

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.002

MiRNA-326抑制人椎间盘退变髓核细胞活力和凋亡的机制

高笛, 刘殿鹏

(安阳市第六人民医院骨科, 河南 安阳 455000)

[摘要] 目的: 探讨过表达miRNA-326对椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)髓核(nucleus pulposus, NP)细胞凋亡的影响及其作用机制。方法: 构建miRNA-326慢病毒表达载体, 在293T细胞中获得重组慢病毒, 经感染NP细胞得到稳定过表达细胞系GV369-miRNA-326-NP, 同时设置空载体GV369-NP组与空白组。荧光显微镜观察慢病毒载体的标签蛋白[绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)]的表达, 实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)方法检测miRNA-326的表达, 流式细胞术检测细胞凋亡, 荧光素酶报告基因分析验证miRNA-326与FasL的靶向关系, 蛋白质印迹法检测细胞中凋亡相关蛋白FADD, caspase-3, Bcl-2及Bax的表达, 使用试剂盒检测细胞线粒体膜电势的变化情况。结果: 荧光显微镜下示, 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, 而空白组未见绿色荧光。与空白组相比, GV369-miRNA-326-NP组中miRNA-326的表达水平、Bcl-2表达水平和线粒体膜电位明显升高, 而细胞凋亡率, FADD, caspase-3和Bax的表达水平明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); GV369-NP组与空白组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。荧光素酶报告基因分析证实miRNA-326与FasL存在靶向关系。结论: MiRNA-326可抑制IDD NP细胞发生凋亡, 既可通过靶向性调控外源性FasL/Fas通路参与caspase-3和FADD介导的细胞凋亡, 也可通过线粒体途径对细胞凋亡发挥作用。

[关键词] miRNA-326; 椎间盘退变髓核细胞; 细胞凋亡; 实时荧光定量PCR; 流式细胞术

Mechanism of miRNA-326 inhibiting the activity and apoptosis of human disc degeneration nucleus pulposus cells

GAO Di, LIU Dianpeng

(Department of Orthopedics, Anyang Sixth People's Hospital, Anyang Henan 455000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect and mechanism of miRNA-326 overexpression on apoptosis of degenerative nucleus pulposus (NP) cells in intervertebral disc. **Methods:** MiRNA-326 lentivirus expression vector was constructed and recombinant lentivirus was obtained in 293T cells. After infection with NP cells, the stable overexpressed cell line GV369-miRNA-326-NP was obtained, at the same time, the empty vector GV369-NP group and the blank group were set up. The expression of lentivirus label protein GFP was observed by

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-02

通信作者 (Corresponding author): 高笛, Email: gaodi197708@163.com

fluorescence microscope. The expression of miRNA-326 was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Apoptosis of cells was detected by flow cytometry. The targeting relationship between miRNA-326 and FasL was verified by Luciferase reporter gene analysis and the expression of apoptosis-related proteins (FADD, caspase-3, Bcl-2 and Bax) was detected by Western blotting. The change of cell mitochondrial membrane potential was detected with the kit. **Results:** Under fluorescence microscope, green fluorescence was observed in the lentivirus infected overexpressed cell lines and empty carrier cell lines, but not in the blank cell group. Compared with the blank group, the expression levels of miRNA-326, Bcl-2 and mitochondrial membrane potential in the GV369-miRNA-326-NP group were significantly increased, while the expression levels of apoptosis rate, FADD, caspase-3 and Bax were significantly decreased, with statistically significant differences ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference between the GV369-NP group and the blank group ($P > 0.05$). Luciferase reporter gene analysis confirmed a targeted relationship between miRNA-326 and FasL. **Conclusion:** MiRNA-326 can inhibit the apoptosis of degenerative nucleus pulposus cells in intervertebral disc. It can not only participate in the apoptosis mediated by caspase-3 and FADD through the targeted regulation of exogenous FasL/Fas pathway, but also play a role in the apoptosis through mitochondrial pathway.

Keywords miRNA-326; intervertebral disc degeneration of nucleus pulposus cells; cell apoptosis; real-time quantitative polymerase chain reaction; flow cytometry

近年来, 患有下腰痛的人数不断增多, 慢性疼痛严重影响着人们的生活质量和精神状态, 同时也带来了沉重的社会医疗负担, 而椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是引起下腰痛的一个重要原因^[1]。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 (nucleus pulposus, NP) 细胞、蛋白多糖和II型胶原蛋白的细胞外基质组成的NP^[2]。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他原因, 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NP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^[3]。目前尚未完全清楚IDD的分子机制, 大量研究启示我们或与NP细胞凋亡密切相关。微小RNA (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^[4], 其作用机制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, miRNA-326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^[5]。目前miRNA-326在IDD中的作用研究逐渐成为热点, 但其作用机制尚不十分明确。因此, 本研究首先对miRNA-326在人IDD NP细胞中进行过表达, 并探讨其对细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要细胞、试剂和仪器

大肠杆菌菌株DH5 α 、人胚胎肾上皮细胞293T由郑州大学基础医学院生理教研室保存; 人IDD NP细胞由本实验制备并保存。MiR-326模拟物 (miR-326 mimic) 及空白对照 (mimic control) 由上海吉玛生物技术代为合成; miR-326过表达慢病毒载体系统购自上海吉玛生物技术有限公司, 由GV369、辅助包装质粒pHelper1.0和pHelper2.0 3个载体质粒构成; DMEM, FBS, 双抗, 0.25%胰酶购自美国Gibico公司; 限制性内切酶购自美国NEB公司; Taq聚合酶和T4 DNA连接酶购自日本TaKaRa公司, 双荧光素酶报告基因分析试剂盒、DNA Ladder购自美国Thermo公司; JC-1, PCR, 反转录试剂盒及去内毒素小量提取质粒试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; SD-001/SD-002动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒购自北京英文特生物技术有限公司; 脂质体lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司; 线粒体膜电势检测试剂盒购

自美国R&D公司; 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; HEK293T细胞、内参 β -actin抗体、兔抗人FADD一抗、兔抗人caspase-3、兔抗人Bcl-2、兔抗人Bax一抗和HRP标记的羊抗兔IgG二抗购自上海艾博抗贸易有限公司。

1.2 细胞制备及培养

人IDD NP细胞来自2018年7至10月在安阳市第六人民医院脊柱外科经病理学检测证实发生蜕变并切除的椎间盘NP组织。患者年龄36~58岁, 男女各6例, 排除脊柱外伤、恶性肿瘤或神经系统疾病史。在无菌超净工作台内, 将收集的病变NP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 mm×1 mm×1 mm大小碎块, 加入适量在37 °C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(fetal bovine serum, FBS)终止消化, 并吸入离心管中以1 000 r/min离心10 min, 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 °C, 5%CO₂培养箱中静置培养, 2~3 d后用倒置显微镜观察细胞生长情况, 隔天更换1次培养液, 当细胞融合度达到80%~90%时进行传代培养。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 miRNA-326 过表达载体构建及慢病毒收获

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DH5 α 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, 测序正确的阳性克隆命名为GV369-miRNA-326。

将生长良好的293T细胞置于新的培养瓶中传代培养, 培养条件为37 °C, 5%CO₂, 次日待细胞长至70%左右, 弃掉原培养液, 更换为无血清培养基于培养箱中继续培养2 h后备用。将构建的阳性质粒GV369-miRNA-326、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 °C, 5%CO₂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 °C离心机中以4 000 r/min离心10 min, 将上清液倒入滤器中过滤, 然后转至超速离心管中, 4 °C超速离心2 h, PBS重悬沉淀即为包装好的慢病毒液, 分装保存备用^[6]。

1.4 人 miRNA-326 慢病毒过表达稳定细胞系构建

将对数生长期的人IDD NP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48 h换液, 连续筛选1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IDD NP细胞, 待细胞生长状态处于对数生长期时铺于6孔板中, 37 °C, 5%CO₂培养过夜, 次日细胞长至75%左右时, 加入适量GV369-miRNA-326慢病毒液和空载体慢病毒液, 感染人IDD NP细胞8 h后更换新培养液, 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1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-miRNA-326及空载体慢病毒液的人IDD NP细胞系命名为GV369-miRNA-326-NP和GV369-NP, 以未转染的NP细胞为空白对照。

1.5 RT-qPCR 检测 miRNA-326 的表达效率

收集感染GV369-miRNA-326-np和GV369-NP的细胞以及空白组细胞, 采用TRIzol法提取各组细胞总RNA并进行反转录, 按照PrimeScrip反转录试剂盒步骤反转录成cDNA, 采用SYBR Premix Ex Taq说明书配置PCR反应体系, 反应条件为: 95 °C预变性10 min, 然后95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 10 s, 40个循环; 95 °C 5 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s。U6作为内参(正向引物为5'-CCTGAGCAGGAACAGCTTGA-3', 反向引物为5'-CGTACGTAGTCGAACCGAGA-3'), miRNA-326(正向引物为5'-CCATATCGCTGGATGACGAT-3', 反向引物为5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'), miR-148a(正向引物为5'-ACTGTCTCCCAACCCTTGTA-3', 反向引物为5'-GCCGTGGGGTGTTCATAACT-3'), 相对表达量用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}表示。每个样本独立重复实验3次。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将感染了慢病毒的人IDD NP细胞用不含EDTA的0.25%胰酶进行消化, 吸至离心管中以1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用PBS洗2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荧光光谱的重叠, 作用1 h内将制备好的样品置于流式细胞仪中检测, 同时设置GV369-NP细胞及空白组作为对照。

1.7 荧光素酶报告基因分析

采用PCR法从人胚胎肾上皮细胞293T基因组DNA中扩增FasL的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)序列, 构建至野生型荧光素酶报告基因载体pGL3(pGL3-FasL-WT)中, 同时构建突变型重组质粒(pGL3-FasL-MUT), 将HEK293T细胞按30%左右密度铺于25孔板, 将miR-326 mimic及mimic control分别与上述质粒共转染至HEK293T细胞, 以未转染的HEK293T细胞为对照组, 转染后25 h, 根据双荧光素酶测定试剂盒说明书检测荧光素酶活性, 萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性值即为报告基因活性。

1.8 蛋白质印迹法检测 FADD, caspase-3, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

收集感染慢病毒的人IDD NP细胞, 采用SD-001/SD-002动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒提取细胞中总蛋白质, 并用BCA蛋白质定量检测试剂盒测定蛋白质含量。将制备好的蛋白质样品进行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。分别加入用封闭液1:1 000稀释的兔抗人FADD一抗、1:500稀释

的caspase-3一抗、1:1 000稀释的兔抗人Bcl-2以及1:2 000稀释的兔抗人Bax, 置于4 °C冰箱孵育过夜。次日, PBST洗膜3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细胞及空白组为对照, 并以 β -actin为内参蛋白。

1.9 线粒体电位变化情况检测

参照JC-1线粒体膜电位检测试剂盒说明书, 依次完成实验步骤, 将转染后的细胞培养48 h后, 在不同波长下观察细胞显色水平, 其中红色荧光的激发波长490 nm, 发射波长580 nm; 绿色荧光的激发波长490 nm, 发射波长520 nm观察。使用计算机采集荧光图像, Image J软件重叠红绿荧光, 将合成荧光的红、绿色荧光光密度比值作为膜电位表达水平。

1.10 统计学处理

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-326 稳定过表达人 IDD NP 细胞系

感染慢病毒的人IDD NP细胞, 经过适宜浓度的嘌呤霉素筛选后, 得到稳定转染的过表达人miRNA-326的细胞系GV369-miRNA-326-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)。

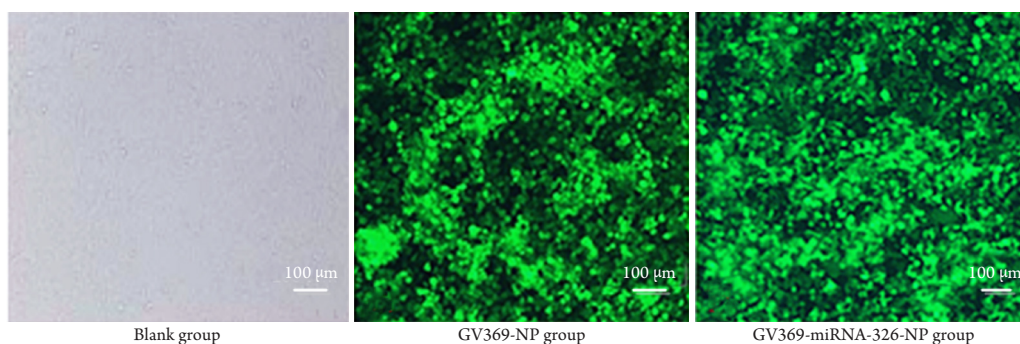


图1 构建的过表达慢病毒感染NP细胞

Figure 1 Overexpressed lentivirus infected NP cells were constructed

2.2 RT-qPCR 检测 miRNA-326 的表达

与空白组相比, GV369-miRNA-326-NP组中 miRNA-326 的表达量明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); GV369-NP组与空白组中 miRNA-326 的表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明构建的稳定细胞系能高效表达 miRNA-326 (图2)。

2.3 过表达 miRNA-326 对细胞凋亡的影响

与空白组相比, GV369-miRNA-326-NP组细胞凋亡率明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。GV369-NP组和空白组比较, 细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图3)。

2.4 miRNA-326 与 FasL 的作用关系

双荧光素酶报告基因结果显示: 转染 miR-326 后, 野生型 FasL 的荧光素酶活性被抑制 ($P < 0.05$), 突变型 FasL 的荧光素酶活性无明显变化 ($P > 0.05$), 说明 FasL 与 miR-326 具有靶向调控关系 (图4)。

2.5 蛋白质印迹法检测 FADD, caspase-3, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达结果

以蛋白质印迹法检测 3 组细胞中 FADD, caspase-3, Bcl-2 以及 Bax 蛋白表达, 结果显示: 与空白组相比, GV369-miRNA-326-NP 组中 FADD, caspase-3 及 Bax 的表达水平明显下降, 而 Bcl-2 表达水平明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。GV369-NP 组与空白组相比, 差异无统计学意义

($P > 0.05$, 图5)。

2.6 线粒体电位的变化情况

转染后的细胞培养 48 h 经 JC-1 处理后, 空白组中细胞线粒体膜电位较低 (红色荧光与绿色荧光比值较低), 结果显示: 与空白组相比, GV369-miRNA-326-NP 组细胞线粒体膜电位出现明显上升趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白组与 GV369-NP 组之间相比线粒体膜电位变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图6)。

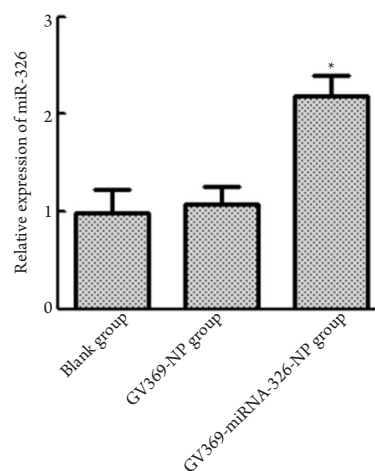


图2 RT-qPCR检测miRNA-326的表达

Figure 2 Expression of miRNA-326 detected by RT-qPCR with blank group, * $P < 0.05$.

Compared with the blank group, * $P < 0.05$.

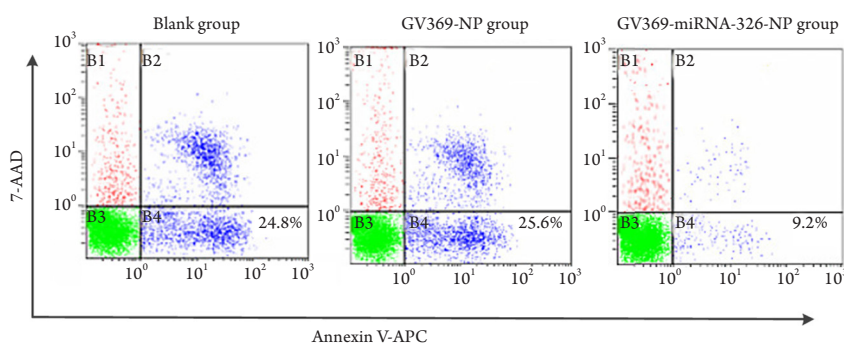
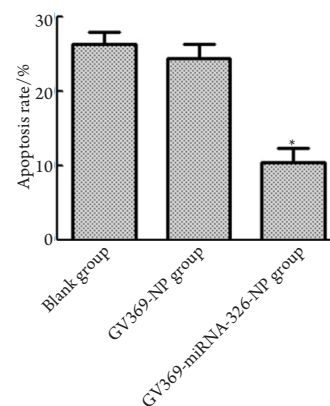


图3 流式细胞术检测细胞凋亡及凋亡率

Figure 3 Flow cytometry detection of apoptosis and apoptosis rate

与空白组相比, * $P < 0.05$.

Compared with the blank group, * $P < 0.05$.



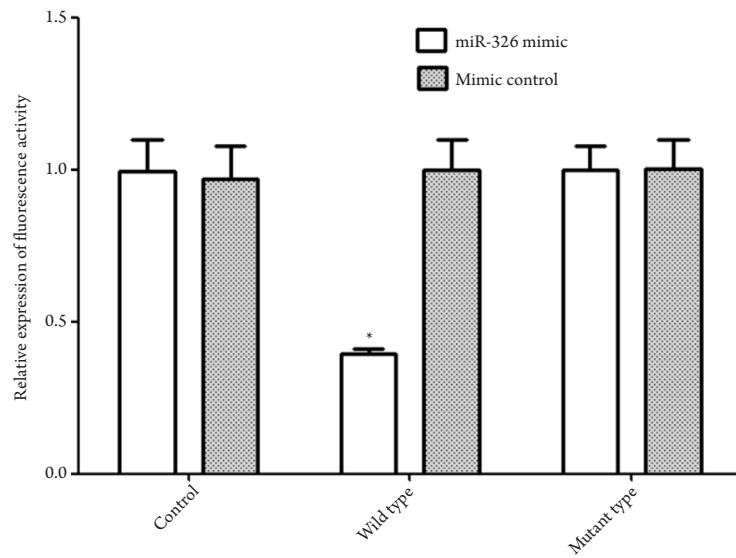


图4 各组荧光素酶活性比较

Figure 4 Comparison of luciferase activity in each group

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, * $P < 0.05$.

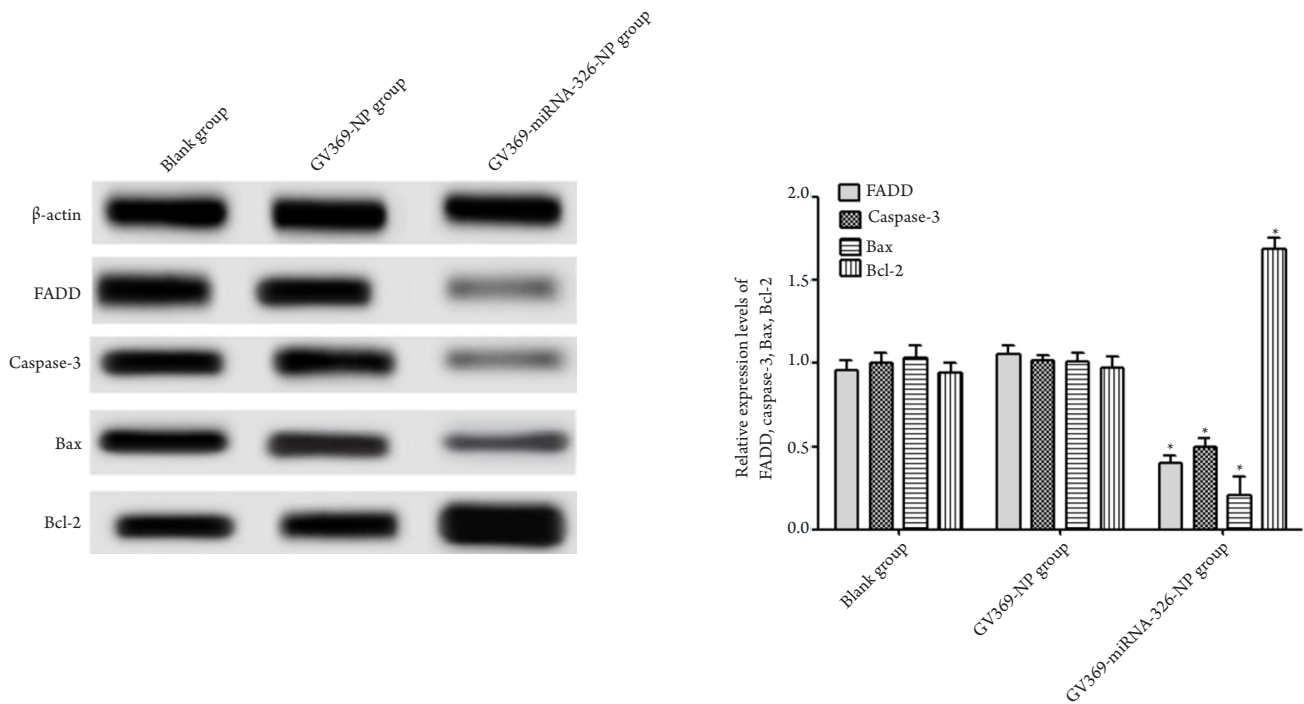


图5 蛋白质印迹法检测细胞中FADD, caspase-3, Bcl-2和Bax蛋白及其相对表达量

Figure 5 Relative expression levels of FADD, caspase-3, Bcl-2 and Bax proteins in cells detected by Western blotting

与空白组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with the blank group, * $P < 0.05$.

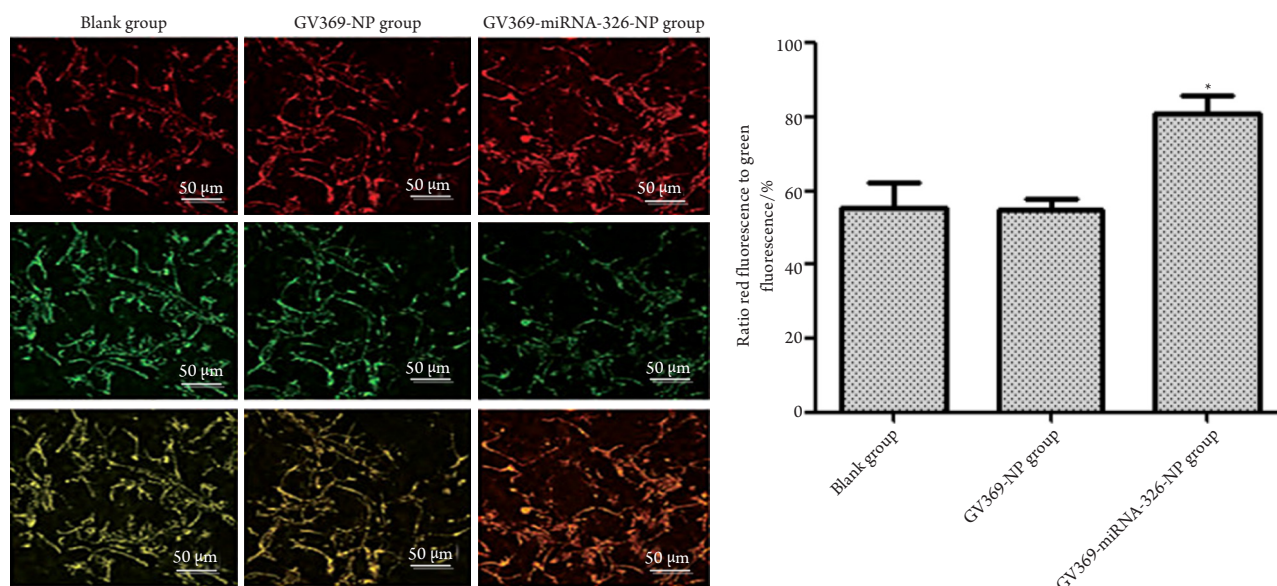


图6 细胞线粒体膜电势的观察

Figure 6 Observation of mitochondrial membrane potential in cells

与空白组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with the blank group, * $P < 0.05$.

3 讨论

近年, IDD性疾病已成为一种常见高发性慢性慢病, 不论是中老年人群还是青年人群都深受其苦。IDD可引起多种症状, 腰腿痛、椎管狭窄、椎间盘突出并伴有压迫神经根导致其他部位疼痛等^[7]。目前, 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。关于其发病的分子机制与转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、miRNA等在IDD中发挥重要作用^[8], 而NF- κ B, PI3K/Akt, MAPK, Wnt/ β -catenin, Notch等被认为是与该病相关的信号转导通路^[9]。这些分子与信号通路相互影响, 关系密切, 在疾病发生过程中共同起作用。

研究^[10]表明: miRNA-326作为miRNA家族的重要成员, 参与机体多项生理活动。miRNA-326在银屑病患者皮损中呈上调表达, 与炎症因子刺激有关。另外, miRNA-326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]、宫颈癌^[13]、肺癌^[14]等高丰度表达, 能够调控细胞的增殖、分化与凋亡等。研究^[15]发现: miRNA-326在退变NP细胞中表达量比正常NP细胞中显著降低。本研究通过构建人IDD NP细胞miRNA-326过表达细胞系发现: 与空白组相比, GV369-miRNA-326-NP细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$); GV369-NP组和空白组组之间差异无统

计学意义($P > 0.05$), 证实miRNA-326可抑制IDD NP发生细胞凋亡, 与既往研究^[16]结果相符。

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, IDD NP细胞凋亡与外源性通路FasL/Fas介导有关^[17]。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)。有报道^[18]称: miRNA-326对该通路有调控作用, 本研究采用双荧光素酶报告基因验证了miRNA-326与FasL具有靶向调控关系, 进一步分析构建的稳定过表达miRNA-326细胞系中FADD和caspase-3蛋白表达情况, 结果显示: 与空白组相比, FADD和caspase-3在GV369-miRNA-326-NP组中的表达水平明显下降($P < 0.05$); 而GV369-NP组与空白组相比无明显差别($P > 0.05$)。进一步证实miRNA-326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, 也叫线粒体途径, 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^[19]。Bcl-2作为主要的抗凋亡成员在线粒体外膜中发挥作用, 可以维持膜结构的完整性^[20]; Bax作为主要的促凋亡成员是通过破坏线粒体膜的完整性发挥作用的^[21]。Bcl-2家族蛋白能够使线粒体膜的通透性发生精确的改变,

也能诱导线粒体孔道开放,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^[22]。本研究同时检测了抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax,结果显示:过表达组(GV369-miRNA-326-NP)中Bax的表达水平下降,而Bcl-2表达水平升高,与其他两组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示miRNA-326在抑制IDD NP细胞凋亡中可能通过了线粒体介导的途径。为此,我们进一步检测了细胞线粒体膜电势的变化情况,结果显示:过表达组(GV369-miRNA-326-NP)细胞膜电势保持稳定,另外2组出现显著下降趋势($P<0.05$),再次验证了线粒体途径参与了miRNA-326抑制IDD NP细胞的凋亡。

综上,miRNA-326在人IDD NP细胞凋亡中具有重要作用,可通过靶向性调控外源性FasL/Fas通路参与caspase-3和FADD介导的细胞凋亡。此外,miRNA-326也可通过线粒体介导的途径抑制IDD NP细胞凋亡。此发现为以后进一步研究椎间盘退行性疾病提供了可靠依据,同时对IDD后的功能恢复治疗具有重要意义。

参考文献

- 岳佳伟, 李大鹏, 吴燕, 等. 椎间盘退变患者髓核组织中HtrA1的表达及其与MMPs的关系[J]. 山东医药, 2017, 57(22): 83-85.
YUE Jiawei, LI Dapeng, WU Yan, et al. Expression of HtrA1 in nucleus pulposus and its relationship with MMPs in patients with disc degeneration[J]. Shandong Medical Journal, 2017, 57(22): 83-85.
- Urrutia J, Besa P, Lobos D, et al. Lumbar paraspinal muscle fat infiltration is independently associated with sex, age, and inter-vertebral disc degeneration in symptomatic patients[J]. Skeletal Radiol, 2018, 47(7): 955-961.
- 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, 53(4): 386-389.
JIA Xiangzhen, XI Yongming, LIU Yong, et al. The regulatory effects of MMP3 and Sox9 genes on human disc degeneration nucleus pulposus cells[J]. Journal of Medical College of Qingdao University, 2017, 53(4): 386-389.
- 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, 31(1): 116-121.
HUANG Yong, FENG Ganjun, LIU Limin, et al. Advances in research on microRNAs and their non-viral vectors in intervertebral disc degeneration[J]. Chinese Journal of Repair and Reconstructive Surgery, 2017, 31(1): 116-121.
- Hu S, Ran Y, Chen W, et al. MicroRNA-326 inhibits cell proliferation and invasion, activating apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting LIM and SH3 protein 1[J]. Oncol Rep, 2017, 38(3): 1569-1578.
- 王来, 楚方旋, 耿慧霞, 等. CREB-shRNA对氧糖剥夺/复氧皮层神经元线粒体形态和凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(8): 1487-1493.
WANG Lai, CHU Fangxuan, GENG Huixia, et al. Effect of CREB-shRNA on mitochondrial morphology and cell apoptosis in OGD/R-induced cortical neurons[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2017, 33(8): 1487-1493.
- Chen B, Liu, Yi, Zhang, Yuan Qiang, et al. IL-21 Is Positively associated with intervertebral disc degeneration by interaction with TNF- α through the JAK-STAT signaling pathway[J]. Inflammation, 2017, 40(2): 612-622.
- 王明远, 宋西正, 李国栋. 人退变腰椎间盘特异性表达microRNA的靶基因及JNK信号转导通路在椎间盘退变中的分子生物学机制[J]. 中国老年学, 2015(16): 4486-4487.
WANG Mingyuan, SONG Xizheng, LI Guodong. Molecular biological mechanism of specific expression of microRNA target genes and JNK signal transduction pathway in human degenerative lumbar disc[J]. Chinese Gerontology, 2015(16): 4486-4487.
- Pan Z, Sun H, Xie B, et al. Therapeutic effects of gefitinib-encapsulated thermosensitive injectable hydrogel in intervertebral disc degeneration[J]. Biomaterials, 2018, 160: 56-68.
- 刘咏萍, 李玉妹. miRNA-326在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(2): 284-287.
LIU Yongping, LI Yushu. Research progress of mirna-326 in autoimmune diseases[J]. Chinese Journal of Immunology, 2017, 33(2): 284-287.
- Wu L, Hui H, Wang LJ, et al. MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting the nin one binding protein[J]. Oncol Rep, 2015, 33(5): 2309-2318.
- Liang Z, Wu H, Xia J, et al. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(6): 817-824.
- Cheng Y, Jiang S, Yuan J, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer cell invasiveness via regulation of microRNA-326/cortactin expression[J]. Gynecol Endocrin, 2018, 34(10): 853-858.
- Sun C, Huang C, Li S, et al. Hsa-miR-326 targets CCND1 and inhibits non-small cell lung cancer development[J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 8341-8359.

15. Yin S, Du W, Wang F, et al. MicroRNA-326 sensitizes human glioblastoma cells to curcumin via the SHH/GLI1 signaling pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(4): 260-270.
16. 张震. 血浆miRNA与腰椎间盘突出变的相关性及补肾壮督方的干预研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
ZHANG Zhen. The correlation between plasma miRNA and lumbar intervertebral disc degeneration and the intervention of bushanzhuangdu prescription[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2017.
17. 何升华, 赖居易, 王业广, 等. 腰突颗粒调节腰椎间盘突出退变模型兔 Fas/FasL基因的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(32): 5140-5145.
HE Shenghua, LAI Juyi, WANG Yeguang, et al. Lumbar process granules regulate the expression of Fas/FasL gene in the rabbit model of lumbar disc degeneration[J]. *Chinese Tissue Engineering Research*, 2017, 21(32): 5140-5145.
18. 吴棣, 徐艳雪, 韩瞳瞳, 等. FasL的特异性miRNA阻断舌鳞癌细胞免疫逃逸的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(8): 1115-1119.
WU Yan, XU Yanxue, HAN Tongtong, et al. Study of FasL specific miRNA blocking immune escape of tongue squamous cancer cells[J]. *Journal of Anhui Medical University*, 2017, 52(8): 1115-1119.
19. Russo A, Cardile V, Graziano ACE, 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]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): pii: E292.
20. Opferman JT, Kothari A. Anti-apoptotic Bcl-2 family members in development[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 37-45.
21. 姜西子, 金艾琳, 马琳, 等. 非小细胞肺癌中PHF20与凋亡相关蛋白Bax的表达及相关性[J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(10): 887-890.
JIANG Xizi, JIN Ailin, MA Lin, et al. Expression and correlation of PHF20 and apoptosis-related protein Bax in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of China Medical University*, 2017, 46(10): 887-890.
22. 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]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4593-4598.

本文引用: 高笛, 刘殿鹏. MiRNA-326抑制人椎间盘退变髓核细胞活力和凋亡的机制[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(4): 814-822. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.002

Cite this article as: GAO Di, LIU Dianpeng. Mechanism of miRNA-326 inhibiting the activity and apoptosis of human disc degeneration nucleus pulposus cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(4): 814-822. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.002