

miR-345-3p在长骨感染性骨不连中的表达及诊断效能研究

戴 艳¹, 胡 军², 张 宇², 胡擎晖¹, 刘 源^{1*}

1. 南京医科大学第一附属医院 感染病科, 江苏 南京 210029

2. 南京医科大学第一附属医院 骨科, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 探讨循环血 miR-345-3p 在长骨感染性骨不连中的表达变化, 评估其作为潜在的新型生物标志物在长骨感染性骨不连的诊断价值。方法 建立股骨感染性骨不连及开放性截骨大鼠模型, 术后 42 d 后, 拍摄 X 线评估内固定位置及骨折愈合情况; 离断股骨后行 micro-CT, 检测骨痂矿物质密度 (BMD)、骨痂体积/总体积 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁间隙 (Tb.Sp)。使用 Sysmex XN-350 全血细胞分析仪进行白细胞计数 (WBC); 采用免疫散射比浊法测定血中 C 反应蛋白 (CRP) 表达水平; 采用毛细管动态光度计成像测定法检测红细胞沉降速率 (ESR) 水平。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测和比较感染性骨不连组及骨折组全血中 miR-345-3p 的表达水平, 并通过受试者工作特征 (ROC) 曲线评估 WBC、CRP、ESR 及 miR-345-3p 在感染性骨不连中的诊断效能。结果 行 X 线及 micro-CT 评估骨折愈合情况, 骨折组骨折线模糊, 断端连续, 有连续骨痂通过骨折线; 长骨感染性骨不连组骨折端硬化, 断端有间隙, 骨痂间无小梁通过, 骨膜增厚。感染性骨不连组术后 42 d, BMD、Tb.Th、Tb.N 显著高于骨折组, Tb.Sp 显著低于骨折组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。感染性骨不连组 WBC、CRP、ESR 较骨折组显著升高 ($P < 0.05$), miR-345-3p 表达较骨折组显著降低 ($P < 0.01$)。miR-345-3p 诊断的 AUC 为 0.906, 优于 WBC、CRP、ESR。结论 全血 miR-345-3p 在长骨感染性骨不连中表达水平显著降低, 有望成为感染性骨不连诊断的潜在新型生物标志物。

关键词: 感染性骨不连; miR-345-3p; 诊断; 生物标志物; ROC 曲线

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 05-0842-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.05.008

Expression and clinical significance of miR-345-3p in infected nonunion of long bones

DAI Yan¹, HU Jun², ZHANG Yu², HU Qinghui¹, LIU Yuan¹

1. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To investigate the expression changes of miR-345-3p in circulating blood and evaluate its diagnostic value as a potential new biomarker in infected nonunion of the long bones. **Methods** The rat models of femoral infected nonunion and open fracture were established. After 42 days of operation, X-ray was taken to evaluate the position of internal fixation and fracture healing; micro CT was performed to detect the bone mineral density (BMD), bone volume/total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N) and trabecular separation (Tb.Sp) of callus. White blood cell count (WBC) was measured by Sysmex XN-350 whole blood cell analyzer, C-reactive protein (CRP) expression was measured by immunonephelometry, erythrocyte sedimentation rate (ESR) was measured by capillary dynamic photometer. Quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect and compare the expression level of miR-345-3p in the whole blood of the infected nonunion group and the fracture group. The diagnostic efficacy of WBC, CRP, ESR, and miR-345-3p in infected nonunion were evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** X-ray and micro CT were used to evaluate the fracture healing. In the fracture group, the fracture line was fuzzy, the fracture end was continuous, and there was a continuous callus passing through the fracture line. In the long bone infectious nonunion group, the fracture end was sclerotic, the

收稿日期: 2020-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603092); 江苏省卫计委“科教强卫工程”青年医学人才项目(QNRC2016606)

第一作者: 戴 艳(1995—), 女, 江苏泰州人, 硕士研究生在读, 研究方向为感染性疾病。E-mail: daiyan1668@163.com

*通信作者: 刘 源(1978—), 女, 江苏南京人, 博士, 主任医师, 研究方向为感染性疾病。E-mail: liuyuan@jsph.org.cn

fracture end had a gap, there was no trabecula passing through between the callus, and the periosteum was thickened. 42 days after operation, BMD, Tb.Th and Tb.N were significantly higher and Tb.Sp was significantly lower in infected nonunion group than in fracture group ($P < 0.05, 0.01$). WBC, CRP and ESR were significantly higher and miR-345-3p expression was significantly lower in infected nonunion group than in fracture group ($P < 0.05, 0.01$). The AUC of miR-345-3p was 0.906, which was better than WBC, CRP and ESR. **Conclusion** The expression level of miR-345-3p in infected nonunion of the long bones was reduced, which may be a potential new biomarker for the diagnosis of infected nonunion.

Key words: infected nonunion; miR-345-3p; diagnosis; biomarker; ROC curve

长骨感染性骨不连是骨折治疗临床后期面临的难题之一^[1-2]。术前诊断骨不连是否存在感染通常依赖于微生物培养等病原学检查以及白细胞(White Blood Cell, WBC)计数、C反应蛋白(C-Reactive Protein, CRP)、红细胞沉降速率(Erythrocyte Sedimentation Rate, ESR)等非特异性炎症指标,尽管联合诊断准确性较高^[3],但对于培养阴性,炎症指标均阴性或者仅一项阳性的患者,往往诊断困难。因此,临床迫切需要一种诊断标志物早期诊断感染性骨不连。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类小的非编码RNA,通过调节靶基因来调节细胞增殖、分化、凋亡和组织发育,其诊断败血症、结核、肝炎等疾病已得到广泛应用^[4]。研究发现,miR-345-3p可调节成骨分化,与骨骼生长发育关系密切,但miR-345-3p与感染性骨不连的关系仍不清楚^[5]。故本研究建立股骨感染性骨不连大鼠模型,通过检测全血miR-345-3p在感染性骨不连中的表达情况,探讨其在诊断中的潜在作用,为感染性骨不连的诊断提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

8周龄Sprague-Dawley雌性大鼠来源于南京医科大学动物中心,实验动物生产许可证号SYXK(苏)2015-0015,体质量200~250 g,SPF级,共18只。所有实验操作经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准(批准编号IACUC-1909030)进行。

1.2 主要试剂

金黄色葡萄球菌(ATCC 25923,信阳市中检计量生物科技有限公司);Trizol Reagent试剂盒(美国Invitrogen公司);引物由上海康成生物工程有限公司提供;PCR master mix(美国Arraystar公司)。

1.3 主要仪器

克氏针(直径为0.8 mm,上海浦东金环医疗用品股份有限公司);X线机(型号MX-20,美国Faxitron公司);micro-CT(SkyScan 1176,德国Bruker公司);Sysmex XN-350全血细胞分析仪;

NanoDrop ND-1000分光光度计(美国Thermo公司);9700型PCR扩增仪、QuantStudio 5实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司);Dataviewer软件、CTAn软件(德国Bruker公司)。

2 方法

2.1 实验动物与分组

SD大鼠18只,随机分为感染性骨不连组10只,骨折组8只,自由进食水和食物,提前2周适应性喂养。

2.2 动物模型的建立

本研究采取开放性截骨模型^[6],大鼠腹腔麻醉(10%水合氯醛,3~4 mL/kg)满意后,手术区域剃毛,常规消毒铺巾。于大鼠右侧髌骨内侧行5 mm长切口,分离股四头肌肌腱,将髌骨向外侧牵拉使其脱位,暴露股骨远端,用5 mL注射器针头于股骨髁间窝沿纵轴方向钻通髓腔后取出。取克氏针通过该孔逆行植入至大鼠股骨大转子,多余克氏针剪断,将断端埋入骨膜下。于右侧股骨中段另开一1 cm切口,钝性分离股骨肌肉,暴露股骨中段,取水口钳使股骨中段横断或短斜型骨折。使用微型注射器于感染性骨不连组大鼠右股骨中段骨折处注射金黄色葡萄球菌悬液(10^4 CFU/10 μ L),骨折组同处注射10 μ L生理盐水,快速逐层缝合关闭切口,常规切口消毒。术后不予制动,自由饮水、进食。术后42 d^[7-8]进行模型评估及采血。

2.3 X线及micro-CT检查

造模后为评估造模是否成功,于麻醉状态下大鼠置俯卧位,拍摄X线,确定克氏针位置。术后42 d后,以10%水合氯醛ip麻醉,麻醉满意后,拍摄X线评估内固定位置及骨折愈合情况。离断股骨后行micro-CT(电流为329 μ A,电压为70 kV,扫描分辨率为9 μ m),使用Dataviewer软件调整三维图像方向;使用CTAn软件,按骨折线上下端各300个层面选取感兴趣区域(Range of Interests, ROI)分别计算相关指标:骨矿物质密度(Bone Mineral Density, BMD)、骨体积/总体积(Bone Volume/Total Volume, BV/TV)、骨小梁厚度(Trabecular

Thickness, Tb.Th)、骨小梁数量(Trabecular Number, Tb.N)、骨小梁间隙(Trabecular Separation, Tb.Sp)。

2.4 血及骨组织获取

于术后第42天分离腹主动脉后, EDTA抗凝管采血。采血后使用颈椎脱臼法处死大鼠, 仰卧位固定, 碘伏消毒手术侧肢体后铺无菌手术巾, 分离并离断右侧股骨, 取出克氏针。

2.5 炎症指标检测

使用 Sysmex XN-350 全血细胞分析仪进行 WBC 计数; 采用免疫散射比浊法测定血中 CRP 表达水平; 采用毛细管动态光度计成像测定法检测 ESR 水平。

2.6 实时定量 PCR(qRT-PCR)测定 miR-345-3p 表达

按 Trizol Reagent 试剂盒说明书提取大鼠全血中的总 RNA。使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计测量 RNA 浓度。制备逆转录反应体系(总 RNA、RT 引物、RNA 酶抑制剂、MMLV 反转录酶、RT 缓冲液、dNTP 混合液), 使用 9700 型 PCR 扩增仪进行逆转录反应合成 cDNA。加入 PCR master mix、miRNA 特异性正反向引物(正向引物序列: 5' GCGTTCCTGAAGTGGGGTC 3'; 反向引物序列: 5' GTGCGTGTCTGTTGAGTTCG 3')制备 PCR 反应体系, 使用 QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪进行实时 PCR 反应。选用 U6 snRNA 作为标准化内参,

采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据分析。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 24.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Kolmogorov-Smirnov 检验和 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验, 使用 F 检验判断方差是否齐性。服从正态分布的数据行两独立样本 t 检验, 非正态分布的数据使用 Mann-Whitney U 检验。若方差不齐则进行 Welch 校正 t 检验。绘制受试者工作特征(Receiver Operating Characteristic, ROC)曲线, 通过比较灵敏度、特异度和 ROC 曲线下面积(Area Under ROC Curve, AUC), 评估各指标的诊断效能。

3 结果

3.1 模型评估

术后 42 d 感染性骨不连组大鼠可见骨膜下积液, 骨折未愈合, 周围组织略红肿。骨折组骨折愈合, 未见红肿、渗出及流脓等现象。行 X 线及 micro-CT 评估骨折愈合情况, 骨折组骨折线模糊, 断端连续, 有连续骨痂通过骨折线; 长骨感染性骨不连组骨折端硬化, 断端有间隙, 骨痂间无小梁通过, 骨膜增厚。术后 42 d, 感染性骨不连组 BMD、Tb.Th、Tb.N 显著高于骨折组; Tb.Sp 显著低于骨折组, 差异均有统计学意义($P < 0.05, 0.01$)。结果见图 1。

3.2 两组各指标比较

术后 42 d, 如图 2 所示, 感染性骨不连组 WBC、

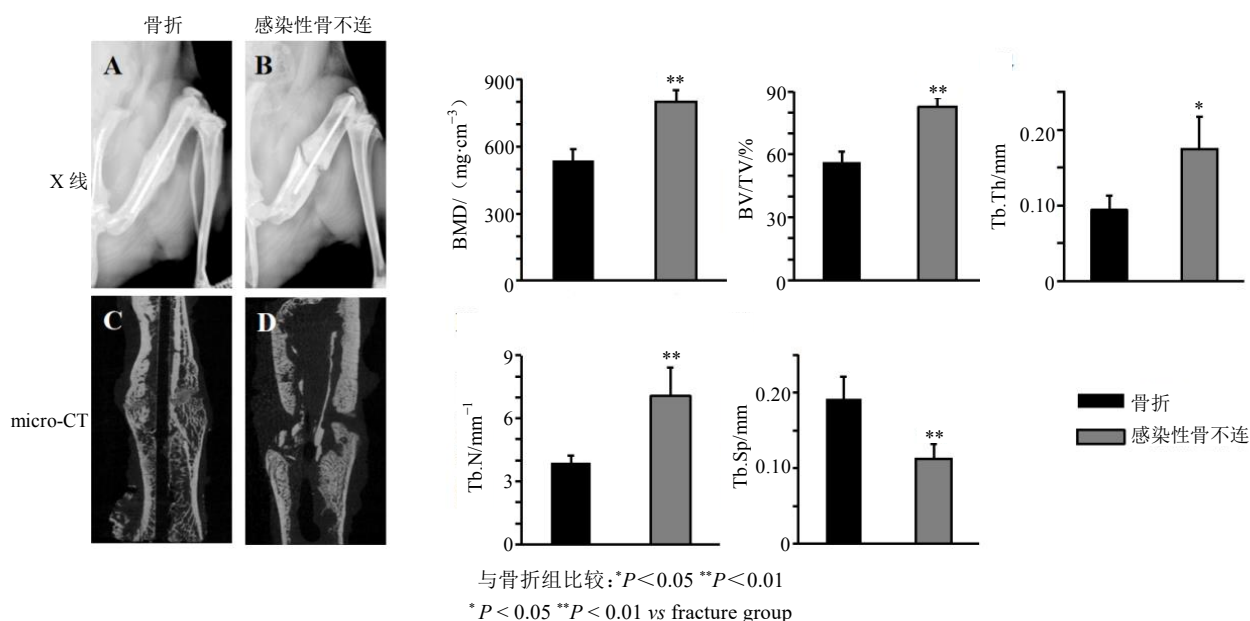


图1 骨折组及感染性骨不连组X线和micro-CT表现以及micro-CT参数BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N和Tb.Sp的比较
Fig. 1 X-ray and micro-CT performance of fracture group and femoral infected nonunion group respectively, and the comparison of micro-CT parameters including BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N and Tb.Sp between two groups

CRP、ESR较骨折组显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。感染性骨不连组 miR-345-3p 表达较骨折组显著降低,组间对比差异有统计学意义($P<0.01$)。

3.3 各指标的诊断效能

在各指标约登指数最大时的最佳 cut-off 值下, WBC 诊断长骨感染性骨不连的灵敏度及特异度分别为 70%、87.5%; CRP 的诊断灵敏度及特异度分别为 80%、75%; ESR 的诊断灵敏度及特异度分别为 70%、87.5%; miR-345-3p 的诊断灵敏度及特异度分别为 80%、87.5%。如图 3 所示, WBC、CRP、ESR 和 miR-345-3p 诊断长骨感染性骨不连的 AUC 分别为 0.756 [95% 置信区间 (CI) 为 0.524~0.989, $P>0.05$]、0.825 (95% CI 为 0.631~1.000, $P<0.05$)、0.838 (95% CI 为 0.653~1.000, $P<0.05$) 和 0.906 (95% CI 为 0.770~1.000, $P<0.01$)。

4 讨论

感染性骨不连涉及感染和骨不连两大难题,由于骨折不愈合,常导致患者肢体废用甚至截肢,且花费巨大。术前诊断感染性骨不连对于治疗方案的选择至关重要,目前研究显示虽然 WBC、CRP、

ESR 特异性可达到 70% 以上,但是敏感度均较低^[9-10]。多种研究开始致力于寻找诊断效能较高的术前诊断手段,包括 D-二聚体^[10]、白介素-6^[9]等血清学诊断以及 ¹⁸F-FDG PET/CT 等影像学诊断^[11],但这些诊断手段由于受影响因素较多以及检查费用高等原因未能广泛应用于临床,所以需要新的诊断标志物术前诊断感染性骨不连。

循环 miRNA 包括全血、血清及血浆等体液 miRNA^[12],因其取材方便、操作损伤小已广泛用于诊断癌症、损伤、感染等多种疾病。有研究表明,多种 miRNA 通过调节成骨细胞分化参与骨折修复过程^[13],参与萎缩性骨不连的发病过程。Waki 等人发现^[14],与闭合性骨折相比,大鼠股骨骨折 14 d 后,萎缩性骨不连骨痂中 miR-31a-3p、miR-31a-5p、miR-146a-5p、miR-146b-5p 和 miR-223-3p 的表达显著上调;余飞等^[15]研究发现,萎缩性骨不连断端瘢痕修复组织与骨折患者相比,存在差异表达的 miRNA,其中 miR-628-3p 可能是通过 RUNX2 减弱 MG63 细胞的成骨分化。miR-345-3p 对牵张力刺激敏感,在受力早期可能对成骨分化发挥调控作用,下调 miR-345-3p 可增加大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化

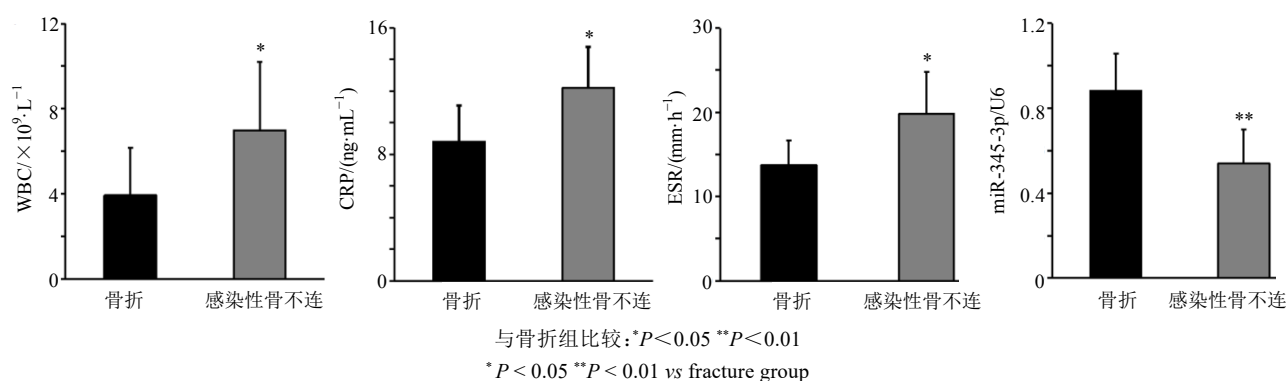


图2 WBC、CRP、ESR和 miR-345-3p 在骨折组及感染性骨不连组中的表达

Fig. 2 WBC, CRP, ESR and miR-345-3p expression level in fracture and infected nonunion group

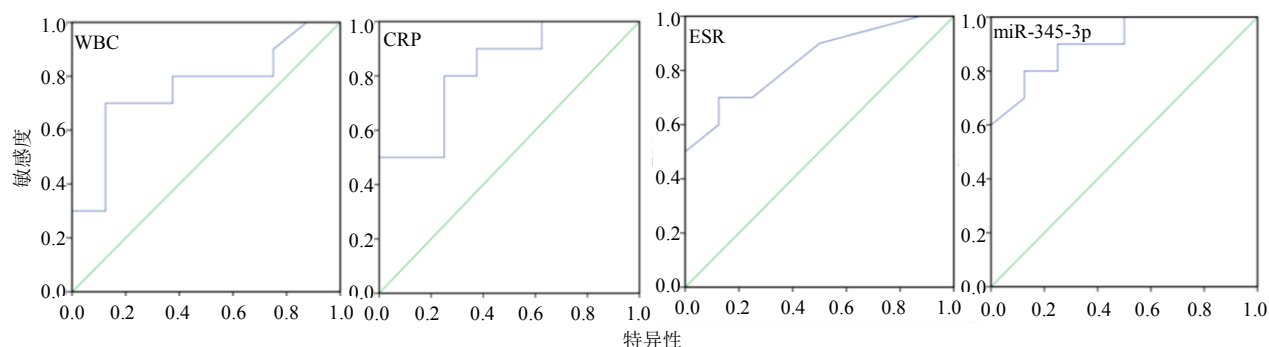


图3 骨折组及感染性骨不连组的循环血炎症指标 WBC、CRP、ESR 及 miR-345-3p 的 ROC 曲线

Fig. 3 ROC curves of circulating blood inflammation index WBC, CRP, ESR, and miR-345-3p levels from fracture and infected nonunion group

能力^[16]。另外,miR-345-3p可靶向调控PI3K-Akt信号通路,此通路不仅可以通过调节成骨细胞的分化影响骨折愈合^[17],而且可以正向调节细菌感染中巨噬细胞的吞噬作用^[18]。

近年来,许多学者研究miRNA在骨折修复中的治疗作用。在小鼠股骨骨折模型中下调miR-92a可增加骨痂体积,促进新生血管形成,从而促进骨折修复^[19]。而Lee等^[20]首次证明miR-29b-3p通过超声微泡介导的基因递送系统加速了骨折修复。在感染性骨不连发病机制中,miR-345-3p在其炎症调控及骨折修复中的作用仍需进一步探讨,而其对感染性骨不连是否有治疗作用是我们未来需要研究的方向。

本研究成功建立了大鼠股骨感染性骨不连模型,首次发现感染性骨不连组骨痂组织与骨折组相比全血miR-345-3p表达有差异,通过ROC曲线将miR-345-3p与其他非特异性炎症指标进行比较,其诊断效能优于WBC、CRP及ESR,能达到较满意的灵敏度、特异度及准确性,可作为诊断感染性骨不连的潜在新型生物标志物,但仍需在人感染性骨不连的循环血中进一步验证。

参考文献

- [1] 程 栋,康庆林. 感染性骨不连的治疗进展 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2011, 13(3): 279-282.
- [2] Struijs P A, Poolman R W, Bhandari M. Infected nonunion of the long bones [J]. J Orthop Trauma, 2007, 21(7): 507-511.
- [3] Stucke C, Olszewski D C, Creevy W R, et al. Preoperative diagnosis of infection in patients with nonunions [J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(15): 1409-1412.
- [4] Drury R E, O'Connor D, Pollard A J. The clinical application of MicroRNAs in infectious disease [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1182.
- [5] Liu L, Liu M, Li R, et al. MicroRNA-503-5p inhibits stretch-induced osteogenic differentiation and bone formation [J]. Cell Biol Int, 2017, 41(2): 112-123.
- [6] 张 钢. 阿伦磷酸钠对大鼠股骨骨质疏松性骨折愈合过程的影响 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [7] Bilgili F, Balci H I, Karayug K, et al. Can normal fracture healing be achieved when the implant is retained on the basis of infection? An experimental animal model [J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(10): 3190-3196.
- [8] Alt V, Lips K S, Henkenbehrens C, et al. A new animal model for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent in situ hybridization of bacteria in bone infection [J]. Bone, 2011, 48(5): 1146-1153.
- [9] 王 松. IL-6在骨折术后内植物相关感染中诊断效能的研究 [D]. 天津: 南开大学, 2017.
- [10] Wang Z, Zheng C, Wen S, et al. Usefulness of serum D-dimer for preoperative diagnosis of infected nonunion after open reduction and internal fixation [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 1827-1831.
- [11] 袁承杰, 朱根锐, 王之枫, 等. 骨科内植物术后感染早期诊断的研究进展 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2018, (3): 237-240.
- [12] 何顺伟, 魏晓星. 新型诊断标志物循环miRNA的研究进展与应用 [J]. 青海医学院学报, 2016, 37(1): 68-72.
- [13] Hadjiargyrou M, Komatsu D E. The therapeutic potential of microRNAs as orthobiologics for skeletal fractures [J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(5): 797-809.
- [14] Waki T, Lee S Y, Niikura T, et al. Profiling microRNA expression in fracture nonunions: Potential role of microRNAs in nonunion formation studied in a rat model [J]. Bone Joint J, 2015, 97-B(8): 1144-1151.
- [15] 余 飞. 萎缩性骨不连组织差异表达的microRNA的筛选及生物学研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2013.
- [16] 李荣荣. miR-345-3p在周期性牵张力诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化中的生物学功能 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [17] Xiong Y, Cao F, Hu L, et al. miRNA-26a-5p accelerates healing via downregulation of PTEN in fracture patients with traumatic brain injury [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 17: 223-234.
- [18] Lv Y, Fang L, Ding P, et al. PI3K/Akt-Beclin1 signaling pathway positively regulates phagocytosis and negatively mediates NF- κ B-dependent inflammation in *Staphylococcus aureus*-infected macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 510(2): 284-289.
- [19] Murata K, Ito H, Yoshitomi H, et al. Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice [J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(2): 316-326.
- [20] Lee W Y, Li N, Lin S, et al. miRNA-29b improves bone healing in mouse fracture model [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 430: 97-107.