

· 论著 ·

长链非编码 RNA MEG3 靶向下调 miR-21 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及炎症反应的影响

丁童* 周彦鹏 冯立平

新乡医学院附属中心医院创伤外科,河南 新乡 453003

中图分类号: R363 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 04-0515-09

摘要: **目的** 探究长链非编码 RNA 母系表达基因 3(MEG3)靶向 miR-21 的作用对白细胞介素 1 β (IL-1 β)诱导的软骨细胞凋亡及炎症反应的影响及其作用机制。**方法** 将细胞分为 cTRL 组、IL-1 β 组、LV-MEG3 组、miR-21 mimic 组和 LV-MEG3+mimic 组,用 IL-1 β 处理软骨细胞后,加入对应的慢病毒或 miRNA mimic 处理细胞。RT-PCR 检测 MEG3、miR-21、基质金属蛋白酶 13(MMP-13)、II 型胶原蛋白(Collagen II)、聚蛋白聚糖(Aggrekan)基因表达水平,Hoechst 检测细胞凋亡,Western blot 检测活化半胱天冬酶 3(cl-Caspase-3)、cl-Caspase-9、MMP-13、Collagen II、Aggrekan 蛋白表达水平和 p65、信号传导及转录激活因子 3(STAT3)磷酸化比率,试剂盒检测丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6、IL-10 水平,免疫荧光检测 p65 的核定位情况。**结果** 与 cTRL 组比较,IL-1 β 组 miR-21 表达,细胞凋亡率,MMP-13 基因表达,cl-Caspase-3、cl-Caspase-9、MMP-13 蛋白表达,MDA、LDH、TNF- α 、IL-6 水平,p65 和 STAT3 磷酸化比率,p65 核内信号水平升高,MEG3 表达,Collagen II、Aggrekan 基因和蛋白表达,SOD、GSH、IL-10 水平降低;与 IL-1 β 组比较,LV-MEG3 组 miR-21 表达,细胞凋亡率,MMP-13 基因表达,cl-Caspase-3、cl-Caspase-9、MMP-13 蛋白表达,MDA、LDH、TNF- α 、IL-6 水平,p65 和 STAT3 磷酸化比率,p65 核内信号水平降低,MEG3 表达水平,Collagen II、Aggrekan 基因和蛋白表达水平,SOD、GSH、IL-10 水平升高;miR-21 mimic 组各项检测指标的变化与 LV-MEG3 组相反;与 miR-21 mimic 组比较,LV-MEG3+mimic 组 miR-21 表达,细胞凋亡率,MMP-13 基因表达,MMP-13、cl-Caspase-3、cl-Caspase-9 蛋白表达,MDA、LDH、TNF- α 、IL-6 水平,p65 和 STAT3 磷酸化比率,p65 核内信号水平降低,MEG3 表达水平,Collagen II、Aggrekan 基因和蛋白表达,SOD、GSH、IL-10 水平升高。**结论** MEG3 可下调 miR-21 表达,从而抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,缓解炎症反应,其作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路激活有关。

关键词: 骨关节炎;软骨细胞;MEG3;miR-21

The effects of long non-coding RNA MEG3 on IL-1 β -induced cell apoptosis and inflammatory response of chondrocytes by targeting miR-21

DING Tong*, ZHOU Yanpeng, FENG Liping

Department of Traumatology, the Affiliated Central Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

* Corresponding author: DING Tong, Email:2873166939@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of long non-coding RNA MEG3 on IL-1 β -induced cell apoptosis and inflammatory response of chondrocytes by targeting miR-21 and its mechanism. **Methods** Cells were divided into cTRL group, IL-1 β group, LV-MEG3 group, miR-21 mimic group, and LV-MEG3 + mimic group. After addition of IL-1 β , cells were treated with corresponding miRNA or lentivirus. Gene levels of MEG3, miR-21, MMP-13, collagen II, and Aggrekan were measured with RT-PCR. Cell apoptosis was determined with Hoechst staining. The protein levels of cl-Caspase-3, cl-Caspase-9, MMP-13, Collagen II, Aggrekan, phosphorylated ratios of p65, and STAT3 were determined with Western blotting. The levels of MDA, LDH, SOD, GSH, TNF- α , IL-6, and IL-10 were determined using the detecting kits. The nuclear localization of p65 was determined with immunofluorescence. **Results** Compared with those in cTRL group, miR-21 level, cell apoptosis rate, MMP-13 gene level, MMP-13, cl-caspase-3 and cl-caspase-9 protein levels, MDA, LDH, TNF- α , IL-6 levels, phosphorylated ratio of p65 and STAT3,

基金项目: 河南省卫生厅重点基金资助项目(2359101)

* 通信作者: 丁童,Email:2873166939@qq.com

nuclear localization of p65 increased, but MEG3 level, gene and protein levels of collagen II and Aggrecan, SOD, GSH, IL-10 levels decreased in IL-1 β group. Compared with those in IL-1 β group, miR-21 level, cell apoptosis rate, MMP-13 gene level, MMP-13, cl-caspase-3 and cl-caspase-9 protein levels, MDA, LDH, TNF- α , IL-6 levels, phosphorylated ratio of p65 and STAT3, nuclear localization of p65 decreased, but MEG3 level, gene and protein levels of collagen II and Aggrecan, SOD, GSH, IL-10 levels increased in LV-MEG3 group. Meanwhile, the alterations in miR-21 mimic group were opposite to those in LV-MEG3 group. Compared with those in miR-21 mimic group, miR-21 level, cell apoptosis rate, MMP-13 gene level, MMP-13, cl-caspase-3 and cl-caspase-9 protein levels, MDA, LDH, TNF- α , IL-6 levels, phosphorylated ratio of p65 and STAT3, nuclear localization of p65 decreased, but MEG3 level, gene and protein levels of collagen II, Aggrecan, SOD, GSH, IL-10 levels increased in LV-MEG3+mimic group. **Conclusion** MEG3 inhibits IL-1 β induced cell apoptosis and alleviates the inflammatory response of chondrocytes by down-regulation of the expression of miR-21, and its mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B signal pathway.

Key words: osteoarthritis; chondrocyte; MEG3; miR-21

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是现代社会经常发生的一种关节疾病,随着人类平均寿命逐渐增长,OA 的发病率也如同预期的一样不断增加。OA 常常有关节疼痛、压痛、骨间摩擦加重、僵硬、关节积液以及行动能力丧失等症状,并伴有不同程度的炎症发生^[1]。关节软骨进行性破坏、滑膜炎、软骨硬化及骨质增生是导致 OA 关节疼痛及行动力损坏的主要原因^[2]。在 OA 炎症发展过程中,白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 发挥着关键的作用,可促进基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达、炎症介质 PGE2 及 NO 水平升高,引发炎症反应^[3],IL-1 β 常被用于 OA 体外模型的建立。目前对 OA 的治疗手段主要有物理治疗、药物治疗和手术治疗等,仅仅能起到缓解关节炎症,不能够有效的根治,并且现有的治疗方式还会受到不良反应的限制^[4]。因此需要寻找更有效的治疗方式,从根本上阻止 OA 的发生。

MicroRNA (miRNA) 是近年来的研究热点之一,作为一类长度约 22 nt 的内源单链非编码 RNA,可与目的 mRNA 非翻译区结合,调控基因的表达。miRNA 广泛参与了人类疾病的调控,在 OA 中也起着重要的调控作用^[5]。已有研究^[6]报道 miR-21 在软骨细胞中可调控 OA 的发展,而单 miRNA 往往可能对多个靶基因都存在调控机制,因此 miR-21 可能还存在其他机制参与调控 OA^[7]。本研究通过培养人关节软骨细胞株 CH8,IL-1 β 处理建立 OA 体外模型,再通过 miR-21 mimic 和母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 过表达慢病毒处理,初步探究了 miR-21 在 OA 软骨细胞中与 MEG3 的作用关系及调控机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM 细胞培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,IL-1 β 购自南京金斯瑞生物科技有限公司,lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司,QuantNova SYBR Green PCR 试剂盒购自德国 Qiagen 公司,Hoechst 染色试剂、RIPA 裂解液、Trizol 试剂购自北京索莱宝生物公司,丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide Dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒及肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) ELISA 试剂盒购自南京建成生物科技公司,miR-21 mimic、重组慢病毒颗粒购自上海吉玛公司,活化半胱天冬酶 3 (cleave Caspase-3)、活化半胱天冬酶 9 (cleave Caspase-9)、基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP-13)、II 型胶原蛋白 (Collagen II)、聚蛋白聚糖 (Aggrecan)、p65、p-p65、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)、p-STAT3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,实验所用引物采用 Primer3 input 设计,上海生工生物公司合成。

1.2 细胞培养

人关节软骨细胞株 CH8 购自 ATCC 公司,细胞在 37 °C 5 % CO₂ 的环境下培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100U/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,隔天换液 1 次,2~3 d 根据细胞生长情况换液。

1.3 细胞分组及处理方法

将细胞分为空白对照 (cTRL) 组、IL-1 β 组、LV-MEG3 组、miR-21 mimic 组和 LV-MEG3+mimic 组,除 cTRL 组外,每组分为加入 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理 2 h,MEG3 重组慢病毒颗粒分别感染 LV-MEG3

和 LV-MEG3+mimic 组细胞,按照 lipofectamine 2000 转染试剂说明书,使用 miR-21 分别转染 miR-21 mimic 组和 LV-MEG3+mimic 组。

1.4 病毒感染 CH8 软骨细胞株

将处理对数生长期的 CH8 细胞接种于 6 孔板,每孔 5×10^4 个,当细胞生长融合至 70% 汇合后, 1×10^8 TU/mL MEG3 重组慢病毒液每孔加入 10 μ L 感染细胞,24 h 后完全培养液 37 $^{\circ}$ C 继续培养 48 h。

1.5 RT-PCR 检测 mRNA 表达水平

根据 1.3 的方法分组处理细胞后,用 Trizol 提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,随后按照 QuantNova SYBR Green PCR kit 说明书进行 PCR 反应,条件设置为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,退火/延伸 60 $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算表达水平。

1.6 Hoeschst 检测细胞凋亡

根据 1.3 的方法分组处理细胞后,接种于 6 孔板,多聚甲醛固定细胞,并使用 0.5% TrintonX-100 进行透膜处理,Hoeschst 荧光染料室温染色 30 min,荧光显微镜下观察细胞凋亡情况,以核固缩,细胞核致密浓染视为细胞凋亡,细胞凋亡率=凋亡细胞/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.7 Western blot 检测蛋白表达

根据 1.3 的方法分组处理细胞后,RIPA 裂解液提取各组总蛋白,BCA 定量,10% SDS-PAGE 分离各组蛋白,点样孔每孔 30 μ g,分离后转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 清洗 3 次后使用二抗孵育 2 h,Ecl 显色,GAPDH 作为内参。

1.8 MDA、SOD、LDH、GSH 水平检测

根据 1.3 的方法分组处理细胞后,硫代巴比妥法(TBA)检测细胞培养液中 MDA 含量,羟胺法检测细胞培养液中 SOD 活力,比色法检测细胞培养液中 LDH 活力,比色法检测细胞培养液中 GSH 含量,所有操作按试剂盒说明书进行。

1.9 ELISA 检测 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平

根据 1.3 的方法分组处理细胞后,采用 ELISA 试剂盒检测细胞培养液中 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平,所有操作按试剂盒说明书进行。

1.10 免疫荧光检测核定位水平

根据 1.3 的方法分组处理细胞后,多聚甲醛固定细胞,TrintonX-100 透膜处理,14 min 后使用 PBS 缓冲液清洗 3 次,10% 封闭山羊血清室温封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。清洗后滴加 FITC 标记的荧光

二抗室温避光孵育 1 h,DAPI 即用液避光孵育 15 min,PBS 清洗 3 次,荧光显微镜观察 p65 的核定位情况。

1.11 统计学处理

用统计学软件 SPSS 17.0 处理实验数据,组间采用 *t* 检验,多组间采用单因素方差分析比较数据,均数 $\pm$ 标准差表示实验结果,当 $P < 0.05$,认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OA 软骨细胞中 MEG3 表达与 miR-21 表达存在相互作用关系

如图 1 所示,与 cTRL 组比较,IL-1 β 组 MEG3 表达水平显著降低(图 1 A),miR-21 表达水平显著升高(图 1 B),差异有统计学意义($P < 0.01$);与 IL-1 β 组比较,LV-MEG3 组 MEG3 表达水平显著升高(图 1 A),miR-21 表达水平显著降低(图 1 B),miR-21 mimic 组 MEG3 表达水平显著降低(图 1 A),miR-21 表达水平显著升高(图 1 B),差异有统计学意义($P < 0.01$);与 miR-21 mimic 组比较,LV-MEG3 +mimic 组 MEG3 表达水平显著升高(图 1 A),miR-21 表达水平显著降低(图 1 B),差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 OA 软骨细胞中 miR-21 和 MEG3 表达对细胞凋亡的影响

如图 2 所示,与 cTRL 组比较,IL-1 β 组细胞凋亡比率显著升高(图 2 B),cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 蛋白表达水平升高(图 2 C),差异有统计学意义($P < 0.01$);与 IL-1 β 组比较,LV-MEG3 组细胞凋亡比率显著降低(图 2 B),cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 蛋白表达水平降低(图 2 C),miR-21 mimic 组细胞凋亡比率显著升高(图 2 B),cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 蛋白表达水平升高(图 2 C),差异有统计学意义($P < 0.01$);与 miR-21 mimic 组比较,细胞凋亡比率显著降低(图 2 B),cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 蛋白表达水平降低(图 2 C),差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 OA 软骨细胞中 miR-21 和 MEG3 表达对细胞外基质相关基因表达的影响

如图 3 所示,与 cTRL 组比较,IL-1 β 组 MMP-13 基因和蛋白表达水平显著升高(图 3 A,C),Collagen II 和 Aggrecan 基因和蛋白表达水平显著降低(图 3 A,C),差异有统计学意义($P < 0.01$);与 IL-1 β 组比较,LV-MEG3 组 MMP-13 基因和蛋白表达水平显著

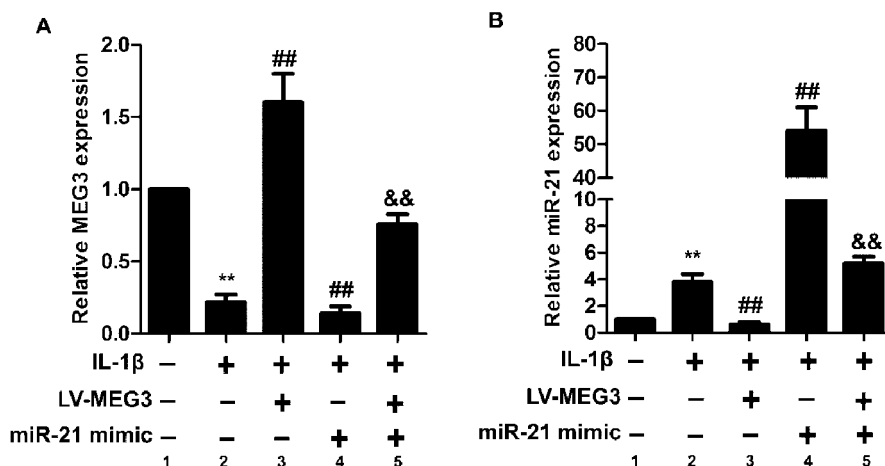


图1 OA软骨细胞中MEG3与miR-21的基因表达

注:A:OA软骨细胞中MEG3的相对表达;B:OA软骨细胞中miR-21的相对表达;1:cTRL组;2:IL-1β组;3:LV-MEG3组;4:miR-21 mimic组;5:LV-MEG3+mimic组。

Fig.1 The expressions of MEG3 and miR-21 in OA chondrocytes

A, The relative expression of MEG3 in OA chondrocytes; B, the relative expression of miR-21 in OA chondrocytes. 1, cTRL group; 2, IL-1β group; 3, LV-MEG3 group; 4, miR-21 mimic group; 5, V-MEG3+mimic group.

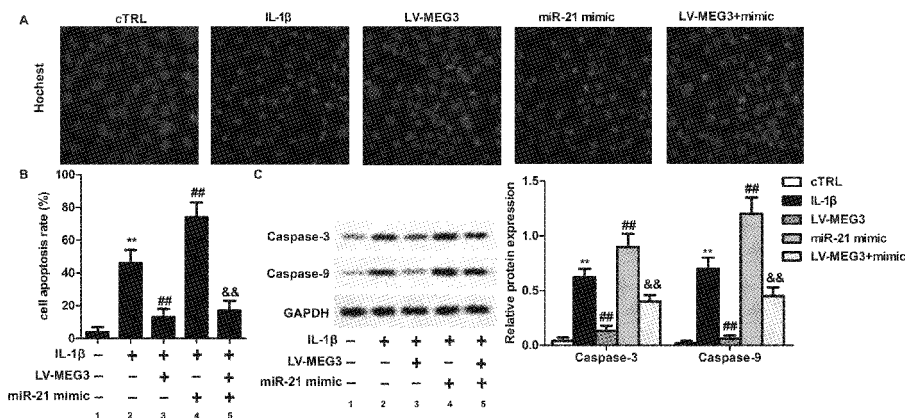


图2 miR-21和MEG3对OA软骨细胞凋亡的影响(200×)

注:A:Hoeschst检测细胞凋亡;B:OA软骨细胞凋亡率;C:Western blot检测凋亡相关蛋白cl-Caspase-3和cl-Caspase-9相对表达水平;1:cTRL组;2:IL-1β组;3:LV-MEG3组;4:miR-21 mimic组;5:LV-MEG3+mimic组。

Fig.2 The effects of miR-21 and MEG3 on cell apoptosis of OA chondrocytes

A, Cell apoptosis detected with Hoeschst staining; B, apoptosis rate of OA chondrocytes; C, the relative expression of apoptosis-related proteins cl-Caspase-3 and cl-Caspase-9 detected with Western blotting. 1, cTRL group; 2, IL-1β group; 3, LV-MEG3 group; 4, miR-21 mimic group; 5, V-MEG3+mimic group.

降低(图3 A,C), Collagen II和Aggrecan基因和蛋白表达水平显著升高(图3 A,C), miR-21 mimic组MMP-13基因和蛋白表达水平显著升高(图3 A,C), Collagen II和Aggrecan基因和蛋白表达水平显著降低(图3 A,C), 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与miR-21 mimic组比较, LV-MEG3+mimic组MMP-13基因和蛋白表达水平显著降低(图3 A,C), Collagen II和Aggrecan基因和蛋白表达水平升高

(图3 A,C), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 miR-21和MEG3表达影响OA软骨细胞的氧化应激

如图4所示, 与cTRL组比较, IL-1β组MDA、LDH水平显著升高(图4 A,B), SOD和GSH水平显著降低(图4 C,D), 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与IL-1β组比较, LV-MEG3组MDA和LDH水平显著降低(图4 A,B), SOD和GSH水平显著升高(图

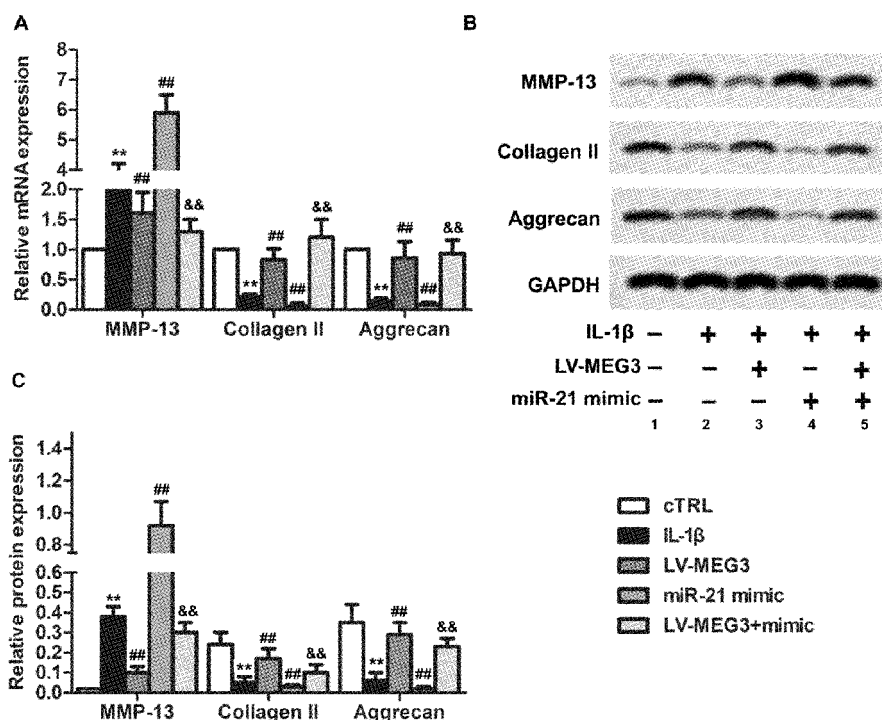


图3 miR-21和MEG3对OA软骨细胞MMP-13、Collagen II和Aggrecan基因和蛋白表达的影响

注:A:MMP-13、Collagen II、Aggrecan相对mRNA表达水平;B:Western blot检测MMP-13、Collagen II、Aggrecan蛋白表达;C:MMP-13、Collagen II、Aggrecan相对蛋白表达水平;1:cTRL组;2:IL-1 β 组;3:LV-MEG3组;4:miR-21 mimic组;5:LV-MEG3+mimic组。

Fig.3 The effects of miR-21 and MEG3 on MMP13, collagen II, and Aggrecan genes and proteins in OA chondrocytes

A, The relative mRNA expression levels of MMP-13, collagen II and Aggrecan; B, the protein expression of MMP-13, collagen II, and Aggrecan detected with Western blotting, C, the relative protein expression of MMP-13, collagen II, and Aggrecan. 1, cTRL group; 2, IL-1 β group; 3, LV-MEG3 group; 4, miR-21 mimic group; 5, V-MEG3+mimic group.

4C,D),miR-21 mimic组MDA和LDH水平升高(图4A,B),SOD和GSH水平降低(图4C,D),差异有统计学意义($P<0.01$);与miR-21 mimic组比较, LV-MEG3+mimic组MDA和LDH水平显著降低(图4A,B),SOD和GSH水平显著升高(图4C,D),差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.5 OA软骨细胞中miR-21和MEG3对炎症细胞因子的影响

如图5所示,与cTRL组比较,IL-1 β 组TNF- α 和IL-6水平显著升高,IL-10水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与IL-1 β 比较, LV-MEG3组TNF- α 和IL-6水平显著降低,IL-10水平显著升高,miR-21 mimic组TNF- α 和IL-6水平升高,IL-10水平降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与miR-21 mimic组比较, LV-MEG3+mimic组TNF- α 、IL-6水平显著降低,IL-10水平升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.6 OA软骨细胞中miR-21和MEG3对NF- κ B信号通路的影响

如图6所示,与cTRL组比较,IL-1 β 组p65和STAT3磷酸化比率显著升高(图6A),细胞核内p65信号水平显著升高(图6B),差异有统计学意义($P<0.01$);与IL-1 β 组比较, LV-MEG3组p65和STAT3磷酸化比率显著降低(图6A),细胞核内p65信号水平显著降低(图6B),miR-21 mimic组p65和STAT3磷酸化比率显著升高(图6A),细胞核内p65信号水平显著升高(图6B),差异有统计学意义($P<0.01$);与miR-21 mimic组比较, MEG3+mimic组p65和STAT3磷酸化比率显著降低(图6A),细胞核内p65信号水平显著降低(图6B),差异有统计学意义($P<0.01$)。

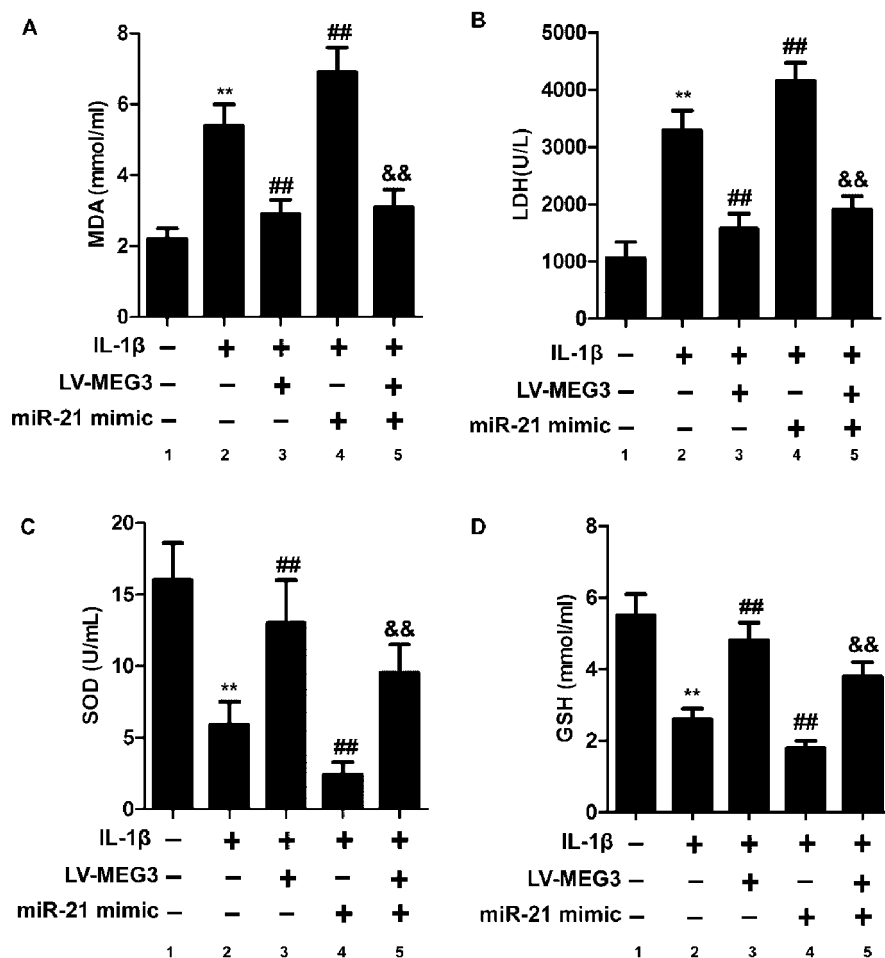


图4 miR-21和MEG3对OA软骨细胞MDA、LDH、SOD和GSH水平的影响

注:A:MDA水平检测;B:LDH水平检测;C:SOD水平检测;D:GSH水平检测;1:cTRL组;2:IL-1 β 组;3:LV-MEG3组;4:miR-21 mimic组;5:LV-MEG3+mimic组。

Fig.4 The effects of miR-21 and MEG3 on the levels of MDA, LDH, SOD, and GSH in OA chondrocytes

A, MDA level; B, LDH level; C, SOD level; D, GSH level. 1, cTRL group; 2, IL-1 β group; 3, LV-MEG3 group; 4, miR-21 mimic group; 5, V-MEG3+mimic group.

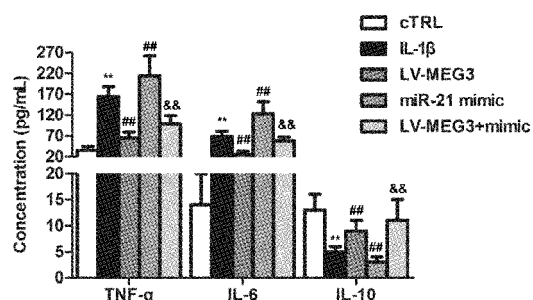


图5 miR-21和MEG3对OA软骨细胞TNF- α 、IL-6和IL-10的水平影响

Fig.5 The effects of miR-21 and MEG3 on the levels of TNF- α , IL-6, and IL-10 in OA chondrocytes

* * $P < 0.01$ versus cTRL group; ## $P < 0.01$ versus IL-1 β group; && $P < 0.01$ versus miR-21 mimic group.

3 讨论

长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 nt 的非编码 RNA^[8], 有着复杂的作用机制, 可通过基因印记、染色质重塑、细胞周期调控、剪接调控、mRNA 降解和翻译调控等方法调控各种生物学进程^[9]。其中 MEG3 因与肿瘤的密切联系而受到研究者的广泛关注^[10], Zhu 等^[11] 的研究表明, MEG3 过表达可通过下调 miR-21 抑制乳腺癌肿瘤的形成, 荧光素酶报告检测结果表明, MEG3 和 miR-21 存在直接的靶向关系。而在正常及疾病组织中, MEG3 与 miR-21 的靶向关系可能发挥着截然不同的调控作用。Su 等^[12] 的研

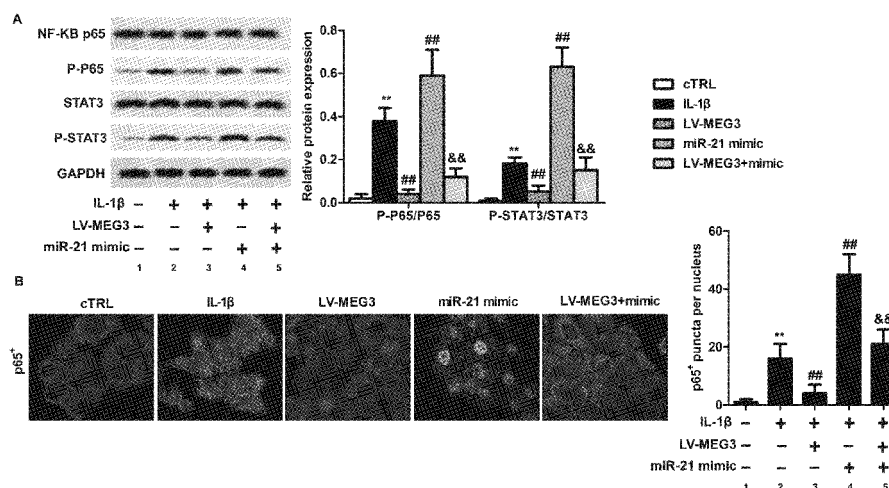


图 6 miR-21 和 MEG3 对 OA 软骨细胞 p65、STAT3 磷酸化的影响及 p65 在细胞核内的表达 (400 $\times$)

注:A:Western blot 检测 p-P65/P65 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达比率;B:p65 在细胞核内的表达;1:cTRL 组;2:IL-1 β 组;3:LV-MEG3 组;4:miR-21 mimic 组;5:LV-MEG3+miR-21 组

Fig.6 The effects of miR-21 and MEG3 on phosphorylation of p65 and STAT3 in OA chondrocytes and the expression of p65 in the cell nuclear

A, The relative protein expression rate of p-P65/P65 and p-STAT3/STAT3 detected with Western blotting; B, the expression of p65 in the cell nuclear. 1, cTRL group; 2, IL-1 β group; 3, LV-MEG3 group; 4, miR-21 mimic group; 5, V-MEG3+miR-21 group.

研究表明,在 OA 组织中,MEG3 表达水平下调;Xu 等^[13]的研究表明,MEG3 下调将会导致 OA 发展,作用机制是与 miR-16/SMAD7 有关。同时,Zhang 等^[6]的研究报道了 miR-21 在软骨细胞中的上调可通过靶向作用于 GDF-5 促进 OA 的发展,因此,在 OA 软骨细胞中,MEG3 和 miR-21 之间可能存在着相互作用调控 OA 的机制。

为了证实这一推测,本研究首先检测了 MEG3 和 miR-21 的基因表达水平,发现在 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞中,MEG3 显著降低,miR-21 显著升高,并且 MEG3 可显著抑制 miR-21 的表达,表明在 OA 软骨细胞中 MEG3 可靶向下调 miR-21 的表达。进一步研究发现,MEG3 过表达可显著抑制 IL-1 β 引起的细胞凋亡,miR-21 可显著提高细胞凋亡,而 MEG3 可显著缓解 miR-21 过表达引起的细胞凋亡,表明 MEG3 可通过下调 miR-21 抑制 OA 软骨细胞凋亡;同时,在分子水平上,MEG3 过表达显著抑制了 cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 的蛋白表达,miR-21 过表达则可显著提高 cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 的蛋白表达,并且 MEG3 可显著抑制 miR-21 过表达引起的 cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 蛋白表达提升。cl-Caspase-3 和 cl-Caspase-9 同属于半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (cysteiny aspartate specific

proteinase, Caspase) 家族,cl-Caspase-3 细胞凋亡的执行因子,表达水平上调与细胞凋亡紧密关联^[14]。cl-Caspase-9 参与了内源凋亡途径的起始,作用方式是裂解激活下游的执行因子,其中 cl-Caspase-3 的酶原是 cl-Caspase-9 的主要底物之一^[15]。结合实验结果表明,MEG3 可通过下调 miR-21,抑制 OA 软骨细胞凋亡,其作用机制与内源凋亡途径相关。

软骨细胞外基质降解对于 OA 的发展起着重要作用,Collagen II 和 Aggrecan 是构成软骨细胞基质的主要成分,和软骨细胞存在大量的信息、物质和能量交流,细胞外基质发生降解是导致软骨细胞坏死,功能丧失的重要原因^[16],MMP-13 属于基质金属蛋白酶 (MMPs) 家族,能降解多种胶原蛋白,在软骨细胞中,其最主要的底物是 Collagen II,是 OA 中研究较多的胶原酶指标^[17]。本研究发现,MEG3 过表达显著抑制了 IL-1 β 诱导的 MMP-13 的表达上调,并促进 Collagen 和 Aggrecan 表达,miR-21 则具有相反的调控作用,MEG3 可显著抑制 miR-21 对 MMP13 的上调和对 Collagen II、Aggrecan 的下调,表明 MEG3 可通过下调 miR-21,抑制 OA 软骨细胞外的基质降解。

氧化应激参与了 OA 的发展,活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在正常关节中具有重要的生理

功能,并与 SOD、GSH 的清除作用达成动态平衡,在 OA 患者体内活性氧含量增加,造成关节软骨的破坏^[18],MDA 是脂膜氧化的终产物^[19],LDH 存在于各组织器官中,当软骨细胞膜损伤时表现为活性升高^[20],MDA、LDH、SOD、GSH 均是测定氧化应激的可用指标。本研究发现 MEG3 过表达可显著抑制 OA 软骨细胞氧化应激的水平,miR-21 加重氧化应激的水平,MEG3 可缓解 miR-21 对氧化应激的上调,表明 MEG3 可通过下调 miR-21,缓解氧化应激对 OA 软骨细胞的损坏。

炎症在 OA 发展中起着重要作用,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 均是参与 OA 炎症发生的重要促炎细胞因子^[21],TNF- α 可与 IL-1 β 协同作用,促进软骨基质降解和关节软骨破坏^[22],TNF- α 还可诱导 IL-6 的产生,进一步加重对关节软骨的破坏。TNF- α 与 IL-6 表达与 OA 炎症严重程度呈正相关^[23]。IL-10 为 OA 炎症中的抗炎细胞因子,可抑制 TNF- α 和 IL-1 等促炎细胞因子的合成,保护软骨细胞^[24]。本研究发现,MEG3 过表达可抑制 IL-1 β 诱导的 TNF- α 、IL-6 水平升高及 IL-10 水平降低,miR-21 过表达的作用正好相反,MEG3 可抑制 miR-21 引起的 TNF- α 、IL-6 水平升高和 IL-10 水平降低,表明 MEG3 可通过下调 miR-21,缓解 OA 的炎症反应。

核转录因子 kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 和信号传导及转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 信号通路在免疫应答和炎症反应的调控中起着重要作用^[25-26]。NF- κ B 与包括 OA 在内的诸多疾病的氧化应激和炎症细胞因子有着密切联系,Zuo 等^[27-28]研究表明,马尾藻可通过下调包括 NF- κ B 在内的一系列信号通路,减轻 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞中的氧化应激和炎症反应。在 NF- κ B 信号通路中,p65 是 NF- κ B 家族最常见的成员之一,通常与 p50 形成二聚体,当诱导物如 TNF- α 激活其上游通路后,二聚体活化转运进入细胞核参与基因表达调控,STAT3 是 STAT 家族的一员,当诱导物如 IL-6 激活上游通路后,STAT3 发生磷酸化形成二聚体,进入核内调控基因表达。本研究发现 MEG3 过表达可抑制 IL-1 β 诱导的 p65 和 STAT3 活化水平升高,降低 p65 核定位水平,miR-21 可提升 IL-1 β 诱导的 p65 和 STAT3 活化并促进 p65 入核,MEG3 可抑制 miR-21 的作用,表明 MEG3 可通过下调 miR-21,抑制 NF- κ B 和 STAT3 信号通路的激活。

综上所述,MEG3 可通过与 miR-21 靶向作用,

下调 miR-21 在 OA 软骨细胞当中的表达水平,进而抑制 IL-1 β 诱导的细胞凋亡,降低软骨细胞外基质的降解水平,抑制 IL-1 β 诱导的氧化应激,缓解炎症反应,其作用机制可能与抑制 NF- κ B 和 STAT3 信号通路的激活有关。本研究首次探究了 MEG3 可通过靶向下调 miR-21 表达,抑制 IL-1 β 诱导的细胞凋亡及炎症反应,并初步探究了其作用机制,可能为 OA 治疗提供了新的靶向治疗思路 and 诊断标志物。后期将重点对 MEG3 对 OA 其他作用机制进行进一步探究。

【参 考 文 献】

- [1] Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis [J]. Acta Med Port, 2015, 28(1): 99-106.
- [2] Ogawa H, Akiyama H. Cartilage/chondrocyte research and osteoarthritis. Mechanobiology for development of osteoarthritis [J]. Clin Calcium, 2018, 28(6): 789-795.
- [3] Kong P, Chen G, Jiang A, et al. Sesamin inhibits IL-1 β -stimulated inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes by activating Nrf2 signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(50): 83720-83726.
- [4] Cutolo M, Berenbaum F, Hochberg M, et al. Commentary on recent therapeutic guidelines for osteoarthritis [J]. Semin Arthritis Rheum, 2015, 44: 611-617.
- [5] Iliopoylos 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.
- [6] Zhang YK, Jia J, Yang SH, et al. MicroRNA-21 controls the development of osteoarthritis by targeting GDF-5 in chondrocytes [J]. Exp Mol Med, 2014, 46(2): e79.
- [7] Wan G, Lim QE, Too HP. High-performance quantification of mature microRNAs by real-time RT-PCR using deoxyuridine-incorporated oligonucleotides and hemi-nested primers [J]. RNA, 2010, 16(7): 1436-1445.
- [8] Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, et al. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? [J]. Oncogene, 2012, 31(43): 4577-4587.
- [9] 夏天,肖内秀,郭俊明.长链非编码 RNA 的作用机制及其研究方法 [J]. 遗传, 2013, 35(3): 269-280.
- [10] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor [J]. J Mol Endocrinol, 2012, 48: R45-53.
- [11] Zhu MZ, Wang XC, Gu YT, et al. MEG3 overexpression inhibits the tumorigenesis of breast cancer by downregulating miR-21 through the PI3K/Akt pathway [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 661: 22-30.
- [12] Su W, Xie W, Shang QK, et al. The long noncoding RNA MEG3 is downregulated and inversely associated with VEGF levels in Osteoarthritis [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 356893.
- [13] Xu J, Xu Y. The lncRNA MEG3 downregulation leads to

- osteoarthritis progression via miR-16/SMAD7 axis [J]. Cell Biosci, 2017, 7: 69.
- [14] Cryns V, Yuan J. Protease to die for[J]. Genes Dev, 1998, 12(11): 1551-1570.
- [15] Mellwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(4): a008656.
- [16] Gibson GJ, Vemer JJ, Nelson FR, et al. Degradation of cartilage collagen matrix associated with changes in chondrocytes in osteoarthritis. Assessment by loss of background fluorescence and immunodetection of matrix components [J]. J Orthop Res, 2001, 19: 33-42.
- [17] Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, et al. Cloning, Expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage [J]. J Clin Invest, 1996, 97(3): 761-768.
- [18] Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(8): 643-654.
- [19] Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, et al. Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects[J]. Ann Biol Clin, 2008, 66(6): 605-620.
- [20] Pradhan AD, Cook NR, Buring JE, et al. C2reactive protein is independently associated with fasting insulin in nondiabetic women [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(4): 650-655.
- [21] Chikanza I, Fernandes L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis [J]. Expert Opin Invest Drugs, 2000, 9(7): 1499.
- [22] Kobayashi M, Squire GR, Mousa A, et al. Role of inter-leukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52: 128-135.
- [23] Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models [J]. Connect Tissue Res, 1999, 40(1): 1-11.
- [24] Ogata A, Hirano T, Hishitani Y, et al. Safety and efficacy of tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord, 2012, 5: 27-42.
- [25] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system [J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3): 227-241.
- [26] Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, et al. Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway [J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(10): 898-905.
- [27] Zuo T, Zhu M, Xu W, et al. Iridoids with genipin stem nucleus inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress by blocking the NF-κB pathway in polycystic ovary syndrome [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(5): 1855-1865.
- [28] Park C, Jeong JW, Lee DS, et al. Sargassum serratifolium extract attenuates interleukin-1β-induced oxidative stress and inflammatory response in chondrocytes by suppressing the activation of NF-κB, p38 MAPK, and PI3K/Akt [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8): 2308.

(收稿日期: 2018-12-03;修回日期: 2019-03-06)

(上接第 510 页)

- [7] Lau DC, Teoh H. Impact of current and emerging glucose-lowering drugs on body weight in type 2 diabetes [J]. Canadian J Diabetes, 2015, 39:S148-S154.
- [8] Malin SK, Kashyap SR. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obesity, 2014, 21(5): 323-329.
- [9] Shi X, Deng Y, Kang H, et al. Association of body composition with predicted hip bone strength among Chinese postmenopausal women: a longitudinal study[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5507.
- [10] Chen SC, Brooks R, Houskeeper J, et al. Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 440: 57-68.
- [11] Takeshita Y, Kita Y, Kato KI, et al. Effects of metformin and alogliptin on body composition in people with type 2 diabetes[J]. J Diabetes Investig, 2019, 10(3): 723-730.
- [12] Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, et al. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet[J]. Clin Sci (Lond), 2010, 119(6): 239-250.
- [13] 滑雅娜, 赵剑波, 庞春燕, 等. RA 患者肌肉含量与骨量变化的相关性分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7): 895-898.

(收稿日期: 2019-07-08;修回日期: 2019-09-27)