

## • 实验研究 •

环状核糖核酸 0136474 调控骨关节炎软骨细胞增殖  
和凋亡的分子机制研究张建军<sup>1△</sup> 谭章琴<sup>1</sup> 冯璐<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨环状 RNA-0136474(circ\_0136474)调控微小 RNA-127-5p(miR-127-5p)/Zest 同源物 2(EZH2)轴对骨关节炎(OA)软骨细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制。方法:收集骨关节炎患者软骨组织并检测其中 circ\_0136474 表达;IL-1 $\beta$  诱导人软骨细胞 CHON-001,并分为对照组、IL-1 $\beta$ 组、si-NC 组、si-circ\_0136474 组、si-circ\_0136474 + anti-miR-NC 组、si-circ\_0136474 + anti-miR-127-5p 组、miR-NC 组和 miR-127-5p mimics 组,CCK-8 法检测细胞活力,流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡,RT-qPCR 检测 circ\_0136474、miR-127-5p 及 EZH2、增殖细胞核抗原(PCNA) mRNA 表达,ELISA 试剂盒检测 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 含量,Western Blot 检测增殖细胞核抗原、Bcl-2、Bax、EZH2 蛋白表达,双荧光素酶报告基因实验验证 miR-127-5p 与 circ\_0136474、EZH2 的靶向关系。结果:circ\_0136474 在骨关节炎患者软骨组织中高表达。经 IL-1 $\beta$  诱导后,细胞活力、S 期、PCNA 表达、Bcl-2 表达和 miR-127-5p 显著降低,G0~G1 期细胞比例、细胞凋亡率、Bax、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13、circ\_0136474、EZH2 蛋白和 EZH2 mRNA 显著增加( $P<0.05$ );双荧光素酶报告基因实验显示,circ\_0136474、EZH2 与 miR-127-5p 存在靶向关系,沉默 circ\_0136474 可促进细胞增殖、延长 S 期,缩短 G0~G1 期,并抑制细胞凋亡,减少 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 含量( $P<0.05$ );抑制 miR-127-5p 表达可逆转沉默 circ\_0136474 对细胞凋亡、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 的抑制作用( $P<0.05$ )。结论:circ\_0136474 在骨关节炎软骨组织中高表达,沉默 circ\_0136474 可通过调节 miR-127-5p/EZH2 轴促进软骨细胞增殖而抑制细胞凋亡。

**[关键词]** 环状核糖核酸;微小核糖核酸;骨关节炎;软骨细胞增殖;软骨细胞凋亡

**[中图分类号]** R684 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)03-0023-07

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240305

Molecular Mechanism Study of Circular Ribonucleic Acid 0136474 in  
Regulating Proliferation and Apoptosis of Osteoarthritis ChondrocytesZHANG Jianjun<sup>1△</sup> TAN Zhangqin<sup>1</sup> FENG Lu<sup>1</sup><sup>1</sup>Jiayang Chinese Medicine Hospital,Jiayang 641400,Sichuan China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of circular RNA-0136474 (circ\_0136474) on the proliferation and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes by regulating the micro RNA-127-5p (miR-127-5p)/Zest homolog 2 (EZH2) axis and its molecular mechanism. **Methods:** The osteoarthritis patients were collected. The expression of circ\_0136474 in cartilage tissue of osteoarthritis patients was detected;human chondrocytes CHON-001 were induced by IL-1 $\beta$  and divided into control group,IL-1 $\beta$  group,si-NC group,si-circ\_0136474 group,si-circ\_0136474 + anti-miR-NC group,si-circ\_0136474 + anti-miR-127-5p group,miR-NC group,and miR-127-5p mimics group. The CCK-8 was applied to detect the cell viability,flow cytometer was applied to detect the cell cycle and apoptosis,RT-qPCR was applied to detect the expression of circ\_0136474,miR-127-5p,EZH2,and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA,ELISA kit was applied to detect the levels of IL-6,TNF- $\alpha$ ,and MMP-13,Western Blot was applied to detect the expression of PCNA,Bcl-2,Bax,and EZH2

proteins,double luciferase reporter gene experiment was applied to verify the targeting relationship between miR-127-5p and circ\_0136474,EZH2. **Results:** The circ\_0136474 was highly expressed in cartilage tissue of osteoarthritis patients;after induction by IL-1 $\beta$ ,the cell viability,S phase,PCNA ex-

基金项目:四川省中医药信息学会关于舒适化医疗(新晨基金)  
专项科研课题(20200119)

<sup>1</sup> 简阳市中医医院(四川 简阳,641400)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:znmc11@163.com

pression, Bcl-2 expression, and miR-127-5p were obviously reduced, the proportion of G0-G1 phase cells, cell apoptosis rate, Bax, IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-13, circ\_0136474, EZH2 protein, and EZH2 mRNA were obviously increased ( $P < 0.05$ ). The double luciferase reporter gene experiment showed that circ\_0136474 and EZH2 had a targeting relationship with miR-127-5p, silencing circ\_0136474 can promote cell proliferation, prolong the S phase, shorten the G0-G1 phase, inhibit cell apoptosis, reduce the levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-13 ( $P < 0.05$ ), inhibiting the expression of miR-127-5p can reverse the inhibitory effects of silencing circ\_0136474 on cell apoptosis, IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-13 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The circ\_0136474 is highly expressed in osteoarthritis cartilage tissue, and silencing circ\_0136474 can promote chondrocyte proliferation and inhibit cell apoptosis by regulating the miR-127-5p/EZH2 axis.

**Keywords:** circular ribonucleic acid; micro ribonucleic acid; osteoarthritis; chondrocyte proliferation; chondrocyte apoptosis

骨关节炎(OA)是一种慢性退行性关节病,多发于老年人,目前尚未发现治愈的方法<sup>[1]</sup>。骨关节炎的发病与软骨细胞凋亡和持续的病理性炎症密切相关<sup>[2]</sup>。研究表明 circ\_0136474 在骨关节炎软骨组织中高表达,其通过抑制骨关节炎软骨细胞增殖,促进凋亡和炎症来促进骨关节炎进展<sup>[3]</sup>。circ\_0136474 通过竞争性结合 miR-127-5p 抑制骨关节炎中软骨细胞增殖<sup>[4]</sup>。生物信息分析显示 Zest 同源物 2(EZH2)是 miR-127-5p 的可能靶点,其与癌症及骨关节炎软骨损伤和功能障碍均相关<sup>[5-8]</sup>,但 miR-127-5p 和 EZH2 之间的关系在骨关节炎进展中未见报道。本研究探讨 circ\_0136474 影响骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的分子机制,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞与主要试剂

人软骨细胞系 CHON-001 购自美国典型培养物保藏中心;青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素购自 Gibco;小干扰 RNA circ\_0136474(si-circ\_0136474)和阴性对照(si-NC)载体、miR-127-5p 模拟物(miR-127-5p mimics)、miR-127-5p 抑制剂(anti-miR-127-5p)和阴性对照(anti-miR-NC)购自基因制药;SYBR Green PCR Master Mix(SR1120)购自索莱宝生物科技有限公司;IL-6(H007-1-1)、TNF- $\alpha$ (H052-1-2)、MMP-13(H459-1)ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Trizol(15596026)、Annexin V-FITC 试剂盒(C1062S)、CCK-8(C0038)购自上海碧云天生物技术有限公司;Bcl-2(ab182858)、Bax(ab32503)、EZH2(ab307646)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG(ab272685)购自英国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 软骨组织收集** 收集 2022 年 7 月至 2023 年 6 月在本院住院治疗的半月板损伤和膝骨关节炎患者资料,各 10 例。所有骨关节炎患者确诊明确,且无其他基础疾病。患者均取关节软骨组织液氮中保存。所有骨关节炎患者均签署知情同意书。本研究得到了本院伦理委员会的批准。

**1.2.2 细胞培养和 IL-1 $\beta$  诱导** 将 CHON-001 细胞放入含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 DMEM 中,并于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中进行传代培养。待细胞融合度达 70%时,用 10 ng/mL 的 IL-1 $\beta$ <sup>[9]</sup> 培养 24 h,以未进行 IL-1 $\beta$  诱导的 CHON-001 细胞作为对照组。

**1.2.3 细胞转染和分组** 将小干扰 RNA circ\_0136474(si-circ\_0136474)、miR-127-5p 模拟物/抑制剂和阴性对照参照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂盒进行转染,将细胞分为对照组、模型组(IL-1 $\beta$  组)、si-NC 组、si-circ\_0136474 组、si-circ\_0136474 + anti-miR-NC 组、si-circ\_0136474 + anti-miR-127-5p 组、miR-NC 组和 miR-127-5p mimics 组。

**1.2.4 双荧光素酶报告基因测定** 根据 miR-127-5p 在 circ\_0136474 和 EZH2 3'UTR 中的结合位点,将 circ\_0136474 和 EZH2 3'UTR 的野生型(wt)和突变型(mut)序列插入 psi-CHECK-2 载体中。CHON-001 细胞接种于 24 孔板( $5 \times 10^4$  个/孔)。细胞生长到 60% 融合度后,将构建的 circ\_0136474-wt/mut、EZH2-wt/mut 载体质粒转染到含有 miR-NC 或 miR-127-5p mimics 的细胞中 48 h。双荧光素酶报告系统检测相应荧光素酶活性。

**1.2.5 RT-qPCR 处理** 将 Trizol 提取的 RNA 反转录成 cDNA,用 SYBR Green 进行 RT-qPCR 处理,用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 circ\_0136474、miR-127-5p 相对表达量。circ\_0136474 正向引物 5'-TGCCATCACAGTGGGAATAC-3'和反向引物 5'-GGTTGTCATAAGCAGGACCA-3';miR-127-5p 正向引物 5'-GCCGAGCTGAAGCTCAGAGG'和反向引物 5'-CTCAACTGGTGTCTGTGA-3';EZH2 正向引物 5'-ACGTCAGATGGTGCCAGCAATA-3'和反向引物 5'-CCCTGACCTCTGTCTCTTACTTGGA-3';增殖细胞核抗原(PCNA)正向引物 5'-GTTGTTGGAGGCACTCAAGGA-3'和反向引物 5'-TAGGTGTCGAAGCCCTCAGA-3';GAPDH 正向引物 5'-TACCCCAATGTGTCCGTC-3'和反向引物 5'-GC-

CCAAGATGCCCTTCAGT-3';U6 正向引物 5'-TGCG-GGTGCTCGCTTCGGCAGC-3'和反向引物 5'-CCAGT-GCAGGGTCCGAGGT-3'。

**1.2.6 细胞增殖检测** 将转染后的 CHON-001 细胞接种在 96 孔板(2×10<sup>6</sup>个/孔)中,孵育 48 h。然后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂再培养 2 h。酶标仪检测 450 nm 处光密度(OD)值。

**1.2.7 细胞周期检测** 将各组转染后的细胞接种于 24 孔板中(2.5×10<sup>5</sup>个/孔),培养 48 h 后,PBS 冲洗,吸取 1 mL 预冷的 70%乙醇,混悬细胞,4 ℃冰箱固定,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤。加入 0.5 μL 蛋白酶体抑制剂(PI),室温培养 30 min,流式细胞仪检测。

**1.2.8 细胞凋亡检测** 收集各组转染后的 CHON-001 细胞,用浓度为 1×10<sup>6</sup>个/mL 的结合缓冲液悬浮,然后用 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 对细胞悬液进行染色。将染色细胞用 300 μL 结合缓冲液稀释,流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

**1.2.9 炎症因子检测** 根据制造商说明,通过 IL-6、TNF-α、MMP-13 检测试剂盒检测各组细胞中 IL-6、TNF-α、MMP-13 水平。

**1.2.10 Western Blot 检测** 提取各组 CHON-001 细胞中的总蛋白,RIPA 裂解,BCA 检测蛋白浓度。将蛋白质在 SDS-PAGE 上分离并转移到 PVDF 膜上。脱脂牛奶封闭后,将膜与一抗 Bcl-2、Bax、EZH2 在 4 ℃下孵育过夜,洗涤,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 1 h,ECL 显色后,以 GAPDH 为内参,用 Image J 软件计算蛋白表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  形式表示。采用单因素方差分析进行多组间比较,LSD-*t* 用于两组间比较, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circ\_0136474 在骨关节炎患者中的表达

与正常软骨组织组比,骨关节炎组软骨组织中 circ\_0136474 的表达显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。经 RNase R 消化后,GAPDH 的相对表达量显著降低,circ\_0136474 的相对表达不受

影响,差异无统计学意义,见表 2。

表 1 RT-qPCR 检测骨关节炎软骨组织中 circ\_0136474 表达( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	circ_0136474
正常软骨组织组	1.13±0.08
骨关节炎组	2.47±0.24 <sup>1)</sup>
<i>t</i>	16.750
<i>P</i>	<0.001

注:1)与正常软骨组织组比, $P < 0.05$ 。

表 2 RNase R 对 circ\_0136474 的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	GAPDH	circ_0136474
对照组	1.00±0.06	0.98±0.05
RNase R 组	0.46±0.04 <sup>1)</sup>	0.95±0.04
<i>t</i>	23.681	1.482
<i>P</i>	<0.001	>0.05

注:1)与对照组比, $P < 0.05$ 。

2.2 miR-127-5p 与 circ\_0136474 及 EZH2 靶向关系验证

StarBase 预测显示,miR-127-5p 与 circ\_0136474 及 EZH2 之间存在结合位点(见图 1)。双荧光素酶实验结果显示,与 miR-NC 组比,miR-127-5p mimics 组 circ\_0136474-wt、EZH2-wt 相对荧光素酶活性显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),circ\_0136474-mut、EZH2-mut 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。RT-qPCR 检测结果显示,与 miR-NC 组比,miR-127-5p mimics 组 miR-127-5p 表达显著升高,EZH2 表达显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 4。



注:1-miR-127-5p与circ\_0136474靶向关系;2-miR-127-5p与EZH2靶向关系

图 1 StarBase 预测 miR-127-5p 与 circ\_0136474 及 EZH2 之间的靶向关系

2.3 circ\_0136474 通过靶向 miR-127-5p 对 EZH2 表达的影响

与对照组比,IL-1β 组 circ\_0136474、EZH2 蛋白表达、EZH2 mRNA 表达显著增加,miR-127-5p 表达显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 si-NC 组比,

表 3 双荧光素酶报告基因检测结果( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	circ_0136474-wt	circ_0136474-mut	EZH2-wt	EZH2-mut
miR-NC 组	1.00±0.06	1.00±0.05	1.03±0.04	1.00±0.03
miR-127-5p mimics 组	0.43±0.08 <sup>1)</sup>	0.97±0.06	0.38±0.03 <sup>1)</sup>	0.98±0.05
<i>t</i>	12.746	0.859	29.069	0.767
<i>P</i>	<0.001	>0.05	<0.001	>0.05

注:1)与 miR-NC 组比, $P < 0.05$ 。

表 4 RT-qPCR 检测 miR-127-5p 及 EZH2 表达 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-127-5p	EZH2 蛋白	EZH2 mRNA
miR-NC 组	1.00±0.04	0.97±0.06	1.00±0.02
miR-127-5p mimics 组	1.58±0.14 <sup>1)</sup>	0.52±0.04 <sup>1)</sup>	0.57±0.05 <sup>1)</sup>
t	8.907	13.954	17.855
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与 miR-NC 组比,  $P<0.05$ 。  
si-circ\_0136474 组 circ\_0136474、EZH2 蛋白和 mRNA 表达显著降低, miR-127-5p 表达显著增加, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比, si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组 EZH2 蛋白表达、EZH2 mRNA 表达显著增加, miR-127-5p 表达显著降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); IL-1 $\beta$  组和 si-NC 组、si-circ\_0136474 组和 si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组比, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 2 及表 5。

表 5 RT-qPCR 和 Western Blot 检测软骨细胞中 circ\_0136474 和 miR-127-5p 表达 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	circ_0136474	miR-127-5p	EZH2 蛋白	EZH2 mRNA
对照组	0.39±0.04	1.67±0.09	0.47±0.05	1.02±0.04
IL-1 $\beta$ 组	0.96±0.04 <sup>1)</sup>	0.97±0.06 <sup>1)</sup>	0.96±0.06 <sup>1)</sup>	2.31±0.32 <sup>1)</sup>
si-NC 组	0.99±0.06	1.00±0.05	0.98±0.04	2.37±0.35
si-circ_0136474 组	0.52±0.05 <sup>2)</sup>	1.53±0.23 <sup>2)</sup>	0.56±0.06 <sup>2)</sup>	1.42±0.16 <sup>2)</sup>
si-circ_0136474+anti-miR-NC 组	0.49±0.03	1.50±0.26	0.54±0.04	1.46±0.20
si-circ_0136474+anti-miR-127-5p 组	0.46±0.05	1.09±0.12 <sup>3)</sup>	0.77±0.08 <sup>3)</sup>	1.81±0.28 <sup>3)</sup>
F	168.449	19.015	77.078	23.085
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与对照组比,  $P<0.05$ ;2)与 si-NC 组比,  $P<0.05$ ;3)与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比,  $P<0.05$ 。

2.4 circ\_0136474 靶向 miR-127-5p 对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞增殖和细胞周期的影响

与对照组比, IL-1 $\beta$  组细胞活力、增殖细胞核抗原蛋白和增殖细胞核抗原 mRNA 显著降低, G0~G1 期延长, S 期缩短, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), G2~M 期无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与 si-NC 组比, si-circ\_0136474 组细胞活力、增殖细胞核抗原蛋白和增殖细胞核抗原 mRNA 显著增加, G0~G1 期缩短, S 期延长, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), G2~M 期无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比, si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组细胞活力、增殖细胞核

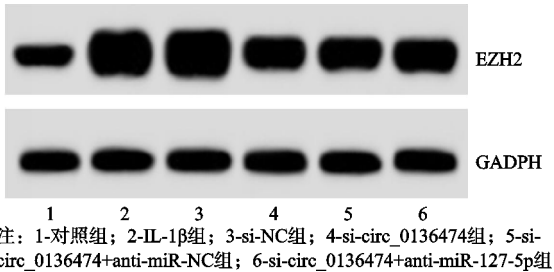


图 2 Western Blot 检测 EZH2 表达

抗原蛋白和增殖细胞核抗原 mRNA 显著降低, G0~G1 期延长, S 期缩短, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), G2~M 期无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); IL-1 $\beta$  组和 si-NC 组、si-circ\_0136474 组和 si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组比, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 3 及表 6 和表 7。

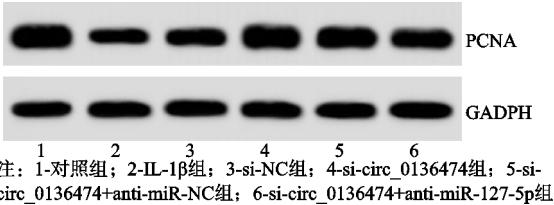


图 3 Western Blot 检测增殖细胞核抗原表达

表 6 circ\_0136474 靶向 miR-127-5p 对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞增殖和细胞周期的影响 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞活力(OD)	G0~G1 期	S 期	G2~M 期
对照组	0.86±0.05	35.46±0.29	33.34±0.31	32.73±0.27
IL-1 $\beta$ 组	0.41±0.03 <sup>1)</sup>	41.35±0.42 <sup>1)</sup>	26.18±0.21 <sup>1)</sup>	33.65±0.24
si-NC 组	0.42±0.02	41.71±0.45	26.06±0.23	33.58±0.23
si-circ_0136474 组	0.79±0.07 <sup>2)</sup>	37.83±0.34 <sup>2)</sup>	29.64±0.28 <sup>2)</sup>	33.46±0.21
si-circ_0136474+anti-miR-NC 组	0.81±0.05	37.62±0.32	29.82±0.30	33.12±0.34
si-circ_0136474+anti-miR-127-5p 组	0.65±0.04 <sup>3)</sup>	39.09±0.35 <sup>3)</sup>	27.47±0.25 <sup>3)</sup>	33.08±0.32
F	93.531	213.060	544.592	8.442
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与对照组比,  $P<0.05$ ;2)与 si-NC 组比,  $P<0.05$ ;3)与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比,  $P<0.05$ 。



表 7 circ\_0136474 靶向 miR-127-5p 对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞增殖蛋白的影响( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	增殖细胞核抗原蛋白	增殖细胞核抗原 mRNA
对照组	1.00 $\pm$ 0.04	1.78 $\pm$ 0.31
IL-1 $\beta$ 组	0.46 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	1.00 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
si-NC 组	0.44 $\pm$ 0.06	1.03 $\pm$ 0.04
si-circ_0136474 组	0.79 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	1.64 $\pm$ 0.27 <sup>2)</sup>
si-circ_0136474+anti-miR-NC 组	0.76 $\pm$ 0.07	1.61 $\pm$ 0.25
si-circ_0136474+anti-miR-127-5p 组	0.91 $\pm$ 0.05 <sup>3)</sup>	1.14 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>
<i>F</i>	62.516	15.200
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:1)与对照组比, $P<0.05$ ;2)与 si-NC 组比, $P<0.05$ ;3)与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比, $P<0.05$ 。

2.5 circ\_0136474 靶向 miR-127-5p 对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞凋亡的影响

与对照组比,IL-1 $\beta$  组细胞凋亡率、Bax 表达显著增加,Bcl-2 表达显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 si-NC 组比,si-circ\_0136474 组细胞凋亡率、Bax 表达显著降低,Bcl-2 表达显著增加,差异有统计学意义( $P<$

0.05);与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比,si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组细胞凋亡率、Bax 表达显著增加,Bcl-2 表达显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),IL-1 $\beta$  组和 si-NC 组、si-circ\_0136474 组和 si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组比,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 4 和图 5 及表 8。

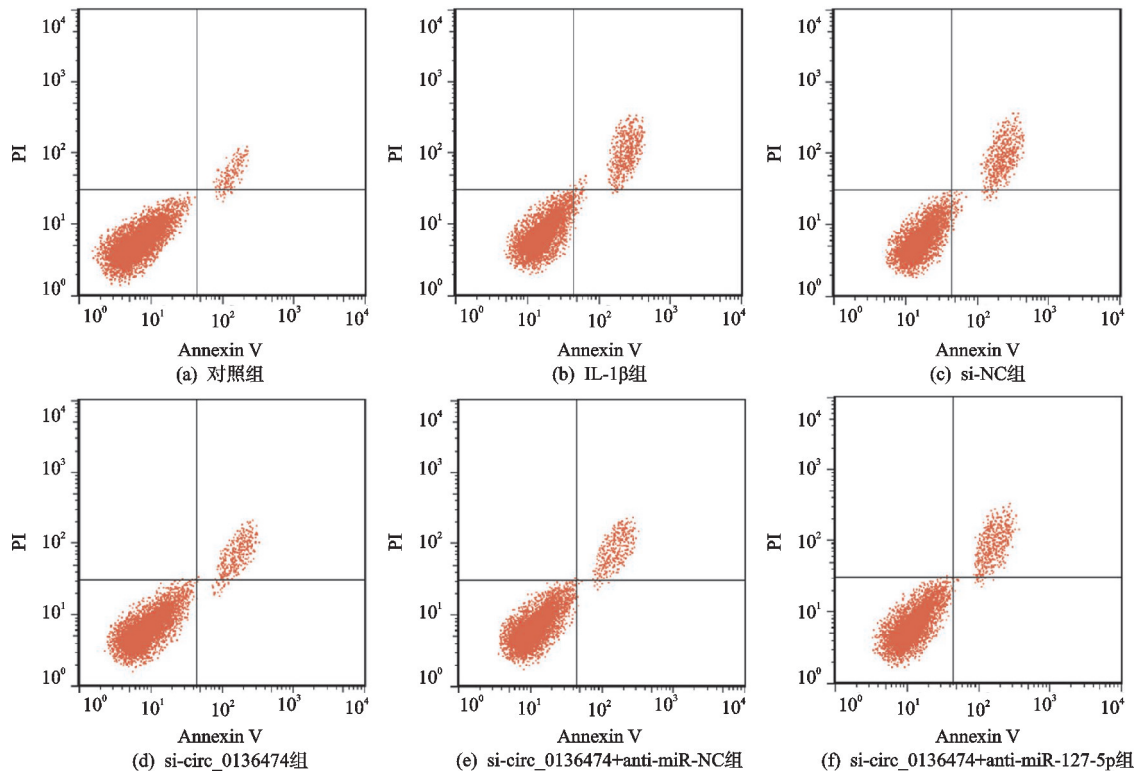
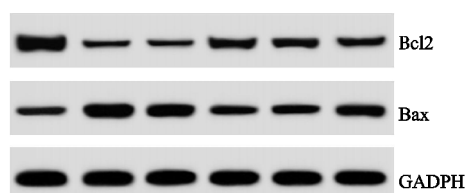


图 4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

表 8 circ\_0136474 靶向 miR-127-5p 对 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞凋亡的影响( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡率/%	Bcl-2	Bax
对照组	3.47 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.05
IL-1 $\beta$ 组	16.23 $\pm$ 0.26 <sup>1)</sup>	0.29 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.93 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
si-NC 组	16.30 $\pm$ 0.27	0.27 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.06
si-circ_0136474 组	8.14 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>	0.72 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>	0.64 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
si-circ_0136474+anti-miR-NC 组	8.20 $\pm$ 0.15	0.71 $\pm$ 0.15	0.65 $\pm$ 0.05
si-circ_0136474+anti-miR-127-5p 组	11.43 $\pm$ 0.18 <sup>3)</sup>	0.52 $\pm$ 0.09 <sup>3)</sup>	0.80 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>
<i>F</i>	3 498.477	43.818	47.505
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与对照组比, $P<0.05$ ;2)与 si-NC 组比, $P<0.05$ ;3)与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比, $P<0.05$ 。



注: 1-对照组; 2-IL-1 $\beta$ 组; 3-si-NC组; 4-si-circ\_0136474组; 5-si-circ\_0136474+anti-miR-NC组; 6-si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p组

图5 Western Blot 检测 Bcl2 及 Bax 表达

## 2.6 沉默 circ\_0136474 对 IL-1 $\beta$ 诱导的炎症因子的影响

表9 沉默 circ\_0136474 对 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 的影响( $n=5, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

组别	IL-6	TNF- $\alpha$	MMP-13
对照组	36.59 $\pm$ 4.13	23.19 $\pm$ 1.12	46.35 $\pm$ 5.46
IL-1 $\beta$ 组	259.67 $\pm$ 14.56 <sup>1)</sup>	159.38 $\pm$ 12.34 <sup>1)</sup>	319.28 $\pm$ 14.33 <sup>1)</sup>
si-NC组	271.33 $\pm$ 15.14	155.41 $\pm$ 11.17	313.44 $\pm$ 13.17
si-circ_0136474组	91.26 $\pm$ 10.31 <sup>2)</sup>	49.36 $\pm$ 4.23 <sup>2)</sup>	77.37 $\pm$ 7.25 <sup>2)</sup>
si-circ_0136474+anti-miR-NC组	97.44 $\pm$ 9.63	45.51 $\pm$ 3.79	74.19 $\pm$ 6.64
si-circ_0136474+anti-miR-127-5p组	213.28 $\pm$ 12.25 <sup>3)</sup>	93.26 $\pm$ 7.69 <sup>3)</sup>	236.72 $\pm$ 10.37 <sup>3)</sup>
F	364.303	278.584	783.161
P	<0.001	<0.001	<0.001

注: 1)与对照组比,  $P<0.05$ ; 2)与 si-NC 组比,  $P<0.05$ ; 3)与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比,  $P<0.05$ 。

## 3 讨论

circRNA 是一种非编码 RNA, 已被证实是治疗骨关节炎的潜在标志物<sup>[10]</sup>。circRNA 在骨关节炎患者中差异表达, 参与多基因、多靶点调控网络, 通过调节增殖、凋亡、分化、氧化应激、炎症反应参与骨关节炎发展<sup>[11]</sup>。相关研究表明 circ\_0136474 在骨关节炎软骨组织和 IL-1 $\beta$  诱导的 CHON-001 细胞中上调, 下调 circ\_0136474 增强了细胞增殖和细胞周期进程, 抑制细胞凋亡, 减轻软骨细胞损伤<sup>[9,12]</sup>。本研究发现 circ\_0136474 在骨关节炎软骨组织中高表达, 经 RNase R 消化后, circ\_0136474 的相对表达不受影响。此外, 沉默 circ\_0136474 可促进细胞增殖, 延长 S 期, 抑制细胞凋亡, 并减少 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 释放, 这与已有研究结果一致<sup>[9]</sup>, 说明敲掉 circ\_0136474 基因可保护软骨细胞免受损伤。

本研究结果还显示 circ\_0136474 与 miR-127-5p 存在靶向关系, 过表达 miR-127-5p 可降低 circ\_0136474-wt 荧光素酶活性, 提示 miR-127-5p 是 circ\_0136474 的靶标。miR-127-5p 在骨关节炎的进展中发挥重要作用, Liu 等<sup>[13]</sup>研究显示沉默 miR-127-5p 可抑制下调 circ\_0002715 对软骨细胞损伤的保护作用, 且过表达 miR-127-5p 可通过下调 LXN 表达抑制软骨细胞损伤。Zhang 等<sup>[14]</sup>研究显示 IL-1 $\beta$  处理降低了 miR-127-5p 表达, 过表达 miR-127-5p 抑制 IL-1 $\beta$  引起的软骨细胞损伤。miR-127-5p 可直接靶向烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)促进细胞活力并抑制骨关节炎软骨细胞凋亡、炎症和细胞外基质(ECM)降解<sup>[15]</sup>。

与对照组比, IL-1 $\beta$  组 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 显著增加, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 si-NC 组比, si-circ\_0136474 组 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 si-circ\_0136474+anti-miR-NC 组比, si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 显著增加, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); IL-1 $\beta$  组和 si-NC 组、si-circ\_0136474 组和 si-circ\_0136474+anti-miR-127-5p 组比, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 见表 9。

与这些研究结果一致, 本研究发现抑制 miR-127-5p 表达可逆转沉默 circ\_0136474 对软骨细胞凋亡及 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-13 的抑制作用, 提示沉默 circ\_0136474 可负向调控 miR-127-5p 促进细胞增殖并抑制细胞凋亡。

EZH2 是 Polycomb 抑制复合物 2(PRC2)的催化亚基, 其 C 端的 SET 结构域表现出甲基转移酶活性, 通过组蛋白 H3 赖氨酸 27(H3K27)甲基化抑制靶基因表达<sup>[16]</sup>, EZH2 缺失可显著降低 PRC2 靶基因上的 H3K27 me3。越来越多的研究表明, EZH2 与骨关节炎的进展相关。据相关研究显示, 骨关节炎患者中 EZH2 表达上调, EZH2 通过激活 TNFSF13B 促进软骨细胞愈合, 改善骨关节炎<sup>[17]</sup>。在骨关节炎软骨细胞中, 过表达 miR-140-3p 通过靶向 EZH2 保护软骨细胞免受 IL-1 $\beta$  诱导的功能障碍影响<sup>[18]</sup>, 抑制 EZH2 表达可增强 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞凋亡和细胞外基质降解<sup>[19-20]</sup>。本研究结果显示 EZH2 是 miR-127-5p 的靶标, 过表达 miR-127-5p 可显著降低 EZH2 蛋白和 EZH2 mRNA 水平, 抑制 miR-127-5p 表达可逆转沉默 circ\_0136474 对细胞凋亡、炎症因子、EZH2 蛋白和 EZH2 mRNA 水平的抑制作用, 延长 G0~G1 期。以上结果说明, 沉默 circ\_0136474 可通过调控 miR-127-5p/EZH2 轴促进软骨细胞增殖, 抑制细胞凋亡。

综上所述, circ\_0136474 在骨关节炎患者软骨细胞中高表达, 沉默 circ\_0136474 可通过调控 miR-127-5p/EZH2 轴促进软骨细胞增殖, 抑制细胞凋亡。然而, 本研究未进行动物实验验证, circ\_0136474 对骨关

节炎的作用机制还需进一步明确。

## 参考文献

- [1] EMAMI A, NAMDARI H, PARVIZPOUR F, et al. Challenges in osteoarthritis treatment[J]. *Tissue Cell*, 2023, 80(1):101992-102003.
- [2] HE Y, LI Z, ALEXANDER P G, et al. Pathogenesis of osteoarthritis: risk factors, regulatory pathways in chondrocytes, and experimental models[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(8):194-227.
- [3] CHENG S, NIE Z, CAO J, et al. Circ\_0136474 promotes the progression of osteoarthritis by sponging miR-140-3p and upregulating MECP2[J]. *J Mol Histol*, 2023, 54(1):1-12.
- [4] LI Z, YUAN B, PEI Z, et al. Circ\_0136474 and MMP-13 suppressed cell proliferation by competitive binding to miR-127-5p in osteoarthritis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(10):6554-6564.
- [5] LUO L, WANG Z, HU T, et al. Multiomics characteristics and immunotherapeutic potential of EZH2 in pancreatic cancer[J]. *Biosci Rep*, 2023, 43(1):BSR20222230-BSR20222252.
- [6] LUI JC, GARRISON P, NGUYEN Q, et al. EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1):13685-13696.
- [7] ALLAS L, BROCHARD S, ROCHOUX Q, et al. EZH2 inhibition reduces cartilage loss and functional impairment related to osteoarthritis[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):19577-19589.
- [8] CHEN L, WU Y, WU Y, et al. The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1):29176-29189.
- [9] ZHU H, ZHU S, SHANG X, et al. Exhausting circ\_0136474 and restoring miR-766-3p attenuate chondrocyte oxidative injury in IL-1 $\beta$ -induced osteoarthritis progression through regulating DNMT3A[J]. *Front Genet*, 2021, 12(1):1-13.
- [10] LI Z, LU J. CircRNAs in osteoarthritis: research status and prospect[J]. *Front Genet*, 2023, 14(1):1-19.
- [11] ZHANG Y, LIU L, LIU K, et al. Regulatory mechanism of circular RNA involvement in osteoarthritis[J]. *Front Surg*, 2022, 9(1):1-13.
- [12] PAN F, LI Z, LUO Y, et al. Circ\_0136474 contributes to the IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte injury by binding to miR-665 to induce the FGFR1 upregulation[J]. *Transpl Immunol*, 2022:101615.
- [13] LIU H, ZHAO H, HUANG Y, et al. Circ\_0002715 promotes the development of osteoarthritis through regulating LXN by sponging miR-127-5p[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1):230-240.
- [14] ZHANG Y, ZHAO P, LI S, et al. CircSCAPER knock-down attenuates IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte injury by miR-127-5p/TLR4 axis in osteoarthritis[J]. *Autoimmunity*, 2022, 55(8):577-586.
- [15] LIU C, CHENG P, LIANG J, et al. Circular RNA circ\_0128846 promotes the progression of osteoarthritis by regulating miR-127-5p/NAMPT axis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1):307-318.
- [16] HWANG I J, PARK J, SEO S B. Non-canonical transcriptional regulation of INHAT subunit SET/TAF-I $\beta$  by EZH2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 635(1):136-143.
- [17] DU X, CHEN Y, ZHANG Q, et al. EZH2 ameliorates osteoarthritis by activating TNFSF13B[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(5):956-965.
- [18] LUOBU Z, WANG L, JIANG D, et al. CircSCAPER contributes to IL-1 $\beta$ -induced osteoarthritis in vitro via miR-140-3p/EZH2 axis[J]. *Bone Joint Res*, 2022, 11(2):61-72.
- [19] LI Y, YUAN F, SONG Y, et al. miR-17-5p and miR-19b-3p prevent osteoarthritis progression by targeting EZH2[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2):1653-1663.
- [20] CHENG F, LI H, LIU J, et al. EZH2 regulates the balance between osteoclast and osteoblast differentiation to inhibit arthritis-induced bone destruction[J]. *Genes Immun*, 2022, 23(3/4):141-148.

(收稿日期:2023-06-09)