

· 基础研究 ·

骨关节炎软骨损伤中 miRNA-214 的作用机制
及靶向基因研究王最¹, 徐佳妮¹, 吴良邦¹, 钱钧²

(1. 解放军联勤保障部队第九〇三医院, 浙江 杭州 310004;

2. 衢州市人民医院, 浙江 衢州 324000)

摘要 目的:探讨骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨损伤中微小 RNA(micro RNA, miRNA)-214 的作用机制及靶向基因。**方法:**①OA 患者膝关节损伤软骨组织中 miRNA-214 表达量检测。根据软骨损伤程度 Outerbridge 分级标准将收集的 OA 患者膝关节软骨组织进行分级,分别提取各软骨组织的总 RNA,逆转录 cDNA 后采用实时定量 PCR 检测损伤软骨组织中 miRNA-214 的表达量。②miRNA-214 在 OA 大鼠软骨损伤中的作用机制分析。采用手术剪断大鼠前交叉韧带的方法建立大鼠 OA 模型。将 40 只造模成功的大鼠随机分为 miRNA-214 高表达组、miRNA-214 低表达组、阴性对照组及模型组,将 10 只接受手术但不剪断前交叉韧带的大鼠纳入假手术组。设计、合成 miRNA-214 模拟物、miRNA-214 抑制剂及 miRNA-214 阴性对照序列,构建慢病毒表达载体,完成病毒包装。在 miRNA-214 高表达组、miRNA-214 低表达组、阴性对照组、模型组及假手术组大鼠右侧膝关节腔内分别注射 100 μ L miRNA-214 模拟物慢病毒混悬液、100 μ L miRNA-214 抑制剂慢病毒混悬液、100 μ L miRNA-214 阴性对照慢病毒混悬液、100 μ L 生理盐水、100 μ L 生理盐水。干预后 4 周,采集各组大鼠腹主动脉血,检测血清白细胞介素(interleukin, IL)-17、IL-23 水平;制备各组大鼠膝关节软骨组织石蜡切片,HE 染色后观察软骨组织病理学改变;采用免疫印迹法检测各组大鼠膝关节软骨组织中聚集蛋白聚糖、II 型胶原蛋白(collagen II, Col II)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13 的蛋白相对表达量。③OA 软骨损伤相关的 miRNA-214 靶向基因分析。检索 miRNA 靶基因数据库中 miRNA-214 的靶向基因,根据文献资料筛选与骨代谢相关的人类 miRNA-214 靶向基因。采用双荧光素酶实验验证 miRNA-214 对活化转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)的靶向性。采用免疫印迹法检测各组大鼠右侧膝关节软骨组织中 ATF4 的蛋白相对表达量。**结果:**①OA 患者膝关节损伤软骨组织中 miRNA-214 表达量检测结果。共收集 38 例 OA 患者的膝关节软骨组织,其中 III 级 28 例、IV 级 10 例。IV 级损伤软骨组织的 miRNA-214 相对表达量高于 III 级($1.67 \pm 0.40, 0.51 \pm 0.16, t = 12.941, P = 0.000$)。②大鼠血清炎症因子水平检测结果。5 组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平比较,组间差异有统计学意义[(62.94 ± 8.12) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (45.19 ± 5.34) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (44.63 ± 6.67) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (24.74 ± 3.90) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (18.15 ± 2.33) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $F = 94.153, P = 0.000$; (72.39 ± 10.26) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (48.70 ± 5.87) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (47.59 ± 5.76) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (27.54 ± 4.05) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (18.13 ± 3.05) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $F = 111.701, P = 0.000$]。miRNA-214 高表达组、阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平均高于假手术组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); miRNA-214 高表达组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平均高于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); miRNA-214 低表达组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平均低于阴性对照组和模型组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$); 阴性对照组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平与模型组比较,组间差异均无统计学意义($P = 0.838, P = 0.675$)。③大鼠软骨组织病理学检查结果。HE 染色结果显示,假手术组软骨组织潮线清晰,结构完整,软骨细胞分布均匀;阴性对照组、模型组软骨组织潮线模糊不清,结构严重破坏,软骨细胞聚集;miRNA-214 高表达组软骨组织损伤情况较阴性对照组、模型组更为严重;miRNA-214 低表达组软骨组织潮线可辨识,结构较为完整,软骨细胞聚集现象较阴性对照组、模型组及 miRNA-214 高表达组有所改善。④大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 蛋白表达量检测结果。5 组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义($0.08 \pm 0.02, 0.14 \pm 0.03, 0.15 \pm 0.04, 0.31 \pm 0.08, 0.72 \pm 0.12, F = 142.932, P = 0.000$; $0.11 \pm 0.03, 0.20 \pm 0.04, 0.22 \pm 0.04, 0.36 \pm 0.05, 1.13 \pm 0.21, F = 170.345, P = 0.000$; $1.32 \pm 0.34, 0.95 \pm 0.13, 0.95 \pm 0.12, 0.21 \pm 0.04, 0.11 \pm 0.03, F = 91.486, P = 0.000$)。miRNA-214 高表达组、阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II 蛋白表达量均低于假手术组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$), MMP-13 蛋白表达量高于假手术组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$); miRNA-214 高表达组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II 蛋白表达量均低于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$), MMP-13 蛋白表达量高于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组($P = 0.005, P = 0.004, P = 0.000$); miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II 蛋白表达量均高于阴性对照组和模型组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$), MMP-13 蛋白表达量低于阴性对

照组和模型组($P=0.000, P=0.000$);阴性对照组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 蛋白表达量与模型组比较,组间差异均无统计学意义($P=0.535, P=0.278, P=1.000$)。⑤miRNA-214 靶向基因验证结果。在转染 ATF4-WT-psiCHECK2 质粒的 293T 细胞中,miRNA-214 模拟物组的荧光酶相对活性小于 miRNA-214 阴性对照组($0.45 \pm 0.07, 1.02 \pm 0.23, t=5.301, P=0.001$);在转染 ATF4-MUT-psiCHECK2 质粒的 293T 细胞中,miRNA-214 模拟物组的荧光酶相对活性与 miRNA-214 阴性对照组比较,差异无统计学意义($1.05 \pm 0.19, 1.03 \pm 0.18, t=0.171, P=0.869$)。⑥大鼠软骨组织中 ATF4 蛋白表达量检测结果。5 组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量比较,组间差异有统计学意义($0.11 \pm 0.03, 0.17 \pm 0.03, 0.18 \pm 0.04, 0.31 \pm 0.05, 0.79 \pm 0.11, F=213.111, P=0.000$)。miRNA-214 高表达组、阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量均低于假手术组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$);miRNA-214 高表达组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量低于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量高于阴性对照组和模型组($P=0.000, P=0.000$);阴性对照组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量与模型组比较,组间差异无统计学意义($P=0.535$)。结论:OA 患者膝关节软骨损伤与软骨组织中 miRNA-214 的表达有关,抑制 miRNA-214 表达能够减轻大鼠膝关节炎症反应、减少软骨基质降解、促进软骨修复,miRNA-214 的作用机制与其抑制 IL-17、IL-23、MMP-13 表达和促进聚集蛋白聚糖、Col II、ATF4 表达有关,ATF4 可能是与 OA 软骨损伤相关的 miRNA-214 的靶基因之一。

关键词 骨关节炎;软骨疾病;微 RNAs;基因表达;大鼠;动物实验

Mechanism and targeted genes of miRNA-214 in osteoarthritis-induced cartilage injury

WANG Zui¹, XU Jiani¹, WU Liangbang¹, QIAN Jun²

1. The 903rd Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Hangzhou 310004, Zhejiang, China

2. Quzhou People's Hospital, Quzhou 324000, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To investigate the mechanism and targeted genes of micro RNA (miRNA)-214 in osteoarthritis (OA)-induced cartilage injury. **Methods:** ①Detection of miRNA-214 expression in injured cartilage of the knee joint in patients with OA. The knee cartilage tissues of OA patients were graded according to the Outerbridge classification for cartilage injury. The total RNA of each cartilage tissue was extracted, and the expression of miRNA-214 in the injured cartilage was detected by real-time quantitative PCR after reverse transcription of cDNA. ②Analysis of mechanism of miRNA-214 in cartilage injury in OA rats. The OA model was established in rats by the surgical cutting of the anterior cruciate ligament. Forty OA model rats were randomly divided into a miRNA-214 high expression group, a miRNA-214 low expression group, a negative control group, and a model group. Another 10 rats undergoing surgery without cutting the anterior cruciate ligament were assigned into the sham operation group. The sequences of miRNA-214 mimics, miRNA-214 inhibitors, and miRNA-214 negative control were designed and synthesized, and lentivirus expression vector was constructed, followed by lentiviral packaging. Rats in the miRNA-214 high expression group, the miRNA-214 low expression group, the negative control group, the model group, and the sham operation group were injected with 100 μ L of miRNA-214 mimic lentivirus suspension, 100 μ L of miRNA-214 inhibitor lentivirus suspension, 100 μ L of miRNA-214 negative control lentivirus suspension, 100 μ L of normal saline, and 100 μ L of normal saline, respectively, at the right knee cavity. At four weeks after the intervention, blood in the abdominal aorta of all rats was sampled and serum interleukin (IL)-17 and IL-23 levels were measured. Paraffin sections of knee cartilage tissues were prepared, and the pathological changes in cartilage tissues were observed following HE staining. The relative protein expression levels of aggrecan, collagen II (Col II), and matrix metalloproteinase (MMP)-13 in the knee cartilage tissues of rats in each group were determined by Western blot. ③Analysis of miRNA-214 targeted genes associated with OA-induced cartilage injury. The targeted genes of miRNA-214 were retrieved from the miRNA targeted gene database, and the human miRNA-214 targeted genes related to bone metabolism were screened according to the literature. The dual luciferase assay was employed to verify the targeting of miRNA-214 on activating transcription factor 4 (ATF4). The relative protein expression of ATF4 in the right knee cartilage tissues of rats in each group was detected by Western blot. **Results:** ①Detection results of miRNA-214 expression in injured cartilage tissues of knee joint in OA patients. Thirty-eight patients with OA were enrolled, including 28 with grade III and 10 with grade IV. The relative expression level of miRNA-214 in grade IV injured cartilage tissues was higher than that in grade III injured cartilage tissues (1.67 ± 0.40 vs $0.51 \pm 0.16, t=12.941, P=0.000$). ②Detection results of serum inflammatory factors in rats. The serum levels of IL-17 and IL-23 in the five groups were statistically significant ($62.94 \pm 8.12, 45.19 \pm 5.34, 44.63 \pm 6.67, 24.74 \pm 3.90, 18.15 \pm 2.33$ pg/mL, $F=94.153, P=0.000$; $72.39 \pm 10.26, 48.70 \pm 5.87, 47.59 \pm 5.76, 27.54 \pm 4.05, 18.13 \pm 3.05$ pg/mL, $F=111.701, P=$

0.000). Serum levels of IL-17 and IL-23 in the miRNA-214 high expression group, the negative control group, the model group, and the miRNA-214 low expression group were higher than those in the sham operation group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$). Serum levels of IL-17 and IL-23 in the miRNA-214 high expression group were higher than those in the negative control group, the model group, and the miRNA-214 low expression group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$). Serum levels of IL-17 and IL-23 in the miRNA-214 low expression group were lower than those in the negative control group and the model group ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$). There was no significant difference in serum levels of IL-17 and IL-23 between the negative control group and the model group ($P=0.838, P=0.675$).

③Pathological examination results of cartilage tissues. As revealed by HE staining, the sham operation group showed clear tide mark of cartilage tissues with intact structure and uniform distribution of chondrocytes, and the negative control group and the model group displayed blurred tide mark of cartilage tissues with seriously damaged structure and aggregated chondrocytes. The cartilage injury in the miRNA-214 high expression group was severer than that in the negative control group and the model group. The miRNA-214 low expression group exhibited distinguishable tide mark of cartilage tissues with comparatively intact structure, and chondrocyte aggregation was improved compared with the conditions in the negative control group, the model group, and the miRNA-214 high expression group.

④Detection results of protein expression levels of aggrecan, Col II, and MMP-13 in rat cartilage tissues. There were significant differences in protein expression levels of aggrecan, Col II, and MMP-13 in cartilage tissues of rats between the five groups ($0.08 \pm 0.02, 0.14 \pm 0.03, 0.15 \pm 0.04, 0.31 \pm 0.08, 0.72 \pm 0.12, F=142.932, P=0.000; 0.11 \pm 0.03, 0.20 \pm 0.04, 0.22 \pm 0.04, 0.36 \pm 0.05, 1.13 \pm 0.21, F=170.345, P=0.000; 1.32 \pm 0.34, 0.95 \pm 0.13, 0.95 \pm 0.12, 0.21 \pm 0.04, 0.11 \pm 0.03, F=91.486, P=0.000$). The protein expression levels of aggrecan and Col II in the miRNA-214 high expression group, the negative control group, the model group, and the miRNA-214 low expression group were lower than those in the sham operation group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$), and the protein expression levels of MMP-13 were higher than that in the sham operation group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$). The protein expression levels of aggrecan and Col II in the miRNA-214 high expression group were lower than those in the negative control group, the model group, and the miRNA-214 low expression group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$), and the protein expression level of MMP-13 was higher than that in the negative control group, the model group, and the miRNA-214 low expression group ($P=0.005, P=0.004, P=0.000$). The protein expression levels of aggrecan and Col II in the miRNA-214 low expression group were higher than those in the negative control group and the model group ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$), and the protein expression level of MMP-13 was lower than that in the negative control group and the model group ($P=0.000, P=0.000$). There was no significant difference in the protein expression levels of aggrecan, Col II, and MMP-13 in cartilage tissues of rats between the negative control group and the model group ($P=0.535, P=0.278, P=1.000$).

⑤Results of miRNA-214 targeted gene verification. In 293T cells transfected with ATF4-WT-psiCHECK2 plasmid, the relative activity of luciferase in the miRNA-214 mimics group was lower than that in the miRNA-214 negative control group (0.45 ± 0.07 vs $1.02 \pm 0.23, t=5.301, P=0.001$). In 293T cells transfected with ATF4 - MUT - psiCHECK2 plasmid, there was no significant difference in the relative activity of luciferase between the miRNA-214 mimics group and the miRNA-214 negative control group (1.05 ± 0.19 vs $1.03 \pm 0.18, t=0.171, P=0.869$).

⑥Detection results of ATF4 protein expression in rat cartilage tissues. The protein expression of ATF4 in the cartilage tissues of rats in the five groups was statistically significant ($0.11 \pm 0.03, 0.17 \pm 0.03, 0.18 \pm 0.04, 0.31 \pm 0.05, 0.79 \pm 0.11, F=213.111, P=0.000$). The protein expression level of ATF4 in cartilage tissues of rats in the miRNA-214 high expression group, the negative control group, the model group, and the miRNA-214 low expression group were lower than that in the sham operation group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$). The protein expression level of ATF4 in cartilage tissues of rats in the miRNA-214 high expression group was lower than that in the negative control group, the model group, and the miRNA-214 low expression group ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$). The protein expression level of ATF4 in cartilage tissues of rats in the miRNA-214 low expression group was higher than that in the negative control group and the model group ($P=0.000, P=0.000$). There was no significant difference in ATF4 protein expression between the negative control group and the model group ($P=0.535$).

Conclusion: Cartilage injury of knee joint in OA patients is related to the expression of miRNA-214 in cartilage tissues, and the inhibition of miRNA-214 expression can relieve knee inflammatory response, reduce cartilage stromal breakdown, and promote cartilage repair in rats. The underlying mechanism of miRNA-214 is attributed to the inhibition of the expression of IL-17, IL-23, and MMP-13 and the promotion of the expression of aggrecan, Col II, and ATF4. ATF4 is potentially one of the targeted genes of miRNA-214 associated with OA-induced cartilage injury.

Keywords osteoarthritis; cartilage diseases; microRNAs; gene expression; rats; animal experimentation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是骨科临床上常见的慢性退行性疾病,多见于 50 岁以上中老年人群,好发于膝关节、髋关节等负重关节,可导致关节变形、活动受限,严重影响患者日常生活^[1]。我国 OA 发病率较高,65 岁以上人群 OA 的发病率超过 50%^[2]。目前,OA 的发病机制尚未明确,尚无有效治疗药物。临床上多采用非手术疗法缓解患者症状、延缓 OA 发展进程;对于晚期 OA 患者,人工关节置换术是唯一有效的治疗方式,但给患者带来较大的创伤和较重的经济负担^[3]。因此,探索 OA 的发病机制及新疗法是 OA 研究的重要方向。随着医学分子生物学及生物信息学的快速发展,多项研究^[4-6]表明,微小 RNA (micro RNA, miRNA) 在骨骼疾病的发生和发展中扮演重要角色。沉默 miRNA-214 在抑制破骨细胞分化、改善骨组织病理结构方面发挥重要作用^[7]。为了探讨 OA 软骨损伤中 miRNA-214 的作用机制及靶向基因,我们进行了相关研究,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验材料 膝关节软骨组织 (来自解放军联勤保障部队第九〇三医院采用全膝关节置换术治疗的 OA 患者)。

1.2 实验动物 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 (270 ± 20) g,购自上海灵畅生物科技有限公司,实验动物许可证号:生产许可 SCXK (沪) 2018-0003。实验方案经解放军联勤保障部队第九〇三医院伦理委员会审查通过,伦理批件号:FTKNHA-KY19。

1.3 实验试剂 BeyoRT™ III cDNA 合成试剂盒、放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司),实时定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒、白细胞介素 (interleukin, IL)-17 和 IL-23 酶联免疫吸附分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海抚生实业有限公司),293T 细胞 (美国 ATCC 公司)。兔抗大鼠聚集蛋白聚糖、II 型胶原蛋白 (collagen II, Col II)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-13、活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (美国 Santa 公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔

免疫球蛋白 G 二抗 (英国 Abcam 公司),荧光素酶报告基因质粒 psiCHECK2 (美国 Promega 公司),Lipofectamine 2000 转染试剂 (美国 Sigma-Aldrich 公司),双荧光素酶检测试剂盒 (上海优宁维生物科技股份有限公司)。

1.4 实验仪器 IQ5 RT-qPCR 仪 (美国 ABI 公司)、GENios Pro 酶标仪 (瑞士帝肯公司)、YS100 显微镜 (日本 Nikon 公司)、ZF-208 全自动凝胶成像分析系统 (上海嘉鹏科技有限公司)。

2 方法

2.1 OA 患者膝关节损伤软骨组织中 miRNA-214 表达量检测 根据软骨损伤程度 Outerbridge 分级标准^[8]将收集的 OA 患者的软骨组织进行分级。将软骨组织于研钵中研磨至细粉状,采用 Trizol 法提取总 RNA,采用逆转录试剂盒合成 cDNA。以 U6 为内参基因,采用 RT-qPCR 试剂盒检测 miRNA-214 表达量,反应体系及程序参考试剂盒说明书设置。计算 CT 值,并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 miRNA-214 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 miRNA-214 及 U6 扩增引物序列

基因名称	引物序列 (5'—3')
miRNA-214	上游引物 CCTGGCTGGACAGAGTTGTCAT
	下游引物 GTACAGGTGAGCGGATGTTCT
U6	上游引物 AATCGGGCCTGCTCAAGTG
	下游引物 GAACAGAAAATGCGGACGGG

2.2 miRNA-214 在 OA 大鼠软骨损伤中的作用机制分析

2.2.1 造模方法 大鼠适应性饲养 1 周后进行造模:给予大鼠腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉,于右侧膝关节髌骨内侧做一切口,显露关节腔;将髌骨向外侧脱位,暴露并剪断前交叉韧带后,复位髌骨;生理盐水冲洗,逐层缝合切口。术后常规注射青霉素预防感染。术后大鼠右侧膝关节肿胀、运动能力降低表明建模成功。

2.2.2 分组方法 随机选取 40 只大鼠按照上述方法进行造模,将造模成功的大鼠随机分为 miRNA-214 高表达组、miRNA-214 低表达组、阴性对照组及模型组,将其余 10 只大鼠纳入假手术组 (接受手术但不剪断前交叉韧带)。

2.2.3 载体构建方法 根据 miRNA-214 序列设计 miRNA-214 模拟物、miRNA-214 抑制剂及 miRNA-214 阴性对照序列 (表 2)。合成 miRNA-214 模拟物、

miRNA-214 抑制剂及 miRNA-214 阴性对照序列并与慢病毒载体 GV2342 连接构建慢病毒表达载体。将慢病毒表达载体与包装质粒 pHelper 1.0、p Helper 2.0 共转染至 293T 细胞,完成病毒包装。序列合成、载体构建及慢病毒包装均由百奥迈科生物技术有限公司完成。

表 2 miRNA-214 模拟物、抑制剂及阴性对照序列

序列名称	序列(5'—3')
miRNA-214 模拟物	ACAGCAGGCACAGACAGGCAG
miRNA-214 抑制剂	CUGCCUGUCUGUGCCUGCUGU
miRNA-214 阴性对照	UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA

2.2.4 干预方法 造模后第 7 天,在高表达组大鼠右侧膝关节腔内注射 100 μL miRNA-214 模拟物慢病毒混悬液(慢病毒滴度 $2.0 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$),在低表达组大鼠右侧膝关节腔内注射 100 μL miRNA-214 抑制剂慢病毒混悬液(慢病毒滴度 $2.0 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$),在阴性对照组大鼠右侧膝关节腔内注射 100 μL miRNA-214 阴性对照慢病毒混悬液(慢病毒滴度 $2.0 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$),在模型组和假手术组大鼠右侧膝关节腔内注射 100 μL 生理盐水。

2.2.5 血清炎症因子水平检测方法 干预后 4 周,给予大鼠腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉,采集各组大鼠腹主动脉血,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 12 min(离心半径 8 cm),取上清液。采用 ELISA 法检测血清 IL-17、IL-23 水平。根据试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪测定各组溶液的吸光值(测定波长 450 nm)。根据标准曲线计算血清炎症因子 IL-17、IL-23 水平。

2.2.6 软骨组织病理学检查方法 在采血后采用脊椎脱臼处死大鼠,剥离右侧膝关节软骨组织。取各组部分软骨组织用 4% 多聚甲醛固定;固定 48 h,以流水冲洗 30 min;乙醇脱水后,石蜡包埋切片,切片厚度 5 μm 。二甲苯脱蜡、水化后,于苏木素溶液中浸泡 8 min,蒸馏水冲洗;盐酸酒精分化,蒸馏水冲洗;碳酸氢钠漂洗至蓝紫色,于伊红染色液中浸染 1 min;常规脱水、透明,封片剂封固后,于光学显微镜下观察软骨组织病理学改变。

2.2.7 软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 蛋白表达量检测方法 取各组大鼠右侧膝关节软骨组织,置于研钵中充分研磨,加入 PBS 制成匀浆,移至离心管内,加入 RIPA 裂解液裂解细胞,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 12 min(离心半径 12 cm);取上清液,采用 BCA

试剂盒测定蛋白浓度。取 50 μg 待测样本,处理后采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳结束后,将凝胶上的蛋白湿转至聚偏二氟乙烯膜上;5% 脱脂奶粉封闭后,加入兔抗大鼠聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13、GAPDH 一抗(1:500),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏过夜孵育;TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗(1:2 000)孵育 2 h,经 ECL 化学发光液显色,采用凝胶成像分析系统拍照,采用 Image J 软件测定蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 为内参,计算聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 的蛋白相对表达量(目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值)。

2.3 OA 软骨损伤相关的 miRNA-214 靶向基因分析

2.3.1 miRNA-214 靶向基因筛选方法 采用 miRNA 靶基因数据库 miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)检索 miRNA-214 靶向基因,获得人类 miRNA-214 的所有靶向基因。根据文献资料筛选与骨代谢相关的人类 miRNA-214 靶向基因。

2.3.2 miRNA-214 靶向基因验证方法 通过 PCR 扩增获得 ATF4 基因野生型 3'-非翻译区(untranslated region, UTR)(ATF4-WT)和突变型 3'-UTR(ATF4-MUT),将其分别与荧光素酶报告基因质粒 psiCHECK2 连接,构建重组质粒 ATF4-WT-psiCHECK2 和 ATF4-MUT-psiCHECK2。将处于对数期的 293T 细胞接种于 96 孔板,每孔接种约 1.0×10^4 个细胞,共接种 20 个复孔。根据转染的 miRNA 不同将 20 个复孔分为 miRNA-214 模拟物组(转染 miRNA-214 模拟物)和 miRNA-214 阴性对照组(转染 miRNA-214 阴性对照),每组 10 个复孔;每组中 5 个复孔同时转染 ATF4-WT-psiCHECK2 质粒,另 5 个复孔同时转染 ATF4-MUT-psiCHECK2 质粒。采用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行转染,转染后培养 48 h。于室温下加入 PLB 裂解液裂解 30 min 后,以 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min(离心半径 8 cm),取上清液。在上清液中加入萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶检测工作液,采用 GENios Pro 酶标仪分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光强度,计算荧光素酶相对活性(萤火虫荧光素酶荧光强度/海肾荧光素酶荧光强度)。

2.3.3 大鼠软骨组织中 ATF4 蛋白表达量检测方法 取各组大鼠右侧膝关节软骨组织,采用蛋白印迹法检测大鼠软骨组织中 ATF4 蛋白表达量,方法同 2.2.7,其中采用兔抗大鼠 ATF4 一抗。以 GAPDH 为内参基

因,计算 ATF4 的蛋白相对表达量。

2.4 数据统计 采用 SPSS25.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。miRNA-214 相对表达量,血清 IL-17、IL-23 水平,软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13、ATF4 蛋白表达量的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验,荧光酶相对活性的组间比较采用 *t* 检验;检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 OA 患者膝关节损伤软骨组织 miRNA-214 表达量检测结果 共收集 38 例 OA 患者的膝关节软骨组织,其中Ⅲ级 28 例、Ⅳ级 10 例,Ⅳ级损伤软骨组织的 miRNA-214 相对表达量高于Ⅲ级(表 3)。

表 3 骨关节炎患者不同损伤等级膝关节软骨组织 miRNA-214 相对表达量

软骨损伤等级	样本量/例	miRNA-214 相对表达量($\bar{x} \pm s$)
Ⅲ级	28	0.51 ± 0.16
Ⅳ级	10	1.67 ± 0.40
<i>t</i> 值		12.941
<i>P</i> 值		0.000

3.2 miRNA-214 在 OA 大鼠软骨损伤中的作用机制分析结果

3.2.1 造模及分组结果 40 只大鼠全部造模成功,miRNA-214 高表达组、miRNA-214 低表达组、阴性对

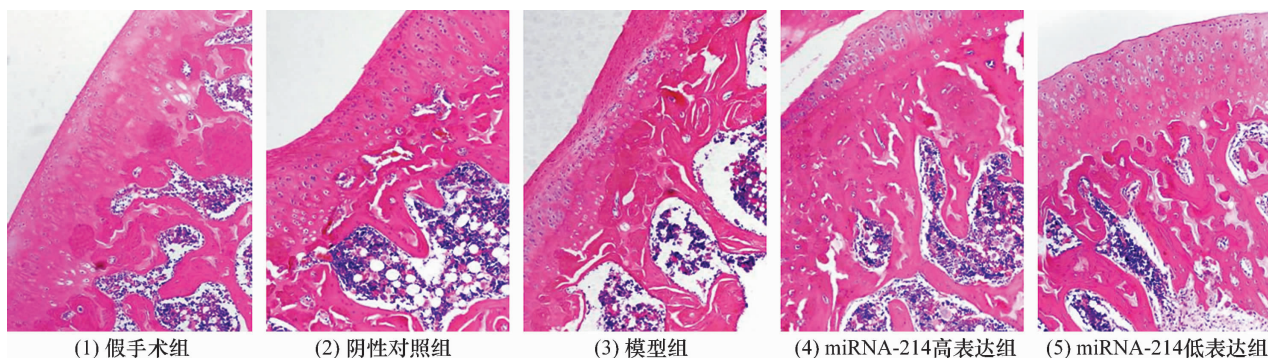
照组及模型组各 10 只;假手术组 10 只大鼠。

3.2.2 大鼠血清炎症因子水平检测结果 5 组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平比较,组间差异有统计学意义。miRNA-214 高表达组、阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平均高于假手术组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$; $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$);miRNA-214 高表达组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平均高于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$);miRNA-214 低表达组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平均低于阴性对照组和模型组($P = 0.000, P = 0.000$; $P = 0.000, P = 0.000$);阴性对照组大鼠血清 IL-17、IL-23 水平与模型组比较,组间差异均无统计学意义($P = 0.838, P = 0.675$)。见表 4。

3.2.3 大鼠软骨组织病理学检查结果 HE 染色结果显示,假手术组软骨组织潮线清晰,结构完整,软骨细胞分布均匀;阴性对照组、模型组软骨组织潮线模糊不清,结构严重破坏,软骨细胞聚集;miRNA-214 高表达组软骨组织损伤情况较阴性对照组、模型组更为严重;miRNA-214 低表达组软骨组织潮线可辨识,结构较为完整,软骨细胞聚集现象较阴性对照组、模型组及 miRNA-214 高表达组有所改善(图 1)。

表 4 各组大鼠血清炎症因子水平

组别	样本量/只	白细胞介素-17($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	白细胞介素-23($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
miRNA-214 高表达组	10	62.94 ± 8.12	72.39 ± 10.26
阴性对照组	10	45.19 ± 5.34	48.70 ± 5.87
模型组	10	44.63 ± 6.67	47.59 ± 5.76
miRNA-214 低表达组	10	24.74 ± 3.90	27.54 ± 4.05
假手术组	10	18.15 ± 2.33	18.13 ± 3.05
<i>F</i> 值		94.153	111.701
<i>P</i> 值		0.000	0.000



(1) 假手术组 (2) 阴性对照组 (3) 模型组 (4) miRNA-214 高表达组 (5) miRNA-214 低表达组

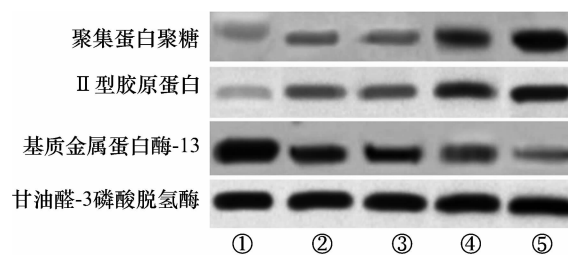
图 1 各组大鼠膝关节软骨组织 HE 染色结果($\times 200$)

3.2.4 大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 蛋白表达量检测结果 5 组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义。miRNA-214 高表达组、阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II 蛋白表达量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), MMP-13 蛋白表达量高于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); miRNA-214 高表达组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II 蛋白表达量均低于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), MMP-13 蛋白表达量高于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组 ($P = 0.005$, $P = 0.004$, $P = 0.000$); miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II 蛋白表达量均高于阴性对照组和模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$), MMP-13 蛋白表达量低于阴性对照组和模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$); 阴性对照组大鼠软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II、MMP-13 蛋白表达量与模型组比较,组间差异均无统计学意义 ($P = 0.535$, $P = 0.278$, $P = 1.000$)。见图 2、表 5。

3.3 OA 软骨损伤相关的 miRNA-214 靶向基因实验验证结果

3.3.1 miRNA-214 靶向基因筛选结果 根据 miR-Walk 靶基因数据库检索结果及文献资料,ATF4 可能是 miRNA-214 的靶向基因。

3.3.2 miRNA-214 靶向基因验证结果 在转染 ATF4-WT-psiCHECK2 质粒的 293T 细胞中,miRNA-214 模拟物组的荧光酶相对活性小于 miRNA-214 阴性对照组;在转染 ATF4-MUT-psiCHECK2 质粒的 293T 细胞中,miRNA-214 模拟物组的荧光酶相对活性与 miRNA-214 阴性对照组比较,差异无统计学意义(表 6)。



①miRNA-214 高表达组;②阴性对照组;③模型组;
④miRNA-214 低表达组;⑤假手术组。

图 2 各组大鼠膝关节软骨组织聚集蛋白聚糖、
II 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶-13 蛋白
表达蛋白印迹法检测结果

3.3.3 大鼠软骨组织中 ATF4 蛋白表达量检测结果 5 组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量比较,组间差异有统计学意义。miRNA-214 高表达组、阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量均低于假手术组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); miRNA-214 高表达组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量低于阴性对照组、模型组及 miRNA-214 低表达组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); miRNA-214 低表达组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量高于阴性对照组和模型组 ($P = 0.000$,

表 5 各组大鼠膝关节软骨组织聚集蛋白聚糖、II 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶-13 蛋白相对表达量

组别	样本量/只	聚集蛋白聚糖($\bar{x} \pm s$)	II 型胶原蛋白($\bar{x} \pm s$)	基质金属蛋白酶-13($\bar{x} \pm s$)
miRNA-214 高表达组	10	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.03	1.32 ± 0.34
阴性对照组	10	0.14 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.95 ± 0.13
模型组	10	0.15 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.95 ± 0.12
miRNA-214 低表达组	10	0.31 ± 0.08	0.36 ± 0.05	0.21 ± 0.04
假手术组	10	0.72 ± 0.12	1.13 ± 0.21	0.11 ± 0.03
F 值		142.932	170.345	91.486
P 值		0.000	0.000	0.000

表 6 2 组 293T 细胞荧光酶相对活性

组别	样本量/孔	荧光酶相对活性($\bar{x} \pm s$)	
		转染 ATF4-WT-psiCHECK2 质粒	转染 ATF4-MUT-psiCHECK2 质粒
miRNA-214 模拟物组	5	0.45 ± 0.07	1.05 ± 0.19
miRNA-214 阴性对照组	5	1.02 ± 0.23	1.03 ± 0.18
t 值		5.301	0.171
P 值		0.001	0.869

$P=0.000$);阴性对照组大鼠软骨组织 ATF4 蛋白表达量与模型组比较,组间差异无统计学意义($P=0.535$)。见表 7、图 3。

表 7 各组大鼠膝关节软骨组织活化转录因子 4 蛋白相对表达量

组别	样本量/只	活化转录因子 4 ($\bar{x} \pm s$)
miRNA-214 高表达组	10	0.11 ± 0.03
阴性对照组	10	0.17 ± 0.03
模型组	10	0.18 ± 0.04
miRNA-214 低表达组	10	0.31 ± 0.05
假手术组	10	0.79 ± 0.11
F 值		213.111
P 值		0.000

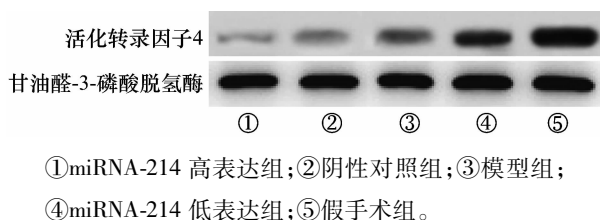


图 3 各组大鼠膝关节软骨组织活化转录因子 4 蛋白表达蛋白印迹法检测结果

4 讨论

OA 以关节软骨退变及软骨下骨硬化为主要特征,其发病机制尚未明确^[9-10]。软骨细胞衰老、软骨细胞外基质合成代谢失衡、炎症反应及基因差异性表达等均与 OA 的发生关系密切^[11-13];而高龄、肥胖、外伤、家族遗传等均是 OA 发生的危险因素^[14]。关节软骨主要由软骨细胞和细胞外基质构成,而细胞外基质的主要成分是 Col II、聚集蛋白聚糖等。Col II、聚集蛋白聚糖在维持软骨组织生理结构、分散骨骼压力方面发挥重要作用^[15-16],MMP-13 则能够降解软骨组织中的胶原蛋白^[17]。miRNA 是一种内源性短链非编码 RNA,可通过与 mRNA 3' 非翻译区互补配对,发挥调控蛋白表达的作用^[18]。miRNA-214 是一类高度保守的 miRNA,可通过调控其靶向基因的表达参与破骨细胞分化,在骨代谢过程中发挥重要作用^[19-20]。曹红等^[21]研究发现,肥胖大鼠软骨组织中 miRNA-214 的表达量升高,通过增加大鼠运动能够抑制 miRNA-214 表达量升高。Li 等^[22]研究发现,抑制软骨细胞中 miRNA-214 表达可提高软骨细胞活性、增加软骨细胞外基质形成,提示 miRNA-214 或可作为软骨损伤修复的新靶点。我们研究发现,miRNA-214 的表达量与 OA 患者的软骨损伤程度呈正比;增

加 miRNA-214 的表达量能够导致大鼠血清 IL-17、IL-23 水平升高,软骨组织聚集蛋白聚糖、Col II 蛋白表达量降低及 MMP-13 蛋白表达量升高,抑制 miRNA-214 表达的结果则与之相反。因此,miRNA-214 在加剧软骨损伤中起作用,通过抑制 miRNA-214 的表达能够抑制炎症反应和软骨降解,促进软骨损伤修复。

ATF4 是一种转录激活因子,参与内质网应激、骨髓造血及骨代谢等多种生理过程的调控^[23-24]。有研究发现,ATF4 与骨代谢密切相关^[25-26]。王玥等^[27]研究发现,采用抗疏健骨颗粒治疗切除卵巢的骨质疏松大鼠,能够提高大鼠股骨中 ATF4 的表达量。郭健民等^[28]研究发现,抑制骨质疏松大鼠 miRNA-214 的表达能够促进 ATF4 表达,提高大鼠骨密度和骨强度,部分逆转骨质疏松大鼠的骨质流失。通过检索 miRNA 靶向基因数据库以及查找文献资料,我们预测在 OA 软骨损伤中,ATF4 可能是 miRNA-214 的靶向基因;在双荧光素酶实验中,在转染 ATF4-WT-psi-CHECK2 和 miRNA-214 模拟物的 293T 细胞中,荧光酶相对活性显著降低,进而验证了 miRNA-214 对 ATF4 的靶向性;而在 OA 模型大鼠软骨组织中,ATF4 的表达量显著降低,抑制 miRNA-214 表达能够促进 ATF4 的表达,而增加 miRNA-214 表达则导致 ATF4 的表达量进一步降低。因此,ATF4 是 OA 软骨损伤中 miRNA-214 的靶向基因,通过抑制 ATF4 的表达,进而修复 OA 软骨损伤。

本研究结果表明,OA 患者膝关节软骨损伤与软骨组织中 miRNA-214 的表达有关,抑制 miRNA-214 表达能够减轻大鼠膝关节炎症反应、减少软骨基质降解、促进软骨修复,miRNA-214 的作用机制与其抑制 IL-17、IL-23、MMP-13 表达和促进聚集蛋白聚糖、Col II、ATF4 表达有关,ATF4 可能是与 OA 软骨损伤相关的 miRNA-214 的靶基因之一。

参考文献

- [1] CHEN Z,ZHONG H,WEI J,et al. Inhibition of Nrf2/HO-1 signaling leads to increased activation of the NLRP3 inflammasome in osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1):300.
- [2] ZHANG J,RONG Y,LUO C,et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(24):25138-25152.
- [3] JAYAKUMAR P,MOORE M G,FURLOUGH K A,et al.

- Comparison of an artificial intelligence-enabled patient decision aid vs educational material on decision quality, shared decision-making, patient experience, and functional outcomes in adults with knee osteoarthritis: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Netw Open*, 2021, 4(2): e2037107.
- [4] 张翌帆, 赵海波, 于腾波, 等. 间质干细胞成骨过程中外泌体内 miRNA-222-5p 对肌腱细胞损伤的修复作用及其机制[J]. *中华骨科杂志*, 2021, 41(10): 644–653.
- [5] ZHANG D, WU Y, LI Z, et al. MiR-144-5p, an exosomal miRNA from bone marrow-derived macrophage in type 2 diabetes, impairs bone fracture healing via targeting Smad1[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 226.
- [6] 耿瑶, 尹志良, 李兴平, 等. hsa-miRNA-223-3p 调控人骨髓间充质干细胞成骨分化的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(7): 1008–1013.
- [7] WANG C G, WANG L, YANG T, et al. Pseudogene PTENP1 sponges miR-214 to regulate the expression of PTEN to modulate osteoclast differentiation and attenuate osteoporosis[J]. *Cytotherapy*, 2020, 22(8): 412–423.
- [8] SLATTERY C, KWEON C Y. Classifications in brief: Outerbridge classification of chondral lesions[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2018, 476(10): 2101–2104.
- [9] ZHENG W, LI X, LIU D, et al. Mechanical loading mitigates osteoarthritis symptoms by regulating endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 4077–4088.
- [10] SHI Y, HU X, CHENG J, et al. A small molecule promotes cartilage extracellular matrix generation and inhibits osteoarthritis development[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1914.
- [11] RIM YA, NAM Y, JU J H. The role of chondrocyte hypertrophy and senescence in osteoarthritis initiation and progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2358.
- [12] NGUYEN T H, DUONG C M, NGUYEN X H, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for osteoarthritis treatment: extracellular matrix protection, chondrocyte and osteocyte physiology, pain and inflammation management[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2887.
- [13] FISCH K M, GAMINI R, ALVAREZ-GARCIA O, et al. Identification of transcription factors responsible for dysregulated networks in human osteoarthritis cartilage by global gene expression analysis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(11): 1531–1538.
- [14] NAMHONG S, WONGDEE K, SUNTORNSARATOON P, et al. Knee osteoarthritis in young growing rats is associated with widespread osteopenia and impaired bone mineralization[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15079.
- [15] YAN J, DING D, FENG G, et al. Metformin reduces chondrocyte pyroptosis in an osteoarthritis mouse model by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(3): 222.
- [16] WANG G, LI Y, MENG X, et al. The study of targeted blocking SDF-1/CXCR4 signaling pathway with three antagonists on MMPs, type II collagen, and aggrecan levels in articular cartilage of guinea pigs[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 195.
- [17] XIAO D, BI R, LIU X, et al. Notch signaling regulates mmp-13 expression via runx2 in chondrocytes[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15596.
- [18] YANG J K, LIU H J, WANG Y, et al. Exosomal miR-214-5p released from glioblastoma cells modulates inflammatory response of microglia after lipopolysaccharide stimulation through targeting CXCR5[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2019, 18(1): 78–87.
- [19] LI K C, CHANG Y H, HSU M N, et al. Baculovirus-mediated miR-214 knockdown shifts osteoporotic ASCs differentiation and improves osteoporotic bone effects repair[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16225.
- [20] FANG Y, QIU J, JIANG Z B, et al. Increased serum levels of miR-214 in patients with PCa with bone metastasis may serve as a potential biomarker by targeting PTEN[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 398–405.
- [21] 曹红, 吴伟, 周绪昌, 等. miR-214 在肥胖大鼠软骨损伤修复中的作用研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(9): 1578–1587.
- [22] LI Q S, MENG F Y, ZHAO Y H, et al. Inhibition of microRNA-214-5p promotes cell survival and extracellular matrix formation by targeting collagen type IV alpha 1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Bone Joint Res*, 2017, 6(8): 464–471.
- [23] 黄媚, 陈熙, 邹军. ATF4 在内质网应激调控成骨分化中的作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(1): 29–35.
- [24] XIANG Z, WU Q, WANG Y, et al. eIF2 α -ATF4 pathway activated by a change in the calcium environment participates in BCP-mediated bone regeneration[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7(7): 3256–3268.
- [25] IN N, JIN N, WANG Z, et al. Osteopromotive carbon dots promote bone regeneration through the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway[J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(10): 2840–2852.

- dics, 2020, 43(6): e627 – e631.
- [2] LAIK J K, KAUSHAL R, KUMAR R, et al. Proximal fibular osteotomy: alternative approach with medial compartment osteoarthritis knee-Indian context [J]. J Family Med Prim Care, 2020, 9(5): 2364 – 2369.
- [3] DEMIRKIRAN N D. Simultaneous application of proximal fibular osteotomy and unicondylar knee arthroplasty [J]. Cureus, 2019, 11(5): e4763.
- [4] YANG Z Y, CHEN W, LI C X, et al. Medial compartment decompression by fibular osteotomy to treat medial compartment knee osteoarthritis: a pilot study [J]. Orthopedics, 2015, 38(12): e1110 – e1114.
- [5] AHMED M, BUX M, KUMAR M, et al. Proximal fibular osteotomy in the management of osteoarthritis of medial compartment of knee joint [J]. Cureus, 2020, 12(6): e8481.
- [6] 李存祥, 贾素华, 王健, 等. 单纯腓骨截断术治疗膝骨关节炎临床研究 [J]. 中国医学创新, 2010, 7(2): 115 – 117.
- [7] 张英泽, 李存祥, 李冀东, 等. 不均匀沉降在膝关节退变及内翻过程中机制的研究 [J]. 河北医科大学学报, 2014, 35(2): 218 – 219.
- [8] WANG X, WEI L, LV Z, et al. Proximal fibular osteotomy: a new surgery for pain relief and improvement of joint function in patients with knee osteoarthritis [J]. J Int Med Res, 2017, 45(1): 282 – 289.
- [9] 蒋协远, 王大伟. 骨科临床疗效评价标准 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [10] 李祖荣, 罗桦杰, 陈梅花, 等. 步态分析和 JOA 评分评定运动疗法及手法治疗膝骨性关节炎效果 [J]. 按摩与康复医学, 2014, 5(11): 21 – 22.
- [11] 王常海, 李峰, 张蓉, 等. 步态分析技术在膝骨性关节炎康复中的应用 [J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(7): 686 – 687.
- [12] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南 (2007 年版) [J]. 中华骨科杂志, 2007, 27(10): 793 – 796.
- [13] 陈伟, 张英泽, 侯志勇, 等. 应用腓骨截骨术治疗膝骨关节炎 [J]. 实用骨科杂志, 2015, 21(10): 945 – 946.
- [14] 余建平, 魏杰, 苏云星. 腓骨截骨术治疗膝骨关节炎的临床分析 [J]. 中国药物与临床, 2015, 15(8): 1161 – 1162.
- [15] 董伊隆, 钱约男, 李一民, 等. 腓骨近端截骨术和膝关节单髁置换术治疗不同严重程度膝骨关节炎的疗效比较 [J]. 中国骨伤, 2020, 33(1): 4 – 10.
- [16] 蒋万忠, 谢科, 程永超, 等. 腓骨近端截骨术与人工全膝关节置换术治疗内翻型膝关节骨关节炎的短期疗效比较 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(15): 1653 – 1656.
- [17] 刘同玉, 阮永龙, 陶新兵, 等. 腓骨近端截骨术与人工全膝关节置换治疗膝骨关节炎的近期疗效观察 [J]. 安徽医学, 2019, 40(5): 540 – 542.
- [18] HUDA N, ISLAM M S U, KUMAR H, et al. Proximal fibular osteotomy for medial compartment knee osteoarthritis: is it worth? [J] Indian J Orthop, 2020, 54(Suppl 1): 47 – 51.
- [19] 裴开源, 刘爱峰, 杨硕, 等. 膝骨性关节炎步态分析研究进展 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(5): 533 – 537.
- [20] 郝朋, 杨柳, 何锐, 等. 人工单髁关节置换术后步态及临床疗效分析 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2020, 34(11): 1369 – 1375.
- [21] 杨金发, 宋善新, 周果. 活动半月板单髁关节置换术对膝关节内侧单间室骨性关节炎患者手术指标、膝关节功能及步态指数的影响 [J]. 中国医学工程, 2021, 29(3): 135 – 138.
- [22] 何金龙, 余俊, 杨海波, 等. 三维步态分析系统在膝骨性关节炎患者中的临床研究 [J]. 宁夏医学杂志, 2021, 43(8): 721 – 724.
- [23] 赵辉, 吴海山. 步态分析在全膝关节置换手术中的应用 [J]. 中华骨科杂志, 2010(6): 630 – 634.
- [24] 周萌, 曹光磊, 张宽, 等. 便携式步态分析仪量化评价全膝关节置换病人的步态特征 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(7): 615 – 619.
- [25] 郭林, 崔太平. 全膝关节置换前后的三维步态分析 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(13): 2417 – 2420.
- [26] 李佳, 邱冰. 三维步态分析在膝关节疾病的运用进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(94): 192 – 194.

(收稿日期: 2022-01-07 本文编辑: 吕宁)

(上接第 14 页)

- [26] DIXIT M, SINGH K B, PRAKASH R, et al. Functional block of IL-17 cytokine promotes bone healing by augmenting FOXO1 and ATF4 activity in cortical bone defect model [J]. Osteoporos Int, 2017, 28(7): 2207 – 2220.
- [27] 王玥, 刘启玲, 徐守竹, 等. 抗疏健骨颗粒对去卵巢骨质疏松大鼠血清骨代谢及骨组织自噬水平的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(4): 487 – 491.

- [28] 郭健民, 周绪昌, 陈熙, 等. 递增负荷跑台运动抑制骨质疏松大鼠 miR-214 表达进而促进骨生成的作用研究 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(11): 2116 – 2121.

(收稿日期: 2022-04-01 本文编辑: 吕宁)