

本文引用: 段嘉豪, 杨少锋, 聂颖, 徐诗嘉, 吕福丹, 李维, 李硕夫. 补肾活血方调控 Nampt/NAD⁺/Sirt1 信号通路促进氧化损伤 ADSCs 类髓核分化的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(9): 1808–1815.

补肾活血方调控 Nampt/NAD⁺/Sirt1 信号通路促进氧化损伤 ADSCs 类髓核分化的研究

段嘉豪, 杨少锋, 聂颖, 徐诗嘉, 吕福丹, 李维, 李硕夫*

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 **目的** 探讨补肾活血方通过烟酰胺磷酸核糖转移酶(Nampt)/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)/沉默信息调节因子 1(Sirt1) 信号通路对氧化损伤脂肪间充质干细胞(ADSCs)类髓核分化的影响。**方法** 采用 Transwell 小室建立大鼠 ADSCs 与髓核细胞(NPCs) 共培养模型,以叔丁基过氧化氢(T-BHP)干预 24 h 建立氧化应激微环境模拟椎间盘退变(IDD)。将细胞分为空白对照组、模型对照组、补肾活血方低剂量组、补肾活血方高剂量组、烟酰胺单核苷酸(NMN)组和 Nampt 抑制剂(FK866)组。在 T-BHP 干预 48 h 后用显微镜观察细胞形态;甲苯胺蓝染色评价聚集体蛋白聚糖(aggreacan)合成;qPCR 检测 II 型胶原蛋白(collagen II)、aggreacan、细胞角蛋白 19(KRT19)及配对盒基因 1(Pax1) mRNA 表达水平;Western blot 检测 collagen II 和肿瘤抑制蛋白(p53)表达水平;ELISA 检测 Sirt1 含量,比色法检测 NAD⁺/NADH 比值。**结果** 与空白对照组比较,模型对照组 collagen II、aggreacan、KRT19、Pax1 mRNA 表达水平及 collagen II 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$),p53 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),Sirt1 含量及 NAD⁺/NADH 比值显著降低($P<0.01$)。与模型对照组比较,补肾活血方高剂量组 collagen II、aggreacan、KRT19、Pax1 mRNA 表达水平及 collagen II 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),p53 蛋白表达水平显著下降($P<0.01$),Sirt1 含量及 NAD⁺/NADH 比值显著升高($P<0.01$);补肾活血方低剂量组 collagen II 和 aggreacan mRNA 表达水平升高($P<0.05$),collagen II 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与补肾活血方高剂量组比较,NMN 组 collagen II 和 aggreacan mRNA 表达水平及 collagen II 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),p53 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),Sirt1 含量及 NAD⁺/NADH 比值显著升高($P<0.01$);FK866 组 collagen II 和 aggreacan mRNA 表达水平显著下降($P<0.01$),KRT19 和 Pax1 mRNA 表达水平降低($P<0.05$),collagen II 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),p53 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),Sirt1 含量及 NAD⁺/NADH 比值下降($P<0.05$)。**结论** 补肾活血方可改善氧化应激损伤 ADSCs 的基质合成能力,促进其向类髓核表型分化,该作用可能与提高 NAD⁺/NADH 比值、抑制 p53、激活 Nampt/NAD⁺/Sirt1 信号通路相关。

〔关键词〕 补肾活血方;脂肪间充质干细胞;髓核细胞;Nampt/NAD⁺/Sirt1 信号通路;椎间盘退变;氧化应激

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.09.008

Bushen Huoxue Formula promotes nucleus pulposus-like differentiation of oxidatively damaged ADSCs by regulating the Nampt/NAD⁺/Sirt1 signaling pathway

DUAN Jiahao, YANG Shaofeng, NIE Ying, XU Shijia, LYU Fudan, LI Wei, LI Shuofu*

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effects of Bushen Huoxue Formula (BSHXF) on the nucleus pulposus-like differentiation of oxidatively damaged adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) through the nicotinamide phosphoribosyl-

〔收稿日期〕2026-02-27

〔基金项目〕湖南省中医药科研计划项目(B2023150);湖南省自然科学基金项目(2023JJ60342);湖南省教育厅优秀项目(25B0358)。

〔通信作者〕* 李硕夫,男,硕士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:258509325@qq.com。

transferase (Namt)/nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)/sirtuin 1 (Sirt1) signaling pathway. **Methods** A co-culture model of rat ADSCs and nucleus pulposus cells (NPCs) was established using Transwell inserts. Tert-butyl hydroperoxide (T-BHP) was used to induce oxidative damage for 24 h to simulate the oxidative stress microenvironment associated with intervertebral disc degeneration (IDD). The cells were divided into blank control, model control, low-dose BSHXF, high-dose BSHXF, nicotinamide mononucleotide (NMN), and NAMPT inhibitor (FK866) groups. After 48 h of T-BHP treatment, cell morphology was observed under a microscope. Toluidine blue staining was performed to evaluate proteoglycan (aggrecan) synthesis. The mRNA expression levels of collagen II, aggrecan, keratin 19 (KRT19), and paired box 1 (Pax1) were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). The protein expression levels of collagen II and tumor suppressor protein (p53) were checked by Western blot. Sirt1 content was measured by ELISA, and the NAD⁺/NADH ratio was determined using a colorimetric assay. **Results** Compared with the blank control group, mRNA expression levels of collagen II, aggrecan, KRT19, and Pax1, as well as the protein expression level of collagen II significantly decreased in the model control group ($P<0.01$), while p53 protein expression level significantly increased ($P<0.01$). The Sirt1 content and NAD⁺/NADH ratio significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model control group, high-dose BSHXF group showed significantly increased mRNA expression levels of collagen II, aggrecan, KRT19, and Pax1, as well as increased protein expression level of collagen II ($P<0.01$), together with significantly decreased p53 protein expression level ($P<0.01$) and significantly increased Sirt1 content and NAD⁺/NADH ratio ($P<0.01$). In the low-dose BSHXF group, mRNA expression levels of collagen II and aggrecan, as well as collagen II protein expression level significantly increased ($P<0.05$). Compared with the high-dose BSHXF group, NMN group showed significantly increased mRNA expression levels of collagen II and aggrecan and protein expression level of collagen II ($P<0.01$), significantly decreased p53 protein expression level ($P<0.01$), and significantly increased Sirt1 content and NAD⁺/NADH ratio ($P<0.01$). FK866 group showed significantly decreased mRNA expression levels of collagen II and aggrecan ($P<0.01$), decreased KRT19 and Pax1 mRNA expression levels ($P<0.05$), significantly increased collagen II protein expression level ($P<0.01$), significantly decreased p53 protein expression level ($P<0.01$), and decreased Sirt1 content and NAD⁺/NADH ratio ($P<0.05$). **Conclusion** BSHXF can improve the matrix synthesis capacity of oxidatively damaged ADSCs and promote their differentiation toward a nucleus pulposus-like phenotype. This effect may be associated with an increased NAD⁺/NADH ratio, inhibition of p53, and activation of the Nampt/NAD⁺/Sirt1 signaling pathway.

[**Keywords**] Bushen Huoxue Formula; adipose-derived mesenchymal stem cells; nucleus pulposus cells; nicotinamide phosphoribosyltransferase/nicotinamide adenine dinucleotide/sirtuin 1 signaling pathway; intervertebral disc degeneration; oxidative stress

下腰痛(low back pain, LBP)是导致全球劳动力丧失与残疾的主要原因,给家庭和社会带来沉重负担^[1]。全球疾病负担研究显示,2020 年全球约有6.19 亿人受 LBP 影响,预计至 2050 年病例数将增至8.43 亿,提示该病的全球疾病负担仍在持续加重^[2]。椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)被认为是 LBP 的主要病理基础^[3]。IDD 表现为聚集蛋白聚糖(aggrecan)与Ⅱ型胶原蛋白(collagen II)等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的降解,伴随椎间盘内髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)的衰老与凋亡,导致 ECM 代谢失衡^[4]。目前,药物、康复治疗及手术等常规治疗方案,仅能缓解疼痛,难以逆转 ECM 成分丢失与 NPCs 功能衰退。因此,促进NPCs 再生,改善 IDD 微环境具有重要意义^[5]。

中医理论将 IDD 归属于“腰痛”“痹证”范畴,

其核心病机以肾虚为本,血瘀为标,补肾活血为该病的基本治则。补肾活血方为现代临床新方,以宋代《太平惠民和剂局方》所载青娥丸加减化裁而成,由杜仲、补骨脂、怀牛膝、丹参、威灵仙和木瓜组成,具有补肾强骨、活血化瘀之功效。本课题组前期研究证实,补肾活血方可增强 NPCs 增殖活性,延缓 IDD 进程,有效改善 IDD 微环境,其作用机制与抑制炎症反应、抑制细胞凋亡、调控基质代谢相关^[6]。然而,该方虽能促进 NPCs 增殖,但难以增加NPCs 的数量与恢复 NPCs 的功能,限制了其对 IDD 的治疗作用。

近年来研究表明,部分补肾活血类中药有助于改善 IDD 微环境,提高移植干细胞的存活率并增强其修复效应^[7]。脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)具有来源丰富、易获取、无免疫排斥等优点,将补肾活血方与 ADSCs

联合应用,有望提升 NPCs 修复能力,改善椎间盘内局部微环境,从根源上干预 IDD 的病理进程。在分子机制层面,烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyltransferase, Nampt)/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸[nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form), NAD⁺]/沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, Sirt1)信号轴是能量代谢、氧化应激的关键通路^[8]。Nampt 作为 NAD⁺补救合成途径的限速酶,直接决定细胞内 NAD⁺供给水平。而 NAD⁺作为 Sirt1 的辅酶,其含量直接影响 Sirt1 活性。Sirt1 通过去乙酰化肿瘤蛋白(tumor protein p53, p53)、叉头框蛋白 O(forkhead box O, FOXO)等转录因子,可激活抗氧化通路,抑制 NPCs 衰老,延缓 IDD^[9-10]。

本研究拟构建 ADSCs 与 NPCs 体外共培养模型,以叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, T-BHP)模拟 ADSCs 移植后椎间盘退变微环境,以补肾活血方含药血清联合烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)与 Nampt 抑制剂(FK866)进行干预,并深入分析其与 Nampt/NAD⁺/Sirt1 信号通路的内在关联,明确补肾活血方促进氧化损伤 ADSCs 类髓核分化的作用靶点与分子调控机制,以期以补肾活血方联合干细胞移植治疗 IDD 提供新的实验依据和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源、培养及实验动物 大鼠原代 ADSCs(货号:JDBG240387)及大鼠原代 NPCs(货号:JIBG240361)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。倒置显微镜下观察原代细胞形态及生长状态,再置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。培养 4 h 后首次换液,之后常规培养。NPCs 与 ADSCs 生长至 80%~90%融合时,按 1:2 的比例进行传代,每隔 2 d 换液 1 次。后续实验均选用第 3 代细胞。

SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只,4~6 周龄,体质量 180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2024-0005。大鼠饲养于室温(22±2)℃、相对湿度 60%±10%的环境中,12 h/12 h 明暗交替循环,自由摄食和饮水,适应性喂养 7 d。实验方案已通过湖南中医药大学第一附属医院实验动

物伦理委员会审批,批准号为 ZYFY20221111-77。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM 低糖培养基、青霉素-链霉素双抗溶液、Trypsin-EDTA、PBS、胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:PM150220、PB180120、PB180226、PB180327、164210-50);甲苯胺蓝染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:G3660-20ml);BCA 蛋白定量试剂盒(艾碧维生物科技有限公司,批号:AWB0104);CCK-8 检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-CK-A362);叔丁基过氧化氢(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:B106035-25ml);NMN、Nampt 抑制剂(FK866)(美国 MedChemexpress 生物科技公司,批号分别为:HY-F0004、HY-50876);Sirt1 ELISA 测定试剂盒(武汉华美生物科技有限公司,批号:S28032115);Trizol 总 RNA 提取试剂(美国赛默飞世尔科技公司,批号:15596026);mRNA 逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技股份有限公司,批号:CW2569);NAD⁺/NADH 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A114-1-1)。

CO₂ 培养箱(新加坡艺思高科技有限公司,型号:CCL-170B-8);倒置显微镜(德国徕卡公司,型号:DMI 1);倒置荧光显微镜(德国卡尔蔡司股份公司,型号:Axio Vert.A1);酶标分析仪(美国伯腾仪器有限公司,型号:ELX-800);实时荧光定量 PCR 仪(德国艾本德股份公司,型号:Mastercycler nexus GX2);电泳仪、半干转膜仪、化学发光凝胶成像系统(美国伯乐公司,型号:PowerPac Basic,Turbo,ChemIDocXRS+);低温高速离心机(英泰集团公司,型号:TDL5E)。

1.2 方法

1.2.1 补肾活血方含药血清及空白血清制备 补肾活血方由杜仲 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 组成,均购自湖南中医药大学第一附属医院,按处方量称取药材,采用水热回流法提取 3 次:第 1 次加 8 倍量水,提取 1 h;第 2、3 次分别加 6 倍量水,各提取 1 h。合并 3 次提取液,用旋转蒸发仪浓缩至生药浓度 6 g/mL,即得中药原液。根据体表面积法将成人临床剂量(66 g/d)换算为大鼠等效剂量[6.875 g/(kg·d)],并以 5 倍等效剂量灌胃[34.375 g/(kg·d)]。采用随机数字表法将

大鼠分为含药血清组和空白血清组,每组5只。含药血清组灌服中药原液,空白血清组同步灌服等体积生理盐水,每日2次,连续7 d。末次灌胃后1 h,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,无菌条件下经腹主动脉采血。全血于4℃静置2 h后离心,吸取上清血清,56℃水浴灭活30 min,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装后于-80℃冻存备用。

1.2.2 CCK-8 检测细胞活力 采用CCK-8检测试剂盒筛选T-BHP最佳建模浓度及补肾活血方含药血清给药的最佳体积分数。取对数生长期NPCs与ADSCs细胞,调整细胞密度为 5×10^4 细胞/孔,按100 μL/孔接种于96孔板中。筛选T-BHP浓度,设置0、25、50、100、250、500 μmol/L 6个组,每组设5个复孔,加入不同浓度T-BHP处理24 h后加入CCK-8试剂,培养箱中孵育2 h,于450 nm波长下测定吸光度OD值,计算细胞活力与半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。为筛选含药血清体积分数,设置0%、5%、10%、20%、30%、40% 6个组,每组设5个复孔,加入不同浓度含药血清干预48 h后,按上述方法检测细胞活力。

1.2.3 退变NPCs与ADSCs共培养模型构建及分组 取第3代对数生长期NPCs和ADSCs,取300 μL细胞悬液(1.5×10^5 细胞)接种于Transwell,上室接种NPCs,下室接种ADSCs,待细胞融合度达80%~90%后进行分组处理。空白对照组以DMEM共培养24 h,随后加入20%空白血清继续培养48 h;模型对照组、补肾活血方低剂量组、补肾活血方高剂量组、NMN组、FK866组先以50 μmol/L T-BHP处理24 h,再分别加入20%空白血清、10%空白血清+10%含药血清、20%含药血清、20%含药血清+10 μmol/L FK866、20%含药血清+10 μmol/L FK866继续培养48 h。上述干预均作用于整个共培养体系。

1.2.4 甲苯胺蓝染色 收集下室ADSCs,弃去培养基,PBS洗涤后加入4%多聚甲醛于(25±2)℃固定45 min,弃去固定液,PBS清洗后加入甲苯胺蓝染色液,避光染色30 min,再次加入PBS洗涤。于倒置显微镜下随机选取3个视野拍照,比较各组细胞形态及聚集蛋白聚糖染色深浅。

1.2.5 qPCR 检测ADSCs中collagen II、aggrecan、细胞角蛋白19(keratin 19, KRT19)及配对盒基因1(paired box 1, Pax1)mRNA 表达 采用Trizol试剂提取各

组ADSCs总RNA,测定RNA浓度及纯度后,按逆转录试剂盒说明书反转录为cDNA。以GAPDH为内参,采用SYBR荧光体系进行qPCR扩增。每份样本设3个复孔,反应结束后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 qPCR 检测引物序列信息
Table 1 Primer sequences for qPCR

基因名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	正向:ACAGCAACAGGCTGCTGGAC	252
	反向:TTTGAGGCTGCAGCGAACTT	
collagen II	正向:ATGTATGGAAGCCCTCGTCC	95
	反向:GTTGAGGCAGTCTGGGTCTT	
aggrecan	正向:ACACCCCTACCCTTGCTTCT	171
	反向:CGATCTCACACAGGTCCCCT	
KRT19	正向:TTCCACACCAGGCATTGACC	92
	反向:CTTCAGCATCCTTCCGGTT	
Pax1	正向:AGCTCTATTAGTCGCATCCTG	78
	反向:CGGCTGTTTACTTGCTTCGT	

1.2.6 Western blot 检测 collagen II 和 p53 蛋白表达 收集各组ADSCs,加入RIPA裂解液,冰上静置裂解,超声破碎后离心取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。各组取等量蛋白进行SDS-PAGE,转膜后以5%脱脂奶粉室温封闭,加入一抗于4℃孵育过夜。次日洗膜后加入HRP标记二抗,室温孵育90 min,再次洗膜,采用增强化学发光法显影,并用ImageJ软件分析目的条带灰度值。

1.2.7 ELISA 检测 Sirt1 含量 收集各组细胞培养上清液,按ELISA试剂盒说明书配制标准品和待测样本,37℃孵育后依次加酶标抗体、洗板、显色和终止反应,在450 nm波长下读取OD值,并依据标准曲线计算Sirt1含量。

1.2.8 NAD⁺/NADH 比值测定 按试剂盒说明书处理样本,在570 nm波长下读取OD值,计算各组细胞内NAD⁺/NADH比值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,采用GraphPad Prism 9.5软件绘图。计量资料先进行正态性检验(*Shapiro-Wilk*检验)及方差齐性检验(*Levene*检验),符合正态分布且方差齐者以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析(*one-way ANOVA*),进

一步两两比较进行 *Tukey* 事后检验;若研究设计以模型对照组为单一参照时,采用 *Dunnnett* 法。非正态分布或方差不齐的资料以“ $M(P_{25}, P_{75})$ ”表示,多组间比较采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NPCs 及 ADSCs 鉴定结果

为保证细胞纯度与活性,进行免疫荧光鉴定实验。大鼠原代 NPCs 主要呈长梭形(图 1A),ADSCs 主要呈纺锤形(图 1B),符合鉴定要求。

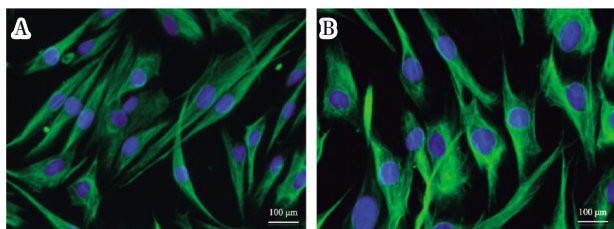


图 1 大鼠原代细胞免疫荧光鉴定结果($\times 200$, 比例尺=100 μm)

Fig.1 Immunofluorescence identification of primary rat cells ($\times 200$, scale bar=100 μm)

注:A.NPCs 鉴定结果;B.ADSCs 鉴定结果。

2.2 T-BHP 浓度及含药血清给药的体积分数筛选

随着 T-BHP 浓度升高,与空白对照组比较,NPCs 和 ADSCs 细胞活力均下降。其中,T-BHP 干预 NPCs 的 IC_{50} 为 50.16 $\mu\text{mol/L}$,干预 ADSCs 的 IC_{50} 为 54.63 $\mu\text{mol/L}$ 。当使用 20%体积分数含药血清干预 NPCs 或 ADSCs 时,细胞活力均达到较佳水平($P < 0.05$)。因此,后续实验选择 50 $\mu\text{mol/L}$ T-BHP 和 20%体积分数含药血清作为干预条件。详见图 2。

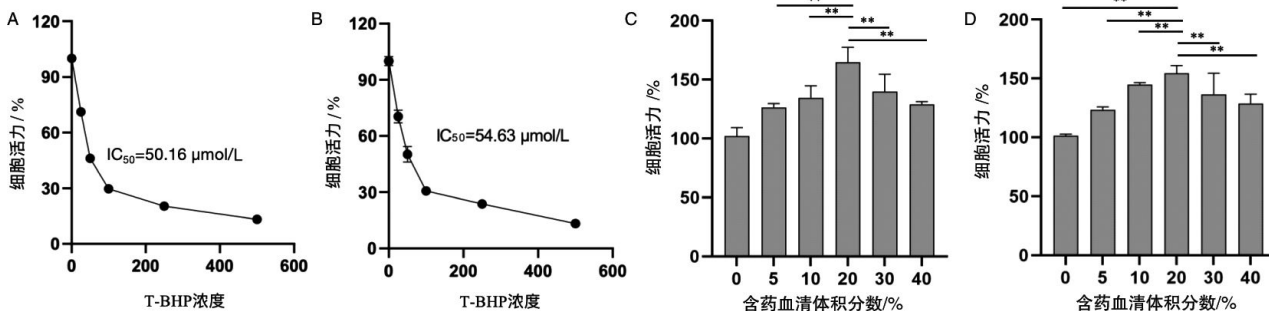


图 2 T-BHP 浓度及含药血清给药后体积分数筛选结果

Fig.2 Screening results for T-BHP concentration and medicated-serum volume fraction

注:A.T-BHP 干预 NPCs 的 IC_{50} 曲线;B.T-BHP 干预 ADSCs 的 IC_{50} 曲线;C.不同体积分数含药血清对 NPCs 活力的影响;D.不同体积分数含药血清对 ADSCs 活力的影响。** $P < 0.01$ 。

2.3 各组退变前后NPCs 和 ADSCs 的形态学观察

正常培养条件下 NPCs 主要呈梭形(图 3A);经 T-BHP 处理 24 h 后,NPCs 出现退变样改变(图 3B)。甲苯胺蓝染色结果显示,空白对照组 ADSCs 聚集蛋白聚糖染色较深,细胞形态多呈多角形或短梭形(图 3C)。模型对照组细胞呈皱缩样改变(图 3D);经 20% 体积分数含药血清处理后,ADSCs 聚集蛋白聚糖染色逐渐加深,细胞形态得到改善(图 3F);10% 体积分数含药血清处理后,细胞形态未见明显改善(图 3E)。与补肾活血方高剂量组比较,加入 NMN 后细胞染色更深(图 3G),而加入 FK866 后染色略变浅(图 3H)。

2.4 各组 ADSCs 相关 mRNA 相对表达量

与空白对照组比较,模型对照组 collagen II、aggrecan、KRT19、Pax1 mRNA 相对表达量均显著降低($P < 0.01$);与模型对照组比较,补肾活血方高剂量组上述 mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.01$);低剂量组仅 collagen II 和 aggrecan 相对表达量升高($P < 0.05$)。与补肾活血方高剂量组比较,NMN 组 collagen II、aggrecan、KRT19、Pax1 mRNA 相对表达量升高($P < 0.01$);FK866 组 collagen II 和 aggrecan mRNA 相对表达量显著下降($P < 0.01$),KRT19 和 Pax1 mRNA 相对表达量降低($P < 0.05$)。详见图 4。

2.5 各组 ADSCs 中 collagen II 和 p53 蛋白相对表达量比较

与空白对照组比较,模型对照组 collagen II 蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01$),而 p53 蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,补肾

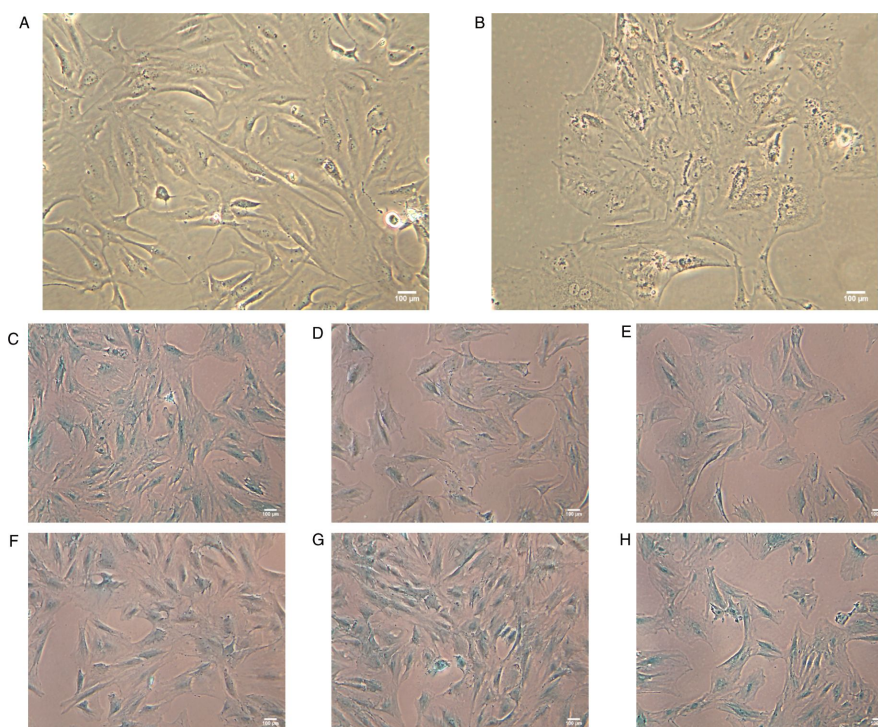


图3 退变前后NPCs及各组ADSCs形态学观察($\times 200$,比例尺=100 μm)

Fig.3 Morphological observation of NPCs before and after degeneration and ADSCs in each group ($\times 200$, scale bar=100 μm)

注:A.T-BHP处理前NPCs;B.T-BHP处理后NPCs;C.空白对照组ADSCs;D.模型对照组ADSCs;E.补肾活血方低剂量组ADSCs;F.补肾活血方高剂量组ADSCs;G.NMN组ADSCs;H.FK866组。

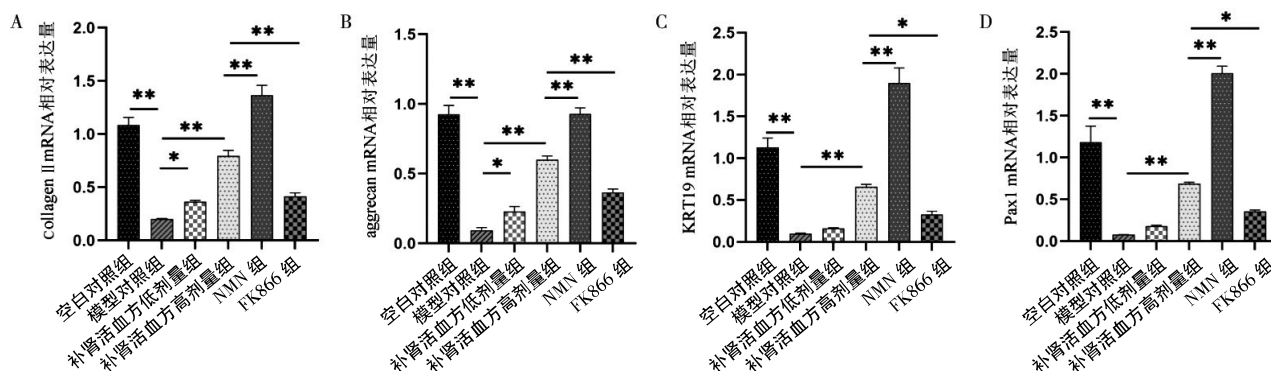


图4 各组ADSCs相关mRNA相对表达量比较

Fig.4 Comparison of relative mRNA expression levels in ADSCs between groups

注:* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

活血方高剂量组 collagen II 蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$),p53 蛋白相对表达量显著降低($P<0.01$);补肾活血方低剂量组 collagen II 蛋白相对表达量升高($P<0.05$),但 p53 蛋白相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。与补肾活血方高剂量组比较,NMN 组 collagen II 蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$),p53 蛋白相对表达量显著降低($P<0.01$);FK866 组 collagen II 和 p53 蛋白相对表达量显著降低($P<0.01$)。详见图 5。

2.6 各组ADSCs中Sirt1含量与NAD⁺/NADH比值

与空白对照组比较,T-BHP干预后ADSCs上清中Sirt1含量显著下降($P<0.01$),细胞内NAD⁺/NADH比值显著降低($P<0.01$)。与模型对照组比较,补肾活血方高剂量组Sirt1含量及NAD⁺/NADH比值显著升高($P<0.01$)。与补肾活血方高剂量组比较,NMN组Sirt1含量及NAD⁺/NADH比值显著升高($P<0.01$);FK866组Sirt1含量及NAD⁺/NADH比值明显下降($P<0.05$)。详见图6。

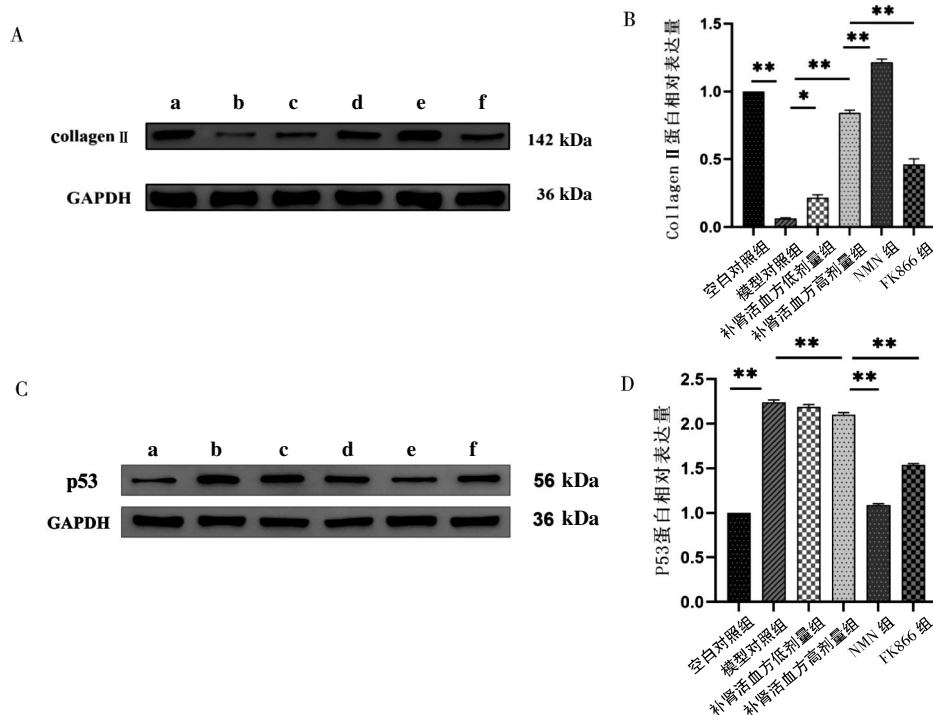


图5 ADSCs 中 collagen II 和 p53 蛋白相对表达量($n=3$)

Fig.5 Western blot images and relative expression levels of collagen II and p53 in ADSCs ($n=3$)

注:A.Collagen II 蛋白条带图;B.Collagen II 相对表达量;C.p53 蛋白条带图;D.p53 相对表达量;a.空白对照组;b.模型对照组;c.补肾活血方低剂量组;d.补肾活血方高剂量组;e.NMN 组;f.FK866 组。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

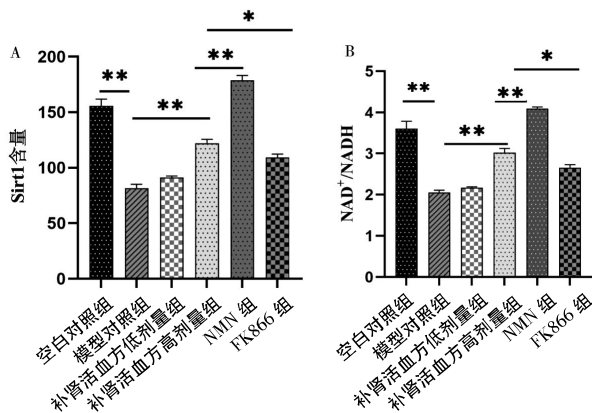


图6 各组 ADSCs 中 Sirt1 含量与 NAD⁺/NADH 比值($n=3$)

Fig.6 Sirt1 content and NAD⁺/NADH ratio in ADSCs between groups ($n=3$)

注:A.Sirt1 含量;B.NAD⁺/NADH 比值。与空白对照组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

3 讨论

本研究在 ADSCs-NPCs 共培养体系中采用 T-BHP 构建椎间盘退变样氧化应激环境,围绕 Nampt/NAD⁺/Sirt1 通路观察补肾活血方的作用机制。与空白对照组比较,模型对照组表现为 collagen II、aggrecan、KRT19、Pax1 mRNA 相对表达量及 collagen II 蛋白相对表达量下降,p53 蛋白相对表达量升高($P<0.01$),细胞内 NAD⁺/NADH 比值和 Sirt1 含量

降低。甲苯胺蓝结果表明 ECM 合成受到抑制,已成功诱导类髓核表型的退变状态。补肾活血方含药血清能够同步提升 ECM 相关基因及类髓核细胞标志物表达水平,抑制 p53 蛋白表达,恢复 NAD⁺/NADH 比值,增加 Sirt1 含量。形态学结果与甲苯胺蓝染色结果提示,该补肾活血方在 IDD 微环境中,能够减轻细胞内氧化应激,修复细胞表型损伤。NMN 作为 NAD⁺ 前体,联合补肾活血方可进一步提高 NAD⁺/NADH 比值和 Sirt1 含量,并进一步上调 collagen II、aggrecan、KRT19 和 Pax1 mRNA 相对表达量,而 FK866 则抑制 collagen II、aggrecan、KRT19 和 Pax1 mRNA 相对表达量。实验结果提示,补肾活血方的保护作用与 Nampt 倡导的 NAD⁺ 合成、Sirt1 活化密切相关^[11]。

本研究“类髓核化”的证据主要体现在两方面:一是 KRT19、Pax1 蛋白与 ECM 相关基因协同上调,提示谱系转向和合成代谢偏移;二是甲苯胺蓝染色结果表明,细胞由皱缩向多角形和短梭形恢复,提示聚集蛋白聚糖合成增加和细胞状态改善。但现阶段结果仅支持 ADSCs 可向类髓核表型分化,而对真实分化程度的判定,仍需更多高特异性标志物和功能学证据支撑^[12-14]。

但本研究仍存在以下局限性。其一,二维培养和单一 T-BHP 氧化应激刺激难以完全模拟体内低氧等复杂退变环境;其二,本研究未检测 Nampt 蛋白及 Sirt1 酶活性^[15-16]。后续可在三维培养体系或动物实验中重复关键指标,并结合 Sirt1 活性、p53 乙酰化水平及线粒体功能指标进一步完善机制。

综上,在氧化应激的恶化微环境中,补肾活血方能够提升 NAD⁺供给,增强 Sirt1 功能,抑制 ADSCs 衰老,促进 ECM 合成,并诱导 ADSCs 向类髓核表型分化。该研究为 IDD 的中医药与再生医学联合干预提供参考依据。

参考文献

- [1] 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]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 24(1): 208.
- [2] Rheumatology T L. The global epidemic of low back pain[J]. The Lancet Rheumatology, 2023, 5(6): e305.
- [3] Wang Y, Cheng H, Wang T, et al. Oxidative stress in intervertebral disc degeneration: molecular mechanisms, pathogenesis and treatment[J]. Cell Prolif, 2023, 56(9): e13448.
- [4] Zhao D W, Zhang J, Chen C, et al. Rejuvenation modulation of nucleus pulposus progenitor cells reverses senescence-associated intervertebral disc degeneration[J]. Advanced Materials, 2025, 37(7): 2409979.
- [5] Xin J G, Wang Y J, Zheng Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Orthopaedic Surgery, 2022, 14(7): 1271-1280.
- [6] Yang S F, Li L H, Zhu L G, et al. Bu-Shen-Huo-Xue-Fang modulates nucleus pulposus cell proliferation and extracellular matrix remodeling in intervertebral disk degeneration through miR-483 regulation of Wnt pathway[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(12): 19318-19329.
- [7] Hu J, Li C, Jin S C, et al. Salvianolic acid B combined with bone marrow mesenchymal stem cells piggybacked on HAMA hydrogel re-transplantation improves intervertebral disc degeneration[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 950625.
- [8] Huang Y J, Peng Y, Sun J C, et al. Nicotinamide phosphoribosyl transferase controls NLRP3 inflammasome activity through MAPK and NF- κ B signaling in nucleus pulposus cells, as suppressed by melatonin[J]. Inflammation, 2020, 43(3): 796-809.
- [9] Yi J, Zhou Q L, Huang J S, et al. Lipid metabolism disorder promotes the development of intervertebral disc degeneration[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 166: 115401.
- [10] 王玉, 郭敬然, 李珊, 等. 腰椎间盘突出症退变椎间盘组织中 SIRT1、NF- κ B 表达及其与退变程度的相关性[J]. 广东医学, 2025, 46(1): 91-95.
- [11] Imai S, Yoshino J. The importance of NAMPT/NAD/SIRT1 in the systemic regulation of metabolism and ageing[J]. Diabetes, Obesity & Metabolism, 2013, 15(3): 26-33.
- [12] Shi Q F, Xu L, Zeng X Y. Sirtuin 1 participates in intervertebral disc degeneration via the nicotinamide phosphoribosyl transferase/nicotinamide adenine dinucleotide/sirtuin 1 pathway responsible for regulating autophagy of nucleus pulposus cells[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2022, 23(4): 267.
- [13] Lu Y, Tang X Y, Wang W X, et al. The role of deacetylase SIRT1 in allergic diseases[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1422541.
- [14] Francisco V, Ait Eldjoudi D, González-Rodríguez M, et al. Metabolomic signature and molecular profile of normal and degenerated human intervertebral disc cells[J]. The Spine Journal, 2023, 23(10): 1549-1562.
- [15] Wang Y G, Yu X J, Qu Y K, et al. Ferrostatin-1 inhibits toll-like receptor 4/NF- κ B signaling to alleviate intervertebral disc degeneration in rats[J]. The American Journal of Pathology, 2023, 193(4): 430-441.
- [16] Sun Y J, Li X, Yang X X, et al. Small extracellular vesicles derived from adipocytes attenuate intervertebral disc degeneration in rats by rejuvenating senescent nucleus pulposus cells and endplate cells by delivering exogenous NAMPT[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 9955448.

(本文编辑 田梦妍)