

# miR-155 对 IL-1 $\beta$ 诱导髓核细胞凋亡、炎症和氧化应激的影响

杨利斌 杨林 王善坤 赵恩典 路坦 梁秋冬

**摘要** 目的 探讨 miR-155 对大鼠髓核细胞的保护作用及机制。方法 培养大鼠髓核细胞; 白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 处理、转染后, 检测 miR-155 表达; 细胞分为 Control 组(对照组)、IL-1 $\beta$  组(模型组)、IL-1 $\beta$  + miR-155 mimic 组和 IL-1 $\beta$  + miR-155 inhibitor 组, 流式细胞术检测细胞凋亡率; ELISA 法检测白介素 6 (IL-6)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白介素 10 (IL-10) 表达水平; 采用试剂盒检测乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 含量; Western blot 法检测 Caspase-3、Caspase-9、p65、p-p65、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 蛋白表达水平。结果 IL-1 $\beta$  抑制 miR-155 表达; 与对照组相比, 模型组髓核细胞凋亡率、Caspase-3、Caspase-9、IL-6、iNOS、LDH、MDA、NF- $\kappa$ B p65 和 TNF- $\alpha$  表达增加, IL-10、SOD 和 GSH 则降低; 与模型组相比, miR-155 mimic 反向调节上述指标。结论 miR-155 抑制大鼠髓核细胞凋亡、炎症和氧化应激, 可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路激活有关。

**关键词** 白介素; 髓核细胞; 凋亡; 炎症; 氧化应激

中图分类号 R 363.1+3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1046-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.012

椎间盘易受损伤而发生形态学改变, 因此造成疼痛性症状和神经功能损伤给患者家庭和社会造成了沉重的压力<sup>[1-2]</sup>。目前, 椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 的治疗方法包括保守治疗、椎间盘切除和脊柱融合等, 但这些方法疗效有限, 不能产生可预测和可靠的结果<sup>[3-4]</sup>。研究<sup>[2, 5]</sup>表明, 炎症微环境和新神经支配产生是椎间盘性疼痛的来源, 其中白介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 可影响椎间盘细胞衰老、自噬和与增殖、再生有关的基因表达。微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 对编码基因表达有负性调控作用, 参与炎症性疾病的调控<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明, miR-155 在髓核细胞变性过程中表达下调。但 miR-155 对大鼠椎间盘细胞凋亡、

炎症反应和氧化应激的影响尚不清楚。基于此, 该文探究 miR-155 对 IL-1 $\beta$  诱导的大鼠髓核细胞凋亡、炎症和氧化应激的作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 清洁级 SD 大鼠 10 只, 雌雄不限, 180 ~ 220 g, 购自北京维通利华实验动物公司 [SCXK(京) 2015-0001]。饲养于新乡医学院实验室, 适应性喂养 1 周, 温度 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C, 湿度 (40  $\pm$  5) %, 光照 10 ~ 12 h, 自由采食和饮水。试验均经过本院动物伦理委员会批准, 并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

**1.1.2 主要试剂** II 型胶原酶 (C6885)、0.25% 胰蛋白酶 (T6424) 和 IL-1 $\beta$  (SRP3083) 购自美国 Sigma 公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (T2190)、软骨染色液 (甲苯胺蓝法) (G2543)、软骨染色液 (番红 O 法) (G2540)、总 RNA 提取试剂盒 (R1200)、定量 PCR 试剂盒 (T2210) 购自索莱宝公司; DMEM/F12 培养液 (11320082)、青链霉素溶液 (15070063)、胎牛血清 (12483020) 购自美国 Gibco 公司; miR-155 mimic、miR-155 inhibitor 和阴性质粒购自美国 Hyclone 公司; 兔源 Caspase-3 (ab4051)、Caspase-9 (ab32539)、p-p65 (ab76302)、p65 (ab32536)、TNF- $\alpha$  (ab221921) 和 GAPDH (ab181602) 单克隆抗体购自 Abcam 公司; 引物使用 Primer5.0 软件设计, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠髓核细胞培养**<sup>[8]</sup> CO<sub>2</sub> 麻醉法处死大鼠, 75% 酒精体表浸泡消毒; 分离胸腰段脊柱, 充分暴露椎间盘, 髓核组织; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 液漂洗, 切成约 1 mm<sup>3</sup> 组织块, 移入灭菌离心管, 加 0.1% II 型胶原酶, 37  $^{\circ}$ C 振荡消化 30 min; 1 000 r/min  $\times$  5 min, 弃上清液; PBS 液漂洗; 加 0.1% II 型胶原酶重悬, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4 h; 将细胞悬液用 70  $\mu$ m 孔径细胞筛网过滤, 用 DMEM/F12 离心洗涤; 转入 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶, 加含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中

2020-03-30 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (编号: 201602109)

作者单位: 新乡医学院第一附属医院骨科四病区, 新乡 453100

作者简介: 杨利斌, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: yanglibin2013

@163.com

培养。观察生长情况,一般4~5 d换液,去除未贴壁组织块,以后每3 d换液1次,当细胞融合率达到85%时可进行传代。取第2代细胞用于鉴定,第3代细胞进行后续实验研究。

**1.2.2 髓核细胞鉴定** 采用番红O和甲苯胺蓝染色进行:将第2代细胞接种于24孔板,待细胞贴壁后PBS充分洗涤;加4%多聚甲醛固定细胞30 min, PBS充分洗涤;用1%甲苯胺蓝染色10 min或0.5%番红O染液滴染1 min,双蒸水洗涤1 min。镜下观察细胞染色情况及形态特征。

**1.2.3 细胞转染** 以 $1 \times 10^5$ 个/ml密度将第3代髓核细胞接种于6孔培养板中,待细胞贴壁后,分为4组:对照组、模型组、IL-1 $\beta$  + miR-155 mimic组和IL-1 $\beta$  + miR-155 inhibitor组。融合率达80%时,采用Lipofectamine 2000转染。对照组和模型组转染miR-155阴性质粒。24 h后,换无血清培养基继续培养12 h;再加入终浓度10 ng/ml的IL-1 $\beta$ 处理24 h后进行后续实验。

**1.2.4 qRT-PCR检测 miR-155 表达** 以 $1 \times 10^5$ 个/ml密度将第3代髓核细胞接种于6孔培养板中,融合率达80%时,①分为Control组(对照组)和IL-1 $\beta$ 组(模型组),前者不作处理,后者加入终浓度10 ng/ml的IL-1 $\beta$ ;②分为对照组和miR-155 mimic组,前者转染miR-155阴性质粒,后者转染miR-155 mimic;③分为对照组和miR-155 inhibitor组,转染miR-155阴性质粒,后者转染miR-155 inhibitor。

24 h后收集各组细胞,提取总RNA并反转录成cDNA,之后进行qRT-PCR。引物:miR-155上游:5'-AAC TTG TAA ACT CCC TCG ACT G-3',下游:5'-CCT TAC GTG ACC TGG AGT CG-3'; GAPDH上游:5'-CGC TCT CTG CTC CTC CTG TTC-3',下游:5'-ATC CGT TGA CTC CGA CCT TCA C-3'。按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算miR-155表达量。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 按1.2.3项处理,收集各组细胞调整为 $1 \times 10^6$ 个/ml,每个样本加入5  $\mu$ l的膜联蛋白V-荧光素异硫氰酸盐(annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)和5  $\mu$ l碘化丙啶(propyl iodide, PI)染色液,室温避光孵育15 min后上机检测。

**1.2.6 ELISA检测髓核细胞炎症因子白介素6(interleukin-6, IL-6)、诱导性一氧化氮(inducible nitric oxide, iNOS)和白介素10(interleukin-10, IL-10)的表达** 按1.2.3项处理后,按照说明书操作,检测各组髓核细胞内炎症因子IL-6、iNOS和IL-10的表达

水平。

**1.2.7 试剂盒检测髓核细胞氧化应激因子乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量** 按1.2.3项处理后,按照说明书操作,检测各组髓核细胞内氧化应激因子LDH、SOD、MDA和GSH含量。

**1.2.8 蛋白印迹检测相关蛋白表达水平** 按1.2.3项处理后,收集各组细胞提取总蛋白,用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法检测蛋白浓度并调平,取30  $\mu$ g蛋白用12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白并转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,室温封闭2 h,以1:800稀释度加入半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartic protease 3, Caspase-3)、Caspase-9、核转录因子kappa B P65(nuclear transcription factor kappa B P65, NF- $\kappa$ B p65)、p-p65和TNF- $\alpha$ 抗体,4  $^{\circ}$ C孵育过夜。次日弃一抗,加入二抗,室温封闭1 h,滴发光液于暗室曝光显影。以GAPDH为内参计算蛋白相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 18.0统计软件处理数据,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料经正态分布和方差齐性检验后,多组差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用LSD检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 原代培养大鼠髓核细胞的鉴定** 采用番红和甲苯胺蓝染色鉴定第二代髓核细胞,重复3次实验的结果如图1显示:番红染色后髓核细胞胞质和核呈棕黄色,甲苯胺蓝染色胞质和核呈蓝色;且两种染色细胞均呈多边形的“铺路石”样,符合髓核细胞(特殊的软骨细胞)形态特点。

**2.2 miR-155表达水平比较** qRT-PCR检测miR-155表达水平,结果如图2显示:与对照组相比,模型组miR-155表达水平降低( $P < 0.01$ ); miR-155 mimic组miR-155的表达增加( $P < 0.01$ ); miR-155 inhibitor组miR-155的表达降低( $F = 20.15, P < 0.01$ )。

**2.3 miR-155抑制IL-1 $\beta$ 诱导的髓核细胞凋亡** 流式细胞术检测各组细胞凋亡率,结果如图3显示:与对照组相比,模型组细胞凋亡率增加( $F = 19.56,$

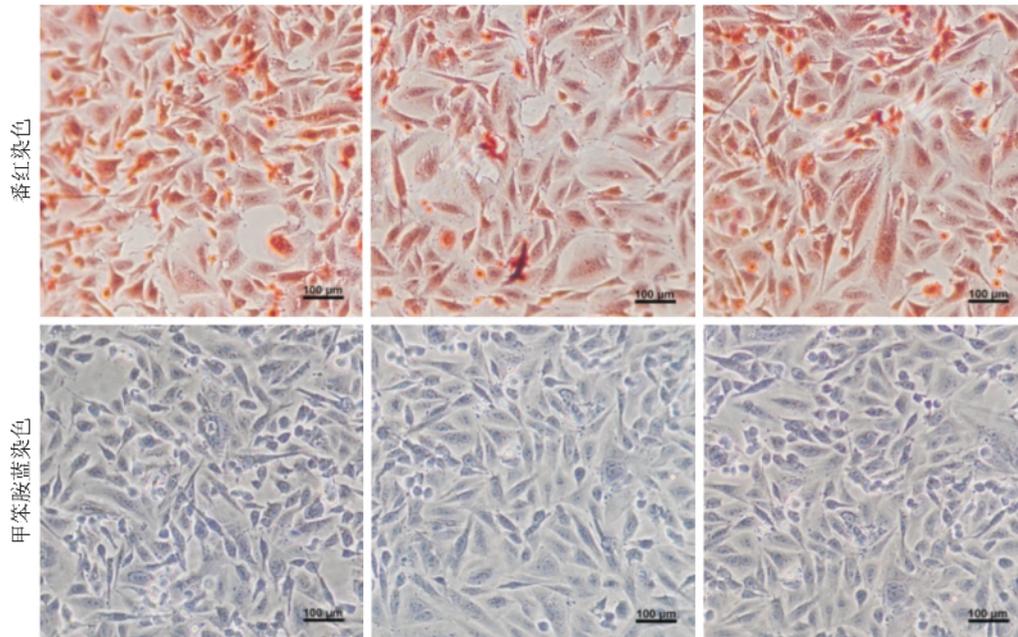


图1 番红和甲苯胺蓝染色鉴定大鼠髓核细胞 ×400

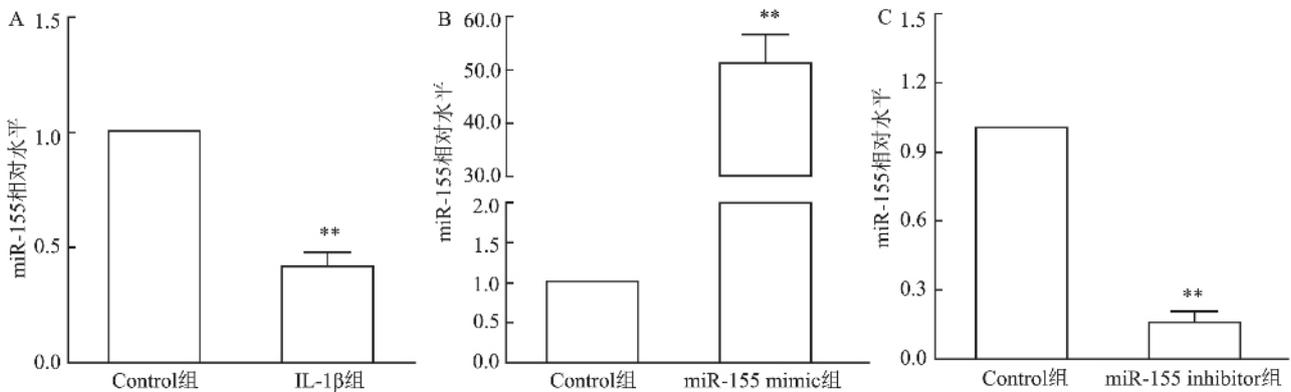


图2 qRT-PCR 检测 miR-155 表达水平

A: 模型组 IL-1β 对 miR-155 表达的影响; B: miR-155 mimic 组 miR-155 mimic 对 miR-155 表达的影响; C: miR-155 inhibitor 组 miR-155 inhibitor 对 miR-155 表达的影响; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

$P < 0.01$ ); 与模型组相比, miR-155 mimic 降低 IL-1β 诱导的细胞凋亡率 ( $F = 15.24, P < 0.01$ ), 而 miR-155 inhibitor 增加细胞凋亡率 ( $F = 12.28, P < 0.01$ )。蛋白印迹进一步检测凋亡相关蛋白表达水平, 结果如图3显示: 与对照组相比, 模型组髓核细胞中 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平增加 ( $F = 19.22, F = 23.45, P < 0.01$ ); 与模型组相比, IL-1β + miR-155 mimic 组 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平降低 ( $F = 13.14, F = 18.52, P < 0.01$ ), 而 IL-1β + miR-155 inhibitor 组 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平则上调 ( $F = 25.24, F = 16.59, P < 0.01$ )。

**2.4 miR-155 抑制 IL-1β 诱导的髓核细胞炎症反应** ELISA 检测各组髓核细胞中炎症细胞因子的表

达水平, 结果显示: 与对照组相比, 模型组髓核细胞中 IL-6、iNOS 表达增加, IL-10 表达降低 ( $F = 23.54, F = 14.55, 12.53, P < 0.01$ ); 与模型组相比, IL-1β + miR-155 mimic 组 IL-6、iNOS 表达降低, IL-10 增加 ( $F = 10.88, 8.69, 12.41, P < 0.01$ ), 而 miR-155 inhibitor 组 IL-6、iNOS 表达增加, IL-10 降低 ( $F = 11.26, 8.61, 8.27, P < 0.01$ )。见图4。

**2.5 miR-155 抑制 IL-1β 诱导的髓核细胞氧化应激** ELISA 检测各组髓核细胞中氧化应激因子的含量, 结果显示: 与对照组相比, 模型组髓核细胞中 SOD、GSH 含量降低, MDA、LDH 含量升高 ( $F = 32.56, 29.62, 25.46, 23.47, P < 0.01$ ); miR-155 mimic 部分逆转了 IL-1β 对上述氧化应激分子的调

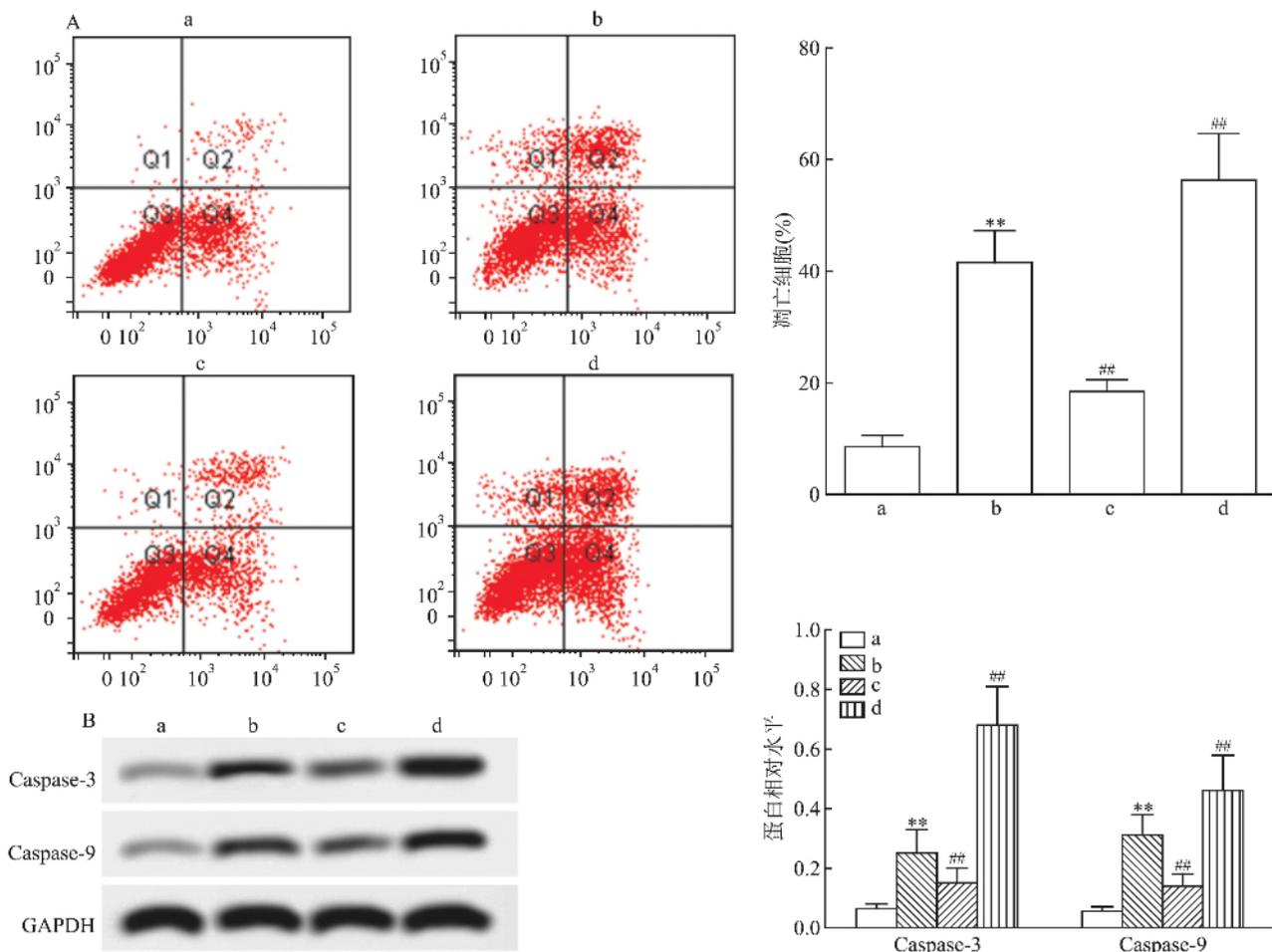


图3 miR-155 对 IL-1 $\beta$  诱导的髓核细胞凋亡和凋亡相关蛋白表达的影响

A: 流式细胞术检测髓核细胞凋亡水平; B: 蛋白印迹实验检测凋亡相关蛋白表达水平; a: Control 组(对照组); b: IL-1 $\beta$  组(模型组); c: IL-1 $\beta$  + miR-155 mimic 组; d: IL-1 $\beta$  + miR-155 inhibitor 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ##  $P < 0.01$

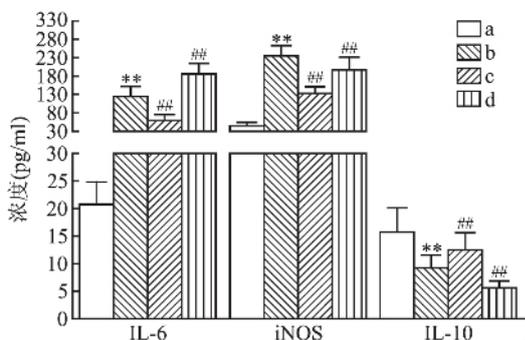


图4 miR-155 对髓核细胞炎症细胞因子含量的影响

a: Control 组(对照组); b: IL-1 $\beta$  组(模型组); c: IL-1 $\beta$  + miR-155 mimic 组; d: IL-1 $\beta$  + miR-155 inhibitor 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ##  $P < 0.01$

节作用( $F = 15.47, 19.25, 12.36, 16.48, P < 0.01$ ), miR-155 inhibitor 则加剧了 IL-1 $\beta$  的调节作用( $F = 12.19, 8.69, 13.44, 8.79, P < 0.01$ )。见图5。

### 2.6 miR-155 抑制 IL-1 $\beta$ 诱导的髓核细胞 NF- $\kappa$ B

p65 磷酸化、TNF- $\alpha$  表达和 P65 入核 蛋白印迹实验检测各组髓核细胞 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化情况,及下游 TNF- $\alpha$  表达水平 结果显示:与对照组相比,模型组 p-p65/p65 和 TNF- $\alpha$  相对表达量增加( $F = 10.28, 21.49, P < 0.01$ );与模型组相比,IL-1 $\beta$  + miR-155 mimic 组 p-p65/p65 和 TNF- $\alpha$  表达水平降低( $F = 8.92, 12.56, P < 0.01$ ),而 miR-155 inhibitor 组 p-p65/p65 和 TNF- $\alpha$  表达水平则增加( $F = 33.59, 26.74, P < 0.01$ )。见图6。

### 3 讨论

炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  是 IL-1 家族中最重要的成员,参与调节机体免疫应答和炎症反应过程,加速多种炎症性疾病的进程<sup>[9]</sup>。Kang et al<sup>[10]</sup> 研究发现,IL-1 $\beta$  刺激髓核细胞后,细胞外基质降解增加,推进椎间盘退化的发展,而 miR-15b 的表达抑制成功干扰了该进程。在本研究中,成功采用 II 型胶原酶法

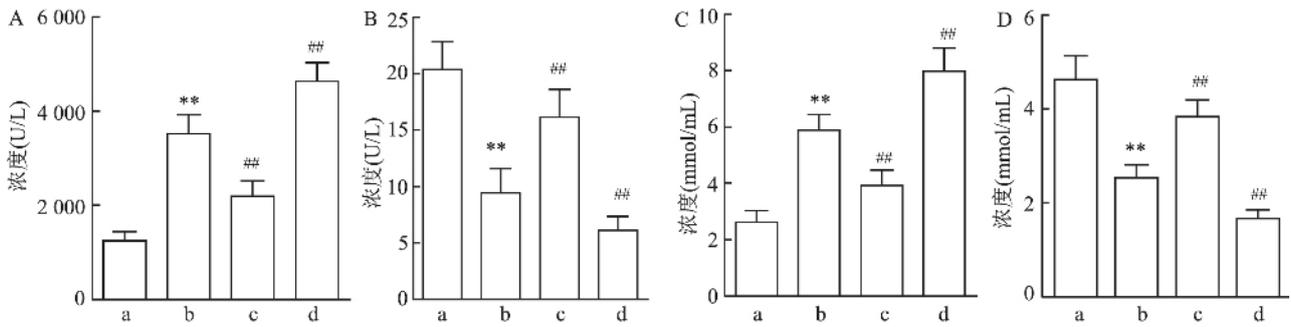


图5 miR-155对髓核细胞氧化应激因子表达的影响

A: LDH; B: SOD; C: MDA; D: GSH; a: Control 组(对照组); b: IL-1β 组(模型组); c: IL-1β + miR-155 mimic 组; d: IL-1β + miR-155 inhibitor 组; 与对照组比较: \*\* P < 0.01; 与模型组比较: ## P < 0.01

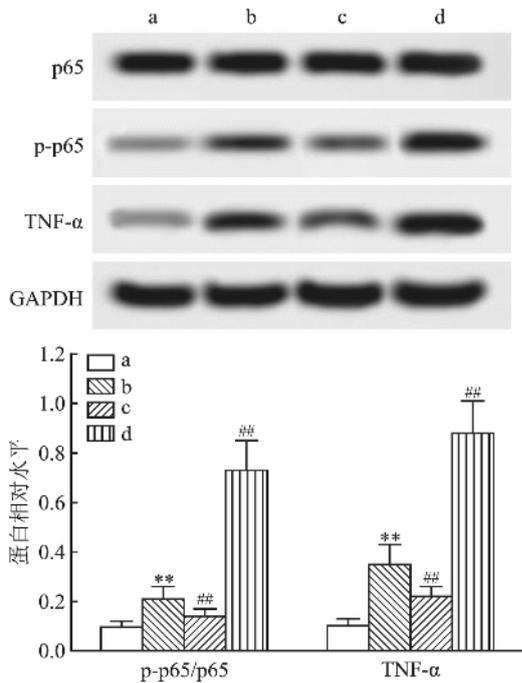


图6 miR-155对髓核细胞 p-p65、TNF-α 表达的影响

a: Control 组(对照组); b: IL-1β 组(模型组); c: IL-1β + miR-155 mimic 组; d: IL-1β + miR-155 inhibitor 组; 与对照组比较: \*\* P < 0.01; 与模型组比较: ## P < 0.01

分离得到较纯的大鼠髓核细胞,并用 10 ng/ml 的 IL-1β 处理髓核细胞以建立椎间盘退变细胞模型。IL-1β 刺激降低了髓核细胞中 miR-155 的表达量,这可能与引起促炎细胞因子过度产生有关。

在变性的椎间盘组织中,炎性细胞因子水平升高,持续压迫脊髓或神经根,激活 iNOS,产生大量一氧化氮,进一步增加受损区域的 iNOS 表达,进而诱导过度的髓核细胞凋亡,从而导致椎间盘退化<sup>[11]</sup>。本研究也证实,IL-1β 处理大鼠髓核细胞后,促炎细胞因子大量表达,而抗炎细胞因子表达减少;可见,在椎间盘退变过程中,炎性细胞因子的含量增加是

必然过程。大量研究<sup>[12]</sup>表明,在老化和退变的椎间盘中存在氧化应激和氧化产物浓度的增加,并通过线粒体途径诱导髓核细胞凋亡,是椎间盘退变的发病机制之一。该实验结果也表明,在 IL-1β 诱导的椎间盘退变细胞模型中存在氧化应激和产物消除的平衡失调,但 miR-155 过表达成功减少了髓核细胞内炎症细胞因子和氧化应激分子的产生,加速了氧化产物的消除,进而降低了髓核细胞凋亡率和凋亡关键蛋白表达水平,而抑制 miR-155 表达则加速了髓核细胞凋亡进程。综合实验结果表明,miR-155 能降低 IL-1β 诱导的椎间盘退变细胞模型髓核细胞的体外凋亡水平。

NF-κB 是一种多向性核转录调节因子,P50/P65 二聚体是其最常见形式,NF-κB 激活入核后可调节炎症介质、细胞因子等表达<sup>[13]</sup>。NF-κB 信号通路在多种疾病中均有重要的调节作用,在骨关节炎细胞中,NF-κB p65 磷酸化水平升高,进而增加其下游 TNF-α 等炎性细胞因子的表达<sup>[14]</sup>。本研究发现,miR-155 过表达能有效降低 p65 入核量,进而抑制 p-p65 和下游炎性细胞因子 TNF-α 的表达水平,从而减少因此造成的髓核细胞凋亡。这与王金海等<sup>[15]</sup>的观点基本一致。综合实验结果表明,在 IL-1β 诱导的椎间盘退变细胞模型中,miR-155 降低髓核细胞凋亡的机制与抑制 NF-κB 信号通路激活有关,但其中是否还有其他信号途径的参与还有待进一步研究。

综上所述,II 型胶原酶可分离得到纯度较高的大鼠髓核细胞,miR-155 表达增加能有效降低 IL-1β 诱导大鼠髓核细胞凋亡、炎症反应和氧化应激,且可能与抑制 NF-κB 信号通路有关。该文旨在为椎间盘退化的治疗提供一个新的方向。

参考文献

[1] Rodrigues-Pinto R, Richardson S M, Hoyland J A. An understand-

- ing of intervertebral disc development ,maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disc degeneration[J]. *Eur Spine J* 2014 ,23(9) : 1803 – 14.
- [2] Bowles R D ,Setton L A. Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair[J]. *Biomaterials* 2017 ,129(1) : 54 – 67.
- [3] Kim J H ,Park J H ,Moon H J , et al. Matrix degradative enzymes and their inhibitors during annular inflammation: initial step of symptomatic intervertebral disc degeneration[J]. *J Korean Neurosurg Soc* 2014 ,55(5) : 237 – 43.
- [4] Davis R J , Nunley P D , Kim K D , et al. Two-level total disc replacement with mobi-C cervical artificial disc versus anterior discectomy and fusion: A prospective , randomized , controlled multicenter clinical trial with 4-year follow-up results[J]. *J Neurosurg Spine* 2015 ,22(1) : 15 – 25.
- [5] Kadow T ,Sowa G ,Vo N , et al. Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations: what are the important translational questions[J]. *Clin Orthop Relat Res* 2015 ,473(6) : 1903 – 12.
- [6] Sondag G R ,Haqqi T M. The role of microRNAs and their targets in osteoarthritis[J]. *Curr Rheumatol Rep* 2016 ,18(8) : 56.
- [7] Ye D ,Dai L ,Yao Y , et al. miR-155 inhibits nucleus pulposus cells' degeneration through targeting ERK 1/2 [J]. *Dis Markers* , 2016 ,18(8) : 1 – 14.
- [8] Lu K ,Li H Y ,Yang K , et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: *in-vitro* study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther* ,2017 ,8(1) : 108.
- [9] Striz I. Cytokines of the IL-1 family: recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations [J]. *Clin Sci ( Lond)* 2017 ,31(17) : 2241 – 56.
- [10] Kang L ,Yang C ,Yin H , et al. microRNA-155 silencing inhibits IL-1 $\beta$ -induced extracellular matrix degradation by targeting SMAD3 in human nucleus pulposus cells [J]. *Biotechnol Lett* , 2017 ,39(4) : 623 – 32.
- [11] Cheng X ,Zhang G ,Zhang L , et al. Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 *via* exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration [J]. *J Cell Mol Med* 2018 ,22(1) : 261 – 76.
- [12] Chen D ,Xia D ,Pan Z , et al. Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration *in vivo* [J]. *Cell Death Dis* 2016 ,7(10) : e2441.
- [13] 王 静 ,李馨筱 ,吴琳娜 ,等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织 NF- $\kappa$ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达及意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志* , 2019 ,11(1) : 33 – 8.
- [14] 朱海泉 ,刘子敏 ,孟祥圣 ,等. 川芎嗪抑制 NF- $\kappa$ B P65 磷酸化对 LPS 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用 [J]. *中国免疫学杂志* , 2019 ,35(2) : 181 – 5.
- [15] 王金海 ,张婷卓 ,赵 敏 ,等. 头穴针刺调控局灶性脑缺血大鼠海马旁回 NF- $\kappa$ B p65 mRNA、I $\kappa$ B mRNA 表达的实验研究 [J]. *针刺研究* , 2018 ,43(9) : 556 – 61.

## Effects of miR-155 on IL-1 $\beta$ -induced apoptosis ,inflammatory response and oxidative stress of nucleus pulposus cells in rats

Yang Libin , Yang Lin , Wang Shankun , et al

( Dept of Orthopaedic Surgery ,The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College ,Xinxiang 453100)

**Abstract Objective** To investigate the protective effect and mechanism of miR-155 on nucleus pulposus cells of rats. **Methods** Rat nucleus pulposus cells were cultured. miR-155 expression was detected after interleukin-1 $\beta$  ( IL-1 $\beta$ ) treatment and transfection. Cells were divided into Control group , IL-1 $\beta$  group ( model group) , IL-1 $\beta$  + miR-155 mimic group and IL-1 $\beta$  + miR-155 inhibitor group. Apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expression levels of interleukin-6( IL-6) , inducible nitric oxide synthase( iNOS) and interleukin-10( IL-10) were detected by ELISA. The contents of lactate dehydrogenase( LDH) , superoxide dismutase( SOD) , malondialdehyde ( MDA) and glutathione( GSH) were detected by the kit. Western blot was used to detect the protein expression levels of Caspase-3 , Caspase-9 , p65 , p-p65 and tumor necrosis factor  $\alpha$ ( TNF- $\alpha$ ) . **Results** IL-1 $\beta$  inhibited the expression of miR-155. Compared with the control group , the apoptotic rate of nucleus pulposus cells , Caspase-3 , Caspase-9 , IL-6 , iNOS , LDH , MDA , NF- $\kappa$ B p65 and TNF- $\alpha$  expression in the model group all increased significantly , while IL-10 , SOD and GSH all decreased significantly. Compared with the model group , miR-155 mimic reversely regulated the above indicators. **Conclusion** MiR-155 inhibits apoptosis , inflammation and oxidative stress in nucleus pulposus of rats , which may be related to the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway activation.

**Key words** interleukin; nucleus pulposus cells; apoptosis; inflammation; oxidative stress