

引用本文:张海英,郑晨颖.膝骨关节炎关节液和滑膜中微小RNA-140-5p的表达及临床意义[J].安徽医药,2022,26(6):1179-1182.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.028.

◇临床医学◇



膝骨关节炎关节液和滑膜中微小RNA-140-5p的表达及临床意义

张海英¹,郑晨颖²

作者单位:¹北京中医药大学东方医院骨科,北京100078;

²北京中医药大学东直门医院骨科,北京100700

摘要: 目的 研究膝骨关节炎(KOA)病人关节液和滑膜中微小RNA(miR)-140-5p的表达及临床意义。方法 选取2018年5月至2019年5月于北京中医药大学东方医院就诊的51例KOA病人为观察组,依据凯尔格伦-劳伦斯(K-L)分级标准将观察组分为3个亚组:KOA II组(12例)、KOA III组(24例)、KOA IV组(15例),另外选取55例同期该院因骨折、截肢等手术治疗的无骨关节炎病人作为对照组。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测并比较各组关节液和滑膜中miR-140-5p的表达,分析miR-140-5p与KOA病情进展的关系;采用受试者工作曲线(ROC)分析miR-140-5p对KOA的诊断价值。结果 观察组关节液(0.51±0.16)、滑膜(0.67±0.21)中miR-140-5p均比对照组[(1.08±0.38)、(1.54±0.35)]低($P<0.05$);KOA II组、KOA III组、KOA IV组相比,关节液[(0.65±0.17)、(0.51±0.14)、(0.42±0.12)]、滑膜[(0.86±0.22)、(0.69±0.15)、(0.49±0.13)]中miR-140-5p均呈依次降低趋势,两两相比差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman相关性分析结果显示,KOA病人关节液、滑膜中miR-140-5p与K-L分级均呈负相关($P<0.05$);ROC结果显示,关节液、滑膜miR-140-5p诊断KOA的曲线下面积(AUC)分别为0.913、0.931,截断值分别是0.78、1.05,灵敏度、特异度、准确度、约登指数、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为98.04%、78.18%、87.74%、0.76、80.65%、97.73%、4.49、0.03;96.08%、89.09%、92.45%、0.85、89.09%、96.08%、8.81、0.04。结论 miR-140-5p在KOA病人关节液及滑膜中均呈低表达,与K-L分级均呈负相关,可能成为KOA病人病情发展的监测指标及治疗靶点。

关键词: 骨关节炎,膝; 关节液; 滑膜; 微小RNA-140-5p

Expression and clinical significance of miR-140-5p in synovial fluid and synovium of knee osteoarthritis

ZHANG Haiying¹, ZHENG Chenying²

Author Affiliations:¹Department of Orthopedics, Dongfang Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China; ²Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To study the expression and clinical significance of microRNA-140-5p (miR-140-5p) in synovial fluid and synovium of patients with knee osteoarthritis (KOA). **Methods** A total of 51 patients with KOA treated in Dongfang Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine from May 2018 to May 2019 were selected as the observation group. According to the Kelgren Lawrence (K-L) classification standard, the observation group was divided into three subgroups: KOA II group (12 cases), KOA III group (24 cases), KOA IV group (15 cases). In addition, 55 patients without osteoarthritis treated by fracture and amputation in the hospital in the same period were selected as the control group. The expression of miR-140-5p in synovial fluid and synovium of each group was detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), the relationship between miR-140-5p and the progression of KOA was analyzed; and the diagnostic value of miR-140-5p to KOA was analyzed by receiver operating characteristic curve (ROC). **Results** MiR-140-5p in synovial fluid (0.51±0.16) and synovium (0.67±0.21) of the KOA group was lower than that of the control group [(1.08±0.38), (1.54±0.35)] ($P<0.05$); miR-140-5p in synovial fluid [(0.65±0.17), (0.51±0.14), 0.42±0.12] and synovium [(0.86±0.22), (0.69±0.15), (0.49±0.13)] in KOA II group, KOA III group and KOA IV group decreased in turn, the differences between any two groups were statistically significant ($P<0.05$); Spearman's results showed that miR-140-5p in synovial fluid and synovium of KOA patients were negatively correlated with K-L grading ($P<0.05$); the results of ROC showed that the areas under the curve (AUC) for diagnosing KOA were 0.913 and 0.931 ($P<0.05$), respectively, the cutoff values were 0.78 and 1.05, respectively, and the sensitivity, specificity, accuracy, Youden index, positive predictive value, negative predictive value, positive likelihood ratio and negative likelihood ratio were 98.04%, 78.18%, 87.74%, 0.76, 80.65%, 97.73%, 4.49, 0.03; 96.08%, 89.09%, 92.45%,

0.85, 89.09%, 96.08%, 8.81, 0.04, respectively. **Conclusion** The miR-140-5p shows low expression in joint fluid and synovium of patients with KOA, and is negatively correlated with K-L grade, which may become a monitoring index and treatment target for the development of KOA patients.

Key words: Osteoarthritis, knee; Synovial fluid; Synovium; MicroRNA-140-5p

骨关节炎是多发于中老年的退行性疾病,随着人口老龄化的加剧,骨关节炎的发病率有持续上升的趋势,骨关节炎以关节疼痛、活动功能受限等为临床表现,严重影响病人日常生活质量,目前发病机制尚未阐明^[1]。当前骨关节炎诊断主要依靠以软骨形态学变化为基础的磁共振成像、超声检查及关节镜技术,存在滞后性、创伤性等限制,确诊时骨关节炎病人关节软骨往往已经发生不同程度损伤,因此寻找骨关节炎的有效早期诊断指标对于早期干预以延缓病情,预防关节发生不可逆的退变是非常重要的^[2-3]。微小RNA(microRNA, miRNA/miR)是机体内源性非编码单链RNA,可在转录后水平调控其靶基因的表达,与多种自身免疫疾病有关,已有研究表明miR-140-5p在关节炎病人外周血、关节液中表达异常^[4-5],膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)病人滑膜中的miR-140-5p的研究较少。本研究旨在探讨KOA病人关节液、滑膜中miR-140-5p的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取北京中医药大学东方医院2018年5月至2019年5月收治的51例进行膝关节镜或关节置换术治疗的KOA病人为观察组,年龄范围为41~75岁。依据凯尔格伦-劳伦斯(Kellgren-Lawrence, K-L)X线影像学分级标准将观察组分为3个亚组:KOA II组(12例)、KOA III组(24例)、KOA IV组(15例),其中II级为明确骨赘;III级为多发骨赘,伴关节间隙中度变窄;IV级为巨大骨赘,伴关节间隙严重变窄及软骨下骨硬化^[6]。纳入标准:(1)符合中华医学会制定的KOA诊断标准^[7];(2)K-L分级为II~IV级;(3)近3个月未经药物治疗;(4)近3个月无膝关节外伤。排除标准:(1)合并心、肝、肾等重要器官疾病者;(2)合并其他自身免疫性疾病者;(3)妊娠、哺乳期妇女。另外选取在该院进行截肢手术或因急性损伤进行关节镜治疗的55例无骨关节炎病人作为对照组,年龄范围为43~73岁。观察组、对照组均于术中收集关节液及滑膜,所有标本均在手术室进行预处理,后置于-80℃超低温冰箱中保存待测。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反

应(qRT-PCR)检测关节液和滑膜中miR-140-5p(仪器:Roche LightCycler 480 II型)。关节液离心(2 000 r/min, 10 min)去除细胞与组织碎片,上清液于-80℃保存待测;术中收集的滑膜放入无菌管中,置入液氮中速冻,后在-80℃超低温冰箱保存待测。采用Trizol法提取总RNA,反转录为互补DNA(cDNA),进行扩增反应,反应条件:95℃预变性30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40个循环,miR-140-5p正向引物:5'-TGTGTCTCTCTCTGTGTCCTG-3',反向引物:5'-GGTATCCTGTCCGTGGTTCTA-3',U6正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物:5'-AAC-GCTTCACGAATTTGCGT-3',试剂盒均购于上海生工生物工程有限公司,严格按照说明书操作。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算关节液和滑膜中miR-140-5p的表达。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用两独立样本 t 检验,三组间差异比较采用单因素方差分析,进一步多组间的两两比较采用LSD法;计数资料以例表示,采用 χ^2 检验比较;采用Spearman相关性分析检验两变量的相关关系;采用受试者工作特征(ROC)曲线探讨关节液、滑膜中miR-140-5p对KOA的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 两组性别、年龄、体质量指数相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 对照组(无骨关节炎)与观察组(膝骨关节炎)一般资料比较

组别	例数	性别(男/女)/例	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	体质量指数/(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)
对照组	55	26/29	55.68±6.87	22.81±3.25
观察组	51	23/28	54.47±7.28	23.13±3.48
$t(\chi^2)$ 值		(0.05)	0.88	0.49
P 值		0.822	0.381	0.625

2.2 两组关节液、滑膜中miR-140-5p表达比较 对照组关节液和滑膜中miR-140-5p表达量分别为(1.08±0.38)、(1.54±0.35),观察组关节液和滑膜中miR-140-5p表达量分别为(0.51±0.16)、(0.67±0.21)。与对照组相比,观察组关节液、滑膜中miR-140-5p表达均较低($t=8.88, P < 0.001$; $t=15.37, P < 0.001$)。

2.3 观察组各亚组关节液、滑膜中 miR-140-5p 表达比较 与 KOA II 组相比, KOA III 组、KOA IV 组关节液、滑膜中 miR-140-5p 均较低 ($P<0.05$), 与 KOA III 组相比, KOA IV 组关节液、滑膜中 miR-140-5p 均较低 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 观察组(膝关节关节炎)各亚组关节液、滑膜中 miR-140-5p 表达比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-140-5p	
		关节液	滑膜
KOA II 组	12	0.65±0.17	0.86±0.22
KOA III 组	24	0.51±0.14 ^①	0.69±0.15 ^①
KOA IV 组	15	0.42±0.12 ^{①②}	0.49±0.13 ^{①②}
F 值		8.77	17.33
P 值		0.001	<0.001

注: KOA 为膝关节关节炎。

①与 KOA II 组相比, $P<0.05$ 。②与 KOA III 组相比, $P<0.05$ 。

2.4 KOA 病人关节液、滑膜 miR-140-5p 与 K-L 分级相关性分析 Spearman 分析结果显示, KOA 病人关节液、滑膜 miR-140-5p 与 K-L 分级均呈负相关 ($r=-0.56, P<0.001; r=-0.68, P<0.001$)。

2.5 关节液、滑膜 miR-140-5p 对 KOA 的诊断价值 ROC 结果显示, 关节液、滑膜 miR-140-5p 诊断 KOA 的曲线下面积 (AUC) 95%CI 分别为 0.913 (0.855, 0.972)、0.931 (0.873, 0.988), 截断值分别是 0.78、1.05, 灵敏度、特异度、准确度、约登指数、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为 98.04%、78.18%、87.74%、0.76、80.65%、97.73%、4.49、0.03、96.08%、89.09%、92.45%、0.85、89.09%、96.08%、8.81、0.04。

3 讨论

骨关节炎以软骨退变、滑膜炎症为主要特点, 发病呈进行性发展, KOA 是最常见类型^[8-9]。软骨组织由软骨细胞、软骨细胞外基质组成, KOA 的病理过程主要是关节软骨细胞外基质合成与降解功能失衡, 引起软骨细胞凋亡, 最终导致软骨退变、丢失及软骨下骨硬化^[10]。软骨细胞外基质由软骨组织唯一细胞类型软骨细胞表达分泌, 主要由蛋白聚糖、II 型胶原蛋白组成, 对软骨维持正常功能起重要作用, 已有研究表明骨关节炎病人基质金属蛋白酶 (MMP)-13 呈高表达, 对蛋白聚糖、II 型胶原蛋白有强降解功能, 带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-5 (a disintegrating and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS-5) 在降解蛋白聚糖中起到重要作用^[11-12]。有研究从 RNA 表达层面对 KOA 的发病机制作出阐述, 报道表明 β -连环素 (β -catenin) 与核因子- κ B

(NF- κ B) 信号通路可能通过共同调控下游炎症因子白细胞介素 (IL)-1 β 的表达参与滑膜炎症反应^[13]。

miRNAs 可通过调控转录后基因表达参与机体炎症反应、肿瘤、心血管疾病等, 一个 miRNA 可调控多达上百个靶基因的表达^[14]。已有研究表明 miRNA 在多种类型关节炎病人中呈异常表达^[4, 15-16], miR-140 由 miR-140-3p、miR-140-5p 组成, 具有调控软骨稳态的作用, 与关节炎的发生密切相关^[5]。韩朝永^[17]研究发现, 与健康对照者相比, KOA 病人关节液中 miR-140 呈低表达, 与 K-L 分级存在相关性。殷春明、潘晓华^[18]研究表明, miR-140-3p 参与骨关节炎的发生, 与病情发展呈负相关。滑膜成纤维细胞的主要生理作用是为关节腔提供营养物质, 以及为周围软骨提供润滑环境, 类风湿关节炎病人滑膜增生、炎症因子过量蓄积。程龙等^[19]研究发现, 在体外将 miR-140-5p 以脂质体 2000 为载体转染到类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中, 滑膜成纤维细胞的促炎性因子 Toll 样受体 4 表达降低, 致使滑膜成纤维细胞增殖及侵袭能力降低。本研究发现, 与对照组相比, 观察组关节液、滑膜中 miR-140-5p 均呈低表达; KOA II 组、KOA III 组、KOA IV 组相比, 关节液、滑膜中 miR-140-5p 表达均依次降低; Spearman 相关性分析显示, KOA 病人关节液、滑膜中 miR-140-5p 的表达与 K-L 分级均呈负相关, 提示关节液、滑膜中 miR-140-5p 与 KOA 病程发展密切相关, 可能成为 KOA 的生物标志物、治疗新靶点, 分析原因是 miR-140-5p 可能通过靶向调控软骨细胞外基质降解因子 MMP-13、ADAMTS-5 的表达^[20], 参与 KOA 的发生、发展。MMP-13、ADAMTS-5 与 KOA 的研究广泛。祁雷等^[21]研究发现, 与假手术组相比, KOA 模型大鼠关节软骨组织中 MMP-13、ADAMTS-5 表达均呈现先升高后降低现象, 与软骨退化过程密切相关。黄恺等^[22]研究发现, 与注射 0.9% 氯化钠注射液的兔骨关节炎模型相比, 经黄连素治疗的模型软骨病变程度较轻, 软骨组织中 MMP-13、ADAMTS-5 表达均较低, 蛋白聚糖、II 型胶原表达较高。滑膜的退行性病变也是 KOA 的重要病理变化。羊鹏飞等^[23]研究表明, 非骨关节炎病人、轻度骨关节炎病人、中度骨关节炎病人相比, 滑膜组织中 MMP-3、半乳糖凝集素 3 阳性表达率依次升高, 与中度骨关节炎病人相比, 中度骨关节炎病人滑膜组织中半乳糖凝集素 3 阳性表达率较高。MMP-3、半乳糖凝集素 3 阳性表达率均与随病情加重而增加, 在骨关节炎的发生及病情发展中发挥作用。本研究中, ROC 结果显示, 关节液、滑膜 miR-140-5p 诊断 KOA 的 AUC 95%CI 分别为 0.913 (0.855, 0.972)、0.931 (0.873,

0.988),截断值分别是0.78、1.05,灵敏度、特异度、准确度、约登指数、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为98.04%、78.18%、87.74%、0.76、80.65%、97.73%、4.49、0.03、96.08%、89.09%、92.45%、0.85、89.09%、96.08%、8.81、0.04,可见关节液、滑膜中miR-140-5p对KOA均有一定诊断价值,或可成为临床潜在诊断指标。

综上所述,KOA病人与非关节炎对照相比,关节液、滑膜中miR-140-5p均呈低表达,与K-L分级均呈负相关,miR-140-5p可能成为KOA的临床监测指标以及治疗靶点,具体调节机制尚需进一步研究探讨。

参考文献

- [1] HAUGEN IK, MAGNUSSON K, TURKIEWICZ A, et al. The prevalence, incidence, and progression of hand osteoarthritis in relation to body mass index, smoking, and alcohol consumption [J]. *J Rheumatol*, 2017, 44(9):1402-1409.
- [2] LI K, CAVAGNAC E, CHEN H, et al. Is knee arthroscopy beneficial in treating traumatic meniscal tears on patients older than 60 years[J]. *J Knee Surg*, 2017, 31(7):635-641.
- [3] 谢洋,李苏皖,张国桥,等.关节镜手术联合口服中药膝痛康方治疗膝骨关节炎临床研究[J]. *安徽医药*, 2019, 23(4):751-753.
- [4] PALMA AD, CHELESCHI S, PASCARELLI NA, et al. Do microRNAs have a key epigenetic role in osteoarthritis and in mechanotransduction[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2017, 35(3):518-526.
- [5] 程龙,徐五琴,张鹏,等.miR-140-5p调控类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和侵袭机制的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(3):345-349.
- [6] MISIR A, YILDIZ KI, KIZKAPAN TB, et al. Kellgren-Lawrence grade of osteoarthritis is associated with change in certain morphological parameters[J]. *Knee*, 2020, 27(3):633-641.
- [7] 中华医学会骨科学分会关节外科学组.骨关节炎诊疗指南(2018年版)[J]. *中华骨科杂志*, 2018, 38(12):705-715.
- [8] PENGAS I, ELDRIDGE S, ASSIOTIS A, et al. MMP-3 in the peripheral serum as a biomarker of knee osteoarthritis, 40 years after open total knee meniscectomy [J]. *J Exp Orthop*, 2018, 5(21):21-28.
- [9] 贾朗,谭波涛,陈锦云.低强度脉冲聚焦超声治疗膝骨关节炎的安全性和有效性[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2020, 40(5):633-638.
- [10] SIMENTAL-MENDÍA M, VILCHEZ-CAVAZOS F, GARCÍA-GARZA R, et al. The matrix synthesis and anti-inflammatory effect of autologous leukocyte-poor platelet rich plasma in human cartilage explants[J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(6):609-618.
- [11] ISAKA S, SOMEYA A, NAKAMURA S, et al. Evaluation of the effect of oral administration of collagen peptides on an experimental rat osteoarthritis model [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6):2699-2706.
- [12] PÉREZ-GARCÍA S, GUTIÉRREZ-CAÑAS I, SEOANE IV, et al. Healthy and osteoarthritic synovial fibroblasts produce a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4, 5, 7, and 12: induction by IL-1 β and fibronectin and contribution to cartilage damage[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(9):2449-2461.
- [13] 张栋,王庆甫,张晓哲,等. β -catenin与NF- κ B信号通路在膝骨关节炎滑膜炎中的表达特点及意义[J]. *中国骨伤*, 2019, 32(8):721-726.
- [14] HIJMANS JG, DIEHL KJ, BMMERT TD, et al. Association between hypertension and circulating vascular-related microRNAs [J]. *J Hum Hypertens*, 2018, 32(6):440-447.
- [15] KONG RN, GAO J, SI YH, et al. Combination of circulating miR-19b-3p, miR-122-5p and miR-486-5p expressions correlates with risk and disease severity of knee osteoarthritis [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6):2852-2864.
- [16] 郑锡铭,娄峻.RA患者外周血及关节液中miR-132、miR-140-5p、miR-150及miR-181a表达水平的临床意义[J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(3):362-366.
- [17] 韩朝永.膝骨关节炎患者关节液中miR-140的表达及其临床意义[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(13):1422-1424.
- [18] 殷春明,潘晓华.膝骨关节炎患者关节液中miR-140-3p表达可反映骨关节炎进程[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(35):5277-5283.
- [19] 程龙,徐五琴,张鹏,等.miR-140-5p调控类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和侵袭机制的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(3):345-349.
- [20] 陈国材,姚楠,刘文刚,等.补肾活血方含药血清对退变型人原代软骨细胞microRNA表达谱的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(5):1086-1089,后插5.
- [21] 祁雷,姚运峰,李子煜,等.大鼠骨关节炎模型的建立及软骨组织中MMP-13和ADAMTS-5的表达[J]. *局解手术学杂志*, 2018, 27(3):157-163.
- [22] 黄恺,蔡海丽,张建方,等.黄连素抑制兔骨关节炎软骨基质金属蛋白酶-13及血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-5表达保护软骨基质的实验研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2016, 20(8):514-519,前插1.
- [23] 羊鹏飞,高鹏,李跃军,等.骨关节炎患者滑膜组织中基质金属蛋白酶3和半乳糖凝集素3的表达及相关性[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(23):3616-3622.

(收稿日期:2020-05-06,修回日期:2020-06-24)