

过氧化物酶 II 对体外培养人退变腰椎间盘髓核细胞的抑制作用*

刘玉林, 周初松, 陈 仲, 罗 平, 林荔军

Inhibition of peroxiredoxin II on human intervertebral disc cells cultured *in vitro*

Liu Yu-lin, Zhou Chu-song, Chen Zhong, Luo Ping, Lin Li-jun

Abstract

BACKGROUND: Intervertebral disc degeneration can reduce nucleus pulposus cells, and peroxiredoxin II involved in the regulation of resist oxidation damage, cell division, differentiation, signal transduction and apoptosis. Peroxiredoxin II has promotive effect on intervertebral disc degeneration, whereas the mechanism remains poorly understood.

OBJECTIVE: To observe the effects of peroxiredoxin II on human intervertebral disc cells activity and type II collagen synthesis *in vitro*.

METHODS: Human degenerated human lumbar disc cells were cultured *in vitro*, and assigned into the control and peroxidase II groups. Peroxidase II with doses of 10, 100 and 1 000 ng/L were added into the peroxidase II groups. The cells were identified by immunohistochemical staining, and the cell proliferation was detected using cck-8 kit. Cell supernatant was collected at days 3 and 7 after operation, and the expression of type II collagen was measured by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS AND CONCLUSION: *In vitro* cultured human degenerative lumbar intervertebral disc nucleus pulposus cells by adding peroxidase increased with the dose-II, the disc nucleus pulposus cells of the volume and type II collagen synthesis gradually reduced ($P < 0.01$). Tips peroxidase II on the intervertebral disc nucleus pulposus cells, the number and type II collagen synthesis significantly inhibited in a dose-dependent manner. Thus speculated that peroxidase II on the nucleus pulposus cells *in vitro* may lead to disc degeneration as a precipitating factor.

Liu YL, Zhou CS, Chen Z, Luo P, Lin LJ. Inhibition of peroxiredoxin II on human intervertebral disc cells cultured *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(11): 1915-1918. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 椎间盘退变可导致髓核细胞数量的减少, 过氧化物酶 II 可参与细胞的抗氧化损伤、细胞分裂、分化、信号转导和凋亡等过程的调控。过氧化物酶 II 对椎间盘退变有促进作用, 但其机制仍不清楚。

目的: 观察过氧化物酶 II 对体外培养的人退变腰椎间盘髓核细胞的活性和 II 型胶原合成的影响。

方法: 体外培养人退变腰椎间盘髓核细胞, 设置对照组及过氧化物酶 II 10, 100 和 1 000 ng/L 组。对照组不含过氧化物酶 II, 其他 3 组加入相应剂量的过氧化物酶 II。应用免疫组化法鉴定髓核细胞, 并采用 cck-8 试剂盒检测细胞增殖情况, 于加过氧化物酶 II 后第 3 和 7 天分别取对照组及各组细胞上清液, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附实验测定 II 型胶原表达情况。

结果与结论: 在体外培养的人退变腰椎间盘髓核细胞, 随加入的过氧化物酶 II 质量浓度的增加, 椎间盘髓核细胞数量和 II 型胶原合成逐渐减少 ($P < 0.01$)。提示过氧化物酶 II 对椎间盘髓核细胞的数量和 II 型胶原合成有明显的抑制作用, 并呈剂量依赖关系。以此推测过氧化物酶 II 对髓核细胞的抑制作用可能是导致椎间盘退变的一种促发因素。

关键词: 过氧化物酶 II; II 型胶原; 椎间盘细胞; 髓核; 椎间盘退变; 组织因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.11.004

刘玉林, 周初松, 陈仲, 罗平, 林荔军. 过氧化物酶 II 对体外培养人退变腰椎间盘髓核细胞的抑制作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(11):1915-1918. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前广泛认为椎间盘退变是细胞学和生物化学因素共同作用的结果, 椎间盘退变主要表现为髓核细胞数量的减少和细胞外基质合成的减少^[1]。随着椎间盘变性的发生, 细胞外基质合成下降, 最终导致了椎间盘疾病的发生。吕志德等^[2]对退变性椎间盘髓核组织进行双向凝胶电泳及质谱分析发现了一种正常椎间盘髓核组织中罕见的蛋白——过氧化物酶 II (Peroxiredoxin II)。已有研究认为过氧化物酶 II 是过氧化物酶家族中最具代表性的蛋白, 可

参与多种细胞功能活动, 包括抗氧化损伤、细胞分裂和分化、信号转导和细胞凋亡等^[3-4]。过氧化物酶 II 对椎间盘退变有促进作用, 由此设想用过氧化物酶 II 的抑制剂封闭其基因表达, 可延缓或逆转椎间盘退变。实验以此探讨了不同质量浓度过氧化物酶 II 对椎间盘髓核细胞数量和 II 型胶原合成的影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照体外实验。

时间及地点: 实验于 2008-11/2009-05 在南方医科大学中心实验室完成。

Department of Orthopaedics, Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China

Liu Yu-lin★, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China liuyulinhp20068888@126.com

Correspondence to: Zhou Chu-song, Chief physician, Associate professor, Department of Orthopaedics, Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China zcsmd@yahoo.com.cn

Received: 2009-11-22 Accepted: 2010-02-10

南方医科大学附属珠江医院骨科, 广东省广州市 510282

刘玉林★, 男, 1980 年生, 河北省保定市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事脊柱损伤机制的研究。liuyulinhp20068888@126.com

通讯作者: 周初松, 主任医师, 副教授, 南方医科大学珠江医院骨科, 广东省广州市 510282 zcsmd@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)11-01915-04

收稿日期: 2009-11-22
修回日期: 2010-02-10
(20091122003/WJZ)

材料:

试剂及仪器	来源
DMEM-F12 培养液	美国 Genom 公司
胎牛血清	杭州四季青公司
II 型胶原酶	美国 Gibco 公司
cck-8 试剂盒	日本同仁化学研究所
ELISA 试剂盒	大连泛邦化工试剂公司
过氧化物酶 II	美国 Proteintech Group Inc
倒置显微镜	日本奥林巴斯公司

组织材料:髓核组织取自中青年患者腰椎间盘退变需髓核摘除内固定患者共3例, 男1例, 女2例, 取材范围L₃₋₅。

纳入标准:参照胡有谷^[5]主编的《腰椎间盘突出症》的诊断标准, 纳入符合腰椎间盘突出症诊断标准的患者3例, 年龄范围为21~45岁。

排除标准:①既往有腰椎间盘手术史。②仅有单纯椎管狭窄或侧隐窝狭窄, 而无椎间盘突出表现。③合并有脊柱肿瘤、感染、椎管内肿瘤及其他可致腰腿疼类疾病。

取材前影像学及取材后病理检查证实为退变髓核组织^[6]。术前MRI检查显示L₄₋₅椎间盘向椎间隙突出, 压迫硬膜囊, L₄₋₅椎间隙呈明显的低信号。术后病理照片示: 浅染的基质中散在分布的深染的髓核细胞, 细胞呈圆形或类圆形, 位于陷窝中, 与软骨细胞类似, 高度分散于细胞外基质中, 见图1, 2。



Figure 1 Preoperative MRI examination of lumbar intervertebral disc
图1 退变的腰椎间盘术前 MRI 检查

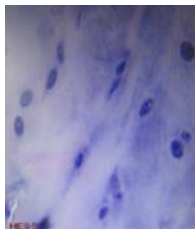


Figure 2 Pathological changes of degenerative lumbar intervertebral disc nucleus pulposus cells (×100)
图2 退变腰椎间盘髓核细胞的术后病理变化(×100)

为减少误差, 所取得3例髓核组织退变程度近似, CT分级计量标准: SI指数为2级^[7-8]。根据中华人民共和国国务院《医疗机构管理条例》在前将方案和风险告知患者

家属^[9], 并签署知情同意书。

实验方法:

细胞的分离与体外培养:取患者L₃₋₅髓核组织后立即放于含DMEM-F12的培养液(1:1)中, 去除纤维环及交界区组织, 以消除纤维环细胞对的影响^[10]。髓核组织用PBS冲洗后, 用眼科剪剪成1 mm³碎块, 用质量浓度为2.5 g/L胰蛋白酶消化20 min。1 000 r/min离心5 min, 去上清液, 用质量浓度为2.5 g/L的II型胶原酶37 °C消化2~4 h, 100目滤网过滤, 细胞悬液1 000 r/min离心5 min, 去上清液, 用PBS悬浮细胞, 1 000 r/min离心5 min去上清液行酶液清洗。清洗后的细胞用DMEM-F12和体积分数10%的胎牛血清稀释, 计数后将细胞以1×10⁷ L⁻¹的密度接种于培养瓶中, 置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中培养。培养5~7 d细胞贴壁后第1次换液, 以后每隔二三天换液1次, 细胞密度达到80%融合时用质量浓度为2.5 g/L的胰蛋白酶(含EDTA)消化传代。实验所用细胞均为第2代细胞^[10]。

II型胶原免疫组化鉴定:细胞II型胶原进行免疫组化染色, 髓核细胞胞浆及胞核内棕黄色颗粒聚集, 苏木精染色。原代髓核细胞胞质丰富, 由一个较大的卵圆形核, 内可见1~3个核仁, 可证实为髓核细胞^[10], 见图3。随后滴加小鼠抗人胶原蛋白II抗体轻轻转动使其均匀覆盖在组织上, 每张切片滴加50~100 μL, 37 °C水浴箱孵育45~60 min, 然后加底物显色剂显色, 每张切片滴加酶标的羊抗小鼠抗体50~100 μL, 37 °C水浴箱孵育15~20 min, 根据DAKO ChemMate™ EnVision/HRP 兔/鼠检测试剂盒(K500711)说明书, 一抗浓度为1:150, 二抗浓度为1:100。苏木精复染, 中性树胶封固, 倒置显微镜下观察并摄片。

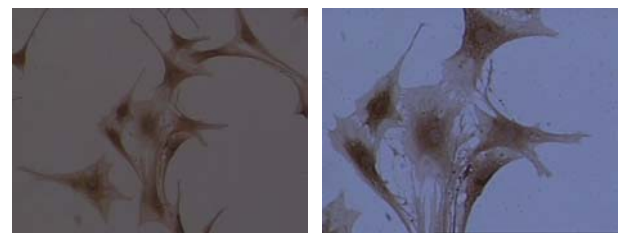


Figure 3 Morphological characteristics of nucleus pulposus cells in primary (Hematoxylin staining)
图3 原代髓核细胞形态学特征(苏木精染色)

分组:设对照组及过氧化物酶II 10, 100和1 000 ng/L组, 对照组不含过氧化物酶II。以上4组分别于1, 3, 5, 7和11 d取细胞在倒置显微镜下观察及绘制cck-8摄取生长曲线。

cck-8摄取实验:取第2代传代细胞, 胰蛋白酶消化悬浮后, 调整细胞密度为5×10⁷ L⁻¹接种于96孔板中, 0.1 mL/孔, 边孔以PBS填充, 置于37 °C, 体积分数为

5%的CO₂培养箱中培养, 细胞培养密度达60%贴壁后, 过氧化物酶 II 组分别加入10, 100和1 000 ng/L的过氧化物酶 II, 对照组不加蛋白, 每组每个时间点均设5个复孔。轻轻振荡混匀, 96孔板置于37 °C、体积分数为5%的CO₂中培养, 分别于第1, 3, 5, 7和11天加入过氧化物酶 II 继续培养1 d, 按cck-8试剂盒说明书, 加入cck-8试剂10 μL/孔, 在37 °C、体积分数5%的CO₂培养箱中继续孵育2 h后进行检测。对照组只含DMEM-F12和体积分数为10%的胎牛血清 0.1 mL, 在酶标仪上测定各孔吸光度值 A, 波长490 nm, 绘制细胞生长曲线。

II型胶原的ELISA检测: 取第2代传代细胞, 胰蛋白酶消化悬浮后, 调整细胞密度为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种于6孔板中。4组每孔各加入细胞悬液1.5 mL, 置于37 °C、体积分数5%的CO₂培养箱中, 细胞培养密度达60%后, 过氧化物酶 II 10, 100和1 000 ng/L组分别加入相应剂量的过氧化物酶 II, 对照组不加过氧化物酶 II, 每组每个时间点均设3个复孔。轻轻振荡混匀, 置于37 °C、体积分数5%的CO₂中培养。加过氧化物酶 II 后第3和7天分别取细胞上清液, 实验采用双抗体夹心酶联免疫吸附实验测定II型胶原表达^[11]。实验过程按说明书进行操作。

主要观察指标: 髓核细胞形态, 细胞增殖情况和II型胶原表达。

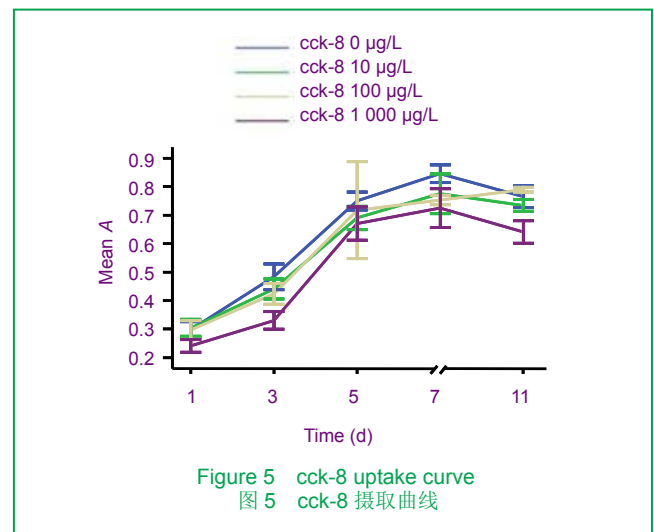
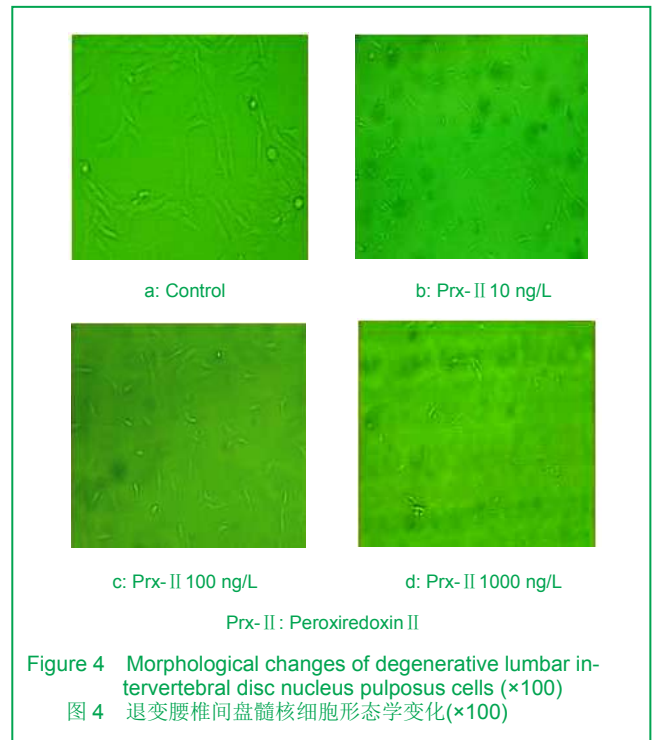
设计、实施、评估者: 设计及评估为第一作者, 干预实施为全部作者, 均经过系统培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 实验计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0统计学软件, 组间差异比较采用两因素的析因方差分析法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 细胞形态及cck-8摄取实验结果 倒置显微镜下观察, 初次消化的髓核原代细胞需六七天贴壁, 初次贴壁的细胞呈短梭形和多角形, 胞质向外伸出突起, 然后逐渐伸长, 8~11 d达到亚饱和状态后呈漩涡状或火焰形的细胞团, 胞质丰富, 由一个较大的卵圆形核, 内可见1~3个核仁。与原代细胞相比, 传代细胞贴壁时间显著缩短, 于4 h可见大部分细胞贴壁, 细胞形态大致相似, 但细胞突起略有伸长, 细胞形态较瘦弱。96孔板中的第2代细胞, 对照组细胞数量较多, 细胞呈聚集的细胞团, 胞质丰富。过氧化物酶 II 组数量及形态均有变化, 过氧化物酶 II 100和1 000 ng/L组变化最为明显, 细胞数量明显减少, 形态不规则, 短缩, 呈逗点状。见图4。

cck-8摄取曲线图见图5。不同时间点对照组cck-8摄取A值均明显高于过氧化物酶 II 组, 并呈剂量依赖关系: 随cck-8质量浓度的增加, A值逐渐减小。对照组及过氧化物酶 II 组于第7天A值均开始呈现下降趋势, 与以往报道传代细胞增殖高峰其为六七天相吻合。



2.2 II型胶原的合成 见图6。

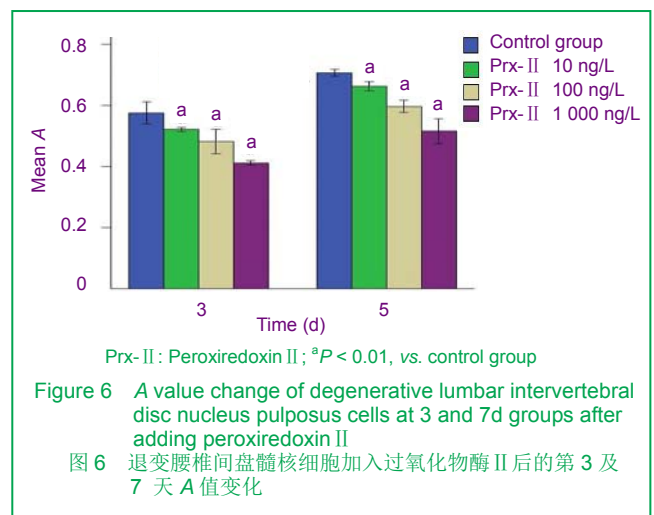


图6为退变髓核细胞加入过氧化物酶 II 后的第3和7天组A值比较。与对照组比较, 第3和7天10, 100和1 000 ng/L过氧化物酶 II 组的 II 型胶原蛋白合成显著降低($P < 0.01$)。

3 讨论

过氧化物酶 II 是过氧化物酶的一种亚型, 过氧化物酶是新近发现的相对分子质量20 000~30 000的过氧化物酶家族成员。吕志德等^[2]在对退变的髓核组织进行凝胶电泳及质谱分析发现了6种性质较为明确的蛋白质, 过氧化物酶 II 为其中的一种, 经Western blot检测再次证实, 退变髓核组织中的确存在。

cck-8试剂是MTT的升级替代产品, 可用于简便而准确的细胞增殖和毒性分析^[12]。实验结果证明过氧化物酶 II 对髓核细胞有明显影响, 过氧化物酶 II 组与对照组相比, 随着过氧化物酶 II 浓度的增加, 细胞无论是从数量还是从形态上都有明显改变, 传2代细胞cck-8细胞增殖实验曲线显示: 所有时间点所测的细胞增殖结果组都比对照组明显降低。传2代细胞从第7天开始细胞开始老化和凋亡, 也与以往的研究报道相吻合。髓核细胞增殖被抑制, 随着过氧化物酶 II 浓度的增加, 其对髓核细胞增殖分化的抑制作用也越来越明显。随着细胞增殖分化被抑制。细胞的分泌功能受到明显的影响。酶联免疫吸附实验检测结果证明 II 型胶原合成组与对照组间有显著差异, 且随剂量增加, 型胶原表达逐渐降低。

过氧化物酶 II 的发现为椎间盘退变的研究提供了新的思路。实验证明异常蛋白质过氧化物酶 II 的出现促进了髓核细胞的凋亡, 减少细胞外基质的合成, 从而促进了椎间盘退变的发生及发展。细胞代谢和氧化应激均可产生活性氧, 虽然活性氧被普遍认为是细胞有氧代谢的“副产品”, 其主要效应是攻击细胞内生物大分子, 具有一定的细胞毒作用, 而细胞内的抗氧化系统把这些毒性效应限制在一定范围之内^[13]。但是, 近年的一系列研究表明, 细胞内活性氧水平的轻微增高促进细胞的增殖和分裂, 而细胞内活性氧水平的显著增高则快速触发细胞的凋亡。由此可见, 细胞内活性氧的产生可能不是一种“副产品”, 而是“目的性”的产物, 在这些过程中活性氧的角色是细胞内一类重要的信号分子^[14]。但是, 过氧化物酶 II 是椎间盘退变的原因还是结果还有待验证, 其具体的作用机制有待进一步探讨。

4 参考文献

[1] Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. 1997 Volvo award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. Spine.1997; 22(24):2781-2795.

[2] Lü ZD, Zhou CS, Jin AM, et al. Zhongguo Zuzhigongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu. 2009;13(7):1271-1274. 吕志德,周初松,靳安民,等.正常和退变腰椎间盘蛋白质的双向电泳和质谱鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(7):1271-1274.

[3] Kang SW, Chae HZ, Seo MS, et al. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . J Biol Chem. 1998; 273(11):6297-6302.

[4] Kim H, Lee TH, Park ES, et al. Role of peroxiredoxins in regulating intra-cellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. J Biol Chem. 2000; 275(24):18266-18270.

[5] Hu YG. Beijing: People's Medical Publishing House. 1995. 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M].人民卫生出版社, 1995:120-121.

[6] Yang XY, Yang SH, Xiong T, et al. Jiepou Xuebao. 2007;4(38):466-469. 刘小云,杨述华,熊涛,等.人椎间盘髓核细胞突起的形态学特征[J].解剖学报, 2007, 4(38):466-469.

[7] Dullerud R, Naksjad PH. CT changes after conservative treatment for lumbar disk herniation. Acta Radiol. 1994;35(5):415-419.

[8] Zhang HY, Huang KM, Wang BC, et al. Yixue Yingxiangxue Zazhi. 1998;8(2):98-99. 张化一,黄抗美,王炳臣,等.腰椎间盘突出症的CT分级与分型[J].医学影像学杂志,1998,8(2):98-99.

[9] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.

[10] Zhang RF, Ruan DK, Zhang C, et al. Jizhu Waikexue Zazhi. 2008;6(3):137-140. 张荣峰,阮狄克,张超,等.不同代次成人正常髓核细胞的形态及生长动力学比较[J].脊柱外科杂志,2008,6(3):137-140.

[11] Gu HL, Duan JZ, Wang H. Zhongguo Zuzhihuaxue Yu Xibao Huaxue Zazhi. 2007;16(3):283-287. 顾海伦,段景筑,王欢.人骨形态蛋白-2 对椎间盘细胞蛋白多糖和 II 型胶原的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(3):283-287.

[12] Qin S, McLaughlin AP, De Vreis GW. Protection of RPE cells from oxidative injury by 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 by augmenting GSH and activating MAPK. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47(11):5098-5105.

[13] Wang SE, Huang QW, Sun L, et al. Jiepou Xuebao.2005; 36(3):300-302. 王世鄂,黄权威,孙岚,等.Peroxiredoxin-II 在小鼠早胚发育中的作用及机理[J].解剖学报,2005,36(3):300-302.

[14] Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. AmJ Physiol Lung Cell Mol Physio. 2000;279(6):L1005-1028.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 本文无任何赞助及利益冲突。

课题的创新点和意义: 本文作为“退变椎间盘相关蛋白分析及作用机理的应用研究”中的一部分。整体实验具有创新点。本研究结果为过氧化物酶的研究方向提供新思路, 同时为椎间盘退变的研究提供了新思路。

课题评估的“金标准”: 国内外的文献研究均以检测蛋白多糖或(和)II型胶原为髓核细胞分泌功能的指标。本实验采用II型胶原为指标, 较为可靠。

设计或课题的偏倚与不足: 本文以退变髓核细胞为实验材料, 采用正常的椎间盘作为材料应更为合适。实验数据可能会有误差, 影响实验结果的可靠性。

提供临床借鉴的价值: 过氧化物酶II对椎间盘退变有促进作用, 可设想用该蛋白的抑制剂或封闭其表达基因等方法来减少其表达, 以达到延缓或逆转椎间盘退变的可能。