

张力性刺激对人髓核细胞表达软骨层间蛋白的调控及机制

何晋月, 孙靖, 路康, 周跃, 潘勇

(第三军医大学新桥医院骨科 400038 重庆市)

【摘要】目的:探索张力性刺激对人椎间盘髓核细胞分泌软骨层间蛋白(cartilage intermediate layer protein, CILP)的影响及其机制。方法:选取 2016 年 6 月在我院因创伤性骨折行 L4/5 椎间盘摘除及相邻椎体融合手术的 1 例 38 岁男性患者的髓核组织作为细胞来源,术前 MRI 示该节段椎间盘组织改良 Pfirrmann 分级为 II 级,分离培养其中的髓核细胞并传代至第 3 代,进行力学实验。使用 Flexcell 5000 系统通过电脑控制气压变化来使载有细胞的塑料膜发生形变,进而对膜载体上的细胞给予不同强度、时长的张力性力学加载。实验组分为 4 组,均以 10%的拉伸量为刺激强度,给予不同时长(6h、12h、24h、48h)的刺激,空白对照组不给予任何刺激。利用 RT-qPCR 技术检测各组 CILP 的基因表达量,选出表达变化最为明显的一组,以该组的刺激时长为限,再将实验组分为 3 组,分别给予不同刺激强度(5%、10%、20%)的张力刺激,空白对照组不给予任何刺激,利用 RT-qPCR 技术检测各组 CILP 的基因表达。选取相比较于对照组 CILP 增长效应最明显的力学强度和时长作为刺激条件,测定髓核细胞在该实验条件下 smad3 的磷酸化程度,并对髓核细胞预先给予 smad3 磷酸化的特异性抑制剂 SIS3 处理后再置于同一力学条件下,以 RT-qPCR 检测 CILP 的基因表达量,以此观察 smad 信号通路是否介导了张力性刺激对于髓核细胞 CILP 表达的调控。实验结果使用配对 *t* 检验以及单因素方差分析进行组间比较。结果:RT-qPCR 结果显示,相较于空白对照组,不同刺激时长的 10%张力性刺激均明显下调了 CILP 的表达,其中在刺激 48h 后对 CILP 的抑制效应达到最大($P<0.05$);5%的张力性刺激 48h 后髓核细胞的 CILP 基因相对表达量与对照组比较无统计学差异($P>0.05$),10%的张力刺激 48h 明显降低 CILP 的表达($P<0.05$),20%的张力刺激 48h 显著提高 CILP 表达量($P<0.05$)且 smad3 的磷酸化水平相对于空白对照明显增高;相对于只给予 20%张力刺激的对照组,先给予 SIS3 预处理再给予相同力学刺激的实验组的 CILP 表达水平显著下调($P<0.05$)。结论:张力性刺激调控髓核细胞的 CILP 表达,调控效应随着刺激时长和刺激强度的变化而不同;smad 信号通路参与高强度的张力性刺激对 CILP 的上调效应。

【关键词】髓核细胞;软骨层间蛋白;张力;Smad 信号通路;椎间盘退变

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2017.02.11

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2017)-02-0169-06

The regulation of cartilage intermediate layer protein expression by tensile loading and the mechanism underlying the process/HE Jinyue, SUN Jing, LU Kang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(2): 169-174

【Abstract】 Objectives: To investigate the mechanic-mediated regulation of cartilage intermediate layer protein (CILP) by tensile loading and the mechanism underlying the process. **Methods:** Nucleus pulposus(NP) tissues were collected from a patient who was 38 years old and undergoing a L4/5 minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion(Mis-TLIF) for traumatic fracture in Xinqiao Hospital in June 2016. MRI prior to the operation showed the degeneration of the intervertebral disc was graded at Pfirrmann II. NP cells were isolated and cultured, cells(passage=3) were prepared for subsequent mechanic-related experiments. By using Flexcell 5000 system, cyclic tensile stimuli(CTS) of various strength(5%, 10%, 20%) at 1.0HZ were delivered to the silicone membranes within the Bioflex culture plates and NP cells adhered to the membranes via computer-controlled negative pressure for different durations(6h, 12h, 24h, 48h), the group without any treatment

第一作者简介:男(1987-),医师,硕士在读,研究方向:脊柱外科

电话:(023)68774328 E-mail:18723476966@163.com

通讯作者:潘勇 E-mail:bravepan@163.com

was regarded as blank control. RT-qPCR was used to analyze the gene expression of CILP in groups. Lastly, the strength and duration were chosen in which CTS displayed its maximal effect as the stimulus condition, and the gene level of CILP was detected with or without the pre-treatment of special inhibitor(SIS3) to confirm whether the smad signaling pathway mediated the up-regulation of CILP by CTS. Statistical comparisons were performed by using a one-way ANOVA test and student *t* test. **Results:** RT-qPCR showed that in all groups treated with 10% CTS, the CILP gene expression was significantly suppressed compared with blank control group($P<0.05$) while reached the bottom at 48h group($P<0.05$). In groups treated with CTS for 48h, 5% CTS exerted an insignificant effect on CILP expression compared with the control ($P>0.05$), while 10% CTS significantly down-regulated CILP expression ($P<0.05$), but 20% CTS markedly increased CILP expression ($P<0.05$), in contrary with the effect by 10% CTS. In addition, compared with the control, 20% CTS led to an increased phosphorylation of smad3. Further, when the smad3 phosphorylation was inhibited by SIS3, the increase of CILP expression by 20% CTS was significantly suppressed ($P<0.05$). **Conclusions:** Tension loading can regulate CILP expression of NP cells, which is relied on the duration and strength. Further, smad signaling pathway mediates the up-regulation of CILP expression by excessive tensional loading.

[Key words] Nucleus pulposus cells; Cartilage intermediate layer protein; Cyclic tensile stretch; Smad pathway; Intervertebral disc degeneration

[Author's address] Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

椎间盘疾病是引起人类腰背痛最主要的病因之一, 而椎间盘退变是导致椎间盘疾病的最重要原因之一^[1]。由于椎间盘组织在正常情况下无神经、血管的分布, 细胞的稳态高度依赖于细胞外微环境的稳定, 因此细胞外环境的改变, 特别是细胞外基质的改变被认为是椎间盘退变中的标志性改变^[1]。在这过程中, 多种细胞因子异常表达, 其中就包括了在椎间盘等软骨组织中特异性表达的蛋白——软骨层间蛋白(cartilage intermediate layer protein, CILP)^[2-4]。在近几年的研究中发现 CILP 的异常高表达与椎间盘的退变存在着关联性^[5-8], 其表达水平随着年龄增大、退变程度加重而升高^[9]。该蛋白作为细胞外基质中的组成成分可特异性地结合某些生长因子, 并拮抗其与细胞膜受体的结合^[9]。高表达 CILP 的转基因小鼠的椎间盘过早地出现了退变的影像学表现^[10,11]。总之, 该蛋白的异常高表达在椎间盘的退变中不仅可作为退变程度的标志物, 更有可能在椎间盘退变的病理过程中发挥了促进性的作用。那么究竟是什么因素导致了该蛋白在退变髓核组织中的异常高表达? 关于该蛋白的调控机制方面的研究鲜有报道。机械性刺激作为影响椎间盘退变的最重要因素之一^[12], 影响着髓核组织内髓核细胞的衰老凋亡、细胞外基质的合成分解代谢等^[13,14], 机械性刺激是否可以调控髓核细胞 CILP 的表达, 从而影响椎间盘退变的病理过程? 本研究拟通过对人的髓核细胞

进行张力性力学加载, 明确张力性刺激是否可以调控 CILP 的表达, 为探索 CILP 在椎间盘的异常高表达提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

DMEM/F12 培养基 (Hyclone), 胰蛋白酶 (Solaibo), 特级胎牛血清 (Gibco), 引物 (上海生工), PCR 试剂盒 (Quickgen), CILP 抗体 (Abcam), smad3 抗体以及磷酸化抗体 (Abcam), 力学加载装置 (Flexercell), RT-PCR 仪 the ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 等。

1.2 髓核细胞的分离培养

选取 2016 年 6 月在我院因创伤性骨折行 L4/5 椎间盘摘除及相邻椎体融合手术的 1 例 38 岁男性患者的髓核组织作为细胞来源, 术前 MRI 示该节段椎间盘组织改良 Pfirrmann 分级为 II 级, 术中取得髓核组织后立即置于无菌生理盐水中, 4h 内转移至已消毒超净台中并置于无菌的培养皿中, 在严格无菌条件下仔细分选透明胶冻样的髓核组织部分, 无菌磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered sal, PBS) 反复冲洗 3~5 次至髓核组织中血液成分清除干净。无菌眼科剪将髓核组织剪成细碎块状, 加入 3~5ml 的胰蛋白酶, 37℃ 恒温箱内过夜, 次日在超净台下用无菌玻璃吸管吸取悬液中的上清部分至无菌离心管内, 以 1200 转/min

离心 5min, 去上清, 以 3~5ml 的含 10% 特级胎牛血清的培养基 DMEM/F12 冲悬后转移至无菌培养皿, 在 5%CO₂ 的恒温箱内培养, 72h 后显微镜可观察到细胞贴壁后行第一次换液, 细胞培养至融合度超过 80% 左右时按 1:2 传代。

1.3 张力性力学加载

在细胞融合度达到 80% 的细胞培养瓶内加入 1~2ml 的胰蛋白酶, 37℃ 下静置 1~2min, 无菌移液管反复轻轻吹打, 待显微镜下见细胞均悬浮于消化液后, 加入等量含血清的 DMEM/F12 培养基终止消化, 1200 转/min 离心 5min, 去上清, 以适量的含有 10% 特级胎牛血清的 DMEM/F12 冲悬, 使细胞浓度达到 5×10⁵/ml, 然后将细胞悬液转移至无菌的 Bioflex 六孔板 (该六孔板底层覆盖有 I 型胶原纤维, 可稳定固定贴壁后的细胞)。在 5% CO₂ 的恒温箱内过夜使细胞稳定贴壁。次日将六孔板置入力学加载装置 Flexcell 5000 system。该系统利用封闭腔抽真空产生的负压使弹性基底膜发生形变, 通过计算机控制系统调节气体的压力来改变基底膜的形变量, 进而使已经贴壁生长的细胞受到循环的张力牵拉加载刺激 Cyclic tensile stretch (CTS)。加载的力学参数为 0-预设值的动态循环, 正弦波形, 频率为 1Hz。首先, 实验组分为 4 个组, 分别给予不同时间的 10% 张力性加载 (6h、12h、24h、48h), 空白对照组不给予任何刺激, 置于与实验组相同的培养环境; 加载结束后立即加入含有 1% 的磷酸酶抑制剂, 提取 RNA 用于 RT-qPCR, 然后再将实验组分为 3 个组, 每个组给予相同时长 (48h) 的张力性刺激, 但力学强度不同 (5%、10%、20%), 空白对照组不给予任何刺激, 加载结束后立即加入含有 1% 的磷酸酶抑制剂, 提取 RNA 用于 RT-qPCR。

1.4 smad3 特异性抑制剂的使用

将培养至第 3 代的髓核细胞使用胰蛋白酶消化, 无菌移液器均匀加入两个无菌六孔板中过夜, 并随机编为两个组, 次日其中一组预先给予 smad3 的特异性抑制剂 SIS3 (10UM) 处理 6h 后置于力学加载装置给予张力刺激 (20% 的张力加载 48h), 每 24h 添加一次相同剂量的抑制剂, 作为实验组; 一组给予相同的力学处置 (20% 的张力加载 48h), 但不给予 smad3 抑制剂预处理, 作为对照组。加载结束后立即加入含有 1% 的磷酸酶抑制剂的裂解液, 提取蛋白和 RNA 用于蛋白印迹实验

和 RT-qPCR。

1.5 RNA 的提取和 RT-qPCR

使用 RNA 提取盒 (Qiagen, Valencia, CA) 提取细胞的总 RNA, 使用逆转录盒 (Qiagen, Valencia, CA) 将 RNA 逆转录成环状 NDA (cDNA)。取 1μg 的 cDNA, 使用定量试剂盒 (QIAGEN) 在仪器 ViiA7 Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystems) 中进行定量分析。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde -3 -phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参。引物序列如下。人 CILP: 上游, AGCGGTGTACGGAAACTCG; 下游, GGAGGTG-GTAATTGCAGGGAACA。人 GAPDH: 上游, CCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAG; 下游, GGTCTACATGGCAACTGTGAGGAG。RT-qPCR 反应步骤: 95℃ 20s 激活酶; 95℃ 5s, 60℃ 34s, 重复 40 个循环。结果以 CT 值表示。反应体系为 20μl, 其中引物浓度 1.4M, cDNA 量 1μg。采用三复孔检测, 取平均值。使用 2^{-ΔΔCT} 计算目的基因的相对表达量。

1.6 smad3 的磷酸化检测

采用蛋白印迹实验检测。将培养至第 3 代的髓核细胞使用胰蛋白酶消化, 无菌移液器均匀加入两个无菌六孔板中过夜, 并随机编为两个组, 一个组给予 20% 的循环张力刺激 48h, 作为实验组, 另一组不给予任何刺激, 置于相同培养条件下, 作为对照组。无菌移液器吸净培养板内的旧培养基, 无菌 PBS 液清洗两次细胞面, 吸尽残余液体。按每孔 80μl 加入混合了 1% 磷酸酶抑制剂的细胞裂解液 Radio Immunoprecipitation Assay (RIPA) (Sigma), 细胞刮充分刮取细胞面, 无菌移液器吸取细胞裂解悬液至无菌的 1.5ml 离心管管内, 冰上静置 30min 充分裂解。以 12000 转/min 在 4℃ 离心 30min, 留上清, 去沉淀。Bicinchoninic acid (BCA) 法测定蛋白浓度约 10ng/μl。配置 8% 的分离胶, 按照每个泳道 20μl 加入蛋白提取液, 100V 恒定电压电泳 90min。将聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜在无水甲醇中浸泡 10s, 再与电泳结束后的胶体严密贴合, 防止气泡产生, 以 0.2mA 的恒定电流电转 2h。电转结束后将 PVDF 条带在 5% 的脱脂奶粉中封闭 1h, 以 5% 的脱脂奶粉液配制 1:1000 的 CILP 抗体工作液, 将 PVDF 条带浸泡在一抗的工作液中, 4℃ 湿盒内过夜。次日以 Tris Buffered Saline with

Tween(TBST)液清洗 5 次,每次 5min,浸泡在 1:5000 二抗稀释液中,37℃恒温箱静置 1h,TBST 液清洗 5 次,每次 5min。将曝光用试剂中的 A 液与 B 液(millipore)按照 1:1 配制化学发光液,并均匀滴加在 PVDF 膜的蛋白面,将其置于曝光装置(image quant las 4000)进行曝光并拍照,观察目标条带 p-smad3 的磷酸化情况(观察目标条带的颜色深浅以判定其表达水平高低)。然后以同样的方法将细胞分为两个组,一组预先给予 smad3 的特异性抑制剂 SIS3 后置于力学加载装置给予张力刺激,作为实验组;一组给予相同的力学处置,但不给予 smad3 抑制剂预处理,作为对照组,结束后以同样的方法步骤提取蛋白测定 smad3 磷酸化程度。

1.7 统计学分析

每个实验均重复 3 次,用 SPSS 18.0 进行统计学分析,最终结果以平均数±标准差(Mean±SD)表示。CILP 的相对基因表达的计算是用 RT-qPCR 结果中该基因的 CT 值减去内参 CT 值,作为 2 的指数再与对照组相除得到的倍数。两组独立实验结果之间的比较用组间配对 *t* 检验,3 组及 3 组以上实验结果的比较使用单因素方差分析进行组间比较, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 不同时长 10% 张力性刺激后髓核细胞 CILP 的基因相对表达

实验组髓核细胞在受到不同时长的 10% 张力刺激后 CILP 的基因表达相对量,6h 组为 0.56 ± 0.11 ,12h 组为 0.52 ± 0.10 ,24h 组为 0.35 ± 0.08 ,48h 组为 0.18 ± 0.08 。与对照组(1.02 ± 0.15)比较,实验各组髓核细胞 CILP 的相对表达量均显著降低,具有统计学差异($P<0.05$),且在 48h 组达到最低($P<0.05$)。

2.2 不同强度的张力性刺激 48h 后髓核细胞 CILP 的基因相对表达

5% 的张力刺激 48h 后髓核细胞的 CILP 基因相对表达量为 0.95 ± 0.10 ,相对于对照组 (1.01 ± 0.18) 无明显变化($P>0.05$);10% 的张力刺激 48h 后 CILP 基因相对表达量为 0.21 ± 0.12 ,相较于对照组显著下降 ($P<0.05$);20% 的张力刺激 48h 后 CILP 的基因相对表达量为 4.7 ± 0.5 ,与对照组相比显著增高($P<0.05$)。

2.3 高强度张力刺激下 smad3 的磷酸化及抑制 smad3 磷酸化后 CILP 的相对基因表达

20% 张力刺激髓核细胞 48h 后 smad3 磷酸化程度如图 1,蛋白印迹实验结果显示,相较于对照组,实验组的 smad3 的磷酸化程度明显增强。经 smad3 抑制剂 SIS3 预处理后再置于相同力学条件下髓核细胞的 smad3 磷酸化程度如图 2,蛋白印迹实验结果显示相较于对照组,smad3 的磷酸化程度显著降低。RT-qPCR 结果显示,只给予张力刺激的对照组 CILP 基因相对表达量为 3.9 ± 0.8 ,经过 SIS3 预处理再给予相同张力刺激的实验组的 CILP 基因相对表达量为 0.8 ± 0.08 ,相对于对照组显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

椎间盘退变是引起椎间盘疾病的主要原因,也是引起腰背部疼痛的主要病因之一。目前认为椎间盘的退变是多因素共同形成的结果,包括力学因素、炎症因子浸润、营养通路障碍、基因突变等^[1]。CILP 作为在软骨性组织特别是椎间盘髓核组织中特异性表达的蛋白,其表达水平随着椎间盘退变程度加重而增高^[2-4]。国外的研究认为该蛋白与椎间盘退变存在基因相关性。在日本和芬兰人群中,CILP 一个基因位点的突变率与椎间盘突出物的发病率存在关联^[5-6];该蛋白的基因序列上 1184 位点的 T→C 突变可以导致 CILP 结合转化生长因子-β(transforming grow factor-β,TGF-β)的能力增强^[3],从而减弱 TGF-β 对髓核细胞的促分泌作用并降低髓核细胞的基质分泌能力。在动物实验中,构建表达 CILP 的转基因小鼠,MRI 检查发现该小鼠的椎间盘组织相对于正常小鼠椎间盘更早地出现退变的影像学表现^[7],提示该蛋白的高表达不仅可作为椎间盘退变的标志物,也可能在椎间盘退变中发挥促进性作用。但是作为椎间盘退变的重要参与因子,关于该蛋白目前的调控机制尚处于空白阶段,仅有生长因子骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)-2 以及 TGF-β 对于该蛋白的上调效应的报道^[11]。但在退变的椎间盘中,由于受到髓核细胞衰老、数量减少,细胞外基质环境破坏等影响,各类生长因子对于髓核细胞表达 CILP 的调控效应还需要进一步研究,不宜用生长因子调控学说解释 CILP 在退变髓核组织中的高表达。那么到底是什么原因可

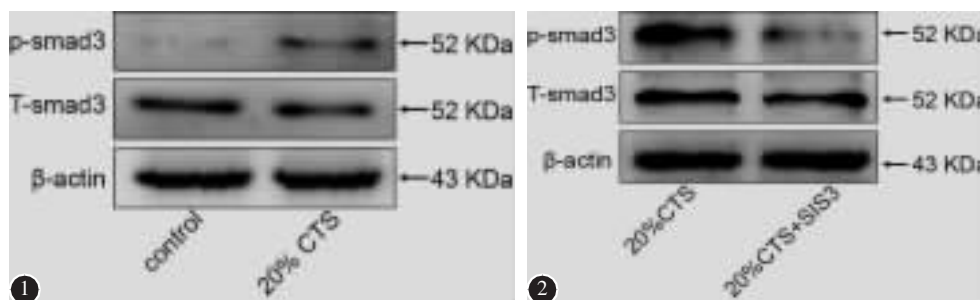


图 1 20%的张力刺激 48h 后髓核细胞中 smad3 磷酸化情况(对照组不给予张力性刺激,实验组给予 20%的张力性刺激 48h。p-smad3,为磷酸化的 smad3;T-smad3,为总 smad3; β -actin 为内参) **图 2** 接受 SIS3 预处理后髓核细胞的 smad3 的磷酸化程度(只接受力学刺激不接受 SIS3 预处理的作为对照组,先接受 SIS3 预处理再接受力学刺激的作为实验组, SIS3 为 smad3 磷酸化的特异性抑制剂)

Figure 1 Western blot showed the smad3 phosphorylation while NP cells were stimulated with 20% CTS for 48h; The group without CTS was as control. P-smad3 is behave of the phosphorylated form of smad3; T-smad3 corresponds to the total smad3. β -actin was as control **Figure 2** Western blot showed the smad3 phosphorylation of groups treated with or without SIS3. The group treated with 20% CTS but without SIS3 served as control; The group treated with SIS3 and 20% CTS served as experimental group. SIS3 is a specific inhibitor to the phosphorylation of smad3; β -actin served as control

以促进髓核细胞高表达 CILP,从而促进椎间盘退变(intervertebral disc degeneration,IDD)的进程?本研究着眼于髓核细胞所处体内环境,首次提出力学刺激可能是调控该蛋白表达的重要原因,从而为该蛋白在退变髓核组织的高表达找到一个全新的合理的解释。

椎间盘组织是全身最大的无血管、无神经的组织,位于其中的细胞生长代谢高度依赖于细胞外环境的稳态。pH 值变化、渗透压改变等均可引起髓核细胞分泌功能的改变。而力学环境变化对于髓核细胞的影响更为明显^[12-14]。国外的研究^[1,2]认为正常的髓核组织由于细胞外基质中高含水性的蛋白多糖以及有序的纤维结构,外界压力在向髓核组织的传递中,力量强度不断减小并向其他形式转化,因此正常髓核组织的髓核细胞所受力学刺激强度大体处于髓核细胞的承受范围内。但在退变的椎间盘组织中,髓核组织的正常细胞外基质破坏明显,组织的正常力学结构被破坏,外界环境的力学刺激向内传递过程中没有受到适当的缓冲和转化,使得髓核细胞直接经受更大的机械刺激,包括过强的压力和张力刺激,而过大的力学刺激又会反过来引起髓核细胞更多的分解性代谢因子的上调,包括炎症因子和金属基质分解酶,从而进一步促进退变性改变^[15]。髓核细胞在高于正常强度的张力性刺激下(23%拉伸量)II型胶原蛋白以及蛋白多糖的分泌明显减少,而 10%的张

力强度正好导致相反的结果^[16-18]。同样的效应也出现在压力对于髓核细胞的调控,当压力刺激的强度在 0.3~0.5MPa,对髓核细胞的合成代谢起主导作用,当强度超过 1.0MPa,分解代谢的效应超过合成代谢^[13,14]。提示同一种力学刺激根据力学强度大小对于髓核细胞的细胞外基质分泌的调控存在着两种不同的方向调控,可能在正常值范围内对于髓核细胞的基质分泌起到促合成作用,而超过一定阈值,分解代谢作用超过合成起主导作用,从而抑制髓核细胞的基质分泌。因此我们有理由怀疑力学刺激同样参与了对 CILP 的调控,并且通过调控该蛋白的表达水平来影响退变的进程。本研究结果显示,张力加载在 5%的时候,CILP 表达变化不明显;当强度增大到 10%,CILP 的基因表达呈逐渐降低趋势,并在 48h 达到最低点,提示适当的张力性刺激对于 CILP 表达主要为抑制性作用。而在张力加载达到 20%的拉伸量后 CILP 的表达出现明显的上调,考虑到生理性张力刺激极少达到 20%的拉伸量,故本研究结果表明生理范围内的力学加载特别是张力性加载可能主要对 CILP 的表达起抑制性作用,而这种抑制作用很可能是 CILP 在正常未退变的髓核组织中表达量相对不高的原因之一,但如果力学刺激超过一定的阈值,对 CILP 表达的促进性作用则超过对其的抑制性作用,从而导致了 CILP 表达的上调。结合既往关于 CILP 高表达可促进 IDD

的研究, 我们的研究结果提示退变髓核组织中 CILP 异常高表达的重要原因之一就是退变后恶化的力学环境, 而高表达水平的 CILP 又进一步促进了退变的进程。

本研究进一步观察了在高张力刺激(20% elongation)下 CILP 表达上调的信号通路。在既往关于 CILP 的调控研究中, TGF- β 可通过激活 smad3 来上调 CILP 的表达^[17]。经过查阅文献, smad 途径在关节的软骨细胞中可以被压力刺激激活^[17]。因此我们认为 smad 信号途径有可能参与了张力性刺激对于 CILP 表达的上调。结果发现在 20% 的张力性刺激组 smad3 的磷酸化明显高于对照组, 且预先给予特异性 smad3 磷酸化抑制剂后, 张力性刺激对于 CILP 表达的上调作用显著降低。提示 smad 信号途径介导了高强度的张力刺激对于髓核细胞分泌 CILP 的上调。

本研究对于张力性刺激调控髓核细胞表达 CILP 及其机制作了初步的探索, 有助于理解 CILP 在椎间盘退变中高水平表达的原因, 并有助于探索干预 CILP 表达的新方法; 有助于探索 CILP 在体内的表达规律并研究关于以 CILP 为靶点的新型治疗方案。但本研究未进一步研究在 10% 的张力刺激通过何种信号途径下调 CILP 的表达, 以及是否其他的信号途径也参与了力学刺激对于 CILP 的调控。

4 参考文献

- Colombini A, Lombardi G, Corsi MM, et al. Pathophysiology of the human intervertebral disc[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(5): 837-842.
- Wang W, Hao J, Zheng S, et al. Association between cartilage intermediate layer protein and degeneration of intervertebral disc: a meta-analysis[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2016, 41(20): E1244-E1248.
- Min SK, Nakazato K, Ishigami H, et al. Cartilage intermediate layer protein and asporin polymorphisms are independent risk factors of lumbar disc degeneration in male collegiate athletes [J]. *Cartilage*, 2014, 5(1): 37-42.
- Yee A, Lam MP, Tam V, et al. Fibrotic-like changes in degenerate human intervertebral discs revealed by quantitative proteomic analysis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(3): 503-513.
- Mayer JE, Iatridis JC, Chan D, et al. Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration [J]. *Spine J*, 2013, 13(3): 299-317.
- Wang Z, Kim JH, Higashino K, et al. Cartilage intermediate layer protein(CILP) regulation in intervertebral discs: the effect of age, degeneration, and bone morphogenetic protein-2 [J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2012, 37(4): E203-208.
- Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, et al. A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(6): 607-612.
- Yao Z, Nakamura H, Masuko-Hongo K, et al. Characterisation of cartilage intermediate layer protein(CILP)-induced arthropathy in mice[J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(3): 252-258.
- Johnson K, Farley D, Hu SI, et al. One of two chondrocyte-expressed isoforms of cartilage intermediate layer protein functions as an insulin-like growth factor 1 antagonist [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(5): 1302-1314.
- Seki S, Tsumaki N, Motomura H, et al. Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(4): 876-881.
- Mori M, Nakajima M, Mikami Y, et al. Transcriptional regulation of the cartilage intermediate layer protein(CILP) gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(1): 121-127.
- Huang M, Wang HQ, Zhang Q, et al. Alterations of ADAMTSs and TIMP-3 in human nucleus pulposus cells subjected to compressive load: implications in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(2): 267-273.
- Le MCL, Frain J, Millward-Sadler J, et al. Altered integrin mechanotransduction in human nucleus pulposus cells derived from degenerated discs[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(2): 460-469.
- Maclean JJ, Lee CR, Alini M, et al. Anabolic and catabolic mRNA levels of the intervertebral disc vary with the magnitude and frequency of in vivo dynamic compression [J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(6): 1193-1200.
- Iorio JA, Jakoi AM, Singla A, et al. Biomechanics of degenerative spinal disorders[J]. *Asian Spine J*, 2016, 10(2): 377-384.
- Bleuel J, Zaucke F, Bruggemann GP, et al. Effects of cyclic tensile strain on chondrocyte metabolism: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119816.
- Madej W, Buma P, van der Kraan P, et al. Inflammatory conditions partly impair the mechanically mediated activation of Smad2/3 signaling in articular cartilage [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18: 146.
- Neidlinger-Wilke C, Wurtz K, Urban JP, et al. Regulation of gene expression in intervertebral disc cells by low and high hydrostatic pressure[J]. *Eur Spine J*, 2006, 15(Suppl 3): S372-378.

(收稿日期:2016-09-09 末次修回日期:2016-12-25)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)