

• 论 著 •

## 老年血液循环因素对年轻小鼠椎间盘衰老表型的影响 \*

雷昌斌<sup>1</sup> 林宏生<sup>2</sup> 唐新文<sup>1</sup> 郭志文<sup>1</sup> 蔡永得<sup>1</sup> 唐 光<sup>1</sup> 王 东<sup>3</sup> 王 炯<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup> 湘南学院附属医院 ( 临床学院 ) 临床医学研究中心, 郴州 423000; <sup>2</sup> 暨南大学第一附属医院骨科, 广州 510632; <sup>3</sup> 匹兹堡大学, 弗格森实验室, Pittsburgh 匹兹堡 15261)

**摘 要 目的:** 通过异时联体共生 (heterochronic parabiosis) 模型评估年老小鼠血液循环因素对年轻小鼠脊柱椎间盘衰老表型的影响。**方法:** 本研究通过手术建立年轻和年老小鼠同时 (isochronic parabiosis, IP)、异时联体共生模型。随机选择 3 个月龄的年轻及 18 个月龄年老雌性小鼠。联体 8 周后分成同时联体年轻小鼠组 (young isochronic, Y-Y), 异时联体年轻小鼠组 (young heterochronic, Y-O), 同时联体年老小鼠组 (old isochronic, O-O)。通过组织切片 H&E 染色观察椎间盘组织学改变, 提取椎间盘组织行 Western blot 和 RT-qPCR 检测衰老基因 P16、P21 及金属蛋白酶 MMP13、ADAMTS4 蛋白和基因表达的差异性。取脊柱椎间盘组织进行组织免疫荧光检测 aggrecan 基因表达差异。**结果:** H&E 染色结果显示 Y-Y 组椎间盘纤维环结构完整, 纤维环及髓核组织没有裂痕, 纤维环及髓核分界清楚, 髓核组织含大量髓核细胞, 基质完整; 而 Y-O 组可见纤维环结构破损并出现裂痕, 纤维环及髓核分界不清, 髓核细胞数相比 Y-Y 组明显减少; O-O 组表现为老年椎间盘形态特征。IF 检测 aggrecan 基因表达量 Y-Y 组明显高于 Y-O 及 O-O 组, 各组间表达有差异性 ( $P < 0.05$ )。Western Blot 检测 P16 蛋白表达 Y-O 组比 Y-Y 组升高  $77.1 \pm 20.5\%$  ( $P < 0.05$ ), RT-qPCR 检测 P16 基因 Y-O 组有升高的趋势, 但组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); Western Blot 检测 P21 蛋白 Y-O 组比 Y-Y 组有升高, 但无明显统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 但 RT-qPCR 检测 P21 基因 Y-O 组比 Y-Y 组升高  $40.5\% \pm 6.7\%$ 、O-O 组比 Y-Y 组升高  $95.5\% \pm 24.2\%$  ( $P < 0.05$ ); 金属蛋白酶 MMP13 及 ADAMTS4 蛋白在 Y-Y 组表达明显低于 Y-O 及 O-O 组 ( $P < 0.05$ ), RT-qPCR 检测 MMP13 及 ADAMTS4 基因表达差异性与蛋白表达相符合。**结论:** 老年小鼠血液循环因素可以加速年轻小鼠椎间盘衰老退变。

**关键词** 联体共生; 椎间盘退变; 血液循环; 衰老

### Influences of circulatory factors of aged mice on intervertebral disc aging phenotype of young mice \*

LEI Chang-Bin<sup>1,2</sup>, LIN Hong-Sheng<sup>2</sup>, TANG Xing-Wen<sup>1</sup>, GUO Zhi-Wen<sup>1</sup>, CAI Yong-De<sup>1</sup>, TANG Guang<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>3</sup>, WANG Jiong<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup> Clinical Medical Research Center, The Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou 423000, China;

<sup>2</sup> Department of Orthopaedics, The first Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China;

<sup>3</sup> Ferguson Laboratory for Orthopaedic Research, Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261)

**Abstract Objective:** The purpose of this study was to investigate the effect of blood circulation factors in aged mice parabiosis model on intervertebral disc aging. **Methods:** The Young (Y, age 3 month) and Old (O, age 18 month) wildtype C57B6 female mice were randomly selected to build Heterochronic Parabiosis and Isochronic Parabiosis model. Mice were separated into three groups, Young Isochronic (Y-Y), Young Heterochronic (Y-

\* 基金项目: 湖南省教育厅普通高校教改项目 (882); 湘南学院国家可持续发展创新议程专项 (201939); 郴州市社会科学基金一般规划项目 (Czssk12017041);

△ 通讯作者 王炯 284228190@qq.com



O), old Isochronic (O-O). The H-E staining was used to observe changes in disc histology. The differences in protein and gene expression of aging genes P16, P21 and metalloproteinase MMP13, ADAMTS4 were detected by Western blot and RT-qPCR. Differences in aggrecan gene expression were detected by immunofluorescence.

**Results:** The results suggested decreased nucleus pulposus (NP) cells and increased clefts in annulus fibrosus (AF) compartment, after exposing young disc to old blood circulation environment. The expression of aggrecan gene decreased in (Y-O) and O-O groups compared to Y-Y group with significant statistical difference among groups ( $P < 0.05$ ). We found P16 protein increased in Y-O group by  $77.1 \pm 20.5\%$  than that in Y-Y group ( $P < 0.05$ ). The P16 gene also increased, but there was no statistical difference between them ( $P > 0.05$ ). The p21 gene increased  $40.5\% \pm 6.7\%$  in Y-O group and  $95.5\% \pm 24.2\%$  in O-O group compared to Y-Y group ( $P < 0.05$ ). The P21 protein increased in Y-O group compared to Y-Y group without statistical difference ( $P > 0.05$ ). We also found the expression of MMP13, ADAMTS4 protein increased in Y-O and O-O group compared to Y-Y group with significant statistical difference ( $P < 0.05$ ). RT-qPCR detected differences in gene expression between MMP13 and ADAMTS4 that are consistent with protein expression. **Conclusion:** The results of this study suggest that the old global blood circulating factors may accelerate the disc aging process.

**Key words** Parabiosis model; Intervertebral disc degeneration; Blood circulation; Ageing

随着人口老龄化进程,退变性疾病逐渐成为影响人们健康和生活水平的主要疾病<sup>[1]</sup>。腰痛也随之成为第二大常见病及多发病。据统计有超过 80% 的人一生中会出现过腰痛,是病人手术的第 5 大病因<sup>[2]</sup>。而椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是引起腰痛的主要病因,造成了重大的社会经济和医疗负担<sup>[3]</sup>。椎间盘退变可由衰老、氧化应激、炎症、DNA 损伤、生物力学改变及全身因素、吸烟、肥胖等引起,其中衰老是引起椎间盘退变的最重要因素<sup>[4,5]</sup>。椎间盘既坚韧又富有弹性,具有缓冲脊柱受压和冲击的作用。椎间盘是人体最大的没有血液供应的器官,内部髓核营养物质及代谢产物,主要通过上下终板及纤维环的外 1/3 毛细血管的渗透作用<sup>[4]</sup>。衰老的椎间盘包括脱水、纤维化、裂隙,椎间盘高度降低等改变,容易造成纤维环破裂、髓核突出<sup>[6]</sup>。目前的治疗和研究都集中在椎间盘局部因素使椎间盘细胞损伤、细胞基质损失,导致椎间盘细胞死亡或衰老<sup>[7]</sup>。也有少量研究证实椎间盘外因素如骨质疏松和血管硬化症<sup>[8]</sup>、肌营养不良<sup>[9]</sup>等可以加速椎间盘退变。但是尚无血液循环因素对椎间盘退变的影响研究。

异时联体共生模型 (heterochronic parabiosis model) 通过将年轻和年老个体的皮肤及软组织相连,使个体间毛细血管融合达到血液和代谢产物交换的目的,距今已有 150 多年的历史<sup>[10]</sup>。联体共生模型有在肿瘤、移植、免疫耐受方面的应用,但直到 20 世纪中后叶才开始在衰老研究中应用。Loffredo 等<sup>[11]</sup>报道异时联体共生模型通过血液交换,年轻小鼠血液中生

长分化因子 11 (growth differentiation factor 11, GDF11) 蛋白可以逆转年老小鼠心肌细胞衰老肥大。本研究团队的前期实验也证实异时联体共生模型血液循环因素可以影响脊柱椎旁肌肉组织的衰老退变<sup>[12]</sup>。椎间盘是人体最大的缺少血液供应器官,营养物质仅通过上下椎板及外围纤维环渗透吸收。联体共生模型能否通过血液循环因素影响缺少血液供应的椎间盘组织的衰老退变? 因此,我们假设老年小鼠血液循环因素可以加速年轻小鼠椎间盘衰老退变。本研究通过建立小鼠异时联体共生模型,对比同时联体 (isochronic parabiosis) 共生模型,评估血液循环因素对小鼠脊柱椎间盘退变的影响,探讨其作用机制,为重新认识椎间盘衰老的原因并探索新的治疗思路提供理论基础。

## 方 法

### 1. 试剂与仪器

培养基: 90% DMEM/F-12(1X) (Life Technologies 公司, 美国); 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (ATLANTA 公司, 美国)。抗体: p16、p21、ADAMTS4、MMP13 (abcam 公司, 美国), LC3 (Thermo 公司, 美国)。DAPI: (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 即 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚, 规格: 2 ml; 型号: P36935 (Invitrogen 公司, 美国)。Quant-iT PicoGreen ds DNA 试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国); 流式细胞仪: 2030 Multilabel Reader VicToR X3 (PerkinElmer 公司, 美国)。聚偏二氟乙烯膜 (poly vinylidene difluoride, PVDF, Bio-Rad 公司, 美国), Western Blot 仪器: (Bio-RAD 公司,



美国)。清洁操作台、病理切片机及荧光显微镜 (Nikon Eclipse Ts100; Nikon 公司, 美国)。

## 2. 实验动物

实验通过动物伦理委员会审查和审批, 并严格遵守国家卫生和医学研究委员会对实验动物护理和管理的相关指南。选用 C57BL/6J 野生型雌性小鼠, 其中年轻小鼠选择 3 个月龄, 年老小鼠选 18 个月龄, 对体重无明显限制。联体手术后按标准条件下每对联体小鼠单笼饲养, 给予充足的食物和水, 并注意消毒和使用抗生素预防联体病。

## 3. 动物模型的建立和分组

将年轻和年老的小鼠异时联体 (heterochronic parabiosis, Y-O), 年轻和年轻小鼠同时联体 (iso-chronic parabiosis, Y-Y), 年老的和年老的小鼠同时联体 (isochronic parabiosis, O-O), 分别联体融合 8 周。术前进行 1 周的适应治疗, 并注意做好小鼠保温及清洁消毒, 手术从一侧小鼠上肢肘关节沿腹部到下肢膝关节处切开皮肤, 从筋膜层分离皮瓣, 为了增大血液交流面积将皮肤及部分腹膜融合, 后者注意连续缝合。麻醉苏醒后检测, 可将小鼠放置 37℃ 温箱有助于小鼠体温调节恢复。每个笼子只能饲养一对共生小鼠, 提供充足的水及食物。术后 24 h 从尾部静脉注射 Evan blue 染料检测联体小鼠是否共享血液循环。文献报道异时联体 2 周后, 两个不同个体的血液循环可达到动态平衡。联体 8 周后处死小鼠, 解剖小鼠脊柱椎间盘组织检测。

## 4. 组织 H&E 染色及免疫荧光染色

取各组脊柱腰椎 (L<sub>5-6</sub>) 功能单位 (functional spine unit, FSU), FSU 一侧尽量靠近终板避免破坏椎间盘组织, 另一侧保留 2 mm 骨组织便于后期包埋操作。将 FSU 浸泡在 2% 多聚甲醛中 24 h, 用 1%PBS 清洗 2 遍后加入 70% 酒精继续浸泡 24 h, 后用石蜡包埋及切片, 进行标准 H&E 染色和组织免疫染色 (LC3)。

## 5. 组织免疫荧光 (immunofluorescence, IF)

解剖脊柱腰椎 (L<sub>1-L4</sub>) 椎体功能单位, 将 FSU 浸泡于 2% 的多聚甲醛中过夜, 取出后用 1%PBS 冲洗 3 次, 将冲洗后 FSU 浸泡在 30% 的蔗糖溶液中放置 4℃ 房间过夜。取出 FSU 用包埋剂 (optimum cutting temperature, OCT) 包埋 (注意将保留骨组织的一端朝上), 放置 -80℃ 冰箱 1 天后冰冻切片, 组织厚度设定为 7 μm, 切片需要包括纤维环组织及内部髓核组织。贴片后的载玻片放入 1% PBS 液 5 min 洗 3 次, 封闭 1 h 后加入 150 μl 一抗 (aggrecan 1:200 稀释) 避光过夜。第 2 天用 PBS 液洗 5 次, 再加

入二抗 150 μl (抗体按 1:500 稀释), 再次用 1%PBS 液洗 5 次后加入 DAPI 染色盖上盖玻片, 注意避光孵育。样本使用尼康荧光显微镜读片, 使用相同的设置和曝光时间获取不同组别的图像并进行等效处理。

## 6. 蛋白印痕检测 (Western blot analysis)

解剖提取颈椎和胸椎椎间盘组织, 称重后按 1 g:10 ml 加入蛋白裂解液, 提取各样本组织蛋白, 平衡蛋白浓度后每孔加入 30 μg 蛋白量, 使用 4%~20% 聚丙烯酰胺凝胶跑胶, 之后用 PVDF 转膜。室温下在 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h。分别加入一抗 P16、P21、MMP13、ADAMTS4 (1:1000 稀释) 在 4℃ 摇摆平台上过夜。第 2 天用 TBS-T 缓冲液清洗 3 遍 PVDF 膜, 每次 10 min, 之后在室温下加入二抗 (1:1 0000 稀释) 并避光摇晃 1 h。后再用 PBS-T 洗涤 3 次, 使用奥德赛成像仪以化学显色蛋白质条带, 并且通过使用仪上的软件进行定量分析。

## 7. RT-qPCR 检测 RNA 表达

解剖提取腰椎 L<sub>1-L3</sub> 椎间盘组织后, 用 Trizol 法提取组织总 RNA 并进行逆转录。按照预先设定的热学过程: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 15 s, 58℃ 退火 30 s, 62℃ 延伸 1 min, 50 个循环, 保存设置。用 GAPDH 作为内参使基因表达标准化。每个样品做 2 个复孔。系统自动绘制扩增曲线和熔解曲线, 并采集 CT 值。引物序列 (5'-3'): GAPDH 上游引物, GGTGTCTCCTGCGACTTCA; 下游引物, TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC。P16 上游引物, AATCTCCGCGAGGAAAGC; 下游引物, GTCTGCAGCGGACTCCAT。P21 上游引物, GGAGACTCTCAGGGTCGAAA; 下游引物, GGATTAGGGCTTCCTCTTGG。MMP13 上游引物, TCCCTGCCCC-TTCCCTATGGT; 下游引物, CTCGGAGCCTGTC-AACTGTGGA。ADAMTS4 上游引物, ATGGCTATGGGCACTGTCTC; 下游引物, GTGTTTGGTCTG-GCACATGG。

## 8. 统计学分析

实验结果采用 Shapiro-Wilk 检验法进行正态性检验。实验结果的统计学分析采用 4 组独立实验数据的平均值, 将所有回收的资料统一编号后, 采用 Graphpad Prism 7.03 统计软件包对数据进行统计描述和统计分析。对于双变量非参数数据, 采用 Mann-Whitney 检验, 用 Bonferroni 校正方差分析对多个实验组的数据进行多重比较。P 值取双侧概率, 进行统计描述和统计推断, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1. H&E 染色及免疫组化染色

实验结果显示,从阴性对照组 Y-Y 中可观察到健康的椎间盘组织 H&E 染色后可见:椎间盘纤维环结构完整,纤维环及髓核组织没有裂痕,纤维环及髓核分界清楚,髓核组织含大量髓核细胞,基质完整;Y-O 组 H&E 染色可见:纤维环基质结构破损并出现裂痕,纤维环及髓核分界不清,髓核细胞数相比 Y-Y 组明显减少,O-O 组 H&E 染色可见:髓核细胞大量消失,纤维环及髓核基质出现大量裂痕(见图1)。

### 2. 组织免疫荧光 IF 检测 aggrecan 表达

IF 检测 Y-O 组年轻小鼠 aggrecan 含量较 Y-Y 组年轻小鼠减少了  $20.1\% \pm 3.2\%$ ,IF 检测 O-O 组椎间盘组织 aggrecan 含量较 Y-Y 组下降  $23.9\% \pm 3.7\%$  ( $P < 0.05$ , 见图2)。

### 3. 衰老基因表达的差异性

本研究检测特异性基因 P21 及 P16 蛋白表达和 RNA 转录的差异性。Western Blot 检测显示:Y-O 组 P16 蛋白表达较 Y-Y 组升高  $77.1 \pm 20.5\%$ ,O-O 组 P16 蛋白表达较 Y-Y 组升高  $206.7 \pm 53.5\%$  ( $P < 0.05$ )。Y-O 组 P21 蛋白表达比 Y-Y 组有升高趋势,但无明显统计学差异。RT-qPCR 检测 P16 基因异时联体后有升高的趋势但组间无统计学差异。RT-qPCR 检测 P21 基因三组的表达分别为 Y-Y:  $1 \pm 0$ 、Y-O:

$1.405 \pm 0.067$ 、O-O:  $1.955 \pm 0.242$ ,组间比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ , 见图3)。

### 4. 椎间盘组织金属蛋白酶表达差异性

实验数据显示,MMP13 蛋白表达及 mRNA 基因检测均是 Y-O 组较 Y-Y 组升高,MMP13 蛋白表达量 O-O 组较年轻小鼠 Y-Y 组升高,组间有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。Western Blot 检测椎间盘基质代谢产物 ADAMTS4 蛋白表达分别为 Y-Y:  $1 \pm 0$ 、Y-O:  $1.331 \pm 0.085$ 、O-O:  $2.690 \pm 0.324$ ,Y-O 及 O-O 组明显升高,与 Y-Y 组比较有明显统计学差异 ( $P < 0.05$ )。RT-qPCR 检测 ADAMTS4 基因表达 Y-O 组比 Y-Y 组升高  $33.5 \pm 22.6\%$ ,但无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。O-O 组与 Y-Y 组比较明显升高,组间比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ , 见图4)。

## 讨 论

联体共生模型 (parabiosis model) 早在 150 年前就已建立,通过两个独立的个体血液融合对免疫、移植、肿瘤、衰老等进行研究<sup>[10,13,14]</sup>。异时联体共生模型使年轻和年老个体血液嵌合,从而达到体内营养物质和代谢产物的交换,改变细胞所处的外环境<sup>[15]</sup>。Sinha 等<sup>[16]</sup>通过对小鼠联体共生模型研究发现全身血液环境中的 GDF11 水平的增加可以改善肌肉结构和功能,逆转肌肉衰老。Yamasaki 等<sup>[17]</sup>使用联体共生模型研究外周血细胞 (peripheral blood

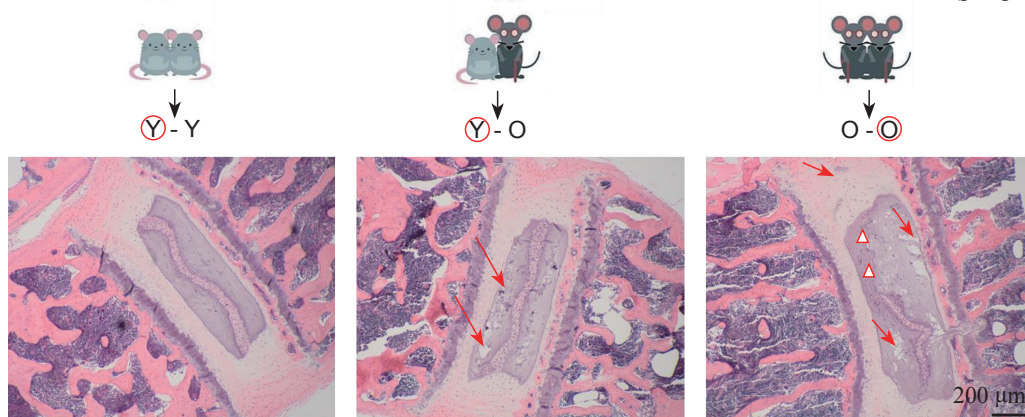


图1 小鼠腰椎间盘组织石蜡切片 H&E 染色及免疫组化染色

小鼠腰椎间盘组织石蜡切 H&E 染色 Y-Y 组纤维环及髓核结构完整,无裂痕,分界清楚,内部髓核基质完整,有大量的髓核细胞;Y-O 组可见纤维环与髓核交界处分界不清,髓核基质部分裂缝(红色箭头),内部髓核细胞明显较 Y-Y 组减少;O-O 组可见髓核细胞减少(红色三角符号),基质周围出现裂缝(红色箭头) 标尺 = 200  $\mu\text{m}$

Fig. 1 Impact of circulatory factors from aged mice on gross disc morphology

H&E staining of lumbar disc was performed to assess the gross morphological changes with aging. In Y-Y group, the structure of AF and NP was intact, without cracks, and the boundary was clear. There were a lot of NP cells in the inner NP matrix; In the Y-O group, the junction between the AF and NP was not clear, and part of the NP matrix was cracked (red arrow), and the number of NP cells in the Y-O group was significantly less than that in the Y-Y group; In O-O group, the number of NP cells decreased (red triangle symbol), and cracks around the matrix (red arrow). Scale bar = 200  $\mu\text{m}$

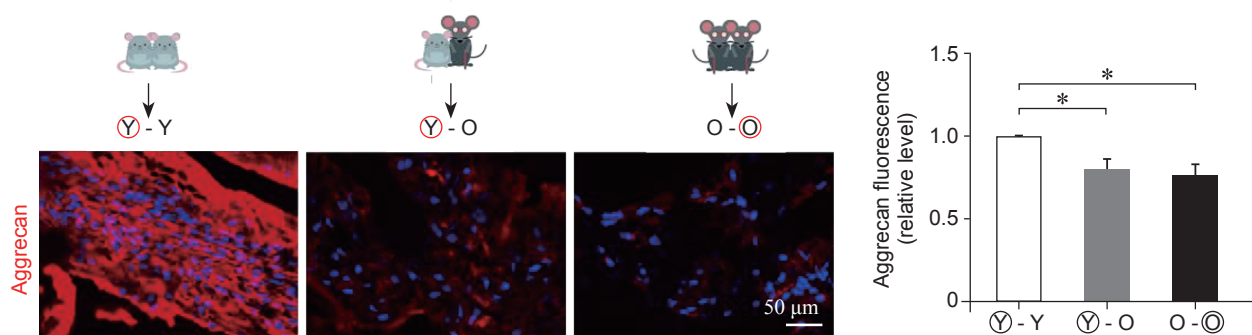


图2 血液循环因素对年轻小鼠椎间盘 aggrecan 蛋白表达的影响 ( $n = 4$ )

红色为 aggrecan 染色, 蓝色为细胞核 DAPI 染色, 可见 Y-Y 组红色 aggrecan 明显较 Y-O 及 O-O 组多, 定量分析显示各组间有明显差异, 所示数据为四组独立实验 ( $\bar{x} \pm SD$ )。\* $P < 0.05$

Fig. 2 Effects of circulatory factors from aged mice on aggrecan protein expression in intervertebral discs in mouse heterochronic parabionts ( $n = 4$ )

Red is aggrecan staining, blue is DAPI staining. It can be seen that red aggrecan in Y-Y group is significantly more than that in Y-O and O-O groups. Quantitative analysis shows that there are significant differences among the groups. Data shown are  $\bar{x} \pm SD$  of 4 independent experiments, \* $P < 0.05$ .

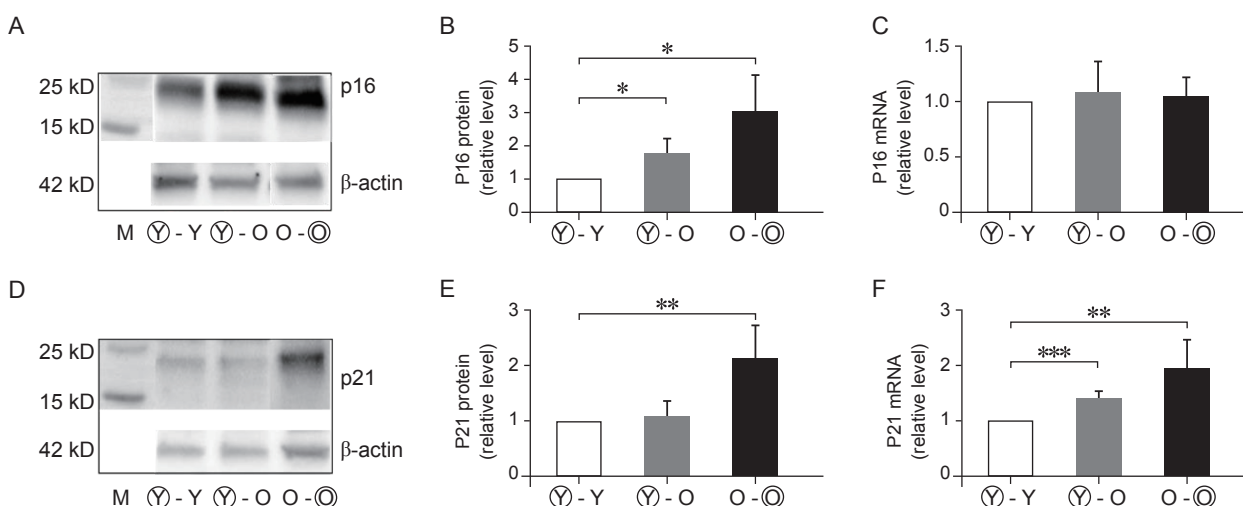


图3 血液循环因素对小鼠异时联体椎间盘衰老基因蛋白和基因表达的影响 ( $n = 4$ )

(A) Western Blot 检测结果显示 Y-O 及 O-O 组衰老基因 P16 表达量较 Y-Y 组升高; (B) P16 蛋白表达量 Western Blot 定量分析结果; (C) P16 基因 RT-qPCR 定量检测结果; (D) Western Blot 检测结果显示 O-O 组衰老基因 P21 表达量较 Y-Y 组明显升高; (E) P21 蛋白表达量 Western Blot 定量分析结果, Y-O 组较 Y-Y 组升高不明显; (F) P21 基因 RT-qPCR 定量检测结果, Y-O 及 O-O 组表达量较 Y-Y 组明显升高。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

Fig. 3 Effects of circulatory factors from aged mice on expression of cellular senescence markers in IVDs in mouse heterochronic parabionts ( $n = 4$ )

(A) The expression of P16 was detected by Western blot; (B) P16 in Y-O and O-O groups was higher than that in Y-Y group; (C) P16 gene was detected by RT-qPCR; (D) The expression of P21 was detected by Western blot; (E) Western blot analysis showed that the expression of P21 protein in Y-O group was not significantly higher than that in Y-Y group; (F) The expression of P21 gene in Y-O and O-O groups was significantly higher than that in Y-Y group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

cells, PBCs) 对同样缺少血液供应的关节软骨的影响研究, 发现 PBCs 可以修复早期关节软骨损伤, 逆转关节软骨退变。本实验通过建立小鼠同时和异时联体模型, 证实椎间盘的衰老不仅受椎间盘局部因素的影响, 血液循环因素也可以影响椎间盘组织的衰老退变。

1. 老年血液循环因素对椎间盘组织形态的影响  
本研究中通过异时联体, 椎间盘组织石蜡切片 H&E 染色见, 通过老年小鼠血液环境的影响年轻小鼠椎间盘组织中央的髓核细胞明显减少, 并且纤维环组织出现裂痕, 纤维环及髓核交界处分界不清楚。Isaac 等<sup>[9]</sup> 对杜氏肌营养不良症 (duchenne muscular

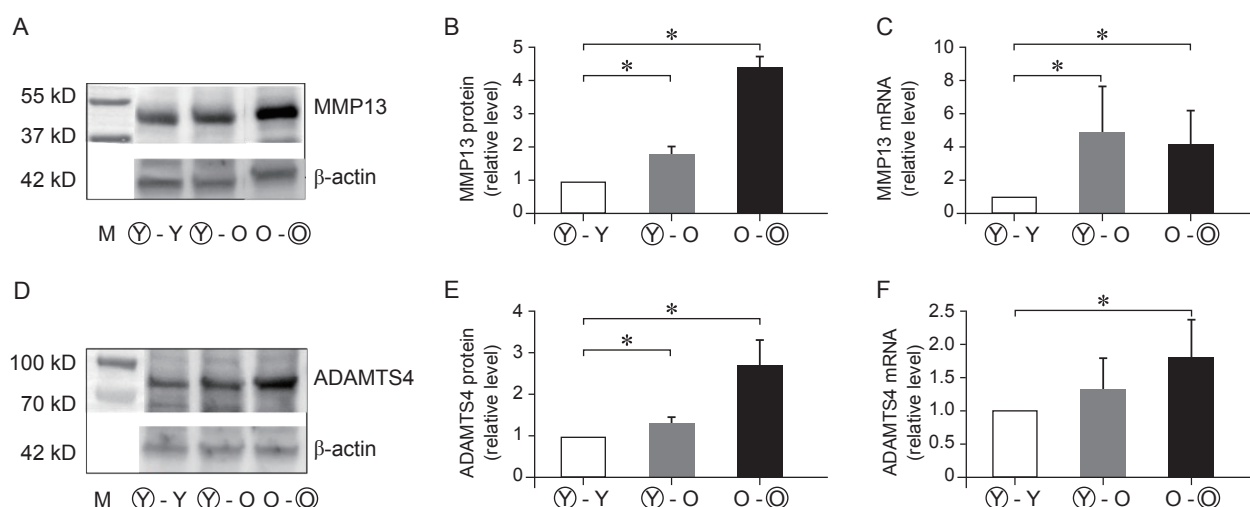


图4 血液循环对小鼠异时联体椎间盘分解代谢蛋白和基因表达的影响 ( $n=4$ )

(A) Western Blot 检测各组 MMP13 蛋白印痕结果; (B) MMP13 蛋白表达量 Western Blot 定量分析结果; (C) MMP13 基因 RT-qPCR 定量检测结果; (D) Western Blot 检测各组 ADAMTS4 蛋白印痕结果; (E) ADAMTS4 蛋白表达量 Western Blot 定量分析结果; (F) ADAMTS4 基因 RT-qPCR 定量检测结果。\* $P < 0.05$

Fig. 4 Effects of circulatory factors from aged mice on catabolic gene expression in intervertebral discs obtained from mouse heterochronic parabionts ( $n=4$ )

(A) MMP13 protein was detected by Western blot; (B) The expression of MMP13 protein was analyzed by Western blot; (C) MMP13 gene was detected by RT-qPCR; (D) ADAMTS4 protein was detected by Western blot; (E) The expression of ADAMTS4 protein was analyzed by Western blot; (F) ADAMTS4 gene was detected by RT-qPCR. \* $P < 0.05$ .

dystrophy, DMD) 模型研究中发现, 肌肉组织的退化可以加速脊柱椎间盘组织的退变。这些都证明椎间盘外的因素可以影响椎间盘组织和细胞的衰老退变。Smith 等<sup>[18]</sup>报道衰老的系统环境中免疫相关分子和细胞变化可以负向调节细胞的形成和分化。

## 2. 老年血液循环因素对椎间盘细胞衰老基因表达的影响

文献报道, 椎间盘衰老细胞 (senescent cells, SnCs) 可以引起细胞 DNA 损伤、炎症反应、造成细胞基质分解代谢和合成代谢失衡等加速细胞衰老退变<sup>[19]</sup>。其中 P53-P21-Rb 和 P16-Rb 信号通路被激活, 是调控细胞衰老的重要通路<sup>[20]</sup>。衰老细胞内 P53-P21-Rb 和 P16-Rb 信号通路被激活, 导致细胞复制停止在 G1 期和抑制 CDK4、CDK6 导致 Rb 和 Hb 的低磷酸化状态引起细胞衰老。Liu 等<sup>[21]</sup> Western Blot 检测小鼠异时联体共生年轻与年老小鼠联体后肾脏组织中 P16 蛋白表达量比年轻与年轻小鼠同时联体时升高。本研究 RT-qPCR 检测发现老年小鼠椎间盘组织 mRNA 中衰老基因 P16 及 P21 基因的表达较年轻小鼠明显升高。异时联体共生组 (Y-O) 椎间盘组织 P16、P21 的蛋白表达明显较同时联体共生组 (Y-Y) 升高, 与文献报道一致。因此, 异时联体共生, 老年小鼠血液环境可以加速衰老基因的

表达。

## 3. 老年血液循环因素对椎间盘组织基质代谢的影响

椎间盘 (intervertebral disc, IVD) 主要由上下椎板、外围纤维环及内部髓核组成, 其主要成分为糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAG)、I 和 II 型胶原蛋白 (collagen) 及聚蛋白多糖 (proteoglycan) 为基础组成<sup>[22]</sup>。聚糖蛋白聚糖 (aggrecan) 是椎间盘组织基质的重要成分, 随着椎间盘衰老会出现纤维化、蛋白水解及水分含量下降导致 aggrecan 含量减少<sup>[23]</sup>。本研究 IF 检测异时联体后 Y-O 组椎间盘中 aggrecan 含量较 Y-Y 组减少, 导致椎间盘基质含水量减少、弹性下降, 加速细胞凋亡。金属蛋白酶与肿瘤细胞迁移、细胞外基质降解和细胞凋亡相关, 椎间盘组织衰老与金属蛋白酶 MMP13、ADAMTS4 表达呈正相关。与此同时金属蛋白酶 MMP13 及 ADAMTS4 可以加快细胞外基质降解, ADAMTS4 可以酶切 aggrecan 多个结合位点, 降解蛋白多糖核心结构<sup>[24]</sup>。异时联体共生老年血液循环因素可以使年轻小鼠椎间盘 MMP13、ADAMTS4 蛋白表达升高, 促进年轻小鼠椎间盘组织老化, 但其具体机制仍需要进一步研究。

综上所述, 异时联体共生模型通过血液循环因



素, 可以影响小鼠脊柱椎间盘组织的衰老退变, 老年小鼠血液循环因素可以加速年轻小鼠椎间盘组织衰老。全身血液环境通过椎间盘组织营养物质吸收与交换, 调控椎间盘外周基质的分解与合成代谢的平衡、促进自噬、氧自由基清除及干细胞修复等方面影响脊柱椎间盘组织的衰老进程。因此, 在治疗椎间盘退变的同时不仅需要考虑椎间盘局部因素, 也需要考虑全身血液循环因素对椎间盘组织的影响。另外, 需要进一步研究血液循环因素影响脊柱椎间盘衰老的作用机制及具体通路的分子调控关系。

### 参 考 文 献

- [1] Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation[J]. *Nature*, 2016, 539(7628):180-186.
- [2] Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain[J]. *Lancet*, 1999, 354(9178):581-585.
- [3] Luo X, Pietrobon R, Sun SX, *et al.* Estimates and patterns of direct health care expenditures among individuals with back pain in the united states[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(1):79-86.
- [4] Vo NV, Hartman RA, Patil PR, *et al.* Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(8):1289-1306.
- [5] Nasto LA, Ngo K, Leme AS, *et al.* Investigating the role of DNA damage in tobacco smoking-induced spine degeneration[J]. *Spine J*, 2014, 14(3):416-423.
- [6] Tam V, Chan W, Leung V, *et al.* Histological and reference system for the analysis of mouse intervertebral disc[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(1):233-243.
- [7] Patil P, Dong Q, Wang D, *et al.* Systemic clearance of p16(INK4a)-positive senescent cells mitigates age-associated intervertebral disc degeneration[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3):e12927.
- [8] Gullbrand SE, Peterson J, Ahlborn J, *et al.* ISSLS prize winner: Dynamic loading-induced convective transport enhances intervertebral disc nutrition[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2015, 40(15):1158-1164.
- [9] Isaac C, Wright A, Usas A, *et al.* Dystrophin and utrophin "double knockout" dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities[J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(3):343-349.
- [10] Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA. Heterochronic parabiosis: Historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity[J]. *Aging Cell*, 2013, 12(3):525-530.
- [11] Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, *et al.* Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy[J]. *Cell*, 2013, 153(4):828-839.
- [12] 雷昌斌, 王东, 林宏生, 等. 异时连体共生对小鼠椎旁肌肉衰老退变的影响 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(1):60-66.
- [13] Katsimpardi L, Kuperwasser N, Camus C, *et al.* Systemic GDF11 stimulates the secretion of adiponectin and induces a calorie restriction-like phenotype in aged mice[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(1):e13038.
- [14] Yousefzadeh MJ, Wilkinson JE, Hughes B, *et al.* Heterochronic parabiosis regulates the extent of cellular senescence in multiple tissues[J]. *Geroscience*, 2020, 42(3):951-961.
- [15] Morrison EJ, Champagne DP, Dzieciatkowska M, *et al.* Parabiosis incompletely reverses aging-induced metabolic changes and oxidant stress in mouse red blood cells[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6):1337-1357.
- [16] Sinha M, Jang YC, Oh J, *et al.* Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle[J]. *Science*, 2014, 344(6184):649-652.
- [17] Yamasaki S, Hashimoto Y, Takigami J, *et al.* Circulating nucleated peripheral blood cells contribute to early-phase meniscal healing[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(3):609-617.
- [18] Smith LK, White CR, Villeda SA. The systemic environment: At the interface of aging and adult neurogenesis[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(1):105-113.
- [19] Patil P, Niedernhofer LJ, Robbins PD, *et al.* Cellular senescence in intervertebral disc aging and degeneration[J]. *Curr Mol Biol Rep*, 2018, 4(4):180-190.
- [20] Feng C, Liu H, Yang M, *et al.* Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: Causes and molecular pathways[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(13):1674-1684.
- [21] Liu D, Ning YC, Zhang YP, *et al.* A young blood environment decreases aging of senile mice kidneys[J]. *J Gerontol*, 2018, 73(4):421-428.
- [22] Silagi ES, Shapiro IM, Risbud MV. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration[J]. *Matrix Biol*, 2018, 71-72:368-379.
- [23] Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, *et al.* Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Science*, 2001, 294(5548):1933-1936.
- [24] Wang WJ, Yu XH, Wang C, *et al.* MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 448:238-246.