

miR-155/瘦素受体/AMPK轴在结核菌素诱导破骨细胞形成中的作用及机制

王增顺, 索南昂秀, 刘立民, 周京元

<https://doi.org/10.12307/2024.333>

投稿日期: 2020-10-21

采用日期: 2020-12-18

修回日期: 2023-06-21

在线日期: 2023-07-08

中图分类号:

R459.9; R318; R681

文章编号:

2095-4344(2024)20-03190-06

文献标识码: A

文章快速阅读: miR-155/瘦素受体/AMPK轴参与结核菌素诱导的破骨细胞形成

细胞及分组干预:

培养单核巨噬细胞RAW264.7细胞, 用不同浓度结核菌素处理, 转染阴性对照序列或miR-155抑制物、阴性对照siRNA序列或瘦素受体siRNA序列。

检测指标:

(1) 抗酒石酸酸性磷酸酶染色检测破骨细胞数量;
(2) 荧光定量PCR检测miR-155 mRNA表达;
(3) Western blot检测瘦素受体、p-AMPK蛋白表达;
(4) 双荧光素酶报告基因验证miR-155靶向瘦素受体。

结论:

(1) 结核菌素诱导破骨细胞形成, 增加miR-155表达, 抑制下游瘦素受体表达及AMPK激活;
(2) miR-155靶向瘦素受体, 进而抑制AMPK激活。

文题释义:

miRNA: 一族18-25 nt的小分子非编码RNA, 能够识别靶基因mRNA 3'UTR并阻碍mRNA翻译或诱导mRNA水解, 进而在转录后水平实现对基因表达的负调控。

破骨细胞: 由单核巨噬细胞分化而来的终末细胞, 介导骨吸收, 在骨发育、生长、修复、重建中具有重要的作用。

摘要

背景: 破骨细胞异常活化在脊柱结核骨质破坏中起重要作用。在骨质疏松发病过程中, 敲低miR-155通过增加瘦素受体的表达来激活磷酸腺苷依赖的蛋白激酶(AMP-dependent protein kinase, AMPK), 进而抑制破骨细胞分化及骨吸收。但miR-155/瘦素受体/AMPK轴在脊柱结核骨质破坏中的作用尚不清楚。

目的: 研究miR-155/瘦素受体/AMPK轴在结核菌素诱导破骨细胞形成中的作用及机制。

方法: 培养单核巨噬细胞RAW264.7细胞, 用不同浓度(1.0, 2.5, 5.0, 10.0 IU/mL)结核菌素处理, 转染阴性对照序列或miR-155抑制物、阴性对照siRNA序列或瘦素受体siRNA序列。采用抗酒石酸酸性磷酸酶染色检测破骨细胞数量, 荧光定量PCR检测miR-155 mRNA表达, Western blot检测瘦素受体、p-AMPK蛋白表达, 双荧光素酶报告基因验证miR-155靶向瘦素受体。

结果与结论: ①与对照组比较, 2.5, 5.0, 10.0 IU/mL结核菌素组破骨细胞数量、miR-155 mRNA表达水平明显增加, 瘦素受体、p-AMPK蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$); ②与阴性对照+5.0 IU/mL结核菌素组比较, miR-155抑制物+5.0 IU/mL结核菌素组破骨细胞数量、miR-155 mRNA表达水平明显降低, 瘦素受体、p-AMPK蛋白表达水平明显增加($P < 0.05$); ③与阴性对照组比较, miR-155抑制物组瘦素受体野生型双荧光素酶报告基因的荧光活力增加, miR-155模拟物组瘦素受体野生型双荧光素酶报告基因的荧光活力降低($P < 0.05$); ④与阴性对照siRNA+miR-155抑制物+5.0 IU/mL结核菌素组比较, 瘦素受体siRNA+miR-155抑制物+5.0 IU/mL结核菌素组miR-155 mRNA表达水平无明显变化($P > 0.05$), 破骨细胞数量明显增加, 瘦素受体、p-AMPK蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$); ⑤结果表明, 结核菌素通过增加miR-155表达抑制下游瘦素受体表达及AMPK激活, 进而诱导破骨细胞形成。

关键词: 破骨细胞; 结核菌素; 单核巨噬细胞; 骨吸收; miR-155; 瘦素受体; AMPK

Role and mechanism of miR-155/leptin receptor/adenosine phosphate-dependent protein kinase axis in tuberculin-induced osteoclast formation

Wang Zengshun, Suonan Angxiu, Liu Limin, Zhou Jingyuan

Department of Orthopedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China

Wang Zengshun, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China

Corresponding author: Suonan Angxiu, Chief physician, Department of Orthopedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China

Abstract

BACKGROUND: Abnormal activation of osteoclasts plays an important role in the bone destruction due to spinal tuberculosis. During the pathogenesis of osteoporosis, miR-155 knockdown activates adenosine phosphate-dependent protein kinase (AMPK) by increasing the expression of leptin receptors, thereby inhibiting osteoclast differentiation and bone resorption. However, the role of miR-155/leptin receptor (LEPR)/AMPK axis in the bone destruction due to spinal tuberculosis remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the role and mechanism of miR-155/LEPR/AMPK axis in tuberculin-induced osteoclast formation.

青海省人民医院骨科, 青海省西宁市 810000

第一作者: 王增顺, 男, 1987年生, 青海省海东市人, 汉族, 2013年大连医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事脊柱外科研究。

通讯作者: 索南昂秀, 主任医师, 青海省人民医院骨科, 青海省西宁市 810000

<https://orcid.org/0000-0001-5959-2918> (王增顺)

基金资助: 2017年青海省卫生和计划生育委员会科研课题(2017-wjzdx-05), 项目负责人: 索南昂秀

引用本文: 王增顺, 索南昂秀, 刘立民, 周京元. miR-155/瘦素受体/AMPK轴在结核菌素诱导破骨细胞形成中的作用及机制 [J].

中国组织工程研究, 2024, 28(20):3190-3195.



METHODS: RAW264.7 cells were cultured and treated with different concentrations of purified protein derivative (PPD) (1.0, 2.5, 5.0, 10.0 IU/mL) and transfected with negative control (NC) sequence or miR-155 inhibitor, NC siRNA sequence or LEPR siRNA sequence. Tartrate resistant acid phosphatase staining was used to detect the number of osteoclasts. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of miR-155. Western blot was used to detect the expression of LEPR and p-AMPK. Double luciferase reporter gene was used to verify miR-155 targeting LEPR.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the number of osteoclasts and the expression level of miR-155 significantly increased, while the expression level of LEPR and p-AMPK significantly decreased in 2.5, 5.0, and 10.0 IU/mL PPD groups ($P < 0.05$). Compared with NC+5.0 IU/mL PPD group, the number of osteoclasts and the expression level of miR-155 significantly decreased, while the expression level of LEPR and p-AMPK significantly increased in the miR-155 inhibitor+5.0 IU/mL PPD group ($P < 0.05$). Compared with the NC group, the fluorescence activity of LEPR wild-type double luciferase reporter gene was increased in the miR-155 inhibitor group, and decreased in the miR-155 mimic group ($P < 0.05$). Compared with si-NC+miR-155 inhibitor+5.0 IU/mL PPD group, the expression level of miR-155 had no significant change, the number of osteoclasts significantly increased, and the expression levels of LEPR and p-AMPK significantly decreased in si-LEPR+miR-155 inhibitor+5.0 IU/mL PPD group ($P < 0.05$). To conclude, tuberculin can induce osteoclast formation by increasing miR-155 expression and inhibiting downstream LEPR expression and AMPK activation.

Key words: osteoclast; tuberculin; mononuclear macrophages; bone resorption; miR-155; leptin receptor; AMPK

Funding: 2017 Scientific Research Project of Qinghai Provincial Health and Family Planning Commission, No. 2017-wjzdx-05 (to SNAX)

How to cite this article: WANG ZS, SUONAN AX, LIU LM, ZHOU JY. Role and mechanism of miR-155/leptin receptor/adenosine phosphate-dependent protein kinase axis in tuberculin-induced osteoclast formation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(20):3190-3195.

0 引言 Introduction

脊柱结核是最常见的骨关节结核类型，表现为进行性椎体骨质破坏。破骨细胞异常活化在脊柱结核骨质破坏中起重要作用，但脊柱结核发病过程中破骨细胞活化的分子机制尚不明确。单核巨噬细胞是破骨细胞的前体细胞，在病理因素的诱导下分化为破骨细胞并介导骨吸收过程，引起骨质破坏。多项骨关节结核的细胞实验研究发现，结核菌素促进单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞^[1-2]，是目前研究脊柱结核骨质破坏的常用细胞模型，研究结核菌素诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的分子机制有助于深入认识脊柱结核骨质破坏的发病机制。

miRNA(miR) 是一类非编码小分子 RNA，在成骨细胞及破骨细胞分化成熟过程中发挥重要作用。有研究报道，miR-155 在骨质疏松小鼠中高表达，敲低 miR-155 可增加瘦素受体表达，激活磷酸腺苷依赖的蛋白激酶 (AMP-dependent protein kinase, AMPK) 途径，抑制破骨细胞分化及骨吸收^[3]，提示 miR-155/瘦素受体/AMPK 轴与破骨细胞分化有关。脊柱结核相关的研究发现，miR-155 高表达与脊柱结核引起的椎体骨质破坏有关^[4]，但 miR-155 在结核菌素诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞过程中的表达是否增加？高表达的 miR-155 是否通过下游瘦素受体/AMPK 促进破骨细胞形成？目前这些问题均未阐明。为此，该研究在结核菌素诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞模型中观察 miR-155/瘦素受体/AMPK 轴的作用及机制，为阐明脊柱结核骨质破坏的发病机制提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 6 月至 2019 年 12 月在青海省人民医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞购自中科院上海细胞资源中心。

1.3.2 试剂 结核菌素注射液 (规格 50 IU/mL、1 mL/支) 购自北京祥瑞生物制品公司；miR-155 抑制物及模拟物、阴性对照序列、瘦素受体 siRNA 序列、阴性对照 siRNA 序列均购

自上海吉凯公司；细胞活力检测试剂盒购自 Promega 公司；抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒购自南京建成研究院；miR 提取分离试剂盒、miR cDNA 第一链合成试剂盒、miR 荧光定量检测试剂盒购自北京天根公司；瘦素受体一抗购自 Abcam 公司；AMPK、p-AMPK 一抗购自 CST 公司。

1.3.3 仪器 显微镜购自 Nikon 公司；荧光定量 PCR 仪购自 ABI 公司；电泳系统及凝胶成像系统购自上海天能公司。

1.4 方法

1.4.1 RAW264.7 细胞培养分组及给药 RAW264.7 细胞用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行贴壁培养，细胞密度长至 80%–90% 后用 0.25% 胰蛋白酶消化，传代后的细胞接种在培养板内并进行分组干预。细胞分组及干预实验分为如下 4 个部分。

(1) 第一部分细胞实验观察不同浓度结核菌素对破骨细胞分化及 miR-155/瘦素受体/AMPK 轴的影响：细胞分为对照组及不同浓度结核菌素组。对照组用不含药物的 DMEM 培养基处理，结核菌素组参照梁思敏等^[4]的研究分别用含有 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 IU/mL 结核菌素注射液的 DMEM 培养基处理，共培养 7 d，每 2 d 换液 1 次，换液前后干预条件不变。每个处理条件设置 5 个重复。

(2) 第二部分细胞实验观察 miR-155 在结核菌素促进破骨细胞分化、抑制瘦素受体/AMPK 中的作用：细胞分为空白对照组、阴性对照组、阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组、miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组。空白对照组用不含药物的 DMEM 培养基处理，阴性对照组转染阴性对照序列，阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组转染阴性对照序列并加入结核菌素注射液使其终浓度达到 5.0 IU/mL，miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组转染 miR-155 抑制物并加入结核菌素注射液使其终浓度达到 5.0 IU/mL，共培养 7 d，每 2 d 换液 1 次，换液前后干预条件不变。每个处理条件设置 5 个重复。

(3) 第三部分细胞实验观察 miR-155 靶向瘦素受体：细胞分为阴性对照组、miR-155 模拟物组、miR-155 抑制物组。将瘦素受体的双荧光素酶报告基因转染进入细胞后，阴性对照组、miR-155 模拟物组、miR-155 抑制物组分别转染阴性对照序列、miR-155 模拟物、miR-155 抑制物，共培养 24 h。每个处理条件设置 5 个重复。

(4) 第四部分细胞实验观察瘦素受体在 miR-155 抑制物抑制结核菌素诱导破骨细胞分化中的作用: 细胞分为对照组、阴性对照 siRNA 组、阴性对照 siRNA+5.0 IU/mL 结核菌素组、阴性对照 siRNA+miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组、瘦素受体 siRNA+miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组。对照组用不含药物的 DMEM 培养基处理, 阴性对照 siRNA 组转染阴性对照 siRNA 序列, 阴性对照 siRNA+5.0 IU/mL 结核菌素组转染阴性对照 siRNA 序列并加入结核菌素注射液使其终浓度达到 5.0 IU/mL, 阴性对照 siRNA+miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组转染阴性对照 siRNA 及 miR-155 抑制物并加入结核菌素注射液使其终浓度达到 5.0 IU/mL, 瘦素受体 siRNA+miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组转染瘦素受体 siRNA 及 miR-155 抑制物并加入结核菌素注射液使其终浓度达到 5.0 IU/mL, 共培养 7 d, 每 2 d 换液 1 次, 换液前后干预条件不变。每个处理条件设置 5 个重复。

1.4.2 细胞存活率检测 RAW264.7 细胞接种在 96 孔培养板内, 细胞接种浓度 $1 \times 10^9 L^{-1}$, 接种量 200 μL /孔, 分组给药后 24 h 采用 MTS 试剂盒进行实验, 每孔加入 200 μL 检测液, 37 $^{\circ}C$ 孵育 4 h 后在酶标仪上检测吸光度值, 计算细胞存活率。

1.4.3 破骨细胞形成检测 RAW264.7 细胞接种在 6 孔培养板内, 细胞接种浓度 $1 \times 10^9 L^{-1}$, 接种量 1.5 mL/孔, 分组给药后 7 d 用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞, 采用抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒进行染色, 苏木精复染后在显微镜下随机观察 5 个视野, 对抗酒石酸酸性磷酸酶阳性染色的破骨细胞进行计数。

1.4.4 miR-155 mRNA 表达检测 RAW264.7 细胞接种在 12 孔培养板内, 细胞接种浓度 $1 \times 10^9 L^{-1}$, 接种量 1.0 mL/孔, 分组给药后 7 d 采用 miRNA 提取分离试剂盒分离细胞中的 miRNA, 而后采用 miR cDNA 第一链合成试剂盒将细胞中提取得到的 miRNA 反转录为 cDNA, 最后采用 miRNA 荧光定量检测试剂盒进行 PCR 反应, 体系如下: cDNA 2 μL 、PreMix 10 μL 、10 $\mu mol/L$ 上游引物及试剂盒中通用下游引物各 0.4 μL 、去离子水补足至 20.0 μL 。在荧光定量 PCR 仪中按照如下程序进行反应: 95 $^{\circ}C$ 15 min 后 94 $^{\circ}C$ 20 s、60 $^{\circ}C$ 34 s, 重复 40 个循环。反应结束后生成循环曲线, 得到循环阈值 Ct, 以 U6 为内参, 计算 miR-155 的表达水平。

1.4.5 瘦素受体、p-AMPK 蛋白表达检测 RAW264.7 细胞接种在 12 孔培养板内, 细胞接种浓度 $1 \times 10^9 L^{-1}$, 接种量 1.0 mL/孔, 分组给药后 7 d 采用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白, 测定蛋白含量并取 30 μg 蛋白样本加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中, 电泳后电转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶在室温封闭 PVDF 膜 1 h, 用 1 : 1 000 稀释的瘦素受体、AMPK、p-AMPK 一抗或 1 : 2 500 稀释的 β -actin 一抗 4 $^{\circ}C$ 孵育 PVDF 膜过夜, 次日洗膜 3 次后用 1 : 2 000 稀释的二抗室温孵育 PVDF 膜 1 h, 最后在凝胶成像仪中曝光得到蛋白条带并计算灰度值, 以瘦素受体/ β -actin、p-AMPK/AMPK 的比值作为蛋白表达水平。

1.4.6 双荧光素酶报告基因实验 取转染瘦素受体野生型双荧光素酶报告基因或突变型双荧光素酶报告基因的阴性对照

组、miR-155 模拟物组、miR-155 抑制物组细胞, 转染 24 h 后采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定细胞中萤火虫及海肾的荧光活力, 按照萤火虫荧光活力/海肾荧光活力计算双荧光素酶报告基因的荧光活性。

1.5 主要观察指标 ①细胞存活率; ②破骨细胞数量; ③ miR-155 表达水平; ④瘦素受体、p-AMPK 表达水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件录入数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过青海省人民医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 不同浓度结核菌素对 RAW264.7 细胞存活率的影响 1.0, 2.5, 5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞的存活率与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 10.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞的存活率与对照组比较明显降低 ($P < 0.05$), 见图 1。

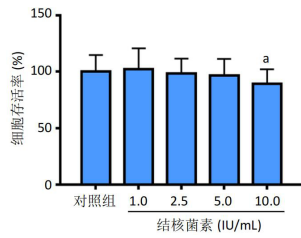
2.2 不同浓度结核菌素对 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响 1.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与对照组比较有所增加, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 2.5, 5.0, 10.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与对照组比较明显增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 不同浓度结核菌素对 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 表达的影响 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞中 miR-155 的 mRNA 表达水平与对照组比较明显增加, 瘦素受体、p-AMPK 的蛋白表达水平与对照组比较明显降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

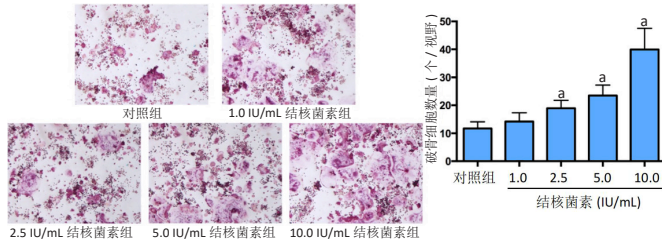
2.4 miR-155 抑制物联合 5.0 IU/mL 结核菌素对 RAW264.7 细胞存活率的影响 空白对照组、阴性对照组、阴性对照 + 5.0 IU/mL 结核菌素组、miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞存活率比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 4。

2.5 miR-155 抑制物联合 5.0 IU/mL 结核菌素对 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响 阴性对照组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与空白对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与阴性对照组比较明显增加 ($P < 0.05$); miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组比较明显减少 ($P < 0.05$), 见图 5。

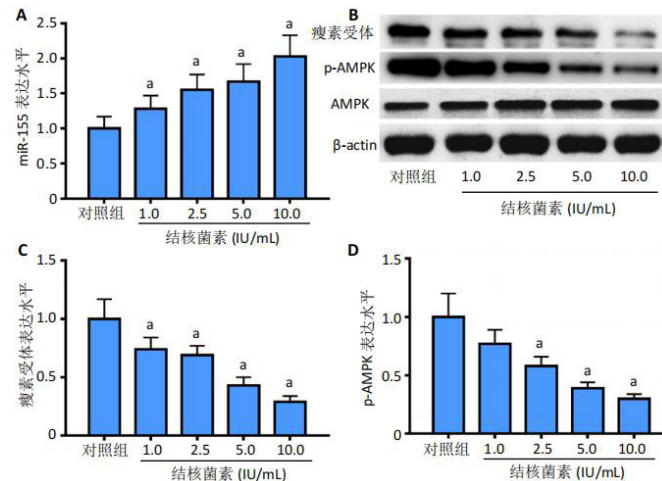
2.6 miR-155 抑制物联合 5.0 IU/mL 结核菌素对 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 表达的影响 阴性对照组 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 的表达水平与空白对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 阴性对照 + 5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞中 miR-155 的 mRNA 表达水平与阴性对照组比较明显增加, 瘦素受体、p-AMPK 的



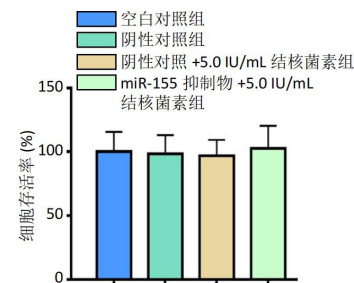
图注: 与对照组比较, $^aP < 0.05$
图 1 | 不同浓度结核菌素对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($n=5$)
Figure 1 | Effect of different concentrations of tuberculin on the survival rate of RAW264.7 cells ($n=5$)



图注: 与对照组比较, $^aP < 0.05$
图 2 | 不同浓度结核菌素对 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响 (抗酒石酸酸性磷酸酶染色, $\times 400$)
Figure 2 | Effect of different concentrations of tuberculin on the differentiation of RAW264.7 cells to osteoclasts (tartrate resistant acid phosphatase staining, $\times 400$)

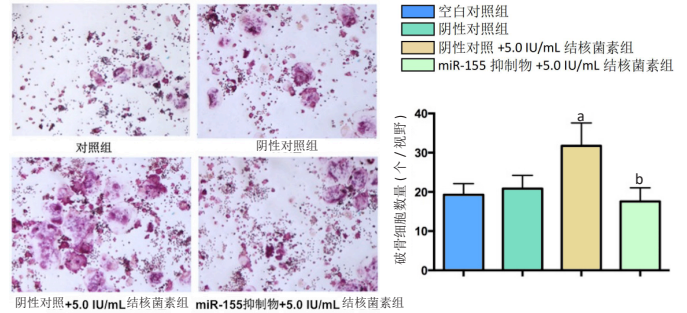


图注: 图中 A 为 5 组间 miR-155 mRNA 表达水平比较; B 为瘦素受体、p-AMPK、AMPK 的蛋白条带; C, D 为 5 组间瘦素受体、p-AMPK 蛋白表达水平比较。与对照组比较, $^aP < 0.05$
图 3 | 不同浓度结核菌素对 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 表达的影响
Figure 3 | Effect of different concentrations of tuberculin on the expression of miR-155, leptin receptor and p-AMPK in RAW264.7 cells

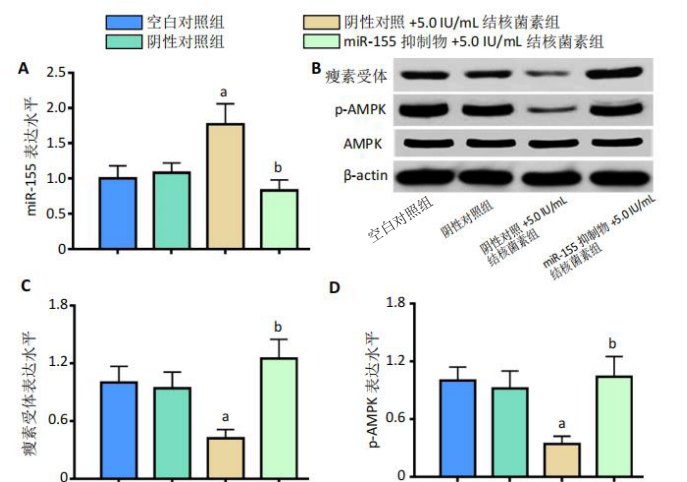


图注: 各组 RAW264.7 细胞存活率比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)
图 4 | miR-155 抑制物联合 5.0 IU/mL 结核菌素对 RAW264.7 细胞存活率的影响
Figure 4 | Effect of miR-155 inhibitor combined with 5.0 IU/mL tuberculin on the survival rate of RAW264.7 cells

蛋白表达水平与阴性对照组比较明显降低 ($P < 0.05$); miR-155 抑制物 +5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞中 miR-155 的 mRNA 表达水平与阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组比较明显降低, 瘦素受体、p-AMPK 的蛋白表达水平与阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组比较明显增加 ($P < 0.05$), 见图 6。



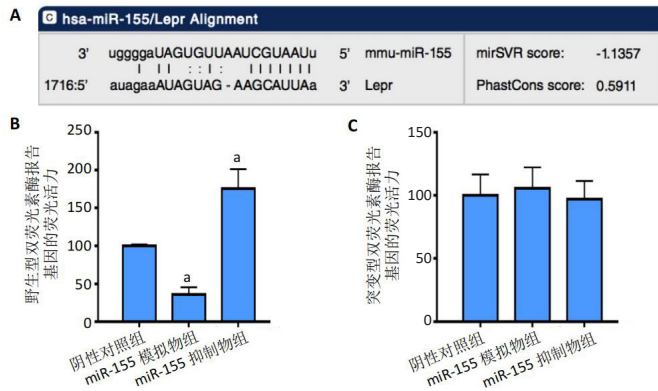
图注: 与阴性对照组比较, $^aP < 0.05$; 与阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组比较, $^bP < 0.05$
图 5 | miR-155 抑制物联合 5.0 IU/mL 结核菌素对 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响 (抗酒石酸酸性磷酸酶染色, $\times 400$)
Figure 5 | Effect of miR-155 inhibitor combined with 5.0 IU/mL tuberculin on the differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts (tartrate resistant acid phosphatase staining, $\times 400$)



图注: 图中 A 为 4 组间 miR-155 mRNA 表达水平比较; B 为瘦素受体、p-AMPK、AMPK 的蛋白条带; C, D 为 4 组间瘦素受体、p-AMPK 蛋白表达水平比较。与阴性对照组比较, $^aP < 0.05$; 与阴性对照 +5.0 IU/mL 结核菌素组比较, $^bP < 0.05$
图 6 | miR-155 抑制物联合 5.0 IU/mL 结核菌素对 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 表达的影响
Figure 6 | Effect of miR-155 inhibitor combined with 5.0 IU/mL tuberculin on the expression of miR-155, leptin receptor and p-AMPK in RAW264.7 cells

2.7 miR-155 靶向瘦素受体的生物信息学分析及双荧光素酶报告基因验证 经生物信息学分析, 瘦素受体基因 mRNA 3'UTR 中含有 miR-155 的结合位点。经双荧光素酶报告基因实验, 与阴性对照组比较, miR-155 模拟物组细胞中瘦素受体野生型双荧光素酶报告基因的荧光活力明显降低 ($P < 0.05$)、瘦素受体突变型双荧光素酶报告基因的荧光活力无明显变化 ($P > 0.05$), miR-155 抑制物组细胞中瘦素受体野生型双荧光素酶报告基因的荧光活力明显增加 ($P < 0.05$)、瘦素受体突变型双荧光素酶报告基因的荧光活力无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 7。

2.8 瘦素受体 siRNA 对 miR-155 抑制物抑制 5.0 IU/mL 结核菌素诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响 阴性对照 siRNA 组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 阴性对照 siRNA +5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与阴性对照

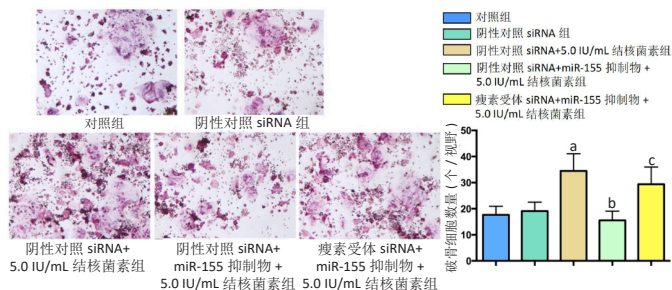


图注：图中 A 为 miR-155 靶向瘦素受体的生物信息学分析；B 为野生型双荧光素酶报告基因的检测；C 为突变型双荧光素酶报告基因的检测。与阴性对照组比较，^a $P < 0.05$

图 7 | miR-155 靶向瘦素受体的生物信息学分析及双荧光素酶报告基因验证

Figure 7 | Bioinformatics analysis and dual luciferase reporter gene verification of miR-155 targeting leptin receptors

siRNA 组比较明显增加 ($P < 0.05$)；阴性对照 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与阴性对照 siRNA + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较明显减少 ($P < 0.05$)；瘦素受体 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的数量与阴性对照 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较明显增加 ($P < 0.05$)，见图 8。



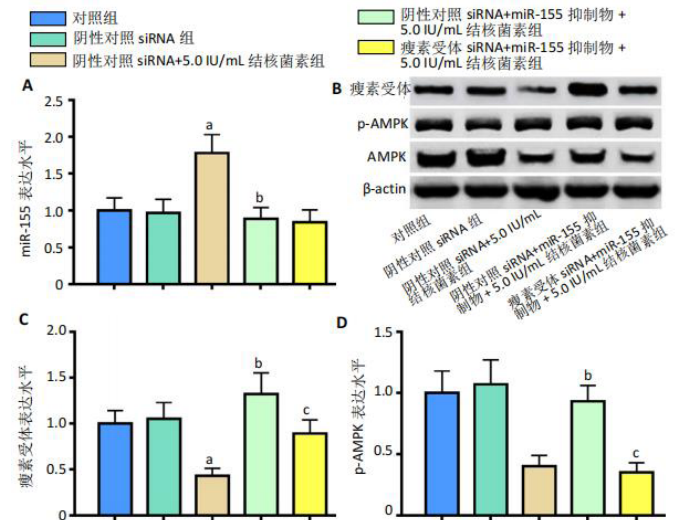
图注：与阴性对照 siRNA 组比较，^a $P < 0.05$ ；与阴性对照 siRNA + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较，^b $P < 0.05$ ；与阴性对照 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较，^c $P < 0.05$

图 8 | 瘦素受体 siRNA 对 miR-155 抑制物抑制 5.0 IU/mL 结核菌素诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响 (抗酒石酸酸性磷酸酶染色, $\times 400$)

Figure 8 | Effect of leptin receptor siRNA on miR-155 inhibitor inhibiting 5.0 IU/mL tuberculin induced differentiation of RAW264.7 cells to osteoclasts (tartrate resistant acid phosphatase staining, $\times 400$)

2.9 敲低瘦素受体对 miR-155 抑制物调节 5.0 IU/mL 结核菌素诱导 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 表达的影响 阴性对照 siRNA 组 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 的表达水平与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；阴性对照 siRNA + 5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞中 miR-155 的 mRNA 表达水平与阴性对照 siRNA 组比较明显增加，瘦素受体、p-AMPK 的蛋白表达水平与阴性对照 siRNA 组比较明显降低 ($P < 0.05$)；阴性对照 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞中 miR-155 的 mRNA 表达水平与阴性对照 siRNA + 5.0 IU/mL 结核菌素组比

较明显降低，瘦素受体、p-AMPK 的蛋白表达水平与阴性对照 siRNA + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较明显增加 ($P < 0.05$)；瘦素受体 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组 RAW264.7 细胞中 miR-155 的 mRNA 表达水平与阴性对照 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，瘦素受体、p-AMPK 的蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)，见图 9。



图注：图中 A 为 5 组间 miR-155 mRNA 表达水平比较；B 为瘦素受体、p-AMPK、AMPK 的蛋白条带；C、D 为 5 组间瘦素受体、p-AMPK 蛋白表达水平比较。与阴性对照 siRNA 组比较，^a $P < 0.05$ ；与阴性对照 siRNA + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较，^b $P < 0.05$ ；与阴性对照 siRNA + miR-155 抑制物 + 5.0 IU/mL 结核菌素组比较，^c $P < 0.05$

图 9 | 敲低瘦素受体对 miR-155 抑制物调节 5.0 IU/mL 结核菌素诱导 RAW264.7 细胞中 miR-155、瘦素受体、p-AMPK 表达的影响

Figure 9 | Effect of leptin receptor knockdown on miR-155 inhibitor regulating the expression of miR-155, leptin receptor and p-AMPK in RAW264.7 cells induced by 5.0 IU/mL tuberculin

3 讨论 Discussion

椎体骨质进行性破坏是脊柱结核的主要特征^[5-6]，可引起椎体塌陷、脊髓压迫，严重者出现脊柱后凸畸形或截瘫^[7]。近些年，越来越多的学者开始关注破骨细胞过度活化在脊柱结核骨质破坏中的作用^[8-10]，国内梁思敏等^[1, 10]研究发现 1.0 IU/mL 和 10.0 IU/mL 结核菌素能够促进单核巨噬细胞向破骨细胞分化，但 10.0 IU/mL 结核菌素会影响 RAW264.7 细胞的活力。

该研究在梁思敏研究结果的基础上对结核菌素促进破骨细胞分化的浓度区间进行了细化，使用 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 IU/mL 4 个浓度的结核菌素对 RAW264.7 细胞进行诱导，结果发现 10.0 IU/mL 结核菌素会使细胞存活率降低，1.0 IU/mL 结核菌素促进破骨细胞分化的作用不显著，2.5, 5.0 IU/mL 结核菌素均不影响细胞存活且促进破骨细胞分化，5.0 IU/mL 结核菌素促进 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的作用较 2.5 IU/mL 结核菌素更为显著，因此后续选择能够促进破骨细胞分化、但不影响细胞存活的 5.0 IU/mL 结核菌素进行实验，具体研究结核菌素诱导破骨细胞分化的分子机制。

miRNA 是一类在转录后水平调节基因表达的非编码小分子 RNA，通过靶向调控成骨基因、破骨基因、成骨或破骨

信号通路参与骨代谢的调控^[11-15]。MAO等^[3]关于骨质疏松的研究发现 miR-155 能够促进破骨细胞分化,引起骨吸收。YANG等^[4]关于脊柱结核的研究发现,脊柱结核患者骨组织中 miR-155 的表达增加且与椎体骨质破坏有关。该研究在不同浓度结核菌素处理的 RAW264.7 细胞中发现 miR-155 表达水平明显增加,与 YANG等^[4]在脊柱结核患者椎体中发现 miR-155 表达增加的结果一致。在此基础上进行 miR-155 抑制物的转染以敲低 miR-155 表达,在结核菌素干预的同时敲低 miR-155 表达,发现结核菌素促进破骨细胞分化的作用明显削弱,表明 miR-155 具有促进破骨细胞分化的作用且结核菌素通过增加 miR-155 的表达促进破骨细胞分化。

根据 MAO等^[3]的研究,瘦素受体是骨质疏松小鼠模型中受到 miR-155 调控的靶基因,下调 miR-155 能够增加瘦素受体表达,进而激活下游 AMPK^[3]。瘦素受体的配体瘦素是一种脂肪来源的细胞因子,能够感受能量代谢的变化并在脂肪细胞、成骨细胞、破骨细胞的分化中起调控作用^[16-17]。王正宇等^[18]研究发现瘦素能够抑制 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞,瘦素与瘦素受体结合后通过下游复杂的信号转导通路发挥生物学作用,其中 AMPK 是感知能量代谢的信号分子,瘦素受体能够使 AMPK 发生磷酸化,p-AMPK 对破骨细胞分化具有抑制作用^[19-20]。该研究发现结核菌素能够以浓度依赖性的方式降低 RAW264.7 细胞中瘦素受体及 p-AMPK 的表达,与其增加 miR-155 表达、促进破骨细胞分化的作用吻合,进一步在结核菌素干预的同时加用 miR-155 抑制物,敲低 miR-155 的表达后,RAW264.7 细胞中瘦素受体及 p-AMPK 的表达明显增加,与 miR-155 在骨质疏松小鼠中调控瘦素受体及 p-AMPK 的作用一致,表明 miR-155 在结核菌素促进 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的过程中参与瘦素受体及 p-AMPK 表达的调控。

为了进一步阐明 miR-155/瘦素受体/AMPK 轴在结核菌素促进破骨细胞分化中的作用,该研究对 miR-155 靶向瘦素受体进行了验证。过表达和敲低 miR-155 分别能够使瘦素受体野生型双荧光素酶报告基因的荧光活力降低和增加,根据生物信息学分析对双荧光素酶报告基因中 miR-155 的结合碱基进行突变后,miR-155 不再影响荧光活力,表明 miR-155 靶向瘦素受体且靶向位点与生物信息学预测一致。在此基础上,该研究设计了瘦素受体的 siRNA,通过转染 siRNA 的方式敲低瘦素受体。在结核菌素及 miR-155 抑制剂干预的同时,敲低瘦素受体后发现 miR-155 抑制物抑制破骨细胞分化,增加瘦素受体及 p-AMPK 的作用均发生逆转,但敲低瘦素受体不影响 miR-155 的表达,表明敲低 miR-155 通过增加瘦素受体表达及 AMPK 磷酸化的方式抑制破骨细胞分化,瘦素受体对 AMPK 的磷酸化具有促进作用,但不影响 miR-155 的表达,进而验证了 miR-155/瘦素受体/AMPK 轴在结核菌素促进破骨细胞分化中的作用。

综上所述,miR-155/瘦素受体/AMPK 轴在结核菌素促进破骨细胞分化中起重要作用,结核菌素通过增加 miR-155

表达抑制下游瘦素受体表达及 AMPK 激活,进而诱导破骨细胞形成,这为今后研究脊柱结核发病过程中骨质破坏的发病机制提供了新思路,也为研究脊柱结核发病过程中骨质破坏新的防治靶点提供了理论参考,但不足之处是未能在动物水平验证 miR-155/瘦素受体/AMPK 轴在脊柱结核骨质破坏中的作用,今后应继续查阅文献、设计动物实验来验证 miR-155/瘦素受体/AMPK 轴在脊柱结核骨质破坏中的作用。

作者贡献: 实验设计为王增顺、索南昂秀,实验实施为王增顺、刘立民,实验评估为索南昂秀,资料收集为周京元。

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: 该文章撰写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

- 梁思敏,马赫,潘希安,等. PPD 诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的实验研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016,38(12):1352-1356.
- LIU ZZ, ZHANG CY, HUANG LL, et al. Elevated expression of lncRNA SNHG15 in spinal tuberculosis: preliminary results. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019; 23(20):9017-9024.
- MAO Z, ZHU Y, HAO W, et al. MicroRNA-155 inhibition up-regulates LEPR to inhibit osteoclast activation and bone resorption via activation of AMPK in alendronate-treated osteoporotic mice. *IUBMB Life.* 2019;71(12):1916-1928.
- YANG C, SHI Z, HU J, et al. miRNA-155 expression and role in pathogenesis in spinal tuberculosis-induced intervertebral disc destruction. *Exp Ther Med.* 2019; 17(4):3239-3246.
- KHANNA K, SABHARWAL S. Spinal tuberculosis: a comprehensive review for the modern spine surgeon. *Spine J.* 2019;19(11):1858-1870.
- CHATTERJEE S, BANTA A. The spectrum of tuberculosis of the spine in pediatric age group: a review. *Childs Nerv Syst.* 2018;34(10):1937-1945.
- VAISHNAV B, SUTHAR N, SHAIKH S, et al. Clinical study of spinal tuberculosis presenting with neuro-deficits in Western India. *Indian J Tuberc.* 2019;66(1):81-86.
- LIU W, ZHOU J, NIU F, et al. Mycobacterium tuberculosis infection increases the number of osteoclasts and inhibits osteoclast apoptosis by regulating TNF- α -mediated osteoclast autophagy. *Exp Ther Med.* 2020;20(3):1889-1898.
- WANG XW, LIU JJ, WU QN, et al. The in vitro and in vivo effects of microRNA-133a on intervertebral disc destruction by targeting MMP9 in spinal tuberculosis. *Life Sci.* 2017;188:198-205.
- 梁思敏,马荣,马赫,等. TNF- α -shRNA 对结核菌素诱导破骨细胞形成的影响 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018,28(8):741-746.
- YANG Y, YUJIAO W, FANG W, et al. The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis. *Biol Res.* 2020;53(1):40.
- GAO Y, PATIL S, QIAN A. The Role of MicroRNAs in Bone Metabolism and Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6081.
- WEIVODA MM, LEE SK, MONROE DG. miRNAs in osteoclast biology. *Bone.* 2021; 143:115757.
- LEI Y, JUNXIN C, YONGCAN H, et al. Role of microRNAs in the crosstalk between osteosarcoma cells and the tumour microenvironment. *J Bone Oncol.* 2020;25: 100322.
- YOSHIKO Y, MINAMIZAKI T. Emerging roles of microRNAs as extracellular vesicle cargo secreted from osteoblasts. *J Oral Biosci.* 2020;62(3):228-234.
- YAN B, WANG L, LI J, et al. Effects of the multifunctional hormone leptin on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Transl Res.* 2020;12(5):1976-1984.
- MAN GC, TAM EM, WONG YS, et al. Abnormal Osteoblastic Response to Leptin in Patients with Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Sci Rep.* 2019;9(1):17128.
- 王正宇,朱云,杨小中,等. 瘦素通过抑制 PPAR γ 的表达抑制 RAW264.7 巨噬细胞向破骨细胞分化 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015,31(2):145-148.
- TONG X, GANTA RR, LIU Z. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates autophagy, inflammation and immunity and contributes to osteoclast differentiation and function. *Biol Cell.* 2020;112(9):251-264.
- 陈苗苗,全锡帅,郑嘉铭,等. 氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸对破骨细胞自噬和分化的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2019,50(11):2339-2347.

(责任编辑: LCH, MZH, ZN, WL)