

· 基础研究 ·

肿瘤坏死因子- α 对人髓核间充质干细胞衰老的影响[△]

伍耀宏, 莫平凡*

(南昌大学附属赣州医院脊柱外科, 江西赣州 341000)

摘要: [目的] 探索肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor - α , TNF- α) 对人髓核间充质干细胞的衰老的影响。[方法] 分离培养第三代正常人髓核间充质干细胞 (human nucleus pulposus mesenchymal stem cells, hNPMSCs), 分为空白对照组和 TNF- α 组, 分别加入无血清培养基与 TNF- α 浓度为 100 ng/ml 的无血清培养基干预 48 h。镜下观察细胞形态, 并用细胞衰老 β 半乳糖苷酶试剂盒染色, 对细胞衰老情况进行观察; CCK-8 检测第 1、3、5、7、9、11、13、15 d 后的细胞增殖活性; Western Blot 检测衰老相关蛋白 P53、P16 表达情况。[结果] 镜下观察及 β 半乳糖苷酶染色均可见 TNF- α 组细胞呈衰老状态。CCK-8 检测, 随时间推移两组细胞 CCK-8 检测光密度 (optical density, OD) 值均显著增加 ($P < 0.05$)。相应时间点两组间比较, 第 1~7 d, 两组间的人 NPMSCs 增殖活性 OD 值的差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而第 9~15 d, TNF- α 组的人 NPMSCs 的 OD 值均显著低于空白对照组 ($P < 0.05$)。Western Blot 检测显示 TNF- α 组衰老相关蛋白 P53、P16 的表达显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。[结论] TNF- α 能够抑制人 NPMSCs 的生物学活性, 加速细胞衰老。

关键词: 肿瘤坏死因子- α , 髓核间充质干细胞, 细胞衰老

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 16-1487-05

Effects of TNF- α on the senescence of human nucleus pulposus mesenchymal stem cells // WU Yao-hong, MO Ping-fan. Ganzhou Hospital, Nanchang University, Ganzhou 341000, China

Abstract: [Objective] To explore the effect of TNF- α on the senescence of human nucleus pulposus mesenchymal stem cells. **[Method]** The normal human nucleus pulposus mesenchymal stem cells (hNPMSCs) were isolated from human undegenerated lumbar disc and cultured to the third generation, and then divided into the normal blank control group and TNF- α group, which were treated with serum-free medium, and serum-free medium contenting TNF- α of 100 ng/ml for another 48 h respectively. The cell morphology was observed under the microscope and then stained by senescence β -galactosidase kit. CCK-8 assay was used to assess the cell viability at 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 days after treatment, while western blot assay was performed to detect the expression of aging-related protein p53 and p16. **[Result]** The microscopic observation and β -galactosidase staining showed that the hNPMSCs treated with TNF- α were considerably more senescent than those in the blank control group. As results of CCK-8 assay, the optical density (OD) presenting cell proliferation viability ramped up significantly in both groups over time ($P < 0.05$). Although there were not statistically significant differences between the two groups from 1 day to 7 days ($P > 0.05$), the TNF- α group had significantly lower OD than the control group from 9 days to 15 days ($P < 0.05$). Regarding to western blot detection, the TNF- α group presented significantly higher expression of aging-related proteins p53 and p16 than the control group ($P < 0.05$). **[Conclusion]** In this study, the TNF- α does inhibit cell proliferation of hNPMSCs, whereas accelerate senescence of the cells.

Key words: tumor necrosis factor- α (TNF- α), nucleus pulposus mesenchymal stem cells, senescence

颈肩腰腿痛主要是因为椎间盘退变突出压迫神经所致^[1, 2], 对椎间盘退变的具体机制现尚未阐明。而目前针对其的治疗手段有限, 为了从根本上治疗椎间盘退变疾病, 对椎间盘退变机制的研究已成为当今的热点^[3]。大量研究表明机体组织的生长及修复与组织

或器官来源的成体干细胞有着紧密的联系, 如皮肤组织的再生修复与皮肤来源的干细胞, 血液组织再生与血液来源干细胞, 肝组织损伤后的再生与修复与肝组织来源的干细胞^[4]。近期, 同样有研究认为人髓核间充质干细胞 (human nucleus pulposus mesenchymal

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.16.10

[△]基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81960407); 江西省青年科学基金项目(编号: 20171BAB215026)

作者简介: 伍耀宏, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 椎间盘退变及其修复, (电话) 15717073715, (电子信箱) wuyao hong1986@126.com

* 通信作者: 莫平凡, (电子信箱) 12812829@qq.com

stem cells, HNPMSCs) 是维持椎间盘内稳态的关键因素,并在椎间盘的变性和修复中起重要作用^[5, 6], NPMSCs 衰老可能是加速椎间盘退变的重要环节^[7]。炎症微环境在椎间盘退变中起着至关重要的作用,同时也是引起病理学衰老的重要因素。TNF- α 作为重要的炎症因子,与椎间盘退变进程密切相关^[8]。目前研究证明,低浓度 TNF- α 能够促进大鼠 NPMSCs 的迁移、增殖等生物学功能^[9]。但对于 TNF- α 对 HNPMSCs 的衰老影响尚未见报道。本研究旨在探讨 TNF- α 对 HNPMSCs 衰老的生物学影响,进而了解椎间盘退变疾病的机制,为今后针对其治疗的手段提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 髓核组织来源

获取因手术摘除的未退变髓核组织,主要来源于脊柱创伤、畸形患者。实验所取标本均获得患者及家属同意,签署知情同意书,并获得南昌大学附属赣州医院伦理委员会批准。

1.2 髓核间充质干细胞分离培养

手术中获取髓核组织,洗涤、剪碎后置于 0.1% II 型胶原酶 37℃ 摇床中消化 4 h,终止消化,1 200 r/min × 6 min 离心。将细胞重悬后接种在培养瓶中,在 37℃ 恒温细胞培养箱中培养,常规方法进行传代培养获取 P1 代细胞,将 P1 代人 NPMSCs 以 10 个/ml 密度接种至培养皿,2~3 d 换液 1 次,待细胞集落形成且融合至 80% 左右,培养获取干细胞集落,继续传代至 P3 代。

1.3 体外干预

使用 10% FBS (fetal bovine serum) 的完全培养基培养细胞至 P3 代后,去除原完全培养基,使用 PBS 缓冲液冲洗培养瓶 2~3 次。将细胞分为空白对照组和 TNF- α 组,分别加入无血清培养基与含 TNF- α 浓度为 100 ng/ml 的无血清培养基,培育 48 h,进行后续实验。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 β 半乳糖苷酶染色

六孔板中培养 P3 代细胞,观察细胞形态。吸出培养液,PBS 洗涤 3 min,再予以 β 半乳糖苷酶染色固定液室温固定 15 min,吸出固定液,PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,去除 PBS 后加入染色工作液 1 ml,37℃ 孵育过夜,保鲜膜封住孔板。显微镜下观察细胞染色情况,并计算每个视野内染色阳性细胞数量,阳

性率 = (视野中阳性细胞数量/视野中总细胞数量) × 100%。

1.4.2 CCK-8 检测

取 P3 代人 NPMSCs,分别按 2×10^3 个种于 96 孔板孔中,每 2 d 换液 1 次。分别检测第 1、3、5、7、9、11、13、15 d 的细胞活性。加入 10 μ l CCK-8 溶液,培养箱中孵育 4 h,在酶标仪中检测在 450 nm 处每孔的光吸收值 (optical density, OD),每个时间点各组 5 个孔,重复 3 次。

1.4.3 Western blot 检测

获取 48 h 干预后 NPMSCs,检测 P53、P16 衰老相关蛋白表达水平。按照说明书提取总蛋白,检测蛋白浓度,利用 SDS-PAGE 将等量总蛋白电泳分离,转移至 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭后,加入上述途径各关键蛋白的一抗,4℃ 过夜。TBST 缓冲液漂洗,加入辣根过氧化物酶标记的二抗。室温反应 2 h, TBST 洗膜 3 次。显色后在凝胶成像系统中进行曝光,显影定影观察结果。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,资料呈正态分布时,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内时间点比较采用单因素方差分析;资料呈非正态分布时,采用秩和检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态及 β -半乳糖苷酶染色

镜下观察人 NPMSCs 的形态见图 1,空白对照组细胞呈长梭形,折光性良好,细胞饱满、立体感强,镜下体积大 (图 1a); TNF- α 组细胞细长,折光性差,细胞干瘪,无立体感,镜下体积小,提示细胞活性降低 (图 1b)。

β -半乳糖苷酶染色见图 2,空白对照组 β -半乳糖苷酶染色呈现淡蓝色的阳性衰老细胞较少,细胞多呈半透明状 (图 2a)。相比之下, TNF- α 组中因 β -半乳糖苷酶染色呈现淡蓝色的阳性衰老细胞占比显著增加,且着色加深 (图 2b)。两组阳性细胞比率比较直方图见图 2c, TNF- α 组平均阳性率为 (77.10 \pm 10.51) %, 空白对照组平均阳性率 (27.99 \pm 6.08) %, 两组差异有统计学意义 (*P* < 0.05),表明经 TNF- α 刺激后, HNPMSCs 的衰老程度增加,停止分裂。

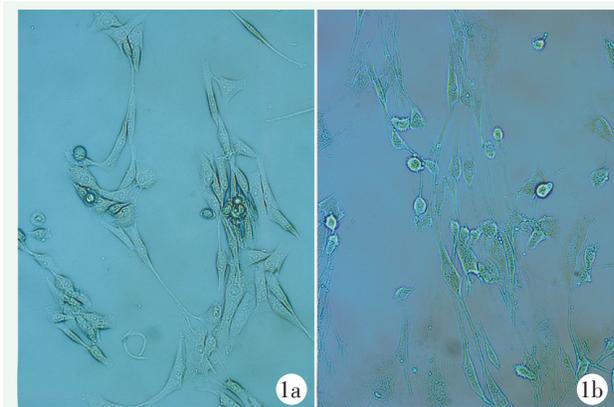


图1 HNPMSCs的细胞形态观察 1a: 空白对照组, 细胞呈长梭形, 折光性良好, 细胞饱满、立体感强, 镜下体积大 1b: TNF- α 组, 细胞细长, 折光性差, 细胞干瘪, 无立体感, 镜下体积小

2.2 细胞增殖能力

CCK-8法对人NPMSCs的增殖情况检测结果见表1。随时间推移, 两组细胞CCK-8检测OD值均极显著增加 ($P < 0.001$)。相应时间点两组间比较, 第1~7 d, TNF- α 组与空白对照组的人NPMSCs增殖活

性OD值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在第7~9 d开始, TNF- α 组的人NPMSCs的增殖OD值开始显著低于空白对照组 ($P < 0.01$), 且从第9 d起两组间细胞增殖活性OD值的差距逐渐增加。第9~15 d, TNF- α 组的人NPMSCs增殖活性OD值均极显著低于空白对照组 ($P < 0.001$)。

2.3 Western blot 检测衰老相关蛋白水平

Western Blot检测HNPMSCs中衰老相关蛋白P53、P16表达结果见图3。计算TNF- α 组与空白对照组中各条带对应的灰度值, 将TNF- α 组中P53与P16的灰度值除以空白对照组中P53与P16的灰度值, 得到TNF- α 组中P53与P16相对于空白对照组的相对表达量。空白对照组中, P53与P16的蛋白表达量为1个单位, TNF- α 组的P53蛋白相对表达量为 (2.41 ± 0.41) , P16蛋白相对表达量为 (1.85 ± 0.29) , 空白对照组与TNF- α 组中2种蛋白表达上的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中TNF- α 组与空白对照组在蛋白P16上表达量的差距相对于蛋白P53的差距要小。

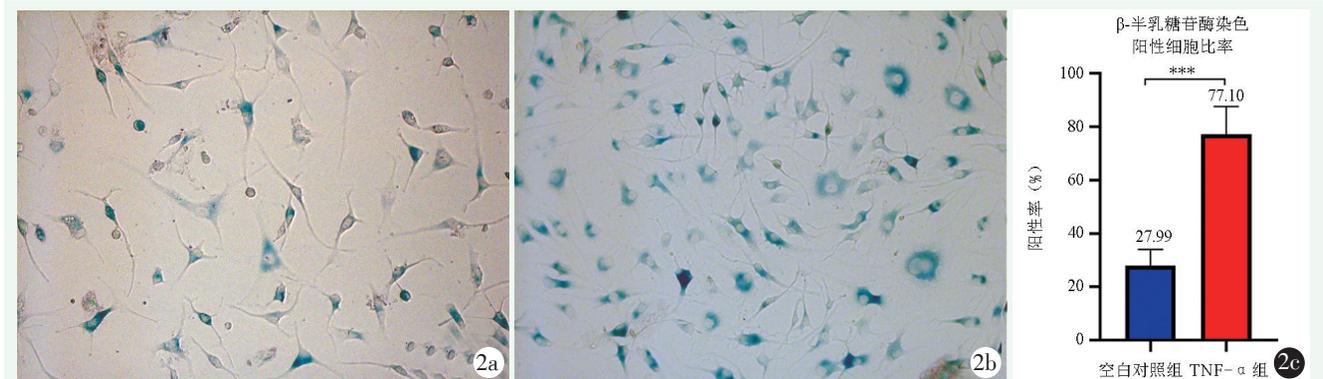


图2 β 半乳糖苷酶染色 2a: 空白对照组, 呈现淡蓝色的阳性衰老细胞较少 2b: TNF- α 组, 淡蓝色的阳性衰老细胞占比明显增加 2c: 两组阳性衰老细胞比率的比较直方图, 空白对照组显著低于TNF- α 组

表1 不同时间点两组细胞增殖CCK-8检测结果 (OD值, $\bar{x} \pm s$) 与比较

时间点	空白对照组 (n=5)	TNF- α 组 (n=5)	P值
1 d	0.10 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.627
3 d	0.19 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.877
5 d	0.24 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.586
7 d	0.31 \pm 0.01	0.30 \pm 0.01	0.069
9 d	0.37 \pm 0.01	0.35 \pm 0.01	0.003
11 d	0.41 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01	<0.001
13 d	0.48 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	<0.001
15 d	0.50 \pm 0.01	0.40 \pm 0.01	<0.001
P值	<0.001	<0.001	

3 讨论

椎间盘分为髓核、纤维环、终板三部分, 近年来, 这三部分组织相继发现了间充质干细胞的存在, 三种椎间盘组织来源的间充质干细胞均在椎间盘退变过程中发挥着重要作用^[10-12]。众所周知, 椎间盘退变始发于髓核组织的退变, 因此髓核组织来源的NPMSCs在三种椎间盘来源的间充质干细胞中也相对更受研究者的关注。Risbud等^[10]首次从退变的椎间盘组织中分离出表达一系列骨髓间充质干细胞表面抗原分子并具有分化能力的细胞, 并命名为髓核间充质干细胞(NPMSCs)。Blanco等^[13]根据国际干细胞治

疗学会制定的标准对 NPMSCs 进行了鉴定，证实了 NPMSCs 具有干细胞免疫表型和多向分化能力。越来越多研究证明，NPMSCs 是椎间盘内稳态平衡的关键

因素，其生物学活性的改变能够影响椎间盘的退变过程^[4]。

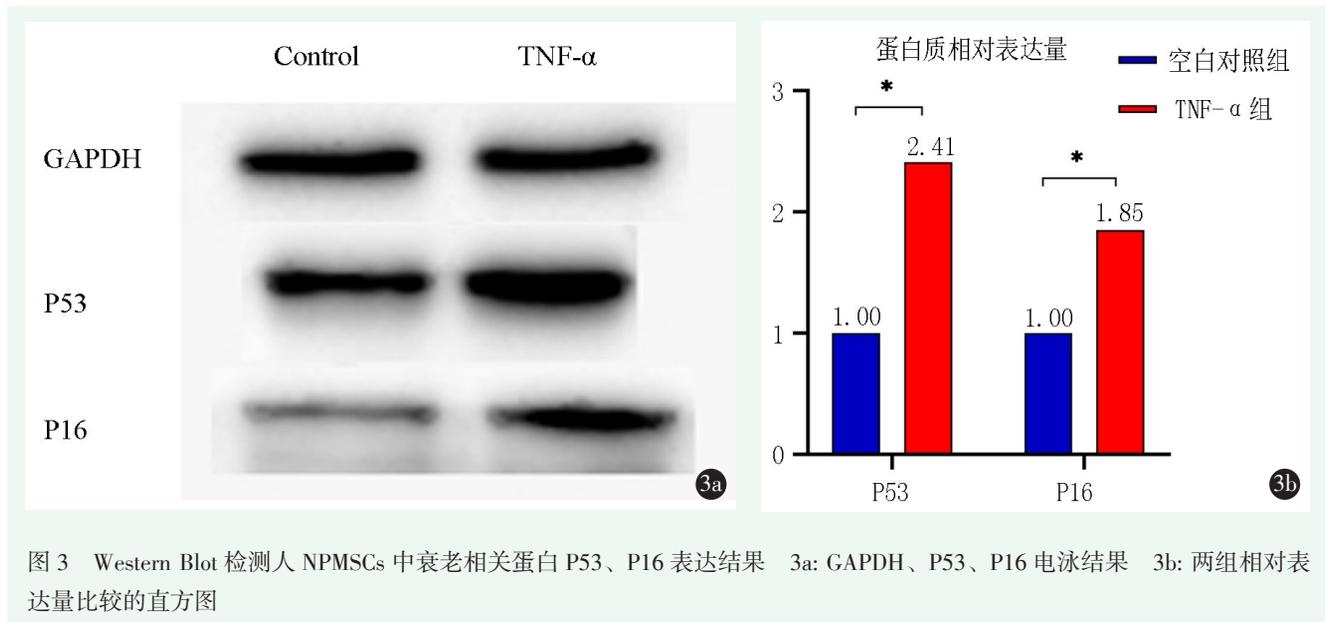


图3 Western Blot 检测人 NPMSCs 中衰老相关蛋白 P53、P16 表达结果 3a: GAPDH、P53、P16 电泳结果 3b: 两组相对表达量比较的直方图

传统观念认为，干细胞具有无限潜能，能够持续分裂。然而越来越多研究表明，干细胞并非无限分裂，它在内部及外部因素作用下也可出现衰老现象^[14]。同样作为干细胞的 NPMSCs，也存在衰老现象。Sakai 等^[15]发现，在椎间盘退变过程中，NPMSCs 的数量及功能并不是一成不变的，会随年龄的增加和椎间盘退变程度的加重而耗竭，细胞衰老即是耗竭的主要原因。TNF- α 作为椎间盘退变的重要炎症因子，也是影响椎间盘内细胞生物学性能的重要因素^[16]。彭鑫等^[17]研究发现，TNF- α 能够通过锌指蛋白 A20 介导髓核细胞的衰老过程。程实等^[9]利用低浓度的 TNF- α 干预大鼠 NPMSCs，发现能够促进 NPMSCs 的增殖活性以及迁移能力，一定程度上可以促进椎间盘退变的修复作用，此研究结论仅限于低浓度 TNF- α 对大鼠 NPMSCs 的影响，至于高浓度 TNF- α 对大鼠 NPMSCs 的影响尚无定论。截止目前，TNF- α 对人 NPMSCs 衰老影响的相关研究未见报道。在本研究中，将高浓度 (100 ng/ml) 的 TNF- α 干预人 NPMSCs 2 d 后，细胞形态发生明显变化， β 半乳糖苷酶染色提示细胞衰老明显增加，CCK-8 结果提示第 7 d 以前细胞增殖活性组间无明显差异，可能与接种细胞密度较低及 HNPMSCs 的增殖较缓慢有关，因此在第 7 d 后，TNF- α 组较空白对照组 HNPMSCs 的增殖活性显著降低。P53/P21 和 P16/PRb 信号途径是细胞衰老的重要信号通路^[18]，本研

究分别选择了 2 条重要通路的关键蛋白 P53 及 P16 进行蛋白水平检测，结果提示 TNF- α 组蛋白表达水平均较空白对照组增加，证明 TNF- α 通过 P53/P21 和 P16/PRb 信号途径介导了人 NPMSCs 的衰老过程。

综上所述，高浓度 TNF- α 能够激活 P53/P21 和 P16/PRb 信号途径促进人 NPMSCs 的衰老进程。但本研究尚未对信号通路上下游分子机制进行深入研究，后续将进一步探讨 TNF- α 能够促进 HNPMSCs 相关机制，为椎间盘退变的机制提供新的研究思路。

参考文献

- [1] Peng B, DePalma MJ. Cervical disc degeneration and neck pain [J]. *J Pain Res*, 2018, 11: 2853-2857.
- [2] 孙磊, 宁志杰. 慢性非特异性腰痛 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2010, 18 (23): 1967-1969.
- [3] Oichi T, Taniguchi Y, Oshima Y, et al. Pathomechanism of intervertebral disc degeneration [J]. *JOR Spine*, 2020, 3 (1): e1076.
- [4] Li Z, Peroglio M, Alini M, et al. Potential and limitations of intervertebral disc endogenous repair [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015, 10 (4): 329-338.
- [5] Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing C, et al. The presence of local mesenchymal progenitor cells in human degenerated intervertebral discs and possibilities to influence these in vitro: a descriptive study in humans [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22 (5): 804-814.
- [6] Lazzarini R, Guarnieri S, Fulgenzi G, et al. Mesenchymal stem cells from nucleus pulposus and neural differentiation potential: a continuous challenge [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 67 (1): 111-124.

- [7] Huang D, Peng Y, Ma K, et al. Puerarin relieved compression-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction in human nucleus pulposus mesenchymal stem cells via the PI3K/Akt pathway [J]. *Stem Cells Int*, 2020; 7126914.
- [8] 杜伟, 申勇, 李宝俊, 等. 细胞因子 IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、MMP3 与颈椎间盘退变机制的相关性研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2012, 20 (3): 259-262.
- [9] 程实, 林凌瀚, 应金威, 等. 低浓度 TNF- α 对大鼠髓核间充质干细胞增殖及迁移的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26 (3): 242-247.
- [10] Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32 (23): 2537-2544.
- [11] Feng G, Yang X, Shang H, et al. Multipotential differentiation of human anulus fibrosus cells [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 92 (3): 675.
- [12] Liu LT, Huang B, Li CQ, et al. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (10): 1-14.
- [13] Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35 (26): 2259-2265.
- [14] 吴平平, 胡文龙, 殷婷婷, 等. FOXO4 通过抑制凋亡维持人脐带间充质干细胞衰老 [J]. *生理学报*, 2020, 72 (4): 426-432.
- [15] 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, 13 (3): 1264.
- [16] Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, et al. Disc in flames: roles of TNF- α and IL-1 β in intervertebral disc degeneration [J]. *Eur Cell Mater*, 2015, 30: 104-117.
- [17] 彭鑫, 张聪, 王锋, 等. A20 介导 TNF- α 炎症微环境下髓核细胞衰老的机制研究 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29 (9): 834-840.
- [18] 郑文婕, 童坦君, 张宗玉. 细胞衰老的重要通路: p16INK4a/Rb 和 p19ARF/p53/p21Cip1 信号途径 [J]. *生命的化学*, 2002, 22 (4): 18-20.

(收稿:2021-01-01 修回:2022-05-16)
(同行评议专家:黄波 饶义康)
(本文编辑:宁桦)

读者·作者·编者

如何提高向本刊投稿的成功率

为了提高向本刊投稿的成功率,避免稿件反复修改而延长刊用周期,投稿前一定要认真研读本刊近期出版的杂志,特别是应检索相关内容的文章,并注意参考其内容。可登录《中国矫形外科杂志》官网 (<http://jxwk.ijournal.cn>) 点击“期刊浏览”栏目,按提示阅读。在网站首页点击来稿要求,即可查看最新的《中国矫形外科杂志》稿约,在下载区查看 2021 年本刊各栏目样稿,并按照稿约及样稿的要求书写。稿件格式一定要按拟投栏目的格式要求撰写,字数、图表、参考文献要完全符合相应栏目要求。在投稿系统上传稿件的同时,必须上传 2 个基本附加文件(单位介绍信、学术诚信承诺书)。如有基金支持一定要标注清楚,在读研究生、住院医师投稿必须要有导师或上级医师推荐函。

除以上附加文件外,如作者能提供同行专家推荐意见(2名),对文稿内容的科学性、创新性、实用性、可读性做出评价。可提升本刊来稿审评效率,缩短审稿周期,使优质稿件尽快发表。

以上附加文件的参考样式请登录《中国矫形外科杂志》官网 (<http://jxwk.ijournal.cn>) 首页下载专区下载。填写并签名或加印章后,需制成 JPG 或 PDF 文件,上传至本刊投稿系统,或将原件快递至编辑部。必备文件齐全后,本刊方对稿件进行处理。

投稿步骤如下:

(1) 点击网站左侧“作者登录”按钮。(2) 输入您已注册的账号及密码。(3) 如您不需要修改您的信息,请点击下一步跳过。(4) 点击页面左侧“投稿”按钮。(5) 依次点击“下一步”及“已阅读并同意”。(6) 上传全文。(7) 在附件中上传单位介绍信、学术诚信承诺书、基金证明文件、导师推荐函(适用于在读研究生)、上级医师推荐函(适用于高级职称以下人员),以及同行评议函(限非本单位专家)。文中有图片时,必须将每一个独立画面的图像文件,以高清质量(300dpi)的 JPG 格式,按在正文中的名称,如:1a,1b,3c 等命名文件,在附件中同时上传。然后点击下一步。(8) 填写稿件基本信息,完成投稿。

《中国矫形外科杂志》编辑部

2022年1月25日