

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.05.011

补肾活血方含药血清对过氧化氢诱导大鼠髓核细胞焦亡的作用*

张超,李兆勇[△]

(湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

摘要:目的 探讨补肾活血方含药血清对过氧化氢诱导大鼠髓核细胞焦亡的作用。方法 随机选取5只SD大鼠,灌胃给予3.597 g/kg补肾活血方,眼球取血,分离得含药血清;其余9只大鼠分离提取髓核细胞。用含0,5%,10%,20%,40%,80%,100%补肾活血方含药血清与髓核细胞孵育24 h,采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)测定细胞活力。将髓核细胞随机分为空白对照组(A组)、模型组(B组)及含药血清低、中、高剂量组(C₁组、C₂组、C₃组)。A组加入无血清培养基;B组加入400 μmol/L过氧化氢;C₁组、C₂组、C₃组分别预先用5%,10%,20%含药血清处理2 h,再用400 μmol/L过氧化氢孵育4 h。采用乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒测定其细胞活性,采用酶联免疫吸附法测定细胞上清液中白细胞介素1β(IL-1β)的表达水平,采用蛋白免疫印迹法测定细胞中p17、p20、半胱天冬蛋白酶1(caspase-1)、含NLR家族Pyrin域蛋白(NLRP3)、Gasdermin D(GSDMD)、Beclin 1、Rab5、Rab7、LC3 II/I蛋白的表达水平,采用丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒分别测量细胞中MDA和GSH的含量及SOD的活性。结果 与补肾活血方含药血清的培养基比较,5%,10%,20%含药血清培养基中细胞活力差异不显著($P>0.05$)。与B组比较,C₁组、C₂组、C₃组细胞上清液中IL-1β和GSDMD-NT、p17、p20、LC3 II/I蛋白的表达水平均显著减低,MDA含量显著减少($P<0.05$);与B组比较,C₂组、C₃组细胞上清液中SOD活性和Rab5、Rab7蛋白的表达水平均显著升高,GSH含量显著增加($P<0.05$)。结论 补肾活血方抑制了过氧化氢诱导大鼠髓核细胞的焦亡、NLRP3炎性小体的活化及氧化应激,促进了细胞自噬。但其物质基础复杂,主要活性成分和作用机制仍不清楚,有待进一步深入研究。

关键词: 补肾活血方;髓核细胞;焦亡;自噬;炎性小体

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)05-0049-06

Effect of Serum - Containing Bushen Huoxue Recipe on Hydrogen Peroxide - Induced Pyroptosis of Rat Nucleus Pulposus Cells

ZHANG Chao, LI Zhaoyong

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China 410007)

Abstract: Objective To investigate the effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on the pyroptosis of rat nucleus pulposus cells induced by hydrogen peroxide. **Methods** Five SD rats were randomly selected and given 3.597 g/kg of Bushen Huoxue Recipe by gavage, and their blood was taken from eyeballs to obtain serum - containing drug. Nucleus pulposus cells were isolated from other rats. The nucleus pulposus cells were incubated with 0, 5%, 10%, 20%, 40%, 80% and 100% of serum - containing Bushen Huoxue Recipe for 24 h, and the cell viability was measured by cell counting kit 8 (CCK-8) method. The nucleus pulposus cells were randomly divided into the blank control group (group A), model group (group B), serum - containing drug low - , medium - and high - dose groups (groups C₁, C₂ and C₃). The cells in group A were added with serum - free medium, and those in group B were added with 400 μmol/L of hydrogen peroxide (H₂O₂). The cells in groups C₁, C₂ and C₃ were pretreated with 5%, 10%, and 20% of serum - containing drug for 2 h, then incubated with 400 μmol/L of H₂O₂ for 4 h. The cell activity was measured by lactate dehydrogenase (LDH) kit, the expression level of interleukin - 1β (IL - 1β) in cell supernatant

*基金项目:湖南省自然科学基金青年基金项目[2020JJ5443]。

第一作者:张超,男,硕士,主治医师,研究方向为脊柱与脊髓疾病的诊治,(电子信箱)h15899225117@163.com。

[△]通信作者:李兆勇,男,硕士,医师,研究方向为脊柱与脊髓疾病的诊治,(电子信箱)191644929@qq.com。

安徽农业科学,2012,40(8):4547-4550.

[7] 吕子明,姜永涛,吴立军,等.人工蛹虫草子实体化学成分研究[J].中国中药杂志,2008,33(24):2914-2917.

[8] 秦向东,刘吉开.云芝化学成分研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2012,27(5):774-776.

[9] WELSCH SJ, UMKEHRER M, KALINSKI C, et al. Synthesis of substituted imidazolines by an Ugi / Staudinger / aza - Wittig sequence[J]. Tetrahedron Letters, 2015, 56(8):1025-1029.

[10] YU T, WEISS RG, YAMADA T, et al. Reversible room - tem-

perature ionic liquids: WO2008094846A1[P]. 2014-05-01.

[11] GONÇALVES RSB, PINHEIRO AC, DA SILVA ET, et al. Simple methodology for the preparation of amino alcohols from amino acid esters using NaBH₄ - methanol in THF [J]. Synthetic Communications, 2011, 41(9):1276-1281.

[12] GLUNZ PW, RICH DH. Reduction of sterically hindered α, α - disubstituted amino esters [J]. Synthetic Communications 1999, 29(5):835-842.

(收稿日期:2021-03-23;修回日期:2021-07-08)

was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the levels of p17, p20, caspase-1, NL-RP3, Gasdermin D (GSDMD), Beclin 1, Rab5, Rab7 and LC3 II/I protein were measured by Western blot. The contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and the activity of superoxide dismutase (SOD) were measured by the MDA, GSH and SOD kits.

Results There was no significant difference in cell viability between 5%, 10% and 20% medium with serum-containing Bushen Huoxue Recipe and medium without serum-containing Bushen Huoxue Recipe ($P > 0.05$). Compared with those in group B, the expression levels of IL-1 β , GSDMD-NT, p17, p20 and NLRP3 protein in the cell supernatant decreased significantly, while the content of MDA decreased significantly in groups C₁, C₂ and C₃ ($P < 0.05$). Compared with those in group B, the activity of SOD and the expression levels of Rab5, Rab7 and LC3 II/I protein in cell supernatant increased significantly, while the content of GSH increased significantly in groups C₂ and C₃ ($P < 0.05$). **Conclusion** Bushen Huoxue Recipe inhibits the hydrogen peroxide-induced pyroptosis of rat nucleus pulposus cells, the activation of NLRP3 inflammasome and oxidative stress, and promotes autophagy. However, its material basis is complex, and its main active components and mechanism are still unclear, which needs to be further studied.

Key words: Bushen Huoxue Recipe; nucleus pulposus cells; pyroptosis; autophagy; inflammasome

下腰痛主要由椎间盘退变(IDD)引起,IDD的发生和发展涉及氧化应激反应、感染、吸烟、外伤等^[1],疗法主要为对症治疗,无法治愈。椎间盘内部主要由髓核组成,髓核维持了细胞外基质的完整性和椎间盘的生物力学^[2]。在IDD期间,纤维环的破裂、软骨终板的退化及炎症会诱导活性氧产生,从而加重髓核细胞的氧化应激反应,加速细胞衰老和死亡^[3]。髓核细胞的减少和功能障碍是引发IDD的主要原因^[4],故缓解髓核细胞死亡是恢复椎间盘功能及延缓IDD病程的重要策略。细胞焦亡是由激活的半胱天冬酶1(caspase-1)介导的炎性细胞死亡^[5]。含NLR家族Pyrin域蛋白3(NLRP3)炎性小体是caspase-1的常见激活剂,由NLRP3、PYCARD、半胱天冬酶1酶原(pro-caspase-1)组成^[6]。细胞焦亡最显著的特征是依赖于caspase-1的激活,并伴随炎性细胞因子白细胞介素1 β (IL-1 β)和白细胞介素18(IL-18)的释放^[7]。IL-1 β 与IDD密切相关,高度表达于变性的椎间盘^[8]。补肾活血方由君药杜仲,臣药补骨脂、怀牛膝,佐使药丹参、威灵仙、木瓜组方,具有补肾强骨、活血通络功效,临床治疗椎间盘源性腰痛疗效较好^[9]。本研究中探讨了补肾活血方含药血清对过氧化氢诱导大鼠髓核细胞焦亡的作用,旨在为临床应用提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:A51119600C型酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);1658001型小型垂直电泳仪、1703930型小型转印槽(美国伯乐公司)。

试剂:细胞计数试剂盒8(CCK-8)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0037, C0016, S0131S, S0101S);谷胱甘肽(GSH)试剂盒(美国Abcam公司,批号为ab138881);IL-1 β 大鼠酶联免疫吸附试剂盒(美国Merck公司,批号为RAB0227);

IL-1 β , caspase-1, NLRP3, Gasdermin D(GSDMD), Beclin 1, Rab5, Rab7, LC3 II/I, β -肌动蛋白(β -actin)一抗,均购自美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为#12703, #24232s, #15101, #36425, #4122, #3547, #9367, #4108, #3700);0.25% II型胶原酶、胰蛋白酶、胎牛血清(美国Gibco公司);DMEM/F-12细胞培养基(美国HyClone公司,批号为SH30023,含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素);过氧化氢(美国Sigma公司,批号为88597);杜仲、补骨脂、怀牛膝、丹参、威灵仙、木瓜(湖南中医药大学第一附属医院,批号分别为190226, 192037, 183104, 180527, 191149, 202658),经谢朝晖主任药师鉴定为正品。

动物:SD大鼠14只,雄性,12周龄,体质量250~300 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0014,饲养环境温度20~25℃,相对湿度为50%~65%,明暗交替(12 h/12 h)适应性饲养。所有动物实验均经湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准。

1.2 方法

补肾活血方制备^[10]:取杜仲15 g,补骨脂10 g,怀牛膝10 g,丹参12 g,威灵仙10 g,木瓜9 g,加水没过药材表面3~5 cm,浸泡30 min,武火煮沸,文火煎煮30 min,过滤,将药液保存于干净的烧杯中,剩余药渣进行第2次煎煮;加水没过药材表面1~2 cm,武火煮沸,文火煎煮20 min,过滤,与第1次煎煮的药液混合,摇匀,约400 mL,水浴蒸发至每1 mL浸膏含生药2.97 g。

含药血清制备:随机选取5只SD大鼠,给药前禁食12 h,每千克体质量的用药量由标准动物剂量折算表^[11]计算确定,并根据公式(大鼠每日用药量=成人每日用药量/正常成人体质量×换算常数×校正系数)计算补肾活血方剂量。灌胃给予生药3.597 g/kg,每天1次,连续7 d。大鼠眼球取血2 mL,分离得血清,备用。

大鼠原代髓核细胞分离与培养^[12]:取3只SD大鼠,

腹腔注射 350 ~ 400 mg / kg 水合氯醛,深度麻醉,分离大鼠腰椎,用镊子分离椎间盘的髓核,切碎,用 0.25% II 型胶原酶于 37 °C 下消化 30 min,用 DMEM / F - 12 细胞培养基终止消化,1 500 r / min 离心 5 min,将细胞重悬,并接种至培养瓶,在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养,每 3 d 更换 1 次培养基。平行设置 3 组。

细胞活性测定:将髓核细胞接种于 96 孔板,密度为 5 × 10³ 个 / 孔,细胞贴壁后,弃去培养基,分别加入 0, 5%, 10%, 20%, 40%, 80%, 100% 含药血清,添加无血清培养基至 100 μL,每个浓度做 3 个复孔,培养 24 h。采用 CCK - 8 测定细胞活力,筛选细胞给药浓度。操作步骤按说明书进行。

细胞分组和处理:将髓核细胞接种于 12 孔板,密度为 1 × 10⁵ 个 / 孔,细胞贴壁后,弃去培养基。随机分为空白对照组(A组),模型组(B组),含药血清低、中、高剂量组(C₁组、C₂组、C₃组)。A组加入无血清培养基,B组加入 400 μmol / L 过氧化氢,C₁组、C₂组、C₃组的细胞分别预先用 5%, 10%, 20% 含药血清处理 2 h,用 400 μmol / L 过氧化氢孵育 4 h,备用。培养液终体积为 1 mL。

LDH 活性测定:分别吸取上述各组细胞培养上清液 50 μL,采用 LDH 试剂盒测量细胞 LDH 活性,操作步骤严格按说明书进行。

IL - 1β 水平测定:分别吸取上述各组细胞培养上清液 50 μL,采用 IL - 1β 大鼠酶联免疫吸附试剂盒测量细胞中 IL - 1β 的水平,操作步骤严格按说明书进行。

p17 和 p20 表达水平测定^[13]:用 10% 三氯乙酸沉淀蛋白,用预冷的丙酮洗涤,2 × 上样缓冲液溶解,采用免疫蛋白印迹法测定 p17 和 p20 的表达水平。

NLRP3, GSDMD, Beclin 1, Rab5, Rab7, LC3 II / I 蛋白表达水平测定:分别吸取上述各组细胞上清液,提取蛋白质,采用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE 分离蛋白,转移至聚偏二氟乙烯膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 90 min,与特异性抗体(caspase - 1, NLRP3, GSDMD, Beclin 1, Rab5, Rab7, LC3 II / I, β - actin, 按 1:1 000 稀释)于 4 °C 下孵育,过夜,与合适的辣根过氧化物酶偶联二抗(按 1:1 000 稀释)室温孵育 90 min。采用增强型化学发光试剂于曝光仪下显色,使用 Image 灰度扫描。

MDA 含量测定:分别吸取上述各组细胞培养上清液 50 μL,采用硫代巴比妥酸法测量细胞内 MDA 的含量,严格按 MDA 试剂盒说明书进行。

GSH 含量和 SOD 活性测定:用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,采用蛋白质定量法测量细胞中 GSH 含量和 SOD 活性,严格按 GSH 和 SOD 试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad 5.0 统计学软件分析。结果采用 $\bar{X} \pm s$

表示,单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对髓核细胞活力的影响

与空白含药血清培养基比较,100%, 80%, 40% 含药血清培养基中细胞活力均显著下降($P < 0.05$), 20%, 10%, 5% 含药血清培养基中细胞活力差异不显著($P > 0.05$),故最终选择 20%, 10%, 5% 含药血清。

表 1 补肾活血方含药血清对髓核细胞活力的影响($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 1 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on the activity of nucleus pulposus cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)			
含药血清	细胞活力	含药血清	细胞活力
0	99.73 ± 3.15	40%	88.03 ± 2.47*
5%	97.97 ± 2.48	80%	71.90 ± 2.04*
10%	98.63 ± 3.22	100%	63.63 ± 4.04*
20%	98.50 ± 2.59		

注:与空白含药血清培养基比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those of drug - free serum, * $P < 0.05$.

2.2 对髓核细胞焦亡的影响

与 A 组比较,B组细胞上清液中 IL - 1β、GSDMD - NT 蛋白的水平、LDH 活性均显著升高($P < 0.05$);与 B 组比较,C₁组、C₂组、C₃组细胞上清液中 IL - 1β、GSDMD - NT 蛋白的表达水平、LDH 活性均显著降低($P < 0.05$)。详见表 2 和图 1。

表 2 补肾活血方含药血清对髓核细胞 IL - 1β 含量和 LDH 活性的影响($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 2 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on IL - 1β content and LDH activity of nucleus pulposus cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	IL - 1β (pg / mL)	LDH (%)
A 组	57.63 ± 11.33	15.44 ± 4.25
B 组	975.00 ± 73.16 [#]	79.92 ± 4.18 [#]
C ₁ 组	794.00 ± 49.68*	65.44 ± 4.26*
C ₂ 组	570.40 ± 34.44*	55.10 ± 3.99*
C ₃ 组	446.20 ± 52.39*	45.42 ± 2.11*

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,* $P < 0.05$ 。表 3 至表 5、图 1 至图 3 同。

Note: Compared with those in group A, * $P < 0.05$ (for Tab. 2 - 5 and Fig. 1 - 3); Compared with those in group B, * $P < 0.05$ (for Tab. 2 - 5 and Fig. 1 - 3).

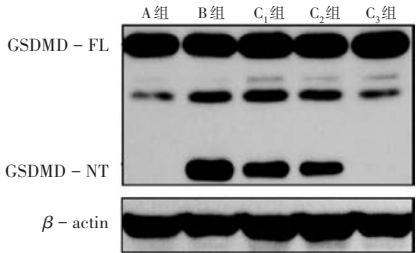


图 1 补肾活血方含药血清对髓核细胞 GSDMD 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Fig. 1 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on the expression of GSDMD protein in nucleus pulposus cells ($n = 3$)

2.3 对髓核细胞 NLRP3 炎性小体活化的影响

与A组比较,B组细胞上清液中p17,p20,NLRP3的表达水平均显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C₁组、C₂组、C₃组细胞上清液中p17,p20,NLRP3的表达水平均显著降低($P > 0.05$)。详见表3和图2。

表3 补肾活血方含药血清对髓核细胞NLRP3炎性小体活化的影响($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 3 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on the activation of NLRP3 inflammasome of nucleus pulposus cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	p17 / pro - IL - 1 β	p20 / pro - caspase1	NLRP3 / β - actin
A组	0.41 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.09
B组	1.00 $\pm$ 0.09 [#]	1.00 $\pm$ 0.07 [#]	1.00 $\pm$ 0.11 [#]
C ₁ 组	0.85 $\pm$ 0.03 [*]	0.47 $\pm$ 0.06 [*]	0.80 $\pm$ 0.05 [*]
C ₂ 组	0.68 $\pm$ 0.02 [*]	0.28 $\pm$ 0.03 [*]	0.77 $\pm$ 0.09 [*]
C ₃ 组	0.52 $\pm$ 0.07 [*]	0.26 $\pm$ 0.02 [*]	0.56 $\pm$ 0.05 [*]

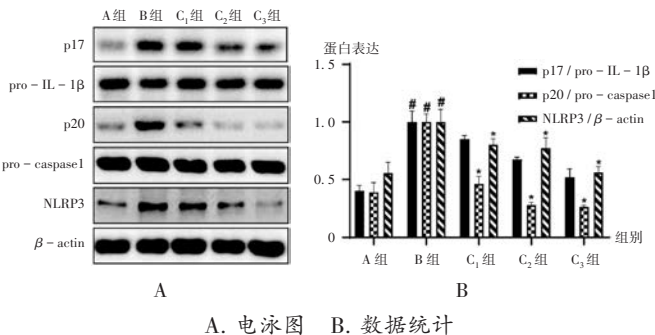


图2 补肾活血方含药血清对髓核细胞NLRP3炎性小体活化的影响($n = 3$)

A. Electrophoretogram B. Data statistics

Fig. 2 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on the activation of NLRP3 inflammasome of nucleus pulposus cells ($n = 3$)

2.4 对髓核细胞氧化应激的影响

与A组比较,B组细胞中MDA含量显著增加,SOD活性显著降低,GSH含量显著减少($P < 0.05$);与B组比较,C₁组、C₂组、C₃组细胞中MDA含量均显著减少($P < 0.05$);与B组比较,C₂组、C₃组细胞中SOD活性均显著升高,GSH含量均显著增加($P < 0.05$)。详见表4。

表4 补肾活血方含药血清对髓核细胞氧化应激的影响($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 4 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on oxidative stress of nucleus pulposus cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	MDA(nmol / mg)	SOD(U / mg)	GSH(μ mol / g)
A组	1.38 $\pm$ 0.16	155.10 $\pm$ 11.96	30.63 $\pm$ 3.67
B组	4.31 $\pm$ 0.16 [#]	54.76 $\pm$ 6.78 [#]	10.79 $\pm$ 1.81 [#]
C ₁ 组	3.88 $\pm$ 0.11 [*]	69.68 $\pm$ 7.81	13.47 $\pm$ 2.25
C ₂ 组	3.67 $\pm$ 0.12 [*]	77.12 $\pm$ 6.74 [*]	18.62 $\pm$ 1.48 [*]
C ₃ 组	3.27 $\pm$ 0.10 [*]	85.76 $\pm$ 4.66 [*]	18.91 $\pm$ 1.48 [*]

2.5 对髓核细胞自噬信号活化的影响

与A组比较,B组细胞中Beclin 1的蛋白表达水平

显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,C₁组、C₂组、C₃组细胞中Beclin 1的蛋白表达水平显著降低,LC3 II / I的表达水平均显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C₂组、C₃组细胞中Rab5和Rab7的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。详见表5和图3。

表5 补肾活血方含药血清对髓核细胞自噬信号活化的影响($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 5 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on autophagy signal activation of nucleus pulposus cells ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	Rab5	Rab7	Beclin 1	LC3 II / I
A组	1.11 $\pm$ 0.09	0.89 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.04
B组	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.07 [#]	1.00 $\pm$ 0.07
C ₁ 组	1.22 $\pm$ 0.12	1.47 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.05 [*]	1.57 $\pm$ 0.17 [*]
C ₂ 组	1.60 $\pm$ 0.11 [*]	1.48 $\pm$ 0.14 [*]	0.34 $\pm$ 0.04 [*]	2.46 $\pm$ 0.14 [*]
C ₃ 组	1.68 $\pm$ 0.09 [*]	1.53 $\pm$ 0.05 [*]	0.28 $\pm$ 0.03 [*]	4.04 $\pm$ 0.09 [*]

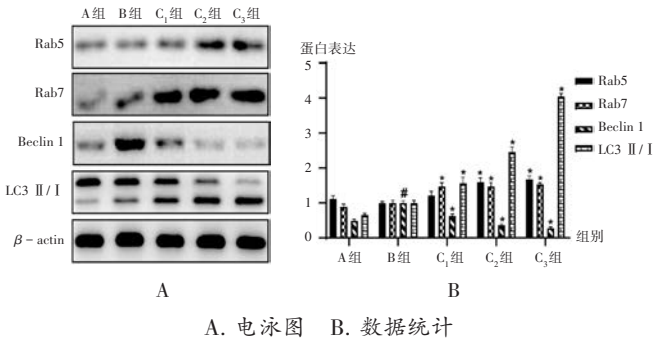


图3 补肾活血方含药血清对髓核细胞自噬信号活化的影响($n = 3$)

A. Electrophoretogram B. Data statistics

Fig. 3 Effect of serum - containing Bushen Huoxue Recipe on oxidative stress of nucleus pulposus cells ($n = 3$)

3 讨论

椎间盘包括1个内部富含聚集蛋白聚糖的凝胶状髓核和1个外部富含胶原蛋白I的纤维软骨纤维环,其上方和下方均由透明软骨终板交界^[14]。IDD涉及与年龄相关的变化及多种压力因素引起的组织损伤,氧化反应介导的髓核细胞死亡与IDD发生和发展密切相关^[15]。

中医学理论认为,IDD由于肾气不足,感受风、寒、湿邪,或由劳累外伤、损伤筋骨,致气血运行不畅、经脉瘀阻而成。根据中医“久病入络”理论,多数患者还兼有瘀阻,故IDD的发生与肾虚血瘀密切相关。临床应用补肾活血方并配合功能锻炼,腰椎术后患者的髓核细胞轮廓明显,可促进其功能恢复^[16-17],提示补肾活血方可通过抑制髓核细胞的减少而预防IDD患者组织中的caspase - 1,IL - 1 β ,IL - 18呈高表达,髓核细胞中活性氧的水平也升高,通常采用过氧化氢诱导髓核细胞焦亡,探讨髓核细胞减少的病理和干预机制^[18-19]。诱导细胞焦亡的典型途径是caspase - 1依赖性的,危险相关

和病原体相关的分子模式均可激活;非典型途径是 caspase - 4 / 5 或 caspase - 11 依赖性的,通常被革兰阴性菌的脂多糖激活^[20]。由于椎间盘是一个无菌环境,故本研究中主要探讨补肾活血方含药血清对过氧化氢诱导髓核细胞焦亡典型途径激活的影响。

由表2可知,过氧化氢(400 $\mu\text{mol/L}$)处理髓核细胞4 h可明显促进细胞LDH和IL - 1 β 释放,上调GSDMD - NT蛋白的表达。GSDMD是介导细胞焦亡的重要蛋白,caspase - 1活化可裂解GSDMD,释放GSDMD - NT,形成gasdermin孔,细胞内外物质均可通过gasdermin孔进行交换,使细胞体积增大,导致细胞膜破裂,发生细胞焦亡^[21]。补肾活血方含药血清可以明显抑制过氧化氢(400 $\mu\text{mol/L}$)诱导的髓核细胞中LDH和IL - 1 β 的释放,下调GSDMD - NT蛋白的表达,表明补肾活血方含药血清可抑制髓核细胞焦亡。同时,可下调髓核细胞中p17, p20, NLRP3蛋白的表达,表明补肾活血方含药血清可通过抑制NLRP3炎性小体相关成分蛋白的表达而延缓髓核细胞的焦亡。

血管生成和炎症会加重髓核细胞的氧化应激,并导致IDD的发生和发展,故需缓解自由基引起的损害,防止恶性循环^[22]。另外,氧化反应和caspase - 1激活间的关系随情况而变化,如活性氧的产生可抑制还原型辅酶II介导的巨噬细胞和单核细胞caspase - 1的活性,以及SOD1缺陷型小鼠巨噬细胞中caspase - 1的活化^[23-24]。由表3可知,过氧化氢(400 $\mu\text{mol/L}$)可促进髓核细胞中MDA释放,降低GSH含量和SOD活性。MDA是反映组织损伤及氧化反应的重要参数,主要与机体的脂质氧化速率和强度有关。GSH是机体内的重要调节代谢物质,与细胞内的抗氧化和解毒有关。SOD是一种重要的抗氧化金属酶,在机体的氧化和抗氧化反应系统中具有重要调节作用。补肾活血方含药血清可抑制过氧化氢(400 $\mu\text{mol/L}$)诱导的髓核细胞的MDA释放,并升高GSH含量,增强SOD活性,表明补肾活血方抑制了髓核细胞的氧化反应。

自噬是一种保守的细胞行为,可维持细胞内稳态,通过溶酶体降解错误折叠的蛋白质和功能失调的细胞器^[25],涉及肿瘤、糖尿病、衰老、神经退行性疾病、炎症、肝病等多种疾病。氧化应激可加速自噬形成,而自噬可通过降解氧化物质和破坏线粒体而减少氧化损伤。自噬在过氧化氢诱导髓核细胞焦亡过程中具有重要作用,参与IDD的病理和发展^[12]。由表4可知,与模型组比较,含药血清、中、高剂量组髓核细胞中Rab5, Rab7, LC3 II / I的表达水平显著升高,表明补肾活血方激活了髓核细胞的自噬过程。

综上所述,补肾活血方抑制了过氧化氢诱导的细胞焦亡、NLRP3炎性小体的活化及氧化应激,促进了细

胞自噬。该研究结果可为临床应用补肾活血方提供一定的依据,但补肾活血方物质基础复杂,主要活性成分和机制仍不清楚,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] FENG CC, LIU H, YANG MH, et al. Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: causes and molecular pathways[J]. Cell Cycle, 2016, 15(13): 1674 - 1684.
- [2] VO N, NIEDERNHOFER LJ, NASTO LA, et al. An overview of underlying causes and animal models for the study of age - related degenerative disorders of the spine and synovial joints[J]. J Orthop Res, 2013, 31(6): 831 - 837.
- [3] SHAMJI MF, SETTON LA, JARVIS W, et al. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(7): 1974 - 1982.
- [4] KIM KW, CHUNG HN, HA KY, et al. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs[J]. Spine J, 2009, 9(8): 658 - 666.
- [5] MIAO EA, LEAF IA, TREUTING PM, et al. Caspase - 1 - induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria[J]. Nat Immunol, 2010, 11(12): 1136 - 1142.
- [6] SHEN JL, XU SX, ZHOU H, et al. IL - 1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41067.
- [7] NASTO LA, ROBINSON AR, NGO K, et al. Mitochondrial - derived reactive oxygen species (ROS) play a causal role in aging-related intervertebral disc degeneration[J]. J Orthop Res, 2013, 31(7): 1150 - 1157.
- [8] LE MAITRE CL, FREEMONT AJ, HOYLAND JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc[J]. J Pathol, 2004, 204(1): 47 - 54.
- [9] 朱立国, 展嘉文, 冯敏山, 等. 补肾活血方治疗椎间盘源性腰痛的临床观察[J]. 世界中医药, 2017, 12(3): 554 - 557.
- [10] 梁世香. 中药煎煮的基本方法与注意事项[J]. 今日药学, 2008, 18(2): 38 - 39.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069 - 1072.
- [12] HE RJ, CUI M, LIN H, et al. Melatonin resists oxidative stress - induced apoptosis in nucleus pulposus cells[J]. Life Sci, 2018, 199: 122 - 130.
- [13] YE JZ, ZENG B, ZHONG MY, et al. Scutellarin inhibits caspase - 11 activation and pyroptosis in macrophages via regulating PKA signaling[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(1): 112 - 126.
- [14] HUANG YC, HU Y, LI Z, et al. Biomaterials for intervertebral disc regeneration: current status and looming challenges[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(11): 2188 - 2202.
- [15] BAI ZB, LIU W, HE DS, et al. Protective effects of autophagy and NFE2L2 on reactive oxygen species - induced pyroptosis