

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.22.001

• 基础研究 •

miR-130a-3p 调控 SOX4 对骨关节炎软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响 *

赵轶男 孙 强 毕 龙 陈小超 程建岗^Δ

(空军军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710000)

摘要 目的:探讨 miR-130a-3p 对骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响及作用机制。**方法:**收集我院住院的 40 例半月板损伤患者和 40 例 OA 患者,采用 RT-PCR 检测半月板损伤患者和 OA 患者膝关节软骨组织中 miR-130a-3p 的表达。在 OA 软骨细胞中分别转染 miR-NC、miR-130a-3p mimics、miR-130a-3p inhibitors、siRNA-SOX4(si-SOX4)或过表达 SOX4 的慢病毒载体 (LV-SOX4),采用 CCK8 法检测细胞增殖情况;RT-PCR 和 western blot 检测细胞分化相关分子 BMP2 和 BMP4;RT-PCR 检测炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 的表达。**结果:**半月板损伤患者软骨组织和软骨细胞中 miR-130a-3p 的表达明显高于 OA 患者(P 均 <0.05),而 SOX4 的表达水平明显低于 OA 患者($P<0.05$)。OA 患者膝关节软骨组织中 miR-130a-3p 和 SOX4 的表达呈显著负相关($P<0.05$)。miR-130a-3p mimics 能够明显促进 OA 软骨细胞增殖($P<0.05$)、增加分化相关分子 BMP2 和 BMP4 的表达(P 均 <0.05)以及抑制炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 的表达(P 均 <0.05)。miR-130a-3p inhibitors 能够明显抑制 OA 软骨细胞增殖($P<0.05$)、分化相关分子 BMP2 和 BMP4 的表达 (P 均 <0.05) 以及促进炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 的表达 (P 均 <0.05)。OA 软骨细胞在转染 miR-130a-3p mimics 后,SOX4 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低(P 均 <0.05),在转染 miR-130a-3p inhibitors 后,SOX4 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高(P 均 <0.05)。双荧光素酶结果显示 miR-130a-3p 能够靶向结合 SOX4。在 OA 软骨细胞中,采用 siRNA 低表达 SOX4 后,明显促进细胞增殖和分化以及抑制炎症因子的释放。共转染 miR-130a-3p mimics 和 LV-SOX4 能够逆转过表达 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响(P 均 >0.05),而共转染 miR-130a-3p inhibitors 和 LV-SOX4 能够进一步加强低表达 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子的影响(P 均 <0.05)。**结论:**miR-130a-3p 在 OA 中明显低表达,并能够通过靶向抑制 SOX4 促进 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放。

关键词:miR-130a-3p;骨关节炎;SOX4;增殖;分化;炎症因子

中图分类号:R-33;R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)22-4201-07

miR-130a-3p Regulates the Proliferation, Differentiation and Release of Inflammatory Factors of Osteoarthritis Chondrocytes through miR-130a-3p*

ZHAO Yi-nan, SUN Qiang, BI Long, CHEN Xiao-chao, CHENG Jian-gang^Δ

(Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of miR-130a-3p on osteoarthritis (OA) chondrocyte proliferation, differentiation and inflammation, and the underlying mechanisms. **Methods:** 40 patients with OA and 40 patients with meniscus injury in our hospital were selected. miR-130a-3p expression in OA and meniscus injury patients were analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). After transfecting OA chondrocytes with miR-NC, miR-130a-3p mimics, miR-130a-3p inhibitors, si-SOX4 or LV-SOX4, cell proliferation was detected by the cell counting kit-8 (CCK8) assay, BMP2 and BMP4 were detected by RT-PCR and western blotting, and the expression of IFN- γ and TNF- α were detected by RT-PCR. **Results:** The expression level of miR-130a-3p in patients with meniscus injury and normal chondrocytes was higher than that in OA patients ($P<0.05$). However, the expression level of SOX4 was lower than that in OA patients ($P<0.05$). The expression level of miR-130a-3p was significantly negatively related with the expression level of SOX4 in OA cartilage tissues ($P<0.05$). After OA chondrocytes transfected with miR-130a-3p mimics, OA chondrocyte proliferation was significantly increased ($P<0.05$), the expression of BMP2 and BMP4 were significantly increased ($P<0.05$) and the expression of IFN- γ and TNF- α were significantly decreased ($P<0.05$). After OA chondrocytes transfected with miR-130a-3p inhibitors, OA chondrocyte proliferation was significantly decreased ($P<0.05$), the expression of BMP2 and BMP4 were significantly decreased ($P<0.05$) and the expression of IFN- γ and TNF- α were significantly increased ($P<0.05$). After transfection with miR-130a-3p mimics, the expression levels of SOX4 mRNA and protein were significantly decreased in OA chondrocytes ($P<0.05$), while the expression levels of

* 基金项目:国家自然科学基金项目(2016YFC1100304)

作者简介:赵轶男(1984-),硕士,主治医师,主要研究方向:骨科,关节外科,电话:15991674480, E-mail: fujindexinxiang@126.com

^Δ 通讯作者:程建岗(1978-),硕士,主治医师,主要研究方向:创伤骨科,电话:18792692680, E-mail: 419307191@qq.com

(收稿日期:2019-04-26 接受日期:2019-05-28)

SOX4 mRNA and protein were significantly increased after transfection with miR-130a-3p inhibitors ($P<0.05$). Double luciferase results showed that miR-130a-3p could bind SOX4 in a targeted manner ($P<0.05$). Low expression of SOX4 by siRNA in OA chondrocytes could significantly promote cell proliferation, differentiation, and inhibit the release of inflammatory cytokine. After co-transfection with miR-130a-3p mimics and LV-SOX4, the effects of overexpression of miR-130a-3p on cell proliferation and differentiation and the release of inflammatory factors in OA chondrocytes could be reversed ($P<0.05$). However, after co-transfection with miR-130a-3p inhibitors and LV-SOX4, the effects of low expression of miR-130a-3p on cell proliferation and differentiation and inflammatory factors in OA chondrocytes could be further enhanced (all $P<0.05$). **Conclusions:** miR-130a-3p was significantly low expressed in OA and could regulate the proliferation, differentiation and inflammatory cytokine release in OA chondrocytes through targeting SOX4.

Key words: miR-130a-3p; Osteoarthritis; SOX4; Proliferation; Differentiation; Inflammatory cytokine

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R684.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)22-4201-07

前言

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的退行性关节疾病,影响全球 2.5 亿人,主要导致关节僵硬,甚至丧失运动能力^[1,2]。OA 的发生机制是由于蛋白聚糖的减少,导致不平衡的软骨基质的合成与降解,从而增加骨赘形成^[3]。OA 还伴随着软骨细胞的减少,导致关节软骨的破坏,一般很难自我修复。目前,OA 尚无明确的有效根治手段,临床上主要是控制疼痛、改善关节功能和提高患者生活质量,在保守治疗无效时,可通过软骨移植、关节清理和关节置换等外科手术治疗^[4]。因此,阐明 OA 的发病机制对 OA 的治疗起到重要作用。

microRNAs(miRNAs)是一类普遍存在于生物体基因组、长度仅为 20-24nt 的非编码小分子 RNA。虽然 miRNAs 仅占所有 RNA 的 1.0%左右,却参与了 30%-50%的基因调节,通过对目标 mRNA 的靶向调节,miRNAs 调节了如细胞增殖、分化和凋亡等各种细胞生理过程^[5]。随着人们对 miRNAs 的深入研究,越来越多的证据表明其与骨关节炎、骨质疏松症、骨肿瘤等多种骨疾病的发病与病情进展密切相关^[6-8]。研究显示 miR-144 特异性表达于软骨组织,通过对组蛋白脱乙酰化酶 4 调节,能够抑制软骨细胞的退变,miR-140 转染至人的软骨细胞中可抑制 IL-1 β 诱导的 ADAMTS5 表达,从而维持软骨细胞的增殖状态^[9, 10]。

我们在前期研究中发现 miR-130a-3p 中显著低表达,然而其作用机制尚未完全阐明。因此,本研究选择我院收治的半月板损伤患者和 OA 患者,分析了 OA 患者软骨细胞 miR-130a-3p 的表达,进一步分离 OA 患者软骨细胞,探讨 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 组织标本

选取 2016 年 3 月至 2018 年 11 月在我院住院的 40 名 OA 患者和 40 名半月板损伤患者。OA 诊断标准采用美国风湿学院标准,患者平均年龄 62.5 ± 10.2 岁,包括男性 24 例,女性 16 例;半月板损伤患者平均年龄 43.7 ± 9.6 岁,包括男性 28 例,女性 12 例。所有患者均未患有风湿性关节炎、痛风性关节炎、类风湿性关节炎和继发性骨关节炎等。在术中切除软骨组织,所有组织标本分成相同大小并保存于液氮中。所有患者均在术前

签署知情同意书。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 细胞培养基 (Gibco, Rockville, MD, USA), CCK-8 试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology, Jiangsu, China), TRIzol Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), RNA 反转录试剂盒 (TaKaRa, Otsu, Japan), lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 兔抗人 BMP2、BMP4、IFN- γ 、TNF- α 、 β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), HRP 标记的羊抗兔 IgG (Abcam, Cambridge, UK)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 人软骨细胞通过两步酶消化法进行分离,然后进行传代培养。软骨组织被剪碎后采用 PBS 冲洗,然后采用 0.25 %的胰蛋白酶消化,震荡孵育 40 min 后使用 D-Hanks 缓冲液冲洗并以 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 II 型胶原酶消化,离心分离软骨细胞,将原代软骨细胞采用含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 细胞培养基在 37°C 、5 % CO_2 平衡湿度培养箱中培养。取对数生长期软骨细胞进行实验。采用 INTERFERin 转染试剂并按试剂说明书进行 si-SOX4、LV-SOX4、miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 转染。细胞转染采用 Lipofectamine 2000 方法,其具体操作按照说明书进行。每组重复设置 5 个孔。

1.3.2 qRT-PCR 按照 Trizol 试剂盒步骤提取组织和细胞中总 RNA。采用标准荧光定量 PCR 法检测。以 β -actin 为内参通过 260 nm 和 280 nm 吸光度,qRT-PCR 按照 SYBR Green 试剂盒说明书进行反应体系的配制,通过 Prime Script[®] RT 试剂盒检测 RNA 的浓度,反转录试剂盒合成 cDNA。采用比较 CT 值法对获得的数据进行相对定量分析。

1.3.3 CCK-8 方法检测细胞增殖 取对数生长期的各组细胞,以 2×10^3 个密度接种到 96 孔培养板中,常规培养。各组细胞分别培养 24、48、72 和 96 h 后,加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK-8 溶液,孵育 10 min,用酶标仪测定在 405 nm 波长的吸光度进行检测。

1.3.4 Western blot 法 收集转染 24 h 后的细胞,常规提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶每孔加入 $40 \mu\text{g}$ 的待测蛋白,110 V 电泳,250 mA 电转至 PVDF 膜,5 %脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h,分别加入 BMP2、BMP4、IFN- γ 、TNF- α 、 β -actin 一抗 4°C 孵育过夜,TBST 洗膜 $3 \times 10 \text{ min}$,二抗 37°C 孵育 1 h,TBST 洗膜 $3 \times 30 \text{ min}$,ECL 显影。运用 Quantity one 软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin 作内参,计

算相对表达量。

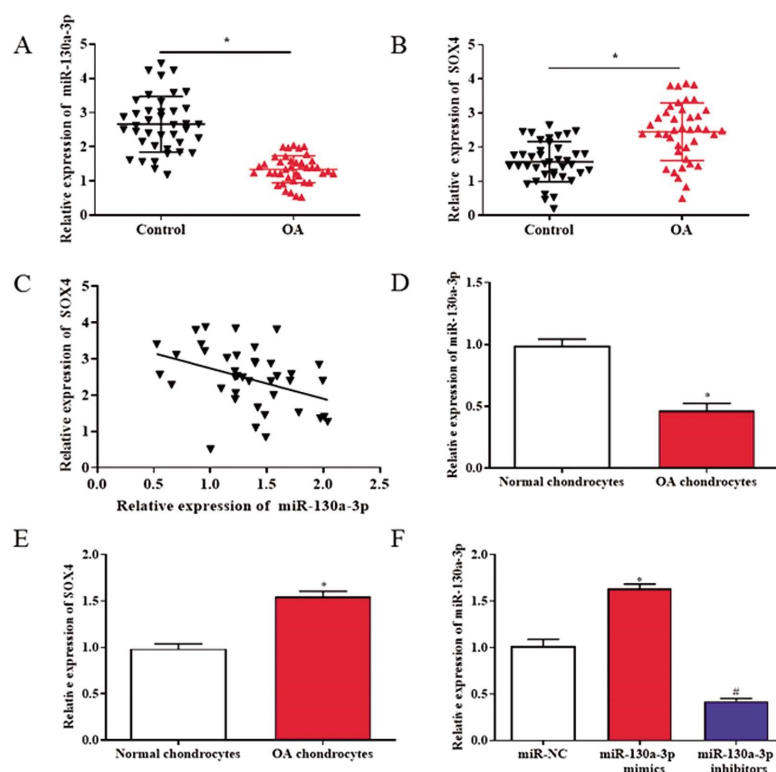
1.3.5 双荧光素酶报告 将野生型(WT)或突变型(MUT)SOX4克隆到 pmirGLO 质粒受体中,同时将 miR-130a-3p mimics 或 miR-NC 导入 OA 软骨细胞中,共培养 48 h 后采用双荧光素酶受体分析系统测量双荧光素活性。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验,Pearson 相关系分析 OA 软骨组织中 miR-130a-3p 和 SOX4 表达的相关性,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OA 软骨组织和细胞中 miR-130a-3p 和 SOX4 的表达



注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 1 miR-130a-3p 和 SOX4 在 OA 软骨组织和细胞中的表达水平

Fig.1 Expression of microRNA-130a-3p and SOX4 in cartilage tissues and cells of OA

注:(A. 半月板损伤软骨组织和 OA 软骨组织中 miR-130a-3p 表达水平;B. 半月板损伤软骨组织和 OA 软骨组织中 SOX4 表达水平;

C. miR-130a-3p 和 SOX4 在 OA 软骨组织中表达相关性;D. 正常软骨细胞和 OA 软骨细胞中 miR-130a-3p 表达水平;

E. 正常软骨细胞和 OA 软骨细胞中 SOX4 表达水平;F. OA 软骨细胞分别转染 miR-NC、miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors)

(A. The expression levels of miR-130a-3p in OA and meniscus injury tissues. B. The expression levels of SOX4 in OA and meniscus injury tissues.

C. Correlation between miR-130a-3p and SOX4 expression in OA cartilage tissues. D. The expression levels of miR-130a-3p in normal chondrocytes and

OA chondrocytes. E. The expression levels of SOX4 in normal chondrocytes and OA chondrocytes. F. OA chondrocytes transfected with miR-NC,

miR-130a-3p mimics, miR-130a-3p inhibitors.)

2.2 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响

在 OA 软骨细胞转染 miR-130a-3p mimics 后,将 OA 软骨细胞培养 3 天,结果显示转染 miR-130a-3p mimics 后,OA 软骨细胞增殖能力较转染 miR-NC 组明显增加($P < 0.05$,图 2A);在转染 miR-130a-3p inhibitors 后,OA 软骨细胞增殖能力较转染

半月板损伤患者软骨组织中 miR-130a-3p 的表达明显高于 OA 患者软骨组织 ($P < 0.05$,图 1A),SOX4 的表达明显低于 OA 患者软骨组织($P < 0.05$,图 1B)。同时,OA 患者膝关节软骨组织中 miR-130a-3p 和 SOX4 的表达呈负相关($P < 0.05$,图 1C)。进一步分离 OA 患者中软骨细胞,结果显示 OA 软骨细胞中 miR-130a-3p 的表达明显低于正常软骨细胞 ($P < 0.05$,图 1D),OA 软骨细胞中 SOX4 的表达明显高于正常软骨细胞($P < 0.05$,图 1E)。采用 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 转染至 OA 软骨细胞,结果显示在转染 miR-130a-3p mimics 后,miR-130a-3p 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$,图 1F),转染 miR-130a-3p inhibitors 后 miR-130a-3p 的表达水平明显降低 ($P < 0.05$,图 1F)。

miR-NC 组明显降低($P < 0.05$,图 2B)。进一步分析 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞分化的影响,采用 RT-PCR 和 western blot 检测软骨分化相关分子 BMP2 和 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示在转染 miR-130a-3p mimics 后,OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平较转染 miR-NC 组明显增加(P 均 < 0.05 ,图 2C 和 2E);在转染 miR-130a-3p inhibitors

后,OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平较转染 miR-NC 组明显降低(P 均 <0.05 , 2D 和 2F)。同时,在 OA 软骨细胞转染 miR-130a-3p mimics 后能够明显抑制炎症因子

IFN- γ 和 TNF- α 的释放(P 均 <0.05 , 2G 和 2I), 在转染 miR-130a-3p inhibitors 后能够明显促进炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 的释放(P 均 <0.05 , 2H 和 2J)。

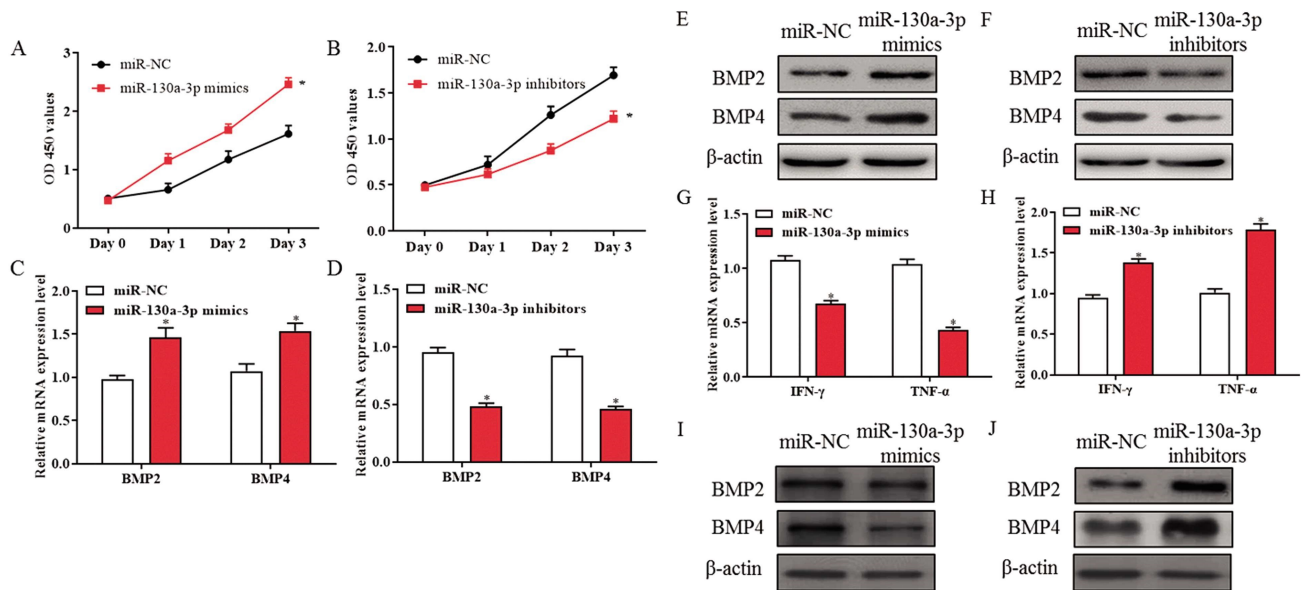


图 2 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响

Fig.2 The effects of microRNA-130a-3p on the proliferation, differentiation and release of inflammatory factors of OA chondrocytes

注: (A 和 B. 转染 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 后 OA 软骨细胞增殖情况; C 和 E. 转染 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 后 OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 mRNA 表达水平; D 和 F. 转染 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 后 OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 蛋白表达水平; G 和 H. 转染 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 后 OA 软骨细胞 IFN- γ 和 TNF- α mRNA 表达水平; I 和 J. 转染 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 后 OA 软骨细胞 IFN- γ 和 TNF- α 蛋白表达水平), 与对照组相比, $*P<0.05$ 。

(A and B. The proliferation of OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics and miR-130a-3p inhibitors. C and E. The mRNA expression of BMP2 and BMP4 in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics and miR-130a-3p inhibitors. D and F. The protein expression of BMP2 and BMP4 in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics and miR-130a-3p inhibitors. G and H. The mRNA expression of IFN- γ and TNF- α in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics and miR-130a-3p inhibitors. I and J. The protein expression of IFN- γ and TNF- α in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics and miR-130a-3p inhibitors.)

2.3 miR-130a-3p 能够靶向结合 SOX4

为进一步分析 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的调控机制, 在 OA 软骨细胞转染 miR-130a-3p mimics 后, SOX4 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低 ($P<0.05$, 图 3A 和 3B); 同时, 在转染 miR-130a-3p inhibitors 后, SOX4 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高 ($P<0.05$, 图 3A 和 3B)。为证实 miR-130a-3p 能够靶向结合 SOX4, miR-130a-3p 和 SOX4 的靶点结合情况详见图 3C, 进一步采用双荧光素酶报告分析显示 SOX4-WT 组中转染 miR-130a-3p mimics 后双荧光素活性明显下降 ($P<0.05$, 图 3D), 在 SOX4-MUT 组中转染 miR-130a-3p mimics 后双荧光素活性未见明显改变 ($P>0.05$, 图 3D)。在进一步研究中采用 LV-SOX4 和 si-SOX4 转染 OA 软骨细胞, 结果显示在 OA 软骨细胞转染 LV-SOX4 后 SOX4 的表达水平明显升高 ($P<0.05$, 图 3E), 转染 si-SOX4 后 SOX4 的表达水平明显降低 ($P<0.05$, 图 3F)。

2.4 SOX4 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响

在 OA 软骨细胞转染 si-SOX4 后, OA 软骨细胞增殖能力较转染 si-NC 组明显增加, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$, 图 4A); 分化相关分子 BMP2 和 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平较转染 miR-NC 组明显增加 (P 均 <0.05 , 图 4B 和 4C); 同时炎症

因子 IFN- γ 和 TNF- α 的释放明显减少 (P 均 <0.05 , 4D)。

2.5 miR-130a-3p 通过调控 SOX4 影响 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放

进一步验证 miR-130a-3p 是通过靶向结合 SOX4 调控 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放, 在 OA 软骨细胞共转染 miR-130a-3p mimics 和 LV-SOX4 后, OA 软骨细胞增殖能力和单独转染 miR-NC 组未见明显差异 ($P>0.05$, 图 5A), 在 OA 软骨细胞共转染 miR-130a-3p inhibitors 和 LV-SOX4 后, OA 软骨细胞增殖能力较单独转染 miR-130a-3p inhibitors 或 miR-NC 组均明显降低 (P 均 <0.05 , 图 5B)。同时, 在 OA 软骨细胞共转染 miR-130a-3p mimics 和 LV-SOX4 后, OA 软骨细胞 BMP2、BMP4、IFN- γ 和 TNF- α 表达水平与单独转染 miR-NC 组未见明显差异 ($P>0.05$, 图 5C、5D 和 5G), 在共转染 miR-130a-3p inhibitors 和 LV-SOX4 后, OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 表达水平较单独转染 miR-130a-3p inhibitors 或 miR-NC 组均明显降低; IFN- γ 和 TNF- α 表达水平明显升高 (P 均 <0.05 , 5E、5F 和 5H)。

3 讨论

近年来, 越来越多的研究显示 miRNAs 在 OA 的发病中起

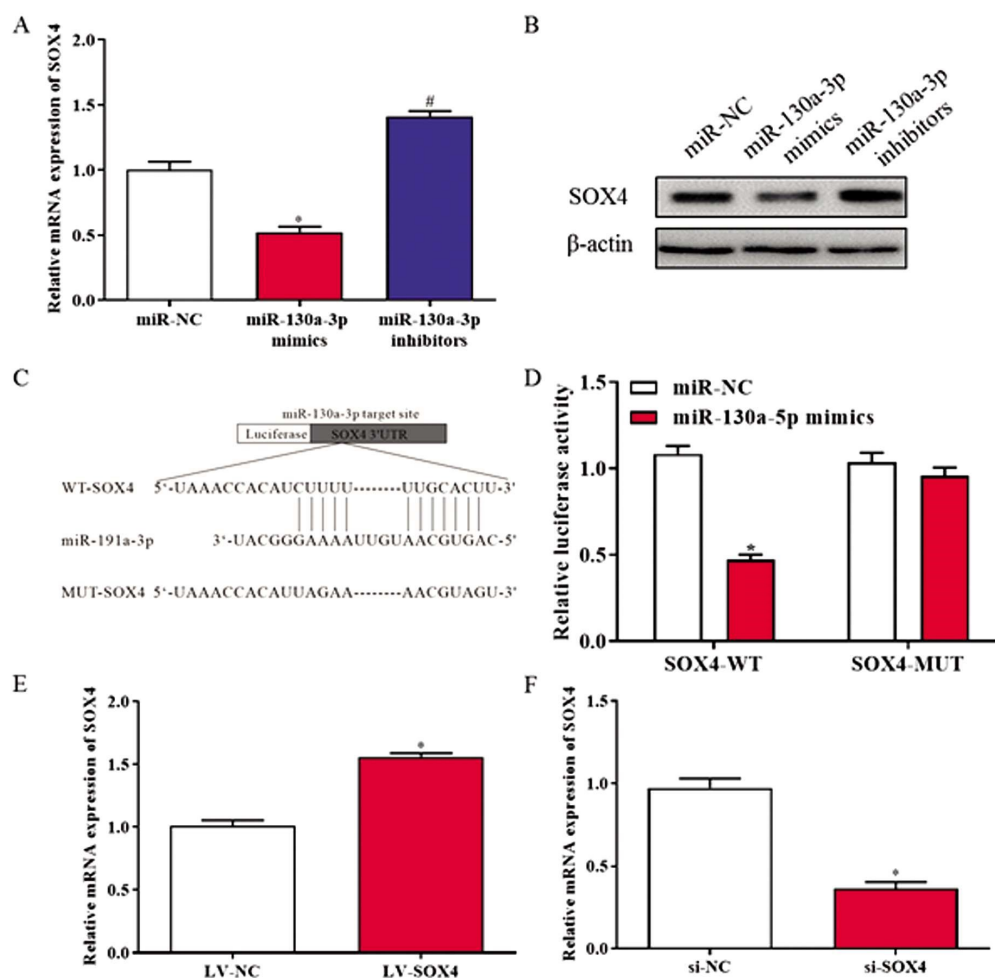


图3 miR-130a-3p 能够靶向结合 SOX4

Fig.3 miR-130a-3p can target SOX4

注:(A 和 B. 转染 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 后 OA 软骨细胞 SOX4 mRNA 和蛋白表达水平;C. miR-130a-3p 和 SOX4 的靶点结合情况;D. SOX4-WT 和 SOX4-MUT 组中双荧光素酶活性;E 和 F. OA 软骨细胞分别转染 LV-SOX4 和 si-SOX4 后 SOX4 的表达水平)。

与对照组相比,* $P<0.05$ 。

(A and B. The mRNA and protein expression of SOX4 in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics and miR-130a-3p inhibitors. C. Target binding of miR-130a-3p and SOX4. D. Double luciferase activity in SOX4-WT and SOX4-MUTgroup. E and F. The expression of SOX4 in OA chondrocytes after transfection with LV-SOX4 and si-SOX4.)

着重要作用^[11,12]。研究显示 OA 患者软骨细胞中的 miR-27 和 miR-125 表达水平明显低于正常软骨细胞,通过基因转染使 miR-27 和 miR-125 过表达,OA 患者软骨细胞的增殖和分化被促进^[13,14]。在本研究中,OA 软骨组织和软骨细胞中均存在 miR-130a-3p 明显低表达。进一步采用细胞实验验证 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞的影响,采用 miR-130a-3p mimics 和 miR-130a-3p inhibitors 转染至 OA 软骨细胞,转染 miR-130a-3p mimics 的 OA 软骨细胞 miR-130a-3p 表达水平明显升高,转染 miR-130a-3p inhibitors 的 OA 软骨细胞中 miR-130a-3p 表达水平明显升高。同时,过表达 miR-130a-3p 后 OA 软骨细胞的增殖能力和分化相关分子 BMP2 和 BMP4 的表达明显升高,炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 的表达下调,在低表达 miR-130a-3p 后 OA 软骨细胞的增殖和分化明显抑制,炎症因子释放增加。这说明 miR-130a-3p 在 OA 中低表达,并能抑制 OA 软骨细胞的增殖和分化,以及促进炎症因子的释放。Hu 等研究显示 miR-130a-3p 在 OA 也呈低表达,并影响 OA 软骨细

胞的增殖和凋亡^[15]。也有研究显示 miR-130a-3p 能够调控 OA 软骨细胞中炎症因子 H₂O₂、IL-1 β 和 TNF- α 的释放^[16]。这些结果均提示 miR-130a-3p 参与了 OA 的发生发展,但其具体作用机制尚未阐明。

SOX4 是一种 47 kD 的蛋白质,含有三种不同的蛋白质结构域,是一种转录因子,参与了细胞增殖、分化和炎症因子的释放^[17]。目前研究较为明确的是 SOX4 能够在胚胎发育中起着重要作用,并能够决定细胞的分化^[18]。最新研究显示 SOX4 能够通过调控 ADAMTS4 和 ADAMTS5 参与 OA 软骨的病变^[19]。本研究结果显示 OA 软骨细胞中 SOX4 的表达明显升高,同时 miR-130a-3p 和 SOX4 在 OA 软骨组织中的表达水平呈明显负相关。这提示 miR-130a-3p 可能调控 SOX4 影响 OA 软骨细胞的增殖、分化和炎症因子的释放。进一步研究显示 OA 软骨细胞转染 miR-130a-3p mimics 后,SOX4 的表达水平明显降低,转染 miR-130a-3p inhibitors 后,SOX4 的表达水平明显升高。为证实 miR-130a-3p 和 SOX4 存在结合,双荧光素酶报告分析显示

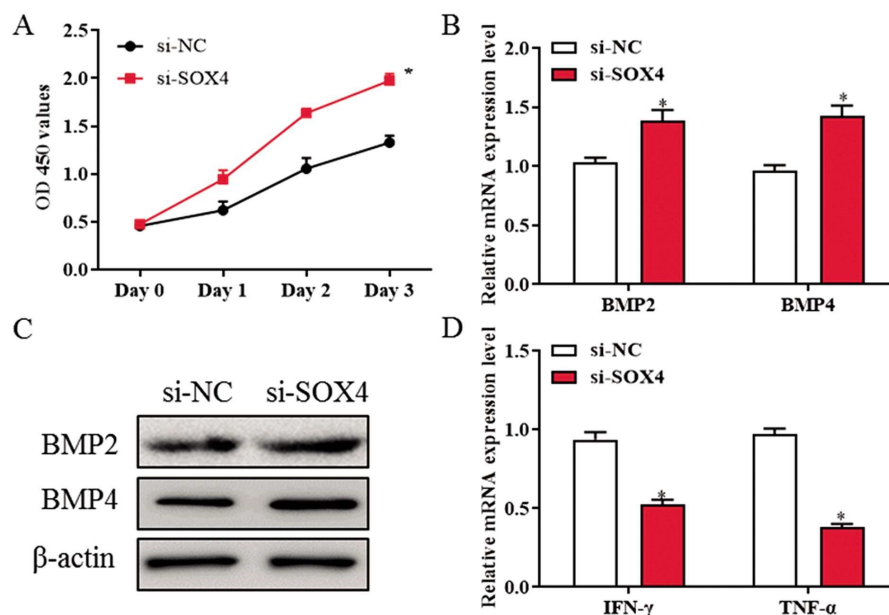


图 4 SOX4 对 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放的影响

Fig.4 Effects of SOX4 on proliferation, differentiation and release of inflammatory factors of OA chondrocytes

注:(A. 转染 si-SOX4 后 OA 软骨细胞增殖情况;B 和 C. 转染 si-SOX4 后 OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平;D. 转染 si-SOX4 后 OA 软骨细胞 IFN-γ 和 TNF-α mRNA 表达水平),与对照组相比,* $P<0.05$ 。

(A. The proliferation of OA chondrocytes after transfection with si-SOX4. B and C. The mRNA and protein expression of BMP2 and BMP4 in OA chondrocytes after transfection with si-SOX4. D. The mRNA expression of IFN-γ and TNF-α in OA chondrocytes after transfection with si-SOX4.)

miR-130a-3p 能够靶向结合 SOX4。这些结果均证实 miR-130a-3p 和 SOX4 相互间的调控作用。

有研究显示低表达 SOX4 能够抑制骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和迁移,以及诱导细胞凋亡^[20]。同时 miR-138 能够靶向抑制 SOX4 参与胃癌的生长^[21]。Hu 等研究显示 LncRNA CCAT1/miR-130a-3p 轴能够通过调控 SOX4 增加非小细胞肺癌顺铂耐药性^[22]。在本研究中探讨了 SOX4 对 OA 软骨细胞的影响,结果显示低表达 SOX4 能够明显促进 OA 软骨细胞增殖和分化相关 BMP2 和 BMP4 的表达,同时抑制炎症因子 IFN-γ 和 TNF-α 的释放。这提示 SOX4 也能参与 OA 的进展。

为了进一步反向验证 miR-130a-3p 通过 SOX4 调控 OA 的发生发展。在本研究中,OA 软骨细胞共转染 miR-130a-3p mimics 和 LV-SOX4 后,OA 软骨细胞增殖、分化能力和炎症因子释放情况与单独转染 miR-NC 组未见明显差异,同时共转染 miR-130a-3p inhibitors 和 LV-SOX4 后,OA 软骨细胞增殖和分化能力较单独转染 miR-130a-3p inhibitors 或 miR-NC 组均明显降低,炎症因子释放明显增加。这提示 miR-130a-3p 通过靶向结合 SOX4,从而抑制 SOX4 的表达,进而参与 OA 软骨细胞的增殖、分化和炎症因子释放。

综上所述,miR-130a-3p 在 OA 中明显低表达,并能够通过靶向抑制 SOX4 调控 OA 软骨细胞增殖、分化和炎症因子释放,miR-130a-3p 可能成为 OA 治疗的一个潜在靶点。

参考文献(References)

- [1] Dong Z, Jiang H, Jian X, et al. Change of miRNA expression profiles in patients with knee osteoarthritis before and after celecoxib treatment[J]. J Clin Lab Anal, 2019, 33(1): e22648
- [2] Boehme K A, Rolauffs B. Onset and Progression of Human Osteoarthritis-Can Growth Factors, Inflammatory Cytokines, or Differential miRNA Expression Concomitantly Induce Proliferation, ECM Degradation, and Inflammation in Articular Cartilage?[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8) [Epub ahead of print]
- [3] Soyocak A, Kurt H, Ozgen M, et al. miRNA-146a, miRNA-155 and JNK expression levels in peripheral blood mononuclear cells according to grade of knee osteoarthritis[J]. Gene, 2017, 627: 207-211
- [4] Wang C, Al-Ani M K, Sha Y, et al. Psoralen Protects Chondrocytes, Exhibits Anti-Inflammatory Effects on Synoviocytes, and Attenuates Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(1): 229-238
- [5] Kolhe R, Hunter M, Liu S, et al. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2029
- [6] Kopanska M, Szala D, Czech J, et al. MiRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis [J]. J Orthop Surg Res, 2017, 12(1): 51
- [7] Li Z, Zhang W, Huang Y. MiRNA-133a is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promoting osteoclast differentiation[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(3): 273-280
- [8] Martin-Guerrero I, Bilbao-Aldaiturriaga N, Gutierrez-Camino A, et al. Variants in the 14q32 miRNA cluster are associated with osteosarcoma risk in the Spanish population [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15414
- [9] Si H B, Zeng Y, Liu S Y, et al. Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(10): 1698-1707

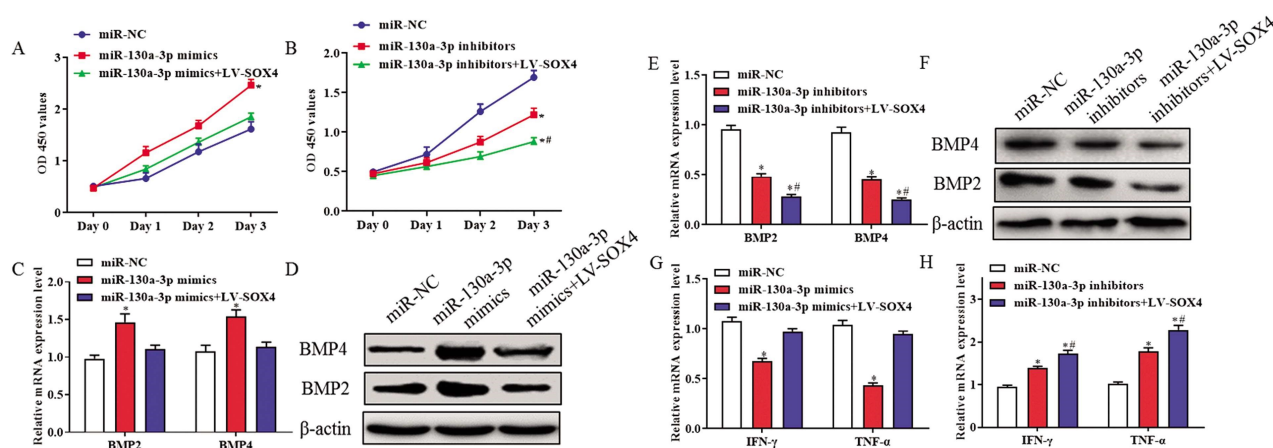


图 5 HOTAIR 调控 miR-130a-3p 对 OA 软骨细胞增殖和分化的影响

Fig.5 Effects of HOTAIR on the proliferation and differentiation of OA chondrocytes by regulating the expression of microRNA-130a-3p

注:(A. 转染 miR-130a-3p mimics 和共转染 miR-130a-3p mimics 和 LV-SOX4 后 OA 软骨细胞增殖情况 B. 转染 miR-130a-3pinhibitors 和共转染 miR-130a-3p inhibitors 和 LV-SOX4 后 OA 软骨细胞增殖情况 C 和 D. miR-130a-3p mimics 和共转染 miR-130a-3p mimics 和 LV-SOX4 后 OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平 E 和 F. 转染 miR-130a-3pinhibitors 和共转染 miR-130a-3p inhibitors 和 LV-SOX4 后 OA 软骨细胞 BMP2 和 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平 G. 转染 miR-130a-3p mimics 和共转染 miR-130a-3p mimics 和 LV-SOX4 后 OA 软骨细胞 IFN- γ 和 TNF- α 表达水平 H. 转染 miR-130a-3pinhibitors 和共转染 miR-130a-3p inhibitors 和 LV-SOX4 后 OA 软骨细胞 IFN- γ 和 TNF- α 表达水平), 与对照组相比,* $P < 0.05$,与 miR-130a-3p inhibitors 组相比,# $P < 0.05$ 。

Note: (A. The proliferation of OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics or co- transfection with miR-130a-3p mimics and LV-SOX4. B. The proliferation of OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p inhibitors or co- transfection with miR-130a-3p inhibitors and LV-SOX4. C and D. The mRNA and protein expression of BMP2 and BMP4 in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics or co- transfection with miR-130a-3p mimics and LV-SOX4. E and F. The mRNA and protein expression of BMP2 and BMP4 in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p inhibitors or co- transfection with miR-130a-3p inhibitors and LV-SOX4. G. The mRNA expression of IFN- γ and TNF- α in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p mimics or co- transfection with miR-130a-3p mimics and LV-SOX4. H. The mRNA expression of IFN- γ and TNF- α in OA chondrocytes after transfection with miR-130a-3p inhibitors or co- transfection with miR-130a-3p inhibitors and LV-SOX4.)

- [10] Si H, Zeng Y, Zhou Z, et al. Expression of miRNA-140 in Chondrocytes and Synovial Fluid of Knee Joints in Patients with Osteoarthritis[J]. Chin Med Sci J, 2016, 31(4): 207-212
- [11] Zhao X, Li H, Wang L. MicroRNA-107 regulates autophagy and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes by targeting TRAF3 [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 71: 181-187
- [12] Lin Z, Tian X Y, Huang X X, et al. microRNA-186 inhibition of PI3K-AKT pathway via SPP1 inhibits chondrocyte apoptosis in mice with osteoarthritis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 6042-6053
- [13] Ge F X, Li H, Yin X. Upregulation of microRNA-125b-5p is involved in the pathogenesis of osteoarthritis by downregulating SYVN1[J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 2490-2496
- [14] Zhang M, Lygrisse K, Wang J. Role of MicroRNA in Osteoarthritis [J]. J Arthritis, 2017, 6(2) [Epub ahead of print]
- [15] Hu Y, Li S, Zou Y. Knockdown of LncRNA H19 Relieves LPS-Induced Damage by Modulating miR-130a in Osteoarthritis[J]. Yonsei Med J, 2019, 60(4): 381-388
- [16] Lu Z, Luo M, Huang Y. LncRNA-CIR regulates cell apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis [J]. J Cell Biochem, 2018 [Epub ahead of print]
- [17] Bellmunt J. Stem-Like Signature Predicting Disease Progression in Early Stage Bladder Cancer. The Role of E2F3 and SOX4 [J]. Biomedicine, 2018, 6(3)[Epub ahead of print]
- [18] Sun R, Jiang B, Qi H, et al. SOX4 contributes to the progression of cervical cancer and the resistance to the chemotherapeutic drug through ABCG2[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1990
- [19] Takahata Y, Nakamura E, Hata K, et al. Sox4 is involved in osteoarthritic cartilage deterioration through induction of ADAMTS4 and ADAMTS5[J]. FASEB J, 2019, 33(1): 619-630
- [20] Chen D, Hu C, Wen G, et al. DownRegulated SOX4 Expression Suppresses Cell Proliferation, Migration, and Induces Apoptosis in Osteosarcoma In Vitro and In Vivo [J]. Calcif Tissue Int, 2018, 102(1): 117-127
- [21] Pang L, Li B, Zheng B, et al. miR-138 inhibits gastric cancer growth by suppressing SOX4[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 1295-1302
- [22] Hu B, Zhang H, Wang Z, et al. LncRNA CCAT1/miR-130a-3p axis increases cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell line by targeting SOX4[J]. Cancer Biol Ther, 2017, 18(12): 974-983