

# 青藤碱可有效抑制白细胞介素 1 $\beta$ 介导的髓核细胞凋亡

王倩<sup>1</sup>, 卢子昂<sup>2</sup>, 李利和<sup>1</sup>, 吕超亮<sup>1</sup>, 王盟<sup>3</sup>, 张存鑫<sup>1</sup>

https://doi.org/10.12307/2023.873

投稿日期: 2022-11-29

采用日期: 2023-01-29

修回日期: 2023-03-15

在线日期: 2023-03-24

中图分类号:

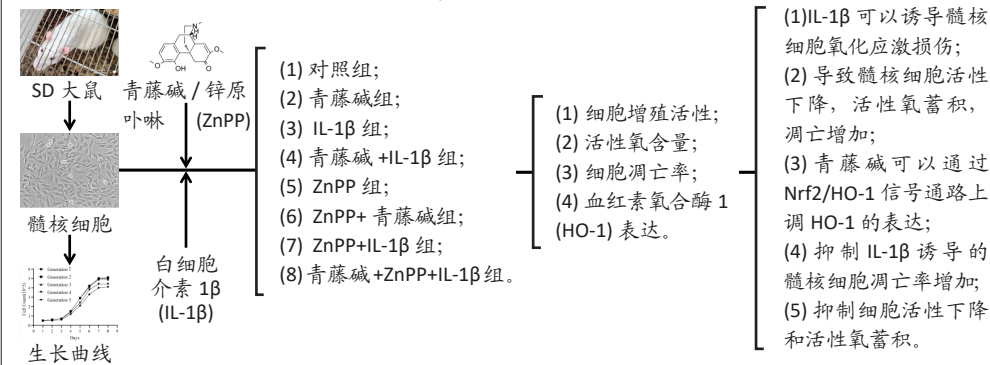
R459.9; R318; R681.5+7

文章编号:

2095-4344(2024)02-00224-07

文献标识码: B

## 文章快速阅读: 青藤碱抑制白细胞介素 1 $\beta$ 诱导髓核细胞凋亡的作用机制



## 文题释义:

**青藤碱:** 是从防己科落叶缠绕藤本植物青藤及毛青藤的干燥藤茎中提取的一种生物碱, 呈黄色针状结晶, 熔点 161 °C, 熔化后熔点又升至 182 °C, 278 °C 分解, 可溶于有机溶剂, 微溶于水, 具有镇痛、镇静、止咳、抗炎、抗氧化、降血压、免疫调节等作用。临床用于治疗类风湿性关节炎和急性关节炎等。

**血红素氧合酶 1(HO-1):** 是诱导型血红素降解的限速酶, 广泛分布于哺乳动物的各种细胞内, 可被多种刺激因子诱导表达, 具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用。其表达与上游 Nrf2 的磷酸化及核转位密切相关, 他们组成的 Nrf2/HO-1 信号轴是细胞内重要的抗氧化酶体系之一。

## 摘要

**背景:** 椎间盘退变是导致脊柱退行性疾病的基础, 然而目前尚无有效的治疗药物。

**目的:** 探讨青藤碱是否可以抑制白细胞介素 1 $\beta$  诱导的髓核细胞凋亡及其分子机制。

**方法:** 采用胰酶联合 II 型胶原酶消化法体外培养大鼠髓核细胞, 并绘制细胞生长曲线, 采用 CCK-8 法筛选合适的青藤碱药物浓度。将髓核细胞分为对照组、青藤碱组、白细胞介素 1 $\beta$  组、青藤碱+白细胞介素 1 $\beta$  组、锌原卟啉(血红素氧合酶 1 抑制剂)组、锌原卟啉+青藤碱组、锌原卟啉+白细胞介素 1 $\beta$  组、青藤碱+锌原卟啉+白细胞介素 1 $\beta$  组。分别检测各组髓核细胞增殖活性、活性氧含量、凋亡率及血红素氧合酶 1 的表达情况。

**结果与结论:** ①体外培养的大鼠髓核细胞呈现多角形、三角形、短楔形等形态, 其呈现“S”型曲线生长, 接种第 1-3 天生长缓慢, 第 4-6 天生长迅速, 第七八天生长速度缓慢, 进入“平台期”, 细胞数量不再增加; ②当青藤碱的浓度  $\leq 80 \mu\text{mol/L}$  时, 髓核细胞的增殖活性不会受到显著影响 ( $P > 0.05$ ); ③白细胞介素 1 $\beta$  可以显著降低髓核细胞的增殖活性, 增加活性氧含量, 导致细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ); ④当采用青藤碱干预后, 不仅可以促进血红素氧合酶 1 的表达 ( $P < 0.05$ ), 而且可以抑制白细胞介素 1 $\beta$  诱导的髓核细胞增殖活性降低、活性氧含量和凋亡率增加 ( $P < 0.05$ ), 其作用可被锌原卟啉逆转 ( $P < 0.01$ )。

**关键词:** 青藤碱; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 血红素氧合酶 1; 髓核细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 活性氧; 椎间盘; 椎间盘退变

**缩略语:** 白细胞介素: interleukin, IL; 血红素氧合酶 1: heme oxygenase-1, HO-1

## Sinomenine effectively inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis in nucleus pulposus cells

Wang Qian<sup>1</sup>, Lu Ziang<sup>2</sup>, Li Lihe<sup>1</sup>, Lyu Chaoliang<sup>1</sup>, Wang Meng<sup>3</sup>, Zhang Cunxin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Spine Surgery, <sup>2</sup>Clinical Medical Experiment Center, Jining No. 1 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China; <sup>3</sup>School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, Shandong Province, China

Wang Qian, Master, Department of Spine Surgery, Jining No. 1 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China

**Corresponding author:** Zhang Cunxin, Master, Attending physician, Department of Spine Surgery, Jining No. 1 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Intervertebral disc degeneration is the basis of spinal degenerative diseases; however, there is no effective treatment.

**OBJECTIVE:** To investigate whether sinomenine can inhibit interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis in nucleus pulposus cells and its molecular mechanism.

**METHODS:** Rat nucleus pulposus cells were cultured *in vitro* by trypsin combined with type II collagenase digestion, and the cell growth curve was plotted.

济宁市第一人民医院, <sup>1</sup>脊柱外科, <sup>3</sup>临床医学实验中心, 山东省济宁市 272000; <sup>2</sup>济宁医学院, 临床医学院, 山东省济宁市 272067

第一作者: 王倩, 男, 1983 年生, 山东省巨野县人, 汉族, 2008 年河北医科大学毕业, 硕士, 主要从事椎间盘退变方面的研究。

通讯作者: 张存鑫, 硕士, 主治医师, 济宁市第一人民医院脊柱外科, 山东省济宁市 272000

https://orcid.org/0000-0002-0370-5335(王倩)

基金资助: 山东省中医药科技项目(Q-2022025), 项目负责人: 张存鑫; 济宁市重点研发计划项目(2020JKNS008), 项目负责人:

张存鑫; 济宁市重点研发计划项目(2019SMNS003), 项目负责人: 王盟

引用本文: 王倩, 卢子昂, 李利和, 吕超亮, 王盟, 张存鑫. 青藤碱可有效抑制白细胞介素 1 $\beta$  介导的髓核细胞凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(2):224-230.



An appropriate sinomenine concentration was determined using the cell counting kit-8 kit. Nucleus pulposus cells were divided into control group, sinomenine group, interleukin-1 $\beta$  group, sinomenine+interleukin-1 $\beta$  group, zinc protoporphyrin group, zinc protoporphyrin+sinomenine group, zinc protoporphyrin+interleukin-1 $\beta$  group, and sinomenine+zinc protoporphyrin+interleukin-1 $\beta$  group. Proliferative activity, reactive oxygen species content, apoptosis rate, and heme oxygenase-1 expression in nucleus pulposus cells were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The rat nucleus pulposus cells cultured *in vitro* were polygonal, triangular, and short wedge-shaped, and the cell growth showed an "S" curve. The cells grew slowly in the first 3 days of culture, rapidly in 4–6 days, and slowly again in 7–8 days. The cells then entered the "platform stage" where the number of cells no longer increased. The proliferative activity of myeloid cells showed no significant changes when the concentration of sinomenine was  $\leq 80 \mu\text{mol/L}$  ( $P > 0.05$ ). Interleukin-1 $\beta$  significantly reduced the proliferative activity of nucleus pulposus cells, increased the content of reactive oxygen species and led to apoptosis ( $P < 0.01$ ). Sinomenine intervention not only promoted heme oxygenase-1 expression ( $P < 0.05$ ) but also inhibited interleukin-1 $\beta$ -induced decrease in proliferative activity and increase in reactive oxygen species content and apoptosis rate in nucleus pulposus cells ( $P < 0.05$ ). These effects could be reversed by zinc protoporphyrin ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** sinomenine; interleukin-1 $\beta$ ; heme oxygenase-1; nucleus pulposus cell; cell proliferation; apoptosis; reactive oxygen species; intervertebral disc; intervertebral disc degeneration

**Funding:** Shandong Province Chinese Medicine Science and Technology Project, No. Q-2022025 (to ZCX); Jining Key R&D Program Projects, Nos. 2020JKNS008 (to ZCX) and 2019SMNS003 (to WM)

**How to cite this article:** WANG Q, LU ZA, LI LH, LYU CL, WANG M, ZHANG CX. Sinomenine effectively inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis in nucleus pulposus cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(2):224-230.

## 0 引言 Introduction

腰椎间盘突出症的临床表现主要是腰腿疼痛,大多数患者经保守治疗后可有效缓解,仅少数患者需要手术治疗<sup>[1]</sup>。研究表明,腰椎间盘突出症引起腰腿痛一方面与髓核组织突出机械压迫神经有关,另一方面与病变局部炎症因子对神经的炎性刺激有关。JUNGEN等<sup>[2]</sup>的一项系统分析也证实,白细胞介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、趋化因子5等炎症因子均与坐骨神经痛相关。DENES等<sup>[3]</sup>研究发现,肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、IL-6、IL-8等在椎间盘突出引起腰腿疼痛中起重要作用,并采用肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和IL-6抑制剂治疗后,腰腿疼痛可有效缓解。此外,ZHAO等<sup>[4]</sup>随访发现,26%–39%的腰痛患者无椎间盘突出,但使用抗炎药物治疗后,腰痛可明显缓解,特别是椎间盘或椎管内注射糖皮质激素后,对缓解腰痛具有非常显著的疗效。因此,人们认为炎症因子是引起腰痛的始动因素。

椎间盘由髓核组织、纤维环及上下软骨终板构成<sup>[5]</sup>。髓核组织主要由髓核细胞和细胞外基质构成,而细胞外基质主要由髓核细胞产生,因此,髓核细胞对维持椎间盘的功能至关重要<sup>[6]</sup>。髓核细胞的退变是导致椎间盘退变的病理基础。椎间盘退变的诱因包括氧化应激、衰老、营养缺乏、遗传易感性及机械负荷等<sup>[7]</sup>。研究表明,椎间盘退变早期伴有大量炎性因子浸润,包括IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子、IL-18等<sup>[8]</sup>。这些炎症因子,除了可以通过激活炎症小体NLRP3介导的细胞焦亡<sup>[9-10]</sup>,导致髓核细胞的数量减少和质量下降外,还可以介导细胞氧化应激损伤。LI等<sup>[11]</sup>研究发现IL-1 $\beta$ 可以导致软骨细胞氧化应激损伤,且这种损伤和骨性关节炎的发生呈正相关性。ZHU等<sup>[12]</sup>采用IL-1 $\beta$ 处理软骨细胞24 h后发现,软骨细胞内活性氧含量显著增加,且抗氧化酶系统表达受到显著抑制。

青藤碱是从防己科落叶缠绕藤本植物青藤及毛青藤的干燥藤茎中提取的一种生物碱,其具有镇痛、抗炎、抗氧化等作用<sup>[13-15]</sup>。研究表明青藤碱不仅可以调节单核/巨噬细胞亚群,还可以调控Toll样受体4/核因子 $\kappa\text{B}$ 等炎性信号通路,抑制细胞的炎症反应<sup>[16-17]</sup>。此外,青藤碱可有效上调内源性抗氧化系统,促进抗氧化酶,如血红素氧合酶1(heme

oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶1等表达,减轻细胞的氧化应激损伤<sup>[18-19]</sup>。综上所述,青藤碱发挥作用的关键机制在于抗炎、抗氧化等作用。青藤碱在髓核细胞中是否同样发挥抗炎、抗氧化等作用来抑制炎症因子介导的细胞凋亡,抑制椎间盘退变,尚未见相关报道。

此次研究拟采用IL-1 $\beta$ 诱导髓核细胞凋亡,探索青藤碱是否可以抑制IL-1 $\beta$ 介导的髓核细胞凋亡及其分子机制,为椎间盘退变的药物治疗提供新的方向和理论基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 分组设计细胞学实验。数据符合正态分布,则组间比较采用单因素方差分析,方差齐则用LSD分析,方差不齐则用Game's-Howell分析;数据不符合正态分布则进行秩和检验。

**1.2 时间及地点** 实验于2022-09-01/10-31在济宁市第一人民医院肿瘤转化实验室完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 实验动物** 健康8周龄SD大鼠4只,雌雄不限,体质量200 g左右,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,许可证号:SCXK(鲁)20190003。

动物实验符合济宁市第一人民医院动物实验伦理审查标准(伦理编号:JNRM-2022-DW-023)。

**1.3.2 实验试剂** 青藤碱购自美国MedChemExpress公司,锌原卟啉(Zinc Protoporphyrin, HO-1抑制剂,货号:HY-101193,规格:1 mg,品牌:MCE)购自MedChemExpress公司。胰蛋白酶购自汉强生物技术有限公司,II型胶原蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司,南美胎牛血清购自澳大利亚AusGeneX公司,CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所,Annexin V PE Apoptosis Detection Kit购自美国Biogems公司,Fast Pure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2试剂盒、HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒、BCA Protein Quantification Kit购自南京诺唯赞公司,HO-1 Antibody、Beta Actin Antibody、Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) HRP购自美国Affinity Biosciences公司。

**1.3.3 实验仪器** 细胞计数仪(型号:AMQA2000,生产企业:

赛默飞世尔, S/N: 2187A20090034)。流式细胞仪(型号: CytoFLEX, 生产企业: 贝克曼(中国), S/N: BE39397)。细胞培养箱(型号: 3111, 生产企业: 赛默飞世尔, 批号: S/N: 300209779)。Multiskan™ FC 酶标仪(型号: 51119180, 生产企业: 赛默飞世尔, S/N: 357-705277)。全自动化学发光图像分析系统(型号: Tanon-4600, 生产企业: 天能, S/N: 20T12NP64-12138)。Applied Biosystems PCR 热循环仪(型号: EN61326-1, 生产企业: 赛默飞世尔, SN: 2721220120892)。

1.4 方法

1.4.1 髓核细胞体外培养 采取脱颈法处死大鼠后, 浸泡于体积分数 75% 乙醇溶液中 2 min 后, 转移至生物安全柜, 剪开大鼠背部及尾部皮肤, 无菌获得大鼠腰椎、骶椎及尾椎, 小心切开椎间盘并收集髓核组织。将髓核组织用无菌眼科剪剪碎后, 转移至 15 mL 离心管, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 消化 30 min, 期间每 5 min 摇匀一次, 加入含有血清的培养液终止消化。离心去上清后, 加入适量 II 型胶原蛋白酶 37 °C 消化 30 min 后, 期间每 5 min 摇匀一次, 加入血清终止消化。离心去上清后, 加入培养液并调整细胞浓度至 (3-5) × 10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 接种至 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 每瓶接种 5 mL, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。第 3 天时进行半量换液, 之后每 3 d 进行全量换液。约 2 周后, 当细胞汇合至 90% 以上时, 即可消化进行传代培养。

大鼠髓核细胞的培养及鉴定:

Table with 2 columns: 属性 (Cell source, Original culture method, etc.) and 描述 (SD rat intervertebral disc nucleus, etc.)

1.4.2 绘制细胞生长曲线 取第 1-5 代髓核细胞, 调整细胞浓度至 5.0 × 10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 等量接种至 24 孔板, 每孔 1 mL。接种后第 1-8 天, 每天取 3 孔细胞进行计数, 并计算细胞数量平均值, 连续 8 d。以时间 (d) 为横坐标, 细胞数量平均值 (个) 为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.4.3 青藤碱浓度筛选 将第 3 代髓核细胞接种至 96 孔板, 每孔 100 μL, 待细胞汇合至 85% 时, 弃掉原培养液, 加入含有不同浓度青藤碱的培养液。培养液中青藤碱的浓度分别为 0, 10, 20, 40, 80 和 160 μmol/L, 每组设 8 孔, 置于二氧化碳培养箱中孵育 24 h 后, 采用 CCK-8 试剂盒检测每组细胞的增殖活性。

1.4.4 实验分组 将第 3 代髓核细胞分为以下 8 组, 各组培养液分别 5 mL: ①对照组: 不做处理; ②青藤碱组: 培养液中含有 40 μmol/L 青藤碱; ③ IL-1β 组: 培养液中含有 10 ng/mL IL-1β; ④青藤碱 +IL-1β 组: 培养液中含有 40 μmol/L 青藤碱和 10 ng/mL IL-1β; ⑤锌原卟啉组: 培养液中含有 5 μmol/L 锌原卟啉; ⑥锌原卟啉 + 青藤碱组: 培养液中含有 5 μmol/L 锌原卟啉和 40 μmol/L 青藤碱; ⑦锌原卟啉 +IL-1β 组: 培养液中含有 5 μmol/L 锌原卟啉和 10 ng/mL IL-1β; ⑧青藤碱 + 锌原卟啉 +IL-1β 组: 培养液中含有 40 μmol/L 青藤碱、5 μmol/L 锌原卟啉和 10 ng/mL IL-1β。在二氧化碳培养箱内孵育 8 h 后, 检测各组细胞的增殖活性、凋亡率、活性氧含量、HO-1 的 mRNA 和蛋白水平。

1.4.5 细胞增殖活性检测 96 孔板内的髓核细胞处理结束后, 弃掉原培养液。更换不含血清的培养液后, 再每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 继续培养 2-4 h, 酶标仪检测各组细胞在 450 nm 处的吸光度值。细胞增殖活力计算公式如下:

细胞增殖活力 (%) = [A(实验) - A(空白)] / [A(对照) - A(空白)] × 100%

式中 A(实验) 为含有不同药物和 CCK-8 溶液孔的吸光度值, A(空白) 为含有 CCK-8 溶液而没有细胞孔的吸光度值, A(对照) 为含有正常培养细胞和 CCK-8 溶液孔的吸光度值。

1.4.6 流式细胞术检测髓核细胞凋亡率 各组细胞处理结束后消化收集并用预冷的 PBS 洗涤 2 遍。4 °C 离心后弃上清并加入 100 μL Binding Buffer 重悬细胞。对照组和实验组分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI Staining Solution; Annexin-V 组 (单阳性组) 加入 5 μL Annexin V-FITC, PI 组 (单阳性组) 加入 5 μL PI Staining Solution, 空白组细胞 (双阴性组) 不做处理, 轻轻吹打均匀后, 避光、25 °C 孵育 10 min; 加入 400 μL Binding Buffer 轻轻吹打混匀后上机检测。

1.4.7 荧光探针 DCFH-DA 标记法检测髓核细胞内总活性氧含量 96 孔荧光酶标板内的髓核细胞处理结束后, 弃掉原培养液, 加入预先采用 DMEM/F12 培养液稀释好的 10 μmol/L DCFH-DA 溶液, 每孔 100 μL, 阳性对照组内加入 Rosup 作为对照。置于细胞培养箱中 20-30 min 后, DMEM/F12 培养液洗涤 3 遍后荧光酶标仪检测各种荧光强度 (酶标仪设置参数: 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长)。

1.4.8 RT-PCR 检测 HO-1 mRNA 转录 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 | 扩增引物序列 Table 1 | Amplification primer sequences

Table with 2 columns: 基因名称 (Gene name) and 引物序列 (5'-3') (Primer sequence (5'-3')). Rows include 血红素氧合酶 1 and β-actin.

使用 Fast Pure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂

盒提取细胞总 RNA, 应用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒进行反转录。应用 LightCycler®480 System Real Time PCR 扩增仪分析目的基因表达。

**1.4.9 Western blot 技术检测 HO-1 的蛋白表达** 各组细胞处理结束后采用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 3 遍, 置于冰上加入裂解液, 细胞刮刮取细胞后, 转入 1.5 mL 离心管。4 °C、15 000 r/min 离心 15 min, 取上清采用 BCA Protein Quantification Kit 检测蛋白样品浓度, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)后, 金属浴加热至 100 °C, 煮沸 5 min。等量上样后进行电泳、转膜。取出 PVDF 膜加入一抗(1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 溶液清洗 3 遍后, 加入二抗(1 : 5 000), 室温孵育 1 h 后, TBST 溶液清洗 3 遍。滴加适量 ECL 工作液, 使 ECL 工作液覆盖 PVDF 膜, 室温孵育两三分分钟后, 采用全自动化学发光图像分析系统进行显影并采集图像。

**1.5 主要观察指标** 细胞分组处理结束后, 分别检测各组髓核细胞的增殖活性、凋亡率、细胞内活性氧含量以及 HO-1 的表达量。

**1.6 统计学分析** 实验结果采用 SPSS 18.0(美国 IBM 公司)进行数据分析, 应用 GraphPad Prism 8(美国 GraphPad Software 公司)进行统计绘图。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据之间采用独立样本 *t* 检验进行分析, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。文章统计学方法已经济宁市第一人民医院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 髓核细胞形态学观察** 原代培养的大鼠髓核细胞在接种后逐渐开始贴壁生长, 细胞以集落的形式聚集在一起(图 1A), 贴壁后的大鼠髓核细胞呈现多角形、短棒形、短梭形等形态(图 1B), 细胞核大而明显, 多数细胞呈现单个细胞核, 少数正在分裂的细胞内可见染色质向胞核两端集合(图 1C)。

**2.2 髓核细胞生长曲线** 髓核细胞呈“S”型曲线生长。第 1-3 天细胞生长缓慢, 第 4-6 天细胞快速分裂, 呈现“指数”增长, 第七八天细胞生长速度显著下降, 进入“平台期”(图 2A)。对第 1-5 代髓核细胞在接种第 8 天的计数进行对比分析发现, 第 4 代髓核细胞在第 8 天的细胞计数显著少于第 1 代( $P < 0.01$ ), 且细胞形态发生改变, 因此后续的细胞实验以第 3 代髓核细胞作为研究对象(图 2B)。

**2.3 青藤碱浓度筛选** 为了研究青藤碱对髓核细胞的潜在作用, 首先需要确定青藤碱的最佳药物浓度, 避免青藤碱本身对髓核细胞的增殖活性产生影响。通过采用 CCK-8 试剂盒筛选发现, 髓核细胞的增殖活性随着青藤碱浓度的增加而下降, 当青藤碱的浓度为 160  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞增殖活性显著小于 0  $\mu\text{mol/L}$  组( $P < 0.05$ )。因此, 后续实验研究选择 80  $\mu\text{mol/L}$  作为青藤碱的干预浓度, 见图 3。

**2.4 髓核细胞增殖活性、活性氧含量及凋亡检测** 采用 CCK-8 试剂盒检测各组髓核细胞增殖活性发现, IL-1 $\beta$  可以显著降低

髓核细胞增殖活性( $P < 0.01$ ); 采用青藤碱预处理后, 虽然与对照组相比髓核细胞增殖活性仍然降低( $P < 0.01$ ), 但较单纯采用 IL-1 $\beta$  处理(IL-1 $\beta$  组)显著增加( $P < 0.01$ ); 当采用锌原卟啉干预 HO-1 的表达后, 青藤碱的细胞保护作用可被逆转(图 4A)。

采用荧光探针 DCFH-DA 标记法检测各组髓核细胞内总活性氧含量发现, IL-1 $\beta$  可以显著增加髓核细胞中活性氧的蓄积( $P < 0.01$ ); 采用青藤碱预处理后, 虽然与对照组相比髓核细胞中活性氧含量仍然显著增加( $P < 0.01$ ), 但较单纯采用 IL-1 $\beta$  处理(IL-1 $\beta$  组)显著降低( $P < 0.01$ ); 当采用锌原卟啉干预 HO-1 的表达后, 青藤碱不能减轻 IL-1 $\beta$  诱导的活性氧含量增加( $P > 0.05$ )(图 4B)。

这种变化趋同同样发现在髓核细胞的凋亡检测结果中(图 4C, D), 令人意外的是, 采用锌原卟啉预处理后, 会进一步增加 IL-1 $\beta$  诱导的髓核细胞凋亡( $P < 0.01$ )。

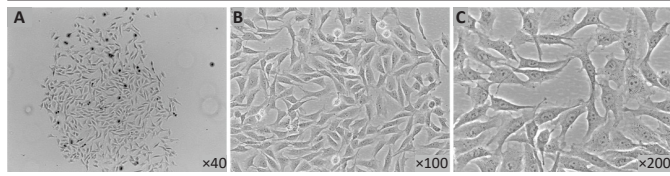
**2.5 各组髓核细胞内 HO-1 表达情况** 采用 RT-PCR 和 Western-blot 技术检测 HO-1 转录和表达情况, 使用  $\beta$ -actin 作为内参。与对照组相比, 青藤碱组和青藤碱 +IL-1 $\beta$  组中 mRNA 和蛋白含量显著增加( $P < 0.01$ )。当采用锌原卟啉干预后, 可显著降低青藤碱上调 HO-1 表达的作用( $P < 0.01$ ), 其他组中 mRNA 和蛋白含量虽然略有变化, 但差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见图 5。

## 3 讨论 Discussion

此次研究成功在体外培养了大鼠髓核细胞, 通过观察发现髓核细胞呈现多角形、短棒形、短梭形等形态, 并呈“S”型曲线生长。对比发现第 4, 5 代髓核细胞的生长分裂速度明显下降, 不适宜作为研究对象。青藤碱可以通过上调 HO-1 的表达抑制 IL-1 $\beta$  诱导的髓核细胞增殖活性降低、活性氧蓄积和凋亡率增加, 但其作用可被锌原卟啉逆转。

腰椎间盘突出症是指椎间盘物质(髓核组织或环纤维化)移位、突出到椎间盘间隙之外, 压迫脊髓或神经根, 导致腰痛伴一侧或双侧下肢疼痛或麻木等的一系列临床症状。腰椎间盘突出症是骨科的常见疾病, 治疗费用昂贵, 给患者、家庭及社会带来巨大的经和社会负担<sup>[20]</sup>。导致腰椎间盘突出症的病因较多, 如椎间盘退变、创伤、椎间盘发育异常、遗传因素、腰骶先天异常、机械负荷、腰姿不正、妊娠、受寒受潮等, 但其发病的主要原因是椎间盘退变。

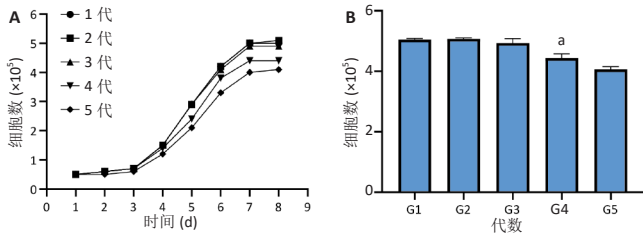
椎间盘是脊柱的承重单元, 具有缓解和均匀分散脊柱应力的作用。研究表明, 多种脊柱退行性疾病的发展均与椎间盘退变相关。椎间盘主要由上下软骨终板、周围的纤维环和中间的髓核组织构成, 髓核组织对维持椎间盘的正常功能至关重要。髓核组织主要由髓核细胞和细胞外基质组成, 其中细胞外基质主要由髓核细胞合成和分泌。因此, 髓核细胞的病理改变将直接影响脊柱退行性疾病的发展。环境因素、遗传因素、营养状态、机械应力等多种因素参与了椎间盘退变的发展过程。但越来越多的研究报道了炎症因素对椎间盘退变的影响。BAI 等<sup>[21]</sup>采用 IL-1 $\beta$  处理髓核细胞后发现, IL-1 $\beta$



图注：图 A 为髓核细胞群落；图 B 为髓核细胞在 100 倍光镜下，呈现多角形、短棒形、短棒形等形态；图 C 为髓核细胞在 200 倍光镜下，可见细胞呈现单个细胞核，细胞核大而明显

图 1 | 原代大鼠髓核细胞形态学观察

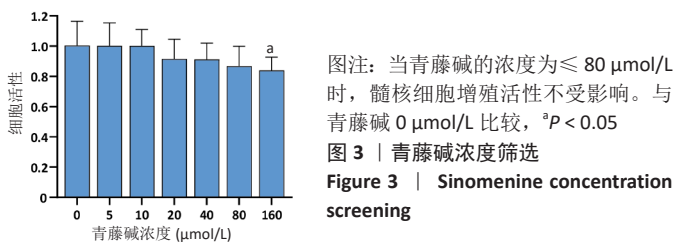
Figure 1 | Morphological observation of primary rat nucleus pulposus cells



图注：图 A 为第 1-5 代髓核细胞生长曲线；图 B 为第 1-5 代髓核细胞在接种第 8 天的计数，第 4 代髓核细胞在接种第 8 天的数量显著少于第 1 代。与第 1 代比较， $^{\#}P < 0.01$

图 2 | 髓核细胞生长曲线

Figure 2 | Growth curve of nucleus pulposus cells



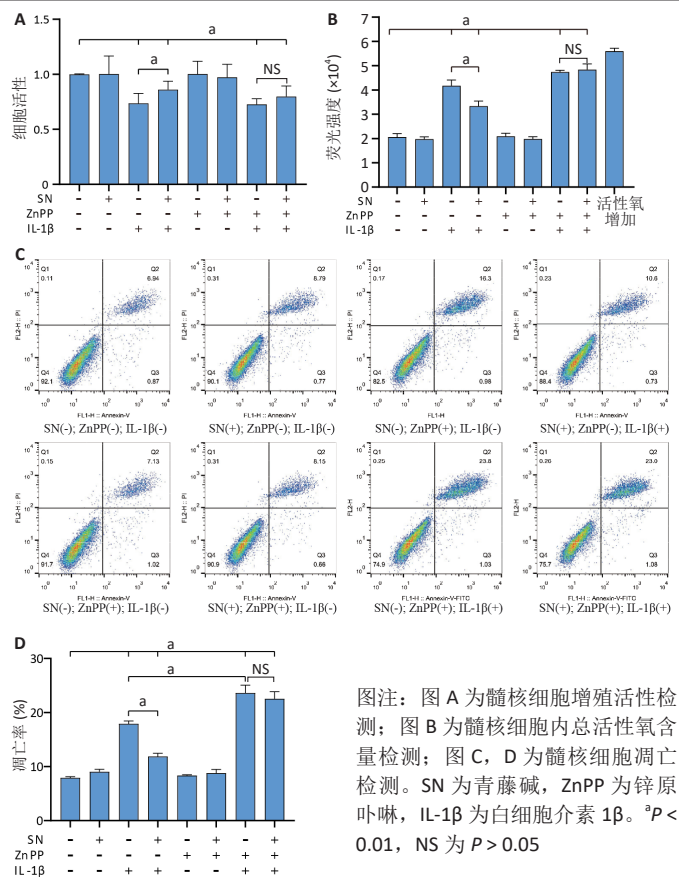
图注：当青藤碱的浓度为  $\leq 80 \mu\text{mol/L}$  时，髓核细胞增殖活性不受影响。与青藤碱  $0 \mu\text{mol/L}$  比较， $^{\#}P < 0.05$

图 3 | 青藤碱浓度筛选

Figure 3 | Sinomenine concentration screening

可以通过核因子  $\kappa\text{B}$  信号通路促进一氧化氮合酶、一氧化氮、前列腺素 E2、环氧合酶 2、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和 IL-6 等炎症分子释放，进而促进基质金属蛋白酶 3 和基质金属蛋白酶 13 的表达，加速椎间盘退变。ZHOU 等<sup>[22]</sup> 研究发现，IL-1 $\beta$  可以通过激活 NLRP3 炎症小体导致髓核细胞焦亡，进而导致椎间盘退变。由此可见，IL-1 $\beta$  对髓核细胞的影响可能主要通过诱导炎症反应。

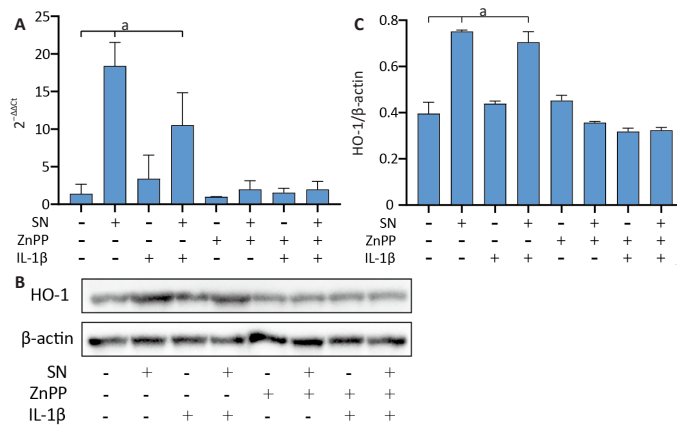
然而，MA 等<sup>[23]</sup> 研究发现，IL-1 $\beta$  除了可以诱导髓核细胞焦亡和 NLRP3 炎症小体激活外，还可以显著抑制自噬，并导致线粒体氧化应激损伤。作者采用 IL-1 $\beta$  处理髓核细胞后也发现，IL-1 $\beta$  不仅可以抑制髓核细胞的增殖活性，还可以显著促进髓核细胞中活性氧的蓄积，并导致凋亡增加，其原因可能与 IL-1 $\beta$  影响髓核细胞能量代谢有关。早期研究认为，活性氧作为细胞能量代谢的副产物，具有损伤 DNA、细胞器膜、影响蛋白质合成等负向调节作用。然而，最近的研究表明，活性氧可作为信号分子参与细胞内多种信号通路的传导，包括炎症信号通路的激活<sup>[24]</sup>。DAI 等<sup>[25]</sup> 研究认为，氧化应激反应特别是活性氧的产生，是启动 NLRP3 炎症小体激活的关键触发因素；他们将人角膜上皮细胞暴露于高渗透压的环境中 24 h，观察到细胞内活性氧含量较对照组增加约 3 倍；同时还发现 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达水平显著升高，当采用骨化三醇抑制活性氧的蓄



图注：图 A 为髓核细胞增殖活性检测；图 B 为髓核细胞内总活性氧含量检测；图 C、D 为髓核细胞凋亡检测。SN 为青藤碱，ZnPP 为锌原卟啉，IL-1 $\beta$  为白细胞介素 1 $\beta$ 。 $^{\#}P < 0.01$ ，NS 为  $P > 0.05$

图 4 | 髓核细胞增殖活性、活性氧含量及凋亡检测

Figure 4 | Detection of apoptosis, intracellular reactive oxygen species and proliferative activity of nucleus pulposus cells



图注：图 A 为 HO-1 mRNA 转录情况；图 B 为 HO-1 蛋白电泳条带；图 C 为 HO-1 蛋白电泳条带灰度分析。SN 为青藤碱，ZnPP 为锌原卟啉，IL-1 $\beta$  为白细胞介素 1 $\beta$ 。 $^{\#}P < 0.01$

图 5 | 青藤碱可以促进血红素氧合酶 1(HO-1) 的表达，其作用可被锌原卟啉逆转

Figure 5 | Sinomenine promotes heme oxygenase-1 expression and this effect can be reversed by zinc protoporphyrin

积后，上述结果可被显著逆转；所以他们认为 ROS-NLRP3-IL-1 $\beta$  信号传导轴在高渗透压诱导的人角膜上皮细胞凋亡中发挥重要作用。WU 等<sup>[26]</sup> 的研究也有类似结论，他们采用尼古丁处理人主动脉内皮细胞后，可以通过激活 NLRP3-ASC 炎症小体活化，促进下游 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的产生，进而导致细胞焦亡，

促进动脉粥样硬化斑块的形成；当清除人主动脉内皮细胞内活性氧后，该过程被终止；因此，他们认为焦亡可能是尼古丁促动脉粥样硬化斑块形成的关键，而刺激活性氧产生并激活 NLRP3 炎性小体是尼古丁诱导焦亡的信号机制。

上述研究的结论均支持活性氧是炎性信号通路的起始因子，而在此次研究中发现，IL-1 $\beta$  处理髓核细胞后，在炎症因子的刺激下也可以促进髓核细胞内活性氧的产生，但活性氧产生的机制如何？

既往研究表明，核因子  $\kappa$ B 信号通路参与了椎间盘退变的发展过程，其原因与核因子  $\kappa$ B 信号通路调控的髓核细胞炎症反应和氧化应激密切相关<sup>[27-28]</sup>。IL-1 $\beta$  刺激髓核细胞后可以激活 I $\kappa$ B $\alpha$ ，从而促进 p65 的核易位，诱导核因子  $\kappa$ B 信号通路的活化。核因子  $\kappa$ B 通路将进一步促进促炎分子（环氧化酶 2 和诱导型一氧化氮合酶）的产生，导致髓核细胞凋亡和细胞外基质降解。此外，IL-1 $\beta$  刺激髓核细胞后，显著增加了促氧化应激相关蛋白（如 Nox2/4 等）的表达，而抗氧化应激相关蛋白（如超氧化物歧化酶 1 等）的表达受到抑制<sup>[29]</sup>。因此，IL-1 $\beta$  处理髓核细胞后，导致髓核细胞氧化应激损伤一方面与其调控促 / 抗氧化应激相关蛋白的表达有关，另一方面与其调控核因子  $\kappa$ B 信号通路活化有关。所以，IL-1 $\beta$  对髓核细胞的损伤表现在诱导炎症损伤和氧化应激损伤两个方面，且二者互为诱因，形成恶性循环，具体表现为：IL-1 $\beta$  通过调控促 / 抗氧化应激相关蛋白的表达和核因子  $\kappa$ B 信号通路活化导致髓核细胞内活性氧蓄积，蓄积的活性氧又可以启动 NLRP3 炎症小体激活促进下游 IL-1 $\beta$  和 IL-18 等炎性递质的释放。

针对 IL-1 $\beta$  对髓核细胞的双重损害作用机制，结合相关文献研究，采取抗炎和抗氧化措施可有效缓解 IL-1 $\beta$  的损害作用，缓解椎间盘退变，进而抑制腰椎间盘突出症的发展。目前临床上用以抑制 IL-1 $\beta$  释放的主要药物是糖皮质激素，由于腰椎间盘突出症药物治疗具有反复发作、需长期用药的特点，导致腰椎间盘突出症患者可能需要长期服用糖皮质激素，导致水、盐、糖、蛋白质及脂肪代谢紊乱，削弱机体免疫力，引起骨质疏松、股骨头无菌性坏死等并发症的发生。因此，寻找糖皮质激素的替代药品对于治疗腰椎间盘突出症具有重要意义。近年来，中药因其低毒性、高疗效而备受关注，许多中药已被证明具有强效的抗炎、抗氧化等作用<sup>[30]</sup>。青藤碱提取自中草药青藤及毛青藤的干燥藤茎中，兼具镇痛、抗炎、抗氧化等多重作用。作者采用青藤碱处理髓核细胞后，发现青藤碱可以促进 HO-1 的表达，并能显著抑制 IL-1 $\beta$  导致的髓核细胞增殖活性下降、活性氧蓄积和凋亡增加，其机制与青藤碱激活 Nrf2/HO-1 信号通路相关。Nrf2 在调节抗氧化蛋白的表达中起主要作用，保护细胞免受活性氧的直接和间接损伤<sup>[31]</sup>。生理状态下 Nrf2 在细胞质中与 Keap1 结合形成复合体，在无应激的条件下逐渐被泛素化分解。当细胞受到外界刺激时，如氧化应激、炎症损伤、电离辐射等，Nrf2 从 Nrf2/Keap1 复合体中被释放出来，进入细胞核，与抗氧化反应元件结合，促进下游 HO-1、醌氧化还原酶 1、NADPH 等

抗氧化蛋白的表达<sup>[32]</sup>。此次研究中，在基因转录水平和蛋白表达水平均检测到青藤碱显著上调 HO-1 的表达，因此推断，青藤碱可以通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路，上调 HO-1 的表达，抑制 IL-1 $\beta$  介导的髓核细胞凋亡。此外，有研究表明，青藤碱还可以通过促进细胞自噬，调控巨噬细胞的表型，改善髓核细胞活性、炎症和损伤<sup>[33-34]</sup>。所以，青藤碱对髓核细胞的保护作用是多途径、多机制的。

综上所述，此次研究表明，青藤碱通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路来减少 IL-1 $\beta$  诱导的髓核细胞增殖活性下降，并缓解氧化应激损伤，减轻细胞凋亡，可能是治疗椎间盘退变有希望的靶点药物。然而，此次研究仍存在一定的局限性，上述结果仍需要临床进一步确认。

致谢：感谢蒋树龙教授提供的技术及设备支持。

作者贡献：实验设计、评估及统筹安排为通讯作者张存鑫，实验实施及结果搜集论文撰写为第一作者王倩，数据分析及图片绘制、编辑等为作者卢子昂，李利和，吕超亮。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- CHEN BL, GUO JB, ZHANG HW, et al. Surgical versus non-operative treatment for lumbar disc herniation: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rehabil*. 2018;32(2):146-160.
- JUNGEN MJ, TER MEULEN BC, VAN OSCH T, et al. Inflammatory biomarkers in patients with sciatica: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019;20(1):156.
- DENES K, ARANYI Z, CSILLIK A, et al. Serum biomarkers in acute low back pain and sciatica. *Orv Hetil*. 2020;161(13):483-490.
- ZHAO L, MANCHIKANTI L, KAYE AD, et al. Treatment of Discogenic Low Back Pain: Current Treatment Strategies and Future Options-a Literature Review. *Curr Pain Headache Rep*. 2019;23(11):86.
- LIU HY, KANG HL, SONG C, et al. Urolithin A Inhibits the Catabolic Effect of TNF $\alpha$  on Nucleus Pulposus Cell and Alleviates Intervertebral Disc Degeneration in vivo. *Front Pharmacol*. 2018;9:1043.
- LI P, HOU G, ZHANG RJ, et al. High-magnitude compression accelerates the premature senescence of nucleus pulposus cells via the p38 MAPK-ROS pathway. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):209.
- HIDER SL, KONSTANTINOU K, HAY EM, et al. Inflammatory biomarkers do not distinguish between patients with sciatica and referred leg pain within a primary care population: results from a nested study within the ATLAS cohort. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019;20(1):202.
- WANG YJ, CHE MX, XIN JG, et al. The role of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in intervertebral disc degeneration. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110660.

- [9] ZHAO KC, AN R, XIANG Q, et al. Acid-sensing ion channels regulate nucleus pulposus cell inflammation and pyroptosis via the NLRP3 inflammasome in intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif.* 2021; 4(1):e12941.
- [10] XU QL, XING HY, WU JQ, et al. miRNA-141 Induced Pyroptosis in Intervertebral Disk Degeneration by Targeting ROS Generation and Activating TXNIP/NLRP3 Signaling in Nucleus Pulposus Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:871.
- [11] LI ZW, WANG JM, MA YM. Montelukast attenuates interleukin IL-1beta-induced oxidative stress and apoptosis in chondrocytes by inhibiting CYSLTR1 (Cysteinyl Leukotriene Receptor 1) and activating KLF2 (Kruppel Like Factor 2). *Bioengineered.* 2021;12(1):8476-8484.
- [12] ZHU WR, TANG H, LI JC, et al. Ellagic acid attenuates interleukin-1beta-induced oxidative stress and exerts protective effects on chondrocytes through the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/ Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway. *Bioengineered.* 2022;13(4):9233-9247.
- [13] JIANG W, FAN WM, GAO TL, et al. Analgesic Mechanism of Sinomenine against Chronic Pain. *Pain Res Manag.* 2020;2020:1876862.
- [14] IINO T, SAKO T. Inhibition and resumption of processing of the staphylokinase in some Escherichia coli prfA suppressor mutants. *J Biol Chem.* 1988;263(35):19077-19082.
- [15] FAN H, SHU Q, GUAN XL, et al. Sinomenine Protects PC12 Neuronal Cells against H2O2-induced Cytotoxicity and Oxidative Stress via a ROS-dependent Up-regulation of Endogenous Antioxidant System. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37(8):1387-1398.
- [16] LIU WW, ZHANG YJ, ZHU WN, et al. Sinomenine Inhibits the Progression of Rheumatoid Arthritis by Regulating the Secretion of Inflammatory Cytokines and Monocyte/Macrophage Subsets. *Front Immunol.* 2018; 9:2228.
- [17] ZENG MY, TONG QY. Anti-inflammation Effects of Sinomenine on Macrophages through Suppressing Activated TLR4/NF-kappaB Signaling Pathway. *Curr Med Sci.* 2020;40(1):130-137.
- [18] FAN H, SHU Q, GUAN XL, et al. Sinomenine Protects PC12 Neuronal Cells against H2O2-induced Cytotoxicity and Oxidative Stress via a ROS-dependent Up-regulation of Endogenous Antioxidant System. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37(8):1387-1398.
- [19] PENG Y, OU H, YANG MS, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages by sinomenine through regulating heme oxygenase-1 expression and autophagy. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2018;43(9):964-970.
- [20] KIM YK, KANG DM, LEE I, et al. Differences in the Incidence of Symptomatic Cervical and Lumbar Disc Herniation According to Age, Sex and National Health Insurance Eligibility: A Pilot Study on the Disease's Association with Work. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(10):2094.
- [21] BAI XL, DING WY, YANG SD, et al. Higenamine inhibits IL-1beta-induced inflammation in human nucleus pulposus cells. *Biosci Rep.* 2019;39(6): BSR20190857.
- [22] ZHOU YF, CHEN ZQ, YANG X, et al. Morin attenuates pyroptosis of nucleus pulposus cells and ameliorates intervertebral disc degeneration via inhibition of the TXNIP/NLRP3/Caspase-1/IL-1beta signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;559:106-112.
- [23] MA ZX, TANG P, DONG W, et al. SIRT1 alleviates IL-1beta induced nucleus pulposus cells pyroptosis via mitophagy in intervertebral disc degeneration. *Int Immunopharmacol.* 2022;107:108671.
- [24] FORRESTER SJ, KIKUCHI DS, HERNANDES MS, et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 2018;122(6): 877-902.
- [25] DAI YQ, ZHANG J, XIANG J, et al. Calcitriol inhibits ROS-NLRP3-IL-1beta signaling axis via activation of Nrf2-antioxidant signaling in hyperosmotic stress stimulated human corneal epithelial cells. *Redox Biol.* 2019;21:101093.
- [26] WU XX, ZHANG HQ, QI W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):171.
- [27] KANG L, HU J, WENG YX, et al. Sirtuin 6 prevents matrix degradation through inhibition of the NF-kappaB pathway in intervertebral disc degeneration. *Exp Cell Res.* 2017;352(2):322-332.
- [28] LI Z, WANG X, PAN H, et al. Resistin promotes CCL4 expression through toll-like receptor-4 and activation of the p38-MAPK and NF-kappaB signaling pathways: implications for intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(2):341-350.
- [29] LUO X, HUAN L, LIN F, et al. Ulinastatin Ameliorates IL-1beta-Induced Cell Dysfunction in Human Nucleus Pulposus Cells via Nrf2/NF-kappaB Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:5558687.
- [30] ZHANG CX, WANG T, MA JF, et al. Protective effect of CDDO-ethyl amide against high-glucose-induced oxidative injury via the Nrf2/HO-1 pathway. *Spine J.* 2017;17(7):1017-1025.
- [31] EARLY JO, MENON D, WYSE CA, et al. Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1beta in macrophages via NRF2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(36):E8460-E8468.
- [32] YUAN ML, ZHAO B, JIA HP, et al. Sinomenine ameliorates cardiac hypertrophy by activating Nrf2/ARE signaling pathway. *Bioengineered.* 2021;12(2):12778-12788.
- [33] GAO ZX, LIN YC, ZHANG P, et al. Sinomenine ameliorates intervertebral disc degeneration via inhibition of apoptosis and autophagy in vitro and in vivo. *Am J Transl Res.* 2019;11(9):5956-5966.
- [34] HOU XF, SHEN YC, SUN ML, et al. Effect of regulating macrophage polarization phenotype on intervertebral disc degeneration. *Immun Inflamm Dis.* 2022;10(11):e714.

(责任编辑: GD, ZN, WL, LCH)