

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.17.002

LRG1 通过 CCR1 促进类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞激活的机制研究*

庞琳烜¹, 谢荣华¹, 李治琴², 杜望磊¹, 丁 进^{1△}

(1. 空军军医大学西京医院临床免疫科, 西安 710032; 2. 咸阳市第一人民医院风湿科, 陕西咸阳 712000)

[摘要] **目的** 探讨富亮氨酸重复糖蛋白 1(LRG1)对类风湿性关节炎(RA)滑膜成纤维细胞增殖、迁移、侵袭及人脐静脉内皮细胞(HUVECs)血管生成的影响及机制。**方法** 将成纤维样滑膜细胞系 MH7A 细胞分为 6 组:对照组(未做任何处理)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)组(20 ng/mL TNF- α 处理细胞)、阴性对照干扰小 RNA(NC siRNA)组(细胞转染 NC siRNA 后以 TNF- α 处理)、LRG1 siRNA 组(细胞转染 LRG1 siRNA 后以 TNF- α 处理)、LRG1 siRNA+Vector 组(细胞转染 LRG1 siRNA 和 pcDNA3.1 后以 TNF- α 处理)和 LRG1 siRNA+趋化因子受体 1(CCR1)组(细胞转染 LRG1 siRNA 和 pcDNA3.1-CCR1 后以 TNF- α 处理)。采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测细胞增殖能力;划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力;MH7A 培养基处理 HUVECs,采用血管形成实验检测血管生成能力;实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 检测 LRG1、CCR1 mRNA 及蛋白表达水平。免疫共沉淀实验(Co-IP)检测 LRG1 与 CCR1 的相互作用。**结果** 与对照组比较,各浓度(5、10、20、40 ng/mL)TNF- α 组 LRG1 mRNA 及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),且 20 ng/mL 为最佳浓度。与 NC siRNA 组相比,LRG1 siRNA 组细胞增殖能力 $[(137\pm 15)\% \text{ vs. } (228\pm 24)\%, P<0.05]$ 、迁移能力明显降低,侵袭细胞数明显减少 $[(56.0\pm 6.7) \text{ 个 vs. } (102.0\pm 7.9) \text{ 个}, P<0.05]$ 。沉默 LRG1 后 HUVECs 的血管形成能力明显降低。Co-IP 结果显示,LRG1 可与 CCR1 相互作用。沉默 LRG1 可下调 CCR1 表达水平($P<0.05$),而过表达 CCR1 可逆转 LRG1 沉默对 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。**结论** LRG1 通过 CCR1 促进 MH7A 细胞增殖、迁移、侵袭和 HUVECs 血管生成,为 RA 的治疗奠定了理论基础。

[关键词] 类风湿性关节炎;富亮氨酸重复糖蛋白 1;趋化因子受体 1;增殖;侵袭;血管生成

[中图法分类号] R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)17-2570-07

Mechanism of LRG1 promoting synovial fibroblast activation in rheumatoid arthritis through CCR1*

PANG Linxuan¹, XIE Ronghua¹, LI Zhiqin², DU Wanglei¹, DING Jin^{1△}

(1. Department of Clinical Immunology, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 2. Department of Rheumatology, The First People's Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence and mechanism of leucine-rich repeat glycoprotein 1 (LRG1) on proliferation, migration, invasion of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis (RA) and the angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** Fibrous synovial cells line MH7A were divided into six groups: the control group (without any treatment), tumor necrosis factor- α (TNF- α) group (treated with 20 ng/mL TNF- α), negative control interfering small RNA (NC siRNA) group (treated with TNF- α after transfection of NC siRNA), LRG1 siRNA group (treated with TNF- α after transfection of LRG1 siRNA), LRG1 siRNA+Vector group (treated with TNF- α after transfection of LRG1 siRNA and PCDN3.1) and LRG1 siRNA+ chemokine receptor 1 (CCR1) group (treated with TNF- α after transfection of LRG1 siRNA and pcDNA3.1-CCR1). Cell proliferation was detected by CCK-8 assay. Cell migration and invasion were analyzed by scratch assay and Transwell invasion assay. HUVECs were treated with culture of MH7A with different treatment, and cell angiogenesis was analyzed by tube formation assay. qRT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of LRG1 and CCR1, respectively. Interaction of LRG1 and CCR1 was detected by co-immunoprecipitation (Co-IP). **Results** Compared with the control group,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81701617);陕西省自然科学基金项目(2021JM-234)。 作者简介:庞琳烜(1983—),主治医师,学士,主要从事类风湿关节炎诊断治疗相关研究。 △ 通信作者, E-mail: dingjin_32@163.com。

the expression levels of LRG1 mRNA and protein were significantly increased in the TNF- α groups with different concentrations (5,10,20,40 ng/mL), and 20 ng/mL was the optimal concentration. Compared with the NC siRNA group, the cell proliferation ability $[(137\pm15)\% \text{ vs. } (228\pm24)\%, P<0.05]$ and migration ability of the LRG1 siRNA group were significantly reduced, and the number of invading cells was significantly reduced $(56.0\pm6.7 \text{ vs. } 102.0\pm7.9, P<0.05)$. After silencing LRG1 the angiogenesis ability of HUVECs cells decreased significantly. The results of Co-IP showed that LRG1 was interacted with CCR1. Silencing of LRG1 downregulated the expression of CCR1 ($P<0.05$). On the other hand, overexpression of CCR1 reversed the inhibitory effects of LRG1 silencing on the proliferation, migration and invasion of MH7A cells.

Conclusion LRG1 promotes MH7A cell proliferation, migration, invasion as well as HUVECs angiogenesis through CCR1, which lays a theoretical foundation for the treatment of RA.

[Key words] rheumatoid arthritis; leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1; chemokine receptor 1; proliferation; invasion; angiogenesis

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以侵蚀性关节炎为主要临床表现的自身免疫性疾病^[1]。流行病学数据显示,我国 RA 发病率为 0.42%,病程 5~10 年时致残率高达 43%^[2]。随着病程延长,RA 致残率逐渐升高,严重影响患者的生活质量。由于发病机制不清、病因不明,目前尚没有 RA 的特效治疗方法。RA 主要病理表现为滑膜组织增生和血管翳形成,并逐渐出现关节软骨和骨破坏,最终导致关节畸形和功能丧失。因而,明确滑膜增生和血管翳形成的机制将为 RA 的治疗提供依据。

富亮氨酸重复糖蛋白 1(leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1, LRG1)是富亮氨酸重复蛋白家族的一员,含有 8 个富亮氨酸重复结构域。LRG1 广泛参与蛋白质-蛋白质相互作用、信号转导及细胞黏附^[3]。LRG1 不仅作为跨膜蛋白高表达于神经系统,并参与突触的生长、形成及神经递质的转移和释放^[4],也可作为部分肿瘤或炎症性疾病的诊断标志物^[5-6]。研究表明,RA 患者血清 LRG1 水平明显高于骨关节炎患者,且血清 LRG1 水平与 RA 疾病活动度呈正相关^[7-8],说明 LRG1 可能参与 RA 的疾病进程。但 LRG1 是否可以调控滑膜增生和血管翳形成及其可能的机制尚不清楚。趋化因子受体 1(chemokine receptor 1, CCR1)是一种 A 类 G 蛋白偶联受体,可介导其相应的配体控制细胞定向迁移。而滑膜干细胞池中中间充质干细胞向滑膜组织迁移是滑膜增生的原因之一。研究表明,CCR1 在 RA 患者单核细胞中明显升高^[9]。CCR1 拮抗剂可减轻兔椎间盘退变模型中椎间盘炎症^[10]。基于此,本文研究了 LRG1 调控成纤维样滑膜细胞增殖、迁移、侵袭及影响血管内皮细胞血管生成能力的机制,以及 CCR1 在其中发挥的作用,以期 RA 的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

成纤维样滑膜细胞株 MH7A 细胞购自广州吉妮欧生物科技有限公司。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)购自武汉

普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

Lipfectamin3000 购自美国 Invitrogen 公司。细胞计数试剂盒 8(CCK-8)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。PrimeScript™ 逆转录试剂盒(去基因组)购自宝日医生物技术(北京)有限公司。Matrigel 胶购自美国 Corning 公司。LRG1 兔多克隆抗体(PA5-118035)、CCR1 兔多克隆抗体(PA5-112058)购自美国 Invitrogen 公司。LRG1 干扰小 RNA(siRNA)及其阴性对照 siRNA(NC siRNA)、pcDNA3.1-CCR1 及其阴性对照(pcDNA3.1 空载质粒 Vector)由上海吉凯基因医学科技股份有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MH7A 细胞和 HUVECs 均培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养。

1.2.2 细胞因子处理

取对数生长期的 MH7A 细胞接种于 6 孔板中(2×10^6 个/孔),待其融合率至 80% 时,分别加入 1、5、10、20 ng/mL 的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)刺激 MH7A 细胞 24 h。

1.2.3 细胞转染及分组

取对数生长期的 MH7A 细胞(2×10^5 个/mL)接种于 6 孔板。待其融合率至 70%~90% 时,弃去原培养基,饥饿过夜,次日进行转染。实验分组如下:对照组(细胞不做处理)、TNF- α 组(细胞给予 10 ng/mL 的 TNF- α 处理 24 h)、NC siRNA 组(细胞转染 NC siRNA 24 h 后,给予 20 ng/mL 的 TNF- α 处理 24 h)、LRG1 siRNA 组(细胞转染 LRG1 siRNA #1 或 LRG1 siRNA #2 24 h 后,给予 20 ng/mL 的 TNF- α 处理 24 h)、LRG1 siRNA+Vector 组(细胞共转染 LRG1 siRNA #1 和 pcDNA3.1 载体 24 h,给予 TNF- α 处理 24 h)和 LRG1 siRNA+CCR1 组(细胞共转染 LRG1 siRNA #1 和 pcDNA3.1-CCR1 24 h,

给予 TNF- α 处理 24 h)。根据 Lipfectamin3000 说明书,125 μ L 减血清(Opti-MEM)培养基稀释 7.5 μ L Lipfectamin3000 试剂(记为 A 液);250 μ L Opti-MEM 培养基稀释 5 μ g/ μ L LRG1 siRNA 工作液(或 5 μ g/ μ L LRG1 siRNA 和 5 μ g/ μ L pcDNA3.1-CCR1)和 10 μ L P3000 试剂(记为 B 液);125 μ L A 液与 125 μ L B 液混合后即为转染复合物。每孔加入 250 μ L 转染复合物,转染 24 h 后给予 20 ng/mL 的 TNF- α 处理 24 h。转染 48 h 提取细胞总蛋白,通过 Western blot 验证转染效率。LRG1 siRNA 序列如下:正义链 5'-GGG AAA CCA GCU GAA GUU U-3',反义链 3'-CCC UUU GGU CGA CUU CAA A-3'。

1.2.4 CCK-8 测定细胞活力

取对数生长期的 MH7A 细胞接种于 6 孔板,经转染 LRG1 siRNA 质粒(或 LRG1 siRNA 质粒和 pcDNA3.1-CCR1 质粒)24 h 后,消化细胞并将细胞接种于 96 孔板中(5×10^4 个/mL,每孔 100 μ L),于 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。24 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液孵育 4 h。使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(A_{450})值。

1.2.5 实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)检测 LRG1 和 CCR1 mRNA 表达水平

取对数生长期的 MH7A 细胞接种于 6 孔板,经转染 LRG1 siRNA 质粒(或 LRG1 siRNA 质粒和 pcDNA3.1-CCR1 质粒)24 h 后给予 20 ng/mL 的 TNF- α 处理 24 h。TRIzol 试剂提取总 RNA。用 RNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为互补 DNA(cDNA),qRT-PCR 检测 LRG1 和 CCR1 mRNA 的表达水平。以 β -actin 为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因表达的相对变化值。LRG 引物序列如下:正向 5'-TGC TCA CCC TTG ACC TTA GC-3',反向 5'-TAG GTA GCG CAG TTT TGG CT-3'。CCR1 引物序列如下:正向 5'-AGA CTT CAC GGA CAA AGT CC-3',反向 5'-TGA TCA CAC TTG TCA CCA CC-3'。

1.2.6 Western blot 检测 LRG1 和 CCR1 表达水平

取对数生长期的 MH7A 细胞接种于 6 孔板,经转染 LRG1 siRNA 质粒(或 LRG1 siRNA 质粒和 pcDNA3.1-CCR1 质粒)24 h 后给予 20 ng/mL 的 TNF- α 处理 24 h。每孔加入放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液冰上裂解 20 min,BCA 法测定细胞蛋白质浓度。取 20 μ g 蛋白于 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶分离,转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入 LRG1 兔多克隆抗体(1:1 500 稀释)和 CCR1 兔多克隆抗体(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:2 000 稀释)室温孵育 1 h,随后增强化学发光液处理显示免疫印迹条带,采用 ImageJ 软件分析各条带的灰度值。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭

Matrigel 预处理 Transwell 上室。然后将转染 LRG1 siRNA 质粒(或 LRG1 siRNA 质粒和 pcD-

NA3.1-CCR1 质粒)24 h 后的细胞用含 1%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,并接种于 Transwell 上室(1×10^5 个/mL,每孔 200 μ L),Transwell 下室为含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。上室加入 100 μ L TNF- α (10 ng/mL),37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 环境下培养 24 h。用棉签轻轻刮去上室中未侵袭的细胞,4%多聚甲醛固定细胞,0.1%结晶紫染色 10 min,显微镜下观察侵袭细胞数。

1.2.8 血管形成实验观察细胞生长状态及小管形成情况

Matrigel 基质胶涂抹 48 孔板,每孔 200 μ L。按照 1.2.3 细胞分组方法处理 MH7A 细胞,然后分别用对照组、TNF- α 组、NC siRNA 组、LRG1 siRNA 组收集到的条件培养基(200 μ L)重悬 HUVECs(2×10^4 个/mL)。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 6 h。倒置显微镜观察细胞生长状态及小管形成情况。

1.2.9 免疫共沉淀实验(co-immunoprecipitation, Co-IP)

Co-IP 检测 LRG1 与 CCR1 相互作用。用含蛋白酶抑制剂 Aprotinin(终浓度为 1 μ L/mL)的非变性裂解液 NETN 处理 MH7A 细胞,冰上静置裂解 30 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液;实验分为 3 组:Input 组、LRG1 组和 IgG 组。其中 20 μ L 上清液加入 $2 \times$ 上样缓冲液煮 5 min,作为 Input 组;剩余上清液加入 LRG1 兔多克隆抗体(2 μ L,IgG 抗体作为对照),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,随后加入 80 μ L 的 G 蛋白-琼脂糖凝珠,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。离心弃上清液后,加入 600 μ L NETN 裂解液,颠倒混匀。洗涤 3 次后在沉淀中加入 20 μ L $2 \times$ 上样缓冲液煮 5 min。Western blot 检测 LRG1 和 CCR1 表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(Tukey 法进行事后检验)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

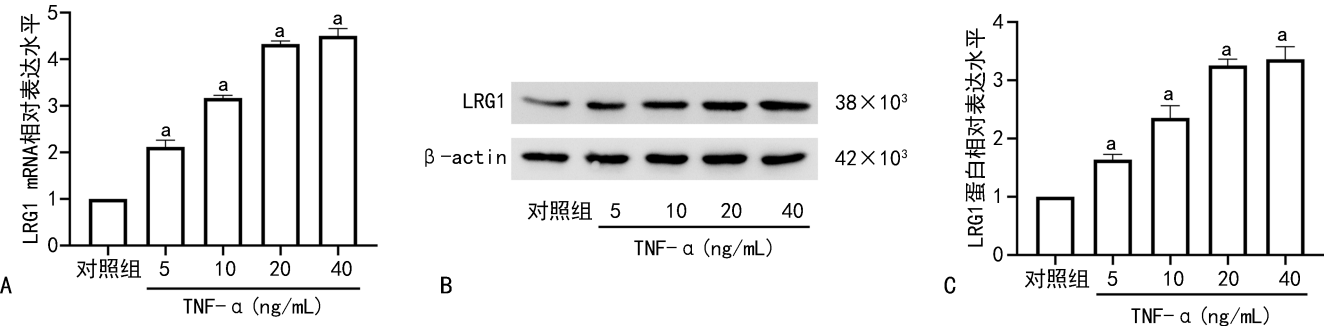
2.1 LRG1 在 TNF- α 处理的 MH7A 细胞中表达升高

与对照组比较,随着 TNF- α 浓度的升高,MH7A 中 LRG1 mRNA 和蛋白相对表达水平均逐渐升高,见图 1;与 20 ng/mL TNF- α 处理相比,40 ng/mL TNF- α 处理 MH7A 细胞后,LRG1 mRNA 及蛋白相对表达水平无明显差异,因此后续选用 20 ng/mL TNF- α 进行实验。

2.2 沉默 LRG1 降低 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭能力

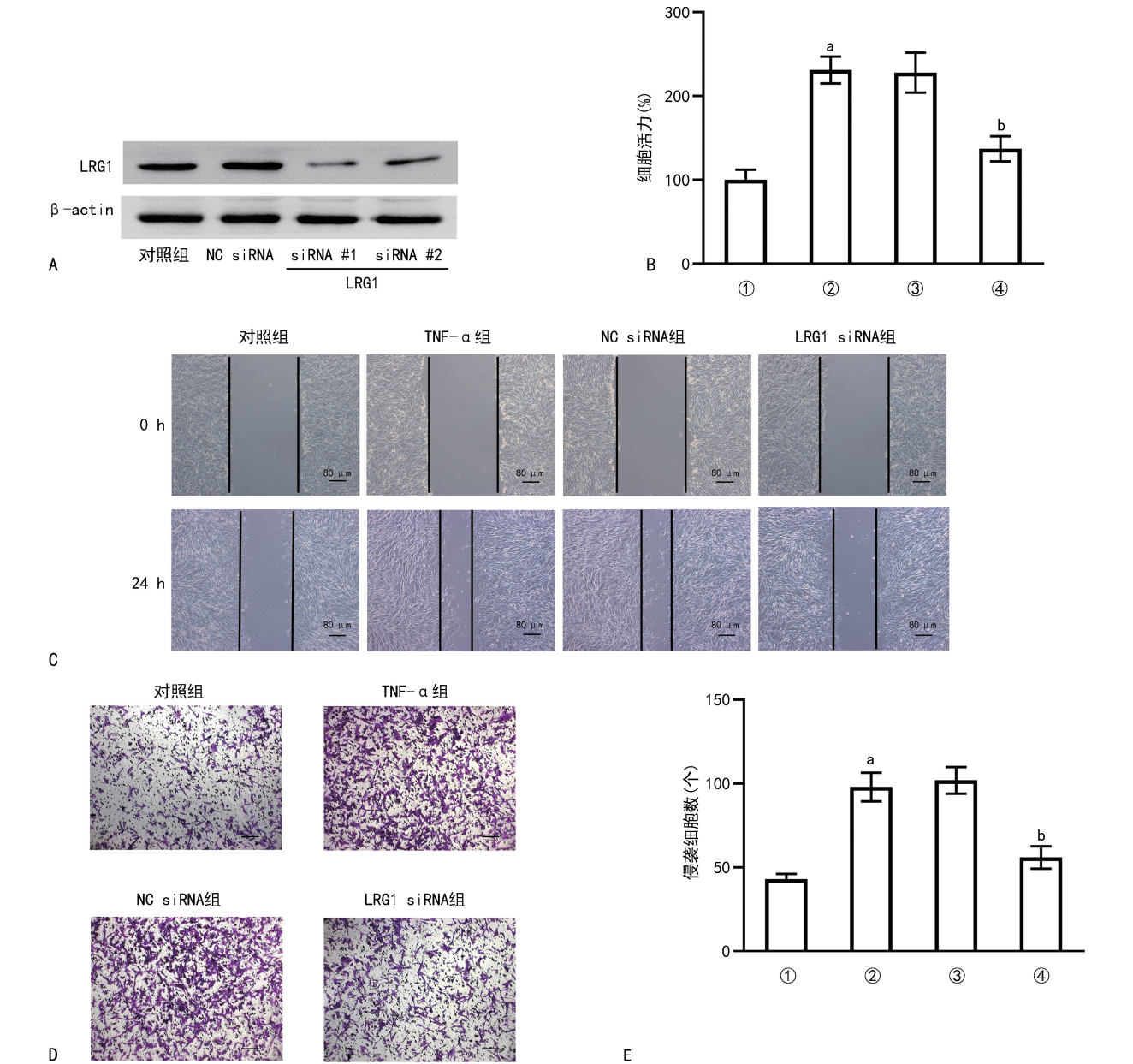
Western blot 实验表明,LRG1 敲低后,MH7A 细胞中 LRG1 相对表达水平明显降低,且 LRG1 siRNA #1 相比 LRG1 siRNA #2 敲低效率更高(图 2A),因此将 LRG1 siRNA #1 用于后续实验。CCK-8 实验表明,TNF- α 处理后 MH7A 细胞活力明显升高;与 NC siRNA 组相比,LRG1 siRNA 组细胞活力

明显下降 $[(137\pm15)\% \text{ vs. } (228\pm24)\%, P<0.05]$, 见图2B。划痕实验和侵袭实验表明,与对照组相比, TNF- α 组细胞迁移率升高,细胞侵袭能力增加;与 NC siRNA 组相比,LRG1 siRNA 组细胞迁移率明显降低,侵袭细胞数明显减少 $[(56.0\pm 6.7) \text{ 个 vs. } (102.0\pm7.9) \text{ 个}, P<0.05]$,见图2C~E。



A:qRT-PCR 检测 TNF- α 处理后 LRG1 mRNA 相对表达水平;B,C:Western blot 检测 TNF- α 处理后 LRG1 相对表达水平;^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图1 TNF- α 处理上调 MH7A 细胞中 LRG1 表达水平



A:Western blot 检测 LRG1 敲低效率;B:CCK-8 实验检测细胞活力;C:划痕实验检测细胞迁移能力;D,E:Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力;^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 NC siRNA 组比较;①:对照组;②:TNF- α 组;③:NC siRNA 组;④:LRG1 siRNA 组。

图2 沉默 LRG1 降低 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭能力

2.3 LRG1 敲除降低 HUVECs 血管生成能力

用 LRG1 敲除的 MH7A 细胞培养基处理 HUVECs 以观察 HUVECs 血管生成情况。结果表明,与 NC siRNA 组相比,LRG1 敲除后(LRG1 siRNA 组)HUVECs 的血管形成能力明显降低,见图 3。

2.4 LRG1 与 CCR1 相互作用

TNF- α 组 CCR1 mRNA 及蛋白相对表达水平分别是对照组的 2.6 倍和 2.0 倍,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 NC siRNA 组相比,LRG1 siRNA 组 CCR1 mRNA(1.74 ± 0.19 vs. 2.55 ± 0.26)及蛋白(1.27 ± 0.05 vs. 1.87 ± 0.16)相对表达水平均明显降低,见图 4A~C。Co-IP 结果表明,在 LRG1 的免疫沉淀复合物中,检测到 CCR1 的存在,表明 LRG1 可

与 CCR1 相互作用,见图 4D。

2.5 过表达 CCR1 抑制 LRG1 对 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

将 LRG1 siRNA 和 pcDNA3.1-CCR1 共转染至 MH7A 细胞中,然后检测细胞增殖、迁移和侵袭能力。Western blot 结果表明,敲低 LRG1 并过表达 CCR1 后(LRG1 siRNA+CCR1 组)CCR1 表达水平明显升高(图 5A)。与单独敲低 LRG1(LRG1 siRNA+Vector 组)相比,敲低 LRG1 并过表达 CCR1 后,MH7A 细胞活力[(260 ± 23)% vs. (95 ± 6)%, $P<0.05$],细胞迁移率明显升高,侵袭细胞数明显增加[(60.5 ± 5.8)个 vs. (87.6 ± 7.4)个],见图 5B~E。

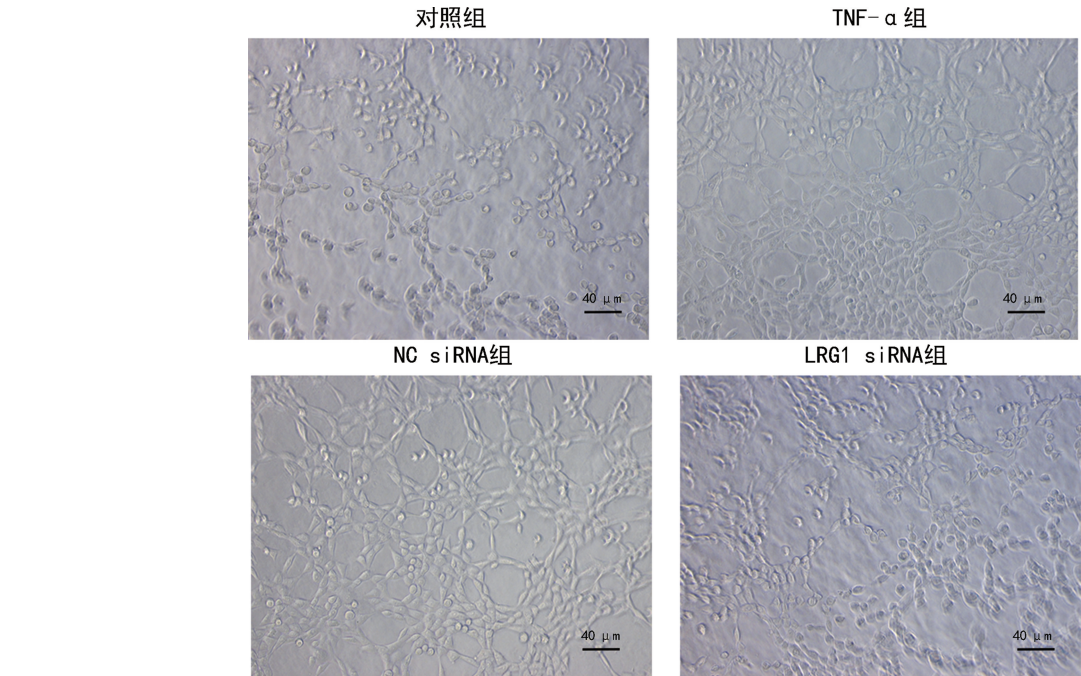


图 3 不同条件处理的 MH7A 细胞培养基对 HUVECs 血管生成能力的影响

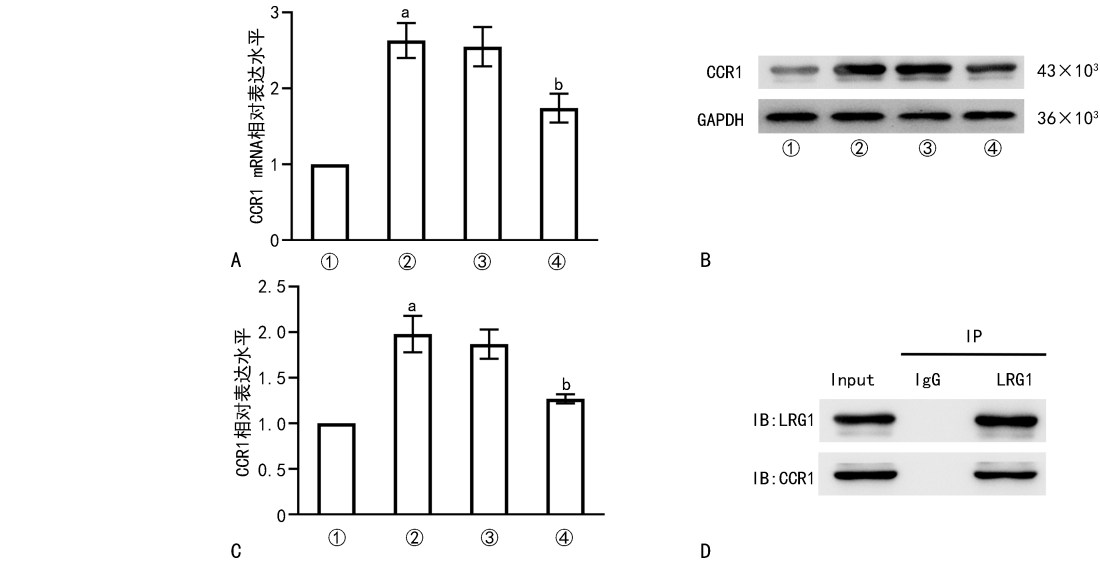
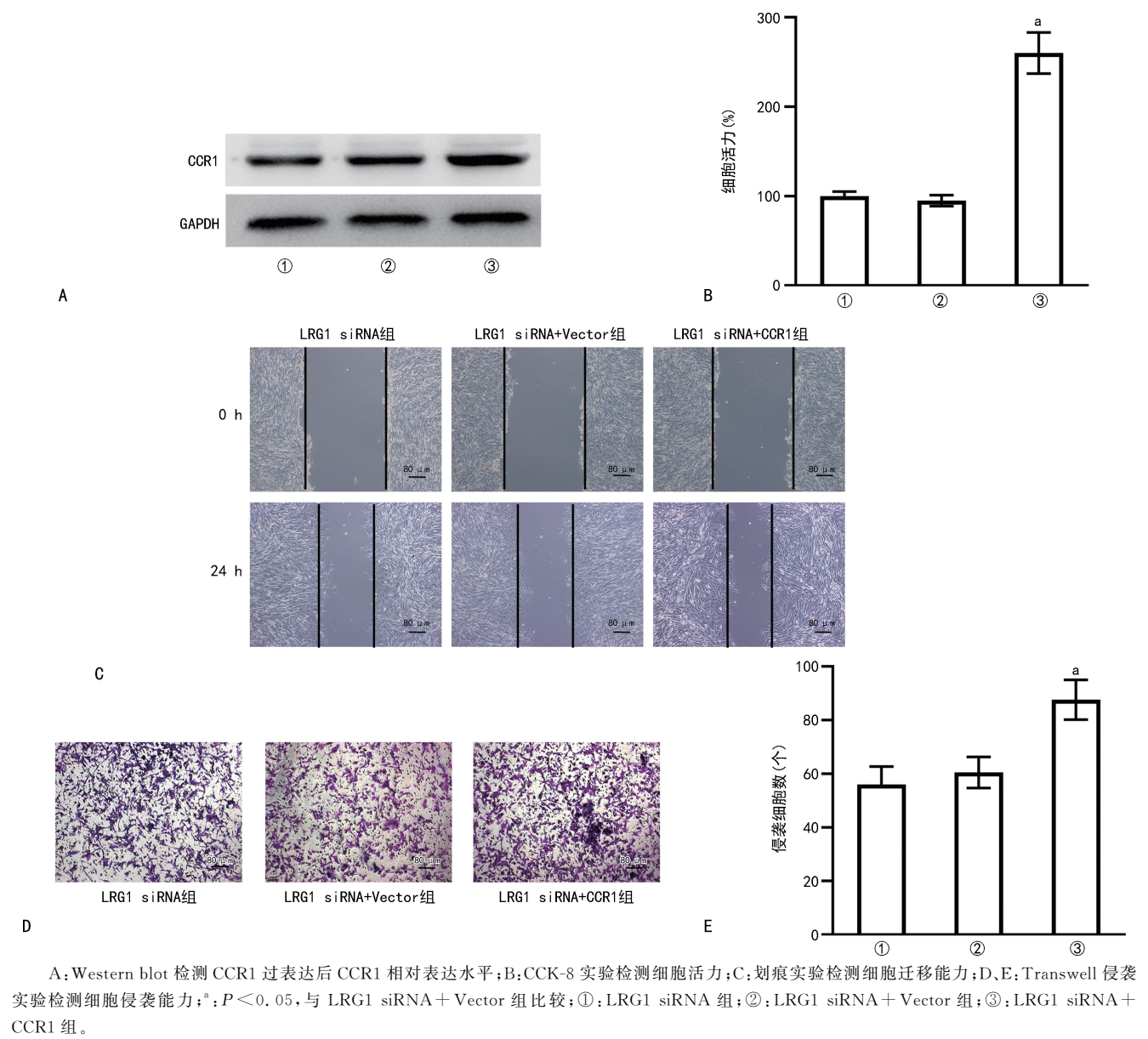


图 4 LRG 调控 CCR1 表达并与 CCR1 相互作用



A: Western blot 检测 CCR1 过表达后 CCR1 相对表达水平;B:CCK-8 实验检测细胞活力;C:划痕实验检测细胞迁移能力;D、E:Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力;^a: $P<0.05$,与 LRG1 siRNA+Vector 组比较;①:LRG1 siRNA 组;②:LRG1 siRNA+Vector 组;③:LRG1 siRNA+CCR1 组。

图5 过表达 CCR1 抑制 LRG1 对 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

3 讨论

本研究表明,沉默 LRG1 可降低 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭能力,并降低 HUVECs 血管生成能力。机制研究表明,LRG1 可与 CCR1 相互作用,并通过调控 CCR1 调节 MH7A 细胞行为。研究表明,RA 患者血清 LRG1 水平明显高于骨关节炎患者,且血清 LRG 水平与 RA 疾病活动度呈正相关^[7-8];在托珠单抗治疗期间,LRG 比 C 反应蛋白或基质金属蛋白酶 3 作为 RA 疾病活动生物标志物的效能更高^[11],说明 LRG1 可能参与 RA 的疾病进程。HE 等^[12]研究发现,LRG1 可通过血管内皮生长因子促进胃癌细胞的增殖和血管生成能力。在心力衰竭小鼠模型中,LRG1 通过与转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1,TGF- β 1)竞争受体结合抑制心脏成纤维细胞的激活^[13]。本研究发现,TNF- α 处理 MH7A 细胞后,LRG1 水平升高,且沉默 LRG1 可降低 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭能力。血管翳由滑膜中新生血

管、滑膜细胞、炎症细胞等构成,具有类似肿瘤组织的特性,其生成是 RA 一个显著的病理特征。新生血管与正常血管结构上有很多不同之处,如生长迅速、结构紊乱、缺乏肌层致血管壁薄而脆等。研究表明,LRG1 可通过激活 TGF- β 通路调控糖尿病肾病、胆管癌、非小细胞肺癌等多种疾病异常血管的形成^[14-16]。抑制 LRG1 可提高内皮细胞覆盖率并改善血管功能^[17]。另一方面,白细胞介素-6(interleukin 6,IL-6)通过促进信号转导及转录激活因子 3(signal transduction and activator of transcription 3,STAT3)与 LRG1 启动子结合来激活 LRG1 转录,并促进血管生成;而敲除 LRG1 后,IL-6 不能刺激血管生成^[18]。这些发现提示 LRG1 可参与调控血管形成。本研究发现,沉默 LRG1 可抑制 HUVECs 血管生成。

除了血管翳形成,滑膜增生是 RA 的另一种主要病理表现形式。滑膜增生可能有两种原因:(1)成纤维样滑膜细胞数量增多;(2)滑膜干细胞池中间充质

干细胞向滑膜组织迁移并分化。本研究表明,沉默 LRG1 可抑制 MH7A 细胞的迁移和侵袭能力。这与 LRG1 在骨关节炎中的功能相似,即 LRG1 可促进骨关节炎软骨下骨中的血管生成和间充质干细胞迁移^[19]。通过查阅文献发现,LRG1 可能与 CCR1 相互作用^[20]。CCR1 可吸引循环单核细胞向发炎的滑膜迁移^[21]。同时,CCR1 可促进间充质干细胞归巢并向损伤组织的迁移^[22]。本研究发现,沉默 LRG1 可明显降低 CCR1 mRNA 及蛋白表达水平。通过 Co-IP 本研究证实了 LRG1 与 CCR1 的相互作用,并发现过表达 CCR1 可逆转 LRG1 沉默对 MH7A 细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用。因此,作者推测 LRG1 有可能通过调控 CCR1 表达影响滑膜组织中间充质干细胞向炎症部位的迁移,导致滑膜增生。但是 LRG1 是直接还是间接与 CCR1 结合还需进一步实验验证。

综上所述,沉默 LRG1 可下调 CCR1 从而抑制 MH7A 细胞的增殖、迁移、侵袭和 HUVECs 细胞血管生成能力,为 LRG1 作为 RA 治疗靶标提供了理论依据。

参考文献

- [1] SCHERER H U, HÄUPL T, BURMESTER G R. The etiology of rheumatoid arthritis[J]. J Autoimmun, 2020, 110: 102400.
- [2] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. 中华内科杂志, 2018, 57(4): 242-251.
- [3] ZOU Y, XU Y, CHEN X, et al. Research progress on leucine-rich alpha-2 glycoprotein 1: a review[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 809225.
- [4] CHONG P F, SAKAI Y, TORISU H, et al. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein in the cerebrospinal fluid is a potential inflammatory biomarker for meningitis[J]. J Neurol Sci, 2018, 392: 51-55.
- [5] FURUTA T, SUGITA Y, KOMAKI S, et al. The multipotential of leucine-rich α -2 glycoprotein 1 as a clinicopathological biomarker of glioblastoma[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2020, 79(8): 873-879.
- [6] SHINZAKI S, MATSUOKA K, TANAKA H, et al. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a potential biomarker to monitor disease activity in inflammatory bowel disease receiving adalimumab: PLANET study[J]. J Gastroenterol, 2021, 56(6): 560-569.
- [7] SERADA S, FUJIMOTO M, OGATA A, et al. iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(4): 770-774.
- [8] HA Y J, KANG E J, LEE S W, et al. Usefulness of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a disease activity biomarker in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Korean Med Sci, 2014, 29(9): 1199-1204.
- [9] ŠUCUR A, JAJIC Z, IKIC MATIJAŠEVIĆ M, et al. Combined manual and automated immunophenotypisation identified disease-specific peripheral blood immune subpopulations in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 38(5): 903-916.
- [10] CHOU P H, CHEE A, SHI P, et al. Small molecule antagonist of C-C chemokine receptor 1 (CCR1) reduces disc inflammation in the rabbit model[J]. Spine J, 2020, 20(12): 2025-2036.
- [11] FUJIMOTO M, SERADA S, SUZUKI K, et al. Leucine-rich α 2 -glycoprotein as a potential biomarker for joint inflammation during anti-interleukin-6 biologic therapy in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(8): 2056-2060.
- [12] HE L, FENG A, GUO H, et al. LRG1 mediated by ATF3 promotes growth and angiogenesis of gastric cancer by regulating the SRC/STAT3/VEGFA pathway[J]. Gastric Cancer, 2022, 25(3): 527-541.
- [13] LIU C, LIM S T, TEO M H Y, et al. Collaborative regulation of LRG1 by TGF- β 1 and PPAR- β / δ modulates chronic pressure overload-induced cardiac fibrosis[J]. Circ Heart Fail, 2019, 12(12): e005962.
- [14] ZHANG A, FANG H, CHEN J, et al. Role of VEGF-A and LRG1 in abnormal angiogenesis associated with diabetic nephropathy[J]. Front Physiol, 2020, 11: 1064.
- [15] JIN Z, KOBAYASHI S, GOTOH K, et al. The prognostic impact of leucine-rich α -2-glycoprotein-1 in cholangiocarcinoma and its association with the IL-6/TGF- β 1 axis[J]. J Surg Res, 2020, 252: 147-155.
- [16] LI Z, ZENG C, NONG Q, et al. Exosomal leucine-rich- α 2-glycoprotein 1 derived from non-small-cell lung cancer cells promotes angiogenesis via TGF- β signal pathway[J]. Mol Ther Oncolytics, 2019, 14: 313-322.
- [17] O'CONNOR M N, KALLENBERG D M, CAMILLI C, et al. LRG1 destabilizes tumor vessels and restricts immunotherapeutic potency[J]. Med (N Y), 2021, 2(11): 1231-1252. (下转第 2585 页)

- litis antigenic complex viruses: from structure to immunity[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2213-2215.
- [2] WANG R, WANG X, ZHANG L, et al. The epidemiology and disease burden of children hospitalized for viral infections within the family Flaviviridae in China: a national cross-sectional study[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, 16(7): 1-20.
- [3] 吴丹, 尹遵栋, 李军宏, 等. 中国 2014—2018 年流行性乙型脑炎流行病学特征[J]. *中国疫苗和免疫*, 2020, 26(1): 1-4.
- [4] MEYER F, VALENTINI L. Disease-related malnutrition and sarcopenia as determinants of clinical outcome[J]. *Visc Med*, 2019, 35(5): 282-291.
- [5] CASTRO J D S, SANTOS C A D, ROSA C O B, et al. STRONGkids nutrition screening tool in pediatrics: an analysis of cutoff points in Brazil[J]. *Nutr Clin Pract*, 2022, 37(5): 1225-1232.
- [6] 胡亚美, 江载芳, 申昆玲, 等. 诸福棠实用儿科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [7] MALEKIAN TAGHI A, ASNAASHARI K, SHABANI-MIRZAEI H, et al. Evaluation of the risk of malnutrition in hospitalized children by PYMS, STAMP, and STRONGkids tools and comparison with their anthropometric indices: a cross-sectional study[J]. *BMC Nutr*, 2022, 8(1): 33-40.
- [8] PEREIRA D S, DA SILVA V M, LUZ G D, et al. Nutrition risk prevalence and screening tools' validity in pediatric patients: a systematic review[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2022: 2462-2465.
- [9] BARROS T A, CRUVEL J, SILVA B M, et al. Agreement between nutritional risk screening tools and anthropometry in hospitalized pediatric patients[J]. *Clin Nutr ESPEN*, 2022, 47: 227-232.
- [10] SANTOS C A D, ROSA C O B, FRANCESCINI S, et al. Nutrition risk assessed by STRONGkids predicts longer hospital stay in a pediatric cohort: a survival analysis[J]. *Nutr Clin Pract*, 2021, 36(1): 233-240.
- [11] 何冰洁, 廖艳, 刘玉玲, 等. 住院患儿营养风险筛查及营养评估[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(19): 1467-1470.
- [12] CAO J, PENG L, LI R, et al. Nutritional risk screening and its clinical significance in hospitalized children[J]. *Clin Nutr*, 2014, 33(3): 432-436.
- [13] MARQUEZ C M V, ALBERICI P C. Nutritional screening tool versus anthropometric assessment in hospitalized children: which method is better associated to clinical outcomes? [J]. *Arch Latinoam Nutr*, 2015, 65(1): 12-20.
- [14] GAMBRA-ARZOZ M, ALONSO-CADENAS J A, JIMENEZ-LEGIDO M, et al. Nutrition risk in hospitalized pediatric patients: higher complication rate and higher costs related to malnutrition[J]. *Nutr Clin Pract*, 2020, 35(1): 157-163.
- [15] 张丹, 卢艳萍, 潘素香, 等. 婴幼儿下呼吸道感染患儿应用 STRONGkids 工具营养筛查及对临床结局的可能影响[J]. *中华临床营养杂志*, 2019, 27(4): 233-237.
- (收稿日期: 2023-03-21 修回日期: 2023-07-14)
(编辑: 张芃捷)
- (上接第 2576 页)
- [18] DRITSOULA A, DOWSETT L, PILOTTI C, et al. Angiopathic activity of LRG1 is induced by the IL-6/STAT3 pathway[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 4867.
- [19] WANG Y, XU J, ZHANG X, et al. TNF- α -induced LRG1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2715.
- [20] HUTTLIN E L, BRUCKNER R J, NAVARRETE-PÉREA J, et al. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome[J]. *Cell*, 2021, 184(11): 3022-3040.
- [21] ZHAO X, GU M, XU X, et al. CCL3/CCR1 mediates CD14⁺ CD16⁻ circulating monocyte recruitment in knee osteoarthritis progression[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(5): 613-625.
- [22] JIANG H H, JI L X, LI H Y, et al. Combined treatment with CCR1-overexpressing mesenchymal stem cells and CCL7 enhances engraftment and promotes the recovery of simulated birth injury-induced stress urinary incontinence in rats[J]. *Front Surg*, 2020, 7: 40.
- (收稿日期: 2023-01-12 修回日期: 2023-05-25)
(编辑: 冯 甜)