

## • 实验研究 •

## 鹿茸多肽对软骨终板细胞基质蛋白及其降解酶基因表达的影响

李文超<sup>1</sup> 林一峰<sup>1</sup> 梁祖建<sup>1</sup> 沈国喜<sup>1</sup> 原超<sup>1</sup> 朱辉<sup>1</sup> 池立业<sup>1</sup> 张文财<sup>1</sup> 刘洪江<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:观察鹿茸多肽对 IL-1 $\beta$  诱导的大鼠椎间盘软骨终板细胞的增殖及基质蛋白(Ⅱ, X 型胶原)、基质降解酶(金属蛋白酶-13)基因表达的影响。方法:选取 1 月龄的健康 SD 大鼠,对其椎间盘软骨终板细胞进行分离与培养,取第 3 代软骨终板细胞实验,空白对照组不做任何处置,诱导组单加入 10  $\mu\text{g/L}$  的 IL-1 $\beta$ ,药物处理组分三组,分别在培养基中加入 10  $\mu\text{g/L}$  的 IL-1 $\beta$  和 10  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  的鹿茸多肽。MTT 比色法检测三个时间节点(24 h, 48 h, 72 h)各组椎间盘软骨终板细胞的增殖情况;qPCR 检测法对软骨终板细胞中基质Ⅱ, X 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶-13 基因的表达情况。结果:在 24 h, 48 h, 72 h 时间点,MTT 法检测 10  $\mu\text{g/mL}$  鹿茸多肽组在各时间点软骨终板细胞增殖情况与 IL-1 $\beta$  组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );而 30  $\mu\text{g/mL}$  组和 50  $\mu\text{g/mL}$  组均能减轻 IL-1 $\beta$  对软骨终板细胞增殖的抑制作用,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。qPCR 检测结果显示:IL-1 $\beta$  诱导组的Ⅱ型胶原蛋白基因的表达减弱, X 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶-13 基因的表达增强,与空白组对比差异有统计学意义( $P<0.05$ );鹿茸多肽各浓度组均能上升Ⅱ型胶原蛋白基因的表达,下调 X 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶-13 基因的表达水平,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),以 50  $\mu\text{g/mL}$  组效果显著,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结论:一定浓度的鹿茸多肽(50  $\mu\text{g/mL}$  组)能有效地拮抗 IL-1 $\beta$  对软骨终板细胞增殖的抑制作用,上升Ⅱ型胶原蛋白基因的表达,下调 X 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶-13 基因的表达,改善了基质的代谢,起到延缓椎间盘软骨终板退变的作用。

**[关键词]** 鹿茸多肽;软骨终板;椎间盘退变;白介素-1 $\beta$ ;基质金属蛋白酶-13

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)01-0006-05

## Effects of Pilose Antler Polypeptides on Matrix Protein and Matrix Degradation Enzyme mRNA Expression of Rat Cartilage Endplate Cell

LI Wenchao<sup>1</sup> LIN Yifeng<sup>1</sup> LIANG Zujian<sup>1</sup> SHEN Guoxi<sup>1</sup> YUAN Chao<sup>1</sup>  
ZHU Hui<sup>1</sup> CHI Liye<sup>1</sup> ZHANG Wencai<sup>1</sup> LIU Hongjiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Third Hospital, Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510375, China.

**Abstracts Objective:** To observe effects of pilose antler polypeptides (PAP) at different concentrations on matrix protein (collagen type Ⅱ and type X) and Matrix degradation enzyme (MMP-13) mRNA expression of rat cartilage endplate cell induced by the IL-1 $\beta$ . **Methods:** Chondrocytes from endplate of 4-weeks-old SD rat's intervertebral discs were obtained and cultured. Chondrocytes at passage 3 were divided into five groups: normal group without any treatment, induced group with IL-1 $\beta$  (10  $\mu\text{g/L}$ ) and PAP groups with IL-1 $\beta$  (10  $\mu\text{g/L}$ ) divided into three groups adding 10  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$  and 50  $\mu\text{g/mL}$  PAP respectively. MTT method was used to measure the proliferation at three time points (24 h, 48 h, and 72 h), while qPCR method was used to detect the expression of collagen type Ⅱ, type X and MMP-13 mRNA. **Results:** At 24 h, 48 h, and 72 h time point, the proliferation of 10  $\mu\text{g/mL}$  PAP group and induced group were measured by MTT and no significant differences were found ( $P>0.05$ ); while the proliferation were increased in 30  $\mu\text{g/mL}$  and 50  $\mu\text{g/mL}$  PAP groups with significant differences ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). By qPCR, collagen type Ⅱ mRNA expression was decreased, while collagen type X mRNA and MMP-13 mRNA expression were increased in induced group. Compared to the normal group, there was significant difference ( $P<0.05$ ). Compared to the induced group, Collagen type Ⅱ mRNA expression was increased, while collagen type X mRNA and MMP-13 mRNA expression were decreased in all the PAP groups with significant differences ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), especially the 30  $\mu\text{g/mL}$  PAP group and 50  $\mu\text{g/mL}$  PAP group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** This study demonstrated PAP at

certain concentrations can decrease the inhibition of endplate chondrocytes induced by IL-1 $\beta$ , increase the expression of collagen type II mRNA and inhibit the expression of collagen type X mRNA and MMP-13 mRNA, improving matrix metabolism, resulting in relief the cartilage endplate of intervertebral disc degeneration.

**Keywords:** pilose antler polypeptides; cartilage endplate; intervertebral disc degeneration; IL-1 $\beta$ ; matrix metalloproteinase-13

椎间盘退变的分子机制十分复杂,软骨终板的退变显著降低了椎间盘生物力学结构的完整性和盘内营养、废物的交换,破坏了细胞外基质的代谢平衡<sup>[1]</sup>,是椎间盘退变的始动因素。软骨终板中基质主要成分 II 型胶原(Collagen II)合成减少,X 型胶原(Collagen X)增多是软骨终板退变和钙化的标志<sup>[2]</sup>。以降解 II 型胶原为主的基质金属蛋白酶-13(Matrix Metalloproteinase-13,MMP-13)也来源于软骨细胞。中医认为脊柱退变源于督脉阳气的虚衰<sup>[3]</sup>,临床以温养督脉为法治疗退变性脊柱病,疗效显著<sup>[4]</sup>。鹿茸为温养督脉阳气之第一要药,鹿茸多肽是从梅花鹿茸中分离纯化出的一种多肽物质,富含多种细胞生长因子,能抑制心肌干细胞的凋亡<sup>[5,6]</sup>,增强心肌干细胞分化基因的表达<sup>[7]</sup>,促进软骨细胞增殖,以 50  $\mu\text{g/mL}$  浓度为最佳<sup>[8]</sup>,抑制软骨细胞凋亡<sup>[9]</sup>,阻止关节软骨基质中糖胺多糖和 II 型胶原表达减少<sup>[10]</sup>。但对椎间盘软骨终板的影响还未见报道,为此本实验选用 IL-1 $\beta$  诱导软骨终板细胞退变模型,观察不同时间节点软骨终板细胞的增殖情况以及 II,X 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶-13 基因的表达变化,旨在分析鹿茸多肽对软骨终板细胞及基质蛋白及其降解酶基因表达的影响,探讨温养督脉阳气来治疗椎间盘退变的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞来源

健康 1 月龄 SD(Sprague-Dawley)大鼠,SPF 级,均购自常州卡文斯动物有限公司,许可证号 SCXK(苏)2016-0010。

### 1.2 试剂及仪器

盐酸氯胺酮注射液(批号 H35020148,福建古田药业有限公司),1640 基础培养基(Gibco 公司),胎牛血清(FBS,Gibco 公司),0.25%胰蛋白酶(美国,Pro-mega 公司),IL-1 $\beta$ (美国,Sigma 公司),二甲亚砜(DMSO,Gibco 公司),75%的乙醇(DEPC 水配制),氯仿,异丙醇,琼脂糖,iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),SsoFast EvaGreen Supermix(Bio-Rad Laboratories,Hercules, CA),MACC1 引物及  $\beta$ -actin 引物(美国,Sigma 公司),DEPC 水(Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO),吸管,细胞超净台,37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱,水浴锅,磁力搅拌器,低温高速离心机,低温冰箱,EP 管,枪头,弯头吸

管,分光光度计(BeckmanDU800,USA),凝胶成像仪,电泳槽,q-PCR 仪(Bio-Rad CFX96),96 孔板,酶标仪(Thermo variol skant flash,USA)。

### 1.3 药品

鹿茸多肽,由中国农业科学院特产研究所春义鹿茸研究组提供。

### 1.4 大鼠椎间盘软骨终板细胞的分离和培养

将大鼠氯胺酮腹腔注射麻醉,酒精喷湿被毛,大鼠背部朝上,剪开被毛,露出椎间盘,取出椎间盘软骨组织,将组织用无菌 PBS 清洗 3 次,剪碎为 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm,加入 4 mL 酶消化液,37  $^{\circ}\text{C}$  消化 1 h,充分吹打细胞消化液,使细胞尽量脱落,200 目过滤,收集沉淀物,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加无菌 PBS 清洗并离心两次,弃上清,在含有体积分数为 0.1 的胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)以及含有 1%青霉素/链霉素的 DMEM 中培养,将培养皿放置到 5% CO<sub>2</sub>,37  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱内培养。细胞传代扩增:吸出 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中的培养基,用 PBS 清洗细胞 1 次,添加 0.125%胰蛋白酶消化液约 1 mL 至培养瓶中,37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 3 min 左右,倒置显微镜下观察,待细胞回缩变圆后吸弃消化液。再加入完全培养液终止消化,用吸管轻轻吹打混匀,按 1:2 比例进行接种传代,然后补充新鲜的完全培养基至 5 mL,放入 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养;待细胞完全贴壁后,培养观察。之后每隔 2~3 d 更换新鲜的完全培养基,将密度长到 80% 以上的第 3 代软骨终板细胞取出进行实验。

### 1.5 大鼠椎间盘软骨终板细胞的鉴定

细胞爬片完成后,去除培养液,取 4%多聚甲醛将细胞固定 15 min,用 PBS 反复漂洗 3 次,加入 0.1%甲苯胺蓝染色 30 min,用 PBS 反复漂洗 3 次,然后 4%多聚甲醛中 15 min 固定后,在室温条件下消化 10 min,用 PBS 反复漂洗 3 次,在体积分数为 1%的 BSA 中封闭 30 min,然后添加 1%的 BSA 稀释的 II 型胶原一抗(1:200 稀释),在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 24 h。用 PBS 反复漂洗 3 次,添加荧光二抗,在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下杂交 1 h,用 PBS 反复漂洗 3 次,在显微镜下观察并照相记录。

### 1.6 MTT 法测鹿茸多肽对大鼠椎间盘软骨细胞增殖的影响

取第 3 代软骨终板细胞接种于 96 孔酶标板中,分别为正常组、IL-1 $\beta$  诱导组以及鹿茸多肽各浓度给药

组,正常组添加 DMEM 培养液,IL-1 $\beta$  诱导组添加含有 10  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  的 DMEM 培养液,鹿茸多肽各浓度组分别添加配置好的 10  $\mu$ g/mL,30  $\mu$ g/mL,50  $\mu$ g/mL 鹿茸多肽的培养液。每孔 100  $\mu$ L,用铝箔包裹培养板,于 37  $^{\circ}$ C 湿润环境中温育 4 h。弃去孔中的培养基和 MTT(轻柔操作,防止结晶丢失),加入 150  $\mu$ L DMSO,以溶解残留的 MTT-甲臜结晶。水平摇床低速混合 10 min,使结晶充分溶解。酶标仪 490 nm 处记录吸光值。将 24 h,48 h,72 h 测得的 OD 值汇总。

1.7 qPCR 检测

1.7.1 总 RNA 的提取 每孔  $1\times 10^{-5}$  的浓度将细胞放置于 6 孔板内,用 2 mL 含有 10% FBS 的 DMEM 培养细胞,3 d 后改用无血清培养基培养过夜,10  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  的 DMEM 培养,给药组为不同浓度鹿茸多肽(10  $\mu$ g/mL,30  $\mu$ g/mL,50  $\mu$ g/mL)添加 0.5% 的 FBS、含 10  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$  的培养基培养 24 h。用 RNAeasy kit 抽提 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度并标记。取 2 ng $\sim$ 2  $\mu$ g 总 RNA 用 MMLV-RT 逆转录酶按照说明书合成 cDNA。

1.7.2 q-PCR 按照试剂说明书配好反应体系,上机进行实时 PCR 扩增和检测。引物序列见表 1,反应体系为 20  $\mu$ L 总体系,具体是 2 $\times$ Mix SYBR Green I 荧光反应液 10  $\mu$ L,上下游引物(10 pmol/L)各 0.25  $\mu$ L,样品模板 1  $\mu$ L,用灭菌水补足 20  $\mu$ L 体系。反应条件 95  $^{\circ}$ C 2 min 预变性,循环内 95  $^{\circ}$ C 30 s 变性,60  $^{\circ}$ C 退火 35 s,PCR 反应设置 40 个循环,并在每个循环延伸末端点收集荧光信号,绘制扩增曲线;40 个循环后设置(95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 15 s)反应步骤,并且对 60 $\sim$ 95  $^{\circ}$ C

升温整个过程全程荧光信号收集,绘制融解曲线。每个样本重复 3 个复孔,Bio-Rad CFX96 Manager 软件分析,GraphPad 软件作图。

表 1 引物序列

基因	初始序列(5 $\rightarrow$ 3 $'$ )	
	Forward Primer	Reverse Primer
$\beta$ -actin	CCCATCTATGA	TTTAATGTCACG
	GGGTTACGC	CACGATTTC
Collagen X	TCTGGGATGCC	GTCGTGATACT
	TCTTGTC	GGGTTCTAG
Collagen II	AGAGCGGAGAC	CCCCTTCCCTAT
	TACTGGATTG	GGTGAT
MMP-13	TTGTGGCGATT	CGTCAGAAAGAA
	GCAGGTCT	ACCGAA

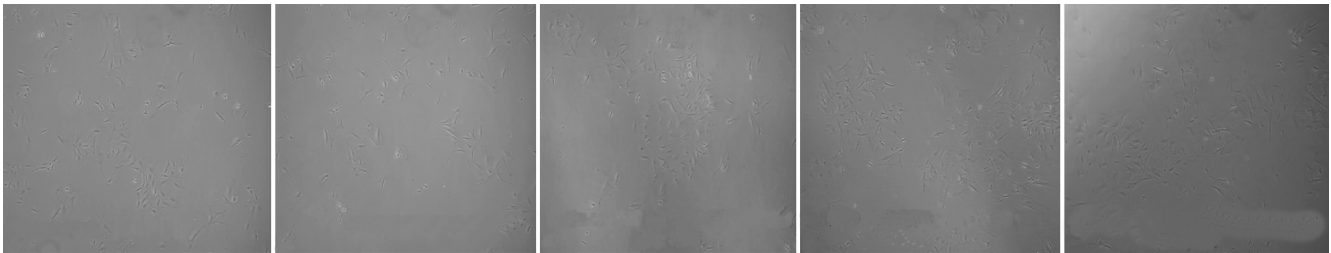
1.8 统计学分析

采用 SPSS22.0 统计软件,进行方差分析,多组与同一组比较采用最小显著差法(LSD)法;检验水准  $\alpha=0.05$ , $P<0.05$  差异有统计学意义,数据均以  $\bar{x}\pm s$  表示。

2 结果

2.1 倒置显微镜下(300 倍)

原代软骨终板细胞形态学观察,刚分离的终板软骨细胞呈球形,24 h 后细胞逐渐开始贴壁,呈梭形均匀生长,胞核大而圆。6 d 左右,细胞间开始出现突起相连结,周围有基质样物质沉积,培养的 3 代软骨终板细胞维持了软骨终板细胞原有的表型(见图 1A)。药物施加 24 h 后,IL-1 $\beta$  诱导组软骨终板细胞见图 1B,IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 10  $\mu$ g/mL 组软骨终板细胞见图 1C,IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 30  $\mu$ g/mL 组软骨终板细胞见图 1D,IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 50  $\mu$ g/mL 组软骨终板细胞见图 1E。



A 3代软骨终板细胞 B 24 h后IL-1 $\beta$  诱导组软骨终板细胞 C 24 h后IL-1 $\beta$  +鹿茸多肽 10  $\mu$ g/mL软骨终板细胞组 D 24 h后IL-1 $\beta$  +鹿茸多肽 30  $\mu$ g/mL软骨终板细胞组 E 24 h后IL-1 $\beta$  +鹿茸多肽 50  $\mu$ g/mL软骨终板细胞组

图 1 各组 24 h 软骨终板细胞(300 $\times$ )

2.2 鹿茸多肽对 IL-1 $\beta$  抑制软骨终板细胞增殖作用的影响

正常组软骨终板细胞在各时间点均能正常生长,增殖较为平缓。在 24 h,48 h,72 h 各时间点上 IL-1 $\beta$  组均显示能抑制软骨终板细胞的生长,差异有统计学意义( $P<0.05$ );10  $\mu$ g/mL 鹿茸多肽组在各时间点软骨终板细胞增殖情况与 IL-1 $\beta$  组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );鹿茸多肽 30  $\mu$ g/mL 组和 50  $\mu$ g/mL 组与 IL-1 $\beta$

组对比,均能减轻 IL-1 $\beta$  对软骨终板细胞增殖的抑制作用,差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),见表 2。

2.3 鹿茸多肽对诱导软骨终板细胞 MMP-13, Collagen II, Collagen X 基因表达影响

各组细胞培养 24 h 进行检测,与空白对照组比较,软骨终板细胞经过 IL-1 $\beta$  诱导后,细胞中 MMP-13, Collagen X 基因表达水平升高( $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ),Collagen II 表达降低,差异有统计学意义( $P<$

0.05)。鹿茸多肽各给药组与诱导组进行比较,均可降低 MMP-13 及 Collagen X 基因表达量,差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );上调 Collagen II 基因表

达量,差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );以 50  $\mu\text{g/mL}$  组效果显著,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见表 3 及图 2。

表 2 软骨终板细胞 MTT 法检测结果( $\bar{x}\pm s,n=5$ )

组别	24 h	<i>t</i>	48 h	<i>t</i>	72 h	<i>t</i>
空白组	0.15±0.02 <sup>1)</sup>	2.36	0.22±0.17 <sup>2)</sup>	6.85	0.35±0.07 <sup>2)</sup>	9.06
IL-1 $\beta$ 组	0.11±0.01		0.12±0.02		0.14±0.02	
IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 10 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.12±0.15 <sup>3)</sup>	0.33	0.14±0.06 <sup>3)</sup>	1.32	0.18±0.01 <sup>3)</sup>	2.06
IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 30 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.13±0.27 <sup>1)</sup>	2.74	0.18±0.01 <sup>2)</sup>	4.44	0.25±0.03 <sup>1)</sup>	5.03
IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.14±0.33 <sup>1)</sup>	2.82	0.20±0.03 <sup>2)</sup>	5.52	0.31±0.04 <sup>2)</sup>	7.16
<i>F</i>	2.57		16.88		26.4	
<i>P</i>	0.155		0.014		<0.001	

注:与 IL-1 $\beta$ (10  $\mu\text{g/L}$ )组比较,采用 LSD 检验法,1) $P<0.05$ ,2) $P<0.01$ ,3) $P>0.05$ 。

表 3 软骨终板细胞 MMP-13,Collagen X,Collagen II 基因表达量比较( $\bar{x}\pm s,n=3$ )

组别	MMP-13	Collagen II	Collagen X
空白组	1.02±0.05 <sup>1)</sup>	0.99±0.25 <sup>2)</sup>	1.03±0.05 <sup>1)</sup>
IL-1 $\beta$ 组	3.19±0.54	0.31±0.21	3.46±0.64
IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 10 $\mu\text{g/mL}$ 组	2.45±0.72 <sup>2)</sup>	0.42±0.32 <sup>2)</sup>	2.59±0.52 <sup>2)</sup>
IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 30 $\mu\text{g/mL}$ 组	1.63±0.42 <sup>2)</sup>	0.84±0.12 <sup>2)</sup>	1.89±0.42 <sup>2)</sup>
IL-1 $\beta$ +鹿茸多肽 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	1.25±0.24 <sup>1)</sup>	0.91±0.54 <sup>1)</sup>	1.67±0.34 <sup>1)</sup>
<i>F</i>	5.94	5.19	26.72
<i>P</i>	0.015	0.024	<0.01

注:与 IL-1 $\beta$ (10  $\mu\text{g/L}$ )组比较,采用 LSD 检验法,1) $P<0.05$ ;2) $P<0.01$ 。

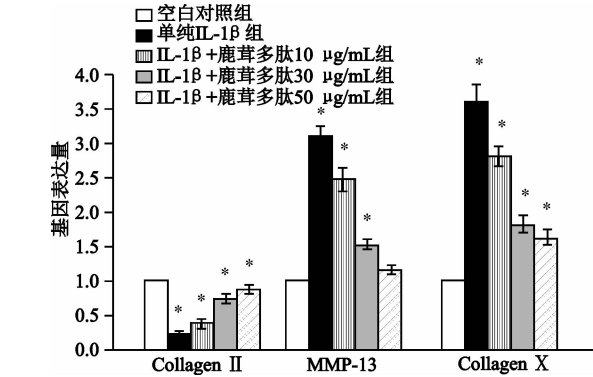


图 2 各组软骨终板细胞 MMP-13,Collagen X,Collagen II 基因表达量比较

3 讨论

椎间盘退变是指椎间盘自然老化、退化的生理病理过程,它是一系列退行性脊柱病的病理基础<sup>[11]</sup>。软骨终板作为椎间盘退变的始动因素,一旦发生退变或钙化,将妨碍椎间盘营养的输送和废物的排除,导致盘内乳酸增加,氧含量降低,产生多种细胞炎症因子如白细胞介素-1、肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ 7,17-22)、基质金属蛋白酶(MMP-1,-2,-3,-4,-13,-6)等,促进盘内细胞更广泛的炎症反应,进一步降低合成代谢因子、蛋白聚糖、II 型胶原等<sup>[12]</sup>,加速整个椎间盘的退变<sup>[1]</sup>。虽然对软骨终板退变的具体机制尚不明确,但目前研究的热点多聚焦于炎症因子、软骨终板细胞的凋亡、基质成分、基质降解酶等方面。其中白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ )属于椎间盘中调节基质退变的一个

十分重要的致炎细胞因子,通过软骨终板细胞合成分泌<sup>[13,14]</sup>。研究表明能诱导软骨终板细胞的变性<sup>[15]</sup>,导致大量功能蛋白和酶类表达明显降低,从而构建椎间盘退变的细胞退变模型<sup>[16-18]</sup>。本研究中,取 10  $\mu\text{g/L}$  的 IL-1 $\beta$  刺激软骨终板细胞,MTT 法检测发现能明显抑制软骨终板细胞的增殖,与空白对照组对比差异有统计学意义( $P<0.05$ );q-PCR 检测发现,与空白对照组对比,软骨终板细胞中 MMP-13,Collagen X 基因表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ , $P<0.01$ );Collagen II 基因表达明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与既往研究结论相符<sup>[19]</sup>。软骨终板属于透明软骨,主要由透明的软骨终板细胞和丰富的细胞外基质组成,细胞外基质则主要富含 II 型胶原及蛋白聚糖<sup>[20]</sup>。当软骨终板出现退变和钙化时,基质表现为 II 型胶原及蛋白聚糖的降解,浓度降低<sup>[21]</sup>,其基因的表达在软骨终板细胞中明显减少<sup>[19]</sup>。在钙化组织及其周边细胞外基质中则会出现较多的 X 型胶原及其基因的表达<sup>[22]</sup>。X 型胶原是由肥大软骨细胞合成分泌的,能激活钙通道,引起钙离子快速流入基质,钙离子进一步促进 X 型胶原的产生<sup>[23]</sup>,X 型胶原的增加会增加软骨终板的钙化,引发更严重的椎间盘退变。MMP-13 与其他基质金属蛋白酶相比,具有更高的切割降解基质的能力,对 II 型胶原蛋白的催化效率是 MMP-1 的 5 倍,与椎间盘退变关系最为密切<sup>[24]</sup>,抑制 MMP-13 可有效防止软骨基质的降解和丧失<sup>[25]</sup>。

Huang 等<sup>[26]</sup>发现在退变的软骨终板细胞中有高浓度的分解代谢因子 MMP-13 基因的表达和低浓度 II 型胶原蛋白基因的表达,同时补充  $\alpha 2$ -巨球蛋白能抑制促炎细胞因子表达,从而延缓椎间盘退变。

本研究用 MTT 法检测发现 10  $\mu\text{g/mL}$  鹿茸多肽在各时间点软骨终板细胞增殖情况与 IL-1 $\beta$  诱导组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而 30  $\mu\text{g/mL}$  和 50  $\mu\text{g/mL}$  鹿茸多肽组与 IL-1 $\beta$  诱导组对比,均能减轻 IL-1 $\beta$  对软骨终板细胞增殖的抑制作用,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明只有达到了一定浓度的鹿茸多肽才能促进软骨终板细胞的增殖。q-PCR 法检测软骨终板细胞中 MMP-13、II 和 X 型胶原蛋白基因的表达与 IL-1 $\beta$  诱导组对比,各浓度的鹿茸多肽(10  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ )均能上升 II 型胶原蛋白基因的表达。下调 MMP-13、X 型胶原蛋白基因的表达水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),以 50  $\mu\text{g/mL}$  组效果最为明显,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。因此,鹿茸多肽延缓软骨终板退变的机制可能是一定浓度鹿茸多肽能大幅度减轻相关基质降解酶与基质蛋白基因的表达,减轻基质的降解,有效拮抗 IL-1 $\beta$  对软骨终板细胞增殖的抑制。

中医认为椎间盘属“筋”的范畴,“阳气者,柔则养筋”,鹿茸生发阳气,强筋壮骨,为温通督脉阳气之第一要药,但具体机制不详。本实验选用梅花鹿茸提取的纯化多肽物质-鹿茸多肽,富含多种细胞生长因子,有强筋骨、壮肾阳、益精血、延年益寿、抗衰老等功效<sup>[27]</sup>,临床研究证明了通过温养督脉阳气来治疗以椎间盘退变为病理基础的一系列退行性脊柱病的科学性<sup>[4]</sup>。一定浓度鹿茸多肽(浓度  $> 30 \mu\text{g/mL}$ )能有效拮抗炎症因子 IL-1 $\beta$  对软骨终板细胞增殖的抑制,调控软骨终板细胞中基质蛋白(II, X 型胶原)、基质降解酶(MMP-4-13)等活性蛋白的基因表达,改善了软骨终板细胞及其基质的代谢,丰富了中医关于椎间盘退变从温养督脉阳气方面论治的理论。

## 参考文献

- [1] SHIRAZI-ADL A, TAHERI M, URBAN J P, et al. Analysis of cell viability in intervertebral disc: effect of endplate permeability on cell population[J]. Biomech, 2010, 43(7):1330-1336.
- [2] BYVALTSEV V A, KOLESNIKOV S I, BELYKH E G, et al. Complex analysis of diffusion transport and microstructure of an intervertebral disk[J]. Bull Exp Biol Med, 2017, 164(2):223-228.
- [3] 林一峰, 直彦亮, 梁祖建, 等. 浅谈温养督脉法治疗脊柱退行性疾病的思路与方法[J]. 新中医, 2010, 42(8):99-100.
- [4] 唐汉武, 林一峰, 原超, 等. 温通督脉法治疗退行性腰椎管狭窄症的临床研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5):1148-1150.
- [5] 黄晓巍, 徐岩, 刘玥欣, 等. 鹿茸多肽对心肌干细胞凋亡和线粒体膜稳定性的影响[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(9):1426-1631.
- [6] ZHA E, LI X, LI D, et al. Immunomodulatory effects of a 3.2 kDa polypeptide from velvet antler of cervus nippon temminck[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 16(2):210-213.
- [7] 黄晓巍, 徐岩, 刘玥欣, 等. 鹿茸多肽介导心肌干细胞分化对终末心肌分化基因 ANP 和 MLC-2V 表达的影响[J]. 吉林大学学报:医学版, 2018, 44(2):249-251.
- [8] LIN J H, DENG L X, WU Z Y, et al. Pilose antler polypeptides promote chondrocyte proliferation via the tyrosine kinase signaling pathway[J]. J Occup Med Toxicol, 2011, 6(1):27(1-5).
- [9] 李振华, 赵文海, 冷向阳, 等. 鹿茸多肽对兔骨性关节炎软骨细胞增殖及凋亡调节作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(10):701-703.
- [10] 张春霞, 孙磊, 修忠标, 等. 鹿茸多肽对实验性膝骨性关节炎关节软骨中糖胺多糖和 II 型胶原水平的影响[J]. 中国骨伤, 2012, 25(2):138-142.
- [11] DE SCHEPPER E I, DAMEN J, VAN MEURS J B, et al. The association between lumbar disc degeneration and low back pain: the influence of age, gender, and individual radiographic features[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2010, 35(5):531-536.
- [12] ABBIE L A, IRVING M, SHAPIRO, et al. Syndecan-4 in intervertebral disc and cartilage: saint or synner? [J]. Matrix Biol, 2016, 5254:355-362.
- [13] TAKIGAWA Y, HATA K, MURAMATSU S, et al. The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9[J]. J Cell Sci, 2010, 12(3):3780-3788.
- [14] HAUDENSCHILD D R, CHEN J, PANG N, et al. Rho-kinase-dependent activation of Sox9 in chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(1):191-200.
- [15] WANG G, HUANG K, DONG Y, et al. Lycorine suppresses endplate-chondrocyte degeneration and prevents intervertebral disc degeneration by inhibiting NF- $\kappa$ B signalling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(3):1252-1269.
- [16] 张宇, 赵永见, 周泉, 等. IL-1 $\beta$  诱导小鼠椎间盘软骨终板细胞炎性退变的细胞模型研究[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(8):665-668.
- [17] DUPAUL-CHICOINE J, SALEH M. A new path to IL-1 $\beta$  production controlled by caspase-8 [J]. Nat Immunol, 2012, 13(3):211-212.
- [18] ZHANG Y, ZHAO Y J, ZHOU Q, et al. Inflammatory disc degeneration cell model induced by IL-1 $\beta$  on mouse endplate chondrocytes[J]. Immunol J, 2012, 28:665-668.
- [19] 陈军平, 王兆杰, 安荣泽, 等. 软骨终板通透性对兔退变腰椎间盘 II 型胶原表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(10):781-784.

- [20] LAFFOSSE J M, ACCADBLE F, MOLINIER F, et al. Correlations between effective permeability and marrow contact channels surface of vertebral endplates[J]. Orthop Res, 2010, 28(9):1229-1234.
- [21] 张昭, 杨学军, 宋雄英, 等. 兔椎间失稳后弹性内固定软骨终板Ⅱ型胶原蛋白变化的实验研究[J]. 河北医科大学学报, 2015, 36(7):775-776.
- [22] 骆阳, 齐璨, 罗鹏远, 等. 甲状旁腺素对卵巢切除大鼠椎间盘软骨终板Ⅰ型胶原及Ⅹ型胶原表达的影响[J]. 河北医科大学学报, 2015, 39(2):155-159.
- [23] 张恒, 周庄, 勾禹, 等. 甲状旁腺激素对椎间盘退变的影响及研究进展[J]. 中国综合临床, 2015, 31(4):375-378.
- [24] 胡宝山, 许喜筠, 郭元利, 等. 关于腰椎间盘退变过程中基质金属蛋白酶-13 的来源[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(17):4894-4896.
- [25] WANG J, MA J, GU J H, et al. Regulation of type Ⅱ collagen, matrix metalloproteinase-13 and cell proliferation by interleukin-1 $\beta$  is mediated by curcumin via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling in rat chondrocytes[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2):1837-1845.
- [26] HUANG B, ZHANG X, ZHENG Z, et al. Alpha 2-macroglobulin as dual regulator for both anabolism and catabolism in the cartilaginous endplate of intervertebral disc[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2018, 22:1097-1099.
- [27] 杨光旭, 魏雪苗. 鹿茸多肽药理学活性的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2017, 38(2):126-129.

(收稿日期:2018-08-04)