

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.10.018
文章编号: 1005-8982 (2022) 10-0098-05

临床研究·论著

MicroRNA-206、microRNA-29b、microRNA-133a的表达及对骨折患者延迟愈合的预测价值*

彭洋¹, 向桃², 唐玉琦², 赵冬雪², 艾巧玲², 程明²

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院 骨科, 四川 成都 610072;
2. 成都市金牛区人民医院 康复科, 四川 成都 610036)

摘要: 目的 分析 microRNA-206 (miR-206)、microRNA-29b (miR-29b)、microRNA-133a (miR-133a) 的表达及对骨折患者延迟愈合的预测价值, 为临床应用提供依据。**方法** 选取2020年1月—2020年12月四川省医学科学院·四川省人民医院收治的123例骨折延迟愈合患者作为观察组, 另取该院100例骨折愈合正常患者作为对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测患者血清 miR-206、miR-29b、miR-133a 的表达; 绘制受试者工作特征(ROC)曲线, 分析各指标单独及联合预测骨折延迟愈合的价值。**结果** 观察组血清 miR-206、miR-29b、miR-133a 相对表达量高于对照组 ($P < 0.05$)。miR-206、miR-29b、miR-133a 预测骨折延迟愈合的准确性分别为 82.79%、83.90% 和 86.67%, 较三者联合预测准确性(96.72%)低。三者联合预测骨折延迟愈合的敏感性和特异性分别为 95.94%(95% CI: 0.922, 0.986)、96.00%(95% CI: 0.937, 0.993), 高于单独预测。**结论** 骨折延迟愈合患者血清 miR-206、miR-29b、miR-133a 相对表达量较高; 三者联合检测可有效预测患者延迟愈合, 具有较高的临床应用价值。

关键词: 骨折; 延迟愈合; microRNA-206; microRNA-29b; microRNA-133a

中图分类号: R726.8

文献标识码: A

The value of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a in predicting the delayed union of fracture*

Yang Peng¹, Tao Xiang², Yu-qi Tang², Dong-xue Zhao², Qiao-ling Ai², Ming Cheng²

(1. Department of Orthopedics, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Department of Rehabilitation, Jinniu District People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610036, China)

Abstract: Objective To analyze the predictive value of the expressions of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a for the delayed union of fracture, and so as to provide evidence for clinical practice. **Methods** The 123 patients with delayed union of fracture treated in Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital from January 2020 to December 2020 were selected as the observation group, and 100 patients with normal fracture healing in the hospital were selected as the control group. The levels of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction. The receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted and the predictive values of each indicator alone and the combined detection of these indicators were analyzed. **Results** The serum levels of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a in the observation group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The accuracy

收稿日期: 2021-10-14

* 基金项目: 四川省科技计划项目(No: 2020YFS0416)

[通信作者] 程明, E-mail: 17084599@qq.com

of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a in predicting the delayed union of fracture was 82.79%, 83.90% and 86.67%, lower than that of the combined detection of these indicators (96.72%). The sensitivity and specificity of the combined detection of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a in predicting the delayed union of fracture were 95.94% (95% CI: 0.922, 0.986) and 96.00% (95% CI: 0.937, 0.993), which were both higher than those of these indicators alone. **Conclusions** The serum levels of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a are higher in patients with the delayed union of fracture. The combined detection of these indicators effectively predicts the occurrence of delayed union in fracture patients, which is of value for further clinical practice.

Keywords: fracture; delayed union; microRNA-206; microRNA-29b; microRNA-133a

由炎症、创伤、肿瘤切除等多种因素诱发的节段性骨缺损是临床面临的重要难题之一。有研究指出,骨组织不愈合、延迟愈合等均可能造成长期疼痛,降低患者生活质量,并因反复手术而增加经济负担^[1]。此外,有研究指出,骨折愈合延迟可能给患者造成严重不良影响,甚至可能导致患者死亡,因此临床选择合理有效的治疗手段对患者进行干预,提高患者骨组织修复速度和治疗效果是重要的治疗策略之一^[2]。近年来,临床上骨折的治疗包括骨形态发生蛋白、血小板衍生生长因子等生物疗法,以及低强度和磁场脉冲超声等物理疗法。有研究指出,虽然上述方法可有效促进骨组织修复,但是临床疗效均不满意^[3]。

MicroRNA (miRNA)是机体重要的可有效调节基因表达的非编码RNA,在肌肉、软骨和骨组织发育及稳态调节中发挥重要调节作用,在骨组织修复过程中扮演重要角色,可作为潜在的评估和预测骨折愈合状态的重要指标^[4]。MicroRNA-206 (miR-206)、microRNA-29b (miR-29b)、microRNA-133a (miR-133a)是骨发育和塑形的生物标志物,参与体内多种转录因子和调节生长因子的活性调节,在骨代谢的发生、发展中扮演重要角色。但在骨折患者延迟愈合的评估中 miR-206、miR-29b、miR-133a 扮演何种作用仍鲜有报道。本研究选取四川省医学科学院·四川省人民医院收治的123例骨折延迟愈合患者作为研究对象,分析 miR-206、miR-29b、miR-133a 的表达及对骨折患者延迟愈合的预测价值,为临床应用提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年1月—2020年12月四川省医学科学院·四川省人民医院收治的骨折延迟愈合患者

123例作为观察组,另取同期本院100例骨折愈合正常患者作为对照组,均为股骨干闭合性粉碎性骨折。

观察组男性79例,女性44例;年龄(49.82 ± 7.31)岁;病程(14.39 ± 4.12)月;Winquist分型:I型21例,II型24例,III型29例,IV型49例;手术方式:切开复位动力加压钢板螺钉内固定术57例,切开复位带锁髓内钉内固定术66例。对照组男性65例,女性35例;年龄(50.19 ± 8.13)岁;病程(13.97 ± 3.91)月;Winquist分型:I型18例,II型20例,III型21例,IV型41例;手术方式:切开复位动力加压钢板螺钉内固定术48例,切开复位带锁髓内钉内固定术52例。两组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会审议并批准,患者及其家属均签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 ①年龄 ≥ 18 周岁;②首次接受手术治疗的骨折患者;③骨折损伤后 ≥ 3 个月无明显愈合倾向;④骨折延迟愈合相关指征符合相关标准;⑤X射线扫描见骨痂完全不生或极少生长;⑥断端骨质出现间隙或硬化。

1.2.2 排除标准 ①合并严重心脑血管疾病;②合并出现呼吸系统疾病;③合并骨代谢疾病或糖尿病;④肝、肾等脏器功能出现严重损伤;⑤入组前3个月有激素服用史;⑥临床或随访治疗缺失。

1.3 主要试剂及仪器

RNA抽提试剂盒、RNA逆转录试剂盒、酶标仪(美国赛默飞公司),引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司提供,离心机(美国Beckman公司),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

1.4 qRT-PCR 检测血清 miR-206、miR-29b、miR-133a 的表达

术后 6 周采集患者空腹静脉血 5 mL, 离心收集血清。用 RNA 抽提试剂盒提取血清总 RNA, 逆转录为 cDNA, 采用 qRT-PCR 仪检测血清 miR-206、miR-29b、miR-133a。反应体系共 10 μ L: 正反向引物各 0.3 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 3.4 μ L, SYBR Premix Ex Taq 5 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 个循环。所有实验重复 3 次, 以 U6 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
miR-206b	正向: 5'-CGGCCCTCCTCGCCTTGAGGAC-3'	22
	反向: 5'-GCAGTGCTACAGGGTCCCAGGT-3'	22
miR-29b	正向: 5'-TGGCCCTCGTAGCCTTGAGGAC-3'	21
	反向: 5'-CCAGTGCTGCAGGGTCCCAGGT-3'	20
miR-133a	正向: 5'-GCACCACCAACTGCTTA-3'	17
	反向: 5'-ACTAGAGGCAGGGATGAT-3'	18
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'	16
	反向: 5'-AAGCCTCACGAATTTGCGT-3'	20

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计数资料以构成比或 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验; 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验; 绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 分析 miR-206、miR-29b、miR-133a 单独及联合预测骨折延迟愈合的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 miR-206、miR-29b、miR-133 相对表达量比较

两组血清 miR-206、miR-29b、miR-133 相对表达量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 观察组均高于对照组。见表 2。

2.2 miR-206、miR-29b、miR-133a 预测骨折延

表 2 两组血清 miR-206、miR-29b、miR-133 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-206	miR-29b	miR-133a
观察组	123	0.54 \pm 0.22	0.78 \pm 0.28	0.87 \pm 0.32
对照组	100	0.31 \pm 0.12	0.53 \pm 0.25	0.54 \pm 0.23
t 值		9.921	5.769	8.943
P 值		0.000	0.000	0.000

迟愈合的准确性

ROC 曲线结果显示, miR-206、miR-29b、miR-133a 的截断值分别为 0.36、0.61、0.63, 高于此截断值则预测患者骨折延迟愈合。miR-206、miR-29b、miR-133a 预测骨折延迟愈合的准确性分别为 82.79%、83.90% 和 86.67%, 3 者联合预测骨折延迟愈合的准确性为 96.72%, 高于单独预测。见表 3。

表 3 miR-206、miR-29b、miR-133a 预测骨折延迟愈合的结果比较

指标	延迟愈合 例(%)	正常愈合 例(%)	合计/例
miR-206			
延迟愈合	101(82.79)	21(17.21)	122
正常愈合	22(21.78)	79(78.22)	101
miR-29b			
延迟愈合	99(83.90)	19(16.10)	118
正常愈合	24(22.86)	81(77.14)	105
miR-133a			
延迟愈合	104(86.67)	16(13.33)	120
正常愈合	19(18.45)	84(81.55)	103
联合			
延迟愈合	118(96.72)	4(3.28)	122
正常愈合	5(4.95)	96(95.05)	101

2.3 miR-206、miR-29b、miR-133a 预测骨折延迟愈合的价值

ROC 曲线结果显示, miR-206、miR-29b、miR-133a 联合预测骨折延迟愈合的敏感性和特异性分别为 95.94% (95% CI: 0.922, 0.986)、96.00% (95% CI: 0.937, 0.993) 高于单独预测。其中, miR-206 敏感性为 82.11% (95% CI: 0.766, 0.881), 特异性为 79.00% (95% CI: 0.742, 0.841); miR-29b 敏感性为 80.49%

(95% CI: 0.776, 0.887), 特异性为 81.00% (95% CI: 0.774, 0.892), 特异性为 84.00% (95% CI: 0.808, 0.874, 0.845); miR-133a 敏感性为 84.55% (95% CI: 0.890)。见表 4 和图 1。

表 4 miR-206、miR-29b、miR-133a 预测骨折延迟愈合的参数

指标	截断值	AUC	S_b	P 值	敏感性/%	95% CI		特异性/%	95% CI	
						下限	上限		下限	上限
miR-206	0.36	0.824	0.029	0.000	82.11	0.766	0.881	79.00	0.742	0.841
miR-29b	0.61	0.832	0.028	0.000	80.49	0.776	0.887	81.00	0.784	0.845
miR-133a	0.63	0.833	0.030	0.000	84.55	0.774	0.892	84.00	0.808	0.890
联合		0.954	0.016	0.000	95.94	0.922	0.986	96.00	0.937	0.993

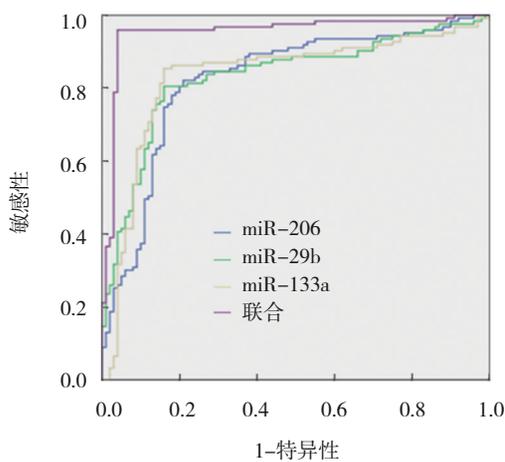


图 1 miR-206、miR-29b、miR-133a 及 3 者联合预测骨折延迟愈合的 ROC 曲线

3 讨论

随着我国经济飞速发展,骨折发生率也呈逐渐升高的趋势^[5]。多数患者治疗后骨折可有效愈合,但仍有部分患者出现愈合延迟,恢复时间较长,甚至增加二次手术风险,导致患者预后不佳。有研究指出,骨折愈合是体内重要的骨骼原始连续性重建、骨再生,并恢复骨正常功能和结构的过程^[6]。有学者指出,骨折延迟愈合过程中有多种因子相互作用^[7]。

miRNA 可有效调控机体内大量基因表达,并参与细胞分化、增殖、组织器官形成、胚胎发育等多种生理过程。骨折修复愈合的动态过程包括原始骨痂形成、血肿机化、骨痂改造塑形等多个阶段,而 miRNA 在该过程中出现显著变化。有研究指出,与健康人群比较,绝经后妇女低骨密度椎体骨折患者体内 miR-2861、miR-124 明显升高,miR-29、miR-23、miR-21 显著降低^[8]。有研究表明,血清 miRNA 促进

新生血管生成、骨缺损修复^[9]。骨折患者多伴随血管损伤,并出现缺氧、缺血,对干细胞及营养物质的运输造成一定影响。有学者指出,骨折患者在支架材料植入初始阶段常发生细胞死亡,最终可能诱发延迟愈合甚至修复失败^[10]。

本研究结果显示,观察组血清 miR-206、miR-29b、miR-133a 相对表达量高于对照组。miR-206、miR-29b、miR-133a 联合预测骨折延迟愈合的敏感性、特异性明显高于单独检测。有研究发现,骨骼肌 miR-206 特异性表达会有效抑制成骨细胞分化,当该基因被敲除后则可有效促进成骨分化^[11]。miR-29b 是调控新生血管功能和结构的重要生物活性因子。有研究发现 miR-29b 可靶向调控 Akt3,降低体内 VEGF 水平,对血管生成进行负向调控^[12]。而在成骨细胞分化和成熟过程中,miR-29b 还参与骨基质和骨胶原的合成与分泌,进而对骨形成进行调控。此外,有研究发现 miR-29b 能效调控骨髓间充质干细胞分化,在骨折愈合过程中扮演重要角色^[13]。miR-133 是近年来受到人们广泛关注的参与肌肉和肿瘤发生、发展的调控活性因子。有研究发现,miR-133 在骨代谢过程中发挥重要调控作用^[14]。miR-133 能靶向抑制骨生成,调控 RUNX2 信号通路并参与骨折愈合过程。本研究结果与上述研究结果相似,临床上可通过检测患者血清 miR-206、miR-29b、miR-133a 相对表达量对体内骨代谢水平进行综合分析,可更全面地反映骨折患者骨代谢、血管功能,从而评估患者骨折延迟愈合状态。

综上所述,联合检测骨折患者 miR-206、miR-29b、miR-133a 相对表达量可有效预测患者延迟愈合状态,具有较高的应用价值。但本研究病例数较

少,且并未对患者进行长期随访,有待后续深入研究和分析。

参 考 文 献 :

- [1] XU B, CHEN L X, LEE J H. Smoking and alcohol drinking and risk of non-union or delayed union after fractures: a protocol for systematic review and dose-response meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(5): e18744.
- [2] LIU P, JIN D X, ZHANG C Q, et al. Revision surgery due to failed internal fixation of intertrochanteric femoral fracture: current state-of-the-art[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21(1): 573.
- [3] SONG D Y, HE G X, SONG F F, et al. Inducible expression of Wnt7b promotes bone formation in aged mice and enhances fracture healing[J]. *Bone Res*, 2020, 8: 4.
- [4] 白凤庭, 李林, 陈军豪, 等. 非编码RNA与骨骼肌发育研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11): 3584-3594.
- [5] YUASA M, SAITO M, BLUM D M, et al. The size of intramedullary fixation affects endochondral-mediated angiogenesis during fracture repair[J]. *J Orthop Trauma*, 2019, 33(10): e385-e393.
- [6] 申震, 姜自伟, 陈国茜, 等. 成血管-成骨耦联相关因子、细胞在骨中作用机制的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(3): 458-463.
- [7] SIMPSON C R, KELLY H M, MURPHY C M. Synergistic use of biomaterials and licensed therapeutics to manipulate bone remodelling and promote non-union fracture repair[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 160: 212-233.
- [8] TSUBOUCHI Y, IKEDA S, KATAOKA M, et al. Combination therapy with low-dose teriparatide and zoledronate contributes to fracture healing on rat femoral fracture model[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1): 267.
- [9] KORHONEN L, LUTZ N, SINIKUMPU J J. The association of metal frame construct of ESIN and radiographic bone healing of pediatric forearm fractures[J]. *Injury*, 2020, 51(4): 856-862.
- [10] 王红蕾, 屈雪, 刘昌胜. 重视对骨质疏松性骨折骨缺损修复材料的研究[J]. *中华创伤杂志*, 2020, 36(1): 9-13.
- [11] ZHANG J Y, TORNETTA P 3rd, JONES B, et al. Locking hole inserts: effect of insertion torque on fatigue performance and insert loosening in locking plates[J]. *J Orthop Trauma*, 2019, 33(3): 120-124.
- [12] ZHAO W T, CHENG L, QUEK C, et al. Novel miR-29b target regulation patterns are revealed in two different cell lines[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17449.
- [13] YAO L X, ZHOU B L, YOU L, et al. LncRNA MIAT/miR-133a-3p axis regulates atrial fibrillation and atrial fibrillation-induced myocardial fibrosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(4): 2605-2617.
- [14] 张红蕾, 周祉好, 候亚鹏, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞通过miR-130b调控上皮钠通道的机制研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(1): 88-93.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 彭洋, 向桃, 唐玉琦, 等. MicroRNA-206、microRNA-29b、microRNA-133a的表达及对骨折患者延迟愈合的预测价值[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(10): 98-102.

Cite this article as: PENG Y, XIANG T, TANG Y Q, et al. The value of microRNA-206, microRNA-29b and microRNA-133a in predicting the delayed union of fracture[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(10): 98-102.