

网络出版时间: 2025-06-30 13:50:25 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0856.007>

# LncRNA MALAT1/miR-15b-5p 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路对脂多糖诱导软骨细胞损伤的影响

赵志, 刘梦鲲, 查日飞, 张汀葆, 王 瑾

(蚌埠医科大学第一附属医院骨科, 组织移植安徽省重点实验室, 蚌埠 233004)

**摘要** 目的 探讨骨关节炎中长链非编码 RNA 转移相关肺腺癌转录物 1 (MALAT1) /微小 RNA-15b-5p (miR-15b-5p) 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在脂多糖 (LPS) 诱导软骨损伤中的分子机制。方法 以 5 mg/L LPS 处理 ATDC5 细胞形成骨关节炎细胞损伤模型, RT-qPCR 检测细胞中 MALAT1 和 miR-15b-5p 的表达。MTT、流式细胞术、茜素红染色和 ELISA 检测 MALAT1 和 miR-15b-5p 对 LPS 诱导的软骨细胞损伤的影响。双荧光素酶报告基因实验检验 MALAT1 和 miR-15b-5p 的调控关系。Western blot 检测相关蛋白的表达情况。结果 在 LPS 诱导的 ATDC5 细胞中, MALAT1 表达降低 ( $P < 0.05$ )。与 Control 组比较, LPS 组细胞活性降低, 凋亡率升高, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-6、白细胞介素-1 $\beta$  水平升高, 钙化结节增多, MMP13、ADAMTS5 蛋白表达水平升高, Collagen II、Aggrecan 蛋白表达水平降低, Wnt1 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。MALAT1 过表达可消减 LPS 对软骨细胞活性、凋亡、炎症反应、成骨分化、细胞外基质降解和 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的影响 ( $P < 0.05$ ); 而 miR-15b-5p 过表达增强了 LPS 对软骨细胞的作用 ( $P < 0.05$ )。结论 MALAT1 在 LPS 诱导的软骨细胞中低表达, 其通过靶向 miR-15b-5p 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路减轻 LPS 诱导的软骨细胞损伤。

**关键词** MALAT1; miR-15b-5p; 软骨细胞; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 骨关节炎; 炎症反应; 成骨分化; 细胞外基质

**中图分类号** R 684.3

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2025)07-1231-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.010

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的慢性退行性关节疾病, 其特征为关节软骨的严重退化和损伤<sup>[1]</sup>。软骨细胞的凋亡和炎症是 OA 软骨细胞变性的主要驱动因素<sup>[2]</sup>。长链非编码 RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是一类长度超过 200 个核苷酸的转录本, 在疾病的发生和发展中发挥着重要的调节作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明, 转移相关肺腺癌转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 在 OA 中能够抑制炎症反应和细胞凋亡。微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一种小型内源性非蛋白编码 RNAs, 能够作为 lncRNAs 的响应分子。研究<sup>[5]</sup>发现, 高水平的 miR-15b-5p 会导致 OA 症状的加重。此外, MALAT1 可以通过 PI3K/Akt 信号通路靶向 miR-127-5p, 促进软骨细胞的增殖<sup>[6]</sup>。然而, lncRNA MALAT1 和 miR-15b-5p 在 OA 疾病中的作用及其具体机制迄今尚未被报道。该研

究结合生物信息学分析和细胞功能实验, 探讨 MALAT1/miR-15b-5p 在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 OA 软骨细胞损伤中的作用及其潜在机制, 旨在为 OA 的靶向治疗奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 胎牛血清、DMEM 培养基、TRIzol 试剂、Lipofectamine<sup>®</sup> 2000、ECL 试剂盒 (货号: A5256701、SH30021.01、15596018CN、11668500、32209, 美国赛默飞世尔公司), PCR 反转录试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒 (货号: RR047Q、RR064A, 日本 Takara 公司), MALAT1、GAPDH 引物、MALAT1 过表达质粒及阴性对照由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供, U6 引物、miR-15b-5p 引物、miR-15b-5p 模拟物 (miR-15b-5p mimic) 及阴性对照 (mimic NC) 购自广州锐博生物科技有限公司, MTT 检测试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、报告基因质粒 TopFlash、FopFlash (货号: C0009S、P0013C、P0012、D2501、D2503, 上海碧云天生物技术有限公司), Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (货号: A211-01/02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、IL-6

2025-03-25 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (编号: KJ2021A0807); 蚌埠医科大学研究生科研创新计划项目 (编号: Byycxz21087)

作者简介: 赵志, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: zhaozhi@bbmc.edu.cn

和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 检测试剂盒 (货号: MLB00C、M6000B、MTA00B, 英国 R&D Systems 公司), Wnt1 一抗、 $\beta$ -catenin 一抗、MMP13 一抗、ADAMTS5 一抗和 GAPDH 一抗、山羊抗兔辣根过氧化物酶偶联二抗 (货号: ab15251、ab223075、ab315267、ab41037、ab8245、ab6721, 英国 Abcam 公司), Collagen II 一抗 (货号: 28459-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司), Aggrecan 一抗 (货号: GTX54920, 美国 GeneTex 公司), 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 [货号: 11402ES60, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司], 酶标仪 (型号: SpectraMax i3x, 美国 BD 公司), 细胞培养箱 (型号: BBD6220, 美国赛默飞世尔公司), RT-qPCR 仪 (型号: Mx3005P, 美国 Stratagene 公司)。

**1.2 细胞培养** 小鼠软骨细胞系 ATDC5 细胞购自美国典型培养物保藏中心。细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。用浓度为 5 mg/L 的 LPS 处理细胞 24 h (LPS 组), 以未处理的细胞为对照 (Control) 组。

**1.3 RT-qPCR 实验** TRIzol 试剂提取 ATDC5 细胞 RNA。使用 PCR 反转录试剂盒逆转录生成 cDNA, 随后采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行检测分析。GAPDH 和 U6 分别用于内参对照, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算 miR-15b-5p 和 MALAT1 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab. 1 RT-qPCR primer sequence

Gene	Primer sequence (5'-3')
MALAT1	F: GCAGTGTGCCAATGTTTCGT R: GCTGTTTCTGCTCCGAGAT
miR-15b-5p	F: ATGAACCTTCTCTGTCTTGG R: CAGTGCCTGTCGTGGAGT
U6	F: CAGCACATATACTAAAATTGGAACG R: ACGAATTTGCGGTGCATCC
GAPDH	F: AGGTCCGTGTGAACGGATTTC R: GGGGTCGTTGATGGCAACA

**1.4 细胞转染** 将处于对数生长期的 ATDC5 细胞经胰酶消化后按照  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 6 孔板中。当达到 80% 融合度时, 根据制造商的方案, 使用 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 进行转染操作, 分组如下: Ov-NC 组 (转染 MALAT1 过表达质粒的阴性对照), Ov-MALAT1 组 (转染 MALAT1 过表达质粒), mimic NC 组 (转染 miR-15b-5p mimic 的阴性对照), miR-15b-

5p mimic 组 (转染 miR-15b-5p mimic) 和 Ov-MAL-AT1 + miR-15b-5p 组 (共转染 MALAT1 过表达质粒和 miR-15b-5p mimic)。细胞培养 48 h 后加入 LPS 处理, 用于后续分析。

**1.5 MTT 检测细胞活性** 将处于生长对数期的 ATDC5 细胞消化后, 按  $5 \times 10^3$  个/孔接种在 96 孔板中。当细胞达到 80% 融合度时, 进行细胞转染和 LPS 处理。处理结束后, 每孔加入 20  $\mu$ L 的 MTT 溶液在 37 °C 条件下继续孵育 4 h。然后吸去各孔中的培养液, 加入 150  $\mu$ L 二甲亚砜, 室温下在摇床上振荡 10 min, 使用酶标仪测定 570 nm 的吸光度 (optical density, OD) 值。

**1.6 细胞凋亡检测** 采用流式细胞仪结合 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒测定细胞凋亡率。取对数生长期 ATDC5 细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中, 经细胞转染及 LPS 处理后, 胰酶消化收集细胞。PBS 洗涤细胞 2 次, 加入结合缓冲液重悬细胞。细胞悬液中加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI, 轻柔涡旋混匀后, 室温避光孵育 15 ~ 20 min, 立即上机检测。

**1.7 ELISA 实验** 收集各组细胞培养上清液, 2 000 r/min 离心 15 min 后取上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平。

**1.8 茜素红染色** 将 ATDC5 细胞按照  $2 \times 10^4$  个/孔接种在 24 孔板中, 待细胞生长至 80% 融合度时进行细胞转染和 LPS 处理。随后, 将细胞加入含 0.1  $\mu$ mol/L 地塞米松、50 mmol/L 抗坏血酸、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸的成骨分化培养基培养 3 周。随后, 用 4% 多聚甲醛在 4 °C 下固定 ATDC5 细胞 30 min。最后用茜素红染色 5 min, 显微镜下拍照。

**1.9 Western blot 实验** 应用 RIPA 裂解液分离纯化 ATDC5 细胞总蛋白, 然后用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度。随后, 按照 Western blot 操作步骤进行电泳、转膜、封闭、洗膜以及一抗、二抗孵育等过程, 最后使用 ECL 试剂盒显影, 使用 ImageJ 软件分析蛋白质水平的变化。

**1.10 双荧光素酶报告基因实验** 采用生物信息学在线数据库 ENCORI (<https://rnasysu.com/encori/index.php>) 预测 MALAT1 靶基因, miR-15b-5p 与 MALAT1 具有互补结合位点。按照制造商的说明, 构建 pmirGlo-MALAT1 野生型 (MALAT1-WT) 和 pmirGLO-MALAT1 突变型 (MALAT1-MUT) 双荧光素酶报告基因质粒。将 MALAT1-WT 或 MALAT1-MUT 双荧光素酶报告基因质粒分别与 miR-15b-5p mimic

或 mimic NC 共转染细胞。PRL-TK 用作转染效率对照。为了评估  $\beta$ -catenin 的转录活性,利用 TOP/FOP 报告系统和双荧光素酶报告基因检测试剂盒,用 PRL-TK 和  $\beta$ -catenin 响应性萤火虫荧光素酶报告质粒 TopFlash 或阴性对照 FopFlash 瞬时转染细胞。使用酶标仪测量荧光素酶活性。

**1.11 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间相关性分析采用单因素方差分析,两组数据间的比较采用独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 MALAT1 过表达对 LPS 诱导软骨细胞凋亡和炎症的影响** RT-qPCR 检测结果显示,与 Control 组比较,MALAT1 在 LPS 组中低表达( $t = 6.69, P < 0.05$ ) ,见图 1A。与 Ov-NC 组比较,MALAT1 在 Ov-

MALAT1 组中表达上调( $t = 9.50, P < 0.05$ ) ,见图 1B。MTT 检测结果显示,与 Control 组比较,LPS 组细胞活力降低( $t = 20.08, P < 0.05$ ) ;与 LPS + Ov-NC 组比较,LPS + Ov-MALAT1 组细胞活性升高( $t = -32.53, P < 0.05$ ) ,见图 1C。流式结果流式检测结果显示,与 Control 组比较,LPS 组细胞凋亡率升高( $t = -11.98, P < 0.05$ ) ;与 LPS + Ov-NC 组比较,LPS + MALAT1 组凋亡率降低( $t = 7.64, P < 0.05$ ) ,见图 1D。此外,ELISA 检测量结果显示,与 Control 组比较,LPS 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平升高( $t = -61.03、-7.30、-20.45$  均  $P < 0.05$ ) ;与 LPS + Ov-NC 组比较,LPS + MALAT1 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平降低( $t = 20.17、7.55、19.00, P < 0.05$ ) ,见图 1E。上述结果表明,上调 MALAT1 表达增强 LPS 诱导软骨细胞活性,抑制 LPS 诱导软骨细胞凋亡和炎症反应。

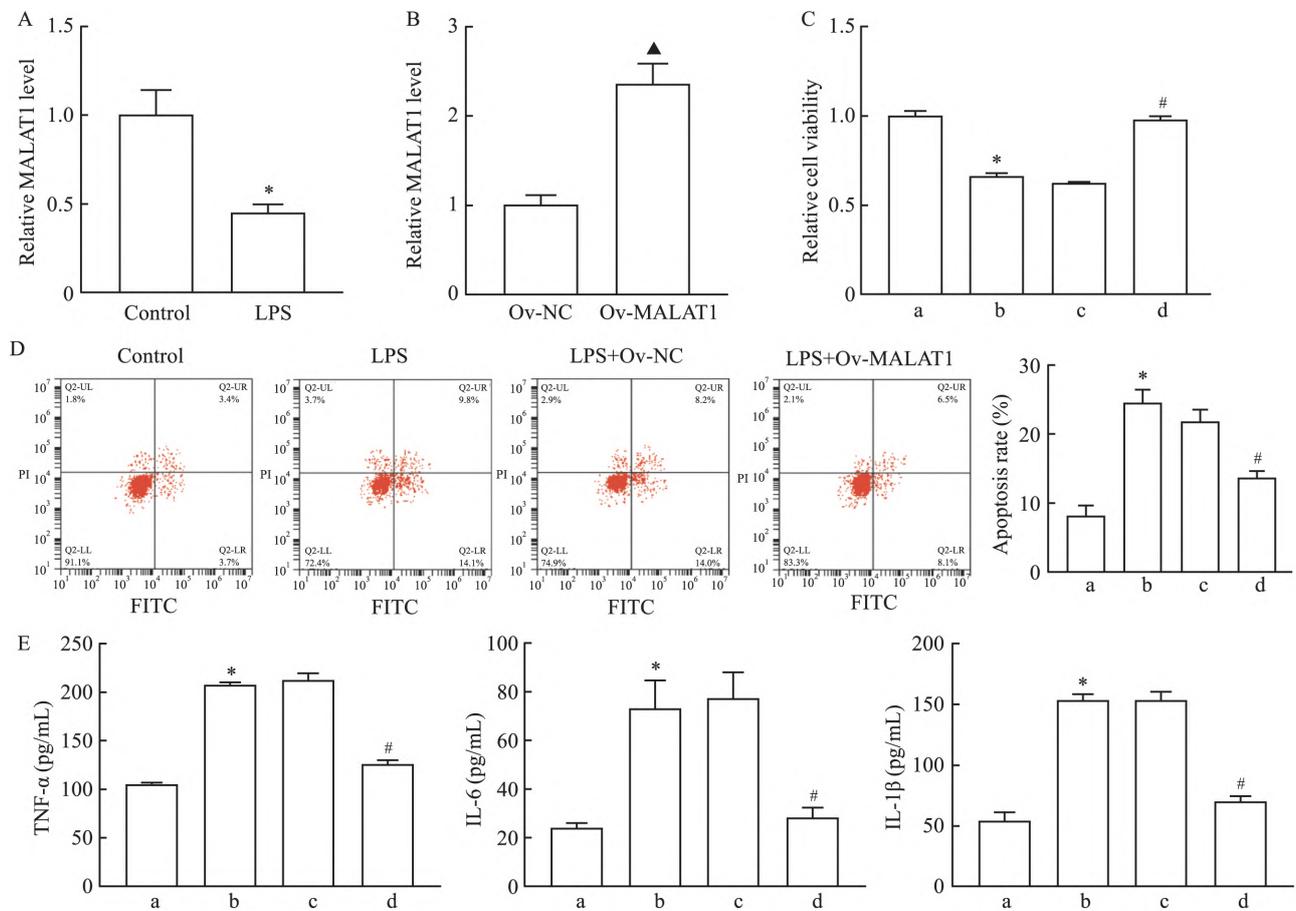


图1 MALAT1 过表达对 LPS 诱导软骨细胞的凋亡和炎症的影响

Fig. 1 The effects of MALAT1 overexpression on the apoptosis and inflammation of LPS-induced chondrocytes

A: The expression level of MALAT1 was measured by RT-qPCR following LPS induction; B: The expression level of MALAT1 after MALAT1 overexpression was assessed by RT-qPCR; C: Cell viability in each group was evaluated by MTT; D: The apoptosis rate of each group was assessed by flow cytometry; E: The levels of TNF- $\alpha$  , IL-6 and IL-1 $\beta$  of each group were assessed by ELISA; a: Control group; b: LPS group; c: LPS + Ov-NC group; d: LPS + Ov-MALAT1 group; \*  $P < 0.05$  vs Control group; ▲  $P < 0.05$  vs Ov-NC group; #  $P < 0.05$  vs LPS + Ov-NC group.

**2.2 MALAT1 过表达对 LPS 诱导软骨细胞细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 分解代谢的影响** 茜素红染色结果显示, 与 Control 组比较, LPS 组出现明显的钙化结节 ( $t = -9.14, P < 0.05$ ); 与 LPS + Ov-NC 组比较, LPS + Ov-MALAT1 组钙化面积减小 ( $t = 8.51, P < 0.05$ ), 见图 2A。Western blot 检测结果显示, 与 Control 组比较, LPS 组 MMP13 和 ADAMTS5 的表达水平增加 ( $t = -8.49$ 、

$-20.69, P < 0.05$ ) , 而 Aggrecan 和 Collagen II 的表达水平降低 ( $t = 13.39、10.95$ , 均  $P < 0.05$ ); 与 LPS + Ov-NC 组比较, LPS + Ov-MALAT1 组 MMP13 和 ADAMTS5 的表达减少 ( $t = 3.04、8.43$ , 均  $P < 0.05$ ) , 而 Aggrecan 和 Collagen II 的水平升高 ( $t = -4.82、-6.79$ , 均  $P < 0.05$ ) , 见图 2B。上述结果表明, 上调 MALAT1 表达抑制 LPS 诱导软骨细胞钙化和 ECM 的分解。

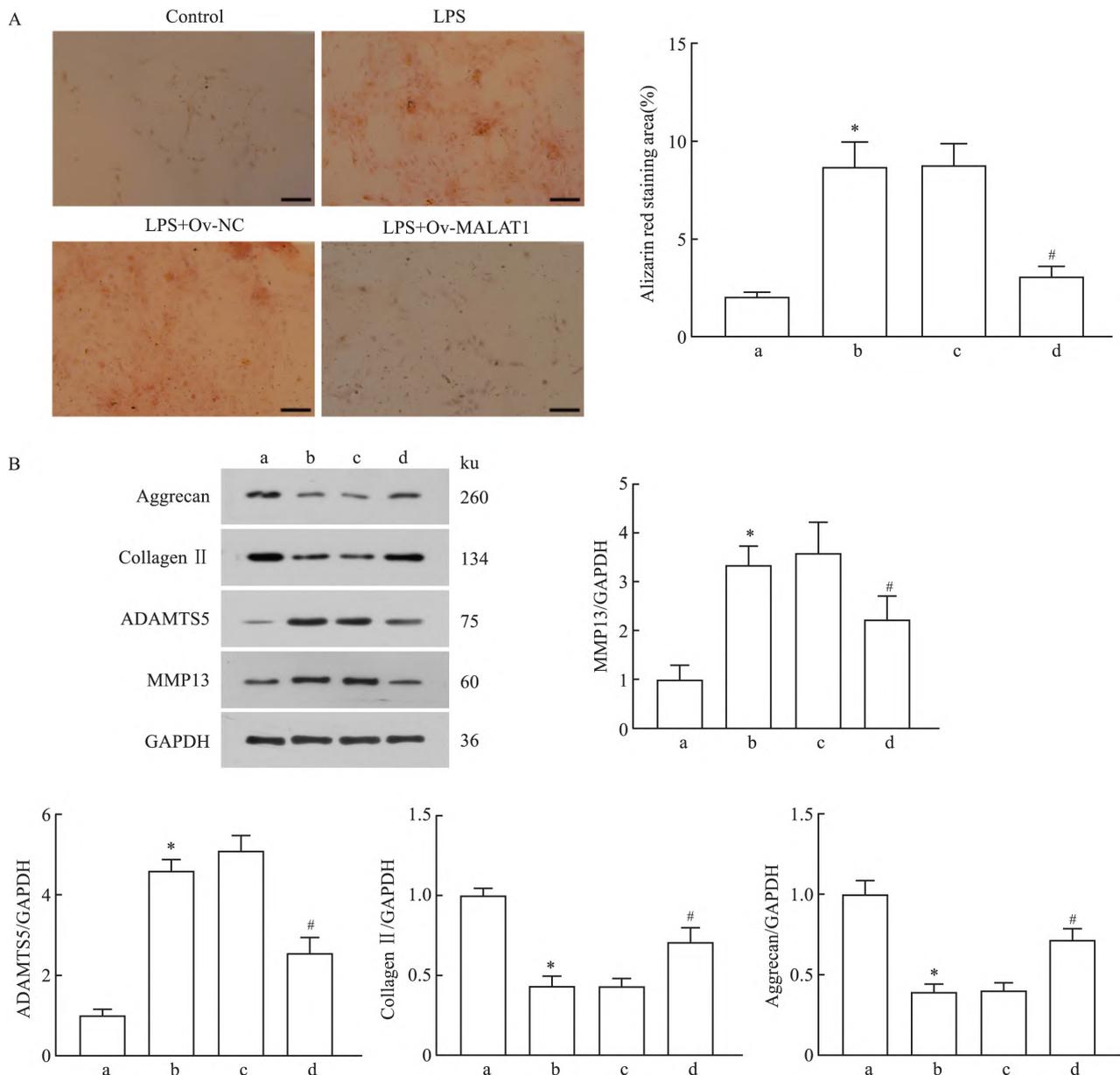


图 2 MALAT1 过表达对 LPS 诱导软骨细胞 ECM 分解代谢的影响

Fig. 2 The effects of MALAT1 overexpression on the catabolism of ECM in LPS-induced chondrocytes

A: Alizarin red staining in each group ( $\times 100$ , scale:  $50 \mu\text{m}$ ); B: The protein expression levels of MMP13, ADAMTS5, Collagen II and Aggrecan in each group were detected by Western blot; a: Control group; b: LPS group; c: LPS + Ov-NC group; d: LPS + Ov-MALAT1 group; \*  $P < 0.05$  vs Control group; #  $P < 0.05$  vs LPS + Ov-NC group.

**2.3 MALAT1 与 miR-15b-5p 的靶向关系** 生物信息学在线数据库 ENCORI 分析结果显示 miR-15b-5p 与 MALAT1 具有互补序列, 见图 3A。双荧光素酶报告基因试验结果显示, 在 ATDC5 细胞中, miR-15b-5p mimic 降低了 MALAT1-WT 组的荧光素酶活性( $t = 22.55, P < 0.05$ ), 而 MALAT1-MUT 组的荧光素酶活性无显著变化, 见图 3B。RT-qPCR 检测结果显示, 与 Control 组比较, miR-15b-5p 在 LPS 组表达水平升高( $t = 5.59, P < 0.05$ ), 见图 3C; 与 mimic NC 组比较, miR-15b-5p 在 miR-15b-5p mimic 组表达水平升高( $t = 9.60, P < 0.05$ ), 见图 3D。随后, RT-qPCR 检测了 MALAT1 和 miR-15b-5p 共转染后 miR-15b-5p 的表达情况。结果显示, 与 Control 组比较, miR-15b-5p 在 LPS 组表达水平升高( $t = 15.29, P < 0.05$ ); 与 LPS + Ov-NC 组比较, miR-15b-5p 在 LPS + Ov-MALAT1 组表达水平降低( $t = 9.23, P < 0.05$ ); 与 LPS + mimic NC 组比较, LPS + miR-15b-5p mimic 组中 miR-15b-5p 的表达水平增加( $t = 12.09,$

$P < 0.05$ ); 与 LPS + Ov-MALAT1 组比较, miR-15b-5p 在 LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic 组表达水平升高( $t = 15.47, P < 0.05$ ); 与 LPS + miR-15b-5p mimic 组比较, miR-15b-5p 在 LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic 组表达水平降低( $t = 13.49, P < 0.05$ ), 见图 3E。以上结果表明, 在 ATDC5 细胞中, MALAT1 可以靶向结合 miR-15b-5p。

**2.4 MALAT1 靶向 miR-15b-5p 对 LPS 诱导的细胞凋亡和炎症的影响** MTT 结果显示, 与 Control 组比较, LPS 组细胞活力降低( $t = 24.49, P < 0.05$ ); 与 LPS 组比较, LPS + Ov-MALAT1 组的细胞活力增加( $t = -24.59, P < 0.05$ ), LPS + miR-15b-5p mimic 组的细胞活力降低( $t = 16.55, P < 0.05$ ); 与 LPS + miR-15b-5p mimic 组比较, LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic 组细胞活力升高( $t = -16.77, P < 0.05$ ), 见图 4A。流式结果流式检测结果显示, 与 Control 组比较, LPS 组细胞凋亡率升高( $t = -8.20, P < 0.05$ ); 与 LPS 组比较, LPS + Ov-MALAT1 组凋

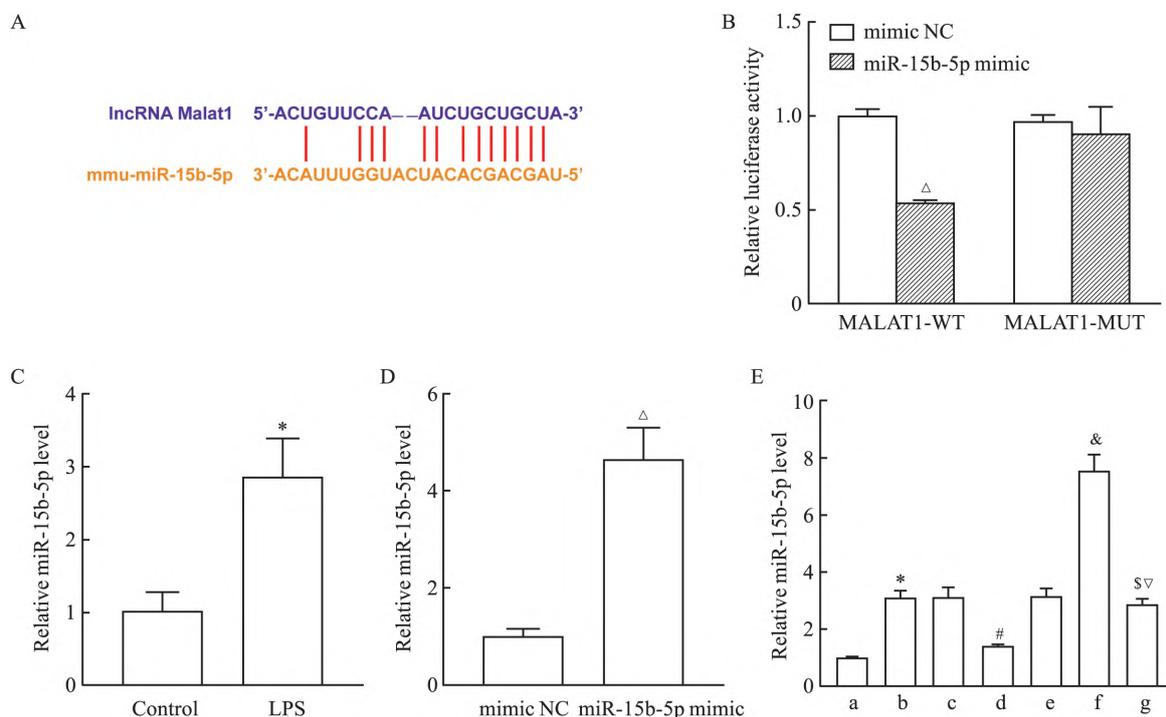


图3 MALAT1 与 miR-15b-5p 的靶向关系

Fig. 3 The targeting relationship between MALAT1 and miR-15b-5p

A: Binding sites between MALAT1 and miR-15b-5p predicted using ENCORI; B: The relationship between MALAT1 and miR-15b-5p evaluated by dual luciferase gene reporter assay; C: The expression level of miR-15b-5p measured by RT-qPCR following LPS induction; D: The expression level of miR-15b-5p after miR-15b-5p mimic transfection assessed by RT-qPCR; E: The expression level of miR-15b-5p in each group assessed by RT-qPCR; a: Control group; b: LPS group; c: LPS + Ov-NC group; d: LPS + Ov-MALAT1 group; e: LPS + mimic NC group; f: LPS + miR-15b-5p mimic group; g: LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic group; \*  $P < 0.05$  vs Control group;  $\Delta P < 0.05$  vs mimic NC group; #  $P < 0.05$  vs LPS + Ov-NC group; &  $P < 0.05$  vs LPS + mimic NC group; §  $P < 0.05$  vs LPS + Ov-MALAT1 group;  $\nabla P < 0.05$  vs LPS + miR-15b-5p mimic group.

亡率降低 ( $t = 5.19, P < 0.05$ ) ,LPS + miR-15b-5p 组 凋亡率增加 ( $t = -3.16, P < 0.05$ ) ; 与 LPS + miR-15b-5p mimic 组比较 ,LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic 组 凋亡率降低 ( $t = 4.60, P < 0.05$ ) ,见图 4B。此外 ,ELISA 检测量结果显示 ,与 Control 组比较 ,LPS 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平升高 ( $t = -16.11、-11.14、-14.98$  均  $P < 0.05$ ) ; 与 LPS 组比较 ,LPS + Ov-MALAT1 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的

水平降低 ( $t = 21.51、9.37、12.12$  ,均  $P < 0.05$ ) ,而在 LPS + miR-15b-5p mimic 组升高 ( $t = -11.87、-6.06、-6.42$  ,均  $P < 0.05$ ) ; 与 LPS + miR-15b-5p mimic 组比较 ,LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的水平降低 ( $t = 13.44、8.23、7.34$  均  $P < 0.05$ ) ,见图 4C。上述结果表明 ,MALAT1 过表达质粒与 miR-15b-5p mimic 共转染消除了 MALAT1 和 miR-15b-5p 对 ATDC5 细胞的细胞

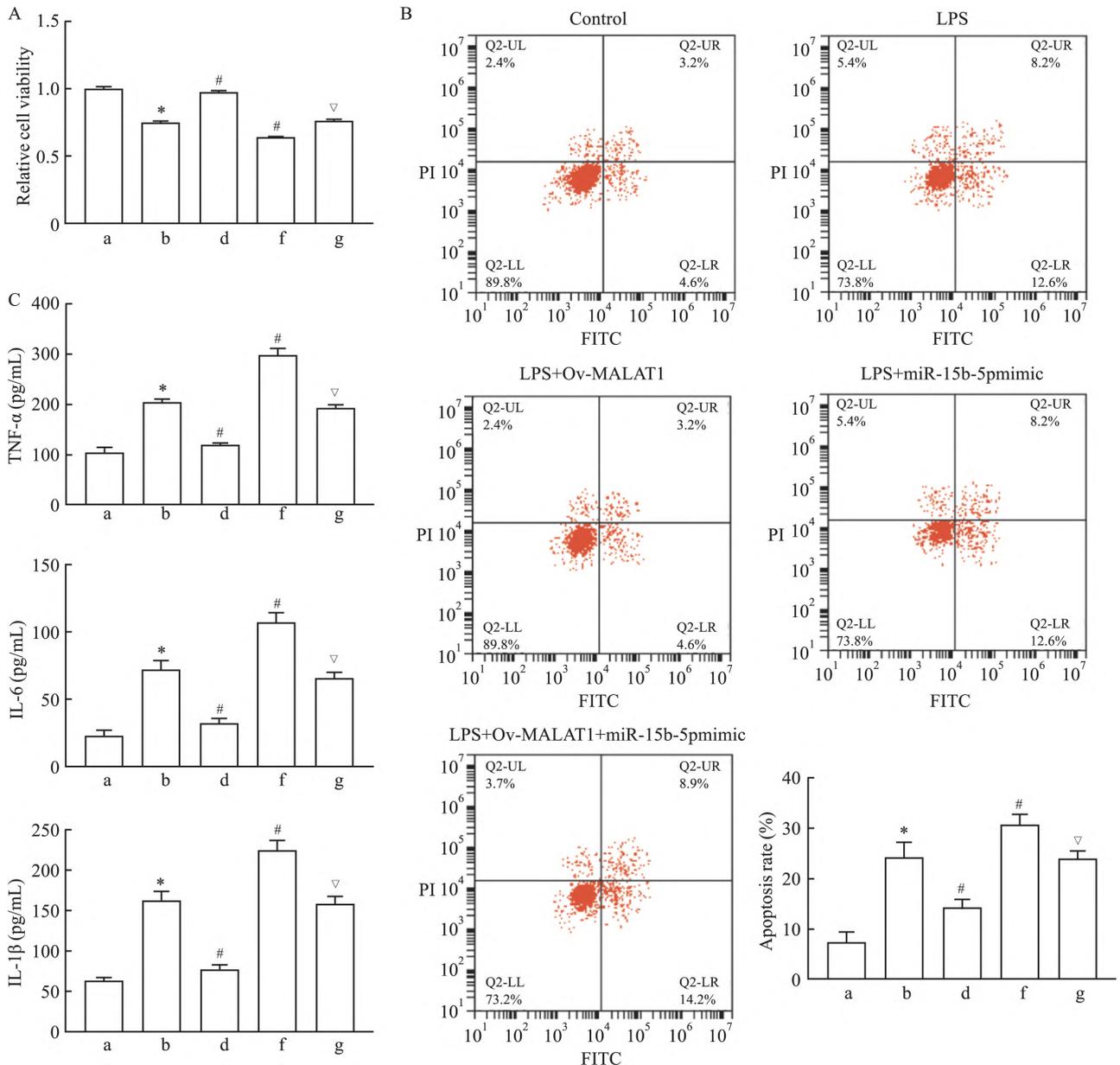


图 4 MALAT1 靶向 miR-15b-5p 对 LPS 诱导软骨细胞的凋亡和炎症的影响

Fig. 4 The effects of MALAT1 targeting miR-15b-5p on the apoptosis and inflammation of LPS-induced chondrocytes

A: Cell viability in each group evaluated by MTT; B: The apoptosis rate of each group assessed by flow cytometry; C: The levels of TNF- $\alpha$  , IL-6 , and IL-1 $\beta$  of each group assessed by ELISA; a: Control group; b: LPS group; d: LPS + Ov-MALAT1 group; f: LPS + miR-15b-5p mimic group; g: LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic group; \*  $P < 0.05$  vs Control group; #  $P < 0.05$  vs LPS group; ▽  $P < 0.05$  vs LPS + miR-15b-5p mimic group.

活力、凋亡、炎症的调节作用 ,MALAT1 可以通过靶向抑制 miR-15b-5p 表达增强软骨细胞活性 ,抑制软骨细胞凋亡和炎症反应。

**2.5 MALAT1 靶向 miR-15b-5p 对 LPS 诱导软骨细胞 ECM 分解代谢的影响** 茜素红染色结果显示 ,与 Control 组比较 ,LPS 组出现明显的钙化结节 ( $t = -13.30, P < 0.05$ ) ;与 LPS 组比较 ,LPS + Ov-MALAT1 组钙化面积减小 ( $t = 10.66, P < 0.05$ ) ,LPS + miR-15b-5p mimic 组中钙化面积增大 ( $t = -9.40, P < 0.05$ ) ;与 LPS + miR-15b-5p mimic 组比较 ,LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic 组钙化面积减小 ( $t = 17.92, P < 0.05$ ) ,见图 5A。Western blot 检测结果显示 ,与 Control 组比较 ,LPS 组 MMP13 和 ADAMTS5 的表达水平增加 ( $t = -10.52, -7.45$  均  $P < 0.05$ ) ,Aggrecan 和 Collagen II 的表达水平降低 ( $t = 7.08, 13.67$  均  $P < 0.05$ ) ;

与 LPS 组比较 ,LPS + Ov-MALAT1 组 MMP13 和 ADAMTS5 的表达减少 ( $t = 8.27, 7.30$  ,均  $P < 0.05$ ) ,Aggrecan 和 Collagen II 的水平升高 ( $t = -6.08, -4.69$  ,均  $P < 0.05$ ) ;LPS + miR-15b-5p mimic 组 MMP13 和 ADAMTS5 的表达增加 ( $t = -6.68, -3.56$  ,均  $P < 0.05$ ) ,而 Aggrecan 和 Collagen II 的水平降低 ( $t = 6.93, 5.14$  ,均  $P < 0.05$ ) ;与 LPS + miR-15b-5p mimic 组比较 ,LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic 组 MMP13 和 ADAMTS5 的表达减少 ( $t = 8.21, 6.48$  ,均  $P < 0.05$ ) ,Aggrecan 和 Collagen II 的水平升高 ( $t = -2.87, -7.67$  ,均  $P < 0.05$ ) ,见图 5B。上述结果表明 ,MALAT1 过表达质粒与 miR-15b-5p mimic 共转染消除了 MALAT1 和 miR-15b-5p 对 ATDC5 细胞钙化和 ECM 分解的调节作用 ,MALAT1 可以通过靶向抑制 miR-15b-5p 表达抑制软骨细胞钙化和 ECM 的分解。

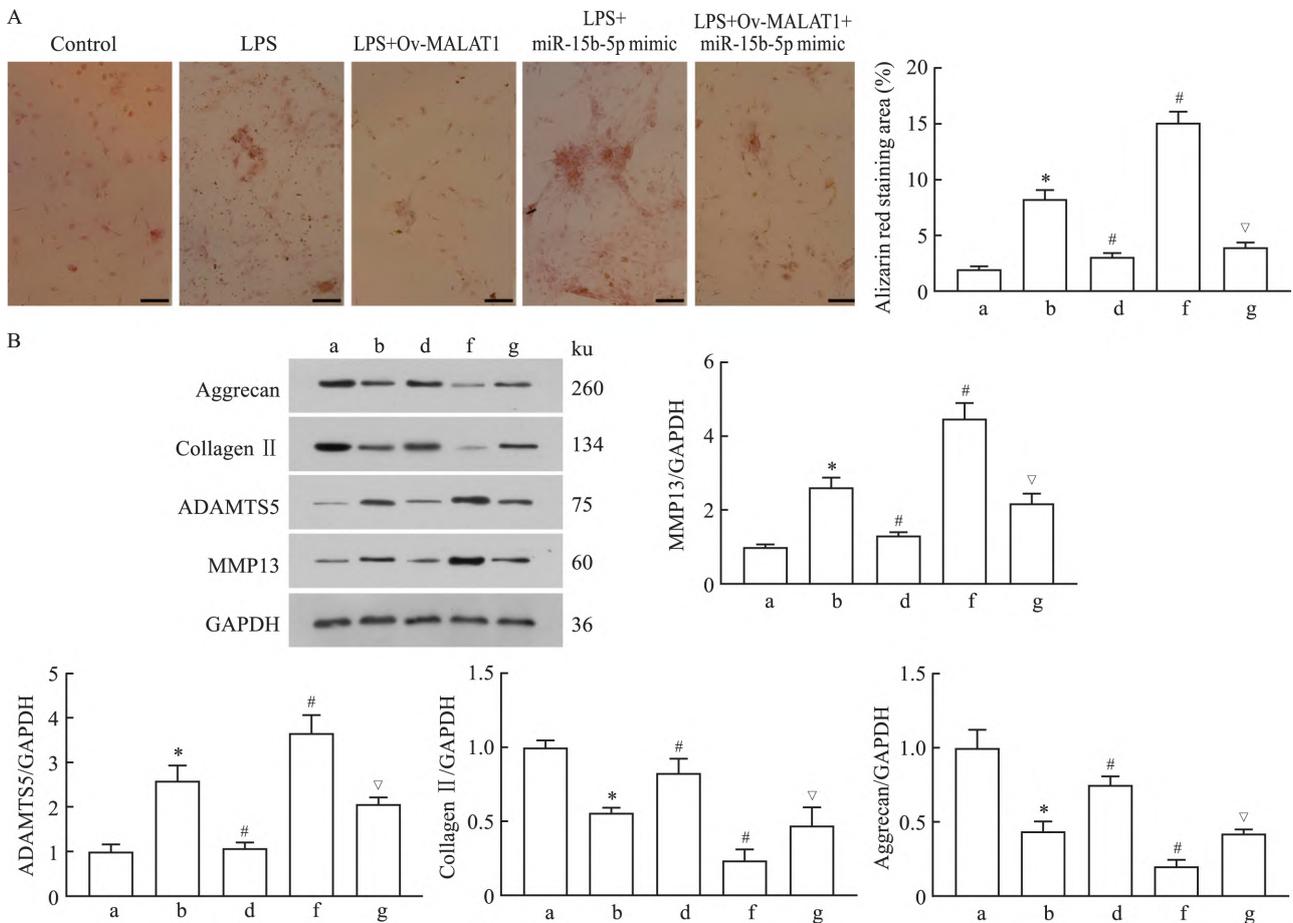


图5 MALAT1 靶向 miR-15b-5p 对 LPS 诱导软骨细胞的 ECM 分解代谢的影响

Fig.5 The effects of MALAT1 targeting miR-15b-5p on the catabolism of ECM in LPS-induced chondrocytes

A: Alizarin red staining in each group ( × 100 , scale: 50 μm) ; B: The protein expression levels of MMP13 ,ADAMTS5 ,Collagen II and Aggrecan in each group detected by Western blot; a: Control group; b: LPS group; d: LPS + Ov-MALAT1 group; f: LPS + miR-15b-5p mimic group; g: LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic group; \*  $P < 0.05$  vs Control group; #  $P < 0.05$  vs LPS group; ▽  $P < 0.05$  vs LPS + miR-15b-5p mimic group.

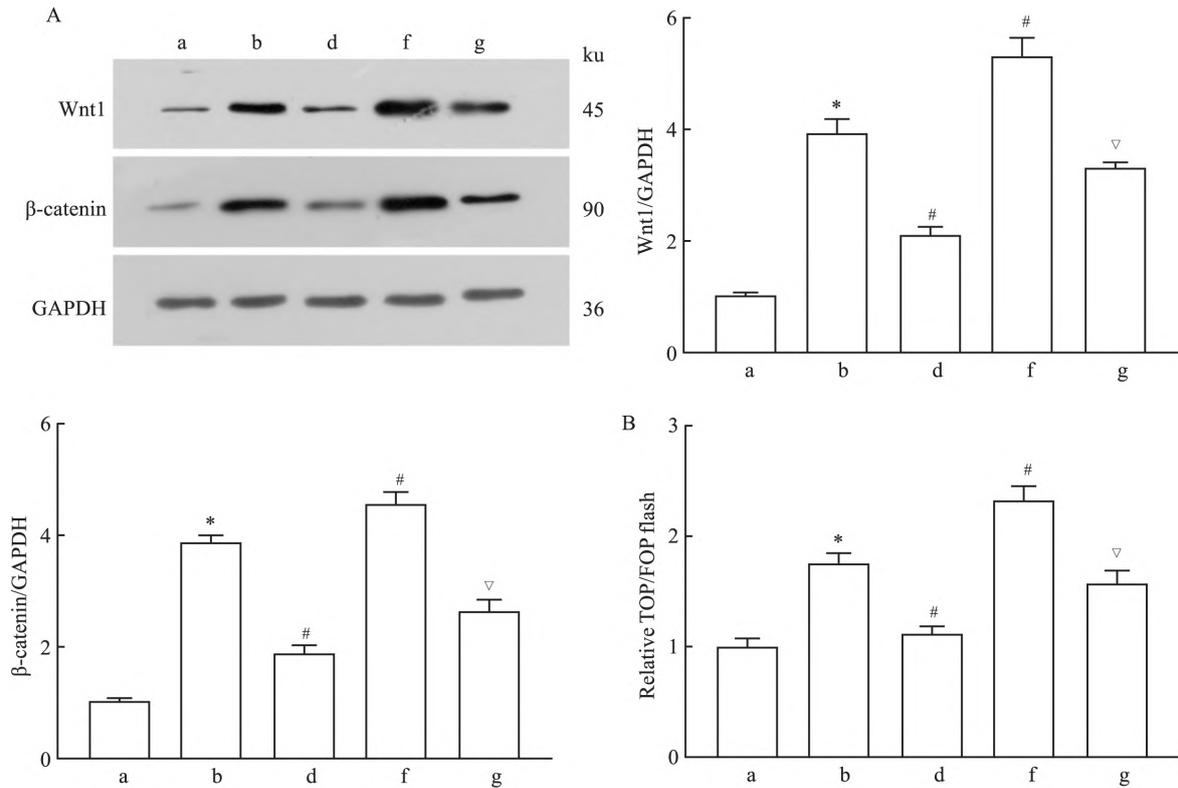


图6 MALAT1/miR-15b-5p对Wnt/β-catenin通路的影响

Fig. 6 The effects of MALAT1/miR-15b-5p on the Wnt/β-catenin signaling pathway

A: The protein levels of Wnt1 and β-catenin detected by Western blot; B: The transcriptional activity of β-catenin detected by TOP/FOP flash luciferase; a: Control group; b: LPS group; d: LPS + Ov-MALAT1 group; f: LPS + miR-15b-5p mimic group; g: LPS + Ov-MALAT1 + miR-15b-5p mimic group; \*  $P < 0.05$  vs Control group; #  $P < 0.05$  vs LPS group; ▽  $P < 0.05$  vs LPS + miR-15b-5p mimic group.

**2.6 MALAT1/miR-15b-5p对Wnt/β-catenin通路的影响** Western blot 检测结果显示,与 Control 组比较,LPS 组中 Wnt1 和 β-catenin 的表达增加 ( $t = -17.81、-11.17$ ,均  $P < 0.05$ );与 LPS 组比较,LPS + Ov-MALAT1 组 Wnt1 和 β-catenin 的表达下调( $t = 9.90、16.00$ ,均  $P < 0.05$ ),LPS + miR-15b-5p mimic 组 Wnt1 和 β-catenin 的表达增加( $t = -5.34、-4.49$ ,均  $P < 0.05$ );而且,MALAT1 过表达质粒与 miR-15b-5p mimic 共转染消除了 MALAT1 和 miR-15b-5p 对 Wnt1 和 β-catenin 蛋白表达的影响( $P < 0.05$ ),见图 6A。TOP/FOP Flash 荧光素酶检测结果显示,与 Control 组比较,LPS 组 TOP/FOP Flash 荧光素酶活性增强( $t = -11.17$ , $P < 0.05$ );与 LPS 组比较,LPS + Ov-MALAT1 组 TOP/FOP Flash 荧光素酶活性降低( $t = 9.83$ , $P < 0.05$ ),在 LPS + miR-15b-5p mimic 组升高( $t = -6.39$ , $P < 0.05$ );而且,Ov-MALAT1 与 miR-15b-5p mimic 共转染消除了 MALAT1 和 miR-15b-5p 对 TOP/FOP Flash 荧光素酶活性的影响( $P < 0.05$ ),见图 6B。上述结果表

明,MALAT1 可以通过靶向抑制 miR-15b-5p 表达激活 Wnt/β-catenin 信号通路。

### 3 讨论

近年来的研究<sup>[7]</sup>发现,lncRNAs 与体内多种重要的生理和病理过程密切相关。Li et al<sup>[8]</sup>研究表明,OA 患者及其细胞培养物中 MALAT1 的表达水平降低。此外,MALAT1 能够调节 LPS 处理的软骨细胞的 ECM 分解代谢、炎症反应,尤其是细胞凋亡。本研究显示,在 LPS 诱导的 ATDC5 软骨细胞中,MALAT1 的表达显著下调。经过 MALAT1 的过表达处理后,细胞活性显著提高,细胞凋亡显著减少,炎性因子的表达受到抑制,细胞的分化能力显著增强。这表明 MALAT1 在软骨损伤中发挥了保护作用。

软骨组织由软骨细胞和 ECM 组成。ECM 的生成与降解失衡是软骨退变的重要原因之一<sup>[9]</sup>。Collagen II 是关节软骨 ECM 胶原的主要成分,其主要功能是维持软骨结构和功能的完整性<sup>[10]</sup>。当软骨中 Collagen II 表达减少或其网状结构收到破坏时,

软骨基质分泌会减少,炎症细胞浸润加剧,从而改变软骨细胞生存的微环境,促进软骨细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。MMP13 和 ADAMTS5 是负责降解软骨基质中的 Aggrecan 和 Collagen II 的主要蛋白酶<sup>[12-13]</sup>。本研究显示,LPS 诱导显著促进了 ATDC5 细胞中 MMP13 和 ADAMTS5 蛋白的表达,同时抑制 Aggrecan 和 Collagen II 蛋白的表达。而 MALAT1 的过表达则可以减弱 LPS 诱导的作用。这些结果表明,MALAT1 能够诱导软骨细胞分泌大量 ECM,并抑制其降解,以维持正常的软骨功能。

研究<sup>[14]</sup>显示,MALAT1 可以通过海绵吸附作用调控 miRNA,从而在疾病中发挥作用。Yin et al<sup>[15]</sup>的研究发现,MALAT1 能够通过下调 miR-129-5p 来介导骨髓间充质干细胞的成骨分化。本研究基于生物信息学软件的预测,通过双荧光素酶报告基因实验证实 MALAT1 在软骨细胞中可以作为分子“海绵”结合 miR-15b-5p,并发挥潜在的调控作用。针对 miR-15b-5p,已有研究证实其高表达可导致骨关节炎炎症细胞因子的过度表达,从而促进 OA 的发生<sup>[16]</sup>。本研究显示,在 LPS 诱导的 ATDC5 细胞中,miR-15b-5p 表达上调;miR-15b-5p mimic 转染抑制了软骨细胞的活性和分化,但促进了细胞的凋亡和炎症反应。这些结果表明,MALAT1 可以通过靶向下调 miR-15b-5p 的表达来减轻 LPS 诱导的软骨细胞损伤。

Wnt 家族蛋白是一类与胚胎骨形成、组织修复、纤维化和关节稳态相关的形态发生因子。Wnt 调节多种信号级联反应,包括  $\beta$ -catenin 依赖性途径<sup>[17]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 广泛分布于软骨组织的细胞质、细胞核和细胞膜中,可能诱导 OA 中的软骨细胞衰老<sup>[18]</sup>。在实验性骨关节炎小鼠模型中,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路可改善 OA 的症状<sup>[19]</sup>。本研究发现 MALAT1 的过表达降低了 LPS 诱导的 ATDC 细胞中 Wnt1 和  $\beta$ -catenin 的蛋白水平。miR-15b-5p mimic 消除了 MALAT1 对 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的抑制作用。这些数据表明,MALAT1 可以通过调节抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路来抑制 OA 的进展。

综上所述,MALAT1 在 LPS 诱导的软骨细胞中表达水平较低,作为一种分子“海绵”,MALAT1 能够特异性结合 miR-15b-5p,并进一步调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,从而改善 LPS 诱导的 OA 软骨细胞损伤。后续研究可通过动物实验和临床样本分析,深入探讨 MALAT1/miR-15b-5p 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的深层机制及其潜在分子靶标,以期为

OA 的靶向治疗提供新的参考。

## 参考文献

- [1] Glyn-Jones S, Palmer A J R, Agricola R, et al. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9991): 376-87. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60802-3.
- [2] Hwang H, Kim H. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26035-54. doi: 10.3390/ijms161125943.
- [3] Sun X, Wang Z, Hall J M, et al. Chromatin-enriched RNAs mark active and repressive Cis-regulation: an analysis of nuclear RNA-seq [J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, 16(2): e1007119. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007119.
- [4] Pan C, Huang W, Chen Q, et al. LncRNA malat-1 from MSCs-derived extracellular vesicles suppresses inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 772002. doi: 10.3389/fbioe.2021.772002.
- [5] Lu M, Zhou E. Long noncoding RNA LINC00662-miR-15b-5p mediated GPR120 dysregulation contributes to osteoarthritis [J]. *Pathol Int*, 2020, 70(3): 155-65. doi: 10.1111/pin.12875.
- [6] Liang J, Xu L, Zhou F, et al. MALAT1/miR-127-5p regulates osteopontin (OPN)-mediated proliferation of human chondrocytes through PI3K/Akt pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 431-9. doi: 10.1002/jcb.26200.
- [7] Mei D, Daniel Tan W S, Tay Y, et al. Therapeutic RNA strategies for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(7): 475-86. doi: 10.1016/j.tips.2020.04.007.
- [8] Li H, Xie S, Li H, et al. LncRNA MALAT1 mediates proliferation of LPS treated-articular chondrocytes by targeting the miR-146a-PI3K/Akt/mTOR axis [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 116801. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116801.
- [9] Guilak F, Nims R J, Dicks A, et al. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix [J]. *Matrix Biol*, 2018, 71-72: 40-50. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.008.
- [10] Rahman M A. Collagen of extracellular matrix from marine invertebrates and its medical applications [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(2): 118. doi: 10.3390/md17020118.
- [11] Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: the link between obesity and osteoarthritis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 38-50. doi: 10.1016/j.cytogr.2018.10.002.
- [12] Santamaria S. ADAMTS-5: a difficult teenager turning 20 [J]. *Int J Exp Pathol*, 2020, 101(1/2): 4-20. doi: 10.1111/iep.12344.
- [13] Guo H, Yin W, Zou Z, et al. Quercitrin alleviates cartilage extracellular matrix degradation and delays ACLT rat osteoarthritis development: an *in vivo* and *in vitro* study [J]. *J Adv Res*, 2021, 28: 255-67. doi: 10.1016/j.jare.2020.06.020.
- [14] Xia W, Chen H, Xie C, et al. Long-noncoding RNA MALAT1 sponges microRNA-92a-3p to inhibit doxorubicin-induced cardiac senescence by targeting ATG4a [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(9): 8241-60. doi: 10.18632/aging.103136.

- [15] Yin J, Zheng Z, Zeng X, et al. lncRNA MALAT1 mediates osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by sponging miR-129-5p [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13355. doi: 10.7717/peerj.13355.
- [16] Lu M, Zhou E. Long noncoding RNA LINC00662-miR-15b-5p mediated GPR120 dysregulation contributes to osteoarthritis [J]. *Pathol Int*, 2020, 70(3): 155–65. doi: 10.1111/pin.12875.
- [17] Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192–205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012.
- [18] Li W, Xiong Y, Chen W, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling may induce senescence of chondrocytes in osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2631–8. doi: 10.3892/etm.2020.9022.
- [19] Lietman C, Wu B, Lechner S, et al. Inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling ameliorates osteoarthritis in a murine model of experimental osteoarthritis [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(3): e96308. doi: 10.1172/jci.insight.96308.

## The effect of LncRNA MALAT1/miR-15b-5p regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway on lipopolysaccharide-induced chondrocyte injury

Zhao Zhi, Liu Mengkun, Zha Rifei, Zhang Tingbao, Wang Cheng

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Anhui Key Laboratory of Tissue Transplantation, Bengbu 233004)

**Abstract Objective** To explore the molecular mechanism of long non-coding RNA metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) /microRNA-15b-5p (miR-15b-5p) regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in lipopolysaccharide (LPS)-induced chondrocyte injury in osteoarthritis. **Methods** ATDC5 cells were treated with 5 mg/L LPS to establish the osteoarthritis cell injury model, and the expression levels of MALAT1 and miR-15b-5p in the cells were detected by RT-qPCR. The MTT, flow cytometry, Alizarin red staining, and ELISA were used to assess the effects of MALAT1 and miR-15b-5p on LPS-induced chondrocyte injury. The dual-luciferase reporter gene assay was used to examine the regulatory relationship between MALAT1 and miR-15b-5p. Western blot assay was used to evaluate the expression of relevant proteins. **Results** In LPS-induced ATDC5 cells, MALAT1 expression decreased ( $P < 0.05$ ). Compared to the control group, the LPS group exhibited reduced cell activity, an increased apoptosis rate, elevated levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and interleukin-1 $\beta$ , a higher number of calcified nodules, increased expression levels of extracellular matrix degradation-related proteins MMP13 and ADAMTS5, decreased expression levels of Collagen II and Aggrecan, and increased protein expression levels of Wnt1 and  $\beta$ -catenin ( $P < 0.05$ ). Overexpression of MALAT1 could mitigate the effects of LPS on chondrocyte activity, apoptosis, inflammatory response, osteogenic differentiation, extracellular matrix degradation, and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway ( $P < 0.05$ ). Additionally, the overexpression of miR-15b-5p enhanced the impact of LPS on chondrocytes ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MALAT1 is lowly expressed in LPS-induced chondrocytes, and it alleviates LPS-induced chondrocyte injury by targeting miR-15b-5p to inhibit the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.

**Key words** MALAT1; miR-15b-5p; chondrocyte; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; osteoarthritis; inflammation response; osteogenic differentiation; extracellular matrix

**Fund programs** Natural Science Research Projects of Anhui Educational Committee (No. KJ2021A0807); Graduate Student Research Innovation Project of Bengbu Medical University (No. Byycxz21087)

**Corresponding Author** Zhao Zhi, E-mail: zhaozhi@bbmc.edu.cn