

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.24.004

LncRNA MEG3 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响 *

赵轶男 袁志毕 龙郝赋 牛志霞 孙强[△]

(空军军医大学西京医院 骨科 陕西 西安 710000)

摘要 目的:探讨长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, LncRNA)人母系表达基因(Maternally expressed gene 3, MEG3)对骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨细胞增殖和凋亡的影响及作用机制。**方法:**选取我院住院的 OA 患者和半月板损伤患者各 40 例,采用 RT-PCR 检测两组患者软骨组织和细胞中 MEG3 的表达。在 OA 软骨细胞中,转染 siRNA-MEG3(si-MEG3)或过表达 MEG3 的慢病毒载体(LV-MEG3),采用 CCK8 法检测细胞增殖情况,流式细胞仪检测细胞周期和凋亡情况,RT-PCR 和 western blot 检测 PCNA、Dvl2、GSK-3 β 、cyclinD1 和 β -catenin mRNA 和蛋白表达。**结果:**OA 患者膝关节软骨组织中 MEG3 的表达水平明显低于半月板损伤患者软骨组织($P<0.05$),同时 OA 软骨细胞中 MEG3 的表达水平明显低于正常软骨细胞($P<0.05$)。OA 软骨细胞转染 si-MEG3 后,细胞增殖能力和 PCNA 表达明显下降(P 均 <0.05),G₀/G₁ 期细胞比例明显升高($P<0.05$),S 期细胞比例明显下降($P<0.05$),细胞凋亡率明显增加(P 均 <0.05)。低表达 MEG3 能够显著降低 Dvl2、GSK-3 β 、cyclinD1 和 β -catenin mRNA 和蛋白表达水平(P 均 <0.05),增加 GSK-3 β mRNA 和蛋白表达水平(P 均 <0.05)。在 OA 软骨细胞转染 LV-MEG3 后,细胞增殖能力和 PCNA 表达明显升高(P 均 <0.05),G₀/G₁ 期细胞比例明显下降($P<0.05$),S 期细胞比例明显增加($P<0.05$),细胞凋亡率明显减少(P 均 <0.05)。高表达 MEG3 能够显著增加 OA 软骨细胞中 Dvl2、GSK-3 β 、cyclinD1 和 β -catenin mRNA 和蛋白表达水平(P 均 <0.05),降低 GSK-3 β mRNA 和蛋白表达(P 均 <0.05)。同时,采用 XAV939 阻滞 Wnt/ β -catenin 信号通路能够显著逆转过表达 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖和凋亡的影响。**结论:**MEG3 在 OA 患者和软骨细胞中均显著低表达,并能够通过阻滞 Wnt/ β -catenin 信号通路激活影响 OA 软骨细胞增殖和凋亡。MEG3 可能成为 OA 治疗的重要靶分子。

关键词:lncRNA MEG3;骨关节炎;Wnt/ β -catenin;增殖;凋亡

中图分类号:R-33;R684.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)24-4617-07

LncRNA MEG3 Regulates the Osteoarthritis Chondrocyte Proliferation and Apoptosis through Inhibiting Wnt/ β -catenin Signaling Pathway*

ZHAO Yi-nan, YUAN Zhi, BI Long, HAO Fu, NIU Zhi-xia, SUN Qiang[△]

(Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Long non-coding RNA (lncRNA) Maternally expressed gene 3 (MEG3) on osteoarthritis (OA) chondrocyte proliferation and apoptosis, and the underlying mechanisms. **Methods:** 40 patients with OA and 40 patients with meniscus injury in our hospital were selected. MEG3 expression in OA cartilage tissues and cells were analyzed by real-time polymerase chain reaction(RT-PCR). After transfecting OA chondrocytes with si-MEG3 or LV-MEG3, cell proliferation was detected by the cell counting kit-8 (CCK8) assay, cell cycle distribution and apoptosis were measured by flow cytometry analysis, and PCNA, Dvl2, GSK-3 β , cyclinD1 and β -catenin were detected by RT-PCR and western blotting. **Results:** The expression level of MEG3 in OA cartilage tissues was lower than that in patients with meniscus injury ($P<0.05$) and the expression level MEG3 in OA chondrocytes was lower than that in normal chondrocytes ($P<0.05$). Cell proliferation, and PCNA expression decreased significantly ($P<0.05$), the percentage of OA chondrocytes in G₀/G₁ significantly increased ($P<0.05$), the percentage of OA chondrocytes in the S phase significantly decreased($P<0.05$), and apoptosis significantly increased ($P<0.05$) in OA chondrocytes transfected with si-MEG3 compared to those in the si-NC group. Down regulation of MEG3 decreased DVL2, cyclin D1, and β -catenin expression ($P<0.05$) and increased GSK-3 β expression($P<0.05$). Cell proliferation, and PCNA expression increased significantly ($P<0.05$), the percentage of OA chondrocytes in G₀/G₁ significantly decreased($P<0.05$), the percentage of OA chondrocytes in the S phase significantly increased($P<0.05$), and apoptosis significantly decreased($P<0.05$) in OA chondrocytes transfected with LV-MEG3 compared to those in the LV-NC group. Up-regulation of MEG3 increased DVL2, cyclin D1, and β -catenin expression($P<0.05$) and decreased GSK-3 β expression($P<0.05$). Meanwhile, the effects of overexpression MEG3 on OA chondrocyte proliferation and apoptosis were reversed by inhibition of the Wnt/ β -catenin signal pathway by XAV939.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(2016YFC1100304)

作者简介:赵轶男(1984-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:骨科、关节外科,电话:15991674480, E-mail: fujindexinxiang@126.com

[△] 通讯作者:孙强(1986),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:关节外科、足踝外科,电话:18202924273, E-mail: naps@vip.163.com

(收稿日期:2019-06-05 接受日期:2019-06-29)

Conclusions: MEG3 expression was down-regulated in both OA patients and chondrocytes, which could affect the proliferation and apoptosis in OA chondrocytes by blocking the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. MEG3 may become an important target molecule for OA treatment.

Key words: LncRNA MEG3; Osteoarthritis; Wnt/ β -catenin; Proliferation; Apoptosis

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

Article ID: 1673-6273(2019)24-4617-07

前言

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见的退行性疾病,主要以关节基质破坏和关节软骨细胞减少为特点,多发生于中老年人群^[1]。随着我国社会人口老龄化的加重,OA 的发生率也不断升高,成为越来越受到关注的社会问题。目前,OA 尚无有效的根治手段,多以控制患者症状和改善关节功能为主。OA 的发病是一个多因素、多步骤的复杂过程,其中基因的异常表达发挥着重要作用。研究显示长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, LncRNA)在 OA 的发生发展中起到重要作用^[2]。

LncRNA 是一类长度大于 200 个核酸的 RNA, 其具有发育与组织表达的特异性, 在多种疾病中出现了异常的表达,并参与了转录后剪切、编辑、转运、翻译以及降解等过程^[3]。研究显示 LncRNA MEG3(MEG3)在喉部鳞状细胞癌、白血病、急性肾移植、阿尔兹海默病和类风湿关节炎中发挥着重要作用^[4-8],但其在 OA 中的作用尚未完全阐明。因此,本研究选取我院住院的 OA 患者和半月板损伤患者,采用 RT-PCR 检测两组患者软骨细胞中 MEG3 的表达水平,同时通过在 OA 软骨细胞中转染 si- MEG3 和 LV- MEG3,探讨 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖和凋亡的影响以及作用机制。

1 材料和方法

1.1 组织标本

选取 2016 年 3 月至 2018 年 11 月期间在我院住院的 40 名 OA 患者和 40 名半月板损伤患者。OA 诊断标准采用美国风湿学院标准,患者平均年龄(62.5 ± 10.2)岁,包括男性 24 例,女性 16 例;半月板损伤患者平均年龄(43.7 ± 9.6)岁,其中男性 28 例,女性 12 例。所有患者均未患有风湿性关节炎、痛风性关节炎、类风湿性关节炎和继发性骨关节炎等。在术中切除软骨组织,所有组织标本分成相同大小并保存于液氮中。所有在术前签署知情同意书。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 细胞培养基 (Gibco, Rockville, MD, USA), CCK-8 试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology, Jiangsu, China), TRIzol Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), RNA 反转录试剂盒(TaKaRa, Otsu, Japan), lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 兔抗人 PCNA、Dvl2、GSK-3 β 、cyclinD1、 β -catenin 和 β -actin 抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), HRP 标记的羊抗兔 IgG (Abcam, Cambridge, UK), XAV939(Millipore 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 人软骨细胞通过两步酶消化法进行分离,然后进行传代培养。软骨组织被剪碎后采用 PBS 冲洗,

然后采用 0.25 % 的胰蛋白酶消化, 震荡孵育 40 min 后使用 D-Hanks 缓冲液冲洗并以 2 mg/mL 的 II 型胶原酶消化,离心分离软骨细胞,将原代软骨细胞采用含 10 % 胎牛血清的 DMEM/F12 细胞培养基在 37 °C、5 % CO₂ 平衡湿度培养箱中培养。取对数生长期软骨细胞进行实验。Wnt 抑制剂组加入 XAV939($1 \mu\text{mol/L}$),采用 INTERFERin 转染试剂并按试剂说明书进行 si- MEG3 和 LV- MEG3 转染。MEG3 干扰序列为 5'-(AGCCAGCTGTCCCTCTTAC CTCCTGTCAGA-3'(sense) and 5'- GTAAGAGGGACAGCTGGCT-3'(antisense)。细胞转染采用 Lipofectamine 2000 方法,其具体操作按照说明书进行。每组重复设置 5 个孔。

1.3.2 qRT-PCR 按照 Trizol 试剂盒步骤提取组织和细胞中总 RNA。采用标准荧光定量 PCR 法检测。以 β -actin 为内参通过 260 nm 和 280 nm 吸光度,qRT-PCR 按照 SYBR Green 试剂盒说明书进行反应体系的配制,通过 Prime Script™ RT 试剂盒检测 RNA 的浓度,反转录试剂盒合成 cDNA。采用比较 CT 值法对获得的数据进行相对定量分析。

1.3.3 CCK-8 方法检测细胞增殖 取对数生长期的各组细胞,以 2×10^3 个密度接种到 96 孔培养板中,常规培养。各组细胞分别培养 24、48、72 和 96 h 后,加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,孵育 10 min,用酶标仪测定在 405 nm 波长的吸光度进行检测。

1.3.4 Western blot 法 收集转染 24 h 后的细胞,常规提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶每孔加入 40 μg 的待测蛋白,110 V 电泳,250 mA 电转至 PVDF 膜,5 % 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,分别加入 PCNA、Dvl2、GSK-3 β 、cyclinD1、 β -catenin 和 β -actin 一抗 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 $\times$ 10 min,二抗 37 °C 孵育 1 h,TBST 洗膜 3 $\times$ 30 min,ECL 显影。运用 Quantity one 软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin 作内参,计算相对表达量。

1.3.5 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期和凋亡率 取对数生长期的细胞,以 3×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板,胰酶消化收集转染 24 h 后细胞,PBS 洗涤后制备成细胞悬液,加入预冷的 70 % 乙醇,4 °C 固定过夜。加入 PBS 洗涤 2 次后弃上清,加入 PI 工作液,室温下避光孵育 30 min 后,流式细胞仪检测细胞周期。用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶染色液($0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),轻轻混匀,室温避光孵育 20 min,用流式细胞仪进行检测。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OA 软骨组织和细胞中 MEG3 的表达

OA 患者软骨组织中 MEG3 的表达水平明显高于半月板损伤患者,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1A),OA 软骨细胞中 MEG3 的表达水平明显高于正常软骨细胞,差异具有统计

学意义($P<0.05$,图 1B)。采用 si- MEG3 转染 OA 软骨细胞后,MEG3 的表达水平明显降低($P<0.05$,图 1C),OA 软骨细胞转染 LV- MEG3 后,MEG3 的表达水平明显升高($P<0.05$,图 1D)。

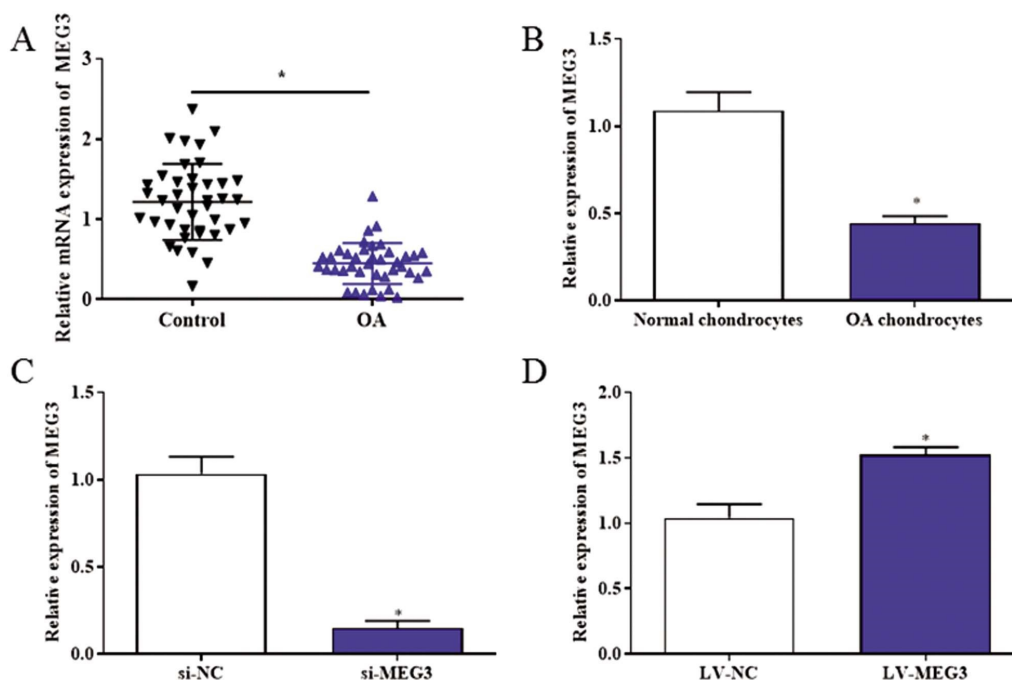


图 1 MEG3 在 OA 软骨组织和细胞中的表达

(A. MEG3 在半月板损伤软骨组织和 OA 软骨组织中的表达水平;B. MEG3 在正常软骨细胞和 OA 软骨细胞中的表达水平;C. OA 软骨细胞分别转染 si-NC 和 si-MEG3; D. OA 软骨细胞分别转染 LV-NC 和 LV-MEG3)

注:与对照组相比,* $P<0.05$

Fig.1 Expression of MEG3 in cartilage tissues and cells of OA

(A. The expression levels of MEG3 in OA and meniscus injury tissues. B. The expression levels of MEG3 in normal chondrocytes and OA chondrocytes.

C. OA chondrocytes transfected with si-NC and si-MEG3. D. OA chondrocytes transfected with LV-NC and LV-MEG3.)

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

2.2 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖的影响

在 OA 软骨细胞转染 si-MEG 并培养 3 天,分别检测 OA 软骨细胞的增殖情况,结果显示转染 si-MEG3 后,OA 软骨细胞增殖能力较转染 si-NC 组明显降低($P<0.05$,图 2A);转染 LV-MEG3 后,OA 软骨细胞增殖能力较转染 LV-NC 组明显升高($P<0.05$,图 2B)。进一步分析 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖相关分子表达的影响,结果显示在转染 si-MEG3 后,OA 软骨细胞 PCNA mRNA 和蛋白表达水平较转染 si-NC 组明显降低(P 均 <0.05 ,图 2C 和 2E);转染 LV-MEG3 后,OA 软骨细胞 PCNA mRNA 和蛋白表达水平较转染 LV-NC 组明显升高,差异均具有统计学意义(P 均 <0.05 ,2D 和 2F)。

2.3 MEG3 对 OA 软骨细胞周期的影响

在 OA 软骨细胞转染 si-MEG3 和 LV-MEG3 后,采用流式检测细胞周期情况。结果显示转染 si-MEG3 后 OA 软骨细胞 G_0/G_1 期细胞比例明显高于转染 si-NC 组($P<0.05$),S 期细胞比例明显低于转染 si-NC 组($P<0.05$),在 M 期细胞比例中两组无统计学差异($P>0.05$,图 3A 和 3B)。转染 LV-MEG3 后 OA 软骨细胞 G_0/G_1 期细胞比例明显低于转染 si-NC 组($P<0.05$),S 期细胞比例明显高于转染 si-NC 组($P<0.05$),在 M 期细胞比例中两组无统计学差异($P>0.05$,图 3C 和 3D)。

2.4 MEG3 对 OA 软骨细胞凋亡的影响

OA 软骨细胞转染 si-MEG3 和 LV-MEG3 后,进一步采用流式分析 MEG3 对 OA 软骨细胞凋亡的影响,结果显示转染 si-MEG3 的 OA 软骨细胞凋亡率明显高于转染 si-NC 组($P<0.05$,图 4A 和 4B)。转染 LV-MEG3 的 OA 软骨细胞凋亡率低于转染 LV-NC 组($P<0.05$,图 4C 和 4D)。

2.5 MEG3 对 OA 软骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

Wnt/ β -catenin 信号通路在 OA 中具有重要作用,为进一步分析 MEG3 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响,采用 RT-PCR 和 Western Blot 检测 Dvl2、GSK-3 β 、cyclinD1 和 β -catenin mRNA 和蛋白的表达水平,结果显示 OA 软骨细胞转染 si- MEG3 后,Dvl2、cyclinD1 和 β -catenin mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组均明显降低(P 均 <0.05),GSK-3 β mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组明显升高(P 均 <0.05 ,图 5A 和 5C)。OA 软骨细胞转染 LV-MEG3 后,Dvl2、cyclinD1 和 β -catenin mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组均明显升高(P 均 <0.05),GSK-3 β mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组明显降低(P 均 <0.05 ,图 5B 和 5D)。

2.6 阻滞 Wnt/ β -catenin 信号通路后 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖和凋亡的影响

为进一步反向验证过表达 MEG3 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对 OA 软骨细胞增殖和凋亡的影响,采用 XAV939 阻滞

Wnt/ β -catenin 信号通路,结果显示在转染 LV-MEG3 和加入 XAV939 后,阻滞 Wnt/ β -catenin 信号通路能够显著逆转过表达

MEG3 对 OA 软骨细胞增殖和凋亡的影响(P 均 >0.05 ,图6)。

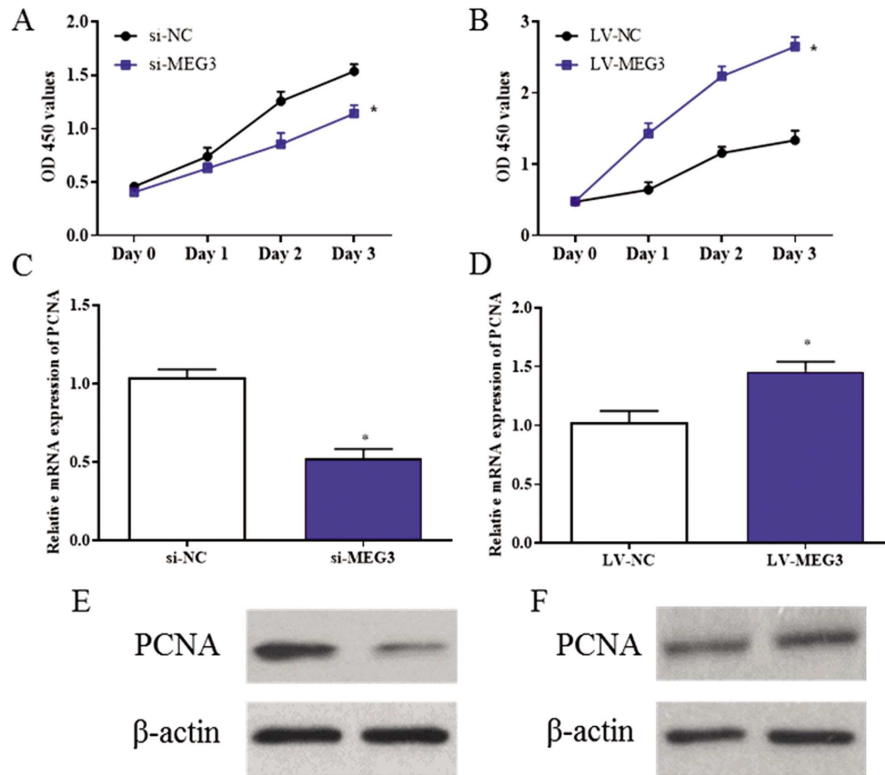


图2 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖的影响

(A 和 B. 在 OA 软骨细胞中转染 si-MEG3 和 LV-MEG3 后细胞增殖情况;C 和 E. 转染 si-MEG3 后 OA 软骨细胞 PCNA mRNA 和蛋白表达水平; D 和 F. 转染 LV-MEG3 后 OA 软骨细胞 PCNA 蛋白表达水平)

注:与对照组相比, $*P<0.05$ 。

Fig.2 The effects of MEG3 on the proliferation of OA chondrocytes

(A and B. The proliferation of OA chondrocytes after transfection with si-MEG3 and LV-MEG3. C and E. The mRNA expression of PCNA in OA chondrocytes after transfection with si-MEG3 and LV-MEG3. D and F. The protein expression of PCNA in OA chondrocytes after transfection with si-MEG3 and LV-MEG3.)

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

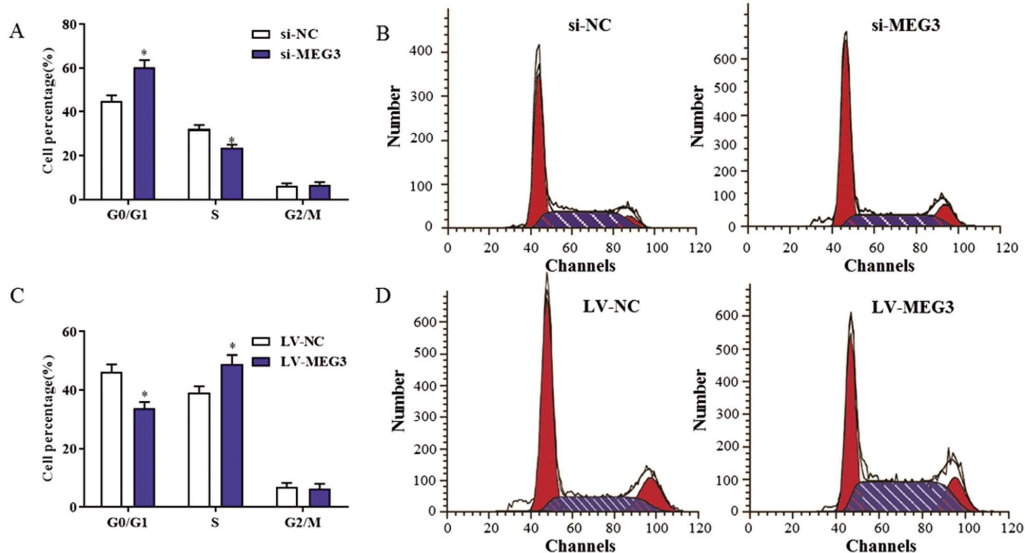


图3 MEG3 对 OA 软骨细胞周期的影响

(A 和 B. 转染 si-MEG3 后对 OA 软骨细胞周期的影响;C 和 D. 转染 LV-MEG3 后对 OA 软骨细胞周期的影响)

Fig.3 The effects of MEG3 on the cell cycle of OA chondrocytes

(A and B. The cell cycle of OA chondrocytes after transfection with si-MEG3. C and D. The cell cycle of OA chondrocytes after transfection with LV-MEG3.)

注:与对照组相比, $*P<0.05$ 。

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

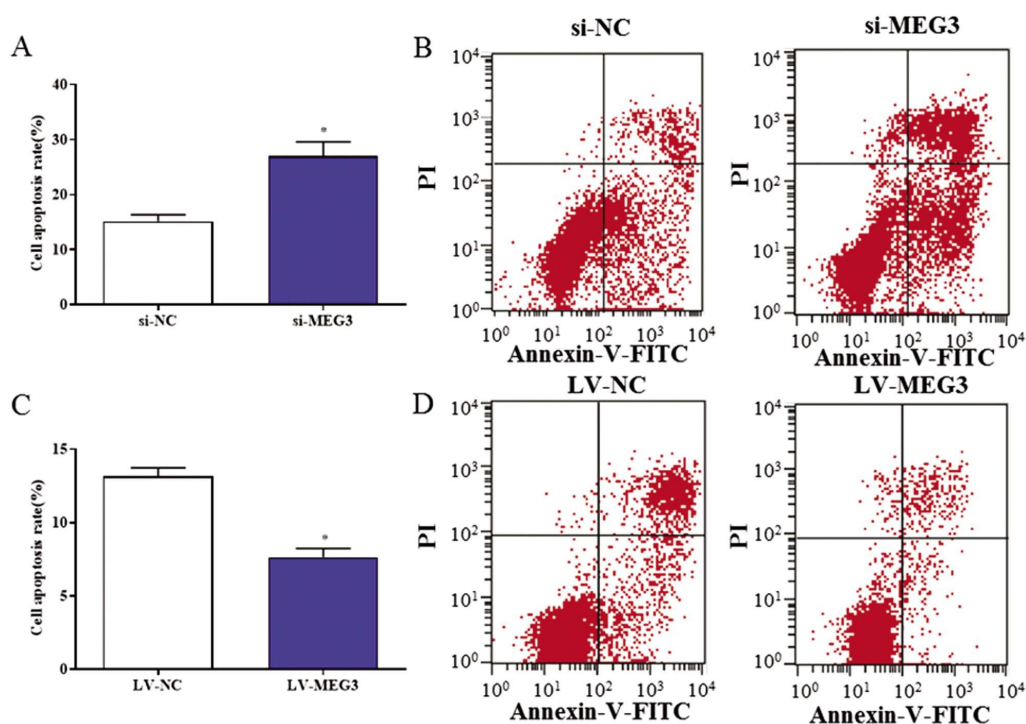


图4 MEG3对OA软骨细胞凋亡的影响

(A和B. 转染 si-MEG3 后对 OA 软骨细胞凋亡的影响; C和D. 转染 LV-MEG3 后对 OA 软骨细胞凋亡的影响)

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Fig.4 The effects of MEG3 on the apoptosis of OA chondrocytes

(A and B. The apoptosis of OA chondrocytes after transfection with si-MEG3. C and D. The apoptosis of OA chondrocytes after transfection with LV-MEG3.)

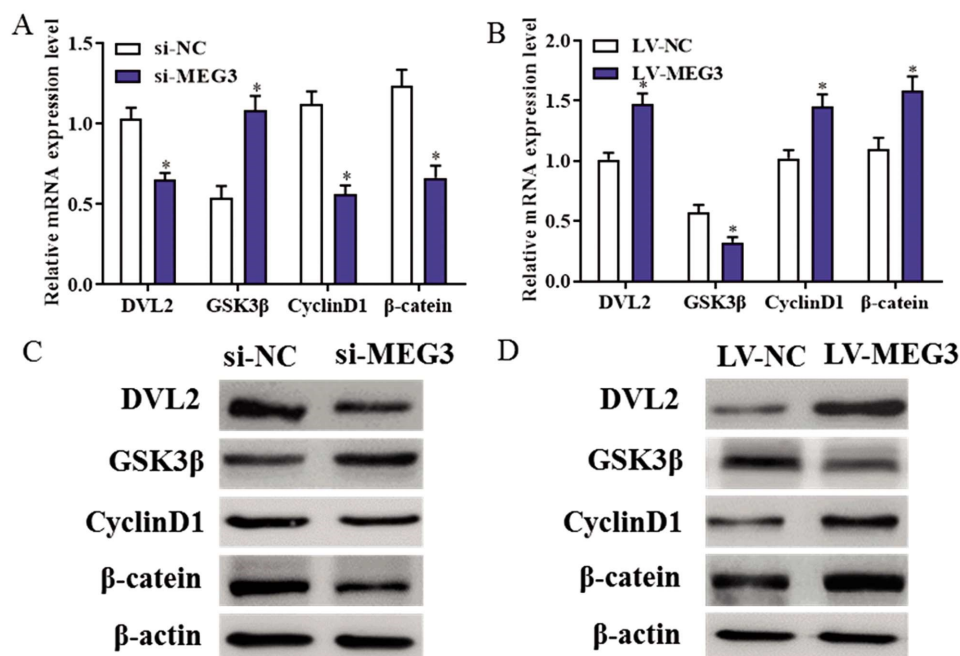
Note: compared with the control group, * $P < 0.05$.

图5 MEG3对OA软骨细胞Wnt/β-catenin信号通路的影响

(A和C. 转染 si-MEG3 后对 OA 软骨细胞 Dvl2、GSK-3β、cyclinD1 和 β-catenin mRNA 和蛋白表达水平的影响; B和D. 转染 LV-MEG3 后对 OA 软骨细胞 Dvl2、GSK-3β、cyclinD1 和 β-catenin mRNA 和蛋白表达水平的影响)

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Fig.5 The effects of MEG3 on the Wnt/β-catenin signal pathway of OA chondrocytes

(A and C. The mRNA and protein expression of Dvl2, GSK-3β, cyclinD1 and β-catenin in OA chondrocytes after transfection with si-MEG3. B and D. The mRNA and protein expression of Dvl2, GSK-3β, cyclinD1 and β-catenin in OA chondrocytes after transfection with LV-MEG3.)

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

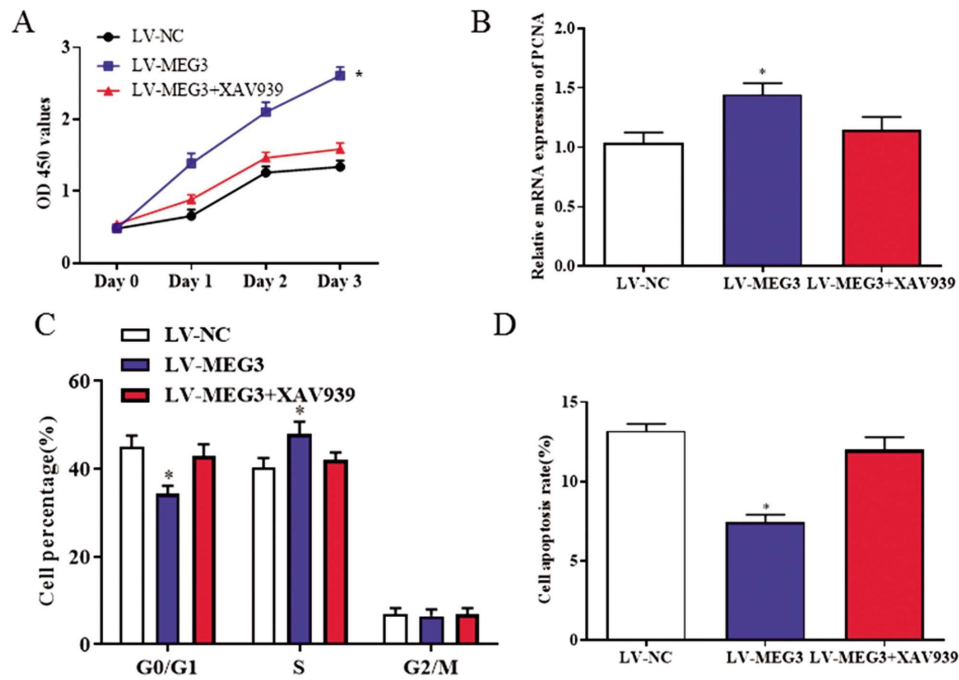


图 6 阻滞 Wnt/β-catenin 信号通路后 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖和凋亡的影响

(A. 转染 LV-MEG3 和加入 XAV939 后,对 OA 软骨细胞增殖的影响;B. 转染 LV-MEG3 和加入 XAV939 后,对 OA 软骨细胞 PCNA 表达的影响; C. 转染 LV-MEG3 和加入 XAV939 后,对 OA 软骨细胞周期的影响;D. 转染 LV-MEG3 和加入 XAV939 后,对 OA 软骨细胞凋亡的影响)

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Fig.6 The effects of MEG3 on the proliferation and apoptosis of OA chondrocytes after blocking the Wnt/β-catenin signal pathway

(A. The proliferation of OA chondrocytes after transfection with LV-MEG3 and treatment with XAV939. B. The expression of PCNA of OA chondrocytes after transfection with LV-MEG3 and treatment with XAV939. C. The cell cycle of OA chondrocytes after transfection with LV-MEG3 and treatment with XAV939. D. The apoptosis of OA chondrocytes after transfection with LV-MEG3 and treatment with XAV939.)

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

3 讨论

OA 是一种以细胞外基质降解和软骨丧失为特征的慢性疾病,主要表现为关节疼痛,易导致老年人致残。越来越多的证据显示在青少年中增加的体育锻炼会导致严重的膝关节损伤,进一步增加 OA 的发生^[9]。目前研究显示 OA 的发病主要与代谢、机械损伤、炎症刺激和遗传因素有关,但是其调节机制尚未完全明确^[10]。在 OA 疾病的控制方面,主要是通过减轻疼痛,或者物理治疗以及关节置换为主。然而,迄今还没有有效的 OA 治疗方式。研究显示在 OA 中存在多种 LncRNAs 的异常表达,包括 FOXD2-AS1、H19、TUG1、ATB 和 KLF3-AS1 等^[11-15]。最近有研究显示 MEG3 在 OA 中存在明显低表达,过表达 MEG3 表达后能够明显抑制 OA 小鼠炎症因子 IL-6、TNFα、IL-1β 和 IL-8 的释放,提示 MEG3 在 OA 的发生发展中发挥着重要作用^[16]。

本研究结果显示软骨组织和软骨细胞中 MEG3 在 OA 均存在明显低表达。进一步采用细胞实验验证 MEG3 对 OA 软骨细胞的影响,采用 si-MEG3 和 LV-MEG3 转染至 OA 软骨细胞,在转染 si-MEG3 后 OA 软骨细胞中 MEG3 表达水平明显下降,在转染 LV-MEG3 后 OA 软骨细胞中 MEG3 表达水平明显升高。同时,低表达 MEG3 的 OA 软骨细胞的增殖能力明显降低,同时细胞增殖分子 PCNA 的表达下降。然而,过表达 MEG3 的 OA 软骨细胞的增殖能力明显升高,增殖相关分子 PCNA 的表达升高,这提示 MEG3 在 OA 中能够影响细胞增殖。有研究显示 MEG3 能够通过调控 PI3K/AKT 信号通路影响

类风湿性关节炎人成纤维样滑膜细胞的增殖^[17]。

细胞的增殖和细胞周期密切相关,本研究中,OA 软骨细胞低表达 MEG3 能够明显增加 G₀/G₁ 期细胞比例,降低 S 期细胞比例,同时诱导细胞凋亡增加;过表达 MEG3 能够明显减少 G₀/G₁ 期细胞比例,增加 S 期细胞比例,同时抑制细胞凋亡。这说明在 OA 中低表达的 MEG3 能够将 OA 软骨细胞阻滞在 G₀/G₁ 期并诱导细胞凋亡。有研究显示动脉粥样硬化中,MEG3 能够靶向调控 miR-26a/Smad1 轴影响血管平滑肌的增殖和凋亡^[18]。然而 MEG3 在 OA 中的作用机制还有待进一步明确。

Wnt/β-catenin 信号通路参与了细胞增殖、分化、细胞粘附和细胞极性等多种细胞行为的调节^[19]。大量研究显示 Wnt/β-catenin 信号通路在多种免疫相关疾病和炎症性疾病中发挥至关重要作用^[20,21]。Wnt/β-catenin 信号通路的异常激活、β-catenin 蛋白和 Wnt 蛋白的异常表达参与了疾病的发生发展,主要通过激活下游靶分子调节细胞的增殖、侵袭、凋亡和炎症因子的释放^[22]。β-catenin 蛋白在细胞连接处和 E-cadherin 结合成粘附复合物,可以增加细胞间的粘附作用^[23]。当细胞浆中游离的 β-catenin 蛋白转入细胞核后,可以激活下游分子 cyclin D1 等靶基因的转录,促进细胞增殖和迁移^[24]。有研究显示 Wnt/β-catenin 信号通路在 OA 中发挥着重要作用^[25]。

本研究结果显示 OA 软骨细胞转染 si-MEG3 后,Dvl2、cyclinD1 和 β-catenin mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组均明显降低,GSK-3β mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组明显升高。同时,OA 软骨细胞转染 LV-MEG3 后,Dvl2、cy-

clinD1 和 β -catenin mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组均明显升高, GSK-3 β mRNA 和蛋白的表达水平较转染 si-NC 组明显降低。这提示抑制 MEG3 后能够明显抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活, 通过过表达 MEG3 后可以促进 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。有研究显示 MEG3 能够通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路参与胶质瘤的发生发展^[26]。这进一步说明 MEG3 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控作用。

为了进一步反向验证 MEG3 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路参与 OA 的进展, 在本研究中采用 XAV939 阻滞 Wnt/ β -catenin 信号通路, 结果显示在转染 LV-MEG3 和加入 XAV939 后, 阻滞 Wnt/ β -catenin 信号通路能够显著逆转过表达 MEG3 对 OA 软骨细胞增殖和凋亡的影响。同时在口腔鳞状细胞癌中 MEG3 也能够通过 Wnt/ β -catenin 信号通路参与疾病的发生发展^[27]。

综上所述, MEG3 在 OA 软骨组织和细胞中呈显著低表达, 并能够通过阻滞 Wnt/ β -catenin 信号通路激活影响 OA 软骨细胞增殖和凋亡。MEG3 可能成为 OA 治疗的重要靶分子。

参考文献(References)

- [1] Wang K, Chu M, Ding W, et al. Putative functional variants of lncRNA identified by RegulomeDB were associated with knee osteoarthritis susceptibility[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2018, 19(1): 284
- [2] Li L, Lv G, Wang B, et al. The role of lncRNA XIST/miR-211 axis in modulating the proliferation and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes through CXCR4 and MAPK signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2555-2562
- [3] Zhu J K, He T D, Wei Z X, et al. lncRNA FAS-AS1 promotes the degradation of extracellular matrix of cartilage in osteoarthritis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(10): 2966-2972
- [4] Zhao Y Q, Liu X B, Xu H, et al. MEG3 inhibits cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23 (5): 2062-2068
- [5] Sellers Z P, Bolkun L, Kloczko J, et al. Increased methylation upstream of the MEG3 promoter is observed in acute myeloid leukemia patients with better overall survival[J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1): 50
- [6] Pang X, Feng G, Shang W, et al. Inhibition of lncRNA MEG3 protects renal tubular from hypoxia-induced kidney injury in acute renal allografts by regulating miR-181b/TNF-alpha signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2019
- [7] You D, You H. Repression of long non-coding RNA MEG3 restores nerve growth and alleviates neurological impairment after cerebral ischemia-reperfusion injury in a rat model [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 1447-1457
- [8] Liu Y R, Yang L, Xu Q Q, et al. Long noncoding RNA MEG3 regulates rheumatoid arthritis by targeting NLRC5[J]. J Cell Physiol, 2019
- [9] Li X, Tang C, Wang J, et al. Methylene blue relieves the development of osteoarthritis by upregulating lncRNA MEG3 [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4): 3856-3864
- [10] Shen H, Wang Y, Shi W, et al. lncRNA SNHG5/miR-26a/SOX2 signal axis enhances proliferation of chondrocyte in osteoarthritis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(2): 191-198
- [11] Wang Y, Cao L, Wang Q, et al. lncRNA FOXD2-AS1 induces chondrocyte proliferation through sponging miR-27a-3p in osteoarthritis [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 1241-1247
- [12] Hu Y, Li S, Zou Y. Knockdown of lncRNA H19 Relieves LPS-Induced Damage by Modulating miR-130a in Osteoarthritis [J]. Yonsei Med J, 2019, 60(4): 381-388
- [13] Dang X, Lian L, Wu D. The diagnostic value and pathogenetic role of lncRNA-ATB in patients with osteoarthritis [J]. Cell Mol Biol Lett, 2018, 23: 55
- [14] Tang L P, Ding J B, Liu Z H, et al. lncRNA TUG1 promotes osteoarthritis-induced degradation of chondrocyte extracellular matrix via miR-195/MMP-13 axis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22 (24): 8574-8581
- [15] Liu Y, Lin L, Zou R, et al. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis [J]. Cell Cycle, 2018, 17 (21-22): 2411-2422
- [16] Li X, Tang C, Wang J, et al. Methylene blue relieves the development of osteoarthritis by upregulating lncRNA MEG3 [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4): 3856-3864
- [17] Lu X, Qian J. Downregulated MEG3 participates in rheumatoid arthritis via promoting proliferation of fibroblast-like synoviocytes[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3): 1637-1642
- [18] Bai Y, Zhang Q, Su Y, et al. Modulation of the Proliferation/Apoptosis Balance of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis by lncRNA-MEG3 via Regulation of miR-26a/Smad1 Axis [J]. Int Heart J, 2019, 60(2): 444-450
- [19] Zhong G, Liang R, Yao J, et al. Artemisinin Ameliorates Osteoarthritis by Inhibiting the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(6): 2575-2590
- [20] Xu K, Ma C, Xu L, et al. Polygalacic acid inhibits MMPs expression and osteoarthritis via Wnt/beta-catenin and MAPK signal pathways suppression[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 63: 246-252
- [21] Fernandez-Torres J, Zamudio-Cuevas Y, Lopez-Reyes A, et al. Gene-gene interactions of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in knee osteoarthritis[J]. Mol Biol Rep, 2018, 45(5): 1089-1098
- [22] Meo B P, Xiao L, Hurley M M. FGF23 Regulates Wnt/beta-Catenin Signaling-Mediated Osteoarthritis in Mice Overexpressing High-Molecular-Weight FGF2[J]. Endocrinology, 2018, 159(6): 2386-2396
- [23] Yang X, He H, Gao Q, et al. Pulsed electromagnetic field improves subchondral bone microstructure in knee osteoarthritis rats through a Wnt/beta-catenin signaling-associated mechanism[J]. Bioelectromagnetics, 2018, 39(2): 89-97
- [24] Liu S, Yang H, Hu B, et al. Sirt1 regulates apoptosis and extracellular matrix degradation in resveratrol-treated osteoarthritis chondrocytes via the Wnt/beta-catenin signaling pathways[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 5057-5062
- [25] Okura T, Ohkawara B, Takegami Y, et al. Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/beta-catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 2808
- [26] Gong X, Huang M. Long non-coding RNA MEG3 promotes the proliferation of glioma cells through targeting Wnt/beta-catenin signal pathway[J]. Cancer Gene Ther, 2017, 24(9): 381-385
- [27] Liu Z, Wu C, Xie N, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma by regulating the WNT/beta-catenin signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 4053-4058