

• 基础研究 •

丹酚酸 A 调控 miR-940 与 miR-576-5p 促进退变
终板软骨细胞修复的作用研究

展嘉文^{1,2},王尚全^{1,2},陈明^{1,2},孙凯^{2,3},于杰^{2,3},李玲慧^{1,2},魏戌⁴,孙武³,陈忻³,蔡楚豪¹,张伟业¹,
韩涛^{1,2},尹煜辉¹,唐彬³,朱立国^{2,3}

(1. 中国中医科学院望京医院运动医学中心,北京 100102;2. 中医正骨技术北京市重点实验室,北京 100102;3. 中
国中医科学院望京医院脊柱二科,北京 100102;4. 中国中医科学院附属望京医院学术发展处,北京 100102)

【摘要】 目的:观察丹酚酸 A(salvianolic acid A,SAA)对退变终板软骨细胞(cartilaginous endplates cells,CEPCs)的干预作用,及其调控的潜在非编码 RNA(micro-RNA,miRNA)作用靶点。方法:从腰椎间盘手术标本中分离 CEPCs,用不同浓度 SAA(2、5、10 μM 处理 24、48、72 h,利用 CCK-8 检测细胞活性确定 SAA 的最适剂量和干预时间。通过阿利新蓝染色和对血小板反应蛋白解整合素金属肽酶-5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-5, ADAMTS-5)、基质金属肽酶 3(matrix metalloproteinase 3,MMP-3)、Ⅱ型胶原 a1(collagen type Ⅱ a1,Col2a1)的蛋白表达检测,分析 SAA 对 IL-1β 诱导的退变 CEPCs 的干预作用。进一步结合生信分析,以及实时荧光定量 PCR(quantitative real-time,qRT-PCR)与 Western blot 检测,并应用 miRNA 模拟物(miR-mimics)与抑制剂(miR-inhibitor),验证 SAA 对潜在靶 miRNAs 的调控作用。结果:10 μM SAA 处理 48 h 显著提高了 CEPCs 活性,增加了白细胞介素(interleukin-1β,IL-1β)所抑制的糖胺聚糖积累与 Col2a1 表达,并降低了细胞基质中 ADAMTS-5 与 MMP3 表达(P<0.05)。通过生物信息分析筛选与差异基因表达检测,确定了 SAA 的潜在靶 miRNAs 为 miR-940 和 miR-576-5p。进一步在 SAA 处理组中加入 miR-940-mimic 或 miR-576-5p-mimic,与 SAA 处理组相比过表达 miR-940 或 miR-576-5p 后 CEPCs 基质中 ADAMTS-5 与 MMP3 表达显著升高,Col2a1 表达显著降低。结论:SAA 能够提高 CEPCs 活性,改善退变 CEPCs 的基质成分表达,而 SAA 的调控作用与抑制 miR-940 和 miR-576-5p 表达有关,两者可能是 SAA 调节 CEPCs 退变的作用靶点。

【关键词】 椎间盘; 丹酚酸 A; 终板软骨细胞; 细胞外基质; micro-RNA

中图分类号:R336

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2023.10.014

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Salvianolic acid A contributes to cartilage endplate cell restoration by regulating miR-940 and miR-576-5p
ZHAN Jia-wen^{1,2},WANG Shang-guan^{1,2},CHEN Ming^{1,2},SUN Kai^{2,3},YU Jie^{2,3},LI Ling-hui^{1,2},SUN Wu⁴,CHEN Xin³,CAI Chu-hao¹,ZHANG Wei-ye¹,HAN Tao^{1,2},YIN Yu-hui¹,TANG Bin²,ZHU Li-guo^{2,3} (1.Sport Medicine center,Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Meidical Science,Beijing 100102,China;2. Beijing Key Laboratory of Manipulative Technique Beijing 100102,China;3.The Second Department of Spine ,Wangjing Hospital,China Academy of Chinese Medical Science , Beijing 100102,China;4. Department of Academic Development ,Wangjing Hospital,China Academy of Chinese Medical Science ,Beijing 100102,China)

ABSTRACT Objective To investigate whether Salvianolic acid A (SAA) can restore cartilage endplate cell degeneration of intervertebral discs and to identify the mechanism via regulation of micro-RNA. Methods Cartilage endplate cells were isolated from lumbar intervertebral disc surgical samples and were treated with serum containing a series of concentrations of SAA (2,5, and 10 μM) for 24,48, and 72 h to identify a proper dose and treatment time of SAA. The effect SAA on interleukin-1β (IL-1β)-induced extracellular matrix degradation of cartilage endplate cells were analyzed by Alcian blue staining and assessment of the expression levels of ADAMTS-5,MMP3 and Col2a1. Further,the potential target miRNAs were preliminarily screened by micro-RNA sequencing combining qRT-PCR and Western blot,and then,the miRNAs mimics and inhibitors were used to verify the regulatory effect of SAA on potential target miRNAs. Results The 10 μM SAA treatment for 48 h significant-

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81930118,81804120,81774330);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项(编号:ZYYCXTD-C-202003);中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才(创新类)培养专项(编号:ZZ13-YQ-038)
Fund program:National Natural Science Foundation China(No. 81804120,81930118,81774330)
通讯作者:朱立国 E-mail:zhlg95@aliyun.com
Corresponding author:ZHU Li-guo E-mail:zhlg95@aliyun.com

ly enhanced the viability of cartilage endplate cells, and increased Col2a1 expression and glycosaminoglycan accumulation that were repressed by IL-1 β , and reduced the effect of IL-1 β on ADAMTS-5, and MMP3. Screening analysis based on micro-RNA sequencing and Venny analysis identified the downstream micro-RNAs, including miR-940 and miR-576-5p. Then, the miR-940-mimic or miR-576-5p-mimic were transfected into CEPCs. Compared with the SAA group, the expression of ADAMTS-5 and MMP3 increased significantly and the expression of COL2A1 obviously decreased after overexpression of miR-940 or miR-576-5p in CEPCs. **Conclusion** Salvianolic acid A attenuated the IL-1 β -induced extracellular matrix degradation of cartilage endplate cells by targeting regulate the miR-940 and the miR-576-5p.

KEYWORDS Intervertebral disc; Salvianolic acid A; Cartilaginous endplates cells; Extracellular matrix; Micro-RNA

终板是椎间盘的重要结构,其功能体现在对椎间盘的力学传导与营养供应^[1-2]。终板软骨细胞(cartilaginous endplates cells, CEPCs)作为终板的主要细胞类型,其凋亡和细胞外基质变性将导致终板退变^[3],引发椎间盘应力分布异常与营养代谢障碍,因此,CEPCs退变被认为是促使椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)的始动因素^[4],成为IDD的主要病理特征之一。限制CEPCs退变是维持椎间盘健康与预防椎间盘退行性疾病的一种有效治疗手段^[5-6]。本团队前期应用含有丹参的中药复方治疗下腰痛类相关疾病取得了较好疗效^[7],通过离体组织研究表明丹参水溶性成分能够抑制椎间盘退变进程^[8]。在此基础上,通过网络药理分析发现丹参水溶性入血成分丹酚酸A(salvianolic acid A, SAA)能够从多靶点改善退变软骨细胞状态^[9]。而相关研究^[10-11]及笔者的最新研究^[9]已证实SAA能够调节关节软骨细胞显著改善骨关节炎进程。因此,SAA对CEPCs的作用和机制值得探究。Micro RNAs(miRNAs)是一类长度不超过20个碱基的非编码RNA,通过靶向mRNA3'非翻译区来调节基因表达^[12-13]。已有报道miRNAs参与了CEPCs的细胞外基质调控^[14-15]。本研究将观察SAA调控CEPCs的作用及其潜在的miRNA作用靶点,为SAA的调控机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 方法与分组

1.1.1 试剂及仪器 实验主要材料和试剂:白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) (Sigma, 美国), miRNAs模拟物和抑制物(锐博生物, 中国广州), 细胞转染 (Lipofectamine™ RNAiMAX, Invitrogen, 美国), SAA (元叶科技有限公司, 中国上海) 纯度>98%, 反转录试剂盒 (Takara, 日本), TRIZOL (Invitrogen, 美国), 引物序列(上海生工代工合成), 阿利新蓝(Sigma, 美国), 细胞培养基(Gibco, 美国), 胎牛血清(Gibco, 美国), CCK-8溶液(凯基生物技术有限公司, 中国), PCR试剂盒(Takara, 日本), BCA蛋白定量试剂盒(中国北京生物技术研究所以)。

主要仪器:倒置荧光显微镜(NIB-100F; 中国宁波永安光学有限公司), Western blot电泳系统 (Bio-rad, 美国), 生物倒置显微镜(江南永新 XD-202, 中国), CO₂培养箱(Thermo, 美国), 超净台(Thermo, 美国), MILi-Qso型超纯水仪(Millipore, 美国), 高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国)等。

1.1.2 终板软骨细胞培养方法 CEPCs取自术中腰椎手术患者, 研究方案经中国中医科学院望京医院伦理委员会批准(编号:WJEC-KT-2020-014-P001), 患者予以知情同意。手术切除的终板组织, 经彻底清除髓核及纤维环后, 用磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)洗涤3次, 切成小块(2~3 mm³), 蛋白酶在37℃下消化1h, 再用0.1%胶原酶Ⅱ在37℃下消化12h。CEPCs在含有10%胎牛血清(fatal bovine serum, FBS), 0.1 mg·ml⁻¹链霉素和100 U/ml青霉素的细胞培养基(Dulbecco's modified eagle media, DMEM)中, 在5% CO₂的37℃条件下扩增。CEPCs在第1代(p1)以1×10⁶冷冻, 每个冷冻瓶有1 ml冷冻溶液。

1.1.3 分组与干预措施 对照组, 予含10%FBS的DMEM; IL-1 β 处理组, 予10 mg·ml⁻¹ IL-1 β 诱导CEPCs退变; IL-1 β +SAA干预组, 在IL-1 β 处理组基础上予SAA干预, SAA浓度与处理时间根据CCK-8结果确定。

1.2 观察项目与方法

1.2.1 CEPCs增殖活性检测 采用CCK-8检测CEPCs的增殖活性。将各组细胞悬浮液等比例接种于96孔板, 37℃、5%CO₂培养箱中继续培养12h, 然后用细胞进行转染或处理24、48、72h后, 每孔加入10 μ l的CCK-8。在细胞培养箱内继续孵育2h, 450 nm测定吸光度检测增殖情况。进行4次独立实验。

1.2.2 糖胺聚糖含量测定 采用前期研究方法^[16]。将CEPCs置于6孔培养皿中, 用乙醇(70%)固定1h, 用蒸馏水洗涤2次(每次5 min), 并在室温下用阿利新蓝染色30 min。用蒸馏水洗涤细胞5次, 然后用倒置荧光显微镜观察。进行4次独立实验。

1.2.3 蛋白表达检测 使用 Western blot 检测抗体Ⅱ型胶原 a1 (clollagen typeⅡ a1,Col2a1)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶-5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 5,ADAMTS-5)、基质金属肽酶-3(matrix metallopepridase 3,MMP-3)的蛋白表达。用含有蛋白酶抑制剂的缓冲液 (radio-immunoprecipitation assay,RIPA)从细胞中提取总蛋白,使用蛋白定量试剂盒 (bicinchoninic acid kit,BCA)测定蛋白浓度。蛋白质经过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)处理,并转移到聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride,PVDF)。用 5%脱脂牛奶在等渗缓冲盐溶液 (tris buffered saline with tween,TBST),pH 7 中孵育,封闭膜。在室温下孵育 1 h,加入 Col2a1、ADAMTS-5、MMP3、微管蛋白(tubulin)一抗 4℃下水平摇床孵育过夜。再次洗脱后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗共同孵育 1 h;再次洗脱后,使用化学发光底物在凝胶成像仪曝光检测蛋白表达。进行 4 次独立实验。

1.2.4 CEPCs 中 SAA 调控潜在 miRNAs 筛选 使用 Diana 工具 mirPathv.3 来预测与 NF-κB 和 MAPK 信号通路相关的 miRNAs,结合 Omnibus(GSE45856)的表达,Venny 用来寻找候选的 miRNAs。

1.2.5 miRNAs 表达的检测 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time,qRT-PCR)检测 miRNAs 表达情况。总 RNA 用 TRIZOL 分离,参照反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成,采用 qRT-PCR 试剂盒 (SYBR Green 1)进行 qRT-PCR。miRNA 以 U6 为内参,使用凝胶成像系统确定和计算灰色值和相对强度。引物序列见表 1,采用 2^{-ΔΔCt} 算法得到各组基因 miRNA 的相对表达量^[17]。进行 4 次独立实验。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。服从正态分布和方差齐性,则用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。

表 1 引物序列表
Tab.1 Primer sequence table

基因名称	方向	引物序列
hsa-miR-1291	F	TGGCCCTGACTGAAGACC
	R	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
hsa-miR-576-5p	F	ATTCTAATTCTCCAC
	R	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
hsa-miR-940	F	AAGGCAGGGCCCCCG
	R	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
hsa-miR-595	F	GAAGTGTGCCGTGCT
	R	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
hsa-miR-23c	F	ATCACATTGCCAGTGA
	R	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
hsa-miR-511-5p	F	GTGTCTTTTGCTCTG
	R	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
hsa-miR-376c-5p	F	GGTGGATATTCCTTC
	R	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
U6	F	GCTTCGGCAGCACATAT ACTAAAAT
	R	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA

CCK-8 比较,采用双因素方差分析;Western blot、qRT-PCR 检测,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著差异 (least significant difference,LSD) 检验进行统计学检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAA 对 CEPCs 增殖活性影响

为评估 SAA 对 CEPCs 的作用,以不同浓度的 SAA (2.5、10 μM)分别处理 CEPCs 24、48、72 h,采用 CCK-8 法检测细胞增殖活力。结果显示,不同处理时间与不同 SAA 浓度对 CEPCs 增殖活性的影响差异均有统计学意义 ($F=5092.816,P=0.000;F=12.183,P=0.000$),处理时间和 SAA 浓度的交互项差异也有统计学意义 ($F=2.658,P=0.014$)。进一步对比相同处理时间下,不同浓度 SAA 干预后的 CEPCs 增殖活

表 2 不同浓度 SAA 处理 CEPCs 不同时间后细胞增殖活性 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.2 Cell proliferation activity of CEPCs treated with different concentrations of SAA at different times ($\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
空白组	0.393±0.016	0.664±0.014	0.976±0.026	1.456±0.029	1 611.679	0.000
2 μM 组	0.389±0.007 ^{a1}	0.668±0.022 ^{a4}	0.998±0.016 ^{a7}	1.483±0.048 ^{a10}	1 103.371	0.000
5 μM 组	0.392±0.024 ^{a2}	0.699±0.017 ^{a5}	1.004±0.026 ^{a8}	1.522±0.046 ^{a11}	1 020.608	0.000
10 μM 组	0.389±0.016 ^{a3}	0.695±0.025 ^{a6}	1.058±0.024 ^{a9}	1.561±0.033 ^{a12}	1 578.527	0.000
F 值	0.044	3.133	8.663	5.167		
P 值	0.987	0.066	0.002	0.016		

注:与同一时间点空白组对比,^{a1} $t=0.145,P=0.716$;^{a2} $t=0.006,P=0.940$;^{a3} $t=0.103,P=0.760$;^{a4} $t=0.110,P=0.752$;^{a5} $t=9.568,P=0.051$;^{a6} $t=4.500,P=0.078$;^{a7} $t=2.120,P=0.196$;^{a8} $t=2.360,P=0.175$;^{a9} $t=21.320,P=0.004$;^{a10} $t=0.895,P=0.381$;^{a11} $t=5.783,P=0.053$;^{a12} $t=22.092,P=0.003$

性,显示 10 μM SAA 处理 48 h 即可提高细胞增殖活力($P=0.004$),因此选择该剂量和时间进行后续分析(表 2)。

2.2 SAA 对退变 CEPCs 基质的影响

根据相关研究^[18]应用 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IL-1 β 诱导 CEPCs 退变,通过 Western blot 结果表明与对照组相比,IL-1 β 处理组增强了 ADAMTS-5 与 MMP3 的表达,降低了 Col2a1 的表达,而加入 10 μM SAA 后与 IL-1 β 处理组相比 ADAMTS-5 与 MMP3 表达显著降低,Col2a1 表达增高(图 1,表 3)。阿利新蓝染色显示 IL-1 β 处理后糖胺聚糖染色减少,而 SAA 处理后改变了 IL-1 β 的抑制作用,糖胺聚糖染色增加(图 2)。

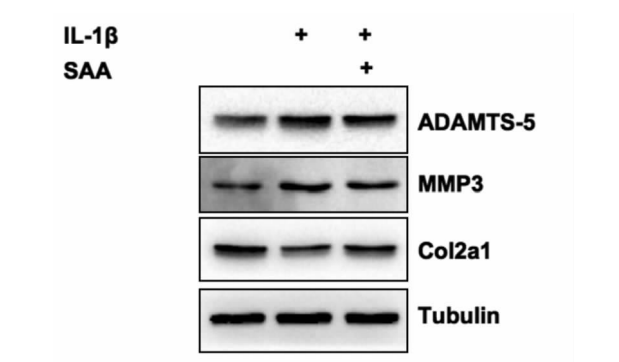


图 1 Western blot 检测 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 的蛋白表达
Fig.1 The protein expression levels of ADAMTS-5、MMP3 and Col2a1 were measured by Western blot

2.3 SAA 的潜在调控靶点

进一步分析与 CEPCs 基质降解相关的潜在 miRNAs。NF- κ B 与 MAPK 通路是有关终板软骨退变与 IL-1 β 调控的主要信号通路。Diana 工具 mir-Pathv.3 预测有 606 个 miRNAs 与 NF- κ B 信号通路相关,而有 630 个 miRNAs 与 MAPK 信号通路相关。根据 Omnibus(GSE45856)的表达,椎间盘退变中有

表 3 Western blot 检测 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 蛋白表达结果($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Western blot results analyzed by gray scale scanning ($\bar{x}\pm s$)

组别	ADAMTS-5	MMP3	Col2a1
对照组	0.61 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01	0.85 $\pm$ 0.09
IL-1 β 处理组	0.82 $\pm$ 0.08 ^{a1}	0.19 $\pm$ 0.07 ^{a3}	0.53 $\pm$ 0.06 ^{a5}
SAA 干预组	0.70 $\pm$ 0.03 ^{a2b1}	0.12 $\pm$ 0.02 ^{a4b2}	0.70 $\pm$ 0.06 ^{a6b3}
F 值	10.159	63.762	14.300
P 值	0.012	0.000	0.005

注:与对照组对比,^{a1} $t=14.694$, $P=0.019$;^{a2} $t=9.968$, $P=0.034$;^{a3} $t=129.193$, $P=0.000$;^{a4} $t=57.680$, $P=0.002$;^{a5} $t=25.351$, $P=0.007$;^{a6} $t=4.852$, $P=0.092$ 。与 IL-1 β 处理组对比,^{b1} $t=8.224$, $P=0.044$;^{b2} $t=18.821$, $P=0.012$;^{b3} $t=12.250$, $P=0.025$

101 个 miRNAs 发生异常表达(图 3),三者交集揭示了 7 个潜在 miRNAs:hsa-miR-1291,hsa-miR-576-5p,hsa-miR-940,hsa-miR-376c-5p,hsa-miR-23c,hsa-miR-511-5p,和 hsa-miR-595。进一步以 IL-1 β (10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) 处理,或 IL-1 β (10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) 和 10 μM SAA 共同处理 CEPCs,应用 qRT-PCR 验证可被 SAA 逆转表达的 miRNA,发现 miR-940 和 miR-576-5p 的表达差异最为显著(表 4)。

2.4 过表达或抑制表达 miR-940 和 miR-576-5p 对退变 CEPCs 基质表达的影响

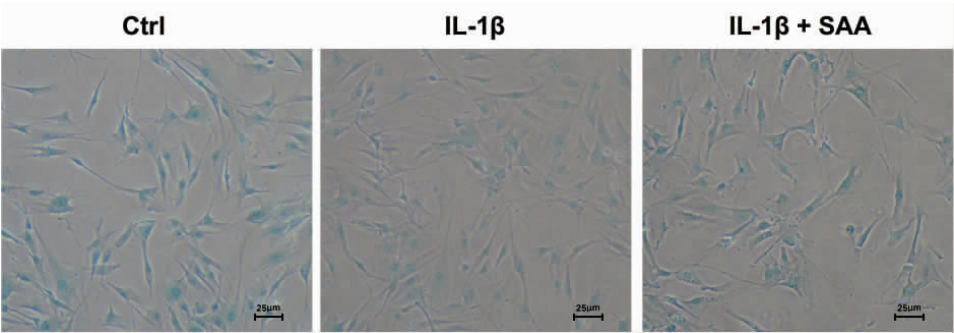
按照前期研究方法^[19],应用 Lipofectamine2000 转染试剂分别将 miR-940 mimic,miR-940 inhibitor,miR-576-5p mimic,miR-576-5p inhibitor 转染至 CEPCs 中,通过 Western blot 结果表明与 IL-1 β 处理组相比,加入 miR-940 mimic 和 miR-576-5p mimic 后进一步增强了退变 CEPCs 中 ADAMTS-5 和 MMP3 的表达,并显著降低了 Col2a1 表达。而加入 miR-940 inhibitor 与 miR-576-5p inhibitor 后 ADAMTS-5

表 4 采用 qPCR 法检测 CEPCs 中潜在 miRNA 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Expression levels of the indicated miRNAs were measured by qPCR assays in the cells($\bar{x}\pm s$)

组别	hsa-miR-1291	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-940	hsa-miR-376c-5p	hsa-miR-23c	hsa-miR-511-5p	hsa-miR-595
对照组	1.06 $\pm$ 0.45	1.00 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.07	1.12 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.15	0.84 $\pm$ 0.28
IL-1 β 处理组	3.21 $\pm$ 0.60 ^{a1}	1.63 $\pm$ 0.06 ^{a3}	2.15 $\pm$ 0.01 ^{a5}	0.83 $\pm$ 0.06 ^{a7}	1.12 $\pm$ 0.16 ^{a9}	0.84 $\pm$ 0.10 ^{a11}	1.45 $\pm$ 0.42 ^{a13}
IL-1 β +SAA 组	2.88 $\pm$ 0.09 ^{a2b1}	1.00 $\pm$ 0.05 ^{a4b2}	1.30 $\pm$ 0.19 ^{a6b3}	1.05 $\pm$ 0.06 ^{a8b4}	1.25 $\pm$ 0.25 ^{a10b5}	0.95 $\pm$ 0.11 ^{a12b6}	1.23 $\pm$ 0.14 ^{a14b7}
F 值	26.701	133.302	19.638	12.011	0.622	1.640	3.081
P 值	0.000	0.000	0.002	0.131	0.564	0.250	0.110

注:与对照组对比,^{a1} $t=32.309$, $P=0.001$;^{a2} $t=54.903$, $P=0.000$;^{a3} $t=176.700$, $P=0.000$;^{a4} $t=0.003$, $P=0.956$;^{a5} $t=45.409$, $P=0.007$;^{a6} $t=0.335$, $P=0.588$;^{a7} $t=4.389$, $P=0.111$;^{a8} $t=0.797$, $P=0.406$;^{a9} $t=0.004$, $P=0.950$;^{a10} $t=0.844$, $P=0.410$;^{a11} $t=2.832$, $P=0.153$;^{a12} $t=0.453$, $P=0.526$;^{a13} $t=4.620$, $P=0.084$;^{a14} $t=4.539$, $P=0.100$ 。与 IL-1 β 处理组对比,^{b1} $t=1.988$, $P=0.208$;^{b2} $t=243.820$, $P=0.000$;^{b3} $t=34.128$, $P=0.004$;^{b4} $t=4.450$, $P=0.102$;^{b5} $t=0.722$, $P=0.434$;^{b6} $t=1.809$, $P=0.236$;^{b7} $t=0.763$, $P=0.422$



注:Ctrl 为对照组
图 2 采用阿利新蓝染色法分别检测糖胺聚糖含量
Fig.2 Glycosaminoglycan content were measured by Alcian blue staining

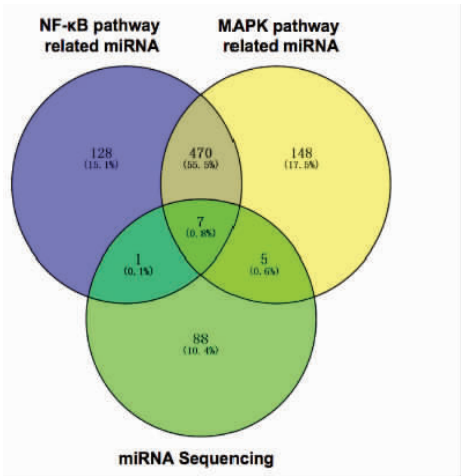


图 3 CEPCs 中 SAA 调控潜在 miRNA 筛选
Fig.3 Screening of potential miRNAs regulated by SAA in CEPCs

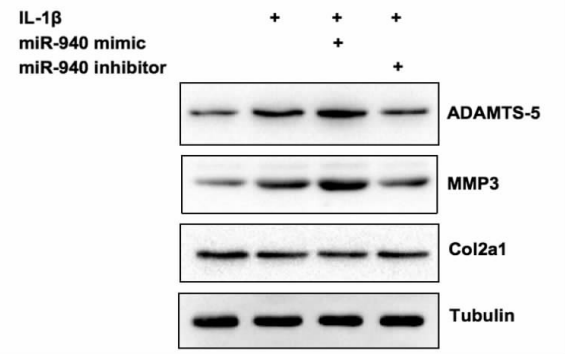


图 4 Western blot 检测过表达或抑制表达 miR-940 对退变 CEPCs 基质的影响。CEPCs 用 IL-1β (10 ng·ml⁻¹) 处理,或用 IL-1β (10 ng·ml⁻¹) 和 miR-940 mimic 或 inhibitor 共同处理。采用 Western blot 检测 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 的蛋白表达水平
Fig.4 Effects of miRNA-940 mimics or inhibitors on CEPCs matrix by Western blot. CEP cells were treated with IL-1β (10 ng·ml⁻¹) or co-treated with IL-1β (10 ng·ml⁻¹) and miRNA-940 mimics or inhibitors. The protein expression levels of ADAMTS-5, MMP3 and Col2a1 were analyzed by western blot analysis

和 MMP3 的表达显著降低,但 Col2a1 表达差异无统计学意义 (图 4、图 5,表 5、表 6)。

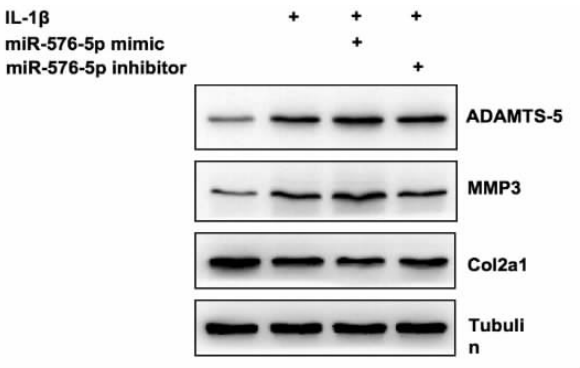


图 5 Western blot 检测过表达或抑制表达 miR-576-5p 对退变 CEPCs 基质的影响。CEPCs 用 IL-1β (10 ng·ml⁻¹) 处理,或用 IL-1β (10 ng·ml⁻¹) 和 miR-576-5p mimic 或 inhibitor 共同处理。采用 Western blot 检测 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 的蛋白表达水平
Fig.5 Effects of miR-576-5p mimics or inhibitors on CEPCs matrix by Western blot. CEPCs were treated with IL-1β (10 ng·ml⁻¹) or co-treated with IL-1β (10 ng·ml⁻¹) and miR-576-5p mimics or inhibitors. The protein expression levels of ADAMTS-5, MMP3 and Col2a1 were analyzed by western blot analysis

2.5 验证 SAA 通过调控 miR-940 或 miR-576-5p 延缓 CEPCs 退变

在 SAA 处理组中加入 miR-940 mimic 或 miR-576-5p mimic,结果显示与 SAA 处理组相比,加入 miR-940 mimic 或 miR-576-5p mimic 后均逆转了 SAA 对基质的调控作用,其中 ADAMTS-5 与 MMP3 的表达较 SAA 处理组均显著升高,Col2a1 表达则显著降低 (图 6,表 7)。

3 讨论

3.1 CEPCs 退变是 IDD 的主要病理特征

椎间盘是人体负重和维持脊柱稳定性的重要组成部分,IDD 是导致背部疾病的主要原因,也是腰痛的重要病理基础^[20-21]。治疗的目的是预防或延迟 IDD,促进修复以减轻症状,至少延迟手术的需要^[22]。然而,尽管有大量的研究,但生物和机械途径合成引起的 IDD 的机制尚不清楚^[23],因此延迟或修

表 5 Western blot 检测加入 miR-940 mimic 和 miR-940 inhibitor 后 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 蛋白表达结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 Western blot was used to detect the expression of ADAMTS-5,MMP3 and Col2a1 protein after miR-940 mimic and miR-940 inhibitor were added ($\bar{x}\pm s$)

组别	ADAMTS-5	MMP3	Col2a1
对照组	0.42±0.05	0.33±0.04	0.89±0.12
IL-1β 处理组	0.79±0.07	0.73±0.09	0.72±0.10
IL-1β+miR-940 mimic 组	0.99±0.12 ^{a1}	1.01±0.11 ^{a3}	0.55±0.08 ^{a5}
IL-1β+miR-940 inhibitor 组	0.56±0.06 ^{a2b1}	0.60±0.07 ^{a4b2}	0.63±0.10 ^{a6b3}
F 值	31.179	41.409	6.232
P 值	0.000	0.000	0.000

注：与 IL-1β 处理组对比，^{a1}*t*=9.123,*P*=0.040；^{a2}*t*=18.931,*P*=0.012；^{a3}*t*=13.076,*P*=0.022；^{a4}*t*=5.492,*P*=0.079；^{a5}*t*=8.248,*P*=0.048；^{a6}*t*=1.768,*P*=0.25。与 IL-1β+miR-940 mimic 对比，^{b1}*t*=33.518,*P*=0.004；^{b2}*t*=31.410,*P*=0.005；^{b3}*t*=0.407,*P*=0.558

表 6 Western blot 检测加入 miR-576-5p mimic 与 miR-576-5p inhibitor 后 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 蛋白表达结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.6 Western blot was used to detect the expression of ADAMTS-5,MMP3 and Col2a1 proteins after miR-576-5p mimic and miR-576-5p inhibitor were added ($\bar{x}\pm s$)

组别	ADAMTS-5	MMP3	Col2a1
对照组	0.30±0.04	0.33±0.03	0.89±0.12
IL-1β 处理组	0.62±0.08	0.76±0.07	0.73±0.08
IL-1β+miR-576-5p mimic 组	0.88±0.12 ^{a1}	1.00±0.10 ^{a3}	0.55±0.06 ^{a5}
IL-1β+miR-576-5p inhibitor 组	0.76±0.09 ^{a2b1}	0.66±0.07 ^{a4b2}	0.60±0.05 ^{a6b3}
F 值	31.179	41.409	6.232
P 值	0.000	0.000	0.017

注：与 IL-1β 处理组对比，^{a1}*t*=8.950,*P*=0.042；^{a2}*t*=1.163,*P*=0.342；^{a3}*t*=11.303,*P*=0.028；^{a4}*t*=2.984,*P*=0.159；^{a5}*t*=10.668,*P*=0.031；^{a6}*t*=6.392,*P*=0.065。与 IL-1β+miR-940 mimic 对比，^{b1}*t*=8.330,*P*=0.047；^{b2}*t*=22.694,*P*=0.009；^{b3}*t*=1.356,*P*=0.309

复 IDD 已成为骨科研究中的一个难题。

软骨终板变性在 IDD 中的作用已经引起了广泛的关注^[24-25],CEPCs 的细胞外基质改变是 IDD 的一个重要标志^[4,26]。终板退变是多种因素造成的结果^[24-25,27-28],如衰老和异常负荷,干扰 CEPCs 的功能,导致细胞肥大和凋亡,并通过影响相关细胞因子的表达破坏细胞外基质,最终导致软骨终板的钙化、裂

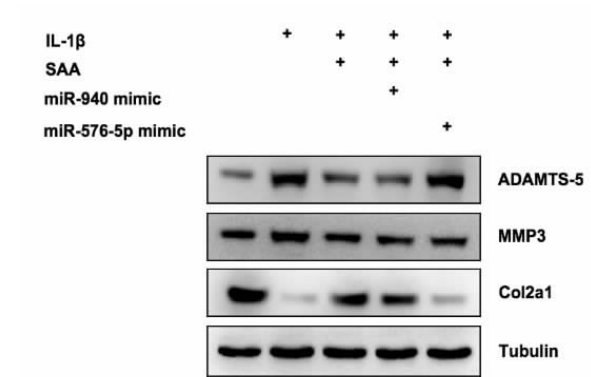


图 6 Western blot 检测 miR-940 或 miR-576-5p 对 SAA 调控作用的影响。CEPCs 用 IL-1β (10 ng·ml⁻¹) 处理,或用 IL-1β (10 ng·ml⁻¹) 和 SAA (10 μM) 以及 miR-940 mimic 或 miR-576-5p mimic 共同处理。采用 Western blot 检测 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 的蛋白表达水平

Fig.6 The effects of miR-940 or miR-576-5p on the regulation of SAA were detected by Western blot. CEPCs were treated with IL-1β (10 ng·ml⁻¹) or co-treated with IL-1β (10 ng·ml⁻¹) and SAA (10 μM) with miR-940 mimic or miR-576-5p mimic. The protein expression levels of ADAMTS-5, MMP3 and Col2a1 were analyzed by western blot analysis

表 7 Western blot 检测 SAA 处理组中加入 miR-940 mimic 或 miR-576-5p mimic 后 ADAMTS-5、MMP3 和 Col2a1 蛋白表达结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.7 Expression of ADAMTS-5, MMP3 and Col2a1 proteins were detected by Western blot after miR-940 mimic or miR-576-5p mimic was added to SAA-treated group ($\bar{x}\pm s$)

组别	ADAMTS-5	MMP3	Col2a1
对照组	0.98±0.11	1.01±0.14	1.62±0.17
IL-1β 处理组	1.99±0.20	1.67±0.12	0.51±0.15
IL-1β+SAA 组	1.20±0.14 ^{a1}	1.10±0.06 ^{a4}	1.44±0.12 ^{a7}
IL-1β+SAA+miR-940 mimic 组	1.59±0.19 ^{a2b1}	1.34±0.15 ^{a5b3}	1.16±0.10 ^{a8b5}
IL-1β+SAA+miR-576-5p mimic 组	1.86±0.22 ^{a3b2}	1.42±0.12 ^{a6b4}	0.80±0.13 ^{a9b6}
F 值	16.113	13.787	33.700
P 值	0.000	0.000	0.000

注：与 IL-1β 处理组对比，^{a1}*t*=23.863,*P*=0.008；^{a2}*t*=6.872,*P*=0.059；^{a3}*t*=0.521,*P*=0.510；^{a4}*t*=52.693,*P*=0.002；^{a5}*t*=8.953,*P*=0.040；^{a6}*t*=6.618,*P*=0.062；^{a7}*t*=70.590,*P*=0.001；^{a8}*t*=40.590,*P*=0.003；^{a9}*t*=6.804,*P*=0.060。与 IL-1β+SAA 对比，^{b1}*t*=8.295,*P*=0.047；^{b2}*t*=13.236,*P*=0.022；^{b3}*t*=8.401,*P*=0.042；^{b4}*t*=15.698,*P*=0.017；^{b5}*t*=8.522,*P*=0.043；^{b6}*t*=39.153,*P*=0.003

隙和通透性降低。前期笔者研究了异常负荷对终板变性的影响,发现 CEPCs 对异常压缩负荷和炎症因子的刺激非常敏感^[29],同时调控不良条件下 CEPCs 的分子表达谱,可以修复终板结构,延缓 IDD^[30]。

3.2 中药单体成分 SAA 能够延缓 CEPCs 退变

中药单体成分的有效性和药用机制受到广泛关

注。多种中草药单体成分已被确定在 IDD 的调节中发挥作用^[19,31-32]。例如,川芎嗪通过抑制髓核细胞中 TGF- β 的激活来缓解 IDD^[31]。红花单体羟基红花黄色素 A 能拮抗 IL-1 β 诱导的终板软骨细胞凋亡的作用^[33]。笔者前期发现杜仲苷可通过抑制 miR-140-5p/CREB1 信号通路来抑制髓核细胞凋亡^[19]。结合在线预测工具,系统地分析和验证了潜在的 IDD 治疗单体成分^[34],其中 SAA 在治疗 IDD 和抑制软骨细胞凋亡方面具有潜在的优势。

SAA 是丹参的一种水溶性成分,被报道具有抗炎和抗凋亡作用^[35]。CHIEN 等^[36]发现 SAA 可阻断 NF-KB 信号通路,增加 Bcl2 的表达,以抑制受损脑神经发生组织的炎症和凋亡。ZHANG 等^[37]报道了 SAA 通过抑制 NF-kB 和 MAPK 信号通路的激活,减少了 HK-2 细胞中炎症因子如 TNF、IL-6、iNOS 和 COX-2 的产生。近年来,学者们探讨了 SAA 对软骨细胞的影响,发现 SAA 可以通过抑制软骨细胞的炎症和相关凋亡来缓解骨关节炎的进展^[10-11]。笔者之前的在体研究^[9]证实了 SAA 可通过抑制软骨细胞凋亡、降低炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达水平,减轻持续压迫引起的腰椎小关节软骨损伤。然而,SAA 对 CEPCs 基质降解的影响尚不清楚。

在本研究中,观察了 SAA 对 IL-1 β 诱导的退变 CEPCs 的潜在影响,发现 SAA 可增强 CEPCs 的细胞增殖活性,逆转了 IL-1 β 对 CEPCs 基质成分的降解作用,抑制了退变 CEPCs 中 ADAMTS-5 和 MMP3 的表达。这些数据表明 SAA 具有延缓 CEPCs 退变的作用。在此基础上,进一步研究了 SAA 可能的 miRNAs 作用靶点。

3.3 miR-940 和 miR-576-5p 可能是 SAA 的作用靶点

miRNAs 在 IDD 发展中的作用已被广泛报道,作为一种小的非编码 RNA,通过靶向 mRNA 的 3' 非翻译区来调控基因表达,这可能是 IDD 药物治疗的靶点^[38]。研究也已证实 miRNAs 参与了 CEPCs 的调控^[14],如 METTL3 通过激活 m6A/miR-126-5p 轴来增强 IL-1 β 相关的 CEPCs 变性^[18],miR-34a 通过抑制 Bcl-2 的表达来诱导 fas 调控的 CEPCs 凋亡^[14]。根据笔者的研究结果,miR-940 和 miR-576-5p 参与了 CEPCs 退变过程,抑制 miR-940 与 miR-576-5p 表达可逆转 IL-1 β 所导致的 CEPCs 基质降解。基于这一发现,进一步验证了 SAA 对 miR-940 和 miR-576-5p 的依赖作用,表明两者过表达后 SAA 对退变 CEPCs 的改善作用显著降低。以上结果说明 SAA 能够增强 CEPCs 的增殖活性,有效改善退

变 CEPCs 基质成分表达,其作用机制与抑制 miR-940 和 miR-576-5p 表达有关,两者可能是 SAA 调节 CEPCs 退变的作用靶点。下一步将继续研究 miR-940 和 miR-576-5p 在 CEPCs 退变中的下游靶基因与 SAA 的调控机制,为拓展 SAA 治疗 IDD 的适应证与应用范围提供依据。

参考文献

- [1] ARUN R,FREEMAN B J,SCAMMELL B E,et al. 2009 ISSLS Prize Winner:what influence does sustained mechanical load have on diffusion in the human intervertebral disc:an in vivo study using serial postcontrast magnetic resonance imaging[J]. Spine,2009,34(21):2324-2337.
- [2] HEE H T,CHUAH Y J,TAN B H,et al. Vascularization and morphological changes of the endplate after axial compression and distraction of the intervertebral disc[J]. Spine,2011,36(7):505-511.
- [3] XU H G,CHEN X H,DING G Z,et al. Effect of pcDNA3.1-vascular endothelial growth factor 165 recombined vector on vascular buds in rabbit vertebral cartilage endplate[J]. Chin Med J,2012,125(22):4055-4060.
- [4] KOBAYASHI S,BABA H,TAKENO K,et al. Fine structure of cartilage canal and vascular buds in the rabbit vertebral endplate. Laboratory investigation[J]. J Neurosurg Spine,2008,9(1):96-103.
- [5] BROWN S,MATTA A,ERWIN M,et al. Cell clusters are indicative of stem cell activity in the degenerate intervertebral disc;can their properties be manipulated to improve intrinsic repair of the disc[J]. Stem Cells Dev,2018,27(3):147-165.
- [6] ZHANG H,ZHU T,ZHANG L,et al. Stromal cell-derived factor-1 induces matrix metalloproteinase expression in human endplate chondrocytes, cartilage endplate degradation in explant culture, and the amelioration of nucleus pulposus degeneration in vivo [J]. Int J Mol Med,2018,41(2):969-976.
- [7] YANG S F,LI L H,ZHU L G,et al. Bu-Shen-Huo-Xue-Fang modulates nucleus pulposus cell proliferation and extracellular matrix remodeling in intervertebral disk degeneration through miR-483 regulation of Wnt pathway[J]. J Cell Biochem,2019,120(12):19318-19329.
- [8] 展嘉文,朱立国,冯敏山,等. 丹参注射液含药血清对离体培养兔脊柱运动节段椎间盘的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(5):1834-1837.
- [9] ZHAN J W,ZHU L G,FENG M S,et al. Effects of Salvia Injection containing serum on the intervertebral discs of in vitro culture rabbit spinal motion segment[J]. China J Tradit Chin Med Pharm,2015,30(5):1834-1837. Chinese.
- [10] 展嘉文,朱立国,王尚全,等. 丹酚酸 A 治疗在体腰椎小关节骨性关节炎的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2021,29(7):7-11,16.
- [11] ZHAN J W,ZHU L G,WANG S Q,et al. Efficacy of salvianolic acid A on lumbar facet joint osteoarthritis in rabbits in vivo[J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop,2021,29(7):7-11,16. Chinese.
- [12] FENG S,CONG H,JI L. Salvianolic acid A exhibits anti-inflammatory and antiarthritic effects via inhibiting NF- κ B and p38/MAPK pathways[J]. Drug Des Devel Ther,2020,14:1771-1778.
- [13] WU Y F,WANG Z H,LIN Z,et al. Salvianolic acid A has anti-osteoarthritis effect in vitro and in vivo[J]. Front Pharmacol,2020,

- 11:682.
- [12] BARTEL D P. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
 - [13] SAYED D, ABDELLATIF M. microRNAs in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 827–887.
 - [14] CHEN H J, WANG J X, HU B, et al. miR-34a promotes Fas-mediated cartilage endplate chondrocyte apoptosis by targeting Bcl-2[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1/2): 21–30.
 - [15] LIU M H, SUN C, YAO Y, et al. Matrix stiffness promotes cartilage endplate chondrocyte calcification in disc degeneration via miR-20a targeting ANKH expression[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25401.
 - [16] HAN Y C, LI X H, YAN M J, et al. Oxidative damage induces apoptosis and promotes calcification in disc cartilage endplate cell through ROS/MAPK/NF- κ B pathway: implications for disc degeneration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(3): 1026–1032.
 - [17] YANG X J. Analysis of the copy number of exogenous genes in transgenic cotton using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Afr J Biotechnol*, 2012, 11(23): 6226–6233.
 - [18] XIAO L, ZHAO Q L, HU B, et al. METTL3 promotes IL-1 β -induced degeneration of endplate chondrocytes by driving m6A-dependent maturation of miR-126-5p[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23): 14013–14025.
 - [19] YANG S F, LI L H, ZHU L G, et al. Aucubin inhibits IL-1 β - or TNF- α -induced extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cell through blocking the miR-140-5p/CREB1 axis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 13639–13648.
 - [20] KELLER T S, HANSSON T H, ABRAM A C, et al. Regional variations in the compressive properties of lumbar vertebral trabeculae. Effects of disc degeneration[J]. *Spine*, 1989, 14(9): 1012–1019.
 - [21] ADAMS M A, DOLAN P. Spine biomechanics[J]. *J Biomech*, 2005, 38(10): 1972–1983.
 - [22] STOVER J D, FARHANG N, BERRETT K C, et al. CRISPR epigenome editing of AKAP150 in DRG neurons abolishes degenerative IVD-induced neuronal activation[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(9): 2014–2027.
 - [23] DOWDELL J, ERWIN M, CHOMA T, et al. Intervertebral disk degeneration and repair[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80(3S): S46–S54.
 - [24] LOTZ J C, FIELDS A J, LIEBENBERG E C. The role of the vertebral end plate in low back pain[J]. *Global Spine J*, 2013, 3(3): 153–164.
 - [25] RODRIGUEZ A G, SLICHTER C K, ACOSTA F L, et al. Human disc nucleus properties and vertebral endplate permeability[J]. *Spine*, 2011, 36(7): 512–520.
 - [26] LIU J H, HAO L, SUYOU L T, et al. Biomechanical properties of lumbar endplates and their correlation with MRI findings of lumbar degeneration[J]. *J Biomech*, 2016, 49(4): 586–593.
 - [27] ARIGA K, MIYAMOTO S, NAKASE T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc[J]. *Spine*, 2001, 26(22): 2414–2420.
 - [28] XU H G, ZHENG Q, SONG J X, et al. Intermittent cyclic mechanical tension promotes endplate cartilage degeneration via canonical Wnt signaling pathway and E-cadherin/ β -catenin complex cross-talk[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(1): 158–168.
 - [29] ZHAN J W, WANG S Q, FENG M S, et al. Constant compression decreases vascular bud and VEGFA expression in a rabbit vertebral endplate ex vivo culture model[J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0234747.
 - [30] ZHAN J W, WANG S Q, FENG M S, et al. Effects of axial compression and distraction on vascular bud and VEGFA expression in the vertebral endplate of an ex vivo rabbit spinal motion segment culture model[J]. *Spine*, 2021, 46(7): 421–432.
 - [31] LIU S F, CHENG Y H, TAN Y Q, et al. Ligustrazine prevents intervertebral disc degeneration via suppression of aberrant TGF β activation in nucleus pulposus cells [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5601734.
 - [32] ZHANG Z J, LIN J L, TIAN N F, et al. Melatonin protects vertebral endplate chondrocytes against apoptosis and calcification via the Sirt1-autophagy pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 177–193.
 - [33] 张宇, 赵永见, 周泉, 等. 羟基红花黄素 A 拮抗 IL-1 β 诱导软骨终板细胞凋亡的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(12): 1704–1709.
 - ZHANG Y, ZHAO Y J, ZHOU Q, et al. The anti-apoptotic effect of Hydroxy safflower yellow A on end-plate chondrocytes induced by IL-1 β [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(12): 1704–1709. Chinese.
 - [34] ZHAN J W, WANG S Q, WEI X, et al. Systematic analysis of Long non-coding RNAs reveals diagnostic biomarkers and potential therapeutic drugs for intervertebral disc degeneration[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5069–5084.
 - [35] SU C Y, MING Q L, RAHMAN K, et al. Salvia miltiorrhiza: traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology[J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 163–182.
 - [36] CHIEN M Y, CHUANG C H, CHERN C M, et al. Salvianolic acid A alleviates ischemic brain injury through the inhibition of inflammation and apoptosis and the promotion of neurogenesis in mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99: 508–519.
 - [37] ZHANG H F, WANG Y L, GAO C, et al. Salvianolic acid A attenuates kidney injury and inflammation by inhibiting NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways in 5/6 nephrectomized rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(12): 1855–1864.
 - [38] 姜超, 张永远, 黄大耿, 等. 非编码 RNA 在椎间盘退变中的作用机制及应用前景[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2020, 30(11): 1046–1054.
 - JIANG C, ZHANG Y Y, HUANG D G, et al. The mechanism and application of non-coding RNA in intervertebral disc degeneration[J]. *Chin J Spine Spinal Cord*, 2020, 30(11): 1046–1054. Chinese.

(收稿日期: 2022-01-21 本文编辑: 连智华)