

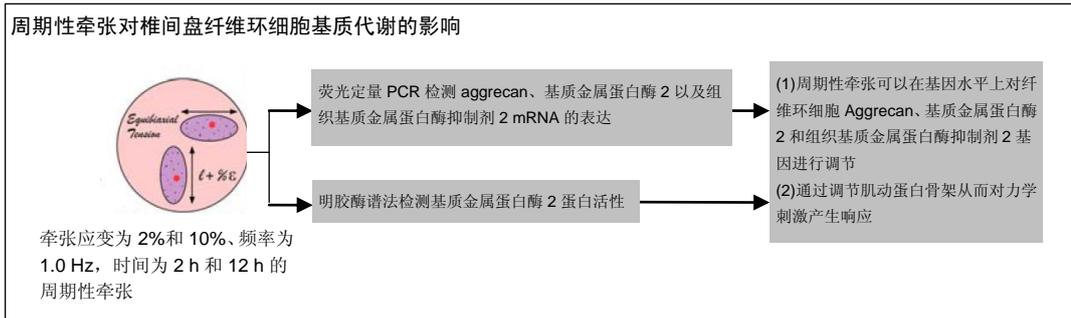
周期性牵张椎间盘纤维环细胞肌动蛋白骨架的重排

张德宏¹, 方鹏飞², 王兴盛¹, 赵继荣¹, 李晓娜³(¹甘肃省中医院脊柱骨科, 甘肃省兰州市 730050; ²甘肃省中医院白银分院骨科, 甘肃省白银市 730900; ³太原理工大学应用力学与生物医学工程研究所, 山西省太原市 030024)

引用本文: 张德宏, 方鹏飞, 王兴盛, 赵继荣, 李晓娜. 周期性牵张椎间盘纤维环细胞肌动蛋白骨架的重排[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(7): 972-980.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.07.008 ORCID: 0000-0003-4656-340x(张德宏)

文章快速阅读:



张德宏, 男, 1968 年生, 甘肃省兰州市人, 汉族, 1991 年甘肃中医学院毕业, 主任医师, 主要从事微创治疗脊柱及关节疾患的研究。

通讯作者: 方鹏飞, 硕士, 主治医师, 甘肃省中医院白银分院骨科, 甘肃省白银市 730900

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)07-00972-09

稿件接受: 2016-01-08

http://www.crter.org

文题释义:

纤维环: 位于椎间盘的周缘部, 由纤维软组织组成, 纤维环的纤维在椎体间斜行, 在横切面上排列成同心环状, 相邻环的纤维具有相反的斜度, 而相互交叉。纤维环的前方有坚强的前纵韧带, 前纵韧带的深层纤维并不与纤维环的浅层纤维融合在一起, 却十分加强纤维环的力量; 纤维环的后方有后纵韧带, 并与之融合在一起, 后纵韧带虽较前纵韧带为弱, 亦加强纤维环后部的坚固性。

肌动蛋白: 是微丝的结构蛋白, 以单体和多聚体两种形式存在。单体的肌动蛋白是由一条多肽链构成的球形分子, 又称球状肌动蛋白, 外形类似花生果。肌动蛋白的多聚体形成肌动蛋白丝, 称为纤维状肌动蛋白。

摘要

背景: 当椎间盘承受应力时, 髓核内部产生的液压使纤维环向外扩张、膨胀, 纤维环胶原纤维被拉伸, 使纤维环细胞外基质也受到压力的作用。蛋白聚糖是椎间盘中主要的蛋白多糖成分, 基质金属蛋白酶 2 是椎间盘降解细胞外基质的主要酶, 金属蛋白酶组织抑制剂是特异性抑制基质金属蛋白酶活性的多功能因子, 与基质金属蛋白酶相互调节, 保持平衡。

目的: 探讨周期性牵张在椎间盘纤维环基质代谢中的作用机制。

方法: 采用 Flexcell4000 牵张系统对体外培养的大鼠椎间盘纤维环细胞施加牵张应变为 2% 和 10%、频率为 1.0 Hz, 时间为 2 h 和 12 h 的周期性牵张, 分别于 2 h 和 12 h 卸载并收集细胞和条件培养基分别进行基因和蛋白检测。采用荧光定量 PCR 检测 aggrecan、基质金属蛋白酶 2 以及组织基质金属蛋白酶抑制剂 2 mRNA 的表达; 采用明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶 2 蛋白活性。

结果与结论: ① 2% 牵拉对肌动蛋白骨架形成的应力纤维影响不大, 10% 牵拉则使肌动蛋白骨架发生明显解聚。② 2% 牵拉 12 h Aggrecan 上调, 牵拉 2 h 基质金属蛋白酶 2、组织基质金属蛋白酶抑制剂 2 上调, 二者保持动态平衡, 基质金属蛋白酶 2 活性无显著变化。③ 10% 牵拉对 Aggrecan 无影响。无论牵拉 2 h 或 12 h, 均使基质金属蛋白酶 2 上调, 组织基质金属蛋白酶抑制剂 2 下调, 二者失衡, 基质金属蛋白酶 2 活性无显著变化。④ 结果提示周期性牵张可以在基因水平上对纤维环细胞 Aggrecan、基质金属蛋白酶 2 和组织基质金属蛋白酶抑制剂 2 基因进行调节, 通过调节肌动蛋白骨架从而对力学刺激产生响应。

关键词:

组织构建; 软组织工程; 周期性牵拉; 椎间盘纤维环细胞; 细胞骨架; 基质代谢; 蛋白多糖; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制剂; 胶原; 甘肃省自然科学基金

主题词:

细胞骨架; 椎间盘; 细胞外基质; 组织工程

基金资助:

甘肃省自然科学基金计划(1208RJZA174)

Zhang De-hong, Chief physician, Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Corresponding author: Fang Peng-fei, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Baiyin Branch, Gansu Provincial Hospital of TCM, Baiyin 730900, Gansu Province, China

Effects of cyclic tensile strain on actin cytoskeleton rearrangement in annulus fibrosus cells

Zhang De-hong¹, Fang Peng-fei², Wang Xing-sheng¹, Zhao Ji-rong¹, Li Xiao-na³ (¹Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ²Department of Orthopedics, Baiyin Branch, Gansu Provincial Hospital of TCM, Baiyin 730900, Gansu Province, China; ³Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: When the intervertebral disc is under stress, the hydraulic pressure generated inside the nucleus pulposus makes the annulus fibrosus extend outward and expand, and the annulus collagen fibers are stretched so that the extracellular matrix of annulus fibrosus cells is also under the pressure. In the intervertebral disc, aggrecan is the main component of proteoglycans, matrix metalloproteinase-2 is a major enzyme for extracellular matrix degradation, and tissue inhibitor of metalloproteinase is a multifunctional specific inhibition factor for matrix metalloproteinase activity. There is a mutual regulation between the latter two to keep the homeostasis between them.

OBJECTIVE: To investigate the mechanism of cyclic tensile strain in the metabolism of intervertebral disc annulus matrix.

METHODS: Rat anulus fibrosus cells were subjected to 2% or 10% cyclic tensile strain at 1.0 Hz for 2 and 12 hours using Flexcell4000 tension system. Then cells were collected and cultured in conditioned medium for gene and protein detection. Real-time quantitative PCR was used to detect mRNA expression of aggrecan, matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2. Gelatin zymography was used to detect matrix metalloproteinases-2 activity.

RESULTS AND CONCLUSION: The use of 2% cyclic tensile strain had no obvious effect on the stress fiber of actin cytoskeleton, whereas actin cytoskeleton was depolymerized in response to 10% cyclic tensile strain. The 2% cyclic tensile strain raised the expression of Aggrecan at 12 hours; whereas raised the matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 at 2 hours, both of which were in homeostasis; matrix metalloproteinases-2 activity had no significant changes. 10% cyclic tensile strain had no effect on the mRNA expression of Aggrecan. No matter stretching 2 or 12 hours, the matrix metalloproteinases-2 was up-regulated, and the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 was down-regulated, both of which were not in balance. Moreover, the matrix metalloproteinases-2 activity was not significantly changed. These findings indicate that the mRNA expressions of Aggrecan, matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 alter in response to cyclic tensile strain in rat anulus fibrosus cells, and the tensile strain induces different mechano-responses in the actin cytoskeleton.

Subject headings: Cytoskeleton; Intervertebral Disk; Extracellular Matrix; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. 1208RJZA174

Cite this article: Zhang DH, Fang PF, Wang XS, Zhao JR, Li XN. Effects of cyclic tensile strain on actin cytoskeleton rearrangement in annulus fibrosus cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(7): 972-980.

0 引言 Introduction

椎间盘纤维环是由多层同心圆排列的胶原纤维板层构成, 其组成主要为纤维环细胞。在生理条件下纤维环主要承受牵张应变^[1]。力学因素在调节如纤维环胶原、蛋白多糖和基质金属蛋白酶等基质代谢中发挥了重要的作用^[1]。椎间盘纤维环基质代谢对力学的反应与力学加载的方式、幅度、频率、时间以及组织退变有关^[2]。

椎间盘退变是一个复杂的、多因素参与的过程。退变的椎间盘组织基质发生了降解。尽管机制不明, 但研究表明基质金属蛋白酶在此过程中发挥了重要作用^[3]。作为基质金属蛋白酶家族的重要成员之一, 基质金属蛋

白酶2(又称明胶酶A)可以降解包括蛋白聚糖、明胶及多种胶原在内的多种细胞外基质成分, 在维持椎间盘组织的动态平衡中显得尤其重要。发生退变的椎间盘组织中基质金属蛋白酶2表达和活性均显著增加^[4-7]。非生理性应力也会导致椎间盘基质金属蛋白酶2表达上调^[8]。组织基质金属蛋白酶抑制剂作为基质金属蛋白酶的天然抑制物可抑制基质金属蛋白酶的活性, 对维持细胞外基质的稳态具有重要作用。研究表明基质金属蛋白酶和组织基质金属蛋白酶抑制剂表达失衡可导致椎间盘在内的组织降解^[3, 9-10]。

作为纤维环蛋白多糖的主要组分, Aggrecan在纤维环的水分保持、维持胶原纤维板层的稳定性、抵抗变形

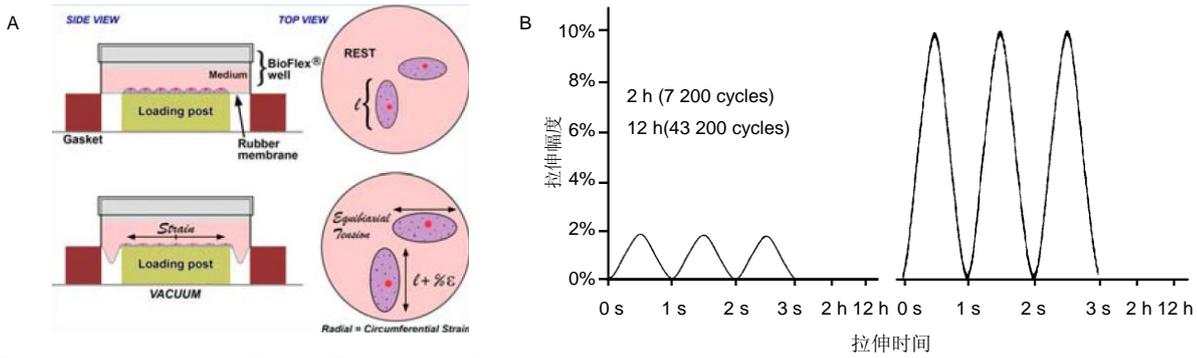


图 1 Flexcell4000 牵张系统工作原理及加载参数

Figure 1 The working principle of Flexcell4000 tension system and loading parameters

图注: 图中 A 为 Flexcell4000 牵张系统用真空泵对培养的细胞施加静态或动态循环负压, 使 BioFlex 培养板基底膜变形, 从而使贴壁生长在膜上的细胞也发生相应的变形, 诱发细胞发生生物学变化; B 为加载参数: 2%、1.0 Hz、2 h 和 12 h; 10%、1.0 Hz、2 h 和 12 h。

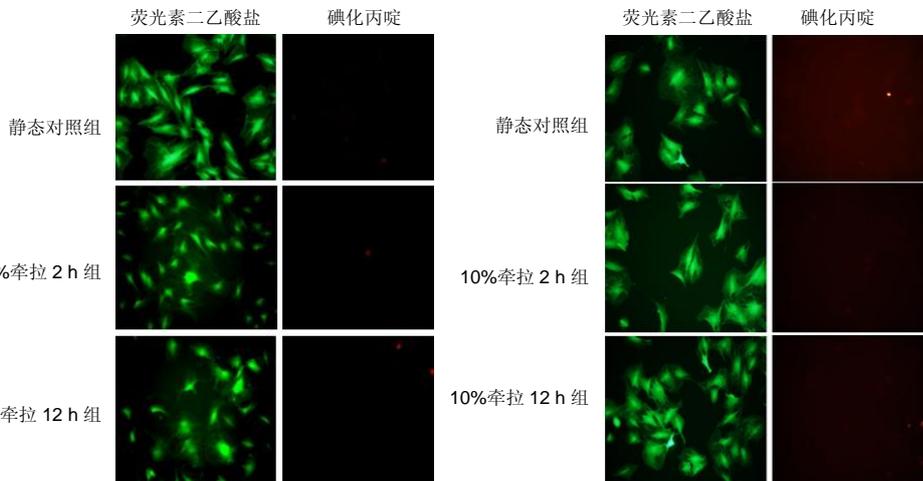


图 2 周期性牵拉下大鼠椎间盘纤维环细胞的活性(x200)

Figure 2 Cell viability of anulus fibrosus cells from rat intervertebral discs subjected to 2% and 10% cyclic tensile strain (x200)

图注: 图中 A 为 2% 拉伸幅度, B 为 10% 拉伸幅度。绿色为活细胞, 红色为死细胞核。

表 1 大鼠基因引物序列

Table 1 Rat primer sequences

基因	基因库(ID)	引物(5'-3')	产物大小(bp)
Aggrecan	58968	上游: CGC TTG CCA GGG GGA GTT GTA TTC 下游: GGA GGC CAG GGT AGC ATT TTG AGC	89
基质金属蛋白酶 2	81686	上游: TTT GCT CGG GCC TTA AAA GTA T 下游: CCA TCA AAC GGG TAT CCA TCT C	128
组织基质金属蛋白酶抑制剂 2	29543	上游: AGG GCC AAA GCA GTG AGC GAG AA 下游: CCG CCT TCC CTG CAA TTA GAT ATT C	214
GAPDH	24383	上游: ATG ATT CTA CCC ACG GCA AG 下游: CTG GAA GAT GGT GAT GGG TT	405

和缓冲压力等方面发挥了重要作用, Aggrecan 含量的减少将使纤维环组织中的胶原纤维板层间发生相对滑动, 引起纤维环发生退变^[11]。敲除 Aggrecan 基因可导致小鼠椎间盘发生退变^[12]。

为进一步探究机械牵张在椎间盘退变中的作用, 实验采用体外细胞牵张系统, 研究了周期性牵张对大鼠椎间盘纤维环细胞基质代谢的影响, 阐明不同牵张幅度对肌动蛋白骨架及 aggrecan、基质金属蛋白酶 2 和组织基质金属蛋白酶抑制剂表达的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于 2014 年 10 月到 2015 年 2 月在兰州军区总医院动物实验中心和太原理工大学力学与生物医学工程研究所完成。

1.3 材料

实验动物: 8 只 Spraguc-Dawley 大鼠, 体质量为 180.0-220.0 g, 雌雄各半, 鼠龄 90 d, 由甘肃中医学院动物实验中心提供, 合格证号为 SYXK(甘)2011-0001。

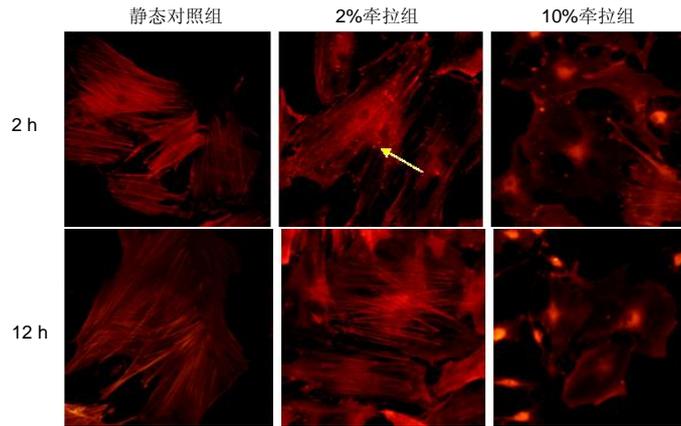


图3 周期性牵拉对大鼠椎间盘纤维环细胞肌动蛋白骨架的影响(x200)

Figure 3 The effect of cyclic tensile strain on the actin cytoskeleton of anulus fibrosus cells from rat intervertebral discs (x200)

图注: 箭头所指为 2%牵拉 2 h 部分肌动蛋白纤维发生解聚, 而 10%牵拉后肌动蛋白应力纤维发生明显解聚。箭头指示肌动蛋白纤维解聚。

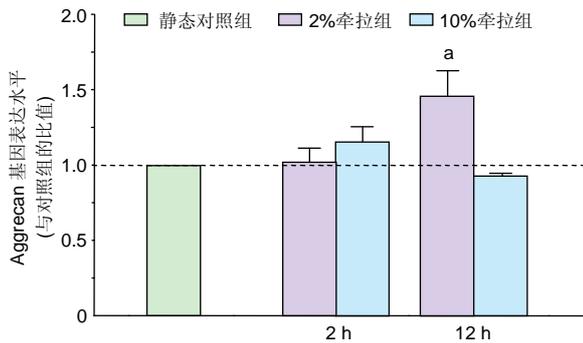


图4 周期性张应变对大鼠椎间盘纤维环细胞 Aggrecan 基因表达的影响

Figure 4 Effect of cyclic tensile strain on the mRNA expression of Aggrecan in anulus fibrosus cells from rat intervertebral discs

图注: 与静态对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

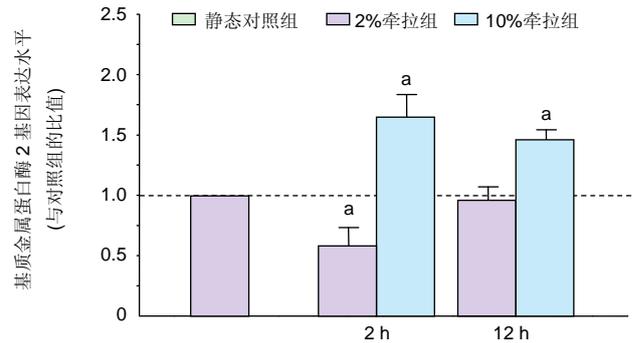


图5 周期性张应变对大鼠椎间盘纤维环细胞组织基质金属蛋白酶 2 基因表达的影响。

Figure 5 Effect of cyclic tensile strain on the mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 in anulus fibrosus cells from rat intervertebral discs

图注: 与静态对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

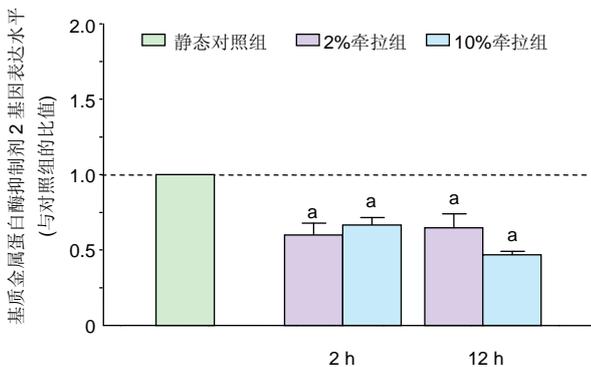


图6 周期性张应变对大鼠椎间盘纤维环细胞组织基质金属蛋白酶抑制剂 2 基因表达的影响。

Figure 6 Effect of cyclic tensile strain on the mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in anulus fibrosus cells from rat intervertebral discs

图注: 与静态对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

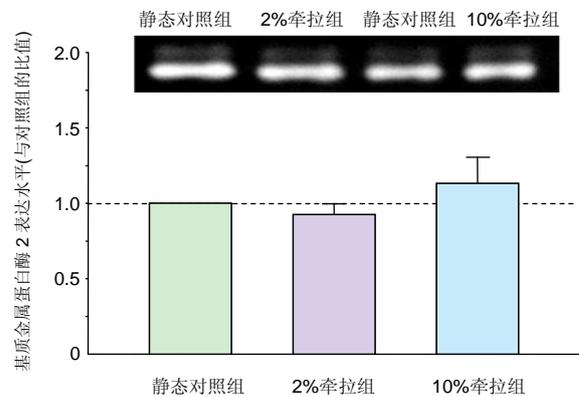


图7 周期性张应变对大鼠椎间盘纤维环细胞基质金属蛋白酶 2 蛋白表达水平的影响

Figure 7 Effect of cyclic tensile strain on the protein expression of matrix metalloproteinase-2 in anulus fibrosus cells from rat intervertebral discs

图注: 各组细胞中基质金属蛋白酶 2 蛋白表达水平接近。

严格遵守相关标准进行饲养, 实验过程中对动物处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

1.4 方法

1.4.1 大鼠纤维环细胞传代提取培养 大鼠麻醉处死,

无菌条件下取下脊椎, 去除椎间盘周围的软组织及髓核组织, PBS 中漂洗纤维环组织, 剪碎, 分别采用 0.25% 胰蛋白酶(Gibco 公司)和 0.1% 胶原酶(Gibco 公司)37 °C 下消化, 直至镜下可见单个悬浮细胞终止消化, 离心, 加入含体积分数 10% 胎牛血清(Gibco 公司)的 DMEM 培

培养基(Gibco公司),置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中培养。本实验采用细胞为第4-6代。细胞分为4组:2%牵拉2 h组、2%牵拉12 h组、10%牵拉2 h组和10%牵拉12 h组,加载参数分别为2%,1.0 Hz、2 h、12 h和10%,1.0 Hz、2 h和12 h,采用Flexcell4000牵张系统(美国Flexcell公司)对体外培养的大鼠椎间盘纤维环细胞施加,卸载后收集上清,进行明胶酶谱实验(检测基质金属蛋白酶2活性);收集细胞进行mRNA检测;进行actin骨架染色;进行细胞活性检测。以不进行牵拉的细胞做为静态对照组。静态对照组与其他组细胞同时培养,同时取样。每组实验设3个重复孔。

1.4.2 纤维环细胞周期性等双轴牵拉方法 采用Flexcell4000牵张系统对大鼠纤维环细胞实施周期性等双轴牵拉。该系统通过真空泵产生的负压抽吸特制的柔性培养膜,使黏附生长在培养膜上的细胞受到牵拉作用(图1A)。整个加载装置放置于培养箱内,加载程序由计算机软件自动控制。细胞用0.25%胰蛋白酶消化,以 $3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于裱衬有I型胶原蛋白的上,置于孵箱内培养。待细胞80%融合时,换成含体积分数1%胎牛血清的DMEM培养基进行力学加载。人日常步行频率接近1.0 Hz^[13],椎间盘纤维环所承受的应变在1%-13%范围内^[1],因此实验采用2%或10%拉伸幅度、1.0 Hz、正弦波对椎间盘纤维环细胞进行体外牵拉(图1B),分别于2 h和12 h卸载并收集细胞和条件培养基进行基因和蛋白检测。条件培养基采用BCA法进行蛋白定量。

1.4.3 细胞活性及肌动蛋白骨架检测 荧光素二乙酸盐/碘化丙啶(Thermo scientific公司)染色检测细胞活性。倒置显微镜(Olympus公司)下观察,在蓝色激发光下活细胞呈绿色,绿色激发光下死细胞呈红色。对2种激发光下感兴趣的视野使用双重曝光拍照。Phalloidin-TRITC标记肌动蛋白骨架,倒置荧光显微镜(Olympus公司)观察。

1.4.4 荧光实时定量PCR 收集细胞,TRIZOL(Invitrogen公司)提取总RNA,PrimeScript™试剂盒进行反转录获得cDNA。采用荧光实时定量PCR检测Aggrecan、基质金属蛋白酶2和组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达,以GAPDH作为内参。引物序列见表。采用2^{-ΔΔCt}法对基因表达进行相对定量分析。引物由上海生工公司合成。引物序列见表1。

1.4.5 明胶酶谱法 采用8% SDS-PAGE胶(含0.1%明胶)进行电泳。再经洗脱、孵育、考马斯亮蓝染色、脱色,直至显示清晰的条带。拍照后采用Image-Pro Plus 5.1

图像分析软件(Media cybernetics公司)进行条带灰度分析。将静态对照组定为1,用各实验组与其的比值即为基质金属蛋白酶2活性的变化。

1.5 主要观察指标 纤维环细胞中的细胞骨架相关蛋白及mRNA的表达水平。

1.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 差表示,每组实验重复3次,用SPSS 13.0软件进行t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞活性及肌动蛋白纤维重组 无论是2%还是10%周期性牵拉均对细胞活性无显著影响(图2)。静态培养2 h和12 h,纤维环细胞肌动蛋白骨架均呈现出明显的应力纤维。2%牵拉2 h,部分肌动蛋白骨架发生解聚,12 h后基本恢复正常的应力纤维排列方式。10%牵拉2 h肌动蛋白应力纤维发生明显解聚,12 h后胞浆内的肌动蛋白仍处于解聚状态,细胞膜下有聚集(图3)。

2.2 Aggrecan、基质金属蛋白酶2和组织基质金属蛋白酶抑制剂2 mRNA表达水平 静态培养条件下大鼠纤维环细胞可表达Aggrecan、基质金属蛋白酶2和组织基质金属蛋白酶抑制剂2 mRNA。与静态对照组相比,2%和10%牵拉2 h对Aggrecan基因表达均无显著影响。牵拉12 h,2%牵拉应变使Aggrecan基因显著上调,为静态对照组的1.46倍($P < 0.05$),而10%牵拉则与静态对照组接近(图4)。

与静态对照组相比,牵拉2 h,2%牵拉组对基质金属蛋白酶2基因表达显著下调,10%牵拉则使基质金属蛋白酶2基因显著上调,分别是静态对照组的0.58倍和1.65倍($P < 0.05$);牵拉12 h,2%牵拉对基质金属蛋白酶2基因表达无显著性改变,10%牵拉则使基质金属蛋白酶2基因表达显著上调,是静态对照组的1.46倍($P < 0.05$),但二者对基质金属蛋白酶2活性均无显著影响(图5)。

与静态对照组相比,无论2%牵拉还是10%牵拉均使组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达显著下调($P < 0.05$);与2 h相比,10%牵拉12 h较2%牵拉使组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达进一步下调($P < 0.05$;图6)。

2.3 基质金属蛋白酶2蛋白表达水平 牵拉12 h,与静态对照组相比,无论2%还是10%,对基质金属蛋白酶2蛋白表达水平均无显著影响(图7)。

3 讨论 Discussion

力学刺激对维持椎间盘细胞外基质的动态平衡和组织的完整性至关重要。本实验发现不同幅度的周期性

牵张对肌动蛋白骨架及Aggrecan、基质金属蛋白酶2和组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达的影响有所不同。2%牵张对肌动蛋白骨架形成的应力纤维影响不大, 10%牵拉则使肌动蛋白骨架发生明显解聚。2%牵拉促进合成代谢, 使Aggrecan mRNA表达上调, 使基质金属蛋白酶2 mRNA和组织基质金属蛋白酶抑制剂2 mRNA表达下调, 二者保持动态平衡; 而10%牵拉则促进分解代谢, 使Aggrecan mRNA表达不变, 基质金属蛋白酶2 mRNA上调和组织基质金属蛋白酶抑制剂2 mRNA下调, 二者失衡; 2%和10%牵拉对基质金属蛋白酶2表达水平均无显著变化。

腰椎间盘退变是引起下腰痛的主要原因之一, 其退变机制目前尚未研究清楚^[14]。一般认为椎间盘退变是形态学的一种变化, 表现为局部生物力学失稳现象。椎间盘退行性过程中力学因素和生物化学因素均发挥着重要作用, 集中体现在细胞和细胞外基质成分的变化。椎间盘细胞外基质主要由水、胶原和蛋白聚糖构成, 具有复杂的生物力学性能, 使其能够最大程度地适应周围力学环境, 从而影响椎间盘形态与结构^[15-17]。椎间盘退变过程是一种由生物力学和细胞生物学相互作用引起的复杂病理过程^[18]。但对起源于基质的退变或细胞的退变, 目前仍有不同认识^[19]。Neidlinger等^[20]研究发现椎间盘髓核退变后含水量减少、弹性及压力降低, 同时纤维环脱水变性、韧度减小, 使椎间盘失去了承载压力的能力。有研究显示椎间盘细胞的生物学行为的改变通过复杂的网络联系影响椎间盘退变的发生进展^[21]。病因学研究表明椎间盘退变是遗传-环境等多因素共同作用的结果, 其中非生理的生物力学环境是造成椎间盘退变的始动因素。鉴于椎间盘作为脊柱连接和传递载荷过程中的重要功能单元, 机械载荷在生理或病理状态下调控椎间盘细胞的生物学行为和基质代谢方面起着重要作用^[22]。Iatridis等^[23]研究表明机械刺激的强度、时间以及频率与椎间盘基质的代谢变化相关, 生理状态下的机械应力能够刺激椎间盘细胞的合成代谢, 有助于正常细胞外基质的合成; 而非生理条件下的载荷, 可能通过多种途径影响细胞基质代谢过程及存活, 使分解代谢基因表达上调, 而合成代谢基因下调。

Wuertz等^[24]发现6%的循环牵张应变是纤维环细胞外基质表达的最佳适应强度。Sowa等^[25]发现周期性张应变对体外培养的大鼠纤维环细胞炎性细胞因子介导的分解代谢具有保护作用; 而周期性张应变可引起家兔纤维环细胞分解代谢加强, 但拉伸频率、幅度、持续时间等对蛋白多糖的合成量无明显影响。Hamish等^[26]对体外培养的人

退变纤维环细胞加载了频率为1 Hz和0.33 Hz、20%的张应力, 发现纤维环细胞的代谢情况与所受牵张应变大小有一定的相关性。李爽等^[27]研究发现应力刺激对于椎间盘纤维环细胞的调节作用具有双向性。椎间盘承受着复杂的应力作用, 应力刺激可影响椎间盘细胞的功能, 而作为椎间盘蛋白多糖的主要组成Aggrecan在椎间盘退变的发生过程中起着重要的作用^[28]。细胞外基质中的大分子物质, 特别是Aggrecan, 对椎间盘功能的维持具有十分重要的作用, 其数量及结构改变, 将影响椎间盘的功能。对体外培养的兔纤维环细胞施加5%、1 Hz周期性张应变使蛋白聚糖合成明显降低, 而1%周期性张应变则无此作用^[1]。10%、0.5 Hz的周期性牵拉24 h使猪纤维环细胞Aggrecan基因表达显著上调^[29]。本实验结果与上述结果不同: 2%牵拉2 h, 对Aggrecan基因表达无显著影响, 但牵拉12 h, 则使Aggrecan表达上调, 而10%牵拉12 h内对Aggrecan基因表达无显著影响。提示长时间高频低幅的周期性机械牵拉有利于Aggrecan的合成。其机理与周期性张应变激活椎间盘纤维环细胞ERK1/2信号分子, 并通过该信号分子下调椎间盘纤维环细胞Aggrecan mRNA表达有关^[30]。

Wu等^[31]在人类退变腰椎间盘髓核组织中发现大量的基质金属蛋白酶, 认为这些酶是由侵入椎间盘的血管和椎间盘组织所产生, 且与椎间盘退变程度正相关。有学者对外伤造成的椎间盘退变动物模型进行免疫组化分析, 证实了退变的椎间盘组织中基质金属蛋白酶2表达升高, 周围组织中基质金属蛋白酶的表达也被诱导升高^[32]。

椎间盘通过分解代谢基因, 如基质金属蛋白酶3、蛋白聚糖、I型胶原、II型胶原、硫酸软骨素蛋白聚糖等, 来调节椎间盘的分解与合成代谢, 维持椎间盘的稳定^[33]。范东伟等^[34]研究发现, 周期性张应变可以引起椎间盘细胞的椎间盘基质代谢基因表达的改变, 而且不同牵张幅度的应力, 导致椎间盘基质基因表达不同, 在低牵张应力下, 合成代谢基因表达升高, 分解代谢基因表达降低; 在高牵张应力下, 分解代谢基因表达升高, 合成代谢基因表达降低。Gilbert等^[35]研究发现椎间盘组织在周期性高应力环境下, 可能会引起椎间盘基质分解增加, 合成减少, 从而导致退变的发生。周期性张应变可引起家兔纤维环细胞分解代谢的加强, 但拉伸幅度、频率、持续时间等对蛋白多糖的合成量无明显影响。

生理条件下细胞外基质的合成和降解过程处于平衡状态, 基质金属蛋白酶可以降解细胞外基质成分, 组织基质金属蛋白酶抑制剂是基质金属蛋白酶的天然抑制因子,

二者的比例失调可导致组织降解。力学刺激参与了包括纤维环细胞在内的多种细胞基质金属蛋白酶和组织基质金属蛋白酶抑制剂的表达调节^[36]。体外椎间盘纤维环细胞牵拉实验表明: 椎间盘基质代谢的调节与力学加载的方式、幅度、频率、时间以及组织退变与否有关^[2]。由于各研究小组所采用的细胞来源、加载参数等有所差别, 因此, 对力学载荷对椎间盘纤维环细胞基质代谢的影响尚无统一论。10%、1.0 Hz周期性牵拉60 min使牛椎间盘纤维环细胞基质金属蛋白酶2 基因显著增加, 对组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达无显著影响。牵拉后对细胞继续培养8 h, 组织基质金属蛋白酶抑制剂2蛋白表达则显著下降。10%、1.0 Hz牵拉人正常纤维环细胞20 min使基质金属蛋白酶3和ADAMTS-4基因表达下调, 减少分解代谢; 0.33 Hz则通过下调 I 型和 II 型胶原基因表达, 上调基质金属蛋白酶9基因促进分解代谢。但发生退变组织的纤维环细胞的牵张的反应却与之相反。该研究结果提示低频0.1 Hz、6%的周期性牵拉具有明显的抗分解代谢的作用。

5%、0.5 Hz周期性牵拉24 h使猪椎间盘纤维环细胞内基质金属蛋白酶表达水平显著增加, 但对分泌至培养基中的整体基质金属蛋白酶表达水平无显著影响; 对基质金属蛋白酶1-3、组织基质金属蛋白酶抑制剂1和组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达亦无显著作用; 但静态牵拉则使上述基因表达显著下调^[37]。动物实验对老鼠尾椎盘进行静态压缩1 d, 基质金属蛋白酶2表达水平形式无显著变化, 压缩4 d则使基质金属蛋白酶2蛋白表达水平形式显著升高, 并维持至第7天, 但基质金属蛋白酶2基因和整体蛋白表达在整个实验过程中均保持不变。该研究提示力学载荷对椎间盘基质金属蛋白酶2表达的调节是通过影响基质金属蛋白酶2表达水平而非基因或翻译水平来实现的^[8]。本实验发现2%牵拉2 h, 对基质金属蛋白酶2基因表达下调, 同时也使组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达下调; 牵拉12 h, 则使基质金属蛋白酶2和组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达进一步下调。这将保持二者表达平衡, 从而促进基质合成行为。10%牵拉则使基质金属蛋白酶2基因表达上调和组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达下调, 二者处于失衡状态; 牵拉12 h, 基质金属蛋白酶2基因表达进一步上调, 组织基质金属蛋白酶抑制剂2基因表达进一步下调, 从而促进基质分解。但基质金属蛋白酶2蛋白表达水平无显著性变化, 二者并不一致, 这可能与基质金属蛋白酶2存在转录后翻译机制有关。

Tian等^[38]研究发现, 解整链蛋白金属蛋白酶4表达随应力拉伸幅度升高而表达增强。Pratsinis等^[39]发现蛋

白激酶家族可以接受细胞外力学信号, 将胞外刺激信号传递给细胞核, 调控细胞增殖、分化、迁移和凋亡等, 该家族包括ERK、JNK和p38等亚族。有学者实验研究发现周期性张应变可上调纤维环细胞JNK蛋白磷酸化水平, 具有双向、快速的特点, 但对P38磷酸化水平无明显影响; JNK抑制剂SP600125预处理可部分逆转周期性张应变下调纤维环细胞aggrecan mRNA的作用^[40]。

10%周期性张应变可下调大鼠纤维环细胞Aggrecan mRNA的表达, MAPK家族中的信号分子ERK1/2在该过程中起一定的调控作用。但MAPK家族中除了ERK1/2以外, 还有其他重要的成员, 如C-Jun氨基末端激酶、P38等^[41], 这些信号分子在椎间盘退变过程中也有重要作用^[42]。

Campbell等^[53]发现周期性牵张力(10个循环, 1 Hz, 0-15%)可导致细胞骨架重塑, 增强软骨细胞对力学环境的适应能力。Fanning等^[44]发现体外牵张刺激软骨细胞能够激活ERK1/2、p38、JNK通路调控细胞的基因表达、增殖和代谢功能。Ren等^[45]推测机械应力促进大鼠软骨细胞增殖细胞外基质合成是通过整合素 β 1-Src-Rac1/PLCy1- ERK1/2信号通路来调控。Li等^[46]实验表明周期性机械牵张力通过激活整合素介导的FAK和ERK1/2信号通路促进Caco-2细胞增殖。Plotkin等^[47]发现机械刺激能够通过整合素-细胞骨架-Src-ERK1/2信号通路抑制成骨细胞的凋亡。

本实验还发现不同幅度和时间的周期性等双轴牵拉可以影响大鼠纤维环细胞肌动蛋白骨架的聚合与解聚。静态培养的大鼠纤维环细胞肌动蛋白骨架均呈现出明显的应力纤维。2%牵拉2 h, 部分肌动蛋白骨架发生解聚, 12 h后基本恢复正常的应力纤维排列方式。10%牵拉2 h肌动蛋白应力纤维发生明显解聚, 12 h后仍处于解聚状态, 细胞膜下有聚集。Abbott等^[18]发现1.0 Hz、20%的周期性单轴牵拉24 h可使肌动蛋白纤维排列趋于一致, 并与受力方向垂直。这是细胞为避免受力过大而表现出的自我保护行为。实验采用的是等双轴牵拉, 细胞在各个方向均受力, 因此并没有观察到这种行为。肌动蛋白骨架作为重要的力学信号转导分子, 参与了细胞外基质代谢的调节。力学载荷对纤维环细胞肌动蛋白骨架信号通路的影响有待进一步深入研究。

虽然体外实验可以模拟在体纤维环细胞的受力, 但并不能代表体内的真实情况, 因此对本结果的解释需谨慎。由于多种因素参与了椎间盘纤维环基质代谢的调节, 因此有关力学载荷对其影响以及与椎间盘退变的关系尚需进一步深入系统的研究。

作者贡献: 张德宏进行实验设计, 实验实施为李晓娜, 实验评估为李晓娜, 资料收集为方鹏飞, 方鹏飞成文, 王兴盛审校。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 试验方案经甘肃省中医院实验伦理委员会批准。实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Rannou F, Richette P, Benallaoua M, et al. Cyclic tensile stretch modulates proteoglycan production by intervertebral disc annulus fibrosus cells through production of nitrite oxide. *J Cell Biochem.* 2003;90(1):148-157.
- [2] Sowa G, Coelho P, Vo N, et al. Determination of annulus fibrosus cell response to tensile strain as a function of duration, magnitude, and frequency. *J Orthop Res.* 2011;29(8):1275-1283.
- [3] Vo NV, Hartman RA, Yurube T, et al. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J.* 2013;13(3):331-341.
- [4] Rastogi A, Kim H, Twomey JD, et al. MMP-2 mediates local degradation and remodeling of collagen by annulus fibrosus cells of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(2):R57.
- [5] Zhang Y, Gu Z, Qiu G. Association of the polymorphism of MMP2 with the risk and severity of lumbar disc degeneration in the Chinese Han population. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(13):1830-1834.
- [6] Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, et al. Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1997;22(24):2877-2884.
- [7] Rutges JP, Kummer JA, Oner FC, et al. Increased MMP-2 activity during intervertebral disc degeneration is correlated to MMP-14 levels. *J Pathol.* 2008;214(4):523-530.
- [8] Hsieh AH, Lotz JC. Prolonged spinal loading induces matrix metalloproteinase-2 activation in intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003;28(16):1781-1788.
- [9] Kozaci LD, Guner A, Oktay G, et al. Alterations in biochemical components of extracellular matrix in intervertebral disc herniation: role of MMP-2 and TIMP-2 in type II collagen loss. *Cell Biochem Funct.* 2006;24(5):431-436.
- [10] Omlor GW, Lorenz H, Engelleiter K, et al. Changes in gene expression and protein distribution at different stages of mechanically induced disc degeneration--an in vivo study on the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res.* 2006;24(3):385-392.
- [11] 郭志良, 周跃, 李华壮, 等. 周期性张应变对纤维环细胞 Aggrecan mRNA 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2007, 36(6): 545-547.
- [12] Watanabe H, Nakata K, Kimata K, et al. Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(13):6943-6947.
- [13] Skaggs DL, Weidenbaum M, Iatridis JC, et al. Regional variation in tensile properties and biochemical composition of the human lumbar annulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976).* 1994;19(12):1310-1319.
- [14] Yurube T, Takada T, Suzuki T, et al. Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R51.
- [15] Sowa GA, Coelho JP, Bell KM, et al. Alterations in gene expression in response to compression of nucleus pulposus cells. *Spine J.* 2011;11(1):36-43.
- [16] Liu B, Qu MJ, Qin KR, et al. Role of cyclic strain frequency in regulating the alignment of vascular smooth muscle cells in vitro. *Biophys J.* 2008;94(4):1497-1507.
- [17] Hamilton DJ, Pilliar RM, Waldman S, et al. Effect of circumferential constraint on nucleus pulposus tissue in vitro. *Spine J.* 2010;10(2):174-183.
- [18] Zhang YH, Zhao CQ, Jiang LS, et al. Substrate stiffness regulates apoptosis and the mRNA expression of extracellular matrix regulatory genes in the rat annular cells. *Matrix Biol.* 2011;30(2):135-144.
- [19] Gantenbein B, Grünhagen T, Lee CR, et al. An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(23):2665-2673.
- [20] Neidlinger-Wilke C, Mietsch A, Rinkler C, et al. Interactions of environmental conditions and mechanical loads have influence on matrix turnover by nucleus pulposus cells. *J Orthop Res.* 2012;30(1):112-121.

- [21] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression. *Biotech Histochem*. 2006;81(4-6):125-131.
- [22] Walter BA, Korecki CL, Purmessur D, et al. Complex loading affects intervertebral disc mechanics and biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(8):1011-1018.
- [23] Iatridis JC, MacLean JJ, Roughley PJ, et al. Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism in vivo. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:41-46.
- [24] Wilder-Smith P, Lee K, Guo S, et al. In vivo diagnosis of oral dysplasia and malignancy using optical coherence tomography: preliminary studies in 50 patients. *Lasers Surg Med*. 2009;41(5):353-357.
- [25] Amaechi BT, Higham SM, Podoleanu AG, et al. Use of optical coherence tomography for assessment of dental caries: quantitative procedure. *J Oral Rehabil*. 2001;28(12):1092-1093.
- [26] Popescu DP, Sowa MG, Hewko MD, et al. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J Biomed Opt*. 2008;13(5):054053.
- [27] 李爽, 马信龙, 孙晓雷, 等. 循环牵张应力对人退变纤维环细胞增殖的影响[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2011, 34(6): 344-361.
- [28] Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Variations in aggrecan localization and gene expression patterns characterize increasing stages of human intervertebral disk degeneration. *Exp Mol Pathol*. 2011;91(2):534-539.
- [29] Cho H, Seth A, Warmbold J, et al. Aging affects response to cyclic tensile stretch: paradigm for intervertebral disc degeneration. *Eur Cell Mater*. 2011;22:137-145; discussion 145-146.
- [30] 郭志良, 周跃, 滕海军, 等. 周期性张应变下调椎间盘纤维环细胞Aggrecan mRNA表达的分子机制研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2012, 34(10):791-793.
- [31] Wu WP, Jiang JM, Qu DB, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and matrix metalloproteinase-2 in degenerative lumbar intervertebral disc. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2010;30(5):1152-1155.
- [32] 綦惠, 赵丹慧, 田伟. 基质金属蛋白酶与椎间盘退变研究的新进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2010, 20(1):69-72.
- [33] Vo NV, Hartman RA, Yurube T, et al. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J*. 2013;13(3):331-341.
- [34] 范东伟, 陈仲强, 郭昭庆, 等. 周期性牵张应力对人椎间盘纤维环细胞合成和分解的影响[J]. *天津医药*, 2014, 42(3): 241-244.
- [35] Gilbert HT, Nagra NS, Freemont AJ, et al. Integrin - dependent mechanotransduction in mechanically stimulated human annulus fibrosus cells: evidence for an alternative mechanotransduction pathway operating with degeneration. *PLoS One*. 2013;8(9):e72994.
- [36] Liu C, Feng P, Li X, et al. Expression of MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 by cultured rabbit corneal fibroblasts under mechanical stretch. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239(8):907-912.
- [37] Gilbert HT, Hoyland JA, Millward-Sadler SJ. The response of human annulus fibrosus cells to cyclic tensile strain is frequency-dependent and altered with disc degeneration. *Arthritis Rheum*. 2010;62(11):3385-3394.
- [38] Tian Y, Yuan W, Fujita N, et al. Inflammatory cytokines associated with degenerative disc disease control aggrecanase-1 (ADAMTS-4) expression in nucleus pulposus cells through MAPK and NF- κ B. *Am J Pathol*. 2013;182(6): 2310-2321.
- [39] Pratsinis H, Constantinou V, Pavlakis K, et al. Exogenous and autocrine growth factors stimulate human intervertebral disc cell proliferation via the ERK and Akt pathways. *J Orthop Res*. 2012;30(6):958-964.
- [40] 郭志良, 周跃, 滕海军, 等. JNK及P38信号分子在周期性张应变下调大鼠椎间盘纤维环细胞Aggrecan mRNA表达中的作用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21(19):1977-1981.
- [41] Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*. 2013;513(1):1-13.
- [42] 邹隆强. MAPK信号传导通路在髓核细胞研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2012, 20(21):1963-1965.
- [43] Campbell JJ, Blain EJ, Chowdhury TT, et al. Loading alters actin dynamics and up-regulates cofilin gene expression in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(2): 329-334.
- [44] Fanning PJ, Emkey G, Smith RJ, et al. Mechanical regulation of mitogen-activated protein kinase signaling in articular cartilage. *J Biol Chem*. 2003; 278(51):50940-50948.
- [45] Ren K, Liu F, Huang Y, et al. Periodic mechanical stress activates integrin β 1-dependent Src-dependent PLC γ 1-independent Rac1 mitogenic signal in rat chondrocytes through ERK1/2. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(4):827-842.
- [46] Li W, Duzgun A, Sumpio BE, et al. Integrin and FAK-mediated MAPK activation is required for cyclic strain mitogenic effects in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280(1):G75-87.
- [47] Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, et al. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(3):C633-643.