

牛膝多糖通过 SIRT3/Parkin 调控的线粒体自噬减轻 IL-1 β 诱导的大鼠髓核细胞氧化应激和 NLRP3 炎性小体活化

黄家俊¹, 吴迪友¹, 陶广义¹, 赵 宇¹, 黄俊卿^{2*}, 杨 彬^{2*}

1. 河南中医药大学骨伤学院, 河南 郑州 450000

2. 河南省中医院, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 探究牛膝多糖 (*Achyranthis Bidentatae Radix* polysaccharides, ABPS) 对髓核细胞退变的保护作用及其机制。方法 分离大鼠椎间盘髓核细胞, 采用白细胞介素-1 β (interleukin1 β , IL-1 β) 处理构建髓核细胞退变模型, 将细胞分为对照组、IL-1 β 组、ABPS (100 mg/L) + IL-1 β 组、ABPS (200 mg/L) + IL-1 β 组, 研究 ABPS 对 IL-1 β 处理大鼠髓核细胞增殖、氧化应激、NOD 样受体蛋白 3 (NOD-Like Receptor Protein 3, NLRP3) 和线粒体自噬的影响。采用慢病毒技术转染帕金森病蛋白 2 (Parkinson disease protein 2, Parkin) shRNA, 随后采用 IL-1 β 和 ABPS 处理, 研究线粒体自噬在 ABPS 抑制 IL-1 β 处理髓核细胞氧化应激和 NLRP3 炎性小体活化中的作用。将细胞分为对照组、IL-1 β 组、ABPS + IL-1 β 组、ABPS + IL-1 β + 沉默信息调节因子 3 (silent information regulators 3, SIRT3) 抑制剂 (3-TYP) 组, 研究 SIRT3 在 ABPS 调控细胞线粒体自噬中的作用。免疫荧光法检测细胞增殖核抗原 (proliferation related Ki 67 antigen, Ki67) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 以及微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light 3, LC3) 与线粒体的共定位情况; 流式细胞术检测细胞周期分布; Western blotting 检测 II 型胶原 (type II Collagen)、蛋白聚糖 (aggrecan)、活化型 Caspase-3 (cleaved Casase-3)、NLRP3、Caspase-1、Parkin、LC3、选择性自噬接头蛋白-1 (sequestosome-1, SQSTM1/p62)、研究 SIRT3、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 以及 Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白表达; 原位末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 检测细胞凋亡; 荧光探针检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 和线粒体活性氧 (mitochondrial ROS, mtROS); 比色法检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平。结果 与对照组比较, IL-1 β 组髓核细胞存活率、type II Collagen 和 aggrecan 水平以及 Ki67 荧光强度均显著降低 ($P < 0.05$), 而 G₀/G₁ 期细胞分布比例则明显升高 ($P < 0.05$)。与 IL-1 β 组比较, ABPS 处理组细胞存活率、type II collagen 和 aggrecan 蛋白水平以及 Ki67 荧光强度升高 ($P < 0.05$), G₀/G₁ 期细胞分布比例明显降低 ($P < 0.05$)。此外, 与对照组比较, IL-1 β 组髓核细胞中 SOD 和 GSH 水平降低 ($P < 0.05$), MDA、ROS、TUNEL 阳性细胞、NLRP3、Caspase-3、cleaved Caspase-3 和 Caspase-1 蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$)。ABPS 处理逆转了 IL-1 β 处理对髓核细胞氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化的影响。此外, ABPS 处理减弱了 IL-1 β 处理诱导的髓核细胞 MMP 降低和 mtROS 升高 ($P < 0.05$)。ABPS 增强了 IL-1 β 处理髓核细胞中 Parkin 和 LC3 的表达 ($P < 0.05$), SQSTM1/p62 蛋白表达进一步降低 ($P < 0.05$)。Parkin shRNA 阻断了 ABPS 对 IL-1 β 处理髓核细胞线粒体自噬、氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体的影响 ($P < 0.05$)。此外, IL-1 β 处理组髓核细胞中的 SIRT3 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), ABPS 处理后细胞中的 SIRT3 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。3-TYP 阻断了 ABPS 对 IL-1 β 处理髓核细胞中 Parkin 介导线粒体自噬的调节作用 ($P < 0.05$)。结论 ABPS 可通过调控 SIRT3/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬, 减轻 IL-1 β 诱导的髓核细胞氧化应激和 NLRP3 炎性小体活化。

关键词: 牛膝多糖; 髓核细胞; 沉默信息调节因子 3; 帕金森蛋白; 线粒体自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)05-1652-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.05.016

Achyranthis Bidentatae Radix polysaccharides attenuate IL-1 β -induced oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in rat myeloid cells via SIRT3/Parkin-regulated mitophagy

收稿日期: 2024-09-13

基金项目: 2023 年体育局课题研究项目 (202320); 全国中医临床特色技术传承人才项目 [国中医药人教教育便函 (2019) 96 号]; 2024 年河南省中医药课题专项课题 (2024ZY2066)

作者简介: 黄家俊, 硕士研究生, 从事中医药防治脊柱和脊柱相关疾病的临床研究。E-mail: huangjiajun0825@163.com

*通信作者: 杨 彬, 副主任中医师, 研究方向为中医药防治脊柱和脊柱相关疾病的临床研究。E-mail: byang007@126.com

黄俊卿, 主任中医师, 研究方向为中医药防治脊柱和脊柱相关疾病的临床研究。E-mail: 13939003396@139.com

HUANG Jiajun¹, WU Diyou¹, TAO Guangyi¹, ZHAO Yu¹, HUANG Junqing², YANG Bin²

1. College of Orthopedics and Traumatology, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

2. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective The aim of this study is to investigate the protective effect of *Achyranthes Bidentata* polysaccharides (ABPS) against degeneration of nucleus pulposus cells (NCPs) and its possible mechanisms. **Methods** Rat intervertebral disc NCPs were isolated and treated with interleukin-1 β (IL-1 β) to construct a model of NCP degeneration. The cells were divided into control group, IL-1 β group, ABPS (100 mg/L) + IL-1 β group, and ABPS (200 mg/L) + IL-1 β group to investigate the effects of ABPS on proliferation, oxidative stress, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and mitophagy in IL-1 β -treated rat NCPs. To investigate the role of mitophagy in ABPS-mediated inhibition of IL-1 β -induced oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in NCPs, lentiviral vector-mediated transfection of Parkinson disease protein 2 (Parkin) short hairpin RNA (shRNA) was performed, followed by treatment with IL-1 β and ABPS. To examine the role of silent information regulators 3 (SIRT3) in ABPS regulation of mitophagy, cells were divided into four groups: control, IL-1 β , ABPS + IL-1 β , and ABPS + IL-1 β + 3-TYP. Immunofluorescence was employed to examine the co-localization of cell proliferation-related Ki 67 antigen (Ki67), cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3), and microtubule-associated protein 1 light 3 (LC3) with mitochondria. Flow cytometry was performed for cell cycle analysis. Western blotting was used to detect protein expression levels of type II Collagen, aggrecan, cleaved Caspase-3, NLRP3, Caspase-1, Parkin, LC3, sequestosome-1 (SQSTM1/p62), SIRT3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2 associated X protein (Bax). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) was employed to detect cell apoptosis. Fluorescent probes were used to assess reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP), and mitochondrial ROS (mtROS). Colorimetric assays were performed to measure the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA). **Results** Compared with the control group, the viability of NCPs, type II Collagen and aggrecan levels, and proliferation related Ki67 fluorescence intensity were significantly decreased in the IL-1 β group ($P < 0.05$), while the distribution ratio of cells in G₀/G₁ phase was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the IL-1 β group, cell viability, type II Collagen and aggrecan protein levels, and Ki67 fluorescence intensity were increased in the ABPS-treated group ($P < 0.05$), while the distribution ratio of cells in G₀/G₁ phase was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of SOD and GSH in NCPs were decreased in the IL-1 β group ($P < 0.05$), and the levels of MDA, ROS, TUNEL-positive cells, NLRP3, Caspase3, cleaved Caspase-3, and Caspase1 were significantly increased ($P < 0.05$). ABPS treatment reversed the effects of IL-1 β treatment on oxidative stress, apoptosis and NLRP3 inflammasome activation in NCPs. In addition, ABPS treatment attenuated the IL-1 β -induced reduction of MMP and increase of mtROS in NCPs ($P < 0.05$). ABPS enhanced the expression of Parkin and LC3 in IL-1 β -treated NCPs ($P < 0.05$), and SQSTM1/p62 protein expression was further reduced ($P < 0.05$). Parkin shRNA blocked the effects of ABPS on mitophagy, oxidative stress, apoptosis, and NCPs3 inflammasome in IL-1 β -treated NCPs ($P < 0.05$). The level of SIRT3 protein in NCPs from IL-1 β -treated group was decreased ($P < 0.05$) and increased ($P < 0.05$) in ABPS-treated cells. 3-TYP blocked the regulation of ABPS on Parkin-mediated mitophagy in IL-1 β -treated NCPs ($P < 0.05$). **Conclusion** ABPS attenuates IL-1 β -induced NCPs oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation by modulating SIRT3/Parkin signaling pathway-mediated mitophagy.

Key words: *Achyranthis Bidentatae Radix* polysaccharides; nucleus pulposus cells; silent information regulators 3; Parkinson protein; mitophagy

下腰痛 (lower back pain, LBP) 是增加残疾率的最重要原因之一。LBP 的发病率逐年上升, 造成了巨大的经济和医疗负担^[1]。椎间盘 (intervertebral disk, IVD) 退化是导致腰背痛的主要风险因素^[2]。作为 IVD 的主要功能细胞, 髓核细胞参与细胞外基质 (extracellular Matrix, ECM) 的合成, 在维持 IVD 的平衡方面发挥着重要作用^[3]。髓核细胞的退化最终会导致 IVD 生物力学功能的丧失。因此, 延缓髓核细胞退化和保持髓核数量对于预防和治疗 IVD 退化非常重要。既往的研究表明, IVD 微环境导致的

氧化应激和髓核细胞过度凋亡在 IVD 退化的发病机制中发挥着重要作用^[4-5]。此外, 最新研究发现, NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性体的激活失调与 IVD 退化密切相关^[6]。靶向 NLRP3 炎性小体可减轻氧化应激诱导的髓核细胞中 ECM 的降解和细胞凋亡^[7]。在髓核细胞中, NLRP3 炎症小体的激活促进了炎症因子水平的提高, 从而推动了 IVD 退化的进程^[8]。

线粒体自噬是自噬的一种特殊类型, 可选择性地降解损伤的线粒体并维持线粒体的平衡。越来越

多的研究表明,线粒体功能障碍与许多退行性疾病(包括 IVD 退化)密切相关^[9]。有研究表明,诱导线粒体自噬可通过清除损伤的线粒体、降低 ROS 水平、抑制 NLRP3 炎症小体的激活以及髓核细胞凋亡来延缓 IVD 退化过程^[6]。去乙酰化酶 3 (silent information regulator 3, SIRT3) 线粒体的主要组成部分,与包括有丝分裂、炎症、细胞凋亡和衰老在内的许多生理和病理过程的调控密切相关^[10]。SIRT3 的损伤会扰乱线粒体氧化还原平衡,加剧退变髓核细胞的凋亡,而恢复 SIRT3 则会产生相反的效果^[11]。尽管如此,SIRT3 在 IVD 退化过程中调控有丝分裂的潜在作用仍有待揭示。

牛膝多糖 (*Achyranthis Bidentatae Radix polysaccharides*, ABPS) 是从牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根中提取的,临床和药理研究表明,ABPS 具有免疫调节、抗炎和抗氧化的作用^[12-14]。Fu 等^[15]研究发现,ABPS 可调节 ECM 的平衡,从而减缓骨关节炎期间软骨退化的过程。在 IVD 退化的病理过程中,髓核细胞会释放大量炎症因子,从而引发一连串与退化过程相关的事件^[16]。根据相关文献,白细胞介素-1 β (interleukin1 β , 1L-1 β) 常用于构建髓核细胞退化的模型^[17]。本研究检测了 ABPS 对 1L-1 β 诱导的髓核细胞中氧化应激、细胞凋亡和 NLRP3 炎症小体活化的影响,以及其抗髓核细胞变性的潜在分子机制,尤其是关注 SIRT3 介导的有丝分裂。本研究为临床预防和治疗 IVD 退化提供参考。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠,6 周龄,体质量 170~190 g,购自郑州华兴实验动物中心,动物许可证编号 SCXK 2019-0002。大鼠饲养于温度 22℃、相对湿度 (50±5)% 的环境,光照与黑暗各 12 h。所有实验方案均经河南省中医院中心实验室动物伦理委员会批准 (伦理号 PZ-HNSZY-2022-014)。

1.2 药品与试剂

牛膝 (批号 Y231101) 购自四川春盛药业集团股份有限公司,经河南省中医院焦伟杰副主任中药师鉴定为苋科植物牛膝 *A. bidentata* Bl. 的干燥根。

II 型胶原酶 (type II collagen, 批号 C2-BIOC)、IL-1 β (批号 SRP3083) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;DMEM-F12 培养基 (批号 SLM-243-B) 购自美

国 Gibco 公司;1%青霉素/链霉素 (批号 G4003)、0.25%胰酶-EDTA (批号 G4010) 购自中国武汉 Servicebio 公司。转染试剂 (批号 1168027)、CMXRos 荧光探针 (批号 M7512) 购自美国 Invitrogen 公司;Parkin shRNA (批号 sc-270243-V) 购自美国 Santa Cruz;DCFH-DA 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 探针 (批号 HY-D0940) 和 SIRT3 抑制剂 3-TYP (批号 HY-108331) 购自美国 MedChemExpress 公司;QuickBlock 免疫染色封闭液 (批号 P0260)、细胞增殖核抗原 (proliferation related Ki 67 antigen, Ki67) 抗体 (批号 AF1738)、FITC 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 荧光二抗 (批号 A0562)、Cy3 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 荧光二抗 (批号 A0516)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液 (批号 C1005)、细胞计数-8 试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8, 批号 C0038)、细胞周期检测试剂盒 (批号 C1052)、蛋白酶抑制剂混合物 (批号 P1005)、RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (批号 A0208)、原位末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 凋亡检测试剂盒 (批号 C1089)、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 检测试剂盒 (批号 C2006) 购自中国上海碧云天生物技术有限公司;Type II collagen 抗体 (批号 AF0135)、蛋白聚糖 (aggrecan) 抗体 (批号 DF7561)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 AF7021)、NLRP3 抗体 (批号 DF7438)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 抗体 (批号 AF5418)、SIRT3 抗体 (批号 AF5135)、帕金森疾病蛋白 2 (Parkinson disease protein 2, Parkin) 抗体 (批号 AF0235)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light 3, LC3) 抗体 (批号 AF5402)、选择性自噬接头蛋白-1 (sequestosome-1, SQSTM1/p62) 抗体 (批号 AF5384)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 AF6139)、Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 AF0120)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 AF6311)、活化型 Caspase-3 (cleaved Casase-3) 抗体 (批号 AF7022)、ECL 显影剂 (批号 S0033S) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司;MitoSOX 线粒体活性氧

(mitochondrial ROS, mtROS) 探针 (批号 LX3608) 购自中国南京沃博生物科技有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 D799594)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 D79961) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 D799762) 购自上海生工生物工程股份有限公司; *D*-(+)-无水葡萄糖 (批号 50-99-7)、*D*-甘露糖 (批号 3458-28-4)、鼠李糖 (批号 6155-35-7)、*D*-(+)-半乳糖醛酸 (批号 91510-62-2)、*D*-半乳糖 (批号 59-23-4)、*D*-(+)-木糖 (批号 58-86-6)、*D*-阿拉伯糖 (批号 10323-20-3)、*D*-海藻糖 (批号 6138-23-4) 购自上海源叶生物科技有限公司 (*D*-阿拉伯糖对照品质量分数 $\geq 99\%$, 其余各单糖对照品质量分数均 $\geq 98\%$)。

1.3 仪器

IX71 型荧光显微镜 (日本东京奥林巴斯公司); MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 股份有限公司); BD-FACSVerse 型流式细胞仪 (美国 BD Bioscience 公司); LSM700 型激光扫描共聚焦显微镜 (德国蔡司集团)。

2 方法

2.1 牛膝多糖含量测定

2.1.1 牛膝多糖的制备 取干燥的牛膝药材粉末 5 g, 置 1 000 mL 圆底烧瓶中, 加入 500 mL 蒸馏水, 水浴加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 浓缩, 加无水乙醇使含醇量为 90%, 搅拌后 4 °C 冰箱静置过夜, 弃上清液, 沉淀用无水乙醇重复洗涤 2 次, 使沉淀无醇味, 放入真空冷冻干燥机中进行干燥, 直至恒定质量, 即得干品牛膝多糖粉末^[18]。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取“2.1.1”项下牛膝多糖粉末 0.01 g 至 10 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容至 10 mL, 即得供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称定无水葡萄糖 0.1 mg, 用蒸馏水定容至 100 mL, 制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液。

2.1.4 苯酚-硫酸法最大吸收波长的选择 精密吸取葡萄糖对照品溶液 100 μ L, 用蒸馏水定容至 1.0 mL, 转移到试管中, 加 5% 苯酚溶液 1 mL 混匀, 迅速加入浓硫酸 5 mL, 摇匀后置沸水浴中 20 min, 取出后冰水浴 10 min, 冷却至室温。同法制得供试品溶液和空白溶液, 在 200~800 nm 内测定吸光度 (A) 值, 结果表明最大吸收波长为 485 nm^[19]。

2.1.5 标准曲线的绘制 精密吸取标准品溶液 20、

40、80、120、160、250 μ L, 分别定容至 1.0 mL 量瓶, 转移入试管, 再加 1 mL 的 5% 苯酚溶液, 摇匀后迅速加入浓硫酸 5 mL, 振摇, 沸水浴中加热 20 min 后, 冰水浴 10 min 至室温, 使用紫外可见分光光度计在 485 nm 处测定 A 值。以 A 值为纵坐标 (Y), 以葡萄糖含量为横坐标 (X), 进行回归处理, 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=3.9875X+0.1575$, $R^2=0.9997$, 表明线性关系良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取“2.1.1”项下制备的同一供试品溶液, 按照“2.1.4”项方法测定 A 值, 以 30 min 为间隔, 连续测定 2 h, 计算得 RSD 为 1.92%, 表明室温条件下供试品溶液 2 h 内稳定性良好。

2.1.7 精密度试验 精密吸取牛膝多糖供试品溶液, 按照“2.1.4”项测定 A 值, 重复测定 6 次, 计算得 RSD 为 2.15%, 表明仪器精密度良好。

2.1.8 重复性试验 精密称取同一供试品 6 份, 按照“2.1.4”项方法测定 A 值, 考察其重复性。结果 RSD 为 0.19%, 表明该方法重复性良好。

2.1.9 含量测定 吸取供试品溶液 1.0 mL, 按“2.1.4”项下进行测定, 根据回归方程计算结果, 按干燥品计算样供试品中多糖含量。重复 3 次平行实验, 计算得出牛膝多糖平均提取率 28.45%, 质量分数为 47.58%。

2.2 溶液的制备及色谱分析

2.2.1 单糖对照品溶液 分别称取 *D*-(+)-无水葡萄糖 (6.87 mg)、*D*-甘露糖 (5.51 mg)、鼠李糖 (5.70 mg)、*D*-(+)-半乳糖醛酸 (4.66 mg)、*D*-阿拉伯糖 (4.35 mg)、*D*-(+)-半乳糖 (4.25 mg)、*D*-(+)-木糖 (4.54 mg)、海藻糖 (5.69 mg), 至 1 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 涡旋混匀获得上述 8 种单糖的单一对照品溶液。

2.2.2 牛膝多糖水解液 称取 100 mg 牛膝多糖粉, 用 2 mol/L 三氟乙酸溶液溶解, 密封后, 110 °C 水解 4 h 后取出, 冷却至室温, 用 3 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.5。

2.2.3 衍生化处理及各衍生化溶液制备 分别吸取“2.2.1”项下各单糖对照品溶液、“2.2.2”项下多糖水解液各 0.3 mL, 分别依次加入 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液和 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液, 涡旋混合, 70 °C 衍生 30 min, 冷却至室温, 加入 0.3 mol/L 氯化氢溶液终止反应。在离心管中加入 1 mL 氯仿溶液进行萃取, 弃去氯仿层, 取上层溶液; 重复 3 次, 合并上层溶液后经 0.45 μ m 滤膜滤过, 收集滤液,

获得经衍生化处理后的各溶液。分别吸取经衍生化处理后的各单糖对照品溶液 0.2 mL, 合并后经 0.45 μm 滤膜滤过, 收集滤液, 获得经衍生化处理后的混合对照品溶液。

2.2.4 色谱条件与系统适用性试验 采用 RD-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 pH 6.5 磷酸盐缓冲液(A)-乙腈(B)为流动相, 等度洗脱(82:18) 30 min; 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 250 nm; 进样体积为 10 μL 。取“2.2.2”“2.2.3”项的牛膝多糖水解液和混合对照品溶液, 进样测定并记录色谱图。

2.3 髓核细胞的分离和培养

对 30 只雄性 SD 大鼠 ip 过量戊巴比妥 (>150 mg/kg) 后实施安乐死。在显微镜下仔细解剖分离腰椎。为了释放髓核细胞, 用 0.1% 的 Type II Collagen 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化髓核组织 4 h。用 200 目滤网滤过后, 髓核细胞于 DMEM-F12 培养基 (含 1% 青霉素/链霉素)、5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。培养基每隔 1 d 更换 1 次。通过免疫荧光法检测 P1 和 P3 代细胞中 Type II Collagen 的表达水平, 对髓核细胞进行鉴定。

2.4 细胞分组与给药

2.4.1 ABPS 对髓核细胞存活率的影响 分别用 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 和 400.00 mg/L 的 ABPS 处理髓核细胞 24 h, 选取 ABPS 合适的处理剂量。

2.4.2 ABPS 对 IL-1 β 处理髓核细胞增殖、氧化应激、NLRP3 炎性小体活化和线粒体自噬的影响 将细胞分为对照组、IL-1 β 组、ABPS (100 mg/L) + IL-1 β 组、ABPS (200 mg/L) + IL-1 β 组, 除对照组外, 其余各组均用 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理细胞 24 h, 建立髓核细胞退化模型。

2.4.3 Parkin 调节的线粒体自噬在 ABPS 抑制 IL-1 β 诱导髓核细胞氧化应激和 NLRP3 炎症小体活化中的作用 按照说明书, 先用阴性对照(NC)shRNA 和 Parkin shRNA (50 nmol/L) 转染细胞。随后将细胞分为对照(NC shRNA 转染)组、IL-1 β (NC shRNA 转染)组、ABPS (200 mg/L) + IL-1 β (NC shRNA 转染)组、ABPS (200 mg/L) + IL-1 β (Parkin shRNA 转染)组。

2.4.4 SIRT3 在调控 Parkin 介导线粒体自噬中的作用 将髓核细胞分为对照组、IL-1 β 组、ABPS + IL-1 β 组、ABPS + IL-1 β + 3-TYP 组。使用 SIRT3 抑制剂 3-TYP (50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 2 h 后, 采用 200 mg/L

的 ABPS 与 10 ng/mL IL-1 β 继续处理细胞 24 h。

2.5 免疫荧光染色

将髓核细胞以 1×10^5 个/mL 密度接种于 24 孔板, 每孔 1 mL 细胞悬液, 按“2.4.2”项下方法处理细胞。室温下用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min。随后, 用 0.1% TritonX-100 在室温下透化髓核细胞 15 min。用 QuickBlock 阻断缓冲液阻断细胞 15 min, 然后用 Type II Collagen (1:100)、Ki67 (1:200) 或 Caspase-3 (1:100) 抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 PBS 冲洗 3 次后, 用 FITC 标记山羊抗兔二抗 (1:200) 和 Cy3 标记山羊抗兔二抗 (1:200) 孵育细胞。最后, 用 DAPI 染色液对细胞核进行反染色, 避光 5 min。采用荧光显微镜采集图像。

2.6 细胞存活率检测

将髓核细胞以 5×10^4 个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL 细胞悬液, 设置空白组。按“2.4.2”项下方法处理细胞。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 于 450 nm 波长下测定 A 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.7 流式细胞仪分析细胞周期

将髓核细胞以 2×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板, 按“2.4.2”项下方法处理细胞。使用流式细胞仪, 按照试剂盒说明书分析细胞周期。

2.8 Western blotting 检测相关蛋白表达

用含有蛋白酶抑制剂混合物的预冷 RIPA 缓冲液裂解髓核细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别孵育一抗 Type II Collagen (1:2 000)、aggrecan (1:2 000)、GAPDH (1:5 000)、NLRP3 (1:1 000)、Caspase-1 (1:1 000)、PINK1 (1:1 000)、Parkin (1:1 000)、LC3 (1:1 000)、P62 (1:1 000)、SIRT3 (1:1 000)、cleaved Caspase-3 (1:1 000)、Bax (1:1 000) 和 Bcl-2 (1:2 000), 二抗室温孵育 1 h。采用 ECL 显影, Image-J 软件对灰度值进行分析。

2.9 ROS 的测定

加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 20 min。用无血清培养基清洗 2 次后, 用荧光显微镜观察细胞。此外, 使用 MitoSOX 探针检测 mtROS 水平。将 MitoSOX 工作溶液 (5 $\mu\text{mol/L}$) 加入到髓核细胞中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育 10 min, HBSS 洗涤 3 次后, 使用荧

光显微镜拍照。

2.10 SOD、GSH 和 MDA 的测定

收集髓核细胞，按照试剂盒说明书测定 SOD、GSH 和 MDA 的水平。

2.11 TUNEL 染色法检测髓核细胞的凋亡

用 4% 多聚甲醛固定髓核细胞 30 min，再用 0.3% TritonX-100 通透 5 min。根据试剂盒说明书，用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒测定髓核细胞的凋亡。观察前用 DAPI 染色液复染细胞核，于显微镜下观察。

2.12 MMP 检测

在 37 °C 避光条件下，用 JC-1 工作溶液(2 μmol/L) 孵育髓核细胞 30 min，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.13 线粒体自噬的测定

将髓核细胞以 1×10^5 个/孔密度接种于铺有载玻片的 6 孔板。PBS 洗涤细胞 2 次，200 nmol/L CMXRos 荧光探针 37 °C 孵育 30 min 进行线粒体标记，4% 多聚甲醛固定、0.3% TritonX-100 透化，封闭结束后添加 LC3 一抗(1:100) 孵育过夜。用 FITC 标记的山羊抗兔二抗孵育细胞，DAPI 染核后使用激光扫描共聚焦显微镜采集图像。

2.14 统计学分析

使用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间和两组间的差异分别采用单因素方差分析、LSD 检验和 t 检验。

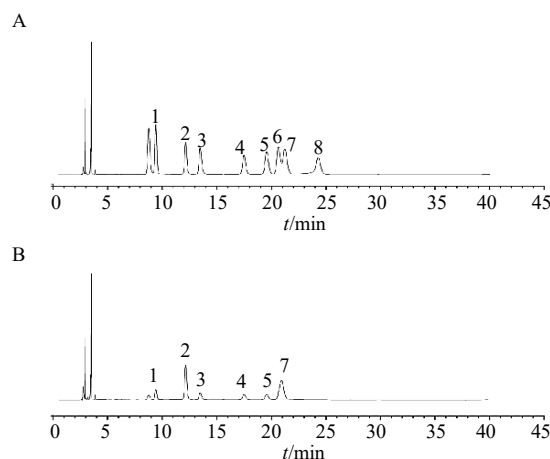
3 结果

3.1 单糖成分含量测定

如图 1 所示，各成分峰均能达到良好分离(分离度均大于 1.5)，理论板数以甘露糖计大于 6000，且阴性对照溶液对样品峰的测定不产生干扰。牛膝多糖中甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的质量分数分别为 3.98、21.27、4.29、6.66、3.47、10.81 mg/g。

3.2 对 IL-1β 处理大鼠髓核细胞增殖和退变的影响

免疫荧光染色结果显示，Type II Collagen 在细胞中表达(呈红色荧光)，且 P1 代和 P3 代细胞中 Type II Collagen 表达没有明显差异(图 2-A)。如图 2-B 所示，与对照组比较，400.00 mg/L ABPS 处理的髓核细胞存活率显著降低($P < 0.05$)。如图 2-C 所示，与对照组比较，IL-1β 组细胞存活率显著降低($P < 0.05$)；与 IL-1β 组比较，ABPS 低、高剂量组细胞存活率显著升高($P < 0.05$)。如图 2-D~G 所示，与对照组比较，IL-1β 组的 Ki67 蛋白表达水平降低($P < 0.05$)，G₀/G₁ 期细胞分布比例升高；与 IL-



A-混合对照品溶液；B-牛膝多糖水解液；1-D-甘露糖；2-鼠李糖；3-D-(+)-半乳糖醛酸；4-D-(+)-无水葡萄糖；5-D-(+)-半乳糖；6-D-(+)-木糖；7-D-阿拉伯糖；8-海藻糖。

A-mixed reference substance solution; B-hydrolyzate of *Achyranthis Bidentatae Radix* polysaccharides; 1-D-mannose; 2-rhamnose; 3-D-(+)-galacturonic acid; 4-D-(+)-anhydrous glucose; 5-D-(+)-galactose; 6-D-(+)-xylose; 7-D-arabinose; 8-trehalose.

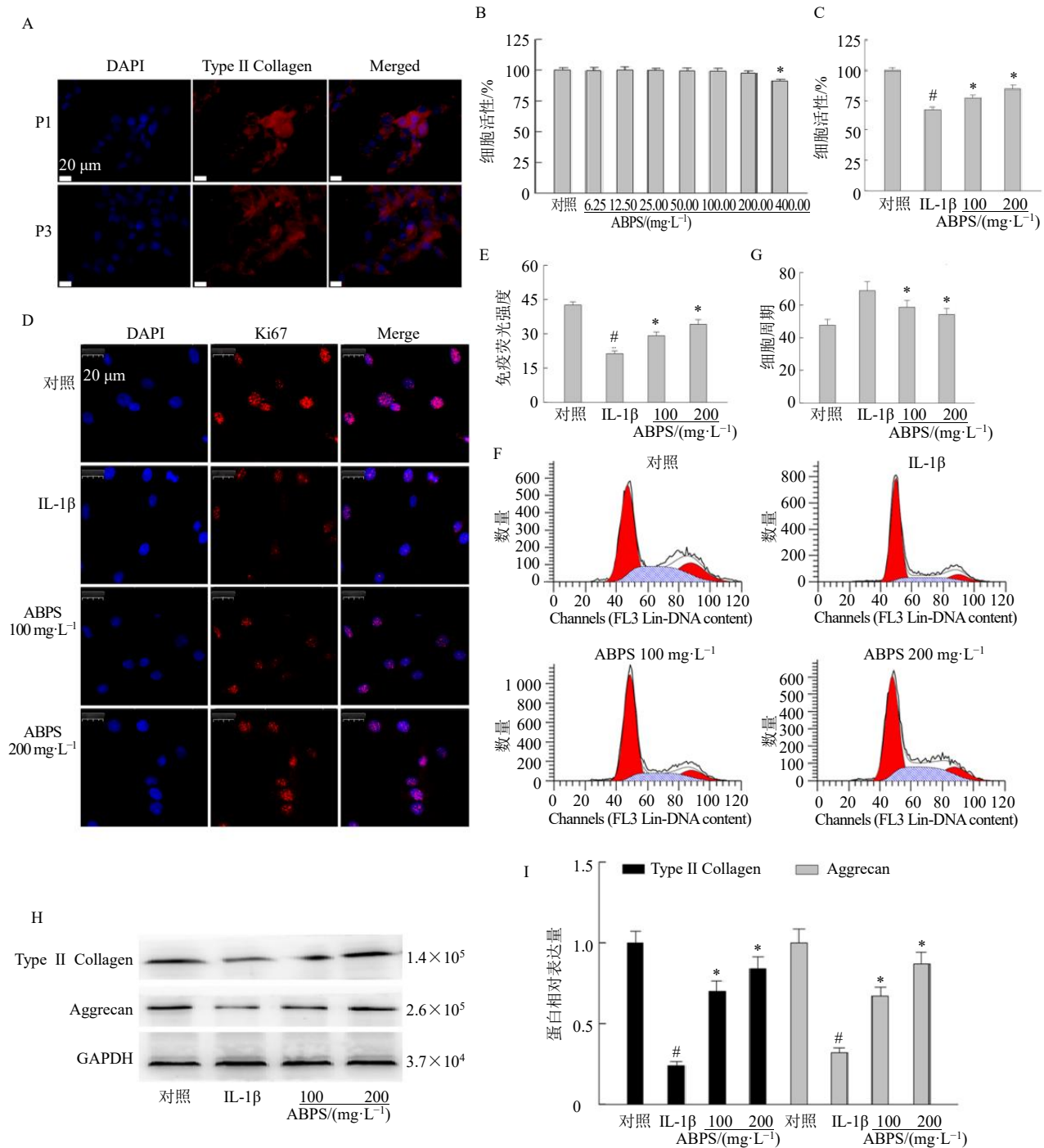
图 1 衍生化-HPLC 图谱

Fig. 1 Derivatization-HPLC chromatograms

1β 组比较，ABPS 低、高剂量组细胞中 Ki67 蛋白表达显著升高($P < 0.05$)，G₀/G₁ 期细胞比例降低。如图 2-H、I 所示，与对照组比较，IL-1β 组 Type II Collagen 和 aggrecan 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)；与 IL-1β 组比较，ABPS 低、高剂量组 Type II Collagen 和 aggrecan 蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。以上结果表明，ABPS 能改善 IL-1β 对髓核细胞增殖的抑制作用，延缓髓核细胞退变。

3.3 对 IL-1β 处理大鼠髓核细胞氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化的影响

如图 3-A、B 所示，与对照组比较，IL-1β 组髓核细胞中的 ROS 水平显著升高($P < 0.05$)；与 IL-1β 组比较，ABPS 低、高剂量组髓核细胞中的 ROS 水平显著降低($P < 0.05$)。如图 3-C、D 所示，与对照组比较，IL-1β 组细胞的 SOD 活性和 GSH 水平显著降低($P < 0.05$)；与 IL-1β 组比较，ABPS 低、高剂量组髓核细胞中的 SOD 活性和 GSH 水平显著升高($P < 0.05$)；如图 3-E~G 所示，与对照组比较，IL-1β 组细胞中 MDA 含量和 TUNEL 阳性细胞数显著升高($P < 0.05$)；与 IL-1β 组比较，ABPS 低、高剂量组细胞中 MDA 含量和 TUNEL 阳性细胞数降低($P < 0.05$)。如图 3-H~K 所示，与对照组比较，IL-1β 组细胞中 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达均显著增加($P < 0.05$)；与 IL-1β 组比较，



A-P1、P3 代髓核细胞中 Type II Collagen 的蛋白表达; B-不同质量浓度 ABPS 处理髓核细胞 24 h 后的细胞活力; C-CCK-8 测定细胞活力; D、E-各组髓核细胞中 Ki67 的免疫荧光结果; F、G-细胞周期分布; H、I-髓核细胞中 Type II Collagen 和 aggrecan 蛋白的表达; 与对照组比较: # $P < 0.05$; 与 IL-1 β 组比较: * $P < 0.05$, 下图同。

A-protein expression of Type II Collagen in P1 and P3 generation nucleus pulposus cells; B-cell viability of nucleus pulposus cells after 24 h treatment with different concentrations of ABPS; C-cell viability was determined by CCK-8. D, E-immunofluorescence results of Ki67 in nucleus pulposus cells in each group; F, G-cell cycle distribution; H, I-protein expressions of Type II Collagen and aggrecan in nucleus pulposus cells; $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs IL-1 β group, same as below figures.

图 2 ABPS 对 IL-1 β 处理大鼠髓核细胞增殖和退变的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of ABPS on proliferation and degeneration of IL-1 β treated rat nucleus pulposus cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

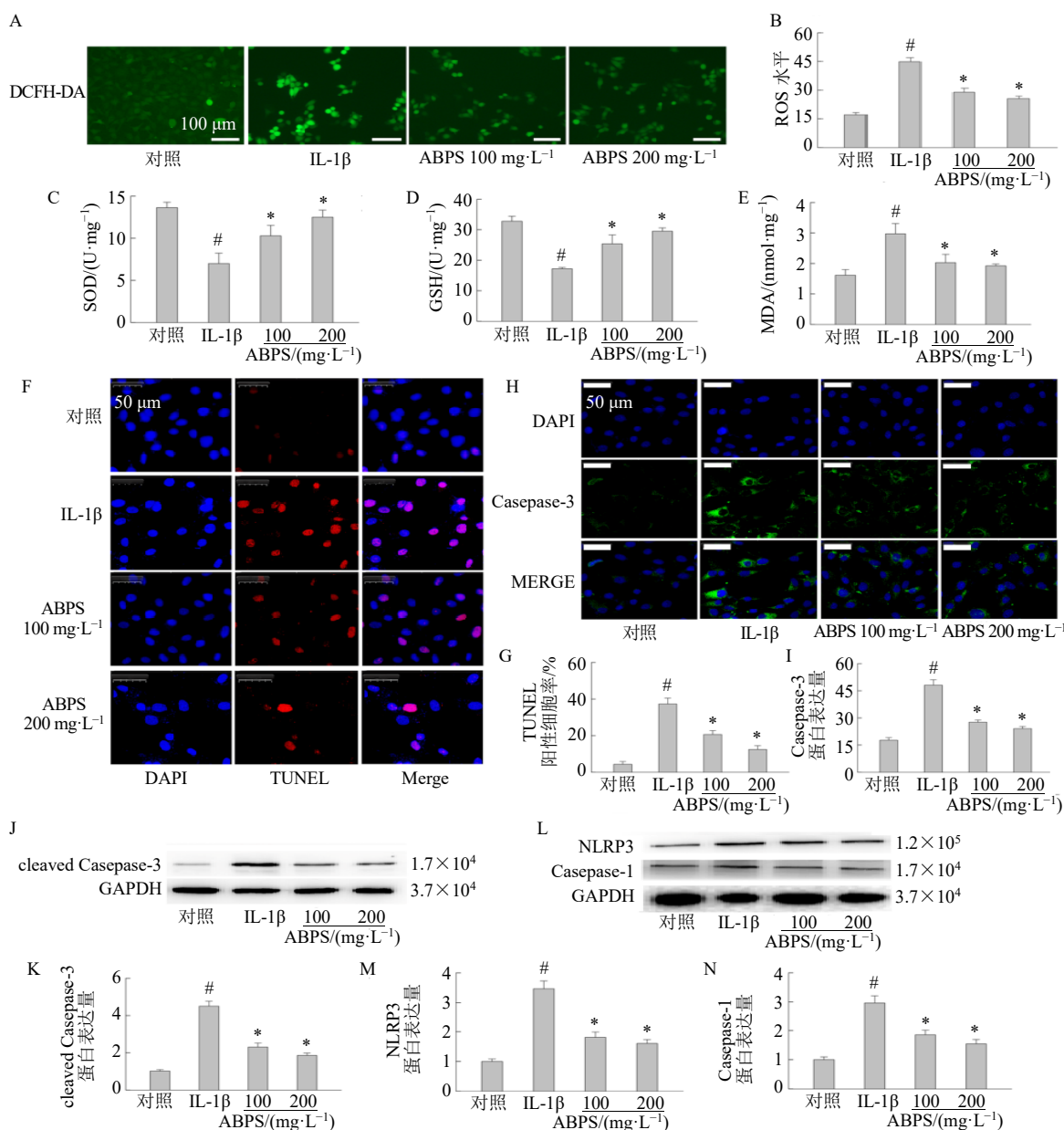


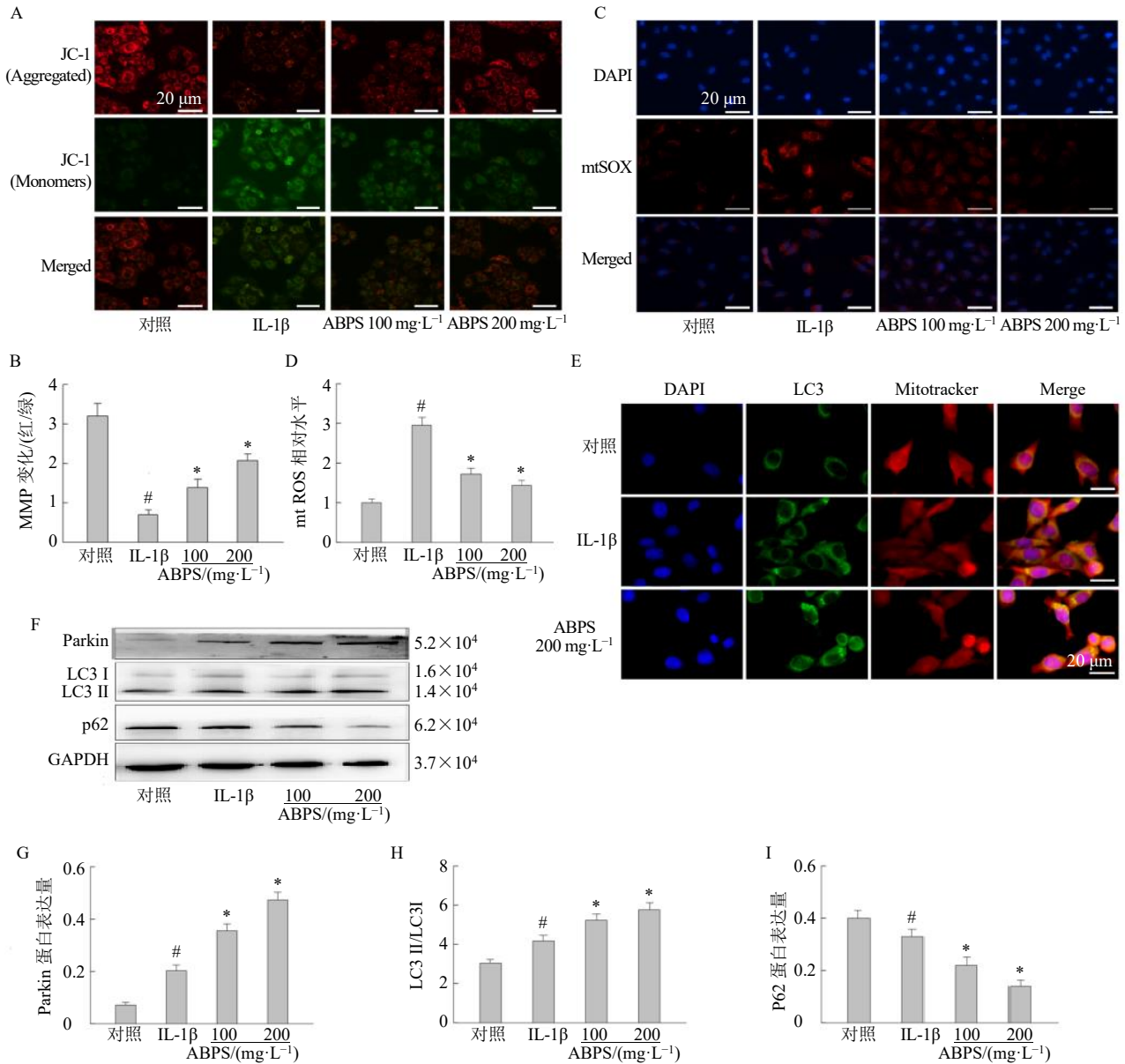
图 3 ABPS 对 IL-1β 处理大鼠髓核细胞氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of ABPS on oxidative stress, apoptosis and activation of NLRP3 inflammasome in IL-1β treated rat nucleus pulposus cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ABPS 低、高剂量组细胞中 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。如图 3-L~N 所示, 与对照组比较, IL-1β 组细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 IL-1β 组相比, ABPS 低、高剂量组细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明, ABPS 可抑制 IL-1β 诱导的髓核细胞氧化应

激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化。

3.4 对髓核细胞线粒体自噬的影响

如图 4-A、B 所示, 与对照组比较, IL-1β 组细胞 MMP 水平降低 ($P < 0.05$); 与 IL-1β 组相比, ABPS 低、高剂量组细胞 MMP 水平显著升高 ($P < 0.05$)。如图 4-C、D 所示, 与对照组比较, IL-1β 组细胞 mtROS 水平升高 ($P < 0.05$); 与 IL-1β 组比较,



A、B-JC-1 染料检测髓核细胞中 MMP 的变化；C、D-mtROS 染料检测细胞中 mtROS 的变化；E-观察 LC3 与线粒体（Mitotracker 标记）的共定位情况；F—I-细胞中 Parkin 蛋白、LC3II/LC3I 的值和 p62 蛋白表达。

A, B-changes of MMP in nucleus pulposus cells were detected by JC-1 dye; C, D-mtROS dye was used to detect changes of mtROS in cells. E-co-localization of LC3 and mitochondria (Mitotracker label) was observed; F—I-expressions of Parkin protein, LC3II/LC3I and p62 protein in cells.

图 4 ABPS 对髓核细胞线粒体自噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

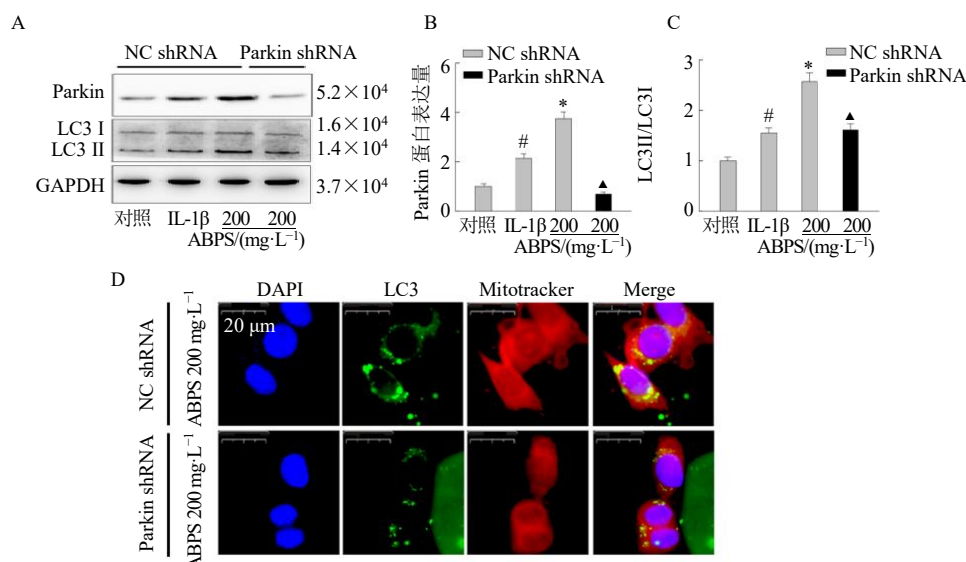
Fig. 4 Effect of ABPS on mitophagy in nucleus pulposus cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ABPS 低、高剂量组细胞 mtROS 水平显著降低 ($P < 0.05$)。如图 4-E 所示，ABPS 促进了自噬蛋白 LC3 与线粒体的共定位。如图 4-F~I 所示，与对照组比较，IL-1 β 组细胞 Parkin 蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 的值显著升高 ($P < 0.05$)，p62 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)；与 IL-1 β 组相比，ABPS 低、高剂量组细胞 Parkin 蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 的值显著

升高 ($P < 0.05$)，p62 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。结果表明，ABPS 可激活 IL-1 β 处理髓核细胞的线粒体自噬。

3.5 Parkin shRNA 对 ABPS 处理髓核细胞线粒体自噬的影响

如图 5-A~C 所示，Parkin shRNA 可抑制 ABPS 诱导的 Parkin 和 LC3 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。如



A~C-各组髓核细胞中 Parkin 蛋白表达和 LC3II/LC3I 的值; D-LC3 与线粒体的共定位; 与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与 IL-1β 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 ABPS+IL-1β 组 (NC shRNA) 比较: [▲] $P < 0.05$, 下图同。

A~C-Parkin protein expression and LC3II/LC3I in nucleus pulposus cells from each group; D-co-localization of LC3 with mitochondria; [#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs IL-1β group; [▲] $P < 0.05$ vs ABPS + IL-1β group (NC shRNA), same as below figures.

图 5 Parkin shRNA 减弱了 ABPS 诱导的髓核细胞线粒体自噬 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Parkin shRNA attenuates ABPS-induced mitophagy in nucleus pulposus cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 5-D 所示, Parkin shRNA 阻止了 LC3 与线粒体的共定位。结果表明, Parkin 参与了 ABPS 诱导的髓核细胞线粒体自噬。

3.6 Parkin shRNA 对 ABPS 处理髓核细胞氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化的影响

如图 6-A~F 所示, ABPS 处理能够逆转 IL-1 诱导的 MMP 降低以及 ROS 和 mtROS 水平的升高。Parkin shRNA 减弱了 ABPS 对 IL-1β 处理髓核细胞 MMP、ROS 和 mtROS 水平的影响。如图 6-G~K 所示, Parkin shRNA 减弱了 ABPS 对 IL-1β 处理髓核细胞 MDA 水平、Caspase-3 表达和 NLRP3 炎性小体活化的抑制作用。如图 6-L~N 所示, Parkin shRNA 抑制了 ABPS 诱导的 Type II Collagen 和 Aggrecan 蛋白表达上调。结果表明, ABPS 对 IL-1β 处理髓核细胞的保护作用与其激活 Parkin 介导的线粒体自噬有关。

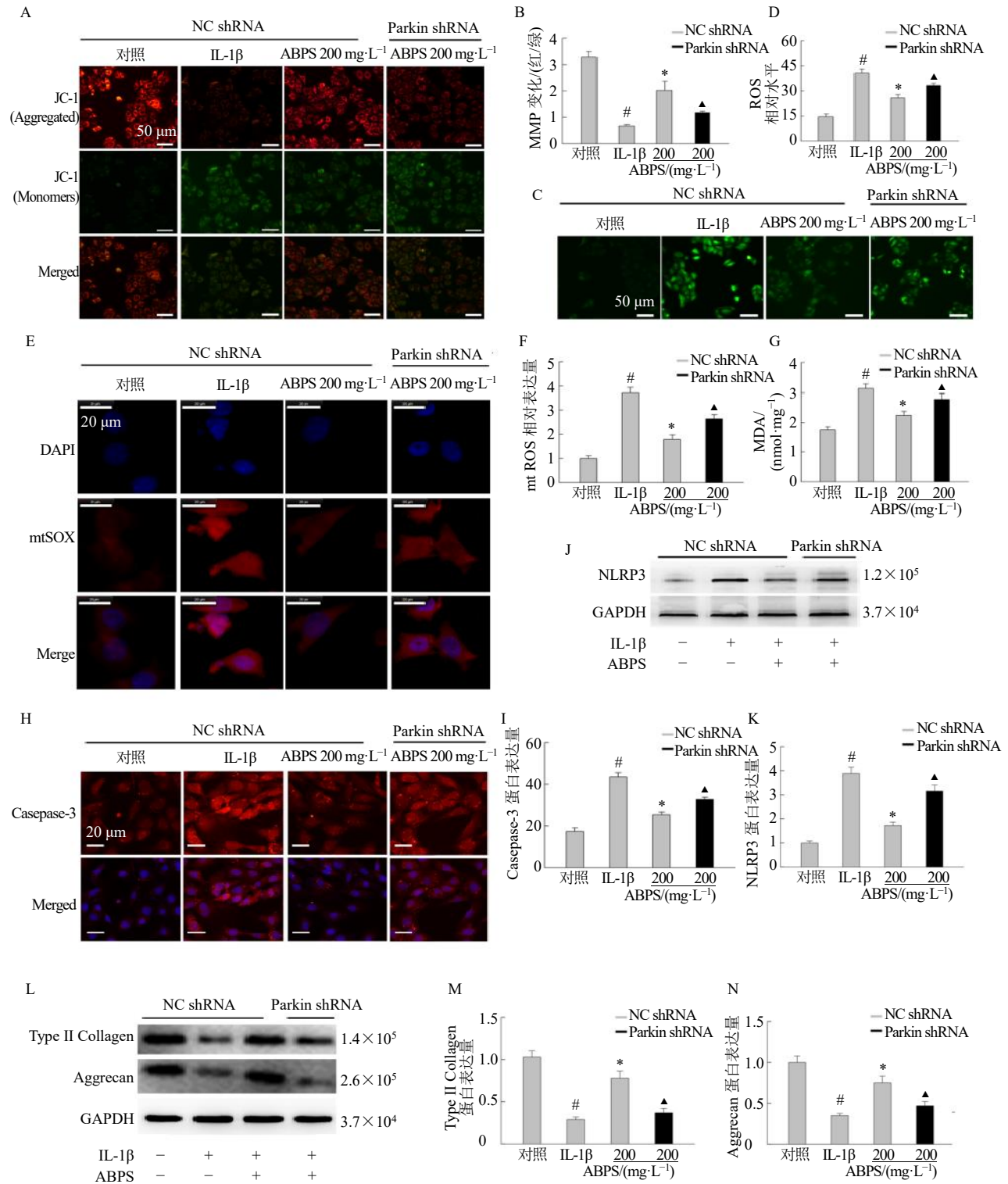
3.7 ABPS 对 IL-1β 处理髓核细胞中 SIRT3 蛋白表达的影响

如图 7-A、B 所示, 与对照组相比, IL-1β 组髓核细胞中 SIRT1 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与 IL-1β 组比较, ABPS+IL-1β 组细胞中的 SIRT1 蛋白表达水平未见明显变化。如图 7-C、D 所示, IL-1β 组髓核细胞中 SIRT3 蛋白表达水平较对照组

显著降低($P < 0.05$), 而 ABPS+IL-1β 组细胞中的 SIRT1 蛋白表达水平与 IL-1β 组比较显著升高($P < 0.05$)。如图 7-E~G 所示, 与 ABPS+IL-1β 组比较, ABPS+IL-1β+3-TYP 组细胞中的 SIRT3 和 Parkin 蛋白水平降低($P < 0.05$)。研究结果表明, ABPS 通过影响 SIRT3 来调控 Parkin 蛋白表达。

3.8 3-TYP 对细胞线粒体自噬、氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化的影响

如图 8-A~C 所示, 与对照组比较, IL-1β 组细胞 LC3 与线粒体共定位程度升高和 mtROS 水平显著升高($P < 0.05$); 与 IL-1β 组比较, ABPS+IL-1β 组细胞 LC3 与线粒体共定位程度升高, mtROS 水平显著降低($P < 0.05$); 与 ABPS+IL-1β 组比较, ABPS+IL-1β+3-TYP 组细胞 LC3 与线粒体共定位程度降低, mtROS 水平显著升高($P < 0.05$)。如图 8-D~G 所示, 与对照组比较, IL-1β 组细胞 Bax 和 NLRP3 蛋白水平显著升高($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著降低($P < 0.05$); 与 IL-1β 组比较, ABPS+IL-1β 组细胞 Bax 和 NLRP3 蛋白水平显著降低($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著升高($P < 0.05$); 与 ABPS+IL-1β 组比较, ABPS+IL-1β+3-TYP 组细胞 Bax 和 NLRP3 蛋白水平显著升高($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著降低($P < 0.05$)。结果表明,

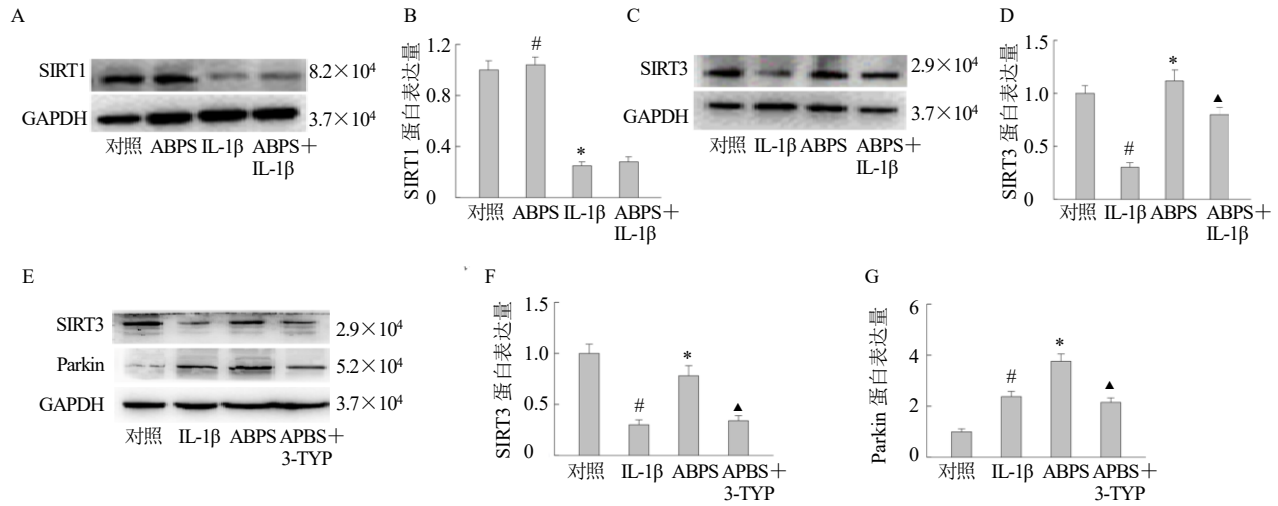


A、B-MMP 水平；C、D-DCFH-DA 染色法检测髓核细胞中 ROS 水平；E、F-mtSOX 染色测定髓核细胞中 mtROS 的变化；G-MDA 含量；H、I-Caspase-3 蛋白表达；J、K-NLRP3 蛋白表达；L~N-细胞中 Type II Collagen 和 Aggrecan 蛋白表达。

A, B-MMP level; C, D-ROS levels in nucleus pulposus cells were detected by DCFH-DA staining; E, F-changes of mtROS in nucleus pulposus cells were measured by mtSOX staining; G-MDA content; H, I-Caspase-3 protein expression; J, K-NLRP3 protein expression; L~N-protein expressions of Type II Collagen and Aggrecan in cells.

图 6 Parkin shRNA 对髓核细胞氧化应激和 NLRP3 炎症小体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of Parkin shRNA on oxidative stress and NLRP3 inflammasome in nucleus pulposus cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

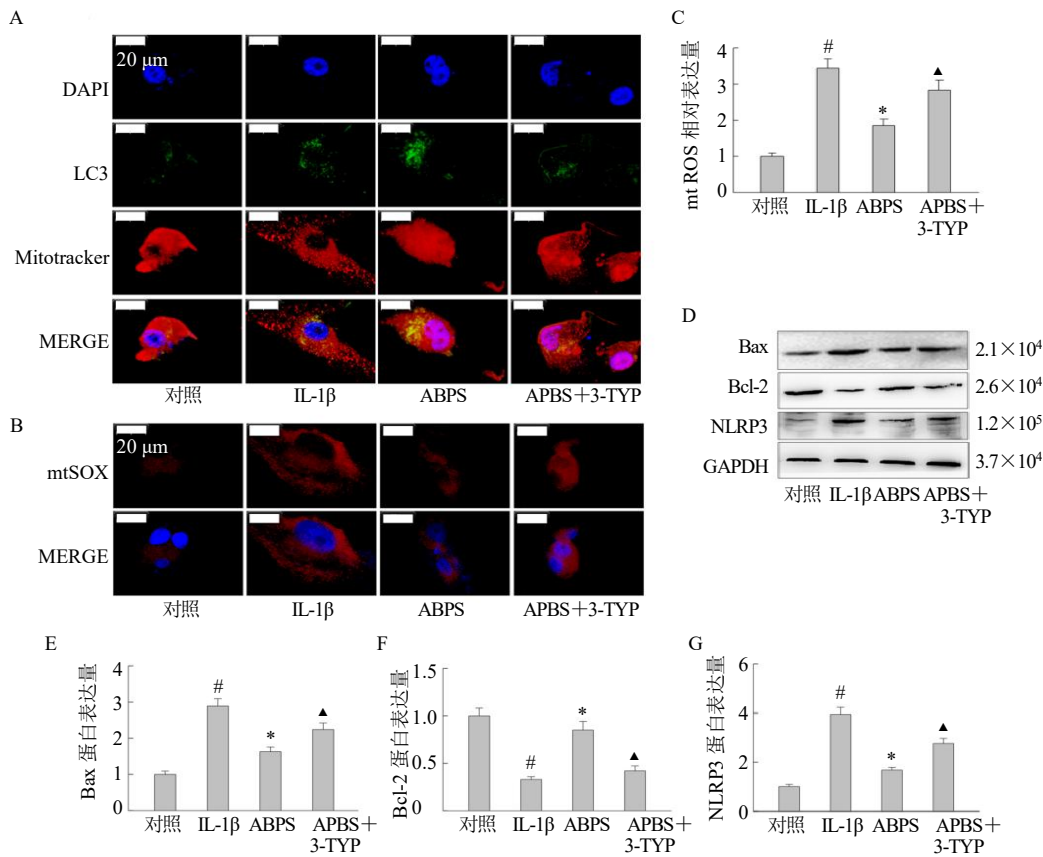


A~D-Western blotting 检测 SIRT1 和 SIRT3 表达。E~G-Western blotting 检测 SIRT3 和 Parkin 蛋白表达；与对照组比较：# $P < 0.05$ ；与 IL-1 β 组比较，* $P < 0.05$ ；与 ABPS+IL-1 β 组比较：▲ $P < 0.05$ ；下同。

A—D-expressions of SIRT1 and SIRT3 were determined by Western blotting. E—G-expressions of SIRT3 and Parkin were determined by Western blotting；# $P < 0.05$ vs control group；* $P < 0.05$ vs IL-1 β group；▲ $P < 0.05$ vs ABPS + IL-1 β group；same as below figures.

图 7 ABPS 对 IL-1 β 处理的髓核细胞中 SIRT3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of ABPS on SIRT3 expression in IL-1 β -treated nucleus pulposus cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-线粒体自噬代表性图像；B、C-mtROS 水平；D~G-Bax、Bcl-2 和 NLRP3 的蛋白表达。

A-representative images of mitophagy；B、C-mtROS level；D—G-protein expressions of Bax, Bcl-2, and NLRP3.

图 8 3-TYP 对细胞线粒体自噬、氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of 3-TYP on mitophagy, oxidative stress, apoptosis and NLRP3 inflammasome activation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ABPS 通过调控 SIRT3 抑制 IL-1 β 诱导的髓核细胞氧化应激、凋亡和 NLRP3 炎性小体活化。

4 讨论

流行病学调查显示,IVD 是腰椎疼痛最常见的原因。近年来,IVD 退行性病变的发病率逐年增加,发病年龄有年轻化的趋势,这给世界公共卫生安全带来了巨大的挑战^[20]。IVD 退行性病变的主要病理基础是髓核细胞数目以及活性的降低、细胞外基质合成减少和细胞凋亡水平的增加。作为一种炎性细胞因子,IL-1 β 参与调节免疫反应和炎症反应,加速各种炎症性疾病的进展^[21]。IL-1 β 治疗可引起细胞外基质降解增加,促进 IVD 退行性病变发展过程中髓核细胞的退变^[22]。因此,本研究利用 IL-1 β 刺激大鼠原代髓核细胞,建立退变髓核细胞模型。本研究结果显示,在 IL-1 β 刺激下,髓核细胞的细胞活力和 Ki67 水平降低,外基质标志物蛋白质 Type II Collagen 和 Aggrecan 表达水平降低,凋亡率增加。ABPS 是从牛膝中提取的多糖类化合物,具有多种药理作用,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抗衰老^[23]。本研究的结果表明,ABPS 干预缓解了 IL-1 β 对髓核细胞增殖的抑制作用,增加了退变髓核细胞中 Type II Collagen 和 Aggrecan 的表达水平,显著降低了细胞的凋亡率,表明 ABPS 可以在体外抑制 IL-1 β 诱导的髓核细胞退变。

氧化应激和炎症是导致上述病理变化的关键因素,抗炎和抗氧化疗法是改善 IVD 退化过程中髓核细胞损伤和结构破坏的有效策略^[24]。组织或细胞中过度产生的 ROS 与抗氧化防御系统之间的严重失衡导致细胞受损。紊乱的 ROS 清除过程可诱导 IVD 细胞凋亡,降低 Type II Collagen 的表达,引起细胞外基质降解失衡,加速 IVD 退化过程^[25]。此外,炎症是髓核细胞退变的另一个重要特征^[26]。越来越多的证据表明,NLRP3/Caspase-1 通路参与了髓核细胞的退变过程,并具有促进炎症的作用^[27]。一旦 NLRP3 炎症小体被激活,就可以激活下游的 Caspase-1,从而促进炎症细胞的聚集并引发一系列炎症反应^[28]。本研究的结果显示,ABPS 减轻了 IL-1 β 诱导的 ROS 和 MDA 水平升高以及 GSH 水平的降低。本研究结果表明,IL-1 β 处理后髓核细胞中的 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白水平显著升高,而 ABPS 则抑制了 NLRP3/Caspase-1 信号的活化。这些结果表明,ABPS 可以通过抑制氧化应激和 NLRP3/Caspase-1 通路活化来延缓 IL-1 β 诱导的髓

核细胞退变退化。

作为细胞“动力源”的线粒体,参与了多种重要的细胞过程。线粒体也是 ROS 生成的主要来源^[29]。由于这些关键功能,维持线粒体的稳态对细胞至关重要。线粒体功能障碍在多种退行性疾病中受到影响,包括 IVD^[30]。研究表明,IL-1 β 引起髓核细胞中线粒体功能障碍。自噬可清除功能障碍的线粒体,因此成为维持线粒体稳态的关键机制^[31]。受损的自噬会导致损伤的线粒体积累,引起氧化应激、NLRP3 炎症小体激活、髓核细胞退变以及 ECM 降解,从而促进 IVD^[10]。由于 ABPS 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞退变具有保护作用^[32]。因此,本研究进一步探究了 ABPS 对线粒体自噬的影响。结果表明,ABPS 增加了 IL-1 β 处理髓核细胞中的 Parkin 和 LC3 的表达,线粒体自噬水平明显增加。然而,Parkin shRNA 显著逆转了 ABPS 对 IL-1 β 处理髓核细胞线粒体自噬的影响,以及其对髓核细胞氧化应激、细胞凋亡和 NLRP3 炎性小体活化的抑制作用。这表明 ABPS 对退变髓核细胞的保护作用与 Parkin 介导的线粒体自噬有关。

为了阐明 ABPS 如何调节 Parkin 介导的线粒体自噬,着重研究了 SIRT1 和 SIRT3 的调节作用。SIRT1 是一种依赖 NAD 的去乙酰化酶,通过调节 IVD 退化过程中的 Parkin 依赖性自噬,减轻 IL-1 β 诱导的髓核细胞焦亡,从而发挥保护作用^[32]。与之前的研究一致,在 IL-1 β 处理的 NPC 中观察到了 SIRT1 表达的降低。然而,ABPS 孵育并未影响 IL-1 β 处理髓核细胞中 SIRT1 的表达。作为重要的线粒体去乙酰化酶,SIRT3 主要位于线粒体中,影响与线粒体稳态相关的几乎所有重要方面^[33-34]。在退化的髓核组织中,SIRT3 的表达降低,促进 SIRT3 表达是治疗 IVD 退化的有效策略^[35]。本研究发现,ABPS 显著减轻了 IL-1 β 诱导的 SIRT3 在髓核细胞中的减少。SIRT3-特异性抑制剂 3-TYP 显著抑制了 Parkin 表达和线粒体自噬的活化,ABPS 缓解的细胞凋亡、氧化应激和 NLRP3 炎症小体激活也受到 3-TYP 的抑制^[36]。本研究结果表明,ABPS 通过调节 SIRT3/Parkin 信号通路来抑制 IL-1 β 诱导的氧化应激和炎症反应。

综上,本研究结果表明 ABPS 能够延缓 IL-1 β 诱导的髓核细胞退变。线粒体自噬激活可降低 IL-1 β 诱导的髓核细胞氧化应激、细胞凋亡以及 NLRP3 炎性小体活化,其机制可能与 SIRT3/Parkin 信号通

路的激活有关。然而,本研究仅限于细胞体外实验,未来可以通过体内实验进一步研究 ABPS 在延缓 IVDD 中的作用及其机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Popescu A, Lee H. Neck pain and lower back pain [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 279-292.
- [2] Samanta A, Lufkin T, Kraus P. Intervertebral disc degeneration-Current therapeutic options and challenges [J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1156749.
- [3] Zhang G Z, Liu M Q, Chen H W, *et al.* NF- κ B signalling pathways in nucleus pulposus cell function and intervertebral disc degeneration [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(7): e13057.
- [4] Suyama K, Sakai D, Hayashi S, *et al.* Bag-1 protects nucleus pulposus cells from oxidative stress by interacting with HSP70 [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3): 863.
- [5] Liu L, Zhang Y Y, Fu J W, *et al.* Gli1 depletion induces oxidative stress and apoptosis of nucleus pulposus cells via Fos in intervertebral disc degeneration [J]. *J Orthop Translat*, 2023, 40: 116-131.
- [6] Zhao Y P, Qiu C, Wang W H, *et al.* Cortistatin protects against intervertebral disc degeneration through targeting mitochondrial ROS-dependent NLRP3 inflammasome activation [J]. *Theranostics*, 2020, 10(15): 7015-7033.
- [7] Ma H W, Xie C L, Chen Z T, *et al.* MFG-E8 alleviates intervertebral disc degeneration by suppressing pyroptosis and extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cells via Nrf2/TXNIP/NLRP3 axis [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 209.
- [8] Chao-Yang G, Peng C, Hai-Hong Z. Roles of NLRP3 inflammasome in intervertebral disc degeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(6): 793-801.
- [9] Saberi M, Zhang X L, Mobasheri A. Targeting mitochondrial dysfunction with small molecules in intervertebral disc aging and degeneration [J]. *Geroscience*, 2021, 43(2): 517-537.
- [10] Liu W, Zhao X L, Wu X J. Duhuo Jisheng Decoction suppresses apoptosis and mitochondrial dysfunction in human nucleus pulposus cells by miR-494/SIRT3/mitophagy signal axis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 177.
- [11] Song Y, Li S, Geng W, *et al.* Sirtuin 3-dependent mitochondrial redox homeostasis protects against AGEs-induced intervertebral disc degeneration [J]. *Redox Biol*, 2018, 19: 339-353.
- [12] Chai J H, He T T, Jiang S L, *et al.* Oligo/polysaccharides from *Cyathula officinalis* and *Achyranthes bidentata*: A review of structures and bioactivities [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(4): 307-326.
- [13] 杨正汉, 赵继荣, 王兴盛, 等. 牛膝及其有效成分防治腰椎间盘突出症的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(1): 143-147.
- [14] 郑曲, 张宇, 杨永菊, 等. 牛膝及其活性成分治疗骨关节炎的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(20): 3032-3036.
- [15] Fu C L, Qiu Z W, Huang Y F, *et al.* Protective role of *Achyranthes bidentata* polysaccharides against chondrocyte extracellular matrix degeneration through lncRNA GAS5 in osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(2): 532.
- [16] 岳宗进, 刘汝银, 于露, 等. 牛膝多糖通过 Notch1 通路影响骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化的机制 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2022, 43(4): 600-606.
- [17] Zhang Y, He F, Chen Z, *et al.* Melatonin modulates IL-1 β -induced extracellular matrix remodeling in human nucleus pulposus cells and attenuates rat intervertebral disc degeneration and inflammation [J]. *Aging*, 2019, 11(22): 10499-10512.
- [18] 刘天亮, 董诚明, 杨朝帆, 等. 不同产地及不同种源栽培品牛膝的品质评价 [J]. *中药材*, 2020, 43(10): 2363-2368.
- [19] 王小燕, 郭常润, 常军民, 等. 怀牛膝多糖的柱前衍生化-HPLC 指纹图谱建立及单糖成分含量测定 [J]. *中国药房*, 2021, 32(3): 294-300.
- [20] Mohd Isa I L, Teoh S L, Mohd Nor N H, *et al.* Discogenic low back pain: Anatomy, pathophysiology and treatments of intervertebral disc degeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 208.
- [21] Francisco V, Pino J, González-Gay M Á, *et al.* A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(1): 47-60.
- [22] Li H T, Wang X Q, Pan H Y, *et al.* The mechanisms and functions of IL-1 β in intervertebral disc degeneration [J]. *Exp Gerontol*, 2023, 177: 112181.
- [23] Zhou Y, Sheng Y J, Li C Y, *et al.* Beneficial effect and mechanism of natural resourced polysaccharides on regulating bone metabolism through intestinal flora: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 7): 127428.
- [24] Cheng X Q, Lin J Y, Chen Z H, *et al.* CB2-mediated attenuation of nucleus pulposus degeneration via the amelioration of inflammation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* [J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 92.
- [25] Li P F, Xiong F, Xing H Y, *et al.* Retinoic acid inhibits the pyroptosis of degenerated nucleus pulposus cells by

- activating Sirt1-SOD2 signaling [J]. *Connect Tissue Res*, 2023, 64(4): 337-349.
- [26] Zehra U, Tryfonidou M, Iatridis J C, *et al.* Mechanisms and clinical implications of intervertebral disc calcification [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(6): 352-362.
- [27] 叶辛, 梅正峰, 李陶冶, 等. 补阳还五汤通过 NLRP3/caspase-1 调控大鼠髓核细胞退变的机制 [J]. *中国现代医生*, 2022, 60(21): 66-70.
- [28] Yu Y W, Li W T, Xian T H, *et al.* Human embryonic stem-cell-derived exosomes repress NLRP3 inflammasome to alleviate pyroptosis in nucleus pulposus cells by transmitting miR-302c [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7664.
- [29] Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, *et al.* Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11338.
- [30] Wang H, Liu C, Zhao Y X, *et al.* Mitochondria regulation in ferroptosis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99(1): 151058.
- [31] Onishi M, Yamano K, Sato M, *et al.* Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): e104705.
- [32] Ma Z X, Tang P, Dong W, *et al.* SIRT1 alleviates IL-1 β induced nucleus pulposus cells pyroptosis via mitophagy in intervertebral disc degeneration [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 107: 108671.
- [33] Hu S W, Wang S S. The role of SIRT3 in the osteoporosis [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 893678.
- [34] Guo Y Y, Jia X, Cui Y Z, *et al.* Sirt3-mediated mitophagy regulates AGEs-induced BMSCs senescence and senile osteoporosis [J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101915.
- [35] Zhang G Z, Deng Y J, Xie Q Q, *et al.* Sirtuins and intervertebral disc degeneration: Roles in inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 508: 33-42.
- [36] Hu J G, Liu T, Fu F, *et al.* Omentin1 ameliorates myocardial ischemia-induced heart failure via SIRT3/FOXO3a-dependent mitochondrial dynamical homeostasis and mitophagy [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 447.

[责任编辑 罗 曦]