

引用本文: 邓慧琳, 杨婧, 郭俐. α -硫辛酸对白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用[J]. 安徽医药, 2021, 25(1): 57-63. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.01.015.

◇临床医学◇



α -硫辛酸对白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用

邓慧琳^a, 杨婧^a, 郭俐^b

作者单位: 南充市中心医院, ^a风湿免疫科, ^b神经内科, 四川 南充 637000

摘要: **目的** 探讨 α -硫辛酸(ALA)调控微小RNA-877(miR-877)/N-myc下游调节基因2(NDRG2)分子轴对白细胞介素1 β (IL-1 β)诱导的软骨细胞损伤的影响及其机制。**方法** 本研究于2019年1月至2019年7月在南充市中心医院风湿免疫科实验室完成。分离培养SD大鼠膝关节软骨细胞,按照随机数字表法分为对照(Con)组、IL-1 β 组、IL-1 β +ALA-低剂量(L)组、IL-1 β +ALA-中剂量(M)组、IL-1 β +ALA-高剂量(H)组、IL-1 β +miRNA抑制物阴性对照(anti-miR-NC)组、IL-1 β +miR-877抑制物(anti-miR-877)组、IL-1 β +空载体质粒(pcDNA)组和IL-1 β +NDRG2过表达质粒(pcDNA-NDRG2)组、IL-1 β +ALA+miRNA模拟物阴性对照(miR-NC)组和IL-1 β +ALA+miR-877组。流式细胞术检测细胞凋亡,酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)的分泌量,蛋白质印记(western blot)法检测NDRG2蛋白的表达水平,实时定量PCR(qRT-PCR)检测miR-877和NDRG2 mRNA的表达水平。双荧光素酶报告基因实验和western blot检测miR-877和NDRG2的靶向调控关系。**结果** 与Con组比较,IL-1 β 组软骨细胞IL-6[(3.27 $\pm$ 0.31)比(1.06 $\pm$ 0.09)ng/L]、TNF- α 、IFN- γ 的分泌增加,miR-877[(2.65 $\pm$ 0.24)比(1.02 $\pm$ 0.09)]表达升高,NDRG2[(0.21 $\pm$ 0.03)比(0.69 $\pm$ 0.06)]表达降低,细胞凋亡率[(0.69 $\pm$ 0.06)比(6.24 $\pm$ 0.63)%]升高(均 $P < 0.05$);与IL-1 β 组比较,IL-1 β +ALA-L组、IL-1 β +ALA-M组、IL-1 β +ALA-H组软骨细胞IL-6[(2.91 $\pm$ 0.25), (2.33 $\pm$ 0.23), (1.65 $\pm$ 0.16)比(3.27 $\pm$ 0.31)ng/L]、TNF- α 、IFN- γ 的分泌降低,miR-877[(2.21 $\pm$ 0.19), (1.96 $\pm$ 0.17), (1.43 $\pm$ 0.14)比(2.65 $\pm$ 0.24)]的表达降低,NDRG2[(0.34 $\pm$ 0.03), (0.46 $\pm$ 0.04), (0.58 $\pm$ 0.05)比(0.21 $\pm$ 0.03)]表达升高,细胞凋亡率[(20.13 $\pm$ 2.12), (16.32 $\pm$ 1.63), (11.04 $\pm$ 1.15)比(27.62 $\pm$ 2.43)%]降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与IL-1 β +anti-miR-NC组比较,IL-1 β +anti-miR-877组软骨细胞IL-6[(1.38 $\pm$ 0.14)比(3.34 $\pm$ 0.33)ng/L]、TNF- α 、IFN- γ 的分泌降低,细胞凋亡率[(12.54 $\pm$ 1.25)比(27.14 $\pm$ 2.73)%]降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与IL-1 β +pcDNA组比较,IL-1 β +pcDNA-NDRG2组软骨细胞IL-6[(1.43 $\pm$ 0.15)比(3.47 $\pm$ 0.34)ng/L]、TNF- α 、IFN- γ 的分泌降低,细胞凋亡率[(13.55 $\pm$ 1.35)比(28.14 $\pm$ 2.83)%]降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与IL-1 β +ALA+miR-NC组相比,IL-1 β +ALA+miR-877组软骨细胞IL-6[(3.01 $\pm$ 0.29)比(1.42 $\pm$ 0.13)ng/L]、TNF- α 、IFN- γ 的分泌升高,细胞凋亡率[(25.47 $\pm$ 2.53)比(11.68 $\pm$ 1.87)%]增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** α -硫辛酸能够减轻IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤,其机制与调控miR-877/NDRG2通路有关。

关键词: 硫辛酸; 微小RNA-877; 基因,myc; N-myc下游调节基因2; 软骨细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素类; 细胞凋亡; 大鼠,Sprague-Dawley

Induction of IL-1 β by α -lipoic acid protective effect of chondrocyte injury

DENG Huilin^a, YANG Jing^a, GUO Li^b

Author Affiliation: ^aDepartment of Rheumatology and Immunology, ^bDepartment of Neurology, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of α -lipoic acid (ALA) on the interleukin 1 β (IL-1 β)-induced chondrocyte injury induced by regulating microRNA-877 (miR-877) /Downstream regulatory gene 2 of N-myc (NDRG2) molecular axis and its mechanism. **Methods** The experiment was completed in the Laboratory of Rheumatology and Immunology of Nanchong Central Hospital from January 2019 to July 2019. SD rats were purchased from Hunan Slack Jingda Experimental Animal Co., Ltd. Isolated and cultured chondrocytes in vitro were divided into control (Con) group, IL-1 β group, IL-1 β +ALA low dose-(L) group, IL-1 β +ALA medium dose (M) group, IL-1 β +ALA high dose (H) group. IL-1 β +negative control of miRNA inhibitor (anti-miR-NC) group, IL-1 β +miR-877 inhibitor (anti-miR-877) group, IL-1 β + empty vector plasmid (pcDNA) group and IL-1 β +NDRG2 overexpression plasmid (pcDNA-NDRG2) group, IL-1 β +ALA+ negative control of miRNA mimics (miR-NC) group and IL-1 β +ALA+miR-877 group according to the random number table method. Apoptosis was detected by flow cytometry, the secretion of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, the expression NDRG2 protein were detected by Western blot, and the expression levels of NDRG2 mRNA and miR-877 were de-

tected by Real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The dual luciferase reporter gene assay and western blot were used to detect the targeted regulatory relationship between miR-877 and NDRG2. **Results** Compared with the Con group, the secretion of IL-6 (3.27 ± 0.31 vs. 1.06 ± 0.09) ng/L, TNF- α and IFN- γ in chondrocytes of IL-1 β group increased, the expression of miR-877 (2.65 ± 0.24 vs. 1.02 ± 0.09) increased, and the expression of NDRG2 (0.21 ± 0.03 vs. 0.69 ± 0.06) decreased, the apoptotic rate (0.69 ± 0.06 vs. 6.24 ± 0.63)% increased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); Compared with IL-1 β group, the secretion of IL-6 (2.91 ± 0.25 , 2.33 ± 0.23 , 1.65 ± 0.16 vs. 3.27 ± 0.31) ng/L, TNF- α and IFN- γ in chondrocytes of IL-1 β +ALA-L group, IL-1 β +ALA-M group, IL-1 β +ALA-H group decreased, the expression of miR-877 (2.21 ± 0.19 , 1.96 ± 0.17 , 1.43 ± 0.14 vs. 2.65 ± 0.24) decreased, the expression of NDRG2 (0.34 ± 0.03 , 0.46 ± 0.04 , 0.58 ± 0.05 vs. 0.21 ± 0.03) increased, and the apoptosis rate (20.13 ± 2.12 , 16.32 ± 1.63 , 11.04 ± 1.15 vs. 27.62 ± 2.43)% decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with IL-1 β +anti-miR-NC group, the secretion of IL-6 (1.38 ± 0.14 vs. 3.34 ± 0.33) ng/L, TNF- α and IFN- γ in chondrocytes of IL-1 β +anti-miR-877 group decreased, and the apoptosis (12.54 ± 1.25 vs. 27.14 ± 2.73)% rate decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with IL-1 β +pcDNA group, the secretion of IL-6 (1.43 ± 0.15 vs. 3.47 ± 0.34) ng/L, TNF- α and IFN- γ in chondrocytes of IL-1 β +pcDNA-NDRG2 group decreased, and the apoptosis rate (13.55 ± 1.35 vs. 28.14 ± 2.83)% decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with IL-1 β +ALA+miR-NC group, the secretion of IL-6 (3.01 ± 0.29 vs. 1.42 ± 0.13) ng/L, TNF- α and IFN- γ in chondrocytes of IL-1 β +ALA+miR-877 group increased, and the apoptosis rate (25.47 ± 2.53 vs. 11.68 ± 1.87)% increased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** α -lipoic acid could attenuate IL-1 β -induced chondrocyte injury, and its mechanism is related to the regulation of miR-877/NDRG2 pathway.

Key words: Thioctic acid; miR-877; Genes, myc; NDRG2; Chondrocytes; Tumor necrosis factor- α ; Interleukins; Apoptosis; Rats, Sprague-Dawley

类风湿关节炎(RA)影响全球约1%的人口健康,是世界各国普遍关注的健康问题和经济问题^[1-2]。研究显示, α -硫辛酸在白细胞介素1 β (IL-1 β)诱导的软骨细胞模型中发挥抗炎作用,对骨关节炎软骨细胞损伤具有保护作用^[3],但其作用机制尚未完全阐明。近年来,微小RNA(miRNA)因其广泛参与增殖、凋亡、炎症和免疫等生物学和生物学过程而受到广泛关注。例如,在II型胶原诱导的RA大鼠模型中,微小RNA-26a(miR-26a)的表达下调,上调miR-26a可以减轻软骨损伤,刺激细胞增殖,抑制软骨细胞凋亡^[4];微小RNA-23a(miR-23a)通过抑制核因子 κ B激酶抑制剂(IKK α)表达抑制RA软骨细胞的炎症反应^[5]。微小RNA-877-5p(miR-877-5p)是miRNA家族成员之一,研究发现,在阿司匹林所致的人胃黏膜上皮细胞损伤中miR-877-5p表达上调,抑制miR-877-5p表达能够减轻阿司匹林所致胃黏膜上皮细胞损伤^[6]。N-myc下游调节基因2(NDRG2)隶属于NDRG基因家族的成员,与骨发育密切相关^[7]。研究发现,TNF- α 刺激人类风湿性关节炎滑膜细胞可降低细胞中NDRG2的蛋白水平^[8]。生物信息学分析显示,NDRG2是miR-877的潜在靶基因,但 α -硫辛酸和miR-877-5p对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响,以及 α -硫辛酸能否通过调控miR-877/NDRG2表达影响IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤目前还尚未可知。因此,本研究以IL-1 β 诱导的软骨细胞模拟RA软

骨细胞损伤模型,分析 α -硫辛酸对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响,初步探索其可能的分子机制,以为 α -硫辛酸在RA的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 一般材料 本研究于2019年1月至2019年7月在南充市中心医院风湿免疫科实验室完成。8只(4周龄)SPF级雄性SD大鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司;IL-1 β 购自美国Sigma公司; α -硫辛酸(CAS号:1077-28-7;纯度:BR,99%)购于上海源叶生物技术有限公司;杜尔伯格氏伊戈尔培养基(DMEM)和胎牛血清购于hyclone公司;聚合酶链式反应(PCR)引物、miRNA模拟物阴性对照(miR-NC)、miR-877模拟物(mimics)、miRNA抑制物阴性对照(anti-miR-NC)、miR-877抑制物(anti-miR-877)、NDRG2野生型荧光素酶报告载体(WT-NDRG2)和NDRG2突变型荧光素酶报告载体(MUT-NDRG2)的构建和测序由北京华大基因公司提供;Trizol试剂、放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液、蛋白质印迹(Western)封闭液、洗涤液均购于上海碧云天公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和干扰素 γ (IFN- γ)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购于武汉艾美捷科技有限公司;兔源B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)单克隆抗体、兔源Bcl相关X蛋白(Bax)多克隆抗体、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗

体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔Ⅱ抗购于Abcam公司;鼠源NDRG2单克隆抗体和HRP标记的羊抗鼠Ⅱ抗购于Santa Cruz公司。

1.2 大鼠膝关节软骨细胞分离及培养 取8只SPF级SD大鼠,麻醉处死后,无菌条件刮取膝关节软骨,经2 g/L的Ⅱ型胶原酶消化处理4 h,分离软骨细胞,用含有10%胎牛血清的DMEM培养基进行体外培养。

1.3 细胞分组和处理 将同一批次生长良好的第二代关节软骨细胞以 2×10^5 个/孔接种到6孔板,采用随机数字表随机分为Con组(正常培养的软骨细胞)、IL-1 β 组(用含10 ng/mL的IL-1 β 的细胞培养液处理,构建软骨细胞损伤模型)、IL-1 β +ALA-L组(用含10 ng/mL的IL-1 β 和0.1 μ mol/L的 α -硫辛酸的细胞培养液处理)、IL-1 β +ALA-M组(用含10 ng/mL的IL-1 β 和1 μ mol/L的 α -硫辛酸的细胞培养液处理)、IL-1 β +ALA-H组(用含10 ng/mL的IL-1 β 和10 μ mol/L的 α -硫辛酸的细胞培养液处理)、IL-1 β +anti-miR-NC组(转染anti-miR-NC后,用含10 ng/mL的IL-1 β 细胞培养液处理)、IL-1 β +anti-miR-877组(转染anti-miR-877后,用含10 ng/mL的IL-1 β 细胞培养液处理)、IL-1 β +pcDNA组(转染pcDNA后,用含10 ng/mL的IL-1 β 细胞培养液处理)和IL-1 β +pcDNA-NDRG2组(转染pcDNA-NDRG2后,用含10 ng/mL的IL-1 β 细胞培养液处理)。干预处理时间为48 h。为进一步验证 α -硫辛酸是通过调控miR-877/NDRG2通路进而影响IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤,把miR-NC和miR-877 mimics分别转染软骨细胞后,用含10 ng/mL的IL-1 β 和10 μ mol/L的 α -硫辛酸的细胞培养液干预处理,标记为IL-1 β +ALA+miR-NC组和IL-1 β +ALA+miR-877组,并进行后续分析。建模IL-1 β 浓度参考文献[9], α -硫辛酸浓度梯度设定参考文献[10]。

1.4 qRT-PCR检测 收集按照“1.3”进行相应干预处理的各组软骨细胞,经PBS液漂洗后,利用Trizol试剂于冰上提取总RNA,逆转录为cDNA后,以cDNA为模板进行qPCR扩增。分别以U6和GAPDH为内参基因,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-877和NDRG2 mRNA的相对表达量。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 收集按照“1.3”进行相应干预处理的各组细胞,用预冷的PBS液洗涤细胞,离心弃去上清液,用1×Binding Buffer重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。取100 μ L细胞悬液加入流式管内,再加入5 μ L的Annexin V-FITC,混匀后,室温避光孵育10 min,加入5 μ L的PI染液,

继续孵育5 min后,补加PBS至500 μ L,轻轻混匀后,进行上机检测。

1.6 试剂盒检测IL-6、TNF- α 和IFN- γ 的含量 收集1.3进行相应干预处理的细胞培养液,按照ELISA试剂盒说明书操作步骤进行。

1.6.1 蛋白质印迹法检测蛋白表达情况 收集按照“1.3”进行相应干预处理的各组细胞,经PBS漂洗后,离心弃取上清液,用适量预冷的RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度,按照1:4比例加入5×蛋白上样缓冲液,混匀后,煮沸3~5 min使细胞蛋白变性;取30 μ g蛋白样品上样进行SDS-PAGE凝胶电泳;电泳结束后,进行常规湿法转膜(PVDF);转膜结束后,加入Western封闭液室温条件封闭1 h;Western洗涤液漂洗10 min,漂洗3次,加入已稀释的NDRG2(1:500)、Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:500)以及GAPDH(1:2 500) I抗室温孵育2 h;Western洗涤液漂洗10 min,漂洗3次;加入Ⅱ抗室温孵育1 h;Western洗涤液再次洗膜后,进行ECL显影;Image J软件分析目的条带灰度值(以GAPDH为内参)。

1.6.2 双荧光素酶报告基因实验 利用生物信息软件对miR-877的靶基因进行预测,发现miR-877与NDRG2能够特异性结合,猜测NDRG2是miR-877的靶基因,并进行验证。构建野生型WT-NDRG2和突变型MUT-NDRG2的NDRG2-3'UTR荧光素酶报告基因载体,利用Lipofectamine™ 2000将miR-877 mimics和miR-NC分别与WT-NDRG2和MUT-NDRG21共转染软骨细胞,培养48 h后,利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组细胞的荧光素酶活性。

1.7 统计学方法 利用SPSS 20.0学软件进行统计学分析,两组间比较采用独立样本 t 检验进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,之后组间两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -硫辛酸对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响 与Con组比较,IL-1 β 组软骨细胞促炎因子IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌增加,抗凋亡蛋白Bcl-2的表达降低,促凋亡蛋白Bax的表达升高,细胞凋亡率升高;与IL-1 β 组比较,IL-1 β +ALA-L组、IL-1 β +ALA-M组和IL-1 β +ALA-H组软骨细胞IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌降低,Bcl-2蛋白的表达升高,Bax蛋白的表达降低,细胞凋亡率降低,且随着 α -硫辛酸浓度的增加,细胞凋亡率逐步降低($P < 0.05$)。见表1。以上

表1 α -硫辛酸对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响/ $\bar{x} \pm s$

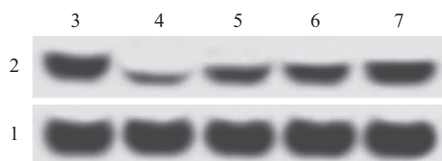
组别	重复次数	IL-6/(ng/L)	TNF- α /(ng/L)	IFN- γ /(ng/L)	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
Con	9	1.06 $\pm$ 0.09	2.17 $\pm$ 0.19	5.79 $\pm$ 0.58	6.24 $\pm$ 0.63	0.68 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.03
IL-1 β	9	3.27 $\pm$ 0.31 ^①	13.06 $\pm$ 1.14 ^①	21.36 $\pm$ 2.18 ^①	27.62 $\pm$ 2.43 ^①	0.25 $\pm$ 0.02 ^①	0.75 $\pm$ 0.07 ^①
IL-1 β +ALA-L	9	2.91 $\pm$ 0.25 ^②	9.87 $\pm$ 0.88 ^②	17.45 $\pm$ 1.47 ^②	20.13 $\pm$ 2.12 ^②	0.36 $\pm$ 0.03 ^②	0.63 $\pm$ 0.06 ^②
IL-1 β +ALA-M	9	2.33 $\pm$ 0.23 ^{②③}	7.29 $\pm$ 0.73 ^{②③}	12.48 $\pm$ 1.54 ^{②③}	16.32 $\pm$ 1.63 ^{②③}	0.47 $\pm$ 0.04 ^{②③}	0.52 $\pm$ 0.05 ^{②③}
IL-1 β +ALA-H	9	1.65 $\pm$ 0.16 ^{②③④}	4.58 $\pm$ 0.44 ^{②③④}	8.06 $\pm$ 0.81 ^{②③④}	11.04 $\pm$ 1.15 ^{②③④}	0.58 $\pm$ 0.05 ^{②③④}	0.43 $\pm$ 0.04 ^{②③④}
F 值		149.495	291.319	182.088	206.853	145.850	97.400
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Con 为对照组, IL-1 β 为白细胞介素 1 β 组, IL-1 β +ALA-L 为白细胞介素-1 β 低剂量硫辛酸组, IL-1 β +ALA-M 为白细胞介素-1 β 中剂量硫辛酸组, IL-1 β +ALA-H 为白细胞介素-1 β 高剂量硫辛酸组, IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子 α , IFN- γ 为干扰素 γ , Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白, Bax 为 Bcl 相关 X 蛋白。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 IL-1 β 组比较, $P < 0.05$ 。③与 IL-1 β +ALA-L 组比较, $P < 0.05$ 。④与 IL-1 β +ALA-M 组比较, $P < 0.05$ 。

结果表明, IL-1 β 可诱导软骨细胞损伤, α -硫辛酸对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤具有保护作用。

2.2 α -硫辛酸对 IL-1 β 诱导的软骨细胞中 miR-877 和 NDRG2 表达的影响 图 1 和表 2 显示, 与 Con 组比较, IL-1 β 组软骨细胞 miR-877 的表达水平升高, NDRG2 mRNA 和 NDRG2 蛋白的表达水平降低; 与 IL-1 β 组比较, IL-1 β +ALA-L 组、IL-1 β +ALA-M 组和 IL-1 β +ALA-H 组软骨细胞 miR-877 的表达水平降低, NDRG2 mRNA 和 NDRG2 蛋白的表达水平升高, 且随着 α -硫辛酸浓度的增加, miR-877 的表达水平



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—N-myc 下游调节基因 2; 3—对照组; 4—白细胞介素 1 β 组; 5—白细胞介素 1 β 低剂量硫辛酸组; 6—白细胞介素 1 β 中剂量硫辛酸组; 7—白细胞介素 1 β 高剂量硫辛酸组。

图1 NDRG2蛋白免疫印迹图

表2 α -硫辛酸对IL-1 β 诱导的软骨细胞中miR-877和NDRG2表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

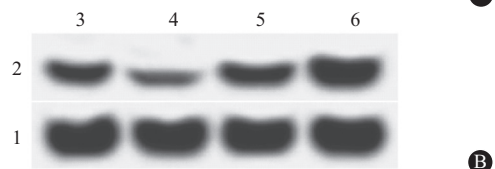
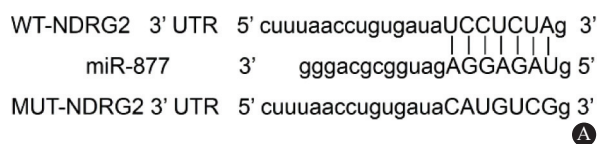
组别	重复次数	miR-877	NDRG2 mRNA	NDRG2蛋白
Con	9	1.02 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.06
IL-1 β	9	2.65 $\pm$ 0.24 ^①	0.37 $\pm$ 0.04 ^①	0.21 $\pm$ 0.03 ^①
IL-1 β +ALA-L	9	2.21 $\pm$ 0.19 ^②	0.51 $\pm$ 0.05 ^②	0.34 $\pm$ 0.03 ^②
IL-1 β +ALA-M	9	1.96 $\pm$ 0.17 ^{②③}	0.68 $\pm$ 0.04 ^{②③}	0.46 $\pm$ 0.04 ^{②③}
IL-1 β +ALA-H	9	1.43 $\pm$ 0.14 ^{②③④}	0.89 $\pm$ 0.07 ^{②③④}	0.58 $\pm$ 0.05 ^{②③④}
F 值		123.273	163.035	170.668
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Con 为对照组, IL-1 β 为白细胞介素 1 β 组, IL-1 β +ALA-L 为白细胞介素 1 β 低剂量硫辛酸组, IL-1 β +ALA-M 为白细胞介素 1 β 中剂量硫辛酸组, IL-1 β +ALA-H 为白细胞介素 1 β 高剂量硫辛酸组, NDRG2 为 N-myc 下游调节基因 2。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 IL-1 β 组比较, $P < 0.05$ 。③与 IL-1 β +ALA-L 组比较, $P < 0.05$ 。④与 IL-1 β +ALA-M 组比较, $P < 0.05$ 。

逐渐降低, NDRG2 的表达水平逐渐升高 ($P < 0.05$)。以上结果表明, α -硫辛酸可抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞中 miR-877 的表达, 促进 NDRG2 表达。

2.3 miR-877 靶向调控 NDRG2 的表达 利用生物信息学软件预测 miR-877 靶基因显示, miR-877 和 NDRG2 存在部分连续的结合位点, 见图 2A。表 3 显示, 与 miR-NC 和 WT-NDRG2 共转染组相比, miR-877 和 WT-NDRG2 共转染组软骨细胞的荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$); 与 miR-NC 和 MUT-NDRG2 共转染组相比, miR-877 和 MUT-NDRG2 共转染组软骨细胞的荧光素酶活性变化无统计学意义。图 2B 显示, 与 miR-NC 组比较, miR-877 组软骨细胞中 NDRG2 蛋白表达量显著降低 [(0.23 $\pm$ 0.03) 比 (0.65 $\pm$ 0.06), $P < 0.05$]; 与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-877 组软骨细胞中 NDRG2 蛋白表达量显著升高 [(0.98 $\pm$ 0.08) 比 (0.63 $\pm$ 0.05), $P < 0.05$]。以上结果表明, NDRG2 是 miR-877 的靶基因, miR-877 可负性调控 NDRG2 的表达。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—N-myc 下游调节基因 2; 3—下游调节基因 2; 4—微小 RNA-877; 5—为抑制物阴性对照; 6—RNA-877 抑制物。

图2 miR-877 靶向调控 NDRG2 的表达: A 为 NDRG2 的 3' UTR 序列中含有与 miR-877 互补的核苷酸序列; B 为 NDRG2 蛋白免疫印迹 (WT-NDRG2 为野生型 NDRG2 荧光素酶报告载体, MUT-NDRG2 为 NDRG2 为突变型 NDRG2 荧光素酶报告载体)

2.4 抑制 miR-877 表达对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响 表 4 和图 3 显示, 与 Con 组比较, IL-1 β

表3 双荧光素酶报告实验/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	WT-NDRG2	MUT-NDRG2
miR-NC	9	1.02±0.09	1.00±0.08
miR-877	9	0.37±0.03	0.99±0.09
t 值		20.555	0.249
P 值		<0.001	0.806

注: miR-877 为微小 RNA-877 模拟物; miR-NC 为 miRNA 模拟物阴性对照; WT-NDRG2 为野生型 NDRG2 荧光素酶报告载体; MUT-NDRG2 为 NDRG2 突变型 NDRG2 荧光素酶报告载体。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—Bcl 相关 X 蛋白; 3—B 淋巴细胞瘤-2 蛋白; 4—对照组; 5—白细胞介素-1 β 组; 6—白细胞介素-1 β +miRNA 抑制物阴性对照组; 7—白细胞介素-1 β +miR-877 抑制物组。

图3 凋亡相关蛋白表达

组软骨细胞 miR-877 的表达水平升高, IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌增加, Bcl-2 蛋白的表达水平降低, Bax 蛋白的表达水平升高, 细胞凋亡率增加; 与 IL-1 β +

anti-miR-NC 组相比, IL-1 β +anti-miR-877 组软骨细胞 miR-877 的表达水平降低, IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌减少, Bcl-2 蛋白的表达水平升高, Bax 蛋白的表达水平降低, 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。表明, 抑制 miR-877 表达可减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤。

2.5 NDRG2 过表达对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响 表 5 和图 4 显示, 与 Con 组比较, IL-1 β 组软骨细胞 NDRG2 蛋白的表达水平降低, IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌增加, Bcl-2 蛋白的表达水平降低, Bax 蛋白的表达水平升高, 细胞凋亡率增加; 与 IL-1 β +pcDNA 组比较, IL-1 β +pcDNA-NDRG2 组软骨细胞 NDRG2 蛋白的表达水平升高, IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌减少, Bcl-2 蛋白的表达水平升高, Bax 蛋白的表达水平降低, 细胞凋亡率减少 ($P < 0.05$)。这表明, 过表达 NDRG2 可减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤。

2.6 过表达 miR-877 逆转了 α -硫辛酸对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的作用 表 6 和图 5 显示, 与 IL-1 β 组比较, IL-1 β +ALA 组软骨细胞 miR-877 的表达降低, NDRG2 蛋白的表达升高, IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌降低, Bcl-2 蛋白的表达升高, Bax 蛋白的表达

表4 抑制 miR-877 表达对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-877	IL-6/(ng/L)	TNF- α /(ng/L)	IFN- γ /(ng/L)	凋亡率/%	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Con	9	1.00±0.09	1.03±0.09	2.14±0.21	5.51±0.52	7.21±0.71	0.65±0.06	0.32±0.02
IL-1 β	9	2.67±0.26 ^①	3.31±0.29 ^①	13.15±1.32 ^①	20.36±2.17 ^①	26.47±2.62 ^①	0.24±0.03 ^①	0.75±0.07 [*]
IL-1 β +anti-miR-NC	9	2.71±0.27	3.34±0.33	13.48±1.35	20.48±2.34	27.14±2.73	0.23±0.03	0.77±0.06
IL-1 β +anti-miR-877	9	1.65±0.16 ^②	1.38±0.14 ^②	4.14±0.42 ^②	8.12±0.87 ^②	12.54±1.25 ^②	0.54±0.05 ^②	0.43±0.04 ^②
F 值		142.958	247.726	334.713	201.762	220.500	206.127	176.543
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Con 为对照组, IL-1 β 为白细胞介素-1 β 组, IL-1 β +anti-miR-NC 为白细胞介素-1 β +miRNA 抑制物阴性对照组, IL-1 β +anti-miR-877 为白细胞介素-1 β +miR-877 抑制物组, IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子 α , IFN- γ 为干扰素 γ , Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白, Bax 为 Bcl 相关 X 蛋白。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 IL-1 β +anti-miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

表5 NDRG2 过表达对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	NDRG2 蛋白	IL-6/(ng/L)	TNF- α /(ng/L)	IFN- γ /(ng/L)	凋亡率/%	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
Con	9	0.67±0.06	1.06±0.11	2.46±0.25	5.49±0.54	6.87±0.69	0.66±0.06	0.33±0.03
IL-1 β	9	0.26±0.03 ^①	3.38±0.33 ^①	14.29±1.43 ^①	21.42±2.14 ^①	26.54±2.68 ^①	0.23±0.03 ^①	0.74±0.07 ^①
IL-1 β +pcDNA	9	0.24±0.02	3.47±0.34	14.98±1.44	21.98±2.21	28.14±2.83	0.21±0.02	0.76±0.06
IL-1 β +pcDNA-NDRG2	9	0.56±0.05 ^②	1.43±0.15 ^②	4.68±0.39 ^②	9.76±0.98 ^②	13.55±1.35 ^②	0.51±0.05 ^②	0.48±0.04 ^b
F 值		226.176	223.461	346.550	232.234	217.516	234.608	142.336
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Con 为对照组, IL-1 β 为白细胞介素-1 β 组, IL-1 β +pcDNA 为白细胞介素-1 β +空载体质粒组, IL-1 β +pcDNA-NDRG2 为白细胞介素-1 β +NDRG2 过表达质粒, NDRG2 为 N-myc 下游调节基因 2, IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子 α , IFN- γ 为干扰素 γ , Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白, Bax 为 Bcl 相关 X 蛋白。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 IL-1 β +pcDNA 组比较, $P < 0.05$ 。

表6 miR-877过表达逆转了 α -硫辛酸(10 μ mol/L)对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-877	NDRG2蛋白	IL-6/(ng/L)	TNF- α /(ng/L)	IFN- γ /(ng/L)	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
IL-1 β	9	1.03 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.03	3.38 $\pm$ 0.33	13.15 $\pm$ 0.13	22.14 $\pm$ 0.23	28.43 $\pm$ 2.15	0.24 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.07
IL-1 β +ALA	9	0.46 $\pm$ 0.04 ^①	0.67 $\pm$ 0.06 ^①	1.43 $\pm$ 0.14 ^①	4.32 $\pm$ 0.45 ^①	8.36 $\pm$ 0.84 ^①	12.46 $\pm$ 1.28 ^①	0.59 $\pm$ 0.05 ^①	0.38 $\pm$ 0.03 ^①
IL-1 β +ALA+miR-NC	9	0.44 $\pm$ 0.05	0.69 $\pm$ 0.06	1.42 $\pm$ 0.13	4.28 $\pm$ 0.43	8.24 $\pm$ 0.87	11.68 $\pm$ 1.87	0.62 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.04
IL-1 β +ALA+miR-877	9	0.83 $\pm$ 0.08 ^②	0.36 $\pm$ 0.03 ^②	3.01 $\pm$ 0.29 ^②	10.28 $\pm$ 1.06 ^②	18.43 $\pm$ 1.78 ^②	25.47 $\pm$ 2.53 ^②	0.35 $\pm$ 0.04 ^②	0.65 $\pm$ 0.05 ^②
F值		177.941	209.167	167.394	464.178	385.660	167.909	143.163	149.091
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

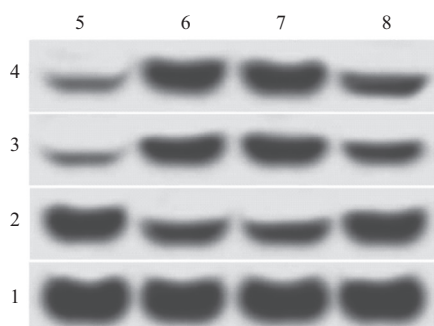
注:IL-1 β 为白细胞介素1 β ,IL-1 β +ALA为白细胞介素1 β + α -硫辛酸,IL-1 β +ALA+miR-NC为白细胞介素1 β + α -硫辛酸+miRNA模拟物阴性对照,IL-1 β +ALA+miR-877为白细胞介素1 β + α -硫辛酸+miR-877模拟物,NDRG2为N-myc下游调节基因2,IL-6为白细胞介素6,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ,IFN- γ 为干扰素 γ ,Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2蛋白,Bax为Bcl相关X蛋白,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

①与IL-1 β 组比较, $P < 0.05$ 。②与IL-1 β +ALA+miR-NC组比较, $P < 0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—Bclm相关X蛋白;3—B淋巴细胞瘤-2蛋白;4—N-myc下游调节基因2;5—对照组;6—白细胞介素1 β 组;7—白细胞介素1 β +空载体质粒组;8—白细胞介素1 β +NDRG2过表达质粒。

图4 NDRG2和凋亡相关蛋白免疫印迹图



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—Bcl相关X蛋白;3—B淋巴细胞瘤-2蛋白;4—N-myc下游调节基因2;5—白细胞介素1 β ;6—白细胞介素1 β + α -硫辛酸;7—白细胞介素1 β + α -硫辛酸+miRNA模拟物阴性对照;8—白细胞介素1 β + α -硫辛酸+miR-877模拟物。

图5 NDRG2和凋亡相关蛋白免疫印迹图

降低,细胞凋亡率降低;与IL-1 β +ALA+miR-NC组比较,IL-1 β +ALA+miR-877组软骨细胞miR-877的表达升高,NDRG2蛋白的表达降低,IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌升高,Bcl-2蛋白的表达降低,Bax蛋白的表达升高,细胞凋亡率增加。表明,过表达miR-877能够逆转 α -硫辛酸对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用。

3 讨论

α -硫辛酸是一种天然存在的硫醇抗氧化剂,它不仅在糖尿病方面有广泛的临床应用,而且在心血管疾病和肝肾疾病中也有广泛的应用^[11-12]。最近的研究表明, α -硫辛酸通过抑制IRF-1的转录活性发挥抗炎作用,从而对IL-1 β 诱导的软骨细胞具有保护作用^[3]; α -硫辛酸还可增加牛油果和大豆非皂化物对体外培养的软骨细胞的抗炎活性^[13]。此外, α -硫辛酸还可抑制NF- κ B通路活化,抑制TNF- α 分泌,对碘乙酸钠诱导的骨关节炎大鼠软骨细胞具有保护作用^[14]。本研究发现, α -硫辛酸呈浓度依赖性地抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌,抑制Bax的表达,促进Bcl-2的表达,抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,发挥保护作用,这与Sun等^[3]的研究结论相一致。同时,本研究发现 α -硫辛酸呈浓度依赖性地抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞miR-877的表达,促进NDRG2表达。此外,双荧光素酶报告基因实验和western blot检测显示,miR-877可负性调控NDRG2的表达。因此,推测 α -硫辛酸对IL-1 β 诱导的软骨细胞的保护作用可能与miR-877/NDRG2分子轴的异常表达有关。

近年来,随着对miRNA研究的不断深入,miRNA与细胞凋亡、损伤的联系越来越清晰。前人研究发现,miR-877参与多种细胞的凋亡过程,在X射线引起的视网膜神经节细胞损伤中,miR-877表达上调,miR-877通过调控其靶基因参与视网膜神经节细胞的放射损伤过程^[15];同时,miR-877表达上调还参与曲伐沙星等多种药物诱导的肝损伤过程^[16-17];此外,下调miR-877表达对阿司匹林所诱导的胃黏膜细胞损伤具有保护作用^[6]。本研究发现,抑制miR-877表达可抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞中IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌,降低Bax的表达,增加Bcl-2的表达,抑制细胞凋亡。提示抑制miR-877表

达与 α -硫辛酸对IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的保护作用一致。

NDRG 基因家族包括 NDRG1、NDRG2、NDRG3 和 NDRG4 四个家族成员,是近年发现的一类细胞内信号分子。NDRG2 基因定位于染色体 14q11.2 位点,作为一种抑癌基因,NDRG2 基因的表达缺失与结肠癌^[18]、胃癌^[19]等恶性肿瘤的发生密切相关。同时,NDRG2 还可在应激条件下发生改变,影响细胞的生理和病理过程。在大鼠心肌缺血再灌注损伤中 NDRG2 表达下调^[20];在肺缺血再灌注损伤中,过表达 NDRG2 可抑制炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达,抑制病理组织的炎性改变^[21]。本研究发现,过表达 NDRG2 可抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞炎性因子 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的分泌,降低 Bax 的表达,增加 Bcl-2 的表达,抑制细胞凋亡。提示 miR-877/NDRG2 分子轴参与对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的调控。为进一步验证 α -硫辛酸对调控 miR-877/NDRG2 分子轴对 IL-1 β 诱导的软骨细胞发挥保护作用,将 miR-877 转染软骨细胞,经 IL-1 β 诱导和 α -硫辛酸干预处理后,发现 miR-877 过表达可逆转 α -硫辛酸对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤的影响。提示, α -硫辛酸通过调控 miR-877/NDRG2 通路对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤具有保护作用,在 RA 等炎症相关关节疾病的预防和治疗中具有科研前景。

综上所述, α -硫辛酸通过减弱炎症反应,抑制细胞凋亡,对 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤具有保护作用,其机制与调控 miR-877/NDRG2 通路有关。本研究的发现为 α -硫辛酸在 RA 的临床应用奠定了理论基础。

参考文献

- [1] EL MIEDANY Y. Co-morbidity index in rheumatoid arthritis: time to think[J]. Clin Rheumatol, 2015, 34(12): 1995-2000.
- [2] KOENDERS MI, VAN DEN BERG WB. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, 36(4): 189-195.
- [3] SUN T, GAO F, LIN X, et al. α -Lipoic acid (α -LA) inhibits the transcriptional activity of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) via SUMOylation[J]. Toxicol In Vitro, 2014, 28(7): 1242-1248.
- [4] JIANG L, CAO S. Role of microRNA-26a in cartilage injury and chondrocyte proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis rats by regulating expression of CTGF[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 979-992.
- [5] HU J, ZHAI C, HU J, et al. MiR-23a inhibited IL-17-mediated pro-inflammatory mediators expression via targeting IKK α in articular chondrocytes[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 43: 1-6.
- [6] 韩维维, 谈路轩, 李超, 等. 瑞巴派特通过抑制 miR-877-5p 的表达减轻阿司匹林对人胃黏膜上皮细胞损伤的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2018, 27(6): 661-665.
- [7] 朱煌. NdrG2 基因在小鼠脊椎骨发育过程中的功能研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
- [8] 程欣. NdrG2 在类风湿性关节炎中的作用初步研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2006.
- [9] 林燕云, 游纯秋, 蒋擎, 等. 独活寄生汤抑制白细胞介素-1 β 诱导的软骨细胞凋亡的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(7): 1702-1705.
- [10] 施红敏, 韦晟. α -硫辛酸注射液对过氧化氢致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(6): 450-453.
- [11] SAYGIN M, ASCI H, CANKARA FN, et al. The impact of high fructose on cardiovascular system: role of α -lipoic acid[J]. Hum Exp Toxicol, 2016, 35(2): 194-204.
- [12] ZHANG J, MCCULLOUGH PA. Lipoic acid in the prevention of acute kidney injury[J]. Nephron, 2016, 134(3): 133-140.
- [13] FRONDOZA CG, FORTUNO LV, GRZANNA MW, et al. α -Lipoic acid potentiates the anti-inflammatory activity of avocado/soybean unsaponifiables in chondrocyte cultures[J]. Cartilage, 2018, 9(3): 304-312.
- [14] WANG J, SUN H, FU Z, et al. Chondroprotective effects of Alpha-lipoic acid in a rat model of osteoarthritis[J]. Free Radic Res, 2016, 50(7): 767-780.
- [15] 朱美娟. 视网膜神经节细胞放射损伤后 miRNAs 的差异表达及靶基因预测[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [16] MITSUGI R, ITOH T, FUJIWARA R. MicroRNA-877-5p is involved in the trovafloxacin-induced liver injury[J]. Toxicol Lett, 2016, 263: 34-43.
- [17] YAMASHITA Y, ASAKURA M, MITSUGI R, et al. MicroRNA expression in the vildagliptin-treated two- and three-dimensional HepG2 cells[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2016, 31(3): 201-209.
- [18] HONG SN, KIM SJ, KIM ER, et al. Epigenetic silencing of NDRG2 promotes colorectal cancer proliferation and invasion[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(1): 164-171.
- [19] OU XW, WANG RX, KANG MF, et al. Hypoxia promotes migration and invasion of gastric cancer cells by activating HIF-1 α and inhibiting NDRG2 associated signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(23): 8237-8247.
- [20] 孙中婵, 沈岚, 孙冬冬, 等. NDRG2 在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的表达[J]. 心脏杂志, 2010, 22(4): 529-532.
- [21] 陈家宽, 王荣, 李建忠, 等. N-myc 下游调节基因-2 过表达对大鼠肺缺血再灌注损伤的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(15): 2816-2819.

(收稿日期: 2019-08-28, 修回日期: 2020-09-14)