

## ◇ 临床医学研究 ◇

**miRNA-140、MMP-3 在 OA 关节滑液中的表达及相关性研究**

邹磊, 周圆家, 饶峰, 王琰, 丁浩, 陈福宇, 史晨辉, 王维山

**摘要** 目的 比较 miRNA-140 和 MMP-3 在骨性关节炎 (OA) 组与非 OA 组关节滑液中的表达, 探究 miRNA-140 和 MMP-3 与 OA 的相关性。方法 采用实时定量 PCR 技术检测 miRNA-140、MMP-3 在 OA 组 ( $n=65$ ) 与非 OA 组 ( $n=65$ ) 关节滑液中的表达水平, 并运用 Spearman 相关分析分析 miRNA-140 与 MMP-3 的相关性。结果 组间比较显示 OA

组 miRNA-140 的表达显著低于非 OA 组 ( $P < 0.05$ ), MMP-3 的表达明显高于非 OA 组 ( $P < 0.05$ )。OA 组内各因子之间相关分析显示, miRNA-140 和 MMP-3 呈显著负相关性 ( $r = -0.693, -0.720, P < 0.05$ )。结论 相对于非 OA 病变, OA 组关节滑液中 miRNA-140 低表达, MMP-3 高表达, 两者之间呈负相关性。

**关键词** 骨性关节炎; 基质金属蛋白酶-3; 小 RNA; 关节滑液中图分类号 R 684.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1289-04

2015-04-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81160225、81260453、81360451); 兵团医药卫生专项课题(编号: 2013BA020); 兵团国际交流与合作专项基金(编号: 2012BC002); 兵团骨科创新团队专项(编号: 2014BC003)

作者单位: 石河子大学医学院, 石河子 832000

作者简介: 邹磊, 男, 硕士研究生;

王维山, 男, 副教授, 副主任医师, 责任作者, E-mail:

wwsmc2002@sina.com

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 与基因、遗传、免疫等多种因素有关<sup>[1-2]</sup>。目前对 OA 的发病机理尚不清楚。研究<sup>[3]</sup>显示大部分 mRNA 都受到 miRNA 的调控, miRNA 可通过调控基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 实现对 OA 的调节。由于

- [5] 闵小芬, 李前进, 尹艳艳, 等. 定眩颗粒镇静催眠及镇吐作用的试验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(5): 356-8.  
[6] 陈晓燕, 王家辉, 柏玉举, 等. 小半夏加茯苓胶囊对顺铂诱发犬和家鸽呕吐的影响[J]. 中成药, 2007, 29(12): 1749-51.  
[7] 朱伟, 张丹, 李志. 紫苏叶梗对小鼠胃排空和小肠推进功

能的影响[J]. 陕西中医, 2011, 32(8): 1081-3.

- [8] 封银曼, 常桂花. 陈皮枳术汤对大鼠胃动力障碍的实验研究[J]. 中医学报, 2011, 26(8): 949-50.

- [9] 王帅, 盛亮亮, 贾冬, 等. 仲景温胃颗粒对小鼠胃动力障碍模型的影响[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(5): 1165-8.

## Experimental study of zhizhu dangshen granules on intestinal propulsive function and antemetic effect

Zhang Yan, Wang Yuling, Wu Wenning, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To study the effects of zhizhu dangshen granules on intestinal propulsive function and antemetic effect in animals. **Methods** The models of intestinal dysfunction induced by atropine, dopamine and epinephrine in mice were used to study gastrointestinal propulsive function. The models of vomit induced by copper sulfate and cisplatin in pigeon were used to study antemetic effect. **Results** A single administration of Zhizhu dangshen granules (20 g/kg) could alleviate inhibition of intestinal propulsive function induced by atropine in mice. Three preventive administration of Zhizhu dangshen granules (10 g/kg and 20 g/kg) could improve the inhibition of intestinal propulsive function induced by dopamine and epinephrine in mice. A single administration of Zhizhu dangshen granules (16 g/kg) could reduce the vomitive times induced by copper sulfate in pigeon. Three preventive administration of Zhizhu dangshen granules (4 g/kg, 8 g/kg and 16 g/kg) had no effect on vomit induced by cisplatin in pigeon. **Conclusion** Zhizhu dangshen granules significantly increases intestinal propulsive function. It also has certain antiemetic effect on peripheral vomit.

**Key words** Zhizhu dangshen granules; intestinal propulsive effect; analgesic effect

MMP-3 有降解蛋白多糖、纤维蛋白链接素和胶原等基质的作用,被认为是基质降解的关键因素<sup>[4]</sup>,是导致软骨退变的基本因子<sup>[5]</sup>。在 miRNA-140 的调控下,动物模型 OA 的发展过程中表现出蛋白多糖的丢失和关节软骨的退变<sup>[6]</sup>。此外,miRNA-155 在类风湿性关节炎滑液纤维母细胞中的过度表达导致了 MMP-13 受到抑制而不是 MMP-3,却没有证实 MMP-3 与 miRNA-155 结合<sup>[7]</sup>。对于 miRNA-140 与 MMP-3 在关节滑液中的表达及相关性,尚无明确报道。该研究将通过检测 OA 组与非 OA 组关节滑液中 miRNA-140 和 MMP-3 的表达情况,探究两者之间的关系。

### 1 材料与方法

**1.1 病例材料** 实验共收集滑液标本 130 例,均选自 2013 年 11 月~2014 年 8 月石河子大学第一附属医院骨科住院患者;其中 OA 组 65 例,男 25 例,女 40 例;平均年龄 50~72(61.2±5.4)岁,OA 患者均根据文献<sup>[8]</sup>中的诊断标准进行纳入,排除患有肝肾功能异常、恶性肿瘤、感染性疾病者;抗‘O’类风湿因子阳性,血沉 C 反应蛋白异常者以及妊娠和哺乳期妇女;非 OA 组 65 例,男 30 例,女 35 例;平均年龄 22~54(34.1±8.1)岁。非 OA 组滑液均来自因外伤行截肢的膝关节和单纯膝关节半月板损伤、前后交叉韧带损伤、游离体、滑膜皱襞综合征行关节镜治疗的患者。实验获取滑液标本得到石河子大学医学伦理委员会的支持,所有患者自愿签订知情同意书。

#### 1.2 主要仪器和试剂

**1.2.1 主要仪器** NanoDrop 2000c 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);ABI PRISM 7300 荧光定量 PCR(美国 Applied Biosystems 公司)。

**1.2.2 主要试剂** miRNA mirVana™ 提取试剂盒 miRNA Isolation Kit、TaqMan® 2 × Universal PCR Master Mix II、反转录试剂盒 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit、引物 miRNAa 及 MMP3(美国 ABI 公司)。

#### 1.3 方法

**1.3.1 提取总 RNA** 首先分离关节液,即用 15 ml 无菌、无酶的离心管取符合实验对象膝关节液 3~4 ml 在室温 3 000 r/min 离心 5 min;小心吸取上清液,分装入 1.5 ml EP 管中,-70℃保存。其次用 TRIzol 一步法提取总 RNA,步骤为裂解、分层、RNA

沉淀、RNA 洗涤和 RNA 溶解。

**1.3.2 逆转录合成 cDNA** 按照 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 中的操作要求配置 15 μl 反应体系,将稀释后的 5 μl RNA 样本和 3 μl 的目的基因引物及内参 U6 加入预先按照说明书中提供的试剂配成每份 7 μl 的混合液中,简单 500 r/min 离心 30 s 后放进 PCR 仪反应,反应条件为变形:96℃ 30 min,退火:42℃ 30 min,延伸:85℃ 5 min。

**1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测** 按照反应体系配置说明配备总反应液 20 μl,其中 TaqMan® 2 × Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG® 10 μl; Nuclease-free water 7.76 μl; product from RT reaction 1.33 μl; Custom TaqMan® Small RNA AssAy (20 ×) 1 μl; 每个样本设 3 个复孔,反应条件为:变形:95℃ 10 min,退火:95℃ 15 s,延伸:60℃ 1 min,共 40 个循环。应用 ABI Prism 7700 system 提供的分析软件 Rtor-Gene real-time PCR analysis software 进行分析,ΔCt = CtmiRNA - CtU6,以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示每个 miRNA 的相对表达量,经过对数换算后作为统计分析数据。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示;组间比较采用独立样本 *t* 检验,各指标间相关性采用 Spearman 分析。

### 2 结果

**2.1 miRNA-140、MMP-3 在 OA 关节滑液组织中的表达情况** 本实验采用实时定量 PCR 技术,检测 65 例 OA 患者与 65 例非 OA 患者关节滑液中 miRNA-140 和 MMP-3 的表达情况,结果显示滑液中的目的基因均能检测到,且扩增曲线良好,扩增率较高。见图 1。其中两组 miRNA-140 的表达量分别为 (0.87±0.49)、(1.98±0.78) μg/L,差异有统计学意义(*t* = -4.831, *P* < 0.001);MMP-3 的表达量分别为 (3.32±1.64)、(0.47±0.32) μg/L,差异有统计学意义(*t* = 8.259, *P* < 0.001)。

**2.2 OA 组与非 OA 组关节滑液中 miRNA-140 与 MMP-3 的相关性** 根据 Spearman 相关分析结果显示,OA 组关节滑液中 miRNA-140 与 MMP-3 的表达水平呈负相关性(*r* = -0.693),非 OA 组 miRNA-140 与 MMP-3 的表达水平也呈负相关性(*r* = -0.720)。可见两种因子在关节滑液中的表达呈现显著负相关性。见图 2。

### 3 讨论

研究<sup>[9]</sup>证实 OA 软骨下骨代谢异常及软骨组织

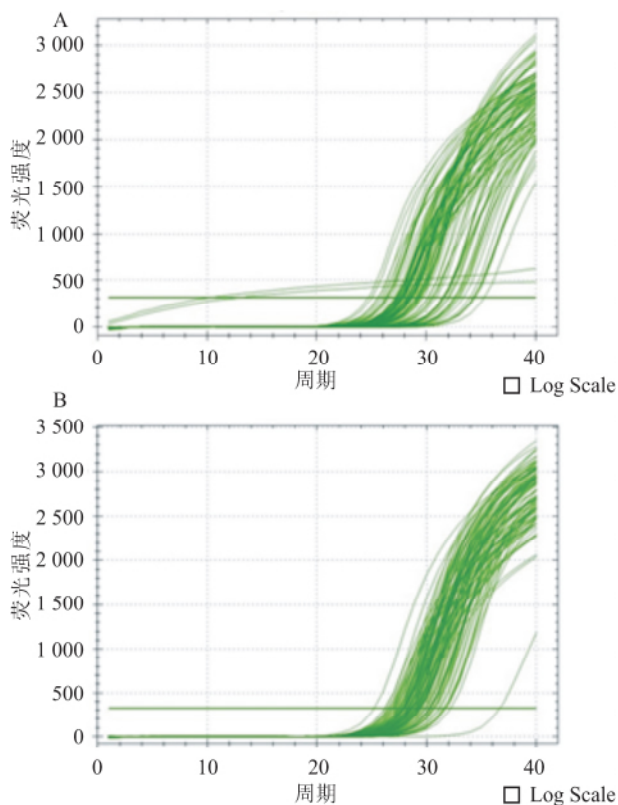


图1 扩增曲线  
A: miRNA-140; B: MMP-3

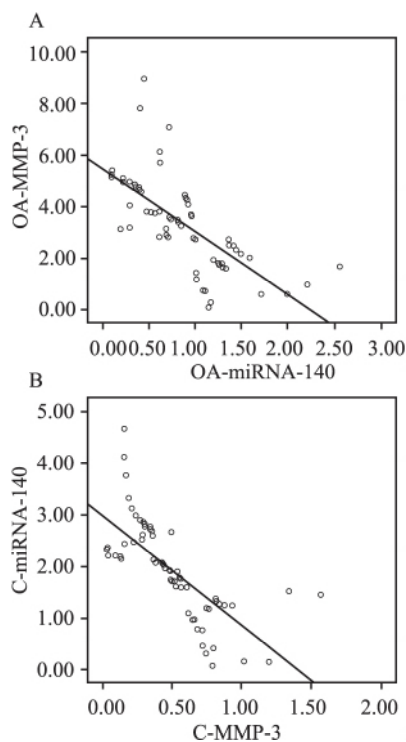


图2 MMP-3与miRNA-140的相关性分析  
A: OA组; B: 非OA组

子共同参与而导致的。通过检测 OA 组和非 OA 组患者关节滑液中 miRNA-140 和 MMP-3 的含量并进行对比显示,miRNA-140 在 OA 患者滑液中的含量明显低于非 OA 组,而 MMP-3 的含量在 OA 患者滑液中则明显高于非 OA 组,说明两种因子与 OA 的发生明显相关。通过 SPSS 软件双变量相关分析发现,两种因子在 OA 组中的表达呈明显的负相关性。提示在 OA 的发生发展过程中,两种因子之间也存在一定的负性调节作用。

有关研究<sup>[6]</sup>显示 miRNA-140 是维持关节内环境稳定的一个重要因子,在 OA 患者软骨退变过程中起到重要作用。研究<sup>[10]</sup>显示在试管试验中发现与 OA 病理机制相关的白介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 在治疗软骨细胞时,IL-1 $\beta$  可抑制 miRNA-140 的表达。相反带有 miRNA-140 的软骨细胞经过转染却降低了 IL-1 $\beta$  诱导的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 (ADAMTS5) 的表达。Miyaki et al<sup>[10]</sup>在 2010 年的研究报道 miRNA-140 虽然并不参与关节软骨的形成,但是过度表达的 miRNA-140 会导致 OA 的发生;并且认为 ADAMTS5 mRNA 是 miRNA-140 调控的一个靶基因。ADAMTS5 mRNA 可降低聚集蛋白聚糖,是 OA 病理过程中的关键酶<sup>[11]</sup>。研究<sup>[10]</sup>说明 miRNA-140 可通过某种途径导致关节软骨的退变,进而导致 OA 的发生。

近期研究<sup>[12]</sup>证实 OA 患者的软骨细胞中 miRNAs 与 MMP-3 存在一定的相关性,并认为 miRNAs 可负向调节 MMP-3 的表达。研究<sup>[13]</sup>显示炎症反应因子,如白介素-1 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  能够促进 MMPs 的基因表达。且显著增高的 MMP-3 不能被数量不足的肿瘤坏死因子  $\beta$ 1 抵消,并进一步加速软骨的退化<sup>[14]</sup>。本试验通过分析对比 OA 组与非 OA 组的 miRNA-140、MMP-3 在关节滑液中的含量发现,两者存在明显的负相关性,并且随着 MMP-3 含量的增高,进一步加重了 OA 组关节软骨的退变过程。本实验 miRNA-140 与 MMP-3 的相关性说明 miRNA 与 MMP3 之间存在着某种调控机制,但具体调控机理尚不十分清楚,有待进一步的研究。

综上所述,在 OA 患者的关节滑液中,miRNA-140 呈现出低表达,而 MMP-3 却呈现出高表达,说明两种因子的含量对 OA 的发生有一定的调节作用;本实验的相关分析结果显示 miRNA-140 与 MMP-3 存在一定负性相关关系,说明这两种因子之间存在着一定的负性调节作用,由于这种负性调节作用是在 OA 患者关节滑液的检测中被发现,可

细胞外基质的降解是在多种基因调控下,由多种因

以推断这种作用对 OA 的发生发展亦存在一定的调控作用, 这为研究者对阐明 OA 的发生发展提供了理论依据。虽然已有研究<sup>[6]</sup>证实 miRNA-140 对 MMP-3 基因的表达存在着一定的调控作用, 但其具体调控机制尚不十分清楚, 本实验证明两种因子之间存在一定的负相关性, 这也为探究 miRNA-140 与 MMP3 之间的调控机理的研究奠定了一定的基础。

### 参考文献

- [1] Zeng Q Y, Zang C H, Li X F, et al. Associated risk factors of knee osteoarthritis: a population survey in Taiyuan, China [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2006, 119(18): 1522-7.
- [2] 何凡, 徐建华, 丁长海, 等. 膝关节炎患者血清瘦素水平变化及其临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(5): 512-5.
- [3] 陈宗科, 秦蓉, 储婧, 等. miR-24 和 miR-22 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. *安徽医科大学学报*. 2013, 48(2): 167-70.
- [4] Hegemann N, Wondimu A, Ullrich K, et al. Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 91(3-4): 199-204.
- [5] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 33-42.
- [6] Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(11): 1173-85.
- [7] Stanczyk J, Pedrioli D M, Brentano F, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(4): 1001-9.
- [8] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊疗指南 [M]. *中国临床医生杂志*, 2008, 36(1): 28-30.
- [9] Hasegawa Y, Iwase T, Kitamura S, et al. Eccentric rotational acetabular osteotomy for acetabular dysplasia and osteoarthritis: follow-up at a mean duration of twenty years [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2014, 96(23): 1975-82.
- [10] Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 responses [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(9): 2723-30.
- [11] Glasson S S, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis [J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 644-8.
- [12] Jones S W, Watkins G, Le Good N, et al. The identification of differentially expressed microRNAs in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- $\alpha$  and MMP-13 [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(4): 464-72.
- [13] Liacini A, Sylvester J, Li W Q, et al. Mithramycin downregulates proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4): R777-83.
- [14] Jiang Q, Qiu Y T, Chen M J, et al. Synovial TGF- $\beta$ 1 and MMP-3 levels and their correlation with the progression of temporomandibular joint osteoarthritis combined with disc displacement: A preliminary study [J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(2): 218-22.

## The expression and correlation studies about miRNA-140 , MMP-3 of synovial fluid in OA

Zou Lei, Zhou Yuanjia, Rao Feng, et al

(Dept of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000)

**Abstract Objective** To exploring the correlation between miRNA-140 and MMP-3 in osteoarthritis (OA), this study compared the OA group with non-OA group over the expression of MMP-3 and miRNA-140 in synovial fluid. **Methods** Using Real-time quantitative PCR to detect the expression levels of miRNA-140, MMP-3 in synovial fluid both OA group ( $n=65$ ) and non-OA group ( $n=65$ ), then exploring the relationship between miRNA-140 and MMP-3 by using Spearman correlation analysis software. **Results** The expression of miRNA-140 in OA group was significantly lower than non-OA group ( $P < 0.05$ ), while the expression of MMP-3 in OA group was significantly higher than non-OA group ( $P < 0.05$ ). miRNA-140 and MMP-3 had a significant negative correlation in OA group by using Spearman correlation analysis software, the correlation coefficient ( $r = -0.693, -0.720, P < 0.05$ ). **Conclusions** Relative to non-OA lesions, miRNA-140 shows low expression in OA synovial fluid group, while MMP-3 in the OA group is highly expressed, both showed a significant negative correlation in OA group and non-OA group.

**Key words** osteoarthritis; matrix metalloproteinases-3; microRNA; synovial fluid