

学校编码: 10384

密级__

学号:

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

TIPE2 通过上调 caspase 下调 NF- κ B 促进佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维样细胞凋亡

TIPE2 promote synovial fibroblasts cell apoptosis of adjuvant arthritis rats by up-regulating caspase while down-regulating NF- κ B

石春燕

指导教师姓名: 庄国洪 副教授

专 业 名 称: 肿瘤学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

2015 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(TIPE2 通过上调 caspase 下调 NF- κ B 促进佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维样细胞凋亡)课题(组)的研究成果,获得(庄国洪副教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(抗癌研究中心、器官移植研究所)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 石春燕

2015年5月20日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ √ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：石春燕

2015年 5月20日

摘要

目的: TIPE2 能够抑制炎症以及肿瘤的发生发展, 并且 TIPE2 过表达能够促进细胞的凋亡。类风湿关节炎是一种免疫多态性慢性疾病, 我们应用类风湿关节炎模型大鼠佐剂型关节炎滑膜成纤维样细胞(fibroblast-like synoviocytes of rat adjuvant arthritis, AA-FLS), 通过体外实验分析 TIPE2 对死亡受体 5 诱导细胞凋亡的作用探讨 TIPE2 对佐剂型关节炎发病的影响。

方法: 通过 RT-PCR、荧光实时定量 PCR 和 Western-blotting 技术检测正常大鼠滑膜成纤维样细胞以及 AA-FLS 中 TIPE2 的表达, 明确 TIPE2 在两种细胞系的表达情况。进一步应用慢病毒载体稳定转染 AA-FLS, 提高 TIPE2 在 AA-FLS 的表达并应用荧光显微镜、RT-PCR、荧光实时定量 PCR 和 Western-blotting 技术进行鉴定。通过细胞增殖实验以及流式细胞术应用抗 DR5 单链抗体 ZF1 研究 TIPE2 对 AA-FLS 细胞增殖及凋亡的影响, Western-blotting, caspase8 活性检测试剂盒检测相关蛋白的表达, 并用 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 以及 NF- κ B 抑制剂 Bay 同步干扰试验组, 然后通过流式细胞术检测凋亡, 研究 TIPE2 调控的可能机制。

结果: 通过 RT-PCR、荧光实时定量 PCR 和 Western-blotting 技术检测发现 TIPE2 在正常大鼠滑膜成纤维样细胞表达, 在 AA-FLS 中表达明显降低。通过慢病毒载体转染技术, 获得 TIPE2 过表达稳定细胞株 TIPE2^{+/+}-FLS 以及相应的空载组细胞株 MIGR1-FLS。在 TIPE2^{+/+}-FLS 稳定细胞株中, TIPE2 基因水平及蛋白水平的表达都显著上调, TIPE 家族其他成员如 TIPE1, TIPE3 的表达量没有改变。ZF1 刺激后, 细胞生长抑制率、细胞凋亡率及 DR5 的表达量以及 caspase8 的活化量在 TIPE2^{+/+}-FLS 均有明显的增加, 与 MIGR1-FLS 组相比, 差异显著, 具有统计学意义; 并且 TIPE2^{+/+}-FLS 磷酸化的 NF- κ B 和磷酸化的 AKT 明显下调, 与 MIGR1-FLS 组相比, 差异显著。在 ZF1 处理前 60 min, TIPE2^{+/+}-FLS 组给予 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 预处理, MIGR1-FLS 组给予 NF- κ B 抑制剂 Bay 预处理, 结果提示 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 预处理的 TIPE2^{+/+}-FLS 组凋亡率明显降低, 其凋亡率与 MIGR1-FLS 组相当; NF- κ B 抑制剂 Bay 预处理的 MIGR1-FLS

组凋亡率明显提高。

结论：提高 TIPE2 的表达可以提高 ZF1 诱导 AA-FLS 凋亡的敏感性，其机制可能有两点，其一：TIPE2 上调 AA-FLS 膜跨膜蛋白 DR5 表达上调，激活更多的 caspase；其二：抑制 NF- κ B 和 AKT 的活化。

关键词：类风湿关节炎 佐剂型关节炎 FLS 慢病毒载体 DR5 TIPE2

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective. The TIPE2 protein is an inhibitor of inflammation and cancer, and its overexpression induces cell death. We examined the role of TIPE2 with respect to adjuvant arthritis (AA)-associated mechanisms of pathogenesis. We also analyzed the TIPE2 regulation of DR5-mediated apoptosis in vitro during AA.

Methods. We used semi-quantitative and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays and western blotting to determine the presence of TIPE2 in normal fibroblast-like synoviocytes (normal FLS) and AA fibroblast-like synoviocytes (AA-FLS). And then, recombinant MIGR1/TIPE2^{+/+} and control MIGR1 lentivirus vectors were transfected to AA-FLS. The effects of a single chain variable fragment (ScFv) antibody ZF1 against DR5 were examined using proliferation assays and flow cytometry. The extent of apoptosis was determined by flow cytometry, western blotting and active caspase 8 assays, and caspase inhibitor Z-VAD-FMK and NF-κB inhibitors Bay was used synchronously, and then the apoptosis were detected by flow cytometry.

Results. In the current study, TIPE2 protein was detected in normal FLS, but scarcely any in AA-FLS. The AA-FLS transfected with a TIPE2 expression plasmid showed significantly improved levels of TIPE2 mRNA and protein expression. The expression of DR5, inhibition of cellular growth, and apoptosis of the TIPE2^{+/+}-FLS were significantly increased compared with cells transfected with the control MIGR1 vector. The levels of pNF-κB and pAKT were lower in the TIPE2^{+/+} group treated with ZF1, whereas the activity of caspase 8 was higher. Before ZF1 processing, TIPE2^{+/+}-FLS group was pretreated with caspase inhibitor Z-VAD-FMK and MIGR1-FLS group was pretreated with the NF-κB inhibitors Bay, results suggest the apoptosis rate of TIPE2^{+/+}-FLS group pretreated with caspase inhibitor Z-VAD-FMK significantly decreased, while the apoptosis rate of MIGR1-FLS group was pretreated with the NF-κB inhibitors Bay increased significantly.

Conclusion. The possible mechanisms of the induction of apoptosis of TIPE2^{+/+} AA-FLS could be related to the roles of TIPE2. On one hand, TIPE2 enhances DR5 expression levels and thus promotes the activation of active caspase 8; on the other hand, inhibits the activation of NF-κB and AKT.

Keywords: Rheumatoid arthritis; adjuvant arthritis; fibroblast-like synoviocytes; lentivirus vectors ;DR5; TIPE2

目 录

第一章 前言	1
一、类风湿关节炎的发病因素	1
1 细胞因子与 RA	2
1.1 白介素 (IL-1)	2
1.2 白细胞介素-6 (IL-6)	2
1.3 白细胞介素-15 (IL-15)	3
1.4 肿瘤坏死因子 (TNF- α)	3
1.5 转化生长因子 (TGF- β 1)	3
1.6 干扰素 (IFN- γ)	4
2 Th1/Th2 平衡与类风湿性关节炎	4
3 细胞凋亡与类风湿性关节炎	5
4 性激素与类风湿性关节炎	5
4.1 雌激素	5
4.2 雄激素	5
5 原癌基因与类风湿性关节炎	6
二、类风湿关节炎的治疗	6
1 内科治疗	7
1.1 非甾体抗炎药 (Non-steroid anti-inflammatory drugs, NSAIDs)	7
1.2 改善病情的抗风湿药 (Disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs)	7
1.3 糖皮质激素 (GCS)	7
2 外科手术治疗	8
3 生物治疗	8
3.1 细胞因子靶向治疗	8
3.2 以细胞为靶位的治疗	8
4 基因治疗	9

5 造血干细胞移植治疗.....	9
三、佐剂型关节炎大鼠模型的应用	9
四、作为免疫相关性疾病靶点的死亡受体 5 (DEATH RECEPTOR 5, DR5) 的研究进展.....	10
1. 死亡受体 5(DR5)的结构及分布.....	10
2. 死亡受体 5(DR5)诱导肿瘤细胞凋亡	11
2.1 死亡受体 5 (DR5) 的相关配体 TRA-8	11
2.2 死亡受体 5 (DR5) 的作用机制	11
3. TRAIL 与类风湿性关节炎	12
五、TIPE2 的研究进展	12
1. TIPE2 基因定位结构及其表达.....	13
2. TIPE2 基因表达与分布.....	13
3. TIPE2 生物学功能	13
4. TIPE2 与免疫相关疾病.....	13
六、实验方案设计.....	14
1. 研究目的和意义	14
2. 研究内容.....	14
第二章 TIPE2 过表达质粒转染佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维样细胞以及鉴定	16
一、材料和方法	16
1. 材料.....	16
1.1 细胞株及质粒	16
1.2 主要试剂及耗材.....	16
1.3 主要仪器及设备.....	17
1.4. 主要溶液的配置.....	18
2. 方法.....	20
2.1 细胞培养	20
2.2 AA 大鼠 FLS 细胞中 TIPE2 表达检测	20
2.3 细胞培养及质粒转染.....	25

2.4 转染 MIGR1/TIPE2 ^{+/+} 后 AA-FLS 细胞的鉴定	26
二、结果与分析	26
1. TIPE2 在 AA-FLS 中极低表达.....	26
2. TIPE2 过表达质粒和 MIGR1 空载质粒转染 AA-FLS.....	27
3. PCR 检测 TIPE2 ^{+/+} -FLS、MIGR1-FLS 中 TIPE2 的表达特点	28
4. Western 检测 TIPE2 ^{+/+} -FLS、MIGR1-FLS 中 TIPE2 表达.....	28
三、讨论.....	29
第三章 TIPE2 在佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维样细胞的凋亡中的作用及其机理初步研究.....	31
一、材料和方法	31
1. 材料.....	31
1.1 细胞株.....	31
1.2 主要试剂及耗	31
1.3 主要仪器及设备.....	32
1.4. 主要溶液的配置.....	33
2. 方法.....	35
2.1 MTT 法检测 抗 DR5 单链抗体 ZF1 对 TIPE2 ^{+/+} -FLS 增殖的抑制作用	35
2.2 CyStain DNA 1step 染色流式细胞术对 ZF1 诱导细胞凋亡率的检测	36
2.3 Annexin V/PI 流式细胞术检测转染后 AA-FLS 细胞凋亡	36
2.4 Western blot 检测细胞 caspase8、caspase3、caspase9、Bid 和 Bax 蛋白表达	36
2.5 caspase8 活性检测	37
2.6 Western blot 检测细胞活化的 caspase8 蛋白表达	39
2.7 Western blot 检测细胞 TIPE2、DR5 蛋白表达	39
2.8 流式细胞术检测转染后 AA-FLS 细胞中 DR5 的表达	39
2.9 Western blot 检测细胞 AKT 、AKT (phospho) 、NF-κBp 105/p50 (phospho)蛋白表达	40

2.10 Annexin V/PI 流式细胞术检测抑制剂干扰后细胞凋亡.....	40
二、结果与分析	41
1. MTT 法检测抗 DR5 单链抗体 ZF1 在不同时间点对 TIPE2 ^{+/+} -FLS 的 细胞毒性效应.....	41
2 CyStain DNA 1step 染色流式细胞术对 ZF1 诱导细胞凋亡率的检测	41
3 Annexin V/PI 流式细胞术检测转染后 AA-FLS 细胞凋亡	43
4 Western blot 检测细胞 caspase8、caspase3、caspase9、Bid 和 Bax 蛋 白表达	44
5 caspase8 活性检测.....	45
6 Western blot 检测细胞活化的 caspase8 蛋白表达.....	46
7 Western blot 检测细胞 TIPE2、DR5 蛋白表达	47
8 流式细胞术检测转染后 AA-FLS 细胞中 DR5 的表达	48
9 Western blot 检测细胞 AKT 、 AKT (phospho) 、 NF-κBp105/p50 (phospho)蛋白表达	50
10 Annexin V/PI 流式细胞术检测抑制剂干扰后细胞凋亡	50
三、讨论.....	51
总 结.....	56
参 考 文 献.....	57
附 录.....	64
致 谢.....	66

Contents

Chapter 1 Introduction	1
I Etiology factors of rheumatoid arthritis	1
1 Cell cytokine and RA	2
1.1 IL-1	2
1.2 IL-6	2
1.3 IL-15	3
1.4 TNF- α	3
1.5 TGF- β 1	3
1.6 IFN- γ	4
2. Th1/Th2 cellular balance and rheumatoid arthritis	4
3. Apoptosis and rheumatoid arthritis	5
4. Sex hormone and rheumatoid arthritis	5
4.1 estrogen	5
4.2 androgen	5
5. Oncogene and rheumatoid arthritis.	6
II Therapy of rheumatoid arthritis	6
1 Medical therapy.	7
1.1 Non-steroid anti-inflammatory drugs, NSAIDs	7
1.2 Disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs	7
1.3 GCS	7
2 Surgical treatment	8
3 Biological therapy.	8
3.1 Cytokines targeted therapy	8
3.2 Targeted therapy for cells	8
4 Gene therapy	9
5 Replacement therapy using hemopoietic stem cell transfer	9
III Application of type of adjuvant arthritis rat model	10
IV as immune research progress of correlation disease targets of death receptor 5	10

1.	The structure and distribution of death receptor 5 (DR5)	10
2.	Death receptor 5 (DR5) inducing tumor cell apoptosis	11
2.1	Death receptor 5 (DR5) related ligand TRA - 8	11
2.2	The mechanism of action of death receptor 5 (DR5)	11
3.	TRAIL and rheumatoid arthritis	12
V	The research progress of TIPE2	12
1.	TIPE2 gene location structure and its expression	13
2.	TIPE2 gene expression and distribution	13
3.	TIPE2 biology function	13
4.	TIPE2 immune related diseases	13
VI	The experiment design	14
1.	Research purpose and meaning	14
2.	The research content	15
Chapter 2 TIPE2 expression plasmid transfection fibroblast-like synoviocytes of rat adjuvant arthritis and identification		
I	Materials and methods	16
1.	Materials	16
1.1	Cell lines and plasmid	16
1.2	Main reagents and consumables	16
1.3	Main instruments and equipment	17
1.4.	Configuration of the main solution	18
2.	Method	20
2.1	Cell culture	20
2.2	TIPE2 expression in AA-FLS of rats	21
2.3	Cell culture and plasmid transfection	25
2.4	After transfection MIGR1 / TIPE2 + / + AA - the identification of FLS cells	26
II	Results and Analysis	26
1.	TIPE2 extremely low expression in the AA - FLS	26
2.	TIPE2-overexpression-plasmid and MIGR1 plasmid transfect AA-FLS	27
3.	PCR detection TIPE2 expression after AA-FLS transfected	28
4.	Western detection TIPE2 expression after AA-FLS transfected	28

III Discussion	29
Chapter 3 preliminary study the role of TIPE2 in apoptosis of AA-FLS and its mechanism	31
I Materials and methods.	31
1. The material	31
1.1 Cell lines	31
1.2 Main reagents and consumption	31
1.3 Main instruments and equipment	32
1.4. Configuration of the main solution	33
2. Method	35
2.1 Determined by MTT method to detect resistance DR5 single antibody ZF1 for TIPE2 ^{+/+} - FLS proliferation inhibition	35
2.2 One step dyeing CyStain DNA flow cytometry to detect ZF1 inducing cell apoptosis rate	36
2.3 Flow cytometry detection Annexin V/PI AA - FLS apoptosis after transfection	36
2.4 Western blot detection cell caspase8, caspase3, caspase9, Bid and Bax protein expression	36
2.5 Caspase8 activity detection	37
2.6 Western blot test cell activation caspase8 protein expression	39
2.7 Western blot test cell TIPE2, DR5 protein expression	39
2.8 Flow cytometry to detect AA - FLS cells after transfection DR5 expression	39
2.9 Western blot test cell AKT, AKT (phospho) and Bp 105 / nf-kappa p50 (phospho) protein expression	40
2.10 Annexin V/PI Flow cytometry detected apoptosis after inhibitor disturbance	40
II Results and Analysis	41
1. Determined by MTT method to detect DR5 single antibody ZF1 resistance at different time points for TIPE2 ^{+/+} FLS cytotoxic effect	41
2 One step dyeing CyStain DNA flow cytometry to detect ZF1 inducing cell apoptosis rate	41
3 Flow cytometry detection Annexin V/PI AA - FLS apoptosis after	

transfection	43
4 Western blot detection cell caspase8, caspase3, caspase9, Bid and Bax protein expression	44
5 Caspase8 activity detection	45
6 Western blot test cell activation caspase8 protein expression	46
7 Western blot test cell TIPE2, DR5 protein expression	47
8 Flow cytometry to detect AA - FLS cells after transfection DR5 expression	48
9 Western blot test cell AKT, AKT (phospho), the nf-kappa Bp105 / p50 (phospho) protein expression	50
10 Annexin V/PI Flow cytometry detected apoptosis after inhibitor disturbance	50
III Discussion	51
Summary	56
References	57
Appendices	64
Acknowledge	66

第一章 前言

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以对称性、多滑膜关节炎病理表现和关节外病变为主要临床症状的慢性全身性炎症性疾病。该病好发于全身小关节如手、腕、足等关节,反复发作,迁延不愈,具体表现为慢性关节滑膜炎、滑膜增生甚至出现纤维化。早期可有小关节红、肿、热、痛及功能障碍等临床症状,晚期患病关节可出现不同程度的僵硬甚至畸形,伴有骨及骨骼肌萎缩,是临床上极易致残的一种自身免疫相关性疾病。从病理改变的角度来看,类风湿关节炎是一种主要累及关节滑膜,晚期可波及到关节软骨、关节韧带、肌腱和骨组织,甚至心、肺、眼、浆膜等结缔组织的广泛性炎症性疾病。

类风湿关节炎的患者占世界人口的 1%-2%,在我国,类风湿关节炎的患病率为 0.32%-0.36%。随着年龄的增长 RA 的患病率逐渐增加,多数群体研究提示老年人(65 岁以上或 70 岁以上)中患病率最高。本病易反复发作,致残率较高,预后不佳,到目前为止还没有很好方法可以根治之。随着免疫学和分子生物学的进一步发展、RA 动物模型的建立,发现关节滑膜成纤维样细胞的肿瘤样生长、侵袭关节软骨以及自主分泌炎性细胞因子等在 RA 疾病的发生发展过程中起着重要作用^[1]。

一、类风湿关节炎的发病因素

长期以来,类风湿性关节炎的治疗始终未得到有效解决,主要原因是其病因一直是困扰人们的一个难题。最开始的医学观点认为类风湿关节炎是患者血清中的自身抗体即类风湿因子(rheumatoid factor, RF),即针对 IgG Fc 片段的 IgM, RF 及其免疫复合物(immunologic complex, IC)沉积于关节囊滑膜,以 III 型超敏反应为主的引起全身小关节滑膜增厚、水肿、充血、淋巴细胞和巨噬细胞浸润的病理过程^[2]。随着对风湿性疾病研究以及临床流行病学的进展,特别是 RA 的各种动物模型的成功建立及其在研究 RA 发病机制等方面的大量应用,人们发现,细胞因子、Th1/Th2 细胞平衡、细胞凋亡、性激素、原癌基因等在 RA 的发病过程中起着重要作用。

1 细胞因子与 RA

细胞因子是由机体的免疫细胞及非免疫细胞合成和分泌的一类能够调节多种细胞的生理功能的小分子多肽类的总称，具有广泛的生物活性，对调节细胞增殖和分化有重要作用。细胞因子包括白细胞介素（Interleukin, IL）、干扰素（Interferon, IFN）、肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor, TNF）、转化生长因子（Transforming growth factor, TGF）等。

1.1 白介素（IL-1）

IL-1 是引起 RA 关节软骨破坏的最重要的促炎细胞因子之一，RA 患者关节组织中的 IL-1 主要由滑膜软骨细胞产生。IL-1 的作用机理可概括如下：①刺激人滑膜细胞中胞浆型磷脂酶 A2(PLA2)基因及环氧酶-2 基因表达、蛋白质合成，并使其活性增强，分解磷脂膜，产生花生四烯酸，导致前列腺素(PGE2)生成并释放^[3]，同时，促进滑膜细胞和软骨细胞合成并释放胶原酶，PGE2 和胶原酶协同作用引发滑膜炎反应、软骨基质的崩解，而游离的胶原、局部免疫复合物等分解产物又进一步刺激 IL-1 的产生，形成一个恶性循环；②诱导 RA 关节滑液细胞增殖并产生蛋白激酶，蛋白激酶直接作用于软骨基质引起软骨吸收；③促进变性蛋白酶合成分泌，引起间质降解及骨破坏；④刺激滑膜、软骨细胞合成过量的金属蛋白酶——基质溶素和胶原酶，基质溶素可直接破坏分解软骨基质；⑤诱导产生蛋白聚糖，使骨质脱钙；⑥促进滑膜细胞释放纤维蛋白溶酶原激活剂，诱导滑膜、软骨释放 PLA2，而 PLA2 能抑制蛋白多糖前体物质氨基多糖(GAG)的合成，阻滞软骨细胞对各种生长因子的促有丝分裂作用；⑦作用于内皮细胞促进嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞聚集，引起 RA 关节局部炎症反应发生；⑧在类风湿血管翳的形成中起重要作用，称其为“中心罪犯”^[4]。关于 IL-1 如何激活滑膜细胞，其细胞信号转导的具体机制是目前研究的热点。

1.2 白细胞介素-6（IL-6）

有研究证明 IL-6 主要由关节滑膜成纤维样细胞合成并分泌到关节液，在 RA 发病机制中的作用表现在：促进活化的 B 细胞增殖，诱导抗体分泌，增加 IgM 型类风湿因子(Rheumatoid factor, RF)的生成^[5]，同时诱导关节滑膜成纤维样细胞分泌急性相蛋白(Acute-phase protein, APP)，是 IL-1 和 TNF 的某些生物效应的放大因子。关节滑膜液中 IL-6 的浓度与 RA 的疾病活动程度正相关，且与 IL-1、

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.