

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.005

白细胞介素-17对体外培养髓核细胞增殖和代谢的影响*

张洪跃¹ 周潘宇¹ 汪 洋¹ 许硕贵^{1Δ} 王秀会²

(1 第二军医大学附属长海医院急诊科 上海 200433; 2 上海浦东新区周浦医院 上海 201318)

摘要 目的:探究白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)对体外培养髓核细胞增殖和细胞代谢的影响。**方法:**髓核细胞取自经核磁共振影像确认需手术的退变椎间盘组织,建立体外培养体系。用2、5、10、15、20 ng/mL IL-17刺激髓核细胞72 h后,MTS法检测细胞增殖情况。用适当浓度IL-17刺激细胞48 h或96 h后,采用实时定量-PCR和免疫印迹方法检测基质和组织代谢相关基因的mRNA和蛋白表达。**结果:**IL-17刺激可以抑制体外培养髓核细胞的增殖,且15 ng/mL浓度的抑制作用最强。15 ng/mL IL-17刺激髓核细胞后,聚集蛋白聚糖(aggrekan, ACAN)和I型胶原(type I collagen, COL1A1)mRNA表达水平显著下降($P<0.05$),基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-3, MMP3)、金属蛋白酶3组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase-3, TIMP3)的mRNA表达水平显著上升($P<0.05$)。COL2A1 mRNA的表达下降,MMP13、含I型血小板结合蛋白基序的结聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin like and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs-4, ADAMTS4)、ADAMTS5、TIMP1 mRNA的表达上升,但差异均不显著($P>0.05$)。IL-17刺激48 h时,COL1A1的蛋白水平明显下降($P=0.010$),而ADAMTS5的蛋白水平显著上升($P=0.005$)。但刺激96 h时,COL1A1的蛋白表达下降,ADAMTS5的蛋白表达上升,但无显著差异($P>0.05$);COL2A1的蛋白表达水平显著下降($P=0.037$)。**结论:**IL-17可抑制体外培养髓核细胞的增殖及代谢,在椎间盘的退变过程中可能发挥了重要的促进作用。

关键词:白细胞介素-17;细胞因子;炎症;椎间盘退变

中图分类号:R-33;R681.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)12-2218-05

The Effect of IL-17 on the Proliferation and Metabolism of Nucleus Pulposus Cells Cultured in Vitro*

ZHANG Hong-yue¹, ZHOU Pan-yu¹, WANG Yang¹, XU Shuo-gui^{1Δ}, WANG Xiu-hui²

(1 Department of emergency, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 Pudong new area Zhoupu hospital, Shanghai, 201318, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of interleukin-17 (interleukin-17, IL-17) on proliferation and metabolism of nucleus pulposus cells cultured in vitro. **Methods:** The magnetic resonance imaging showed that nucleus pulposus cells were isolated from human degenerative disc tissues and cultured in vitro. Cells were cultured without or with different concentrations of IL-17. After 72 hours of stimulation by IL-17 of 2, 5, 10, 15, 20 ng/mL, the rate of proliferation inhibition was measured by MTS; Nucleus pulposus cells were cultured without or with an proper concentration of IL-17 for 48 or 96 hours. We used Real-time PCR and Western Blot method to measure the mRNA expression and protein expression levels of matrix macromolecules and tissue degradation genes. **Results:** It reported that the proliferation of nucleus pulposus cells cultured in vitro was inhibited with the stimulation of IL-17, while the inhibition effect of 15ng/mL IL-17 was significantly stronger. At the dose of 15 ng/mL, the stimulation of IL-17 contributed to multiple cellular responses, including increased mRNA expression of aggrecan (aggrecan, ACAN) and type I collagen (type I collagen, COL1A1) genes ($P<0.05$), and significantly decreased mRNA expression of tissue degradation genes, matrix metalloproteinase-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3, TIMP3) ($P<0.05$). The mRNA expression of COL2A1 and MMP13, a disintegrin like and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs-4 (a disintegrin like and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs-4, ADAMTS4), ADAMTS5, TIMP1 genes was increased, but the difference was not significant ($P>0.05$). After 48 hours of stimulation by IL-17, the results of Western Blot showed that the level of COL1A1 was dramatically decreased ($t=-2.814$, $P=0.010$), however the peptidases (ADAMTS5) level was significantly increased ($t=3.131$, $P=0.005$). However, after 48 hours of stimulation by IL-17, the protein expression of COL1A1 decreased and the protein expression of ADAMTS5 increased, but there was no significant difference ($P>0.05$); COL2A1 protein expression level was significantly decreased ($P=0.037$). **Conclusions:** These findings suggest that IL-17 can inhibit the proliferation of nucleus pulposus cells in vitro and affect its metabolism, which leads to the degenerative changes of disc disease.

* 基金项目:上海市卫生局科研计划项目(20134394)

作者简介:张洪跃(1984-),男,硕士研究生,住院医师,研究方向:再生骨科医学

Δ 通讯作者:许硕贵(1969-),男,博士,主任医师,研究方向:记忆合金材料

(收稿日期:2017-01-10 接受日期:2017-02-08)

Key words: Interleukin-17; Cytokine; Inflammation; Intervertebral disc degeneration

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R681.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2218-05

前言

椎间盘退变是一种脊椎动物常见的疾病^[1],是由多因素参与的对其成分、结构、功能起渐进性破坏的慢性疾病^[2],主要病理表现为胶原类型转换、细胞外基质水含量和蛋白多糖降低、基质降解酶数量和活性增高、降解酶抑制因子减少以及炎症介质释放^[3]。IL-17 是一种促炎因子^[4],可单独或协同其他炎症因子抑制聚集蛋白聚糖的合成,增加降解酶类表达,进而对聚集蛋白聚糖和胶原分子进行降解,从而促进关节退变^[5]。椎间盘髓核组织的主要细胞类型与关节的软骨细胞非常类似,提示 IL-17 可能通过类似的方式参与椎间盘退变的发生。既往研究显示 IL-17 作用于体外培养的椎间盘细胞后可促进其分泌炎症介质和细胞间粘附分子^[6],进而影响其代谢,表明 IL-17 在椎间盘退变的炎症病理过程中发挥重要的调节作用。但目前尚无研究证实 IL-17 通过抑制椎间盘细胞增殖和细胞外基质合成,促进降解酶类对聚集蛋白聚糖和胶原分子进行降解,进而介导椎间盘退化发生。因此,本研究通过研究 IL-17 对体外培养髓核细胞增殖和细胞代谢的影响,旨在探讨其在椎间盘退变中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 21 例 2013 年 10 月至 2014 年 5 月我院住院部骨科腰椎间盘退变患者,手术过程中切取退变的腰椎间盘组织标本,患者平均年龄为 68.38 ± 7.68 岁,其中 12 例为男性;患者无严重感染、癌症、高血压、糖尿病和其他遗传相关性疾病。腰椎间盘退变按 Thompson's 退变分级^[7]为 III 至 IV 级;所有患者均经诊断确认需椎间盘切除,并且研究获得患者知情和许可。

1.2 试剂与仪器

DMEM/F12 培养液(美国 Gibco 公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司),2.5 g/L 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),II 型胶原酶(美国 Invitrogen 公司),二甲基亚砜(DMSO,美国 Invitrogen 公司),青霉素、链霉素(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Takara 公司),单溶液细胞增殖检测试剂盒(美国 Promega 公司),细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),超净工作台(上海生工),恒温水浴箱(上海生工),分光光度计。

1.3 髓核细胞分离与培养

取退变椎间盘髓核组织,去除混杂的纤维环和软骨,保存于生理盐水中,30 min 后用眼科剪将髓核组织剪碎,0.25% 胰蛋白酶联合 0.2% II 型胶原酶消化 1 h。1000 r/min 离心 10 min,去上清。收集细胞计数后,按 1×10^6 接种于底面积为 25 cm² 培养瓶中。加入 5 mL 完全培养液(完全培养液:20% FBS+DEME/F12+100 μ g/mL 青霉素+100 μ g/mL 链霉素)。5% CO₂、37℃ 恒温细胞培养箱中孵育,每 2-3 天更换细胞培养液。待细胞融合达 80% 以上,进行传代。

1.4 IL-17 干预体外培养髓核细胞

髓核细胞增殖实验:取第 3 次传代后的髓核细胞,平均随机加入 96 孔板,分为七组。分别加入 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL IL-17 刺激髓核细胞,另一组不加入 IL-17,作为未刺激组。待细胞贴壁生长 72 h 后,进行髓核细胞增殖检测。每组设 3 个平行。

髓核细胞代谢实验:取第 3 次传代后的髓核细胞,加入 96 孔板并随机分为七组。其中加入适当浓度 IL-17 的为刺激组,不加 IL-17 为未刺激组。分别于 48 h 和 96 h 收集细胞,进行髓核细胞代谢检测。每组设 3 个平行。

1.5 IL-17 干预前后髓核细胞增殖和代谢变化

1.5.1 MTS 法检测髓核细胞的增殖情况 IL-17 干预细胞 72 h 后,更换培养液,每孔中加入 20 μ L 的 MTS 试剂,培养箱中孵育 4 h。酶标仪检测培养液吸光度(450 nm 波长)。MTS 试剂可被活细胞内的脱氢酶类代谢,转化为可溶的有色甲臞化合物,因此培养基中活细胞数与甲臞化合物的量成正比。甲臞化合物的量根据测定的吸光度值计算,从而计算出 IL-17 对髓核细胞的增殖抑制情况^[8]。抑制率(suppression ratio)公式:(未刺激组 - 刺激组)/(未刺激组 - 本底) $\times$ 100%。

1.5.2 实时定量 PCR(RT-PCR)检测 mRNA 表达 总 RNA 提取和 cDNA 合成:收集 IL-17 处理 48 h 和 96 h 后的髓核细胞,提取总 RNA。紫外分光光度计和凝胶电泳检测 RNA 的纯度和完整性。取 5 μ g 总 RNA,使用 SuperScript[®] III First Strand kits (Invitrogen) 的 20 μ L 反应体系,按照操作说明将 mRNA 逆转录为 cDNA,使用前保存于 -20℃。

引物设计与合成:根据 GenBank 中人内参基因 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 与 ACAN (aggrecan)、COL1A1(collagen, type I, alpha 1)、COL2A1(collagen, type II, alpha 1)、MMP-3 (matrix metalloproteinase-3 (stromolysin))、MMP-1(matrix metalloproteinase-1(collagenase)、ADAMTS4(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4)、ADAMTS5 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5)、TIMP-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1)、TIMP-13(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-13)、GAPDH(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)的 mRNA 序列,根据引物设计原则,利用 Primer Express 3.0 软件设计基因专一性引物。引物的核酸序列见表 1。引物设计完成后由上海生工生物技术公司合成。

RT-PCR 检测基因表达:应用 RT-PCR 试剂盒,采用实验中扩增效率最佳浓度的 cDNA 样本和引物量进行检测。25 μ L 反应体系:SYBR[®] Premix ExTaq12.5 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,ROX Reference Dye II 0.5 μ L,cDNA 样本 2 μ L,ddH₂O 9 μ L。PCR 扩增过程为 95℃ 预变性 10s,95℃ 变性 20s,65℃ 退火延伸 20 s,循环 45 次,每次循环结束后进行荧光检测。溶解曲线法检测 PCR 扩增产物的特异性。PCR 扩增产物,通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

RT-PCR 数据分析:分别测定每个基因扩增的 Ct 值。Ct 值

与 DNA 起始拷贝数呈负相关性。采用相对定量方法分析各样 分析值。
本 Δ Ct 值, Δ Ct= 目的基因 Ct- 内参基因 Ct, Δ Ct 为最后数据

表 1 基因序列与引物设计信息
Table1 Gene sequences and primer information

Gene	GenBank Accession NO.	Primer pair (5'- 3')	Length of product (bp)
ACAN	NM_001135	For: CAGAATCAACTGCTGCAGACCA Rev: TTCGATGGTCCTGTCGTTTCAG	227
COL1A1	NM_000088	For: AGTGGTTTGGATGGTGCCAA Rev: GCACCATCATTTCCACGAGC	170
COL2A1	NM_001844	For: GGGACTGtTCCTCTGCGACGACA Rev: CTTTGGTCCTGGTTGCCCACT	172
MMP3	NM002422	For: TGAGGACACCAGCATGAACC Rev: ACTTCGGGATGCCAGGAAAG	248
MMP13	NM002427	For: CATGAGTTCGGCCACTCCTT Rev: CCTCGGAGACTGGTAATGGC	230
ADAMTS4	NM005099	For: CACATTCTTGTCGGCAGCA Rev: CCCCTCCCCACTGAGTCTTA	489
ADAMTS5	NM007038	For: ACTTTCCTTTGGCACACCCA Rev: ACGTCACTGACCACTGTTGG	230
TIMP1	NM003254	For: GCGGATACTTCCACAGGTCC Rev: CTGGTCCGTCCACAAGCAAT	242
TIMP3	NM000362	For: CCCTCCCACAAGTGGACATC Rev: ACTCCGACGGGAACTTCAG	139
GAPDH	NM002046	For: TCAAGATCATCAGCAATGCC Rev: TGTGGTCATGAGTCCTTCCA	227

1.5.3 western blot 检测蛋白表达 收集 IL-17 处理 48 h 和 96 h 后的体外培养髓核细胞,用含有蛋白酶抑制剂(罗氏分子生物化学试剂, 曼海姆, 德国) 的 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(Bradford Protein Assay Kit)测定蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白提取物通过 12%SDS-PAGE 胶分离后湿法转膜。含 5%脱脂奶粉的 TBS- 吐温封闭膜 2 h,TBS 摇床法洗涤 3 次,每次 5 min。配置多克隆羊抗人—抗孵育液,分别加入 ACAN,COL1A1,COL2A1,ADAMTS4,ADAMTS5 一抗,稀释度分别为 1:1500,1:500,1:1000,1:2000,孵育过夜后,再用 TBS 洗 3 次, 每次 5 min。用与过氧化物酶偶联的兔抗羊二抗(Santa Cruz Biotechnology 公司)孵育 2 h,用碱性磷酸酶显色,拍照获得特异条带后进行光密度值分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以平均值 $\pm$ 标准误差表示,两组间指标差异比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

表 2 IL-17 处理 48 小时对体外培养髓核细胞相关基因表达的影响

Table 2 Effect of interleukin-17 treated for 48h on the mRNA expression of related genes in annulus fibrosus cells

Groups	ACAN	COL1A1	COL2A1	MMP3	MMP13	ADAMTS4	ADAMTS5	TIMP1	TIMP3
Stimulated	7.19 $\pm$ 2.06	11.87 $\pm$ 3.83	8.80 $\pm$ 3.03	5.42 $\pm$ 2.25	7.41 $\pm$ 3.14	11.08 $\pm$ 4.09	13.38 $\pm$ 3.65	10.34 $\pm$ 2.32	8.20 $\pm$ 3.21
Unstimulated	4.52 $\pm$ 2.63	8.21 $\pm$ 1.41	7.46 $\pm$ 2.67	8.86 $\pm$ 3.86	8.19 $\pm$ 2.74	13.21 $\pm$ 3.86	11.53 $\pm$ 4.18	11.44 $\pm$ 3.02	12.05 $\pm$ 4.03
P	0.011	0.005	0.263	0.014	0.523	0.203	0.261	0.328	0.017

2.1 不同浓度 IL-17 对体外培养髓核细胞增殖的影响

2、5、10、15 和 20 ng/mL IL-17 作用于体外培养的髓核细胞 72 h 后, 髓核细胞的增殖抑制率分别为 3.84% $\pm$ 0.63%、6.76% $\pm$ 1.02%、8.32% $\pm$ 0.74%、12.91% $\pm$ 0.67%、12.78% $\pm$ 1.52%, IL-17 浓度低于 15 ng/mL 时,细胞生长抑制率随浓度升高而增加,15 ng/mL 对髓核细胞的抑制显著强于 2 ng/mL($P=0.000$)、5 ng/mL ($P=0.000$) 和 10 ng/mL ($P=0.000$), 而 15 ng/mL 和 20 ng/mL 髓核细胞的抑制作用比较差异无统计学意义($P=0.789$)。

2.2 IL-17 对体外培养髓核细胞相关基因表达的影响

15ng/mL IL-17 作用于体外培养的髓核细胞 48 h 和 96 h 后, 与未处理组相比,ACAN mRNA 的表达显著下降;MMP3 mRNA 的表达显著上升;COL1A1 mRNA 的表达在 48 h 时显著下降($P<0.05$),在 96 h 时差异不显著;TIMP3 mRNA 的表达在 48 h 时显著上升 ($P<0.05$), 在 96 h 时差异不显著;COL2A1 mRNA 的表达有下降, 但差异不显著;MMP13、ADAMTS4、ADAMTS5、TIMP1 mRNA 的表达有上升,但差异不显著。详见表 2 和 3。

表 3 IL-17 处理 96 小时对体外培养髓核细胞相关基因表达的影响

Table 3 Effect of interleukin-17 treated for 96h on the mRNA expression of related genes in annulus fibrosus cells

Groups	ACAN	COL1A1	COL2A1	MMP3	MMP13	ADAMTS4	ADAMTS5	TIMP1	TIMP3
Stimulated	10.43± 3.32	8.24± 2.97	10.21± 3.53	7.01± 2.88	11.38± 4.23	10.20± 4.23	5.46± 2.35	8.37± 2.75	11.23± 4.02
Unstimulated	7.02± 2.28	9.31± 3.23	8.97± 3.94	10.56± 2.93	9.21± 3.54	12.24± 3.57	6.38± 3.14	6.86± 2.47	10.41± 2.96
P	0.008	0.407	0.425	0.007	0.187	0.215	0.425	0.171	0.575

2.3 IL-17 对体外培养髓核细胞相关蛋白表达的影响

如表 4 和表 5 所示,15 ng/mL IL-17 作用于体外培养的髓核细胞,刺激 48 h 时,髓核细胞内 COL1A1 基因的蛋白表达较未刺激组显著下降;ADAMTS5 基因的蛋白表达较未刺激组显

著升高;但刺激 96 h 时,COL1A1 基因,ADAMTS5 基因的蛋白表达与未刺激组无显著差异;而与未刺激组的 COL2A1 基因蛋白表达相比,刺激组的蛋白表达水平显著下降。

表 4 IL-17 处理 48 小时对体外培养髓核细胞相关蛋白表达的影响

Table 4 Effect of interleukin-17 treated for 48h on the protein expression of related genes in annulus fibrosus cells

Groups	ACAN	COL1A1	COL2A1	ADAMTS4	ADAMTS5
Stimulated	0.75± 0.31	0.41± 0.12	0.59± 0.22	0.42± 0.21	0.58± 0.19
Unstimulated	0.64± 0.25	0.65± 0.27	0.61± 0.23	0.57± 0.17	0.39± 0.09
P	0.349	0.010	0.830	0.067	0.005

表 5 IL-17 处理 96 小时对体外培养髓核细胞相关基因表达的影响

Table 5 Effect of interleukin-17 treated for 96h on the protein expression of related genes in annulus fibrosus cells

Groups	ACAN	COL1A1	COL2A1	ADAMTS4	ADAMTS5
Stimulated	0.36± 0.15	0.56± 0.19	0.51± 0.16	0.28± 0.09	0.19± 0.07
Unstimulated	0.34± 0.13	0.63± 0.22	0.69± 0.23	0.31± 0.11	0.22± 0.09
P	0.730	0.413	0.037	0.472	0.372

3 讨论

白细胞介素-17(IL-17)在人退变椎间盘组织中表达显著升高^[9],提示 IL-17 在椎间盘退化过程中可能发挥了重要作用。本实验通过建立体外培养髓核细胞,观察不同浓度 IL-17 对髓核细胞增殖的影响,并 IL-17 从细胞外基质成分和代谢酶类的表达变化方面探讨 IL-17 在椎间盘退变发病机制中的可能作用。本研究结果显示 IL-17 作用于体外培养的髓核细胞 72 h 后,增殖被明显抑制,且抑制程度随 IL-17 浓度的增加而显著增加,剂量为 15 ng/mL 时,髓核细胞增殖受到的抑制作用最强。Gabr 等^[10]用不同浓度 IL-17 刺激髓核细胞后,发现 10 ng/mL 浓度以上 IL-17 产生一氧化氮量(NO)最多,与本实验的结果基本一致。但本研究中,15 ng/mL 和 20 ng/mL IL-17 对髓核细胞的增殖抑制作用差异不显著,可能是浓度增至 15 ng/mL 左右时,髓核细胞内 IL-17 受体已被完全被饱和^[11],因此即使浓度增加,但对增殖的抑制率不再增加。NO^[12]已明确可通过促进细胞凋亡加重椎间盘的退变,而 IL-17 可以显著诱导一氧化氮合成酶的表达,从而促进 NO 的生成,因此 IL-17 也可通过间接促进髓核细胞的凋亡而发挥抑制细胞增殖的作用。

根据增殖实验结果,以 15 ng/mL 为 IL-17 代谢实验的最适刺激浓度。RT-PCR 结果显示 IL-17 刺激体外培养髓核细胞 48

h 时,细胞外基质成分 ACAN 和 COL1A1 mRNA 表达显著低于未刺激组;刺激 96 h 时,ACAN 的 mRNA 表达仍显著低于未刺激组。蛋白水平检测结果也表明,15 ng/mL IL-17 刺激髓核细胞 48 h 时,COL1A1 基因的蛋白表达较未刺激组髓核细胞显著下降。II 型胶原 mRNA 含量在刺激后有下降,但 2 个时间点均与未刺激组无显著差异。Seguin 等^[13]分析了 TNF- α 刺激体外培养髓核细胞后多种基因 mRNA 表达变化情况,发现 TNF- α 可显著降低髓核细胞中 ACAN 的表达,说明炎症因子在椎间盘退变过程中的一个重要作用可能就是减少细胞外基质的产生。除了细胞外基质含量的降低^[14],退变椎间盘组织还会发生 II 型胶原向 I 型胶原的转化^[15]。本研究未发现 II 型胶原 mRNA 表达水平降低,但 IL-17 刺激体外培养髓核细胞 96h 时,COL2A1 基因蛋白表达水平较未刺激组的显著下降,而 COL1A1 基因蛋白表达水平与未刺激组的无差异。可能是 IL-17 刺激在引起 I 型胶原 mRNA 表达下降的同时,也促进了髓核细胞内 I 型胶原转化为 II 型胶原,从而使 I 型胶原蛋白水平在 48 h 后渐渐上升,而 II 型胶原蛋白水平则下降。这一结果说明 IL-17 抑制了细胞外基质大分子的生成,并且能促进 II 型胶原向 I 型胶原的转化,破坏细胞外基质的平衡。

髓核细胞不仅可合成细胞基质大分子,还会分泌多种组织酶^[16],发挥基质降解作用。本实验中,IL-17 作用于髓核细胞后,

细胞内降解酶水平发生了变化。与未刺激组相比,MMP3 mRNA 的表达在 48 h 和 96 h 时均显著上升;TIMP3 mRNA 的表达在 48 h 时显著上升。Liang 等的研究发现,椎间盘退行伴有 MMP3 和 TIMP3 基因 mRNA 的表达升高^[17,18],与本研究结果相近。而 ADAMTS4、ADAMTS5、TIMP1 mRNA 的表达在刺激后有上升,但差异不显著。可能是体外培养髓核细胞的基因表达已经发生了上调,因而对 IL-17 刺激未响应。ADAM-TS5 的蛋白表达在 48 h 时较未刺激组显著升高,表明上调的 ADAMTS5 mRNA 可能对 IL-17 有响应,从而在翻译水平生成更多的 ADAMTS5 蛋白,进而参与降解细胞外基质。以上结果表明,IL-17 作用于髓核细胞后,降解酶的数量增多、活性增强,进而对椎间盘细胞外基质的降解作用增强,细胞外基质大分子大量减少,退化进一步严重。

虽然 IL-17 刺激体外培养髓核细胞是研究椎间盘退变过程的一种有效途径,但本实验仍然存在一些不足。由于本研究选取的髓核细胞来源于退变椎间盘组织,观察到的 mRNA 和蛋白水平变化可能因没有正常来源髓核细胞作对照而存在误差。且研究发现,退变椎间盘髓核细胞本身也有 IL-17 水平的升高^[9],而本实验并未考虑本身 IL-17 表达对实验的影响。因此还需进一步探讨动物模型中 IL-17 刺激对在体髓核细胞的影响,从而更准确的探讨 IL-17 在椎间盘退变中的作用和功能。

本实验通过建立体外培养髓核细胞,检测炎症因子 IL-17 对髓核细胞增殖和代谢的影响,发现 IL-17 可抑制体外培养髓核细胞的增殖,同时通过抑制细胞外基质分子的表达,增强其降解酶的表达,破坏细胞外基质平衡。因此,IL-17 在椎间盘的退变过程中可能发挥了重要的促进作用。

参考文献(References)

- [1] Zhang W, Nie L, Guo Y J, et al. Th17 cell frequency and IL-17 concentration correlate with pre- and postoperative pain sensation in patients with intervertebral disk degeneration [J]. Orthopedics, 2014, 37(7): e685-691
- [2] Ding F, Shao Z W, Xiong L M. Cell death in intervertebral disc degeneration [J]. Apoptosis, 2013, 18(7): 777-785
- [3] 孟祥宇, 夏建龙, 杨挺, 等. 椎间盘退变的机制及修复[J]. 中国组织工程研究, 2015, 11: 1768-1773
Meng Xiang-yu, Xia Jian-long, Yang Ting, et al. Mechanism and repair of intervertebral disc degeneration[J]. China Tissue Engineering Research, 2015, 11: 1768-1773
- [4] 林秋水, 周许辉, 王新伟, 等. 退变颈椎间盘中 IL-17 表达与分布的研究[J]. 颈腰痛杂志, 2011, 32(2): 83-87
Lin Qiu-shui, Zhou Xu-hui, Wang Xin-wei, et al. Expression and distribution of IL-17 in degenerated cervical intervertebral discs [J]. Journal of Cervicodynia & Lumborum, 2011, 32 (2): 83-87
- [5] 张莹, 周小莉, 戴敏, 等. 小柴胡汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清中 IL-17、IL-23 及 IL-27 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25 (13): 1391-1394
Zhang Ying, Zhou Xiao-li, Dai Min, et al. Effects of xiaochaihu decoction on IL-17, IL-23 and IL-27 in serum of rats with collagen-induced arthritis [J]. Journal of Modern Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2016, 25 (13): 1391-1394
- [6] 李涛, 刘强. IL-17 与 BMP-7 在退变腰椎间盘髓核组织中的表达及其意义[J]. 中国现代医生, 2011, 49(6): 1-2, 10
Li Tao, Liu Qiang. Expression and significance of IL-17 and BMP-7 in degenerated lumbar disc nucleus [J]. Modern Chinese Medicine, 2011, 49(6): 1-2, 10
- [7] Thompson J P, Pearce R H, Schechter M T, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc[J]. Spine, 1990, 15(5): 411-415
- [8] Liu W, Xu C, Wan H, et al. MicroRNA-206 overexpression promotes apoptosis, induces cell cycle arrest and inhibits the migration of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(2): 420-428
- [9] 张瑜, 陈莹, 林楠, 等. 白细胞介素 17 在妊娠合并乙肝中的表达[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(27): 5309-5311, 5328
Zhang Yu, Chen Xuan, Lin Nan, et al. The Expression of IL-17 in the Placenta of Pregnant Women Infected by HBV [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(27): 5309-5311, 5328
- [10] Gabr M A, Jing L, Helbling A R, et al. Interleukin-17 synergizes with IFNgamma or TNFalpha to promote inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells[J]. J Orthop Res, 2011, 29(1): 1-7
- [11] Kuestner R E, Taft D W, Haran A, et al. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F [J]. J Immunol, 2007, 179(8): 5462-5473
- [12] 孙煦化, 肖荣驰, 王莉, 等. 一氧化氮、白细胞介素 1 及组织胺与椎间盘退变关系的研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(12): 109-110
Sun Xu-hua, Xiao Rong-chi, Wang Li, et al. Relationship between nitric oxide, interleukin-1 and histamine and intervertebral disc degeneration[J]. Shandong Medicine, 2011, 51(12): 109-110
- [13] Seguin C A, Pilliar R M, Roughley P J, et al. Tumor necrosis factor-alpha modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue[J]. Spine, 2005, 30(17): 1940-1948
- [14] 王春生, 张维斌. 髓核细胞移植抑制椎间盘退变[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(53): 9239-9244
Wang Chun-sheng, Zhang Wei-bin. Inhibition of intervertebral disc degeneration by nucleus pulposus cell transplantation [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering, 2013, 17 (53): 9239-9244
- [15] 黄勇, 吴小涛. 椎间盘退变的病理表现及细胞因子调控机制的研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2012, 31(4): 492-496
Huang Yong, Wu Xiao-tao. Pathological changes of intervertebral disc degeneration and cytokine regulation mechanism of the progress [J]. Journal of Southeast University (Medical Science), 2012, 31 (4): 492-496
- [16] 陶海鹰, 贺斌, 卫爱林, 等. 羧甲基壳聚糖对体外培养大鼠椎间盘髓核细胞增殖、细胞周期及细胞外基质分泌的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(10): 2165-2168
Tao Hai-ying, He Bin, Wei Ao-lin, et al. Effects of carboxymethyl chitosan on the proliferation, cell cycle and extracellular matrix secretion of rat intervertebral disc nucleus in vitro[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2013, 30(10): 2165-2168
- [17] Liang Q Q, Ding D F, Xi Z J, et al. Protective effect of ligustrazine on lumbar intervertebral disc degeneration of rats induced by prolonged upright posture [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014(508461)

处理 2 h 或 3 h 的治疗,机制可能与氧自由基、肾上腺素能抗炎通路、胆碱能抗炎通路有关^[23,24]。

本研究采用 LPS 和 ATP 刺激骨髓源性巨噬细胞使细胞发生焦亡,又给予细胞吸入 40 %、60 %和 100 %不同浓度的氧气,发现焦亡相关细胞因子 IL-1 β 水平降低,说明高氧可以抑制骨髓源性巨噬细胞的焦亡,高氧可能成为临床上治疗脓毒症的一种重要手段。

参考文献(References)

- [1] Eichholz K, Bru T, Tran TT, et al. Immune-Complexed Adenovirus Induced AIM2-Mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(9): e100587
- [2] Jorgensen I, Lopez JP, Laufer SA, et al. IL-1 β , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis[J]. Eur J Immunol, 2016 Sep 28 [Epub ahead of print]
- [3] Sui DM, Xie Q, Yi WJ, et al. Resveratrol Protects against Sepsis-Associated Encephalopathy and Inhibits the NLRP3/IL-1 β Axis in Microglia[J]. Mediators Inflamm, 2016, 1045657
- [4] Wang J, Wang H, Zhu R, et al. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis [J]. Biomaterials, 2015, 53: 475-83
- [5] Hou Li, Xie K, Li N, et al. 100% oxygen inhalation protects against zymosan-induced sterile sepsis in mice: the roles of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes[J]. Shock, 2009, 32(4): 451-461
- [6] Lobo LA, Benjamim CF, Oliveira AC. The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis[J]. Clin Transl Immunology, 2016, 5(7)
- [7] Cogger VC, Le Couteur DG, Ishii I, et al. Cystathionine-Gamma-Lyase Gene Deletion Protects Mice against Inflammation and Liver Injury following Polymicrobial Sepsis[J]. PLoS One, 2016, 11(8)
- [8] Napier BA, Brubaker SW, Sweeney TE, et al. Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity[J]. J Exp Med, 2016, 3
- [9] Matsuda A, Jacob A, Wu R, et al. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses [J]. J Nippon Med Sch, 2012, 79(1): 4-18
- [10] Zou L, Chen HH, Li D, et al. Imaging Lymphoid Cell Death In Vivo During Polymicrobial Sepsis[J]. Crit Care Med, 2015, 43(11): 2303-2312
- [11] Sarkar A, Hall MW, Exline M, et al. Caspase-1 regulates Escherichia coli sepsis and splenic B cell apoptosis independently of interleukin-1 β and interleukin-18 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(9): 1003-1010
- [12] Li P, Allen H, Banerjee S, et al. Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock[J]. Cell, 1995, 80(3): 401-411
- [13] Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation[J]. Trends Cell Biol, 2009, 19(9): 455-464
- [14] Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes[J]. Nature, 1992, 356(6372): 768-774
- [15] Hu Z, Murakami T, Suzuki K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85765
- [16] Gil M, Kim YK, Hong SB, et al. Naringin Decreases TNF- α and HMGB1 Release from LPS-Stimulated Macrophages and Improves Survival in a CLP-Induced Sepsis Mice[J]. PLoS One, 2016, 11(10)
- [17] Wu J, Zhou J, Chen X, et al. Attenuation of LPS-induced inflammation by ICT, a derivative of icariin, via inhibition of the CD14/TLR4 signaling pathway in human monocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(1): 74-79
- [18] Mezzasoma L, Antognelli C, Talesa VN. Atrial natriuretic peptide down-regulates LPS/ATP-mediated IL-1 β release by inhibiting NF- κ B, NLRP3 inflammasome and caspase-1 activation in THP-1 cells[J]. Immunol Res, 2016, 64(1): 303-312
- [19] Naji A, Muzemba BA, Yagyu K, et al. Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26162
- [20] Nuvolone M, Sorce S, Schwarz P, et al. Prion pathogenesis in the absence of NLRP3/ASC inflammasomes[J]. PLoS One, 2015, 10(2)
- [21] Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management[J]. BMJ, 2016, 353: i1585
- [22] Barth E, Bassi G, Maybauer DM, et al. Crit Care Med. Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis[J]. Crit Care Med, 2008, 36(2): 495-503
- [23] Pei Y, Bai X, Dong H, et al. β 2-adrenergic receptor antagonist butoxamine partly abolishes the protection of 100% oxygen treatment against zymosan-induced generalized inflammation in mice[J]. Shock, 2011, 36(3): 272-278
- [24] Zhang Z, Bai X, Du K, et al. Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway contributes to the protective effects of 100% oxygen inhalation on zymosan-induced generalized inflammation in mice[J]. J Surg Res, 2012, 174(2): e75-83

(上接第 2222 页)

- [18] Tsuji T, Chiba K, Imabayashi H, et al. Age-related changes in expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 associated with transition from the notochordal nucleus pulposus to the fibrocartilaginous nucleus pulposus in rabbit intervertebral disc [J]. Spine, 2007, 32(8): 849-856
- [19] Yao Z, Nie L, Zhao Y, et al. Salubrin Suppresses IL-17-Induced Upregulation of MMP-13 and Extracellular Matrix Degradation Through the NF- κ B Pathway in Human Nucleus Pulposus Cells [J]. Inflammation, 2016, 39(6): 1997-2007