

miR-663b 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞炎症反应和凋亡的影响及其机制

李亚雄 马学晓 常胜 魏嘉豪 刘勇

(青岛大学附属医院脊柱外科, 山东 青岛 266035)

[摘要] 目的 探讨 miR-663b 对白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导的髓核细胞(NPCs)炎症反应和凋亡的影响及其机制。方法 根据对 NPCs 不同处理方式分为 A 组(无任何处理)、B 组(IL-1 β 诱导)、C 组(IL-1 β 诱导+miR-663b mimic 转染)、D 组(IL-1 β 诱导+miR-663b NC 转染)。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 4 组 NPCs 中 miR-663b 及炎症因子(*TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β*)、II 型胶原蛋白、多聚糖蛋白基因的表达情况,采用 CCK8 法和 TUNEL 染色法检测 4 组 NPCs 增殖和凋亡情况,采用免疫印迹法检测各组 NPCs IL-1 受体 1(IL1R1)蛋白表达情况。使用 TargetScan 数据库预测 miR-663b 与 IL1R1 间的潜在结合位点,将 293T 细胞分 E 组(转染 IL1R1-wt 质粒+miR-663b mimic)、F 组(转染 IL1R1-wt 质粒+miR-663b mimic NC)、G 组(转染 IL1R1-mut 质粒+miR-663b mimic)和 H 组(转染 IL1R1-mut 质粒+miR-663b mimic NC),检测各组 NPCs 荧光素酶的活性。结果 RT-qPCR 结果显示,C 组较 A、B、D 组 miR-663b 相对表达量显著上升($t=9.41\sim 22.93, P<0.01$);与 B、D 组相比,C 组 *TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* 、II 型胶原蛋白及多聚糖蛋白基因相对表达量显著改变($t=3.17\sim 32.51, P<0.01$)。CCK8 法及 TUNEL 染色法结果显示,与 B、D 组相比,C 组 NPCs 增殖显著增加($t=3.14, 3.96, P<0.01$),而细胞凋亡显著减少($t=4.28, 168.61, P<0.01$)。RT-qPCR 和免疫印迹法结果显示,与 B、D 组相比,C 组 NPCs IL1R1 和 IL1R1 蛋白相对表达量显著下降($t=6.39\sim 12.84, P<0.01$)。双荧光素酶报告基因实验显示,E 组荧光素酶活性显著低于 F、G、H 组($t=10.62\sim 16.27, P<0.01$)。结论 miR-663b 或通过与 IL1R1 靶向结合下调 NPCs 的 IL1R1 表达,并减缓 NPCs 炎症反应及凋亡进程。

[关键词] 微 RNAs;髓核;基因表达调控;细胞增殖;细胞凋亡;受体,白细胞介素 1;椎间盘退行性变

[中图分类号] R681.5

[文献标志码] A

EFFECT OF miR-663b ON INTERLEUKIN-1 β -INDUCED INFLAMMATORY RESPONSE AND APOPTOSIS OF NUCLEUS PULPO-SUS CELLS AND ITS MECHANISM

LI Yaxiong, MA Xue-xiao, CHANG Sheng, WEI Jiahao, LIU Yong (Spine Surgery Department, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266035, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of miR-663b on the inflammatory response and apoptosis of nucleus pulposus cells (NPCs) induced by interleukin-1 β (IL-1 β) and its mechanism. **Methods** According to the different treatment methods, NPCs were divided into group A (no treatment), group B (induced by IL-1 β), group C (IL-1 β induction+miR-663b mimic transfection), and group D (IL-1 β induction+miR-663b NC transfection). RT-qPCR was used to measure the expression levels of miR-663b, inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), interleukin-6 (*IL-6*), and *IL-1 β*], type II collagen, and polysaccharide in NPCs; CCK-8 assay and TUNEL staining were used to observe the proliferation and apoptosis of NPCs; Western blotting was used to measure the protein expression level of interleukin-1 receptor 1 (IL1R1) in NPCs. TargetScan database was used to predict the potential binding sites between miR-663b and IL1R1. The 293T cells were divided into group E (transfected with IL1R1-wt plasmid+miR-663b mimic), group F (transfected with IL1R1-wt plasmid+miR-663b mimic), group G (transfected with IL1R1-mut plasmid+miR-663b mimic), and group H (transfected with IL1R1-mut plasmid+mimic NC), and the luciferase activity of NPCs was measured for each group. **Results** RT-qPCR results showed that compared with groups A, B, and D, group C had a significant increase in the relative expression level of miR-663b ($t=9.41-22.93, P<0.01$), and compared with groups B and D, group C had significant changes in the relative expression levels of *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* , type II collagen, and polysaccharide ($t=3.17-32.51, P<0.01$). CCK-8 assay and TUNEL staining showed that compared with groups B and D, group C had a significant increase in the proliferation of NPCs ($t=3.14, 3.96, P<0.01$) and a significant reduction in the apoptosis of NPCs ($t=4.28, 168.61, P<0.01$). RT-qPCR and Western blotting showed that compared with groups B and D, group C had significant reductions in the relative protein expression levels of IL1R1 and IL1R1 in NPCs ($t=6.39-12.84, P<0.01$). Dual-luciferase reporter assay showed that group E had a significantly lower luciferase activity than groups F, G, and H ($t=10.62-16.27, P<0.01$). **Conclusion** This study shows that miR-663b may downregulate the expression of IL1R1 in NPCs through targeted binding to IL1R1 and slow down the inflammatory response and apoptosis of NPCs.

[KEY WORDS] MicroRNAs; Nucleus pulposus; Gene

expression regulation; Cell proliferation; Apoptosis; Receptors, interleukin-1; Intervertebral disc degeneration

[收稿日期] 2023-01-19; **[修订日期]** 2023-03-18

[通讯作者] 刘勇, Email: liuyongdr20@163.com

椎间盘退变(IDD)是引起腰痛的主要原因^[1]。炎症反应是 IDD 发生的重要病理机制。IDD 发生初期,髓核组织和纤维环发生局部炎症,这种初级炎症反应有利于组织细胞的自我修复,当炎症的发展失去可控性,内源性细胞持续上调多种促炎因子,如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等^[2],这些因子被认为是激活巨噬细胞炎性小体的上游信号,可阻止巨噬细胞抗炎表型的极化^[3]。上述过程导致基质金属蛋白酶激活、生长因子表达下调以及胶原蛋白、多聚糖蛋白降解等一系列级联反应,最终引起髓核细胞(NPCs)的炎症和凋亡,加速椎间盘退变^[4]。

IL-1 受体 1(IL1R1)在不同人类及小鼠细胞类型中表达丰度低,但具有较高亲和性^[5]。椎间盘退变期炎性微环境内以 IL-1 β 为主的炎症因子升高,IL-1 β 与 IL1R1 结合使其构象发生改变,产生强烈的促炎信号,加速 NPCs 的凋亡^[6]。miRNA 是长度约为 20~25 个核苷酸序列的内源性非编码 RNA,通过与靶基因结合,从而抑制靶基因的转录以及翻译^[7]。大多数 miRNAs 在各动物物种中作为关键生物通路和过程的调节器,在进化中起重要作用^[8]。miR-663b 在肿瘤及炎性相关疾病中研究比较多,有研究发现 miR-663b 主导的 ceRNA 调控网络参与了脂多糖诱导的支气管上皮炎症改变的关键调控过程^[9]。YU 等^[10]发现 miR-663b 在缺氧引起的心肌细胞初期炎症调控中发挥着重要作用。本研究旨在探究 miR-663b 在减缓 NPCs 炎症及凋亡中的作用,为 IDD 临床治疗策略提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 样本收集

收集 2021 年 9 月—2022 年 5 月于我院行椎间孔镜下腰椎间盘突出切除术的 24 例 IDD 患者的椎间盘髓核组织标本。患者男 11 例,女 13 例;年龄 25~59 岁。排除标准:①哺乳期、妊娠期妇女;②合并急、慢性感染疾病者;③合并肿瘤者;④同时患有全身免疫性疾病或其他全身疾病者。

1.2 材料与试剂

F12/DMEM 培养基、青/链霉素(1:1)混合液、II 型胶原酶购自北京索莱宝有限公司,IL-1 β 购自美国 MCE 公司,RNeasyTM 试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量扩增试剂盒购自南京诺唯赞有限公司,miRNA-663b mimic、mimic NC 购自广州锐博生物科技有限公司,293T 细胞购自武汉普诺赛科技有限

公司,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自上海雅酶有限公司,抗 IL1R1 一抗购自武汉 Abclonal 生物科技公司,HRP-山羊抗兔二抗购自上海爱必信有限公司,双荧光素酶试剂盒、CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自上海翌圣有限公司,TUNEL 凋亡检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特有限公司。

1.3 细胞分离与培养

将手术取出的髓核组织立即用装有组织保存液的冰盒转移至试验台,PBS 冲洗后用组织剪充分剪碎,按照髓核组织体积的 3 倍加入 0.2% II 型胶原酶溶液 37 °C 下在恒温摇床中 200 r/min 消化 4~6 h;采用 70 μ m 细胞滤筛过滤细胞,以 800 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入 5 mL 含 0.10 mL 胎牛血清和 0.01 mL 的青霉素/链霉素(1:1)的 DMEM,重悬细胞后转移至培养瓶中,并于 37 °C、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中继续培养,每 3 d 换液 1 次,待 NPCs 传至第 2 代,且细胞融合度约 90% 时用于后续实验。

1.4 NPCs 炎症模型构建

将二代 NPCs 按每孔约 5×10^4 个细胞接种至 6 孔板中,铺板培养 24 h,在显微镜下观察细胞的密度为 80% 左右时,按照 0、5、10、20 μ g/L 浓度梯度加入 IL-1 β ,继续培养 24 h 后,通过 RT-qPCR 检测不同 IL-1 β 浓度下 NPCs miR-663b 的表达情况,以此选择最佳处理浓度。随后按最佳浓度处理 NPCs 0、12、24、48 h,再次 RT-qPCR 检测 NPCs 中 miR-663b 表达情况,从而选择最佳处理时间。后续实验均采用该 NPCs 炎症模型进行。

1.5 NPCs 分组及处理

将二代 NPCs 分为 A、B、C、D 组,分别按每孔约 5×10^4 个细胞接种至 6 孔板中。其中 A 组无任何处理,B 组仅 IL-1 β 诱导处理,C 组 IL-1 β 诱导+miR-663b mimic 转染,D 组 IL-1 β 诱导+miR-663b mimic NC 转染。

1.6 RT-qPCR 法检测 A~D 组 NPCs miR-663b 转染效率及 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、II 型胶原蛋白、多聚糖蛋白基因的表达水平

使用 RNeasyTM 试剂盒分别提取 A~D 组二代 NPCs 的 RNA,加入 miR-663b 逆转录引物(表 1),按照 miRNA 以及 mRNA 逆转录试剂盒说明书中要求合成第一链 cDNA,随后分别按照 miRNA 以及 mRNA 荧光定量扩增试剂盒说明书的要求进行定量扩增,每组分别设置 2 个复孔。反应体系为:10 μ L 的 SYBR qPCR-Mix,0.4 μ L 的 10 μ mol/L

前引物, 0.4 μL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ 后引物, 1 μL 模板, 7.2 μL ddH₂O。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 总共进行 40 次循环。miR-663b 测定反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共进行 40 次循环。以 U6 和 GAPDH 分别作为 miRNA 和 mRNA 的内对照, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因的相对表达量, 每组实验重复 3 次, 结果取均值。

表 1 引物名称及其序列

引物名称	引物序列	长度 (bp)
miR-663b	F: 5'-TATTATGGTGGCCCGGCCGT-3'	20
	R: 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'	20
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACTA-3'	20
	R: 5'-AACGCTTACGAAATTTGCGT-3'	20
IL1R1	F: 5'-CCTCATCACAGTGCTTAAT-3'	19
	R: 5'-TGCTGCATCTATACCATGT-3'	19
Aggrecan	F: 5'-CCAGCACCAATGTAA-3'	19
	R: 5'-CCTCCACGAACTCAGAAG-3'	19
collagen II	F: 5'-GGAGCAGCAAGAGCAAGGAGAAG-3'	23
	R: 5'-TCATCTGGACGTTGGCAGTGTG-3'	23
TNF- α	F: 5'-AATGGCGTGGAGCTGAGA-3'	19
	R: 5'-ATGCGGCTGATGGTGTGG-3'	19
IL-1 β	F: 5'-TACAGTGGCAATGAGGATGA-3'	20
	R: 5'-TAGTGGTGGTCGAGATTCA-3'	20
IL-6	F: 5'-ATCTGGATTCAATGAGGAGA-3'	20
	R: 5'-TCTGGCTTGTCTCACTAC-3'	20
GAPDH	F: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	20
	R: 5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	20

1.7 免疫印迹法检测 A~D 组 NPCs IL1R1 的相对表达量

使用移液枪吸除 A~D 组二代 NPCs 的培养液, 并用 PBS 轻柔冲洗 3 次。使用加有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 在碎冰上提取各处理组中 NPCs 蛋白^[11]。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 每孔上样 20 μg 蛋白, 在含有 150 g/L 分离胶和 50 g/L 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离, 先恒压 80 V 电泳 30 min, 后调整电压至 120 V, 电泳 1 h。随后在冰上将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上, 转膜电流 300 mA, 时间 2 h。用 TBST 漂洗 3 次 PVDF 膜后浸泡在脱脂牛奶中封闭 2 h。封闭结束后 TBST 漂洗 3 次, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下与一抗孵育过夜。第 2 天回收一抗, 加入辣根过氧化物酶标记过的二抗, 室温下孵育 2 h。二抗孵育结束后, 用 TBST 漂洗条带 3 次, 随后滴加增强型特敏发光液进行显影并拍照, 以 β -actin 作为内参照, 使用 Image J 软件对条带灰度值进行分

析, IL1R1 蛋白的相对表达量以 IL1R1 蛋白灰度值/ β -actin 蛋白灰度值计算。

1.8 CCK-8 法检测 A~D 组 NPCs 的增殖情况

将 A~D 组二代 NPCs 重悬并接种于 96 孔板中, 密度为每孔约 2×10^3 个细胞, 培养 3 d 后在相应孔中加入 CCK-8 试剂, 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2.5 h, 然后用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 细胞活性用 A 值表示。

1.9 TUNEL 染色法检测 A~D 组 NPCs 凋亡情况

在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下将 A~D 组二代 NPCs 爬片浸入 40 g/L 的多聚甲醛溶液中, 固定 20 min, 随后 PBS 漂洗 3 次, 使用 0.2% 的 TritonX-100 通透液浸泡 5 min, PBS 漂洗后加入适量凋亡检测液放入湿盒中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min。加入 DAPI, 室温避光孵育 8 min, PBS 冲洗, 加抗淬灭剂封片。在荧光显微镜下观察, 所有细胞核呈蓝色, TUNEL 染色阳性细胞 (发生凋亡细胞) 呈红色, 细胞凋亡情况用凋亡率表示 (凋亡率 = 阳性细胞数/总细胞数)。

1.10 双荧光素酶报告基因检测及分析

在 TargetScanHuman 7.1 以及 miRbase 生物信息数据库中筛选并且鉴定 miR-663b 的靶基因 IL1R1^[12], 将 IL1R1 3' 端非翻译区 (UTR) 基因片段插入 pGL3 promoter 载体, 并参考 IL1R1-野生型 (wt) 基因序列设计出 IL1R1-突变型 (mut) 基因序列, 同样嵌入质粒中进行扩增, 载体的构建由上海唯问生物科技有限公司完成。将购自普诺赛科技有限公司生长良好 293T 细胞按实验需求分别转染 IL1R1-3' UTR-wt 质粒 + miR-663b mimic (E 组)、IL1R1-3' UTR-wt 质粒 + miR-663b mimic NC (F 组)、IL1R1-3' UTR-mut 质粒 + miR-663b mimic (G 组)、IL1R1-3' UTR-mut 质粒 + miR-663b mimic NC (H 组), 转染 24 h 后, 收集细胞并裂解。使用双荧光素酶报告检测系统测定各组细胞荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶活性作为内参照。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NPCs 炎症模型构建

以 0、5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 β 处理后, 各浓度下 NPCs miR-663b 相对表达量分别为 1.00 ± 0.01 、

0.63±0.05、0.32±0.68、0.36±0.61,组间比较有显著差异($F=108.20, P<0.01$),但 10、20 $\mu\text{g/L}$ 浓度间无显著差异($t=0.66, P>0.05$),故确定 10 $\mu\text{g/L}$ 为 IL-1 β 最佳处理浓度。以 IL-1 β 分别处理 0、12、24、48 h 后,不同处理时长 NPCs miR-663b 相对表达量分别为 1.00±0.01、0.60±0.14、0.51±0.09、0.45±0.06,组间相比较有显著差异($F=24.33, P<0.01$),但是 24 h 较 48 h 无显著差异($P>0.05$),因此后续实验选择浓度 10 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 处理 24 h 构建 NPCs 炎症模型。

2.2 miR-663b 对 A~D 组 NPCs 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、II 型胶原蛋白和多聚糖蛋白基因表达影响

RT-qPCR 结果显示,miR-663b 在 4 组中表达

表 2 各组 miR-663b 及炎症因子、II 型胶原蛋白、多聚糖蛋白基因的相对表达量比较($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-663b	TNF- α 基因	IL-6 基因	IL-1 β 基因	II 型胶原蛋白基因	多聚糖蛋白基因
A 组	2.78±0.18	0.11±0.02	0.43±0.09	0.50±0.06	1.06±0.12	0.96±0.10
B 组	1.77±0.06	0.29±0.05	1.70±0.03	0.70±0.09	0.61±0.02	0.56±0.03
C 组	13.96±1.72	0.16±0.02	0.86±0.15	0.28±0.07	0.85±0.05	0.85±0.11
D 组	1.69±0.19	0.29±0.04	1.67±0.07	0.66±0.07	0.54±0.06	0.61±0.08

2.3 miR-663b 对 A~D 组 NPCs 增殖及凋亡影响

CCK-8 实验结果显示,A~D 组二代 NPCs 培养 3 d 以后细胞活性值分别为 1.66±0.17、1.16±0.13、1.45±0.02、1.10±0.01,4 组细胞活性值比较差异有显著性($F=16.97, P<0.05$);与 B、D 组相比,C 组细胞活性值均显著升高($t=3.14、3.96, P<0.01$),A 组细胞活性值亦升高($t=3.18、3.21, P<0.01$);B、D 组相比无显著差异($P>0.05$)。

TUNEL 染色结果显示,A~D 组中二代 NPCs 凋亡率分别为 0.96±0.05、4.20±0.03、1.10±0.01、4.06±0.05,4 组 NPCs 凋亡率比较差异有显著性($F=7 030.00, P<0.01$)。与 B、D 组相比,C 组细胞凋亡率均显著降低($t=4.28、168.61, P<0.01$),A 组细胞凋亡率亦降低($t=3.68、100.04, P<0.01$);B、D 组相比无显著差异($P>0.05$)。

2.4 miR-663b 对 A~D 组 NPCs 中 IL1R1 基因及蛋白相对表达量的影响

RT-qPCR 结果显示,A~D 组中 IL1R1 基因相对表达量分别为 0.71±0.06、1.39±0.17、0.27±0.08、1.20±0.08,4 组 NPCs 的 IL1R1 相对表达量比较差异有显著性($F=62.21, P<0.01$);与 B、D 组相比,C 组 IL1R1 相对表达量显著降低($t=6.48、12.84, P<0.01$),A 组 IL1R1 相对表达量显著降低($t=5.18、10.07, P<0.01$);B、D 组相比无显著差异($P>0.05$)。

量比较差异有显著性($F=141.30, P<0.01$),C 组与其他组比较 miR-663b 表达量均显著性升高($t=9.41\sim 22.93, P<0.01$)。4 组中炎症因子基因表达比较均有显著差异($F=20.27\sim 125.70, P<0.01$),与 B、D 组相比,C 组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 基因相对表达量均明显降低($t=3.17\sim 32.51, P<0.01$),A 组亦降低($t=12.58\sim 23.11, P<0.01$);B、D 组相比无显著差异($P>0.05$)。4 组中 II 型胶原蛋白及多聚糖蛋白基因表达差异有显著性($F=14.96、30.02, P<0.01$),与 B、D 组相比,C 组 II 型胶原蛋白、多聚糖蛋白基因相对表达量均显著升高($t=4.09\sim 6.47, P<0.01$),A 组亦升高($t=3.27\sim 3.96, P<0.01$);B、D 组相比则无显著差异($P>0.05$)。见表 2。

免疫印迹法结果显示,A~D 组 IL1R1 蛋白相对表达量分别为 0.26±0.01、0.45±0.02、0.30±0.03、0.51±0.02,4 组比较差异有显著性($F=82.11, P<0.01$),与 B、D 组相比,C 组 IL1R1 相对表达量显著降低($t=6.39、9.69, P<0.01$),A 组 IL1R1 相对表达量亦显著降低($t=12.34、19.51, P<0.01$);B、D 组相比无显著差异($P>0.05$)。见图 1。

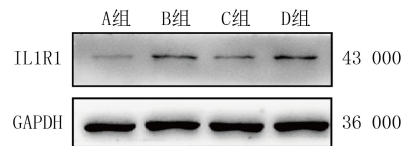


图 1 4 组 NPCs 免疫印迹检测结果

2.5 E~H 组 NPCs 的双荧光素酶活性分析结果

双荧光素酶报告基因实验结果显示,E~H 组的荧光酶活性值分别为 28.90±1.25、45.66±2.43、41.54±1.23、45.54±1.26,4 组比较差异具有显著性($F=71.07, P<0.01$)。E 组与其他 3 组比较荧光酶活性值显著降低($t=10.62\sim 16.27, P<0.01$),其余 3 组两两比较均无显著差异($P>0.05$)。

3 讨 论

髓核组织位于脊柱纤维环中心,上下终板之间,是维持椎间盘平衡以及稳态必不可少的组分^[13]。NPCs 表型发生改变、促炎递质表达上调、活性细胞数量减少及细胞外基质含量下降被认为是 IDD 发

生的主要病理特征,上述病理特征也导致了局部细胞微环境的改变,此类改变可以进展到 IVD 结构和功能的损害^[14]。炎症因子的升高是推动这一级联事件的关键因素^[15],因此抑制 NPCs 炎症反应和凋亡是治疗 IDD 的重要策略。

既往研究发现,退变椎间盘组织中 IL-1 β 水平显著升高参与了 IDD 的多个病理过程^[16-17]。IL-1 β 引起基质生物学改变是 IDD 的特征^[18-19]。IL1R1 作为一种重要的免疫调节因子,在参与自身炎症反应和调节免疫平衡方面发挥着重要作用,而 IL1R1 对于所有 IL-1 β 介导的信号转导事件都是必不可少的^[20]。IL-1 β 与 IL1R1 结合在蛋白辅酶协助下诱导活性蛋白磷酸化,最终导致 NF- κ B 激活,加剧细胞炎症和凋亡。随着分子芯片技术和微阵列分析技术的发展,越来越多证据表明 miRNA 在细胞分化、增殖和生存中发挥核心作用。近年来,miRNA 被发现在介导细胞增殖和凋亡、炎症反应以及细胞外基质降解等方面具有广泛作用,众多研究者将 miRNA 如何有效阻断 NPCs 凋亡作为缓解 IDD 的研究重点^[21]。JI 等^[22] 从临床数据集的 miRNA 芯片分析及体内外实验中证实,miR-141 通过与 SIRT1/NF- κ B 通路相互作用,一定程度上促进 IDD 进展。DU 等^[23] 研究发现抑制 miR-133a-5p 表达或增加 FBXO6 表达可能是治疗 IDD 的有效策略。

本研究显示,miR-663b 在 IL-1 β 构建的 NPCs 炎症模型中表达下调,且呈剂量和时间依赖性。在证明了 miR-663b 在 IL-1 诱导的 NPCs 炎症模型中表达下调后,本研究进一步探究了过表达 miR-663b 是否可以缓解 NPCs 炎症和改善细胞基质成分的表达。实验表明,过表达 miR-663b 的 C 组相比较于其他组,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达被明显抑制,而 II 型胶原蛋白以及多聚糖蛋白基因的相对表达量明显增高,这些结果均表明 miR-663b 在 IL-1 β 刺激 NPCs 细胞的炎症反应中起保护作用。本研究 CCK8 法及 TUNEL 染色结果显示,C 组相比较于其他组 NPCs 活性显著上升,NPCs 凋亡率显著下降,上述结果表明 miR-663b 可以有效减缓 NPCs 炎症反应,改善细胞基质分子的降解及 NPCs 的凋亡。另外,生物信息库分析及双荧光素酶报告基因实验证实 miR-663b 的下游靶点基因是 IL1R1,说明了 miR-663b 通过抑制 IL1R1 表达,起到了减缓 NPCs 炎症反应的作用。以上均表明 miR-663b 在 IDD 的进展中发挥重要作用,为探索 IDD 的病理机制提供了新的研究方向。

综上所述,本研究发现 miR-663b 可以通过与 IL1R1 靶向结合下调 IL1R1 表达,从而减缓 NPCs 炎症反应和凋亡进程,miR-663b 及其抗炎机制或可为 IDD 研究提供更多理论基础。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWELL27201)。所有试验过程均遵照《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

作者声明:李亚雄、马学晓、刘勇参与了研究设计;李亚雄、常胜、魏嘉豪参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] FRANCISCO V, PINO J, GONZÁLEZ-GAY M Á, et al. A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration[J]. Nat Rev Rheumatol, 2022,18(1):47-60.
- [2] RISBUD M V, SHAPIRO I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: Pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014,10(1):44-56.
- [3] MIRZA R E, FANG M M, WEINHEIMER-HAUS E M, et al. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice[J]. Diabetes, 2014,63(3):1103-1114.
- [4] ZHANG C, GULLBRAND S E, SCHAER T P, et al. Inflammatory cytokine and catabolic enzyme expression in a goat model of intervertebral disc degeneration[J]. J Orthop Res, 2020,38(11):2521-2531.
- [5] DOWER S K, KRONHEIM S R, MARCH C J, et al. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1[J]. J Exp Med, 1985,162(2):501-515.
- [6] PALOMO J, DIETRICH D, MARTIN P, et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family: Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases[J]. Cytokine, 2015,76(1):25-37.
- [7] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993,75(5):843-854.
- [8] CHRISTOPHER A F, KAUR R P, KAUR G, et al. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy[J]. Perspect Clin Res, 2016,7(2):68-74.
- [9] LIU J Y, JIANG Y X, ZHANG M Y, et al. Comprehensive bioinformatics analysis of lipopolysaccharide-induced altered autophagy in acute lung injury and construction of underlying competing endogenous RNA regulatory mechanism [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021:6831770.
- [10] YU F, ZHANG X S, SUN C Q, et al. Downregulation of miRNA-663b protects against hypoxia-induced injury in cardiomyocytes by targeting BCL2L1[J]. Exp Ther Med, 2020,19(6):3581-3588.

- [8] 王凌啸, 郑锡铭. 缺血缺氧性脑病新生儿血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平变化及其临床意义[J]. 中国实用医刊, 2017, 44(2):72-74.
- [9] LOSSIN C. A catalog of SCN1A variants[J]. Brain Dev, 2009, 31(2):114-130.
- [10] 周喜靖, 余璐, 姚焰坤, 等. SCN1A 基因突变相关部分性癫痫伴热性惊厥附加症的基因型和表型分析[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(3):445-450.
- [11] SCHUSTER J, LAAN L, KLAR J, et al. Transcriptomes of Dravet syndrome iPSC derived GABAergic cells reveal dysregulated pathways for chromatin remodeling and neurodevelopment[J]. Neurobiol Dis, 2019, 132:104583.
- [12] PATINO G A, ISOM L L. Electrophysiology and beyond: Multiple roles of Na⁺ channel β subunits in development and disease[J]. Neurosci Lett, 2010, 486(2):53-59.
- [13] VAN L T K, HIEN H T D, KIEU H T T, et al. De novo homozygous variant of the SCN1A gene in a patient with severe Dravet syndrome complicated by acute encephalopathy[J]. Neurogenetics, 2021, 22(2):133-136.
- [14] KIVITY S, OLIVER K L, AFAWI Z, et al. SCN1A clinical spectrum includes the self-limited focal epilepsies of childhood[J]. Epilepsy Res, 2017, 131:9-14.
- [15] 王波, 马启玲, 陈光福, 等. SCN1A 基因多态性与全面性癫痫伴热性惊厥附加症临床表型的关系[J]. 中国临床研究, 2018, 31(5):581-584.
- [16] XU X J, YANG X X, WU Q X, et al. Amplicon resequencing identified parental mosaicism for approximately 10% of “de novo” SCN1A mutations in children with dravet syndrome[J]. Hum Mutat, 2015, 36(9):861-872.
- [17] 张才军, 黄志. 儿童热性惊厥诊治策略研究进展[J]. 儿科药学杂志, 2018, 24(12):50-53.
- [18] VERBEEK N E, VAN KEMPEN M, GUNNING W B, et al. Adults with a history of possible Dravet syndrome: An illustration of the importance of analysis of the SCN1A gene[J]. Epilepsia, 2011, 52(4):e23-e25.
- [19] WALLACE A, WIRRELL E, KENNEY-JUNG D L. Pharmacotherapy for dravet syndrome[J]. Pediatr Drugs, 2016, 18(3):197-208.
- [20] 黄建敏, 钱哲, 陈海燕, 等. SCN1A 基因单核苷酸多态性与广西壮族癫痫卡马西平疗效的相关性[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(3):271-274.
- [21] BERTOK S, DOLŽAN V, GORIČAR K, et al. The association of SCN1A p.Thr1067Ala polymorphism with epilepsy risk and the response to antiepileptic drugs in Slovenian children and adolescents with epilepsy[J]. Seizure, 2017, 51:9-13.
- [22] DE LANGE I M, GUNNING B, SONSMA A C M, et al. Influence of contraindicated medication use on cognitive outcome in Dravet syndrome and age at first afebrile seizure as a clinical predictor in SCN1A-related seizure phenotypes[J]. Epilepsia, 2018, 59(6):1154-1165.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第 214 页)

- [11] XING H, ZHANG Z, MAO Q, et al. Injectable exosome-functionalized extracellular matrix hydrogel for metabolism balance and pyroptosis regulation in intervertebral disc degeneration[J]. Journal of nanobiotechnology, 2021, 19(1):1-15.
- [12] GU S X, LI X, HAMILTON J L, et al. microRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc[J]. Gene, 2015, 555(2):80-87.
- [13] HSIEH A H, TWOMEY J D. Cellular mechanobiology of the intervertebral disc: New directions and approaches[J]. J Biomech, 2010, 43(1):137-145.
- [14] YANG W, YU X H, WANG C, et al. Interleukin-1 β in intervertebral disk degeneration[J]. Clin Chim Acta, 2015, 450:262-272.
- [15] LI Y X, MA X X, ZHAO C L, et al. Nucleus pulposus cells degeneration model: A necessary way to study intervertebral disc degeneration[J]. Folia Morphol (Warsz), 2022; Doi:10.5603/FM.a2022.0102.
- [16] WANG Y J, CHE M X, XIN J G, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration[J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 131:110660.
- [17] BURKE J G, WATSON R W, MCCORMACK D, et al. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators[J]. J Bone Joint Surg Br, 2002, 84(2):196-201.
- [18] GENEVAY S, FINCKH A, MEZIN F, et al. Influence of cytokine inhibitors on concentration and activity of MMP-1 and MMP-3 in disc herniation[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(6):R169.
- [19] LE MAITRE C L, HOYLAND J A, FREEMONT A J. Interleukin-1 receptor antagonist delivered directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human intervertebral disc: An in situ zymographic and gene therapy study[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(4):R83.
- [20] TODD L, PALAZZO I, SUAREZ L, et al. Reactive microglia and IL1 β /IL-1R1-signaling mediate neuroprotection in excitotoxin-damaged mouse retina[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):118.
- [21] WANG C, WANG W J, YAN Y G, et al. microRNAs: New players in intervertebral disc degeneration[J]. Clin Chim Acta, 2015, 450:333-341.
- [22] JI M L, JIANG H, ZHANG X J, et al. Preclinical development of a microRNA-based therapy for intervertebral disc degeneration[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):5051.
- [23] DU X F, CUI H T, PAN H H, et al. Role of the miR-133a-5p/FBXO6 axis in the regulation of intervertebral disc degeneration[J]. J Orthop Translat, 2021, 29:123-133.

(本文编辑 范睿心 厉建强)