

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170816

· 论著 ·

# 上调 microRNA-543 表达对大鼠骨关节炎软骨细胞的保护作用

李 坤, 张育民\*, 王亚康, 郭建斌

西安交通大学附属红会医院关节外科髋关节病区, 西安 710054

**[摘要]** 目的: 探讨微小 RNA-543(microRNA-543, miRNA-543/miR-543)对大鼠骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨细胞的可能作用及潜在机制。方法: 采用膝关节内侧副韧带切断法建立大鼠OA模型, real-time PCR 法检测 OA 模型大鼠软骨组织与正常大鼠软骨组织 miR-543 的表达差异。体外分离正常膝关节软骨细胞, IL-1 $\beta$ (10 ng/L)共培养 24 h 模拟体外 OA 状态, 以 miR-543 mimics 转染软骨细胞, 采用 MTT、real-time PCR 及 Western 印迹法观察 miR-543 过表达对 IL-1 $\beta$  诱导下软骨细胞增殖及凋亡相关鼠双微体基因 4(murine double minute 4, MDM4)、蛋白激酶 B1(protein kinase B1, PKB1/Akt1)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)和炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达的影响。结果: OA 模型大鼠软骨组织较正常大鼠软骨组织 miR-543 表达明显下调( $P<0.05$ )。与正常软骨细胞相比, IL-1 $\beta$  诱导后软骨细胞存活率降低( $P<0.05$ ), MDM4 表达上调, Akt1/Bcl-2 表达下调( $P<0.05$ ), 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 释放增加( $P<0.05$ ); 转染 miR-543 mimics 后, IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞存活率明显升高( $P<0.05$ ), MDM4 表达下调, Akt1/Bcl-2 表达上调( $P<0.05$ ), 炎症相关因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达降低( $P<0.05$ )。结论: OA 大鼠软骨组织 miR-543 表达较正常软骨组织明显降低; 上调 miR-543 表达体外可促进软骨细胞增殖, 抗 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞损伤, 可能与其下调 MDM4 表达、上调 Akt1/Bcl-2 表达, 减少炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6)有关。

**[关键词]** 骨关节炎; miRNA-543; 细胞增殖; 细胞凋亡; 炎症因子**[中图分类号]** R-332      **[文献标志码]** A

## Up-regulated expression of miRNA-543 in protecting chondrocytes in rat model of osteoarthritis

LI Kun, ZHANG Yu-min\*, WANG Ya-kang, GUO Jian-bin

Department of Articular Surgery, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of microRNA-543 (miR-543) on chondrocytes in rat model of osteoarthritis and its biological mechanisms. **Methods:** The rat model of osteoarthritis was established and real-time PCR was used to detect the expression of miR-543. The expression of miR-543 was compared between osteoarthritis and normal rats. The chondrocytes of chronic osteoarthritis rats were isolated *in vitro* and then were transfected with miR-543 mimics. MTT assay was used to observe the effect of miR-543 overexpression on cell proliferation, and the expressions of apoptosis-related murine double minute 4 (MDM4), protein kinase B1 (PKB1/Akt1), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) were detected by real-time PCR or Western blotting. **Results:** The expression of miR-543 in cartilage tissues was significantly lower in osteoarthritis rats than that in normal rats ( $P<0.05$ ). IL-1 $\beta$  could significantly decrease the survival rate of chondrocytes, up-regulate the expression of MDM4, down-regulate the expressions of Akt1, Bcl-2, and increase the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 (all  $P<0.05$ ). While after miR-543 mimics was transfected, the survival rate of chondrocytes was significantly increased, the expression of MDM4 was significantly down-regulated, the expressions of Akt1, Bcl-2 were significantly up-regulated, and the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 were significantly suppressed (all  $P<0.05$ ). **Conclusions:** The expression of miR-543 in cartilage tissue is significantly lower in osteoarthritis rats than that in normal rats. Up-regulated expression of miR-543 can antagonize IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte injury by promoting chondrocytes proliferation, down-regulating MDM4 expression, up-regulating Akt1, Bcl-2 expression, and reducing the productions of inflammatory factors such as TNF- $\alpha$  and IL-6.

**[Key Words]** osteoarthritis; miRNA-543; cell proliferation; apoptosis; inflammatory factor

[收稿日期] 2017-09-21

[接受日期] 2017-12-18

[作者简介] 李 坤, 主治医师. E-mail: 36789298@qq.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 029-87836602, E-mail: xuerl61@126.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一组由关节边缘处的骨骼变化、关节软骨完整性异常及关节软骨和软骨下骨退化引起的异质性症候群,与多种炎性介质、细胞因子等致病因素密切相关,是老年人群普遍存在的慢性疾病,严重影响患者生活质量,对社会经济也造成了巨大的负担<sup>[1-2]</sup>。OA 的发病机制复杂,软骨细胞在细胞外基质(ECM)中的异常增殖、迁移导致的关节软骨愈合、修复能力异常可能是其主要的致病原因<sup>[3]</sup>,这也是目前最主要的治疗靶标。

微小 RNA(microRNA/miRNA/miR)是长度在21~25个核苷酸的内源性非编码小RNA,通过对靶基因mRNA进行切割或翻译抑制,导致蛋白质表达下调,进而调控细胞增殖、凋亡等多个生物学过程<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5-9]</sup>表明,一系列的miRNAs(miR-602、miR-608、miR-30、miR-146a、miR-183)可能参与了OA的发生发展,且与基质金属蛋白酶(MMP)或血管细胞黏附分子-1的表达相关。

miR-543对MMP7有调控作用,可能参与调节软骨细胞ECM的平衡<sup>[10]</sup>,与骨肉瘤肿瘤细胞的糖酵解和增殖亢进有关<sup>[11]</sup>,但目前关于其在OA中的作用及机制尚不明确。因此,本研究基于大鼠OA模型及体外细胞实验探讨miR-543对大鼠OA模型软骨细胞的可能作用及机制,为OA的临床防治提供参考靶标。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 DMEM-F12培养液购自美国Gibco公司;胰蛋白酶、青-链霉素、胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;miR-543 mimics及相应阴性对照、转染试剂购自上海吉玛基因化学科技有限公司;MTT、二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司,TRIzol试剂、RT-PCR试剂盒和反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;BCA蛋白定量试剂盒、鼠双微体基因4(murine double minute 4, MDM4)、蛋白激酶B1(protein kinase B1, PKB1/Akt1)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗均购自美国Abcam公司。

1.2 动物分组及OA模型的建立 30只健康SD大鼠购自济南金丰实验动物有限公司,许可证号:

SCXK(鲁)20140006。大鼠常规饲料喂养,随机均分为OA模型组及正常对照组( $n=15$ ),正常对照组大鼠不做特殊处理,OA模型组大鼠采用0.5%水合氯醛(0.35 g/100 g)腹腔注射麻醉后切断膝关节内侧副韧带,建立OA模型,术后每天对两组大鼠肌内注射青霉素 $2 \times 10^4$  U/kg,共3 d。1周后,每天驱赶OA模型组及正常对照组大鼠跑步30 min。

1.3 软骨细胞的原代培养及miR-543 mimics的转染 无菌条件下取正常大鼠双侧膝关节软骨,切下组织一部分用于RNA抽提,另一部分置于含双抗的磷酸盐缓冲液清洗,300×g离心10 min,弃上清,20%胎牛血清DMEM-F12培养基37℃、适当湿度、5%CO<sub>2</sub>培养。转染前1 d,将待转染细胞以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于12孔板,待细胞融合达60%~80%时,按Lipofectamine 2000转染试剂盒说明书方法进行转染miR-543 mimics及相应阴性对照(miR-543-NC),验证转染效率后行后续实验。

1.4 MTT法检测软骨细胞增殖能力 取对数生长期待测软骨细胞,96孔板中每孔接种5 000个细胞,每组设6个复孔,同时设立无细胞的空白对照。细胞转染miR-543 mimics后,10 ng/L IL-1β处理24 h,每孔加入5 μg/mL MTT溶液20 μL,孵育4 h后弃上清,加入DMSO 200 μL/孔,振荡10 min,酶标仪读取光密度( $D_{490}$ )值,重复3次。

1.5 Real-time PCR检测软骨细胞凋亡相关基因及炎症因子基因的表达 原代软骨细胞培养于6孔板,不转染/转染miR-543 mimics或miR-543-NC 48 h后,加入10 ng/L IL-1β连续培养24 h,TRIzol法提取细胞总RNA,反转录合成cDNA后行real-time PCR检测待测基因表达水平,严格按说明书进行操作,待测基因及内参序列如表1。反应条件:95℃,3 min;40个PCR循环(95℃,15 s;55℃,20 s;72℃,20 s;83.5℃,15 s);95℃,15 s;60℃,1 min;95℃,15 s。以ABI 7500实时定量PCR系统进行实验,收集荧光信号,绘制熔解曲线,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析相关基因的表达水平。

1.6 Western印迹法检测软骨细胞凋亡相关蛋白的表达 原代软骨细胞培养于6孔板,不转染/转染miR-543 mimics或miR-543-NC 48 h后提取待测细胞总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将各组蛋白与上样缓冲液/loading buffer充分混合后100℃变性5 min,每孔50 μL加入到十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶上样孔, 进行电泳和转膜, 5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1 h。加入按使用说明稀释后的待测一抗 4℃ 过夜。TBST 缓冲溶液清洗后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:1 000 稀释)。37℃ 孵育 1 h, TBST 缓冲液清洗后以 ECL 发光液显影, 自动凝胶成像系统采集图像, 以 GAPDH 作为内参分析 MDM4、Akt1、Bcl-2 等蛋白的表达水平。

表 1 Real-time PCR 引物序列

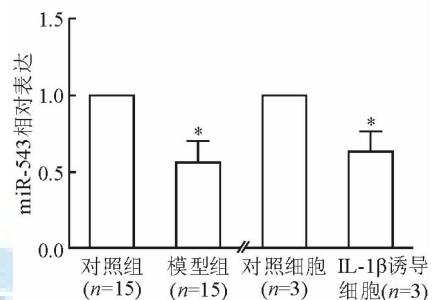
基 因	引物序列(5'-3')
miR-543	
上游引物	CCA GCT ACA CTG GGC AGC AGC AAT TCA TGT TT
下游引物	CTC AAC TGG TGT CGT GGA
U6	
上游引物	GCG CGT CGT GAA GCG TTC
下游引物	GTG CAG GGT CCG AGG T
MDM4	
上游引物	TGG GAG AAC TAC TGG GAC GT
下游引物	TCC TGT GCG AGA CGA GAG T
Akt1	
上游引物	GAG GCC GTC AGC CAC AGT CTG GAT G
下游引物	GAG GCC GTC AGC CAC AGT CTG GAT
Bcl-2	
上游引物	CTG GTG GAC AAA TCG CTC TG
下游引物	GGT CTG CTG ACC TCA CTT GTG
TNF- $\alpha$	
上游引物	CGC TAC GAC CGC CAG ATT G
下游引物	ACA CCG TTC ACC AGC AAG TC
IL-6	
上游引物	CCT TCG GTC CAG TTG CCT TCT
下游引物	CCA GTG CCT CTT TGC TGC TTT C
GAPDH	
上游引物	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
下游引物	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

MDM4: 鼠双微体基因 4(murine double minute 4); Akt1: 蛋白激酶 B1(protein kinase B1, PKB1); Bcl-2: B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2); TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ); IL-6: 白细胞介素-6(interleukin-6)

1.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析, 方差齐性用 LSD 法, 方差不齐采用 Dunnett's T3 法, 检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结 果

2.1 MiR-543 在 OA 模型大鼠软骨组织及 IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞中的表达变化 结果(图 1)表明: 大鼠 OA 模型组软骨组织 miR-543 表达较正常对照组明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与未接受 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞相比, IL-1 $\beta$  诱导后的软骨细胞 miR-543 表达水平降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图 1 OA 模型大鼠软骨组织及 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞中 miR-543 的表达

\*  $P < 0.05$  与对照组(细胞)相比

2.2 软骨细胞 miR-543 转染效率验证 结果(图 2)表明: miR-543-NC 转染组软骨细胞 miR-543 表达与对照组差异无统计学意义; miR-543-mimics 转染组软骨细胞 miR-543 表达较对照组明显升高( $P < 0.05$ )。

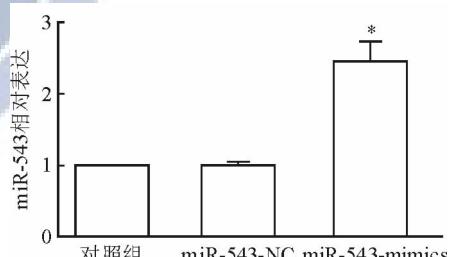


图 2 转染后不同组别软骨细胞 miR-543 的表达

\*  $P < 0.05$  与对照组相比; n = 6,  $\bar{x} \pm s$

2.3 上调 miR-543 表达对软骨细胞增殖能力的影响 结果(图 3)表明: 与正常对照软骨细胞相比, 转染 miR-543 mimics 后软骨细胞增殖率明显提升, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与正常对照软骨细胞相比, IL-1 $\beta$  诱导可导致软骨细胞增殖能力下降( $P < 0.05$ ), 转染 miR-543 mimics 上调 miR-543 表达后可逆转 IL-1 $\beta$  对细胞增殖的抑制作用( $P < 0.05$ )。

2.4 上调 miR-543 表达对骨关节炎软骨细胞凋亡相关基因表达的影响 结果(图 4)表明: 与正常对照软骨细胞相比, miR-543 mimics 转染细胞 MDM4

mRNA 表达下调, Akt1、Bcl-2 mRNA 表达上调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与正常对照软骨细胞相比, IL-1 $\beta$  诱导后细胞 MDM4 mRNA 表达上调, Akt1、Bcl-2 mRNA 表达下调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );转染 miR-543 mimics 可减轻 IL-1 $\beta$  诱导的 MDM4、Akt1、Bcl-2 mRNA 表达变化( $P < 0.05$ )。

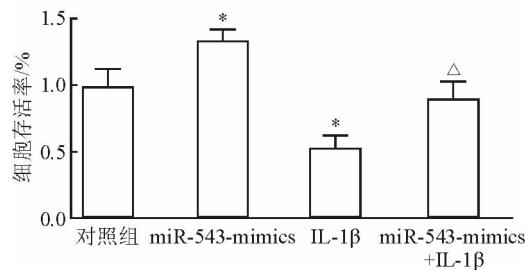


图 3 上调 miR-543 表达对软骨细胞增殖能力的影响

\*  $P < 0.05$  与对照组相比,  $\triangle P < 0.05$  与 IL-1 $\beta$  组相比;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

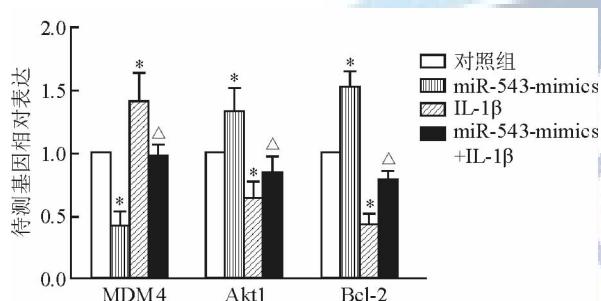


图 4 上调 miR-543 表达对软骨细胞 MDM4、Akt1、Bcl-2 mRNA 表达的影响

\*  $P < 0.05$  与对照组相比,  $\triangle P < 0.05$  与 IL-1 $\beta$  组相比;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.5 上调 miR-543 表达对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞炎症相关基因表达的影响 结果(图 5)表明:与正常对照组相比, IL-1 $\beta$  诱导后软骨细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达上调( $P < 0.05$ );转染 miR-543 mimics 上调 miR-543 表达可减轻 IL-1 $\beta$  诱导的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达变化( $P < 0.05$ )。

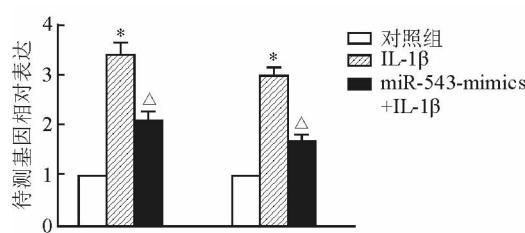


图 5 上调 miR-543 表达对软骨细胞炎症相关基因表达的影响

\*  $P < 0.05$  与对照组相比,  $\triangle P < 0.05$  与 IL-1 $\beta$  组相比;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.6 上调 miR-543 表达对骨关节炎软骨细胞凋亡相关蛋白表达的影响 结果(图 6)表明:与正常对照组相比, 转染 miR-543 mimics 软骨细胞 MDM4 表达下降, Akt1、Bcl-2 表达上升( $P < 0.05$ );与正常对照组相比, IL-1 $\beta$  诱导后软骨细胞 MDM4 表达上升, Akt1、Bcl-2 表达下降( $P < 0.05$ );转染 miR-543 mimics 上调 miR-543 表达可减少 IL-1 $\beta$  诱导的 MDM4、Akt1、Bcl-2 蛋白表达的变化。

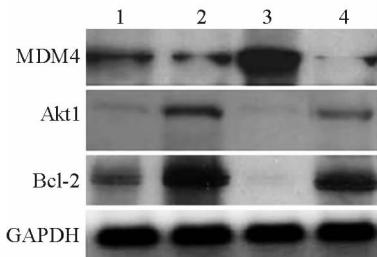


图 6 上调 miR-543 表达对骨关节炎软骨细胞凋亡相关蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: miR-543-mimics; 3: IL-1 $\beta$ ; 4: miR-543-mimics + IL-1 $\beta$

### 3 讨论

本研究结果表明 miR-543 在骨软骨炎大鼠软骨组织中表达明显下降,提示 miR-543 正常表达可能对维持软骨细胞的正常生理功能有重要意义。MiR-543 功能获得性实验发现,miR-543 可促进软骨细胞增殖( $P < 0.05$ ),减轻 IL-1 $\beta$  诱导的增殖抑制作用( $P < 0.05$ ),提示 miR-543 表达抑制可能是 OA 的分子生物学病因之一,miR-543 表达水平的监测对于 OA 的发生及病情评估有潜在的临床价值。外源性 miR-543 补充对于缓解骨关节炎发展具有积极意义。

软骨细胞异常凋亡是骨关节炎进展的重要原因之一,MDM4 可定位于凋亡的关键细胞器线粒体,激活 TP53 线粒体凋亡途径,还可结合并抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 功能,促进细胞色素 C 的释放,产生促凋亡作用<sup>[12]</sup>。Akt1 则可调控 mTOR 信号通路,减少细胞凋亡<sup>[13]</sup>。MiR-543 过表达的软骨细胞与对照细胞相比,MDM4 表达降低,Bcl-2、Akt1 表达升高。在 IL-1 $\beta$  诱导下,miR-543 表达可减少促凋亡蛋白 MDM4 的释放,提高凋亡抵抗蛋白 Bcl-2、Akt1 的水平。在后续研究中,还需借助生物信息学分析及荧光素酶报告实验研究证实 miR-543 对 MDM4、Akt1、Bcl-2 是否存在直接的调控作用。

OA 发病过程中,炎症因子的过表达与 OA 的

严重程度密切相关,大量炎症因子释放不仅会造成软骨细胞损伤,还可影响软骨细胞分化、诱导ECM降解<sup>[14-15]</sup>。IL-1 $\beta$ 诱导软骨细胞时,发现炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6表达明显上升( $P<0.05$ ),提示IL-1 $\beta$ 可造成软骨细胞炎症损伤,而miR-543过表达时,TNF- $\alpha$ 、IL-6表达被抑制( $P<0.05$ ),提示miR-543可能还有减轻炎症损伤的作用。

综上所述,OA大鼠软骨组织与正常软骨组织相比miR-543表达明显下调。过表达miR-543可促进软骨细胞增殖,下调MDM4蛋白表达,上调Akt1、Bcl-2蛋白表达,导致炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6表达降低,可拮抗IL-1 $\beta$ 诱导的增殖抑制、促凋亡蛋白上调、抗凋亡蛋白下调、促炎症因子产生作用,具有潜在的临床应用价值。

## 参考文献

- [1] DAMMAN W, LIU R, KROON F P, et al. Do comorbidities play a role in hand osteoarthritis disease burden? Data from the hand osteoarthritis in secondary care cohort [J]. J Rheumatol, 2017, 44(11):1659-1666.
- [2] 陈亮,杨晓凌.骨关节炎患者血清中炎性因子IL-1 $\beta$ 、IL-6和COX-2的表达[J].中国临床医学,2016,23(1):61-62.
- [3] BADAWY M, FENSTAD A M, BARTZ-JOHANNESSEN C A, et al. Hospital volume and the risk of revision in Oxford unicompartmental knee arthroplasty in the Nordic countries - an observational study of 14,496 cases[J]. BMC Musculoskeletal Disord, 2017, 18(1):388.
- [4] SHAH R, YERI A S, DAS A, et al. Small RNA-seq during acute maximal exercise reveal RNAs involved in vascular inflammation and cardiometabolic health: brief report [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313 (6): H1162-H1167.
- [5] BEYER C, ZAMPETAKI A, LIN N Y, et al. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(3):e18.
- [6] AKHTAR N, MAKKI M S, HAQQI T M. MicroRNA-602 and microRNA-608 regulate sonic hedgehog expression via target sites in the coding region in human chondrocytes[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(2):423-434.
- [7] LI L, YANG C, LIU X, et al. Elevated expression of microRNA-30b in osteoarthritis and its role in ERG regulation of chondrocyte[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 76:94-99.
- [8] YAMASAKI K, NAKASA T, MIYAKI S, et al. Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(4):1035-1041.
- [9] LI X, KROIN J S, KC R, et al. Altered spinal microRNA-146a and the microRNA-183 cluster contribute to osteoarthritic pain in knee joints[J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(12):2512-2522.
- [10] SONG N, LIU H, MA X, et al. Placental growth factor promotes metastases of ovarian cancer through MiR-543-regulated MMP7[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(3): 1104-1112.
- [11] ZHANG M, LYGRISSE K, WANG J. Role of microRNA in osteoarthritis[J]. J Arthritis, 2017, 6(2). pii:239.
- [12] MANCINI F, PIERONI L, MONTELEONE V, et al. MDM4/HIPK2/p53 cytoplasmic assembly uncovers coordinated repression of molecules with anti-apoptotic activity during early DNA damage response[J]. Oncogene, 2016, 35(2):228-240.
- [13] TANG H, CHEN J, FRAIDENBURG D R, et al. Deficiency of Akt1, but not Akt2, attenuates the development of pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(2): L208-L220.
- [14] DA SILVA M R, LINHARES D, VASCONCELOS D M, et al. Neuroimmune expression in hip osteoarthritis: a systematic review[J]. BMC Musculoskeletal Disord, 2017, 18 (1):394.
- [15] MA C H, WU C H, JOU I M, et al. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes[J]. Redox Biol, 2018, 14:72-81.

〔本文编辑〕廖晓瑜,贾泽军