

机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001857

白血病抑制因子对退变髓核细胞胞外基质的影响
及其机制研究周 浩¹, 肖 强², 沈皆亮¹, 王 棚¹, 郑鹏骥¹, 刘沪喆¹, 郝 杰¹, 王羿阳¹, 胡侦明¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016; 2. 江西省人民医院骨科, 南昌 330006)

【摘要】目的:探讨退变椎间盘髓核组织白血病抑制因子(leukemia inhibit factor, LIF)表达及其对胞外基质表达的影响。**方法:**40 只新西兰兔随机分 5 组(1 组为对照组, 4 组为实验组), 每组 8 只。针刺法建立 L4/5、L5/6 椎间盘退变模型, 术后 0、2、4、8 周对椎间盘进行 MRI 扫描及 HE 染色评价退变程度, 免疫组化检测髓核组织 LIF 的表达。体外原代培养兔髓核细胞, 不同浓度重组 LIF 蛋白刺激髓核细胞 24、48、72 h, Western blot 检测聚蛋白多糖(Aggrecan)、II 型胶原(COLLA2 α 1)的表达, 免疫荧光检测最大浓度组和对照组 Aggrecan 的表达并行 Western blot 检测金属蛋白酶组织抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP-1)和基质金属蛋白酶-3(matrixmetalloproteinase-3, MMP-3)的表达。**结果:**影像学和组织学评分显示椎间盘退变随造模时间延长而加重, 各组间差异有统计学意义(1.000 ± 0.000 , 2.000 ± 0.535 , 2.750 ± 0.463 , 3.875 ± 0.354 , $P=0.000$; 4.000 ± 0.000 , 7.375 ± 0.518 , 9.375 ± 1.302 , 11.750 ± 0.463 , $P=0.000$)。免疫组化显示 2 周组 LIF 表达最高, 随着椎间盘退变加重, 其表达降低, 但各组均高于 0 周组, 差异有统计学意义(559.608 ± 68.689 , $16\ 135.613 \pm 577.329$, $8\ 149.739 \pm 457.189$, $2\ 018.254 \pm 211.870$, $P=0.000$)。细胞学实验显示, 加入不同浓度 LIF 刺激后, Aggrecan、COLLA2 α 1 的蛋白表达与 LIF 刺激浓度呈正相关, 各处理组与对照组差异有统计学意义(0.191 ± 0.020 , 0.212 ± 0.020 , 0.321 ± 0.041 , 0.511 ± 0.032 , 0.561 ± 0.042 , $P=0.000$), Aggrecan 免疫荧光结果与之相符。处理组 TIMP-1 表达明显高于对照组(0.454 ± 0.022 , 0.211 ± 0.012 , $P=0.000$), MMP-3 明显低于对照组(0.243 ± 0.013 , 0.362 ± 0.021 , $P=0.000$)。 **结论:** LIF 在退变髓核组织中表达上升, 且具有促进胞外基质合成作用, 其潜在机制与 LIF 能够上调 TIMP-1 并下调 MMP-3 作用相关。

【关键词】兔; 椎间盘退变; 髓核细胞; 白血病抑制因子; 胞外基质**【中图分类号】**R602**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-12-29Effects of leukemia inhibit factor on extracellular matrix of degenerative
nucleus pulposus cells and its mechanismZhou Hao¹, Xiao Qiang², Shen Jieliang¹, Wang Peng¹, Zheng Pengji¹,
Liu Huzhe¹, Hao Jie¹, Wang Yiyang¹, Hu Zhenming¹

(1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Orthopedics, Jiangxi Provincial People's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of leukemia inhibit factor(LIF) in degenerative disc nucleus pulposus and its role in degenerative nucleus pulposus extracellular matrix synthesis. **Methods:** Forty adult New Zealand white rabbits were randomly divided into 5 groups(1 group as the control group, the remaining 4 groups as the experimental group), 8 rabbits in each group. Intervertebral disc degeneration model was established by puncturing the L4/5 and L5/6 intervertebral discs in the experimental group. MRI scoring was performed on the discs at 0, 2, 4, 8 weeks immediately after the operation, and the discs were obtained and stained with hematoxylin and eosin to get histological scores and to determine the degree of degeneration. Immuno-histochemical staining was used to semi-quantitatively detect the expression of LIF in nucleus pulposus. Rabbit nucleus pulposus cells were harvested for primary

作者介绍:周 浩, Email: 1182975604@qq.com,

研究方向: 脊柱退行性疾病。

通信作者:胡侦明, Email: spinecenter@163.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 81372003); 江西省自然科学基金资助项目(编号: 20151BAB205092); 江西省卫生计生委科技计划资助项目(编号: 20155065)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181012.1430.004.html>
(2018-10-14)culture; the expressions of Aggrecan, COLLA2 α 1 in human intervertebral disc nucleus pulposus cells were detected by Western blot at 24, 48, 72 h after treated with gradient concentration human recombinant LIF protein. In maximal concentration group and control group, Aggrecan expression was again verified by immunofluorescence and the expressions of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3) were detected by Western blot. **Results:** The imaging

scores and histological scores showed that the degeneration of intervertebral disc increased with the prolongation of modeling time, and there was a significant difference (1.000 ± 0.000 , 2.000 ± 0.535 , 2.750 ± 0.463 , 3.875 ± 0.354 , $P=0.000$; 4.000 ± 0.000 , 7.375 ± 0.518 , 9.375 ± 1.302 , 11.750 ± 0.463 , $P=0.000$). The LIF expression in puncture 2-week group was significantly higher, as disc degeneration aggravated, the expression decreased gradually, and the expression level of each experimental group was higher than that of the 0 week group, the difference was statistically significant (559.608 ± 68.689 , $16\ 135.613 \pm 577.329$, $8\ 149.739 \pm 457.189$, $2\ 018.254 \pm 211.870$, $P=0.000$). Cytology experiments showed that after stimulation of different LIF concentrations, Aggrecan, COLLA2 α 1 protein expression and LIF stimulus concentration was positively correlated, and there was a significant difference between each concentration group and the control group (0.191 ± 0.020 , 0.212 ± 0.020 , 0.321 ± 0.041 , 0.511 ± 0.032 , 0.561 ± 0.042 , $P=0.000$), and Aggrecan immunofluorescence results were consistent. TIMP-1 expression in the treatment group was significantly higher than that of control group (0.454 ± 0.022 , 0.211 ± 0.012 , $P=0.000$); MMP-3 expression in the treatment group was significantly lower than that in the control group (0.243 ± 0.013 , 0.362 ± 0.021 , $P=0.000$). **Conclusion:** LIF expression in degenerative nucleus pulposus is increased, and LIF can promote the synthesis of extracellular matrix, and its underlying mechanism is related to up-regulating TIMP-1 and down-regulating MMP-3.

【Key words】rabbit; disc degeneration; nucleus pulposus; leukemia inhibit factor; extracellular matrix

脊柱退变导致的下腰痛已成为一个严重的公共问题,近年来的研究认为椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是脊柱退行性疾病发生的关键诱因^[1]。但 IDD 的具体发病机制仍不明确。但胞外基质合成与分解代谢失衡被认为是导致 IDD 的直接原因^[2]。近年来研究表明,炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)- α 等在椎间盘退变过程中对细胞凋亡及胞外基质代谢中发挥重要作用^[3-4]。白血病抑制因子(leukemia inhibit factor, LIF)最早在研究鼠骨髓样白血病 M1 型细胞时发现^[5], LIF 与炎症因子 IL-6 同属 E6 家族,且具有相同的受体转换机制^[6]。以往研究表明, LIF 因子对关节软骨具有促分解代谢作用,而软骨和髓核细胞具有相似的细胞表型^[7-8],但 LIF 在椎间盘组织内是否表达,以及在椎间盘退变中的作用仍未见报道。本研究拟通过纤维环穿刺建立兔椎间盘退变模型,观察 LIF 在退变椎间盘髓核中的表达情况,通过原代培养兔髓核细胞研究 LIF 对于胞外基质的作用,通过检测 LIF 对于基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、金属蛋白酶组织抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)的影响初步探讨其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验动物、细胞及试剂

成年新西兰兔 40 只,雌雄不限(2.5 ± 0.2 kg),购自重庆医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(渝)2017-0001]。

主要试剂:戊巴比妥钠(Merck)、多聚甲醛固定液、EDTA 脱钙液(BOSTER)、SP 法免疫组化染色试剂盒、Alexa Fluor 594 荧光二抗(中杉金桥)、HE 染色试剂(重庆医科大学大学生命科学研究院)、胰蛋白酶抗原修复液(雷根生物)、DMEM/F12、胎牛血清(HyClone)、Human LIF Protein(Novus)、II 型胶原酶(Sigma)、Aggrecan 抗体、COLLA2 α 1 抗体、LIF 抗体(Bioss)、TIMP-1 抗体、MMP-3 抗体(Proteintech)。磁共振扫描仪(1.5T)由重庆医科大学第一附属医院金山分院放射科提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及椎间盘退变模型建立 新西兰兔 40 只随机分 5 组(对照组,造模 0、2、4、8 周组),每组 8 只(本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会制定的伦理学标准)。参照 Masuda 等^[9]介绍的方法,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉,行后外侧入路暴露 L4/5、L5/6 椎间隙侧方,18G 针头由纤维环向椎间隙正中心穿刺,深度 5 mm,停留 5 s 后立即拔出,逐层关闭切口。

1.2.2 椎间盘退变的影像学评估 造模后 0、2、4、8 周,对脊柱进行矢状位 T2WI 扫描。参数设置:重复时间 TR 2 500 ms,回波时间 TE 85 ms,扫描层数 11,层厚 2 mm,矩阵 196×196 ,带宽 31.25,视野 $18\text{ cm} \times 18\text{ cm}$ 。根据改良 Thompson 分级评分标准^[9]对椎间盘进行评估。

1.2.3 椎间盘退变的组织学评估 MRI 检查后当天处死动物,取出完整的椎间盘,4%多聚甲醛固定 24 h,EDTA 脱钙液中充分脱钙 4~5 周(每 3~4 d 更换脱钙液)。行石蜡包埋,正中矢状位切片,厚度 5 μm ,脱蜡至水,行 HE 染色。按 Masuda 评分标准^[9]进行退变程度的病理评估。

1.2.4 椎间盘髓核 LIF 免疫组织化学表达量检测 切片脱蜡至水,胰蛋白酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 抗原修复 3~5 min,按照 sp-9001 免疫组化试剂盒说明书进行(LIF 一抗 1:250 稀释),脱水、透明后封片拍照,阳性反应为细胞胞浆和(或)包膜、细胞外基质中黄褐色沉淀。观察方法:每张切片在 $400 \times$ 光学显微镜下随机选取视野拍摄,应用 Image pro-Plus 6.0 软件进行积分

光密度值测定,并进行统计学分析。

1.2.5 髓核细胞的分离与培养 取造模 4 周组完整的椎间盘,无菌生理盐水洗净后置于干燥冰盒带回实验室超净台,参照何斌等^[10]的方法,取出髓核组织,用含双抗(1%)的 PBS 清洗后置于 0.125%胰酶和 0.2%Ⅱ型胶原酶,37℃恒温水浴分别消化 30 min、4 h。后用 200 目细胞筛过滤、离心,取细胞沉淀用含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬后种植于培养瓶中 37℃恒温孵箱培养。

1.2.6 Western blot 检测 Aggrecan 和 COLLA2 α 1 蛋白的表达 将 P2 代细胞接种至 10 cm 培养皿中,待细胞融合度至 80% 左右时,血清剥夺 24 h 后,加入重组 LIF 蛋白处理细胞(0、10、20、50、100 ng/mL),继续培养 24、48、72 h,培养终止后收集细胞提取各组细胞蛋白。BCA 法测定细胞浓度后,利用 Western blot 检测 Aggrecan 及 COLLA2 α 1 的蛋白表达情况。

1.2.7 免疫荧光标记 Aggrecan 的表达 取 P2 代细胞行细胞爬片,重组 LIF 蛋白(0、100 ng/mL)处理 48 h,收集爬片,PBS 清洗 2 min $\times$ 3 次,4%多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 清洗 2 min $\times$ 3 次,即用正常山羊血清 37℃封闭 30 min,兔源 Aggrecan 一抗(1:50)4℃过夜孵育。PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,后用山羊抗兔 Alexa Fluor 594 荧光二抗(1:500)室温孵育 1 h。PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,DAPI 染核 5 min,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,抗荧光淬灭剂封片。倒置荧光显微镜下拍照。

1.2.8 Western blot 检测 TIMP-1 和 MMP-3 蛋白的表达 取 P2 代细胞用重组 LIF 蛋白(0、100 ng/mL)处理 48 h,收集细胞提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后,Western blot 检测 TIMP-1 和 MMP-3 蛋白的表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件包进行统计分析,所有数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析比较多个样本均数间差异,组间两两比较采用 LSD- t 法;2 组独立样本数据比较使用独立样本 t 检验;MRI 评分、组织学评分和造模时间的相关性分析采用 Spearman Rank Correlation test 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MRI 影像学评分

对照组及造模 0 周组髓核呈均匀高信号。2 周组髓核信号轻度降低、区域减小。4 周组髓核信号进一步下降。8 周组影像表现出信号明显降低甚至无信号。根据改良 Thompson 评分标准,对照组和造模 0 周组评分一致,造模组随着时间的延长评分增加,且造模各组间差异有统计学意义($1.000 \pm 0.000, 2.000 \pm 0.535, 2.750 \pm 0.463, 3.875 \pm 0.354, P=0.000$) (表 1、图 1)。

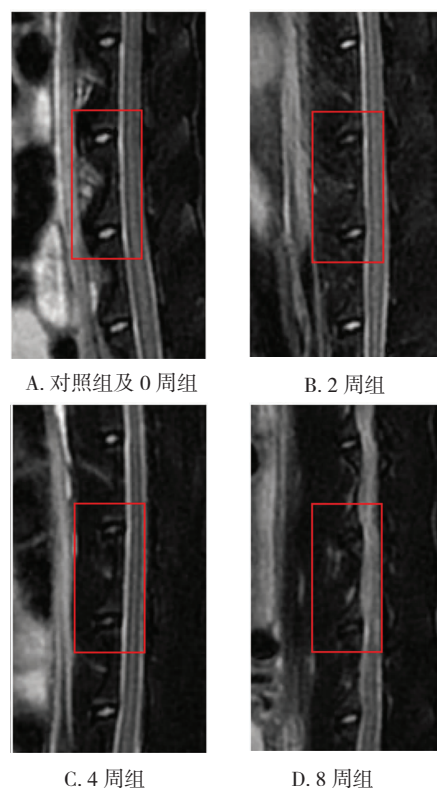


图 1 各组 MRI 影像结果

表 1 对照组及各造模组检测指标结果

组别	MRI评分	组织学评分	免疫组化测量值
对照组	1.000 ± 0.000	4.000 ± 0.000	548.571 ± 45.762
0周组	1.000 ± 0.000^a	4.000 ± 0.000^a	559.608 ± 68.689^a
2周组	2.000 ± 0.535^b	7.375 ± 0.518^b	16135.613 ± 577.329^b
4周组	2.750 ± 0.463^{bc}	9.375 ± 1.302^{bc}	$8149.739 \pm 457.189^{bc}$
8周组	3.875 ± 0.354^{cd}	11.750 ± 0.463^{cd}	$2018.254 \pm 211.870^{cd}$
F/P 值		75.400/0.000	158.055/0.000
2周组 vs. 0周组	P 值	0.000	0.000
4周组 vs. 0周组	P 值	0.000	0.000
8周组 vs. 0周组	P 值	0.000	0.000
4周组 vs. 2周组	P 值	0.001	0.000
8周组 vs. 4周组	P 值	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P>0.05$;b,与 0 周组比较, $P<0.05$;c,4 周与 2 周比较, $P<0.05$;d,8 周与 4 周比较, $P<0.05$

2.2 组织学观察及评分

HE 染色(图 2)可见:对照组及 0 周组低倍镜下椎间盘中央髓核区呈圆形或椭圆形,纤维环呈规则排列;高倍镜下见丰富的泡沫凝胶状基质成分,髓核细胞体积大呈团状或花环状聚集。2 周组髓核组织开始皱缩,纤维环内出现小裂隙,与髓核交界不清;轻度的细胞外基质固缩,髓核细胞散乱分布;4 周组髓核细胞外基质固缩和纤维化明显,纤维环排列紊乱有较多裂隙;髓核细胞明显减少,出现纤维样和(或)软骨样细胞。8 周组髓核区域呈纤维样改变,纤维环出现明显的断裂或曲折;纤维样或软骨样细胞增生明显。Masuda 组织学评分示对照组及 0 周组分值相同,而评分随着造模时间延长而增加,各组间差异有统计学意义($4.000 \pm 0.000, 7.375 \pm 0.518, 9.375 \pm 1.302, 11.750 \pm 0.463, P=0.000$)。

2.3 造模时间与退变评分相关性分析

结果显示造模时间、MRI 评分、组织学评分两两之间呈有统计学意义正相关,表明椎间盘退变造模成功,即随着造模时间的延长,椎间盘退变程度不断加重且各组间退变程度

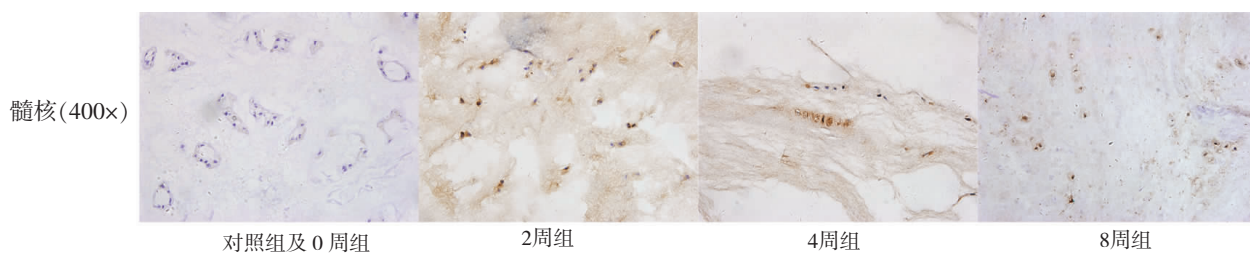
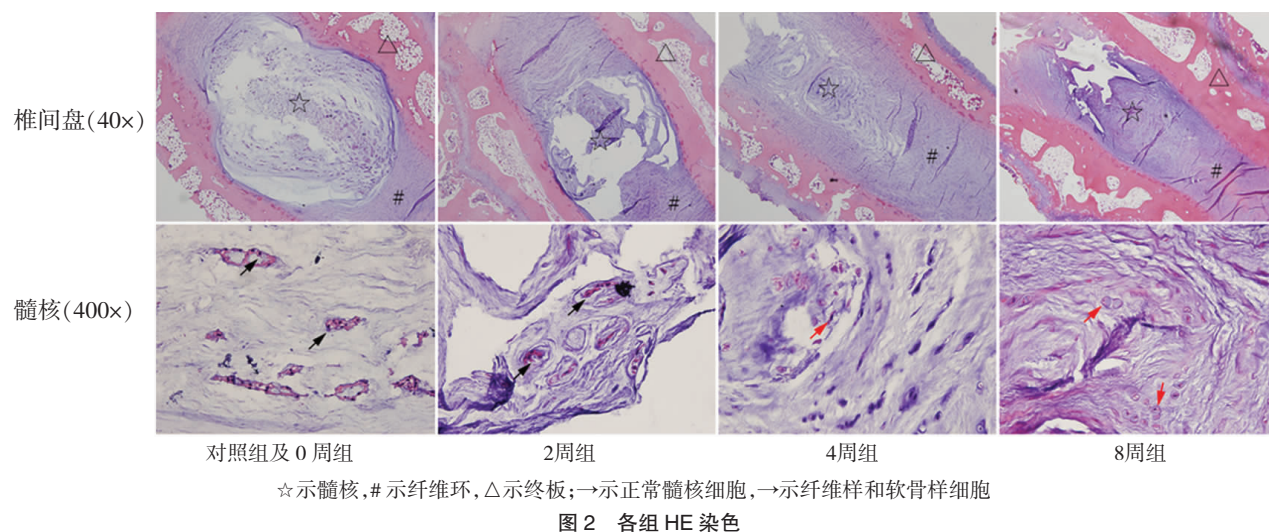
差异具有统计学意义(表 2)。

表 2 造模时间、MRI 评分、组织学评分相关性分析

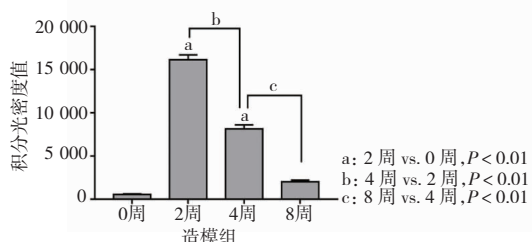
		MRI 评分	组织学评分
时间(周)	相关系数 r	0.941	0.960
	P 值	0.000	0.000
MRI 评分	相关系数 r		0.953
	P 值		0.000

2.4 LIF 表达情况

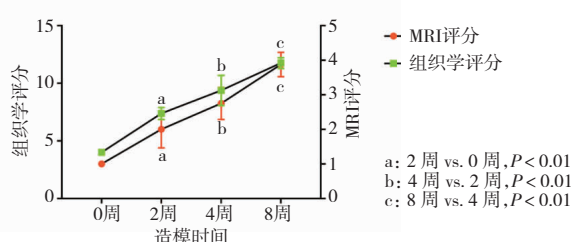
对照组及 0 周组髓核 LIF 染色呈阴性。2 周组椎间盘髓核细胞 LIF 染色呈强阳性且胞外基质染色明显;4 周组髓核细胞 LIF 染色呈阳性,细胞外基质染色减弱;8 周组 LIF 染色呈弱阳性(图 3A)。由积分光密度测定值可知,0 周组与对照组无统计学差异($548.571 \pm 45.762, 559.608 \pm 68.689, P=0.977$);造模各组间差异具有统计学意义($559.608 \pm 68.689, 16135.613 \pm 577.329, 8149.739 \pm 457.189, 2018.254 \pm 211.870, P=0.000$)(表 1、图 3B)。



A. 各组髓核 LIF 表达情况



B. LIF 在各造模组表达量统计



C. MRI 评分及组织学评分随造模时间变化统计

图 3 兔椎间盘髓核组织 LIF 表达及椎间盘退变评分统计

2.5 LIF 因子促进髓核细胞 AggreCAN 和 COLLA2 α 1 蛋白的表达

各处理时间组 Western blot 显示 AggreCAN (AGCAN) 和 COLLA2 α 1 (COL2) 蛋白的表达均随着处理浓度的增加而增加 (图 4A~C、E~F)。与 0 ng/mL 组比较, 其余各浓度组的 AggreCAN、COLLA2 α 1 表达增高 ($0.191 \pm 0.020, 0.212 \pm 0.020, 0.321 \pm 0.041, 0.511 \pm 0.032, 0.561 \pm 0.042, P=0.000; 0.19 \pm 0.01,$

$0.25 \pm 0.01, 0.34 \pm 0.01, 0.60 \pm 0.01, 0.61 \pm 0.01, P=0.000$), 在 100 ng/mL 时 LIF 因子促进二者表达的作用最大, 且至少能维持 72 h。故在后续的实验中, 采取 100 ng/mL 处理 48 h 的实验条件进行。荧光显微镜观察处理组与对照组中 AggreCAN 的表达得到与 Western blot 一致的结果 (图 4D), 由图可见, AggreCAN 表达于胞质, 胞核未见表达, 与对照组比较, 100 ng/mL 处理组中荧光强度明显增加。数据见表 3、4。

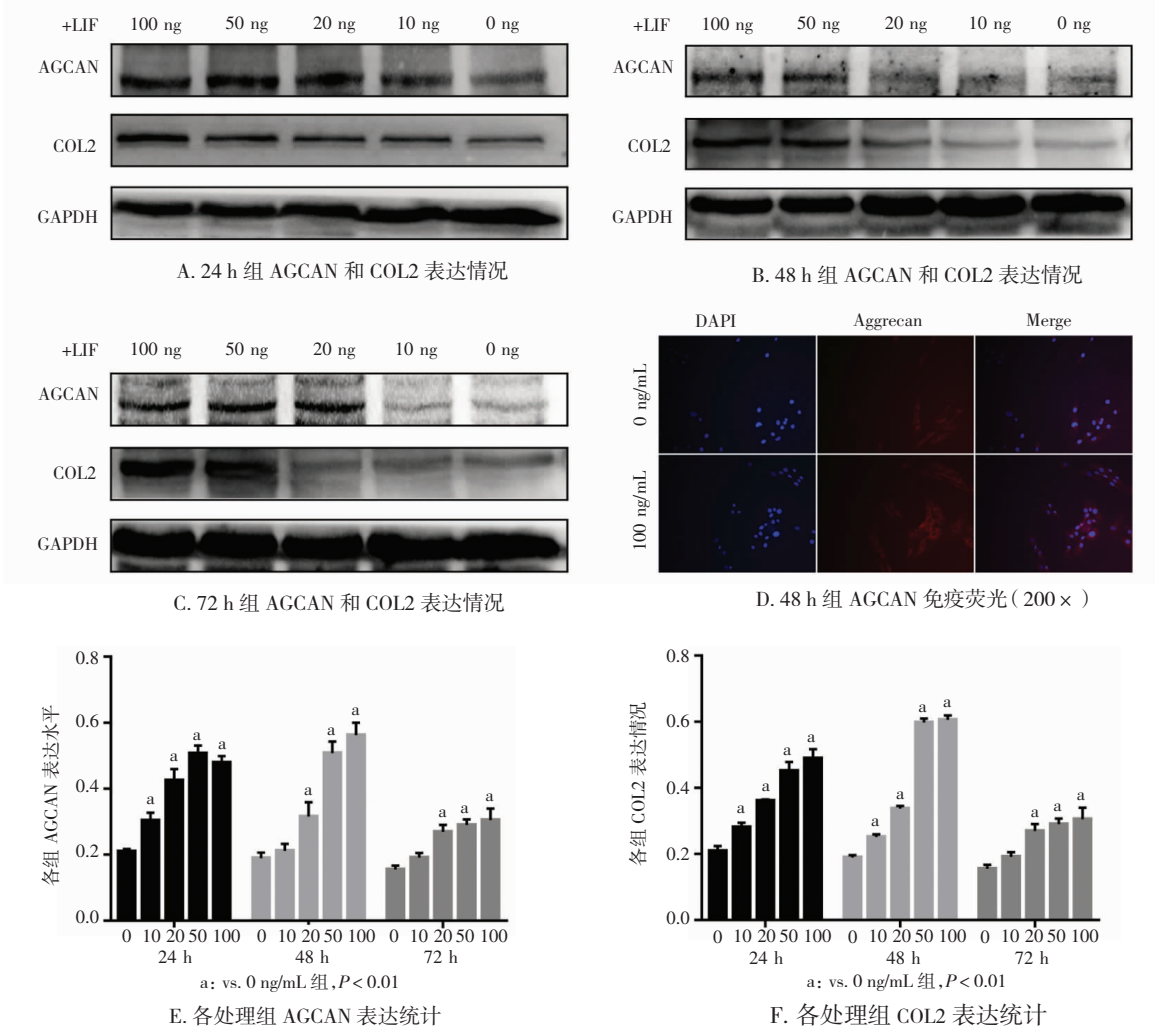


图 4 AggreCAN 和 COLLA2 α 1 在不同 LIF 浓度及不同时间处理组的表达

表 3 各组 AggreCAN 蛋白表达水平

组别	24 h	48 h	72 h
0 ng/mL (A) 组	0.210 ± 0.007	0.190 ± 0.016	0.155 ± 0.012
10 ng/mL (B) 组	0.304 ± 0.023^a	0.212 ± 0.021	0.191 ± 0.014
20 ng/mL (C) 组	0.425 ± 0.035^a	0.316 ± 0.043^a	0.269 ± 0.021^a
50 ng/mL (D) 组	0.507 ± 0.024^a	0.508 ± 0.035^a	0.290 ± 0.017^a
100 ng/mL (E) 组	0.479 ± 0.020^a	0.562 ± 0.038^a	0.305 ± 0.035^a
<i>F/P</i> 值	83.237/0.000	83.121/0.000	27.460/0.000
B vs. A	<i>P</i> 值	0.001	0.433
C vs. B	<i>P</i> 值	0.000	0.003
D vs. C	<i>P</i> 值	0.002	0.000
E vs. D	<i>P</i> 值	0.178	0.065

注: a, 与 0 ng/mL 组比较, $P < 0.01$

表 4 各组 COLLA2 α 1 蛋白表达水平

组别		24 h	48 h	72 h
0 ng/mL (A) 组		0.209 $\pm$ 0.015	0.189 $\pm$ 0.007	0.288 $\pm$ 0.014
10 ng/mL (B) 组		0.281 $\pm$ 0.013 ^a	0.251 $\pm$ 0.008 ^a	0.349 $\pm$ 0.014 ^a
20 ng/mL (C) 组		0.361 $\pm$ 0.004 ^a	0.337 $\pm$ 0.008 ^a	0.384 $\pm$ 0.022 ^a
50 ng/mL (D) 组		0.451 $\pm$ 0.027 ^a	0.598 $\pm$ 0.012 ^a	0.413 $\pm$ 0.014 ^a
100 ng/mL (E) 组		0.489 $\pm$ 0.028 ^a	0.606 $\pm$ 0.013 ^a	0.515 $\pm$ 0.012 ^a
	F/P 值	105.206/0.000	1 137.931/0.000	85.223/0.000
B vs. A	P 值	0.001	0.000	0.001
C vs. B	P 值	0.001	0.000	0.023
D vs. C	P 值	0.000	0.000	0.048
E vs. D	P 值	0.039	0.036	0.000

注:a,与 0 ng/mL 组比较, $P < 0.01$

2.6 LIF 因子促进 TIMP-1 表达的同时降低 MMP-3 的表达

LIF 因子可以对髓核细胞 TIMP-1 和 MMP-3 的表达产生影响(图 5、表 5)。如图 5 所示,与对照组相比,LIF 因子处理 48 h 后,明显增加了 TIMP-1 蛋白的表达(0.454 ± 0.022 , 0.211 ± 0.012 , $P=0.000$),同时 LIF 明显降低 MMP-3 蛋白的表达(0.243 ± 0.013 , 0.362 ± 0.021 , $P=0.000$)。

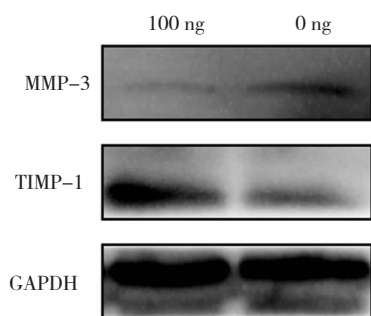


图 5 Western blot 检测 LIF 处理组及对照组 TIMP-1、MMP-3 蛋白表达

表 5 TIMP-1、MMP-3 蛋白表达水平

组别	TIMP-1	MMP-3
0 ng/mL 组	0.236 $\pm$ 0.012	0.449 $\pm$ 0.022
100 ng/mL 组	0.358 $\pm$ 0.153	0.209 $\pm$ 0.012
t 值	10.908	-16.873
P 值	0.000	0.000

3 讨论

本研究首次证实了 LIF 在髓核细胞中具有表达,且在退变髓核组织中表达增加。采用纤维环穿刺法成功建立了兔的椎间盘退变模型,免疫组化显示 LIF 在退变的椎间盘表达增加且在进展期(2 周)最强。对于 LIF 在体内的表达情况,理解为 LIF 在髓

核组织中作为一种促胞外基质合成的正向因子,当椎间盘处于退变进展期(2 周),LIF 反应性的表达增加以减缓炎症因子对胞外基质的分解作用。随着椎间盘退变的加重、髓核细胞变性及其数量减少,LIF 分泌减少消耗殆尽,最终表现为 LIF 的低检测量(8 周)。LIF 在退变髓核组织中的高表达类似于 IL-4、IL-10,作为体内重要的抗炎因子,两者在退变椎间盘组织中也呈高表达^[11]。

有研究显示 LIF 因子在骨关节炎中作为一种负性的促分解代谢因子存在^[8],为明确 LIF 因子在椎间盘髓退变中的作用,根据免疫组化结果结合造模退变程度,本研究取造模 4 周的兔髓核细胞进行细胞实验。

胞外基质降解是椎间盘退变的重要特征,而蛋白多糖和 II 型胶原作为胞外基质的重要成分,其合成降低会导致椎间盘的正常结构和功能的改变^[12]。参照 Upadhyay 等^[13]设置的浓度梯度的方法,用不同浓度的 LIF 因子处理髓核细胞,在不同时间点检测蛋白多糖和 II 型胶原的表达,以期明确 LIF 因子对髓核细胞的生物学作用。Western blot 结果显示各时间点蛋白多糖和 II 型胶原的表达随 LIF 浓度增加而增加,即 LIF 对髓核细胞外基质表达具有促进作用。本研究利用免疫荧光技术分别检测了处理组和对照组中蛋白多糖的荧光强度以验证 LIF 的促进作用,结果与 Western blot 的结论一致。至此,本课题组明确了 LIF 因子促进髓核细胞胞外基质的合成。

MMP-3 能够直接降解蛋白多糖及多型胶原,还可以激活潜在的各类 MMPs,形成瀑布效应,从而加

速退变过程。TIMP-1 作为 MMPs 的抑制物,与其结合而使 MMPs 失活^[14-15]。近期有研究也显示通过调节 TIMP-1/MMPs 平衡从而对骨关节炎起到保护作用^[16]。本实验也证实两者的表达情况与细胞外基质合成情况相符合即 MMP-3 在处理组表达量明显低于对照组,而 TIMP-1 与之相反。这一结果初步揭示了 LIF 可以通过胞外基质代谢酶的调控,从而促进退变髓核细胞胞外基质的合成。

综上所述,本实验首次对 LIF 在体内的表达及其对退变髓核细胞外基质的作用进行了探究,完善了 LIF 的疾病表达谱和组织表达谱,明确了 LIF 在恢复退变髓核细胞正常表型的作用即促进胞外基质 Aggrecan 和 COLLA2 α 1 的表达并且该作用至少与上调 TIMP-1、下调 MMP-3 的表达有关。本研究揭示 LIF 对于维持椎间盘组织正常结构和功能方面存在潜在积极意义。但其具体和更深入的作用机制以及在椎间盘退行性疾病中的修复和治疗作用还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it?[J]. Spine, 2006, 31(18): 2151-2161.
- [2] Vo N, Niedernhofer LJ, Nasto LA, et al. An overview of underlying causes and animal models for the study of age-related degenerative disorders of the spine and synovial joints[J]. J Orthop Res, 2013, 31(6): 831-837.
- [3] Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1): 44-56.
- [4] Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain[J]. Rheumatology, 2008, 48(1): 5-10.
- [5] Ichikawa Y. Differentiation of a cell line of myeloid leukemia[J]. J Cell Physiol, 1969, 74(3): 223-234.
- [6] Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, et al. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor[J]. Science, 1992, 255(5050): 1434-1437.
- [7] Lee CR, Sakai D, Nakai T, et al. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat[J]. Eur Spine J, 2007, 16(12): 2174-2185.
- [8] Lotz M, Moats T, Villiger PM. Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium and can contribute to the pathogenesis of arthritis[J]. J Clin Invest, 1992, 90(3): 888-896.
- [9] Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. Spine, 2005, 30(1): 5-14.
- [10] 何 斌, 杨 坚, 彭方亮, 等. 退变髓核细胞与正常髓核细胞体外培养的生物学特性对比[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(2): 197-199.
- [11] Akyol S, Eraslan BS, Etyemez H, et al. Catabolic cytokine expressions in patients with degenerative disc disease[J]. Turk Neurosurg, 2010, 20(4): 492-499.
- [12] Videman T, Gibbons LE, Battie MC. Age- and pathology-specific measures of disc degeneration[J]. Spine, 2008, 33(25): 2781-2788.
- [13] Upadhyay A, Sharma G, Kivivuori S, et al. Role of a LIF antagonist in LIF and OSM induced MMP-1, MMP-3, and TIMP-1 expression by primary articular chondrocytes[J]. Cytokine, 2009, 46(3): 332-338.
- [14] Eser B, Eser O, Yuksel Y, et al. Effects of MMP-1 and MMP-3 gene polymorphisms on gene expression and protein level in lumbar disc herniation[J]. Genet Mol Res, 2016 Sep 9, 15(3). doi:10.4238/gmr.15038669.
- [15] Deng B, Ren JZ, Meng XQ, et al. Expression profiles of MMP-1 and TIMP-1 in lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 19080-19086.
- [16] Qu H, Li J, Wu LD, et al. Trichostatin A increases the TIMP-1/MMP ratio to protect against osteoarthritis in an animal model of the disease[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3): 2423-2430.

(责任编辑: 罗 萍)