

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.002

Linc01776 在椎间盘退行性变中生物学功能的研究 *

王云浩 孙中仪 于召龙 李秋园 朱文峰 田纪伟[△]

(上海交通大学附属第一人民医院骨科 上海 200080)

摘要 目的:椎间盘退行性变(intervertebral disc degeneration, IVDD)是中老年人中的高发病率与高致残率的疾病,目前其病理生理机制尚未完全研究清楚。本实验旨在研究 linc01776 在 IVDD 中的差异性表达,并通过生物信息学探索调控 IVDD 的分子学机制,从而为 IVDD 的治疗提供作用靶点。**方法:**根据 Pfaffmann 评分,将退变椎间盘标本分成对照组与 IVDD 组,通过 qRT-PCR 验证 linc01776 在退变椎间盘中的差异表达;构建 Linc01776 敲除质粒表达载体,并研究 Linc01776 在 IVDD 中生物学功能学研究;预测 Linc01776 参与的竞争性内源 RNA (CeRNA) 调控机制。**结果:**linc01776 在退变椎间盘中表达显著增加。敲除 linc01776 后,Aggrecan 表达增加,MMP3、MMP13 表达减少,细胞外基质分解降低。通过生物信息学预测 Linc01776/miR-196b-5p/Akt1 的 CeRNA 机制调控通路。**结论:**Linc01776 促进髓核细胞外基质降解,调控 IVDD 的发生与发展。Linc01776/miR-196b-5p/Akt1 信号轴可能为其调控 IVDD 进程的 CeRNA 机制调控通路。

关键词:椎间盘退行性变;长链非编码 RNA;linc01776;竞争性内源 RNA

中图分类号:R-33;R681.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)18-3405-05

The Biological Function Analysis of Linc01776 in the Degeneration of Intervertebral Disc*

WANG Yun-hao, SUN Zhong-yi, YU Zhao-long, LI Qiu-yuan, ZHU Wen-feng, TIAN Ji-wei[△]

(Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: Intervertebral disc degeneration (IVDD) is a disease with high morbidity and high disability in middle-aged and elderly people. The pathophysiological mechanism has not been fully studied. This study investigated the differential expression of linc01776 in IVDD and explored the molecular mechanism of IVDD through bioinformatics. This may provide a target for the treatment of IVDD. **Methods:** According to Pfaffmann score, degenerative disc tissues were divided into control group and IVDD group and qRT-PCR was used to verify the differential expression of linc01776 in degenerated intervertebral discs. The Linc01776 knocking-out plasmid expression vector was constructed to study the biofunctionality of Linc01776 in IVDD. The competitive endogenous RNA (CeRNA) regulatory mechanism involved in Linc01776 was predicted. **Results:** The expression of linc01776 was significantly increased in the degenerated intervertebral disc. Knocking out linc01776 could promote the expression of Aggrecan and inhibit the expression of the MMP3 and MMP13. What's more, it could further promote the decomposition of extracellular matrix. The regulatory pathway of the CeRNA mechanism of Linc01776/miR-196b-5p/Akt1 was predicted by bioinformatics. **Conclusion:** Linc01776 promotes the degradation of nucleus pulposus extracellular matrix and regulates the occurrence and development of IVDD. The Linc01776/miR-196b-5p/Akt1 signal axis may be a regulatory pathway for the CeRNA mechanism that regulates IVDD progression.

Key word: Intervertebral disc degeneration; Long non-coding RNA; Linc01776; Competitive endogenous RNA

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R681.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)18-3405-05

前言

椎间盘退行性变(intervertebral disc degeneration, IVDD)是中老年人中的高发病率与高致残率的疾病,也是就医、住院的常见疾病之一^[1,2]。目前其机制研究主要集中在生物力学、氧化应激、炎症因子、细胞凋亡、细胞外基质与自噬等方面^[3,4]。而长链非编码 RNAs(lncRNAs)是一类长度大于 200 nt 的非编码蛋

白转录本,在机体的生理及病理生理过程中执行重要的生物学功能。研究表明,lncRNAs 参与肿瘤、糖尿病、阿尔兹海默病等疾病的发病过程^[5,6]。但 lncRNA 参与 IVDD 调控的分子机制目前仍处于起步阶段。

在人类基因组中,仅有约为 1.5%的核苷酸序列可以编码蛋白,其余的约 98.5%的核苷酸序列为非编码序列,以时空特异性方式(如不同发育阶段)或组织特异性参与人体内的病理

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81572169)

作者简介:王云浩(1992-),男,硕士,研究方向:椎间盘退行性变,E-mail: WYH_627@163.com

[△] 通讯作者:田纪伟(1965-),男,博士生导师,主任医师,研究方向:椎间盘退行性变,E-mail: TJW609@163.com

(收稿日期:2019-04-11 接受日期:2019-05-06)

生理进程并调控疾病的发生发展^[7]。非编码 RNA 具有多种类型,如循环 RNA、microRNAs、环状 RNA、长链非编码 RNA (long no coding RNA, LncRNA) 等^[8]。其中, lncRNA 参与调控了包括从胚胎发育、干细胞维持、细胞分化、增殖、凋亡、代谢、自噬、信号传导以及免疫应答等几乎所有生理或病理过程与以及疾病的发生发展过程。lncRNA 的结构异常与表达异常常与人类的重大疾病(如肿瘤、心脑血管疾病、退行性神经疾病等)密切相关^[9]。

竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 机制,是调控细胞功能与机体病理生理过程的重要机制^[10]。当 lncRNA 与 mRNA 有相同的核苷酸片段时,两者可竞争结合 miRNA。lncRNA 发挥海绵吸附作用,吸附 miRNA,致使被 miRNA 结合的 mRNA 增加, mRNA 表达量增加。lncRNA 通过 ceRNA 机制,以 miRNA 为桥梁,间接调控 mRNA 的表达,参与细胞病理生理功能的调节。在椎间盘退变中, lncRNA 也可能通过 ceRNA 机制,通过吸附 miRNA,进而调控下游 mRNA 表达,影响髓核细胞外基质降解,进而促进椎间盘退变的发生与发展。

本课题组前期对退变椎间进行基因芯片分析,共发现 1570 个差异表达 lncRNAs,其中 linc01776 差异表达最为显著^[11]。本研究通过 qRT-PCR 对 linc01776 在退变椎间盘中的表达进一步验证,并通过敲除 linc01776 研究其生物学功能,使用生物信息学通过结合 ceRNA 机制预测其下游分子,构建其 ceRNA 机制通路。

1 材料方法

1.1 研究对象

收集 2018 年 5 月-2018 年 12 月在上海交通大学附属第一人民医院经椎间盘手术切除标本 12 例,其中男性 5 例,女性 7 例,年龄平均(59.83 ± 7.81)。根据 Pfirrmann 评分,将评分 I-III 级的标本作为对照组,评分 IV-V 的标本作为 IVDD 组。术前均签署知情同意书,并经上海交通大学附属第一人民医院伦理委员会批准。

1.2 实验材料

细胞培养用牛血清 (Sigma 公司)、DMEM-F12 培养基 (gibco 公司)、TRIzol RNA 分离试剂 (Thermo 公司)、TB Green™ Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒 (TaKaRa 公司)、MMP3 兔抗人抗体 (CST 公司)、MMP13 兔抗人抗体 (CST 公司)、GAPDH 兔抗人抗体 (CST 公司)、Aggrecan 兔抗人抗体 (Abcam 公司)、ECL 发光试剂 (Pierce Biotechnology 公司)、Linc01776 的 shRNA (吉玛公司)、Lipofectamine 3000 转染试剂 (Thermo 公司)。

1.3 髓核原代细胞提取与培养

将椎间盘标本用 PBS 清洗 3 次,将髓核组织与纤维环组织机械分离,并将髓核组织修剪成 2-3 mm³ 组织块。将髓核组织块经 0.25% 的胰蛋白酶 37℃ 恒温震荡消化 0.5h 后,于 800 rpm 下离心 5 min,然后经 0.2% II 型胶原酶 37℃ 恒温震荡消化 3-4h 后,经 70 μm 细胞筛网过滤,于 800 rpm 下离心 5 min,用 PBS 清洗,重复 3 次。将分离的髓核细胞中加入 10 mL 含双抗和 10% FBS 的 DMEM/F-12 细胞培养基,并放入 5% CO₂、

37℃ 培养箱进行培养,每隔 3 天换液。

1.4 细胞转染

将细胞接种于 6 孔板,待长至 70%-80% 时进行转染。取 7.5 μL Lipofectamin® 3000,并用 125 μL Opti-MEM 培养基稀释。取 2.5 μg shRNA,并用 125 μL Opti-MEM 培养基稀释,然后加入 P3000™ 试剂,充分混匀。将稀释后 shRNA 混合液按 1:1 体积加入已稀释的 Lipofectamin® 3000 混合液中。放置于室温下孵育 5 min。将 shRNA-脂质体混合物加入到 6 孔板中。将细胞放置于 37℃ 培养箱孵育 2d。

1.5 IL-1β 诱导髓核细胞退变

将细胞接种于 6 孔板,待长至 70%-80% 时,含有 20 ng/mL 的 IL-1β 的 DMEM-F12 培养基中培养 24h,收集用于进行后续试验。根据不同处理因素分成 3 组进行实验,其中对照组为未转染未经 IL-1β 诱导的原代髓核细胞,此为未退变髓核细胞;IL-1β 组为,未转染髓核细胞并经 20 ng/mL IL-1β 诱导,此为退变髓核细胞;IL-1β+shRNA 组为转染髓核细胞并经 IL-1β 诱导,此为敲除 Linc01776 并经 IL-1β 诱导的髓核细胞。

1.6 RT-PCR 实验

通过 TRIzol 法提取 RNA 并测定其浓度,将通过逆转录获得 DNA 模板并进行 PCR 扩增反应。扩增基因包括 Linc01776、Aggrecan、MMP3、MMP13 以及 GAPDH。反应体系为 20 μL (DNA 模板 2 μL、PCR Forward Primer 0.8 μL、PCR Reverse Primer 0.8 μL、ROX Reference Dye II 0.4 μL、TB Green Premix Ex Taq II 10 μL、灭菌水 6 μL),然后 μ 后),依次 95℃ 预变性 30 s、95℃ 变性 5 s、60℃ 退火 30 s,共 40 个循环周期。;每个循环周期结束后进行荧光检测,采用 ABI StepOne 软件进行数据收集,对对照组与 IVDD 组 Linc01776 表达水平进行相对定量计算,对对照组、IL-1β 组、IL-1β+shRNA 组 Aggrecan、MMP3、MMP13 表达水平进行相对定量计算。

1.7 WB 实验

待 6 孔板中细胞铺满至 80% 以上,使用胰酶对细胞进行消化并收集。加入 200 μL RIPA 裂解液获得细胞蛋白标本,并于高温进行变性。用 SDS-PAGE 凝胶试剂盒配制凝胶,并依次进行上样,恒压 80V 电泳 120 min,恒流 300 mA 转膜 100 min,快速封闭液室温封闭 15 min,一抗 4℃ 摇床过夜孵育。次日 TBST 洗膜 3 次,二抗(1:2000)室温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后 ECL 显影,使用 Image J 软件进行灰度分析。

1.8 生物信息学分析

通过 UCSC 数据库 (<http://genome.ucsc.edu/>) 预测 Linc01776 序列,通过 AnnoLnc 数据库 (<http://annolnc.cbi.pku.edu.cn/>) 预测 Linc01776 靶基因,将预测靶基因通过 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行信号通路分析,并筛选靶基因与信号通路。通过 miRcode 数据库 (<http://www.mircode.org/>) 预测筛选出的靶基因 AKT1 的上游 miRNA 并通过 DIANA TOOLS 数据库 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>) 预测 Linc01776 下游 miRNA。将筛选出的 miRNA 取交集,筛选出 miRNA 为 miR-196b-5p。根据 LncRNA 吸附 miRNA 调控 mRNA 的 ceRNA 机制,构建 ceRNA 调控通路,并通过 DIANA TOOLS 数据库分析 Linc01776 与 miRNA 与 mRNA 的互补序列。

1.9 统计学分析

使用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检测,以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 linc01776 在退变髓核细胞中的差异性表达

通过 RT-PCR 检测发现,在对照组与退变组中 Linc01776 存在差异性表达,结果见图 1。在退变组中 Linc01776 表达量 (4.71 ± 0.71) 较对照组中 Linc01776 表达量 (1.04 ± 0.03) 明显升高,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果证明,Linc01776 在退变髓核细胞中表达增加,提示其在椎间盘退变过程中发挥一定的生物学功能并通过敲除 Linc01776 进一步验证。

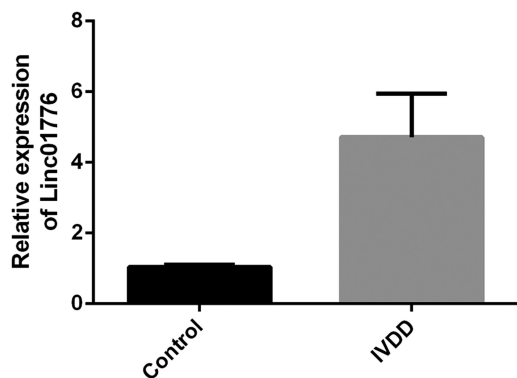


图 1 linc01776 在退变椎间盘中的差异表达

Fig.1 The different expression of linc01776 in IVDD

2.2 qRT-PCR 检测 AggreCAN、MMP3 与 MMP13 的表达

采用 qRT-PCR 分别检测 linc01776 敲除后髓核细胞 AggreCAN、MMP3 与 MMP13 的表达,结果见图 2。

IL-1 β 组中 AggreCAN 表达量在 IL-1 β 组为 (0.28 ± 0.07) 较对照组 (1.02 ± 0.01) 降低,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),证明 IL-1 β 抑制髓核细胞中 AggreCAN 的表达。在 IL-1 β +shRNA 组为 (1.32 ± 0.11) 较 IL-1 β 组升高,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),证明敲除 linc01776 则可以抑制 IL-1 β 所诱导的 AggreCAN 表达减少,进而抑制髓核细胞退变。

IL-1 β 组中 MMP3 表达量在 IL-1 β 组为 (2.13 ± 0.10) 较对照组 (1.01 ± 0.07) 升高,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),证

明 IL-1 β 促进髓核细胞中 MMP3 的表达。在 IL-1 β +shRNA 组为 (1.44 ± 0.15) 较 IL-1 β 组降低,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),证明敲除 linc01776 则可以抑制 IL-1 β 所诱导的 MMP3 表达增加,进而抑制髓核细胞退变。

IL-1 β 组中 MMP13 表达量在 IL-1 β 组为 (1.67 ± 0.04) 较对照组 (1.01 ± 0.04) 升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),证明 IL-1 β 促进髓核细胞中 MMP13 的表达。在 IL-1 β +shRNA 组为 (1.27 ± 0.03) 较 IL-1 β 组降低,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),证明而敲除 linc01776 则可以抑制 IL-1 β 所诱导的 MMP13 表达增加,进而抑制髓核细胞退变。

根据以上结果可以得出,敲除 Linc01776 后 AggreCAN 表达增加,MMP3、MMP13 表达减少,说明 Linc01776 通过抑制 AggreCAN 表达,促进 MMP3、MMP13 表达进而在椎间盘退变中发挥生物学功能。

2.3 Western Blot 检测 AggreCAN、MMP3 与 MMP13 的表达

采用 Western Blot 分别检测 linc01776 敲除后髓核细胞 AggreCAN、MMP3 与 MMP13 的表达,结果见图 3。IL-1 β 组相比对照组,AggreCAN 表达减少,MMP3、MMP13 表达增加,证明 IL-1 β 促进髓核细胞外基质分解,促进 IVDD 的发生发展。IL-1 β +shRNA 组相比 IL-1 β 组,AggreCAN 表达增加,MMP3、MMP13 表达减少,证明敲除 Linc01776 可以抑制 IL-1 β 所诱导的 AggreCAN 分解,抑制 IL-1 β 所诱导的 MMP3、MMP13 表达,进而缓解 IVDD。

2.4 linc01776 下游靶基因信号通路富集分析

通过 AnnoLnc 数据库 (<http://annolnc.cbi.pku.edu.cn/index.jsp>) 预测 Linc01776 靶基因,共预测 11807 个靶基因。通过 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 进行 KEGG 通路富集,结果见图 4。发现 p53 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、TNF 信号通路等与 IVDD 有明显相关性。其中,靶基因 AKT1 为 PI3K-AKT 信号通路的调控基因,且有研究表明 AKT1 与 IVDD 有相关性,故选择 AKT1 为靶基因,并进行下一步预测^[12]。

2.5 预测 miRNA 与互补序列

通过 miRTarBase 数据库 (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) 预测 AKT1 的 miRNA,结果见表 1。通过 miRcode 数据库 (<http://www.mircode.org>) 预测 Linc01776 的 miRNA 结果见表 2。将两者取交集,筛选出目标 miRNA 为 miR-196b-5p。为进一步验证预测的可靠性,通过 DIANA TOOLS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>) 数据库,分析 Linc01776 与 miR-196b-5p、

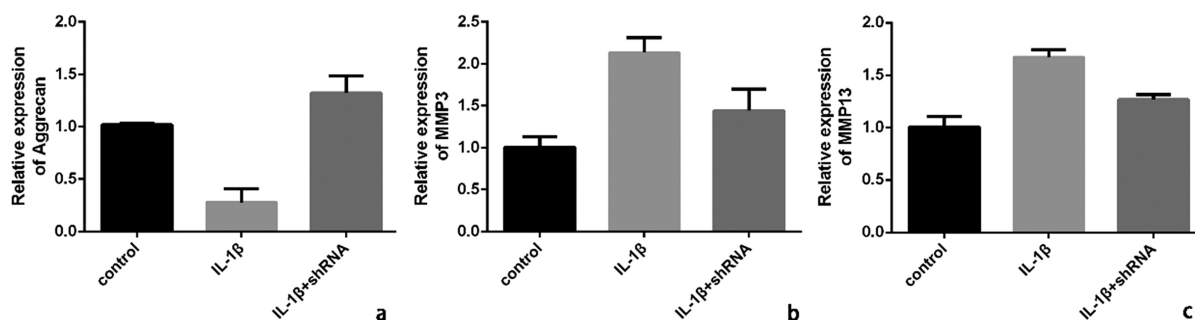


图 2 qRT-PCR 检测敲除 linc01776 后 AggreCAN、MMP3、MMP13 的表达(a: AggreCAN 表达;b: MMP3 表达;c: MMP13 表达)

Fig.2 Expression of AggreCAN、MMP3、MMP13 after knocking out linc01776 in qRT-PCR

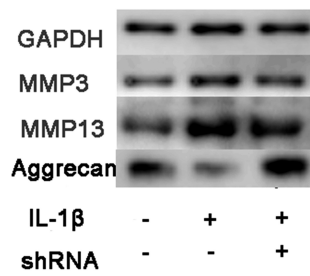


图3 WB 检测敲除 linc01776 后 AggreCAN、MMP3、MMP13 的表达

Fig.3 Expression of AggreCAN, MMP3, MMP13 after knocking out linc01776 in WB

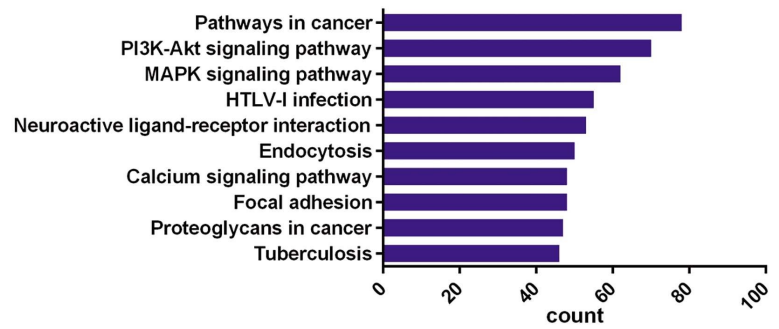


图4 linc01776 靶基因 KEGG 通路富集分析

Fig.4 The KEGG analysis of the target genes

miR-196b-5p 与 AKT1 的互补序列,结果见图 5。

2.6 构建 ceRNA 机制调控信号轴

通过 DIANA TOOLS(<http://diana.imis.athena-innovation.gr>) 数据库分析 linc01776 与 miR-196b-5p 间、miR-196b-5p 与 AKT1 间存在互补序列,为构建 linc01776 的 ceRNA 通路提供了信息学的基础,同时其说明它们相互之间有结合的可能性。

故根据 ceRNA 机制,linc01776 可通过海绵吸附作用,吸附 miR-196b-5p 调控 AKT1 表达在 IVDD 发挥作用,故预测并构建 linc01776/miR-196b-5p/AKT1 的 ceRNA 机制调控信号轴,结果见图 6。此通路为下一步的研究提供了方向,当然,其也需要通过敲除 linc01776 与 miR-196b-5p 检测下游基因,进一步去验证。

表 1 AKT1 预测 miRNA

Table 1 Predicted miRNA of AKT1

miRNA	Target
has-miR-196b-5p	AKT1
has-miR-34a-5p	AKT1
has-miR-206	AKT1
has-miR-409-3p	AKT1
has-miR-340-5p	AKT1

表 2 linc01776 预测 miRNA

Table 2 Predicted miRNA of linc01776

miRNA	LincRNA
has-miR-194Linc	01776
has-miR-196b-5p	Linc01776
has-miR-19ab	Linc01776
has-miR-205	Linc01776
has-miR-216b-5p	Linc01776

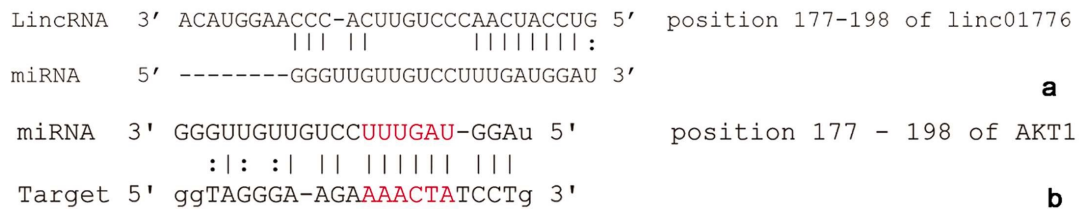


图 5 互补序列(a:linc01776 与 miR-196b-5p 互补序列;b:miR-196b-5p 与 AKT1 互补序列)

Fig.5 Complementary sequences (a: complementary sequences of linc01776 and miR-196b-5p; b: complementary sequences of linc01776)

3 讨论

IVDD 发病机制复杂多样,对其机制的深入研究是当今脊柱外科的迫切要求,对 IVDD 预防与治疗提供重要的依据。本研究从长链非编码 RNA 领域展开实验,发现 linc01776 参与调控细胞外基质降解,促进椎间盘退变。并通过生物信息学,预测 linc01776 通过 ceRNA 机制调控 miR-196b-5p 与 AKT1 参与 IVDD 发生与发展,并构建 linc01776/miR-196b-5p/AKT1 的 ceRNA 调控信号轴。

研究表明,lncRNA 在 IVDD 的发病过程中发挥重要作用。Wang K 发现,长链非编码 RNA linc-ADAMTS5 通过 RREB1 相互作用,抑制 ADAMTS5 表达进而减缓椎间盘退变^[13]。Xi Y 研究发现,长链非编码 RNA HCG18 通过海绵吸附作用吸附

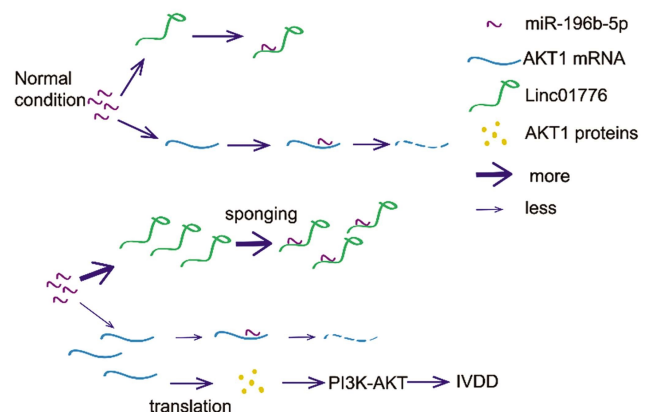


图 6 linc01776/miR-196b-5p/AKT1 的 ceRNA 机制调控信号轴示意图

Fig.6 Diagram of ceRNA regulation mechanism of linc01776/miR-196b-5p/AKT1 signal axis

miR-146a-5p,促进 TRAF6 表达进一步促进椎间盘退变。本研究发现,在 IVDD 中 linc01776 存在差异性表达,说明其参与 IVDD 的发生发展。

细胞外基质降解是椎间盘退变的机制之一。其中,蛋白聚糖(Aggrecan)是由一个核心蛋白与一条或多条糖胺聚糖共价组成成的糖蛋白,主要由结缔组织特化细胞或纤维细胞和软骨细胞产生^[14]。Aggrecan 是细胞外基质的重要组成部分,具有保水性,维持细胞外基质完整性的生物学作用^[15]。Zhang B 研究发现,在 miR-3150a-3p 诱导下 Aggrecan 的低表达促进 IVDD 的发展。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类含有 Zn^{2+} 的内切酶,对细胞外基质降解作用广泛,对细胞外基质的结构重塑于沉积有重要影响^[16]。当细胞微环境发生改变,比如炎症因子刺激、氧化应激、高糖刺激等,MMPs 表达升高,细胞外基质降解^[17,18]。其中,MMP3、MMP13 两者均以 collagen II、Aggrecan 为底物进行分解。在 IVDD 发生发展时,MMP3、MMP13 表达增高,髓核细胞的细胞外基质分解增加,髓核细胞形态与功能改变,发生退变^[19]。Jing W 研究发现,MMP3 在 miR-93 作用下低表达,可减少二型胶原酶降解,减缓 IVDD 的发展^[20]。HuaWB 研究发现,MMP13 在 miR-127-5p 作用下高表达,可促进二型胶原分解进而导致 IVDD 的发病^[21]。本实验研究发现,在敲除 linc01776 后,MMP3、MMP13 表达降低,Aggrecan 表达增加,髓核细胞外基质降解,linc01776 通过调节细胞外基质参与 IVDD 的发生与发展。

通过生物信息学,我们预测出调控 IVDD 的 linc01776/miR-196b-5p/AKT1 信号轴。Zhu X 研究发现,miR-196b-5p 以 COL1A1 为靶点调控细胞增殖,而细胞增殖减少又是 IVDD 的病因之一,所以 miR-196b-5p 有可能参与 IVDD 发病机制调控^[22,23]。Qian D 研究发现,AKT1 在 miR-374b 调控下表达降低,可以促进细胞凋亡,同时细胞凋亡又可以促进 IVDD 的发病^[24,25]。因此,预测所得 linc01776/miR-196b-5p/AKT1 信号轴可能参与 IVDD 发病的生理病理机制。但是,生信分析只是为我们提供了新的研究方向,其仍需要通过实验进一步验证。本课题计划在敲除 linc01776 后,再次进行高通量测序进而研究其下游基因的具体表达情况,并和本预测结果相比较。同时,也通过进一步的 RT-PCR 验证结果。

综上所述,linc01776 在 IVDD 的发生与发展中发挥了重要作用,为 IVDD 的预防与治疗提供一个新的靶点。通过生物信息学预测的 linc01776/miR-196b-5p/AKT1 信号轴提供了新的研究方向,此通路可行性与确切机制仍有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Silva-Correia J, Correia S I, Oliveira J M, et al. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk [J]. Biotechnology advances, 2013, 31(8): 1514-1531
- [2] Risbud M V, Shapiro I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. Nature reviews Rheumatology, 2014, 10(1): 44-56
- [3] 梁鹤,董双海,夏天,等.氧化应激介导的 NF- κ B 信号转导通路在椎间盘退变中的作用 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(14): 2777-2779
- [4] Lyu F J, Cheung K M, Zheng Z, et al. IVD progenitor cells: a new horizon for understanding disc homeostasis and repair [J]. Nature reviews Rheumatology, 2019, 15(2): 102-112
- [5] Reddy M A, Chen Z, Park J T, et al. Regulation of inflammatory phenotype in macrophages by a diabetes-induced long noncoding RNA [J]. Diabetes, 2014, 63(12): 4249-4261
- [6] Kraus T F J, Haider M, Spanner J, et al. Altered Long Noncoding RNA Expression Precedes the Course of Parkinson's Disease-a Preliminary Report[J].Molecular neurobiology, 2017, 54(4): 2869-2877
- [7] 杨峰,易凡,曹慧青,等.长链非编码 RNA 研究进展[J].遗传, 2014, 5: 456-468
- [8] Batista P J, Chang H Y. Long noncoding RNAs: Cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1298-1307
- [9] Geisler S, Collier J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2013, 14(11): 699-712
- [10] Karreth F A, Pandolfi P P. ceRNA cross-talk in cancer: when ce-bling rivalries go awry[J]. Cancer discovery, 2013, 3(10): 1113-1121
- [11] 孙中仪,晏鹏,王圣杰,等.长链非编码 RNA 在人退变椎间盘组织中的基因表达谱[J].中华医学杂志, 2017, 97(33): 2582-2586
- [12] Pasku D, Soufla G, Katonis P, et al. Akt/PKB isoforms expression in the human lumbar herniated disc: correlation with clinical and MRI findings [J]. European spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2011, 20(10): 1676-1683
- [13] Wang K, Song Y, Liu W, et al. The noncoding RNA linc-ADAMTS5 cooperates with RREB1 to protect from intervertebral disc degeneration through inhibiting ADAMTS5 expression [J]. Clinical science (London, England: 1979), 2017, 131(10): 965-979
- [14] Kiani C, Chen L, Wu Y J, et al. Structure and function of aggrecan [J]. Cell research, 2002, 12(1): 19-32
- [15] Ismail H M, Miotla-Zarebska J, Troeberg L, et al. Brief Report: JNK-2 Controls AggreCan Degradation in Murine Articular Cartilage and the Development of Experimental Osteoarthritis [J]. Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ), 2016, 68(5): 1165-1171
- [16] Zhang B, Guo W, Sun C, et al. Dysregulated MiR-3150a-3p Promotes Lumbar Intervertebral Disc Degeneration by Targeting AggreCan [J]. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2018, 45(6): 2506-2515
- [17] Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations [J]. Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology, 2015, 44-46: 207-223
- [18] Fields G B. New strategies for targeting matrix metalloproteinases [J]. Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology, 2015, 44-46: 239-246
- [19] Feng G, Zha Z, Huang Y, et al. Sustained and Bioresponsive Two-Stage Delivery of Therapeutic miRNA via Polyplex Micelle-Loaded Injectable Hydrogels for Inhibition of Intervertebral Disc Fibrosis [J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7(21): e1800623
- [20] Jing W, Jiang W. MicroRNA-93 regulates collagen loss by targeting MMP3 in human nucleus pulposus cells [J]. Cell proliferation, 2015, 48(3): 284-292

- 疗效[J].骨科临床与研究杂志, 2019, 4(2): 84-87
- [7] 杨昀, 王尧, 诸寅, 等. 肌电图检查在腕管综合征与神经根型颈椎病诊断中的应用[J]. 中国医刊, 2012, 47(10): 77-78
- [8] 古暘, 何芳, 张科勋, 等. 高频超声与神经肌电图对于腕管综合征诊断价值的对比分析[J]. 重庆医学, 2018, 47(2): 239-241
- [9] Samarakoon LB, Guruge MH, Jayasekara M, et al. Anatomical landmarks for safer carpal tunnel decompression: an experimental cadaveric study[J]. Patient Safety in Surgery, 2014, 8(1): 8
- [10] Kanatani T, Nagura I, Kurosaka M, et al. Electrophysiological assessment of carpal tunnel syndrome in elderly patients: one-year follow-up study[J]. J Hand Surg Am, 2014, 39(11): 2188-2191
- [11] 杨伟烙. 神经肌电图检查在腕管综合征的应用与临床分析[J]. 中国医学工程, 2016, 24(10): 90-91
- [12] Kozak A, Schedlbauer G, Wirth T, et al. Association between work-related biomechanical risk factors and the occurrence of carpal tunnel syndrome: an overview of systematic reviews and a meta-analysis of current research[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2015, 16: 231
- [13] Harris-Adamson C, Eisen EA, Kapellusch J, et al. Biomechanical risk factors for carpal tunnel syndrome: a pooled study of 2474 workers [J]. Occup Environ Med, 2015, 72(1): 33-41
- [14] 李秋霞. 肌电图检查在腕管综合征与神经根型颈椎病诊断中的应用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(22): 175
- [15] 杨丽. 肌电图检查在腕管综合征与神经根型颈椎病诊断中的价值[J]. 临床研究, 2018, 26(3): 11-12
- [16] 马彦, 段玉琼, 樊继军. 神经根型颈椎病合并腕管综合征 98 例肌电图分析[J]. 宁夏医学杂志, 2018, 40(5): 449-450
- [17] 余征. 神经肌电图检查在神经根型颈椎病和腕管综合征中诊断及鉴别诊断的价值[J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(1): 124-125
- [18] 李美君, 施广懿, 徐龙生. 理发师人群与腕管综合征的关系[J]. 浙江医学, 2017, 39(23): 2160-2161
- [19] 张玲, 李应宏. 神经肌电图在腕管综合征中的诊断价值[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2016, 33(4): 379-381
- [20] 刘志文, 李国强, 朱丽吟, 等. 脉管平滑肌细胞刺激技术治疗轻中度腕管综合征的疗效观察 [J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(9): 53-54
- [21] 杨颖颖. 肌电图在前臂正中神经卡压的诊断和鉴别诊断中的应用价值[J]. 临床医药文献杂志, 2016, 3(38): 7636-7637
- [22] 鲁亚蕊, 毕宠刚, 张晓楠, 等. 神经-肌电图电生理检查应用于腕管综合征的诊断价值探讨[J]. 基层医学论坛, 2017, 21(10): 1256-1257
- [23] 童蓉. 肌电图诊断西宁地区妊娠期腕管综合征 16 例分析[J]. 青海医药杂志, 2015, 45(5): 59-60
- [24] 曹龙, 沈为林. 腕管综合征患者肌电图检查结果分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(11): 1191-1192
- [25] Wiperman J, Goerl K. Carpal tunnel syndrome: diagnosis and management[J]. American Family Physician, 2016, 94(12): 993-999
- [26] 张园. 神经肌电图检测在腕管综合征临床诊断中的应用[J]. 中国医药指南, 2016, 14(20): 97-98
- [27] 何翼. 肌电图检测在腕管综合征诊断中的应用[J]. 健康之路, 2018, 17(4): 255
- [28] 刘勇, 郭含军, 李浩, 等. 小切口正中神经松解术治疗腕管综合征 25 例[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2017, 14(6): 38-40
- [29] Tang CQY, Lai SWH, Tay SC. Long-term outcome of carpal tunnel release surgery in patients with severe carpal tunnel syndrome [J]. THE BONE & JOINT JOURNAL, 2017, 99-B(10): 1348-1353
- [30] Sayegh ET, Strauch RJ. Open versus endoscopic carpal tunnel release: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(3): 1120-1132
- [31] Zhang D, Blazar P, Earp BE. Rates of complications and secondary surgeries of mini-open carpal tunnel release [J]. Hand (NY), 2018: 1558944718765226
- [32] Karl JW, Gancarczyk SM, Strauch RJ. Complications of carpal tunnel release[J]. Orthop Clin N Am, 2016, 47(2): 425-433
- [33] Calotta NA, Lopez J, Deune EG. Improved surgical outcomes with endoscopic carpal tunnel release in patients with severe median neuropathy[J]. Hand (NY), 2017, 12(3): 252-257
- [34] Riegler G, Pivec C, Platzgummer H, et al. High-resolution ultrasound visualization of the recurrent motor branch of the median nerve: normal and first pathological findings [J]. European Radiology, 2017, 27: 2941-2949
- [35] Guo D, Tang Y, Ji Y, et al. A non-scalpel technique for minimally invasive surgery: percutaneously looped thread transection of the transverse carpal ligament[J]. Hand (NY), 2015, 10(1): 40-48
- [36] 诸寅, 刘波, 田光磊. 掌近侧小切口切开松解减压术治疗腕管综合征[J]. 中国医刊, 2010, 45(6): 23-24

(上接第 3409 页)

- [21] Hua W B, Wu X H, Zhang Y K, et al. Dysregulated miR-127-5p contributes to type II collagen degradation by targeting matrix metalloproteinase-13 in human intervertebral disc degeneration [J]. Biochimie, 2017, 139: 74-80
- [22] Cai P, Yang T, Jiang X, et al. Role of miR-15a in intervertebral disc degeneration through targeting MAP3K9 [J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2017, 87: 568-574
- [23] Zhu X, Rao X, Yao W, et al. Downregulation of MiR-196b-5p impedes cell proliferation and metastasis in breast cancer through regulating COL1A1 [J]. American journal of translational research, 2018, 10(10): 3122-3132
- [24] Qian D, Chen K, Deng H, et al. MicroRNA-374b Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis in T-cell Lymphoblastic Lymphoma by Repressing AKT1 and Wnt-16 [J]. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2015, 21(21): 4881-4891
- [25] Lin Y, Jiao Y, Yuan Y, et al. Propionibacterium acnes induces intervertebral disc degeneration by promoting nucleus pulposus cell apoptosis via the TLR2/JNK/mitochondrial-mediated pathway [J]. 2018, 7(1): 1