

四环素联合桂枝加葛根汤对髓核细胞增殖和相关因子表达的影响

刘汝银, 彭晓艳, 岳宗进, 冯仲锴, 王新立, 王西彬, 鲁花

(河南中医药大学第二附属医院脊柱科 450002 郑州市)

【摘要】目的:探讨四环素(TET)联合桂枝加葛根汤(CK)对髓核细胞增殖和蛋白聚糖(aggrecan)、Ⅱ型胶原蛋白(type Ⅱ collagen, Col2a)、基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的影响。**方法:**体外分离培养 8 周龄健康雄性 SD 大鼠髓核细胞并进行鉴定。然后用药物处理分离成功的髓核细胞:TET 组分别应用不同浓度(5, 10, 15, 20, 25 μg/ml)的 TET 处理, CK 组分别应用低、中、高剂量 TET 处理, TET+CK 组应用 20 μg/ml TET 和中剂量 CK 处理, 对照组不添加药物。采用 CCK8 方法检测不同药物处理组细胞增殖活力;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 TET+CK 组髓核细胞的 aggrecan、Col2a、iNOS 和 MMP-13 的 mRNA 表达量, 免疫印迹(Western blot)检测 Aggrecan、Col2a、iNOS 和 MMP-13 的蛋白表达量。利用 pcDNA3.1-CMV(+)构建重组质粒 pcDNA3.1-iNOS, 转染组用 pcDNA3.1-iNOS 转染髓核细胞, 应用 20 μg/ml TET 和中剂量 CK 处理, 空载体组用空载体(pcDNA3.1)转染细胞, 应用 20 μg/ml TET 和中剂量 CK 处理, 对照组不添加药物且不转染, 应用 qRT-PCR 检测各组 iNOS 和 MMP-13 的 mRNA 表达量, Western blot 检测各组 iNOS 和 MMP-13 的蛋白表达量。**结果:**分离培养的髓核细胞 Col2a 和 Aggrecan 免疫组织化学染色阳性细胞比例分别为 96%和 98%。不同浓度 TET 或 CK 处理髓核细胞后细胞活力与对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$)。20 μg/ml TET 和中剂量 CK 联合作用后髓核细胞的活力、Aggrecan 和 Col2a 的 mRNA 和蛋白表达量均较对照组显著性升高 ($P<0.05$), iNOS、MMP-13 的 mRNA 和蛋白表达量较对照组显著性下降($P<0.05$)。转染 pcDNA3.1-iNOS 重组质粒后髓核细胞 iNOS 和 MMP-13 的 mRNA 和蛋白表达与对照组和空载体组均显著性升高 ($P<0.05$)。**结论:**TET 联合 CK 可促进髓核细胞增殖, 增加髓核细胞 Aggrecan 和 Col2a mRNA 和蛋白的表达, 同时可以通过抑制 iNOS 减少 MMP-13 mRNA 和蛋白的表达量, 为药物预防和治疗椎间盘退变提供了理论依据。

【关键词】 四环素; 桂枝加葛根汤; 髓核细胞; 细胞增殖; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.05.12

中图分类号: R965, R691.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-05-0463-07

Tetracycline combined with Cinnamon Twig Decoction Plus Kudzuvine Root impacted on nucleus pulposus cells proliferation and correlated factor expressions/LIU Ruyin, PENG Xiaoyan, YUE Zongjin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(5): 463-469

【Abstract】Objectives: To investigate the effects of tetracycline(TET) combined with Cinnamon Twig Decoction Plus Kudzuvine Root(CK) on nucleus pulposus cell proliferation and the expressions of aggrecan, type Ⅱ collagen(Col2a), matrix metalloproteinase-13(MMP-13) and inducible nitric oxide synthase(iNOS). **Methods:** The nucleus pulposus cells of 8-week-old healthy male SD rats were isolated and identified in vitro. The successfully isolated nucleus pulposus cells were then treated with drug. TET group was treated with different concentrations (5, 10, 15, 20, 25 μg/ml) of TET. CK group was treated with low, middle and high doses of CK. TET+CK group was treated with 20 μg/ml of TET and middle dose of CK. Control group was treated without drug. Cell viabilities in different drug-treated groups were measured by CCK8 method. The relative mRNA expressions of aggrecan, Col2a, iNOS and MMP-13 in TET+CK group were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR). The relative protein expressions of aggrecan, Col2a, iNOS, and MMP-13 were measured by Western bolt. The recombinant plasmid pcDNA3.1-iNOS was constructed by

第一作者简介: 男(1973-), 副主任医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱外科

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

pcDNA3.1-CMV (+). The nucleus pulposus cells were transfected with pcDNA3.1-iNOS and treated with 20 μ g/ml of TET and middle dose of CK in transfer group. Nucleus pulposus cells in blank load transfection group were transfected with pcDNA3.1 and treated with 20 μ g/ml of TET and middle dose of CK. The control group was treated without drug or transfection. qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of iNOS and MMP-13 in each group. Western blot was used to detect the protein expressions of iNOS and MMP-13 in each group. **Results:** Immunohistochemical staining of type II collagen and aggrecan was obviously positive staining in isolated cultured nucleus pulposus cells, and showed 96% and 98% positive cells respectively. The viability of nucleus pulposus cells with each concentration of TET and CK was not significantly different with that of control group ($P>0.05$). The mRNA and protein expression levels of aggrecan and Col2a were significantly up-regulated ($P<0.05$), while iNOS and MMP-13 were markedly down-regulated in the cells treated with 20 μ g/ml of TET and middle dose of CK when compared with those in control group ($P<0.05$). The mRNA and protein expression levels of iNOS and MMP-13 were significantly up-regulated after transfection with recombinant plasmid pcDNA3.1-iNOS when compared with those in control group and blank load transfection group. **Conclusions:** TET combined with CK significantly promotes nucleus pulposus cell proliferation, the mRNA and protein expressions of aggrecan and Col2a, while inhibits the mRNA and protein expression of MMP-13 through down-regulating iNOS expression. It provides theoretical basis for drug prevention and treatment of intervertebral disc degeneration.

【Key words】 Tetracycline; Cinnamon Twig Decoction Plus Kudzuvine Root; Nucleus pulposus cells; Cell proliferation; Rat

【Author's address】 Department of Spine, the Second Affiliated Hospital of He'nan University of TCM, Zhengzhou, 450002, China

椎间盘突出症以颈肩腰腿痛为主要临床症状,其重要原因是椎间盘的退行性变化,这种退变开始于髓核,髓核细胞减少、髓核基质的主要成分含量降低,基质降解的增加导致椎间盘的生物力学性质异常变化,引起椎间盘突出^[1-5]。因此,促进髓核细胞增殖和蛋白聚糖(aggrecan)以及II型胶原蛋白(type II collagen, Col2a)的表达分泌,减少基质的降解,有助于改善椎间盘退变。有研究报道,桂枝加葛根汤(Cinnamon Twig Decoction Plus Kudzuvine Roo, CK)可以促进椎间盘纤维环细胞表达 Aggrecan、血小板衍生生长因子 A、骨形态发生蛋白 2, 并且抑制椎间盘组织合成诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)^[6-8]。另外,在成人呼吸窘迫综合征和冠状动脉疾病中,四环素(tetracycline, TET)具有抑制 iNOS 和金属蛋白酶(matrixmetallo proteinases, MMPs)的作用^[9,10]。在椎间盘退变过程中,Aggrecan、iNOS、MMPs 和 Col2a 扮演了重要角色, TET 和 CK 对髓核细胞中相关因子表达和细胞增殖的作用如何,两者联合后作用如何,尚未见相关报道。本研究旨在探讨 CK 联合 TET 对髓核细胞增殖及其因子表达的影响,为预防和治疗椎间盘退变提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和器材

Sprague Dawley(SD)大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物许可证号:SYXK(沪)2007-0005。实验操作严格按照国家卫生和医学研究委员会对实验用动物护理和使用的指导方针。实验获得河南中医药大学动物实验伦理委员会的审查并得到批准。Hind III 和 Eco RV 酶切后的 iNOS 的 cDNA 购自美国 Oxford Biomedical Research; 质粒小提试剂盒、pcDNA3.1-CMV (+)、SYBR Green I Prmix 购自大连宝生物工程有限公司;小牛血清、DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司;四环素购自 Sigma 公司;Hind III、Eco RV 酶、反转录试剂盒和 Turbofect 购自赛默飞世尔科技公司;大肠杆菌 DH5a 感受态细胞(DH5a 细胞)购自天根生化科技(北京)有限公司;CCK-8 试剂盒、BCA 试剂盒购自上海碧云天公司;iNOS、Col2a、Aggrecan、MMP-13 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔抗购自美国 CST 公司;山羊抗兔的二抗购自北京博奥森生物技术有限公司。高速离心机和移液器购自德国 Eppendorf 公司;电泳仪购自英国 Syngene 公司;蛋白凝胶成像系统和普通 PCR 仪购自美国 Bio-

Rad公司;超净工作台购自北京医疗设备厂;细胞培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 髓核细胞的分离和鉴定

8 周龄(200~250g)健康雄性 SD 大鼠,用 2% 戊巴比妥钠(100mg/kg)腹腔注射麻醉后脱颈处死,乙醇浸泡消毒 5min,常规铺单后再次消毒大鼠背部皮肤,无菌条件下分离腰段脊柱。切开椎间盘外层纤维环,将胶冻状髓核完整取出,磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍。剪碎髓核组织呈 1×1×1mm 大小,加入 2 倍体积的 0.1% II 型胶原酶,37℃消化 5h。1000 转/min 离心 5min,弃上清后加入 10U/ml 的透明质酸酶 37℃消化 2h,离心弃上清,用含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞融合度达到 70%~80%,在倒置相差显微镜下用细胞刮刀刮除长梭形及大多角形成纤维细胞区域,DMEM/F12 培养基冲洗 2 次继续培养,待圆形、短梭形细胞长成单一形态的克隆体时,用 0.25%胰酶消化重悬细胞后接种于另一培养瓶继续培养,细胞达 90%融合后传代,PBS 洗涤 1 次,0.25%胰酶室温 37℃消化,制成细胞悬液。1000 转/min 离心 5min,弃上清,重悬后,以 1:3 的比例置于培养箱中继续传代培养。取第 3 代细胞爬片,PBS 冲洗 3 遍,多聚甲醛室温固定 30min 后 PBS 清洗,0.3% Triton X-100 孵育 20min,用 3%H₂O₂ 的甲醇溶液室温封闭 30min 后 PBS 清洗,山羊血清 37℃孵育 30min。分别滴加 II 型胶原(Col2a)多抗(1:50)和 aggrecan 单抗(1:100),4℃过夜,PBS 洗净加入二抗工作液 37℃孵育 30min,PBS 冲洗,DAB 显色 10min 后 PBS 冲洗,苏木素复染 3min,中性树胶封固。显微镜下随机检测 10 个视野(×200),每个视野检测 20 个细胞,总共 200 个细胞,分别计数 Col2a 和 aggrecan 免疫组织化学染色阳性细胞数,计算染色阳性细胞百分比,即为髓核细胞纯度。

1.3 CK 含药血清的制备

CK 按《伤寒论》原方:葛根 12g,桂枝 9g,芍药 9g,生姜 9g,甘草 6g,大枣 12 枚,麻黄 9g。加 8 倍重量的水浸泡上述药物 30min,文火煎熬两次,分别煎熬 40min 和 30min,将两次的煎液合并,3800 转/min 离心,将上清液浓缩至含生药 0.5g/ml 的浓缩液,于 4℃保存。SD 大鼠随机分为四组,每组 20 只。用药液灌胃,1 次/d,连续灌胃 4d,高剂量组每只灌胃量 4ml,中剂量组每只灌胃量 2ml,低剂量

每只灌胃量为 1ml,空白组每只灌胃量为 2ml 生理盐水。在末次灌胃后 2h 乙醚吸入麻醉大鼠,于腹主动脉及心脏采血,分离血清。

1.4 重组质粒 pcDNA3.1-iNOS 的构建及转染

用 Hind III 和 Eco RV 双酶切真核载体 pcDNA3.1-CMV(+),将其与购买的含有 iNOS 开放阅读框的 Hind III 和 Eco RV 酶切过的 cDNA 片段(3.9 kb)连接,转化到 DH5a 细胞中,筛选阳性克隆并扩增重组质粒,利用质粒小提试剂盒提取质粒,并用 Hind III 和 Eco RV 酶双酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定正确的质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

将状态良好的第 4 代髓核细胞以 2×10⁵/孔接种于 12 孔板,37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 24h 后,加 pcDNA3.1-iNOS(2μg)或 pcDNA3.1-CMV(+)(2μg)到含有 4μl Turbofect 的 200μl 不含血清的 DMEM/F12,混匀后逐滴滴入孔中,对照组只加 200μl 不含血清的 DMEM/F12;转染组转染 pcDNA3.1-iNOS 且加 20μg/ml TET 和中剂量 CK 处理细胞;空载体组转染 pcDNA3.1 且加 20μg/ml TET 和中剂量 CK 处理细胞,24h 后将培养基换成含有 10%小牛血清、20μg/ml TET 和中剂量 CK 的 DMEM/F12,继续培养 24h 用于 qRT-PCR 和 Western blot 检测。

1.5 髓核细胞增殖情况检测

将生长状态良好的第 4 代髓核细胞按照每孔 7×10³ 个细胞的密度接种于 96 孔板,将其置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 24h。将细胞随机分为 TET 组(只加 TET)、CK 组(只加 CK)、TET+CK 组(TET+CK)和对照组(不加任何药物)。TET 组药物最终浓度分别为 5、10、15、20 和 25μg/ml;CK 组 1L 培养基中含 200ml 对照组和低、中、高剂量 CK 的血清。TET+CK 组 TET 的终浓度为 20μg/ml、1L 培养基中含 200ml 中剂量 CK 的血清。每组设置 5 个复孔,继续培养 48h 后加每 100μl 培养基中加入 10μl CCK8,37℃孵育 3h,450nm 处测定吸光值。

1.6 髓核细胞 aggrecan、Col2a、iNOS 和 MMP-13 mRNA 表达水平检测

Trizol 法提取各组细胞总 RNA,利用反转试剂盒将其反转成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应。以 GAPDH 为内参,反应程序如下:预变性 94℃ 30s,94℃ 10s,61℃(Col2a 和

iNOS)、62℃ (GAPDH 和 AggreCan)30s,40 个循环。反应体系为 20μl,SYBR Green I Prmix 10μl,cDNA 1μl,各引物见表 1。

1.7 髓核细胞 AggreCan、Col2a、iNOS 和 MMP-13 蛋白表达水平检测

收集各组细胞,提取蛋白,利用 BCA 试剂盒测定浓度。取 25μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)电泳,利用半干法将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上,再用含有 5%脱脂奶粉的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(tris buffered saline,TBS)封闭 2h。加入兔抗的一抗 iNOS、Col2a、AggreCan、MMP-13 和 GAPDH,1:500 稀释,4℃过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗,室温孵育 1h,暗室曝光观察结果。

1.8 统计学分析

计量数据以均数±标准差表示,利用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差分析和两两比较分析方法, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 髓核细胞鉴定

分离的细胞 Col2a、aggreCan 免疫组织化学染色可见大量阳性表达,胞浆染成棕黄色(图 1),符合髓核特征。Col2a 和 aggreCan 的免疫组化染色阳性细胞比例为 96%和 98%。

2.2 髓核细胞的增殖情况

TET 和 CK 分别单独作用后,随着药物浓度的增加髓核细胞的活力也随之有所增加,但与对照组比较均无显著性差异($P>0.05$)(表 2、3);TET (20μg/ml) 与中剂量 CK 联合作用后髓核细胞的活力较对照组显著性上升(表 4, $P<0.05$)。说明两药物联合应用可明显提高髓核细胞的活力。

2.3 TET 和 CK 联合用药对髓核细胞 Col2a 和 AggreCan 表达的影响

在 20μg/ml TET 或中剂量 CK 作用下髓核细胞 Col2a 和 AggreCan 的 mRNA 和蛋白表达量与对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$);TET (20μg/mL)联合 CK(中剂量)作用两者的表达量均显著性上调(表 5、图 2, $P<0.05$)。说明 TET 和 CK 联合用药有助于髓核细胞 Col2a 和 AggreCan mRNA 和蛋白的表达。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

引物序列		Primer sequences
iNOS	正向	Sense:5'-CGCCCTTCCGCACTTCT-3'
	反向	Anti-sense:5'-GCGGGGCGCATCGGAACCCAGCC-3'
Col2a	正向	Sense:5'-CGAGGTGACAAAGGAGAAGC-3'
	反向	Anti-sense:5'-CTGGTTGTTACGCGACTTGA-3'
AggreCan	正向	Sense:5'-AGCCGGAGACGACAGAAGTA-3'
	反向	Anti-sense:5'-AGTCTCCCACTCCAGAAGCA-3'
MMP-13	正向	Sense:5'-TAAGGACATGCGCACTTCT-3'
	反向	Anti-sense:5'-GTCTGGCGTTTTTGATGTT-3'
GAPDH	正向	Sense:5'-CGTCTTCACCACTATGGAGA-3'
	反向	Anti-sense:5'-CGGCCATCAGCCACAGTTT-3'

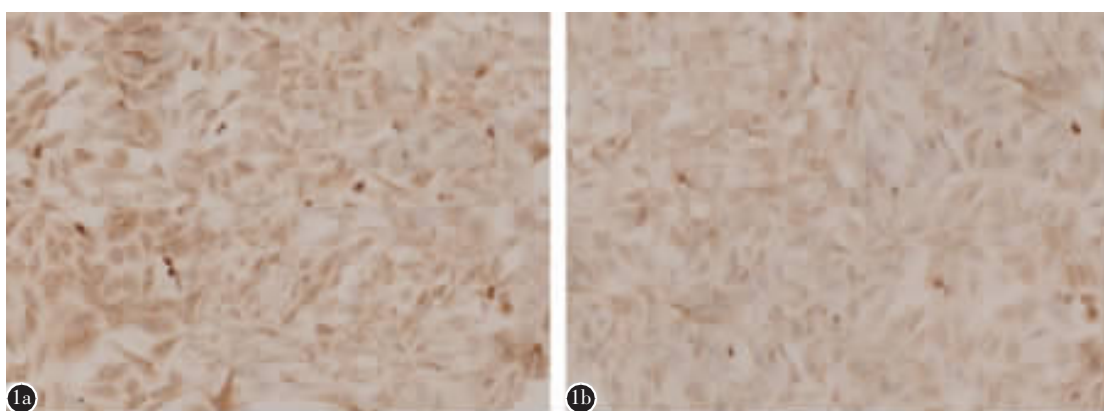


图 1 大鼠髓核细胞 II 型胶原和 AggreCan 免疫组织化学染色结果(×100) a 第 3 代髓核细胞 II 型胶原染色阳性细胞比例为 96%,符合髓核特征 b 第 3 代髓核细胞 AggreCan 染色阳性细胞比例为 98%,符合髓核特征

Figure 1 Immunohistochemical staining of type II collagen and aggreCan in rat nucleus pulposus cells(×100) **a** Type II collagen staining in the third generation of nucleus pulposus cells. The proportion of positive cells stained is 96%, consistent with nucleus pulposus characteristic **b** AggreCan staining in the third generation of nucleus pulposus cells. The proportion of positive cells stained is 98%, consistent with nucleus pulposus characteristic

2.4 TET 和 CK 联合用药对髓核细胞 iNOS 和 MMP-13 的表达

在 TET (20 μ g/ml) 或 CK (中剂量) 单独作用下, iNOS 和 MMP-13 的表达量较对照组减少, 但

表 2 TET 不同浓度下髓核细胞的增殖 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Proliferation of nucleus pulposus cells at different concentrations of TET

	OD 值 OD value
对照组 Control group	1 $\pm$ 0.04
5 μ g/ml 组 5 μ g/ml group	1.08 $\pm$ 0.12
10 μ g/ml 组 10 μ g/ml group	1.13 $\pm$ 0.06
15 μ g/ml 组 15 μ g/ml group	1.24 $\pm$ 0.08
20 μ g/ml 组 20 μ g/ml group	1.38 $\pm$ 0.03 ^①
25 μ g/ml 组 25 μ g/ml group	1.20 $\pm$ 0.07

注: ①与对照组比较 $P>0.05$

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

表 3 CK 不同浓度下髓核细胞的增殖 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Proliferation of nucleus pulposus cells at different concentrations of CK

	OD 值 OD value
对照组 Control group	1 $\pm$ 0.05
低剂量组 Low dose group	1.05 $\pm$ 0.08
中剂量组 Middle dose group	1.28 $\pm$ 0.03 ^①
高剂量组 High dose group	1.16 $\pm$ 0.13

注: ①与对照组比较 $P>0.05$

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

表 4 TET、CK 和联合用药下髓核细胞的增殖 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Proliferation of nucleus pulposus cells under the combined action of TET and CK

	OD 值 OD value
对照组 Control group	1 $\pm$ 0.03
TET 组 TET group	1.25 $\pm$ 0.01
CK 组 CK group	1.21 $\pm$ 0.05
TET+CK 组 TET+CK group	1.62 $\pm$ 0.09 ^①

注: ①与对照组比较 $P<0.05$

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

表 5 TET、CK 和联合用药下髓核细胞 Col2a 和 AggreCan mRNA 和蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Col2a and AggreCan mRNA expressions in nucleus pulposus cells under the combined action of TET and CK

	mRNA				蛋白 Protein			
	对照组 Control group	TET 组 TET group	CK 组 CK group	TET+CK 组 TET+CK group	对照组 Control group	TET 组 TET group	CK 组 CK group	TET+CK 组 TET+CK group
Col2a	1.02 $\pm$ 0.03	1.82 $\pm$ 0.05	1.35 $\pm$ 0.006	2.88 $\pm$ 0.09 ^①	0.93 $\pm$ 0.03	1.35 $\pm$ 0.01	1.52 $\pm$ 0.004	2.68 $\pm$ 0.04 ^①
AggreCan	0.92 $\pm$ 0.02	1.62 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.07	2.63 $\pm$ 0.12 ^①	1.01 $\pm$ 0.02	1.36 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.03	2.99 $\pm$ 0.15 ^①

注: ①与对照组比较 $P<0.05$

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

差异无显著性 ($P>0.05$); TET (20 μ g/ml) 联合 CK (中剂量) 作用下两者表达量较对照组显著性减少 ($P<0.05$, 图 3, 表 6)。

2.5 抑制 iNOS 对 MMP-13 表达的影响

TET+CK+转染组 iNOS 的表达较 TET+CK+空载体组显著性升高 ($P<0.01$), 说明 iNOS 过表达成功。TET+CK+转染组中 MMP-13 的 mRNA 和蛋白质表达量较 TET+CK+空载体组显著性升高 (图 4, 表 7, $P<0.05$)。

3 讨论

椎间盘主要由髓核和纤维环组成, 是成人体内最先开始退变的组织^[11]。变性的髓核引起周围纤维环等软组织结构的退变, 导致椎间盘高度和稳定性改变^[12-14]。椎间盘突出症是脊柱外科的常见病, 给人们的生活和工作带来极大的不便。

椎间盘退变主要是髓核中基质的降解和水合作用的下降, 而髓核细胞合成基质的主要成分有 aggrecan 和 Col2a, 髓核细胞的凋亡和 aggrecan 与 Col2a 合成的减少是椎间盘退变的关键因素^[14, 15]。有研究显示, CK 可以通过调节钙调素来促进椎间盘纤维环细胞的增殖和修复, 起到预防和治疗椎间盘退变的作用^[16]。还有研究表明, TET 对成骨细胞和间充质干细胞等的增殖有影响^[17, 18]。本研究成果显示, CK 和 TET 单独应用对髓核细胞的活力作用不明显, 然而两种药物联合作用效果显著。另外, 有研究报道 CK 可以调控椎间盘组织多种蛋白质如 AggreCan、II 型胶原蛋白、骨形态发生蛋白 2 等^[7]。还有研究显示, TET 有抑制 MMPs 的作用^[19], MMPs 可以降解细胞外基质, MMP-13 是 II 型胶原降解酶^[20]。本研究发现, CK 和 TET 单独作用髓核细胞对 AggreCan 和 Col2a 表达量的上调不显著, 当两药物联合后 AggreCan 和 Col2a 的表达量显著升高, 这可能是因为两种药物产生效应的叠加, 使对 AggreCan 和 Col2a 的调控更加有力,

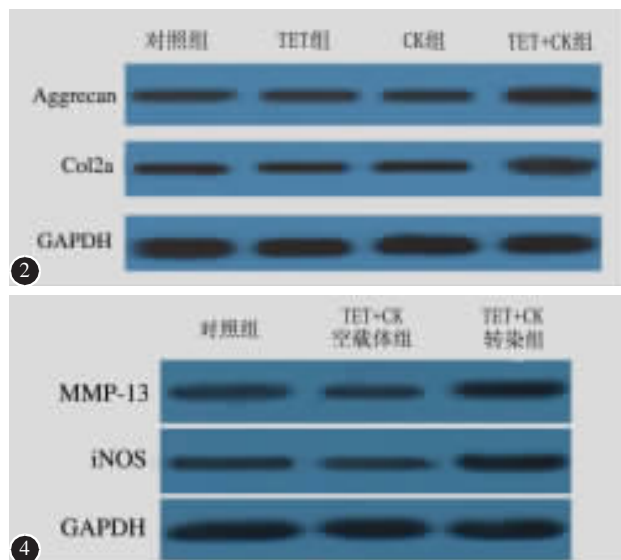


图 2 TET 和 CK 联合用药下髓核细胞 Col2a 和 Aggrecan 的蛋白表达较对照组显著升高 图 3 TET 和 CK 联合用药下髓核细胞 iNOS 和 MMP-13 蛋白的表达较对照组显著降低 图 4 过表达 iNOS 后 MMP-13 蛋白表达量的变化显著升高

Figure 2 The protein expressions of Col2a and Aggrecan was significantly higher in the nucleus pulposus cells treated with TET and CK than in the control group

Figure 3 The protein expressions of iNOS and MMP-13 in the nucleus pulposus cells treated with TET and CK was significantly lower compared with the control group Figure 4 The protein expression of MMP-13 was significantly increased after overexpression of iNOS

表 6 TET、CK 和联合用药下髓核细胞 iNOS 和 MMP-13 mRNA 和蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 iNOS and MMP-13 mRNA expressions in nucleus pulposus cells under the combined action of TET and CK

	mRNA				蛋白 Protein			
	对照组 Control group	TET组 TET group	CK组 CK group	TET+CK组 TET+CK group	对照组 Control group	TET组 TET group	CK组 CK group	TET+CK组 TET+CK group
iNOS	0.63±0.02	0.55±0.03	0.61±0.05	0.23±0.06 ^①	0.58±0.05	0.52±0.02	0.53±0.01	0.21±0.06 ^①
MMP-13	0.71±0.02	0.65±0.04	0.61±0.06	0.27±0.09 ^①	0.73±0.05	0.64±0.04	0.68±0.02	0.23±0.03 ^①

注:①与对照组比较 $P<0.05$

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

表 7 转染组与空载体组 iNOS、MMP-13 mRNA 和蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 MMP-13 mRNA and protein expression after iNOS overexpression

	mRNA			蛋白 Protein		
	对照组 Control group	TET+CK+空载体组 TET+CK+pcDNA3.1	TET+CK+转染组 TET+CK+iNOS	对照组 Control group	TET+CK+空载体组 TET+CK+pcDNA3.1	TET+CK+转染组 TET+CK+iNOS
iNOS	0.62±0.03	0.33±0.01	1.20±0.03 ^①	0.71±0.05	0.38±0.06	1.03±0.03 ^①
MMP-13	0.77±0.06	0.67±0.03	1.98±0.09 ^①	0.66±0.02	0.52±0.04	1.82±0.05 ^①

注:①与 TET+CK+空载体组比较 $P<0.01$

Note: ①Compared with TET+CK+pcDNA3.1 group, $P<0.01$

对于此现象的具体原因还有待进一步研究。

iNOS 是 NOS 的一种亚型,可催化生成高浓度的一氧化氮(nitric oxide, NO), NO 与椎间盘组织中 IL-1 和 IL-6 作用诱导产生炎性介质,降低基质中 Aggrecan 和 Col2a 的含量,从而引发椎间盘的退变^[21, 22]。同时 iNOS 的缺失可以抑制 MMPs 的表达^[23],从而抑制椎间盘间质的降解。有研究表明,CK 可以降低 iNOS 的表达,TET 也有抑制 iNOS 的作用^[24, 25]。本研究结果显示,CK 和 TET 单

独作用均可降低 iNOS 和 MMP-13 的表达量,但差异不显著,联合用药后 iNOS 和 MMP-13 的表达量显著下降,可能因为联合用药后效应叠加。为了研究在髓核细胞中联合用药是否可以通过抑制 iNOS 的表达量降低 MMP-13,从而减少椎间盘基质的降解,我们过表达了 iNOS,结果显示 MMP-13 的 mRNA 和蛋白水平均被上调,显著逆转了联合用药对 MMP-13 表达的抑制作用。说明 CK 联合 TET 可以通过抑制 iNOS 的表达量来减少具有

降解基质功能的 MMP-13 的表达。

综上,CK 联合 TET 可以显著促进髓核细胞的增殖,且可上调 Aggrecan 和 Col2a 的表达,降低 iNOS 进而下调 MMP-13 的合成,从而降低椎间盘基质的降解。但是在动物模型中的用药效果和分子机制还有待进一步研究,为预防和改善椎间盘退变提供更多的参考。

4 参考文献

- Miyagi M, Millecamps M, Danco AT, et al. ISSLS Prize winner: increased innervation and sensory nervous system plasticity in a mouse model of low back pain due to intervertebral disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2014, 39(17): 1345-1354.
- Barnoon I, Chai O, Sruog I, et al. Spontaneous intradural disc herniation with focal distension of the subarachnoid space in a dog[J]. Can Vet J, 2012, 53(11): 1191-1194.
- Yang SD, Yang DL, Sun YP, et al. 17beta-estradiol protects against apoptosis induced by interleukin-1beta in rat nucleus pulposus cells by down-regulating MMP-3 and MMP-13 [J]. Apoptosis, 2015, 20(3): 348-357.
- Iwata M, Ochi H, Asou Y, et al. Variations in gene and protein expression in canine chondrodystrophic nucleus pulposus cells following long-term three-dimensional culture [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63120.
- Iatridis JC, Nicoll SB, Michalek AJ, et al. Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies: what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair[J]. Spine J, 2013, 13(3): 243-262.
- 王诗忠, 黄龙生, 陈少清, 等. 桂枝加葛根汤对椎间盘纤维环细胞蛋白多糖表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11): 2543-2547.
- 仲卫红, 李宇涛, 郑其开, 等. 桂枝加葛根汤含药血清干预纤维环细胞的蛋白组学差异[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(11): 1718-1723.
- 王拥军, 施杞, 周重建, 等. 葛根汤与桂枝汤对兔颈椎间盘组织 IL-1 β , iNOS, TNF α , TGF β mRNA 表达的调节作用[J]. 中西医结合学报, 2003, 1(4): 273-276.
- Nieman GF, Zerler BR. A role for the anti-inflammatory properties of tetracyclines in the prevention of acute lung injury[J]. Curr Med Chem, 2001, 8(3): 317-325.
- Bench TJ, Jeremias A, Brown DL. Matrix metalloproteinase inhibition with tetracyclines for the treatment of coronary artery disease[J]. Pharmacol Res, 2011, 64(6): 561-566.
- Haefeli M, Kalberer F, Saegesser D, et al. The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(14): 1522-1531.
- Leckie SK, Bechara BP, Hartman RA, et al. Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. Spine J, 2012, 12(1): 7-20.
- Feng G, Zhao X, Liu H, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration[J]. J Neurosurg Spine, 2011, 14(3): 322-329.
- Lee KI, Moon SH, Kim H, et al. Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured nucleus pulposus cells using atelocollagen scaffold and growth factors[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37(6): 452-458.
- Sun Z, Yin Z, Liu C, et al. IL-1beta promotes ADAMTS enzyme-mediated aggrecan degradation through NF-kappaB in human intervertebral disc[J]. J Orthop Surg Res, 2015, 10(1): 159.
- 廖军, 洪钰, 王诗忠, 等. 桂枝加葛根汤含药血清对纤维环细胞 CaM/CaMK II 信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 930-931.
- Jin SH, Kweon H, Park JB, et al. The effects of tetracycline-loaded silk fibroin membrane on proliferation and osteogenic potential of mesenchymal stem cells[J]. J Surg Res, 2014, 192(2): e1-9.
- Iwata N, Nozaki K, Horiuchi N, et al. Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation [J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(9): 2589-2596.
- Bahrami F, Morris DL, Pourgholami MH. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential [J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(1): 44-52.
- 管剑龙, 施桂英, 韩星海, 等. 骨关节炎软骨细胞和滑膜细胞金属蛋白酶活性的影响因素[J]. 中华风湿病学杂志, 2001, 5(1): 19-22.
- Chreifi G, Li H, McInnes CR, et al. Communication between the zinc and tetrahydrobiopterin binding sites in nitric oxide synthase[J]. Biochemistry, 2014, 53(25): 4216-4223.
- Shah G, Zhang G, Chen F, et al. iNOS expression and NO production contribute to the direct effects of BCG on urothelial carcinoma cell biology[J]. Urol Oncol, 2014, 32(1): 45 e1-9.
- Zaragoza C, Lopez-Rivera E, Garcia-Rama C, et al. Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 9): 1896-1902.
- 陆军, 王遵来, 李岩. 颈椎病中医药治疗的实验研究[J]. 天津中医药, 2012, 29(3): 305-309.
- Dinc M, Bilgen MS, Kucukalp A, et al. An assessment of the chondroprotective effects of intra-articular application of statin and tetracycline on early-stage experimental osteoarthritis[J]. ISRN Orthop, 2012, 2012: 182097.

(收稿日期:2017-11-30 末次修回日期:2018-02-25)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)