

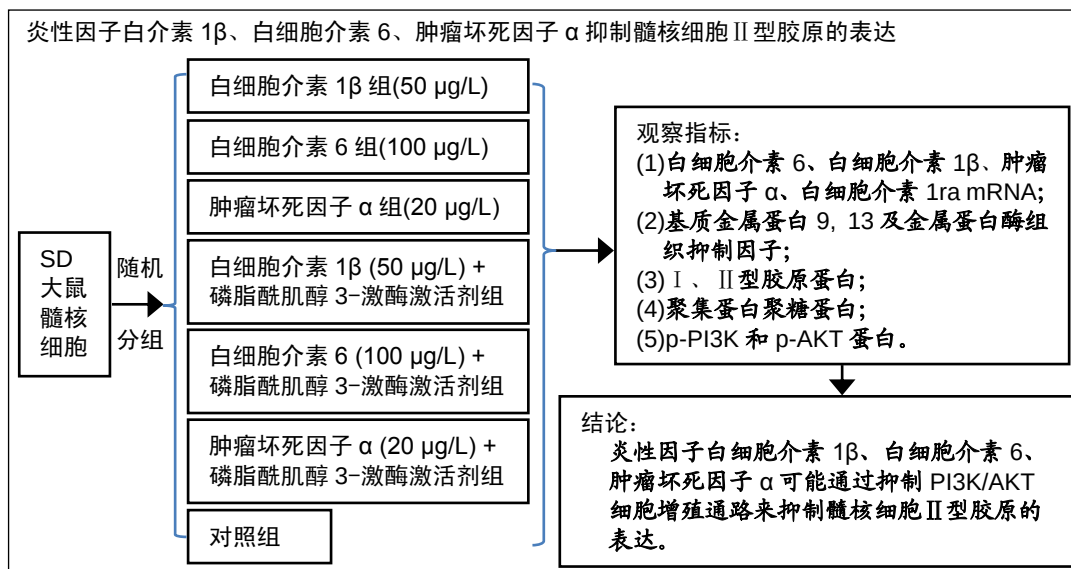
抑制髓核细胞 II 型胶原表达的炎性因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 及肿瘤坏死因子 α

梁卫东, 任周梁, 盛 军, 曹 锐, 盛伟斌(新疆医科大学第一附属医院脊柱外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1748

ORCID: 0000-0002-2532-2335(梁卫东); 0000-0002-3342-2504(任周梁)

文章快速阅读:



梁卫东, 男, 1983 年生, 新疆维吾尔自治区阿勒泰市人, 蒙古族, 2009 年新疆医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨科相关临床及基础研究。

并列第一作者: 任周梁, 男, 1991 年生, 四川省仪陇县人, 汉族, 2016 年新疆医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨科相关临床及基础研究。

通讯作者: 盛伟斌, 博士, 主任医师, 新疆医科大学第一附属医院脊柱外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

文献标识码:B

稿件接受: 2019-02-12

文题释义:

髓核的组成: 发育成熟的髓核是一个由软骨样细胞分散在细胞间质内, 周围围绕着一个比较致密的胶原纤维网的含水球, 位于椎间盘偏后位置, 占椎间盘横断面积的 50%–60%; 由于它的含水量很高, 并和软骨终板紧密接触, 是椎间盘接受经软骨终板主要营养途径渗透交换营养的主要部分。

胶原蛋白 II 型: 胶原蛋白有不同的类型, 目前为止已经发现了几十种。其中 I、III 型主要存在于皮肤血管等结缔组织中; II 型主要由软骨细胞产生, 多存在于骨骼、关节、肌腱等组织; VII 型主要存在于子宫胎盘中。

椎间盘退变: 随着年龄的增长, 髓核、纤维环及软骨终板等椎间盘各个组织的老化退变, 是一系列脊柱退行性疾病的前提和病理基础, 如椎间盘突出、脊柱不稳、神经根病变等。病理表现为椎间盘细胞数量减少和功能降低, 导致聚合蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白进行性减少。

摘要

背景: 炎性因子在椎间盘退变中起着重要的作用, 其抑制 II 型胶原表达机制尚未完全明确。

目的: 探讨炎性因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 对髓核细胞 II 型胶原表达的影响及作用机制。

方法: 成年雄性 SD 大鼠由新疆医科大学动物实验中心提供, 实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号为 IACUC20151203-09)。分离、培养及鉴定 SD 大鼠髓核细胞, 将其随机分为 7 组: ①对照组; ②白细胞介素 1 β (50 μ g/L)组; ③白细胞介素 6(100 μ g/L)组; ④肿瘤坏死因子 α (20 μ g/L)组; ⑤白细胞介素 1 β (50 μ g/L)+740Y-P 组(PI3K 激活剂); ⑥白细胞介素 6(100 μ g/L)+740Y-P 组; ⑦肿瘤坏死因子 α (20 μ g/L)+740Y-P 组; 并进行相应干预。48 h 后收集髓核细胞进行 RT-PCR, Western Blot 检测及免疫荧光染色, 分别检测白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 对髓核细胞中基质金属蛋白/金属蛋白酶组织抑制因子, 炎性因子表达对 I 型、II 型胶原蛋白, 聚集蛋白聚糖以及 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达的影响。

结果与结论: ①白细胞介素 1 β 组和肿瘤坏死因子 α 组中金属蛋白酶组织抑制因子 1 mRNA 表达量明显低于对照组($P < 0.05$); 白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 组中基质金属蛋白酶 9 和基质金属蛋白酶 13 mRNA 表达量明显高于对照组($P < 0.05$); 所有实验干预组中白细胞介素 6 mRNA 表达量明显高于对照组($P < 0.05$); 白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 组中白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α mRNA 表达量明显高于对照组; 白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 组中白细胞介素 1ra 表达量明显低于对照组($P < 0.05$); ②与对照组相比, 白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 组的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖表达明显降低, 而白细胞介素 6 组的则略有降低; 与白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 组相比, 对应的给予 PI3K 激活剂组的表达则明显升高; ③结果表明: 炎性因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 可能通过抑制 PI3K/AKT 细胞增殖通路来抑制髓核细胞 II 型胶原的表达。



Liang Weidong, Master, Attending physician, Department of Spinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Ren Zhouliang, Master, physician, Department of Spinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Liang Weidong and Ren Zhouliang contributed equally to this work.

Corresponding author: Sheng Weibin, MD, Chief physician, Department of Spinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

关键词:

白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α ; 髓核细胞; II型胶原; PI3K/AKT

中图分类号: R446, R318

基金资助:

新疆医科大学第一附属医院内科研基金项目(20152RQN05), 项目负责人: 梁卫东

缩略语:

磷脂酰肌醇3-激酶: phosphatidylinositol3-kinase, PI3K

Interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha inhibit expression of type II collagen in nucleus pulposus cells

Liang Weidong, Ren Zhouliang, Sheng Jun, Cao Rui, Sheng Weibin (Department of Spinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: The role of inflammatory factors in the degeneration of intervertebral discs has received increasing attention. The mechanism by which inflammatory factors inhibit the expression of type II collagen has not been fully elucidated.

OBJECTIVE: To observe the expression of type II collagen in nucleus pulposus cells after intervention with inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the mechanism of action.

METHODS: Adult male Sprague-Dawley rats were provided by the Animal Experimental Center of Xinjiang Medical University, and the study protocol was approved by the Animal Experimental Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (approval No. IACUC20151203-09). Nucleus pulposus cells from rats were isolated, cultured, identified and randomly divided into seven groups: control group, IL-1 β (50 μ g/L) group, IL-6 (100 μ g/L) group, TNF- α (20 μ g/L) group, IL-1 β (50 μ g/L)+740Y-P (a PI3K activator) group, IL-6 (100 μ g/L)+740Y-P group, TNF- α (20 μ g/L)+740Y-P group. After 48 hours of intervention, nucleus pulposus cells were collected. RT-PCR, western blot and immunofluorescence staining were used to detect the effects of IL-1 β , IL-6 and TNF- α on expression of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase, type I and type II collagens, Aggrecan, and PI3K/AKT signaling pathway proteins in nucleus pulposus cells.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in IL-1 β and TNF- α groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The mRNA levels of matrix metalloproteinases-9 and -13 in the IL-1 β , IL-6 and TNF- α groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The expression of IL-6 mRNA in all experimental intervention groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the IL-1 β , IL-6 and TNF- α groups were significantly higher than those in the control group. The expression of interleukin-1ra in the IL-1 β and TNF- α groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). (2) Immunofluorescence results showed that compared with the control group, the expression of type II collagen and Aggrecan significantly decreased in the IL-1 β and TNF- α groups, and slightly decreased in the IL-6 group. Compared with IL-1 β , IL-6 and TNF- α groups, the expression of type II collagen and Aggrecan was significantly increased in the three corresponding PI3K activator groups. These findings indicate that IL-1 β , IL-6 and TNF- α as inflammatory factors may inhibit the expression of type II collagen in nucleus pulposus cells by inhibiting the PI3K/AKT cell proliferation pathway.

Key words: interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α ; nucleus pulposus cells; type II collagen; PI3K/AKT

Funding: Institutional Research Fund Project of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, No. 20152RQN05 (to LWD)

0 引言 Introduction

成人椎间盘退行性疾病的发病率相当高,有70%–80%的人在一生中会经历下腰痛,而在15%能确定病因的下腰痛中,有超过50%的病例是因为腰椎间盘突出性退行性疾病引起^[1-3]。炎性因子在椎间盘退变中的作用越来越受到重视。研究已表明白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 等可以促进髓核细胞的凋亡,特别是白细胞介素1 β 作为细胞外白细胞介素1的主要形式,是炎性反应发生的关键中心环节,有促进炎性形成的作用,可通过诱导细胞因子及炎性因子来介导炎性反应,诱导白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 、PGE2及白细胞介素1 α 等合成释放^[4-7],同时可通过p38/MAPK通路诱导髓核细胞的凋亡,从而使II型胶原表达降低^[8-10]。然而,目前对于炎性因子抑制II型胶原表达的机制尚未完全明确。研究假设炎性因子白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 通过抑制磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3K)/AKT髓核细胞增殖通路,达到抑制II型胶原表达的作用,拟从细胞和分子水平

证实这一假设。此外,白细胞介素6既有抗炎也有促炎作用,其抑制髓核细胞增殖的能力是否与其他2种炎性因子一致,尚需实验进一步证实。因此,研究的目的是观察髓核细胞II型胶原的表达情况,探讨炎性因子白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 对其表达的作用及可能机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞形态学、分子生物学观察实验。

1.2 时间及地点 2017年1至11月在新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康成年雄性SD大鼠10只,鼠龄4–6周,体质量200–250 g,由新疆医科大学动物实验中心提供,许可编号: SCXK(新)20032001。实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号为IACUC20151203-09),根据委员会提供的指南进行动物和细胞实验。

1.3.2 实验用主要试剂及仪器 Western-Blot相关一抗、二抗(美国Abcam公司); PVDF膜(美国Merck公司); D/F12培养基(美国Hyclone公司); II型胶原(中国北京博奥森公司); 白细胞介素6、白细胞介素1 β 、肿瘤坏死因子 α (美国Peprotech公司); 740Y-P(美国APEXBIO公司); 聚集蛋白聚糖(中国北京博奥森公司); SYBRGreen PCR试剂盒、反转录试剂盒(美国Thermo公司); BCA蛋白定量试剂盒(武汉Biosharp公司); 细胞培养箱(美国Thermo公司); 倒置荧光显微镜IX71(美国OLYMPUS公司); 低温冷冻离心机(美国Sigma 3K15); Real-time检测仪(美国ABI-7500); 所有引物(表1)由上海生工生物工程股份有限公司设计并生产。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列
白细胞介素 1 β (Rat)-RT-F:	TGT GAT GTT CCC ATT AGA C
白细胞介素 1 β (Rat)-RT-R:	AAT ACC ACT TGT TGG CTT A
白细胞介素 6(Rat)-RT-F:	AAA CCC TAG TTC ATA TCT TC
白细胞介素 6(Rat)-RT-R:	CTT AGC CAC TCC TTC TGT
肿瘤坏死因子 α (Rat)-RT-F:	CAA ACC ACC AAG CAG AGG
肿瘤坏死因子 α (Rat)-RT-R:	GGT ATG AAA TGG CAA ATC G
基质金属蛋白酶 13(Rat)-RT-F:	CCC CTT CCC TAT GGT GAT
基质金属蛋白酶 13(Rat)-RT-R:	AAG CCA AAG AAA GAC TGC
基质金属蛋白酶 9(Rat)-RT-F:	CCC TAC TGC TGG TCC TTC T
基质金属蛋白酶 9(Rat)-RT-R:	TTG GCT TCC TCC GTG ATT
白细胞介素 1ra(Rat)-RT-F:	TCA TCC TTC TGT TTC GTT
白细胞介素 1ra(Rat)-RT-R:	TTG GTA TTT GGT CCT TGT A
金属蛋白酶组织抑制因子 1(Rat)-RT-F:	TCT GGC ATC CTC TTG TTG
金属蛋白酶组织抑制因子 1(Rat)-RT-R:	CGC TGG TAT AAG GTG GTC T
GAPDH(Rat)-RT-F:	ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC
GAPDH(Rat)-RT-R:	TTT GAG GGT GCA GCG AAC TT

1.4 实验方法

1.4.1 原代髓核细胞的分离、培养及鉴定

(1)髓核细胞的分离、培养: 用氯胺酮和甲苯噻嗪腹腔注射处死5只SD大鼠, 乙醇喷湿消毒, 将鼠的背部皮肤剪开, 取下一整根脊柱放入培养基中, 将脊柱的软骨环取下来放入新的培养基中, 从软骨环中取下髓核组织放入加有培养基的离心管中, 待将髓核组织全部取下之后, 用培养基清洗2次, 再加入混合胶原酶37℃进行消化, 15-30 min期间显微镜下观察消化的进程, 待细胞消化好之后, 1 500 r/min离心5 min, 离心之后将上清吸出来, 沉淀用D/F12完全培养基培养。细胞传至第1, 2代进行实验。

(2)II型胶原鉴定髓核细胞: 髓核细胞爬片, PBS漂洗3次之后, 40 g/L多聚甲醛固定10 min。内源过氧化物酶灭活; 体积分数3% H_2O_2 /PBS室温孵育10 min, PBS漂洗5 min, 重复3次。10%FBS封闭, 室温15 min。加入II型胶原抗体, 4℃孵育过夜。洗片: 用1 mL移液枪在切片表面加2 mL PBS洗涤, 重复3次, 每次5 min。将CY3标记二抗滴至切片上, 每片1滴, 37℃孵育30 min。PBS漂洗3次, 5 min/次; 室温避光孵育Hoechst 15 min。封固, 荧光显微镜下观察。

髓核细胞培养及鉴定

细胞来源:	细胞来源于 SD 大鼠髓核组织, SD 大鼠由新疆医科大学动物实验中心提供
细胞培养基:	D/F12 完全培养基
添加材料:	髓核细胞用混合胶原酶消化 15-30 min
细胞传代:	细胞传至第 1, 2 代进行实验
细胞鉴定:	通过检测 II 型胶原表达鉴定髓核细胞
伦理学批准:	实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号为 IACUC20151203-09)

1.4.2 细胞分组及RT-PCR检测各因子的mRNA表达

(1)细胞分组: 48 h后收集髓核细胞, 将其随机分为7组: ①对照组; ②白细胞介素1 β (50 μ g/L)组; ③白细胞介素6(100 μ g/L)组; ④肿瘤坏死因子 α (20 μ g/L)组; ⑤白细胞介素1 β (50 μ g/L)+740Y-P组(PI3K激活剂); ⑥白细胞介素6(100 μ g/L)+740Y-P组; ⑦肿瘤坏死因子 α (20 μ g/L)+740Y-P组。

(2)RT-PCR检测各组金属蛋白酶组织抑制因子1、基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶13、白细胞介素6、白细胞介素1 β 、白细胞介素1ra、肿瘤坏死因子 α mRNA的表达: 上述分组细胞长满后, 将培养皿中旧培养液丢弃, 加入1 mL的1 $\times$ PBS清洗1 min后弃去, 加入1 mL 0.25%胰蛋白酶消化1 min, 收集细胞, 1 000 r/min离心5 min, 收集沉淀; 沉淀细胞中分别加入相应量的Trizol裂解液裂解细胞, 吹打混匀并转移到无RNA酶的离心管中, 室温放置5 min, 向离心管中加入预冷的氯仿(200 μ L氯仿/1 mL Trizol), 剧烈振荡15 s, 室温放置10 min, 离心(4℃, 12 000 $\times$ g) 15 min; 小心吸出上层水相约500 μ L转移至无RNA酶的离心管中, 加入等体积(500 μ L)的异丙醇, 颠倒混匀6-8次, -20℃冰箱放置30 min, 4℃, 10 000 $\times$ g离心15 min, 可见RNA沉淀; 弃上清, 650 μ L体积分数75%乙醇(75%乙醇的配置: 1倍的DEPC处理水加3倍的无水乙醇)洗涤沉淀, 4℃, 8 000 r/min, 离心5 min, 弃上清。重复前一步骤1遍, 弃上清, 吸净残存乙醇, 自然干燥5-10 min; 20 μ L DEPC处理水, 溶解RNA, -20℃冰箱保存待用。

反转录cDNA: 将经过稀释后的RNA样本进行RT, 反应体系如下: 5 $\times$ 反转录buffer 4 μ L, RT引物0.5 μ L, 下游通用引物0.5 μ L, dNTPs 0.5 μ L, 反转录酶MMLV 1 μ L, DEPC处理水10 μ L, RNA模板4 μ L, 总体积20 μ L。反应条件: 37℃ 1 h; 95℃ 5 min。灭活MMLV。qRT-PCR: 将制备好的cDNA进行PCR扩增, 扩增体系如下: SYBRGreen Mix 12.5 μ L, 上游引物F 0.5 μ L, 下游引物R 0.5 μ L, ddH₂O水14.5 μ L, cDNA模板2 μ L, 总体积30 μ L。扩增条件: 94℃ 10 min, (94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 20 s) 40个循环。反应结束后, 根据扩增曲线和熔解曲线判断反应质量, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法鉴定相应每组mRNA的表达量,

与对照组对照分析统计学意义。数据采用仪器自带软件分析: ABI Prism 7500 SDS Software。

1.4.3 Western Blot检测 各组 I 型胶原、II 型胶原、基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶13、聚集蛋白聚糖以及 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的表达 48 h 后收集髓核细胞, 随机分为7组(细胞分组同1.4.2)。用预冷的已加PMSF的RIPA裂解液混匀, 充分裂解髓核细胞、离心取上清, 进行蛋白质定量后贮存于-80 °C 冰箱。根据样品数量, 将BCA试剂A与试剂B按体积比为50:1配制适量BCA工作液, 充分混匀; 各孔加入200 μ L BCA工作液; 把酶标板放在振荡器上振荡30 s, 37 °C 放置30 min, 然后在562 nm下测定吸光度。根据所测样品的吸光值, 在标准曲线上即可查得相应的蛋白浓度(g/L)。

PAGE胶的制备后, 每孔上样量为20 μ g蛋白, 可以根据实验要求加大上样量。根据蛋白定量结果取所需蛋白加入适量上样缓冲液, 沸水浴10 min后离心取上清上样。将配制好的PAGE胶放入电泳槽中, 加入适量电泳缓冲液, 取下梳子用枪轻轻吹打加样孔, 避免孔内有余胶残留影响上样。将准备好的样品用加样枪慢慢加到对应的孔内, 注意勿溢出加样孔。一般浓缩胶80 V 20 min, 分离胶120 V 60 min。当染料到达胶底部时切断电源, 停止电泳, 进行下一步转膜。将胶小心的移入转膜缓冲液中, 剪下同样大小的PVDF膜, 以甲醇浸泡3 min, 然后水洗2 min, 剪下同样大小的6块滤纸与PVDF膜, 在转膜缓冲液中平衡15 min。在转膜装置上从负极到正极放置垫片、滤纸、胶、膜、滤纸、垫片, 除去气泡。恒流200 mA, 40 min左右。为检测转膜是否成功, 可用丽春红染色, 丽春红染色工作液: 2%的丽春红贮备液1:10稀释, 即加9倍的ddH₂O。染色方法: 将膜放入TBST洗1次, 再置于丽春红染色工作液中, 在室温下摇动染色5 min, 大量的水洗膜直至水变清无色蛋白条带清晰(膜也可以用TBST或水重新洗后再进行染色)PVDF膜需用甲醇再活化后用TBST洗后进行封闭。封闭: 5% BSA室温封闭1 h或4 °C 过夜。一抗: 抗体加入封闭液中稀释到所需浓度, 和膜孵育4 °C 孵育过夜。二抗: 孵育一抗的膜用TBST洗涤3次, 每次5 min。随后根据用量, 按照1:5 000稀释二抗, 与膜37 °C 孵育1 h。用TBST洗涤3次, 每次5 min。一体式化学发光仪拍摄照片。

1.4.4 细胞免疫荧光观察 各组 II 型胶原和聚集蛋白聚糖表达情况 髓核细胞爬片, PBS漂洗3次之后, 40 g/L多聚甲醛固定10 min。内源过氧化物酶灭活; 体积分数3% H₂O₂/PBS室温孵育10 min, PBS漂洗5 min, 重复3次。将切片浸入抗原修复液中(柠檬酸三钠缓冲液)中, 96 °C 5 min。用1 mL移液器在切片表面加2 mL PBS洗涤, 重复3次, 每次5 min。10% FBS封闭, 室温15 min。加入II型胶原抗体或者聚集蛋白聚糖抗体, 4 °C 孵育过夜。洗片: 用1 mL移液枪在切片表面加2 mL PBS洗涤, 重复3次, 每次5 min。将CY3标记二抗滴至切片上, 每片1滴, 37 °C 孵育30 min。

PBS漂洗3次, 5 min/次; 室温避光孵育Hoechst 15 min。封固, 荧光显微镜下观察。

1.5 主要观察指标 ①髓核细胞培养结果及免疫荧光染色情况; ②金属蛋白酶组织抑制因子1、基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶13、白细胞介素6、白细胞介素1 β 、白细胞介素1ra、肿瘤坏死因子 α mRNA的表达情况; ③ I 型胶原、II 型胶原、基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶13、聚集蛋白聚糖以及p-PI3K和p-AKT的表达。

1.6 统计学分析 实验应用 $\bar{x} \pm s$ 形式描述所有数据, 应用SPSS 19.0(美国IBM公司)统计软件处理和分析。2组比较采用独立样本t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 髓核细胞分离、培养及鉴定结果 椎间盘组织中分离培养存在一定数量髓核细胞, 经原代消化, 48 h后细胞贴壁生长, 呈梭形, 见图1。II型胶原免疫荧光染色显示: 分离得到的髓核细胞高表达II型胶原, 见图2。

2.2 RT-PCR检测 各组髓核细胞中基质金属蛋白酶、金属蛋白酶组织抑制因子、炎症因子的mRNA表达 结果显示, 白细胞介素1 β 组和肿瘤坏死因子 α 组中金属蛋白酶组织抑制因子1 mRNA表达量明显低于对照组($P < 0.05$), 白细胞介素1 β +740Y-P组和肿瘤坏死因子 α +740Y-P组分别高于白细胞介素1 β 组与肿瘤坏死因子 α 组。说明在白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 的作用下, 髓核细胞中金属蛋白酶组织抑制因子1 mRNA表达水平明显下降, 在740Y-P (PI3K激活剂)的参与下, 表达则升高。见表2。

白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 组中基质金属蛋白酶9和基质金属蛋白酶13 mRNA表达量明显高于对照组($P < 0.05$), 白细胞介素1 β +740Y-P组、白细胞介素6+740Y-P组和肿瘤坏死因子 α 组+740Y-P组分别低于白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 组。说明髓核细胞在白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的作用下, 髓核细胞中基质金属蛋白酶9和基质金属蛋白酶13 mRNA表达水平明显升高, 其中白细胞介素6作用组升高的幅度较小, 在740Y-P的参与下, 表达则有所下降, 见表2。

所有实验干预组中白细胞介素6 mRNA表达量明显高于对照组($P < 0.05$), 且白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 组分别高于白细胞介素1 β +740Y-P组、白细胞介素6+740Y-P组和肿瘤坏死因子 α 组+740Y-P组。说明在白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的作用下, 髓核细胞中白细胞介素6 mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$), 在740Y-P的参与下, 表达则有所下降。

白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 组中白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α mRNA表达量明显高于对照组($P < 0.05$), 且分别低于白细胞介素1 β +740Y-P组、白细胞介素6+740Y-P组和肿瘤坏死因子 α 组+740Y-P组, 说明在白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的作用

下,髓核细胞中白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α mRNA表达水平明显升高,其中白细胞介素6作用组升高的幅度较小,在740Y-P的参与下,表达则有所下降。

白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 组中白细胞介素1ra 表达量明显低于对照组($P < 0.05$),分别低于白细胞介素1 β +740Y-P组和肿瘤坏死因子 α 组+740Y-P组,说明在白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 的作用下,髓核细胞中白细胞介素1ra mRNA的表达水平明显降低($P < 0.05$),在740Y-P的参与下,表达则有所升高,而白细胞介素6作用组无明显变化。

2.3 Western Blot检测各组髓核细胞中 I 型、II 型胶原蛋白、聚集蛋白聚糖蛋白及PI3K/AKT信号通路蛋白的表达结果显示,髓核细胞在白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的作用下, I 型胶原、基质金属蛋白酶9和基质金属蛋白酶13蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$),其中白细胞介素6作用组升高的幅度较小,在740Y-P的参与下,表达则有所下降。在白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 的作用下, II 型胶原和聚集蛋白聚糖蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),其中白细胞介素6组无明显影响,在740Y-P的参与下,表达则有所升高, p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),其中白细胞介素6组对p-PI3K和p-AKT的影响不大,在740Y-P的参与下,表达则有所升高。见图3。

2.4 细胞免疫荧光观察各组髓核细胞中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的表达与对照组相比,白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 组的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖表达明显降低,而白细胞介素6组中则略有降低;与白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 组相比,在给予740Y-P(PI3K激动剂)组中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的表达则明显升高,见图4。说明激活PI3K/AKT增殖通路可促进髓核细胞 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的表达。

3 讨论 Discussion

椎间盘退变是颈椎病与椎间盘源性下腰痛的主要原因,常导致颈肩痛、腰腿痛等临床症状,严重影响患者生活质量^[11-13]。研究发现炎性因子在椎间盘退变过程中扮演重要角色,并与椎间盘退变的发生发展密切相关^[14]。椎间盘稳态的破坏是导致椎间盘退变的首要原因,最终导致临床病理状态。椎间盘位于上下椎体之间,由髓核、纤维环和上下软骨终板组成。髓核呈高度水化状态,水分含量占自身质量的80%,其内含大量聚蛋白聚糖,蛋白聚糖, II 型胶原蛋白以及少量VI、IX、XI型胶原蛋白^[15-17]。椎间盘内稳态的维持主要体现在结构的完好及分解与合成代谢的平衡,一旦稳态平衡被打破,即发生病理改变,却往往伴随着炎症反应的发生,炎性因子刺激椎间盘细胞产生基质金属蛋白酶,进一步使基质降解,髓核细胞凋亡^[18-20]。

近来研究发现,白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 等被公认为是与椎间盘退行性变相关的最重要

的炎性细胞因子^[21-23]。其中,白细胞介素1 β 是白细胞介素1家族成员之一,通过诱导细胞因子及炎性因子来介导炎性反应,可诱导白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 、前列腺素E2、环氧化酶2及白细胞介素1 α 等合成释放。在人的椎间盘中,退变的程度越重,白细胞介素1的免疫染色阳性率越高^[24]。白细胞介素6是重要的炎性促进剂,可刺激炎性细胞聚集、激活和炎性介质的释放,促进椎间盘退变的炎性过程,同时兼具抗炎的作用^[25-26]。肿瘤坏死因子 α 参与炎性反应的全部过程,在炎性局部血管通透性增加、白细胞附壁、渗出和致病因子消除等过程中均起到促进作用,此外,可以加剧蛋白多糖和胶原的降解或减少其合成,使椎间盘主要表现为髓核中蛋白多糖的减少及胶原强度的降低,从而促进了椎间盘退变^[27]。该研究采用白细胞介素1 β 、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素6这3种炎性因子来诱导髓核细胞凋亡,通过检测细胞基质中蛋白聚糖和 I 型、II 型胶原蛋白表达,以及基质金属蛋白酶和金属蛋白酶组织抑制因子,这2个细胞外基质合成和降解调节中的重要组成成分,来证实炎性因子对髓核细胞退变的作用。该研究发现炎性因子可促进髓核细胞的凋亡、抑制 II 型胶原蛋白的表达,这与大多数研究结果一致,但有关机制尚未完全明确。

以往的机制研究主要集中在介导应激反应中的细胞凋亡通路^[28-32],如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)和应激活化蛋白激酶/c-Jun氨基末端激酶(stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase, JNK/SAPK)这2条信号转导途径,并且Studer等^[8-10]研究已证实炎性因子如肿瘤坏死因子 α 可通过P38/MAPK和P-JNK/SAPK途径导致人髓核细胞凋亡,但随着研究的进一步深入,细胞增殖通路在炎性反应中的作用越来越受重视。PI3K/AKT信号通路参与细胞多重生命活动的关键细胞信号通路^[33-37],在细胞增殖和肿瘤的发展进程中起着重要作用,但其在椎间盘细胞退变中的作用尤其是对髓核细胞增殖影响的研究鲜有报道。该研究在之前的基础上外源性给予PI3K/AKT增殖通路激活剂740Y-P,并且验证了其可逆转炎性因子抑制髓核细胞增殖的这一过程。结果发现,白细胞介素1 β 、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素6可抑制髓核细胞 II 型胶原的表达,其中白细胞介素6的作用不如其余二者,而在PI3K激活剂740Y-P的参与下, II 型胶原、聚集蛋白聚糖、p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平明显升高, I 型胶原、基质金属蛋白酶9和基质金属蛋白酶13蛋白表达水平明显降低。因此推测炎性因子可能通过抑制髓核细胞增殖使 II 型胶原的表达减少;通过外源性激活PI3K/AKT增殖信号通路,可促进髓核细胞的增殖和 II 型胶原的产生,也证实了以上的发现。

综上所述,炎性因子白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 可能通过抑制PI3K/AKT细胞增殖通路来抑制髓核细胞 II 型胶原的表达,从而使椎间盘发生退变。由

于研究仅为细胞实验结果，下一步研究将从人体椎间盘病理标本着手验证这一结论，为研究椎间盘退变炎性相关的分子生物学机制提供理论基础。

作者贡献: 实验设计为梁卫东，采用单盲评估；实验实施、资料收集、数据统计为任周梁、曹锐；文章撰写为梁卫东、任周梁；审核为盛军、盛伟斌。

经费支持: 该文章接受了“新疆医科大学第一附属医院内科科研基金项目(20152RQN05)”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。

机构伦理问题: 实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号为 IACUC20151203-09)，根据委员会提供的指南进行动物和细胞实验。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在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。

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

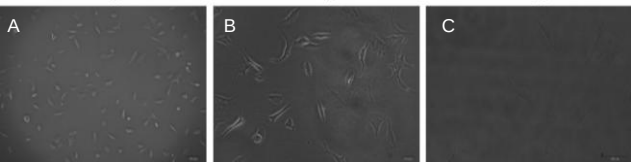
- [1] McCarron RF, Wimpee MW, Hudkins PG et al. The inflammatory effect of nucleus pulposus. A possible element in the pathogenesis of low-back pain. *Spine*. 1987;12(8):760-764.
- [2] Kalichman L, Hunter DJ. The genetics of intervertebral disc degeneration: Familial predisposition and heritability estimation. *Joint Bone Spine*. 2008;75:383-387.
- [3] Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. *Eur Spine J*. 2008; 17(Suppl 4): 441-451.
- [4] Shamji MF, Setton LA, Jarvis W, et al. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues. *Arthritis Rheum*. 2010;62(7): 1974-1982.
- [5] Studer RK, Vo N, Sowa G, et al. Human nucleus pulposus cells react to IL-6: independent actions and amplification of response to IL-1 and TNF- α . *Spine*. 2011; 36(8):593-599.
- [6] Scheller J, Garbers C, Rose-John S. Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol*. 2013;11:002.
- [7] Shen Jieliang, Xu Shengxi, Zhou Hao et al. IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. *Sci Rep*. 2017; 7: 41067.
- [8] Studer RK, Gilbertson LG, Georgescu H, et al. p38 MAPK inhibition modulates rabbit nucleus pulposus cell response to IL-1. *Orthop. Res*. 2008; 26(7): 991-998.
- [9] Mwale F, Wang HT, Zukor DJ et al. Effect of a Type II Collagen Fragment on the Expression of Genes of the Extracellular Matrix in Cells of the Intervertebral Disc. *Open Orthop J*. 2008;2:1-9.
- [10] Gorth DJ, Mauck RL, Chiaro JA, et al. IL-1ra delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres attenuates IL-1 β -mediated degradation of nucleus pulposus in vitro. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4): R179.
- [11] Cuéllar JM, Borges PM, Cuéllar VG, et al. Cytokine expression in the epidural space: a model of noncompressive disc herniation-induced inflammation. *Spine*. 2013; 38(1): 17-23.
- [12] Studer RK, Aboka AM, et al. p38 MAPK inhibition in nucleus pulposus cells: a potential target for treating intervertebral disc degeneration. *Spine*. 2007; 32(25): 2827-2833.
- [13] Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(1):5-10.
- [14] Vergroesen PP, Kingma I, Emanuel KS, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(7):1057-1070.
- [15] Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;386(9995):743-800.
- [16] Willems N, Tellegen AR, Bergknot N, et al. Inflammatory profiles in canine intervertebral disc degeneration. *BMC Vet. Res*. 2016;12:10.
- [17] Gu SX, Li X, Hamilton JL, et al. MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc. *Gene*. 2015; 555(2): 80-87.
- [18] Zhou T, Lin H, Cheng Z, et al. Mechanism of microRNA-146a-mediated IL-6/STAT3 signaling in lumbar intervertebral disc degeneration. *Exp Ther Med*. 2017, 14(2): 1131-1135.
- [19] Yang H, Gao F, Li X, et al. TGF- β 1 antagonizes TNF- α induced up-regulation of matrix metalloproteinase 3 in nucleus pulposus cells: role of the ERK1/2 pathway. *Connect. Tissue Res*. 2015; 56(6): 461-468.
- [20] Freemont AJ. Keep up the heat on IL-1. *Blood*. 2012; 120(13): 2538-2539.
- [21] Croker BA, Kiu H, Roberts AW. IL-6 promotes acute and chronic inflammatory disease in the absence of SOCS3. *Immunol Cell Biol*. 2012;90 (1):124-129.
- [22] Hiyama A, Yokoyama K, Nukaga T, et al. A complex interaction between Wnt signaling and TNF- α in nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6): R189.
- [23] Holm S, Mackiewicz Z, Holm AK et al. Pro-inflammatory, pleiotropic, and anti-inflammatory TNF- α , IL-6, and IL-10 in experimental porcine intervertebral disk degeneration. *Vet. Pathol*. 2009; 46(6): 1292-300.
- [24] Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1. *Orthop. Res*. 2014; 32(4): 551-556.
- [25] Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1beta and TNFalpha expression profile. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(4): R77.
- [26] Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1beta and TNF alpha expression profile. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(4):R77.

表 2 RT-PCR 检测各组髓核细胞金属蛋白酶组织抑制因子 1、基质金属蛋白酶 9、基质金属蛋白酶 13、白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1ra mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$, 相对表达量)

Table 2 Relative expression levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-9, matrix metalloproteinase-13, interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-1ra mRNA in each group of nucleus pulposus cells

指标	·对照组	白细胞介素 1 β 组	白细胞介素 6 组	肿瘤坏死因子 α 组	白细胞介素 1 β + 740Y-P 组	白细胞介素 6+ 740Y-P 组	肿瘤坏死因子 α + 740Y-P 组
金属蛋白酶组织抑制因子 1	1.003 $\pm$ 0.096	0.557 $\pm$ 0.025 ^b	0.894 $\pm$ 0.058	0.668 $\pm$ 0.035 ^b	0.819 $\pm$ 0.065	0.982 $\pm$ 0.021	0.848 $\pm$ 0.110
基质金属蛋白酶 13	1.000 $\pm$ 0.029	2.396 $\pm$ 0.078 ^b	1.259 $\pm$ 0.093 ^b	2.129 $\pm$ 0.039 ^b	1.365 $\pm$ 0.080 ^b	1.066 $\pm$ 0.076	1.152 $\pm$ 0.043 ^b
基质金属蛋白酶 9	1.000 $\pm$ 0.224	2.863 $\pm$ 0.274 ^b	1.347 $\pm$ 0.016 ^b	2.633 $\pm$ 0.046 ^b	1.699 $\pm$ 0.178 ^b	1.091 $\pm$ 0.077	1.285 $\pm$ 0.069 ^b
白细胞介素 6	1.000 $\pm$ 0.021	3.445 $\pm$ 0.183 ^b	3.133 $\pm$ 0.162 ^b	3.205 $\pm$ 0.059 ^b	2.133 $\pm$ 0.037 ^b	1.932 $\pm$ 0.048 ^b	2.045 $\pm$ 0.132 ^b
白细胞介素 1 β	1.000 $\pm$ 0.028	3.265 $\pm$ 0.094 ^b	1.636 $\pm$ 0.143 ^b	3.102 $\pm$ 0.069 ^b	1.858 $\pm$ 0.053 ^b	1.232 $\pm$ 0.037 ^b	1.806 $\pm$ 0.133 ^b
白细胞介素 1ra	0.370 $\pm$ 0.062	0.371 $\pm$ 0.062 ^b	0.851 $\pm$ 0.078	0.454 $\pm$ 0.102 ^b	0.654 $\pm$ 0.066 ^b	0.972 $\pm$ 0.102	0.794 $\pm$ 0.077 ^a
肿瘤坏死因子 α	1.000 $\pm$ 0.024	3.169 $\pm$ 0.130 ^b	1.498 $\pm$ 0.132 ^b	3.261 $\pm$ 0.198 ^b	1.776 $\pm$ 0.104 ^b	1.121 $\pm$ 0.047 ^a	1.915 $\pm$ 0.067 ^b

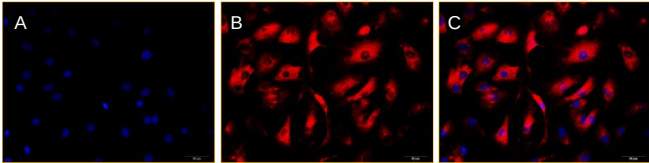
表注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。



图注：图 A, B, C 分别为 $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ 。结果显示，细胞贴壁生长，呈梭形。

图 1 大鼠髓核细胞体外培养 48 h 后明场照片

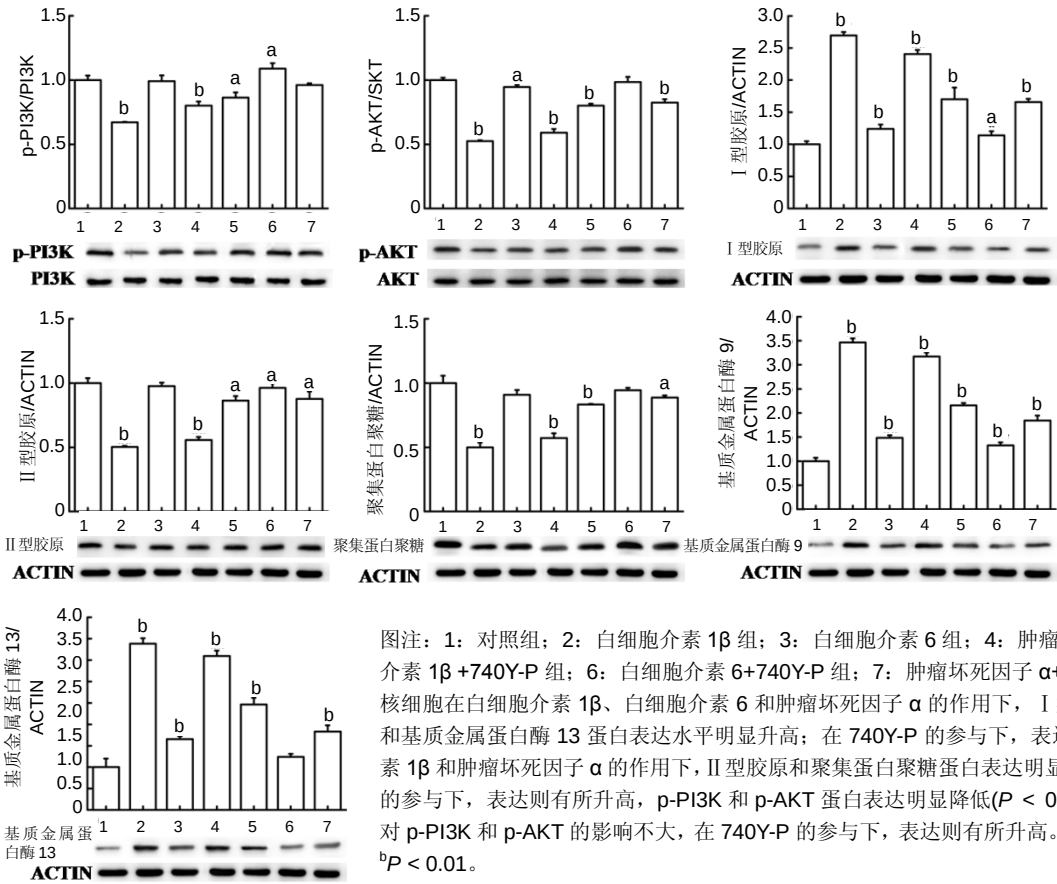
Figure 1 Photos of nucleus pulposus cells in bright field at 48 hours of culture



图注：图 A, B, C 分别为 Hoechst 染色、II 型胶原染色、Merge 图。结果可见，髓核细胞内高表达 II 型胶原。

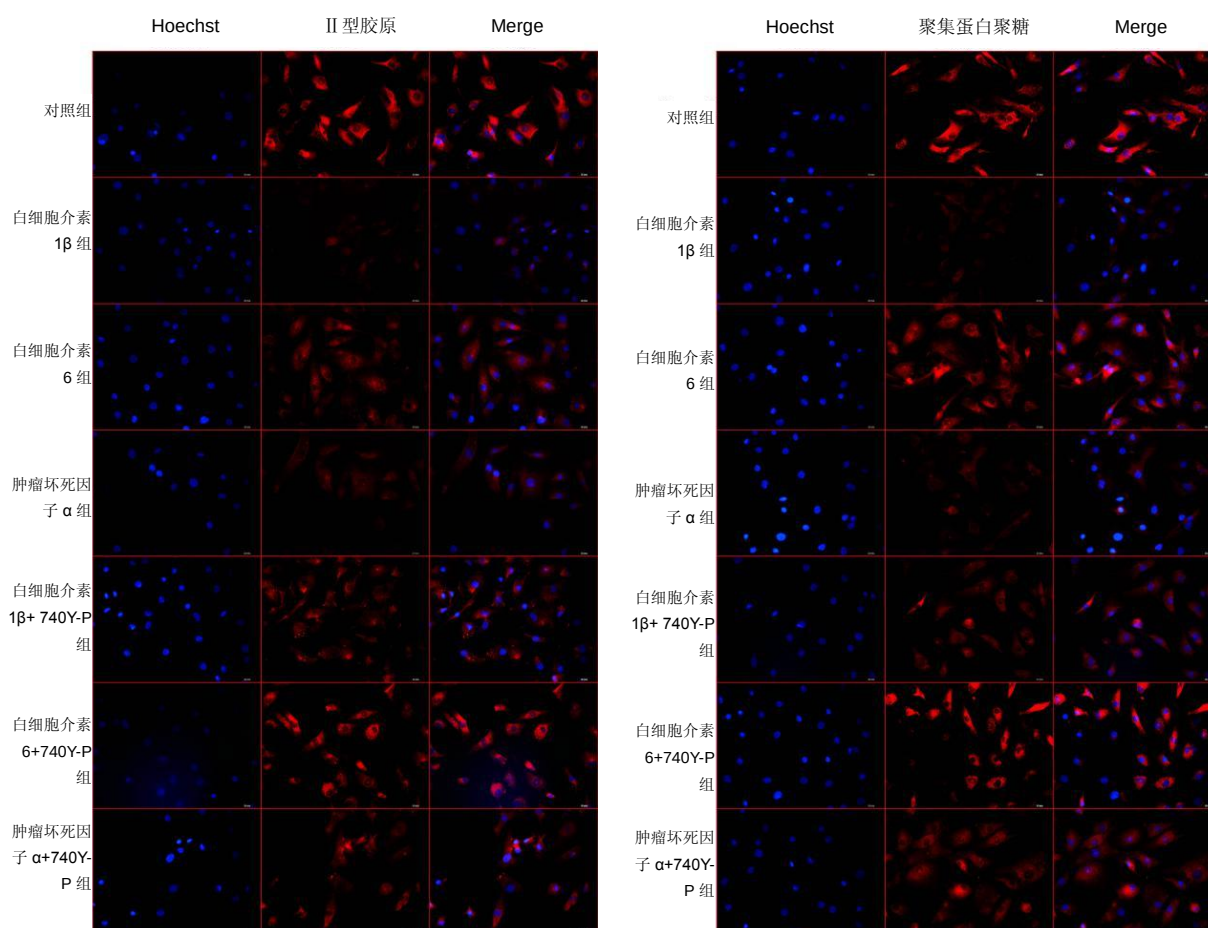
图 2 大鼠髓核细胞 II 型胶原免疫荧光染色结果

Figure 2 Immunofluorescence staining of type II collagen in nucleus pulposus cells



图注：1：对照组；2：白细胞介素 1 β 组；3：白细胞介素 6 组；4：肿瘤坏死因子 α 组；5：白细胞介素 1 β + 740Y-P 组；6：白细胞介素 6 + 740Y-P 组；7：肿瘤坏死因子 α + 740Y-P 组。结果显示，髓核细胞在白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的作用下，I 型胶原、基质金属蛋白酶 9 和基质金属蛋白酶 13 蛋白表达水平明显升高；在 740Y-P 的参与下，表达则有所下降。在白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的作用下，II 型胶原和聚集蛋白聚糖蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)；在 740Y-P 的参与下，表达则有所升高，p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)，其中白细胞介素 6 组对 p-PI3K 和 p-AKT 的影响不大，在 740Y-P 的参与下，表达则有所升高。与对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。

图 3 各组髓核细胞 I 型胶原、基质金属蛋白酶 9 和基质金属蛋白酶 13、II 型胶原和聚集蛋白聚糖、以及 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的相对表达量
Figure 3 Changes in relative expression levels of type I collagen, matrix metalloproteinase-9, matrix metalloproteinase-13, type II collagen, Aggrecan, p-PI3K and p-AKT in nucleus pulposus cells in each group



图注：与对照组相比，白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 组的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖表达明显降低，而白细胞介素 6 组中则略有降低；在给予 740Y-P(PI3K 激动剂)组中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的表达则明显升高。

图 4 各组髓核细胞中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖免疫荧光染色结果

Figure 4 Immunofluorescence staining of type II collagen and Aggrecan in nucleus pulposus cells in each group

- [27] Jiang L, Zhang X, Zheng X, et al. Apoptosis, senescence, and autophagy in rat nucleus pulposus cells: implications for diabetic intervertebral disc degeneration. J Orthop Res. 2013; 31(5): 692-702.
- [28] Chen ZH, Jin SH, Wang MY, et al. Enhanced NLRP3, caspase 1, and IL 1 β levels in degenerate human intervertebral disc and their association with the grades of disc degeneration. Anat Rec(Hoboken).2015;298(4):720-726.
- [29] Yang W, Yu XH, Wang C, et al. Interleukin-1 β in intervertebral disk degeneration. Clin Chim Acta. 2015; 450: 262-272.
- [30] Phillips KL, Jordan Mahy N, Nicklin MJ, et al. Interleukin 1 receptor antagonist deficient mice provide insights into pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. Ann Rheum Dis.2013;72(11):1860-1907.
- [31] Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Increased IL 17 expression in degenerated human discs and increased production in cultured annulus cells exposed to IL 1 β and TNF α . Biotech Histochem.2013;88(6):302-310.
- [32] Cai F, Zhu L, Wang F, et al. The Paracrine Effect of Degenerated Disc Cells on Healthy Human Nucleus Pulposus Cells Is Mediated by MAPK and NF- κ B Pathways and Can Be Reduced by TGF- β 1. DNA Cell Biol. 2017; 36: 143-158.
- [33] Wang C, Yu XH, Yan Y, et al. Tumor necrosis factor- α : a key contributor to intervertebral disc degeneration. Acta Biochim. Biophys Sin. 2017;49:1-13.
- [34] Cornejo MC, Cho SK, Giannarelli C, et al. Soluble factors from the notochordal rich intervertebral disc inhibit endothelial cell invasion and vessel formation in the presence and absence of pro inflammatory cytokines. Osteoarthritis Cartilage.2015;23(3):487 - 496.
- [35] Yang H, Liu H, Li X, et al. TNF- α and TGF- β 1 regulate Syndecan-4 expression in nucleus pulposus cells: role of the mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways. Connect Tissue Res.2015; 56: 281-287.
- [36] Wang WJ, Yu XH, Wang C, et al. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. Clin Chim Acta. 2015; 448: 238-246.
- [37] Walter BA, Likhithpanichkul M, Illien Junger S, et al. TNF- α transport induced by dynamic loading alters biomechanics of intact intervertebral discs. PLoS One.2015;10(3):e0118358.