

张超, 吴俊学, 王冶, 等. 和厚朴酚对 D-半乳糖致腰椎间盘突出大鼠血清炎症因子及细胞线粒体凋亡通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 62-68, 75.

Zhang C, Wu JX, Wang Y, et al. Effects of honokiol on serum inflammatory factors and the mitochondrial apoptosis pathway in rats with D-galactose-induced intervertebral disc degeneration [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 62-68, 75.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.010

和厚朴酚对 D-半乳糖致腰椎间盘突出大鼠血清炎症因子及细胞线粒体凋亡通路的影响

张超¹, 吴俊学¹, 王冶¹, 谢海洋¹, 彭玲^{2*}

(1. 川北医学院附属医院 骨外科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院附属医院 临床营养科, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探索和厚朴酚对 D-半乳糖致腰椎间盘突出大鼠血清炎症因子含量变化, 细胞外基质标记物表达水平及凋亡通路相关蛋白表达水平的影响。方法 45 只 SD 大鼠随机分为对照组 (Control)、D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 模型组 (Model)、和厚朴酚低剂量组 (2 mg/kg)、和厚朴酚中剂量组 (4 mg/kg)、和厚朴酚高剂量组 (8 mg/kg), 每组 9 只。模型组和和厚朴酚给药组采用皮下注射 D-gal 方法建立大鼠椎间盘退变模型, 对照组皮下注射等体积生理盐水。造模成功后, 给药组大鼠分别灌胃和厚朴酚 2、4、8 mg/kg, 其余各组大鼠灌胃生理盐水, 连续给药 4 周后处死大鼠。HE 和番红 O 染色观察比较各组椎间盘形态组织学; qRT-PCR 检测大鼠椎间盘组织细胞外基质标记物的 mRNA 水平; ELISA 检测大鼠血清中白细胞介素 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量的变化; TUNEL 染色观察大鼠椎间盘的组织凋亡情况; Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)/Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、胱天蛋白酶-9 (Caspase-9)、Caspase-3、c-Myc 的蛋白表达。结果 模型组和和厚朴酚低、中剂量组椎间盘组织形态学评分较对照组显著升高 ($P < 0.05$)。和厚朴酚中、高剂量组椎间盘组织形态学评分较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。模型组和和厚朴酚低剂量组软骨受损严重, 和厚朴酚中、高剂量组软骨受损较轻。和厚朴酚能显著升高 SRY 相关 HMG 盒 9 (SOX-9)、II 型胶原 (Collagen II) 和蛋白聚糖 (Aggrecan) 的表达水平 ($P < 0.05$)。模型组和和厚朴酚低、中、高剂量组 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 的含量较对照组均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 和厚朴酚中、高剂量组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量均显著降低 ($P < 0.05$); IL-10 的含量显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组和和厚朴酚低、中剂量组凋亡细胞数显著升高 ($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值显著降低 ($P < 0.05$), Caspase-9、Caspase-3、c-Myc 的蛋白水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 和厚朴酚中、高剂量组凋亡细胞数显著降低 ($P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值显著升高 ($P < 0.05$), Caspase-9、Caspase-3、c-Myc 的蛋白水平均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 和厚朴酚对 D-半乳糖致腰椎间盘突出有明显疗效。

【关键词】 和厚朴酚; 腰椎间盘突出; 炎症因子; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0062-07

Effects of honokiol on serum inflammatory factors and the mitochondrial apoptosis pathway in rats with D-galactose-induced intervertebral disc degeneration

ZHANG Chao¹, WU Junxue¹, WANG Ye¹, XIE Haiyang¹, PENG Ling^{2*}

(1. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China.

2. Department of Clinical Nutrition, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

【基金项目】 南充市科技项目 (18SXHZ0341)。

【作者简介】 张超 (1991—), 男, 硕士, 研究方向: 骨科创伤、肿瘤、脊柱退变与临床。E-mail: zhangchaokaituo@163.com

【通信作者】 彭玲 (1990—), 女, 研究方向: 临床营养。E-mail: pengling199001@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of honokiol on serum inflammatory factors, extracellular matrix component expression, and apoptotic pathway-related protein expression in rats with D-galactose-induced intervertebral disc degeneration. **Methods** Forty-five SD rats were randomly divided into control (Control), D-galactose (D-gal) model (Model), honokiol low dose (2 mg/kg), honokiol medium dose (4 mg/kg) and honokiol high dose (8 mg/kg) groups, with 9 rats in each group. The rat model of intervertebral disc degeneration was established by subcutaneous injection of D-galactose in model and honokiol groups, and the Control group was subjected to subcutaneous injection of normal saline. After successful modeling, administration group rats were gavaged with magnolol at 2, 4 and 8 mg/kg, and the remaining rats were gavaged with normal saline in each group. Rats were sacrificed after 4 weeks of continuous administration. HE and safranin O staining was used to observe and compare the morphology and histology of intervertebral discs in each group. The mRNA levels of extracellular matrix components were measured by qRT-PCR in rat intervertebral discs. Changes of interleukin IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-10 in rat serum were detected by ELISAs. TUNEL staining was performed to observe apoptosis of rat intervertebral disc. Protein expression of B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2)/Bcl-2 associated X protein (Bax), Caspase-9, Caspase-3 and c-Myc was detected by Western blot. **Results** The scores of intervertebral disc histomorphology in the D-galactose group and honokiol low and medium dose groups were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with that in the D-galactose group, the scores of intervertebral disc histomorphology in medium and high dose honokiol groups were significantly lower ($P < 0.05$). Cartilage damage in the model group and the honokiol low dose group was severe, and that in honokiol medium and high dose groups was slightly damaged. Honokiol significantly increased the expression levels of SRY-related high mobility group-box gene 9 (SOX-9), collagen II and aggrecan ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10 in the D-galactose group and honokiol medium and high dose groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). Compared with that in the D-galactose group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the honokiol medium and high dose groups were reduced significantly ($P < 0.05$), and the content of IL-10 was increased significantly ($P < 0.05$). Compared with that in the control group, the number of apoptotic cells in the model group and honokiol low and medium dose groups was increased significantly ($P < 0.05$), the Bcl-2/Bax ratio decreased significantly ($P < 0.05$), and the protein levels of Caspase-9, Caspase-3 and c-Myc were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with that in the model group, the number of apoptotic cells in the honokiol medium and high dose groups was decreased significantly ($P < 0.05$), the Bcl-2/Bax ratio was increased significantly ($P < 0.05$), and the protein levels of Caspase-9, Caspase-3 and c-Myc were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Honokiol has obvious therapeutic effects on lumbar intervertebral disc degeneration induced by D-galactose.

【Keywords】 honokiol; intervertebral disc degeneration; inflammatory factor; apoptosis

椎间盘退变是一种与年龄相关的慢性过程,其特征是髓核细胞数量和功能减少,导致细胞外基质产生不足^[1]。研究认为炎症在细胞外基质代谢的发病机制中起着至关重要的作用^[2]。促炎细胞因子抑制髓核细胞产生细胞外基质,诱导衰老,细胞死亡和变性椎间盘细胞自噬,导致椎间盘结构改变并引起临床体征和症状^[3]。目前对椎间盘退变的治疗手段从保守治疗到外科手术,然而,这些椎间盘退变的临床治疗方法存在很大的局限性,只能部分缓解椎间盘退变引起的症状,不能从根本上逆转椎间盘退变。因此,应开发相应的有效药物,真正改善椎间盘退变的进展。和厚朴酚是一种天然黄酮类化合物,从厚朴的根和树皮中提取,研究表明,和厚朴酚在体内外具有抗氧化、脂质过氧化、抗炎症的药理作用及神经保护作用^[4-7]。此外,最近一

项使用大鼠尾巴模型的研究表明,和厚朴酚可以渗透并分布在椎间盘退变中,从而在体外和体内均达到治疗效果^[8]。这使得和厚朴酚成为治疗椎间盘退变的一个有吸引力的候选物。本研究探索和厚朴酚对 D-半乳糖致腰间盘退变大鼠血清炎症因子含量变化,细胞外基质标记物表达水平及凋亡通路相关蛋白表达水平的影响,以期今后为椎间盘退变的临床治疗提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

45 只 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠由川北医学院实验动物中心提供[SCXK(川)2018-018],鼠龄为 6~7 周,体重 200~260 g。实验期间饲养于该中心[SYXK(川)2018-076],温度 24℃~26℃,湿度

50%~60%,光照 12 h,自由饮食饮水,适应性喂养 1 周后进行实验。该动物实验得到了川北医学院动物伦理委员会的批准(IACUC-2019-011),实验过程中遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

和厚朴酚和 D-半乳糖,美国 Sigma 公司;SRY 相关 HMG 盒 9(SOX-9)、II 型胶原(Collagen II)、蛋白聚糖(Aggregan)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-9、c-Myc 兔来源一抗和 HRP 标记的山羊抗兔二抗,英国 Abcam 公司;蛋白 Marker,美国 Fermentas 公司;EDTA 缓冲液(pH=8.0),武汉百耐特化工有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit, TaKaRa (DRR037S);SYBR® Premix ExTaq™ (Tli RNaseH Plus), TaKaRa (DRR420A);PVDF 膜,谷歌生物;RIPA 强裂解液、ECL 发光试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;大鼠 IL-1β、IL-6、IL-10 和 TNF-α ELISA 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司。

高速低温离心机,德国艾本德公司;Varioskan Flash 多功能酶标仪和 Nano Drop 2000,中国赛默飞世尔公司;OLYMPUS DP71 显微镜,日本奥林巴斯光学有限公司;AMA440N 高压灭菌锅,英国 Astell 公司;ABI StepOnePlus™ 荧光定量 PCR 仪,美国基因仪器公司;电泳槽、电转仪和 BIO-RAD Gel Doc XR+凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、模型建立与药物干预

将 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 9 只,分别为对照组(Control)、D-半乳糖(D-galactose,D-gal)模型组(Model)、和厚朴酚低剂量组(2 mg/kg)、和厚朴酚中剂量组(4 mg/kg)、和厚朴酚高剂量组(8 mg/kg)。模型组和和厚朴酚低、中、高剂量组参照刘仁造模的方法^[9],如表 1 所示,采用皮下注射 D-半乳糖(300 mg/kg)方法建立衰老大鼠椎间盘退变模型。和厚朴酚低、中、高剂量组大鼠分别灌胃给和

厚朴酚 2、4、8 mg/kg,对照组和模型组大鼠灌胃给予生理盐水。连续给药 4 周后处死大鼠,取腰部椎间盘进行相关研究。

1.3.2 HE 染色

取部分大鼠腰部椎间盘放入 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 以上,然后将组织置于脱水机内依次梯度乙醇进行脱水后,石蜡包埋、切片;将切片分别置于二甲苯 I 和二甲苯 II、梯度乙醇进行脱蜡处理,然后苏木精、伊红染色;随后依次用乙醇和二甲苯处理直至脱水透明,用中性树胶封片,光学显微镜下观察组织病理学变化。

1.3.3 番红 O 染色

石蜡组织切片制备同 1.3.2,PBS 清洗 3 次后,用 1%番红 O 染液浸染 1.5 min;1%固绿染液复染 1 min;体积分数 75%乙醇分化 2 s;自然晾干,二甲苯透明,中性树脂封片后,光学显微镜下观察并拍照。

1.3.4 qRT-PCR 检测基因 mRNA 水平

使用 TRIzol 试剂提取大鼠椎间盘组织总 RNA,并通过 Nanodrop2000 测定浓度,然后使用 Super RT cDNA 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。使用 Quantifast® SYBR® GreenPCR Kit 在 ABI 7500 仪器上进行 PCR,反应条件为 95℃ 15 s;60℃ 60 s。SOX-9、Collagen II、Aggregan 和 GAPDH 的引物如下:SOX-9:5'-GGCCCTTCCTCTCCTCAACC-3',5'-ACTGCCGTGGCCTTTTACA-3';CollagenII:5'-GGCTCCCCAGAACATCACCTACCA-3',5'-TCGGCCCTCATCTCCACATCATTG-3';Aggregan:5'-ACATCCCA GAAAACTTCTTT-3',5'-CGGCTTCGTCAGCAAAGC CA-3';GAPDH:5'-AGCCGCATCTTCTTGTGCAGTG-3',5'-TGCTAACCAGGCGTCCGATACG-3'。

1.3.5 免疫印迹法

取适量大鼠腰椎间盘组织匀浆,用 RIPA 裂解缓冲液在 4℃ 下提取蛋白质,使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶对等量蛋白质(40 μg)进行电泳,然后转移到聚偏

表 1 动物模型建立与药物干预

Table 1 Animal model establishment and drug intervention

分组 Groups 处理 Treatment	对照组 Control group	模型组 Model group	和厚朴酚低剂量组 Honokiol low dose group	和厚朴酚中剂量组 Honokiol medium dose group	和厚朴酚高剂量组 Honokiol high dose group
D-半乳糖(300 mg/kg) D-gal	—	+	+	+	+
和厚朴酚(mg/kg) Honokiol	生理盐水 Normal saline	生理盐水 Normal saline	2	4	8

氟乙烯 (PVDF) 膜上,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭膜 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,使用化学发光剂 ECL 显示条带,用 Image J 定量蛋白条带灰度值。

1.3.6 ELISA 法检测血清炎症因子含量

采用 ELISA 法测定大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 的含量。操作步骤严格按照大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 试剂盒说明书进行。

1.3.7 TUNEL 染色

石蜡组织切片制备同 1.3.2,取石蜡切片用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,然后与含有 TdT 和生物素化 dUTP 的 TUNEL 反应混合物 37℃ 孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次,每次 10 min,在 37℃ 的洗涤缓冲液中孵育 30 min 终止反应。在光学显微镜下计数 TUNEL 阳性细胞的数量。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 21.0 进行数据分析。所有数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 和厚朴酚对椎间盘组织形态学变化的影响

HE 染色结果显示,对照组髓核排列规则;模型组大鼠椎间盘纤维环多不完整,出现破裂,髓核细胞减少;和厚朴酚低、中、高剂量组纤维环胶原纤维层较对照组薄,纤维环稍有裂隙,软骨细胞浸润比对照组增多,髓核细胞稍有减少;但与模型组相比退变方面表现出改善。与对照组相比,模型组和和厚朴酚低、中剂量组椎间盘组织形态学评分显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,和厚朴酚中、高剂量

组椎间盘组织形态学评分显著降低 ($P<0.05$)。模型组和和厚朴酚低剂量组较对照组番红 O 淡染表明软骨基质流失严重,软骨组织受损,和厚朴酚中、高剂量组番红 O 染色较对照组稍有减少,但与模型组比较软骨组织损伤较轻 (图 1)。

2.2 和厚朴酚对细胞外基质标记物表达水平的影响

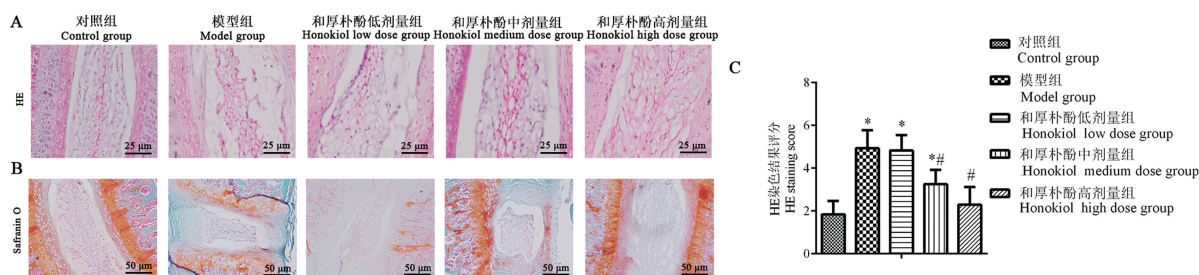
与对照组相比,模型组 SOX-9 mRNA、Collagen II mRNA、Aggrecan mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$);和厚朴酚低、中、高剂量组 SOX-9 mRNA 和 Aggrecan mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$);和厚朴酚低、中剂量组 Collagen II mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组相比,和厚朴酚中、高剂量组 SOX-9 mRNA、Collagen II mRNA 和 Aggrecan mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.05$) (表 2)。与对照组相比,模型组 SOX-9、Collagen II 和 Aggrecan 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$);和厚朴酚低、中剂量组 SOX-9、Collagen II 和 Aggrecan 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$)。与模型组相比,和厚朴酚中、高剂量组 SOX-9、Collagen II 和 Aggrecan 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$) (图 2)。

2.3 和厚朴酚对血清中各炎症因子含量的影响

与对照组相比,模型组和和厚朴酚中、高剂量组 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 的含量均显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,和厚朴酚中、高剂量组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量均显著降低 ($P<0.05$);IL-10 的含量显著升高 ($P<0.05$) (表 3)。

2.4 和厚朴酚对椎间盘组织凋亡的影响

与对照组相比,模型组和和厚朴酚低、中剂量组凋亡细胞数显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,和厚朴酚中、高剂量组凋亡细胞数显著降低 ($P<0.05$) (图 3)。



注:A: HE 染色;B: 番红 O 染色;C: 组织学评分。与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 1 各组腰椎间盘组织形态学变化

Note. A, HE staining. B, Safranin O staining. C, Histological score. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$.

Figure 1 Histomorphological changes of lumbar intervertebral discs in each group

表 2 各组 SOX-9、Collagen II、Aggrecan 的 mRNA 表达水平变化

Table 2 Changes in mRNA expression levels of SOX-9, Collagen II and Aggrecan in each group

组别 Groups	SRY 相关蛋白 9 SOX-9	II 型胶原 Collagen II	蛋白聚糖 Aggrecan
对照组 Control group	1	1	1
模型组 Model group	0.24±0.05 *	0.16±0.06 *	0.12±0.04 *
和厚朴酚低剂量组 Honokiol low dose group	0.26±0.04 *	0.18±0.08 *	0.14±0.03 *
和厚朴酚中剂量组 Honokiol medium dose group	0.63±0.07 **	0.59±0.05 **	0.42±0.05 **
和厚朴酚高剂量组 Honokiol high dose group	0.88±0.06 **	0.92±0.07 #	0.75±0.06 **

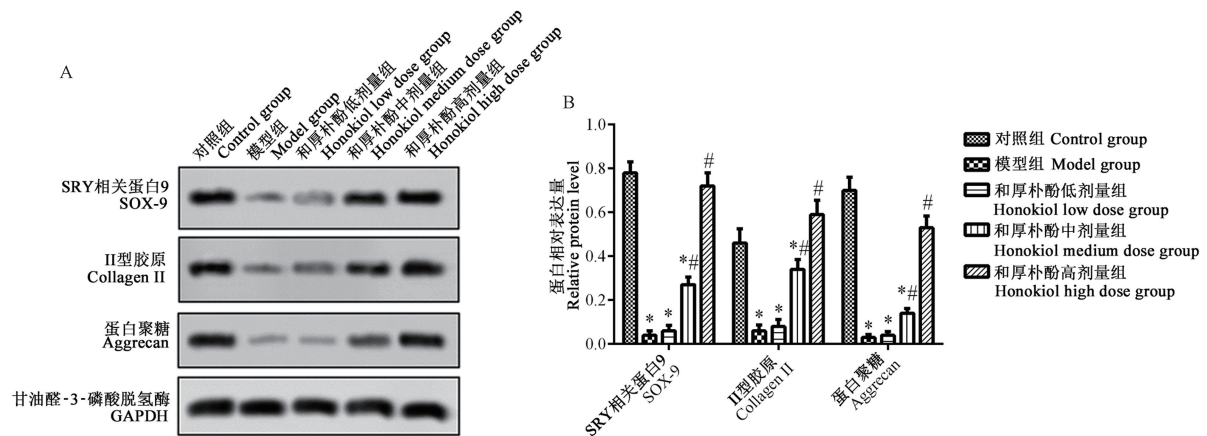
注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$.注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 2 各组 SOX-9、Collagen II 和 Aggrecan 的蛋白表达水平变化

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$.

Figure 2 Changes in the expression levels of SOX-9, Collagen II and Aggrecan proteins in each group

表 3 各组 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 的含量变化Table 3 Changes of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α levels in each group

组别 Groups	白细胞介素-1 β (pg/mL) IL-1 β	白细胞介素-6(pg/mL) IL-6	肿瘤坏死因子- α (pg/mL) TNF- α	白细胞介素-10(pg/mL) IL-10
对照组 Control group	26.18±7.42	14.22±4.34	36.44±7.22	6.26±1.14
模型组 Model group	132.32±14.27 *	79.10±9.76 *	169.84±21.54 *	9.52±2.42 *
和厚朴酚低剂量组 Honokiol low dose group	126.78±16.93 *	71.82±8.17 *	158.33±14.76 *	10.29±2.16 *
和厚朴酚中剂量组 Honokiol medium dose group	98.13±11.64 **	42.94±6.76 **	112.91±16.49 **	18.28±3.43 **
和厚朴酚高剂量组 Honokiol high dose group	62.65±9.43 **	19.86±5.43 **	70.48±11.72 **	27.31±3.08 **

注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$.

2.5 和厚朴酚对线粒体凋亡相关通路蛋白表达的影响

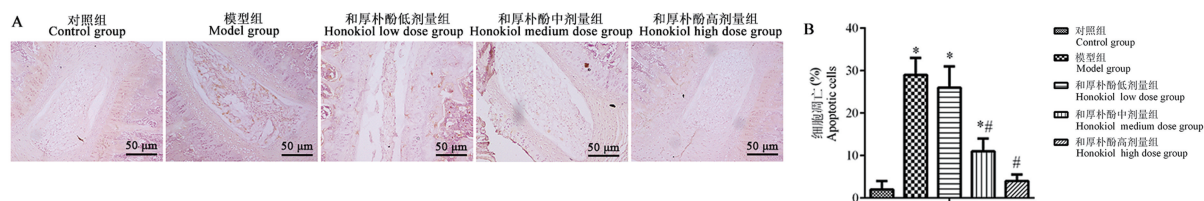
与对照组相比,模型组和和厚朴酚低、中剂量组 Bcl-2/Bax 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$); Caspase-9、Caspase-3、c-Myc 的蛋白水平平均显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,和厚朴酚中、高剂量组 Bcl-2/Bax 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$); Caspase-9、Caspase-3、c-Myc 的蛋白水平平均显著降低 ($P<0.05$) (图 4)。

3 讨论

椎间盘退变是一种多因素疾病,可导致多种脊柱相关疾病,如慢性腰痛、椎间盘突出和椎管狭窄。随着医疗技术的发展,目前最常见的是保守治疗和

外科手术治疗,但是这些治疗方法疗效有限,无法从根本上治疗和逆转椎间盘的退变进程。因此研究椎间盘退变的分子生物学机制,为寻找新的治疗椎间盘退变的方法具有非常重要的意义。

正常人椎间盘 HE 染色发现髓核结构完整,细胞和细胞外基质网络结构良好。随着椎间盘退变的加重,髓核组织内网状结构逐渐消失,纤维逐渐增多、增粗,髓核组织分裂增多,体积缩小。Tang 等^[10]研究发现,在给予和厚朴酚后,裂隙数量减少,髓核组织大小恢复,和厚朴酚处理的大鼠椎间盘的组织学评分(表明椎间盘退变的程度)明显降低。与前人研究一致,本研究发现和厚朴酚明显降低椎间盘组织形态学评分,减少软骨基质流失,表明和厚朴酚对椎间盘退变具有缓解的作用。

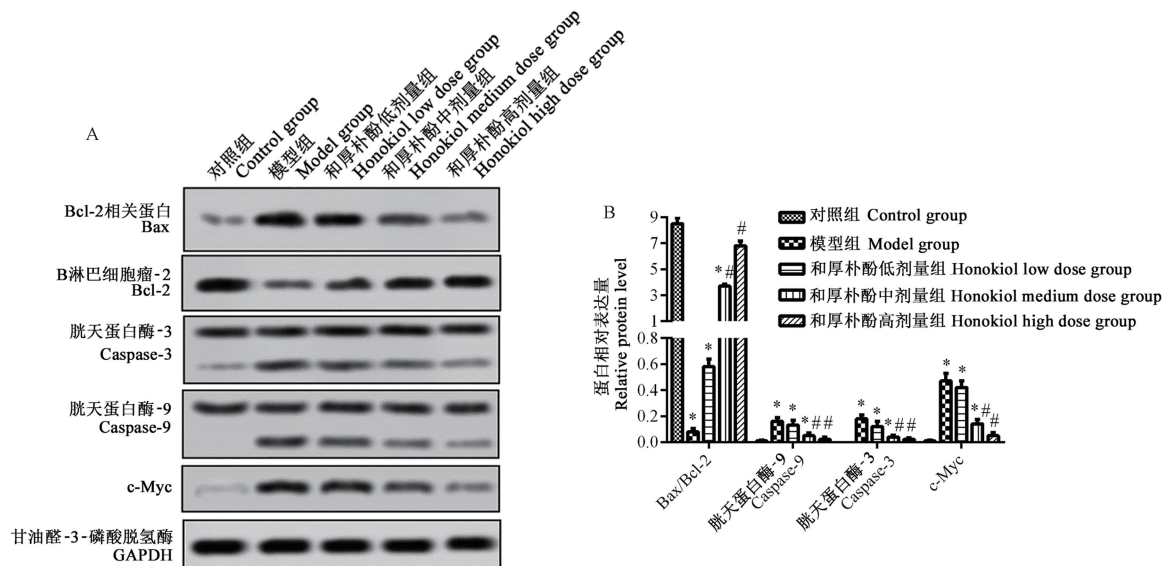


注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 3 各组腰椎间盘细胞凋亡变化(TUNEL 染色)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$.

Figure 3 Apoptosis of lumbar disc cells in each group(TUNEL staining)



注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 4 各组中 Bcl-2/Bax、Caspase-9、Caspase-3 和 c-Myc 蛋白的表达变化

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$.

Figure 4 Protein expression changes of Bcl-2/Bax, Caspase-9, Caspase-3 and c-Myc in each group

SOX-9、Collagen II、Aggrecan 是细胞外基质标记物,与椎间盘退变有着密切的联系。Collagen II 和 Aggrecan 使髓核保持水分,从而缓冲和吸收压力^[11]。当细胞外基质的分解代谢活性超过其合成代谢活性时,Collagen II 和 Aggrecan 的相对含量降低,导致水分流失和椎间盘退变的发生发展^[12]。研究发现 SOX-9 的增加可以正向调控包括 aggrecan 和 collagen 在内的软骨细胞特异性基因的表达^[13]。此外,和厚朴酚能明显增加 SOX-9 和 Aggrecan 的表达,缓解细胞外基质的变性^[10]。与前人研究一致,本研究发现和厚朴酚明显上调 SOX-9、Collagen II、Aggrecan 的表达,表明和厚朴酚能促进细胞外基质的生成,延缓椎间盘退变的发展。

炎症在椎间盘退变的早期阶段起着重要的作用,促炎介质由椎间盘退变过程中炎症细胞(淋巴细胞和巨噬细胞)和椎间盘成分(纤维环和髓核)的双重来源产生^[3,14]。IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 与其他炎症介质一起诱导衰老,细胞死亡和变性椎间盘细胞自噬,导致椎间盘结构改变并引起临床体征和症状^[3]。据报道,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平在椎间盘退变中被上调,IL-10 表达水平被下调,从而触发降解酶的产生以及免疫细胞向椎间盘突出或退变的椎间盘中的浸润^[15-18]。研究发现和厚朴酚能够抑制 IL-1 β 和 IL-6 的表达,表明和厚朴酚可能在抑制椎间盘退变的发病机制方面有价值^[10]。与前人研究一致,本研究发现和厚朴酚明显降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量,提高 IL-10 的含量,表明和厚朴酚能减轻炎症,从而减缓椎间盘退变。

细胞凋亡是椎间盘细胞死亡的一种非常重要的类型,在椎间盘退变过程中起着至关重要的作用。研究发现川芎内酯能促进髓核细胞中 Bcl-2 的表达,并降低 Bax 和 Cleaved-Caspase 3 的表达^[19]。miR-532 可下调 c-Myc 和 Survivin 蛋白的表达^[20]。而在关于和厚朴酚对椎间盘退变的研究, Tang 等^[10] 研究发现和厚朴酚预处理可以抑制凋亡蛋白 Caspase-9、Caspase-3 和 Bax 的表达。与前人研究一致,本研究发现和厚朴酚明显增加 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平,降低 Caspase-9、Caspase-3、c-Myc 的蛋白表达水平,表明和厚朴酚能够抑制椎间盘细胞的凋亡,有望防止或逆转早期椎间盘退变的发生。

综上所述,本研究通过和厚朴酚降低血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量,提高 IL-10 的含量,促进 SOX-9、Collagen II、Aggrecan 的表达以及抑制

Caspase-9、Caspase-3、c-Myc 的蛋白水平,表明和厚朴酚对腰椎间盘退变具有缓解作用,为和厚朴酚用于椎间盘退变的防治提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Feng H, Danfelter M, Strömquist B, et al. Extracellular matrix in disc degeneration [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(Suppl 2): 25-29.
- [2] Liu H, Pan H, Yang H, et al. LIM mineralization protein-1 suppresses TNF- α induced intervertebral disc degeneration by maintaining nucleus pulposus extracellular matrix production and inhibiting matrix metalloproteinases expression [J]. J Orthop Res, 2015, 33(3): 294-303.
- [3] Rishbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: Pain and disc content [J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1): 44-56.
- [4] Zhang Q, Wang J, Liu D, et al. Targeted delivery of honokiol by zein/hyaluronic acid core-shell nanoparticles to suppress breast cancer growth and metastasis [J]. Carbohydr Polym, 2020, 240: 116325.
- [5] Chuang DY, Chan MH, Zong Y, et al. Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells [J]. J Neuroinflammation, 2013, 10: 15-29.
- [6] Chen PJ, Wang YL, Kuo LM, et al. Honokiol suppresses TNF- α -induced neutrophil adhesion on cerebral endothelial cells by disrupting polyubiquitination and degradation of I κ B α [J]. Sci Rep, 2016, 6: 26554-26566.
- [7] Chen YJ, Tsai KS, Chan DC, et al. Honokiol, a low molecular weight natural product, prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in human osteoarthritis chondrocytes [J]. J Orthop Res, 2014, 32(4): 573-580.
- [8] Chen CH, Chiang CJ, Wu LC, et al. *In vitro* penetration and *in vivo* distribution of honokiol into the intervertebral disc in rat [J]. Anal Sci, 2015, 31(12): 1297-1302.
- [9] 刘仁. D-半乳糖致衰老大鼠椎间盘退变及补肾活血汤干预的研究 [D]. 湖南: 湖南中医药大学, 2014.
- [10] Tang P, Gu JM, Xie ZA, et al. Honokiol alleviates the degeneration of intervertebral disc via suppressing the activation of TXNIP-NLRP3 inflammasome signal pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 120: 368-379.
- [11] 江涛, 冯程程, 张明月, 等. 酮咯酸氨丁三醇抑制核转录因子对骨关节炎大鼠软骨损伤修复及血管新生的调节作用 [J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(6): 6-13.
- [12] Wang AM, Cao P, Yee A, et al. Detection of extracellular matrix degradation in intervertebral disc degeneration by diffusion magnetic resonance spectroscopy [J]. Magn Reson Med, 2015, 73(5): 1703-1712.
- [13] Li P, Xu Y, Gan Y, et al. Estrogen enhances matrix synthesis in nucleus pulposus cell through the estrogen receptor β -p38 MAPK pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(6): 2216-2226.

(下转第 75 页)

- adiposity: identification of mouse and human mesenteric estrogen-dependent adipose (MEDA)-4 gene and its adipogenic function [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6): 2665-2676.
- [18] Yamakawa J, Moriya J, Takahashi T, et al. A Kampo medicine, Boi-ogi-to, inhibits obesity in ovariectomized rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010, 7(1): 87-95.
- [19] 吴绍泽, 王立红, 谷剑. 雌激素及其受体对脂质代谢影响的研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2017, 16(4): 419-422, 428.
- [20] Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1 [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1409-1439.
- [21] Wang L, Wu J, Cao H, et al. The correlation between intestinal gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and proglucagon in hyperlipidemic rats and Goto-Kakizaki (GK) rats [J]. *Endocr Pathol*, 2009, 20(4): 227-234.
- [22] Ding X, Saxena NK, Lin S, et al. Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice [J]. *Hepatology*, 2006, 43(1): 173-181.
- [23] Xu F, Li Z, Zheng X, et al. SIRT1 mediates the effect of GLP-1 receptor agonist exenatide on ameliorating hepatic steatosis [J]. *Diabetes*, 2014, 63(11): 3637-3646.
- [24] 侯洪涛, 裴艳梅, 张建, 等. GLP-1 下调非酒精性脂肪肝大鼠 SOCS-3 和 SREBP-1c 的表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(7): 1312-1316.
- [25] 刘志平, 赵致维, 张金华. 非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群与胰高血糖素样肽 1 的相关性分析 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(1): 136-139.
- [26] van der Klaauw AA, Keogh JM, Henning E, et al. High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release [J]. *Obesity*, 2013, 21(8): 1602-1607.
- [27] 于倩, 李春君, 丁敏, 等. 胰高血糖素样肽-1 受体激动剂减轻小鼠体质量的作用机制研究 [J]. *天津医药*, 2015, 43(11): 1226-1229, 1230.

[收稿日期]2020-11-27

(上接第 68 页)

- [14] Hanaei S, Abdollahzade S, Khoshnevisan A, et al. Genetic aspects of intervertebral disc degeneration [J]. *Rev Neurosci*, 2015, 26(5): 581-606.
- [15] Luo L, Gao Y, Yang C, et al. Halofuginone attenuates intervertebral discs degeneration by suppressing collagen I production and inactivating TGF β and NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 745-753.
- [16] Liang H, Yang X, Liu C, et al. Effect of NF- κ B signaling pathway on the expression of MIF, TNF- α , IL-6 in the regulation of intervertebral disc degeneration [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2018, 18(4): 551-556.
- [17] Wang S, Wei J, Fan Y, et al. Progranulin is positively associated with intervertebral disc degeneration by interaction with IL-10 and IL-17 through TNF pathways [J]. *Inflammation*, 2018, 41(5): 1852-1863.
- [18] 佟德民, 孙凤杰, 孙利群, 等. 自体垂直悬吊牵引与靶向调控 caspase3 对兔退变椎间盘细胞的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2017, 42(12): 1072-1077.
- [19] Wang K, Chen T, Ying X, et al. Ligustilide alleviated IL-1 β induced apoptosis and extracellular matrix degradation of nucleus pulposus cells and attenuates intervertebral disc degeneration *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 398-407.
- [20] Sun Z, Jian Y, Fu H, et al. MiR-532 downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling via targeting Bcl-9 and induced human intervertebral disc nucleus pulposus cells apoptosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 138(4): 263-270.

[收稿日期]2020-11-10