

实时荧光定量 PCR 检测骨性关节炎病人膝关节液中 miR-140 的表达

张明^{1,2}, 刘立宏¹, 肖涛¹, 郭文娟³

(1. 中南大学湘雅二医院创伤骨科研究室, 长沙 410011; 2. 北京市大兴区人民医院骨科, 北京 102600;
3. 中国人民解放军总医院老年心血管病监护室, 北京 100853)

[摘要] 目的: 检测不同 Kellgren 和 Lawrence X 线分级骨性关节炎病人膝关节液中微小 RNA-140 (microRNA-140, miR-140) 的表达水平, 为进一步研究 miR-140 在骨性关节炎发生、发展中的作用提供理论依据。方法: 收集骨性关节炎病人膝关节液 40 例 [关节炎组, 又依据 Kellgren 和 Lawrence X 线诊断标准分为 I 级亚组 (10 例)、II 级亚组 (10 例)、III 级亚组 (10 例)、IV 级亚组 (10 例)], 非骨性关节炎膝关节液 20 例 (对照组, 包括半月板损伤、交叉韧带损伤、外伤)。应用实时荧光定量 PCR 检测骨性关节炎组及对照组膝关节液中 miR-140 的含量。以 U6snRNA 为内参, 求出每个样本的 Ct 值。结果: miR-140 在所有关节液标本中都能检测到。与对照组比较, miR-140 在关节炎组中的含量下降 ($P < 0.05$)。IV 级亚组 miR-140 的表达水平与 I 级亚组、II 级亚组、III 级亚组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 骨性关节炎的严重程度与 miR-140 的表达水平呈负相关 ($r = -0.917$, $P < 0.05$)。结论: 人膝关节液中存在 miR-140, 并且可以方便地应用实时荧光定量 PCR 进行检测。miR-140 在关节炎组膝关节液中的表达水平下调, 且与骨性关节炎的严重程度呈负相关, 这可能与骨性关节炎的发生、发展有关, 并可为潜在的诊断提供预警的分子靶标。

[关键词] 骨性关节炎; 膝关节液; 微小 RNA; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.12.005

Detection of the expression level of miR-140 using real-time fluorescent quantitative PCR in knee synovial fluid of osteoarthritis patients

ZHANG Ming^{1,2}, LIU Lihong¹, XIAO Tao¹, GUO Wenjuan³

(1. Department of Osteocarcinoma Institute, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;
2. Department of Orthopaedics, People's Hospital of Daxing District, Beijing 102600;
3. Department of Cardiovascular Disease Care Unit, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

ABSTRACT

Objective: To examine the expression of microRNA-140 (miR-140) in osteoarthritis (OA) graded by X-ray diagnosis criteria of Kellgren and Lawrence and to provide a theoretical basis for further studying the role of miR-140 in OA development.

Methods: Knee synovial fluid specimens were collected in 40 OA patients (the OA group), the OA group was divided into 4 subgroups according to X-ray diagnosis criteria of Kellgren and Lawrence:

收稿日期 (Date of reception): 2011-09-12

作者简介 (Biography): 张明, 硕士研究生, 医师, 主要从事骨肿瘤和骨关节的研究。

通信作者 (Corresponding author): 肖涛, Email: xiaotaoyl@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81072191)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81072191).

grade I subgroup ($n=10$), grade II subgroup ($n=10$), grade III subgroup ($n=10$), and grade IV subgroup ($n=10$). Twenty patients served as a control group (the control group), including meniscus injury, cruciate ligament injury, trauma patients. The expression level of miR-140 in the knee synovial fluid was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (stem-loop RT-qPCR, TaqMan). U6 snRNA was used as the reference control, and Ct value was calculated.

Results: MiR-140 was detected in all knee synovial fluid specimens. The expression level of miR-140 in the OA group was much lower than that in the control group ($P<0.05$). There was significant difference in the expression level of miR-140 between the grade IV subgroup and the grade I, grade II and grade III subgroups (all $P<0.05$). The expression levels of miR-140 was negatively related to the severity of OA ($r=-0.917$, $P<0.05$).

Conclusion: MiR-140 in human knee synovial fluid can be detected conveniently by real-time PCR. The expression level of miR-140 decreases in the knee synovial fluid in OA patients, and is negatively related to the severity of OA. This may be related to the occurrence and development of OA, and can provide early potential diagnostic molecular target.

KEY WORDS

osteoarthritis; knee synovial fluid; microRNA; real-time quantitative polymerase chain reaction

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 又称退行性关节炎, 是一种与年龄相关的慢性、渐进性、退行性关节炎病^[1-2]; 是老年人关节疼痛和致残的主要原因, 给社会及家庭带来沉重负担。OA 好发于负重较大的膝关节、髋关节、脊柱及手指等部位, 以细胞外基质合成不足、关节软骨退变、骨赘形成和累及滑膜为特征。发病机制十分复杂, 目前尚不清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是内源性的、长度约 19~25 个核苷酸单链的 RNA 分子。Miyaki 等^[3] 研究显示: 定向敲除 miR-140 基因, 可使小鼠出现与年龄相关的 OA 样改变, 特征是蛋白多糖的丢失和关节软骨的纤维化。为进一步研究 miR-140 是否与人 OA 的相关及可能机制, 并通过生物信息初步分析其下游靶基因, 作者采用实时荧光定量 PCR 检测不同分级 OA 病人膝关节液中 miR-140 的表达, 以便了解 miR-140 作为 OA 的膝关节液诊断标志物的潜在价值。

1 对象与方法

1.1 对象

按照美国风湿病学会 (American Rheumatism Association, ARA) 制定的诊断标准^[4], 选取 OA 病人 40 例为关节炎组, 并且又依据 Kellgren 和 Lawrence X 线诊断标准将其分为 I 级亚组 (10 例)、II 级亚组 (10 例)、III 级亚组 (10 例)、IV 级亚组 (10 例), 其中男性 11 例, 女性 29 例, 最小年龄 41 岁, 最大年龄 80 (平均 57.5) 岁。非 OA 为对照组 (20 例), 其中

半月板损伤 12 例, 交叉韧带损伤 3 例, 外伤 4 例, 胫骨平台骨折 1 例, 年龄 13~46 (平均 32.9) 岁。

所有的实验对象均来自于中南大学湘雅二医院创伤骨科研究室, 行关节腔注射玻璃酸钠治疗, 穿刺同时抽取关节液, 置于 15 mL 无菌、无酶的离心管中备用。本研究方案得到了中南大学伦理学委员会认可, 全部标本收集于 2010 年 6 月至 2010 年 12 月。

1.2 材料

1.2.1 主要仪器设备及耗材

高速冷冻离心机购自美国热电公司; 各种量程移液器购自德国 Eppendorf 公司; 吸头、EP 管、PCR 管购自美国 Axygen 公司; 可见-紫外分光光度计购自美国 Beckman Coulter 公司 (型号: DU800); 超净工作台购自苏州净化设备厂; PCR 热循环仪购自美国 Applied Biosystems 公司 (型号: 2700); 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司 (型号: StepOne™), 0.1 mL 平盖 8 连管购自美国 Bioplastics 公司; 15 mL 无菌、无酶的离心管购自美国 Corning 公司。

1.2.2 主要试剂

TRIzol 为美国 Molecular Research Center 公司 TRI Reagent®BD 试剂。无酶水、氯仿、异丙醇、无水乙醇为湘雅二医院中心试验室提供。75% 乙醇采用无酶水和无水乙醇按 1:3 的比例配制。TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 购自美国 Applied Biosystems 公司。TaqMan® MicroRNA Assays 试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司。TaqMan 2×Universal PCR

Master Mix II (no UNG) 购自美国 Applied Biosystems 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 3000 r/min 离心 5 min, 小心吸取上清液, 分装入 1.5 mL EP 管中, -70 °C 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 反转录合成 cDNA

应用 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 和 TaqMan® MicroRNA Assays 试剂盒中特异性的茎-环状反转录引物, 进行反转录反应。反应在 Applied Biosystems 2700 热循环仪上进行。配置反应液的所有操作均在冰上进行。反应体系见表 1。反应条件: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min。选择 OD_{260/280} 值在 1.6~2.1 之间的总 RNA 标本。每次反应总 RNA 量为 100 ng。

表 1 反转录反应体系成分及体积

Table 1 Composition and volume of reverse transcription reaction

反应体系成分	反应体积 / μ L
三磷酸脱氧核糖核苷酸 (带三磷酸脱氧胸苷)	0.15
多标记反转录酶 (50 U/ μ L)	1.00
反转录缓冲液	1.50
RNA 酶抑制剂 (20 U/ μ L)	0.19
无酶水	4.16
反转录引物	3.00
总 RNA	5.00
合计	15.00

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 miR-140 和 U6snRNA

应用上述 TaqMan® MicroRNA Assays 试剂盒中的 PCR 引物探针混合液进行 PCR 扩增及荧光检测。在美国 Applied Biosystems 公司 StepOne™ 荧光定量 PCR 仪上进行反应。反应体系见表 2。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s 及 60 °C 1 min, 后 2 步共 50 个循环。在相对定量分析中, 荧光定量 PCR 的结果以 Ct 值显示。Ct 值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所需要的循环数, Ct 值越大, 表达量越低。首先计算 3 个平行反应的平均 Ct 值, Δ Ct 等于目的基因的 Ct

值减去内参基因 U6snRNA 的 Ct 值。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct =$ 处理组平均 Δ Ct - 对照组平均 Δ Ct) 来计算表达差异的倍数。用 $2^{-\Delta Ct}$ 表示目的基因相对表达量^[5]。

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系的成分及体积

Table 2 Composition and volume of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

反应体系成分	反应体积 / μ L
通用 PCR 预混液 II (无核苷酶)	10
无酶水	5
微小 RNA 试样	1
反转录产物	4
合计	20

1.3.4 PCR 产物电泳

PCR 产物采用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 60 V, 40 min。

1.3.5 生物信息分析

miR-140 下游靶基因预测采用 Targetscan 进行分析 (<http://www.targetscan.org/>)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。两个样本符合正态分布 ($P > 0.05$) 和方差齐性 ($F = 0.569$, $P > 0.05$), 采用独立样本的 t 检验对两组样本实时荧光定量 PCR 检测结果进行比较。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。采用 ANOVA 方差分析对实验组不同分级样本实时荧光定量 PCR 检测结果进行组间比较。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。基因相对表达量与 OA 严重程度之间的关系采用 Spearman 等级相关秩和检验。

2 结果

2.1 OA 组与对照组的组间比较

与对照组比较, miR-140 在关节炎组膝关节液中的表达水平下调 (图 1, 2), 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PCR 产物电泳显示 miRNA-140 的 PCR 产物约 60~70 bp (图 3)。

2.2 OA 组内比较及其与 miR-140 表达水平之间的相关性分析

IV 级亚组 miR-140 的表达水平与 I 级亚组、II 级亚组、III 级亚组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); OA 的严重程度与 miR-140 的表达水平呈负相关 ($r = -0.917$, $P < 0.05$)。

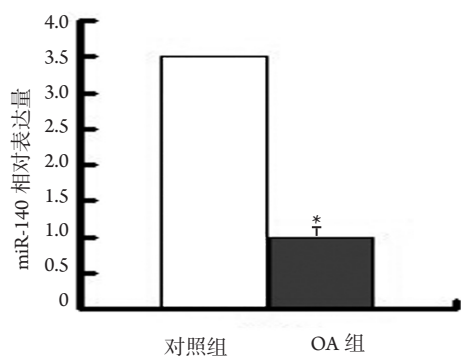


图 1 OA 组和对照组膝关节液中 miR-140 的相对表达量的比较。miR-140 在 OA 组膝关节液中的表达水平下调, 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

Figure 1 Results comparison of Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction in the OA group and the control group. The expression of miR-140 was significantly down-regulated in the OA group, $P < 0.05$ vs the control group.

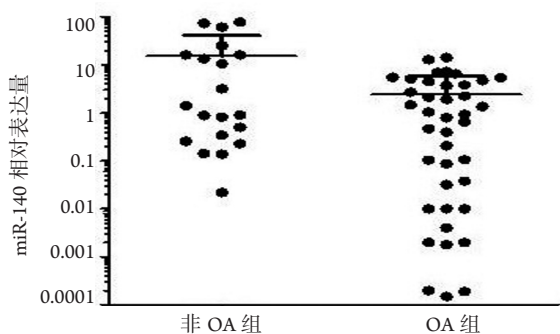


图 2 OA 组和对照组膝关节液中 miR-140 的相对表达量比较的散点图。

Figure 2 Scattergram of the relative expression of the miR-140 by RT-PCR in the OA group and the control group.

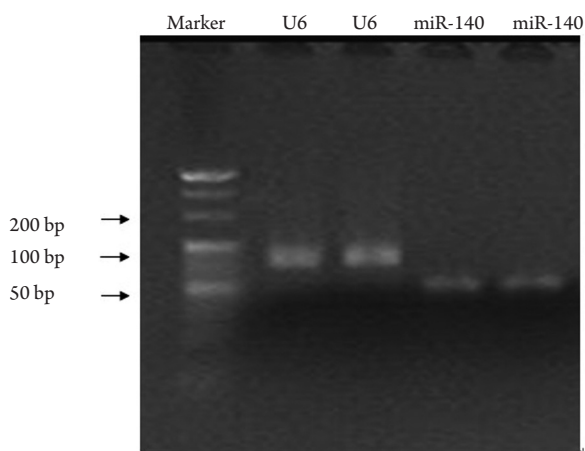


图 3 PCR 产物电泳图。内参 U6 的 PCR 产物约 100 bp, miR-140 的 PCR 产物约 60~70 bp。

Figure 3 Electrophoresis gram of RT-PCR products. RT-PCR products of reference control U6 is about 100 bp and miR-140 is about 60~70 bp.

2.3 Targetscan 软件预测与 OA 相关的 miR-140 靶基因结果

Targetscan 软件是 miRNA 研究领域杰出科学家 Bartel 研究组开发的在线分析软件, 同时也是预测 miRNA 靶基因最常用和权威的在线软件。Targetscan 通过互补及结合序列保守性等原则进行数据库比对, 对 miRNA 进行预测, 其预测准确度高^[6-8]。对 hsa-miR-140-5P (hsa-miR-140-5P 与 hsa-miR-140 序列相同) 的靶基因进行预测, 结果有 251 种靶基因, 目前研究与 OA 相关的靶基因有骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)、转化生长因子 β I 型受体 (transforming growth factor-beta receptor type I, TGFBR I)。

3 讨论

OA 是中老年人发病率很高的骨关节疾病。研究表明其发病机制与机械应力^[6]、炎症介质^[7]、生化异常如遗传易感性、其它代谢性疾病、职业、性别、种族、饮食等^[8]有关。但确切的发病机制尚未明确。OA 的治疗主要是非手术治疗和手术治疗。在发病早期以非手术治疗为主。如股四头肌功能锻炼包括直腿抬高、平路慢走、游泳、骑矮座的自行车等; 消炎镇痛包括非甾体类消炎药物、环氧化酶抑制剂止痛药、白介素酶抑制剂止痛药等; 保护关节软骨包括避免剧烈运动、关节腔注射玻璃酸钠、口服氨基葡萄糖类药物等; 改善血液循环包括口服中药、局部热敷、磁疗、烤电等。在晚期可以行关节置换手术, 主要缓解患者的疼痛和恢复行走功能。非手术治疗效果不佳, 不能阻止疾病的进展, 容易反复发作且会加重; 手术治疗有很多并发症, 术后恢复期较长, 给病人带来身体、精神以及经济上的负担。OA 严重影响人们的生活质量, 所以研究其发病机制, 寻找有效的治疗方法具有十分重要的临床意义。

MiR-140 是 micRNAs 家族中的成员之一, 在一些软骨中有表达且调节软骨的发育。MiR-140 具有软骨组织特异性表达且这些表达的改变可能导致发病^[9-11]。Miyaki 等^[12]在 2009 年采取 miRNA 芯片和定量的 PCR, 通过人关节软骨细胞和人类间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 进行对比, 结果发现 miR-140 具有软骨细胞分化相关的表达。Araldi 等^[13]研究显示在 OA 软骨中 MiR-140 表达减少以及 IL-1 β 相应的反应可以导致 OA 特征的基因表达的异常, MiR-140 在软骨发育和体内平衡过程中发挥关键作用。Miyaki 等^[3]通过敲除目标基因 miR-140 制造老鼠模型, 结果发现 miR-140 调节软骨发育, 其缺

失导致了与年龄相关的 OA 样改变(蛋白多糖的丢失和关节软骨的纤维化)。关节液是由滑膜分泌的,而关节软骨的营养很大部分靠关节液的渗透作用,关节软骨细胞中有 miR-140 的表达,推断关节液中可能有 miR-140 的表达,所以选择 miR-140 作为研究指标,本研究结果证实在 OA 病人膝关节液中 miR-140 表达下调。

成熟的 miR-140 在软骨细胞中生成,miR-140 表达量在 OA 病人中下调有很多的因素。可能的因素包括 miR-140 生成减少和 miR-140 降解增加。导致 miR-140 生成减少的因素可能有:OA 病人的软骨细胞发生病变,导致 miR-140 生成减少;能够影响 Drosha 酶和 Dicer 酶活性的因素也可以导致成熟的 miR-140 的生成减少。导致 miR-140 降解增加的因素可能有:OA 病人的软骨细胞发生凋亡,可能会导致 miR-140 的降解;OA 发病过程中促进 miR-140 降解的因素可能会增加,抑制 miR-140 降解的因素可能会减少,从而导致 miR-140 的降解增加。具体的影响因素及其调节机制尚不清楚,需要进一步研究。

OA 的主要特征是细胞外基质合成不足、关节软骨的退变。miR-140 在 OA 中的作用机制可能有:miR-140 可能通过对靶基因 BMP2、TGFB1 的调节从而减少 OA 的发生率^[14-15];一些炎症因子如白介素-1 β (introduction interleukin-1 β , IL-1 β)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族成员(如 MMP9 和 MMP13 等)参与 OA 的发生、发展。MMP 是软骨基质降解的最主要的酶,其可被组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase inhibitor, TIMP)所抑制,二者在体内达到动态平衡共同调节软骨基质的合成和降解。可以在后续试验中,对 OA 动物模型进行膝关节腔注射 miR-140,验证是否能够延缓疾病进程。

本实验是通过实时荧光定量的 PCR 检测膝关节液中 miR-140 的表达,结果显示 OA 病人的表达下调。说明 miR-140 可能与 OA 的发生、发展有关,为进一步研究 miR-140 与 OA 的关系奠定了初步基础。

参考文献

- Hamerman D. Aging and osteoarthritis: basic mechanisms[J]. *Am Geriatr Soc*, 1993, 41(7): 760-770.
- Bos SD, Slagboom PE, Meulenbelt I. New insights into osteoarthritis: early developmental features of an ageing - related disease[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2008, 20(5): 553-559.
- Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(21): 1173-1185.
- Mandell BF, Lipani J. Refractory osteoarthritis. Differential diagnoses and therapy[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 1995, 21(1): 163-178.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1):15-20.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. *Mol Cell*, 2007, 27(1): 91-105.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of MicroRNAs[J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- Schouten JS, Ouweland FA, Valkenburg HA. A 12-year follow-up study in the general population on prognostic factors of cartilage loss in osteoarthritis of the knee[J]. *Ann Rheum Dis*, 1992, 51(8): 932-937.
- Richard FL. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(5): 1357-1360.
- Haq I, Murphy E, Dacre J. Osteoarthritis[J]. *Postgrad Med J*, 2003, 79(933):377-383.
- 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): 2723-2730.
- Araldi E, Schipani E. MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(11): 1075-1080.
- Shimizu T, Tanaka T, Iso T, et al. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Mx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 19138-19148.
- Esmeralda NBD, Dennis FGR, Elly LV, et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice[J]. *Immunol*, 2009, 182(12): 7937-7945.

(本文编辑 傅希文)