

胫骨高位截骨术后血小板 miRNA 的表达水平及临床意义

陈居海

(淄博博山区中医院骨一科, 山东 淄博 255000 E-mail: yuchen79614@126.com)

【摘要】 目的: 探讨外侧闭合胫骨高位截骨术对膝关节活动功能恢复的影响及意义。方法: 自 2018 年 2 月至 12 月, 选择初次接受胫骨高位截骨术治疗的 78 例膝关节炎患者作为观察组, 男 46 例, 女 32 例, 年龄 55~73 (61.78±6.39) 岁; 病程 6~24 (16.52±4.25) 个月; Kellgren-Lawrence (K-L) 分级, II 级 36 例, III 级 42 例。另选取 20 例健康人作为健康组, 男 13 例, 女 7 例, 年龄 56~73 (60.89±7.12) 岁。比较观察组和健康组的外周血 miR-146 相对表达量。同时对观察组患者进行 6 个月的随访, 将随访期间膝关节活动功能恢复正常或较术前明显改善的患者纳为有效组; 而膝关节功能未有明显改善或呈加重趋势的患者纳为无效组。分析有效组和无效组的临床资料及血清 miR-146 相对表达量和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的表达水平。结果: 观察组 miR-146 相对表达量高于健康组 ($t=3.749, P<0.05$)。随访 6 个月结果显示, 无效组 15 例 (19.23%), 有效组 63 例 (80.77%)。有效组的血清 miR-146 相对表达量和 IL-6 表达水平均低于无效组 ($P<0.05$)。ROC 曲线分析及最大约登指数计算出血清 miR-146、IL-6 指标最大曲线下面积 (area under curve, AUC) 分别为 0.859、0.702; 其截断值分别为 0.98 (灵敏度=86.30%, 特异度=93.20%) 和 175.65 (灵敏度=72.80%, 特异度=69.50%)。结论: 血清 miR-146 表达水平呈上升趋势, 调控软骨细胞分化。监测患者术后的 miR-146 指标, 对预测患者术后骨关节活动功能恢复状况具有参考价值。

【关键词】 截骨术; 膝关节; 骨性关节炎, 膝; 细胞因子类

中图分类号: R684.3

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.09.008

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Expression and clinical significance of platelet miRNA after high tibial osteotomy CHEN Ju-hai. The First Department of Orthopaedics, Boshan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zibo 255000, Shandong, China

ABSTRACT Objective: To explore effect and significance of lateral closed high tibial osteotomy on recovery of activity of knee joint. **Methods:** From February to December 2018, 78 patients with knee osteoarthritis who were treated by high tibial osteotomy for the first time were selected as the observation group, including 46 males and 32 females, aged from 55 to 73 years old with an average age of (61.78±6.39) years old, the course of disease ranged from 6 to 24 months with an average of (16.52±4.25) months; according to Kellgren-Lawrence (K-L) grading, 36 patients were grade II and 42 patients were grade III. Another 20 healthy people were selected as healthy group, including 13 males and 7 females, aged from 56 to 73 years old with an average of (60.89±7.12) years old. The expression of miR-146 in peripheral blood was compared between observation group and healthy group. At the same time, patients in observation group were followed up for 6 months. The patients whose knee joint function returned to normal or improved significantly during the follow-up period were admitted as the effective group, while the patients whose knee joint function did not improve significantly or tended to aggravate were admitted as the ineffective group. The clinical data and the relative expression of serum miR-146 between effective group and ineffective group were analyzed. **Results:** The relative expression of serum miR-146 in observation group after operation was significantly higher than that in healthy group ($P<0.05$). The results of six months follow-up showed that 15 patients (19.23%) in ineffective group and 63 patients (80.77%) in effective group. Relative expression of miR-146 and interleukin-6 (IL-6) in ineffective group were higher than that of effective group ($P<0.05$). ROC curve analysis and maximum Yoden index were used to calculate the truncation values of the maximum area under curve (AUC) of serum miR-146 and IL-6, which was 0.859 and 0.702 respectively. The truncation values of miRNA-146 and IL-6 were 0.98 (sensitivity was 86.30%, specificity was 93.20%) and 175.65 (sensitivity was 72.80%, specificity was 69.50%). **Conclusion:** The expression level of serum miR-146 showed upward trend, which could regulate the differentiation of chondrocyte. The monitoring of miR-146 after operation has reference value for predicting the recovery of bone and joint function after operation.

KEYWORDS Osteotomy; Knee joint; Osteoarthritis, knee; Cytokines

胫骨高位截骨术 (high tibial osteotomy, HTO) 主要是将下肢力线轴转移至外侧间室, 减轻内侧间室负荷, 延缓膝关节寿命, HTO 是治疗膝关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 的常用方法之一。临床观察发现, 部分中老年 KOA 患者在接受 HTO 治疗后, 其膝关节活动功能仍得不到改善, 可能是膝关节腔内的软骨未能得到有效修复。软骨细胞作为关节软骨中惟一的细胞, 细胞外基质降解、软骨细胞凋亡及细胞因子产生在骨关节炎的病理演变中极为重要。微小 RNA 分子在生物体内诸多分子代谢过程中发挥积极的调控作用。有文献^[1]表明, miRNA 在骨关节炎的病理发展过程中起着重要的调控作用。血小板含有丰富的 miRNA, 微小分子 miR-146 是研究较多的类型, 而微小分子 miR-146 在 KOA 患者行 HTO 后的调控软骨修复过程, 目前尚无相关报道。本研究自 2018 年 2 月至 12 月回顾性分析 78 例 KOA 患者行 HTO 术后外周血 miR-146 表达水平及临床意义, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择

纳入标准: (1) 临床资料完整, 年龄 ≥ 55 岁。(2) 具有外周血 miR-146 和炎症因子白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的检测结果。(3) X 线 Kellgren-Lawrence (K-L) 分级^[2] II-III 级。(4) 膝关节主要韧带功能完好。排除标准: (1) 合并严重病毒感染。(2) 合并严重贫血。(3) 合并血色素沉着病。(4) 有关节感染或膝关节外伤史。(5) 合并恶性肿瘤。(6) 术后出现凝血障碍或使用抗凝药物者。

1.2 临床资料

纳入 78 例膝骨关节炎患者作为观察组, 男 46 例, 女 32 例, 年龄 55~73 (61.78 \pm 6.39) 岁; 体重指数 (body mass index, BMI) (25.42 \pm 2.27) kg/m²; 病程 6~24 (16.52 \pm 4.25) 个月; K-L 分级, II 级 36 例, III 级 42 例。另选取签署知情同意书的 20 例健康者作为健康组, 男 13 例, 女 7 例; 年龄 56~73 (60.89 \pm 7.12) 岁; BMI (25.54 \pm 2.35) kg/m²。两组年龄、性别、体重指数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。见表 1。

1.3 治疗方法

所有患者采用腰麻, 仰卧位, 驱血并使用气囊止血带, 屈膝 90°, 选取膝关节平面下约 5 cm 胫骨前内侧做一长度约 5 cm 的切口, 前方显露至胫骨结节上缘, 后方切开鹅足腱膜上缘, 并向后切断内侧副韧带浅层前缘, 将韧带和肌腱牵开, 插入板钩插, 保护胫骨神经血管。在透视下由前向后打入直径 1.5 mm 的克氏针, 在内侧平台下约 1 cm 平行于胫骨关节面置入 2 mm 克氏针, 在截骨线处斜向腓骨头上置入 2 mm

表 1 观察组与健康组的基线资料比较

Tab.1 Comparison of baseline data between observation group and healthy group

组别	例数	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	性别(例)		BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)
			男	女	
健康组	20	60.89 \pm 7.12	13	7	25.42 \pm 2.27
观察组	78	61.78 \pm 6.39	46	32	25.54 \pm 2.35
检验值		$t=0.457$	$\chi^2=0.241$		$t=0.132$
P 值		1.026	0.623		1.214

克氏针, 周围骨皮质采用无菌窄骨刀慢慢凿开。外翻膝关节使截骨线张开, 撑开器固定胫骨后内侧皮质, 撑开 1 mm 可矫正内翻, 通过皮下隧道, 在骨膜外安放 TomoFix 内固定系统, 然后螺钉固定截骨两端, 确认钢丝螺钉固定无误后, 生理盐水冲洗术野, 放置引流管, 逐层缝合切口, 术后观察至无引流液时拔管。

术后第 1 天进行膝关节被动活动, 如跖屈锻炼、踝关节背伸、股四头肌长收缩锻炼等。术后第 3 天进行膝关节屈曲功能锻炼, 辅以持续被动活动仪。术后 3 个月复查 X 线片, 如截骨端愈合良好, 则可完全负重。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 样本采集 采集所有受试者的空腹肘静脉血 4 ml, 置于 EDTA 管, 室温静置 10 min, 离心处理 (转速为 1 500 r/min, 离心时间为 10 min, 离心半径 $r=15$ cm), 收集上层血清置于另一支无菌抗凝管中, -80 °C 冷冻保存备用。

1.4.2 血清 miR-146 指标测定 (1) miRNA 提取及逆转录反应: 采用赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司的 miRNA Vana PARIS 试剂盒, 按照说明书对血清的总 RNA 进行提取。采用美国 Ambion 公司的 TaqMan miRNA 试剂盒进行逆转录反应。miR-146 正向引物: 5'-UGAGAACUGAAUCCAUAGGCUGU-3'; 反向引物: 5'-ACUCUUGACUUAAGGUAUCC-GACA-3'; 完成逆转录反应。(2) 采用荧光定量 PCR 法检测: 内参为 U6, 40 个循环 (95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min) 延伸 72 °C (7 min)。根据公式 $2^{-\Delta CT}$ 计算 miR-146 表达水平。

1.4.3 血清 IL-6 指标测定 采用 OLYMPUS AU5400 全自动生化分析仪 (日本 Olympus 公司生产) 检测血清 IL-6 水平, 试剂均购自上海恒远公司。

1.5 随访情况

采用门诊随访、电话随访、微信随访及家访等方法对观察组患者进行 6 个月随访, 记录随访结果, 将膝关节活动功能恢复正常或较术前明显改善的患者纳为有效组; 而膝关节功能未有明显改善或呈加重趋势的患者纳为无效组。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,定量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组各观察项目比较采用独立样本 t 检验;定性资料比较采用 χ^2 检验;通过 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 评价 miR-146、IL-6 指标在预测 HTO 后膝关节功能的效能。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 miR-146 表达水平比较。

观察组 miR-146 相对表达量(0.98 ± 0.06)与健康组(0.23 ± 0.17)比较差异有统计学意义($t=3.749$, $P<0.05$)。

2.2 观察组不同疗效间的临床资料比较

术后随访 6 个月,有效组 63 例(80.77%),无效组 15 例(19.23%)。有效组和无效组在年龄、性别、BMI、病程、K-L 分级方面比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。有效组的血清 miR-146 相对表达量和 IL-6 表达水平均低于无效组($P<0.05$)。见表 2。

2.3 ROC 曲线分析

血清 miR-146、IL-6 指标在预测 KOA 患者行 HTO 后膝关节功能恢复状况的 AUC 面积分别为: 0.859、0.702, AUC 的截断值分别为 0.98 (灵敏度=86.30%, 特异度=93.20%)和 175.65 (灵敏度=72.80%, 特异度=69.50%)。见图 1 及表 3。

3 讨论

3.1 影响 HTO 术后膝关节活动功能恢复的因素

HTO 是治疗 KOA 的有效方法之一,能够改善软骨下的血供,促进软骨再生,缓解膝关节疼痛,术后康复快,治疗有效率可达 80% 以上^[3]。与本研究发现 KOA 患者行 HTO 术后的膝关节活动功能有效恢

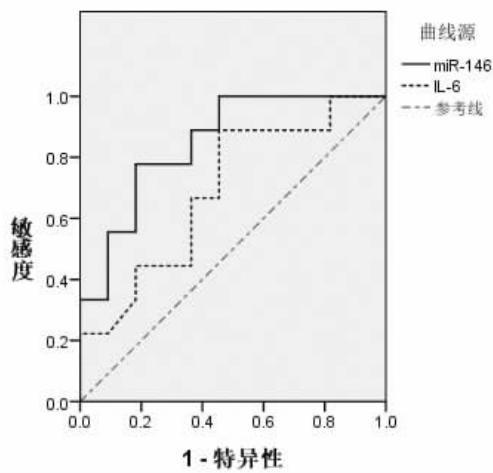


图 1 血清 miR-146 和 IL-6 的 ROC 曲线

Fig.1 ROC curve of serum miR-146 and IL-6

复率 80.77% 基本相符,但仍有 19.23% 的患者在行 HTO 治疗后未能得到改善。其原因可能是这类患者机体免疫能力较低,导致关节腔内在受机械和化学刺激下,软骨修复困难,致使膝关节活动功能无法正常恢复。

3.2 HTO 术后膝关节活动功能恢复与微小 RNA 的理化特性

miRNA 是一类长度有 19~22 个核苷酸的内源性非编码单链微小分子 RNA。血小板外 miRNA 与风湿、关节炎、感染、创伤、癌症、脑血管等诸多疾病的发生发展密切相关^[4]。而 KOA 病理发展过程与机械应激、促炎因子密切相关。软骨细胞作为膝关节软骨中惟一的细胞,在维持膝骨关节结构和功能方面发挥着重要作用。因此,软骨细胞过度凋亡和外基质降解会导致关节软骨退变,加之过多的机械应激、促

表 2 观察组不同疗效间的临床资料比较

Tab.2 Comparison of clinical data between different therapeutic effects in observation group

组别	例数	性别(例)		年龄 ($\bar{x}\pm s$, 岁)	病程 ($\bar{x}\pm s$, 月)	BMI ($\bar{x}\pm s$, kg/m ²)	K-L 分级(例)		IL-6 ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)	miR-146 相对 表达量
		男	女				II 级	III 级		
有效组	63	33	30	61.65±7.85	16.57±4.78	25.37±1.72	27	36	162.46±15.67	0.92±0.14
无效组	15	11	4	62.32±7.96	16.31±4.63	25.65±1.45	9	6	213.35±17.44	1.22±0.22
检验值		$\chi^2=2.163$		$t=0.121$	$t=0.235$	$t=0.582$	$\chi^2=1.433$		$t=2.965$	$t=3.356$
P 值		0.141		1.221	1.163	0.562	0.231		0.039	0.023

表 3 血清 miR-146 和 IL-6 指标的 ROC 曲线分析结果

Tab.3 ROC curve analysis of serum miR-146 and IL-6 indicators

参数	AUC 面积	截断值	灵敏度(%)	特异度(%)	P 值	95%CI	
						下限	上限
miR-146	0.859	0.98	86.30	93.20	0.002	0.712	0.946
IL-6	0.702	175.65	72.80	69.50	0.034	0.617	0.797

炎因子参与膝骨关节炎的病理过程中,也会引起促使炎症因子诱导的软骨损伤,包括软骨细胞外基质代谢紊乱、软骨稳态破坏、基质降解酶增强等。miRNA 可通过调节炎症递质及多种生长因子表达来参与膝骨关节炎的病理变化^[5]。miR-146 作为第一个被发现在免疫应答中具有调节作用的 microRNA,其定位于人类 5 号染色体上。免疫应答与炎症疾病发生发展密切相关。由此可推测,miR-146 在 KOA 患者 HTO 术后的膝关节活动功能中可能具有一定的调控作用。本研究发现,KOA 患者行 HTO 术后的 miR-146 相对表达量明显高于健康人群,提示微小分子 miR-146 参与 KOA 的病理过程。研究还发现 HTO 术后膝关节活动功能恢复无效或呈加重趋势患者的血清 miR-146 相对表达量和 IL-6 表达水平均高于膝关节活动功能有效恢复的患者 ($P < 0.05$),表明微小分子 miR-146 不仅参与了 KOA 患者行 HTO 术后的膝关节活动功能调节,还可调控 IL-6 受体相关激酶,改变 IL-6 的表达,进而影响骨神经细胞的分化,导致软骨组织再生困难。其原因可能是软骨细胞来源于骨髓造血干细胞分化而来的骨髓单核细胞,也是体内唯一参与骨吸收的细胞,调控软骨细胞分化的细胞因子主要有 IL-6,肿瘤坏死因子受体相关分子-6,核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)受体活化素配体等^[6-7],而 miR-146 的起始因子包括一些 NF- κ B 转录因子结合位点,故而在受到上述细胞因子对骨髓单核细胞刺激后,miR-146 表达升高。当软骨细胞中 NF- κ B 通路被激活后可导致细胞活性明显降低,促炎症因子及促降解酶表达增高,凋亡相关通路被激活,导致大量细胞凋亡。而 miR-146 表达升高恰好是因为 KOA 患者在 HTO 术后中的 NF- κ B 信号通路活化,在导致软骨细胞存在过度凋亡时,会使骨组织无法正常修复,从而导致膝骨关节活动功能受限,得不到明显改善或加重骨关节病情。那么 miR-146 表达水平是否能有效预测 KOA 患者 HTO 术后的骨关节活动功能情况呢?ROC 曲线分析和最大约登指数计算结果发现,血清 miR-146 相对表达量的最佳截断值为 0.98 (灵敏度=86.30%,特异度=93.20%)。结果表明 miR-146 在预测 KOA 患者 HTO 术后的骨关节活动功能恢复状况具有较高的灵敏度和特异性。其原因是 miR-146 在软骨细胞中高水平表达的 miRNA,它对于软骨细胞分化、增殖及软骨细胞修复功能都有重要的影响。这也提示,当 KOA 患者行 HTO 术后的外周血 miR-

146 表达水平 ≥ 0.98 时,临床上应增加随访次数,加强膝骨关节的康复训练,提高机体免疫力,促进软骨组织修复,才能有效提升患者的膝关节活动功能。由于本研究样本量有限,且属回顾性研究,仍需更大样本量或前瞻性研究来进一步证实。

综上所述,KOA 患者行 HTO 术后的血清 miR-146 相对表达量呈高表达。在临床中,检测 KOA 患者行 HTO 术后的外周血 miR-146 表达水平,将有助于了解 KOA 患者术后骨关节活动功能恢复状况,对预后诊断具有一定指导价值。

参考文献

- [1] 王继成,易智. miRNA 与骨关节炎病理发展过程的相关性[J]. 中国组织工程研究,2019,23(24):3875-3881.
WANG JC, YI Z. The correlation between microRNAs and the pathological development of osteoarthritis[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2019, 23(24):3875-3881. Chinese.
- [2] 张栋,王庆甫,杨黎黎,等. 膝骨性关节炎的超声表现特点及其相关性研究[J]. 中国骨伤,2018,31(12):1108-1113.
ZHANG D, WANG QF, YANG LL, et al. Ultrasound features of knee osteoarthritis and their correlation[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(12):1108-1113. Chinese with abstract in English.
- [3] 王庆甫,马玉峰,殷岳杉. 重新认识膝骨性关节炎的诊断和防治[J]. 中国骨伤,2016,29(9):779-781.
WANG QF, MA YF, YIN YS. A new understanding of the diagnosis and treatment of knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2016, 29(9):779-781. Chinese with abstract in English.
- [4] Le LT, Swingle TE, Crowe N, et al. The microRNA -29 family in cartilage homeostasis and osteoarthritis[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(5):583-596.
- [5] Zhen Y, Zhao XH, Chao W, et al. Several microRNAs could predict survival in patients with hepatitis B-related liver cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7:45195.
- [6] 谈冰,刘健,章平衡,等. 基于 NF- κ B 及细胞因子的变化探讨骨关节炎患者高凝状态的机制[J]. 免疫学杂志,2015,32(10):882-887.
TAN B, LIU J, ZHANG PH, et al. Explore the mechanism of hypercoagulability in patients with osteoarthritis based on the changes of NF-kappa B and cytokines[J]. Mian Yi Xue Za Zhi, 2015, 32(10):882-887. Chinese.
- [7] 张栋,王庆甫,张晓哲,等. β -catenin 与 NF- κ B 信号通路在膝骨关节炎滑膜炎中的表达特点及意义[J]. 中国骨伤,2019,32(8):721-726.
ZHANG D, WANG QF, ZHANG XZ, et al. Expression and significance of beta-catenin and NF-kappa B signaling pathway in synovitis of knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2019, 32(8):721-726. Chinese with abstract in English.

(收稿日期:2019-09-17 本文编辑:李宜)