

· 基础研究 ·

机械振动对去卵巢骨折大鼠 miR-214-3p、IL-1 β 的影响王艺喆¹ 李婷婷² 孙大明¹ 黄婉莹¹ 洪勇良¹ 周丹丹³ 汪学红¹¹武汉体育学院, 武汉 430079; ²绍兴文理学院, 绍兴 312000; ³湖南中医药大学, 长沙 410208

通信作者: 汪学红, Email: Wangxuehong555@163.com

【摘要】 目的 观察机械振动对去卵巢骨折大鼠骨折断端 miR-214-3p 及血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 表达的影响。**方法** 选取 30 只 3 月龄雌性 Wistar 大鼠, 按照随机数字表法将其分为对照组、模型组、振动组, 每组 10 只。振动组大鼠骨折术后 5 d 进行全身振动治疗, 振动频率 35 Hz, 每日 20 min, 每周 5 d。对照组自然饲养, 模型组行卵巢摘除术后自然饲养, 均不予振动治疗。术后 2 周、6 周, 采用 Lane-Sandhu X 射线评分系统评价大鼠的骨折愈合质量, 采用 RT-PCR 技术检测大鼠骨中 miR-214-3p 的含量, 用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中 IL-1 β 的含量。**结果** 术后 2 周、6 周, 模型组断端骨痂生长评分低于对照组, 振动组断端骨痂生长评分高于模型组 ($P<0.05$)。与对照组同时时间点比较, 模型组、振动组术后 2 周、6 周骨折断端 miR-214-3p 含量均较高 ($P<0.05$)。与模型组同时时间点比较, 振动组术后 6 周骨折断端 miR-214-3p 含量 (0.71 ± 0.03) 较低 ($P<0.05$)。模型组大鼠术后 2 周、6 周的 IL-1 β 较对照组高, 振动组大鼠术后 2 周、6 周的 IL-1 β 较对照组及模型组低 ($P<0.05$)。**结论** 机械振动可抑制骨折断端 miR-214-3p 的表达, 降低 IL-1 β 水平, 加速骨质疏松后骨折愈合过程。

【关键词】 机械振动; 骨质疏松骨折; miR-214-3p; 白细胞介素-1 β **基金项目:** 湖北省自然科学基金资助项目 (2011CDB312); 武汉体育学院青年教师科研基金资助项目 (2014QZ09)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.10.002

Effects of mechanical vibration on microRNA-214-3p and serum interleukin-1 β in ovariectomized rats with a fractureWang Yizhe¹, Li Tingting², Sun Daming¹, Huang Wanying¹, Hong Yongliang¹, Zhou Dandan³, Wang Xuehong¹¹Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China; ²Shaoxing University, Shaoxing 312000, China; ³Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Corresponding author: Wang Xuehong, Email: Wangxuehong555@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of mechanical vibration on the expression of microRNA-214-3p and serum interleukin-1 β (IL-1 β) in the broken ends of fractured bones in ovariectomized rats. **Methods** Thirty 3-month-old female Wistar rats were randomly divided into a control group, a model group, and a vibration group, each of 10. An operation of ovariectomy was performed in those of the model and vibration groups to establish osteoporosis model. Five months later a model of mid femur fracture was made with animals in all the groups. Five days after their fracture, the vibration group received 20 minutes of whole-body vibration treatment at 35Hz for 5 days a week, while the control group and the model group received natural rearing without any additional intervention. At 2 and 6 weeks after the operation, the Lane-Sandhu X-ray scoring system was used to evaluate the quality of fracture healing, and reverse-transcription polymerase chain reactions and enzyme-linked immunosorbent assays were used to detect miR-214-3p in the fractured bones and the serum levels of IL-1 β . **Results** At 2 weeks and 6 weeks after the operation the average growth score of the broken ends in the model group was significantly lower than that of the control group, while that of the vibration group was significantly higher than the model group's average. Compared with the control group at the same time point, the average miR-214-3p content of the model and vibration groups was significantly higher 2 and 6 weeks after the surgery. Compared with the model group, the average level of miR-214-3p of the fractured ends of the vibration group was significantly lower at 6 weeks. Two and six weeks after the surgery, the average IL-1 β of the model group was significantly higher than the control group's average, and that of the vibration group was significantly lower. **Conclusion** Mechanical vibration can promote osteoporotic

fracture healing by inhibiting the expression of miR-214-3p and reducing the level of IL-1 β at the broken ends of fractured bones.

【Key words】 Mechanical vibration; Bone fractures; MicroRNA-214-3p; Interleukin-1 β
Funding: The Natural Science Foundation of Hubei Province (2011CDB312); The Young Teachers' Scientific Research Fund of Wuhan Institute of Physical Education (2014QZ09)
DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.10.002

骨质疏松可能会导致严重骨折,是老年患者致残、致死的主要原因之一^[1]。促进骨质疏松骨折愈合的药物,因价格昂贵及副作用,在临床上使用受限^[2]。机械振动作为一种简单、安全、方便、无创的物理疗法,是近年来临床应用的热点。曹文娟等^[3]研究报道,低频振动可以加快骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)向成骨分化,并通过成骨细胞产生的相关蛋白,使破骨细胞活性降低。绝经后妇女由于雌激素下降,导致骨质疏松症的患病率变高,原因主要是破骨细胞性细胞因子的释放,导致破骨细胞吸收骨骼的能力增强,从而加快了骨质疏松的发生发展,使骨骼脆性增加,易发生骨折。研究发现,短链非编码 RNA、microRNAs(miRNAs)在骨质疏松发病机制中有重要作用^[4-5]。Cao 等^[6]研究表明,miR-214-3p 可以降低炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的表达。本研究采用机械振动的方法对去卵巢骨折术后大鼠进行干预,探讨相关机制,为临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物及分组
选取雌性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Wistar 大鼠 30 只,3 月龄,体重(280 $\pm$ 20)g,由湖北省疾病预防控制中心提供[SCXK(鄂)2008-0005],分笼饲养,自由摄食饮水,通风良好,室温(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C。按照随机数字表法,将大鼠分为对照组、模型组、振动组,每组 10 只。
二、造模方法
模型组和振动组大鼠麻醉前禁食 6 h,腹腔麻醉后,取仰卧位、固定四肢,用灭菌医用剪刀在下腹部横向切口摘除双侧卵巢。对照组采用相同方法去除卵巢四周体积相似的脂肪组织,不去除卵巢^[7]。去卵巢术后 5 个月,大鼠腹腔麻醉,常规消毒后用医用剪刀纵向切开皮肤及皮下组织,暴露股骨髁间凹。在股骨髁间凹插入注射器针头,沿髓腔至股骨粗隆间,在股骨中段切至少 3 个横截面大于 1 mm 的切口,股骨近端用止血钳固定,股骨远端由操作者突然发力,股骨断裂即骨折造模成功。将骨折部位复位后用克氏针(武汉产)固定,逐层缝合切口,建立骨折模型^[8]。

三、机械振动治疗方案
骨折术后 5 d,采用 Power Plate Pro 5 AIR 全能训练型仪器(北京产)对振动组大鼠实施上下纵向的振动治疗,频率 35 Hz,振动幅度 2 mm,加速度 0.3 g,每日 20 min,每周 5 d^[9]。对照组和模型组大鼠在振动台上活动 20 min,不进行振动干预。
四、观察指标
在机械振动干预 2 周、6 周后,所有大鼠采血前禁食 12 h,腹腔注射 10%水合氯醛(3 ml/kg)麻醉,剪尾取血后分离血清。置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待测。同时,各组分别脱颈处死 5 只大鼠。取大鼠骨组织,迅速将其表面附着肌肉剥离,清除骨组织上残留血液,放入无菌管冻存,并放进-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。
1. miR-214-3p 检测:提取总 RNA,使用试剂盒将其反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 实验。引物序列见表 1。
2. IL-1 β 检测:采用酶联免疫吸附测定法检测血清 IL-1 β 的水平,所有实验操作均按照试剂盒说明书完成。

3. 骨折愈合情况:通过拍摄 X 光片观察大鼠的骨折愈合情况,用 Lane-Sandhu X 射线片^[10]评分系统比较术后 2 周、6 周大鼠断端骨痂生长评分。

表 1 引物序列		
基因	上游引物	下游引物
R-U6	CCTGCTTCGGCAGCA-	AACGCTTCACGAATTT-
	CAT	GCCT
mo-miR-214-3p	ACAGACAGGCAGCT-	CTCAACTGCTGTCGTG-
	CAACTGA	GAGTC

五、统计学分析
采用 SPSS 21.0 版统计学软件进行数据处理,结果采用($\bar{x}\pm s$)形式表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、3 组大鼠术后 2 周、6 周骨折愈合情况
通过对比对照组、模型组和振动组大鼠骨折断端骨痂的结构变化,发现振动组大鼠骨折修复在第 2、6 周内均优于模型组。与对照组同时时间点比较,模型组术后 2 周、6 周断端骨痂生长评分较低($P<0.05$)。与

模型组同时时间点比较,振动组术后 2 周、6 周断端骨痂生长评分较高($P<0.05$)。详见表 2、图 1。

表 2 3 组大鼠术后 2 周、6 周断端骨痂生长评分比较
(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	术后 2 周	术后 6 周
对照组	10	2.45±0.60	3.22±0.81
模型组	10	1.20±0.45 ^a	1.72±0.56 ^a
振动组	10	3.56±0.78 ^{ab}	3.98±1.02 ^{ab}

注:与对照组同时时间点比较,^a $P<0.05$;与模型组同时时间点比较,^b $P<0.05$

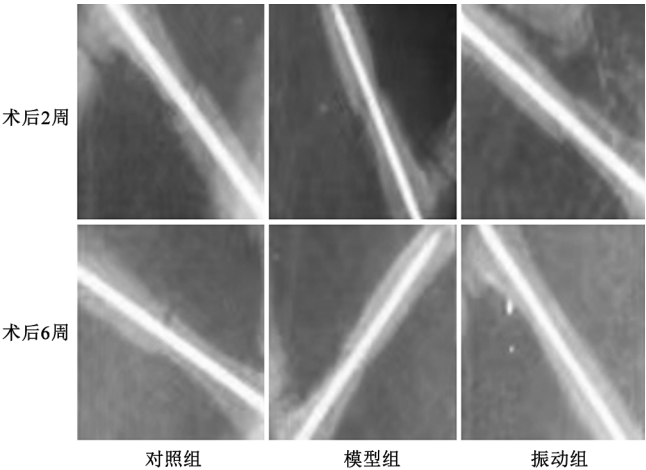


图 1 3 组大鼠 Lane-Sandhu X 射线片的结果

二、3 组大鼠术后 2 周、6 周骨折断端 miR-214-3p 表达情况

与对照组同时时间点比较,模型组、振动组术后 2 周、6 周骨折断端 miR-214-3p 含量均较高($P<0.05$)。与模型组同时时间点比较,振动组术后 6 周骨折断端 miR-214-3p 含量较低($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 3 组大鼠术后 2 周、6 周骨折断端 miR-214-3p 含量
($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	术后 2 周	术后 6 周
对照组	10	0.97±0.03	0.53±0.03
模型组	10	1.19±0.06 ^a	1.51±0.05 ^a
振动组	10	1.16±0.03 ^a	0.71±0.03 ^{ab}

注:与对照组同时时间点比较,^a $P<0.05$;与模型组同时时间点比较,^b $P<0.05$

三、3 组大鼠术后 2 周、6 周血清中 IL-1 β 含量变化

与对照组同时时间点比较,模型组大鼠术后 2 周、6 周的 IL-1 β 较高($P<0.05$),振动组大鼠术后 2 周、6 周的 IL-1 β 较低($P<0.05$)。与模型组同时时间点比较,振动组大鼠术后 2 周、6 周的 IL-1 β 较低。详见表 4。

表 4 3 组大鼠术后 2 周、6 周血清中 IL-1 β 含量比较
(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	术后 2 周	术后 6 周
对照组	10	192.35±14.91	187.03±12.50
模型组	10	201.76±18.99 ^a	243.81±16.72 ^a
振动组	10	156.08±10.16 ^{ab}	86.49±8.56 ^{ab}

注:与对照组同时时间点比较,^a $P<0.05$;与模型组同时时间点比较,^b $P<0.05$

讨 论

在建立骨折模型的实验研究中,一般使用开放性截骨造模和闭合骨折造模两种方式。本实验选择的是开放性股骨截骨术,具有可靠性高、成本低、可重复性好等优势,较好地避免了骨折不愈合或畸形愈合等不良事件^[11]。本研究中,与模型组大鼠比较,振动组大鼠治疗后的 Lane-Sandhu X 射线断端骨痂生长评分提高,说明机械振动可以改善骨折断端的血供、提高骨痂生长速度、达到促进骨折愈合的目的,提示机械振动对去卵巢股骨骨折大鼠的骨折愈合是安全有效的。

骨折发生后可直接导致机体发生防御性炎症反应,多种炎症因子分泌量增加,如促炎细胞因子(IL-1 β , IL-6, TNF- α)和抗炎细胞因子(IL-4, IL-10, TGF- β 1),易引起全身炎症反应^[12]。Gao 等^[13]研究发现,机械振动刺激(加速度 0.5 g、频率 45 Hz)可通过改变细胞骨架微观结构、促进细胞增殖、增强骨基质矿化等方式,正向调节成骨细胞的生物学功能。本研究发现,振动组大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 在术后 2 周、6 周均明显降低,说明全身机械振动干预可以降低骨质疏松性骨折大鼠 IL-1 β 的合成分泌,抑制炎症因子及破骨细胞的活性,促进骨折愈合。

miRNAs 是短链非编码 RNA,在骨质疏松发病机制中具有重要作用^[4-5]。miRNA 通过调节与破骨细胞分化相关基因的表达,来介导骨的生成与吸收平衡,被认为是骨稳态过程中的重要调节因子。miR-214 在多种生物学功能中起着关键作用。Nakamachi 等^[14]研究证实,miR-124 直接作用于人 NFATc1 mRNA 的 3'-UTR,可以抑制人破骨细胞的分化。有研究表明,miR-124 抑制 NFATc1 介导的通路在调控 RANKL 依赖性和非依赖性破骨细胞分化中起重要作用,这可能是绝经后骨质疏松症的有效治疗靶点^[15]。有研究表明,miR-214 表达的改变与骨的病理状态也存在一定的关系^[16]。Cao 等^[6]研究发现,miR-214-3p 与炎症因子 IL-1 β 相关,IL-1 β 可以通过促进 p-ikB α 和 p-p65 的表达,进而激活核转录因子 κ B (nuclearfactor-kappa b, NF- κ B) 通路,miR-214-3p 过表达可以显著降低 p-ikB α 和 p-p65 的含量,提示 miR-214-3p 过表达可以抑制

NF- κ B 通路的激活,降低 miR-214-3p 通过靶向 IKKB 基因调控骨关节炎的发展,说明 miR-214-3p/IKKb/NF- κ B 轴可能是治疗骨关节炎的潜在治疗靶点。

本研究发现,振动组大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 和 miR-214-3p 均降低,而 Li 等^[17] 研究显示,miR-214-3p 可抑制骨形成,由此可以推论,全身机械振动干预可以通过减少骨质疏松性骨折大鼠 IL-1 β 的合成分泌和抑制 miR-214-3p 合成,促进骨折愈合。综上,机械振动抑制破骨细胞中 miR-214-3p 的表达可能是治疗绝经后骨质疏松骨折的一个新的治疗靶点,可能与 miR-214-3p/IKKb/NF- κ B 通路有关,但其具体机制还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Buchbinder R, Johnston RV, Rischin KJ, et al. Percutaneous vertebroplasty for osteoporotic vertebral compression fracture[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 4(4): CD006349. DOI: 10.1002/14651858.CD006349.pub3.
- [2] 辛力, 林华. 促骨形成药物干预骨质疏松性骨折临床研究进展[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2017, 10(1): 72-78. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2591.2017.01.013.
- [3] 曹文娟, 罗政强, 徐飞, 等. 低频振动对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化及相关基因表达的影响[J]. *骨科*, 2019, 10(5): 457-461. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2019.05.017.
- [4] 陈逸青, 章秋, 代芳. 外泌体在骨重建以及骨质疏松中的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(1): 129-134. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2020.01.027.
- [5] 孙浩远, 刘宁. miRNA 的功能及其在退行性骨关节疾病和骨质疏松症中的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(4): 641-645. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2020.04.004.
- [6] Cao Y, Tang S, Nie X, et al. Decreased miR-214-3p activates NF- κ B pathway and aggravates osteoarthritis progression[J]. *EBioMedicine*, 2021, 65(1): 103283. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103283.
- [7] 汪学红, 周保军. 骨质疏松后骨折实验动物模型的建立[J]. *湖北*

中医学院学报, 2010, 12(6): 21-23. DOI: 10.3969/j.issn.1008-987X.2010.06.008.

- [8] 李婷婷, 洪勇良, 王艺喆, 等. 密骨方对去卵巢骨质疏松骨折大鼠臂板蛋白 3A 表达的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(10): 6-9.
- [9] 汪学红, 孙大明, 周丹丹, 等. 机械振动对去卵巢大鼠骨折愈合中成纤维细胞生长因子 23 抗体的调节作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(1): 118-120. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2020.01.034.
- [10] 曹鹏飞, 魏成建, 高润子, 等. 外敷散对家兔骨折愈合的影响[J]. *中医药导报*, 2018, 24(19): 14-17.
- [11] Collier CD, Hausman BS, Zulqadar SH, et al. Characterization of a reproducible model of fracture healing in mice using an open femoral osteotomy[J]. *Bone Rep*, 2020, 121(1): 100250. DOI: 10.1016/j.bonr.2020.100250.
- [12] Celer O, Akalm A, Oztunali C. Effect of teriparatide treatment on endothelial function, glucose metabolism and inflammation markers in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2016, 85(4): 556-560. DOI: 10.1111/cen.13139.
- [13] Gao H, Zhai M, Wang P, et al. Low-level mechanical vibration enhances osteoblastogenesis via a canonical Wnt signaling-associated mechanism[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 317-324. DOI: 10.3892/mmr.2017.6608.
- [14] Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, et al. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(3): 601-608. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206417.
- [15] Ohnuma K, Kasagi S, Uto K, et al. MicroRNA-124 inhibits TNF- α - and IL-6-induced osteoclastogenesis [J]. *Rheumatol Int*, 2019, 39(4): 689-695. DOI: 10.1007/s00296-018-4218-7.
- [16] Sun Y, Kuek V, Liu Y, et al. MiR-214 is an important regulator of the musculoskeletal metabolism and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 231-245. DOI: 10.1002/jcp.26856.
- [17] Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 10872. DOI: 10.1038/ncomms10872.

(修回日期:2021-09-02)

(本文编辑:凌 琛)