

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.21.006

miRNA-27a 靶向 SPRY2 对退变椎间盘血管长入生成作用的影响 *

黄启帆¹ 白杰¹ 何坤¹ 王贤¹ 李浩¹ 唐上德^{2Δ}

(1 广州中医药大学第二临床医学院 广东 广州 510006; 2 广东省中医院珠海医院 广东 珠海 519000)

摘要 目的: 探讨 miRNA-27a 靶向调控 Sprouty 同源物 2 (Sprouty Homolog 2, SPRY2) 对人髓核细胞系 (nucleus pulposus cells, NPCs) 诱导人微血管内皮细胞 (Human microvascular vascular endothelial cells, HMEC-1) 血管生成作用的影响。**方法:** 收集脊柱侧弯和椎间盘退变 (Intervertebral disc degeneration, IDD) 患者的椎间盘组织分别作为对照组和 IDD 组, 通过 miRNA 芯片筛选差异表达的 miRNA。RT-qPCR 和荧光原位杂交实验验证组织中 miR-27a 的表达水平。慢病毒转染细胞, 细胞分为 Control 组 (未转染); NC 组 (转染慢病毒空载); sh-miR-27a 组 (转染 miR-27a 抑制慢病毒); miR-27a 组 (转染 miR-27a 过表达慢病毒); SPRY2 组 (转染 SPRY2 过表达慢病毒) 及 miR-27a + SPRY2 组 (转染 miR-27a 和 SPRY2 过表达慢病毒)。RT-qPCR 检测髓核细胞中 miR-27a 和 SPRY2 的表达。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-27a 和 SPRY2 的靶向关系。将经过不同处理的髓核细胞条件培养基与完全培养基混合培养 HMEC-1 细胞, Transwell 和管腔形成实验检测 HMEC-1 细胞的侵袭和血管生成能力。免疫荧光和 ELISA 检测髓核细胞和混合培养基中转化生长因子-β1 (Transforming growth factor-β1, TGF-β1) 含量。**结果:** 与对照组椎间盘组织相比, IDD 组 miR-27a 表达明显增加。与 NC 组相比, SPRY2 在 sh-miR-27a 组中表达升高 ($P < 0.05$), miR-27a 组中表达降低 ($P < 0.05$)。与 NC 组相比, miR-27a 组 HMEC-1 细胞侵袭和血管生成能力增强 ($P < 0.05$), TGF-β1 表达上升 ($P < 0.05$); SPRY2 组 HMEC-1 细胞侵袭数减少 ($P < 0.05$), 管腔样结构未形成。与 miR-27a 组相比, miR-27a + SPRY2 组 HMEC-1 细胞侵袭和血管生成能力下降 ($P < 0.05$), TGF-β1 表达下降 ($P < 0.05$)。**结论:** miRNA-27a 通过靶向抑制 SPRY2 的表达促进髓核细胞诱导 HMEC-1 细胞成血管能力。

关键词: microRNA-27a; SPRY2; 椎间盘退变; 侵袭; 血管形成

中图分类号: R-33; R681.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)21-4030-07

MiRNA-27a Targets SPRY2 to Play a Role in Degenerative Disc Vascular Growth*

HUANG Qi-fan¹, BAI Jie¹, HE Kun¹, WANG Xian¹, LI Hao¹, TANG Shang-de^{2Δ}

(1 The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong, Guangzhou, 510006, China;

2 Guangdong Province Hospital Of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai branch, Zhuhai, Guangdong, 519000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the angiogenesis of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) induced by human nucleus pulposus cells (NPCs) through miRNA-27a / SPRY2. **Methods:** Intervertebral disc tissues from scoliosis and intervertebral disc degeneration (IDD) patients were collected as control group and IDD group, and differentially expressed miRNAs were screened by miRNA chip. The expression of miR-27a in tissues was verified by RT-qPCR and fluorescence in situ hybridization. Lentivirus-transfected cells were divided into Control group (untransfected); NC group (transfected with lv-pNanog); sh-miR-27a group (transfected with miR-27a knockdown plasmid); miR-27a group (transfected with miR-27a overexpression plasmid); SPRY2 group (transfected with SPRY2 overexpression plasmid) and miR-27a + SPRY2 group (transfected with miR-27a and SPRY2 overexpression plasmid). The expression of miR-27a and SPRY2 in nucleus pulposus cells was detected by RT-qPCR. verified the The targeting relationship between miR-27a and SPRY2 was verified by dual-luciferase reporter gene assay. HMEC-1 cells were cultured by mixed medium which is mixed by conditioned medium of nucleus pulposus and complete medium. Transwell and lumen formation experiments were used to detect the invasion and angiogenesis ability of HMEC-1 cells. Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) expression in nucleus pulposus cells and mixed medium was detected by immunofluorescence and ELISA. **Results:** Compared with the control group, the expression of miR-27a in IDD group was significantly increased. Compared with the NC group, the expression of SPRY2 was increased in the sh-miR-27a group ($P < 0.05$) and decreased in the miR-27a group ($P < 0.05$). Compared with the NC group, the invasion and angiogenesis of HMEC-1 cells in the miR-27a group were enhanced ($P < 0.05$), and the expression of TGF-β1 was increased ($P < 0.05$); Invasion of HMEC-1 cell in the SPRY2 group was reduced ($P < 0.05$), the lumen-like structure was not formed. Compared with the

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A030313643)

作者简介: 黄启帆(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 脊柱外科, 电话: 15219809497, E-mail: vkexj8@163.com

Δ 通讯作者: 唐上德(1970-), 男, 主任医师, 研究方向: 脊柱外科, E-mail: cfo0id@163.com

(收稿日期: 2020-05-05 接受日期: 2020-05-28)

miR-27a group, the invasion and angiogenesis ability of HMEC-1 cells in the miR-27a + SPRY2 group reduced ($P < 0.05$), and the expression of TGF- β 1 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** miRNA-27a promotes the ability of nucleus pulposus cells to induce angiogenesis of HMEC-1 cells by inhibiting the expression of SPRY2.

Key words: microRNA-27a; SPRY2; Disc degeneration; Invasion; Angiogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R681.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)21-4030-07

前言

椎间盘退变(Intervertebral disc degeneration, IDD)是骨科临床常见问题,全球有 75 %-85 %的老年人患有因 IDD 引起的腰背痛^[1,2]。研究表明 IDD 伴随着胞外基质组分变化、纤维环裂隙形成和血管神经长入^[3-5]。正常椎间盘组织并无血管、神经存在^[6]。椎间盘微损伤的修复过程中,异常血管、神经长入修复区,导致痛觉过敏^[7]。因此椎间盘血管长入对 IDD 进程产生巨大影响。众多研究报道 miRNA 在神经退行性疾病、骨关节退行性疾病中均发挥重要作用。研究^[8]表明 miR-27a 可在不同组织中表达,参与多种疾病的发生发展,具有诱导肿瘤增殖、迁移和侵袭以及促进多种器官纤维化的作用。此外,miR-27a 还参与调控血管生成,在心血管疾病患者血清中表达上调^[9]。Liu 等^[10]研究证实 miR-27a 可通过调节髓核细胞凋亡参与椎间盘退行性病变。目前关于 microRNA 在 IDD 血管生成过程中发挥的作用鲜有研究,因此本研究基于以往 miR-27a 分别在血管生成和 IDD 进展中发挥的重要作用,将二者联系起来进行初步探讨,以期对 IDD 的研究提供新的思路并为其临床治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

选取 2017 年 5 月~2018 年 5 月分别因脊柱侧弯和椎间盘退变来我院接受手术治疗的各 5 例作为研究对象,术中取出椎间盘组织分别作为对照组和 IDD 组,其中脊柱侧弯的椎间盘退变按 Pfirrmann^[11]等的 MRI 分级为 I 级,椎间盘退变组织按该分级标准为 IV 级。本研究经我院伦理委员会批准,患者及家属均知情同意并自愿签字。

人髓核细胞系(NPCs)及人微血管内皮细胞(HMEC-1)均购自中科院上海细胞库。miR-27a 抑制和过表达慢病毒、SPRY2 抑制慢病毒购自上海吉玛有限公司。DMEM/F12、DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司;反转录试剂盒购自美国 sigma 公司;Lipofectamine-3000 转染试剂、荧光素酶试剂盒购自美国 vector 公司;Trizol 试剂盒购自 TaKaRa 公司;地高辛标记的 miRNA-27a 探针购自 Exqion 公司;FISH 检测试剂盒购自广州伯信生物科技有限公司;Transwell 试剂盒购自美国 BD 公司;Matrigel Matrix 购自美国 Corning 公司;TGF- β 1 抗体购自 abcam 公司;TGF- β 1 ELISA 试剂盒购自上海酶联生物公司。

1.2 细胞培养及转染

髓核细胞和 HMEC-1 细胞分别用 10 %胎牛血清 DMEM/F12 和 DMEM 培养基培养,每 2 天换液 1 次,汇合率达 90 %左右传代。取对数生长期髓核细胞进行转染,采用 Lipofectamine 3000 通过脂质体介导法转染,将构建好的慢病

毒转染至髓核细胞中,转染按 Lipofectamine 3000 试剂说明书操作。细胞分为 Control 组(未转染);NC 组(转染慢病毒空载);sh-miR-27a 组(转染 miR-27a 抑制慢病毒);miR-27a 组(转染 miR-27a 过表达慢病毒);SPRY2 组(转染 SPRY2 过表达慢病毒)及 miR-27a +SPRY2 组(转染 miR-27a 和 SPRY2 过表达慢病毒)。

1.3 microRNA 芯片筛选差异表达 microRNA

依据 Trizol 法提取对照组和 IDD 组椎间盘组织样品的总 RNA。采用 Agilent Human miRNA V19.0 芯片按照 miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 标准程序对各组样本中 miRNA 分子进行荧光标记和杂交试验。Agilent Microarray Scanner 扫描芯片结果, GenePix Pro 6.0 软件分析结果。

1.4 RT-qPCR 检测组织中 miR-27a 及 SPRY2 的表达

依据 Trizol 法提取各组样本的总 RNA,使用引物如下:miR-27a(FP:5'-GCAGGGCTTAGCTGCTTG-3',RP:5'-GTGCA GGGTCCGAGGT-3');SPRY2(FP:5'-GAGGCCAGAGCTCAG AGTGGCAACGGGTCTG-3',RP:5'-TGTCGGCTTTTCAAAGT TCCTAGGGGGGAC-3'); β -actin(FP:5'-GCCCATCTATGAGG GTTACGC-3',RP:5'-GCTTTAGCCACGCTCGGTC-3')。反应条件:75℃预变性,2 min,进入以下循环 90℃变性,5 min;60℃退火,60 s;72℃延伸,30 s;共 40 个循环。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。每个样本独立重复实验 3 次。

1.5 荧光原位杂交实验检测 miR-27a 的表达

地高辛标记 miRNA-27a 探针使用浓度为 1:100。应用常规方法制备对照组和 IDD 组椎间盘组织切片,切片厚度为 5 μ m。按照 FISH 检测试剂盒说明书步骤将 miRNA-27a 探针与切片杂交,切片于 400 倍镜下随机选取 5 个不连续视野,采用 IPP6.0 专业图像分析软件对各组图片阳性区域测定平均光密度值(mean optical density, MOD)进行半定量分析。

1.6 生物信息学预测及双荧光素酶报告基因验证 miR-27a 及 SPRY2 的关系

采用 miRNA 靶基因数据库 MiRanda 预测 miR-27a 和 SPRY2 的结合片段。采用 PCR 扩增含有 miR-27a 结合位点的 SPRY2 片段,并将该扩增片段插入荧光素酶载体 psi-CHECK 中,构建野生型质粒并记为 psi-CHECK-SPRY2-wild,同时采用基因突变技术对结合片段中的核苷酸进行突变,并构建突变型质粒 psi-CHECK-SPRY2-mutant。将 miR-27a 及阴性对照分别与空载质粒、野生型质粒 psi-CHECK-SPRY2-wild 和突变型质粒 psi-CHECK-SPRY2-mutant 共转染至 HEK293T 细胞,并将细胞分为空白组(control 组)、野生型(wild 组)和突变型(mutant 组)转染后 24 h,根据双荧光素酶检测试剂盒说明书测定荧光素酶活性,萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性值即为报告基因活性。

1.7 Transwell 实验检测细胞侵袭

5×10^4 个髓核细胞按分组种入 24 孔板中, 1×10^4 个 HMEC-1 细胞种入 Transwell 上室中。分别培养贴壁。实验当天, 取各组髓核细胞条件培养基与 DMEM 完全培养基混合(1:1), 并加入种有 HMEC-1 细胞的 Transwell 下室中, 保证小室的半透膜淹没于下室培养基中但又不浸入上室, 共培养 12 h。小室浸入 4 % 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗, 再浸入 0.1 % 结晶紫溶液染色 10 min, PSB 漂洗。倒置荧光显微镜采集图像, ImageJ 软件分析图像。

1.8 血管内皮细胞管腔形成实验

提前 1 天将 Matrigel 基质胶在 4 °C 下解冻过夜, 用无血清 DMEM 培养基 1:1 比例稀释, 将稀释好的基质胶加入 24 孔板中, 每孔 300 μ L。放入 37 °C、5 % CO₂ 培养箱中凝固待用。HMEC-1 细胞血清饥饿过夜, 消化并用各组髓核细胞条件培养基与 DMEM 完全培养基的混合液(1:1)重悬。将各组 HMEC-1 细胞悬液分别加入基质胶包被的 24 孔板中。4 h 后显微镜下观察成管情况, Image J 软件分析图像。

1.9 免疫荧光检测髓核细胞中 TGF- β 1 表达

将各组髓核细胞消化后铺至 6 孔板中, 正常培养 24 h 后弃培养基, 加 4 % 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗后加 0.1 % Triton100 通透 15 分钟, PBS 冲洗, 5 % BSA 的封闭液室温封闭 30 min, 分别加适量用封闭液稀释的 TGF- β 1 一抗, 室温孵育 2 h, PBS 冲洗干净, 加稀释好的荧光标记的二抗于 37 °C 避光作用 1 h, 用稀释好的 DAPI 染细胞核, 封片并置于共聚焦显微镜下观察拍照。

1.10 ELISA 检测共培养细胞培养基中 TGF- β 1 含量

取各组 HMEC-1 细胞混合培养基为待测样本。ELISA 试剂盒测定 TGF- β 1 的含量, 具体操作步骤依照试剂盒说明书进

行。反应终止后, 采用酶标仪测量 450 nm 处的 OD 值。

1.11 统计学分析

数据统计采用 SPSS 19.0 软件, 作图工具采用 Graphpad5.01, 两组间比较采用 t 检验, 多组件比较采用 F 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA 芯片筛选结果

与对照组对比, IDD 组表达差异见图 1 及表 1, 其中 miR-27a、miR-551b、miR-1288 及 miR-450b 上调表达差异较明显 (fold change > 2), miR-155、miR-510 及 miR-492 下调表达差异较明显 (fold change < 0.5)。

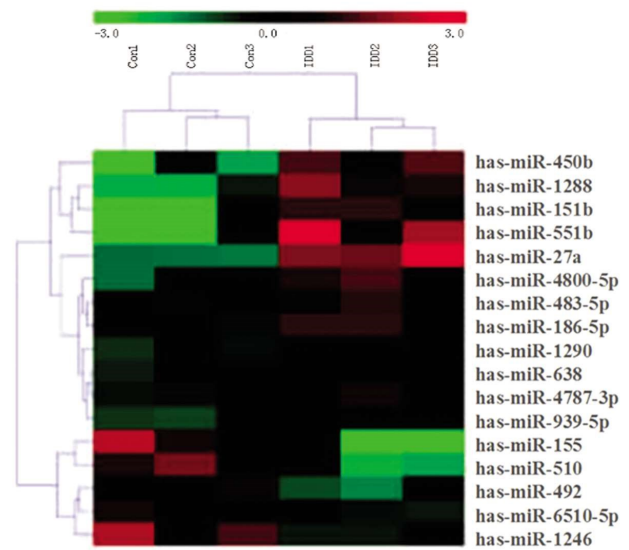


图 1 髓核组织中差异表达的 miRNA

Fig. 1 Differentially expressed miRNA in nucleus pulposus

表 1 髓核组织中差异表达的 miRNA

Table 1 Differentially expressed miRNA in nucleus pulposus

	miRNAs	fold change	P value
Up	miR-27a	5.341	<0.001
	miR-551b	3.215	<0.001
	miR-1288	2.732	<0.001
	miR-450b	2.324	<0.001
Down	miR-155	0.323	<0.001
	miR-510	0.387	<0.001
	miR-492	0.416	<0.001

2.2 miR-27a 在椎间盘组织中的表达水平验证

采用 RT-qPCR 和荧光原位杂交实验分别检测对照组和 IDD 组椎间盘组织中 miR-27a 的表达水平。如图 2 所示, RT-qPCR 结果显示 IDD 组 miR-27a 表达为对照组的 5.5 倍, 与芯片结果一致; 荧光原位杂交结果显示, 与对照组相比, IDD 组中 miR-27a 荧光强度明显加强, 提示 IDD 组 miR-27a 表达量显著增加 ($P < 0.05$)。

2.3 miR-27a 对髓核细胞 SPRY2 表达的靶向调控

如图 3 所示, miR-27a 过表达时可明显抑制 SPRY2 的表

达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而敲低 miR-27a 后 SPRY2 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。通过 Target Scan 网站预测 miR-27a 与 SPRY2 的关系, 发现二者具有互补结合序列。荧光素酶报告基因实验结果显示过表达 miR-27a 后能显著抑制转染 SPRY2 野生型质粒组的荧光素酶活性 ($P < 0.05$), 而对突变组的荧光素酶活性无影响 ($P > 0.05$), 提示 miR-27a 能靶向调控并抑制 SPRY2 的表达。

2.4 髓核细胞通过 miR-27a/SPRY2 影响血管内皮细胞的侵袭能力

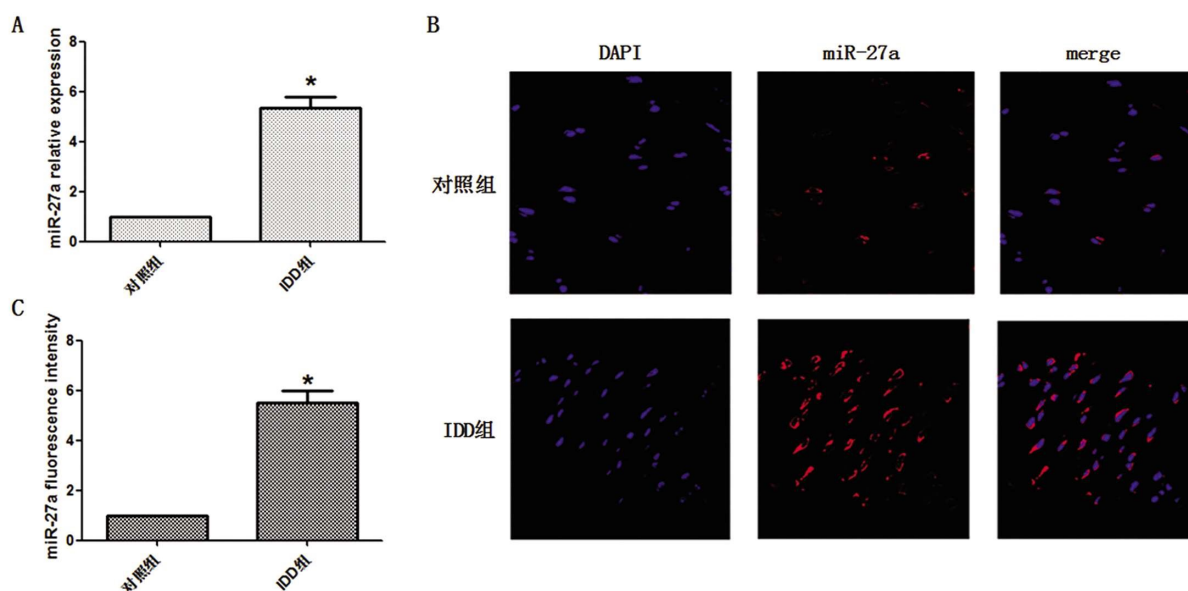


图2 miR-27a 在椎间盘组织中的表达验证

Fig. 2 Verification of miR-27a expression in intervertebral disc tissue

注:A: qRT-PCR 检测 miR-27a 在各组椎间盘组织中的表达(与对照组比较, $*P<0.05$); B: 荧光原位杂交检测 miR-27a 在各组椎间盘组织中的表达($SP \times 100$); C: 荧光强度定量分析(与对照组比较, $*P<0.05$)。

Note: A: The expression of miR-27a in the intervertebral disc tissues of each group was detected by qRT-PCR (compared to the control group, $*P<0.05$); B: The expression of miR-27a in the intervertebral disc tissues of each group was detected by fluorescence in situ hybridization; C: Quantitative analysis of fluorescence intensity(compared to the control group, $*P<0.05$).

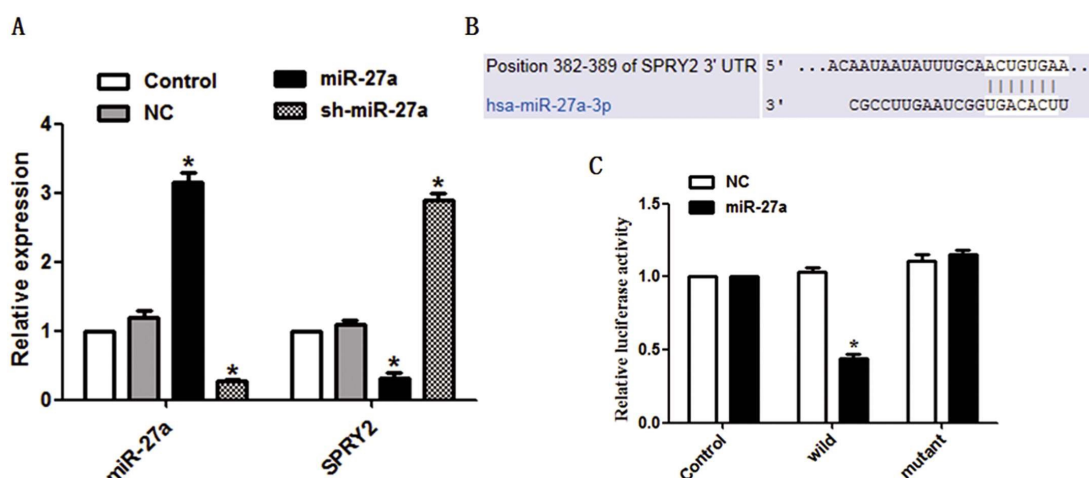


图3 miR-27a 对 SPRY2 表达的靶向调控

Fig. 3 miR-27a targeted regulation of SPRY2 expression

注:A: qRT-PCR 检测 miR-27a 和 SPRY2 mRNA 表达(与 NC 组比较, $*P<0.05$); B: Target Scan 网站预测 miR-27a 与 SPRY2 的互补结合序列; C: 双荧光素酶报告基因检测(与 NC 组比较, $*P<0.05$)。

Note: A: qRT-PCR detection of miR-27a and SPRY2 mRNA expression (compared with NC group, $*P<0.05$); B: Target Scan website predicts the complementary binding sequence of miR-27a and SPRY2; C: Double luciferase reporter gene detection (compared with NC group, $*P<0.05$).

为了验证髓核细胞是否能通过 miR-27a/SPRY2 影响 HMEC-1 细胞的侵袭能力, 将接受不同处理的髓核细胞与 HMEC-1 细胞共培养, 观察各组髓核细胞对 HMEC-1 细胞侵袭能力的影响。结果如图 4 所示, 与 NC 组相比, miR-27a 组侵袭细胞数明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而过表达 SPRY2 组侵袭细胞数则明显减少 ($P<0.05$)。与 miR-27a 组相比, miR-27a+SPRY2 组侵袭细胞明显减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。提示过表达 miR-27a 后, 可明显促进 HMEC-1 细胞

的侵袭能力, 而在过表达 miR-27a 的基础上过表达 SPRY2, 能逆转由 miR-27a 对 HMEC-1 细胞的侵袭能力的促进作用。

2.5 髓核细胞通过 miR-27a/SPRY2 影响血管内皮细胞的成血管能力

通过管腔形成实验观察各组髓核细胞对 HMEC-1 细胞成血管能力的影响。将不同处理后髓核细胞的条件培养基与 HMEC-1 细胞共培养, 结果如图 5 所示, 与 NC 组相比, 当过表达 miR-27a 后, 可明显观察到管腔样结构, 差异有统计学意义

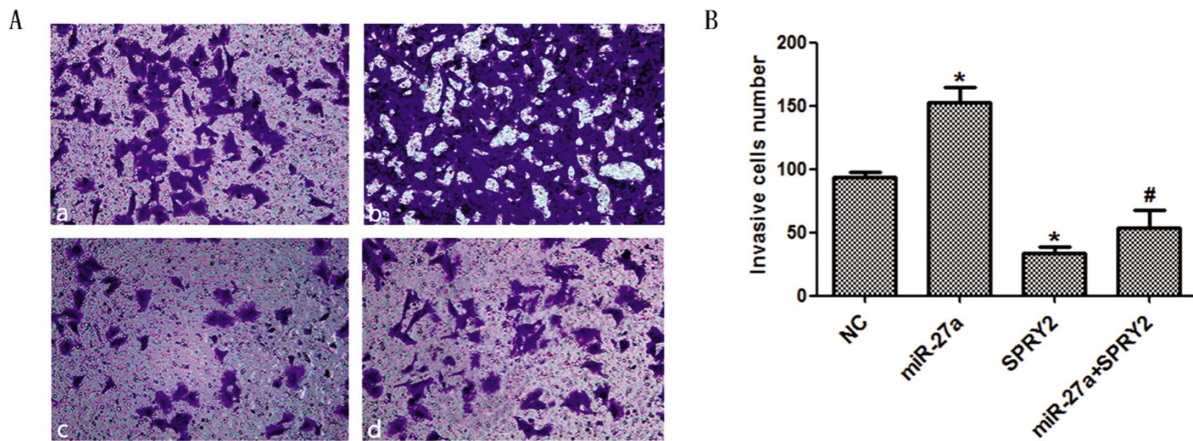


图4 过表达 miR-27a 对 HMEC-1 细胞侵袭能力的影响 (SP × 200)

Fig. 4 The effect of miR-27a overexpression on the invasion ability of HMEC-1 cells

注:a:NC 组;b:miR-27a 组;c:SPRY2 组;d:miR-27a+ SPRY2 组;与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 miR-27a 组比较, # $P<0.05$ 。

Note: a: NC group; b: miR-27a group; c: SPRY2 group; d: miR-27a + SPRY2 group; compared with NC group,

* $P<0.05$; compared with miR-27a group, # $P<0.05$.

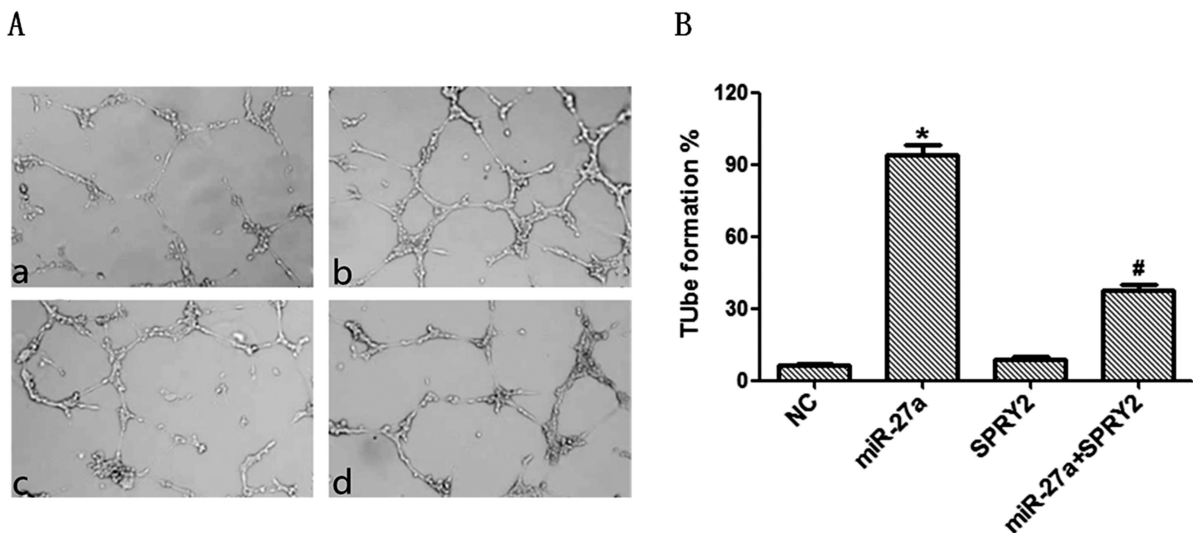


图5 过表达 miR-27a 对 HMEC-1 细胞管腔形成能力的影响 (SP × 200)

Fig. 5 The effect of overexpression of miR-27a on the luminal forming ability of HMEC-1 cells

注:a: NC 组;b:miR-27a 组;c:SPRY2 组;d:miR-27a+ SPRY2 组;与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 miR-27a 组比较, # $P<0.05$ 。

Note: a: NC group; b: miR-27a group; c: SPRY2 group; d: miR-27a + SPRY2 group; compared with NC group,

* $P<0.05$; compared with miR-27a group, # $P<0.05$.

($P<0.05$), 而过表达 SPRY2 组, 未见管腔样结构形成。与 miR-27a 组相比, miR-27a+SPRY2 组管腔样结构显著减少, 差异有统计学意义($P<0.05$)。提示过表达 miR-27a 后, 可明显促进 HMEC-1 细胞的成血管能力, 而在过表达 miR-27a 的基础上过表达 SPRY2, 能显著抑制由 miR-27a 对 HMEC-1 细胞成管能力的促进作用。

2.6 各组髓核细胞及混合培养基中 TGF- β 1 表达情况

免疫荧光检测各组髓核细胞中 TGF- β 1 的表达水平, ELISA 检测各组混合培养液中 TGF- β 1 的表达水平。结果如图 6 所示, TGF- β 1 位于髓核细胞胞质内, 与 NC 组相比, miR-27a 组髓核细胞和培养液中 TGF- β 1 均明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$); 而过表达 SPRY2 后, 髓核细胞和培养液中 TGF- β 1 明显减少, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与 miR-27a 组相比, miR-27a+SPRY2 组髓核细胞和培养液内 TGF- β 1 显著减

少, 差异有统计学意义($P<0.05$), 表明 miR-27a 促进髓核细胞 TGF- β 1 的表达和分泌, 而进一步过表达 SPRY2 能够逆转这种情况。

3 讨论

椎间盘是人体中最大的无血管器官, 然而随着 IDD 的进展, 椎间盘趋向于血管化^[12]。现有研究表明退化髓核细胞可诱导血管内皮细胞的迁移造成血管生成, 然而其分子机制尚不完全清楚。多项基因芯片对比研究^[13,14]发现, 退变髓核细胞中 miRNA 的表达与正常髓核细胞中存在显著差异, 这些差异表达的 miRNA 通过调控其各自的上下游通路可能参与髓核细胞的退变进程, 包括调控髓核细胞凋亡、增殖, 通过基质金属蛋白酶家族调控细胞外基质稳态失衡, 调控炎症因子的分泌等等。研究表明^[15,16], miR-27a 可通过抑制髓核细胞凋亡、促进髓核细

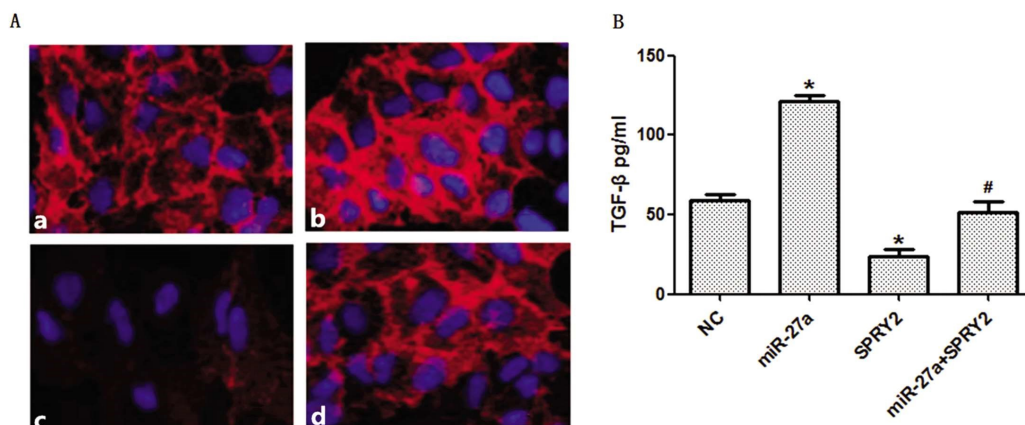


图6 各组培养液中 TGF-β1 表达情况 (SP × 200)

Fig. 6 TGF-β1 expression in culture medium of each group

注: A: 免疫荧光检测 TGF-β1 的表达水平; B: ELISA 检测 TGF-β1 的表达水平;

(a: NC 组; b: miR-27a 组; c: SPRY2 组; d: miR-27a + SPRY2 组; 与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 miR-27a 组比较, # $P < 0.05$)。

Note: A: Immunofluorescence detection of TGF-β1 expression level; B: ELISA detection of TGF-β1 expression level; (a: NC group; b: miR-27a group; c: SPRY2 group; d: miR-27a + SPRY2 group; Compared with NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-27a group, # $P < 0.05$).

胞释放炎症因子等机制在椎间盘退变进展中发挥重要作用。本研究通过基因芯片筛选对照组和 IDD 组椎间盘组织中差异表达的 miRNA, 也发现 IDD 组中 miR-27a 上调倍数明显, 进一步通过 RT-qPCR 和荧光原位杂交实验证明 IDD 组中 miR-27a 的表达上升显著, 提示 miR-27a 在椎间盘退变中的重要性。

SPRY2 蛋白是 Sprouty 蛋白家族的成员之一。研究表明, SPRY2 可在多种肿瘤细胞中表达下调, 与肿瘤细胞的异常增殖关系密切^[17-20]。除此之外, 还可在抑制细胞转化及新生血管生成等方面发挥重要作用^[21-23]。由于 miRNA 通过降解或阻遏靶基因的表达在各种疾病中发挥调控作用, 因此, 本研究设想 miR-27a 可能通过调节 SPRY2 的表达在 IDD 中发挥作用。生物信息学和荧光素酶报告基因实验证实 SPRY2 是 miR-27a 的靶蛋白, 表明 miR-27a 可能通过降解或阻遏 SPRY2 mRNA 的翻译, 使 SPRY2 在细胞中差异性表达, 进而调控下游通路的激活。侵袭实验和管腔形成实验也证实了这一点, 髓核细胞中 miR-27a 的过表达抑制了 SPRY2 的表达, 进而促进了 HMEC-1 细胞的侵袭能力和成血管能力, 而恢复 SPRY2 的表达后逆转了上述现象, 提示髓核细胞能通过 miR-27a/SPRY2 促进 HMEC-1 细胞的侵袭和血管生成能力。

新生毛细血管的出现可能是椎间盘退变后自体修复损伤的反应^[24]。在修复过程中, 新生肉芽组织的血管结构通常沿着纤维环裂隙长入退变椎间盘的内部, 并伴有大量生长因子和细胞因子, 如 TGF-β1、碱性成纤维细胞生长因子 bFGF、结缔组织生长因子 CTGF 等将引起椎间盘细胞进一步变性和分化^[6, 25, 26]。研究表明 TGF-β 家族成员对血管新生具有促进作用, 其中 TGF-β1 是具有多种功能的分化和生长调控因子, 在炎症反应及组织修复中发挥重要作用^[27-29]。生长因子信号通路主要由受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)激活, SPRY2 是 RTK 等信号通路的抑制因子^[30-32], Lovicu^[33]等人的研究表明 SPRY2 能够抑制 TGF-β 信号通路, 进而抑制纤维化的发展。本研究也发现髓核细胞中 SPRY2 能够抑制 TGF-β1 的表达, 证实髓核细胞能通过 miR-27a/SPRY2 通路调节 TGF-β1 的表达,

进而诱导 HMEC-1 细胞的侵袭和血管生成能力。

总之, 本研究成功建立了髓核细胞和血管内皮细胞相互作用的体外模型, 证明髓核细胞能通过 miR-27a 抑制 SPRY2 的表达, 促进 TGF-β1 的产生并诱导 HMEC-1 细胞侵袭和血管生成能力增强。为体内实验的进行提供了基础, 也为 IDD 的研究提供了新的靶点和思路。

参考文献(References)

- [1] Liu Y, Yu T, Ma XX, et al. Lentivirus-mediated TGF-beta3, CTGF and TIMP1 gene transduction as a gene therapy for intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11 (4): 1399-1404
- [2] Navone S E, Marfia G, Giannoni A, et al. Inflammatory mediators and signalling pathways controlling intervertebral disc degeneration [J]. *Histology and histopathology*, 2017, 32(6): 523-542
- [3] Ping Liu, Feng Chang, Ting Zhang, et al. Downregulation of microRNA-125a is involved in intervertebral disc degeneration by targeting pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 [J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017, 20(11): 1260-1267
- [4] Christian Waldenberg, Hanna Hebelka, Helena Brisby, et al. MRI histogram analysis enables objective and continuous classification of intervertebral disc degeneration [J]. *European Spine Journal*, 2017, 27 (9178): 1-7
- [5] Zhao K, Zhang Y, Kang L, et al. Epigenetic silencing of miRNA-143 regulates apoptosis by targeting BCL2 in human intervertebral disc degeneration [J]. *Gene*, 2017, 628: 259-266
- [6] Bo Sun, Nishant Dwivedi, Tyler J Bechtel, et al. Citrullination of NF-κB p65 promotes its nuclear localization and TLR-induced expression of IL-1β and TNFα [J]. *Science Immunology*, 2017, 2(12)
- [7] 张晗祥, 何斌, 胡侦明. SDF1/CXCR4 信号轴在退变髓核细胞诱导血管新生中的作用 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(05): 72-79
- [8] Lin T, Ma Q, Zhang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in human osteosarcoma by targeting CCNG1 [J]. *Oncology Letters*, 2017, 15(1): 1067-1071
- [9] Silvestris N, Danza K, Longo V, et al. Angiogenesis in adenosquamous

- cancer of pancreas[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95773-95779
- [10] Liu Gang, Cao Peng, Chen Huajiang, et al. MiR-27a Regulates Apoptosis in Nucleus Pulposus Cells by Targeting PI3K[J]. *Plos One*, 2013, 8(9): e75251
- [11] Pfirrmann CWA, Metzdorf A, Zanetti M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001, 26: 1873-1878
- [12] Middendorp M, Vogl T J, Kollias K, et al. Association between intervertebral disc degeneration and the Oswestry Disability Index[J]. *J Back Musculoskelet Rehabil*, 2017, 30(4): 819
- [13] Kong L, Sun M, Jiang Z, et al. MicroRNA-194 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6)[J]. *Medical Science Monitor*, 2018, 24: 3056-3067
- [14] Xiaotong Meng, Yue Zhu, Lin Tao, et al. MicroRNA-125b-1-3p mediates intervertebral disc degeneration in rats by targeting teashirt zinc finger homeobox 3 [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2018, 15(3): 2627
- [15] Hu P, Feng B, Wang G, et al. Microarray based analysis of gene regulation by microRNA in intervertebral disc degeneration [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(4): 4925-4930
- [16] Zhenguo Cao, Liang Chen. Inhibition of miR 27a suppresses the inflammatory response via the p38/MAPK pathway in intervertebral disc cells [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2017, 14(5): 4572-4578
- [17] Jiang, Meng, Ma, Weiyuan, Gao, Yumei, et al. IL-22 induced miR-122-5p promotes keratinocyte proliferation by targeting Sprouty2[J]. *Experimental Dermatology*, 2017, 26(4): 368-374
- [18] Li Y, Chen H, She P, et al. microRNA-23a promotes cell growth and metastasis in gastric cancer via targeting SPRY2-mediated ERK signaling[J]. *ncology letters*, 2018, 5(6): 8433-8441
- [19] Zhao Q, Chen S, Zhu Z, et al. miR-21 promotes EGF-induced pancreatic cancer cell proliferation by targeting Spry2 [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(12): 1157
- [20] Samadai N, Salehipour P, Ayati M, et al. A potential clinical significance of DAB2IP and SPRY2 transcript variants in prostate cancer [J]. *Pathology Research and Practice*, 2018, 214 (12): 2018-2024
- [21] Ying-Fang, Wang, Hong-Yun, et al. Upregulation of microRNA-129-5p inhibits cell invasion, migration and tumor angiogenesis by inhibiting ZIC2 via downregulation of the Hedgehog signaling pathway in cervical cancer[J]. *Cancer biology & therapy*, 2018, 19(12): 1162-1173
- [22] Wang GB, Liu JH, Hu J, et al. MiR-21 enhanced glioma cells resistance to carmustine via decreasing Spry2 expression[J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2017, 21(22): 5065
- [23] Day E K, Sosale N G, Xiao A, et al. Glioblastoma Cell Resistance to EGFR and MET Inhibition Can Be Overcome via Blockade of FGFR-SPRY2 Bypass Signaling[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(10): 3383-3396
- [24] Tang P, Gu J M, Xie Z A, et al. Honokiol alleviates the degeneration of intervertebral disc via suppressing the activation of TXNIP-NLRP3 inflammasome signal pathway [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 120: 368-379
- [25] Han Z, Gao L, Shi Q, et al. Quantitative magnetic resonance imaging for diagnosis of intervertebral disc degeneration of the cervico-thoracic junction: a pilot study[J]. *American Journal of Translational Research*, 2018, 10(3): 925-935
- [26] Li Y, Cao L, Li J, et al. Influence of microgravity-induced intervertebral disc degeneration of rats on expression levels of p53/p16 and proinflammatory factors[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 17(2): 1367-1373
- [27] Patricia G Tremblay, Marc-André Sirard. Transcriptomic analysis of gene cascades involved in protein kinase A and C signaling in the KGN line of human ovarian granulosa tumor cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2017, 96(4): 855-865
- [28] Tang, Bian, Cheng, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits keloid fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen synthesis in vitro via the TGFβ/Smad and ERK signaling pathways[J]. *International journal of molecular medicine*, 2018, 41(3): 1487-1499
- [29] Justin Z, Alfiya S, Truskinovsky A M, et al. TGF-β signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association[J]. *Bmc Cancer*, 2018, 18(1): 670
- [30] Xu J, Yu X, Huang C, et al. Association of 5 well-defined polymorphisms in the gene encoding transforming growth factor-β 1 with coronary artery disease among chinese patients with hypertension[J]. *Angiology*, 2015, 66(7): 652-658
- [31] Shin, Eun Hae, Zhao, Guannan, Wang, Qian, et al. Sprouty gain of function disrupts lens cellular processes and growth by restricting RTK signaling[J]. *Developmental Biology*, 2015, 406(2): 129-146
- [32] 张利民, 包秀丽. Sprouty 调控转化生长因子-β 信号通路介导的上皮间充质转化抑制后囊膜混浊的研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2019, 39(7): 690-694
- [33] Lovicu F J, Shin E H, Mcavoy J W. Fibrosis in the lens. Sprouty regulation of TGFβ- signaling prevents lens EMT leading to cataract[J]. *Experimental Eye Research*, 2016, 142: 92-101