

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.19.010

# miR-29a 对于膝关节骨性关节炎大鼠滑膜损伤中的保护作用研究\*

刘旭剑<sup>1</sup> 王东来<sup>1</sup> 李增怀<sup>1</sup> 冯奇<sup>1</sup> 常富军<sup>2</sup> 冯建刚<sup>1Δ</sup>

(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 miR-29a 对于膝关节骨性关节炎(KOA)大鼠滑膜损伤中的保护作用研究。**方法:**采用前交叉韧带横断法(ACLT)建立 KOA 大鼠模型。大鼠注射 microRNA 阴性对照和 miR-29a。通过实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 KOA 滑膜组织和滑膜细胞中 miR-29a 的表达。RT-qPCR 和蛋白免疫印迹试验检测 Toll 样受体 4/ 髓样分化蛋白 88/ 核因子 κB(TLR4/Myd88/NF-κB) 信号通路相关蛋白的表达。检测 KOA 滑膜组织及滑膜细胞中炎症因子的表达水平。**结果:**KOA 滑膜组织和滑膜细胞中 miR-29a 表达下调。上调 miR-29a 可抑制 KOA 大鼠滑膜细胞的炎症反应,促使 KOA 大鼠的 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路失活。**结论:**上调 miR-29a 可通过 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路失活抑制 KOA 大鼠滑膜细胞炎症反应,从而保护滑膜损伤。

**关键词:**miR-29a; 膝关节骨性关节炎; 滑膜损伤; 机制

**中图分类号:** R-33; R684.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)19-3649-05

## Protective Effect of miR-29a on Synovial Injury in Rats with Knee Osteoarthritis\*

LIU Xu-jian<sup>1</sup>, WANG Dong-lai<sup>1</sup>, LI Zeng-huai<sup>1</sup>, FENG Qi<sup>1</sup>, CHANG Fu-jun<sup>2</sup>, FENG Jian-gang<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Orthopaedics, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, 050011, China;

2 Department of Orthopaedics, 980 Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Shijiazhuang, Hebei, 050000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the protective effect of miR-29a on synovial injury in rats with knee osteoarthritis (KOA).

**Methods:** A KOA rat model was established by anterior cruciate ligament transection (ACLT). Rats were injected with microRNA-negative control and miR-29a. miR-29a expression in synovial tissue and synovial cells of KOA was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Toll-like receptor 4/ myeloid differentiation protein 88/ nuclear factor κB (TLR4/MyD88/NF-κB) signaling pathway related protein expression was detected by RT-qPCR and Western blot assay. The expression levels of inflammatory cytokines in KOA synovial tissue and synovial cells were detected. **Results:** miR-29a expression was down-regulated in KOA synovial tissue and synovial cells. Up-regulation of Mir-29a inhibits the inflammatory response of synoviocytes in KOA rats, and inactivates the TLR4/Myd88/NF-κB signaling pathway in KOA rats. **Conclusion:** The up-regulation of miR-29a inhibited the inflammatory response of synovial cells in KOA rats through the inactivation of TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway, thereby protecting the synovial injury.

**Key words:** miR-29a; Knee osteoarthritis; Synovial injury; Mechanism

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R684.3 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2021)19-3649-05

### 前言

膝关节骨性关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)是老年人最常见的退行性疾病之一, KOA 的可能性随着年龄的增长而增加<sup>[1,2]</sup>。KOA 的危险因素有创伤性膝关节损伤、肥胖、体力劳动等,但 KOA 的早期诊断仍是一个未解决的难题。微小核糖核酸(microRNA)是一种非编码小 RNA,它通常包含约 20 个核苷酸,并具有调节某些靶基因的能力<sup>[3]</sup>。有研究表明, KOA 的滑膜、关节液中 miR-29a 呈低表达状态,而且随着 KOA 严重程度的增加, miR-29a 表达呈显著降低趋势,与 VEGF 表达水平呈负相关性<sup>[4]</sup>。但 miR-29a 与 KOA 滑膜损伤的相关性尚不明确。韦嵩<sup>[5]</sup>等研究显示,经筋微创疗法治疗 KOA 可通过调控 TLR4

信号转导通路,抑制下游 MyD88、NF-κB,阻断炎症细胞因子的分泌,减少软骨破坏,改善关节活动功能障碍、晨僵等症状,从而达到控制 KOA 进一步发展的目的。KOA 的治疗机制可能与降低 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白表达有关<sup>[6]</sup>。因此,本研究通过 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路,探讨 miR-29a 对 KOA 大鼠滑膜损伤的保护作用及机制,以期为 KOA 的治疗提供新的治疗靶点。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

选取健康雄性 SD 大鼠 40 只,周龄为 3 周,体重(180±10)g,由河北医科大学第四医院动物实验中心提供。提供大鼠常规的

\* 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(20170759)

作者简介:刘旭剑(1981-),男,硕士,主治医师,研究方向:膝关节、骨肿瘤, E-mail: ssyliuxujian@126.com

Δ 通讯作者:冯建刚(1961-),男,硕士,主任医师,研究方向:骨与软组织肿瘤、脊柱、关节, E-mail: 2006fjg@163.com

(收稿日期:2021-04-23 接受日期:2021-05-18)

食物和饮用水,适应性喂养 1 周。喂养条件为:室温 18-26℃,湿度 40-70%,噪音在 85dB 以下,每小时通风 8-12 次,12 h/12 h 人工昼夜周期。本研究获得了本院医学伦理委员会批准。

### 1.2 动物模型的建立及分组

将大鼠随机分为四组:对照组(n=10)、ACLT 组(n=10)、ACLT+ microRNA 阴性对照组 (n=10)、ACLT+miR-29a 组 (n=10)。采用前交叉韧带横断法(ACLT)建立大鼠模型。术前测量大鼠体重,采用 0.1 mg/kg 麻醉剂注射大鼠,麻醉后放置在手术台上。ACLT 组、ACLT+ microRNA 阴性对照组和 ACLT+miR-29a 组大鼠取右膝关节髌骨旁内侧切口,打开关节囊,见髌股关节面后将髌骨推向外侧,膝关节屈曲,分离前交叉韧带(注意勿损伤软骨),行抽屉试验确定已离断前交叉韧带,闭合关节腔,分层缝合切口。对照组大鼠仅切开至关节腔,不进行前交叉韧带离断。醒后将大鼠置于笼中常规饲养,大鼠四肢不固定。ACLT+microRNA 阴性对照组和 ACLT+miR-29a 组分别于术后 3 天、1 周、2 周、3 周、4 周在膝关节腔内注射 0.5 mL microRNA 阴性对照和 miR-29a。4 周后,每组大鼠均进行安乐死,收集膝关节标本,制成冰冻切片和石蜡切片,采用组织学和分子生物学提取总 RNA 和总蛋白。

### 1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

麻醉大鼠股动脉置血 1 h 后离心,取血清,滑膜组织磨匀离心,收集各组上清液,用无菌 EP 管包装。根据 IL-6 和 TGF- $\beta$  ELISA 试剂盒构建制备 8 个标准品,第 8 孔为空白对照组。标准物质和样本(100  $\mu$ L)分别加入 96 孔板,在 37℃ 孵育 2 h,加上 100  $\mu$ L 初级抗体并孵育 1 h。每个孔添加 100  $\mu$ L 二级抗体,并添加 100  $\mu$ L 显色试剂,孵育 30 min。每孔添加 50  $\mu$ L 终止液停止反应。测定各孔的吸光度值和浓度,绘制标准曲线。

### 1.4 实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

总 RNA 由 TRIzol 试剂盒从标本和细胞中提取。根据反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以 U6 为 miR-29a 相对表达的内参,以  $\beta$ -actin 为 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B、Bcl-2、Bax、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的内参。引物:miR-29a:5'-GAGTTGACCACAGCACCTC-3';U6:5'-CTCAACTGGTGTCTGTGGA-3';TLR4:5'-CTCGCTTCGGCAGCACCA-3';Myd88:5'-AACGCTTCACGA ATTGCGT-3';NF- $\kappa$ B:5'-ACAAACGCCGGAACCTTTTCG-3';Bcl-2:5'-GTCCGACACACAACCTTAAGC-3';Bax:5'-TTGCCAGC-GAGCTAATTGAG-3';IL-1 $\beta$ :5'-ACAGGCTGAGTGCAAAC TTG-3';TNF- $\alpha$ :5'-TGTCTGCACCTGTTCCAAAG-3'; $\beta$ -actin:5'-TTACAGGAAGTCCCTCACCCCTC-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 mRNA 的相对转录水平。

### 1.5 蛋白免疫印迹试验

提取滑膜组织和细胞总蛋白。用去离子水对每个样品的蛋白浓度进行评估和调整,确保装量一致。将样品与上样缓冲液混合,在 100℃ 下煮沸 5 min,电泳分离,将蛋白转移到硝化棉膜上,在 4℃ 下用 5% 脱脂奶粉密封过夜。加入一抗和二抗后孵育过夜。将滑膜浸泡在增强化学发光(ECL)反应试剂 1 min。曝光后观察结果。 $\beta$ -actin 作为内部参照。

### 1.6 细胞分离、培养和鉴定

将正常大鼠和 KOA 大鼠的滑膜组织用含双抗体的 PBS 浸泡 5 min, PBS 洗涤 3 次,置于培养皿中。将滑膜组织切成小

块,并放置在 6 mL 胶原酶 II (4 mg/mL) 含 10% PBS 的溶液中 3 h,使滑膜组织胰蛋白酶化,离心,丢弃上清液,然后添加 2 mL 杜氏改良培养基(DMEM)培养液,离心,丢弃上清液,再加入 4 mL DMEM 培养液混合,加入 1 mL PBS (20% 最终浓度),孵育并丢弃贴壁细胞。原代细胞形成单层后,用 0.25% 胰蛋白酶传代,取对数生长期细胞进行实验。倒置显微镜下观察细胞的生长情况。滑膜细胞纯度鉴定:将第三代细胞接种于 24 孔板上 (1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔),细胞覆盖孔后弃培养液,用羊血固定 1 h,血管细胞粘附分子 (VCAM)-1 在 4℃ 孵育过夜,随后 PBS 冲洗 3 次,荧光二抗孵育 1 h,4',6'-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色 10 min,荧光显微镜下观察,保存结果。

### 1.7 细胞分组和转染

将滑膜细胞分为正常组(无任何处理的正常滑膜细胞)、ACLT 组(无任何转染的 KOA 滑膜细胞)、ACLT+ microRNA 模拟阴性对照组(转染 microRNA 模拟阴性对照的 KOA 滑膜细胞)、ACLT+miR-29a 模拟组(转染 miR-29a 模拟的 KOA 滑膜细胞)。按照试剂盒说明,用模拟 microRNA 阴性对照和模拟 miR-29a 转染细胞,然后将转染的细胞在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 孵育。24h 后更换培养液,在荧光倒置显微镜下观察转染效率。

### 1.8 流式细胞术

膜联蛋白/碘化丙啶双染法检测细胞凋亡:每组细胞 1000 rpm、4℃ 离心 5 min 后收集。去离子水稀释结合缓冲液 (4 mL 结合缓冲液 +12 mL 去离子水)。随后用预冷 PBS 洗涤 2 次,1000 rpm 离心 5 min,弃上清,250  $\mu$ L 结合缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度至 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞/孔;细胞悬液 (5 mL) 加入 5 mL 流管,然后添加 5  $\mu$ L 膜联蛋白和 5  $\mu$ L 碘化丙啶混合液,无光照环境曝光 15 min。PBS (400  $\mu$ L) 添加到反应管,然后注入在流式细胞仪,分析结果。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示及 t 检验,计数资料以频数和百分率表示及  $\chi^2$  检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 KOA 大鼠滑膜组织中 miR-29a 表达情况

与对照组比较,ACLT 组、ACLT+ microRNA 阴性对照组、ACLT+miR-29a 组中 miR-29a 的表达下降,Mankin 评分明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 ACLT 组比较,ACLT+miR-29a 组 miR-29a 表达升高,Mankin 评分明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。ACLT 组与 ACLT+microRNA 阴性对照组 miR-29a 表达和 Mankin 评分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。如表 1 所示。

### 2.2 miR-29a 对 KOA 大鼠炎症指标 IL-6 和 TGF- $\beta$ 的影响

ACLT 组、ACLT+ microRNA 阴性对照组和 ACLT+miR-29a 组大鼠血清、滑膜组织和相对 RNA 水平中 IL-6 和 TGF- $\beta$  的表达水平均较对照组升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 ACLT 组相比,ACLT+miR-29a 组 IL-6 和 TGF- $\beta$  的表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。如表 2 所示。

表 1 各组 miR-29a 的相对 RNA 水平和 Mankin 评分比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Relative RNA levels of miR-29a and Mankin score in each group( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	miR-29a	Mankin score
Control group	1.00±0.01	0.25±0.01
ACLT group	0.25±0.03*	7.01±0.30*
ACLT+ microRNA negative control group	0.30±0.03*	6.98±0.30*
ACLT+miR-29a group	0.71±0.05**	2.18±0.15**
F value	48.497	92.716
P value	0.000	0.000

Note: compared with the control group, \* $P<0.05$ ; compared with ACLT group, \*\* $P<0.05$ .

表 2 各组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of the expression levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in each group( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	Serum(pg/mL)		Synovial tissue(pg/mL)		Relative RNA level( $\bar{x}\pm s$ )	
	IL-6	TGF- $\beta$	IL-6	TGF- $\beta$	IL-6	TGF- $\beta$
Control group	263.58±16.34	632.54±23.86	752.03±34.21	2534.12±42.01	1.00±0.01	1.00±0.01
ACLT group	520.67±25.63*	1206.34±30.56*	1734.05±32.05*	5634.28±64.37*	3.05±0.20*	3.77±0.20*
ACLT+ microRNA negative control group	510.42±22.38*	1152.06±31.65*	1634.20±30.22*	5312.47±72.08*	3.14±0.20*	3.56±0.21*
ACLT+miR-29a group	386.04±17.95**	759.42±25.33**	1088.34±24.37**	3420.54±66.34**	1.43±0.14**	1.86±0.14**
F value	27.945	42.507	30.15	102.34	21.547	16.974
P value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group, \* $P<0.05$ ; compared with ACLT group, \*\* $P<0.05$ .

2.3 miR-29a 对 KOA 大鼠滑膜组织中 TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 通路的影响

与对照组比较, ACLT 组、ACLT+ microRNA 阴性对照组和 ACLT+miR-29a 组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 的表达水平均显著

升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 与 ACLT 组相比, ACLT+miR-29a 组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 的表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。如表 3 所示。

表 3 各组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 的相对 RNA 水平( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Relative RNA levels of TLR4, Myd88, and NF- $\kappa$ B in each group( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	TLR4	Myd88	NF- $\kappa$ B
Control group	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
ACLT group	4.21±0.26*	8.13±0.30*	6.84±0.28*
ACLT+ microRNA negative control group	4.17±0.26*	8.04±0.30*	6.73±0.28*
ACLT+miR-29a group	2.18±0.15**	3.14±0.22**	3.20±0.20**
F value	34.085	33.924	27.416
P value	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group, \* $P<0.05$ ; compared with ACLT group, \*\* $P<0.05$ .

2.4 KOA 大鼠滑膜细胞中 miR-29a 表达情况

与正常组比较, ACLT 组、ACLT+ microRNA 模拟阴性对照组和 ACLT+miR-29a 模拟组大鼠滑膜细胞中 miR-29a 表达水平下降, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。与 ACLT 组比较, ACLT+miR-29a 模拟组大鼠滑膜细胞中 miR-29a 表达水平升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。ACLT 组与 ACLT+ microRNA 模拟阴性对照组比较, 大鼠滑膜细胞中 miR-29a 表达水平

差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。如表 4 所示。

2.5 上调 miR-29a 可抑制 KOA 大鼠滑膜细胞的炎症反应

ACLT 组、ACLT+ microRNA 模拟阴性对照组和 ACLT+miR-29a 模拟组大鼠滑膜细胞中 IL-6 和 TGF- $\beta$  的表达水平及其相对 RNA 表达水平均较正常组显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。与 ACLT 组比较, ACLT+miR-29a 模拟组 IL-6 和 TGF- $\beta$  的表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

如表 5 所示。

表 4 大鼠滑膜细胞中 miR-29a 的表达( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 4 Expression of miR-29a in rat synovial cells( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	miR-29a
Control group	1.00±0.01
ACLT group	0.21±0.03*
ACLT+ microRNA simulation negative control group	0.23±0.03*
ACLT + miR-29a simulation group	0.77±0.05* <sup>&amp;</sup>
F value	36.251
P value	0.000

Note: compared with the control group,\* $P<0.05$ ; compared with ACLT group, <sup>&</sup> $P<0.05$ .

表 5 各组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达水平( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 5 The expression levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in each group( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	Synovial cell(pg/mL)		Relative RNA level	
	IL-6	TGF- $\beta$	IL-6	TGF- $\beta$
Control group	325.02±28.63	753.46±44.58	1.00±0.01	1.00±0.01
ACLT group	865.37±38.91*	3647.08±75.11*	3.10±0.18*	2.89±0.17*
ACLT+ microRNA simulation negative control group	981.06±47.64*	3584.02±70.12*	2.88±0.13*	3.19±0.20*
ACLT + miR-29a simulation group	520.47±40.85* <sup>&amp;</sup>	1624.35±52.07* <sup>&amp;</sup>	2.01±0.10* <sup>&amp;</sup>	2.34±0.16* <sup>&amp;</sup>
F value	33.694	50.317	30.514	33.024
P value	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group,\* $P<0.05$ ; compared with ACLT group, <sup>&</sup> $P<0.05$ .

### 2.6 上调 miR-29a 可抑制 KOA 大鼠滑膜细胞 TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 通路的激活

与正常组比较, ACLT 组、ACLT+ microRNA 模拟阴性对照组和 ACLT+miR-29a 模拟组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 的表达水

平均显著升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与 ACLT 组相比, ACLT+miR-29a 模拟组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 的表达水平明显降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。如表 6 所示。

表 6 各组 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 的相对 RNA 水平( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 6 Relative RNA levels of TLR4, Myd88, and NF- $\kappa$ B in each group( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	TLR4	Myd88	NF- $\kappa$ B
Control group	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
ACLT group	4.36±0.30*	8.30±0.35*	7.05±0.35*
ACLT+ microRNA simulation negative control group	4.33±0.30*	8.25±0.35*	6.84±0.35*
ACLT + miR-29a simulation group	2.25±0.20* <sup>&amp;</sup>	3.22±0.20* <sup>&amp;</sup>	3.16±0.20* <sup>&amp;</sup>
F value	60.370	36.210	29.341
P value	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group,\* $P<0.05$ ; compared with ACLT group, <sup>&</sup> $P<0.05$ .

### 3 讨论

KOA 是一种以关节软骨损伤及软骨下骨继发改变为特征的慢性关节炎疾病, 常伴有疼痛甚至残疾, 在其发展过程中软骨、软骨下骨和滑膜的每一个病理改变均是不可或缺的, 彼此相互作用<sup>[8]</sup>。ACLT 通过破坏膝关节稳定性诱导 KOA 发生, 对生理结构影响少, 创伤较小, 能较全面反映 KOA 病理进

程<sup>[9]</sup>。关节囊的内层是滑膜, 主要由疏松结缔组织构成, 可分泌滑液营养和润滑关节软骨, 在关节活动中起重要作用<sup>[10]</sup>。KOA 发展机制中滑膜炎扮演着重角色, KOA 的进展与滑膜炎严重程度呈正相关性<sup>[11]</sup>。有效抑制滑膜细胞的炎症反应可以保护滑膜, 抑制 KOA 滑膜炎, 进而缓解 KOA<sup>[12]</sup>。有研究显示 miR-29a 与一些人类疾病有关, 如 miR-29a 可能与心功能不全相互影响, 从而在冠心病发病过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>;

miR-29a 在口腔鳞癌 SCC-9 细胞中表达上调可降低靶基因 PIK3R2 的表达,影响 PI3K/Akt 信号通路,引起细胞增殖、迁移和侵袭能力下降<sup>[14]</sup>。本研究显示,上调 miR-29a 可明显抑制 KOA 滑膜组织和滑膜细胞中 IL-6 和 TGF- $\beta$  等炎症相关因子的表达,表明 KOA 大鼠炎症反应减弱,而上调 miR-29a 可使 KOA 大鼠的 TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 信号通路失活,提示可能通过 TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 信号通路失活化抑制 KOA 大鼠滑膜细胞炎症反应和凋亡,从而保护滑膜损伤,最终达到缓解 KOA 的目的。

TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路是参与调节机体炎症、坏死及凋亡等的重要信号通路<sup>[15]</sup>。TLR 家族既是信号分子,也是脂多糖的受体,TLR4 是 TLR 家族成员之一,主要分布于单核巨噬细胞表面,介导脂多糖炎症信号在细胞内传导,是脂多糖的优先受体<sup>[16]</sup>。TLR4 可诱发炎症因子表达,引起炎症反应,引起胞质区 NF- $\kappa$ B 活化,激活炎症反应,导致 IL-1、TNF 等炎症因子释放,从而产生级联反应<sup>[17]</sup>。Myd88 是 TLR4 信号通路中的关键接头分子,在上游信号的传递以及疾病的发生和进展中发挥着重要作用<sup>[18,19]</sup>。Myd88 促使 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白激酶泛素化降解,使 NF- $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白复合物中活化<sup>[20,21]</sup>。而 NF- $\kappa$ B 是 TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路下游的重要节点,参与调解炎症因子等的表达,特异性结合多种基因启动子的  $\kappa$ B 位点,促进转录,在免疫应答、炎症应答和细胞生长调节中发挥重要作用<sup>[22,23]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路是脂多糖介导的所有信号转导通路中最重要的下游通路,提示 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路可能是引发炎症反应和器官损伤的关键靶点<sup>[24,25]</sup>。本研究显示,KOA 滑膜组织和滑膜细胞中 miR-29a 表达下调,TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 表达水平均显著升高,上调 miR-29a 后,TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B 的表达水平均降低;表明上调 miR-29a 后 KOA 大鼠的 TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 信号通路失活,从而阻断炎症因子分泌,减少滑膜损伤,从而缓解 KOA。通过抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路可改善软骨形态,减轻滑膜损伤,延缓 KOA 的发生发展<sup>[7,26,27]</sup>。姜黄素、乌头汤等可通过调控 / 阻断 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,降低炎症水平,抑制 KOA 滑膜炎症反应,从而起到预防或治疗 KOA 的作用<sup>[28,29]</sup>。

综上所述,上调 miR-29a 可通过 TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 信号通路失活化抑制 KOA 大鼠滑膜细胞炎症反应,从而保护滑膜损伤。因此,上述结果为 KOA 的治疗开辟了新的途径。

#### 参考文献(References)

- [1] 叶海霞,谭波涛,贾功伟,等. 膝关节骨性关节炎的物理治疗进展[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2020, 42(9): 853-857
- [2] Tang X, Wang S, Zhan S, et al. The Prevalence of Symptomatic Knee Osteoarthritis in China: Results From the China Health and Retirement Longitudinal Study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(3): 648-653
- [3] 王国栋. MiRNA-145 对软骨细胞增殖与凋亡的影响及其机制研究[D]. 青岛大学, 2018, 1-43
- [4] 崔黎明,曹建刚,李强,等. 膝关节骨性关节炎患者滑膜和关节液中 miR-29a 和 VEGF 的表达水平及意义 [J]. *广东医学*, 2019, 40(24): 3423-3427
- [5] 韦嵩,申茜,李晚晓,等. 经筋微创松解术治疗膝骨关节炎对 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号转导通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(10): 4637-4641
- [6] 谢亮. 经筋微创松解疗法联合暖日迪 -15 味丸对膝骨性关节炎患者 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号转导通路及 TGF- $\beta$ \_1 水平的影响[J]. *新中医*, 2019, 51(5): 186-190
- [7] Huang X, Qiao F, Xue P. The protective role of microRNA-140-5p in synovial injury of rats with knee osteoarthritis via inactivating the TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(18): 2344-2358
- [8] 张蒙,刘培来,卢群山,等. 不同目标力线设定对开放性楔形胫骨高位截骨术治疗膝关节骨性关节炎疗效的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(6): 1181-1184
- [9] 邱皓,陈诗谋,翁政,等. 富血小板血浆干预膝骨性关节炎模型兔关节软骨和滑膜的改变 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(14): 2205-2210
- [10] 张斌,代凤雷,尹宏,等. 地黄梓醇干预早期膝骨关节炎大鼠膝关节滑膜组织中炎症相关因子的表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(29): 4656-4661
- [11] Bennell KL, Hunter DJ, Paterson KL. Platelet-Rich Plasma for the Management of Hip and Knee Osteoarthritis[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(5): 24
- [12] 沈瑞明,马丽辉,郑颜萍. 木犀草素通过 TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路参与急性痛性关节炎大鼠的抗炎作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2020, 45(2): 115-122
- [13] 孙玉敏,李斌. 冠心病患者血清 miR-21、miR-29a 表达水平与心电图 QRS 波时限相关性分析 [J]. *陕西医学杂志*, 2021, 50(6): 713-716. DOI:10.3969/j.issn.1000-7377.2021.06.018
- [14] 史雪聪,赵熠,罗伟民. miR-29a 对口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(3): 270-274
- [15] Fattori V, Zarpelon AC, Staurengo-Ferrari L, et al. Budlein A, a Sesquiterpene Lactone From *Viguiera robusta*, Alleviates Pain and Inflammation in a Model of Acute Gout Arthritis in Mice [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1076
- [16] He X, Qian Y, Li Z, et al. TLR4-Upregulated IL-1 $\beta$  and IL-1RI Promote Alveolar Macrophage Pyroptosis and Lung Inflammation through an Autocrine Mechanism[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31663
- [17] 王学宗,丁道芳,薛艳,等. TLR4/NF- $\kappa$ B 通路参与大鼠膝骨关节炎滑膜早期病变的研究[J]. *中国骨伤*, 2019, 32(1): 68-71
- [18] Liu DD, Cao G, Han LK, et al. Flavonoids from *Radix Tetrastigmae* improve LPS-induced acute lung injury via the TLR4/MD-2-mediated pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1733-1741
- [19] Bing X, Xuelei L, Wanwei D, et al. EGCG Maintains Th1/Th2 Balance and Mitigates Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium through TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Rats[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2017: 3057268
- [20] Wu L, Du L, Ju Q, et al. Silencing TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Alleviated Inflammation of Corneal Epithelial Cells Infected by ISE[J]. *Inflammation*, 2020, 10(3): 721-731
- [21] Lei R, Li J, Liu F, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes the keloid development through the activation of TGF- $\beta$ /Smad and TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathways[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(23): 3239-3250
- [22] Deng LL, Yuan D, Zhou ZY, et al. Saponins from *Panax japonicus* attenuate age-related neuroinflammation via regulation of the mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(11): 1877-1884

5597567

- [5] Gui Y, Xu Z, Jin T, et al. Using extracellular circulating micrnas to classify the etiological subtypes of ischemic stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(4): 352-361
- [6] Cheng ZJ, Dai TM, Shen YY, et al. Atorvastatin pretreatment attenuates ischemic brain edema by suppressing aquaporin 4 [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(11): 3247-3255
- [7] Morita K, Matsumoto N, Saito K, et al. Bmp signaling alters aquaporin-4 expression in the mouse cerebral cortex [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 10540
- [8] Wang Y, Huang J, Ma Y, et al. Microrna-29b is a therapeutic target in cerebral ischemia associated with aquaporin 4[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(12): 1977-1984
- [9] Pereira BM, Weinstein PR, Zea-Longa E, et al. Effect of blood flow rate and donor vessel diameter on the patency of carotid venous bypass grafts in dogs[J]. *Surg Neurol*, 1989, 31(3): 195-199
- [10] Grieve SM, Mazhar J, Callaghan F, et al. Automated quantification of myocardial salvage in a rat model of ischemia-reperfusion injury using 3d high-resolution magnetic resonance imaging (mri)[J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(4): e000956
- [11] Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke[J]. *Nat Med*, 2000, 6(2): 159-163
- [12] Cai L, Zhou Y, Wang Z, et al. Neuroserpin extends the time window of tpa thrombolysis in a rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(11): e22570
- [13] Suster I, Feng Y. Multifaceted regulation of microrna biogenesis: Essential roles and functional integration in neuronal and glial development[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6765
- [14] Tu Y, Hu Y. Mirna-34c-5p protects against cerebral ischemia/reperfusion injury: Involvement of anti-apoptotic and anti-inflammatory activities[J]. *Metab Brain Dis*, 2021
- [15] Tiedt S, Prestel M, Malik R, et al. Rna-seq identifies circulating mir-125a-5p, mir-125b-5p, and mir-143-3p as potential biomarkers for acute ischemic stroke[J]. *Circ Res*, 2017, 121(8): 970-980
- [16] Kijpaisalratana N, Nimsamer P, Khamwut A, et al. Serum mirna125a-5p, mir-125b-5p, and mir-433-5p as biomarkers to differentiate between posterior circulation stroke and peripheral vertigo[J]. *BMC Neurol*, 2020, 20(1): 372
- [17] Liu Y, Li Y, Ren Z, et al. Microrna-125a-3p is involved in early behavioral disorders in stroke-afflicted rats through the regulation of cadm2[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 1851-1859
- [18] Hou X, Xu H, Chen W, et al. Neuroprotective effect of dimethyl fumarate on cognitive impairment induced by ischemic stroke [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(6): 375
- [19] Fu X, Li Q, Feng Z, et al. The roles of aquaporin-4 in brain edema following neonatal hypoxia ischemia and reoxygenation in a cultured rat astrocyte model[J]. *Glia*, 2007, 55(9): 935-941
- [20] Yang Q, Yu J, Qin H, et al. Irbesartan suppresses lipopolysaccharide (lps)-induced blood-brain barrier (bbb) dysfunction by inhibiting the activation of mlck/mlc[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107834
- [21] 董静, 褚鹤龄, 高子丹, 等. 水通道蛋白 4 与脑血管病[J]. *国际脑血管病杂志*, 2016, 24(11): 1050-1054
- [22] Reijkerker A, Lopez-Ramirez MA, van Het Hof B, et al. Micrnas regulate human brain endothelial cell-barrier function in inflammation: Implications for multiple sclerosis [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(16): 6857-6863
- [23] Zheng Y, Pan C, Chen M, et al. Mir-29a ameliorates ischemic injury of astrocytes in vitro by targeting the water channel protein aquaporin 4[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1707-1717
- [24] Wang H, Zheng X, Jin J, et al. Lncrna malat1 silencing protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through mir-145 to regulate aqp4[J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 40
- [25] Yao X, Derugin N, Manley GT, et al. Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after transient focal cerebral ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584: 368-372
- [26] Lu H, Sun SQ. A correlative study between aqp4 expression and the manifestation of dwi after the acute ischemic brain edema in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116(7): 1063-1069

(上接第 3653 页)

- [23] Wang X, Zhou J, Yang J, et al. Role of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling in the contrast-induced injury of renal tubular epithelial cells[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5): 115
- [24] Sun XJ, Li XQ, Wang XL, et al. Sevoflurane inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-induced acute inflammatory lung injury via toll-like receptor 4 signaling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122752
- [25] Liu M, Xie J, Sun Y. TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B-Mediated Inflammation Contributes to Cardiac Dysfunction in Rats of PTSD [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(6): 1029-1035
- [26] Li Z, Zou Y, Fan D, et al. The mechanism of medial collateral ligament repair in knee osteoarthritis based on the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B inflammatory signaling pathway[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2020, 20(3): 398-403
- [27] 余永林, 吴家顺, 热合米丁·艾买提, 等. 淫羊藿甙干预脂肪间充质干细胞修复膝骨性关节炎的作用及相关机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(3): 301-306
- [28] 陈俊, 林洁, 赵忠胜, 等. 乌头汤对膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(27): 4381-4386
- [29] Zhang Y, Zeng Y. Curcumin reduces inflammation in knee osteoarthritis rats through blocking TLR4 /MyD88/NF- $\kappa$ B signal pathway[J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(3): 353-359