

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.007

文章编号: 1005-8982(2017)21-0037-06

脂联素抑制人髓核细胞分泌疼痛介质 PGE2 的初步机制研究

梁志白, 赵枫

(中国人民解放军第 180 医院 骨二科, 福建 泉州 362000)

摘要:目的 验证脂联素在椎间盘源性腰痛患者中可能发挥的抗炎作用,并初步研究其机制。**方法** 首先检测髓核组织内脂联素受体表达水平;随后提取并培养人髓核细胞,检测炎症因子 TNF- α 对髓核细胞内脂联素受体调控;最后采用慢病毒基因沉默的手段检测脂联素抑制炎症因子诱导髓核细胞产生 PGE-2 的作用及机制。**结果** 椎间盘源性腰痛患者髓核组织内脂联素受体 Adipo R1/2 表达水平低于正常髓核组织 ($P < 0.05$),炎症介质 TNF- α 能抑制脂联素受体 AdipoR1/2 的表达 ($P < 0.05$)。当脂联素处理髓核细胞后, TNF- α 对 PGE-2 分泌的诱导受抑并且呈浓度剂量依赖效应 ($P < 0.05$);髓核细胞过表达 Adipo R1/R2 后,均能抑制炎症因子 TNF- α 诱导髓核细胞产生 PGE-2,其中以 Adipo R2 为明显 ($P < 0.05$)。**结论** 脂联素能够通过两个受体 Adipo R1、Adipo R2 抑制髓核细胞合成分泌疼痛介质 PGE-2,提示脂联素可能为一个保护性因子在椎间盘源性腰痛环境中发挥抗炎作用。

关键词: 椎间盘源性腰痛;脂联素;炎症反应;PGE-2

中图分类号: R274.34

文献标识码: A

Inhibitory effect of adiponectin on secretion of PGE2 in human nucleus pulposus cells

Zhi-bai Liang, Feng Zhao

(Department of Orthopedic Surgery, the 180th Hospital of PLA,
Quanzhou, Fujian 362000, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory effects of adiponectin in patients with discogenic back pain and the potential mechanism. **Methods** The expression of adiponectin receptor Adipo R1/2 in human nucleus pulposus (NP) tissue was examined. Human NP cells were isolated for further culture. The regulatory effect of TNF- α on adiponectin receptors in NP cells was detected. Moreover, lentiviral gene silencing technology was utilized to investigate the inhibitory effect of adiponectin on TNF- α -induced production of PGE-2 and underlying mechanism. **Results** The expression of Adipo R1/2 was significantly decreased in NP tissues derived from patients with discogenic back pain compared with normal NP tissues ($P < 0.05$). TNF- α inhibited the expression of Adipo R1/2, and up-regulated the secretion of PGE2 in NP cells, which was attenuated by adiponectin dose-dependently ($P < 0.05$). Over-expression of Adipo R1/2 abolished the TNF- α -induced PGE2 production ($P < 0.05$). **Conclusions** Adiponectin is potentially a protective mediator in patients with discogenic back pain through AdipoR1/2-dependent inhibition of secretion of PGE2.

Keywords: discogenic back pain; adiponectin; inflammation; PGE2

椎间盘源性疼痛是指椎间盘退变、椎间盘内部结构与功能紊乱刺激神经末梢疼痛感受器引发的疼

痛,同时排除神经机械压迫引发的腰腿痛^①。后续研究证实盘源性疼痛与椎间盘内疼痛介质密切相关,

如一氧化二氮 (nitrous oxide, N_2O)、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、环加氧酶 (cyclooxygenase 2, Cox2) 或磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)^[2], 能刺激长入的末梢神经和背根神经节诱发椎间盘源性腰痛。

脂联素 (adiponectin, Apn) 是由脂肪细胞分泌的一种激素蛋白, 多项研究证实 Apn 具有抗炎、抗氧化应激等功用^[3]。Apn 可以促进巨噬细胞、单核细胞及树突状细胞分泌促炎因子拮抗剂, 对抗炎症刺激、延缓炎症反应进程^[4]。椎间盘源性腰痛患者髓核组织存在广泛炎症级联反应内环境, Apn 能否调节椎间盘内炎症恶性循环尚未清楚。本实验拟通过体外培养人髓核细胞, 检测 Apn 在人髓核细胞中的抗炎作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 髓核组织获取及细胞培养

正常椎间盘组织取自因腰椎爆裂性骨折行椎间盘摘除骨折复位内固定者, 盘源性腰痛椎间盘组织取自于因盘源性腰痛行椎间盘摘除者, 置入 $-80^{\circ}C$ 冷冻保存备用。人髓核细胞购自无锡英纽瑞生物医药科技有限公司 (货号 INV-HN0094), 培养方法依照 RISBUD 等^[5]文献报道。细胞传代至 3~5 代用于后续试验。

1.2 试剂耗材

人全长 Apn (Catalog no.1065-AP; R&D 公司), MEM 培养基 (Gibco 公司), Adipo R1、Adipo R2 抗体 (ab189446 44 kDa, ab126611 43 kDa, Abcam 公司), β -Tubulin Antibody 抗体 (#2146, CST 公司), 前列腺素 E2 (PGE2) ELISA 试剂盒 (Catalog no. ADI-900-001; Enzo Life 公司), 慢病毒 LV-sh Adipo R1 和 LV-sh Adipo R2 (购自百恩维生物)。

1.3 细胞处理

培养人髓核细胞, 使用肿瘤坏死因子 α (TNF-

α) (0、12.5 及 $25 \mu g/ml$) 处理髓核细胞, 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 Adipo R1、Adipo R2 的表达情况以明确炎症因子对脂联素受体的调控。随后采用 TNF- α ($25 \mu g/ml$) 处理髓核细胞, 于 0、12 及 24 h 收集细胞, qRT-PCR 检测 Adipo R1、Adipo R2 的表达以确定炎症因子对脂联素受体调控的时间曲线。

离体培养人髓核细胞, 首先使用不同浓度 Apn 联合 TNF- α 处理细胞, 分为 4 组: Ctr、TNF- α ($25 \mu g/ml$)、TNF- α ($25 \mu g/ml$)+Apn ($1 \mu g/ml$) 和 TNF- α ($25 \mu g/ml$)+Apn ($5 \mu g/ml$), 24 h 后收细胞上清液, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 PGE-2 浓度。

为进一步明确脂联素受体在 Apn 抑制髓核细胞产生 PGE-2、PLA2 中的作用, 构建慢病毒 Adipo R1、Adipo R2 过表达载体 Lenti-Adipo R1/R2。采用 qRT-PCR 方法检测髓核细胞中 Adipo R1、Adipo R2 的过表达情况以确保 Adipo R1、Adipo R2 表达率升高 2 倍以上; 检测人髓核细胞中 Adipo R1、Adipo R2 过表达后, TNF- α 对 PGE-2 的诱导情况: 病毒转染人髓核细胞 5 d 后加入 TNF- α 诱导, 24 h 后收集细胞上清液, ELISA 检测 PGE-2 浓度。

1.4 Western blot 检测

微量二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法检测蛋白浓度。取 $20 \mu g$ 蛋白样本、配置 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, PVDF 膜将分离后蛋白转印纸膜上, 3% BSA 室温封闭 1 h, PGE-2 (1:2 000) 一抗 $4^{\circ}C$ 摇床孵育过夜, 室温二抗孵育 1 h, ECL 发光液孵育并曝光。

1.5 qRT-PCR

依据说明书将 $2 \mu g$ 总 RNA 逆转录为 cDNA, 采用 SYB Green (TaKaRa 公司) 试剂进行扩增, ABI 7500 检测, 内参采用 β -actin。每样本设立 3 副孔、每组实验重复 3 次。使用 Primer Premier 5.0 设计引

附表 qRT-PCR 引物序列

基因	引物	参考序列
AdipoR1	正向: 5'-TCCTGCCAGTAACAGGGAAG-3'	NM_002422
	反向: 5'-AGGGAAGTGTCAGTACCG-3'	
AdipoR2	正向: 5'-CCAACAGAAAACCGATTGGGG	NM_001145138
	反向: 5'-GCCTCTAAAATGGGCTCCAAA-3'	
β -actin	正向: 5'-AACC CGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTT-3'	K00790.1
	反向: 5'-AGCAGCCGTGGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'	

物,引物序列见附表。

1.6 ELISA

依据说明书将人髓核细胞以 1×10^5 个 / 孔接种于 24 孔板,分别给予不同分组刺激后,移除上清液并 无菌磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗,37℃ 孵育 30 min 后收集上清,严格按照 ELISA 说明书检测上清液中 PGE₂ 的含量,所测浓度以 ng/ml 表示。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盘源性疼痛患者血清中脂联素受体水平

髓核组织内存在脂联素受体 Adipo R1/R2 mRNA,盘源性腰痛患者髓核组织内脂联素受体 Adipo R1/2 表达水平降低,以 Adipo R2 降低明显。Western blot 显示类似结果。见图 1。

2.2 炎症因子对髓核细胞内脂联素受体的调控作用

人髓核细胞经不同浓度 TNF- α 处理后,脂联素受体 Adipo R1/R2 mRNA 表达降低,并于 25 μ g/ml 时

达到低谷;时间曲线显示 25 μ g/ml TNF- α 能抑制人髓核细胞内 Adipo R1/R2 mRNA 表达,并与 24 h 达到最低值。Western blot 结果显示脂联素能抑制人髓核细胞内 Adipo R1/R2 蛋白表达,并于 24 h 达到低谷。见图 2。

2.3 Apn 对髓核细胞内炎症因子诱导 PGE₂ 分泌的影响

人髓核细胞经 TNF- α 处理后,PGE₂ 含量升高,当加入 Apn 后,TNF- α 对 PGE₂ 分泌的诱导则受抑制并且呈浓度依赖效应($P < 0.05$)。见图 3。

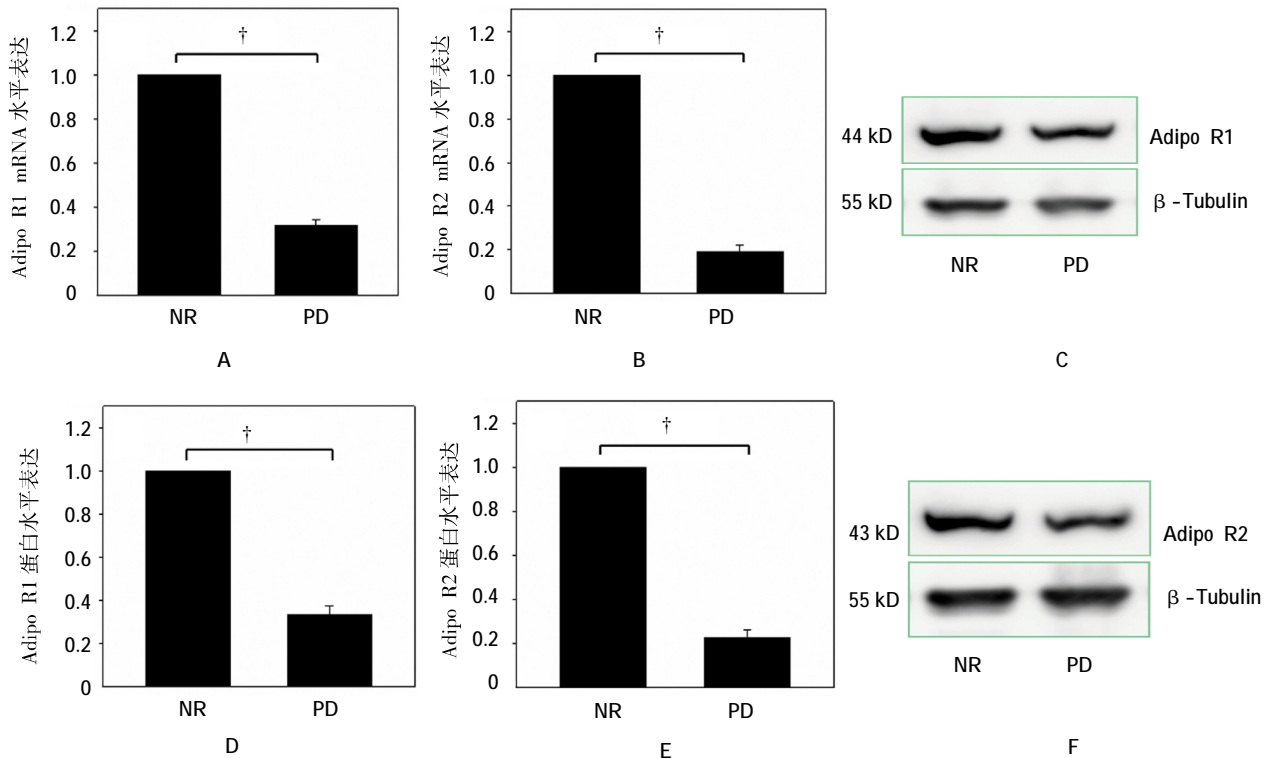
2.4 Apn 对髓核细胞内脂联素受体表达的影响

Apn 能促进髓核组织内存在脂联素受体 Adipo R1/R2 mRNA 表达。见图 4。

2.5 髓核细胞内 Adipo R1/R2 表达情况及对炎症因子 PGE-2 分泌的影响

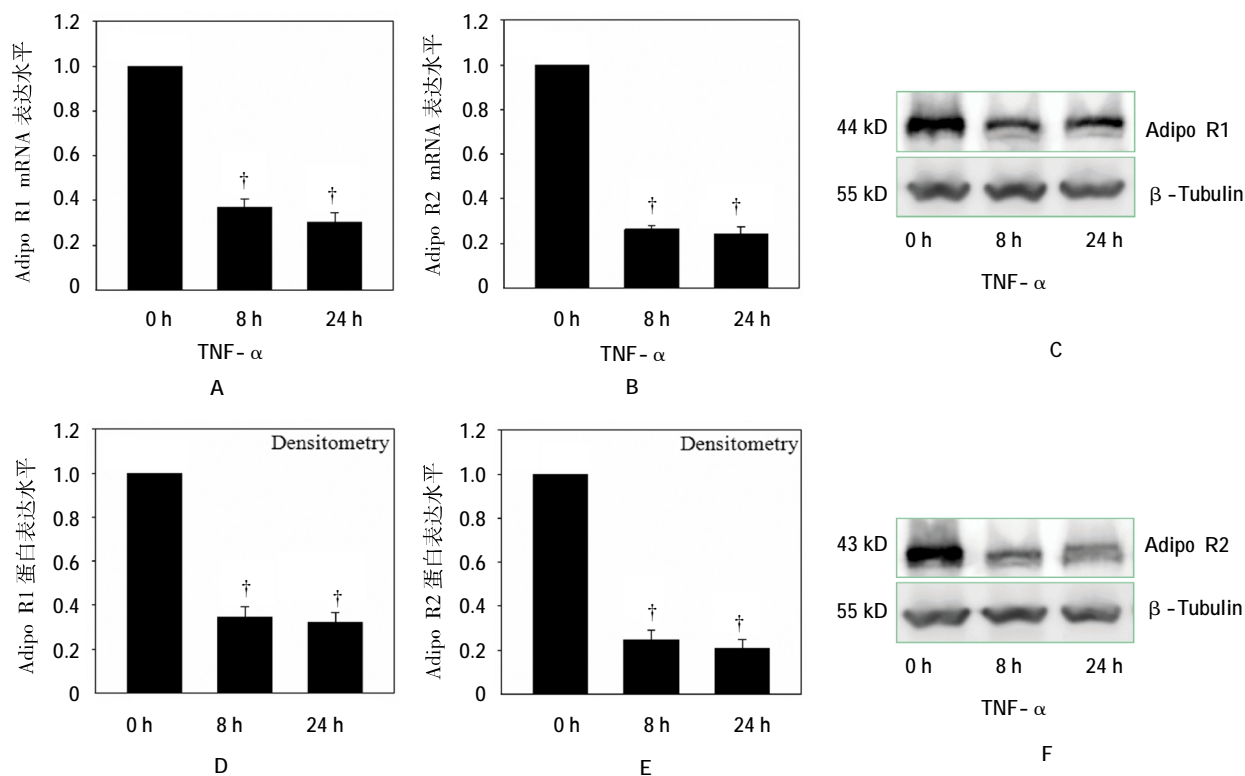
髓核细胞感染 Lenti-Adipo R1/R2 过表达病毒后,髓核细胞内 Adipo R1/R2 表达升高,均超过 2 倍以上。见图 5A-E。

应用慢病毒技术过表达髓核细胞内 Adipo R1/R2 后,再给予 TNF- α 刺激髓核细胞,均能抑制炎症因子 TNF- α 诱导髓核细胞产生 PGE₂,其中以 Adipo R2 明显。见图 5F。



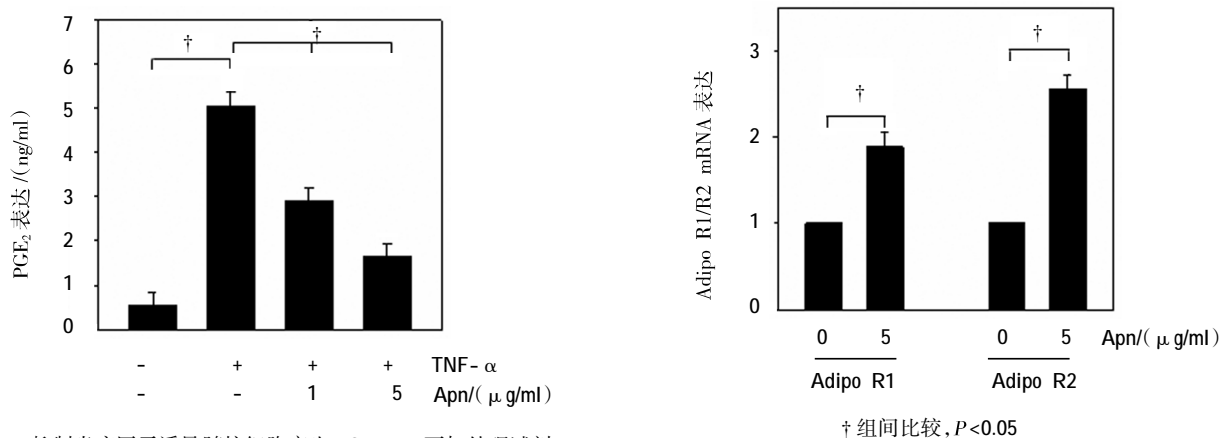
A-C:脂联素受体 Adipo R1/R2 mRNA 表达情况;D-F:脂联素受体 Adipo R1/R2 蛋白表达情况。NR:正常髓核组织;PD:盘源性腰痛患者病变髓核组织。† 组间比较, $P < 0.05$

图 1 髓核组织内脂联素受体表达水平



A-C: TNF- α 作用下髓核细胞内 Adipo R1/R2 mRNA 表达水平; D-F: TNF- α 作用下髓核细胞内 Adipo R1/R2 蛋白表达水平。† 与 0 h 比较, $P < 0.05$

图 2 炎症因子对髓核细胞内脂联素受体调控



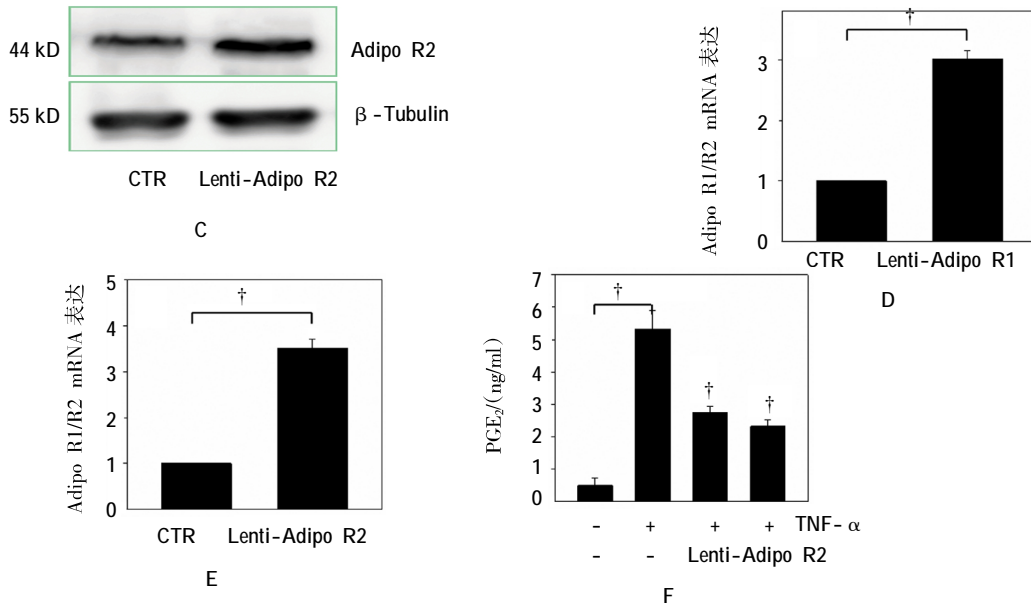
Apn 抑制炎症因子诱导髓核细胞产生 PGE₂。-: 不加处理试剂, +: 加入处理试剂。† 与仅加入 TNF- α 组比较, $P < 0.05$

图 4 Apn 对髓核细胞 Adipo R1/R2 mRNA 表达的影响



A

B



A:激光共聚焦显微镜检测显示 Lenti-Adipo R1/R2 组均表达较强的绿色荧光蛋白($\geq 80\%$);B-E:人髓核细胞中 Adipo R1/R2 的过表达情况;F:人髓核细胞经 Adipo R1/R2 有效过表达后,使用 TNF- α 髓核细胞并检测 PGE-2 含量。-:不加处理试剂,+:加入处理试剂。 \dagger 组间比较, $P < 0.05$

图 5 Apn 抑制炎症因子诱导髓核细胞产生 PGE₂

3 讨论

CROCK 等^[1]率先提出椎间盘结构与功能紊乱刺激椎间盘疼痛感受器为椎间盘源性腰痛的发病机制。随着椎间盘退变进展,纤维环由内至外逐渐撕裂、微小血管和末梢神经沿破裂纤维环长入椎间盘,同时髓核内产生的炎症因子渗漏至相邻硬膜外结构、硬脊膜、脊神经节的背根神经,炎症因子刺激长入末梢神经和背根神经节诱发椎间盘源性腰痛。目前研究证实,IL-1 β 、TNF- α 及磷脂酶 A2(PLA2)是与神经根性病变更相关的重要促炎因子^[7],其能刺激细胞产生疼痛介质 PGE₂ 诱发疼痛,抑制 IL-1 β 、TNF- α 和 PLA2 的活性可以降低硬膜外炎症反应、缓解疼痛^[8]。

脂联素(Adiponectin, Apn)是由脂肪细胞分泌的一种激素蛋白,多项研究证实,Apn 具有抗炎、抗氧化应激等功用^[3,9]。既往研究显示,Apn 在骨关节炎中既存在促炎和抗炎双重作用。Apn 诱导 COX-2 和膜结合型前列腺素 E 合成酶-1 的表达,导致 PGE₂ 合成分泌增加、刺激疼痛^[10]。然而亦有实验发现,Apn 能缓解 DBA/1 小鼠的胶原诱导性关节炎模型中骨关节炎严重程度,同时可以减少关节中 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 的表达^[11]。髓核细胞属于软骨样细胞,与关节软骨细胞具有相似的细胞行为学。

本研究着重于检测 Apn 在椎间盘源性腰痛患者中可能发挥的抗炎作用,结果显示盘源性腰痛患者髓核组织内脂联素受体 Adipo R1/2 表达水平降低;为进一步研究是否椎间盘源性腰痛患者椎间盘内炎症环境诱导的 Adipo R1/2 表达差异,本研究采用炎症因子 TNF- α 处理髓核细胞,结果显示炎症介质 TNF- α 能抑制 Apn 受体 Adipo R1/2 的表达,鉴于 TNF- α 亦是椎间盘退变的细胞模型诱导剂,本结果与既往研究类似^[12]。TERASHIMA 等^[12]发现,随着椎间盘退变进展 AdipoR1/2 表达呈下降趋势,此外 Apn 能抑制 IL-1 β 对髓核/纤维环细胞合成分泌炎症因子 TNF- α 的诱导作用。结果表明 Apn 参与椎间盘内炎症抑制作用。

鉴于椎间盘源性腰痛患者髓核细胞分泌大量疼痛介质如 PGE₂ 等,为检测 Apn 是否能抑制髓核细胞合成分泌疼痛介质,采用 Apn 处理髓核细胞,结果显示 Apn 能抑制 TNF- α 诱导髓核细胞分泌 PGE₂、并且呈浓度剂量依赖效应。进一步构建慢病毒 Adipo R1、Adipo R2 过表达载体;发现髓核细胞过表达 Adipo R1/R2 后,均能抑制 TNF- α 对髓核细胞产生 PGE₂ 的诱导作用。结果表明,Adipo R1、Adipo R2 均参与抑制髓核细胞合成分泌疼痛介质 PGE₂,Apn 在椎间盘源性腰痛环境中发挥抗炎、抗应激的功能。

综上所述,本研究通过慢病毒基因沉默等试验发现 **Apn** 能够通过 2 个受体 **Adipo R1** 及 **Adipo R2** 抑制抑制髓核细胞合成分泌疼痛介质 **PGE-2**,提示 **Apn** 可能作为一个保护性因子在椎间盘源性腰痛环境中发挥抗炎、抗应激。因此,可考虑 **Apn** 治疗椎间盘源性腰痛,接下来可以进一步体内实验验证上述作用及相关机制。

参 考 文 献:

- [1] SIMON J, MCAULIFFE M, SHAMIM F, et al. Discogenic low back pain [J]. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 2014, 25(2): 305-317.
- [2] PODICHETTY V K. The aging spine: the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration [J]. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 2007, 53(5): 4-18.
- [3] FISMAN E Z, TENENBAUM A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2014, 13(1): 103.
- [4] CRONSTEIN B N, SUNKUREDDI P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis[J]. *Journal of Clinical Rheumatology*, 2013, 19(1): 19-29.
- [5] BINCH A L, SHAPIRO I M, RISBUD M V. Syndecan-4 in intervertebral disc and cartilage: saint or synner[J]. *Matrix Biology*, 2016(52/54): 355-362.
- [6] CROCK H V. Internal disc disruption. A challenge to disc prolapse fifty years on[J]. *Spine*, 1986, 11(6): 650-653.
- [7] JOHNSON Z I, SCHOEPLIN Z R, CHOI H, et al. Disc in flames: Roles of TNF-alpha and IL-1 beta in intervertebral disc degeneration[J]. *European Cells & Materials*, 2015(30): 104-116.
- [8] ANDRADE P, HOOGLAND G, DEL ROSARIO J S, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibitors alleviation of experimentally induced neuropathic pain is associated with modulation of TNF receptor expression[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2014, 92(11): 1490-1498.
- [9] 陈懿建, 万通, 陈方平. 脂联素 - 一种新的抗炎因子[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2009, 29(1): 86-92.
- [10] LIU D, LUO S, LI Z. Multifaceted roles of adiponectin in rheumatoid arthritis[J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28(2): 1084-1090.
- [11] LEE S W, KIM J H, PARK M C, et al. Adiponectin mitigates the severity of arthritis in mice with collagen-induced arthritis[J]. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 2008, 37(4): 260-268.
- [12] TERASHIMA Y, KAKUTANI K, YURUBE T, et al. Expression of adiponectin receptors in human and rat intervertebral disc cells and changes in receptor expression during disc degeneration using a rat tail temporary static compression model [J]. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2016, 11(1): 147.