

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2021.01.0096

• 短篇论著 •

微RNA-603靶向山梨糖和SH3结构域包含蛋白3诱导髓核细胞炎症反应影响椎间盘退行性变

李 理¹, 李金程², 高淑华³, 秦 琴^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院实验诊断科, 上海 200433

2. 宁波美康中医医院检验科, 宁波 315100

3. 东部战区总医院门诊部, 南京 210006

[摘要] **目的** 筛选椎间盘退行性变(IDD)组织中表达升高的miRNA, 探究其在IDD中的作用及可能机制。**方法** 比较已发表的2个IDD miRNA表达谱测序数据集, 筛选出表达升高最显著的miRNA——miRNA-603。收集10例IDD患者和10例腰椎骨折患者的椎间盘组织, 取正常椎间盘组织分离培养髓核细胞。用qRT-PCR检测IDD组织和正常椎间盘组织中miRNA-603的表达。通过miRNA-603过表达和抑制实验探究miRNA-603在TNF- α 诱导的髓核细胞炎症反应中的作用。利用生物信息学网站及已发表的IDD mRNA测序数据集, 获得miRNA-603的靶基因山梨糖和SH3结构域包含蛋白3(SORBS3), 并利用双荧光素酶报告基因实验验证。通过miRNA-603和SORBS3过表达实验探究miRNA-603和SORBS3在髓核细胞炎症反应中的功能。**结果** miRNA-603在IDD组织中表达升高($P < 0.01$)。在髓核细胞中过表达miRNA-603可以促进IL-6和IL-1 β 的表达(P 均 < 0.01); 抑制miRNA-603表达后, TNF- α 刺激诱导的IL-6和IL-1 β 表达降低($P < 0.01, P < 0.05$)。同时, cleaved caspase-1的蛋白表达量也降低($P < 0.01$)。生物信息学预测显示miRNA-603可以靶向调控SORBS3基因, IDD组织样本检测显示SORBS3低表达($P < 0.01$)。与单独过表达miRNA-603相比, 同时过表达miRNA-603和SORBS3可抑制TNF- α 诱导的髓核细胞中IL-6和IL-1 β 的表达(P 均 < 0.01)。**结论** 人IDD组织中miRNA-603表达升高。miRNA-603可能通过靶向抑制SORBS3继而诱导髓核细胞炎症反应, 推动IDD进程。

[关键词] 微RNA-603; 椎间盘退行性变; 炎症; 山梨糖和SH3结构域包含蛋白3**[中图分类号]** R 681.533**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2021)01-0096-07

microRNA-603 targeting sorbin and SH3 domain-containing protein 3 inducing inflammatory response in nucleus pulposus cells and affecting intervertebral disc degeneration

LI Li¹, LI Jin-cheng², GAO Shu-hua³, QIN qin^{1*}

1. Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Clinical Laboratory, Ningbo Meikang Traditional Chinese Medicine Hospital, Ningbo 315100, Zhejiang, China

3. Outpatient Department, General Hospital of PLA Eastern Theater Command, Nanjing 210006, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To screen microRNA (miRNA) with elevated expression in intervertebral disc degeneration (IDD) tissues, and to explore its role and possible mechanisms in IDD. **Methods** Two published IDD miRNA sequencing databases were compared to screen the most highly expressed miRNA—miRNA-603. Intervertebral disc tissues of 10 patients with IDD and 10 patients with lumbar spine fracture were collected, and the nucleus pulposus cells from normal intervertebral disc tissues were isolated and cultured. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miRNA-603 in the IDD and normal intervertebral disc tissues. The role of miRNA-603 in tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced inflammation of nucleus pulposus cells was explored using miRNA-603 mimics and inhibitor factor. Sorbin and SH3 domain-containing protein 3 (SORBS3), a target gene of miRNA-603, was found by using bioinformatics website and the published IDD miRNA sequencing databases, and was verified by dual-luciferase reporter assay. The function of miRNA-603 and SORBS3 in the inflammatory response of nucleus pulposus cells was explored by the

[收稿日期] 2020-01-04 **[接受日期]** 2020-09-02**[作者简介]** 李 理, 初级技师. E-mail: autumnlili@126.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162075, E-mail: qinq78@163.com

overexpression of miRNA-603 and *SORBS3*. **Results** The expression of miRNA-603 increased significantly in IDD tissues ($P < 0.01$). Overexpression of miRNA-603 could promote the expression of interleukin (IL)-6 and IL-1 β in nucleus pulposus cells (both $P < 0.01$); inhibition of the miRNA-603 expression could reduce the TNF- α -induced expression of IL-6 and IL-1 β ($P < 0.01$, $P < 0.05$). At the same time, the expression of cleaved caspase-1 also decreased ($P < 0.01$). Bioinformatics prediction showed that miRNA-603 could targetedly regulate *SORBS3*, and the expression of *SORBS3* in IDD tissues was low ($P < 0.01$). Compared with the overexpression of miRNA-603 alone, co-overexpression of miRNA-603 and *SORBS3* inhibited the TNF- α -induced expression of IL-6 and IL-1 β in nucleus pulposus cells (both $P < 0.01$). **Conclusion** The expression of miRNA-603 increases in human IDD tissues. miRNA-603 can induce the inflammatory response of nucleus pulposus cells by targetedly inhibiting *SORBS3*, which may promote the IDD process.

[Key words] microRNA-603; intervertebral disc degeneration; inflammation; sorbin and SH3 domain-containing protein 3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(1): 96-102]

椎间盘退行性变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是较为常见的脊椎疾病, 其发病高峰年龄为 50~60 岁, 近年发现 IDD 发病呈年轻化趋势^[1]。IDD 主要表现为腰痛及腰椎支撑功能下降, 严重时可引起腰腿痛甚至神经损害, 对患者的工作能力和生活质量造成极大影响。因此, 寻找 IDD 早期退变生物标志分子对其早期诊断和治疗具有重要意义。

miRNA 是一类长度为 20~22 nt 的碱基序列, 通过靶向靶基因的 3' 非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR) 抑制靶基因的表达^[2]。miRNA 还参与调控细胞凋亡、自噬、增殖及肿瘤转移等^[3-4]。研究表明, miRNA 在髓核细胞凋亡及炎症反应中发挥了重要作用^[5-6]。本研究通过 miRNA 表达谱测序数据库, 筛选出 IDD 组织中表达升高最显著的 miRNA-603, 探讨 miRNA-603 在 IDD 发生、发展中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 生物信息学分析 通过基因表达汇编 (gene expression omnibus, GEO) 数据库查询到 IDD 相关的测序数据集, 分别为 GSE19943、GSE63492 和 GSE34095, 其中 GSE19943 和 GSE63492 是 miRNA 表达谱测序数据集, GSE34095 为 mRNA 表达谱测序数据集。分析比较 GSE19943 和 GSE63492 数据集, 筛选出 3 个在 IDD 组织中均高表达的 miRNA: miRNA-603、miRNA-574-3p、miRNA-199a-5p。利用 TargetScan、miRTarBase 生物信息学网站和 GSE34095 数据集的 IDD mRNA 表达谱测序数据获得 miRNA-603 的靶基因为山梨糖和 SH3 结构域包含蛋白 3 (sorbin and SH3 domain-containing protein 3, *SORBS3*)。

1.2 资料来源 收集海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院 2018 年 1 月至 12 月经手术治疗的 IDD 患者和腰椎骨折患者的椎间盘组织。IDD 患者 ($n=10$): 男 7 例、女 3 例, 年龄 33~73 岁, 平均年龄为 (53.6 \pm 11.6) 岁; 腰椎骨折患者 ($n=10$): 男 6 例、女 4 例, 年龄 34~74 岁, 平均年龄为 (52.7 \pm 11.5) 岁。本研究通过海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院伦理委员会审批, 所有患者均知情同意。

1.3 髓核细胞分离及原代培养 从腰椎骨折患者的椎间盘组织中分离出髓核组织, 然后用 0.25% II 型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 消化 3~5 h; 用细胞滤网过滤去除杂质, 细胞悬液以 300 \times g 离心 5 min, 然后弃上清, 获得髓核细胞。用适量的完全培养液重悬细胞后, 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。选择 2 代以后的髓核细胞进行后续实验或冻存备用。

1.4 细胞免疫荧光染色 取适量髓核细胞接种于带有细胞爬片的 24 孔板内, 转染 miRNA-603 模拟物 (广州市锐博生物科技有限公司) 48 h 后, 用 PBS 洗 2 次, 每次 3 min; 每孔加入 500 μ L 4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min; PBS 洗 3 次, 每孔加入 500 μ L 4% Triton X-100 室温孵育 20 min; PBS 洗 3 次, 每孔加入 500 μ L 2% 牛血清白蛋白室温孵育 30 min; 加入一抗 *SORBS3* 抗体 (货号 NBP2-20861, 美国 NOVUS 公司), 4 $^{\circ}$ C 静置过夜; 第 2 天弃去一抗, PBS 洗 3 次后加入二抗 (货号 4413, 美国 CST 公司) 室温孵育 60 min; PBS 洗 3 次后加入 DAPI 室温孵育 5 min; PBST 洗 2 次后收集细胞爬片, 荧光显微镜下观察、拍照。

1.5 qRT-PCR 分析 取 50 mg 组织, 加入 TRIzol

试剂后用组织匀浆机匀浆,再用RNA抽提试剂盒抽提样品的总RNA并检测浓度。细胞样本直接加入TRIzol试剂后用RNA抽提试剂盒抽提样品,琼脂糖凝胶电泳检测RNA的纯度。用日本TaKaRa公司的miRNA、mRNA反转录试剂盒进行反转录,用日本TaKaRa公司的SYBR Green实时荧光定量PCR预混液试剂盒检测相关基因的表达。引物设计与合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,引物序列(5'-3')为miRNA-603正向引物CACACACTGCAATTACTTTTGCAA,反向引物CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA; miRNA-574-3p正向引物GCACCAAGCAAGTCTGGAA,反向引物CGAGGCCTCTGTCTTACAGG; miRNA-199a-5p,正向引物ACACTCCAGCTGGGCCAGTGTTCA-GACTACC,反向引物CTCAACTGGTGTCTGG-AGTCGGCAATTCAGTTGAGGAACAGGTA; *U6*正向引物ACACACACACACACGTAT,反向引物AAGGATGACACGAAATTC; *SORBS3*正向引物TCTTCCACATCCCAGTCTCC,反向引物CACATGCTTGGTGAAGAACG; *IL-6*正向引物AGTGAG-GAACAAGCCAGAGC,反向引物AGCTGCGC-AGAATGAGATGA; *IL-1 β* 正向引物CCACCTCC-AGGGACAGGATA,反向引物TCAACACGCAG-GACAGGTAC; β -actin正向引物CCCAAGGCC-AACAGGAAAA,反向引物GGTGCCCATCTCCT-GCTCAA。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.6 蛋白质印迹分析 用RIPA裂解液裂解细胞,之后用蛋白浓度检测试剂盒(美国ThermoFisher公司)测定蛋白浓度,把不同浓度的样品调整至相同浓度后加入蛋白上样缓冲液加热变性。上样行SDS-PAGE,之后将蛋白从凝胶转移至NC膜上,室温封闭1h,加入一抗4℃孵育过夜;第2天回收一抗,用PBST洗膜3次,每次5min;加入对应的二抗,室温孵育1h, PBST洗膜3次,每次5min;滴加电化学发光液显影。用ImageJ软件量化分析条带灰度,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值代表蛋白相对表达量。实验所用一抗包括SORBS3抗体(货号NBP2-20861,美国NOVUS公司)、caspase-1抗体(货号24232,美国CST公司)、cleaved caspase-1抗体(货号89332,美国CST公司)、IL-1 β 抗体(货号12703,美国CST公司)、微管蛋白抗体(货号2148,美国CST公

司)、二抗为HRP标记的抗兔IgG(货号7074S,美国CST公司)。

1.7 双荧光素酶基因报告实验 通过UCSC(University of California Santa Cruz)数据库查询到*SORBS3* 3' UTR序列,将其插入pMIR-report luciferase质粒(上海吉凯基因医学科技股份有限公司),构建pMIR-SORBS3 3' UTR重组质粒,将重组载体和对照空载体转入293T细胞(中国科学院上海细胞库),同时转入Renilla质粒(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)作为内参,再分别转入miRNA-603模拟物,24h后收集细胞。根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Promega公司)说明书进行操作。

1.8 免疫组织化学染色 将椎间盘组织石蜡切片脱蜡水化,之后将切片放入PBS中微波炉加热10min进行抗原修复,取出切片,用正常山羊血清室温封闭20min,吸取血清后滴加SORBS3抗体,置于4℃冰箱过夜;取出切片,用PBS洗3次,每次5min,加入生物素标记的二抗室温孵育1h; PBS洗3次,每次5min,滴加DAB显色液,5min后PBS洗3次,中性树胶封片拍照。免疫组织化学染色试剂盒及DAB显色试剂盒均购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.9 统计学处理 应用SPSS 21.0软件进行统计学分析,用GraphPad Prism 5.0软件制图。判断数据是否服从正态分布(Shapiro-Wilk检验)和方差齐性(Levene检验),符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 miRNA-603在IDD组织中高表达 分析2个IDD miRNA表达谱测序数据集GSE19943和GSE63492,结果显示有3个miRNA在IDD组织中高表达,分别为miRNA-603、miRNA-574-3p、miRNA-199a-5p(图1A、1B)。为进一步验证这3个miRNA在正常椎间盘组织和IDD组织中的表达差异,我们收集了10例IDD患者和10例腰椎骨折患者椎间盘组织,qRT-PCR结果显示,与正常椎间盘组织相比,IDD组织中3个miRNA的表达均上调($P < 0.01$, $P < 0.05$),其中miRNA-603表达升高最明显(图1C)。

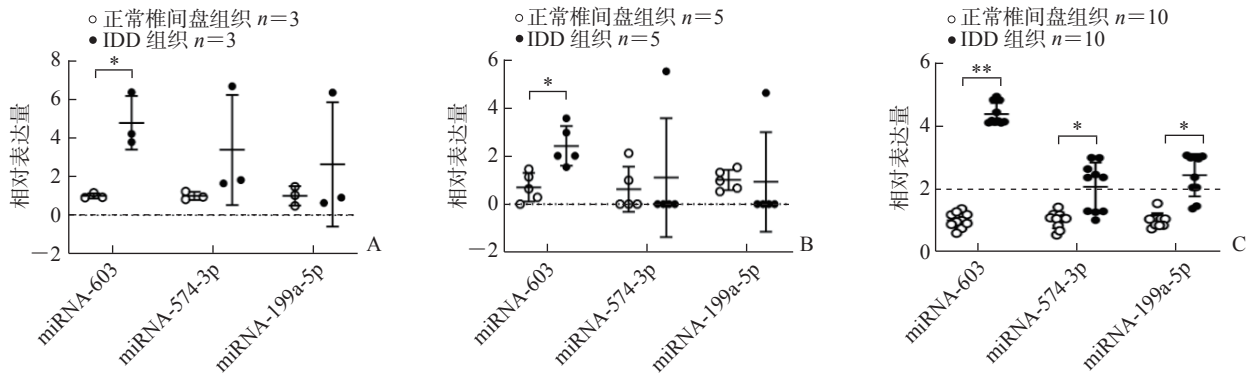


图1 miRNA-603 在 IDD 组织中高表达

A: GSE19943 miRNA 表达谱测序数据集中miRNA-603, miRNA-574-3p 和miRNA-199a-5p 的表达; B: GSE63492 miRNA 表达谱测序数据集中miRNA-603, miRNA-574-3p 和miRNA-199a-5p 的表达; C: qRT-PCR 检测miRNA-603, miRNA-574-3p 和miRNA-199a-5p 在IDD 患者椎间盘组织和腰椎骨折患者正常椎间盘组织中的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s$ 。 miRNA: 微 RNA; IDD: 椎间盘退行性变; qRT-PCR: 实时定量聚合酶链反应。

2.2 miRNA-603 促进髓核细胞炎症反应 分离培养正常髓核细胞, 用脂质体 3000 转染 miRNA-603 对照和模拟物, 收集细胞培养上清, qRT-PCR 检测结果显示髓核细胞过表达 miRNA-603 后, 可明显诱导 *IL-6* 和 *IL-1 β* mRNA 的表达 (P 均 < 0.01 , 图 2A)。收集细胞裂解液, 蛋白质印迹分析检测结果显示, 转染 miRNA-603 模拟物后, cleaved caspase-1 和 IL-1 β 表达增加 (P 均 < 0.01 , 图 2B)。

抑制子转染髓核细胞, 再用 100 ng/mL TNF- α 刺激细胞 24 h, 之后收集细胞培养上清, qRT-PCR 检测结果显示髓核细胞转染 miRNA-603 抑制子后, 可明显减弱 TNF- α 诱导的 *IL-6* 和 *IL-1 β* mRNA 的表达 (P 均 < 0.01 , 图 2C)。收集细胞裂解液, 蛋白质印迹分析检测结果显示转染 miRNA-603 抑制子后, 可以抑制 cleaved caspase-1 和 IL-1 β 的表达 ($P < 0.01$, $P < 0.05$; 图 2D)。

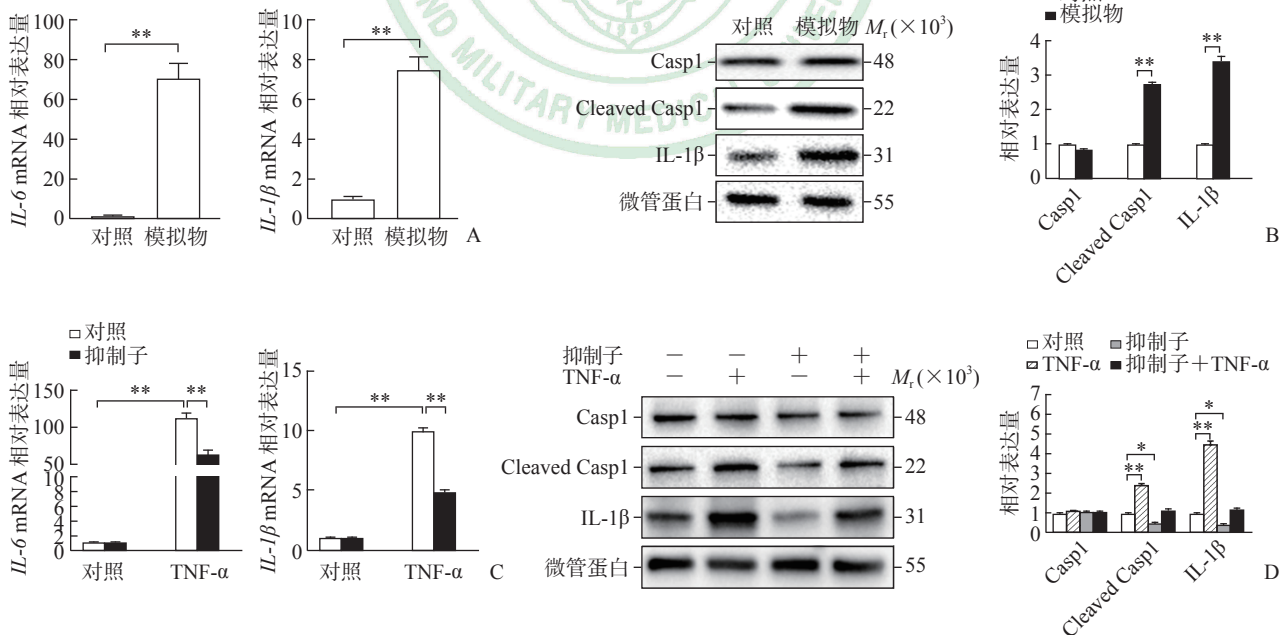


图2 miRNA-603 促进髓核细胞的炎症反应

A: qRT-PCR 检测转染miRNA-603 模拟物后髓核细胞中*IL-6* 和*IL-1 β* mRNA 的表达; B: 蛋白质印迹分析检测转染miRNA-603 模拟物后髓核细胞中cleaved caspase-1 (Casp1) 和IL-1 β 的表达; C: qRT-PCR 检测转染miRNA-603 抑制子后TNF- α 诱导的髓核细胞中*IL-6* 和*IL-1 β* mRNA 的表达; D: 蛋白质印迹分析检测转染miRNA-603 抑制子后TNF- α 诱导的髓核细胞中cleaved Casp1 和IL-1 β 的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。 miRNA: 微 RNA; qRT-PCR: 实时定量聚合酶链反应; IL: 白细胞介素; TNF- α : 肿瘤坏死因子 α 。

2.3 miRNA-603 靶向 *SORBS3* 促进 TNF- α 诱导的髓核细胞炎症反应 通过生物信息学网站 TargetScan 和 miRTarBase, 分别查询到 4 819 个和 506 个 miRNA- 603 的靶基因, 其中有 478 个公共基因, 再通过 GSE34095 mRNA 表达谱测序数据集, 发现 *SORBS3* 作为 miRNA-603 的靶基因在 IDD 组织中低表达 (图 3A)。qRT-PCR (图 3B) 和细胞免疫荧光染色 (图 3C) 检测结果显示, 髓核细胞中过表达 miRNA-603 后, *SORBS3* 表达量降低。双荧光素酶报告基因实验结果 (图 3D) 显示, 过

表达 miRNA-603 可以明显抑制野生型荧光素酶报告质粒的活性, 当 *SORBS3* 3' UTR 结合位点突变后, 这种抑制得以恢复, 说明 miRNA-603 可以靶向 *SORBS3* 抑制其表达。qRT-PCR 检测结果显示, 与单独转染 miRNA-603 模拟物相比, 在髓核细胞中同时转染 miRNA-603 模拟物和 *SORBS3*, 诱导的 *IL-6* 和 *IL-1 β* mRNA 表达明显降低 (P 均 < 0.01 , 图 3E)。结果提示 miRNA-603 通过抑制 *SORBS3* 的表达, 继而促进髓核细胞的炎症反应。

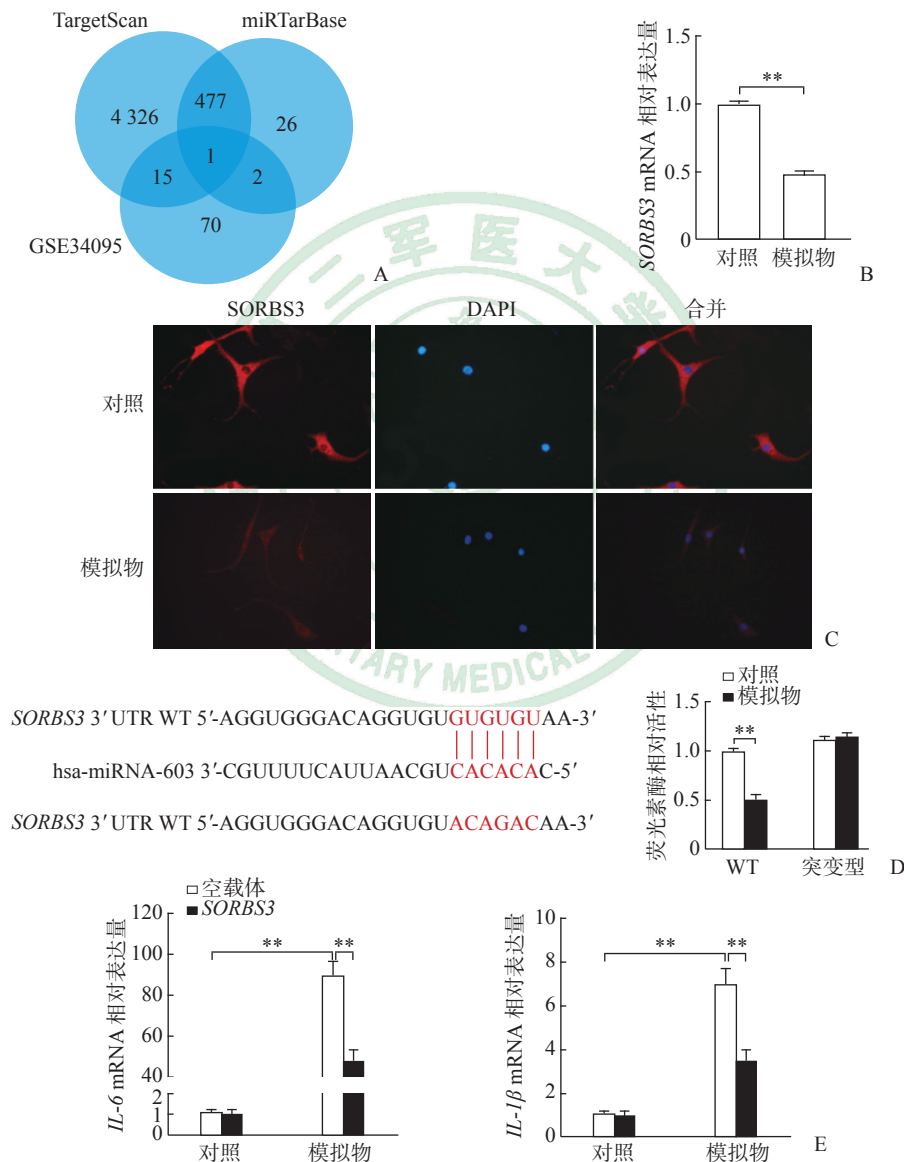


图 3 miRNA-603 靶向 *SORBS3* 促进 TNF- α 诱导的炎症反应

A: 通过生物信息学网站 TargetScan 和 miRTarBase 及 GSE34095 mRNA 表达谱测序数据集筛选出 miRNA-603 的靶基因 *SORBS3*; B: qRT-PCR 检测过表达 miRNA-603 后髓核细胞中 *SORBS3* 的表达; C: 细胞免疫荧光染色检测髓核细胞中 *SORBS3* 的表达 (200 \times); D: 双荧光素酶报告基因实验验证 miRNA-603 可靶向调控 *SORBS3* 的表达; E: qRT-PCR 检测结果表明 *SORBS3* 可抑制 miRNA-603 模拟物诱导的 *IL-6* 和 *IL-1 β* mRNA 表达. ** $P < 0.01$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. miRNA: 微 RNA; *SORBS3*: 山梨糖和 SH3 结构域包含蛋白 3; TNF- α : 肿瘤坏死因子 α ; DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吡啶; 3' UTR: 3' 非编码区; WT: 野生型; IL: 白细胞介素; qRT-PCR: 实时定量聚合酶链反应.

2.4 SORBS3 在 IDD 组织中低表达并可减弱 TNF- α 诱导的髓核细胞炎症反应 qRT-PCR (图 4A) 和免疫组织化学染色 (图 4B) 结果显示, 与正常的椎间盘组织相比, SORBS3 在 IDD 组织中低表达 ($P < 0.01$)。为了明确 SORBS3 的改变能否影响髓核细胞发生炎症反应, 我们在髓核细胞中过表达

SORBS3, 24 h 后加入 100 ng/mL TNF- α , 继续培养 24 h 后检测炎症相关因子。qRT-PCR 检测结果显示, 与空载体组加入 TNF- α 相比, 过表达 SORBS3 组加入 TNF- α 的细胞中 IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达明显降低 (P 均 < 0.01 , 图 4C)。结果提示 SORBS3 可以抑制髓核细胞发生炎症反应。

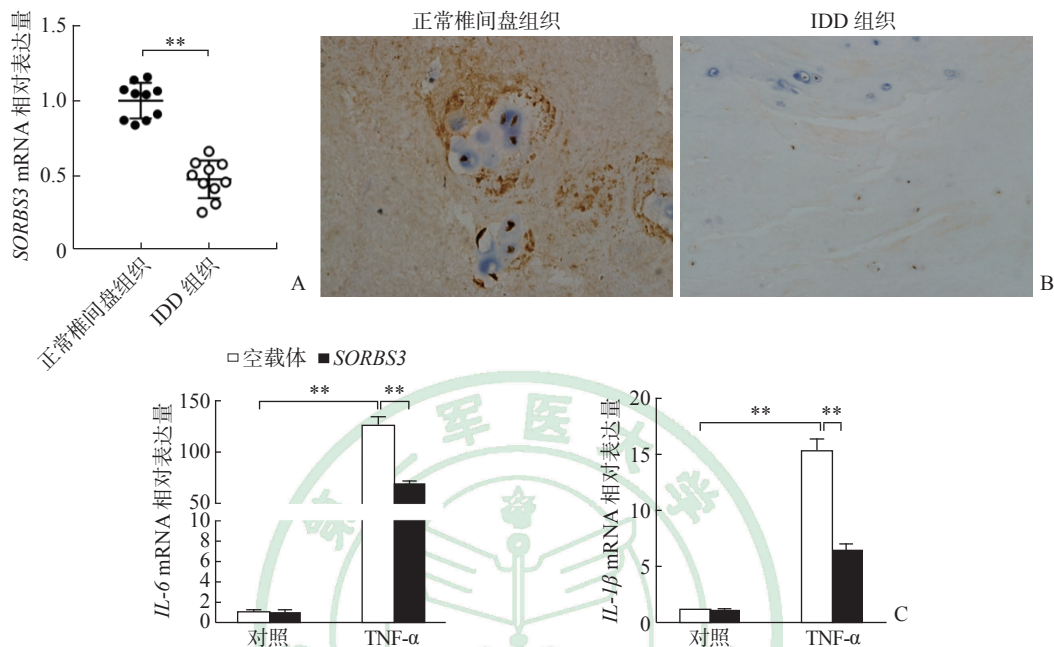


图 4 SORBS3 在 IDD 组织中低表达并可减弱 TNF- α 诱导的炎症反应

A: qRT-PCR 检测 SORBS3 mRNA 在正常椎间盘组织及 IDD 组织中的表达 (** $P < 0.01$, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$); B: 免疫组织化学染色检测 SORBS3 在正常椎间盘组织及 IDD 组织中的表达 (40 \times); C: qRT-PCR 检测髓核细胞中过表达 SORBS3 后 TNF- α 诱导的 IL-6 和 IL-1 β mRNA 的表达 (** $P < 0.01$, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$). SORBS3: 山梨糖和 SH3 结构域包含蛋白 3; IDD: 椎间盘退行性变; TNF- α : 肿瘤坏死因子 α ; IL: 白细胞介素; qRT-PCR: 实时定量聚合酶链反应.

3 讨论

miRNA 是一种非编码单链 RNA, 广泛存在于动植物及部分病毒中, 其在基因转录调控中有着重要作用^[7]。针对 miRNA 的研究表明, 目前绝大多数疾病均与 miRNA 的表达异常有关, 基于 miRNA 的发病机制研究及治疗方法已成为研究热点之一^[8]。随着研究的不断扩展和深入, miRNA 在 IDD 中的重要功能逐渐被揭示, 在椎间盘内环境、椎间盘组织细胞死亡等方面均发挥重要作用^[9]。本研究对比了 2 个 IDD miRNA 表达谱测序数据集, 发现与正常的椎间盘组织相比, miRNA-603 在 IDD 组织中高表达。目前 miRNA-603 在炎症反应中的作用尚未见报道, 仅有部分报道显示, 与卵巢癌癌旁组织相比, miRNA-603 在卵巢癌组织中低表达, 其可以抑制

卵巢癌^[10]; 在三阴性乳腺癌中, miRNA-603 可以抑制三阴性乳腺癌细胞的生长、迁移和侵袭^[11]。

炎症是由有害刺激或病症引起的适应性反应。在 IDD 的发生、发展过程中, 由于椎间盘组织损伤, 引起椎间盘组织炎症加剧, 产生 IL-2、IL-3、IL-8、TNF- α 等炎症因子^[12]。这些炎症因子一方面可以通过调控一氧化氮和前列腺素的表达增强缓激肽、5-羟色胺等疼痛因子对神经末梢疼痛的加强作用, 使患者的症状不断加重^[13]; 另一方面, 它们可以降低髓核细胞周围的多糖及胶原量, 影响髓核细胞微环境及调控死亡受体通路使椎间盘细胞发生凋亡, 进而引起 IDD^[14]。我们在髓核细胞中过表达 miRNA-603, 结果显示过表达 miRNA-603 可以明显诱导 IL-6 和 IL-1 β 的表达; 在以 TNF- α 刺激作为炎症模型的基础上, 抑制 miRNA-603 的表达, 结果显示 TNF- α 诱导的 IL-6

和 IL-1 β 表达明显减弱。上述结果说明在髓核细胞中 miRNA-603 具有诱导炎症反应的作用。通过生物信息学方法,我们预测 *SORBS3* 是 miRNA-603 的靶基因。有研究表明,在肝癌细胞中过表达 *SORBS3* 可使 *IL-6* 基因表达降低^[13]。之后,我们在髓核细胞中过表达 miRNA-603,发现 *SORBS3* 的表达量明显降低,说明 miRNA-603 可以抑制 *SORBS3* 的表达,双荧光素酶报告基因实验进一步证明 *SORBS3* 是 miRNA-603 的靶基因。在髓核细胞中过表达 *SORBS3*,可以明显抑制 TNF- α 诱导的 IL-6 和 IL-1 β ,与加入 miRNA-603 抑制子诱导的 IL-6 和 IL-1 β 表达趋势一致,说明 miRNA-603 可以靶向 *SORBS3* 促进 TNF- α 诱导的炎症反应。

综上所述,本研究发现 miRNA-603 在 IDD 组织中表达升高,在髓核细胞中过表达 miRNA-603 可以诱导炎症反应,*SORBS3* 作为 miRNA-603 的靶基因具有抑制炎症反应的作用。本研究结果为 IDD 中髓核细胞炎症的发生提供了理论依据,同时也为椎间盘退变性疾病提供了一个可能的早期诊疗靶点。

[参考文献]

- [1] YANG S, ZHANG F, MA J, DING W. Intervertebral disc ageing and degeneration: the antiapoptotic effect of oestrogen[J/OL]. *Ageing Res Rev*, 2020, 57: 100978. DOI: 10.1016/j.arr.2019.100978.
- [2] VISHNOI A, RANI S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509: 1-10.
- [3] HUANG J, SUN C, WANG S, HE Q, LI D. MicroRNA miR-10b inhibition reduces cell proliferation and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11: 2051-2059.
- [4] DONG C G, WU W K, FENG S Y, WANG X J, SHAO J F, QIAO J. Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41: 1005-1012.
- [5] WANG C, WANG W J, YAN Y G, XIANG Y X, ZHANG J, TANG Z H, et al. MicroRNAs: new players in intervertebral disc degeneration[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 450: 333-341.
- [6] KONG L, SUN M, JIANG Z, LI L, LU B. MicroRNA-194 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc by targeting TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 3056-3067.
- [7] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141: 1202-1207.
- [8] CORTEZ M A, ANFOSSI S, RAMAPRIYAN R, MENON H, ATALAR S C, ALIRU M, et al. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58: 244-253.
- [9] 王睿哲,徐辰,李真,钟华建,袁文. miRNA 影响椎间盘退变的机制研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2018, 28: 949-953.
- [10] LU J, WANG L, CHEN W, WANG Y, ZHEN S, CHEN H, et al. MiR-603 targeted hexokinase-2 to inhibit the malignancy of ovarian cancer cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 661: 1-9.
- [11] BAYRAKTAR R, PICHLER M, KANLIKILICER P, IVAN C, BAYRAKTAR E, KAHRAMAN N, et al. MicroRNA 603 acts as a tumor suppressor and inhibits triple-negative breast cancer tumorigenesis by targeting elongation factor 2 kinase[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 11641-11658.
- [12] TERTTI M, PAAJANEN H, LAATO M, AHO H, KOMU M, KORMANO M. Disc degeneration in magnetic resonance imaging. A comparative biochemical, histologic, and radiologic study in cadaver spines[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991, 16: 629-634.
- [13] PLOEGER C, WALDBURGER N, FRAAS A, GOEPPERT B, PUSCH S, BREUHAHN K, et al. Chromosome 8p tumor suppressor genes *SH2D4A* and *SORBS3* cooperate to inhibit interleukin-6 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2016, 64: 828-842.
- [14] NAVONE S E, MARFIA G, GIANNONI A, BERETTA M, GUARNACCIA L, GUALTIEROTTI R, et al. Inflammatory mediators and signalling pathways controlling intervertebral disc degeneration[J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32: 523-542.

[本文编辑] 商素芳