doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.003

miR-155 对人椎间盘退变髓核细胞凋亡的作用及机制研究 *

潘东晟[1] 张永峰[1] 吕艳红[2] 赵四平[3] 李俊琴[4] 王 哲[1△]

（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 miR-155 对人椎间盘退变髓核细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法：**首先构建慢病毒表达载体，在 293T 细胞中获得重组慢病毒，然后感染椎间盘退变髓核细胞得到稳定过表达细胞系，同时设置空载体和空白细胞组对照。用荧光显微镜观察慢病毒载体的标签蛋白 GFP 的表达，分别提取三组细胞总 RNA，采用 RT-qPCR 方法检测 miR-155 的表达；通过流式细胞术检测细胞凋亡，Western-Blot 检测细胞中凋亡相关蛋白 FADD、Caspase-3、Bcl-2 及 Bax 的表达，JC-1 试剂盒检测细胞线粒体膜电位的变化情况。**结果：**在荧光显微镜下，经慢病毒感染的过表达细胞系和空载体细胞系均出现绿色荧光，而空白细胞组未见绿色荧光；RT-qPCR 结果显示构建的稳定过表达细胞系(GV369-miR-155-NP)中 miR-155 的表达水平较高，且与空载体细胞系及空白细胞对照组均呈显著性差异(P<0.05)；与空载体组(GV369-NP)及空白细胞对照组相比，过表达组(GV369-miR-155-NP)细胞凋亡率显著降低(P<0.05)，FADD、Caspase-3、Bax 的表达水平均明显下降，而 Bcl-2 表达水平显著增加(P<0.05)。**结论：**miR-155 可能通过靶向结合 Caspase-3 和 FADD 阻止 FasL-Fas 途径或通过线粒体途径抑制人椎间盘退变髓核细胞凋亡。

关键词：miR-155；椎间盘退变髓核细胞；细胞凋亡

中图分类号：R-33；Q78；R681.53 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2019)15-2812-06

Effect and Mechanism of miR-155 on the Apoptosis of Degenerative Nucleus Pulposus Cells in the Human Intervertebral Disc*

PAN Dong-sheng[1], ZHANG Yong-feng[1], LV Yan-hong[2], ZHAO Si-ping[3], LI Jun-qin[4], WANG Zhe[1△]

(1 Department of Orthopedics, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;
2 Department of obstetric and gynaecology Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;
3 Fenyang college of shanxi medical university, Fenyang, Shanxi, 032200, China;
4 Laboratory of regenerative medicine, xijing hospital, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To establish a intervertebral disc degeneration of nucleus pulposus cell line (NP) with stable overexpression of miR-155, and to explore the effect and mechanism of miR-155 in apoptosis of NP. **Methods:** The lentivirus expression vector was first constructed and the recombinant lentivirus was rescued in 293T cells. Then the stable overexpression cell lines were obtained by infecting the degenerated nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. At the same time the empty vector and the blank cell group were set up as controls. The expression of lentivirus label protein GFP was observed by fluorescence microscope. The total RNA was extracted respectively from three groups of cells and the expression of miR-155 was detected by RT-qPCR method. Apoptosis of cells was detected by flow cytometry and the expression of apoptosis-related proteins (FADD, Caspase-3, Bcl-2 and Bax) was detected by Western-Blot. The change of cell mitochondrial membrane potential was detected with the JC-1 kit. **Results:** Using fluorescence microscope, green fluorescence was observed in the over-expressed cell lines and empty vector cell lines infected by lentivirus, but green fluorescence was not found in the blank cell group. RT-qPCR results showed that the expression of miR-155 in stable overexpression cell line (GV369-miR-155-NP) was highly higher than that in empty vector cell line and blank cell control group (P<0.05). Compared with the empty vector group (GV369-NP) and the blank cell control group, the apoptosis rate of overexpressed group (GV369-miR-155-NP) was significantly lower (P<0.05). The expressions of FADD, caspase-3 and Bax were significantly decreased, while the expression of bcl-2 was significantly increased (P<0.05). **Conclusion:** MiR-155 may inhibit the apoptosis of degenerative nucleus pulposus cells through preventing FasL-Fas pathway targeting Caspase-3 and FADD or mitochondrial pathway.

Key words: miR-155; Intervertebral disc degeneration of nucleus pulposus cells; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R681.53 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2812-06

* 基金项目：国家自然科学基金项目(81070996，11274249)；陕西省社发攻关基金(2011K14-07-14)

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

△ 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：2018-12-20 接受日期：2019-01-13)

前言

近年来,患有下腰痛的人数不断增多,椎间盘退变(IDD)是引起下腰痛的重要原因之一。长期慢性疼痛严重影响患者的生活质量和精神状态,同时带来了沉重的社会医疗负担。椎间盘的外层是由纤维排列的同心圆构成的环状致密结缔组织,可以容纳并保护内层结构,而内层是由包含髓核细胞、蛋白多糖和Ⅱ型胶原蛋白的细胞外基质组成的髓核。椎间盘没有血管组织,通过椎体软骨终板进行新陈代谢活动。随着年龄的增大或其它原因,椎体软骨终板缺少足够的营养物质,渗透性降低,从而影响椎间盘的代谢。这一过程极有可能导致髓核细胞活性降低甚至死亡,同时伴随着细胞外基质的丧失、Ⅰ型胶原蛋白大量合成并取代Ⅱ型胶原蛋白,最终促使椎间盘发生裂缝。目前,椎间盘退变的分子机制尚未完全清楚,研究表明可能与髓核细胞凋亡密切相关。

微小 RNA (MicroRNA,miRNA)是一类存在于真核生物中长度为 18～25nt 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。作为 miRNA 家族的重要成员之一，miR-155 所在的非编码 B 细胞集合基因簇(BIC)的第 3 个外显子位于人类 21 号染色体上，但 miR-155 在椎间盘退变中的作用及具体机制尚不十分明确[1,2]。本研究首先对在人椎间盘退变髓核细胞中过表达 miR-155,探讨了其对细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂和仪器

大肠杆菌菌株 DH5α、人胚胎肾上皮细胞 293T 由本实验室保存；人椎间盘退变髓核细胞由本实验制备并保存。miR-155 过表达慢病毒载体系统购自吉凯基因化学技术有限公司,由 GV369、辅助包装质粒 pHelper1.0 和 pHelper2.0 三个载体质粒构成。

DMEM (11966-025)、FBS (26170043)、双抗(15140148)、0.25%胰酶(12605-010)购自 Gibico 公司；Taq 聚合酶(RR001A)和 T4 DNA 连接酶 (2011A) 购自 TaKaRa；Quant one step qRT-PCR Kit (SYBR Green)(FP303)及无内毒素质粒中量提取试剂盒(DP108)均购自天根;动物细胞 / 组织总蛋白提取试剂盒(SD-001/SD-002)购自英文特生物技术北京有限公司;线粒体膜电势检测试剂盒 (C2006) 购自碧云天公司；脂质体 Lipofectamine2000 (11668019) 于美国 Invitrogen 公司采购；Annexin V-APC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒(KGA1023)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;内参β-actin 抗体(ab8227)、兔抗人 FADD 一抗(ab219195)、兔抗人 Caspase-3(ab13847)、兔抗人 Bcl-2(ab32124)、兔抗人 Bax(ab32503)一抗和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(ab205718)购自 Abcam。

ZNC-1000 型超净工作台,苏洁医疗器械(苏州)有限公司；TS-200B 型震荡培养箱,合肥艾本森科学仪器有限公司;Forma 3951 细胞培养箱,Thermo Scientific;MDS-2 倒置荧光显微镜,南京麦迪森仪器有限公司;CytoFLEX LX 流式细胞仪，贝克曼库尔特;5810R 型高速离心机,eppendorf。

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× 1× 1 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% CO_2 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%时需要进行传代培养。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 人 miR-155 过表达载体构建及慢病毒收获

根据 GenBank 和 miRbase 数据库中的 miR-155 序列,采用 Oligo6.0 设计引物并送上海生工生物公司合成。PCR 方法扩增出目的片段,酶切并用凝胶回收试剂盒进行纯化回收。连接线性化慢病毒表达载体 GV369，转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中,涂布具有嘌呤霉素抗性的 LB 平板,挑取菌落进行鉴定,然后将阳性克隆扩大培养后提取质粒,同时送测序。测序正确的阳性克隆命名为 GV369-miR-155。

将生长良好的 293T 细胞传代培养至新的培养瓶中，置于 37℃、5% CO_2 培养箱中,次日待细胞长至 70%左右,弃掉原培养液,换为无血清培养基继续放于培养箱 2 h 后供转染用。将构建的阳性质粒 GV369-miR-155、辅助包装质粒 Helper1.0 和 Helper2.0 与转染试剂轻混均匀,室温孵育,然后取适量混合液缓慢滴加至备用的 293T 细胞培养瓶中,轻轻晃动混匀后,放于 37℃、5% CO_2 培养箱培养。同时设置 GV369 空载体转染对照。6 h 后取出弃液，换成新的 10%FBS 的 DMEM 培养基继续培养。48 h 后,吸取细胞培养瓶中营养液,在提前设置好的 4℃离心机中离心,4000× g、10 min, 将上清液倒入滤器中过滤,然后转至超速离心管中,4℃超速离心 2 h,弃掉上清,用 PBS 重悬沉淀即为包装好的慢病毒液,分装保存备用。

1.4 人 miR-155 慢病毒过表达稳定细胞系构建

首先需要筛选嘌呤霉素对人椎间盘退变髓核细胞的最低全部致死浓度。将对数生长期的人椎间盘退变髓核细胞铺于 48 孔细胞培养板,过夜培养后,每孔加入适量含有不同梯度浓度嘌呤霉素的 10%FBS 的 DMEM 培养基，每隔 48h 换液,连续筛选一周,观察细胞生长状况,全部死亡的浓度即为最低筛选浓度。

复苏本实验室制备并保存的人椎间盘退变髓核细胞,待细胞生长状态处于对数生长期时铺于 6 孔板中,37℃、5% CO_2 培养过夜,次日细胞长至 75%左右时,加入适量 GV369-miR-155 慢病毒液和空载体慢病毒液，感染人椎间盘退变髓核细胞 8h

后换新培养液，继续培养 2 d 并在荧光显微镜下观察绿色荧光标签的表达。按照筛选嘌呤霉素最低致死剂量时的细胞密度，将上述细胞传代至 6 孔板，每隔 48 h 换为含最低致死剂量嘌呤霉素的 10%FBS 的 DMEM 培养基，连续筛选一周，挑取未被药物杀死的活细胞即为阳性细胞，进行扩大培养即为构建成功的稳定表达细胞系。分别将感染了 GV369-miR-155 及空载体慢病毒液的人椎间盘退变髓核细胞系命名为 GV369-miR-155-NP 和 GV369-NP。

1.5 RT-qPCR 检测 miR-155 的表达效率

分别收集感染了 GV369-miR-155-NP 和 GV369-NP 的细胞以及空白对照组细胞 Blank control，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-155 的表达情况。同时以 U6 作为内参基因。每个样本均重复进行 3 次实验。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将感染了慢病毒的人椎间盘退变髓核细胞用不含 EDTA 的 0.25%胰酶进行消化，吸至离心管中，离心 1000 r/min，5 min，弃上清，用 PBS 洗两次，收集细胞。加入适量 Annexin Ⅴ Binding Buffer 重悬细胞，再分别加 Annexin V-APC 及 7-AAD，室温避光孵育 15 min。用 Annexin V-APC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒对细胞双染，以避免与慢病毒表达的 GFP 荧光色谱的重叠。作用 1 h 内将制备好的样品置于流式细胞仪中检测分析。同时设置 GV369-NP 的细胞及 Blank control 对照组。

1.7 Western-Blot 检测 FADD、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

收集感染了慢病毒的人椎间盘退变髓核细胞，用 Invent 公司的 SD-001/SD-002 动物细胞 / 组织总蛋白提取试剂盒，提取收集细胞中总蛋白，并用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白含量。将制备好的蛋白样品进行 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 稀释的兔抗人 FADD 一抗、1:500 稀释的 Caspase-3 一抗、1:1000 稀释的兔抗人 Bcl-2 以及 1:2000 稀释的兔抗人 Bax，置于 4℃冰箱孵育过夜。次日，PBST 洗膜，三次，每次 10 min，再加 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。同时设置 GV369-NP 的细胞及 Blank control 对照组，并以 β-actin 作为内参蛋白。

1.8 线粒体电势变化情况检测

参照线粒体膜电势检测试剂盒说明书，依次完成实验步骤，并立即置于荧光显微镜下观察细胞线粒体电势变化情况。细胞胞质若呈现完全绿色则说明线粒体膜电势发生改变，胞质若呈红色说明线粒体膜电势无变化。计数线粒体膜电势有变化的细胞数目并计算比例。

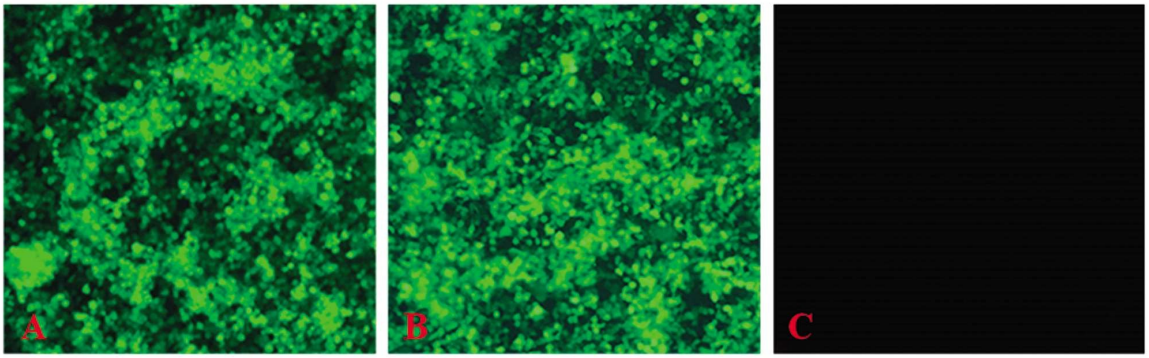
1.9 统计学分析

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

2 结果

2.1 稳定过表达 miR-155 的人椎间盘退变髓核细胞系的建立

感染了慢病毒的人椎间盘退变髓核细胞经过适宜浓度的嘌呤霉素筛选后得到稳定过表达 miR-155 的人椎间盘退变髓核细胞系 GV369-miR-155-NP 以及空载体慢病毒细胞系 GV369-NP。在荧光显微镜下观察，经慢病毒感染的过表达细胞系和空载体细胞系均出现绿色荧光，即慢病毒表达载体上的标签蛋白 GFP 表达，表明感染成功，而空白组细胞未见绿色荧光(图 1)。



A: GV369-miR-155-NP　B: GV369-NP　C: Blank control

图 1 构建 miR-155 过表达的人椎间盘退变髓核细胞

Fig.1 Construction of miR-155-over expressed human intervertebral disc degeneration of nucleus pulposus cell line

A: GV369-miR-155-NP, B: GV369-NP ,C: Blank control

采用 RT-qPCR 检测 miR-155 过表达组、空载体组及空白细胞对照组 miR-155 的表达，以 U6 作为内参基因，以空白细胞对照组作为标准，感染空载体病毒的椎间盘髓核细胞(GV369-NP)中 miR-155 的表达无明显变化($P>0.05$)，感染过表达慢病毒的椎间盘髓核细胞(GV369-miR-155-NP)中 miR-155 的表达水平较高，且与前两者均呈显著性差异($P<0.05$)(图 2)。以上结果表明构建的稳定细胞系能高效表达 miR-155。

2.2 过表达 miR-155 对人椎间盘退变髓核细胞凋亡的影响

如图 3 所示，过表达组(GV369-miR-155-NP)细胞凋亡率与空载体组(GV369-NP)及空白细胞对照组相比均显著降低，差异均具有统计学意义($P<0.05$)，而空载体组(GV369-NP)和空白细胞组细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P>0.05$)(图 3)。

2.3 过表达 miR-155 对人椎间盘退变髓核细胞 FADD、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

与空载体组比较，miR-155 过表达组(GV369-miR-155-NP)中 FADD、Caspase-3 及 Bax 的表达水平显著下调，而 Bcl-2 表

达水平明显上调(P<0.05),而空载体组(GV369-NP)与空白细胞对照组以上指标比较无明显统计学差异(P>0.05)。

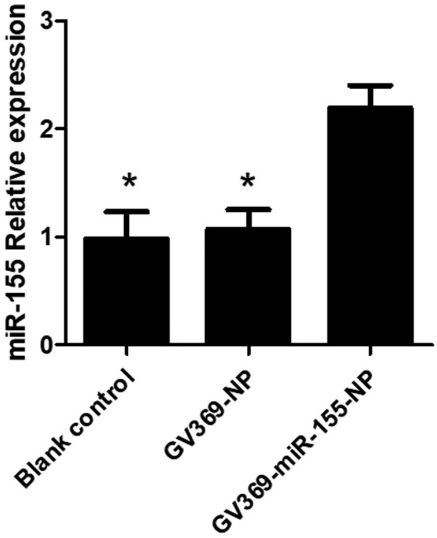


图 2 RT-qPCR 检测 miR-155 的表达

Fig.2 RT-qPCR was used to detect the expression of miR-155

注:GV369-miR-155-NP 与 GV369-NP 及空白细胞对照组相比差异均显著(*P<0.05)。

Note: GV369-miR-155-NP was significantly different from GV369-NP and the control group of blank cells (*P<0.05).

2.4 过表达 miR-155 对人椎间盘退变髓核细胞线粒体电势的影响

将经过 DePsipher 处理后的细胞立即置于荧光显微镜下进行观察,过表达组(GV369-miR-155-NP)中细胞胞质主要呈现红色,仅有个别细胞出现绿色荧光,说明该组细胞线粒体膜电势稳定;空载体组(GV369-NP)与空白细胞对照组中呈现绿色荧光的细胞数量明显增多,说明两组中细胞线粒体膜电势出现下降趋势,两组之间相比线粒体膜电势变化无显著差异(P>0.05),而与过表达组 (GV369-miR-155-NP) 相比差异具有统计学意义(P<0.05),过表达组(GV369-miR-155-NP)中相对荧光强度比值(强红色荧光强度百分比 / 强绿色荧光强度百分比)显著高于另外两组(P<0.05)。(图 5)。

3 讨论

椎间盘退变可引起多种症状,腰腿痛、椎管狭窄、椎盘突出并伴有压迫神经根导致其它部位疼痛等。年龄、饮酒、过度劳累等被认为是导致椎间盘退变性疾病的外在因素。目前,关于其发病的分子机制与传导通路也存在众多观点,炎症因子、遗传基因、氧化应激、NO 诱导、MicroRNA 等在椎间盘退变中发挥重要作用 [3-5], 而核转录因子 -κB (nuclear factor-kappa B, NF-κB)、磷脂酰肌醇激酶 / 蛋白激酶 B (Phosphoinositide 3-kinase/ Protein Kinase B, PI3K/Akt)、丝裂原激活的蛋白激酶(MAP 激酶,MAPK)等被认为是与该病相关的信号传导通路[6-8]。

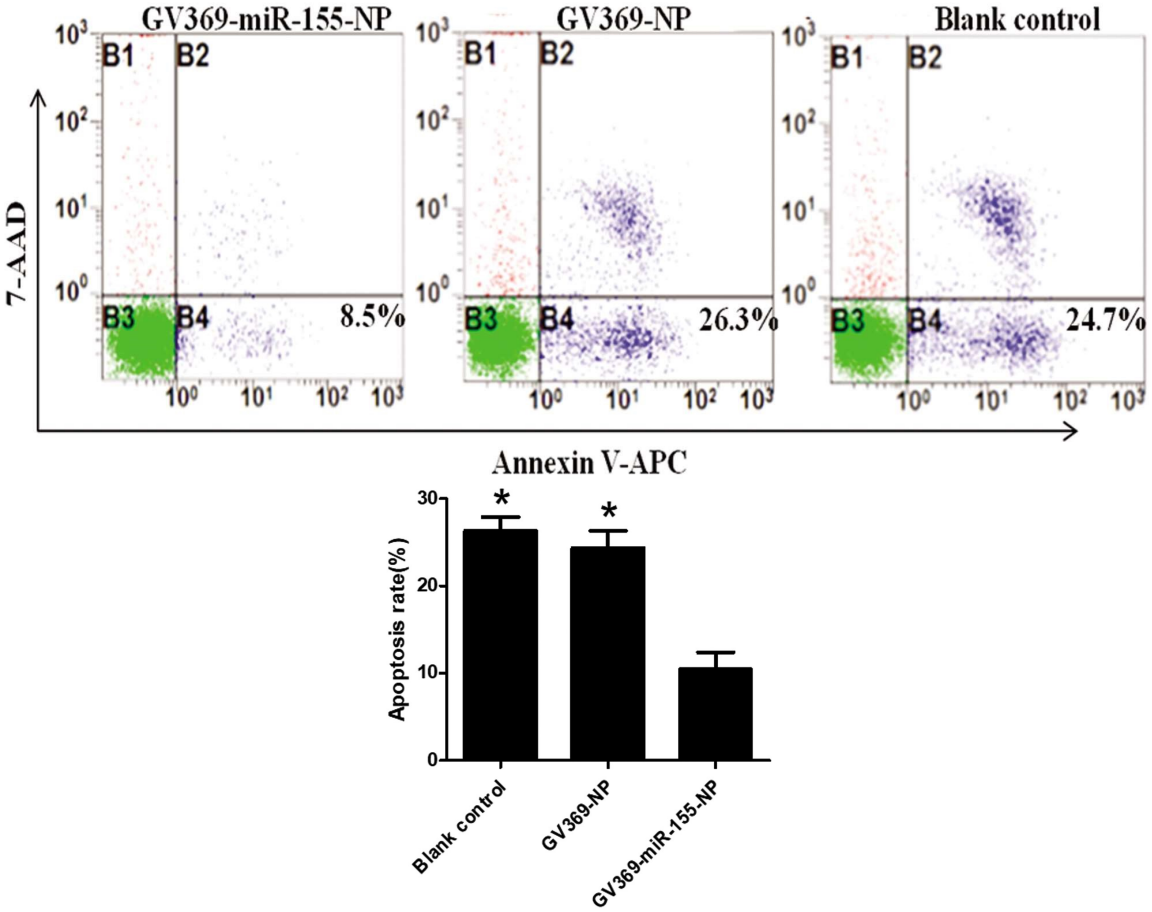


图 3 流式细胞术检测细胞凋亡及凋亡率

Fig.3 Detection of apoptosis and apoptosis rate by flow cytometry

注:GV369-miR-155-NP 与 GV369-NP 及空白细胞对照组相比差异均显著(*P<0.05)。

Note: GV369-miR-155-NP was significantly different from GV369-NP and the control group of blank cells (*P<0.05).

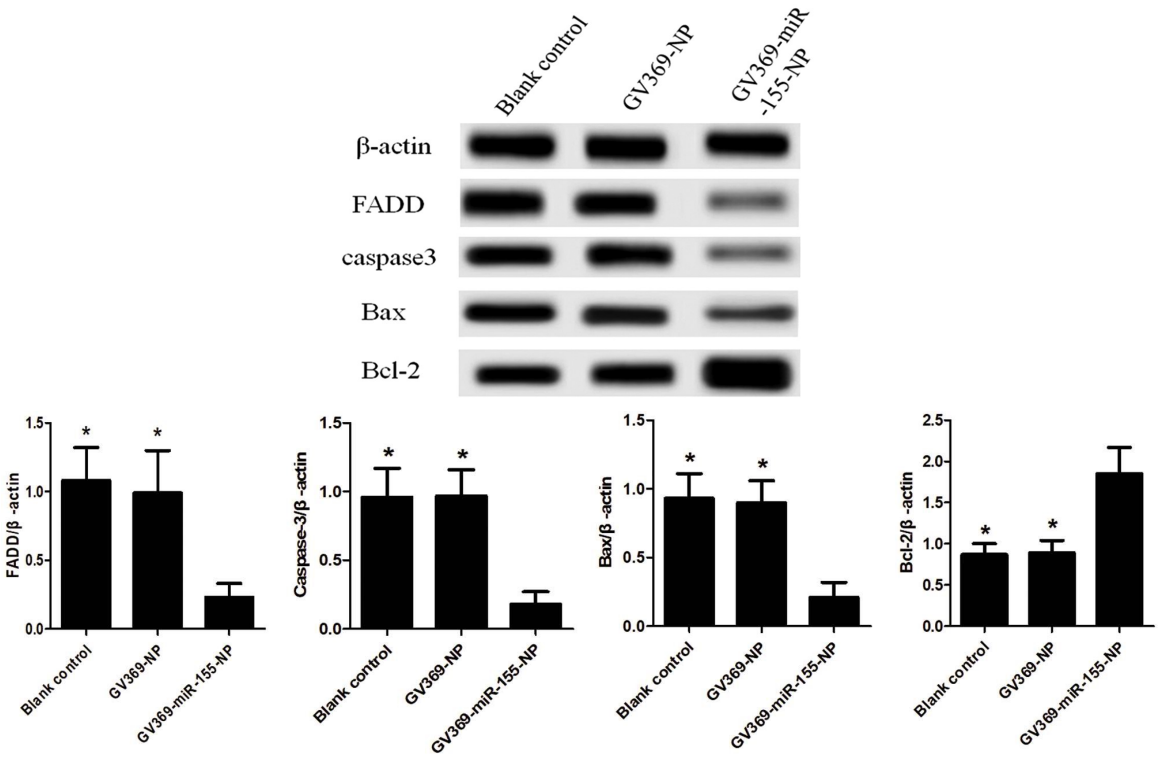
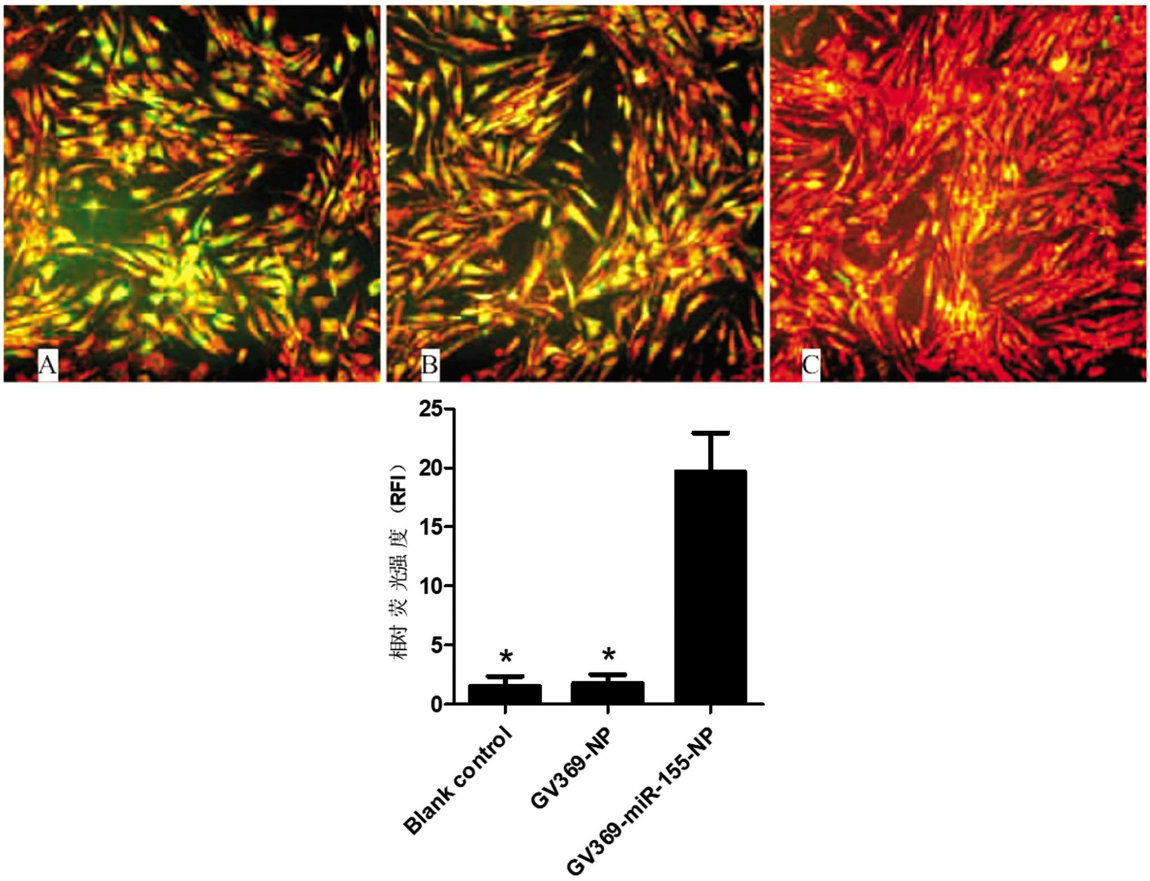


图 4 Western-Blot 检测细胞中 FADD、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白及其相对表达量

Fig.4 Detection of FADD, caspase-3, bcl-2 and Bax proteins and their relative expressions in cells by western-blot

注:GV369-miR-155-NP 与 GV369-NP 及空白细胞对照组相比差异均显著(*P<0.05)。

Note: There were significant differences between GV369-miR-155-NP and GV369-NP and blank cell control group (*P<0.05).



A:Blank control B:GV369-NP C:GV369-miR-155-NP

图 5 细胞线粒体膜电势的观察及相对荧光轻度比值

Fig.5 Observation of cell mitochondrial membrane potential and its relative fluorescence intensity ratio

miR-155 作为 MicroRNA 家族的重要成员,参与机体多项生理活动，其在树突状细胞、T 细胞以及 B 细胞等免疫细胞中均可表达,能够作用于蛋白受体、转录因子及细胞因子等,对免疫系统进行调控从而使免疫系统维持平衡。炎症反应中，miR-155 通过抑制或促进相关因子发挥调节作用[9]。miR-155 在银屑病患者皮损中呈上调表达[10],与炎症因子刺激有关。此外，miR-155 在白血病中相当于一种癌基因,在多种实体肿瘤如结直肠癌[11]、乳腺癌[12,13]、胰腺癌[14]、肺癌[15]等高丰度表达,能够调控细胞的增殖、分化与凋亡等。

以往研究显示 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[16],但其具体作用机制尚不完全明确。本研究首先选用人椎间盘退变髓核细胞,构建了 miR-155 的稳定过表达的细胞系,发现 miR-155 可抑制椎间盘退变髓核发生细胞凋亡,与以往研究发现的正常髓核细胞中其表达量高而退变髓核细胞中表达下调相一致。死亡受体与其配体相结合是细胞凋亡外源性通路的介导机制,椎间盘退变髓核细胞凋亡与外源性通路 FasL-Fas 介导有关[17-19]。FasL-Fas 凋亡通路的关键蛋白包含 caspase-3 及 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)[20-23],生物信息学分析显示 miR-155 可以跟 caspase-3 及 FADD 靶向性结合。因此,本研究结果显示 miR-155 的稳定过表达的人椎间盘退变髓核细胞 FADD 和 Caspase-3 的表达均明显下调，提示 miR-155 对 FADD 和 Caspase-3 的表达起到抑制作用，与其能够抑制细胞凋亡的结果相符。内源性途径引起的细胞凋亡首先发生于线粒体内，也称为线粒体途径，该途径主要通过 Bcl-2 家族蛋白进行调节。Bcl-2 家族蛋白主要包括抗凋亡成员 Bcl-2、Bcl-W、Bcl-xL 及 Mcl-1 等,促凋亡成员 Bak、Bax 及 Bok 等[24,25]。Bcl-2 作为主要的抗凋亡成员在线粒体外膜发挥作用，可以维持膜结构的完整性[26];Bax 作为主要的促凋亡成员是通过破坏线粒体膜的完整性进而发挥作用的[27,28]。Bcl-2 家族蛋白能够使线粒体膜的通透性发生精确的改变;也能诱导线粒体使其通透性转变孔道开放,而保护其外膜免受损伤,同时线粒体基质出现高渗状态,进一步膨胀造成外膜破裂,都能使膜间隙中的凋亡诱导因子、细胞色素 C、促凋亡蛋白等物质进入胞质中,而后促凋亡蛋白可独立破坏核内染色质也可通过激活 caspase,最终引起细胞凋亡[29-31]。本研究结果显示 miR-155 的稳定过表达的人椎间盘退变髓核细胞中 Bax 的表达下降，而 Bcl-2 表达升高,提示 miR-155 可能通过了线粒体介导的途径抑制椎间盘退变髓核细胞凋亡。为此,我们进一步检测了细胞线粒体膜电势的变化情况,发现 miR-155 的稳定过表达的人椎间盘退变髓核细胞线粒体膜电势更稳定,提示线粒体途径可能参与了 miR-155 对椎间盘退变髓核细胞凋亡的抑制作用。

综上所述,miR-155 可抑制人椎间盘退变髓核细胞凋亡，可能与靶向结合 Caspase-3 和 FADD 阻止 FasL-Fas 途径或通过线粒体途径有关。此发现为以后进一步研究椎间盘退行性疾病提供了参考依据。

参 考 文 献(References)

[1] 黄勇, 丰干钧, 刘立岷, 等. 椎间盘退变中微小 RNA 及其非病毒载体的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, (1): 116-121

[2] 陶波, 王锐英. MicroRNA 在椎间盘退变中的研究进展 [J]. 饮食保健, 2016, 3(21)

[3] 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

[4] 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

[5] Zhou J, Liang A, Hong J, et al. MicroRNA-155 suppresses the catabolic effect induced by TNF-α and IL-1β by targeting C/EBPβ in rat nucleus pulposus cells[J]. Connective Tissue Research, 2018[Epub ahead of print]

[6] Guo F, Zou Y, Zheng Y. Moracin M inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in nucleus pulposus cells via regulating PI3K/Akt/mTOR phosphorylation [J]. International Immunopharmacology, 2018, 58: 80-86

[7] Shen J, Fang J, Hao J, et al. SIRT1 Inhibits the Catabolic Effect of IL-1β Through TLR2/SIRT1/NF-κB Pathway in Human Degenerative Nucleus Pulposus Cells[J]. Pain Physician, 2016, 19(1): E215

[8] Li S, Bao L, Si L, et al. Research on Roles of Mongolian Medical Warm Acupuncture in Inhibiting p38 MAPK Activation and Apoptosis of Nucleus Pulposus Cells[J]. 2018[Epub ahead of print]

[9] Yang L, Liu L, Ying H, et al. Acute downregulation of miR-155 leads to a reduced collagen synthesis through attenuating macrophages inflammatory factor secretion by targeting SHIP1[J]. Journal of Molecular Histology, 2018(Suppl. 1): 1-10

[10] 王丽丽, 王也, 王英, 等. MicroRNA-155、microRNA-203 在银屑病患者皮肤中的表达及定位 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(12): 2205-2208

[11] Liu J, Chen Z, Xiang J. MicroRNA-155 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting CTHRC1in vitro [J]. Oncology Letters, 2018, 15(4): 5561-5568

[12] Santos J C, Nds L, Sarian L O, et al. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 829

[13] Han J G, Jiang Y D, Zhang C H, et al. A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer [J]. Annals of Surgical Treatment & Research, 2017, 92(2): 55-66

[14] Ablet A, Peng Y Y, Yerson N, et al. Expression of miR-21 and miR-155 in plasma of patients with pancreatic cancer and its clinical significance [J]. Journal of Clinical & Experimental Medicine, 2018 [Epub ahead of print]

[15] Xue X, Liu Y, Wang Y, et al. MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN[J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 84508

[16] 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

[17] Zhang J F, Shi L L, Zhang L, et al. MicroRNA-25 Negatively Regulates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury-Induced Cell Apoptosis Through Fas/FasL Pathway [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2016, 58(4): 507-516

[18] Liu X M, Yang Z M, Liu X K. Fas/FasL induces myocardial cell apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion rat model [J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2017, 21(12): 2913

(下转第 2806 页)

[25] Wei GH, Wang X. lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21: 3850-3856

[26] Li Y, Zhao J, Yu S, et al. Extracellular Vesicles Long RNA Sequencing Reveals Abundant mRNA, circRNA, and lncRNA in Human Blood as Potential Biomarkers for Cancer Diagnosis [J]. Clin Chem, 2019[Epub ahead of print]

[27] Zheng R, Yao Q, Ren C, et al. Upregulation of Long Noncoding RNA Small Nucleolar RNA Host Gene 18 Promotes Radioresistance of Glioma by Repressing Semaphorin 5A [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2016, 96: 877-887

[28] Zhao XL, Zhao ZH, Xu WC, et al. Increased expression of SPRY4-IT1 predicts poor prognosis and promotes tumor growth and metastasis in bladder cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8: 1954-1960

[29] Cui F, Wu D, He X, et al. Long noncoding RNA SPRY4-IT1 promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition [J]. Tumour Biol, 2016, 37: 10871-10876

[30] Xu Y, Yao Y, Jiang X, et al. SP1-induced upregulation of lncRNA SPRY4-IT1 exerts oncogenic properties by scaffolding EZH2/LSD1/DNMT1 and sponging miR-101-3p in cholangiocarcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37: 81

[31] Xie M, Nie FQ, Sun M, et al. Decreased long noncoding RNA SPRY4-IT1 contributing to gastric cancer cell metastasis partly via affecting epithelial-mesenchymal transition [J]. J Transl Med, 2015, 13: 250

[32] Wang MW, Liu J, Liu Q, et al. LncRNA SNHG7 promotes the proliferation and inhibits apoptosis of gastric cancer cells by repressing the P15 and P16 expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21: 4613-4622

[33] Zhu L, Zhang Q, Li S, et al. Interference of the long noncoding RNA CDKN2B-AS1 upregulates miR-181a-5p/TGFbetaI axis to restrain the metastasis and promote apoptosis and senescence of cervical cancer cells [J]. Cancer Med, 2019[Epub ahead of print]

[34] Mu Z, Dong D, Wei N, et al. Silencing of lncRNA AFAP1-AS1 inhibits cell growth and metastasis in clear cell renal cell carcinoma [J]. Oncol Res, 2019[Epub ahead of print]

[35] Zhang L, Liu SK, Song L, et al. SP1-induced up-regulation of lncRNA LUCAT1 promotes proliferation, migration and invasion of cervical cancer by sponging miR-181a [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47: 556-564

[36] Jafari-Oliayi A, Asadi MH. SNHG6 is upregulated in primary breast cancers and promotes cell cycle progression in breast cancer-derived cell lines [J]. Cell Oncol (Dordr), 2019[Epub ahead of print]

[37] Sellers ZP, Bolkun L, Kloczko J, et al. Increased methylation upstream of the MEG3 promotor is observed in acute myeloid leukemia patients with better overall survival [J]. Clin Epigenetics, 2019, 11: 50

（上接第 2817 页）

[19] Wang M, Su P. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update [J]. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2018, 64(2): 1-10

[20] He L, Ren Y, Zheng Q, et al. Fas-associated protein with death domain (FADD) regulates autophagy through promoting the expression of Ras homolog enriched in brain (Rheb) in human breast adenocarcinoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 24572-24584

[21] Russo A, Cardile V, Graziano A C E, et al. Involvement of Bax and Bcl-2 in Induction of Apoptosis by Essential Oils of Three Lebanese Salvia Species in Human Prostate Cancer Cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(1)

[22] Opferman J T, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development[J]. Cell Death & Differentiation, 2018, 25(1): 37-45

[23] Xie Z Y, Chen L, Zhang C, et al. Acid-Sensing Ion Channel 1a Regulates Fate of Rat Nucleus Pulposus Cells in Acid Stimulus Through Endoplasmic Reticulum Stress [J]. Biores Open Access, 2018, 7(1): 2-9

[24] Yue B, Lin Y, Ma X, et al. Effect of Survivin gene therapy via lentivirus vector on the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(5): 4593-4598

[25] Xie Z Y, Chen L, Wang F, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in Nucleus Pulposus Degeneration and Attenuates Low pH-Induced Apoptosis of Rat Nucleus Pulposus Cells [J]. Dna & Cell Biology, 2017, 36(8): 627

[26] 贺斌, 陶海鹰, 卫爱林,等. 线粒体途径在吡咯喹啉醌抑制氧化应激诱导施万细胞凋亡中的作用 [J]. 中华整形外科杂志, 2017, 33(1): 43-48

[27] 杨联军, 朱立新, 董为人,等. 氧化应激诱导髓核细胞凋亡中细胞内活性氧及线粒体膜电位的变化 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30(2): 193-195

[28] Yang S D, Ma L, Yang D L, et al. Combined effect of 17β-estradiol and resveratrol against apoptosis induced by interleukin-1β in rat nucleus pulposus cells via PI3K/Akt/caspase-3 pathway [J]. Peerj, 2016, 4(10): e1640

[29] 溶酶体与线粒体途径在局麻药诱导兔椎间盘细胞死亡中的作用研究[D]. 华中科技大学, 2016

[30] Wang J, Chen H, Cao P, et al. Inflammatory cytokines induce caveolin-1/β-catenin signalling in rat nucleus pulposus cell apoptosis through the p38 MAPK pathway [J]. Cell Proliferation, 2016, 49(3): 362-372

[31] 线粒体凋亡通路在氧化应激诱导大鼠髓核细胞凋亡中的作用研究[D]. 南方医科大学, 2014