

微RNA-887-3p 能抑制大鼠椎间盘纤维环细胞中MDM4 表达和细胞增殖并促进细胞凋亡

朱晓雨, 袁韩涛, 李四波

(上海中医药大学附属第七人民医院脊柱外科, 上海 200137)

[摘要] **目的** 探讨微RNA (microRNA, miRNA 或 miR) -887-3p 对大鼠椎间盘纤维环细胞增殖和凋亡的影响及其潜在的分子机制。**方法** 取8周龄SPF级雄性SD大鼠的纤维环组织, 离心制备并鉴定纤维环细胞。实验随机分为4组: 正常组 (Normal group) 是不做任何处理的原代纤维环细胞; 对照组 (Control group) 用10 ng/mL 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 处理纤维环细胞24 h, 形成退变细胞模型; 干扰组 (miR-887-3p inhibitor) 是在对照组的基础上用Lipo3000转染miR-887-3p抑制子; 过表达组 (miR-887-3p mimics) 是在对照组的基础上用Lipo3000转染miR-887-3p模拟物。采用CCK-8法检测各组细胞活力; 流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 实时荧光定量PCR法检测miR-887-3p和鼠双微体4 (murine double minute 4, MDM4) mRNA的表达; 蛋白质印迹法检测MDM4、Bcl-2和Caspase-3的蛋白表达水平。**结果** 免疫荧光染色法鉴定分离培养的细胞发现, 大鼠椎间盘纤维环细胞中Collagen I的阳性率在90%以上, 提示纤维环细胞纯度大于90%。实时荧光定量PCR结果显示, 利用IL-1 β 构建纤维环退变细胞模型后, miR-887-3p表达水平与正常组相比显著上升 ($P<0.001$); 与对照组相比, 转染miR-887-3p抑制子后, miR-887-3p表达水平显著下降 ($P<0.001$)。CCK-8法检测结果表明, 与正常组相比, 对照组细胞活力显著下降 ($P<0.001$); 与对照组相比, 抑制miR-887-3p的表达后, 细胞增殖能力显著增强; miR-887-3p过表达后, 细胞增殖能力显著下降。流式细胞仪检测结果表明, 与正常组相比, 对照组的细胞凋亡率显著增加 ($P<0.001$); 与对照组相比, miR-887-3p干扰组的细胞凋亡率显著降低 ($P<0.001$), miR-887-3p过表达组的细胞凋亡率显著增加 ($P<0.001$)。蛋白质印迹法检测结果发现, 与正常组相比, 对照组中Bcl-2的表达水平显著降低 ($P<0.001$), Caspase-3的表达水平显著升高 ($P<0.001$); 与对照组相比, miR-887-3p干扰组中Bcl-2和MDM4表达水平显著升高 ($P<0.01$), Caspase-3的表达水平显著降低 ($P<0.01$); 而miR-887-3p过表达组中Bcl-2和MDM4表达水平显著降低 ($P<0.05$), Caspase-3的表达水平显著升高 ($P<0.05$)。实时荧光定量PCR和蛋白免疫印迹结果显示, 干扰miR-887-3p后, MDM4蛋白和mRNA的表达增加 ($P<0.001$); 过表达miR-887-3p后, MDM4蛋白和mRNA的表达降低 ($P<0.01$, $P<0.001$)。**结论** miR-887-3p可能通过调控MDM4的表达来影响大鼠椎间盘纤维环细胞的增殖和凋亡, 进而影响椎间盘退变的发生和发展。

[关键词] 微RNA-887-3p; 椎间盘纤维环细胞; 退变模型; 细胞增殖; 细胞凋亡; 大鼠

[中图分类号] R681.5; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)03-0270-09



MicroRNA-887-3p Inhibited MDM4 Expression and Proliferation but Promoted Apoptosis of Intervertebral Disc Annulus Fibrosus Cells in Rats

ZHU Xiaoyu, YUAN Hantao, LI Sibao

(Department of Spinal Surgery, Seventh People's Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China)

Correspondence to: LI Sibao (ORCID: 0000-0002-3822-1509), E-mail: 13761603358@163.com

[基金项目] 上海市浦东新区科技发展基金-民生科研专项“椎间盘纤维环细胞中hsa-miR-887-3p在凋亡中的作用及复合胶原蛋白海绵修复大鼠纤维环损伤的研究”(PKJ2019-Y18); 上海市浦东新区卫生健康委学科带头人培养计划-李四波(PWRd2019-10); 浦东新区中央财政支持中医药传承创新发展示范试点项目“石印玉全国名中医传承工作室”(YC-2023-0120)、“中医高峰学科(中西医结合骨伤科)”(YC-2023-0601); 财政部国家中医药管理局医疗服务与保障能力提升补助资金(重点科室部分)项目“中西医协同重点科室建设”(沪卫中管便函[2023]46号)

[第一作者] 朱晓雨(1998—), 女, 硕士研究生, 从事脊柱退行性病变研究。E-mail: 1254402429@qq.com

[通信作者] 李四波(1978—), 男, 博士, 副主任医师, 从事脊柱退行性病变临床与实验研究。E-mail: 13761603358@163.com。ORCID: 0000-0002-3822-1509

[ABSTRACT] Objective To investigate the effects of microRNA (miRNA, miR)-887-3p on the proliferation and apoptosis of rat intervertebral disc annulus fibrosus cells and its underlying molecular mechanism. **Methods** Annulus fibrosus tissues were obtained from 8-week-old SPF-grade SD male rats, centrifuged to prepare and identify annulus fibrosus cells. Rats in the experiment were randomly divided into four groups: a Normal group consisting of primary annulus fibrosus cells without any treatment; a Control group treated with 10 ng/mL interleukin-1 β (IL-1 β) for 24 hours to establish a degenerative cell model; an interference group (miR-887-3p inhibitor) transfected with miR-887-3p inhibitor using Lipo3000 based on the Control group; and an overexpression group (miR-887-3p mimics) transfected with miR-887-3p mimics using Lipo3000 based on the Control group. CCK-8 assay was used to assess cell viability; flow cytometry was used to measure cell apoptosis rates; real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression levels of miR-887-3p and murine double minute 4 (MDM4) mRNA; Western blotting was used to measure the protein expression levels of MDM4, Bcl-2, and Caspase-3. **Results** Immunofluorescence staining of isolated and cultured cells revealed a Collagen I positive rate of over 90% in rat intervertebral disc annulus fibrosus cells, indicating a cell purity level greater than 90%. Real-time fluorescence qPCR results showed that after establishing an annulus fibrosus degenerative cell model using IL-1 β , the expression level of miR-887-3p significantly increased compared to the Normal group ($P<0.001$). Compared to the Control group, transfection with miR-887-3p inhibitor resulted in a significant decrease in its expression level ($P<0.001$). The CCK-8 assay showed that compared to the Normal group, cell viability significantly decreased in the Control group ($P<0.001$). Compared to the Control group, cell proliferation ability significantly increased after miR-887-3p inhibition, and significantly decreased after overexpression of miR-887-3p. Flow cytometry results revealed that compared to the Normal group, the apoptosis rate in the Control group significantly increased ($P<0.001$). Compared to the Control group, the cell apoptosis rate significantly decreased in the miR-887-3p interference group ($P<0.001$) and increased in the overexpression group ($P<0.001$). Western blotting analysis showed that compared to the Normal group, Bcl-2 expression level significantly decreased ($P<0.001$) and Caspase-3 expression level significantly increased ($P<0.001$) in the Control group. Compared to the Control group, Bcl-2 and MDM4 expression levels significantly increased ($P<0.01$), and Caspase-3 expression level significantly decreased ($P<0.01$) in the miR-887-3p interference group; whereas in the overexpression group, Bcl-2 and MDM4 expression levels significantly decreased ($P<0.05$), and Caspase-3 levels significantly increased ($P<0.05$). Real-time fluorescence qPCR and protein immunoblotting results showed that after interfering with miR-887-3p, the expression of MDM4 protein and mRNA increased ($P<0.001$); after overexpressing miR-887-3p, their expression decreased (protein, $P<0.01$; mRNA, $P<0.001$). **Conclusion** MiR-887-3p may modulate the cell proliferation and apoptosis of rat intervertebral disc annulus fibrosus cells by regulating MDM4 expression, thereby influencing the development and progression of disc degeneration.

[Key words] miR-887-3p; Intervertebral disc annulus fibrosus cells; Degenerative model; Cell proliferation; Apoptosis; Rats

椎间盘是脊柱中的重要结构,具有承载与缓冲脊柱应力的功能,能够确保脊柱的正常生理活动^[1]。衰老、异常应力、损伤和遗传等原因均会导致椎间盘的退变,具体表现为髓核的含水量降低、细胞外基质降解、细胞凋亡、自噬、衰老和炎症等现象。椎间盘退变使髓核组织的弹性变弱,同时在外力、应力的累积下逐渐导致纤维环的破裂,最终椎间盘的髓核突出甚至脱出,压迫周围的脊髓或神经根,进而出现疼痛、麻木、肢体瘫痪、大小便障碍等症状^[2-3]。临床上,

修复破裂的纤维环是治疗椎间盘退变的关键环节,然而在目前的临床实践中尚未找到满意的治疗方法^[4-5]。

近年来,一类新的非蛋白质编码微RNA (microRNA, miRNA 或 miR) 的发现,为骨关节疾病^[6]、肿瘤^[7]和神经疾病^[8]等机制研究提供了新的思路。miRNA 是一种内源性,长约19~23个核苷酸的非编码单链RNA分子,与RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合后,通过与靶mRNA的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3' UTR)

完全或不完全配对, 促进目标 mRNA 降解和翻译抑制, 进而通过负调控靶基因的表达来参与细胞增殖、分化、凋亡和代谢等过程^[9-10]。越来越多的研究证实, 椎间盘相关细胞可被 miRNA 调控, 例如: Chen 等^[11]发现 miR-375 高表达可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路, 进而抑制椎间盘细胞侵袭、迁移和凋亡的方式来缓解炎症反应; Liu 等^[12]证实, miR-140-5p 在关节液和滑膜中均呈低表达, 并与 K-L 分级呈负相关, 提示 miR-140-5p 可能成为膝骨关节炎的临床监测指标和治疗靶点。因此, 深入探究 miRNA 与相关疾病的关系, 对于疾病机制的研究意义重大。

有研究报道, miR-887-3p 参与肿瘤^[13]、心血管^[14]和骨关节^[15]等多种疾病的进展。鼠双微体 4 (murine double minute 4, MDM4) 调控细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡等生命过程, 在多种疾病的发生、发展中发挥重要作用^[16]。本研究通过抑制或过表达 miR-887-3p, 探讨 MDM4 在退行性椎间盘纤维环细胞中的作用机制, 以期以 miR-887-3p 为靶点治疗椎间盘退变疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究所用 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (260±30) g, 购自上海必凯科翼生物技术有限公司 [SCXK (沪) 2018-0006, 质量合格证编号为 20180006054207]。每日向大鼠投喂江苏省协同医药生物工程有限公司生产的大鼠小鼠维持饲料。饲养环境给予 12 h : 12 h 的明暗循环光照, 室内温度和相对湿度分别维持在 22~24 °C 和 60%~70%。该实验由上海中医药大学 [SYXK (沪) 2020-0009] 实施, 并经上海市第七人民医院伦理委员会的批准 (批号: 2023-AR-014), 遵循实验动物 3R 原则。

1.1.2 实验试剂和仪器

IL-1 β (400-01B-10) 购自美国 PeproTech 公司; miR-887-3p 模拟物 (HY-R02495) 和抑制子 (HY-RI02495) 均购自美国 MedChemExpress 公司; LipofectAMINE 3000 (L3000008) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; I 型胶原酶 (9001-12-1) 购自美国 Sigma 公司; PBS 及胰蛋白酶 (P1022 和 T1300) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清 (FBSSR-01021-500) 购自广州赛业生物科技有限公司; TRIzol (T9108) 购自日本 TaKaRa 公司; DMEM/f12 培养基

(1132-033) 购自美国 Gibco 公司; 5 $\times$ 上样缓冲液 (LT104)、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (PG113)、多色预染蛋白分子量标准 (WJ103) 和脱脂奶粉均购自上海雅酶生物医药科技有限公司; RIPA 裂解液 (WB0102)、BCA 蛋白定量试剂盒 (WB0123) 和蛋白酶磷酸酶抑制剂 (WB0122) 均购自上海威奥生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒 (C0038) 和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (C1062M) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。荧光 (Cy3) 标记的羊抗兔 IgG (BA1032) 购自武汉博士德生物工程有限公司。抗 Bcl-2 一抗抗体 (26593-1-AP Rabbit /IgG; Polyclonal) 和抗 Caspase-3 一抗抗体 (19677-1-AP; Rabbit /IgG; Polyclonal) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 抗 MDM4 一抗抗体 (CSB-PA013627GA01 HU; Rabbit /IgG; Polyclonal) 购自武汉华美生物工程有限公司; 抗 β -actin 一抗抗体 (4970; Rabbit /IgG; Polyclonal) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗抗体 (5450-0010) 购自美国 SeraCareLife Science 公司; 戊巴比妥钠 (57-43-2) 购自上海原思标物科技有限公司。

CO₂ 培养箱 (日本 Sanyo 公司), 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 超净工作台 (苏州博莱尔净化设备有限公司), 高速离心机 (美国 Beckman Coulter 公司), 化学发光成像仪 (美国 ProteinSimple 公司), LightCycler 96 实时定量 PCR 仪 (美国 Roche 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠椎间盘纤维环细胞分离与培养

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (150 mg/kg)^[17], 确认动物死亡后用 75% 乙醇溶液浸泡 5 min, 然后移至超净工作台内, 仰卧位固定大鼠, 沿腹腔正中线剪开皮肤, 打开胸腔, 取出完整脊椎。仔细分离椎间盘, 剪下椎间盘外围纤维环组织, 将纤维环剪成 1 mm³ 的小块组织。向组织中加入消化液 (含胶原酶, 由 DMEM 完全培养基配制), 吸管吹打混匀, 置于 37 °C 培养箱中培养 6 h; 吸管吹打消化后的组织 20 次, 经 200 目细胞筛过滤, 收集滤液, 500 $\times$ g 离心 5 min, 收集细胞沉淀待用。

1.2.2 大鼠椎间盘纤维环细胞鉴定

采用免疫荧光染色法对大鼠椎间盘纤维环细胞进行鉴定: 首先进行细胞爬片, 在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 min $\times$ 3 次; 质量分数 4% 的多聚甲醛溶液固定爬片 15 min, PBS 浸洗玻片 3 min $\times$ 3 次; 经 0.5% TritonX-100 (PBS 配制) 室温通透 20 min,

PBS浸洗玻片3 min×3次,并用吸水纸吸干;在玻片上滴加正常山羊血清,室温封闭30 min;吸水纸吸净封闭液后,每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗(抗Collagen I抗体),放入湿盒,于4℃孵育过夜;第2天用PBST浸洗爬片3 min×3次;吸水纸吸净爬片上多余液体,滴加稀释好的荧光(Cy3)标记的羊抗兔IgG,在湿盒中于20~37℃下孵育1 h, PBST浸洗切片3 min×3次;滴加DAPI并避光孵育5 min,对标本进行细胞核染色, PBST浸洗切片5 min×4次,以洗去多余的DAPI;用吸水纸吸净爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封固,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.3 实验分组、细胞模型构建与转染

细胞实验分4组:正常组(Normal group),不做任何处理的原代纤维环细胞;对照组(Control group),用IL-1 β 处理的纤维环细胞,形成退变细胞模型;干扰组(miR-887-3p inhibitor),在对照组的基础上转染miR-887-3p抑制子,下调miR-887-3p表达;过表达组(miR-887-3p mimics),在对照组的基础上转染miR-887-3p模拟物,上调miR-887-3p表达。

大鼠椎间盘纤维环细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于6孔板中,按上述描述分组处理。待细胞完全贴壁后开始干预,除正常组外,其余3组细胞在转染前均用10 ng/mL的IL-1 β 处理24 h,构建大鼠椎间盘纤维环细胞退变模型^[18-20]。

采用瞬时转染法转染miR-887-3p抑制子和模拟物到大鼠椎间盘纤维环细胞:取对数生长期细胞,计数后接种于6孔板,过夜;当细胞融合度达到30%~50%时转染;将miR-887-3p抑制子和模拟物分别与LipofectAMINE 3000轻吹混匀,室温静置20 min;然后分别加入相应的细胞中,在37℃、5% CO₂的保温箱中孵育8 h;更换含10%血清的完全培养基;转染48 h后提取细胞总蛋白或者总RNA。

1.2.4 细胞活力检测

按CCK-8试剂盒说明书进行相关操作:纤维环细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板中,分为4组,每组设5个复孔;细胞完全贴壁后,分组转染8 h,然后分别培养12 h、24 h、48 h和72 h;随后向各孔中加入10 μ L CCK-8溶液,同时设置空白孔(仅培养基);在37℃细胞培养箱中避光孵育2 h后,用酶标仪于450 nm波长处测量吸光度值,计算细胞增殖活力。细胞活力=(实验组吸光度值-空白孔吸光度值)/(对照组吸光度值-空白孔吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

纤维环细胞(1×10^5 个/孔)接种于6孔板中培养,按照前述方法分组干预后,与Annexin V-FITC/PI双染凋亡检测试剂盒中的工作液孵育30 min;经质量分数4%多聚甲醛溶液室温固定15 min,每孔中加入5 μ L Annexin V-FITC溶液,4℃孵育30 min;再用PI避光孵育10 min,最后用流式细胞仪读数。应用Image J软件分析,计算细胞凋亡率(早期凋亡和晚期凋亡总和所占百分率)。

1.2.6 实时荧光定量PCR检测相关mRNA表达

按照前述方法分组干预后,收集纤维环细胞。用TRIzol法提取细胞总RNA, poly(T)加尾法逆转录合成cDNA,然后采用SYBRgreen荧光染料法PCR进行miR-887-3p和MDM4 mRNA扩增。miR-887-3p上游引物为5'-TGCGCGTGAACGGGCGCCATCC-3',下游引物为5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3';内参U6上游引物为5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物为5'-AACGCACGAATTTGCGT-3';MDM4上游引物为5'-TGGGAGAACTACTGGGACGT-3',下游引物为5'-TCCTGTGCGAGACGAGACT-3';内参GAPDH上游引物为5'-TGATTCTACCCACGGCAAGTT-3',下游引物为5'-TGATGGGTTTCCCATTGATGA-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。根据2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因的相对表达量^[21-22]。

1.2.7 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达

按照前述方法分组干预后收集纤维环细胞,于低温下用PBS洗涤细胞3次,使用总蛋白提取试剂盒在冰上提取总蛋白,然后用BCA试剂盒定量蛋白浓度。使用5 $\times$ loading buffer将蛋白样品稀释至合适浓度,煮沸后待用。蛋白总上样量为30 μ g, SDS-PAGE分离样品,转移到PVDF膜上,用5% BSA室温封闭2 h;将PVDF膜与一抗(抗Bcl-2、Caspase-3、MDM4抗体,稀释比例为1:2 000)在4℃下孵育过夜;TBST洗涤5 min×3次;加入带辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔IgG, 1:2 000)室温孵育2 h;TBST洗涤5 min×3次;滴加显影液后曝光,应用Image J软件进行分析,计算目的条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,并用GraphPad Prism 9制作统计图。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功获得大鼠椎间盘纤维环退变细胞模型

免疫荧光染色法鉴定分离培养的大鼠椎间盘纤维环细胞，结果发现细胞中 Collagen I 表达阳性率在 90% 以上，表明分离的纤维环细胞纯度大于 90%，可以用于后续的实验（图 1A）。然后用 IL-1 β 处理大鼠椎间盘纤维环细胞，获得纤维环退变细胞模型。

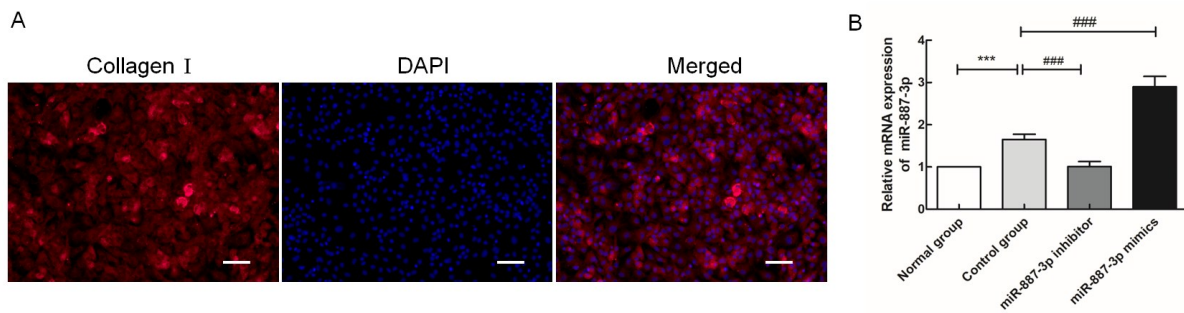
2.2 转染 miR-887-3p 抑制子和模拟物后 miR-887-3p 表达变化

将 miR-887-3p 抑制子、模拟物转染到退变的纤维环细胞后，实时荧光定量 PCR 检测结果发现，与未处理的正常组相比，IL-1 β 处理的对照组（即纤维环退变细胞模型组）中 miR-887-3p 的表达水平显著上升（ $P<0.001$ ）。而与对照组相比，干扰组（即 miR-887-3p

抑制子转染组）中 miR-887-3p 表达水平显著下降（ $P<0.001$ ），过表达组（即 miR-887-3p 模拟物转染组）中 miR-887-3p 的表达水平显著上升（ $P<0.001$ ）（图 1B）。

2.3 miR-887-3p 表达变化对大鼠椎间盘纤维环细胞增殖的影响

CCK-8 法检测转染 miR-887-3p 抑制子和模拟物后大鼠椎间盘纤维环细胞增殖能力的变化。结果显示，与正常组相比，对照组（IL-1 β 处理后获得的纤维环退变细胞模型）细胞活力显著下降（ $P<0.001$ ），且随着时间延长逐渐下降；抑制 miR-887-3p 表达后，细胞增殖能力与对照组相比明显增强，与正常组相比差异已无统计学意义（ $P>0.05$ ）；而 miR-887-3p 过表达后，细胞增殖能力与对照组相比进一步降低（ $P<0.001$ ），与正常组相比显著降低（ $P<0.001$ ），且随着时间延长逐渐下降（表 1）。



注：A，免疫荧光染色法鉴定大鼠椎间盘纤维环细胞（Collagen I 表达被 Cy3 荧光抗体标记后显红色；DAPI 染色细胞核呈蓝色；Merged 为两者叠加；比例尺：100 μ m）。B，实时荧光定量 PCR 检测 miR-887-3p 抑制子和模拟物转染后的 miR-887-3p 相对表达量（与正常组相比，*** $P<0.001$ ；与对照组相比，### $P<0.001$ ）。

Note: A, Immunofluorescence staining was used to identify rat intervertebral disc annulus fibrosus cells (Collagen I expression marked by Cy3 fluorescent antibody appeared red; cell nuclei stained with DAPI appeared blue; Merged, the overlay of A and B; Scale bar: 100 μ m). B, Relative expression of miR-887-3p after transfection with miR-887-3p inhibitor and mimics detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Compared to the normal group, *** $P<0.001$; Compared to the control group, ### $P<0.001$.

图1 大鼠椎间盘纤维环细胞鉴定及 miR-887-3p 表达水平检测

Figure 1 Identification of rat intervertebral disc annulus fibrosus cells and detection of miR-887-3p expression levels

表1 CCK-8 检测 miR-887-3p 抑制子和模拟物转染后大鼠椎间盘纤维环细胞的增殖能力

Table 1 CCK-8 assay used to test cell proliferation ability of rat intervertebral disc annulus fibrosus cells after transfection with miR-887-3p inhibitor and mimics

组别 Groups	细胞活力 / % Cell viability / %			
	12 h	24 h	48 h	72 h
正常组 (Normal group)	100.00 $\pm$ 3.24	100.00 $\pm$ 2.65	100.0 $\pm$ 3.02	100.00 $\pm$ 1.24
对照组 (Control group)	98.65 $\pm$ 2.54	75.25 $\pm$ 6.26**	62.40 $\pm$ 6.86***	36.54 $\pm$ 2.04***
miR-887-3p inhibitor	96.56 $\pm$ 2.23	95.46 $\pm$ 1.25	94.54 $\pm$ 3.01	95.23 $\pm$ 2.25
miR-887-3p mimics	95.71 $\pm$ 1.62	62.71 $\pm$ 7.62***	40.74 $\pm$ 5.13***	23.15 $\pm$ 3.63***

注：与正常组相比，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与对照组相比，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

Note: Compared to the normal group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Compared to the control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.4 miR-887-3p 表达变化对大鼠椎间盘纤维环细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测瞬时转染 miR-887-3p 抑制子、模拟物后大鼠椎间盘纤维环细胞凋亡率的变化。结果显示,与正常组相比,对照组(IL-1 β 处理后获得的纤维环退变细胞模型)细胞凋亡率显著增加($P<0.001$)。与对照组相比,miR-887-3p 干扰组的细胞凋亡率显著降低($P<0.001$),而 miR-887-3p 过表达组的细胞凋亡率显著增加($P<0.001$)(图2)。

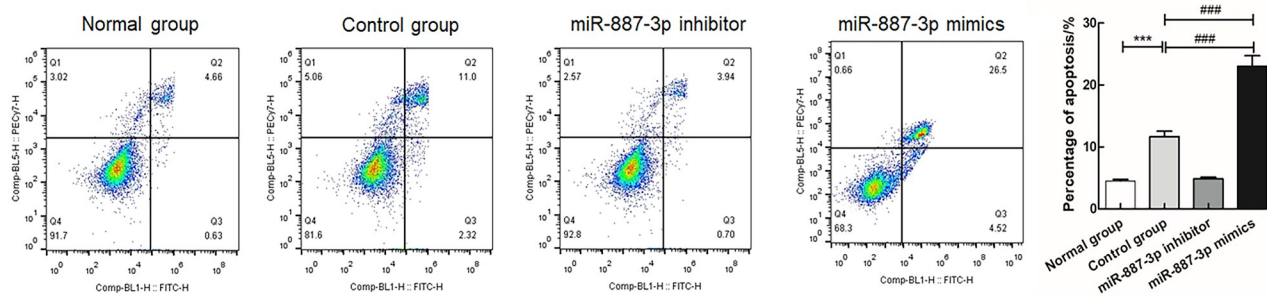
2.5 miR-887-3p 表达变化对大鼠椎间盘纤维环细胞凋亡相关蛋白表达的影响

蛋白质印迹法检测转染 miR-887-3p 抑制子、模拟物后凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Caspase-3 的表达变化。结果发现,与正常组相比,对照组(IL-1 β 处理后获得的纤维环退变细胞模型)中 Bcl-2 的表达水平显著降低($P<0.001$),Caspase-3 的表达水平显著升高($P<0.001$)。与对照组相比,miR-887-3p 干扰组中 Bcl-2

的表达水平显著升高($P<0.01$),Caspase-3 的表达水平降低($P<0.01$);miR-887-3p 过表达组中 Bcl-2 的表达水平降低($P<0.05$),Caspase-3 的表达水平显著升高($P<0.05$)(图3)。

2.6 转染后 miR-887-3p 抑制子、模拟物对相关通路蛋白的影响

前期通过生物信息学分析发现,MDM4 可能在 miR-887-3p 影响椎间盘纤维环细胞功能的过程中起一定作用。实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测转染 miR-887-3p 抑制子、模拟物后 MDM4 mRNA 和蛋白的表达变化。结果发现,与正常组相比,对照组(IL-1 β 处理后获得的纤维环退变细胞模型)中 MDM4 mRNA 的表达水平显著升高($P<0.01$);与对照组相比,miR-887-3p 干扰后 MDM4 mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高($P<0.001$);miR-887-3p 过表达后 MDM4 mRNA 和蛋白的表达水平均显著下降($P<0.001$, $P<0.01$)(图4)。



注:与正常组相比,*** $P<0.001$;与对照组相比,### $P<0.001$ 。

Note: Compared to the normal group, *** $P<0.001$; Compared to the control group, ### $P<0.001$.

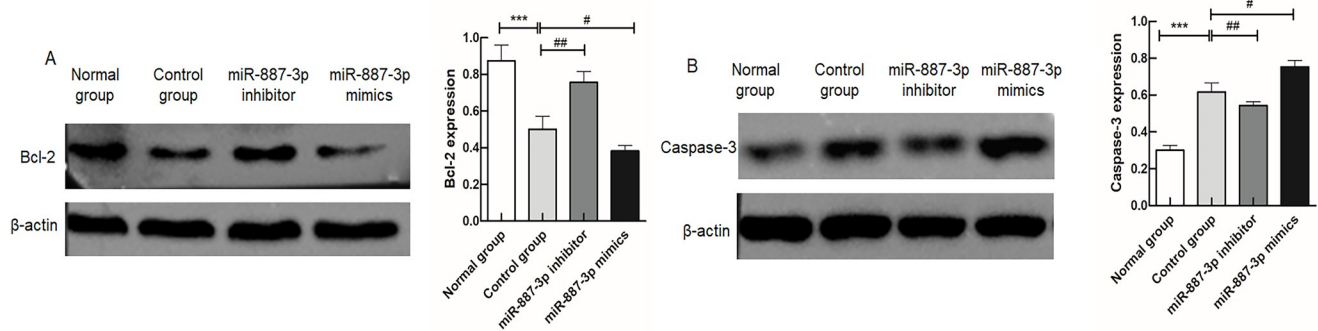
图2 流式细胞仪检测转染 miR-887-3p 抑制子和模拟物转染后 48 h 的大鼠椎间盘纤维环细胞凋亡率

Figure 2 Flow cytometry measurement of apoptosis rates in rat intervertebral disc annulus fibrosus cells 48 h after transfection with miR-887-3p inhibitor and mimics

3 讨论

椎间盘退变是引起慢性下腰痛最为常见的病症之一。椎间盘结构包括髓核、纤维环和软骨终板,其中纤维环组织在维持椎间盘的稳定性方面发挥重要作用,对椎间盘退变的发生、发展至关重要^[1]。目前,椎间盘退变的病理机制尚未阐明,通常认为由遗传、基因多态性、炎症因子激活和细胞外基质降解等导致的椎间盘细胞衰老与凋亡是椎间盘退变的始动因素^[2]。因此,研究椎间盘细胞退变的分子机制有助于阐明其退变的病理机制。

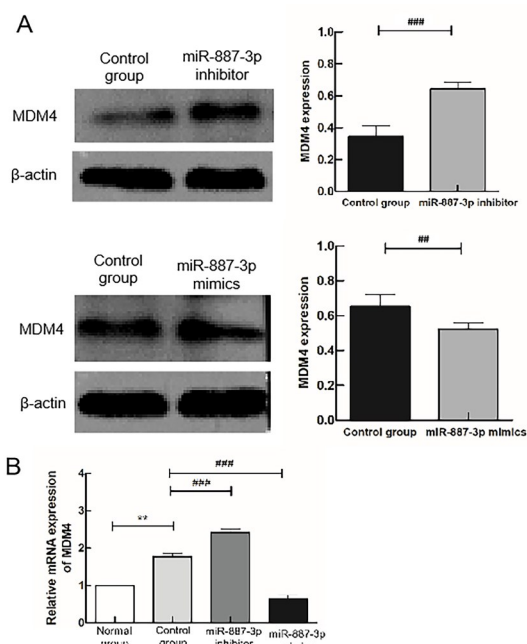
miRNA 调节转录后的蛋白表达,通常是高度保守的,具有组织特异性,这一特性大大提高了 miRNA 在某些疾病诊断中作为有价值的临床标志物的可能性^[4]。椎间盘退变是一系列分子、细胞、生化和结构变化的过程,研究表明有多种 miRNA 参与了椎间盘退变病变的过程。以往研究证实,miR-377 负调控 ADAMTS5 基因的表达,减少聚集体的分解,从而加速组织退化^[23]。李小川等^[24]发现,上调 miR-155 可通过抑制 FADD 和 Caspase-3 表达,促进 Fas 介导的髓核细胞凋亡。本研究从大鼠中获取正常的椎间盘纤维环细胞,用免疫荧光染色法进行鉴定后,用 IL-1 β 处理



注：与正常组相比，*** $P<0.001$ ；与对照组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

Note: Compared to the normal group, *** $P<0.001$; Compared to the control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

图3 蛋白质印迹法检测瞬时转染miR-887-3p抑制子和模拟物48 h后大鼠椎间盘纤维环细胞中Bcl-2(A)和Caspase-3(B)蛋白表达
Figure 3 Western blotting analysis of Bcl-2(A) and Caspase-3(B) protein expression in rat intervertebral disc annulus fibrosus cells 48 h after transient transfection with miR-887-3p inhibitor and mimics



注：蛋白质印迹法 (A) 和实时荧光定量PCR (B) 检测鼠双微体4 (MDM4) 的表达。与正常组相比，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与对照组相比，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ 。

Note: Expression of murine double minute 4 (MDM4) was detected by Western blotting (A) and real-time fluorescence quantitative PCR (B). Compared to the normal group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Compared to the control group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

图4 瞬时转染miR-887-3p抑制子和模拟物48 h后大鼠椎间盘纤维环细胞中MDM4 mRNA和蛋白表达的变化
Figure 4 Changes in MDM4 mRNA and protein expression in rat intervertebral disc annulus fibrosus cells 48 h after transient transfection with miR-887-3p inhibitor and mimics

24 h 构建纤维环细胞退变模型；检测发现，miR-887-3p 在退行性椎间盘纤维环细胞中高表达，抑制或者过

表达 miR-887-3p 均可影响MDM4的表达水平；在此基础上进一步检测抑制或者过表达 miR-887-3p 对退行性椎间盘纤维环细胞活力和细胞凋亡等的影响，以期 miR-887-3p 作为靶点治疗纤维环细胞退变的椎间盘疾病提供参考。

细胞凋亡是在一定的生理或病理条件下，受多种基因调控的程序化的细胞死亡方式^[25]。大量研究表明，线粒体通路及其相关蛋白在凋亡中起着至关重要的作用。在众多的凋亡相关基因中，Bcl-2 作为第一个被确认能够抗细胞凋亡的基因，定位于18号染色体21区，主要分布于线粒体外膜的胞质面、内质网及核膜上^[26]；Caspase-3 是近年来Caspase 家族中最重要的凋亡执行者之一，通常以非活化的酶原形式存在于细胞质中，可在多种凋亡信号的刺激下被激活，并使多种蛋白底物发生变性^[27]。本研究结果表明，与正常组相比，退变细胞中Bcl-2 的表达水平下降，Caspase-3 的表达水平增加。进一步转染miR-887-3p 抑制子后，退变的纤维环细胞中miR-887-3p 表达水平降低，细胞凋亡率降低，Bcl-2 表达水平增加，Caspase-3 表达水平降低；而转染miR-887-3p 模拟物后，miR-887-3p 表达水平升高，细胞凋亡率增加，Bcl-2 表达水平降低，Caspase-3 表达水平增加。

大量研究表明，MDM4 是p53 的主要负调控因子，在乳腺癌、胃癌和结肠癌等恶性肿瘤中均过表达^[16]。有研究利用单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 基因分型和双荧光素酶报告基因检测技术发现，功能性MDM4 rs4245739 SNP 与中国汉族人群的小细胞肺癌风险显著降低有关，MDM4 有望成为潜在的疾病标志物^[28]。也有研究表明，MDM4 对

p53的调控是双向的：一方面通过抑制p53的表达来抑制肿瘤凋亡；另一方面通过结合Bcl-2促进p53磷酸化，进而促进线粒体内源化凋亡^[29]。还有研究发现，MDM4在类风湿关节炎中通过调控miR-431靶向MDM4，抑制细胞侵袭，促进细胞凋亡^[30]。本研究发现，miR-887-3p干扰后MDM4表达升高，miR-887-3p过表达后MDM4表达降低，提示miR-887-3p可能通过调控MDM4表达影响细胞的增殖和凋亡，进而阻止椎间盘退变的发生和发展。

综上，miR-887-3p能够显著影响退变的纤维环细胞的增殖能力和凋亡水平，其分子机制可能是与其调控MDM4的表达有关。需要说明，本文仅仅进行了动物细胞体外实验，缺乏体内研究，后续将建立动物实验模型，进一步明确miR-887-3p在大鼠椎间盘纤维环退变中的作用。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海市第七人民医院实验动物伦理委员会审批(批号:2023-AR-014)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行,包括《动物管理条例》(2017年3月1日)和《实验动物:动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892-2018)。

All animal experiments involved in this study were reviewed and approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Shanghai Seventh People's Hospital (Approval Letter No. 2023-AR-014). All experimental procedures were performed in accordance with laws and regulations related to laboratory animals in China, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017) and *Laboratory Animal: Guidelines for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018).

[作者贡献 Author Contribution]

朱晓雨负责实验操作、统计分析及论文撰写;
袁韩涛负责动物实验;
李四波负责课题整体构思及文章修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 罗卓荆, 杨柳, 王迪. 我国椎间盘退变的生物学研究成就及展望[J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(6):481-485, 489. DOI:10.13276/j.issn.2097-1656.2023.06.001.
LUO Z J, YANG L, WANG D. Achievements and prospects of biological research of intervertebral disc degeneration in China[J]. J Air Force Med Univ, 2023, 44(6):481-485, 489. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2023.06.001.
- [2] 冷佳俐, 汪振宇, 刘芳. MiR-335-3p靶向调控CCL5在TNF- α 诱导椎间盘退变中相关机制[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(12):2956-2961. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2023.12.038.
- [3] LENG J L, WANG Z Y, LIU F. Mechanism of miR-335-3p targeted regulation of CCL5 in TNF- α -induced intervertebral disc degeneration[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(12):2956-2961. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.12.038.
- [4] FENG C C, LIU H, YANG M H, et al. Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: causes and molecular pathways[J]. Cell Cycle, 2016, 15(13):1674-1684. DOI: 10.1080/15384101.2016.1152433.
- [5] 肖冰, 齐军强, 王浩田, 等. 微小RNA在椎间盘退变中的作用机制及治疗研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2023, 33(3):274-280. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2023.03.13.
- [6] XIAO B, QI J Q, WANG H T, et al. Research progress in mechanism and treatment of microRNA in intervertebral disc degeneration[J]. Chin J Spine Spinal Cord, 2023, 33(3):274-280. DOI:10.3969/j.issn.1004-406X.2023.03.13.
- [7] KEPLER C K, PONNAPPAN R K, TANNOURY C A, et al. The molecular basis of intervertebral disc degeneration[J]. Spine J, 2013, 13(3):318-330. DOI: 10.1016/j.spinee.2012.12.003.
- [8] 许刚, 张长春, 朱坤, 等. MiR-141-3p对腰椎间盘突出症大鼠背根神经节炎症及下肢疼痛的抑制和改善作用[J]. 中国组织工程研究, 2024, 10(16):2593-2598. DOI: 10.12307/2024.277.
- [9] XU G, ZHANG C C, ZHU K, et al. Effects of miR-141-3p on dorsal root ganglion inflammation and lower limb pain in rats with lumbar disc herniation[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 10(16):2593-2598. DOI: 10.12307/2024.277.
- [10] 黄皆和, 王茜, 郑舜杰, 等. 微小RNA-103a-3p通过肿瘤蛋白53调控凋亡抑制剂1/P53对骨质疏松症的影响[J]. 解剖学报, 2024, 55(2):174-180. DOI:10.16098/j.issn.0529-1356.2024.02.007.
- [11] HUANG J H, WANG Q, JIA S J, et al. Effects of microRNA-103a-3p on osteoporosis through tumor protein 53-regulated inhibitor of apoptosis 1/P53[J]. Acta Anat Sin, 2024, 55(2):174-180. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2024.02.007.
- [12] SHARMA B, TORRES M M, RODRIGUEZ S, et al. MicroRNA-502-3p regulates GABAergic synapse function in hippocampal neurons[J]. Neural Regen Res, 2024, 19(12):2698-2707. DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-23-01064.
- [13] 应瑛, 许岳, 路通, 等. MiR-34a-5p/PLCD3轴调控骨关节炎进展的机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(33):5320-5325. DOI: 10.12307/2024.653.
- [14] YING P, XU Y, LU T, et al. Mechanism by which miR-34a-5p/PLCD3 axis regulates osteoarthritis progression[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(33): 5320-5325. DOI: 10.12307/2024.653.
- [15] 王晓玲, 孟莉丹, 王学敏, 等. HOTTIP通过竞争性结合miR-506调节Vimentin基因的表达调控肾透明细胞癌细胞迁移[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(7):1200-1207. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2024.07.004.
- [16] WANG X L, MENG L D, WANG X M, et al. HOTTIP regulates the expression of Vimentin gene through competitively binding miR-506 to regulate the migration of clear cell renal cell carcinoma cells[J]. J Mod Oncol, 2024, 32(7): 1200-1207. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2024.07.004.
- [17] 陈胜乐, 米盼盼, 许雅芳, 等. 微小RNA-375对腰椎间盘突出大鼠JAK2/STAT3信号通路的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(19):2036-2040. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2021.19.006.

- CHEN S L, MI P P, XU Y F, et al. Effect of microRNA-375 on JAK2/STAT3 signaling pathway in lumbar disc herniation[J]. J Clin Exp Med, 2021, 20(19):2036-2040. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2021.19.006.
- [12] 张海英, 郑晨颖. 膝关节炎关节液和滑膜中微小 RNA-140-5p 的表达及临床意义[J]. 安徽医药, 2022, 26(6):1179-1182. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.028.
- ZHANG H Y, ZHENG C Y. Expression and clinical significance of miR-140-5p in synovial fluid and synovium of knee osteoarthritis[J]. Anhui Med Pharm J, 2022, 26(6): 1179-1182. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.028.
- [13] XU X B, ZHENG S S. MiR-887-3p negatively regulates STARD13 and promotes pancreatic cancer progression[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 6137-6147. DOI: 10.2147/CMAR.S260542.
- [14] GOODWIN A J, LI P F, HALUSHKA P V, et al. Circulating miRNA 887 is differentially expressed in ARDS and modulates endothelial function[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, 318(6): L1261-L1269. DOI: 10.1152/ajplung.00494.2019.
- [15] IWAMOTO N, FUKUI S, KOGA T, et al. FRI0067 Microrna profiling of mtx-treated fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis revealed a possibility of microrna-887-3p as novel therapeutic target of ra[J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76 (Suppl 2):503.DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.3327.
- [16] ALMEIDA G M, CASTILHO A C, ADAMOSKI D, et al. MDM4: what do we know about the association between its polymorphisms and cancer? [J]. Med Oncol, 2022, 40(1): 61. DOI: 10.1007/s12032-022-01929-z.
- [17] 卢今, 张颖, 潘学营, 等. 2020 版美国兽医协会动物安乐死指南解析[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(3):195-206. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.086.
- LU J, ZHANG Y, PAN X Y, et al. A brief interpretation of AVMA guide lines on euthanasia of animals: 2020 edition[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(3): 195-206. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817.2021.086.
- [18] YANG X, WANG L, YUANZQ, et al. Interleukin-1 β induces apoptosis in annulus fibrosus cells through the extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. Connect Tissue Res, 2018, 59(6):593-600. DOI: 10.1080/03008207.2018.1442445.
- [19] LI Z Q, KONG L, LIU C, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate IL-1 β -induced annulus fibrosus cell damage[J]. Am J Med Sci, 2020, 360(6):693-700. DOI: 10.1016/j.amjms.2020.07.025.
- [20] GONÇALVES R M, SAGGESE T, YONG Z Y, et al. Interleukin-1 β more than mechanical loading induces a degenerative phenotype in human annulus fibrosus cells, partially impaired by anti-proteolytic activity of mesenchymal stem cell secretome[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 9: 802789. DOI: 10.3389/fbioe.2021.802789.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262.
- [22] HAWKINS S F C, GUEST P C. Multiplex analyses using real-time quantitative PCR[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1546: 125-133. DOI: 10.1007/978-1-4939-6730-8_8.
- [23] TSIRIMONAKI E, FEDONIDIS C, PNEUMATICOS S G, et al. PKC ϵ signalling activates ERK1/2, and regulates aggrecan, ADAMTS5, and miR377 gene expression in human nucleus pulposus cells[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e82045. DOI: 10.1371/journal.pone.0082045.
- [24] 李小川, 阮狄克. MicroRNAs 在退变椎间盘中表达与调控机制的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2015, 25(10):942-945. DOI:10.3969/j.issn.1004-406X.2015.10.13.
- LI X C, RUAN D K. The research progress on expression and regulation mechanism of microRNAs in degenerative intervertebral disc diseases[J]. Chin J Spine Spinal Cord, 2015, 25(10):942-945. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.10.13.
- [25] YAN J, WU L G, ZHANG M, et al. MiR-328-5p induces human intervertebral disc degeneration by targeting WWP2[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 3511967. DOI: 10.1155/2022/3511967.
- [26] ASHKENAZI A, FAIRBROTHER W J, LEVERSON J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(4): 273-284. DOI: 10.1038/nrd.2016.253.
- [27] ASADI M, TAGHIZADEH S, KAVIANI E, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects[J]. Biotech And App Biochem, 2022, 69(4): 1633-1645. DOI: 10.1002/bab.2233.
- [28] GAO F, XIONG X Y, PAN W T, et al. A regulatory MDM4 genetic variant locating in the binding sequence of multiple microRNAs contributes to susceptibility of small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135647. DOI: 10.1371/journal.pone.0135647.
- [29] 刘磊, 傅立国, 隋鑫. MicroRNA miR-34a-5p 通过靶向 MDM4 抑制巨噬细胞氧化应激损伤的研究[J]. 智慧健康, 2023, 9(18):158-161, 165. DOI:10.19335/j.cnki.2096-1219.2023.18.037.
- LIU L, FU L K, SUI X. Microrna mir-34a-5p inhibiting oxidative stress damage of macrophages by targeting MDM4[J]. Smart Healthc, 2023, 9(18): 158-161, 165. DOI: 10.19335/j. cnki. 2096-1219.2023.18.037.
- [30] 梁舒, 左淑飞, 崔玉荣, 等. 槲皮素通过调控 miR-431-5p/鼠双微基因 4 信号通路抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞侵袭和促进凋亡[J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(12):50-56. DOI:10.7619/jcmp.20231319.
- LIANG S, ZUO S F, CUI Y R, et al. Quercetin inhibits invasion and promotes apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by regulating miR-431-5p/mouse double minute 4 signaling pathway[J]. J Clin Med Pract, 2023, 27(12): 50-56. DOI: 10.7619/jcmp.20231319.
- (收稿日期: 2024-01-05 修回日期: 2024-05-10)
(本文编辑: 张俊彦, 翟玉凤, 丁宇菁, 周烁)
- [引用本文]**
朱晓雨, 袁韩涛, 李四波. 微 RNA-887-3p 调控大鼠椎间盘纤维环细胞增殖和凋亡的作用机制研究[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(3): 270-278. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.003.
- ZHU X Y, YUAN H T, LI S B. MicroRNA-887-3p inhibited MDM4 expression and proliferation but promoted apoptosis of intervertebral disc annulus fibrosus cells in rats[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(3): 270-278. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817. 2024.003.