

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.008

miR-382-3p 靶向 RASA1 基因调控骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡*

GILDAS ALOGO YING¹ 焦建宝^{2Δ} 梁东星³ 任路通² 王一凡² 王康⁴

(1 河北医科大学附属医院骨科 河北 保定 071000; 2 河北大学附属医院骨科 河北 保定 071000;

3 保定市骨科医院脊柱外科 河北 保定 071000; 4 河北省儿童医院骨科 河北 石家庄 050000)

摘要 目的:探讨 miR-382-3p 对骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响及其机制。**方法:**用 100 ng/mL 的脂多糖(LPS)处理软骨细胞,记为 LPS 组,以正常培养的软骨细胞作为正常对照(NC)组。miR-NC、miR-382-3p、anti-miR-NC、anti-miR-382-3p 转染至软骨细胞中,记为 miR-NC 组、miR-382-3p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-382-3p 组;将 miR-NC、miR-382-3p、si-NC、si-RASA1 转染至软骨细胞后再用 100 ng/mL 的 LPS 处理,记为 miR-NC+LPS 组、miR-382-3p+LPS 组、si-NC+LPS 组、si-RASA1+LPS 组;将 miR-382-3p 分别与 pcDNA-NC、pcDNA-RASA1 共转染至软骨细胞后再用 100 ng/mL 的 LPS 处理,记为 miR-382-3p+pcDNA-NC+LPS 组、miR-382-3p+pcDNA-RASA1+LPS 组。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-382-3p 和 Ras p21 蛋白活化因子 1(RASA1)mRNA 表达水平;蛋白质印迹(Western blot)法检测 RASA1、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved-caspase-3)蛋白表达;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞存活率;流式细胞术检测细胞凋亡;荧光素酶报告实验检测 miR-382-3p 和 RASA1 的靶向关系。**结果:**LPS 诱导的软骨细胞中 miR-382-3p 表达水平显著降低,RASA1 表达水平显著升高,CyclinD1 表达水平显著降低,Cleaved-caspase-3 表达水平显著升高,细胞存活率显著降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。过表达 miR-382-3p 和敲减 RASA1,LPS 诱导的软骨细胞中 CyclinD1 表达水平显著升高,Cleaved-caspase-3 表达水平显著降低,细胞存活率显著升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)。miR-382-3p 靶向调控 RASA1,高表达 RASA1 部分逆转了 miR-382-3p 高表达对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响。**结论:**过表达 miR-382-3p 促进软骨细胞增殖,抑制 LPS 诱导的软骨细胞凋亡,其机制可能与 RASA1 有关。

关键词:miR-382-3p;RASA1;骨关节炎;软骨细胞;增殖;凋亡

中图分类号:R33;R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)13-2440-07

miR-382-3p Targets RASA1 Gene to Regulate Osteoarthritis Chondrocyte Proliferation and Apoptosis*

GILDAS ALOGO YING¹, JIAO Jian-bao^{2Δ}, LIANG Dong-xing³, REN Lu-tong², WANG Yi-fan², WANG Kang⁴

(1 Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Baoding, Hebei, 071000, China;

2 Department of Orthopaedics Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei, 071000, China;

3 Department of CRISTA surgery Baoding Orthopedic Hospital, Baoding, Hebei, 071000, China;

4 Department of Orthopedics Children's hospital of hebei province, Shijiazhuang, Hebei, 050000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-382-3p on the proliferation and apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis and its mechanism. **Methods:** Chondrocytes were treated with 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) and recorded as LPS group, normally cultured chondrocytes were used as normal control (NC) group. miR-NC, miR-382-3p, anti-miR-NC, anti-miR-382-3p were transfected into chondrocytes, and recorded as miR-NC group, miR-382-3p group, anti-miR-NC group and anti-miR-382-3p group; miR-NC, miR-382-3p, si-NC, si-RASA1 were transfected into chondrocytes and then treated with 100 ng/mL LPS, and recorded as miR-NC+LPS group, miR-382-3p+LPS group, si-NC+LPS group, si-RASA1+LPS group; co-transfect miR-382-3p with pcDNA-NC and pcDNA-RASA1 into chondrocytes, respectively, and then then treated with 100 ng/mL LPS, recorded as miR-382-3p+pcDNA-NC+LPS group and miR-382-3p + pcDNA-RASA1+LPS group. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect miR-382-3p and Ras p21 protein activator 1 (RASA1) mRNA expressions; Western blot was used to detect RASA1, CyclinD1 and cleaved cysteine-containing aspartate-specific proteases-3 (Cleaved-caspase-3) protein expression; Tetramethylazolum colorimetry (MTT) to detect cell survival rate; flow cytometry to detect apoptosis; luciferase report experiments to detect the targeting relationship between miR-382-3p and RASA1. **Results:** The expression of miR-382-3p in chondrocytes induced by LPS was significantly reduced, the expression of RASA1

* 基金项目:河北省卫生厅科研基金项目 (20160422)

作者简介:GILDAS ALOGO YING(1994-),男,国籍:赤道几内亚,学士,研究方向:关节、创伤,E-mail:jchx8012@163.com,电话:15128475701,护照号码:F0160154

Δ 通讯作者:焦建宝(1964-),男,硕士研究生导师,主任医师,研究方向:关节、创伤,E-mail:hdfyjbb@163.com,电话:13931212539

(收稿日期:2019-12-29 接受日期:2020-02-23)

was significantly increased, the expression of CyclinD1 was significantly reduced, the expression of Cleaved-caspase-3 was significantly increased, the cell survival rate was significantly reduced, and the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$). Overexpression of miR-382-3p and knockdown of RASA1, CyclinD1 expression was significantly increased in chondrocytes induced by LPS, Cleaved-caspase-3 expression was significantly reduced, cell survival rate was significantly increased, apoptosis rate was significantly reduced ($P<0.05$). miR-382-3p targets RASA1, and overexpression of RASA1 partially reverses the effect of overexpression of miR-382-3p on the proliferation and apoptosis of chondrocytes treated with LPS. **Conclusions:** Overexpression of miR-382-3p promotes chondrocyte proliferation and inhibits LPS-induced chondrocyte apoptosis; the mechanism may be related to RASA1.

Key words: miR-382-3p; RASA1; Osteoarthritis; Chondrocytes; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R33; R684.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)13-2440-07

前言

骨关节炎是常见于中老年人的慢性退行性疾病,严重影响患者健康及生活质量,目前主要有基础治疗、药物治疗及手术治疗,但效果不一^[1]。骨关节炎主要病理改变为关节软骨退行性改变及其局部骨质硬化增生,软骨细胞是软骨组织内唯一的细胞类型,表达和分泌大量的细胞外基质维持软骨正常功能,软骨细胞异常凋亡与骨关节炎的发生发展密切相关^[2]。研究表明 miRNA 异常表达参与了骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡、关节软骨细胞外基质稳态、软骨细胞炎症等,可作为骨关节炎早期诊断的标志物;miRNA 还可作为骨关节炎分子靶向治疗中的调控基因^[3]。研究报道 miR-382-3p 在白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 刺激的软骨细胞中被下调,miR-382-3p 可能通过直接靶向连接蛋白 43(connexin 43, CX43)通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/骨髓分化主要反应 88 (Myeloid differentiation primary response 88, MyD88)/核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞炎症反应^[4]。miR-382-3p 还显著增强了成骨分化,与绝经后 2 型糖尿病妇女的脆性骨折有关^[5]。Ras p21 蛋白活化因子 1 (Ras p21 protein activator 1, RASA1) 是 RAS GTP 酶激活蛋白 (RAS GAPs) 家族的成员之一,研究报道 miR-144 通过靶向 RASA1 缓解慢性收缩损伤引起的神经性疼痛^[6]。miR-4530 通过靶向 RASA1 抑制人脐静脉内皮细胞增殖并诱导凋亡^[7]。然而 miR-382-3p 和 RASA1 对骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响尚不清楚,本实验旨在研究 miR-382-3p 是否通过调控 RASA1 影响影响。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清、DEME 培养基均购自美国 Gibco 公司;脂多糖 (LPS)购自美国 Sigma 公司;Trizol 试剂、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自美国 ProgeMa 公司;Lipofectamine TM 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 试剂盒、蛋白提取试剂盒、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC)和碘化丙啶(PI)试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京 Solarbio 公

司。Thermo FC 酶标仪购自美国 Thermo 公司;FACSCanto II 流式细胞仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞的分离培养 标本取自本院骨科截肢患者的膝骨关节软骨,标本获得经患者同意。将膝骨关节软骨无菌条件下切成 1 mm³ 小块,加入 2 倍体积的 II 胶原酶在 37℃ 下充分消化,用 60 目细胞筛过滤除渣后再以 800 rpm 的转速离心 6 min,去上清,加入含 15%胎牛血清的 DEME 培养液重悬,37℃、5% CO₂ 条件下培养,2-3 天换液一次。

1.2.2 细胞处理与分组 取对数生长期软骨细胞,用 100 ng/mL 的脂多糖(LPS)处理 8 h,记为 LPS 组,以正常培养的软骨细胞作为正常对照 (NC) 组。miR-NC、miR-382-3p、anti-miR-NC、anti-miR-382-3p 转染至软骨细胞中,记为 miR-NC 组、miR-382-3p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-382-3p 组;将 miR-NC、miR-382-3p、si-NC、si-RASA1 转染至软骨细胞后再用 100 ng/mL 的 LPS 处理,记为 miR-NC+LPS 组、miR-382-3p+LPS 组、si-NC+LPS 组、si-RASA1+LPS 组;将 miR-382-3p 分别与 pcDNA-NC、pcDNA-RASA1 共转染至软骨细胞后再用 100 ng/mL 的 LPS 处理,记为 miR-382-3p+pcDNA-NC+LPS 组、miR-382-3p+pcDNA-RASA1+LPS 组。转染均按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒进行操作。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测 miR-382-3p 和 RASA1 mRNA 表达水平 各组细胞培养 48 h,提取总 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,按照荧光定量试剂盒使用说明进行 PCR,每个样品设 3 个重复,循环条件为 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s; 72℃ 30 s, 共 40 个循环;60℃ 延长 5 min。相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$} 法计算。miR-382-3p 和 RASA1 分别以 U6 和 β -actin 为内参, miR-382-3p 上游引物序列:5'-ACACTCCAGCTGGGAAT-CATTACGGACA-3',下游引物序列:5'-CCAGTGCAGGGTC-CGAGGT-3';U6 上游引物序列:5'-CGCTTCGGCAGCA-CATATACTA-3',下游引物序列:5'-CGCTTCAC-GAATTTGCGTGTCA-3';RASA1 上游引物序列:5'-TGACA-GAACGATAGCAGAAGAAC-3',下游引物序列:5'-TTCCAC-CAATGTAGTAATCTCCAC-3'; β -actin 上游引物序列:5'-CTC-CATCCTGGCCTCGCTGT-3',下游引物序列:5'-GCTGTCAC-CTTCACCGTTCC-3';引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.4 蛋白质印迹 (Western blot) 法检测 RASA1、CyclinD1、Cleaved-caspase-3 蛋白表达 提取各组细胞总蛋白,用 BCA 试

剂盒进行蛋白定量。各组蛋白上样量 60 μ g, SDS-PAGE 后, 经电转将蛋白转移至 PVDF 上。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min, 分别加入相应的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 再加入二抗室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 后在暗室中曝光显影, 再浸入定影液, 最后洗去残液, 晾干, 将胶片用 Quantity One 凝胶分析软件处理, 测定各组蛋白条带的灰度值, 以目的条带和 β -actin 条带的比值作为蛋白表达水平。

1.2.5 MTT 检测细胞存活率 各组细胞培养 48 h 后每孔分别加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 继续孵育 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 振荡反应 10 min 使沉淀溶解, 用酶标仪于波长 490 nm 处检测吸光度(OD)值。细胞存活率(%)=实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 $\times$ 100%。实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 各组细胞培养 48 h 后用预冷的 PBS 漂洗 2 次, 与 500 μ L 的结合缓冲液混匀。先加入 10 μ L 的 Annexin V-FITC, 再加入 5 μ L 的 PI, 混匀后避光孵育 10 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡率。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.7 荧光素酶报告实验检测 miR-382-3p 和 RASA1 的靶向关系 构建含有 miR-382-3p 结合位点的 RASA1-3'UTR 野生型及突变型荧光素酶报告基因载体, 将其分别与 miR-NC 和 miR-382-3p 共转染至软骨细胞中。按照说明书检测荧光素酶活性, 实验重复 3 次。

1.2.8 pulldown 实验 设计两种不同的生物素标记探针 RASA1 (与 miR-382-3p 序列可互补结合) 和 NC 探针 (不与

miR-382-3p 序列互补结合), 将这两种探针分别与 M-280 链霉亲和素磁珠 25 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 得到探针包被的磁珠, 与细胞裂解产物于 4 $^{\circ}$ C 孵育 3 h, 然后用缓冲液洗涤, 得到复合物, 将磁珠洗脱, 提取 RNA, RT-qPCR 分析 miR-382-3p 表达水平。

1.2.9 统计学分析 实验数据经 SPSS 20.0 分析, 计量资料用均数 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组比较行 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在 LPS 诱导的软骨细胞, miR-382-3p 和 RASA1 表达情况

与对照组相比, LPS 诱导的软骨细胞中 miR-382-3p 表达水平显著降低, RASA1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$) (图 1, 表 1)。

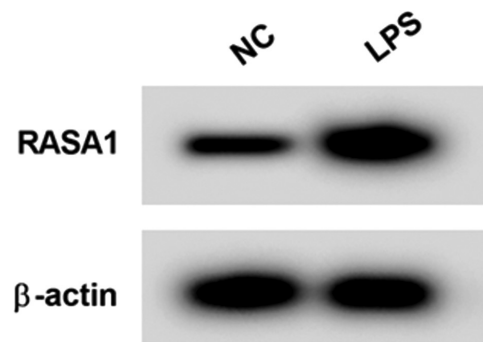


图 1 Western Blot 检测 RASA1 蛋白表达
Fig.1 Western Blot detection of RASA1 protein expression

表 1 在 LPS 诱导的软骨细胞中 miR-382-3p 和 RASA1 表达情况($\bar{x} \pm s$, n=9)
Table 1 Expression of miR-382-3p and RASA1 in chondrocytes induced by LPS($\bar{x} \pm s$, n=9)

Group	miR-382-3p	RASA1 mRNA	RASA1 protein
NC	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.12	0.40 $\pm$ 0.04
LPS	0.36 $\pm$ 0.04*	2.39 $\pm$ 0.24*	1.08 $\pm$ 0.11*
t	17.827	15.541	17.429
P	0.000	0.000	0.000

注: 与 NC 比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with NC group, * $P < 0.05$.

2.2 过表达 miR-382-3p 对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响

与对照组相比, LPS 诱导的软骨细胞中 miR-382-3p 表达水平显著降低, CyclinD1 表达水平显著降低, Cleaved-caspase-3 表达水平显著升高, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与 miR-NC+LPS 组相比, miR-382-3p+LPS 组软骨细胞中 miR-382-3p 表达水平显著升高, CyclinD1 表达水平显著升高, Cleaved-caspase-3 表达水平显著降低, 细胞存活率显著升高, 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$) (图 2, 表 2)。

2.3 敲减 RASA1 对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响

与 si-NC+LPS 组相比, si-RASA1+LPS 组软骨细胞中 RASA1 表达水平显著降低, CyclinD1 表达水平显著升高, Cleaved-caspase-3 表达水平显著降低, 细胞存活率显著升高, 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$) (图 3, 表 3)。

2.4 miR-382-3p 靶向 RASA1

starbase 预测显示 miR-382-3p 与 RASA1 存在结合位点 (图 4A)。荧光素酶报告实验显示, 与 miR-NC 组相比, miR-382-3p 组中转染野生型表达载体的软骨细胞荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$); 而转染突变型表达载体的软骨细胞荧光素酶活性无显著差异 (表 4)。与 Bio-NC 组相比, miR-382-3p 在含有 RASA1 探针的细胞中富集 (图 4B); 与 miR-NC 组相比, miR-382-3p 组 RASA1 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-382-3p 组 RASA1 表达水平显著升高 ($P < 0.05$) (图 4C, 表 5)。

2.5 高表达 RASA1 可以部分逆转 miR-382-3p 高表达对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响

与 miR-382-3p+pcDNA-NC+LPS 组相比, miR-382-3p+pcDNA-RASA1+LPS 组软骨细胞中 RASA1 表达水平显著升

高, CyclinD1 表达水平显著降低, Cleaved-caspase-3 表达水平显著升高, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)(图 5, 表 6)。

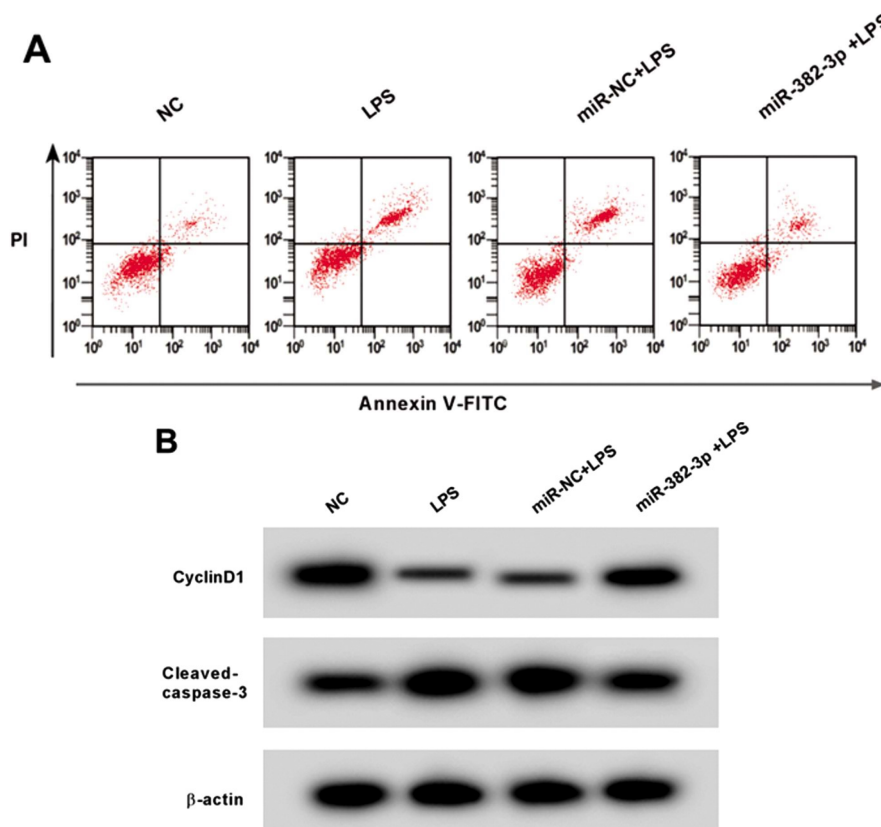


图 2 过表达 miR-382-3p 对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响

A: 流式细胞仪检测软骨细胞的凋亡

B: Western Blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3 蛋白的表达

Fig.2 Effect of overexpression of miR-382-3p on proliferation and apoptosis of chondrocytes treated with LPS

A: Chondrocyte apoptosis detected by flow cytometry

B: Western Blot detection of CyclinD1, Cleaved-caspase-3 protein expression

表 2 过表达 miR-382-3p 对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of overexpression of miR-382-3p on the proliferation and apoptosis of chondrocytes treated with LPS($\bar{x} \pm s, n=9$)

Group	miR-382-3p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	Cell viability(%)	Apoptosis rate (%)
NC	1.00± 0.12	0.85± 0.09	0.45± 0.05	100.00± 10.25	10.32± 1.05
LPS	0.34± 0.03*	0.38± 0.04*	1.25± 0.13*	62.42± 6.24*	29.22± 2.92*
miR-NC+LPS	0.36± 0.04	0.40± 0.05	1.24± 0.12	65.14± 6.51	31.17± 3.12
miR-382-3p+LPS	0.85± 0.08 [#]	0.75± 0.08 [#]	0.65± 0.07 [#]	89.27± 8.93 [#]	15.26± 1.53 [#]
F	176.176	111.806	155.992	45.691	175.286
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 NC 比较, * $P<0.05$;与 miR-NC+LPS 比较, [#] $P<0.05$ 。

Note: Compared with NC group, * $P<0.05$; compared with miR-NC+LPS group, [#] $P<0.05$.

3 讨论

骨关节炎是一种常见的累及关节软骨和周围结构的退行性疾病,迄今尚无特效疗法,软骨细胞影响着骨关节炎的进展^[8]。有研究报道脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)可诱导骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应^[9]。LPS 还可诱导兔软骨细胞损伤^[10]。因此本实验通过用 LPS 诱导建立骨关节炎细胞模型,结

果显示, LPS 诱导的软骨细胞中细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高;说明 LPS 可诱导软骨细胞凋亡。

miRNA 是一种非编码 RNA, 可以通过炎症、软骨基质降解、细胞凋亡、自噬等对骨关节炎的形成和发展起作用, 可以作为骨关节炎的新型生物标志物和骨关节炎治疗靶点^[11,12]。研究报道 miR-200b-3p 过表达促进软骨细胞生存, 降低细胞凋亡^[13]。miR-127-5p 通过靶向下调 adipoR1 表达可促进软骨细胞增殖

进而抑制炎症反应^[14]。以上结果表明 miRNA 可参与调控软骨细胞增殖、凋亡,且可能通过靶基因起作用。

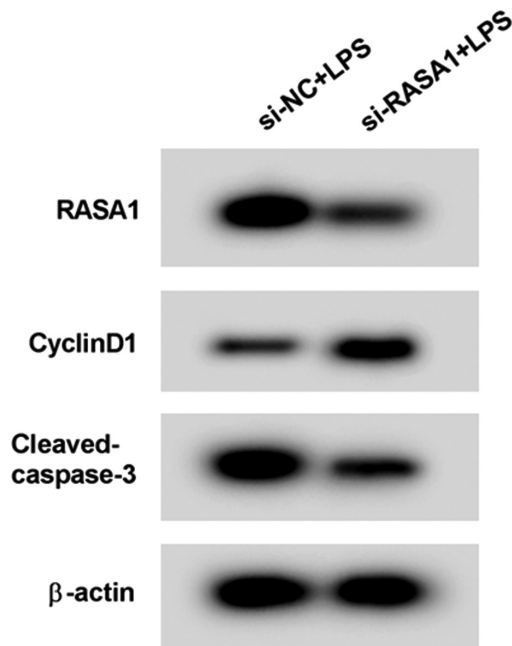


图3 Western Blot 检测 RASA1、CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 的蛋白表达

Fig.3 Western Blot detection of RASA1, CyclinD1 and Cleaved-caspase-3 protein expression

已有研究报道 miR-382-3p 与绝经后 2 型糖尿病妇女的脆性骨折有关^[5];说明 miR-382-3p 可能与骨的发生相关,但还未有相关详细研究报道。有研究报道 miR-382-3p 参与乳腺癌的发展,可作为乳腺癌检测的生物标志物^[15]。miR-382-5p 通过靶向抑制核因子蛋白 90(Nuclear factor 90,NF90)抑制乳腺癌细胞增殖,促进细胞凋亡^[16]。lncRNA NEAT1 通过轴向调控 miR-382-3p / Rho 相关激酶 1(Rho-associated kinase1,ROCK1)促进卵巢癌细胞的转移^[17]。以上结果表明 miR-382-5p 与癌症的发生发展相关,其在乳腺癌和卵巢癌中起抑癌作用。而 miR-382-5p 与骨关节炎的进展的影响极其机制尚不清楚。本实验结果显示 LPS 诱导的软骨细胞中 miR-382-3p 表达水平显著降低,说明 miR-382-3p 可能与软细胞的增殖、凋亡有关。miR-382-3p 过表达,LPS 诱导的软骨细胞中 CyclinD1 表达水平显著升高,Cleaved-caspase-3 表达水平显著降低,细胞存活率显著升高,细胞凋亡率显著降低。CyclinD1 是细胞周期调控关键因子,CyclinD1 高表达表明细胞增殖增多^[18]。Caspase-3 是调控细胞凋亡关键因子,其活化后促进细胞凋亡,Caspase-3 活化为 Cleaved-caspase-3,Cleaved-caspase-3 水平高低一定程度可代表细胞凋亡情况^[19]。本实验结果说明 miR-382-3p 过表达促进软骨细胞增殖,抑制 LPS 诱导的软骨细胞凋亡。

研究报道 RASA1 与肿瘤发生发展密切相关,RASA1 能够激活三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate,GTP)酶,使活化的 RAS 蛋白转为非活化状态,关闭 Ras 信号通路从而抑制肿瘤的

表3 敲减 RASA1 对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响($\bar{x} \pm s$,n=9)

Table 3 Effects of knockdown of RASA1 on proliferation and apoptosis of chondrocytes treated with LPS($\bar{x} \pm s$,n=9)

Groups	RASA1	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	Cell viability(%)	Apoptosis rate (%)
si-NC+LPS	1.06± 0.12	0.38± 0.04	1.22± 0.12	63.57± 6.36	30.89± 3.09
si-RASA1+LPS	0.42± 0.04*	0.77± 0.08*	0.57± 0.06*	86.13± 8.61*	14.28± 1.43*
t	15.179	13.081	14.534	6.323	14.635
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 si-NC+LPS 比较,* $P<0.05$ 。

Note: Compared with si-NC+LPS group, * $P<0.05$.

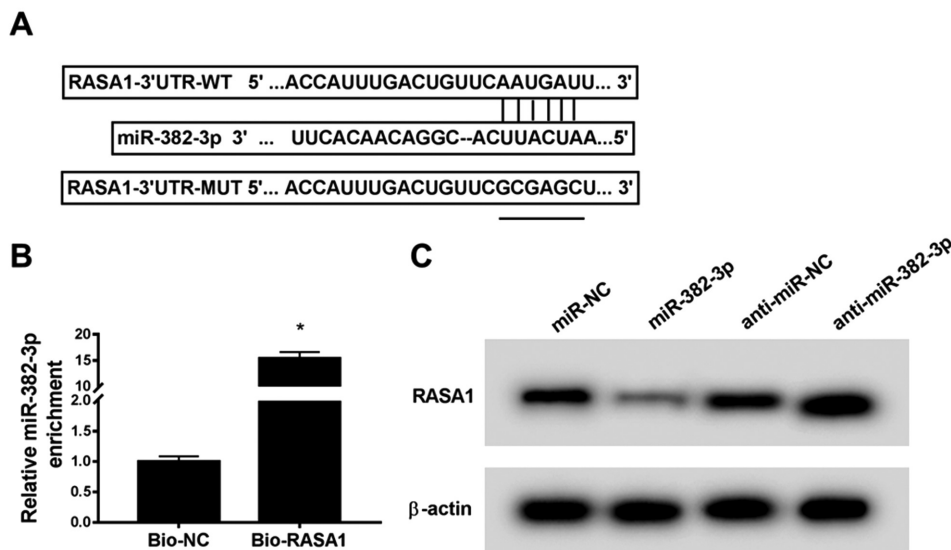


图5 Western Blot 检测 RASA1、CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白表达

Fig.5 Western Blot detection of RASA1, CyclinD1 and Cleaved-caspase-3 protein expression

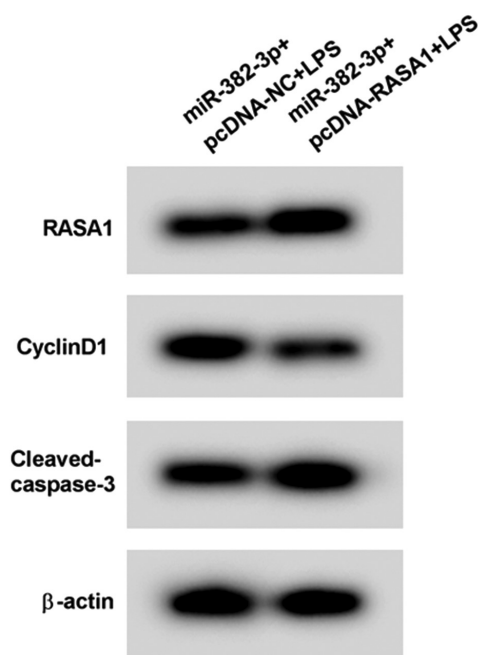


图4 miR-382-3p 靶向调控 RASA1 表达

A: starbase 对 miR-382-3p 和 RASA1 结合进行预测示意图

B: pulldown 检测结果

C: Western Blot 检测 RASA1 表达量

Fig.4 miR-382-3p targets RASA1 expression

A: Schematic diagram of starbase predicting the combination of miR-382-3p and RASA1

B: Western Blot detects RASA1 expression

发生^[20]。下调退变关节软骨中 Ras 蛋白含量可延缓大鼠椎间盘软骨细胞退变^[21]。抑制 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号通路可抑

表4 miR-NC 或 miR-382-3p 与报告质粒共转染软骨细胞后双荧光素酶活性检测($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 4 Detection of dual luciferase activity after co-transfection of miR-NC or miR-382-3p with reporter plasmid into chondrocytes($\bar{x} \pm s, n=9$)

Groups	Luciferase activity	
	WT	MUT
miR-NC	1.00± 0.11	1.07± 0.12
miR-382-3p	0.35± 0.04*	1.05± 0.10
t	16.660	0.384
P	0.000	0.706

注:与 miR-NC 比较,* $P<0.05$ 。Note: Compared with miR-NC group, * $P<0.05$.表6 高表达 RASA1 可以部分逆转 miR-382-3p 高表达对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 6 Overexpression of RASA1 can partially reverse the effects of miR-382-3p overexpression on the proliferation and apoptosis of chondrocytes treated with LPS($\bar{x} \pm s, n=9$)

Groups	RASA1	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	Cell viability(%)	Apoptosis rate (%)
miR-382-3p+pcDNA-NC+LPS	0.60± 0.06	0.78± 0.08	0.62± 0.06	90.68± 9.07	14.88± 1.49
miR-382-3p+pcDNA-RASA1+LPS	0.96± 0.10*	0.48± 0.05*	1.05± 0.11*	71.02± 7.11*	27.06± 2.71*
t	8.746	9.540	10.295	5.118	11.815
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-382-3p+pcDNA-NC+LPS 比较,* $P<0.05$ 。Note: Compared with miR-382-3p+pcDNA-NC+LPS group, * $P<0.05$.

制 TNF- α 诱导软骨细胞凋亡^[22]。电针干预通过下调调节软骨 Ras,Raf,MEK1/2 及 ERK1/2 mRNA 表达减轻膝关节关节炎模型大鼠软骨细胞损伤,从而发挥对骨关节炎关节软骨的保护作用^[23]。说明 Ras 信号通路与骨关节炎及软骨细胞相关。然而 RASA1 对于骨关节炎相关研究甚少,本实验中 LPS 诱导的软骨细胞中 RASA1 表达水平显著升高,敲减 RASA1,LPS 诱导的软骨细胞中 CyclinD1 表达水平显著升高,Cleaved-caspase-3 表达水平显著降低,细胞存活率显著升高,细胞凋亡率显著降低。说明抑制 RASA1 表达可抑制软骨细胞凋亡。

研究报道 miR-382-3p 过表达通过直接靶向和抑制 RASA1 和 SPRED1 激活 Ras- 丝裂原活化蛋白激酶/ERK 激酶(mitogen activated protein kinase/ERK kinase,MEK)- 细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)信号通路,并促进口腔鳞状细胞癌细胞增殖,细胞周期进程,集落形成和侵袭能力^[24]。RASA1 上调促进结肠癌细胞侵袭和肿瘤形成^[25]。miR-223 通过靶向结直肠癌 Ras 信号通路中关键基因 RASA1,能够调控 Ras 信号途径,在结直肠癌细胞的增殖和迁移过程中发挥重要的作用^[26]。miR-21 通过调控 RASA1 参与银屑病的发病^[27]。miR182 通过抑制 RASA1 和 SPRED1 激活 Ras-MEK-ERK 途径影响口腔鳞状细胞癌的进展。上结果表明 RASA1 可参与癌症的进展,且 miRNA 可参与调控 RASA1 的表达。本实验通过在线软件预测 miR-382-3p 和 RASA1 具有结合位点,进一步通过双荧光素酶报告实验验证了 miR-382-3p 靶向调控 RASA1,且高表达 RASA1 逆转了 miR-382-3p 高表达对 LPS 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响。提示,miR-382-3p 可通过调控 RASA1 影响软骨细胞增殖和凋亡。

表5 Western Blot 检测 RASA1 的表达($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 5 Western Blot detects RASA1 expression($\bar{x} \pm s, n=9$)

Group	RASA1
miR-NC	0.42± 0.04
miR-382-3p	0.15± 0.02*
anti-miR-NC	0.45± 0.05
anti-miR-382-3p	0.77± 0.08 [#]
F	212.780
P	0.000

注:与 miR-NC 比较,* $P<0.05$;与 anti-miR-NC 比较,[#] $P<0.05$ 。Note: Compared with miR-NC group, * $P<0.05$; compared with anti-miR-NC group, [#] $P<0.05$.

综上所述,过表达 miR-382-3p 可通过下调 RASA1 促进软骨细胞增殖,抑制 LPS 诱导的软骨细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] 李爽,王伟.膝骨性关节炎手术治疗的研究进展[J].中国骨与关节损伤杂志,2019,34(6): 666-669
- [2] 焦丹丽,那秋娟.软骨细胞衰老在骨关节炎中的作用[J].老年医学与保健,2019,25(3): 414-417
- [3] 王继成,易智.miRNA 与骨关节炎病理发展过程的相关性[J].中国组织工程研究,2019,23(24): 109-115
- [4] Lei J, Fu Y, Zhuang Y, et al. miR-382-3p suppressed IL-1 β induced inflammatory response of chondrocytes via the TLR4/MyD88/ NF- κ B signaling pathway by directly targeting CX43[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 23160-23168
- [5] Heilmeier U, Hackl M, Skalicky S, et al. Serum miRNA signatures are indicative of skeletal fractures in postmenopausal women with and without type 2 diabetes and influence osteogenic and adipogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. J Bone Miner Res, 2016, 31(12): 2173-2192
- [6] Zhang X, Guo H, Xie A, et al. MicroRNA-144 relieves chronic constriction injury-induced neuropathic pain via targeting RASA1 [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2019
- [7] Jing L, Li H, Zhang T, et al. MicroRNA-4530 suppresses cell proliferation and induces apoptosis by targeting RASA1 in human umbilical vein endothelial cells[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5): 3393-3402
- [8] 俞冬升.软骨细胞代谢影响骨关节炎的作用和机制研究 [D].浙江大学,2017
- [9] 朱海泉,刘子敏,孟祥圣,等.川芎嗪抑制 NF- κ B P65 磷酸化对 LPS 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用[J].中国免疫学杂志,2019,35(02): 59-63
- [10] 王刚涛,张旭辉,张卫东,等.蜕皮甾酮对脂多糖诱导兔软骨细胞损伤的保护作用[J].天津医药,2015,43(06): 17-20
- [11] 赵园园,代思明,张跃,等.miRNAs 对骨关节炎调控的研究进展[J].中华医学杂志,2019,99(3): 235-237
- [12] 毛丹,韦纪英,吴明松.miRNA 与骨关节炎发生发展关系的研究进展[J].山东医药,2018,58(37): 96-99
- [13] 商安全,王微微,陆文英,等.miR-200b-3p 与 DNA 甲基转移酶-3a 在骨关节炎软骨细胞中的表达及作用机制 [J]. 临床检验杂志,2018,36(8): 617-623
- [14] 李政,胡洪波,李玉民,等.MiR-127-5p 通过靶向调节 adipoR1 促进骨关节炎软骨细胞的增殖 [J]. 中国生物化学与分子生物学报,2016,32(5): 544-551
- [15] Fu L, Li Z, Zhu J, et al. Serum expression levels of microRNA-382-3p, -598-3p, -1246 and -184 in breast cancer patients[J]. Oncol Lett, 2016, 12(1): 269-274
- [16] 韩昕峰,李春燕,侯青霞,等.微小 RNA-382-5p 靶向作用核因子蛋白 90 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 医学研究杂志,2018,47(09): 145-149
- [17] Liu Y, Wang Y, Fu X, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promoted ovarian cancer cells' metastasis through regulation of miR-382-3p/ ROCK1 axis[J]. Cancer Sci, 2018, 109(7): 2188-2198
- [18] 卢梦玲,闫超,赖多,等.Cyclin D1 与细胞周期调控[J].生物技术通报,2011,(10): 55-59
- [19] 董雅洁,高维娟.bcl-2、bax、caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J].中国老年学杂志,2012,32(21): 224-226
- [20] 黄炎,杨继元.Ras GTPase 激活蛋白在肿瘤发生中的作用[J].海南医学,2017,28(13): 2156-2159
- [21] 付长龙,梅阳阳,李氏,等.基于 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号通路探究狗脊多糖延缓大鼠椎间盘软骨细胞退变[J].中华中医药杂志,2019,34(7): 3311-3314
- [22] 俞明珠.电针调节 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号通路抑制软骨细胞凋亡的机制研究[D].福建中医药大学,2015
- [23] 付长龙,林洁,赵忠胜,等.电针抑制 Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 信号通路介导骨关节炎软骨超微结构退变 [J]. 中国组织工程研究,2017,21(32): 5134-5139
- [24] Wang J, Wang W, Li J, et al. miR182 activates the Ras-MEK-ERK pathway in human oral cavity squamous cell carcinoma by suppressing RASA1 and SPRED1 [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10 (1): 667-679
- [25] Gong B, Liu W W, Nie W J, et al. MiR-21/RASA1 axis affects malignancy of colon cancer cells via RAS pathways [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(5): 1488-1497
- [26] 马玉涛.miR-223 靶向 RASA1 影响结直肠癌的发生发展的研究 [D]. 南京大学,2013
- [27] 王慧琴,唐承波,唐红,等.miR-21 及其靶蛋白 RASA1 在寻常型银屑病皮损组织中的表达及意义[J].中华全科医学,2017,15 (7): 1141-1143, 1180

(上接第 2505 页)

- [26] Friedlander AH, Lee UK, Polanco JC, et al. Positive Association Between Neutrophil-Lymphocyte Ratio and Presence of Panoramicallly Imaged Carotid Atheromas Among Men [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2019, 77(2): 321-327
- [27] Corriere T, Di Marca S, Cataudella E, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio is a strong predictor of atherosclerotic carotid plaques in older adults[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2018, 28(1): 23-27
- [28] 孟新颜,杨承志.内正五聚蛋白 3 和血小板与淋巴细胞比值对急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块稳定性和近期预后的影响研究[J].实用心脑血管病杂志,2017,26(9): 37-40
- [29] Karageorgos GM, Apostolakis IZ, Nauleau P, et al. Arterial wall mechanical inhomogeneity detection and atherosclerotic plaque characterization using high frame rate pulse wave imaging in carotid artery disease patients in vivo[J]. Phys Med Biol, 2020, 65(2): 025010
- [30] Zhou D, Li J, Liu D, et al. Irregular surface of carotid atherosclerotic plaque is associated with ischemic stroke: a magnetic resonance imaging study[J]. J Geriatr Cardiol, 2019, 16(12): 872-879