

# 膝骨关节炎患者血清基因表达水平与病情程度的关系

王世海<sup>1△</sup> 武晔<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨膝骨关节炎(KOA)患者血清微小核糖核酸-212-5p(miR-212-5p)表达水平与病情严重程度的关系。方法:选取 152 例 KOA 患者(治疗组)及同期 147 例健康志愿者(对照组),均检测血清 miR-212-5p 及促炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )水平。结果:治疗组促炎症因子水平高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),miR-212-5p 低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );炎症因子在轻、中、重度 KOA 患者中依次升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),miR-212-5p 依次降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );KOA 患者血清 miR-212-5p 与促炎症因子水平负相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ );促炎症因子、miR-212-5p 均是 KOA 病情加重的影响因素,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:KOA 患者血清 miR-212-5p 表达水平降低,可作为评估 KOA 病情严重程度的辅助指标。

**[关键词]** 膝骨关节炎;微小核糖核酸-212-5p;病情严重程度;炎症细胞因子;相关性

**[中图分类号]** R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)08-0032-04

## Relationship between Serum miR-212-5p Level and Disease Severity in Patients with Knee Osteoarthritis

WANG Shihai<sup>1△</sup> WU Ye<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hebei Cangzhou integrated traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Cangzhou 061000, Hebei China.

**Abstract Objective:** To investigate the relationship between the expression level of serum microRNA-212-5p (miR-212-5p) and the severity of knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** 152 patients with KOA (treatment group) and 147 healthy volunteers (control group) in the same period were selected, and the serum levels of miR-212-5p and inflammatory factors (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) were detected. **Results:** The levels of inflammatory factors in the treatment group were higher than those in the control group ( $P<0.05$ ) but miR-212-5p was lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). The inflammatory factors in patients with mild, moderate and severe KOA patients increased in turn ( $P<0.05$ ), while miR-212-5p decreased in turn ( $P<0.05$ ). The serum miR-212-5p in KOA patients was negatively correlated with the levels of inflammatory factors ( $P<0.05$ ). Inflammatory factors and miR-212-5p were the influencing factors for exacerbation of KOA ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The expression level of serum miR-212-5p is decreased in patients with KOA, which can be used as an auxiliary index to evaluate the severity of KOA.

**Keywords:** knee osteoarthritis; microRNA-212-5p; severity of illness; inflammatory cytokines; relevance

膝骨关节炎(KOA)早期可采取保守治疗,但随着病情进展,患者可因劳动力丧失等而最终选择行关节置换术,因此及早评估 KOA 患者病情严重程度以指导临床治疗很有必要<sup>[1]</sup>。血清学检查具有简便、客观灵敏等优点,据报道促炎细胞因子可用于评估 KOA 严重程度<sup>[2]</sup>,但有一定局限性。研究表明 miRNA 可能参与 KOA 发病过

程<sup>[3]</sup>,另有研究报道 miR-212-5p 可调节炎症反应<sup>[4]</sup>。miR-212-5p 在 KOA 患者中的表达及其与病情严重程度的关系鲜有报道,本研究特对此展开分析。

### 1 研究对象和方法

#### 1.1 研究对象

经本院伦理委员会批准,选取 2019 年 7 月至 2021 年 4 月本院收治的 152 例 KOA 患者设为治疗组,另选取同期 147 例健康志愿者设为对照组。

#### 1.2 诊断标准

采用《骨关节炎诊疗指南》<sup>[5]</sup>中相关诊断标准:

基金项目:沧州市重点研发计划指导项目(204106028)

<sup>1</sup> 河北沧州中西医结合医院(河北 沧州,061000)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: wsh1988w@163.com

1)X线检查结果显示,关节间隙变窄,关节边缘有骨赘形成或软骨下骨硬化;2)近 1 个月内反复膝关节疼痛;3)活动时有关节摩擦感。

健康人标准:在本院体检科进行健康体检结果均为正常,无任何膝关节疼痛、不适情况。

1.3 纳入标准

1)治疗组患者均符合以上诊断标准确诊为 KOA;2)对照组均为健康者,无内外科及创伤性疾病;3)受试者或家属知情同意。

1.4 排除标准

1)伴脏器功能异常;2)脑血管疾病;3)合并恶性肿瘤者;4)内分泌、神经、血液系统疾病;5)自身免疫性疾病;6)类风湿、创伤性或其他关节炎者;7)近期接受关节内药物注射治疗者;8)关节外其他感染性疾病。

1.5 方法

1.5.1 血清 miR-212-5p 水平的检测方法 荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测<sup>[6]</sup>。1)标本收集及保存:治疗组受试对象于入院第 2 天、对照组于体检当天,均清晨抽取肘静脉血,采用无酶、无菌的 15 mL 离心管收集 3~4 mL,室温环境(25 ℃)下离心 5 min,3 500 r/min,小心吸取上清液分装于 1.5 mL EP 管内,-80℃下保存。2)提取总 RNA 并反转录 cDNA:按照 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书操作,提取 RNA,并将其逆转录为 cDNA。3)PCR 扩增及荧光检测:StepOne™荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),反应条件为 95 ℃ 5min,95 ℃ 10s,60 ℃ 30s,72 ℃ 30s,共 35 个循环。引物序列:上游 5' GTAACGCTCGGAGAGTCGA 3',下游 5' TGAGC-GCTAGAGCGAGA 3';另以 U6 为内参,其上游 5' CCAGATGGAAGCTGGAGA 3',下游 5' TACGAA-ATGCGATTCGAAGC 3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目标基因相对表达量。

1.5.2 血清白介素 1β(IL-1β)、白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平检测方法 两组患者采集空腹静脉血 2 mL,采用酶联免疫法(ELISA),检测血清

IL-1β、IL-6、TNF-α 水平,试剂盒(均来自北京百奥莱博科技有限公司)<sup>[7]</sup>。

1.5.3 KOA 病情严重程度判定 根据 X 线片检查结果评估严重程度<sup>[8]</sup>,正常为无改变;轻度为轻微或明显骨赘,但未累及关节间隙;中度为关节间隙中度狭窄;重度为关节间隙明显变窄,软骨下骨硬化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件对所得数据进行统计处理,两组间计量资料采用 *t* 检验,多组间以单因素方差分析与 SNK-*q* 检验;以 Pearson 法分析血清 miR-212-5p 表达水平与炎症因子相关性,采用 Logistic 多元回归分析法分析 KOA 病情严重程度加重的影响因素。*P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

纳入治疗组共 299 例,男 133 例,女 166 例;年龄为 45~91 岁,中位数为 63 岁;病程为 3~22 年,中位数为 11 年。病情严重程度(依据 X 线检查)分级:轻度 59 例,中度 51 例,重度 42 例。两组性别、年龄对比差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 两组患者基线资料的比较

组别	例数/例	性别		年龄/岁 ( $\bar{x}\pm s$ )
		男/例	女/例	
对照组	152	61	91	55.24±4.21
治疗组	147	72	75	55.60±2.58
统计检验值		$\chi^2=2.369$		<i>t</i> =0.708
<i>P</i>		0.124		0.480

2.2 治疗组与对照组血清促炎症因子及 miR-212-5p 表达水平比较

治疗组血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均高于对照组,血清 miR-212-5p 表达水平低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。

2.3 不同病情严重程度 KOA 患者血清促炎症因子与 miR-212-5p 表达水平比较

血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平在轻度、中度、重

表 2 两组患者血清促炎症因子及 miR-212-5p 表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数/例	IL-1β/(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	TNF-α/(pg·mL <sup>-1</sup> )	miR-212-5p
对照组	147	9.29±2.43	41.87±1.46	10.86±1.68	1.16±0.24
治疗组	152	21.96±4.81	61.38±2.07	24.89±1.14	0.65±0.19
<i>t</i>		28.600	93.895	78.705	20.408
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

度 KOA 患者中依次升高,差异有统计学意义(*P*<0.05);KOA 重度患者血清 miR-212-5p 水平低于中度和轻度患者(*P*<0.05),中度患者低于轻度患者(*P*<0.05),见表 3。

2.4 KOA 患者血清 miR-212-5p 表达水平与促炎症因子相关性

经 Pearson 法分析,治疗组患者血清 miR-212-5p 与 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达水平呈显著负相关,差异

表 3 各病情程度患者血清促炎症因子及 miR-212-5p 表达水平比较(̄x±s)

病情程度	例数/例	IL-1β/(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	TNF-α/(pg·mL <sup>-1</sup> )	miR-212-5p
轻度	59	14.79±2.37	55.64±1.11	19.54±1.27	0.89±0.47
中度	51	18.52±3.15 <sup>1)</sup>	60.19±2.51 <sup>1)</sup>	24.46±2.16 <sup>1)</sup>	0.64±0.31 <sup>1)</sup>
重度	42	36.16±2.94 <sup>1)2)</sup>	69.57±2.46 <sup>1)2)</sup>	32.93±1.68 <sup>1)2)</sup>	0.34±0.64 <sup>1)2)</sup>
F		766.696	484.009	742.919	16.101
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与轻度组比较,P<0.05;2)与中度组比较,P<0.05。

有统计学意义(P<0.05),见表 4。

表 4 KOA 患者血清 miR-212-5p 表达水平与促炎症因子相关性分析

指标	r	P
IL-1β	-0.925	<0.001
IL-6	-0.836	0.007
TNF-α	-0.847	0.005

表 5 血清各指标与 KOA 病情严重程度关系的多因素分析

血清指标	β	SE	Waldχ <sup>2</sup>	P	OR	95%CI
IL-1β 水平	1.549	0.467	11.002	<0.001	4.707	3.754~5.903
IL-6 水平	1.448	0.445	10.588	0.001	4.255	3.394~5.337
TNF-α 水平	1.603	0.471	11.583	<0.001	4.968	3.962~6.230
miR-212-5p 表达水平	-0.614	0.205	8.971	0.012	0.541	0.431~0.678

3 讨论

KOA 是一种慢性不可逆疾病,其发病可能与先天性关节畸形、关节损伤、机体代谢失常、机械磨损等因素相关,若不及时给予有效干预,病情可逐步进展而导致机体活动受限。相关研究指出炎症反应可能参与了 KOA 的发生发展进程<sup>[9]</sup>,有研究表明 miRNA 能够参与成骨细胞、破骨细胞及软骨细胞的增殖、凋亡及分化等生理病理过程,在 KOA 的发病中起着重要作用<sup>[10]</sup>。研究表明血清 miR-212-5p 水平的过度表达可以抑制炎症过程<sup>[11]</sup>,因此本研究探讨血清 miR-212-5p 表达水平与 KOA 患者病情严重程度的关系,以期指导临床诊疗。

3.1 KOA 患者血清 miR-212-5p 表达水平与促炎症因子水平变化情况

本研究结果表明 KOA 患者血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均高于健康者,但血清 miR-212-5p 表达水平低于健康者,提示血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、miR-212-5p 水平变化可能与 KOA 的发生有关。促炎症细胞因子是引起原发性骨关节炎的主要因素,促炎症因子可诱导并加快软骨损伤。IL-1β、IL-6 及 TNF-α 均是促炎症因子,其中 IL-1β 与 TNF-α 可影响软骨细胞,同时作用于成纤维细胞,对基质大分子的合成发挥抑制作用,且阻滞蛋白多糖聚合体生成,亦可对软骨降解酶发挥刺激作用及介导前列腺素的分泌,进而促使软骨破坏,影响骨吸收<sup>[12]</sup>。IL-6 是由巨噬细胞、T 细

2.5 KOA 患者血清各指标与病情严重程度的关系

将血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、miR-212-5p 表达水平设为自变量,直接输入数值,另将 KOA 病情严重程度设为因变量(轻/中度=0,重度=1),经 Logistic 多元回归分析,血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平升高是 KOA 病情严重的危险因素(P<0.05),而血清 miR-212-5p 表达水平升高是其保护因素,差异有统计学意义(P<0.05),见表 5。

胞、B 细胞等产生的多功能细胞因子,可诱导、激活免疫细胞增殖分化,导致持续炎症反应<sup>[13]</sup>。有研究报道,miRNA 可通过调节炎症递质、血管内皮生长因子和神经生长因子的表达参与骨关节炎的病理过程<sup>[14]</sup>。生物信息学显示,miR-212-5p 是 miRNAs 家族的一员,能够调控炎症反应,并参与软骨基质降解<sup>[15]</sup>。因此,血清 miR-212-5p 表达水平可能与 KOA 的发生相关。

3.2 血清促炎症因子、miR-212-5p 表达水平与 KOA 患者病情严重程度的关系

本研究结果表明血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平在 KOA 轻度、中度、重度患者中逐渐升高,而血清 miR-212-5p 水平逐渐降低,且血清 miR-212-5p 水平与 IL-1β、IL-6、TNF-α 均呈负相关性,另经 Logistic 多元回归分析显示血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平高表达及 miR-212-5p 水平低表达均是 KOA 患者病情加重的危险因素,提示血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 及 miR-212-5p 水平与 KOA 患者病情严重程度密切相关,且血清 miR-212-5p 水平与 IL-1β、IL-6、TNF-α 均具有一定的负相关性。机体内促炎症因子的异常增多,可加快软骨细胞的降解,致骨关节炎程度加重<sup>[16]</sup>。邹明等<sup>[17]</sup>曾探究 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平与膝关节炎的严重程度,IL-1β、IL-6、TNF-α 水平越高,膝关节炎病情越严重,与本研究结果一致。MiRNA 与靶基因互补位点配对结合后负调控靶基因的表达,当机体内抗炎因子

与促炎因子稳态失衡时,上调 miRNA 可间接降低促炎因子水平,使其处于稳定状态<sup>[18]</sup>。相关研究报道,慢性阻塞性肺疾病患者血清 miR-212-5p 表达水平显著降低,且 miR-212-5p 可抑制炎症的过度释放<sup>[19]</sup>。另有研究显示,下调 CRNDE 可靶向负调控 miR-212-5p 提高 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞增殖,并降低细胞凋亡和炎症因子表达<sup>[20]</sup>。根据上述研究分析,推测血清 miR-212-5p 可能通过影响机体炎症反应而控制病情进展。因此,临床中可通过检测血清 miR-212-5p 表达水平而对 KOA 患者病情严重程度进行评估,从而指导临床治疗。

综上所述,KOA 患者血清 miR-212-5p 表达水平异常降低,且与血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平呈负相关性,亦与 KOA 病情严重程度呈负相关性,从而有望成为 KOA 精准治疗及预后评价的重要参考标志物。

### 参考文献

- [1] 姚会欣,高建良,李红艳. 骨康胶囊联合透明质酸钠关节腔灌注治疗中老年膝骨关节炎的临床研究[J]. 国际老年医学杂志,2020,41(5):308-311.
- [2] 姚力僕,唐洁,郑洁,等. 血清相关炎症因子表达水平与老年膝骨性关节炎病情严重程度的相关性[J]. 西部医学,2021,33(1):144-147.
- [3] 钟丽红,丘创华,彭紫元,等. miRNA-16, miRNA-146a, miRNA-223 在类风湿关节炎患者外周血中检测的临床意义[J]. 检验医学与临床,2020,17(4):447-451.
- [4] HUA B, XIANG J, GUO L, et al. MicroRNA-212-5p regulates the inflammatory response of periodontal ligament cells by targeting myeloid differentiation factor 88[J]. Arch Oral Biol, 2020, 118(7):104831.
- [5] 王弘德,李升,陈伟,等.《骨关节炎诊疗指南(2018 年版)》膝骨关节炎部分的更新与解读[J]. 河北医科大学学报,2019,40(9):993-995.
- [6] 吴娟,张雅琴,吴云彬,等. S-poly(T) plus 荧光定量 PCR 技术在检测肝癌相关 miR-199 中的临床应用价值[J]. 肿瘤防治研究,2020,47(10):761-765.
- [7] 冯方,刘英,彭毅,等. 膝骨关节炎患者关节滑液中 IL-17 水平与疾病严重程度的相关性[J]. 西部医学,2020,32(6):845-848.
- [8] 阮家诚,蒯声政,王大平. 步态及影像学在膝骨性关节炎严重程度评估中的应用进展[J]. 中国康复医学杂志,2020,35(10):1274-1279.
- [9] LI L, LI Z, LI Y, et al. Profiling of inflammatory mediators in the synovial fluid related to pain in knee osteoarthritis[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2020, 21(99): 1-10.
- [10] 王国梁,李彦林,向耀宇,等. 基质细胞衍生因子 1 诱导骨关节炎软骨细胞的 miRNA 表达谱分析[J]. 中国组织工程研究,2020,24(31):4948-4953.
- [11] SI J, JIN Y, CUI M, et al. Neuroprotective effect of miR-212-5p on isoflurane-induced cognitive dysfunction by inhibiting neuroinflammation[J]. Toxicol Mech Methods, 2021, 31(7):501-506.
- [12] 凌华军,林伟文,李贝,等. 比较富血小板血浆及透明质酸对临床患者膝关节炎模型中炎症因子 IL-1, TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. 检验医学与临床,2020,17(19):2780-2783.
- [13] 张磊,张劲. 滑膜炎膏治疗膝骨性关节炎疗效及对 IL-1, IL-6 水平影响的临床研究[J]. 湖北中医药大学学报,2020,22(2):41-44.
- [14] 施利华,李恒,郭潘,等. miRNA-27a 和 miRNA-146a 在骨性关节炎患者中的诊断意义[J]. 中华全科医学,2020,18(3):412-414.
- [15] LIU R, LI F, ZHAO W. Long noncoding RNA NEAT1 knockdown inhibits MPP+-induced apoptosis, inflammation and cytotoxicity in SK-N-SH cells by regulating miR-212-5p/RAB3IP axis [J]. Neurosci Lett, 2020, 731: 135060.
- [16] 赵铁男,孙强,毕龙,等. 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[J]. 现代生物医学进展,2019,19(22):11-17.
- [17] 邹明,张红梅,徐艺箴. 膝关节炎患者关节置换术后细菌感染严重程度与 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的相关性[J]. 中国微生态学杂志,2020,32(1):44-46.
- [18] 王继成,易智. MiRNA 与骨关节炎病理发展过程的相关性[J]. 中国组织工程研究,2019,23(24):3875-3881.
- [19] JIA Q, CHANG J, HONG Q, et al. miR-212-5p exerts a protective effect in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Discov Med, 2018, 26(144):173-183.
- [20] 吕晓龙,黄久勤,王红旗. CRNDE 靶向 miR-212-5p 基因对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡及炎症因子分泌的影响[J]. 中华生物医学工程杂志,2021,27(3):305-310.

(收稿日期:2021-12-05)