

# 骨关节炎患者外周血单个核细胞 miR-335-5p 表达及其意义

何伟珍 尹志华 徐晓东 叶志中 郭佩

**【摘要】 目的** 探讨微小 RNA-335-5p (miR-335-5p) 在骨关节炎患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达及其意义。**方法** 收集 50 例骨关节炎患者及 30 例健康志愿者的外周抗凝血,分离 PBMC,实时定量 PCR 检测 miR-335-5p 表达水平。分析 miR-335-5p 与骨关节炎患者的年龄、BMI 及 Kellgren-Lawrence X 线分级之间的相关性。**结果** 骨关节炎患者 PBMC 中 miR-335-5p 表达水平低于健康对照组 ( $0.00090 \pm 0.00008$  vs.  $0.00278 \pm 0.00025$ ,  $P < 0.001$ ), 骨关节炎患者 PBMC 中 miR-335-5p 表达水平与其年龄 ( $r = -0.763$ ,  $P < 0.001$ )、BMI ( $r = -0.440$ ,  $P < 0.001$ ) 呈负相关,与 Kellgren-Lawrence X 线分级无关 ( $P > 0.05$ )。**结论** miR-335-5p 在骨关节炎患者 PBMC 中表达下调,与年龄、BMI 呈负相关,提示其可能是骨关节炎的保护性基因。

**【关键词】** 骨关节炎; 微小 RNA-335-5p; 外周血单个核细胞

**Expression and significance of miR-335-5p in the peripheral blood mononuclear cells of patients with osteoarthritis** He Weizhen, Yin Zhihua, Xu Xiaodong, Ye Zhizhong, Guo Pei. Xiangmihu Branch, the Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518040, China  
Corresponding author, He Weizhen, E-mail: h wz6639@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression and significance of microRNA-335-5p (miR-335-5p) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with osteoarthritis. **Methods** The peripheral blood samples were collected from 50 osteoarthritis patients and 30 healthy controls. The PBMCs were isolated from the blood samples. The expression level of miR-335-5p was detected using quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR). The correlation between miR-335-5p and age, body mass index (BMI) and Kellgren-Lawrence classification for knee osteoarthritis was analyzed. **Results** The expression of miR-335-5p in the PBMCs of osteoarthritis patients was significantly down-regulated compared with that in the healthy controls ( $0.00090 \pm 0.00008$  vs.  $0.00278 \pm 0.00025$ ,  $P < 0.001$ ). In the PBMCs of osteoarthritis patients, the expression of miR-335-5p was negatively correlated with the age ( $r = -0.763$ ,  $P < 0.001$ ) and BMI ( $r = -0.440$ ,  $P < 0.001$ ), whereas it was not correlated with the Kellgren-Lawrence classification for knee osteoarthritis ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The expression of miR-335-5p is significantly down-regulated in the PBMCs of osteoarthritis patients. Moreover, it is negatively correlated with age and BMI, suggesting that miR-335-5p might be a protective gene for osteoarthritis.

**【Key words】** Osteoarthritis; MicroRNA-335-5p; Peripheral blood mononuclear cell

骨关节炎是中老年人的常见病,其发病机制复杂,涉及遗传、机械运动和环境等多种因素。分子机制的研究表明,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<sup>[1]</sup>。骨

关节炎的基本病变包括软骨破坏和骨赘形成,骨赘形成主要由成骨细胞完成。miR-335-5p 可抑制成骨分化,也可通过 2 个正反馈环促进鼠间充质干细胞的软骨形成,提示 miR-335-5p 可能与骨关节炎

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2017.05.008

基金项目:国家自然科学基金(81102266,81301529);深圳市科技计划项目(JCYJ20140416094256891);深圳市医学重点学科建设资助项目(2005C10)

作者单位:518040 深圳,中山大学附属第八医院香蜜湖分院

通讯作者,何伟珍.E-mail: h wz6639@126.com

的发病有关<sup>[2-3]</sup>。本研究通过检测 miR-335-5p 在骨关节炎患者外周血单个核细胞（PBMC）中的表达水平，分析其与骨赘形成之间的关系，探讨骨关节炎发病分子机制中的一个侧面。

对象与方法

一、研究对象  
选取 2014 年 10 月至 2015 年 6 月在我院住院或门诊就诊的膝骨关节炎患者 50 例，其中男 13 例、女 37 例，年龄（55.0 ± 10.2）岁。另选择在我院行健康体检的 30 名正常人为健康对照组，其中男 14 名、女 16 名，年龄（54.6 ± 10.6）岁。2 组的性别构成、年龄比较差异均无统计学意义（*P* 均 > 0.05）。膝骨关节炎的诊断基于 1986 年美国风湿病学会膝骨关节炎分类标准。本研究经过医院伦理委员会批准，并且所有参与者均签署知情同意书。

二、主要仪器和试剂  
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），Trizol 试剂（美国 Life Technologies 公司），TaqMan miR 逆转录试剂盒（美国 ABI 公司）。

三、实验方法  
依地酸二钠抗凝管收集外周血，分离 PBMC。采用 Trizol 法提取 PBMC 中 RNA，微量分光光度计检测 RNA 浓度以及纯度。按试剂盒说明书步骤将提取的总 miR 逆转录成模板 DNA。总反应体系共 15 μl，其中 10 倍稀释的逆转录缓冲液 1.5 μl、100 mmol/L dNTP 0.15 μl、5 U/μl 逆转录酶 1 μl、40 U/μl 核糖核酸酶抑制剂 0.19 μl、5 倍稀释的逆转录引物 3 μl（具体序列见表 1，产物长度 25 bp，由上海英维捷基公司合成）、miR 样品 1 μl、纯水 8.16 μl。反应条件：16℃ 30 min，42℃ 30 min，85℃ 5 min。对照物 U6 的逆转录反应条件：37℃ 30 min，85℃ 5 min。取 1 μl 逆转录产物，用 Taqman 通用 PCR 反应混合物和 TaqMan miR Assay 进行实时定量 PCR。反应条件：95℃ 10 min，95℃ 15 s、60℃ 1 min 40 个循环，FAM 通道，60℃ 收集荧光。在 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR，每份标本做 3 个复孔。以 PE Biosystem SDS 2.0 软件分析 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 ΔCt 值。计算标准化后的 2<sup>-ΔCt</sup> 值表示 miR 的相对表达水平。

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

四、膝骨关节炎的 Kellgren-Lawrence X 线分级  
Kellgren-Lawrence 膝骨关节炎的 X 线分级：① 0 级，正常；② I 级，关节间隙无变窄，可疑骨赘或微小骨赘；③ II 级，关节间隙可疑变窄，有明显的轻度骨赘；④ III 级，关节间隙明显狭窄，骨质有硬化性改变，中度多发骨赘形成；⑤ IV 级，关节间隙明显狭窄，严重硬化性改变及明显关节畸形，有大量骨赘形成。  
五、统计学处理  
采用 SPSS 18.0 分析数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较用独立样本 *t* 检验，变量间相关性分析采用 Pearson 线性相关或 Spearman 秩相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、骨关节炎组和健康对照组 PBMC 中 miR-335-5p 的表达水平比较  
miR-335-5p 在骨关节炎患者 PBMC 中的表达水平低于健康对照组（0.00090 ± 0.00008 vs. 0.00278 ± 0.00025，*t* = 4.057，*P* < 0.001）。  
二、骨关节炎患者 PBMC 中 miR-335-5p 表达水平与年龄、BMI 及 X 线分级的相关性  
50 例骨关节炎患者，年龄（55.0 ± 10.2）岁、BMI（24.2 ± 3.6）kg/m<sup>2</sup>，其 PBMC 中 miR-335-5p 的表达水平与年龄（*r* = -0.763，*P* < 0.001）、BMI（*r* = -0.440，*P* < 0.001）呈负相关。Kellgren-Lawrence 的 X 线分级中，0、I、II、III 级分别有 13、30、5、2 例，其 PBMC 中 miR-335-5p 的表达水平分别为 0.00016 ± 0.00002、0.00083 ± 0.00017、0.00637 ± 0.00098、0.00348 ± 0.00034，X 线分级与 miR-335-5p 表达水平无关（*P* > 0.05）。

讨 论

骨关节炎的发病机制尚未阐明，但 Wnt 信号通路在其中发挥重要作用。在软骨内的成骨过程中，Wnt 信号通过靶基因的表达参与了骨发育和骨重塑的调节<sup>[4]</sup>。DKK1 是一种分泌蛋白，能够通过

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<sup>[5]</sup>。对骨关节炎的研究发现, 在参与调节成骨细胞分化的 miR 中, 靶向 DKK1 的 miR 仅有 miR-29a 和 miR-335-5p<sup>[6]</sup>。

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<sup>[7]</sup>。有学者认为, 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<sup>[2]</sup>。

笔者前期研究显示, miR-335-5p 在骨关节炎患者膝关节液中的表达下调<sup>[8]</sup>。本研究显示, miR-335-5p 在骨关节炎患者 PBMC 中的表达下调 ( $P < 0.05$ ), 这种表达降低可能影响其靶基因 DKK1 和 SFRP1 的表达, 进而作用于 Wnt 信号通路导致骨代谢异常。Tornero-Esteban 等<sup>[9]</sup>研究也发现, miR-335 在骨关节炎患者的骨髓间充质干细胞 (MSC) 中表达低于对照组, 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 异常表达时可能导致疾病的发生。因此, 骨关节炎患者 PBMC 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。

骨关节炎的易感因素包括高龄、肥胖、遗传、性激素、吸烟等, 如肥胖和骨关节炎患病率和发病率均呈正相关, 降低体质量可减少骨关节炎发生、发展。本研究显示, 骨关节炎患者 miR-335-5p 的表达水平与年龄、BMI 呈负相关。这种负相关关系提示骨关节炎患者 BMI 越大、miR-335-5p 表达越低, BMI 越小、miR-335-5p 表达增加。从这个相关关系而言, miR-335-5p 似乎是骨关节炎的一个保护性基因。患者可以通过降低 BMI, 减轻骨关节炎的症状, 但 BMI 的下降是否会导致 miR-335-5p 的表达增加, 需要进一步研究证实。

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。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, 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, 提示其不会促进骨赘的形成, 进一步支持了前面的假说, 即 miR-335-5p 可能是

骨关节炎的一个保护性基因。

综上所述, miR-335-5p 在骨关节炎患者 PBMC 中表达下调, 并与骨关节炎患者的年龄、BMI 呈负相关, 提示 miR-335-5p 可能是骨关节炎的一个保护性基因, 而这种作用是否通过调控靶基因 DKK1 激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与骨关节炎的发生、发展, 是否能成为骨关节炎诊断与治疗的新靶点, 尚需进一步研究。

## 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] 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.
- [3] 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.
- [4] Lu C, Wan Y, Cao J, Zhu X, Yu J, Zhou R, Yao Y, Zhang L, Zhao H, Li H, Zhao J, He L, Ma G, Yang X, Yao Z, Guo X. Wnt-mediated reciprocal regulation between cartilage and bone development during endochondral ossification. *Bone*, 2013, 53 (2): 566-574.
- [5] Semenov MV, Zhang X, He X. DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem*, 2008, 283 (31): 21427-21432.
- [6] Vrtačník P, Marc J, Ostanek B. Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52 (5): 589-608.
- [7] 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.
- [8] 何伟珍, 尹志华, 郭佩, 徐晓东, 叶志中. 骨关节炎患者关节液中 miR-335-5p 表达及意义. *新医学*, 2017, 48 (1): 31-33.
- [9] 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: 2016-12-30)

(本文编辑: 林燕薇)