

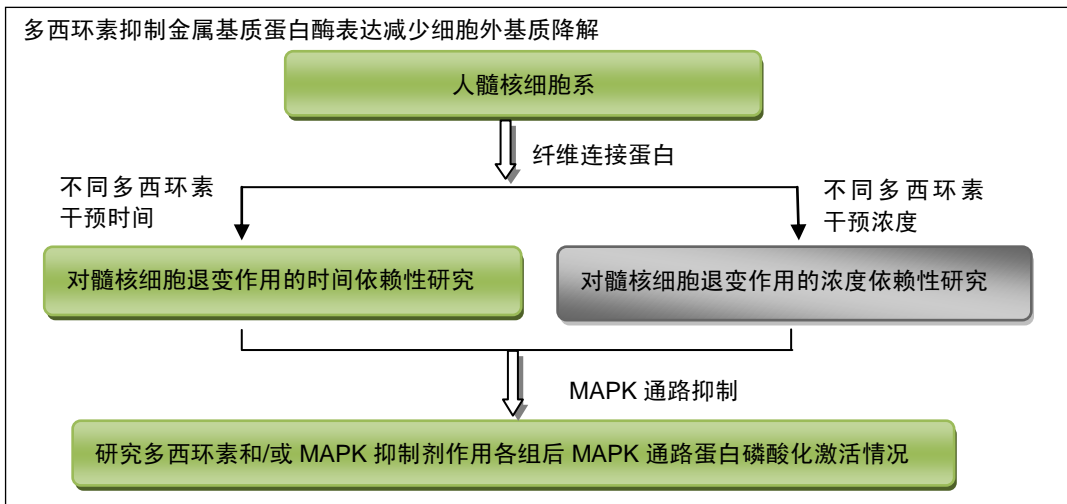
# 多西环素在纤维连接蛋白诱导髓核细胞退变过程中的作用

张海飞, 赵 广, 张治宇(中国医科大学附属第四医院骨外科, 辽宁省沈阳市 100032)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0296

ORCID: 0000-0002-2818-6404(张治宇)

文章快速阅读:



张海飞, 男, 1981 年生, 内蒙古自治区通辽市人, 蒙古族, 2017 年中国医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事脊柱退行性疾病的治疗研究。

通讯作者: 张治宇, 博士, 主任医师, 教授, 中国医科大学附属第四医院骨外科, 辽宁省沈阳市 110032

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-04-18



## 文题释义:

**多西环素:** 是四环素类抗生素, 可以非特异性抑制基质金属蛋白酶。正因为此特性, 它已开始用于血管外科、神经科、循环科、呼吸科等多种疾病的预防和治疗的研究中。多西环素可以通过细胞因子和细胞因子受体调控胶原酶来抑制蛋白水解从而保护关节软骨, 据此该文探讨多西环素是否可以通过类似机制抑制间盘退变。

**丝裂原活化蛋白激酶信号通路:** 丝裂原活化蛋白激酶属于一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可在多种不同的信号转导途径中充当一种共同的信号转导成分, 且在细胞周期调控中发挥重要的作用。已有基础研究证实退变椎间盘中丝裂原活化蛋白激酶信号通路发挥了重要作用。

## 摘要

**背景:** 多西环素在阻止间盘退变方面有一定的作用, 但是其在椎间盘中抑制基质金属蛋白酶的机制并未完全阐明。

**目的:** 从分子内信号传导角度采用细胞实验来阐明多西环素抑制间盘内基质金属蛋白酶的作用机制。

**方法:** 体外培养人间髓核细胞, 在培养液中加入相对分子质量为 45 000 纤维连接蛋白片段制造退变模型。在退变模型中按照不同作用时间及不同作用浓度分组, 均通过 Western blot 方法检测各组 II 型胶原和基质金属蛋白酶 13 蛋白的表达情况。然后在 10 mg/L 多西环素作用 24 h 后, Western blot 方法测定各组 ERK1/2、p-ERK1/2、P38、p-P38、JNK、p-JNK 蛋白表达水平, 并根据以上实验结果选择 ERK 及 JNK 通路抑制后, Western blot 检测多西环素对 MAPK 通路蛋白表达的影响。

**结果与结论:** ①纤维连接蛋白可以诱导髓核细胞退变, 表现为基质金属蛋白酶 13 表达增加、II 型胶原表达降低。多西环素可以抑制纤维连接蛋白诱导的退变髓核细胞基质金属蛋白酶 13 的表达, 但并不呈时间依赖性和剂量依赖性; ②多西环素作用于经纤维连接蛋白诱导的髓核细胞后可以抑制其 ERK1/2 及 JNK 磷酸化, 双重抑制有效地阻断了 ERK1/2 及 JNK 在髓核细胞中的激活, 与多西环素或 MAPK 抑制剂单独作用相比, 这种联合作用协同地增强了对 ERK 及 JNK 磷酸化的抑制作用。因此多西环素可能通过阻断 ERK1/2 及 JNK 在髓核细胞中的激活来抑制金属基质蛋白酶表达, 进而减少细胞外基质降解, 具有预防和治疗间盘退变的潜在作用。

## 关键词:

髓核细胞; 间盘退变; 纤维连接蛋白片段; 多西环素; 细胞外信号调节激酶; 基质金属蛋白酶; II 型胶原; 细胞外基质

## 主题词:

纤维蛋白类; 多西环素; 组织工程

## 基金资助:

辽宁省科学技术计划项目(20170541058)

Zhang Hai-fei, M.D.,  
Attending physician,  
Department of Orthopedics,  
the Fourth Affiliated Hospital  
of China Medical University,  
Shenyang 100032, Liaoning  
Province, China

Corresponding author:  
Zhang Zhi-yu, M.D., Chief  
physician, Professor,  
Department of Orthopedics,  
the Fourth Affiliated Hospital  
of China Medical University,  
Shenyang 100032, Liaoning  
Province, China

## Role of doxycycline in the fibronectin-induced degeneration of nucleus pulposus cells

Zhang Hai-fei, Zhao Guang, Zhang Zhi-yu (Department of Orthopedics, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 100032, Liaoning Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Doxycycline has a certain effect on disc degeneration progression, but the mechanism by which doxycycline inhibits the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in intervertebral disc remains unclear.

**OBJECTIVE:** To clarify the mechanism by which doxycycline inhibits MMPs expression in intervertebral disc by cytologic experiment in views of intramolecular signal transduction.

**METHODS:** The human nucleus pulposus cells were cultured *in vitro*, and 45 000 fibronectin fragments were added into the culture medium to make the degeneration model. The degenerative models were divided according to different action time and different concentrations. The expression levels of type II collagen and MMP13 in each group were detected by western blot assay. After treatment with 10 mg/L doxycycline for 24 hours, the expression levels of ERK1/2, p-ERK1/2, P38, p-P38, JNK, and p-JNK proteins in each group were determined by western blot assay. Based on the above experimental results, the inhibition of ERK and JNK pathways was selected, and the effect of doxycycline on the expression of MAPK pathway protein was detected by western blot assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Fibronectin could induce the degeneration of nucleus pulposus cells, showing an increase in expression level of MMP13 and a decrease in expression of type II collagen. Doxycycline could inhibit the expression of MMP13 in degenerative nucleus pulposus cells induced by fibronectin, but not in a time- or dose-dependent manner. After degenerative nucleus pulposus cells induced by fibronectin were treated with doxycycline, the phosphorylation of ERK1/2 and JNK was inhibited, and dual inhibition effectively blocked the activation of ERK1/2 and JNK compared with MAPK inhibitors or doxycycline alone. So doxycycline may block ERK1/2 and JNK activation in the nucleus pulposus cells to inhibit MMP expression, and thus reduce the extracellular matrix degradation. Thereafter, doxycycline exerts a potential role in preventing and treating disc degeneration.

**Subject headings:** Fibronectins; Doxycycline; Tissue Engineering

**Funding:** the Science and Technology Program of Liaoning Province, No. 20170541058

## 0 引言 Introduction

腰痛是一种常见病, 发病率较高, 严重影响人们的生活质量, 已经成为一项健康和社会的重大问题, 常由椎间盘退变引起<sup>[1-2]</sup>。间盘退变引发生物力学体系发生变化, 从而继发一系列性疾病, 如腰椎间盘突出、腰椎不稳、退变性腰椎滑脱以及腰椎管狭窄等<sup>[3-4]</sup>。如何预防及治疗椎间盘突出症引起了越来越多医疗工作者的重视。影响椎间盘退变的因素很多, 但生物学体系稳态失衡是其主要原因<sup>[5]</sup>。正因如此, 近年来关于椎间盘退变基础研究的重点主要在于对细胞外基质降解的机制研究, 特别关注于基质金属蛋白酶、聚蛋白多糖酶及基质金属蛋白酶组织抑制剂的基因表达和活性的调控<sup>[6-9]</sup>。一些学者已经开始研究人退变间盘及实验动物模型有关金属蛋白酶基因和蛋白表达, 结果显示在人退变间盘组织中可检测到多种基质金属蛋白酶表达增加<sup>[10-13]</sup>。虽然以上研究观察到了在退变间盘中基质金属蛋白酶的表达增加, 但依然没有直接证据显示哪种基质金属蛋白酶在退变间盘细胞外基质降解中起到关键作用<sup>[14-15]</sup>。

研究发现多西环素可以通过细胞因子和细胞因子受体调控胶原酶来抑制蛋白水解从而保护关节软骨<sup>[16-18]</sup>。据此推测多西环素可以通过类似机制抑制间盘退变。齐明等<sup>[19]</sup>建立了一种机械性大鼠间盘退变模型, Western blot检测结果发现在多西环素干预后基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的蛋白表达水平明显降低, 说明在活体间盘内注射多西环素可以抑制金属基质蛋白酶表达。所以多西环素在阻止间盘退变方面有一定的作用, 作者在以上研究基础上, 探讨多西环素在纤维连接蛋白片段诱导髓核细胞退变过程中的作用及机制。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 属于一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可在多种不同的信号转导途径中充当一种共同的信号转导成份, 且在细胞周期调控中发挥重要的作用<sup>[20]</sup>。已有基础研究证实退变椎间盘中主要有3条并行的MAPK信号通路发挥了重要作用: ERK1/2信号通路在外界环境改变下激活, 对髓核细胞增殖及细胞外基质的降解起着重要的调节作用;

JNK 信号通路对细胞外基质及基质金属蛋白酶基因表达起着重要的调节作用, 抑制该通路可能延缓椎间盘的退变; 炎性细胞因子可以在退变间盘中激活p38 MAPK信号通路, 抑制该通路能减少炎性因子刺激下椎间盘的退变<sup>[21-27]</sup>。一些研究表明多西环素在胸腺细胞及支气管上皮细胞等通过MAPK信号通路对基质金属蛋白酶调控<sup>[28-29]</sup>。所以多西环素也可能通过MAPK通路调控髓核细胞内基质金属蛋白酶的表达。作者以体外细胞模型为对象, 探索多西环素在退变间盘中抑制基质金属蛋白酶作用的分子机制, 为多西环素应用于预防和治疗椎间盘退变提供理论基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年7月至2017年2月在中国医科大学四院中心试验室。

1.3 材料 人髓核细胞系购自sciencell公司。

**实验用主要试剂及仪器:** DMEM/F12培养基购自Gibco公司; 相对分子质量45 000纤维链接蛋白片段, PD98059, SP600125购自Sigma公司; 单克隆抗体ERK, phospho-ERK, p38, phospho-p38, JNK, phospho-JNK,  $\beta$ -actin购自Cell Signaling Technology公司; Collagen II 抗体, 基质金属蛋白酶13抗体购自abcam公司; 全蛋白提取试剂盒, 一抗二抗去除液, SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, ECL发光液购自wanleibo公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购自beyotime公司; Western洗涤液购自捷世康公司; SDS-PAGE电泳液(干粉)购自Bogoo公司; 预染蛋白分子量标准购自Fermentas公司; PVDF膜购自Millipore公司; 倒置显微镜购自Nikon公司; RB2-97程控降温仪购自Sanyo公司; 超净工作台购自济南洁康净化设备厂; 硝酸纤维素膜购自碧云天公司; 电泳仪、凝胶成像系统购自北京六一仪器公司; 台式低温超速离心机购自贝克曼公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 用人髓核细胞系细胞完全培养基, 添加

体积分数20%胎牛血清,于37℃和体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下培养,然后传代用于实验。细胞以1×10<sup>4</sup>个/cm<sup>2</sup>的密度接种。100 nmol/L纤维连接蛋白加入无血清的培养液中干预2 d,以制备髓核细胞退变模型。

1.4.2 多西环素对髓核细胞退变作用的时间依赖性分析 将浓度为1×10<sup>4</sup>个/cm<sup>2</sup>细胞随机分为8组:对照组、纤维连接蛋白组、纤维连接蛋白+多西环素干预1, 2, 4, 8, 12, 24 h组。除对照组外,其余组细胞加入100 nmol/L纤维连接蛋白干预2 d建立髓核细胞退变模型。然后纤维连接蛋白+多西环素干预1, 2, 4, 8, 12, 24 h组细胞分别加入10 mg/L多西环素作用1, 2, 4, 8, 12, 24 h,然后用Western blot方法测定II型胶原及基质金属蛋白酶13蛋白表达水平。

1.4.3 多西环素对髓核细胞退变作用的浓度依赖性分析 将浓度为1×10<sup>4</sup>个/cm<sup>2</sup>细胞随机分为6组:对照组、纤维连接蛋白组、纤维连接蛋白+10, 20, 40, 80 mg/L多西环素组。除对照组外,其余组细胞加入100 nmol/L纤维连接蛋白干预2 d建立髓核细胞退变模型。纤维连接蛋白+10, 20, 40, 80 mg/L多西环素组加入10, 20, 40, 80 mg/L多西环素干预24 h。用Western blot测定II型胶原及基质金属蛋白酶13蛋白表达水平。

1.4.4 多西环素对髓核细胞中MAPK通路的影响 将浓度为1×10<sup>4</sup>个/cm<sup>2</sup>细胞随机分为4组:对照组、纤维连接蛋白组、多西环素组和纤维连接蛋白+多西环素组。纤维连接蛋白组和纤维连接蛋白+多西环素组细胞加入100 nmol/L纤维连接蛋白干预2 d建立髓核细胞退变模型,多西环素组和纤维连接蛋白+多西环素组在干预后加入10 mg/L多西环素干预24 h。Western blot测定II型胶原、基质金属蛋白酶13、ERK1/2、p-ERK1/2、P38、p-P38、JNK及p-JNK蛋白表达水平。

1.4.5 退变髓核细胞中多西环素对MAPK通路的抑制机制 将浓度为1×10<sup>4</sup>个/cm<sup>2</sup>细胞随机分为7组:对照组、纤维连接蛋白组、纤维连接蛋白+多西环素组、纤维连接蛋白+PD98059组、纤维连接蛋白+多西环素+PD98059组、纤维连接蛋白+SP600125组及纤维连接蛋白+多西环素+SP600125组。纤维连接蛋白+PD98059组和纤维连接蛋白+多西环素+PD98059组加入50 μmol/L抑制剂PD98059干预1 h。纤维连接蛋白+SP600125组及纤维连接蛋白+多西环素+SP600125组加入10 μmol/L抑制剂SP600125干预1 h。然后纤维连接蛋白+多西环素组、纤维连接蛋白+PD98059组、纤维连接蛋白+多西环素+PD98059组、纤维连接蛋白+SP600125组及纤维连接蛋白+多西环素+SP600125组加入10 mg/L多西环素处理24 h。Western blot检测多西环素对各组细胞中ERK1/2、p-ERK1/2、P38、p-P38、JNK、p-JNK蛋白表达的影响。

1.4.6 Western blot分析 RIPA裂解液裂解贴壁细胞,测定蛋白浓度。采用SDS-PAGE凝胶配制试剂盒进行分离,通过电转方法将蛋白质转到PVDF膜上。按照适当比例用Western一抗稀释液稀释一抗。用滴管等吸尽封闭液,立即加入稀释好的一抗,4℃缓慢摇动孵育过夜。孵育一抗后的PVDF膜从杂交袋中取出,浸入TBST中,摇床摇动

5 min,重复此步骤4次。将二抗工作液倒入杂交袋中,放入漂洗好的PVDF膜,用压膜机封口,室温在侧摆摇床上缓慢摇动孵育1 h。回收二抗。加入TBTS,在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤5-10 min。吸尽洗涤液后,再加入TBTS洗涤5-10 min。共洗涤3次。使用超敏ECL化学发光试剂盒检测蛋白。成像仪成像,采集图像,使用Gel-Pro-Analyzer 6.3软件对图像进行分析。目的蛋白的相对表达量计算公式:目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带吸光度值/相应β-actin条带吸光度值。实验重复3次。

1.5 主要观察指标 ①纤维连接蛋白诱导退变髓核细胞中的II型胶原蛋白和基质金属蛋白酶13的表达情况;②不同质量浓度多西环素及不同时间对退变髓核细胞干预后的II型胶原蛋白和MMPI3的表达情况;③10 mg/L多西环素作用退变髓核细胞24 h后 ERK1/2、p-ERK1/2、P38、p-P38、JNK、p-JNK蛋白表达情况;④ERK及JNK通路抑制时多西环素对ERK1/2、p-ERK1/2、P38、p-P38、JNK、p-JNK蛋白表达的影响。

1.6 统计学分析 采用SPSS 16.0统计软件(IBM SPSS Statistics)进行统计学处理。数据用 $\bar{x}\pm s$ 来描述。利用t检验或方差分析评价各处理组间的不同。检验水准α值取双侧0.05。

## 2 结果 Results

2.1 多西环素对髓核细胞退变作用的时间依赖性 与对照组相比,纤维连接蛋白组基质金属蛋白酶13蛋白表达水平显著提高( $P < 0.05$ ),且II型胶原蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。而与纤维连接蛋白组相比,不同干预时间的多西环素干预均能降低基质金属蛋白酶13蛋白表达水平( $P < 0.05$ ),提升II型胶原蛋白的表达水平( $P < 0.05$ )。单因素方差分析结果表明多西环素不同作用时间对髓核细胞基质金属蛋白酶13及II型胶原蛋白含量的影响差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),但并没有时间依赖性的线性趋势。多西环素作用24 h时II型胶原蛋白表达水平最高,而作用8 h时基质金属蛋白酶蛋白表达水平最低(图1,表1)。

2.2 多西环素对髓核细胞退变作用的剂量依赖性 与对照组相比,纤维连接蛋白组基质金属蛋白酶13蛋白表达水平显著提高,而且II型胶原蛋白表达水平下降( $P < 0.05$ )。与纤维连接蛋白组相比,纤维连接蛋白+10, 20, 40, 80 mg/L多西环素组基质金属蛋白酶13蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.05$ ),而II型胶原蛋白表达水平明显提高( $P < 0.05$ )。不同剂量多西环素对髓核细胞基质金属蛋白酶13及II型胶原蛋白含量的影响差异无显著性意义( $P > 0.05$ ),但10 mg/L多西环素即可对蛋白产生作用,且随着剂量增大,并未出现剂量依赖的线性趋势(图2,表2)。

2.3 多西环素对MAPK通路的影响研究 与对照组相比,纤维连接蛋白作用髓核细胞后,基质金属蛋白酶13蛋白表达水平显著提高,而II型胶原蛋白表达水平下降,纤维连接蛋白组ERK1/2和JNK的磷酸化明显增强( $P < 0.05$ ),而p38并未出现磷酸化增强。纤维连接蛋白+多西环素组细胞中ERK1/2和JNK磷酸化较纤维连接蛋白组显著降低( $P < 0.05$ ),

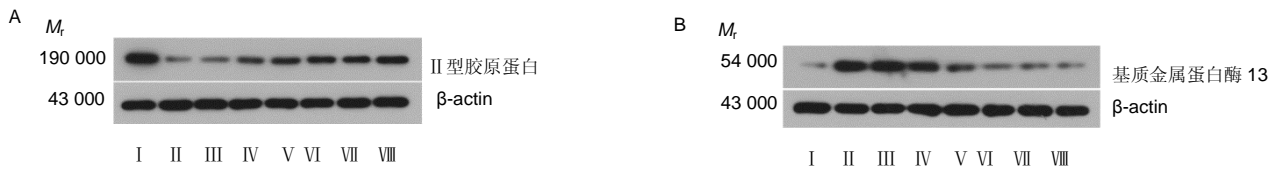


图 1 不同纤维连接蛋白作用时间对髓核细胞中 II 型胶原蛋白和基质金属蛋白酶 13 表达的影响

Figure 1 Expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13 in nucleus pulposus cells under different action time of fibronectin

图注: 图中 A 为 II 型胶原蛋白, B 为基质金属蛋白酶 13。I-VIII 分别为对照组、纤维连接蛋白组、纤维连接蛋白+多西环素干预 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 组。

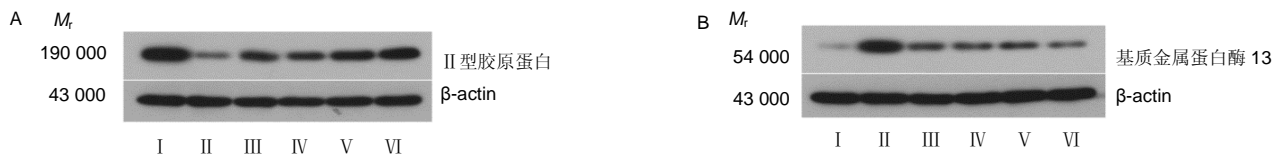
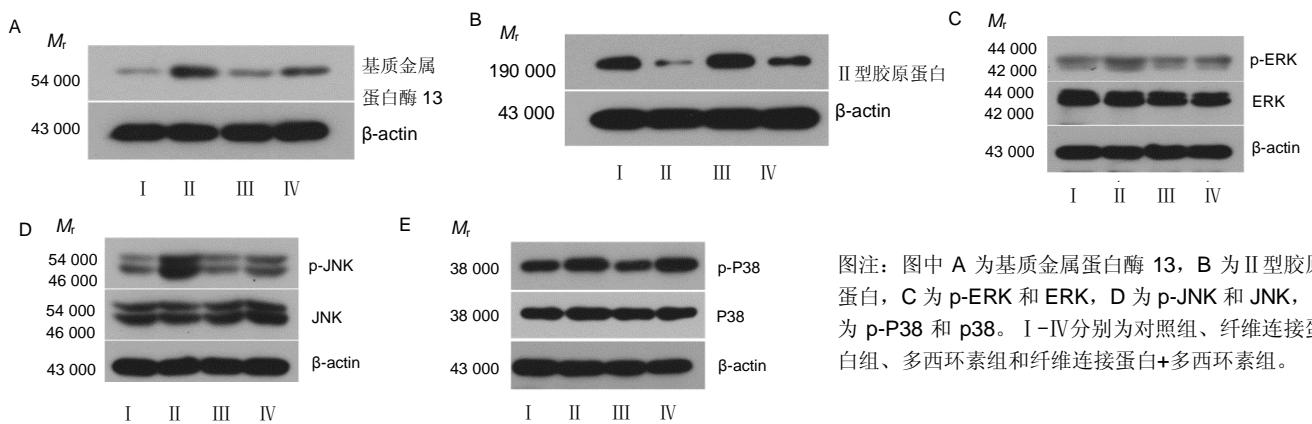


图 2 不同质量浓度多西环素对退变髓核细胞中 II 型胶原蛋白和基质金属蛋白酶 13 表达水平的影响

Figure 2 Expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13 in degenerative nucleus pulposus cells under different concentrations of doxycycline

图注: 图中 A 为 II 型胶原蛋白, B 为基质金属蛋白酶 13。I-VI 分别为对照组、纤维连接蛋白组、纤维连接蛋白+10, 20, 40, 80 mg/L 多西环素组。



图注: 图中 A 为基质金属蛋白酶 13, B 为 II 型胶原蛋白, C 为 p-ERK 和 ERK, D 为 p-JNK 和 JNK, E 为 p-P38 和 p38。I-IV 分别为对照组、纤维连接蛋白组、多西环素组和纤维连接蛋白+多西环素组。

图 3 多西环素对退变髓核细胞中基质金属蛋白酶 13、II 型胶原蛋白及 MAPK 通路蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of doxycycline on the expression of matrix metalloproteinase 13, type II collagen and MAPK pathway protein in degenerative nucleus pulposus cells

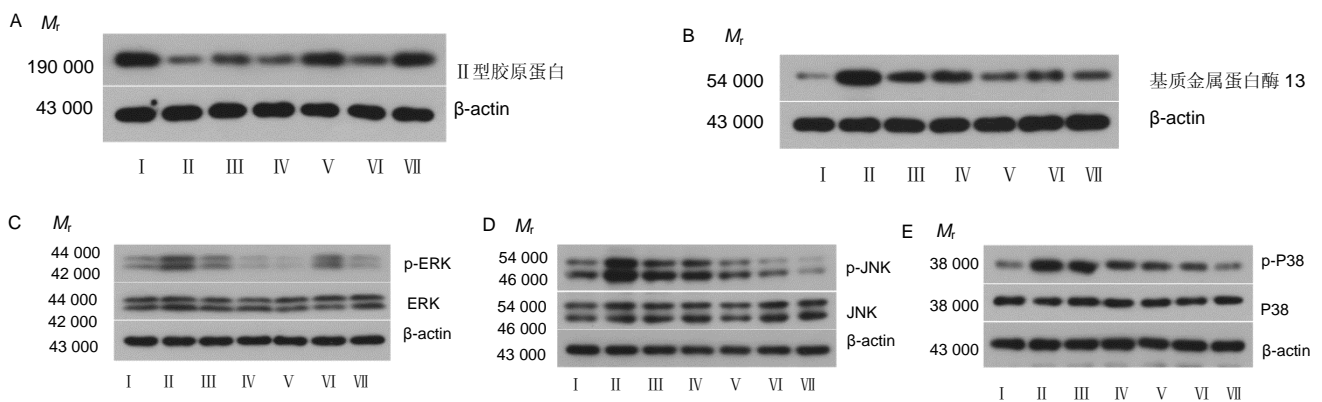


图 4 多西环素在 MAPK 通路抑制后对 II 型胶原蛋白、MMP 蛋白及 MAPK 通路蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of doxycycline on the expression of type II collagen, matrix metalloproteinase, and MAPK pathway protein after MAPK signaling pathway inhibition

图注: 图中 A 为 II 型胶原蛋白, B 为基质金属蛋白酶 13, C 为 p-ERK 和 ERK, D 为 p-JNK 和 JNK, E 为 p-P38 和 p38。I-VII 分别为对照组、纤维连接蛋白组、纤维连接蛋白+多西环素组、纤维连接蛋白+PD98059 组、纤维连接蛋白+多西环素+PD98059 组、纤维连接蛋白+SP600125 组及纤维连接蛋白+多西环素+SP600125 组。

表 4 多西环素在 MAPK 通路抑制后对 II 型胶原蛋白、MMP 蛋白及 MAPK 通路蛋白表达的影响 (x±s, 与 β-actin 吸光度比值)

Table 4 Effect of doxycycline on the expression levels of type II collagen, matrix metalloproteinase, and MAPK pathway protein after MAPK signaling pathway inhibition

项目	对照组	纤维连接蛋白组	纤维连接蛋白+多西环素组	纤维连接蛋白+PD98059 组	纤维连接蛋白+多西环素+PD98059 组	纤维连接蛋白+SP600125 组	纤维连接蛋白+多西环素+SP600125 组
II 型胶原蛋白	1.033±0.052	0.195±0.019	0.477±0.020	0.343±0.017	0.794±0.031 <sup>a</sup>	0.416±0.018	0.801±0.028 <sup>a</sup>
基质金属蛋白酶 13	0.142±0.009	1.213±0.067	0.474±0.021	0.537±0.031	0.332±0.016 <sup>a</sup>	0.492±0.019	0.322±0.014 <sup>a</sup>
p-ERK	0.535±0.027	1.282±0.071	0.652±0.027	0.419±0.025	0.263±0.019 <sup>a</sup>	0.734±0.037	0.427±0.022 <sup>a</sup>
ERK	1.663±0.081	1.761±0.076	1.573±0.061	1.582±0.078	1.564±0.055	1.523±0.066	1.832±0.091
p-P38	0.285±0.008	0.983±0.041	0.964±0.026	0.549±0.023	0.551±0.026	0.382±0.019	0.277±0.012
P38	0.705±0.019	0.576±0.023	0.644±0.032	0.603±0.035	0.665±0.023	0.571±0.017	0.604±0.018
p-JNK	1.293±0.041	3.363±0.242	2.164±0.141	2.214±0.168	1.594±0.101 <sup>a</sup>	0.902±0.046	0.587±0.065 <sup>a</sup>
JNK	1.672±0.058	1.744±0.065	1.783±0.056	1.868±0.077	1.659±0.053	1.853±0.098	1.814±0.088

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup>P < 0.05。

表 1 不同纤维连接蛋白作用时间对髓核细胞中 II 型胶原蛋白和基质金属蛋白酶 13 表达的影响 (x±s, 与 β-actin 吸光度比值)

Table 1 Expression levels of type II collagen and matrix metalloproteinase 13 in nucleus pulposus cells under different action time of fibronectin

组别	II 型胶原蛋白	基质金属蛋白酶 13
对照组	1.243±0.041	0.098±0.005
纤维连接蛋白组	0.205±0.009 <sup>a</sup>	0.893±0.032 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+多西环素干预 1 h 组	0.237±0.010 <sup>a</sup>	0.884±0.027 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+多西环素干预 2 h 组	0.350±0.007 <sup>a</sup>	0.629±0.035 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+多西环素干预 4 h 组	0.481±0.011 <sup>a</sup>	0.395±0.016 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+多西环素干预 8 h 组	0.536±0.013 <sup>a</sup>	0.242±0.009 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+多西环素干预 12 h 组	0.482±0.008 <sup>a</sup>	0.237±0.012 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+多西环素干预 24 h 组	0.621±0.021 <sup>a</sup>	0.252±0.017 <sup>a</sup>

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup>P < 0.05。

表 2 不同质量浓度多西环素对退变髓核细胞中 II 型胶原蛋白和基质金属蛋白酶 13 表达水平的影响 (x±s, 与 β-actin 吸光度比值)

Table 2 Expression levels of type II collagen and matrix metalloproteinase 13 in degenerative nucleus pulposus cells under different concentrations of doxycycline

组别	II 型胶原蛋白	基质金属蛋白酶 13
对照组	1.020±0.037	0.095±0.011
纤维连接蛋白组	0.205±0.013 <sup>a</sup>	0.898±0.037 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+10 mg/L 多西环素组	0.511±0.029 <sup>a</sup>	0.312±0.015 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+20 mg/L 多西环素组	0.506±0.031 <sup>a</sup>	0.293±0.017 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+40 mg/L 多西环素组	0.698±0.051 <sup>a</sup>	0.267±0.018 <sup>a</sup>
纤维连接蛋白+80 mg/L 多西环素组	0.675±0.043 <sup>a</sup>	0.245±0.007 <sup>a</sup>

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup>P < 0.05。

说明多西环素可能抑制纤维连接蛋白介导的髓核细胞 ERK1/2 以及 JNK 的激活(图 3, 表 3)。根据以上结果, 分别用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 和 JNK 抑制剂 SP600125 抑制纤维连接蛋白诱导的 ERK 及 JNK 磷酸化增强, 结果经 Western blot 测量显示, 加入多西环素的同时加入 PD98059 或 SP600125 可抑制有效地阻断了 ERK1/2 及 JNK 在髓核细胞中的激活, 且与 PD98059 或 SP600125 单独作用相比, 这种联合作用协同地增强了 ERK 磷酸化的抑制作用(P < 0.05)(图 4, 表 4)。

表 3 多西环素对退变髓核细胞中基质金属蛋白酶 13、II 型胶原蛋白及 MAPK 通路蛋白表达的影响 (x±s, 与 β-actin 吸光度比值)

Table 3 Effect of doxycycline on the expression levels of matrix metalloproteinase 13, type II collagen and MAPK pathway protein in degenerative nucleus pulposus cells

项目	对照组	纤维连接蛋白组	多西环素组	纤维连接蛋白+多西环素组
II 型胶原蛋白	0.496±0.048	0.095±0.013 <sup>a</sup>	0.560±0.035	0.256±0.027 <sup>a</sup>
基质金属蛋白酶 13	0.065±0.019	0.556±0.037 <sup>a</sup>	0.074±0.015	0.173±0.018 <sup>a</sup>
p-ERK	0.377±0.051	0.767±0.042 <sup>a</sup>	0.330±0.026	0.418±0.053 <sup>a</sup>
ERK	1.093±0.087	1.088±0.065	1.001±0.078	0.943±0.067
p-P38	0.554±0.031	0.582±0.031	0.503±0.033	0.609±0.041
P38	0.582±0.021	0.688±0.029	0.551±0.019	0.663±0.026
p-JNK	0.495±0.033	1.118±0.067 <sup>a</sup>	0.442±0.015	0.753±0.044 <sup>a</sup>
JNK	1.055±0.086	1.038±0.077	1.092±0.095	1.083±0.077

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup>P < 0.05。

### 3 讨论 Discussion

椎间盘髓核细胞为类软骨细胞, 蛋白聚糖和 II 型胶原纤维等细胞外基质的合成与分泌对于维持间盘正常形态和环境, 延缓间盘退变至关重要。研究发现在腰椎间盘退变中类软骨细胞的分化程度显著降低, 且细胞外基质明显减少, 病理特征表现包括细胞减少、蛋白多糖含量降低、纤维环结构紊乱和破裂等<sup>[29]</sup>。一些炎性细胞因子如白细胞介素 1、肿瘤坏死因子、转化生长因子等都参与了间盘退变进程中的调控<sup>[30-33]</sup>, 而且诸如金属基质蛋白酶等能够促进间细胞外基质加速降解, 但一些促进软骨分化和细胞外基质分泌合成的细胞因子能够抑制上述炎性细胞因子, 促进软骨基质的合成, 维持间盘稳态<sup>[34-38]</sup>。这些细胞因子通过复杂的网络信号通路发生相互作用与调控, 维持间盘损伤和修复的平衡。如果在某些因素如高渗、低氧、压力等作用下, 这种平衡将被打破, 间盘细胞会不同程度发生退变。虽然间盘退变的分子机制是一个复杂的过程, 但金属基质蛋白酶在此过程中发挥关键作用<sup>[24, 39-41]</sup>。那么多西环素作为金属基质蛋白酶抑制剂, 是否能够起到抑制金属基质蛋白酶的合成, 延缓间盘退变呢? 作者在前期研究中建立机械性鼠尾间盘退变模型, 采用

Western blot检测经多西环素干预后的髓核细胞基质金属蛋白酶3和基质金属蛋白酶13的表达, 结果发现在多西环素干预组中基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的蛋白表达量明显降低, 说明在活体间盘内注射多西环素可以抑制基质金属蛋白酶表达, 而基质金属蛋白酶的表达量的减少会促使间盘基质降解速度变慢<sup>[19]</sup>。所以在动物实验上已验证多西环素在阻止间盘退变方面有一定的作用。

作者首先建立了纤维连接蛋白片段诱导髓核细胞退变模型。纤维蛋白为一族高分子糖蛋白, 有着促进细胞与纤维基质间连接的生理作用, 与机体创伤修复、组织炎症、纤维化及硬化过程等有密切关系<sup>[42]</sup>。纤维连接蛋白是其分解产物, 间盘发生退变时其表达明显增多, 另一方面在退变过程中基质金属蛋白酶的表达明显增加, 而正是基质金属蛋白酶将纤维连接蛋白分解为纤维连接蛋白<sup>[43]</sup>。所以以上过程可能形成一个退变反馈回路, Homandberg等<sup>[44]</sup>提出, 纤维连接蛋白的作用由纤维连接蛋白、基质金属蛋白酶、纤维连接蛋白、II型胶原蛋白组成的正反馈恶性循环, 即纤维连接蛋白增加了基质金属蛋白酶的表达, 增加的基质金属蛋白酶分解纤维粘连蛋白形成更多的纤维连接蛋白, 而II型胶原蛋白的表达减少, 间盘退变是这个恶性循环的最终结局。实验成功建立纤维连接蛋白诱导髓核细胞退变模型, 观察到纤维连接蛋白可以减少II型胶原蛋白的表达, 增加基质金属蛋白酶13的表达正与这个理论一致。但抑制其中一个环节可能就打破反馈回路, 延缓间盘退变。所以实验应用多西环素作用于经纤维连接蛋白诱导的髓核退变模型, 研究其在退变过程中的具体作用。

作者观察到多西环素不同作用时间对髓核细胞基质金属蛋白酶13及II型胶原蛋白含量的影响差异有显著性意义, 但并没有时间依赖性的线性趋势, 并提示各多西环素作用时间组中作用24 h效应值最大, 所以下一步实验中将采取多西环素作用时间为24 h。但不同质量浓度的多西环素对髓核细胞基质金属蛋白酶13及II型胶原蛋白水平影响的差异无显著性意义, 推测可能低浓度多西环素(10 mg/L)即可达到抑制基质金属蛋白酶的效用, 增加浓度并不会使其抑制作用增强, 这一点在类似的实验中得到证实<sup>[45-47]</sup>。

MAPK信号通路在髓核细胞退变过程中发挥着重要的调节作用。作者发现多西环素作用于经纤维连接蛋白诱导的髓核细胞后可以抑制其ERK1/2及JNK磷酸化, 导致基质金属蛋白酶13的分泌减少, 这为以减少分解代谢的预防及早期治疗提供了一定的理论基础。随后的研究继续选取了ERK1/2及JNK通路节点应用其通路抑制剂干预, 初步证实双重抑制有效地阻断了ERK1/2及JNK在髓核细胞中的激活, 与多西环素或通路抑制剂单独作用相比, 这种联合作用协同地增强了对ERK及JNK磷酸化的抑制作用。但多西环素对此通路其他节点的作用未明确, 需要进一步实验探讨。据此实验首次从分子内信号传导角度, 采用体外细胞实验及多种技术有机结合来阐明多西环素抑制间盘内基质金属蛋白酶的作用机制, 为多西环素应用于预防和治理椎间盘退变提供理论基础。

**作者贡献:** 张海飞, 张治宇进行实验设计; 实验实施为张海飞, 赵广; 实验评估为张海飞, 张治宇; 资料收集为张海飞, 赵广; 张海飞, 赵广成文, 张治宇审核。

**经费支持:** 该文章接受了“辽宁省科学技术计划项目(20170541058)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 本文统计学方法已经中国医科大学附属第四医院生物统计学专家审核。

**数据开放获取声明:** 研究结果将在同行评议期刊或以会议报告形式发表, 出版数据将公开发布于www.figshare.com。获取共享数据的途径: 无限期获取。

**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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Borenstein D. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. *Curr Opin Rheumatol*. 1992;4(2):226-232.
- [2] Raciborski F, Gasik R, Klak A. Disorders of the spine. A major health and social problem. *Reumatologia*. 2016;54(4):196-200.
- [3] Gaudin D, Krafcik BM, Mansour TR, et al. Considerations in Spinal Fusion Surgery for Chronic Lumbar Pain: Psychosocial Factors, Rating Scales, and Perioperative Patient Education-A Review of the Literature. *World Neurosurg*. 2017;98:21-27.
- [4] Allegri M, Montella S, Salici F, et al. Mechanisms of low back pain: a guide for diagnosis and therapy. Version 2. *F1000Res*. 2016;5: F1000 Guide Rev-1530.
- [5] Hemanta D, Jiang XX, Feng ZZ, et al. Etiology for Degenerative Disc Disease. *Chin Med Sci J*. 2016;31(3):185-191.
- [6] Canbay S, Turhan N, Bozkurt M, et al. Correlation of matrix metalloproteinase-3 expression with patient age, magnetic resonance imaging and histopathological grade in lumbar disc degeneration. *Turk Neurosurg*. 2013;23(4):427-433.
- [7] Hwang MH, Kim KS, Yoo CM, et al. Photobiomodulation on human annulus fibrosus cells during the intervertebral disk degeneration: extracellular matrix-modifying enzymes. *Lasers Med Sci*. 2016;31(4): 767-777.
- [8] Liu S, Wu N, Liu J, et al. Association between ADAMTS-4 gene polymorphism and lumbar disc degeneration in Chinese Han population. *J Orthop Res*. 2016;34(5):860-864.
- [9] Sowa GA, Perera S, Bechara B, et al. Associations between serum biomarkers and pain and pain-related function in older adults with low back pain: a pilot study. *J Am Geriatr Soc*. 2014;62(11):2047-2055.
- [10] 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.
- [11] Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(23):3005-3013.
- [12] Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, et al. 2002 SSE Award Competition in Basic Science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. *Eur Spine J*. 2002;11(4):308-320.

- [13] Bachmeier BE, Nerlich A, Mittermaier N, et al. Matrix metalloproteinase expression levels suggest distinct enzyme roles during lumbar disc herniation and degeneration. *Eur Spine J*. 2009;18(11):1573-1586.
- [14] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol*. 2004;204(1):47-54.
- [15] 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.
- [16] Shlopov BV, Stuart JM, Gumanovskaya ML, et al. Regulation of cartilage collagenase by doxycycline. *J Rheumatol*. 2001;28(4):835-842.
- [17] Okuma T, Hirata M, Yano F, et al. Regulation of mouse chondrocyte differentiation by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Biomed Res*. 2015;36(1):21-29.
- [18] Aydin O, Korkusuz F, Korkusuz P, et al. In vitro and in vivo evaluation of doxycycline-chondroitin sulfate/PCL microspheres for intraarticular treatment of osteoarthritis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103(6):1238-1248.
- [19] 齐明,朱悦,崔显峰,等.多西环素对大鼠退变间盘中金属蛋白酶抑制作用的研究[J].*中国医学创新*,2009,6(4):1-4.
- [20] Dérjard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*. 1995;267(5198):682-685.
- [21] Li P, Gan Y, Xu Y, et al. Osmolarity affects matrix synthesis in the nucleus pulposus associated with the involvement of MAPK pathways: A study of ex vivo disc organ culture system. *J Orthop Res*. 2016;34(6):1092-1100.
- [22] Tao Y, Zhou X, Liang C, et al. TGF- $\beta$ 3 and IGF-1 synergy ameliorates nucleus pulposus mesenchymal stem cell differentiation towards the nucleus pulposus cell type through MAPK/ERK signaling. *Growth Factors*. 2015;33(5-6):326-336.
- [23] Park JJ, Moon HJ, Park JH, et al. Induction of proinflammatory cytokine production in intervertebral disc cells by macrophage-like THP-1 cells requires mitogen-activated protein kinase activity. *J Neurosurg Spine*. 2016;24(1):167-175.
- [24] Dimozi A, Mavrogenatou E, Sklirou A, et al. Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *Eur Cell Mater*. 2015;30:89-102; discussion 103.
- [25] Dong ZH, Wang DC, Liu TT, et al. The roles of MAPKs in rabbit nucleus pulposus cell apoptosis induced by high osmolality. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(19):2835-2845.
- [26] Wang X, Wang H, Yang H, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ - and interleukin-1 $\beta$ -dependent matrix metalloproteinase-3 expression in nucleus pulposus cells requires cooperative signaling via syndecan 4 and mitogen-activated protein kinase-NF- $\kappa$ B axis: implications in inflammatory disc disease. *Am J Pathol*. 2014;184(9):2560-2572.
- [27] Niu CC, Lin SS, Yuan LJ, et al. Hyperbaric oxygen treatment suppresses MAPK signaling and mitochondrial apoptotic pathway in degenerated human intervertebral disc cells. *J Orthop Res*. 2013;31(2):204-209.
- [28] Huang Y, Li R, Chen X, et al. Doxycycline up-regulates the expression of IL-6 and GM-CSF via MAPK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways in mouse thymic epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(9):1143-1149.
- [29] Bensman TJ, Nguyen AN, Rao AP, et al. Doxycycline exhibits anti-inflammatory activity in CF bronchial epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012;25(5):377-382.
- [30] Hiyama A, Hiraishi S, Sakai D, et al. CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  regulates the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the nucleus pulposus cells. *J Orthop Res*. 2016;34(5):865-875.
- [31] Liu Z, Zhou K, Fu W, et al. Insulin-Like Growth Factor 1 Activates PI3k/Akt Signaling to Antagonize Lumbar Disc Degeneration. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(1):225-232.
- [32] Travascio F, Elmasry S, Asfour S. Modeling the role of IGF-1 on extracellular matrix biosynthesis and cellularity in intervertebral disc. *J Biomech*. 2014;47(10):2269-2276.
- [33] Fang F, Jiang D. IL-1 $\beta$ /HMGB1 signalling promotes the inflammatory cytokines release via TLR signalling in human intervertebral disc cells. *Biosci Rep*. 2016;36(5):e00379.
- [34] Tao H, Wu Y, Li H, et al. BMP7-Based Functionalized Self-Assembling Peptides for Nucleus Pulposus Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(31):17076-17087.
- [35] Ellman MB, Kim J, An HS, et al. Lactoferricin enhances BMP7-stimulated anabolic pathways in intervertebral disc cells. *Gene*. 2013;524(2):282-291.
- [36] Peeters M, Detiger SE, Karfeld-Sulzer LS, et al. BMP-2 and BMP-2/7 Heterodimers Conjugated to a Fibrin/Hyaluronic Acid Hydrogel in a Large Animal Model of Mild Intervertebral Disc Degeneration. *Biores Open Access*. 2015;4(1):398-406.
- [37] Ren XF, Diao ZZ, Xi YM, et al. Adeno-associated virus-mediated BMP-7 and SOX9 in vitro co-transfection of human degenerative intervertebral disc cells. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):3736-3744.
- [38] Wang Z, Hutton WC, Yoon ST. Bone morphogenetic protein-7 antagonizes tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced activation of nuclear factor  $\kappa$ B and up-regulation of the ADAMTS, leading to decreased degradation of disc matrix macromolecules aggrecan and collagen II. *Spine J*. 2014;14(3):505-512.
- [39] Eser B, Eser O, Yuksel Y, et al. Effects of MMP-1 and MMP-3 gene polymorphisms on gene expression and protein level in lumbar disc herniation. *Genet Mol Res*. 2016;15(3).
- [40] Kang YM, Hong SH, Yang JH, et al. Pamidronate Down-regulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induced Matrix Metalloproteinases Expression in Human Intervertebral Disc Cells. *J Bone Metab*. 2016;23(3):165-173.
- [41] Chou PH, Wang ST, Yen MH, et al. Fluid-induced, shear stress-regulated extracellular matrix and matrix metalloproteinase genes expression on human annulus fibrosus cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:34.
- [42] Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol*. 2005;24(6):389-399.
- [43] Ruel N, Markova DZ, Adams SL, et al. Fibronectin fragments and the cleaving enzyme ADAM-8 in the degenerative human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014;39(16):1274-1279.
- [44] Homandberg GA, Costa V, Ummadi V, et al. Antisense oligonucleotides to the integrin receptor subunit  $\alpha$ (5) decrease fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(5):381-393.
- [45] Huang Y, Li R, Chen X, et al. Doxycycline up-regulates the expression of IL-6 and GM-CSF via MAPK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways in mouse thymic epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(9):1143-1149.
- [46] Wang Z, Xue Y, Jiao H, et al. Doxycycline-mediated protective effect against focal cerebral ischemia-reperfusion injury through the modulation of tight junctions and PKC $\delta$  signaling in rats. *J Mol Neurosci*. 2012;47(1):89-100.
- [47] Bensman TJ, Nguyen AN, Rao AP, et al. Doxycycline exhibits anti-inflammatory activity in CF bronchial epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012;25(5):377-382.