA
GACAGCCTCTGGCTTTCTTTCCGGGCAAGGACTCTATATATACAGAGGGAG
CTTCCTAGCTGGGATATTGGAGCAGCAAGAGGCTGGGAAGCCATCACTTAC
CTTGCACTGAGAAAGAAGACAAAGGCCAGTAAGCTTCCC

突变体 M3 (GGCTTTCTGGAAGGGCAAGGA 删除)：

CTAGCTAGCCAAGTGATTCCAAATAATCTGCTAGGAGTCACCATTCTAATG
ATTGCCTAGTCTATTCATAGCTAATCAAGAGGATGTTATAAAGCATGAGTCA
GACAGCCTCTGGCTTTCTGGAAGGGCAAGGACTCTATATATACAGAGGGAG
CTTCCTAGCTGGGATATTGGAGCAGCAAGAGGCTGGGAAGCCATCACTTAC
CTTGCACTGAGAAAGAAGACAAAGGCCAGTAAGCTTCCC

- 2) 载体 pGL3-basic 与突变序列经 *Nhe* I、*Hind* III 限制性内切酶 37 °C 酶切 3 h 后，回收目的条带，在 T4 DNA 连接酶的作用下，16 °C 连接过夜；

3) 将上述连接液转化 DH 5 α 感受态细胞，酶切鉴定并筛选出阳性克隆进行测序。

2.11 转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子区突变体转录活性的影响

- 1) 取处于对数生长期的 HEK293T 细胞，接种至 24 孔细胞培养板中，待细胞融合度达 70% 左右；
- 2) 分别将 3 个不同 MMP1 启动子区突变体 (100 ng) 与 pCMV-ETS1 (100 ng) 和 pRL-TK (5 ng) 共转 HEK293T 细胞，每个实验组设立 4 个复孔；
- 3) 转染 48 h 后，弃培养上清，PBS 洗两遍后，将 100 μ L 1 \times PLB 细胞裂解液加入细胞培养孔中，在室温轻缓晃动培养板 15 min，把裂解液转移到检测试管中，12000 rpm 离心 10 min；
- 4) 避光条件下，将 0.2 mL Stop & Glo[®] Substrate 加入 10 mL Stop & Glo[®] 缓冲液中，配制成 1 \times Stop & Glo[®] 反应溶液，低温保存备用；
- 5) 先取 5 μ L 细胞裂解液，加入 10 μ L Luciferase Assay Buffer II，快速混匀，立即放入荧光照度计检测萤火虫荧光素酶活性，记录数值 1，再加入 10 μ L Stop & Glo 反应溶液，快速混匀后检测海肾荧光素酶活性，记录数值 2；
- 6) 根据每孔报告基因的数据 (数值 1/数值 2)，求取各实验组平均值、标准差。

2.12 ChIP 实验鉴定转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子的结合能力

2.12.1 细胞的甲醛交联与超声破碎

- 1) 取处于对数生长期的 HEK293T 细胞，接种至 100 mm 细胞培养皿中，待细胞融合度达 70% 左右；
- 2) 将质粒 pCMV-ETS1 (100 ng) 和质粒 pGL3-MMP1 promoter (100 ng) 共转 HEK293T 细胞；
- 3) 取出 1 平皿细胞，加入 270 μ L 37% 甲醛，使得甲醛的终浓度为 1%，温和地晃动平皿混匀；
- 4) 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min，加 10 \times 甘氨酸 1 mL 于平皿中终止交联，混匀后室温孵育 5 min 后，将培养皿置于冰上；
- 5) 吸尽培养基，用冰冷的 PBS 清洗细胞 2 次，加入 1 mL 预冷的含 PMSF 的 PBS，细胞刮刀收集细胞，4 $^{\circ}$ C，1000 rpm，离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀 (可于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存数月)；

- 6) 以 200 μL 内含 PMSF 的 SDS 裂解缓冲液重悬细胞, 冰上放置 10 min, 留取 5 μL 行琼脂糖凝胶电泳;
- 7) 超声破碎: 冰上超声剪切染色质 DNA, 期间取 1 μL 行琼脂糖凝胶电泳, 超声条件优化使染色 DNA 被剪切成为 200 bp~1000 bp 的片段 (30 个脉冲, 每个 10 s, 脉冲间隔 10 s);
- 8) 超声剪切结束后, 12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 转移上清至 2 mL 离心管中, 去除不溶物质;
- 9) 加入 8 μL 体积 5 M NaCl, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 4 h 至过夜, 以解交联 (所获超声剪切物可于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 2 个月);

2.12.2 免疫共沉淀

- 1) 用含蛋白酶抑制剂的 ChIP 稀释缓冲液稀释 DNA 溶解液;
- 2) 加入 60 μL 蛋白 A/G-琼脂糖, 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 1 h, 以排除非特异性结合;
- 3) 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000 rpm, 离心 1 min, 将上清转移至新的 Eppendorf 管中, 留取 20 μL 作为 Input DNA 对照;
- 4) 将上清分为三份, 分别加入对应的抗体:
 - 阳性对照: anti-RNA Polymerase (1 μg)
 - 阴性对照: Normal Mouse IgG (1 μg)
 - 实验组: 针对 DNA 结合蛋白的特异性抗体 (1~10 μg);
- 5) 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育过夜 (孵育时间可视情况而调整)。
- 6) 孵育过夜后, 每管中加入 60 μL 蛋白 G-琼脂糖, 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 1 h;
- 7) 依次用下列溶液清洗沉淀复合物, 清洗的步骤: 加入 1 mL 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 3~5 min, 3000~5000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1 min, 小心移除上清;
 - ① Low salt wash buffer, 1 次
 - ② High salt wash buffer, 1 次
 - ③ LiCl wash buffer, 1 次
 - ④ TE buffer, 2 次

- 8) 加入 100 μL 洗脱缓冲液 (105 μL 20%SDS, 210 μL 1 M NaHCO_3 , 1785 μL ddH_2O), 轻弹管壁混匀, 室温孵育 15 min, 4 $^\circ\text{C}$, 5000 rpm, 离心 1 min, 收集上清液;
- 9) 重复洗脱一次;
- 10) 解交联: 加入 5 M NaCl 8 μL , 65 $^\circ\text{C}$ 孵育, 4 h 至过夜。

2.12.3 RT-PCR 分析

2.12.3.1 DNA 纯化

- 1) 向所有管中加入 1 μL RNase A, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育, 30min;
- 2) 加 4 μL 0.5 M EDTA, 8 μL 1M Tris-HCl 和 1 μL Proteinase K 45 $^\circ\text{C}$, 孵育 1~2 h。
- 3) 向 200 μL DNA 样品中加入 1 mL Bind Reagent A;
- 4) 弃穿过液, 吸取剩余 600 μL 混合物于吸附柱中, 室温, 12000 rpm, 离心 30 s;
- 5) 弃穿过液, 加 500 μL Wash Reagent B 于吸附柱中, 室温, 12000 rpm, 离心 30 s;
- 6) 弃穿过液, 空转 12000 rpm, 室温离心 30 s;
- 7) 弃穿过液, 将 50 μL Elution Buffer C 滴加于吸附膜上, 室温, 12000 rpm, 离心 30 s。

2.12.3.2 PCR 扩增

以上述溶解于 ddH_2O 中的 DNA 作为模板, 利用特异性引物进行 PCR 扩增, 用于 ChIP 实验的引物序列如下:

引物名称	引物序列
ChIP I	Forward: TGGGCAGGAGATGCTAAATAAGA
	Reverse: GCTCCTTGGTGCTAGGCAG
ChIP II	Forward: CCAGAGTCACGCTCAGTCTC
	Reverse: CCACCCCTTGCCCATCATTA
ChIP III	Forward: CCATGGAGTACTCTTTGACCTGT
	Reverse: TGTGCGAAGGAGACACACTC
ChIP IV	Forward: AAGCATGAGTCAGACAGCCT
	Reverse: GATGGCTTCCCAGCCTCTTG
ChIP V	Forward: ACAGAGGGAGCTTCCTAGCTG
	Reverse: TCCGCTTTTCAACTGGCCTT

按以下组分制备 PCR 反应体系:

组分	体积
2×Taq PCR MasterMix	10 μL
正向引物 (10 μM)	1 μL
反向引物 (10 μM)	1 μL
DNA	2 μL
ddH ₂ O	6 μL
Total	20 μL

PCR 反应参数设置如下:

步骤	温度	时间	循环数
变性	95°C	3 min	1×
变性	95°C	20 s	
退火	59°C	30 s	25×
延伸	72°C	30 s	
延伸	72°C	2 min	1×

2.12.3.3 琼脂糖凝胶电泳分析

PCR 扩增产物, 加入 10×Loading buffer, 行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果通过灰度扫描分析转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子的结合能力。

2.13 EMSA 实验验证转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子的结合区域

1) 根据生物信息学分析预测的转录因子 ETS1 结合位点的序列设计探针, 交由上海生工生物工程有限公司合成, 探针序列如下:

引物名称	引物序列
未标记野生型探针	Forward: GGCTTTCTGGAAGGGCAAGGA Reverse: TCCTTGCCCTTCCAGAAAGCC
生物素标记野生型探针	Forward: GGCTTTCTGGAAGGGCAAGGA Reverse: TCCTTGCCCTTCCAGAAAGCC
未标记突变型探针	Forward: GGCTTTCTTTCCGGGCAAGGA Reverse: TCCTTGCCCGGAAAGAAAGCC
生物素标记突变型探针	Forward: GGCTTTCTTTCCGGGCAAGGA Reverse: TCCTTGCCCGGAAAGAAAGCC

2) EMSA 胶的配制:

组分	体积
10×TBE buffer	1 mL
40% 丙烯酰胺	2 mL
80% 甘油	625 μ L
10% 过硫酸铵	150 μ L
TEMED	10 μ L
ddH ₂ O	16.2 mL
Total	20 mL

3) EMSA 结合反应:

阴性对照反应

组分	体积
Nuclease-free water	7 μ L
5×EMSA/Gel-Shift结合缓冲液	2 μ L
细胞核蛋白	0 μ L
标记好的探针	1 μ L
Total	10 μ L

样品反应

组分	体积
Nuclease-free water	5 μ L
5×EMSA/Gel-Shift结合缓冲液	2 μ L
细胞核蛋白	2 μ L
标记好的探针	1 μ L
Total	10 μ L

探针冷竞争反应

组分	体积
----	----

Nuclease-free water	4 μ L
5 \times EMSA/Gel-Shift结合缓冲液	2 μ L
细胞核蛋白	2 μ L
未标记的探针	1 μ L
标记好的探针	1 μ L
Total	10 μ L

突变探针冷竞争反应

组分	体积
Nuclease-free water	4 μ L
5 \times EMSA/Gel-Shift结合缓冲液	2 μ L
细胞核蛋白	2 μ L
未标记的探针	1 μ L
标记好的探针	1 μ L
Total	10 μ L

Super-shift 反应

组分	体积
Nuclease-free water	4 μ L
5 \times EMSA/Gel-Shift结合缓冲液	2 μ L
细胞核蛋白	2 μ L
目的蛋白特异性抗体	1 μ L
标记好的探针	1 μ L
Total	10 μ L

按照上述顺序依次先加入除标记探针外的各种试剂，混匀，室温放置 10 min，以消除探针和蛋白的非特异性结合；再加入标记探针，混匀，室温放置 20 min；加入 10 \times EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液，混匀后立即上样；

- 4) 电泳：用 0.5 \times TBE 缓冲液作为电泳液，按照 10 V/厘米的电泳预电泳 10 min，把混合了上样缓冲液的样品加入到上样孔内，100 V，电泳 45 min；

- 5) 转膜: 使用 BioRad 的湿法电转膜装置, 以 $0.5\times$ TBE 缓冲液作为转膜液, 恒流 380 mA, 电转移 1 h;
- 6) 交联: 电转移后, 用镊子夹取尼龙膜, 置于一干燥的滤纸上, 使用超净台内紫外灯, 距离膜 10 cm 左右交联 15 min;
- 7) 封闭: 将交联过的含有样品的尼龙膜, 放入 15 mL 封闭液中, 水平摇床上缓慢摇动 15 min;
- 8) 取出尼龙膜, 放入 15 mL 含有 7.5 μ L Streptavidin-HRP Conjugate 的封闭液中, 水平摇床上缓慢摇动 15 min;
- 9) 将尼龙膜转移至另一装有 15 mL 洗涤液的容器内, 水平摇床上缓慢洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次;
- 10) 检测平衡液中平衡 5 min;
- 11) 用镊子夹取尼龙膜至预先铺有保鲜膜的发光板中, 于暗室中进行 ECL 发光, 胶片曝光采图。

2.14 CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞侵袭功能的影响

2.14.1 腺病毒 Ad-CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞侵袭功能的影响

- 1) 取处于对数生长期的 FLS, 将细胞接种至 6 孔细胞培养板, 实验分为以下三个处理组: ① FLS; ② FLS+腺病毒 Ad-EGFP 感染; ③ FLS+腺病毒 Ad-CYR61 感染, FLS 经腺病毒感染 48 h 后, 通过荧光显微镜确认 FLS 感染成功, 继而进行饥饿培养;
- 2) 包被基底膜: 用 DMEM 细胞培养基将 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释, 稀释液包被于 Transwell 小室上室面, 37 °C 孵育过夜;
- 3) 水化基底膜: 向 Transwell 小室上室面加入 50 μ L 10 g/L BSA-DMEM 无血清培养液, 37 °C 孵育 30 min;
- 4) 将饥饿培养 24 h 的各实验组 FLS 消化, PBS 洗 1~2 遍, 用含 0.1%FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞, 分别调整各实验组细胞密度至 5×10^4 /mL;
- 5) 分别取 200 μ L 细胞悬液接种于 Transwell 小室上室面, 下室中加入 500 μ L 含 10%FBS 的 DMEM 培养基, 同时注意避免气泡的产生;
- 6) 37 °C 常规培养 24 h;

- 7) 取出小室，用棉签小心擦除上室细胞及液体，95%乙醇固定 10 min，待液体挥发完全后，加入 0.1%结晶紫染色 10 min，用 PBS 漂洗小室中残余的结晶紫染色液；
- 8) 计数：在倒置显微镜下（×40 倍）观察并随机选取 10 个视野拍照，计数移至微孔膜下层的细胞。

2.14.2 siCYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞侵袭功能的影响

- 1) 取处于对数生长期的 FLS，将细胞接种至 6 孔细胞培养板，实验分为以下三个处理组：① FLS；② FLS+无关干扰小 RNA 转染；③ FLS+siCYR61 转染，FLS 经干扰小 RNA 转染 48 h 后，以荧光标记的无关 siRNA 为参照，通过荧光显微镜确认 FLS 转染成功，继而进行饥饿培养；
- 2) 包被基底膜：用 DMEM 细胞培养基将 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释，稀释液包被于 Transwell 小室上室面，37 °C 孵育过夜；
- 3) 水化基底膜：向 Transwell 小室上室面加入 50 μL 10 g/L BSA-DMEM 无血清培养液，37 °C 孵育 30 min；
- 4) 将饥饿培养 24 h 的各实验组 FLS 消化，PBS 洗 1~2 遍，用含 0.1%FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞，分别调整各实验组细胞密度至 5×10^4 /mL；
- 5) 分别取 200 μL 细胞悬液接种于 Transwell 小室上室面，下室中加入 500 μL 含 10%FBS 的 DMEM 培养基，同时注意避免气泡的产生；
- 6) 37 °C 常规培养 48 h；
- 7) 取出小室，用棉签小心擦除上室细胞及液体，95%乙醇固定 10 min，待液体挥发完全后，加入 0.1%结晶紫染色 10 min，用 PBS 漂洗小室中残余的结晶紫染色液；
- 8) 计数：在倒置显微镜下（×40 倍）观察并随机选取 10 个视野拍照，计数移至微孔膜下层的细胞。

2.15 CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞迁移功能的影响

- 1) 取处于对数生长期的 FLS，将细胞接种至 100 mm 细胞培养皿，实验分为以下三个处理组：① FLS；② FLS+无关干扰小 RNA 转染；③ FLS+siCYR61 转染，FLS 经干扰小 RNA 转染 48 h 后，以荧光标记的无关 siRNA 为参照，通过荧光显微镜确认 FLS 转染成功，继而进行饥饿培养；
- 2) 胶原包被：将用 0.2% 醋酸溶解的终浓度为 2 μg/μL II 型胶原溶液，按照 8 μg/cm²

的浓度，包被于细胞培养皿内，超净台内风干；

- 3) 预先用黑色标记笔在 6 孔细胞培养板底部，均匀地划横线，大约每隔 0.5~1 cm 一道，横穿过细胞培养孔，每孔至少穿过 5 条直线；
- 4) 将 FLS 细胞经胰酶消化后，以 3×10^5 个细胞分别接种于有胶原包被和无胶原包被的 6 孔板细胞培养板中进行常规培养，直至细胞呈单层排列，基本融合；
- 5) 取干净的枪头和直尺，消毒备用；
- 6) 以直尺为一边，用 20 μL 枪头制造划痕（尽量垂至于背后的横线划痕，枪头要垂直，不能倾斜），每个孔划一次，记录下划痕区相对距离；
- 7) 经 PBS 洗去游离细胞后，继续在含 10%FBS 的 DMEM 细胞培养液中培养 72 h；
- 8) 于倒置显微镜下观察细胞划痕的修复情况并进行拍照计算各实验组细胞横向迁移的距离（ μm ）。

2.16 统计学处理

运用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 Student's *t* 检验分析，所有实验均重复 3 次，实验结果以 $x \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 CYR61 对 MMP1 的表达调控

3.1.1 腺病毒 Ad-CYR61 的包装及其感染效率鉴定

3.1.1.1 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 腺病毒载体构建

3.1.1.1.1 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 酶切鉴定结果

pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 质粒大提后，用 *Nhe* I 和 *Hind* III 做双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果（图 3-1）显示，pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 重组质粒，双酶切后产生 1146 bp 左右目的片段，与预期结果相符。

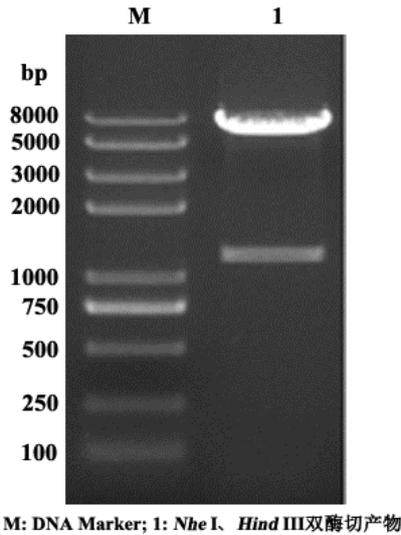


图 3-1 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 质粒酶切鉴定结果

3.1.1.1.2 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 测序结果

将酶切鉴定符合预期结果的重组质粒样本交由上海生工生物工程有限公司进行测序，，序列正确，如图（图 3-2）所示。

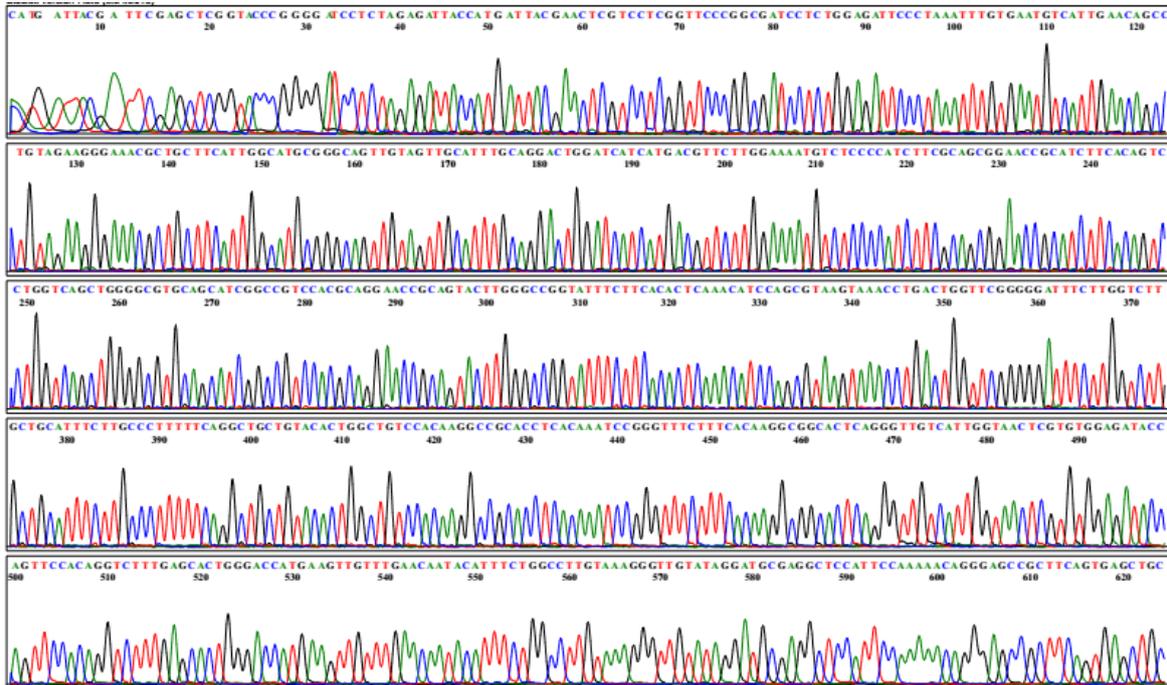


图 3-2 重组质粒 pDC316-mCMV-EGFP-CYR61 测序图谱

3.1.1.2 腺病毒 Ad-CYR61 感染 FLS 效率鉴定

将 RA FLS 接种于 24 孔板，待细胞融合度达 90%左右时，按照 MOI 值分别为 10、25 和 50 加入不同体积腺病毒 Ad-CYR61 毒液；感染 24 h 后，更换含 20%FBS

的 DMEM 完全培养基常规培养液继续培养 48h; 分别通过荧光显微镜 (图 3-3 A) 和 Western-blot (曝光时间 30 s) (图 3-3 B&C), 观察 Ad-CYR61 的表达情况。随着 MOI 值升高, 腺病毒感染 FLS 细胞数量逐渐增多, CYR61 蛋白表达量相应增加。当 MOI=50 时, 腺病毒感染效率达到 95% 以上, CYR61 蛋白表达量达到未感染前 2 倍以上。根据各实验组荧光强度以及蛋白表达水平, 初步确定腺病毒 Ad- CYR61 感染 FLS 的最适滴度为 MOI=50。

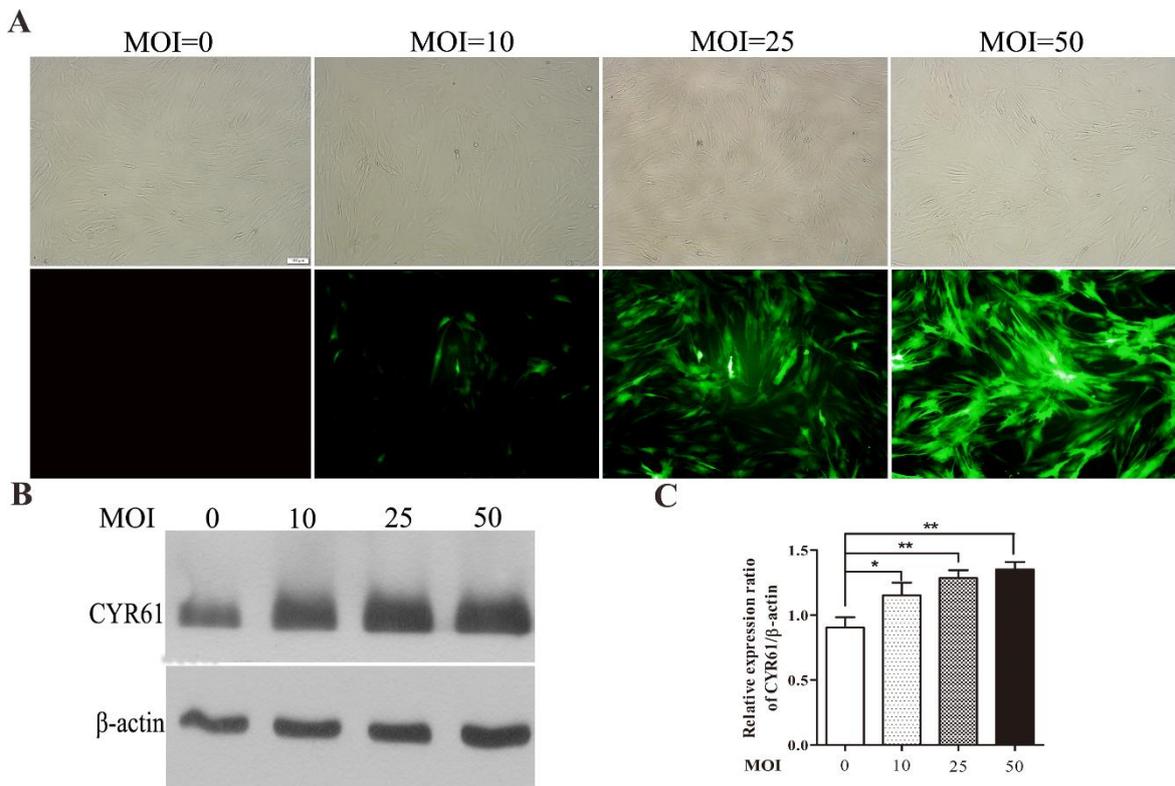


图 3-3 腺病毒 Ad-CYR61 感染 FLS 效率鉴定

3.1.2 过表达 CYR61 对 MMP1 表达水平的影响

通过 Real-time PCR 实验(图 3-4 A), 我们发现腺病毒 Ad-CYR61 感染 FLS, MMP1 mRNA 表达水平上调约 110 倍左右, MMP2 mRNA 表达水平上调 6 倍左右, 分别与对照组和对照腺病毒相比, 具有明显的统计学差异(** $P<0.01$), 而 MMP9 和 MMP13 mRNA 表达水平在 CYR61 过表达后没有明显变化。同时, Western-blot 实验结果(图 3-4 B) 显示, 过表达 CYR61 能够促进 MMP1 蛋白的表达。

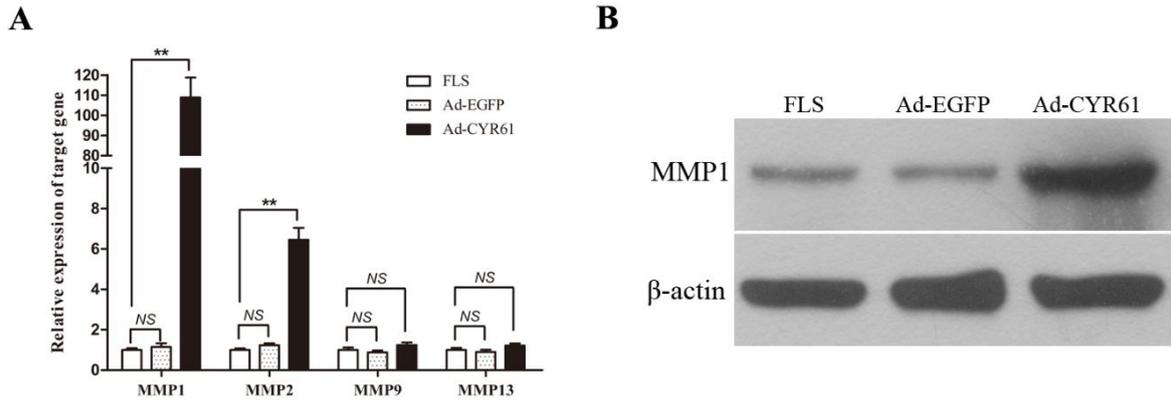


图 3-4 Real-time PCR 和 Western-blot 检测过表达 CYR61 对 MMP1 表达水平的影响

3.1.3 siCYR61 的筛选与干涉效率鉴定

根据 CYR61 CDS 区序列,分别设计合成 3 对 CYR61 干扰小 RNA,以 LipoTM 2000 为介质转染 RA FLS 细胞,同时以荧光对照干扰小 RNA 为参照,确定各组干扰小 RNA 的转染效率。经 Western-blot 分析 siCYR61 在 RA FLS 细胞中的干涉效率(曝光时间 2 min)。结果(图 3-5 A&B)显示,3 对 CYR61 干扰小 RNA 均能够一定程度干涉 CYR61 蛋白表达,其中 3 号 siCYR61 干涉效率最强,干涉效率达到 90% 以上,故选之进行后续实验研究。

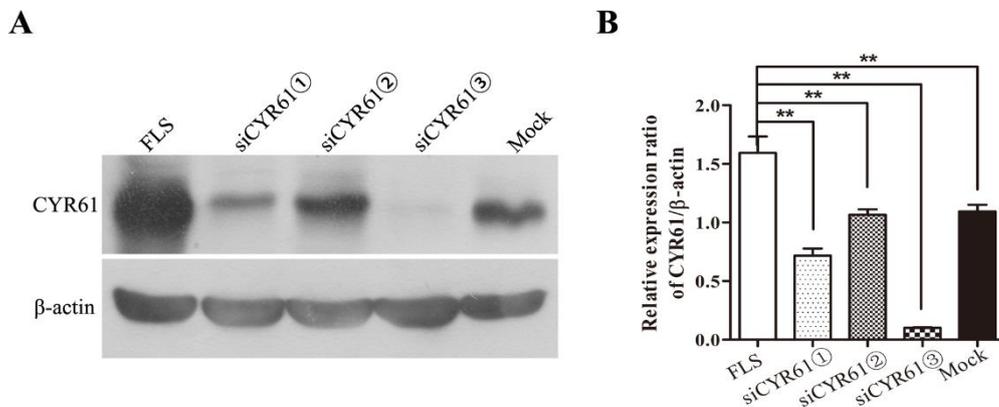


图 3-5 Western-blot 鉴定 siCYR61 干涉效率

3.1.4 siCYR61 对 MMP1 表达水平的影响

本实验分为以下六个实验组:① FLS;② FLS +II 型胶原;③ siNC/ FLS;④ siNC/ FLS+II 型胶原;⑤ siCYR61/FLS;⑥ siCYR61/ FLS+II 型胶原。首先用 siCYR61 转染 RA FLS 细胞,常规培养 48 h,以荧光对照干扰小 RNA 为阴性对照,

通过荧光显微镜观察，确认 siRNA 转染成功后，将 RA FLS 细胞消化下来，用无血清 DMEM 洗液重悬后，接种于包被有 II 型胶原的细胞培养皿，继续培养 12 h。继而，将各实验组细胞分为两份，其中一份用于细胞总 RNA 的提取，进行 Real-time PCR 检测（图 3-6 A）；另外一份用于提取总蛋白，以 β -actin 为内参，行 Western-blot 检测（图 3-6 B）。结果显示，干扰 CYR61 能够抑制 MMP1 的表达，即使通过 II 型胶原刺激，由于 CYR61 被阻断，无法回复 MMP1 的表达。

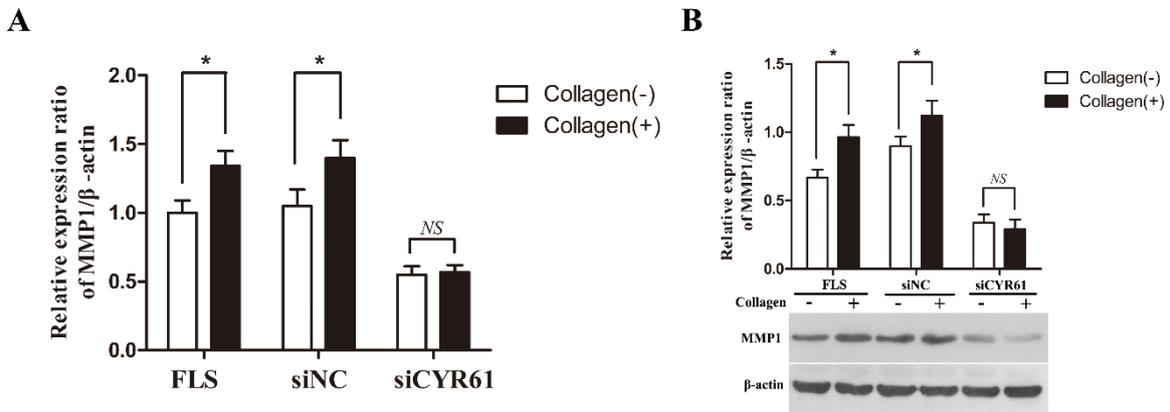


图 3-6 Real-time PCR 和 Western-blot 检测 siCYR61 对 MMP1 表达水平的影响

3.2 CYR61 调控 MMP1 表达的分子机制

3.2.1 生物信息学分析 MMP1 启动子区

使用 NCBI 建立的核苷酸数据库在线资源 GenBank，获得了人 MMP1 启动子序列，通过 Genomatix 网站在线分析软件 MatInspector 预测 MMP1 启动子区转录因子结合部位，结果发现 MMP1 基因转录起始位点上游 1326 bp 启动子区域存在 1 个 GATA3 转录因子结合位点，1 个 MZF 转录因子结合位点以及 5 个 ETS1 转录因子结合位点。

GATA3
ETS1

GGAATACACATCTTTCATTACAGAGCCATGTATTTATTTAATGGGCAGGAGATGCTAAATAAGATCTTTTGAATGGAGGAATGCATAAAAT ATATGAATG
 AATGCATACATGAAAGAATAAAATAAATGCTGCCTAGCACCAAGGAGCGAAGATAGACTCATATCAAGGGAAACAAGTATGATTAAAAATAAGACCCAGCA
ETS1

GTCACGCTCAGTCTCTTCCAGCCCTTTTCATCAICCGGTACATT CAGACAAGTTTCAGGGAAGGATCCTATTGTCCCATGATAATGATGGCAAGGGGT
MZF1
GGGGAGTTATCTCATACTCCGCCTGTGGATGAGGGGTCTTCTCAGGTAAGGCTCTTAAATCCTAGGCCTGAGTAAATTTTTTCAAATTTTATTTTAGACA
 GGGTCCCTCTCTGTGCTAGGCTGGAGTGCAGCGGCACAATCACAGTCAATGCAGCCTCAACCTCCCAGGCCAAGTATCCTCCACCTCAGCCTCT
 TCAGTGACTAGGACTACAGGTGCATGACTCCATGCTTGCTAACTTTAAAAAATGTTTGTGTTGTTGTTGTTTTCACAGAGATGGGGTCTCACCATGT
 TGCCAGGCTGATCTTGAACCTCTGGGCTCAAGTGATTCCTGCTCGGCTCCTGAAATCTGGGATTATAGGCTTGAGCCACCATGCTGGCTCTGA
 GTAAGATTAAGGGAAGCCATGGTGCTATCGCAATAGGGTACCAGGCAGCTTAACAAAGGCAGAAAGGGAACCTCAGAGAACCCGAAGAGCCACCGTAAA
 GTGAGTGTGGGGAGCTGAACCTCAGTCAGTACAGGTGCCGAACAGCCATCAGGTGCGCAGTGTAGTAATCCACCTCTGCCCTGGGAGCAAGGTGT
 GTGGAGAAACCTGTAGCACTTTATGACCATCAGAACCAGTCTTTTCAAAAAGACCATGGAGTACTCTTTGACCTGTGATATAACAAGAACCTTTCTCA
ETS1

AATAGGAAAGAAATGAA TTGGAGAAAACCACTGTTTACATGGCAGAGTGTGTCCTTCGCACACATCTGTTTGAAGTTAATCATGACATTGCAACACC
 AAGTGATTTCCAAATAATCTGCTAGGAGTCAACATTTCTAATGATTGCTAGTCTATTTCATAGCTAATCAAGAGGATGTTATAAAGCATGAGTCAGACAGC
ETS1
ETS1

CTCTGGCTTTCTGGAAGGCAAGGA CTCTATATATACAGAGGGAGCTTCTAGCTGGG ATATTGGAGCAGCAAGAGGCTGGGAAGCCATCACTTACCTTG
 CACTGAGAAAGAAGACAAAGGCCAGT

图 3-7 生物信息学分析 MMP1 启动子区域转录因子结合位点

3.2.2 CYR61 与候选转录因子表达相关性分析

为了验证 CYR61 与生物信息学分析获得的可能参与调控 MMP1 表达的候选转录因子之间的相关性，首先利用腺病毒 Ad-CYR61 感染 CYR61 低表达细胞株 HEK 293T，通过 Real-time PCR 实验从基因转录水平，验证 CYR61 与候选转录因子 GATA3、MZF1 以及 ETS1 的表达相关性。结果（图 3-8 A）显示，过表达 CYR61 能够显著性的促进转录因子 ETS1 和 MMP1 的 mRNA 表达水平，而转录因子 GATA3 和 MZF1 mRNA 表达水平，在腺病毒 Ad-CYR61 感染前后差异无统计学意义 ($P>0.05$)，进一步采用 Western-blot 实验（图 3-8 B）证实了，CYR61 能够上调转录因子 ETS1 的表达。接着，利用 siCYR61 转染 FLS，同样通过 Real-time PCR 方法观察 CYR61 下调对候选转录因子 GATA3、MZF1 以及 ETS1 的表达影响，结果（图 3-8 C）表明 siCYR61 能够抑制转录因子 ETS1 和 MMP1 的 mRNA 表达水平，而对转录因子 GATA3 和 MZF1 mRNA 表达水平没有影响，Western-blot 实验结果（图 3-8 D）进一步说明了 siCYR61 能够抑制 ETS1 的表达。综上所述，CYR61 与转录因子 ETS1 表达具有明显相关性，可能通过其调控下游 MMP1 的表达。

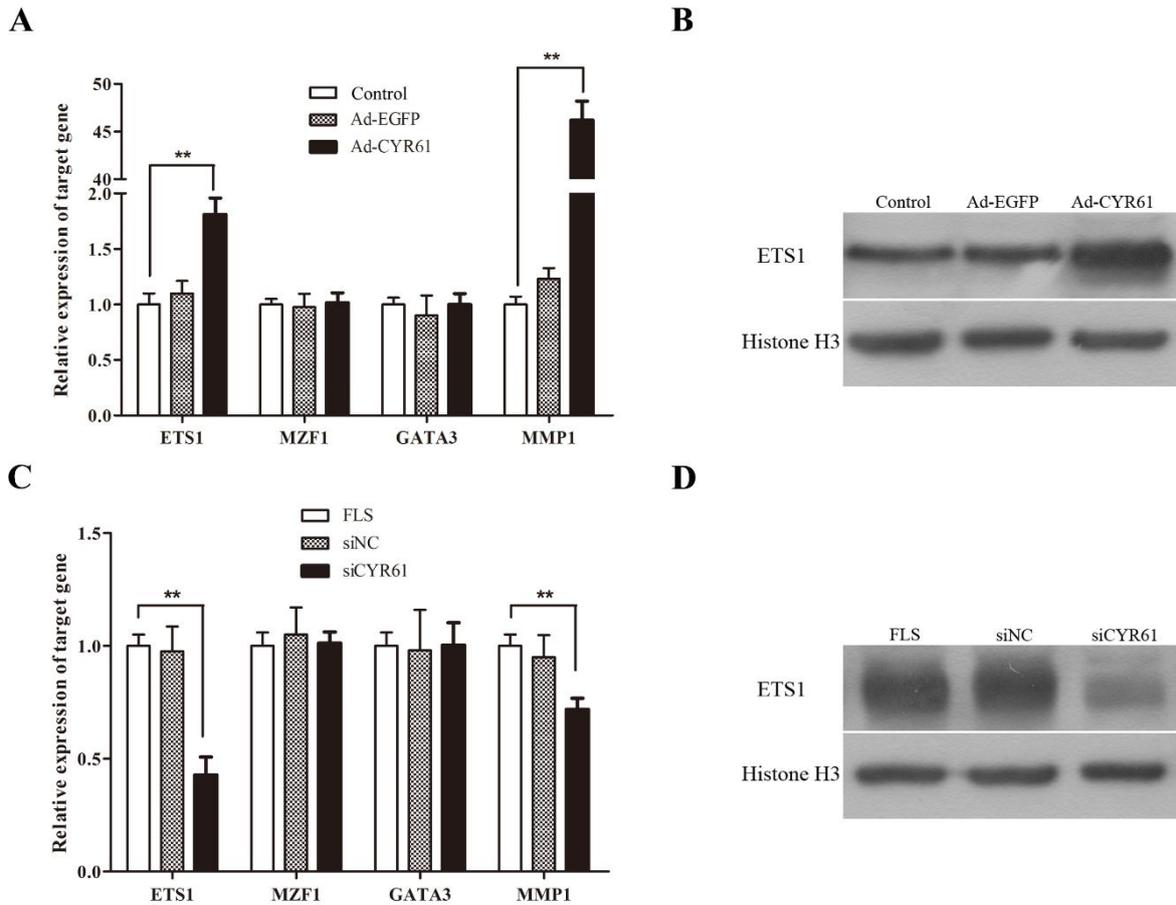


图 3-8 Real-time PCR 和 Western-blot 分析 CYR61 与候选转录因子表达的相关性

3.2.3 转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子转录活性的影响

为了证实转录因子 ETS1 参与调控 MMP1 的表达，分别将不同含量的 pCMV-ETS1 与 pGL3-MMP1 promoter 和 phRL-TK 共转 HEK293T 细胞，通过双荧光素酶报告基因实验验证转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子转录活性的影响。结果（图 3-9）表明随着 pCMV-ETS1 质粒转染量的升高，MMP1 启动子活性逐渐升高，与未转染 pCMV-ETS1 质粒的相对荧光素酶活性相比具有显著性的差异（** $P < 0.01$ ）。

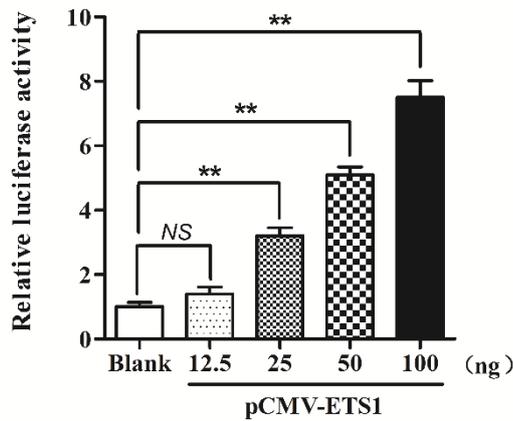
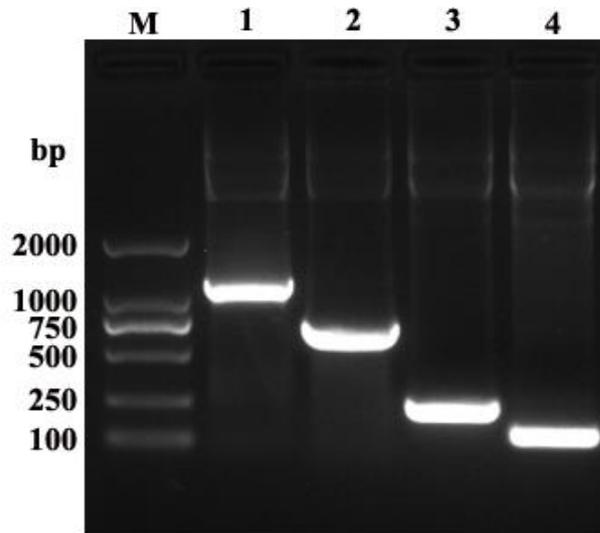


图 3-9 双荧光素酶报告基因检测转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子转录活性的影响

3.2.4 MMP1 启动子区截短体构建

3.2.4.1 PCR 扩增 MMP1 启动子区截短体序列

通过特异性引物 PCR 扩增 MMP1 启动子区域从而获得截短体序列, 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 3-10) 显示, 各截短体的 PCR 扩增产物与预期理论值 (截短体 F1: 1176 bp, 截短体 F2: 726 bp, 截短体 F1: 217 bp, 截短体 F1: 97 bp) 相符。



M: DNA Marker DL2000; 1: 截短体F1 PCR扩增产物; 2: 截短体F2 PCR扩增产物;
3: 截短体F3 PCR扩增产物; 4: 截短体F4 PCR扩增产物

图 3-10 PCR 扩增 MMP1 启动子区截短体序列

3.2.4.2 双酶切鉴定 MMP1 启动子区截短体重组质粒的构建

各截短体重组质粒大提后, 用 *Nhe* I 和 *Hind* III 做双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果如图 (图 3-11) 所示, 结果显示各截短体重组质粒双酶切后产生 4 个不同大小

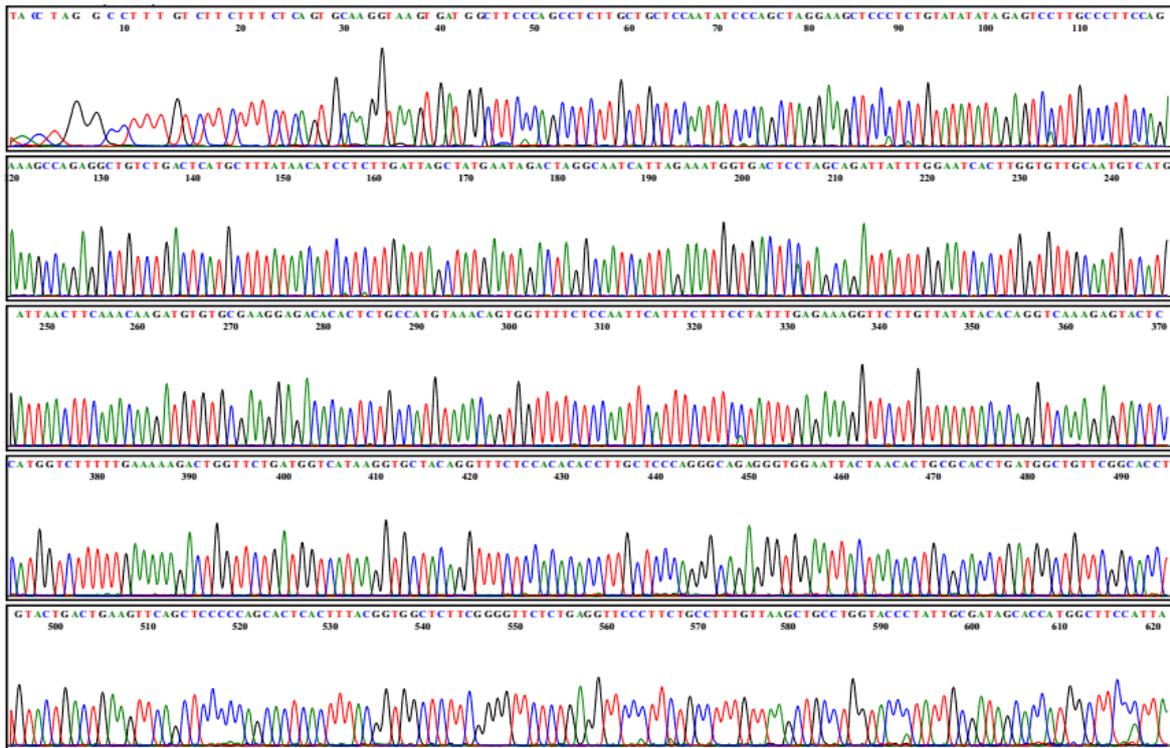


图 3-13 截短体 F2 测序图谱

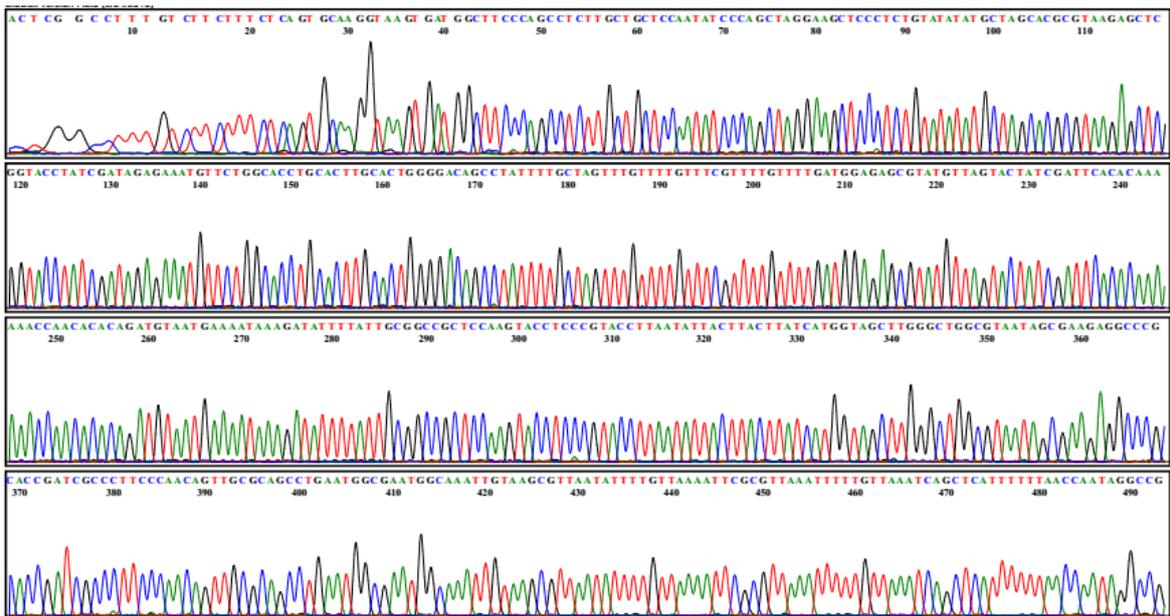


图 3-14 截短体 F3 测序图谱

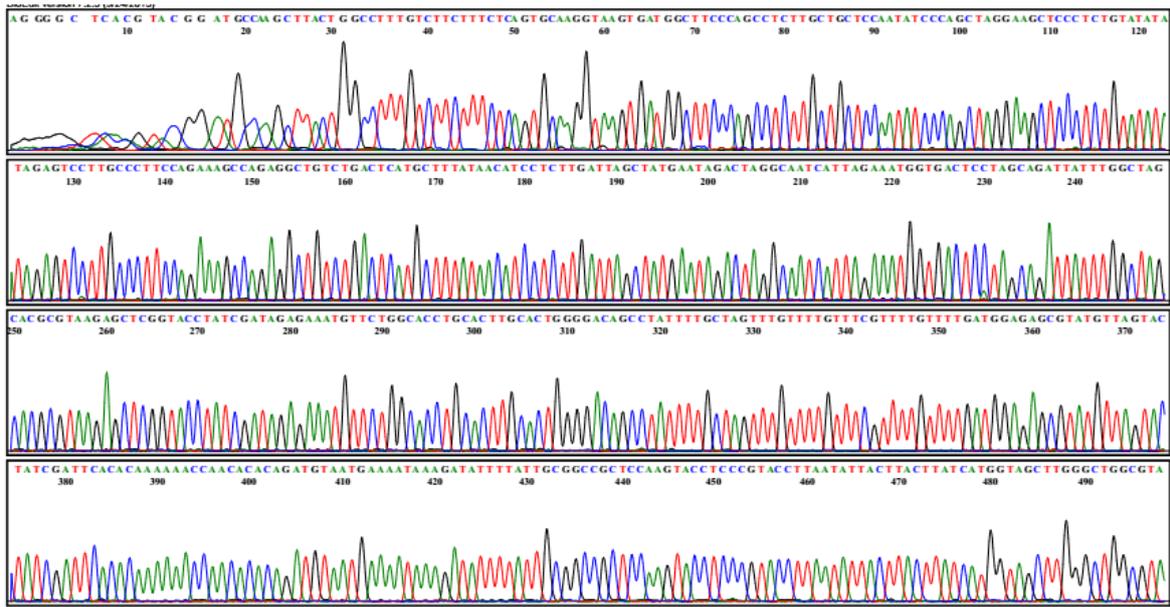


图 3-15 截短体 F4 测序图谱

3.2.5 转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子区截短体转录活性的影响

为了进一步明确 MMP1 启动子区转录因子 ETS1 的核心调控位点，分别将含有 MMP1 启动子区截短体的重组质粒与 pCMV-ETS1 和 phRL-TK 共转 HEK293T 细胞，通过双荧光素酶报告基因实验观察转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子区截短体转录活性的影响。结果（图 3-16）显示，转染 pCMV-ETS1 质粒，MMP1 启动子全长、截短体 F1、截短体 F2、截短体 F3 转录活性增强，而 ETS1 对 MMP1 启动子区截短体 F4 转录活性无影响，说明转录因子 ETS1 在 MMP1 启动子区的核心调控区位于 MMP1 基因转录起始位点上游-217~-97 bp。

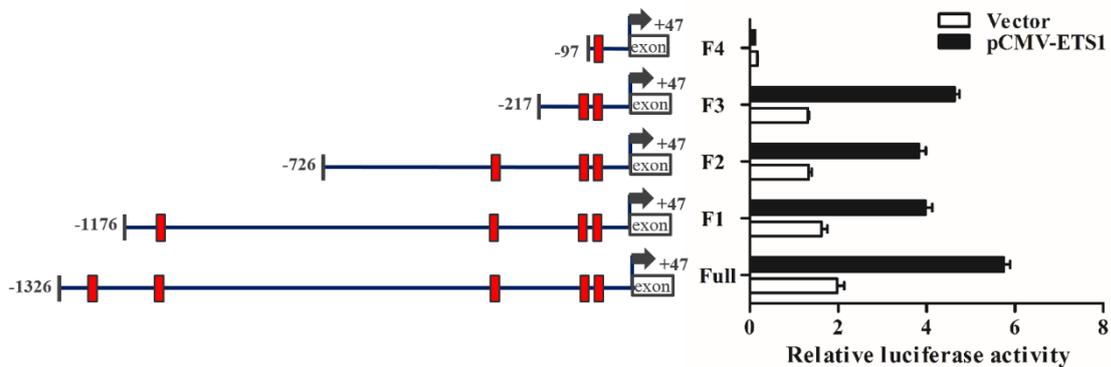
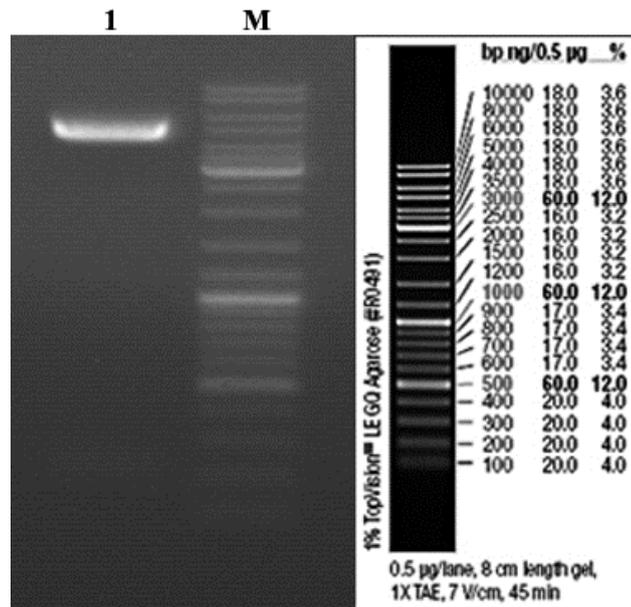


图 3-16 双荧光素酶报告基因分析转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子区截短体转录活性的影响

3.2.6 MMP1 启动子区突变体构建

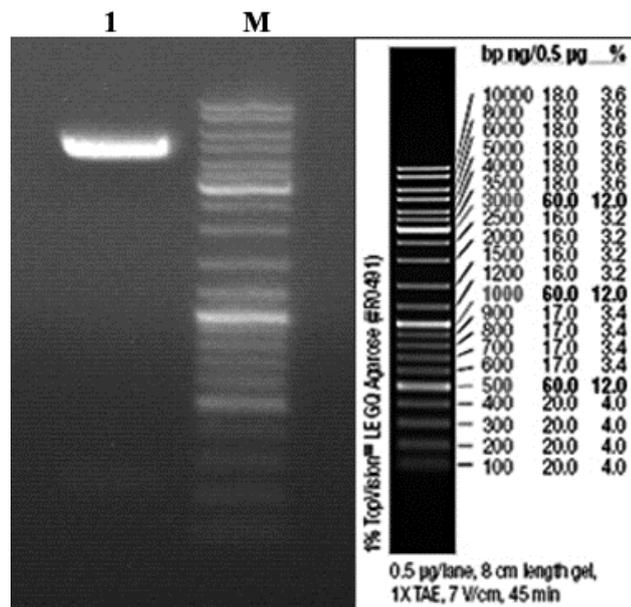
3.2.6.1 双酶切鉴定 MMP1 启动子区突变体

各突变体大提后，用 *Nhe* I 和 *Hind* III 做双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果（图 3-17、图 3-18 和图 3-19）显示，各突变体双酶切后均产生 230 bp 左右的目的片段，与预期结果（突变体 M1: 227 bp、突变体 M1: 223 bp、突变体 M1: 206 bp）相符。



M: DNA Marker ; 1: *Nhe* I、*Hind* III双酶切产物

图 3-17 MMP1 启动子区突变体 M1 酶切鉴定结果



M: DNA Marker ; 1: *Nhe* I、*Hind* III双酶切产物

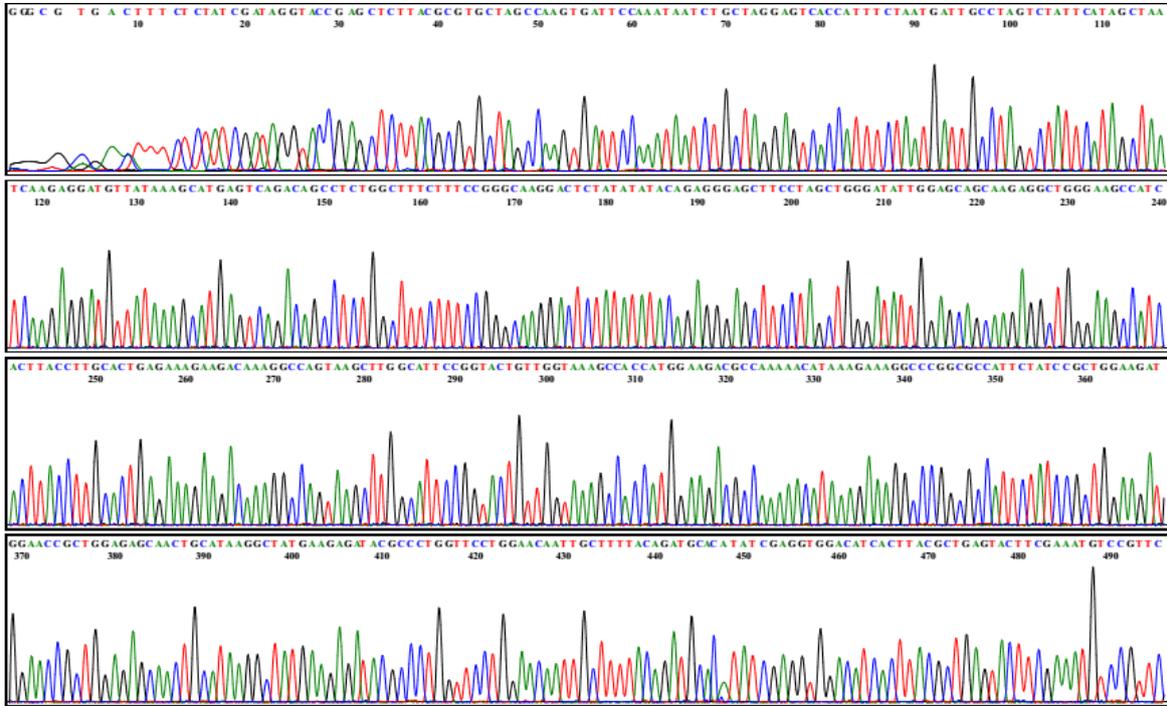


图 3-21 突变体 M2 测序图谱

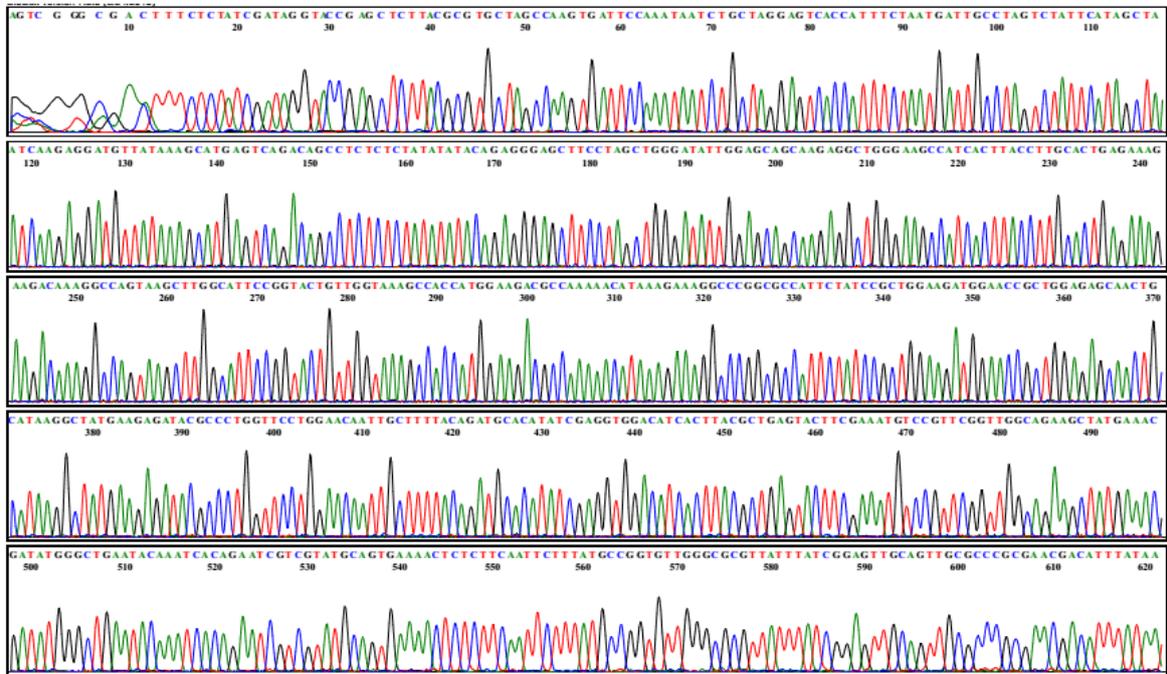


图 3-22 突变体 M3 测序图谱

3.2.7 转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子区突变体转录活性的影响

前期我们通过生物信息学分析发现, MMP1 基因转录起始位点上游-217~-97 bp 存在转录因子 ETS1 的潜在结合序列 GGCTTTCTGGAAGGGCAAGGA。转录因子 ETS1 含有一段约 85 个氨基酸的序列——DNA 结合域, 能够识别带有 GGAA/T 核心基序的靶 DNA。为了进一步明确转录因子 ETS1 在 MMP1 启动子区结合的核心序列, 我们分别构建了 3 个突变体, 通过双荧光素酶报告基因验证, ETS1 对突变体转录活性的影响。结果(图 3-23)显示, 无论是核心序列 GGAA 缺失还是突变为 TTCC, 突变体转录活性明显降低, 而 ETS1 结合序列完全删除, 突变体基本没有转录活性, 由此证实了位于 MMP1 基因转录起始位点上游-114~-111 bp 启动子序列 GGAA 可能是转录因子 ETS1 结合 MMP1 启动子的核心序列。

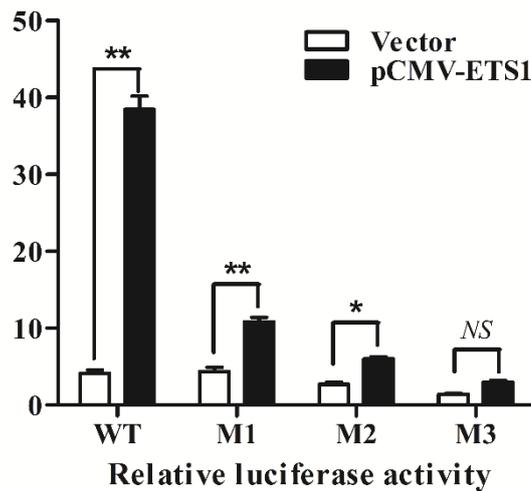
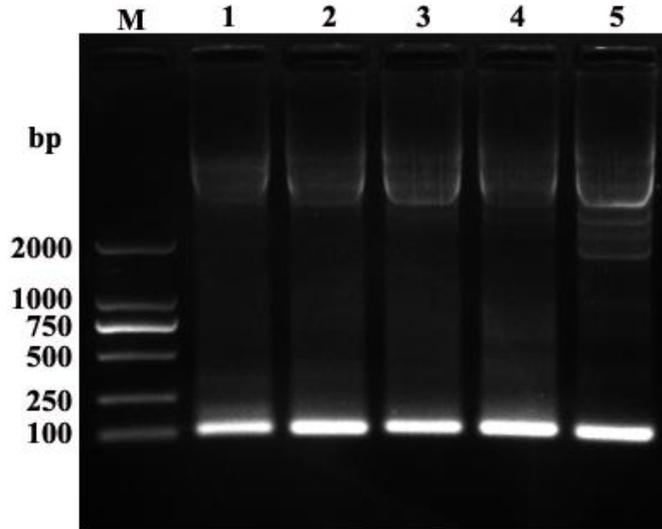


图 3-23 双荧光素酶报告基因检测转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子区突变体转录活性的影响

3.2.8 ChIP 实验鉴定转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子的结合

3.2.8.1 ChIP 实验引物特异性鉴定

根据 MMP1 启动子区潜在 ETS1 转录因子结合位点序列, 设计合成特异性引物, 通过 PCR 实验扩增 5 条包含有 ETS1 结合序列的启动子序列, 琼脂糖凝胶电泳结果(图 3-24)显示, PCR 扩增获得了特异性的目的条带, 大小约为 100 bp 左右, 与预期实验结果理论值相符, 可用于后续 ChIP 实验。

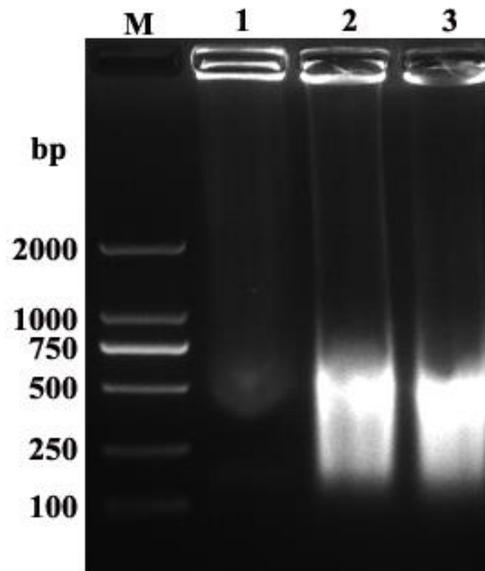


M: DNA Marker DL2000; 1: ChIP I 引物扩增产物; 2: ChIP II 引物扩增产物; 3: ChIP III 引物扩增产物
4: ChIP IV 引物扩增产物; 5: ChIP V 引物扩增产物

图 3-24 ChIP 引物特异性鉴定

3.2.8.2 DNA 超声条件优化

染色质免疫沉淀试验中对共价交联的基因组染色进行超声破碎处理以获得适当大小的 DNA 片段是后续 ChIP 实验成功的前提条件。影响基因组 DNA 破碎的因素很多，如超声时间、超声环境和超声功率等因素。通过超声条件优化摸索，结果（图 3-25）发现，冰上裂解，30%最大输出功率，脉冲超声时间 10 s，间隔超声时间 10 s，脉冲 45 次，绝大多数 DNA 片段大小位于 100~500 bp 之间，可用于后续 ChIP 实验。



M: DNA Marker DL2000; 1: 未超声染色质; 2: 染色质超声10 s,脉冲30次;
3: 染色质超声10 s,脉冲45次

图 3-25 DNA 超声优化

3.2.8.3 ChIP 实验分析转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子的结合能力

ChIP 实验分别设立了 Input 组、anti-RNA Polymerase II 抗体阳性对照、普通 Ig G 阴性对照以及 ETS1 实验组，结果显示所有 anti-RNA Polymerase II 抗体阳性对照组 PCR 都有条带出现，保证了 ChIP 实验系统合理，所有普通 Ig G 阴性对照组都没有条带出现排除了非特异结合，最终通过灰度扫描并计算，实验组与 Input 组条带亮度比值，确定转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子区域不同结合位点的结合能力。数据分析结果（图 3-26）表明，转录因子 ETS1 与 MMP1 基因转录起始位点上游-217~-97 bp 启动子序列结合能力最强。

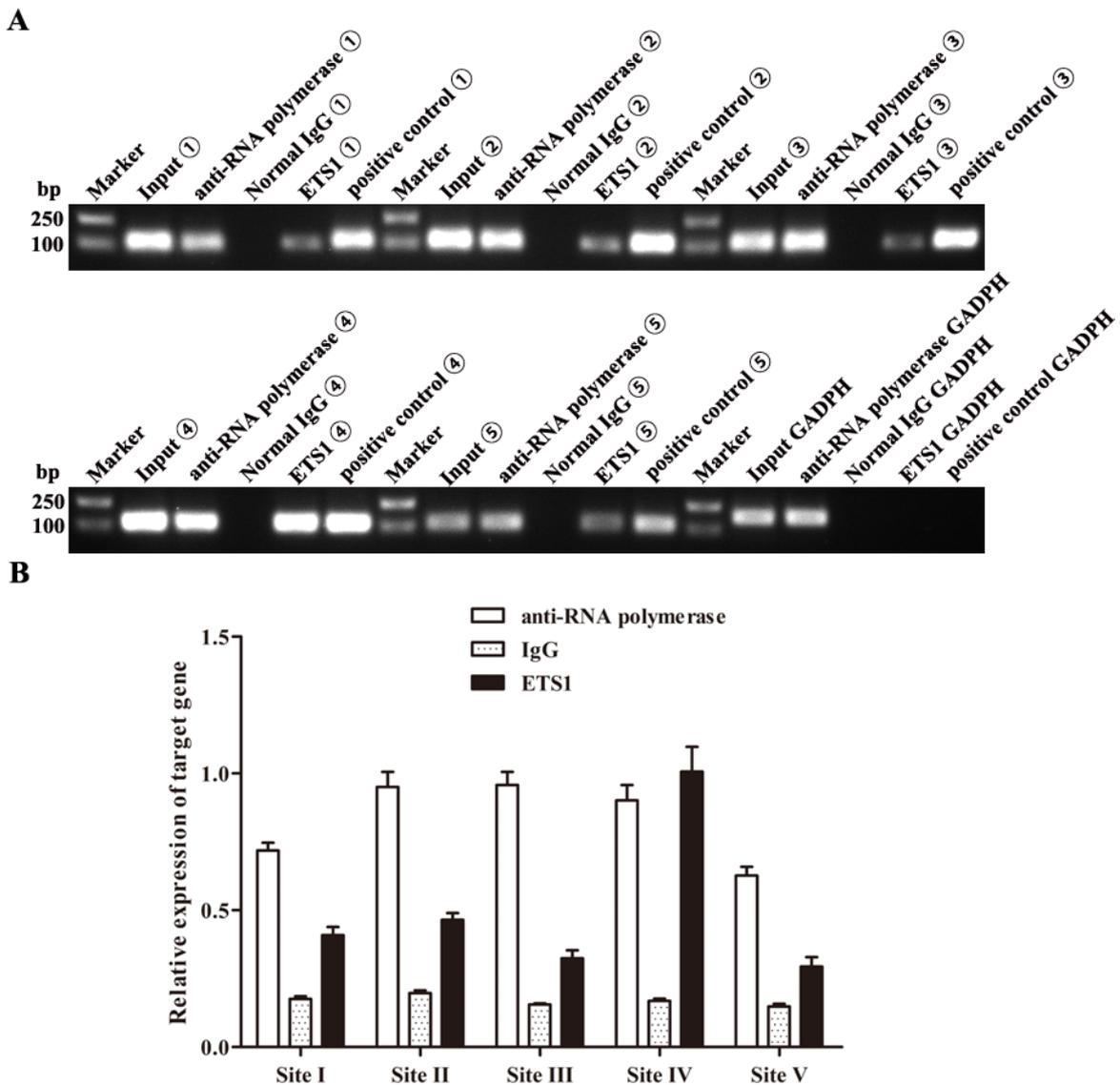


图 3-26 ChIP 实验鉴定转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子区截短体的结合能力

3.2.9 EMSA 实验验证转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子的结合区域

EMSA 凝胶迁移实验是一种研究 DNA 与蛋白质相互作用的常用技术，当核转录因子 ETS1 与合成的 MMP1 启动子探针结合后，其复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率将小于未结合转录因子的 DNA，从而检测转录因子 ETS1 能否与 MMP1 的启动子相互结合。我们首先将探针滴加到尼龙膜，经紫外交联、封闭、Streptavidin-HRP Conjugate 孵育，通过 ECL 发光鉴定了用于 EMSA 实验的探针的标记效率(图 3-27 A)；继而进行 EMSA 实验，结果(图 3-27 B)显示在细胞核蛋白存在条件下，加入生物素标记野生型探针，形成的核酸-蛋白复合在聚丙烯酰胺凝胶电泳中出现拖尾现象；当加入 50 倍过量的未标记野生型探针时，竞争与 ETS1 蛋白的结合，因而没有观察到拖尾现象；而在细胞核蛋白存在条件下，同时加入生物素标记野生型探针和转录因子 ETS1 特异性抗体，形成核酸-蛋白-抗体复合物，因此出现 Super-shift 条带。以上实验结果为转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子相互结合提供了直接的证据。

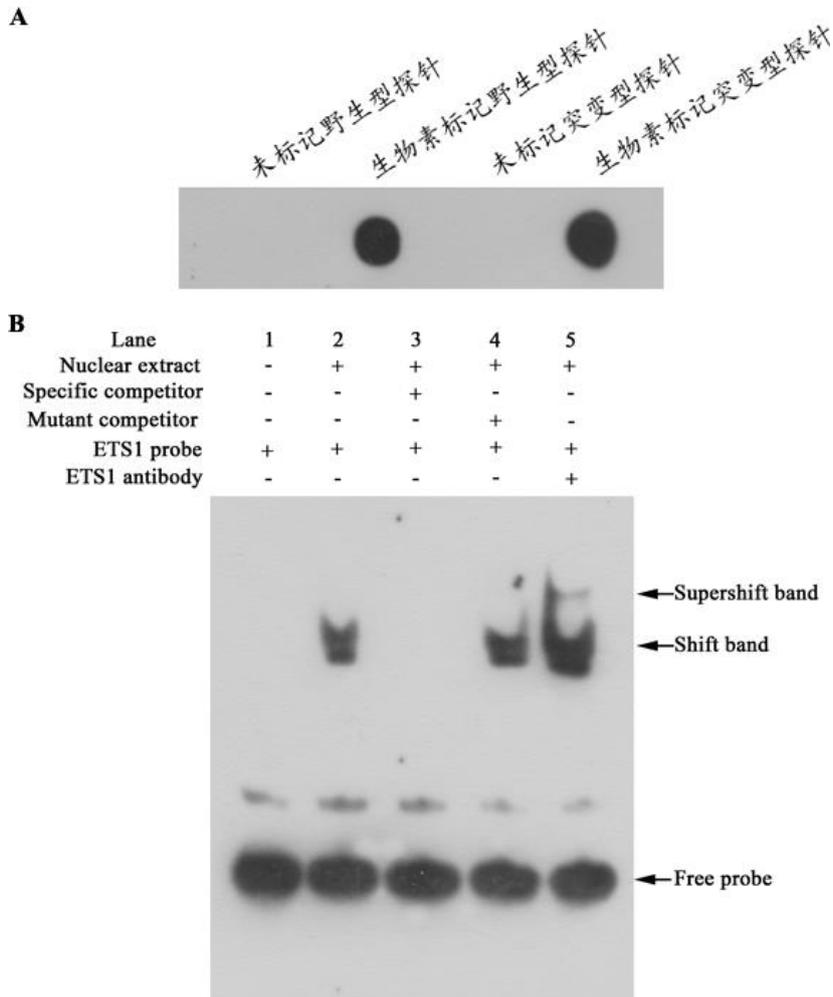


图 3-27 EMSA 实验验证转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子的结合

3.3 CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞功能的影响

3.3.1 CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞侵袭功能的影响

3.3.1.1 过表达 CYR61 促进 RA 滑膜成纤维细胞侵袭

FLS 具有“类肿瘤”样细胞的生物学特性，能够分泌基质金属蛋白酶，降解细胞外基质，通过 Transwell 实验(图 3-28 A)，观察到 FLS 接种于包被有 Matrigel 的 Transwell 上室面，经 24 h 孵育后，有 50 ± 2 个细胞穿过基质胶到达 Transwell 下室面；Ad-EGFP 病毒感染预处理的 FLS，穿过小室面的细胞数为 56 ± 4 个，与正常对照组相比，没有统计学差异 ($P > 0.05$)；而经 Ad-CYR61 感染预处理的 FLS，穿过小室面的细胞数为 142 ± 8 个，与正常对照组或与 Ad-EGFP 病毒感染组相比，具有明显的统计学差异 (** $P < 0.01$) (图 3-28 B)。以上结果表明，过表达 CYR61 能够促进 RA FLS 的细胞侵袭。

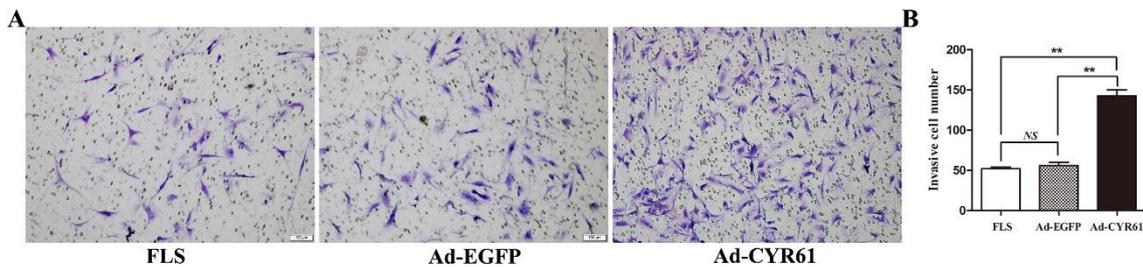


图 3-28 Transwell 实验检测 Ad-CYR61 对成纤维样滑膜细胞侵袭功能的影响 (10 \times)

3.3.1.2 CYR61 小干扰 RNA 抑制 RA 滑膜成纤维细胞侵袭

为了进一步证实 CYR61 对 RA FLS 细胞侵袭功能的影响。我们通过 Transwell 实验 (图 3-29 A)，观察到 FLS 接种于包被有 Matrigel 的 Transwell 上室面，经 48 h 孵育后，有 194 ± 14 个细胞穿过基质胶到达 Transwell 下室面；无关干扰小 RNA 转染预处理的 FLS，穿过小室面的细胞数为 183 ± 13 个，与正常对照组相比，没有统计学差异 ($P > 0.05$)；而经 siCYR61 转染预处理的 FLS，穿过小室面的细胞数为 92 ± 8 个，与正常对照组或与 siNC 病毒感染组相比，具有明显的统计学差异 (** $P < 0.01$) (图 3-29 B)。以上结果表明，干涉 CYR61 表达能够抑制 RA FLS 的细胞侵袭。

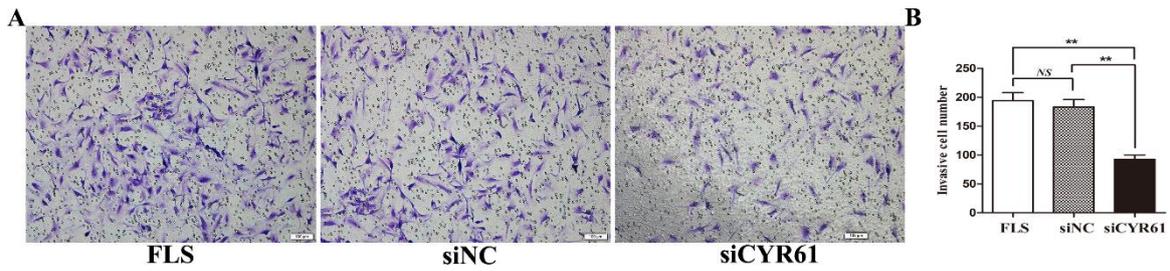


图 3-29 Transwell 实验检测 siCYR61 对成纤维样滑膜细胞侵袭功能的影响 (10×)

3.3.2 CYR61 促进 RA 滑膜成纤维样细胞的迁移

滑膜成纤维样细胞的运动能力对于研究 RA 关节软骨破坏具有重要的意义，据此我们通过细胞划痕实验评价 CYR61 对 RA FLS 细胞横向迁移的作用。结果(图 3-30 A) 显示，正常对照组、无关干扰小 RNA 处理组和 CYR61 干扰组的成纤维样滑膜细胞，划痕 72 h 后，细胞横向迁移距离分别为 $82 \pm 10 \mu\text{m}$ 、 $90 \pm 12 \mu\text{m}$ 和 $59 \pm 5 \mu\text{m}$ ，CYR61 干扰抑制了 FLS 细胞迁移；而经 II 型胶原刺激的 FLS 和无关干扰小 RNA 处理的 FLS，细胞横向迁移距离增大，分别为 $160 \pm 13 \mu\text{m}$ 和 $175 \pm 15 \mu\text{m}$ ，与未经 II 型胶原刺激的各组 FLS 之间均存在明显的统计学差异 (** $P < 0.01$) (图 3-29 B)，CYR61 干扰后即使给予 II 型胶原刺激，也无法增强 FLS 的迁移能力。由此得出结论，CYR61 在 RA FLS 细胞迁移中扮演着重要的角色，抑制 CYR61 的表达能够削弱 RA FLS 细胞迁移能力。

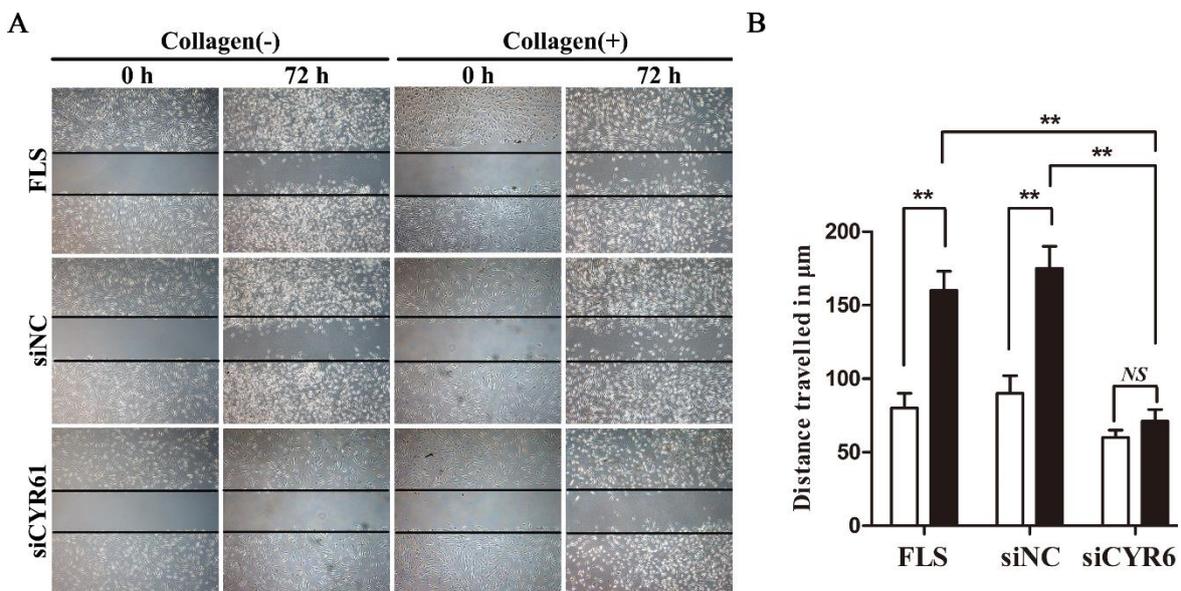


图 3-30 细胞划痕实验检测 CYR61 对成纤维样滑膜细胞迁移功能的影响 (10×)

4 讨论

CYR61 是 CCN 家族具代表性的成员,是重要的细胞基质调节因子,处于细胞内、外信号转导通路下游,参与细胞粘附、迁移、增殖、凋亡、衰老和细胞分化等过程,在肿瘤形成、软骨和骨生成、创伤愈合、血管性疾病、纤维化疾病、糖尿病视网膜病变和类风湿性关节炎中起到至关重要的作用。Nguyen 等^[103]将 CYR1 转染至低侵袭力、低表达 CYR1 的乳腺癌细胞系 MCF-7 后, MCF-7 获得高侵袭性,能诱导基质金属蛋白酶 1 (MMP1) 的生成,转染至裸鼠后形成大的癌灶,具有强致瘤性,而在高侵袭性乳腺癌细胞中干涉 CYR61 的表达可降低基质成纤维细胞的 MMP1 分泌能力,削弱乳腺癌细胞的侵袭能力。另有研究发现^[70],稳定转染 CYR61 基因的正常乳腺上皮细胞 MCF-12A 在裸鼠体内亦可诱导肿瘤形成。将重组腺病毒 Ad-CYR61 感染人骨肉瘤细胞,使其获得较强的迁移能力^[104, 105]。Young^[106]等发现,在神经胶质瘤细胞中抑制 CYR1 能明显减弱细胞侵袭力。在胃癌细胞系 AGS 中转染了 CYR1 后,可增强 COX-2 蛋白表达及酶活性^[38],而 COX-2 可通过增强基质金属蛋白酶活性和促进血管生成而促进胃癌的进展^[107, 108]。对 CYR1 促进胃癌细胞侵袭性的机制进行进一步研究,发现 CYR1 可通过 PI3K/mTOR 和 MAPK 依赖的信号通路促进低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducing factor-1 α , HIF-1 α) 蛋白合成增加,而且可诱导 HIF-1 α 介导的低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 依赖的转录活性,使 HIF-1 α 调控的侵袭相关基因纤溶酶原激活因子抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 表达上调,从而促进胃癌细胞的侵袭性^[109]。上述研究表明 CYR1 与多种肿瘤的侵袭及转移有关。RA FLS 是一种类肿瘤样细胞,也具有增殖、侵袭的特性,因此该分子在介导 RA FLS 细胞增殖及侵袭过程中可能发挥重要的生物学功能。

本实验我们首先通过首先通过腺病毒过表达 CYR61 观察 CYR61 与 MMPs 的表达相关性, Real-time PCR 和 Western-blot 结果显示,过表达 CYR61 能够促进 MMP1 的表达; CYR61 是否参与 DDR2 活化调控 MMP1 的表达过程? 我们通过 CYR61 siRNA 干涉 CYR61 的表达,反相实验证实 II 型胶原-DDR2-CYR61-MMP1 信号通路的存在。为了进一步深入探讨, CYR61 调控 MMP1 表达的具体分子机制,我们充分运用生物信息学分析, MMP1 启动子区域潜在转录因子的结合位点, Real-time PCR 和 Western-blot 验证发现, CYR61 能够调控转录因子 ETS1 的表达。

转录因子 ETS1 是原癌基因 ETS 家族中最具代表性的成员之一，ETS 家族成员还包括 ETS2、Erg、GABP、ELK、PEA3 和 ELF 等多个亚族。该家族成员包含有两个结构域：DNA 结合区域和调控区域，基因高度保守，共同特点是具有高度保守 ETS 结构域，为螺旋-转角-螺旋基序，可识别并结合富含嘌呤的 DNA 核心序列 GGAA/T。ETS1 是目前研究较多的一个成员，研究表明，ETS1 对细胞分化、增殖、血管生成^[110]、细胞凋亡、肿瘤新生血管^[111]和肿瘤侵袭转移^[112]具有重要的调控作用^[113]。

目前已有研究表明，MMPs 基因的启动子区含有 ETS1 的结合序列，ETS1 的过表达可以诱导 MMP1、MMP3、MMP7 和 MMP9 等基质金属蛋白酶的表达，从而达到参与 ECM 的降解作用^[114]。为了进一步明确 ETS1 对 MMP1 的调控作用，我们首先通过双荧光素酶报告基因验证了转录因子 ETS1 对 MMP1 启动子转录活性的调节作用；进而，构建 MMP1 启动子截短体明确 MMP1 启动子区转录因子 ETS1 的核心调控位点，结果发现转录因子 ETS1 在 MMP1 启动子区的核心调控区位于 MMP1 基因转录起始位点上游-217~-97 bp；接着，我们结合生物信息学分析结果，构建了 3 个突变体，通过双荧光素酶报告基因验证，ETS1 对突变体转录活性的影响，结果显示无论是核心序列 GGAA 缺失还是突变为 TTCC，突变体转录活性明显降低，而 ETS1 结合序列完全删除，突变体基本没有转录活性，由此证实了位于 MMP1 基因转录起始位点上游-114~-111 bp 启动子序列 GGAA 可能是转录因子 ETS1 结合 MMP1 启动子的核心序列；最终我们通过 ChIP 实验证实了转录因子 ETS1 与 MMP1 启动子区域不同结合位点的结合能力不尽相同，而转录因子 ETS1 与 MMP1 基因转录起始位点上游-217~-97 bp 启动子序列结合能力最强，EMSA 实验进一步明确了转录因子 ETS1 与 MMP1 基因转录起始位点上游-122~-102 bp 启动子序列之间存在直接结合，阐明 CYR61 调控下游效应分子的具体分子机制。同时，为了考究 II 型胶原刺激 DDR2 活化促进 CYR61 的表达，诱导下游效应分子 MMPs 的产生，从而降解细胞外基质，增强 FLS 的侵袭迁移功能这一假说的成立，我们还需要通过 Transwell 和细胞划痕实验检测关键分子 CYR61 对 RA 滑膜成纤维样细胞侵袭功能的影响，来完善证据链。结果表明，CYR61 在 FLS 侵袭迁移中具有重要的作用，siRNA 阻断 CYR61 的表达能够明显抑制 FLS 的细胞侵袭功能。通过以上实验设计，最终证实 II 型胶原-DDR2-CYR61-MMPs 通路的存在，阐明 CYR61 对 MMPs 的调控机制，为 RA 发病机理的研究奠定基础，又可发现新的药物靶位。

第四部分 CYR61 对 CIA 大鼠关节软骨破坏的影响

引言

前期我们通过体外实验证实了 DDR2 活化能够增强转录因子 AP-1 与 CYR61 启动子区的结合活性，从而诱导 CYR61 启动子转录活性升高，促进 CYR61 的表达。而 CYR61 通过上调 ETS1 的表达影响 MMP1 的蛋白水平，从而促进 RA FLS 细胞的侵袭转移。

为进一步明确 DDR2-CYR61-MMP1 通路在 RA 关节软骨损伤中的作用，我们进行了活体动物实验。通过 II 型胶原和完全弗氏佐剂混合尾根部皮下注射的方法制备大鼠 CIA 模型。通过体重监测、累积关节炎发生率、足跖厚度、关节炎指数评分等指标评价干扰腺病毒 shCYR61 对大鼠炎症反应的缓解作用；继而，运用 X 射线以及 Micro CT 结合 3D 重建技术，分析干扰腺病毒 shCYR61 对 CIA 大鼠关节软骨损伤的治疗作用；最后，利用 HE 染色比较干扰腺病毒 shCYR61 局部治疗的组织病理学变化情况。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF(specific pathogen-free, SPF)级 Wistar 大鼠 40 只，雌性，7~8 周龄，体重 200~220 g。

1.2 主要试剂

苦味酸	西亚试剂
0.9% NaCl 注射液	辰欣药业公司
甲醇	西安化学试剂厂
BSA	北京鼎国生物工程公司
戊巴比妥钠	上海伟进生物有限公司
甘氨酸	华美生物工程公司

SDS	华美生物工程公司
丙烯酰胺	华美生物工程公司
Tween-20	华美生物工程公司
RIPA 细胞裂解液	碧云天生物技术研究
PMSF	碧云天生物技术研究
鼠抗 β -actin 单克隆抗体	北京康为世纪生物科技有
HRP 标记的二抗	北京康为世纪生物科技有
TEMED	德国 Serva 公司
β -巯基乙醇	美国 Sigma 公司
Tris 碱	美国 Sigma 公司
完全弗氏佐剂	美国 Sigma 公司
感光胶片	美国 Kodak 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	美国 Thermo 公司
ECL 化学发光显色液	美国 Thermo 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
牛 II 型胶原	美国 Chondrex 公司
预染蛋白 Marker	美国 Fermentas 公司
兔抗鼠 CYR61 多克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司

1.3 主要仪器

微米 X 射线三维成像系统	德国 YXLON 公司
FA1604S 型电子天平	上海天平仪器厂
PHS-3C 型精密 pH 计	上海雷磁仪器厂
TH-2C 恒温震荡器	江苏太仓实验设备厂
5415C 台式离心机	德国 Eppendorf 公司
高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
生化培养箱	日本 SANYO 公司
制冰机	日本 SANYO 公司
IX70 倒置显微镜	日本 Olympus 公司

蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
Western-blot 转印仪	美国 Bio-Rad 公司
GS-15R 高速台式冷冻离心机	美国 Beckman 公司

2 实验方法

2.1 干涉腺病毒 Ad-shCYR61 的包装及其感染效率鉴定

2.1.1 pDC316-ZsGreen-ShRNA-CYR61 腺病毒载体构建

1) shRNA 片段的合成

合成序列如下:

shCYR61 Forward:

5'-GCGAGATGTTCTCCAAGAATTCAAGAGATTCTTGGAGAACATCTCGCTT
TTTTAGATCTG-3'

shCYR61 Reverse:

5'-GATCCAGATCTAAAAAAGCGAGATGTTCTCCAAGAATCTCTTGAATTCT
TGGAGAACATCTCGC-3'

- 2) 分别取对应 2 μL DNA 引物片段, 加入至 16 μL 退火 Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0) 中, 充分混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 退火自然冷却至室温, 退火产物分别用无菌水稀释 100 倍;
- 3) 载体 pDC316-ZsGreen-ShRNA 用限制性内切酶 *Pst* I 单酶切, 酶切体系如下:

组分	体积
pDC316-ZsGreen-ShRNA	2 μg
10 \times Buffer	3 μL
<i>Pst</i> I	1 μL
ddH ₂ O 补足	30 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 min, PCR 产物胶回收。

- 4) pDC316-ZsGreen-ShRNA *Pst* I 单酶切回收质粒的 Klenow 酶末端补齐。

反应体系如下:

组分	体积
----	----

质粒	17 μ L
10 \times Buffer	2 μ L
Klenow	0.5 μ L
dNTP	0.5 μ L

37 $^{\circ}$ C 反应 20 min, PCR 产物胶回收。

- 5) pDC316-ZsGreen-ShRNA *Pst* I Klenow N 端补平后, 再用限制性内切酶 *Bam*H I 单酶切, 反应体系如下:

组分	体积
目的质粒回收产物	26 μ L
10 \times Buffer	3 μ L
<i>Bam</i> H I	1 μ L

37 $^{\circ}$ C 反应 40 min 然后跑胶用琼脂糖凝胶试剂盒回收。

- 6) 质粒 pDC316-ZsGreen-ShRNA 回收大片段与 shCYR61 的稀释退火产物的连接, 16 $^{\circ}$ C 水浴反应过夜。连接反应体系如下:

组分	体积
pDC316-ZsGreen-ShRNA 大片段	1 μ L
ShRNA 退火产物	1 μ L
10 \times DNA Ligase Buffer	1 μ L
T ₄ DNA Ligase	1 μ L
ddH ₂ O	6 μ L

- 7) 取 10 μ L 上述连接产物加入 100 μ L DH 5 α 感受态细菌中, 于冰上混匀后孵育 30 min; 42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 90 s, 立即取出置于冰上孵育 2 min; 将混合物与 400 μ L 无抗性的 LB 培养基混匀, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中, 250 rpm/min, 孵育 1 h; 用移液器吸取 200 μ L 转化产物加入含 100 μ g/mL Ampicillin 的 LB 培养板中, 涂布均匀后倒置于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱中, 孵育过夜;
- 8) 挑取单菌落接种于 LB 培养液 (含 5 mL, 100 μ g/mL Ampicillin) 中, 置于恒温摇床, 37 $^{\circ}$ C, 250 rpm, 培养过夜;
- 9) 抽提质粒, 用 *Bgl* II 进行酶切鉴定;

- 10) 将酶切鉴定符合预期结果的重组质粒样本交由上海生工生物工程有限公司进行测序。

2.1.2 pDC316-ZsGreen-ShRNA-CYR61 腺病毒包装

- 1) 取对数生长期的 HEK293 细胞，按照 5×10^5 /孔细胞密度接种于含有 10%FBS 的 DMEM 培养基的 6 孔细胞培养板中，置于 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养；
- 2) 待细胞融合度达 80~90%时，将细胞培养基更换为 Optic-MEM 无血清培养基。同时，将 4 μg 骨架质粒 pBHGlox_E1,3Cre 和 1 μg 穿梭质粒 pDC316-ZsGreen-ShRNA-CYR61 溶于 250 μL Optic-MEM 无血清培养基配制成 A 液，将 10 μL Lipofectamine® 2000 溶于 250 μL Optic-MEM 无血清培养基配制成 B 液，混匀室温静置 5 min；
- 3) 将 AB 液混合，静置 20 min 后，将转染混合液逐滴加入 6 孔细胞培养板中，轻轻混匀，置于 37 °C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育；
- 4) 转染 6 h 后将培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h；
- 5) 待细胞长满后常规消化传代，接种于含有 5%FBS 的 DMEM 培养基的 25 cm² 细胞培养瓶中继续培养；
- 6) 待细胞长满后常规消化传代，接种于含有 5%FBS 的 DMEM 培养基的 75 cm² 细胞培养瓶中继续培养，每天观察细胞出毒迹象；
- 7) 当细胞收缩变圆逐渐从瓶底脱落，细胞形态呈葡萄状时进行收毒；
- 8) 将出毒的细胞置于-70 °C 冰箱和 37 °C 水浴锅中反复冻融三次，室温，3000 rpm，离心 5 min，收集上清液，即为病毒母液 (P1)。
- 9) 病毒扩增：常规 HEK293 细胞，待细胞融合度达到 80~90%时，加入 P1 代病毒母液，感染 48 h 后收毒，将出毒的细胞置于-70 °C 冰箱和 37 °C 水浴锅中反复冻融三次，室温，3000 rpm，离心 5 min，收集上清液；扩增至 P3 代，用腺病毒纯化试剂盒纯化病毒；
- 10) 病毒生物学滴度测定：常规培养 HEK293 细胞，待细胞融合度达 80~90%时，消化细胞并进行细胞计数，按 1×10^4 cell/孔细胞密度将 HEK293 细胞接种于 96 孔板，每孔含有 90 μL 培养基，用含有 5%FBS 的 DMEM 培养基 10 倍梯度稀释上述纯化

的病毒（如下图），每个病毒浓度设立 4 个平行复孔，感染 48 h 后，通过荧光显微镜观察并计算每孔荧光细胞数量。一般情况下，在最高病毒稀释度 m 的孔中可观察 N ($N < 10$) 个荧光细胞，同时计算平行复孔中荧光细胞的数量，求取平均值 a ，则病毒滴度为 $a \times 10^m / \text{mL}$ (m 为稀释度)，若 $N > 10$ ，则需继续稀释。

滴定量	1 μL	0.1 μL	0.01 μL	0.001 μL	0.0001 μL
病毒液	5or10	10	10	10	10
DMEM 完全培养基	45or90	90	90	90	90
上样量	10	10	10	10	10

2.1.3 干扰腺病毒 Ad-shCYR61 感染 FLS 效率鉴定

- 1) 将 RA FLS 接种于 100 mm 细胞培养皿，待细胞融合度达约 80% 时，加入 $\text{MOI}=50$ 干扰腺病毒 Ad-shCYR61 以及无关干扰病毒 Ad-Scramble 进行感染；
- 2) 病毒感染 FLS 细胞 6 h 后，更换为含有 20% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 48 h；
- 3) 荧光显微镜观察干扰腺病毒 Ad-shCYR61 和 Ad-Scramble 的感染情况，根据荧光强度，初步确定干扰腺病毒感染 FLS 的效率及最佳感染滴度；
- 4) 收集细胞，提取细胞总蛋白并进行 BCA 蛋白定量；
- 5) 调整蛋白浓度，行 Western-blot 鉴定干扰腺病毒 Ad-shCYR61 干扰效率。

2.2 抗原乳化

将等体积的完全弗氏佐剂和浓度为 2 mg/mL 胶原溶液分别装入两个 5 mL 注射器内，尽量排除空气，用医用三通连接注射器制备成简易的抗原乳化器，接口处用封口膜固定，两手各持一注射器交替推动约 20~30 min，可形成白色乳状物（乳化全过程置于冰上操作，确保注射器内容物处于低温状态，防止胶原变性），最终将乳化剂滴加于水中检测抗原乳化效果，转移至 1 mL 注射器中。乳化效果判断：滴入水中的乳化剂呈球形滴状，具有油包水剂的特性，悬浮于水面上，且 5 min 内不分散，保持形态完整，即认为乳化成功，可用于后续动物免疫。

2.3 实验设计与分组

将大鼠随机分为 4 组：① 正常对照组；② CIA 模型对照组；③ 无关干扰腺病毒治疗组；④ shCYR61 腺病毒治疗组。每组 10 只大鼠，分别编号并用苦味酸做标记。

2.4 免疫

将大鼠以 2% 戊巴比妥钠（注射剂量 0.2 mL/g）腹腔注射麻醉后，剪去尾根部的毛发，消毒后，在距离尾根部 2 cm 位置插入注射器直至针头距离尾根部 0.5 cm 处皮下注射 200 μ L 胶原-佐剂诱导剂，正常对照组注射 200 μ L 生理盐水。

2.5 腺病毒 shCYR61 局部治疗

胶原诱导第 3 天，除正常对照组外，其余三组动物经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后，俯卧位膝关节伸直后，自关节间隙外侧进针，向关节腔注入 20 μ L shCYR61 干扰腺病毒或无关干扰腺病毒（滴度为 5×10^9 pfu），CIA 模型对照组注射等量的生理盐水。与此同时在脚踝关节附近皮下及肌肉组织中注射 20 μ L shCYR61 干扰腺病毒或无关干扰腺病毒（滴度为 5×10^9 pfu），模型对照组注射等量生理盐水。每隔 7 d 重复注射 1 次，腺病毒治疗共 3 次，胶原诱导 21 d 后观察治疗效果。

2.6 一般情况观察

自免疫时起至免疫后 6 周处死时，每日观察大鼠饮食、水量、排泄，足爪有无红肿及其活动情况，每周进行一次体重测量。

2.7 CIA 大鼠足跖肿胀程度比较

胶原诱导 3 周后，每隔 4 d 用游标卡尺测量各实验组大鼠后足跖厚度，分别求取平均值，比较干扰腺病毒 shCYR61 局部治疗后 CIA 大鼠足跖肿胀程度。

2.8 CIA 大鼠临床关节炎指数评分

胶原诱导 3 周后，每隔 4 d 由两位对实验分组不知情的观察者分别对大鼠关节炎程度进行评分，求取平均值。根据文献报道^[115]，评分标准如下：0 分，无红肿；1 分，趾关节稍肿，足爪或足垫单个区域有炎症反应；2 分，关节轻度红肿，足爪和足垫或踝关节 2 个区域以上有炎症反应；3 分，关节中度红肿，轻度功能障碍；4 分，关节重度红肿，僵直甚至畸形，严重功能障碍。

2.9 X 射线评估腺病毒 shCYR61 的治疗效果

自免疫时起至免疫后 6 周后对大鼠后足爪行 X 射线摄片检查患足病变情况，并与正常对照组做比较。根据关节破坏和骨侵蚀程度^[116]，设定评分标准如下：0 分，无损伤；1 分，轻度骨损伤，表现为 1 个闪亮的光点；2 分，中度骨损伤，3 分，显

著性骨损伤，表现为多个区域有 2~4 个光点；4 分，严重骨侵蚀累及关节；5 分，关节完全破坏。

2.10 Micro-CT 扫描评价腺病毒 shCYR61 治疗对 CIA 大鼠关节损伤的影响

胶原诱导 6 周后给予大鼠 2%戊巴比妥钠腹腔麻醉后，大鼠右下肢常态固定，Micro-CT 扫描右侧膝关节、踝关节及右足。扫描参数为电压 80 kV，电流 500 μ A，360 度扫描，曝光时间 1200 ms，平均帧数 2，扫描分辨率 20.89 μ m。扫描后原始数据用 Cobra 软件进行数据三维重建后转入 Inveon research workplace (version 2.2.0) 工作站进行处理。根据是否存在软组织肿胀、骨质破坏及关节畸形等征象比较关节损伤程度。

2.11 HE 染色观察腺病毒 shCYR61 对关节软骨损伤的治疗效果

- 1) 取材：于胶原免疫后 6 周时，以 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后引颈处死。
截取大鼠双侧膝关节以及包括踝关节在内的整个足爪；
- 2) 固定：将收集的标本用生理盐水冲洗一下，置于 10%中性福尔马林固定 24 h；
- 3) 脱钙：用 14%EDTA 脱钙液浸泡标本，室温脱钙约 4~5 周，每周更换新鲜的脱钙液，直至大头针能轻易刺穿骨组织；
- 4) 脱水：50%酒精 → 70%酒精 → 80%酒精 → 95%酒精 → 100%酒精 → 100%酒精，每级 0.5 h；
- 5) 透明：1/2 二甲苯+1/2 无水乙醇 (2 h) → 纯二甲苯 (1.5 h) → 纯二甲苯 (1.5 h)；
- 6) 浸蜡：将处理的材料置于 1/2 石蜡+1/2 二甲苯中，40 $^{\circ}$ C 烘箱 40 min，再放入石蜡 I 30 min、石蜡 II 40 min；
- 7) 包埋：先将恒温箱的温度提升至 60 $^{\circ}$ C，换纯蜡 3 次，每次 1~2 h，将蜡块模具置于 45~60 $^{\circ}$ C 的烫板上，放入样品并摆放好位置，将样品标签正面朝外置于底部，补足石蜡；
- 8) 切片：将固定好的石蜡块安装于切片机的夹物台上，将石蜡块与刀口之间调整至合适的角度和位置，用右手摇动转轮使蜡块被切成蜡带的同时，左手持毛笔把蜡带提起，蜡带长度达 20~30 cm 时，右手持另一支毛笔将蜡带轻轻的挑起，避免卷曲并牵引成带，平放在蜡带盒上，将靠刀面的较光滑的一面向下，较皱的一面向上，切取一小段蜡片，通过显微镜观察切片效果；

- 9) 粘片：将粘贴剂滴加于薄玻片上，取切片浮置于粘贴剂上，然后置于烘片台上，使切片展开烫平，以蜡片不现皱纹为度，将切片依次排好，最后用滤纸吸除多余水分，并用记号笔在载玻片上编号，放入 37 °C 温箱中烘干过夜；
- 10) 脱蜡与染色：纯二甲苯（10~20 min）→ 纯二甲苯（5~10 min）→ 1/2 二甲苯+1/2 纯酒精 → 无水乙醇 → 95% 酒精 → 85% 酒精 → 70% 酒精 → 50% 酒精 → 自来水冲洗 10 s → 切片放入苏木精中染色 10~30 min → 自来水流水冲洗 15 min 使切片颜色变蓝；
- 11) 分化和漂洗：将切片置于 1% 盐酸乙醇液中浸洗褪色，约 2~10 s，观察至切片变红，颜色较浅终止，用自来水流水冲洗切片使其恢复蓝色；
- 12) 脱水 I 和复染：切片依次浸入 50% 酒精（3~5 min）→ 70% 酒精（3~5 min）→ 80% 酒精（3~5 min），于切片上滴加 0.5% 伊红酒精溶液复染 1~3 min；
- 13) 脱水 II 和透明：用 95% 乙醇将切片中多余的红色洗去，然后无水乙醇中浸洗 3~5 min，进而用吸水纸去除残余的乙醇，最后将切片置于二甲苯 I、II 中各浸洗 3~5 min；
- 14) 封藏：将染色完成的切片取出，避免二甲苯干燥，迅速使用移液器将树胶滴加在组织上，盖上盖玻片，待凝固后通过显微镜观察 HE 染色结果。

2.12 统计学处理

运用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 Student's *t* 检验分析，所有实验均重复 3 次，实验结果以 $x \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 干涉腺病毒 Ad-shCYR61 的包装及其感染效率鉴定

3.1.1 pDC316-ZsGreen-ShRNA-CYR61 腺病毒载体构建

3.1.1.1 重组质粒 pDC316-ZsGreen-ShRNA-CYR61 酶切鉴定结果

由于载体 pDC316-ZsGreen-ShRNA 骨架和 CYR61 基因片段上均含有一个 *Bgl* II 酶切位点，因此通过 *Bgl* II 单酶切，可产生 600 bp 左右酶切产物。琼脂糖凝胶电泳结果（图 4-1）显示，*Bgl* II 酶切 pDC316-ZsGreen-ShRNA-CYR61 重组质粒，产生

3.1.2 干扰腺病毒 Ad-shCYR61 感染 FLS 效率鉴定

干扰腺病毒 Ad-shCYR61 以及 Ad-Scramble 感染 FLS 48 h 后,经荧光显微镜观察 (图 4-3 A) 发现, MOI=50 干扰腺病毒感染 FLS 效率能够达到 90% 以上, 通过 Western-blot 进一步检测腺病毒 shCYR61 的干扰效率, 结果 (图 4-3 B&C) 显示干扰腺病毒 Ad-shCYR61 与无关干扰腺病毒相比, 能够显著性的抑制目的基因 CYR61 的表达, 干扰效率达到 70% 以上, 可用于后续局部治疗。

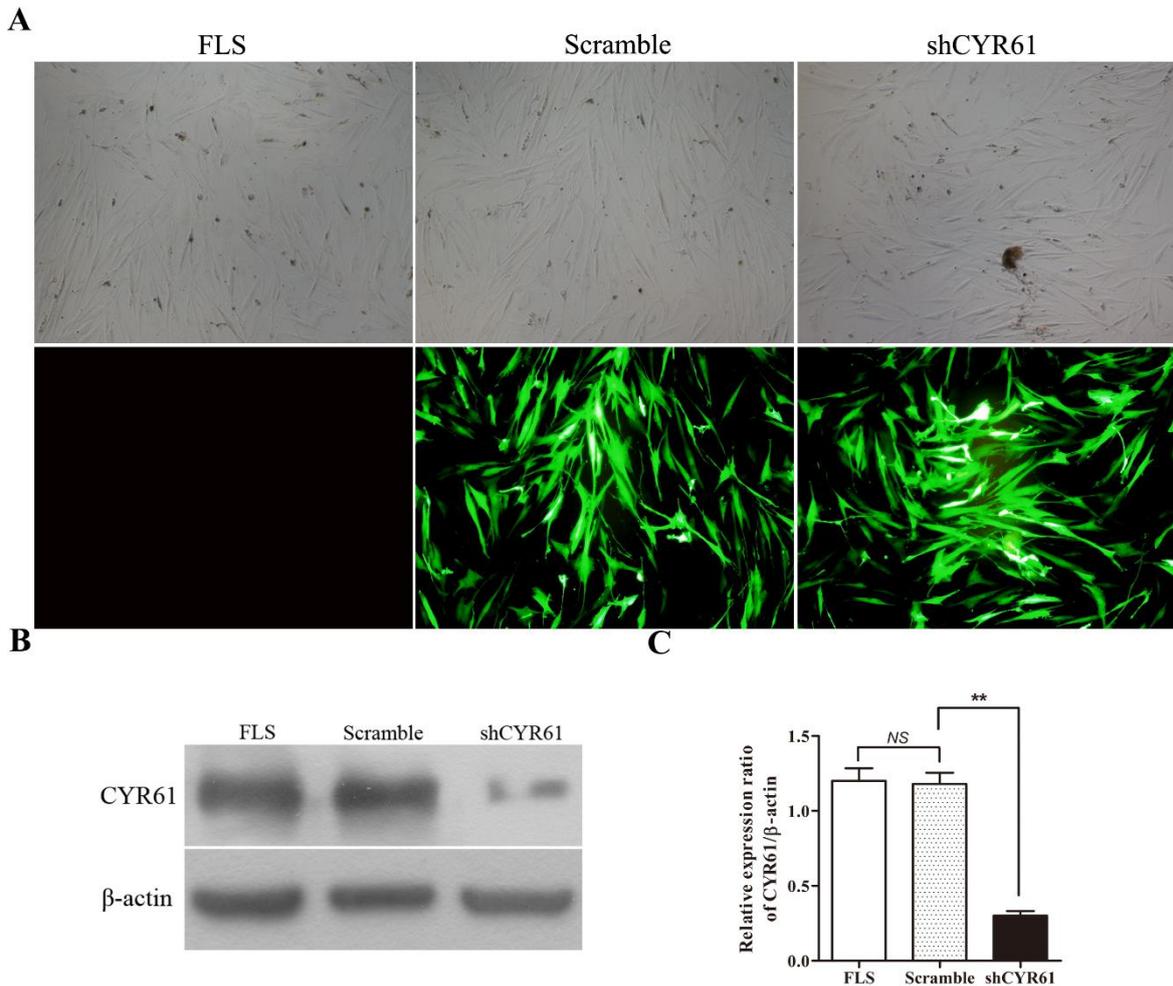


图 4-3 干扰腺病毒 Ad-shCYR61 干扰效率鉴定

3.2 一般情况观察

正常对照组大鼠饮食、饮水、排泄正常, 体重平均每周增长 60~70 g 毛色有光泽, 四肢无明显发红肿胀, 活动自如。而胶原诱导关节炎大鼠食欲较差, 体形消瘦, 毛色暗淡无光泽, 易脱毛, 行动受限。胶原免疫约 3 周时, 各 CIA 组大鼠开始出现足

爪红肿，免疫 3~4 周病变进入急性期，CIA 模型组和无关腺病毒治疗组大鼠食欲较差，体重急剧下降，受累足明显红肿，无法负重，出现跛行，而腺病毒 shCYR61 治疗组大鼠食欲较好，体重有所增加，足爪红肿程度较轻优于 CIA 模型组和无关腺病毒治疗组，仍旧行为活泼。免疫 4~5 周病变进入慢性期，各 CIA 组大鼠红肿略消退，体重有所回升，CIA 模型组和无关腺病毒治疗组关节逐渐出现畸形、僵直，行为受限，而腺病毒 shCYR61 治疗组大鼠饮食、活动基本恢复正常（图 4-4）。

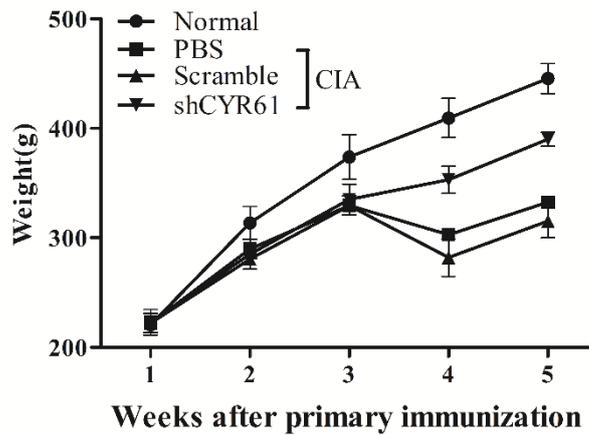


图 4-4 体重监测结果

3.3 干扰腺病毒抑制 CYR61 的表达能够缓解 CIA 大鼠炎症反应

通过 Western-blot 实验，结果（图 4-5 A）表明正常大鼠滑膜组织中 CYR61 表达较低，而大鼠经 II 型胶原诱导产生关节炎时 CYR61 表达量升高，我们利用腺病毒干扰的方法，将腺病毒 shCYR61 局部注射入 CIA 大鼠膝关节间隙及踝关节周围组织，CYR61 表达量显著下调，提示腺病毒 shCYR61 具有理想的活体靶基因干扰效果。在 CIA 模型对照组和无关干扰腺病毒治疗组中，随着时间的积累，大鼠关节炎的发生率不断升高，达到 80%，后足红肿、关节僵硬程度日益加重（图 4-5 B）。相比之下，CIA 大鼠给予腺病毒 shCYR61 局部注射治疗后，关节炎的发生率和严重程度得到了明显缓解。胶原免疫后 6 周，shCYR61 治疗大鼠与对照病毒治疗大鼠之间临床关节炎指数评分具有显著性的差异（图 4-5 C）。通过进一步大鼠后足厚度测量，分析干扰 CYR61 的表达对于 CIA 大鼠的作用，结果（图 4-5 D）与临床指数评分一致，都证实了抑制 CYR61 的表达能够明显的缓解 CIA 大鼠的炎症反应程度。

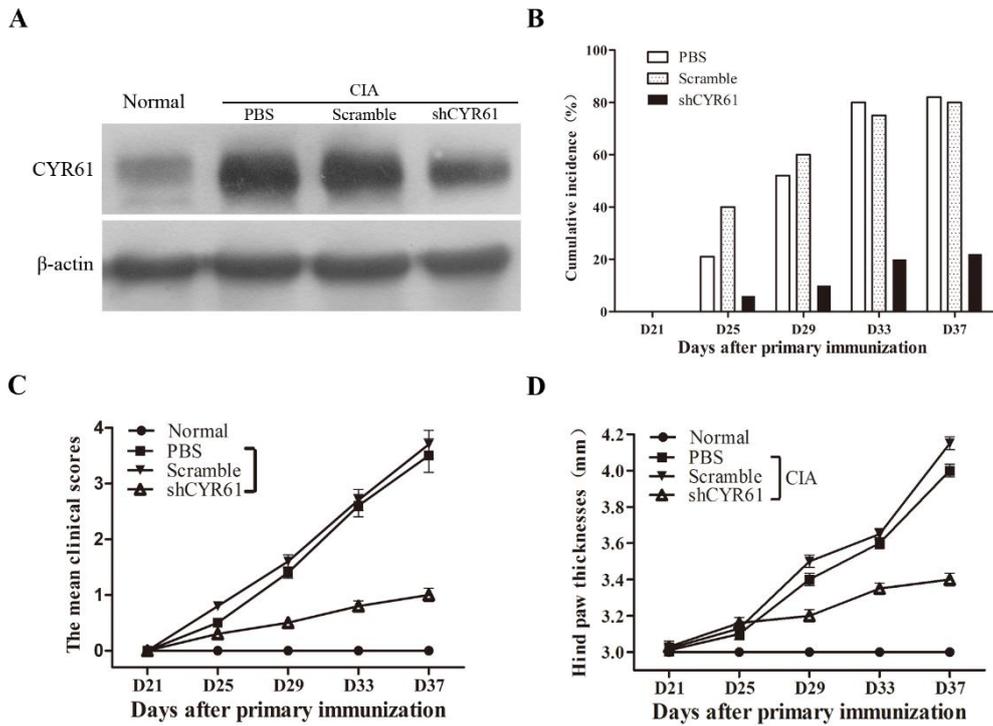


图 4-5 干扰腺病毒抑制 CYR61 的表达能够缓解 CIA 大鼠炎症反应

3.4 X 射线评估腺病毒 shCYR61 的治疗效果

于免疫后 6 周进行 X 线摄片，结果（图 4-6 A）显示，正常对照组大鼠足部软组织无肿胀，而 PBS 与对照病毒治疗组发病大鼠软组织明显肿胀；正常大鼠的关节间隙清晰，无骨质疏松现象，相比之下，PBS 与对照病毒治疗组大鼠出现典型 CIA 症状，包括关节面模糊，关节间隙狭窄，出现骨质疏松，关节强直等现象。然而，shCYR61 治疗组大鼠虽存在软组织一定程度的肿胀，骨损伤却显著性的降低。影像学评分结果（图 4-6 B）显示，shCYR61 治疗组与 PBS 治疗组之间的差异，具有统计学意义 ($P < 0.05$)，PBS 与对照病毒治疗组之间的差异，无统计学意义 ($P > 0.05$)。

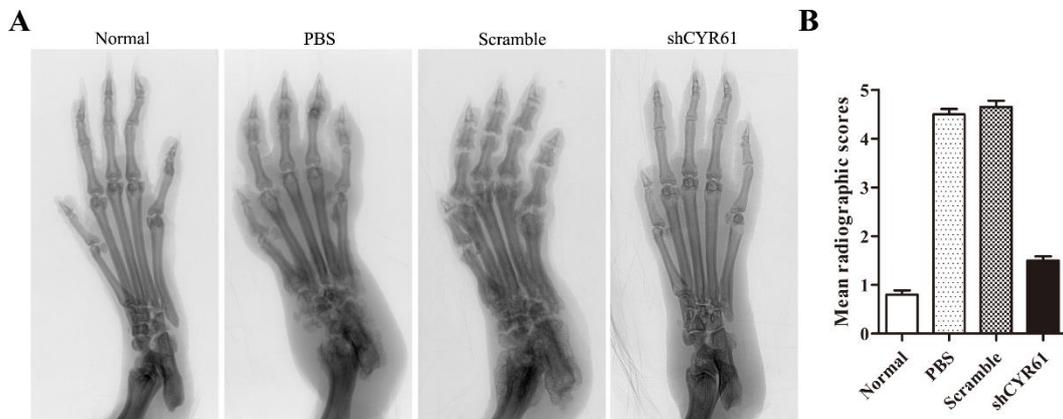


图 4-6 X 射线评估腺病毒 shCYR61 的治疗效果

3.5 Micro-CT 扫描评价腺病毒 shCYR61 治疗对 CIA 大鼠关节损伤的影响

于免疫后 6 周分别对各实验组大鼠右足趾关节、踝关节及膝关节行 Micro-CT 扫描及三维重建分析。结果发现，模型对照组和无关干扰腺病毒治疗组大鼠右后足趾关节多发成角畸形（图 4-7 A），踝关节骨质破坏显著（图 4-7 B），膝关节股骨下端髌骨附着处、胫骨近端腓侧及腓骨小头可见大量骨质破坏（图 4-7 C）。shCYR61 干扰腺病毒治疗后可显著减轻膝关节和踝关节的骨质破坏。

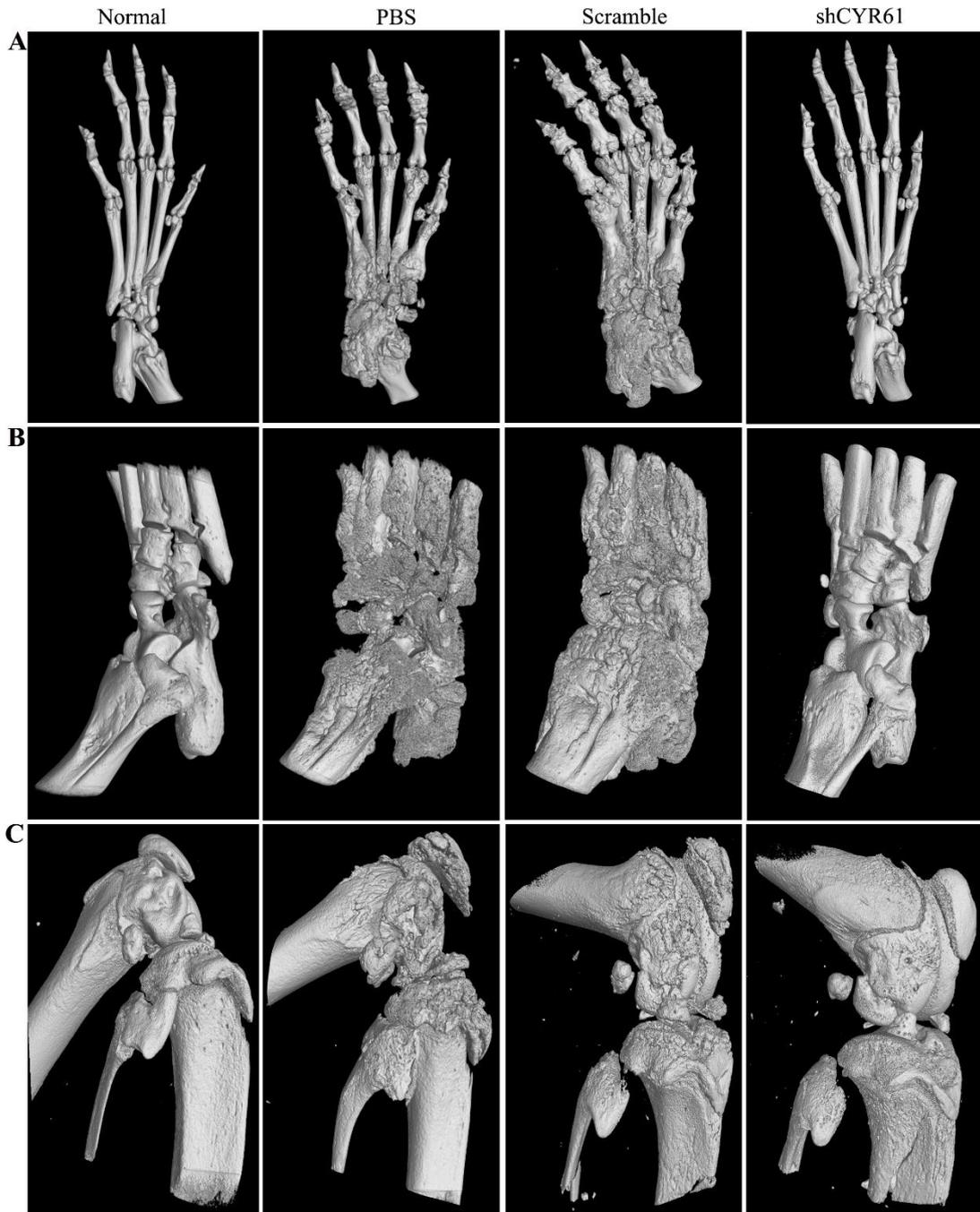


图 4-7 X 射线评估腺病毒 shCYR61 的治疗效果

3.6 HE 染色观察腺病毒 shCYR61 对 CIA 大鼠关节软骨损伤的治疗效果

于免疫后 6 周大鼠患侧膝关节行组织病理学检查。HE 染色结果如图（图 4-8）所示，和正常空白对照组相比，模型对照组和无关干扰腺病毒组大鼠膝关节滑膜组织明显增生肥厚，滑膜周围结缔组织中有大量淋巴细胞和少量中性粒细胞浸润，有丰富的血管翳形成，关节软骨及软骨下骨侵蚀破坏严重，给予 shCYR61 干扰腺病毒治疗后则可显著缓解滑膜增生和关节的炎症反应。

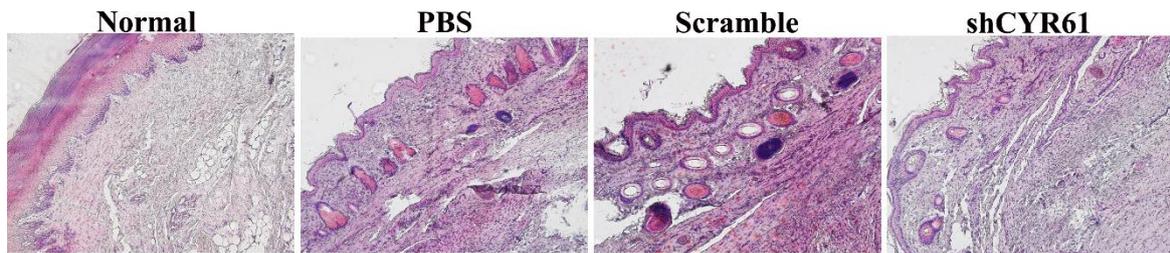


图 4-8 HE 染色观察腺病毒 shCYR61 对 CIA 大鼠关节软骨损伤的治疗效果

4 讨论

前期实验，我们不仅在 RA 滑膜组织中对 CYR61 的表达状态进行大样本系统分析，系统评价其与 RA 发生、发展的相关性，明确了 CYR61 对 RA 关节软骨破坏的临床意义，而且通过体外实验证实了 II 型胶原刺激 DDR2 活化通过增强转录因子 AP-1 的结合活性促进 CYR61 的表达，转录因子 ETS1 介导 CYR61 调控下游效应分子 MMP1 的表达，从而降解细胞外基质，促进 RA FLS 的侵袭转移。为进一步明确 II 型胶原-DDR2-CYR61-MMP1 通路在 RA 关节损伤中的作用，我们进行了活体动物实验。

由于腺病毒载体具有宿主细胞范围宽泛、高感染效率、可插入大片段外源基因，能够介导外源基因短时间内呈高水平表达状态，不与宿主染色体发生整合，不诱导细胞突变等优点^[117]，且腺病毒载体制备，易获得携带有外源基因的高滴度病毒。因此，腺病毒载体已被广泛应用于多种疾病基因治疗的基础研究和临床实验。同样，将腺病毒载体局部注射用于治疗 CIA 动物模型的实验室研究已成为探讨 RA 发病分子机制的热门手段^[118-122]。我们通过构建 Wistar 大鼠 CIA 模型，给予干扰腺病毒 shCYR61 局部治疗，阻断动物关节局部 CYR61 的表达，评价腺病毒 shCYR61 的治

疗效果。结果提示，干涉 CYR61 的表达能够明显降低关节炎的发生率和关节炎指数评分，显著改善关节软组织肿胀程度；X 射线和 Micro-CT 检查结果提示，干涉腺病毒 shCYR61 对 CIA 大鼠关节软骨破坏具有良好的治疗效果；组织病理学检查结果发现阻断 CYR61 的表达能够减少炎性细胞的浸润。

通过本研究，我们提出 CYR61 在 DDR2-MMPs 通路及 RA FLS 迁移侵袭过程中具有重要作用的理论，拓展了我们对 DDR2 介导的 MMPs 过分泌破坏关节软骨分子机制的认识，为 RA 发病机理的研究奠定基础，预示 CYR61 可能成为潜在治疗类风湿性关节炎的药物靶位。

然而本研究，仅是发现了 DDR2 活化能够促进细胞组成型 CYR61 的表达，但是 II 型胶原活化 DDR2 对 CYR61 分泌的影响有待进一步研究。Qiuyu Zhang 等^[53]的研究结果证实，CYR61 可分泌到细胞基质中结合整合素受体从而激活整合素通路而发挥促 RA 滑膜细胞增殖的作用，那么分泌到细胞基质中的 CYR61 能否与 RA 滑膜细胞上的 DDR2 受体结合从而直接提高 DDR2 的磷酸化水平呢？（RA 滑膜细胞中应答 II 型胶原的受体目前只有两个：整合素受体和 DDR2 受体^[123]）另有文献报道，DDR2 胞浆区的酪氨酸磷酸化水平依赖于 Src 的活化水平，且其磷酸化酪氨酸能募集 Shc，上调 MMP-2 的表达^[123]。而 Qiuyu Zhang 等^[53]的研究结果证实，CYR61 可通过与整合素受体结合从而提高了 FAK/Src 复合物的活化水平。那么该通路活化的 Src 能否上调 DDR2 的磷酸化水平，从而形成分泌到基质中的 CYR61-结合整合素受体-活化 Src-导致 DDR2 磷酸化水平升高-MMPs 活性增加这样一个通路而导致 RA 滑膜细胞的侵袭及软骨破坏呢？明确这些问题需要我们进一步深入的研究。与此同时，我们虽然证实了 CYR61 能够上调转录因子 ETS1 的表达，ETS1 通过与 MMP1 启动子区结合，激活 MMP1 转录活性，促进 MMP1 的合成分泌，导致 RA FLS 细胞侵袭迁移，但 CYR61 调控 ETS1 表达的具体分子机制尚不清楚，有待进一步深入地研究。

小 结

- 1) 系统分析了滑膜组织中 DDR2、CYR61 和 MMPs 的表达状态，证实了在 RA 滑膜组织中 DDR2、CYR61 和 MMP1 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平均显著高于 OA 滑膜组织，而免疫组化结果显示 DDR2 和 MMP1 分布于滑膜的衬里层，CYR61 泛表达于滑膜组织中，RA 标本中三者的表达水平均高于 OA 滑膜组织。
- 2) 成功构建重组腺病毒 Ad-DDR2、Ad-CYR61 以及干涉腺病毒 shCYR61。荧光倒置显微镜、Real-time PCR 和蛋白免疫印迹等实验结果表明，成功获得了携带目的外源基因表达效率高的重组腺病毒，干涉腺病毒 shCYR61 在体内具有理想的干涉效果。
- 3) 筛选并鉴定针对 DDR2、c-Jun 和 CYR61 基因 CDS 区的 siRNA，干涉效率均达到 80% 以上，可用于后续实验研究。
- 4) II 型胶原刺激 DDR2 活化通过增强转录因子 AP-1 复合体与 CYR61 启动子区的结合活性，促进 CYR61 启动子的转录活性，从而诱导 CYR61 的表达。
- 5) CYR61 通过上调 ETS1 的表达影响 MMP1 的蛋白水平，从而促进 RA FLS 细胞的侵袭转移。
- 6) 成功构建胶原诱导关节炎大鼠模型，给予干涉腺病毒 shCYR61 局部治疗，能够明显降低 CIA 大鼠的炎症反应程度，缓解关节软骨损伤。

参考文献

- [1] Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nature reviews Rheumatology*. 2015.
- [2] Wang J, Lu H, Liu X, Deng Y, Sun T, Li F, et al. Functional analysis of discoidin domain receptor 2 in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2002;19:161-8.
- [3] Su J, Yu J, Ren T, Zhang W, Zhang Y, Liu X, et al. Discoidin domain receptor 2 is associated with the increased expression of matrix metalloproteinase-13 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *Molecular and cellular biochemistry*. 2009;330:141-52.
- [4] Zhang W, Ding T, Zhang J, Su J, Li F, Liu X, et al. Expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2) extracellular domain in *pichia pastoris* and functional analysis in synovial fibroblasts and NIT3T3 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006;290:43-53.
- [5] Zhang W, Ding T, Zhang J, Su J, Yu J, Li J, et al. Fusion expression of DDR2 extracellular domain in insect cells and its purification and function characterization. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;102:41-51.
- [6] Zhao Y, Tian X, Li Z. Prevalence and clinical significance of antibodies to citrullinated fibrinogen (ACF) in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*. 2007;26:1505-12.
- [7] Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nature immunology*. 2001;2:746-53.
- [8] Blass S, Meier C, Vohr HW, Schwochau M, Specker C, Burmester GR. The p68 autoantigen characteristic of rheumatoid arthritis is reactive with carbohydrate epitope specific autoantibodies. *Annals of the rheumatic diseases*. 1998;57:220-5.
- [9] Toh ML, Miossec P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Current opinion in rheumatology*. 2007;19:284-8.
- [10] Bruhl H, Cihak J, Talke Y, Rodriguez Gomez M, Hermann F, Goebel N, et al. B-cell inhibition by cross-linking CD79b is superior to B-cell depletion with anti-CD20 antibodies in treating murine collagen-induced arthritis. *European journal of immunology*. 2015;45:705-15.
- [11] Rodgers DT, Pineda MA, McGrath MA, Al-Riyami L, Harnett W, Harnett MM. Protection against collagen-induced arthritis in mice afforded by the parasitic worm product, ES-62, is associated with restoration of the levels of interleukin-10-producing B cells and reduced plasma cell infiltration of the joints. *Immunology*. 2014;141:457-66.
- [12] Zhu P, Lu N, Shi ZG, Zhou J, Wu ZB, Yang Y, et al. CD147 overexpression on synoviocytes in rheumatoid arthritis enhances matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *Arthritis research & therapy*. 2006;8:R44.
- [13] Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA. The seven-span transmembrane receptor

CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *The Journal of experimental medicine*. 1996;184:1185-9.

[14] Salmon M, Scheel-Toellner D, Huissoon AP, Pilling D, Shamsadeen N, Hyde H, et al. Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99:439-46.

[15] Lindhout E, van Eijk M, van Pel M, Lindeman J, Dinant HJ, de Groot C. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;162:5949-56.

[16] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141:1117-34.

[17] Johnson JD, Edman JC, Rutter WJ. A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:5677-81.

[18] Chen SC, Wang BW, Wang DL, Shyu KG. Hypoxia induces discoidin domain receptor-2 expression via the p38 pathway in vascular smooth muscle cells to increase their migration. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;374:662-7.

[19] Lin KL, Chou CH, Hsieh SC, Hwa SY, Lee MT, Wang FF. Transcriptional upregulation of DDR2 by ATF4 facilitates osteoblastic differentiation through p38 MAPK-mediated Runx2 activation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25:2489-503.

[20] Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;412:74-9.

[21] Fu HL, Valiathan RR, Arkwright R, Sohail A, Mihai C, Kumarasiri M, et al. Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288:7430-7.

[22] Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer discovery*. 2011;1:78-89.

[23] Iwai LK, Payne LS, Luczynski MT, Chang F, Xu H, Clinton RW, et al. Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *The Biochemical journal*. 2013;454:501-13.

[24] Zhao W, Zhang C, Shi M, Zhang J, Li M, Xue X, et al. The discoidin domain receptor 2/annexin A2/matrix metalloproteinase 13 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66:2355-67.

[25] Yang J, Wheeler SE, Velikoff M, Kleaveland KR, LaFemina MJ, Frank JA, et al. Activated alveolar epithelial cells initiate fibrosis through secretion of mesenchymal proteins. *The American journal of pathology*. 2013;183:1559-70.

[26] Olaso E, Arteta B, Benedicto A, Crende O, Friedman SL. Loss of discoidin domain receptor 2 promotes hepatic fibrosis after chronic carbon tetrachloride through altered paracrine interactions between hepatic stellate cells and liver-associated macrophages. *The American journal of pathology*.

2011;179:2894-904.

[27] Zhang XH, Yan M, Liu L, Wu TJ, Ma LL, Wang LX. Expression of discoidin domain receptors (DDR2) in alcoholic liver fibrosis in rats. *Archives of medical research*. 2010;41:586-92.

[28] Luo Z, Liu H, Sun X, Guo R, Cui R, Ma X, et al. RNA interference against discoidin domain receptor 2 ameliorates alcoholic liver disease in rats. *PloS one*. 2013;8:e55860.

[29] Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer metastasis reviews*. 2012;31:295-321.

[30] Ren T, Zhang J, Zhang J, Liu X, Yao L. Increased expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2): a novel independent prognostic marker of worse outcome in breast cancer patients. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2013;30:397.

[31] Zhang K, Corsa CA, Ponik SM, Prior JL, Piwnica-Worms D, Eliceiri KW, et al. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nature cell biology*. 2013;15:677-87.

[32] Hu K, Xu L, Cao L, Flahiff CM, Brussiau J, Ho K, et al. Pathogenesis of osteoarthritis-like changes in the joints of mice deficient in type IX collagen. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54:2891-900.

[33] Xu L, Peng H, Glasson S, Lee PL, Hu K, Ijiri K, et al. Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56:2663-73.

[34] Xu L, Servais J, Polur I, Kim D, Lee PL, Chung K, et al. Attenuation of osteoarthritis progression by reduction of discoidin domain receptor 2 in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62:2736-44.

[35] Chen Y, Du XY. Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;100:1337-45.

[36] Kireeva ML, Lam SC, Lau LF. Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin α v β 3. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:3090-6.

[37] Chen N, Chen CC, Lau LF. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin α 6 β 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:24953-61.

[38] Lin MT, Chang CC, Lin BR, Yang HY, Chu CY, Wu MH, et al. Elevated expression of Cyr61 enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells through integrin α 2 β 1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:34594-604.

[39] Schober JM, Chen N, Grzeszkiewicz TM, Jovanovic I, Emeson EE, Ugarova TP, et al. Identification of integrin α (M) β (2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood*. 2002;99:4457-65.

- [40] Jedsadayamata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:24321-7.
- [41] Yakubenko VP, Yadav SP, Ugarova TP. Integrin alphaDbeta2, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties. *Blood*. 2006;107:1643-50.
- [42] Yang GP, Lau LF. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1991;2:351-7.
- [43] Chen CC, Lau LF. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41:771-83.
- [44] Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:10443-52.
- [45] Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SC, Lau LF. The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology*. 2002;143:1441-50.
- [46] Grzeszkiewicz TM, Kirschling DJ, Chen N, Lau LF. CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through Integrin alpha vbeta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha vbeta 3, independent of its carboxyl-terminal domain. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:21943-50.
- [47] Leu SJ, Lam SC, Lau LF. Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins alphavbeta3 and alpha6beta1 in human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:46248-55.
- [48] Lin BR, Chang CC, Chen LR, Wu MH, Wang MY, Kuo IH, et al. Cysteine-rich 61 (CCN1) enhances chemotactic migration, transendothelial cell migration, and intravasation by concomitantly up-regulating chemokine receptor 1 and 2. *Molecular cancer research : MCR*. 2007;5:1111-23.
- [49] Sun ZJ, Wang Y, Cai Z, Chen PP, Tong XJ, Xie D. Involvement of Cyr61 in growth, migration, and metastasis of prostate cancer cells. *British journal of cancer*. 2008;99:1656-67.
- [50] Kireeva ML, Mo FE, Yang GP, Lau LF. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Molecular and cellular biology*. 1996;16:1326-34.
- [51] Franzen CA, Chen CC, Todorovic V, Juric V, Monzon RI, Lau LF. Matrix protein CCN1 is critical for prostate carcinoma cell proliferation and TRAIL-induced apoptosis. *Molecular cancer research : MCR*. 2009;7:1045-55.
- [52] Gery S, Xie D, Yin D, Gabra H, Miller C, Wang H, et al. Ovarian carcinomas: CCN genes are aberrantly expressed and CCN1 promotes proliferation of these cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11:7243-54.

- [53] Zhang Q, Wu J, Cao Q, Xiao L, Wang L, He D, et al. A critical role of Cyr61 in interleukin-17-dependent proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60:3602-12.
- [54] Jin Y, Kim HP, Ifedigbo E, Lau LF, Choi AM. Cyr61 protects against hyperoxia-induced cell death via Akt pathway in pulmonary epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005;33:297-302.
- [55] Lin MT, Chang CC, Chen ST, Chang HL, Su JL, Chau YP, et al. Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:24015-23.
- [56] Latinkic BV, Mo FE, Greenspan JA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Promoter function of the angiogenic inducer Cyr61 gene in transgenic mice: tissue specificity, inducibility during wound healing, and role of the serum response element. *Endocrinology*. 2001;142:2549-57.
- [57] Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology*. 2010;12:676-85.
- [58] Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Kaminska A, Fuchs M, Klein G, Podewski E, et al. Regulation of proangiogenic factor CCN1 in cardiac muscle: impact of ischemia, pressure overload, and neurohumoral activation. *Circulation*. 2004;109:2227-33.
- [59] Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT. Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15:1014-23.
- [60] Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:26746-53.
- [61] O'Brien TP, Lau LF. Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1992;3:645-54.
- [62] Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF. CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:6355-60.
- [63] Fataccioli V, Abergel V, Wingertsmann L, Neuville P, Spitz E, Adnot S, et al. Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Human gene therapy*. 2002;13:1461-70.
- [64] Chen N, Leu SJ, Todorovic V, Lam SC, Lau LF. Identification of a novel integrin α v β 3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:44166-76.
- [65] Mo FE, Muntean AG, Chen CC, Stolz DB, Watkins SC, Lau LF. CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Molecular and cellular biology*. 2002;22:8709-20.

- [66] Chen CC, Mo FE, Lau LF. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:47329-37.
- [67] Grote K, Salguero G, Ballmaier M, Dangers M, Drexler H, Schieffer B. The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. *Blood*. 2007;110:877-85.
- [68] Kassis JN, Virador VM, Guancial EA, Kimm D, Ho AS, Mishra M, et al. Genomic and phenotypic analysis reveals a key role for CCN1 (CYR61) in BAG3-modulated adhesion and invasion. *The Journal of pathology*. 2009;218:495-504.
- [69] Monnier Y, Farmer P, Bieler G, Imaizumi N, Sengstag T, Alghisi GC, et al. CYR61 and alphaVbeta5 integrin cooperate to promote invasion and metastasis of tumors growing in preirradiated stroma. *Cancer research*. 2008;68:7323-31.
- [70] Xie D, Miller CW, O'Kelly J, Nakachi K, Sakashita A, Said JW, et al. Breast cancer. Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:14187-94.
- [71] D'Antonio KB, Toubaji A, Albadine R, Mondul AM, Platz EA, Netto GJ, et al. Extracellular matrix associated protein CYR61 is linked to prostate cancer development. *The Journal of urology*. 2010;183:1604-10.
- [72] Goodwin CR, Lal B, Zhou X, Ho S, Xia S, Taeger A, et al. Cyr61 mediates hepatocyte growth factor-dependent tumor cell growth, migration, and Akt activation. *Cancer research*. 2010;70:2932-41.
- [73] Lin MT, Zuon CY, Chang CC, Chen ST, Chen CP, Lin BR, et al. Cyr61 induces gastric cancer cell motility/invasion via activation of the integrin/nuclear factor-kappaB/cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11:5809-20.
- [74] Kok SH, Chang HH, Tsai JY, Hung HC, Lin CY, Chiang CP, et al. Expression of Cyr61 (CCN1) in human oral squamous cell carcinoma: An independent marker for poor prognosis. *Head & neck*. 2010;32:1665-73.
- [75] Sakamoto S, Yokoyama M, Aoki M, Suzuki K, Kakehi Y, Saito Y. Induction and function of CYR61 (CCN1) in prostatic stromal and epithelial cells: CYR61 is required for prostatic cell proliferation. *The Prostate*. 2004;61:305-17.
- [76] Lv H, Fan E, Sun S, Ma X, Zhang X, Han DM, et al. Cyr61 is up-regulated in prostate cancer and associated with the p53 gene status. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;106:738-44.
- [77] Tong X, Xie D, O'Kelly J, Miller CW, Muller-Tidow C, Koeffler HP. Cyr61, a member of CCN family, is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:47709-14.
- [78] Tong X, O'Kelly J, Xie D, Mori A, Lemp N, McKenna R, et al. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway. *Oncogene*. 2004;23:4847-55.
- [79] Feng P, Wang B, Ren EC. Cyr61/CCN1 is a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma

and involved in DNA damage response. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40:98-109.

[80] Chien W, Kumagai T, Miller CW, Desmond JC, Frank JM, Said JW, et al. Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:53087-96.

[81] Dobroff AS, Wang H, Melnikova VO, Villares GJ, Zigler M, Huang L, et al. Silencing cAMP-response element-binding protein (CREB) identifies CYR61 as a tumor suppressor gene in melanoma. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284:26194-206.

[82] Sigala F, Georgopoulos S, Papalambros E, Chasiotis D, Vourliotakis G, Niforou A, et al. Heregulin, cysteine rich-61 and matrix metalloproteinase 9 expression in human carotid atherosclerotic plaques: relationship with clinical data. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2006;32:238-45.

[83] Lee HY, Chung JW, Youn SW, Kim JY, Park KW, Koo BK, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circulation research*. 2007;100:372-80.

[84] Yu Y, Gao Y, Qin J, Kuang CY, Song MB, Yu SY, et al. CCN1 promotes the differentiation of endothelial progenitor cells and reendothelialization in the early phase after vascular injury. *Basic research in cardiology*. 2010;105:713-24.

[85] Hasan A, Pokeza N, Shaw L, Lee HS, Lazzaro D, Chintala H, et al. The matricellular protein cysteine-rich protein 61 (CCN1/Cyr61) enhances physiological adaptation of retinal vessels and reduces pathological neovascularization associated with ischemic retinopathy. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:9542-54.

[86] Hughes JM, Kuiper EJ, Klaassen I, Canning P, Stitt AW, Van Bezu J, et al. Advanced glycation end products cause increased CCN family and extracellular matrix gene expression in the diabetic rodent retina. *Diabetologia*. 2007;50:1089-98.

[87] Kuiper EJ, Hughes JM, Van Geest RJ, Vogels IM, Goldschmeding R, Van Noorden CJ, et al. Effect of VEGF-A on expression of profibrotic growth factor and extracellular matrix genes in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48:4267-76.

[88] You JJ, Yang CM, Chen MS, Yang CH. Regulation of Cyr61/CCN1 expression by hypoxia through cooperation of c-Jun/AP-1 and HIF-1alpha in retinal vascular endothelial cells. *Experimental eye research*. 2010;91:825-36.

[89] You JJ, Yang CH, Chen MS, Yang CM. Cysteine-rich 61, a member of the CCN family, as a factor involved in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50:3447-55.

[90] You JJ, Yang CH, Yang CM, Chen MS. Cyr61 induces the expression of monocyte chemoattractant protein-1 via the integrin alphanubeta3, FAK, PI3K/Akt, and NF-kappaB pathways in retinal vascular endothelial cells. *Cellular signalling*. 2014;26:133-40.

- [91] Lin J, Zhou Z, Huo R, Xiao L, Ouyang G, Wang L, et al. Cyr61 induces IL-6 production by fibroblast-like synoviocytes promoting Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188:5776-84.
- [92] Kok SH, Lin LD, Hou KL, Hong CY, Chang CC, Hsiao M, et al. Simvastatin inhibits cysteine-rich protein 61 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the regulation of sirtuin-1/FoxO3a signaling. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65:639-49.
- [93] Lin J, Huo R, Xiao L, Zhu X, Xie J, Sun S, et al. A novel p53/microRNA-22/Cyr61 axis in synovial cells regulates inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66:49-59.
- [94] Seemayer CA, Distler O, Kuchen S, Muller-Ladner U, Michel BA, Neidhart M, et al. [Rheumatoid arthritis: new developments in the pathogenesis with special reference to synovial fibroblasts]. *Zeitschrift fur Rheumatologie*. 2001;60:309-18.
- [95] Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Molecular cell*. 1997;1:13-23.
- [96] Morales-Ducret J, Wayner E, Elices MJ, Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1992;149:1424-31.
- [97] Stevens CR, Mapp PI, Revell PA. A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes. *Rheumatology international*. 1990;10:103-6.
- [98] Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S. Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48:1873-80.
- [99] Schwachula A, Riemann D, Kehlen A, Langner J. Characterization of the immunophenotype and functional properties of fibroblast-like synoviocytes in comparison to skin fibroblasts and umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology*. 1994;190:67-92.
- [100] Palmer DG, Selvendran Y, Allen C, Revell PA, Hogg N. Features of synovial membrane identified with monoclonal antibodies. *Clinical and experimental immunology*. 1985;59:529-38.
- [101] Kunz M, Moeller S, Koczan D, Lorenz P, Wenger RH, Glocker MO, et al. Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:45651-60.
- [102] Han JS, Macarak E, Rosenbloom J, Chung KC, Chaqour B. Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2003;270:3408-21.
- [103] Nguyen N, Kuliopulos A, Graham RA, Covic L. Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. *Cancer research*. 2006;66:2658-65.

- [104] Sabile AA, Arlt MJ, Muff R, Bode B, Langsam B, Bertz J, et al. Cyr61 expression in osteosarcoma indicates poor prognosis and promotes intratibial growth and lung metastasis in mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2012;27:58-67.
- [105] Chen J, Song Y, Yang J, Gong L, Zhao P, Zhang Y, et al. The up-regulation of cysteine-rich protein 61 induced by transforming growth factor beta enhances osteosarcoma cell migration. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;384:269-77.
- [106] Young N, Van Brocklyn JR. Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness. *Experimental cell research*. 2007;313:1615-27.
- [107] Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Seminars in oncology*. 2004;31:2-11.
- [108] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6:135-8.
- [109] Lin MT, Kuo IH, Chang CC, Chu CY, Chen HY, Lin BR, et al. Involvement of hypoxia-inducing factor-1alpha-dependent plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in Cyr61/CCN1-induced gastric cancer cell invasion. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:15807-15.
- [110] Wernert N, Stanjek A, Kiriakidis S, Hugel A, Jha HC, Mazitschek R, et al. Inhibition of Angiogenesis In Vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 1999;38:3228-31.
- [111] Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B, et al. c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *The American journal of pathology*. 1992;140:119-27.
- [112] Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, et al. Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer research*. 1994;54:5683-8.
- [113] Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR. The ETS-domain transcription factor family. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1997;29:1371-87.
- [114] Davidson B, Reich R, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Berner A, et al. Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7:551-7.
- [115] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature protocols*. 2007;2:1269-75.
- [116] Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, van De Loo FA, Heinegard D, van Den Berg WB. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *Journal of immunology (Baltimore,*

Md : 1950). 1999;163:5049-55.

[117] Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *The EMBO journal*. 1993;12:2589-99.

[118] Hah YS, Lee YR, Jun JS, Lim HS, Kim HO, Jeong YG, et al. A20 suppresses inflammatory responses and bone destruction in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62:2313-21.

[119] Pickens SR, Chamberlain ND, Volin MV, Mandelin AM, 2nd, Agrawal H, Matsui M, et al. Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63:2289-98.

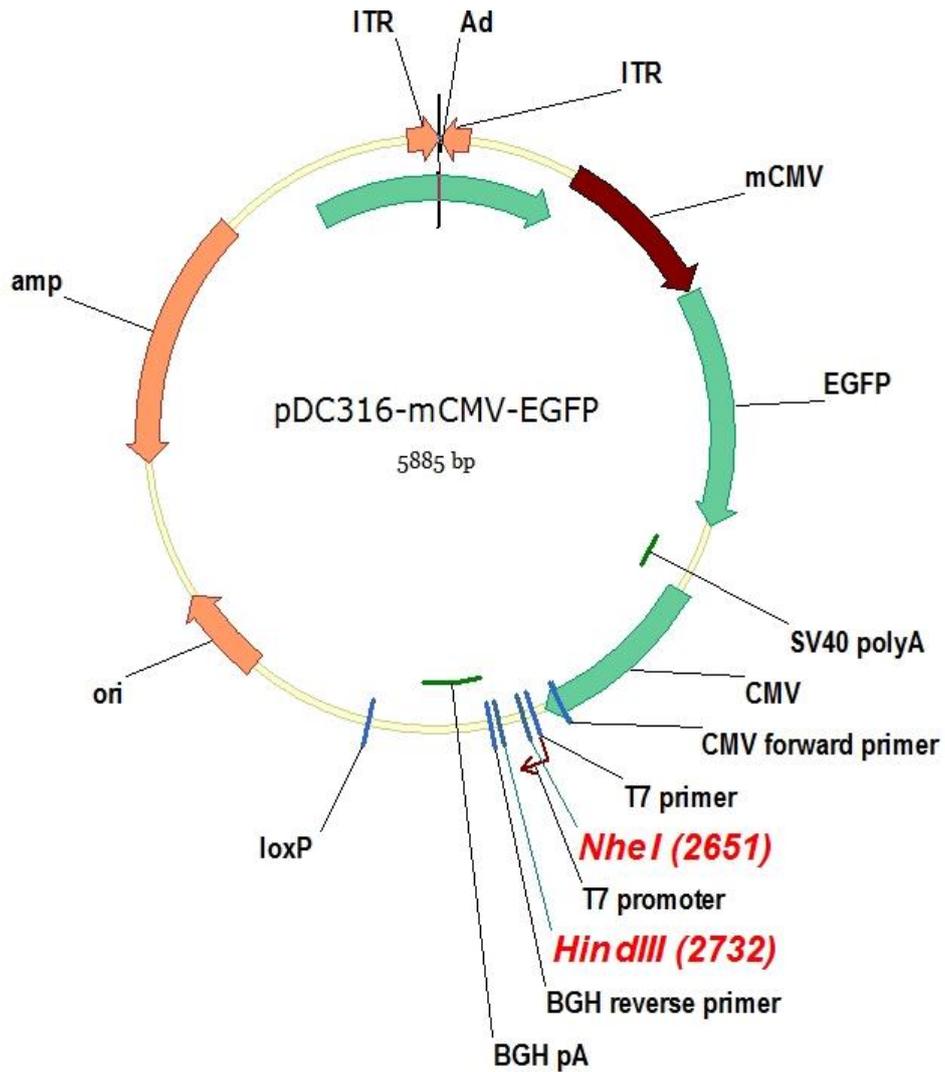
[120] Lee HS, Ka SO, Lee SM, Lee SI, Park JW, Park BH. Overexpression of sirtuin 6 suppresses inflammatory responses and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65:1776-85.

[121] Murakami Y, Akahoshi T, Aoki N, Toyomoto M, Miyasaka N, Kohsaka H. Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60:1615-23.

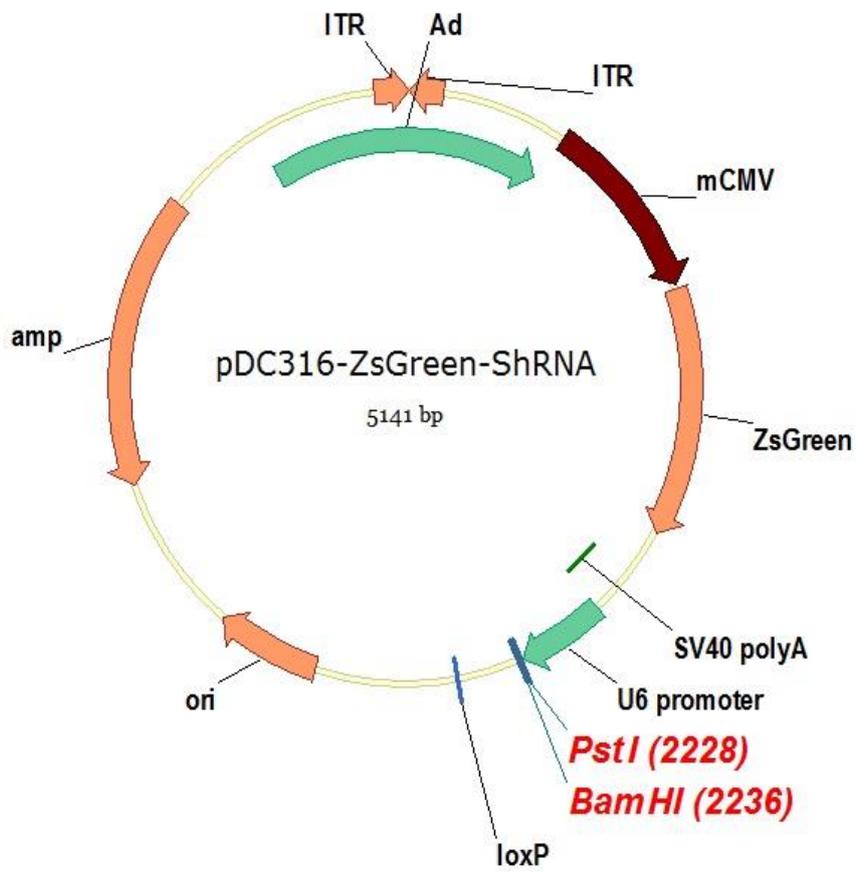
[122] Lee HS, Woo SJ, Koh HW, Ka SO, Zhou L, Jang KY, et al. Regulation of apoptosis and inflammatory responses by insulin-like growth factor binding protein 3 in fibroblast-like synoviocytes and experimental animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66:863-73.

[123] Carafoli F, Bihan D, Stathopoulos S, Konitsiotis AD, Kvensakul M, Farndale RW, et al. Crystallographic insight into collagen recognition by discoidin domain receptor 2. *Structure (London, England : 1993)*. 2009;17:1573-81.

附 录



pDC316-mCMV-EGFP 腺病毒载体图谱



pDC316-ZsGreen-ShRNA 腺病毒载体图谱

个人简历和研究成果

个人简历:

黄同列, 男, 1987年5月出生, 福建仙游人, 汉族, 中共党员

教育经历:

2005.08~2009.06	第四军医大学生物技术专业	学士
2009.08~2012.06	第四军医大学生物化学与分子生物学	硕士
2012.08~2015.06	第四军医大学生物化学与分子生物学	博士

研究成果:

- 1) **Huang T**, Zhang K, Sun L, Xue X, Zhang C, Shu Z, Mu N, Gu J, Zhang W, Wang Y, Zhang Y, Zhang W. Body protective compound 157 enhances alkali-burned wound healing in vivo and promotes proliferation, migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Drug design, development and therapy*. 2015 April; 9: 2485–2499. (IF: 3.026)
- 2) **Huang T**, Zhang W, Zhang Y. The DDR2-CYR61-MMP1 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis & Rheumatology*. (Submitted, IF: 7.871)
- 3) Mu N, Zhang C, Shu Z, **Huang T**, Li M, Hao Q, Li W, Zhang W, Zhao J, Zhang Y, Liu N, Wang S, Jin X, Xue X, Zhang W, Zhang Y. Reciprocal regulation of NF- κ B and microRNA-10a in rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial. *Annals of the Rheumatic Diseases*. (Submitted, IF: 9.270)
- 4) Zhang C, Wang W, Qin X, Xu Y, **Huang T**, Hao Q, Li W, Wu S, Zhang Y. B7-H1 protein vaccine induces protective and therapeutic antitumor responses in SP2/0 myeloma-bearing mice. *Oncology reports*. 2013 Nov; 30(5): 2442-8. (IF: 2.191)
- 5) Shu Z, Li J, Mu N, Gao Y, **Huang T**, Zhang Y, Wang Z, Li M, Hao Q, Li W, He L, Zhang C, Zhang W, Xue X, Zhang Y. Expression, purification and characterization of

galectin-1 in Escherichia coli. Protein Expression and Purification. 2014 July; 99: 58–63. (IF: 1.508)

- 6) **黄同列**, 张昭, 舒震, 徐玉金, 赵薇, 张存, 张伟, 张英起等. 十五肽 BPC-157 对人脐静脉内皮细胞功能的影响. 生物技术通讯. 2012, (23)2:153-157.
- 7) 王志, **黄同列**, 薛晓畅, 张英起等. 重组猪生长抑素的基因克隆、表达与纯化. 第四军医大学学报. 2009, (30)2:126-128.
- 8) 张昭, **黄同列**, 徐天娇, 赵薇, 李萌, 张伟, 张英起等. 一种新型抗纤维化小肽 AcSDKP 的构建及活性初步研究. 生物技术通讯. 2012, (23)2:158-161.
- 9) 王丽丽, **黄同列**, 李维娜, 刘楠楠, 张伟, 张英起等. 十五肽 BPC-157 通过 p38 MAPK 信号通路途径调节人脐静脉内皮细胞的功能. 生物技术通讯. 2012, 2:183-187.

参与科研项目:

- 1) 国家自然科学基金面上项目 (NO.81273279), CYR61 在 DDR2-MMPs 通路中发挥的作用及其介导 RA 滑膜细胞侵袭和软骨破坏的机制
- 2) 国家自然科学基金面上项目 (NO.81373201), NF- κ B 和 miR-103 调节环路在类风湿性关节炎中的作用及机制研究
- 3) 国家自然科学基金青年项目 (NO.81301785), MIC-1 诱导外周血 naive CD4⁺ T 细胞向 iTreg 分化的机制研究

专利申请:

- 1) 张英起, 王增禄, 张昭, 杨赛, 李萌, 张伟, **黄同列**: 一种利用固相多肽合成法合成四肽异构体的方法及其应用. 中国人民解放军第四军医大学. Jul, 11 2012: CN102558298
- 2) 张英起, 王增禄, 郭翰文, **黄同列**: 一种短肽、其异构体及其应用. 中国人民解放军第四军医大学. Jul, 4 2012: CN102532265

致 谢

值此学位论文完成之际，谨向我的导师张英起教授、辅导老师张伟副教授致以深深地敬意。张英起教授渊博的学识、严谨的科研态度令我敬佩不已，在博士期间，他活跃的科研思路、孜孜不倦的奋斗精神深深地感染着我，我博士毕业论文的顺利完成凝结了张英起教授的点滴教诲。张伟副教授行为世范、身先士卒的工作态度和严以律己、宽以待人的生活作风令我永生难忘。

衷心地感谢李萌副教授、薛晓畅副教授、张存讲师、郝强讲师和李维娜讲师在生活和工作上给予的关心和指导，他们乐观向上的生活态度、精益求精的科研理念都使我受益匪浅，让我更加坚定了投身科研事业的决心和信心。

衷心地感谢赵宁高级实验师、刘节高级实验师、王增禄高级实验师、刘晓燕高级实验师、包春杰高级实验师为我创造了良好的学习和工作氛围，在他们身上我学到的不仅仅是实验技能和科研思维，更多的是做人、做事的道理。

真诚地感谢张颖博士、舒震博士、张阔博士、刘烁博士、周治中博士、穆楠博士、高源硕士、马晓雯硕士、田钰茜硕士、顾锦涛硕士，感谢他们在学习期间对我的关心、包容和帮助。

真诚地感谢西京医院骨科朱锦宇副教授、临床免疫科赵金康副教授和孙百灵老师在课题研究中给予的大力支持和默默奉献。

最后，我要感谢我的父母以及岳父、岳母，他们一直在默默地支持、鼓励和关爱着我，他们是我生命中的宝贵财富，人生旅途中的航向标；感谢我的爱人孙丽娟女士，总是在我忙碌时体恤，欢喜时微笑，失落时激励，困难时分担，忧伤时陪伴，让我感受家的温暖，感谢有你幸福相伴；感谢特特小朋友的降临，你的到来为我的生活增添色彩，你的到来激发我奋勇向前的斗志，你的到来让我在未来的道路上信心满满。