doi:10.11659/jjssx.06E019073

·基础研究·

miR-146a 调控 TGF-β/SMAD2 信号通路对膝关节韧带损伤的影响

王 振,杜异凡,袁赞安,邝欢欢,位付涛 (联勤保障部队第九八八医院骨科,河南 郑州 450042)

[摘 要] **目的** 探究 miR-146a 调控 TGF-β/SMAD2 信号通路对膝关节韧带损伤的影响。**方法** 将 32 只兔平均分为假手术组(只切开皮肤并缝合,但不损伤前交叉韧带)、模型组(膝关节韧带损伤后仅缝合)、安慰剂组(膝关节韧带损伤后给予生理盐水安慰剂)、miR-146 mimic 组(膝关节韧带损伤后给予 miR-146a mimic 处理)。对模型动物进行行为能力观察和副韧带拉伸试验,通过 HE 染色观察兔膝关节内侧副韧带的组织变化,采用 Western blot 和 qRT-PCR 检测膝关节转化生长因子-β(TGF-β)和 SMAD2 的表达。**结果** 假手术组兔膝关节可正常活动,关节软骨清晰无损坏;模型组和安慰剂组兔四肢出现疼痛现象,有明显抽搐,软骨裂痕明显严重,关节腔内液体明显增多,骨髓组织出血严重、结构紊乱;miR-146 mimic 组兔关节腔内液体、骨髓组织出血及结构紊乱明显减少/轻,膝关节活动明显好转。miR-146 mimic 组最大应变明显较强,且其最大位移明显较长,均优于模型组和安慰剂组($P<0.05$)。Western blot 分析显示,模型组和安慰剂组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达明显低于假手术组($P<0.05$);miR-146 mimic 组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达显著高于模型组和安慰剂组($P<0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示,模型组及安慰剂组 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达显著低于假手术组和 miR-146 mimic 组($P<0.05$);与假手术组比较,miR-146 mimic 组 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达较低($P<0.05$)。**结论** miR-146a 可促进 TGF-β/SMAD2 蛋白表达,增强韧带拉伸效果,改善膝关节韧带的损伤。

[关键词] miR-146a;TGF-β/SMAD2 信号通路;膝关节;韧带损伤

[中图分类号] R684 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-06-14

[基金项目] 国家自然科学基金(81744125)

[通信作者] 位付涛,E-mail:47651717@qq.com

[2] 赵振钏,亓 蓉,吴小华,等.卵巢刺激慢反应患者补充生长激素的疗效评价[J].中国计划生育和妇产科,2019,11(7):41-44.doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2019.07.11.

[3] 杨润雨,张 杨,冯晓玲.卵巢储备功能下降所致不孕症中西医机制及治疗进展探析[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(9):189-192.doi:10.13194/j.issn.1673-842x.2019.09.049.

[4] Wang YR,Chang Q,Sun J,et al.Effects of HMG on revascularization and follicular survival in autotransplant mouse ovarian tissue[J].Reprod Biomed Online,2012,24(6):646-653.doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.025.

[5] 刘 杰.转化生长因子 β 通过调节 VEGF-A 的表达影响子宫内膜异位症的发展[J].中国妇幼保健,2020,35(5):938-940.doi:10.19829/j.zgfybj.issn.1001-4411.2020.05.050.

[6] 王玉霞,孔红霞,韩贝贝,等.VASH1 和 VEGFR-2 在宫颈鳞癌组织的表达及意义[J].山东医药,2015,55(21):40-42.doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2015.21.015.

[7] Tavana S,Valojerdi MR,Azarnia M,et al.Restoration of ovarian tissue function and estrous cycle in rat after autotransplantation using hyaluronic acid hydrogel scaffold containing VEGF and bFGF[J].Growth Factors,2016,34(3-4):97-106.doi:10.1080/08977194.2016.1194835.

[8] 龙惠东,周灿权,邓伟芬,等.人冻融卵巢组织异种异位移植血管生成的研究[J].中国妇幼健康研究,2020,31(2):213-218.doi:10.3969/ji.ssn.1673-5293.2020.02.016.

[9] Turwankar A,Ghaskadbi S.VEGF and FGF signaling during head regeneration in hydra[J].Gene,2019:144047.doi:10.1016/j.gene.2019.144047.

[10] 林哲洙,张 磊,张 睿,等.乳腺浸润性导管癌 Ephrin-A1、VEGF、VEGFR2 表达对血管生成的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(10):2466-2468.doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.10.053.

[11] 高江曼,严 杰,于 洋,等.VEGF 和 bFGF 联用对小鼠卵巢组织移植后的影响[J].天津医药,2013,41(5):459-461.doi:10.3969/j.issn.0253-9896.2013.05.017.

[12] 李 超,殷金凤,罗 莉,等.米索前列醇联合 COOK 球囊用于足月孕引产的临床观察[J].中国妇幼健康研究,2017,28(8):1010-1013.doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2017.08.042.

[13] 熊 露,刘 莉,胡雅君.TNF-α、IFN-γ、IL-2 及生殖激素在卵巢早衰中的水平变化及临床意义[J].国际检验医学杂志,2020,41(6):745-748.doi:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.06.028.

[14] 沈 澍,周晓燕,胡恒贵,等.血清 INHB、IGF-1、VEGF、E2 在多囊卵巢综合征患者中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2019,40(2):181-183.doi:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.014.

[15] 颜 贝,单园园,蒲 静,等.小鼠卵巢玻璃化冻存中 FSH 干预对移植卵巢 VEGF 和 VEGFR-2 表达的影响[J].宁夏医科大学学报,2014,36(6):600-603.doi:10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2014.06.024.

[16] 叶耀群.雌-孕激素序贯疗法对药物流产后出血患者卵巢功能和血管生成调节因子的影响[J].中国实用医药,2019,14(18):4-6.doi:10.14163/j.cnki.11-5547/r.2019.18.002.

(编辑:杨 颖)

Effect of miR-146a regulating TGF-β/SMAD2 signaling pathway on knee ligament injury

WANG Zhen, DU Yi-fan, YUAN Zan-an, KUANG Huan-huan, WEI Fu-tao (Department of Orthopedics, Logistic Support Forces No. 988 Hospital, Zhengzhou Henan 450042, China)

Abstract: Objective To explore the effect of miR-146a regulating TGF-β/SMAD2 signaling pathway on knee ligament injury. **Methods** A total of 32 rabbits were equally divided into sham operation group (incised and sutured the skin without injurying the anterior cruciate liagment), model group (merely sutured after knee ligament injury), and placebo group (normal saline placebo was given after knee ligament injury), miR-146 mimic treatment group (miR-146a mimic was given after knee ligament injury). Behavioral ability observation and collateral ligament stretching test were performed on the model animals. Tissue changes of the medial collateral ligament of the knee joint in rabbits were observed by hematoxyin and eosin(HE) staining. The knee joint transforming growth factor-β (TGF-β) and SMAD2 expression levels were detected by Western blot and qRT-PCR. **Results** In the sham operation group, the knee joints of the rabbits were able to move normally, and the articular cartilages were clear and undamaged; in the model group and the placebo group, the rabbits had pain in the limbs, convulsions, severe cartilage cracks, increased fluid in the joint cavity, severe bleeding and structural disorder in bone marrow tissue; in the miR-146 mimic treatment group, the fluid in the articular cavity, bone marrow tissue hemorrhage and structural disorder of the rabbits were significantly reduced, and the knee joint activity improved significantly. The maximum strain of miR-146 mimic treatment group was significantly stronger, and its maximum displacement was significantly longer, which were better than model group and placebo group ($P<0.05$). Western blot analysis showed that the expression levels of TGF-β and SMAD2 protein in the model group and placebo group were significantly lower than that of the sham operation group ($P<0.05$); the expression levels of TGF-β and SMAD2 protein in the miR-146 mimic treatment group were significantly higher than those of the model group and placebo group ($P<0.05$). The qRT-PCR test results showed that the expression levels of TGF-β and SMAD2 mRNA in the model group and the placebo group were significantly lower than those of the sham operation group and miR-146 mimic treatment group ($P<0.05$); compared with the sham operation group, the expression levels of TGF-β and SMAD2 mRNA in the miR-146 mimic treatment group were lower ($P<0.05$). **Conclusion** miR-146a can promote TGF-β/SMAD2 protein expression, enhance the effect of ligament stretching and improve the ligament condition of knee joints.

Keywords: miR-146a; TGF-β/SMAD2 signaling pathway; knee joint; ligament injury

膝关节是人体承受重力最多的关节,起着重要的支撑作用[1]。膝关节韧带损伤是由膝关节和韧带超负荷受力引起。近年来,膝关节损伤发生率有增加的趋势。在膝关节韧带损伤中内侧副韧带损伤通常较严重,且伤后其愈合能力较低,若未进行及时有效的治疗会引起创伤性关节炎等膝关节疾病,导致患者需要行内侧副韧带移植[2-3]。但由于移植物来源及数量有限等缺点,故膝关节韧带损伤的治疗非常棘手。目前,转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)是较高效的促纤维化因子,创伤后一般可依靠 TGF-β 信号来促进瘢痕增生[4]。应力可调控 TGF-β1 的表达,又可激活下游的 SMAD2,并调节韧带干细胞的生长和迁移。TGF-β/SMAD2 信号通路可调控基因的转录,转录后的 mRNA 也可调控 TGF-β/SMAD2 信号传导通路的相关基因[5-6]。有研究显示,miR-146a 可改善关节损伤,其高表达可减少骨组织破坏,但由于影响内侧副韧带损伤的因素较多,miRNA 对膝关节韧带损伤的研究机制并不完善[7-8]。因此,本研究通过建立兔膝关节韧带损伤模型,探究 miR-146a 是否通过调控 TGF-β/SMAD2 信号通路对膝关节韧带损伤产生影响,以期为膝关节韧带损伤的治疗提供更有效的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择兔龄 12 周左右的雄性新西兰兔 32 只,体质量 2 ~ 2.2 kg,购自联勤保障部队第九八八医院,在 SPF 级动物房中分笼饲养,室温维持在 22 ℃ 左右,昼夜交替循环,自由摄食饮水。

1.2 试剂与仪器

石蜡切片机(德国 LETIZ 公司);光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);苏木素伊红染色试剂(北京京试化学试剂公司);戊巴比妥钠(天津药业焦作有限公司);碘伏(北京京试化学试剂公司);反转录试剂盒(TakaRa 公司);miR-146 mimic(北京英格恩生物科技有限公司)。

1.3 动物模型与分组

将 32 只兔平均分为假手术组、模型组、安慰剂组及 miR-146 mimic 组,各组兔禁食 1 d 后用于实验。造模前所有兔禁水 10 ~ 16 h。假手术组只切开皮肤并缝合,但不损伤前交叉韧带。对模型组、安慰剂组及 miR-146 mimic 组兔进行交叉韧带切断术,首先于兔耳缘静脉注射 10% 水合氨醛 3 mL/kg 进行麻醉,在兔的

右膝关节作2 cm的切口,暴露髌骨并脱离,使膝关节最大程度弯曲,暴露前交叉韧带并全部剪断,然后用生理盐水反复清洗干净,逐层缝合,建模成功。miR-146 mimic组在建模成功后3 d,关节腔内注射1 mg/kg的miR-146 mimic,连续注射4周。安慰剂组将关节腔注射液替换为等量生理盐水,其余处理与miR-146 mimic组相同。术后所有兔均正常饲养,可自由活动,每天肌肉注射1次头孢唑啉(1.0 mg/kg),连续注射3周。所有兔于术后第9周处死。

1.4 兔膝关节行为学观察

参考改良的Lequesne MG膝关节级别评估方法,对各组兔进行膝关节行为学评估(表1)。

表1 Lequesne MG评分标准

分类	等级	症状	评分
局部疼痛刺激反应	Ⅰ级	无异常疼痛应	0
	Ⅱ级	患肢收缩	1
	Ⅲ级	患肢收缩、轻微痉挛	2
	Ⅳ级	患肢收缩严重、严重痉挛	3
步态改变	Ⅰ级	患肢能正常奔跑且有力	0
	Ⅱ级	患肢不能完全奔跑,但蹬地有力	1
	Ⅲ级	患肢参与行走,但跛行明显	2
	Ⅳ级	患肢不能参与行走,不能触地、蹬地	3
关节活动度	Ⅰ级	90°以上	0
	Ⅱ级	45°~90°	1
	Ⅲ级	15°~45°	2
	Ⅳ级	15°以下	3
关节肿胀	Ⅰ级	没有肿胀,骨性标记清晰	0
	Ⅱ级	轻度肿胀,骨性标记变浅	1
	Ⅲ级	明显肿胀,骨性标记消失	2

1.5 兔膝关节大体观察

9周后停止对兔的干预,从每组兔中随机取出6只处死,随即进行解剖,观察兔膝关节的组织病理学表现,标准见表2。

表2 彭太平法组织病理学分级

分级	关节面与滑膜表现
Ⅰ级	膝关节面光滑、软骨透明,有光泽,无缺损及新生物,滑膜色泽淡红,无水肿充血表现
Ⅱ级	关节面较光滑,色泽较暗,软骨透明度低、光泽差,未见明显新生物,滑膜轻度肿胀,未见明显充血
Ⅲ级	关节面不光滑,软骨不透明、无光泽,可见明显缺损及新生物,滑膜色泽暗,水肿充血明显

1.6 内侧副韧带取材及力学测试

内侧副韧带取材:将兔处死后,取出膝关节部位及髌骨,保留好各处韧带,用纱布包裹、密封,置于-20 ℃保存,备用。内侧副韧带拉伸测试:测试前1 d取出样本,于4 ℃解冻。测试时测量内侧副韧带的长度、宽度和厚度,安装防脱夹。生物材料在应力作用下存在差异,实验前加上标准试样、卸载重复15次,预调后进行内侧副韧带拉伸试验,并计算最大位移、最大应力、最大应变和强度模量[9]。

1.7 内侧副韧带HE染色

用福尔马林将内侧副韧带组织固定72 h后进行脱钙处理,1周后进行酒精梯度脱水,最后将组织浸泡在100%的酒精中1 h。脱水后的组织放入二甲苯溶液中浸泡1 h,随后将组织置入石蜡中浸泡1 h并用石蜡包埋,切成厚度为5 μm的石蜡切片,再用热水将组织烫平后烘干。将石腊切片置入二甲苯溶液中浸泡20 min,重复2次。再次酒精梯度脱水后用蒸馏水浸泡。伊红染色后重新进行梯度脱水,并再次放入二甲苯溶液中浸泡24 h,晾干后滴入中性树脂并封固观察。

1.8 Western blot检测内侧副韧带TGF-β和SMAD2蛋白表达

分离兔内侧副韧带组织,剪成小块,按照10:1的比例加入裂解液并转入EP管中,于4 ℃以14 000 r/min的速度离心10 min,离心后弃上清;随后于95 ℃将蛋白热浴变性10 min,后置于-80 ℃冰箱封存。将用BCA试剂盒定量后的蛋白样品进行电泳,电泳后将蛋白凝胶中的蛋白转移到PVDF膜上,转膜条件为50 V、3 h。转膜后将PVDF膜浸泡于TBST缓冲液中,摇晃1 h后孵育一抗,再用5%脱脂奶粉封闭1 h。再次用TBST漂洗10 min,反复3次。于36 ℃孵育二抗2 h后,使用TBST漂洗2次,TBS漂洗1次,每次10 min。使用ECL试剂检测蛋白,在暗室进行曝光,分析蛋白的相对表达量。

1.9 qRT-PCR检测内侧副韧带TGF-β和SMAD2 mRNA的表达量

逆转录(RT)和定量聚合酶链反应(qPCR)检测各组兔内侧副韧带组织中TGF-β及SMAD2的表达情况。按照RNase free dH_2O 4.5 μL、5×RT反应缓冲液2 μL、Randam primer 0.5 μL、Oligo dT 0.5 μL、反转录酶0.5 μL、RNA 2 μL进行反转录反应。将cDNA样品分成3份,每组总cDNA样本稀释20倍,取3 μL cDNA进行PCR扩增反应。引物序列见表3。

表3 qRT-PCR引物序列

基因名称	正向/反向	引物序列
TGF-β	正向	5′-CCACCTGCAAGACCATCGAC-3′
	反向	5′-CCACCTGCAAGACCATCGAC-3′
SMAD2	正向	5′-GGTATGAAATGGCAAATCG-3′
	反向	5′-GTCGTAGCAAACCACCAAG-3′
β-actin	正向	5′-GAGGCATCCTGACCCTGAAG-3′
	反向	5′-GAGGCATCCTGACCCTGAAG-3′

1.10 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,TGF-β和SMAD2蛋白2组间比较采用t检验,数据以均数±标

准差($\bar{x} \pm s$)表示,率的比较采用χ^2检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

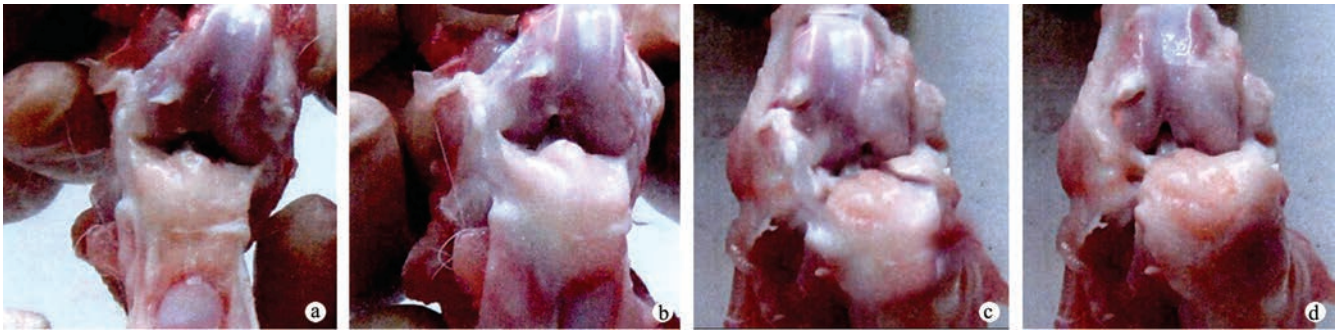
2 结果

2.1 兔膝关节行为学观察结果

假手术组、模型组、安慰剂组及 miR-146 mimic 组 Lequesne MG 评分分别为 0 分、(6.0 ± 1.10)分、(6.1 ± 1.23)分和(1.1 ± 0.47)分。模型组、安慰剂组 Lequesne MG 评分显著高于假手术组和 miR-146 mimic 组($P<0.05$),但模型组与安慰剂组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。假手术组兔膝关节无明显疼痛,可正常活动;模型组和安慰剂组兔膝关节有明显收缩情况,且行走不稳;miR-146 mimic组兔膝关节活动度有明显好转,能正常活动。

2.2 兔膝关节大体观察结果

假手术组兔膝关节软骨正常,无明显变化,且色泽光亮,软骨无缺失,关节液清澈透明,滑膜为淡红色,无充血和水肿情况发生;与假手术组兔比较,模型组及安慰剂组兔软骨裂痕明显,关节腔内液体增多,充血严重;与模型组、安慰剂组比较,miR-146 mimic 组兔关节腔内液体、骨髓组织出血及结构紊乱情况明显减少/轻,膝关节活动度明显好转,接近于假手术组(图 1)。



a:假手术组;b:模型组;c:安慰剂组;d:miR-146 mimic 组

图 1 兔膝关节大体观察

2.3 内侧副韧带拉伸试验结果

miR-146 mimic 组的最大应力和最大应变较其他组更强,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组、安慰剂组比较,假手术组和 miR-146 mimic 组最大位移明显较长,差异有统计学意义($P<0.05$),但 miR-146 mimic 组和假手术组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组、安慰剂组比较,假手术组和 miR-146 mimic 组强度模量较高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。从结果可知,模型组和安慰剂组膝关节韧带拉伸力学变化最大,miR-146 mimic 组明显好转,提示 miR-146a 可有效改善这种拉伸力学特性。

表 4 兔膝关节内侧副韧带拉伸实验数据比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	最大应力(MPa)	最大应变(%)	最大位移(mm)	强度模量(MPa)
假手术组	16.62 ± 5.21	10.15 ± 2.21	2.31 ± 0.26	316.27 ± 73.28
模型组	11.43 ± 1.72*#	7.81 ± 1.80*#	1.85 ± 0.11*#	279.17 ± 33.35*#
安慰剂组	11.51 ± 1.85*#	7.91 ± 1.87*#	1.92 ± 0.09*#	280.15 ± 34.01*#
miR-146 mimic 组	22.76 ± 3.63*	10.99 ± 0.91*	2.46 ± 0.21	308.19 ± 28.82*

*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与 miR-146 mimic 组比较,$P<0.05$

2.4 兔内侧副韧带 HE 染色结果

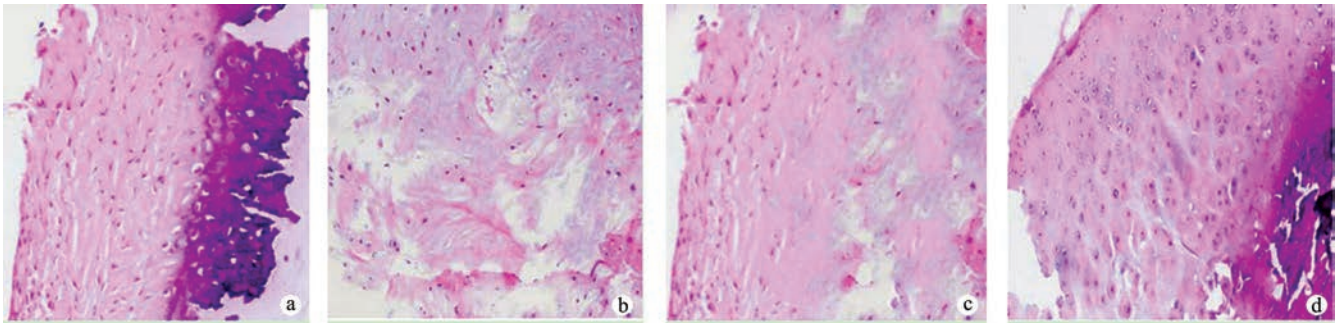
假手术组兔 HE 染色显示软骨组织完整,表面平整,细胞排列有序;模型组和安慰剂组情况相似,软骨表面有明显的磨损,组织破坏严重,细胞较少且排列紊乱;miR-146 mimic 组软骨表面较为平整且完整,软骨细胞排列规则,潮线较深且连续,见图 2。

2.5 Western blot 检测兔内侧副韧带 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达

模型组及安慰剂组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达明显低于假手术组($P<0.05$),其中模型组相对于假手术组 TGF-β 蛋白含量减少 60.5%,SMAD2 蛋白含量减少 78.3%。miR-146 mimic 组 TGF-β 蛋白和 SMAD2 蛋白表达明显高于模型组及安慰剂组($P<0.05$),其中 miR-146 mimic 组相对于安慰剂组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白含量分别增加了 59.8% 和73.2%,均接近于假手术组,见图 3。

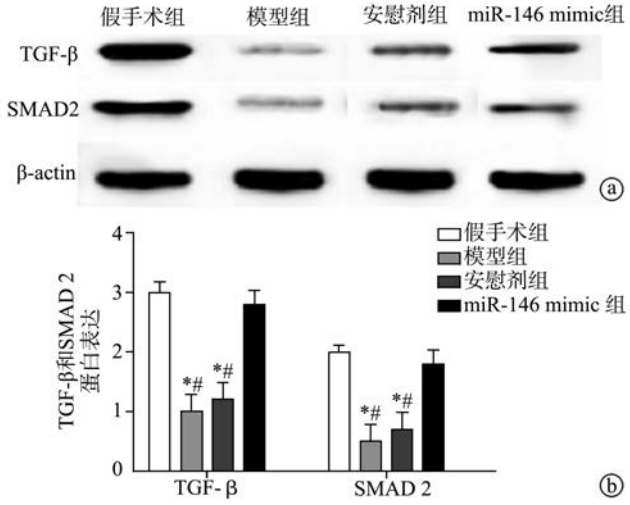
2.6 qRT-PCR 检测兔内侧副韧带 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达

与假手术组比较,模型组、安慰剂组兔内侧副韧带 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达明显较少($P<0.05$);与模型组、安慰剂组比较,miR-146 mimic 组 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达明显较多($P<0.05$),见图 4。



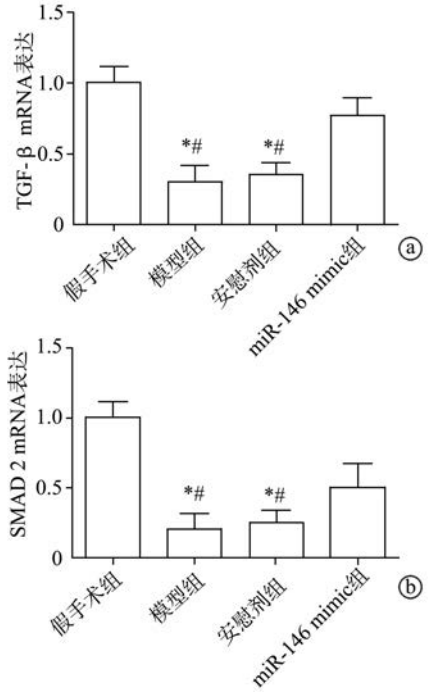
a:假手术组;b:模型组;c:安慰剂组;d:miR-146 mimic 组

图 2 兔膝关节内侧副韧带 HE 染色(×400)



a:各组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达电泳图;b:各组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达定量分析 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与miR-146 mimic 组比较,$P<0.05$

图 3 兔内侧副韧带 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达



a:各组 TGF-β mRNA 的表达定量分析;b:各组 SMAD2 mRNA 表达定量分析 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与 miR-146 mimic 组比较,$P<0.05$

图 4 兔内侧副韧带荧光检测 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达

3 讨论

膝关节前交叉韧带是纤维软骨与内侧副韧带的结合,其中内侧副韧带最薄,是常见的韧带损伤部位[10-12]。内侧副韧带损伤主要分为部分断裂和完全断裂,部分断裂为韧带实质部的局部断裂、局部血肿,会影响膝关节活动;而完全断裂为横断、斜面或纵形断裂,会导致膝关节内侧失去联系,丧失稳定性[13]。膝关节韧带的重塑一直是韧带损伤修复关注的问题。研究显示,调控 miRNA 对于韧带损伤具有一定治疗作用[14],但具体调控机制尚不清楚。本研究通过建立兔膝关节内侧副韧带损伤模型,观察 miR-146a 转录调节因子在膝关节韧带中的凋亡和分化作用,发现 TGF-β/SMAD2 信号通路能对膝关节韧带损伤的恢复起到一定的促进作用。

有研究发现,miRNA 在创伤后的修复中发挥着重要作用,相关靶基因通过调节miRNA促进细胞的增殖,从而对韧带损伤起到一定的修复作用[15]。本研究结果显示,与模型组、安慰剂组比较,miR-146 mimic 组兔患肢轻度痉挛、稍肿胀、能正常活动;miR-146 mimic 组最大应变和最大位移明显增加;膝关节韧带拉伸力学明显好转,可见 miR-146a 可有效改善这种拉伸力学特性,对内侧副韧带损伤的恢复有一定的促进作用。有研究显示 miR-146a 是先天性炎症反应的重要调节因子,与细胞凋亡有关[16];也有研究表明 miR-146a 在骨关节炎、关节软骨损伤等多种骨关节疾病中起保护作用[17-18]。因此,本研究推测 miR-146a 对内侧韧带损伤的保护作用可能通过直接或间接的方式抑制炎症因子活性。

本研究 HE 染色结果显示,模型组、安慰剂组骨髓

组织出血严重、结构紊乱;与模型组比较,miR-146 mimic 组骨髓组织出血及结构紊乱情况明显好转。qRT-PCR 及 Western blot 检测结果显示,模型组、安慰剂组 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 和蛋白表达明显较少,miR-146 mimic 组 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 和蛋白表达明显增加,表明 miR-146a 对于韧带损伤具有修复作用。Kim 等[19]的研究发现,在 TGF-β 刺激细胞后,SMAD2 蛋白形成三聚体复合物并广泛激活下游靶基因,从而促进膝关节韧带损伤的恢复。而最新的研究发现,剪切应力诱导的 miR-146a 增多还可以通过靶向胶原蛋白促进血管生成[20],在一定程度上对韧带损伤修复后血供的恢复有一定的帮助,同时也证实了本研究的结论。

综上所述,miR-146a 可促进 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达,加强韧带拉伸效果,促进膝关节韧带损伤的修复。

[参考文献]

[1] Kazennikov OV, Kireeva TB, Shlykov VY. Maintenance of human vertical posture upon asymmetric leg loading and fixation of the knee joint of one leg[J]. Hum Physiol, 2018, 44(1): 41 - 46. doi: 10.1134/S0362119718010097.

[2] Andrews K, Lu A, Mckean L, et al. Review: medial collateral ligament injuries[J]. J Orthop, 2017, 14(4): 550 - 554. doi: 10.1016/j.jor.2017.07.017.

[3] Hwang KT, Sung IH, Choi JH, et al. A higher association of medial collateral ligament injury of the knee in pronation injuries of the ankle[J]. Arch Orthop Traum Surg, 2018, 138(11): 1 - 6. doi: 10.1007/s00402 - 018 - 2907 - z.

[4] Wang W, Liu R, Su Y, et al. MicroRNA-21-5p mediates TGF-β-regulated fibrogenic activation of spinal fibroblasts and the formation of fibrotic scars after spinal cord injury[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(2): 178 - 188. doi: 10.7150/ijbs.24074.

[5] Shao JB, Gao ZM, Huang WY, et al. The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-β1 in neuroblastoma cells[J]. Int J Oncol, 2017, 50(5): 1623. doi: 10.1007/s13577 - 017 - 0163 - 0.

[6] 钱康琦,孙玉明,詹秀琴. 蛋白免疫印迹杂交法研究葛根素对成骨细胞 TGF-β1 及 Smad2/3 蛋白表达的影响[J]. 长春中医药大学学报,2013,29(1): 18 - 20. doi: 10.3969/j.issn.1007 - 4813.2013.01.008.

[7] 陈祥和,彭海霞,孙 朋,等. 不同力学刺激对 T2DM 小鼠骨中 TGF-β/Smad 途径及骨形成的影响[J]. 上海体育学院学报,2018,42(3): 99 - 106. doi: 10.16099/j.sus.2018.03.016.

[8] 陈 明,董启榕,黄 群,等. 转化生长因子-β1/Smad2/3 信号通路在 0.5 Gy X 线促进成骨细胞分化过程的作用[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(6): 1103 - 1106. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001 - 9030.2018.06.032.

[9] 朴成东,张维蛟,刘月莹. 骨性关节炎动物模型外侧副韧带的拉伸力学性质[J]. 中国组织工程研究,2009,13(46): 9097 - 9100. doi: 10.3969/j.issn.1673 - 8225.2009.46.020.

[10] Carr NJ, Bibeau F, Bradley RF. The histopathological classification, diagnosis and differential diagnosis of mucinous appendiceal neoplasms, appendiceal adenocarcinomas and pseudomyxoma peritonei[J]. Histopathology, 2017, 71(6): 94. doi: 10.1111/his.13324.

[11] Alirezazadeh P, Hejrati B, Monsef-Esfehani A. Representation learning-based unsupervised domain adaptation for classification of breast cancer histopathology images[J]. Biocybern Biomed Eng, 2018, 38(3): 86. doi: 10.1016/j.bbe.2018.04.008.

[12] Roos AK, Avins AL, Ahmed MA. Two genetic loci associated with medial collateral ligament injury[J]. Int J Sports Med, 2017, 38(7): 501 - 507. doi: 10.7150/ijms.7104.

[13] Dale KM, Bailey JR, Moorman CT. Surgical management and treatment of the anterior cruciate ligament/medial collateral ligament injured knee[J]. Clin Sports Med, 2017, 36(1): 87 - 103. doi: 10.1016/j.csm.2016.08.005.

[14] Huang X, Qiao F, Xue P. The protective role of microRNA-140-5p in synovial injury of rats with knee osteoarthritis via inactivating the TLR4/Myd88/NF-κB signaling pathway[J]. Cell Cycle, 2019, 18(18): 2344 - 2358. doi: 10.1080/15384101.2019.1647025.

[15] Xiao M, Iglinski-Benjamin KC, Sharpe O, et al. Exogenous micro-RNA and antagomir modulate osteogenic gene expression in tenocytes[J]. Exp Cell Res, 2019, 378(2): 119 - 123. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.008.

[16] Martin NA, Hyrlov KH, Elkjaer ML, et al. Absence of miRNA-146a differentially alters microglia function and proteome[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1110. doi: 10.3389/fimmu.2020.01110.

[17] Riley T, Mafi R, Mafi P. Knee ligament injury and the clinical application of tissue engineering techniques: a systematic review[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2018, 13(3): 373 - 379. doi: 10.2174/1574888X12666170915120135.

[18] Tecalcocruz AC, Ríoslópez DG, Vázquezvictorio G. Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF-β/Smad signaling pathway in health and disease[J]. Signal Transduct Tar, 2018, 3(1): 15. doi: 10.1038/s41392 - 018 - 0015 - 8.

[19] Kim CR, Kim YM, Lee MK, et al. Pyropia yezoensis peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF-β/Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(1): 31 - 38. doi: 10.3892/ijmm.2016.2807.

[20] Troidl K, Hammerschick T, Albarran-Juarez J, et al. Shear stress-induced miR-143-3p in collateral arteries contributes to outward vessel growth by targeting collagen V-α2[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(5): e126 - e137. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.313316.

(编辑:魏 源)