

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.10.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20240228.0849.002\(2024-02-28\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20240228.0849.002(2024-02-28))

环状 RNA circAZIN1 在骨关节炎中调控软骨细胞退变的作用机制^{*}

王湘江,韩嘉跃,杨浪,温国洪,关鸿,王贵清,利洪艺[△]

(广州医科大学附属清远医院/清远市人民医院骨科五区,广东清远 511518)

[摘要] **目的** 研究环状 RNA (circRNA) hsa_circ_0003304(circAZIN1)在骨关节炎(OA)中调控软骨细胞退变的作用及机制。**方法** 基因芯片检测人脂肪源性干细胞(hADSC)成软骨分化过程中 circRNA 的表达水平变化。从基因芯片检测差异化表达最明显的前 10 位 circRNA 中,用 IL- β 及 TNF- α 构建的软骨细胞炎症模型进一步筛选出 circAZIN1,过表达 circAZIN1(转染 pcDNA3.1-circAZIN1-EF1-ZsGreen 质粒)后实时荧光定量 PCR(qPCR)检测其对软骨细胞外基质(ECM)代谢的影响。RNA-蛋白体外结合(RNA pull down)试验检测 circAZIN1 结合的蛋白,miRNA-circRNA Interactions 预测 circAZIN1 可能海绵吸附的微 RNA(miRNA)及其位点,进一步利用 TargetMiner、miRDB 及 TargetScan 数据库预测 circAZIN1 可能海绵吸附的 miRNA 及下游 mRNA,过表达 miRNA 后检测 circAZIN1、miRNA 及下游的 mRNA 是否存在镜像调控现象。**结果** circAZIN1 在 hADSC 成软骨分化过程中(第 3 天和第 21 天)、IL- β 及 TNF- α 构建的软骨细胞炎症模型中差异化表达最明显(第 3 天组 vs. 第 21 天组、对照组 vs. IL- β 组、对照组 vs. TNF- α 组);过表达 circAZIN1 可促进软骨细胞 ECM 的合成、抑制其分解;RNA-Pull down 试验检测到 circAZIN1 明显结合 AGO2 蛋白,提示 circAZIN1 海绵吸附 miRNAs 的可能性大,进一步数据库预测 circAZIN1 的下游 miRNA 为 hsa-miR-654-3p,而 hsa-miR-654-3p 的下游 mRNA 为 CACNA1I,最后过表达 hsa-miR-654-3p 后 qPCR 检测证实 circAZIN1、hsa-miR-654-3p 及 CACNA1I 间存在镜像调控现象。**结论** circAZIN1 通过海绵吸附 hsa-miR-654-3p 继而抑制 CACNA1I 的沉默效应从而发挥抑制软骨细胞退变的作用,这为 circRNA 在 OA 发生、发展中的调控机制研究提供了参考。

[关键词] 骨关节炎;软骨退变;软骨细胞;环状 RNA;海绵吸附

[中图分类号] R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)10-1446-08

The role and mechanism of circular RNA circAZIN1 in regulating chondrocyte degeneration in osteoarthritis^{*}

WANG Xiangjiang, HAN Jiali, YANG Lang, WEN Guohong, GUAN Hong, WANG Guiqing, LI Hongyi[△]

(Fifth Department of Orthopaedic, Affiliated Qingyuan Hospital, Guangzhou Medical University/
Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and mechanism of circular RNA (circRNA) hsa_circ_0003304 (circAZIN1) in regulating chondrocyte degeneration in osteoarthritis (OA). **Methods** Gene chip was used to detect the expression level of circRNA during the chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hADSC). The circAZIN1 was further screened through the chondrocyte inflammation model constructed with interleukin- β (IL- β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) from the top 10 circRNAs with the most differentiated expression detected by gene chip. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction PCR (qPCR) was used to detect the effect of circAZIN1 overexpression (transfected with pcDNA3.1-circAZIN1-EF1-ZsGreen plasmid) on the metabolism of chondrocyte extracellular matrix (ECM). RNA-Pull down test was conducted to detect the protein bound by circAZIN1, miRNA-circRNA Interactions predicted the microRNAs (miRNAs) and their sites that circAZIN1 may be sponge-adsorbed, further TargetMiner,

^{*} 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2022254、B2021209);广东省自然科学基金面上项目(2022A1515012516);广东省清远市科技计划项目(2022KJJH028)。[△] 通信作者, E-mail: lihongyi211@163.com。

miRDB and TargetScan databases were applied to predict miRNAs which circAZIN1 may sponge-adsorbed. circAZIN1, miRNA and downstream mRNA were detected to find whether there was mirror regulation phenomenon after overexpression of miRNA. **Results** CircAZIN1 had the most significant differential expression during the chondrogenic differentiation of hADSC (day 3 and day 21) and in the chondrocyte inflammation model constructed by IL- β , TNF- α (day 3 group *vs.* day 21 group, the control group *vs.* the IL- β group, the control group *vs.* the TNF- α group). Overexpression of circAZIN1 could promote the ECM synthesis in chondrocytes and inhibit its decomposition. RNA-Pull down test result showed that circAZIN1 obviously bound AGO2 protein, suggesting that circAZIN1 had a high possibility of sponge adsorbing miRNAs. Further database predicted that its downstream was hsa-miR-654-3p, and the downstream mRNA of hsa-miR-654-3p was CACNA1I. After the overexpression of hsa-miR-654-3p, qPCR test found that circAZIN1, hsa-miR-654-3p and CACNA1I had a mirror image regulation phenomenon. **Conclusion** circAZIN1 inhibits the silencing effect of CACNA1I through sponge adsorption of hsa-miR-654-3p and thus plays a role in inhibiting chondrocyte degeneration, which provides a reference for the study of the regulatory mechanism of circRNA in the development of OA.

[**Key words**] osteoarthritis; cartilage degeneration; chondrocytes; circular RNA; sponge adsorption

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是运动系统最常见的退行性疾病之一,常表现为软骨退变、滑膜炎、软骨下骨硬化及骨赘形成^[1]。OA 发病率高,软骨损伤退变难以再生,目前病因未明,缺乏有效的治疗靶点,导致一部分早期 OA 逐渐进展为严重的终末期 OA,最终需行人工关节置换,给个人及社会造成沉重的负担^[2]。因此,如何有效地促进软骨细胞再生、延缓甚至阻止早期 OA 的进展一直是关节外科亟需突破的研究瓶颈,随着社会老龄化的日益加重,对软骨细胞再生的作用机制进行深入研究迫在眉睫^[3]。研究发现环状 RNA(circRNA)结构稳定、高度保守,组织及阶段特异性强,且生物功能多样,在海绵结合微 RNA(microRNA, miRNA)、结合或者翻译蛋白及调控亲本基因表达方面均发挥重要作用,已成为目前癌症、炎性病变、退行性疾病等研究领域的热点^[4]。有研究表明 circRNA 在 OA 发生、发展中软骨细胞退变的调控方面同样起着重要的作用,然而具体作用机制尚未明确^[5],因此本研究拟探索 circRNA hsa_circ_0003304(circAZIN1)在 OA 中调控软骨细胞退变的具体作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞组织标本

本研究的临床样本收集及相关生物学研究已通过本院医学伦理委员会审查并获得批复(审批号:IRB-202303-K21)。本实验提取人脂肪源性干细胞(human adipose-derived stem cells, hADSC)所需的脂肪组织来自 6 例健康成人[年龄 18~34 岁,平均(25.3 $\pm$ 6.7)岁,其中男 2 例,女 4 例]的腹部、臀部或大腿减脂、无菌手术抽脂,软骨组织来自股骨颈骨折(无骨关节炎或者类风湿病史, Kellgren & Lawrence 影像分级 I 级, Thompson 大体形态学分级 I 级)或 OA 需行人工关节置换术的患者的股骨头软骨。术前均与患者

详细交代临床样本收集的目的、利弊及可能带来的风险,患者均表示理解、同意并签署知情同意书。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基、DMEM 培养基(4.5 g/L D-葡萄糖)购自美国 HyClone 公司, α MEM 培养基购自武汉赛维尔生物科技有限公司,胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶溶液[含乙二胺四乙酸(EDTA)]购自美国 Gibco 公司,胶原酶 P、链霉菌蛋白酶购自瑞士 Roche 公司, OriCell 成人脂肪源性干细胞(hADSC)成软骨诱导分化培养基试剂盒购自美国 Cyagen 公司, RNA 提取试剂盒购自荷兰 Qiagen 公司, miRNA 逆转录试剂盒、mRNA 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, Magna RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)试剂盒购自美国 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 hADSC 制备与培养

将分离干净剪碎的黄色脂肪组织转至 50 mL 离心管,估算脂肪组织总体积后按照 1:1 体积加入已无菌过滤的 2 mg/mL 的 I 型胶原酶溶液,充分混匀后放置 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床定速 90 r/min 消化 1 h;经 70 μ m 细胞滤网过滤至新的 50 mL 离心管,弃滤网,过滤液 150 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液,加入 2 mL PBS 重悬后 150 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液,重复 PBS 洗涤一遍,弃上清液;加入 α MEM 完全培养基 2 mL 重悬,显微镜细胞计数板进行细胞计数,按 1 $\times$ 10⁶/瓶的密度将细胞接种于 75 cm² 的培养瓶,放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。定期观察细胞生长情况,视情况 2~3 d 予以 PBS 洗 2 次后换新鲜 α MEM 培养基。

1.3.2 人软骨细胞制备与培养

将软骨切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小,称重。按照 1 g 软骨加入 12 mL 浓度为 4 mg/mL 的蛋白酶溶液,放入 37 ℃ 恒温无菌摇床定速 90 r/min 消化 1 h。取蛋白酶溶液并用 PBS 清洗两遍,然后按照比例加入浓度 0.25 mg/mL 为胶原酶 P 溶液,放入 37 ℃ 恒温无菌定速 60 r/min,摇 4~6 h;过滤后加入等体积 PBS,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬,显微镜下细胞计数板计数细胞,将 2.5×10⁶ 个细胞种植到加入含 10% FBS 的 75 cm² 培养瓶中,DMEM/F12 培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.3.3 细胞总 RNA 提取

PBS 清洗两遍,吸干 PBS 后向培养板中加入 QI-Azol 裂解液,吹打贴壁细胞;将细胞转至 1.5 mL EP 管后加入 140 μL 氯仿,剧烈摇动 15 s,室温静置孵育 3 min;4 ℃ 12 000×g 离心 15 min,小心将最上层水相转移至新的 1.5 mL EP 管;加入 1.5 倍体积的无水乙醇,充分摇匀后将混合液转入试剂盒配套的 RNeasy[®] Mini 柱子并套入 2 mL RNA 收集管,8 000×g 离心 15 s,弃过柱液,重复此步直至混合液全部转至柱子;柱子加入 700 μL RWT 缓冲液,8 000×g 离心 15 s,弃过柱液;加入 500 μL RPE 缓冲液,8 000×g 离心 15 s,弃过柱液;重复此步骤;将柱子套入新的 2 mL RNA 收集管,最高转速空甩离心 2 min 以甩干柱子的过滤膜;将柱子套入新的 1.5 mL EP 管,加入无酶水 30 μL 至过滤膜中央,8 000×g 离心 1 min,收集管内液体即为所提取的总 RNA;Nano-drop 紫外分光光度计测 RNA 浓度和纯度。

1.3.4 逆转录反应

1.3.4.1 miRNA 逆转录

根据逆转录试剂盒 miR-X[™] miRNA First-Strand Synthesis Kit 使用加尾法逆转录,在 0.2 mL 鼓盖薄壁管依次加入 3.75 μL 总 RNA、5 μL 2×mRQ 缓冲液及 1.25 μL mRQ Enzyme Mix 混匀后放入逆转录仪按 37 ℃ 1 h、85 ℃ 5 min 条件,完成逆转录,然后加入 40 μL 无酶 ddH₂O 至总体积 50 μL,cDNA 制备完成以备下一步 qPCR 用。

1.3.4.2 mRNA 及 circRNA 逆转录

根据逆转录试剂盒 PrimeScript[™] RT Reagent Kit,在 0.2 mL 鼓盖薄壁管依次加入 1 μg 总 RNA、4 μL 5×Primescrip Master Mix 及无酶 ddH₂O 补足至总体积 20 μL 混匀后放入逆转录仪依次 37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 min,完成逆转录后加入 80 μL 无酶 ddH₂O 至总体积 100 μL,cDNA 制备完成以备下一步 qPCR 用。

1.3.5 qPCR 反应

根据 TB Green[™]Premix Ex Taq[™] II 试剂盒说明书进行 miRNA qPCR 反应,在 0.2 mL 鼓盖薄壁管依次加入 5 μL 2×TaKaRa SYBR Premix Ex Taq[™] II、3.2 μL ddH₂O、0.4 μL miRNA 特异引物、0.4 μL mRQ 3'引物、1 μL cDNA 至总体积 10 μL;根据 TB Green[™]Premix Ex Taq[™] II 试剂盒说明书进行 mRNA qPCR 反应,在 0.2 mL 鼓盖薄壁管依次加入 5 μL 2×TaKaRa SYBR Premix Ex Taq[™] II、3.2 μL ddH₂O、0.4 μL mRNA 上游引物、0.4 μL mRNA 下游引物、1 μL cDNA 至总体积 10 μL。最后放入 PCR 仪依次 95 ℃ 10 s、95 ℃ 5 s、60 ℃ 20 s,循环 40 次,95 ℃ 60 s、55 ℃ 30 s、95 ℃ 30 s 熔解。而 circRNA 的反应体系为 cDNA(1:10 稀释) 5 μL、上游引物(10 μmo/L) 0.4 μL、下游引物(10 μmo/L) 0.4 μL,2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL,ddH₂O 补齐至 20 μL;反应条件:预变性 95 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s、60 ℃ 34 s,循环 40 次;95 ℃ 15 s、60 ℃ 60 s、95 ℃ 15 s 熔解。引物序列见表 1,miRNA 的特异引物采用 sRNAPrimerDB 设计,mRNA 的引物采用 Primer-Bank 设计,miRNA 内参为 U6,mRNA 内参为 GAPDH。qPCR 检测采用 Applied Biosystems 和 QuantStudio[™] real-time PCR Software 软件,以 2^{-ΔΔCt} 法分析 Ct 值用以表示 miRNA、mRNA 表达水平。

表 1 qPCR 检测引物序列

基因	方向	序列(5'-3')	产物大小 (bp)
hsa-GAPDH	正向	AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG	197
	反向	GCA GGA GGC ATT GCT GAT GAT	
hsa-COL2A1	正向	GCA CCT GCA GAG ACC TGA AAC	186
	反向	GCA AGT CTC GCC AGT CTC CA	
hsa-MMP-13	正向	TCC TGA TGT GGG TGA ATA CAA TG	184
	反向	GCC ATC GTG AAG TCT GGT AAA AT	
hsa-AZIN1	正向	ATT GAT GAT GCA AAC TAC TCC GT	167
	反向	GCC ACT ACA TTC TGC CAT TGA	
hsa-circAZIN1	正向	AGT GAA TAT CCT GAC ATG TGA CA	534
	反向	TGT CTG GGT CCT TAG AAT ATG CA	
hsa_circ_0009000	正向	AGG GAG CAA TTG GTA AGG CA	254
	反向	AGC ACT CAT CAC AAA TGG CA	
hsa_circ_0024758	正向	TCA TTC TGT CAA TGG CTG CTG	184
	反向	AGC AAA CAG ACG AGT GGA GA	
hsa_circ_0065769	正向	TGG ACG TGA AGA GCA GAG TT	1 439
	反向	TCC AGA CCG CCT TCT TCT TT	
hsa_circ_0029636	正向	GAA AAA GAG CCG GTT GAA AAG C	960
	反向	CTG TCC TCC AAG TAT CAT CT	
hsa_circ_0025693	正向	TGT TGG GCC TCC TAA TCC TC	599
	反向	TTT CCA CTG CTG CAA CAA GG	
hsa_circ_0011162	正向	CCC TCA GCC CTA ATC AAC CT	330
	反向	GGC TGG TTC CGG TTT TAT GG	

续表1 qPCR 检测引物序列

基因	方向	序列(5'-3')	产物大小 (bp)
hsa_circ_0002164	正向	TGC CTT CAA GTA GCC ATG GA	461
	反向	TGT ACT GGC ATG CTC TGT GA	
hsa_circ_0005782	正向	AAA CAC CGA TGG CTT CTT CC	304
	反向	CAA CCA CTG ATG CAC CAC TC	
hsa_circ_0012151	正向	GCA CCT TTA CAG ACT GGA GC	278
	反向	GGA GCC CAG CAC TTT TCT TG	
hsa-miR-654-3p		UAU GUC UGC UGA CCA UCA CCU U	84

1.3.6 RNA-蛋白体外结合(Pull down)实验

1.3.6.1 体外转录模板准备

在插入片段下游的酶切位点,应用相应的限制性内切酶进行单酶切反应,以制备线性化 DNA 片段。酶切反应体系、条件根据内切酶说明书进行。酶切产物用酚/氯仿乙醇沉淀法进行纯化,向酶切产物中加入1倍体积 Tris 饱和酚和1倍体积氯仿,混合均匀,室温 10 000 r/min 离心 5 min,将上层水相转移至新的 1.5 mL EP 管中,加入等体积氯仿后混合均匀,室温 10 000 r/min 再次离心 5 min,将上层水相转移至新的 1.5 mL EP 管中,加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠、2.5 倍体积无水乙醇和与上层水相等体积的异丙醇,混合均匀后-80℃沉淀 DNA 约 1~2 h,室温 10 000 r/min 离心 10 min,预冷的 70%乙醇清洗沉淀后晾干,用 10 μL 无酶 ddH₂O 溶解后作为模板用于后续体外转录。

1.3.6.2 体外转录与生物素标记 RNA

使用美国 Thermo Fisher 公司的 Pierce RNA3' End Desthiobiotinylation 试剂盒,按照操作说明依次配制反应体系,16℃过夜反应,次日,将所得生物素标记的 RNA 用美国 Thermo Fisher 公司的 MEGAclear™ Transcription Clean-Up 试剂盒纯化,用于后续实验。

1.3.6.3 RNA-蛋白结合与洗脱

取 5 μL 50 pmol 生物素标记的 RNA,用 RNA Structure 缓冲液补足至 100 μL,快速升温至 95℃孵育 5 min,随后置于冰上 5 min,最后室温孵育 20 min。取 50 μL 均质的链亲和素结合磁珠,用等体积 20 mmol/L Tris(pH 7.5)清洗 3 次后,上磁力架,待磁珠被完全吸附后弃上清液,加入配制好的 RNA-Protein Binding Reaction Maser Mix(含有 50 pmol 生物素标记的 RNA 和 200 μg 蛋白重悬磁珠),4℃旋转孵育 60 min。随后用 1×Wash Buffer 清洗 RNA 结合蛋白混合物 3 次,加入 Elution Buffer,37℃洗脱 30 min,用 Loading buffer 变性蛋白,用于后续分析。

1.3.6.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析及银染

所得 RNA 结合蛋白混合物用 SDS-PAGE 进行分析,使用美国 Thermo Fisher 公司的 NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels 预制胶进行电泳,分离后的蛋白转至聚偏氟乙烯(PDVF)膜后使用美国 Thermo Fisher 公司的 Pierce Silver Stain 试剂盒进行银染,切下特异性结合的蛋白条带进行后续质谱鉴定。

1.3.7 转染

1.3.7.1 过表达质粒 pcDNA3.1-circAZIN1 的构建

选择 pcDNA3.1-circRNA-EF1-ZsGreen 载体,选用合适的限制性内切酶进行酶切载体,琼脂糖凝胶回收得到纯化的线性化载体;PCR 后琼脂糖凝胶回收得到目的片段;将线性化载体和目的片段予 HB infusion™ 克隆连接;转化感受态 DH5a 菌液,涂板培养,挑单克隆行菌落验证;选择菌落验证正确的阳性克隆进行测序;最后将测序正确的克隆样品进行质粒抽提。以 Lipofectamine3000 转染试剂盒转染质粒。

1.3.7.2 miR-654-3p mimic

miR-654-3p mimic 序列为 5'-UAU GUC UGC UGA CCA UCA CCU U-3',阴性对照(miR-654-3p mimic 对照)为 5'-UCA CCG GGU GUA AAU CAG CUU G-3',以 riboFECT™ CP Transfection 转染试剂盒转染 miR-654-3p mimic。

1.3.7.3 si-CACNA1I

si-CACNA1I-1 序列为 5'-GAA GGC TGG GTG GAG ATC ATG TAC T-3',si-CACNA1I-2 序列为 5'-CCG GGT CCT GTG TCA GAC CAT TAT T-3',以 Lipofectamine3000 转染试剂盒转染 si-CACNA1I,对比两个序列的干扰效率,以干扰效率高的 si-CACNA1I 进行后续实验。

1.3.8 蛋白免疫印记(Western blot)

1.3.8.1 收集样本提取总蛋白

用含 1%蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,收集蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。

1.3.8.2 上样及电泳

洗净并晾干的玻璃板于 Bio-RAD 固定装置中固定。按照 8%/10%/12% SDS-PAGE 彩色(红色)凝胶超快速配制试剂盒按照说明书依次配制下层胶混合液加入玻璃板,15 min 后待下层胶凝固后再加入配制好的上层胶溶液,按照实际实验要求将蛋白样品加入凝胶的相应加样孔中,约 25 μg/孔,并在相邻空白加样孔加入蛋白 marker;以 80 V 30 min,100 V 60 min 的条件进行电泳,直至溴酚蓝刚好迁移至玻璃板底部、蛋白 marker 充分迁移;视蛋白相对分子量大小大概设置 250 mA 转膜约 2 h,将蛋白转移至 PVDF 膜。转膜完成后,取出 PVDF 膜,转至 5%脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,TBST 洗膜,加入 5%牛血清白蛋

白(BSA)溶液稀释配制好的一抗,4℃冰箱孵育过夜。回收一抗后,TBST洗膜3次,5 min/次;弃TBST后加入1:5 000的与一抗相对应种属的二抗,室温孵育1 h。回收二抗后,TBST洗膜3次,5 min/次。1:1配制好化学发光液,在条带正面滴加适量的化学发光液,在化学发光成像系统(ChemiDoc Touch)上根据具体情况曝光适当时间,保存图片。Image J 软件分析条带灰度值。

1.4 统计学处理

利用SPSS20.0软件进行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 circAZIN1 在成软骨分化中后期呈差异性高表达及在 OA 中表达减少

本次研究收集hADSC成软骨分化第3天及第21天软骨小球样本行circRNA表观遗传学基因芯片检测,筛选出差异性表达最明显的10个circRNA(第3天 $vs.$ 第21天,图1A)。qPCR检测上述10个circRNA在IL-1 β 及TNF- α 构建的软骨细胞炎症模型中的表达发现其中circAZIN1较对照下调(对照 $vs.$

IL-1 β 软骨细胞炎症模型或对照 $vs.$ TNF- α 软骨细胞炎症模型,图1B、C)。qPCR检测circAZIN1在hADSC成软骨分化全过程中的变化规律,发现circAZIN1表达在成软骨分化早中期(第3~21天)升高,晚期(第28~35天)下降(图1D)。qPCR检测结果显示circAZIN1在9例OA患者软骨中的总体表达水平低于正常软骨(图1E)。

2.2 鉴定 circAZIN1 的作用及预测其下游机制

为进一步鉴定circAZIN1调控软骨细胞退变的具体作用,本研究以pcDNA3.1质粒载体构建过表达circAZIN1体系,qPCR结果提示:过表达质粒pcDNA3.1-circAZIN1构建成功(图2A)。过表达circAZIN1后软骨细胞外基质(extracellular matrix,ECM)合成指标COL2A1 mRNA表达水平增加,ECM分解指标MMP-13 mRNA表达水平减少(图2B),提示过表达circAZIN1可促进软骨细胞ECM合成。本研究利用miRNA-circRNA Interactome预测到circAZIN1下游结合AGO2蛋白可能性较大(图2C),进一步RNA-Pull down试验检测发现circAZIN1可与AGO2抗体结合(图2D),提示circAZIN1海绵结合miRNA可能性大。

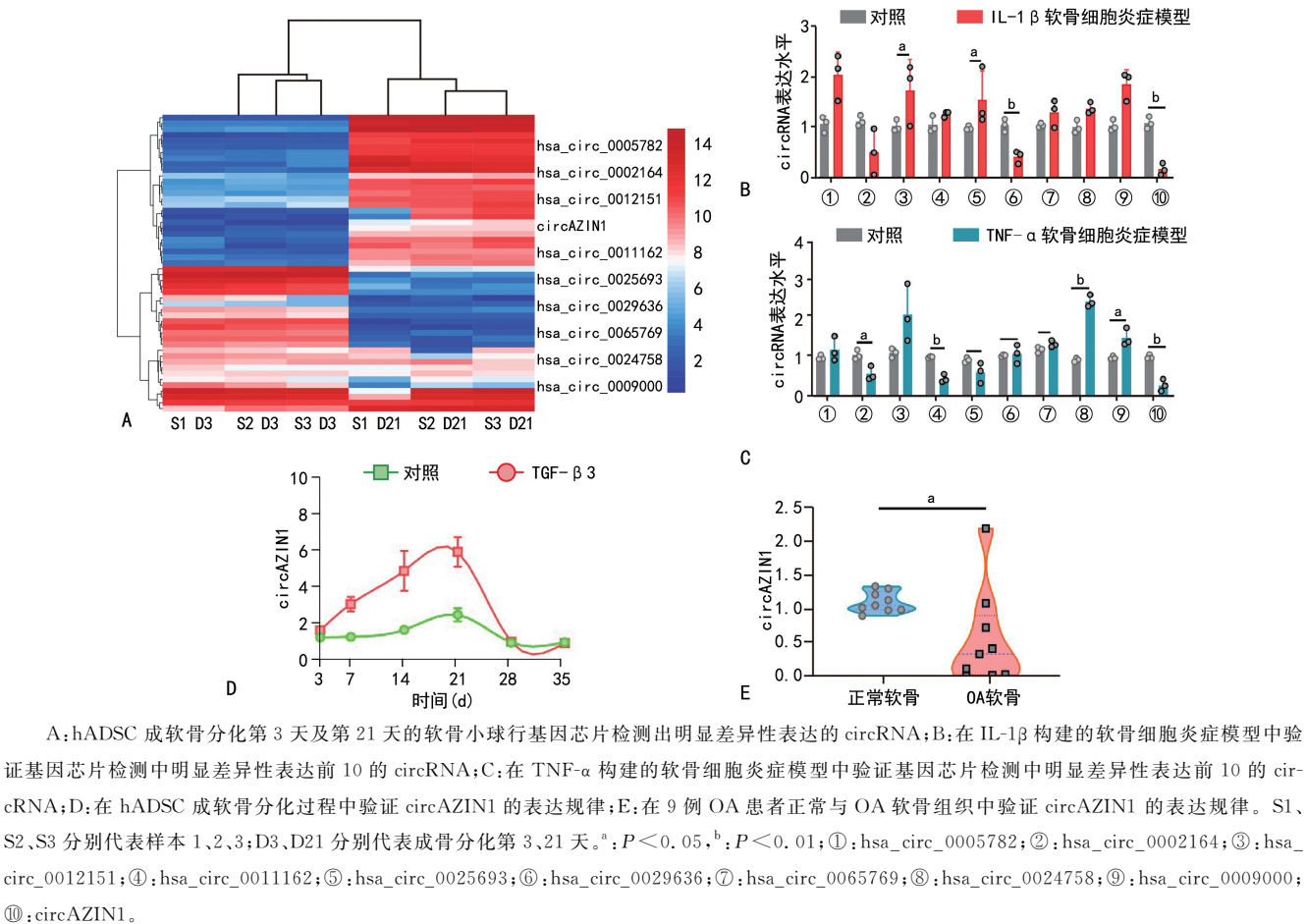
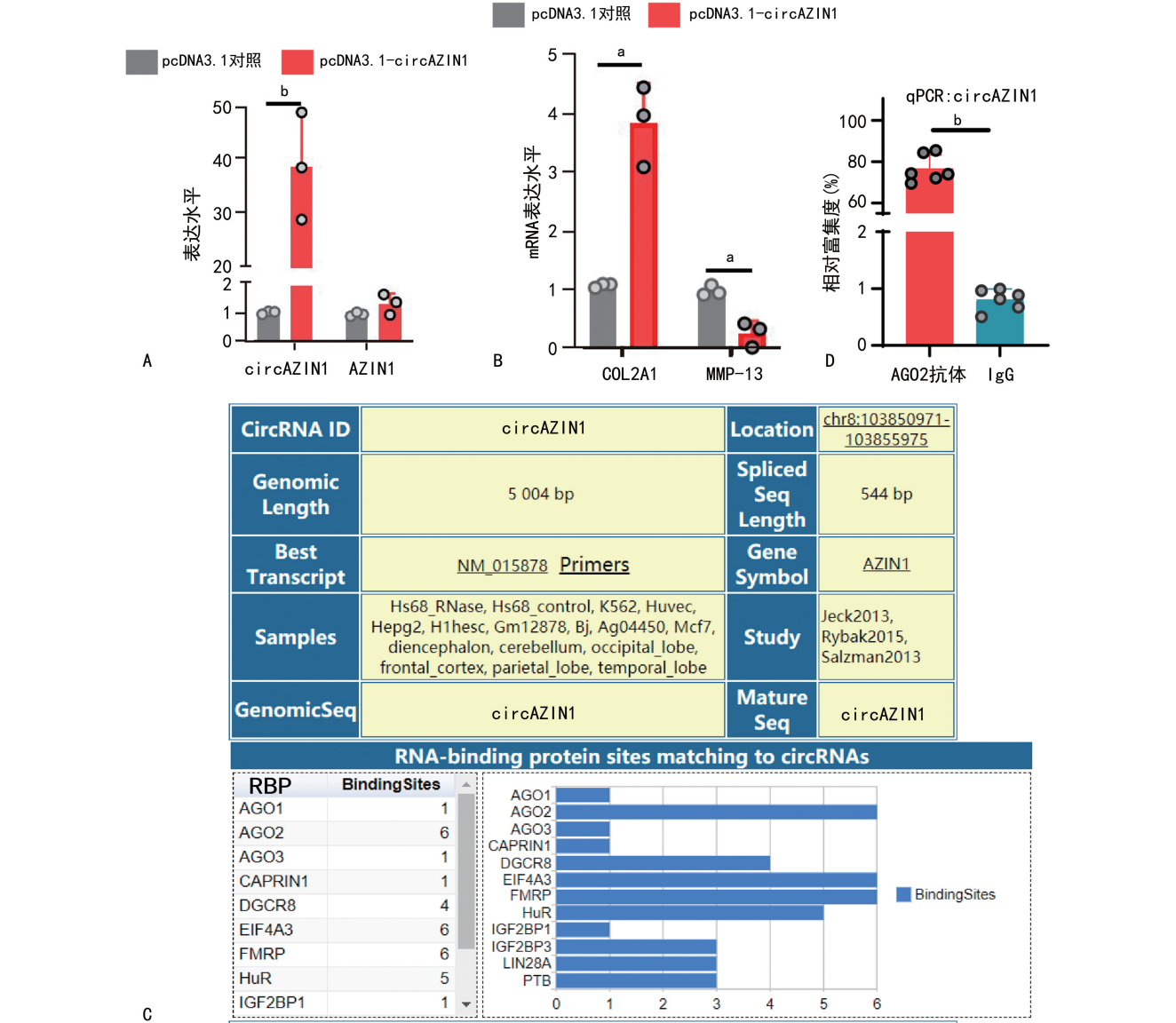


图1 基因芯片筛选并验证 circAZIN1 在成软骨分化及 OA 中的表达规律



A: 转染过表达 circAZIN1 质粒检测 circAZIN1 及其亲本基因 AZIN1 的表达情况; B: 转染过表达 circAZIN1 质粒检测 ECM 合成指标 COL2A1 mRNA 及分解指标 MMP-13 mRNA 的表达情况; C: miRNA-circRNA Interactome 预测 circAZIN1 的可能下游作用机制; D: RNA-Pull down 试验检测 circAZIN1 可与 AGO2 抗体结合。^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$ 。

图2 预测并鉴定 circAZIN1 的下游作用机制

2.3 鉴定下游 miR-654-3p 及 CACNA1I 作用

在 Starbase 上根据 miRNA-circRNA Interactions 预测到 circAZIN1 可能海绵吸附 hsa-miR-654-3p, 进一步预测 circAZIN1 与 hsa-miR-654-3p 可能结合位点为 AGGCCAGACAU(图 3A)。qPCR 检测结果显示: 在人软骨细胞中转染过表达 circAZIN1 质粒后检测到过表达 circAZIN1 组软骨细胞(转染 pcDNA3.1-circAZIN1)的 miR-654-3p 表达水平比阴性对照组(转染 pcDNA3.1-对照)明显下调(图 3B), 而在人软骨细胞中转染 miR-654-3p mimic 后过表达 miR-654-3p 组相对于阴性对照组(转染 miR-对照), COL2A1 表达水平下调、MMP-13 表达水平上调(图 3C)。继而利用 TargetMiner、miRDB 及 TargetScan 数据库联合预测 miR-654-3p 的可能下游作用靶基

因, 进一步交集后仅剩 CACNA1I(图 3D), 提示 CACNA1I 可能是 miR-654-3p 下游作用分子, 在人软骨细胞中转染 miR-654-3p mimic 后检测过表达 miR-654-3p 组相较于阴性对照组 CACNA1I 表达水平明显下调(图 3C); 转染干扰 CACNA1I 表达的 si-CACNA1I-1 及 si-CACNA1I-2, 发现 si-CACNA1I-1 敲低效率更高, 以 si-CACNA1I-1 作后续实验干扰序列; 而 si-CACNA1I-1 组(转染 si-CACNA1I-1)的软骨细胞中 COL2A1 表达水平较阴性对照组(转染 si-对照)明显下调、MMP-13 表达水平明显上调(图 3E), 与过表达 miR-654-3p 后 ECM 的变化规律一致, 提示 circAZIN1 通过海绵结合 hsa-miR-654-3p 继而解除 hsa-miR-654-3p 对下游 mRNA CACNA1I 的转录表达抑制作用。

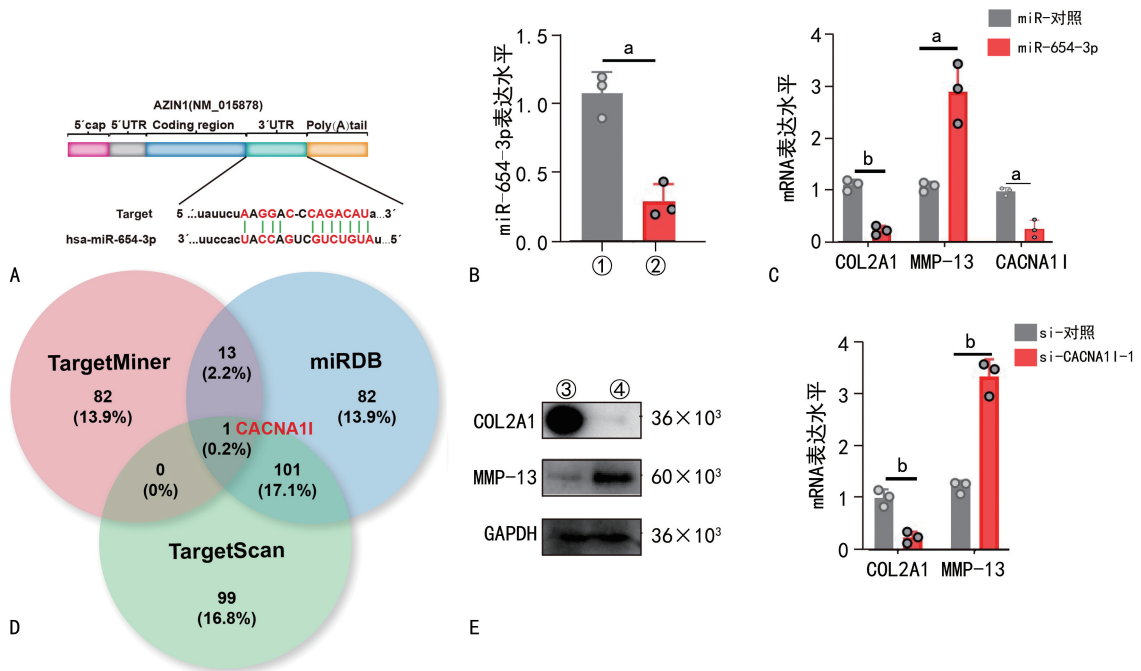


图 3 预测并鉴定 miR-654-3p 的下游作用机制

3 讨论

软骨退变是 OA 发生、发展最重要的病理改变,而软骨细胞是软骨组织中唯一的细胞成分,虽然只占软骨组织的 4%,但目前认为软骨细胞退变是 OA 发生、发展的最主要病因之一^[6]。软骨细胞退变的具体机制尚未明确,circRNA 因其结构稳定、高度保守、组织及阶段特异性强、生物功能多样等优点已成为目前 OA 疾病研究的热点之一^[7]。本研究在 hADSC 成软骨分化小球的 circRNA 基因芯片筛查中发现 circAZIN1 明显高表达,而 circAZIN1 可促进 ECM 合成、抑制其分解,进一步研究发现 circAZIN1 海绵吸附 hsa-miR-654-3p 促进 CACNA1I mRNA 表达从而发挥抑制软骨细胞退变的作用。既往研究显示 circAZIN1 在人和哺乳动物的脑组织、胎盘及骨髓干细胞中均有较高的表达丰度,且对上述器官及组织的发育起着重要作用^[8-9]。本研究初步揭示了 circAZIN1 通过海绵吸附 hsa-miR-654-3p、抑制其对 CACNA1I mRNA 沉默作用继而影响软骨细胞退变的分子作用机制,符合既往研究报道的 circRNA-miRNA-mRNA 间表达水平“此起彼伏”竞争内源 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) 的调控机制表现,有望成为 OA 诊疗的潜在靶点^[10]。研究报道 hsa-miR-654-3p 可能是动脉粥样硬化及乳腺癌特异性的组织及血清学诊断标志物^[11-12],而 CACNA1I 则可能通过影响钙离子通道引发精神分裂症^[13-14],因此本研究为首次

报道 circAZIN1、hsa-miR-654-3p 及 CACNA1I 可能影响软骨细胞退变及 OA 发生、发展,为 circRNA 在 OA 中的研究提供参考。

circRNA 在许多疾病中通过海绵吸附 miRNA、结合蛋白及编码蛋白等发挥重要的生物功能,OA 相关研究报道发现 circSERPINE2 通过靶向 miR-1271 及 ETS 相关基因发挥保护软骨细胞的生物功能^[15],而 circPDE4D 则通过结合 miR-103a-3p 而调控 FGF18 起保护作用^[16],circNFKB1 通过结合 ENO1 蛋白激活 NF- κ B 信号通路活性来促进 OA 的进展^[17],而本研究发现 hADSC 成软骨分化过程中明显差异性表达的 circAZIN1,继而发现 circAZIN1 可促进软骨细胞 ECM 合成、抑制其降解从而发挥保护软骨的作用, RNA-Pull down 实验研究发现 circAZIN1 可明显吸附 AGO2 蛋白,提示 circAZIN1 可能通过海绵吸附 miRNAs 起到软骨保护作用,进一步发现其具体作用机制可能是 circAZIN1 靶向 hsa-miR-654-3p 调控 miRNA 的下游 CACNA1I mRNA 的转录,本研究为 circRNA 在早期 OA 治疗的转化应用提供理论依据。

综上所述,本研究在 hADSC 成软骨分化小球样本的 circRNA 表观遗传学基因芯片筛查中发现 circAZIN1 表达水平明显上调,其具有抑制软骨细胞退变的作用,初步揭示了 circAZIN1 通过海绵吸附 hsa-miR-654-3p 继而抑制 CACNA1I 的沉默效应从而发

挥抑制软骨细胞退变的作用,为 circRNA 在 OA 发生、发展中的调控作用机制提供参考,但上述 3 个分子间的具体作用位点的鉴定及相互作用的具体机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] HUNTER D, BIERMA S. Osteoarthritis[J]. Lancet,2019,393(10182):1745-1759.

[2] MURRAY C, VOS T, LOZANO R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet,2012,380(9859):2197-2223.

[3] JIANG Y. Osteoarthritis year in review 2021: biology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30 (2):207-215.

[4] ZHOU W, CAI Z, LIU J, et al. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins[J]. Mol Cancer,2020,19(1):172.

[5] YOUND D, BARTER M, SOUL J. Osteoarthritis year in review: genetics, genomics, epigenetics[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30 (2): 216-225.

[6] LI B, GUAN G, MEI L, et al. Pathological mechanism of chondrocytes and the surrounding environment during osteoarthritis of temporomandibular joint[J]. J Cell Mol Med,2021,25(11):4902-4911.

[7] LIU C, CHEN L. Circular RNAs: characterization, cellular roles, and applications[J]. Cell, 2022,185(12):2016-2034.

[8] SU F, GAO Z, LIUY, et al. Integrated tissue and blood miRNA expression profiles identify novel biomarkers for accurate non-invasive diagnosis of breast cancer; preliminary results and future clinical implications[J]. Toxicol Lett, 2014, 229 (1): 311-318.

[9] HAN X, WANG H, LI Y, et al. A 2 miRNAs-based signature for the diagnosis of atherosclerosis[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2021, 21(1):

150.

[10] CHENG Y, SU Y, WANG S, et al. Identification of circRNA-lncRNA-miRNA-mRNA competitive endogenous RNA network as novel prognostic markers for acute myeloid leukemia[J]. Genes (Basel), 2020,11(8):868.

[11] AANIESZKA R, CHRISTIN S, PETAR G, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. Mol Cell,2015,58(5):870-885.

[12] PHILIPP G, PETAR G, SEBASTIAN M, et al. A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues[J]. J Mol Med, 2017, 95 (11): 1179-1189.

[13] EL G, SCHNEEBERGER P, FERNANDEZ M, et al. CACNA1I gain-of-function mutations differentially affect channel gating and cause neurodevelopmental disorders[J]. Brain, 2021, 144 (7):2092-2106.

[14] BAEZ D, ALLEN A, AKERS S, et al. Analysing an allelic series of rare missense variants of CACNA1I in a Swedish schizophrenia cohort [J]. Brain, 2022, 145(5):1839-1853.

[15] SHEN S, WU Y, CHEN J, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene [J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(6):826-836.

[16] WY Y, HONG Z, XU W, et al. Circular RNA circPDE4D protects against osteoarthritis by binding to miR-103a-3p and regulating FGF18 [J]. Mol Ther, 2021, 29(1):308-323.

[17] TANG S, NIE X, RUAN J, et al. Circular RNA circNFKB1 promotes osteoarthritis progression through interacting with ENO1 and sustaining NF-κB signaling [J]. Cell Death Dis, 2022, 13 (8):695.

(收稿日期:2023-08-22 修回日期:2023-12-27)

(编辑:姚 雪)