

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.07.004

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190327.1529.059.html(2019-03-28)

脑梗死过程中微 RNA-181d 和肿瘤坏死因子 α 的表达及机制研究*

单海雷,焦光美,窦志杰,马 征,张晓璇,杨 宁,高燕军 Δ

(承德医学院附属医院神经内科,河北承德 067000)

[摘要] **目的** 检测临床脑梗死患者和小鼠脑缺血再灌注模型血清中 miR-181d 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达变化,并探讨其相关性。**方法** 选取发病 48 h 内入住承德医学院附属医院的脑梗死患者 32 例(脑梗死损伤组),另选取同期 13 例健康体检者(对照组)。取受试者外周血血清,采用实时定量 PCR(qRT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测血清中 miR-181d 和 TNF- α 的表达。同时采用线栓法建立小鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,分别在 0、1、3、7、14 和 28 d 检测血清 miR-181d 和 TNF- α 的表达水平。分析 miR-181d 和 TNF- α 表达的关系。在人胚肾 HEK-293T 细胞通过荧光素酶报告基因方法,并在人外周血单核细胞 THP-1 中利用蛋白质印迹法(Western blot)检测 miR-181d 对 TNF- α 的抑制作用。**结果** 脑梗死损伤组患者血清 miR-181d 表达水平低于对照组($P < 0.05$)。在小鼠 MCAO 模型中,随着脑梗死病程延长,血清 miR-181d 表达水平逐渐下调。TNF- α 表达水平在脑梗死患者和小鼠 MCAO 模型中均上调,并与 miR-181d 的表达呈负相关($r = -0.7038, P = 0.0004; r = 0.9653, P = 0.0018$)。miR-181d 可以结合到 TNF- α 的 3'非翻译区(3'-UTR)并抑制后者的表达。在人外周血单核细胞 THP-1 中,miR-181d 可以抑制 TNF- α 蛋白的产生。**结论** miR-181d 的表达下调可能导致 TNF- α 升高,从而使炎症反应加重。

[关键词] 脑梗死;微 RNAs;肿瘤坏死因子 α ;大脑中动脉阻塞

[中图分类号] R743.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)07-1094-05

The expression of microRNA-181d and tumor necrosis factor- α in cerebral infarction and its mechanism*

SHAN Hailei, JIAO Guangmei, DOU Zhijie, MA Zheng, ZHANG Xiaoxuan, YANG Ning, GAO Yanjun Δ

(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of microRNA-181d (miR-181d) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum samples derived from patients with cerebral infarction and cerebral ischemia-reperfusion mice, and explore the relationship between circulating miR-181d and TNF- α . **Methods** The serum samples of 32 cases of patients with cerebral infarction admitted to the Affiliated Hospital of Chengde Medical University within 48 h after onset (the brain infarction injury group) and 13 healthy volunteers (the control group) were collected. The real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the expression of miR-181d and TNF- α in the serum samples. At the same time, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) mice models were established by using the suture method. The expression levels of serum miR-181d and TNF- α were detected at 0, 1, 3, 7, 14 and 28 d, respectively. The relationship between miR-181d and TNF- α was analysed. Furthermore, the inhibitory effect of miR-181d on TNF- α was determined by dual-luciferase reporter gene assay and western blot analysis in human embryonic kidney HEK-293T cells and peripheral blood mononuclear THP-1 cells, respectively. **Results** The serum expression of miR-181d in the brain infarction injury group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). In the MCAO mice models, the serum expression of miR-181d was gradually down-regulated as the course of cerebral infarction prolonged. The serum expression levels of TNF- α were up-regulated in both patients and MCAO mice models, and were negatively correlated with the expression levels of miR-181d, respectively ($r = -0.7038, P = 0.0004; r = -0.9653, P = 0.0018$). Moreover, miR-181d negatively regulate the expression of TNF- α by directly binding to its 3'-UTR. In human peripheral blood mononuclear cell THP-1, miR-181d inhibited the expression of TNF- α protein. **Conclusion** Down-regulation of miR-181d leads to an increase of TNF- α expression, which may aggravate the inflammatory response.

[Key words] cerebral infarction; microRNA; tumor necrosis factor- α ; middle cerebral artery occlusion

* 基金项目:2017 年河北省承德市科学技术研究与发展计划项目(201701A057)。 作者简介:单海雷(1984-),主治医师,硕士,主要从事脑血管病、神经免疫性疾病研究。 Δ 通信作者, E-mail: yanjungao2009@126.com。

脑梗死是世界范围内人群死亡的主要原因之一,也是导致长期神经功能损伤的主要原因。多重因素导致的疾病复杂性阻碍脑梗死的诊断和治疗^[1]。虽然已开展许多有关脑梗死治疗的临床试验,但目前血栓溶解仍是主要治疗方法^[2]。因此,迫切需要开发新的有效的诊断和治疗方法。微 RNAs(microRNAs, miRNAs)是生物体内广泛存在的含 19~24 个核苷酸的非编码 RNA,其可与靶基因 mRNA 的 3'非翻译区域(3'UTR)结合,阻止它们的翻译。miRNAs 可调节多种细胞活动,如细胞增殖、分化、凋亡、器官发育、机体代谢和肿瘤发生。且近年来,许多研究已经注意到 miRNAs 在脑梗死中的作用。脑缺血后,大脑中 miRNAs 的表达发生改变^[3]。另外,有些 miRNA 在人体血清或血浆中稳定存在,可以作为组织损伤和病理状态的特异标志物^[4]。研究发现,miR-181 家族中,miR-181a 对小鼠的缺血性神经损伤具有保护作用^[5],下调的 miR-181b 通过对热休克蛋白 A5(HSPA5)和 UCHL1 蛋白水平的负调控,诱导神经保护对抗缺血性损伤,为缺血性脑卒中提供了一个潜在的治疗靶点^[6]。缺血后 miR-181c 直接作用于肿瘤坏死因子- α (TNF- α),从而调节小胶质激活和小神经胶质细胞介导的神经元损伤^[7]。然而,miR-181 家族的第 4 个重要成员 miR-181d 在脑缺血中的作用还鲜有报道。本研究旨在通过检测脑梗死患者和大脑中动脉阻塞(MCAO)模型小鼠血清中 miR-181d 的表达水平及其与炎症的关系,初步揭示 miR-181d 在脑梗死中的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清标本 采用回顾性研究方法,收集 32 例发病 48 h 内入住承德医学院附属医院的脑梗死患者血清(脑梗死损伤组),其中男 21 例,女 11 例,年龄 34~73 岁,平均(54.0 \pm 18.7)岁。另选取体检正常的健康对照人群 13 例收集血清(对照组),男 9 例,女 4 例,年龄 38~69 岁,平均(53.0 \pm 14.7)岁。所有患者采血前均未进行过扩容、扩血管及溶栓治疗,无创伤及手术史;并且除外其他癌症、感染或免疫疾病患者。两组性别、年龄及高血压、糖尿病、高血脂等并发症比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究符合医学伦理学标准,获得患者或家属的知情同意,同时经本院伦理委员会批准。

1.1.2 小鼠 MCAO 模型 C57BL/6 雄性小鼠,体质量为 20~25 g,于 22~24 °C 正常昼夜交替环境饲养。称重后,按 70 mL/kg 腹腔注射 5%水合氯醛。参照 Longa 线栓法建立小鼠左侧 MCAO 模型。36 只小鼠分为假手术组($n=6$)和脑梗死组($n=30$)。脑梗死组于梗死后 1、3、7、14、28 d 取材。

1.2 方法

1.2.1 血样采集和血清总 RNA 提取 收集脑梗死患者发病 48 h 内的静脉血 5 mL,置于含乙二胺四乙酸

(EDTA)的抗凝管中,4 °C 冰箱静置 30 min,3 000 r/min 离心 30 min,取上层血清置于无 RNA 酶离心管中,然后按照血清 miRNA 提取试剂盒说明书(北京天根生化科技有限公司)提取血清总 RNA。

1.2.2 细胞培养 THP-1 细胞购自美国 ATCC 公司。人胚肾 HEK-293T 细胞系购自 CBTC CAS。这些细胞均用 DMEM 培养基[含 10%胎牛血清(FBS,购自美国 Invitrogen 公司上海分公司)]于 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

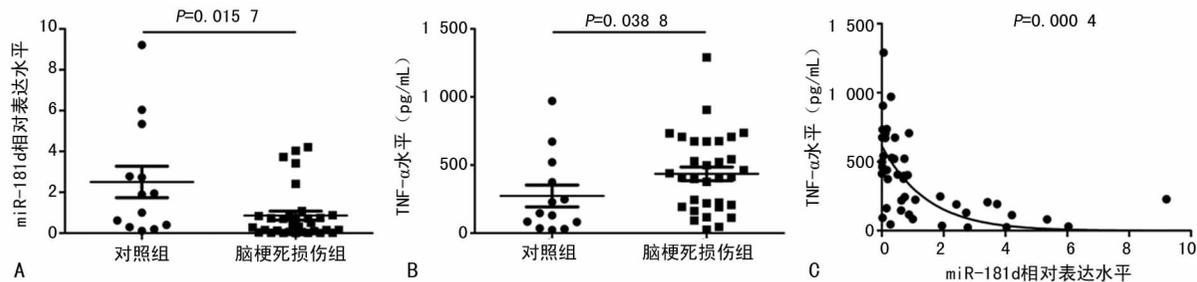
1.2.3 实时定量反转录 PCR(qRT-PCR) 从血清中提取的总 RNA 用 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit(美国 Applied biosystem 公司)和 miR-181d 特异性反转录引物反转录成特异性产物。然后使用 TaqMan miR-181d 探针(美国 Applied biosystem 公司)在 IQ5 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行 qRT-PCR。整个反应体系严格按照说明书进行。

1.2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA) 使用 Abcam 公司试剂盒(人 TNF- α ELISA 试剂盒 ab46087;小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 ab208348)检测。使用每个样品的 3 个平行样进行统计分析。

1.2.5 报告基因质粒构建 包含 miR-181d 潜在结合位点的人 TNF- α 3'-UTR 序列是通过 PCR 扩增获得,以 HEK-293T 细胞的 DNA 为模板。突变质粒采用上海碧云天生物技术有限公司的快速突变系统生成。PCR 产物通过 SgfI 和 PmeI 位点连接到 psiCHECK-2 载体上(美国 Promega 公司)。插入片段的序列通过 DNA 测序证实。所用引物:TNF- α 3'-UTR-WT-正向:5'-GAC CGC GAT CGC CCA CTA AGA ATT CAA ACT G-3';TNF- α 3'-UTR-WT-反向:5'-CTT AGT TTA AAC CGA TTA CAG ACA CAA CT-3';TNF- α 3'-UTR-Mut-正向:5'-TTT ATT ATT TAT TTA TTT ACA GAA CTT ACA ATT TAT TTG-3';TNF- α 3'-UTR-Mut-反向:5'-CAA ATA AAT TGT AAG TTC TGT AAA TAA ATA AAT AAT AAA -3'。

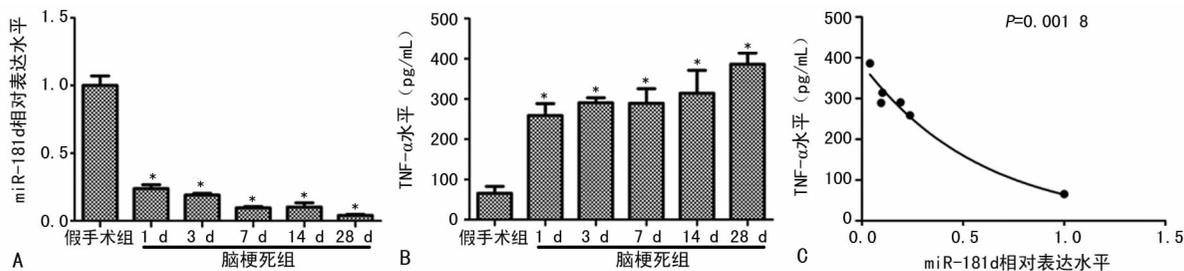
1.2.6 荧光素酶报告基因检测实验 将含 TNF- α 3'-UTR 或其突变体的报告基因载体的 psiCHECK-2 质粒和 miR-181d 或对照模拟物一起,使用脂质体 2000 试剂(美国 Invitrogen 公司)瞬时转染到 HEK-293T 细胞中。48 h 后,用被动裂解缓冲液 100 μ L(美国 Promega 公司)裂解细胞,然后按照 Promega 双荧光素酶报告系统试剂盒说明书(美国 Promega 公司)检测裂解液的荧光素酶表达水平(体系:20 μ L;使用贝特霍尔 FB12 光度计测量)。内参为海肾荧光素酶。

1.2.7 蛋白质印迹法(Western blot) 细胞吸去上层细胞培养基后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 遍,然后加入 RIPA 裂解液,98 °C 变性 10 min;用制备好的 10%丙烯酰胺(SDS)胶板电泳(90 V 电压);用硝酸纤维素膜转膜过夜(100 V,4 °C);脱脂牛奶常温封闭 2 h;用含 2%牛奶的 PBS 配置一抗过夜孵育;1% TBST 洗



A: 血清 miR-181d 表达水平比较; B: 血清 TNF- α 表达水平比较; C: miR-181d 和 TNF- α 表达水平的相关性分析

图 1 脑梗死组与对照组血清 miR-181d 和 TNF- α 的表达及相关性分析



A: 血清 miR-181d 表达水平比较; B: 血清 TNF- α 表达水平比较; C: 小鼠 MCAO 模型血清 miR-181d 和 TNF- α 表达水平的相关性分析; *: $P < 0.01$, 与假手术组比较

图 2 小鼠 MCAO 模型血清 miR-181d 和 TNF- α 的表达和相关性分析

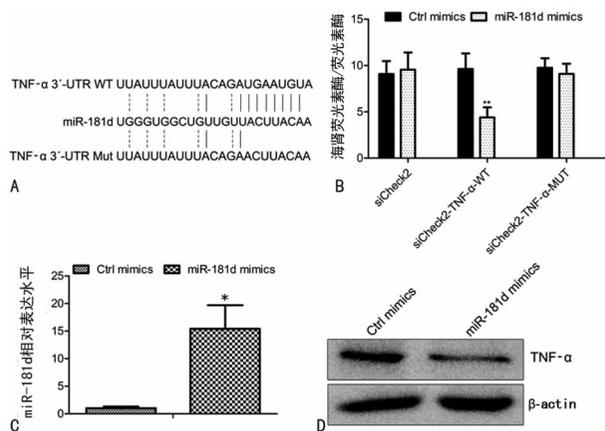
膜 3 遍, 每遍 10 min, 用含 2% 牛奶的 PBS 配置二抗, 和膜室温孵育 2 h; 再用 1% TBST 清洗膜 3 遍, 每遍 15 min。加入辣根过氧化物酶底物, 反应 2 min, 用上海勤翔 ChemiScope 6000 化学发光系统曝光。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验。miR-181d 和 TNF- α 的相关性分析采用 Pearson 相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-181d、TNF- α 在脑梗死损伤组与对照组血清的表达变化及相关性 脑梗死损伤组患者血清 miR-181d 表达水平低于对照组 ($P = 0.0157$), 见图 1A。与对照组比较, 脑梗死损伤组患者血清 TNF- α 表达水平升高 ($P = 0.0388$), 见图 1B。进一步对所有血清标本 miR-181d 和 TNF- α 表达水平进行相关性分析, 结果表明 TNF- α 和 miR-181d 的表达水平呈负相关 ($r = -0.7038$, $P = 0.0004$), 见图 1C。

2.2 miR-181d 和 TNF- α 在 MCAO 模型小鼠血清中的表达变化及相关性 利用 qRT-PCR 和 ELSIA 检测假手术组和不同时段脑梗死组小鼠血清 miR-181d 和 TNF- α 的表达水平。结果表明, 脑梗死组小鼠血清 miR-181d 表达水平低于假手术组, 并且 miR-181d 表达水平随着脑梗死发生时间的不断增加而降低, 见图 2A。与之相反, TNF- α 在脑梗死组小鼠血清中的表达水平高于假手术组, 并且随着脑梗死发生时间的不断增加而升高, 见图 2B。在小鼠 MCAO 模型血清中, miR-181d 和 TNF- α 的表达水平呈负相关 ($r = 0.9653$, $P = 0.0018$), 见图 2C。



A: 人类 TNF- α 3'-UTR 的 miR-181d 结合位点模式图, 突变序列显示在下方; B: 报告基因实验检测 miR-181d 与 TNF- α 3'-UTR 的结合; C: 100 nmol/L miR-181d 的类似物转染到野生型的 THP-1 细胞中, qRT-PCR 检测 miR-181d 的表达; D: miR-181d 的类似物转染到野生型的 THP-1 细胞中, Western blot 检测 TNF- α 的表达; *: $P < 0.01$, 与 Ctrl mimics 比较

图 3 miR-181d 通过结合到 3'-UTR 抑制 TNF- α 表达

2.3 miR-181d 对 TNF- α 的抑制作用 通过在线分析软件 Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_71/) 搜索发现 miR-181d 潜在与 TNF- α 的 3'UTR 的 500~507 bp 位置发生结合, 且进化上高度保守 (图 3A)。接下来构建了野生型和突变型的 TNF- α 3'UTR 片段 (针对 miR-181d 潜在结合位点), 并将它们连接到报告基因质粒 psiCHECK2 上。然后同时转染 miR-181d 模拟物或对照模拟物及含 TNF- α 3'UTR 的报告基因质粒于 HEK-293T 细胞中。检测结果表明, miR-181d 模拟物可以显著抑制含野生型 TNF- α 3'UTR 的报告基因的活性, 表明 miR-181d 可以与 TNF- α 3'UTR 结合。但是当 miR-181d 的潜在

结合位点发生突变后,抑制作用减弱,说明这个结合位点对 miR-181d 来说,是十分重要的(图 3B)。进一步在 THP-1 细胞中过表达 miR-181d(图 3C),发现 TNF- α 的蛋白水平降低(图 3D)。

3 讨 论

miRNA 在脑发育和功能上起着十分关键的作用,血液循环中的大部分 miRNA 并不是从破碎的组织细胞被动漏出,而是从受损组织细胞主动分泌进入血液循环,并进入靶细胞发挥作用。本研究中结果显示,脑梗死患者血清 miR-181d 的表达水平明显低于健康对照人群。此外,本研究成功建立了小鼠 MCAO 模型,在 MCAO 模型小鼠中血清 miR-181d 水平明显低于假手术组,并且随着病程的延长持续降低。总的来说,这些发现证实血清 miR-181d 的下调可以作为脑梗死的一个生物标志物。本研究的不足之处在于没有确定血清 miR-181d 下调的原因。另一方面,由于本研究所使用的临床病例数较少,其结论的推广确立有待扩大样本的前瞻性临床研究证实。

研究表明炎症是脑梗死的关键因素^[8],白细胞介素(IL)-1、IL-2、TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-12、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)等炎性因子均参与了脑梗死的发生、发展^[9-12];脑梗死患者血清 TNF- α 、IL-2、TGF- β 1 等水平明显升高, TNF- α 、IL-2、TGF- β 1 可促进脑组织的炎性反应及血管斑块的形成,上述炎性因子的表达水平与病情严重程度及梗死面积相关。本研究在脑梗死患者血清标本中同样检测到 TNF- α 表达水平升高。此外,在小鼠 MCAO 模型中血清 TNF- α 水平亦表现为上调。相关性分析显示,在临床样本和小鼠模型中,miR-181d 和 TNF- α 的表达均呈明显负相关。说明 miR-181d 和 TNF- α 之间存在着潜在的调控关系。关于这一点,在其他的研究和体系中也得到证实。在星形胶质细胞中,HUTCHISON 等^[13]研究发现敲除 miR-181 可以增强高迁移率组蛋白 B1(HMGB1)的产生并促使脂多糖(LPS)诱导产生多种炎性因子,同时过表达 miR-181 会导致炎症抑制因子 IL-10 的表达升高。DAN 等^[14]研究发现在脓毒症多导致的免疫麻痹过程中,乌本昔可以通过诱导 miR-181 的转录,导致 TNF- α mRNA 水平的降解和蛋白水平的下调。然而,也有文献报道,miR-181 和 TNF- α 在功能上也有可能存在正向的协同作用。GHORBANI 等^[15]发现在小鼠成纤维细胞中,过表达 miR-181 可以增强 TNF- α 所诱导的线粒体膜电位的降低和随后发生的细胞凋亡。本研究同时利用双荧光酶报告基因和 Western blot 实验证明 miR-181d 可以通过与 TNF- α mRNA 的 3'-UTR 区域相结合来抑制 TNF- α 的表达。说明炎性细胞是血清中 miR-181d 作用的靶细胞之一。在正常的生理过程中,miR-181d 的表达抑制炎性反应的发生。而在脑缺血疾病发生时,miR-181d 的表达出现下调,血清中 miR-181d 的

表达也随之降低,后者的表达下降会导致炎性细胞中 TNF- α 表达的升高。也就是说,miR-181d 的表达变化不仅可以作为临床脑缺血性疾病的诊断和预后指标。同时过表达 miR-181d 不失为治疗和改善脑梗死的一种潜在选择。在后续的研究中,需要利用细胞和动物实验进一步明确 miR-181d 在脑梗死过程中所发挥的功能。另一方面,miR-181d 作为 miRNA,可以参与调控多种信号通路的转导,这方面有待进一步的研究。

miR-181 家族共有 miR-181a、miR-181b、miR-181c 和 miR-181d 四个 miRNA。它们分别由不同染色体区域转录而成,且序列上高度相似。有关 4 种亚型在脑缺血性疾病研究中的深入程度有所不同,以 miR-181a 的研究最多。如小鼠脑卒中后,miR-181a 抑制剂的治疗可以改善小鼠的行为学指标^[5]。而 OUYANG 等^[16]却发现 miR-181a 可以通过靶向 GRP78 使脑缺血病情恶化。此外,MA 等^[17]研究表明在临床脑卒中患者中 miR-181c 的表达升高,同时 miR-181c 可以促进神经瘤母细胞 Neuro-2a 的凋亡。在小鼠 MCAO 模型中,miR-181 类似物的处理可以降低小神经胶质瘤细胞的激活并促进凋亡细胞的表达^[7]。本研究检测到脑梗死患者和小鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型血清 miR-181d 表达下调,血清 TNF- α 表达升高,并进一步在人胚肾细胞(HEK-293T)细胞和 THP-1 细胞中证明 miR-181d 可以抑制 TNF- α 的表达。结合前述报道,系统地阐明了 miR-181 家族各成员在脑缺血性疾病中的表达谱及其功能的差异。

参考文献

- [1] KATSURA K, SUDA S, ABE A, et al. Brain protection therapy in acute cerebral infarction [J]. *J Nippon Med Sch*, 2012, 79(2): 104-110.
- [2] KATSANO A H, KOSMIDO M, GIANNOPOULOS S, et al. Cerebral arterial infarction in inflammatory bowel diseases [J]. *Eur J Intern Med*, 2014, 25(1): 37-44.
- [3] ZHU R, LIU X, ZHU Y, et al. MiRNAs: potential diagnostic and therapeutic targets for cerebral ischemia [J]. *Neurol Res*, 2016, 38(1): 86-92.
- [4] BLONDAL T, JENSBY NIELSEN S, BAKER A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids [J]. *Methods*, 2013, 59(1): S1-6.
- [5] XU L J, OUYANG Y B, XIONG X, et al. Post-stroke treatment with miR-181 antagomir reduces injury and improves long-term behavioral recovery in mice after focal cerebral ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2015, 264: 1-7.
- [6] PENG Z, LI J, LI Y, et al. Downregulation of miR-181b in mouse brain following ischemic stroke induces neuroprotection against ischemic injury through targeting heat shock protein A5 and ubiquitin carboxyl-terminal hydro-

- lase isozyme L1[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(10):1349-1362.
- [7] ZHANG L, DONG L Y, LI Y J, et al. The microRNA miR-181c controls microglia-mediated neuronal apoptosis by suppressing tumor necrosis factor[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9:211.
- [8] RIEDEL B, BROWNE K, SILBERT B. Cerebral protection; inflammation, endothelial dysfunction, and postoperative cognitive dysfunction[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2014, 27(1):89-97.
- [9] YAMASAKI Y, ITOYAMA Y, KOGURE K. Involvement of cytokine production in pathogenesis of transient cerebral ischemic damage[J]. *Keio J Med*, 1996, 45(3):225-229.
- [10] STOLL G, JANDER S, SCHROETER M. Cytokines in CNS disorders; neurotoxicity versus neuroprotection[J]. *J Neural Transm Suppl*, 2000, 59:81-89.
- [11] ZHOU Y X, WANG X, TANG D, et al. IL-2mAb reduces demyelination after focal cerebral ischemia by suppressing CD8⁺ T cells[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(4):532-543.
- [12] CRUZ Y, GARCIA E E, GALVEZ J V, et al. Release of interleukin-10 and neurotrophic factors in the choroid plexus: possible inductors of neurogenesis following co-
- polymer-1 immunization after cerebral ischemia[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(10):1743-1752.
- [13] HUTCHISON E R, KAWAMOTO E M, TAUB D D, et al. Evidence for miR-181 involvement in neuroinflammatory responses of astrocytes[J]. *Glia*, 2013, 61(7):1018-1028.
- [14] DAN C, JINJUN B, ZI-CHUN H, et al. Modulation of TNF- α mRNA stability by human antigen R and miR181s in sepsis-induced immunoparalysis[J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(2):140-157.
- [15] GHORBANI S, TALEBI F, GHASEMI S, et al. miR-181 interacts with signaling adaptor molecule DENN/MADD and enhances TNF-induced cell death[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0174368.
- [16] OUYANG Y, LU Y, YUE S, et al. miR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1):555-563.
- [17] MA Q, ZHAO H, TAO Z, et al. MicroRNA-181c exacerbates brain injury in acute ischemic stroke[J]. *Aging Dis*, 2016, 7(6):705-714.

(收稿日期:2018-10-08 修回日期:2018-11-23)

(上接第 1093 页)

- [14] HUANG D W, SHERMAN B T, TAN Q, et al. DAVID Bioinformatics Resources; expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Web Server issue):W169-175.
- [15] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(Database issue):D362-368.
- [16] KOBAYASHI S, UCHIDA K, YAYAMA T, et al. Motor neuron involvement in experimental lumbar nerve root compression; a light and electron microscopic study[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32(6):627-634.
- [17] ALAMIN T F, MUNOZ M, ZAGEL A, et al. Ribosomal PCR assay of excised intervertebral discs from patients undergoing single-level primary lumbar microdiscectomy[J]. *Eur Spine J*, 2017, 26(8):2038-2044.
- [18] SLOMNICKI L P, PIETRZAK M, VASHISHTA A, et al. Requirement of neuronal ribosome synthesis for growth and maintenance of the dendritic tree[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11):5721-5739.
- [19] POIROT O, TIMSIT Y. Neuron-like networks between ribosomal proteins within the ribosome[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:26485.
- [20] MESKAUSKAS A, PETROV A N, DINMAN J D. Identification of functionally important amino acids of ribosomal protein L3 by saturation mutagenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(24):10863-10874.
- [21] KOBAYASHI M, OSHIMA S, MAEYASHIKI C, et al. The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36780.
- [22] ARTERO-CASTRO A, PEREZ-ALEA M, FELICIANO A, et al. Disruption of the ribosomal P complex leads to stress-induced autophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(9):1499-1519.
- [23] XIAO L, DING M, FERNANDEZ A, et al. Curcumin alleviates lumbar radiculopathy by reducing neuroinflammation, oxidative stress and nociceptive factors[J]. *Eur Cell Mater*, 2017, 33:279-293.
- [24] CHANG F, ZHANG T, GAO G, et al. Therapeutic effect of percutaneous endoscopic lumbar discectomy on lumbar disc herniation and its effect on oxidative stress in patients with lumbar disc herniation[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1):295-299.
- [25] GUTERL C C, SEE E Y, BLANQUER S B, et al. Challenges and strategies in the repair of ruptured annulus fibrosus[J]. *Eur Cell Mater*, 2013, 25:1-21.
- [26] HIROSE Y, CHIBA K, KARASUGI T, et al. A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(5):1122-1129.

(收稿日期:2018-10-04 修回日期:2018-11-27)