

- [16] Martínez C, Sánchez M, Hidalgo A, *et al.* Mechanisms of diethylstilbestrol-induced relaxation in rat aorta smooth muscle [J]. *Vascul Pharmacol*, 2003, 40(4): 197-204.
- [17] 中华中医药学会, 中药实验药理专业委员会. 痛经动物模型制备规范(草案) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 20-24.
- [18] 马青, 师伟, 刘少玲, 等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠血清 E<sub>2</sub>、P、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、TXB<sub>2</sub> 及 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(5): 1281-1284.
- [19] Moya R, Moisa C F, Wynter H, *et al.* Transdermal glyceryl trinitrate in the management of primary dysmenorrhea[J]. *Int J Gynecol Obstet*, 2000, 69(2): 113-118.
- [20] 张来宾, 阎玺庆, 段金殿, 等. 艾叶不同提取物对小鼠原发性痛经的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 205-208.
- [21] Dawood M Y. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management [J]. *Obstet Gynecol*, 2006, 108(2): 428-441.
- [22] Ilhan N, Halifeoglu I, Ozercan H I, *et al.* Tissue malondialdehyde and adenosine triphosphatase level after experimental liver ischaemia-reperfusion damage[J]. *Cell Biochem Funct*, 2001, 19(3): 207-212.

## 地黄梓醇对椎间盘髓核细胞 NLRP3 炎性体的调控作用

张鹏<sup>1,2</sup>, 尹志良<sup>2</sup>, 朱献忠<sup>2</sup>, 刘康<sup>3</sup>, 冯刚<sup>1,3\*</sup>

(1. 西南医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 成飞医院, 四川 成都 610091; 3. 南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院, 四川 南充 637000)

**摘要:** 目的 研究地黄梓醇对椎间盘髓核细胞 NLRP3 炎性体的调控作用。方法 采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激大鼠原代椎间盘髓核细胞建立细胞模型, 地黄梓醇预给药。CCK8 法测定细胞活力, 流式细胞仪检测髓核细胞凋亡, ELISA 测定细胞上清液 T-SOD、MDA、IL-1β 水平, 实时荧光定量 PCR 测定 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1β mRNA 表达, Western blot 检测 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1β、NF-κB p65 蛋白表达, 免疫荧光法检测 TXNIP、NLRP3 表达。结果 地黄梓醇 (5、10 μmol/L) 能上调细胞上清液 T-SOD 水平, 下调 MDA、IL-1β 水平 (P<0.05), 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导髓核细胞凋亡 (P<0.05), 降低髓核细胞 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1β mRNA 及蛋白表达 (P<0.05, P<0.01), 并且 10 μmol/L 地黄梓醇能抑制 NF-κB p65 蛋白表达 (P<0.05)。结论 地黄梓醇可有效抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的髓核细胞凋亡, 可能与调控 ROS/NLRP3/IL-1β 通路轴有关。

**关键词:** 地黄梓醇; 过氧化氢; 髓核细胞; NLRP3

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0061-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.014

## Regulatory effects of catapcol on NLRP3 inflammasome in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc

ZHANG Peng<sup>1,2</sup>, YIN Zhi-liang<sup>2</sup>, ZHU Xian-zhong<sup>2</sup>, LIU Kang<sup>3</sup>, FENG Gang<sup>1,3\*</sup>

(1. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Chengfei Hospital, Chengdu 610091, China; 3. Nanchong Central Hospital · The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

收稿日期: 2019-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81071270); 四川省教育厅创新团队计划项目 (13TD0030); 南充市市校合作科研专项计划项目 (NSMC20170310)

作者简介: 张鹏 (1981—), 男, 硕士生, 副主任医师, 从事椎间盘退行性疾病的基础与临床研究。Tel: (028) 87455213, E-mail: 748781174@qq.com

\*通信作者: 冯刚 (1969—), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事骨和软组织工程、椎间盘退行性变疾病的生物治疗研究。Tel: (0817) 2258108, E-mail: fenggangncc@163.com

**ABSTRACT: AIM** To study the regulatory effects of catapol on NLRP3 inflammasome in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. **METHODS** Pre-administered with catapol, the primary nucleus pulposus cells in rats were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to establish the cell models. Subsequently the cells were subjected to the detection of cellular viability by CCK8; cell apoptosis by flow cytometry; T-SOD, MDA and IL-1 levels of cell supernatant by ELISA; mRNA expressions of *TXNIP*, *NLRP3*, *caspase-1* and *IL-1β* by real-time quantitative PCR; the protein expressions of *TXNIP*, *NLRP3*, *caspase-1*, *IL-1β*, *NF-κB p65* by Western blot; and the expressions of *TXNIP* and *NLRP3* by immunofluorescence. **RESULTS** Catapol at either concentration of 5 μmol/L or 10 μmol/L up-regulated the T-SOD level of cell supernatant, down-regulated the levels of MDA and IL-1β ( $P < 0.05$ ), and inhibited the apoptosis of nucleus pulposus cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ), decreased the expression of *TXNIP*, *NLRP3*, *caspase-1*, *IL-1β* mRNA and protein in nucleus pulposus cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Furthermore, inhibited expression of *NF-κB p65* protein was observed with the intervention of 10 μmol/L catapol ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** Catapol's effective inhibition on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of medullary nucleus cells may contribute to its regulatory effect on ROS/NLRP3/IL-1β pathway axis. **KEY WORDS:** Catapol; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; medullary nucleus cells; NLRP3

椎间盘病变为临床骨科常见疾病之一，因其病理牵延性、严重损伤性及其继发性炎症已逐渐被临床所重视<sup>[1]</sup>。目前，椎间盘病变的临床病理机制尚未完全弄明白，现有的相关性结论大多与患者年龄、遗传、生物力学、生存环境等因素有关；近年来逐渐有学者提出了不同学说，从分子生物学（氧化应激反应、免疫炎症）、机械力学、细胞衰老等方面阐述了其观点<sup>[2]</sup>。椎间盘退行性改变的病理学基础是病灶部位髓核细胞减少引起的胞外基质合成减少和成分改变，继发细胞快速凋亡<sup>[3]</sup>，而过度凋亡是椎间盘髓核细胞减少的直接原因<sup>[4]</sup>。研究表明，细胞凋亡与胞内氧化应激反应有直接相关性<sup>[5]</sup>，因此，如何提高髓核细胞对氧化应激反应引起凋亡的防御能力，降低髓核细胞凋亡率成为了近年来治疗椎间盘病变领域的基础研究热点<sup>[6]</sup>。

地黄 *Rehmannia glutinosa* 为玄参科地黄属植物，其味甘、苦，性寒，块根为常用中药，素有清热生津、益精填髓之功效。对于地黄药效物质基础的研究比较明确的为环烯醚萜类，而其中又以梓醇最为突出。研究表明，地黄梓醇等成分具有调节免疫、抗骨质疏松、抗炎、神经保护、抗糖尿病等多种药理学，以及抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种生物学效应<sup>[7-8]</sup>，但目前对其抗椎间盘髓核细胞退变尚无系统全面的研究。本实验检测了地黄梓醇在体外对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激髓核细胞的影响，为加快该成分应用于临床相关疾病的治疗提供实验依据。

## 1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠（4~6 周龄），购于北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证

号 SCXK（京）2016-0011。

1.2 试剂与药物 地黄梓醇，质量分数 > 98%（南京道斯夫生物科技有限公司，批号 180612Z）。改良 1640 培养基（美国 Gibco 公司，批号 1848026）；青霉素、链霉素混合液（碧云天生物技术有限公司，批号 C0222）；CCK-8 细胞活力试剂盒（日本 Dojindo 公司，批号 GB707）；逆转录及 qPCR 试剂盒（北京全式金生物技术有限公司，批号 H31203）；抗 *TXNIP*、*IL-1β*、*NF-κB p65*（英国 Abcam 公司，货号分别为 ab188865、ab8320、ab7970）；抗 *NLRP3*、*caspase-1*（美国 STC 公司，批号分别为 13158、sc-514）；TRITC 标记的兔抗山羊二抗、FITC 标记的羊抗兔二抗（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号分别为 119343、116128）；T-SOD、MDA、*IL-1β*（北京安迪华泰生物科技有限公司，批号分别为 E-11084、E-10376、E-10083）；细胞凋亡检测试剂盒 Annexin V-FITC /PI（碧云天生物技术有限公司，批号 C3062M）。

1.3 仪器 多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；高速低温离心机（美国 Thermo Fisher 公司）；CO<sub>2</sub> 培养箱（日本 Sanyo 公司）；倒置相差显微镜（日本 Nikon 公司）；EVOS FL 无目镜荧光倒置显微镜（美国 AMG 公司）。

## 2 方法

2.1 细胞原代培养 SD 大鼠用大剂量麻醉药物处死，无菌条件下小心完整分离腰椎椎间盘，无菌 PBS 冲洗干净，小心去除非腰椎间盘组织，超净工作台上在解剖显微镜下分离椎间盘中凝胶状髓核组织，置于无菌培养皿中并剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 组织碎块，

转入培养瓶中，加入2倍量0.1%Ⅱ型胶原酶，37℃恒温振荡消化直至块状组织基本消失时终止消化，取上清，1400 r/min离心5 min，弃上清加入完全培养液，置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养，倒置显微镜下每天观察髓核细胞贴壁和生长情况，每3 d更换1次培养基，除去未贴壁细胞，继续培养贴壁细胞。髓核细胞形成单层后，0.25%胰蛋白酶（含EDTA）进行消化传代，取第3代细胞进行后续实验。

2.2 CCK-8 测定梓醇安全浓度及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用最佳浓度 取对数生长期椎间盘髓核细胞，收集细胞后将细胞浓度调整为 2×10<sup>5</sup>/mL 并接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 24 h，让其贴壁。将细胞培养板孔内的培养液吸出，设置地黄梓醇 7 个组（40、20、10、5、2.5、1.25、0 μmol/L）H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8 个组（1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 μmol/L）样品各 100 μL，每组各设 3 个复孔，实验重复至少 3 次。细胞按照上述方法处理后分别培养 24、48 h，进行细胞存活率测定。

2.3 分组 根据安全浓度测试结果，取对数期生长细胞随机分为空白组、模型组（500 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）、地黄梓醇（5 μmol/L）组、地黄梓醇（10 μmol/L）组。空白组不做任何处理；模型组用 500 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 24 h；地黄梓醇组用不同浓度成分预处理 1 h 后，500 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 24 h。

2.4 流式细胞术检测髓核细胞凋亡 调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>/mL 后接种于 6 孔板，每孔 2.5 mL，待细胞贴壁生长至 70% 左右时按“2.3”项下分组处理，24 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化髓核细胞，转入离心管中，4℃、1 500 r/min 离心 5 min，用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，4℃、1 500 r/min 离心 5 min，吸弃 PBS，加入 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞，每管加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 5 μL PI Staining Solution 后轻轻混匀，在避光、室温条件下孵育 15 min，加入 400 μL 1×Binding Buffer 混匀。上机检测。

2.5 测定细胞上清液 MDA、T-SOD、IL-1β 水平 调整细胞浓度为 2×10<sup>5</sup>/mL 后接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，培养箱培养中 24 h 后，根据细胞分组处理细胞，收集上清液进行 T-SOD、MDA、IL-1β 水平测定，具体步骤参见试剂盒说明书。每组各设 3 个复孔，实验重复至少 3 次。

2.6 实时荧光定量 PCR 测定 TXNIP、NLRP3、

casepase-1、IL-1β mRNA 调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>/mL，接种于 6 孔板，培养箱中培养 24 h 后根据细胞分组处理，Trizol 法提取 mRNA，置于 PCR 扩增仪中进行 mRNA 扩增，收集各组数据，并且进行统计学分析，2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各基因的相对表达。引物序列见表 1，PCR 扩增反应条件为预变性（95℃，2 min），变性（95℃，15 s），退火（57℃，15 s），延伸（72℃，1 min），55 个循环。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
TXNIP	正向 AAGCGTTGAGTAGTACAGATGAG
	反向 GGTATGCCGTGGCAAGAGTC
NLRP3	正向 CGGTGACCTTGTGTGTGCTT
	反向 TCATGTCTCTGAGCCATGGAAG
casepase-1	正向 GAACAAAGAAGGTGGCCGAT
	反向 AGACGTGTACGAGTGGGTCT
IL-1β	正向 CCTATGTCTTGCCCGTGGAG
	反向 CACACACTAGCAGGTCGTCA
β-action	正向 TTGTAACCAACTGGGACGATATGG
	反向 GATCTTGATCTTCATGCTGCTAGG

2.7 Western blot 检测蛋白表达 调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>/mL，每孔 2 000 μL 接种于 6 孔板，培养箱中培养 24 h 后按“2.3”项下分组处理，收集细胞，提取细胞总蛋白，BCA 试剂盒定量后 100℃变性 5 min。SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转移至 PVDF 膜。5% 的 BSA 室温封闭 1 h 后一抗（1:800）4℃孵育过夜。次日复温后 TBST 清洗 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育 1 h，PBS 清洗。室温下加入 ECL 发光液，凝胶成像系统曝光显影，Quantity One 软件统计灰度值，计算蛋白相对表达量。实验重复至少 3 次。

2.8 免疫荧光法测定 NLRP3 和 TXNIP 蛋白表达 调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>/mL，每孔 600 μL 接种于 24 孔板，培养箱中培养 24 h 后根据细胞分组处理，PBS 洗涤 3 次后弃上清液，4% 甲醛 500 μL 固定细胞 15 min，滴加 0.3% TritonX-100 打孔，5% BSA 封闭。滴加一抗，4℃放置过夜后复温，滴加荧光二抗，37℃避光孵育，甘油封片，上机观察并拍照。

2.9 统计学分析 采用 SPSS19.0 软件进行处理，计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，组间比较采用单因素方差分析，假定方差齐性采用 LSD 法检验，未假定方差齐性采用 Dunnett's T3 法检验，偏态分布的计

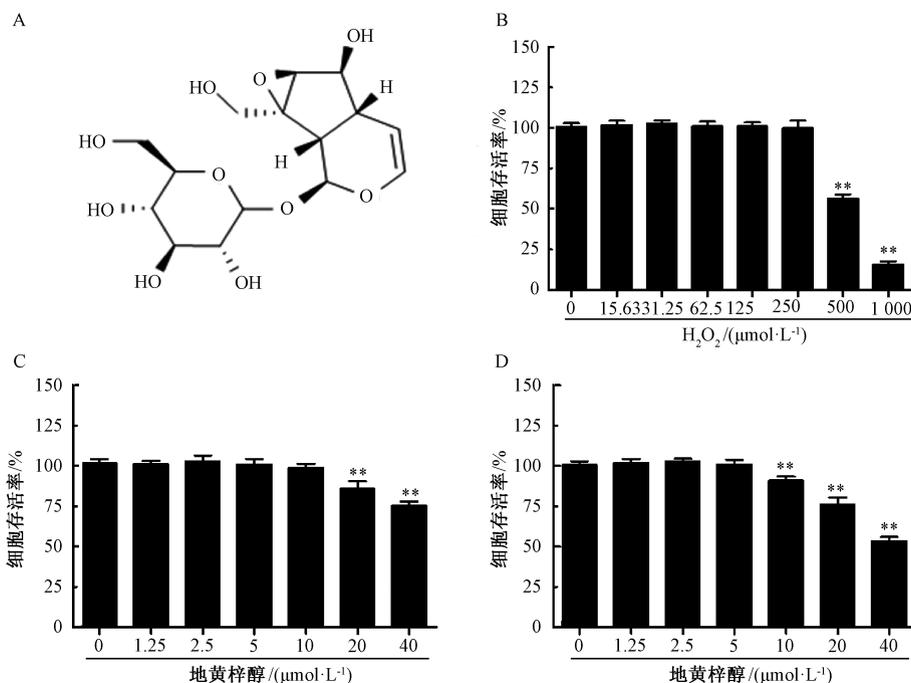
量资料组间比较采用 Kruskal-wallis 秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 地黄梓醇、 $H_2O_2$ 对大鼠髓核细胞毒性的影响

根据《美国药典》中细胞相对增殖率与细胞

毒性分级的关系, 500  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  作用 24 h 后细胞存活率为 56% 左右, 可用此浓度完成后续实验。地黄梓醇作用 24、48 h, 浓度为 1.25~20  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞毒性分级  $\leq 1$  级。见图 1。



注: A 为地黄梓醇分子结构, B 为不同浓度  $H_2O_2$  处理 24 h 后细胞的存活率, C 为不同浓度地黄梓醇处理 24 h 后细胞的存活率, D 为不同浓度地黄梓醇处理 48 h 后细胞的存活率。与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 地黄梓醇、 $H_2O_2$  对大鼠髓核细胞毒性的影响

Fig. 1 Effects of catalpol and  $H_2O_2$  on the cytotoxicity of rat nucleus pulposus cells

3.2 地黄梓醇对  $H_2O_2$  刺激后大鼠髓核细胞凋亡的影响 AnnexinV-FITC/PI 染色结果显示,  $H_2O_2$  刺激后, 细胞凋亡率上调 ( $P < 0.01$ ); 地黄梓醇预处理髓核细胞后,  $H_2O_2$  刺激所引起的细胞凋亡被抑制 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

3.3 地黄梓醇对  $H_2O_2$  刺激后大鼠髓核细胞上清液 T-SOD、MDA、IL-1 $\beta$  水平的影响 与模型组比较, 地黄梓醇能上调大鼠髓核细胞上清液 T-SOD 水平 ( $P < 0.05$ ), 下调 MDA、IL-1 $\beta$  水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 3。

3.4 地黄梓醇对 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组细胞 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 5、10  $\mu\text{mol/L}$  地黄梓醇预处理后抑制了 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 并且以 10  $\mu\text{mol/L}$  作用更强。见图 4。

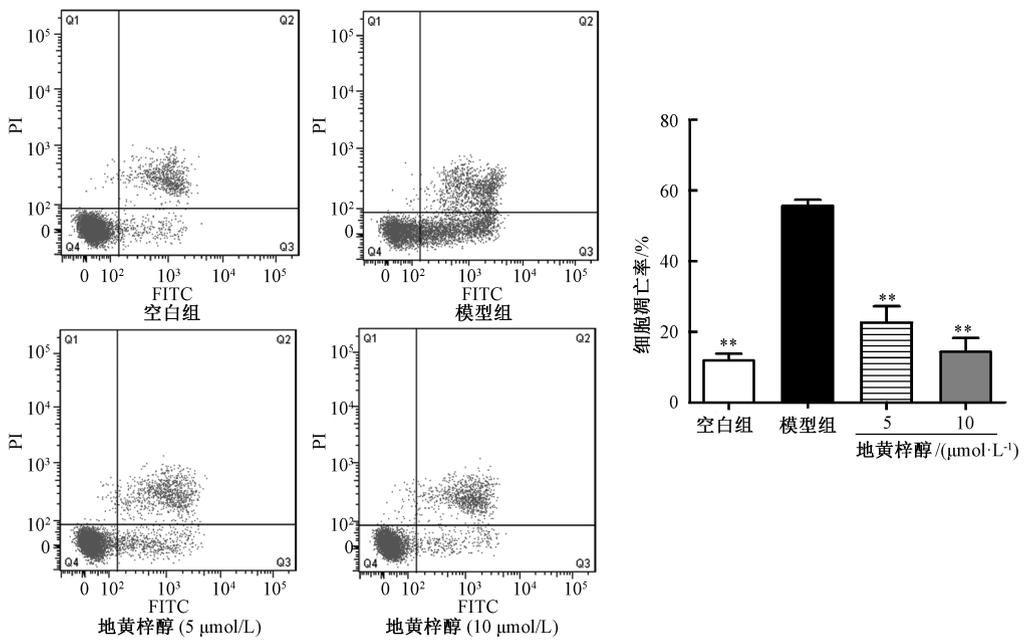
3.5 地黄梓醇对 TXNIP、NLRP3、caspase-1、

IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 地黄梓醇 (5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 5。免疫荧光结果显示, 与空白组比较, 模型组 NLRP3、TXNIP 表达均上调, 地黄梓醇 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组细胞两者表达降低, 见图 6。

3.6 地黄梓醇对 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响 与对照组比较, 模型组 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 10  $\mu\text{mol/L}$  地黄梓醇能抑制 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。见图 7。

### 4 讨论

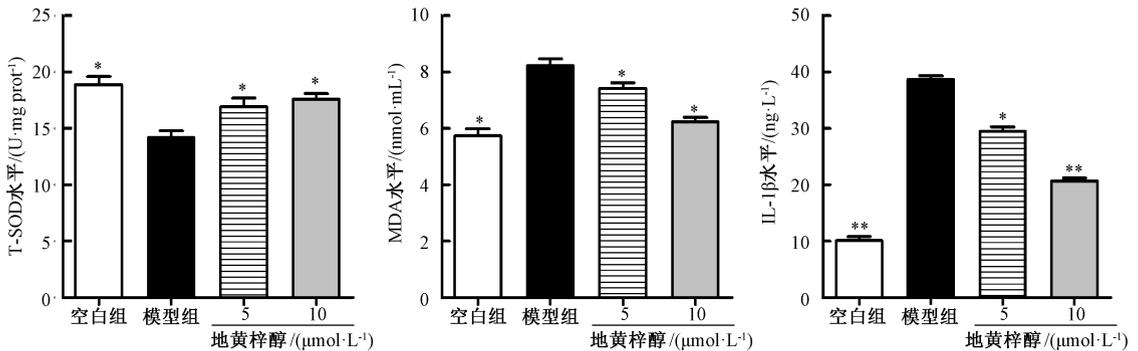
目前椎间盘退行性病变的治疗策略主要以减轻临床症状为主, 包括保守治疗和外科手术, 如果保守治疗失败, 通常会选择通过外科手术来减轻疼痛<sup>[9]</sup>, 然而, 这些治疗措施仅是对临床症状的改善, 而不是彻底解决病因。随着临床技术的不断进



注：与模型组比较，\*\*  $P < 0.01$ 。

图2 地黄梓醇对  $H_2O_2$  刺激后大鼠髓核细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of catalpol on apoptosis of rat nucleus pulposus cells stimulated by  $H_2O_2$



注：与模型组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

图3 地黄梓醇对  $H_2O_2$  刺激后大鼠髓核细胞上清液 T-SOD、MDA、IL-1β 水平影响

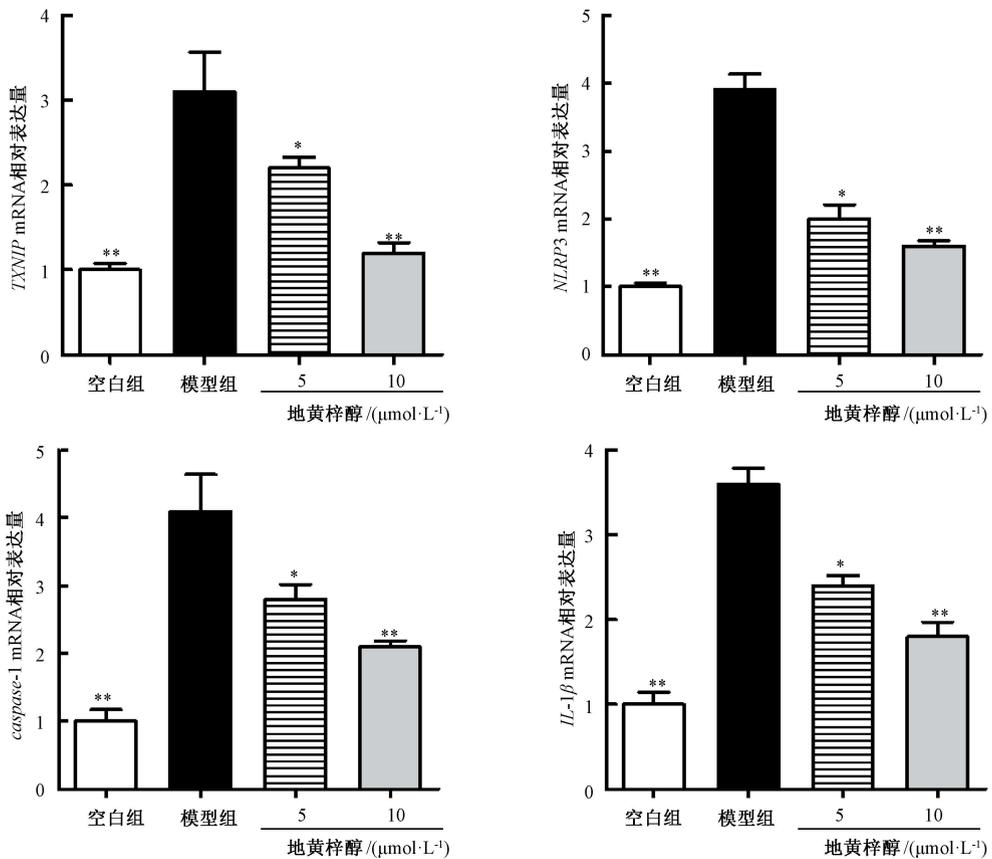
Fig. 3 Effects of catalpol on levels of T-SOD, MDA and IL-1β in supernatant of rat nucleus pulposus cells stimulated by  $H_2O_2$

步，治疗椎间盘退行性疾病的药物、物理与手术疗法有很大进展，但仍然无法避免椎间盘退行性变发生，无法从根本上解决患者痛苦<sup>[10]</sup>。大量研究显示，椎间盘退变与髓核细胞的凋亡密切相关，而氧化应激环境是造成细胞凋亡的重要环节<sup>[11]</sup>。本研究采用  $H_2O_2$  作用于髓核细胞后，流式细胞仪检测细胞凋亡率，结果显示细胞大量凋亡，而地黄梓醇能够明显降低其凋亡率。

SOD 被称作机体抗氧化的第一道防线，其主要作用是清除超氧阴离子自由基 ( $O_2^- \cdot$ ) 保护细胞免受损伤<sup>[12-13]</sup>，可避免因  $O_2^-$  浓度过高引起的不良反应及损伤。MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之

一，间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度<sup>[14]</sup>。本实验中  $H_2O_2$  导致髓核细胞上清 T-SOD 水平降低，MDA 水平升高，加入地黄梓醇预处理后能明显升高髓核细胞清 T-SOD 水平，降低 MDA 水平，表明地黄梓醇能够通过降低细胞氧化应激反应从而实现抗凋亡作用。

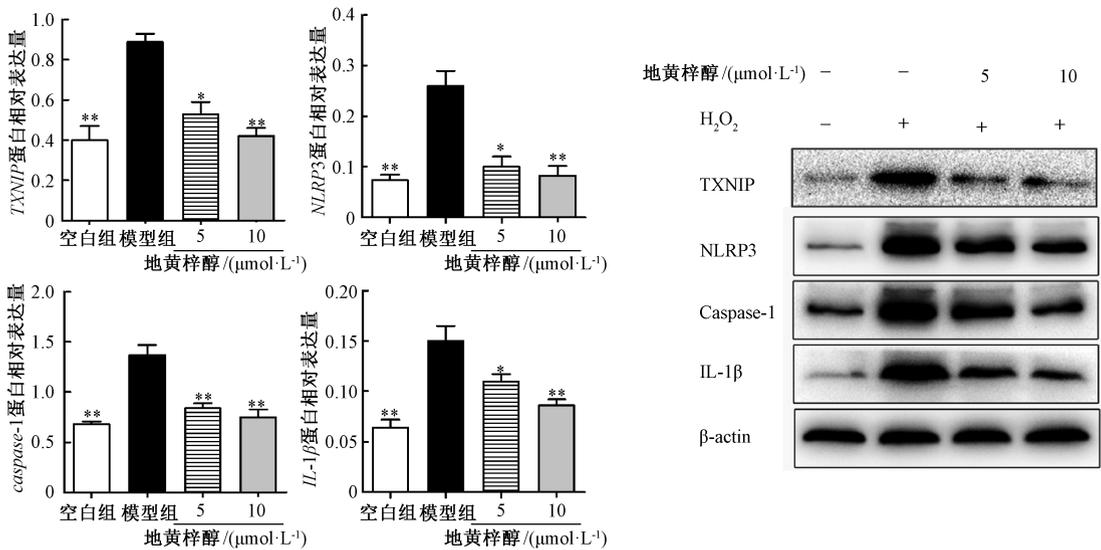
NLRP3 炎性复合体是固有免疫的重要组成部分，活化的共同上游机制包括 ROS 产生、溶酶体破裂、细胞内  $K^+$  外流<sup>[15-16]</sup>。MDA、T-SOD 水平反映机体脂质损伤程度，脂质损伤的发生常伴随着 ROS 的生成，TXNIP 作为内源硫氧还蛋白抑制剂，能够抑制硫氧还蛋白的活性氧清除功能，导致细胞



注：与模型组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

图4 地黄梓醇对  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激后大鼠髓核细胞 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of catalpol on TXNIP, NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in rat nucleus pulposus cells stimulated by  $\text{H}_2\text{O}_2$



注：与模型组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

图5 地黄梓醇对  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激后大鼠髓核细胞 TXNIP、NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of catalpol on the expression of TXNIP, NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$  in rat nucleus pulposus cells stimulated by  $\text{H}_2\text{O}_2$

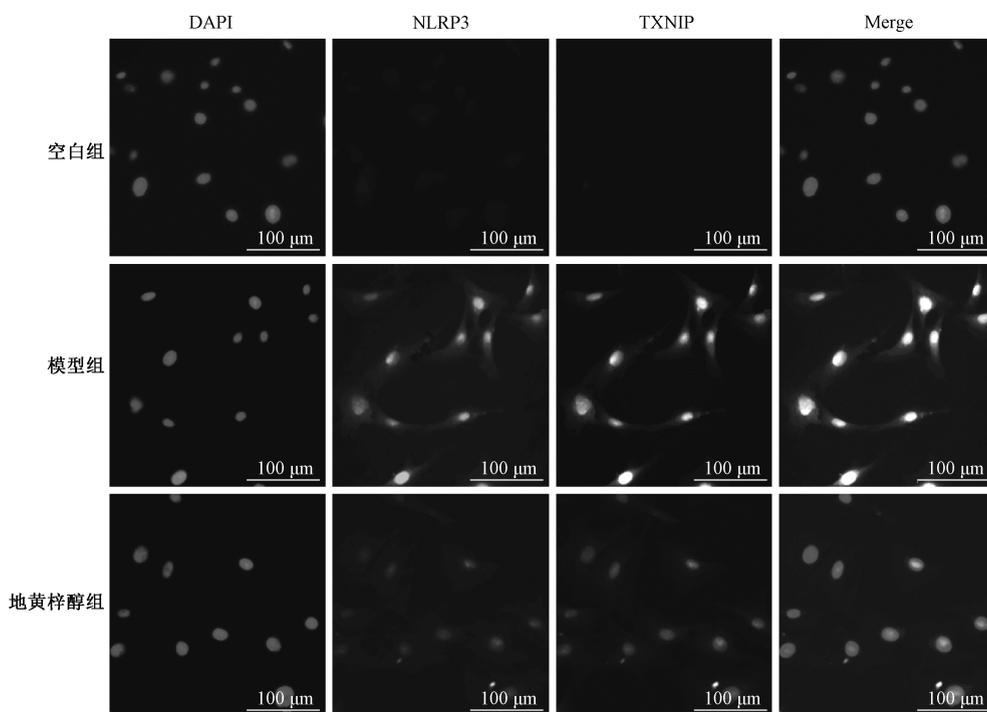
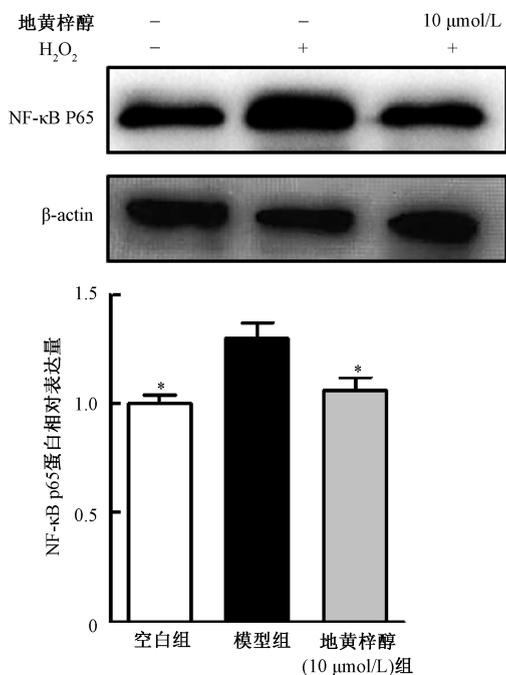


图6 地黄梓醇对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激大鼠髓核细胞NLRP3和TXNIP的表达影响

Fig. 6 Effects of catalpol on the expression of TXNIP and NLRP3 in rat nucleus pulposus cells stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



注: 与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图7 地黄梓醇对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激后大鼠髓核细胞NF-κB蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of catalpol on the expression of NK-κB in rat nucleus pulposus cells stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

氧化应激反应, 而 ROS 的过度产生可以上调 TXNIP 的表达, 进而激活 NLRP3 炎性小体<sup>[17-18]</sup>。本研究中, 暴露于氧化应激反应中的髓核细胞 TXNIP、NLRP3 炎性体表达增加, 而地黄梓醇可明显

降低此作用。NLRP3 是一种复合体支架, 在内外源性刺激因素作用下进行低聚化后招募 procaspase-1 和 ASC 形成 NLRP3 炎性小体, 随后进一步激活 caspase-1, 进而促进 IL-1β 的成熟和分

泌<sup>[19]</sup>。IL-1 $\beta$ 形成后,可以通过招募 CD45+Grhigh 中性粒细胞进一步促进炎症因子的释放,以及与 TNF- $\alpha$  协同作用激活 NF- $\kappa$ B 通路,引起纤维蛋白原样 2 释放增加的双重作用,引起细胞凋亡和纤维蛋白沉积<sup>[20]</sup>。本研究采用 ELISA、Western blot、PCR 等手段检测 caspase-1、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 的变化情况,观察到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用髓核细胞后出现髓核细胞 caspase-1 表达、IL-1 $\beta$  释放、I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化,导致 NF- $\kappa$ B 释放亚基 p65 表达明显增加,而地黄梓醇可明显抑制上述作用,表明它对 NLRP3 炎性体激活引起的下游产物增加有明显抑制作用。

综上所述,地黄梓醇对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的髓核细胞凋亡具有保护作用,可能与调控 ROS/NLRP3/IL-1 $\beta$  通路轴有关,可抑制活性氧簇激活 NLRP3 炎性体,引起 IL-1 $\beta$  释放增加,导致 NF- $\kappa$ B 通路被激活,从而发挥抗凋亡作用。因此,地黄梓醇有望成为阻止髓核细胞进一步退变的理想抗凋亡剂。

#### 参考文献:

[ 1 ] 刘宗玮,温剑涛,张德宏,等. 腰椎间盘突出症椎间盘退变相关炎症因子研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(2): 388-391.

[ 2 ] 唐 蟠. 和厚朴酚在椎间盘髓核退变中的作用及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.

[ 3 ] He J, Zhang A, Song Z, *et al.* The resistant effect of SIRT1 in oxidative stress-induced senescence of rat nucleus pulposus cell is regulated by Akt-FoxO1 pathway[J]. *Biosci Rep*, 2019, 32(9): 395.

[ 4 ] 谢荣辉,殷 明,殷嫦嫦,等. 绿原酸保护大鼠髓核细胞对氧化应激的作用机制研究[J]. 中药材, 2014, 37(3): 465-469.

[ 5 ] Chen J, Liu G Z, Sun Q, *et al.* Protective effects of ginsenoside Rg3 on TNF- $\alpha$ -induced human nucleus pulposus cells through inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 216(5): 1-9.

[ 6 ] Xu Y, Yao H, Wang Q, *et al.* Aquaporin-3 attenuates oxidative stress-induced nucleus pulposus cell apoptosis through regulating the P38 MAPK pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1687-1697.

[ 7 ] 李红伟,孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218-228.

[ 8 ] Chen J W, Ni B B, Li B, *et al.* The responses of autophagy and apoptosis to oxidative stress in nucleus pulposus cells: implications for disc degeneration[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(4): 1175-1189.

[ 9 ] 杨 斐,赵建宁,徐海栋. 椎间盘髓核细胞修饰的相关研究进展[J]. 转化医学电子杂志, 2017, 4(2): 53-56.

[ 10 ] 敖 鹏,殷嫦嫦,吴添龙,等. 自噬与椎间盘退变关系的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(11): 1382-1390.

[ 11 ] Ma K, Chen S, Li Z, *et al.* Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(2): 41-48.

[ 12 ] Ding F, Shao F W, Xiong L M. Cell death in intervertebral disc degeneration[J]. *Apoptosis*, 2013, 18(7): 777-785.

[ 13 ] Lu X, Wang C, Liu B. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 42(1): 58-65.

[ 14 ] Guan L, Geng X, Stone C, *et al.* PM<sub>2.5</sub> exposure induces systemic inflammation and oxidative stress in an intracranial atherosclerosis rat model[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(4): 1-9.

[ 15 ] 毛开睿,孙 兵. NLRP3 炎症小体研究进展[J]. 现代免疫学, 2011(1): 1-4.

[ 16 ] 王新宇,王 曼,孙帅军,等. 丹酚酸 B 保护大鼠缺血心肌与炎症小体 NLRP3 表达的相关性研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(10): 1383-1388.

[ 17 ] Dutta K K, Nishinaka Y, Masutani H, *et al.* Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal arcinogenesis[J]. *Lab Invest*, 2005, 85(4): 798-807.

[ 18 ] Chen W, Zhao M, Zhao S, *et al.* Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(2): 157-166.

[ 19 ] 范 玲,谢星星,陈 立,等. 赶黄草 3 种提取物对小鼠内毒素性肝损伤的保护作用[J]. 中成药, 2019, 41(2): 291-297.

[ 20 ] Guo S, Yang C, Diao B, *et al.* The NLRP3 inflammasome and IL-1 $\beta$  accelerate immunologically mediated pathology in experimental viral fulminant hepatitis[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(9): e1005155.