

基础研究

褪黑素受体在不同程度退变腰椎髓核组织中的表达

罗俊男¹, 郭东明¹, 温世峰¹, 钟波夫¹, 肖文德¹, 王立¹, 鞠洪斌¹, 梁英杰¹, 王业杨²

(1 广州市第一人民医院脊柱外科 华南理工大学附属第二医院 510180 广州市;

2 广东省第二人民医院脊柱外科 510317 广州市)

【摘要】目的:研究褪黑素受体褪黑素 1 型受体(MT1)、褪黑素 2 型受体(MT2)以及核转录因子- κ B(NF- κ B)在不同程度退变腰椎髓核组织中的表达。**方法:**选取 2014 年 3 月~2016 年 1 月于我院住院患者 31 例(19 例男性和 12 例女性, 年龄 47~62 岁, 平均 56.9 $\pm$ 4.9 岁)。采用 MRI 对髓核退变程度进行 Pfirrmann 分级并经手术收集髓核标本, 其中 IV 级标本 11 例纳入退变 I 组; V 级标本 12 例纳入退变 II 组; 8 例分级小于 III 级标本纳入对照组。实时定量 PCR 检测髓核组织中 MT1、MT2、NF- κ B mRNA 的表达, 免疫印迹和免疫组织化学技术检测 MT1、MT2、p65 NF- κ B 和磷酸化 p65 (p-p65)NF- κ B 蛋白的表达, 利用 Spearman 相关分析退变髓核组织中 MT1、MT2、NF- κ B 蛋白表达的关系。**结果:**实时定量 PCR 结果显示对照组 MT1 和 MT2 mRNA 分别为 1.00 $\pm$ 0.04 和 1.00 $\pm$ 0.04, 退变 I 组 MT1 和 MT2 mRNA 分别为 0.68 $\pm$ 0.06 和 0.77 $\pm$ 0.04, 退变 II 组 MT1 和 MT2 mRNA 分别为 0.52 $\pm$ 0.03 和 0.68 $\pm$ 0.06, 各组间均存在统计学差异 ($P<0.05$)。各组 NF- κ B mRNA 分别为 1.00 $\pm$ 0.03、0.99 $\pm$ 0.07、0.98 $\pm$ 0.05, 无统计学差异 ($P>0.05$)。免疫印迹结果显示对照组 MT1 和 MT2 蛋白表达分别为 1.00 $\pm$ 0.05 和 1.00 $\pm$ 0.05, 退变 I 组为 0.73 $\pm$ 0.07 和 0.56 $\pm$ 0.04, 退变 II 组别为 0.62 $\pm$ 0.05 和 0.55 $\pm$ 0.04, 各组间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。三组 p65 NF- κ B 表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.05、1.00 $\pm$ 0.06、0.99 $\pm$ 0.04, 无统计学差异 ($P=0.920$)。对照组 p-p65 NF- κ B 蛋白为 1.00 $\pm$ 0.07, 退变 I 组和退变 II 组 p-p65 NF- κ B 蛋白水平分别为 1.43 $\pm$ 0.08 和 1.49 $\pm$ 0.08, 各组间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。免疫组织化学技术检测结果显示退变髓核组织 MT1 和 MT2 蛋白与 p-p65 蛋白表达具有负相关关系 ($P<0.05$), 相关系数 r 分别为 -0.6492 和 -0.6190。**结论:**髓核组织退变程度增加, 褪黑素受体表达降低, 而 NF- κ B 活化增加, 进而参与椎间盘组织退变过程。

【关键词】褪黑素受体; 核转录因子- κ B; 退行性变; 腰椎; 髓核组织

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2018.09.11

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-09-0839-07

Expression of melatonin receptors in lumbar nucleus pulposus with degeneration of different grades/LUO Junnan, GUO Dongming, WEN Shifeng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(9): 839-845

【Abstract】Objectives: To investigate the expression of melatonin receptor type 1(MT1), melatonin receptor type 2(MT2) and nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B) in lumbar nucleus pulposus with degeneration of different grades. **Methods:** Thirty-one patients enrolled in our hospital from March 2014 to January 2016 were selected(19 males and 12 females, age 47-62, mean age 56.9 $\pm$ 4.9). Magnetic resonance imaging was used to identify the grade of intervertebral disc degeneration with Pfirrmann grading system. Then the nucleus pulposus samples were collected during surgery. 11 samples of grade IV were allocated into degeneration I group; 12 samples of grade V into degeneration II group; 8 samples lower than grade III into control group. MRNA expressions of MT1, MT2, p65 NF- κ B and phosphorylated p65(p-p65) NF- κ B were examined by real-time quantitative PCR. Protein expressions of MT1, MT2, p65 NF- κ B were also evaluated by immunoblot and immunohistochemistry. Correlation between MT1, MT2 and NF- κ B was analyzed by using Spearman method. **Results:** The results of qRT-PCR showed that MT1 and MT2 mRNA expression in control group were 1.00 $\pm$ 0.04 and 1.00 $\pm$ 0.04, respectively, while the expressions of MT1 mRNA in degeneration I and degeneration II

基金项目:广州市海珠区科技计划项目(201304231038742045);广东省科技计划项目(编号:2011A032100001)

第一作者简介:男(1988-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(020)81048247 E-mail:luojngz@163.com

通讯作者:王业杨 E-mail:yeyangwy@163.com

group were 0.68 ± 0.06 and 0.52 ± 0.03 . MT2 mRNA expressions were 0.77 ± 0.04 and 0.68 ± 0.06 . The difference among these three groups was significant ($P < 0.05$). NF- κ B mRNA expressions in three groups were 1.00 ± 0.03 , 0.99 ± 0.07 and 0.98 ± 0.05 , with insignificant difference ($P > 0.05$). Western blot results showed that MT1 and MT2 protein levels in control group were 1.00 ± 0.05 and 1.00 ± 0.05 , while MT1 protein levels in degeneration I and degeneration II group were 0.73 ± 0.07 and 0.56 ± 0.04 . MT2 protein levels in degeneration I and degeneration II group were 0.62 ± 0.05 and 0.55 ± 0.04 . The difference among these three groups was significant ($P < 0.05$). P65 protein levels in three groups were 1.00 ± 0.05 , 1.00 ± 0.06 and 0.99 ± 0.04 , with insignificant difference ($P = 0.920$). Phosphorylated p65 (p-p65) protein level in control group was 1.00 ± 0.07 , while those in degeneration I and degeneration II group were 1.43 ± 0.08 and 1.49 ± 0.08 , the difference among these three groups was also significant ($P < 0.05$). The results of immunohistochemistry showed that MT1 and MT2 in degenerated nucleus pulposus were inversely correlated with the expression of p-p65 protein ($P < 0.05$). The correlation coefficients were -0.6492 and -0.6190 . **Conclusions:** With the increase of degeneration grade in human nucleus pulposus, the expression of melatonin receptors is suppressed and the activity of NF- κ B is promoted.

[Key words] Melatonin receptors; Nuclear transcription factor κ B; Degeneration; Lumbar; Nucleus pulposus

[Author's address] Department of spine surgery, Guangzhou First People's Hospital, the Second Affiliated Hospital of South China University of Technology, Guangzhou, 510180, China

椎间盘退行性变常引起患者颈部或腰腿部疼痛,其退变过程涉及遗传、炎症、老化、机械张力等多个因素的作用。有研究表明,切除松果体的鸡发生椎间盘退变和脊柱畸形,而添加褪黑素则可抑制脊柱病变^[1];相较于正常小鼠,低褪黑素小鼠经双足直立诱导可获得更高的脊柱侧凸发生率^[2]。体外实验也发现褪黑素能够通过褪黑素 1 型受体(melatonin receptor type 1, MT1)和褪黑素 2 型受体(melatonin receptor type 2, MT2)抑制人髓核细胞增殖并促进 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖的表达,进而防止椎间盘退变^[3]。这些研究表明,褪黑素及其受体在维持椎间盘正常结构和功能中作用明显。已知褪黑素可调节细胞中核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)的活性,而后者过度活化是诱导退变髓核组织炎症因子表达的重要因素^[4-5]。然而,目前还存在着以下问题:(1)退变髓核组织中是否涉及 MT1 和 MT2 的表达变化;(2)MT1 和 MT2 的表达是否与炎症相关的转录因子 NF- κ B 活性相关。本研究拟检测并分析人不同程度退变髓核组织中 MT1、MT2、NF- κ B 的表达,探讨褪黑素受体在髓核细胞退变中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

RNA 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂 SYBR PremixEx Taq II 购于大连宝日生物; Trizol 试剂、ECL 显色试剂盒购于美国 Thermo

Fisher 生物公司; SDS-聚丙烯酰胺、聚偏氟乙烯(PVDF)、辣根酶标记链霉卵白素二氨基联苯胺(DAB)、脱脂奶粉购于江苏碧云天生物公司; MT1 抗体、MT2 抗体、p65 抗体、p-p65 抗体、 β -actin 抗体、HRP 标记第二抗体购于美国 Abcam 抗体公司; 苏木素、中性树胶购于上海瑞楚生物公司; 中性甲醛、酒精、过氧化氢等购于北京化工厂。

1.2 实验分组

椎间盘标本来自 2014 年 3 月~2016 年 1 月我院住院患者共 31 例,其中男性 19 例,女性 12 例,年龄 47~62 岁,平均 56.9 ± 4.9 岁。通过 MRI 对椎间盘退变程度进行诊断评估(Pfirrmann 分级),其中 IV 级标本共 11 例纳入退变 I 组,其中男性 7 例,女性 4 例; V 级标本 12 例纳入退变 II 组,其中男性 7 例,女性 5 例; 8 例分级小于 III 级标本列为对照组,其中男性 5 例,女性 3 例。本研究获得广州市第一人民医院伦理委员会批准(批准号: A2017-136),同时所有患者及家属签署知情同意书。

1.3 实时定量 PCR 法分析基因表达

按照 100mg 组织加入 1ml Trizol 试剂的比例提取人髓核组织 RNA。采用 RNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA。取 cDNA 作为模板(1 μ g),配成 20 μ l 实时定量 PCR 扩增体系,其中上、下游引物各 0.5 μ l, SYBR PremixEx Taq II 10 μ l, 模板 2 μ l, 双蒸水 7 μ l。qRT-PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 下 2min 激活,随后 94 $^{\circ}$ C 20s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 40 个循环,溶解曲线温度 65~95 $^{\circ}$ C。取循环阈值

(cycle threshold, Ct) 作为相对定量的值, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量。扩增使用引物序列见表 1。

1.4 免疫印迹法检测蛋白表达

将髓核组织用 PBS 漂洗后加入预冷的裂解液研磨裂解。随后将裂解混合物于 4℃、12000r/min 离心 10min(离心半径 15cm), 取离心后上清液并测定蛋白浓度。每泳道取 30μg 蛋白, 常温下于 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳分离蛋白, 随后将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 1h。封闭并 TBST 洗涤后, 加入第一抗体, 4℃下孵育过夜。各第一抗体稀释度: MT1 抗体(1:1000), MT2 抗体(1:1000), p65 抗体(1:1000), p-p65(1:1000), β-actin(1:1000)。TBST 洗涤后, 加入 HRP 标记第二抗体(稀释度 1:8000)室温下孵育 1h。利用 ECL 显色试剂盒显色, 暗室环境负片成像, 选取 β-actin 作为上样内参, Image J 图像软件测定蛋白灰度值。

1.5 免疫组织化学检测蛋白表达

取髓核组织于 4% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋并制作 4μm 切片。将切片用梯度酒精脱蜡、水化后, 3% H₂O₂ 室温下孵育 10min, 微波 5min 修复抗原。PBS 洗涤冷却后的切片, 加入 5% 的牛血清白蛋白进行封闭(10min), 随后加入一抗 [MT1 抗体(稀释度 1:200)、MT2 抗体(稀释度 1:500)、p65 抗体(稀释度 1:500)和 p-p65 抗体(稀释度 1:500)] 于 37℃ 中孵育 2h; PBS 洗涤, 加入生物素标记的二抗, 于 37℃ 中孵育 15min; PBS 洗涤, 加入辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37℃ 中孵育 20min; PBS 洗涤, 加入二氨基联苯胺(di-aminobenzidine, DAB)显色液显色 3~5min; 自来水冲洗, 苏木素复染 2min, 自来水冲洗; 梯度酒精脱水后用中性树胶封片。光学显微镜下选取 5 个视

野拍照, 放大倍数 400 倍, 采用 Image J 图像软件测定光密度(optical density, OD)值。

1.6 统计学方法

所有数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示, 利用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。对照组、退变 I 组和退变 II 组组间 MT1、MT2、NF-κB mRNA 和蛋白等指标的差异比较采用单因素方差分析(one way-ANOVA), 并采用 SNK-q 进行多重比较。各组退变髓核组织 MT1、MT2 与 NF-κB 的 OD 值的联系采用 Spearman 等级相关进行统计分析。概率值 $P < 0.05$ 时, 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MT1、MT2、NF-κB mRNA 的表达水平

相比于对照组 MT1 和 MT2, 退变 I 组和退变 II 组 MT1 mRNA 明显降低($P < 0.05$), MT2 mRNA 也降低($P < 0.05$)。对照组、退变 I 组和退变 II 组 NF-κB mRNA 无明显差异($P > 0.05$, 表 2)。

2.2 免疫印迹检测 MT1、MT2、p65 NF-κB、p-p65 NF-κB 蛋白的表达水平

对照组与退变 I 组和退变 II 组 MT1 蛋白相比, 表达量明显降低($P < 0.05$), MT2 蛋白表达也降低($P < 0.05$)。各组 p65 NF-κB 表达水平无明显差异($P > 0.05$)。对照组 p-p65 NF-κB 蛋白与退变 I 组和退变 II 组相比, 明显增高($P < 0.05$, 图 1, 表 3)。

2.3 免疫组织化学检测 MT1、MT2、p65 NF-κB、p-p65 NF-κB 蛋白的表达水平

对照组 MT1 的 OD 值为与退变 I 组和退变

表 2 髓核组织褪黑素受体和核转录因子-κB mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative expression of melatonin receptors and nuclear transcription factor-κB mRNA in degenerated nucleus pulposus

	MT1	MT2	NF-κB
对照组(n=8) Control group	1.00±0.04	1.00±0.04	1.00±0.03
退变 I 组(n=11) Degeneration I group	0.68±0.06 ^①	0.77±0.04 ^①	0.99±0.07
退变 II 组(n=12) Degeneration II group	0.52±0.03 ^{①②}	0.68±0.06 ^{①②}	0.98±0.05

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与退变 I 组比较, $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$; ②Compared with degeneration I group, $P < 0.05$

表 1 实时定量 PCR 分析目的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes for real-time quantitative PCR analysis

基因名 Symbol	引物序列(5'-3') Sequences (5'-3')
MT1	上游 Forward GGGACCATGCAGGGCAAC 下游 Reverse TGCGTTCCTGAGCTTCTTGT
MT2	上游 Forward GCACACAAGACCAAGGAAAGG 下游 Reverse CCCTTGACAGTTACCAAGTTCC
NF-κB	上游 Forward CTTAGGAGGGAGAGCCCCAC 下游 Reverse GAAGGTATGGGCCATCTGCT
β-actin	上游 Forward TGACGTGGACATCCGCAAAG 下游 Reverse CTGGAAGCTGGACAGCGAGG

Ⅱ组比较,明显降低($P<0.05$)。对照组 MT2 的 OD 值与退变Ⅰ组和退变Ⅱ组比较,也明显降低($P<0.05$)。各组 p65 NF- κ B 的 OD 值无明显差异($P>0.05$)。各组 p-p65 NF- κ B 平均 OD 值有统计学差异($P<0.05$,表 4,图 2)。

2.4 MT1、MT2 与 p-p65 NF- κ B 蛋白表达的相关性分析

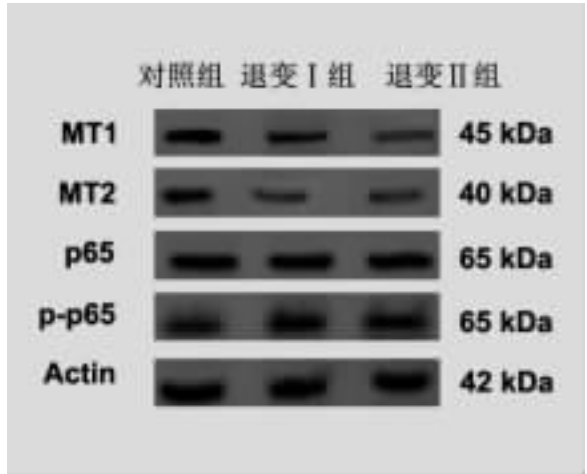


图 1 髓核组织 MT1、MT2、p65 NF- κ B、p-p65 NF- κ B 蛋白免疫印迹分析
Figure 1 Immunoblotting analysis of MT1, MT2, p65 NF- κ B and p-p65 NF- κ B protein in degenerated nucleus pulposus

退变髓核组织 MT1 与 p-p65 NF- κ B 的 OD 值有显著性负相关关系 ($r=-0.6492, P<0.05$), MT 与 p-p65 NF- κ B 的 OD 值也有显著性负相关关系 ($r=-0.6190, P<0.05$,图 3,图 4)。

3 讨论

椎间盘由髓核、纤维环和软骨终板三部分构成。髓核组织具有表达丰富的聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原蛋白,从而在髓核中维持较高的渗透压和亲水性,这种特性有助于维持椎间盘的高度并分散脊柱压力;退变髓核组织由于营养供应和细胞外基质的改变,聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原蛋白含量降低,基质金属蛋白酶表达量增加,渗透压也随之变化^[6]。髓核细胞外基质的表达受外界多种因子的调控,褪黑素在其中的作用受到越来越多研究者的关注。He 等^[7]发现褪黑素有助于髓核细胞抵抗氧化应激损伤、促进细胞外基质蛋白合成、减轻线粒体途径细胞凋亡。椎间盘退变是慢性背部疼痛重要原因,因此了解椎间盘退变的病理机制是治疗和控制慢性背部疼痛的重要前提。

MT1 和 MT2 都是 G 蛋白偶联受体,分别由 4 号和 11 号常染色体上的基因编码,广泛表达于人体和其他哺乳动物细胞中^[8]。有研究认为在同时表达 MT1 和 MT2 的细胞中,MT1 与 MT2 能各自

表 3 髓核组织中褪黑素受体和核转录因子- κ B 蛋白相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Relative expression of melatonin receptors and nuclear transcription factor- κ B protein in degenerated nucleus pulposus

	MT1	MT2	p65	p-p65
对照组($n=8$)/Control group	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.07
退变Ⅰ组($n=11$)/Degeneration I group	0.73 $\pm$ 0.07 ^①	0.62 $\pm$ 0.05 ^①	1.00 $\pm$ 0.06	1.43 $\pm$ 0.08 ^①
退变Ⅱ组($n=12$)/Degeneration II group	0.56 $\pm$ 0.04 ^{①②}	0.55 $\pm$ 0.04 ^{①②}	0.99 $\pm$ 0.04	1.49 $\pm$ 0.08 ^{①②}

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与退变Ⅰ组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with degeneration I group, $P<0.05$

表 4 髓核组织褪黑素受体和核转录因子- κ B 蛋白 OD 值 ($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Optical density of melatonin receptors and nuclear transcription factor- κ B protein in degenerated nucleus pulposus

	MT1	MT2	p65	p-p65
对照组($n=8$)/Control group	0.030 $\pm$ 0.006	0.022 $\pm$ 0.004	0.020 $\pm$ 0.004	0.014 $\pm$ 0.005
退变Ⅰ组($n=11$)/Degeneration I group	0.020 $\pm$ 0.004 ^①	0.017 $\pm$ 0.004 ^①	0.021 $\pm$ 0.003	0.023 $\pm$ 0.007 ^①
退变Ⅱ组($n=12$)/Degeneration II group	0.013 $\pm$ 0.003 ^{①②}	0.013 $\pm$ 0.004 ^{①②}	0.021 $\pm$ 0.003	0.026 $\pm$ 0.004 ^①

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与退变Ⅰ组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with degeneration I group, $P<0.05$

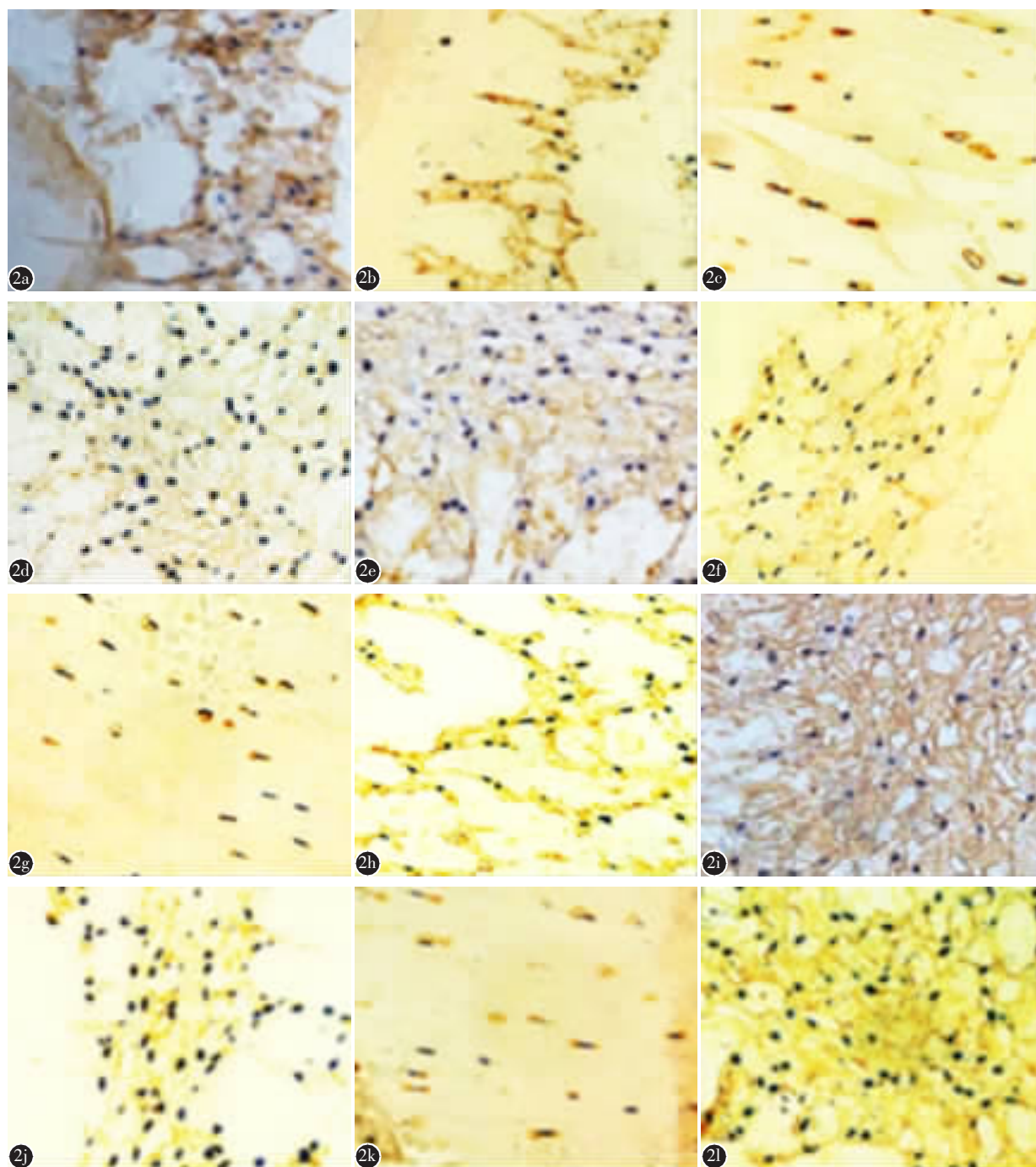


图 2 免疫组化分析不同退变程度髓核组织 MT1、MT2、p65 NF- κ B、p-p65 和 NF- κ B 蛋白的表达水平($\times 400$) a、b 对照组髓核组织中 MT1 和 MT2 蛋白阳性表达 c、d 对照组髓核组织 p65 和 p-p65 蛋白呈弱阳性表达 e、f 退变 I 组 MT1 和 MT2 蛋白表达水平降低 g、h 退变 I 组 p65 表达水平不变, p-p65 蛋白的表达水平升高 i、j 退变 II 组 MT1 和 MT2 弱阳性表达 k、l 退变 II 组 p65 弱阳性表达, p-p65 蛋白强阳性表达

Figure 2 Analysis of MT1, MT2, p65 NF- κ B and p-p65 NF- κ B protein expression in degenerated nucleus pulposus of different grades by immunohistochemistry($\times 400$) a, b Positive expression of MT1 and MT2 in nucleus pulposus of control group c, d Weakly positive expression of p65 and p-p65 protein expression in nucleus pulposus of control group e, f Decreased expression of MT1 and MT2 in degeneration I group g, h Unchanged expression of p65 and increased expression of p-p65 protein expression in degeneration I group i, j Weakly positive expression of MT1 and MT2 in degeneration II group k, l Weakly expression of p65 and strongly positive expression of p-p65 protein expression in degeneration II group

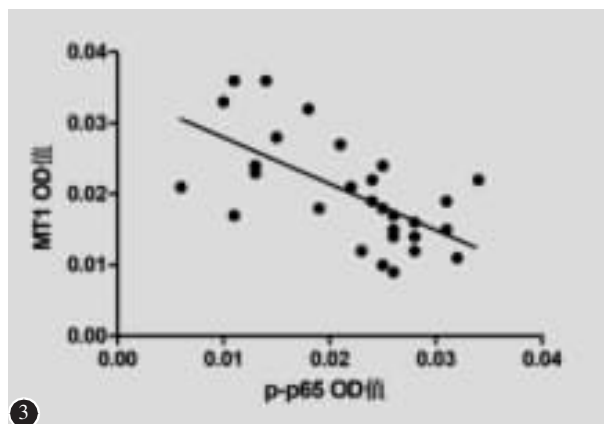


图 3 退变髓核组织 MT1 OD 值与 p-p65 OD 值相关分析。横轴为退变髓核组织切片中磷酸化 p65(p-p65)蛋白 OD 值,纵轴为 MT1 蛋白 OD 值,Spearman 相关分析结果 $r=-0.6492, P<0.001$ 图 4 退变髓核组织 MT2 OD 值与 p-p65 OD 值相关分析。横轴为退变髓核组织切片中磷酸化 p65(p-p65)蛋白 OD 值,纵轴为 MT2 蛋白 OD 值,Spearman 相关分析结果 $r=-0.6190, P<0.001$

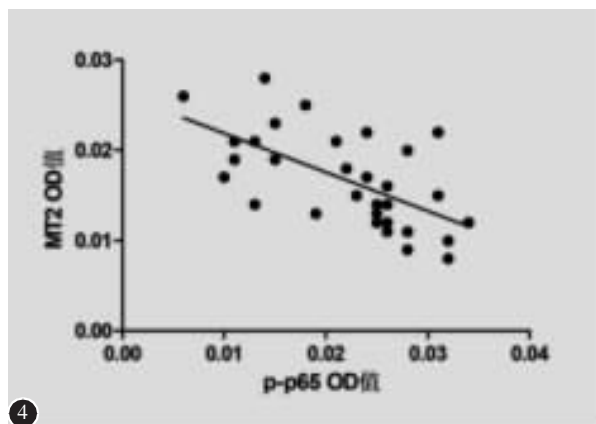


Figure 3 Correlation analysis between MT1 OD value and p-p65 OD value in degenerated nucleus pulposus. The abscissa axis represented the OD value of phosphorylated p65 (p-p65) protein in degenerated nucleus pulposus section, the ordinate axis represented the OD value of MT1 protein. The result of Spearman correlation analysis: $r=-0.6492, P<0.001$
Figure 4 Correlation analysis between MT2 OD value and p-p65 OD value in degenerated nucleus pulposus. The abscissa axis represented the OD value of phosphorylated p65 (p-p65) protein in degenerated nucleus pulposus section, the ordinate axis represented the OD value of MT2 protein. The result of Spearman correlation analysis: $r=-0.6190, P<0.001$

形成同源二聚体,也可以形成异源二聚体介导褪黑素的作用^[9]。本研究分别从 mRNA 水平和蛋白水平探讨了 MT1 和 MT2 在髓核组织中的表达,发现退变髓核组织具有低表达量的 MT1 和 MT2 受体,并且受到退变程度的影响。胰岛素样生长因子(insulin growth factor,IGF)等生长因子具有促生长、抗衰老、抗凋亡等作用。髓核细胞老化和凋亡与椎间盘中生长因子的供应减少相关,MT1 受体可介导褪黑素的作用,同时促进下游 PI3K/Akt 信号转导^[10]。因此,髓核组织褪黑素受体表达下调可能直接影响生长因子的作用,加剧髓核细胞的老化和凋亡。

本研究发现 NF- κ B 的活性在退变髓核组织中明显增高。有研究^[11]认为促炎因子白介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)是诱导椎间盘退变的重要介质,而在改变髓核细胞外基质方面,NF- κ B 是 IL-1 β 作用的关键转录因子。IL-1 β 刺激髓核细胞 NF- κ B 的 p65 亚基活化并向细胞核转移^[12]。Wang 等^[13]发现 NF- κ B 与 IL-1 β 的一个靶蛋白-无孢蛋白基因启动子区结合进而起始基因转录,负向调控聚集蛋白聚糖和胶原蛋白表达。活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)也是诱导椎间

盘退变的另一个重要因子。ROS 可促进人髓核细胞 NF- κ B 活化,诱导肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α ,TNF- α)以及基质金属蛋白酶的产生,改变细胞外基质^[14]。本研究分析了两个退变组中 MT1、MT2 与 NF- κ B 表达之间的联系,发现 MT1、MT2 分别与活化 NF- κ B 呈现负相关关系。MT1 和 MT2 与 NF- κ B 在髓核细胞中的相互作用关系还不明确。但是在大鼠松果体中的研究^[15]发现,NF- κ B 的活性直接影响 MT1 和 MT2 的表达水平。而反过来,褪黑素也可通过其受体调节细胞内 NF- κ B 的转录活性并抑制 NF- κ B 介导的炎症反应^[16]。因此,类似于其他人体细胞,髓核细胞中可能存在褪黑素受体与 NF- κ B 相互作用的机制。

本研究通过 qRT-PCR、免疫印迹和免疫组织化学技术探讨了人体不同退变程度髓核中褪黑素受体以及炎症转录因子的表达和相关关系,结果发现褪黑素受体在人退变髓核组织中表达下调并与活化的 NF- κ B 呈负相关关系,说明了褪黑素受体可能参与了髓核组织退变过程。

4 参考文献

1. Turgut M, Basaloglu HK, Yenisey C, et al. Surgical pinealec

- tomy accelerates intervertebral disc degeneration process in chicken[J]. *Eur Spine J*, 2006, 15(5): 605–612.
2. 吴涛, 朱泽章, 刘军, 等. 双足直立诱导低褪黑素水平雌性小鼠脊柱侧凸模型的观察[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2014, 24(4): 350–354.
 3. Li Z, Li X, Chen C, et al. Melatonin inhibits nucleus pulposus (NP) cell proliferation and extracellular matrix (ECM) remodeling via the melatonin membrane receptors mediated PI3K–Akt pathway [J]. *J Pineal Res*, 2017, 63 (3). doi: 10.1111/jpi.12435. Epub 2017 Aug 16.
 4. Leon J, Casado J, Jiménez Ruiz SM, et al. Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF-kappabeta [J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(4): 415–426.
 5. Wang H, Tian Y, Wang J, et al. Inflammatory cytokines induce NOTCH signaling in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (23): 16761–16774.
 6. Dowdell J, Erwin M, Choma T, et al. Intervertebral disk degeneration and repair[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80(3S): S46–S54.
 7. He R, Cui M, Lin H, et al. Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells[J]. *Life Sci*, 2018, 199: 122–130. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.020. Epub 2018 Mar 9.
 8. Li DY, Smith DG, Hardeland R, et al. Melatonin receptor genes in vertebrates[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11208–11223.
 9. Baba K, Benleulmi–Chaachoua A, Journe AS, et al. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function [J]. *Sci Signal*, 2013, 6 (296): ra89. doi: 10.1126/scisignal.2004302.
 10. Picinato MC, Hirata AE, Cipolla–Neto J, et al. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets [J]. *J Pineal Res*, 2008, 44(1): 88–94.
 11. Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, et al. Disc in flames: roles of TNF-alpha and IL-1beta in intervertebral disc degeneration[J]. *Eur Cell Mater*, 2015, 30: 104–117.
 12. Kang L, Hu J, Weng Y, et al. Sirtuin 6 prevents matrix degradation through inhibition of the NF-kappaB pathway in intervertebral disc degeneration[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352 (2): 322–332.
 13. Wang S, Liu C, Sun Z, et al. IL-1beta increases asporin expression via the NF-kappaB p65 pathway in nucleus pulposus cells during intervertebral disc degeneration [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4112.
 14. Feng C, Yang M, Lan M, et al. ROS: Crucial intermediators in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 5601593. doi: 10.1155/2017/5601593. Epub 2017 Mar 14.
 15. Cecon E, Chen M, Marcola M, et al. Amyloid beta peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway[J]. *FASEB J*, 2015, 29(6): 2566–2582.
 16. Garcia JA, Volt H, Venegas C, et al. Disruption of the NF-kappaB/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice[J]. *FASEB J*, 2015, 29(9): 3863–3875.
- (收稿日期:2018-01-12 末次修回日期:2018-06-28)
(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)
(本文编辑 姜雅浩)