

miR-214在肥胖小鼠软骨损伤修复中的作用研究

曹红 吴伟 周绪昌 邹军 刘向云 王淼*

(上海体育学院运动科学学院, 上海 200438)

摘要 该研究探究了miR-214在肥胖小鼠软骨损伤修复中的作用机制。从小鼠5周龄开始, 进行为期20周的对照组(C组)普通饲料喂养, 以及肥胖组(O组)与肥胖+运动组(OE组)高脂饲料喂养, 当小鼠17周龄时, 对OE组行8周的跑台运动, 并于干预结束48 h后取材。饲养期间每周测量体质量, 取材后行Micro-CT扫描、石蜡切片染色评分、RT-PCR。结果表明, O组、OE组小鼠体质量显著高于C组, 跑台期间OE组较O组体质量呈下降趋势; O组染色评分显著高于C组, OE组Mankin's评分较O组有显著性降低; O组胫骨平台内侧骨密度相关参数显著低于C组, OE组同等部位Tb.N显著高于O组, 然而仅O组的胫骨平台外侧骨密度较C组显著降低; O组中炎症分解指标IL-6、ADAMTS5表达增高, 合成指标COL2表达下降, 同时miR-214表达增加, 较C组均具有显著差异, OE组经过跑台干预后一定程度逆转了O组上述基因的表达情况。研究得出, 跑台运动可抑制miR-214的表达, 进而降低肥胖小鼠的软骨损伤退变风险, 抑制炎症表达, 促进软骨修复。

关键词 肥胖; 骨关节炎; 软骨损伤; 跑台运动; miR-214

Role of miR-214 in the Repair of Cartilage Injury in Obese Mice

CAO Hong, WU Wei, ZHOU Xuchang, ZOU Jun, LIU Xiangyun, WANG Miao*

(School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract This study explored the mechanism of miR-214 in the cartilage repair in obese mice. At the age of five weeks, the mice were divided into control group (C group), obesity group (O group) and obesity+exercise group (OE group). C group was fed with conventional diet, and O group and OE group were fed with high-fat diet for 20 weeks. At the age of 17 weeks, the OE group was given with treadmill exercise for eight weeks, and all the samples were taken 48 h after the last intervention. The body mass was measured every week during the feeding period. Micro-CT scanning, paraffin section staining score and RT-PCR were performed. The results showed that the body masses of O group and OE group were significantly higher than that of C group, and the body mass of OE group decreased compared with O group during treadmill running. The staining scores of O group were significantly higher than those of C group, while Mankin's score of OE group was significantly lower than that of O group. The BMD-related parameters of the medial tibial plateau in O group were significantly lower than those in C group, and Tb.N at the same site in OE group was significantly higher than that in O group. However, on the outside of the tibial plateau, only the BMD of O group was significantly lower than that of C group. Compared with C group, the expression of IL-6, ADAMTS5, and miR-214 were increased, while COL2 was decreased in O group. The expres-

收稿日期: 2020-01-07

接受日期: 2020-06-15

国家自然科学基金(批准号: 81871835、81772429)和上海市人类运动能力开发与保障重点实验室(上海体育学院)(批准号: 11DZ2261100)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-51253425, E-mail: thomask88@126.com

Received: January 7, 2020

Accepted: June 15, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81871835, 81772429), and Shanghai Key Laboratory of Human Sport Competence Development and Maintenance (Shanghai University of Sport)(Grant No.11DZ2261100)

*Corresponding author. Tel: +86-21-51253425, E-mail: thomask88@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5334>

sion of these genes in O group could be partially reversed in OE group after treadmill exercise. Studies have concluded that treadmill exercise can inhibit the expression of miR-214, thereby reducing the risk of cartilage damage and degeneration in obese mice, inhibiting the expression of inflammation, and promoting cartilage repair.

Keywords obesity; osteoarthritis; cartilage injury; treadmill running; miR-214

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨退变、软骨下骨重塑、骨赘生成、关节内滑膜炎反应和广泛性血管生成为特征的慢性退行性疾病^[1]。OA的发病受遗传、环境、代谢、生物化学等多种因素的共同影响,其中肥胖是影响OA发生发展的重要危险因素之一^[2-3]。肥胖者膝关节承受的压力明显大于正常体质量者,当关节压力增大程度超过关节软骨的耐受范围时,可直接导致肥胖者膝关节发生软骨损伤,也可通过超负荷的关节压力加强软骨细胞的分解代谢,从而引起大量软骨细胞凋亡^[4]。因此,可以通过急性软骨损伤以及慢性软骨分解和细胞凋亡在肥胖患者中引发OA。

此外,肥胖者体内含有大量脂肪因子如瘦素、内脂素、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等可导致软骨细胞代谢状态改变、软骨退变,从而诱发OA,因为这种OA与代谢因素相关所以也被称为代谢性OA^[5-6]。肥胖和OA联系紧密,肥胖带来关节力学变化和代谢性改变,这两种变化共同导致OA的发生。已有研究表明,高脂饮食建立小鼠肥胖模型也可以作为OA造模的有效方式^[7]。随着全球老龄人群和肥胖人群的增加,OA的发生率也随之骤增,目前世界范围内约有2.5亿人受到OA的影响,OA给患者家庭和社会带来沉重的经济负担^[8]。探究肥胖相关OA的治疗方法对于减轻社会负担具有重要意义。

目前,针对OA的治疗手段主要包括手术治疗、药物治疗和运动疗法等。手术治疗的并发症发生率较高且费用昂贵;药物治疗具有副作用,且对疼痛的控制效果有限^[9-10]。运动疗法费用低、可接受性高,且缓解疼痛和活动受限效果显著^[11]。运动疗法通过给予适当的机械应力改善软骨细胞的活性和代谢表型,从而促进关节软骨损伤退变的修复^[12]。但运动疗法究竟是通过何种途径改善软骨细胞的状态,促进软骨修复的,目前尚未完全明确。已往研究表明,miR-214在骨骼疾病中发挥着关键作用,其异常表达会引起骨骼、软骨生长调控异常,进而导致OA发生^[13-14],在敲除miR-214后,OA小鼠的病情明显得到控制,软

骨损伤退变的情况有所好转^[15]。那么在运动疗法修复肥胖小鼠软骨损伤退变的过程中,是否也可以通过调控miR-214达到目的呢?基于此点,本研究通过高脂饮食建立肥胖小鼠骨关节炎模型,随后进行跑台运动干预,研究miR-214在跑台运动修复肥胖小鼠软骨损伤退变中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

4周龄的雄性C57BL/6小鼠21只,体质量13~18 g,购自南京动物模式研究所,饲养于上海体育学院SPF级动物房屏障内,白天和黑夜12 h交替,温度为(22±2) °C,湿度为40%~70%,每周换垫料1次,每3天加水和饲料1次,每周一称重。

小鼠适应性喂养1周后,随机分为3组:对照组(C组, $n=7$)、肥胖组(O组, $n=7$)、肥胖+运动组(OE组, $n=7$)。C组进行普通饲料喂养, O组、OE组进行高脂饲料喂养(含3.0%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、5.0%白糖、10.0%猪油和81.3%普通饲料)。在小鼠17周龄时, OE组进行为期8周的跑台运动,其余组无运动干预。所有动物实验均通过上海体育学院伦理委员会批准。

1.2 运动干预

在运动干预期间, O组与OE组持续进行高脂饲料喂养,同时OE组小鼠在17周龄时进行为期8周的跑台(杭州端氏制造)运动干预,每周训练5天,休息2天。第1周为跑台预适应阶段,速度为8 m/min,时间为30 min;第2~8周,跑台组进行10 min的热身运动(前5 min:速度为8 m/min,后5 min:速度为10 m/min),40 min的正式训练(速度为14 m/min)以及10 min的放松训练(前5 min:速度为10 m/min,后5 min:速度为8 m/min)。跑台速度14 m/min符合小鼠50%~70%的最大摄氧量强度,可以起到促进小鼠软骨损伤退变修复的作用^[16-17]。

1.3 动物取材

各组小鼠在最后一次干预48 h后进行取材,处死取材前12 h禁食、给水。次日早上称量体质量后按照小鼠体质量给予10%阿佛丁(1.2%, 0.6 mL/20 g

体质量)腹腔注射麻醉,待小鼠完全麻醉后取左右下肢,使用眼科手术剪剥离膝关节周围肌肉韧带等软组织,保留完整膝关节,随后将整个下肢用PBS冲洗,将准备用于染色评分、Micro-CT的组织使用4%的多聚甲醛固定,准备用于RT-PCR的组织使用液氮冷冻保存。

1.4 软骨下骨Micro-CT检测

将取材后整个下肢放置于多聚甲醛内固定48 h,然后将下肢转移至75%酒精中,4 °C保存。Micro-CT(Scanco公司,瑞士)设置扫描参数(FOV/Diameter: 31 948 μm , Voxel size: 10.4 μm , Energy: 55 kv, Intensity: 72 μA , Sample time: 250 000 μs)扫描膝关节。扫描结束后,从胫骨平台出现的位置选取100层分别重建各组胫骨平台内侧与外侧:C组胫骨平台外侧(LC组)、O组胫骨平台外侧(LO组)、OE组胫骨平台外侧(LOE组),C组胫骨平台内侧(MC组)、O组胫骨平台内侧(MO组)、OE组胫骨平台内侧(MOE组)。

采用Micro-CT自带软件进行骨结构分析,测量参数如下:(1)骨小梁间隙(trabecular spacing, Tb.Sp);(2)骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th);(3)骨小梁数目(trabecular number, Tb.N);(4)骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV);(5)骨矿物质密度(bone mineral density, BMD)。

1.5 关节软骨染色评分

小鼠下肢在4%多聚甲醛中固定48 h后,更换EDTA脱钙液(10% EDTA, pH7.15),常温摇床脱钙1个月,脱钙液每3天更换1次。以刀片能够轻松切开骨组织为度,完成组织完全脱钙。小鼠下肢脱钙结束后,在膝关节上、下方各1 cm处剪断股骨和胫骨,剔除关节周围的肌肉、韧带以及髌骨等多余组织,保留膝关节。将膝关节进行逐级乙醇脱水(70%、80%、90%、95%、100%乙醇)、二甲苯透明、浸蜡后,将关节侧紧贴包埋盒底部包埋,切片先切除多余关节组织,直至软骨负重区,连续切片,切片厚度为4 μm 。将切片进行常规脱蜡脱水,自来水洗后行HE染色与番红固绿染色。

HE染色:用苏木精浸染切片5 min,捞出切片,水洗脱色,用1%盐酸酒精分化3 s,再放入伊红中染色3 min,酒精逐级脱水;二甲苯透明;中性树胶封片。在200倍光镜下由2位独立观察者按Mankin's评分标准进行评分,取2组评分的均值作为最终得分。

番红固绿染色:用固绿浸染切片5 min,水洗至

软骨绿色较浅,用媒染剂处理30 s,水洗3 min,再放入番红O染液30 s,酒精逐级脱水;二甲苯透明;中性树胶封片。在200倍光镜下由2位独立观察者按OARSI进行评分,取2组评分的均值作为最终得分。

1.6 RNA提取、逆转录与RT-PCR检测

取材后立即将下肢放入液氮冷冻,随后转移至-80 °C冰箱保存,待使用时再取出。将样品从-80 °C取出、解冻,剥离膝关节软骨,剔除多余软组织,在研钵中加入覆盖软骨高度的液氮量并研碎软骨。液氮挥发后,将软骨粉末装入1.5 mL EP管中,使用Trizol[宝生物工程(大连)有限公司]提取软骨总RNA,利用酶标仪检测出每个样本RNA的浓度和纯度后,将总RNA按照试剂盒说明书分别使用miRNA逆转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]以及常规的逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)将总RNA逆转录成cDNA,随后进行荧光定量扩增。以检测miR-214、含血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)、zeste基因增强子同源物2(zeste gene enhancer homolog 2, EZH2)、 β -catenin、2型胶原纤维(collagen type 2, COL2)和IL-6的表达[引物合成于生工生物工程(上海)股份有限公司]。miR-214下游引物为逆转录试剂盒提供,所有引物序列见表1,采用两步法进行扩增,miR-214以U6为内参,其余基因以 β -actin为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.7 数据统计分析

所有结果用均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用SPSS 20.0软件进行分析处理。采用单因素方差分析进行多组间比较,用LSD法进行组间两两比较,以 $P<0.05$ 表示结果具有显著差异。

2 结果

2.1 小鼠体质量

从图1A可以看出,3组小鼠体质量都随着年龄的增加而升高。在第16周时,O组小鼠体质量相较于C组小鼠体质量增加44.6%($P<0.01$),OE组小鼠体质量较C组增加48.7%($P<0.01$),均超过20%的C组小鼠体质量,表明肥胖造模成功。在小鼠肥胖造模期间,O组、OE组小鼠体质量明显高于C组小鼠体质量,5、6、8周龄的小鼠体质量不具有统计学差异,其余周龄的小鼠体质量均有明显差异($P<0.05$)。图1B中,

在跑台运动干预过程中, O组与OE组小鼠体质量仍然是显著高于C组的($P<0.01$)。相较O组小鼠体质量, OE组小鼠体质量在8周跑台训练过程中有明显的下降, 在小鼠21、23周龄时, OE组体质量显著低于O组

体质量($P<0.05$)。

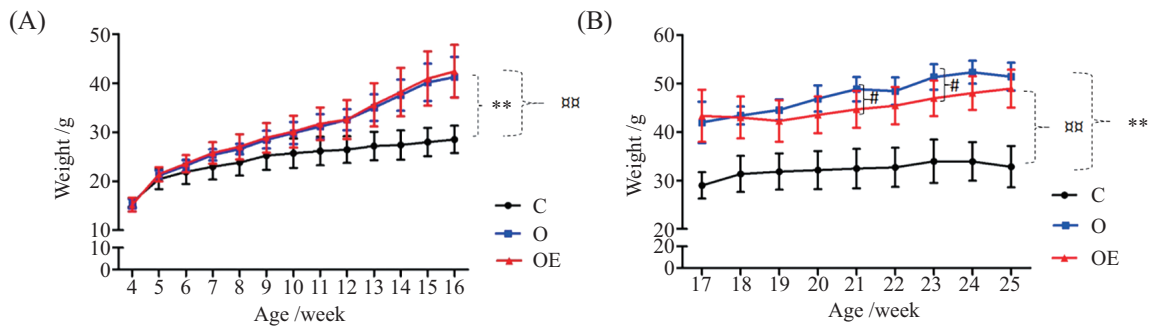
2.2 软骨下骨Micro-CT检查

由表2可以看出, 在胫骨平台两侧中, O组的BMD均低于C组, 且具有显著性差异($P<0.05$)。3组

表1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of each gene

引物 Primer	正向序列(5'→3') Forward sequence (5'→3')	反向序列(5'→3') Reverse sequence (5'→3')
miR-214	ACA GCA GGC ACA GAC AGG C	CTC GCT TCG GCA GCA CA
U6	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT	CAG AAG GAG GAG GCA GGA AGA GG
EZH2	CTG GTT CAA GGT GTC TGG CTT CTG	CTG GTG GTG TTC TGG CTG CTT C
β -catenin	CCC AGT CCT TCA CGC AAG A	CCC TCT GAG CCC TAG TCA
COL2	TCG GCC CTC ATC TCT ACA TC	GGC TCC CAG AAC ATC ACC TA
IL-6	GTG TGG AGC AAC ATG TGG AAC TCT	TTG GTT CAG CCA CTG CCG TA
ADAMTS-5	TGG ACA AGA ACA GCA ACG AG	AAT CTC CTA GTC CTG GCT TG
β -actin	CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC	AAC AGT CCG CCT AGA AGC AC



A: 运动干预前各组小鼠在不同年龄的体质量; B: 运动干预过程中各组小鼠在不同年龄的体质量。C、O组间比较: $**P<0.01$; C、OE组间比较: $^{\square}P<0.01$; O、OE组间比较: $^{\#}P<0.05$ 。

A: body mass of each group at different ages before exercise intervention; B: body mass of each group at different ages during exercise intervention. Comparison between groups C and O: $**P<0.01$; comparison between groups C and OE: $^{\square}P<0.01$; comparison between groups O and OE: $^{\#}P<0.05$ 。

图1 不同组小鼠在不同年龄阶段的体质量变化

Fig.1 The body mass changes of different groups of mice at different ages

表2 不同组胫骨平台内外侧髌骨皮质和骨松质结构参数

Table 2 Parameters of cortical and cancellous structure of tibial plateau in different groups

组别 Group	骨矿物质密度/mg HA·ccm ⁻¹ Bone mineral density /mg HA·ccm ⁻¹	骨体积分数 Bone volume fraction	骨小梁数目 Trabecular number	骨小梁厚度 Trabecular thickness	骨小梁间隙 Trabecular spacing
LC	957.75±15.67	0.68±0.03	7.08±0.19	0.131±0.012	0.134±0.010
LO	935.03±7.50*	0.65±0.03	6.90±0.21	0.127±0.006	0.142±0.007
LOE	941.36±9.49	0.65±0.02	7.08±0.26	0.123±0.010	0.130±0.012
MC	930.53±5.78	0.58±0.03	7.01±0.09	0.101±0.004	0.133±0.003
MO	909.24±9.85 ^Δ	0.53±0.03 ^Δ	6.62±0.05 ^{ΔΔ}	0.094±0.003	0.141±0.004 ^Δ
MOE	925.41±15.88	0.57±0.02	6.98±0.13 ^{##}	0.098±0.006	0.128±0.005 [#]

胫骨平台外侧组中, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与LC进行比较。胫骨平台内侧组中, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$, 与MC进行比较; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, 与MO进行比较。

In lateral tibial plateau group, $*P<0.05$, $**P<0.01$ compared with LC group. In medial tibial plateau group, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ compared with MC group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ compared with MO group.

中均显示, 胫骨平台内侧软骨下骨骨质变化较外侧严重: MO组中BV/TV较MC组显著性降低($P<0.05$), Tb.N降低程度具有非常显著的差异($P<0.01$), Tb.Sp显著高于MC组($P<0.05$)。此外, 通过8周的跑台干预可以一定程度逆转肥胖小鼠胫骨平台内侧软骨下骨骨质改变: MOE组Tb.N较MO组出现非常显著的增高($P<0.01$), Tb.Sp则是显著性降低的($P<0.05$), 其余骨质指标则是呈现下降趋势, 但不具有显著差异。

图2中各组小鼠胫骨平台Micro-CT横断面图像和3D重建图显示了3组小鼠胫骨平台横断面的骨质情况。C组胫骨平台骨小梁均匀, 形状规则, 排列为整齐有序; O组骨小梁排列分布不规则, 骨小梁间隔距离增大, 骨量较C组有轻微的减少; OE组中部分骨小梁排列不均, 骨小梁间距较宽。

2.3 关节软骨染色评分

如图3A所示, HE染色中, O组小鼠膝关节软骨

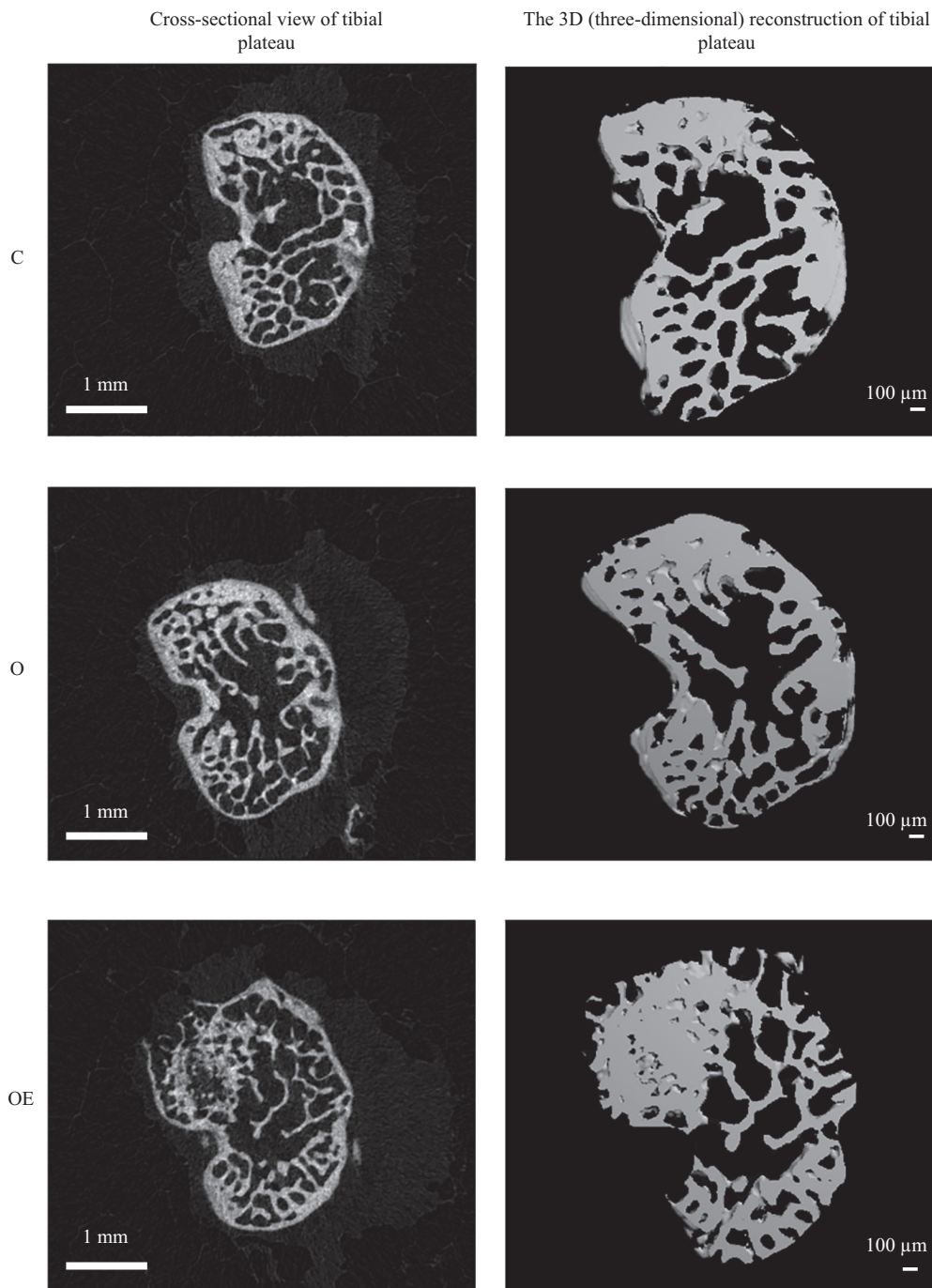
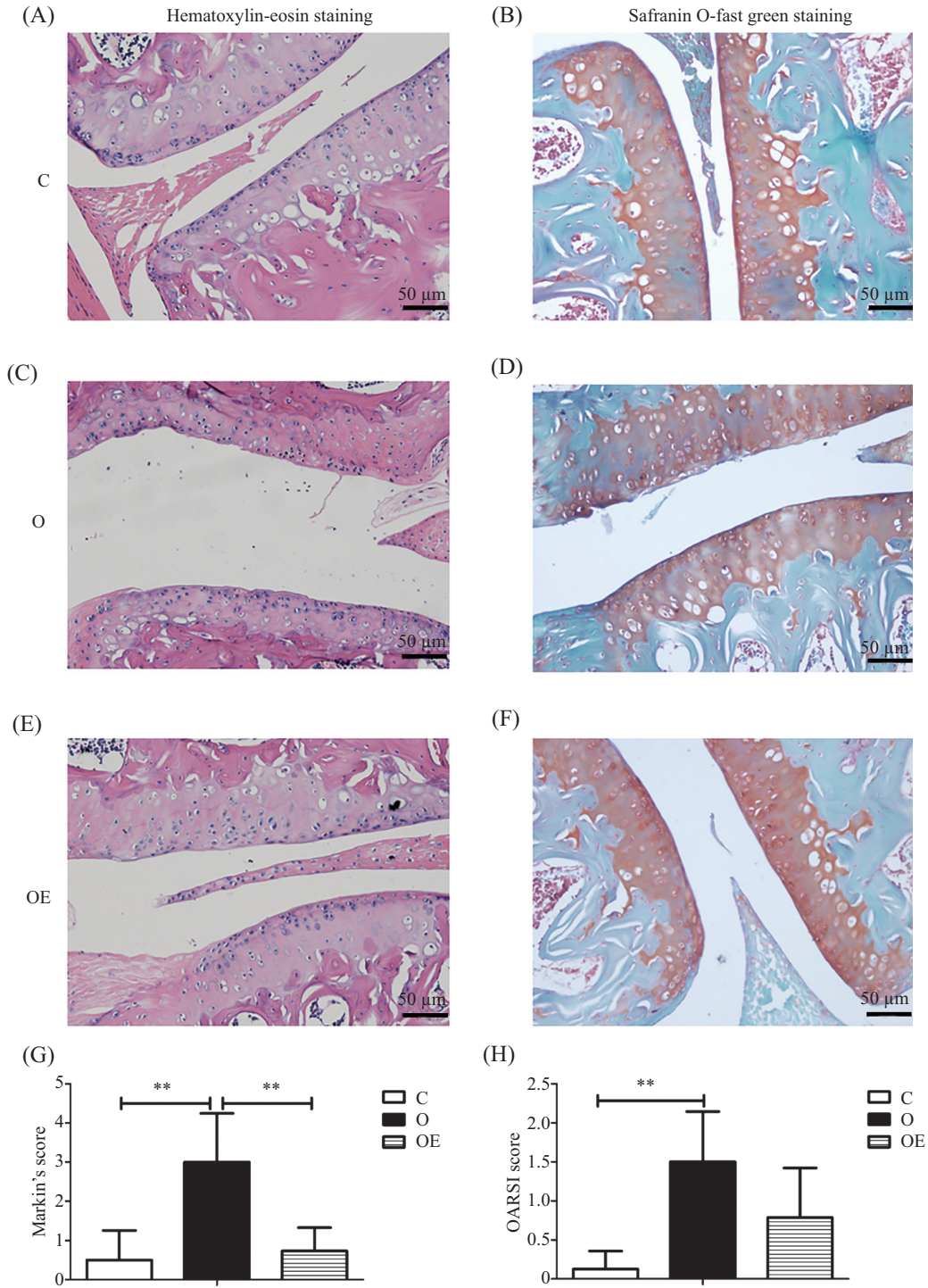


图2 各组小鼠胫骨平台Micro-CT横断面图像和3D重建图

Fig.2 Micro-CT cross-sectional images and 3D reconstruction of tibial plateau of mice in each group

表面不光滑, 有不规则的裂隙, 软骨细胞排列紊乱, 数量明显减少。图3E显示, OE组小鼠经过跑台干预后, 关节软骨表面裂隙减少, 软骨细胞排列较整齐,

软骨细胞增多, 软骨损伤情况相较于O组有明显的改善。图3D显示, 番红固绿染色中, O组小鼠关节软骨表面有裂隙, 少量软骨丢失, 出现软骨破坏、钙化

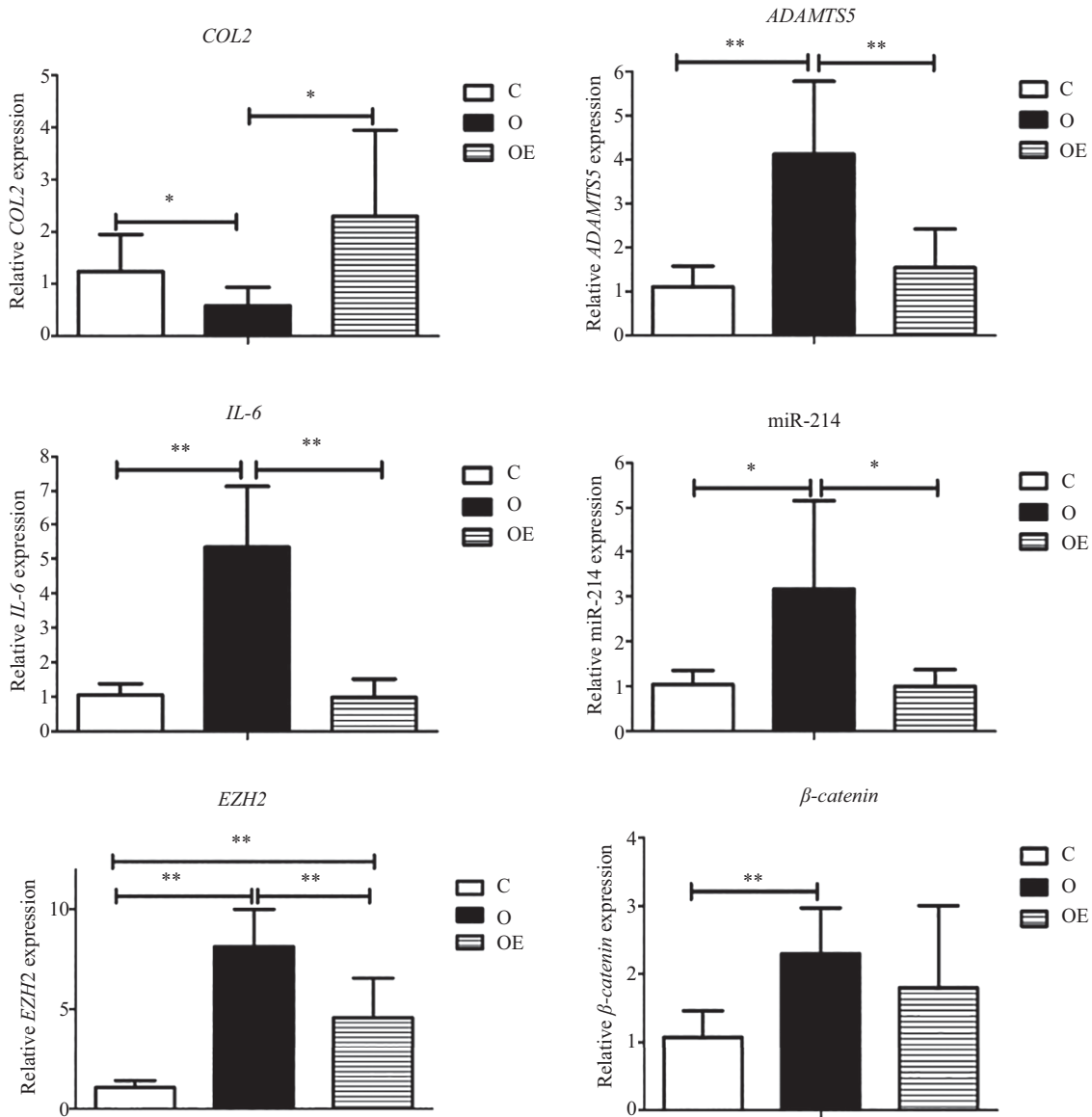


A~F: 各组小鼠膝关节软骨HE、番红固绿染色的组织学图像; G、H: 各组Mankin's评分以及OARSF评分; ** $P<0.01$ 。

A~F: histological images of knee articular cartilage by HE and safranin O-fast green staining in each group; G,H: Mankin's score and OARSF score of articular cartilage in each group; ** $P<0.01$.

图3 各组小鼠膝关节软骨组织染色及评分

Fig.3 Staining and scoring of articular cartilage of mice in each group



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 各组小鼠中COL2、AMAMTS5、IL-6、miR-214、EZH2和 β -catenin的表达情况

Fig.4 Gene expression of COL2, AMAMTS5, IL-6, miR-214, EZH2, and β -catenin in each group of mice

现象;在图3F中,OE组小鼠膝关节软骨表面光滑平整,有少量软骨钙化现象,但损伤严重程度明显低于O组。图3G中显示,O组Mankin's评分明显高于C组评分,运动干预后OE组评分较O组明显降低,结果具有显著性差异($P < 0.01$)。同时,O组OARSI评分较C组有显著性增高($P < 0.01$),OE组OARSI评分较O组有下降趋势,但是不具有显著性差异(图3H)。结果证明,8周的跑台运动干预对于小鼠软骨损伤具有修复作用。

2.4 mRNA表达水平变化

如图4所示,O组小鼠关节软骨内炎症因子IL-6与ADAMTS5的表达显著性增加($P < 0.01$),软骨组成

成分COL2的表达显著降低($P < 0.05$),表明O组小鼠软骨分解代谢旺盛,出现了软骨损伤。同时,O组小鼠软骨中miR-214及其相关的EZH2、 β -catenin均表达上升($P < 0.05$)。然而,8周的跑台干预可以一定程度逆转O组软骨中上述基因的表达。

3 讨论

OA是由年龄增长、肥胖、损伤、劳损等诸多因素引起的一种退行性病变。肥胖作为OA发病的重要因素,从力学以及代谢两方面增加OA风险,一方面体质量的增加导致关节软骨负荷增大^[18],另一方面,大量脂肪的存在导致脂肪因子分泌增加,上调软骨细

胞外基质降解酶的表达,诱导大量软骨细胞凋亡,从而促进OA的病程发展^[19]。诸多研究已经通过高脂饮食诱导小鼠肥胖成功诱发了小鼠OA^[7,20],基于此,本研究通过高脂饲料建立小鼠肥胖模型,诱发OA。高脂饲养的小鼠在16周龄时,体质量均较C组明显增加,增加体质量大于20%对照组体质量,证明肥胖造模成功。8周的运动干预期间,O组与OE组小鼠进行全程的高脂饲料喂养,2组小鼠体质量仍然呈上升趋势。研究发现,体质量每增加1%,肥胖者胫骨平台内侧软骨体积大约减少3%^[21],软骨损伤退变程度加剧。HE染色和番红固绿染色结果直观显示,O组小鼠软骨细胞减少,软骨发生损伤破坏。同时,O组的Mankin's和OARSI评分较C组有显著性增高。评分越高软骨损伤程度越严重,再次证明了肥胖造模诱发OA的有效性。但相较于O组小鼠体质量,OE组中小鼠体质量增长幅度较小,并且在小鼠21、23周龄时,OE组小鼠体质量明显低于O组($P<0.05$)。染色结果显示,OE组软骨损伤情况、纤维化状态有所好转,Mankin's评分较O组也显著性降低。由此证明,跑台运动对于高脂饮食诱发的OA,能一定程度减轻体质量,从而减轻关节负荷,减少软骨体积丢失,促进软骨损伤修复,减缓软骨退变^[21-22]。

异常的软骨下骨骨重塑是OA的典型特征。在OA早期,骨吸收占主导;在OA中晚期,骨形成占主导。具体表现为:异常机械应力导致骨吸收增加,软骨下骨骨量减少,骨小梁间隙增加,软骨下骨板变薄,后期骨小梁体积增多,骨量增多,骨赘生成^[23]。研究显示,一般情况下膝关节应力更集中于胫骨平台内侧,因此OA患者软骨体积丢失、损伤程度均是内侧大于外侧^[24]。肥胖导致关节负荷增加,异常增加胫骨平台负荷,诱发软骨损伤退变,软骨下骨骨质变化,由于应力更集中于胫骨平台内侧,因此内侧软骨损伤及软骨下骨骨质改变程度均大于外侧同等部位。O组Micro-CT中胫骨平台内外侧扫描分析的结果与上述结论一致:胫骨平台内侧骨密度、BV/TV、Tb.N均较同侧对照组显著性降低,Tb.Sp则是较同侧对照组显著性增大的。外侧仅有骨密度与同侧对照组有显著性降低。Tb.Sp是骨小梁分离度,数值越大提示骨吸收增加,可能发生骨质疏松,BMD、BV/TV、Tb.N与骨量成正相关。数据显示,肥胖小鼠胫骨平台内侧骨量下降,骨小梁间隙增大更为显著,符合OA早期的骨质变化情况。上述软骨下骨骨质变

化可以在跑台干预后被一定程度逆转,其中MOE组中Tb.Th显著高于MO组,Tb.Sp显著性降低,BMD、Tb.N、BV/TV无显著性差异,但仍略高于MO组。由此推测,跑台运动对肥胖小鼠的作用可深至软骨下骨,调节软骨下骨骨转换,阻断软骨下骨重塑,从而间接地减轻关节软骨的损伤退变,减缓OA的病程发展。

最近研究发现,miRNAs在软骨发育中起到重要的调控作用。miRNAs可以调控软骨细胞增殖、分化和凋亡,影响软骨细胞外基质合成,参与细胞炎症反应,在OA的发生发展中发挥重要作用^[25]。研究证明,miR-214异常表达会引起骨骼、软骨生长调控异常,进而导致软骨退变、软骨下骨骨重塑的发生^[13-14]。ROBERTO等^[26]发现软骨分化的过程中,miR-214的表达最开始处于高水平状态随后逐渐降低以保障正常的软骨发育,若上调miR-214的表达则会导致软骨发育不良。关节软骨细胞一般终生保持稳定和永久的表型以维持关节功能。高表达miR-214导致软骨细胞永久性分化表型转换、肥大化转变,最终导致潮线上移,软骨组织体积减少,出现软骨退变,诱发OA。此外,miR-214表达上调还可影响软骨下骨,已知miR-214可以调控成骨细胞与破骨细胞的分化进而影响骨量^[27-28]。软骨下骨骨量下降、力学性能被破坏使关节软骨承受更大的应力,又会进一步加剧软骨损伤和退行性变情况。

本研究发现,在O组小鼠关节软骨中miR-214的表达显著增加,且软骨下骨的骨量下降,经过8周跑台运动后miR-214表达下调,软骨下骨骨量也有所恢复,因此可以推测miR-214正是作用于关节软骨以及软骨下骨两方面导致了OA的发生。这与余晓明^[29]、郇松玮^[15]等的研究一致,二者的研究均发现,OA的严重程度与miR-214升高水平成正比。经过8周跑台运动后,miR-214表达显著降低,且OA的相关炎症、分解代谢指标、Mankin's评分、OARSI评分都有所降低,并有显著性差异,说明运动有可能是通过抑制miR-214的表达进而减缓软骨退变、软骨下骨重塑过程。

已有研究表明,miR-214可以通过直接抑制 β -catenin表达进而抑制Wnt/ β -catenin信号通路^[30]。此外也有多项研究同样发现了miR-214可以与ctnnb1的3'非翻译区(3' UTR)直接相互作用,进而抑制 β -catenin表达^[31-33]。 β -catenin是Wnt信号通路的核心分子,Wnt/

β -catenin通路的过表达或抑制都会引起成熟关节软骨细胞的大量凋亡,从而导致软骨破坏并引发OA^[34-35]。因此,我们可以推测miR-214通过调控 β -catenin的表达进而诱导OA的发生。然而我们的实验结果表明,miR-214和 β -catenin的表达一致,均在肥胖小鼠中大量表达,并在8周的跑台运动后有一定程度下降,这与以往研究报道的miR-214负向调控 β -catenin的特性相矛盾。可以推测miR-214与 β -catenin在OA的病程发展中不是简单的通过miR-214/ β -catenin途径来发挥作用的。

EZH2在OA软骨细胞内的表达水平增高,过表达EZH2也会引起软骨细胞的OA转变,抑制EZH2,上述趋势则明显逆转^[38]。EZH2可以通过组蛋白H3K27me2和H3K27me3的甲基化激活Wnt/ β -catenin信号通路^[36-37],本研究结果显示,O组小鼠中 β -catenin和EZH2表达增高,运动干预后二者均表达下调,两者趋势一致。可以推测,EZH2/Wnt/ β -catenin或许在调控OA的病程发展中发挥作用。SONG等^[39]研究发现,miR-214与EZH2表现为双负调控环,miR-214抑制EZH2表达,同样高表达的EZH2也可以抑制miR-214。由于miR-214负向调控EZH2与 β -catenin的表达,因此miR-214或许是通过其他的途径调控了OA的发生发展。但在本研究中仅检测了miR-214、EZH2、 β -catenin的表达量情况,若想要确定miR-214在OA中的具体调控途径还需要进一步的研究。

肥胖是OA的高风险因素,面对肥胖引发的软骨损伤退变,运动疗法是一种被广泛认可的治疗手段。目前已知,运动疗法可以有效减轻体质量,从而减少关节负荷、脂肪因子含量,减轻软骨的损伤退变,但是其作用机制尚不完全明确。本研究为进一步探究运动疗法降低肥胖患者的软骨损伤退变风险,以及缓解OA病情发展的机制提供了新的理论基础,即运动可能通过抑制miR-214的表达作用于关节软骨与软骨下骨,从而共同促进软骨损伤退变的修复。

参考文献 (References)

- [1] GLYN-JONES S, PALMER A J, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9991): 376-87.
- [2] DAVIS M A, ETTINGER W H, NEUHAUS J M. Obesity and osteoarthritis of the knee: evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I) [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 1990, 20(3 Suppl 1): 34-41.
- [3] STURMER T, GUNTHER K P, BRENNER H. Obesity, overweight and patterns of osteoarthritis: the Ulm osteoarthritis study [J]. *J Clin Epidemiol*, 2000, 53(3): 307-13.
- [4] SUN H. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1211: 37-50.
- [5] FRANCISCO V, PEREZ T, PINO J, et al. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: when the levee breaks [J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(2): 594-604.
- [6] ZHUO Q, YANG W, CHEN J, et al. Metabolic syndrome meets osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(12): 729-37.
- [7] 何健宜, 姜梦琪, 刘旭丹, 等. 高脂饮食诱导C57BL/6J肥胖小鼠骨关节炎模型的建立 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志 (HE J Y, JIANG M Q, LIU X D, et al. Establishment of osteoarthritis model in C57BL/6J obese mice induced by high fat diet [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry)*, 2017, 26(5): 445-50.
- [8] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-59.
- [9] DING C. Do NSAIDs affect the progression of osteoarthritis [J]? *Inflammation*, 2002, 26(3): 139-42.
- [10] SCHMIDT I. Surgical treatment options in thumb carpometacarpal osteoarthritis: a recent literature overview searching for practice pattern with special focus on total joint replacement [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2015, 11(1): 39-46.
- [11] TANAKA R, OZAWA J, KITO N, et al. Effects of exercise therapy on walking ability in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *Clin Rehabil*, 2016, 30(1): 36-52.
- [12] 曹红, 周绪昌, 李慧, 等. 压应力对软骨细胞的影响 [J]. *中国细胞生物学学报 (CAO H, ZHOU X C, LI H, et al. Effects of compression on chondrocytes [J]. Chinese Journal of Cell Biology)*, 2019, 41(5): 973-8.
- [13] KARSENTY G, KRONENBERG H M, SETTEMBRE C. Genetic control of bone formation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25: 629-48.
- [14] GOLDRING M B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2012, 4(4): 269-85.
- [15] 郇松玮, 查振刚, 王华军, 等. miR-214在小鼠骨关节炎软骨及软骨下骨中的表达分析 [J]. *中国矫形外科杂志 (HUAN S W, ZHA Z G, WANG H J, et al. Cartilage and subchondral bone expression of miR-214 in osteoarthritis model of mice [J]. Orthopedic Journal of China)*, 2019, 27(7): 641-5.
- [16] HØYDAL M A, WISLØFF U, KEMI O J, et al. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training [J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2007, 14(6): 753-60.
- [17] PATE K M, SHERK V D, CARPENTER R D, et al. The beneficial effects of exercise on cartilage are lost in mice with reduced levels of ECSOD in tissues [J]. *J Appl Physiol*, 2015, 118(6): 760-7.
- [18] RUSSELL E M, MILLER R H, UMBERGER B R, et al. Lateral wedges alter mediolateral load distributions at the knee joint in obese individuals [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(5): 665-71.
- [19] GOLDRING S R, GOLDRING M B. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, (427 Suppl): S27-36.
- [20] 宗文浩, 李可峰, 郭炜炜, 等. 自主运动对高脂饮食诱导的肥胖小鼠膝关节软骨形态学的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*

- (ZONG W H, LI K F, GUO W W, et al. Effect of voluntary exercise on cartilage morphology of knee osteoarthritis in obese mice induced by high-fat diet [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2019, 25(9): 1273-9.
- [21] TEICHTAHL A J, WLUKA A E, TANAMAS S K, et al. Weight change and change in tibial cartilage volume and symptoms in obese adults [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6): 1024-9.
- [22] RICHELLE P, POITOU C, GARNERO P, et al. Benefits of massive weight loss on symptoms, systemic inflammation and cartilage turnover in obese patients with knee osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(1): 139-44.
- [23] HAYAMI T, PICKARSKI M, ZHUO Y, et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis [J]. *Bone*, 2006, 38(2): 234-43.
- [24] LAHM A, DABRAVOLSKI D, SPANK H, et al. Regional differences of tibial and femoral cartilage in the chondrocyte gene expression, immunohistochemistry and composite in different stages of osteoarthritis [J]. *Tissue Cell*, 2017, 49(2 Pt B): 249-56.
- [25] YU X M, MENG H Y, YUAN X L, et al. MicroRNAs involvement in osteoarthritis and the prospects for treatments [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 236179.
- [26] ROBERTO V P, GAVAIA P, NUNES M J, et al. Evidences for a new role of miR-214 in chondrogenesis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3704.
- [27] LIU J, LI Y, LUO M, et al. MicroRNA-214 inhibits the osteogenic differentiation of human osteoblasts through the direct regulation of baculoviral IAP repeat-containing 7 [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 351(2): 157-62.
- [28] LI K C, CHANG Y H, YE H C L, et al. Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow-derived MSCs expressing microRNA sponges [J]. *Biomaterials*, 2016, 74: 155-66.
- [29] 余晓明, 袁雪凌, 孟昊业, 等. 骨性关节炎患者膝关节软骨及软骨下骨中miR-214的表达 [J]. *解放军医学院学报* (YU X M, YUAN X L, MENG H Y, et al. Expression level of miR-214 in cartilage and subchondral bone of patients with osteoarthritis [J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*), 2015, 36(11): 1131-3.
- [30] TENG J W, JI P F, ZHAO Z G. MiR-214-3p inhibits beta-catenin signaling pathway leading to delayed fracture healing [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1): 17-24.
- [31] CAO F, ZHAN J, CHEN X, et al. miR-214 promotes periodontal ligament stem cell osteoblastic differentiation by modulating Wnt/betacatenin signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9301-8.
- [32] DENG Z F, ZHENG H L, CHEN J G, et al. miR-214-3p targets beta-Catenin to regulate depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress in mice [J]. *Cereb Cortex*, 2019, 29(4): 1509-19.
- [33] LI J P, ZHUANG H T, XIN M Y, et al. MiR-214 inhibits human mesenchymal stem cells differentiating into osteoblasts through targeting beta-catenin [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(21): 4777-83.
- [34] PRAXENTHALER H, KRAMER E, WEISSER M, et al. Extracellular matrix content and WNT/beta-catenin levels of cartilage determine the chondrocyte response to compressive load [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864(3): 851-9.
- [35] ZHU M, CHEN M, ZUSCIK M, et al. Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(7): 2053-64.
- [36] CHENG A S, LAU S S, CHEN Y, et al. EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes beta-catenin-dependent hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 4028-39.
- [37] GE K. Epigenetic regulation of adipogenesis by histone methylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(7): 727-32.
- [38] CHEN L, WU Y, WU Y, et al. The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29176.
- [39] SONG H J, LIU Y, JIN X, et al. Long non-coding RNA LINC01535 promotes cervical cancer progression via targeting the miR-214/EZH2 feedback loop [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6098-111.