

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.10.001

❖ 基础研究 ❖

lncRNA-H19 通过靶向 miR-106a-5p 在骨关节炎软骨基质降解和钙化中的调控作用

刘旭剑¹, 王东来¹, 李增怀¹, 冯奇¹, 常富军², 冯建刚¹

(1. 河北医科大学第四医院骨科, 河北 石家庄 050011; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第 980 医院骨科, 河北 石家庄 050000)

【摘要】目的: 探讨长链非编码 RNA H19 通过靶向 microRNA (miR)-106a-5p 对骨关节炎 (OA) 软骨基质降解和钙化的调控作用。**方法:** 收集临床骨关节炎软骨组织和健康软骨组织, 采用实时荧光定量 PCR 检测软骨组织中 lncRNA-H19、miR-106a-5p mRNA 表达水平; 将人软骨细胞系 (HC-A) 分为 H19 干扰组 (si-H19)、阴性转染组 (si-Control)、miR-106a-5p mimic 组 (miR-106a-5p)、mimic 阴性对照组 (miR-106a-5p-NC)、miR-106a-5p 抑制剂组 (inhibitor)、阴性抑制剂对照组 (inhibitor-NC) 组、inhibitor + si-H19 和 inhibitor-NC + si-H19 组, 检测细胞中碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素 (OCN) 和骨涎蛋白 (BSP) mRNA 表达水平; Western blot 检测软骨细胞基质金属蛋白酶 (MMP)-1、MMP-13 和 II 型 $\alpha 1$ 胶原纤维 (COL2A1) 的水平; CCK-8 检测细胞增殖率; 流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果:** OA 软骨组织中 lncRNA-H19 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$), miR-106a-5p mRNA 表达下调 ($P < 0.05$); 沉默 lncRNA-H19 可明显抑制软骨细胞凋亡, 促进软骨细胞增殖 ($P < 0.05$), 并下调 MMP-1 和 MMP-13 的表达水平 ($P < 0.05$), 上调 COL2A1 的表达 ($P < 0.05$)。沉默 lncRNA-H19 可抑制软骨细胞 ALP、OCN、BSP mRNA 水平和 ALP 活性 ($P < 0.05$)。沉默 miR-106a-5p 逆转了沉默 lncRNA-H19 对软骨细胞基质降解和钙化标志物的抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论:** lncRNA-H19 可通过抑制 miR-106a-5p 表达, 促进细胞外软骨基质的降解和钙化, 从而参与 OA 的进展。

【关键词】 骨关节炎; 软骨基质降解; 钙化; lncRNA-H19; miR-106a-5p

【中图分类号】 R684.3 **【文献标志码】** A

Regulation of lncRNA-H19 in cartilage matrix degradation and calcification in osteoarthritis by targeting miR-106a-5p

LIU Xu-jian¹, WANG Dong-lai¹, LI Zeng-huai¹, FENG Qi¹, CHANG Fu-jun², FENG Jian-gang¹

(Department of Orthopedics, 1. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011; 2. 980 Hospital, Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the regulatory effects of long-stranded non-coding RNA H19 (lncRNA-H19) on cartilage matrix degradation and calcification in osteoarthritis (OA) by targeting microRNA (miR-106a-5p). **Methods:** Collect clinical osteoarthritis cartilage tissue and healthy cartilage tissue, the mRNA expression levels of lncRNA-H19 and miR-106a-5p in cartilage tissues were detected by real-time quantitative PCR. The cells were divided into H19 interference group (si-H19), negative transfection group (si-Control), miR-106a-5p mimic group (miR-106a-5p), mimic-negative control group (miR-106a-5p-NC), miR-106a-5p inhibitor group (inhibitor), negative inhibitor control group (inhibitor-NC), inhibitor + si-H19 and inhibitor-NC + si-H19 group. Test cells, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) and bone sialoprotein (BSP) mRNA expression level. Western blot was used to detect the levels of matrix metalloproteinase (MMP-1), MMP-13 and type II $\alpha 1$ collagen fibers (COL2A1). CCK-8 was used to detect cell proliferation rate, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. **Results:** The expression of lncRNA-H19 mRNA was up-regulated in OA cartilage tissue ($P < 0.05$), down-regulation of miR-106a-5p mRNA expression ($P < 0.05$). Silent lncRNA-H19 could significantly inhibit the apoptosis of chondrocytes, promote the proliferation of chondrocytes ($P < 0.05$), and down-regulate the expression levels of MMP-1 and MMP-13 ($P < 0.05$). The expression of COL2A1 was up-regulated ($P < 0.05$). Silenced lncRNA-H19 inhibited the mRNA levels of ALP, OCN and BSP and the activity of ALP in chondrocytes ($P < 0.05$). Silencing miR-106a-5p significantly reversed the inhibitory effects of H19 on chondrocyte matrix degradation and calcification markers ($P < 0.05$). **Conclusion:** LncRNA-H19 may promote the degradation and calcification of extracellular cartilage matrix by inhibiting the expression of miR-106a-5p, thus participating in the progression of OA.

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题 (20170759)

作者简介: 刘旭剑 (1981 -), 男, 硕士, 主治医师。E-mail: swsxujian@126.com

[Key words] Osteoarthritis; Cartilage matrix degradation; Calcification; lncRNA-H19; miR-106a-5p

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种慢性退行性关节疾病,其发病机制涉及机体的各种生理和病理过程^[1],但其确切发病机制尚不清楚。研究^[2-4]指出,长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和 microRNA (miRNA) 的表观遗传修饰对 OA 的发生及发展中发挥着重要作用,如软骨组织中的 miR-16/SMAD7 轴可通过下调 lncRNA MEG3 的表达水平加速 OA 的进展^[4],且还可通过上调 miR-146a 和 miR-98 促进 OA 的进展^[3]。此外,携带 miR-140-5p 的外泌体可促进 OA 大鼠软骨细胞的增殖和迁移,而不扰乱细胞外基质的分泌^[5]。lncRNA-H19 具有调节细胞增殖、分化和代谢等生物学功能,可能是刺激软骨恢复的潜在靶点,在胶质瘤细胞中可通过 miR-138/HIF-1 α 轴上调 lncRNA H19 而促进细胞增殖、迁移^[6];lncRNA H19 可通过对 TNFAIP8 的正向调节,改变 EMT 的级联反应,促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[7];lncRNA-H19 在 OA 软骨组织中的高水平表达可调控 miR-675,进而影响软骨的合成和分解代谢^[8]。OA 患者的 miR-106a-5p 表达下降,而增加 miR-106a-5p 的表达可改善前交叉韧带横断 (anterior cruciate ligament transaction, ACLT) 所致 OA 模型的组织学特征^[9]。本研究拟探讨 lncRNA-H19 靶向 miR-106a-5p 在调节 OA 软骨基质降解和钙化中调控作用,旨在为 OA 软骨细胞变性的诊断和治疗提供潜在的靶点。

1 资料与方法

1.1 试剂与耗材

TRIzol 试剂盒购置美国 Invitrogen 公司,Prime-Script TM RT Master Mix 和 LipofecamineTM 2000 试剂盒购置 Eurofins MWG Operon 公司 (德国),HC-A 人软骨细胞系购置上海奥路生物技术有限公司,Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 培养基购于德国 Biochrom AG Seromed 公司,SYBR qPCR Mix 和细胞计数试剂盒 8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) (购置日本 TaKaRa 公司),磷酸酶检测试剂盒购置中国建成生物工程公司,BCA 试剂盒购置美国赛默飞世尔科技公司,聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜购置美国 Millipore 公司。Bax 抗体、Bel-2 抗体、MMP-1 抗体、MMP-13 抗体、II 型胶原 $\alpha 1$ (COL2A1) 抗体、GAPDH 及相关二抗均购置美国 Abcam 公司。

1.2 一般资料

采集 2014 年 3 月至 2020 年 3 月在河北医科大学第四医院接受关节置换术的 30 例原发性膝关节炎患者的软骨组织样本作为病例组。纳入标

准:(1)均符合原发性膝关节炎诊断标准^[10];(2)均行膝关节镜手术治疗;(3)发病于膝关节;(4)体重指数 18~24 kg/m²。排除标准:(1)合并类风湿性关节炎者;(2)严重高血压、高颅压、II 型呼吸衰竭者;(3)心功能不全、心动过缓或严重的心律失常者;(4)严重的电解质紊乱者;(5)合并糖尿病、恶性肿瘤者;(6)局部感染、凝血功能异常者。另选同期 30 例截肢患者的关节软骨组织样本作为健康对照组。本次研究均经医院伦理委员会批准,患者知情并同意。30 例原发性膝关节炎患者中,男性 17 例,女性 13 例,平均年龄 50.63 岁 (39~72 岁)。30 例截肢患者中,男性 19 例,女 11 例,平均年龄 48.85 岁 (29~73 岁)。两组年龄、性别等资料比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.3 实时定量聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)

采用 TRIzol 试剂盒从临床骨关节炎软骨组织、健康软骨组织和软骨细胞中提取完整的 RNA,先预冷磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 2~3 遍,加入 1 mL Trizol 裂解细胞 15 min,待贴壁细胞完全脱落后,移至 2 mL EP 管,并使用紫外分光光度计测量 RNA 浓度。按照 Prime-Script TM RT Master Mix 试剂盒的说明书,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应 6 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min,35 个循环条件下合成互补 DNA (complementary DNA, cDNA),得到 cDNA 产物,保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$,用于进一步的 qPCR 实验。RT-qPCR 反应体系总量为 20 μL ,其中 cDNA 产物 2 μL ,50 \times ROX 0.4 μL ,SYBR qPCR Mix 10 μL ,上游引物 0.8 μL ,下游引物 0.8 μL ,RNase 水添加至 20 μL 。U6 作为 miR-106a-5p 的内参, β -actin 作为 mRNA 表达的内参,每个实验设 3 个重复,每个样本重复 3 次。采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算表达水平。所用引物及片段大小如下:lncRNA-H19 (650bp): F:5'-ATC GGT GCC TCA GCG TTC GG-3', R:5'-CTG TCC TCG CCG TCA CAC CG-3'; ALP (454 bp): F:5'-CCC TTC ACT GCC ATC CTG TAC-3', R:5'-CCA TGG AGA CGT TCT CTC TCT CA-3'; OCN (294 bp): F:5'-GGC AGG GAA GTC AGG GTA G-3', R:5'-CCC GTG GTT TCC TGG TC-3'; BSP (450 bp): F:5'-ATG CCT GCC TTG TAC CAC GAG C-3', R:5'-TCC ATC GAA GAA TCA AAG CAG AG-3'; miR-106a-5p (23bp): F:5'-AAA AGU GCU UAC AGU GCA GGU AG-3', R:5'-AAC CAT GAC CTC AAG AAC-3'; U6 (75bp): F:5'-CGC AAG GAT GAC ACG CAA ATT CG-3', R:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; β -actin (325

bp):F:5'-ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC-3',F:
5'-TTT CTA GAC GGC AGG TCA GG-3'。

1.4 细胞培养和转染

HC-A 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中于 37 °C、5% CO₂ 的潮湿无菌培养箱中培养,每两天更换一次培养基。将细胞接种到 6 孔的培养皿中。24 h 后,当细胞密度达到 70% 时,将细胞分为 H19 干扰组 (si-H19,5'-TTC ATG TTG TGG GTT CTG GGA GCC-3')、阴性转染组 (si-Control,5'-TGA TGT CTA GCG CTT GGG CTT TG-3')、miR-106a-5p mimic 组 (miR-106a-5p,5'-AAA AGU GCU UAC AGU GCA GGU AG-3')、mimic 阴性对照组 (miR-106a-5p-NC,5'-CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA-3')、miR-106a-5p 抑制剂组 (inhibitor,5'-CUA CCU GCA CUG UAA GCA CUU UU-3') 和阴性抑制剂对照组 (inhibitor-NC,5'-CAG GAC AGC UUC GAG UUA ATT-3') 组,所有序列均有生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将最终浓度 100 nmol/L 的 LipofecamineTM2000 si-H19、si-Control、miR-106a-5p mimic、miR-106a-5p-NC、inhibitor、inhibitor-NC、inhibitor + si-H19、inhibitor-NC + si-H19 转染细胞并孵化 6 h,然后转入完全培养基培养 24 h。

1.5 细胞增殖实验

转染 si-H19 或 si-Control 后,收集细胞,以每孔 1 000 个细胞的密度接种到 96 孔板中,分别培养 0、24、48 或 72 h。每孔加入终浓度为 10% 的 CCK-8 试剂盒溶液,避光孵育 1 h。最后,采用全自动酶标仪 ALISEI(意大利 SEAC 公司生产)在 450 nm 波长下检测吸光度 (optical density, OD) 值,以表示细胞增殖情况。

1.6 细胞凋亡实验

si-H19 和 si-Control 转染后,收集对数生长期的细胞并消化,然后用冷 PBS 洗涤两次,用 1 mL 联合缓冲液重悬使细胞密度为 1×10^6 /mL。将 100 μ L 的细胞悬浮液加入 5 mL 的流管中,加入 10 μ L 的 Annexin-V-FITC 和 10 μ L 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色。随后,在室温下避光孵育 15 min。使用 BD FACS 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 分析细胞凋亡率。所有测定均在 3 个独立实验中进行。

1.7 Western blot 分析

提取转染细胞的总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。变性后,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离总蛋白,并转移到 PVDF 膜上。在 5% 脱脂牛奶中封闭后,将膜与

Bax、Bcl-2、MMP-1、MMP-13、COL2A1 和 GAPDH 一抗在 4 °C 下孵育过夜。然后用含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐水 (150 mM NaCl tris buffered saline Tween, TBST) 洗涤膜,与二抗在室温下孵育 2 h,用 TBST 洗涤。最后,用增强化学发光 (ECL) 检测试剂反应后,检测蛋白条带。使用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析,首先,将所有条带扣除背景影响;然后用目标蛋白的灰度值除以其对应泳道的内参照条带灰度值,以此作为该组的目标蛋白相对表达量,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参。

1.8 基质金属蛋白酶活性检测

提取细胞裂解液,根据制造商的说明,实验严格按照 pro-MMP-1 和 MMP-13 ELISA 试剂盒说明书进行,采用酶联仪在 450 nm 波长出依序测量各孔的 OD 值,在加终止液后 15 min 以内进行检测。试剂盒的灵敏度分别为 0.02 ng/mL 和 0.009 ng/mL。

1.9 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 测定

采用 ALP 检测试剂盒法检测 ALP 活性。每个转染组的细胞用 PBS 洗涤,用含 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、0.02% Na₂S₂O₈ 和 1 Triton 抑肽酶的溶液裂解。用移液管取相同体积的裂解液,37 °C 孵育 15 min,采用分光光度计测定 ALP 活性。

1.10 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA),其中单因素方差分析进行事后检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA-H19 和 miR-106a-5p 在 OA 中的表达情况

与健康组织中 lncRNA-H19 mRNA 相比,OA 软骨组织中 lncRNA-H19 mRNA 的表达明显升高,差异有统计学意义 ($t = 43.225, P < 0.05$); 而与健康组织中 miR-106a-5p mRNA 相比,OA 软骨组织中 miR-106a-5p mRNA 的表达明显降低 ($t = 74.447, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 lncRNA-H19 对细胞增殖、凋亡的影响

si-H19 转染后,可显著抑制 lncRNA-H19 mRNA 的表达 ($P < 0.05$),并且可显著促进细胞增殖,且至少维持 72 h ($P < 0.05$)。流式细胞仪检测结果显示,转染 si-H19 沉默 lncRNA-H19 可以显著抑制细胞凋亡 ($P < 0.05$)。而 si-H19 在 HC-A 细胞中可导

致 Bax 低表达, Bcl-2 高表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

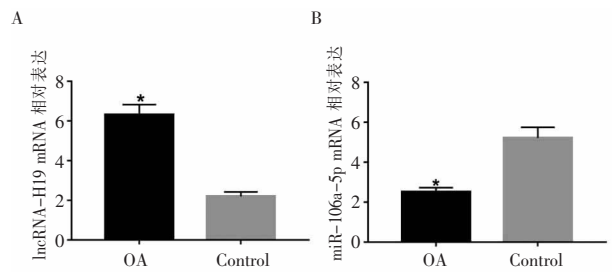


图 1 lncRNA-H19 和 miR-106a-5p 在 OA 中的表达情况

A.lncRNA-H19 在健康软组织和 OA 软组织中的表达水平; B.miR-106a-5p 在健康软组织和 OA 软组织中的表达水平。 $*P < 0.05$, 与对照组比较。

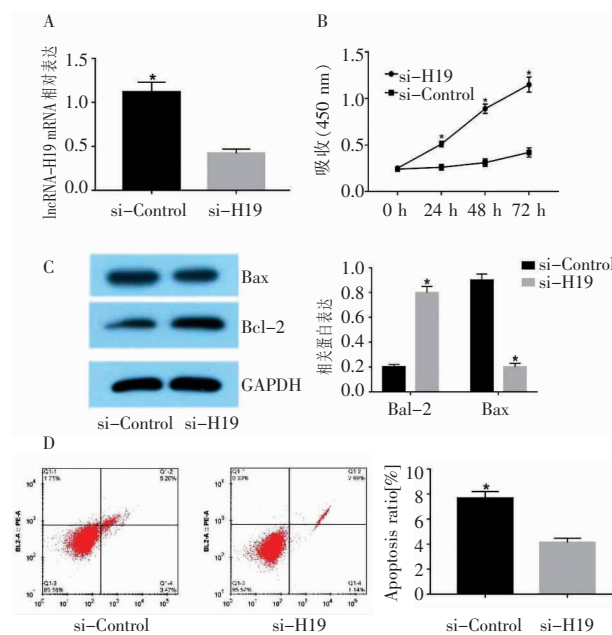


图 2 lncRNA-H19 沉默对软骨细胞功能的影响

A. 转染 si-H19 对软骨细胞 lncRNA-H19 水平的影响; B. 采用 CCK-8 检测 lncRNA-H19 沉默对软骨细胞增殖的影响; C. 采用 Western blotting 检测凋亡指标 Bax 和 Bcl-2 的蛋白水平; D. 采用流式细胞术检测细胞凋亡率变化。OA: 骨关节炎; CCK-8: 细胞计数试剂盒。 $*P < 0.05$, 与 si-Control 比较。

2.3 lncRNA-H19 对细胞外基质相关基因的影响

si-H19 转染 HC-A 细胞后, MMP-1 和 MMP-13 的表达被抑制, COL2A1 的表达增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 lncRNA-H19 对软骨细胞骨化相关指标的影响

转染 si-H19 后, ALP、OCN 和 BSP mRNA 水平显著下调 ($P < 0.05$)。转染 si-H19 也能抑制软骨细胞的 ALP 活性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 miR-106a-5p 受 lncRNA-H19 负调控作用

转染 si-H19 可显著上调 miR-106a-5p mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$)。转染 miR-106a-5p mimic 可

上调 miR-106a-5p mRNA 的表达, 转染 miR-106a-5p inhibitor 可抑制 miR-106a-5p mRNA 的表达。见图 5。

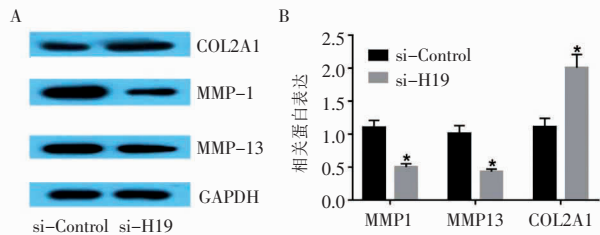


图 3 软骨细胞中转染 si-H19 对基质降解相关指标的影响

$*P < 0.05$, 与 si-Control 比较。采用 Western blot 检测基质降解相关蛋白水平。

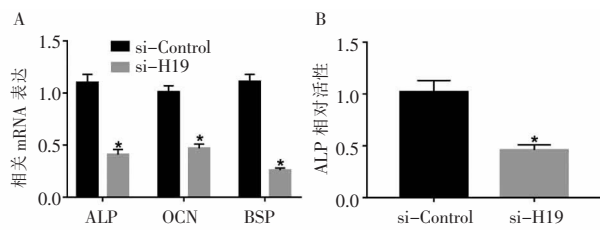


图 4 si-H19 转染软骨细胞对骨化相关指标的影响

A. 采用 RT-qPCR 检测细胞中 ALP、OCN、BSP mRNA 表达水平; B. 采用检测试剂盒检测软骨细胞中 ALP 的活性。ALP: 碱性磷酸酶; OCN: 骨钙素; BSP: 骨涎蛋白。 $*P < 0.05$, 与 si-Control 比较。

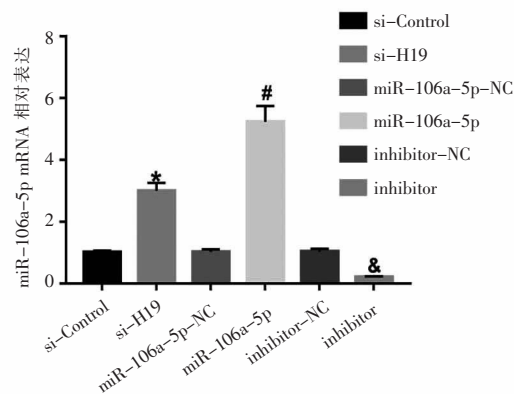


图 5 miR-106a-5p 受 lncRNA-H19 负调控作用

不同转染的软骨细胞中 miR-106a-5p 的表达水平, $*P < 0.05$, 与 si-Control 比较; $\#P < 0.05$, 与 miR-106a-5p-NC 比较; $\&P < 0.05$, 与 inhibitor-NC 比较。OA: 骨关节炎。

2.6 lncRNA-H19/miR-106a-5p 对细胞外基质相关基因的影响

转染 miR-106a-5p inhibitor 和 si-H19 后, 与 si-H19 组相比, miR-106a-5p inhibitor 组 MMP-1 和 MMP-13 表达水平和活性均上调, COL2A1 表达水平下调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 与 si-H19 + inhibitor-NC 组相比, si-H19 + miR-106a-5p inhibitor 组 MMP-1 和 MMP-13 表达水平和活性均上调, 而 COL2A1 表达下调, 差异均有统计学意义

($P < 0.05$)。见图 6。

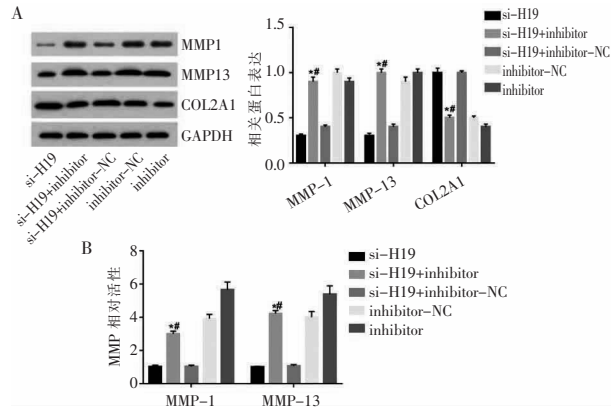


图 6 lncRNA-H19/miR-106a-5p 对细胞外基质相关基因的影响

A. 采用 Western blot 检测 MMP-1、MMP-13、COL2A1 蛋白表达, $*P < 0.05$, 与 si-H19 相比; $\#P < 0.05$, 与 si-H19+inhibitor-NC 相比; B. 采用试剂盒法检测 MMP-1、MMP-13 活性变化, $*P < 0.05$, 与 si-H19 相比; $\#P < 0.05$, 与 si-H19+inhibitor-NC 相比。

2.7 lncRNA-H19/miR-106a-5p 对软骨细胞骨化相关指标的影响

转染 miR-106a-5p inhibitor 和 si-H19 后, 与 si-H19 组相比, miR-106a-5p inhibitor + si-H19 组 ALP、OCN、BSP mRNA 水平均上调 ($P < 0.05$), 软骨细胞 ALP 活性明显增加 ($P < 0.05$)。与 si-H19 + inhibitor-NC 组相比, miR-106a-5p inhibitor + si-H19 组的 ALP、OCN、BSP mRNA 水平显著上调 ($P < 0.05$), 软骨细胞 ALP 活性明显增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 7。

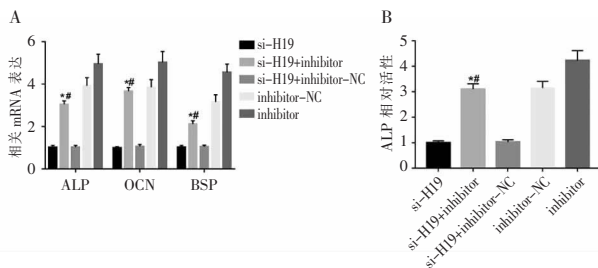


图 7 lncRNA-H19/miR-106a-5p 对软骨细胞骨化相关指标的影响

A. 采用 RT-qPCR 检测软骨细胞中 ALP、OCN、BSP mRNA 水平; B. 采用试剂盒法检测软骨细胞中 ALP 的活性。 $*P < 0.05$, 与 si-H19 比较; $\#P < 0.05$, 与 si-H19+inhibitor-NC 比较。ALP: 碱性磷酸酶; OCN: 骨钙素; BSP: 骨涎蛋白。

3 讨论

OA 以软骨结构和功能退化为主要特征, 病变部位多为关节周围组织, 最终可能导致关节疼痛和功能活动受限, 是老年人常见的关节退行性疾病^[11]。然而, 关于 OA 的治疗效果和预后并不理

想。常用的非甾体抗炎和镇痛药只能通过减轻疼痛和炎症来提高患者生活质量, 关节内注射激素或透明质酸也只适用于缓解 OA 炎症症状^[12-13]。因此, 对 OA 发病机制的深入研究可以为该病的治疗提供详细的理论依据。本研究结果表明, OA 软骨组织中 lncRNA-H19 表达上调, 而沉默 lncRNA-H19 可明显抑制软骨细胞凋亡, 促进软骨细胞增殖, 并下调 MMP-1 和 MMP-13 的表达水平, 上调 COL2A1 的表达。沉默 lncRNA-H19 可抑制软骨细胞 ALP、OCN、BSP mRNA 水平和 ALP 活性。另外, OA 软骨组织中 miR-106a-5p 表达下调, 沉默 miR-106a-5p 显著逆转了沉默 H19 对软骨细胞基质降解和钙化标志物的抑制作用。提示 lncRNA-H19 高表达可能通过调节软骨细胞增殖、凋亡、基质降解和钙化过程参与 OA 的发展, 同时与 miR-106a-5p 低表达密切相关。此外, miR-106a-5p 的负调控被证明是 lncRNA-H19 调控 OA 软骨基质降解和钙化的重要机制之一。

MMP 蛋白酶家族在骨性关节炎的病理过程中起着重要作用, 广泛分布于人体, 其主要功能是控制细胞外基质成分的降解, 是生理重建和病理损伤过程的主要因素之一^[14-15]。在 OA 中, MMP 在软骨细胞、滑膜细胞和破骨细胞中表达, 密切参与软骨基质大分子的水解, 包括 II 型胶原和多糖, 最终破坏关节软骨细胞外基质的结构和功能的完整性。MMPs 是 OA 关节软骨破坏的重要因素, 骨关节炎患者滑膜液和软骨中 MMPs 的浓度升高, 与骨关节炎的严重程度呈正相关^[16]。MMP-1 是软骨基质降解的限速酶之一, 也是最典型的 II 型胶原, 可降解胶原纤维三螺旋区的胶原, 并诱导其他 MMP 家族成员的激活。MMP-13, 在结缔组织中表达, 而在健康软骨组织中很少表达或不表达, 只有在软骨成骨的过程中, MMP-13 的分泌才能降解软骨基质, 达到成骨的目的。此外, MMP-13 是一种强效蛋白酶, 对细胞外基质中的胶原和非胶原物质具有特殊的降解作用, 尤其是对 II 型胶原^[17]。因此, MMP-13 是裂解 U 型胶原最有效的蛋白酶。近期研究^[18]证实, MMP-13 不仅在受损软骨中过表达, 而且在滑膜组织、钙化软骨中表达上调。本研究发现, 沉默 lncRNA-H19 可明显下调 MMP-1 和 MMP-13 的表达水平, 而过表达 miR-106a-5p 同样可下调软骨细胞中 MMP-1 和 MMP-13 的表达, 提示 lncRNA-H19 和 miR-106a-5p 可能通过调节细胞外基质参与 OA 的发生发展。

此外, 本研究还发现 lncRNA-H19 沉默显著抑制了软骨细胞中 OCN、BSP 的表达水平, 并抑制了 ALP 活性, 与 Zhou 等^[19]研究相符。本文进一步研究发现, 抑制 miR-106a-5p 可以部分逆转 lncRNA-

H19 沉默导致的 ALP 活性、OCN、BSP 表达水平的下调,提示抑制 miR-106a-5p 的表达可促进细胞成骨分化与先前的研究^[9,20]基本一致

综上所述,lncRNA-H19 在 OA 软骨组织中表达上调,lncRNA-H19 可能通过抑制 miR-106a-5p 的表达,促进细胞外软骨基质的降解和钙化,从而参与 OA 的发生发展。

参考文献

[1] DeRogatis M, Anis HK, Sodhi N, *et al.* Non-operative treatment options for knee osteoarthritis[J]. *Annals of translational medicine*, 2019, 7(7):S245.

[2] Abbasifard M, Kamiab Z, Sadeghi I, *et al.* The role and function of long non-coding RNAs in osteoarthritis[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2020, Doi:10.1016/j.yexmp.2020.104407.

[3] Kourtis A, Adamopoulos PG, Papalois A, *et al.* Quantitative analysis and study of the mRNA expression levels of apoptotic genes BCL2, BAX and BCL2L12 in the articular cartilage of an animal model of osteoarthritis [J]. *Annals of Translational Medicine*, 2018, 6(12):243.

[4] Xu J, Xu Y. The lncRNA MEG3 downregulation leads to osteoarthritis progression via miR-16/SMAD7 axis[J]. *Cell Bioscience*, 2017, 7(1):69.

[5] 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.

[6] Liu ZZ, Tian YF, Wu H, *et al.* LncRNA H19 promotes glioma angiogenesis through miR-138/HIF-1 α /VEGF axis[J]. *Neoplasma*. 2020, 67(1):111-118.

[7] Li Y, Ma HY, Hu XW, *et al.* LncRNA H19 promotes triple-negative breast cancer cells invasion and metastasis through the p53/TNFAIP8 pathway[J]. *Cancer Cell International*, 2020, 20(483):87-108.

[8] Steck E, Boeuf S, Gabler J, *et al.* Regulation of H19 and its encoded microRNA-675 in osteoarthritis and under anabolic and catabolic in vitro conditions[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2012, 90(10):1185-1195.

[9] Ji Q, Qi D, Xu X, *et al.* Cryptotanshinone protects cartilage against developing osteoarthritis through the miR-106a-5p/GLIS3 Axis [J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2018, 11:170-179.

[10] Jevsevar DS. Treatment of osteoarthritis of the knee: evidence-based guideline, 2nd edition [J]. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2013, 21(9):571-576.

[11] Schmelz M, Mantyh P, Malfait AM, *et al.* Nerve growth factor antibody for the treatment of osteoarthritis pain and chronic low-back pain: mechanism of action in the context of efficacy and safety [J]. *Pain*, 2019, 160(10):2210-2220.

[12] Huang R, Li X, Xu S, *et al.* Acupoint injection treatment for primary osteoporosis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Annals of palliative medicine*, 2019, 8(5):586-595.

[13] 黄凯华, 吴志浩, 张子亮, 等. 透明质酸、富血小板血浆及两者联合应用对膝关节关节炎的疗效评估 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(12):1707-1711.

[14] 于永慧, 王承龙, 刘剑刚, 等. 细胞外基质重建规律衍变与梗死后缺血心肌纤维化发生 [J]. *心脏杂志*, 2019, 31(1):83-88.

[15] 王海英, 丁晓, 杨立, 等. 不同分期骨关节炎关节液中相关降解酶的表达差异 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(23):3609-3615.

[16] Alamgeer A, Hasan UH, Ultra AM, *et al.* Phytochemicals targeting matrix metalloproteinases regulating tissue degradation in inflammation and rheumatoid arthritis [J]. *Phytomedicine*, 2020, Doi:10.1016/j.phymed.2019.153134.

[17] 范凯健, 吴菁, 李钦, 等. 基质金属蛋白酶 13 在软骨重塑和关节炎中的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(5):607-611.

[18] Dai Y, Lu J, Li F, *et al.* Changes in cartilage and subchondral bone in a growing rabbit experimental model of developmental trochlear dysplasia of the knee [J]. *Connective tissue research*, 2019, 62(3):299-312.

[19] Zhou P, Li Y, Di R, *et al.* H19 and Foxc2 synergistically promotes osteogenic differentiation of BMSCs via WNT- β -catenin pathway [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(8):13799-13806.

[20] Zhang X, Liu X, Ni X, *et al.* Long non-coding RNA H19 modulates proliferation and apoptosis in osteoarthritis via regulating miR-106a-5p [J]. *Journal of Biosciences*, 2019, 44(6):1-10.

(收稿日期:2021-04-24

修回日期:2021-06-29)