

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.19.003

microRNA-34a 在大鼠膝骨关节炎模型中的功能研究*

张文强¹, 丁倩², 张娜³, 李月白⁴

(1. 郑州大学护理学院临床教研, 郑州 450052; 2. 河南省人民医院胸外科 1 病区, 郑州 450003; 3. 郑州大学第一附属医院脑外 3 病区, 郑州 450052; 4. 郑州大学第一附属医院骨科, 郑州 450003)

[摘要] 目的 探讨微小 RNA-34a(miR-34a)在碘乙酸钠所致大鼠膝骨关节炎模型中的表达变化,并初步明确其功能。方法 选取 30 只雄性 Wistar 大鼠,左侧膝盖不注射碘乙酸钠作为对照组,右侧膝盖注射碘乙酸钠作为模型组;造模完成后检测两组大鼠关节液内 miR-34a 表达水平的变化;分离两组大鼠的膝关节软骨细胞并进行原代培养,敲低 miR-34a 后,使用流式细胞仪测定细胞凋亡情况。结果 模型组 Makin 评分为(5.09±1.35)分,对照组为(1.27±0.64)分,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,模型组中 miR-34a 在关节液和关节软骨细胞内的表达均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。将 miR-34a 用它的反义互补片段敲低后,模型组大鼠关节软骨细胞的凋亡受到明显抑制($P<0.05$)。结论 miR-34a 在碘乙酸钠所致大鼠膝骨关节炎的关节液中表达升高,并且抑制 miR-34a 的表达会降低关节炎大鼠的关节软骨细胞凋亡率。

[关键词] 膝骨关节炎;关节液;微小 RNA-34a;细胞凋亡**[中图分类号]** R684.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)19-2599-03

Study on function of microRNA-34a in rat model of knee osteoarthritis*

Zhang Wenqiang¹, Ding Qian², Zhang Na³, Li Yuebai⁴

(1. Clinical Section of Teaching and Research, Nursing College of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China; 2. First Ward, Department of Thoracic Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China; 3. Third Ward, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China; 4. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of microRNA-34a(miR-34a) in sodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis rat model and to initially clarify its function. **Methods** Thirty male Wistar rats were selected. The right knees were injected with sodium iodoacetate (model group) and the left knees served as the control group without injecting by sodium iodoacetate. The expression levels of miR-34a in the synovial fluid and articular chondrocytes were compared between two groups after constructing the model. Articular chondrocytes in the two groups were separated for conducting the primary culture, after miR-34a knockdown, the flow cytometry was used to determine cell apoptosis. **Results** The Makin score in the model group was(5.09±1.35)points, which was (1.27±0.64)points in the control group, the difference had statistical significance($P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of miR-34a in the synovial fluid and articular chondrocytes in the model group were increased, the difference was statistically significant($P<0.05$). After the miR-34a knockdown by using its complementary antisense fragment, articular chondrocytes apoptosis in the model group was significantly inhibited($P<0.05$). **Conclusion** The expression of miR-34a in the synovial fluid of sodium iodoacetate-induced knee osteoarthritis is increased, moreover inhibiting the microRNA-34a expression could reduce the apoptotic rate of articular chondrocytes in osteoarthritis rat.

[Key words] knee osteoarthritis; synovial fluid; microRNA-34a; apoptosis

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见的退行性关节病,特征是关节软骨退行性改变。OA 不仅造成关节软骨的损伤,还可累及整个关节,导致关节软骨退变、纤维化,以及关节面的损伤。膝关节作为人体负重较大的关节,是 OA 的好发部位^[1-2]。然而,OA 的治疗尚局限于对症治疗。临床上应用非甾体类抗炎药和激素等仅是减轻疼痛症状,不能逆转 OA 的病理过程^[3-4]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种长度为 18~25 个核苷酸片段的内源性非编码的 RNA,通过结合靶 mRNA 的 3'UTR 区来调控基因表达^[5]。当前基于 miRNA 治疗的临床试验已应用于多学科的多种疾病,具有很大的临床诊断和治疗潜力。而应用于关节炎的类似治疗比较少。在 OA 软骨中,有研究发现 miRNA 可能参与 OA 的病理过程^[6-10]。据报道,miRNA-34a(miR-34a)具有抗增殖能力,能够调控细胞周期从 G₁ 到 S 的过渡^[11]。此外,miR-34a 可由 p53 诱导继而

引起细胞凋亡或者细胞周期停滞^[12]。但是,miR-34a 在膝 OA 中的作用并不明确。本实验通过构建大鼠膝 OA 模型研究 miR-34a 表达改变,通过探讨 miR-34a 调控凋亡机制为 OA 的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物来源 8 周龄的 Wistar 雄性大鼠 30 只,均来自郑州大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 miRNA 反转录 PCR 试剂盒及相应反转录引物购自南京凯基试剂公司;miR-34a 荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒及相应 PCR 引物购自上海吉玛生物制药有限公司;鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)购自上海恪敏生物科技有限公司;miR-34a 的抑制剂及配套使用的转染试剂购自广州锐博公司;细胞凋亡试剂盒(Annexin-V-FITC/PI 双染)购自江苏碧云天公司。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071520)。 作者简介:张文强(1978—),讲师,硕士,主要从事外科学研究。

1.3 方法

1.3.1 OA 大鼠模型的建立 选取 8 周龄的 Wistar 雄性大鼠 30 只,左侧膝盖不注射碘乙酸钠,作为对照组;右侧膝盖注射碘乙酸钠,作为模型组。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉,两侧膝关节去皮后 75% 乙醇常规消毒,屈曲 45°,自髌骨下髌腱最外侧进针,到达股骨髁后将注射器回抽 2 mm,右侧膝盖注入 0.1 mL 4% 碘乙酸钠溶液 50 μ L,进行骨关节炎模型诱导,左侧膝盖注射等体积的生理盐水。膝关节腔内注射碘乙酸钠溶液 2 周后,将建模侧膝关节与对侧膝关节进行对比,建模侧膝关节出现肿胀及屈伸功能障碍,表示建模成功。在造模后 8 周处死大鼠,获取大鼠关节样品进行分析。

1.3.2 大鼠模型评价 10% 水合氯醛 0.3 mg/kg 腹腔麻醉大鼠,取材前各组大鼠禁食 12 h。取各组大鼠右侧膝关节股骨髁,观察各组大鼠关节软骨大体形态学变化。随后将关节软骨置于 4% 多聚甲醛中固定,乙二胺四乙酸(EDTA)染色,光镜下观察关节软骨及滑膜组织结构变化,并行关节软骨 Makin 评分。

1.3.3 大鼠关节软骨细胞的分离及培养 自对照组大鼠的膝关节分离获得关节软骨细胞,将关节软骨组织切为小片(<1 mm³),经 0.2% 胰蛋白酶和 0.2% II 型胶原酶分别消化 30 min 和 2 h。释放的细胞在达氏修正依氏培养基(DMEM)/F12 培养液中培养并添加 10% 胎牛血清(FBS)和抗菌药物。初级细胞进行单层培养,细胞融合达到 70% 后传代,将细胞以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板,细胞置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中恒温培养。

1.3.4 核苷酸片段的转染 细胞达到融合状态后将其分为 3 组:空白对照组、随机序列核酸组(Scramble 组)及抑制剂组(Inhibitor 组),分别处理。锁核苷酸(locked nucleic acid, LNA)修饰的不同浓度 DNA 寡核苷酸转染按照制造商的方案使用 Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司)进行。空白对照组,无质粒载体仅加入脂质体;Scramble 组,将阴性对照的核苷酸片段转染至细胞;Inhibitor 组,将 miRNA-34a 的反向互补片段的抑制剂转染至细胞。孵育完成后,将各组质粒与脂质体混合物分别加入已标记的对应孔板中,轻摇使其与培养基混合,均匀分布于孔板内。再将细胞置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱中孵育,6 h 后换液,先用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,换成含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基继续培养。Scramble 组及 Inhibitor 组加入终浓度为 100 ng/mL 的 IL-1 β 诱导关节软骨细胞凋亡。

1.3.5 细胞凋亡率的检查 采用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-fluoresceinisothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FICT/PI)双染法检测细胞凋亡率。细胞处理完毕后,用预冷的 PBS 冲洗细胞 3 次后,使用 0.25% 胰酶进行消化,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞;向离心管中加入 PBS,重复离心操作 1 次。向细胞中加入 500 μ L 结合缓冲液,反复吹打制备单细胞悬液,并控制每组的细胞密度为每毫升 1×10^6 个。将细胞悬液转移至流式管中,向每支流式管中加入 5 μ L Annexin V-FITC,避光保存 30 min,上机前 5 min 向每支流式管中加入 2.5 μ L PI,并上机检测,结果所示的右下象限和右上象限为凋亡细胞比例。

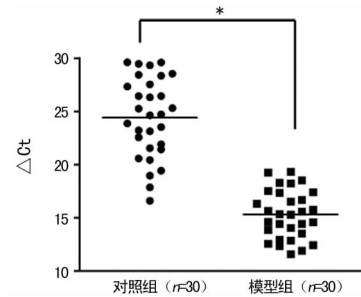
1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠关节 Makin 评分比较 模型组大鼠的 Makin

评分为(5.09 \pm 1.35)分,对照组为(1.27 \pm 0.64)分,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

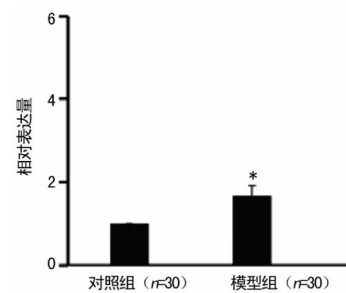
2.2 两组大鼠膝关节 OA 关节液内 miR-34a 的表达水平比较 在体内实验中,对 30 只实验大鼠左膝和右膝关节液中的 miR-34a 表达水平进行检测。qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,模型组 miR-34a 在关节液内表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 miR-34a 可能是潜在的 OA 标记物。见图 1。



*: $P < 0.05$, 模型组与对照组比较。

图 1 两组大鼠膝关节 OA 关节液内 miR-34a 的表达水平比较

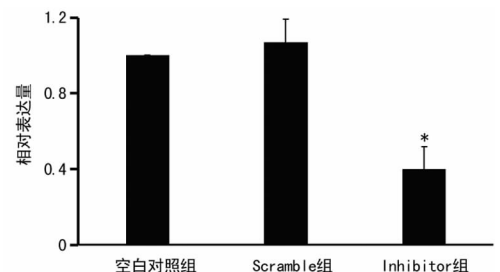
2.3 两组大鼠关节软骨细胞中 miR-34a 的表达水平比较 qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,模型组关节软骨细胞中 miR-34a 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 两组大鼠关节软骨细胞中 miR-34a 的表达水平比较

2.4 miR-34a 抑制剂可敲低内源性 miR-34a 的表达水平 为了进一步研究 miR-34a 的生物学功能,使用 miR-34a 的反义互补片段(抑制剂)来敲低内源性 miR-34a 的表达。qRT-PCR 结果显示,与 Scramble 组比较,转染 miR-34a 抑制剂能够有效地敲低内源性 miR-34a 的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



*: $P < 0.05$, 与 Scramble 组比较。

图 3 各组关节软骨细胞内源性 miR-34a 的表达水平比较

2.5 敲低内源性 miR-34a 的表达可抑制关节软骨细胞的凋亡 OA 中经常伴随有关节软骨细胞凋亡的发生。使用流式细胞术检测模型组大鼠关节软骨细胞的凋亡,结果显示,与空白对照组比较,Inhibitor 组大鼠的细胞凋亡率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 Scramble 组则未见细胞凋亡率发

生明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 4。

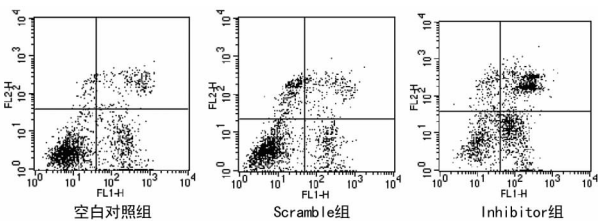


图 4 各组关节软骨细胞的细胞凋亡率

3 讨 论

miRNA 可以通过调节特定 miRNA 的蛋白质翻译过程或与特定 miRNA 结合来调控基因表达,广泛参与人体神经分化、脂肪代谢、细胞增殖和凋亡等生理病理过程,是一种重要的调节因子。例如,let-7 的表达可能通过引起 RAS 基因的高表达而在肺癌中发挥关键作用^[13]; miRNA-143 和 miRNA-145 在结肠癌中表达下降;miRNA 在人类疾病例如白血病、病毒感染等疾病中扮演着重要角色^[14-15]。

miR-34 家族成员由 p53 基因诱导,通过靶向调控 E2F 转录因子 3(E2F transcription factor 3, E2F3)、细胞周期素 E2、细胞周期蛋白依赖激酶 6(cyclin-dependent kinase 6, CDK6)等,导致细胞凋亡、细胞周期停滞和衰老^[10-16-17]。最近的研究证实,miR-34a 是 p53 激活后诱导最显著的 miRNA,导致基因表达的改变。在人类癌症中,miR-34a 是 p53 的一个直接转录目标,并且是 p53 肿瘤抑制网络的重要组成部分^[17-18]。研究发现,miR-34a 可能通过直接靶向 mRNA 编码的 E2F3 和显著降低 E2F3 蛋白水平,诱导神经母细胞瘤细胞凋亡,是一个潜在的肿瘤抑制剂。Tazawa 等^[18]证实,在结肠癌患者中 miR-34a 表达下调;研究标明 miR-34a 是结肠癌疾病发展过程中的一个重要因子,未来可通过 miR-34a 来进行靶向治疗^[18]。

有研究证实,miRNA 在 OA 的进展过程中发挥一定作用^[7,18]。Yamasaki 等^[8]报道,miRNA-146 在低级别 OA 关节软骨中表达升高,其表达可由 IL-1 β 的刺激诱导。Miyaki 等^[9]研究证实,OA 关节软骨中 miR-140 表达下降可能导致特征性 OA 异常基因表达模式。软骨细胞凋亡是 OA 进展的一个主要因素。因此,本研究通过构建大鼠膝 OA 模型来检测 miR-34a 在 OA 软骨的表达情况,体内实验结果显示,模型组中 miR-34a 在关节液内表达升高。另外,本研究进行细胞培养并建立细胞凋亡模型检测细胞凋亡情况,结果显示,加入 IL-1 β 后,miR-34a 表达升高;将 miR-34a 用它的反义互补片段敲低后,IL-1 β 引发的关节软骨细胞的凋亡受到明显抑制。

综上所述,本实验证实对 miR-34a 作用靶点进行沉默,可抑制软骨细胞凋亡,达到保护软骨、延缓关节软骨退变的作用,为 OA 的治疗提供进一步的理论支持。

参考文献

[1] Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15(9):981-1000.

[2] De Silva V, El-Metwally A, Ernst E, et al. Evidence for the efficacy of complementary and alternative medicines in the management of osteoarthritis: a systematic review [J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2011, 50(5):911-920.

[3] Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P. MicroRNAs in disease

and potential therapeutic applications [J]. *Molecular Therapy*, 2007, 15(12):2070-2079.

[4] Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease[J]. *Clin Genet*, 2008, 74(4):296-306.

[5] Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26):5911-5922.

[6] Jones SW, Watkins G, Le Good N, et al. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2009, 17(4):464-472.

[7] Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, et al. Integrative MicroRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11):e3740.

[8] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(4):1035-1041.

[9] Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(9):2723-2730.

[10] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2007, 26(5):745-752.

[11] Kofman AV, Kim J, Park SY, et al. microRNA-34a promotes DNA damage and mitotic catastrophe[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(22):3500-3511.

[12] Kim HR, Roe JS, Lee JE, et al. A p53-inducible microRNA-34a downregulates Ras signaling by targeting IMPDH[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(4):682-688.

[13] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family[J]. *Cell*, 2005, 120(5):635-647.

[14] Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(12):882-891.

[15] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(24):15524-15529.

[16] Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2007, 26(5):731-743.

[17] He L, He XY, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network[J]. *Nature*, 2007, 447(7148):1116-1130.

[18] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(39):15472-15477.