

·基础研究·

本文引用:杨少锋,朱立国,李兆勇,李硕夫,郭彦涛,聂颖,张晨阳.miR-483/CREB1轴介导桃叶珊瑚苷抑制髓核细胞胞外基质降解的研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):550-554.

miR-483/CREB1轴介导桃叶珊瑚苷抑制髓核细胞胞外基质降解的研究

杨少锋^{1,2},朱立国^{1*},李兆勇²,李硕夫²,郭彦涛²,聂颖²,张晨阳²

(1.中国中医科学院望京医院,北京 100102;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 研究 miR-483/CREB1 轴在桃叶珊瑚苷(aucubin, AU)抑制人退行性髓核(nucleus pulposus, NP)细胞胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解中的功能作用。方法 AU 处理人退行性 NP 细胞后,检测细胞活性、ECM 相关蛋白及 cAMP 反应元件结合蛋白 1(cAMP responsive element binding protein 1, CREB1)的表达。实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)和 Western blot 检测 miR-483 表达变化对 CREB1 丰度的影响;双荧光素酶报告实验(luciferase, LUC)检测 miR-483 和 CREB1-3'-UTR 的靶向结合;CREB1 过表达载体和(或)miR-483 mimics 共转染后,AU 处理,检测 CREB1 及 ECM 相关蛋白的表达。结果 AU 可显著增强 NP 细胞活性($P=0.0004$),抑制 ECM 降解酶基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶-5(a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif-5, ADAMTS-5)与 CREB1 的表达,促进胶原蛋白 II 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type II alpha 1 chain, COL2A1)和 miR-483 的表达($P<0.001$)。miR-483 过表达可抑制 CREB1 的表达($P<0.0001$),LUC 实验表明 miR-483 可与 CREB1-3'-UTR 靶向结合。功能实验结果表明 CREB1 可削弱 AU 对 NP 细胞 ECM 的降解的抑制作用,而 miR-483 可部分逆转 CREB1 对 AU 的抑制作用。结论 AU 诱导 NP 细胞表达 miR-483,进而抑制 CREB1 的表达,增强 NP 细胞的活性,抑制 ECM 的降解。

[关键词] 桃叶珊瑚苷;髓核细胞;胞外基质;cAMP 反应元件结合蛋白;微小 RNA

[中图分类号]R285.5;R681.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.05.008

Study on Aucubin-mediated MiR-483/CREB1 Axis Inhibits Extracellular Matrix Degradation in Human Degenerative Nucleus Pulposus Cells

YANG Shaofeng^{1,2}, ZHU Ligu^{1*}, LI Zhaoyong², LI Shuofu², GUO Yantao², NIE Ying², ZHANG Chenyang²

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To study the functional role of miR-483/CREB1 axis in the inhibition of extracellular matrix (ECM) degradation in human degenerative nucleus pulposus (NP) cells by aucubin (AU). **Methods** After treatment of human degenerative NP cells with AU, cell viability, ECM-related protein and cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1) expression were measured. Quantitative real-time PCR (QPCR) and western blot were used to detect the effect of miR-483 expression on CREB1 abundance; dual luciferase reporter assay (LUC) was used to detect the targeted binding relationship between miR-483 and CREB1-3'-UTR; The CREB1 overexpression vector and/or miR-483 mimics were co-transfected into NP cells, and the expression of CREB1 and ECM-related proteins was detected after AU treatment. **Results** AU significantly enhanced the activity of NP cells ($P=0.0004$), inhibited the expression of EMP degrading enzyme matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) ($P=0.0003$), a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif-5 (ADAMTS-5) and CREB1 ($P<0.0001$), and promoted the expression

[收稿日期]2018-10-23

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2017JJ2208);湖南省教育厅科学研究项目(19C1392)。

[作者简介]杨少锋,男,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:椎间盘退变防治。

[通讯作者]*朱立国,男,博士,主任医师,博士研究生导师,E-mail:zhlg@aliyun.com。

of collagen type II alpha 1 chain (COL2A1) ($P < 0.000 1$) and miR-483 ($P = 0.000 6$). Overexpression of miR-483 inhibited the expression of CREB1 ($P < 0.000 1$). LUC experiments indicated that miR-483 can bind to the CREB1-3'-UTR. Functional experiment showed that CREB1 can attenuate the inhibitory effect of AU on the degradation of ECM in NP cells, while miR-483 partially reverses the inhibitory effect of CREB1 on AU. **Conclusion** AU induces the expression of miR-483 in NP cells, thereby inhibiting the expression of CREB1, ultimately enhancing the activity of NP cells and inhibiting the degradation of ECM.

[**Keywords**] aucubin; nucleus pulposus cells; extracellular matrix; cAMP responsive element binding protein 1; miRNA

椎间盘退行性病变(intervertebral disc degeneration,IDD)是椎间盘突出、下腰痛、脊柱稳定性下降等脊柱病变的病理基础,由此导致患者因为严重腰痛而劳动能力下降甚至完全丧失^[1]。当前有关IDD的发病机制研究显示,椎间盘髓核(nucleus pulposus, NP)细胞凋亡以及胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度降解是导致IDD发生的主要原因^[2]。

中药杜仲(*Eucommia Ulmoides* Oliv.)可增强骨密度、调节骨代谢^[3],相关研究也证明其可用于治疗IDD、骨质疏松症和其他骨科疾病^[4]。杜仲主要活性成分为桃叶珊瑚苷(aucubin, AU)。AU常用于治疗骨关节炎^[5],并具有保护肝脏、抗炎、促进血管生成、抗氧化、促进神经干细胞分化等多种功能^[6-7],但AU在IDD中的功能和作用机制还未见相关报道。

随着近年来对非编码RNA研究的日益深入,miRNA介导的转录后调控也被发现参与IDD发病过程^[8]。miRNA是一种长度约22~25个核苷酸的内源性非编码单链RNA,可通过与靶基因mRNA的3'-UTR区互补配对形成RNA诱导沉默复合体而抑制靶基因转录或诱使靶mRNA降解,从而调控靶基因表达^[9]。本课题组研究发现,以杜仲为主药的补肾活血方可通过影响NP细胞中miR-483的表达促进NP细胞增殖和ECM重塑^[10]。结合位点预测工具targetscan (www.targetscan.org/vert_72/)预测发现转录调控因子——cAMP反应元件结合蛋白1(cAMP responsive element binding protein 1, CREB1)可能是miR-483的结合靶点,因此,本项目拟进一步研究AU对NP细胞ECM重塑的影响及miR-483/CREB1轴在其中的功能作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验采用的退行性NP细胞分离自湖南中医药大学第一附属医院收治的IDD患者椎间盘组织^[7]。细胞使用含有10%胎牛血清(GIBCO, USA)、链霉素和青霉素(Solarbio, 北京)的DMEM培养基(GIBCO, USA)培养。

miR-483 mimics/inhibitor、实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)引物及试剂均购自上海吉玛制药技术有限公司;基质金属蛋

白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)抗体(货号:ab52915)、血小板反应蛋白解整合素金属肽酶-5(a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif-5, ADAMTS-5)抗体(货号:ab41037)、CREB1抗体(货号:ab32096)、II型胶原 $\alpha 1$ (collagen type II alpha 1 chain, COL2A1)抗体(货号:ab34712)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(货号:ab8245)、HRP标记的羊抗兔(货号:ab205718)或羊抗小鼠(货号:ab205719)二抗均购自美国Abcam公司;98%AU标准品由江莱生物提供;MTT检测试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;双荧光素酶报告实验(dual luciferase reporter gene assay, LUC)试剂盒、细胞培养和Western blot相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及转染 将DMEM培养基培养的NP细胞置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。转染时,取对数生长期的NP细胞接种至6孔细胞培养板,继续培养至60%~70%的细胞密度,遵照Lipofectamine 2000的使用说明书,转染miR-483 mimics。

1.2.2 MTT实验 使用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)溶解AU标准品以制备1 mmol/L的母液,再用PBS稀释AU母液制备不同浓度的工作液。收集对数期细胞,向96孔细胞培养板中加入细胞悬液,并保证每孔的细胞数约为 1×10^4 个。细胞单层铺满孔底后加入不同浓度的AU工作液,对照组则使用等体积的PBS,孵育24~72 h,倒置显微镜下观察,之后,每孔加入20 μ L MTT溶液,培养4 h,并使用PBS漂洗。二甲基亚砜溶解后测定490 nm处的吸光值。

1.2.3 Western blot实验 分别使用AU(终浓度为16 μ mol/L)和等体积的PBS(作为对照组)处理NP细胞,其后提取两组细胞中的总蛋白,BCA法测定MMP-3、ADAMTS-5、CREB1、COL2A1等蛋白的浓度,其后进行SDS-PAGE、转膜、封闭、洗膜,加入相应的蛋白一抗,4℃孵育12 h后洗膜,继而加入二抗,ECL显色,不同组别之间使用GAPDH作为内源性对照。

1.2.4 qPCR 实验 使用 TRIZOL 试剂提取处于对数生长期的 NP 细胞中的总 RNA, 然后使用 U6-R 与 miR-483-RT 引物(见表 1)分别进行反转录以获得 qPCR 检测模板。再按照程序进行 qPCR 反应, 最后使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算 miR-483 的表达水平。

1.2.5 荧光素酶报告质粒的构建 通过 PCR 扩增含有 miR-483 与 CREB1 结合位点上下游 800 bp 序列的 CREB1 基因片段到 Renilla psiCHECK-2 载体下游, 并命名为 wtCREB1 荧光素酶报告质粒。其在此基础上设计相应的引物对结合位点进行突变(见表 1), 得到 mutCREB1 荧光素酶报告质粒。

表 1 qPCR 和荧光素酶报告质粒构建所有引物序列

Primer	Sequence(5'-3')
miR-483-RT	CTCCTATCCACTGCCTGCTCTGGACTCGGCAATTGCACCTGGATA-CGACAAGACC
miR-483-F	GCCTCACTCTCTCTCTCC
miR-483-R	CAGTGCCTGCTCTGGA
CREB1-F	ATTCACAGGACTCAGTGGATACT
CREB1-R	CACCGTTACACTGGTGTATGG
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
WT-CREB1-F	CCGCTCGAGATTTTCAGGATTAAGTAGGG
WT-CREB1-R	ATTTGCGGCGCTATTTATCTCACAACCTCTTCACCT
Mut-CREB1-F	AAATAGTTAGCTCAAACCTTGTTTTATCTTTTTTCATC
Mut-CREB1-R	GGTTTGAGCTAACTATTTAATTAAGTGGCTAGTCATATCTAATTT

1.2.6 LUC 实验 取对数生长期的 NP 细胞接种于 24 孔细胞培养板, 培养 12 h 后, 转染 wt/mut CREB1 荧光素酶报告质粒, 同时分别转染 miR-483 mimics 及 mimics NC, 再培养 48 h 后, 使用 LUC 检测试剂盒测定各组细胞中的荧光素酶相对活性。

1.3 数据统计分析

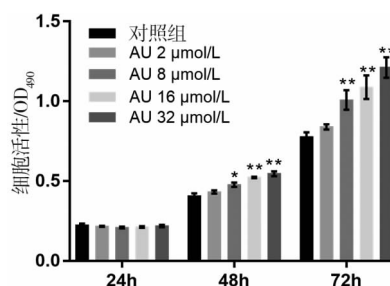
本实验所有数据均由统计软件 SPSS 20.0 分析处理, 最终数据为 3 次平行重复实验的 $\bar{x} \pm s$, 格拉布斯准则去除逸出值后, 两两比较, 先进行方差齐性 Levene 检验, 若方差齐, 采用 LSD-t 检验, 不齐则采用 t' 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐, 使用单因素方差分析进行总均值比较, 而后采用 SNK 法进行两两比较, 若方差不齐, 改用 Welch 检验进行总体均值比较, 而后采用 Dunnett T3 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AU 最佳处理时间和浓度的选择

分别使用 0、2、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的 AU 处理退行性 NP 细胞 24、48、72 h, 其后 MTT 实验检测细胞活性。结果发现 NP 细胞的活性随着处理时间的延

长和 AU 浓度的增高而增强, 表明 AU 可提高 NP 细胞活性。此外, 对照组和不同浓度的 AU 处理组在 48 h 时, OD_{490} 值分别为 0.406 ± 0.017 、 0.432 ± 0.010 、 0.477 ± 0.014 、 0.523 ± 0.005 、 0.546 ± 0.015 。统计分析结果显示, 48 h 时 16 $\mu\text{mol/L}$ 处理组与对照组之间存在极显著差异 ($P = 0.0004$, 见图 1), 因此选择 16 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 为后续实验中 AU 干预条件。



注: 与对照组相比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, $n = 3$

图 1 不同时间和不同浓度 AU 处理对退行性 NP 细胞活性的影响

2.2 AU 处理对 NP 细胞 ECM 降解的影响

通过 Western blot 实验检测了 ECM 降解酶 MMP-3、ADAMTS-5 和胶原蛋白 COL2A1 的表达变化情况, 结果使用 AU 处理之后, MMP-3 的相对表达水平从 0.994 ± 0.084 下降为 0.617 ± 0.104 ($P = 0.0003$), ADAMTS-5 的相对表达水平从 1.037 ± 0.099 下降为 0.349 ± 0.061 ($P < 0.0001$), COL2A1 的相对表达水平从 1.023 ± 0.028 增加为 1.532 ± 0.120 ($P < 0.0001$, 如图 2A、图 2B)。以上结果表明 AU 处理可抑制 NP 细胞的 ECM 降解过程。

2.3 AU 处理对 miR-483 和 CREB1 表达的影响

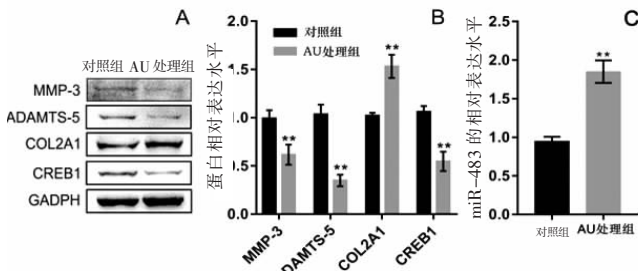
其后检测 AU 处理对 NP 细胞中 miR-483 和 CREB1 的丰度影响, 结果显示, AU 处理后 miR-483 的表达水平发生显著上调 ($P = 0.0006$, 如图 2C), 而 CREB1 蛋白的表达水平发生显著下调 ($P < 0.0001$, 如图 2A 和 2B)。以上结果表明 miR-483 和 CREB1 可能在 AU 功能行使过程中发挥着某些作用。

2.4 NP 细胞中 miR-483 和 CREB1 的靶向调控关系验证

qPCR 结果显示, 转染该 mimics 后, miR-483 的表达上调近 40 倍(如图 3A); 其后通过 qPCR 和 Western blot 分别检测转染 miR-483 mimics 后 NP 细胞中 CREB1 的 mRNA 和蛋白水平, 结果显示, CREB1 的 mRNA 和蛋白水平均发生极显著下调(如图 3B 和 3C), 表明细胞中 miR-483 的表达变化可影响 CREB1 的转录和翻译。

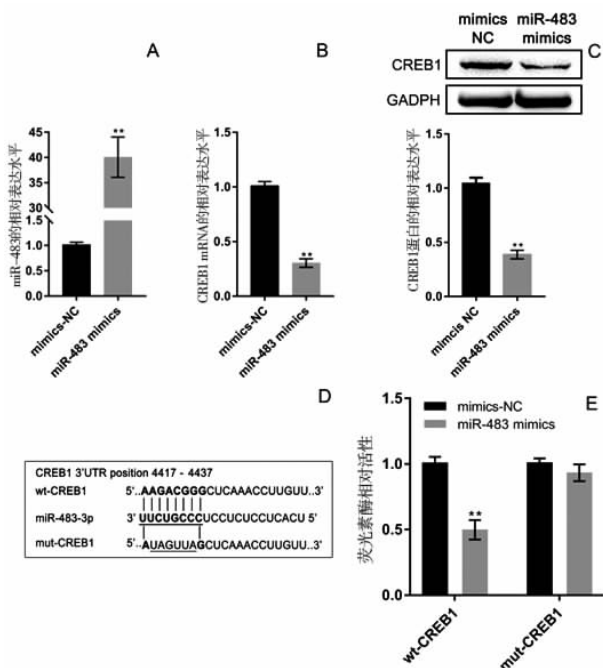
其后通过权威在线工具 targetscan 预测 miR-

483 与 CREB1 mRNA 之间的结合位点(如图 3D 所示),并构建含有结合位点上下游 800 bp 的 CREB1 基因片段的野生型荧光报告重组载体(wt-CREB1),并在此基础上合成和构建结合位点发生突变的突变型荧光报告重组载体(mut-CREB1)。将重组载体与 miR-483 mimics 共转染进 NP 细胞后,发现 miR-483 mimics 可显著抑制转染 wt-CREB1 细胞的相对荧光素酶活性($P < 0.0001$),而对转染有 mut-CREB1 细胞的相对荧光素酶活性无影响(见图 3E)。



注:A.Western blot 实验检测 AU 处理对 ECM 相关蛋白和 CREB1 的影响;B. 灰度分析 AU 处理对 ECM 相关蛋白和 CREB1 的影响;C.AU 处理对 miR-483 表达的影响。与对照组相比,** $P < 0.01$, $n = 3$

图 2 AU 处理对 NP 细胞 ECM 相关蛋白表达、CREB1 和 miR-483 的影响

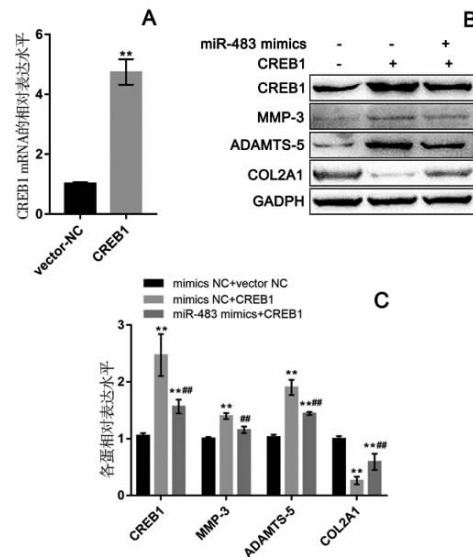


注:A.miR-483 mimics 的过表达效率验证;B.miR-483 mimics 转染对细胞中 CREB1 mRNA 水平的影响;C.miR-483 mimics 转染对 CREB1 蛋白水平的影响;D.miR-483 与 CREB1 的结合位点示意图;E.LUC 实验验证 miR-483 和 CREB1 的靶向结合关系。与 mimics-NC 转染组相比,** $P < 0.01$, $n = 3$

图 3 NP 细胞中 miR-483 和 CREB1 的靶向调控验证

2.5 miR-483/CREB1 轴在 AU 抑制 NP 细胞 ECM 降解中的作用验证

构建 CREB1 过表达载体并转染入 NP 细胞中进行过表达效率验证,发现该载体可显著增强细胞中 CREB1 mRNA 丰度(如图 4A)。使用 CREB1 过表达载体和 mimics NC 共转染 NP 细胞,其后使用 AU 处理,Western blot 检测发现 CREB1 蛋白的表达显著增强,并且细胞中 ECM 降解酶 MMP-3、ADAMTS-5 的表达上调,而胶原蛋白 COL2A1 的表达发生下调;使用 CREB1 过表达载体和 miR-483 mimics NC 共转染 NP 细胞,AU 处理后,细胞中 CREB1 和 ECM 降解酶 MMP-3、ADAMTS-5 的表达发生降低,而 COL2A1 的表达则出现上调。表明 CREB1 可削弱 AU 对 NP 细胞 ECM 的降解的抑制作用,而 miR-483 可部分逆转 CREB1 对 AU 的抑制作用。



注:A.CREB1 过表达载体的过表达效率验证;B.Western blot 实验检测 miR-483 和(或)CREB1 过表达对 ECM 降解相关蛋白的影响;C.灰度分析 miR-483 和(或)CREB1 过表达后 NP 细胞中相关蛋白的表达情况。与 vector NC 转染组或 mimics NC + vector NC 共转染组相比,** $P < 0.01$,与 mimics NC + CREB1 共转染组相比,## $P < 0.01$, $n = 3$

图 4 miR-483/CREB1 轴在 AU 抑制 NP 细胞 ECM 降解中的功能作用

3 讨论

由 IDD 导致的各类疾病已发展为严重影响人们生活质量、威胁人类身体健康的世纪难题。其发病机制和治疗方法一直是研究的焦点领域,虽然当前基因治疗、干细胞移植、生物工程治疗等均取得了一定的进展,但多数仍止步于动物实验,其临床有效性和安全性还需进一步评估^[1]。近年来,广大中医学者

在前人对IDD病因的相关论述基础上,结合大量临床实践发现中医药可作用于IDD发生发展的多个环节或靶点,延缓IDD进程^[12]。

IDD在中医学中归属于“痹症”“腰痛”范畴,中医药治疗多从肾虚、气虚、督脉阻滞等着手^[13],而中药杜仲性温,具强筋壮骨、滋养肝肾的作用,因此本项目进一步对杜仲在IDD治疗中的功能进行研究,结果发现杜仲的活性成分AU可显著增强退行性NP细胞的活性,并且增强的幅度与AU的浓度和处理时间相关。Western blot实验显示AU处理后NP细胞中ECM降解酶MMP-3、ADAMTS-5的表达降低,而COL2A1的表达则出现上调,表明AU可抑制NP细胞的ECM降解。大量研究表明,表达失调的miRNA如miR-143^[14]、miR-222^[15]等可直接调控其靶基因的表达,影响椎间盘组织中细胞的增殖、凋亡和ECM降解过程,参与IDD发生和演进过程。中药如补肾壮督方(全方由海马、鹿角胶、黄芪、熟地黄、细辛组成)可上调大鼠退变椎间盘组织和血浆中的miR-125a水平,延缓IDD发展^[16];本课题组前期也报道了补肾活血方可影响NP细胞中miR-483的表达,促进NP细胞增殖和ECM重塑^[10]。

对AU抑制ECM降解的分子机制研究发现,AU处理可显著增强NP细胞中miR-483的表达,抑制CREB1的表达。QPCR和LUC实验表明,miR-483可靶向抑制细胞中CREB1表达,提示miR-483/CREB1轴在AU功能发挥过程中可能具有重要作用。最后通过验证实验表明,CREB1过表达可显著增强细胞中ECM降解酶、抑制胶原蛋白的表达,而miR-483可逆转CREB1对AU功效的抑制作用。CREB1是一种被广泛研究的转录因子,可作为转录激活因子与启动子上的cAMP反应元件相结合,促进多种基因转录,参与细胞代谢、细胞周期、DNA修复和生存^[17]。并且CREB1可调控IL-2、IL-6、IL-10和TNF- α 的表达参与炎症进程^[18],而NP细胞可通过分泌炎症因子诱导MMPs和ADAMTSs等ECM降解酶表达,加速IDD疾病进程^[19]。

综上所述,本研究发现,中药杜仲的主要活性成分AU可作用于miR-483/CREB1轴,抑制NP细胞ECM降解,延缓IDD的发展进程。通过明确和完善AU治疗IDD的具体分子机制,可为传统中医药防治IDD提供实验依据,并提供新的技术方法和研究思路。

参考文献

[1] GERHARDT A, EICH W, TREEDE R D, et al. Conditioned pain modulation in patients with nonspecific chronic back pain with chronic local pain, chronic widespread pain, and fibromyalgia[J]. *Pain*, 2017, 158(3): 430-439.

[2] SILAGI E S, SHAPIRO I M, RISBUD M V. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration[J]. *Matrix Biology: Journal of the In-*

ternational Society for Matrix Biology, 2018;71-72:368-379.

[3] 朱福群,唐芳瑞,刘荣华.杜仲强筋健骨的药理作用及临床应用研究进展[J]. *江西中医药大学学报*,2015,27(4):92-96.

[4] WANG C Y, TANG L, HE J W, et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacological properties of *Eucommia ulmoides*: A review[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2019, 47(2): 259-300.

[5] LU H, JIANG J, XIE G, et al. Effects of an aqueous extract of eucommia on articular cartilage in a rat model of osteoarthritis of the knee[J]. *Experimental and Therapeutic Medicines*, 2013, 6(3):684-688.

[6] XIAO Y, CHANG W, WU Q Q, et al. Aucubin protects against TGF β 1-Induced cardiac fibroblasts activation by mediating the AMPK α /mTOR signaling pathway[J]. *Planta Medica*, 2018, 84(2): 91-99.

[7] KIM Y M, SIM U C, SHIN Y, et al. Aucubin promotes neurite outgrowth in neural stem cells and axonal regeneration in sciatic nerves[J]. *Experimental Neurobiology*, 2014, 23(3): 238-245.

[8] ZHOU X, CHEN L, GRAD S, et al. The roles and perspectives of microRNAs as biomarkers for intervertebral disc degeneration[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017; 11(12):3481-3487.

[9] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017,16(3):203-222.

[10] YANG S, LI L, ZHU L, et al. Bu-Shen-Huo-Xue-Fang (BSHXF) modulates nucleus pulposus cell proliferation and extracellular matrix (ECM) remodeling in intervertebral disc degeneration through miR-483 regulation of Wnt pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019,120(12):19318-19329.

[11] SHARIFI S, BULSTRA S K, GRIJPMAN D W, et al. Treatment of the degenerated intervertebral disc; closure, repair and regeneration of the annulus fibrosus[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015,9(10):1120-1132.

[12] ZHANG B, XU H, WANG J, et al. A narrative review of non-operative treatment, especially traditional Chinese medicine therapy, for lumbar intervertebral disc herniation[J]. *Biosci Trends*, 2017,11(4):406-417.

[13] 杨宇,夏建龙,陈刚,等.中药治疗脊髓型颈椎病的研究进展[J]. *中国中医急症*,2016,25(4):685-687.

[14] YANG Q, GUO X P, CHENG Y L, et al. MicroRNA-143-5p targeting eEF2 gene mediates intervertebral disc degeneration through the AMPK signaling pathway [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2019,21(1):97.

[15] LIU J, YU J, JIANG W, et al. Targeting of CDKN1B by miR-222-3p may contribute to the development of intervertebral disc degeneration[J]. *FEBS Open Biology*, 2019,9(4):728-735.

[16] 张震.血浆miRNA与腰椎间盘突出退变的相关性及补肾壮督方的干预研究[D].广州:广州中医药大学,2017.

[17] WANG Y W, CHEN X, MA R, et al. Understanding the CREB1-miRNA feedback loop in human malignancies[J]. *Tumour Biology*, 2016,37(7):8487-8502.

[18] WEN A Y, SAKAMOTO K M, MILLER L S. The role of the transcription factor CREB in immune function[J]. *Journal of Immunology*, 2010,185(11):6413-6419.

[19] ZHANG W L, CHEN Y F, MENG H Z, et al. Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2017, 35(6):1323-1334.