

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.005

过表达 MicroRNA-21 通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路调控人退变髓核细胞自噬的研究*

潘东晟¹ 张永峰¹ 吕艳红² 赵四平³ 李俊琴⁴ 王哲^{1Δ}

(1 空军军医大学附属西京医院脊柱外科 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学附属西京医院妇产科 陕西 西安 710032;

3 山西医科大学汾阳学院 山西 汾阳 032200; 4 空军军医大学附属西京医院再生医学实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨过表达 miR-21 通过 PTEN/PI3K/AKT 通路对人退变髓核细胞自噬的影响。**方法:**构建稳定过表达 miR-21 mimic 人退变髓核细胞, 转染无意义序列作为 miR-21 mimic control 组, 采用 RT-qPCR 检测转染效率; 利用 MDC 荧光染色法观察细胞自噬泡; Western-Blot 检测细胞自噬相关蛋白 LC3 和 P62 的表达以及 PTEN/PI3K/AKT 信号通路中关键蛋白 PTEN、PI3K 及 AKT 的表达水平。**结果:**RT-qPCR 结果表明 miR-21 mimic 转染成功且效率较高, 与 miR-21 mimic control 组及空白细胞对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。荧光显微镜观察 MDC 染色情况, miR-21 mimic 组的细胞中几乎没有发现自噬体, 而 miR-21 mimic control 组以及空白对照组细胞中自噬体均较多, 与前者相比差异均明显, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-21 mimic 组细胞中 LC3-II/LC3-I 表达量的比值均显著低于 miR-21 mimic control 组及空白对照组细胞 ($P < 0.05$); 而 P62 在 miR-21 mimic 组细胞中表达量显著高于 miR-21 mimic control 组及空白细胞对照组, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-21 mimic 组中 PTEN 蛋白的表达水平较低, 与另外两组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$); 磷酸化的 PI3K (p-PI3K) 和 AKT (p-Akt) 在 miR-21 mimic 组中均明显高于 miR-21 mimic control 组和空白细胞对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**miR-21 可以通过靶向沉默 PTEN, 促进 PI3K 和 AKT 发生磷酸化, 进而使 PTEN/PI3K/AKT 信号通路被激活, 最终抑制人椎间盘退变髓核细胞的自噬。

关键词:miR-21; 椎间盘退变髓核细胞; PTEN/PI3K/AKT; 细胞自噬

中图分类号:R-33; R681.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2626-06

Research of MicroRNA-21 Regulates Autophagia of Human Degenerative Nucleus Pulposus Cells via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway*

PAN Dong-sheng¹, ZHANG Yong-feng¹, LV Yan-hong², ZHAO Si-ping³, LI Jun-qin⁴, WANG Zhe^{1Δ}

(1 Department of Orthopedics, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of obstetric and gynaecology Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Fenyang college of Shanxi medical university, Fenyang, Shanxi, 032200, China;

4 Laboratory of regenerative medicine, Xijing hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of overexpression of miR-21 on autophagy of human degenerative nucleus pulposus cells via PTEN/PI3K/AKT pathway. **Methods:** The stable overexpression of miR-21 mimic in human degenerated nucleus pulposus cells was constructed, and the meaningless sequence was transfected as miR-21 mimic control group. The transfection efficiency was detected by RT-qPCR. The autophagy vesicles were observed by MDC fluorescence staining. Western Blot was used to detect the expression of autophagy related proteins LC3 and P62, as well as the expression levels of PTEN, PI3K and AKT, key proteins in the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. **Results:** RT-qPCR showed that transfection of miR-21 mimic was successful and efficient, which was significantly different from that of miR-21 mimic control group and blank cell control group ($P < 0.05$). The results of MDC staining observed by Fluorescence microscopy, showed that autophagosomes were hardly found in cells of miR-21 mimic group, while miR-21 mimic control group and blank control group had more autophagosomes, which were significantly different from the former ($P < 0.05$). The ratio of LC3-II/LC3-I expression in miR-21 mimic group cells was significantly lower than that in miR-21 mimic control group and blank control group ($P < 0.05$). While the expression of P62 in miR-21 mimic group was significantly higher than that in miR-21 mimic control group and blank cell control group, which had statistical significance ($P < 0.05$). MiR-21 mimic group had a low expression level of PTEN protein, which was statistically significant compared with the other two groups ($P < 0.05$). Phosphorylated PI3K (p-pi3k) and AKT (p-akt) in miR-21 mimic group were higher than that in miR-21 mimic control group and blank cell control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions:** MiR-21 can promote the phosphorylation of PI3K and AKT by targeting silencing PTEN, which can activate the PTEN/PI3K/AKT signal pathway, ultimately inhibit the autophagy of the degenerative nucleus pulposus cells of

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81070996; 11274249); 陕西省社会发展攻关基金项目(2011K14-07-14)

作者简介: 潘东晟(1988-), 硕士, 主要研究方向: 脊柱诊断治疗, E-mail: sdchexiangming@163.com, 电话: 18392421842

Δ 通讯作者: 王哲(1969-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事脊柱脊髓损伤方面研究

(收稿日期: 2018-12-05 接受日期: 2018-12-28)

human intervertebral disc.

Key words: miR-21; Intervertebral disc degeneration of nucleus pulposus cells; PTEN/PI3K/AKT; Cell autophagy

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

Article ID: 1673-6273(2019)14-2626-06

前言

椎间盘退变性疾病(IDDD)是一类常见的以颈肩、腰腿痛为主要症状的慢性病,如椎间盘突出、退变性椎管狭窄、颈椎病等,极其影响人们的日常生活,严重者会致残。该种疾病被认为与多种因素有关,外在因素包括年龄、饮酒、异常机械载荷、过度劳累等,内在因素有各类细胞因子、信号通路、遗传基因、MicroRNA、氧化应激、NO诱导等^[1-4]。椎间盘外层纤维环破裂、内层髓核突出、上下软骨终板钙化及椎间隙高度丢失是该病的主要病理特征^[5,6]。髓核细胞是椎间盘的主要组成之一,相关研究发现椎间盘退变性疾病中该细胞活性明显降低甚至死亡,数量减少,细胞外基质代谢失衡^[7]。关于椎间盘退变性疾病病理机制尚没有统一的定论,但不少观点认为与髓核细胞的生理状况关系密切^[8]。自噬是细胞程序性死亡(PCD)的方式之一,属于II类PCD。自噬过程中形成的自噬体和自噬溶酶体是自噬的特征性产物。自噬对细胞的双重作用表现为,适宜的自噬水平对细胞发挥保护作用,过度自噬则会使细胞发生死亡^[9,10]。文献显示椎间盘退变性疾病的发生过程伴随着细胞自噬^[11],但其作用机制有待进一步研究。此外,有研究报道miRNAs通过正负双向调节进而调控细胞的自噬水平,对细胞的生理平衡进行干预。MicroRNA-21是miRNAs家族中的重要成员,能够通过抑制老鼠关节软骨组织细胞的自噬来调节其活性^[12-14]。椎间盘组织同样是一种纤维软骨组织,然而关于MicroRNA-21与人椎间盘组织中细胞自噬的关系研究甚少。基于以上观点,本研究拟通过PTEN/PI3K/AKT信号通路,进一步研究MicroRNA-21在人椎间盘退变髓核细胞自噬中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要细胞、试剂和仪器

人椎间盘退变髓核细胞由本实验制备、鉴定并保存。

DMEM、FBS、双抗、0.25%胰酶购自Gibico公司;miR-21 mimic与miR-21 mimic control由广州锐博生物公司合成;脂质体Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent于美国Invitrogen公司采购;PCR、反转录试剂盒购自天根;SD-001/SD-002动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒购自英文特生物技术北京有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购自康为世纪;LC3A/B(D3U4C) Rabbit mAb、SQSTM1/P62 Rabbit mAb、PTEN Rabbit mAb、Anti-PI3K p85 (phospho Y607) antibody及Phospho-Akt(Ser473)(D9E) Rabbit mAb一抗购自Santa公司;内参GAPDH抗体、HRP标记的羊抗兔IgG二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。

JB-CJ-2FX型超净工作台;SVSC-3263型震荡培养箱;Thermo细胞培养箱;荧光显微镜;流式细胞仪;5810R型高速离心机。

1.2 细胞制备及培养

人椎间盘退变髓核组织由本院脊柱外科提供,于2018年

7月至10月进行手术治疗收集并妥善保存。患者年龄在30-50岁,男女各6例,无其它脊柱外伤及影响手术病史。在无菌超净工作台内,将收集的病变髓核组织小心取出,加D-Hanks液反复浸泡清洗干净,用灭菌手术剪刀将组织剪成 $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ 大小碎块,加入适量在37℃水浴箱中预热的含0.25%胰酶进行消化,肉眼观察组织无明显块状后,加适量胎牛血清(FBS)终止消化并吸入离心管中离心1000 r/min,10分钟,转至超净台,弃上清,加入2 mL含有10%FBS的DMEM培养基将细胞轻轻吹打散开,吸至培养瓶中,再补加适量含有10%FBS的DMEM培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱中静置培养,2~3天后用倒置显微镜观察细胞生长情况,隔一天换一次培养液,当细胞融合度达到80%~90%时需要传代培养。经过化学染色对制备的细胞进行表型鉴定确认为人退变髓核细胞。若制备细胞量大或暂时不使用,可以加细胞冻存液后置于液氮中冻存,待用时取出复苏培养即可。

1.3 miR-21 mimic 转染人椎间盘退变髓核细胞

将人退变髓核细胞按 1×10^6 密度铺于6孔板中培养,转染前24 h,细胞单层长到85%左右时,弃掉原培养液,换为无RNase的培养液继续培养,待转染用。按照转染试剂Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent说明书将miR-21 mimic转染至备用细胞中,轻轻晃动混匀后,将6孔板继续置于37℃、5% CO₂培养箱培养,6 h后,弃培养液,重新换成完全培养液。同时设置miR-21 mimic control转染组及空白细胞对照组。

1.4 RT-qPCR 检测 miR-21 mimic 的转染效率

转染48 h后,分别收集转染了miR-21 mimic和miR-21 mimic control的细胞以及空白对照组细胞,用Trizol法提取各自总RNA并进行反转录,以反转录得到的cDNA为模板,采用RT-qPCR方法检测miR-21的转染效率。同时以U6作为内参基因。每个样本均重复进行3次实验。

1.5 MDC 荧光染色法检测细胞自噬泡

将转染后继续培养48 h的六孔板中细胞取出,弃掉原培养液,每孔加适量PBS洗2遍,弃掉PBS后加适量终浓度为0.1 mM的MDC染料,在37℃条件下避光作用,45~60 min后置于室温并弃掉染料,加4%多聚甲醇对细胞进行固定,作用15 min后,每孔用适量PBS洗2遍,弃掉PBS,待干燥后立即将六孔板中细胞置于荧光显微镜下观察并拍照。随机选取200×视野下的100个细胞,对含有5个或5个以上点状荧光自噬泡的细胞进行计数,按以上方法选取3个不同视野计数,计算细胞自噬百分率并取平均值进行分析。

1.6 Western-Blot 检测细胞自噬相关蛋白 LC3 和 P62

转染48 h后,分别收集转染了miR-21 mimic和miR-21 mimic control的细胞以及空白对照组细胞,用动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒,提取收集细胞中总蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。将蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳后转至PVDF膜,加含有5%BSA的封闭液室温下封闭2 h。分

别加用封闭液 1:1000 稀释的 LC3A/B (D3U4C) Rabbit mAb 一抗、1:1000 稀释的 SQSTM1/P62 Rabbit mAb 一抗,置于 4 °C 冰箱孵育过夜。次日, PBST 洗膜三次,每次 10min,再分别加稀释好的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h, PBST 洗膜,加 ECL 进行显色,暗室曝光拍照,同时以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.7 Western-Blot 检测细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT 蛋白

将转染了 miR-21 mimic 和 miR-21 mimic control 的细胞以及空白对照组细胞继续培养 48 h 后,分别收集三组中的细胞,用动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒,提取收集细胞中总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜,加含有 5%BSA 的封闭液室温下封闭 2 h。分别加用封闭液 1:1500 稀释的一抗 PTEN Rabbit mAb、Anti-PI3K p85 (phospho Y607) antibody 及 Phospho-Akt(Ser473)(D9E) Rabbit mAb,置于 4 °C 冰箱孵育过夜。次日, PBST 洗膜三次,每次 10 min,再分别加稀释好的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h, PBST 洗膜,加 ECL 进行显色,暗室曝光拍照,同时以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.8 统计学分析方法

数据分析采用软件 SPSS16.0,计量资料采用平均值±标准差来表示,多组间采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 mimic 在人椎间盘退变髓核细胞中的转染效率

采用 RT-qPCR 检测转染了 miR-21 mimic 和 miR-21 mimic control 的细胞组以及空白细胞对照组,以 U6 作为内参基因,以空白细胞对照组作为标准,转染 miR-21 mimic 的细胞组中 miR-21 水平较高,与转染 miR-21 mimic control 的细胞组和空白细胞对照组差异显著,具有统计学意义 ($P < 0.05$),而转染

miR-21 mimic control 的细胞组与空白细胞对照组相比差异不明显 ($P > 0.05$) (图 1)。这一结果表明 miR-21 mimic 转染成功且效率较高,与预期相符且满足实验要求。

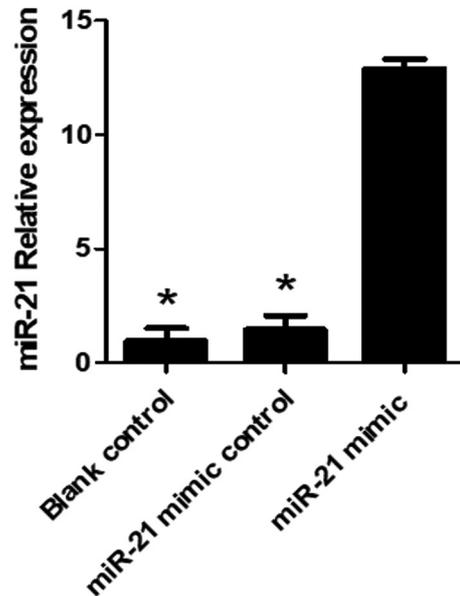


图 1 miR-21 mimic 的转染效率

Fig.1 Transfection efficiency of mir-21 mimic Compared with miR-21 mimic, * $P < 0.05$

2.2 miR-21 对人椎间盘退变髓核细胞自噬泡的影响

采用 MDC 荧光染色法检测人椎间盘退变髓核细胞中的自噬泡,通过荧光显微镜观察,转染 miR-21 mimic 的细胞中几乎没有发现自噬体;转染 miR-21 mimic control 的细胞以及空白细胞中自噬体均增多,与前者相比均差异明显,具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2,3)。此结果启示我们,miR-21 对人椎间盘退变髓核细胞中自噬泡的形成起到抑制作用。

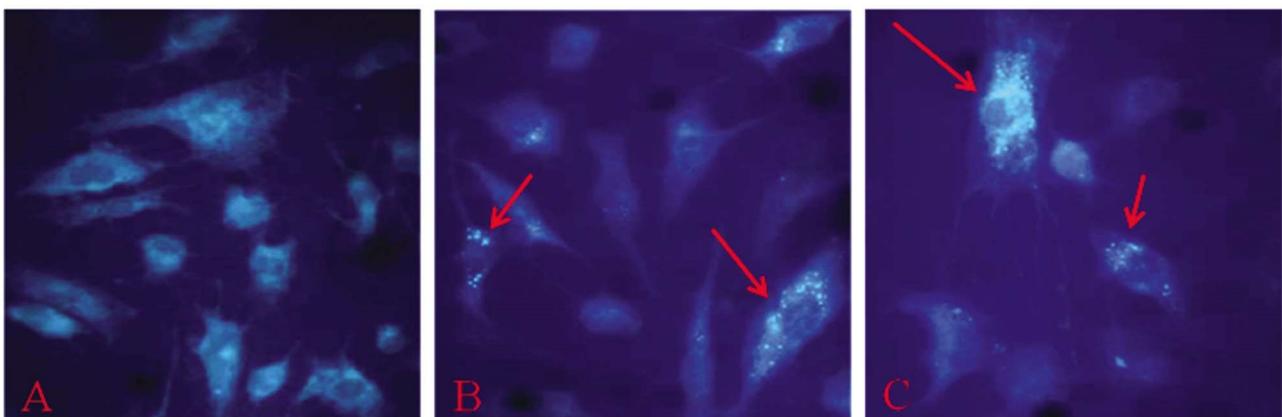


图 2 MDC 对退变髓核细胞的荧光染色 (10× 20)

Fig.2 Fluorescence staining of MDC on degenerated nucleus pulposus cells (10× 20)

A: miR-21 mimic; B: miR-21 mimic control; C: Blank control
(The red arrow indicates the presence of autophagosome cells)

2.3 miR-21 对人椎间盘退变髓核细胞自噬相关蛋白的影响

经 Western-Blot 分别检测三组细胞中自噬相关蛋白 LC3 和 P62 的表达,以 GAPDH 作为内参蛋白。结果显示,转染

miR-21 mimic control 的细胞组中 LC3-II/LC3-I 表达量的比值与空白细胞对照组无明显差异 ($P > 0.05$),而转染 miR-21 mimic 的细胞组中,LC3-II/LC3-I 表达量的比值较低,且与前两组差异

显著,具有统计学意义($P<0.05$)。P62 在转染 miR-21 mimic 的细胞中表达量显著高于转染 miR-21 mimic control 的细胞及空白组细胞,具有统计学意义($P<0.05$)。(图 4)。

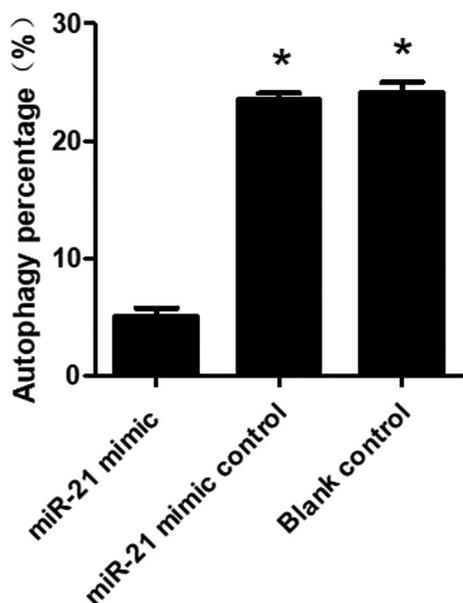


图 3 退变髓核细胞的自噬百分率

Fig.3 Autophagy percentage of degenerated nucleus pulposus cells Compared with miR-21 mimic,* $P<0.05$

2.4 Western-Blot 检测 miR-21 调控 NP 细胞自噬中 PTEN、PI3K 及 AKT 蛋白

采用 Western-Blot 分别检测三组细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT 蛋白的表达情况,以 GAPDH 作为内参蛋白。转染 miR-21 mimic 的细胞组中 PTEN 蛋白的表达量较低,分别与转染 miR-21 mimic control 的细胞组和空白细胞对照组相比,差异均显著,有统计学意义($P<0.05$),而后两组之间相比差异不显著,无统计学意义($P>0.05$)。磷酸化的 PI3K(p-PI3K)和 AKT (p-Akt) 在转染 miR-21 mimic 的细胞组中均明显高于转染 miR-21 mimic control 的细胞组和空白细胞对照组,差异显著且有统计学意义($P<0.05$),同样,后两组之间相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

近年来,人们的生活水平得到显著提高,然而越来越多的人却遭受着各种慢性病的困扰,身心健康及生活质量受到严重影响。椎间盘退变性疾病 (IDDD)便是常见而多发的一系列综合性慢性病,包括颈椎病、腰椎间盘突出、椎间盘源性腰痛、腰椎滑脱和腰椎管狭窄等^[15,16]。椎间盘退变引起的下腰痛是一个全世界都面临的公共健康问题,因为绝大部分人的生命中至少会有一次下腰痛的经历,另外长期遭受椎间盘退变性疾病的人群也不在少数^[17]。当前,关于该类疾病的治疗,在患病早期主要

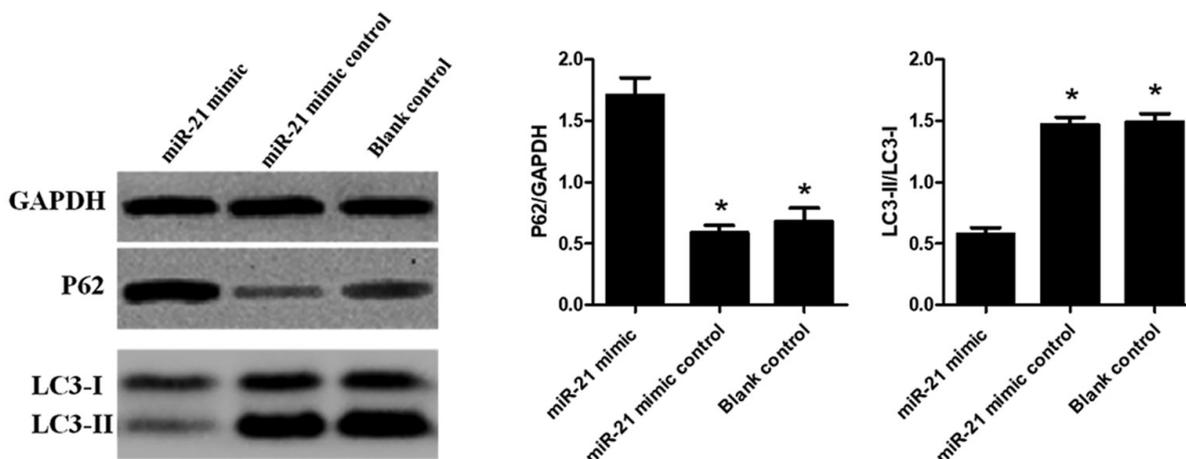


图 4 自噬相关蛋白的表达分析

Fig.4 Expression analysis of autophagy related proteins Compared with miR-21 mimic,* $P<0.05$

采取保守疗法,晚期选择手术治疗,尽管如此,也只能缓解症状,暂缓患者痛苦^[18-20]。因此,为找到根除该类疾病的有效治疗方法,明确其发病机制成为十分重要且必要的事情。

MicroRNA (miRNA) 是存在于真核生物中一类长度为 18~25 nt 的非编码单链小分子 RNA,其发夹结构是由经 Dicer 酶加工的单链 RNA 前体(包含约 70~90 个碱基)形成,能够与特定靶基因相结合进而参与调控转录后基因的表达。其作用机理主要是直接结合在特定的靶信使 RNA 的 3' 非转录区,促使靶 RNA 发生降解或者翻译受到抑制,从而使目的基因的表达受到影响^[21,22]。miRNA 家族包括诸多成员,相关研究发现,miR-155 在退变髓核细胞中表达量比正常髓核细胞中显著降低^[23],且能抑制髓核细胞凋亡。miR-210 在退变髓核细胞中高表

达并能降低细胞自噬水平,同时能促进细胞凋亡^[24]。

关于 miR-21,相关研究报道,在老鼠模型中,它能抑制软骨细胞自噬相关复合物的形成,从而对细胞活性发挥调控作用^[25]。在同样属于纤维软骨样组织的人椎间盘组织中,我们推测 miR-21 同样能够对髓核细胞的自噬进行调控,在椎间盘退变中发挥重要作用。为此,我们首先将化学合成的 miR-21 mimic 采用脂质体转染法将其转染至人退变髓核细胞中实现过表达 miR-21,采用 RT-qPCR 方法检测 miR-21 的转染效率,结果表明 miR-21 mimic 转染成功且效率较高,与 miR-21 mimic control 组及空白细胞对照组相比,差异显著,与预期相符且满足实验要求。为明确 miR-21 是否影响人椎间盘退变髓核细胞的自噬,首先采用 MDC 荧光染色法检测细胞中的自噬泡,通过荧

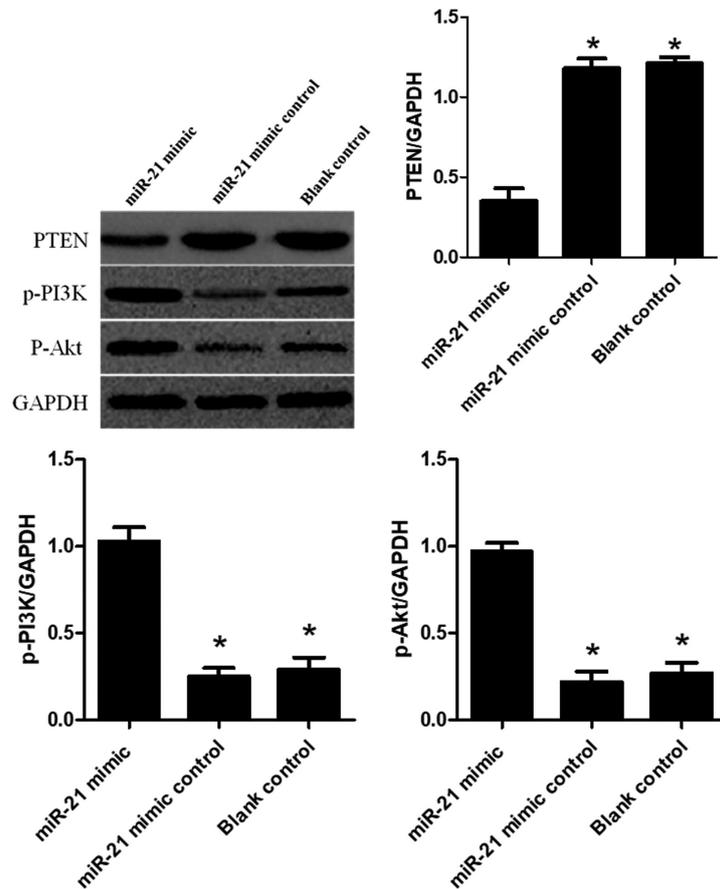


图5 miR-21 对 NP 细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT 蛋白的影响

Fig.5 Effect of miR-21 on PTEN, PI3K and AKT proteins in NP cells

Compared with miR-21 mimic,* $P < 0.05$

光显微镜观察到, 转染 miR-21 mimic 的细胞中几乎没有发现自噬体, 转染 miR-21 mimic control 的细胞以及空白细胞中自噬体均增多, 与前者相比差异明显, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这一结果启示我们, miR-21 在人椎间盘退变髓核细胞自噬中发挥作用, 并且对自噬泡的形成起到抑制作用。其次, P62 (SQSTM1) 和 LC3 是细胞自噬这一动态过程中的两个特异性蛋白。在自噬活化过程中, LC3-I 是首先由 LC3 形成的一种模型蛋白, LC3-II 则是由 LC3-I 裂解而来的游离型胞浆蛋白, LC3-II/LC3-I 两者的比值通常用来评价自噬水平的高低。P62/SQSTM1 是在自噬过程中, 溶酶体降解的阶段性标志物, 细胞自噬水平与其表达水平呈反比^[15,16,26,27]。因此, 通过 P62 和 LC3 的表达及活化情况可以判断细胞自噬水平。本研究同时采用 Western-Blot 方法检测细胞中自噬相关蛋白 LC3 和 P62 的表达情况, 结果显示, LC3-II/LC3-I 表达量的比值在转染 miR-21 mimic 的细胞组中明显较低, 与转染 miR-21 mimic control 的细胞组及空白细胞对照组相比差异显著, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而转染 miR-21 mimic 的细胞中 P62 的表达量显著高于转染 miR-21 mimic control 的细胞及空白组细胞, 同样具有统计学意义 ($P < 0.05$)。此结果表明转染 miR-21 mimic 的细胞自噬水平较低, 进一步证实 miR-21 在人椎间盘退变髓核细胞自噬过程中是起抑制作用的。PTEN 作为一种抑癌基因位于人类染色体 10q23 上, 有研究报道, 在肿瘤中 PTEN 可以通过干扰 PI3K/AKT 信号通路抑制肿瘤细胞生长增殖和侵袭迁移。磷脂酰肌醇(3, 4, 5)-三磷酸(PIP3)是磷脂酰肌醇-3 激酶

(PI3K)的产物,也是 PTEN 蛋白最重要的一种底物,同时还能介导使 AKT 发生活化^[17-20,28-31]。为了探索 miR-21 抑制人椎间盘退变髓核细胞自噬过程中, 是否有 PTEN/PI3K/AKT 信号通路参与, 本研究采用 Western-Blot 分别检测细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT 蛋白的表达情况,结果显示 PTEN 蛋白在转染 miR-21 mimic 的细胞组中表达量显著低于转染 miR-21 mimic control 的细胞组和空白细胞对照组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与转染 miR-21 mimic control 的细胞组和空白细胞对照组相比,磷酸化的 PI3K(p-PI3K)和 AKT(p-Akt)在转染 miR-21 mimic 的细胞组中表达量显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这一结果表明 miR-21 可以抑制人椎间盘退变髓核细胞中 PTEN 蛋白的表达,而 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平明显提高,由此推测,miR-21 是通过靶向沉默 PTEN 表达,提高 PI3K 及 AKT 磷酸化水平,使人椎间盘退变髓核细胞自噬受到抑制。

综上所述,miR-21 在人椎间盘退变髓核细胞自噬过程中具有重要作用,并且可以通过靶向沉默 PTEN, 促进 PI3K 和 AKT 发生磷酸化,使 PTEN/PI3K/AKT 信号通路被激活,最终抑制细胞自噬。该研究丰富了 miR-21 通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路调控椎间盘退变性疾病的作用机制,对今后进一步研究椎间盘退变性疾病及发现新的理论和治疗方法提供重要参考价值。

参考文献 (References)

- [1] 王程, 王文军, 杨威, 等. 微 RNA: 一类新的椎间盘退变调控因子[J]. 浙江大学学报(医学版), 2016, 45(2): 170-178

- [2] 贾相振, 西永明, 刘勇, 等. MMP3 与 Sox9 基因对人椎间盘退变髓核细胞调控作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2017, (4): 386-389
- [3] Lin Y, Jiao Y, Yuan Y, et al. Propionibacterium acnes induces intervertebral disc degeneration by promoting nucleus pulposus cell apoptosis via the TLR2/JNK/mitochondrial-mediated pathway [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 1
- [4] 孙中仪, 田纪伟. 白细胞介素与椎间盘退变的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(3): 249-252
- [5] 徐宏光. 终板软骨在椎间盘退变中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(53): 8645-8645
- [6] Erwin W M, Desouza L, Funabashi M, et al. The biological basis of degenerative disc disease: proteomic and biomechanical analysis of the canine intervertebral disc[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2015, 17(1): 1-13
- [7] Jakoi A M, Pannu G, D'Oro A, et al. The Clinical Correlations between Diabetes, Cigarette Smoking and Obesity on Intervertebral Degenerative Disc Disease of the Lumbar Spine[J]. *Asian Spine J*, 2017, 11(3): 37-347
- [8] 胡舟扬, 李新华, 崔健, 等. 椎体终板退变机制的研究进展 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016, 26(2): 182-187
- [9] 冯文之, 陈扬, 俞立. 细胞自噬分子机制的进展 [J]. 生命科学, 2015, 27(7): 859-866
- [10] Blagonravov M L, Korshunova A Y, Azova M M, et al. Cardiomyocyte Autophagia and Morphological Alterations in the Left Ventricular Myocardium during Acute Focal Ischemia [J]. *Bulletin of Experimental Biology & Medicine*, 2016, 160(3): 398-400
- [11] 陈德横, 周凯亮, 徐华梓. 自噬在椎间盘退变中的作用研究进展[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(12): 9-12
- [12] Song J, Ahn C, Chun C H, et al. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis[J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(12): 1628-1635
- [13] Zhang F, Wang J, Chu J, et al. Micro RNA-146a Induced by Hypoxia Promotes Chondrocyte Autophagy through Bcl-2 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4): 1442-1453
- [14] Wu Y R, Qi H J, Deng D F, et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer [J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(9): 1-10
- [15] 敖鹏, 殷婷婷, 吴添龙, 等. 自噬与椎间盘退变关系的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(11): 1382-1390
- [16] 张潇潇, 姜宏, 张志刚, 等. 肿瘤坏死因子与腰椎间盘突出退变的相关性研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(12): 79-82
- [17] 李文举, 李亦梅. 椎间盘退变机制研究现状及生物治疗展望[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2014, 7(1): 66-69
- [18] 丁德成, 李伟明, 韩成龙. 细胞和分子治疗在椎间盘退行性病变中的研究进展[J]. 解剖科学进展, 2016, (5): 531-534
- [19] 宋永利. 细胞生物学治疗方法在椎间盘退行性病变方面的研究[J]. 中国伤残医学, 2016, 24(17): 92-92
- [20] 庄国柱. 针灸配合西药治疗腰椎间盘突出症的临床研究 [J]. 中西医结合研究, 2017, 9(4): 208-209
- [21] Ha M, Kim V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(8): 509-24
- [22] Lin S, Gregory R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2015, 15(6): 321
- [23] Wang H Q, Yu X D, Liu Z H, et al. Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3[J]. *Journal of Pathology*, 2011, 225(2): 232-242
- [24] 王程. MiR-210 靶向沉默 ATG7、Bcl-2 对人退变髓核细胞自噬、凋亡的影响[D]. 2016
- [25] Wei X, Wang W, Wang L, et al. MicroRNA-21 induces 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer cells by regulating PTEN and PDCD4[J]. *Cancer Medicine*, 2016, 5(4): 693-702
- [26] Anna M. Schläfli, Olivia Adams, José A. Galván, et al. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 39544-39555
- [27] Berezowska S, Galván J A. Immunohistochemical Detection of the Autophagy Markers LC3 and p62/SQSTM1 in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissue [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1560: 189
- [28] Pan H, Tao L, Jiang Y, et al. Overexpression of Circular RNA ciRS-7 Abrogates the Tumor Suppressive Effect of miR-7 on Gastric Cancer via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(1): 440-446
- [29] Yang J, Zou Y, Jiang D. Honokiol suppresses proliferation and induces apoptosis via regulation of the miR 21/PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in human osteosarcoma cells[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 41(4): 1845-1854
- [30] Jing Z, Li L, Peng Y, et al. Surface chemistry induces mitochondria-mediated apoptosis of breast cancer cells via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2018, 1865(1): 172
- [31] 孙吉春, 黄飞舟, 聂晚频, 等. MiR-21 通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路抑制胰腺癌细胞系生长侵袭能力的体外研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(12): 39-44