

Notch1 信号通路调节成骨因子影响腰椎间盘钙化机制研究

方明, 王兴武

(宁波大学医学院附属医院, 浙江 宁波 315000)

【摘要】 目的:探究 Notch1 信号通路调节成骨因子影响腰椎间盘钙化的机制。方法:分离 SD 大鼠原代纤维环细胞并进行传代培养,分别加入诱导因子骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)诱导钙化(分别为 BMP-2 组和 b-FGF 组),并设置对照组(正常培养基中培养)。随后进行细胞形态及细胞荧光鉴定、茜素红染色、ELISA 检测、qRT-PCR 实验,以确定诱导钙化的效果。再次进行细胞分组,分为对照组、钙化组(加入诱导因子 BMP-2)、钙化+LPS 组(加入诱导因子 BMP-2 和 Notch1 通路激活剂 LPS)、钙化+DAPT 组(加入诱导因子 BMP-2 和 Notch1 通路抑制剂 DAPT),进行茜素红染色、流式细胞术检测细胞凋亡,ELISA 检测成骨因子含量,Western blot 检测 BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达情况。结果:诱导因子筛选结果表明 BMP-2 组和 b-FGF 组大鼠纤维环细胞矿化结节数目均明显增加,且 BMP-2 组效果更显著;同时 ELISA 及 Western blot 结果表明诱导组细胞中 BMP-2、b-FGF 含量水平及 BMP-2、b-FGF、Notch1 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.01$)。探究 Notch1 信号通路影响腰椎间盘钙化机制结果表明:与钙化组相比,钙化+LPS 组大鼠纤维环细胞矿化结节数目,细胞凋亡率,BMP-2、b-FGF 含量水平,BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达水平进一步显著增加;而钙化+DAPT 组大鼠纤维环细胞矿化结节数目,细胞凋亡率,BMP-2、b-FGF 含量水平,BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:Notch1 信号通路通过正向调控成骨因子含量促进腰椎间盘钙化。

【关键词】 Notch1 信号通路; 成骨因子; 腰椎间盘钙化

中图分类号:R681.5

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2023.05.015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Mechanism of the Notch1 signaling pathway regulating osteogenic factor influences lumbar disc calcification

FANG Ming, WANG Xing-wu (Affiliated Hospital of Medical College of Ningbo University, Ningbo 315000, Zhejiang, China)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of the Notch1 signaling pathway in regulating osteogenic factors and influencing lumbar disc calcification. **Methods** Primary annulus fibroblasts from SD rats were isolated and subcultured in vitro. The calcification-inducing factors bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and basic fibroblast growth factor (b-FGF) were added to separate groups to induce calcification, which were referred to as the BMP-2 group and the b-FGF group, respectively. A control group was also set up, which was cultured in normal medium. Subsequently, cell morphology and fluorescence identification, alizarin red staining, ELISA, and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed to determine the effect of calcification induction. Cell grouping was performed again, including the control group, the calcification group (adding the inducer BMP-2), the calcification + LPS group (adding the inducer BMP-2 and the Notch1 pathway activator LPS), and the calcification + DAPT group (adding the inducer BMP-2 and the Notch1 pathway inhibitor DAPT). Alizarin red staining and flow cytometry were used to detect cell apoptosis, ELISA was used to detect the content of osteogenic factors, and Western blot was used to detect the expression of BMP-2, b-FGF, and Notch1 proteins. **Results** The induction factor screening results showed that the number of mineralized nodules in fibroannulus cells in BMP-2 group and b-FGF group was significantly increased, and the increase was greater in the BMP-2 group. Meanwhile, ELISA and Western blot results showed that BMP-2, b-FGF and mRNA expression levels of BMP-2, b-FGF and Notch1 in the induced group were significantly increased ($P<0.01$). The results of the mechanism of Notch1 signaling pathway affecting lumbar disc calcification showed that compared to calcified group, the number of fibroannulus cell mineralization nodules, apoptosis rate, BMP-2, b-FGF content, the expression levels of BMP-2, b-FGF, and Notch1 proteins were further increased significantly. However, the

基金项目:宁波市自然科学基金(编号:2019A610246)

Fund program: Natural Science Foundation of Ningbo (No. 2019A610246)

通讯作者:方明 E-mail: fmdoc88473718@aliyun.com

Corresponding author: FANG Ming E-mail: fmdoc88473718@aliyun.com

number of mineralization nodules, apoptosis rate, BMP-2 and b-FGF levels, BMP-2, b-FGF and Notch1 protein expression levels were decreased in the calcified +DAPT group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Notch1 signaling pathway promotes lumbar disc calcification through positive regulation of osteogenic factors.

KEYWORDS Notch1 signaling pathway; Osteogenic factor; Calcification of the lumbar disc

目前, 钙化型腰椎间盘突出症的发病人群逐渐趋于年轻化, 且若不及时诊断治疗可能会引起椎间盘与硬膜粘连, 导致神经受到压迫^[1-2]。Notch1 信号通路与细胞的增殖、分化、凋亡以及机体多种病变密切相关, 包括血管钙化、骨骼的异常改变甚至癌症的发生等, 被认为是血管钙化和骨形成最关键的调节因子^[3]。目前国内外对异位钙化或骨化的研究多集中于心血管和肌腱韧带, 而对同样为异位钙化的椎间盘钙化的研究却相对较少。因此, 本文通过探索 Notch1 信号通路对成骨因子的影响, 从而判断其对于椎间盘钙化的作用机制, 以期为后期临床用药提供新的治疗靶点及参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM 高糖培养基, 货号 SH30243.01, HyClone。1%茜素红染色液 (PH4.2), 货号 G1452, Solarbio。细胞凋亡试剂盒, 货号 556547, BD。大鼠骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) ELISA 试剂盒和 大鼠碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) ELISA 试剂盒, 货号 MM-0208R2 和 MM-0057R2, 江苏酶免实业有限公司。山羊抗小鼠 IgG H&L (DyLight® 488) 预吸附二抗, 货号 ab96879, abcam。Collagen II Antibody、BMP-2 Antibody、bFGF Antibody、Notch1 Antibody、 β -actin Antibody, 货号 AF0135、AF5163、DF6038、AF5307、AF6266, Affinity。

1.2 实验设备

AE2000 光学显微镜、BB150 二氧化碳培养箱, Thermo Scientific。Ts2-FC 倒置荧光显微镜, 日本尼康。C6 流式细胞仪, BD。EPS300 电泳仪、VE 180C 电泳槽、VE186 转膜仪, 天能。610020-9Q 化学发光仪, 勤翔。CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪, BIO RAD。

1.3 实验动物

18 只体质量为 (200±20) g 的 SD 大鼠, 于上海斯莱克实验动物有限责任公司购买, 动物生产许可证号为 SCXK(沪)2017-0005。饲养于杭州鹰吻生物科技有限公司动物中心, 动物使用 SYXK 许可证号为 (浙)2020-0024, 适应性喂养期间自由饮食。

1.4 大鼠纤维环细胞的分离与培养

大鼠脱颈处死, 固定于手术台, 逐层剪开背部皮肤, 沿棘突剪开两旁肌肉, 剪断肋骨, 并用咬骨钳沿椎弓根剪断脊柱并取出, 磷酸盐缓冲盐水 (phosphate

buffered saline, PBS) 冲洗干净后逐个分离椎间盘, 余下纤维剪成 1 mm³ 碎片, 置于无菌 PBS 离心管中。2.5 g/L 胰蛋白酶消化 15 min, DMEM 终止消化, 以 800 r/min 离心 5 min, 去上清加入 II 型胶原酶消化, 4 h 后终止消化离心弃上清, 加入 DMEM (15% FBS) 稀释, 置于 37 °C, 体积分数 5% 的 CO₂ 的培养箱中培养。当细胞生长到占培养瓶 90% 时开始进行传代。大鼠纤维环细胞形态鉴定及荧光鉴定见 1.4.1 节部分内容。随后将细胞随机分为 3 组: 对照组, 在正常培养基中培养, 不加任何诱导因子; BMP-2 组, 200 μ l 钙化诱导液 1 (50 μ g/L BMP-2, 100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L L-抗坏血酸、5 mmol/L β -甘油磷酸), 800 μ l I-GRO PLUS 培养基 (含 10% 胎牛血清); b-FGF 组, 200 μ l 钙化诱导液 2 (50 μ g/L b-FGF、100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L L-抗坏血酸、5 mmol/L β -甘油磷酸), 800 μ l I-GRO PLUS 培养基 (含 10% 胎牛血清)。实验分组及操作参照吴子健等^[4]实验研究。

1.4.1 大鼠纤维环细胞形态鉴定及荧光鉴定

(1) 细胞形态鉴定: 从开始培养细胞起对其进行细胞数量及形态观察。(2) 细胞荧光: 取消化第 2 代的纤维环细胞, 首先进行细胞爬片, 药物作用结束后固定细胞, 并加入 1~2 ml 0.5% Triton X-100 通透细胞膜, 加入封闭液封闭 0.5 h, 孵育一抗, PBS 润洗, 孵育二抗, 进行核染制片, 检测大鼠纤维环细胞中 II 型胶原蛋白表达情况。

1.4.2 茜素红染色 取对数生长期原代纤维环细胞接种于 12 孔板, 每孔 5×10⁵ 个。钙化诱导 7 d 后, 弃原培养基, PBS 冲洗, 固定, 0.3% Triton X-100 通透细胞 5 min, PBS 润洗, 加入 500 μ l 茜素红染色液 (0.2%, pH 8.3) 染色 20 min, 双蒸水清洗后镜检观察。

1.4.3 ELISA 实验 试剂盒室温复温后, 加入标准品及待测样本, 按照说明书进行操作, 测定检测细胞中 BMP-2、b-FGF 的浓度。

1.4.4 qRT-PCR 实验 提取 RNA, 配置反应体系后进行点样, 置于 PCR 仪上进行反应, 反应条件: 95 °C, 10 min 变性; 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s; 40 次循环。引物序列见表 1。

1.5 实验分组及处理

对照组: 正常培养基培养, 不加任何诱导因子。钙化组: 200 μ l 钙化诱导液 1 (50 μ g/L BMP-2、100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L L-抗坏血酸、5 mmol/L β -甘油磷酸), 800 μ l I-GRO PLUS 培养基

(含 10%胎牛血清) 进行诱导培养,诱导钙化。钙化+LPS 组: 在钙化诱导液 1 的基础上加 0.2 mg/Notch1 信号通路的激活剂 LPS。钙化+DAPT 组: 在钙化诱导液 1 的基础上加 50 μmol/L 的 Notch1 信号通路特异性抑制剂 DAPT。

1.5.1 茜素红染色 实验操作同 1.4.2 节, 通过染色观察各组大鼠纤维环细胞矿化结节的变化情况。

1.5.2 流式细胞术实验 将对数生长期细胞以每孔 1.2×10^6 个细胞接种到 6 孔板中, 24 h 后调整细胞浓度为每毫升 1×10^6 个, 加入结合缓冲液。再分别加入 5 μl Annexin V-FITC 与 10 μl PI, 混匀, 避光孵育 15 min, 最后再次加入 400 μl 结合缓冲液于流式细胞仪中检测细胞凋亡情况。

1.5.3 ELISA 实验 按照试剂盒操作说明, 检测细胞中 BMP-2、bFGF 的浓度。

1.5.4 Western blot 检测 收集对数生长期细胞, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清置于冰上裂解, 利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度, 后制备凝胶进行电泳, 电泳结束后转至 PVDF 膜。然后加入含 5%脱脂奶粉的封闭液封闭, 加入 BMP-2 Antibody、bFGF Antibody、Notch1 Antibody 4 °C 孵育过夜,

后加入 5%脱脂奶粉封闭液稀释二抗, 封闭反应, E-CL 化学发光显影, 镜检。

1.6 观察项目与方法

显微镜镜检观察大鼠纤维环细胞形态, 胶原蛋白表达 (特征蛋白 II 型胶原蛋白镜检时呈现绿色荧光) 情况及钙化结节数量 (细胞计数法进行测量计算)。并利用 ELISA、qRT-PCR 及 Western blot 测量相关指标炎症因子, mRNA 及蛋白含量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 定量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, ELISA、qRT-PCR 及 Western blot 所得的数据多组间比较采用 One-way-ANOVA 单因素方差分析, 组间比较采用 SNK 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 钙化诱导剂选择

2.1.1 大鼠纤维环细胞形态鉴定及荧光鉴定 大鼠纤维环细胞细胞形态学特征见图 1。根据图 1 可知, 细胞培养 1 d 后开始进行贴壁, 2 d 后数量开始逐渐增多, 4 d 后部分细胞生出触手向四周蔓延, 细胞多呈菱形, 8 d 后细胞体积变大相互接合, 10 d 后

表 1 大鼠基因引物序列
Tab.1 Primer sequence of rat gene

大鼠基因	正向引物	反向引物
BMP-2	GGACATGGTTGTGGAGGGTT	CATTGGGAAATATTAAGTGTTCAGC
b-FGF	AAAACCTGACCCGATCCCTC	CGTGACGCAGCTCCTAAAGT
Notch1	GAGCCTGGGTGCCTGTAGTG	AGAGTGAGCAGGTCACAGCT
GAPDH	CAATCCTGGCGGTACAACCT	GATGCTGATGGGTTTCCCGT

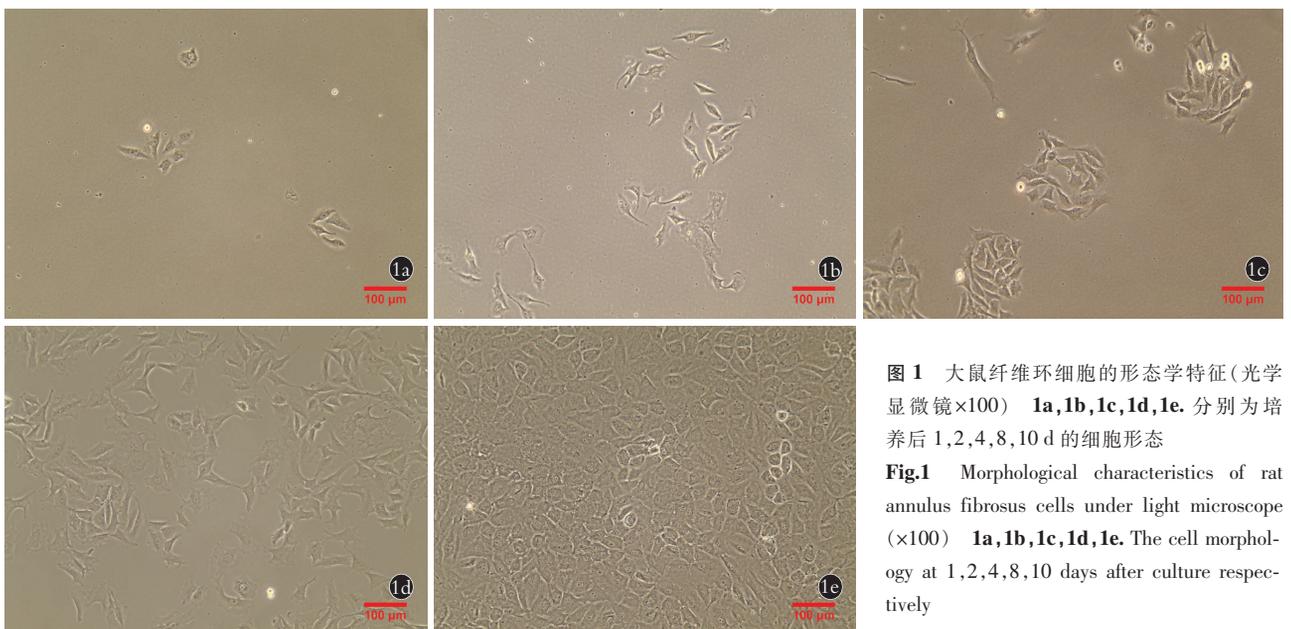


图 1 大鼠纤维环细胞的形态学特征 (光学显微镜×100) 1a, 1b, 1c, 1d, 1e. 分别为培养后 1, 2, 4, 8, 10 d 的细胞形态
Fig.1 Morphological characteristics of rat annulus fibrosus cells under light microscope (×100) 1a, 1b, 1c, 1d, 1e. The cell morphology at 1, 2, 4, 8, 10 days after culture respectively

呈铺路石状,铺满瓶底约 90%。细胞中能明显看到特征蛋白 II 型胶原蛋白的表达(绿色荧光部分),位于细胞质(图 2)。

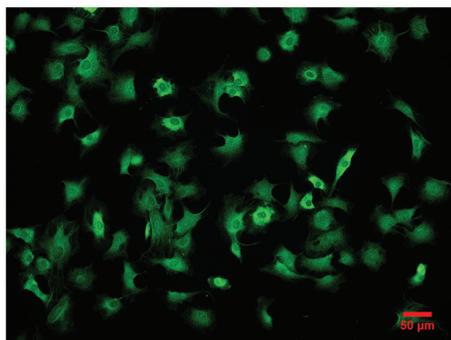


图 2 大鼠纤维环细胞中 II 型胶原蛋白表达(倒置荧光显微镜×200)
Fig.2 Expression of type II collagen in rat annulus fibrosus cells under inverted fluorescence microscope (×200)

2.1.2 BMP-2 及 b-FGF 对大鼠纤维环细胞矿化结节的影响 BMP-2 及 b-FGF 对大鼠纤维环细胞矿化结节的影响见图 3。倒置荧光显微镜下显示,相比于对照组,BMP-2 组和 b-FGF 组大鼠纤维环细胞矿化结节数目明显增加,且 BMP-2 组效果更显著。

2.1.3 ELISA 检测细胞中 BMP-2 和 b-FGF 的浓

度 与对照组比较,BMP-2 组和 b-FGF 组细胞中 b-FGF 含量均显著升高,b-FGF 组 BMP-2 含量水平显著降低。见表 2。

表 2 各组细胞中 BMP-2 和 b-FGF 含量变化情况(̄x±s)

Tab.2 Changes of BMP-2 and B-FGF contents in each

group(̄x±s)

单位:ng·L⁻¹

组别	平行样本量(个)	BMP-2	b-FGF
对照组	6	13.55±1.50	8.96±0.69
BMP-2 组	6	55.18±5.24 [▲]	17.06±1.37 [▲]
b-FGF 组	6	34.85±2.38 ^{▲●}	29.43±2.48 [▲]

注:与对照组比较,▲P<0.01;与 BMP-2 组比较,●P<0.05

2.1.4 qPCR 检测细胞中各种因子基因水平表达与对照组比较,BMP-2 组、b-FGF 组细胞中 BMP-2、b-FGF、Notch1 mRNA 表达水平均显著升高(P<0.01)。见图 4。

2.2 Notch1 信号通路调节成骨因子影响腰椎间盘钙化的机制研究

2.2.1 Notch1 对各组大鼠纤维环细胞矿化结节的影响 茜素红染色结果表明,与对照组比较,钙化组细胞矿化结节显著增多。而与钙化组比较,钙化+LPS

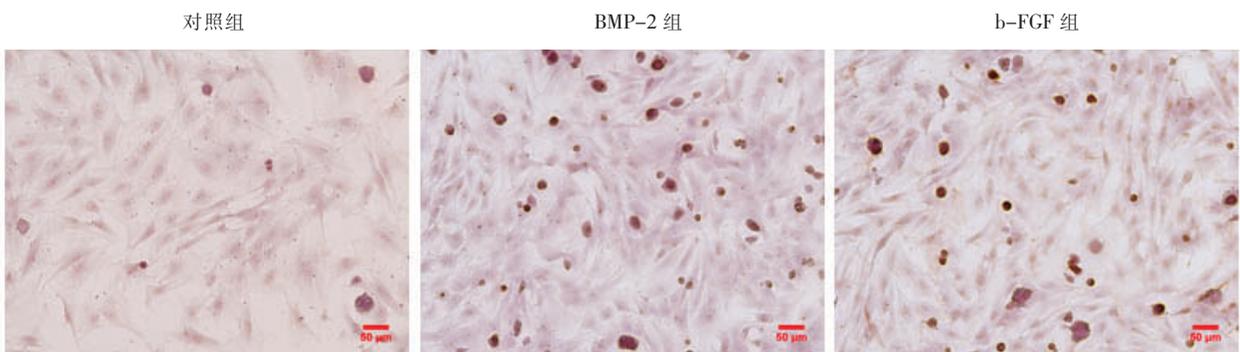
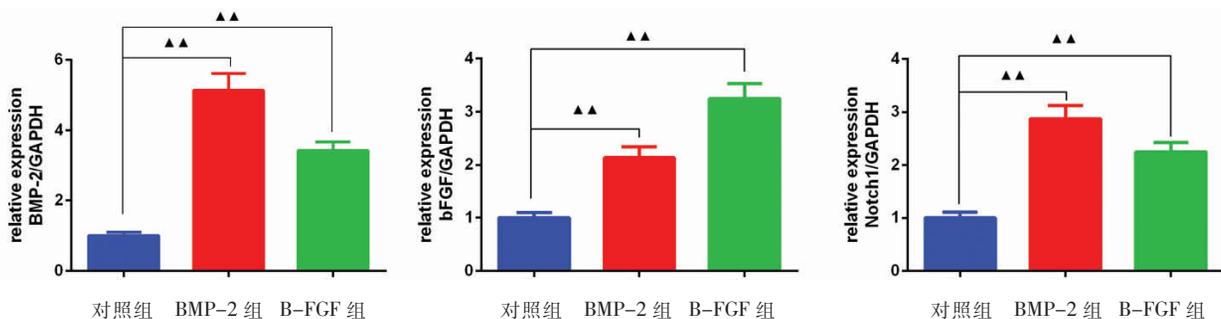


图 3 BMP-2 及 b-FGF 对大鼠纤维环细胞矿化结节的影响(茜素红染色×200)
Fig.3 Effects of BMP-2 and B-FGF on rat annulus fibroblasts (alizarin red staining ×200 under inverted fluorescence microscope)



注:与对照组比较,▲▲P<0.01

图 4 各组细胞中 BMP-2、b-FGF 及 Notch1 mRNA 的表达

Fig.4 mRNA expression levels of BMP-2, b-FGF and Notch1 in each group detected by qPCR

组大鼠纤维环细胞矿化结节数目进一步显著增加,而钙化+DAPT 组大鼠纤维环细胞矿化结节数目显著减少。见图 5。

2.2.2 Notch1 对各组大鼠细胞凋亡的影响 由流式细胞术得出各组细胞凋亡情况,与对照组比较,钙化组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)。与钙化组比较,钙化+LPS 组细胞凋亡率进一步显著升高($P<0.05$),而钙化+DAPT 组细胞凋亡率显著降低($P<0.01$)。见图 6。

2.2.3 Notch1 对各组大鼠细胞中 BMP-2、b-FGF、Notch1 的浓度的影响 与对照组比较,钙化组细胞中 BMP-2、b-FGF 含量水平均升高($P<0.01$);与钙化组比较,钙化+LPS 组细胞中 BMP-2、b-FGF 含量水平均进一步升高($P<0.01$),钙化+DAPT 组 BMP-2、b-FGF 含量水平则均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组细胞中 BMP-2 及 b-FGF 含量变化情况($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Changes of BMP-2 and B-FGF contents in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	平行样本数/个	BMP-2/ng·L ⁻¹	b-FGF/ng·L ⁻¹
对照组	3	15.56±1.71	10.00±0.72
钙化组	3	42.67±3.47 ^{▲▲}	23.33±2.16 ^{▲▲}
钙化+LPS 组	3	58.00±5.39 ^{**}	30.42±2.70 ^{**}
钙化+DAPT 组	3	37.28±2.73 [*]	19.00±2.02 ^{**}

注:与对照组比较,▲▲ $P<0.01$;与钙化组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

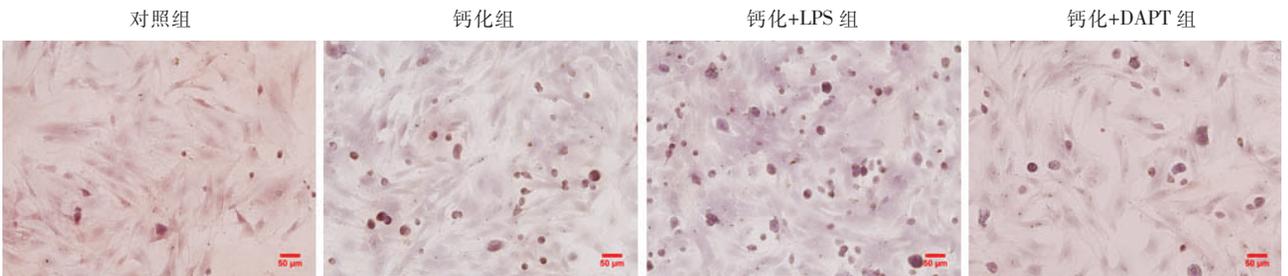
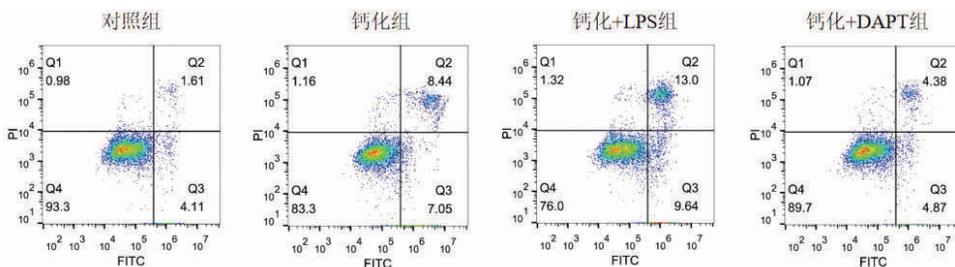


图 5 各组大鼠纤维环细胞矿化结节的变化情况(茜素红染色×200)

Fig.5 Changes of rat annulus fibrosus mineralized nodules in each group (alizarin red staining ×200 under inverted fluorescence microscope)



注:与对照组比较,▲▲ $P<0.01$;与钙化组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 6 Notch1 对各组大鼠细胞凋亡的影响

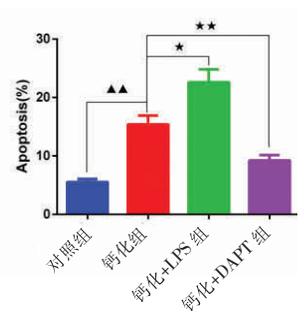
Fig.6 Effect of Notch1 on apoptosis of rats in each group

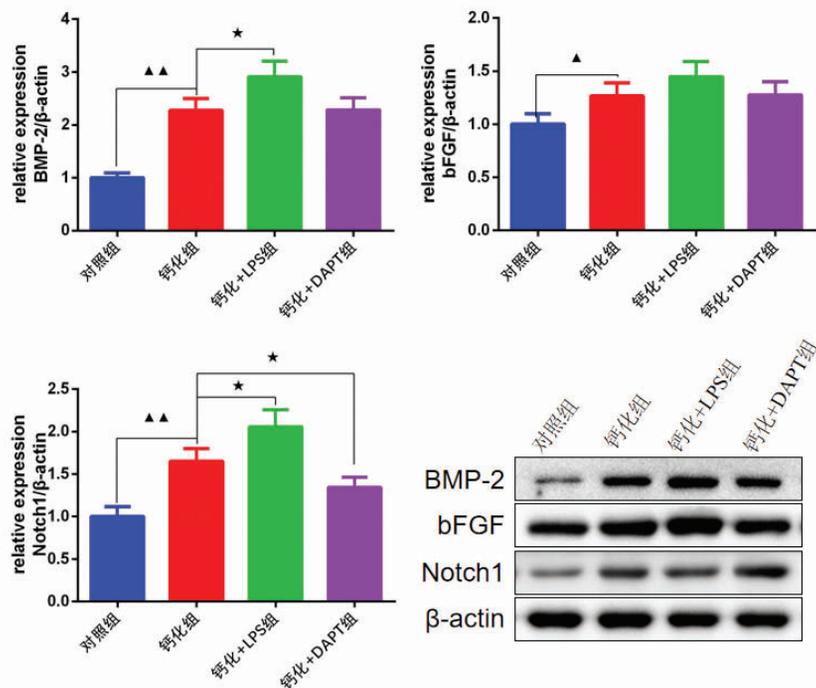
2.2.4 Notch1 对大鼠细胞中各种因子蛋白水平的表达 与对照组比较,钙化组纤维环细胞中 BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与钙化组比较,钙化+LPS 组 BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达水平均呈现上升趋势且 BMP-2 及 Notch1 蛋白表达更显著 ($P<0.05$),而钙化+DAPT 组 BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达水平均降低,且 BMP-2 变化更显著($P<0.05$)。见图 7。

3 讨论

3.1 项目开展的意义及研究方向

腰椎间盘突出是由椎间盘退变引起的,同时也被认为是促进椎间盘退变的原因之一。研究表明^[5],椎间盘钙化与多种疾病密切相关,如血色素沉着、脊髓灰质炎、强直性脊柱炎等。由于目前对椎间盘钙化的作用机制尚不明晰,因此寻找合适的作用细胞对于探究椎间盘钙化的机制以及探索新的治疗方法有着重要的意义^[6]。马俊等^[7]在进行椎间盘相关机制探究过程中利用大鼠纤维环细胞的增殖实验,得出 Notch 信号能够影响椎间盘纤维环细胞,能够在后期作为靶点延缓椎间盘相关病变。徐翔等^[8]利用山羊在进行腰椎间盘摘除术后修复研究中,以椎间盘纤维环细胞为切入点,证实了山羊骨髓间充质干细胞对纤维环缺损有更好的修复能力。以上研究表明纤维环细胞在进行椎间盘疾病探究中应用广泛,同时还与 Notch 通路有一定的联系,因此本研究利用椎间盘纤维环细胞开展实验。





注:与对照组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与钙化组比较, $* P < 0.05$

图 7 Western blot 检测纤维环细胞中 BMP-2、b-FGF 及 Notch1 蛋白表达情况及条带图

Fig.7 Protein expression and band map of BMP-2, b-FGF and Notch1 in annulus fibrosus cells detected by Western blot

3.2 BMP-2 作为钙化诱导剂的优势

BMP-2 在 BMP 家族中活性较高,是骨祖细胞分化发育成骨细胞必不可少的一个炎症因子,可以调节椎间盘细胞外基质合成代谢^[9]。相关研究表明^[10],在培养的椎间盘细胞中加入 BMP-2,能够促进椎间盘细胞 II 型胶原蛋白的表达量以及多糖分泌量提高,提示 BMP-2 与椎间盘退变以及钙化有较大的相关性。龚财判等^[11]也在研究中发现 BMP-2 参与了血管钙化,并与 Notch1 共同作用。由此可见 BMP-2 在钙化过程中有较多参与,提示 BMP-2 能够促进钙化。b-FGF 是多功能的细胞生长因子,可以促进成纤维细胞增殖及分泌 I 型胶原蛋白,并且还可以上调胶原和纤维粘连蛋白的表达水平,从而加速细胞外基质合成及沉积,使细胞出现钙化^[12-13]。本实验中,分别利用 BMP-2、b-FGF 两种成骨诱导因子诱导钙化,从而判断哪种钙化诱导方式更优,为后续实验开展奠定基础。实验结果表明,两种方式均可诱导细胞钙化,但是通过茜素红结果可以看到加入 BMP-2 诱导后钙化结节数更多,因此选择 BMP-2 进行文章后续钙化诱导。

3.3 Notch1 信号通路与椎间盘钙化以及成骨因子 BMP-2、b-FGF 的关系

Notch 信号通路在脊椎动物和无脊椎动物中都

有较高的表达,是进化较为保守的跨膜受体蛋白家族,近些年研究发现它与椎间盘钙化有不可分割的关系,使椎间盘钙化的是 BMP-2 与 Notch1 共同作用导致的结果^[14-15]。因此,为了进一步探究 Notch1 信号通路与椎间盘钙化以及成骨因子 BMP-2、b-FGF 的关系,本研究在纤维环细胞中加入了 LPS 用来活化 Notch1 蛋白的表达,DAPT 抑制 Notch1 蛋白的表达,从而更好地探究 Notch1 信号通路在椎间盘钙化过程中发挥的重要作用。实验结果表明,加入 LPS 后,细胞钙化结节相较于钙化组显著升高,细胞凋亡率显著升高,而加入 DAPT 后,纤维环细胞钙化结节数量明显减少,并且细胞凋亡率也大幅下降,提示 Notch1 信号通路活性与钙化呈正相关。并且 ELISA 数据说明,当 Notch1 信号通路活性增强时成骨因子 BMP-2、b-FGF 含量显著升

高,而当加入 DAPT 抑制 Notch1 信号通路活性时 BMP-2、b-FGF 含量显著降低,提示 Notch1 信号通路在细胞钙化过程中与成骨因子关系密切,Notch1 信号通路活性与成骨因子水平呈正相关。Western blot 结果表明加入 LPS 后 Notch1 信号通路被激活,BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达水平均呈现上升趋势,加入 DAPT 后 Notch1 信号通路被抑制,BMP-2、b-FGF、Notch1 蛋白表达水平均呈现下降趋势,进一步证实 Notch1 活性与 BMP-2、b-FGF 活性呈正相关。

综上所述,本文证实了 Notch1 信号通路在腰椎间盘钙化过程中发挥了重要作用,其作用机制可能是通过增强体内成骨因子 BMP-2、b-FGF 水平,从而诱导椎间盘钙化。

参考文献

[1] 韩世虎,朱保国,郑楠,等. 经皮椎间孔镜下髓核摘除术治疗腰椎间盘突出症疗效观察[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(13): 55-58.
HAN S H, ZHU B G, ZHENG N, et al. Effect of percutaneous transforaminal endoscopic discectomy for lumbar disc herniation [J]. J Clin Med Pract, 2020, 24(13): 55-58. Chinese.
[2] TABUCHI M, HAMAJIMA K, TANAKA M, et al. UV light-generated superhydrophilicity of a titanium surface enhances the transfer, diffusion and adsorption of osteogenic factors from a collagen sponge [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6811.

- [3] WU X W, WANG X C, SHAN L Y, et al. High-mobility group AT-Hook 1 mediates the role of nuclear factor I/X in osteogenic differentiation through activating canonical Wnt signaling[J]. *Stem Cells*, 2021, 39(10):1349-1361.
- [4] 吴子健, 胡昭端, 周晓红, 等. 通督活血汤含药血清可抑制椎间盘纤维环细胞的焦亡[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(14):2148-2154.
- WU Z J, HU Z D, ZHOU X H, et al. Tongdu Huoxue Decoction-mediated serum inhibits pyroptosis in annulus fibrosus cells of the intervertebral disc[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2021, 25(14):2148-2154. Chinese.
- [5] 彭奇, 胡智旭, 郑师强, 等. 关节镜联合小针刀治疗钙化性冈上肌腱炎的疗效观察[J]. *浙江临床医学*, 2021, 23(4):497-499.
- PENG Q, HU Z X, ZHENG S Q, et al. Clinical observation of arthroscopy combined with small needle knife in the treatment of calcified supraspinatus tendinitis[J]. *Zhejiang Clin Med J*, 2021, 23(4):497-499. Chinese.
- [6] LAI Q Z, ZHANG X J, CHEN M L, et al. Salvia miltiorrhiza-asarum ointment combined with Chinese medical massage alleviates symptoms of osteoarthritis in a rat model through the Notch1/matrix metalloproteinase-13 signaling pathway[J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41(4):600-607.
- [7] 马俊, 张颖, 陈元元, 等. 氧浓度及 Notch 通路对大鼠纤维环细胞增殖和细胞周期的影响[J]. *脊柱外科杂志*, 2015, 13(1):50-55.
- MA J, ZHANG Y, CHEN Y Y, et al. Influences of oxygen tension and Notch signaling pathway on proliferation and cell cycle of rat annulus fibrosus cells[J]. *J Spinal Surg*, 2015, 13(1):50-55. Chinese.
- [8] 徐翔, 吴一民, 李树文, 等. 山羊骨髓间充质干细胞与纤维蛋白胶修复椎间盘纤维环缺损的组织学比较[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(13):1974-1978.
- XU X, WU Y M, LI S W, et al. Histological comparison between goat bone marrow mesenchymal stem cells and adhesive fibrin for the repair of annulus fibrosus defect of intervertebral discs[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(13):1974-1978. Chinese.
- [9] 郑青波, 廖月姣, 王福彬, 等. 牦牛 BMP2 基因生物信息学与表达调控分析[J]. *中国草食动物科学*, 2021, 41(5):1-7.
- ZHENG Q B, LIAO Y J, WANG F B, et al. Biological information analysis and expression regulation analysis of BMP2 gene in yak[J]. *China Herbi Sci*, 2021, 41(5):1-7. Chinese.
- [10] 陈铁柱, 王宁科, 李晓声. 腰痹舒干预腰椎间盘突出退变模型兔髓核组织水通道蛋白 1、水通道蛋白 3 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(8):1168-1173.
- CHEN T Z, WANG N K, LI X S. Effect of Yaobishu on protein expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in nucleus pulposus of the degenerated lumbar intervertebral disc in a rabbit[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(8):1168-1173. Chinese.
- [11] 龚财判, 欧三桃. Notch1 信号通路及血管钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(2):213-216.
- GONG C P, OU S T. Notch1 signaling pathway and vascular calcification[J]. *Chin J Arterioscler*, 2016, 24(2):213-216. Chinese.
- [12] 张爱利, 耿志霞, 韩冬. 益肺通络汤对肺间质纤维化模型大鼠血清 TGF- β 1 和 bFGF 及 TNF- α 表达以及肺组织 HYP 的影响[J]. *临床医药实践*, 2021, 30(11):840-842, 871.
- ZHANG A L, GENG Z X, HAN D. Effects of Yifei Tongluo Decoction on expression of TGF- β 1, bFGF, TNF- α in serum and HYP in lung tissue of pulmonary interstitial fibrosis model rats[J]. *Proceeding Clin Med*, 2021, 30(11):840-842, 871. Chinese.
- [13] 叶挺. Notch1 蛋白在人心脏瓣膜间质细胞凋亡与钙化关系中的作用[D]. 合肥:安徽医科大学, 2017.
- YE T. The role of Notch1 protein in the relationship between apoptosis and calcification of human heart valve interstitial cells[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2017. Chinese.
- [14] 陈燕文, 陈都, 甘春蕾, 等. 维持性血液透析患者血清 BMP-2 和 BMP-4 水平与血管钙化的关系[J]. *临床误诊误治*, 2021, 34(8):91-95.
- CHEN Y W, CHEN D, GAN C L, et al. Correlations between serum levels of BMP-2 and BMP-4 with vascular calcification in patients undergoing maintenance hemodialysis[J]. *Clin Misdiagnosis & Mistherapy*, 2021, 34(8):91-95. Chinese.
- [15] SAFARI B, DAVARAN S, AGHANEJAD A. Osteogenic potential of the growth factors and bioactive molecules in bone regeneration[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175:544-557.

(收稿日期:2022-08-12 本文编辑:王宏)