doi:10.11659/jjssx.09E021017

·基础研究·

miR-142-3p 靶向 PERK/Bip 信号通路对骨关节炎模型大鼠的干预作用

魏 萌,张英民,康少英,李建伟,王振兴,陈 伟 (邯郸市中心医院骨三科,河北 邯郸 056001)

[摘 要] **目的** 探究微小 RNA-142-3p(miR-142-3p)靶向蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)/免疫球蛋白结合蛋白(Bip)信号通路对骨关节炎模型大鼠的干预作用。**方法** 选取 60 只 SPF 级雄性大鼠,随机挑选 15 只作为空白组,其余 45 只建立骨关节炎模型,最终 39 只建模成功,随机分为模型组、下调组、上调组,每组 13 只;建模成功后,空白组和模型组于膝部注射生理盐水,上调组和下调组分别于右膝关节腔内注射 miR-142-3p mimic 和 miR-142-3p inhibitor。HE 染色观察各组大鼠膝关节软骨组织病理学变化;观察并比较各组大鼠膝关节活动度、压痛阈值、热痛阈值;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平;实时荧光定量 PCR 检测转化生长因子-β(TGF-β)、Ⅰ型胶原 α1(COL1α1)、金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1)mRNA 水平;Western blot 检测 PERK/Bip 信号通路蛋白表达量。**结果** 与模型组相比,下调组 miR-142-3p 表达量降低,上调组 miR-142-3p 表达量升高,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 miR-142-3p 转染成功。通过组织病理学观察发现,空白组和上调组大鼠膝关节软骨组织完整,模型组和下调组大鼠膝关节软骨退变,正常软骨结构丧失。与空白组比较,其他各组大鼠膝关节活动度较小,压痛阈值、热痛阈值较低,IL-1β、TNF-α、TGF-β、COL1α1、TIMP1 mRNA 水平较高,PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,下调组大鼠膝关节活动度较小,压痛阈值、热痛阈值较低,IL-1β、TNF-α、TGF-β、COL1α1、TIMP1 mRNA 水平较高,PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组和下调组比较,上调组大鼠膝关节活动度较大,压痛阈值、热痛阈值较高,IL-1β、TNF-α、TGF-β、COL1α1、TIMP1 mRNA 水平较低,PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达较低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 上调骨关节炎大鼠 miR-142-3p 的表达可有效改善大鼠膝关节活动度、压痛阈值及热痛阈值,减轻炎症反应,调节滑膜纤维化标志物水平。可能的分子机制是 miR-142-3p 通过抑制 PERK/Bip 信号通路上 PERK、Bip、Caspase-9 蛋白的表达减轻炎症反应。

[关键词] PERK/Bip 信号通路;微小 RNA-142-3p;骨关节炎;炎症反应;滑膜纤维化

[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-03

Intervention effect of miR-142-3p targeting PERK/Bip signaling pathway in rats with osteoarthritis

WEI Meng, ZHANG Ying-min, KANG Shao-ying, LI Jian-wei, WANG Zhen-xing, CHEN Wei (Third Department of Orthopaedics, Handan Central Hospital, Handan Hebei 056001, China)

Abstract: Objective To investigate the intervention effect of microRNA-142-3p (miR-142-3p) targeting protein kinase R-like ER kinase (PERK) / immune globulin binding protein (Bip) signaling pathway in rats with osteoarthritis. **Methods** A total of 60 SPF male rats were selected, 15 of which were randomly selected as the blank group, and the remaining 45 rats were established for osteoarthritis model. Finally, 39 rats were successfully modeled and they were randomly divided into the model group, the down-regulated group and the up-regulated group, with 13 rats in each group. After successful modeling, the blank group and the model group were injected with normal saline in knees, and the up-regulated group and the down-regulated group were injected with miR-142-3p mimic and miR-142-3p inhibitor in the right knee cavity, respectively. Histopathological changes of knee cartilage in each group were observed by HE staining. Knee range of motion, tenderness threshold and thermal pain threshold in each group were observed and compared. Serum levels of interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of transforming growth factor-β (TGF-β), type Ⅰ collagen α1 (COL1α1) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The protein expression of PERK/Bip signaling pathway were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the expression level of miR-142-3p was decreased in the down-regulated group and increased in the up-regulated group, with statistically significant differences ($P<0.05$), indicating that miR-142-3p was successfully transfected. Through histopathological observation, it was found that the knee cartilage tissues of rats in the blank group and the up-regulated group were intact, while the knee cartilage tissues of rats in the model group and the down-regulated group were degenerated and the normal cartilage structures were lost. Compared with the blank group, the other three groups had lower knee range of motion, lower tenderness threshold and thermal pain threshold, higher levels of IL-1β, TNF-α,

[基金项目] 邯郸市科学技术研究与发展计划(1823208046ZC)

[通信作者] 陈 伟,E-mail:rma755541@21cn.com

TGF-β,COL1α1 and TIMP1 mRNA, and higher protein expression of PERK, Bip and Caspase-9, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the model group, the down-regulated group had lower knee range of motion, lower tenderness threshold and thermal pain threshold, higher levels of IL-1β, TNF-α, TGF-β, COL1α1 and TIMP1 mRNA, and higher protein expression of PERK, Bip and Caspase-9, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the model group and the down-regulated group, the up-regulated group had higher knee range of motion, higher tenderness threshold and thermal pain threshold, lower levels of IL-1β, TNF-α, TGF-β, COL1α1 and TIMP1 mRNA, and lower protein expression of PERK, Bip and Caspase-9, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** The up-regulation of miR-142-3p expression in rats with osteoarthritis can effectively improve the knee range of motion, tenderness threshold and thermal pain threshold, alleviate the inflammatory response, and regulate the levels of synovium fibrosis markers. The possible molecular mechanism is that miR-142-3p alleviates inflammation response by inhibiting the protein expression of PERK, Bip, and Caspase-9 in the PERK/Bip signaling pathway.

Keywords: PERK/Bip signaling pathway; miR-142-3p; osteoarthritis; inflammatory response; synovial fibrosis

骨关节炎是一种慢性致残性关节疾病,临床症状为关节痛、关节僵硬、关节功能障碍等[1]。有研究显示,骨关节炎在肥胖、中老年、超负荷运动人群中发病率较高,且多见于女性[2]。目前临床治疗此病多采取药物治疗,但疗效不佳,故寻找更好的替代疗法成为了亟需解决的问题[3]。微小 RNAs(miRNAs)是一种单链内源性表达的、较小的非编码 RNA,广泛存在于动植物及病毒中[4]。miRNAs 在疾病的发生发展过程中起关键作用,且具有治疗疾病的潜力[5-6]。miR-142-3p 是调节炎症通路的新因子,可抑制软骨细胞的凋亡[7]。有研究发现,miR-142-3p 在骨关节炎中表达异常[8],而其异常表达可能为骨关节炎的早期诊断和治疗提供帮助。由于骨关节炎患者较高的致残率,早期诊断和后期干预治疗具有重要意义。miR-142-3p 有望成为较理想的骨关节炎相关标志物,但是目前关于 miR-142-3p 如何干预骨关节炎的分子机制及其参与的信号通路尚不清楚。故本研究建立骨关节炎大鼠模型,通过调控 miR-142-3p 的表达,探究其对骨关节炎模型大鼠的干预作用,以期为骨关节炎的早期诊断、疾病监测和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

研究动物:60 只 SPF 级健康雄性大鼠,由四川省疾病预防控制中心提供[动物许可证号:SYXK(川)2020-229],鼠龄 7 ~ 8 周,平均(7.63 ± 0.65)周;体质量 217 ~ 249 g,平均(232.29 ± 21.07)g。所有大鼠均于室温(22 ~ 24)℃、湿度 40% ~ 70%、自然光照及通风、无病原菌的干净笼子中饲养,水和食物均经消毒,按统一标准饲养,允许自由活动,饲养 1 周。本实验经我院伦理委员会批准(批准号:HD-DWLL-2019-023)。

主要试剂:miR-142-3p mimic 和 miR-142-3p inhibitor 由南通百奥迈科生物技术有限公司合成;白细胞介素 1β(interleukin 1β,IL-1β)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒购自杭州铂赛生物科技有限公司(批号:BSH2021351A);肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)ELISA 试剂盒购自上海韵泰信息科技有限公司(批号:YT202110831);小鼠抗大鼠蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase,PERK)、免疫球蛋白结合蛋白(immune globulin binding protein,Bip)抗体购自上海西格生物科技有限公司(批号:XGK202145、XGK202157);小鼠抗大鼠 Caspase-9 抗体购自武汉益普生物科技有限公司(批号:ATA25899-53)。

1.2 方法

1.2.1 建模及分组 在 60 只大鼠中随机挑选 15 只作为空白组(空白组自然生长不做处理),其余 45 只大鼠采用前交叉韧带横断术诱导骨关节炎产生,建立骨关节炎大鼠模型:在全身麻醉下作内侧髌旁切口,将髌骨脱位,露出右膝关节,采用显微剪刀切断前交叉韧带,进行前抽屉试验以确保切断成功,复位髌骨后,依次缝合关节囊和皮肤,术后大鼠置于可自由活动的笼子中。建模过程中脱失 6 只,前抽屉试验呈阴性,剩余 39 只大鼠进行前抽屉试验均呈阳性,最终 39 只大鼠建模成功,随机分为模型组、下调组、上调组,每组 13 只。上调组大鼠膝部注射 miR-142-3p mimic,下调组大鼠尾部注射 miR-142-3p inhibitor,剂量均为 100 ng/mg。空白组、模型组大鼠膝部注射等剂量生理盐水。

1.2.2 miR-142-3p 转染效率鉴定 在 miR-142-3p 转染完成 24 h 后,采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-142-3p 的转染效率,每组随机选取 5 只大鼠,使用 6% 水合氯醛(6 mL/kg)腹腔麻醉后处死,取膝关节软骨组织并提取 RNA,逆转录获得 cDNA。以 U6 为内参,miR-142-3p 上游序列:5'-CGCCGTGTAGTGTTTCCTAC-3',下游序列:5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 上游序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游序列:5'-CGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.3 HE 染色 采用6%水合氯醛(6 mL/kg)腹腔麻醉各组大鼠,在右膝处切开皮肤,分离皮下筋膜组织,取其右侧膝关节新鲜软骨组织,以生理盐水冲洗,4%多聚甲醛固定,采用 HE 试剂盒对各组大鼠的右侧膝关节软骨组织样本进行染色,显微镜下观察膝关节软骨组织病理学变化。

1.2.4 膝关节活动度、压痛阈值、热痛阈值检测 观察并比较各组大鼠膝关节活动度,其中空白组10只,模型组、上调组、下调组各8只,采用 YLS-3E 电子压痛仪测定各组大鼠压痛阈值,采用足底热痛测试仪测定大鼠两侧足后趾热痛阈值,以大鼠疼痛后嘶鸣作为痛阈指标,压痛阈值、热痛阈值均测定3次,每次间隔5~10 min,取均值。

1.2.5 ELISA 检测 采集各组大鼠腹动脉血2 mL,离心分离血清,参照 IL-1β、TNF-α 的 ELISA 试剂盒说明书吸取上清液进行加样及后续操作。实验步骤:制作标准品,按照梯度稀释标准品;对应板孔中加入100 μL 标准品工作液或样本,37 ℃孵育2 h 后立即加入100 μL 生物素化抗体工作液;反应板洗涤3次,每孔加抗体工作液 100 μL,35 ℃温育 45 min;将100 μL TMB 溶液加入反应孔,35 ℃反应 45 min,加入终止液,采用酶标仪检测上述指标水平(颜色深浅与上述指标水平成正比)。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 待测血清采用 Trizol 法进行总 RNA 提取,并使用核酸蛋白检测仪进行浓度检测;逆转录后进行 PCR,依次加入 Mix 10 mL、上游引物1 mL、下游引物1 mL、RNAase free 水7 mL、cDNA 1 mL,每管 20 mL。转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)上游引物:5'-TGCACCGCAA-CAACGCAATCT-3',下游引物:5'-TTCTGGCACTGCTTC-CCGAATG-3';Ⅰ型胶原α1(collagen type Ⅰα1,COL1α1)上游引物:5'-TTGGTCCTGCTGGCAAGAATGG-3',下游引物:5'-TCTGTCACCTTGTTCGCCTGTC-3';金属蛋白酶组织抑制因子1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1,TIMP1)上游引物:5'-TGTTTCCCTGTTCAGCCATCCC-3',下游引物:5'-GGTAGCCCTTCTCAGAGCCCAT-3';内参 GAPDH 上游引物:5'-AGGTTGTCTCCTGTGACTTCAA-3',下游引物:5'-CTGTTGCTGTAGCCATATTCATTG-3'。PCR 反应条件:预变性95 ℃ 5 min,94 ℃ 20 s,56 ℃ 20 s,72 ℃ 1 min,40个循环;72 ℃终末延伸6 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 TGF-β、COL1α1、TIMP1 的相对表达量。

1.2.7 Western blot 在各组膝软骨组织研磨匀浆样本中加入蛋白提取液提取总蛋白,采用 BCA 法对 PERK/Bip 信号通路蛋白进行定量检测,取 10 μL 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,加入适量一抗(兔源 PERK、Bip、Caspase-9)封闭,4 ℃过夜孵育,TBST 洗涤标本,加入适量二抗(羊抗兔 IgG)室温孵育1 h,各组标本洗膜,加入等体积化学发光液 A 液、B 液与 PAGE 膜反应,曝光显影,内参蛋白为 GAPDH。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD-t* 检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率鉴定

与空白组相比,其他各组大鼠 miR-142-3p 表达量较低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,下调组 miR-142-3p 表达量较低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组和下调组比较,上调组 miR-142-3p 表达量较高,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示 miR-142-3p 转染成功,见表1。

表1 转染效率鉴定($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	miR-142-3p 表达量
空白组	1.16±0.35
模型组	0.83±0.22*
下调组	0.51±0.11*#
上调组	1.05±0.26*#△
F	4.277
P	0.003

*:与空白组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与下调组比较,$P<0.05$

2.2 各组大鼠膝关节软骨组织病理学观察

空白组大鼠膝关节软骨组织清晰、完整;模型组、下调组大鼠软骨退变,软骨面减少,正常软骨结构丧失;上调组大鼠软骨形态、结构明显恢复,见图1。

2.3 各组大鼠膝关节活动度、压痛阈值、热痛阈值比较

与空白组比较,其他各组大鼠膝关节活动度较小,压痛阈值、热痛阈值较低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,下调组大鼠膝关节活动度较小,压痛阈值、热痛阈值较低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组和下调组比较,上调组大鼠膝关节活动度较大,压痛阈值、热痛阈值较高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

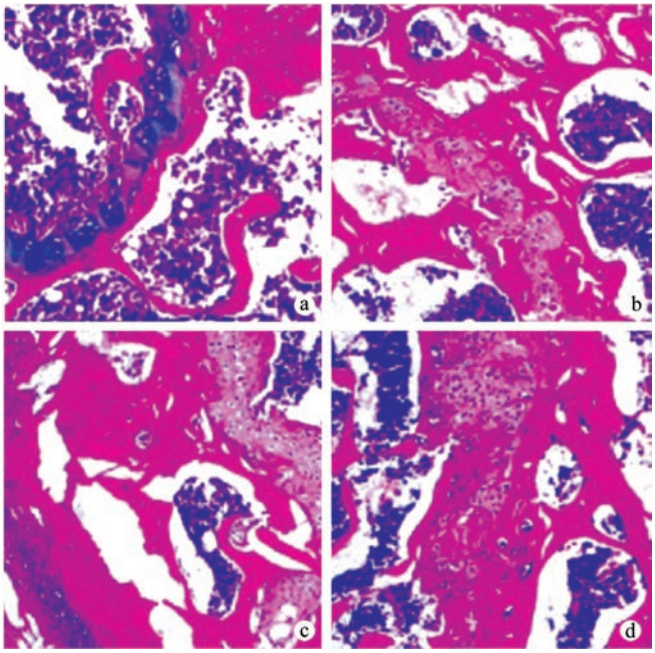
2.4 各组大鼠炎症因子水平比较

与空白组比较,其他各组大鼠 IL-1β、TNF-α 水平较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,下调组大鼠 IL-1β、TNF-α 水平较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组和下调组比较,上调组大

鼠 IL-1β、TNF-α 水平较低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.5 各组大鼠滑膜纤维化标志物 mRNA 比较

与空白组比较,其他各组大鼠 TGF-β、COL1α1、TIMP1 mRNA 水平较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,下调组大鼠 TGF-β、COL1α1、TIMP1 mRNA 水平较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组和下调组比较,上调组大鼠 TGF-β、COL1α1、TIMP1 mRNA 水平较低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表4。



a:空白组;b:模型组;c:下调组;d:上调组

图1 各组大鼠膝关节软骨组织病理学观察(HE×100)

表2 各组大鼠膝关节活动度、压痛阈值、热痛阈值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	膝关节活动度/°	压痛阈值/g	热痛阈值/g
空白组	10	142.56±14.27	508.59±50.87	9.86±0.99
模型组	8	105.87±10.59*	427.61±42.78*	7.14±0.72*
下调组	8	87.34±8.75*#	369.47±36.97*#	6.53±0.67*#
上调组	8	123.49±12.35*#△	483.56±48.37*#△	9.25±0.94*#△
F		6.755	5.300	6.665
P		<0.001	<0.001	<0.001

*:与空白组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与下调组比较,$P<0.05$

表3 各组大鼠炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$,ng/L)

组别	n	IL-1β	TNF-α
空白组	10	88.46±8.87	43.59±4.38
模型组	8	121.75±12.18*	61.72±6.19*
下调组	8	159.36±15.94*#	93.86±9.41*#
上调组	8	93.58±9.37*#△	48.12±4.82*#△
F		10.060	12.240
P		<0.001	<0.001

*:与空白组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与下调组比较,$P<0.05$

2.6 各组大鼠 PERK/Bip 信号通路蛋白表达比较

与空白组比较,其他各组大鼠 PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,下调组大鼠 PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达较高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组和下调组比较,上调组大鼠 PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达较低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表5、图2。

表4 各组大鼠滑膜纤维化标志物 mRNA 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF-β	COL1α1	TIMP1
空白组	10	1.08±0.11	1.13±0.12	1.27±0.13
模型组	8	2.43±0.25*	3.49±0.35*	2.54±0.25*
下调组	8	3.48±0.35*#	4.28±0.44*#	3.19±0.33*#
上调组	8	1.46±0.15*#△	1.42±0.13*#△	1.51±0.16*#△
F		15.000	17.630	12.960
P		<0.001	<0.001	<0.001

*:与空白组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与下调组比较,$P<0.05$

表5 各组大鼠 PERK/Bip 信号通路蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PERK	Bip	Caspase-9
空白组	10	0.56±0.05	0.89±0.09	0.49±0.05
模型组	8	0.97±0.09*	1.16±0.12*	0.72±0.08*
下调组	8	1.34±0.15*#	1.49±0.15*#	0.96±0.11*#
上调组	8	0.68±0.07*#△	0.97±0.09*#△	0.58±0.06*#△
F		11.280	8.408	5.578
P		<0.001	<0.001	<0.001

*:与空白组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与下调组比较,$P<0.05$

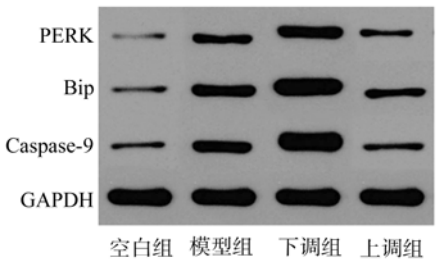


图2 PERK/Bip 信号通路蛋白

3 讨论

目前对于骨关节炎的发病机制尚无统一定论,有研究认为其发病可能与某些基因表达调控紊乱密切相关,其中 miRNAs 在骨关节炎发病及进展中所起到的关键作用被广泛接受[9-10]。研究显示,miR-9-5p、miR-424-59在骨关节炎软骨中表达异常,miRNAs 可能作为一种调控基因在骨关节炎的病理发展过程中起作用,在骨关节炎的早期诊断及治疗中具有重要意义[11-12]。有研究显示,过表达 miR-142-3p 可抑制 IL-1、IL-6 等水平,促进软骨细胞增殖,抑制细胞凋亡,其可作为治疗骨关节炎的潜在分子靶点[13]。也有研究显示,miR-142-3p 在关节炎患者中呈低表达,上调 miR-142-3p 的表达可降低成纤维样滑膜细胞活性,促

进其凋亡,从而改善滑膜细胞功能,促进病情恢复[14]。本研究表明,在骨关节炎模型大鼠中,上调 miR-142-3p 表达可增加大鼠膝关节活动度,提高压痛阈值、热痛阈值,并降低炎症因子 IL-1β、TNF-α 表达水平,从而减轻炎症反应,促进膝关节功能恢复。

临床实践证实,TGF-β 是转化生长因子超家族的多功能细胞因子,其主要功能是调节炎症过程,在软骨的形成、维持、修复过程中起关键作用;COL1α1 可直接参与Ⅰ型胶原蛋白的合成,在组织纤维化、韧带损伤、软骨破坏等多种病理过程中起关键作用;TIMP1 是基质金属蛋白酶抑制剂家族主要成员之一,可维持软骨结构完整[15-17]。张力等[18]的研究显示,膝骨关节炎模型大鼠使用膝痹宁治疗后,TGF-β、COL1α1、TIMP1 水平较低,可能是由于膝痹宁可有效减轻膝骨关节滑膜纤维化,从而改善膝关节功能[16]。在本研究中,上调 miR-142-3p 可有效抑制滑膜组织中 TGF-β、COL1α1、TIMP1 表达,缓解滑膜组织纤维化,从而有利于疾病恢复。

PERK/Bip 信号通路是经典的信号通路之一,其中 PERK、Bip、Caspase-9 为该通路常见因子[19]。PERK 是内质网膜蛋白,炎症因子 IL-1β、TNF-α 异常升高会活化 PERK,PERK 活化后会促使 Bip 的激活态,进而导致 PERK/Bip 信号通路及 Caspase-9 被激活,而活化的 Caspase-9 可启动细胞凋亡程序,导致软骨退变[20]。有研究显示,在骨关节炎模型大鼠中,PERK、Bip 蛋白表达量升高,从而诱导膝关节炎症反应、激活 PERK/Bip 信号通路,导致关节软骨退变,进而造成骨关节炎[21]。还有研究显示,使用中药治疗骨关节炎可抑制 PERK/Bip、Wnt/β-catenin 等信号通路及 IL-4、TNF-α 等炎症因子的表达,调控软骨细胞转录,从而减轻软骨组织损伤[22]。PERK/Bip 信号通路在骨关节炎内质网应激反应引起软骨细胞凋亡过程中起重要的调控作用。在应激反应发生时,Bip 蛋白使 PERK 胞浆区的蛋白激酶活化,进一步磷酸化 elF-2α,导致异常蛋白产生减少,并高表达 Bip 等分子伴侣,从而减轻内质网应激反应,阻止软骨细胞凋亡和软骨退变[23-24]。在本研究中,上调 miR-142-3p 可以抑制炎症因子 IL-1β、TNF-α 的表达;下调 miR-142-3p 可以提高炎症因子 IL-1β、TNF-α 的表达,从而活化 PERK 蛋白激活 Bip 信号通路;因此,上调 miR-142-3p 可能通过降低 PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达抑制 PERK/Bip 信号通路,减轻骨关节炎大鼠软骨损伤,改善其临床症状,提示 PERK/Bip 信号通路是治疗骨关节炎的一个作用靶点。

综上所述,上调 miR-142-3p 可明显抑制骨关节炎大鼠 PERK、Bip、Caspase-9 蛋白表达,减轻炎症反应,改善膝关节活动度,提高压痛阈值、热痛阈值,修复膝关节组织损伤,其作用机制可能与抑制 PERK/Bip 信号通路活性相关,为临床骨关节炎的诊治提供了新思路。但目前尚无研究阐明 miR-142-3p、PERK/Bip 信号通路与骨关节炎的关系,还需进一步研究证实。

[参考文献]

[1] 董 进,韩 瑞,宋少辉,等. 膝关节骨性关节炎软骨损伤的 MRI 形态评分及 T2 值变化与临床表现的相关性[J]. 中国现代医学杂志,2019,29(4):69-72. doi:10.3969/j.issn.1005-8982.2019.04.015.

[2] 朱 芮,袁普卫,董 博,等. 近五年来膝骨关节炎的针灸治疗概况[J]. 中国医药导报,2021,18(13):35-38.

[3] 肖勇洪,王 蕊. 中西医结合治疗骨关节炎研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2021,30(13):1470-1474. doi:10.3969/j.issn.1008-8849.2021.13.024.

[4] Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell,2004,116:281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.

[5] Xie Y, Zinkle A, Chen L, et al. Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair [J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(10):547-564. doi:10.1038/s41584-020-0469-2.

[6] 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.

[7] Li JT, Zeng N, Yan ZP, et al. A review of applications of metabolomics in osteoarthritis[J]. Clin Rheumatol,2021,40(7):2569-2579. doi:10.1007/s10067-020-05511-8.

[8] Wang X, Guo Y, Wang C, et al. MicroRNA-142-3p inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting HMGB1 [J]. Inflammation,2016,39(5):1718-1728. doi:10.1007/s10753-016-0406-3.

[9] 石淇允,谭旭仪,李无阴,等. 基于网络药理学独活寄生汤治疗膝骨关节炎的分子机制[J]. 中国药理学通报,2021,37(5):704-709. doi:10.3969/j.issn.1001-1978.2021.05.020.

[10] Dong Z, Jiang H, Jian X, et al. Change of miRNA expression profiles in patients with knee osteoarthritis before and after celecoxib treatment [J]. J Clin Lab Anal,2019,33(1):e22648. doi:10.1002/jcla.22648.

[11] 王 汉,庞士龙,赵晓宇. miR-9-5p 和 miR-125 b-5p 在膝关节骨性关节炎软骨中的表达及意义[J]. 广东医学,2021,42(2):211-215. doi:10.13820/j.cnki.gdyx.20192522.

[12] Latourte A, Kloppenburg M, Richette P. Emerging pharmaceutical therapies for osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(12): 673-688. doi:10.1038/s41584-020-00518-6.

[13] 容伟明,袁长深,段 戡,等. 多芯片联合分析骨关节炎的分子机制[J]. 中国组织工程研究,2021,25(26):4223-4229. doi:10.12307/2021.125.

[14] 吴 洁,马 玲,付冬冬,等. 调控类风湿关节炎 PBMC 中 miR-142-3p的表达对 ADAM17 表达及成纤维样滑膜细胞活性的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2020,55(6):844-848. doi:10.13705/j.issn.1671-6825.2019.09.162.

[15] 马 静,邹 宁. TGF-β/Smad 信号通路在骨关节炎中作用的研究进展[J]. 中华地方病学杂志,2021,40(3):253-258. doi:10.3760/cma.j.cn231583-20200914-00240.

[16] Hunter DJ, March L, Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a Lancet Commission[J]. Lancet, 2020, 396(10264):1711-1712. doi:10.1016/S0140-6736(20)32230-3.

doi:10.11659/jjssx.10E021015

·基础研究·

lncRNA BLACAT1 在下咽鳞状细胞癌中介导自噬调控肿瘤细胞的化疗敏感性

迪丽努尔·尼加提,杨 娜,古丽娜尔·吐尔地 (新疆维吾尔自治区人民医院放疗中心,新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] **目的** 探究长链非编码 RNA(lncRNA)膀胱癌相关转录因子 1(BLACAT1)对下咽鳞状细胞癌(HSCC)细胞株顺铂(DDP)敏感性的影响及其作用机制。**方法** 采用 qRT-PCR 检测 40 例 HSCC 患者的癌组织、癌旁组织、HSCC 细胞株 FaDu 及 DDP 耐药细胞株 FaDu/DDP 中 lncRNA BLACAT1 的表达水平,CCK-8 检测经不同浓度 DDP 处理后 FaDu 细胞和 FaDu/DDP 细胞的存活率。分别转染 siRNA-BLACAT1 序列和 siRNA 阴性对照至 FaDu/DDP 细胞中,记为 si-BLACAT1 组和 si-NC 组,以未转染的 FaDu/DDP 细胞作为对照组,qRT-PCR 验证转染效果,CCK-8 检测转染后经不同浓度 DDP 处理的 FaDu/DDP 细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡率,透射电子显微镜观察细胞自噬情况,免疫荧光染色测定 LC3B 荧光斑点的形成情况,Western blot 检测细胞自噬相关蛋白的表达。**结果** HSCC 组织中 lncRNA BLACAT1 mRNA 相对表达量显著高于癌旁组织($P<0.01$);FaDu/DDP 细胞中 lncRNA BLACAT1 mRNA 相对表达量高于 FaDu 细胞($P<0.05$)。si-BLACAT1 组细胞 lncRNA BLACAT1 mRNA 相对表达量低于对照组和 si-NC 组($P<0.05$);当 DDP 作用浓度在 6.25 μmol/L 及以上时,FaDu/DDP 细胞存活率高于 FaDu 细胞($P<0.05$),si-BLACAT1 + DDP 组细胞存活率低于 DDP 组和 si-NC + DDP 组($P<0.05$)。与对照组比较,DDP 组和 si-NC + DDP 组 FaDu/DDP 细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 DDP 组和 si-NC + DDP 组比较,si-BLACAT1 + DDP 组细胞凋亡率也升高($P<0.05$)。对照组有一些自噬体和自噬溶酶体形成,DDP 组和 si-NC + DDP 组自噬溶酶体形成较多,而 si-BLACAT1 + DDP 组细胞中未观察到自噬体及自噬溶酶体。DDP 组和 si-NC + DDP 组细胞内 LC3B 荧光斑点数较对照组增加($P<0.05$);si-BLACAT1 + DDP 组细胞内 LC3B 荧光斑点数较 DDP 组和 si-NC + DDP 组均减少($P<0.05$)。与对照组比较,DDP 组和 si-NC + DDP 组 FaDu/DDP 细胞中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平上调,Beclin-1蛋白表达量上升,p62 蛋白表达量下降($P<0.05$);与 DDP 组和 si-NC + DDP 组比较,si-BLACAT1 + DDP 组细胞中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平下调,Beclin-1 蛋白表达量下降,p62 蛋白表达量上升($P<0.05$)。**结论** lncRNA BLACAT1 在 HSCC 组织及 DDP 耐药细胞株 FaDu/DDP 中高表达,下调 lncRNA BLACAT1 能够提高 HSCC 细胞对 DDP 的敏感性,其作用机制可能通过抑制自噬水平实现。

[关键词] 下咽鳞状细胞癌;lncRNA BLACAT1;自噬;化疗敏感性;头颈癌

[中图分类号] R73-3;R739.63 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-10-08

lncRNA BLACAT1 mediating autophagy in hypopharyngeal squamous cell carcinoma to modulate the chemosensitivity of tumor cells

Dilinuer·Nijiati, YANG Na, Gulinaer·Tuerdi (Center of Radiotherapy, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumchi Xinjiang 830000, China)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2018D01C251)

[通信作者] 古丽娜尔·吐尔地,E-mail:52576537@qq.com

[17] Vincent TL. Peripheral pain mechanisms in osteoarthritis[J]. Pain, 2020,161 (Suppl 1):S138 - S146. doi:10.1097/j.pain.0000000000001923.

[18] 张 力,黄正泉,李晓辰,等.膝痹宁对膝骨关节炎模型大鼠滑膜纤维化的影响[J].时珍国医国药,2020,31(1):29 - 32.

[19] 李炳亮,王 建,杨 娅.4-苯基丁酸抑制 PERK/Bip 信号通路缓解骨关节炎大鼠内质网应激[J].解剖科学进展,2020,26(6):673 - 676. doi:10.16695/j.cnki.1006 - 2947.2020.06.015.

[20] Precerutti M, Formica M, Bonardi M, et al. Acromioclavicular osteoarthritis and shoulder pain:a review of the role of ultrasonography[J]. J Ultrasound,2020,23(3):317 - 325. doi:10.1007/s40477 - 020 - 00498 - z.

[21] 崔 璀,朱 悦,王正大.骨细胞分化增殖凋亡及内质网应激信号通路特异性蛋白表达实验研究[J].广东医学,2019,40(15):2139 - 2142. doi:10.13820/j.cnki.gdyx.20190604.

[22] 张璐瑶,刘 维.中药治疗骨关节炎作用机制的研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(12):1901 - 1904.

[23] Zhang P, McGrath B, Li S, et al. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas[J]. Mol Cell Biol,2002,22(11):3864 - 3874. doi:10.1128/MCB.22.11.3864 - 3874.2002.

[24] Wang FM, Galson DL, Roodman GD, et al. Resveratrol triggers the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response and represses pro-survival XBP1 signaling in human multiple myeloma cells[J]. Exp Hematol,2011,39(10):999 - 1006. doi:10.1016/j.exphem.2011.06.007.

(编辑:魏 源)