

# miR-146a 通过 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路调控 脊柱结核进展的分子机制

李小鹏<sup>1</sup> 厉锋<sup>1</sup> 董阳<sup>2</sup> 张杨<sup>1</sup> 赵晓栋<sup>1</sup> 张骁<sup>1</sup> 孙泉<sup>1</sup> 王军<sup>3</sup> 陈高扬<sup>4</sup>

**【摘要】** 目的 探讨 miR-146a/转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)/母亲抗肢瘫 (small mother against decapentaplegic, SMAD) 通路在脊柱结核进展中的调控机制。方法 收集脊柱结核病人和正常病人髓核组织, 验证 miR-146a/TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路在结核髓核组织中的表达量; 分离培养髓核细胞, 敲低/过表达 miR-146a, 分别应用 qPCR、Western blot、CCK-8、划痕实验验证 miR-146a 对 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路表达及髓核细胞增殖、迁移能力的影响。结果 与正常病人比较, 脊柱结核病人髓核细胞增殖及迁移能力显著减低, miR-146a 在脊柱结核病人髓核组织中表达量显著减低, 而脊柱结核病人髓核组织中 SMAD 同系物 2 (SMAD2)、SMAD 同系物 3 (SMAD3)、SMAD 同系物 4 (SMAD4)、TGF- $\beta$ 1 基因表达增高, SMAD 同系物 7 (SMAD7) 表达减低, 提示 miR-146a 与 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路活性显著负相关。过表达 miR-146a 可抑制 SMAD2、SMAD3、SMAD4、TGF- $\beta$ 1 和促进 SMAD7 表达, 而敲低 miR-146a 可促进 SMAD2、SMAD3、SMAD4、TGF- $\beta$ 1 mRNA 和抑制 SMAD7 表达水平。细胞实验进一步证实过表达 miR-146a 可促进脊柱结核病人髓核细胞增殖和迁移能力, 而敲低 miR-146a 可显著抑制其增殖和迁移能力。结论 miR-146a 是脊柱结核进展的关键调控因子, 其可通过抑制 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路活性进而调控髓核细胞增殖及迁移活性。

**【关键词】** 脊柱结核; miR-146a; TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路; 髓核细胞

**Molecular Mechanism of miR-146a in Regulating the Progression of Spinal Tuberculosis via the TGF- $\beta$ 1/SMAD Pathway.** LI Xiaopeng<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, DONG Yang<sup>2</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, ZHAO Xiaodong<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>1</sup>, SUN Quan<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>3</sup>, CHEN Gaoyang<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Department of Spinal Surgery, Weifang People's Hospital (First Affiliated Hospital of Weifang Medical College), Weifang 261200, China; <sup>2</sup>Department of Radiology, Weifang People's Hospital (First Affiliated Hospital of Weifang Medical College), Weifang 261200, China; <sup>3</sup>Department of Orthopedics, Weifang Second People's Hospital, Weifang 261200, China; <sup>4</sup>Department of Hand & Foot and Microvascular Surgery, Shenzhen People's Hospital (First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology), Shenzhen Institute of Orthopedics, Shenzhen Key Laboratory of Musculoskeletal Tissue Reconstruction and Function Restoration (ZDSYS2020081143752005), Shenzhen 518020, China

Corresponding author: CHEN Gaoyang, E-mail: chen199001207@163.com

WANG Jun, E-mail: rmyywangjun@wfm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the regulatory mechanism of miR-146a / transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)/small mother against decapentaplegic (SMAD) signaling pathway in the progression of spinal tuberculosis. **Methods** The spinal tuberculosis nucleus pulposus tissues were collected and the expression of miR-146a/TGF- $\beta$ 1/SMAD signaling pathway in tuberculosis nucleus pulposus tissues was examined. The nucleus pulposus cells were isolated from tuberculosis nucleus pulposus tissues. Then miR-146a mimics and inhibitors were used to overexpress or knock down miR-146a. The effect of miR-146a on TGF- $\beta$ 1/SMAD signaling pathway was examined using qPCR and Western blotting assays. The effect of miR-146a on the

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2024.01.011

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202004070241); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2020MH093); 深圳市医学三名工程项目 (SZSM202111015)

作者单位: 1. 潍坊市人民医院 (潍坊医学院第一附属医院) 脊柱外科, 山东潍坊 261200; 2. 潍坊市人民医院 (潍坊医学院第一附属医院) 放射科, 山东潍坊 261200; 3. 潍坊市第二人民医院骨科, 山东潍坊 261200; 4. 深圳市人民医院 (南方科技大学第一附属医院, 暨南大学第二临床医学院) 手足显微血管外科, 深圳市骨科研究所, 深圳市运动系统组织与功能重建重点实验室 (ZDSYS2020081143752005), 广东深圳 518020

通信作者: 陈高扬, E-mail: chen199001207@163.com; 王军, E-mail: rmyywangjun@wfm.edu.cn

proliferation and migration ability of nucleus pulposus cells were tested using CCK - 8 and scratch assays.

**Results** The proliferation and migration ability of nucleus pulposus cells in patients with lumbar tuberculosis was significantly reduced, and the expression level of miR - 146a in the nucleus pulposus tissue of patients with lumbar tuberculosis patients was also significantly reduced. We also found that the expression of SMAD homologue 2 (SMAD2), SMAD3, SMAD4, and TGF-β significantly increased, and the expression of SMAD7 was reduced, indicating that the expression of miR - 146a was negatively correlated to the activity of TGF - β/SMAD pathway. Furthermore, overexpression of miR - 146a significantly suppressed the expression of SMAD2, SMAD3, SMAD4, TGF - β1, but suppressed the expression of SMAD7. On the contrary, knocking down miR - 146a significantly promoted the expression of SMAD2, SMAD3, SMAD4, TGF - β1, but inhibited the expression of SMAD7. We also found that overexpression of miR - 146a could promote the proliferation and migration ability of tuberculosis nucleus pulposus cells, but knocking down miR - 146a could significantly suppress the proliferation and migration ability of tuberculosis nucleus pulposus cells. **Conclusion** miR - 146a is one of the key regulators of spinal tuberculosis progression, which regulates the proliferation and migration activity of nucleus pulposus cells by inhibiting the TGF-β1/SMAD pathway activity.

**[Key words]** Spinal tuberculosis; miR-146a; TGF-β1/SMAD pathway; Nucleus pulposus cells

脊柱结核是最常见的肺外结核,可破坏病人椎体与椎间盘,进而形成流注脓肿,常并发脊柱畸形与截瘫,甚至导致死亡,严重影响了人们的生活质量<sup>[1-3]</sup>。脊柱结核最重要的特征性改变是椎间盘破坏<sup>[4]</sup>,但其破坏机制不明确。转化生长因子β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)是调控椎间盘代谢的重要因子,可通过上调基质金属蛋白酶的表达促进胶原蛋白的降解,导致椎间盘破坏,同时对椎间盘细胞基质的合成与增殖起重要调节作用<sup>[5-6]</sup>。在脊柱结核的相关研究中,有学者报道TGF-β1能够促使细胞内结核杆菌大量繁殖,降低单核巨噬细胞的吞噬能力,其大量聚集时可导致细胞外基质及骨质破坏、空洞和纤维化<sup>[7]</sup>。可见TGF-β1在脊柱结核破坏的病理过程中起着重要的作用,但导致TGF-β1在脊柱结核中表达失衡的机制尚不明确。

微小RNA(miRNA)被认为是转录后水平关键调控因子,其可通过调控目标mRNA的水平参与转录后调控,进而影响生理和病理过程<sup>[8-9]</sup>。近年来,miR-146a被证实是重要的调控性非编码RNA,其在调节免疫炎症反应、肿瘤、骨与软骨代谢中发挥重要调控作用<sup>[10]</sup>。有研究提示miR-146a通过靶向母亲抗肢瘫同系物4(SMAD4)调节TGF-β1表达,调控疾病进展<sup>[11-12]</sup>。TGF-β1主要通过与其特异性受体结合激活SMAD同系物2(SMAD2)、SMAD同系物3(SMAD3)蛋白进入细胞核,且通过SMAD4、SMAD同系物7(SMAD7)蛋白的调控激活或抑制目的基因转录从而发挥生物学作用,研究显示SMAD4在TGF-β1/SMAD信号通路占据着核心地位,是信号传导过程中共同需要的介质<sup>[7]</sup>。因此,我们提出假设:miR-146a通过结合SMAD4调控TGF-β1/SMAD通路,进而调控脊柱结核进展。

在本文中,我们拟探究miR-146a是否通过介导TGF-β1/SMAD通路调控脊柱结核进展,以期深入了解脊柱结核发生发展提供新的见解,以及为脊柱结核的防治提供新的策略。

### 材料与方法

#### 一、标本收集

试验对象为在潍坊市人民医院脊柱外科行脊柱结核病灶清除手术及脊柱外伤手术可取得的髓核及血液标本的病人,遵循其知情同意。在取得病人的知情同意后方能入组,其中结核组病人10例,男5,女5,年龄为(34.2±10.3)岁;外伤对照组病人10例,男5,女5,年龄为(32.1±14.0)岁。

入组标准:结核组根据术前影像学(图1)及临床症状,术后的组织病理检查等明确诊断,排除其他疾病。对照组病人排除脊柱其他感染性疾病、肿瘤及免疫学疾病等。本实验所有临床标本均根据《赫尔辛基宣言》经病人及家属同意后采集,研究方案获得潍坊人民医院伦理委员会批准(伦理批号: KYLL20190412-1)。

#### 二、试剂与仪器

由武汉普诺赛生命科技有限公司购得人椎间盘髓核细胞完全培养基,由中国汉恒生物科技有限公

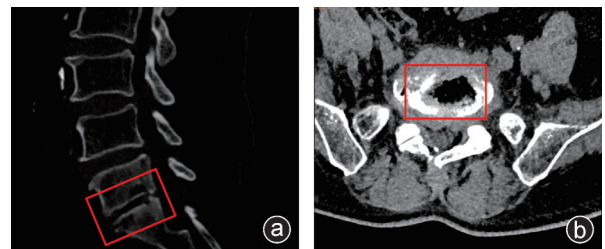


图1 CT检查矢状位(a)和水平位(b)所示结核感染椎间盘及椎体骨破坏

司购得 miR-146a 的抑制剂 (inhibitor, 序列为: 5'-AACCCAUGGAAUUCAGUUCUCA - 3')、模拟物 (mimics, 序列为: 5'-UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU-3', 5'-CCCAUGGAAUUCAGUUCUCAUU-3') 以及野生型和突变型 (miR-146a 结合位点突变) SMAD4 序列的萤火虫荧光素酶报告基因质粒, 由日本 TAKARA 公司购得 PrimeScript RT 试剂, 由中国碧云天购得 RIPA 裂解缓冲液、PBS 溶液、ELC 显色液, 由美国 Invitrogen 购得 liposome 2000、Trizol 试剂和蛋白第二抗体, 由上海生工生物技术有限公司设计合成荧光定量 PCR 引物 (表 1), 由美国 Signalway Antibody 公司购得蛋白提取试剂盒, 由英国 Abcam 公司购得 GAPDH (ab9485; 1: 5 000)、SMAD2 (ab280888; 1: 1 000)、SMAD3 (ab40854; 1: 1 000)、SMAD4 (ab40759; 1: 1 000)、SMAD7 (ab216428; 1: 1 000) 抗体。由美国菌种保藏中心购得 293T 细胞, 由美国 Applied Biosystems 购得 StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪, 由美国 ThermoFisher 公司购得酶标仪, 由德国 Leica 公司购得倒置荧光显微镜。

### 三、细胞分离与培养

结核组病人和对照组病人椎间盘髓核细胞的分离方法参照前期文献<sup>[13]</sup>, 细胞培养在人椎间盘髓核细胞完全培养基中, 放置于细胞培养箱中 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C), 每 3 天更换培养液, 待贴壁细胞扩增至 80%, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

### 四、构建 miR-146a 的抑制剂和模拟物及细胞转染方法

由汉恒生物构建 miR-146a 的抑制剂 (inhibitor) 和模拟物 (mimics), 用于细胞水平敲低和过表达 miR-146a。细胞转染步骤简述如下: 将脊柱结核病人

髓核细胞均匀铺种于 12 孔板或 96 孔板, 待细胞密度达 50%, 更换培养基为无血清培养基, 应用 liposome 2000 将 miR-146a mimics (mimics 组) 和 miR-146a inhibitor (inhibitor 组) 转染进入脊柱结核病人髓核细胞, 同时设置 control 组, 6 小时后更换为正常培养基, 每个实验重复 3 次。

### 五、增殖实验

将结核组和对照组髓核细胞、敲低/过表达 miR-146a 脊柱结核病人髓核细胞铺种于 96 孔板 (100 μL/孔), 然后将培养板放在培养箱中预培养。24 小时后向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液, 将培养板置于培养箱内孵育 1~4 h 后, 上清液转入新的 96 孔板中, 应用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度, 每个实验重复 3 次。

### 六、迁移实验

将结核组和对照组髓核细胞、敲低/过表达 miR-146a 脊柱结核病人髓核细胞铺种于 12 孔板, 待细胞贴壁后, 应用直尺和 20 μL 枪头均匀地划横线, 宽度约 500 μm, PBS 清洗划除的细胞后, 培养皿放置于 37 °C, 2% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。培养 24、48 h 后拍照并计算划痕处细胞相对位移, 每个实验重复 3 次。根据位移计算细胞迁移能力, 细胞迁移率 = (初始划痕宽度 - 24/48 小时后划痕宽度) / 初始划痕宽度 × 100%。

### 七、RNA 表达检测

应用 TRIZOL 法提取结核组病人和对照组病人髓核组织及外周血、敲低和过表达 miR-146a 脊柱结核病人髓核细胞的总 RNA, 然后应用逆转录试剂逆转录为 cDNA。使用 StepOnePlus 定量 PCR 系统通过荧光定量 PCR 扩增 cDNA。U6 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 分别用作 miRNA 和 mRNA 的内部参考基因。

### 八、Western blot 检测蛋白表达

使用蛋白提取试剂盒提取结核组病人和对照组病人髓核组织、敲低和过表达 miR-146a 脊柱结核病人髓核细胞的总蛋白, 将变性蛋白在 SDS-PAGE 凝胶上分离, 然后转移到 PVDF 膜上。接下来, 将 PVDF 膜与 GAPDH (ab9485; 1: 5 000)、SMAD2 (ab280888; 1: 1 000)、SMAD3 (ab40854; 1: 1 000)、SMAD4 (ab40759; 1: 1 000)、SMAD7 (ab216428; 1: 1 000) 抗体在 4 °C 下孵育过夜后, 将 PVDF 膜与相应的第二抗体 (A32731) 在 25 °C 下培养 1 小时。最后, 将 ECL 显色溶液添加到 PVDF 膜中以显示蛋白质带。

### 九、荧光素酶报告基因实验

将 293T 细胞接种到 96 孔板, 由汉恒生物构建

表 1 本研究中使用的引物序列

基因	引物
TGF-β1	正向 CAATTCCTGGCGATACCTCAG
	反向 GCACAACCTCCGGTGACATCAA
SMAD2	正向 CGTCCATCTTGCCATTTCAGG
	反向 CTCAAGCTCATCTAATCGTCTCTG
SMAD3	正向 TGGACGCAGGTTCTCCAAAC
	反向 CCGGCTCGCAGTAGGTAAC
SMAD4	正向 CTCATGTGATCTATGCCCGTC
	反向 AGGTGATACAACCTCGTTCGTAGT
SMAD7	正向 TTCCTCCGCTGAAACAGGG
	反向 CCTCCCAGTATGCCACCAC
GAPDH	正向 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	反向 GGCTGTTGCATACTTCTCATGG

野生型和突变型(miR-146a结合位点突变)SMAD4序列的萤火虫荧光素酶报告基因质粒,将上述质粒分别与 miR-146a mimics 或 mimics control 转染入 293T 细胞,设置单纯转染萤火虫荧光素酶报告基因质粒为对照组。同时,向每组中加入等量海参荧光素酶报告基因质粒为参照。转染 48 小时后,应用酶标仪检测两种荧光活性,并计算相对荧光活性。

### 十、统计学分析

数据描述为均值±标准差,通过 GraphPad Prism 7.5(GraphPad Software, 美国)进行分析和可视化。使用学生 *Student t* 检验比较两组之间的差异,  $P < 0.05$  提示差异有统计学意义。使用 Pearson 相关系数分析分子之间表达的相关性。

## 结 果

### 一、结核感染椎间盘细胞增殖和迁移能力变化

通过划痕实验发现,结核组病人的髓核细胞 24 h 和 48 h 的迁移率显著低于对照组病人的髓核细胞(图 2 a、b),同时 CCK-8 实验提示结核组病人髓核细胞的增殖活性显著低于对照组病人(图 2 c)。上述结果提示结核感染可导致髓核细胞的迁移及增殖活性显著减弱。

### 二、miR-146a 在结核病人组织中表达量鉴定

miR-146a 在脊柱结核病人的髓核组织中表达量显著低于对照组(差异倍数:  $0.55 \pm 0.24, P < 0.001$ , 图 3 a), miR-146a 在脊柱结核病人的外周血中的表达量显著低于对照组(差异倍数:  $0.56 \pm 0.36, P < 0.05$ , 图 3 b),提示 miR-146a 表达量与脊柱结核的进展呈负相关。

### 三、SMAD 通路在髓核组织中的表达水平与 miR-146a 表达量相关性检测

我们进一步检测了 Smad 通路关键基因及蛋白在结核组病人和对照组病人髓核组织中的表达量, PCR 结果发现髓核组织中 SMAD2(差异倍数:  $2.58 \pm 2.19, P < 0.05$ )、SMAD3(差异倍数:  $9.69 \pm 4.44, P < 0.001$ )、SMAD4(差异倍数:  $10.11 \pm 6.48, P < 0.001$ )、TGF- $\beta$ 1 mRNA(差异倍数:  $5.26 \pm 1.66, P < 0.001$ )在脊柱结核病人髓核组织中的表达量显著增高,而 SMAD7 mRNA(差异倍数:  $0.47 \pm 0.33, P < 0.01$ )表达显著减低(图 4 a), Western blot 结果提示蛋白表达趋势与 qPCR 一致(图 4 b、c)。上述结果提示 miR-146a 表达量与 SMAD2、SMAD3、SMAD4、TGF- $\beta$ 1 显著负相关,而与 SMAD7 呈显著正相关。以上结果提示在髓核组织中, SMAD 通路活性与 miR-146a 显著负相关,在髓核细胞中 miR-146a 对 SMAD 通路可能具有抑制作用。

### 四、miR-146 靶向 Smad4 调控 SMAD/TGF- $\beta$ 1 通路鉴定

已有研究提示 miR-146a 可靶向结合 SMAD4 3'-UTR 端进而抑制其表达,我们在实验中构建了包含 SMAD4 3'-UTR 端野生型或突变型序列的荧光素酶报告基因质粒(图 5 a),并与 miR-146a mimics 共同转染 293T 细胞,结果提示:与对照组相比, SMAD4 3'-UTR 端野生型荧光素酶报告基因质粒与 miR-146a mimics 共同转染时,荧光活性显著减低,而 SMAD4 3'-UTR 端野生型荧光素酶报告基因质粒与 mimics 对照组,以及 SMAD4 3'-UTR 端突变型荧光素酶报告基因质粒与 miR-146a mimics 或 mimics 对照组荧光活性无明显变化,提示 miR-146a mimics 可靶向识别 SMAD4 3'-UTR 端(图 5 b)。为了进一步明确 miR-146a 在髓核细胞中对 SMAD 通路的调控作用,我们通过体外实验在脊柱结核病人髓核细胞中过表达或

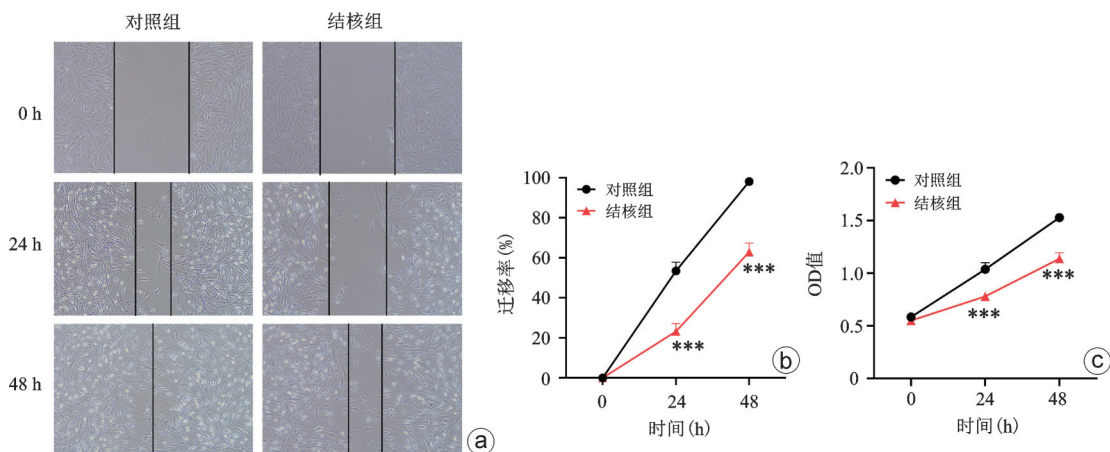


图2 结核组病人的髓核细胞增殖(a、b)和迁移能力(c)显著减低,和对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$

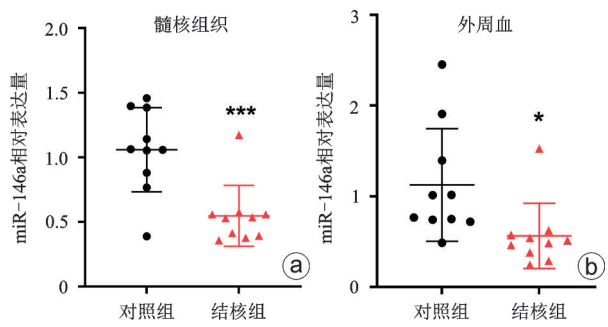


图3 miR-146a在脊柱结核病人髓核组织(a)和外周血(b)中表达量显著减低,和对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$

敲低 miR-146a(图 6 a),并检测 SMAD/TGF- $\beta$ 1 通路表达变化,结果提示过表达 miR-146a 可显著下调 SMAD2、SMAD3、SMAD4 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 及蛋白表达水平,但可上调 SMAD7 表达水平;相反,敲低 miR-146a 可显著上调 SMAD2、SMAD3、SMAD4 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 及蛋白表达水平,但可下调 SMAD7 表达水平(图 6 b~d)。上述实验结果进一步证实 miR-146a 在髓核细胞中可调控 SMAD/TGF- $\beta$ 1 通路。

#### 五、miR-146a 调控脊柱结核髓核细胞增殖及分

#### 化作用及机制鉴定

我们同时验证了过表达或敲低 miR-146a 对脊柱结核病人髓核细胞增殖、凋亡及迁移的影响,结果提示:相较于 control 组,过表达 miR-146a(mimics 组)可显著促进髓核细胞增殖及迁移活性并降低其凋亡活性,而敲低 miR-146a(inhibitor 组)可显著降低髓核细胞增殖及迁移活性并促进其凋亡活性(图 7 a~c),上述结果提示 miR-146a 是促进髓核细胞增殖及迁移活性的关键因子。

#### 讨 论

脊柱是全身骨关节结核最易发生的部位,其中以椎体结核占大多数<sup>[3]</sup>。研究表明,结核感染可致椎间盘髓核破坏,是造成椎间盘破坏的重要因素<sup>[14]</sup>。

miR-146a 的编码基因位于人类 5 号染色体 LOC285628 基因上的第二外显子,miR-146a 功能极其强大,是首个具有免疫系统调节作用的 miRNA,其主要作用是负性调节免疫炎症反应,包括类风湿性关节炎、红斑狼疮等多种免疫性疾病<sup>[15-16]</sup>。在我

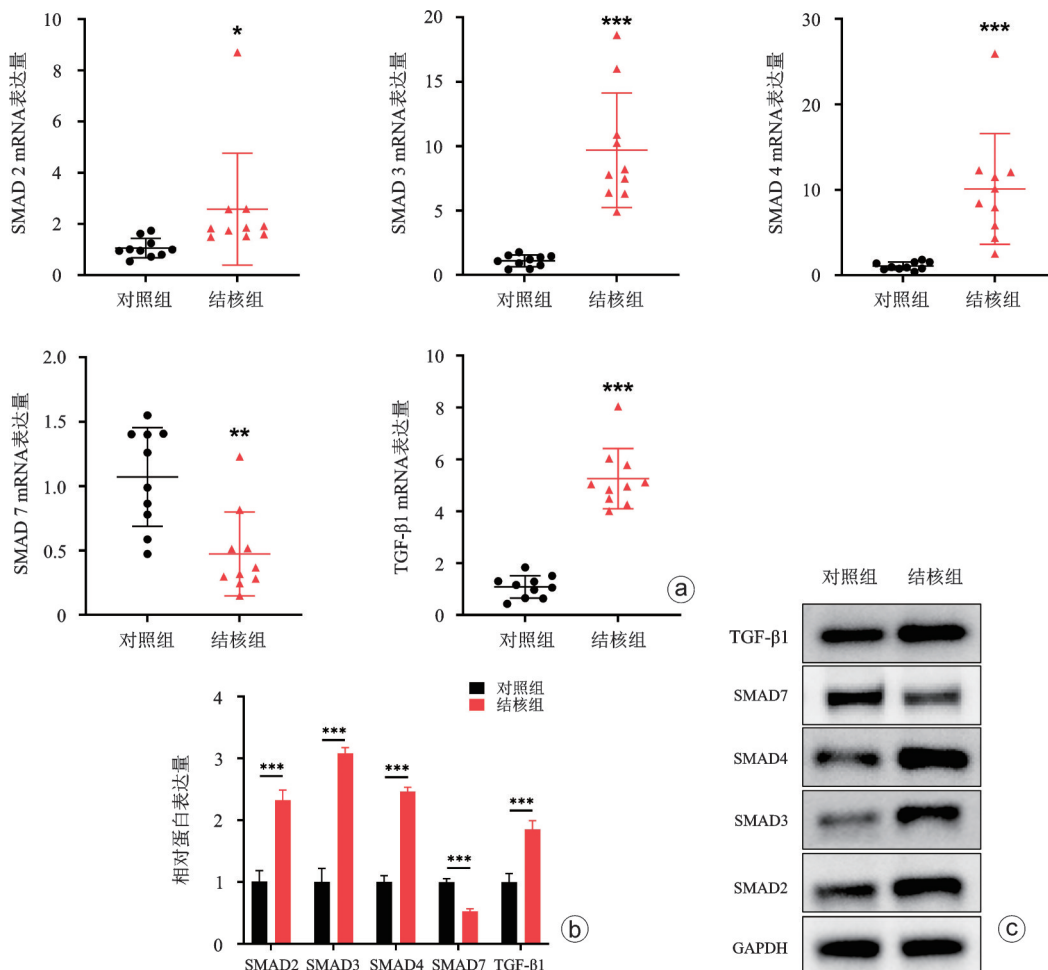


图4 SMAD通路关键基因 mRNA(a)和蛋白(b、c)在脊柱结核髓核组织中表达量鉴定,和对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$

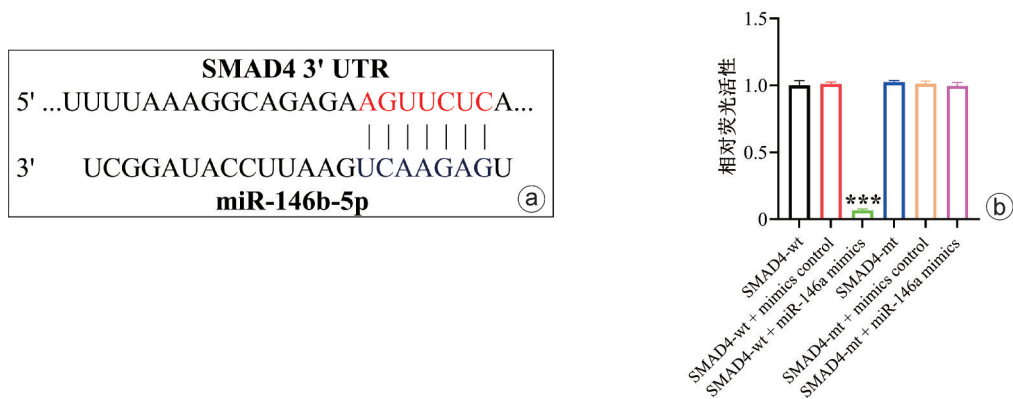


图5 SMAD4 3'-UTR端miR-146a结合位点预测(a)及荧光素酶报告基因实验验证(b),和对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$

们的研究中发现 miR-146a 表达量在脊柱结核中显著减低,提示其可能与脊柱结核进展相关,但其可能参与的机制仍鲜有研究报道。

有研究发现全反式维甲酸可诱导 miR-146a 通过靶向 SMAD4 调节急性粒细胞白血病细胞的增殖<sup>[17]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>的研究发现 miR-146a 通过靶向调控 SMAD4 进而调节 TGF- $\beta$ 1 诱导人上皮成纤维细胞分化。上述所有的文献均揭示了 SMAD4 是 miR-146a 的靶蛋白。TGF- $\beta$ 1/SMAD 通道是脊柱结核椎间盘破坏发生发展的关键信号通路,研究报道高剂量 TGF- $\beta$ 1 可通过结合特异性受体激活 SMAD2、SMAD3 蛋白进入细胞核,进而通过调控髓核细胞代谢促进髓核退变<sup>[5,19-20]</sup>。SMAD4 在 TGF- $\beta$ 1/SMAD 信号通路占据着

核心地位,SMAD4 是促进 SMAD2/3 蛋白入核过程中的关键介质,而 SMAD7 在此过程中发挥抑制作用<sup>[5,19-20]</sup>。同时,目前已有证据证明 SMAD4 与椎间盘退变密切相关,在椎间盘退变组织中的表达明显高于正常椎间盘组织<sup>[21]</sup>,而 miR-146a 是 SMAD4 的关键抑制剂,因此我们推测 miR-146a 在脊柱结核中是否可通过 TGF- $\beta$ 1/Smads 通路调控脊柱结核髓核退变(图 8)。

在我们的研究中,我们首先通过相关性分析证实 miR-146a 表达量与 SMAD2、SMAD3、SMAD4 和 TGF- $\beta$ 1 表达量呈显著负相关,而与 SMAD7 呈正相关,提示 miR-146a 对 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路具有抑制作用。进一步体外细胞实验证实,过表达 miR-146a

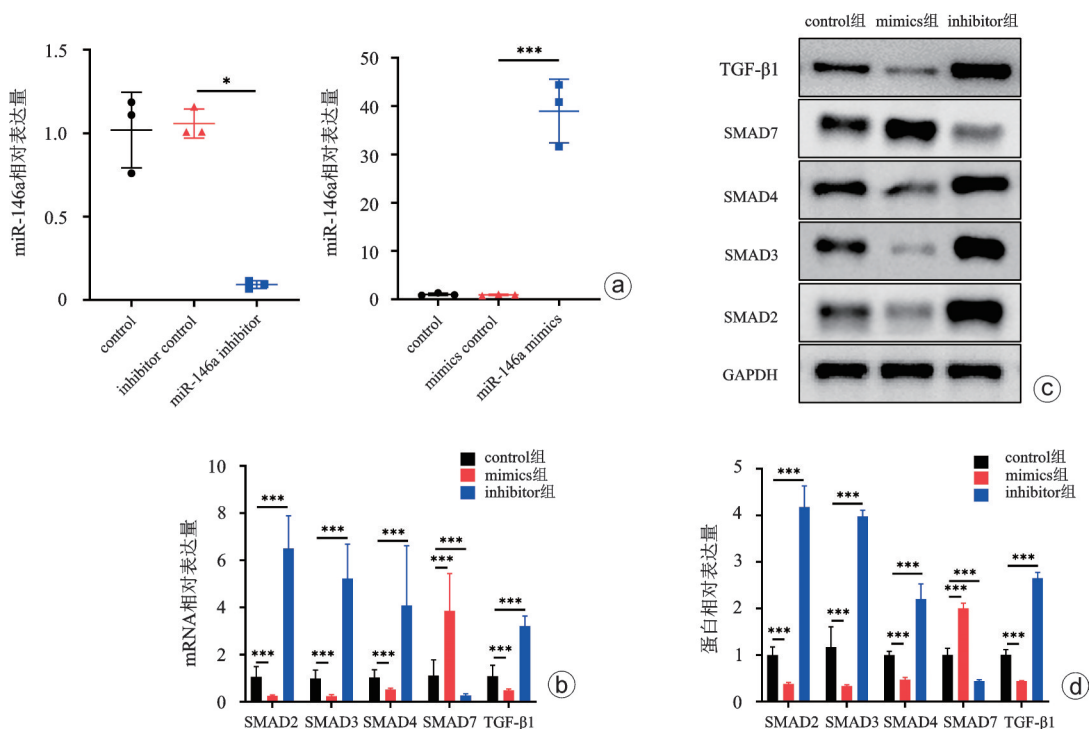


图6 敲低/过表达 miR-146a(a)对 SMAD 通路关键基因 mRNA(b)和蛋白(c,d)表达影响,和对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$

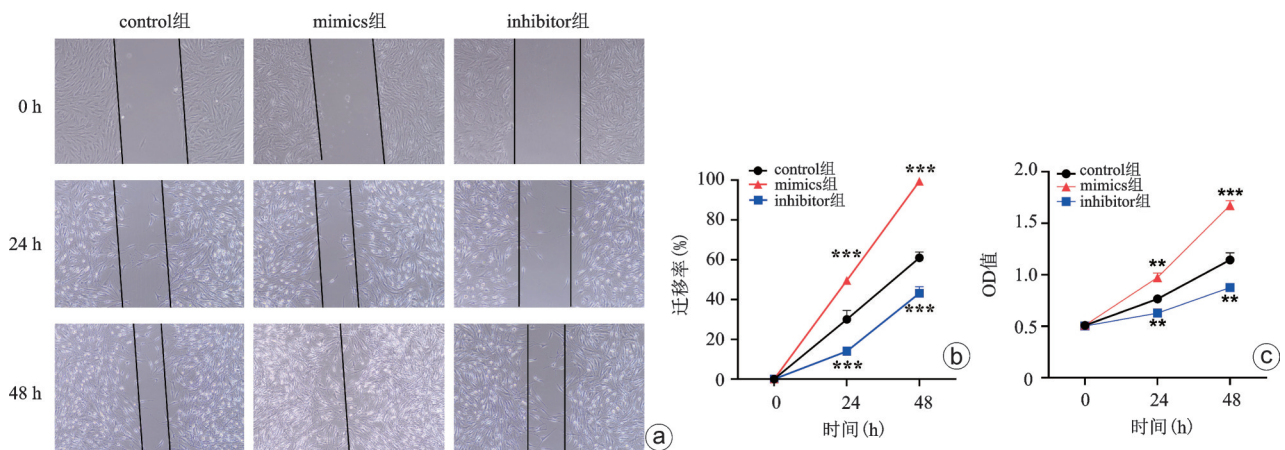


图7 敲低/过表达 miR-146a 对结核髓核细胞迁移(a、b)和增殖(c)影响,和对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$

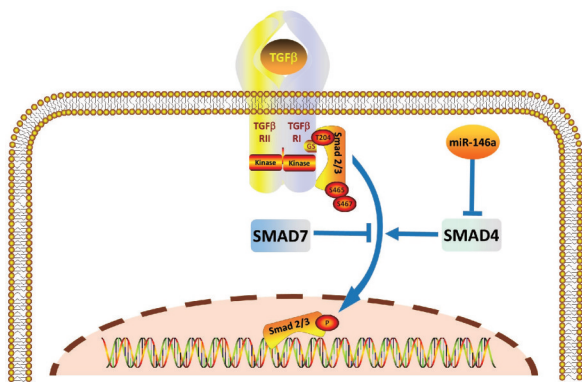


图8 miR-146a 调控 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路示意图(绘图作者:陈高扬)

可显著抑制 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路活性并促进髓核细胞增殖、迁移并抑制凋亡,而敲低 miR-146a 结果相反,进一步证实 miR-146a 可通过抑制 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路促进髓核细胞增殖及迁移活性。

当然,本研究仍存在一定的不足。一方面,本研究仅用 PCR 法检测了 miR-146a 在结核病人外周血及滑膜组织中的表达量,未能在组织水平对 miR-146a 进行免疫荧光原位杂交定位,以及 miR-146a 与组织标本中相关分子免疫组化的关联研究;另一方面,本研究基于样本检测解释了 miR-146a 在脊柱结核组织中的表达趋势,并通过体外细胞实验证实了 miR-146a 对 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路活性及髓核细胞增殖及迁移活性的调控作用,但由于脊柱结核动物模型造模难度较大,因此并未能从动物水平阐明 miR-146a 对脊柱结核的治疗功效。因此,未来仍需开展动物实验探讨 miR-146a 在治疗脊柱结核中的应用前景。

综上所述,通过本研究,我们发现 miR-146a 是脊柱结核进展的关键调控因子,其可通过抑制 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路活性进而调控髓核细胞增殖及迁移活性,本研究为深入了解脊柱结核发生发展的分子

机制提供了新的见解,同时为脊柱结核的治疗提供新思路。

### 参 考 文 献

- [1] Jain AK, Rajasekaran S, Jaggi KR, et al. Tuberculosis of the Spine[J]. J Bone Joint Surg Am, 2020, 102(7): 617-628.
- [2] Leowattana W, Leowattana P, Leowattana T. Tuberculosis of the spine[J]. World J Orthop, 2023, 14(5): 275-293.
- [3] 梁健, 康文婷, 冯晶, 等. 我国脊柱结核外科治疗现状及进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2023, 20(3): 84-88.
- [4] 陈兴银, 叶正云, 姜盼, 等. 老年脊柱结核误诊为骨质疏松骨折行椎体成形术致不全瘫一例[J]. 骨科, 2021, 12(6): 566-569.
- [5] Qu Z, Zhang F, Chen W, et al. High-dose TGF- $\beta$ 1 degrades human nucleus pulposus cells via ALK1-Smad1/5/8 activation[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(4): 3661-3668.
- [6] Sun Y, Lyu M, Lu Q, et al. Current perspectives on nucleus pulposus fibrosis in disc degeneration and repair[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6612.
- [7] Yang Z, Lou C, Wang X, et al. Preparation, characterization, and in-vitro cytotoxicity of nanoliposomes loaded with anti-tubercular drugs and TGF- $\beta$ 1 siRNA for improving spinal tuberculosis therapy[J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 824.
- [8] 林希圣, 郑超, 杨柳, 等. miR-542-3p 对骨肉瘤细胞侵袭能力的影响及其靶基因预测[J]. 骨科, 2018, 9(1): 50-55.
- [9] Wang J, Li X, Guo X, et al. MicroRNA-34a-5p promotes the progression of osteoarthritis secondary to developmental dysplasia of the hip by restraining SESN2-induced autophagy[J]. J Orthop Res, 2023, 42(1): 66-77.
- [10] Olivieri F, Praticchizzo F, Giuliani A, et al. miR-21 and miR-146a: the microRNAs of inflammaging and age-related diseases[J]. Ageing Res Rev, 2021, 70: 101374.
- [11] Zou Y, Li S, Li Z, et al. MiR-146a attenuates liver fibrosis by inhibiting transforming growth factor- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes[J]. Cell Signal, 2019, 58: 1-8.
- [12] Zhang Q, Cai R, Tang G, et al. MiR-146a-5p targeting SMAD4 and TRAF6 inhibits adipogenesis through TGF- $\beta$  and AKT/mTORC1 signal pathways in porcine intramuscular preadipocytes[J]. J Anim Sci Biotechnol, 2021, 12(1): 12.
- [13] 李大鹏, 吴燕, 黄永辉, 等. 人髓核细胞分离、传代培养方法的建立及意义[J]. 山东医药, 2017, 57(32): 1-4.
- [14] Wang B, Wang Y, Hao D. Current study of medicinal chemistry for

- treating spinal tuberculosis [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(25): 5201-5212.
- [15] Iacona JR, Lutz CS. miR-146a-5p: expression, regulation, and functions in cancer [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2019, 10(4): e1533.
- [16] Liu JN, Lu S, Fu CM. MiR-146a expression profiles in osteoarthritis in different tissue sources: a meta-analysis of observational studies[J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1): 148.
- [17] Zhong H, Wang HR, Yang S, et al. Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF- $\beta$  pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line[J]. *Int J Hematol*, 2010, 92(1): 129-135.
- [18] Liu Z, Lu CL, Cui LP, et al. MicroRNA-146a modulates TGF- $\beta$ 1-induced phenotypic differentiation in human dermal fibroblasts by targeting SMAD4[J]. *Arch Dermatol Res*, 2012, 304(3): 195-202.
- [19] Yang H, Wang L, Zhao J, et al. TGF- $\beta$ -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2015, 87(3): 249-257.
- [20] Zhang YM, Xu WB, Li BZ, et al. Identification and functional analysis of drosophila mothers against decapentaplegic protein gene 1 (Smad1) from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: the first evidence of Smad1 involved in immunity in invertebrates[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2022, 127: 13-22.
- [21] Xie S, Zhao C, Chen W, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 and 7 inhibit the degeneration of intervertebral discs by blocking the Puma-dependent apoptotic signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2367-2379.

(收稿日期: 2023-07-27)

(本文编辑: 龚哲妮)

#### 引用格式

李小鹏, 厉锋, 董阳, 等. miR-146a 通过 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路调控脊柱结核进展的分子机制[J]. *骨科*, 2024, 15(1): 55-62. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2024.01.011.