doi:10.11659/jjssx.08E021138

·临床研究·

膝关节骨关节炎中 miR-1271 的表达及其与 ERG 的相关性分析

俞东升,董 涛,夏洪超,徐 建 (青岛市第八人民医院骨科,山东 青岛 266555)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-1271 在膝关节骨关节炎中的表达情况及其与 E26 转录因子相关基因(ERG)的相关性。**方法** 选取我院 60 例膝关节骨关节炎患者作为 OA 组,另选取 60 例外伤导致的单纯膝关节半月板损伤患者(非 OA 组)作为对照。采用 qRT-PCR 检测膝关节滑液中 miR-1271 与 ERG 的表达水平;采用双荧光素酶报告基因实验检测 miR-1271 与 ERG 的靶向结合关系;miR-1271 与 ERG 的相关性采用 *Spearman* 分析。**结果** qRT-PCR 检测结果显示,与非 OA 组相比,OA 组 miR-1271 在膝关节骨关节炎中显著高表达($P<0.001$),而 ERG 在膝关节骨关节炎中显著低表达($P<0.001$)。OA 组关节滑液中 miR-1271 与 ERG 的表达呈负相关($r=-0.746$,$P=0.013$),非 OA 组关节滑液中 miR-1271 与 ERG 的表达也呈负相关($r=-0.723$,$P=0.024$)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与共转染 NC mimic 和 PGLO-ERG WT 细胞相比,共转染 miR-1271 mimic 和 PGLO-ERG WT 细胞的荧光强度显著降低($P<0.001$);而共转染 NC mimic 和 PGLO-ERG MUT 细胞与共转染 miR-1271 mimic 和 PGLO-ERG MUT 细胞的荧光强度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** miR-1271 在膝关节骨关节炎患者中显著高表达,而 ERG 在膝关节骨关节炎患者中显著低表达,且 miR-1271 可靶向 ERG 进行负性调控,对膝关节骨关节炎的发生发展起重要作用。

[关键词] 膝关节骨关节炎;miR-1271;E26 转录因子相关基因;双荧光素酶

[中图分类号] R593.21 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-08-27

Expression of miR-1271 in knee osteoarthritis and its correlation with ERG

YU Dong-sheng, DONG Tao, XIA Hong-chao, XU Jian (Department of Orthopedics, Qingdao Eighth People's Hospital, Qingdao Shandong 266555, China)

Abstract: Objective To explore the expression of miR-1271 in knee osteoarthritis and its correlation with E26 transformation-specific-related gene (ERG). **Methods** A total of 60 patients with knee osteoarthritis in our hospital were selected as the OA group, and another 60 patients with simple knee meniscus injury caused by trauma (the non-OA group) were selected as the control. qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-1271 and ERG in the synovial fluid of the knee joint; the dual-luciferase reporter gene assay was used to detect the targeted binding relationship between miR-1271 and ERG; the correlation between miR-1271 and ERG was analyzed by *Spearman*. **Results** The results of qRT-PCR showed that compared with the non-OA group, miR-1271 in the knee osteoarthritis of the OA group was significantly higher ($P<0.001$), while ERG in the knee osteoarthritis was significantly lower ($P<0.001$). The expression of miR-1271 in synovial fluid of the OA group was negatively correlated with ERG ($r=-0.746$, $P=0.013$), and the expression of miR-1271 in synovial fluid of the non-OA group was also negatively correlated with ERG ($r=-0.723$, $P=0.024$). The results of dual-luciferase reporter gene assay showed that compared with the co-transfected NC mimic and PGLO-ERG WT cells, the fluorescence intensity of the co-transfected miR-1271 mimic and PGLO-ERG WT cells was significantly decreased ($P<0.001$); there was no statistically significant difference in the fluorescence intensity between the co-transfected NC mimic and PGLO-ERG MUT cells and the co-transfected miR-1271 mimic and PGLO-ERG MUT cells ($P>0.05$). **Conclusion** miR-1271 is significantly highly expressed in patients with knee osteoarthritis, while ERG is significantly lowly expressed in patients with knee osteoarthritis. miR-1271 can target ERG for negative regulation, which plays an important role in the occurrence and development of knee osteoarthritis.

Keywords: knee osteoarthritis; miR-1271; E26 transformation-specific-related gene; dual-luciferase

骨关节炎是以软骨退行性变和继发骨质增生为主的骨关节疾病,多见于中老年人[1-2],但目前其具体发病机制仍未完全阐明。近年来,越来越多的研究显示,microRNAs 在骨关节炎的发病机制中具有关键性调控作用[3-5]。已有研究显示,miR-1271 在子宫内膜癌、乳腺癌、胶质瘤等疾病中具有调控细胞增殖、凋亡等作用,而E26转录因子(E26 transformation-specific,ETS)相关基因(ETS-related gene,ERG)被证明在诱导软骨细胞分化中发挥重要作用[6-8],但在膝关节骨关节炎中 miR-1271 与 ERG 的关系尚未见报道。本研究选取我院膝关节滑液标本,通过 qRT-PCR 检测样本中 miR-1271、ERG 的表达水平,双荧光素酶报告基因实验检测 miR-1271 与 ERG 的靶向结合关系,旨在为深入了解膝关节骨关节炎的发病机制并开发潜在的治疗靶点提供参考。

[基金项目] 青岛市医药科研指导计划资助项目(2017-WJZD027)

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2019年1月至2020年12月我院骨科收治的60例膝关节骨关节炎患者作为OA组,其中男29例,女31例;年龄(64.90±15.23)岁;左侧24例,右侧36例。OA组患者的诊断标准参考中华医学会骨科学分会2007年制定的骨关节炎诊治指南[9],排除合并肝肾等严重器质性疾病、过敏体质、类风湿因子阳性、精神类疾病及血沉、C反应蛋白异常患者。另选取我院同期收治的60例外伤导致的单纯膝关节半月板损伤患者(非OA组)作为对照,其中男32例,女28例;年龄(61.56±13.26)岁;左侧25例,右侧35例。2组性别、年龄、发病部位比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经我院医学伦理委员会审批(2019024),所有患者均知情同意。

1.2 主要仪器和试剂

Nanodrop微量紫外分光光度计(1011U,美国Thermo公司),C1000热循环仪(美国Bio-RAD公司),Glomax20/20 luminometer荧光检测仪(美国Promega公司)。mirVana™ miRNA分离试剂盒、TaqMan Universal PCR Master Mix试剂盒、TaqMan® MicroRNA Reverse Transcrption试剂盒(德国QIAGEN公司),双荧光素酶检测试剂盒(E1910,美国Promega公司)。转染质粒(NC-mimic、miR-1271、PGLO-ERG WT、PGLO-ERG MUT)及Oligofectamine转染试剂(上海生工生物公司)。293T细胞购自上海中科院细胞库,置于37 ℃、5% CO_2的培养箱(美国Thermo公司)中,用含10%胎牛血清(美国Gibco公司)、100 μg/mL链霉素和100 U/mL青霉素的DMEM(美国Gibco公司)培养。

1.3 方法

1.3.1 样本采集 患者取平卧位,膝关节局部消毒麻醉后,取髌上外侧入路行膝关节腔穿刺,抽取关节液约2 mL,室温下静置1 h;3 000 r/min离心20 min,去除细胞和关节组织残存碎片,取上清置于1.5 mL微量离心管中,-80 ℃冰箱保存待后续检测。

1.3.2 qRT-PCR 用Trizol法提取总RNA。采用Nanodrop微量紫外分光光度计检测提取的总RNA浓度和纯度。以U6为实验内参,设计miR-1271、ERG、U6的引物(表1)。在C1000热循环仪中使用GoScript™逆转录系统进行qRT-PCR。采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta CT}$)计算样本中miR-1271、ERG的相对表达水平。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	引物序列	
miR-1271	正向引物	5'-GAGTTAATTTTTGGTGGATGTTAGTAAGTA-3'
	反向引物	5'-TAATCACACCCCTTAACCACATAC-3'
ERG	正向引物	5'-ACCCAGCAGCTCATATCAAGGAACT-3'
	反向引物	5'-CTGCGCTCGTTCGTGGTCATGT-3'
U6	正向引物	5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'
	反向引物	5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'

1.3.3 双荧光素酶报告基因实验 利用双荧光素酶报告基因实验验证miR-1271与ERG是否存在靶向关系。分别构建靶基因ERG双荧光素酶报告基因载体以及与miR-1271结合位点的突变体:PGLO-ERG WT、PGLO-ERG MUT。将荧光素酶报告质粒分别与miR-1271 mimic和阴性对照NC mimic共转染至293T细胞中,转染12 h后,加入DMSO处理24 h,收集不同组细胞,1×PBS洗涤后使用双荧光素酶检测试剂盒的缓冲液裂解细胞,用Glomax20/20 luminometer荧光检测仪检测firefly和Renilla荧光素酶活性,以Renilla荧光素酶活性为内参,将firefly荧光素酶活性的相对表达归一化为Renilla荧光素酶活性。实验重复3次。

1.4 统计学分析

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计学分析,定量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本t检验;定性资料以计数方式表示,组间比较采用χ^2检验;miR-1271与ERG的相关性采用*Spearman*分析。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR检测结果

qRT-PCR检测结果显示,与非OA组相比,OA组miR-1271显著高表达,而ERG显著低表达,差异均有统计学意义($P<0.001$),见表2。

表2 患者miR-1271、ERG表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=60$)

组别	miR-1271	ERG
OA组	2.53±0.34	0.91±0.27
非OA组	1.54±0.67	2.01±0.42
t	7.064	8.846
P	<0.001	<0.001

2.2 *Spearman*分析关节滑液中miR-1271与ERG的相关性

*Spearman*分析结果显示:OA组关节滑液中miR-1271与ERG的表达呈负相关($r=-0.746$, $P=0.013$),且在非OA组关节滑液中miR-1271与ERG的表达也呈负相关($r=-0.723$, $P=0.024$)。提示miR-1271与ERG在关节滑液中的表达呈显著负相关。

2.3 双荧光素酶报告基因实验检测结果

与共转染 NC mimic 和 PGLO-ERG WT 细胞相比，共转染 miR-1271 mimic 和 PGLO-ERG WT 细胞的荧光强度显著降低（$P<0.001$）；而共转染 NC mimic 和 PGLO-ERG MUT 细胞与共转染 miR-1271 mimic 和 PGLO-ERG MUT 细胞的荧光强度比较差异无统计学意义（$P>0.05$），说明 miR-1271 能特异性结合并抑制 ERG 表达，见表 3。

表 3 患者双荧光素酶报告基因实验检测结果比较

项目	PGLO-ERG WT	PGLO-ERG MUT
NC mimic	0.95 ± 0.15	1.03 ± 0.25
miR-1271 mimic	0.27 ± 0.08	0.95 ± 0.19
t	10.453	0.559
P	<0.001	0.584

3 讨论

microRNA 是一种内源性非编码单链小分子 RNA，长度 20～22 nt，在转录后水平调控靶基因的表达[10-13]。microRNAs 与骨关节炎密切相关[14]。既往研究发现，microRNAs 可能通过影响软骨细胞凋亡、炎症反应和细胞外基质降解，在骨关节炎的发生和发展中发挥重要作用[14-16]。

miR-1271 定位于人染色体 5q35.2 上，与细胞增殖、侵袭、分化和凋亡等密切相关[7]。既往研究发现，miR-1271 在前列腺癌、结直肠癌、卵巢癌等肿瘤的发生和发展中起重要作用[17-18]，然而其在膝关节骨关节炎中的作用尚未见报道。本研究结果显示，与非 OA 组比较，miR-1271 在 OA 组膝关节滑液中显著高表达。有研究发现，miR-1271 可通过促进人软骨细胞凋亡，降低细胞外基质的合成[19]。以上结果提示 miR-1271 可能参与膝关节骨关节炎的发生。

ERG 作为转录因子 ETS 基因家族成员之一，定位于染色体 21q22.3，编码蛋白有 1 个与 ETS 同源的由 84 个氨基酸组成的 DNA 结合区域[6]。ERG 作为 microRNAs（如 miR-204、miR-200b-3p）的下游靶点，在细胞增殖、分化、凋亡和免疫炎症损伤等病理生理过程中起到重要作用[20-21]。ERG 被证明在诱导软骨细胞分化中发挥重要作用[6-8]，本研究结果显示，OA 组 ERG 表达水平明显低于非 OA 组，提示 ERG 可能参与膝关节骨关节炎的发生，与既往报道一致[8]。ERG 是 miR-1271的靶基因，miR-1271/ERG 信号通路与细胞增殖、凋亡有关[22]。本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-1271 与 ERG 的靶向结合作用。说明 miR-1271 可能通过 ERG 参与膝关节骨关节炎的发生和发展。

综上所述，miR-1271 在膝关节骨关节炎患者关节滑液中显著高表达，而 ERG 在膝关节骨关节炎患者关节滑液中显著低表达，且 miR-1271 可靶向 ERG 进行负性调控，可为未来膝关节骨关节炎的治疗提供新的策略。但本研究样本量有限，结果可能存在偏倚，研究结论未来还需多中心、大样本量的临床研究来证实。

[参考文献]

[1] Zheng L, Zhang Z, Sheng P, et al. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis[J]. Ageing Res Rev, 2021, 66: 101249. doi: 10.1016/j.arr.2020.101249.

[2] Boffa A, Previtali D, Di Laura Frattura G, et al. Evidence on ankle injections for osteochondral lesions and osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. Int Orthop, 2021, 45(2): 509-523. doi: 10.1007/s00264-020-04689-5.

[3] Coutinho de Almeida R, Ramos YFM, Mahfouz A, et al. RNA sequencing data integration reveals an miRNA interactome of osteoarthritis cartilage[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(2): 270-277. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213882.

[4] Reynard LN, Barter MJ. Osteoarthritis year in review 2019: genetics, genomics and epigenetics[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(3): 275-284. doi: 10.1016/j.joca.2019.11.010.

[5] Xie F, Liu YL, Chen XY, et al. Role of microRNA, lncRNA, andexosomes in the progression of osteoarthritis: a review of recent literature[J]. Orthop Surg, 2020, 12(3): 708-716. doi: 10.1111/os.12690.

[6] 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. doi: 10.1016/j.biopha.2015.10.014.

[7] Tian Y, Chen YY, Han AL. MiR-1271 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting LDHA in endometrial cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(13): 5648-5656. doi: 10.26355/eurrev_201907_18300.

[8] Yamamura K, Ohta Y, Mamoto K, et al. Effect of eldecalcitol on articular cartilage through the regulation of transcription factor Erg in a murine model of knee osteoarthritis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 179-184. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.155.

[9] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007 年版)[J]. 中华骨科杂志, 2007, 27(10): 793-796. doi: 10.3760/j.issn:0253-2352.2007.10.016.

[10] Tao SC, Yuan T, Zhang YL, et al. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model[J]. Theranostics, 2017, 7(1): 180-195. doi: 10.7150/thno.17133.

[11] Ding Y, Wang L, Zhao Q, et al. MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(2): 779-790. doi: 10.3892/ijmm.2018.4033.

[12] Zhu H, Hu Y, Wang C, et al. CircGCN1L1 promotes synoviocyte proliferation and chondrocyte apoptosis by targeting miR-330-3p and TNF-α in TMJ osteoarthritis[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 284. doi: 10.1038/s41419-020-2447-7.

[13] Li F, Yao J, Hao Q, et al. miRNA-103 promotes chondrocyte apoptosis by down-regulation of Sphingosine kinase-1 and ameliorates PI3K/AKT pathway in osteoarthritis[J]. Biosci Rep, 2019, 39(10): BSR20191255. doi: 10.1042/BSR20191255.

doi:10.11659/jjssx.09E021071

·临床研究·

早期胃癌内镜下胃黏膜剥离术完全切除后复发的风险模型构建

陈文妹,毛 苇,孔灿灿,邝继孙,邱敏霞,楼润龙 (海南省人民医院海南医学院附属海南医院消化内科,海南 海口 570300)

[摘 要] **目的** 基于列线图模型预测早期胃癌(EGC)内镜下胃黏膜剥离术(ESD)完全切除后复发的风险。**方法** 选取行ESD完全切除的EGC患者为研究对象。根据患者术后是否复发,将其分为复发组和无复发组。比较2组患者年龄、性别、BMI、吸烟史、合并高血压、合并糖尿病、胃溃疡、幽门螺旋杆菌(Hp)感染、肿瘤直径、分化程度、浸润深度、阳性淋巴结数、肿瘤部位、手术时间、术中出血量、病灶切除面积。采用*Cox*回归分析确定EGC患者ESD完全切除后复发的独立危险因素,构建列线图预测模型,并绘制受试者工作特征(*ROC*)曲线评估列线图模型的预测能力,计算曲线下面积(*AUC*)。**结果** 2组患者年龄、性别、BMI、吸烟史、合并高血压、合并糖尿病、胃溃疡、肿瘤直径、分化程度、浸润深度、肿瘤部位、手术时间、病灶切除面积比较,差异无统计学意义($P>0.05$),Hp感染、术中出血量、阳性淋巴结数比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。单因素*Cox*回归分析显示,Hp感染阳性、阳性淋巴结数≥3个、术中出血量大是EGC患者ESD完全切除后复发的危险因素;多因素*Cox*回归分析显示,Hp感染阳性、阳性淋巴结数≥3个是EGC患者ESD完全切除后复发的独立预测因素。基于两独立预测因素构建的列线图模型拟合效果良好,校正指数C-index为0.916(95% *CI*:0.882~0.951),*AUC*为0.933(95% *CI*:0.919~0.947)。**结论** Hp感染阳性、阳性淋巴结数≥3个与EGC患者ESD完全切除后复发密切相关。本研究构建的列线图模型可作为预测复发的量化工具,有助于临床制定EGC患者的个体化治疗方案,提高患者预后水平。

[关键词] 早期胃癌;内镜下胃黏膜剥离术;复发;列线图模型

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-14

Construction of risk model for recurrence of early gastric carcinoma after complete resection by endoscopic submucosal dissection

CHEN Wen-mei, MAO Wei, KONG Can-can, KUANG Ji-sun, QIU Min-xia, LOU Run-long (Department of Gastroenterology, Hainan General Hospital, Hainan Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan 570300, China)

Abstract: Objective To predict the risk of recurrence of early gastric carcinoma (EGC) after complete resection by endoscopic submucosal dissection (ESD) based on the nomogram model. **Methods** EGC patients who underwent complete resection by ESD were selected, and they were divided into the recurrence group and the non-recurrence group according to whether the patients recurred after surgery. The age, gender, BMI, smoking history, complicated with hypertension, complicated with diabetes mellitus, gastric ulcer, infection of Helicobacter

[通信作者] 毛 苇,E-mail:weim@vip.163.com

[14] Zhou ZB, Huang GX, Fu Q, et al. circRNA.33186 contributes to the pathogenesis of osteoarthritis by sponging miR-127-5p[J]. Mol Ther, 2019,27(3):531-541. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.006.

[15] Luo X, Wang J, Wei X, et al. Knockdown of lncRNA MFI2-AS1 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoarthritis progression by miR-130a-3p/TCF4[J]. Life Sci, 2020, 240: 117019. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117019.

[16] Xiao J, Wang R, Zhou W, et al. Circular RNA CSNK1G1 promotes the progression of osteoarthritis by targeting the miR-4428/FUT2 axis[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(1): 232-242. doi: 10.3892/ijmm.2020.4772.

[17] Liang HF, Zhang XZ, Liu BG, et al. Circular RNA circ-ABCB10 promotes breast cancer proliferation and progression through sponging miR-1271[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(7): 1566-1576. doi: 10.2147/346.S238513.

[18] Huang YK, Su YF, Lieu AS, et al. MiR-1271 regulates glioblastoma cell proliferation and invasion by directly targeting the CAMKK2 gene [J]. Neurosci Lett, 2020, 737: 135289. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135289.

[19] Shen S, Wu Y, Chen J, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(6): 826-836. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214786.

[20] Todorova K, Metodiev MV, Metodieva G, et al. Micro-RNA-204 participates in TMPRSS2/ERG regulation and androgen receptor reprogramming in prostate cancer[J]. Horm Cancer, 2017, 8(1): 28-48. doi: 10.1007/s12672-016-0279-9.

[21] Moh-Moh-Aung A, Fujisawa M, Ito S, et al. Decreased miR-200b-3p in cancer cells leads to angiogenesis in HCC by enhancing endothelial ERG expression[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10418. doi: 10.1038/s41598-020-67425-4.

[22] Lv YS, Wang C, Li LX, et al. Effects of circRNA_103993 on the proliferation and apoptosis of NSCLC cells through miR-1271/ERG signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(16): 8384-8393. doi: 10.26355/eurrev_202008_22635.

(编辑:贺绍梅)