

LncRNA FGD5-AS1 靶向 miR-103a-3p 对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞凋亡的机制研究

郭秀珍¹ 高斌礼^{1*} 郭文¹ 刘庆梁¹ 冯睿² 吴燕珍³

1. 内蒙古医科大学附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010050

2. 包头医学院第二附属医院, 内蒙古 包头 014010

3. 内蒙古包钢医院, 内蒙古 包头 014010

中图分类号: R363.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 06-0832-06

摘要: **目的** 探讨 LncRNA FGD5-AS1 靶向 miR-103a-3p 对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞损伤及细胞凋亡的影响与分子机制。**方法** 体外培养大鼠关节软骨细胞, 分为 NC 组、IL-1 β 组 (IL-1 β 浓度为 10 ng/mL)。采用 qRT-PCR 检测细胞中 FGD5-AS1、miR-103a-3p 的表达水平。分别将 pcDNA-FGD5-AS1、miR-103a-3p mimics 转染至软骨细胞, 随后使用 IL-1 β 处理 48 h。采用 ELISA 检测 IL-6、TNF- α 、IL-8 水平; 流式细胞术检测细胞凋亡率; 双荧光素酶报告实验验证 FGD5-AS1 与 miR-103a-3p 的靶向关系; Western blot 检测 Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 蛋白表达量。**结果** 与 NC 组相比, IL-1 β 组软骨细胞中 FGD5-AS1 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$), miR-103a-3p、Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$), IL-6、TNF- α 、IL-8 水平显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); FGD5-AS1 过表达后可明显降低 IL-6、TNF- α 、IL-8、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 水平 ($P < 0.05$), 降低细胞凋亡率 ($P < 0.05$), 抑制 Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3 表达 ($P < 0.05$); 双荧光素酶报告实验证实 FGD5-AS1 靶向结合 miR-103a-3p 并可负向调控 miR-103a-3p 的表达 ($P < 0.05$); miR-103a-3p 过表达可明显逆转 FGD5-AS1 过表达对细胞凋亡及炎症反应的抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论** LncRNA FGD5-AS1 可通过靶向负调控 miR-103a-3p 的表达从而抑制 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞炎症反应及细胞凋亡, 其作用机制可能通过抑制 NF- κ B 信号通路激活有关。

关键词: LncRNA FGD5-AS1; miR-103a-3p; IL-1 β ; 关节软骨细胞; 凋亡

Mechanism of LncRNA FGD5-AS1 on IL-1 β -induced articular chondrocyte apoptosis through targeting regulation of miR-103a-3p expression

GUO Xiuzhen¹, GAO Binli^{1*}, GUO Wen, LIU Qingliang, FENG Rui², WU Yanzhen³

1. The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 01050

2. The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010

3. Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou 014010, China

* Corresponding author: GAO Binli, Email gblidoc@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of LncRNA FGD5-AS1 targeting miR-103a-3p on IL-1 β -induced articular chondrocyte injury and apoptosis and its molecular mechanism. **Methods** Rat articular chondrocytes were cultured in vitro and divided into NC group and IL-1 β group (IL-1 β 10 ng/mL). The expression levels of FGD5-AS1 and miR-103a-3p in cells were detected by qRT-PCR. PcDNA-FGD5-AS1, miR-103a-3p mimics were transfected into chondrocytes respectively, and then treated with IL-1 β for 48 h. ELISA was used to detect the levels of IL-6, TNF- α and IL-8. Flow cytometry was used to detect the apoptotic rate. The dual luciferase report experiment verified the targeting relationship between FGD5-AS1 and miR-103a-3p. Western blot was used to detect the expression levels of Bax, Cyt C, Cleaved Caspase-3, p-NF- κ B p65, and p-I κ B α protein. **Results** Compared with the NC group, the expression level of FGD5-AS1 in chondrocytes in the IL-1 β group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the expression levels of miR-103a-3p, Bax, Cyt C, and Cleaved Caspase-3 were significantly increased ($P < 0.05$), the levels of IL-6, TNF- α and IL-8 were significantly increased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$). FGD5-

AS1 overexpression could significantly reduce the levels of IL-6, TNF- α , IL-8, p-NF- κ B p65, and p-I κ B α ($P < 0.05$), reduced the rate of apoptosis ($P < 0.05$), and inhibited Bax, Cyt C, and Cleaved Caspase-3 expression ($P < 0.05$). The double luciferase reporting experiment confirmed that FGD5-AS1 targets miR-103a-3p and could negatively regulate the expression of miR-103a-3p ($P < 0.05$). Overexpression of miR-103a-3p could significantly reverse the inhibitory effect of FGD5-AS1 overexpression on apoptosis and inflammatory response ($P < 0.05$). **Conclusion** LncRNA FGD5-AS1 could negatively regulate the expression of miR-103a-3p, thereby inhibiting IL-1 β -induced articular chondrocyte inflammation and apoptosis, and its mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway activation.

Key words: LncRNA FGD5-AS1; miR-103a-3p; IL-1 β ; articular chondrocytes; apoptosis

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床常见的一种慢性退变性疾病,其主要病理特征为关节软骨发生退行性病变,而关节软骨由软骨细胞与细胞外基质构成^[1]。研究^[2-3]表明 IL-6、TNF- α 、IL-8 等炎症因子分泌量增加可促进炎症反应的发生,从而促进 OA 进展。因而抑制炎症反应可减少 OA 中软骨退变,从而减缓疾病进展。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 可影响关节软骨细胞基质合成,从而参与 OA 发生及发展过程。研究^[4]表明, IL-1 β 可作为体外研究中 OA 的诱导剂。LncRNA FGD5-AS1 在牙周炎中呈低表达,过表达可抑制牙周炎的发展^[5]。生物信息学分析显示 miR-103a-3p 可能是 FGD5-AS1 的靶基因,研究^[6]表明 miR-103a-3p 在类风湿关节炎患者血清中表达上调。但 FGD5-AS1 是否可靶向调控 miR-103a-3p 参与骨关节炎发生发展过程尚未可知。研究^[7]表明,抑制 NF- κ B 信号通路的激活可有效抑制机体内炎症反应。本研究采用 IL-1 β 诱导大鼠关节软骨细胞模拟 OA 环境,检测细胞中 FGD5-AS1 与 miR-103a-3p 的表达水平,探究其对关节软骨细胞炎症损伤及细胞凋亡的影响及作用机制,为进一步揭示 OA 发生与发展的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠关节软骨细胞(宁波明舟生物科技有限公司);DMEM 与胎牛血清(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(上海钰博生物科技有限公司);IL-1 β (美国 Sigma-Aldrich 公司);Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司);pcDNA3.1 (上海远慕生物科技有限公司);miR-103a-3p mimics 及阴性对照 (miR-NC)、si-FGD5-AS1 及 si-NC (上海吉玛制药技术有限公司);Trizol 试剂、反转录与荧光定量 PCR 试剂盒(北京天根生化科技有限公司);IL-6、TNF- α 、IL-8 ELISA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(上海朗智生物

科技有限公司);兔抗鼠 Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3 抗体(美国 CST 公司);兔抗鼠 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 抗体(美国 Santa Cruz 公司);辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组:将软骨细胞分为 NC 组(未进行处理的软骨细胞)、IL-1 β 组(浓度为 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理软骨细胞)^[8]。分别将 pcDNA、pcDNA-FGD5-AS1、pcDNA-FGD5-AS1 与 miR-NC、pcDNA-FGD5-AS1 与 miR-103a-3p mimics 转染至软骨细胞,在含有 10 ng/mL 的 IL-1 β 培养基内培养 48 h。

1.2.2 ELISA 检测 IL-6、TNF- α 、IL-8 浓度:收集各组细胞培养上清液,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下经 1 300 r/min 转速离心 10 min,吸取上清,参照 ELISA 检测试剂盒说明书检测各组炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-8 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 qRT-PCR 检测细胞中 FGD5-AS1、miR-103a-3p 的表达水平:采用 Trizol 法提取各组细胞中总 RNA,应用 Nanodrop 2000c 超微量分光光度计测定 RNA 浓度,参照反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共循环 40 次。FGD5-AS1 以 GAPDH 为内参,miR-103a-3p 以 U6 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算 FGD5-AS1、miR-103a-3p 的相对表达量。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率:收集各组对数期软骨细胞,预冷 PBS 洗涤,加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI,充分混匀后,室温避光孵育 10 min,置于 FACS Calibur 流式细胞仪及应用 Cellaquest 软件检测各组细胞凋亡。

1.2.5 双荧光素酶报告基因检测 FGD5-AS1 的靶基因:靶基因预测软件 starbase 预测显示 FGD5-AS1 与 miR-103a-3p 存在结合位点,利用基因突变技术将结合位点进行突变,分别将结合位点与突变位点插入荧光素酶报告基因载体分别构建野生型载体

WT-FGD5-AS1 与突变型载体 MUT-FGD5-AS1, 分别将 WT-FGD5-AS1、MUT-FGD5-AS1 与 miR-NC、miR-103a-3p mimics 共转染至软骨细胞, 参照荧光素酶活性检测试剂盒检测各组相对荧光素酶活性。

1.2.6 Western blot 检测 Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3、p-NF-κB p65、p-IκBα 蛋白表达: 收集各组对数生长期软骨细胞, 加入 RIPA 裂解液后经 1 000 r/min 转速离心 15 min (4 ℃), 吸取上清液 (总蛋白)。采用 BCA 检测蛋白浓度, 取 40 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 反应, 将电泳产物转移至 PVDF 膜, 封闭 2 h, 加入蛋白一抗稀释液 (1 : 1 000), 4 ℃ 孵育 24 h, TBST 洗涤, 加入二抗稀释液 (1 : 2 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤, 滴加 ECL 显影, 应用 Quantityone 软件检测条带灰度值。

1.3 统计学处理

应用 SPSS21.0 统计学软件分析数据, 计量资料均符合正态分布, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据均以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-1β 诱导的关节软骨细胞中 LncRNA FGD5-AS1 与 miR-103a-3p 的表达量

实验结果显示, 与 NC 组相比, IL-1β 组软骨细胞中 FGD5-AS1 的表达水平显著降低 (*P* < 0.05), miR-103a-3p 的表达水平显著升高 (*P* < 0.05), 见表 1。

表 1 IL-1β 诱导的关节软骨细胞中 LncRNA FGD5-AS1 与 miR-103a-3p 的表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1 Expressions of LncRNA FGD5-AS1 and miR-103a-3p in articular chondrocytes induced by IL-1β ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	FGD5-AS1	miR-103a-3p
NC 组	1.00±0.10	1.01±0.13
IL-1β 组	0.45±0.06 [*]	2.54±0.17 [*]

注: 与 NC 组相比, ^{*}*P* < 0.05。

2.2 FGD5-AS1 过表达对 IL-1β 诱导的关节软骨细胞炎症损伤的影响

与 NC 组相比, IL-1β 组炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-8 水平显著升高 (*P* < 0.05); 与 IL-1β + pcDNA 组相比, IL-1β + pcDNA-FGD5-AS1 组炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-8 水平显著降低 (*P* < 0.05), 见表 2。

表 2 FGD5-AS1 过表达对 IL-1β 诱导的关节软骨细胞炎症损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9, \text{pg/mg}$)

Table 2 Effect of FGD5-AS1 overexpression on IL-1β-induced articular chondrocyte inflammation and injury ($\bar{x} \pm s, n = 9, \text{pg/mg}$)

组别	IL-6	TNF-α	IL-8
NC 组	289.36±16.57	56.37±9.25	59.85±7.16
IL-1β 组	1320.57±145.76 [*]	278.31±17.69 [*]	265.74±22.35 [*]
IL-1β+pcDNA 组	1423.95±136.57	286.74±15.64	258.64±16.52
IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1 组	422.57±20.15 [#]	86.52±10.23 [#]	72.15±8.57 [#]
<i>F</i> 值	309.648	722.875	516.190
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: 与 NC 组相比, ^{*}*P* < 0.05; 与 IL-1β+pcDNA 组相比, [#]*P* < 0.05。

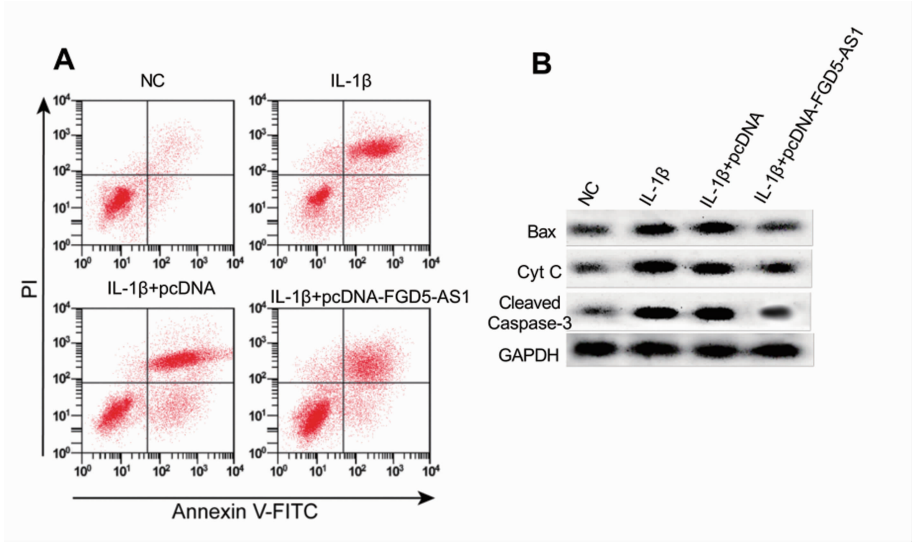


图 1 FGD5-AS1 过表达对 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡的影响 A: 流式细胞术检测细胞凋亡率; B: 细胞凋亡相关蛋白免疫印迹图。

Fig.1 Effect of FGD5-AS1 overexpression on the apoptosis of articular chondrocytes induced by IL-1β

2.3 FGD5-AS1 过表达对 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡的影响

与 NC 组相比,IL-1β 组关节软骨细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$);与 IL-1β+pcDNA 组相比,IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1 组关节软骨细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量显著降低($P<0.05$),见图 1、表 3。

表 3 FGD5-AS1 过表达对 IL-1β 诱导的关节软骨细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s,n=9$)

组别	凋亡率 /%	Bax 蛋白	Cyt C 蛋白	Cleaved Caspase-3 蛋白
NC 组	8.57±1.32	0.45±0.08	0.43±0.09	0.41±0.06
IL-1β 组	32.15±2.15*	0.98±0.12*	1.03±0.13*	0.96±0.12*
IL-1β+pcDNA 组	33.26±3.10	0.96±0.15	1.01±0.14	0.95±0.11
IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1 组	13.28±1.19 [#]	0.53±0.02 [#]	0.50±0.08 [#]	0.51±0.10 [#]
F 值	335.399	64.201	73.100	74.835
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 NC 组相比,* $P<0.05$;与 IL-1β+pcDNA 组相比,[#] $P<0.05$ 。

2.4 FGD5-AS1 靶向调控 miR-103a-3p 的表达

starBase 预测显示 LncRNA FGD5-AS1 与 miR-103a-3p 存在结合位点,见图 2。双荧光素酶报告实验结果显示,转染野生型载体 WT-FGD5-AS1 的细胞中,miR-103a-3p 组荧光素酶活性显著低于 miR-NC 组($P<0.05$);转染突变型载体 MUT-FGD5-AS1 的细胞中,miR-103a-3p 组荧光素酶活性相较于 miR-NC 组差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。qRT-PCR 检测结果显示,与 pcDNA 组相比,pcDNA-FGD5-AS1 组 miR-103a-3p 的表达水平显著降低($P<0.05$);与 si-NC 组相比,si-FGD5-AS1 组 miR-103a-3p 的表达水平显著升高($P<0.05$),见表 5。

表 6 FGD5-AS1 调控 miR-103a-3p 影响关节软骨细胞炎症损伤($\bar{x}\pm s,n=9$,pg/mg)

Table 6 FGD5-AS1 regulates miR-103a-3p to affect articular chondrocyte inflammation and injury($\bar{x}\pm s,n=9$,pg/mg)

组别	IL-6	TNF-α	IL-8
IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1+miR-NC 组	423.57±20.21	87.52±10.25	73.15±9.24
IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1+miR-103a-3p 组	986.57±23.54*	167.24±13.57*	168.46±13.49*
t 值	54.439	14.063	17.487
P 值	0.000	0.000	0.000

注:与 IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1+miR-NC 组相比,* $P<0.05$ 。

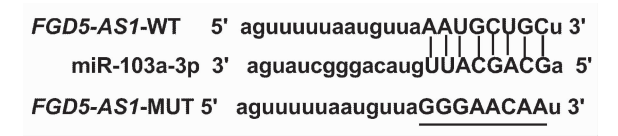


图 2 FGD5-AS1 的序列中含有与 miR-103a-3p 互补的核苷酸序列

Fig.2 The sequence of FGD5-AS1 contains a nucleotide sequence complementary to miR-103a-3p

表 4 双荧光素酶报告实验($\bar{x}\pm s,n=9$)

Table 4 Double luciferase report experiments($\bar{x}\pm s,n=9$)

组别	WT-FGD5-AS1	MUT-FGD5-AS1
miR-NC 组	1.01±0.03	1.02±0.13
miR-103a-3p 组	0.45±0.11*	1.03±0.15
t 值	14.735	0.151
P 值	0.000	0.882

注:与 miR-NC 组相比,* $P<0.05$ 。

表 5 FGD5-AS1 负向调控 miR-103a-3p 的表达($\bar{x}\pm s,n=9$)

Table 5 FGD5-AS1 negatively regulates miR-103a-3p expression($\bar{x}\pm s,n=9$)

组别	miR-103a-3p
pcDNA 组	0.96±0.15
pcDNA-FGD5-AS1 组	0.34±0.08*
si-NC 组	0.95±0.17
si-FGD5-AS1 组	2.31±0.20 [#]
F 值	254.896
P 值	0.000

注:与 pcDNA 组相比,* $P<0.05$;与 si-NC 组相比,[#] $P<0.05$ 。

2.5 FGD5-AS1 调控 miR-103a-3p 影响关节软骨细胞炎症损伤及细胞凋亡

与 IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1+miR-NC 组相比,IL-1β+pcDNA-FGD5-AS1+miR-103a-3p 组炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-8 水平显著升高($P<0.05$),细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$),见图 3、表 6、表 7。

表 7 细胞凋亡相关蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 7 Relative expression of apoptosis-related proteins($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	凋亡率/%	Bax 蛋白	Cyt C 蛋白	Cleaved Caspase-3 蛋白
IL-1 β +pcDNA- FGD5-AS1+ miR-NC 组	12.85 $\pm$ 1.20	0.56 $\pm$ 0.10	0.51 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.12
IL-1 β +pcDNA- FGD5-AS1+miR- 103a-3p 组	29.54 $\pm$ 3.29 [*]	0.95 $\pm$ 0.12 [*]	0.98 $\pm$ 0.11 [*]	0.97 $\pm$ 0.13 [*]
<i>t</i> 值	14.297	7.490	9.921	7.461
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 IL-1 β +pcDNA-FGD5-AS1+miR-NC 组相比, ^{*}*P* < 0.05。

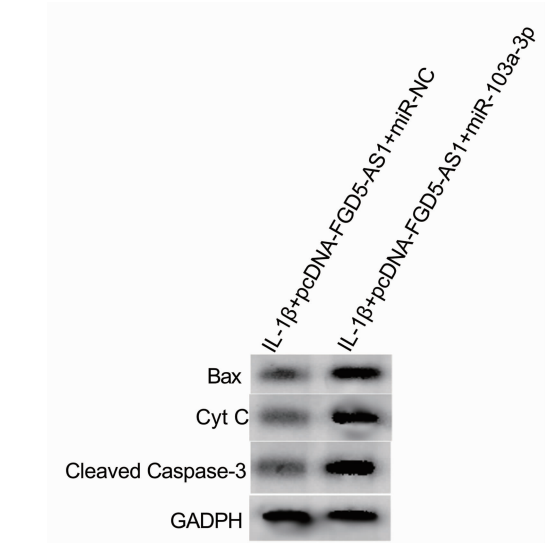


图 3 细胞凋亡相关蛋白免疫印迹图

Fig.3 Western blot of apoptosis-related proteins

2.6 FGD5-AS1 靶向 miR-103a-3p 调控 NF- κ B 信号通路

实验结果显示,与 IL-1 β +pcDNA 组相比,IL-1 β +pcDNA-FGD5-AS1 组 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 蛋白相对表达量显著降低(*P* < 0.05);与 IL-1 β +pcDNA-FGD5-AS1+miR-NC 组相比,IL-1 β +pcDNA-FGD5-AS1+miR-103a-3p 组 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 蛋白相对表达量显著升高(*P* < 0.05),见图 4、表 8。

3 讨论

FGD5-AS1 在急性心肌梗死患者中表达下调,并可能参与急性心肌梗死发生及发展过程^[9]。研究^[10]表明,FGD5-AS1 可促进结直肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭。本研究结果显示,FGD5-AS1 在 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞中表达下调,提示 FGD5-AS1 表达量降低可能促进 OA 的发生及发展。同时还显

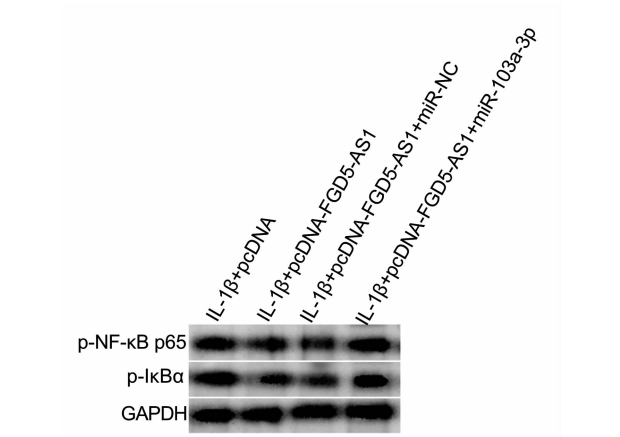


图 4 NF- κ B 信号通路相关蛋白免疫印迹图

Fig. 4 Western blot of NF- κ B signaling pathway related proteins

表 8 NF- κ B 信号通路相关蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 8 Relative expression of NF- κ B signaling pathway related proteins($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	p-NF- κ B p65 蛋白	p-I κ B α 蛋白
IL-1 β +pcDNA 组	0.90 $\pm$ 0.16	0.91 $\pm$ 0.11
IL-1 β + pcDNA-FGD5- AS1 组	0.40 $\pm$ 0.07 [*]	0.42 $\pm$ 0.05 [*]
IL-1 β + pcDNA-FGD5- AS1+miR-NC 组	0.39 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.08
IL-1 β + pcDNA-FGD5- AS1+miR-103a-3p 组	0.87 $\pm$ 0.10 [#]	0.90 $\pm$ 0.12 [#]
<i>F</i> 值	67.144	81.424
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:与 IL-1 β +pcDNA 组相比, ^{*}*P* < 0.05;与 IL-1 β +pcDNA-FGD5-AS1+miR-NC 组相比, [#]*P* < 0.05。

示 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞中炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-8 水平升高,与相关文献报道相似^[11],提示 IL-1 β 可明显造成软骨细胞炎症损伤。进一步研究结果显示,FGD5-AS1 过表达后炎症因子水平明显降低,提示 FGD5-AS1 过表达可通过降低炎症因子水平而减轻 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞炎症损伤。相关报道^[12]指出细胞氧化应激损伤可促进凋亡蛋白 Bax 表达,Bax 表达上调可促进线粒体释放 Cyt C 进而激活 Caspase 级联反应最终诱导细胞凋亡。本研究结果显示 IL-1 β 处理后关节软骨细胞凋亡率明显升高,Bax、Cyt C、Cleaved Caspase-3 蛋白水平明显升高,而 FGD5-AS1 过表达后可明显抑制 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞凋亡,提示 FGD5-AS1 过表达可能通过调控线粒体途径而抑制 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞凋亡。

miR-103a-3p 表达量升高可能与骨骼疾病发生

过程有关^[13]。研究^[14]表明 miR-103a-3p 可促进血管紧张素 II 诱导的肾脏炎症及纤维化的发生。本研究通过双荧光素酶报告实验结果证实 FGD5-AS1 靶向负调控 miR-103a-3p 的表达,进一步研究显示 miR-103a-3p 过表达后可明显逆转 FGD5-AS1 过表达对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞炎症损伤及细胞凋亡的作用,提示 FGD5-AS1 过表达可通过下调 miR-103a-3p 表达从而减轻 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞炎症损伤,抑制细胞凋亡。相关报道^[15]指出 p65 是 NF- κ B 信号通路主要蛋白,正常生理状态下 NF- κ B 与 I κ B 结合,若细胞受到刺激后 I κ B 降解后可释放 NF- κ B p65 进而促进关节软骨细胞炎症损伤。本研究结果显示 FGD5-AS1 过表达后可明显降低 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 表达,而 miR-103a-3p 过表达后可明显促进 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 表达,提示 FGD5-AS1 过表达可能通过靶向抑制 miR-103a-3p 表达而抑制 NF- κ B 信号通路激活从而减轻 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞炎症损伤,抑制细胞凋亡,对软骨细胞发挥保护作用。

综上所述,FGD5-AS1 过表达靶向抑制 miR-103a-3p 表达可抑制 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞炎症反应及细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路的活化有关,可为深入探讨 FGD5-AS1 对关节软骨细胞凋亡及炎症的影响及分子机制奠定理论基础,有助于阐明 OA 发病机制及防治 OA。

【参 考 文 献】

[1] Miller RE, Lu Y, Tortorella MD, et al. Genetically engineered mouse models reveal the importance of proteases as osteoarthritis drug targets.[J]. Curr Rheumatol Rep, 2013, 15(8): 1-15.

[2] 邱伟建,肖鹏,吴学建. 苍术素抑制白细胞介素-1 β 诱导的人骨关节炎软骨细胞炎症[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(8): 1442-1444.

[3] Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis[J]. Cytokine Growth FR, 2018, 44(1): 38-50.

[4] 熊寿良,徐宏光,王强,等. 白细胞介素 1 β 诱导软骨细胞中雷帕霉素靶蛋白信号通路表达的变化[J]. 中华医学杂志,

2017, 97(7): 540-544.

[5] Chen H, Lan Z, Li Q, et al. Abnormal expression of long noncoding RNA FGD5-AS1 affects the development of periodontitis through regulating miR-142-3p/SOCS6/NF- κ B pathway[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2098-2106.

[6] Anaparti V, Smolik I, Meng X, et al. Whole blood microRNA expression pattern differentiates patients with rheumatoid arthritis, their seropositive first-degree relatives, and healthy unrelated control subjects [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 249-259.

[7] Yu C, Xiong Y, Chen D, et al. Ameliorative effects of atracytoldin on intestinal inflammation and co-occurring dysmotility in both constipation and diarrhea prominent rats[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2017, 21(1): 1-9.

[8] 王宏强,仇成凤,邓紫薇,等. 二烯丙基二硫对 IL-1 β 诱导 SD 大鼠关节软骨细胞的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(9): 1498-1503.

[9] Shen LS, Hu XF, Chen T, et al. Integrated network analysis to explore the key mRNAs and lncRNAs in acute myocardial infarction[J]. Math Biosci Eng, 2019, 16(6): 6426-6437.

[10] Li D, Jiang X, Zhang X, et al. Long noncoding RNA FGD5-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion through upregulating CDCA7 via sponging miR-302e [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2019, 55(8): 577-585.

[11] 王少霞. 长链非编码 RNA H19 靶向 miR-194-5p 抑制 LPS 诱导心肌细胞炎症反应[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(19): 4839-4842.

[12] 张丽咪,贺燕勤,于顾然. 白术内酯 I 对 H₂O₂ 诱导的 bEnd.3 细胞氧化应激损伤的影响[J]. 中医药导报, 2019, 25(3): 35-38.

[13] Valassi E, Garcia-Giralt N, Malouf J, et al. Circulating miR-103a-3p and miR-660-5p are associated with bone parameters in patients with controlled acromegaly[J]. Endocr Connect, 2019, 8(1): 39-49.

[14] Lu Q, Ma Z, Ding Y, et al. Circulating miR-103a-3p contributes to angiotensin II-induced renal inflammation and fibrosis via a SNRK/NF- κ B/p65 regulatory axis[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2145-2155.

[15] 窦凌晨,海国栋,封青川,等. 尼古丁对白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞炎症反应及核因子- κ B 信号通路的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(5): 885-887.

(收稿日期: 2019-12-04;修回日期: 2019-12-23)