

牛膝总皂苷对大鼠椎间盘髓核细胞外基质合成的影响

王新立, 刘汝银, 王西彬, 岳宗进
(河南省中医院脊柱外科, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨牛膝总皂苷 (ABS) 对大鼠椎间盘髓核细胞外基质合成的影响。**方法** 体外培养大鼠椎间盘髓核细胞, 并建立氧糖剥夺 (OGD) 模型模拟退变微环境。采用不同浓度 ABS 单独或加入 SIRT1 抑制剂 EX527、自噬抑制剂 3-MA 干预细胞。CCK-8 法检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞凋亡, caspase-3 试剂盒检测 caspase-3 活性, 实时定量 PCR 检测细胞外基质 *collagen II*、*Aggrecan* mRNA 表达, Western blot 检测 SIRT1、*collagen II*、*Aggrecan* 及自噬相关蛋白 ATG5、LC3II/LC3I 和 p62 的蛋白表达。**结果** ABS (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可促进大鼠椎间盘髓核细胞存活 ($P < 0.01$); ABS 干预可使 OGD 环境中的细胞存活率增加, 细胞凋亡、caspase-3 活性降低, *collagen II*、*Aggrecan* mRNA 和蛋白表达均上调, SIRT1、ATG5 和 LC3II/LC3I 蛋白表达上调, p62 蛋白表达下调 ($P < 0.05$); EX527、3-MA 干预可抑制 OGD 环境中 ABS 介导的细胞增殖增加、凋亡减少, *collagen II* 和 *Aggrecan* 的蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。**结论** ABS 可通过 SIRT1/自噬信号通路促进大鼠椎间盘髓核细胞存活和细胞外基质合成。

关键词: 牛膝总皂苷; 椎间盘髓核细胞; 细胞外基质; SIRT1; 自噬

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0069-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.015

Effects of *Achyranthes bidentata* saponins on extracellular matrix synthesis in rat nucleus pulposus

WANG Xin-li, LIU Ru-yin, WANG Xi-bin, YUE Zong-jin

(Department of Spinal Surgery, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate effects of *Achyranthes bidentata* saponins (ABS) on extracellular matrix synthesis in rat nucleus pulposus. **METHODS** Upon rat nucleus pulposus cells of intervertebral disc cultured *in vitro*, oxygen glucose deprivation (OGD) model was established to mimic the microenvironment of intervertebral disc degeneration. Cells were cultured with different concentrations of ABS, with or without SIRT1 inhibitor EX527 or autophagy inhibitor 3-MA. Subsequently cells were subjected to detection of cellular proliferation by CCK-8 assay, cellular apoptosis by flow cytometry, caspase-3 activity by its detection kit, the expression of collagen II and Aggrecan mRNA by quantitative real time PCR, the protein expression of SIRT1, collagen II, Aggrecan and autophagy-related protein ATG5, LC3II/LC3 I and p62 by Western blot. **RESULTS** ABS (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promoted the survival of rat nucleus pulposus cells ($P < 0.01$). ABS intervention significantly increased cell viability; reduced cell apoptosis and caspase-3 activity, upregulated the mRNA and protein expression of collagen II and Aggrecan, as well as the protein expression of SIRT1, ATG5 and LC3II/LC3 I; and down-regulated the protein expression of p62 in OGD-treated cells ($P < 0.05$). Moreover, treatment with EX527 or 3-MA dramatically reversed ABS-mediated increase of cell proliferation, reduction of cell apoptosis and upregulation of the protein expression of collagen II and Aggrecan in OGD-treated cells ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** ABS can promote the survival of rat intervertebral disc nucleus pulposus cells and its synthesis of extracellular matrix via activating SIRT1/ autophagy signaling pathway.

KEY WORDS: *Achyranthes bidentata* saponins; intervertebral disc nucleus pulposus cells; extracellular matrix; SIRT1; autophagy

收稿日期: 2019-01-27

作者简介: 王新立 (1982—), 男, 硕士, 主治医师, 从事脊柱疾病相关研究。Tel: (0371) 60977103, E-mail: xinli_wxl@163.com

椎间盘退变性疾病是中老年人的常见病和多发病,被认为与椎间盘结构的崩塌和功能失调有关^[1]。髓核细胞为类软骨细胞,是椎间盘髓核的主要细胞,能够合成及分泌 II 型胶原 (collagen II)、聚集蛋白聚糖 (aggrecan) 等功能性细胞外基质,在维持椎间盘结构稳定、功能完整等方面起着关键性作用^[1-2]。研究认为,椎间盘退变与髓核细胞数量减少及其细胞外基质代谢失衡导致的细胞微环境改变密切相关^[2-3],但其具体分子机制尚未完全明确。牛膝提取物被证实具有促进软骨细胞增殖、增加软骨细胞 collagen II 表达、恢复软骨基质成分、修复软骨损伤的作用^[4-6]。牛膝总皂苷 (*Achyranthes bidentata* saponins, ABS) 作为传统中药牛膝的主要有效成分,也被证实能够促进软骨细胞增殖,抑制软骨细胞凋亡,修复软骨组织损伤^[7-8],但是否影响髓核细胞的存活及其细胞外基质合成尚未见报道。本实验以大鼠椎间盘髓核细胞为研究对象,体外建立氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 模型模拟椎间盘髓核细胞退变微环境,探究 ABS 对髓核细胞增殖、凋亡和细胞外基质合成的影响,并探讨其可能的作用机制,以期对相关发病机制及其治疗方法的研究提供新思路 and 实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 (6 周龄,体质量 220~250 g),由河南中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证号 SYXK (豫) 2015-0005。所有动物实验均经过河南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准文号 Z1.0/513)。

1.2 试剂 DMEM 培养基 (批号 12800-017)、胎牛血清 (FBS,批号 16000-044)、胰酶 (批号 25200-056)、II 型胶原酶 (批号 C21901) 均购于美国 Gibco 公司。ABS 由本课题组提取制备,质量分数约 52%。沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (sirtuin1, SIRT1) 抑制剂 6-氯-2, 3, 4, 9-四氢-1H-咪唑-1-甲酰胺 (6-chloro-2, 3, 4, 9-tetrahydro-1H-carbazole 1-carboxamide, EX527, 批号 E7034)、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA, 批号 M9281) 均购于美国 Sigma 公司。CCK-8 细胞活性检测试剂盒 (批号 C0038)、caspase-3 活性检测试剂盒 (批号 C1115)、RIPA 裂解液 (批号 P0013)、BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 P0011) 均购于上海碧云天生物科技有限公司。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 BD556547)

购自美国 BD 公司。TRIzol (批号 80802)、MML-V 逆转录试剂盒 (批号 K1622) 均购于美国 Invitrogen 公司。SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (批号 RR820A) 购于宝生物工程 (大连) 有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。Collagen II (批号 sc-52658)、Aggrecan (批号 sc-166951) 抗体购于美国 Santa Cruz 公司; SIRT1 抗体 (批号 2493S) 购于美国 Cell Signaling Technology 公司; ATG5 (批号 ab108327)、LC3 (批号 ab128025)、p62 (批号 ab109012)、 β -actin (批号 ab8226) 抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗均购于英国 Abcam 公司。

2 方法

2.1 大鼠椎间盘髓核细胞的分离与培养 采用 1% 戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠,无菌条件下分离其脊柱,收集腰椎间盘。解剖显微镜下分离椎间盘髓核组织,用含双抗的 PBS 清洗后剪碎,依次采用 0.25% 胰酶和 0.2% II 型胶原酶在 37 °C 水浴中分别消化 30 min、3 h。离心后收集细胞沉淀,重悬于含 10% FBS 及 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,每 3 d 换液 1 次。待细胞融合度约 80% 左右,用 0.25% 胰酶消化传代,选取第 3 代细胞进行实验。为了选择合适的作用浓度,向培养基中添加不同浓度 (0、20、40、60、80 μ g/mL) ABS,培养 48 h 后 CCK-8 试剂盒检测细胞存活率。

2.2 氧糖剥夺模型及分组 采用体外 OGD 模型,用于模拟髓核细胞退变微环境。将大鼠椎间盘髓核细胞分为对照组,采用正常培养基培养大鼠椎间盘髓核细胞; OGD 组,将细胞培养基更换为无血清无糖的 DMEM 培养基,置于 37 °C 低氧 (5% CO₂、1% O₂、94% N₂) 条件下培养 12 h; OGD+ABS 组,向无血清无糖的 DMEM 培养基中添加 40 μ g/mL ABS,再于 37 °C 低氧中培养; OGD+ABS+EX527 组,向无血清无糖的 DMEM 培养基中添加 40 μ g/mL ABS、2 μ mol/L SIRT1 抑制剂 EX527,再于 37 °C 低氧中培养; OGD+ABS+3-MA 组,向无血清无糖的 DMEM 培养基中添加 40 μ g/mL ABS、5 mmol/L 自噬抑制剂 3-MA,再于 37 °C 低氧中培养。

2.3 CCK-8 检测细胞存活率 按照 CCK-8 细胞存活率检测试剂盒操作,检测各组细胞存活率。将经过不同处理的各组细胞以 2×10^5 /mL 浓度接种于 96 孔板,培养 24 h 后每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液,

37 ℃ 孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度值 (A_{450})。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书操作, 检测各组细胞凋亡。将经过不同处理的各组细胞以 3.5×10^5 /mL 浓度接种于 6 孔板, 用冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 500 μ L 结合缓冲液悬浮细胞。向细胞悬液中依次加入 10 μ L Annexin V-FITC、10 μ L PI, 缓慢混匀, 室温避光孵育 15 min, 于 1 h 内在 FACS Calibur 流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。

2.5 caspase-3 试剂盒检测 caspase-3 活性 按照 caspase-3 活性检测试剂盒说明书操作, 检测各组细胞 caspase-3 活性。收集经过不同处理的各组细胞, 冷 PBS 洗涤细胞 1 次, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 10 min, 离心后收集上清。向 96 孔板每孔分别加入 10 μ L 各组上清、10 μ L caspase-3 底物、80 μ L 反应缓冲液, 混匀后 37 ℃ 孵育 2 h, 酶标仪检测 405 nm 处吸光度值 (A_{405})。

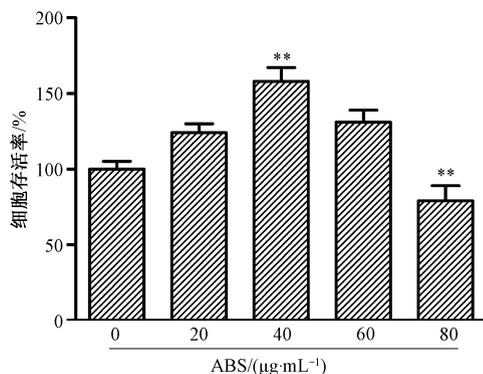
2.6 实时定量 PCR 检测 collagen II 和 Aggrecan mRNA 表达 收集经过不同处理的各组细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, 用 MML-V 逆转录试剂盒合成模板 cDNA。以 β -actin 为内参, 利用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒, 按照说明书行实时定量 PCR 检测。引物序列如下: collagen II 正向 5'-GGAAGAGTGGAGACTACTGGATTGAC-3', 反向 5'-TCCATGTTGCAGAAAACCTTCA-3'; Aggrecan 正向 5'-TCTACCGCTGCCAGGTGAT-3', 反向 5'-TGTAATGGAACACGATGCCTTT-3'; β -actin 正向 5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3', 反向 5'-AAACG-CAGCTCAGTAACAG-3'。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中目的基因的相对表达量。

2.7 Western blot 检测 collagen II、Aggrecan、SIRT1 及自噬相关蛋白表达 收集经过不同处理的各组细胞, RIPA 裂解, 离心提取总蛋白, BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品采用 10% SDS-PAGE 进行分离, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 漂洗后分别与抗 collagen II (1 : 800)、Aggrecan (1 : 1 000)、SIRT1 (1 : 1 000)、ATG5 (1 : 1 000)、LC3 (1 : 1 000)、p62 (1 : 10 000)、 β -actin (1 : 1 000) 等抗体 4 ℃ 孵育过夜, 漂洗后与辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 漂洗后加入发光液显影。用 Image J 软件分析条带灰度, 以目标蛋白与内参 β -actin 灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达水平。

2.8 统计学分析 用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理, 采用组间单因素方差分析及 LSD-t 检验进行两两比较, 所有实验均重复 3 次, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ABS 对髓核细胞存活率的影响 如图 1 所示, ABS 质量浓度为 20 ~ 40 μ g/mL 时, 大鼠椎间盘髓核细胞存活率逐渐升高, 在 40 μ g/mL 时最强 ($P < 0.01$), 而 ABS 质量浓度 60 ~ 80 μ g/mL 时细胞存活率逐渐降低, 表明低质量浓度下能促进大鼠椎间盘髓核细胞的存活率。



注: 与 ABS (0 μ g/mL) 组比较, ** $P < 0.01$ 。

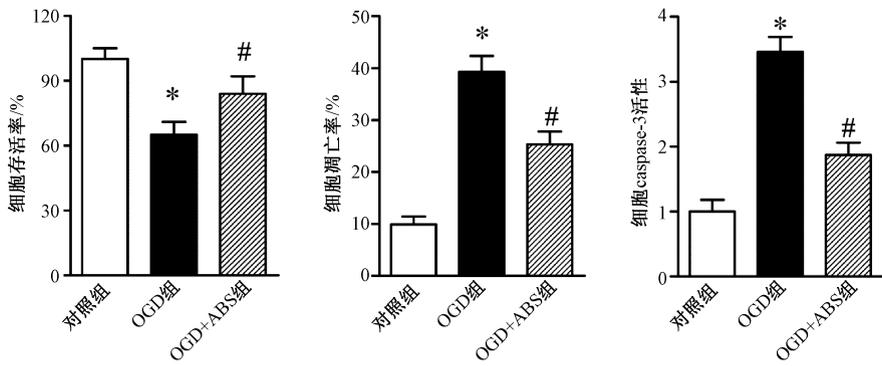
图 1 不同质量浓度 ABS 对髓核细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of ABS on the survival rate of nucleus pulposus cells

3.2 ABS 抑制 OGD 诱导的髓核细胞凋亡 如图 2 所示, 与对照组比较, OGD 组细胞存活率降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、caspase-3 活性升高 ($P < 0.05$); 加入 ABS 干预后, 与 OGD 组比较细胞存活率升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡、caspase-3 活性降低 ($P < 0.05$), 表明 ABS 可减少退变微环境中髓核细胞的凋亡。

3.3 ABS 对 OGD 诱导的髓核细胞胞外基质的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, OGD 组细胞 collagen II、Aggrecan mRNA 和蛋白表达水平均下调 ($P < 0.05$), 表明 OGD 模拟的退变微环境下, 髓核细胞胞外基质 collagen II、Aggrecan 表达减少; 与 OGD 组比较, OGD+ABS 组 collagen II、Aggrecan mRNA 和蛋白表达水平均上调 ($P < 0.05$), 表明 ABS 可抑制退变微环境中髓核细胞的胞外基质减少。

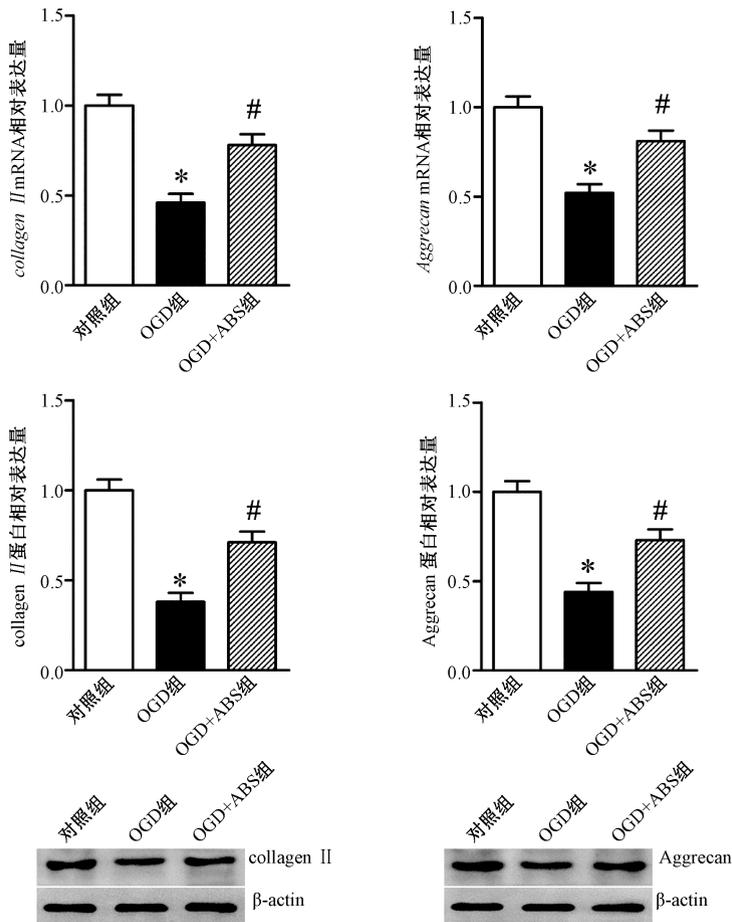
3.4 ABS 激活 SIRT1/自噬信号通路促进髓核细胞存活和细胞外基质合成 SIRT1 和自噬相关信号通路被证实与退变髓核细胞的存活及其胞外基质合成



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 OGD 组比较，# $P < 0.05$ 。

图 2 ABS 对 OGD 诱导的髓核细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of ABS on OGD-induced apoptosis of nucleus pulposus cells



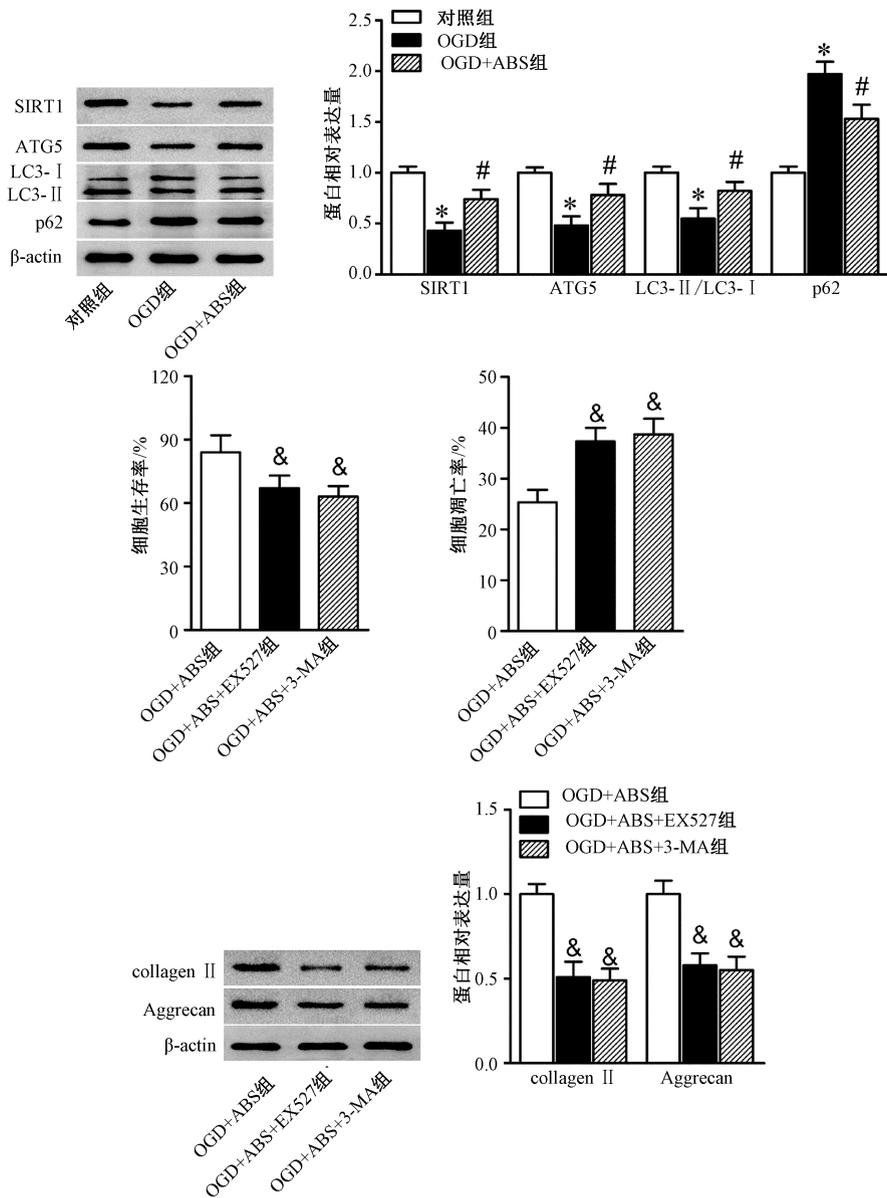
注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 OGD 组比较，# $P < 0.05$ 。

图 3 ABS 对 OGD 诱导的髓核细胞胞外基质的影响

Fig. 3 Effects of ABS on OGD-induced extracellular matrix of nucleus pulposus cells

密切相关^[2,9]。如图 4 所示，与对照组比较，OGD 组 SIRT1、ATG5 和 LC3 II/LC3 I 蛋白表达均减少，p62 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)；与 OGD 组比较，OGD+ABS 组 SIRT1、ATG5 和 LC3 II/LC3 I 的蛋白表达均增加，p62 蛋白表达减少 ($P < 0.05$)，表明

在 OGD 模拟的退变微环境下，ABS 处理激活了 SIRT1/自噬信号通路。与 OGD + ABS 组比较，OGD+ABS+EX527 组和 OGD+ABS+3-MA 组的细胞存活率下调 ($P < 0.05$)，细胞凋亡率上调 ($P < 0.05$)，collagen II、Aggrecan 蛋白表达水平均下调



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 OGD 组比较，# $P < 0.05$ ；与 OGD+ABS 组比较，& $P < 0.05$ 。

图 4 ABS 激活 SIRT1/自噬信号通路对髓核细胞存活和胞外基质合成的影响

Fig. 4 Effects of ABS-activated SIRT1/autophagy signaling pathway on the survival of nucleus pulposus cells and extracellular matrix synthesis

($P < 0.05$)，表明抑制 SIRT1/自噬信号通路可抑制 ABS 诱导的髓核细胞存活和细胞外基质合成。

4 讨论

髓核退变，包括髓核细胞数量的减少及其胞外基质减少引起的髓核功能障碍，被认为是椎间盘退变的主要因素^[2-3]，因此，促进髓核细胞的存活，增加髓核细胞胞外基质合成，或减少其胞外基质降解对于抑制椎间盘退变进程具有重要意义。研究表明，ABS 能够促进软骨细胞增殖，抑制软骨细胞凋亡^[7-8]，但其是否影响类软骨细胞-髓核细胞的存活及胞外基质代谢尚不明确。因此，本研究首先采

用不同 ABS 体外干预大鼠椎间盘髓核细胞，发现低浓度下能够促进大鼠髓核细胞的增殖，提示它可影响髓核细胞的存活。为了进一步探究 ABS 是否影响退变微环境中髓核细胞的存活，本研究采用 OGD 模型体外模拟髓核细胞退变微环境，发现 ABS 处理后可使处于 OGD 环境中的髓核细胞的增殖显著增加、凋亡显著减少，细胞 caspase-3 活性显著降低，提示它可促进退变微环境中髓核细胞的存活。

椎间盘退变往往伴随着髓核细胞胞外基质的减少，使得髓核组织结构不稳，髓核细胞功能发生障

碍,从而增加髓核细胞基质合成、分泌,或者减少其基质降解,能有效延缓椎间盘退变进程^[3,10]。既往研究表明,牛膝提取物能增加软骨细胞 collagen II 表达并恢复软骨基质成分^[4,6];本研究发现,ABS 后处理可使处于 OGD 环境中的髓核细胞的主要细胞外基质 collagen II、Aggrecan mRNA 和蛋白表达均显著增加,提示 ABS 可促进退变微环境中髓核细胞的胞外基质合成与分泌。

SIRT1 能够调控细胞的多种生命活动,已被证实可以调控软骨细胞的分化,代谢以及抗应激能力,并且影响软骨细胞的增殖、凋亡、自噬、胞外基质表达^[11]。研究发现,SIRT1 和自噬相关信号通路可以调控退变髓核细胞的存活和胞外基质合成^[2,9],多种中药有效成分可通过调控两者来影响髓核细胞的存活及胞外基质合成^[12-13]。本研究发现,ABS 处理可显著上调 OGD 环境中髓核细胞 SIRT1、ATG5、LC3 II/LC3 I 蛋白表达,下调 p62 蛋白表达,提示 ABS 可激活退变微环境中髓核细胞的 SIRT1/自噬信号通路。此外,SIRT1 抑制剂 EX527 或自噬抑制剂 3-MA 的干预可显著抑制 OGD 环境中 ABS 介导的髓核细胞增殖增加、凋亡减少、collagen II 和 Aggrecan 蛋白表达上调,提示 ABS 可能通过激活 SIRT1/自噬信号通路促进大鼠椎间盘髓核细胞存活和细胞外基质合成。

综上所述,ABS 可通过激活 SIRT1/自噬信号通路促进退变髓核细胞的存活及其胞外基质表达,进而抑制椎间盘髓核退变。本研究为椎间盘退变性疾病的治疗提供了新方向,也为 ABS 在椎间盘退变性疾病防治应用提供了实验依据。

参考文献:

[1] Lin Y, Yue B, Xiang H, *et al.* Survivin is expressed in degenerated nucleus pulposus cells and is involved in proliferation and the prevention of apoptosis *in vitro*[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13 (1): 1026-1032.
[2] 沈皆亮, 胡侦明, 钟小明, 等. SIRT1 通过 AKT 通路和

ERK1/2 通路共同调节退变髓核细胞细胞外基质的合成 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(8): 1811-1814.
[3] Tan Y, Yao X, Dai Z, *et al.* Bone morphogenetic protein 2 alleviated intervertebral disc degeneration through mediating the degradation of ECM and apoptosis of nucleus pulposus cells via the PI3K/Akt pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43 (1): 583-592.
[4] 彭力平, 马笃军, 林栋栋, 等. 牛膝醇提物体内诱导兔骨关节炎模型软骨修复的病理学观察 [J]. *湖南中医杂志*, 2013, 29(2): 126-129.
[5] Weng X, Lin P, Liu F, *et al.* *Achyranthes bidentata* polysaccharides activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote chondrocyte proliferation [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34 (4): 1045-1050.
[6] 李成付, 王玖忠, 边瑜健, 等. 牛膝醇提物促进兔骨关节炎软骨修复的作用及其机制的实验研究 [J]. *中国临床研究*, 2015, 28(7): 844-847.
[7] Xu X X, Zhang X H, Diao Y, *et al.* *Achyranthes bidentata* saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis *in vitro* [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2017, 33(2): 62-68.
[8] 刘 渊, 孙雪莲, 周红海, 等. ABS 含药血清对兔膝软骨细胞增殖与凋亡的实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26 (10): 2382-2385.
[9] 江立波, 张小磊, 徐华梓, 等. 细胞自噬对饥饿环境下椎间盘髓核细胞的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28 (7): 1302-1307.
[10] Fang W, Zhou X, Wang J, *et al.* Wogonin mitigates intervertebral disc degeneration through the Nrf2/ARE and MAPK signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 65: 539-549.
[11] Sun W, Li Y, Wei S. miR-4262 regulates chondrocyte viability, apoptosis, autophagy by targeting SIRT1 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats with osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 1119-1128.
[12] Wang X H, Zhu L, Hong X, *et al.* Resveratrol attenuated TNF- α -induced MMP-3 expression in human nucleus pulposus cells by activating autophagy via AMPK/SIRT1 signaling pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241 (8): 848-853.
[13] 冯仲锴, 孙永强, 刘汝银, 等. 黄芪甲苷通过 SIRT1/PGC-1 α 通路促进退变的髓核细胞增殖 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2016, 37(5): 743-747.