

miR-146a/27a 在 SD 大鼠 OA 软骨、滑膜组织中的表达及意义

周圆家, 邹磊, 董金波, 史晨辉, 王维山

摘要 目的 观察切断前交叉韧带 (ACLT) 构建 SD 大鼠骨性关节炎 (OA) 模型的病理特点, 并检测 miR-146a 和 miR-27a 在 OA 动物模型软骨、滑膜组织中的表达情况。方法 120 只 SD 大鼠随机分为实验组和对照组, 实验组行左膝前交叉韧带切断术, 对照组只打开关节腔不切断前交叉韧带, 分别于术后 2、4、8 周获取关节软骨、滑膜组织, 对软骨情况进行大体及组织学评分, 应用 RT-PCR 检测软骨和滑膜组织中 miR-146a、miR-27a 的表达情况。结果 实验组术后 2 周软骨表面粗糙, 色泽灰暗, 4 周和 8 周病变程度加重, 对照组关节软骨无明显退变; 实验组不同时间段 Mankin 评分与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。实验组和对照组 2、4、8 周时软骨组织中 miR-146a 的相对表达量分别为 (0.58 ± 0.13) vs (0.66 ± 0.14)、(0.43 ± 0.08) vs (0.68 ± 0.12)、(0.18 ± 0.06) vs (0.61 ± 0.07), 各个时间点差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 同期检测到软骨组织中 miR-27a、滑膜组织中 miR-146a 和 miR-27a 在实验组和对照组各时间点的表达量差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。应用 Pearson 相关分析显示, miR-146a、miR-27a 在软骨组织中的表达情况与 Mankin 评分呈显著负相关 ($r = -0.92$ 、 -0.89 , $P < 0.05$), 而滑膜、软骨中 miR-146a 和 miR-27a 的表达呈线性正相关 ($r = 0.78$ 、 0.80 , $P < 0.05$)。结论 miR-146a 和 miR-27a 在 SD 大鼠 OA 模型软骨组织、滑膜组织中呈低表达, 且与 OA 软骨病变程度呈负相关。

关键词 骨关节炎; 微小 RNA; 软骨组织; 滑膜组织

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)03-0275-05

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 又称退行性骨关节病, 是一种以关节软骨组织发生退行性病变为主要特征, 并伴随年龄增长发病率明显升高的疾病。可累及关节软骨、滑膜、软骨下骨及关节周围肌肉、韧带。以关节缓慢发展的疼痛、肿胀, 伴功能障碍为临床表现, 主要有滑膜增生、软骨破坏、软骨下骨骨

化及骨赘形成等一系列病理表现^[1]。由于人们对 OA 病理变化的具体机制仍然无法确定, 因此目前治疗仍然以减轻疼痛, 减缓关节功能受损为主, 无法达到软骨正常结构恢复的治愈目标。近年来随着研究的深入, 越来越多的文献表明蛋白降解酶在 OA 病理变化过程中发挥着极其重要的作用, 目前研究比较清楚的有基质金属蛋白酶系统 (matrix metalloproteinase, MMPs) 和纤溶酶原系统。研究^[2]表明 miRNA 也在 OA 的病变过程中起着关键的调控作用。本课题组前期通过基因芯片技术检测了 OA 滑膜组织中 miRNA 的表达谱发现, 与正常滑膜组织比较, miR-27a、miR-146a、miR-140、miR-181、miR-182b 的表达差异均有统计学意义, 其中 miR-27a 和 miR-146a 的差异更为明显, 为了进一步验证二者在 OA 动物模型中的表达情况, 该实验以切断 SD 大鼠膝前交叉韧带, 制作 OA 模型, 应用 RT-PCR 检测 OA 早、中、晚期软骨及滑膜组织中 miR-146a 和 miR-27a 的表达情况, 分析其与 OA 病变的相关性, 为后期研究 miR-27a 和 miR-146a 在 OA 中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取成年雄性 SD 大鼠 120 只, 体重 250~300 g, 由新疆维吾尔自治区疾病控制中心动物饲养科提供。分笼饲养, 自由饮水、进食。饲养温度 20~26℃, 湿度 50%~70%, 昼夜节律按照 1:1 进行。将 SD 大鼠编号后随机分为模型组和正常组, 每组 60 只。实验均选取左侧膝关节作为手术侧。

1.2 主要试剂及仪器 miScript II 逆转录试剂盒 (凯杰 218161)、miScript SYBR Green PCR 检测试剂盒 (凯杰 218073)、1% 琼脂糖、漩涡振荡机 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); Heraguard EC 超净工作台 (美国 Thermo Scientific 公司); 单道可调移液器 (德国 Eppendorf 艾本德公司); CFX96 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); PowerPac Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 水平电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 构建 SD 大鼠 OA 模型 实验组手术建模过程: 将 SD 大鼠称重后, 按 0.3 ml/100 g 水合氯醛腹腔内注射麻醉, 选取左膝关节, 备皮、消毒。取中立

2014-11-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81160225、81360451); 兵团医药卫生专项资助课题 (编号: 2013BA020); 兵团国际交流与合作专项资助课题 (编号: 2012BC002); 兵团创新团队专项课题 (编号: 2014CC002)

作者单位: 新疆石河子大学医学院附属医院骨科, 石河子 832000

作者简介: 周圆家, 男, 硕士研究生;

王维山, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wwsmc2002@sina.com

位沿髌韧带内侧弧形微型切开,纵向切开髌旁支持带,脱位及外翻髌骨,暴露髌间,屈曲关节维持髌骨脱位,同时用蘸有生理盐水的纱布保持关节湿润,直视下将前交叉韧带切断。对照组:只切开发关节腔,不破坏交叉韧带。分笼饲养,自由活动、饮食,术后3 d肌肉注射青霉素20万单位预防感染。

1.4 病理学检测 每批10只大鼠,分别于建模手术后2、4、8周取左膝关节对软骨情况进行大体观察。对所取膝关节,矢状位切取约5 mm厚带软骨下骨质的软骨、滑膜标本,置于10%中性甲醛固定24 h,15% EDTA脱钙15 d,常规脱水、石蜡包埋,作5 μ m厚度连续纵切片,行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察组织学病理变化。

1.5 RT-PCR 检测软骨组织、滑膜组织中 miR-146、miR-27a 表达 应用 miScript SYBR Green PCR Kit (200),在荧光定量 PCR 仪上按照标准步骤进行反应。按照反应体系配置说明配备总反应液 25 μ l: 其中 2* Quantiect SYBR Green PCR 12.5 μ l; 10* miscript Universal Primer 2.5 μ l; 10* miscript Primer Assay 140/27a/U6 2.5 μ l; RNase-free water 5 μ l; Template cDNA 2.5 μ l,每个样本设3个复孔,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变 5 min,一个循环。15 s 94 $^{\circ}$ C 30 s 55 $^{\circ}$ C 30 s 70 $^{\circ}$ C 40 个循环。计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值进行定量分析 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示目的基因相对表达量^[3]。

1.6 统计学处理 对 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,基因相对表达量与 OA 严重程度之间的关系采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 SD 大鼠 OA 关节软骨大体形态学 对照组关节软骨透明蓝白色,关节面光滑,色泽光亮,无明显关节积液及滑膜增生,关节边缘整齐。实验组,术后2周:有少量关节积液,滑膜轻度充血增生,软骨面淡黄,触之轻度变软。术后4周:滑液增多,滑膜充血增生,软骨表面粗糙,轻度糜烂,失去原有光泽,色泽变暗。术后8周:滑液相对减少,滑膜增生,软骨面不规则,溃疡形成,部分软骨下骨暴露,有骨赘形成。各组软骨退变程度逐渐加重。与对照组比较,实验组2周时已出现软骨退行病变,第4、8周时退行性变进一步加重,差异有统计学意义($F = 13.786$, $P < 0.05$),见图1。

2.2 SD 大鼠 OA 关节软骨病理变化 正常组:软骨表面平整,细胞排列整齐,软骨层次结构清晰,潮

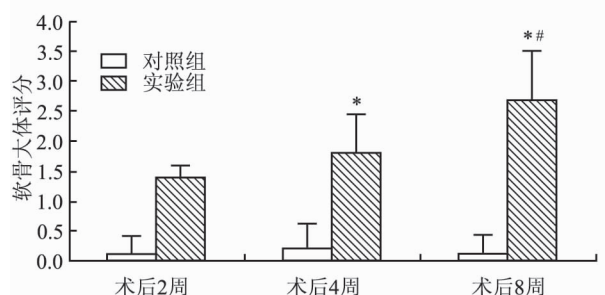
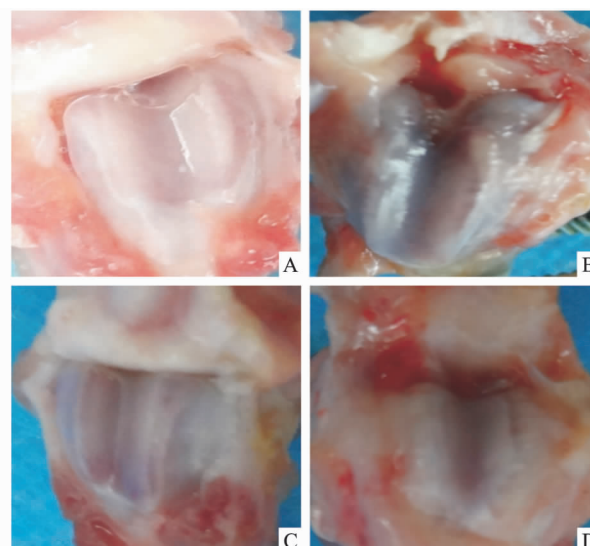


图1 不同病变程度软骨组织大体观察

A: 对照组; B: 实验组术后2周; C: 实验组术后4周; D: 实验组术后8周; 与术后2周比较: * $P < 0.05$; 与术后4周比较: # $P < 0.05$

线完整。实验组4周,浅层软骨细胞收缩,细胞数量增多,少量关节面纤维组织形成,潮线紊乱,染色减退。实验组6周:表层细胞部分片状剥脱,部分细胞收缩,细胞核变小,表面部分纤维组织覆盖,界限模糊。实验组8周,病变加重,软骨细胞消失,可深达钙化层,表层大量纤维覆盖,软骨细胞簇集成团,界限不清。各实验组软骨细胞退变加重。光镜下对软骨退变损伤程度进行 Mankin 评分,实验组 ACLT 术后各时间点软骨 Mankin 评分与对照组比较,差异有统计学意义($F = 104.252$, $P < 0.01$)。实验组组间比较 Mankin 评分随病程延长分值增加,符合骨性关节炎软骨退变的特点。见图2。

2.3 miR-146a 在 SD 大鼠 OA 关节软骨、滑膜组织中表达 软骨组织中,对照组 miR-146a 2、4、8 周的表达量差异无统计学意义($F = 0.875$, $P = 0.428$),实验组各个时间点之间的差异有统计学意义($F = 44.417$, $P < 0.001$)。滑膜组织中,对照组 miR-146a 2、4、8 周的表达量差异无统计学意义($F = 0.092$, $P = 0.913$),实验组各个时间点之间的差

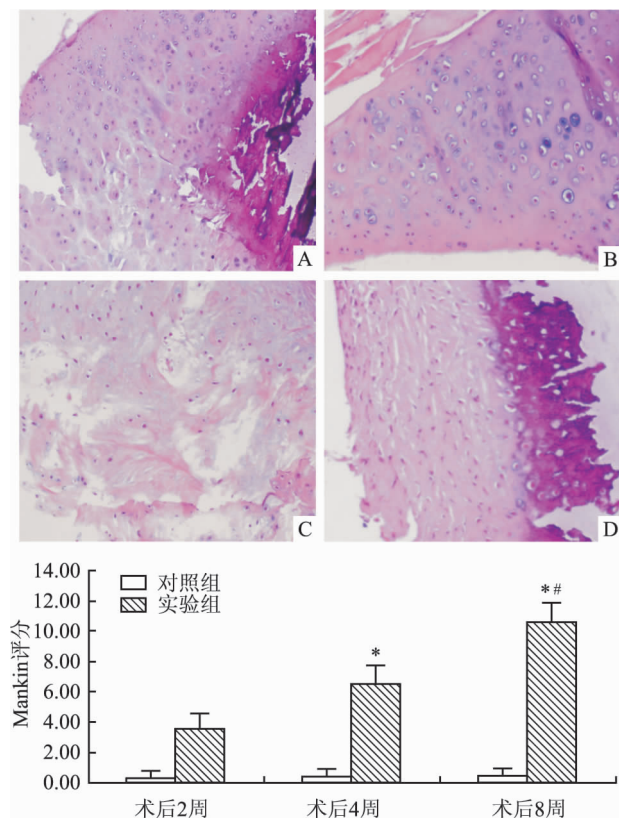


图2 不同病变程度软骨组织镜下观察

A: 对照组; B: 实验组术后2周; C: 实验组术后4周; D: 实验组术后8周; 与术后2周比较: * $P < 0.05$; 与术后4周比较: # $P < 0.05$

具有统计学意义 ($F = 15.857, P < 0.05$)。随着时间的延长, 实验组 miR-146a 在软骨和滑膜组织中的表达量呈降低趋势。见图3。

2.4 miR-27a 在 SD 大鼠 OA 关节软骨、滑膜组织中的表达 软骨组织中, 对照组 miR-27a 2、4、8 周的表达量差异无统计学意义 ($F = 0.059, P = 0.943$), 实验组各个时间点之间的差异有统计学意义 ($F = 32.141, P < 0.01$)。滑膜组织中, 对照组 miR-27a 2、4、8 周的表达量差异无统计学意义 ($F = 0.059, P = 0.943$), 实验组各个时间点之间的差异有统计学意义 ($F = 32.141, P < 0.01$)。随着时间的延长, 实验组 miR-27a 在软骨和滑膜组织中的表达量呈降低趋势。见图4。

2.5 miR-146a/27a 与关节软骨病变程度的相关性

应用 Pearson 相关性分析显示, miR-146a、miR-27a 在软骨组织中的表达情况与 Mankin 评分呈显著负相关性 ($r = -0.92, -0.89, P < 0.05$), 而滑膜、软骨中 miR-146a 和 miR-27a 的表达呈线性正相关性 ($r = 0.78, 0.80, P < 0.05$), 见图5。

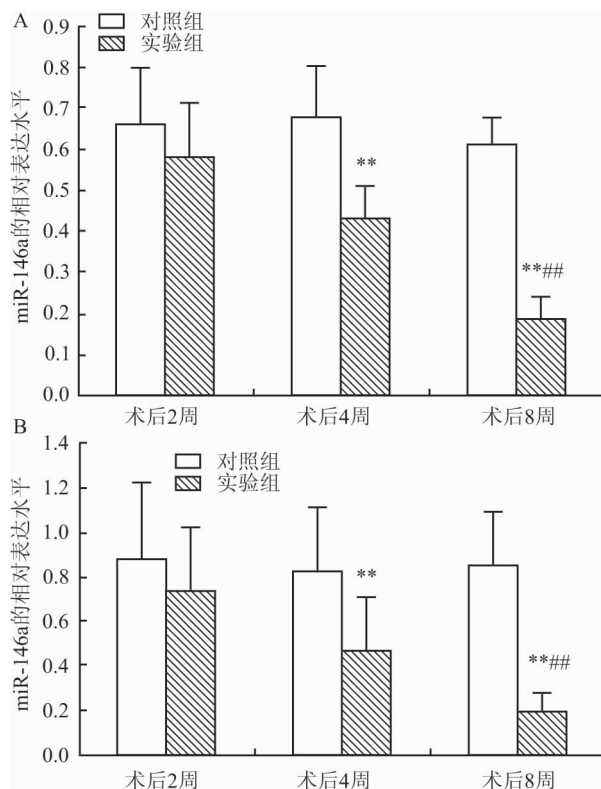


图3 miR-146a 在不同病变程度软骨、滑膜组织中的表达情况

A: miR-146a 在软骨组织中的表达; B: miR-146a 在滑膜组织中的表达; 术后2周与术后4周、8周比较: ** $P < 0.01$; 术后4周与术后8周比较: ### $P < 0.01$

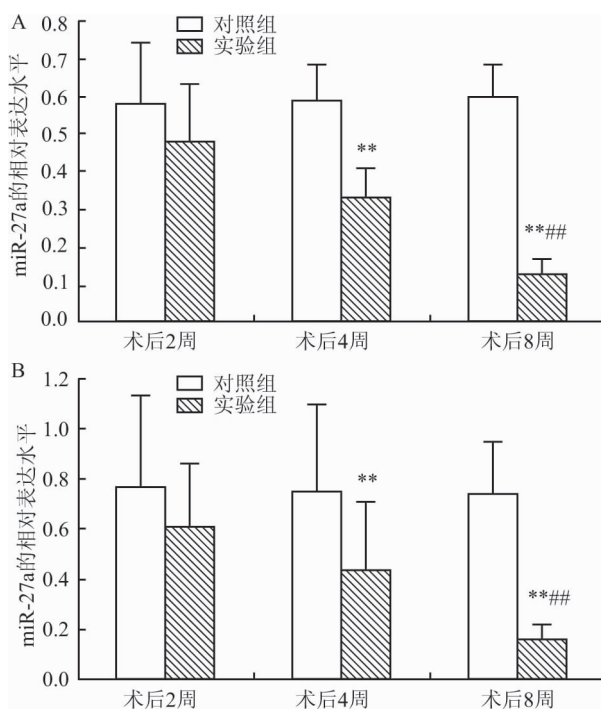


图4 miR-27a 在不同病变程度软骨、滑膜组织中的表达情况

A: miR-27a 在软骨组织中的表达; B: miR-27a 在滑膜组织中的表达; 与术后2周比较: ** $P < 0.01$; 与术后4周比较: ### $P < 0.01$

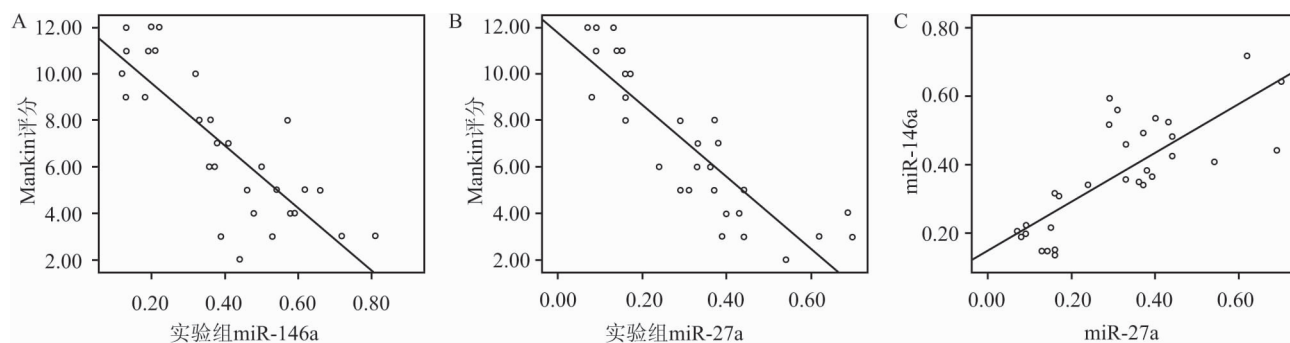


图5 miR-146a/27a与关节软骨病变程度的相关关系

A: Mankin 评分与 miR-146a 表达水平的相关性; B: Mankin 评分与 miR-27a 表达水平的相关性; C: miR-146a 和 miR-27a 表达水平的相关性

3 讨论

OA 是机械力学和生物学因素共同作用的结果,目前具体病变机制还未明确。由于在临床上难以获取正常人及早期 OA 患者的软骨、滑膜组织标本,为此借鉴 Tochigi et al^[4]建立的新西兰大白兔 OA 模型,本实验对 SD 大鼠采用前交叉韧带切断术,造成膝关节受力改变,实为创伤性骨关节炎,主要是在生物力学紊乱基础上的生物学反应所致 OA,且随着时间的延长关节稳定性越差,OA 的症状越重。

miRNA 作为新的调控因子在关节软骨基质破坏、软骨细胞凋亡以及滑膜炎等方面发挥重要调控作用。近年来确立了 miRNA 在人类疾病发病机制中起着至关重要的作用^[5-6]。miRNA 是真核生物基因表达的一类负调控因子,具有高度的生物进化保守性、组织特异性、空间和时间特异性、基因簇集现象等生物学特性^[7]。Nakasa et al^[8]对 OA 患者软骨细胞 miR-146a 基因表达谱的研究表明 OA 轻度患者的软骨细胞中 miR-146a 呈高表达,且 miR-146a 的表达受 IL-1 的影响。该研究表明 miR-146a 是骨关节炎涉及软骨病变的基因作用靶点。Jones et al^[9]研究显示在 OA 早期阶段,miR-146a 与 NF- κ B 途径中多个基因密切相关,但在中、晚期 OA 患者软骨细胞中 miR-146a 的表达受抑制。miR-146a 的表达减少是可能促进 OA 发展的影响因素。Yamasaki et al^[10]同样也发现 miR-146a 在 Mankin 评分低的 OA 软骨组织中呈高表达,且伴随 Mankin 评分的增高及 MMP-13 的表达增加而呈逐渐下调趋势。miR-146a 在 OA 软骨中的表达变化是关节软骨降解与合成之间代谢失衡的一种表现。

Kim et al^[11]发现 miR-27a 过氧化物酶体生物激活受体- γ 抑制脂肪细胞分化,而肥胖是膝关节等负

重关节发生 OA 的危险因素之一^[12]。Tardif et al^[13]研究表明在 OA 早期软骨细胞中高表达虽差异无统计学意义,但在细胞中加入抗 miR-27a 的物质后,其对 MMP-13 的表达在 48 ~ 72 h 呈现了明显上升趋势,据此推测 miR-27a 可能间接参与 MMP-13 的调控,加速了关节软骨破坏进程。

本研究也显示 miR-146a 和 miR-27a 在实验组的表达明显低于对照组,且随着时间的延长其表达量呈现降低趋势,对其与 Mankin 评分相关性进行统计分析显示,miR-146a、miR-27a 在软骨组织中的表达情况与 Mankin 评分呈显著负相关性,伴随 Mankin 分值的增加呈低表达,表明 miR-146a 和 miR-27a 的表达与 OA 的严重程度呈负相关。

OA 的病理基础是关节软骨基质中的蛋白聚糖和胶原纤维网的降解,使关节软骨退变、结构破坏,并引起滑膜炎。以 uPA 为代表的丝氨酸蛋白水解酶,可介导细胞外基质蛋白的水解并参与关节软骨的细胞外基质降解及关节滑膜增生,在 OA 的病理过程中起重要作用^[14],本研究前期也初步探讨了 miR-27a、miR-140、uPA 和 MMP-3 在 OA 病理变化中起着重要的作用,并且相互之间存在某种调控关系^[15]。通过本次研究也表明,miR-146a 和 miR-27a 参与 OA 的病理变化过程。但是有关其在 OA 病理变化中的具体机制及与其他因素的相互关系,有待进一步实验证实。

参考文献

- [1] Goldring M B, Goldring S R. Osteoarthritis [J]. J Cell Physiol, 2007, 213(3): 626-34.
- [2] 黄泽宇, 沈彬, 裴福兴, 等. Micro-RNA 在骨关节炎中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(17): 1600-3.
- [3] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-8.

- [4] Tochigi Y, Vaseenon T, Heiner A D, et al. Instability dependency of osteoarthritis development in a rabbit model of graded anterior cruciate ligament transection [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93(7): 640–7.
- [5] Le L T, Swingle T E, Clark I M. The role of micro-RNAs in osteoarthritis and chondrogenesis [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(8): 1963–74.
- [6] 汪伟, 孙晓娜, 张玉峰, 等. miR-451 与 MIF 在胃癌组织中表达的相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(11): 1384–6.
- [7] Vasudevan S, Tong Y, Steitz J A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1931–4.
- [8] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1284–92.
- [9] Jones S W, 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 Cartilage* 2009, 17(4): 464–72.
- [10] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage [J]. *Arthritis Rheum* 2009, 60(4): 1035–41.
- [11] Kim S Y, Kim A Y, Lee H W, et al. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 392(3): 323–8.
- [12] 何凡, 徐建华, 丁长海, 等. 膝骨关节炎患者血清瘦素水平变化及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(5): 512–5.
- [13] Tardif G, Hum D, Pelletier J P, et al. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *BMC Musculoskelet Disord* 2009, 10: 148. doi: 10.1186/1471-2474-10-148.
- [14] Bian Q, Wang Y J, Liu S F, et al. Osteoarthritis: genetic factors, animal models, mechanisms, and therapies [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4: 74–100.
- [15] 王维山, 史晨辉, 何仁豪, 等. MicroRNAs、uPA 及 MMP-3 在骨关节炎患者滑膜组织中的表达及相关性 [J]. *中国老年学杂志* 2014, 34(4): 871–3.

Expression and significance of miR-146a, miR-27a in the cartilage and synovial of SD rat model of osteoarthritis

Zhou Yuanjia, Zou Lei, Dong Jinbo, et al

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000)

Abstract Objective To observe anterior cruciate ligament transection (ACLT) to build clinical pathological features of SD rat model of osteoarthritis (OA) and to examine the expression of miR-146a and miR-27a in joint cartilage and synovial of SD rat model of OA. **Methods** Experimental groups received unilateral ACLT, the treatment of control groups was similar to the experimental groups but no transection ACL, and they were sacrificed at 2, 4 and 8 weeks after surgery respectively. Knees were harvested to observe the pathologic change of cartilage macroscopically and histologically, histopathological grading OA was performed according to a Mankin's scoring system. The expression levels of miR-146a and miR-27a in joint cartilage and synovial were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. **Results** Two weeks after ACLT cartilage surface roughness and color gloomy were seen, and became more severe at 4 and 8 weeks after operation, while cartilage still remained normal after pseudo operation. Mankin score of the experimental groups in different time periods were significant differences with the control groups. In the experimental and control groups, the relative expression levels of miR-146a at 2, 4, 8 weeks in joint cartilage were (0.58 ± 0.13) vs (0.66 ± 0.14) , (0.43 ± 0.08) vs (0.68 ± 0.12) , (0.18 ± 0.06) vs (0.61 ± 0.07) , and each time point that had statistically significant differences ($P < 0.01$). At the same period detected cartilage tissue miR-27a, synovial tissue miR-146a and miR-27a, there were statistically significant differences at each time point between the expression of the experimental groups and the control groups ($P < 0.01$). Application pearson correlation analysis showed that the expression levels of miR-146a and miR-27a in cartilage tissue were significantly negatively correlated to Mankin score ($r = -0.92, -0.89, P < 0.05$), while the expression levels of miR-146a, miR-27a in synovium and cartilage were significantly positive correlation ($r = 0.78, 0.80, P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of miR-146a and miR-27a decreased in joint cartilage and synovial in SD rat model of OA, and that were negatively related to the severity of OA.

Key words osteoarthritis; miRNA; cartilage; synovial