

微小 RNA-6779-5p 对白细胞介素-1 β 诱导软骨细胞损伤的影响及机制研究

左淑飞, 梁舒, 秦艺璐, 吴洁, 张超, 郭占非, 边彩月, 范文强

(新乡市中心医院/新乡医学院第四临床学院 风湿免疫科, 河南 新乡, 453000)

摘要: **目的** 分析微小 RNA-6779-5p (miR-6779-5p) 在白细胞介素-1 β (IL-1 β) 刺激的软骨细胞中对细胞增殖和凋亡的影响以及相关的分子机制。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法分析 RNA 的表达量。将 miR-6779-5p 模拟物、白细胞介素 1 受体相关激酶 3 (IRAK3) 过表达载体以及各自对照转染 CHON-001 细胞, 采用 10 ng/mL 的 IL-1 β 刺激细胞。应用功能试验分析 miR-6779-5p 和 IRAK3 对 IL-1 β 诱导的细胞损伤的影响; 采用免疫印迹试验分析核因子- κ B (NF- κ B) 通路的相关蛋白表达; 鉴定 miR-6779-5p 和 IRAK3 的关系。**结果** miR-6779-5p 在骨关节炎患者中表达下调, 而 IRAK3 表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); miR-6779-5p 和 IRAK3 的 RNA 水平在不同浓度 IL-1 β 诱导的 CHON-001 细胞中也有相同的表达趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-1 β 处理后, CHON-001 细胞的活力 (100.00% 对比 51.00%) 和 EdU 阳性率降低 (43.00% 对比 25.00%), 细胞凋亡率增加 (6.43% 对比 18.60%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但这些影响在 miR-6779-5p 过表达后缓解 (细胞活力: 52.00% 对比 85.00%; EdU 阳性率: 25.67% 对比 38.67%; 细胞凋亡率: 18.70% 对比 12.10%), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-6779-5p 靶向结合 IRAK3。IRAK3 表达上调在 IL-1 β 诱导的 CHON-001 细胞中逆转 miR-6779-5p 过表达对细胞的影响, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-6779-5p 模拟物在 IL-1 β 诱导的软骨细胞中减少 p-P65 和 P65 比值 (2.06 对比 1.34) 以及 p-I κ B α 和 I κ B α 的比值 (2.42 对比 1.42), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 IRAK3 过表达缓解了这些影响 (p-P65 和 P65 比值: 1.30 对比 1.88; p-I κ B α 和 I κ B α 的比值: 1.45 对比 2.16), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** miR-6779-5p 通过抑制 IRAK3/NF- κ B 通路的激活来挽救 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤, 表明 miR-6779-5p 可能是治疗骨关节炎的潜在靶点。

关键词: 骨关节炎; 白细胞介素-1 β ; 软骨细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 微小 RNA-6779-5p; 白细胞介素 1 受体相关激酶 3; 核因子- κ B 通路

中图分类号: R 684.3; Q522 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2023)12-069-07 DOI: 10.7619/jcmp.20231173

Effect and mechanism of mircoRNA-6779-5p on chondrocyte injury induced by interleukin-1 β

ZUO Shufei, LIANG Shu, QIN Yilu, WU Jie, ZHANG Chao,
GUO Zhanfei, BIAN Caiyue, FAN Wenqiang

(Department of Rheumatology and Immunology, Xinxiang City Central Hospital, the Fourth Clinical College of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, 453000)

Abstract: Objective To analyze the effects of microRNA-6779-5p (miR-6779-5p) on cell proliferation and apoptosis in chondrocyte stimulated by interleukin-1 β (IL-1 β) and the related molecular mechanism. **Methods** Expression level of RNA was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). CHON-001 cells were transfected with miR-6779-5p mimics, overexpression vector of interleukin-1 receptor associated kinase 3 (IRAK3) and their respective controls, and 10 ng/mL IL-1 β was used to stimulate the cells. The effects of miR-6779-5p and IRAK3 on cell injury induced by IL-1 β were analyzed by functional tests; the nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway related protein expression was analyzed by Western blotting; the relationship between miR-6779-5p and IRAK3 was identified. **Results** MiR-6779-5p expression was down-regulated in osteoarthritis patients, while IRAK3 expression was up-regulated ($P < 0.05$). MiR-6779-5p and IRAK3 expressions also showed the same trend in CHON-001 cells induced by IL-1 β at differed concentrations ($P < 0.05$).

收稿日期: 2023-04-14 修回日期: 2023-06-21

基金项目: 河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20200959, LHGJ20210908, LHGJ20200939)

通信作者: 范文强, E-mail: Fwq.1125@163.com

IL-1 β treatment decreased the activity (100.00% versus 51.00%) and EdU positive rate (43.00% versus 25.00%) of CHON-001 cells but increased cell apoptosis rate (6.43% versus 18.60%) ($P < 0.05$), however, these effects were alleviated after miR-6779-5p overexpression (cell viability: 52.00% versus 85.00%; the positive rate of EdU: 25.67% versus 38.67%; cell apoptosis rate: 18.70% versus 12.10%, $P < 0.05$). In addition, miR-6779-5p targeted IRAK3. The up-regulation of IRAK3 expression could reverse the effects of miR-6779-5p overexpression on CHON-001 cells ($P < 0.05$). Moreover, miR-6779-5p mimics reduced the p-P65-to-P65 ratio (2.06 versus 1.34) and the p-I κ B α -to-I κ B α ratio (2.42 versus 1.42) in IL-1 β -induced chondrocytes ($P < 0.05$), but IRAK3 overexpression mitigated these effects (p-P65-to-P65 ratio: 1.30 versus 1.88; p-I κ B α -to-I κ B α ratio: 1.45 versus 2.16, $P < 0.05$). **Conclusion** MiR-6779-5p can ameliorate chondrocyte injury induced by IL-1 β by inhibiting the activation of IRAK3/NF- κ B pathway, which suggests that miR-6779-5p might be a potential target for the treatment of osteoarthritis.

Key words: osteoarthritis; interleukin-1 β ; chondrocytes; cell proliferation; cell apoptosis; microRNA-6779-5p; interleukin-1 receptor-associated kinase 3; nuclear factor- κ B pathway

骨关节炎是一种关节疾病,患者常伴有慢性疼痛、关节僵硬以及身体残疾等特征,发病率和年龄有关^[1-2]。骨关节炎的治疗方法有手术治疗、非药物治疗(例如运动、减肥和物理治疗)和药物治疗,而在药物治疗相关方案中,中西医结合治疗具有绝对优势^[3-5]。微小 RNA(miRNAs)是一类单链的 RNAs,包含 18~25 个核酸,不具有编码蛋白的能力,能够通过结合基因非编码区调控基因表达^[6-7]。既往研究^[8]主要关注 miRNAs 对肿瘤发展的影响,但炎症相关疾病的发病机制也涉及 miRNAs。研究^[9]显示,miRNAs 通过介导肠道屏障稳态、炎症反应和细胞自噬进程参与炎症性肠病。miRNAs 能通过调节宿主防御功能、炎症因子以及抑炎因子的表达来介导包括细菌性肺炎和病毒性肺炎在内的呼吸系统炎症性疾病发展^[10]。研究表明一些 miRNAs 如 miR-29b-5p^[11]、miR-1271^[12]以及 miR-146a^[13]可能参与调控骨关节炎的发病进程。miR-6779-5p 属于 miRNA 家族成员,但尚无相关研究阐明骨关节炎发展是否涉及 miR-6779-5p。

研究^[14-16]揭示白细胞介素-1 β (IL-1 β)能通过核因子 κ B(NF- κ B)信号轴调控软骨损伤。ZHANG J M 等^[17]采用 IL-1 β 诱导的骨关节炎细胞模型证明中度机械应激能够通过调控线粒体功能和活性氧清除参与软骨细胞凋亡。GUO X 等^[18]采用 IL-1 β 诱导的骨关节炎细胞模型证明了毛蕊异黄酮参与骨关节炎的发生发展。本研究通过瞬时转染的方法将商业合成的 miR-6779-5p 模拟物转染到 IL-1 β 诱导软骨细胞,通过细胞计数

试剂盒 8(CCK-8)法、5-乙基-2'-脱氧尿苷(EdU)实验、流式细胞仪以及荧光素酶报告实验分析 miR-6779-5p 对骨关节炎发展的影响及机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

采用体外细胞分子生物学实验。实验在新乡市中心医院风湿免疫科实验室进行,于 2023 年 2 月 28 日完成。主要试剂有:IL-1 β (广州赛业科技);RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技);白细胞介素 1 受体相关激酶 3(IRAK3)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗抗体以及二抗抗体(武汉华美生物);CCK-8 试剂盒、BCA 定量试剂盒、胎牛血清、蛋白分子量标准、蛋白酶抑制剂、琼脂糖和 NP-40(上海碧云天技术);MiRcute miRNA isolation kit、TGrinder H24R 组织研磨低温均质仪、细胞增殖试剂盒和 miR-6779-5p 模拟物(广州锐博科技);Lipofectamine 2000 转染试剂、Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)、聚偏氟乙烯膜、pcDNA3.1 载体、磷酸缓冲液、减血清培养基(美国 Thermo Fisher 公司);IRAK3 过表达载体(南京金斯瑞生物);点直接突变试剂盒和凋亡检测试剂盒(上海翊圣生物);本实验中所用的其他一抗抗体(美国 CST 公司)。主要仪器有:蛋白电泳仪和转模仪(美国 Invitrogen 公司);蛋白成像系统(美国 UVP 公司);流式细胞仪(美国 Thermo Fisher 公司);TGrade Lite 金属浴和 TGrade mini 涡旋混匀仪(北京天根生化科技)。

1.2 实验方法

1.2.1 人体软骨组织: 人体软骨标本的收集得到了新乡市中心医院伦理委员会的同意, 所有参与者均提供了知情同意书。23 例骨关节炎软骨组织是从骨关节炎患者中收集而来, 19 例正常软骨组织由创伤性截肢者提供, 这些组织在收集后储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.2.2 细胞培养: 人软骨细胞 (CHON-001, 上海酶研生物) 培养在添加有 10% 胎牛血清和 1% 抗生素的 DMEM 培养基中, 并于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养。

1.2.3 诱导实验: 根据所需培养孔数量准备细胞, CHON-001 细胞汇合度达到 90% 左右时用胰酶进行消化, 消化时间依据显微镜下细胞状态而定。将细胞接种到 12 孔板中, 待细胞密度达到 50% ~ 70% 时, 将 IL-1 β (0、5、10、15 ng/mL) 加到所需孔中, 并放置到培养箱中维持 24 h^[19]。将添加 0 ng/mL IL-1 β (即添加同体积的磷酸缓冲液) 的培养孔标记为 0 ng/mL 组, 将添加 5、10 和 15 ng/mL IL-1 β 的培养孔分别标记为 5 ng/mL 组、10 ng/mL 组和 15 ng/mL 组。

在细胞转染的前 1 d, 按照实施转染实验的时间, 调整 CHON-001 细胞密度并接种到 12 孔板中, 培养过夜, 将 Lipofectamine 2000 转染试剂和 miR-6779-5p 或 miR-NC 在旋涡震荡仪上混匀, 参照说明书的要求静置 15 min, 随后依次将混合液加到培养孔中, 将培养皿在操作工作台上轻轻摇晃后放置在培养箱中孵育 48 h, 随后与 10 ng/mL IL-1 β 或者同体积的磷酸缓冲液孵育 24 h, 并标记为 control 组、IL-1 β 组、IL-1 β + miR-NC 组以及 IL-1 β + miR-6779-5p 组。以同样方法标记 IL-1 β + miR-6779-5p + pcDNA 组和 IL-1 β + miR-6779-5p + IRAK3 组。

1.2.4 实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分析 RNA 表达: 利用 NanoDrop-1000 设备检测提取的 RNA 浓度。样品浓度提前稀释到规定的浓度范围, 根据商业化的反转录试剂盒操作步骤合成 cDNA。将 cDNA 稀释 5 倍, 参照以下标准设置 20 μL 定量体系定量 RNA 表达: 2 μL cDNA 模板、上游引物和下游引物各 0.5 μL 、10 μL Super-Real PreMix Color 和 7 μL 双蒸水。将 cDNA 稀释 5 倍, 参照以下标准设置 20 μL 定量体系定量 miRNA 表达: 2 μL cDNA 模板、miRNA 特异引物和 mRQ 3' 引物各 0.5 μL 、10 μL TB Green Advantage

Premix 和 7 μL 双蒸水。基因的定量是在 IQ5 热循环仪上进行的。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析基因表达, 引物序列见表 1。

表 1 定量分析引物序列

基因		引物序列 (5'-3')
IRAK3	上游引物	TGGCAGAGAGACTTTTCAAGCA
	下游引物	GACGATGTCCCATCTCCTGG
miR-6779-5p	上游引物	GTATGAGCTGGGAGGGGCTGG
	下游引物	CTCAACTGGTGTCTGGAG
GAPDH	上游引物	AAGCTGTGGGCAAGGTCATC
	下游引物	CGCTCAAAGTGGAGGAGTGG
U6	上游引物	CTCGCTTCGGCAGCACATA
	下游引物	CGAATTTGCGTGTCTCCT

1.2.5 细胞活力分析: 将 CHON-001 细胞在 96 孔板上培养并接受细胞转染以及 IL-1 β 处理操作, 随后根据 CCK-8 试剂盒的说明将 CCK-8 试剂加入培养孔中, 4 h 后检测样品光密度值。

1.2.6 细胞增殖实验: 将经过细胞转染和 IL-1 β 处理的软骨细胞培养在 96 孔板上 2 h (实验前已加入标准浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU), 随后根据说明书的要求将多聚甲醛加入培养孔中。在软骨细胞和 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色液孵育后, 利用荧光显微镜分析 EdU 阳性的细胞。

1.2.7 细胞凋亡分析: 采用结合缓冲液将细胞重悬, 随后将细胞和膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 以及碘化丙啶避光孵育 10 min。采用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.2.8 双荧光素酶报告实验: 采用 PCR 技术将包含预测 miR-6779-5p 结合位点的 IRAK3 3' 非编码区 (3' UTR) 扩增并插入到 pmirGLO 载体, 命名 WT-IRAK3 3' UTR。采用点直接突变试剂盒将 IRAK3 3' UTR 中的 5'-CCTCCCAG-3' 突变成 5'-GGAGGGTC-3', 以相同方式构建 MUT-IRAK3 3' UTR。将报告质粒和 miR-6779-5p 或 miR-NC 转染到软骨细胞中, 48 h 后采用双荧光素酶报告实验试剂盒检测荧光素酶活性。

1.2.9 蛋白表达分析: 采用 NP-40 裂解液裂解样品以提取样品蛋白, 蛋白浓度分析利用 BCA 试剂盒完成。根据测定的蛋白浓度, 计算 20 μg 蛋白所需体积, 将相应体积的蛋白样品采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 处理。将聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜在脱色摇床中和稀释过的 IRAK3、GAPDH、p-P65、P65、I κ B α 和 p-I κ B α 一抗抗体在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 12 h。PVDF

膜在脱色摇床经过洗涤后与二抗孵育 2 h。最后利用图像分析系统分析 PVDF 膜。

1.3 统计学分析

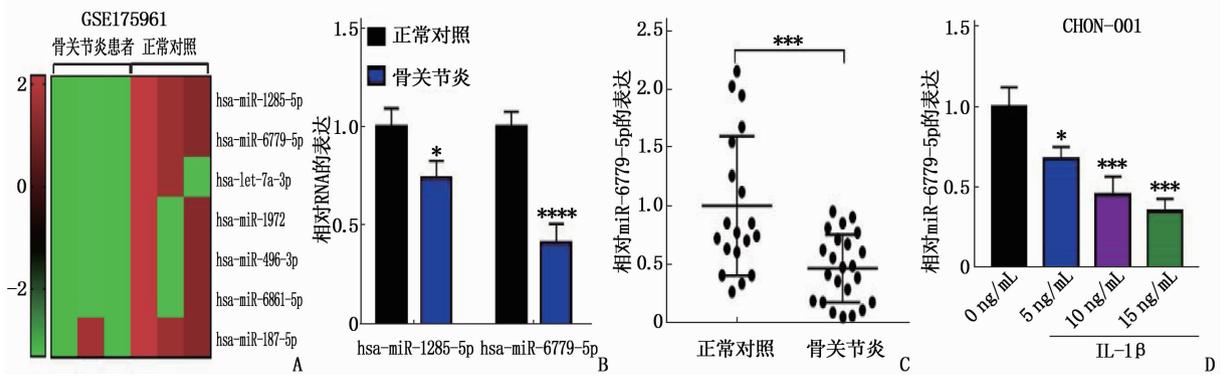
采用 GraphPad Prism 软件分析数据,结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。利用 *t* 检验和方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-6779-5p 在骨关节炎患者软骨组织和 IL-1 β 刺激的 CHON-001 细胞中低表达

本研究首先利用 GEO 数据库 (GEO 数据登

录号: GSE175961) 筛选了骨关节炎患者中表达异常的 miRNAs, 并罗列了表达较低的前 7 位 miRNAs (图 1A); 随后又鉴定了前 2 位 miRNAs 的表达量 (miR-1285-5p 和 miR-6779-5p), 与 miR-1285-5p 相比, miR-6779-5p 在骨关节炎患者中表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1B); miR-6779-5p 在骨关节炎患者软骨组织中的表达较正常对照组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1C), 且 IL-1 β 处理能够在 CHON-001 细胞中呈浓度依赖性地减少 miR-6779-5p 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1D)。



A: GEO 数据库分析骨关节炎患者中表达较低的前 7 位 miRNAs; B、C: miR-1285-5p 以及 miR-6779-5p 表达分析, 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; D: 不同浓度 IL-1 β 处理对 CHON-001 细胞 miR-6779-5p 的表达影响, 与 0 ng/mL 比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 miR-6779-5p 表达检测 (hsa 表示物种为人类)

2.2 miR-6779-5p 模拟物减弱了 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤

与 control 组相比, IL-1 β 组中 miR-6779-5p 的表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β + miR-NC 组比较, IL-1 β + miR-6779-5p 组中 miR-6779-5p 的表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2A)。与 control 组相比, IL-1 β 组中软骨细胞活力和 EdU 阳性率降低, 细胞凋亡率增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β + miR-NC 组比较, IL-1 β + miR-6779-5p 组中软骨细胞活力和 EdU 阳性率升高, 细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2B、2C、2D)。

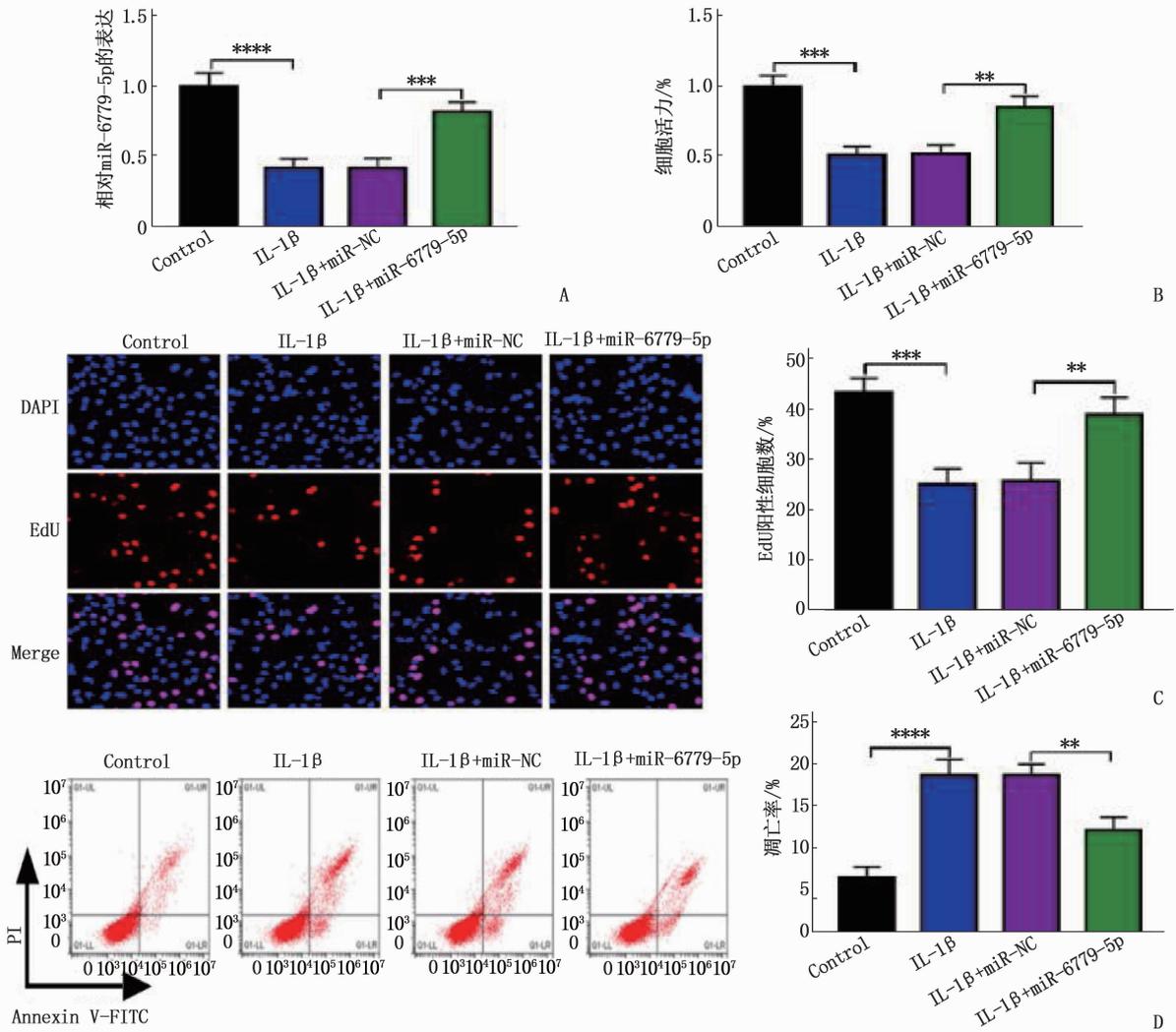
2.3 miR-6779-5p 和 IRAK3 的关系鉴定

IRAK3 和 miR-6779-5p 结合位点见图 3A。本研究发现, 相对荧光素酶活性在 WT-IRAK3 3'UTR 和 miR-6779-5p 共转染后降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但在 MUT-IRAK3 3'UTR 和 miR-6779-5p 共转染后相对荧光素酶活性变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3B)。IRAK3 在骨关节炎患者软骨组织中的表达较正常对照组更

高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3C), 且在骨关节炎患者软骨组织中的表达与 miR-6779-5p 表达呈负相关 ($P < 0.05$) (图 3D)。IL-1 β 处理能够在 CHON-001 细胞中呈浓度依赖性地增加 IRAK3 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3E)。

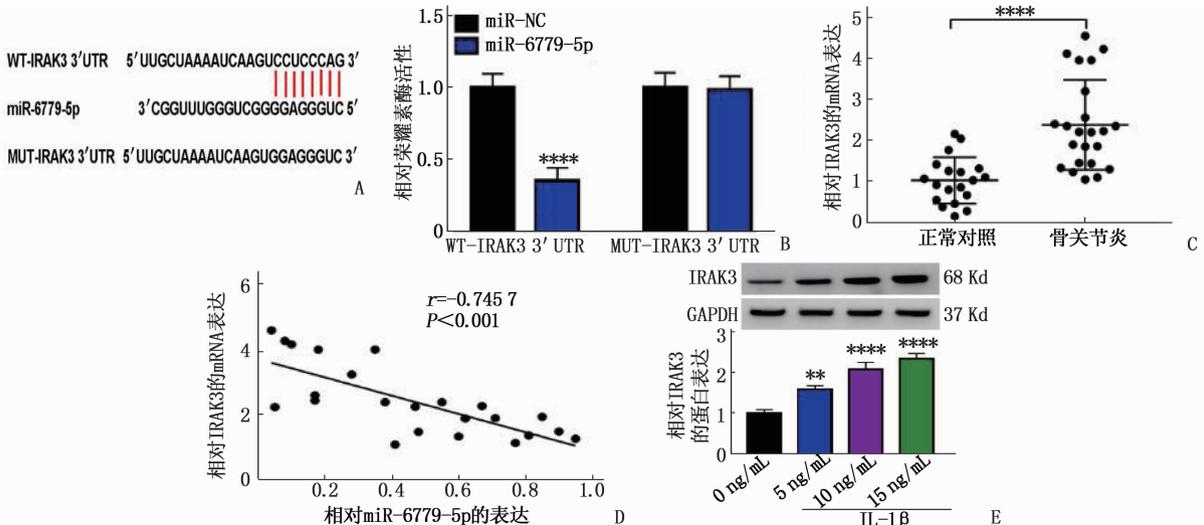
2.4 miR-6779-5p 通过结合 IRAK3 减弱 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤

与 control 组相比, IL-1 β 组中 IRAK3 的表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β + miR-NC 组比较, IL-1 β + miR-6779-5p 组中 IRAK3 的表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4A)。与 control 组相比, IL-1 β 组中软骨细胞活力和 EdU 阳性率降低, 细胞凋亡率增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β + miR-NC 组比较, IL-1 β + miR-6779-5p 组中软骨细胞活力和 EdU 阳性率升高, 细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4B、4C、4D)。然而, IRAK3 过表达后减弱了 miR-6779-5p 对 IRAK3 表达、细胞活力、细胞增殖以及细胞凋亡的影响, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4A、4B、4C、4D)。



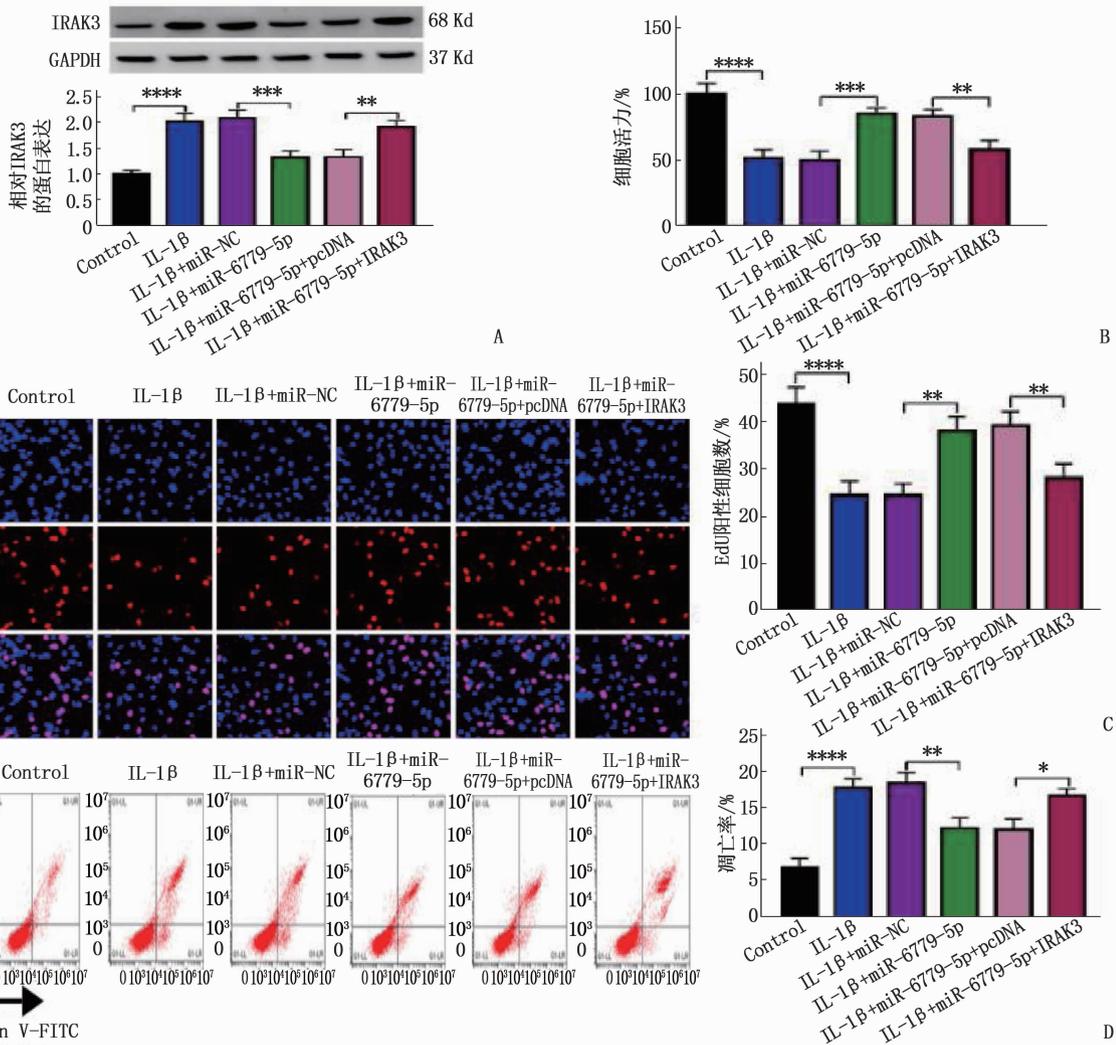
A: miR-6779-5p 和 IL-1β 处理对 miR-6779-5p 表达的影响; B, C, D: miR-6779-5p 和 IL-1β 处理对细胞活力、增殖和凋亡的影响 (放大 400 倍)。与 IL-1β 比较, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 IL-1β + miR-NC 比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 miR-6779-5p 影响 IL-1β 诱导软骨细胞损伤



A: miR-6779-5p 和 IRAK3 结合位点; B: miR-6779-5p 和 IRAK3 靶向关系的鉴定; C: IRAK3 mRNA 表达; D: miR-6779-5p 和 IRAK3 相关性分析; E: IRAK3 蛋白表达。与 miR-NC 比较, **** $P < 0.0001$; 与正常对照组比较, **** $P < 0.0001$; 与 0 ng/mL 比较, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 3 miR-6779-5p 靶向结合 IRAK3

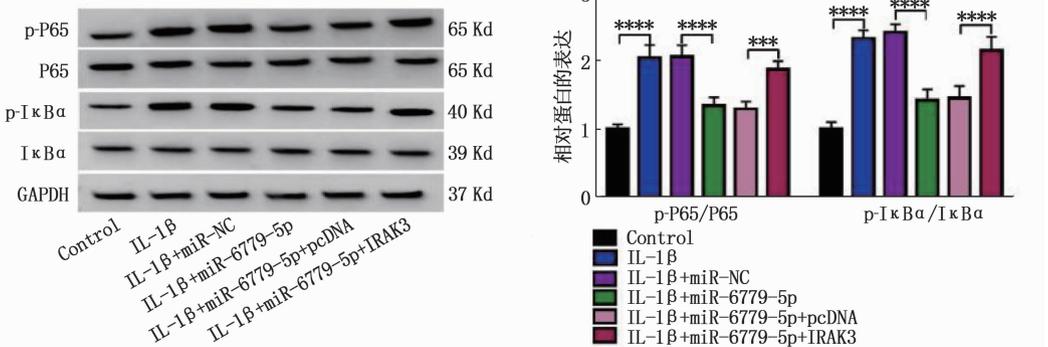


A: IRAK3 表达分析; B、C: miR-6779-5p 和 IRAK3 对细胞增殖的影响(放大 400 倍); D: miR-6779-5p 和 IRAK3 过表达在 IL-1β 处理的软骨细胞中对细胞凋亡的影响。与 control 组比较, **** $P < 0.0001$; 与 IL-1β + miR-NC 比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 IL-1β + miR-6779-5p + IRAK3 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 miR-6779-5p 模拟物和 IRAK3 过表达在 IL-1β 诱导软骨细胞损伤的影响

2.5 miR-6779-5p 在 IL-1β 处理的软骨细胞中通过介导 IRAK3 调控 NF-κB 通路 miR-6779-5p 模拟物在 IL-1β 诱导的软骨细胞中减少 p-P65 和 P65 比值以及 p-IκBα 和 IκBα

的比值,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是这些影响在 IRAK3 过表达后缓解,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。



与 control 组比较, **** $P < 0.0001$; 与 IL-1β + miR-NC 比较, **** $P < 0.0001$; 与 IL-1β + miR-6779-5p + pcDNA 比较, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 p-P65、P65、p-IκBα 和 IκBα 蛋白表达分析

3 讨论

miRNAs 的特殊基因沉默特性使得这类非编码 RNAs 参与不同疾病的发展过程^[6, 20-21]。骨关节炎发病机制涉及 miRNAs, miRNAs 的低表达会造成骨骼生长缺陷^[22]。这些小 RNAs 介导软骨细胞凋亡和增殖^[23-24]。最近的研究数据^[25-26]指出 miR-6779-5p 与肿瘤恶性有关,但尚无数据报道其是否参与骨关节炎的发生发展。本研究运用 GEO 数据库筛选发现 miR-6779-5p 表达在骨关节炎患者中显著降低,并且 qRT-PCR 分析证实了此结果;本研究结果还表明 miR-6779-5p 在 IL-1 β 诱导的软骨细胞中表达下调,且呈剂量依赖性。此外,miR-6779-5p 逆转了 IL-1 β 对软骨细胞增殖的抑制作用和对凋亡的促进作用。

miRNAs 在转录后水平通过和靶基因结合来介导基因表达,进而调控细胞分化、致癌性转化以及细胞增殖等生物学进程^[27]。本研究分析发现 miR-6779-5p 靶标 IRAK3。IRAK3 属于 IRAK 家族成员,该家族蛋白是一类胞浆蛋白,在先天性免疫中具有重要作用^[28]。此外,体外的骨关节炎模型^[29]揭示 IRAK3 下调有助于关节软骨损伤的恢复,相关机制涉及 miR-33b-3p 对 IRAK3 的靶向调控作用。研究^[19]指出 IRAK3 参与骨关节炎发展,本研究数据表明 IRAK3 高表达促进骨关节炎软骨细胞损伤,说明 IRAK3 在骨关节炎关节软骨中表达增加以及 IRAK3 有助于骨关节炎发展。不同的是,本研究指出 IRAK3 结合 miR-6779-5p 调节软骨细胞损伤。研究^[28, 30]显示 IRAK3 过表达减弱了 miR-6779-5p 对细胞增殖和凋亡的影响。鉴于 IRAK3 能够通过激活 NF- κ B 通路参与炎症反应,本研究又分析了 miR-6779-5p 在 IL-1 β 处理的软骨细胞中是否通过介导 IRAK3 调控 NF- κ B 通路,结果显示 miR-6779-5p 减少 p-P65 和 P65 比值以及 p-I κ B α 和 I κ B α 的比值,但是这些影响在 IRAK3 过表达后得到缓解,说明了骨关节炎的发病进程可能涉及 miR-6779-5p/IRAK3/NF- κ B 通路调控。

综上所述,miR-6779-5p 通过抑制 IRAK3/NF- κ B 通路的激活来挽救 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤,表明 miR-6779-5p 可能是治疗骨关节炎的潜在靶点。但本研究只利用骨关节炎的细胞模型鉴定 miR-6779-5p/IRAK3/NF- κ B 通路在骨关节炎发展中的作用,后期还应开展相应的动物模型

实验来验证此通路在骨关节炎发展中的作用。

参考文献

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] 贾笛, 韦佳佳, 段修权, 等. 基于全球视角的中国骨关节炎疾病负担分析[J]. *现代预防医学*, 2022, 49(13): 2312-2316.
- [3] KLOPPENBURG M, BERENBAUM F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(3): 242-248.
- [4] 徐黎, 李凯, 过哲, 等. 膝关节骨关节炎全关节磁共振成像评分观察者间一致性评价[J]. *骨科临床与研究杂志*, 2021, 6(2): 106-111.
- [5] 刘军. 中西医结合治疗膝骨关节炎的优势[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(7): 775-777.
- [6] HILL M, TRAN N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4): dmm047662.
- [7] 高洁, 娜迪拉, 方志敏. miRNA 在急性心肌梗死诊断、治疗及预后中的研究进展[J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26(1): 139-142.
- [8] 许晓丹, 汤立军. miRNA 与炎性相关疾病[J]. *生命科学*, 2016, 28(9): 1039-1043.
- [9] WHITEOAK S. The role of microRNAs in inflammatory bowel disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(8): 2112-2123.
- [10] 张帆, 李思洋, 丁军颖, 等. microRNA 在呼吸系统炎性疾病中的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 108-114.
- [11] ZHU J J, YANG S H, QI Y D, et al. Stem cell-homing hydrogel-based miR-29b-5p delivery promotes cartilage regeneration by suppressing senescence in an osteoarthritis rat model [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(13): eabk0011.
- [12] SHEN S Y, WU Y Z, CHEN J X, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(6): 826-836.
- [13] 李力, 罗晓星. 类风湿关节炎患者关节液中 miRNA 表达谱研究及其临床意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2017, 21(13): 51-55.
- [14] 李宇博, 骆晓飞, 尹夏, 等. 杜仲多糖通过抑制 NF- κ B 通路减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤[J]. *中国骨伤*, 2022, 35(7): 661-668.
- [15] 靳泽怡, 丁彩琳, 于睿, 等. 软骨细胞与间充质干细胞诱导成软骨肥大分化的调控机制及策略[J]. *骨科临床与研究杂志*, 2021, 6(5): 313-317.
- [16] 周亮, 陈兴真, 李振宇, 等. lncRNA HOTAIR 在白细胞介素 1 β 介导骨关节炎中的作用机制[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(35): 5607-5613.
- [17] ZHANG J M, HAO X X, CHI R M, et al. Moderate mechanical stress suppresses the IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by regulating mitochondrial dynamics [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(11): 7504-7515.

络,同时促进药物吸收。本研究中观察组下肢深静脉血栓发生率低于对照组,表明本研究采用的护理方法能够预防血液凝聚和血栓形成。“和伤散”熏洗联合刘氏“三指按摩”手法护理能够明显降低髋关节骨折患者术后下肢深静脉血栓发生率,相较于传统护理方法能够更好地改善患者术后凝血指标,降低血栓形成风险,值得临床推广使用。

参考文献

[1] WU H Y, LI Y Q, TONG L J, *et al.* Worldwide research tendency and hotspots on hip fracture: a 20-year bibliometric analysis[J]. *Arch Osteoporos*, 2021, 16(1): 1-14.

[2] 于君君, 边永彬, 刘阳. 中西医结合预防老年髋部骨折围手术期下肢深静脉血栓形成: 评《老年髋部骨折中西医结合精准治疗与管理》[J]. *世界中医药*, 2022, 17(21): 3132.

[3] 邓凯歌, 王立芳, 葛宇峰, 等. 老年髋部骨折患者术后死亡风险预测模型的研究进展[J]. *骨科临床与研究杂志*, 2022, 7(1): 54-58.

[4] 陈浩, 王善付, 王建伟. 名老中医刘秉夫伤科外治经验概述[J]. *中医药学报*, 2013, 41(5): 27-29.

[5] 沈杰枫, 蔡建平, 王建伟, 等. 刘氏伤科“三指按摩”手法[J]. *中医正骨*, 2013, 25(12): 79-80.

[6] KIRKILESIS G, KAKKOS S K, BICKNELL C, *et al.* Treatment of distal deep vein thrombosis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 4(4): CD013422.

[7] PETERSON C W. Venous thrombosis: an overview [J]. *Pharmacotherapy*, 1986, 6(4 Pt 2): 12S-17S.

[8] 黄晓焱, 孔令俊, 王晨亮, 等. 中医防治髋部骨折术后深静脉血栓研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2021, 17(2): 194-197.

[9] 郑丹丹, 吴荷玉, 李莎, 等. 老年髋部骨折术后并发深静脉血栓的护理研究综述[J]. *护理实践与研究*, 2022, 19(10): 1474-1477.

[10] 赵艳萍, 高换雄. 骨科患者术后下肢深静脉血栓形成的优质护理干预[J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(22): 70-72.

[11] 戴慧燕, 高荣荣, 徐佩, 等. 气压泵联合低分子肝素钙预防髋部骨折术后深静脉血栓的疗效分析[J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(9): 24-26.

[12] 樊敏, 陈鹏. 中医预防术后深静脉血栓形成研究进展[J]. *实用中医药杂志*, 2022, 38(10): 1838-1840.

[13] 孙晓洁, 陈立恒, 仇永锋, 等. 中药涂擦联合静脉泵预防老年髋部骨折术后下肢深静脉血栓临床研究[J]. *陕西中医药大学学报*, 2022, 45(4): 105-108.

[14] 侯玉芬, 刘政. 下肢深静脉血栓形成诊断及疗效标准(2015年修订稿)[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2016, 22(5): 520-521.

[15] 孟茜茜. 穴位按摩联合情志护理对老年髋部骨折术后DVT形成的影响[J]. *西藏医药*, 2022, 43(5): 132-134.

[16] 吕晓霞. 活血止痛熏洗剂联合红花黄色素注射液预防骨折术后下肢深静脉血栓和促进骨折愈合的效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2019, 4(3): 140-141.

[17] 刘虹, 陈萍. 中医特色护理干预对股骨颈骨折患者术后下肢肿胀、疼痛及DVT形成的影响[J]. *医学理论与实践*, 2022, 35(2): 325-327.

[18] 张慧永, 李林, 陈曦光. 益气活血通脉汤治疗老年脑梗死合并下肢深静脉血栓患者的效果[J]. *实用临床医药杂志*, 2020, 24(17): 62-65.

[19] 刘秉夫. *伤科指要*[M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 2007: 6-12.

(本文编辑: 周冬梅 钱锋)

(上接第75面)

[18] GUO X, PAN X Y, WU J H, *et al.* Calycosin prevents IL-1 β -induced articular chondrocyte damage in osteoarthritis through regulating the PI3K/AKT/FoxO1 pathway [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2022, 58(6): 491-502.

[19] YU J Z, QIN Y, ZHOU N X. Knockdown of Circ_SLC39A8 protects against the progression of osteoarthritis by regulating miR-591/IRAK3 axis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 170.

[20] VISHNOI A, RANI S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509: 1-10.

[21] MENON A, ABD-AZIZ N, KHALID K, *et al.* miRNA: a promising therapeutic target in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11502.

[22] SWINGLER T E, NIU L, SMITH P, *et al.* The function of microRNAs in cartilage and osteoarthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37(5): 40-47.

[23] GHAFOURI-FARD S, POULET C, MALAISE M, *et al.* The emerging role of non-coding RNAs in osteoarthritis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 773171.

[24] ZHANG H J, ZHENG W D, LI D, *et al.* miR-146a-5p promotes chondrocyte apoptosis and inhibits autophagy of osteoarthritis by targeting NUMB [J]. *Cartilage*, 2021, 13(2-suppl): 1467S-1477S.

[25] YANG X Y, LIU Y, ZHOU X H, *et al.* Circular RNA 0010117 promotes aggressive glioblastoma behavior by regulating the miRNA-6779-5p/SPEN axis [J]. *Transl Oncol*, 2022, 25: 101515.

[26] KIM S, BAE W J, AHN J M, *et al.* microRNA signatures associated with lymph node metastasis in intramucosal gastric cancer[J]. *Mod Pathol*, 2021, 34(3): 672-683.

[27] MADHUMITA M, PAUL S. A review on methods for predicting miRNA-mRNA regulatory modules [J]. *J Integr Bioinform*, 2022, 19(3): 20200048.

[28] FREIHAT L A, WHEELER J I, WONG A, *et al.* IRAK3 modulates downstream innate immune signalling through its guanylate cyclase activity [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15468.

[29] TAO T, ZHANG Y K, WEI H, *et al.* Downregulation of IRAK3 by miR-33b-3p relieves chondrocyte inflammation and apoptosis in an in vitro osteoarthritis model[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85(3): 545-552.

[30] ZHOU H, YU M J, FUKUDA K, *et al.* IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NF κ B activation and cytokine production[J]. *EMBO J*, 2013, 32(4): 583-596.

(本文编辑: 梁琥 钱锋)