

miR-23b 对风湿关节炎大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 及破骨细胞的影响

宋建辉, 穆继宏, 黎士文

<https://doi.org/10.12307/2023.407>

投稿日期: 2021-12-16

采用日期: 2022-06-20

修回日期: 2022-08-31

在线日期: 2022-09-21

中图分类号:

R446; R318; R496

文章编号:

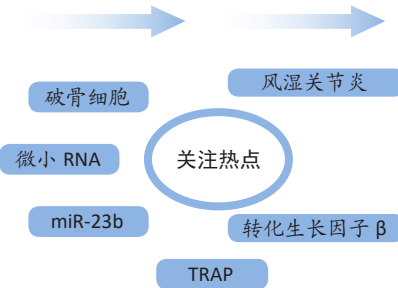
2095-4344(2023)26-04175-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 降低 miR-23b 表达抑制大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 表达降低破骨细胞活性

研究来源

- 类风湿性关节炎
- 风湿关节炎
- 佐剂性关节炎
- 动物模型
- 破骨细胞
- 转化生长因子 $\beta 1$
- 微小 RNA



研究分支

- 风湿关节炎
- 骨破坏
- 转化生长因子 $\beta 1$
- 破骨细胞活性
- 免疫炎症疾病

文题释义:

miR-23b: 作为一种非编码miRNA, 是一种可在不同器官发挥多效性调节功能的miRNA, 其可通过与下游靶基因结合来调节信号转导通路, 影响细胞炎性因子的分泌及细胞的增殖、分化等生命进程, 同时在免疫炎症反应中扮演着重要角色。

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$): 属于一组新近发现的调节细胞生长和分化的TGF- β 超家族, 其在炎症、组织修复和胚胎发育等方面发挥重要作用, 同时近年来发现其对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用。

摘要

背景: 研究表明, miR-23b水平升高与风湿关节炎的发生发展密切相关, 故抑制miR-23b的表达可作为治疗该病的一个新靶点。

目的: 探究miR-23b对风湿关节炎大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 调节及对破骨细胞活性的抑制作用。

方法: 选取60只SPF级SD雄性大鼠, 随机分为正常对照组、模型组、miR-NC组、miR-23b inhibitor组。除正常对照组外, 其他3组大鼠采用弗氏完全佐剂法进行风湿关节炎建模, 建模成功后, 对miR-NC组尾静脉注射 $20 \mu\text{L } 1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的miR-NC, miR-23b inhibitor组尾静脉注射 $20 \mu\text{L } 1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的miR-23b inhibitor, 正常对照组、模型组同期尾静脉注射同体积生理盐水。21 d后, 苏木精-伊红染色法检测大鼠关节组织病理形态; Real-time PCR 法检测大鼠血清中miR-23b的mRNA相对表达; 免疫组化法检测大鼠滑膜组织中转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达; 抗酒石酸酸性磷酸酶染色法及鬼笔环肽染色法检测破骨细胞活性。

结果与结论: ①正常对照组大鼠关节滑膜细胞结构正常且排列整齐, 模型组、miR-NC组出现明显滑膜细胞增生且排列紊乱, 同时可见毛细血管及纤维结缔组织明显增生, 且出现大量炎性细胞浸润现象, miR-23b inhibitor组可见滑膜细胞轻度增生及少量炎性细胞浸润, 水肿、充血情况明显改善; ②与正常对照组比较, 模型组大鼠血清中miR-23b 相对表达明显升高($P < 0.05$), 模型组与miR-NC组相比无明显差异($P > 0.05$), miR-23b inhibitor组血清中miR-23b 相对表达较miR-NC组明显降低($P < 0.05$); ③与正常对照组比较, 模型组大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达显著升高($P < 0.05$), 模型组与miR-NC组相比无明显差异($P > 0.05$), miR-23b inhibitor组滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达较miR-NC组明显降低($P < 0.05$); ④与正常对照组比较, 模型组大鼠滑膜成纤维细胞抗酒石酸酸性磷酸酶染色可见大量阳性表达的典型多核破骨细胞($P < 0.05$), 模型组与miR-NC组相比无明显差异($P > 0.05$), miR-23b inhibitor组破骨细胞体积及数目较miR-NC组明显减少($P < 0.05$); ⑤与正常对照组比较, 模型组大鼠破骨细胞鬼笔环肽染色可见明显纤维肌动蛋白环形成($P < 0.05$), 模型组与miR-NC组相比无明显差异($P > 0.05$), miR-23b inhibitor组纤维肌动蛋白环面积较miR-NC组明显缩小($P < 0.05$); ⑥上述结果说明, 降低miR-23b表达可对风湿关节炎起到治疗作用, 其可有效抑制大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 表达, 降低破骨细胞活性。

关键词: miR-23b; 风湿关节炎; 滑膜组织; 转化生长因子 $\beta 1$; 破骨细胞活性

缩略语: 抗酒石酸酸性磷酸酶: Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP

miR-23b effects on transforming growth factor beta1 and osteoclast activity in synovial tissue of rats with rheumatoid arthritis

Song Jianhui, Mu Jihong, Li Shiwen

The Second Naval Hospital of Southern Theater Command, Sanya 572000, Hainan Province, China

Song Jianhui, Attending physician, The Second Naval Hospital of Southern Theater Command, Sanya 572000, Hainan Province, China

Corresponding author: Mu Jihong, MD, Attending physician, The Second Naval Hospital of Southern Theater Command, Sanya 572000, Hainan Province, China

南部战区海军第二医院, 海南省三亚市 572000

第一作者: 宋建辉, 男, 1982年生, 海南省乐东县人, 汉族, 主治医师, 主要从事创伤外科、显微外科的研究。

通讯作者: 穆继宏, 博士, 主治医师, 南部战区海军第二医院, 海南省三亚市 572000

<https://orcid.org/0000-0002-2358-1165> (宋建辉)

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (SQ2015ZRJJ0102), 项目负责人: 穆继宏

引用本文: 宋建辉, 穆继宏, 黎士文. miR-23b 对风湿关节炎大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 及破骨细胞的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(26):4175-4180.

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that an elevation in miR-23b is closely related to the occurrence and development of rheumatoid arthritis; therefore, inhibiting the expression of miR-23b can be a new target for the treatment of the disease.

OBJECTIVE: To explore the effect of miR-23b on the regulation of transforming growth factor- β 1 in synovial tissue and the inhibition of osteoclast activity in rats with rheumatoid arthritis.

METHODS: Sixty SPF male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, model group, miR-NC group, and miR-23b inhibitor group ($n=15$ per group). Except for the normal control group, animal models of rheumatoid arthritis were prepared in the other three groups using Fredrin complete adjuvant method. After successful modeling, the miR-NC group was injected with 20 μ L of 1×10^8 /L miR-NC and the miR-23b inhibitor group was injected with 20 μ L of 1×10^8 /L miR-23b inhibitor. Normal control group and model group were injected with the same volume of normal saline at the same time. Twenty-one days later, hematoxylin-eosin staining was used to detect the pathological morphology of the articular tissue of rats, real-time PCR was used to detect the relative mRNA expression of miR-23b in rat serum, and immunohistochemical method was used to detect the protein expression of transforming growth factor- β 1 in the synovial tissue of rats. The activity of osteoclasts was detected by tartrate-resistant acid phosphatase staining and phalloidin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: In the normal control group, the structure of synovial cells was normal and neatly arranged. In the model and miR-NC groups, synovial cells proliferated obviously and arranged in disorder. At the same time, capillaries and fibrous connective tissue were obviously proliferated, accompanied by a large number of inflammatory cells infiltrated. In the miR-23b inhibitor group, mild hyperplasia of synovial cells and a small amount of inflammatory cell infiltration appeared, and edema and congestion were significantly improved. The relative expression of miR-23b in the serum was significantly increased in the model group compared with the normal control group ($P < 0.05$), while there was no significant difference between the model group and the miR-NC group ($P > 0.05$). The relative expression of miR-23b in the miR-23b inhibitor group was significantly lower than that in the miR-NC group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the expression of transforming growth factor- β 1 protein in the synovial tissue was significantly increased in the model group ($P < 0.05$), while there was no significant difference between the model and miR-NC groups ($P > 0.05$). The expression of transforming growth factor- β 1 protein in the synovial tissue was significantly lower in the miR-23b inhibitor group than the miR-NC group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, a highly positive expression of typical multinucleated osteoclasts was found in the synovial fibroblasts of the model group by the tartrate-resistant acid phosphatase staining ($P < 0.05$). There was no significant difference between the model and the miR-NC groups ($P > 0.05$). The volume and number of osteoclasts in the miR-23b inhibitor group were significantly lower than those in the miR-NC group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the phalloidin staining of osteoclasts significantly indicated the formation of rings composed of actin filaments in the model group ($P < 0.05$) and there was no significant difference between the model and miR-NC groups ($P > 0.05$), while the actin ring area was significantly reduced in the miR-23b inhibitor group compared with the miR-NC group ($P < 0.05$). The above results indicate that reducing the expression of miR-23b can play a therapeutic effect on rheumatoid arthritis, which can effectively inhibit the expression of transforming growth factor- β 1 and reduce the activity of osteoclasts in rat synovial tissue.

Key words: miR-23b; rheumatoid arthritis; synovial tissue; transforming growth factor- β 1; osteoclast activity

Funding: Natural Science Foundation of Hainan Province, No. SQ2015ZRJJ0102 (to MJH)

How to cite this article: SONG JH, MU JH, LI SW. miR-23b effects on transforming growth factor beta1 and osteoclast activity in synovial tissue of rats with rheumatoid arthritis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(26):4175-4180.

0 引言 Introduction

风湿关节炎是风湿科常见的慢性自身免疫疾病，通常以关节病变、滑膜炎等为主要特征，同时累及血液、消化、呼吸系统等多种器官，且该病还具有较高的致残率，这不仅对患者的生产生活造成了极大负担，也浪费了大量的社会财富，给社会带来了沉重的经济负担^[1]。因此，预防并探寻一种有效的治疗手段已经成为目前医学领域一个重要的研究课题。风湿关节炎的一个典型病理特征就是骨破坏，而目前研究认为破骨细胞活性的变化是造成该病骨破坏的关键因素，故如何抑制破骨细胞活性、探讨骨侵蚀的病理机制对风湿关节炎的防治具有积极意义^[2]。近年来有研究发现，细胞因子的过表达或失调可介导包括风湿关节炎在内的多种免疫炎症疾病，而转化生长因子 β 1作为一种重要且多功能的细胞因子，其在风湿关节炎中扮演着重要角色，其可促进滑膜增生、促进免疫炎症反应等，从而参与疾病进程^[3]。

风湿关节炎的病因复杂，目前尚未完全阐明，但越来越多的研究表明，基因的正常表达与其密切相关，其中微小RNA(microRNA, miR)几乎参与了该病的整个发病过程^[4]。miR-23b是一种可在不同器官发挥多效性调节功能的miRNA，有研究表明，miR-23b水平升高与风湿关节炎的发生发展密切相关，故抑制miR-23b的表达可作为治疗该病的一个新靶点^[5]。但其作用机制目前临床几乎没有研究，因此文章就miR-23b对风湿关节炎大鼠滑膜组织转化生长因子 β 1调节及对破骨细胞活性的抑制作用进行研究探讨，为临床治疗风湿关节炎提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。组间进行t检验，多组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2020年5月至2021年11月在空军军医大学西京医院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选取湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供的60只SPF级SD雄性大鼠，合格证书为：SCXK(湘)2020-0009，体质量220-280g，25℃、50%相对湿度、自然光照下饲养，按照《实验动物管理条例》规定进行实验。实验方案经南部战区海军第二医院实验动物伦理委员会批准，批准号为202004-10。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 仪器与试剂 弗氏完全佐剂(货号：F5881，北京伊塔生物科技有限公司)；miR-23b inhibitor(货号：hsa-miR-23b，百奥迈科生物技术有限公司)；重组腺病毒载体转染试剂盒(货号：YJ160036，上海一基实业有限公司)；高速冷冻离心机(货号：5024R，德国Eppendorf公司)；多聚甲醛(货号：158127，Sigma-AldrichLLC.公司)；培养瓶(货号：430720，北京伊塔生物科技有限公司)；巨噬细胞集落刺激因子(货号：BRP144，北京博尔西科技有限公司)；培养箱(货号：D180-P，深圳市瑞沃德生命科技有限公司)；自动包埋机(货号：EG1150，德国Leica公司)；苏木素染液(货

号: G1080, 北京索莱宝科技有限公司); 伊红染液(货号: AG1100-100ml, 上海吉至生化科技有限公司); 光学显微镜(货号: CX-60, 日本 OLYMPUS 公司); 荧光实时定量 PCR 仪(货号: 7500, 美国 Invitrogen 公司); PowerPac™ 基础电泳仪(货号: 164-5051, 美国 Bio-Rad 公司); 实时 Real-Time PCR 试剂盒(货号: 7000, 美国 ABI 公司); 超纯 RNA 提取试剂盒(货号: SN0300, 北京翔悦环宇科技发展有限公司); 紫外分光光度计(货号: UH5700, 上海正晁商贸有限公司); DNA Eraser(货号: 21190, 北京启维益成科技有限公司); cDNA 第一链合成试剂盒(货号: KR104, 北京天根生化科技有限公司); 免疫组化试剂盒(货号: YDDEF001, 上海羽味生物科技有限公司); DAB 显色试剂盒(货号: R2751, 北京康瑞纳生物科技有限公司); 抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒(货号: 387A-1KT, 上海宇劲生物技术有限公司); Triton X-100(货号: FT21411yy, 上海梵态生物科技有限公司); 鬼笔环肽-罗丹明标记(货号: BY23102, 西安百萤生物科技有限公司); 激光扫描共聚焦显微镜(货号: FV3000, 奥林巴斯销售服务有限公司); 转化生长因子 $\beta 1$ 抗体(货号: PL0304412, 上海雅吉生物科技有限公司); 生理盐水(货号: YT3740, 北京伊塔生物科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠分组及风湿性关节炎模型的建立 选取 60 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 随机分为正常对照组、模型组、miR-NC 组、miR-23b inhibitor 组, 每组 15 只。除正常对照组外, 对其他 3 组大鼠进行风湿性关节炎建模。首先将大鼠固定好, 将其后肢消毒后, 于足趾皮下注射 0.1 mL 的弗氏完全佐剂, 7 d 后再注射 1 次, 观察大鼠后肢出现明显红肿且后肿胀持续, 则视为建模成功, 正常对照组同期给予同体积生理盐水。基因转染: 按照重组腺病毒载体转染试剂盒说明书, 将 miR-NC、miR-23b inhibitor 质粒与载体分别加入到不含血清的 DMEM 培养液中, 混合均匀后室温条件下孵育 10 min, 然后分别取等量 miR-NC、miR-23b inhibitor 加入到脂质体中配置成转染液, 密封保存以备后续实验。建模成功后 1 d, miR-NC 组尾静脉注射 $20 \mu\text{L} \times 10^8 \text{L}^{-1}$ 的 miR-NC, miR-23b inhibitor 组尾静脉注射 $20 \mu\text{L} \times 10^8 \text{L}^{-1}$ 的 miR-23b inhibitor, 均 1 次/d 持续 21 d, 正常对照组、模型组同期尾静脉注射同体积生理盐水。

1.4.2 标本采集处理 在实验结束后将大鼠用 75 mg/kg 的氯胺酮麻醉处死, 腹主动脉收集血样静置 4 h, 在 4 °C、3 500 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液于冰箱中密封保存。同时取双肢关节组织及滑膜组织, 左肢滑膜组织用 40 g/L 的多聚甲醛溶液固定 96 h 后, 生理盐水漂洗干净, 放入冰箱中密封保存, 右肢滑膜组织剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的组织块后将其置入培养瓶内培养, 24 h 换 1 次培养液, 待组织块间生长的成纤维细胞彼此接触时去除组织块, 将其继续培养至 3 代后, 将其接种于 6 孔板内, 加入 20 g/L 巨噬细胞集落刺激因子进行诱导破骨细胞, 然后将其置于体积分数 5%CO₂ 的培养箱中, 在 37 °C 的条件下培养 3 周, 以备后续实验。

实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探究 miR-23b 对风湿性关节炎大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 调节及对破骨细胞活性的抑制作用
动物来源及品系	SPF 级 SD 大鼠由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供
模型与所研究疾病的关系	该模型为研究风湿性关节炎的经典模型
造模技术描述	于大鼠足趾皮下注射 0.1 mL 的弗氏完全佐剂, 7 d 后再注射 1 次, 然后观察大鼠后肢情况, 当出现明显红肿且后肿胀持续, 则视为建模成功
造模主要诱导用药	弗氏完全佐剂
动物数量及分组方法	选取 60 只 SD 大鼠, 随机分为正常对照组、模型组、miR-NC 组及 miR-23b inhibitor 组, 每组 15 只
造模后实验观察指标	①关节组织苏木精-伊红染色观察; ②血清中 miR-23b mRNA 相对表达; ③滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达; ④滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞 TRAP 染色观察及鬼笔环肽染色观察
造模后动物处理	实验结束后麻醉大鼠, 腹主动脉收集血样, 同时取双肢关节组织及滑膜组织进行后续实验及指标检测
伦理委员会批准	实验方案经南部战区海军第二医院实验动物伦理委员会批准(批准号为 202004-10)

1.4.3 大鼠关节组织病理检测 取各组关节组织, 用梯度乙醇依次脱水、二甲苯透明后, 进行常规石蜡包埋、切片、脱蜡处理, 然后将切片用体积比为 1 : 19 的冰醋酸和体积分数 95% 的乙醇固定 1 min, 自来水冲洗后, 用苏木精-伊红染色, 染色完成后, 用梯度乙醇及二甲苯脱水、透明后, 中性树胶封固处理, 用光学显微镜进行组织病理学观察。

1.4.4 大鼠血清中 miR-23b 的 mRNA 检测 采用 Real-time PCR 法检测, 严格按照实时 Real-Time PCR 试剂盒步骤进行检测, 取大鼠血清, 用超纯 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用紫外分光光度计检测 RNA 纯度, 用电泳仪检测其完整性, 用 DNA Eraser 对残留 DNA 进行消化, 然后根据 cDNA 第一链合成试剂盒说明, 进行反转录合成 cDNA; 利用荧光实时定量 PCR 仪, 在 95 °C 条件下预变性 10 min, 变性 30 s, 70 °C 条件下延伸 1 min, 60 °C 条件下退火 30 s, 此循环进行 40 次, 收集 miR-23b 的荧光信号, 反应结束后用软件自动分析并绘制 PCR 产物熔解曲线图, 然后以同一样本中的 U6 的 Ct 值作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其基因相对表达量, miR-23b 引物序列为, 上游: ACA CTC CAG CTG GGA TCA CAT TGC CAG G, 下游: CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG GGT AAT CC, 154 bp; U6 上游: CTC GCT TCG GCA GCA CA, 下游: AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT, 112 bp。

1.4.5 大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达检测 采用免疫组化法进行检测, 取各组大鼠滑膜组织, 进行常规石蜡包埋、切片、脱蜡后, 在清水中冲洗一段时间, 然后用体积分数 3% 的 H₂O₂ 去离子水孵育 10 min, 清水洗涤 2 次, PBS 洗涤 3 次, 高压修复 3 min, 冷却后在 37 °C, 2%BSA 条件下封闭 30 min, 按说明书用封闭液稀释一抗 (1 : 200), 加入稀释的转化生长因子 $\beta 1$ 的一抗 4 °C 冰箱过夜, PBS 洗涤 3 次,

加入二抗 (1 : 200), 37 °C 轻摇室温孵育 30 min; PBS 洗涤 5 次, 加入 SP, 37 °C 室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 用 DAB 进行 8 min 显色后, 自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、中性树胶封固处理, 用光学显微镜观察, 然后用计算机病理图像处理系统对其阳性表达进行半定量测定, 并用积分吸光度值来展示统计的结果。

1.4.6 滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞 TRAP 染色观察破骨细胞形成情况 根据 TRAP 染色试剂盒使用说明书, 取各组诱导完成的破骨细胞, PBS 洗涤 3 次, 室温下 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min 后, 去离子水洗涤 3 次, 加入 37 °C 预热的 TRAP 染色液, 避光染色 1 h, 去离子水洗涤 3 次后, 苏木素染色 1 min, PBS 洗涤 3 次, 待干燥后用中性树胶进行封固, 在光学显微镜下拍照观察, TRAP 阳性细胞核 ≥ 3 的为破骨细胞, 然后用计算机病理图像处理系统对其阳性表达进行半定量测定, 并用积分吸光度值来展示统计的结果。

1.4.7 滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞鬼笔环肽染色观察肌动蛋白环变化 取各组诱导完成的破骨细胞, PBS 洗涤 3 次, 室温下 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 3 次后, 加入 0.1% 的 Triton X-100 透膜 10 min, 在 5% BSA 条件下封闭 60 min, PBS 洗涤 3 次, 用罗丹明标记的鬼笔环肽避光染色 30 min, PBS 洗涤 3 次后, 用 DAPI 核染 3 min, PBS 洗涤 3 次, 用荧光封片液封固, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察拍照, 绿色为肌动蛋白环, 蓝色为细胞核, 然后用计算机病理图像处理系统对其阳性表达进行半定量测定, 并用积分吸光度值来展示统计的结果。

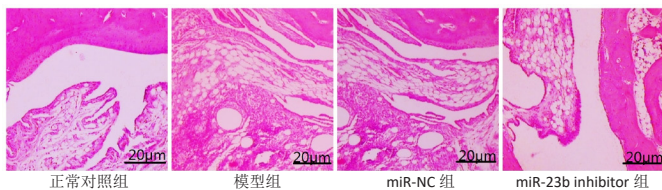
1.5 主要观察指标 ①各组大鼠关节组织苏木精 - 伊红染色观察; ②血清中 miR-23b mRNA 相对表达情况; ③滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达情况; ④滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞 TRAP 染色观察; ⑤滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞鬼笔环肽染色观察。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 对大鼠观察指标进行统计分析, 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 组间进行 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章的统计学方法已经南部战区海军第二医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 各组大鼠关节组织苏木精 - 伊红染色结果 正常对照组关节滑膜细胞结构正常且排列整齐, 可见少量毛细血管和疏松结缔组织, 未见关节腔渗出、水肿、充血等现象; 模型组、miR-NC 组出现明显滑膜细胞增生且排列紊乱, 同时可见毛细血管及纤维结缔组织明显增生; miR-23b inhibitor 组可见滑膜细胞轻度增生, 水肿、充血情况明显改善, 见图 1。

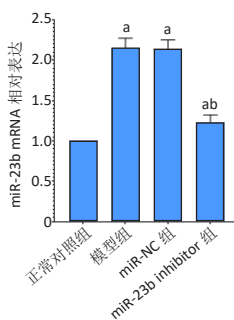
2.2 各组大鼠血清中 miR-23b 相对表达结果 正常对照组 miR-23b 相对表达为 1.00, 模型组为 2.15, miR-NC 组为 2.14, miR-23b inhibitor 组为 1.23; 与正常对照组比较, 模型组血清中 miR-23b 相对表达明显升高 ($P < 0.05$), 模型组与 miR-NC 组



图注: 正常对照组关节滑膜细胞结构正常且排列整齐; 模型组、miR-NC 组可见滑膜细胞明显增生且排列紊乱, 毛细血管及纤维结缔组织明显增生; miR-23b inhibitor 组可见滑膜细胞轻度增生, 水肿、充血情况明显改善

图 1 | 各组大鼠关节组织苏木精 - 伊红染色 (x400)
Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining of rat joint tissue in each group (x400)

相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 与 miR-NC 组相比, miR-23b inhibitor 组血清中 miR-23b 相对表达明显降低 ($P < 0.05$), 见图 2。

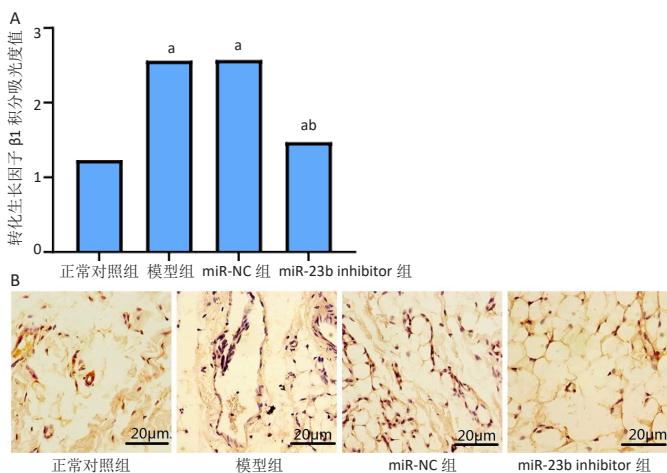


图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 miR-NC 组相比, ^b $P < 0.05$

图 2 | 各组大鼠血清中 miR-23b mRNA 相对表达

Figure 2 | Relative expression of miR-23b mRNA in serum of rats in each group

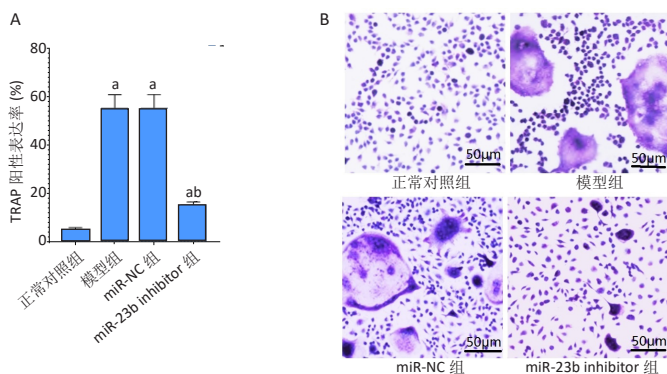
2.3 各组大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达结果 正常对照组转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达积分吸光度值为 1.23, 模型组为 2.56, miR-NC 组为 2.57, miR-23b inhibitor 组为 1.47, 与正常对照组比较, 模型组滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 模型组与 miR-NC 组相比无明显差异 ($P > 0.05$), miR-23b inhibitor 组与 miR-NC 组相比, 滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 见图 3。



图注: 图 A 为蛋白的半定量分析, 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 miR-NC 组相比, ^b $P < 0.05$; B 为免疫组化染色光学显微镜观察 (x400), 可见 miR-23b inhibitor 组滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达较 miR-NC 组明显降低

图 3 | 各组大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达
Figure 3 | Expression of transforming growth factor- $\beta 1$ protein in synovial tissue of rats in each group

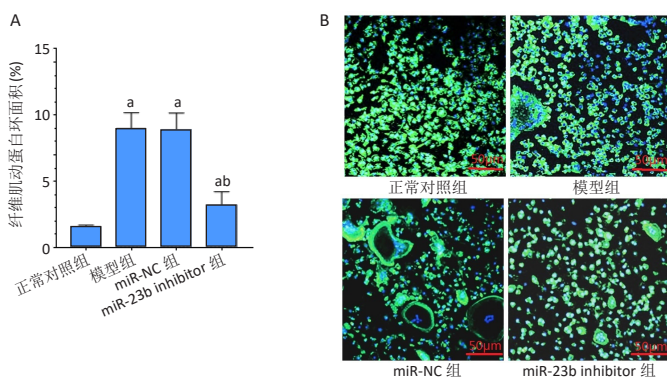
2.4 各组大鼠滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞 TRAP 染色结果 正常对照组 TRAP 阳性表达率为 5.23%，模型组为 55.36%，miR-NC 组为 55.41%，miR-23b inhibitor 组为 15.44%；与正常对照组比较，模型组可见大量 TRAP 阳性表达的典型多核破骨细胞 ($P < 0.05$)，模型组与 miR-NC 组相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，与 miR-NC 组相比，miR-23b inhibitor 组破骨细胞体积及数目明显减少 ($P < 0.05$)，见图 4。



图注：图 A 为阳性表达半定量分析，与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与 miR-NC 组相比，^b $P < 0.05$ ；B 为 TRAP 染色光学显微镜下观察 ($\times 200$)，可见 miR-23b inhibitor 组破骨细胞体积及数目较 miR-NC 组明显减少
图 4 | 各组大鼠滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色结果

Figure 4 | Tartrate-resistant acid phosphatase staining of rat synovial fibroblast-induced osteoclasts in each group

2.5 各组大鼠兔笔环肽染色结果 正常对照组纤维肌动蛋白环面积为 1.58%，模型组为 8.98%，miR-NC 组为 8.95%，miR-23b inhibitor 组 3.22%，与正常对照组比较，模型组可见明显纤维肌动蛋白环形成 ($P < 0.05$)，模型组与 miR-NC 组相比无明显差异 ($P > 0.05$)，miR-23b inhibitor 组与 miR-NC 组相比，纤维肌动蛋白环面积明显缩小 ($P < 0.05$)，见图 5。



图注：图 A 为纤维肌动蛋白环面积检测结果，与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与 miR-NC 组相比，^b $P < 0.05$ ；B 为兔笔环肽染色激光扫描共聚焦显微镜下观察 ($\times 200$)，可见 miR-23b inhibitor 组纤维肌动蛋白环面积较 miR-NC 组明显缩小

图 5 | 各组大鼠滑膜成纤维细胞诱导破骨细胞兔笔环肽染色结果
Figure 5 | Phalloidin staining of rat synovial fibroblast-induced osteoclasts in each group

3 讨论 Discussion

风湿性关节炎是可发生在任何年龄段的疾病，且其发病率随着年龄的增加而增加，而几乎所有患者关节功能都会出现不同程度的丧失，这给患者及其家属带来了沉重的生理、心理负担，同时也对患者日常生活及社会活动造成了极大影响^[6]。因此，探寻一种有效地治疗手段就显得尤为重要。miRNA 作为一种非编码 RNA，可通过调控其靶基因来调控许多病理、生理过程，且近年来有研究表明，其在包括风湿性关节炎在内的多种与炎症和免疫反应相关的疾病中发挥着重要作用^[7]。因此，此次研究就 miR-23b 对风湿性关节炎大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 调节及对破骨细胞活性的抑制作用进行研究探讨，以期为临床应用提供参考。

此次研究发现，miR-23b 在风湿性关节炎大鼠模型中呈高表达，而抑制 miR-23b 可显著改善风湿性关节炎大鼠的病理状况，这说明抑制 miR-23b 对风湿性关节炎具有治疗作用。多数 miRNA 都在免疫炎症反应中占有重要地位，而 miR-23b 是 miRNAs 的一种，其可通过与下游靶基因结合来调节信号传导通路，影响细胞炎症因子的分泌及细胞的增殖、分化等生命进程^[8-9]。风湿性关节炎属于慢性自身免疫性疾病，以侵蚀性、对称性多关节炎为主要临床表现，同时逐渐出现关节软骨及骨破坏，严重时甚至会导致关节畸形以及功能丧失，因此早诊断、早治疗就显得尤为重要^[10]。而对于风湿性关节炎大鼠，miR-23b 抑制剂可能是通过与 miR-23b 结合，来降解其 mRNA 并抑制其蛋白质的合成，从而调控关键信号通路的转录及翻译，抑制与细胞外基质形成和损害相关的基因表达，并参与细胞过程的调控，进而抑制炎症因子的分泌、促进滑膜细胞的凋亡、抑制滑膜细胞的增殖及分化等，最终到达有效改善疾病状况的目的。刘茜^[11]研究发现，miR-23b 在类风湿性关节炎患者的血清中呈异常高表达，经治疗后其表达显著下降，这说明其可能成为提示疾病活动和判断疗效的生物学指标，这与此次研究的结果类似。

此次研究表明，与正常对照组比较，模型组、miR-NC 组滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达显著升高，miR-23b inhibitor 组与 miR-NC 组相比，滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达明显降低，这说明抑制 miR-23b 可显著抑制转化生长因子 $\beta 1$ 表达。近年来研究表明，细胞因子在炎症和免疫等生物活动过程中发挥着重要作用，其是风湿性关节炎出现损伤及炎症的重要因素，而转化生长因子 $\beta 1$ 作为细胞因子的一种，其在增强细胞外基质合成和炎症细胞趋化、促进血管及滑膜细胞增生等方面发挥着重要作用^[12-13]。风湿性关节炎的发病机制极为复杂，是遗传、环境、激素等多种因素共同作用的结果，且越来越多的研究表明，自身免疫性炎症反应是导致骨与关节组织持续性损伤的关键所在，因此如何抑制自身免疫性炎症反应是目前临床工作的重点所在^[14]。而对于风湿性关节炎大鼠，miR-23b 抑制剂可能是通过抑制上游免疫细胞的活化及相关信号通路的表达，来抑制转化生长因子 $\beta 1$ 的

分泌及表达,从而下调共刺激分子及黏附分子的表达、抑制细胞凋亡因子在滑膜细胞中的表达、抑制细胞外基质的合成与降解等,进而抑制滑膜及血管增生、减少炎症细胞浸润以及肉芽组织形成,最终达到保护软骨和骨的作用,有效改善大鼠关节病理情况^[15]。刘欢等^[16]研究发现,与健康者相比,类风湿关节炎患者血清中转化生长因子 $\beta 1$ 水平明显升高,且与疾病活动指数呈正相关,这说明其参与了类风湿关节炎的发生、发展,这与此次研究的结果类似。

此次研究发现,抑制 miR-23b 可显著降低 TRAP 阳性表达,抑制纤维肌动蛋白环形成,这说明抑制 miR-23b 可显著抑制破骨细胞活性。TRAP 染色及鬼笔环肽染色是反映破骨细胞活性的有效指标,TRAP 染色主要反映了破骨细胞的形成,是破骨细胞的典型标志物,而鬼笔环肽染色可有效显示破骨细胞的分化情况^[17-18]。风湿关节炎易致残的主要原因为关节侵蚀导致的骨破坏及损伤,而破骨细胞是其中的关键细胞之一,有研究表明,破骨细胞的活化是骨损伤及骨代谢紊乱的关键因素,因此抑制破骨细胞活性是临床治疗该病的重要途径之一^[19]。对于风湿关节炎大鼠,miR-23b 抑制剂可能是通过调控靶基因的表达及影响细胞因子的生成,来干预相关信号蛋白的表达,从而影响破骨样分化因子的生成、并参与细胞膜、细胞质等细胞器的形成,进而抑制破骨细胞的活化及分化,最终到达减轻风湿关节炎大鼠骨质破坏的目的。冯佳等^[20]研究发现,艾拉莫德对类风湿关节炎患者外周血中的破骨细胞活性有显著抑制作用,其可通过抑制破骨细胞特异性基因的表达,来抑制其增殖、分化,这与此次研究的结果类似。

综上所述,降低 miR-23b 可对风湿关节炎起到治疗作用,其可有效抑制大鼠滑膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 表达,降低破骨细胞活性。但研究仍然存在一定不足,如未设计关节液 miR-23b 的分析,未设计最基本的炎性指标检测,未进行多剂量实验等,研究内容需进一步完善,在今后的研究中应该增加实验样本,通过多元化实验方案为临床治疗提供有力的临床依据。

作者贡献: 宋建辉进行实验并收集数据、设计文章内容、查阅文献、撰写文章;穆继宏协助数据整理分析、修改、补充文章设计缺陷,并查阅相关文献,对前言及讨论进行补充说明;黎士文对文章数据进行统计学分析及统计学图片制作、审阅文章、补充遗漏及核对统计值。

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中不存在利益冲突。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《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。

4 参考文献 References

- [1] TATANGELO M, TOMLINSON G, PATERSON JM, et al. Health care costs of rheumatoid arthritis: A longitudinal population study. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251334.
- [2] 商玮,徐子涵,郭郡浩,等.姜黄素对类风湿关节炎破骨细胞分化中 NF- κ B p65 和 NFATc1 表达的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*,2018,24(4):52-57.
- [3] ZHANG J, LI C, ZHENG Y, et al. Inhibition of angiogenesis by arsenic trioxide via TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF functional module in rheumatoid arthritis. *Oncotarget*. 2017;8(43):73529-73546.
- [4] 龙瑞文,周焯,吕蔚然,等.类风湿关节炎患者外周血 miR-146a、miR-155、Ets-1 以及 IRAK1 的表达及临床意义 [J]. *现代免疫学*,2017,37(2):115-120.
- [5] ZHU S, PAN W, SONG X, et al. The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK- α . *Nat Med*. 2012;18(7):1077.
- [6] 邓媛,陈勇,陈振云,等.雷公藤对类风湿关节炎疗效及 IgA,IgG,RF 变化研究 [J]. *中华中医药学刊*,2020,38(2):242-244.
- [7] XIAO J, WANG R, ZHOU W, et al. LncRNA NEAT1 regulates the proliferation and production of the inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by targeting miR-204-5p. *Human Cell*. 2021;34(2):372-382.
- [8] 杨明义,苏亚妮,许珂,等. MiR-103a-3p 与 miR-107: 骨关节炎进展过程中的潜在生物标志物 [J]. *中华风湿病学杂志*,2021,25(9):616-621.
- [9] 韩浩博. 树枝状高分子 PAMAM 衍生物介导 miR-23b 递送治疗肿瘤和类风湿性关节炎的研究 [D]. 长春: 吉林大学,2020.
- [10] ANITA C, MUNIRA M, MURAL Q, et al. Topical nanocarriers for management of Rheumatoid Arthritis: A review. *Biomed Pharmacother*. 2021;141(1):111880.
- [11] 刘茜. microRNA-23b 在类风湿关节炎患者血浆中的表达及其临床意义 [D]. 苏州: 苏州大学,2018.
- [12] WANG Y, LI G, GUO W, et al. LncRNA PlncRNA-1 participates in rheumatoid arthritis by regulating transforming growth factor β 1. *Autoimmunity*. 2020;53(6):297-302.
- [13] 牟晓月,张幽幽,陶海英,等. 类风湿关节炎外周 Foxp3、TGF- β 1 与动脉粥样硬化的关系 [J]. *医学研究杂志*,2019,48(6):105-108.
- [14] LOPES FHA, FREITAS MVC, DE BRUIN VMS, et al. Depressive symptoms are associated with impaired sleep, fatigue, and disease activity in women with rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol*. 2021;61(1):18-23.
- [15] CHEN M, SHI J, ZHANG W, et al. miR-23b controls TGF- β 1 induced airway smooth muscle cell proliferation via direct targeting of Smad3. *Pulm Pharmacol Ther*. 2017;42:33-42.
- [16] 刘欢,李浪. 类风湿关节炎患者血清肿瘤坏死因子- α , 转化生长因子- β 1 水平与疾病活动指数的相关性 [J]. *临床医学研究与实践*,2020,5(19):90-91.
- [17] 吴玉寒,陈勇. 类风湿关节炎破骨细胞的活化机制及其预测指标 [J]. *生命的化学*,2020,40(3):378-383.
- [18] 徐子涵,商玮,蔡辉. 破骨细胞在类风湿关节炎骨侵蚀中的研究进展 [J]. *现代医学*,2017,45(3):446-450.
- [19] PANDEY AK, SAXENA A, DEY SK, et al. Correlation between an intronic SNP genotype and ARL15 level in rheumatoid arthritis. *J Genet*. 2021;100:26.
- [20] 冯佳,龚书识,夏燕,等. 艾拉莫德对类风湿关节炎外周血破骨细胞分化及破骨细胞相关基因表达的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*,2019,25(1):97-102.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)