

微小 RNA-34a 对强直性脊柱炎滑膜成纤维细胞成骨分化的影响

宫树一¹ 王景续¹ 穆胜凯¹

[摘要] **目的:**探讨 miRNA-34a 对强直性脊柱炎(AS)滑膜成纤维细胞成骨分化的影响及其机制。**方法:**将滑膜成纤维细胞分为正常组(来自创伤性骨折患者的细胞)、AS 对照组(来自 AS 患者的细胞)、AS+NC 组(转染阴性对照并给予转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和 骨形态发生蛋白 2(BMP-2)处理 AS 细胞)和 AS+miRNA-34a 寡核苷酸模拟物(miRNA-34a mimics)组(转染 miRNA-34a mimics 并给予 TGF- β 1 和 BMP-2 处理 AS 细胞),采用实时-PCR 检测各组细胞中 miRNA-34a 和成骨相关基因碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)、Runx 相关转录因子 2(Runx2) mRNA 以及 Notch 信号通路的 Notch1 受体与其下游靶基因 Hes1 mRNA 的表达水平;将 Notch 信号通路激活剂 rhNF- κ B 加入含 miRNA-34a mimics 的细胞中,观察 ALP、OCN 和 Runx2 mRNA 的表达变化。**结果:**与正常组相比,AS 对照组和 AS+NC 组细胞中 miRNA-34a 表达降低,ALP、OCN、Runx2、Notch1 和 Hes1 mRNA 的表达水平均明显升高($P<0.05$);与 AS+NC 组相比,AS+miRNA-34a mimics 组细胞中 miRNA-34a 表达升高,而 ALP、OCN、Runx2、Notch1 和 Hes1 mRNA 的表达水平均明显降低($P<0.05$)。给予 rhNF- κ B 作用后,miRNA-34a mimics 对 ALP、OCN 和 Runx2 mRNA 的抑制作用减弱。**结论:**miRNA-34a 可通过调控 Notch 信号通路抑制 AS 滑膜成纤维细胞的成骨分化能力。

[关键词] 强直性脊柱炎;滑膜成纤维细胞;成骨分化;信号通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2021)09-0001-04

Efficacy of miRNA-34a on the Osteogenic Differentiation of Synovial Fibroblasts in Ankylosing Spondylitis and Its Mechanism

GONG Shuyi¹ WANG Jingxu¹ MU Shengkai¹

¹Department of Ridge Column Surgery, Shenyang Orthopaedics Hospital, Shenyang 110044, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of miRNA-34a on osteogenic differentiation of ankylosing spondylitis (AS) synovial fibroblasts and its mechanism. **Methods:** Synovial fibroblasts were divided into normal group (cells from patients with traumatic fractures), AS control group (cells from patients with AS), AS+NC group (transfection negative control and treatment of AS cells with TGF- β 1 and BMP-2) and AS + miRNA-34a mimics group (transfection of miRNA-34a mimics and treatment of AS cells with TGF- β 1 and BMP-2). The expression levels of miRNA-34a and osteogenesis-related genes ALP, OCN, Runx2 mRNA, as well as Notch signaling pathway Notch1 receptor and its downstream target gene Hes1 mRNA in the cells of each group were detected by RT-PCR. The Notch signaling pathway activator rhNF- κ B was added into the cells containing miRNA-34a mimics, and the expression changes of ALP, OCN and Runx2 mRNA were observed. **Results:** Compared with the normal group, the expression of miRNA-34a in AS control group and AS+NC group was decreased, and the expression levels of ALP, OCN, Runx2, Notch1 and Hes1 mRNA were significantly increased ($P<0.05$). Compared with AS+NC group, the expression of miRNA-34a in AS+miRNA-34a mimics group was increased, while the expression levels of ALP, OCN, Runx2, Notch1 and Hes1 mRNA were significantly decreased ($P<0.05$). The inhibitory efficacy of miRNA-34a mimics on ALP, OCN and Runx2 mRNA were reversed after giving rhNF- κ B. **Conclusion:** miRNA-34a can inhibit the osteogenic differentiation of AS synovial fibroblasts by regulating the Notch signaling pathway.

Keywords: ankylosing spondylitis; synovial fibroblasts; osteogenic differentiation; notch signaling pathway

基金项目:辽宁省自然科学基金指导计划项目
(20180550704)

¹ 沈阳市骨科医院脊柱外科(沈阳,110044)

强直性脊柱炎(AS)是一种病程长和致残率高的自身免疫炎症性疾病,其中骶髂关节和中轴关节病变是其典型的病理特征,过度的骨形成可引起关节强直和脊椎畸形,影响患者的生活质量^[1-3]。成纤维细胞是脊柱韧带和关节滑膜的主要成分,具有分化为成骨细胞的巨大潜能,是AS脊柱关节发生骨化的主要细胞^[4]。目前,关于AS发生与发展的机制尚不清楚。因此,深入探讨AS成纤维细胞成骨分化的分子机制,寻找抑制成纤维细胞成骨分化的有效分子靶点对治疗AS具有重要意义。随着研究的不断深入,许多微小RNAs(miRNAs)在成骨分化和骨形成中的作用已被发现^[5]。有报道^[6]证实,miRNA-34a在炎症条件下可抑制成骨样细胞成骨分化,但其具体作用机制尚未阐明。因此,本研究通过观察miRNA-34a在AS滑膜成纤维细胞中的表达情况,并探讨miRNA-34a对细胞成骨分化的影响及其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集2017年10月至2019年5月于本院行髋关节置换手术的5名AS患者的滑膜组织标本,年龄26~48岁,男4例,女1例;患者均符合纽约诊断标准(1984年修订)。另收集5例创伤性骨折患者的滑膜组织作为对照,其中年龄介于46~55岁,男3例,女2例。所有受试者均排除髋关节滑膜炎和风湿病等,组织标本的收集均获得患者及家属的知情同意以及本院伦理委员会批准,且均储存于-80℃下备用。

1.2 主要试剂

DMEM培养基购于美国Gibco公司,胎牛血清购于杭州四季青公司,脂质体2000、胰蛋白酶、Trizol试剂、cDNA逆转录试剂盒和实时-PCR试剂盒购于美国Invitrogen公司。青链霉素双抗购于美国Thermo公司,转化生长因子- β 1(Transforming Growth Factor- β 1,TGF- β 1)和骨形态发生蛋白2(Bone Morphogenetic Protein 2,BMP2)购于美国Sigma公司。Notch信号通路激活剂rhNF- κ B购于美国Progenex公司。BCIP/NBT溶液购于中国华兴博创生物公司。RNA提取试剂盒购于德国QIAGEN公司,miRNA-34a mimics(F:5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3'和R:5'-AACCAGCUAAGACACUGCCAUU-3')及其阴性对照序列(F:5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'和R:5'-UUGUACUACACAAAAGUACUG-3')购于广州锐博生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 滑膜成纤维细胞的体外培养 采用组织块贴壁法。以无菌的D-Hanks溶液洗涤组织标本后,采用含1%青链霉素双抗的DMEM培养基以自然沉降法对

剪碎的组织小块(体积1 mm³)浸洗3次。收集组织块接种于含有20%胎牛血清和1%青链霉素双抗的DMEM培养基的培养瓶中,于5% CO₂、37℃恒温细胞培养箱中培养4 h至组织块贴壁。继续培养72 h后,有细胞游出。当细胞铺满瓶底85%时,以0.25%胰蛋白酶消化、传代。收集生长良好的第四代对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 细胞分组与转染 实验分组:滑膜成纤维细胞分为正常组、AS对照组、AS+NC组和AS+miRNA-34a mimics组,实验处理:其中除正常组外,各组细胞均AS患者的成纤维细胞,而正常组为来自创伤性骨折患者的正常成纤维细胞。AS+NC组和AS+miRNA-34a mimics组的细胞培养基添加有5 ng/mL TGF- β 1和7 ng/mL BMP-2,并参照脂质体2000说明书步骤将终浓度为50 nmol/L miRNA-34a mimics及其阴性对照转染至细胞中,转染48 h后,继续培养24 h收集各组细胞进行后续实验。后期实验另设AS+miRNA-34a mimics + rhNF- κ B组:采用含5 ng/mL TGF- β 1和7 ng/mL BMP-2的培养基进行培养,以miRNA-34a mimics转染滑膜成纤维细胞48 h后,给予浓度为1 g/mL的rhNF- κ B作用24 h。

1.3.3 成骨相关基因碱性磷酸酶(ALP)染色 将滑膜成纤维细胞以适当密切接种至6孔细胞板上,常规培养过夜。弃培养液后,按照上节中的分组处理细胞。培养7 d后,先以磷酸缓冲液洗涤,再经4%多聚甲醛进行固定。固定时间为30 min。再次洗涤后,加入BCIP/NBT工作液,常温条件下避光反应30 min。洗涤后观察染色情况。

1.3.4 实时PCR检测 分别参照RNA提取试剂盒和cDNA逆转录试剂盒说明书步骤提取各组细胞的总RNA并逆转录成为cDNA。取2 μ L cDNA,与各1 μ L上下游引物、12.5 μ L的SYBR Premix Ex Taq II和8.5 μ L ddH₂O混合配成总体积为25 μ L的PCR扩增体系。上PCR仪,按照如下反应条件进行扩增:95℃ 5 min(95℃ 30 s;60℃ 30 s;72℃ 40 s)×40个循环、72℃终延伸6 min。以U6和GAPDH为管家基因,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各目的基因的相对表达量。其中由上海生工生物合成的PCR引物见表1。

1.3.5 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用SPSS 22.0进行统计学分析,多组间比较使用单因素方差分析,组间多重比较采用SNK-q。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-34a在AS来源的滑膜成纤维细胞中的表达

与正常组相比,AS对照组细胞中miRNA-34a的

表 1 PCR 扩增引物序列

引物名称	序列(5'-3')
miRNA-34a	上游:5'-CCCACATTTCTTCTTATCAACAG -3'
	下游:5'-GGCATCTCTCGCTTCATCTT -3'
ALP	上游:5'-ACCATTCCCACGTCTTCACATTTG -3'
	下游:5'-AGACATTCTCTCGTTCACCGCC -3'
Runx2	上游:5'-TCTGGCCTTCCACTCTCAGT-3'
	下游:5'-GACTGGCGGGGTGTAAGTAA -3'
OCN	上游:5'-ATGAGAGCCCTCACACTCCTCG-3'
	下游:5'-GTCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'
Notch1	上游:5'-GGAGGCATCCTACCCTTTTC -3'
	下游:5'-TGTGTTGCTGGAGCATCTTC-3'
Hes1	上游:5'-CTCTCTTCCCTCCGACTCT-3'
	下游:5'-AGGCGCAATCCAATATGAAC -3'
U6	上游:5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC -3'
	下游:5'-TGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3'
GAPDH	上游:5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT -3'
	下游:5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

表达水平明显降低($P<0.05$);以 TGF- β 1 和 BMP-2 作用后,AS+NC 组细胞中 miRNA-34a 的表达水平较 AS 对照组明显降低($P<0.05$);与 AS+NC 组相比,转染 miRNA-34a mimics 的 AS+miRNA-34a mimics 组细胞中 miRNA-34a 的表达水平明显升高($P<0.05$),见表 2。

表 3 各组细胞中 ALP、OCN 和 Runx2 mRNA 的相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

分组	ALP	OCN	Runx2
正常组	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.06
AS 组	2.15 \pm 0.24 ¹⁾	1.86 \pm 0.21 ¹⁾	1.58 \pm 0.11 ¹⁾
AS+NC 组	2.64 \pm 0.18 ¹⁾²⁾	2.32 \pm 0.16 ¹⁾²⁾	1.84 \pm 0.13 ¹⁾²⁾
AS+miRNA-34a mimics 组	1.78 \pm 0.12 ³⁾	1.25 \pm 0.09 ³⁾	1.10 \pm 0.08 ³⁾
<i>F</i>	53.668	51.670	48.656
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与 AS 对照组相比, $P<0.05$;3)与 AS+NC 组相比, $P<0.05$ 。

TGF- β 1 和 BMP-2 处理后的 AS+NC 组细胞中 Notch 信号通路的 Notch1 受体及其下游靶基因 Hes1 mRNA 的表达水平较正常组和 AS 组明显升高($P<0.05$);与 AS+NC 组相比,AS+miRNA-34a mimics 组细胞中 Notch1 和 Hes1 mRNA 的表达水平明显降低($P<0.05$),见表 4。

2.5 激活 Notch 信号通路对 miRNA-34a mimics 抑制滑膜成纤维细胞成骨分化的影响

与 AS+NC 组相比,给予 miRNA-34a mimics 后,韧带成纤维细胞中 ALP、OPN 和 Runx2 mRNA 明显降低;而给予 Notch 信号通路激动剂 rhNF- κ B 作用后,miRNA-34a mimics 对 ALP、OPN 和 Runx2 mRNA 表达的抑制作用减弱,见表 5。

3 讨论

AS 的发病率逐年上升且已严重影响患者生活质

表 2 各组细胞中 miRNA-34a 的相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

分组	miRNA-34a
正常组	1.00 \pm 0.06
AS 对照组	0.55 \pm 0.03 ¹⁾
AS+NC 组	0.46 \pm 0.02 ¹⁾²⁾
AS+miRNA-34a mimics 组	1.76 \pm 0.12 ³⁾
<i>F</i>	219.373
<i>P</i>	<0.001

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与 AS 对照组相比, $P<0.05$;3)与 AS+NC 组相比, $P<0.05$ 。

2.2 miRNA-34a mimics 对 ALP 染色结果的影响

ALP 染色结果显示,AS 组和 AS+NC 组细胞的 ALP 活性明显强于正常组,且 AS+NC 组强于 AS 组;但是,AS+miRNA-34a mimics 组的 ALP 活性明显低于 AS+NC 组。

2.3 miRNA-34a mimics 对滑膜成纤维细胞成骨相关基因 ALP、OCN 和 Runx2 mRNA 表达的影响

AS 组细胞中 ALP、OCN 和 Runx2 mRNA 的表达水平较正常组明显升高,而显著低于 AS+NC 组($P<0.05$);与 AS+NC 组相比,AS+miRNA-34a mimics 组细胞中 ALP、OCN 和 Runx2 表达明显降低($P<0.05$),见表 3。

2.4 miRNA-34a mimics 对滑膜成纤维细胞中 Notch 信号通路的影响

表 4 各组细胞中 Notch1 和 Hes1 mRNA 相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

分组	Notch1	Hes1
正常组	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.08
AS 组	3.24 \pm 0.12 ¹⁾	4.06 \pm 0.25 ¹⁾
AS+NC 组	3.75 \pm 0.25 ¹⁾²⁾	4.62 \pm 0.28 ¹⁾²⁾
AS+miRNA-34a mimics 组	2.46 \pm 0.32 ³⁾	2.87 \pm 0.25 ³⁾
<i>F</i>	93.617	146.602
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与 AS 对照组相比, $P<0.05$;3)与 AS+NC 组相比, $P<0.05$ 。

量,越来越多的研究证实 miRNAs 在 AS 成骨分化过程中异常表达,可通过多种途径调控成纤维细胞向成骨细胞分化,进而参与 AS 的发生、发展过程^[7-10]。

表 5 各组细胞中 ALP、OPN 和 Runx2 mRNA 的相对表达量比较 (x̄±s)

分组	ALP	OPN	Runx2
AS+NC 组	1.00±0.06	1.00±0.06	1.00±0.06
AS+miRNA-34a mimics 组	0.65±0.12 ¹⁾	0.42±0.03 ¹⁾	0.55±0.04 ¹⁾
AS+miRNA-34a mimics+rhNF-κB 组	0.84±0.09 ²⁾	0.65±0.08 ²⁾	0.98±0.06 ²⁾
<i>F</i>	10.586	70.431	66.102
<i>P</i>	0.011	<0.001	<0.001

注:1)与诱导+NC 组相比, $P<0.05$;2)与诱导+miRNA-34a mimics 组相比, $P<0.05$ 。

miRNA-34a 属于 miRNA-34 家族成员,定位于 1p36 染色体上,在多种组织或细胞中异常表达,在骨形成和成骨细胞分化过程中发挥重要作用^[11-13]。miRNA-34a 可抑制人牙周膜细胞成骨细胞分化^[14]。TGF-β1 和 BMP-2 是具有促成骨分化作用的两种细胞因子,与 AS 病理性成骨关系密切^[15-17]。本研究通过 TGF-β1 和 BMP-2 联合作用后 miRNA-34a 在 AS 来源的滑膜成纤维细胞中表达降低,提示 miRNA-34a 可能在滑膜成纤维细胞向成骨分化的过程中发挥着重要作用。ALP 是成熟成骨细胞的标志性酶,OCN 和 Runx2 是成骨分化的标志蛋白,三者的表达水平是反映成骨能力的主要指标^[17-19]。Notch 信号通路是一条十分保守的信号通路,Notch1 是 Notch 受体之一,Hes1 是其下游最为典型的靶基因,参与调控细胞的增殖和分化等过程,在骨形成和骨重建等过程中发挥着重要作用^[20]。本研究结果显示,上调 miRNA-34a 表达可降低 TGF-β1 和 BMP-2 诱导的细胞中成骨相关基因 ALP、OCN 和 Runx2 mRNA 以及 Notch 信号通路相关基因 Notch1、Hes1 mRNA 的表达,提示 miRNA-34a 过表达可抑制 AS 滑膜成纤维细胞成骨分化和 Notch 信号通路的活性。给予 Notch 信号通路激活剂 rhNF-κB 作用后,miRNA-34a mimics 对滑膜成纤维细胞成骨分化的抑制作用减弱,提示 miRNA-34a 可通过调控 Notch 信号通路抑制 AS 滑膜成纤维细胞向成骨细胞分化。

总之,miRNA-34a 在 AS 滑膜成纤维细胞中低表达,上调其表达可通过调控 Notch 信号通路抑制 AS 滑膜成纤维细胞成骨分化,这一结果丰富了 AS 滑膜成纤维细胞成骨分化的分子机制,也为改善和治疗 AS 提供了新的线索和依据。

参考文献

[1] 郭洪录,郭晓利,李力毅,等.表没食子儿茶素没食子酸对强直性脊柱炎大鼠 Th1/Th2 免疫平衡,软骨细胞凋亡的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2020,55(5):676-681.

[2] 包乌吉斯古冷,赵君,刘睿.补肾清热汤联合中药外敷治疗肾虚湿热型强直性脊柱炎的效果观察[J]. 实用临床医学杂志,2019,23(18):54-57.

[3] 杜志峰,李振彬.强直性脊柱炎疾病活动相关细胞因子分

析[J]. 河北医学,2019,25(11):173-176.

[4] 勾志静,耿良.补肾强脊颗粒联合塞来昔布对强直性脊柱炎成纤维细胞抗骨化作用及 BMP/Smad 信号通路的影响[J]. 陕西中医,2018,39(9):1194-1197.

[5] AKKOUCH A, ELIASON S, SWEAT M E, et al. Enhancement of microRNA-200c on osteogenic differentiation and bone regeneration by targeting Sox2-mediated Wnt signaling and Klf4 [J]. Hum Gene Ther, 2019, 30(11):1405-1418.

[6] 王贵玲,杨谛,郭佳杰,等. MicroRNA 34a-5p 对成骨细胞炎症反应及分化的影响[J]. 口腔医学研究,2017,33(11):1139-1142.

[7] 袁明权,王博,王秋霞,等. 补肾中药治疗强直性脊柱炎临床疗效 Meta 分析[J]. 西部中医药,2020,33(11):76-85.

[8] TANG S L, HUANG Q H, WU L G, et al. MiR-124 regulates osteoblast differentiation through GSK-3β in ankylosing spondylitis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(20):6616-6624.

[9] 王亚寒,罗建平,王小刚,等. 微小 RNA-145 靶向 Notch 通路抑制人韧带成纤维细胞向成骨细胞分化[J]. 中华实验外科杂志,2017,34(11):1828-1831.

[10] IWAMOTO N, FUKUI S, TAKATANI A, et al. Osteogenic differentiation of fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis is induced by microRNA-218 through a ROBO/Slit pathway [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1):189-199.

[11] SHEN Y, LIU Y, GAO H, et al. N-Acetyl-L-leucine-polyethylenimine-mediated miR-34a delivery improves osteogenesis and bone formation in vitro and in vivo [J]. Rsc Advances, 2018, 8(15):8080-8088.

[12] YU W W, ZHENG Y, YANG Z J, et al. N-AC-I-Leu-PEI-mediated miR-34a delivery improves osteogenic differentiation under orthodontic force [J]. Oncotarget, 2017, 8(66):110460-110473.

[13] XIN W, WANG X, ZHANG W, et al. Tumor necrosis factor-α inhibits bone marrow stem cell differentiation into osteoblasts by downregulating microRNA-34a expression [J]. Ann Clin Lab Sci, 2019, 49(3):324-329.

[14] 程孟文,周毅. MiR-34a 在牙周膜细胞成骨向分化中的作用[J]. 口腔医学研究,2017,33(9):928-932.