

甘延池,何嘉辉,尚奇,等. 黄芩素对 TBHP 诱导小鼠髓核细胞衰老的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 61-68, 103.

Gan YC, He JH, Shang Q, et al. Baicalein protects mouse nucleus pulposus cells from TBHP-induced senescence [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 61-68, 103.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.008

黄芩素对 TBHP 诱导小鼠髓核细胞衰老的保护作用

甘延池^{1,3},何嘉辉^{1,3},尚奇^{1,3},陈桂锋^{1,3},陈弘林^{1,3},张学来^{2,3},张友^{1,3},
颜先伟^{1,3},刘慧雯^{1,3},梁德^{2,3},任辉^{2,3},江晓兵^{2,3*}

(1.广州中医药大学,广州 510405;2.广州中医药大学第一附属医院,广州 510405;
3.广州中医药大学岭南医学研究中心,广州 510405)

【摘要】 目的 研究黄芩素 (Baicalein,BAI) 对叔丁基过氧化氢 (tert-Butyl hydroperoxide, TBHP) 诱导的小鼠髓核细胞 (nucleus pulposus cells,NPCs) 的影响。**方法** 取 8 周龄小鼠,体外分离培养髓核细胞,传代至 P2~P3 代。将实验分为对照组、模型组及黄芩素组 3 组。 β 半乳糖苷酶染色检测髓核细胞衰老变化。实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR,RT-qPCR) 检测聚集蛋白聚糖 (aggrecan)、II 型胶原蛋白 (collagen II)、基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3,MMP-3)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9,MMP-9)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、p53、p16 mRNA 表达。免疫荧光法 (immunofluorescence, IF) 检测 TNF- α 表达水平。免疫印迹试验 (Western blot) 检测白细胞介素-6 (IL-6)、aggrecan、p53、p16、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达。**结果** TBHP 最佳干预浓度为 100 μ mol/L,干预时间 4 h;黄芩素最佳干预浓度为 1.0 μ g/mL,干预时间为 24 h。与对照组比较,模型组 β 半乳糖染色阳性率较对照组显著升高 ($P<0.05$),p53、p16、IL-1 β 、TNF- α mRNA 及蛋白表达显著升高 ($P<0.05$),MMP-3 mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$),MMP-9 mRNA 表达升高,差异无统计学意义 ($P>0.05$),aggrecan mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P<0.05$),collagen II mRNA 表达降低,差异无统计学意义 ($P>0.05$),IL-6 蛋白表达升高,差异无统计学意义 ($P>0.05$);与模型组比较,黄芩素组 β 半乳糖染色阳性率较模型组明显降低 ($P<0.05$),p53、p16、IL-1 β 、TNF- α mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P<0.05$),MMP-3、MMP-9 mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$),aggrecan mRNA 及蛋白表达显著升高 ($P<0.05$),collagen II mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$),IL-6 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。**结论** 黄芩素能延缓 TBHP 诱导的小鼠髓核细胞衰老的进程。

【关键词】 黄芩素;TBHP;髓核细胞;衰老

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0061-08

Baicalein protects mouse nucleus pulposus cells from TBHP-induced senescence

GAN Yanchi^{1,3}, HE Jiahui^{1,3}, SHANG Qi^{1,3}, CHEN Guifeng^{1,3}, CHEN Honglin^{1,3}, ZHANG Xuelai^{2,3}, ZHANG You^{1,3},
YAN Xianwei^{1,3}, LIU Huiwen^{1,3}, LIANG De^{2,3}, REN Hui^{2,3}, JIANG Xiaobing^{2,3*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China. 2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405. 3. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【Abstract】 Objective To investigate whether Baicalein (BAI) protects nucleus pulposus cells (NPCs) exposed to tert-Butyl hydroperoxide (TBHP). **Methods** NPCs were extracted from 8-week-old mice and cultured to passages 2

[基金项目] 广州中医药大学“双一流”与高水平大学学科协同创新团队 (2021xk57)。

[作者简介] 甘延池 (1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治脊柱退变性疾病基础研究。E-mail:274604642@qq.com

[通信作者] 江晓兵 (1984—),男,博士,主任中医师,博士生导师,研究方向:骨质疏松脊柱伤病、骨组织工程材料学研究。

E-mail:spinedrxb@sina.com

and 3 for experiments in control, model, and baicalein groups. SA- β -galactosidase staining was used to detect senescence of NPCs. Real-time quantitative PCR was used to measure *aggrecan*, *collagen II*, matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , p53 and p16 mRNA expression. TNF- α was detected by immunofluorescence. Protein expression of *aggrecan*, p53, p16, IL-1 β and TNF- α was detected by Western blot. **Results** The concentration of TBHP was 100 μ mol/L, and the treatment time was 4 h. The optimal concentration of baicalein was 1 μ g/mL with a treatment time of 24 h. Compared with the control group, the positive rate of SA- β -galactose staining in the TBHP group was significantly increased ($P < 0.05$), p53, p16, IL-1 β and TNF- α mRNA and protein expression was significantly increased ($P < 0.05$), and MMP-3 mRNA expression was significantly increased ($P < 0.05$). MMP-9 mRNA expression was increased, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$), *aggrecan* mRNA and protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$), *collagen II* mRNA expression was decreased, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$), and IL-6 protein expression was increased, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the model group, the positive rate of SA- β -galactose staining in the baicalein group was significantly lower ($P < 0.05$). p53, p16, IL-1 β , and TNF- α mRNA and protein expression was significantly lower ($P < 0.05$), and MMP-3 and MMP-9 mRNA expression was significantly lower ($P < 0.05$). *Aggrecan* mRNA and protein expression was significantly increased ($P < 0.05$), *collagen II* mRNA expression was significantly increased ($P < 0.05$), and IL-6 protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$).

Conclusions Baicalein delays senescence of NPCs induced by TBHP.

【Keywords】 baicalein; TBHP; nucleus pulposus cells; aging

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

椎间盘退行性变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是指椎间盘自然退行性变和衰老的生理病理过程, 是临床上各种脊柱相关疾病发生的病理基础^[1]。IDD 常会引起椎体不稳、椎间盘突出、椎管狭窄等改变, 最后导致出现腰痛、甚至伴有神经根或脊髓受压症状, 给患者生活带来困扰, 同时在世界范围内造成了巨大的社会和经济负担^[2]。越来越多的研究表明^[3-5], IDD 与细胞死亡相关, 除凋亡之外, 坏死、焦亡、自噬和铁死亡, 也与 IDD 密切相关。而在引起 IDD 的诸多因素中, 衰老髓核细胞的积累为 IDD 的发病机制提供了新的认识, 髓核细胞的衰老随着椎间盘退变程度的进展而加剧^[6]。此外, 衰老的髓核细胞可能会改变椎间盘微环境, 产生衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP), 其中包括衰老因子、促炎因子过度表达, 以及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 减少^[7]。也有研究证实^[8], 随着衰老细胞的积累引起衰老相关的分泌表型表达, 并诱导椎间盘基质降解, 导致加速 IDD 进程。因此延缓髓核细胞衰老对防治 IDD 具有重要意义。

近年来, 提取自天然植物的化合物用于治疗退行性疾病越来越受欢迎, 疗效较好且副作用较少^[9]。黄芩素 (Baicalein, BAI) 又称为黄芩苷元、黄芩黄素, 是从黄芩根中提取的生物活性成分, 具有抗炎、抗菌等药理作用, 其分子结构式见图 1A^[10]。

然而, 对于 BAI 体外抗衰老的分子机制尚未阐明。因此, 本研究利用叔丁基过氧化氢 (tert-Butyl hydroperoxide, TBHP) 诱导的 NPCs 衰老模型, 旨在研究 BAI 对衰老 NPCs 的分子代谢影响, 为中医药防治 IDD 的进一步研究提供新思路 and 理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 6 只, 体重 (25 $\pm$ 2) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供 [SCXK (粤) 2018-0034], 动物饲养于广州中医药大学实验动物中心屏障环境中 [SYXK (粤) 2018-0001], 自由供给饲料、饮用洁净水 (均由广州中医药大学实验动物中心提供), 饲养环境 12 h 光照和 12 h 黑暗交替进行, 相对湿度 (55 $\pm$ 10) %, 温度 20~25 $^{\circ}$ C。实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀, 并通过广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理审查 (TCMF1-2019047)。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清 (Gibco, 10100147); 青链霉素混合液 (100 $\times$) 细胞培养专用 (Solarbio, P1440); BAI (Solarbio, SB8010); 基础培养基 DMEM/F12 (Servicebio, G4612); 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色检测试剂盒 (Beyotime, C0602); 0.25% 胰蛋白酶消化液 (Servicebio, G4001); II 型胶原酶 (Biosharp,

BS164); 逆转录试剂盒 PrimeScriptTM RT MasterMix (TaKaRa, RR036A); 荧光定量 TB Green[®] Premix Ex TaqTM (TaKaRa, RR420A); CCK-8 检测试剂盒 (Glpbio, GK10001); SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (Beyotime, P0683); BCA 蛋白定量试剂盒 (Beyotime, P0011); 抗荧光淬灭封片液含 DAPI (Beyotime, P0131); p16、IL-1 β 、TNF- α 抗体 (Affinity, AF0228, AF5103, AF7014); p53、IL-6、aggrecan、actin 一抗 (Beyotime, AF1162, AF7236, AF6162, AF0003); 羊抗兔第二抗体 (Affinity, S0001) 等, 引物由生工生物工程股份有限公司合成。T100 梯度 PCR 仪、电泳仪、全能型凝胶成像分析系统、CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); 全波长酶标仪 (Thermo, 美国); 倒置荧光显微镜 (徕卡, 德国) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 完全培养基、BAI 药液配制

完全培养基: 基础培养基 DMEM/F12、胎牛血清 (FBS)、1% 青链霉素混合液配制成含 15% FBS 培养基用于后续实验。BAI 药液: 称量 BAI 干粉 1 mg, 溶解于 1 mL 的二甲基亚砜 (DMSO) 中, 即为 1 mg/mL BAI 药液, 后续实验根据浓度需要使用完全培养基进行稀释、干预细胞。

1.3.2 NPCs 的分离、培养、传代

将小鼠采用腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 麻醉后脱颈处死, 75% 乙醇浸泡 5 min, 于无菌操作台上取出小鼠腰椎, 分离出椎间盘, 取髓核组织放入含 0.25% 胰蛋白酶的 15 mL 离心管中, 37 $^{\circ}$ C 摇床消化 15 min; 22~24 $^{\circ}$ C、1000 r/min、离心 5 min, 去除胰蛋白酶, 加入 0.25% II 型胶原酶, 37 $^{\circ}$ C 摇床消化 6 h; 22~24 $^{\circ}$ C、1000 r/min、离心 5 min, 移去胶原酶, PBS 重悬后离心, 去除 PBS。加入完全培养基 5 mL 重悬, 取重悬液种植于 T25 细胞培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养, 每 3~4 d 换液 1 次, 显微镜下观察细胞状况, 细胞生长至 80% 融合时, 1: (2~3) 传代, 取 P2~P3 代用于后续细胞实验。

1.3.3 细胞活力检测

NPCs 以 10⁴/孔种植于 96 孔板, 每孔体积 100 μ L, 用于后续检测。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 1 d, NPCs 贴壁后, 用不同浓度 BAI (0、0.01、0.1、1.0、2.0、2.5、5.0 μ g/mL) 及不同浓度 TBHP (0、50、100、150、200、250 μ mol/L) 分组干预, 每组设 6 个复孔, 干预结束每孔加入 CCK-8 检测工作液 10 μ L, 孵

育 2.5 h 后用酶标仪检测各组细胞 450 nm 处 A 值 (吸光度)。

1.3.4 细胞分组

NPCs 接种于 100 mm 培养皿或 6 孔板中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。对照组: 未给 TBHP 及 BAI 处理; 模型组: TBHP 处理 4 h 后换成完全培养基培养 24 h; BAI 组: TBHP 处理 4 h 后换成含 BAI 的完全培养基培养 24 h。

1.3.5 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色

NPCs 以 10⁵/孔种植到 6 孔板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 1 d 使细胞贴壁, 分为对照组、模型组和 BAI 组; 干预结束去除培养液, 用 PBS 清洗 1 次, 加入 1 mL 固定液室温固定 15 min; 移去固定液, PBS 清洗 3 次, 每次 3 min; 按说明书比例配制染色工作液, 洗净后每孔加 1 mL 染色液, 最后用保鲜膜密封置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育过夜; 次日在显微镜下观察阳性细胞。

1.3.6 免疫荧光实验

将 NPCs 以 10⁴/孔的密度种植于 24 孔板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 1 d 使细胞贴壁。分为对照组、模型组和 BAI 组。干预结束后用 PBS 清洗 3 min 共 3 次, 吸除 PBS 后加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min。PBS 洗涤 3 min 共 3 次, 吸除 PBS 后使用 0.3% Triton 通透处理 10 min。吸除 Triton, 用 PBS 再洗涤 3 min 共 3 次, 洗净后加入免疫染色封闭液封闭 30 min, 吸净封闭液, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日回收一抗, 用预冷 PBS 洗涤细胞 3 min 共 3 次后, 吸净液体, 加入二抗室温避光孵育 1 h, 回收二抗, PBS 洗涤细胞 3 min 共 3 次, 吸净液体后加入抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) 标记 20 min。镜下观察并采集图像。

1.3.7 RT-qPCR 检测基因表达

干预结束后, 按照试剂盒说明提取对照组、模型组和 BAI 组细胞总 RNA, 测浓度, 反转录及实时荧光定量 PCR 检测 aggrecan、collagen II、MMP-3、MMP-9、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、p53、p21 mRNA 表达, PCR 仪扩增反应条件按说明书操作。用 $\Delta\Delta CT$ 法进行相对定量分析。平均相对含量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$, 为相对于对照组 mRNA 的水平。引物序列见表 1。

1.3.8 Western blot 检测蛋白表达

细胞干预结束, 用细胞裂解液裂解细胞, 收集 3 组细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 加入适量上样缓冲液, 热变性、冷却。10% SDS-PAGE

制胶、电泳、转膜、快速封闭液封闭 30 min,加入一抗 4℃摇床孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,孵育二抗。用全能型凝胶成像系统,加发光液进行曝光、拍照。以β-actin 为内参,用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值^[11]。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,数据为计量资料,采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用单因素方差分析及组间两两比较法分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

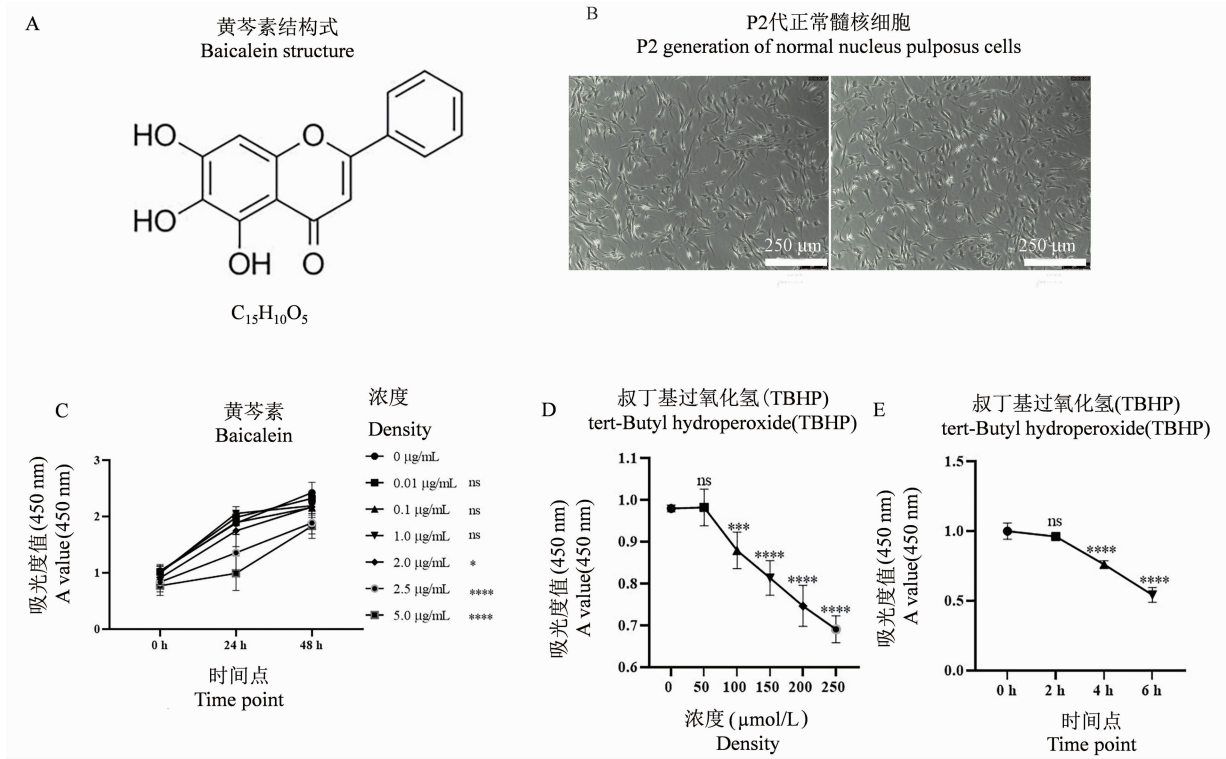
2 结果

2.1 小鼠 NPCs 形态特征

小鼠原代 NPCs 贴壁需要时间较长,大约需要 3~4 d 贴壁,生长缓慢,聚集性生长,形态呈类圆形,大约 7~8 d 进行传代,传代后的 P2~P3 代 NPCs 生长速度较快,形态呈短梭形,轮廓清晰(图 1B)。

表 1 引物序列

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
聚集蛋白聚糖 <i>Aggrecan</i>	F:5'-CCTGCTACTTCATCGACCCC-3' R:5'-AGATGCTGTTGACTCGAACCT-3'
Ⅱ型胶原蛋白 <i>Collagen Ⅱ</i>	F:5'-GGGAATGTCCTCTCGGATGAC-3' R:5'-GAAGGGGATCTCGGGGTG-3'
p53 基因 <i>p53</i>	F:5'-GTCACAGCACATGACGGAGG-3' R:5'-TCTTCCAGATGCTCGGGATAC-3'
p16 基因 <i>p16</i>	F:5'-CGCAGGTTCTTGCTCACTGT-3' R:5'-TGTTACAGAAAGCCAGAGCG-3'
白细胞介素-1β <i>IL-1β</i>	F:5'-CTGTGACTCATGGGATGATGATG-3' R:5'-CGGAGCCTGTAGTGCAGTTG-3'
肿瘤坏死因子 α <i>TNF-α</i>	F:5'-GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG-3' R:5'-TTGTTGTTTGTGAGTGTGAG-3'
基质金属蛋白酶-3 <i>MMP-3</i>	F:5'-ACATGGAGACTTTGTCCCTTTTG-3' R:5'-TTGGCTGAGTGGTAGAGTCCC-3'
基质金属蛋白酶-9 <i>MMP-9</i>	F:5'-CTGGACAGCCAGACACTAAAG-3' R:5'-CTCGCGCAAGTCTTCAGAG-3'



注:A:黄芩素结构式;B:P2代正常髓核细胞;C:CCK-8 检测黄芩素对髓核细胞活力的影响;D:CCK-8 检测不同浓度 TBHP 对髓核细胞活力的影响;E:CCK-8 检测在 TBHP 干预 0 h、2 h、4 h、6 h 后髓核细胞活力。与对照组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 1 黄芩素、TBHP 对髓核细胞活力的影响

Note. A, Baicalein structure. B, P2 generation of normal nucleus pulposus cells. C, CCK-8 was used to detect the effect of baicalein on the activity of nucleus pulposum cells. D, CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of TBHP on the activity of nucleus pulposum cells. E, CCK-8 was used to detect the activity of nucleus pulposus cells after 0 h, 2 h, 4 h and 6 h TBHP intervention. Compared with the control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 1 The effects of baicalein and TBHP on activity of nucleus pulposus cells

2.2 CCK-8 法检测 TBHP、BAI 对 NPCs 的影响

与对照组(0 μg/mL)相比,BAI(1.0 μg/mL)干预 24 h 后 NPCs 活力增强,且作用最为显著,但差异无统计学意义($P>0.05$);而 BAI(2.0、2.5、5.0 μg/mL)干预 24 h 后的 NPCs 活力均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组(0 μmol/L)相比,TBHP 浓度为 100 μmol/L 时 NPCs 活力显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);另外,在该浓度干预 4 h 时的 NPCs 活力显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。因此,后续实验选择 BAI 最佳干预浓度为 1.0 μg/mL,干预时间为 24 h(图 1C);TBHP 造模浓度为 100 μmol/L(图 1D),干预时间 4 h(图 1E)。

2.3 细胞 β 半乳糖苷酶染色检测髓核细胞衰老率

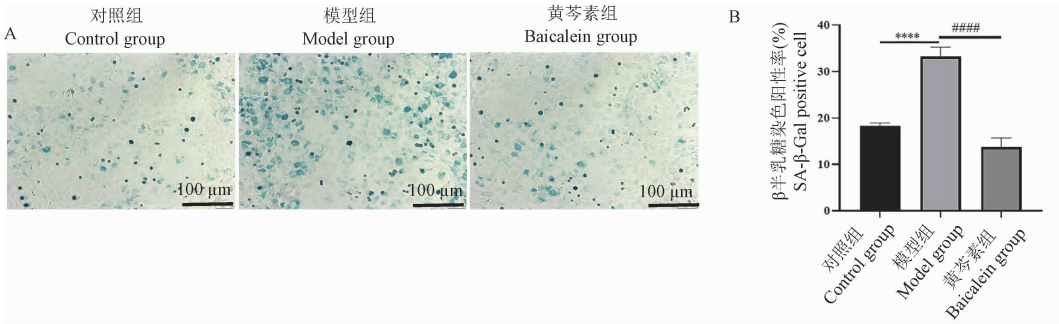
与对照组相比,模型组细胞 β 半乳糖苷酶染色阳性率增加,差异有显著统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,黄芩素组细胞 β 半乳糖苷酶染色阳性率下降($P<0.05$)(图 2)。

2.4 免疫荧光检测细胞内 TNF-α 蛋白表达

与对照组相比,模型组髓核细胞内 TNF-α 表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,免疫荧光检测显示黄芩素组髓核细胞内 TNF-α 表达显著下降,显示差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3)。

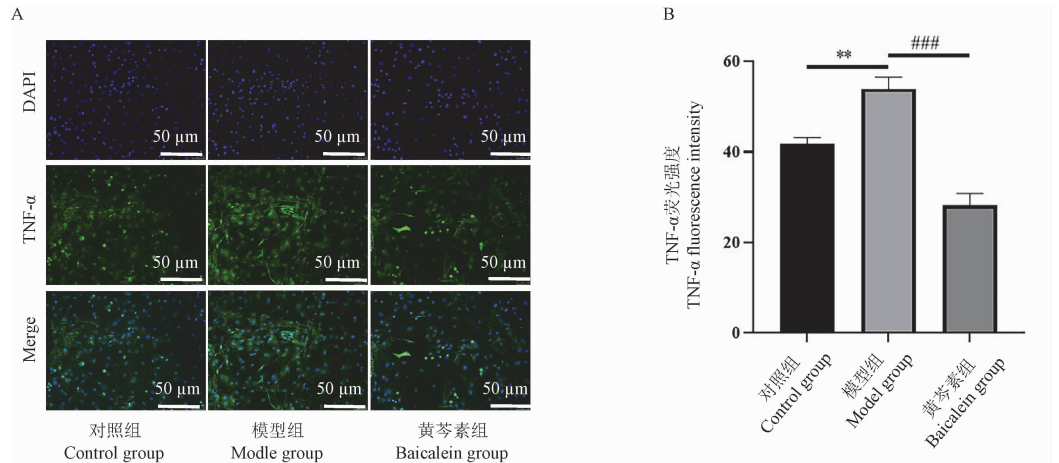
2.5 RT-qPCR 检测 mRNA 表达情况

与对照组相比,模型组 p53、p16、IL-1β、TNF-α、MMP-3 基因表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);MMP-9 基因表达升高,但差异无统计学意义($P>0.05$);aggrecan 基因表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);collagen II 基因表达降低,但差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组相比,黄芩素组 p53、p16、IL-1β、TNF-α、MMP-3、MMP-9 基因表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);aggrecan、collagen II 基因表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4)。



注:与对照组比较,**** $P<0.0001$;与模型组比较,#### $P<0.0001$ 。
图 2 细胞 β 半乳糖苷酶染色图及阳性率统计分析
Note. Compared with control group, **** $P<0.0001$. Compared with model group, #### $P<0.0001$.

Figure 2 Cell β-galactosidase staining and statistical analysis of positive rate



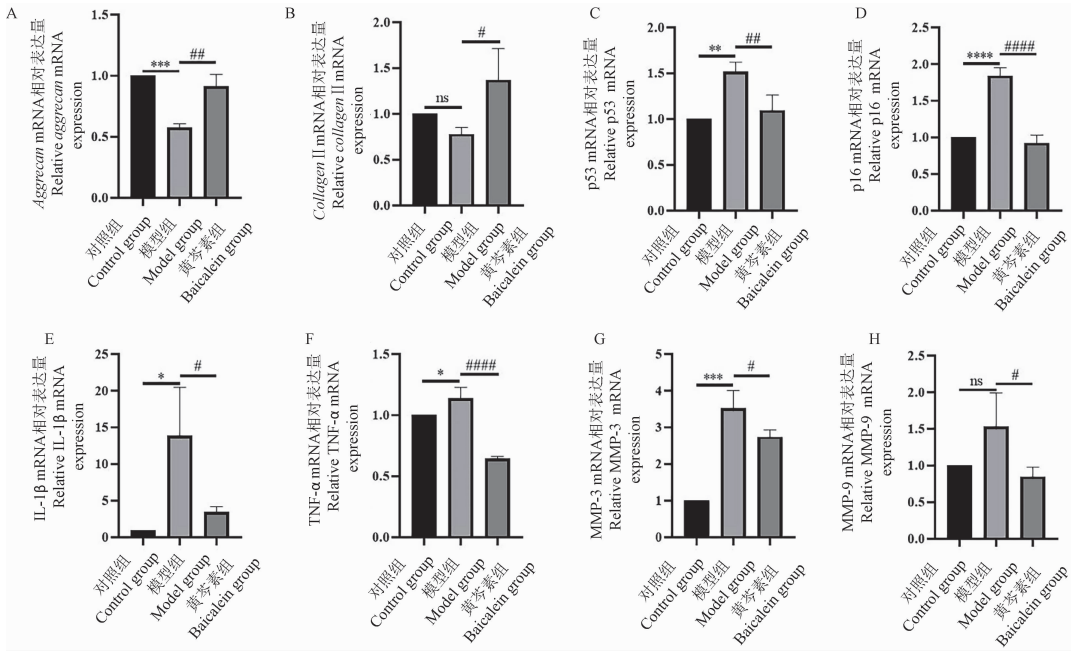
注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,### $P<0.001$ 。
图 3 TNF-α 表达荧光图及相对荧光强度统计分析
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, ### $P<0.001$.

Figure 3 Fluorescence pattern of TNF-α expression and statistical analysis of relative fluorescence intensity

2.6 Western blot 检测相关蛋白表达

与对照组相比,模型组 p53、p16、IL-1β、TNF-α 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), IL-6 蛋白表达无统计学意义 ($P>0.05$); aggrecan 蛋白表达降低, 差异无

统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较,黄芩素组 p53、p16、IL-1β、TNF-α、IL-6 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), aggrecan 蛋白表达升高, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 5)。

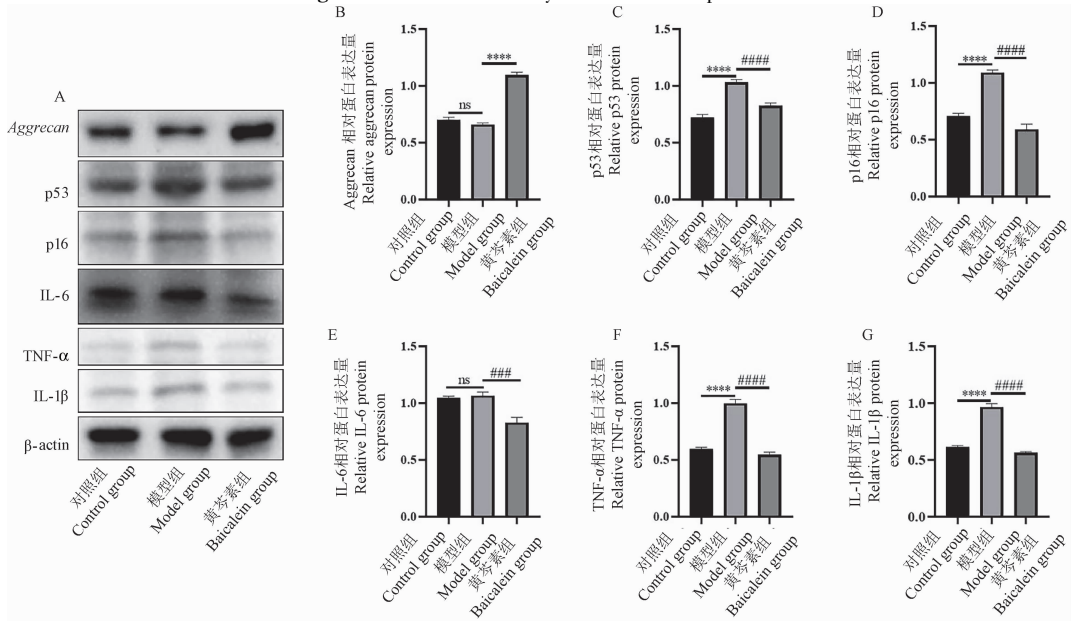


注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, #### $P<0.0001$ 。

图 4 相关 mRNA 表达统计分析

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, #### $P<0.0001$.

Figure 4 Statistical analysis of mRNA expression



注:与对照组比较, **** $P<0.001$;与模型组比较, #### $P<0.0001$ 。

图 5 相关蛋白表达条带图及统计分析

Note. Compared with control group, **** $P<0.001$. Compared with model group, #### $P<0.0001$.

Figure 5 Expression band map and statistical analysis of related proteins

3 讨论

下腰痛 (low back pain, LBP) 是世界范围内的一个重要医学问题,给社会 and 患者带来巨大的经济负担^[12]。虽然 LBP 的病因复杂,但椎间盘退变 (IDD) 被认为是导致 LBP 的主要原因^[13]。根据研究表明,IDD 的发展是基于椎间盘微环境的细胞和生化发生改变,导致椎间盘功能和结构进行性损伤^[14]。虽然 LBP 的发病机制尚未完全阐明,但是细胞外基质 (ECM) 的破坏、IDD 细胞分泌表型的改变、活性细胞的丧失、细胞衰老和细胞凋亡的增加以及过度的炎症反应被认为是 IDD 发生的重要因素^[15-17],这些因素加重正常椎间盘功能的破坏。然而,针对细胞衰老的具体分子生物学机制研究仍较少。Liu 等^[18]研究证实,在衰老的髓核组织中,髓核细胞数量减少和功能异常,继而造成 *aggrecan*、*collagen II* 等基质成分破坏,合成代谢功能减退,最终会导致椎间盘分散脊柱压力和维持椎间隙高度等生物力学功能丢失,引起椎间盘退变。因此,抑制髓核细胞衰老、促进髓核细胞外基质表达^[19],将有望成为防治 IDD 的一种有效的治疗方法。

黄芩素是从植物黄芩根中提取的一种黄酮类化合物,在中药中有着悠久的历史^[20]。BAI 具有多种药理活性,包括抗氧化、抗菌和抗炎^[10]。但 BAI 的抗衰老作用鲜见报道,且抗衰老机制尚未进行系统深入研究。Childs 等^[21]和 Mikawa 等^[22]研究证实,细胞衰老是指各种应激因素引起的细胞周期阻滞,随着衰老过程的进行,衰老细胞在各种组织器官中积累,加速组织器官衰老,进而增加老年性疾病的发病率。与凋亡细胞不同是,衰老细胞仍然保持一定的代谢活性并可分泌多种细胞外调节剂,这些物质被称为衰老相关分泌表型 (SASP)^[23-24],其中包括促炎细胞因子、趋化因子、组织损伤蛋白酶和生长因子^[25-26]。Li 等^[27]和 Fu 等^[28]研究证实 p53 和 p16 是髓核细胞衰老的重要标志物,在衰老的细胞中表达上调,其结果与本研究结果相似。在本实验中,我们利用 TBHP 干预髓核细胞诱导细胞衰老,在 TBHP 干预后髓核细胞衰老相关标志物 p53、p16 较正常对照组表达显著增加 ($P < 0.05$),细胞 β 半乳糖苷酶染色结果显示髓核细胞衰老率也显著增加 ($P < 0.05$);与模型组比,用 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 BAI 处理髓核细胞后,衰老标志物 p53、p16 以及髓核细胞衰老率显著下降 ($P < 0.05$),表明 BAI 在一定

程度上可延缓髓核细胞衰老的进程。

Segar 等^[29]研究证实,炎症是 IDD 加速的主要原因,椎间盘发生退变时促炎细胞因子表达水平显著升高,提示 IDD 与局部炎症反应和炎症细胞因子关系密切。Wang 等^[30]进一步研究表明,IDD 可以通过释放炎症介质和聚集免疫细胞浸润而加速 IDD 的进程。可见炎症反应在 IDD 的发生发展中关系密切,TNF- α 的表达是引起 IDD 的重要因素之一^[31-32]。另外,Cui 等^[33]证实在 IDD 中 TNF- α 和 IL-1 β 等促炎细胞因子表达上调,从而降低 IDD 细胞中 *aggrecan*、*collagen II* 的表达。伍耀宏等^[34]研究证实,TNF- α 会诱导衰老标志物 p53、p16 的表达,加速细胞衰老。在本研究中,TBHP 干预髓核细胞后促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 较正常对照组表达显著增加 ($P < 0.05$),*aggrecan* 表达显著下降 ($P < 0.05$),*collagen II* 表达下降 ($P > 0.05$);与模型组相比,用 BAI 干预髓核细胞后,促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 、IL-6 均显著下降 ($P < 0.05$),*aggrecan*、*collagen II* 表达显著升高 ($P < 0.05$),表明 BAI 能抑制衰老相关分泌表型中促炎细胞因子表达。

此外,Mizuno 等^[35]研究表明,ECM 内稳态的改变导致 ECM 组分丢失也是 IDD 进展的最重要标志之一,主要表现为 ECM 分解代谢和合成代谢的失衡,基质金属蛋白酶 (MMPs)、金属蛋白酶 (ADAMTs) 是 ECM 成分丢失的重要酶。Johnson 等^[36]发现 ECM 的降解是通过增加分解酶来促进的,如 MMPs 和 ADAMTs。本实验研究中发现,与对照组比较,MMP-3 mRNA 在模型组中表达显著升高 ($P < 0.05$),MMP-9 mRNA 表达升高 ($P > 0.05$),加 BAI 后其表达均显著下降 ($P < 0.05$),因此,本实验发现细胞衰老可能促进 ECM 分解,而 BAI 在一定程度上可以延缓 ECM 分解这一进程。

综上所述,髓核细胞衰老是一个复杂的过程,诱导因素较多,但本研究旨在探讨黄芩素对 TBHP 诱导体外衰老细胞的干预作用,证实在 TBHP 诱导的髓核衰老细胞中,BAI 可减少衰老标志物、促炎细胞因子表达,增加 ECM 的合成,减少 ECM 的分解,在一定程度上可逆转 TBHP 诱导的细胞衰老进程。然而,本实验研究仍有不足,其一,BAI 延缓细胞衰老的作用机制尚未研究,在后续实验中可从相关信号通路进一步研究 BAI 延缓细胞衰老的机制;其次,本实验研究仅局限于细胞体外实验,尚未进行体内实验研究,后续可通过建立动物椎间盘退变模

型后进一步研究 BAI 延缓椎间盘退变作用及其作用机制。总体来说,本研究证实 BAI 可延缓髓核细胞衰老,为中医药防治 IDD 的深入研究提供新的认识。

参考文献:

[1] Silagi ES, Shapiro IM, Risbud MV. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration [J]. Matrix Biol, 2018, 71-72: 368-379.

[2] Morris H, Gonçalves CF, Dudek M, et al. Tissue physiology revolving around the clock: circadian rhythms as exemplified by the intervertebral disc [J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80(7): 828-839.

[3] Ohnishi T, Iwasaki N, Sudo H. Causes of and molecular targets for the treatment of intervertebral disc degeneration: a review [J]. Cells, 2022, 11(3): 394.

[4] Kakiuchi Y, Yurube T, Kakutani K, et al. Pharmacological inhibition of mTORC1 but not mTORC2 protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism through Akt and autophagy induction [J]. Osteoarthritis Cartil, 2019, 27(6): 965-976.

[5] 张皓博, 赵宇楠, 杨学军. 细胞焦亡在椎间盘退变中的作用及治疗意义 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(9): 1445-1451.

[6] le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(3): R45.

[7] van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing [J]. Nature, 2014, 509(7501): 439-446.

[8] Cherif H, Bisson DG, Mannarino M, et al. Senotherapeutic drugs for human intervertebral disc degeneration and low back pain [J]. Elife, 2020, 9: e54693.

[9] 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.

[10] Zhang CL, Zhang S, He WX, et al. Baicalin may alleviate inflammatory infiltration in dextran sodium sulfate-induced chronic ulcerative colitis via inhibiting IL-33 expression [J]. Life Sci, 2017, 186: 125-132.

[11] 张超, 吴俊学, 王冶, 等. 和厚朴酚对 D-半乳糖致腰椎间盘退变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.

[12] Lin CC, Li Q, Williams CM, et al. The economic burden of guideline-recommended first line care for acute low back pain [J]. Eur Spine J, 2018, 27(1): 109-116.

[13] Millecamps M, Tajerian M, Naso L, et al. Lumbar intervertebral disc degeneration associated with axial and radiating low back pain in ageing SPARC-null mice [J]. Pain, 2012, 153(6): 1167-1179.

[14] Wang Y, Che M, Xin J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration [J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 131: 110660.

[15] Weber KT, Jacobsen TD, Maidhof R, et al. Developments in intervertebral disc disease research: pathophysiology, mechanobiology, and therapeutics [J]. Curr Rev Musculoskeletal Med, 2015, 8(1): 18-31.

[16] Kadow T, Sowa G, Vo N, et al. Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations: what are the important translational questions? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(6): 1903-1912.

[17] Priyadarshani P, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(2): 206-212.

[18] Liu W, Jin S, Huang M, et al. Duhuo Jisheng Decoction suppresses matrix degradation and apoptosis in human nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in a rat model [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 250: 112494.

[19] 陈涛, 奚菊群, 刘忠军, 等. 辛伐他汀 PLGA 缓释微球对大鼠椎间盘退变的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8): 49-55, 42.

[20] Li HB, Jiang Y, Chen F. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 812(1-2): 277-290.

[21] Childs BG, Durik M, Baker DJ, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy [J]. Nat Med, 2015, 21(12): 1424-1435.

[22] Mikawa R, Sato T, Suzuki Y, et al. p19^{Arf} exacerbates cigarette smoke-induced pulmonary dysfunction [J]. Biomolecules, 2020, 10(3): 462.

[23] He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease [J]. Cell, 2017, 169(6): 1000-1011.

[24] Birch J, Passos JF. Targeting the SASP to combat ageing: Mitochondria as possible intracellular allies? [J]. Bioessays, 2017, 39(5): 235.

[25] Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular senescence: a translational perspective [J]. EBioMedicine, 2017, 21: 21-28.

[26] Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, et al. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles in aging [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 107.

[27] Li X, Lin F, Wu Y, et al. Resveratrol attenuates inflammation environment-induced nucleus pulposus cell senescence *in vitro* [J]. Biosci Rep, 2019, 39(5): BSR20190126.

[28] Fu J, Yu W, Jiang D. Acidic pH promotes nucleus pulposus cell senescence through activating the p38 MAPK pathway [J]. Biosci Rep, 2018, 38(6): BSR20181451.

[29] Segar AH, Fairbank JCT, Urban J. Leptin and the intervertebral disc: a biochemical link exists between obesity, intervertebral disc degeneration and low back pain-an *in vitro* study in a bovine model [J]. Eur Spine J, 2019, 28(2): 214-223.