

分类号 _____

密级 _____

UDC _____

编号 _____

南方医科大学

博士学位论文

CRLF1 激活 ERK1/2 信号通路调控 TGF- β 1 介导的

黄韧带肥厚的机制研究

CRLF1 mediates TGF- β 1 induced hypertrophy of ligamentum flavum

by activating ERK1/2 signaling pathway

郑振雨

导师姓名 _____ 张忠民 教授

专业名称 _____ 外科学（骨外科）

培养类型 _____ 全日制（学术型）

论文提交日期 _____ 2020 年 5 月 22 日

南方医科大学 2017 级博士学位论文

**CRLF1 激活 ERK1/2 信号通路调控 TGF- β 1 介导的
黄韧带肥厚的机制研究**

**CRLF1 mediates TGF- β 1 induced hypertrophy of
ligamentum flavum by activating ERK1/2 signaling
pathway**

课题来源：国家自然科学基金面上项目（81672228）

学 位 申 请 人	郑振雨
导 师 姓 名	张忠民
专 业 名 称	外科学（骨外）
培 养 类 型	学术型
培 养 层 次	博士
所 在 学 院	第三临床学院

答 辩 委 员 会 主 席 夏 虹 教 授

答 辩 委 员 会 成 员 白 晓 春 教 授

沈 靖 南 教 授

朱 立 新 教 授

瞿 东 滨 教 授

2020 年 5 月 22 日 广州

CRLF1 激活 ERK1/2 信号通路调控 TGF- β 1

介导的黄韧带肥厚的机制研究

博士研究生：郑振雨

指导老师：张忠民教授

摘 要

背景

黄韧带肥厚是腰椎椎管狭窄的一个重要因素，严重时压迫神经根和马尾，导致腰部疼痛及间歇性跛行。尽管有研究认为黄韧带肥厚可能和各种炎症因子、生长因子、老龄及机械应力有关，但是导致黄韧带肥厚的关键分子及其调控机制仍然未知。另外，由于缺乏有效的黄韧带肥厚动物模型，尚未发现关于黄韧带肥厚分子机制的体内研究。

目的

本研究旨在：1.发现黄韧带肥厚的关键调控蛋白，探索其调控细胞外基质形成的机制。2.建立小鼠黄韧带肥厚模型，对黄韧带肥厚的分子机制进行体内验证。

方法

1.收集正常和肥厚的人黄韧带组织，组织学染色检测两组纤维化情况。用同位素相对标记与绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术对两组样本进行分析，整合转录组与蛋白质组数据，发现关键蛋白：细胞因子受体样因子 1 (Cytokine Receptor Like Factor 1, CRLF1)。使用免疫组化和 qPCR 技术对结果进行验证。

2.分离并体外培养人正常黄韧带细胞，使用 TGF- β 1 和成熟的重组人 CRLF1 刺激黄韧带细胞，通过免疫荧光、Western Blot 及 qPCR 技术检测各组细胞纤维

化相关标志物的 mRNA、蛋白表达和 ERK1/2 信号通路活化情况；加入 ERK1/2 通路抑制剂，观察其对 CRLF1 和 TGF- β 1 生物学作用的影响；加入 SMAD3 通路抑制剂，观察其对 TGF- β 1 诱导的 CRLF1 的 mRNA 表达的影响。使用 siRNA 技术抑制 CRLF1 表达，观察 TGF- β 1、IL-1 β 及机械应力诱导的纤维化是否受到影响。

3.建立双足站立小鼠黄韧带肥厚模型，有限元分析黄韧带受力情况，组织学染色观察其病理改变与人的肥厚黄韧带病理改变是否相同。

4.构建 CRLF1 过表达和抑制的腺相关病毒载体，体内验证 CRLF1 在黄韧带肥厚发展过程中的作用。

结果

1. 肥厚黄韧带组织中有序的弹力纤维明显减少，胶原纤维和肌成纤维细胞明显增加，P-ERK1/2 表达量增加，CRLF1 在肥厚黄韧带中高表达，且 CRLF1 阳性细胞数与 α -SMA 阳性细胞数成正相关，黄韧带内肌成纤维细胞可以分泌 CRLF1。

2. TGF- β 1 在转录水平调节纤维化相关标志物 mRNA 的合成，而 CRLF1 主要在转录后水平促进这些标志物的合成；CRLF1 和 TGF- β 1 均可激活 ERK1/2 信号通路，阻断 ERK1/2 通路后 CRLF1 和 TGF- β 1 的促纤维化作用均被抑制。TGF- β 1 可以促进 CRLF1 mRNA 的合成，而 CRLF1 mRNA 升高不明显，使用 SIS3 阻断 SMAD3 通路后，TGF- β 1 诱导的 CRLF1 的 mRNA 表达明显下调。抑制 CRLF1 可以降低 TGF- β 1、IL-1 β 和机械应力导致的纤维化。

3.双足站立小鼠黄韧带受力显著增加，双足站姿小鼠黄韧带肥厚模型可以有效模拟人肥厚黄韧带的病理变化。

4.双足站立组小鼠黄韧带中 CRLF1 阳性细胞数明显增加。CRLF1 可以在体内促进黄韧带肥厚的形成，抑制 CRLF1 可以减少黄韧带肥厚的形成。

结论

CRLF1 在多种刺激诱导纤维化的过程中都起到核心节点作用。抑制 CRLF1

可以减少黄韧带肥厚的形成。

关键词：CRLF1 ERK1/2 SMAD3 黄韧带肥厚 小鼠模型

CRLF1 mediates TGF- β 1 induced hypertrophy of ligamentum flavum by activating ERK1/2 signaling pathway

Name: Zheng Zhenyu

Supervisor: Professor Zhang Zhongmin

ABSTRACT

Background

Hypertrophy of the ligamentum flavum (HLF) is an important factor for lumbar spinal stenosis (LSS). In severe cases, it can compress nerve roots and cauda equina, causing lumbar pain and intermittent claudication. Although some studies have suggested that the ligamentum flavum (LF) hypertrophy may be related to various inflammatory factors, growth factors, aging and mechanical stress, the key molecules that cause the ligamentum flavum hypertrophy (LFH) and their regulatory mechanisms remain unknown. In addition, due to the lack of an effective animal model of ligamentum flavum hypertrophy, there are currently no in vivo studies on the molecular mechanism of ligamentum flavum hypertrophy.

Objective

The purpose of this study is: 1. To find out the key regulatory proteins of the ligamentum flavum hypertrophy, and explore its mechanism of regulating the formation of extracellular matrix (ECM). 2. To establish a new mouse model of ligamentum flavum hypertrophy, and verify the molecular mechanism in vivo.

Methods

1. The normal LF and HLF tissues were collected and the fibrosis of the two groups was detected by histological staining. Two groups of samples were analyzed by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) technology, and the key protein: cytokine receptor like factor 1 (CRLF1) was found by integrating the data of transcriptome and proteome. Immunohistochemistry and qPCR were used to verify the results.

2. Human normal LF cells were isolated and cultured in vitro. TGF- β 1 and mature recombinant human CRLF1 (rhCRLF1) was used to treat the LF cells. The mRNA, protein expression of fibrosis related markers and the activation of SMAD3 and ERK1/2 signalling pathway were detected by immunofluorescence, Western blot and RT-qPCR. ERK1/2 pathway inhibitor was added to observe the biological effects of CRLF1 and TGF- β 1. The effect of SMAD3 pathway inhibitor on TGF- β 1 induced CRLF1 mRNA expression was observed. The expression of CRLF1 was inhibited by siRNA technology, and the effects of TGF- β 1, IL-1 β and mechanical stress-induced fibrosis were observed.

3. To establish a model of HLF in bipedal standing mice. The stress on LF was analyzed by finite element analysis. Histologic staining was used to observe whether the pathological changes were the same as those of human hypertrophic ligamentum flavum.

4. To construct the adeno-associated virus vector of CRLF1 overexpression and inhibition, and to verify the role of CRLF1 in the development of LF hypertrophy in vivo.

Results

1. Orderly elastic fibers in the HLF tissue were significantly reduced, irregular collagen fibers, the collagen fibers and myofibroblasts and the expression of p-ERK1/2 were significantly increased; CRLF1 was highly expressed in HLF. The

expression of CRLF1 and α -SMA was positively correlated.

2. TGF- β 1 regulates the synthesis of fibrosis related markers at the transcriptional level, while CRLF1 mainly promotes the synthesis of fibrosis related markers at the post transcriptional level; The ERK1/2 signalling pathway was activated by CRLF1 and TGF- β 1. The fibrogenic effects of CRLF1 and TGF- β 1 were inhibited when the ERK1/2 pathway was blocked. TGF- β 1 can promote the synthesis of CRLF1 mRNA, but the increase of CRLF1 mRNA was not obvious. CRLF1 mRNA was significantly down-regulated when SMAD3 pathway was blocked. Inhibition of CRLF1 can reduce fibrosis caused by TGF- β 1, IL-1 β and mechanical stress.

3. The stress of the ligamentum flavum in bipedal standing mice increased significantly, and the model of ligamentum flavum hypertrophy in bipedal standing mice could effectively simulate the pathological changes of human LFH.

4. Compared to the control group, the number of CRLF1 positive cells in bipedal standing mice increased. CRLF1 over expression can lead the formation of HLF in vivo, and inhibition of CRLF1 reduced the formation of HLF caused by bipedal standing.

Conclusion

CRLF1 plays a key role in the process of multiple stimulation induced fibrosis. Inhibition of CRLF1 can reduce the formation of ligamentum flavum hypertrophy.

KEYWORDS : CRLF1; ERK1/2; SMAD3; Ligamentum flavum hypertrophy;
Mouse model

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	i
目 录	1
前 言	1
参考文献	7
第一章 肥厚黄韧带中 CRLF1 起源及表达作用研究.....	16
引言	16
1 实验材料	17
2 实验方法	20
3 结果	28
4 讨论	36
参考文献	38
第二章 CRLF1 调控黄韧带肥厚的机制研究.....	43
引言	43
1 实验材料	44
2 实验方法	48
3 结果	59
4 讨论	68
参考文献	71
第三章 小鼠黄韧带肥厚模型的构建及 CRLF1 功能的体内研究... 76	76
引言	76

目 录

1 实验材料	77
2 实验方法	81
3 结果	88
4 讨论	100
5 全文总结	101
参考文献	102
附 录	105
攻读博士学位期间成果	106
致 谢	107
南方医科大学学位论文原创性声明	108

前 言

随着我国医疗技术的进步和经济水平的提高，中老年人口比例逐渐增加，与年龄相关的疾病也随之增加。例如，腰椎管狭窄症，它是造成老年人腰腿痛的常见病因之一^[1, 2]。椎管位于脊柱的中后部，在维持躯体姿势、力量传导、保护神经结构等方面起着重要作用。流行病学研究发现，腰椎管狭窄症的患病率约为 9.3%，通常在 60 岁至 70 岁左右发病^[3]。65 岁以上接受脊柱外科手术的人群中，大多是由于椎管狭窄症所致^[4]。腰椎管狭窄可由骨或软组织的增生引起^[5]，其特征是椎管管径变小或神经根孔的直径变窄，神经结构受到挤压^[6]。常见的临床症状表现为腰腿痛^[4]、间歇性跛行，病情严重时可导致下肢活动功能受限、丧失劳动能力，虽然腰椎管狭窄症不会对生命构成威胁，但它会对日常活动造成严重的影响^[7-9]。

腰椎管狭窄症的诊断较为复杂，其分类涉及到多种因素。Ishimoto 等人研究发现，40 岁以上有严重椎管狭窄的患者中（椎管横截面积减少三分之二以上）只有 17.5% 的患者有症状^[10]。Boden 等发现，60 岁以上有椎管狭窄的人群中，有 21% 是无症状的^[11]。由于无症状的腰椎管狭窄发生率很高，所以患者的症状是腰椎管狭窄症分类的关键。目前多数学者根据临床症状和狭窄部位，将椎管狭窄症分为中央型、侧方型和混合型。中央型椎管狭窄患者通常有神经源性跛行，表现为下腰部、臀部和/或大腿后部疼痛，腰椎伸直时疼痛加重，腰椎屈曲时疼痛减轻；外侧型椎管狭窄可能导致神经根症状，例如皮肤麻木、无力等。虽然经典的症状和影像学检查有助于临床评估，但是北美脊柱学会研究后发现，没有足够的证据表明哪些症状与椎管狭窄相关，患者病史在诊断中可能更加重要^[12]。并且由于疾病进展缓慢，诊断可能会被延迟。

腰椎管狭窄的治疗方法相对有限。保守治疗方法可用于早期和中度严重的患者^[13]。包括改变不良生活工作习惯、消炎镇痛、物理治疗、糖皮质激素药物注射、针灸、按摩等治疗。但是保守治疗也有其局限性，例如，非甾体类消炎

止痛药物可能有肾脏毒性和消化系统溃疡等副作用^[14]，并且缺乏长期研究数据。物理治疗的效果还没有明确证据，目前还不确定哪些是有效的治疗方法^[13]。硬膜外糖皮质激素注射早期效果较好，但是随着时间的推移，疗效会下降，长期使用还会增加糖尿病、高血压和骨质疏松的发病风险^[13]。而针灸按摩等疗效缺乏实验数据支持。一旦病人的病情发展到中度以上，保守治疗方法可能会变得无效，手术是其唯一的选择。Amundsen 等人进行了一项为期 10 年的前瞻性随机实验，他们发现，手术组患者的预后优于保守治疗组。保守治疗的患者中有 50% 效果良好，而手术的患者中有 80% 效果良好^[15]。

然而令人遗憾的是，虽然目前手术方式较为成熟，但是不管是切开减压还是微创手术都有可能引起并发症。Costandi 等研究了椎管狭窄症切开手术和微创手术的并发症后发现：脑脊液漏开放手术发生率为 2%-20%，微创手术为 1.1%-12.5%；硬膜外血肿发生率都为 0%-5%；术后感染开放手术发生率为 0%-5.7%，微创手术为 0%-4%^[13]。另外手术本身也会加重患者心理和身体负担。因此，对于椎管狭窄，临床上迫切需要一种安全、有效、治疗成本相对较低的治疗方法。

引起腰椎管狭窄症的病理原因较多，其中最重要的因素是黄韧带的退变^[8, 9, 16-18]。1913 年，Elsberg 第一次描述了由黄韧带肥厚引起的神经症状^[19]。Park 等人首先明确了肥厚的黄韧带是造成椎管狭窄的原因。他们发现椎管狭窄患者黄韧带的平均厚度为 4.44 mm，对照组无椎管狭窄患者的黄韧带平均厚度为 2.44 mm^[20]。所以寻找黄韧带肥厚的主要致病因子及其作用机制、并在此基础上阻断或减缓肥厚的进展，将成为防治腰椎管狭窄症的最佳方案。

黄韧带起源于上位椎板前面的中下部，止于下位椎板上缘，黄韧带向两侧可以延伸到椎间关节的关节囊，两侧黄韧带在中线处汇合^[21]。黄韧带构成了椎管后方和外侧的重要保护结构，维持硬脊膜后表面的光滑。它与后方韧带复合体的其他韧带一起控制着椎体间运动、限制脊柱过度前屈，在维持脊柱稳定和姿势中起着重要作用^[22]。Denis 创立的脊柱三柱理论学说也强调了韧带对脊柱稳

定的作用。病理学研究发现，正常的黄韧带中含有大量排列有序的弹力纤维和少量胶原纤维^[23-26]。但是随着黄韧带的退变，弹力纤维与胶原纤维比例逐渐降低，并且，发生纤维性变，常伴有钙化^[18, 27, 28]。

已有许多报道对黄韧带肥厚的外部因素进行了相关研究。但迄今为止，年龄和机械应力这两个因素中哪一个是黄韧带肥厚的主要原因一直缺少直接的研究证据。有学者认为患者的年龄与黄韧带退变及腰椎管狭窄症发病密切相关^[28]。Koichi Sairyō 发现伴随着患者年龄的增长，黄韧带厚度逐渐增加，并且在 L3/4 和 L4/5 节段的黄韧带增厚最明显^[24]。Okuda^[27, 29, 30]等人研究发现衰老不仅会引起椎间盘退变和小关节疾病等退行病变，还会导致黄韧带纤维化、失去弹性、折叠、最终形成肥厚的黄韧带。Postacchini 等人^[31]使用显微镜和透射电镜发现，黄韧带在衰老过程中发生了纤维化和软骨化改变，纤维变性、软骨样化生和钙化降低了黄韧带的弹性，即使卧位时韧带厚度正常，纤维化的黄韧带也可能在站立位时突入椎管。

另外一种观点认为黄韧带肥厚可能与异常增加的机械应力有关^[32-34]。Kazunori 的研究显示，异常的应力刺激会使弹力纤维发生断裂，并使黄韧带发生软骨性改变^[34]。Nakatani 发现机械应力可以在转录水平刺激黄韧带细胞胶原蛋白和 TGF- β 1 的表达^[35]。一些学者认为，椎体滑脱、长期不良姿势，都可以使黄韧带长时间处于机械拉伸状态，机械负荷可引起黄韧带组织的弹力纤维发生微损伤^[36-38]，反复的微损伤可导致黄韧带细胞分泌大量生长因子及各种炎症因子，这些因子会使黄韧带的弹力纤维发生降解，胶原纤维替代原有的弹力纤维，发生瘢痕性重塑^[26, 39]，由于瘢痕组织的机械弹力性能较差，应力刺激更容易使之发生断裂，在不断的损伤与修复当中出现胶原纤维沉积，最终导致黄韧带肥厚。因此，构建合适的动物模型研究黄韧带肥厚的主要外部因素是目前急需解决的问题。本课组的前期研究已发现双足站立小鼠可导致椎间盘退变^[40]。在此基础上，本课题拟探讨使用双足站立小鼠构建黄韧带肥厚模型的可能性。

目前，对于黄韧带肥厚的内部分子机制研究主要集中在炎症因子、基质金

属蛋白酶和生长因子方面。有研究发现, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)、白细胞介素-6 (IL-6)等炎症因子可以刺激黄韧带细胞高表达胶原纤维^[26, 41, 42]。Kim 和 Park 等^[41, 43] 发现肥厚黄韧带中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 升高明显, 并发现炎症因子可以促进黄韧带细胞分泌 MMP2 和 MMP9, 他们认为炎症因子刺激产生的基质金属蛋白酶可能参与了黄韧带弹力纤维的降解, 为胶原纤维的增生提供空间。在生长因子方面, 目前研究较多的是转化生长因子 β 1 (transformation growth factor- β 1, TGF- β 1)。TGF- β 1 是目前公认的主要促纤维化因子^[44, 45]。TGF- β 1 可以激活成纤维细胞, 促进其向肌成纤维细胞的转化, 肌成纤维细胞可以高特异性的表达 α -SMA 并增强细胞外基质合成 (ECM)^[46]。Mario 等发现血管内皮细胞和巨噬细胞分泌的 TGF- β 1 促进了黄韧带的肥厚^[47]。Nakatani 等人发现, 机械应力刺激人黄韧带细胞可以引起 TGF- β 1 水平升高和胶原纤维分泌增加^[35]。然而, 虽然 TGF- β 1 可能与黄韧带肥厚过程中的纤维化有关, 但是对 TGF- β 1 在黄韧带肥厚中的具体作用仍缺乏深入的认识。由于 TGF- β 1 具有多种生物学效应, 其抑制剂会产生多种副作用。因此我们还是希望能够找到阻断 TGF- β 1 下游的调控纤维化功能的靶蛋白, 选择性阻断 TGF- β 1 促纤维化的功能, 而不影响其他功能。

在各种刺激诱导的组织纤维性变过程中, ERK1/2 信号通路都起了很重要的作用^[48, 49], 有研究显示 ERK1/2 信号通路参与调控了肌成纤维细胞转化和细胞外基质的分泌^[50, 51]。具有较高特异性的 ERK1/2 信号通路抑制剂不断被发现, 为精确地分析各种细胞因子和 ERK1/2 信号通路在纤维形成过程中的作用提供了重要工具。因此有必要研究 ERK1/2 是否参与了黄韧带肥厚的过程。

在生理和病理发生发展过程中, 蛋白质是基因功能得以体现的最终形式, mRNA 是基因信息表达的传递单位。目前, 将基于二代和三代测序技术的转录组测序技术称为 RNA 测序 (RNA sequencing, RNA-seq), 将鉴别差异蛋白表达的技术称为同位素相对标记与绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术^[52]。现在, 多组学综合分析方法已经开始用于研究动物

的病理生理变化、生殖调控以及生长发育等方面。例如, Christiano 综合分析转录组与蛋白组测序数据, 研究哺乳动物感染布氏锥虫后细胞转录水平和蛋白质表达的变化^[53]。Zhao 等利用蛋白质组和转录组数据研究螨虫的发育停滞原因^[54]。理论上讲, 使用 iTRAQ 和 RNA-seq 技术分析病理状态相同的组织, 其数据之间的一致性能在一定程度上验证高通量筛选数据的可靠性。在此, 我们对正常和肥厚的黄韧带组织进行 iTRAQ 分析, 并与数据库中已有的转录组数据进行整合, 从而缩小差异蛋白的范围, 再将候选蛋白质通过 RT-qPCR 和免疫组织化学技术进行验证, 为探索潜在的治疗靶点提供具体方向。使用这种方法, 我们发现, CRLF1 的表达显著增加, 有可能是黄韧带肥厚的关键靶点。

CRLF1 是一种分泌型可溶性蛋白, 与两种分泌受体 IL12B 和 EBI3 具有同源性, 可以参与机体的炎症反应^[55, 56]。另外临床上发现, CRLF1 基因突变可引起冷汗综合征^[57]和 Crisponi 综合征^[58], 并且常伴面部肌肉萎缩、脊柱侧凸、异常的体温升高和颅面畸形^[59]。另外, Clancy^[61] 使用 BMP-2 蛋白注射到小鼠股四头肌中研究其成骨作用时, 用肌肉切片原位杂交发现, CRLF1 在软骨细胞和成骨细胞中表达升高, 他们认为 CRLF1 蛋白可能在软骨形成或骨形成的过程中发挥重要作用。在这里我们推测, CRLF1 可能不仅会参与异位骨化中细胞外基质的合成过程, 也可能会参与纤维化过程中细胞外基质的合成。

目前, 已有研究发现一些促纤维化因素可以促进 CRLF1 的表达。例如, Katsuki 等研究发现, TGF- β 1 可以促进软骨细胞分泌 CRLF1^[62]。Elson 发现一些炎症因子: TNF- α 、IL-6 和 γ -干扰素均可诱导 CRLF1 的表达^[63]。Detry 等研究发现, CRLF1 可以和白细胞介素 12 (Interleukin-12, IL-12)亚单位(p35)结合^[64], 既参与了免疫调节又参与了多种关节炎的发生发展^[65]。Fleissig 发现机械应力可以在牙周膜纤维细胞中上调 CRLF-1 的表达^[66]。考虑到炎症因子、生长因子和机械应力都能促进纤维化相关标志物的表达, 我们推测 CRLF1 可能参与了这些因素的促纤维化过程中。

既往的观点认为, CRLF1 与心肌营养因子样细胞因子 1 (Cardiotrophin Like

Cytokine Factor 1, CLCF1) 结合形成异源二聚体, 该二聚体与睫状神经营养因子受体 (CNTFR) 结合, 从而完成细胞的信号转导^[67]。但是, 目前已经有研究者对 CRLF1 的配体地位提出了质疑, 并认为 CRLF1 可能还具有成为 CLCF1 配体之外的功能。其原因如下: 由于 CLCF1 基因突变也会导致冷汗综合征, 所以人们才普遍认为 CRLF1 作为 CLCF1 的配体而发挥生物学功能, 但是, CRLF1 基因敲除小鼠会丧失吸吮功能, 而在围产期死亡, 这表明 CRLF1 基因缺失更加致命, 其功能不止是与 CLCF1 形成配体发挥作用^[60]。另外, Brendan 等在神经细胞瘤细胞中研究发现 CRLF1 自身具有增强神经细胞瘤细胞抵抗 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 诱导的氧化应激作用, 肯定了 CRLF1 具有成为 CLCF1 配体之外的作用^[68]。

在以前的研究中, 由于缺乏黄韧带肥厚动物模型, 只有在术中采集的人黄韧带样本和培养的人黄韧带细胞被用来研究黄韧带的退变。无法进行体内实验。然而, 疾病严重程度、病程长短等因素会影响研究的结果。因此, 有必要在动物体内建立一个黄韧带肥厚模型, 以阐明黄韧带肥厚的分子机制。近年来, 利用小鼠模型来研究机械加载的效果越来越受到关注, 部分原因是由于这些模型在使用成本、获取标本和可控的加载水平等方面具有优势。目前唯一的小鼠黄韧带肥厚模型是由 Saito 开发的一种应力加载装置实现的^[69]。这个装置由两个移动的床板、牵拉带和电机驱动器组成。小鼠四肢被牢牢地绑在床上。当床的上半部分不断地移动时, 脊柱被以每分钟 20 个周期的速度不断地弯曲和伸展, 3 小时/天, 进行 12 周的加载后可以观察腰 5/6 水平黄韧带肥厚程度。虽然这套装置能使小鼠黄韧带在实验中承受连续的机械应力。但是, 可以发现, 这种黄韧带肥厚小鼠模型需要复杂的拉伸器械, 在试验过程中小鼠需要每小时进行一次进行腹腔内麻醉, 且并不能够模拟人长期脊柱前屈的姿势。这个模型构建困难, 操作复杂。另外一种黄韧带肥厚动物模型是由 Hayashi 建立的兔子黄韧带肥厚模型^[34], 采用手术切开内固定技术, 钉板固定 L2/3 和 L4/5, 从而获得 L3-4 水平的机械应力集中。他发现, 该模型会造成兔子黄韧带肥厚。但是该模型缺点明显,

需要手术造模，使用内固定限制椎体活动，这破坏了椎体周围组织结构。最重要的是这两种模型都不符合人脊柱受力的特点，也没有相应的应力分析。这些模型的实用性有待进一步验证。我们的前期研究发现，双足站立小鼠可有效的造成椎间盘和小关节退变，这为我们进一步建立小鼠黄韧带退变模型并进行体内研究打下了基础。另外，有限元分析在脊柱力学研究中非常有用，可以帮助我们了解黄韧带受机械应力影响的程度和方式。

综上所述，为发现调控黄韧带肥厚的主要细胞因子及其调控机制，并为体内研究提供实用的黄韧带肥厚动物模型，我们的研究策略如下：

1. 收集患者肥厚和正常黄韧带组织，实用 iTRAQ 技术获得蛋白质组学数据，分析数据库中已有的转录组数据，将两组数据进行整合，发现目标蛋白：CRLF1，验证探索目标蛋白的细胞来源及表达情况。

2. 培养人黄韧带细胞，体外研究 TGF- β 1、CRLF1 对与细胞纤维性变的调控作用及其可能的机制。

3. 在前期研究的基础之上，探讨使用双足站立小鼠构建黄韧带肥厚模型的可能性。使用有三维有限元分析研究双足站立姿势对小鼠黄韧带受力的影响。研究使用双足站立小鼠模型模拟人黄韧带肥厚病理改变的可能性。

4. 构建 CRLF1 过表达和抑制载体，在小鼠体内验证其对黄韧带肥厚的调控作用。

参考文献

- [1] Altun I, Yuksel K Z. Histopathological Analysis of Ligamentum Flavum in Lumbar Spinal Stenosis and Disc Herniation [J]. Asian spine journal, 2017, 11(1): 71-4.
- [2] Backstrom K M, Whitman J M, Flynn T W. Lumbar spinal stenosis-diagnosis and management of the aging spine [J]. Manual therapy, 2011, 16(4): 308-17.
- [3] Ishimoto Y, Yoshimura N, Muraki S, et al. Prevalence of symptomatic lumbar

- spinal stenosis and its association with physical performance in a population-based cohort in Japan: the Wakayama Spine Study [J]. *Osteoarthritis and cartilage*, 2012, 20(10): 1103-8.
- [4] Deyo R A, Gray D T, Kreuter W, et al. United States Trends in Lumbar Fusion Surgery for Degenerative Conditions [J]. *Spine*, 30(12): 1441-5.
- [5] Katz J N, Harris M B. Clinical practice. Lumbar spinal stenosis [J]. *The New England journal of medicine*, 2008, 358(8): 818-25.
- [6] Chen H, Kelling J. Mild procedure for lumbar decompression: a review [J]. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 2013, 13(2): 146-53.
- [7] Yoshiiwa T, Miyazaki M, Notani N, et al. Analysis of the Relationship between Ligamentum Flavum Thickening and Lumbar Segmental Instability, Disc Degeneration, and Facet Joint Osteoarthritis in Lumbar Spinal Stenosis [J]. *Asian spine journal*, 2016, 10(6): 1132-40.
- [8] Sakai Y, Ito S, Hida T, et al. Clinical outcome of lumbar spinal stenosis based on new classification according to hypertrophied ligamentum flavum [J]. *Journal of orthopaedic science*, 2017, 22(1): 27-33.
- [9] Cheung P W H, Tam V, Leung V Y L, et al. The paradoxical relationship between ligamentum flavum hypertrophy and developmental lumbar spinal stenosis [J]. *Scoliosis and spinal disorders*, 2016, 11(1): 26.
- [10] Ishimoto Y, Yoshimura N, Muraki S, et al. Associations between radiographic lumbar spinal stenosis and clinical symptoms in the general population: the Wakayama Spine Study [J]. *Osteoarthritis and cartilage*, 2013, 21(6):783-8.
- [11] Baker A D L. Abnormal Magnetic-Resonance Scans of the Lumbar Spine in Asymptomatic Subjects. A Prospective Investigation [M]. *Classic Papers in Orthopaedics* , 2014, 245-247.
- [12] Scott K, Steven W H, John E E et al. An evidence-based clinical guideline for

- the diagnosis and treatment of lumbar disc herniation with radiculopathy [J]. Spine Journal Official Journal of the North American Spine Society, 2014, 14(1): 180-91.
- [13] Costandi S, Chopko B, Mekhail M, et al. Lumbar spinal stenosis: therapeutic options review [J]. Pain practice, 2015, 15(1):68-81.
- [14] Djurasovic M, Glassman S D, Carreon L Y, et al. Contemporary Management of Symptomatic Lumbar Spinal Stenosis [J]. Orthop Clin North Am, 2010, 41(2): 183-91.
- [15] Amundsen T, Weber H, Nordal H J, et al. Lumbar Spinal Stenosis: Conservative or Surgical Management? : A Prospective 10-Year Study [J]. Spine, 2000, 25(11): 1424.
- [16] Altinkaya N, Yildirim T, Demir S, et al. Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? [J]. Spine, 2011, 36(16): E1093-7.
- [17] Kosaka H, Sairyō K, Biyani A, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis [J]. Spine, 2007, 32(25): 2805-11.
- [18] Yoshida M, Shima K, Taniguchi Y, et al. Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. Pathogenesis and morphologic and immunohistochemical observation [J]. Spine, 1992, 17(11): 1353-60.
- [19] Elsberg C A. Experiences in spinal surgery: Observations upon 60 laminectomies for spinal disease [J]. Surg Gynecol Obstet, 1913, 16,117-32.
- [20] Park J B, Chang H, Lee J K. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation [J]. Spine, 2001, 26(21): E492-5.
- [21] Goldwyn R. Gray's Anatomy [J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 1985,

76(1): 147-8.

- [22] Losiniecki A J, Serrone J C, Keller J T, et al. Lumbar ligamentum flavum: spatial relationships to surrounding anatomical structures and technical description of en bloc resection [J]. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*, 2013, 74(6): 388-92.
- [23] Safak A A, Is M, Sevinc O, et al. The thickness of the ligamentum flavum in relation to age and gender [J]. *Clinical anatomy*, 2010, 23(1): 79-83.
- [24] Koichi S A B, Vijay G, Douglas L, et al. Pathomechanism of Ligamentum Flavum Hypertrophy A Multidisciplinary Investigation Based on Clinical, Biomechanical, Histologic, and Biologic Assessments [J]. *Spine*, 2005, 30(23): 2649-56.
- [25] Kosaka H S K, Biyani A, Leaman D, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis [J]. *Spine*, 2007, 32(25): 2805-11.
- [26] Sairyo K, Biyani A, Goel V K, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue [J]. *Spine*, 2007, 32(11): E340-7.
- [27] Okuda T, Baba I, Fujimoto Y, et al. The pathology of ligamentum flavum in degenerative lumbar disease [J]. *Spine*, 2004, 29(15): 1689-97.
- [28] Schrader P K, Grob D, Rahn B A, et al. Histology of the ligamentum flavum in patients with degenerative lumbar spinal stenosis [J]. *European spine journal*, 1999, 8(4): 323-8.
- [29] Fukuyama S, Nakamura T, Ikeda T, et al. The effect of mechanical stress on hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum [J]. *J Spinal Disord*, 1995, 8(2): 126-30.
- [30] Nachemson A L, Evans J H. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum) [J]. *J Biomech*, 1968, 1(3):

211-20.

- [31] Postacchini F, Gumina S, Cinotti G, et al. Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. Light and electron microscopic morphology [J]. *Spine*, 1994, 19(8): 917-22.
- [32] Hur J W, Kim B J, Park J H, et al. The Mechanism of Ligamentum Flavum Hypertrophy: Introducing Angiogenesis as a Critical Link That Couples Mechanical Stress and Hypertrophy [J]. *Neurosurgery*, 2015, 77(2): 274-81
- [33] Chen J, Liu Z, Zhong G, et al. Cyclic stretch enhances apoptosis in human lumbar ligamentum flavum cells via the induction of reactive oxygen species generation [J]. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 2016, 39(4): 450-4.
- [34] Hayashi K, Suzuki A, Abdullah Ahmadi S, et al. Mechanical stress induces elastic fibre disruption and cartilage matrix increase in ligamentum flavum [J]. *Scientific reports*, 7(1): 13092.
- [35] Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1 [J]. *Journal of orthopaedic research*, 2002, 20(6): 1380-6.
- [36] Landi A. Soft Stenosis of the Lumbar Spine: Thickness vs Hypertrophy of the Ligamentum Flavum. A Pathogenetic and Molecular Point of View [J]. *Journal of Spine*, 2013, 2:e111
- [37] Hur J W, Bae T, Ye S, et al. Myofibroblast in the ligamentum flavum hypertrophic activity [J]. *European spine journal*, 2017, 26(8): 2021-30.
- [38] Naffziger H C, Inman V, Saunders J B. Lesions of the intervertebral disc and ligamenta flava [J]. *Surg Gynecol Obstet*, 2020, 66(1): 288-99.
- [39] Zhang Y, Chen J, Zhong Z M, et al. Is Platelet-Derived Growth Factor-BB Expression Proportional to Fibrosis in the Hypertrophied Lumbar Ligamentum

- Flavum [J]. *Spine*, 2010, 35(25): E1479-E86.
- [40] Xiang A, Liang W, Yan S, et al. Development and Characterization of a Novel Bipedal Standing Mouse Model of Intervertebral Disc and Facet Joint Degeneration [J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2019, 477(6): 1492-504.
- [41] Kim B J, Hur J W, Park J S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human ligamentum flavum cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta [J]. *Journal of neurosurgery Spine*, 2016, 24(3): 428-35.
- [42] Nakamura T, Okada T, Endo M, et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes inflammatory conditions in the ligamentum flavum in the pathogenesis of lumbar spinal canal stenosis by activating interleukin-6 expression [J]. *European spine journal*, 2015, 24(9): 2001-9.
- [43] Park J B, Kong C G, Suhl K H, et al. The increased expression of matrix metalloproteinases associated with elastin degradation and fibrosis of the ligamentum flavum in patients with lumbar spinal stenosis [J]. *Clinics in orthopedic surgery*, 2009, 1(2): 81-9.
- [44] Bierie B, Chung C H, Parker J S, et al. Abrogation of TGF-beta signaling enhances chemokine production and correlates with prognosis in human breast cancer [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2009, 119(6): 1571-82.
- [45] Akhurst R J, Hata A. Targeting the TGF-beta signalling pathway in disease [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2012, 11(10): 790-811.
- [46] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210.
- [47] Lohr M, Hampl J A, Lee J Y, et al. Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF-beta expression [J]. *Acta neurochirurgica*, 2011, 153(1): 134-41.

- [48] Davis J, Molkenin J D. Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide [J]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014, 70(9): 9-18.
- [49] Madala S, Schmidt S, Davidson C, et al. MEK-ERK Pathway Modulation Ameliorates Pulmonary Fibrosis Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Activation [J]. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2012, 46(3): 380-8.
- [50] McCubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1773(8): 1263-84.
- [51] Xu S W, Howat S L, Renzoni E A, et al. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23098-103.
- [52] Du C, Liang J R, Chen D D, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of the metabolism mechanism associated with silicon response in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* [J]. *Journal of proteome research*, 2014, 13(2): 720-34.
- [53] Christiano R, Kolev N G, Shi H, et al. The proteome and transcriptome of the infectious metacyclic form of *Trypanosoma brucei* define quiescent cells primed for mammalian invasion [J]. *Molecular microbiology*, 2017, 106(1): 74-92.
- [54] Zhao J Y, Zhao X T, Sun J T, et al. Transcriptome and proteome analyses reveal complex mechanisms of reproductive diapause in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2017, 26(2): 215-32.
- [55] Shi Y, Wang W, Yourey P A, et al. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1999, 262(1): 132-8.
- [56] Senaldi G, Varnum B C, Sarmiento U, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family [J]. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(20): 11458-63.
- [57] Knappskog P M, Majewski J, Livneh A, et al. Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene [J]. American journal of human genetics, 2003, 72(2): 375-83.
- [58] Crisponi L, Crisponi G, Meloni A, et al. Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1 [J]. American journal of human genetics, 2007, 80(5): 971-81.
- [59] Yamazaki M, Kosho T, Kawachi S, et al. Cold-induced sweating syndrome with neonatal features of Crisponi syndrome: longitudinal observation of a patient homozygous for a CRLF1 mutation [J]. American journal of medical genetics Part A, 2010, 152a(3): 764-9.
- [60] Alexander W S, Rakar S, Robb L, et al. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6 [J]. Current biology, 1999, 9(11): 605-8.
- [61] Clancy B M, Johnson J D, Lambert A J, et al. A gene expression profile for endochondral bone formation: oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2-induced bone formation in mouse quadriceps [J]. Bone, 2003, 33(1): 46-63.
- [62] Tsuritani K, Takeda J, Sakagami J, et al. Cytokine receptor-like factor 1 is highly expressed in damaged human knee osteoarthritic cartilage and involved in osteoarthritis downstream of TGF-beta [J]. Calcified tissue international, 2010, 86(1): 47-57.
- [63] Elson G C, Graber P, Losberger C, et al. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family [J]. Journal of immunology, 1998, 161(3): 1371-9.
- [64] Detry S, Skladanowska K, Vuylsteke M, et al. Revisiting the combinatorial

- potential of cytokine subunits in the IL-12 family [J]. *Biochemical pharmacology*, 2019, 165(240-8).
- [65] Finnegan A, Grusby M J, Kaplan C D, et al. IL-4 and IL-12 Regulate Proteoglycan-Induced Arthritis Through Stat-Dependent Mechanisms [J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(6): 3345.
- [66] Fleissig O, Reichenberg E, Tal M, et al. Morphologic and gene expression analysis of periodontal ligament fibroblasts subjected to pressure [J]. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2018, 154(5): 664-76.
- [67] Elson G C, Lelievre E, Guillet C, et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex [J]. *Nature neuroscience*, 2000, 3(9): 867-72.
- [68] Looyenga B D, Resau J, MacKeigan J P. Cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) protects against 6-hydroxydopamine toxicity independent of the gp130/JAK signaling pathway [J]. *PloS one*, 2013, 8(6): e66548.
- [69] Saito T, Yokota K, Kobayakawa K, et al. Experimental Mouse Model of Lumbar Ligamentum Flavum Hypertrophy [J]. *PloS one*, 2017, 12(1): e0169717.

第一章 肥厚黄韧带中 CRLF1 起源及表达作用研究

引言

正常的黄韧带由约 80%的弹性纤维和 20%的胶原纤维组成^[1]。病理学研究发现,未增生的黄韧带中弹力纤维排列有序,黄韧带细胞数量较少^[2-4]。增生的黄韧带中弹力纤维比例下降并且发生断裂,胶原纤维与黄韧带细胞数量增多^[5-7]。另有研究发现肥厚黄韧带中存在严重的纤维化病灶,纤维化的程度和黄韧带肥厚程度有密切关系^[4]。

炎症反应会引起组织基质破坏和瘢痕组织形成,可能是导致黄韧带肥厚的重要内部原因。有研究发现消炎镇痛药物可能会预防黄韧带肥厚^[4, 8, 9]。另外一些学者研究发现, TGF- β 1^[10-12]、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)^[13]、结缔组织生长因子 (Connective Tissue Growth Factor, CTGF)^[14]和血小板衍生生长因子 (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF)^[15]高表达可能促进了黄韧带肥厚的发展。但是,到目前为止,黄韧带肥厚的关键调控因子和确切的调控机制仍旧不清楚。有必要通过高通量筛选找到调控黄韧带肥厚的关键细胞因子。而单一组学分析很难确定黄韧带肥厚过程中最重要的调控因子。因为可能会发现多种基因表达的上调和下调,这一点通过现有的转录组数据就能发现问题。在分析 GEO 数据库中黄韧带的转录组学数据时我们发现,肥厚黄韧带中上调倍数超过 2 倍 ($\log_2(\text{fc}) > 2$)的 mRNA 总共有 198 个上调基因,上调倍数超过 1.5 倍 ($\log_2(\text{fc}) > 1.5$)的 mRNA 总共有 594 个上调基因。多组学分析既能缩小目标基因的范围,又能提高数据的可靠性,是找到关键调控分子的有效办法。本章研究采用了 iTRAQ 技术发现肥厚黄韧带中差异表达的蛋白质,结合现有的转录组数据,通过整合转录组和蛋白质组学分析,最终发现了目标蛋白: CRLF1。

CRLF1 是一种分泌型可溶性蛋白,属于 1 型细胞因子受体家族。Elson 发现某些炎症因子,如 TNF- α 、IL-6 和 γ -干扰素等可在一些组织的纤维细胞中诱

导 CRLF1 的高表达^[16]。Tsuritani 等人^[17]发现 CRLF1 在膝关节骨性关节炎受损的关节软骨中高表达，他们认为 CRLF1 可以作为骨性关节炎的生物标志物。所以 CRLF1 可能参与到了炎症引起的组织修复过程中。但遗憾的是，到目前为止，在黄韧带肥厚的研究中，还没有关于 CRLF1 的报道。

Tomasek 等发现，在组织进行纤维性修复过程中，成纤维细胞转化为肌成纤维细胞^[18]。肌成纤维细胞的特异性标志物是 α -SMA，肌成纤维细胞增多是纤维化的一个重要特征^[19, 20]。有研究发现，在伤口愈合的过程中，机械应力和 TGF- β 1 调控了肌成纤维细胞的转化数量和 I 型胶原纤维的分泌^[21]。因此，如果黄韧带肥厚是一种慢性损伤与纤维性修复的过程，那么需要明确肥厚黄韧带中肌成纤维细胞的含量是否变化。

本课题提出假设为：脊柱退变或机械应力等因素刺激下黄韧带可能会发生微损伤，在损伤与修复的循环中有可能产生大量的促纤维化因子，CRLF1 有可能参与到了这些因子的促纤维化作用过程中，促进了黄韧带细胞向肌成纤维细胞的转化，介导了黄韧带的肥厚。所以本章研究拟利用组织学染色技术对黄韧带病理变化进行研究，并使用免疫组化和 PCR 技术对高通量筛选结果进行验证，使用免疫荧光双标技术探索 CRLF1 的细胞来源。

1 实验材料

1.1 实验试剂

生理盐水	广州白云山制药厂	中国
Masson 染色试剂盒	南京建成公司	中国
苏木素粉剂	Sigma-Aldrich 公司	美国
伊红粉剂	Sigma-Aldrich 公司	美国
PBS	博士德公司	中国
酒精	广州化学试剂厂	中国
中性树脂	广州化学试剂厂	中国

第一章 肥厚黄韧带中 CRLF1 起源及表达作用研究

中性甲醛	广州化学试剂厂	中国
二甲苯	广州化学试剂厂	中国
DAPI 细胞核染色液	Sigma-Aldrich 公司	美国
辣根过氧化物酶显色试剂盒	碧云天生物试剂公司	中国
即用型山羊血清	Boster 公司	中国
牛血清白蛋白组分五 (BSA)	索莱宝公司	中国
I 型胶原一抗	Abcam 公司	英国
III型胶原一抗	Abcam 公司	英国
CRLF1 一抗	Affinity 公司	中国
p-ERK1/2 一抗	Abcam 公司	英国
α -SMA 一抗	Abcam 公司	英国
Vimentin 一抗	ABclonal 公司	中国
GAPDH 一抗	锐抗公司	中国
HRP-抗鼠二抗	锐抗公司	中国
HRP-抗兔二抗	锐抗公司	中国
FITC-抗鼠二抗	ABclonal 公司	中国
Cy-3-抗兔二抗	ABclonal 公司	中国
Tween-20	ABclonal 公司	中国
5× Primer RT Master Mix	Takara 公司	中国
SYBR Premix Taq	Takara 公司	中国
DEPC 水	Vazyme 公司	中国
qRT-PCR 引物设计与合成	上海生物工程有限公司	中国
iTRAQ 试剂盒	Applied Biosystems	美国
细胞培养皿	Corning 公司	美国
离心管	Corning 公司	美国

1.2 主要设备仪器

无菌工作台	Thermo Fisher	美国
生物安全柜	苏州医疗设备厂	中国
包埋机	Leica 公司	德国
脱水机	Taiva 公司	中国
组织切片机	Leica 公司	德国
-80℃冰箱	Thermo Fisher	美国
普通冰箱	新飞公司	中国
高速冷冻离心机	BECKMAN 公司	美国
雪花制冰机	上海虔钧科学仪器有限公司	中国
超微量紫外分光光度计	DeNovix 公司	美国
荧光定量 PCR 仪	BIO-RAD 公司	美国
组织研磨机	SCIENTZ 公司	中国
体视显微镜	ZEISS 公司	德国
恒温水浴箱	上海一恒科学仪器有限公司	中国
恒温干燥箱	上海飞跃实验仪器有限公司	中国
磁共振扫描仪	Philips 公司	荷兰
台式振荡器	精宏公司	中国
台式磁力搅拌器	常州诺基仪器有限公司	中国
移液枪	索莱宝公司	中国
台式多连管离心机	ABSON 公司	美国
高压蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂	中国
电子天平	舜宇恒平科学仪器有限公司	中国
普通光学显微镜	Nikon 公司	日本
荧光显微镜	Olympus 公司	日本
显微照相装置	Olympus 公司	日本
台式摇床	Heidolph 公司	德国

1.3 主要试剂配制:

1.3.1 脱蜡溶液的制备: 取 360ml 无水酒精, 加入超纯水 40ml, 配成酒精浓度为 90% 的溶液 400ml。取 320ml 无水酒精, 加入超纯水 80ml, 配成酒精浓度为 80% 的溶液 400ml。取 280ml 无水酒精, 与 120ml 超纯水充分混合, 配成 400ml 70% 酒精溶液。使用量筒取无水酒精 200ml, 加入等体积的超纯水 200ml 配成酒精浓度为 50% 的溶液 400ml。二甲苯溶液可以直接使用, 但使用时注意顺序保持不变。

1.3.2 组织分化液的制备: 浓盐酸被稀释时会释放大量热量, 所以分两次制备。使用 100ml 量筒量取 99ml 无水酒精, 再慢慢的将 1ml 浓盐酸加入, 配成 100ml 的分化液, 如此配两次, 共配成 200ml 的分化液, 封装于玻璃瓶中, 室温保存备用。

2 实验方法

2.1 患者选择与黄韧带厚度测量方法

本研究经广东省广州市南方医科大学第三附属医院伦理委员会批准。进入实验的患者都签署知情同意书。研究人员向患者详绍研究目的和方法。告知患者需要获得其术前影像学资料, 术中需要获得其切除的病理标本: 黄韧带, 但不影响其手术过程及治疗效果。收集 2018 年 4 月至 2019 年 4 月入住我科室的患者信息, 共 40 例。患者住院后, 调阅患者的腰椎影像学资料, 将患有腰椎间盘突出症并接受椎管减压但黄韧带厚度正常者 20 例, 作为对照组。患有椎管狭窄症且黄韧带肥厚者 20 例, 作为肥厚组。由于内分泌疾病^[22, 23]和年龄因素^[24, 25]可能会影响到黄韧带的退行性变, 所以两组取年龄构成相近并排除患有内分泌系统疾病的患者。为了排除不同腰椎节段对黄韧带退变的影响, 只选择腰 4/5 经关节突平面且较厚一侧的黄韧带进行测量。为了排除不同病变程度对黄韧带病理变化的影响^[12], 我们选择的 20 例实验组患者的黄韧带厚度均大于 4 mm, 20 例对照组患者的黄韧带厚度均小于 3 mm。

2.2 术中黄韧带样本的采集

患者选择完成后，黄韧带收集在患者接受手术时进行。所有黄韧带标本全部取自腰 4/5 节段。为了排除不同病变部位对黄韧带病理变化的影响^[12]，取材部位均为黄韧带背侧部。术中无菌条件下仔细剔除黄韧带上面的脂肪和骨组织，生理盐水反复冲洗组织上的血迹，将黄韧带沿冠状面剪开，只取背侧部分，然后再将该部分分为两份，一份立即放入中性甲醛固定液中，放置在 4℃ 冰箱里固定 48 小时。另外一份放入冻存管，marker 笔标记后立即放入液氮内冻存。以备后续的 iTRAQ 和 qPCR 使用。同时记录对应的患者信息和取材时间。

2.3 黄韧带组织标本切片制备

2.3.1 黄韧带组织标本脱水

将中性甲醛固定 48 小时后的黄韧带组织使用自来水冲洗 8 小时，然后将黄韧带组织放入脱水机中，设置程序为软组织脱水程序。1) 梯度酒精脱水：在酒精含量分别为 50%，70%，80%，90%，100%，100% 的溶液中各处理 30min；2) 二甲苯 I 号溶液、二甲苯 II 号溶液中处理各 30min；3) 液体石蜡 1 号处理 40min、液体石蜡 2 号处理 40min。

2.3.2 石蜡包埋程序

黄韧带标本脱水结束后使用包埋机包埋黄韧带组织。首先打开冰冻台、预热包埋机。使包埋机中的石蜡融化成液体蜡后再放入黄韧带组织和包埋盒，待液体蜡完全进入包埋盒内后，取出黄韧带组织和包埋盒，摆好位置，确保黄韧带纵轴方向能够与切片方向一致，灌蜡后迅速置于冰台上冷却 30min。包埋好的黄韧带蜡块可常温保存。

2.3.3 黄韧带组织蜡块切片

预先加热水浴锅，使之达到 40℃。首先将黄韧带蜡块放入 -20℃ 冰箱内 1 小时，然后放置于冰面上，保持蜡块处于低温状态。切片时将蜡块固定在切片机上，沿黄韧带组织长轴方向进行切片。首先进行修片，修片时切片厚度设定为

10 μ m, 连续切片, 显微镜观察, 待切到所需部位时, 将切片厚度设置为 4 μ m 继续切片。观察前先将切好的组织片放入水浴锅中充分展平, 然后用载玻片捞出, 显微镜观察是否切到标本合适位置。切片时间过长后应该将蜡块再次放置于冰面上, 以保持蜡块表面硬度。将附有黄韧带切片的载玻片存放于常温下保存。

2.4 人黄韧带组织学实验

2.4.1 H&E 染色实验

(1) **烤片:** 65 $^{\circ}$ C 烤箱将石蜡切片烤片 2h, 观察烤片情况, 确认无掉片情况后, 再进行脱蜡水化。

(2) **脱蜡水化:** 其步骤为: 先脱蜡, 在二甲苯 I 号和 II 号溶液中浸泡 8 min 分钟。然后水化, 100% 酒精 I 号和 II 号溶液中各浸泡 5 分钟, 90%、80%、70% 和 50% 酒精溶液分别浸泡 5 分钟。将切片放入蒸馏水中。

(3) H&E 染色具体步骤:

A. 切片放入湿盒中, 每个切片加苏木素染液 100 μ l, 染色 60s, 去除染色液, 流水冲洗 5min, 终止染色。

B. 分化液分化 3 s, 取出切片, 放置于盛有去离子水的溶液缸中终止分化;

C. 使用自来水冲洗切片返蓝, 显微镜观察, 至细胞核变成蓝色后即可停止冲洗。

D. 每个片子加伊红染液约 50 μ l, 染色 1min, 甩掉伊红染色液, 流水冲洗, 控制冲洗时间在 1-5min 之间, 光学显微镜下观察染色情况, 如果染色欠佳, 可从新进行伊红染色。

E. 将切片依次放入二甲苯溶液 5min 进行透明处理, 将切片放入通风橱内风干。

F. 待切片风干后使用中性树脂封片, 封片时每个玻片上滴加 1 滴中性树脂, 盖玻片从一边开始慢慢覆盖组织, 使气泡得以排出。

G. 待盖玻片固定以后, 使用正置显微镜观察黄韧带形态并拍照。

2.4.2 免疫组织化学染色 (IHC) 实验

A. 将各组黄韧带组织切片用显微镜选好并做标记，烤片、脱蜡水化步骤同 H&E 染色。

B. 抗原修复：切片放入盛有自来水的溶液中清洗 3 次，每次 5min，然后将切片置于盛有枸橼酸盐修复液的缸子中，将缸子放入 60℃ 水浴锅，修复时间为 16 h。

C. 抗原修复时间结束时，将盛有枸橼酸盐的缸子从水浴锅中取出，自然冷却 2 小时。将切片放入盛有 PBS 的溶液缸内清洗黄韧带组织切片 3 次，每次 5min。

D. 淬灭：使用免疫组化笔围绕黄韧带组织周边画圈。用约 50 μ l 的 3% 双氧水滴加在组织上，确保完全覆盖组织，常温淬灭 15min。时间结束后甩去切片上的双氧水，将切片置于盛有 PBS 的溶液缸中，放于慢摇床上清洗 3 次。

E. 山羊血清封闭：将切片放入湿盒，每个切片上滴加即用型山羊血清约 50 μ l，室温封闭 60 min。时间结束后甩去切片上的山羊血清，注意此时不要清洗。

F. 一抗孵育：按照说明书上的比例用 1% BSA 的 PBS 稀释好一抗，移液枪吸取约 20 μ l 滴到黄韧带切片上，置于 4℃ 冰箱中孵育 16 h。

G. 滴加二抗：一抗孵育时间结束后，取出湿盒，室温复温 30min，甩去切片上的一抗孵育液，放入盛有 PBS 的溶液缸中清洗 3 次，每次 5min。然后将按照说明书建议比例稀释好的二抗滴加在组织上，在室温条件下孵育 1 小时。再次 PBS 清洗。

H. DAB 显色：吸取 1ml 的稀释液，向其中滴加一滴 DAB 显色液，避光条件下将显色液滴加到黄韧带组织切片标本上，务必使之完全覆盖组织，暗室内用显微镜观察，控制显色程度并用计时器计时。当发现感兴趣区域呈现棕黄色时，将切片浸泡在盛有自来水的溶液缸中停止反应。

I. 苏木素染色：使用移液枪滴加 30 μ l 的苏木素，复染细胞核的时间设定为 30s，然后将切片放入盛有去离子水的溶液缸内，清洗方法如前所述，使细胞核反蓝。

J. 透明：将切片浸泡在二甲苯溶液中 5min、晾干，封片时每个玻片上滴加

1 滴中性树脂，盖玻片从一边开始慢慢覆盖组织，使气泡得以排出。待中性树脂凝固后显微镜下观察。

2.4.3 Masson 染色实验

烤片、脱蜡水化步骤同H&E染色。

Masson染色具体步骤：

A. 将切片放入盛有PBS的溶液缸中，置于慢摇床上缓慢清洗切片。

B. 将切片在湿盒内摆放好，将50 μl 1号核染液小心滴加到切片上，染色1 min。甩去核染液，立即用3号冲洗液冲洗30 s。

C. 将50 μl 2号浆染液小心滴加到切片上，染色1 min。甩去浆染液，立即用3号冲洗液冲洗30 s。

D. 滴加4号分色液100 μl ,10min,甩干净；E. 滴加5号复染液100 μl , 5 min。甩干净后无水乙醇清洗；F.切片干燥后中性树脂封片，封片时每个玻片上滴加1滴中性树脂，盖玻片从一边开始覆盖组织，使气泡得以排出。待中性树脂凝固后倒置显微镜下观察。

2.4.4 免疫荧光染色（IFC）

脱蜡水化、抗原修复、淬灭、山羊血清封闭、特异性一抗孵育等操作与前述免疫组织化学染色步骤相同。

A. 孵育二抗。一抗孵育时间结束之后甩去切片上的一抗孵育液，再次放入盛有 PBS 的溶液缸中，在慢摇床上清洗 3 次，每次 5min。在暗室中将 FITC 和 CY30 标记的二抗按照说明书推荐的比例用稀释液进行稀释，充分混匀后用移液枪将其滴加在相应的切片上，确保黄韧带组织被完全覆盖，切片继续放在湿盒内避光孵育 1 h, 然后放入盛有 PBS 的溶液缸中，慢摇床上清洗 3 次，每次 5 min。注意清洗时同样要求避光。

B. 封片。在避光条件下将切片放入通风橱内，待切片风干后用指甲油在黄韧带切片周围画圈封闭，然后在使用中性树脂胶封片，封片时每个玻片上滴加 1 滴 DAPI 细胞核显色液，盖玻片从一边开始慢慢覆盖组织，使气泡得以排出。待

盖玻片固定后荧光显微镜下观察染色结果并拍照记录。

2.4.5 黄韧带组织中 CRLF1 及 CLCF1 的 mRNA 表达水平检测

A. 在进行 RT-qPCR 实验之前先做好准备工作。首先预冷离心机至 4℃，设定离心机转速为 12000rpm。取出高温消毒后的研钵，将研钵中倒入液氮，使之冷却，然后将组织放入研钵在液氮中研磨，待液氮挥发后加入 0.2ml Trizol 液继续研磨，直至看不见碎块，再次加入 0.3ml Trizol 液清洗，将混匀后标本转移到 1.5ml 的 EP 管中。放置 5 分钟，然后在 0.5 ml Trizol 中加入 0.1 ml 的氯仿，上下摇晃离心管 30 秒。

B. 在室温条件下静置 5min 后放入设定好的离心机离心 15 分钟。取出离心管，可见其溶液分为三层，下层呈红色，中间层为白色的膜状，是蛋白和 DNA，上层呈无颜色透明状，RNA 存在于上层中。

C. 将含有 RNA 的上层溶液小心的用移液枪转移到另一干净的无酶 EP 管中。吸取时一定注意枪头不要碰到中间层或下层，以免提取的 RNA 中含有杂质，影响后续检测效果。加入等体积的异丙醇后轻柔上下颠倒，室温静置 10 分钟。然后继续离心 10 min。在管底部看到羽毛状的 RNA 沉淀。

D. 轻轻倒掉液体，用移液枪小心地吸取残留的液体，注意不要吸掉 RNA，加入 75%乙醇洗涤，离心 5 min。弃去酒精，放在通风橱内干燥，注意不能将 RNA 沉淀过于烦躁，否则影响溶解。然后加入 50 μ l DEPC 水，使之充分溶解。

E. 超微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度，以 DEPC 水作空白对照。如果 A260/A280 值在 1.8-2.0 之内，则可用于下一步试验。

F. 逆转录实验

第一步

5×Primer RT Master Mix	4 μ l
RNA 样本	4 μ l
无酶水	12 μ l
轻轻吹打	

第二步反转录条件

直接将上一步的反应液进行 37°C 15 min, 85°C 5s, 4°C 的反应。逆转录结束。

G. PCR 实验

SYBR Premix Taq	10 μl
上游引物 (终浓度: 10μM)	0.4 μl
下游引物 (终浓度: 10μM)	0.4μl
模板 cDNA	2 μl
DEPC 水	To 20 μl

PCR 程序设定:

- ① 设定预变性循环次数为 1 次, 95°C 30 s;
- ② PCR 反应设定循环次数为 40 次, 95°C 10 s ; 60°C 30 s; 72°C, 20s;
- ③ 溶解曲线设定为 95°C 15 s ; 60°C 60 s; 95°C 15 s;

GAPDH mRNA 表达水平作为内部参照, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来计算分析数据。

表 1-1. 实验中所用的引物序列

Table 1-1. Primer sequences used in the experiment

Gene Name		
CRLF1	Forward	5' - GATGCAGAAGTCGCACAAG - 3'
	Reverse	5' - TTATCTGGCAGGACCTCTCG - 3'
CLCF1	Forward	5' - CTGGGACCTATCTGAACTACCT - 3'
	Reverse	5' - CAGTTTGTCATTGAGGCTTCG - 3'
GAPDH	Forward	5' - TGTTCGTCATGGGTGTGAAC - 3'
	Reverse	5' - ATGGCATGGACTGTGGTCAT - 3'

2.5 蛋白质组学分析

(1) 样品制备

从液氮灌中取出 3 个肥厚和 3 个正常的组黄韧带组织, 使用组织研磨机研

磨。为了研磨充分，在研磨钵中再次手工研磨，加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液，移入 EP 管中，使用超声裂解。在 4℃、12000×g 离心 10 分钟。收集上清。BCA 法检测样品蛋白质浓度。

(2) 胰蛋白酶消化和 iTRAQ 标记

首先，在 60℃ 条件下用 Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) 还原剂还原 200ug 样本，1 小时。Methyl methanethiosulfonate (MMTS) 半胱氨酸烷基化 30min，然后用胰蛋白酶消化蛋白质过夜。根据试剂盒说明进行 iTRAQ 标记。每个样品分别标记上两个标签 (premiR-195:113 和 114 标签; premiR-000:115 和 116 标签; premiR-30d:117 和 118 标签; 空白: 119 和 121 标签)。将标记好的多肽混合在一起。

(3) 高 pH 反相色谱分析

将标记好的多肽样本装入 Ultimate3000 高效液相色谱系统内的柱上，用于分馏。洗脱液 A 等比例洗涤。肽分馏时，使用浓度梯度为 15% 到 50% 的 B 液持续冲洗，0.2ml/min，持续 45 分钟。然后使用 90% 的 B 液冲洗柱子 10min，置于 95% 的 A 液中 10 分钟，紫外探测器探测 20 次，每 1 分钟一次。真空离心干燥。

(4) 反相液相色谱-串联质谱 (Reversed-Phase Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, RPLC-MS/MS) 分析

将上一步的产物在上样缓冲液中进行重悬，并使用 Ultimate 3000 nano-LC system 系统进行分离，共 70min。分离完成后使用 Q Exactive 进行质谱分析。以高灵敏度模式 (分辨率 > 15000) 记录。

(5) 肽段分析

将发现的多肽数据先导入软件 Protein Pilot Software 4.0 (AB SCIEX, CA), 对多肽数据进行分析。参数设置如下: Cys alkylation: MMTS; ID focus: biological modifications; Database: Uniprot-HUMAN; Search effort: thorough ID。数据分析时，以 $\log_2(fc) > 1.5$, $p\text{-value} < 0.05$ and $CV < 0.5$ 作为选择标准。

(6) GO 分析

本研究使用 QuickGO 进行注释, (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)该注释工具联合利用了生物信息领域的权威数据库, 比如 Ensembl、InterPro、GOC、UniProt、HGNC 等等 37 个数据库, 同时对蛋白进行 GO 注释, 保障了数据的注释质量和准确性。

2.6 差异表达基因的鉴定

转录组数据 GSE113212 的基因表达情况是从 Gene Expression Omnibus (GEO) dataSets (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库下载的。该数据集比较了 4 个肥厚黄韧带和 4 个正常黄韧带 mRNA 表达。将数据下载完成后用 R 语言、limma 软件包(3.34.8 版)对差异基因进行分析。以 $\log_2(\text{fc}) > 2$ 和 $p\text{-value} < 0.01$ 为截止标准。筛选出的转录组和蛋白质组数据输入 Excel 软件, 发现共同上调的基因。

2.7 统计分析

采用 SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)进行数据统计分析。所有的体外数据都进行至少三次独立实验。使用 GraphPad Prism 7 制作统计图。数据以均数 \pm 标准差表示。两组间均数比较方差齐时, 采用两独立样本 t 检验法(Students's t text) 方差不齐时采用矫正的 t 检验。多组间比较方差齐时采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 多重比较采用 LSD 法。方差不齐时采用 Welch 检验, 多重比较采用 Dunnett'S T3 法, $p\text{-value} < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 增生的黄韧带中纤维性变改变明显

术前收集患者的信息显示患者的年龄差异无统计学意义, 患者的黄韧带厚度: 对照组 2.23 ± 0.11 mm, 肥厚组 5.29 ± 0.14 mm。 $p < 0.0001$ (表 1-1)。对收集到的黄韧带样本进行组织学分析, H&E 染色显示, 正常黄韧带中可见纤维排列规则, 没有发生断裂现象, 增生黄韧带中纤维发生断裂, 排列不规则, 部分呈

扭曲状（图 1-1 A, B）。Masson 染色显示：正常黄韧带中含有丰富的红色排列规则的弹力纤维，有少量蓝色的胶原纤维。而肥厚的黄韧带中红色的弹性纤维减少明显，被大量紊乱的蓝色胶原纤维替代（图 1-1 C, D）。

表 1-1. 患者一般信息

Table 1-1. Patients information

	Non-HLF (n = 20)	HLF (n = 20)	P Value
Age	62.9 ± 1.8	65 ± 2.2	0.4
Gender	10 male, 10 female	10 male, 10 female	
Lumbar level	L ₄₋₅	L ₄₋₅	
LF thickness	< 3 mm(2.23 ± 0.11 mm)	> 4 mm(5.29 ± 0.14 mm)	< 0.0001

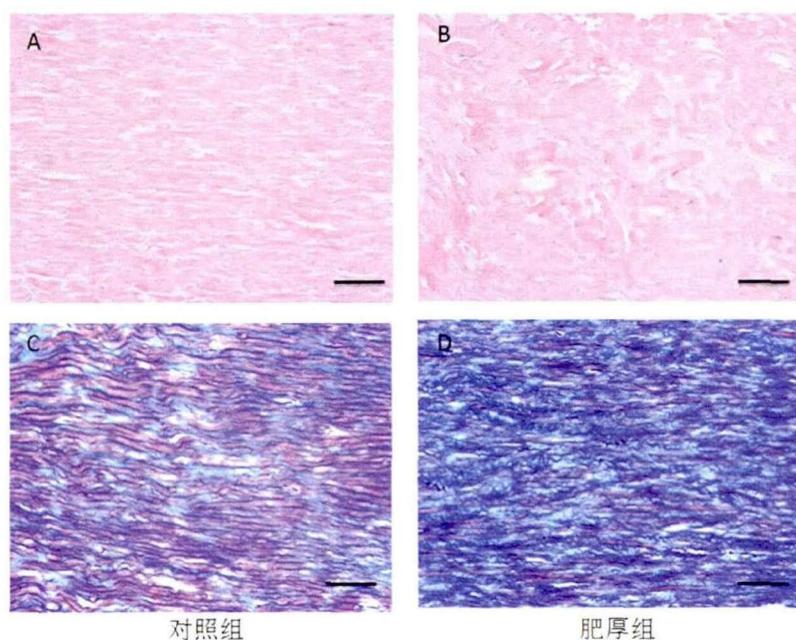


图 1-1. 黄韧带组织标本 H&E 和马松染色：A. 正常黄韧带中纤维排列规则；B. 增生黄韧带中纤维排列不规则，发生断裂。C. 正常黄韧带中含有丰富的红色排列规则的弹力纤维，少量蓝色的胶原纤维；D. 肥厚的黄韧带中红色的弹性纤维减少明显。(n=20)，标尺 100 μm.

Figure 1-1. H&E and Masson staining of ligamentum flavum: A. The fibers are arranged regularly in the normal ligamentum flavum; B. The fibers are irregular in the hypertrophied ligamentum

flavum and broken. C. The normal ligamentum flavum contains abundant red elastic fibers with regular arrangement, and a small amount of blue collagen fibers: D. The red elastic fibers in the thick ligamentum flavum are significantly reduced. (n=20), Scale bars = 100 μ m.

3.2 肥厚组黄韧带中 I、III 型胶原纤维增多，肌成纤维细胞增多，p-ERK1/2 表达升高。

免疫组化染色结果：对照组黄韧带组织中：I 型胶原纤维、III 型胶原纤维较少，肥厚黄韧带标本中 I 型胶原纤维、III 型胶原纤维明显增多（图 1-2）。肌成纤维细胞标志物 a-SMA 在肥厚黄韧带中表达升高，p-ERK1/2 在肥厚的黄韧带中表达增高（图 1-3）。差异有统计学意义（图 1-4）。

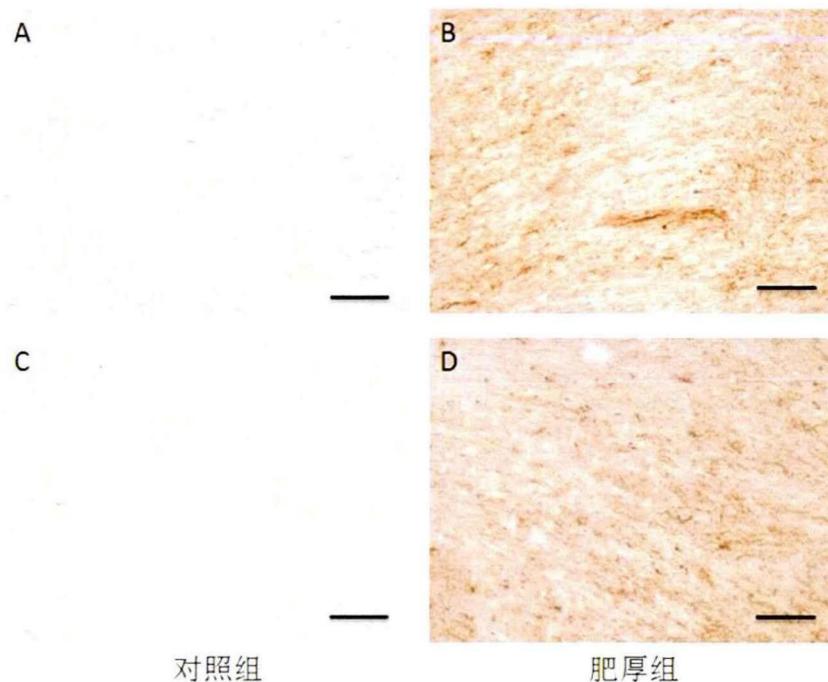


图 1-2. 黄韧带组织标本 I 型和 III 型胶原纤维免疫组化染色，棕色为阳性。A. 对照组黄韧带中 I 型胶原纤维很少；B. 肥厚组黄韧带中 I 型胶原纤维明显增多。C. 正常黄韧带中 III 型胶原纤维很少；D. 肥厚的黄韧带中 III 型胶原纤维明显增多。（n = 20），比例尺 = 100 μ m。

Figure 1-2. Immunohistochemical staining of collagen fibers of type I and type III of ligamentum flavum. (brown is positive area). A. There were few COL1 fibers in the control group ligamentum flavum: B. COL1 fibers in the hypertrophic group ligamentum flavum were significantly

increased. C. There were few COL3 fibers in the control group ligamentum flavum: D. COL3 fibers were significantly increased in the hypertrophic group ligamentum flavum. (n = 20), Scale bars = 100 μ m.

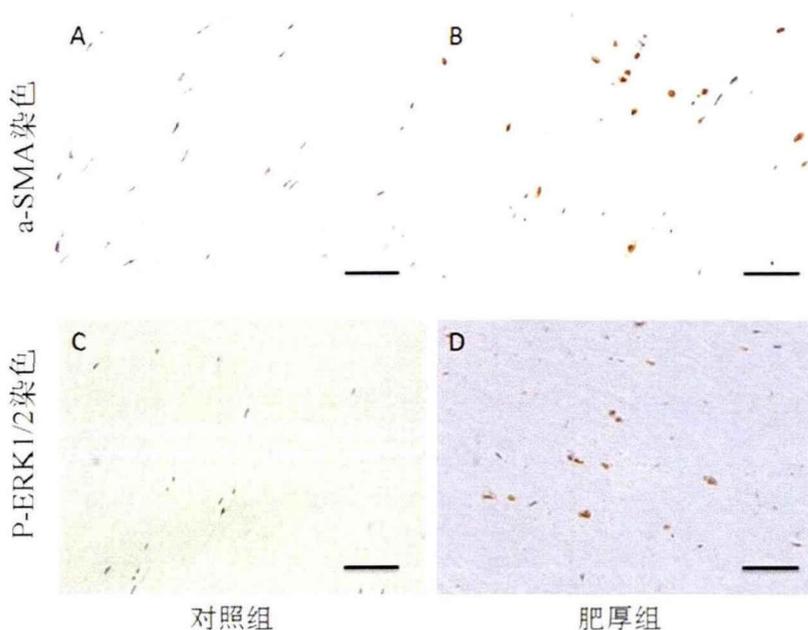


图 1-3. 黄韧带组织标本 a-SMA 和 p-ERK1/2 免疫组化染色，棕色为阳性。A. 对照组黄韧带组织中很少会发现 a-SMA 阳性细胞；B. 增生组黄韧带中组织中可见大量 a-SMA 阳性细胞。C. 对照组黄韧带中 p-ERK1/2 阳性细胞很少；D. 肥厚组黄韧带组织中可见较多的 p-ERK1/2 阳性细胞。(n=20)，比例尺 = 50 μ m。

Figure 1-3. a-SMA and p-ERK 1/2 immunohistochemical staining in ligamentum flavum samples, brown is positive area. (A) a-SMA-positive cells are rarely found in control group: (B) A large number of a-SMA-positive cells can be seen in the hypertrophic group: (C) Few p-ERK1/2 positive cells in control group were observed: (D) A lot of p-ERK1/2 positive cells in the hypertrophic group were observed. (n=20), Scale bars = 50 μ m.

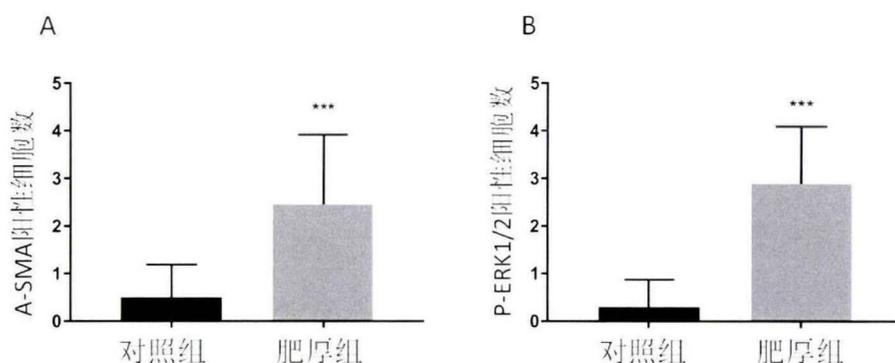


图 1-4. 免疫组化阳性细胞量化分析。(A) 正常黄韧带和肥厚黄韧带免疫组化染色 a-SMA 阳性细胞数;(B) 正常黄韧带和肥厚黄韧带免疫组化染色 p-ERK1/2 阳性细胞数: (n = 20), 采用两独立样本 T 检验, ***P < 0.001。

Figure 1-4. Quantitative analyses of immunohistochemical staining positive cells. (A) The number of a-SMA positive cells in the ligamentum flavum of the control group and hypertrophic group; (B) The number of p-ERK1/2 positive cells in the ligamentum flavum of the control group and the hypertrophic group. (n = 20). Students's t text were used. *** P < 0.001.

3.2 转录组和蛋白质组学综合分析结果

对 iTRAQ 数据进行分析, 共鉴定出 921 个差异蛋白 (图 1-5 A), 通过 GO 分析发现, 这些基因与细胞外空间、细胞外区域部分高度相关 (图 1-5 B), 其中符合条件的上调大于 1.5 倍的蛋白质有 127 个。对 GEO 数据库中正常和肥厚黄韧带的转录组学高通量筛选数据进行分析后, 总共发现了 197 个上调 2 倍的基因 (图 1-5 C)。对 2 个数据集的综合分析确定了肥厚黄韧带组织中有 9 种蛋白质的表达共同上调 (图 1-5 D, 表 1-2)。其中, 肥厚黄韧带中 CRLF1 蛋白的表达差异最明显, 上调了 23.7 倍。数据以火山图的形式呈现。

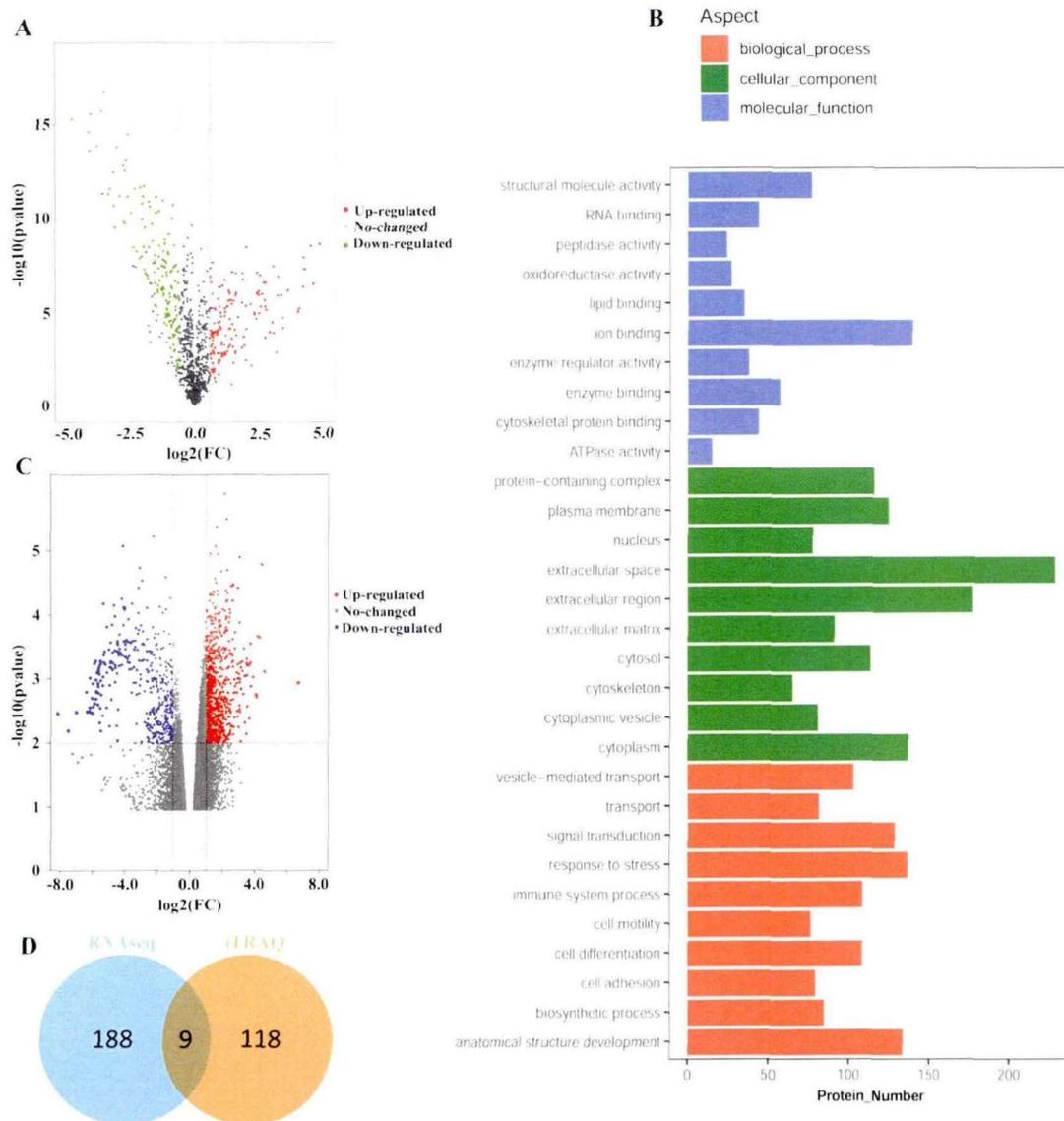


图1-5. 肥厚黄韧带中差异表达的蛋白质筛选结果。火山图是使用样本数据经过log2转化之后构建的。(A) iTRAQ 筛出的差异蛋白数据制作的火山图。垂直线位置代表蛋白表达差异在1.5倍水平，水平线表示 $p = 0.05$ 。图中的红点代表表达上调且具有统计学意义的蛋白质。(B) 肥厚黄韧带相对于正常黄韧带差异表达基因生物过程GO分析结果。(C) 转录组数据中mRNA差异表达的火山图。垂直线所在位置代表表达差异在两倍水平，水平线位置表示 $p = 0.05$ 。图中的红点代表上调表达且具有统计学意义的mRNA。(D) 将这两个数据集进行整合后发现了9个共同表达上调的基因。

Figure 1-5. Differentially expressed proteins in hypertrophied ligamentum flavum. The volcano plot was constructed using normalized signal values of the samples. (A) Volcano plot of differential protein expression in iTRAQ. The vertical lines correspond to 1.5-fold up and down respectively, and the horizontal line represents a P-value of 0.05. The red point in the plot represents the upregulated expressed proteins with statistical significance. (B) Gene ontology (GO) biologic process among proteins between hypertrophied ligamentum flavum and normal ligamentum flavum. (C) Volcano plot of differential mRNA expression in RNAseq. The vertical lines correspond to 2.0-fold up and down respectively, and the horizontal line represents a P-value of 0.05. The red point in the plot represents the upregulated expressed mRNAs with statistical significance. (D) The 2 datasets showed an overlap of 9 genes upregulated.

表1-2. 蛋白组学和转录组学综合分析结果

Table1-2. Results of integrated transcriptome and proteomics analysis

Gene Name	Fold Change	P value
CRLF1	23.686163	3.00E-09
CILP	16.881399	1.02E-05
THBS1	9.7086238	1.42E-06
SERPINE2	8.7795014	0.000141
ACAN	7.8143086	0.000121
HAPLN1	5.8259634	8.70E-07
FGFBP2	4.1008459	3.47E-09
CRTAC1	3.2614812	2.09E-05
COL2A1	1.7246353	0.000884

肥厚黄韧带中共9个相同的表达上调的基因。

Nine genes were co-upregulated in hypertrophied ligamentum flavum.

3.3 对高通量分析结果的验证和 CRLF1 细胞来源探索

为了检验高通量分析结果的可靠性，我们使用免疫组织化学和RT-qPCR技

术来验证高通量数据的分析结果。为了探究CRLF1细胞来源问题，我们使用免疫荧光双标技术研究CRLF1蛋白的来源。结果显示，CRLF1和 α -SMA在所有肥厚黄韧带组织中的表达都上调（图1-6 A, B）。差异有统计学意义（图1-6 C）。CRLF1阳性细胞与肌成纤维细胞数呈正相关（ $r = 0.629$, $P = 0.003$; Spearman相关）（图1-6 D）。此外，RT-qPCR显示，与对照组黄韧带相比，肥厚组黄韧带的CRLF1 mRNA显著增加（图1-6 E），而CLCF1 mRNA（图1-6 F）无明显变化。这一结果也与高通量分析数据一致。用CRLF1抗体和肌成纤维细胞标志物 α -SMA特异性抗体对肥厚黄韧带组织样品进行免疫荧光双标染色。结果显示CRLF1和 α -SMA有良好的共表达（图1-7）。这些结果提示CRLF1是由肥厚黄韧带中的肌成纤维细胞产生的。

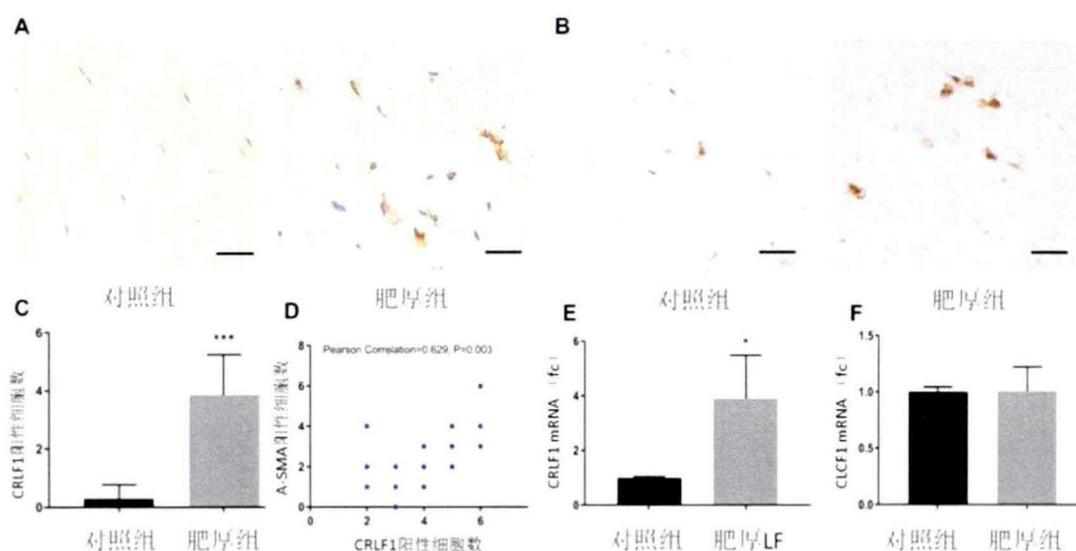


图1-6. CRLF1在肥厚的黄韧带组织中表达升高。(A) 正常与肥厚黄韧带组织CRLF1染色代表照片 (B) 正常与肥厚黄韧带组织 α -SMA染色代表照片。比例尺 = 20 μ m。(C) 肥厚黄韧带和正常黄韧带中的CRLF1阳性细胞数定量分析。(n = 20), ***p < 0.001。(D) 肥厚黄韧带中CRLF1阳性细胞数与 α -SMA阳性细胞数呈正相关 ($r = 0.629$, $P = 0.003$) (E) CRLF1mRNA在肥厚黄韧带和正常黄韧带中的表达差异明显。(n = 4), *p < 0.05 (F) CLCF1mRNA在肥厚黄韧带和正常黄韧带中的表达差异无统计学意义。(n = 4), p = 0.96。

Figure 1-6. (A) Immunostaining of CRLF1 in normal ligamentum flavum. (B) Immunostaining of

CRLF1 in hypertrophied ligamentum flavum. Scale bars = 20 μm . (C) The number of CRLF1 positive cells in normal ligamentum flavum and hypertrophied ligamentum flavum. ($n=20$), $***p < 0.001$. (D) The number of CRLF1 positive cells correlated well with number of α -SMA positive cells in hypertrophied ligamentum flavum ($r = 0.629$, $P = 0.003$). (E) The difference in the expression of CRLF1 mRNA between hypertrophied ligamentum flavum and normal ligamentum flavum was significant. ($n = 4$). $*p < 0.05$. (F) There was no difference in the expression of CLCF1 mRNA between hypertrophied ligamentum flavum and normal ligamentum flavum. ($n = 4$). $p = 0.96$. Scale bars = 20 μm . Error bars represent the SD.

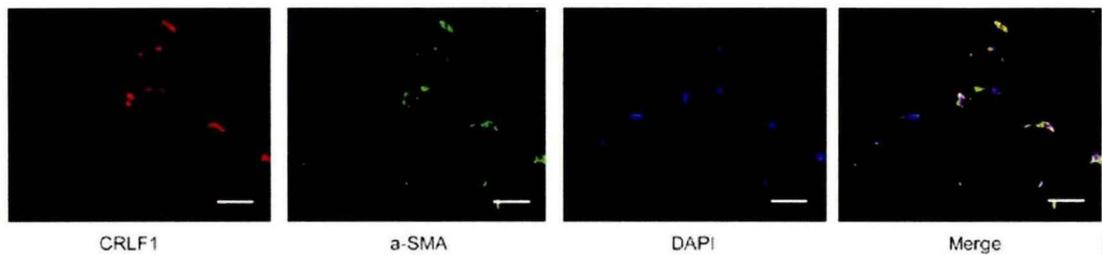


图 1-7. 在肥厚黄韧带中 CRLF1 和 α -SMA 双重免疫荧光染色。用 DAPI 染色细胞核。比例尺 = 20 μm 。

Figure 1-7. Double immunofluorescence staining for CRLF1 and α -SMA. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars = 20 μm .

4 讨论

目前研究发现纤维化是黄韧带增生的主要病理改变。纤维化有许多致病因子，比如各种生长因子、炎症因子、基质金属蛋白酶等。尽管发现这些细胞因子也能促进黄韧带细胞的纤维性变，但是，哪种因子能起到关键的调控作用依旧未知。

纤维化的一个重要特征是成纤维细胞转化为活化的肌成纤维细胞，肌成纤维细胞表达 α -SMA，可以大量分泌细胞外基质^[20]。在增生的黄韧带中，弹性纤维被过量的胶原组织所取代^[2-4]。所以如果肥厚黄韧带是损伤性瘢痕修复，那么肥厚的黄韧带中应该存在大量活化的肌成纤维细胞。本章研究结果显示， α -SMA

阳性细胞数确实明显增多, 并且肥厚黄韧带中 I 型和 III 型胶原纤维大量增生。说明我们成功收集到了正常和肥厚的黄韧带组织。

ERK1/2 信号通路对各种刺激诱导成纤维细胞发生纤维性变的过程中起很重要的作用^[26, 27]。有研究证实, 在器官或组织纤维化时, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/MAPK 激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号级联调节了细胞纤维化的过程^[28, 29]。我们的研究显示, 肥厚黄韧带中 p-ERK1/2 明显增多, 因此有必要在后续研究中探讨 ERK1/2 信号通路是否参与了黄韧带肥厚的过程。

在本研究中, 我们通过 iTRAQ 技术对肥厚黄韧带和正常黄韧带组织的蛋白表达差异进行筛选, 然后分析 GEO 数据库中已有的转录组数据, 最后将两组数据进行整合, 发现了 9 种蛋白在两组数据中共同升高, 其中 CRLF1 是表达差异最大的蛋白。使用这种方法缩小了差异蛋白的范围, 提高了数据的可靠性。为了进一步提高数据的可靠性, 我们对候选蛋白通过 RT-qPCR 和免疫组化方法进行验证, 结果进一步证实了 CRLF1 在肥厚的黄韧带中高表达。另外我们发现, 虽然 CLCF1 在肥厚的黄韧带中上调明显, 但是 CLCF1 表达未见升高, 因此 CRLF1 可能是黄韧带细胞信号系统中的独立调节因子。这与以前人们认为 CRLF1 与 CLCF1 形成复合体结构才分泌进而发挥生物学作用的观点不一样^[30, 31]。目前, 只有 Brendan 等在神经细胞瘤细胞中研究发现 CRLF1 自身具有增强神经细胞瘤细胞抵抗 6-羟多巴胺(6-OHDA)诱导的氧化应激作用^[32]。他们推测, CRLF1 的生物学作用可能不仅仅是成为配体, 这与本研究的发现一致。

目前关于 CRLF1 蛋白研究相对较少, 黄韧带中 CRLF1 的细胞来源依旧未知。本研究发现, CRLF1 的表达与成纤维细胞转分化为活化的肌成纤维细胞成正相关。免疫荧光共染的方法证明了 CRLF1 来源于黄韧带肌成纤维细胞。所以我们认为, 内源性的 CRLF1 可能参与了黄韧带的肥厚过程。

综上所述, 我们成功收集到了患者正常和肥厚的黄韧带, 通过多组学分析和组织学染色证实了肥厚黄韧带中 CRLF1 明显上调、ERK1/2 信号通路活性增加、并明确了 CRLF1 的细胞来源。在接下来的研究中, 我们将深入探讨 CRLF1

对黄韧带细胞可能的生物作用及潜在机制，揭示其他促纤维化因子与 CRLF1 在黄韧带肥厚形成过程中的调控关系及其机制。探索 CRLF1 是否有望成为的一个新的治疗黄韧带肥厚的靶点。

参考文献

- [1] Safak A A, Is M, Sevinc O, et al. The thickness of the ligamentum flavum in relation to age and gender [J]. *Clinical anatomy*, 2010, 23(1): 79-83.
- [2] Sairyo K, Biyani A, Goel V, et al. Pathomechanism of Ligamentum Flavum Hypertrophy A Multidisciplinary Investigation Based on Clinical, Biomechanical, Histologic, and Biologic Assessments [J]. *Spine*, 2005, 30(23): 2649-56.
- [3] Kosaka H, Sairyo K, Biyani A, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis [J]. *Spine*, 2007, 32(25): 2805-11.
- [4] Sairyo K, Biyani A, Goel V K, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue [J]. *Spine*, 2007, 32(11): E340-7.
- [5] Okuda T, Baba I, Fujimoto Y, et al. The pathology of ligamentum flavum in degenerative lumbar disease [J]. *Spine*, 2004, 29(15): 1689-97.
- [6] Schrader P K, Grob D, Rahn B A, et al. Histology of the ligamentum flavum in patients with degenerative lumbar spinal stenosis [J]. *European spine journal*, 1999, 8(4): 323-8.
- [7] Yoshida M, Shima K, Taniguchi Y, et al. Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. Pathogenesis and morphologic and immunohistochemical observation [J]. *Spine*, 1992, 17(11): 1353-60.

- [8] Kim B J, Hur J W, Park J S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human ligamentum flavum cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta [J]. *Journal of neurosurgery Spine*, 2016, 24(3): 428-35.
- [9] Nakamura T, Okada T, Endo M, et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes inflammatory conditions in the ligamentum flavum in the pathogenesis of lumbar spinal canal stenosis by activating interleukin-6 expression [J]. *European spine journal*, 2015, 24(9): 2001-9.
- [10] Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1 [J]. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2002, 20(6): 1380-6.
- [11] Sairyo K, Biyani A, Goel V, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments [J]. *Spine*, 2005, 30(23): 2649-56.
- [12] Park J B, Chang H, Lee J K. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation [J]. *Spine*, 2001, 26(21): E492-5.
- [13] Junseok W Hu, Bum J K, Jin Hyun P, et al. The Mechanism of Ligamentum Flavum Hypertrophy Introducing Angiogenesis as a Critical Link That Couples Mechanical Stress and Hypertrophy [J]. *Neurosurgery* 2015, 77(2): 274-82.
- [14] Zhong Z M, Zha D S, Xiao W D, et al. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spine stenosis associated with the increased expression of connective tissue growth factor [J]. *Journal of orthopaedic research*, 2011, 29(10): 1592-7.
- [15] Zhang Y, Chen J, Zhong Z M, et al. Is platelet-derived growth factor-BB expression proportional to fibrosis in the hypertrophied lumbar ligamentum flavum? [J]. *Spine*, 2010, 35(25): E1479-86.

- [16] Elson G C, Graber P, Losberger C, et al. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family [J]. *Journal of immunology*, 1998, 161(3): 1371-9.
- [17] Tsuritani K, Takeda J, Sakagami J, et al. Cytokine receptor-like factor 1 is highly expressed in damaged human knee osteoarthritic cartilage and involved in osteoarthritis downstream of TGF-beta [J]. *Calcified tissue international*, 2010, 86(1): 47-57.
- [18] Tomasek J J, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2002, 3(5): 349-63.
- [19] Sappino A P, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations [J]. *Laboratory investigation*, 1990, 63(2): 144-61.
- [20] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210.
- [21] Alexis D, Antoine G, Franoise G, et al. Transforming Growth Factor- β 1 Induces α -Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts [J]. *Journal of Cell Biology*, 1993, 122(1): 103-11.
- [22] Shemesh S, Sidon E, Kaisler E, et al. Diabetes mellitus is associated with increased elastin fiber loss in ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis: results of a pilot histological study [J]. *European spine journal*, 2018, 27(7): 1614-22.
- [23] Anekstein Y, Smorgick Y, Lotan R, et al. Diabetes mellitus as a risk factor for the development of lumbar spinal stenosis [J]. *The Israel Medical Association journal*, 2010, 12(1): 16-20.

- [24] Altinkaya N, Yildirim T, Demir S, et al. Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? [J]. *Spine*, 2011, 36(16): E1093-7.
- [25] Kolte V S, Khambatta S, AMBIYE M V. Thickness of the ligamentum flavum: correlation with age and its asymmetry-an magnetic resonance imaging study [J]. *Asian spine journal*, 2015, 9(2): 245-53.
- [26] Davis J, Molkentin J D. Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide [J]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014, 70(9): 9-18.
- [27] Madala S, Schmidt S, Davidson C, et al. MEK-ERK Pathway Modulation Ameliorates Pulmonary Fibrosis Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Activation [J]. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2012, 46(3): 380-8.
- [28] McCubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1773(8): 1263-84.
- [29] Xu S w, Howat S L, Renzoni E A, et al. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23098-103.
- [30] Rousseau F, Gauchat J F, McLeod J G, et al. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(26): 10068-73.
- [31] Herholz J, Meloni A, Marongiu M, et al. Differential secretion of the mutated protein is a major component affecting phenotypic severity in CRLF1-associated disorders [J]. *European journal of human genetics*, 2011, 19(5): 525-33.

- [32] Looyenga B D, Resau J, MacKeigan J P. Cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) protects against 6-hydroxydopamine toxicity independent of the gp130/JAK signaling pathway [J]. PloS one, 2013, 8(6): e66548.

第二章 CRLF1 调控黄韧带肥厚的机制研究

引言

纤维化是黄韧带肥厚的主要病理特点。黄韧带肥厚时，弹力纤维被降解，含量逐渐减少，细胞外基质合成增加并逐渐积累，弹力纤维逐渐被胶原纤维取代，有时在肥厚的黄韧带中还可发现软骨的形成^[1-3]。

在第一章的研究中我们发现肥厚黄韧带中 CRLF1 表达明显上调。CRLF1 作为一种分泌型可溶性蛋白，属于 I 型细胞因子受体家族。CRLF1 基因突变除了会产生冷汗综合征^[4]和 Crisponi 综合征^[5]外还会引发面部肌肉萎缩、脊柱侧凸与颅面畸形^[6]。早期研究认为 CRLF1 与其配体 CLCF1 结合后才能分泌出细胞发挥生物学作用，但是已经有研究证实 CRLF1 本身具有独立的生物学作用^[7]。

机械应力、炎症因子和生长因子是黄韧带肥厚重要的始动因素。Nakatani 等人发现，机械应力刺激人黄韧带细胞可以引起胶原纤维分泌的增加^[8]。Fleissig 发现机械应力可以在牙周膜纤维细胞中上调 CRLF-1 的表达^[9]。TGF- β 1 是主要的促纤维化因子。Katsuki 等发现，TGF- β 1 可以促进软骨细胞分泌 CRLF1^[10]。慢性炎症刺激在黄韧带肥厚的发生过程中起重要作用，TNF- α 、IL-1 β 、IL6 等炎症因子可能促进了黄韧带肥厚的发生^[3, 11-13]。Elson 发现 TNF- α 、IL-6 和 γ -干扰素等均可以在纤维细胞中可诱导 CRLF1 的表达^[14]。并且，Clancy^[15]认为 CRLF1 可能在软骨形成的过程中发挥重要作用。所有这些研究结果都提示 CRLF1 在细胞外基质合成中的重要作用。考虑到炎症因子、生长因子和机械应力在组织纤维性修复中的重要作用，我们推测 CRLF1 可能在黄韧带肥厚中扮演了重要角色。

ERK1/2 信号通路广泛参与了细胞的增值、分化等生物过程，在成纤维细胞发生纤维性变的过程中起很重要的作用^[16, 17]。有研究证实，在多种器官和组织的纤维化过程中，ERK1/2 信号信号通路都调节了细胞外基质的分泌^[18-20]。但是目前为止，关于 CRLF1 与 ERK1/2 信号通路的研究仅仅局限于肿瘤系统研究中。另外，TGF- β 1 参与了多种组织的纤维性修复过程，在促进成纤维细胞分泌胶原

纤维时可通过多种信号通路,其中既包括 Smad2/3 通路又包括 ERK1/2 信号通路^[16]。因此有必要在黄韧带细胞纤维性变过程中研究 TGF- β 1、CRLF1 和 Smad、ERK1/2 信号通路之间的关系。

结合前人的研究成果和前一章的研究发现,我们推测 CRLF1 可能是一种新的促纤维化因子,通过调控细胞外基质的分泌促进了黄韧带肥厚。本章内容拟首先提取人正常黄韧带细胞,使用 TGF- β 1 建立纤维性变的细胞模型,使用哺乳动物来源的成熟人重组 CRLF1 蛋白研究其生物作用,利用 RNA 干扰技术抑制 CRLF1 表达,研究其对黄韧带细胞纤维性变的影响。同时使用 Smad3 和 ERK1/2 通路抑制剂研究 CRLF1 上下游调控机制。

1 实验材料

1.1 实验仪器

无菌工作台	Thermo Fisher Scientific	美国
细胞培养箱	Thermo Fisher Scientific	美国
FX-5000 细胞拉伸仪	Flexcell 公司	美国
BioFlex IV 细胞牵拉板	Flexcell 公司	美国
低温离心机	Sigma	德国
普通离心机	湘仪公司	湖南
普通电子秤	sartorius	德国
荧光定量 PCR 仪	BIO-RAD 公司	美国
倒置荧光显微镜	Zeiss	德国
普通光学显微镜	OLYMPUS	日本
显微镜照相设备	Olympus 公司	日本
台式摇床	其林贝尔	中国
台式多连管离心机	ExtraGene 公司	美国
碎冰生成装置	Grant 公司	美国

垂直电泳仪	Bio-Rad power-pac 200	美国
普通冰箱	新飞公司	中国
-80℃低温冰箱	Revco 公司	美国
台式磁力搅拌器	杭州仪表公司	中国
4.5μm 过滤器	Gelman	美国
超纯水净化系统装置	Millipore	美国
水浴锅	一恒仪器有限公司	中国
高压水蒸汽灭菌装置	Hirayama	日本
Ph 测定仪	奥豪斯	中国

1.2 实验试剂

MTT 检测盒	Solarbio 公司	中国
蛋白分子量标记 Marker	Solarbio 公司	中国
成熟重组 rhCRLF1 蛋白	Immuno Clone 公司	美国
重组 rhTGF-β1	Sino Biological 公司	中国
Triton X-100	Solarbio 公司	中国
DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒	碧云天	中国
抗兔 Cy3-荧光二抗	ABclonal 公司	中国
抗鼠 FITC-荧光二抗	ABclonal 公司	中国
vimentin 一抗	Santa cruz 公司	美国
Collagen I A1 一抗	Affinity 公司	美国
Collagen III A1 一抗	Gene Tex 公司	美国
MMP2 一抗	Affinity 公司	英国
α-SMA 一抗	ABclonal 公司	中国
ERK1/2 一抗	R & D 公司	美国
p-ERK1/2 一抗	R & D 公司	美国
DAPI	Thermo Fisher 公司	美国

第二章 CRLF1 调控黄韧带肥厚的机制研究

U0126	MEC 公司	美国
SIS3	MedChem Express 公司	美国
GAPDH 一抗	北京锐抗公司	中国
辣根过氧化物酶标记抗鼠二抗	北京锐抗公司	中国
辣根过氧化物酶标记抗兔二抗	北京锐抗公司	中国
超敏 ECL 显影液	Affinity 公司	美国
Tris-HCL	Solarbio 公司	中国
Tween-20	Sigma-Aldrich	美国
脱脂奶粉	蒙牛公司	中国
甲醇	广州化学试剂厂	中国
pmsf	Solarbio 公司	中国
Trizol	Sigma-Aldrich	美国
pmsf	碧云天公司	中国
细胞裂解液	碧云天公司	中国
siCRLF1 设计与合成	上海生物工程公司	中国
RFect transfection reagent	常州百代公司	中国
Glycine 粉剂	广州化学试剂厂	中国
DMSO	Solarbio 公司	中国
NaCl 粉剂	广州化学试剂厂	中国
无水酒精	广州化学试剂厂	中国
Tris 碱	Bio-Rad 公司	美国
acrylic amide	Bio-Rad 公司	美国
胶原酶 I 型	Gibco 公司	美国
细胞培养用青霉素-链霉素	碧云天公司	中国
四甲基二乙胺 (TEMED)	Sigma 公司	美国
过硫酸铵 (AP)	Sigma 公司	美国

十二烷基磺酸钠 (SDS)	Sigma 公司	美国
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	Solarbio 公司	中国
胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)	Solarbio 公司	中国
硝酸纤维素膜 NC 膜	Solarbio 公司	中国
Tween-20	seebio 公司	中国
胎牛血清	Gibco 公司	美国
细胞培养板	Corning 公司	美国
EP 管	碧云天公司	中国
DMEM 培养基 含糖 4.5%	GIBCO 公司	美国

1.3 试剂配制

Western blot 实验缓冲液的制备:

10×TBS: 使用量杯量取 800ml 去离子水, 使用电子天平和干净的称量纸称取 80g NaCl 和 24.2g Tris 粉末加入去离子水中, 放入磁力搅拌棒, 塑料膜覆盖量杯口, 置于磁力搅拌器上搅拌过夜使之彻底溶解, 待完全溶解后, 定容至 1000ml 室温保存备用。

1×TBST 缓冲液: 将 100ml 10×TBS 加入 900ml 离子水混匀, 滴加 1ml 0.1% Tween-20, 放入磁力搅拌棒, 塑料膜覆盖量杯口, 置于磁力搅拌器上搅拌, 充分混匀后立即使用。

封闭液: 电子天平称取 5 g 脱脂奶粉, 100ml 1×TBST 中, 振荡器振荡。注意一定要充分溶解, 如果奶粉溶解不充分, 曝光时会产生污染光点。

抗体稀释液: 电子天平称取 2.5g 牛血清白蛋白组分五 (BSA) 粉末加入到 50ml TBST 溶液中并振荡, 使之充分溶解, 配成含 5% 胎牛血清白蛋白的溶液。稀释二抗时用电子天平称取 5g 脱脂奶粉加入到 100ml 1×TBST 溶液中, 充分溶解后放于 4℃ 冰箱, 一周内使用。

30% 丙烯酰胺的制备方法: 称取 58g 丙烯酰胺和 2g 甲叉丙烯酰胺, 与 160ml 去离子水混匀。去离子水定容至 200ml, 分装后锡纸包裹避光, 置于 4℃ 冰箱内

备用。

5×loading buffer: 量取 1M Tris-HCl 2.5ml, SDS 1g, 溴酚蓝 50mg, 甘油 5ml, 用超纯水混匀并定容至 5ml。振荡器振荡充分溶解后分装, 每管 1ml, 置于 -20℃ 冰箱冻存。

10×Tris-甘氨酸电泳缓冲液: 电子天平称取 Tris 60.6g, 甘氨酸 376g, SDS 20g。加入到装有 1600ml 去离子水中的量杯中, 放入磁力搅拌棒, 塑料膜覆盖量杯口, 置于磁力搅拌器上搅拌过夜, 待完全溶解后, 离子水定容至 2000ml。

10×电泳转移液: 用电子天平称和干净称量纸称取 60.6g Tris, 288g 甘氨酸, 加入 1400ml 去离子水中, 放入磁力搅拌棒, 塑料膜覆盖量杯口, 搅拌过夜。加去离子水, 使总体积为 2000 ml。

2 实验方法

2.1 人正常黄韧带细胞的提取

本研究经中国广东省广州市南方医科大学第三附属医院伦理道德审查委员会批准。所有纳入对象均签署知情同意书。研究者向患者详细介绍研究目的和研究方法。告知患者需要获得其术前 MRI 影响资料, 术中需要获得其切除的病理标本, 但不影响其手术过程治疗效果。将患有腰椎间盘突出症并接受椎管减压者定义为黄韧带正常组。将患有椎管狭窄, 黄韧带肥厚的患者定义为黄韧带肥厚组。排除患有内分泌系统疾病的患者。术前在患者腰椎磁共振图像上测量腰 4/5 节段小关节处黄韧带厚度, 确定黄韧带正常组厚度小于 3 mm, 肥厚组黄韧带厚度大于 4 mm。术中无菌条件下仔细剔除黄韧带上面的脂肪和骨组织, 无菌生理盐水反复冲洗组织上的血迹, 将黄韧带组织立即放入装有 40ml 无菌生理盐的离心管中, 外部包上无菌巾后放入碎冰冰面上, 10min 内送入实验室。

使用消毒好的器械取出黄韧带, 用 1%青霉素-链霉素的生理盐水清洗黄韧带 3 次。确保其表面没有杂质。在培养皿中用手术刀及眼科剪将黄韧带组织切成直径约 0.5 mm 的碎块, 将切好的碎块放入 10 ml 离心管并加入 0.2% I 型胶原酶,

放入细胞培养箱内，37℃下用消化 1h。消化时间结束后用移液枪吸除消化液，加入含有 1%青霉素-链霉素的 DMEM 吹打洗涤，然后放入离心机离心 5 分钟，转速为 1000 转/分钟。洗涤两次以后将黄韧带组织碎块均匀的放入培养皿中，使用含有 10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素-链霉素的高糖培养基孵育，孵育条件是 37℃、5% CO₂。

在孵育期间，一定保持培养皿处于静止状态，7 天时可换液一次，换液时轻拿轻放，避免组织块移动，10 天后，黄韧带细胞从组织中迁移出来。根据黄韧带细胞生长的量决定换液频率，较少时 5 天换一次液，较多时 3 天换液。待细胞长满培养皿约 50%左右的面积时，将黄韧带组织块去除，进行传代。传代时基础培养基清洗 1 次，37℃，0.25% 胰蛋白酶消化液消化 1 分钟，见部分细胞脱落时，吹打细胞并吸入 10ml 离心管离心，1000 转/分钟。然后将细胞按 1:3 的比例进行传代。所有实验均在细胞传代小于 5 代时进行。所有细胞在处理前饥饿培养 16 小时。

2.2 鉴定黄韧带细胞

黄韧带细胞主要表达波形蛋白和少量的 I 型胶原蛋白，根据以前的文献，我们选用这两种标志物对细胞进行免疫荧光鉴定。

A. 取第三代黄韧带细胞，消化后接种于底部放有细胞爬片的六孔板中。细胞贴壁后用中性甲醛溶液固定细胞 10 min，倒掉中性甲醛，PBS 清洗细胞 3 次，每次 5 分钟。0.5%Triton 对细胞进行通透化处理 10 min，PBS 漂洗 3 次，每次 5 分钟。然后用含有 1% BSA 的 PBS 溶液封闭 30min。

B.细胞爬片分别使用 Vimentin 一抗孵育液和 Collagen1A1 一抗孵育液孵育，置于 4℃冰箱内过夜。

C. 吸出一抗后，PBS 3 次。然后在暗室内加入稀释好的 FITC 和 Cy3 荧光标记的二抗，湿盒密闭孵育 1 小时。暗室内 PBS 洗 3 次，加入 DAPI 染核 5 分钟，去除多余的 DAPI。

D. 荧光显微镜下观察，波形蛋白为绿色，I 型胶原纤维为红色荧光。

2.3 细胞增殖活性检测

本研究使用 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2- h -四唑溴化铵(MTT)检测 CRLF1 对黄韧带细胞增殖的影响。将黄韧带细胞接种于 96 孔板, 5000 个细胞/孔。细胞培养箱内孵育 6 小时。加入浓度梯度的 CRLF1, 设置对照组 (Con)、20ng/ml CRLF1 组、200ng/ml CRLF1 组、500ng/ml CRLF1 组, 每组 6 个复孔, 处理 48 小时, 进行 3 次试验。PBS 洗 3 次。每孔加入 20 μ l 5mg/ml MTT, 在细胞培养箱内孵育 4 小时。吸去 MTT 孵育液, 加入 150 μ l 二甲亚砜(DMSO)。在震荡仪上振荡 10 min, 用酶标仪在 570 nm 吸收波长下测吸光度, 以判断细胞增殖情况。

2.4 细胞迁移能力分析

CRLF1 对黄韧带细胞迁移能力的影响使用划痕实验检测。CRLF1 处理黄韧带细胞 48h, 用 TGF- β 1 作为阳性对照。具体方法如下: 将黄韧带细胞接种于 6 孔板内, 密度 1×10^5 个/孔, 3 个复孔。待细胞长满至 90% 面积后, 换用含有 0.2% 胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿 16 小时。用剪去微量枪头前端的枪头划直线。无血清培养基洗掉划落的细胞, 换新的 0.2% 胎牛血清培养基, 分组如下: 对照组、500 ng/ml CRLF1 组, 及 5 ng/ml TGF- β 1 组, 细胞培养箱中培养 48h, 用显微镜分别记录开始和结束时的细胞迁移情况。用 ImageJ 软件分析创面闭合度, 用创面变化百分比量化划痕愈合率。

2.5 细胞免疫荧光检测 CRLF1 对黄韧带细胞向肌成纤维细胞转分化的影响

A. 黄韧带细胞消化后接种于底部放有细胞爬片的六孔板中。待细胞长满至 80% 面积后, 换用 0.2% 胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿 16 小时。分组如下: 对照组, 浓度 CRLF1 组 (浓度为 500 ng/ml), 5 ng/ml TGF- β 1 组。各组处理 24 h 后弃去培养基, PBS 清洗细胞 2 次。

B. 中性甲醛溶液固定细胞 10 min, 倒掉中性甲醛, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 分钟。0.5% Triton 对细胞进行通透化处理 10 min, PBS 再次漂洗 3 次。1% BSA

封闭 30min。

C. α -SMA 一抗孵育细胞爬片，置于湿盒中，4℃冰箱内过夜。

D. 次日 PBS 轻轻洗去一抗孵育液。然后在暗室内加入 Cy3 荧光标记的二抗，湿盒内避光孵育 1 小时。PBS 洗 3 次，DAPI 染核 10 分钟，荧光显微镜下观察蛋白表达情况， α -SMA 为红色荧光。

2.6 CRLF1 对黄韧带细胞纤维化相关蛋白及 mRNA 合成的影响

2.6.1 Western blot 检测黄韧带细胞中纤维化相关蛋白表达

(1) **总蛋白提取：**将黄韧带细胞种于 6 孔板， 1×10^5 个/孔。待细胞长满至 80% 面积后，0.2% 胎牛血清的 DMEM 培养基处理，饥饿 16 小时。对细胞分组处理，时间结束后弃去培养基，PBS 清洗细胞 2 次，然后将细胞培养皿置于碎冰面上，使用 200 μ l RIPA 裂解液裂解 5min，塑料刮刀刮取细胞，务必刮取干净，然后吸至 1.5ml EP 管中，4℃下 12000 rpm 离心 10min，将上清吸至另一个 EP 管中，取 20 μ l 用于 BCA 蛋白测定。其余按 1/9 体积加入 β -巯基乙醇，100 °C 金属浴 10 min 使蛋白质变性，-80℃保存。

(2) **BCA法测定蛋白质浓度：**将蛋白标准品用PBS稀释成500 μ g/ml。根据试剂盒说明，将A液和B液按照体积比为50:1配制成工作液，振荡充分混匀。用PBS将黄韧带样本裂解液稀释10倍，EP管分装，每管10 μ l，用移液枪向各个EP管中加入200 μ l工作液并混匀。然后将混合液逐孔加到96孔板中。室温下振荡器振荡30min。酶标仪在570nm处测定吸光度，根据标准曲线计算样品的蛋白浓度。

(3) Western Blot 实验步骤：

首先取出跑胶专用的玻璃板，使用自来水反复冲洗，擦拭干净后放入 65℃ 烤箱内烘干。把将干燥且干净的玻璃板对齐后置于制胶夹板中卡紧，再次观察两块玻璃板底部是否对齐，将制胶夹板牢固的固定在制胶架上，注意玻璃板与底部与胶垫连接处不能有空隙。

Western Blot 电泳凝胶的配制：

按成分表上面的比例进行下胶的配制，根据蛋白分子量的大小，我们配制

的下胶为10%的分离胶，小心加入配胶用的各组分溶液，可以使用移液枪适当吹打，吹打时避免产生气泡。TEMED溶液最后加入，吹打混匀后立即加入灌胶，因为这时胶会较快凝固，时间过长会影响灌胶效果和蛋白电泳效果。灌胶时用枪头津贴玻璃板，均匀的将胶加入玻璃板内。当胶的液面距离短的玻璃板上缘1.5 cm时停止加胶。使用去离子水压胶面。静置30min后观察可见去离子水与分离胶交界处有一条折射线时，说明胶已凝固，将分离胶上层的去离子水倒掉，把滤纸剪成长条形，将滤纸放入玻璃板的缝隙中，将残余液体吸干净。

再次查阅配胶表，我们使用的浓缩胶的浓度为4%。同样加入TEMED之后加胶，将浓缩胶填满两玻璃板之间的空间，将Western Blot样品模板梳从一侧开始插入浓缩胶中，插入时使胶面逐渐与模板梳接触，且动作要缓慢，最后使梳子保持在水平位置，这样插入过程中会减少产生气泡的机会，保证最佳的电泳结果。另外，由于胶在凝固过程中体积会有少量的减小，要注意补胶。30min后浓缩胶就可以凝固，要轻柔的将样品梳垂直向上拔出。

安装电泳槽。将配置好的胶板从配胶架子上拆下，固定到U型电泳槽的两侧凹面内，使小玻璃板的上缘紧贴电泳槽的胶条，避免出现缝隙。然后向其中加入配置好的电泳液，仔细观察是否有液体漏出，如有漏出则需从新安装胶板。

蛋白样品上样。将提取的黄韧带蛋白样品放在金属浴中，温度调整为 100℃，煮10 min以使蛋白样品发生变性。放置5min使其降温，此时可见管壁上有少量凝结的水珠，用离心机离心，2000 rpm，然后用移液枪轻轻吹打样品，将电泳槽安装到电泳仪内，然后用10 ul的移液枪头将蛋白样品按顺序加入到上样孔中，在最左侧上样孔内加入蛋白质分子量指示剂Marker，在样品两边的上样孔内也加入Marker。加样动作要轻柔以避免气泡产生或样品流入别的上样孔内。

电泳。将电泳仪内的电泳液补充到指定位置，检查正负极是否正确连接，本研究中用恒流电泳法，16 mA 的电流强度适用于只有一块电泳凝胶电泳时，如果有两块电泳凝胶电泳时侧泳 32mA 的电流强度，依次类推，电泳过程密切观察电压大小，电压通常不要超过 100V。由于分子量不同，电泳时蛋白移动速

率不同,所以电泳时间也要相应调整,观察 Marker 在凝胶中迁移的位置,适时关闭电源停止电泳,我们的实验中电泳时间通常在 1 h-2 h 之间。为了保证电泳具有最佳效果,电泳液不回收,每次电泳都从新配制 1×的电泳液。

转膜。由于转膜过程产热较多,因此,我们在转膜之前就将转膜液放入-20℃冰箱进行冷冻。电泳完成以后,将冰冻好的转膜液少量倒入转膜盘中,在其中放置好滤纸。然后拆下电泳槽取出玻璃板,塑料尺撬开玻璃板,根据蛋白的分子量在胶上的位置决定切胶的面积。在切胶时,切除胶的一角进行标记,防止颠倒样本的顺序。根据胶的面积,裁剪出于硝酸纤维素膜(NC膜),注意手套等不能碰触 NC膜,在转膜液里将 NC展平后,将凝胶铺在 NC膜上,然后将凝胶和 NC膜包在两层滤纸之间。剪刀减去多余的部分,使膜的四周变得整齐,确保两层滤纸不能相互碰触,使用压平板进行压平,挤出内部气体。然后将其夹入黑色和白色两个海绵垫之中,确保黑色海绵对着凝胶,白色海绵对着 NC膜,用转移液浸透海绵垫,再次用压平板压平,确保没有气泡产生。将海绵垫安装到转移夹中夹紧,确保夹子的黑面对着黑色的海绵。将夹子安装到转膜槽里,倒入适量的 1×冰冻转膜液,并在转膜槽内放入两个冰袋,转膜槽周围加满碎冰块,加快热量散发。转膜电压设定为 100 V,密切观察转膜时电流大小。根据转膜蛋白分子量的不同,调整转膜时间,本实验采用的方法是分子量在 10-60 kDa 的蛋白转膜 1 h,分子量在 60-100kDa 的转膜时间为 1.5h,分子量超过 100 kDa 的转膜时间为 2 h。

封闭。设置的转膜时间结束后,小心取出 NC膜,避免破碎,直接放进盛有 5%脱脂奶粉的湿盒中进行封闭,室温下慢摇床上以适当的速度封闭 1 h。

剪膜。待封闭时间结束后,使用 TBST 在慢摇床上洗膜 2 次,每次 3 min。根据 Marker 所标记的蛋白分子量,剪切出检测的条带。剪膜时要注意标记好样本的顺序,避免颠倒。剪膜过程中还要及时用 TBST 溶液湿润 NC膜,避免长时间暴露的空气中,影响检测效果。

孵育抗体。将配制好的一抗孵育液 3ml 倒入湿盒中并做好标记,将剪切好

的条带标记加入孵育盒中，于 4℃ 冰箱里，将孵育盒放在慢摇床上摇晃过夜。第二天，回收孵育盒内的抗体稀释液到标记好的 15ml 离心管内，此时也应注意不应让 NC 条带长时间暴露于空气中，避免相应的蛋白被氧化，影响检测效果。立即用 TBST 溶液清洗 NC 膜 3 次，每次 5min，同样在慢摇床上进行。孵育二抗时，用 5% 的脱脂奶粉按照 1:3000 的稀释比例稀释好二抗后，加入到相应的孵育孔中，适当摇晃孵育盒，使液面完全覆盖住 NC 膜，室温下进行孵育将孵育盒放在慢摇床上孵育 1 h。

使用 ECL 曝光液曝光。孵育时间结束后，倒掉孵育盒中的二抗稀释液，立即应用 TBST 清洗 NC 膜 3 次，每次 5min，同样在慢摇床上进行。在暗室内将 ECL 显影液 A 液 1ml 和 B 液 1ml 混合并摇晃均匀。打开曝光机，滤纸擦拭曝光板，确保曝光板上清洁，然后将 NC 膜放入曝光板上，立即用配置好的显影液滴加到 NC 膜上，前后左右晃动使曝光液充分覆盖在 NC 膜上，然后将 NC 膜放入化学发光曝光机。使用预先设置好的曝光时间，时间为 5 s, 10 s, 20 s, 1 min, 2 min, 4 min。根据条带显影效果确定曝光时间，待曝光完成后，保存结果并记录分析。

2.6.2 RT-qPCR 检测黄韧带细胞中纤维化相关 mRNA 表达

将黄韧带细胞种于 6 孔板。1×10⁵ 个/孔。待细胞长满至 80% 面积后，饥饿培养 16 小时。分组处理细胞，各组处理 24 h 后弃去培养基，PBS 清洗细胞 2 次。每个孔中加入 1ml Trizol，完全覆盖细胞，轻柔吹打 1 分钟后装入无酶的 EP 管内。后续步骤同第一章。

用于 RT-qPCR 的引物序列：

Gene Name		
COL1A1	Forward	5'-GAGGGCCAAGACGAAGACATC-3'
	Reverse	5'-CAGATCACGTCATCGCACAAC-3'
COL3A1	Forward	5'-GCCAAATATGTGTCTGTGACTCA-3'
	Reverse	5'-GGGCGAGTAGGAGCAGTTG-3'
MMP2	Forward	5'-ATTGTATTTGATGGCATCGCTC-3'
	Reverse	5'-ATTCATTCCCTGCAAAGAACAC-3'
a-SMA	Forward	5'-CCAGAGCCATTGTCACACAC-3'

	Reverse	5'-CAGCCAAGCACTGTCAGG-3'
GAPDH	Forward	5'-TGTTTCGTCATGGGTGTGAAC-3'
	Reverse	5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'

2.7 siCRLF1 转染步骤

目前，在全世界范围内，原代细胞的核酸转染都是个难点，本实验选用了 RFectPM 原代细胞小核酸转染试剂，这种新型试剂特别适合于原代成纤维细胞的转染。在转染 siRNA 时，该试剂不需要细胞饥饿，血清的存在不影响转染效果。

具体步骤：

A. 细胞接种：将第 4 代黄韧带细胞消化后接种于 6 孔培养板，每孔 1ml 培养基（不加抗生素），使细胞在转染时密度在 60%，饥饿 16 小时。

B. siRNA-RFectPM 混合物准备：25 pmol siRNA 和 8 μ l RFectPM 分别用 200 μ l 无血清的 DMEM 培养基稀释；室温孵育 5min；孵育 5min 后，将两种稀释液混合。混匀后继续孵育 20 min。

C. 转染：上一步配好的转染液 400 μ l 加入到含有 1ml 培养液的 6 孔细胞培养板内。轻轻晃动培养板，使转染液能够均匀分布。

D. 细胞培养箱内 37 $^{\circ}$ C 培养 48h，检测基因抑制效果。如果需要，细胞培养 4-6h 时可以更换培养基，但不是必须。

E. 48 小时后转染好的细胞用含 0.2% 的胎牛血清饥饿 16 小时，用于后续实验。

用于转染的人靶向 CRLF1 siRNA 序列

CRLF1-targeting siRNA sequences of human

Human		
RNAi 1#	Sense	5'-GGAUGCAGAAGUCGCACAATT-3'
	Antisense	5'-UUGUGCGACUUCUGCAUCCTT-3'
RNAi 2#	Sense	5'-GCCAAAUACCAGAUCCGCUTT-3'

第二章 CRLF1 调控黄韧带肥厚的机制研究

	Antisense	5'-AGCGGAUCUGGUAUUUGGCTT-3'
RNAi 3 #	Sense	5'-GGCUCUCUUUACGCCCUAUTT-3'
	Antisense	5'-AUAGGGCGUAAAGAGAGCCTT-3'

2.8 TGF- β 1 经 SMAD3 途径调控 CRLF1 表达的相关研究

A. 首先使用 TGF- β 1 处理黄韧带细胞, 观察 TGF- β 1 是否能促进 CRLF1 分泌。

具体方法: 将黄韧带细胞种于 6 孔板, 1×10^5 个/孔。待细胞长满至 80% 面积后, 0.2% 胎牛血清的 DMEM 培养基处理, 饥饿 16 小时。分组如下: 对照组 (Con), 5 ng/ml TGF- β 1 处理组。各组处理 24 h 后弃去培养基, PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白及 mRNA。Western Blot 检测 CRLF1 蛋白的表达, RT-qPCR 检测 CRLF1 和 CLCF1 mRNA 表达情况。

B. 观察 TGF- β 1 是否促进了 p-SMAD3 的核转位。

具体方法: 人黄韧带细胞按前述方法接种于底部附有细胞爬片的 6 孔板里, 培养和饥饿方式同上所述。分组如下: 对照组 (Con), TGF- β 1 处理组 (浓度为 5 ng/ml), TGF- β 1 (5 ng/ml) + SIS3 (10 μ M) 处理组。其中 SIS3 提前 15 min 加入。各组处理 1 h 后弃去培养基。中性甲醛溶液固定、封闭、孵育抗体、DAPI 染核步骤同 2.5。荧光显微镜下观察 p-SMAD3 表达位置及强度情况, p-SMAD3 为红色荧光。

C. 使用 SMAD3 特异性抑制剂 SIS3 处理黄韧带细胞, 探讨抑制 SMAD3 是否可以在转录水平调节 CRLF1 的产生。

具体方法: 人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里, 培养和饥饿方式同前所述。分组如下: 对照组 (Con), TGF- β 1 处理组 (浓度为 5 ng/ml), TGF- β 1 (5 ng/ml) + SIS3 (10 μ M) 处理组。各组处理 24 h 后弃去培养基, PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞 mRNA。RT-qPCR 检测 CRLF1 mRNA 表达情况。

2.9 CRLF1-ERK1/2 通路对 TGF- β 1 促纤维化效应研究

A. 首先检测 siCRLF1 干扰效果。

具体方法: 人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里, 培养方式同前所述。分组如下: 对照组, siNC 组, siCRLF1 1# 组, siCRLF1 2#组, siCRLF1 3# 组。转染 48 小时后饥饿 16 小时。各组使用 TGF- β 1(5 ng/ml)处理, 24 h 后弃去培养基, PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白, 检测 CRLF1 蛋白表达情况, 明确最佳干扰序列用于后续试验。

B. siCRLF1 减轻 TGF- β 1 促纤维化作用的研究。

具体方法: 人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里, 培养方式同前所述。分组如下: 对照组, TGF- β 1 组, TGF- β 1 + siCRLF1 组, siCRLF1 组。首先进行转染, 48 小时后饥饿细胞 16 小时, 然后使用 TGF- β 1(5 ng/ml)处理, 对照组及 siCRLF1 组使用等体积的 PBS 处理。24 h 后弃去培养基, PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白检测纤维化相关蛋白表达情况。

C. 使用 TGF- β 1 和 CRLF1 处理黄韧带细胞, 观察 ERK1/2 通路激活状况。

具体方法: 人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里, 培养和饥饿方式同前所述。分组如下: CRLF1 处理浓度为 500 ng/ml, 分别处理黄韧带细胞 0min、15min、30min、60min、120min。TGF- β 1 处理组(浓度为 5 ng/ml)分别处理黄韧带细胞 0min、15min、30min、60min、120min。PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白。Western Blot 检测 p-ERK1/2 的表达情况。

D. ERK1/2 信号通路介导 CRLF1 诱导黄韧带细胞纤维性变的研究。

具体方法: 人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里, 培养方式同前所述。分组如下: 对照组, CRLF1 组, CRLF1 + U0126 组, U0126 组。在加入 CRLF1 (500 ng/ml)之前, U0126 预处理 15min。对照组及 U0126 组加入等体积的 PBS, 各组处理 24 h 后弃去培养基, PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白检测纤维化相关蛋白表达情况。

E. ERK1/2 信号通路介导 TGF- β 1 诱导黄韧带细胞纤维性变的研究。

具体方法：人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里，培养和饥饿方式同前所述。分组如下：对照组，TGF- β 1 组，TGF- β 1 + U0126 组，U0126 组。在加入 TGF- β 1 (5 ng/ml) 之前，U0126 预处理 15min。对照组及 U0126 组加入等体积的 PBS，各组处理 24 h 后弃去培养基，PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白检测纤维化相关蛋白表达情况。

F. siCRLF1 降低 TGF- β 1 活化 ERK1/2 信号通路作用的研究。

具体方法：人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里，培养方式同前所述。分组如下：对照组，TGF- β 1 组，TGF- β 1 + siCRLF1 组，siCRLF1 组。首先进行转染，48 小时后饥饿细胞 16 小时，然后使用 TGF- β 1(5 ng/ml)处理，对照组及 siCRLF1 组使用等体积的 PBS 处理。各组处理 15min 后弃去培养基，PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白检测 P-ERK1/2 蛋白表达情况。

2.10 CRLF1 介导炎症因子和机械应力刺激诱导的黄韧带细胞纤维性变的研究

A. siCRLF1 减轻 IL-1 β 促纤维化作用的研究。

具体方法：人黄韧带细胞按前述方法接种于 6 孔板里，培养方式同前所述。分组如下：对照组，IL-1 β 组，IL-1 β + siCRLF1 组，siCRLF1 组。首先进行转染，48 小时后饥饿细胞 16 小时，然后使用 IL-1 β (20 ng/ml)处理，对照组及 siCRLF1 组使用等体积的 PBS 处理。各组处理 24 h 后弃去培养基，PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白检测纤维化相关蛋白表达情况。

B. siCRLF1 减轻机械力促纤维化作用的研究。

细胞机械拉力条件：牵拉板为 BioFlex I 6 孔板，使用 Flexcell FX-5000 细胞牵拉系统在细胞培养箱内对黄韧带细胞施加循环牵拉载荷，牵拉强度为 20%。牵拉 10 s，恢复 10 s。对照组细胞不加载牵拉，其余培养条件相同。

具体实验分组：人黄韧带细胞按前述方法接种于 BioFlex I 6 孔板里。待细胞长满约 60%面积时进行转染操作，转然后 48 小时开始饥饿，用 0.2%胎牛血清培养基对细胞进行饥饿处理，16 小时后用于机械拉力实验。分组如下：对照组，周期性拉力组，周期性拉力 + siCRLF1 组，siCRLF1 组。各组处理 24 h 后弃去

培养基，PBS 清洗细胞 2 次后收集各组细胞总蛋白，检测纤维化相关蛋白表达情况。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 进行数据统计分析。所有的体外数据都进行至少三次独立实验。使用 GraphPad Prism 7 制作统计图。数据以均数±标准差表示。两组间均数比较方差齐时，采用两独立样本 t 检验法 (Students's t text) 方差不齐时采用矫正的 t 检验。多组间比较方差齐时采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，多重比较采用 LSD 法。方差不齐时采用 Welch 检验，多重比较采用 Dunnett'S T3 法，p-value < 0.05 视为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 人黄韧带细胞鉴定

人黄韧带细胞与成纤维细胞类似。根据以前文献报道，我们采用波形蛋白 (Vimentin) 和 I 型胶原纤维作为黄韧带细胞的标志物。培养第 4 代的人黄韧带细胞的波形蛋白和 I 型胶原纤维的免疫荧光染色发现：大量的波形蛋白和少量的 I 型胶原纤维。说明了我们成功的培养了人黄韧带培养的细胞 (图 2-1)。

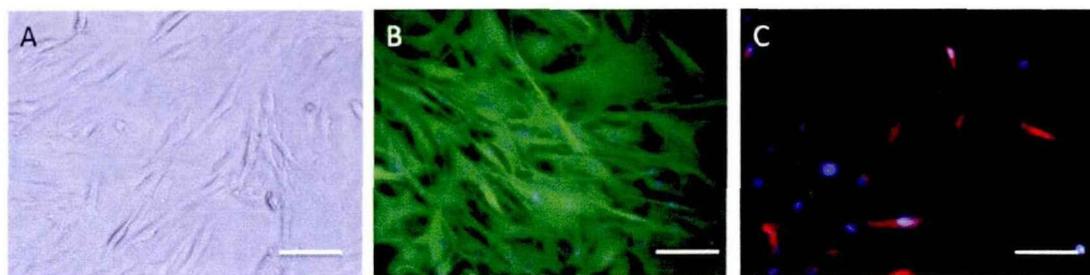


图 2-1 人黄韧带细胞的免疫荧光染色。(A) 人黄韧带细胞形态观察；(B) 波形蛋白发出的绿色荧光。(C) 少量 I 型胶原纤维发出的红色荧光。比例尺= 20 μ m

Figure 2-1 Immunofluorescence staining of human ligamentum flavum. (A) Morphological observation of human ligamentum flavum cells. (B) Green fluorescence of vimentin in ligamentum flavum cells. (C) A few red fluorescence from the COL1 fiber in human ligamentum

flavum cells. Scale bars = 20 μm .

3.2 黄韧带细胞增殖活性鉴定

使用不同浓度的 CRLF1 处理黄韧带细胞 48 小时。用 MTT 法测定细胞存活率。结果显示: CRLF1 任何测试浓度(0 ng / ml, 20 ng / ml, 200 ng / ml, 500 ng / ml)都没有增加或减少黄韧带细胞增殖活性 (图 3)。这表明, CRLF1 在 500 ng/ml 的浓度时对黄韧带细胞的生长没有毒性作用。

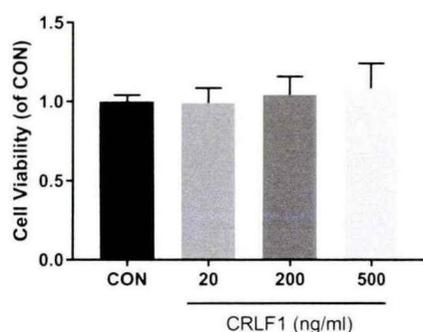


图 2-2 不同浓度处理组中黄韧带的细胞增殖活性检测。 $p > 0.05$ 。

Figure 2-2 Detection of ligamentum flavum cells proliferation in different concentrations of CRLF1. $p > 0.05$.

3.3 CRLF1 对黄韧带细胞转分化和细胞功能的影响

Tomasek 等发现 α -SMA 是鉴定肌成纤维细胞最可靠的特异性指标^[21]。TGF- β 1 可促进多种组织和器官的纤维化, 可以诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化, 使其表达 α -SMA 并分泌胶原纤维^[22-24]。在探讨体外 CRLF1 与纤维化的关系时, 我们使用 TGF- β 1 作为阳性对照组, 分别用 CRLF1 和 TGF- β 1 处理人黄韧带细胞, 观察 α -SMA 表达情况。细胞免疫荧光显示 CRLF1 和 TGF- β 1 明显提升了肌成纤维细胞的分化, 而对照组没有明显的 α -SMA 蛋白表达。

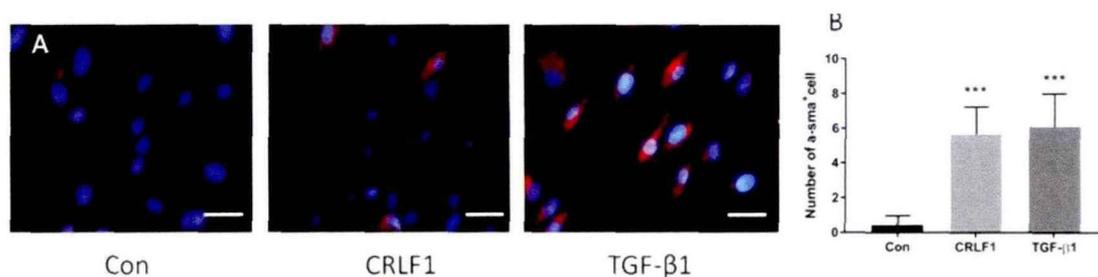


图 2-3 CRLF1 对黄韧带细胞向肌成纤维细胞分化的影响。(A) 用 CRLF1 和 TGF- β 1 处理黄韧带细胞 48 小时后发红色荧光的 a-SMA 阳性细胞数量明显增多。(B) 定量分析显示差异有统计学意义。与对照组相比 *** $p < 0.001$, ($n = 3$), 比例尺= 20 μ m。

Figure 2-3 Effect of CRLF1 on the differentiation of cells of the ligamentum flavum into myofibroblasts. (A) After 48 hours of treatment with CRLF1 and TGF- β 1, the number of a-SMA positive cells with red fluorescence increased significantly. (B) Quantitative analysis showed that the difference was statistically significant. Compared with the control group, *** $p < 0.001$, ($n = 3$), Scale bar = 20 μ m.

本研究使用划痕实验检测 CRLF1 对细胞迁移功能的影响, 结果如图 2-4 所示, CRLF1 组处理 48h 后的划痕愈合率 (0.69 ± 0.04) 较对照组 (0.19 ± 0.02) 相比明显增加, 且 TGF- β 1 阳性对照组 (0.75 ± 0.06) 的细胞也表现出类似的迁移能力。

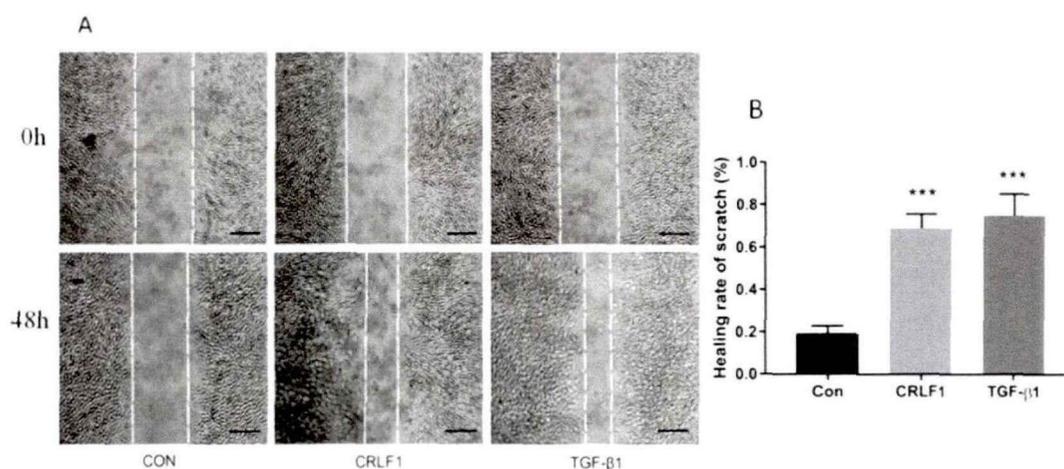


图 2-4 (A) 在用 CRLF1 和 TGF- β 1 处理黄韧带细胞 48 小时后, 使用划痕实验评估黄韧带

第二章 CRLF1 调控黄韧带肥厚的机制研究

细胞迁移能力。(B) 定量分析显示, CRLF1 处理组和 TGF- β 1 处理组均能促进黄韧带细胞的迁移率。与对照组相比 $***p < 0.001$ 。(n = 3), 比例尺= 100 μ m。

Figure 2-4 (A) Migratory ability was evaluated using the scratch assay after 48 hours of treatment with CRLF1 and TGF- β 1. (B) Quantitative analysis of the scratch assay showed that CRLF1 can significantly increase LF cell migration. Compare with the control group, $***p < 0.001$. (n = 3), Scale bars = 100 μ m.

3.4 CRLF1 对黄韧带细胞纤维化相关蛋白及 mRNA 合成的影响

我们用 RT-qPCR 和 western blot 分析研究了 TGF- β 1 和 CRLF1 处理的黄韧带细胞纤维化相关蛋白的表达。纤维化相关蛋白 COL1、COL3、 α -SMA 和 MMP2 均被 CRLF1 和 TGF- β 1 上调(图 2-5 A)。令人惊讶的是, 虽然 TGF- β 1 对黄韧带细胞纤维化标志物在转录水平的调控非常显著, 但是, CRLF1 对这些标志物 mRNA 的影响可以忽略不计(图 2-5 B-E)。因此, 我们认为 CRLF1 的促纤维化作用主要体现在转录后水平。

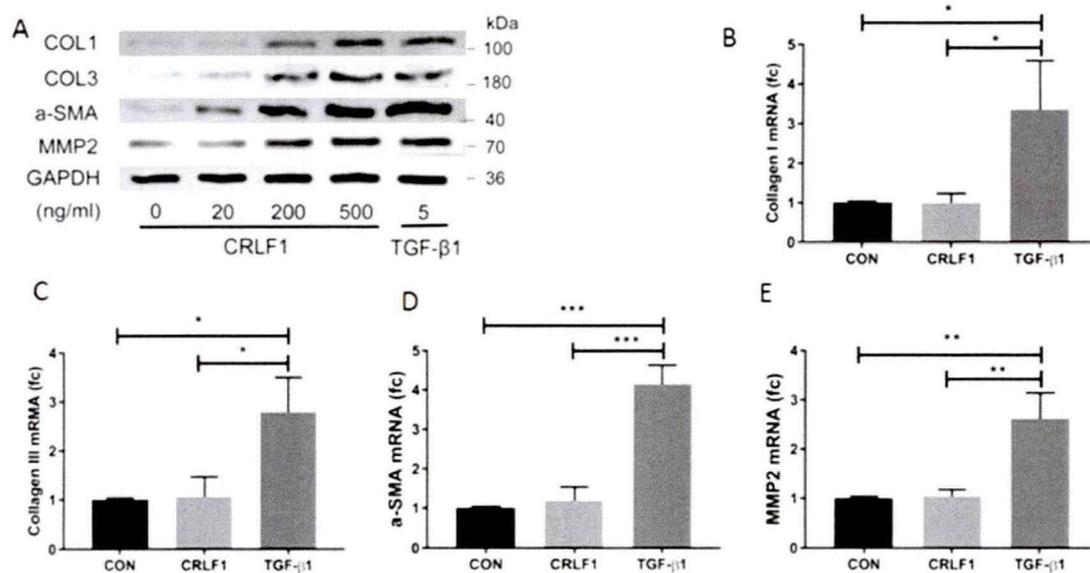


图 2-5 CRLF1 在转录后水平调控黄韧带细胞纤维化相关蛋白的表达。(A) 将黄韧带细胞使用不同浓度的 CRLF1 (0 ng/ml, 20 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml) 和 TGF- β 1 (5 ng/ml) 处理 24 小时, 获得细胞裂解物进行 western blot 分析。(B-E) 制备黄韧带细胞总 RNA 并用于

RT-qPCR 分析。(n = 3), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001。

Figure 2-5 CRLF1 stimulates the expression of fibrosis-related proteins in ligamentum flavum cells at the post-transcriptional level. (A) LF cells were exposed to CRLF1 (0, 20, 200, 500 ng/ml) for 24 hours. Cell lysates were obtained for western blot analysis. (B-E) Total cytosolic RNA was prepared and used for RT-qPCR analysis. Columns represent means \pm SD. (n = 3), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.5 TGF- β 1 经 SMAD3 途径调控 CRLF1 表达的相关研究

由于 TGF- β 1 具有诱导黄韧带细胞转分化为活化的肌成纤维细胞并分泌纤维化相关蛋白的能力,本研究继续深入探讨 CRLF1 与 TGF- β 1 的关系。Western blot 分析显示 TGF- β 1 显著促进黄韧带细胞中 CRLF1 蛋白的表达(图 2-6A、B)。RT-qPCR 分析显示,正如 TGF- β 1 可以在转录水平调控纤维化相关基因的表达一样, TGF- β 1 在转录水平调控了 CRLF1 的表达, TGF- β 1 处理使 CRLF1 的 mRNA 水平增加了约 10.8 倍(图 2-6C)。相比之下, TGF- β 1 对 CLCF1 mRNA 的合成促进作用较小,其增加幅度小于 0.5 倍(图 2-6D)。所以我们认为 TGF- β 1 主要对 CRLF1 的表达起调控作用。免疫荧光显示: TGF- β 1 促进了 SMAD3 的磷酸化和核转位,在用 SMAD3 抑制剂 SIS3 (10 μ M) 抑制 SMAD3 活化后,可以看到 TGF- β 1 诱导的磷酸化的 SMAD3 的核转位减少明显减少(图 2-6E),并且, TGF- β 1 促进 CRLF1 mRNA 表达上调的作用可以被 SIS3 明显抑制(图 2-6F)。

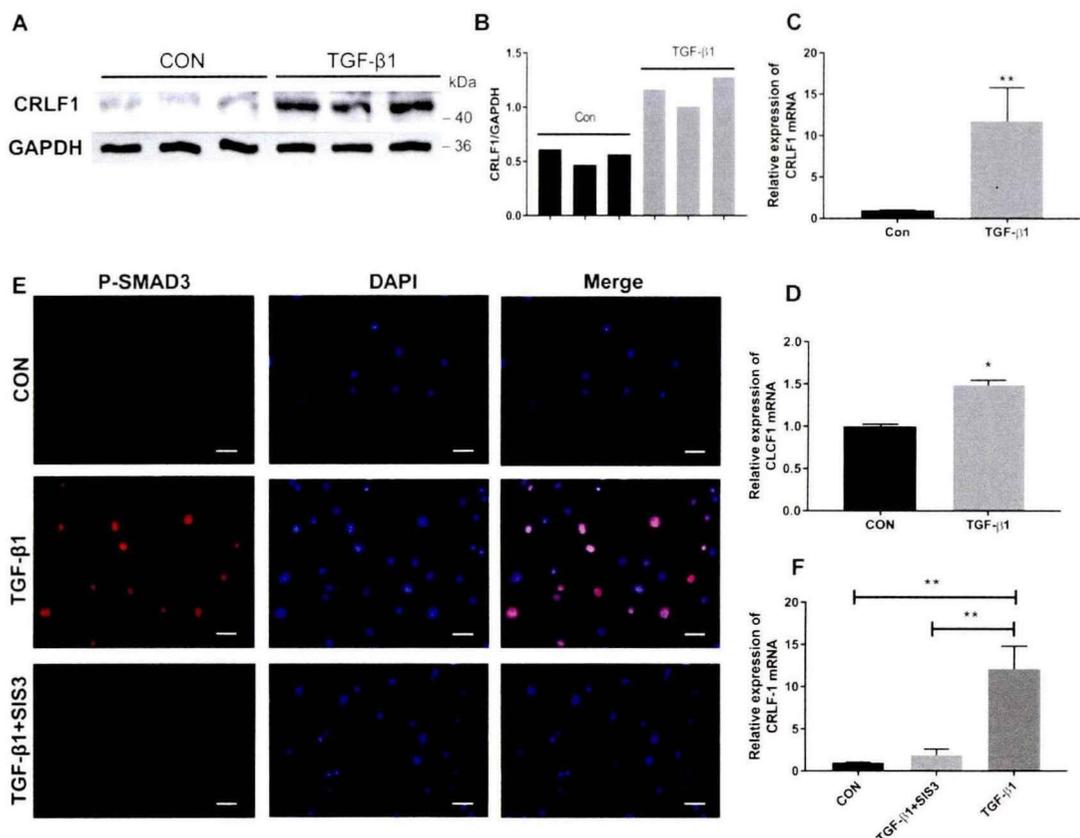


图 2-6 TGF- β 1 对 CRLF1 表达的调节依赖 SMAD3 的活化。(A) 经 TGF- β 1(5 ng/ml)处理 24 小时后黄韧带细胞中 CRLF1 蛋白的表达情况。(B) CRLF1 蛋白灰度值的定量分析。(C) TGF- β 1 (5 ng/ml)处理黄韧带 24 小时后,黄韧带细胞 CRLF1 mRNA 表达平均增加了 10.8 倍。(D) TGF- β 1 处理黄韧带 24 小时后,黄韧带细胞 CLCF1 mRNA 合成虽然增加,差异也有统计学意义,但是才平均增加了约 0.49 倍。(E) 使用 SIS3 预先处理黄韧带细胞 30 min, 然后加入 TGF- β 1 共同处理黄韧带细胞 1 小时, p-SMAD3 和细胞核荧光共定位显示 SMAD3 抑制剂 SIS3 减少 TGF- β 1 诱导的 p-SMAD3 核移位。(F) 使用 SIS3 预先处理黄韧带细胞 30 min 然后加入 TGF- β 1 共同处理黄韧带细胞 24 小时, 提取黄韧带细胞总 RNA, RT-qPCR 分析显示 CRLF1 mRNA 的上调依赖 SMAD-3 的激活。(n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01。比例尺 = 20 μ m。

Figure 2-6 TGF- β 1 regulation of CRLF1 expression is SMAD3-dependent. (A) CRLF1 expression in the LF cells with or without TGF- β 1 (5 ng/ml) treatment (B) Quantitative analysis

of gray value. (C) CRLF1 mRNA in LF cells increased 10.8 fold after 24 h of TGF- β 1 (5 ng/ml) treatment. (D) After 24 h of TGF- β 1 treatment, the synthesis of CLCF1 mRNA increased 0.49 fold. (E) SMAD3 inhibitor SIS3 reduced SMAD3 nuclear translocation induced by TGF- β 1. (F) SIS3 pre-treatment of TGF- β 1-stimulated LF cells. RT-qPCR analysis showed an SMAD-3-dependent upregulation of CRLF1. (n = 3), The data represent the mean \pm SD. *P < 0.05, **P<0.001. Scale bars = 20 μ m。

3.6 CRLF1 通过 ERK1/2 信号途径介导了 TGF- β 1 的促纤维化作用

为了证实 CRLF1 可能参与 TGF- β 1 诱导的纤维化过程, 本实验首先使用特异性 siRNAs 评估 CRLF1 基因敲减的效果, 发现 siCRLF1 3#对 CRLF1 敲减效果明显, 所以后续试验均使用 siCRLF1 3# (图 2-7A)。成纤维细胞中的 ERK 信号对纤维化很重要^[26]。我们观察到 CRLF1 和 TGF- β 1 都能激活黄韧带细胞中的 ERK1/2 通路(图 2-7B, C), 15 分钟时激活达最大值。Western blot 检测发现 siCRLF1 减少了 TGF- β 1 诱导的 ERK1/2 磷酸化和纤维化相关标志物表达 (图 2-7D, E)。在研究 TGF- β 1 和 CRLF1 共同的下游促纤维化途径时, 为了阻断 ERK1/2 信号通路, 我们采用了抑制剂 U0126。Western blot 检测发现 CRLF1 和 TGF- β 1 诱导的纤维化相关蛋白的表达均显著减弱 (图 2-7F, G)。说明 CRLF1-ERK 通路调控了 TGF- β 1 的促纤维化作用。

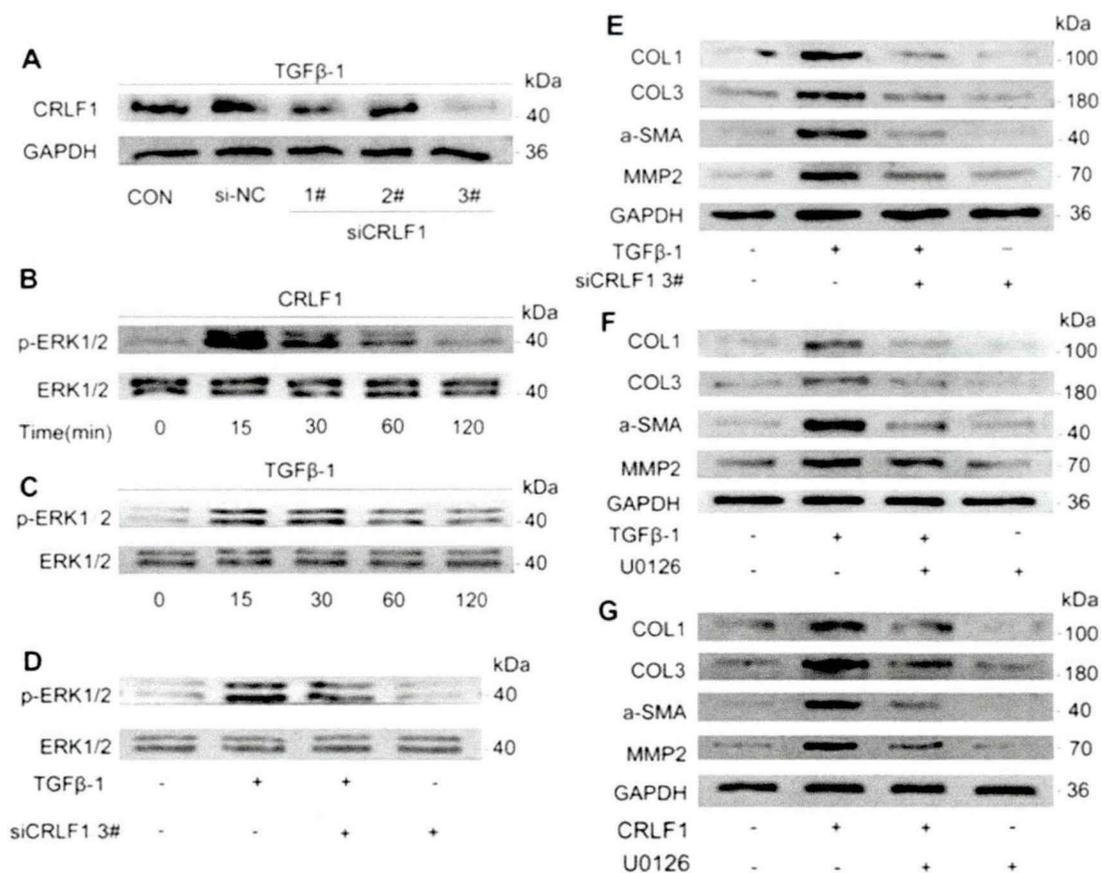


图 2-7 CRLF1 通过 ERK1/2 信号途径调控 TGF-β1 诱导的纤维化。(A) siRNAs 抑制黄韧带细胞表达 CRLF1 的效率验证。(B, C) CRLF1 和 TGF-β1 都可以激活 ERK1/2 信号通路。(D, E) siCRLF1 阻断了 TGF-β1 诱导的 ERK1/2 活化和 COL1、COL3、a-SMA 和 MMP2 蛋白表达的增加。(F, G) 抑制 ERK1/2 信号通路可减弱 TGF-β1 和 CRLF1 诱导的黄韧带细胞纤维化相关蛋白的表达。

Figure 2-7 CRLF1 mediates TGF-β1-induced fibrosis through ERK1/2 signaling pathway. (A) CRLF1 expression induced by TGF-β1 in LF cells transfected with siRNAs. (B, C) ERK1/2 signaling pathway activation by CRLF1 and TGF-β1. (D, E) siCRLF1 blocked the activation of ERK1/2 and the expression of COL1, COL3, a-SMA and MMP2 induced by TGF-β1. (F, G) Inhibition of ERK1/2 phosphorylation attenuated the CRLF1- and TGF-β1-induced expressions of fibrosis markers in LF cells.

3.7 CRLF1 介导炎症因子和机械应力刺激诱导的黄韧带细胞纤维性变

为了进一步阐明 CRLF1 在纤维化发生过程中的作用，将转染 siCRLF1 后的黄韧带细胞用 IL-1 β 或机械拉伸处理 24 小时。对纤维化相关蛋白的 Western blotting 分析显示：siCRLF1 显著降低了这些刺激的促纤维化作用（图 2-8）。

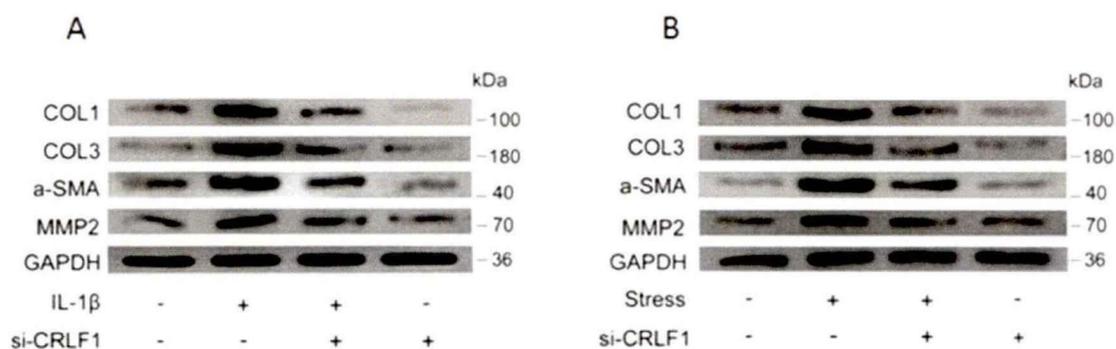


图 2-8 CRLF1 介导了 IL-1 β 和机械应力刺激诱导的黄韧带细胞纤维性变。(A) siCRLF1 显著降低 IL-1 β (20 ng/ml, 24 h) 的促纤维化作用。(B) siCRLF1 显著降低了机械拉伸力的促纤维化作用。

Figure 2-8 CRLF1 mediates fibrosis of ligamentum flavum cells induced by inflammatory factors and mechanical stress stimulation. (A) siCRLF1 significantly reduced the pro-fibrotic effect of IL-1 β (20 ng/ml, 24 h). (B) siCRLF1 significantly reduced the pro-fibrotic effect of mechanical stretching forces. Three independent experiments were carried out.

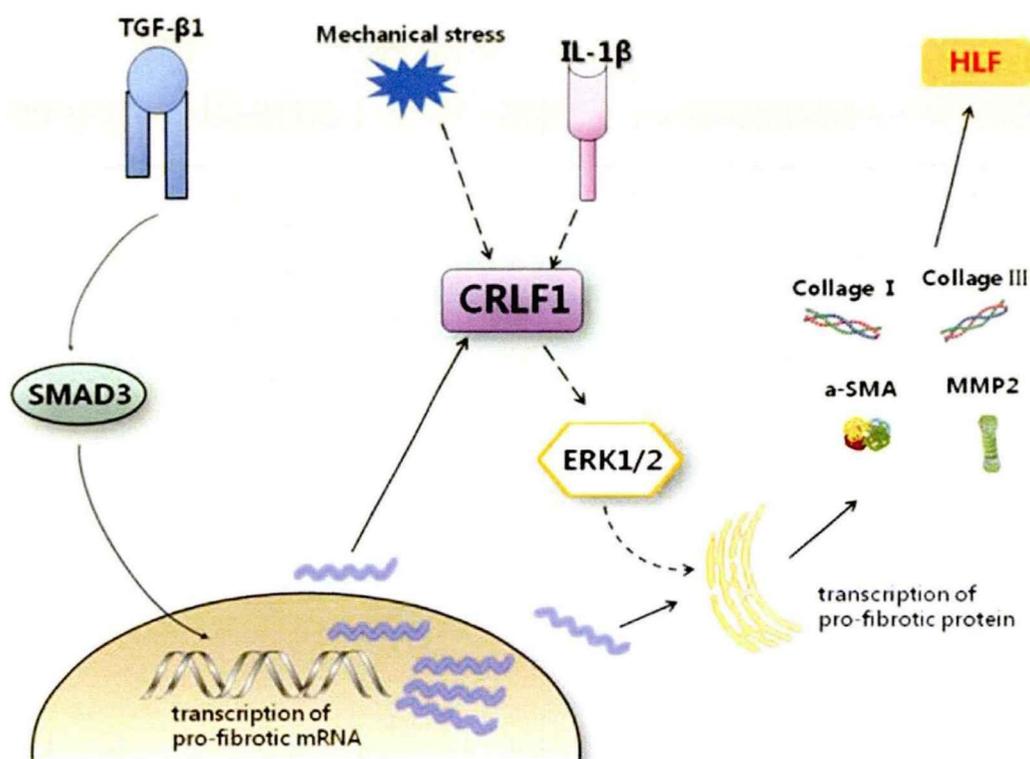


图 2-9 CRLF1 促进黄韧带细胞纤维性变的示意图。TGF-β1 可在转录水平促进 CRLF1 和纤维化标志物 mRNA 的转录。CRLF1 信号通过激活 ERK1/2 通路在转录后水平调节纤维化相关蛋白的表达。

Fig. 2-9 Schematic diagram of CRLF1 promoting fibrosis in ligamentum flavum cells. TGF-β1 can promote the transcription of CRLF1 and fibrosis related biomarkers. CRLF1 signal regulates the expression of fibrosis related biomarkers at the post transcriptional level by activating ERK1/2 pathway.

4 讨论

已有许多报道对黄韧带肥厚的病理机制进行了相关研究，但是关键分子未被发现，对于黄韧带肥厚形成的具体机制仍旧不清楚。首先，参考以前研究文献，我们利用人黄韧带组织块培养出了原代黄韧带细胞，通过免疫荧光技术对培养的细胞进行波形蛋白和 I 型胶原染色，证明了我们获得的细胞是黄韧带细胞。

接下来我们使用第一章高通量筛选的结果，研究了 CRLF1 的具体生物作用和作用机制。

我们的研究证实了关于 CRLF1 生物作用的猜测：CRLF1 可能在细胞中具有自主作用，它不仅可以和 CLCF1 结合分泌出细胞从而发挥生物学作用，而且可能在不表达 CLCF1 分子而单独表达 CRLF1 的细胞中能发挥生物学作用^[7]。在本章研究中，我们使用外源性成熟的重组人 CRLF1，发现其可以促进黄韧带细胞转分化为肌成纤维细胞，并能促进纤维化相关蛋白的表达，这说明 CRLF1 可能是一种新的促纤维化细胞因子。

TGF- β 1 被广泛证明可以经 SMAD3 途径促进成纤维细胞的胶原合成和沉积^[25]，但是进一步的机制却不清楚。我们的研究显示：TGF- β 1 的促纤维化作用主要体现在对纤维化相关基因转录水平的调节，而 CRLF1 促纤维化的作用主要体现在对这些基因转录后水平的调节。阻断 CRLF1 的表达可以抑制 TGF- β 1 的促纤维化作用。先前有研究^[26]发现，由促纤维化刺激因素诱导的 CRLF1 可以抑制肝脏中胶原 III 的表达。本研究结果与之相反，我们发现 CRLF1 在黄韧带细胞中具有强烈的促纤维化作用，可以增加肌成纤维细胞转分化和细胞外基质的产生，并促进黄韧带细胞的迁移。一个可能的原因是以前的实验只是研究了 CRLF1 对转录水平的调控。

本研究中，我们还发现 TGF- β 1 可以促进 CRLF1 mRNA 的合成升高 10 倍以上，但是对 CLCF1 的 mRNA 的合成仅仅提高了不到 0.5 倍。说明 TGF- β 1 主要调控 CRLF1 的转录。进一步使用细胞免疫荧光技术研究发现 TGF- β 1 可促进 SMAD3 的磷酸化和核转位，SIS3 抑制 SMAD3 的磷酸化后 TGF- β 1 诱导的 CRLF1 mRNA 的表达明显降低，说明 TGF- β 1 经 SMAD3 通路在转录水平上调控了黄韧带细胞 CRLF1 的表达。

ERK1/2 信号通路是最重要的细胞信号转导途径之一，它广泛参与到了各个组织器官的纤维化过程和组织修复过程^[27-29]。多种促纤维化因子都可以激活 ERK1/2 信号通路^[30-32]，有研究显示它既参与了转录水平的调控^[33]，也参与了转

录后的调控^[34, 35]。我们的研究显示, TGF- β 1 和 CRLF1 都可以激活黄韧带细胞 ERK1/2 信号通路。在 ERK1/2 抑制剂存在下, TGF- β 1 和 CRLF1 的促纤维化表型均显著降低。考虑到 ERK1/2 通路在许多生物学过程中起着关键作用, 我们认为 TGF- β 1 和 CRLF1 至少部分通过 ERK1/2 通路促进黄韧带细胞的纤维性变, 使用 RNA 干扰技术抑制 CRLF1 之后, TGF- β 1 诱导的 ERK1/2 信号激活和细胞外基质合成均显著减弱, 提示 TGF- β 1 可能经 CRLF1-ERK1/2 途径调控了黄韧带细胞的纤维性变。另外, CRLF1 促纤维化作用体现并不需要纤维化相关标志物明显升高, 所以, 我们考虑 CRLF1-ERK1/2 途径在纤维化的过程中起到了放大器的作用。

虽然 TGF- β 1 抑制剂在各种动物模型中能有效抑制纤维化, 但由于其生物效应广泛, 全身性抑制 TGF- β 引起了重要的安全性问题, 包括免疫调节、炎症和肿瘤发展^[36, 37]。我们的数据表明, CRLF1 是纤维化通路中重要的下游信号分子, 阻断了 CRLF1, 不仅能够降低 TGF- β 1 的促纤维化作用, 还能降低炎症细胞因子和机械应激刺激诱导的纤维化。因此, CRLF1 可能是黄韧带肥厚中一个关键的下游纤维化调控分子。但是, 由于本研究是对 CRLF1 促进黄韧带肥厚调节机制的一个方面进行了研究, 其可能涉及的其他调节机制包括自分泌或旁分泌环路, 蛋白与蛋白相互作用及 micRNA 或 lincRNA 调节机制仍有待后续研究。

综上所述, 本章内容是第一章研究内容的深入, 通过对黄韧带细胞纤维性变中 CRLF1 作用机制的探索, 证实了 CRLF1-ERK1/2 途径在 TGF- β 1 诱导的黄韧带细胞纤维性变中的调控机制。重要的是, 我们发现 CRLF1 在转录后水平调控纤维化的新的生物学功能, 抑制 CRLF1 可以减轻多种刺激引起的纤维化效应, 所以, 我们认为 CRLF1 在黄韧带肥厚的形成中发挥了关键作用, CRLF1 可能是一个极具吸引力的治疗靶点。

参考文献

- [1] Sairyo K, Biyani A, Goel V, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments [J]. *Spine*, 2005, 30(23): 2649-56.
- [2] Kosaka H, Sairyo K, Biyani A, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis [J]. *Spine*, 2007, 32(25): 2805-11.
- [3] Sairyo K, Biyani A, Goel V K, et al. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue [J]. *Spine*, 2007, 32(11): E340-7.
- [4] Knappskog P M, Majewski J, Livneh A, et al. Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene [J]. *American journal of human genetics*, 2003, 72(2): 375-83.
- [5] Crisponi L, Crisponi G, Meloni A, et al. Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1 [J]. *American journal of human genetics*, 2007, 80(5): 971-81.
- [6] Yamazaki M, Kosho T, Kawachi S, et al. Cold-induced sweating syndrome with neonatal features of Crisponi syndrome: longitudinal observation of a patient homozygous for a CRLF1 mutation [J]. *American journal of medical genetics Part A*, 2010, 152a(3): 764-9.
- [7] Looyenga B D, Resau J, MacKeigan J P. Cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) protects against 6-hydroxydopamine toxicity independent of the gp130/JAK signaling pathway [J]. *PloS one*, 2013, 8(6): e66548.
- [8] Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via

- transforming growth factor-beta1 [J]. Journal of orthopaedic research, 2002, 20(6): 1380-6.
- [9] Fleissig O, Reichenberg E, Tal M, et al. Morphologic and gene expression analysis of periodontal ligament fibroblasts subjected to pressure [J]. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2018, 154(5): 664-76.
- [10] Tsuritani K, Takeda J, Sakagami J, et al. Cytokine receptor-like factor 1 is highly expressed in damaged human knee osteoarthritic cartilage and involved in osteoarthritis downstream of TGF-beta [J]. Calcified tissue international, 2010, 86(1): 47-57.
- [11] Kim B J, Hur J W, Park J S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human ligamentum flavum cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta [J]. Journal of neurosurgery Spine, 2016, 24(3): 428-35.
- [12] Nakamura T, Okada T, Endo M, et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes inflammatory conditions in the ligamentum flavum in the pathogenesis of lumbar spinal canal stenosis by activating interleukin-6 expression [J]. European spine journal, 2015, 24(9): 2001-9.
- [13] Park J O, Lee B H, Kang Y M, et al. Inflammatory cytokines induce fibrosis and ossification of human ligamentum flavum cells [J]. J Spinal Disord Tech, 2013, 26(1): E6-12.
- [14] Elson G C, Graber P, Losberger C, et al. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family [J]. Journal of immunology, 1998, 161(3): 1371-9.
- [15] Clancy B M, Johnson J D, Lambert A J, et al. A gene expression profile for endochondral bone formation: oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2-induced bone formation in mouse quadriceps [J]. Bone, 2003, 33(1): 46-63.

- [16] Davis J, Molkenstin J D. Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide [J]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014, 70(9): 9-18.
- [17] Madala S, Schmidt S, Davidson C, et al. MEK-ERK Pathway Modulation Ameliorates Pulmonary Fibrosis Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Activation [J]. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2012, 46(3): 380-8.
- [18] McCubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1773(8): 1263-84.
- [19] Xu S W, Howat S L, Renzoni E A, et al. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23098-103.
- [20] Pat B, Yang T, Kong C, et al. Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: Modulation by antioxidants [J]. *Kidney International*, 2005, 67(3): 931-43.
- [21] Tomasek J J, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2002, 3(5): 349-63.
- [22] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210.
- [23] Kang M, Jeong S J, Park S Y, et al. Antagonistic regulation of transmembrane 4 L6 family member 5 attenuates fibrotic phenotypes in CCl₄-treated mice [J]. *The FEBS journal*, 2012, 279(4): 625-35.
- [24] Lu J, Liu Q, Wang L, et al. Increased expression of latent TGF-beta-binding protein 4 affects the fibrotic process in scleroderma by TGF-beta/SMAD signaling [J]. *Laboratory investigation*, 2017, 97(5): 591-601.

- [25] Akhurst R J, Hata A. Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease [J]. Nature reviews Drug discovery, 2012, 11(10): 790-811.
- [26] Stefanovic L, Stefanovic B. Role of cytokine receptor-like factor 1 in hepatic stellate cells and fibrosis [J]. World journal of hepatology, 2012, 4(12): 356-64.
- [27] Ma F Y, Sachchithanathan M, Flanc R S, et al. Mitogen activated protein kinases in renal fibrosis [J]. Frontiers in bioscience (Scholar edition), 2009, 1(1): 171-87.
- [28] Ladak K, Pope J E. A review of the effects of statins in systemic sclerosis [J]. Seminars in arthritis and rheumatism, 2016, 45(6): 698-705.
- [29] Foglia B, Cannito S, Bocca C, et al. ERK Pathway in Activated, Myofibroblast-Like, Hepatic Stellate Cells: A Critical Signaling Crossroad Sustaining Liver Fibrosis [J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(11): 2700.
- [30] MacLean J, Pasumarthi K B. Signaling mechanisms regulating fibroblast activation, phenoconversion and fibrosis in the heart [J]. Indian journal of biochemistry & biophysics, 2014, 51(6): 476-82.
- [31] Feliers D, Kasinath B S. Mechanism of VEGF expression by high glucose in proximal tubule epithelial cells [J]. Molecular and cellular endocrinology, 2010, 314(1): 136-42.
- [32] Gruhle S, Sauter M, Szalay G, et al. The prostacyclin agonist iloprost aggravates fibrosis and enhances viral replication in enteroviral myocarditis by modulation of ERK signaling and increase of iNOS expression [J]. Basic research in cardiology, 2012, 107(5): 287.
- [33] Gregg J, Fraizer G. Transcriptional Regulation of EGR1 by EGF and the ERK Signaling Pathway in Prostate Cancer Cells [J]. Genes Cancer, 2011, 2(9): 900-9.

- [34] Whelan J T, Hollis S E, Cha D S, et al. Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway [J]. *Journal of cellular physiology*, 2012, 227(3): 1235-41.
- [35] Essafi-Benkhadir K, Pouyssegur J, Pages G. Implication of the ERK pathway on the post-transcriptional regulation of VEGF mRNA stability [J]. *Methods in molecular biology*, 2010, 661(451-69).
- [36] Shull M M, Ormsby I, Kier A B, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease [J]. *Nature*, 1992, 359(6397): 693-9.
- [37] Akhurst R J. TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor? [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2002, 109(12): 1533-6.

第三章 小鼠黄韧带肥厚模型的构建及 CRLF1 功能的体内研究

研究

引言

黄韧带肥厚与年龄和职业密切相关，提示衰老和机械应力可能是造成黄韧带肥厚的始动因素。一些研究者认为异常的应力水平可以加速黄韧带中弹力纤维的降解和胶原纤维的增生^[1-3]。所以推测机械应力会对黄韧带组织造成微损伤，微损伤可以导致炎症因子、生长因子的合成与随后的组织疤痕性修复，最终导致黄韧带肥厚^[4-7]。但也有些学者认为黄韧带肥厚与年龄密切相关，Abbas 的研究认为黄韧带肥厚是一种年龄依赖现象^[12]，随着年龄的增加，弹力纤维与胶原纤维比例降低，导致黄韧带弹性降低，纤维化增加，造成了黄韧带的肥大^[8-11]。目前为止，那种外部因素起主要作用一直缺乏直接的证据。

另外，在以往的研究中，由于缺乏相关的动物模型和有限元分析，不了解动物体内黄韧带受力水平，很多分子机制的研究只能停留在细胞水平，无法在体内研究异常应力和纤维化相关分子对黄韧带肥厚的影响。近年来，利用小鼠模型来研究机械载荷的作用越来越受到人们的重视，部分原因是这种模型在成本、样本获取和可控的荷载水平方面的优势。但是到目前为止只有一种复杂的牵张器械用于小鼠黄韧带肥厚造模^[13]，其缺点是成本高昂，操作复杂，需要反复麻醉小鼠。另外一种兔子黄韧带肥厚模型则需要在脊柱上放置固定装置以限制椎体活动^[14]，这种方法操作复杂，且并不符合人脊柱异常受力的特点。总之，这些模型造价昂贵且难以构建，模型的实用性有待进一步验证。

随着有限元方法在医学领域应用的增加，软组织有限元研究也逐渐开展，有限元方法能够帮助我们获得传统生物力学难以获得的组织受力参数，结合显微 CT 和有限元更能帮助我们直观分析微观层面的力学问题，使得小鼠黄韧带生物力学分析得以开展。我们的课题组在前期研究小鼠脊柱椎间盘退变的基础

上^[15]，利用小鼠避水的习性，将爬行脊椎动物变成直立型脊椎动物，使我们能够方便的比较年龄和机械应力对黄韧带肥厚的影响，得以阐明黄韧带肥厚的主要外部因素。并且使我们首次获得了黄韧带肥厚分子机制的体内研究条件。

本研究的第前两章证实了 CRLF1 在肥厚的黄韧带存在高表达，探索了 CRLF1 对黄韧带细胞纤维性变的调控作用。基于这些结果，我们认为有必要在小鼠体内验证 CRLF1 的促纤维化作用。因此，在本章研究中，我们使用了腺相关病毒（AAV2）构建 CRLF1 过表达和抑制载体，在体内探讨 CRLF1 的调控作用。

1 实验材料

1.1 实验仪器

无菌工作台	Thermo Fisher Scientific	美国
细胞培养箱	Thermo Fisher Scientific	美国
普通离心机	湘仪	湖南
普通电子秤	sartorius	德国
倒置荧光显微镜	Zeiss	德国
普通光学显微镜	OLYMPUS	日本
体视显微镜	Zess 公司	德国
显微注射器 NF36BV 36GA	NanoFil	美国
显微镜照相设备	Olympus 公司	日本
台式摇床	其林贝尔	中国
恒温磁力搅拌器	精宏公司	中国
碎冰生成装置	Grant 公司	美国
垂直电泳仪	Bio-Rad power-pac 200	美国
普通冰箱	新飞公司	中国
-80℃低温冰箱	Revco 公司	美国
脱水机	Taiva 公司	中国

第三章 小鼠黄韧带肥厚模型的构建及 CRLF1 功能的体内研究

包埋机	Leica 公司	德国
普通切片机	Leica 公司	德国
恒温磁力搅拌器	杭州仪表公司	中国
4.5 μ m 过滤器	Gelman	美国
超纯水净化系统装置	Millipore	美国
水浴锅	一恒仪器有限公司	中国
高压水蒸汽灭菌装置	Hirayama	日本
Ph 测定仪	奥豪斯	中国
1.2 实验试剂		
AAV2 过表达和抑制载体构建	汉恒生物科技 公司	中国
小鼠过表达 CRLF1 设计与合成	汉恒生物科技公司	中国
小鼠 siCRLF1 设计与合成	上海生物工程公司	中国
AAV2-GFP (绿色荧光蛋白)	汉恒生物科技公司	中国
重组 rhTGF- β 1	Sino Biological 公司	中国
Triton X-100	Solarbio 公司	中国
Verhoeff-Van Gieson 染色试剂盒	雷根生物公司	中国
辣根过氧化物酶显色试剂盒	碧云天公司	中国
CRLF1 一抗	abcam 公司	美国
α -SMA 一抗	abcam 公司	美国
Collagen 1A1 一抗	Affinity 公司	美国
vimentin 一抗	Santa cruz 公司	美国
GFP 一抗	abcam 公司	美国
GAPDH 一抗	北京锐抗公司	中国
抗兔 Cy3-荧光二抗	ABclonal 公司	中国
抗鼠 FITC-荧光二抗	ABclonal 公司	中国
辣根过氧化物酶标记抗鼠二抗	北京锐抗公司	中国

博士学位论文

辣根过氧化物酶标记抗兔二抗	北京锐抗公司	中国
超敏 ECL 显影液	Affinity 公司	美国
Tris-HCL	Solarbio 公司	中国
Tween-20	Sigma-Aldrich	美国
脱脂奶粉	蒙牛公司	中国
甲醇	广州化学试剂厂	中国
pmsf	Solarbio 公司	中国
Trizol	Sigma-Aldrich	美国
细胞裂解液	碧云天公司	中国
Rfect transfection reagent	常州百代公司	中国
Glycine 粉剂	广州化学试剂厂	中国
无水酒精	广州化学试剂厂	中国
Tris 碱	Bio-Rad 公司	美国
acrylic amide	Bio-Rad 公司	美国
细胞培养用青霉素-链霉素	碧云天公司	中国
番红 O-固绿染色试剂盒	碧云天公司	中国
四甲基二乙胺 (TEMED)	Sigma 公司	美国
过硫酸铵 (AP)	Sigma 公司	美国
十二烷基磺酸钠 (SDS)	Sigma 公司	美国
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	Solarbio 公司	中国
胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)	Solarbio 公司	中国
硝酸纤维素膜 NC 膜	Solarbio 公司	中国
Tween-20	seebio 公司	中国
胎牛血清	Gibco 公司	美国
碘伏	广州白云山制药厂	中国
细胞培养板	Corning 公司	美国

EP 管	碧云天公司	中国
DMEM 培养基 含糖 4.5%	GIBCO 公司	美国

1.3 主要试剂配制

1.3.1 10%水合氯醛溶液配制

50ml 离心管内量取无菌生理盐水 50ml，电子天平称取水合氯醛粉末 5g 溶于其中，振荡混匀充分溶解，0.45um 过滤器过滤除菌，常规保存于 4℃，使用前复温 30 min。

1.3.2 脱毛液配制

电子称量取硫化钡 16g，溶于 200ml PBS，放置于恒温磁力搅拌器，温度设定为 70℃，密切观察，当溶液呈现淡黄色时停止溶解，待温度降至 40℃时可立即使用。

1.3.3 10%EDTA 脱钙液的配制

取 800ml 去离子水，放入搅拌机上加热至约 60℃，然后用电子天平称取 100g EDTA 粉剂缓慢加入去离子水中，再用电子天平称取 NaOH 11g 加入其中以促进溶解。置于磁力搅拌器搅拌，将搅拌时间设定为 8 小时。搅拌完成后，去离子水定容至 1000ml。使用浓 HCl 溶液调节 pH 值在 7.2-7.6 之间。分装后可常温保存。在调节 PH 值时应注意，加入 浓 HCL 调节 PH 时应分多次进行，加入 NaOH 的目的是促进溶解，加入也应该少量多次。

1.3.4 梯度酒精溶液和盐酸酒精分化液配制

同第一章

1.4 实验动物

本实验所用的 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠购自南方医科大学实验动物中心。动物实验获南方医科大学实验动物伦理委员会批准。实验小鼠在恒温 / 恒湿的标准清洁级动物房内分笼饲养，每笼 4 只，室温保持在 24 度℃左右。标准维持饲料喂养，每 3 天更换垫料、食物及饮水。湿度控制在 40-60%，照明时间为明暗 12h 交替。

2 实验方法

2.1 人黄韧带收集及组织切片制备

同第一章

2.2 小鼠黄韧带肥厚模型造模方法

根据我们课题组之前的研究结果，我们利用小鼠的惧水性诱导其采取双足站立姿势。具体方法为将小鼠置于直径约 10cm、高度为 12 厘米的圆柱形透明有机玻璃瓶内，在其底部倒入 5 毫米深的水，诱导其双足站立姿势，在瓶盖上留有 3 个孔用于通风。小鼠每天保持双足站立姿势 6 小时，中间间隔 2 小时自由活动、进食和饮水。其余时间放入正常饲养环境。每周站立造模 7 天。对照组小鼠被置于类似的环境中，底部没有水。

尽管以前有研究发现性别与黄韧带肥厚没有相关性^[9]，但是为消除雌激素可能的作用，我们选取了雄性小鼠，将 32 只 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠（随机分为对照组（n=16）、6 周实验组（双足站立 6 周，n = 8）、10 周实验组（双足站立 10 周，n = 8）。分别于 6 周和 10 周各处死 8 只小鼠，取材后显微镜下观察，以 L5/6 节段小关节处黄韧带轴向切片面积大小代表增生程度，以 L5/6 关节突关节的退变作为脊柱退变的参考。由于对照组中 14 周龄和 18 周龄小鼠的黄韧带和小关节退行性变无明显差异，故以 18 周龄小鼠为对照组。为了研究年龄对黄韧带厚度的影响，随机选取 8 只 18 月龄 C57BL/6 雄性小鼠作为老年小鼠，观察衰老对黄韧带肥厚的影响。

2.3 有限元分析

2.3.1 麻醉后，分别将小鼠以四足站姿和双足站姿两种姿态固定于扫描仓内，进行 Micro-CT（(LaTheta LCT-100S; Aloka, Tokyo, Japan)）扫描，扫描条件为 55 kV，109 μ A，扫描层厚 96 μ m，曝光时间 200 ms，图像大小为 512 \times 512 进行扫描，分别获得四足站姿以及直立站姿的 L5-L6 节段 DICOM 数据 650 张和 606

张图像。将小鼠 L5/6 节段的黄韧带进行连续轴向切片，共 206 张行 HE 染色，将脊柱椎体及黄韧带图像数据导入 Mimics 14.0 软件 (Materialise Corp., Leuven, Belgium) 进行三维重建 (图 1)，重建后的 stl 文件导入 Hypermesh 软件 (v13.0, Altair, Troy, MI, USA) 进行网格划分，最后导入 Abaqus 6.14 软件 (Dassault Systemes Simulia Corp., Providence, RI, USA) 进行材料属性赋值。四足站姿和双足站姿两个模型均包含椎体皮质骨部分、椎体松质骨部分、终板、纤维环、髓核、韧带和关节囊。终板为壳单元，韧带 (除黄韧带以外) 和关节囊为弹簧单元，黄韧带为 truss 单元，其他部件均为四面体单元。关节接触摩擦系数为 0.1^[16]，各部件材料属性见表 3-1。为了分析四足站姿小鼠黄韧带受力情况，将小鼠椎体腹侧固定，在椎体背侧施加 0.2N (小鼠体重一半) 的应力，计算黄韧带应力和应变大小及分布。为了分析双足站姿小鼠黄韧带受力情况，将小鼠 L6 底部固定，在 L5 上方施加 0.2N 的应力，计算黄韧带应力和应变大小及分布。

表 3-1 小鼠两个模型各部件组成以及材料属性。

Table 3-1 Composition and material properties of each component in the two mouse models.

Components	Material and property	Reference
Annulus ground substance	Hyperelastic Mooney-Rivlin C01=C10=0.1; C02=C11=C20=0.01; D1=D2=35	[17]
Nucleus pulposus	Hyperelastic Mooney-Rivlin C01=0.01; C10=0; D1=100	[17]
Endplate	Elastic, E=100, v=0.2	[18]
Cancellous bone	Elastic, E=50, v=0.2	[19]
Cortical bone	Elastic, E=148000, v=0.3	[20]
Ligamentum flavum	Hyperelastic Mooney-Rivlin E=15 (<6.2%), 19.5 (>6.2%) 0.3	[21]

2.4 小鼠腰椎组织标本收集

10%水合氯醛 0.5ml 腹腔注射处死小鼠，立即在腰椎上作纵行皮肤切口，暴露腰椎及骨盆，参考以前文献报道，小鼠 L5/6 位于双侧髂嵴线连线水平。取出 L3-S1 节段，剔除干净椎旁组织，保留部分髂骨做为解剖标记。生理盐水冲洗残留的血迹，随后放置于 50ml 中性甲醛中固定，放置于 4℃ 冰箱内固定 48 小时。

2.5 小鼠腰椎组织切片制备

(1) 实验小鼠腰椎组织固定与脱钙

将中性甲醛固定 48 小时后的小鼠腰椎组织取出，在流水中冲洗 1 小时，洗去中性甲醛。将小鼠组织标本放入 15ml 离心管中，加入准备好的 EDTA 脱钙液 14ml。每个离心管都做好标记，放入塑料袋中，在塑料袋上标记好脱钙开始时间及每次更换脱钙液的时间，然后放在水平旋转的摇床上。为保证脱钙效果，第一周内每天更换脱钙液，以后每 3 天更换一次，一般换液 6 周后可使用缝合针穿刺骨组织以确定脱钙效果，如果针头能轻易传入，则说明脱钙完成。

(2) 小鼠腰椎组织标本脱水

将脱钙后的小鼠腰椎组织使用流水冲 8 小时，然后将组织放入脱水机中，设置好脱水机的程序并开始脱水。使用硬组织脱水程序：1) 梯度酒精脱水：酒精含量为 50%，70%，80%，90%，100%，100%的溶液中各 60min；2) 二甲苯/石蜡 1:1 溶液中 40min；3) 石蜡 1、2、3 溶液中各 40min。

(3) 小鼠腰椎组织标本包埋

手术刀片精确切取小鼠 L5-L6 节段腰椎进行包埋，步骤同第一章人黄韧带组织包埋步骤。

(4) 小鼠腰椎组织标本切片

同第一章人黄韧带组织切片步骤。

2.6 人与小鼠黄韧带组织及细胞染色

2.6.1 苏木素&伊红 (H&E) 染色

显微镜下挑选小鼠 L5/6 小关节处的黄韧带组织切片和人的实验所需的黄韧带切片，其余同第一章 H&E 染色步骤。

2.6.2 弹力纤维 Verhoeff-Van Gieson (VVG) 染色

切片选择、烤片、脱蜡水化同 H&E 染色。

A. VVG 染色：按照 VVG 染液试剂盒说明书推荐，配制 Verhoeff's 染液。比例为酒精苏木素：三氯化铁：碘液 5：2：2。

B. 切片放入湿盒内，每份组织上滴加染液 0.5ml，染色时间 30 min，注意滴加的 Verhoeff's 染液长时间暴露于空气中会凝固，需要在其表面将要凝成膜状前继续滴加新的 Verhoeff's 染色液，防止其凝固，然后自来水冲洗掉 Verhoeff's 染色液。

C. 背景分化：滴加 2% 的三氯化铁分化液 10s 后立即自来水洗一下，在显微镜下观察分化程度，弹力纤维呈黑色，背景呈灰白色。

D. 复染：将饱和苦味酸与酸性品红按 9：1 比例混合后浸染 1min，无水酒精冲洗。

E. 透明封片：二甲苯透明 1min，干燥后中性树胶封片。显微镜下观察拍照。

2.6.3 小鼠关节突关节番红 O-固绿染色

切片选择、烤片、脱蜡水化过程同 H&E 染色。

A. 固绿染色：将切片放入湿盒中，吸取约 0.3ml 固绿染液浸染组织 5 min，用去离子水清洗 1min，显微镜观察软骨无蓝色，1%乙酸分化液分化 30s，去除残留的固绿染液后用去离子水再次清洗 1 min。

B. 番红 O 染色：将 0.1% 番红 O 溶液约 0.3ml 滴加在组织表面，染色 5min，无水乙醇清洗脱水后，二甲苯溶液中透明 1min，中性树脂封片。

C. 显微镜下观察拍照。

2.6.4 免疫组织化学染色

同第一章免疫组织化学染色步骤

2.7 小鼠黄韧带细胞的提取和鉴定

2.7.1 小鼠黄韧带细胞的提取

A. 选取 6 周龄 C57BL / 6 小鼠称重，按 4ul/g 腹腔注射 10%水合氯醛麻醉。脱毛后用 75%乙醇浸泡消毒。

B. 固定小鼠，在腰椎上进行纵向皮肤切口，暴露腰椎及骨盆，取出 L3-L6 节段，放入细胞培养皿中剔除干净椎旁组织。用含有 1%青-链霉素双抗的生理盐水冲洗残留的血迹，随后纤维组织剪刀剪除椎体，去除神经根、马尾和硬脊膜组织，1%青-链霉素双抗的生理盐水冲洗后放入新的细胞培养皿中。

C. 置于体视显微镜下，观察见黄韧带主体部分位于关节突关节内侧，显微镊固定椎板后用 12 号手术刀片和显微剪取下 L4/5 和 L5/6 节段的黄韧带组织，放入装有少量培养基的培养皿中，用刀片切开，然后加入含有 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基。

D. 置于细胞培养箱内，确保其静置，7 天后换一次培养基，轻拿轻放，尽量不要让组织块移动，13 天左右可见细胞从组织块中爬出。因为细胞生长区域不均匀，所以待细胞爬满培养皿底部约 50%面积时，就可以进行消化传代，第一次传代按 1:1 传代，以后传代可按 1: 2 或 1:3 传代。

E. 传代后置入细胞培养箱，培养方式同人黄韧带细胞。

2.7.2 小鼠黄韧带细胞的鉴定

取第四代小鼠黄韧带细胞，接种于底部放有无菌细胞爬片的六孔板中，制作细胞爬片。使用细胞免疫荧光技术检测 vimentin 和 I 型胶原表达情况，以鉴定黄韧带细胞。步骤大体同第一章，具体步骤如下：

A.细胞贴壁后 24 小时，用中性甲醛溶液固定细胞 10 min，倒掉中性甲醛，PBS 清洗细胞 3 次，每次 5 分钟。0.5% Triton 对细胞进行通透化处理 10 min，PBS 漂洗 3 次，每次 5 分钟。然后用含有 1% BSA 的 PBS 溶液封闭 1 小时。

B. 倒掉封闭液，将按照 1:100 比例稀释好的一抗 Vimentin 和一抗 Collagen I 分别滴加在细胞爬片上，置于 4℃冰箱内孵育 12 小时。

C.吸出一抗后用 PBS 洗涤 3 次。然后在暗室内分别加入 FITC 和 Cy3 荧光标记的二抗，室温避光孵育 1 小时。PBS 洗 3 次，每次 5 分钟，避光条件下加入 DAPI 染核 10 分钟，去除多余的 DAPI。

D. 荧光显微镜下观察，波形蛋白为绿色，I 型胶原纤维为红色荧光。

2.8 小鼠黄韧带中 siCRLF1 转染

转染具体步骤同第二章

用于转染的鼠靶向 CRLF1 siRNA 序列

CRLF1-targeting siRNA sequences of mouse

Mouse		
RNAi 1#	Sense	5' - UGGCUCAAGAAGCACGCAU - 3'
	Antisense	5' - AUGCGUGCUUCUUGAGCCA - 3'
RNAi 2#	Sense	5' - GAUCUGAUGUCCUCACACU - 3'
	Antisense	5' - AGUGUGAGGACAUCAG - 3'
RNAi 3#	Sense	5' - UCCUCUUCCAAGCCAAGUA - 3'
	Antisense	5' - UACUUGGCUUGGAAGAGGA - 3'

2.9 CRLF1 功能体内实验

根据以前研究文献，我们使用了腺相关病毒 2 (AAV2) 载体^[22]。采用切开后原位注射的方式造模，具体手术方法如下。

A. 准备好消毒好的手术器械，使用复温后的 10%水合氯醛麻醉，按 4ul/g 腹腔注射。注射完毕后将小鼠放入笼中观察，如果麻醉效果不好可再次注射少量 10%水合氯醛麻醉液。等待麻醉期间加热硫化钡脱毛液，预热至 40 摄氏度。

B. 麻醉成功后，用棉球蘸取少量硫化钡溶液涂抹，范围从双侧最下面的肋骨下缘至骶部，宽度约 1.5cm。脱毛 3 min 以后用蘸有生理盐水的棉球轻轻擦去残留的毛发，然后用干棉球擦干。

C. 将脱毛完成的小鼠使用胶带固定于动物手术台上，密切观察小鼠呼吸、心跳情况，佩戴口罩和无菌手套，使用碘伏消毒液消毒 3 次，铺无菌手术洞巾。注意无菌操作，操作时确保手术器械放置于无菌区域，避免污染。

D. 首先触摸小鼠髂嵴位置，以此位置为中心，在腰部中线上进行纵向皮肤切口，长约 2cm，弯钳游离皮下后用撑开器向两侧牵开皮肤，此时可见小鼠两侧髂嵴处分别有两条白色的筋膜组织，此标记为两侧髂嵴上缘。L5/6 椎间隙即位于两侧髂嵴上缘连线水平。使用手术刀将棘突和椎板两侧肌肉轻柔剥离，充分暴露 L5/6 椎板，去除棘间韧带，放置于体视显微镜下，暴露 L5/6 黄韧带，用微型注射器 (NF36BV 36GA, NanoFil) 将病毒溶液 (3 μ l) 注射到关节突下黄韧带附近，注射时间 5 分钟。然后修复椎旁肌和筋膜，闭合切口。对照组进行假手术处理，只切开腰部皮肤后就进行缝合。

E. 手术结束后，立即肌肉注射青霉素 8 万 IU，预防手术切口感染。将小鼠放于复苏垫子上，设定温度为 38 $^{\circ}$ C，复苏过程注意观察小鼠呼吸和复苏程度。在进行后续实验之前，允许动物恢复 3 周。

F. 验证 AAV-2 转染效率：将 8 只 8 周大的 C57BL / 6 雄性小鼠随机分为对照组和实验组，每组 4 只小鼠。对照组注射 AAV2 载体，实验组注射 AAV2-GFP (绿色荧光蛋白)。注射方式同 A-E，四周后，使用免疫组织化学测定转染效率。

G. 验证 CRLF1 在体内的功能，实验分组：将总共 48 只 8 周大的 C57BL / 6 雄性小鼠随机分为 6 组 (n = 8)：对照组，AAV2-载体组，AAV2-CRLF1 组，AAV2-载体+双足站立组，AAV2-CRLF1 +双足站立组和 AAV2 -siCRLF1 +双足站立组。注射方式同 A-E。注射后休息三周，然后造模，双足站立造模 10 周后，使用 H&E 染色，并计算小鼠黄韧带面积。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 进行数据统计分析。所有的体外数据都进行至少三次独立实验。使用 GraphPad Prism 7 制作统计图。数据以均数 \pm 标准差表示。两组间均数比较方差齐时，采用两独立样本 t 检验法 (Students's t text) 方差不齐时采用校正的 t 检验。多组间比较方差齐时采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，多重比较采用 LSD 法。方差不齐时采用 Welch 检验，多重比较采用 Dunnett'S T3 法，p-value < 0.05 视为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 三维重建与有限元分析

小鼠腰椎的 3 维重建结果如图 3-1A, B 所示, 当小鼠处于双足站立姿势时, L5 椎体相对于 L6 向前弯曲 (图 3-1C)。不管小鼠在四足站立位还是在双足站立位, 黄韧带的应力和应变都主要集中在靠近小关节附近的黄韧带, 这和黄韧带的主要解剖位置一致。力学分析中显示四足站立时小鼠黄韧带的 Von Mises stress (范式等效应力, 它表示模型内部的应力分布, 它可以描述应力在整个模型中的变化, 使人可以直接观察到模型中的危险区域) 为 1.79×10^{-5} MPa, Maximum principal strain (最大主应变, 外力越大使物体产生变形的程度越大, 变其中最大的力产生的应变就是最大主应变) 应变: 为 8.62×10^{-5} (图 3-2 A、B)。当小鼠处于双足站立位时, Von Mises stress 值增加到 8.85×10^{-2} MPa, Maximum principal strain 增加到 6.64×10^{-1} (图 3-2 C、D)。其数值分别增加了 4944 倍和 7703 倍。

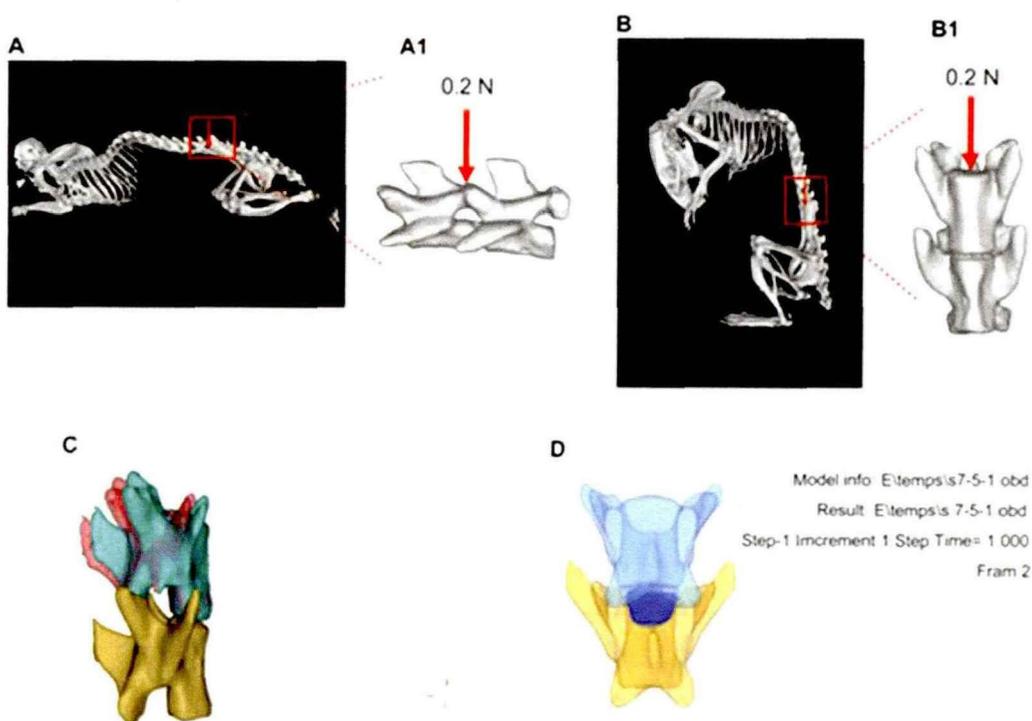


图 3-1 小鼠腰椎三维重建。(A) 基于 DICOM 数据的小鼠四足站立姿势和 (B) 双足站立

姿势脊柱的三维重建模型。(A1) 四足站姿时向腰椎施加 0.2 N 的垂直作用力 (B1) 双足站立姿势时向腰椎施加 0.2 N 的垂直应力。(C) 在四足站姿和双足站立姿势时 L5、L6 的相对位置。红色区域代表四足站立姿势中的 L5 位置, 绿色区域代表双足站立姿势中的 L5 位置。(D) 深蓝色区域代表黄韧带的位置。

Figure 3-1 3D reconstruction of the mice lumbar vertebrae. (A) 3D reconstruction model based on DICOM data for mice in the quadruped standing posture and (B) bipedal standing posture. (A1) 0.2 N was applied to the lumbar in the quadruped standing posture and (B1) bipedal standing posture. (C) The relative position of the L5 in the quadruped standing and bipedal standing posture. The red area represents the L5 position in the quadruped standing posture, and the green area represents the L5 position in the bipedal standing posture. (D) The mazarine area represents the anatomical location of the ligamentum flavum.

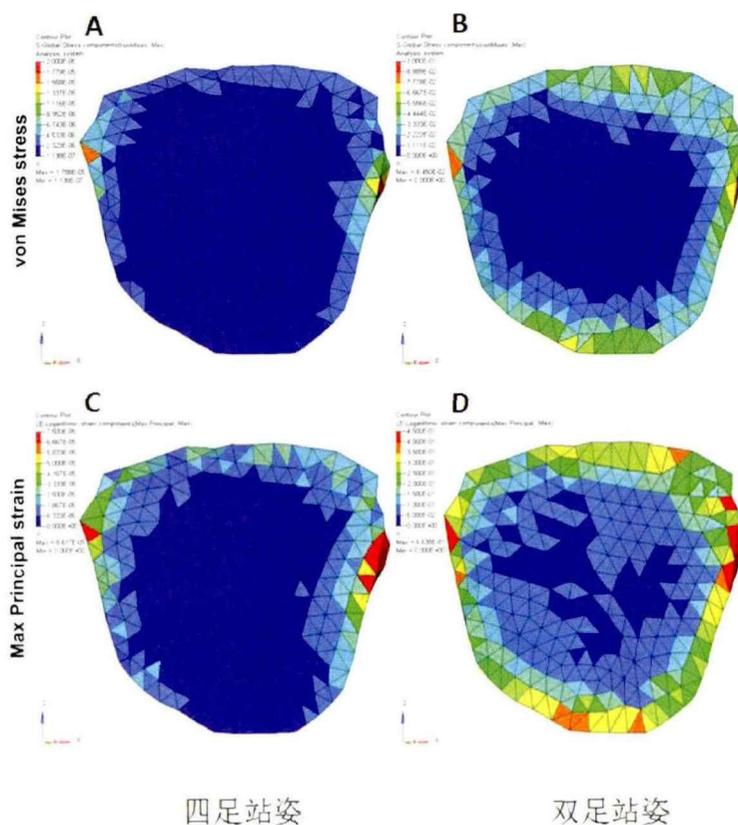


图 3-2 小鼠姿势的改变可以引起黄韧带所受机械应力发生改变。在四足站姿势 A) 和双足站姿 (B) 时黄韧带的 Von Mises stress 分布和大小; 在四足姿势(C) 和双足站立姿势 (D) 时黄韧带的 Maximum principal strain 分布和大小。

Figure 3-2 Changes in posture alter the stress on the mouse ligamentum flavum. The distribution and von Mises stress values of the ligamentum flavum in the quadruped (A) and bipedal standing postures (B); The distribution and values of the maximum principal strain of the ligamentum flavum in the quadruped (C) and bipedal standing postures (D).

3.2 机械应力是导致黄韧带肥厚的主要因素

双足站立小鼠模型造模完成后, 我们采用组织化学染色的方法观察脊柱是否发生退变以及黄韧带增生情况。本研究以关节突关节退变作为判断脊柱退变的一个阳性参照。用小鼠 L5/6 关节突关节处的黄韧带轴向切片的面积变化来代表黄韧带增生的程度。结果如图 3-3: 番红 O-固绿染色显示对照组软骨基质呈红色, 蛋白多糖含量正常; 双足站立组软骨基质呈轻度染色, 蛋白多糖含量降低 (图 3-3A)。这表明双足站立成功地引起了小鼠的脊柱退行性变。双足站立组和对照组之间的黄韧带面积比较采用 H&E 染色 (图 3-3B) 和 ImageJ 软件计算。结果显示双足站立组黄韧带面积明显大于对照组 (对照组 $3.8 \pm 0.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, 6 周双足站立组 $6.8 \pm 0.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, 10 周双足站立组 $10 \pm 1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$)。三组间有显著性差异 ($p < 0.05$; 图 3-3C)。

接下来, 我们比较了对照组、10 周双足站立组和老龄组 (18 个月龄) 的黄韧带面积 (图 3-4), 发现 10 周双足站立组的黄韧带面积大于对照组和老龄组 (对照组为 $3.8 \pm 0.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, 10 周双足站立组为 $10 \pm 1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, 老龄组为 $6.1 \pm 1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), 差异有统计学意义。但 18 个月龄组和对照组之间没有显著差异 ($p = 0.068$)。

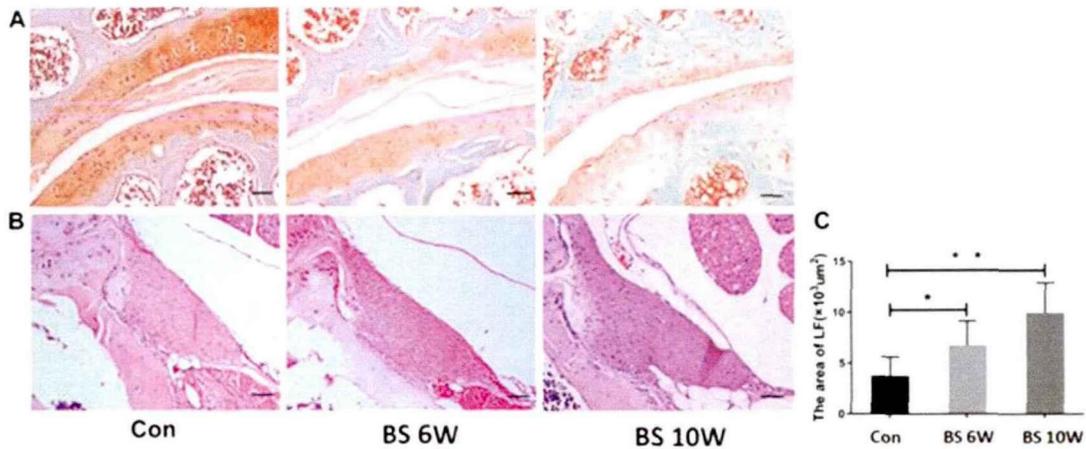


图 3-3 机械应力会导致黄韧带肥厚。(A) 双足站立组和对照组小关节的番红 O-固绿染色。(B) H&E 染色显示: 双足站立组黄韧带面积逐渐增加明显。(C) 各组小鼠黄韧带面积的统计结果 (n = 8), *p < 0.05, **p < 0.01。采用单因素方差分析。比例尺 = 20 μm; Con = 对照组; BS 6W = 双足站立 6 周组; BS 10w = 双足站立 10 周组。

Figure 3-3 Mechanical stress is the main causes of ligamentum flavum hypertrophy. (A) Safranin O-fast green staining of facet joints in the bipedal standing group and control group. (B) H&E staining of ligamentum flavum specimens showed increased ligamentum flavum area in the bipedal standing group. (C) The statistical results for the ligamentum flavum area of mice in different groups. (n = 8), *p < 0.05, **p < 0.01. One-way analysis of variance (ANOVA) was used. Scale bars = 20 μm; Con = control group; BS 6W = 6-week bipedal standing group; BS 10W = 10-week bipedal standing group.

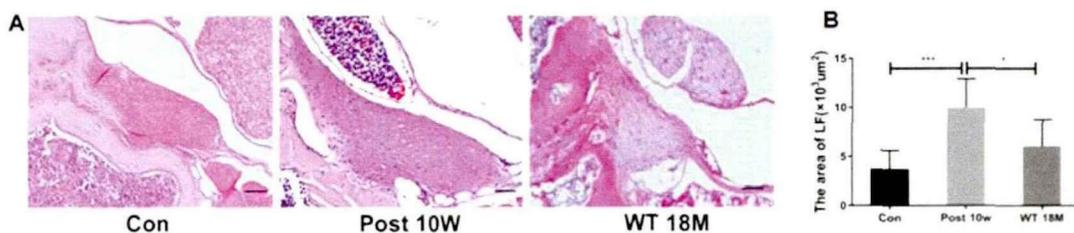


图 3-4 机械应力是导致黄韧带肥厚的主要原因。(A) 对照组、10 周双足站立组和老龄组小鼠黄韧带标本的 H&E 染色。(B) 各组小鼠黄韧带面积的统计结果 (n=8), *p < 0.05, ***p < 0.001。采用单因素方差分析, 标尺 = 20μm; Con = 对照组; BS 10w = 双足站立 10 周组;

WT 18M=18 个月龄的老龄小鼠。

Figure 3-4 Mechanical stress is the main causes of ligamentum flavum hypertrophy. (A) H&E staining of specimens from the control, 10-week bipedal standing and aged mice groups. (B) Statistical results of the ligamentum flavum area of mice in different groups, ($n = 8$), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. One-way analysis of variance (ANOVA) was used. Scale bars = 20 μm ; Con = control group; BS 10W = 10-week bipedal standing group; WT 18M = wild-type aged mice at 18 months.

3.3 双足站立小鼠黄韧带与人肥厚黄韧带细胞外基质的变化相似

为了研究双足站立小鼠的黄韧带病理变化是否能模拟人肥厚黄韧带的病理改变，我们首先研究了两者细胞外基质（extracellular matrix, ECM）的改变是否相似。VVG 染色又称为弹力纤维染色，弹力纤维可以被染成紫黑色，胶原纤维被染成红色。结果显示（图 3-5）：与人正常的黄韧带相比，人肥厚黄韧带中弹性纤维明显减少，胶原纤维明显增加，肥厚黄韧带中弹力纤维与胶原纤维的比值降低（图 3-5A）（黄韧带正常组为 4.8 ± 0.3 ，黄韧带肥厚组为 2.2 ± 0.1 ），差异有统计学意义，*** $p < 0.001$ （图 3-5B）。在小鼠模型中，双足站立 10 周组弹性纤维与胶原纤维的比率显著降低（图 3-5C）（对照组为 5.9 ± 0.2 ，双足站立组 10 周组为 3.2 ± 0.2 ），差异有统计学意义，*** $p < 0.001$ （图 3-5D）。所以双足站立小鼠模型黄韧带的细胞外基质病理变化与人肥厚黄韧带的病理改变相似。

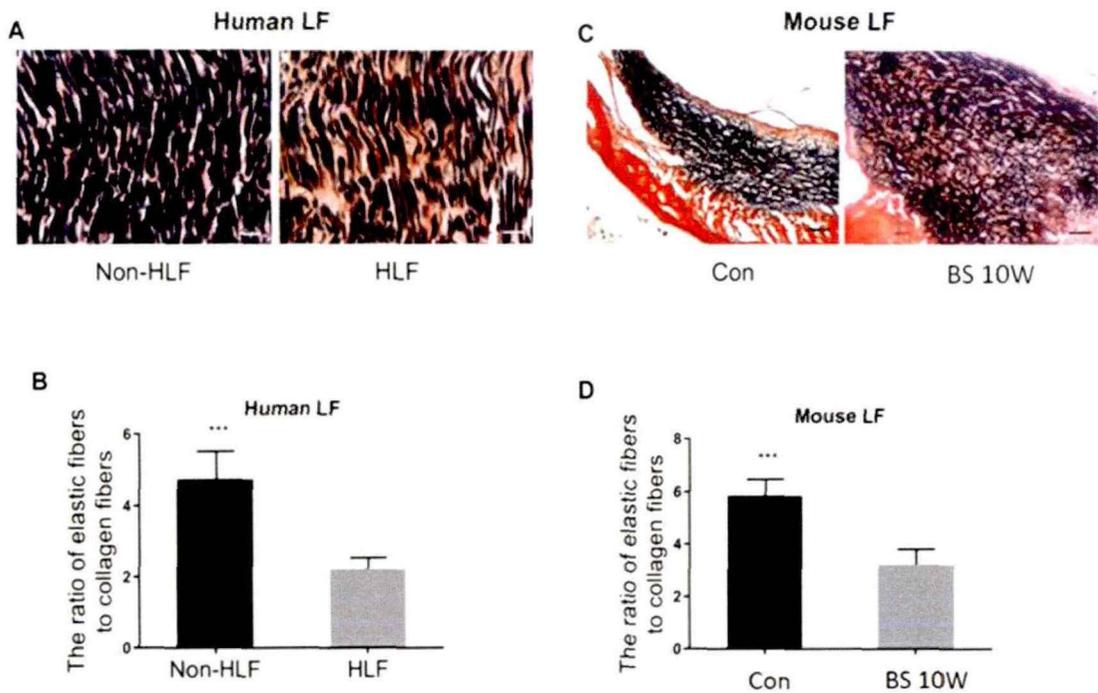


图 3-5 双足站立小鼠模型中黄韧带细胞外基质变化与人肥厚黄韧带细胞外基质改变相似。(A) 人的正常黄韧带和肥厚黄韧带 VVG 染色。VVG 染色显示黑紫色的弹力纤维减少，红色的胶原纤维增加。(B) 弹力纤维面积与胶原纤维面积比值的定量统计，差异统计学意义 ($n = 8$), $***p < 0.001$ 。(C) 小鼠实验中，双足站立组和对照组小鼠黄韧带 VVG 染色。(D) 小鼠对照组和双足站立组弹力纤维与胶原纤维比值的定量分析。($n = 8$), $***p < 0.001$ 。采用两独立样本 t 检验。比例尺 = $10\mu\text{m}$ ；HLF = 肥厚的黄韧带；Non-HLF = 正常黄韧带；Con = 对照组；BS 10W = 双足站立 10 周组。

Figure 3-5 The changes of extracellular matrix of the ligamentum flavum in the bipedal standing mice model can simulate those of human hypertrophied ligamentum flavum. (A) VVG staining of LF specimens in patients with and without hypertrophied ligamentum flavum. VVG staining showed that the purple-black elastic fibres in the hypertrophied ligamentum flavum were reduced, whereas the red collagen fibres were increased. (B) Quantitative analyses of the ratio of elastic fibre to collagen fibre in normal ligamentum flavum and hypertrophied ligamentum flavum. ($n = 8$). $***p < 0.001$. (C) VVG staining of mouse ligamentum flavum specimens in the bipedal standing group and control group. (D) Quantitative analyses of the ratio of elastic fibre to collagen

fibre in the bipedal standing group and control group. ($n = 8$), $***p < 0.001$. Student's t-test was used. Scale bars = 10 μm ; HLF= hypertrophied ligamentum flavum; Non-HLF = non-hypertrophied ligamentum flavum; Con = control group; BS 10W = 10-week bipedal standing group.

3.4 双足站立小鼠黄韧带与人肥厚黄韧带中细胞的病理改变相似

除了细胞外基质的变化外，我们还用免疫组化研究了双足站立小鼠和人肥厚黄韧带中细胞类型的变化。H&E 染色发现，在人黄韧带标本中，肥厚黄韧带标本的细胞密度高于正常黄韧带标本（图 3-6A a1, a2）（正常组为 17.8 ± 0.8 ；肥厚组为 23.3 ± 0.7 ）。差异有统计学意义 ($p < 0.001$)（图 3-6C）。与正常组相比，肥厚组 a-SMA 阳性细胞数显著增加（图 3-6A a3, a4）（正常组为 0.8 ± 0.3 ；肥厚组为 3.5 ± 0.7 ，）差异有统计学意义 ($p < 0.01$)（图 3-6D）。同样，在小鼠标本中，双足站立组的黄韧带细胞密度明显高于对照组（图 3-6B b1, b2）（对照组为 30.63 ± 1 ；双足站立组为 39.6 ± 1.7 ，）差异有统计学意义 ($p < 0.001$)（图 3-6E）。10 周双足站立组黄韧带中 a-SMA 阳性细胞数高于对照组（图 3-6B b3, b4）（对照组 0.1 ± 0.1 ；双足站立组 1.6 ± 0.3 ），差异有统计学意义 ($p < 0.001$)（图 3-6F）。这些结果表明，双足站立小鼠黄韧带肥厚模型的黄韧带病理变化与人的肥厚黄韧带病理改变相同。

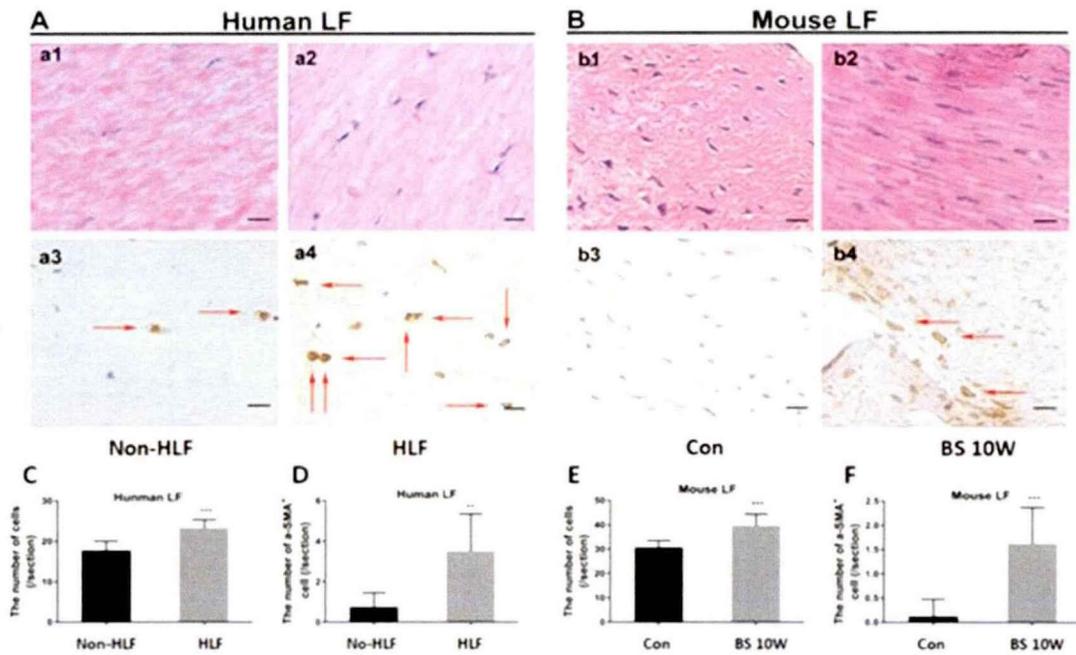


图 3-6 双足站立小鼠黄韧带与人肥厚黄韧带中细胞病理变化相同。(A) 在人标本中, (a1, a2) 肥厚黄韧带中细胞密度显著增加; (a3, a4) 肥厚黄韧带中 a-SMA 阳性细胞数量显著增加。(B) 小鼠标本中, 10 周双足站立组黄韧带细胞密度高于对照组 (b1, b2), 10 周双足站立组黄韧带中 a-SMA 阳性细胞数显著高于对照组 (b3, b4)。(C) 人黄韧带中细胞密度的定量分析 (n=8), ***p < 0.001。(D) 人黄韧带中 a-SMA 阳性细胞的定量分析 (n=8), **p < 0.01。(E) 小鼠黄韧带中细胞密度的定量分析 (n=8), ***p < 0.001。(F) 小鼠黄韧带中 a-SMA 阳性细胞的定量分析 (n=8), ***p < 0.001。比例尺 A = 10 μ m; B = 5 μ m; 两组间比较采用 t 检验; HLF=肥厚黄韧带; Non-HLF=正常黄韧带; Con=对照组; BS 10W=双足站立 10 周组。

Figure3-6 The cytopathological changes of the ligamentum flavum in bipedal standing mice were the same as those in human hypertrophied ligamentum flavum. (A) In human ligamentum flavum samples: (a1, a2) the cell density in hypertrophied ligamentum flavum was significantly increased; (a3, a4) the number of a-SMA-positive cells was significantly increased in hypertrophied ligamentum flavum. (B) In mouse ligamentum flavum samples, the cell density of the ligamentum flavum was higher in the 10-week bipedal standing group than in the control group (b1, b2); the

number of α -SMA-positive cells in ligamentum flavum was significantly higher in the 10-week bipedal standing group than in the control group (b3, b4). (C) Quantitative analyses of human ligamentum flavum cell density. ($n = 8$), $***p < 0.001$. (D) Quantitative analyses of α -SMA-positive cells in human ligamentum flavum. ($n = 8$), $**p < 0.01$. (E) Quantitative analyses of mouse ligamentum flavum cell density. ($n = 8$), $***p < 0.001$. (F) Quantitative analyses of α -SMA-positive cells in mouse ligamentum flavum. ($n = 8$), $***p < 0.001$. Scale bars A = 10 μm ; B = 5 μm ; Student's t-test was used: HLF = hypertrophied ligamentum flavum; Non-HLF = non-hypertrophied ligamentum flavum; Con= control group; BS 10W = 10-week bipedal standing group.

3.5 双足站立小鼠黄韧带中 CRLF1 表达增加

我们使用免疫组织化学染色方法检测了双足站立小鼠黄韧带中 CRLF1 表达量的变化。结果发现，与对照组相比，双足站立 10 周组小鼠黄韧带中 CRLF1 阳性细胞数明显上升（图 3-7 A），差异有统计学意义（图 3-7 B）。这个结果与第一章人肥厚黄韧带中 CRLF1 的表达趋势一致。

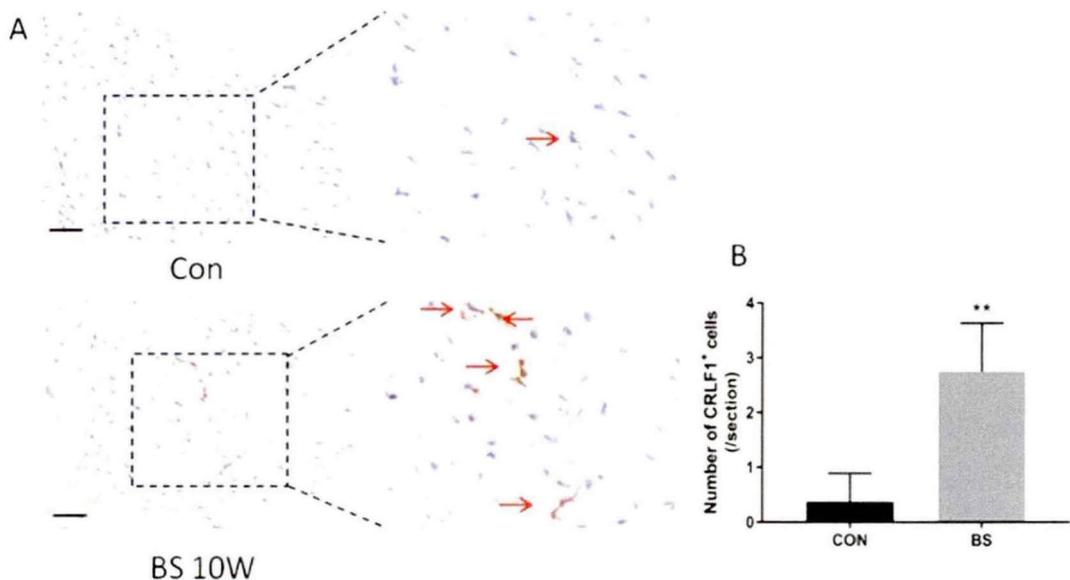


图 3-7 双足站立小鼠黄韧带中 CRLF1 表达增加升高。(A) 与对照组相比，双足站立 10 周组小鼠黄韧带中 CRLF1 阳性细胞数量增加明显。(B) CRLF1 阳性细胞数的定量分析。(n =

8), 与对照组相比 $**p < 0.01$ 。比例尺 = $10 \mu\text{m}$ 。两组间比较采用 t 检验: Con=对照组; BS 10W=双足站立 10 周组。

Figure 3-7 Increased CRLF1 expression in the ligamentum flavum of bipedal standing mice. (A) Compared with the control group, the number of CRLF1 positive cells in the ligamentum flavum increased significantly in the 10 weeks bipedal standing group. (B) Quantitative analysis of CRLF1 positive cells. ($n = 8$), compared with the control group $**p < 0.01$. Scale bars = $10 \mu\text{m}$. Student's t-test was used: Con= control group; BS 10W = 10-week bipedal standing group.

3.6 小鼠黄韧带细胞的鉴定

免疫荧光染色发现: 同人类黄韧带细胞一样, 小鼠黄韧带细胞表达大量波形蛋白和少量的 I 型胶原纤维。说明了我们成功的培养了小鼠黄韧带细胞。

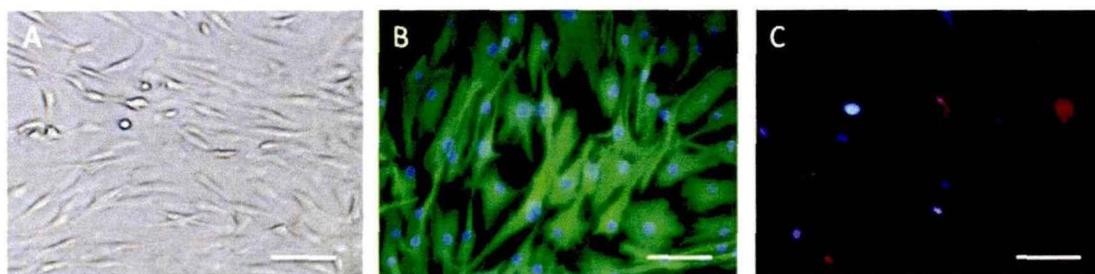


图 3-8 小鼠黄韧带细胞的鉴定。(A) 小鼠黄韧带细胞形态观察。(B) 小鼠黄韧带细胞中大量波形蛋白发出的绿色荧光。(C) 小鼠黄韧带细胞中少量 I 型胶原发出的红色荧光。(比例尺 = $20 \mu\text{m}$)。

Figure 3-8 Identification of mouse ligamentum flavum cells. (A): Morphological observation of mouse ligamentum flavum cells. (B) Green fluorescence from a large amount of vimentin in mouse ligamentum flavum cells. (C) Red fluorescence from a small amount of type I collagen fibers in mouse ligamentum flavum cells. Scale bars = $20 \mu\text{m}$.

3.7 AAV2 载体转染效果和 siCRLF1 的抑制效果验证。

为了获得最佳的小鼠 CRLF1 siRNA 序列, 我们使用体外培养的小鼠黄韧带细胞, 并对 3 个干扰序列进行了验证。图 3-9A 显示的是各个 siRNA 对小鼠黄韧

带细胞表达 CRLF1 的抑制作用。siRNA 3#序列用于构建 AAV2-siCRLF1, 进行后续研究。AAV (adeno-associated virus, AAV) 载体可以提供几个月的转基因表达, 且具有较低的自身免疫反应^[23]。根据以往的文献, 我们使用 AAV2 作为基因过表达和抑制的载体。首先, 我们用 AAV2-GFP (表达绿色免疫荧光蛋白的 AAV2 载体) 来验证病毒的转染效率。结果如图 3-9B 显示: 注射后 4 周, AAV2 载体有效地将 GFP 过表达基因转染到小鼠的黄韧带中。说明这种方法是可行的。

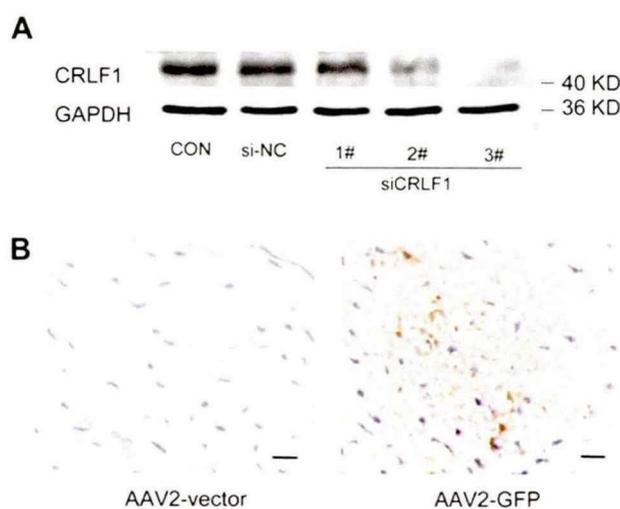


图 3-9 AAV2-GFP 转染效果及 siRNA 引起的 CRLF1 表达抑制效果验证。(A) 转染 siCRLF1 3# 的小鼠黄韧带细胞经 TGF- β 1 处理 24 小时后, CRLF1 蛋白表达明显减少。(B) AAV2-GFP 成功转染了小鼠黄韧带。(n = 4), 比例尺 = 5 μ m。

Figure 3-9 Effects of AAV2-GFP transfection and siRNA-mediated CRLF1 knock-down. (A) The cells showed a marked reduction of CRLF1 protein expression after 24 hours treatment of TGF- β 1 in mouse LF cells which were transfected with siCRLF1 3#. (B) The AAV2-GFP was successfully transfected into LF. (n = 4). Scale bars = 5 μ m.

3.8 CRLF1 在小鼠黄韧带肥厚的形成中起关键作用

为了进一步说明 CRLF1 对在黄韧带肥厚形成中的作用, 我们使用了可以过表达 CRLF1 和抑制 CRLF1 的腺相关病毒载体 (AAV2-CRLF1 和 AAV2-siCRLF1)

原位注射。H&E 染色后使用 ImageJ 计算小鼠黄韧带面积，结果显示：在对照组和 AAV2 载体组之间没有观察到显著差异（图 3-10A. a, b），表明注射 AAV2 载体本身不会促进黄韧带肥厚的发生。与注射 AAV2 载体组相比，CRLF1 过表达可以明显促进四足站立小鼠黄韧带肥厚的形成（图 3-10A. b, c）。而抑制 CRLF1 的表达，可以降低双足站立所造成的小鼠黄韧带肥厚的形成（图 3-10A. e, f）。差异有统计学意义（ $p < 0.01$ ）（图 3-10B）。综上所述，这些数据表明 CRLF1 在小鼠黄韧带肥厚的形成中扮演着关键角色。

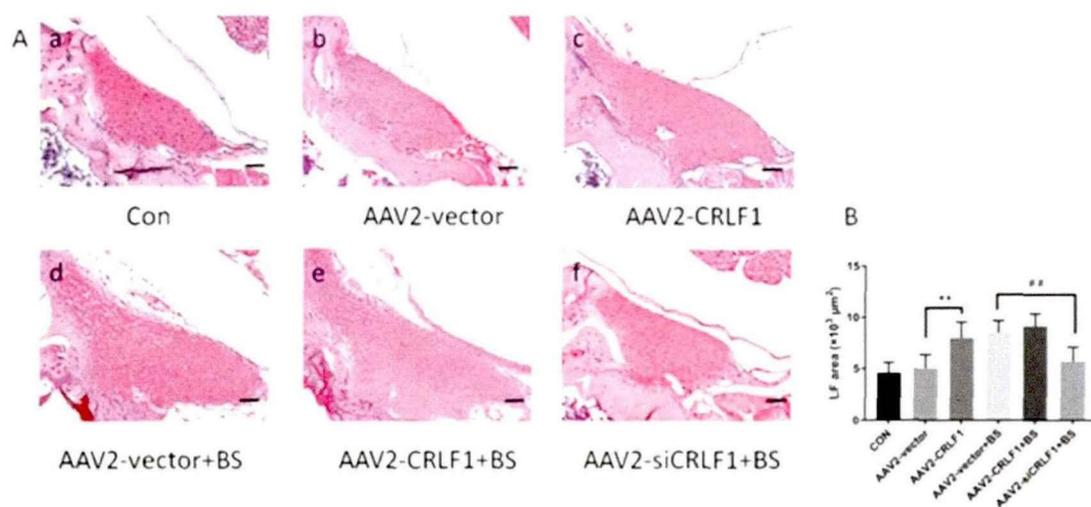


图3-10 CRLF1 在黄韧带肥厚的形成中起关键作用。(A)各组小鼠黄韧带 H&E 染色。(B) 各组小鼠黄韧带面积统计分析。与 AAV2 vector 组相比，AAV2-CRLF1 组明显促进小鼠黄韧带肥厚，(n = 8)，** $p < 0.01$ 。与 AAV2 vector+双足站立组相比，抑制 CRLF1 的表达，可以抑制双足站立引起的小鼠黄韧带肥厚的形成，(n = 8)，### $p < 0.01$ 。采用 One-way ANOVA 分析，比例尺 = 20 μm. Con = 对照组，BS=双足站立 10 周。

Figure 3-10 CRLF1 plays a key role in the formation of ligamentum flavum hypertrophy. (A) H&E staining of ligamentum flavum in each group. (B) Statistical analysis of the area of ligamentum flavum in each group. Compared with AAV vector group, AAV-CRLF1 group significantly promoted the hypertrophy of ligamentum flavum. (n = 8), ** $p < 0.01$. Compared with AAV2 vector + bipedal standing group, inhibition of CRLF1 expression can inhibit the formation of mouse ligamentum flavum hypertrophy caused by bipedal standing. (n = 8), ### $p <$

0.01. One-way ANOVA analysis was used, scale bars = 20 μm , Con = control group, BS = bipedal standing for 10 weeks.

4 讨论

尽管对黄韧带肥厚已有相关研究，但是多集中于研究黄韧带肥厚的病理改变。迄今为止，由于缺少简单可行的动物模型，黄韧带肥厚的分子机制依旧无法在体内进行验证。对黄韧带分子机制的研究也只是对常见的生长因子和炎症因子的促纤维化作用在人的黄韧带细胞中进行验证。另外，由于腰椎黄韧带退变既可能是衰老造成的退变引起，也可能是体重、工作姿势、活动度等机械因素造成的退变引起。由于目前没有实用的可以大量制作黄韧带肥厚动物模型的方法，主要的外部因素难以确定。

本章工作在前期研究的基础上^[15]，使用双足站立小鼠制作黄韧带肥厚动物模型，并用三维有限元分析研究了双足站立姿势对小鼠黄韧带受力特征的影响。在小鼠体内解释了黄韧带肥厚的主要外部因素，并为 CRLF1 作用的体内研究创建了实用的黄韧带肥厚动物模型。本章研究发现小鼠黄韧带外侧起自上下小关节的内侧边缘，并且主要位于该区域，轴向截面显示小鼠黄韧带为近似三角形，两侧的黄韧带以膜状的黄韧带链接。小鼠腰椎三维有限元分析发现，小鼠双足站立姿势可以有效模拟人腰椎前屈时的脊柱位置变化。双足站立时，小鼠的黄韧带应力和应变均发生了巨大变化，应力增加了 4944 倍，应变增加了 7703 倍。其数值之所以发生较大变化，我们考虑部分原因可能是在四足站立姿势时小鼠黄韧带受力过小引起。造模结束后对小鼠黄韧带面积测量时我们发现，双足站立小鼠可以引起黄韧带肥厚，而老龄小鼠的黄韧带面积虽然也有所增加，但是与对照组相比无统计学意义。所以，机械因素可能是黄韧带肥厚的主要外部因素。组织学染色发现，在双足站立小鼠模型中，黄韧带弹力纤维与胶原纤维的比值降低， α -SMA 阳性细胞的数量和 CRLF1 阳性细胞数量明显增加。这些变化与人肥厚黄韧带病理改变相同。虽然由于小鼠中黄韧带与椎管的比率明显小于

人类，使用双足站立小鼠不能用于建立椎管狭窄模型。但是，我们认为双足站立小鼠肥厚的黄韧带可以反映人类黄韧带肥厚的病理特征。

据我们所知，这是首个关于黄韧带肥厚分子机制的体内研究。结合以前的研究，我们首先验证了 AAV2 转染小鼠黄韧带的可行性。AAV2 是一种无包膜的微小病毒科病毒，其特征是非致病性、不整合染色体上的基因，并能赋予载体基因稳定表达数个月的能力^[23]。我们发现，原位注射 AAV2-CRLF1 过表达载体可显著增加黄韧带面积，而注射 AAV2-siCRLF1 可抑制两足站立小鼠的黄韧带肥厚。因此，我们认为 CRLF1 的上调导致了黄韧带细胞向肌成纤维细胞的转化和胶原纤维的分泌，从而引起了黄韧带的肥厚。

综上所述，我们成功的建立了小鼠黄韧带肥厚模型，并证明了力学因素是造成黄韧带肥厚的主要外部因素。在体内验证了抑制 CRLF1 表达可以减少黄韧带肥厚的形成。这为黄韧带肥厚的预防和治疗提供了一个极具吸引力的靶点。

5 全文总结

本课题旨在通过整合转录组和蛋白质组学数据，找到正常黄韧带和肥厚黄韧带中最大的差异蛋白，探讨其在黄韧带退变中的具体作用和调控机制，并构建新型小鼠黄韧带肥厚模型，在体内进行分子功能的验证，为黄韧带肥厚的研究、预防和治疗提供了新的方法和靶点。本研究主要结果：

1. 我们通过对正常和肥厚的黄韧带样本进行多组学分析，发现了 CRLF1 表达差异最大。组织学及 PCR 实验进一步证实了 CRLF1 的表达差异。免疫荧光双标技术确定了 CRLF1 来自于黄韧带中的肌成纤维细胞。说明内源性的 CRLF1 有可能参与了黄韧带肥厚的形成过程。

2. 利用成功培养的人黄韧带细胞，使用外源性哺乳动物来源成熟重组 rhCRLF1 蛋白，在体外实验中证实了 CRLF1 是一种独立的新的促纤维化因子。TGF- β 1 可以经 SMAD3 途径促进 CRLF1 mRNA 的转录。CRLF1 可以经 ERK1/2 通路在转录后水平调节纤维化相关因子的表达。抑制 CRLF1 可以降低多种刺激

诱导的纤维化。

3. 本课题组构建了新型小鼠黄韧带肥厚模型, 使用三维有限元分析证明了小鼠在双足站立姿态时, 黄韧带的应力和应变均有巨大改变。首次在动物模型中证实了机械应力是造成黄韧带肥厚的主要外部因素。并且, 利用 CRLF1 的过表达和抑制载体, 在体内证实了 CRLF1 在黄韧带肥厚过程中的关键作用。

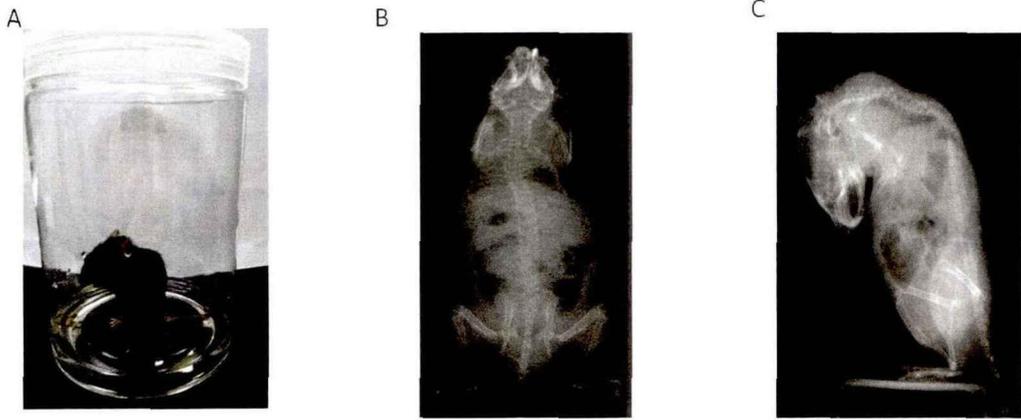
参考文献

- [1] Fukuyama S, Nakamura T, Ikeda T, et al. The effect of mechanical stress on hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum [J]. *J Spinal Disord*, 1995, 8(2): 126-30.
- [2] Sairyo K, Biyani A, Goel V, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments [J]. *Spine*, 2005, 30(23): 2649-56.
- [3] Hur J W, Kim B J, Park J H, et al. The Mechanism of Ligamentum Flavum Hypertrophy: Introducing Angiogenesis as a Critical Link That Couples Mechanical Stress and Hypertrophy [J]. *Neurosurgery*, 2015, 77(2): 274-81.
- [4] Moon H J, Park Y K, Ryu Y, et al. The angiogenic capacity from ligamentum flavum subsequent to inflammation: a critical component of the pathomechanism of hypertrophy [J]. *Spine*, 2012, 37(3): E147-55.
- [5] Shafaq N, Suzuki A, Terai H, et al. Cellularity and cartilage matrix increased in hypertrophied ligamentum flavum: histopathological analysis focusing on the mechanical stress and bone morphogenetic protein signaling [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2012, 25(2): 107-15.
- [6] Kong M H, Morishita Y, He W, et al. Lumbar segmental mobility according to the grade of the disc, the facet joint, the muscle, and the ligament pathology by using kinetic magnetic resonance imaging [J]. *Spine*, 2009, 34(23): 2537-44.

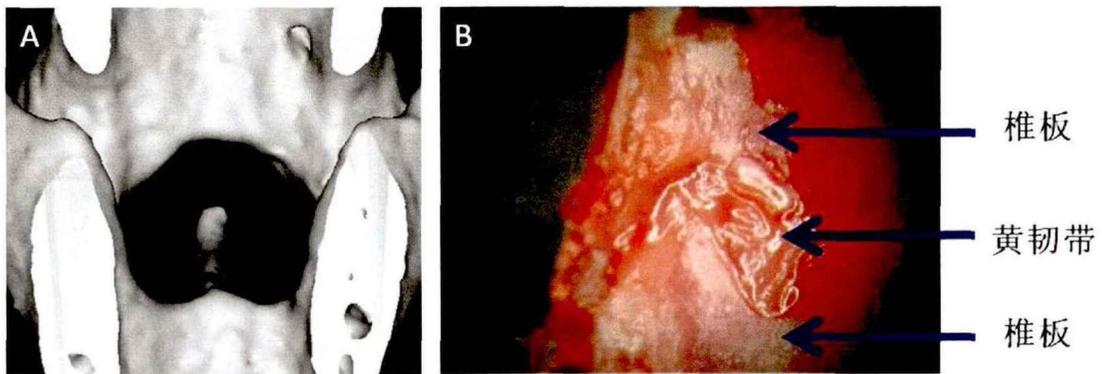
- [7] Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1 [J]. *Journal of orthopaedic research*, 2002, 20(6): 1380-6.
- [8] Park J B, Lee J K, Park S J, et al. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, 87(12): 2750-7.
- [9] Altinkaya N, Yildirim T, Demir S, et al. Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? [J]. *Spine*, 2011, 36(16): E1093-7.
- [10] Kosaka H, Sairyo K, Biyani A, et al. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis [J]. *Spine*, 2007, 32(25): 2805-11.
- [11] Sakamaki T, Sairyo K, Sakai T, et al. Measurements of ligamentum flavum thickening at lumbar spine using MRI [J]. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2009, 129(10): 1415-9.
- [12] Abbas J, Hamoud K, Masharawi Y M, et al. Ligamentum flavum thickness in normal and stenotic lumbar spines [J]. *Spine*, 2010, 35(12): 1225-30.
- [13] Saito T, Yokota K, Kobayakawa K, et al. Experimental Mouse Model of Lumbar Ligamentum Flavum Hypertrophy [J]. *PloS one*, 2017, 12(1): e0169717.
- [14] Hayashi K, Suzuki A, Abdullah Ahmadi S, et al. Mechanical stress induces elastic fibre disruption and cartilage matrix increase in ligamentum flavum [J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 13092.
- [15] Xiang Ao Liang W, Yan Shao, et al. Development and Characterization of a Novel Bipedal Standing Mouse Model of Intervertebral Disc and Facet Joint

- Degeneration [J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2019, 477(6): 1492-504.
- [16] Anne P, Stephen J F, Lutz P N, et al. Factors influencing stresses in the lumbar spine after the insertion of intervertebral cages: finite element analysis [J]. *European Spine Journal*, 2003, 12(4): 413-20.
- [17] Hsieh A H, Wagner D R, Cheng L Y, et al. Dependence of mechanical behavior of the murine tail disc on regional material properties [J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2005, 127(7): 1158-67.
- [18] Argoubi M, Shirazi A A. Poroelastic Creep Response Analysis of a Lumbar Motion Segment in Compression [J]. *Journal of Biomechanics*, 1996, 29(10): 1331-9.
- [19] Silva M J, Keaveny T M, Hayes W C. Load Sharing Between the Shell and Centrum in the Lumbar Vertebral Body [J]. *Spine*, 1997, 22(2): 140-50.
- [20] Lambers F M, Schulte F A, Kuhn G, et al. Mouse tail vertebrae adapt to cyclic mechanical loading by increasing bone formation rate and decreasing bone resorption rate as shown by time-lapsed in vivo imaging of dynamic bone morphometry [J]. *Bone*, 2011, 49(6): 1340-50.
- [21] Chen C S, Chien C K, Liu C L, et al. Stress analysis of the disc adjacent to interbody fusion in lumbar spine [J]. *Medical Engineering Physics*, 2001, 23(7): 483-91.
- [22] Tang J B, Cao Y, Zhu B, et al. Adeno-associated virus-2-mediated bFGF gene transfer to digital flexor tendons significantly increases healing strength. an in vivo study [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90(5): 1078-89.
- [23] Nixon A J, Watts A E, Schnabel L V. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration [J]. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 2012, 21(2): 278-94.

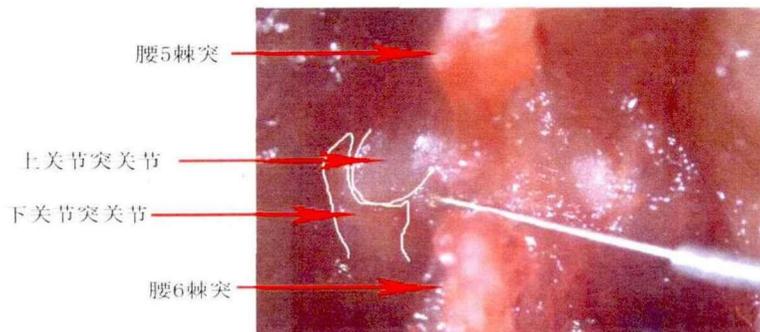
附录



(A) 在含水空间内，小鼠主要保持双足站立姿势。(B, C) 小鼠双足站姿时的 X 线。



术中椎管视角观察黄韧带位置。



黄韧带原位注射时的解剖关系。

攻读博士学位期间成果

1. 论文

1. **Zhenyu Zheng**, Taotao Zhou, Rong Hu, et al. A Specific Aggregation-Induced Emission-Conjugated Polymer Enables Visual Monitoring of Osteogenic Differentiation. (Bioactive Materials, IF: 8.7, online)

2. **Zhenyu Zheng**, Lei Qian, Xiang Ao, et al. Cytokine Receptor-Like Factor 1 Regulates Hypertrophy of the ligamentum flavum. (Frontiers in Cell and Developmental Biology, IF: 5.2, accepted)

3. **Zhenyu Zheng**, Lei Qian, Xiang Ao, et al. Experimental study of lumbar ligamentum flavum hypertrophy induced in bipedal mice. (Journal of Orthopaedic Translation, IF: 3.9, revision)

4. Jun Chu, Bo Yan, Xiang Ao, **Zhenyu Zheng**, Li Peng, J Zhang, et al. Casticin attenuates osteoarthritis-related cartilage degeneration by inhibiting the ROS-mediated Akt/NF- κ B pathway in vitro and in vivo. (Inflammation, IF: 2.9, online)

5. Yongxing Peng, **Zhenyu Zheng**, Weiguo Wang, Lin Liu, Feng Chen, Hongtao Xu, Zhang, Zhongmin. Mechanical stress is a vital factor causing hypertrophy of ligamentum flavum: A finite element analysis of ligamentum flavum stress in different models. (Orthopaedic Surgery, IF: 1.3, online)

2. 参与课题

项目名称：新型聚集诱导发光材料“点亮”示踪成骨分化的机制研究，项目批准号：2019A1515012074；广东省自然科学基金自助项目；（第一参与者）。

致 谢

时光荏苒，流年似水，3年的博士学习是我人生重要的转折点。回眸忆起那些走过的路，思绪万千，不经意间才发现，当初被录取的喜悦，仿佛就发生在昨日。过往的时光如一幅幅画卷渐次铺展，包含了如歌的岁月，似海的师恩，也包含了亲人、朋友和爱人的无私奉献。此刻，由衷的感恩所有关心和帮助过我的人们。

首先，衷心感谢我的导师张忠民教授。恩师平易近人，谆谆教诲如春风似瑞雨，使我受益匪浅，懂得了平易近人的处事方式。恩师对于医疗、科研工作的严谨求精态度，勇于创新的精神使我受益匪浅。我在科研和生活中的每一次进步都凝聚了导师的心血，感谢导师对我的帮助和鼓励。导师渊博的知识、豁达的胸怀、精湛的手术、严谨治学态度是我一生学习的榜样。

衷心地感谢师兄王亮博士帮助我完成的课题方向规划、实施和写作。在不断学习中我有了全新的科研思路，提高了科研能力，领略了科研的风采。

衷心感谢南医三院脊柱外科的黄敏军副主任医师、鄢博医师、汤嘉军医师，陈天宇医师，感谢他们帮助我收集了大量的临床标本和工作中的鼓励。

由衷地感谢我的师弟敖翔、李鹏、储俊、姜涛和茜蕾同学，正是他们前期的工作让实验有了合适的动物模型和力学分析基础，使得本课题得以顺利完成。

在此，最要感谢我的父母和亲人一直以来对我学业的支持和理解，正是他们无条件付出爱帮我了克服困难，不断向前。感谢我的妻子，这三年来你一直默默地奉献和付出，正是她的鼓励和安慰才使我乐观地面对生活，顺利完成学业。

最后，衷心感谢百忙之中参加论文评审和答辩的专家教授，正是他们的指导和宝贵建议才能使我们不断的完善，为解除人类疾苦做出贡献！

