

miR-515-5p 靶向 Toll 样受体 4 调控髓样分化因子 88/NF- κ B 通路抑制骨关节炎软骨细胞凋亡及炎症反应的分子机制研究



蔡东峰, 杨子肖, 钟超, 张靖, 洪嵩

遵义医科大学附属医院骨科 (贵州遵义 563000)

【摘要】 目的 探究 miR-515-5p 抑制骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 软骨细胞凋亡、缓解炎症反应的分子机制。方法 体外培养人软骨细胞系 C28/I2, 使用 10 ng/mL IL-1 β 处理细胞 24 h 构建体外 OA 模型; 另外, 分别采用 miR mimics、mimics 阴性对照 (negative control, NC)、过表达 (over expression, oe)-NC 和 oe-Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 转染 C28/I2 细胞后, 使用 10 ng/mL IL-1 β 处理各组细胞 24 h 构建 OA 模型。采用细胞计数试剂盒 8 和 EdU 检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期, Western blot 检测 B 淋巴瘤 2 蛋白 (B-cell lymphoma 2 protein, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、裂解的半胱天冬酶 3 (cleaved-Caspase-3)、TLR4、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)、p65 及磷酸化 p65 (phosphorylated p65, p-p65) 蛋白的表达水平, 实时荧光定量 PCR 检测 miR-515-5p、TLR4 mRNA 表达水平, ELISA 检测细胞上清液中促炎因子前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、TNF- α 、IL-6 的水平。通过 BiBiServ2 数据库预测 miR-515-5p 和 TLR4 之间的潜在结合位点, 并采用双荧光素酶报告实验验证 miR-515-5p 和 TLR4 的靶向关系。结果 采用 IL-1 β 处理 C28/I2 细胞后, miR-515-5p、Bcl-2 蛋白的表达及细胞增殖能力均显著降低, Bax 和 cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平、细胞上清液中促炎因子 (PGE2、TNF- α 、IL-6) 水平及细胞凋亡率均显著增加; 此外, S 期和 G₂ 期细胞比例显著降低, G₁ 期细胞比例显著增加, 提示 IL-1 β 处理后细胞周期受到阻滞。而转染 miR mimics 后, 细胞中 miR-515-5p 表达水平显著上调, 部分逆转了 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞凋亡, 缓解了 OA 软骨细胞的周期阻滞和炎症反应。采用 IL-1 β 处理 C28/I2 细胞后, TLR4 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高; 过表达 miR-515-5p 后, 靶向抑制了 TLR4 的表达并且阻断了 MyD88/NF- κ B 通路的激活。而过表达 TLR4 可部分逆转 miR mimics 对 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞凋亡及炎症的改善作用。结论 miR-515-5p 靶向负调控 TLR4 的表达, 抑制了 MyD88/NF- κ B 通路激活以及 OA 软骨细胞凋亡, 并有效缓解了细胞炎症反应。

【关键词】 骨关节炎; 软骨细胞; 炎症反应; miR-515-5p; Toll 样受体 4; 细胞凋亡; 细胞周期

miR-515-5p targeting Toll-like receptor 4 regulates myeloid differentiation primary response gene 88/nuclear factor-kappa B pathway to inhibit apoptosis and inflammatory response of osteoarthritis chondrocytes

CAI Dongfeng, YANG Zixiao, ZHONG Chao, ZHANG Jing, HONG Song

Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou, 563000, P. R. China

Corresponding author: HONG Song, Email: hsong0909@163.com

【Abstract】 Objective To explore the molecular mechanism of miR-515-5p in inhibiting chondrocyte apoptosis and alleviating inflammatory response in osteoarthritis (OA). **Methods** Human cartilage cell line C28/I2 was cultured *in vitro* and treated with 10 ng/mL interleukin 1 β (IL-1 β) for 24 hours to construct an *in vitro* OA model. C28/I2 cells were transfected with miR mimics, mimics negative control (NC), over expression (oe)-NC, and oe-Toll-like receptor 4 (TLR4), respectively, and then treated with 10 ng/mL IL-1 β for 24 hours to establish OA model. Cell proliferation capacity was detected by cell counting kit 8 and 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, cell apoptosis and cell cycle were detected by flow

DOI: 10.7507/1002-1892.202312091

基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划项目 (黔科合基础-ZK [2021] 一般 392)

通信作者: 洪嵩, Email: hsong0909@163.com

cytometry, and B-cell lymphoma 2 protein (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved-Caspase-3, TLR4, myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), p65 and phosphorylated p65 (p-p65) protein expression levels were detected by Western blot. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect mRNA expression levels of miR-515-5p and TLR4, and ELISA was used to detect pro-inflammatory factor prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor α (TNF- α), and IL-6 levels in cell supernatant. The potential binding sites between miR-515-5p and TLR4 were predicted by BiBiServ2 database, and the targeting relationship between miR-515-5p and TLR4 was verified by dual luciferase reporting assay. **Results** After the treatment of C28/I2 cells with IL-1 β , the expressions of miR-515-5p and Bcl-2 protein and the proliferation ability of C28/I2 cells significantly reduced. The expression levels of Bax and cleaved-Caspase-3 protein, the levels of pro-inflammatory factors (PGE2, TNF- α , IL-6) in the supernatant of C28/I2 cells, and the apoptosis of C28/I2 cells significantly increased. In addition, the proportion of the cells at S phase and G₂ phase decreased significantly, and the proportion of cells at G₁ phase increased significantly, suggesting that the cell cycle was blocked after IL-1 β treatment. After transfection with miR mimics, the expression level of miR-515-5p in the cells significantly up-regulated, partially reversing the apoptosis of OA chondrocytes induced by IL-1 β , and alleviating the cycle arrest and inflammatory response of OA chondrocytes. After treating C28/I2 cells with IL-1 β , the mRNA and protein levels of TLR4 significantly increased. Overexpression of miR-515-5p targeted inhibition of TLR4 expression and blocked activation of MyD88/nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway. Overexpression of TLR4 could partially reverse the effect of miR mimics on IL-1 β -induced apoptosis and inflammation of OA chondrocytes. **Conclusion** miR-515-5p negatively regulates the expression of TLR4, inhibits the activation of MyD88/NF- κ B pathway and apoptosis of OA chondrocytes, and effectively alleviates the inflammatory response of the cells.

【Key words】 Osteoarthritis; chondrocyte; inflammatory response; miR-515-5p; Toll-like receptor 4; cell apoptosis; cell cycle

Foundation item: Basic Research Program of Guizhou Science and Technology Department (Guizhou Science and Technology Foundation-ZK [2021] General 392)

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种退行性关节疾病, 主要表现为关节软骨的渐进性损伤、软骨细胞凋亡以及关节炎症, 导致患者身体残疾, 严重影响生活质量^[1-2]。研究表明, 软骨细胞凋亡以及促炎因子的产生与 OA 进展密切相关^[3-4]。因此, 抑制软骨细胞凋亡和缓解炎症反应是治疗 OA 的有效措施。然而, OA 的具体发病机制尚不明确。

miRNA 是一类非编码小 RNA, 其可通过靶向结合 mRNA 的特定互补序列, 从而负调控基因表达^[5], 且与 OA 等多种疾病的发展紧密相关^[6-7]。研究表明, 在 OA 发生过程中, miR-515-5p 可能作为内源性竞争 RNA 的中间因子, 其表达缓解了 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡、炎症反应和细胞外基质降解^[8]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是 Toll 样受体家族成员之一且与多种炎症性疾病密切相关, 因其能够识别 OA 中微生物或宿主衍生配体而被广泛关注^[9-11]。研究表明, TLR4 在 OA 软骨和活化的滑膜细胞中表达^[12], 抑制 TLR4 的表达能够减少促炎因子产生, 从而减轻 OA^[13]。TLR4 通过激活髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)/NF- κ B 信号通路释放促炎因子, 从而促进炎症反应^[14]; 而抑制 MyD88/NF- κ B 信号通路能够有效缓解 OA 进展^[15], 提示 TLR4/

MyD88/NF- κ B 信号通路可能在 OA 进展中发挥重要作用。但目前关于 miRNA 与 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路在 OA 中作用机制的研究较少。本研究拟对此进行探究, 为 OA 防治提供有效治疗策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人软骨细胞 C28/I2、HEK293T 细胞 (上海雅吉生物科技有限公司)。mimics 阴性对照 (negative control, NC) 和 mimics miR (MedChemExpress 公司, 美国); pcDNA-TLR4 和 pcDNA3.1 质粒 (上海吉玛制药技术有限公司); pGL3-TLR4-MUT、pGL3-TLR4-WT 和 pGL3 质粒 (湖南丰晖生物科技有限公司); Lipofectamine™2000 (Thermo Fisher 公司, 美国); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8; Dojindo Molecular Technologies 公司, 日本); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara 公司, 日本); 总蛋白提取试剂盒 (沈阳万类生物科技有限公司); 人 TNF- α ELISA 试剂盒、人 IL-6 ELISA 试剂盒、抗 II 型胶原抗体、抗 B 淋巴细胞瘤 2 蛋白 (B-cell lymphoma 2 protein, Bcl-2) 抗体、抗

Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体、抗裂解的半胱天冬酶 3 (cleaved-Caspase-3) 抗体、抗 TLR4 蛋白抗体、抗 MyD88 蛋白抗体、抗 p65 蛋白抗体、抗磷酸化 p65 (phosphorylated p65, p-p65) 蛋白抗体、GAPDH、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) ELISA 试剂盒、EdU 增殖试剂盒 (Abcam 公司, 美国); TRIzol 试剂盒、PrimeScript RT 试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国)。

Bio-Rad 680 酶标仪 (Bio-Rad 公司, 美国); 流式细胞仪 (Aceabio 公司, 美国); Image J 软件 (National Institutes of Health, 美国); ABI 7900HT 快速 PCR 实时系统 (Applied Biosystems 公司, 美国); GraphPad Prism 8.01 软件 (GraphPad Software 公司, 美国); 荧光显微镜 (Leica 公司, 德国)。

1.2 细胞培养及分组

取人软骨细胞 C28/I2 接种于含 10%FBS 的 DMEM 培养基中, 于 37℃、5%CO₂、95% 湿度培养箱中培养^[16], 待细胞附着 90% 后行传代培养, 取第 3 代以后的对数期细胞经免疫荧光染色鉴定^[17]后进行后续实验。

取上述 C28/I2 细胞进行以下分组及处理: 对照组 (A 组, 细胞在上述培养条件下培养不作任何处理), OA 组 (B 组, 细胞采用 10 ng/mL IL-1 β 处理 24 h)^[18], OA+mimics NC 组 (C 组, mimics NC 转染细胞 24 h 后, 10 ng/mL IL-1 β 处理细胞 24 h), OA+mimics miR 组 (D 组, mimics miR 转染细胞 24 h 后, 10 ng/mL IL-1 β 处理细胞 24 h), OA+mimics miR+过表达 (over expression, oe)-NC 组 (E 组, mimics miR 与 oe-NC 共转染细胞 24 h 后, 10 ng/mL IL-1 β 处理细胞 24 h), OA+mimics miR+oe-TLR4 组 (F 组, mimics miR 与 oe-TLR4 共转染细胞 24 h 后, 10 ng/mL IL-1 β 处理细胞 24 h)。转染方法: 采用 LipofectamineTM2000 试剂将 oe-TLR4 和 oe-NC、mimics NC 和 mimics miR 转染 C28/I2 细胞, 转染终浓度为 50 nmol/L。

1.3 miR-515-5p 抑制 OA 软骨细胞凋亡

1.3.1 免疫荧光染色观察 将培养的 C28/I2 细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次, 免疫染色通透液处理 5 min, 1% 牛血清白蛋白封闭 1 h; 加入抗 II 型胶原抗体 4℃ 下孵育过夜; PBS 洗 3 次, 加入二抗孵育 30 min; PBS 洗 3 次, DAPI 染色, 荧光显微镜观察。采用 Image J 软件分析细胞内 II 型胶原阳性率, 鉴定细胞纯度^[17]。

1.3.2 CCK-8 检测细胞增殖 取 A~D 组细胞于

37℃、5%CO₂、95% 湿度条件下分别培养 0、24、48、72 h, 加入 25 μ L CCK-8 试剂孵育 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 (A) 值; 实验重复 3 次^[8]。

1.3.3 EdU 检测细胞增殖 取 A~D 组细胞, 按照 EdU 增殖试剂盒说明书方法检测细胞增殖, 荧光显微镜下观察 EdU 染色细胞并计数, 以相对荧光表达量表示各组荧光素酶活性并反映细胞增殖活力^[19]。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 取 A~D 组细胞, 以 0.25% 胰蛋白酶消化离心后, PBS 洗 3 次, 结合缓冲液重悬细胞; 根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书方法, 将 Annexin V-FITC 和 PI 于室温避光条件下孵育细胞 15~20 min, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况^[20]。

1.3.5 Western blot 检测 取 A~D 组细胞, 采用总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度; 行电泳、转膜、封闭处理后, 加入一抗 (Bcl2、Bax、cleaved-Caspase-3) 于 4℃ 孵育过夜; 洗膜, 加入二抗 37℃ 孵育 1 h。采用化学发光试剂盒检测蛋白条带, 使用 Image J 软件进行灰度分析。

1.3.6 ELISA 检测 取 A~D 组细胞, 采用 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中促炎因子 (PGE2、TNF- α 、IL-6) 的表达水平。

1.3.7 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 检测 取 A~D 组细胞, 使用 TRIzol reagent 提取样本总 RNA, 以 Prime Script RT 试剂盒转录成 cDNA; 然后于 ABI 7900HT 快速 PCR 实时系统上使用 SYBR[®]Premix Ex TaqTM II 进行 qPCR。以 U6 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 miR-515-5p mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

1.4 miR-515-5p 促进 OA 软骨细胞周期

为研究 miR-515-5p 对 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞周期的调控作用, 采用流式细胞术检测 OA 软骨细胞的细胞周期情况。取 A~D 组细胞, 使用无水乙醇 4℃ 固定过夜, 加入 PI 染色液孵育 30 min, 通过流式细胞仪检测染色后的细胞并记录不同细胞周期的细胞比例。

1.5 miR-515-5p 靶向调控 TLR4

为研究 miR-515-5p 与 TLR4 之间的靶向关系, 采用 BiBiServ2 数据库 (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/RNAhybrid>) 预测 miR-515-5p 和 TLR4 之间的潜在结合位点, 并采用双荧光素酶报告实验验证 miR-515-5p 和 TLR4 的靶向关系。将 miR-515-5p 与 TLR4 的互补结合序列及其突变序列进行扩增, 克隆至 pGL3 载体上, 构建野

生型质粒 TLR4-WT 和对应的突变型质粒 TLR4-MUT。使用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 TLR4-MUT+mimics NC、TLR4-MUT+mimics miR、TLR4-WT+mimics NC 和 TLR4-WT+mimics miR 共转染 HEK293T 细胞, 双荧光素酶报告实验检测荧光素酶活性。

然后, 同 1.3.5 和 1.3.7 方法分别采用 Western blot 和 RT-qPCR 检测各组 TLR4 蛋白和 mRNA 相对表达量, 以 GAPDH 为内参, 引物序列见表 1。

1.6 TLR4 逆转 miR-515-5p 对 OA 软骨细胞凋亡抑制及炎症改善作用

取 D ~ F 组细胞, 同 1.3.2 和 1.3.3 方法采用 CCK-8 法和 EdU 检测细胞增殖能力, 同 1.3.4 方法采用流式细胞术检测细胞凋亡情况及细胞周期, ELISA 法检测细胞促炎因子 (PGE2、TNF- α 和 IL-6) 表达水平, 同 1.3.5 方法采用 Western blot 检测 TLR4 蛋白及凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bax 和 cleaved-Caspase-3) 相对表达量。

1.7 miR-515-5p 靶向 TLR4 阻断 MyD88/NF- κ B 信号通路激活

为进一步研究 miR-515-5p 靶向负调控 TLR4 对 MyD88/NF- κ B 信号通路的调控作用, 同 1.3.5 方法采用 Western blot 检测 A ~ F 组细胞中 MyD88、p-p65、p65 蛋白相对表达量。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.01 统计软件进行分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 正态性检验, 均符合正态分布, 数据以均数 \pm 标准差表示, CCK-8 检测结果多组间比较采用双因素方差分析, 其余指标多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 多重比较检验; 检验水准取双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-515-5p 抑制 OA 软骨细胞凋亡

免疫荧光染色检测示, C28/I2 细胞的纯度高 于 90%。见图 1a。

CCK-8 和 EdU 检测示, B 组细胞增殖能力显著 低于 A 组, D 组显著高于 C 组, 培养 24、48、72 h A 值及 EdU 相对荧光表达量组间比较差异均有统 计学意义 ($P<0.05$)。见图 1b、c。

流式细胞术检测示, B 组细胞凋亡率显著高于 A 组, D 组显著低于 C 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1d。

Western blot 检测示, B 组 Bcl-2 蛋白相对表达 量显著低于 A 组, D 组显著高于 C 组; B 组 Bax 和

表 1 RT-qPCR 各基因引物序列

Tab.1 Primer sequences of each gene in RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
miR-515-5p	上游 TTCTCCAAAAGAAAGCACTTTCTG 下游 CTCGCTTCGGCAGCACA
TLR4	上游 GATCTACTCACTTTACCATA 下游 GCTAATCGAGGCTACGACT
U6	上游 GCGCGTCGTGAAGCGTTC 下游 GTGCAGGGTCCGAGG
GAPDH	上游 CACATGGCCTCCAAGGAGTAA 下游 GAGGGTCTCTCTTCTCTTGT

cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量显著高于 A 组, D 组显著低于 C 组; 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1e、f。

ELISA 检测示, B 组 PGE2、TNF- α 、IL-6 表达水 平显著高于 A 组, D 组显著低于 C 组, 差异均有统 计学意义 ($P<0.05$)。见图 1g。

RT-qPCR 检测示, B 组 miR-515-5p mRNA 相 对表达量显著低于 A 组, D 组显著高于 C 组, 差异 均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1h。

2.2 miR-515-5p 促进 OA 软骨细胞周期

流式细胞术检测示, 与 A 组相比, B 组 G₁ 期细 胞比例显著增加, 而 S 期和 G₂ 期显著减小; 与 C 组 相比, D 组 G₁ 期细胞比例显著减小, S 期和 G₂ 期显 著增加; 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2。

2.3 miR-515-5p 靶向调控 TLR4

BiBiServ2 数据库预测示, miR-515-5p 与 TLR4 之间存在结合位点。双荧光素酶报告实验 验证示, 在突变后的 MUT 组中, 转染 mimics NC 或 mimics miR 两者之间的荧光素酶活性差异无统计 学意义 ($P>0.05$); 但在野生型的 WT 组中, 转染 mimics miR 后其荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$), 表明 miR-515-5p 能够与 TLR4 靶向结合。RT-qPCR 和 Western blot 检测示, B 组 TLR4 mRNA 和蛋白 相对表达量显著高于 A 组, D 组均显著低于 C 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 上调 TLR4 部分逆转过表达 miR-515-5p 对 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞凋亡的抑制作用及炎症改善作用

与 D、E 组相比, F 组细胞的增殖能力明显降 低, 培养 24、48、72 h A 值及 EdU 相对荧光表达量 比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 细胞凋亡率 显著增加, G₁ 期细胞比例显著增加, S 期和 G₂ 期细 胞比例显著减少; 细胞上清液中促炎因子 PGE2、 TNF- α 、IL-6 表达水平均显著升高; TLR4、Bax 和

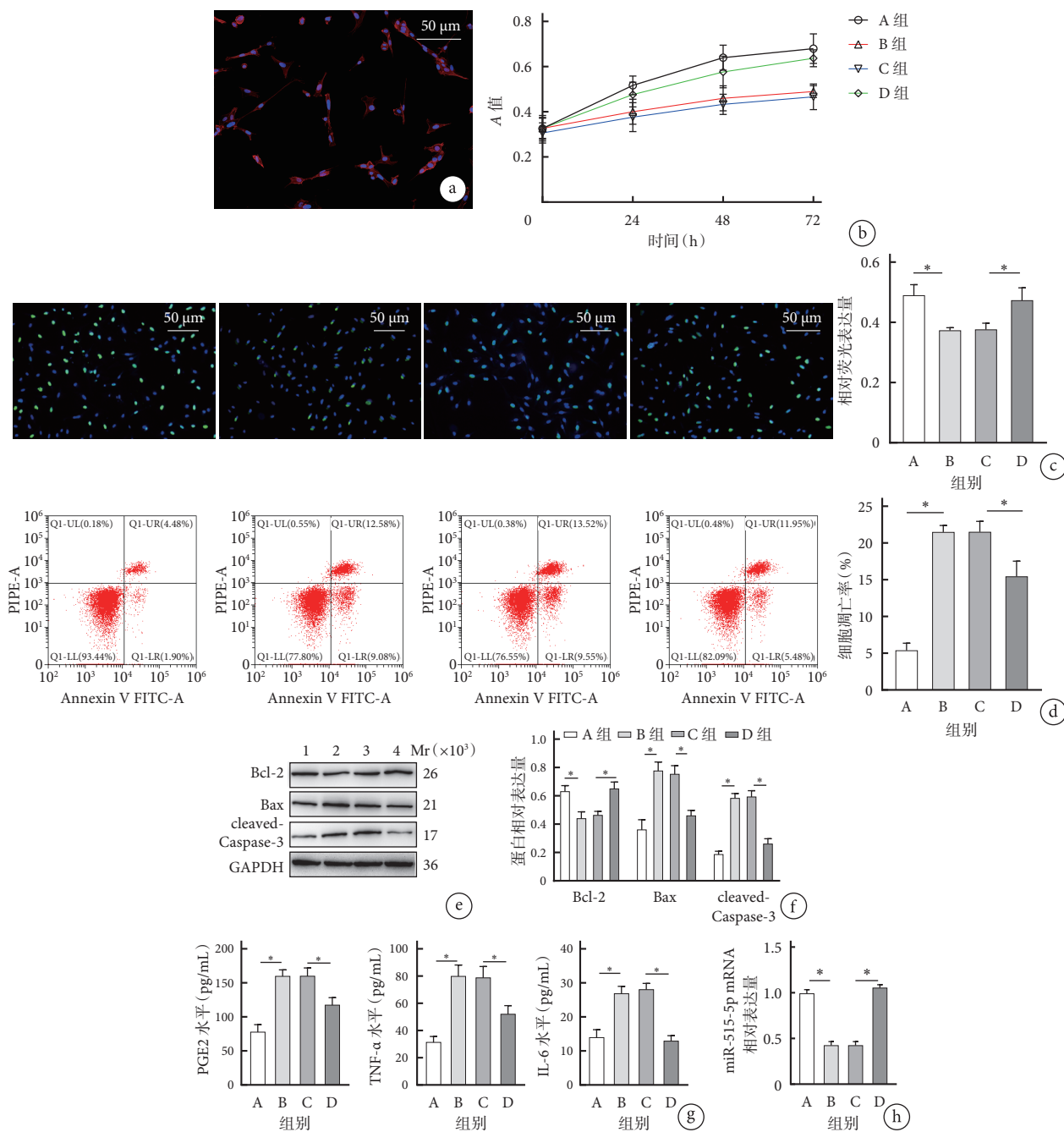


图 1 过表达 miR-515-5p 对 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞凋亡的抑制作用 * $P < 0.05$ a. 免疫荧光染色鉴定 C28/I2 细胞纯度 (荧光显微镜 $\times 200$)；b. CCK-8 法检测细胞增殖；c. EdU 检测细胞增殖 从左至右依次为 A ~ D 组荧光显微镜观察 ($\times 200$) 和相对荧光表达量定量检测；d. 流式细胞术检测细胞凋亡 从左至右依次为 A ~ D 组流式细胞术检测和细胞凋亡率；e. Western blot 检测凋亡相关蛋白表达电泳图 Mr: 相对分子质量 1: A 组 2: B 组 3: C 组 4: D 组；f. Western blot 检测凋亡相关蛋白相对表达量；g. ELISA 检测炎症因子表达水平；h. RT-qPCR 检测 miR-515-5p 基因相对表达量

Fig.1 Inhibitory effect of overexpression of miR-515-5p on IL-1 β -induced apoptosis of OA chondrocytes * $P < 0.05$ a. Identification of the purity of C28/I2 cells by immunofluorescence staining (Fluorescence microscopy $\times 200$); b. Cell proliferation was detected by CCK-8 method; c. EdU was used to detect cell proliferation From left to right for fluorescence microscopy observation ($\times 200$) in groups A-D respectively and quantitatively detected relative fluorescence expression; d. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis From left to right for flow cytometry detection in groups A-D respectively and quantitatively detected cell apoptosis rates; e. Electrophoresis of apoptosis-related protein expressions detected by Western blot Mr: Relative molecular mass 1: Group A 2: Group B 3: Group C 4: Group D; f. The relative expressions of apoptosis-related proteins detected by Western blot; g. The expression levels of inflammatory factors detected by ELISA; h. The relative mRNA expression of miR-515-5p was detected by RT-qPCR

cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量显著升高, Bcl-2 蛋白相对表达量显著降低; 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上指标 D、E 组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

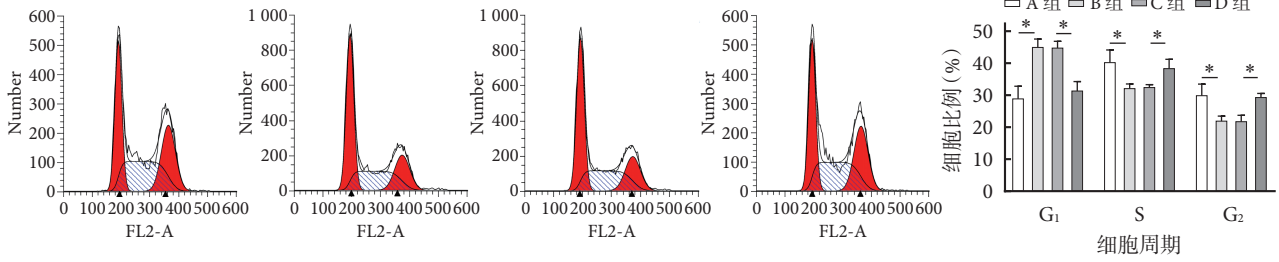


图2 流式细胞术检测过表达 miR-515-5p 对 IL-1β 诱导的 OA 软骨细胞周期的促进作用 *P<0.05 从左至右依次为 A ~ D 组流式细胞术检测和各周期细胞比例

Fig.2 The promoting effect of overexpression of miR-515-5p on IL-1β-induced chondrocyte cycle in OA detected by flow cytometry *P<0.05 From left to right for flow cytometry detection in groups A-D and the proportion of cells in each phase

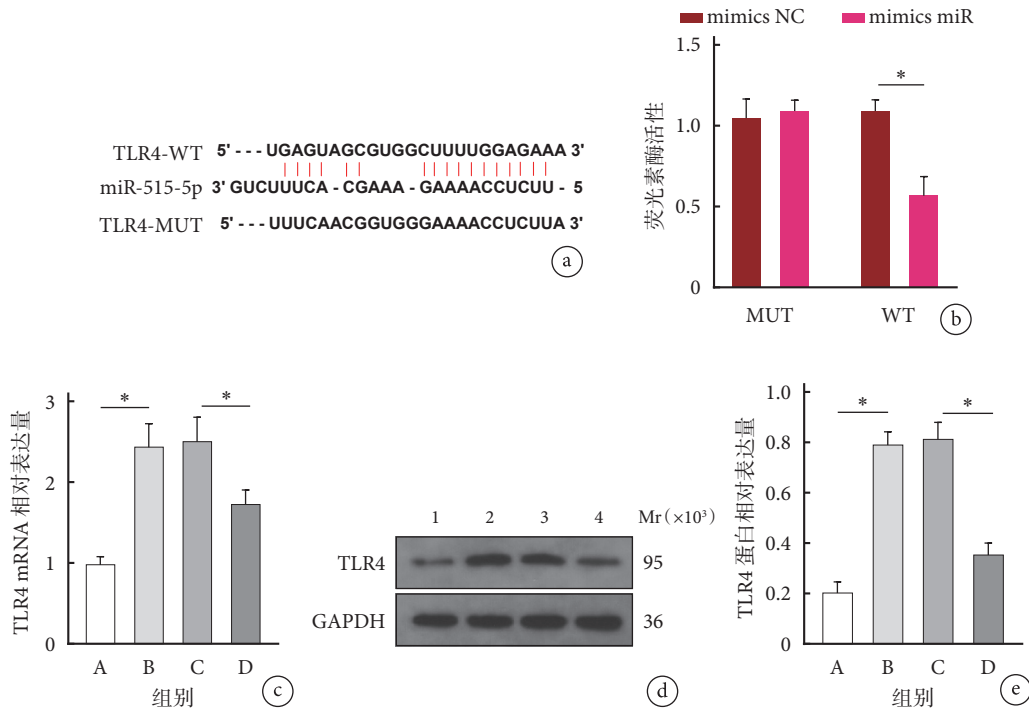


图3 miR-515-5p 靶向负调控 TLR4 相关检测 *P<0.05 a. BiBiServ2 数据库预测 miR-515-5p 与 TLR4 结合位点; b. 荧光素酶报告实验验证 miR-515-5p 与 TLR4 的靶向关系; c. RT-qPCR 检测 TLR4 mRNA 相对表达量; d. Western blot 检测 TLR4 蛋白表达电泳图 Mr: 相对分子质量 1: A 组 2: B 组 3: C 组 4: D 组; e. Western blot 检测 TLR4 蛋白相对表达量

Fig.3 miR-515-5p targeting negative regulatory TLR4 detection *P<0.05 a. BiBiServ2 database predicted the binding sites of miR-515-5p and TLR4; b. Luciferase reporting experiment verified the targeting relationship between miR-515-5p and TLR4; c. The relative expression of TLR4 mRNA detected by RT-qPCR; d. Electrophoresis of TLR4 protein expression detected by Western blot Mr: Relative molecular mass 1: Group A 2: Group B 3: Group C 4: Group D; e. The relative expression of TLR4 protein detected by Western blot

2.5 miR-515-5p 靶向 TLR4 阻断 MyD88/NF-κB 信号通路激活

Western blot 检测示, B 组细胞中 MyD88 及 p-p65/p65 蛋白相对表达量显著高于 A 组, D 组显著低于 C 组, F 组显著高于 E 组, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。见图 5。

3 讨论

OA 是由严重关节变形引起的关节疼痛和功能障碍综合征^[21], 其发生、进展与炎症紧密相关。在

OA 发生过程中, 滑膜细胞、关节软骨细胞以及其他细胞均会表达炎症介质^[22]。为此, 通过靶向调控相关炎症途径是治疗 OA 的潜在策略。本研究中, 我们首先使用 IL-1β 诱导 C28/I2 细胞模拟 OA 软骨炎症损伤, 结果显示, IL-1β 可以显著诱导 PGE2、TNF-α 和 IL-6 促炎因子的产生, 这与既往研究报道一致^[23]。

据报道, miRNA 可通过调节软骨细胞增殖和凋亡、细胞外基质代谢和炎症反应参与 OA 的发生、发展^[24-26]。研究表明, miR-181-5p 能靶向负调

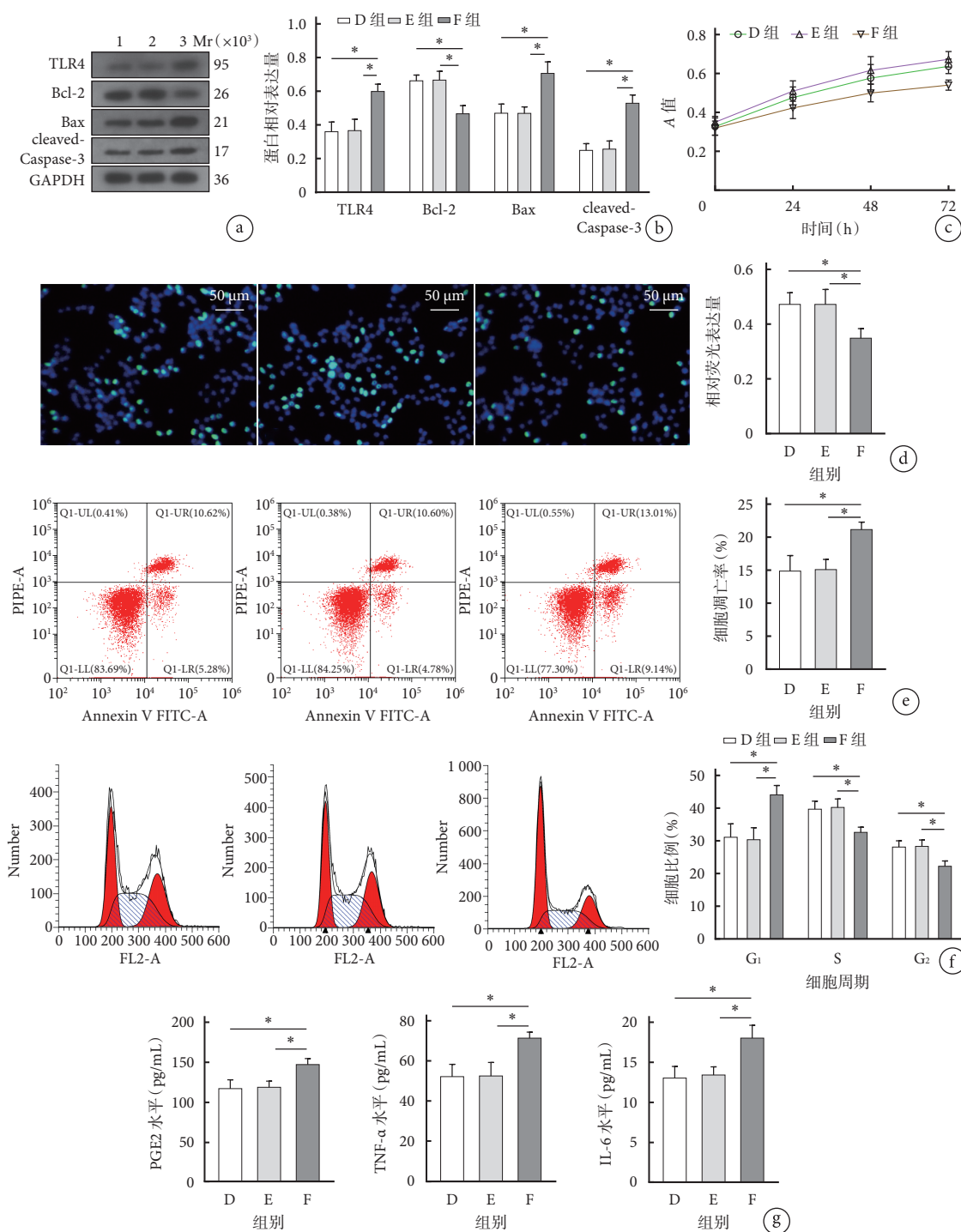


图 4 上调 TLR4 部分逆转过表达 miR-515-5p 对 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞凋亡的抑制作用及炎症改善作用 * $P < 0.05$ a. Western blot 检测 TLR4 和凋亡相关蛋白表达电泳图 Mr: 相对分子质量 1: D 组 2: E 组 3: F 组; b. Western blot 检测 TLR4 和凋亡相关蛋白相对表达量; c. CCK-8 法检测细胞增殖; d. EdU 检测细胞增殖 从左至右依次为 D ~ F 组荧光显微镜观察 ($\times 200$) 和相对荧光表达量定量检测; e. 流式细胞术检测细胞凋亡 从左至右依次为 D ~ F 组流式细胞术检测和细胞凋亡率; f. 流式细胞术检测细胞周期 从左至右依次为 D ~ F 组流式细胞术检测和各周期细胞比例; g. ELISA 检测炎症相关因子表达水平

Fig.4 Inhibitory effect of up-regulated TLR4 partially reversing overexpression of miR-515-5p on IL-1 β -induced apoptosis of OA chondrocytes and amelioration of inflammation * $P < 0.05$ a. Electrophoresis of TLR4 and apoptosis-related proteins expressions detected by Western blot Mr: Relative molecular mass 1: Group D 2: Group E 3: Group F; b. The relative expressions of TLR4 and apoptosis-related proteins detected by Western blot; c. Cell proliferation detected by CCK-8 method; d. EdU was used to detect cell proliferation From left to right for fluorescence microscopy observation ($\times 200$) in groups D-F respectively and quantitatively detected relative fluorescence expression; e. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis From left to right for flow cytometry detection in groups D-F respectively and quantitatively detected cell apoptosis rates; f. Flow cytometry was used to detect cell cycle From left to right for flow cytometry detection in groups D-F respectively and the proportion of cells in each phase; g. The expression levels of inflammatory factors detected by ELISA

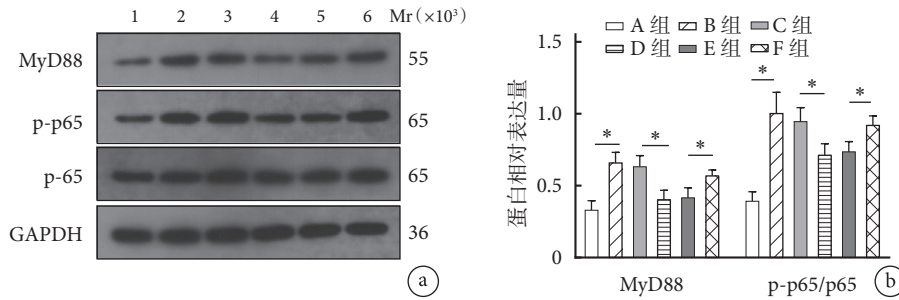


图5 miR-515-5p 靶向 TLR4 阻断 MyD88/NF-κB 信号通路激活观测 *P<0.05 a. Western blot 检测 MyD88 及 p-p65/p65 蛋白表达凝胶电泳图 Mr: 相对分子质量 1: A 组 2: B 组 3: C 组 4: D 组 5: E 组 6: F 组; b. Western blot 检测 MyD88 及 p-p65/p65 蛋白相对表达量

Fig.5 Observation of miR-515-5p targeting TLR4 to block activation of MyD88/NF-κB signaling pathway *P<0.05 a. Electrophoresis of MyD88 and p-p65/p65 protein expressions detected by Western blot Mr: Relative molecular mass 1: Group A 2: Group B 3: Group C 4: Group D 5: Group E 6: Group F; b. The relative expressions of MyD88 and p-p65/p65 proteins detected by Western blot

控 DDX3X (DEAD-box RNA 解旋酶亚家族中研究最广泛且进化保守的成员之一, 被认为是癌症和病毒的治疗靶点) 的表达, 从而调控 NF-κB 信号通路的活化, 进而减少炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的释放^[27]。与上述结果一致, 本研究中我们使用 IL-1β 诱导软骨细胞 OA 软骨炎症损伤模型, 结果示 miR-515-5p 在 OA 中的表达水平下调; 随后, 使用 miR mimics 转染后诱导 OA 模型, 结果显示过表达 miR-515-5p 显著减少了软骨细胞 PGE2、TNF-α 和 IL-6 促炎因子的产生, 缓解了细胞的炎症反应。TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路是经典的炎症反应信号通路, 通过上调 TLR4、p65 等蛋白的表达能够诱发炎症反应, 释放 TNF-α 和 IL-6 促炎因子并参与 OA 的发展^[14]。本研究诱导 OA 模型后发现, B 组细胞中 TLR4、MyD88 及 p-p65 蛋白的表达水平均显著升高, TNF-α、PGE2 和 IL-6 促炎因子的释放也显著增加。TLR4 是 Toll 样受体家族成员之一, 是 NF-κB 的上游靶标, 能够有效识别机体中某些损伤或病原体相关分子, 从而激活信号, 诱发炎症反应, 促进多种炎症因子的产生和释放^[28]。MyD88 是 TLR4/NF-κB 信号通路中重要的衔接蛋白。TLR4 通过激活依赖性 MyD88 通路, 促进 MyD88 与 TNF 受体相关因子 6 结合, 从而激活下游 NF-κB 信号通路, 进而激活细胞内信号转录表达, 促进 TNF-α 和 IL-6 等促炎因子的释放并产生信号级联反应诱发 OA^[29]。因此, TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路是探究 OA 发病机制和治疗机制的一个有效靶点。研究表明, miR-93 可通过靶向负调控 TLR4, 抑制 NF-κB 信号通路的活化, 减少 TNF-α 和 IL-6 等促炎因子的释放从而缓解 OA^[15]。而在本研究中, IL-1β 的诱导激活了 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路, 促进了 PGE2、TNF-α 和 IL-6 促炎因子的释放; 而过表达 miR-

515-5p 后, miR-515-5p 通过靶向负调控 TLR4 抑制 NF-κB 信号通路的活化, 减少了 PGE2、TNF-α 和 IL-6 促炎因子的释放, 从而缓解 OA; 上调 TLR4 的表达后, 部分逆转了过表达 miR-515-5p 对 OA 的抑制作用, 进一步证实了 miR-515-5p 可通过靶向负调控 TLR4 抑制 NF-κB 信号通路的活化, 从而影响 OA 的进展。

综上所述, 本研究首次发现 miR-515-5p 通过靶向负调控 TLR4 阻断 MyD88/NF-κB 信号通路的活化, 从而抑制 OA 软骨细胞凋亡, 进而减轻炎症反应, 为治疗 OA 提供了新思路。然而, 本研究仅在人的软骨细胞系 C28/I2 中进行了体外实验, 尚需结合动物实验进一步验证, 并在未来研究中进一步探究其他潜在的调控机制。

利益冲突 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突; 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道

作者贡献声明 蔡东峰: 研究设计、文章撰写; 杨子肖、钟超: 研究实施、数据收集整理; 张靖: 统计分析; 洪嵩: 对文章的知识性内容作批评性审阅, 行政支持

参考文献

- 1 Taruc-Uy RL, Lynch SA. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. Prim Care, 2013, 40(4): 821-836.
- 2 Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. Ann Rheum Dis, 2014, 73(7): 1323-1330.
- 3 Aigner T, Söder S, Gebhard PM, et al. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3(7): 391-399.
- 4 Le LT, Swingler TE, Clark IM. Review: the role of microRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis. Arthritis Rheum, 2013, 65(8): 1963-1974.

- 5 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- 6 Nugent M. MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(4): 573-580.
- 7 Vicente R, Noël D, Pers YM, *et al.* Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(4): 211-220.
- 8 Wu R, Zhang F, Cai Y, *et al.* Circ_0134111 knockdown relieves IL-1 β -induced apoptosis, inflammation and extracellular matrix degradation in human chondrocytes through the circ_0134111-miR-515-5p-SOCS1 network. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107495. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107495.
- 9 Abella V, Scotece M, Conde J, *et al.* The novel adipokine progranulin counteracts IL-1 and TLR4-driven inflammatory response in human and murine chondrocytes via TNFR1. *Sci Rep*, 2016, 6: 20356. doi: 10.1038/srep20356.
- 10 Wang P, Zhu F, Tong Z, *et al.* Response of chondrocytes to shear stress: antagonistic effects of the binding partners Toll-like receptor 4 and caveolin-1. *FASEB J*, 2011, 25(10): 3401-3415.
- 11 吴文娟, 曾妮, 王硕莹, 等. 黄芩苷对支原体肺炎小鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路的抗炎及肺功能保护作用. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(23): 3521-3526.
- 12 Kim HA, Cho ML, Choi HY, *et al.* The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(7): 2152-2163.
- 13 Qi W, Chen Y, Sun S, *et al.* Inhibiting TLR4 signaling by linarin for preventing inflammatory response in osteoarthritis. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(4): 5369-5382.
- 14 Xu X, Li N, Wu Y, *et al.* Zhufeng tougu capsules inhibit the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway and alleviate knee osteoarthritis: *In vitro* and *in vivo* experiments. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 951860. doi: 10.3389/fphar.2022.951860.
- 15 Ding Y, Wang L, Zhao Q, *et al.* MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 779-790.
- 16 Lu J, Ji ML, Zhang XJ, *et al.* MicroRNA-218-5p as a potential target for the treatment of human osteoarthritis. *Mol Ther*, 2017, 25(12): 2676-2688.
- 17 李永福. 淫羊藿苷介导 PI3K-Akt-mTOR 信号通路调控关节软骨细胞自噬对骨关节炎的作用及机制研究. 杭州: 浙江中医药大学, 2022.
- 18 Lin J, Huang Y, Lin X, *et al.* Bauhinia championii alleviates extracellular matrix degradation in IL-1 β induced chondrocytes via miRNA-145-5p/TLR4/NF- κ B axis. *Heliyon*, 2023, 9(8): e19138. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e19138.
- 19 Yi Y, Yang N, Yang Z, *et al.* LncRNA TM1-3P regulates proliferation, apoptosis and inflammation of fibroblasts in osteoarthritis through miR-144-3p/ONECUT2 axis. *Orthop Surg*, 2022, 14(11): 3078-3091.
- 20 Hou H, Li J, Wang J, *et al.* ITGA9 inhibits proliferation and migration of dermal microvascular endothelial cells in psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2022, 15: 2795-2806.
- 21 Li S, Li Y, Hou L, *et al.* Forsythoside B alleviates osteoarthritis through the HMGB1/TLR4/NF- κ B and Keap1/Nrf2/HO-1 pathways. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38(1): e23569. doi: 10.1002/jbt.23569.
- 22 Shen J, Abu-Amer Y, O'Keefe RJ, *et al.* Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(1): 49-63.
- 23 Zhuang H, Ren X, Jiang F, *et al.* Indole-3-propionic acid alleviates chondrocytes inflammation and osteoarthritis via the AhR/NF- κ B axis. *Mol Med*, 2023, 29(1): 17. doi: 10.1186/s10020-023-00614-9.
- 24 Malemud CJ. MicroRNAs and osteoarthritis. *Cells*, 2018, 7(8): 92. doi: 10.3390/cells7080092.
- 25 Cao Y, Tang S, Nie X, *et al.* Decreased miR-214-3p activates NF- κ B pathway and aggravates osteoarthritis progression. *EBioMedicine*, 2021, 65: 103283. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103283.
- 26 Wang C, Wang L, Guan X, *et al.* MiR-4303 relieves chondrocyte inflammation by targeting ASPN in osteoarthritis. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 618. doi: 10.1186/s13018-021-02731-9.
- 27 Zhao P, Ma G, Ma L. miR-181a-5p targets DDX3X to inhibit the progression of osteoarthritis via NF- κ B signaling pathway. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 606. doi: 10.1186/s13018-023-04073-0.
- 28 庄丽华, 詹松华, 杨烁慧, 等. 电针通过调节 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路改善缺血性脑卒中损伤研究现状. *中华中医药学刊*, 2019, 37(9): 2182-2185.
- 29 刘姣. 推拿对大鼠膝关节关节炎模型的 TLR4/MyD88 信号转导通路的影响. 广州: 广州中医药大学, 2019.

收稿日期: 2023-12-26 修回日期: 2024-03-01

本文编辑: 王雁