

本文引用: 李硕夫, 刘宏哲, 张嘉麟, 杨雷, 陈龙, 郭彦涛, 刘芙蓉. 牛膝总皂苷对 IL-1 β 诱导髓核细胞的凋亡及炎性损伤的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1591-1597.

牛膝总皂苷对 IL-1 β 诱导髓核细胞的凋亡及炎性损伤的影响

李硕夫¹, 刘宏哲², 张嘉麟³, 杨雷¹, 陈龙¹, 郭彦涛¹, 刘芙蓉^{4*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南省人民医院, 湖南长沙 410002;

3. 中南大学, 湖南长沙 410083; 4. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

【摘要】目的 通过观察髓核细胞(nucleus pulposus cell, NPC)的凋亡、炎症及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢研究不同浓度牛膝总皂苷(achyranthes bidentata saponin, ABS)对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导人源 NPC 损伤的保护作用。**方法** 通过 IL-1 β 诱导建立 NPC 退变模型, 随机将细胞分为正常组、模型组(10 ng/mL IL-1 β)、ABS 低剂量组(10 ng/mL IL-1 β +3 μ g/mL ABS)、ABS 中剂量组(10 ng/mL IL-1 β +10 μ g/mL ABS)及 ABS 高剂量组(10 ng/mL IL-1 β +30 μ g/mL ABS), 干预 24 h。CCK-8 法检测细胞活力, 采用 Tunel 法和流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(B-cell lymphoma-2-associated X protein, Bax)、天冬氨酸蛋白酶 3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-x1(B-cell lymphoma-x1, Bcl-x1)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)和血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5(recombinant a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-5, ADAMTS-5)蛋白表达情况。**结果** 与正常组比较, 模型组 NPC 活力显著下降($P<0.01$), 凋亡率增加($P<0.01$), Bax、Caspase-3、COX-2、MMP-3 和 ADAMTS-5 蛋白表达升高($P<0.05$), Bcl-x1 蛋白表达降低($P<0.05$); 与模型组比较, 不同浓度的 ABS 处理后, NPC 活力显著上升($P<0.05$), 凋亡率减少($P<0.05$), Bax、Caspase-3、COX-2、MMP-3 和 ADAMTS-5 蛋白表达降低($P<0.05$), Bcl-x1 蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论** ABS 可以通过抑制由 IL-1 β 诱导引起的 NPC 凋亡、炎症反应、ECM 降解, 促进细胞增殖和活性, 对 NPC 产生保护作用, 其机制可能与抑制 Bax、Caspase-3、ADAMTS-5、MMP-3 及 COX-2 表达, 促进 Bcl-x1 表达相关。

【关键词】 炎性损伤; 牛膝总皂苷; 髓核细胞; 细胞凋亡; 椎间盘退行性变性

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.007

Effects of achyranthes bidentata saponins on IL-1 β -induced apoptosis and inflammatory injury of nucleus pulposus cells

LI Shuofu¹, LIU Hongzhe², ZHANG Jialin³, YANG Lei¹, CHEN Long¹, GUO Yantao¹, LIU Xiaorong^{4*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan Provincial

People's Hospital, Changsha, Hunan 410002, China; 3. Central South University, Changsha, Hunan 410083, China;

4. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

【Abstract】Objective To investigate the protective effects of achyranthes bidentata saponin (ABS) on interleukin-1 β (IL-1 β) induced injury in human nucleus pulposus cell (NPC) by observing the apoptosis, inflammation, and extracellular matrix (ECM) metabolism of NPC. **Methods** The degeneration model of NPC was established by IL-1 β induction, the cells were randomly divided

【收稿日期】2023-04-10

【基金项目】湖南省自然科学基金项目(2022JJ80086, 2022JJ70029); 湖南省卫生健康委员会计划研究项目(D202302078705); 湖南省中医药管理局科研计划项目(B2023150, 2021161, D2022094); 长沙市自然科学基金项目(kq2202460)。

【第一作者】李硕夫, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 中医药防治脊柱脊髓损伤。

【通信作者】* 刘芙蓉, 女, 讲师, 硕士, E-mail: 364059345@qq.com。

into normal group, model group (10 ng/mL IL-1 β), low- (10 ng/mL IL-1 β +3 μ g/mL ABS), medium- (10 ng/mL IL-1 β +10 μ g/mL ABS), and high-dose (10 ng/mL IL-1 β +30 μ g/mL ABS) ABS groups, and the intervention was performed for 24 h. Cell viability was determined by CCK-8 assay, and apoptosis was tested by TUNEL assay and flow cytometry; Western blot was used to determine the protein expressions of B-cell lymphoma-2-associated X protein (Bax), cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-x1 (Bcl-x1), cyclooxygenase-2 (COX-2), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and recombinant a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-5 (ADAMTS-5). **Results** Compared with the normal group, the model group showed significantly lower NPC viability ($P<0.01$), higher apoptosis rate ($P<0.01$), elevated protein expressions of Bax, Caspase-3, COX-2, MMP-3, and ADAMTS-5 ($P<0.05$), and reduced Bcl-x1 protein expression ($P<0.05$); compared with the model group, after ABS treatment of different concentrations, NPC viability increased significantly ($P<0.05$), apoptosis rate was reduced ($P<0.05$), the protein expressions of Bax, Caspase-3, COX-2, MMP-3, and ADAMTS-5 were lower ($P<0.05$), and Bcl-x1 protein expression was higher ($P<0.05$). **Conclusion** ABS has protective effects on NPCs by inhibiting apoptosis, inflammatory response, and ECM degradation of NPC induced by IL-1 β and promoting cell proliferation and activity. Its mechanism may be related to the inhibition of Bax, Caspase-3, ADAMTS-5, MMP-3, and COX-2 expressions, and the promotion of Bcl-x1 expression.

[**Keywords**] inflammatory injury; *Achyranthes bidentata* saponins; nucleus pulposus cells; apoptosis; intervertebral disc degeneration

腰痛是临床上最为常见的症状之一^[1],流行病学显示,全球约有80%的人会在一生中经历一次腰痛^[2],其中24%~80%的人在一年内会再次发作^[3];而在我国,腰痛已经成为45岁以下人群丧失劳动能力的首要原因^[4]。椎间盘退行性变性(intervertebral disc degeneration, IDD)被认为是引起腰痛的主要原因^[5-6],其病变本质可能是免疫炎症反应及氧化应激损伤等引起的髓核细胞(nucleus pulposus cell, NPC)数量减少和功能下降,以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢的异常^[7]。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)等炎症因子被认为是引起IDD和腰痛的关键介质,在IDD中显著上调,并且参与NPC凋亡以及ECM的降解,是引起IDD的重要原因之一^[8-10]。因此,抑制炎症因子的表达,减少细胞凋亡和ECM降解是改善IDD的主要方法。此外,积极寻找抑制NPC炎性损伤,减少NPC凋亡的药物,对于延缓IDD也至关重要。

IDD属于中医学“痹病”“腰痛”范畴,中医病机主要是肝肾亏虚,腰府失养,瘀血阻络,治疗以补肾活血为主。牛膝具有补肾、健骨、强脊等功效,是临床上治疗腰痛病的常用中药之一,其有效成分牛膝总皂苷(*Achyranthes bidentata* saponins, ABS)被证实具有抑制软骨细胞炎症反应^[11]、促进软骨细胞增殖^[12]、抑制软骨细胞凋亡^[13]等作用,并可抑制COX-2的产生^[14]。NPC被称为“类软骨细胞”,其与关节软骨细胞

的结构和生存环境十分相似。ABS是否能抑制NPC的炎性损伤,减少凋亡,抑制ECM降解,促进NPC数量及功能恢复等,还未见相关报道。本实验以人源NPC为研究对象,通过IL-1 β 诱导建立NPC退变模型,观察ABS对NPC的凋亡、炎症及ECM代谢的影响,并初步探究ABS对NPC损伤的保护作用及机制,以期延缓IDD和临床应用ABS提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

退行性NPC(批号:LY0104)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂

牛膝(批号:A220113)、胰酶消化液(批号:01A220418)、双抗青/链霉素(货号:SV30010)均购自上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清(批号:8122618,美国Grand Island Biological Company公司);细胞冻存液(批号:20220809)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(批号:08A230615)、RIPA裂解液(批号:04B230707)、蛋白磷酸酶抑制剂(批号:01B230713)、SuperECL Plus超敏发光液(批号:06C230629)、10%过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)(批号:02C230726)、10%十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)(批号:01D230727)、四甲基乙二胺(批号:03D230615)均购自长沙艾碧维生物科技有限公司;CCK-8试剂盒(批号:PN659,日

本同仁化学研究所);凋亡试剂盒(批号:20220731,江苏凯基生物技术股份有限公司);B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(B-cell lymphoma-2-associated X protein, Bax)抗体(批号:GR3275117-9)、B细胞淋巴瘤-x1(B-cell lymphoma-x1, Bcl-x1)抗体(货号:ab32370)、血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-5(recombinant a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-5, ADAMTS-5)抗体(批号:GR116650-1)、COX-2抗体(货号:ab179800)、 β -actin(货号:66009-1-Ig)均购自英国艾博抗(上海)贸易有限公司;天冬氨酸蛋白水解酶3(cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase-3)抗体(货号:19677-1-AP)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)抗体(货号:17873-1-AP)、HRP山羊抗小鼠IgG抗体(货号:SA00001-1)、HRP山羊抗兔IgG抗体(货号:SA00001-2)均购自美国Proteintech公司。

1.3 主要仪器

超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司,型号:YT-CJ-2NB);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型号:DSZ2000X);电泳仪、电泳槽、转膜仪(北京六一仪器厂,型号:DYY-6C、DY-CZ-24DN、DYCZ-40D);多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:MB-530);低速离心机(上海知信仪器公司,型号:SL02)。

1.4 实验方法

1.4.1 ABS制取与定量测定 按照标准的川牛膝总皂苷提取流程提取ABS^[15]:称取川牛膝100g,放入圆底烧瓶(2L),加入95%乙醇1L,加热回流提取3次,1h/次,合并提取液,70℃水浴旋蒸浓缩至无醇味,剩余提取液加入纯水定容至1L,超声10min,抽滤后量取150mL抽滤液,经大孔吸附树脂柱,然后使用600mL的纯水将其中水溶性成分洗脱并丢弃,接着再用70%乙醇500mL继续洗脱,并收集此洗脱液干燥,直至重量不再变化。以齐墩果酸对照品为参照,最后使用紫外可见分光光度法分析。

1.4.2 NPC退变模型的建立及实验分组 将对数生长期的NPC,按照 1×10^5 个/孔接种于96孔板中,IL-1 β 和ABS浓度参考相关文献[16-17]设定,设置5个组,每组5个复孔:正常组、模型组(10ng/mL的IL-1 β)、ABS低剂量组(10ng/mL的IL-1 β +3 μ g/mL ABS)、ABS中剂量组(10ng/mL的IL-1 β +10 μ g/mL ABS)和ABS高剂量组(10ng/mL的IL-1 β +30 μ g/mL

ABS)。按照分组建立细胞培养体系后,将各处理组细胞置于37℃,5%CO₂培养箱中培养24h,结束后收集细胞,进行后续实验研究。

1.4.3 Tunel法及流式细胞术检测NPC凋亡 (1)Tunel染色观察NPC凋亡。收集各组处理后的NPC,制作爬片,固定,按照Tunel凋亡试剂盒说明书步骤操作。显微镜下计数凋亡细胞数及总细胞数,计算凋亡指数。(2)流式细胞术检测细胞凋亡。收集各组处理后的NPC,使用PBS将收集到的细胞洗涤2次,再2000r/min,离心5min,离心半径为9cm。然后按照说明书,将500 μ L的结合缓冲液悬浮细胞加入试管,先加入5 μ L Annexin V-APC混匀,再加入5 μ L碘化丙锭溶液混匀,最后在室温、避光条件下使其充分反应10min,并在1h内使用流式细胞仪观察、检测。

1.4.4 CCK-8实验检测细胞活力 收集各组处理后的NPC,调整细胞浓度,按照 5×10^5 个细胞/孔密度接种于96孔板内,每个孔加10 μ L CCK-8标准液,先使用完全培养基将CCK-8配制浓度为10%的溶液,去除含药培养基后,再每孔加入100 μ L的上述配制含CCK-8溶液的培养基。在37℃,5%CO₂环境下孵育4h,使用多功能酶标仪分析NPC在450nm处的吸光度(optical density, OD)值,计算细胞存活率,对照组细胞相对存活率设定为100%,其余各组细胞相对存活率计算如下:存活率=(实验组OD值-正常组OD值)/正常组OD值 \times 100%。

1.4.5 Western blot检测Bax、Bcl-x1、Caspase-3、ADAMTS-5、MMP-3及COX-2蛋白表达情况 收集各组处理后的NPC,采用含有PMSF的RIPA裂解液提取细胞中的总蛋白,测量样品蛋白浓度后,上样电泳。冰浴中给予250mA电流转膜。洗涤PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭90min后,将PVDF膜与稀释的一抗Bax(1:2000)、Caspase-3(1:1000)、Bcl-x1(1:1000)、ADAMTS-5(1:250)、MMP-3(1:1000)、COX-2(1:2000)、 β -actin(1:5000)在4℃过夜温育,TBST洗涤3次,每次10min,加入二抗HRP山羊抗小鼠IgG(1:5000)或HRP山羊抗兔IgG(1:6000),室温下孵育2h。膜上滴加ECL发光显色液后,于化学发光成像系统下进行检测,使用Image Pro Plus 6.0软件对蛋白条带进行灰度扫描,分析蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法

使用SPSS 22.0软件进行统计学分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,符合正态分布者采用方差分析,不符合正态分布的采用Wilcoxon检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ABS对IL-1 β 诱导的NPC细胞活力的影响

与正常组比较,模型组 NPC 细胞活力显著下降($P<0.01$);与模型组比较,ABS 低、中、高剂量组 NPC 中细胞活力明显增加($P<0.05$);与 ABS 低剂量组比较,ABS 中、高剂量组细胞活力明显增加($P<0.05$)。详见图 1。

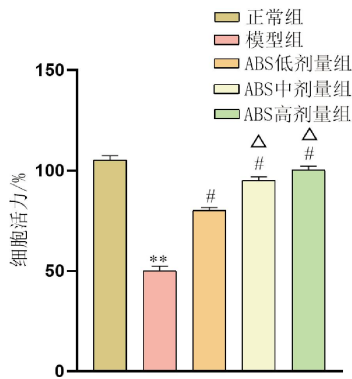


图 1 不同浓度 ABS 对 NPC 活力的影响(n=5)

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$;与 ABS 低剂量组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.2 ABS对IL-1 β 诱导的NPC阳性率及凋亡的影响

正常 NPC 核呈蓝紫色,凋亡细胞核为绿色荧光。与正常组比较,模型组 NPC 阳性率显著上升($P<0.01$);与模型组比较,ABS 低、中、高剂量组 NPC 阳性率降低($P<0.05$);与 ABS 低剂量组比较,ABS 中、高剂量组 NPC 阳性率明显降低($P<0.05$)。详见图 2。

与正常组比较,模型组细胞凋亡率增加($P<0.01$);与模型组比较,ABS 低、中、高剂量组细胞凋亡率降低($P<0.05$);与 ABS 低剂量组比较,ABS 中、高剂量组细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。详见图 3。

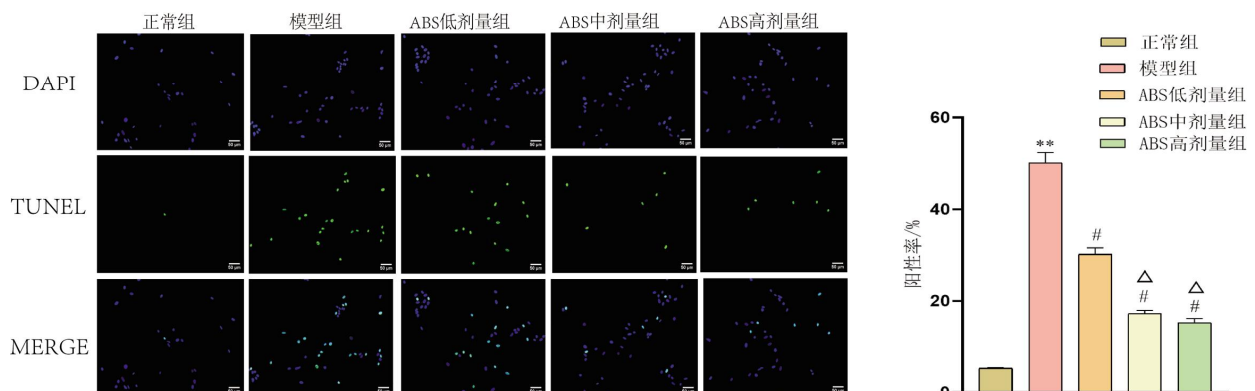


图 2 不同浓度 ABS 对 NPC 阳性率的影响(x200)(n=5)

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$;与 ABS 低剂量组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.3 ABS对IL-1 β 诱导的NPC的ECM代谢相关蛋白ADAMTS-5、MMP-3表达的影响

与正常组相比,模型组 NPC 中 ADAMTS-5、MMP-3 蛋白表达显著上调($P<0.05$);与模型组相比,ABS 低、中、高剂量组 NPC 中 ADAMTS-5、MMP-3 蛋白表达均显著降低($P<0.05$);与 ABS 低剂量组比较,ABS 中、高剂量组 NPC 中 ADAMTS-5、MMP-3 蛋白表达降低($P<0.05$)。详见图 4。

2.4 ABS对IL-1 β 诱导的NPC凋亡相关蛋白Bax、Bcl-xl及Caspase-3表达的影响

与正常组相比,模型组 NPC 中 Bax、Caspase-3 蛋白表达显著上调($P<0.05$),Bcl-xl 蛋白表达显著下调($P<0.05$);与模型组相比,ABS 低、中、高剂量组 NPC 中 Bax、Caspase-3 蛋白表达均显著下调($P<0.05$),Bcl-xl 蛋白表达显著上调($P<0.05$);与 ABS 低剂量组比较,ABS 中、高剂量组 NPC 中 Bax、Caspase-3 蛋白表达降低($P<0.05$),Bcl-xl 蛋白表达升高($P<0.05$)。详见图 5。

2.5 ABS对IL-1 β 诱导的NPC炎症蛋白COX-2表达的影响

与正常组比较,模型组 NPC 中 COX-2 蛋白的表达显著增加($P<0.05$);与模型组比较,ABS 低、中、高剂量组 NPC 中 COX-2 蛋白的表达显著下降($P<0.05$);与 ABS 低剂量组比较,ABS 中、高剂量组 NPC 中 COX-2 蛋白表达降低($P<0.05$)。详见图 6。

3 讨论

腰痛属于复杂难治性疾病,中医学认为其病机主要是本虚标实,以肝肾亏虚为本,瘀血阻络为标,正如《医林绳墨·卷五》言:“故大抵腰痛之证,因于劳损而肾虚者甚多。”现代医学认为,腰痛与 IDD 的关系密切,而 IDD 的致病因素较多,与衰老、机械压

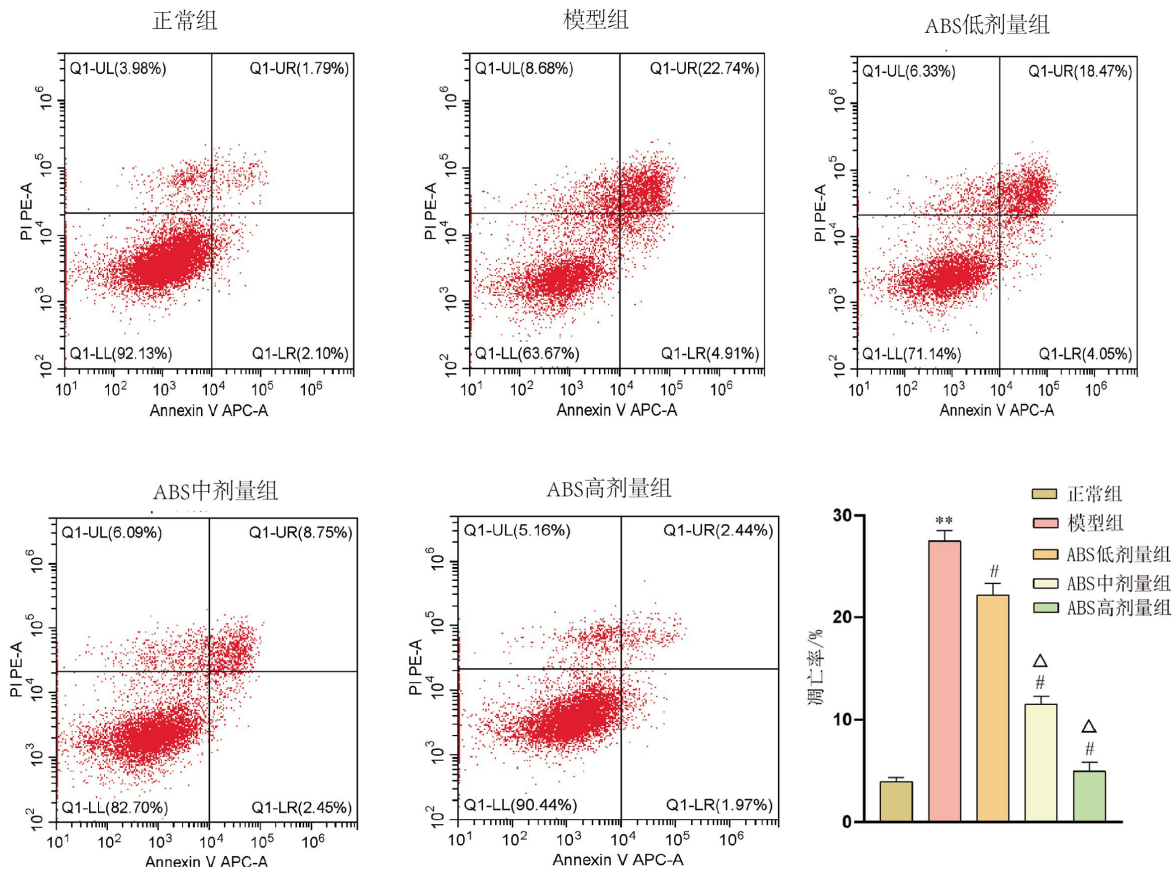


图3 不同浓度 ABS 对NPCs 凋亡率的影响(n=5)

注:与正常组比较,**P<0.01;与模型组比较,#P<0.05;与ABS低剂量组比较,△P<0.05。

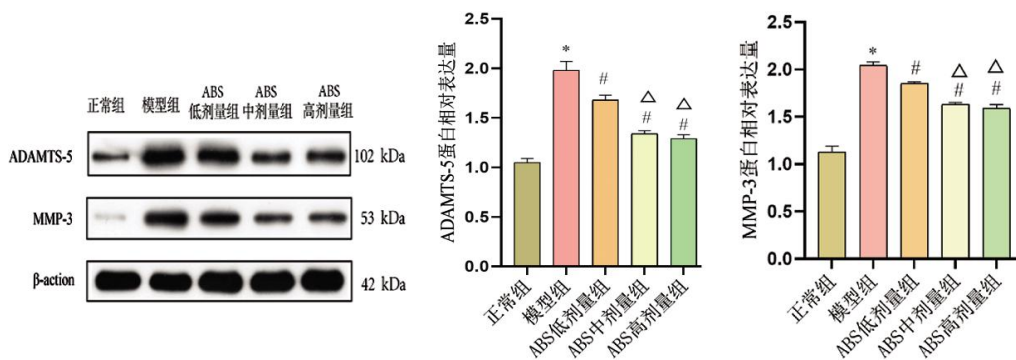


图4 不同浓度 ABS 对ADAMTS-5、MMP-3 蛋白表达的影响(n=5)

注:与正常组比较,*P<0.05;与模型组比较,#P<0.05;与ABS低剂量组比较,△P<0.05。

力、炎症、肥胖、高血糖等因素均相关^[18-19]。椎间盘主要由 ECM 和少量细胞构成,其中 NPC 是主要细胞成分,也是合成 ECM 的主要细胞。IDD 表现为细胞数量下降以及 ECM 合成不足、分解增多^[20]。现代研究表明,炎症反应是引起椎间盘内细胞数量下降和ECM 代谢障碍的主要原因之一^[5],尤其以 IL-1β、TNF-α、IL-6 等为代表的炎症因子增加^[21-22],不仅会刺激细胞,引发细胞凋亡,还会通过促进 MMP-3、ADAMTS-5 等降解酶的增加引起 ECM 中的蛋白聚糖、纤维蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白及胶原蛋白 II、IX、X 等物质的降解,导致椎间盘结构和功能的改变,加速 IDD

的病理过程^[23]。此外,COX-2 也是触发炎症反应的关键环节,过量的炎症因子累积会引起 COX-2 水平快速升高至正常水平的 10~80 倍^[24],引起炎症部位前列腺素 E2(prostaglandin-e-2, PGE2)、前列环素 I2 (prostaglandin-i-2, PGI2)和前列腺素 E1 (prostaglandin-e-1, PGE1)含量的增加,导致炎症损伤进一步加重,还会引发炎症疼痛^[25]。可见,减少炎症反应对椎间盘的损伤是延缓 IDD 的重要途径。

细胞凋亡是受基因调控的程序性死亡,主要受 Bcl-2 家族、Caspase 家族、癌基因、抑癌基因 p53 等调控,其中 Bax、Bcl-xl 及 Caspase-3 等是最具有代

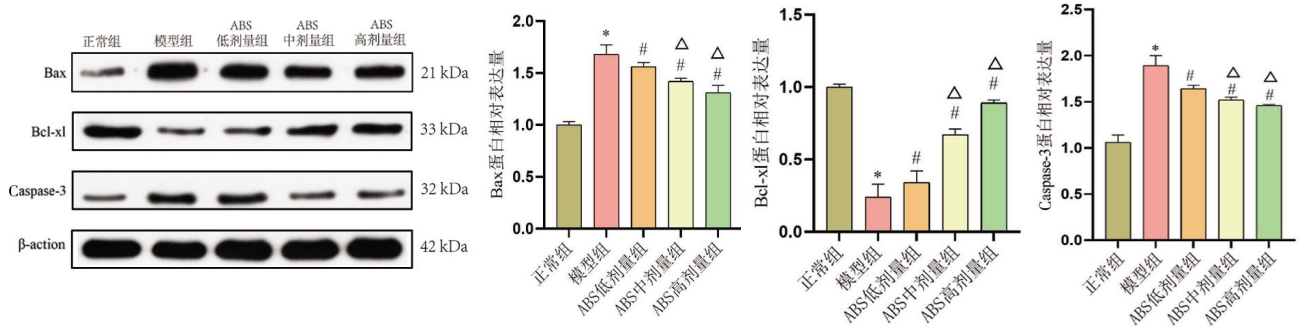


图5 不同浓度 ABS 对 Bax、Bcl-xl 及 Caspase-3 蛋白表达影响(n=5)

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与 ABS 低剂量组比较,^Δ $P<0.05$ 。

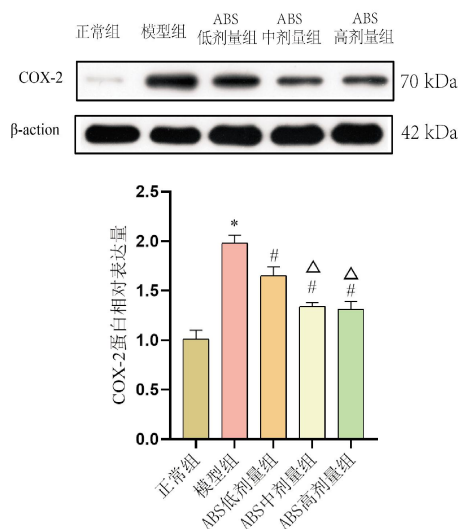


图6 ABS 对 COX-2 蛋白表达影响(n=5)

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与 ABS 低剂量组比较,^Δ $P<0.05$ 。

表性的调控基因,Bax 属于促凋亡类,也是人体最主要的凋亡基因,被激活时能够形成寡聚体从细胞浆内转到线粒体膜上,与相应孔蛋白结合,改变线粒体膜的通透性,使蛋白水解酶以及细胞色素 C(cytochrome C release, CytC)等激活,最后导致细胞凋亡^[26]。通常情况下,当 Bax 含量增多时,Bax/Bax 同源二聚体形成,使得细胞对死亡信号更敏感,启动凋亡过程^[27]。Bcl-xl 属于抗凋亡蛋白,可以通过与 Bax 结合形成 Bax/Bcl-xl 二聚体,阻止 Bax/Bax 二聚体形成,从而竞争性抑制细胞凋亡^[28]。Caspase-3 则是凋亡过程中关键的执行酶,在细胞中通常以酶原的形式存在,在被激活后,被切割成小分子片段,降解各种蛋白,其凋亡的作用可被 Bcl-xl 阻断^[29]。

目前常用于治疗 IDD 引起的腰痛的经典方法是手术切除椎间盘以减轻疼痛^[30]。但手术并不能修复或减缓潜在的退行性病变,同时还存在加重临椎

IDD 的风险。相比于纯粹地机械性切除椎间盘,中医药具有多靶点、多途径、多效应的特点,具有恢复退变椎间盘生物功能、缓解病变、降低并发症等优点,已在防治腰痛及 IDD 中发挥作用^[31]。牛膝是临床上防治腰痛的常用药物,中医学认为其具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行的功效。ABS 是牛膝的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用^[32],但其在 IDD 中的研究相对较少,因此,深入研究 ABS 对 IDD 的治疗作用对于防治腰痛意义重大。

本研究结果显示,IL-1 β 处理后的 NPC,细胞凋亡及细胞阳性率显著增加,细胞活性降低,说明 IL-1 β 诱导可以引起 NPC 炎性损伤,降低细胞活力,促进细胞凋亡。而使用不同浓度的 ABS 进行干预后,NPC 的凋亡率显著下降,细胞活力显著上升,细胞凋亡率下降,说明 ABS 能够对 IL-1 β 诱导的 NPC 产生保护作用,增强 NPC 细胞活力,抑制 NPC 细胞凋亡率。在进一步探究其治疗机制过程中发现,IL-1 β 诱导 NPC 的 Bcl-xl 蛋白的表达显著降低,Bax、Caspase-3、ADAMTS-5、MMP-3 及 COX-2 蛋白的表达明显增加,说明 IL-1 β 诱导引起的炎性损伤过程中伴随着 ADAMTS-5、MMP-3 等降解酶增加引起的 ECM 降解,以及促凋亡因子 Bax、Caspase-3 等的上升,抗凋亡因子 Bcl-xl 的减少,而使用不同浓度的 ABS 进行干预后,Bax、Caspase-3、ADAMTS-5、MMP-3 及 COX-2 水平显著下降,Bcl-xl 显著上升,也说明 ABS 可以通过抑制炎症反应、ECM 降解和细胞凋亡对 NPC 产生保护作用。

综上所述,ABS 可以通过抑制由 IL-1 β 诱导引起的人源 NPC 凋亡、炎性损伤、ECM 降解,增强细胞活性,对 NPC 损伤产生保护作用,其机制可能与抑制 Bax、Caspase-3、ADAMTS-5、MMP-3 及 COX-2 上升,促进 Bcl-xl 表达有关。

参考文献

- [1] KNEZEVIC N N, CANDIDO K D, VLAEYEN J W S, et al. Low back pain[J]. *Lancet*, 2021, 398(10294): 78–92.
- [2] CHOU R. Low back pain[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2021, 174(8): ITC113–ITC128.
- [3] WILL J S, BURY D C, MILLER J A. Mechanical low back pain[J]. *American Family Physician*, 2018, 98(7): 421–428.
- [4] 白跃宏. 下腰痛的康复[J]. *中国矫形外科杂志*, 2005, (3): 67–71.
- [5] FRANCISCO V, PINO J, GONZÁLEZ-GAY M Á, et al. A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2022, 18(1): 47–60.
- [6] 王镇远, 冯帅华, 李泽湘, 等. 补肾活血汤对大鼠腰椎间盘退行性变模型 Fas/FasL 信号通路的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(3): 430–436.
- [7] KIRNAZ S, CAPADONA C, WONG T, et al. Fundamentals of intervertebral disc degeneration[J]. *World Neurosurgery*, 2022, 157: 264–273.
- [8] WILLEMS N, TELLEGEN A R, BERGKNUT N, et al. Inflammatory profiles in canine intervertebral disc degeneration [J]. *BMC Veterinary Research*, 2016, 12: 10.
- [9] WANG Y, CHE M, XIN J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110660.
- [10] RISBUD M V, SHAPIRO I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2014, 10(1): 44–56.
- [11] 任立桐, 姚志城, 喻晓龙. 基于 NF- κ B 信号通路探讨 ABS 治疗膝骨性关节炎滑膜炎效果机制[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2023, 21(6): 164–166.
- [12] 陈浩雄, 徐启良, 黄竞杰, 等. ABS 体外干预膝关节炎软骨细胞增殖与凋亡的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(22): 2400–2404.
- [13] 黄竞杰, 杨俊兴, 陈浩雄. ABS 治疗膝骨关节炎的药理研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(4): 592–595.
- [14] ZHANG K, ZENG X, CHEN Y, et al. Therapeutic effects of Qian-Yu Decoction and its three extracts on carrageenan-induced chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in rats[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 75.
- [15] 程永杰, 杨兴鑫, 张艳利, 等. 正交试验法优选牛膝的提取工艺[J]. *山西医科大学学报*, 2010(1): 42–44.
- [16] 岳宗进, 于露, 刘汝银, 等. 西红花酸对白细胞介素-1 β 诱导的 NPCs 退变的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(16): 3525–3528.
- [17] XU X X, ZHANG X H, DIAO Y, et al. Achyranthes bidentate saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis in vitro[J]. *Kaohsiung Journal of Medical Science*, 2017, 33(2): 62–68.
- [18] LI G, ZHANG W, LIANG H, et al. Epigenetic regulation in intervertebral disc degeneration[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2022, 28(10): 803–805.
- [19] CANNATA F, VADALÀ G, AMBROSIO L, et al. Intervertebral disc degeneration: A focus on obesity and type 2 diabetes[J]. *Diabetes–metabolism Research and Reviews*, 2020, 36(1): 3224–3246.
- [20] YAMADA K, IWASAKI N, SUDO H. Biomaterials and cell-based regenerative therapies for intervertebral disc degeneration with a focus on biological and biomechanical functional repair: Targeting treatments for disc herniation[J]. *Cells*, 2022, 11(4): 602–630.
- [21] LIN X, LIN Q. MiRNA-495-3p attenuates TNF- α induced apoptosis and inflammation in human nucleus pulposus cells by targeting IL-5R α [J]. *Inflammation*, 2020, 43(5): 1797–1805.
- [22] NAVONE S E, PEROGLIO M, GUARNACCIA L, et al. Mechanical loading of intervertebral disc modulates microglia proliferation, activation and chemotaxis[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2018, 26(7): 978–987.
- [23] ZHAO Y, LI A. miR-19b-3p relieves intervertebral disc degeneration through modulating Pten/PI3k/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Aging*, 2021, 13(18): 22459–22473.
- [24] TALUKDER S, AHMED K S, HOSSAIN H, et al. Fimbristylis aestivalis Vahl: A potential source of cyclooxygenase-2(COX-2) inhibitors[J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(6): 2301–2315.
- [25] WANG Y, ZHENG G, XIE X, et al. Low-dose celecoxib-loaded PCL fibers reverse intervertebral disc degeneration by up-regulating CHSY3 expression[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 76–94.
- [26] SPITZ A Z, GAVATHIOTIS E. Physiological and pharmacological modulation of Bax[J]. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2022, 43(3): 206–220.
- [27] SPITZ A Z, ZACHARIOUDAKIS E, REYNA D E, et al. Eltrombopag directly inhibits Bax and prevents cell death[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1134–1149.
- [28] WANG B, MAI Z, DU M, et al. Bcl-xl directly retrotranslocates the monomeric BAK[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2019, 61: 1–9.
- [29] LI X, HU L, ZHU X, et al. The effect of Caspase-3 in mitochondrial apoptosis activation on degradation of structure proteins of esox lucius during postmortem storage[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 367: 130767.
- [30] XIN J, WANG Y, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration[J]. *Orthopaedic Surgery*, 2022, 14(7): 1271–1280.
- [31] 姜海涛, 李四波, 居宇峰, 等. 中医干预颈椎间盘退变的基础研究进展[J]. *陕西中医*, 2018, 39(2): 271–273.
- [32] 林平冬, 翁霞萍, 刘发元, 等. 牛膝有效成分防治骨关节炎的作用机制探讨[J]. *风湿病与关节炎*, 2015, 4(2): 56–59.