

白细胞介素 1 β 调控信号素 3A 表达诱发椎间盘退变的机制

黄杰^{1,2}, 蒋强², 韩嘉恒^{1,2}, 刘江², 张燕², 卢正操², 丁宇^{1,2}

<https://doi.org/10.12307/2024.397>

投稿日期: 2023-05-26

采用日期: 2023-07-08

修回日期: 2023-07-29

在线日期: 2023-08-10

中图分类号:

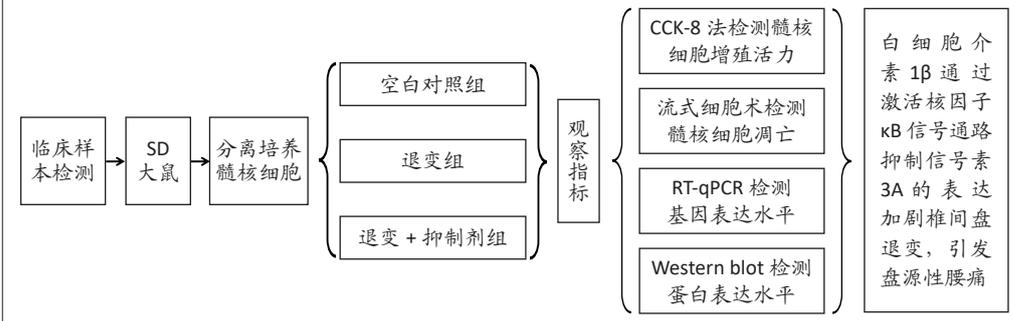
R459.9; R318; R331.1

文章编号:

2095-4344(2024)23-03680-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 信号素 3A 表达降低可能是盘源性腰痛的重要原因



文题释义:

信号素3A: 属于信号素蛋白家族, 是一类分泌蛋白或跨膜蛋白, N端由神经素1和神经丛蛋白A耦合成复合受体, 通过胞内信号传导通路发挥其生物学作用。

盘源性腰痛: 指由椎间盘本身的原因引起的腰痛, 不伴有椎间盘突出和神经根受压, 这种疼痛是由于纤维环破裂、血管肉芽组织长入椎间盘等因素诱发而来。

摘要

背景: 信号素3A是重要的神经血管生长抑制因子, 目前尚不清楚信号素3A是如何参与盘源性腰痛发病的, 研究信号素3A在椎间盘退变中的潜在机制可为防治盘源性腰痛提供新的靶点和理论依据。

目的: 通过激活核因子 κ B信号通路影响信号素3A的表达, 探讨白细胞介素1 β 诱导大鼠椎间盘退变的机制。

方法: 采用RT-qPCR检测人未退变与退变髓核组织内的信号素3A mRNA表达。分离培养SD大鼠髓核细胞, 传代至第3代时分3组培养: 空白对照组常规培养48 h, 退变组加入10 ng/mL白细胞介素1 β 干预48 h, 退变+抑制剂组加入5 μ mol/L核因子 κ B信号通路特异性抑制剂BAY11-7082干预1 h后加入白细胞介素1 β 干预48 h。干预结束后, 采用CCK-8法检测细胞活力, Annexin V/FITC染色法检测细胞凋亡, RT-qPCR检测细胞基质、血管、神经标志物及信号素3A的mRNA表达, Western blot检测标志蛋白、核因子 κ B信号通路蛋白p65及p-p65的蛋白表达。

结果与结论: ①RT-qPCR检测显示, 人退变髓核组织内的信号素3A mRNA表达低于未退变髓核组织($P < 0.05$); ②CCK-8检测与Annexin V/FITC染色显示, 与空白对照组比较, 退变组髓核细胞活力降低、凋亡率增加($P < 0.05$); 与退变组比较, 退变+抑制剂组髓核细胞活力升高、凋亡率降低($P < 0.05$); ③RT-qPCR检测显示, 与空白对照组比较, 退变组II型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素3A的mRNA表达降低($P < 0.05$), CD31、神经丝蛋白200的mRNA表达升高($P < 0.05$); 与退变组比较, 退变+抑制剂组II型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素3A的mRNA表达升高($P < 0.05$), CD31、神经丝蛋白200的mRNA表达降低($P < 0.05$); ④Western blot检测显示, 与空白对照组比较, 退变组II型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素3A的蛋白表达降低($P < 0.05$), CD31、神经丝蛋白200、p65及p-p65的蛋白表达升高($P < 0.05$); 与退变组比较, 退变+抑制剂组II型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素3A的蛋白表达升高($P < 0.05$), CD31、神经丝蛋白200、p65及p-p65的蛋白表达降低($P < 0.05$); ⑤结果表明, 白细胞介素1 β 通过激活核因子 κ B信号通路抑制信号素3A的表达, 同时促进细胞外基质的降解和椎间盘内血管神经的长入, 可能为椎间盘退变及相关盘源性腰痛的诱发因素之一。

关键词: 白细胞介素1 β ; 核因子 κ B信号通路; 信号素3A; 椎间盘退变; 盘源性腰痛

Mechanism by which interleukin-1beta regulates the expression of Semaphorin 3A to induce intervertebral disc degeneration

Huang Jie^{1,2}, Jiang Qiang², Han Jiaheng^{1,2}, Liu Jiang², Zhang Yan², Lu Zhencao², Ding Yu^{1,2}

¹Department of Orthopedics, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; ²Orthopedics of TCM Senior Department, The Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Huang Jie, Master candidate, Department of Orthopedics, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Corresponding author: Ding Yu, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; Orthopedics of TCM Senior Department, The Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

¹华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006; ²解放军总医院第六医学中心中医医学部骨伤科, 北京市 100048

第一作者: 黄杰, 男, 1998年生, 汉族, 湖南省怀化市人, 华南理工大学医学院在读硕士, 主要从事脊柱外科方面的研究。

通讯作者: 丁宇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006; 解放军总医院第六医学中心中医医学部骨伤科, 北京市 100048

<https://orcid.org/0000-0002-2097-9645>(黄杰)

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(82274637), 项目负责人: 丁宇

引用本文: 黄杰, 蒋强, 韩嘉恒, 刘江, 张燕, 卢正操, 丁宇. 白细胞介素 1 β 调控信号素 3A 表达诱发椎间盘退变的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(23):3680-3685.



Abstract

BACKGROUND: Semaphorin 3A (Sema3A) is an important neurovascular growth inhibitor. It is not clear how Sema3A is involved in the pathogenesis of discogenic low back pain. Exploring the potential mechanism of Sema3A in intervertebral disc degeneration can provide a new target and theoretical basis for the prevention and treatment of discogenic low back pain.

OBJECTIVE: To explore the mechanism of interleukin-1 β inhibiting the expression of Sema3A by activating the nuclear factor- κ B signaling pathway to induce intervertebral disc degeneration in rats.

METHODS: RT-qPCR was used to detect the expression of Sema3A mRNA in normal and degenerative human nucleus pulposus tissues. Nucleus pulposus cells of Sprague-Dawley rats were isolated, cultured, and passaged to the 3rd generation. Then, passage 3 cells were divided into three groups: the blank control group was routinely cultured for 48 hours, the degeneration group was intervened with 10 ng/mL interleukin 1 β for 48 hours, and the degeneration+inhibitor group was treated by 5 μ mol/L nuclear factor- κ B signaling pathway-specific inhibitor BAY11-7082 for 1 hour, followed by interleukin-1 β for 48 hours. At the end of the intervention, cell viability was detected by cell counting kit-8, cell apoptosis was detected by Annexin V/FITC staining, mRNA expression of cellular matrix, vascular and neural markers and Sema3A was detected by RT-qPCR, and protein expression of marker proteins, p65 and p-p65 was detected by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: RT-qPCR assay showed that the expression of Sema3A mRNA was lower in degenerative human nucleus pulposus tissue than in normal human nucleus pulposus tissue ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the nucleus pulposus cell viability decreased and the apoptotic rate increased in the degeneration group ($P < 0.05$); compared with the degeneration group, the nucleus pulposus cell viability increased and the apoptotic rate decreased in the degeneration + inhibitor group ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, mRNA expression of type II collagen, polyproteoglycan, and Sema3A was decreased in the degeneration group ($P < 0.05$), while mRNA expression of CD31 and neurofilament 200 was increased ($P < 0.05$). Compared with the degeneration group, mRNA expression of type II collagen, polyproteoglycan, and Sema3A was elevated in the degeneration+inhibitor group ($P < 0.05$) and mRNA expression of CD31 and neurofilament 200 decreased ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the protein expression of type II collagen, polyproteoglycan, and Sema3A was decreased in the degeneration group ($P < 0.05$), and the protein expression of CD31, neurofilament protein 200, p65, and p-p65 was elevated ($P < 0.05$); compared with the degeneration group, the protein expression of type II collagen, polyproteoglycan, and Sema3A was elevated in the degeneration+inhibitor group ($P < 0.05$), and protein expression of CD31, neurofilament 200, p65, and p-p65 was decreased ($P < 0.05$). To conclude, interleukin-1 β does inhibit the expression of Sema3A by activating the nuclear factor- κ B signaling pathway, which can also increase the degradation of extracellular matrix, promote the innervation and angiogenesis in degenerative intervertebral disc, and may be one of potential factors that contribute to intervertebral disc degeneration and discogenic low back pain.

Key words: interleukin-1 β ; nuclear factor- κ B signaling pathway; Sema3A; intervertebral disc degeneration; discogenic low back pain

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 82274637 (to DY)

How to cite this article: HUANG J, JIANG Q, HAN JH, LIU J, ZHANG Y, LU ZC, DING Y. Mechanism by which interleukin-1beta regulates the expression of Semaphorin 3A to induce intervertebral disc degeneration. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(23):3680-3685.

0 引言 Introduction

椎间盘退变导致的慢性腰痛是全球常见的疾病之一,严重影响患者生活质量,带来沉重的社会和经济负担^[1-2]。椎间盘是人体最大的乏血管神经的组织,当椎间盘发生退变时血管神经向椎间盘内延伸,即易诱发椎间盘退变,进而出现腰痛,但其具体的发病机制有待深入探讨。盘源性腰痛源自于椎间盘本身,无椎间盘突出,不伴有硬膜囊及神经根受压引起的根性症状,在影像学上表现为HIZ(high-intensity zone),在手术中取出的突出物标本中可见血管翳,其发生机制与纤维环的炎症、纤维环撕裂和血管神经长入密切相关^[3-4]。文献报道,信号素3A与细胞迁移、血管生成、神经生长、细胞外基质降解及酶分泌等病理生理过程紧密相关^[5-8],当椎间盘发生退变时,该介质通过参与椎间盘内炎症反应及基质代谢、诱导血管神经向退变椎间盘内生长促使盘源性腰痛的发生^[9]。另外研究显示,促炎性因子白细胞介素1 β 分泌明显增加可激活核因子 κ B信号通路,进而启动椎间盘退变^[10]。由此推断,白细胞介素1 β 可能参与调控信号素3A表达诱发椎间盘退变。此次研究以大鼠髓核细胞为实验对象,探讨白细胞介素1 β 诱导核因子 κ B信号通路介导信号素3A的表达,进而通过调控血管神经的分布诱导椎间盘退变的可能性,为椎间盘退变及相关盘源性腰痛的发生机制研究提供新思路和技术方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)对实验数据进行分析。

1.2 时间及地点 实验于2022年7-11月在北京百奥思科生物技术有限公司完成。

1.3 材料

1.3.1 临床样本 临床样本来源于16例行椎间盘髓核摘除患者的术中摘除髓核,男女各8例,年龄18-65岁。供者对研究知情同意并签署了知情同意书。该研究得到中国人民解放军总医院第六医学中心伦理委员会批准(HZKY-PJ-2023-4)。

1.3.2 实验动物 6只SPF级雄性SD大鼠,6-8周龄,体质量180-220g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0008,饲养环境为SPF级环境,温度21.5 $^{\circ}$ C,湿度为55%。动物实验已通过康泰医学检验服务河北有限公司实验动物伦理委员会批准,批准号为MDL2022-11-07-01。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。实验动物在麻醉下完成实验操作,并最大限度地减少其疼痛和死亡。

1.3.3 实验试剂和仪器 DMEM/F12培养基(Gibco);白细胞介素1 β (PEPRO TECH);核因子 κ B信号通路抑制剂BAY11-7082(美仑);II型胶原蛋白抗体、聚蛋白多糖抗体、信号素3A抗体(Affinity);CD31抗体、神经丝蛋白200抗体(Proteintech);p65抗体、p-p65抗体(ZEN BIO);Goat anti-rabbit IgG(H+L)(ab150078);CCK-8试剂盒(FIUORESCENCE);Annexin V/FITC凋亡检测试剂盒(四正柏生物);胎牛血清(四季清生物);ECL试剂盒(艾德莱生物);FC500流式细胞仪、倒置相差显微镜、移液枪、细胞培养箱、酶标仪、化学发光成像系统(Bio-rad)。

1.4 实验方法

1.4.1 髓核组织收集 根据术前影像学Pfirmann分级,6例纳为未退变组(Pfirmann < III级),10例纳为退变组(Pfirmann \geq III级)。严格无菌操作,收集腰椎间盘髓核

摘除术中摘除的髓核组织，用无菌生理盐水冲洗 5 遍，置于标本袋中，冰盒保存带回实验室，采用 RT-qPCR 检测未退变与退变髓核组织的信号素 3A 的 mRNA 表达。

1.4.2 原代髓核细胞分离培养 取 SD 大鼠置于无菌操作台上，使用无菌手术器械获取运动节段椎间盘髓核组织，以 PBS 清洗后转置于离心管中，加入 0.25% 胰酶及 0.2% II 型胶原酶于 37 °C 环境下消化 4 h，以分离出髓核细胞。消化完毕后，弃去胰酶，加入等体积 DMEM/F12 以终止消化，再经 100 μm 细胞滤过膜过滤，取细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清，用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬细胞。将髓核细胞接种至 25 cm² 培养瓶中，置于体积分数为 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的培养箱中培养。定期观察髓核细胞贴壁生长情况，两三天更换培养液确保满意的细胞生长环境。当细胞密度饱和后胰酶消化传代，取 P3 代细胞进行后续实验。

1.4.3 实验分组及髓核细胞退变模型建立 将髓核细胞分 3 组干预：①空白对照组：仅用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (DMEM/F12 : 胎牛血清 =9 : 1) 干预 48 h；②退变组：加入含白细胞介素 1β(10 ng/mL)、体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基干预 48 h，诱导髓核细胞发生退变；③退变 + 抑制剂组：加入含核因子 κB 信号通路特异性抑制剂 BAY11-7082(5.0 μmol/L)、体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基干预 1 h，然后加入白细胞介素 1β (10 ng/mL) 干预 48 h^[11]。

1.4.4 CCK-8 法检测髓核细胞活力 取 P3 代髓核细胞重悬，以 2×10⁷ L⁻¹ 的细胞浓度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，共设置 3 个复孔，培养 24 h 后，按照实验分组换液并添加相应干预因素，每孔培养基体积为 10 μL，干预 48 h。干预结束后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液继续培养 2 h，用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值，吸光度值与细胞增殖能力呈正比。

1.4.5 Annexin V/FITC 染色法检测髓核细胞凋亡 取 P3 代髓核细胞，接种于 6 孔板上，每孔细胞数量为 5×10⁵，培养 24 h 后，按照实验分组换液并添加相应干预因素干预 48 h。干预结束后，收集细胞培养液于离心管内备用，胰酶消化。1 200 r/min 离心 3 min 沉淀细胞，弃去上清。加入 1 mL 4 °C 预冷的 PBS 重悬细胞，再次离心沉淀细胞，弃去上清。用 4 mL 4× 结合缓冲液和 12 mL 去离子水配制稀释结合缓冲液，加入 1× 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节细胞浓度为 1×10⁹ L⁻¹。取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 流式管中，加入 5 μL Annexin V/FITC 混匀后于室温下避光孵育 5 min，加入 10 μL 20 μg/mL 的碘化丙啶溶液和 400 μL PBS，立即进行流式检测。

1.4.6 RT-qPCR 检测目的基因表达 ①利用 Trizol 裂解液提取人髓核组织的总 RNA，反转录合成 cDNA，通过 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 分析 mRNA，检测未退变与退变髓核组织中信号素 3A 的表达差异。②取 P3 代大鼠髓核细胞，以 2×10⁸ L⁻¹ 的细胞浓度接种于 6 孔板中，每孔 2.5 mL，培养 24 h 后，按照实验分组换液并添加相应干预因素，干预 48 h。干预结

束后，利用 Trizol 裂解液从髓核细胞中提取总 RNA，然后进行反转录合成 cDNA，通过 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 分析 mRNA，检测样本中 II 型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素 3A、CD31 及神经丝蛋白 200 的 mRNA 表达差异。PCR 反应条件为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 10 s，58 °C 退火 20 s，72 °C 延伸 20 s，共 40 个循环。相对表达量通过 2^{-ΔΔCT} 公式计算。目的基因引物设计见表 1。

表 1 | 引物序列
Table 1 | Primer sequences

基因	正义引物序列 (5'-3')	反义引物序列 (5'-3')
II 型胶原蛋白	CGC CAT GAA AGT CTT CTG CAA CA	CGC CAT GAA AGT CTT CTG CAA CA
聚蛋白多糖	CGC TGG TCT GAT GGA CAC TC	AGA TCA TCA CTA CGC AGT CCT
信号素 3A	AGG ACT CAC ATT TTG AAA ACG G	GAT AGC AAA GTC TCG TCC CAT
CD31	AGG TGC TAT TCT ATA AGG ACG AT	TGT TCA GTA TCA CGG TGC ATT
神经丝蛋白 200	AGG ACC GTC ATC AGG TAG ACA	TCC AGG GCC ATC TTG ACG TTG
β-actin	CTG AAC GTG AAA TTG TCC GAG A	TTG CCA ATG GTG ATG ACC TG

1.4.7 Western blot 检测目标蛋白表达 取 P3 代髓核细胞，以 2×10⁸ L⁻¹ 的细胞浓度将其接种于 6 孔板中，每孔 2.5 mL，培养 24 h 后，按照实验分组换液并添加相应干预因素，干预 48 h。干预结束后，用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解髓核细胞，制备 BCA 工作液以测定蛋白浓度。总蛋白于聚丙烯酰胺凝胶中电泳后，转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 2 h，与 II 型胶原蛋白 (1 : 3 000)、聚蛋白多糖 (1 : 3 000)、信号素 3A(1 : 1 000)、CD31(1 : 1 000)、神经丝蛋白 200(1 : 1 000)、p65(1 : 1 000) 及 p-p65(1 : 1 000) 抗体结合，于 4 °C 下反应过夜。经 TBST 洗膜 5 次后，与二抗 (1 : 1 000) 室温下孵育 1 h。使用 ECL 试剂盒，化学发光成像系统成像。以 β-actin(1 : 1 000) 作为内参，使用 ImageJ 软件对条带进行定量分析。

1.5 主要观察指标 人未退变与退变髓核组织信号素 3A 的基因表达差异；各组大鼠髓核细胞的活力、凋亡率以及 II 型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素 3A、CD31、神经丝蛋白 200、p65 及 p-p65 的表达。

1.6 统计学分析 使用 Graphpad Prism 9 分析实验数据，绘制图表。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 t 检验，多样本间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)， $P < 0.05$ 说明差异有显著性意义。文章统计学方法已经中国人民解放军总医院第六医学中心生物统计学专家审核。

2 结果 Results

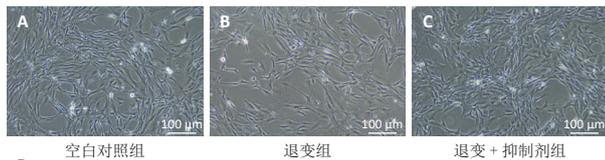
2.1 人退变与未退变髓核组织信号素 3A 的基因表达差异 如图 1 所示，人退变髓核组织内信号素 3A 的 mRNA 表达量低于未退变髓核组织 (1.12±0.14, 0.57±0.05, $P < 0.05$)。

2.2 各组髓核细胞活力检测结果 如图 2 所示，空白对照组髓核细胞形态清晰，数量饱满；给予白细胞介素 1β 后，髓核细胞皱缩，细胞形态不规整，呈凋亡样改变，且细胞数量明显减少；给予 BAY11-7082 干预后，髓核细胞数量增多，细胞损伤情况较退变组得到改善。与空白对照组相比，白细



图注: A 为术中获取的新鲜未退变髓核组织; B 为术中获取的新鲜退变髓核组织 (可见带有血管翳); C 为未退变与退变髓核组织信号素 3A 的 mRNA 表达, $^aP < 0.0001$

图 1 | 人退变与未退变髓核组织信号素 3A 的 mRNA 表达比较
Figure 1 | Comparison of Semaphorin 3A mRNA expression in normal and degenerative human nucleus pulposus tissues

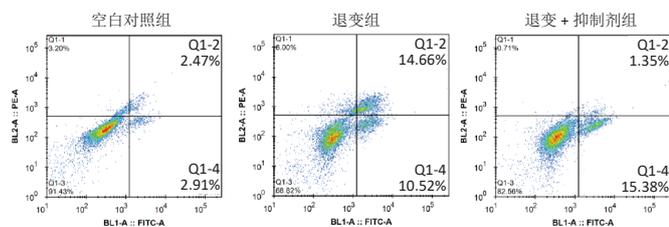


图注: A 为空白对照组, 髓核细胞形态清晰, 数量饱满; B 为退变组, 髓核细胞皱缩, 呈凋亡样改变, 且数量减少; C 为退变 + 抑制剂组, 髓核细胞数量增多, 细胞损伤情况较退变组得到改善; 标尺为 100 μm 。D 为各组髓核细胞 CCK-8 实验检测结果, $^aP < 0.0001$

图 2 | 各组髓核细胞形态及活力检测结果
Figure 2 | Nucleus pulposus cell morphology and viability in each group

胞素素 1 β 显著降低了髓核细胞活力, 核因子 κB 信号通路特异性抑制剂 BAY11-7082 可显著逆转白细胞介素 1 β 诱导髓核细胞的退变作用, 增强髓核细胞的活力 ($P < 0.05$)。

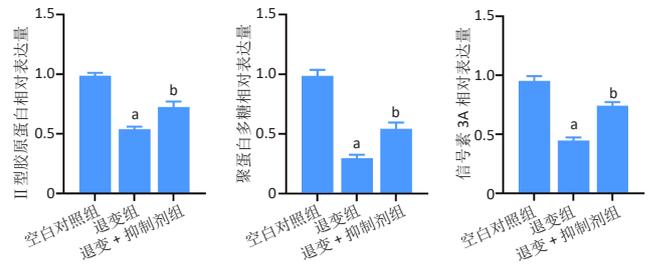
2.3 各组髓核细胞凋亡检测结果 如图 3 所示, 与空白对照组 [(4.94 \pm 0.53)%] 相比, 白细胞介素 1 β 显著诱导髓核细胞凋亡 [(25.18 \pm 0.45)%], BAY11-7082 可显著逆转白细胞介素 1 β 诱导髓核细胞的退变作用, 显著降低髓核细胞的凋亡率 [(16.41 \pm 0.73)%] ($P < 0.05$)。



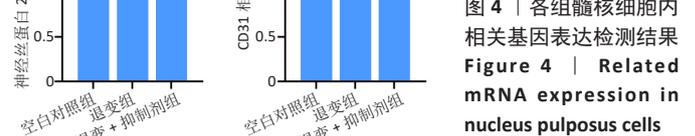
图注: $^aP < 0.0001$
图 3 | Annexin V-FITC/PI 染色法检测各组髓核细胞凋亡情况
Figure 3 | Annexin V-FITC/PI staining detection of apoptosis in nucleus pulposus cells

Figure 3 | Annexin V-FITC/PI staining detection of apoptosis in nucleus pulposus cells

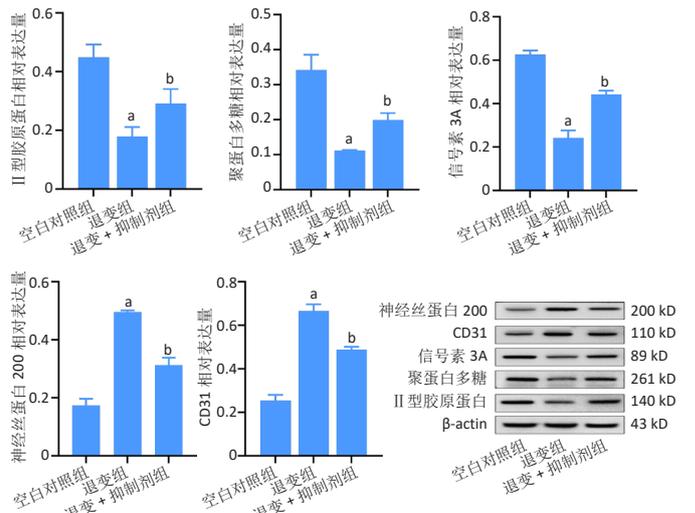
2.4 各组髓核细胞内基因表达检测结果 RT-qPCR 检测结果见图 4 所示, 与空白对照组相比, 退变组 II 型胶原蛋白、聚蛋白多糖和信号素 3A 的 mRNA 表达降低, CD31、神经丝蛋白 200 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与退变组相比, 退变 + 抑制剂组 II 型胶原蛋白、聚蛋白多糖和信号素 3A 的 mRNA 表达升高, 神经丝蛋白 200、CD31 的 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。



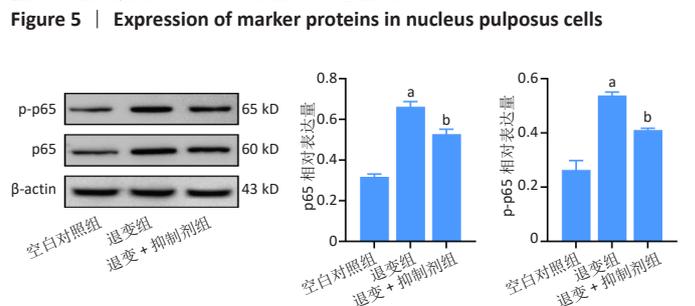
图注: 与空白对照组相比, $^aP < 0.05$; 与退变组相比, $^bP < 0.05$
图 4 | 各组髓核细胞内相关基因表达检测结果
Figure 4 | Related mRNA expression in nucleus pulposus cells



2.5 各组髓核细胞内目标蛋白表达检测结果 各组髓核细胞相关蛋白检测结果见图 5、6 所示, 与空白对照组相比, 退变组 II 型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素 3A 的蛋白表达降低 ($P < 0.05$), CD31、神经丝蛋白 200、p65 及 p-p65 的蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与退变组比较, 退变 + 抑制剂组 II 型胶原蛋白、聚蛋白多糖、信号素 3A 的蛋白表达升高 ($P < 0.05$), CD31、神经丝蛋白 200、p65 及 p-p65 的蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。



图注: 与空白对照组相比, $^aP < 0.05$; 与退变组相比, $^bP < 0.05$
图 5 | 各组髓核细胞内标志蛋白表达检测结果
Figure 5 | Expression of marker proteins in nucleus pulposus cells



图注: 与空白对照组相比, $^aP < 0.05$; 与退变组相比, $^bP < 0.05$
图 6 | 各组髓核细胞内 p65 及 p-p65 蛋白表达检测结果
Figure 6 | The p65 and p-p65 expression in nucleus pulposus cells

3 讨论 Discussion

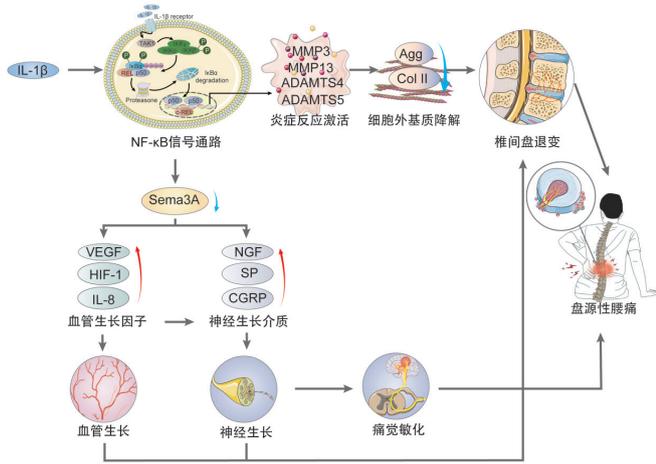
椎间盘退变可引起椎间盘突出、盘源性腰痛、椎管狭窄及椎体不稳等疾病，是引起慢性腰痛最常见的原因之一，但其病理生理机制尚不明确^[12-13]。椎间盘退变是多因素共同作用的结果，其病理表现包括髓核细胞凋亡、纤维环破裂、炎症反应、血管神经长入及细胞外基质成分降解等，因此抑制髓核细胞凋亡、促进髓核细胞增殖、抑制椎间盘内炎症反应、促进 II 型胶原蛋白及聚蛋白多糖等细胞外基质成分合成、抑制血管神经向髓核内部生长是延缓椎间盘退变的主要研究方向^[14-15]。大量研究证实，血管神经长入退变的椎间盘是引起盘源性腰痛的重要原因，因此寻找抑制退变椎间盘内血管神经生长的靶点对于盘源性腰痛的治疗手段具有重要的探索意义。

正常的椎间盘是乏血管神经组织，因其基质成分中的聚蛋白多糖具有抑制血管生长的作用，仅纤维环的外层及软骨终板有少量血管神经，为椎间盘提供营养和氧气并排泄代谢废物。髓核细胞是椎间盘内最重要的细胞成分，可分泌 II 型胶原蛋白及聚蛋白多糖等细胞外基质成分^[16]，II 型胶原蛋白构成细胞骨架，使髓核细胞及聚蛋白多糖在椎间盘内部维持相对稳定状态；而聚蛋白多糖则具有吸水性，维持髓核含水量。当椎间盘发生退变时，合成代谢与分解代谢之间的动态平衡被打破，细胞外基质成分降解，II 型胶原蛋白向 I 型胶原蛋白转化，聚蛋白多糖含量下降，髓核含水量下降，新生的毛细血管自纤维环外层向椎间盘内部生长，同时伴随着传导痛觉的神经纤维向退变椎间盘的髓核深处入侵，这是引起慢性腰痛的主要原因^[17-18]。慢性腰痛的常见原因有腰椎间盘突出症、腰肌劳损、腰椎压缩性骨折及盘源性腰痛等^[19]。盘源性腰痛是源自于椎间盘本身，不伴有椎间盘软性突出压迫硬膜囊及神经根，在影像学上表现为 HIZ，其发生机制与纤维环的炎症、纤维环撕裂和血管神经长入密切相关^[20]。研究表明，背根神经节的神经纤维伴随着逆行的新生血管长入退变的椎间盘内成为疼痛受体，诱发外周神经产生“痛觉超敏”进而引起盘源性腰痛^[17-18, 21]。在临床中有不少因腰椎间盘突出症行手术治疗患者在其手术过程中取出的突出椎间盘中带有血管翳，且该类患者腰痛症状大多数比较严重，因其疼痛症状的产生为椎间盘软性突出压迫硬膜囊及神经根引起的根性症状与椎间盘源性疼痛的叠加效应。血管神经向退变椎间盘内长入是引起椎间盘退变及盘源性腰痛的重要机制，与血管内皮生长因子、神经营养因子及信号素 3A 等调控血管神经生长的细胞因子密切相关。信号素 3A 属于跨膜蛋白家族，通过与神经素 1/神经丛蛋白 A 受体结合抑制背根神经节神经元轴突生长、拮抗血管内皮生长因子活性、抑制血管神经向纤维环内层和髓核内部生长^[6]。研究表明，信号素 3A 与血管内皮生长因子共享神经素 1 受体，通过与 $\alpha 1/\alpha 2$ 结构域结合参与椎间盘退变病理性神经疼痛的发生机制。信号素 3A 是重要的轴突生长抑制因子，具有调控神经导向及血管生成的作用，该因子通过影响血管神经在退变椎间盘中的分布，在椎间盘退变过程中发挥重要作用^[9, 22]。此次研究结

果表明，白细胞介素 1 β 可通过活化核因子 κB 信号通路显著抑制信号素 3A 的表达，进而促进退变椎间盘内血管神经的生长，从而加剧椎间盘的退变，引起盘源性腰痛。

国外研究报道，信号素 3A 在正常的椎间盘组织中高表达，但在退变的椎间盘组织中的表达量明显下降^[5, 23]。信号素 3A 具有多种不同的生物学功能，尤其在神经发育、血管生成等过程中具有重要的化学趋化和导向作用，但其具体的作用机制尚不明确^[23-25]。此次研究根据 RT-qPCR 实验结果分析发现，人退变髓核组织信号素 3A 的基因表达显著低于未退变髓核组织，结果与既往研究报道一致。白细胞介素 1 β 、白细胞介素 8 及肿瘤坏死因子 α 等众多细胞因子参与椎间盘退变，其中白细胞介素 1 β 是参与椎间盘退变的重要促炎性细胞因子，具有降解细胞外基质、诱发炎症级联反应、促进血管神经增殖等作用。研究表明，白细胞介素 1 β 可以通过调控信号素 3A 的表达影响退变椎间盘内血管神经的分布^[26-27]。此次研究通过对血管生长标志物 CD31 及神经生长标志物神经丝蛋白 200 进行检测，观察白细胞介素 1 β 对血管神经的调控作用，结果显示：利用白细胞介素 1 β 诱导大鼠髓核细胞发生退变，可明显地观察到信号素 3A 的表达量下降，而血管生成标志 CD31 及神经生长标志神经丝蛋白 200 蛋白表达显著增加，说明白细胞介素 1 β 可以通过调控信号素 3A 的表达量影响退变椎间盘内血管神经的生长。既往的研究报道，促炎性因子能够调控髓核细胞中信号素 3A 基因表达，与此次研究结果相一致。虽然其调控机制不明，但有研究表明在促炎性因子的作用下，信号素 3A 在髓核细胞中的表达可能受核因子 κB 信号通路的调控^[26]。

核因子 κB 是介导炎症反应的重要转录因子，该细胞通路活化后可调节细胞因子刺激退变椎间盘组织血管神经的生成，加剧椎间盘退变^[28]。国内外大量研究表明，核因子 κB 信号通路的活性与椎间盘退变程度呈正相关，即随着椎间盘退变程度的增加该通路的活性也随之升高，细胞外基质成分明显减少、血管生成和神经发育的标志物的表达显著增加，说明促炎性因子白细胞介素 1 β 可能通过调控核因子 κB 信号通路的活性影响椎间盘内血管神经的生成，进而参与椎间盘退变^[29-32]，其具体机制见图 7。此次研究结果表明，白细胞介素 1 β 激活核因子 κB 信号通路后，髓核细胞的细胞外基质降解增加、信号素 3A 表达量显著下降。为进一步探讨白细胞介素 1 β 调控信号素 3A 表达的深层机制是否与核因子 κB 信号通路相关，此次研究在诱导髓核细胞发生退变之前预先添加核因子 κB 通路的特异性抑制剂 BAY11-7082 处理大鼠髓核细胞^[8]，结果显示在施加通路抑制剂后，白细胞介素 1 β 对核因子 κB 通路的异常活化以及对信号素 3A 的调控作用发生显著逆转，导致细胞外基质成分的增加、血管神经标志物水平的下降。上述实验结果初步表明，核因子 κB 通路在椎间盘退变中发挥重要作用，通过调控核因子 κB -p65 信号通路可以调节髓核细胞中信号素 3A 的表达；同时，该通路的激活引起细胞外基质成分的降解及血管神经的生长，在椎间



图注: IL-1 β : 白细胞介素 1 β ; Sema3A: 信号素 3A; VEGF: 血管内皮生长因子; HIF-1: 低氧诱导因子 1; IL-8: 白细胞介素 8; NGF: 神经生长因子; SP: P 物质; CGRP: 降钙素基因相关肽; MMP: 基质金属蛋白酶; ADAMTS: 解聚蛋白样金属蛋白酶; Agg: 聚蛋白多糖; Col II: II 型胶原蛋白

图 7 | 白细胞介素 1 β 激活核因子 κ B(NF- κ B) 信号通路影响信号素 3A 的表达引发盘源性腰痛的机制图

Figure 7 | Schematic graph of the mechanism by which interleukin-1 β affects Semaphorin 3A expression via the nuclear factor κ B signaling pathway to induce discogenic low back pain

盘退变过程中可能起着关键作用。

综上所述, 促炎性因子白细胞介素 1 β 通过诱导核因子 κ B 信号通路的活化抑制信号素 3A 的表达; 信号素 3A 的表达量下降在细胞外基质降解及诱导血管神经在退变椎间盘的分布过程中发挥关键作用, 加剧椎间盘的退变; 核因子 κ B 通路抑制剂可以上调信号素 3A 的表达, 进而有效延缓椎间盘退变的进程, 为防治盘源性腰痛提供新的靶点和理论依据。

作者贡献: 黄杰进行实验设计, 实验实施为黄杰, 实验评估为丁宇, 资料收集为韩嘉恒、刘江、蒋强、卢正操, 黄杰成文, 丁宇、张燕审核。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守《观察性临床研究报告指南》(STROBE 指南)。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。

4 参考文献 References

[1] GBD 2019 DISEASES AND INJURIES COLLABORATORS. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020; 396(10258):1204-1222.

[2] KNEZEVIC NN, CANDIDO KD, VLAEYEN JWS, et al. Low back pain. *Lancet*. 2021; 398(10294):78-92.

[3] HOOTEN WM, COHEN SP. Evaluation and Treatment of Low Back Pain. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(12):1699-1718.

[4] ZHAO L, MANCHIKANTI L, KAYE AD, et al. Treatment of Discogenic Low Back Pain: Current Treatment Strategies and Future Options-a Literature Review. *Curr Pain Headache Rep*. 2019;23(11):86.

[5] BINCH AL, COLE AA, BREAKWELL LM, et al. Class 3 semaphorins expression and association with innervation and angiogenesis within the degenerate human intervertebral disc. *Oncotarget*. 2015;6(21):18338-18354.

[6] TOLOFARI SK, RICHARDSON SM, FREEMONT AJ, et al. Expression of semaphorin 3A and its receptors in the human intervertebral disc: potential role in regulating neural ingrowth in the degenerate intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(1):R1. doi: 10.1186/ar2898.

[7] VADASZ Z, TOUBI E. Semaphorin3A: A potential therapeutic tool in immune-mediated diseases. *Eur J Rheumatol*. 2018;5(1):58-61.

[8] 李瑶, 孙中仪, 戴健, 等. 椎间盘退变 IL-1 β 激活 NF- κ B 信号通路增强 ADAMTS-4 的表达 [J]. *中国矫形外科杂志*. 2021,29(23):2177-2181.

[9] MIMA Y, SUZUKI S, FUJII T, et al. Potential involvement of semaphorin 3A in maintaining intervertebral disc tissue homeostasis. *J Orthop Res*. 2019;37(4): 972-980.

[10] CHEN F, JIANG G, LIU H, et al. Melatonin alleviates intervertebral disc degeneration by disrupting the IL-1 β /NF- κ B-NLRP3 inflammasome positive feedback loop. *Bone Res*. 2020;8:10.

[11] ZHONGYI S, SAI Z, CHAO L, et al. Effects of nuclear factor kappa B signaling pathway in human intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015; 40(4):224-232.

[12] URITS I, BURSHTAIN A, SHARMA M, et al. Low Back Pain, a Comprehensive Review: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Curr Pain Headache Rep*. 2019;23(3):23.

[13] LYU FJ, CUI H, PAN H, et al. Painful intervertebral disc degeneration and inflammation: from laboratory evidence to clinical interventions. *Bone Res*. 2021;9(1):7.

[14] WEI A, BRISBY H, CHUNG SA, et al. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis. *Spine J*. 2008;8(3):466-474.

[15] CAZZANELLI P, WUERTZ-KOZAK K. MicroRNAs in Intervertebral Disc Degeneration, Apoptosis, Inflammation, and Mechanobiology. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3601.

[16] LIAN C, GAO B, WU Z, et al. Collagen type II is downregulated in the degenerative nucleus pulposus and contributes to the degeneration and apoptosis of human nucleus pulposus cells. *Mol Med Rep*. 2017;16(4):4730-4736.

[17] MIYAGI M, MILLECAMP M, DANCO AT, et al. ISSLS Prize winner: Increased innervation and sensory nervous system plasticity in a mouse model of low back pain due to intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014; 39(17):1345-1354.

[18] BINCH A, CROSS AK, MAITRE CL. The regulation of nerve and blood vessel ingrowth in aneurial and avascular intervertebral disc and articular cartilage. *OA Arthritis*. 2014;2(1):4.

[19] HARTVIGSEN J, HANCOCK MJ, KONGSTED A, et al. What low back pain is and why we need to pay attention. *Lancet*. 2018;391(10137):2356-2367.

[20] MOHD ISA IL, TEOH SL, MOHD NOR NH, et al. Discogenic Low Back Pain: Anatomy, Pathophysiology and Treatments of Intervertebral Disc Degeneration. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):208.

[21] AGILLI M, EKINCI S. Response to 'increase of nerve growth factor levels in the human herniated intervertebral disc: can annular rupture trigger discogenic back pain?'. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):106.

[22] ROZBESKY D, VERHAGEN MG, KARIA D, et al. Structural basis of semaphorin-plexin cis interaction. *EMBO J*. 2020;39(13):e102926.

[23] YIN P, LV H, ZHANG L, et al. Semaphorin 3A: A Potential Target for Low Back Pain. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:216.

[24] LI Z, HAO J, DUAN X, et al. The Role of Semaphorin 3A in Bone Remodeling. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:40.

[25] ADI SD, EIZA N, BEJAR J, et al. Semaphorin 3A Is Effective in Reducing Both Inflammation and Angiogenesis in a Mouse Model of Bronchial Asthma. *Front Immunol*. 2019;10:550.

[26] SUMI C, HIROSE N, YANOSHITA M, et al. Semaphorin 3A Inhibits Inflammation in Chondrocytes under Excessive Mechanical Stress. *Mediators Inflamm*. 2018; 2018:5703651.

[27] LEE JM, SONG JY, BAEK M, et al. Interleukin-1 β induces angiogenesis and innervation in human intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res*. 2011;29(2): 265-269.

[28] KIM H, HONG JY, LEE J, et al. IL-1 β promotes disc degeneration and inflammation through direct injection of intervertebral disc in a rat lumbar disc herniation model. *Spine J*. 2021;21(6):1031-1041.

[29] YANG G, LIAO W, SHEN M, et al. Insight into neural mechanisms underlying discogenic back pain. *J Int Med Res*. 2018;46(11):4427-4436.

[30] ZHANG Y, HE F, CHEN Z, et al. Melatonin modulates IL-1 β -induced extracellular matrix remodeling in human nucleus pulposus cells and attenuates rat intervertebral disc degeneration and inflammation. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(22):10499-10512.

[31] RIVERA JC, SITARAS N, NOUEIHED B, et al. Microglia and Interleukin-1 in Ischemic Retinopathy Elicit Microvascular Degeneration Through Neuronal Semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(8):1881-1891.

[32] WU B, YANG L, PENG B. Ingrowth of Nociceptive Receptors into Diseased Cervical Intervertebral Disc Is Associated with Discogenic Neck Pain. *Pain Med*. 2019;20(6):1072-1077.

(责任编辑: WL, GW, ZN, LWJ)