

## 环状 RNA circ\_0040646 靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、分化和凋亡

<https://doi.org/10.12307/2022.611>

张学普, 吴月欣, 赵浩森, 班兆亮, 马晓虎, 佟刚, 杨立民

投稿日期: 2021-04-12

送审日期: 2021-04-15

采用日期: 2021-05-14

在线日期: 2021-11-06

中图分类号:

R459.9; R394.2; R684.3

文章编号:

2095-4344(2022)20-03141-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章特点一

△ circ\_0040646 在膝骨关节炎软骨组织和细胞中明显高表达, 低表达 circ\_0040646 能够促进骨关节炎软骨细胞的增殖和分化, 抑制细胞凋亡;

△ circ\_0040646 能够通过靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、分化和凋亡。

采用实时荧光定量 PCR 检测 circ\_0040646 在骨关节炎组织和骨关节炎软骨细胞中的表达水平

骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646

实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测增殖相关分子增殖细胞核抗原和分化相关分子骨形成蛋白 2 和 Runx2 的表达水平, 流式细胞术检测细胞凋亡情况

双荧光素酶报告验证 circ\_0040646 和 miR-188-3p 的靶点结合情况, 回复实验验证 circ\_0040646 通过调控 miR-188-3p 发挥作用

circ\_0040646 通过靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化, circ\_0040646 可能成为治疗膝骨关节炎的干预靶点

## 文题释义:

环状RNA: 是一种稳定和保守的非编码RNA类型, 在真核生物中广泛表达, 是在外显子跳跃或反向剪接过程中形成的, 具有闭环结构, 稳定性较好。

microRNAs: 是一类普遍存在于生物体基因组、长度仅为20-24 nt的非编码小分子RNA。

miR-214-3p: 在膝骨关节炎中明显低表达, 下调的miR-214-3p能够激活核因子κB信号通路进而加重膝骨关节炎的进展。

## 摘要

背景: 环状RNA在越来越多的疾病中发挥重要的调控作用, 近期有研究显示环状RNA在膝骨关节炎中存在异常表达, 因此研究环状RNA在骨关节炎中的作用对阐明膝骨关节炎的发病机制具有重要作用。

目的: 探讨circ\_0040646调控miR-188-3p对膝骨关节炎软骨细胞增殖、分化和凋亡的影响。

方法: 采用实时荧光定量PCR检测circ\_0040646在膝骨关节炎患者和膝骨关节炎软骨细胞中的表达水平, 并以半月板损伤患者的正常软骨细胞为对照。在膝骨关节炎软骨细胞中分别转染si-NC(低表达circ\_0040646对照组质粒)、si-circ\_0040646、oe-NC(过表达circ\_0040646对照组质粒)、oe-circ\_0040646、miR-NC(对照组)和miR-188-3p抑制剂后, 采用实时荧光定量PCR和Western blot法检测增殖细胞核抗原、骨形成蛋白2和runt相关转录因子2的表达水平; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; 双荧光素酶报告验证circ\_0040646和miR-188-3p的靶点结合情况。

结果与结论: ①与对照组相比, circ\_0040646在膝骨关节炎患者和膝骨关节炎软骨细胞中明显高表达; ②在膝骨关节炎软骨细胞中低表达circ\_0040646能够促进细胞增殖和分化, 抑制细胞凋亡; 过表达circ\_0040646能够抑制细胞增殖和分化, 促进细胞凋亡; ③circ\_0040646在膝骨关节炎软骨细胞中能够靶向结合miR-188-3p, 在膝骨关节炎软骨细胞中共转染si-circ\_0040646和miR-188-3p inhibitors能够反转单独转染si-circ\_0040646对膝骨关节炎软骨细胞增殖、分化和凋亡的影响; ④结果显示circ\_0040646通过靶向抑制miR-188-3p调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化, circ\_0040646可能成为治疗膝骨关节炎的干预靶点。

关键词: 骨关节炎; 膝骨关节炎; circ\_0040646; miR-188-3p; 增殖; 分化; 凋亡

缩略语: 增殖细胞核抗原: proliferating cell nuclear antigen, PCNA; runt相关转录因子2: runt-related transcription factor 2, Runx2

## A circular RNA, circ\_0040646, regulates the proliferation, differentiation, and apoptosis of knee osteoarthritis chondrocytes by targeted inhibition of microRNA-188-3p

Zhang Xuepu, Wu Yuexin, Zhao Haosen, Ban Zhaoliang, Ma Xiaohu, Tong Gang, Yang Limin

Department of Foot and Ankle Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Zhang Xuepu, Master, Attending physician, Department of Foot and Ankle Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Corresponding author: Yang Limin, Master, Chief physician, Department of Foot and Ankle Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

锦州医科大学附属第一医院足踝外科, 辽宁省锦州市 121001

第一作者: 张学普, 男, 1984年生, 辽宁省建平县人, 汉族, 2011年锦州医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨质疏松方面的研究。

通讯作者: 杨立民, 硕士, 主任医师, 锦州医科大学附属第一医院足踝外科, 辽宁省锦州市 121001

<https://orcid.org/0000-0001-6222-9730>(张学普)

引用本文: 张学普, 吴月欣, 赵浩森, 班兆亮, 马晓虎, 佟刚, 杨立民. 环状 RNA circ\_0040646 靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、分化和凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(20):3141-3146.



## Abstract

**BACKGROUND:** Circular RNAs play an important regulatory role in various diseases. Recent studies have shown that circular RNAs are abnormally expressed in knee osteoarthritis. Therefore, it is very essential to study the effect of circular RNAs on the pathogenesis of knee osteoarthritis.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of circ\_0040646 regulating microRNA-188-3p (miR-188-3p) on the proliferation, differentiation and apoptosis of knee osteoarthritis chondrocytes.

**METHODS:** Quantitative real-time fluorescence PCR was used to detect the expression level of circ\_0040646 in knee osteoarthritis patients and knee osteoarthritis chondrocytes, in comparison with normal chondrocytes from meniscal injury patients. Chondrocytes from knee osteoarthritis patients were transfected with small-interfering negative control (lowly expressed circ\_0040646 control plasmid), small-interfering circ\_0040646, overexpressed negative control (overexpressed circ\_0040646 control plasmid), overexpressed circ\_0040646, miRNA negative control (control group), or microRNA-188-3p inhibitor. Quantitative real-time fluorescence PCR and western blot were used to detect the expression levels of proliferating cell nuclear antigen, bone morphogenetic protein 2 and runt-related transcription factor 2. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Dual luciferase reporter assay was used to detect the targeted binding of circ\_0040646 and miR-188-3p.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, circ\_0040646 was highly expressed in knee osteoarthritis patients and knee osteoarthritis chondrocytes. In knee osteoarthritis chondrocytes, the low expression of circular RNA-0040646 could promote cell proliferation and differentiation, and inhibit cell apoptosis, while overexpression of circ\_0040646 could inhibit cell proliferation and differentiation, and promote cell apoptosis. circ\_0040646 could target miR-188-3p in knee osteoarthritis chondrocytes. Co-transfection of small-interfering circ\_0040646 and miR-188-3p inhibitors could reverse the effect of small-interfering circ\_0040646 alone on the proliferation, differentiation and apoptosis of knee osteoarthritis chondrocytes. These findings reveal that circ\_0040646 can regulate the proliferation, apoptosis and differentiation of knee osteoarthritis chondrocytes by targeted inhibition of miR-188-3p, and therefore, circ\_0040646 may become a target for the treatment of knee osteoarthritis.

**Key words:** osteoarthritis; knee joint; circ\_0040646; miR-188-3p; proliferation; differentiation; apoptosis

**How to cite this article:** ZHANG XP, WU YX, ZHAO HS, BAN ZL, MA XH, TONG G, YANG LM. A circular RNA, circ\_0040646, regulates the proliferation, differentiation, and apoptosis of knee osteoarthritis chondrocytes by targeted inhibition of microRNA-188-3p. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(20):3141-3146.

## 0 引言 Introduction

骨关节炎是一种年龄相关的疾病，主要发生在 65 岁以上的老年人，严重影响患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。膝骨关节炎的典型病理学改变包括软骨破坏、骨赘形成和滑膜增生<sup>[3-4]</sup>，软骨退化的主要特征表现为基质降解酶的上调和细胞外基质的丢失，患者的临床表现为关节僵硬、局部疼痛和关节压痛<sup>[5]</sup>。目前针对膝骨关节炎的治疗主要是改善患者的临床症状，尚缺乏有效的治疗手段<sup>[6]</sup>，因此阐明膝骨关节炎的发病机制对膝骨关节炎的治疗具有重要作用。环状 RNA(circRNA) 是一种内源性非编码 RNA，存在闭环结构<sup>[7]</sup>，能够调控机体多种疾病的进展，参与细胞的增殖、分化、侵袭、迁移、自噬和凋亡等<sup>[8-9]</sup>。大量环状 RNA 在膝骨关节炎中存在异常表达，并通过 miRNA 海绵、通路调控和直接靶向蛋白分子等途径发挥作用<sup>[10-12]</sup>。研究显示 circ\_0040646( 又称 CircCDH13) 在膝骨关节炎中明显高表达，并能影响软骨细胞外基质的生成，然而其具体作用机制尚未完全阐明<sup>[13]</sup>。因而，在此次研究中选取 25 例半月板损伤和 25 例膝骨关节炎患者，检测 circ\_0040646 在膝骨关节炎中的表达水平，进一步分离膝骨关节炎软骨细胞，明确 circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞生物学功能的影响和调控机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 体外细胞学实验，两组间比较采用两独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间采用 LSD-t 检验，采用 Pearson 进行相关性分析。

**1.2 时间及地点** 实验于 2019 年 5 月至 2021 年 3 月在锦州医科大学基础实验室完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 组织标本** 选择 2019 年 5 月至 2020 年 5 月在锦州医科大学附属第一医院住院治疗的 25 例半月板损伤和 25 例膝骨关节炎患者，膝骨关节炎患者平均年龄 (65.7±12.4) 岁，男

15 例，女 10 例；半月板损伤患者平均年龄 (38.9±10.6) 岁，男 17 例，女 8 例。所有患者取膝关节标本并于液氮中保存，所有患者对实验方案知情同意并签署知情同意书。

**纳入标准:** ①患者年龄 18-85 岁；②半月板损伤患者除了存在半月板损伤外，不合并其他基础疾病；③膝骨关节炎患者诊断明确，不合并其他基础疾病。

**排除标准:** ①患者不同意参与此项研究；②患者合并除膝骨关节炎以外的其他关节炎疾病。

**1.3.2 试剂** DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司；TRIzol、RNA 反转录试剂盒、TaqMan MicroRNA 反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司；Western bolt 相关试剂盒购自碧云天生物有限公司；凋亡试剂盒购自美国 Sigma 公司；Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司；质粒购自上海吉凯基因有限公司；兔抗人增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、骨形成蛋白 2 和 runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)、GAPDH 和羊抗兔二抗购自美国 Abcam 公司。

### 1.4 方法

**1.4.1 细胞培养与转染** 将膝骨关节炎患者和膝关节半月板损伤患者 ( 对照组 ) 的软骨组织剪碎，采用两步酶消化法进行分离<sup>[14]</sup>，将分离后的软骨细胞在含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养，于 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育。选取对数生长期的软骨细胞，采用 Lipofectamine 3000 转染 si-NC( 低表达 circ\_0040646 对照组质粒 )、si-circ\_0040646、oe-NC( 过表达 circ\_0040646 对照组质粒 )、oe-circ\_0040646、miR-NC( 对照组 ) 和 miR-188-3p inhibitors(miR-188-3p 抑制剂组 )。

**1.4.2 实时荧光定量 PCR** 采用 TRIzol 提取细胞和组织中的总 RNA，miR-188-3p 检测中采用 TaqMan MicroRNA 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA，然后进行 RT-PCR。

circ\_0040646 正向引物 5'- ACA TCA CTG TCC TGG ATGTC-3', 反向引物 5'- ACT GTG GCT TGA AAC TGA TG-3';

miR-188-3p 正向引物 5'- CCC TCT CTC ACA TCC CTT GCAT-3', 反向引物 5'- ATC CTG CAA ACC CTG CAT GTG-3';

GAPDH 正向引物 5'- AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3', 反向引物 5'- GCA GGA GGC ATT GCT GAT GAT-3';

U6 正向引物 5'- CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 反向引物 5'- AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成, 以 U6 或者 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。

**1.4.3 Western blot 法** 采用 RIPA 裂解液提取软骨细胞总蛋白, 并使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。在 SDS-PAGE 凝胶中每孔加入 40  $\mu\text{g}$  蛋白样品, 电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入兔抗人 PCNA、骨形成蛋白 2、Runx2、GAPDH 一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h, TBST 洗涤, 辣根过氧化物酶结合的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤后滴加 ECL 显色液进行显影。采用 Image J 软件对各条带进行灰度值分析。

**1.4.4 流式细胞术检测细胞凋亡率** 选取处理后的对数生长期细胞, 采用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬, 加入 5  $\mu\text{L}$  膜联蛋白 V- 异硫氰酸荧光素和 5  $\mu\text{L}$  碘化丙啶, 室温孵育 10 min, 然后采用 FACS Calibur 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

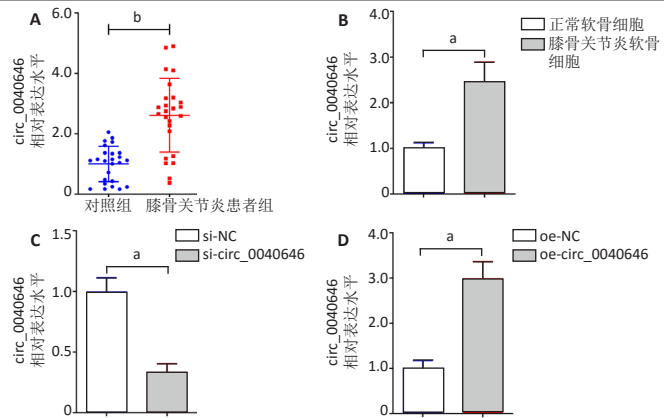
**1.4.5 双荧光素酶报告** 将野生型 (WT) 或突变型 (MUT) circ\_0040646 克隆到 pmirGLO 质粒受体中, 同时将 miR-188-3p mimics 与 miR-NC 转入膝骨关节炎软骨细胞中, 共培养 48 h 后采用双荧光素酶受体分析系统测量双荧光素活性。

**1.5 主要观察指标** circ\_0040646 和 miR-188-3p 在膝骨关节炎软骨组织和软骨细胞中的表达水平; 膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646 后细胞增殖、分化和凋亡情况, 以及增殖相关分子 PCNA 和分化相关分子骨形成蛋白 2、Runx2 的表达水平。

**1.6 统计学分析** 采用 GraphPad Software 公司 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用两独立样本  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间采用 LSD- $t$  检验, 采用 Pearson 进行相关性分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 circ\_0040646 在膝骨关节炎组织和软骨细胞中的表达情况** 与对照组相比, circ\_0040646 在膝骨关节炎患者组中的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 同时 circ\_0040646 在膝骨关节炎软骨细胞中的表达水平明显高于正常软骨细胞 ( $P < 0.05$ )。在膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 后, circ\_0040646 的表达水平明显下调 ( $P < 0.05$ ); 在膝骨关节炎软骨细胞中转染 oe-circ\_0040646 后, circ\_0040646 的表达水平明显上调 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。提示 circ\_0040646 在膝骨关节炎组织和细胞中明显高表达。

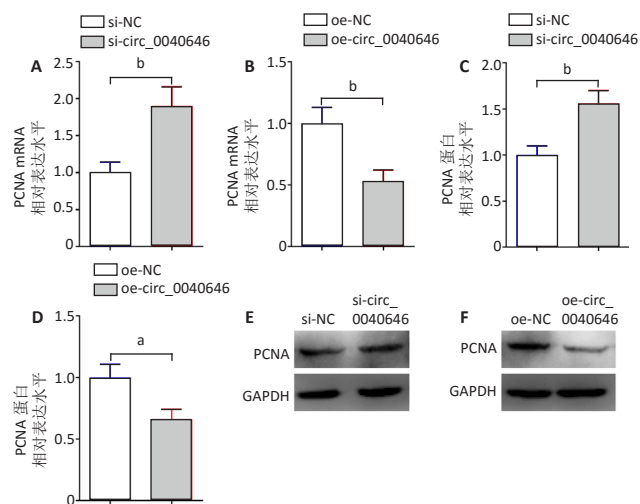


图注: 图 A 为实时荧光定量 PCR 检测 circ\_0040646 在膝骨关节炎患者组和对照组中的表达水平; B 为实时荧光定量 PCR 检测 circ\_0040646 在正常软骨细胞和膝骨关节炎软骨细胞中的表达水平; C, D 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646 后 circ\_0040646 的表达水平; <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ 。si-NC: 低表达 circ\_0040646 对照组质粒; oe-NC: 过表达 circ\_0040646 对照组质粒

图 1 | circ\_0040646 在膝骨关节炎组织和软骨细胞中的表达情况

Figure 1 | The expression of circ\_0040646 in knee osteoarthritis tissue and chondrocytes

**2.2 circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞增殖的影响** 在膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 后, 增殖相关分子 PCNA mRNA 和蛋白的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 转染 oe-circ\_0040646 后, 增殖相关分子 PCNA mRNA 和蛋白的表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。提示低表达 circ\_0040646 能够促进膝骨关节炎软骨细胞的增殖, 过表达 circ\_0040646 能够抑制膝骨关节炎软骨细胞的增殖。



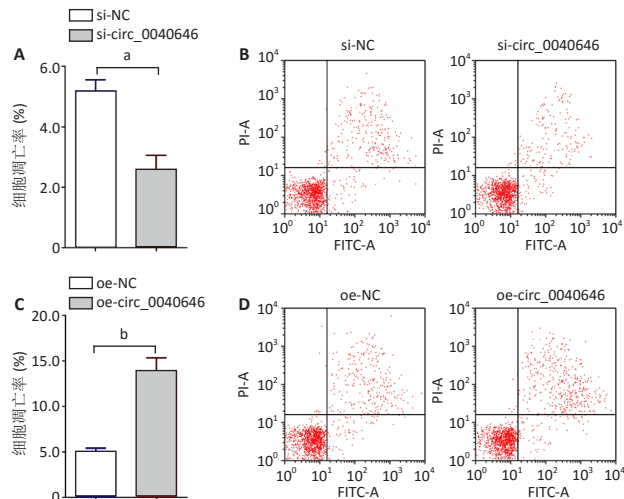
图注: 图 A, B 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646 后 PCNA mRNA 的表达水平; C, D 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646 后 PCNA 蛋白的相对表达量; E, F 为 PCNA 的免疫印迹图; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。si-NC: 低表达 circ\_0040646 对照组质粒; oe-NC: 过表达 circ\_0040646 对照组质粒; PCNA: 增殖细胞核抗原

图 2 | circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞增殖的影响

Figure 2 | The effect of circ\_0040646 on the proliferation of knee osteoarthritis chondrocytes

**2.3 circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞凋亡的影响** 在膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 后, 软骨细胞的凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ ); 转染 oe-circ\_0040646 后, 增软骨细胞的凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。提示低表达

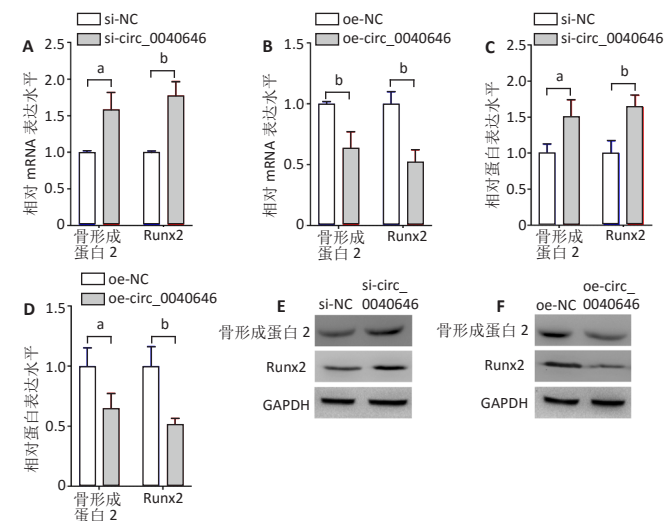
circ\_0040646 能够抑制膝骨关节炎软骨细胞的凋亡，过表达 circ\_0040646 能够促进膝骨关节炎软骨细胞的凋亡。



图注：图中 A 和 B 为膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 后细胞凋亡情况；C、D 为膝骨关节炎软骨细胞中转染 oe-circ\_0040646 后细胞凋亡情况；<sup>a</sup> $P < 0.01$ ，<sup>b</sup> $P < 0.001$ 。si-NC：低表达 circ\_0040646 对照组质粒；oe-NC：过表达 circ\_0040646 对照组质粒

图 3 | circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞凋亡的影响  
Figure 3 | The effect of circ\_0040646 on the apoptosis of knee osteoarthritis chondrocytes

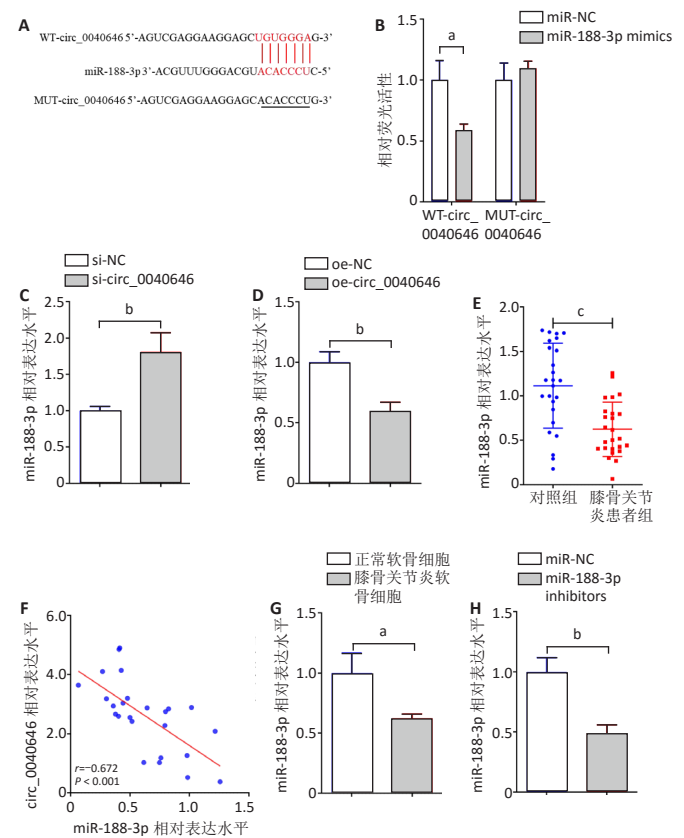
2.4 circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞分化的影响 在膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 后，分化相关分子骨形成蛋白 2 和 Runx2 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )；转染 oe-circ\_0040646 后，分化相关分子骨形成蛋白 2、Runx2 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )，见图 4。提示低表达 circ\_0040646 能够促进膝骨关节炎软骨细胞的分化，过表达 circ\_0040646 能够抑制膝骨关节炎软骨细胞的分化。



图注：图 A、B 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646 后骨形成蛋白 2 和 Runx2 mRNA 的表达水平；C、D 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646 后骨形成蛋白 2 和 Runx2 蛋白的相对表达量；E、F 为骨形成蛋白 2 和 Runx2 的免疫印迹图；<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。si-NC：低表达 circ\_0040646 对照组质粒；oe-NC：过表达 circ\_0040646 对照组质粒；Runx2：runt 相关转录因子 2

图 4 | circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞分化的影响  
Figure 4 | The effect of circ\_0040646 on the differentiation of knee osteoarthritis chondrocytes

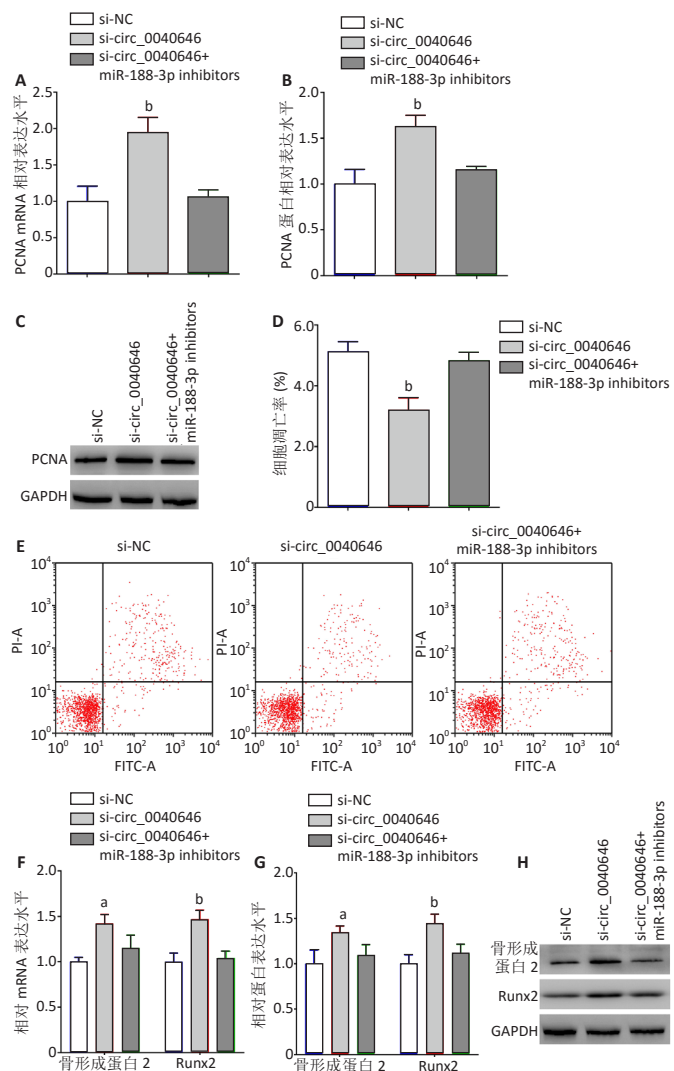
2.5 circ\_0040646 在膝骨关节炎软骨细胞靶向结合 miR-188-3p 通过 <https://circinteractome.nia.nih.gov> 网站预测发现 circ\_0040646 和 miR-188-3p 存在结合位点，双荧光素酶报告显示在转染 WT-circ\_0040646 的膝骨关节炎软骨细胞中，双荧光素酶的活性明显降低 ( $P < 0.05$ )；在膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 后，miR-188-3p 的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )；转染 oe-circ\_0040646 后，miR-188-3p 的表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比，miR-188-3p 在膝骨关节炎患者和膝骨关节炎软骨细胞中的表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )，同时 circ\_0040646 和 miR-188-3p 在膝骨关节炎患者组织中的表达水平呈负相关 ( $P < 0.05$ )，进一步在膝骨关节炎软骨细胞中转染 miR-188-3p 抑制剂后，miR-188-3p 的表达水平明显下调 ( $P < 0.05$ )，见图 5。提示 circ\_0040646 可能通过靶向调控 miR-188-3p 参与膝骨关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化。



图注：图 A 为 circ\_0040646 和 miR-188-3p 的结合位点；B 为双荧光素酶报告；C、D 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646 后 miR-188-3p 的表达水平；E 为实时荧光定量 PCR 检测 miR-188-3p 在膝骨关节炎患者组和对照组中的表达水平；F 为 circ\_0040646 和 miR-188-3p 在膝骨关节炎患者组织中的表达相关性；G 为实时荧光定量 PCR 检测 miR-188-3p 在正常软骨细胞和膝骨关节炎软骨细胞中的表达水平；H 为膝骨关节炎软骨细胞中转染 miR-188-3p 抑制剂后 miR-188-3p 的表达水平；<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，<sup>b</sup> $P < 0.01$ ，<sup>c</sup> $P < 0.001$ 。si-NC：低表达 circ\_0040646 对照组质粒；oe-NC：过表达 circ\_0040646 对照组质粒；miR-NC：对照组；miR-188-3p inhibitors：miR-188-3p 抑制剂组

图 5 | circ\_0040646 在膝骨关节炎软骨细胞靶向结合 miR-188-3p  
Figure 5 | circ\_0040646 binds to miR-188-3p in knee osteoarthritis chondrocytes

2.6 circ\_0040646 通过靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化 在膝骨关节炎软骨细胞中共转染 si-circ\_0040646 和 miR-188-3p inhibitors 后, 增殖相关分子 PCNA mRNA 和蛋白的表达水平较单独转染 si-circ\_0040646 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 较转染 si-NC 组未见明显差异 ( $P > 0.05$ ); 细胞凋亡率较单独转染 si-circ\_0040646 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 较转染 si-NC 组未见明显差异 ( $P > 0.05$ ); 分化相关分子骨形成蛋白 2 和 Runx2 mRNA 和蛋白的表达水平较单独转染 si-circ\_0040646 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 较转染 si-NC 组未见明显差异 ( $P > 0.05$ ), 见图 6。提示 circ\_0040646 能够靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化。



图注: 图 A, B 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-NC、si-circ\_0040646 和共转染 si-circ\_0040646 和 miR-188-3p inhibitors(miR-188-3p 抑制剂组)后 PCNA mRNA 和蛋白的相对表达水平; C 为 PCNA 的免疫印迹图; D, E 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-NC、si-circ\_0040646 和共转染 si-circ\_0040646 和 miR-188-3p 抑制剂后的细胞凋亡情况; F, G 为膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-NC、si-circ\_0040646 和共转染 si-circ\_0040646 和 miR-188-3p 抑制剂后骨形成蛋白 2 和 Runx2 mRNA 蛋白的相对表达水平; H 为骨形成蛋白 2 和 Runx2 的免疫印迹图。与 si-NC 相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。si-NC: 低表达 circ\_0040646 对照组质粒; PCNA: 增殖细胞核抗原

图 6 | circ\_0040646 通过靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化

Figure 6 | circ\_0040646 regulates the proliferation, apoptosis and differentiation of knee osteoarthritis chondrocytes by targeted inhibition of miR-188-3p

### 3 讨论 Discussion

软骨细胞是关节软骨中的细胞成分之一, 在维持关节软骨基质完整性上具有重要作用<sup>[15-16]</sup>。在膝骨关节炎的病理过程中, 存在大量的软骨细胞凋亡, 进而表现出基质降解酶的上调和细胞外基质的丢失<sup>[17-18]</sup>, 因此促进软骨细胞的存活对膝骨关节炎的缓解发挥关键性作用。研究显示 circSEC24A 在膝骨关节炎中明显高表达, 并能促进白细胞介素 1 $\beta$  诱导的软骨细胞凋亡和炎症因子的释放<sup>[19]</sup>。此次研究结果显示, circ\_0040646 在膝骨关节炎组织和软骨细胞中明显高表达, 进一步研究中在膝骨关节炎软骨细胞中分别转染 si-circ\_0040646 和 oe-circ\_0040646, 以验证 circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞生物学功能的影响。

研究显示过表达 circ\_0094742 能够靶向调控 miR-127-5p 抑制白细胞介素 1 $\beta$  诱导的软骨细胞活性降低<sup>[20]</sup>。此次研究结果显示, 低表达 circ\_0040646 能够促进膝骨关节炎软骨细胞增殖相关分子 PCNA mRNA 和蛋白的表达, 过表达 circ\_0040646 能够抑制膝骨关节炎软骨细胞增殖相关分子 PCNA mRNA 和蛋白的表达, 这提示 circ\_0040646 参与了膝骨关节炎软骨细胞的存活。在膝骨关节炎软骨细胞凋亡检测中, 结果显示低表达 circ\_0040646 能够抑制膝骨关节炎软骨细胞的凋亡, 过表达 circ\_0040646 能够促进膝骨关节炎软骨细胞的凋亡, 这提示 circ\_0040646 能够抑制膝骨关节炎软骨细胞增殖, 促进膝骨关节炎软骨细胞的凋亡。研究显示 circRNA\_0092516 在膝骨关节炎患者中明显高表达, 并能抑制软骨细胞的增殖和促进软骨细胞凋亡<sup>[21]</sup>。

骨形成蛋白 2 和 Runx2 是软骨细胞分化的重要分子, 在分化后的软骨细胞中骨形成蛋白 2 和 Runx2 呈现明显高表达<sup>[22-23]</sup>。此次研究在膝骨关节炎软骨细胞中转染 si-circ\_0040646 后, 分化相关分子骨形成蛋白 2、Runx2 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高; 转染 oe-circ\_0040646 后, 分化相关分子骨形成蛋白 2、Runx2 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低, 提示低表达 circ\_0040646 能够促进膝骨关节炎软骨细胞的分化, 过表达 circ\_0040646 能够抑制膝骨关节炎软骨细胞的分化。研究显示 circPSM3 在膝骨关节炎中明显高表达, 并能够靶向调控 miRNA-296-5p 抑制软骨细胞的增殖和分化<sup>[14]</sup>。

microRNAs 是一类普遍存在于生物体基因组、长度仅为 20-24 nt 的非编码小 RNA, 参与调控多种细胞的病理生理过程<sup>[24-26]</sup>。研究显示, miR-214-3p 在膝骨关节炎中明显低表达, 下调的 miR-214-3p 能够激活核因子  $\kappa$ B 信号通路进而加重膝骨关节炎的进展<sup>[27]</sup>; 而敲低 circ-IQGAP1 能够通过靶向 miR-671-5p/TCF4 轴缓解膝骨关节炎的进展<sup>[28]</sup>。此次研究结果显示 circ\_0040646 在膝骨关节炎软骨细胞靶向结合 miR-188-3p, miR-188-3p 在膝骨关节炎患者组织和膝骨关节炎软骨细胞中的表达水平明显降低, 同时 circ\_0040646 和 miR-188-3p 在膝骨关节炎患者组织中的表达水平呈负相关, 提示 circ\_0040646 可能通过靶向调控 miR-188-3p 参与膝骨

关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化。在进一步的回复实验中,在膝骨关节炎软骨细胞中共转染 si-circ\_0040646 和 miR-188-3p inhibitors 能够反转单独转染 si-circ\_0040646 对膝骨关节炎软骨细胞增殖、分化和凋亡的影响,这进一步说明 circ\_0040646 通过靶向调控 miR-188-3p 控制膝骨关节炎的进展。研究显示 circ\_0136474 能够靶向调控 miR-127-5p/MMP-13 轴抑制膝骨关节炎细胞的增殖<sup>[29]</sup>, circRNA-CDR1 能够靶向抑制 miR-641 促进膝骨关节炎的进展<sup>[30]</sup>。

综上所述, circ\_0040646 通过靶向抑制 miR-188-3p 调控膝骨关节炎软骨细胞的增殖、凋亡和分化, circ\_0040646 可能成为治疗膝骨关节炎的干预靶点。

**作者贡献:** 张学普负责实验设计, 张学普、杨立民、佟刚、马晓虎负责实验实施, 赵浩森、班兆亮、吴月欣负责指标测定。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究方案的实施符合《赫尔辛基宣言》和锦州医科大学附属第一医院对研究的相关伦理要求(批准号: 202056, 批准时间: 2020年5月)。

**知情同意问题:** 参与实验的患病个体及其家属为自愿参加, 均对实验过程完全知情同意, 在充分了解实验方案的前提下签署了“知情同意书”。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经锦州医科大学附属第一医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] WHITTAKER JL, TRUONG LK, DHIMAN K, et al. Osteoarthritis year in review 2020: rehabilitation and outcomes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(2):190-207.

[2] ABRAMOFF B, CALDERA FE. Osteoarthritis. *Med Clin North Am*. 2020;104(2):293-311.

[3] HUNTER DJ, MARCH L, CHEW M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a Lancet Commission. *Lancet*. 2020;396(10264):1711-1712.

[4] DEYLE GD, ALLEN CS, ALLISON SC, et al. Physical Therapy versus Glucocorticoid Injection for Osteoarthritis of the Knee. *New Eng J Med*. 2020;382(15):1420-1429.

[5] VAN DEN BOSCH MHJ. Osteoarthritis year in review 2020: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(2):143-150.

[6] WANG L, ZENG N, YAN Z, et al. Post-traumatic osteoarthritis following ACL injury. *Arthritis Res Ther*. 2020;22(1): 57.

[7] LIANG Z, GUO C, ZOU M, et al. circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in human lung cancer: an update. *Cancer Cell Int*. 2020;20(1): 173.

[8] ZHANG C, HU J, YU Y. CircRNA Is a Rising Star in Researches of Ocular Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:850.

[9] SHI Y, JIA X, XU J. The new function of circRNA: translation. *Clin Trans Oncol*. 2020;22(12):2162-2169.

[10] LIU D, LIANG YH, YANG YT, et al. Circular RNA in osteoarthritis: an updated insight into the pathophysiology and therapeutics. *Am J Transl Res*. 2021;13(1):11-23.

[11] WU Y, LU X, SHEN B, et al. The Therapeutic Potential and Role of miRNA, lncRNA, and circRNA in Osteoarthritis. *Curr Gene Ther*. 2019;19(4): 255-263.

[12] ZHOU ZB, HUANG GX, FU Q, et al. circRNA.33186 Contributes to the Pathogenesis of Osteoarthritis by Sponging miR-127-5p. *Mol Ther*. 2019;27(3):531-541.

[13] ZHOU Z, MA J, LU J, et al. Circular RNA CircCDH13 contributes to the pathogenesis of osteoarthritis via CircCDH13/miR-296-3p/PTEN axis. *J Cell Physiol*. 2021;236(5):3521-3535.

[14] NI J, DANG X, SHI Z. CircPSM3 inhibits the proliferation and differentiation of OA chondrocytes by targeting miRNA-296-5p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(7):3467-3475.

[15] HUNT MA, CHARLTON JM, ESCULIER JF. Osteoarthritis year in review 2019: mechanics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(3):267-274.

[16] CHEN G, LIU T, YU B, et al. CircRNA-UBE2G1 regulates LPS-induced osteoarthritis through miR-373/HIF-1 $\alpha$  axis. *Cell Cycle*. 2020;19(13): 1696-1705.

[17] CORVELL PR, DIEKMAN BO, LOESER RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(1):47-57.

[18] WU Q, YUAN ZH, MA XB, et al. Low expression of CircRNA HIPK3 promotes osteoarthritis chondrocyte apoptosis by serving as a sponge of miR-124 to regulate SOX8. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(15): 7937-7945.

[19] SHI L, ZHANG H, SUN J, et al. CircSEC24A promotes IL-1 $\beta$ -induced apoptosis and inflammation in chondrocytes by regulating miR-142-5p/SOX5 axis. *Biotechnol Appl Biochem*. 2021. doi: 10.1002/bab.2145.

[20] SUN M, YANG J, JIANG D, et al. Overexpression of hsa\_circ\_0094742 inhibits IL-1 $\beta$ -induced decline in CHON-001 cell viability by targeting microRNA-127-5p. *Histol Histopathol*. 2021;36(2):207-216.

[21] HUANG Z, MA W, XIAO J, et al. CircRNA\_0092516 regulates chondrocyte proliferation and apoptosis in osteoarthritis through the miR-337-3p/PTEN axis. *J Biochem*. 2021;169(4):467-475.

[22] RATNESWARAN A, KAPOOR M. Osteoarthritis year in review: genetics, genomics, epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(2): 151-160.

[23] YU S, GUO J, SUN Z, et al. BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation. *Cell Death Dis*. 2021;12(2):197.

[24] ZHU Z, HUANG J, LI X, et al. Gut microbiota regulate tumor metastasis via circRNA/miRNA networks. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1788891.

[25] SHEN H, WANG Y, SHI W, et al. lncRNA SNHG5/miR-26a/SOX2 signal axis enhances proliferation of chondrocyte in osteoarthritis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018;50(2):191-198.

[26] ZHAO X, LI H, WANG L. MicroRNA-107 regulates autophagy and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes by targeting TRAF3. *Int Immunopharmacol*. 2019;71:181-187.

[27] CAO Y, TANG S, NIE X, et al. Decreased miR-214-3p activates NF- $\kappa$ B pathway and aggravates osteoarthritis progression. *EBio Medicine*. 2021;65:103283.

[28] XI P, ZHANG CL, WU SY, et al. CircRNA circ-IQGAP1 Knockdown Alleviates Interleukin-1 $\beta$ -Induced Osteoarthritis Progression via Targeting miR-671-5p/TCF4. *Orthop Surg*. 2021;13(3):1036-1046.

[29] LI Z, YUAN B, PEI Z, et al. Circ\_0136474 and MMP-13 suppressed cell proliferation by competitive binding to miR-127-5p in osteoarthritis. *J Cell Mol Med*. 2019;23(10):6554-6564.

[30] ZHANG W, ZHANG C, HU C, et al. Circular RNA-CDR1as acts as the sponge of microRNA-641 to promote osteoarthritis progression. *J Inflamm*. 2020;17:8.

(责任编辑: GD, ZN, JY)