

人滑膜间充质干细胞外泌体中 miR-429 修复骨关节炎软骨损伤的作用初探

周孙欣^{1,2}, 霍娜², 李红坤^{1,2}, 王恒心^{1,2}, 李帅臣^{1,2}, 许诺^{1,2}, 李天琪³, 孟祥博⁴, 张彤^{2*}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心口腔科, 北京 100853; ³武警福建总队医院口腔科, 福建福州 350000; ⁴解放军联勤保障部队第927医院口腔科, 云南普洱 665000

[中图分类号] R782.6 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1947.2025.0317

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 周孙欣, 霍娜, 李红坤, 等. 人滑膜间充质干细胞外泌体中 miR-429 修复骨关节炎软骨损伤的作用初探[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(7): 882-889.

[收稿日期] 2024-11-28 [录用日期] 2024-12-30 [上线日期] 2025-03-17

[摘要] 目的 通过提取人滑膜组织中滑膜间充质干细胞来源外泌体(SMSC-Exos), 结合转录组测序筛选差异表达微RNA(miRNA), 并验证目的miRNA在颞下颌关节骨关节炎(TMJ OA)软骨修复中的关键功能作用。方法 人滑膜组织均取自2023年6—12月解放军总医院第一医学中心收治的6例膝关节手术患者, 其中骨关节炎组(OA组)3例、对照组3例, 均为男性; 提取滑膜组织中的SMSC-Exos进行miRNA测序并作差异分析, 进一步对差异表达的miRNA靶基因进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 以筛选关键的功能性miRNA, 并构建miRNA-靶基因调控网络及靶基因蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。体外构建白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导的兔髌突软骨细胞炎症微环境模型, 对照组采用DMEM/F12基础培养基、炎症诱导组采用含10 ng/ml IL-1 β 的DMEM/F12基础培养基培养。采用RT-qPCR检测在炎症模型中过表达的目标miRNA对软骨表型因子II型胶原 α 1链(*Col2a1*)、蛋白多糖(*Acan*), 以及炎症因子人金属肽酶含血小板反应蛋白基元5(*Adamts5*)、环氧合酶-2(*Cox-2*)mRNA表达的影响。结果 (1)成功分离、培养、鉴定后获得SMSC-Exos; (2)对OA组与对照组患者SMSC-Exos进行miRNA测序, 筛选出16个差异表达miRNAs(|log₂FC| > 2, P < 0.05), 与对照组比较, OA组7个miRNAs上调, 9个miRNAs下调。GO及KEGG分析显示, miR-429的靶基因主要参与发育过程、解剖结构发育、系统发育、细胞发育及分化等生物学过程, 并富集于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B(PI3K-Akt)等炎症相关通路; (3)在兔髌突软骨细胞炎症微环境模型中对miR-429进行功能验证, RT-qPCR检测结果显示, 过表达miR-429后, 炎症诱导组细胞中*Col2a1*、*Acan* mRNA表达水平升高(P < 0.05), *Adamts5*、*Cox-2* mRNA表达水平降低(P < 0.05)。结论 对基于人滑膜组织分离并鉴定的SMSC-Exos进行miRNA测序, 发现OA患者存在特异性miRNA表达谱, 其中miR-429显著下调; 功能验证表明过表达miR-429对炎症微环境下的髌突软骨细胞具有修复和抑制炎症的作用。

[关键词] 微小RNA; 颞下颌关节; 骨关节炎; 软骨; 关节; miR-429

Preliminary exploration of the role of miR-429 in human synovial mesenchymal stem cell-derived exosomes in repairing osteoarthritis cartilage damage

Zhou Sun-Xin^{1,2}, Huo Na², Li Hong-Kun^{1,2}, Wang Heng-Xin^{1,2}, Li Shuai-Chen^{1,2}, Xu Nuo^{1,2}, Li Tian-Qi³, Meng Xiang-Bo⁴, Zhang Tong^{2*}

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China

²Department of Stomatology, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

³Department of Stomatology, Fujian People's Armed Police Corps Hospital, Fuzhou, Fujian 350000, China

⁴Department of Stomatology, the 927th Hospital of the Joint Service Support Force of Chinese PLA, Puer, Yunnan 665000, China

[基金项目] 军队后勤科研项目(BKJWS221C002); 军队医学科技青年培育计划孵化项目(21QNYPY104)

[作者简介] 周孙欣, 硕士研究生, 主要从事颞下颌关节骨关节炎诊治方面的研究

[通信作者] 张彤, E-mail: kqzhengji301@163.com

*Corresponding author, E-mail: kqzhengji301@163.com

This work was supported by the Project of Military Logistics Research (BKJWS221C002), and the Project of Military Medical Science and Technology Youth Cultivation Plan (21QNPY104)

[Abstract] Objective To explore the role of miR-429 in synovial mesenchymal stem cell-derived exosomes (SMSC-Exos) in repairing cartilage damage in temporomandibular joint osteoarthritis (TMJ OA) by extracting SMSC-Exos from human synovial tissue and screening differentially expressed microRNA (miRNA) through transcriptome sequencing. **Methods** Human synovial tissues were obtained from 6 patients who underwent surgery at the First Medical Center of the Chinese PLA General Hospital from June to December 2023, including 3 patients with osteoarthritis (OA group) and 3 control patients (control group), all of whom were male. SMSC-Exos were extracted from the synovial tissues for miRNA sequencing and differential expression analysis. Further, Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed on the target genes of differentially expressed miRNA to identify key functional miRNA and construct miRNA-target gene regulatory networks and protein-protein interaction (PPI) networks of target genes. An *in vitro* model of rabbit condylar cartilage cell inflammatory microenvironment induced by interleukin-1 β (IL-1 β) was established, with the control group cultured in DMEM/F12 basic medium and the inflammation-induced group cultured in DMEM/F12 basic medium containing 10 ng/ml IL-1 β . RT-qPCR was used to detect the effects of overexpressed target miRNA on the mRNA expression levels of cartilage phenotype factors such as type II collagen α 1 chain (*Col2a1*), aggrecan (*Acan*), as well as inflammatory factors including a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (*Adamts5*) and cyclooxygenase-2 (*Cox-2*). **Results** (1) SMSC-Exos were successfully isolated, cultured, and identified. (2) miRNA sequencing of SMSC-Exos from OA and control groups revealed 16 differentially expressed miRNAs ($|\log_2FC| > 2, P < 0.05$). Compared with control group, 7 miRNAs were up-regulated and 9 were down-regulated in OA group. GO and KEGG analysis indicated that the target genes of miR-429 were mainly involved in development process, anatomical structure development, system development, cell development and differentiation, and were enriched in inflammation-related pathways such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B (PI3K-Akt). (3) Functional validation of miR-429 in the rabbit condylar cartilage cell inflammatory model showed that overexpression of miR-429 increased the mRNA expression levels of *Col2a1* and *Acan* ($P < 0.05$) and decreased the mRNA expression levels of *Adamts5* and *Cox-2* ($P < 0.05$) in the inflammation-induced group. **Conclusions** miRNA sequencing of SMSC-Exos isolated and identified from human synovial tissues reveals a specific miRNA expression profile in OA patients, with miR-429 significantly down-regulated. Functional validation demonstrates that overexpression of miR-429 has reparative and anti-inflammatory effects on condylar cartilage cells in an inflammatory microenvironment.

[Key words] microRNA; temporomandibular joint; osteoarthritis; cartilage, articular; miR-429

颞下颌关节骨关节炎 (temporomandibular joint osteoarthritis, TMJ OA) 是口腔颌面部的常见疾病, 主要表现为颞下颌关节的退行性改变。流行病学研究显示, TMJ OA 的发病率为 8%~35%, 占颞下颌关节紊乱性疾病的 8%~16%^[1-2]。TMJ OA 累及颞下颌关节软骨、软骨下骨及滑膜等, 其中关节软骨损伤是 TMJ OA 最主要的特征之一^[3-4], 抑制软骨损伤对逆转 OA 进程至关重要^[5]。临床上对 TMJ OA 主要采取以控制疼痛及炎症为目的的对症治疗, 目前尚无理想的治疗策略可修复及再生受损的关节软骨。

微 RNA (microRNA, miRNA) 是外泌体的重要内含成分, 参与介导细胞间通信及基因调节, 在癌症^[6-8]、心血管疾病^[9-10]、神经系统疾病^[11-12]等疾病的诊断、治疗及预后评估中发挥作用。在软骨修复方面, 迄今为止已发现 miR-140、miR-146、miR-34、miR-181、miR-27 等数十种 miRNAs 参与 OA 的软骨损伤修复, 调控包括炎症的发生发展及软骨细胞的凋亡、自噬、增殖等生物学过程^[13]。滑膜间充质干细胞 (synovial mesenchymal stem cells, SMSCs) 具有软骨修复的组织特异性^[14], 目前已有多项研究证实

SMSCs 及其外泌体 (synovial mesenchymal stem cell-derived exosomes, SMSC-Exos) 在抑制软骨细胞炎症、促进软骨形成及抑制软骨退变等方面发挥作用^[15-16], 而 OA 条件下 SMSCs 的软骨形成特性遭到破坏, 并最终导致软骨修复失败^[17], 其分子机制尚未明确。本研究比较了 OA 与非 OA 患者滑膜组织中 SMSC-Exos 的 miRNA 表达谱并进行差异分析, 旨在筛选出 SMSC-Exos 中可能参与 OA 软骨损伤修复的关键功能性 miRNAs, 为探索 SMSC-Exos 在 OA 治疗中的潜在机制提供新见解, 并有望为 TMJ OA 的临床治疗提供新的 miRNA 靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; 0.25% 胰蛋白酶-EDTA、磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自北京中科迈晨科技有限责任公司; 间充质干细胞无血清培养体系购自上海赛百慷生物技术股份有限公司; 成骨诱导试剂盒、成软骨诱导试剂盒、成脂诱导试剂盒、人间充质干细胞表面标记检测试剂盒购自广州赛业生物科技有限公

司; II型胶原酶购自美国Sigma公司; Trizol试剂购自美国Invitrogen公司; BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液、Lipofectamine™ RNAiMAX购自美国ThermoFisher公司; 反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司; 油红O染色试剂盒、0.2%茜素红染色液、甲苯胺蓝染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 阿利新蓝染色液购自上海碧云天生物技术股份有限公司; miR-429 mimics购自上海吉玛制药技术有限公司; 白细胞介素-1 β (IL-1 β)购自美国MCE公司; CD9、肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)一抗购自美国SBI公司; CD81、Calnexin一抗购自美国Immunoway公司。纳米粒度颗粒跟踪分析仪购自德国Particle Metrix公司; 纳米透射电镜购自美国FEI公司。

1.2 实验方法

1.2.1 组织样本采集 人滑膜组织取自2023年6—12月解放军总医院第一医学中心收治的6例膝关节手术患者, 其中骨关节炎组(OA组)3例、对照组3例, 均为男性。OA组滑膜组织取自OA患者, 排除类风湿性关节炎, 年龄42~48岁。对照组滑膜组织取自同期收治的半月板损伤患者, 排除膝关节疾病史, 年龄37~43岁。本研究已获解放军总医院伦理委员会审批(S2024-269-01)。

1.2.2 SMSCs的分离、培养与鉴定 将滑膜组织移入无菌操作台, 用含双抗PBS冲洗3次。无菌眼科剪去除结缔组织和脂肪, 并剪为1 mm³的碎片。将组织碎片均匀铺于培养皿中, 采用间充质干细胞培养体系进行培养。接种后每2 d进行半量换液, 倒置显微镜下观察细胞融合至80%时传代。取第3代SMSCs, 分别通过成骨、成脂、成软骨分化培养基诱导细胞分化, 并依次进行茜素红染色、油红O染色、阿利新蓝染色, 以鉴定SMSCs的三系分化能力。应用流式细胞术检测SMSCs的特异性表面标志物CD105、CD29、CD73、CD166、CD44、CD34、CD45、CD11b、CD14、人类白细胞抗原(HLA)-DR。

1.2.3 SMSC-Exos的分离、提取与鉴定 取第5代SMSCs, 待细胞融合至70%时, 换用去外泌体间充质干细胞培养基培养48 h并收集上清。采用差速离心法提取外泌体: 4℃下2000 \times g离心10 min, 10 000 \times g离心30 min, 110 000 \times g离心75 min, 弃上清并用1 \times PBS重悬沉淀, 过滤后再次以110 000 \times g离心75 min。重悬后分装并-80℃保存。取20 μ l外泌体样本滴加于铜网, 静置5 min, 吸干多余液体后滴加2%乙酸双氧铀, 孵育并干燥, 透射电镜下观察外泌体形态。采用纳米粒度跟踪分析仪检测粒径分布。取外泌体悬液20 μ l, 加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取蛋白, BCA法定量, Western blotting检测外泌

体标志物CD9、CD81、TSG101的表达水平。

1.2.4 miRNA高通量测序与差异miRNA筛选 使用Trizol试剂提取OA组及对照组的外泌体RNA, 构建miRNA测序文库, 应用Agilent 2100 Bioanalyzer测定文库质量。将文库变性为单链DNA分子, 在Illumina flow cell上捕获并原位扩增为簇。根据测序说明, 在Illumina测序仪上进行测序, 生成的原始数据进行测序质量控制及预处理过滤, 将处理后的数据与参考基因组比对。比对结果良好的数据进行miRNA表达定量分析及差异筛选。应用mirdeep2将测序数据与已知基因组数据对比, 设定表达量阈值为每分钟计数(counts per minute, CPM)均值 \geq 1, 各组统计分析后获得miRNA定量表达结果。应用edgeR, 设定2倍差异, $P \leq 0.05$ 为差异表达的miRNA。

1.2.5 生物信息学分析 应用TargetScan7.1 Mouse和miRDB预测差异miRNA靶基因, 两组数据取交集。使用R包对miRNA靶基因功能进行基因本体论(Gene Ontology, GO)及京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析, 筛选出与OA、软骨生长发育或炎症相关的miRNA。使用Cytoscape V2.8.3建立miRNA-靶基因调控网络, 筛选miR-429的关键靶基因。将靶基因映射至STRING数据库, 设置筛选条件为最低互作分数设为中等置信度0.4, 构建靶基因蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

1.2.6 兔颞下颌髁突软骨细胞的分离、培养与鉴定 本研究获解放军总医院实验动物伦理委员会审批(SQ2023665)。动物饲养严格遵照《实验动物管理条例》的要求, 操作符合3R原则。选取3周龄雄性新西兰兔[实验动物生产许可证号: SCXK(京)2024-0004], 切取双侧髁突并剥离软骨, 剪为1 mm³的碎片。使用0.25%胰蛋白酶+0.1% II型胶原酶消化30 min, 再用0.1% II型胶原酶消化30 min, 离心后重悬并接种于培养皿, 于第2、3、5天观察细胞迁移情况。待细胞汇合至80%时传代。第2代细胞接种12 h后弃培养液, PBS清洗2次, 进行甲苯胺蓝染色并在显微镜下观察。将细胞接种到预先放置盖玻片的培养皿中, 待细胞贴壁后取出盖玻片, PBS清洗后4%多聚甲醛溶液固定, 使用0.1% Triton通透, 3%牛血清白蛋白(BSA)封闭, 加入兔抗II型胶原抗体孵育过夜, 荧光二抗孵育1 h, 封片后在显微镜下观察II型胶原染色结果。

1.2.7 TMJ OA体外模型的建立 取第3代兔髁突软骨细胞接种培养48 h后进行转染, 使用Lipofectamine™ RNAiMAX分别将miR-429 mimics、NC mimics转染入细胞。转染36 h后对照组换液为DMEM/F12基础培养基、炎症诱导组换液为含10 ng/ml IL-1 β 的DMEM/F12

基础培养基，继续培养 48 h。

1.2.8 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测相关因子 mRNA 的表达 Trizol 法提取总 RNA，去除残留基因组 DNA 后将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s、6 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s，共 40 个循环。设置 4 个复孔，实验重复 3 次。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。引物序列见表 1。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计分析。所有数据均为计量资料，呈正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用双因素方差分析(two-way ANOVA)评估不同因素对结果的影响，进一步两两比较采用 Turkey-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SMSCs 形态观察及鉴定 倒置显微镜下观察第 3 代 SMSCs，细胞贴壁生长，呈梭形，符合间充质干细胞的形态特征(图 1A)。三系诱导分化结果显示，经成骨诱导分化 21 d，茜素红染色可见钙盐沉积；经成脂分化诱导 28 d，油红 O 染色可见细胞脂质；经成软骨诱导分化 14 d，微球切片进行阿利新蓝染色，可见 SMSCs 诱导后具有典型的软骨细胞形态。证实 SMSCs 有成骨、成脂、成软骨分化潜能(图 1B)。

表 1 RT-qPCR 引物序列

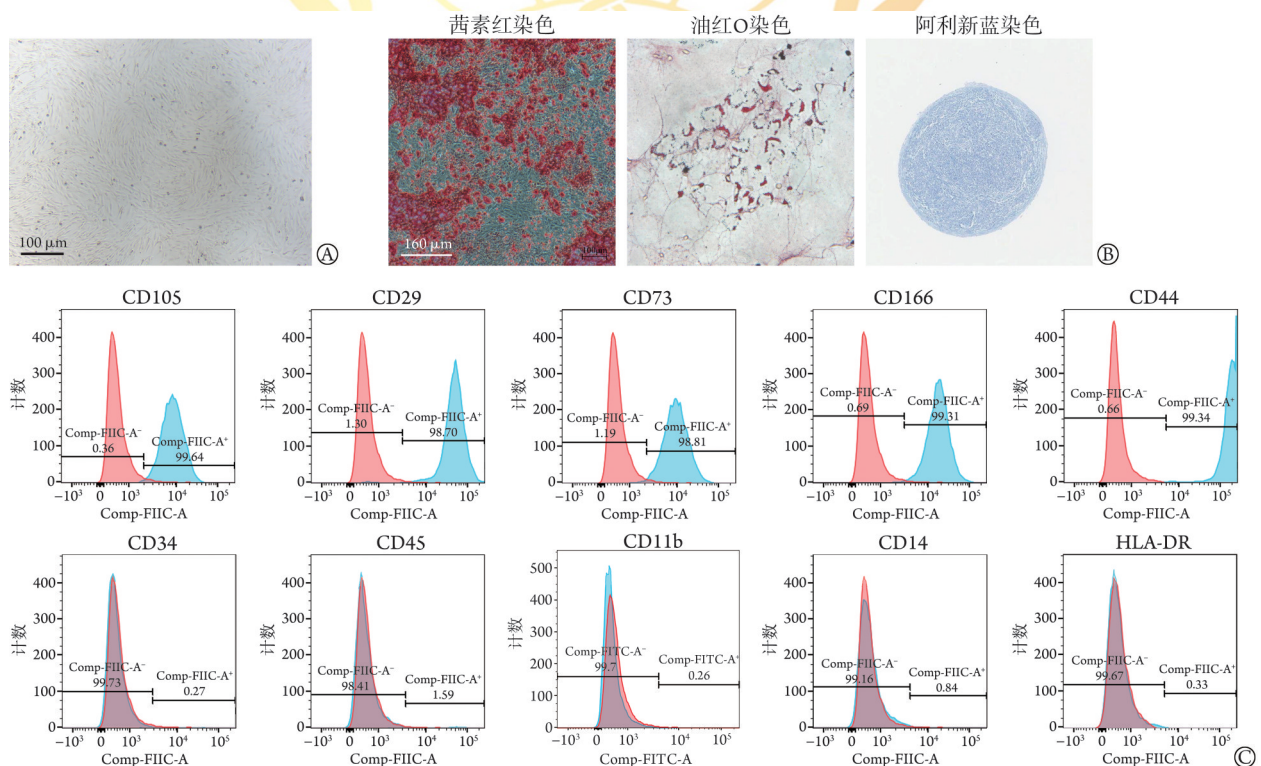
Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

基因	引物序列(5'-3')
hsa-miR-429	正义: CGACCCGACTAATACTGTCTGG
	反义: TATGCTTGTCTCGTCTCTGTGTC
U6	正义: CAGCACATATACTAAAATTGGAACG
	反义: ACGAATTTGCGGTGCATCC
Col2a1	正义: CTGTGCGACGACATAATCTGTG
	反义: CTCCTTTCTGCCCTTTGGTC
Acan	正义: ATGACGTGTACTGCTTCGCA
	反义: AGGTGAACCTCTCTGGCGAC
Adams5	正义: GGTTCCCAAATATGCAGGCG
	反义: TCACCTTTGGCGAGAAGACC
Cox-2	正义: CGTTTGGTGGAGAAGTCGGT
	反义: CAGCAGGACTGTGGGATTGA
Gapdh	正义: TGGTGAAGTCGGAGTGAAC
	反义: GCCGTGGGTGGAATCATACT

RT-qPCR. 实时荧光定量 PCR; Col2a1. II 型胶原 $\alpha 1$ 链; Acan. 蛋白多糖; Adams5. 人金属肽酶含血小板反应蛋白基元 5; Cox-2. 环氧化酶-2

采用流式细胞术对 SMSCs 的特异性表面标志物进行分析，结果显示，SMSCs 中 CD105、CD29、CD73、CD166、CD44 为阳性，而 CD34、CD45、CD11b、CD14、HLA-DR 为阴性(图 1C)，符合间充质干细胞的表型特征。

2.2 SMSC-Exos 形态观察及鉴定 透射电镜及纳米



SMSCs. 滑膜间充质干细胞; HLA-DR. 人类白细胞抗原-DR; A. 第 3 代 SMSCs 显微镜下形态; B. SMSCs 三系分化结果(左、中、右分别为茜素红成骨染色、油红 O 成脂染色、阿利新蓝成软骨染色); C. 流式细胞术分析 SMSCs 表面标志物

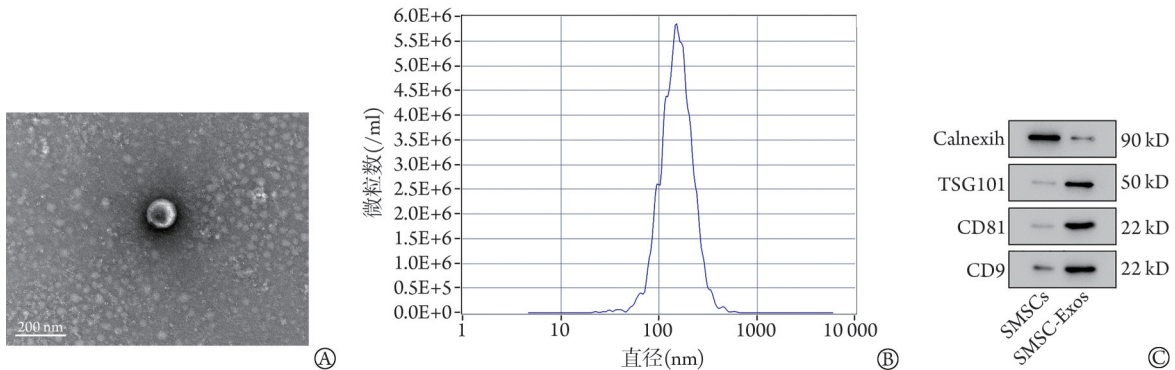
图 1 SMSCs 形态观察及鉴定

Fig.1 Morphological observation and identification of SMSCs

颗粒跟踪分析结果显示,分离得到的微粒直径范围为30~200 nm,形态为中空球形的微泡状(图2A、B)。Western blotting检测显示外泌体表面标志物TSG101、

CD81、CD9表达阳性,Calnexin表达阴性(图2C),提示分离得到的微粒为外泌体。

2.3 差异表达 miRNAs 的聚类分析 通过对对照组

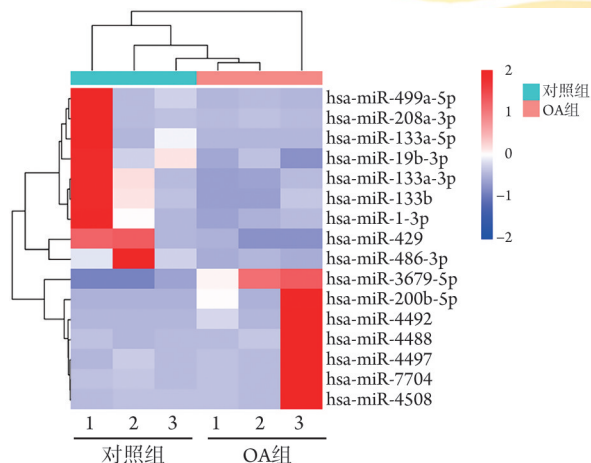


SMSCs.滑膜间充质干细胞; SMSC-Exos.滑膜间充质干细胞来源外泌体; A.透射电子显微镜下 SMSC-Exos 形态; B.纳米粒度跟踪分析仪 SMSC-Exos 粒径分布; C. Western blotting 检测 SMSC-Exos 特征性表面标志物 Calnexin、TSG101、CD81、CD9 的表达

图2 SMSC-Exos 形态观察及鉴定

Fig.2 Morphological observation and identification of SMSC-Exos

和 OA 组 SMSC-Exos 的 miRNA 测序,根据设定的筛选阈值 ($|\log_2FC| > 2$, $P < 0.05$) 对差异表达的全部 miRNAs 进行聚类分析,筛选出 16 个差异表达 miRNAs。与对照组比较,OA 组 7 个 miRNAs 上调,分别为 hsa-miR-3679-5p、hsa-miR-200b-5p、hsa-miR-4492、miR-4488、miR-4497、miR-7704、miR-4508; 9 个 miRNAs 下调,分别为 hsa-miR-429、hsa-miR-1-3p、hsa-miR-133b、miR-133a-3p、miR-19b-3p、miR-133a-5p、miR-208a-3p、miR-499a-5p、miR-486-3p(图3)。



SMSC-Exos.滑膜间充质干细胞来源外泌体; OA组.骨关节炎组

图3 OA组和对照组 SMSC-Exos 差异 miRNAs 聚类热图

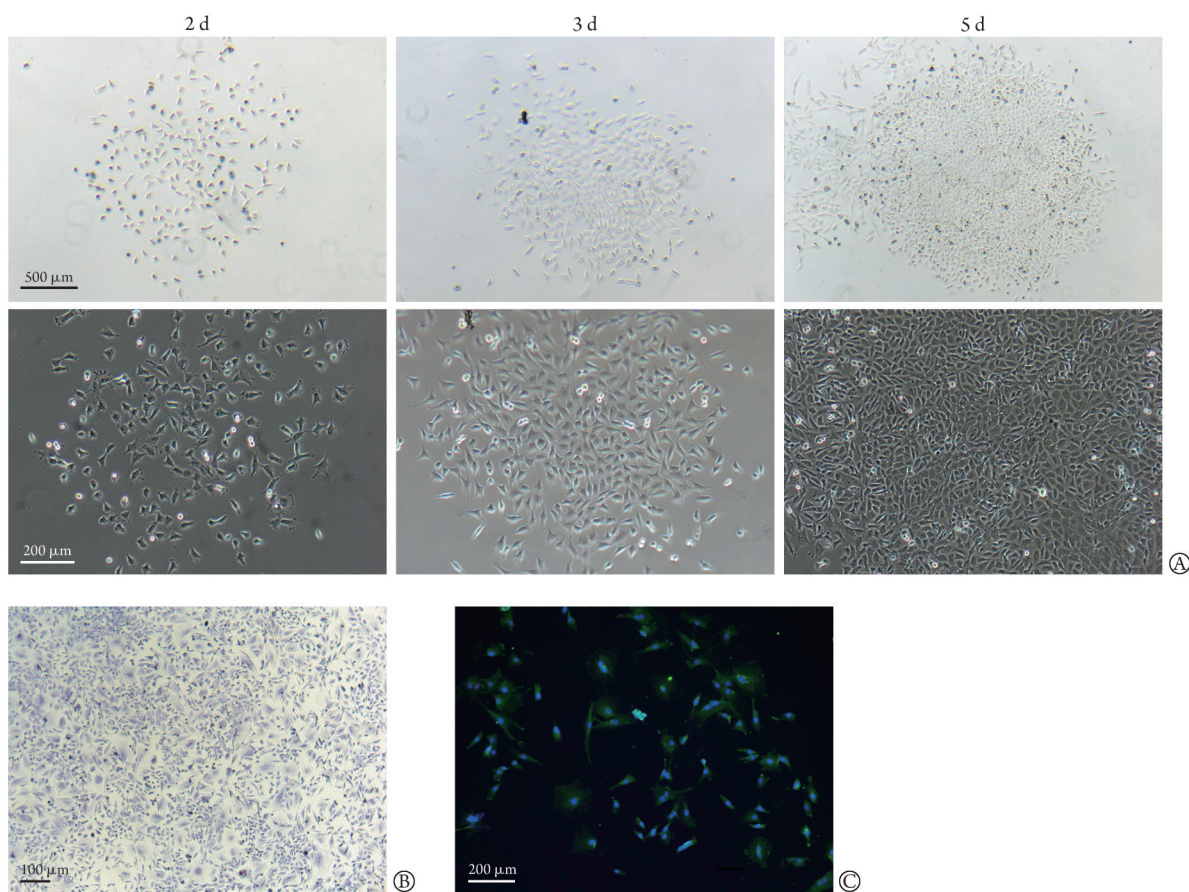
Fig.3 Heatmap of differentially expressed miRNAs in SMSC-Exos between OA and Control groups

2.4 miR-429 靶基因 GO 及 KEGG 富集分析 GO 功能富集分析显示,miR-429 靶基因参与发育过程、解剖结构发育、多细胞生物发育等生物学过程 (biological process, BP)(附图 1A, <https://dx.doi.org/>

10.11855/j.issn.0577-7402.1947.2025.0317FJ); 主要与蛋白质结合、酶结合、DNA 结合转录抑制因子活性等分子功能 (molecular function, MF) 相关(附图 1B, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1947.2025.0317FJ>); 主要存在于蛋白磷酸酶 2A 型复合物、轴突生长锥、蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶复合物等细胞组分 (cellular component, CC)(附图 1C, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1947.2025.0317FJ>)。KEGG 富集分析显示,miR-429 靶基因的功能富集于丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 等信号通路(附图 1D, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1947.2025.0317FJ>)。

2.5 miRNA-mRNA 网络及靶基因 PPI 网络构建 采用 TargetScan7.1 Mouse 和 miRDB 预测 hsa-miR-429 靶基因,两组数据取交集并建立 miRNA-mRNA 网络,共筛选出 150 个靶基因(附图 2A, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1947.2025.0317FJ>)。对筛选出的靶基因进一步构建 PPI 网络,结果显示 CFL2、KDR、ETS1、JUN、UBE2I 为 miR-429 靶基因 PPI 网络的枢纽基因(附图 2B, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1947.2025.0317FJ>)。

2.6 兔原代颞下颌髁突软骨细胞的培养与鉴定 原代髁突软骨细胞种板后 2 d,镜下可见细胞从组织块中迁移至培养皿,呈多角形,未贴壁细胞呈圆形亮点状;种板 3 d 后髁突软骨细胞明显增多且发生接触;种板 5 d 后原代髁突软骨细胞聚集成簇,高倍镜下呈“铺路石”样(图 4A)。甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫组化染色可见软骨细胞着色明显(图 4B、C),表明细胞为原代髁突软骨细胞。



A. 显微镜下兔原代髌突软骨细胞种板2、3、5 d后形态; B. 髌突软骨细胞甲苯胺蓝染色; C. 髌突软骨细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色

图4 兔髌突软骨细胞形态观察及鉴定

Fig.4 Morphological observation and identification of rabbit condylar chondrocytes

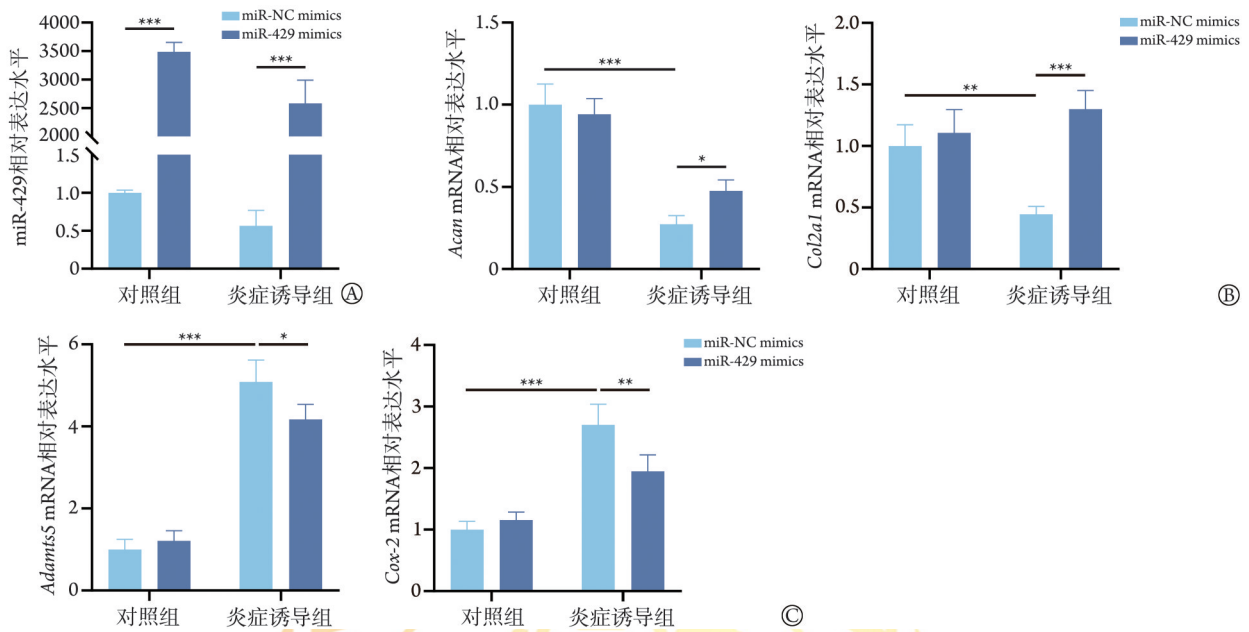
2.7 miR-429对软骨合成代谢、分解代谢及炎症反应的影响 RT-qPCR检测结果显示,转染miR-429 mimics后,对照组及炎症诱导组细胞的miR-429表达水平平均升高超过3000倍($P < 0.001$),表明转染成功(图5A)。与对照组比较,炎症诱导组细胞中蛋白多糖(Aggrecan, *Acan*)、Ⅱ型胶原 $\alpha 1$ 链(collagen type II alpha 1 chain, *Col2a1*) mRNA表达水平明显降低($P < 0.01$),人金属肽酶含血小板反应蛋白基元5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, *Adamts5*)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, *Cox-2*) mRNA表达水平明显升高($P < 0.001$)。过表达miR-429后,炎症诱导组*Acan*、*Col2a1* mRNA表达水平升高($P < 0.05$),*Adamts5*、*Cox-2* mRNA表达水平降低($P < 0.05$)(图5B、C)。

3 讨论

miRNA是一类长度约为22个核苷酸的非编码小分子RNA,几乎存在于所有生物体内^[18],通过与靶mRNA分子的3'非翻译区(3'UTR)相互作用,促使mRNA降解或抑制其翻译,从而调控基因表达^[19-21]。多项研究表明,miRNA在OA等疾病的发生发展中

扮演着重要角色,可能通过调控软骨细胞生长、分化、基质合成等过程,参与OA的发生^[22-23]。miR-140在正常软骨中的表达水平较高,而在OA软骨中的表达水平较低^[24]。此外,miRNA也参与调控炎症反应及软骨细胞凋亡等过程,进一步影响OA的发展。miR-181在OA软骨中表达上调,通过调控炎症相关基因及核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)等信号通路,促进炎症反应及软骨损伤^[25]。这些miRNAs可能成为OA治疗的潜在靶点,通过调控其表达,有望开发基于miRNA或靶向miRNA的药物,为OA软骨修复提供新的治疗策略。

OA条件下,SMSCs的软骨修复能力可能受到损害,其分泌的外泌体中miRNA的功能变化仍然不甚明确。本研究基于miRNA测序及差异分析,共鉴定出16个差异表达的miRNAs,其中7个miRNAs呈上调趋势,9个miRNAs呈下调趋势。差异上调的miRNAs如miR-4492、miR-200b-5p、miR-4508等与OA或炎症反应之间的关联尚未见报道。下调的miRNAs主要包括miR-19b-3p、hsa-miR-1-3p、miR-429等。miR-19b-3p可通过靶向G蛋白偶联受体激酶6(G protein-coupled receptor kinase 6, GRK6),NF- κB 通



RT-qPCR, 实时荧光定量PCR; Col2a1, II型胶原 α 1链; Acan, 蛋白多糖; Adamts5, 人金属蛋白酶含血小板反应蛋白基元5; Cox-2, 环氧化酶-2; A, miR-429转染效率测定; B, RT-qPCR测定miR-429对炎症微环境下兔髌突软骨细胞软骨表型因子(Col2a1、Acan) mRNA表达水平的影响; C, RT-qPCR测定miR-429对炎症微环境下兔髌突软骨细胞炎症因子(Adamts5、Cox-2) mRNA表达水平的影响; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图5 miR-429对炎症微环境下兔髌突软骨细胞软骨合成及分解代谢的影响

Fig. 5 Effects of miR-429 on cartilage synthesis and metabolism in rabbit condylar chondrocytes under an inflammatory microenvironment

路, 抑制IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤、细胞外基质降解及炎症反应, 从而发挥抗炎及软骨保护作用^[26]。miR-1-3p是调控软骨早期生长及细胞增殖的重要因子, 在软骨发育过程中具有关键的调控作用^[27]。本研究发现, OA组的SMSC-Exos中, miR-19b-3p、miR-1-3p表达水平明显低于对照组, 提示这些miRNA可能是SMSC-Exos促进软骨修复及抑制炎症反应的靶点。

本研究还发现, miR-429在OA患者的SMSC-Exos中明显下调。Meng等^[28]发现, miR-429可促进软骨细胞的自噬过程, 从而改善OA软骨损伤。本研究GO功能分析进一步揭示, miR-429的靶基因主要富集在多个与发育相关的生物学过程, 包括解剖结构发育、多细胞生物发育等。此外, KEGG通路分析显示, miR-429的靶基因明显富集于MAPK^[29-30]、PI3K-Akt^[31-32]等多条炎症相关信号通路, 这些通路在OA的发生及进展中具有重要作用。上述结果提示, miR-429在OA条件下表达下调可能是SMSCs软骨修复能力受损的关键因素之一, 其可能通过调控软骨合成及分解代谢, 在OA的病理过程中发挥关键作用。

在成功建立TMJ OA体外模型的基础上, 本研究对髌突软骨细胞中过表达的miR-429进行了相关功能验证。体外实验中, 过表达miR-429后炎症诱导组细胞软骨表型因子(Acan、Col2a1)的mRNA表达水平均升高, 提示miR-429可对软骨的合成代谢发挥促进作

用, 从而修复受损软骨; 而炎症因子(Adamts5、Cox-2)的mRNA表达水平均明显降低, 提示miR-429可通过抑制炎症因子的产生, 减少软骨分解代谢, 具有一定的抗炎、抗分解功能。此外, 已有研究证实, 前突触蛋白2(fasciculation and elongation protein zeta 2, FEZ2)是miR-429的下游靶基因, 提示miR-429可能通过靶向FEZ2发挥其软骨修复作用^[28]。

综上所述, 本研究基于miRNA高通量测序, 筛选并发现miR-429在OA患者的SMSC-Exos中明显下调, 通过过表达miR-429, 发现其在炎症微环境中对髌突软骨细胞的合成代谢具有促进作用, 同时可抑制炎症因子的产生, 提示miR-429可能成为OA治疗的潜在靶点。未来可通过探索基于miR-429的治疗策略, 如miR-429模拟物或载体系统, 增加其在受损软骨中的表达, 从而实现软骨修复及炎症抑制。本研究的局限性在于差异分析的样本量较少, 可能影响结果的普适性, 后续可通过更大规模的样本进行验证。此外, 对miR-429的功能研究未开展体内实验验证, 今后将继续深入探究。

【参考文献】

- [1] Brooks SL, Westesson PL, Eriksson L, et al. Prevalence of osseous changes in the temporomandibular joint of asymptomatic persons without internal derangement[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1992, 73(1): 118-122.

- [2] Kalladka M, Quek S, Heir G, *et al.* Temporomandibular joint osteoarthritis: diagnosis and long-term conservative management: a topic review[J]. *J Indian Prosthodont Soc*, 2014, 14(1): 6-15.
- [3] Yang H, Wen Y, Zhang M, *et al.* MTORC1 coordinates the autophagy and apoptosis signaling in articular chondrocytes in osteoarthritic temporomandibular joint[J]. *Autophagy*, 2020, 16(2): 271-288.
- [4] 许志华, 张勉. 颞下颌关节骨关节炎中软骨异常钙化的研究进展[J]. *实用口腔医学杂志*, 2024, 40(4): 568-573.
- [5] 何静, 孙高, 李男男, 等. 关节腔内注射脂肪干细胞对颞下颌关节骨关节炎模型兔关节软骨破坏的修复作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(1): 71-78.
- [6] Rupaimoole R, Slack FJ. microRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222.
- [7] 何济南, 孔红言, 向丹丹, 等. 抑制KDM2A基因对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(7): 814-822.
- [8] 黎金连, 黄岚珍, 黄希仕, 等. 肝细胞癌预后、诊断和免疫细胞浸润相关关键基因及其潜在治疗药物的生物信息学分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(4): 1062-1075.
- [9] 黄露, 胡增美, 侯佳华, 等. microRNA在心力衰竭中的调控作用及中西药物干预研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(3): 331-338.
- [10] Dzau VJ, Hodgkinson CP. RNA Therapeutics for the Cardiovascular System[J]. *Circulation*, 2024, 149(9): 707-716.
- [11] Wang J, Cao Y, Lu X, *et al.* MicroRNAs and nervous system diseases: network insights and computational challenges[J]. *Brief Bioinform*, 2020, 21(3): 863-875.
- [12] 王亚楠, 徐东刚, 陈昌国, 等. miRNA在创伤性脑损伤诊断及治疗中的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(6): 742-748.
- [13] Szala D, Kopańska M, Trojnak J, *et al.* The role of MicroRNAs in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(12): 6352.
- [14] Jones BA, Pei M. Synovium-derived stem cells: a tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2012, 18(4): 301-311.
- [15] Tao SC, Yuan T, Zhang YL, *et al.* Exosomes derived from miR-140-Sp-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model[J]. *Theranostics*, 2017, 7(1): 180-195.
- [16] Lai C, Liao B, Peng S, *et al.* Synovial fibroblast-miR-214-3p-derived exosomes inhibit inflammation and degeneration of cartilage tissues of osteoarthritis rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(3): 637-649.
- [17] Sun Y, You Y, Wu Q, *et al.* Senescence-targeted microRNA/organoid composite hydrogel repair cartilage defect and prevention joint degeneration *via* improved chondrocyte homeostasis[J]. *Bioact Mater*, 2024, 39: 427-442.
- [18] 李颖, 王健, 顾秀峰, 等. 长链非编码RNA和微小RNA在子痫前期发病机制中的研究进展[J]. *医学新知*, 2023, 33(4): 280-284.
- [19] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [20] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [21] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [22] Nugent M. MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(4): 573-580.
- [23] Li YH, Tavallae G, Tokar T, *et al.* Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(9): 1577-1586.
- [24] Miyaki S, Sato T, Inoue A, *et al.* MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(11): 1173-1185.
- [25] Zhu LM, Yang M. The suppression of miR-181 inhibits inflammatory responses of osteoarthritis through NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(13): 5567-5574.
- [26] Duan L, Duan D, Wei W, *et al.* MiR-19b-3p attenuates IL-1 β induced extracellular matrix degradation and inflammatory injury in chondrocytes by targeting GRK6[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1-2): 205-214.
- [27] Mitchelson KR, Qin WY. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease[J]. *World J Biol Chem*, 2015, 6(3): 162-208.
- [28] Meng C, Na Y, Han C, *et al.* Exosomal miR-429 derived from adipose-derived stem cells ameliorated chondral injury in osteoarthritis *via* autophagy by targeting FEZ2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110315.
- [29] Behl T, Rana T, Alotaibi GH, *et al.* Polyphenols inhibiting MAPK signalling pathway mediated oxidative stress and inflammation in depression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112545.
- [30] Shiloh R, Lubin R, David O, *et al.* Loss of function of ENT3 drives histiocytosis and inflammation through TLR-MAPK signaling[J]. *Blood*, 2023, 142(20): 1740-1751.
- [31] Han Y, Guo S, Li Y, *et al.* Berberine ameliorate inflammation and apoptosis *via* modulating PI3K/Akt/NF- κ B and MAPK pathway on dry eye[J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155081.
- [32] Acosta-Martinez M, Cabail MZ. The PI3K/Akt pathway in meta-inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15330.

(责任编辑: 张小利)