

基础研究

异时连体共生对小鼠椎旁肌肉衰老退变的影响

雷昌斌¹, 王 东², 林宏生³, 唐新文¹, 黄长兵¹, 蔡永得¹, 王 炯¹

(1 湘南学院附属医院骨科 423000 郴州市; 2 Ferguson Laboratory for Orthopaedic Research, Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA; 3 暨南大学第一附属医院脊柱科 510632 广州市)

【摘要】目的:通过异时连体共生(heterochronic parabiosis, HP)模型检测年轻小鼠血液循环环境对年老小鼠脊柱旁肌肉的影响。**方法:**选择 4 月龄的年轻小鼠及 18 月龄年老雌性小鼠,通过手术建立年轻和年老小鼠同时(isochronic parabiosis, IP)、异时连体共生模型。连体 8 周后将小鼠分成同时连体年轻小鼠组(young isochronic, YI),异时连体年轻小鼠组(young heterochronic, YH);同时连体年老小鼠(old isochronic, OI)和异时连体年老小鼠组(old heterochronic, OH)4 组,解剖并提取椎旁肌肉。通过流式细胞仪吸光度检测各组椎旁肌肉糖胺聚糖(glycosaminoglycans, GAG)及各组 DNA 的含量,提取肌肉组织蛋白行蛋白印痕(Western blot)检测衰老基因 P53、P21、P16 及自噬基因 LC3、金属蛋白酶 MMP13 基因的表达。取脊柱旁肌肉组织进行组织免疫荧光(immunofluorescence, IF)检测 Aggrecan、P16 及炎症因子 IL8 的表达差异性。**结果:**GAG 定量分析显示 YI、YH、OH、OI 各组分别为 2.91 ± 0.17 、 2.01 ± 0.21 、 2.23 ± 0.36 、 1.18 ± 0.09 , 其中 YI 与 YH、OH 与 OI 组之间有统计学差异($P < 0.05$);通过 IF 检测 Aggrecan 表达呈下降趋势, YI、YH、OH、OI 各组分别为 717.25 ± 64.44 、 611.59 ± 28.45 、 683.04 ± 17.95 、 570.34 ± 31.81 , 其中 OH 与 OI 组间有统计学差异($P < 0.05$), YI 与 YH 组间无统计学意义($P > 0.05$);IL8 基因表达 YI、YH、OH、OI 各组分别为 494.20 ± 28.35 、 561.62 ± 44.72 、 602.35 ± 45.57 、 726.36 ± 58.40 ; P16 基因表达 YI、YH、OH、OI 各组分别为 701.30 ± 27.21 、 695.92 ± 31.06 、 754.82 ± 25.78 、 815.54 ± 24.70 , 有上升趋势但 YI 与 YH、OH 与 OI 组间无明显差异($P > 0.05$)。Western blot 检测自噬基因 LC3 II/I 蛋白表达呈下降趋势 YI、YH、OH、OI 各组分别为 0.39 ± 0.09 、 0.29 ± 0.05 、 0.26 ± 0.04 、 0.16 ± 0.01 ;衰老基因 P21 蛋白表达 YI、YH、OH、OI 各组分别为 1.09 ± 0.23 、 1.32 ± 0.12 、 1.54 ± 0.03 、 1.86 ± 0.06 ;金属蛋白酶 MMP13 蛋白表达 YI、YH、OH、OI 组分别为 0.59 ± 0.11 、 0.68 ± 0.13 、 0.88 ± 0.15 、 1.11 ± 0.18 。在 LC3 II/I、P21、MMP13 表达中, YI 与 YH 组间无明显差异性($P > 0.05$), OH 与 OI 组间有统计学差异($P < 0.05$)。**结论:**全身血液循环可以影响椎旁肌肉退变,年轻血液环境可以延缓年老小鼠脊柱旁肌肉衰老退变。

【关键词】连体共生;脊柱退变;年轻血液;衰老

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.01.10

中图分类号:R602 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2019)-01-0060-07

Effect of heterochronic parabiosis model on old mouse spine muscle aging/LEI Changbin, WANG Dong, LIN Hongsheng, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(1): 60-66

【Abstract】Objectives: Heterochronic parabiosis model was used to achieve the chimerism of young and elderly individuals through blood circulation, so as to reverse paravertebral muscle aging. **Methods:** With the means of surgical pairing on wild type C57B6 female mouse, young(Y, age 4 mth) and old(O, age 18 mth) by using the heterochronic parabiosis and isochronic parabiosis model. Mouse were sacrificed eight weeks after surgical pairing. After separating four main groups, young isochronic (YI), young heterochronic (YH), old isochronic(OI) and old heterochronic(OH) were obtained. After the treatment, matrix gene expression, total glycosaminoglycans, Western blot and immunofluorescence analysis were used to determine the effects of heterochronic parabiosis model. **Results:** GAG assay showed that the YI, YH, OH, OI data presented a decreasing trend in each group, YI 2.91 ± 0.17 , YH 2.01 ± 0.21 , OH 2.23 ± 0.36 , OI 1.18 ± 0.09 , respectively. There was significant difference between the two groups($P < 0.05$). The immunofluorescence demonstrated increased Aggrecan protein, YI 717.25 ± 64.44 , YH 611.59 ± 28.45 , OH 683.04 ± 17.95 , OI 570.34 ± 31.81 , respectively. There was

第一作者简介:男(1987-),在职博士,主治医师,研究方向:骨与关节退变

电话:(0735)2325359 E-mail:461391194@qq.com

a statistical difference between the OH and OI group ($P<0.05$). And the LI8 expression showed YI 494.20 ± 28.35 , YH 561.62 ± 44.72 , OH 602.35 ± 45.57 , OI 726.36 ± 58.40 ; the P16 expression showed YI 701.30 ± 27.21 , YH 695.92 ± 31.06 , OH 754.82 ± 25.78 , OI 815.54 ± 24.70 , with no statistical significance among the groups. The expression of autophagy gene LC3 II/I showed a decreasing trend by using Western blot, which was YI 0.39 ± 0.09 , YH 0.29 ± 0.05 , OH 0.26 ± 0.04 , OI 0.16 ± 0.01 ; the senescence gene P21 protein expression was YI 1.09 ± 0.23 , YH 1.32 ± 0.12 , OH 1.54 ± 0.03 , OI 1.86 ± 0.06 . The expression of MMP13 protein was YI 0.59 ± 0.11 , YH 0.68 ± 0.13 , OH 0.88 ± 0.15 , OI 1.11 ± 0.18 . Among the LC3 II/I, P21 and MMP13 expressions, there was no significant difference between YI and YH group ($P>0.05$), but significant difference in OH compared with OI group ($P<0.05$). **Conclusions:** Our findings provide evidence supporting the hypothesis that systemic blood circulation can affect paravertebral muscle degeneration. The heterochronic parabiosis model through the young blood circulation can variably promote tissue proliferation, reduce tissue damage, and restore organ function.

[Key words] Parabiosis; Spine degeneration; Young blood; Aging

[Author's address] The Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou, 423000, China

脊柱退行性病变作为临床上一种常见疾病,主要由于衰老过程中炎症、氧化应激及细胞凋亡等引起椎间盘及椎旁肌肉退行性病变^[1,2]。目前尚无方法可完全抑制或者逆转脊柱退行性改变。连体共生动物模型(parabiosis animal model)的理念来源于连体婴儿,连体后仍是两个独立的个体,无宿主与供体之分,可以通过血液交换达到逆转组织衰老的目的,同时避免了器官移植可能引发的强烈的排异反应^[3]。近年来在一些领域如神经、心脏、肾脏、肝脏等组织器官取得新进展和突破,认为通过异时连体(heterochronic parabiosis, HP)共生的血液交换,可以逆转神经、心脏、肾脏等脏器组织的衰老^[4,5]。

脊柱退行性病变主要包括椎间盘、椎旁肌肉及脊椎小关节的退行性病变,退变引起细胞凋亡、自噬、炎症因子增加及细胞基质异常分解代谢有关^[6]。椎间盘、椎旁肌肉及脊椎小关节的退行性病变,引起细胞凋亡、自噬、炎症因子增加及细胞基质异常分解代谢。椎间盘主要是由内部髓核、外围纤维环和上、下终板构成,椎间盘内部髓核无直接血液供应和神经支配,是人体唯一无血供器官,内部缺氧、低 pH 值,营养物质主要通过软骨终板和纤维环的渗透作用^[7]。椎旁肌肉组织钙化及退变引起脊柱生物力学改变,加速椎间盘退变,但是椎旁肌肉组织血供丰富。连体共生是否能够扭转或抑制椎旁肌肉及无血管的椎间盘髓核组织的退变,目前国内尚相关研究。本研究通过小鼠连体共生模型,研究年轻小鼠血液环境对老年小鼠脊柱椎旁肌肉代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验通过动物伦理委员会审查和批准,选用 C57BL/6J 型小鼠,其中年轻小鼠选择 4 月龄雌性小鼠 8 只,年老小鼠选择 18 月龄雌性小鼠 8 只,对体重无明显限制。连体手术后按标准条件下每对连体小鼠单笼饲养,给予充足的食物和水。并严格遵守国家卫生和医学研究委员会对实验动物护理和管理的相关指南。

1.2 主要仪器设备

流式细胞仪:2030 Multilabel Reader VicToR X3 (PerkinElmer, 美国)。Western Blot 仪器:ChemiDoc MP Imaging System (Bio-RAD, 美国)。清洁操作台、病理切片机及荧光显微镜(Nikon Eclipse Ts100, Nikon Instruments Inc. Melville, 美国)。

1.3 试剂

培养基:90% DMEM/F-12 (1X) (Life Technologies, 美国);10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (ATLANTA, 美国)。抗体:P16、P21、ADAMTS4、MMP13 (abcam, 美国), P53 (Cell Signaling 美国)。DAPI: (4',6-diamidino-2-phenylindole) 即 4',6-二脒基-2-苯基吲哚。规格:2ml; 型号:P36935 (Invitrogen, 美国)。

1.4 连体动物模型的建立

按照年轻和年轻同时连体 (isochronic parabiosis, IP), 年轻和年老的 HP, 年老的和年老 IP 连体融合 8 周。术前注意做好小鼠保温及清洁消毒, 手术从一侧小鼠前肢肘关节沿腹部到后肢膝关节处切开皮肤, 从筋膜层分离皮肤, 为了增大血

液交流面积将皮肤及部分腹膜融合,缝合腹膜注意连续缝合,不留间隙,预防内脏疝的出现。麻醉苏醒后,将小鼠放置 37℃ 温箱以便小鼠体温调节恢复。每个笼子饲养 1 对共生小鼠,提供充足的水及食物。术后一天从尾部静脉注射 Evan blue 染料检测连体小鼠是否共享血液循环。术后 2 周为手术伤口感染和连体病发生的高发期,每天用酒精加强伤口消毒和检查,必要时限制小鼠的活动,防止伤口撕裂和感染。连体 8 周连体共生后用 CO₂ 处死小鼠,将连体小鼠分离后按照小鼠的年龄和融合方式分成同时连体年轻小鼠组(young isochronic, YI), 异时连体年轻小鼠组(young heterochronic, YH); 同时连体年老小鼠(old isochronic, OI) 和异时连体年老小鼠组(old heterochronic, OH)。其中 YH 组与 OH 组分离于年轻与年老异时连体模型(图 1), 每组 3 个样本。取出小鼠脊柱腰椎旁肌肉处理。

1.5 糖胺聚糖(glycosaminoglycans, GAG)检测

提取脊柱旁肌肉后按照 1:50 加入消化液(包含 50mmol/L NaOAc, 5mmol/L EDTA, 5mmol/L L-cysteine, 300mg/ml papain, 55mmol/L citric acid, 150mmol/L NaCl)在 60℃ 温箱消化 6h。使用软骨素-6-硫酸酯(Sigma C-8529)作为标准检测,通过二甲基亚甲基蓝染料结合试验(dimethyl-methylene blue dye-Binding assay, DMMB) 程序测量 GAG 含量,每个样本采用双份重复,测定在

595nm 处吸光度,最后取均值。取 25ul 剩余样本使用 Quant-iT PicoGreen ds DNA 试剂盒(Invitrogen, Eugene, OR, 美国)检测样本 DNA 含量,最后用 GAG 值除以单位体积的 DNA 含量。

1.6 组织免疫荧光检测

解剖各组椎旁肌肉切成 0.5×0.5×0.5cm 大小,在 4℃ 房间浸泡于 2% 的多聚甲醛液中静置一晚,取出后用 PBS 冲洗 3 次,再将肌肉浸泡在 30% 的蔗糖溶液中放置 4℃ 房间静置一晚。取出肌肉组织用包埋剂(optimum cutting temperature, OCT)顺着肌纤维方向包埋,放置 -80℃ 冰箱 1d 后冰冻切片,组织厚度设定为 7μm。将贴片后的载玻片放入 PBS 液 5min 洗 3 次,封闭 1h 后加入 150μl 一抗(Aggregan, IL8, P16, 抗体按照 1:200 稀释)避光过夜。第 2 天用 PBS 液洗 5 次,加入二抗 150μl (抗体按 1:500 稀释 Invitrogen, 美国),再次用 PBS 液洗 5 次后加入 DAPI(Invitrogen, Eugene, OR, 美国)染色后盖上盖玻片,注意避光保存。样本使用尼康(Nikon Eclipse Ts100; Nikon Instruments Inc, Melville, 美国)荧光显微镜读片,使用相同的设置和曝光时间获取不同组别的图像并进行等效处理。

1.7 蛋白印痕(Western blot)检测

提取各组脊柱腰椎旁肌肉,按 1:20 加入蛋白裂解液,提取各样本组织蛋白后,先用 BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Pittsburgh, 美

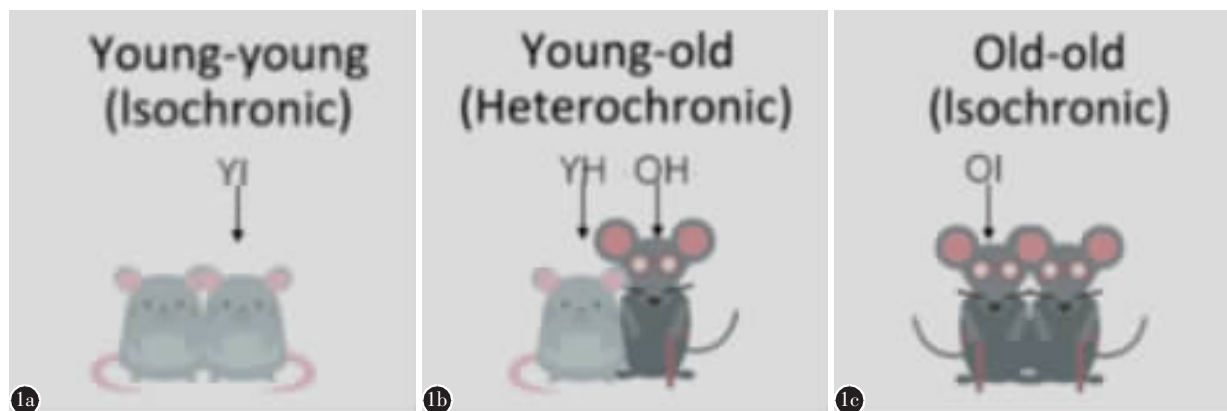


图 1 a 年轻和年轻小鼠连体融合作为阴性对照 b 年轻和年老小鼠连体融合建立异时连体模型 c 年老和年老小鼠连体融合建立阳性对照。术后分离连体小鼠,分为同时连体年轻小鼠组(YI), 异时连体年轻小鼠组(YH), 异时连体年老小鼠组(OH)和同时连体年老小鼠组(OI)

Figure 1 a Young mouse and young mouse isochronic parabiosis b Young mouse and old mouse heterochronic parabiosis c Old mouse and old mouse isochronic parabiosis. Mouse were sacrificed six weeks after surgical pairing, and divided into young isochronic(YI), young heterochronic(YH), old heterochronic(OH) and old isochronic(OI)

国)测定蛋白浓度。平衡蛋白浓度后每孔加入 30 μ g 蛋白量,使用 4%~20%聚丙烯酰胺凝胶跑胶,之后转膜至 PVDF 膜 (Bio-Rad, Hercules, 美国)。室温下在 5% 的无脂牛奶 (Bio-Rad, Hercules, 美国)封闭 1h。分别加入一抗 P16、P21、MMP13、LC3 在 4 $^{\circ}$ C 摇摆平台上过夜。第 2 天用 TBS-T 缓冲液清洗 3 遍 PVDF 膜,每次 10min,之后在室温下加入二抗 (ab:31460, 1:10000 稀释, ThermoFisher, 美国)1h。另外在用 PBS-T 洗涤三次,使用奥德赛成像仪 (LI-COR Biosciences, Lincoln, 美国)以化学显色蛋白质条带,并且通过使用奥德赛成像仪上的软件进行定量分析。

1.8 统计方法

实验结果的统计学分析采用 3 组独立实验数据的平均值,将所有回收的资料统一编号后,采用 Graphpad Prism 7.03 统计软件对数据进行统计分析。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, P 值取双侧概率,进行统计描述和统计推断。应用百分率、均数、标准差等对一般资料进行统计学描述;比较年轻 YI、YH、OH、OI 各组差异。

2 结果

2.1 GAG 检测

实验数据 YI、YH、OH、OI 定量分析后数值呈下降趋势, YI 与 YH、OH 与 OI 之间比较,其中 YI 与 YH、OH 与 OI 组间比较均有统计学差异 ($P<0.05$)。

2.2 免疫荧光检测

通过免疫荧光 (Immunofluorescence, IF) 检测 Aggrecan 表达呈下降趋势, YI 与 YH 组间无明显差异 ($P>0.05$), OH 与 OI 组有统计学差异 ($P<0.05$)。IF 检测 P16、IL8 表达量在 YI、YH、OH、OI 中呈上升趋势,但 YI 与 YH 组, OH 与 OI 组间均没有明显差异性 ($P>0.05$) (表 1、图 2)。

2.3 Western blot 检测

LC3 II/I 在 YI、YH、OH、OI 呈现下降趋势,其中 OH、OI 组间有统计学差异 ($P<0.05$);衰老基因 P21 蛋白表达 OH、OI 组间有统计学差异 ($P<0.05$);金属蛋白酶 MMP13 蛋白表达 OH、OI 组间有统计学差异 ($P<0.05$) (表 2、图 3)。

3 讨论

随着人口结构不断向老龄化发展,腰痛在临

床工作中越来越常见,其中脊柱退行性病变是引起腰痛的主要病因,在 2010 年全球约有 2.17 亿腰痛患者^[8]。本研究通过手术建立年轻和年老小鼠 IP、HP 模型,经过血液融合相互交换物质,研究年轻血液环境对肌肉组织退行性衰老的影响。为进一步研究连体共生模型对小鼠脊柱椎间盘衰老退变的影响及机制提供对照和前期研究基础。

Bert^[9]于 1864 年报道了连体共生模型,包括 IP 及 HP,其理念受连体婴儿的启发,将两个不同的个体通过皮肤血管融合建立血液循环,使得两个个体实现体内血液物质的交换、循环。之后连体共生模型开展从肿瘤、免疫、口腔方面的研究,直到 1972 年 Ludwing 等^[10]首次报道了异时连体动物模型对老年小鼠寿命的影响,才真正开始了异时连体共生模型对于老年性衰老生理、病理等各方面的研究。

连体共生模型已经在神经、心脏、肾脏、免疫等方面证明了异体共生模型年轻血液循环对细胞和组织衰老过程中有重要的调节作用。Loffredo 等^[5]通过对 6 对异时连体共生小鼠模型进行分析,发现年老小鼠肥大的心肌细胞在连体 4 周时明显缩小,并通过蛋白组学分析发现了 TGF- β (transforming growth factor- β) 家族成员 GDF-11 (growth differentiation factor 11) 蛋白,可逆转心肌细胞老年性肥大。Sinha 等^[11]和 Katsimpardi 等^[12]通过连体共生实验则进一步证实了 GDF-11 可以增强脑血管重塑和提高神经元活性,从而促进神经及大脑血管的发育,改善老年小鼠骨骼肌的运动功能。GAG 为脊柱椎间盘及肌肉重要成分,参与多种氨基酸组成,对细胞生长、分化,形态结构,细胞迁移和微生物感染中均有重要作用^[13]。与本研究显示异时连体后 OH 组椎旁肌肉 GAG

表 1 组织免疫荧光 IF 检测 Aggrecan、IL8 及 P16 基因蛋白表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Quantitative analysis of Aggrecan, IL8 and P16 gene expression by tissue immunofluorescence

	Aggrecan	IL8	P16
YI	717.2 $\pm$ 64.44	494.2 $\pm$ 28.35	701.3 $\pm$ 27.21
YH	611.6 $\pm$ 28.45	561.6 $\pm$ 44.72	695.9 $\pm$ 31.06
OH	683 $\pm$ 17.95	602.3 $\pm$ 45.57	754.8 $\pm$ 25.78
OI	570.3 $\pm$ 31.81 ^①	726.4 $\pm$ 58.4	815.5 $\pm$ 24.7

注:①与 OH 组比较 $P<0.05$

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

含量较年老小鼠同时连体 OI 组明显升高, 并且 YI 组大于 YH 组。椎旁肌肉组织衰老不仅受肌肉细胞衰老的局部影响, 也受全身血液环境的影响。

Aggrecan 可以保持肌肉细胞基质水分含量, 其损耗可直接导致细胞基质水量减少, 肌肉纤维化程度升高, 加速细胞凋亡和退变。本研究通过 IF 检测 Aggrecan 表达呈下降趋势, 其中 OH 与 OI 组有统计学差异 ($P < 0.05$)。细胞衰老主要因端粒缩短、DNA 损伤、氧化应激、癌基因激活等原因引起^[14,15]。衰老细胞内 P53-P21-Rb 和 P16-Rb 信号通路被激活, 导致细胞复制停止在 G1 期和抑制

CDK4、CDK6 导致 Rb 和 Hb 的低磷酸化状态引起细胞退变^[16]。我们通过 IF 和 Western blot 检测了衰老基因 P16、P21、P53 在肌肉组织中的表达, 通过连体共生血液共享, 年轻小鼠的血液环境使年老小鼠的椎旁肌肉内衰老基因 P16、P21、P53 基因的表达量减少, 抑制了细胞衰老。

研究表明^[17], 自噬细胞除了可以增强先天性免疫控制细胞内致病菌繁殖外, 还可以预防细胞凋亡。Huang 等^[18]通过研究异时连体共生对小鼠肾脏组织的影响, 发现在年轻小鼠的血液环境下, 老年小鼠肾脏中的自噬水平显著增强, 并可修复

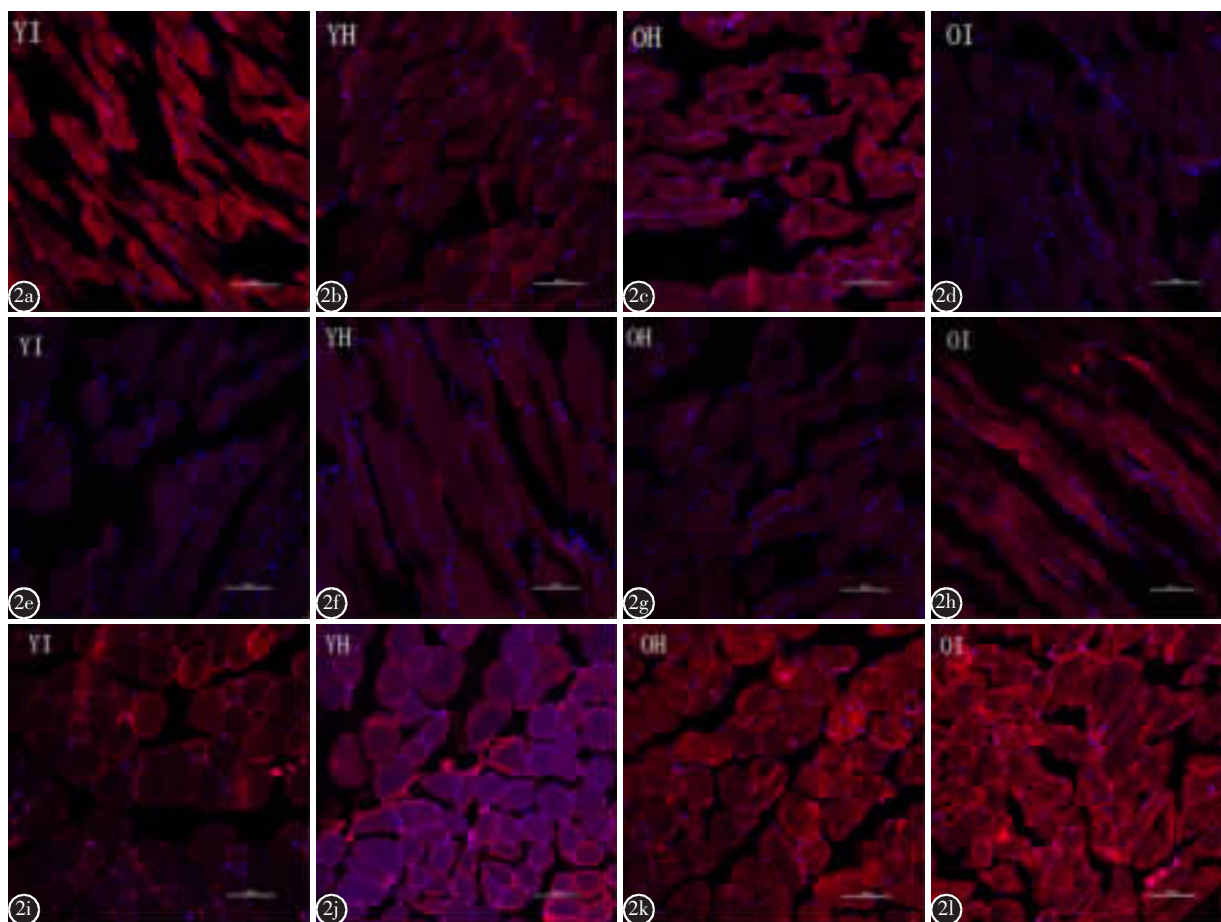


图 2 a~d Aggrecan 基因在脊柱椎旁肌肉组织免疫荧光在荧光显微镜下 YI、YH、OH、OI 四组中的表达图像, 蓝色为细胞核荧光 (DAPI) 染色, 红色为 Aggrecan 染色, 可见红色在 OI 组中最淡 e~h IL8 基因表达在荧光显微镜下 YI、YH、OH、OI 四组中的染色表达图像 i~l P16 基因表达在荧光显微镜下 YI、YH、OH、OI 四组中的染色。蓝色为细胞核荧光 (DAPI) 染色, 红色分别为 IL8、P16 基因表达染色, 四组红色逐渐加深 (20×10 倍)

Figure 2 a~d Immunofluorescence image of muscle tissue the Aggrecan gene expression in YI, YH, OH and OI groups under fluorescent microscope. The blue color was the nuclear fluorescent staining (DAPI), the red was the Aggrecan staining, and the red was the lightest in the OI group e~h The expression of IL8 genes in the four groups of YI, YH, OH and OI under fluorescence microscope i~l The expression of P16 genes in the four groups of YI, YH, OH and OI under fluorescence microscope. Blue was nuclear fluorescent staining, and red was the expression of IL8 and P16 genes, which gradually deepen in all 4 groups (20×10)

衰老损伤的肾脏组织。本研究结果表明自噬基因 ILC3 II/I 在异时连体老年小鼠 OH 组中明显比老年同时连体 OI 组升高 ($P<0.05$), 与 Qi 结果一致。金属蛋白酶 MMP13 与肿瘤细胞迁移、细胞外基质降解和细胞凋亡相关^[19]。我们通过 Western blot 检测 OH 组 MMP13 表达较 OI 组降低, OH 组

表 2 Western Blot 检测蛋白 LC3、P16、P21、P53 和 MMP13 在椎旁肌肉组织中的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of autophagy makers LC3, p16, p21, p53 and MMP13 in the spine muscle tissues

	YI	YH	OH	OI
LC3 II/I	0.39±0.09	0.29±0.05	0.26±0.04	0.16±0.01 ^②
P16	0.51±0.09	0.68±0.07	0.77±0.09	0.82±0.16
P21	1.09±0.23	1.32±0.12	1.54±0.03	1.86±0.06 ^②
P53	0.85±0.05	1.23±0.01 ^①	1.47±0.10	1.67±0.15
MMP13	0.59±0.11	0.68±0.13	0.88±0.15	1.11±0.18 ^②

注: ①与 YI 组比较 $P<0.05$; ②与 OH 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with YI group, $P<0.05$; ②Compared with OH group, $P<0.05$

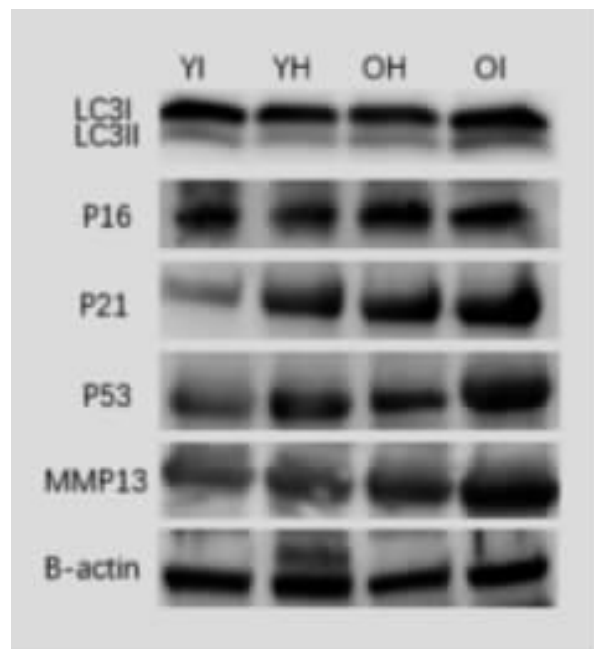


图 3 Western Blot 检测蛋白 LC3、P16、P21、P53 和 MMP13 在各组脊柱肌肉组织中的表达。可见 YH 组各蛋白表达定量高于 YI 组, OH 组蛋白表达量低于 OI 组

Figure 3 Expression of autophagy makers LC3, P16, P21, P53 and MMP13 in the spine muscle tissues. The results showed that the expression of each protein in YH groups were higher than in YI groups and the OH groups protein expression were lower than that in OI groups

与 OI 组间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

连体共生模型是通过血液交换达到使得退变衰老组织恢复活力的目的, 我们的研究结果表明存在一种或多种血源性因子控制脊柱椎旁肌肉的衰老退变。目前衍生出血液、血浆及它们的衍生物对于细胞功能、组织再生、修复已有广泛的应用, 通过改变机体内环境, 达到逆转和延缓衰老的效果。最新的演变发展包括使用间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 及富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 对骨关节炎、肌腱干细胞修复的应用, 并取得了积极的临床疗效^[20, 21]。Aicardi^[4]的研究证实年老小鼠反复注射年轻小鼠血浆可逆转海马细胞外信号调节酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的过度磷酸化, 从而改善小鼠空间工作记忆和联想记忆。

我们建立同时和异时连体共生模型, 了解和分析连体模型对脊柱椎旁肌肉的影响, 为下一步研究连体共生模型对缺少血液和营养物质供应的椎间盘组织退变的影响及机制。研究表明脊椎肌肉衰老受全身血液环境影响, 并不是由椎旁肌肉细胞因素单独决定。但目前我们对血液循环中什么因子或因素逆转椎旁肌肉衰老并不清楚, 需要进一步研究细胞老化的机制和遗传学表现。连体共生年轻小鼠血液循环, 可以逆转老年小鼠体内脊椎旁肌肉衰老, 为临床上治疗脊柱退行性病变引起的腰背痛寻找新的方法和理论, 具有重要的临床指导意义和重大的社会及经济效益。

4 参考文献

- Calvo-Echenique A, Cegonino J, Correa-Martin L, et al. Intervertebral disc degeneration: an experimental and numerical study using a rabbit model[J]. Med Biol Eng Comput, 2018, 56(5): 865-877.
- Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, et al. A mouse intervertebral disc degeneration model by surgically induced instability [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2018, 43(10): E557-E564.
- Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA. Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity[J]. Aging Cell, 2013, 12(3): 525-530.
- Aicardi G. Young blood plasma administration to fight Alzheimer's disease?[J]. Rejuvenation Res, 2018, 21(2): 178-181.
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy[J]. Cell, 2013, 153(4): 828-839.

6. Oh CH, Yoon SH. Whole spine disc degeneration survey according to the ages and sex using pfirrmann disc degeneration grades[J]. *Korean J Spine*, 2017, 14(4): 148–154.
 7. Vo NV, Hartman RA, Patil PR, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(8): 1289–1306.
 8. Driscoll T, Jacklyn G, Orchard J, et al. The global burden of occupationally related low back pain: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 975–981.
 9. Bert P. Expériences et considérations sur la greffe animale[J]. *J Anatomie Physiologie*, 1864, 1: 69–87.
 10. Ludwig FC, Elashoff RM. Mortality in syngeneic rat parabionts of different chronological age[J]. *Trans NY Acad Sci*, 1972, 34(7): 582–587.
 11. Sinha M, Jang YC, Oh J, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle[J]. *Science*, 2014, 344(6184): 649–652.
 12. Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors[J]. *Science*, 2014, 344(6184): 630–634.
 13. Yamada S, Sugahara K, Ozbek S. Evolution of glycosaminoglycans: comparative biochemical study [J]. *Commun Integr Biol*, 2011, 4(2): 150–158.
 14. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing [J]. *Nature*, 2014, 509(7501): 439–446.
 15. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(7): 482–496.
 16. Feng C, Liu H, Yang M, et al. Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: causes and molecular pathways [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(13): 1674–1684.
 17. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 221–225.
 18. Huang Q, Ning Y, Liu D, et al. A young blood environment decreases aging of senile mice kidneys[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018, 73(4): 421–428.
 19. Yu H, Fellows A, Foote K, et al. FOXO3a (forkhead transcription factor O subfamily member 3a) links vascular smooth muscle cell apoptosis, matrix breakdown, atherosclerosis, and vascular remodeling through a novel pathway involving MMP13 (Matrix Metalloproteinase 13)[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 555–565.
 20. Borakati A, Mafi R, Mafi P, et al. A systematic review and meta-analysis of clinical trials of mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(3): 215–225.
 21. Meheux CJ, McCulloch PC, Lintner DM, et al. Efficacy of intra-articular platelet-rich plasma injections in knee osteoarthritis: a systematic review[J]. *Arthroscopy*, 2016, 32(3): 495–505.
- (收稿日期:2018-05-06 末次修回日期:2018-07-12)
(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)
(本文编辑 姜雅浩)