

膝关节骨性关节炎 miR-138 HIF-2 α 表达与意义

林利忠 关助明 林泽金

【摘要】目的 探讨膝关节骨性关节炎(KOA)患者关节液中微小核糖核酸-138(miR-138)和关节软骨中低氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)表达及意义。**方法** 选取2018年3月至2019年1月深圳市龙华区中心医院收治的46例KOA患者和46例非KOA患者作为研究组和对照组。比较两组患者关节液中miR-138及关节软骨中HIF-2 α 表达情况;比较研究组不同分级患者关节液中miR-138和关节软骨中HIF-2 α 表达情况;研究组术后随访1年,观察复发情况,比较未复发及复发患者关节液中miR-138和关节软骨中HIF-2 α 表达情况。**结果** 研究组miR-138表达低于对照组[(0.38 $\pm$ 0.06)比(1.13 $\pm$ 0.14)],HIF-2 α 表达高于对照组[(0.97 $\pm$ 0.08)比(0.28 $\pm$ 0.04)],差异有统计学意义($t=33.396,52.322,P$ 均 <0.001);不同分级患者关节液中miR-138和关节软骨中HIF-2 α 表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$);复发患者miR-138表达低于未复发患者[(0.21 $\pm$ 0.05)比(0.41 $\pm$ 0.13)],HIF-2 α 表达高于未复发患者[(1.58 $\pm$ 0.13)比(0.86 $\pm$ 0.07)],差异有统计学意义($t=3.987,21.695,P$ 均 <0.001)。**结论** KOA的发生、发展及预后可能与miR-138及HIF-2 α 的表达有关。

【关键词】 骨性关节炎;膝关节;微小核糖核酸-138;低氧诱导因子-2 α ;复发

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2022.04.015

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis,KOA)是临床上较为常见的一种慢性骨关节疾病^[1-2],早期诊断及积极治疗可有效延缓疾病进展并及早对预后做出判断。微小核糖核酸(microribonucleic acid,miRNA)是由20~24核苷酸组成的小分子非编码RNA,可通过调控下游靶基因表达而参与多种生理病理过程^[3]。穆尚强等^[4]研究证实,在KOA患者的关节液中有多种miRNAs的表达均有异常。关节软骨主要从流动的关节液及软骨下骨中获取营养和氧,关节软骨中低氧诱导因子-2 α (hypoxia inducible factor-2 α ,HIF-2 α)能够调控软骨细胞对低氧环境的适应性^[5]。相关研究^[6-7]发现,在KOA患者的关节液中miR-138呈显著下调,关节软骨中HIF-2 α 信使RNA(Messenger RNA,mRNA)呈显著上调,二者均有可能是KOA前期

的检查和诊断的监测标志物。为了进一步研究KOA患者关节液中miR-138和关节软骨中HIF-2 α 的作用,本研究利用检测二者的表达,并探讨其变化与意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年3月至2019年1月深圳龙华区中心医院收治的46例KOA患者作为研究组,参照凯尔格伦-劳伦斯(Kellgren-Lawrence,K-L)分级标准^[8]对KOA患者(研究组)进行分级:Ⅱ级11例、Ⅲ级22例、Ⅳ级13例。同时选取46例同期非KOA患者(因发生车祸或严重损伤等需要进行下肢截肢手术且均为非KOA患者)作为对照组。两组患者一般资料进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

作者单位:518110 广东深圳 广东省深圳市龙华区中心医院创伤骨科

矢状方向上牙齿移动模式的影响[J].医学综述,2019,22(10):2048-2050.

[11] 尹晓青,胥雷,李大鲁,等.骨皮质切开术辅助正畸联合治疗骨性Ⅲ类错殆患者1例[J].中华口腔正畸学杂志,2020,27(3):171-174.

[12] 吕吉训,张万林.骨皮质切开术辅助正畸治疗对骨性Ⅱ类错(殆)畸形患者的疗效及对矫治时间的影响[J].实用口腔医学杂志,2019,35(5):668-671.

[13] 程磊,赵春洋,李明,等.骨皮质切开术辅助矫治骨性Ⅱ类错(殆)畸形的疗效研究[J].中华口腔医学杂志,2017,52

(7):404-409.

[14] 明华伟,何芸,周翊飞,等.数字化外科技术辅助颌面部骨纤维异常增殖症精确矫治的临床应用[J].中国数字医学,2020,15(1):71-73.

[15] 田珊珊,白蕊,徐晓梅,等.上颌尖牙在无托槽隐形矫治中伸长运动的三维有限元分析[J].中国组织工程研究,2019,23(10):1489-1495.

(2021-08-27收稿)

(本文编校:刘菲,胡欣)

表 1 两组患者一般资料比较

组别	例数	性别(例)		年龄(岁)	患位(例)		BMI(kg/m ²)
		男性	女性		左膝	右膝	
研究组	46	26	20	59.15 ± 8.43	22	24	22.64 ± 3.65
对照组	46	25	21	59.36 ± 7.16	25	21	22.88 ± 3.91
t/χ ² 值		0.044		0.129	0.391		0.304
P 值		0.834		0.898	0.532		0.762

注: BMI 为身体质量指数。

1.2 纳入与排除标准 研究组纳入标准:均符合美国风湿病学会 KOA 诊断标准^[9]者。研究组排除标准:膝关节创伤者;膝关节有手术史者;近期接受非甾体类抗炎药或糖皮质激素类治疗者;有自身免疫性疾病或炎症性关节炎者。对照组排除标准:有严重心、肝、肾疾病者;关节软骨破损严重者;有血液病者;有恶性肿瘤者。本研究经医院伦理委员会批准(审批号:201802 - 001),所有患者均知情同意。

1.3 样本的收集及储存

1.3.1 关节液标本 无菌收集两组患者的关节液各约 3 mL,室温条件下静置 1 h 后,于离心机内以 3 500 r/s 转速离心处理 10 min。去除细胞和关节组织残存碎片,分离上清液于新的 EP 管, -80℃ 超低温冰箱中保存待测。

1.3.2 关节软骨标本 两组患者均在术中切除关节软骨,所有标本均在离开体后 30 min 内取材完成并于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.4 检测方法

1.4.1 关节液中 miR - 138 表达检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real - time polymerase chain reaction,qRT - PCR)检测。分别取两组患者关节液各 3 mL 并提取其中的总 RNA,使用微量分光光度计检测浓度和纯度。然后将总 RNA 逆转录为互补的脱氧核糖核酸(complementary Deoxyribonucleic Acid,cDNA)。逆转录反应条件:16℃ 30 min→42℃ 30 min→85℃ 5 min。U6 的逆转录反应条件为:37℃ 30 min→85℃ 5 min。取 1 μL 逆转录产物进行进行 qRT - PCR。以 U6 作为内参,正向引物为 5' - CTCGCTTCG - GCAGCACA - 3',反向引物为:5' - AACGCTTCAC - GAATTTGCGT - 3';miR - 138 正向引物为 5' - AGCTG - GTGTTGTGAATCAGGCCG - 3',反向引物为:5' - TG - GTGTCGTGGAGTCG - 3';反应条件:95℃ 10 s;95℃ 15 s→60℃ 20 s 40 个循环;60℃ 3 min。2^{-ΔΔCt}法计算关节液中 miR - 138 的相对表达量。

采用 qRT - PCR 法检测关节软骨中 HIF - 2α 表达情况:分别取两组患者软骨组织标本各 80 mg,提取软骨组织总 RNA,应用紫外分光光度计测定每个样本总

RNA 的 A260/A280 的比值,逆转录为 cDNA。HIF - 2α 上游序列:5' - GAGGGTTTCATTGCTGTGCT - 3',下游序列:5' - CTCACGGATCTCCTCATGGT - 3';内参为 β - actin,上游序列:5' - TCGATATAGCTAT - AGCTAGC - 3';下游序列:5' - TCGATAGAGAG - CAAGCTAGC - 3'。反应条件:94℃ 10 s;94℃ 10 s→60℃ 35 s,共 40 个循环;60℃ 3 min。2^{-ΔΔCt}法计算关节软骨中 HIF - 2α 的相对表达量。

研究组患者膝关节置换术后随访 1 年,复发判断标准^[10]:①近 1 个月大多时间感到膝痛;②有骨赘形成;③膝关节活动时有关节摩擦音;④晨僵 <0.5 h。将随访期间符合上述标准者记为复发,不符合则记为未复发。

1.5 观察指标 观察比较两组患者关节液中 miR - 138 及关节软骨中 HIF - 2α 表达比较;比较研究组不同分级患者关节液中 miR - 138 和关节软骨中 HIF - 2α 表达;比较研究组未复发及复发患者关节液中 miR - 138 和关节软骨中 HIF - 2α 表达情况。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析及 SNK - q 检验;计数资料以频数表示,组间比较采用 χ² 检验。以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者关节液中 miR - 138 及关节软骨中 HIF - 2α 表达比较 研究组关节液中 miR - 138 表达低于对照组,研究组关节软骨中 HIF - 2α 表达高于对照组,差异有统计学意义(P < 0.05)。见表 2。

表 2 两组患者关节液中 miR - 138 与关节软骨中 HIF - 2α 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR - 138	HIF - 2α
研究组	46	0.38 ± 0.06	0.97 ± 0.08
对照组	46	1.13 ± 0.14	0.28 ± 0.04
t 值		33.396	52.322
P 值		<0.001	<0.001

注:miR - 138 为微小核糖核酸 - 138,HIF - 2α 为低氧诱导因子 2α。

2.2 研究组不同分级患者关节液中 miR - 138 和关节软骨中 HIF - 2 α 表达比较 不同分级患者关节液中 miR - 138 和关节软骨中 HIF - 2 α 表达比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与Ⅱ级相比,研究组患者Ⅲ级和Ⅳ级关节液中 miR - 138 表达均显著降低,Ⅳ级又显著低于Ⅲ级,差异有统计学意义($P < 0.05$);相较于Ⅱ级,研究组患者Ⅲ级和Ⅳ级关节软骨中 HIF - 2 α 表达均显著升高,Ⅳ级又显著高于Ⅲ级,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 研究组不同分级患者关节液中 miR - 138 与关节软骨中 HIF - 2 α 表达比较($\bar{x} \pm s$)

分级	例数	miR - 138	HIF - 2 α
Ⅱ级	11	0.54 $\pm$ 0.07	0.74 $\pm$ 0.09
Ⅲ级	22	0.40 $\pm$ 0.05 ^①	0.95 $\pm$ 0.13 ^①
Ⅳ级	13	0.21 $\pm$ 0.06 ^{①②}	1.20 $\pm$ 0.16 ^{①②}
F 值		98.971	36.988
P 值		<0.001	<0.001

注:miR - 138 为微小核糖核酸 - 138,HIF - 2 α 为低氧诱导因子 2 α ;与Ⅱ级比较,^① $P < 0.05$;与Ⅲ级比较,^② $P < 0.05$ 。

2.3 研究组未复发及复发患者关节液中 miR - 138 和关节软骨中 HIF - 2 α 表达情况比较 研究组患者术后1年,共有7例患者出现复发。复发患者关节液中 miR - 138 表达低于未复发患者,复发患者关节软骨中 HIF - 2 α 表达高于未复发患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 未复发与复发患者关节液中 miR - 138 和关节软骨中 HIF - 2 α 表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

预后情况	例数	miR - 138	HIF - 2 α
未复发	39	0.41 $\pm$ 0.13	0.86 $\pm$ 0.07
复发	7	0.21 $\pm$ 0.05	1.58 $\pm$ 0.13
t 值		3.987	21.695
P 值		<0.001	<0.001

注:miR - 138 为微小核糖核酸 - 138,HIF - 2 α 为低氧诱导因子 2 α 。

3 讨论

本研究结果显示,研究组患者关节液中 miR - 138 表达低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 KOA 患者关节液中 miR - 138 表达显著下调,且患者分级越高关节液中 miR - 138 表达越低,提示 KOA 患者关节液中 miR - 138 表达减少,且与患者病情严重程度有关。关节液主要由关节滑囊及腱鞘的滑液膜分泌,若膝关节发生病变,分泌的关节液中会出现病变代谢产物,并滞留在关节腔内。miRNA 主要是通过 RNA 上对应的应答元件相结合发挥功能。有研

究^[11-12]显示,miRNA 广泛参与机体的生理病理过程,当 miRNA 与靶基因结合时,可起到抑制或促进基因表达的作用。另有报道^[13]指出,miR - 138 可作用于 G 蛋白偶联受体激酶 6,调节 B 淋巴细胞瘤 - 2(B - cell lymphoma - 2,Bcl - 2)及 Bcl - 2 同源水溶性相关蛋白 Bax,进而促进软骨细胞增殖并抑制其凋亡,根据上述报道可推测 KOA 患者关节液中 miR - 138 表达下降,对软骨细胞的增殖和凋亡调节功能减弱,使得软骨细胞增殖减少而凋亡增多,因此可加重软骨病理改变。此外,miR - 108 表达下降可影响局部代谢,使得有害代谢物质如促炎症因子等滞留,也是诱发并加重关节软骨病变的主要原因^[14]。本研究与上报道和分析相符,提示 miR - 108 可能是 KOA 治疗研究的潜在靶点。

本研究结果显示,研究组关节软骨中 HIF - 2 α 的表达高于对照组,且研究组分级越高其表达越高,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 KOA 患者 HIF - 2 α 表达显著上调,且可能参与病情进展。HIF - 2 α 对关节软骨中的低氧诱导极为重要,主要在高分化的软骨细胞中表达,是胚胎骨骼发育和培养软骨细胞的软骨内成骨所必须的细胞因子^[15]。研究^[16]发现,HIF - 2 α 可能与关节软骨细胞的破坏及凋亡有关,是关节软骨的主要调控因子,可以通过调控基质分解酶类和多种炎症因子等的表达诱发软骨破损。另一方面,HIF - 2 α 高表达可致使关节软骨更易受到损害,进而加重 KOA 患者的病情。此外,本研究中,研究组复发患者关节液中 miR - 138 表达低于未复发患者,而关节软骨中 HIF - 2 α 表达高于未复发患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),推测二者异常表达可能与 KOA 复发风险有关。有报道^[17]指出,miR - 138 表达下降可能导致关节炎患者细胞免疫紊乱,而细胞免疫紊乱则是影响患者预后的重要因素,但既往尚未见关于关节液中 miR - 138 及关节软骨中 HIF - 2 α 异常表达与 KOA 患者复发的关系报道,但是结合上述分析可以推测关节液中 miR - 138 表达下降可导致软骨细胞大量凋亡,关节软骨中 HIF - 2 α 高表达则可参与关节软骨损害,因而二者均可增加 KOA 复发的风险。

综上所述,关节液中 miR - 138 及关节软骨中 HIF - 2 α 表达与 KOA 的发生、发展及复发风险评估均有关。推测关节液中 miR - 138、关节软骨中 HIF - 2 α 可能是 KOA 筛查、诊断的分子监测物质。由于 KOA 与多种因素调节相关,发病机制较复杂,miR - 138、HIF - 2 α 是否能单独适用于 KOA 筛查、诊断及评估复发风险的监测标志物还需深入进行研究。

参考文献

- [1] BEARD D J, DAVIES L J, COOK J A, et al. The clinical and cost-effectiveness of total versus partial knee replacement in patients with medial compartment osteoarthritis (TOPKAT): 5-year outcomes of a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2019, 394(10200): 746-756.
- [2] 刘同玉, 阮永龙, 陶新兵, 等. 腓骨近端截骨术与人工全膝关节置换治疗膝关节骨性关节炎的近期疗效观察[J]. *安徽医学*, 2019, 40(5): 540-542.
- [3] HWANG H S, PARK S J, LEE M H, et al. MicroRNA-365 regulates IL-1 β -induced catabolic factor expression by targeting HIF-2 α in primary chondrocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17889.
- [4] 穆尚强, 孙爽, 王宇, 等. 膝关节骨性关节炎患者关节液 miRNAs 表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(48): 5-7.
- [5] FERNÁNDEZ-TORRES J, ZAMUDIO-CUEVAS Y, MARTÍNEZ-NAVA G A, et al. Hypoxia-inducible factors (HIFs) in the articular cartilage: a systematic review [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(12): 2800-2810.
- [6] BICKER S, LACKINGER M, WEIB K, et al. MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(20): 3987-4005.
- [7] 程超, 张方杰, 倪松, 等. 骨桥蛋白对骨关节炎软骨细胞缺氧诱导因子-2 α mRNA 表达的影响[J]. *医学临床研究*, 2016, 33(8): 1564.
- [8] EMRANI P S, KATZ J N, KESSLER C L, et al. Joint space narrowing and Kellgren-lawrence progression in knee osteoarthritis: an analytic literature synthesis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(8): 873-882.
- [9] HOCHBERG M C, ALTMAN R D, BRANDT K D, et al. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. American College of Rheumatology [J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38(11): 1541-1546.
- [10] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018年版) [J]. *中华骨科杂志*, 2018, 38(12): 705-715.
- [11] 何伟珍, 尹志华, 郭佩, 等. 骨关节炎患者关节液中 miR-335-5p 表达及意义[J]. *新医学*, 2017, 48(1): 37-39.
- [12] GOLUBOVSKAYA V M, SUMBLER B, HO B, et al. MiR-138 and MiR-135 directly target focal adhesion kinase, inhibit cell invasion, and increase sensitivity to chemotherapy in cancer cells [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(1): 18-28.
- [13] 樊萍, 冯秀媛, 胡楠, 等. miR-138 靶向 GRK6 调控骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的研究[J]. *河北医药*, 2021, 43(1): 10-15.
- [14] 朱旭, 苑博, 赵增同, 等. 膝骨关节炎中微小 RNA-138 与缺氧诱导因子-2 α 表达及意义[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2021, 15(2): 192-198.
- [15] LEE M, WON Y, SHIN Y, et al. Reciprocal activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α and the zinc-ZIP8-MTF1 axis amplifies catabolic signaling in osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(1): 134-145.
- [16] ISHIZUKA S, SAKAI T, HIRAIWA H, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α induces expression of type X collagen and matrix metalloproteinases 13 in osteoarthritic meniscal cells [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(6): 439-448.
- [17] 吴玮玮, 卜殷中. miR-138 在类风湿关节炎患者外周血中的表达及其与 Th1/Th2 的关系[J]. *浙江实用医学*, 2019, 24(5): 325-327, 337.

(2021-08-12 收稿)

(本文编校: 彭松, 周雪春)