DOI:10.16016/j.1000-5404.201602105

# 锌指蛋白 A20 及其相关炎症因子在椎间盘髓核细胞退变前后的表达变化

刘 浠,易威威,温亚枫,叶 禾,谭富强,刘 渤 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科)

[摘要] **目的** 检测椎间盘髓核细胞退变前后锌指蛋白 A20 及其相关炎症因子的表达变化。**方法** 获取我院骨科患者术中切除的椎间盘组织,分为正常组和退变组,采用阿辛蓝染色观察人椎间盘髓核细胞的退变情况,免疫组化观察人椎间盘髓核细胞 A20、TNF-α、IL-1β 及 NF-κB p65 蛋白的表达。体外培养胚胎小鼠髓核细胞,分为对照组(只加入等量的 PBS)、内毒素(LPS)刺激组和 NF-κB 抑制组,分别以 Real-time PCR 检测 LPS 刺激细胞和加入 NF-κB 抑制剂后,A20、TNF-α、IL-1β、Ⅰ型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-4(ADAMST-4)、Ⅰ型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5(ADAMST-5)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达变化;Western blot 检测 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-13、p65、磷酸化 p65(p-p65)的表达变化。**结果** 退变组髓核细胞数量显著少于正常组,并有明显的聚集现象;退变组髓核细胞中 A20、TNF-α、IL-1β、p65 蛋白表达明显高于正常组;LPS 刺激胚胎小鼠髓核细胞后,LPS 刺激组 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMST-4、ADAMST-5、MMP-13 mRNA 与蛋白的表达均高于 NF-κB 抑制组与对照组($P<0.05$),A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-13、p65、p-p65 蛋白含量也较 NF-κB 抑制组与对照组显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 髓核细胞炎症反应与椎间盘退变的发生、发展密切相关,A20 可能通过 NF-κB 信号通路对抑制髓核细胞退变时炎症反应起到关键作用。

[关键词] 椎间盘退变;髓核细胞;锌指蛋白 A20;炎症反应

[中图法分类号] R341;R363.22;R681.53 [文献标志码] A

# Expression of zinc finger protein A20 and related inflammatory factors in nucleus pulposus cells in degenerative intervertebral disc

Liu Xi, Yi Weiwei, Wen Yafeng, Ye He, Tan Fuqiang, Liu Bo (Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of zinc finger protein A20 and related inflammatory factors in nucleus pulposus cells in degenerative intervertebral disc. **Methods** Human intervertebral disc tissues provided by department of orthopedics in our hospital were categorized into normal and degenerative groups. The degenerative degree of nucleus pulposus cells was evaluated by Alcian blue staining. The expression of A20, TNF-α, IL-1β and p65 in nucleus pulposus cells was detected by immunohistochemical (IHC) staining. *In vitro* embryonic mouse nucleus pulposus cells were cultured. Based on the treatment, the cells were divided into control group, LPS stimulation group and NF-κB inhibition group. Real-time PCR (RT-PCR) was performed to measure the mRNA expression of A20, TNF-α, IL-1β, ADAMST-4, ADAMST-5, and MMP-13. Western blotting was used to detect the protein expression of A20, TNF-α, IL-1β, ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-13, p65, and p-p65. **Results** In human degenerative intervertebral disc, the number of nucleus pulposus cells was obviously decreased in favor of aggregation as compared to the normal group. Also, the expression of A20 was significantly higher than the normal group detected by IHC staining. In embryonic mouse nucleus pulposus cells, the mRNA expression of A20, TNF-α, IL-1β, ADAMST-4, ADAMST-5 and MMP-13 was significantly higher in LPS stimulation group than that in NF-kB inhibition group and control group ($P<0.05$). Likely, LPS stimulation increased the protein levels of A20, TNF-α, IL-1β,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81572202)

[通信作者] 刘 渤,E-mail:boliuuc@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160504.0935.005.html(2016-05-04)

ADAMST-4, ADAMST-5, MMP-13, p65 and p-p65 compared to NF-kB inhibition group and control group, which was of statistic significance ($P<0.05$). **Conclusion** The inflammatory response of nucleus pulposus cells is closely related to the occurrence and development of intervertebral disc degeneration, which A20 may play an important role in inhibiting this inflammatory reaction through NF-kB signaling pathway.

[**Key words**] disc degeneration; nucleus pulposus; zinc finger protein A20; inflammatory reaction

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81572202). Corresponding author: Liu Bo, E-mail: boliuuc@163.com

脊柱退行性疾病是脊柱外科常见病和多发病,椎间盘的退变是最主要原因[1]。新近研究表明,由髓核、纤维环细胞所产生的炎性细胞因子及其级联反应在椎间盘退变过程中起关键作用[2-4]。但炎性细胞因子信号通路关键抑制靶点的研究及其对椎间盘退变的保护作用机制目前尚未阐明。因此寻找关键的炎症调控因子,有效抑制椎间盘细胞炎症级联反应及炎性细胞因子的继发性释放显得尤为关键。研究显示锌指蛋白 A20 是一种抑制核因子-κB(NF-κB)活性的胞浆蛋白质,TNF-α、IL-1β 等炎症刺激因素均可诱导内源性 A20 的快速表达。A20 是防止体内炎症反应失控的重要调节蛋白[5]。然而,椎间盘组织髓核细胞退变前后,A20 及其相关炎症因子的表达变化尚不清楚。本研究探讨锌指蛋白 A20 及其相关炎症因子在椎间盘髓核细胞退变前后的表达变化情况,以期为深入研究椎间盘退变机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 人椎间盘髓核组织获取

经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准,所收集的椎间盘组织均来源于我院骨科 2015 年 3 月至 2016 年 3 月住院患者术中常规切除的椎间盘组织,术前与患者签署知情同意书。正常组:临床脊柱骨折患者术中切除已损伤但未退变椎间盘髓核组织,3 例患者,男性 2 例,女性 1 例,平均年龄 22 岁。退变组:临床已发生退变并切除之椎间盘髓核组织,23 例患者,男性 12 例,女性 11 例,平均年龄 67 岁。患者术前均常规完善 MRI 检测,用 Pfirrmann 分级,正常组均为 Grade Ⅰ,退变组为 Grade Ⅲ~Ⅴ。

### 1.2 LPS 刺激胚胎小鼠髓核细胞

胚胎小鼠髓核细胞(由美国芝加哥大学分子肿瘤研究中心何通川教授馈赠)分为 3 组:①LPS 刺激组:胚胎小鼠髓核细胞培养后,在培养基中加入 0.01 μg/mL LPS,在 5% $CO_2$、37 ℃培养箱中培养 12 h 后进行相关检测;②NF-κB 抑制组:胚胎小鼠髓核细胞培养后,在培养基中加入 0.01 μg/mL LPS,同时加入 5 μmol/L BAY 11-7082(NF-κB 抑制剂),在 5% $CO_2$、37 ℃培养箱中培养 12 h 后进行相关检测;③对照组:胚胎小鼠髓核细胞中加入等量的 PBS,在 5% $CO_2$、37 ℃培养箱中培养 12 h 后进行相关检测。

### 1.3 主要实验试剂

DMEM 细胞培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,LPS 购自美国 Sigma 公司,BAY 11-7082 购自美国 Selleck 公司,阿辛蓝染色试剂盒购自北京 Leagene 公司,MTT 试剂购自上海碧云天公司,高纯总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)、2 × Super SYBP Real-time PCR premixture、BioTeke super RT Kit、BCA 蛋白分析试剂盒均购自北京百泰克生物技术有限公司,β-actin 一抗购自美国 Santa Cruz 公司,锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、MMP13 一抗购自中国 Proteintech 公司,p65、p-p65 一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司,ADAMTS4、ADAMTS5 一抗购自美国 Gene Tex 公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,PCR 引物由金斯瑞生物科技公司合成。

### 1.4 阿辛蓝染色

人椎间盘髓核组织经 4% 多聚甲醛固定 48 h,EDTA 微波脱钙 2 周,脱水、包埋、切片、脱蜡至水,入 Alcian 酸化液浸泡 3 min,入 Alcian 染色液染色 15~30 min,流水冲洗 5 min,入核固红染色液复染 10 min,流水冲洗 1 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜下观察。

### 1.5 免疫组化检测人椎间盘髓核组织中锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、p65 的表达

人椎间盘髓核组织经 4% 多聚甲醛固定 48 h,EDTA 微波脱钙 2 周,脱水、包埋、切片、脱蜡至水,3% $H_2O_2$ 孵育 15 min,$ddH_2O$ 浸泡 2 min,PBS 摇床洗涤 3 次,微波抗原修复后自然冷却;PBS 洗涤 3 次,纯山羊血清封闭 10~15 min;滴加锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、p65 一抗(1∶50),4 ℃过夜;复温 45 min;PBS 洗涤,滴加辣根酶标记 IgG 聚合物,室温孵育 60 min;DAB 室温显色 1~2 min,苏木精复染 3~5 min,盐酸酒精分化,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜下观察。

### 1.6 Real-time PCR 检测胚胎小鼠髓核细胞中锌指蛋白 A20 及相关炎症因子 mRNA 的表达

用高纯总 RNA 快速提取试剂盒提取各组细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,用于检测锌指蛋白 A20、

TNF-α、IL-1β、ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-13 mRNA 表达。Real-time PCR 反应体系共 15 μL:2 × Premix 7.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,模板 2 μL,DEPC 水 4.5 μL。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 15 s,55 ℃ 30 s,39 个循环;溶解分析(65 ~ 95 ℃),以 β-actin 为内参照标化各组 cDNA 模板。

### 1.7　蛋白免疫印迹检测胚胎小鼠髓核细胞中锌指蛋白 A20 及相关炎症因子的表达

提取对照组、NF-κB 抑制组和 LPS 刺激组的细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,取等量蛋白上样,10% SDS-PAGE 蛋白电泳分离,250 mA 恒电流转至 PVDF 膜,室温 5% 脱脂牛奶封闭 1 ~ 2 h,TBST 洗膜,加入 β-actin、锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS4、ADAMTS5、MMP13、p65、p-p65 一抗(1∶1 000),4 ℃过夜;TBST 洗膜,分别加入对应二抗(1∶1 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 发光。应用 Image J 软件进行分析,锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS4、ADAMTS5、MMP13、p65、p-p65 与 β-actin 灰度值的比值为蛋白相对表达量。

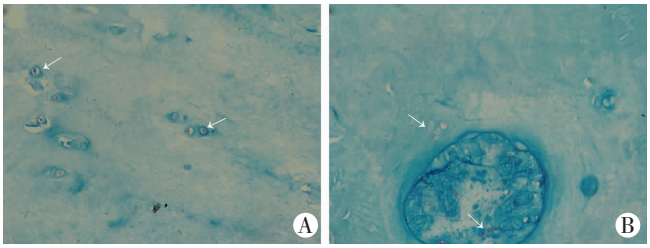
### 1.8　统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两均数比较采用独立样本 $t$ 检验,组间分析采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　人椎间盘髓核组织阿辛蓝染色

阿辛蓝可特异性将酸性粘多糖染成蓝绿色,正常组与退变组均呈蓝绿色,表明所取标本为椎间盘髓核组织。图 1 所示,退变组髓核细胞数量显著少于正常组,同时退变组髓核细胞有明显的聚集现象。




↑:示髓核细胞 A:正常组; B:退变组

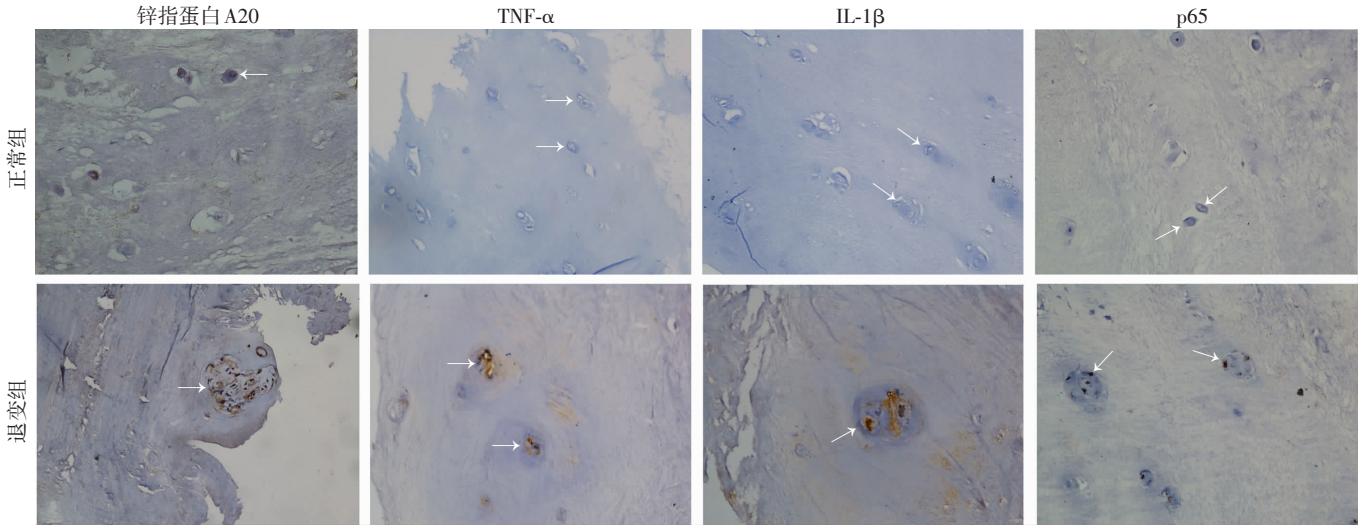
**图 1　阿辛蓝染色观察人椎间盘髓核组织形态变化**(×200)

### 2.2　人椎间盘组织髓核细胞锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、p65 表达情况

免疫组化结果(图 2)显示:正常组髓核细胞细胞质内几乎没有检测到明显的锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β 及 p65 蛋白的表达;而退变组髓核细胞胞质中锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β 及 p65 蛋白表达明显增高,同时髓核细胞出现聚集现象。

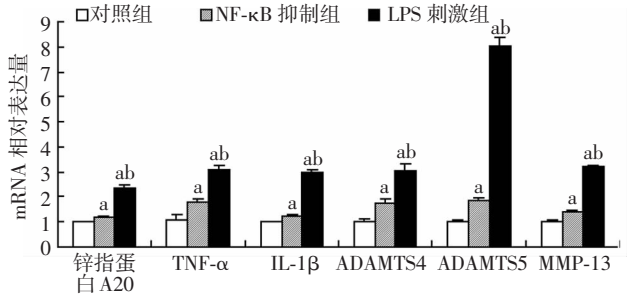
### 2.3　LPS 刺激胚胎小鼠髓核细胞后 A20 及相关炎症因子 mRNA 的表达

与对照组相比,LPS 刺激组与 NF-κB 抑制组 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS-4、ADAMTS-5 及 MMP-13 mRNA 的表达均显著升高($P < 0.05$);而与 LPS 刺激组相比,NF-κB 抑制组 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-13 mRNA 的表达均显著降低($P < 0.05$,图 3)。




↑:示髓核细胞

**图 2　免疫组化检测人椎间盘组织髓核细胞中锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、p65 表达**　(×200)




a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 NF-κB 抑制组比较

**图 3 LPS 刺激胚胎小鼠髓核细胞后锌指蛋白 A20 及相关炎症因子 mRNA 的表达**

### 2.4 LPS 刺激胚胎小鼠髓核细胞后 A20 及相关炎症因子蛋白的表达

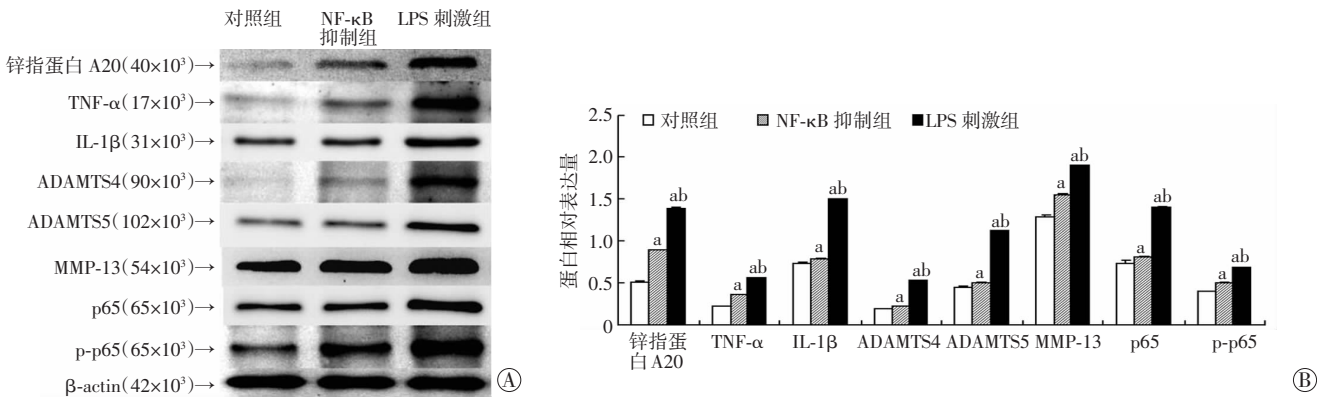
Western blot 检测结果显示:与对照组相比,LPS 刺激组与 NF-κB 抑制组 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS-4、ADAMTS-5 及 MMP-13 蛋白的表达均升高($P<0.05$,图 4);而与 LPS 刺激组相比,NF-κB 抑制组 A20、TNF-α、IL-1β、ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-13 蛋白的表达均降低($P<0.05$)。

## 3 讨论

椎间盘退变与氧化应激、细胞因子、细胞凋亡及基质金属蛋白酶类等在内的多种因素有关[2,6-7]。促炎症分子可引发椎间盘细胞衰老和凋亡[8]。研究[9]证实:TNF-α 和 IL-1β 与椎间盘退变密切相关。由此可见,炎症反应在椎间盘退变的发生、发展中具有重要作用。深入研究炎症反应在椎间盘退变机制中的作用及其治疗措施意义重大。进一步研究显示:与正常椎间盘组织相比,退变椎间盘组织中 IL-1β 表达明显高于 TNF-α 10 倍以上;在退变人椎间盘组织中,高表达的 TNF-α 和 IL-1β 通过调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 NF-κB 信号通路,加剧了蛋白聚糖降解[10-11]。由此可见,NF-κB 信号通路在椎间盘退变炎症反应中处于重要地位。锌指蛋白 A20 最初由 Dixit 等[12]在内皮细胞中发现,其表达受 NF-κB 调控。后续研究进一步证实:A20 对调控机体失控性炎症反应具有重要作用[13-14]。

本研究观察人椎间盘髓核组织退变前后锌指蛋白 A20 的表达情况。参照文献[15]报道,退变组所需椎间盘髓核组织标本均来自我院骨科椎间盘退变患者术中切除的椎间盘髓核组织;因无法获取完全正常人体椎间盘髓核组织用于实验研究,故正常组所需标本均来自我院骨科临床青壮年严重椎体骨折患者已损伤但未退变之椎间盘组织。本研究首先以阿辛蓝染色证实了所取人退变椎间盘髓核组织的确发生了显著的退行性病理改变。然后通过免疫组化染色对退变前后人椎间盘髓核组织锌指蛋白 A20、TNF-α、IL-1β、NF-κB p65 蛋白的表达进行了初步观察,发现退变髓核细胞内 A20、TNF-α、IL-1β、p65 蛋白表达明显高于正常时。实验结果初步提示:人椎间盘组织在退变过程中,伴随着炎症反应,且 A20 与 p65 蛋白的表达也随之增强,NF-κB 信号通路可能与椎间盘退变中炎症因子表达增加密切相关。

为进一步分析锌指蛋白 A20 及其相关因子在退变椎间盘髓核细胞中的表达变化情况,本研究采用胚胎小鼠髓核细胞进行体外培养并用 LPS 刺激,同时应用 NF-κB 抑制剂进行观察。结果显示:与 NF-κB 抑制组和对照组相比,LPS 刺激组 ADAMST-4、ADAMST-5、MMP-13 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高,而应用 NF-κB 抑制剂后,上述指标的表达则显著降低。ADAMST-4、ADAMST-5 是 ADAMTS 家族中两种分泌型金属蛋白酶,在哺乳动物和无脊椎动物体内广泛存在[16]。ADAMTS 可通过特殊蛋白区域与细胞表面及细胞外基质结合,在炎症反应、肿瘤生长和转移等过程中具有重要作用。ADAMTS-4、ADAMTS -5 可降解聚集蛋白聚




A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 NF-κB 抑制组比较

**图 4 Western blot 检测 LPS 刺激胚胎小鼠髓核细胞后锌指蛋白 A20 及相关炎症因子蛋白的表达**

糖,又分别被称为聚集蛋白聚糖酶1(aggrecanase-1)及聚集蛋白聚糖酶2(aggrecanase-2)。有研究表明,椎间盘退变时ADAMTS-4、ADAMTS -5表达上调[5]。MMPs是一类$Ca^{2+}$和$Zn^{2+}$高度依赖的蛋白水解家族,主要包括MMP-1、8、13等。MMP-13又称胶原酶-3,在Ⅱ型胶原降解过程中起主要作用。研究显示在椎间盘退变时,MMP-13的表达明显升高[5]。结合本实验结果,提示LPS刺激胚胎小鼠髓核细胞后的炎症反应过程,诱导了可降解蛋白聚糖和Ⅱ型胶原的细胞因子表达上调,当NF-κB活性被抑制后其表达显著下调,故NF-κB炎性信号通路可能与髓核细胞退变的发生、发展密切相关。

进一步研究表明:与正常椎间盘组织相比,退变的椎间盘组织中TNF-α、IL-1β的表达明显增高;在人椎间盘组织中,随着TNF-α、IL-1β表达的升高,同时也加剧了蛋白聚糖的降解,这一结果是TNF-α、IL-1β通过上调NF-κB信号通路实现的[3,14],这也与本研究实验结果相一致。本研究进一步观察到LPS刺激胚胎小鼠髓核细胞后,TNF-α、IL-1β表达也明显增加,NF-κB活性增强,同时A20表达也显著增高;NF-κB活性降低,A20及细胞因子的表达也明显减少。提示锌指蛋白A20在椎间盘退变的炎症反应中可能具有关键作用。

综上所述,本研究初步证实,炎症反应与椎间盘髓核细胞退变密切相关,而锌指蛋白A20可能通过NF-κB信号通路对抑制髓核细胞退变时炎症反应起到关键作用,其具体作用机制有待深入研究。

**参考文献:**


[1] Deyo R A, Dworkin S F, Amtmann D, *et al*. Focus article report of the NIH task force on research standards for chronic low back pain[J]. Clin J Pain, 2014, 30(8): 701 - 712. DOI: 10.1097/AJP.0000000000000120

[2] Risbud M V, Shapiro I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1): 44 - 56. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.160

[3] Yamamoto J, Maeno K, Takada T, *et al*. Fas ligand plays an important role for the production of pro-inflammatory cytokines in intervertebral disc nucleus pulposus cells[J]. J Orthop Res, 2013, 31(4): 608 - 615. DOI: 10.1002/jor.22274

[4] Kepler C K, Markova D Z, Hilibrand A S, *et al*. Substance P stimulates production of inflammatory cytokines in human disc cells[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(21): E1291 - E1299. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3182a42bc2

[5] Lee E G, Boone D L, Chai S, *et al*. Failure to regulate TNF-induced NF-κB and cell death responses in A20-deficient mice[J]. Science, 2000, 289(5488): 2350 - 2354. DOI: 10.1126/science.289.5488.2350

[6] Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, *et al*. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc[J]. Nat Commun, 2012, 3: 1264. DOI: 10.1038/ncomms2226

[7] Kadow T, Sowa G, Vo N, *et al*. Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations: what are the important translational questions? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(6): 1903 - 1912. DOI: 10.1007/s11999-014-3774-8

[8] Purmessur D, Walter B A, Roughley P J, *et al*. A role for TNFα in intervertebral disc degeneration: a non-recoverable catabolic shift[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(1): 151 - 156. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.034

[9] Molinos M, Almeida C R, Caldeira J, *et al*. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration[J]. J R Soc Interface, 2015, 12(104): 20141191. DOI: 10.1098/rsif.2014.1191

[10] Wang J, Markova D, Anderson D G, *et al*. TNF-α and IL-1β promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc[J]. J Biol Chem, 2011, 286(46): 39738 - 39749. DOI: 10.1074/jbc.M111.264549

[11] Markova D Z, Kepler C K, Addya S, *et al*. An organ culture system to model early degenerative changes of the intervertebral disc II: profiling global gene expression changes[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(5): R121. DOI: 10.1186/ar4301

[12] Dixit V M, Green S, Sarma V, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin[J]. J Biol Chem, 1990, 265(5): 2973 - 2978.

[13] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al*. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-κB signaling[J]. Nature, 2004, 430(7000): 694 - 699. DOI: 10.1038/nature02794

[14] Sun Z, Zhao S, Liu C, *et al*. Effects of nuclear factor kappa B signaling pathway in human intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2015, 40(4): 224 - 232. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000733

[15] Jiang W, Zhang X, Hao J, *et al*. SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells[J]. Sci Rep, 2014, 4: 7456. DOI: 10.1038/srep07456

[16] Kelwick R, Desanlis I, Wheeler G N, *et al*. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family[J]. Genome Biol, 2015, 16: 113. DOI: 10.1186/s13059-015-0676-3


(**收稿**:2016-02-19;**修回**:2016-04-17)

(编辑 龙 亮)