

# miR-206 对腰椎间盘突出症大鼠髓核炎症、镇痛及自噬相关蛋白的作用机制

王美, 索娜, 于欢, 杨建博

<https://doi.org/10.12307/2023.956>

投稿日期: 2022-10-17

采用日期: 2022-12-28

修回日期: 2023-04-07

在线日期: 2023-04-20

中图分类号:

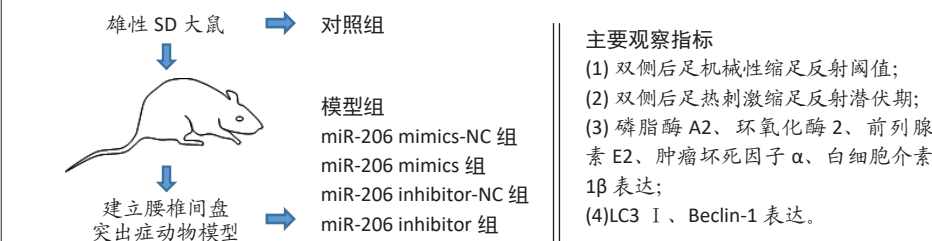
R459.9; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)11-01712-07

文献标识码: A

文章快速阅读: miR-206 对腰椎间盘突出大鼠髓核炎症、镇痛及自噬相关蛋白的作用



## 文题释义:

自噬: 是由 Ashford 和 Porter 在 1962 年发现细胞内有“自己吃自己”的现象后提出的, 是指从粗面内质网的无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等成分形成自噬体 (autophagosome), 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物, 以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。

miRNA: 是一类内生的、长度为 20–24 个核苷酸的小 RNA, 其在细胞内具有多种重要的调节作用。miRNA 不仅在基因位置上保守, 序列上也呈现出高度的同源性。miRNA 高度的保守性与其功能的重要性有密切的关系, 与其靶基因的进化有密切的联系, 研究其进化历史有助于进一步了解其作用机制和功能。

## 摘要

背景: 研究发现, 腰椎间盘突出症患者的疼痛机制与炎症相关, 自噬与椎间盘疾病及炎症反应密切相关, miR-206 表达异常可促进骨龄疾病的发生。

目的: 探讨 miR-206 对腰椎间盘突出大鼠髓核炎症、镇痛及自噬相关蛋白的作用机制。

方法: SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只按照随机数字方法分为对照组、模型组、miR-206 mimics-NC 组、miR-206 mimics 组、miR-206 inhibitor-NC 组及 miR-206 inhibitor 组。除对照组外均建立腰椎间盘突出症大鼠模型, 建模后第 10 天 miR-206 mimics-NC 组、miR-206 mimics 组、miR-206 inhibitor-NC 组及 miR-206 inhibitor 组分别在损伤处注射 miR-206 mimics-NC、miR-206 mimics (miR-206 模拟物)、miR-206 inhibitor-NC 及 miR-206 inhibitor (miR-206 抑制物), 均 20  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 1 次/d, 连续注射 4 d; 对照组及模型组均注射等剂量生理盐水。Von Frey 纤维丝测定大鼠双侧后足机械性缩足反射阈值, 热痛测试仪检测大鼠双侧后足热刺激缩足反射潜伏期; 苏木精-伊红染色观察背根神经节组织形态; qPCR 检测各组大鼠髓核组织炎症因子磷脂酶 A2、环氧化酶 2、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  表达; 免疫印迹检测自噬相关蛋白 LC3 I、Beclin-1 表达。

结果与结论: ① 造模后 3, 7 及 14 d 时, 与对照组相比, 模型组大鼠机械性缩足反射阈值、热刺激缩足反射潜伏期降低, 磷脂酶 A2、环氧化酶 2、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、LC3 I、Beclin-1 表达升高 ( $P < 0.05$ ); miR-206 inhibitor-NC 组、miR-206 mimics-NC 组上述指标与模型组相比差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); ② 与 miR-206 mimics-NC 组相比, miR-206 mimics 组大鼠机械性缩足反射阈值、热刺激缩足反射潜伏期降低, 磷脂酶 A2、环氧化酶 2、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、LC3 I、Beclin-1 水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 miR-206 inhibitor-NC 组相比, miR-206 inhibitor 组大鼠上述指标呈相反变化, 差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); ③ 结果说明, 抑制 miR-206 可以显著改善腰椎间盘突出症大鼠髓核炎症因子水平, 提高疼痛阈值, 降低细胞自噬, 其作用机制与抑制 LC3 I、Beclin-1 表达相关。

关键词: 腰椎间盘突出症; miR-206; 炎症; 镇痛; 自噬

## Mechanism of miR-206 on inflammation, analgesia and autophagy related proteins in nucleus pulposus of rats with lumbar disc herniation

Wang Mei, Suo Na, Yu Huan, Yang Jianbo

Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000, Hebei Province, China

Wang Mei, Master, Attending physician, Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000, Hebei Province, China

Corresponding author: Wang Mei, Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000, Hebei Province, China

哈励逊国际和平医院, 河北省衡水市 053000

第一作者: 王美, 女, 1990 年生, 河北省衡水市人, 汉族, 2019 年济宁医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨科研究。

通讯作者: 王美, 硕士, 哈励逊国际和平医院, 河北省衡水市 053000

<https://orcid.org/0000-0002-4759-6150> (王美)

基金项目: 河北省卫生健康委员会医学科学研究项目 (20211299)

引用本文: 王美, 索娜, 于欢, 杨建博. miR-206 对腰椎间盘突出症大鼠髓核炎症、镇痛及自噬相关蛋白的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(11):1712-1718.



## Abstract

**BACKGROUND:** Pain mechanisms in patients with lumbar disc herniation are associated with inflammation, autophagy is closely related to intervertebral disc diseases and inflammatory response, and aberrant miR-206 expression can trigger skeletal diseases.

**OBJECTIVE:** To investigate the mechanism of miR-206 on inflammation, analgesia and autophagy related proteins in nucleus pulposus in rats with lumbar disc herniation.

**METHODS:** Sixty SPF male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, miR-206 mimics-NC group, miR-206 mimics group, miR-206 inhibitor-NC group and miR-206 inhibitor group. Animal models of lumbar disc herniation were established except for the control group. Ten days after modeling, miR-206 mimics-NC group, miR-206 mimics group, miR-206 inhibitor-NC group and miR-206 inhibitor group were injected with miR-206 mimics-NC (20 μmol/L, 10 μL), miR-206 mimics (20 μmol/L, 10 μL), miR-206 inhibitor-NC (20 μmol/L, 10 μL) and miR-206 inhibitor (20 μmol/L, 10 μL), respectively. Administration was given once a day for 4 continuous days. The control group and model group were injected with the same dose of normal saline. The paw withdrawal mechanical threshold of bilateral hind feet was measured by Von Frey filaments, and the paw withdrawal thermal latency of bilateral hind feet was measured by heat pain tester. The morphology of dorsal root ganglia was observed by hematoxylin-eosin staining. The expressions of inflammatory factors phospholipase A2, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2, tumor necrosis factor α, and interleukin 1β in nucleus pulposus were detected by qPCR. The expressions of autophagy-related proteins LC3I and Beclin-1 were detected by western blot assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 3, 7, and 14 days after modeling, the paw withdrawal mechanical threshold and paw withdrawal thermal latency were both decreased in the model group compared with the control group, while the levels of phospholipase A2, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2, tumor necrosis factor α, interleukin 1β, LC3I and Beclin-1 increased ( $P < 0.05$ ). The above indexes showed no significant changes in the miR-206 inhibitor-NC group and miR-206 mimics-NC group compared with the model group ( $P > 0.05$ ). Compared with the miR-206 mimics-NC group, the miR-206 mimics group had lower paw withdrawal mechanical threshold and paw withdrawal thermal latency and higher levels of phospholipase A2, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2, tumor necrosis factor α, interleukin 1β, LC3I, and Beclin-1 levels ( $P < 0.05$ ). Compared with the miR-206 inhibitor-NC group, the rats in the miR-206 inhibitor group showed opposite changes in the above indicators, and there were significant differences between the two groups ( $P < 0.05$ ). To conclude, inhibition of miR-206 can significantly improve the level of inflammatory factors in nucleus pulposus of rats with lumbar disc herniation, increase pain threshold, and reduce autophagy. The mechanism is related to the inhibition of LC3I and Beclin-1 expression.

**Key words:** lumbar disc herniation; miR-206; inflammation; analgesia; autophagy

**Funding:** Medical Science Research Project of Hebei Provincial Health and Health Commission, No. 20211299

**How to cite this article:** WANG M, SUO N, YU H, YANG JB. Mechanism of miR-206 on inflammation, analgesia and autophagy related proteins in nucleus pulposus of rats with lumbar disc herniation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(11):1712-1718.

## 0 引言 Introduction

腰椎间盘突出症主要发生在 20–50 岁人群中，是临床上常见的骨科疾病，病因是腰椎神经根受压迫或脊髓核炎症反应导致细胞因子传入纤维及脊髓神经元，活化胶质细胞加剧炎症反应，释放大量疼痛因子而产生的病理性疼痛，严重者甚至出现丧失劳动力及残疾<sup>[1]</sup>。据调查，腰背痛患者患有腰椎间盘突出症的概率为 15%–45%，全球腰椎间盘突出症支付的医疗费用高达 2 630 万美元，给社会经济造成巨大负担<sup>[2]</sup>。腰椎间盘突出症患者疼痛机制的研究中已经发现与炎症相关。相关学者发现在腰椎间盘突出症突出的组织中存在较多的磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2) 类酶类物质，可以通过启动花生四烯酸代谢而发挥较强的致炎致痛作用<sup>[3]</sup>。在髓核组织可发现多种相关炎症因子表达，例如白细胞介素 1β、白细胞介素 6 及肿瘤坏死因子等，其生物学作用广泛，可通过促进炎症发生发展，并通过抑制其表达而发挥镇痛作用<sup>[4]</sup>。自噬作为一种早期自我适应性机制，可通过清除受损的细胞器为组织的稳态恢复提供营养物质<sup>[5]</sup>。近期的研究表明，自噬与椎间盘疾病密切相关，例如在退变型大鼠椎间盘组织中发现自噬相关蛋白表达升高，认为其可以通过提高机体氧化应激而加快细胞凋亡及自噬<sup>[6]</sup>。细胞自噬与炎症反应密切相关，炎症相关信号通路 Toll 受体促进细胞自噬的发生，同时其又可参与炎症性疾病的发生，通过了解细胞自噬与炎症反应对于控制腰椎间盘突出症疾病进展具有重要意义。

近些年随着生物分子靶向技术的发展，已经了解微小 RNA(microRNAs, miRNAs) 与众多疾病发生发展存在关联。miR-206 是 miRNAs 成员之一，其表达异常可促进骨骼疾病发生。研究发现，在胫骨损伤中发现在损伤第 5 天时 miR-206 表达是损伤前的 10 倍<sup>[7]</sup>。但是关于 miR-206 在腰椎间盘突出症中发挥何种作用还不得而知，文章通过建立腰椎间盘突出

出症大鼠模型观察 miR-206 对炎症、镇痛及自噬蛋白的影响，希望为相关研究提供理论支持。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 随机对照动物实验。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。

**1.2 时间及地点** 实验于 2021 年 9 月至 2022 年 9 月在河北医科大学动物实验中心完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 实验动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，五六周龄，体质量 (200±30) g，由北京大学医学部实验动物科学部提供，动物合格证号：CXK(京)2020-0010。饲养于哈励逊国际和平医院实验动物中心，保持环境清洁通风，温度 18–22 °C，湿度 50%–60%，明暗周期 12 h/12 h 循环，适应性饲养 1 周后进行实验。实验方案经河北医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**1.3.2 试剂与仪器** miR-206 inhibitor(miR-206 抑制物)、miR-206 inhibitor-NC、miR-206 mimics(miR-206 模拟物)及 miR-206 mimics-NC(上海吉玛生物合成); TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(中国上海索尔生物科技有限公司); 山羊抗小鼠 IgG(中国武汉纯度生物科技有限公司); Beclin 1 兔多克隆抗体(ABCam 中国, 货号: ab264299); 兔抗人 LC3 I (艾美捷科技有限公司, 货号: ADI-APR-100-0200)。29G 注射针(B-D 公司); 切片刀(美国 Kent Scientific Corporation); 高速低温离心机(美国 Backman Coulter); 显微镜(日本 Olympus); 超低温冰箱(美国

ThermoFisher); 实时荧光定量 PCR 仪 (中国中山大学达安基因股份有限公司); 凝胶成像系统及 Western blot 电泳系统 (中国北京赛百奥科技有限公司)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 腰椎间盘突出症动物模型建立** 60 只 SD 大鼠采用随机数字表方法抽取 10 只作为对照组, 给予普通饲料喂养, 其余建立腰椎间盘突出症大鼠模型<sup>[8]</sup>。建模方法: 大鼠腹腔注射 4 mL/kg 的浓度为 1% 的戊巴比妥钠麻醉, 四肢固定, 背部脱毛, 用体积分数 75% 乙醇消毒, 铺无菌单, 采用橡皮筋扎紧大鼠尾部, 逐层分离皮肤, 暴露椎间盘, 无菌环境下取出第 3, 4 尾椎间盘的髓核, 导致尾椎间盘破裂, 将一根 L 形的不锈钢柱插入椎间孔, 对背部神经节稳定性造成影响, 将髓核放到生理盐水中备用。消毒背部, 于背部正中间 L<sub>5</sub> 棘突为中心, 做 2 cm 切口, 将髓核植入 L<sub>5</sub> 和 L<sub>6</sub> 间的神经根, 逐层缝合皮肤。术后给予大鼠肌肉注射青霉素钠 80 万 U, 切口处涂红霉素软膏。剔除 4 只因感染当时死亡的大鼠, 共 46 只大鼠建模成功。

#### 组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探讨 miR-206 对腰椎间盘突出大鼠髓核炎症、镇痛及自噬相关蛋白的作用机制
选择动物的条件	SPF 级雄性 SD 大鼠, 五六周龄, 体质量 (200±30) g
模型与所研究疾病的关系	腰椎间盘突出症手术建模方法是研究大鼠腰椎间盘突出症的经典模型
造模技术描述	无菌环境下取出大鼠第 3, 4 尾椎间盘的髓核, 导致尾椎间盘破裂, 将一根 L 形的不锈钢柱插入椎间孔, 对背部神经节稳定性造成影响, 将髓核放到生理盐水中备用。消毒背部, 以 L <sub>5</sub> 棘突为中心, 做 2 cm 切口, 将髓核植入 L <sub>5</sub> 和 L <sub>6</sub> 间的神经根, 逐层缝合皮肤
动物数量及分组方法	将未建模的 10 只大鼠作为对照组, 46 只建模成功的大鼠按照随机数字方法分为 5 组, 模型组 10 只, miR-206 mimics-NC 组、miR-206 mimics 组、miR-206 inhibitor-NC 组及 miR-206 inhibitor 组均 9 只
造模后实验观察指标	①大鼠双侧后足机械性缩足反射阈值和热刺激缩足反射潜伏期; ②背根神经节组织形态; ③髓核组织炎症因子磷脂酶 A2、环氧化酶 2、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β mRNA 表达; ④髓核组织自噬相关蛋白 LC3 I、Beclin-1 表达
造模过程中动物死亡原因	剔除 4 只因感染当时死亡的大鼠
造模后动物处理	给药后第 15 天, 各组大鼠麻醉处死后取背根神经节组织
伦理委员会批准	实验方案经河北医科大学动物实验伦理委员会批准

**1.4.2 分组及干预方法** 将未进行腰椎间盘突出症建模的 10 只大鼠作为对照组, 建模成功的 46 只大鼠按照随机数字方法分为 5 组, 模型组 10 只, miR-206 mimics-NC 组、miR-206 mimics 组、miR-206 inhibitor-NC 组及 miR-206 inhibitor 组均 9 只。参考文献 [9] 在建模后第 10 天, 大鼠吸入浅麻醉后, 29G 注射针在 L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> 及 L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub> 腰椎棘突间注射 miR-206mimics-NC、miR-206mimics、miR-206inhibitor-NC 及 miR-206inhibitor (20 μmol/L, 10 μL), 术后第 10 天开始注射, 1 次/d, 连续注射 4 d; 对照组及模型组均注射等剂量生理盐水。

**1.4.3 机械性缩足反射阈值 (paw withdrawal mechanical threshold, PWMT) 测定** 各组大鼠分别在给药后 1, 3, 7, 14 d 连续采用 Von Frey 纤维丝测定大鼠双侧后足 PWMT, 由小到大逐渐采用不同质量的纤维丝刺激大鼠足底正中部, 当出现缩足或舔足时停止刺激, 均刺激 5 次, 每次 5 s, 出现 3 次则记为阳性, 此时纤维丝质量即为 PWMT, 取 3 次平均值。

**1.4.4 热刺激缩足反射潜伏期 (paw withdrawal thermal latency, PWTL) 测定** 各组大鼠分别在给药后 1, 3, 7, 14 d 连续使用热痛测试仪检测大鼠双侧后足 PWTL, 光源对准大鼠足部中间, 出现缩足或舔足时停止照射, 反应时间记为 PWTL, 间隔 5 min, 实验重复 3 次, 取平均值。

**1.4.5 苏木精-伊红染色** 大鼠给药后第 15 天, 各组大鼠麻醉处死后取背根神经节组织, 用体积分数 10% 甲醛固定组织, 沿着纵方向进行切片, 10% 硝酸脱钙液进行脱钙, 后石蜡包埋切片 4 μm, 低温保存以便后续实验。石蜡切片组织采用二甲苯及纯度 100% 的医用乙醇中脱水及脱蜡, 采用苏木精染色, 1% 盐酸处理后采用伊红试剂复染, 梯度医用乙醇脱水, 透明处理, 中性树脂封固, 显微镜下观察组织病理形态。

**1.4.6 qPCR 检测** 各组大鼠髓核组织相关炎症因子 mRNA 的表达 采用 Trizol 提取试剂盒提取各组大鼠 L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> 髓核组织中总 RNA。实验检测的相关基因引物均由潍捷基公司设计。将 RNA 反转录为 cDNA 参考 5×PrimeScript RT Master Mix 试剂盒说明书进行。同时参考 SYBR Preme Ex Taq II (2×) 试剂盒说明书进行, 反应溶液采用荧光定量 PCR, 于 Light Cycler480 系统中进行, 基因相对转录水平采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法检测, 引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列  
Table 1 | Primer sequences

基因	方向	引物序列	产物长度 (bp)
磷脂酶 A2	F	5'-CGG GCT ATA GCA TAA TTT AA-3'	1 594
	R	5'-CGT AGC TAT ATA GCG CGC AGC-3'	
环氧化酶 2	F	5'-GCT CAA ACA TGA TGA TAT TTG CAT TC-3'	80
	R	5'-GCT GGC CCT CGC TTA TGA-3'	
前列腺素 E2	F	5'-GCT CCT TGC CTT TCA CGA TTT-3'	175
	R	5'-AGG ATG GCA AAG ACC CAA GG-3'	
肿瘤坏死因子 α	F	5'-TCA GTT CCA TGG CCC AGA C-3'	358
	R	5'-GTT GTC TTT GAC ATC CAT GCC ATT-3'	
白细胞介素 1β	F	5'-CCC TGA ACT CAA CTG TCA AAT AGC A-3'	507
	R	5'-CCC AAG TCA AGG GCT TGG AA-3'	
LC3 I	F	5'-ACG TGC TAG CAT GCC CTC AGA CCG GCC TT-3'	300
	R	5'-ACG TGA ATT CCG AAG CCG AAG GTT TCC TG-3'	
Beclin-1	F	3'-GAT CCA CTG AGC ACC GA-5'	1 352
	R	3'-CTC ACC TGG TGG CAT TGT G-5'	
GAPDH	F	5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3'	452
	R	5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3'	

**1.4.7 免疫印迹检测自噬相关蛋白 LC3 I、Beclin-1 表达** 每组大鼠取 100 mg L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub> 髓核组织, 加入 1 mL 的裂解液及 10 μL 的蛋白酶抑制剂, 充分研磨后按照 15 000 r/min 离心, 4 °C, 20 s/次, 间隔 20 s, 共离心 5 次。60 s 后提取上清液, 每个样本取 25 μL 检测蛋白浓度。按照样本制备溶液, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶, 计算初含 50 μg 的蛋白所需的液体进行上样, 开始电泳。当 Marker 蛋白置



于玻璃板底部时则停止跑胶。后继续转膜，PVDF膜从转膜槽中取出采用TBST漂洗5 min，加入稀释后的一抗LC3 I、Beclin-1(1 : 500) 孵育过夜，加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 5 000)，孵育时间为2 h。避光环境下将显影液加入PDCF膜，60 s，采用Image-lab图像分析系统进行成像和分析。

1.5 主要观察指标 ①大鼠双侧后足 PWMT; ②大鼠双侧后足 PWTL; ③背根神经节组织形态; ④髓核组织炎症因子磷脂酶A2、环氧化酶2、前列腺素E2、肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β mRNA的表达; ⑤髓核组织自噬相关蛋白LC3 I、Beclin-1的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 23.0软件对数据进行分析，数据均符合正态分布，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验，检验水准( $\alpha$ )为0.05， $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。文章的统计学方法已经哈励逊国际和平医院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 造模成功的46只和对照组10只大鼠，全部进入结果分析。

2.2 各组大鼠不同时间PWMT比较 各组大鼠在给药后1 d时的PWMT值比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )，给药后3, 7及14 d时，与对照组相比，模型组PWMT降低( $P < 0.05$ )，模型组与miR-206 mimics-NC组PWMT比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )，与miR-206 inhibitor-NC组相比，miR-206 inhibitor组大鼠PWMT升高( $P < 0.05$ )，与miR-206 mimics-NC组相比，miR-206 mimics组大鼠PWMT降低( $P < 0.05$ )，见表2，见图1。

表2 | 各组大鼠不同时间机械性缩足反射阈值(PWMT)比较 ( $\bar{x} \pm s, g$ )  
Table 2 | Comparison of rat paw withdrawal mechanical threshold at different time among groups

组别	n	1 d	3 d	7 d	14 d
对照组	10	11.20±1.23	11.09±1.30	11.50±1.18	11.42±1.22
模型组	10	11.33±1.31	8.10±0.85 <sup>a</sup>	6.12±0.68 <sup>a</sup>	6.22±0.77 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor-NC组	9	11.19±1.15	8.16±0.93 <sup>a</sup>	6.30±0.66 <sup>a</sup>	6.29±0.80 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor组	9	11.20±1.22	9.60±1.06 <sup>abc</sup>	10.33±0.80 <sup>abc</sup>	10.41±0.93 <sup>abc</sup>
miR-206 mimics-NC组	9	11.38±1.11	8.12±1.01 <sup>abcd</sup>	6.64±0.60 <sup>abcd</sup>	6.15±0.77 <sup>abcd</sup>
miR-206 mimics组	9	11.17±1.25	6.68±0.57 <sup>abcde</sup>	5.20±0.63 <sup>abcde</sup>	5.11±0.65 <sup>abcde</sup>
F值		0.048	22.800	100.700	83.840
P值		0.998	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F <sub>时间</sub>		106.800			
P <sub>时间</sub>		< 0.001			
F <sub>组间</sub>		168.300			
P <sub>组间</sub>		< 0.001			
F <sub>交互</sub>		15.470			
P <sub>交互</sub>		< 0.001			

表注：与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与miR-206 inhibitor-NC组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与miR-206 inhibitor组相比，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与miR-206 mimics-NC组相比，<sup>e</sup> $P < 0.05$

2.3 各组大鼠不同时间PWTL比较 各组大鼠在给药后1 d时的PWTL值比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )，给药后3, 7及14 d时，与对照组相比，模型组PWTL值降低( $P < 0.05$ )，模型组与miR-206 mimics-NC组PWTL比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )，与miR-206 inhibitor-NC组相比，miR-206 inhibitor

组大鼠PWTL值升高( $P < 0.05$ )，与miR-206 mimics-NC组相比，miR-206 mimics组大鼠PWTL值降低( $P < 0.05$ )，见表3，见图2。

表3 | 各组大鼠不同时间热刺激缩足反射潜伏期(PWTL)比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 | Comparison of rat paw withdrawal thermal latency at different time among groups

组别	n	1 d	3 d	7 d	14 d
对照组	10	15.28±1.36	16.03±1.18	16.62±1.25	15.96±1.30
模型组	10	15.05±1.33	9.51±1.01 <sup>a</sup>	7.11±0.68 <sup>a</sup>	5.27±0.63 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor-NC组	9	15.30±1.25	9.60±1.05 <sup>a</sup>	7.24±0.67 <sup>a</sup>	5.50±0.47 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor组	9	15.18±1.29	11.25±1.30 <sup>abc</sup>	12.84±1.44 <sup>abc</sup>	13.50±1.36 <sup>abc</sup>
miR-206 mimics-NC组	9	15.22±1.22	9.54±1.10 <sup>abcd</sup>	7.09±1.05 <sup>abcd</sup>	5.33±0.61 <sup>abcd</sup>
miR-206 mimics组	9	15.40±1.18	7.44±0.95 <sup>abcde</sup>	6.02±0.86 <sup>abcde</sup>	4.20±0.55 <sup>abcde</sup>
F值		0.085	68.810	164.000	300.100
P值		0.994	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F <sub>时间</sub>		286.90			
P <sub>时间</sub>		< 0.001			
F <sub>组间</sub>		437.100			
P <sub>组间</sub>		< 0.001			
F <sub>交互</sub>		42.160			
P <sub>交互</sub>		< 0.001			

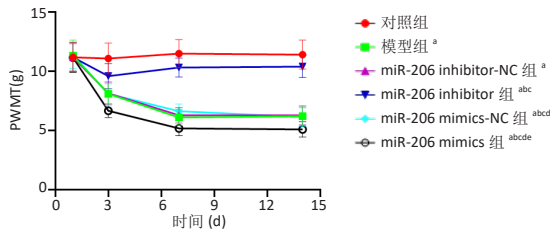
表注：与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与miR-206 inhibitor-NC组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与miR-206 inhibitor组相比，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与miR-206 mimics-NC组相比，<sup>e</sup> $P < 0.05$

2.4 各组大鼠背根神经节组织病理形态 苏木精-伊红染色检测结果显示：对照组大鼠背根神经节组织形态结构清晰，细胞核及尼氏小体排列均匀，模型组、miR-206 mimics-NC组及miR-206 inhibitor-NC组细胞肿胀显著，背根神经节组织形态不规则，空泡严重变形，miR-206 inhibitor组细胞排列改善，仅存在少量空泡变性，miR-206 mimics组背根神经节组织排列紊乱，细胞肿胀变形，空泡显著及尼氏小体紊乱，见图3。

2.5 各组大鼠髓核组织中相关炎症因子mRNA比较 qPCR检测结果显示：与对照组相比，模型组髓核组织中磷脂酶A2、环氧化酶2、前列腺素E2、肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β水平升高；与模型组相比，miR-206 mimics-NC组、miR-206 inhibitor-NC组大鼠磷脂酶A2、环氧化酶2、前列腺素E2、肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β水平相似( $P > 0.05$ )；与miR-206 inhibitor-NC组相比，miR-206 inhibitor组磷脂酶A2、环氧化酶2、前列腺素E2、肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β水平降低；与miR-206 mimics-NC组相比，miR-206 mimics组磷脂酶A2、环氧化酶2、前列腺素E2、肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β水平升高( $P < 0.05$ )，见表4。

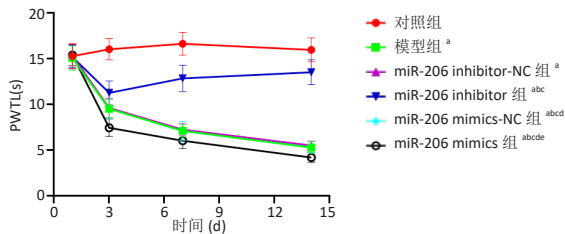
2.6 各组髓核组织大鼠LC3 I、Beclin-1蛋白水平比较 免疫印迹检测结果显示：与对照组相比，模型组髓核组织中LC3 I、Beclin-1水平升高；与模型组相比，miR-206 mimics-NC组、miR-206 inhibitor-NC组大鼠LC3 I、Beclin-1水平相似( $P > 0.05$ )；与miR-206 inhibitor-NC组相比，miR-206 inhibitor组LC3 I、Beclin-1水平降低( $P < 0.05$ )；与miR-206 mimics-NC组相比，miR-206 mimics组LC3 I、Beclin-1水平升高( $P < 0.05$ )，见表5，图4。

2.7 各组大鼠髓核组织LC3 I、Beclin-1 mRNA表达比较 qPCR检测结果显示：与对照组相比，模型组髓核组织中LC3 I、Beclin-1 mRNA升高；与模型组相比，miR-206 mimics-NC组、miR-206 inhibitor-NC组大鼠LC3 I、Beclin-1



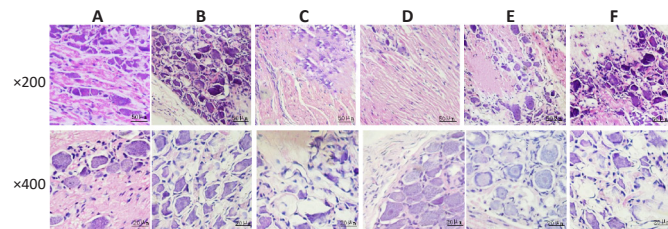
图注：在第3, 7, 14天时, 与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor-NC 组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor 组相比, <sup>d</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 mimics-NC 组相比, <sup>e</sup>*P* < 0.05

图 1 | 各组大鼠不同时间机械性缩足反射阈值 (PWMT) 比较  
Figure 1 | Paw withdrawal mechanical threshold of rats at different time



图注：在第3, 7, 14天时, 与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor-NC 组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor 组相比, <sup>d</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 mimics-NC 组相比, <sup>e</sup>*P* < 0.05

图 2 | 各组大鼠不同时间热刺激缩足反射潜伏期 (PWTL) 比较  
Figure 2 | Paw withdrawal thermal latency of rats at different time



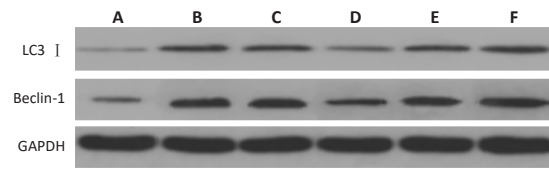
图注：A-F 分别为对照组、模型组、miR-206 inhibitor-NC 组、miR-206 inhibitor 组、miR-206 mimics-NC 组和 miR-206 mimics 组

图 3 | 苏木精 - 伊红染色检测背根神经节组织病理形态  
Figure 3 | Histopathological morphology of dorsal root ganglion detected by hematoxylin-eosin staining

表 4 | 各组大鼠髓核组织中磷脂酶 A2、环氧化酶 2、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β mRNA 水平比较 (x̄±s, 相对表达量)  
Table 4 | Comparison of the mRNA levels of phospholipase A2, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2, tumor necrosis factor α and interleukin 1β in rat nucleus pulposus among groups

组别	n	磷脂酶 A2	环氧化酶 2	前列腺素 E2	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 1β
对照组	10	1.05±0.10	1.03±0.14	1.00±0.09	0.93±0.11	1.12±0.15
模型组	10	4.33±0.67	2.68±0.50	2.30±0.44	1.89±0.37	3.11±0.41
miR-206 inhibitor-NC 组	9	4.25±0.71 <sup>a</sup>	2.57±0.48 <sup>a</sup>	2.25±0.43 <sup>a</sup>	1.85±0.41 <sup>a</sup>	3.08±0.47 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor 组	9	2.60±0.71 <sup>abc</sup>	1.67±0.33 <sup>abc</sup>	1.47±0.39 <sup>abc</sup>	1.25±0.39 <sup>abc</sup>	2.23±0.34 <sup>abc</sup>
miR-206 mimics-NC 组	9	4.41±0.76 <sup>abcd</sup>	2.73±0.54 <sup>abcd</sup>	2.40±0.46 <sup>abcd</sup>	1.91±0.44 <sup>abcd</sup>	3.15±0.44 <sup>abcd</sup>
miR-206 mimics 组	9	6.30±1.02 <sup>abcde</sup>	3.44±0.65 <sup>abcde</sup>	3.03±0.57 <sup>abcde</sup>	2.28±0.48 <sup>abcde</sup>	4.12±0.58 <sup>abcde</sup>
F 值		79.430	32.330	28.150	16.050	57.320
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表注：与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor-NC 组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor 组相比, <sup>d</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 mimics-NC 组相比, <sup>e</sup>*P* < 0.05



图注：A-F 分别为对照组、模型组、miR-206 inhibitor-NC 组、miR-206 inhibitor 组、miR-206 mimics-NC 组和 miR-206 mimics 组  
图 4 | 免疫印迹检测各组大鼠 LC3 I、Beclin-1 蛋白水平比较

Figure 4 | Western blot detection of LC3I and Beclin-1 protein expression in rats

表 5 | 各组大鼠髓核组织 LC3 I、Beclin-1 蛋白水平比较 (x̄±s, 相对表达量)  
Table 5 | Comparison of LC3I and Beclin-1 protein levels in rat nucleus pulposus among groups

组别	n	LC3 I	Beclin-1
对照组	10	0.56±0.05	0.71±0.09
模型组	10	1.14±0.11 <sup>a</sup>	1.52±0.14 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor-NC 组	9	1.09±0.13 <sup>a</sup>	1.50±0.15 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor 组	9	0.69±0.15 <sup>abc</sup>	1.21±0.11 <sup>abc</sup>
miR-206 mimics-NC 组	9	1.16±0.17 <sup>abcd</sup>	1.56±0.20 <sup>abcd</sup>
miR-206 mimics 组	9	2.05±0.36 <sup>abcde</sup>	2.28±0.33 <sup>abcde</sup>
F 值		73.480	72.060
P 值		< 0.001	< 0.001

表注：与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor-NC 组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor 组相比, <sup>d</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 mimics-NC 组相比, <sup>e</sup>*P* < 0.05

mRNA 相似 (*P* > 0.05); 与 miR-206 inhibitor-NC 组相比, miR-206 inhibitor 组 LC3 I、Beclin-1 mRNA 降低 (*P* < 0.05); 与 miR-206 mimics-NC 组相比, miR-206 mimics 组 LC3 I、Beclin-1 mRNA 升高 (*P* < 0.05), 见表 6。

表 6 | 各组大鼠髓核组织 LC3 I、Beclin-1 mRNA 表达比较 (x̄±s, 相对表达量)  
Table 6 | Comparison of LC3I and Beclin-1 mRNA levels in rat nucleus pulposus among groups

组别	n	LC3 I	Beclin-1
对照组	10	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	10	1.47±0.15 <sup>a</sup>	1.60±0.22 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor-NC 组	9	1.45±0.17 <sup>a</sup>	1.55±0.25 <sup>a</sup>
miR-206 inhibitor 组	9	1.22±0.13 <sup>abc</sup>	1.30±0.18 <sup>abc</sup>
miR-206 mimics-NC 组	9	1.52±0.20 <sup>abcd</sup>	1.67±0.21 <sup>abcd</sup>
miR-206 mimics 组	9	1.81±0.28 <sup>abcde</sup>	2.33±0.37 <sup>abcde</sup>
F 值		14.710	21.900
P 值		< 0.001	< 0.001

表注：与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor-NC 组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 inhibitor 组相比, <sup>d</sup>*P* < 0.05; 与 miR-206 mimics-NC 组相比, <sup>e</sup>*P* < 0.05

### 3 讨论 Discussion

腰椎间盘突出症是临床骨科常见疾病, 在中国每 100 人中就有 15 人患有该疾病, 增加了患者的致残率和降低了患者的社会功能及生活质量<sup>[10]</sup>。腰椎间盘突出症发生发展时对神经组织造成压迫, 故导致肢体神经传导障碍, 出现麻木等症。一些学者认为急性创伤会导致椎间盘移位, 这与退化的椎间盘受力损伤相关, 并随着疾病进展会加快椎间盘中外纤维环减弱, 促进椎间盘髓核炎症损伤, 导致腰椎间盘突出症发生发展<sup>[11]</sup>。疼痛是腰椎间盘突出症患者最显著的临床症状, 故降低患者疼痛已经成为临床学者的首要任务。近些年, 关于自噬与腰椎间盘突出症的关系逐渐被证实, 认为



细胞自噬蛋白可促进氧化应激, 加快细胞凋亡而加快疾病进程。例如自噬相关分子 LC3、Beclin 1 等信号可参与炎症因子释放及细胞死亡等过程, 目前, 部分炎症因子的表达与自噬水平已经明确, 例如干扰素  $\gamma$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  及白细胞介素 2 等可以加重细胞自噬而参与炎症相关疾病发生发展<sup>[12]</sup>。腰椎间盘突出症疾病属于炎症反应疾病, 细胞自噬加重可加快髓核细胞凋亡而加重病情, 炎症反应可增加细胞自噬。

近些年, 随着分子生物学技术的发展及应用, miRNA 的作用被发现。miRNA 是由多个核苷酸组成的小分子 RNA, 生物活性多样, 具有调节 DNA、转录、mRNA 降解及调节细胞增殖及凋亡等作用<sup>[13]</sup>。miRNA 与多种病理生理疾病存在关联, 例如炎症、氧化应激及恶性肿瘤等。miR-206 是 miRNAs 家族成员之一, 与多种生理疾病相关, 例如肌萎缩性侧索硬化症、横纹肌肉瘤、心血管疾病及脑缺血再灌注中均表达异常<sup>[14]</sup>。但是在腰椎间盘突出症疾病中暂无研究。

此次研究结果显示: 模型组大鼠 PWMT 水平及 PWTL 水平均降低, miR-206 inhibitor 组腰椎间盘突出症大鼠 PWMT 及 PWTL 水平均降低, miR-206 mimics 组大鼠 PWMT 及 PWTL 水平升高, 说明通过抑制 miR-206 可显著提高腰椎间盘突出症大鼠痛阈值, 而改善疼痛。腰椎间盘突出症发生可由多种原因导致腰椎的纤维环退化破裂, 导致髓核突出压迫神经, 诱发周围组织无菌性炎症反应, 加重神经根部炎症水肿是导致关节疼痛的致病原因。同时, 腰椎间盘突出症存在较强的炎症反应, 促进致痛物质的合成及释放, 刺激神经跟及神经节痛觉感受器而诱发疼痛<sup>[15]</sup>。有研究报道, 在完全福氏佐剂 (CFA) 致炎性疼痛模型大鼠损伤第 1, 3 及 7 天时脊髓灰质后角中 miR-206 表达显著升高, 同时轴突切断模型大鼠中背根神经节中 miR-206 表达升高, 均有致痛作用<sup>[16]</sup>。研究发现, 与正常人相比, 慢性疼痛患者中 miR-206 表达显著升高, 治疗后疼痛改善 miR-206 水平降低<sup>[17]</sup>。miR-206 是骨骼肌特异性 miRNA, 在多种骨骼疾病中表达失调。miR-206 与炎症反应相关, 在桥本氏甲状腺炎患者中 miR-206 上调血清白细胞介素 6、白细胞介素 17、白细胞介素 23 加重病情<sup>[18]</sup>。此次研究推测在腰椎间盘突出症大鼠中通过抑制 miR-206 可以提高大鼠痛阈值, 其作用机制可能与抑制炎症反应相关。

炎症反应是腰椎间盘突出症疼痛的主要机制之一, 相关研究表明, 在单核细胞浸润前髓核组织中就已经有炎症细胞因子表达<sup>[19]</sup>。腰椎间盘突出症患者椎间盘组织膨出后可增加髓核炎症反应, 这是导致患者疼痛的主要因素。研究发现, 在突出的髓核组织中发现多种炎症细胞因子、单核细胞及巨噬细胞, 挤压后增加前列腺素 E2、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  释放<sup>[20]</sup>。磷脂酶 A2 在炎症反应过程中发挥独特作用, 是膜磷脂代谢过程的重要酶类物质, 可增加环氧化酶 2 合成, 加重腰椎间盘突出症患者神经炎症及疼痛<sup>[21]</sup>。此次研究结果显示: 模型组大鼠髓核组织中磷脂酶 A2、环氧化酶 2、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  水平显著升高, miR-206 inhibitor 组大鼠上述 5 项指标

水平均降低, miR-206 mimics 组大鼠上述 5 项指标水平升高, 说明通过抑制 miR-206 表达可显著抑制磷脂酶 A2、环氧化酶 2、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  的水平而改善病情。相关研究表明, 在胶质瘤 U251 细胞中通过脂多糖刺激核因子  $\kappa$ B 可显著升高肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 等炎症因子水平。为了证实 miR-206 是否具有促进炎症反应的作用, 结果表明上调 miR-206 表达后白细胞介素 6 及 CC 类趋化因子 5 (CC chemokine ligand 5, CCL5) 等炎症因子升高, 抑制则降低, 说明其具有促进炎症反应的作用, 作用机制与 miR-206 过表达加快核因子  $\kappa$ B 进入细胞核而加快炎症反应相关<sup>[22]</sup>。

自噬是一个保守的细胞过程, 正常生理状态下细胞自噬较低, 也表明自噬可参与维持髓核细胞完整性的作用, 但是在椎间盘病变大鼠髓核细胞中自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3- II /LC3- I 表达显著升高, 表明退变大鼠髓核细胞中自噬加剧<sup>[23]</sup>。OHSHIMA 等<sup>[24]</sup>研究表明, 高浓度乳酸可增加髓核细胞凋亡, 并增加自噬蛋白 Beclin1 和 LC3- II 表达而促进椎间盘病变。有研究表明, 人髓核细胞中自噬因子 Beclin1 和 LC3- II /LC3- I 表达升高而加重髓核细胞退变, 进而损伤椎间盘<sup>[25]</sup>。此次研究结果显示: 模型组大鼠 Beclin1 和 LC3- II /LC3- I 升高, 说明自噬水平增加, 下调 miR-206 可减少腰椎间盘突出症大鼠髓核组织中 Beclin1 和 LC3- II, 进而抑制自噬。禹文峰<sup>[26]</sup>认为在缺血性脑卒中再灌注损伤中 circRNA4736 通过结合 miR-206 后可降低对 Seipin 蛋白的靶向作用, 而调控 Beclin1 和 LC3- II /LC3- I 水平从而改善神经元凋亡。此次研究推测下调 miR-206 可以抑制减少 Beclin1 和 LC3 I 表达, 改善髓核细胞自噬进而缓解病情。

文章存在一定局限性, 关于 miR-206 对腰椎间盘突出症大鼠自噬 Beclin1 和 LC3 I 的研究机制还需要进一步了解, 这也是今后的研究内容。综上所述, 抑制 miR-206 可以显著改善腰椎间盘突出症大鼠髓核炎症因子水平, 提高疼痛阈值, 降低细胞自噬, 其作用机制与抑制 LC3 I、Beclin-1 表达相关。

**作者贡献:** 王美负责设计方案、收集数据、设计文章内容、查阅文献、实施方案和撰写文章, 索娜协助数据整理分析、实施方案、补充文章设计缺陷, 于欢实施方案并对设计方案进行盲法评估及统计学图片制作, 杨建博审阅文章、补充遗漏及核对统计值。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- [1] WANG L, LI C, WANG L, et al. Sciatica-Related Spinal Imbalance in Lumbar Disc Herniation Patients: Radiological Characteristics and Recovery Following Endoscopic Discectomy. *J Pain Res.* 2022;15:13-22.
- [2] BENSLEER S, WALDE M, ISCHER M, et al. Comparison of treatment outcomes in lumbar disc herniation patients treated with epidural steroid injections: interlaminar versus transforaminal approach. *Acta Radiol.* 2020;61(3):361-369.
- [3] 王裕祥, 杨应忠, 秦卫春, 等. 舒筋祛痹汤对腰椎间盘突出症大鼠 PLA2 活性、IL-6、TNF- $\alpha$  水平和椎间盘退变的影响 [J]. *颈腰痛杂志*, 2018,39(5):543-546.
- [4] 牛辉, 鲍朝辉, 张文明, 等. 基于 c-JNK/CXCL1 信号通路研究椎间盘突出对腰椎间盘突出症大鼠脊髓炎症的抑制作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021,32(5):655-660.
- [5] 吴卉乔. Namp1 酶活性抑制剂 APO866 介导细胞自噬调控椎间盘退变的作用及机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2018.
- [6] SHEN XF, LI YW, LIANG GQ. Anti-inflammatory Effect of Wumen Zhike Gancao Decoction on Rats with Lumbar Disc Herniation Associated with Lipid Metabolic Disorder. *Medicinal Plant.* 2019;10(4):10.
- [7] 温佩彤. 电针结合有氧运动调控大鼠增龄性骨骼肌萎缩 IGF-1/Akt 通路的机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2017.
- [8] 师振予, 郭亦杰, 曾嵘, 等. 腰椎间盘突出症大鼠模型的建立及病理动态研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2020,40(1):28-33.
- [9] 茹靖涛, 李鸣, 苏松雪, 等. 蛛网膜下隙注射 miR-30b 对脊髓 Nav1.3 表达及神经病理性疼痛的影响 [J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2018,53(5):580-584.
- [10] FRANÇA FJR, CALLEGARI B, RAMOS LAV, et al. Motor Control Training Compared With Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation in Patients With Disc Herniation With Associated Radiculopathy: A Randomized Controlled Trial. *Am J Phys Med Rehabil.* 2019;98(3):207-214.
- [11] 梁雪纯. 独活寄生汤辅助常规西医治疗腰椎间盘突出对患者生活质量及相关评分的影响 [J]. *内蒙古中医药*, 2022,41(7):20-23.
- [12] 黄秋阳, 王伟, 罗书, 等. PM<sub>2.5</sub> 通过 TLR4 破坏自噬流加重 Raw264.7 巨噬细胞炎症反应 [J]. *天津医药*, 2022,50(11):1139-1145.
- [13] FISHER L. Retraction: miR-206 reduced the malignancy of hepatocellular carcinoma cells in vitro by inhibiting MET and CTNNB1 gene expressions. *RSC Adv.* 2021;11(8):4439.
- [14] 徐晓婷. 血浆中肌肉组织特异性微小 RNA 与机械通气患者膈肌功能的相关性研究 [D]. 南京: 东南大学, 2018.
- [15] 邵海龙, 穆佐洲. 机体炎症水平和氧化应激水平与腰椎间盘突出症椎间孔镜术后残留疼痛相关性研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2022, 51(10):1274-1277+1281.
- [16] MYTIDOU C, KOUTSOULIDOU A, ZACHARIOU M, et al. Age-Related Exosomal and Endogenous Expression Patterns of miR-1, miR-133a, miR-133b, and miR-206 in Skeletal Muscles. *Front Physiol.* 2021;12:708278.
- [17] 张英, 张渝俊, 慕欣竹, 等. 慢性疼痛患者治疗前后血浆 miR-206 表达差异的临床研究 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2016,22(5):349-353.
- [18] 袁洪波, 陈辉根, 孟佩盈, 等. 桥本甲状腺炎患者血清 miR-206 表达及与免疫平衡的关系 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2021,31(20):2477-2481.
- [19] VAN DIJK B, POTIER E, VAN DIJK M, et al. Reduced tonicitystimulates an inflammatory response in nucleus pulposus tissue that can be limited by a COX-2-specific inhibitor. *J Orthop Res.* 2015;33(11):1724-1731.
- [20] GORTH DJ, SHAPIRO IM, RISBUD MV. Transgenic mice overexpressing human TNF- $\alpha$  experience early onset spontaneous intervertebral disc herniation in the absence of overt degeneration. *Cell Death Dis.* 2018;10(1):7.
- [21] KHAN MI, HARIPRASAD G. Human secretory phospholipase A2 mutations and their clinical implications. *J Inflamm Res.* 2020;13:551-561.
- [22] 段小冬. miR-206 调控 LPS 介导胶质细胞炎症反应的机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [23] 赵小艳. 推拿对椎间盘退变白兔 TGF- $\beta$ 1 与炎性、自噬相关因子影响的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [24] OHSHIMA H, URBAN JP. The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. *Spine.* 1992;17(9):1079-1082.
- [25] 张广智. BRD4 通过调控 AMPK/mTOR/ULK1 通路诱导自噬延缓人源髓核细胞衰老和凋亡 [D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- [26] 禹文峰. CircRNA4736 通过“海绵状”吸附 miR-206 调控 Seipin 介导的线粒体自噬在缺血性脑卒中再灌注损伤的分子机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019,33(6):409-410.

(责任编辑: WZH, ZN, WL, LWJ)