

基础研究

转化生长因子 $\beta 1$ 对大鼠髓核细胞
凋亡影响的实验研究刘汝银¹, 岳宗进¹, 彭晓艳², 王新立¹, 冯仲锴¹

(1 河南省中医院脊柱科; 2 护理科 450002 郑州市)

【摘要】目的:探讨转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 对大鼠髓核细胞凋亡的影响以及其作用机制。**方法:**采用序贯酶消化法分离培养 SD 大鼠髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs), 实验用第 3 代培养的 NPCs, 分为 6 组: A 组, 空白对照组, 用 DMEM 培养基常规培养, 不加任何处理; B 组, 用含有终浓度为 20ng/ml 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 的 DMEM 培养基培养; C 组, 用含有终浓度为 50ng/ml TNF- α 的 DMEM 培养基培养; D 组, 用含有终浓度为 100ng/ml TNF- α 的 DMEM 培养基培养; E 组, 用同时含有终浓度为 100ng/ml TNF- α 和 10ng/ml TGF- $\beta 1$ 的 DMEM 培养基培养; F 组, 在 E 组培养基的基础上加 TGF- $\beta 1$ /smad 通路抑制剂 SB431542 (设置终浓度为 10 μ mol/L) 进行培养。培养 12h 后, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法检测细胞增殖活性, 逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测各组细胞中基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinases 3, MMP3)、凋亡相关蛋白 (bcl-2-associated x protein, Bax)、蛋白聚糖 (ACAN)、II 型胶原 (Collagen II) mRNA 相对表达量, Western blot 检测各组细胞中 MMP3、Bax、ACAN、Collagen II、磷酸化的 smad3 蛋白 (phosphorylate drosophila mothers against decapentaplegic protein 3, p-smad3) 和 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 蛋白表达量。**结果:**与 A 组相比, 不同剂量的 TNF- α (B~D 组) 均能够促进 MMP3 (B~D 组依次为 0.652+0.015、0.899+0.018、1.026+0.023) 和 Bax (B~D 组依次为 0.725+0.058、0.928+0.018 和 1.138+0.019) 的表达, 诱导髓核细胞的凋亡, 并且呈现剂量依赖性关系。与 D 组相比, E 组 MMP3 (0.568+0.015) 和 Bax (0.626+0.024) 表达下调, ACAN (1.056+0.014)、Collagen II (1.098+0.032)、p-smad3 和 Runx2 表达量增高, 差异有统计意义 ($P < 0.05$)。与 E 组相比, F 组 MMP3 (1.015+0.015) 和 Bax (1.126+0.024) 表达上调, ACAN (0.314+0.023)、Collagen II (0.299+0.019)、p-smad3 和 Runx2 表达量下降, 差异有统计意义 ($P < 0.05$)。**结论:**TGF- $\beta 1$ 可能是通过激活 smad/Runx2 通路来拮抗 TNF- α 诱导的大鼠髓核细胞凋亡。

【关键词】转化生长因子 $\beta 1$; 信号转导蛋白 smad/Runt 相关转录因子; 肿瘤坏死因子 α ; 髓核细胞; 凋亡; 大鼠
doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.02.10

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-02-0156-06

Influence of transforming growth factor - $\beta 1$ on nucleus pulposus cell apoptosis/LIU Ruyin, YUE Zongjin, PENG Xiaoyan, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(2): 156-161

【Abstract】Objectives: To explore the effect of TGF- $\beta 1$ on nucleus pulposus cell apoptosis and the potential mechanisms. **Methods:** Nucleus pulposus cells (NPCs) were isolated from Sprague Dawley rats and cultured by the sequential enzyme method. Cells at passage 3 were divided into six groups: group A, cultured in DMEM with no other treatment; group B, cultured in DMEM with 20ng/ml TNF- α ; group C, cultured in DMEM with 50ng/ml TNF- α ; group D, cultured in DMEM with 100ng/ml TNF- α ; group E, cultured in DMEM with 100ng/ml TNF- α and 10ng/ml TGF- $\beta 1$; group F, cultured in DMEM with 100ng/ml TNF- α , 10ng/ml TGF- $\beta 1$ and 10 μ mol/L SB431542. The cell counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell proliferation activity after culturing for 12h, transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was reversed and Western blot were used to detect the expression of matrix metalloproteinases 3 (MMP3), bcl-2-associated x protein (Bax), ACAN, Collagen II, phosphorylate drosophila mothers against decapentaplegic protein 3 (p-smad3) and runt-related

第一作者简介: 男 (1973-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱相关疾病临床与科研

电话: (0371) 60977103 E-mail: huiqingguoh@163.com

通讯作者: 岳宗进 E-mail: shidasda@163.com

transcription factor 2(Runx2). **Results:** Compared with group A, the different concentrations of TNF- α groups (group B-D) promoted the expressions of MMP3(group B-D respectively: 0.652+0.015, 0.899+0.018, 1.026+0.023 respectively) and Bax(0.725+0.058, 0.928+0.018, 1.138+0.019 respectively), and promoted apoptosis in a dose-dependent manner. Compared with group D, the expressions of MMP3(0.568+0.015) and Bax(0.626+0.024) were significantly inhibited in group E, while the expressions of ACAN (1.056+0.014), Collagen II (1.098+0.032), p-smad3 and Runx2 significantly increased, the difference was statistically significant($P<0.05$). Compared with group E, the expressions of MMP3(1.015+0.015) and Bax(1.126+0.024) significantly increased in group F, while the expression of ACAN (0.314+0.023), Collagen II (0.299+0.019), p-smad3 and Runx2 were significantly inhibited, the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusions:** TGF- β 1 can activate smad/Runx2 pathway and antagonize TNF- α induced nucleus pulposus cell apoptosis.

[Key words] Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1); Drosophila mothers against decapentaplegic protein/ Runt-related transcription factor 2 (Smad/Runx2); Tumor necrosis factor- α (TNF- α); Nucleus pulposus cells; Apoptosis

[Author's address] The Department of Spine Section in Hospital of Traditional Chinese Medicine of Henan Province, 450002, Zhengzhou, China

随着我国逐步进入到老龄化社会, 脊柱退行性疾病呈逐年增加趋势, 导致人们生活及生命质量的下降^[1]。脊柱的退变主要分为: 椎间盘退变、椎体退变、关节突关节退变、肌腱和韧带的退变, 其中椎间盘退变是脊柱退行性疾病最主要的病理改变。椎间盘是由髓核(nucleus pulposus, NP)、纤维环(anulus fibrosus, AF)和软骨终板(cartilage end-plate, CEP)构成。髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)在维持椎间盘结构、功能的完整性方面起到核心作用^[2]。研究^[3,4]证实椎间盘退行性疾病中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)呈高表达状态, 作为肿瘤坏死因子超家族成员之一, TNF- α 是强有力的炎性细胞因子, 能够促进椎间盘细胞产生基质金属蛋白酶-3(MMP-3), 降解细胞外基质中的胶原以及糖蛋白, 诱导NPCs的凋亡, 进一步加重了椎间盘退变。研究已经表明转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)具有促进骨髓间充质干细胞向NPCs生成的作用, 为椎间盘退变性疾病生物治疗技术提供了一种新的治疗策略^[5,6]。然而, TGF- β 1除了促进髓核细胞的生成之外, 是否能拮抗TNF- α 诱导的髓核细胞凋亡以及相互作用机制尚不明确。因此, 本研究目的是探讨TGF- β 1对髓核细胞凋亡的影响以及其作用机制, 为TGF- β 1治疗椎间盘退变疾病提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3周龄健康清洁级SD大鼠(雌雄各半)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号: HNASLKJ20122049。

1.2 实验试剂

TNF- α 购自美国SelleckBio公司, DMEM培养基和未经灭活的胎牛血清购自澳大利亚Hyclone公司, 辣根过氧化物酶标记的Goat Anti-Rabbit IgG和HRP二抗购自北京康为世纪生物科技有限公司, MMP-3抗体、Bax抗体、蛋白聚糖(ACAN)抗体、II型胶原(Collagen II)抗体、p-smad3抗体和Runx2抗体均购自美国Sigma公司。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自南京恩晶(EnoGene)生物科技有限公司。

1.3 NPCs的分离与培养

采用序贯酶消化法分离培养NPCs。将健康的250g左右SD大鼠2只(雌雄各一只)采用10%水合氯醛溶液按照0.3ml/100g剂量腹腔注射麻醉法处死, 75%乙醇浸泡10min消毒, 转入超净台内, 在无菌条件下取下大鼠胸腰段脊柱, 彻底清除脊柱周围肌肉组织, 暴露脊柱之间的椎间盘组织。用眼科剪将髓核组织剪成约1×1×1mm大小后, 放入盛有10ml 2% II型胶原酶的100ml烧杯中, 磁力搅拌器搅拌约1h, 待组织完全溶解; 加入等体积含10%胎牛血清(fetal calf serum, FBS)的DMEM培养基中止, 以离心半径9cm、1200r/min离心10min; 弃上清, 重悬细胞, 按1×10⁶个/ml接种至底面积25cm²细胞培养瓶, 加入含10% FBS的DMEM培养基6ml, 37℃、5%CO₂孵箱中培养; 3d后倒置相差显微镜观察细胞贴壁生长情况; 隔

天换液, 10~14d 当细胞接近 90% 融合时行传代培养。

1.4 NPCs 的鉴定

采用 II 型胶原、低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 免疫荧光细胞化学染色进行 NPCs 表型鉴定。取第 3 代细胞以 1×10^4 个/ml 密度接种于表面涂有多聚赖氨酸的消毒盖玻片上, 每片接种 2ml, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 24h, 收集细胞爬片, 4% 多聚甲醛固定液固定 30min, 0.3% Triton X-100 泡 15min 破细胞膜, 微波修复, 非免疫山羊血清封闭, 分别各加入 1:200 稀释的兔抗人 II 型胶原多克隆抗体和兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体 100 μl , 0.02mmol/L PBS 替代抗体作为阴性对照, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 第 2 天加入 1:500 稀释的 CY3 标记羊抗兔 IgG 100 μl 、30min, 荧光显微镜系统、数码彩色 CCD 摄像机及显微图像分析系统观察。

1.5 细胞分组

取第 3 代 NPCs, 常规消化后, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 接种于 24 孔板中。DMEM 培养液常规培养 24h 后吸出培养液, 并按以下不同处理方式分组: A 组, 空白对照组, DMEM 培养液常规培养, 不加任何处理; B 组, 加入含有终浓度为 20ng/ml TNF- α 的 DMEM 培养液; C 组, 加入含有终浓度为 50ng/ml TNF- α 的 DMEM 培养液; D 组, 加入含有终浓度为 100ng/ml TNF- α 的 DMEM 培养液; E 组, 在 D 组培养液的基础上再加入 TGF- β 1, 使其终浓度为 10ng/ml; F 组, 在 E 组培养液的基础上再加入 TGF- β 1/smud 通路抑制剂 SB431542, 使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。各组细胞诱导培养 12h, 显微镜下观察细胞形态及密度变化。同时, 含有 TGF- β 1 两组细胞需要诱导培养 21d 后用于实验, 诱导期间每两天更换一次各自的诱导液。

1.6 CCK-8 法检测各组 NPCs 增殖活性

取各组诱导培养 NPCs 调整浓度为 1×10^5 个/ml 并接种于 96 孔平底板, 共 6 组, 每组 12 孔, 每孔加入 Cell-Counting Kit8 (CCK-8) 细胞活力检测试剂, 每孔 10 μl , 置于 5% CO_2 恒温培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4h 后酶标仪下检测波长 450nm 处的吸光度值 (OD 值)。

1.7 RT-PCR 检测各组 MMP3、Bax、蛋白聚糖 (ACAN)、II 型胶原 (Collagen II) mRNA 表达量

表 1 基因引物序列表

Table 1 The primer sequence of gene

基因名称 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 (bp) Product length
MMP3	F: 5'-CCACTGGAGAGGACTGCGTAG-3' R: 5'-GGTCTGTGCAAGTGATTGAG-3'	452
Bax	F: 5'-AGGAAGCTGGCAGACCAGTACC-3' R: 5'-GGGTCTCTTCTCGCTCTCGTTCA-3'	387
Collagen II	F: 5'-GGAAGAGTGGAGACTACTGGATTGAC-3' R: 5'-TCCATGTTGACAGAAAACCTTCA-3'	558
ACAN	F: 5'-GGTATTGCTGGCTGGTATCTTT-3' R: 5'-CTGTCTTGAGGGCATCTTCACT-3'	411
β -actin	F: 5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3' R: 5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3'	225

各组细胞诱导完成后, 按照 GREEN spin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书中步骤来提取各组细胞中的总 RNA。采用水平式琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 按照 Takara RNA PCR Kit (AMY) Ver 3.0 说明书操作进行反转录。用 RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 然后以 cDNA 的第 1 链作为模板进行 PCR 扩增。RT-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min, 随后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45s, 共进行 32 个循环, 再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析、DNA 吸光度扫描检测; 显色条带图像分析系统 (Alpha Imager 2000) 检测其积分吸光度值, 与内参 β -actin 条带的比值为 mRNA 表达水平参数。所用引物均由上海生工有限公司合成。具体引物序列见表 1。

1.8 Western blot 检测 MMP3、Bax、蛋白聚糖 (ACAN)、II 型胶原 (Collagen II)、p-smad3 和 Runx2 蛋白表达量

诱导完成后收获各组细胞, 加入裂解液提取蛋白, BCA 法总蛋白定量。调整上样量为 25 μg 总蛋白/样本, 上样, 电泳, 转膜, 封闭过夜。封闭完毕后 PBS 洗膜 5 次, 分别加一抗 (所用的一抗稀释比例分别为抗体 MMP-3 1:1000; 抗体 Bax 1:2000; 抗体 ACAN 1:1000; 抗体 Collagen II 1:1000; 抗体 p-smad3 1:1000; 抗体 Runx2 1:1000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1.5h, PBS 洗膜 5 次, 加辣根过氧化物酶标记二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1h, PBS 洗膜 5 次。染色, 曝光, 采用 BIORAD GELDOC XR 凝胶成像系统依次显影、定影, Quantity One Basic 软件分析胶片上蛋白条带。本步实验重复 3 次。

1.9 统计学方法

所有数据采用 SPSS 13.0 软件处理, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 统计学分析多样本比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NPCs II 型胶原免疫组化染色鉴定及纯度分析

第 3 代 NPCs 细胞经过 II 型胶原免疫组化染色后呈现阳性表达, 细胞浆被染成棕黄色, 经苏木精染色后细胞核被染成淡蓝色(图 1)。II 型胶原免疫组化染色阳性细胞的比例为 $(98.12\pm 0.56)\%$ 。

2.2 各剂量 TNF- α 对髓核细胞增殖活性的影响

与 A 组 (0.867 ± 0.022) 相比, 从低到高浓度 TNF- α 组(B~D 组)细胞在波长 450nm 下 OD 值均明显逐渐降低($P<0.05$), 依次为 B 组 (0.724 ± 0.019) 、C 组 (0.578 ± 0.035) 、D 组 (0.356 ± 0.024) , 组间差异有统计学意义。

2.3 各剂量 TNF- α 对 NPCs 中 MMP-3 和 Bax 表达的影响

与 A 组相比, 从低到高浓度 TNF- α 组细胞中 MMP3 和 Bax 的基因表达量和蛋白表达量均明显增加($P<0.05$), 组间差异有统计学意义(表 2 和图 2)。

2.4 TGF- β 1 对 MMP3、Bax、ACAN、Collagen II、p-smad3 和 Runx2 的 mRNA 和蛋白表达的影响

与 D 组相比, E 组细胞在波长 450nm 下吸光值 (0.989 ± 0.026) 增加($P<0.05$), MMP3 和 Bax 的基因表达量和蛋白表达量均明显降低($P<0.05$), ACAN 和 Collagen II 的基因表达量和蛋白表达量均明显增加($P<0.05$), p-smad3 和 Runx2 的蛋

白表达量也明显增加($P<0.05$), 组间差异有统计学意义(表 2 和图 3)。

与 E 组相比, F 组在波长 450nm 下吸光值 (0.356 ± 0.025) 减少, MMP3 和 Bax 的基因表达量和蛋白表达量均明显增加($P<0.05$), ACAN 和 Collagen II 的基因表达量和蛋白表达量均明显减少($P<0.05$), p-smad3 和 Runx2 的蛋白表达量也明显减少($P<0.05$), 组间差异有统计学意义(表 2 和图 4)。

3 讨论

椎间盘退变作为腰腿痛常见的致病因素, 其基础研究一直是脊柱外科领域的研究重点。造成椎间盘退行性变的主要原因通常认为是中央髓核的退变所致, 细胞减少且功能退化, 髓核脱水, 合成蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白能力减弱, 且难以自行逆转^[7,8]。由于髓核细胞在维持椎间盘结构完整性和功能性方面起到核心作用已经被公认, 因此髓核细胞凋亡和增殖平衡的破坏和细胞分泌某种基质蛋白的减少在椎间盘退变中起到非常重要的作用^[9]。椎间盘细胞的过度凋亡导致细胞数目和功能缺失, 同时继发的基质合成与分解代谢失衡也加剧了椎间盘退变。

TNF- α 是肿瘤坏死因子超家族成员, 是强有力的炎性细胞因子。大量研究表明 TNF- α 在椎间盘所致腰痛发病过程中起重要作用^[10]。Weiler^[11]等认为 TNF- α 是一种重要的前炎性因子, 有足够的证据表明其参与脊柱退行性疾病的过程。并且也有研究证实在椎间盘退行性疾病中 TNF- α 的高表达状态。因此, TNF- α 受体拮抗剂或许能够成为治疗椎间盘退变疾病的新方法。已经证实 TGF- β 1 在低氧条件下可以将 BMSCs 在体外诱

表 2 RT-PCR 检测各组中 MMP-3、Bax、ACAN 和 Collagen II mRNA 及蛋白表达

Table 2 RT-PCR analyses of the expression of MMP3, Bax, ACAN and Collagen II in every group

	mRNA				蛋白(Protein)			
	MMP-3	Bax	ACAN	Collagen II	MMP-3	Bax	ACAN	Collagen II
A组(Group A)	0.359 $\pm$ 0.012	0.410 $\pm$ 0.026	0.520 $\pm$ 0.014	0.493 $\pm$ 0.046	0.350 $\pm$ 0.011	0.412 $\pm$ 0.022	0.518 $\pm$ 0.013	0.490 $\pm$ 0.041
B组(Group B)	0.652 $\pm$ 0.015 ^①	0.725 $\pm$ 0.058 ^①	—	—	0.649 $\pm$ 0.011 ^①	0.724 $\pm$ 0.049 ^①	—	—
C组(Group C)	0.899 $\pm$ 0.018 ^①	0.928 $\pm$ 0.018 ^①	—	—	0.899 $\pm$ 0.018 ^①	0.924 $\pm$ 0.015 ^①	—	—
D组(Group D)	1.026 $\pm$ 0.023 ^①	1.138 $\pm$ 0.019 ^①	0.326 $\pm$ 0.045 ^①	0.310 $\pm$ 0.042 ^①	1.024 $\pm$ 0.019 ^①	1.132 $\pm$ 0.014 ^①	0.322 $\pm$ 0.039 ^①	0.309 $\pm$ 0.029 ^①
E组(Group E)	0.568 $\pm$ 0.015 ^②	0.626 $\pm$ 0.024 ^②	1.056 $\pm$ 0.014 ^②	1.098 $\pm$ 0.032 ^②	0.565 $\pm$ 0.014 ^②	0.624 $\pm$ 0.022 ^②	1.051 $\pm$ 0.011 ^②	1.094 $\pm$ 0.033 ^②
F组(Group F)	1.015 $\pm$ 0.015 ^③	1.126 $\pm$ 0.024 ^③	0.314 $\pm$ 0.023 ^③	0.299 $\pm$ 0.019 ^③	1.017 $\pm$ 0.012 ^③	1.124 $\pm$ 0.021 ^③	0.319 $\pm$ 0.018 ^③	0.297 $\pm$ 0.017 ^③

注: ①与 A 组相比 $P<0.05$; ②与 D 组相比 $P<0.05$; ③与 E 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with the group A, $P<0.05$; ②Compared with the group D, $P<0.05$; ③ Compared with the group E, $P<0.05$

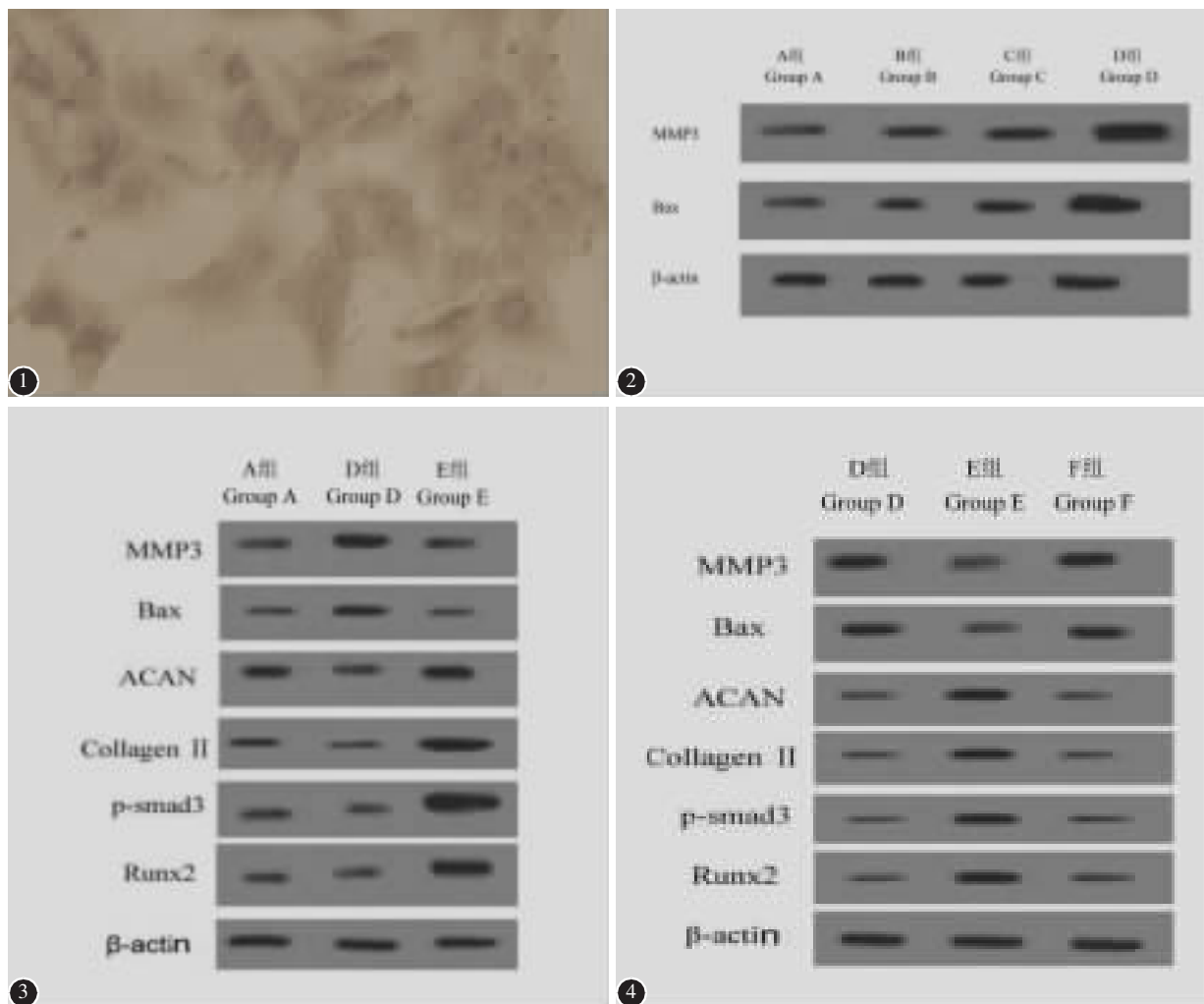


图 1 第 2 代大鼠髓核细胞 II 型胶原免疫组化染色结果(×200) 图 2 Western blot 检测各组细胞 MMP3 和 Bax 蛋白表达 图 3 Western blot 检测 A、D 和 E 组细胞中 MMP3、Bax、ACAN、Collagen II、p-smad 和 Runx2 蛋白表达 图 4 Western blot 检测 D、E 和 F 组细胞中 MMP3、Bax、ACAN、Collagen II、p-smad 和 Runx2 蛋白表达

Figure 1 Type II collagen immunohistochemistry staining of passage 2 NPCs (×200) **Figure 2** Western bolt analyses of the expression of MMP3 and Bax **Figure 3** Western bolt analyses of the expression of MMP3, Bax, ACAN, Collagen II, p-smad and Runx2 in group of A, D and E **Figure 4** Western bolt analyses of the expression of MMP3, Bax, ACAN, Collagen II, p-smad and Runx2 in group of D, E and F

导分化为髓核细胞表型,使其髓核细胞转录产物(蛋白多糖、II 型胶原及 SOX9)表达均显著增高^[12,13],TGF-β1 具有诱导间充质干细胞向髓核细胞分化的能力已经为临床采用细胞治疗技术改善椎间盘退变性疾病提供了良好的理论支持^[14,15]。然而 TGF-β1 在诱导髓核细胞生成的同时,是否对 TNF-α 诱导髓核细胞的凋亡也有影响作用尚未明确。因此,本研究就针对这一作用展开探讨。

本研究中,不同浓度的 TNF-α 处理髓核细胞之后,细胞增殖均受到抑制。另外 TNF-α 能够增

加基质金属蛋白酶 MMP-3 的表达,同时也促进了凋亡相关因子 Bax 的表达,并且呈现一定的剂量依赖性关系。Bax 是细胞凋亡相关因子,Bax 表达的上调会促进髓核细胞凋亡;MMP-3 的高表达会引起细胞外基质的降解,加速了髓核细胞的凋亡。因此,本研究证实了 TNF-α 能够抑制髓核细胞的增殖,促进髓核细胞的凋亡。当 TGF-β1 作用于 TNF-α 处理过的髓核细胞后,细胞增殖活性明显提高,MMP-3 和 Bax 的表达显著降低,髓核细胞中蛋白聚糖和 II 型胶原表达明显增加,同时

smad 和 Runx2 表达上升, 这表明 TGF- β 1 能够促进髓核细胞增殖, 拮抗了 TNF- α 诱导的髓核细胞的凋亡。因此我们推断 TGF- β 1 能够促进髓核细胞增殖, 拮抗 TNF- α 诱导的髓核细胞凋亡, 并且这一作用可能与 TGF- β 1 激活 smad/Runx2 信号通路有关。本研究中继续用 smad 通路抑制剂 SB431542 处理 TGF- β 1+TNF- α 联合处理组细胞之后, 细胞凋亡明显增加, smad 和 Runx2 表达降低, 细胞中蛋白聚糖和 II 型胶原表达明显降低, 这表明 smad/Runx2 信号通路阻断之后, TGF- β 1 不能发挥对 TNF- α 诱导髓核细胞凋亡的拮抗作用。这就进一步验证了 TGF- β 1 对 TNF- α 诱导的髓核细胞凋亡的拮抗作用和 smad/Runx2 信号通路相关。

因此, 我们可以推断 TGF- β 1 通过激活 smad/Runx2 信号通路来拮抗 TNF- α 诱导的髓核细胞凋亡。三研究阐述了 TGF- β 1 增加椎间盘退行性疾病中髓核细胞数目的新机制, 为临床合用肿瘤坏死因子拮抗剂减少类髓核细胞凋亡, 增加髓核细胞数目, 改善椎间盘退行性疾病的病理特征提供新的思路和理论支持。

4 参考文献

1. 刘杰. 腰椎退行性疾病发生机制的生物力学研究进展[J]. 河北医药, 2013, 34(5): 752-754.
2. 王锋, 王运涛, 吴小涛. 髓核细胞修复椎间盘退行性变的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(7): 864-867.
3. Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1[J]. J Orthop Res, 2014, 32(4): 551-556.
4. Mavrogenatou E, Angelopoulou MT, Kletsas D, et al. The catabolic effect of TNF α on bovine nucleus pulposus intervertebral disc cells and the restraining role of glucosamine sulfate in the TNF α -mediated up-regulation of MMP-3[J]. J Orthop Res, 2014, 32(12): 1701-1707.
5. Zhengjun Bian, Jianhua Sun. Development of a KLD-12 polypeptide/TGF- β 1-tissue scaffold promoting the differentiation of mesenchymal stem cell into nucleus pulposus-like cells for treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1093-1103.
6. Morigele M, Shao Z, Zhang Z, et al. TGF- β 1 induces a nucleus pulposus-like phenotype in Notch 1 knockdown rabbit bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(8): 820-825.
7. Kepler CK. The molecular basis of intervertebral disc degeneration[J]. Spine J, 2013, 13(3): 318-330.
8. Liebscher T, Haefeli M, Wuertz K, et al. Age-related variation in cell density of human lumbar intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(2): 153-159.
9. 李海瑞, 郑栋, 江灿, 等. SDF-1 α 改善高糖对骨髓间充质干细胞存活及迁移能力的抑制作用与分子机制的研究[J]. 2015, 36(2): 136-141.
10. 樊国峰, 刘创建. 白细胞介素-1 肿瘤坏死因子- α 与腰椎间盘退变的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(4): 642-646.
11. Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, et al. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls[J]. Spine, 2005, 30(1): 44-53.
12. Sive JI, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs[J]. Mol Pathol, 2002, 55(2): 91-97.
13. Tian B, Li X, Kalita M, et al. Analysis of the TGF β -induced program in primary airway epithelial cells shows essential role of NF- κ B/RelA signaling network in type II epithelial mesenchymal transition[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 529.
14. Si Y, Kim S, Cui X, et al. Transforming growth factor beta (TGF- β) is a muscle biomarker of disease progression in ALS and correlates with smad expression[J]. Plos One, 2015, 10(9): e0138425.
15. Han G, Wang XJ. Roles of TGF β signaling Smads in squamous cell carcinoma[J]. Cell Biosci, 2011, 1: 41.

(收稿日期: 2015-10-29 修回日期: 2016-02-01)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)