doi:10.11659/jjssx.05E022009

·基础研究·

LncRNA ZFAS1 影响骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的机制研究

吴 昊[1],黄 震[2],李 磊[2] (1.恩施州中心医院关节外科,湖北 恩施 445000;2.恩施慧宜中西医结合风湿医院骨与关节外科,湖北 恩施 445000)

[摘 要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)锌指蛋白反义链 1(ZFAS1)在骨关节炎(OA)中的作用及其潜在分子机制。**方法** 将于恩施州中心医院进行膝关节置换术的 OA 患者软骨组织样本作为 OA 组,将同期外伤急诊截肢患者的正常膝关节组织样本作为对照(Control)组,RT-qPCR 实验检测 OA 软骨组织中 lncRNA ZFAS1 和 miR-590 的表达。将 Vector 和 pcDNA-ZFAS1 转染到原代软骨细胞后,MTT 实验和流式细胞术分别检测 OA 软骨细胞增殖和凋亡情况。双荧光素酶报告基因实验分别验证 ZFAS1 和 miR-590 以及 miR-590 和转化生长因子-β 受体 2(TGFβR2)的靶向关系。将 miR-590 mimic 或 NC mimic 与 Vector 和 pcDNA-ZFAS1 共转染到原代软骨细胞,检测细胞增殖和凋亡,RT-qPCR 实验检测软骨细胞中 TGFβR2 mRNA 表达水平,Western blot 检测软骨细胞中 TGFβR2 蛋白的表达。**结果** 与 Control 组比较,OA 组软骨组织中的 lncRNA ZFAS1 表达显著下调($P<0.05$),miR-590 表达显著上调($P<0.05$)。与Vector组比较,pcDNA-ZFAS1 组软骨细胞中 lncRNA ZFAS1 表达水平显著升高,miR-590 表达水平显著降低,软骨细胞增殖能力增强,细胞凋亡率降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。MiR-590 与 ZFAS1 存在互补的结合位点,TGFβR2 与 miR-590 也存在互补的结合位点。与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 和 3'UTR-ZFAS1-WT 共转染组的细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),而 miR-590 mimic 和 3'UTR-ZFAS1-MUT 共转染组的细胞荧光素酶活性无统计学差异($P>0.05$)。此外,与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 和 3'UTR-TGFβR2-WT 共转染组的细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$)。与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 组细胞中 TGFβR2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与 pcDNA-ZFAS1 + NC mimic 组比较,pcDNA-ZFAS1 + miR-590 mimic 组软骨细胞中 miR-590 表达水平显著升高,软骨细胞增殖能力减弱,细胞凋亡率升高,TGFβR2 mRNA和蛋白的表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** LncRNA ZFAS1 通过调控 miR-590/TGFβR2 轴促进 OA 中软骨细胞增殖,并抑制细胞凋亡。

[关键词] 骨关节炎;软骨细胞;lncRNA ZFAS1;凋亡;增殖
[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-05-05

Mechanism of lncRNA ZFAS1 affecting proliferation and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes

WU Hao[1], HUANG Zhen[2], LI Lei[2] (1. Department of Joint Surgery, Enshi Central Hospital, Enshi Hubei 445000, China; 2. Department of Bone and Joint Surgery, Enshi Huiyi Rheumatology Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Enshi Hubei 445000, China)

Abstract: Objective To explore the role of long non-coding RNA (lncRNA) zinc finger protein antisense strand 1 (ZFAS1) in osteoarthritis (OA) and its underlying molecular mechanism. **Methods** Cartilage tissue samples of OA patients who underwent knee replacement

[基金项目] 湖北省卫生健康委科研立项项目(WJ2019H466)
[通信作者] 李 磊,E-mail:Ming_0429@163.com

[17] Kim SH, Jun JH, Oh JE, et al. Renoprotective effects of dexmedetomidine against ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0198307. doi: 10.1371/journal.pone.0198307.
[18] Meng L, Li LY, Lu S, et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF-κB and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. Mol Immunol, 2018, 94: 7 - 17. doi: 10.1016/j.molimm.2017.12.008.
[19] Kim SH, Jun JH, Oh JE, et al. Dexmedetomidine alleviates hepatic ischaemia-reperfusion injury via the PI3K/AKT/Nrf2-NLRP3 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(21): 9983 - 9994. doi: 10.1111/jcmm.16871.
[20] Chen YP, Feng XJ, Hu XY, et al. Dexmedetomidine ameliorates acute stress-induced kidney injury by attenuating oxidative stress and apoptosis through inhibition of the ROS/JNK signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 4035310. doi: 10.1155/2018/4035310.
[21] Yun SH, Choi YS. The effects of dexmedetomidine administration on postoperative blood glucose levels in diabetes mellitus patients undergoing spinal anesthesia: a pilot study[J]. Anesth Pain Med, 2016, 6(6): e40483. doi: 10.5812/aapm.40483.
[22] Wu ZL, Davis JRJ, Zhu Y. Dexmedetomidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by ameliorating oxidative stress and cell apoptosis through the trx1-dependent Akt pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 8979270. doi: 10.1155/2020/8979270.

(编辑:贺绍梅)

in Enshi Central Hospital were taken as the OA group, and normal knee joint tissue samples of trauma patients who underwent emergency amputation during the same period were taken as the Control group. The expression of lncRNA ZFAS1 and miR-590 in OA cartilage were detected by RT-qPCR assay. After Vector and pcDNA-ZFAS1 were transfected into primary chondrocytes, MTT assay and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of OA chondrocytes. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship of ZFAS1 and miR-590, as well as miR-590 and transforming growth factor-beta receptor type 2 (TGFβR2), respectively. MiR-590 mimic or NC mimic was co-transfected with Vector and pcDNA-ZFAS1 into primary chondrocytes to detect cell proliferation and apoptosis; RT-qPCR assay was used to detect the expression level of TGFβR2 mRNA in chondrocytes, and Western blot was used to detect the expression of TGFβR2 protein in chondrocytes. **Results** Compared with the Control group, the expression of lncRNA ZFAS1 in cartilage tissue in the OA group was significantly down-regulated, and the expression of miR-590 was significantly up-regulated ($P<0.05$). Compared with the Vector group, the expression level of lncRNA ZFAS1 in chondrocytes in the pcDNA-ZFAS1 group was significantly increased, the expression level of miR-590 was significantly decreased, the proliferation ability of chondrocytes was enhanced, and the apoptosis rate was decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$). There were complementary binding sites between miR-590 and ZFAS1, and there were complementary binding sites between TGFβR2 and miR-590. Compared with the NC mimic group, the cell luciferase activity in the miR-590 mimic and 3'UTR-ZFAS1-WT co-transfection group was significantly reduced ($P<0.05$), while there was no statistically significant difference in the cell luciferase activity in the miR-590 mimic and 3'UTR-ZFAS1-MUT co-transfection group ($P>0.05$). Compared with the NC mimic group, the cell luciferase activity in the miR-590 mimic and 3'UTR-TGFβR2-WT co-transfection group was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the NC mimic group, the expression levels of TGFβR2 mRNA and protein in the miR-590 mimic group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the pcDNA-ZFAS1 + NC mimic group, the expression level of miR-590 in chondrocytes in the pcDNA-ZFAS1 + miR-590 mimic group was significantly increased, the proliferation ability of chondrocytes was weakened, the apoptosis rate was increased, and the expression levels of TGFβR2 mRNA and protein were significantly reduced, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** LncRNA ZFAS1 promotes proliferation of OA chondrocytes and inhibits the cell apoptosis by regulating the miR-590/TGFβR2 axis.

Keywords: osteoarthritis; chondrocytes; lncRNA ZFAS1; apoptosis; proliferation

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是一种退行性关节疾病,可引起局部炎症反应、软骨损伤和软骨结构改变。如果治疗不及时,不仅会影响患者的日常生活,还会增加心血管疾病的风险[1]。OA 的特点是关节软骨变性,细胞外基质丢失,广泛的纤维化和裂隙,导致软骨表面完全破坏[2]。非甾体抗炎药或环氧合酶-2 抑制剂是缓解 OA 症状的常用药物[3];而晚期患者需要手术治疗,手术方式包括关节镜手术和人工关节置换术,但行关节置换术的患者可能伴随不良的手术后果以及假体寿命有限[4]。有研究报道,自体软骨细胞移植可能成为关节炎和软骨缺损的新治疗策略[5]。然而,由于 OA 的发病机制尚不清楚,目前尚无有效的对症治疗方法。研究发现,软骨细胞凋亡是 OA 进展的关键因素[6]。了解软骨细胞凋亡的潜在分子机制可能是找到治疗 OA 新靶点的关键。长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是一类长度超过 200 个核苷酸的非蛋白质编码 RNA,已成为人类疾病的关键调控因子。越来越多的研究表明,lncRNA 可能在 OA 进展中发挥关键作用,如 lncRNA MIR4435-2HG 在 OA 中下调,并调节软骨细胞的增殖和凋亡[7];lncRNA HOTAIR通过靶向调控 miR-130a-3p 影响 OA 软骨细胞的增殖和调控炎症反应[8]。LncRNA 锌指蛋白反义链 1(zinc finger protein antisense strand 1,ZFAS1)是一种致癌基因,在大多数组织中都有表达[9-10]。有研究发现,lncRNA ZFAS1 可能通过靶向 Wnt3a 信号通路促进 OA 软骨细胞增殖和迁移[11]。然而,lncRNA ZFAS1 在 OA 进展中的分子机制尚不完全清楚。因此,本研究探讨 lncRNA ZFAS1 对 OA 中软骨细胞增殖和凋亡的影响,及其潜在的分子机制,以期为确定 OA 的新治疗靶点提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号:40302ES20)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;TRIzol 试剂(批号:15596018)购自美国 Invitrogen 公司;MTT 溶液(批号:PB180519)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;PrimeScript RT 试剂盒(批号:RR037A)购自宝日医生物技术(北京)有限公司;转化生长因子-β 受体2(transforming growth factor-beta receptor type 2,TGFβR2)抗体(批号:ab253617)购自美国 Abcam 公司;双荧光素酶报告基因试剂盒(批号:RG027)购自上海碧云天生物技术有限公司。酶标仪购自美国 DYNEX Technologies 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司;ABI PRISM 7000 型定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 样本收集

收集2018年8月至2020年8月于恩施州中心医院进行膝关节置换术的OA患者软骨组织样本共20份作为OA组,将同期外伤急诊截肢患者的正常膝关节组织样本20份作为对照(Control)组。排除类风湿关节炎和感染性关节炎患者。将组织样本置于-80 ℃冰箱保存,用于后续实验。本研究已获得恩施州中心医院医学伦理委员会的批准(20180720186),所有患者已签署对本研究的知情同意书。

1.3 原代软骨细胞分离和细胞转染

在无菌条件下去除关节软骨的纤维结缔组织后,将软骨组织切成1 mm^3的大小。随后加入0.25%胰蛋白酶和0.2% Ⅱ型胶原酶消化细胞,6 h后将细胞悬液以1 200 r/min离心10 min,200目筛网过滤器过滤5 min。弃去上清液,用含10%胎牛血清的完全培养基吹打细胞制成单细胞悬液。将细胞以1×10^5/mL的密度接种于25 cm^2培养瓶内,并置于5% CO_2、37 ℃细胞培养箱中进行培养。将处于对数生长期的细胞接种于6孔板中,待细胞融合度达到80%时,使用Lipofectamine™ 2000转染试剂盒将Vector、pcDNA-ZFAS1、pcDNA-ZFAS1 + NC mimic、pcDNA-ZFAS1 + miR-590 mimic、NC mimic、miR-590 mimic质粒分别转染至细胞中,分别命名为Vector组、pcDNA-ZFAS1组、pcDNA-ZFAS1 + NC mimic组、pcDNA-ZFAS1 + miR-590 mimic组、NC mimic组、miR-590 mimic组,48 h后收集转染的细胞。

1.4 MTT实验

于转染后0 h、24 h、48 h、72 h将软骨细胞以每孔6×10^3个的密度接种于96孔板中。然后每孔加入20 μL的0.5% MTT溶液,孵育软骨细胞4 h。弃上清液并加入150 μL二甲基亚砜,充分溶解结晶物。用酶标仪检测在490 nm波长处的光密度(optical density,OD)值。

1.5 流式细胞术

使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒检测细胞凋亡情况。用预冷的PBS洗涤各转染组处理的细胞,并用胰蛋白酶消化,然后将细胞重悬在100 μL含有Annexin V-FITC/PI的结合缓冲液中,室温下避光孵育15 min。最后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.6 RNA提取和RT-qPCR实验

使用TRIzol法提取软骨组织和细胞总RNA。用紫外分光光度计测定RNA在260~280 nm处的OD值。使用PrimeScript RT试剂盒将总RNA逆转录为cDNA。使用SYBR Premix Ex Taq试剂盒以cDNA为模板,进行目的基因定量和分析。以U6和GAPDH作为内参,使用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算基因相对表达。

1.7 Western blot

用放射免疫沉淀分析裂解缓冲液从细胞中提取总蛋白。用Bio-Rad蛋白检测试剂盒定量蛋白浓度。将等量的蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳条件为恒压(80 V、40 min,120 V、50 min),然后转移到聚偏氟乙烯膜上,电转条件为恒流(200 mA,60 min)。用5%脱脂牛奶在室温下封闭膜2 h,并与一抗(1∶1 000)在4 ℃下孵育过夜。用含0.05% Tween-20的PBS洗膜后,将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1∶5 000)在室温下孵育2 h。使用增强的化学发光底物试剂盒对蛋白条带进行可视化,最后用SynGene GeneTools软件进行分析。

1.8 双荧光素酶报告基因实验

使用生物信息学软件预测ZFAS1和miR-590潜在的结合位点,并将序列克隆到pmirGLO双荧光素酶表达载体上,构建ZFAS1野生型报告基因重组质粒(ZFAS1-WT)。使用相同的方法构建ZFAS1突变型报告基因重组质粒(ZFAS1-MUT)。将人胚肾细胞HEK293T接种在24孔板上培养24 h。然后根据说明书使用Lipofectamine™ 2000转染试剂盒将ZFAS1-WT、ZFAS1-MUT和miR-590 mimic或NC mimic共转染至细胞中,即分别为miR-590 mimic和3'UTR-ZFAS1-WT共转染组、miR-590 mimic和3'UTR-ZFAS1-MUT共转染组,NC mimic组为对照。转染48 h后,收集细胞用于荧光素酶活性评估。使用相同的方法验证miR-590与TGFβR2 3'UTR的靶向结合,根据说明书使用Lipofectamine™ 2000转染试剂盒将TGFβR2-WT、TGFβR2-MUT和miR-590 mimic或NC mimic共转染至细胞中,即分别为miR-590 mimic和3'UTR-TGFβR2-WT共转染组、miR-590 mimic和3'UTR-TGFβR2-MUT共转染组,NC mimic组为对照。其余方法与上述描述一致。

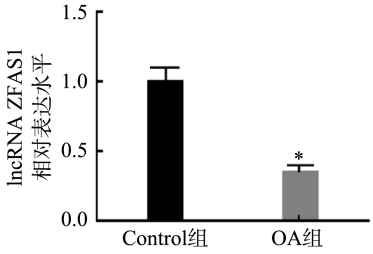
1.9 统计学分析

所有数据均使用SPSS 19.0和Graph Pad Prism 7.0软件进行分析,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。2组间比较采用*Student's t*检验,多组间比较采用单因素方差分析(*ANOVA*)。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA ZFAS1在OA软骨组织中的表达

通过RT-qPCR实验检测OA软骨组织和正常软骨组织中lncRNA ZFAS1的表达水平,结果显示,与Control组比较,OA组软骨组织中的lncRNA ZFAS1表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图1。



*:与 Control 组比较,$P<0.05$

图1 LncRNA ZFAS1 在 OA 软骨组织中的表达

2.2 过表达 lncRNA ZFAS1 对软骨细胞增殖和凋亡的影响

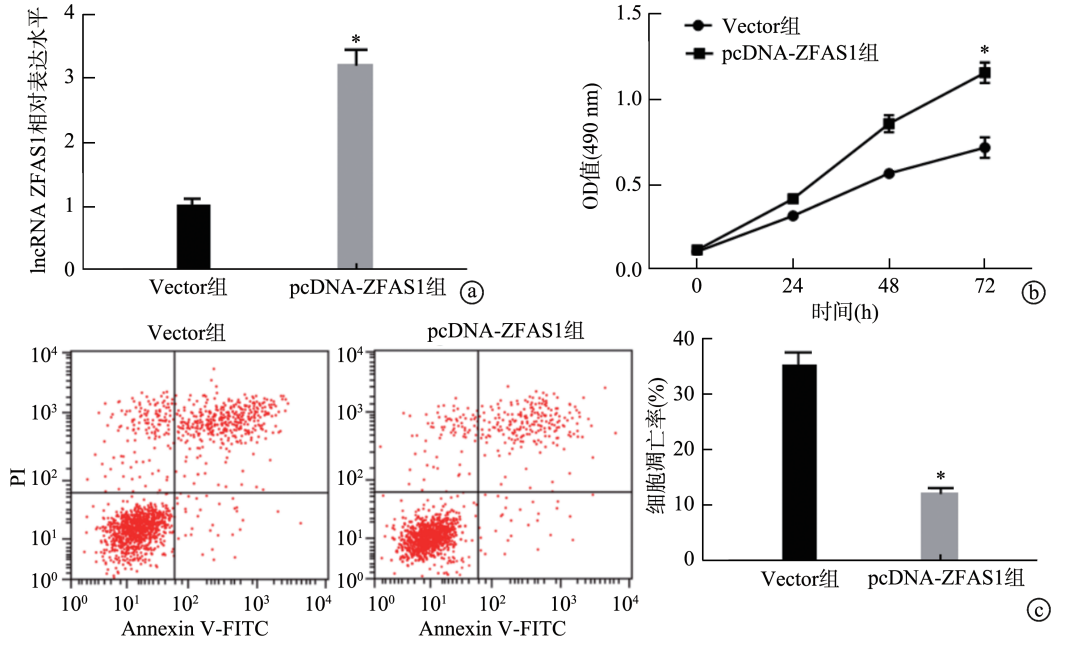
与 Vector 组比较,pcDNA-ZFAS1 组软骨细胞中 lncRNA ZFAS1 表达水平显著升高,软骨细胞增殖能力增强,细胞凋亡率降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图2。

2.3 ZFAS1 可直接靶向并调控 miR-590 的表达

通过生物信息学软件预测发现,miR-590 与 ZFAS1存在互补的结合位点,miR-590可能是ZFAS1的作用靶点。与 Control 组比较,OA 组软骨组织中的 miR-590 表达水平显著升高($P<0.05$)。与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 和 3'UTR-ZFAS1-WT 共转染组的细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),而 miR-590 mimic 和 3'UTR-ZFAS1-MUT 共转染组的细胞荧光素酶活性无统计学差异($P>0.05$),见图3。

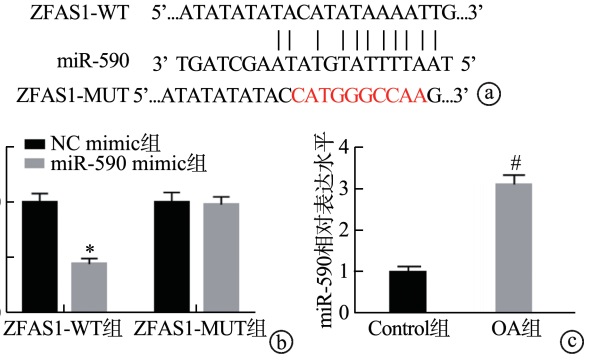
2.4 ZFAS1 通过调控 miR-590 促进软骨细胞的增殖,抑制细胞凋亡

与 Vector 组比较,pcDNA-ZFAS1 组软骨细胞中 miR-590 表达水平显著降低,软骨细胞增殖能力增强,细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 pcDNA-ZFAS1 + NC mimic 组比较,pcDNA-ZFAS1 + miR-590 mimic 组软骨细胞中 miR-590 表达水平显著升高,软骨细胞增殖能力减弱,细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图4。



a:RT-qPCR 实验检测 lncRNA ZFAS1 表达水平;b:MTT 实验检测细胞增殖;c:流式细胞术检测细胞凋亡 *:与 Vector 组比较,$P<0.05$

图2 过表达 ZFAS1 对软骨细胞增殖和凋亡的影响

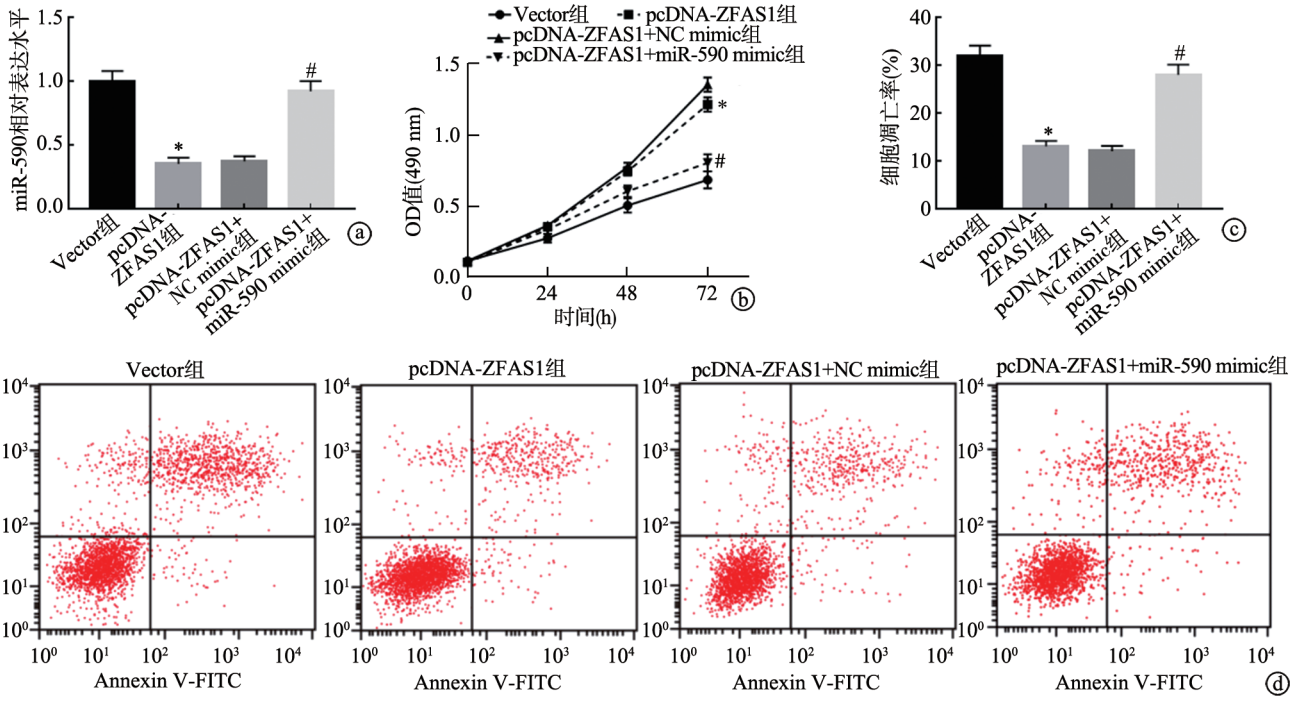


a:ZFAS1 与 miR-590 的结合位点;b:双荧光素酶报告基因实验;c:RT-qPCR 实验检测 OA 组织中 miR-590 的表达 *:与 NC mimic 组比较,$P<0.05$;#:与 Control 组比较,$P<0.05$

图3 ZFAS1 可直接靶向并调控 miR-590 的表达

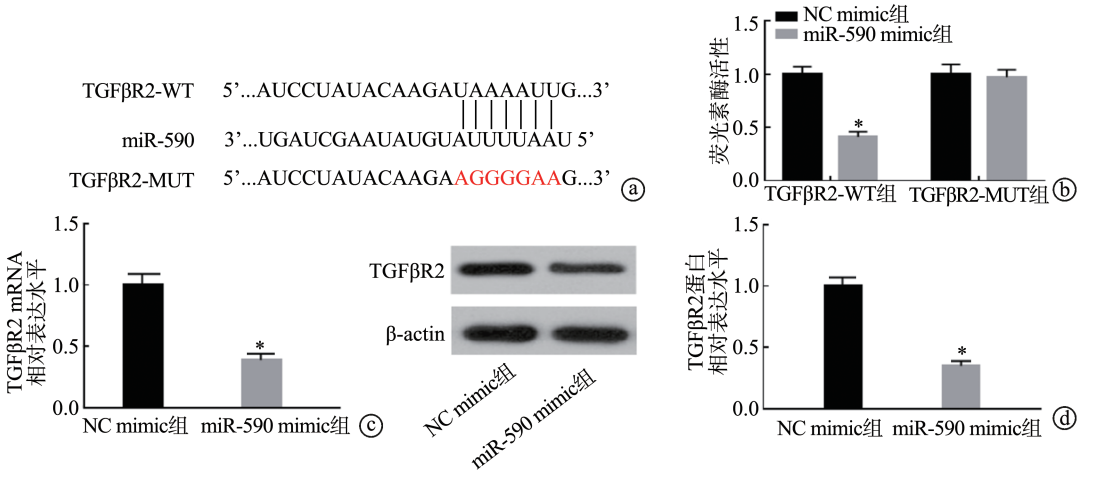
2.5 miR-590 可直接靶向并调控 TGFβR2 的表达

通过生物信息学软件预测发现,TGFβR2 与 miR-590 存在互补的结合位点,TGFβR2 可能是 miR-590 的下游靶点。与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 和 3'UTR-TGFβR2-WT 共转染组的细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),而 miR-590 mimic 和 3'UTR-TGFβR2-MUT 共转染组的细胞荧光素酶活性无统计学差异($P>0.05$)。与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 组细胞中 TGFβR2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),见图5。



a:RT-qPCR 实验检测 miR-590 表达水平;b:MTT 实验检测细胞增殖;c:细胞凋亡率;d:流式细胞术检测细胞凋亡 *:与 Vector 组比较,$P<0.05$;#:与 pcDNA-ZFAS1 + NC mimic 组比较,$P<0.05$

图 4 ZFAS1 通过调控 miR-590 促进软骨细胞的增殖,抑制细胞凋亡



a:miR-590 与 TGFβR2 的结合位点;b:双荧光素酶报告基因实验;c:RT-qPCR 实验检测 TGFβR2 mRNA 的表达;d:Western blot 检测 TGFβR2 蛋白的表达 *:与 NC mimic 组比较,$P<0.05$

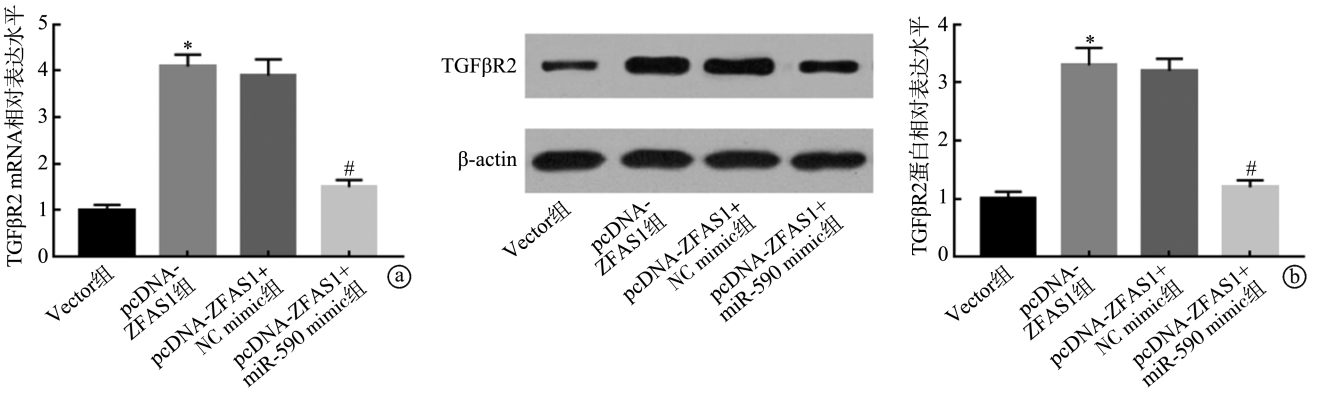
图 5 miR-590 可直接靶向并调控 TGFβR2 的表达

2.6 过表达 ZFAS1 通过调控 miR-590 促进 TGFβR2 mRNA 和蛋白的表达

与 Vector 组比较,pcDNA-ZFAS1 组细胞中 TGFβR2 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);与 pcDNA-ZFAS1 + NC mimic 组比较,pcDNA-ZFAS1 + miR-590 mimic 组 TGFβR2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),见图 6。

3 讨论

OA 是一种异质性疾病,影响所有滑膜关节,如脊柱、髋关节或膝关节,其特征是关节软骨逐渐退化,伴继发性滑膜炎和骨骼重塑。高龄是 OA 的主要危险因素,此外,肥胖和遗传等因素也可影响 OA 的发展。OA 的分子机制目前尚未完全阐明,研究显示细胞外基质破坏、炎症反应或软骨细胞凋亡与 OA 的进展密切相关[12-13]。越来越多的证据表明,lncRNA 是 OA 的生物调节因子,可作为 OA 早期预防、临床诊断和治疗的生物标志物。许多 lncRNA 的异常表达参与软骨细胞的细胞外基质降解、增殖和凋亡。如 lncRNA HOTAIR 通过上调 FUT2 促进细胞外基质降解和软骨



a:RT-qPCR 实验检测 TGFβR2 mRNA 的表达;b:Western blot 检测 TGFβR2 蛋白的表达 *:与 Vector 组比较,$P<0.05$;#:与 pcDNA-ZFAS1 + NC mimic 组比较,$P<0.05$

图 6 过表达 ZFAS1 通过 miR-590 促进 TGFβR2 mRNA 和蛋白的表达

细胞凋亡[14]。LncRNA SNHG5通过调节 miR-10a-5p/H3F3B 轴促进 OA 中软骨细胞增殖并抑制其凋亡[15]。有研究报道 ZFAS1 参与多种癌症(如结肠癌、肺癌和乳腺癌)的发生发展[16-18]。此外,在类风湿性关节炎中,ZFAS1 还可调节成纤维细胞样滑膜细胞的增殖、凋亡和自噬[19]。但 lncRNA ZFAS1 在 OA 发展中的具体分子机制目前尚不清楚。本研究结果显示,ZFAS1 在 OA 软骨组织中表达下调,表明 ZFAS1 可能参与 OA 的进展。为了进一步探讨 ZFAS1 在 OA 中的作用,本研究通过过表达 ZFAS1 处理软骨细胞后,检测细胞增殖和凋亡能力,结果显示,过表达 ZFAS1 可促进软骨细胞增殖,抑制细胞凋亡,与之前的文献报道一致[11]。

研究表明,lncRNA 在生物学或病理学过程中充当 miRNA 的海绵并调节其功能。如 lncRNA HOTAIR 通过 miR-20a-5p/HMGA2 轴影响乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡[20]。敲低 lncRNA MFI2-AS1 可通过 miR-130a-3p/TCF4 轴抑制脂多糖诱导的 OA 进展[21]。ZFAS1 靶向 miR-548e 增强 CXCR4 表达,进而促进卵巢癌细胞的增殖和转移[22]。本研究通过生物信息学软件预测 ZFAS1 潜在的靶基因,并使用双荧光素酶报告基因实验验证了 miR-590 是 ZFAS1 的靶基因。有研究报道,miR-590 可通过不同的分子网络调节癌症的发展,包括胰腺癌、结直肠癌、卵巢癌[23-25]。此外,在 OA 中,miR-590 可通过调节 PI3K/AKT 信号通路促进骨细胞凋亡[26]。本研究结果显示,miR-590 在 OA 患者中的表达显著上调,为了进一步研究 miR-590 在 ZFAS1 调节软骨细胞中的功能,将 pcDNA-ZFAS1 与 miR-590 mimic 共转染到软骨细胞中,结果显示 pcDNA-ZFAS1 可促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,而 miR-590 mimic 转染后可显著逆转这一结果。以上数据表明 ZFAS1 可通过靶向 miR-590 促进软骨细胞增殖并抑制细胞凋亡。因此,本研究认为 ZFAS1 可以作为 miR-590 的分子海绵在 OA 进展中发挥作用。

越来越多的证据表明 TGF-β 参与了 OA 的发展。TGF-β 在 OA 中上调,从而提高软骨细胞活性和蛋白多糖合成以促进软骨损伤修复[27]。TGFβR2 作为一种跨膜丝氨酸-苏氨酸激酶,是启动下游 TGF-β 信号转导的主要因子,可能在 OA 进展中起关键作用。如敲除 TGFβR2 后,在小鼠模型中出现明显的 OA 样表型[28]。CircSERPINE2 通过调节 miR-495/TGFβR2 轴抑制 OA 中软骨细胞凋亡和细胞外基质降解[29]。本研究结果显示,TGFβR2 是 miR-590 的下游靶基因。ZFAS1 过表达后 TGFβR2 mRNA 和蛋白水平显著增加,而 miR-590 mimic转染后可以逆转这一结果。表明 lncRNA ZFAS1 通过 miR-590/TGFβR2 轴促进 OA 进展。

综上所述,lncRNA ZFAS1 在人 OA 软骨组织中下调。此外,ZFAS1 通过海绵吸附 miR-590 并诱导 TGFβR2的表达促进软骨细胞增殖并抑制凋亡,提示 ZFAS1/miR-590/TGFβR2 轴可作为 OA 患者治疗的新靶点。然而,本研究仅通过体外实验探讨了 lncRNA ZFAS1 在 OA 中的作用机制,由于 OA 临床表型相对复杂,病程较长,因此还需要通过体内实验进一步验证 lncRNA ZFAS1 对 OA 进展的影响。

[参考文献]

[1] Nelson AE. Osteoarthritis year in review 2017:clinical[J]. Osteoarthritis Cartilage,2018,26(3):319-325. doi:10.1016/j.joca.2017.11.014.

[2] 郑晓慧,董 博,袁普卫,等. NF-κB 信号通路在骨性关节炎软骨破坏中的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2021,27(7):540-544. doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2021.07.011.

[3] Akazawa M,Mimura W,Togo K,et al. Patterns of drug treatment in patients with osteoarthritis and chronic low back pain in Japan:a retrospective database study[J]. J Pain Res,2019,12:1631-1648. doi:10.2147/JPR.S203553.

[4] Charlesworth J,Fitzpatrick J,Perera NKP,et al. Osteoarthritis-a systematic

review of long-term safety implications for osteoarthritis of the knee[J]. BMC Musculoskelet Disord,2019,20(1):151. doi:10.1186/s12891-019-2525-0.

[5] Boehm E,Minkus M,Scheibel M. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal articular cartilage defects of the humeral head[J]. J Shoulder Elbow Surg,2020,29(1):2-11. doi:10.1016/j.jse.2019.07.030.

[6] 王新军,袁银鹏,王 越,等.软骨细胞凋亡引发骨关节炎的机制研究进展[J].山东医药,2020,60(2):109-112. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2020.02.034.

[7] Xiao Y,Bao Y,Tang L,et al. LncRNA MIR4435-2HG is downregulated in osteoarthritis and regulates chondrocyte cell proliferation and apoptosis[J]. J Orthop Surg Res,2019,14(1):247. doi:10.1186/s13018-019-1278-7.

[8] 王和杰,范忠诚,金旭红,等.长链非编码 RNA 靶向微小 RNA 130a-3p基因对骨关节炎软骨细胞增殖及炎性因子分泌的影响[J].中华实验外科杂志,2021,38(5):871-873. doi:10.3760/cma.j.cn421213-20201106-01923.

[9] Ghafouri-Fard S,Kamali MJ,Abak A,et al. LncRNA ZFAS1:role in tumorigenesis and other diseases[J]. Biomed Pharmacother,2021,142:111999. doi:10.1016/j.biopha.2021.111999.

[10] 李璐燕,陈梦湘,何国献,等.长链非编码 RNA ZFAS1 作为肿瘤预后因子的荟萃分析[J].临床检验杂志,2021,39(9):705-710. doi:10.13602/j.cnki.jcls.2021.09.14.

[11] Ye D,Jian W,Feng J,et al. Role of long noncoding RNA ZFAS1 in proliferation,apoptosis and migration of chondrocytes in osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother,2018,104:825-831. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.124.

[12] Guo H,Yin W,Zou Z,et al. Quercitrin alleviates cartilage extracellular matrix degradation and delays ACLT rat osteoarthritis development:an in vivo and in vitro study[J]. J Adv Res,2020,28:255-267. doi:10.1016/j.jare.2020.06.020.

[13] 鲁 宏,宋 俊,孟京红,等.香叶木素通过 NF-κB 通路缓解 IL-1β 诱导的新生大鼠骨关节炎软骨细胞凋亡和免疫反应[J].中国免疫学杂志,2019,35(3):292-297. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2019.03.008.

[14] Hu J,Wang Z,Shan Y,et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes osteoarthritis progression via miR-17-5p/FUT2/β-catenin axis[J]. Cell Death Dis,2018,9(7):711. doi:10.1038/s41419-018-0746-z.

[15] Jiang H,Pang H,Wu P,et al. LncRNA SNHG5 promotes chondrocyte proliferation and inhibits apoptosis in osteoarthritis by regulating miR-10a-5p/H3F3B axis[J]. Connect Tissue Res,2021,62(6):605-614. doi:10.1080/03008207.2020.1825701.

[16] 高 杨,康荣基,曹 宇.结肠癌患者血清 lncRNA ZFAS1 水平变化及临床意义[J].山东医药,2021,62(28):9-12. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2021.28.003.

[17] Ge HB,Chen S,Huang SR,et al. Long noncoding RNA ZFAS1 acts as an oncogene by targeting miR-193a-3p in human non-small cell lung cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(16):8244. doi:10.26355/eurrev_202008_22584.

[18] Zhang S,Wang J,Yao T,et al. LncRNA ZFAS1/miR-589 regulates the PTEN/PI3K/AKT signal pathway in the proliferation,invasion and migration of breast cancer cells[J]. Cytotechnology,2020,72(3):415-425. doi:10.1007/s10616-020-00388-6.

[19] Yang S,Yin W,Ding Y,et al. LncRNA ZFAS1 regulates the proliferation,apoptosis,inflammatory response and autophagy of fibroblast-like synoviocytes via miR-2682-5p/ADAMTS9 axis in rheumatoid arthritis[J]. Biosci Rep,2020,40(8):BSR20201273. doi:10.1042/BSR20201273.

[20] Zhao W,Geng D,Li S,et al. LncRNA HOTAIR influences cell growth,migration,invasion,and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer[J]. Cancer Med,2018,7(3):842-855. doi:10.1002/cam4.1353.

[21] 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.

[22] Zhang J,Quan LN,Meng Q,et al. miR-548e sponged by ZFAS1 regulates metastasis and cisplatin resistance of OC by targeting CXCR4 and let-7a/BCL-XL/S signaling axis[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020,20:621-638. doi:10.1016/j.omtn.2020.03.013.

[23] Wang YD,Mao JD,Wang JF,et al. MiR-590 suppresses proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting high mobility group A2[J]. Technol Cancer Res Treat,2020,19:1533033820928143. doi:10.1177/1533033820928143.

[24] 徐 明,唐 澍,刘 琦,等.miR-590-3p 对结直肠癌细胞顺铂耐药的影响及其机制[J].山东医药,2020,60(11):6-10. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2020.11.002.

[25] Salem M,O'Brien JA,Bernaudo S,et al. miR-590-3p promotes ovarian cancer growth and metastasis via a novel FOXA2-versican pathway[J]. Cancer Res,2018,78(15):4175-4190. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3014.

[26] Yang J,Zhuang Y,Liu J. Upregulation of microRNA590 in rheumatoid arthritis promotes apoptosis of bone cells through transforming growth factor-β1/phosphoinositide-3 kinase/Akt signaling[J]. Int J Mol Med,2019,43(5):2212-2220. doi:10.3892/ijmm.2019.4116.

[27] Thielen NGM,van der Kraan PM,van Caam APM. TGFβ/BMP signaling pathway in cartilage homeostasis[J]. Cells,2019,8(9):969. doi:10.3390/cells8090969.

[28] Wang PE,Zhang L,Ying J,et al. Bushenhuoxue formula attenuates cartilage degeneration in an osteoarthritic mouse model through TGF-β/MMP13 signaling[J]. J Transl Med,2018,16(1):72. doi:10.1186/s12967-018-1437-3.

[29] Zhang Q,Qiao X,Xia W. CircSERPINE2 weakens IL-1β-caused apoptosis and extracellular matrix degradation of chondrocytes by regulating miR-495/TGFβR2 axis[J]. Biosci Rep,2020,40(11):BSR20201601. doi:10.1042/BSR20201601.

(编辑:贺绍梅)