

骨关节炎患者关节液中 miR-335-5p 表达及意义

何伟珍 尹志华 郭佩 徐晓东 叶志中

【摘要】 目的 检测 miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液中的表达水平, 分析 miR-335-5p 与 Kellgren-Lawrence X 线分级之间的关系。**方法** 实时定量 PCR 检测 20 例骨关节炎患者和 20 例非骨关节炎患者膝关节液中 miR-335-5p 的表达水平, 对骨关节炎患者膝关节进行 Kellgren-Lawrence X 线分级, 分析 miR-335-5p 的表达水平与膝关节 Kellgren-Lawrence X 线分级的相关性。**结果** miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液的 ΔCt 值为 9.78 ± 2.50 , 非骨关节炎患者关节液的 ΔCt 值为 8.23 ± 2.13 , miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液的表达水平低于非骨关节炎患者 ($P < 0.05$)。骨关节炎患者 miR-335-5p 在关节液中相对表达量与 Kellgren-Lawrence X 线分级之间无关 ($r_s = -0.351$, $P = 0.062$)。**结论** miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液中表达下调, 提示其与骨关节炎的发生、发展可能有关。

【关键词】 骨关节炎; 微小核糖核酸 335-5p; 骨赘形成

Expression and significance of miR-335-5p in the synovial fluid of patients with osteoarthritis He Weizhen, Yin Zhizhua, Guo Pei, Xu Xiaodong, Ye Zhizhong. Xiangmihu Rheumatology Department, the Fourth People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen Rheumatology Institute of Guangdong Medical College, Shenzhen 518040, China

Corresponding author, He Weizhen, E-mail: h wz6639@126.com

【Abstract】 Objective To measure the expression level of miR-335-5p in the synovial fluid of patients with osteoarthritis (OA) and analyze the relationship between miR-335-5p and Kellgren-Lawrence classification grade. **Methods** The expression levels of miR-335-5p in the synovial fluid of OA patients ($n = 20$) and non-OA controls ($n = 20$) were detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Kellgren-Lawrence classification of the knee joint was evaluated. The correlation between miR-335-5p level and Kellgren-Lawrence classification grade was assessed. **Results** Down-regulated miR-335-5p was observed in synovial fluid of OA patients ($\Delta\text{Ct } 9.78 \pm 2.50$) compared with that in non-OA controls ($\Delta\text{Ct } 8.23 \pm 2.13$) ($P < 0.05$). No correlation was observed between miR-335-5p level and Kellgren-Lawrence classification grade ($r_s = -0.351$, $P = 0.062$). **Conclusion** The expression level of microRNA-335-5p is down-regulated in the synovial fluid of OA patients, suggesting that it is probably correlated with the incidence and progression of OA.

【Key words】 Osteoarthritis; miR-335-5; Osteophyte formation

骨关节炎的基本病变包括软骨破坏和骨赘形成。分子机制研究表明, 某些微小 RNA (miR) 会影响软骨细胞的表型转变、细胞凋亡和基因表达^[1]。其中, miR-335-5p 可通过 2 个正反馈环促进鼠间充质干细胞的软骨形成^[2]。另外, 关节软骨的营养很大一部分来自于关节液的渗透。本研究通过检测 miR-335-5p 在骨关节炎患者膝关节液中的表达水平, 分析其与骨赘形成之间的相关关系, 探讨 miR-335-5p 在骨关节炎发病中所起的作用。

对象与方法

一、研究对象

选取 2014 年 10 月至 2015 年 6 月在深圳市第四人民医院香蜜湖风湿病分院住院或门诊就诊的膝骨关节炎患者 20 例, 其诊断均符合 1986 年美国风湿病学会膝骨关节炎分类标准。其中男 6 例、女 14 例, 年龄 (55.0 ± 9.6) 岁。另选择非骨关节炎患者 20 例 (均由骨科医师提供, 为髌骨骨折、半

月板损伤等外伤患者)为对照,其中男 6 例、女性 14 例,年龄(51.8 ± 9.9)岁。2 组患者的性别构成、年龄比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。本研究经过广东医学院附属福田医院伦理委员会审核批准,所有参与者均知情同意并签署知情同意书。

二、方 法

1. 主要试剂和仪器

包括 Trizol 试剂(美国 Life Technologies 公司),Taqman miR 逆转录试剂盒(美国 ABI 公司);ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);淋巴细胞分离液(北京鼎国昌盛生物技术公司)。PCR 引物由上海英维捷基公司合成。

2. miR-335-5p mRNA 表达水平的检测

以依地酸二钠抗凝管收集关节液,高速离心,分离上清液。采用 Trizol 法提取关节液中 miR,微量分光光度计检测 RNA 浓度以及纯度。采用 Taqman miR 逆转录试剂盒,按说明将提取的总 miR 逆转录成模板 DNA。按试剂盒说明书将关节液中 miR 样品 1 μ l 加入反应体系中,逆转录的反应条件为:16 $^{\circ}$ C 30 min,42 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 5 min。U6 的逆转录反应条件为:37 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 5 min。取 1 μ l 逆转录产物,用 Taqman 通用 PCR 反应混合物和 Taqman miR 试剂进行实时定量 PCR。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min 40 个循环,FAM 通道,60 $^{\circ}$ C 收集荧光。在 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行实时荧光定量 PCR,每个标本做 3 个复孔。以 SDS 2.0(PE Biosystem)软件分析其 Ct 值。计算各标本平均 Ct 值,以小分子 RNA U6 作为内参,

将 miR-335-5p 的 Ct 值减去 U6 的 Ct 值作为 Δ Ct 值。 Δ Ct 值越低,则 miR-335-5p 的表达水平越高。实验中所使用的的引物序列见表 1。

表 1		miR-335-5p 的 PCR 引物序列	
基 因		引物序列	
miR-335-5p	正向	5'-GAGTTGACCACAGCACCTC-3'	
	反向	5'-GAGACAGTTCTCGTTATTGC-3'	
U6	正向	5'-TGGGGTTATACATTGTGAGAGGA-3'	
	反向	5'-GTGTGCTACGGAGTTCAGAGGTT-3'	

三、统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件包进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验;变量间相关性采用 Spearman 秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、miR-335-5p 在骨关节炎组和非骨关节炎组关节液中的表达

miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液的 Δ Ct 值为 9.78 ± 2.50 ,非骨关节炎患者关节液的 Δ Ct 值为 8.23 ± 2.13 ,miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液的表达水平低于非骨关节炎患者($t = 2.844$, $P = 0.048$)。

二、miR-335-5p 与骨赘形成的关系分析

miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液中的相对表达量与 Kellgren-Lawrence 的 X 线分级之间相关性分析显示,miR-335-5p 的 Δ Ct 值与 Kellgren-Lawrence 的 X 线分级无关($r_s = -0.351$, $P = 0.062$),见表 2。

表 2 骨关节炎患者的 Kellgren-Lawrence X 线分级与 miR-335-5p 相对表达量

项 目	Kellgren-Lawrence X 线分级			
	0 级	1 级	2 级	3 级
例数	5	12	2	1
miR-335-5p 相对表达量 (Δ Ct 值)	10.15 ± 5.90	9.38 ± 2.59	5.98 ± 3.37	6.88

讨 论

在骨关节炎的相关研究中,科研人员已经发现越来越多的 miR 与关节炎的发生有着千丝万缕的联系,miR 介导的基因表达的转录后抑制在成骨分化的调控中起重要作用。通过大量关节炎临床样本发现,这些内源性 miR 的表达水平发生了明显的改变,并且与关节炎的发生、发展有着密切的联

系^[3]。Iliopoulos 等证实与正常软骨相比,有 16 个 miR 在骨关节炎软骨中表达异常。在这些 miR 中,miR-22 表达上调,减少了蛋白聚糖的表达,增加了软骨细胞中 IL-1b 和基质金属蛋白酶-13 水平,而 miR-140 表达下调,可出现与年龄相关的骨关节炎样改变^[4]。黄浩等^[5]认为 miR 可通过介导机制、染色质修饰及 DNA 甲基化的改变 3 个方面参与骨关节炎的发生、发展。

miR-335 在人类定位于 7q32.2, 可调节人干细胞的增殖、迁移和分化^[6]。DKK1 是一种分泌蛋白, 通过与 Wnt 受体复合体 LRP5/6 结合抑制 Wnt 信号通路, 导致骨代谢异常^[8]。研究认为, miR-335 在骨动态平衡中起到重要的调节作用, miR-335-5p 可直接靶向 DKK1 3'-非翻译区, 通过下调 DKK1, 调节成骨分化^[7]。对骨关节炎的研究发现, 所有参与调节成骨细胞分化的 miRNA 中, 靶向 DKK1 的 miR 仅有 miR-29a 和 miR-335-5p^[9]。

本研究显示, miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液中的相对表达水平低于非骨关节炎患者, 这种表达降低, 可能影响到其靶基因 DKK1 和 SFRP1 的表达, 进而作用于 Wnt 信号通路导致骨代谢异常。研究发现, 组织损伤或促炎信号可能引起 miR-335 下调, 继而激活骨髓间充质干细胞 (MSC) 的增生、迁移和分化能力^[10]。Tornero-Esteban 等^[11]研究也发现, miR-335 在骨关节炎患者骨髓的间充质干细胞中表达较对照组低, 且认为这种下调是骨关节炎-MSC 固有的表现, 通过 Wnt 信号通路, 影响了骨关节炎的骨生成和矿化。miR 是一类在进化上高度保守的非编码小分子单链 RNA。在正常状态下, miR 的表达具有严格的组织及时序特异性, 当 miR 异常表达时则可能导致疾病的发生。因此, 骨关节炎患者关节液中 miR-335-5p 表达下调, 提示 miR-335-5p 可能与骨关节炎的发病机制相关。

Kellgren-Lawrence 的 X 线分级是衡量骨关节炎患者关节损伤和骨赘增生程度的一个重要指标, 可划分为 0~4 级, 级别越高, 关节间隙越狭窄, 骨赘增生越严重。本研究显示, 骨关节炎患者 miR-335-5p 的相对表达量与 Kellgren-Lawrence 的 X 线分级之间无关。这种相关性的缺乏, 提示 miR-335-5p 虽与骨关节炎相关, 但与骨赘形成之间并无直接的关系, 表明 miR-335-5p 可能不会促进骨赘形成, 但对其是否会抑制骨赘形成, 需要进一步研究。

综上所述, miR-335-5p 在骨关节炎患者关节液中表达下调, 提示 miR-335-5p 在骨关节炎发病及病情进展中可能起到一定的作用, 而这种作用是否通过调控靶基因 DKK1 激活 Wnt/ β -catenin 信号通

路参与骨关节炎发病, 是否能成为骨关节炎诊断与治疗的新靶点尚需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8 (9): 543-552.
- [2] Lin X, Wu L, Zhang Z, Yang R, Guan Q, Hou X, Wu Q. MiR-335-5p promotes chondrogenesis in mouse mesenchymal stem cells and is regulated through two positive feedback loops. *J Bone Miner Res*, 2014, 29 (7): 1575-1585.
- [3] Le LT, Swingle TE, Clark IM. Review: the role of microRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis. *Arthritis Rheum*, 2013, 65 (8): 1963-1974.
- [4] Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One*, 2008, 3 (11): e3740.
- [5] 黄浩, 张还添, 潘京华, 查振刚. 骨关节炎的表现遗传学研究进展. *广东医学*, 2014, 35 (2): 305-308.
- [6] Tomé M, López-Romero P, Albo C, Sepúlveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, Bernad A, González MA. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 2011, 18 (6): 985-995.
- [7] Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, He X, Stein G, Lian J, Chen J. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res*, 2011, 26 (8): 1953-1963.
- [8] Seménov MV, Zhang X, He X. DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem*, 2008, 283 (31): 21427-21432.
- [9] Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B. Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52 (5): 589-608.
- [10] Tomé M, López-Romero P, Albo C, Sepúlveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, Bernad A, González MA. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 2011, 18 (6): 985-995.
- [11] Tornero-Esteban P, Rodríguez-Rodríguez L, Abásolo L, Tomé M, López-Romero P, Herranz E, González MA, Marco F, Moro E, Fernández-Gutiérrez B, Lamas JR. Signature of microRNA expression during osteogenic differentiation of bone marrow MSCs reveals a putative role of miR-335-5p in osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*, 2015, 16: 182.

(收稿日期: 2016-09-25)

(本文编辑: 林燕薇)