

基础研究

高迁移率蛋白-1 在大鼠腰椎软骨终板退变中的作用及相关机制

李 磊¹, 邢文华¹, 李 峰¹, 吉德民², 胡宝阳², 辛大齐¹, 祝 勇¹, 杨学军¹

(1 内蒙古医科大学第二附属医院骨科 010030 呼和浩特市; 2 内蒙古医科大学研究生学院 010050 呼和浩特市)

【摘要】目的:观察高迁移率蛋白-1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)在大鼠腰椎软骨终板退变中的作用,探讨其相关机制。**方法:**选取 4 周龄 SD 大鼠处死,在显微镜下取出腰椎软骨终板,消化后提取细胞,再进行培养、分离、纯化,免疫荧光染色检测 II 型胶原鉴定软骨终板细胞(cartilage endplate cell, CEC)。用不同浓度的 FBS 分别培养 CEC 24h、48h, MTT 法检测细胞活性。在第三代 CEC 中加入 HMGB1 后,分别在 3h、6h、12h、24h 时检测金属基质蛋白酶-3 (proteins of the matrix metalloproteinase, MMP-3)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的 mRNA 表达, 6h、12h、24h 时检测蛋白表达量; CEC 中加入 100ng/ml HMGB1 后分别在 0、5、10、30、60 和 120min, 使用 Western blot 检测细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)磷酸化的表达;继而将 CEC 分为 6 组:对照组、HMGB1(100ng/ml)组、FPSMZ1(HMGB1 抑制剂)组、HMGB1+FPSMZ1 组、U0126(ERK 抑制剂)组、HMGB1+U0126 组,使用 Western blot 分别检测 MMP-3、VEGF 和 ERK 信号转导途径磷酸化的表达及 Elisa 检测 IL-10 的表达。全部结果均为重复独立 3 次实验,计算其均数±标准差。**结果:**分离纯化的细胞 II 型胶原抗体表达呈阳性,为 CEC 细胞;10%FBS 培养 48h 为 CEC 增殖最佳的时间点和浓度;HMGB1 能够诱导 ERK 和 JNK 信号转导途径磷酸化,从开始到 10min 逐渐升高,10min 时达峰值。HMGB1 上调了 MMP-3 ($P=0.039$) 和 VEGF 的 mRNA ($P=0.042$) 表达,下调 IL-10 ($P=0.025$) 的 mRNA 表达,三种因子蛋白表达与 mRNA 有相同的规律;HMGB1+FPSMZ1 组与 HMGB1 组相比,ERK 信号转导途径的磷酸化明显减少;在 CEC 中加入 U0126 后, MMP-3 ($P=0.041$) 和 VEGF ($P=0.042$) 蛋白表达明显降低,而 IL-10 ($P=0.004$) 蛋白表达明显增高;在 CEC 中加入 FPSMZ1 后, HMGB1 对 ERK 信号转导途径磷酸化表达的作用明显降低 ($P=0.031$)。**结论:**HMGB1 可增加大鼠腰椎 CEC 中的 MMP-3 和 VEGF 的表达,降低 IL-10 的表达,其可能是通过 ERK 信号转导途径实现的。

【关键词】高迁移率蛋白-1; ERK 信号转导途径; 软骨终板; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.11.10

中图分类号: R681.5, R363 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-11-1026-08

The role and mechanism of high mobility group box-1 protein in the degeneration of lumbar cartilage endplate in rats/LI Lei, XING Wenhua, LI Feng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(11): 1026-1033

【Abstract】Objectives: To explore the effect and mechanism of high mobility group box-1 protein(HMGB1) on the degeneration of lumbar cartilage endplate in rats. **Methods:** Four-week-old SD rats were sacrificed and the lumbar cartilage endplates were taken out under the microscope. The supernatant was extracted after digestion. After culture, isolation and purification, immunofluorescence staining was used to detect type II collagen and cartilage endplate cell (CEC). Different concentrations of FBS were used to culture CEC for 24h and 48h respectively. MTT assay was used to detect cell viability. The expressions of MMP-3, vascular endothelial growth factor and interleukin were detected at 3, 6, 12 and 24 hours after adding human HMGB1 to the third generation CEC. The expression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation was detected by Western blot at 0, 5, 10, 30, 60 and 120min after adding 100ng/ml HMGB1 to CEC. CEC was di-

基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(编号:81360278)

第一作者简介:男(1988-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0471)6351230 E-mail:asd8244693@163.com

通讯作者:杨学军 E-mail:yangxuejun2004@126.com;祝勇 E-mail:1036227632@qq.com

vided into six groups: control group, HMGB1(100ng/ml) group, FPSMZ1(HMGB1 inhibitor) group, HMGB1+FPSMZ1 group, U0126(ERK inhibitor) group and HMGB1+U0126 group. The expressions of MMP-3, VEGF and ERK signal transduction pathway phosphorylation and Elisa IL-10 were detected by Western blot. All results were repeated independently for three experiments, and their mean + standard deviation was calculated.

Results: The expression of type II collagen antibody was positive in CEC cells, and the best time and concentration for proliferation of CEC was 48 hours on 10%FBS. HMGB1 could induce phosphorylation of ERK signal transduction pathway, which gradually increased from the beginning to 10min and reached its peak at 10min. HMGB1 up-regulated the expressions of MMP-3($P=0.039$) and VEGF($P=0.042$), but down-regulated the expression of IL-10($P=0.025$). The expression of three factors was the same as that of gene. Compared with HMGB1 group, phosphorylation of ERK signal transduction pathway was significantly reduced in HMGB1+FPSMZ1 group. After ERK signal transduction pathway inhibitor (U0126) added to CEC, the expressions of MMP-3($P=0.041$) and VEGF($P=0.042$) decreased significantly, while the expression of IL-10($P=0.004$) increased significantly. After adding RAGE inhibitor(FPSMZ1) to CEC, the phosphorylation of ERK signal transduction pathway by HMGB1 decreased significantly($P=0.031$). **Conclusions:** HMGB1 can increase the expression of MMP-3 and VEGF in rat lumbar CEC and decrease the expression of IL-10 possibly by ERK signal transduction pathway.

【Key words】 High mobility group box-1 protein; Extracellular regulated protein kinases signaling pathway; Cartilage endplate; Rat

【Author's address】 Department of Spine, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, 010030, China

腰椎间盘突出是导致腰腿疼痛最常见原因之一,当软骨终板退变出现结构异常甚至骨化时会影响椎间盘细胞和周围软组织之间的离子和营养物质的运输^[1],椎间盘的内环境随之发生变化导致椎间盘细胞加速退化^[2]。抑制软骨终板退变可能会给腰椎间盘突出变的预防和治疗提供新的思路。高迁移率蛋白-1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)在多种感染和非感染的炎症反应中都发挥着重要的作用。有研究报道 HMGB1 也参与了关节软骨的退变^[3]。HMGB1 能够通过晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 结合作为下游信号转导的蛋白复合物来发挥其生物学效应^[4]。而蛋白复合物可能是通过细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号转导途径来进一步发挥生物学效应,对软骨细胞的稳态和分化有着至关重要的作用^[5]。关节软骨的组成和结构与腰椎软骨终板相类似,在退变的过程中也具有相似的病理基础^[6]。有研究发现基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、白细胞介素-10(IL-10)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达又与软骨终板的退变相关^[7-10],我们推测 HMGB1 结合 RAGE 受体后形成蛋白复合物,再通过 ERK 信号转导途径调控 MMP-3、VEGF 和 IL-10 的表达,从而进一

步导致软骨终板的退变。本研究旨在观察 HMGB1 在大鼠腰椎软骨终板退变中的表达,探讨软骨终板退变的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

浓缩型正常山羊血清、荧光(Cy3)标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司);CCK-8 (DojinDo Laboratories, Japan);HiScript 逆转录酶 (RNase H)(国药集团化学试剂有限公司);Triton X-100 [西格玛奥的(上海)贸易有限公司];鼠 IL-10 酶联免疫吸附测定试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜, Merk Millipore, Billerica, MA, USA);抗荧光淬灭封片剂(southern-biotech, USA);collagen II (NOVUS, USA);二硫苏糖醇(DTT, 国药集团化学试剂有限公司);十二烷基硫酸钠(SDS, 国药集团化学试剂有限公司);增强化学发光底物(ECL, Thermo, USA);总 RNA 抽提试剂(Trizol, 碧云天生物有限公司);绿色激发波长染料 (50×ROX Reference Dye 2, SYBR Green Master Mix, VAZVME);Taq 和 Pfu DNA 聚合酶的混合物 (Taq Plus DNA Polymerase, DL2000 DNA Marker, 碧云天生物有限公司);引

物合成(武汉博士德生物工程有限公司);实时荧光定量 PCR 仪(ABI7900/illuminaeco, USA);分光光度计(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 实验动物及软骨终板细胞(CEC)的培养和分离

4 周龄清洁级 SD 大鼠(由西安交通大学动物实验中心提供),雌雄不限,体重为 60~80g。处死大鼠,显微镜下取出 L1~L5 腰椎软骨终板,分离实验所需的原代 CEC。具体操作:取出软骨终板,在显微镜下使用刀片刮除髓核及纤维环,剪碎至约 1mm³,磷酸缓冲液(PBS)清洗 3 次;离心 1000 转/min, 3min, 弃上清;加入 0.25%的胰蛋白酶, 37℃消化 30min;离心 5min, 弃上清;添加 10% 胎牛血清(FBS)配置的 0.2% II 型胶原酶, 37℃分解 30min;上清液转移至新 EP 管内,再离心,用含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基重新悬浮细胞,接种于直径为 60mm 细胞培养皿;每隔 3 天换一次液,继续使用 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基进行培养,隔天用倒置显微镜观察、拍照;细胞融合率 90%时传代。

1.3 CEC 的鉴定及活性检测

在培养皿中将已爬好细胞的玻片用 PBS 冲洗 3 次,用 4%的多聚甲醛固定,PBS 反复冲洗玻片 3 次,30.5% Triton X-100 室温通透 20min, PBS 浸泡冲洗玻片 3 次,吸水纸吸干 PBS,在玻片上加山羊血清,室温封闭 30min,吸掉封闭液,每张玻片添加足量的稀释好的一抗,4℃孵育过夜,加荧光二抗,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)冲洗玻片 3 次,吸干多余液体,添加荧光二抗,20℃~37℃孵育 1h, PBST 冲洗玻片 3 次,滴加 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)避光孵育 5min, 使用 PBST 冲洗掉残余的 DAPI 5min,用吸水纸吸干废液,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,随后在荧光显微镜下收集图像。

将 1×10⁵ 个细胞(第 3 代贴壁细胞)接种到 96 孔细胞培养板中,并在含有 10%FBS 的培养基进行中 MTT 实验,细胞达到 90%融合时消化备用,取扩增培养的第 3 代大鼠腰椎软骨终板细胞用胰蛋白酶和 EDTA 的混合消化,以 5×10³/ml 的密度接种于 96 孔培养板中,每孔添加 100μl 细胞悬浮液,共接种 3 块 96 孔培养板,将实验分为 6 组:A 组为对照组,B~F 组为不同浓度(0.1%、0.5%、1%、5%、10%)的 FBS,对照组为不含血清的

培养基,分别培养 24h 和 48h;吸去培养基,每孔添加 MTT 工作液,在细胞培养箱内 37℃孵育 4h,吸去孔内 MTT 工作液,每孔加 DMSO,用移液器吹打使底部紫色完全溶解,使用分光光度计在 OD490nm 检测各孔的吸光值。

1.4 HMGB1 刺激 CEC 后 MMP-3、VEGF 和 IL-10 的 mRNA 及蛋白表达

将第 3 代 CEC 分至 35mm 细胞培养皿,5×10⁵ 个细胞/盘,DMEM 培养基细胞培养 24h 生长至 90%,加入 100ng/ml HMGB1 100μl,在 0h、3h、6h、12h 和 24h,使用 Trizol 试剂提取 CEC mRNA,检测 MMP-3、VEGF、IL-10mRNA (RT-PCR 法),在 0h、6h、12h 和 24h 检测 MMP-3、VEGF(Western blot 法)、IL-10(Elisa 法)的蛋白表达量。RT-PCR 引物见表 1,主要步骤为:95℃、15min,1 个循环;95℃、10s,60℃、20s 和 72℃、30s,40 个循环,使用非特异性扩增法的解离曲线测定。Western blot 法的主要步骤为:用 PBS 和 100ml 含有 1%蛋白酶抑制剂的细胞裂解缓冲液对 CEC 进行洗涤,形成裂解物,在 4℃下以 12000 转/min 离心 5min,并在 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上分离,转至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉(50mmol/L Tris, pH 值 7.6, 150mmol/L NaCl, 0.1%FBS)封闭并在 4℃下孵育,在 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)中洗涤 3 次,将膜与第二抗 IgG-HRP 抗体室温孵育 2h, TBST 中洗涤 3 次, 5~10min,待荧光带明显后,X 光胶片压片后显影、定影,用 Band Scan 软件分析计算胶片灰度值。Elisa 法参照试剂盒:细胞用甲醇固定 15min,室温下封闭内源性过氧化物酶活性 10min,非免疫性动物血清孵育 10min,将载玻片与一抗(稀释度 1/300) 4℃下孵育过夜,室温孵育 10min, 37℃二抗体孵育 15min,在 37℃条件下将载玻片与链霉亲和素-过氧化物酶复合物孵育 15min,加入底物,在 36℃、

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

		碱基序列 Sequence	大小 Size
GAPDH	Forward	5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'	253bp
	Reverse	5'-TTTGAGGGTGCAGCGAAGCT-3'	
VEGF	Forward	5'-CCTCTACCAGCGCAGCTATTG-3'	145bp
	Reverse	5'-CTCCAGGGCTTCATCATTCG-3'	
MMP-3	Forward	5'-ACCTATTCCTGCTGCTGCTC-3'	235bp
	Reverse	5'-ATTGGTAAGGTCTCAGGCTC-3'	
IL-10	Forward	5'-AGGACTTTAAGGCTTACTTGGG-3'	220bp
	Reverse	5'-TCATTCTTCACCTGCTCCACT-3'	

黑暗环境下孵育 15min, 每次操作均使用 PBS 洗涤 3 次, 最后加入终止缓冲液 (非免疫性动物, 100 μ l/孔), 混合后用分光光度计测量 OD 450 值 (检测 3min)。

1.5 HMGB1 与 ERK 信号转导途径的联系

在第三代 CEC 中加入 100ng/ml HMGB1 100 μ l, 分别在 0min、5min、10min、30min、60min 和 120min 时使用 Western blot 检测 ERK 磷酸化的表达。再将 CEC 分至 35mm 细胞培养皿, 5 $\times$ 10⁵ 个细胞/盘, 培养 24h 生长至 90% 时将 CEC 分为 6 组: 对照组、HMGB1 (100ng/ml) 组、FPSMZ1 (HMGB1 抑制剂) 组、HMGB1+FPSMZ1 组、U0126 (ERK 抑制剂) 组、HMGB1+U0126 组, 反应 24h 后, 检测各组 MMP-3、VEGF 和 IL-10 的表达 (方法同 1.4)。

1.6 统计分析

通过 SPSS 18.0 软件 (SPSS, USA) 进行统计分析, 全部结果均为 3 次重复独立实验的均数 $\pm$ 标准差, 两组间的均数比较使用独立样本 *t* 检验, 多组间的均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CEC 鉴定

使用免疫荧光检测 II 型胶原, 在 200 倍和 400 倍荧光显微镜中均能观察到培养的细胞 II 型胶原抗体表达呈阳性 (图 1), 证明分离培养的细胞是 CEC。

2.2 细胞活性的测定

用不同浓度的 FBS 分别培养 CEC 24h、48h, 发现随着 FBS 浓度的不断增加, 软骨终板细胞的细胞活性呈现不断增长的趋势 (表 2), 其在培养浓度为 10% 的 FBS 培养 48h 时增长速度十分迅速, 比在其他时间点与浓度的 FBS 培养的增殖率快。10%FBS 培养 48h 为 CEC 增殖最佳的时间点和浓度。

2.3 HMGB1 与 MMP-3、VEGF、IL-10 表达的关系

在第三代 CEC 中加入 HMGB1 后 0h、3h、6h、12h 和 24h 的 MMP-3、VEGF 和 IL-10 的 mRNA 表达见表 3。HMGB1 上调了 MMP-3 ($P=0.039$) 和 VEGF mRNA ($P=0.042$) 表达, 下调 IL-10 ($P=0.025$) 的 mRNA 的表达。加入 HMGB1 后 6h、12h 和 24h 的 MMP-3、VEGF 和 IL-10 的蛋白表达见图 2 和表 4, 与 mRNA 的表达规律一致。

2.4 HMGB1 与 ERK 信号转导途径的联系

加入 100ng/ml HMGB1 后不同时间点 ERK 信号转导途径磷酸化见图 3 和表 5。HMGB1 能够诱导 ERK 和 JNK 信号转导途径磷酸化, 10min 时达到峰值, 随后随着时间的延长逐渐降低。

同时加入 U0126 后 CEC 中 MMP-3 ($P=0.040$) 和 VEGF ($P=0.041$) 表达降低, 而 IL-10 ($P=0.004$) 的表达升高 (表 6)。

对照组、HMGB1 组、FPSMZ1 组及 HMGB1+FPSMZ1 组的 ERK 信号转导途径的磷酸化表达水平见图 4, 分别为 1、1.62 $\pm$ 0.09、0.81 $\pm$ 0.03 和 1.20 $\pm$ 0.07, 其中 FPSMZ1 组磷酸化 ERK 最少, 四组间比较差异有统计学意义 ($F=0.352$, $P=0.012$)。

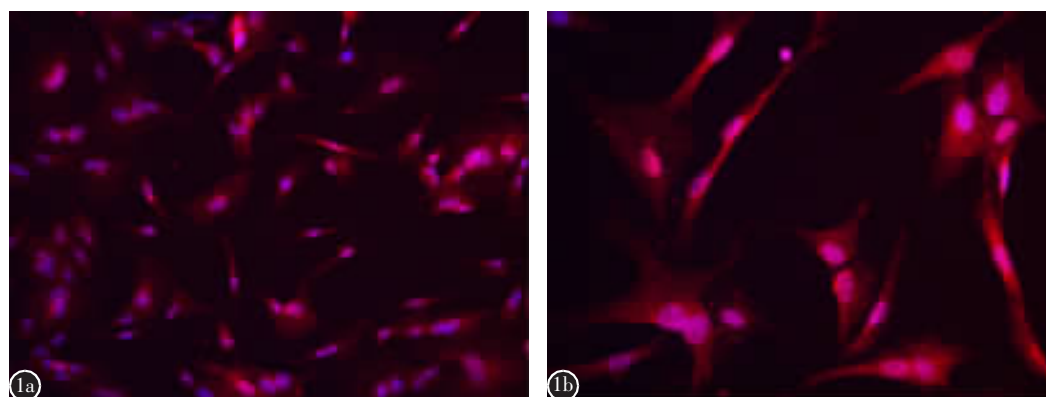


图 1 分离培养的细胞甲苯胺蓝染色后观察可见 II 型胶原抗体表达阳性 (a $\times$ 200; b $\times$ 400)

Figure 1 The cells were stained with toluidine blue under microscopes, and type II collagen antibodies were positive (a $\times$ 200; b $\times$ 400)

3 讨论

椎间盘退变的机制很复杂,其主要机制可能有:椎间盘的营养供应障碍、降解酶活性增高、炎症介质的作用、细胞老化或死亡、抑制因子降低以及遗传因素等^[11]。有研究^[1,2]表明,营养供应障碍是椎间盘退变的关键因素。由于软骨终板具有控制椎间盘营养渗透和承接缓冲负荷的作用,软骨终板退变后产生结构改变甚至骨化会导致椎间盘内

环境发生改变,如 pH 值降低、酸抑制物合成减少和 NO 等有害物质堆积等,会引起一系列连锁反应造成退变的程度进一步加剧,软骨终板细胞数量也会随之减少^[12]。因此,软骨终板退变可能是引起椎间盘退变的重要原因。

软骨终板退变的特征主要是炎症因子的产生导致包含 II 型胶原和蛋白多糖的细胞外基质快速丢失^[6,12-14]。HMGB1 作为炎症的晚期介质,在炎症反应中起着关键作用^[15]。其可以激活各种炎症信号转导途径,促进炎症细胞因子(如 VEGF)的产生^[16,17]。VEGF 能够正反馈促进 HMGB1 释放,导致细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶(MMPs)的产生,从而使炎症反应不断加重^[9]。MMPs 还可导致关节软骨中 II 型胶原和蛋白多糖降解^[18,19]。MMP-3 是 MMPs 家族中的一员,当其在 CEC 中的表达增加时,胶原酶的活性也在不断增加,与家族其他成员相比能更有效地水解 II 型胶原和蛋白多糖,从而加速软骨终板的降解^[20]。IL-10 能够在转录水平抑制细胞因子和趋化因子的产生,也能够通过调控 mRNA 降解的机制在转录后水平发挥作用,还能够上调体内细胞因子拮抗剂和下调

表 2 MTT 法测量细胞活性相对值 (%)
Table 2 The cell activity were detected by MTT

	24h	48h
对照组 Control group	100	100
0.1%FBS	102±6	110±3
0.5%FBS	103±2	111±11
1%FBS	107±5	117±12
5%FBS	114±9	137±11
10%FBS	103±2	148±15
F(P)值 F(P) value	3.12(0.21)	7.52(0.01)

注:表中的数据均为 3 次独立实验获得的平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)

Note: The data in the chart were all obtained through three independent experiments

表 3 HMGB1 刺激后不同时间点软骨终板细胞中 MMP-3、VEGF 和 IL-10 的 mRNA 表达
Table 3 The expression of MMP-3, VEGF and IL-10 mRNA in cartilage endplate cells at different time points after HMGB1 stimulation

	对照组 Control group	HMGB1 刺激后 HMGB1 stimulation			
		3h	6h	12h	24h
MMP-3	1.00±0.00	0.88±0.13	1.18±0.02	1.94±0.08 ^①	1.23±0.03 ^①
VEGF	1.00±0.00	1.04±0.02	1.54±0.05 ^①	1.87±0.13 ^①	1.73±0.07 ^①
IL-10	1.00±0.00	1.19±0.02	0.93±0.12	0.78±0.13	0.43±0.07 ^①

注:①与对照组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$

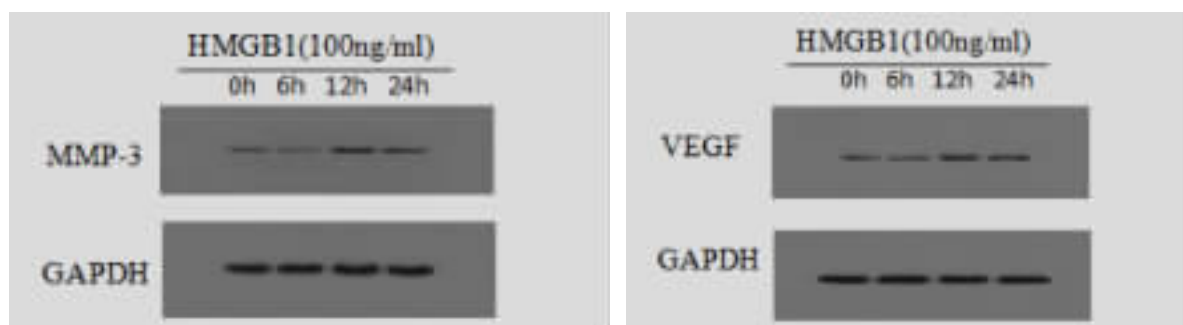


图 2 HMGB1 刺激后不同时间点软骨终板细胞中 MMP-3、VEGF 的蛋白表达情况

Figure 2 HMGB1 was added to third-generation cartilage endplate cells and the expression of MMP-3 and VEGF protein at 6h, 12h, and 24h

表 4 HMGB1 刺激后不同时间点软骨终板细胞中 MMP-3、VEGF、IL-10 蛋白表达

Table 4 The protein expression of MMP-3, VEGF and IL-10 mRNA in cartilage endplate cells at different time points after HMGB1 stimulation

	MMP-3	VEGF	IL-10(pg/ml)
对照组 Control group	1.00±0.00	1.00±0.00	61.29±2.48
6h	1.25±0.04	0.91±0.26	50.11±3.30
12h	2.03±0.14 ^①	1.70±1.13 ^①	27.26±2.63 ^①
24h	1.47±0.05	1.50±0.01	35.62±3.72

注: ①对照组比较 $P<0.05$

Note: ① Comparison between this group and the control group, $P<0.05$

表 5 加入 HMGB1 后 ERK 磷酸化在不同时间的表达

Table 5 The phosphorylation of ERK at the different time after addition HMGB1

	P-ERK	ERK	P值 P value
对照组 Control group	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00
5min	2.17±0.17	1.06±0.07	0.028
10min	2.82±0.29	0.99±0.03	0.042
30min	1.73±0.56	1.05±0.04	0.560
60min	1.27±0.30	1.11±0.05	0.738
120min	0.93±0.19	1.12±0.17	0.5



图 4 HMGB1 或/与 RAGE 抑制剂 FPSMZ1 联合刺激 CEC 后 ERK 信号转导途径的磷酸化表达水平(-为未加左侧试剂, +为加左侧试剂)

Figure 4 The cartilage endplate cells were stimulated with HMGB1 alone or in combination with the RAGE inhibitor-FPSMZ1. The phosphorylation level change(+ is reagent on the left side were added, - is reagent on the left side were not added)

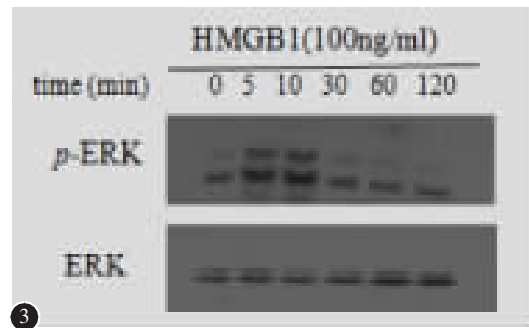


图 3 加入 HMGB1 后不同时间检测 ERK 信号转导途径的磷酸化表达

Figure 3 Treated with HMGB1. The phosphorylation of ERK signal transduction pathway was detected at different times by Western blot

表 6 HMGB1 或/与 U0126 刺激 CEC 后 MMP-3、VEGF(相对值)和 IL-10(绝对值)的变化

Table 6 The cartilage endplate cells were stimulated with HMGB1 or combination with U0126, the expression of MMP-3, VEGF, IL-10

	MMP-3	VEGF	IL-10(pg/ml)
对照组 Control group	1.00±0.00	1.00±0.00	88.44±3.53
HMGB1	1.56±0.04 ^①	1.61±0.38 ^①	48.18±2.45 ^①
U0126	0.71±0.07 ^①	0.69±0.29 ^①	129.73±3.31 ^①
HMGB1+U0126	1.22±0.10 ^①	1.32±0.44 ^①	68.16±1.76 ^①

注: ①对照组比较, $P<0.05$

Note: ①Comparison with control group, $P<0.05$

环氧化酶-2 的表达来抑制前列腺素的产生。因此, IL-10 不但能够抑制炎症反应, 而且还能限制由炎症引起的非正常组织损伤^[15, 16]。可见 MMP-3、VEGF 和 IL-10 与软骨终板的退变密切相关。

以往的研究已经证明, HMGB1 在滑膜成纤维细胞、鳞状细胞和巨噬细胞中能够促进 MMP-3 和 VEGF 的表达, 减少 IL-10 的表达^[21]。本研究对大鼠腰椎 CEC 进行了观察, 结果表明, 在 HMGB1 刺激 12h 后 CEC 中 MMP-3、VEGF 和 IL-10 都有明显的变化。MMP-3 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达随着时间延长呈现先上升后下降的趋势, 其中 24h 数值均大于 6h, 而 IL-10 随着时间延长呈现先下降后上升的趋势, 其中 24h 数值均小于 6h, 说明在大鼠腰椎 CEC 中 HMGB1 与 MMP-3、VEGF 和 IL-10 的变化密切相关。

为进一步了解 HMGB1 促进 CEC 退变的机制, 本研究探讨了可能的信号转导途径。其中

ERK 信号转导途径作为影响软骨细胞退变的途径已经被许多学者所关注^[2],它是各种生化过程的重要调节剂,主要与细胞的增殖、生长和分化有关^[2]。本研究选择 ERK 信号转导途径作为研究对象,通过使用 ERK 信号转导途径抑制剂 U0126,抑制 ERK 信号转导途径的激活,同时检测 MMP-3、VEGF 和 IL-10 蛋白表达的变化,结果发现加入 U0126 后,MMP-3 和 VEGF 蛋白表达下降,IL-10 蛋白表达增高,表明 U0126 削弱了 HMGB1 对 MMP-3、VEGF 和 IL-10 蛋白表达的调控作用,同时证明了 ERK 信号转导途径在 HMGB1 对 MMP-3、VEGF 和 IL-10 蛋白表达的调控作用中起着重要的作用。

为了进一步明确 ERK 信号转导途径在这一过程中的作用,本研究在 CEC 同时加入 HMGB1 和 RAGE 受体的抑制剂 (FPSZM1),结果显示,ERK 信号转导途径的磷酸化表达随着 HMGB1 刺激呈现不断增加的趋势,在加入 FPSZM1 后明显降低,证明 HMGB1 通过 ERK 信号转导途径引起 MMP-3、VEGF 和 IL-10 表达的变化。

综上所述,本研究证实大鼠腰椎 CEC 的退变与 HMGB1 密切相关,明确了软骨终板退变过程中 HMGB1 及相关因子表达的变化趋势,同时阐明了 HMGB1 介导 ERK 引起软骨终板退变可能的分子机制。我们推测抑制 HMGB1 的功能可以减缓软骨终板退变的过程,因此寻找延缓和抑制 HMGB1 功能的方法将可能为寻找治疗椎间盘退变的药物研发提供方向。但本研究对象为大鼠,虽然结果表明 HMGB1 在大鼠体内能够促进腰椎软骨终板的退变,但其在人体软骨终板的作用尚需进一步研究。其次,软骨终板退变的过程非常复杂,可能是多种炎性因子共同作用的结果,实验中的 MMP-3、VEGF 和 IL-10 在软骨终板退变的过程中可能只起到部分作用,需要研究更多参与其中退变机理的炎性因子,以期为后续的临床研究提供更详实的参考。

4 参考文献

1. Bibby SR, Jones DA, Lee RB, et al. The pathophysiology of the intervertebral disc[J]. Joint Bone Spine Revue Du Rhumatisme, 2001, 68(6): 537-542.
2. Zhou X, Chen L, Grad S, et al. The roles and perspectives of microRNAs as biomarkers for intervertebral disc degeneration[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 15(8): 89-99.
3. Garcia-Arandis I, Guillen MI, Gomar F, et al. High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1beta in osteoarthritic synoviocytes [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(4): R165.
4. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages[J]. Scand J Immunol, 2005, 61(1): 1-9.
5. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells [J]. Blood, 2003, 101(7): 2652-2660.
6. Xu HG, Zheng Q, Song JX, et al. Intermittent cyclic mechanical tension promotes cartilage endplate degeneration via canonical Wnt signaling pathway and E-cadherin/beta-catenin complex cross-talk [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(1): 158-168.
7. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor[J]. J Endocrinol, 2011, 209(2): 139-151.
8. Bonassar LJ, Stinn JL, Paguio CG, et al. Activation and inhibition of endogenous matrix metalloproteinases in articular cartilage: effects on composition and biophysical properties[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 333(2): 359-367.
9. Niu K, Zhao YJ, Zhang L, et al. The synergistic effect of amygdalin and HSYA on the IL-1beta induced endplate chondrocytes of rat intervertebral discs[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2014, 49(8): 1136-1142.
10. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease[J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29(10): 71-109.
11. Rannou F, Corvol M, Revel M, et al. Disk degeneration and disk herniation: the contribution of mechanical stress[J]. Joint Bone Spine, 2001, 68(6): 543-546.
12. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc[J]. Spine(Phila Pa 1976), 1995, 20(11): 1307-1314.
13. LeMaitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc[J]. J Pathol, 2004, 204(1): 47-54.
14. Lv F, Huang Y, Lv W, et al. MicroRNA-146a ameliorates inflammation via TRAF6/NF-kappaB pathway in intervertebral disc cells[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 659-664.
15. Wang FC, Pei JX, Zhu J, et al. Overexpression of HMGB1 A-box reduced lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation via HMGB1/TLR4 signaling in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(25): 7764-7776.
16. 刘勇, 邱元正, 张欣, 等. HMGB1 与 VEGF 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及其相关性研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 25(6): 265-269.
17. Terada C, Yoshida A, Nasu Y, et al. Gene expression and localization of high-mobility group box chromosomal protein-

- 1(HMGB-1) in human osteoarthritic cartilage[J]. Acta Med Okayama, 2011, 65(6): 369-377.
18. 王松, 张晔, 王凡, 等. 二期骨折愈合过程中骨痂软骨细胞凋亡与 VEGF 和 TGF- β 1 的表达 [J]. 中国运动医学杂志, 2003, 22(5): 463-465.
19. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors[J]. Arthritis Res, 2002, 4(3): 157-164.
20. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 35-44.
21. He ZW, Qin YH, Wang ZW, et al. HMGB1 acts in synergy with lipopolysaccharide in activating rheumatoid synovial fibroblasts via p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Mediators Inflamm, 2013, 24(19): 596-616.
22. 李晓飞, 张钊, 李晓东, 等. 新型机械激活离子通道蛋白 Piezo1 通过 MAPK/ERK1/2 信号通路介导软骨细胞凋亡的机制[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(31): 2472-2477.
23. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response[J]. Genes Cancer, 2013, 4(9-10): 401-408.
- (收稿日期:2018-04-20 末次修回日期:2018-11-05)
(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)

消息

欢迎订阅 2019 年《中国脊柱脊髓杂志》

《中国脊柱脊髓杂志》是由国家卫生健康委员会主管,中国康复医学会与中日友好医院主办,目前国内唯一以脊柱脊髓为内容的国家级医学核心期刊。及时反映国内外脊柱脊髓领域的科研动态、发展方向、技术水平,为临床医疗、康复及基础研究工作者提供学术交流场所。读者对象为从事脊柱外科、骨科、神经科、康复科、肿瘤科、泌尿科、放射科、基础研究及生物医学工程等及相关学科的专业人员。

本刊为中国科技信息中心“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”,中科院中国科学计量评价研究中心“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”,“中国精品科技期刊”,入选北京大学“中文核心期刊要目总览”,已分别入编 Chinainfo(中国信息)网络资源系统(万方数据)及以中国学术期刊光盘版为基础的中国期刊网(中国知网),影响因子名列前茅。

2019 年本刊仍为月刊,大 16 开,正文 96 页,每月 25 日出版。全册铜版纸彩色印刷。每册定价 30 元,全年 360 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 82-457;网上订阅:中国邮政网上营业厅,网址:<http://bk.11185.cn/index.do>,扫右侧二维码即可上网订阅。国外读者订阅请与中国国际图书贸易集团有限公司中文报刊科联系(100044,北京市车公庄西路 35 号),代号:BM6688。

本刊经理部可随时为国内外读者代办邮购(免邮寄费)。

地址:北京市朝阳区樱花园东街中日友好医院内,邮编:100029。

电话:(010)64284923。

