

基于 TLR4/NF- κ B 通路研究桃叶珊瑚苷联合 ADSCs-exos 对 TBHP 诱导的髓核细胞保护作用

杨雷¹, 李兆勇¹, 马露², 郭彦涛^{1*}, 杨少锋^{1*}, 熊辉², 伍搏宇², 段嘉豪¹,
刘恩旭¹, 张超¹, 聂颖¹, 陈龙¹, 刘林劼²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

[摘要] 该文研究桃叶珊瑚苷 (aucubin) 协同脂肪间充干细胞外泌体 (adipose-derived stem cells-exosomes, ADSCs-exos) 对叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, TBHP) 诱导的人源髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 炎性损伤、衰老及凋亡的保护作用及机制。将 TBHP 诱导 NPCs 分为正常组、模型组、aucubin 组、ADSCs-exos 组及 aucubin+ADSCs-exos 组。细胞计数试剂-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞活力, EdU 染色法检测细胞增殖, 细胞染色- β -半乳糖苷酶活性染色方法 (senescence-associated- β -galactosidase, SA- β -Gal) 检测细胞衰老, 流式细胞术检测细胞周期与凋亡, 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 炎症因子的表达, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和蛋白免疫印记 (Western blot) 法检测聚集蛋白聚糖 (aggrecan)、II 型胶原 α 1 (collagen type II alpha 1, COL2A1)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 及核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的 mRNA 和蛋白表达情况。结果显示, 与模型组比较, aucubin 或 ADSCs-exos 组 NPCs 活性和增殖上升, G₀/G₁ 期细胞比例显著降低, S 期细胞比例显著增加, 凋亡减少, 细胞衰老比例降低, IL-1 β 和 TNF- α 水平下降, TLR4 和 NF- κ B mRNA 及蛋白表达显著减少, IL-10 水平上升, aggrecan 和 COL2A1 mRNA 及蛋白表达均升高; 与 aucubin 或 ADSCs-exos 单独处理组比较, aucubin+ADSCs-exos 组 NPCs 活性和增殖进一步上升, G₀/G₁ 期细胞比例进一步降低, S 期细胞比例进一步增加, 凋亡水平和细胞衰老比例都进一步降低, IL-1 β 和 TNF- α 水平, TLR4 及 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平均进一步下降, 而 IL-10 和 aggrecan, COL2A1 mRNA 及蛋白水平均进一步上升。综上所述, aucubin 和 ADSCs-exos 均能通过抑制炎症反应, 减少 NPCs 凋亡和衰老, 促进细胞活性、增殖以及细胞外基质 (ECM) 的合成而发挥保护作用, 其作用机制与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活有关, 而两者联合应用, 可以对保护作用起协同增效的作用。

[关键词] 脂肪间充干细胞外泌体; 髓核细胞; 桃叶珊瑚苷; TLR4/NF- κ B 信号通路

Aucubin combined with ADSCs-exos protects TBHP-induced nucleus pulposus cells via TLR4/NF- κ B pathway

YANG Lei¹, LI Zhao-yong¹, MA Lu², GUO Yan-tao^{1*}, YANG Shao-feng^{1*}, XIONG Hui², WU Bo-yu²,
DUAN Jia-hao¹, LIU En-xu¹, ZHANG Chao¹, NIE Ying¹, CHEN Long¹, LIU Lin-quan²

(1. the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;
2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] This paper aims to investigate the effects and mechanisms of adipose-derived stem cells-exosomes (ADSCs-exos) together with aucubin in protecting human-derived nucleus pulposus cells (NPCs) from inflammatory injury, senescence, and apoptosis.

[收稿日期] 2023-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (8217151084); 湖南省自然科学基金项目 (2022JJ70029); 长沙市自然科学基金项目 (kq2202460); 湖南省卫健委课题 (202204074858); 湖南省中医药管理局科研项目 (D2022094); 湖南省研究生科研创新课题 (CX20220785)

[通信作者] * 杨少锋, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治脊柱脊髓损伤, E-mail: 574996585@qq.com; * 郭彦涛, 副主任医师, 副教授, 研究方向为中医药防治脊柱脊髓损伤, E-mail: dctgyt2008@163.com

[作者简介] 杨雷, 医师, 博士, 研究方向为中医药防治脊柱脊髓损伤, E-mail: 1169949914@qq.com

The tert-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced NPCs were assigned into normal, model, aucubin, ADSCs-exos, and aucubin+ADSCs-exos groups. The cell viability was examined by cell counting kit-8 (CCK-8), cell proliferation by EdU staining, cell senescence by senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -Gal), and cell cycle and apoptosis by flow cytometry. Enzyme-linked immunosorbent assay was employed to examine the expression of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-10, and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were employed to determine the mRNA and protein levels of aggregated proteoglycan (aggrecan), type II collagen alpha 1 (COL2A1), Toll-like receptor 4 (TLR4), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B). The results showed that compared with the model group, the aucubin or ADSCs-exos group showed enhanced viability and proliferation of NPCs, decreased proportion of G₀/G₁ phase cells, increased proportion of S phase cells, reduced apoptosis and proportion of cells in senescence, lowered IL-1 β and TNF- α levels, elevated IL-10 level, down-regulated mRNA and protein levels of TLR4 and NF- κ B, and up-regulated mRNA and protein levels of aggrecan and COL2A1. Compared with the aucubin or ADSCs-exos group, the aucubin+ADSCs-exos combination further increased the viability and proliferation of NPCs, decreased the proportion of G₀/G₁ phase cells, increased the proportion of S phase cells, reduced the apoptosis and proportion of cells in senescence, lowered the IL-1 β and TNF- α levels, elevated the IL-10 level, down-regulated the mRNA and protein levels of TLR4 and NF- κ B, and up-regulated the mRNA and protein levels of aggrecan and COL2A1. In summary, both aucubin and ADSCs-exos could exert protective effects by inhibiting inflammatory responses, reducing apoptosis and senescence of NPCs, improving cell viability and proliferation as well as extracellular matrix synthesis, which may be associated with the inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway activation. The combination of both plays a synergistic role in the protective effects.

[Key words] adipose-derived stem cells-exosomes; nucleus pulposus cells; aucubin; TLR4/NF- κ B signaling pathway

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230601.703

腰痛病是临床上最为常见疾病之一^[1],流行病学显示,全球约有 80%的人会在一生中经历一次腰痛^[2],其中有 24%~80%的患者在 1 年内会再次复发^[3],而在我国,腰痛病已经成为 45 岁以下人群丧失劳动能力的首要原因^[4],可见腰痛病已经成为一项严重的公共卫生事件。椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)被认为是引起腰痛病的主要原因^[5],其病变本质可能是免疫炎症反应及氧化应激损伤等引起的髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)数量的丢失和功能下降、细胞外基质代谢的异常等病理表型^[6]。NPCs 衰老是 IDD 的重要特征之一,与 IDD 的进展呈正相关^[7]。因此,调控 NPCs 的衰老及其功能是防治 IDD 的重要途径。

目前,腰痛病的治疗主要依赖于手术和非手术治疗 2 种形式^[8],手术并不能修复或减缓潜在的退行性病变,可能有加速 IDD 的风险,而药物治疗只是对症治疗,对 IDD 并无逆转作用,部分药物可能还会加重 IDD。外泌体(exosome)是由细胞分泌直径为 30~150 nm 的外囊泡,内含 DNA、RNA、蛋白质和脂质等物质,可以调控靶细胞的生物效应。干细胞来源的外泌体被认为是 IDD 有潜力的治疗方法^[9-10],可以通过抑制炎症反应防治 NPCs 衰老和炎性损伤^[11],而脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)来源丰富、侵入性小、容易获得、可反

复取材及无免疫排斥等优点,是提取外泌体理想干细胞之一。

IDD 属于中医学的“痹病”“腰痛”范畴,前期研究发现杜仲有效成分之一桃叶珊瑚苷(aucubin)可以抑制炎症反应,降低 NPCs 外基质(extracellular matrix, ECM)降解延缓椎间盘退变^[12-13]。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路是激活炎症因子表达和炎症反应的主要通路之一,其异常激活与 IDD 的炎性损伤关系密切^[14]。因此本研究探究桃叶珊瑚苷是否可以协同脂肪间充质干细胞外泌体调控 TLR4/NF- κ B 通路抑制炎症反应,减少 NPCs 衰老和凋亡,对 NPCs 产生保护作用。

1 材料

1.1 细胞 实验采用商用人源 NPCs 和 ADSCs,均购自赛佰慷(上海)生物科技有限公司,公司已采用流式细胞术测定细胞 CD73、CD90、CD11b、CD45 等标志物的表达鉴定为 ADSCs, II 型胶原表达阳性鉴定为 NPCs。

1.2 药品与试剂 桃叶珊瑚苷(纯度 99.87%,批号 PS020259)购自成都普思生物科技股份有限公司;PKH26 试剂盒(货号 MIDI26)、叔丁基过氧化氢(TBHP)(货号 458139)、4%多聚甲醛(货号 158127)及 4,6-联脒-2-苯基吲哚(DAPI)(货号

10236276001)均购自美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒(货号 C0038)、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(货号 C0602)、5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)试剂盒(货号 C0071S)、异硫氰酸荧光黄(Annexin V-FITC)试剂盒(货号 062719190909)、增强型化学发光(ECL)发光显色液(货号 P0018FS)、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号 PA030)、qPCR 逆转录试剂盒(货号 D7168M)、免疫球蛋白 G(IgG)(货号 A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清(货号 10093)和 TRIzol(货号 16096020)均购自美国 ThermoFisher 公司;cDNA 试剂盒(货号 K1622)购自美国 Fermentas 公司;RIPA 裂解液(货号 83985)购自美国 MCE 公司;青霉素/链霉素(货号 15070063)、DMEM 培养基(货号 11995065)购自美国 Gibco 公司;兔抗 aggrecan(货号 ab36861)、兔抗 II 型胶原 $\alpha 1$ (COL2A1)(货号 b34712)、鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(货号 ab8245)、兔抗 CD9(货号 ab223052)、兔抗 CD63(货号 ab216130)、兔抗肿瘤易感基因 101(TSG101)(货号 ab125011)、兔抗 calnexin(货号 ab133615)、兔抗核因子- κ B(NF- κ B)(货号 ab141588)、兔抗 Toll 样受体 4(TLR4)(货号 ab13556)、山羊 anti-rabbit IgG-HRP(货号 ab205718)和山羊 anti-mouse IgG-HRP(货号 ab6789)均购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器 台式离心机(型号 5920R)购自德国 Eppendorf 生命科学公司;PCR 仪(型号 T100)购自美国 Bio-Rad 公司;转膜仪(型号 DYCZ-40D)购自北京六一仪器厂;-80 °C 超低温冰箱(型号 902-ULTS)购自美国 ThermoFisher 公司;超净工作台(型号 SW-CJ-2F)购自苏静集团安泰有限公司;多功能荧光成像仪(型号 FLX800)购自美国 BioTek 公司;酶标仪(型号 1681130B)购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 脂肪间充干细胞外泌体(ADSCs-exos)提取及鉴定 参照文献的描述用密度梯度离心法分离 ADSCs 来源的外泌体^[15],收集 48 h 后 ADSCs 上清液,提前预设离心机的温度为 4 °C,分别以 300 \times g 离心 10 min 去除细胞,保留上清,2 000 \times g 离心 15 min,去除细胞碎片或凋亡小体,10 000 \times g 离心 45 min,去除大囊泡,并通过 0.22 μ m 滤膜过滤上清液,再于 4 °C,110 000 \times g 超速离心 75 min 取沉淀,弃上清,然后将沉淀物用 PBS 重悬,置于-80 °C 冰箱中

备用。采用透射电镜观察颗粒物的形态,纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径分布,Western blot 检测外泌体表面标志性蛋白 CD63、CD9 和 TSG101 以及 calnexin 表达情况。

2.2 NPCs 退变模型建立及与外泌体共培养 TBHP 可通过氧化应激损伤导致细胞衰老,本研究以 TBHP 氧化损伤导致的 NPCs 衰老模型进行实验^[16],aucubin、外泌体浓度及干预时间参照以往经验及文献[12,17]:将对数生长期 NPCs 的密度,按照 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中,设置 5 个组:正常组、模型组(100 μ mol \cdot L⁻¹ TBHP)、模型组+aucubin 组(100 μ mol \cdot L⁻¹ TBHP+16 μ mol \cdot L⁻¹ aucubin)、模型组+ADSCs-exos 组(100 μ mol \cdot L⁻¹ TBHP+10 μ g \cdot mL⁻¹ ADSCs-exos)、模型+aucubin+ADSCs-exos 组(100 μ mol \cdot L⁻¹ TBHP+16 μ mol \cdot L⁻¹ aucubin+10 μ g \cdot mL⁻¹ ADSCs-exos)。按照分组建立细胞培养体系后,将各处理组细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,分别开展不同的实验。

2.3 NPCs 对外泌体的摄取实验 利用 PKH26 试剂盒操作说明进行外泌体细胞摄取实验。具体而言,将外泌体进行重悬,然后再加入 4 μ L PKH26 染料,并在室温下与外泌体溶液孵育 4 min。然后加入 2 mL 1%的 BSA 常温避光孵育 1 min 以结合多余的染料并终止染色,然后以 110 000 \times g 离心 70 min 收集标记的外泌体,然后加入 PBS 漂洗重悬。再将 PKH26 标记的外泌体与 NPCs 共培养 12 h^[18],细胞用 4%的 PFA 固定,PBS 冲洗,然后 DAPI 染色固定,激光扫描共聚焦显微镜观察。

2.4 CCK-8 实验检测细胞活力 按照 2.2 项下细胞分组,干预 48 h 后,调整细胞浓度,按照 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板上,培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内 30 min,在酶标仪上测量 450 nm 处的吸光度,对细胞存活率进行检测,计算实验组/对照组的吸光度比值,制作细胞生长曲线,实验重复 3 次。

2.5 EdU 染色检测细胞增殖 按照 2.2 项下细胞分组,干预 48 h 后,按照 1×10^5 个/孔培养于 96 孔板中,每孔加入 10 μ mol \cdot L⁻¹ EdU 试剂,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 6 h 后,4%多聚甲醛溶液固定 45 min,按照 EdU 试剂盒说明书进行后续实验,并用 5 mg \cdot L⁻¹ DAPI 染细胞核 20 min,荧光显微镜下观察,出现红染细胞即为增殖细胞,出现蓝染细胞即为全

部细胞。

2.6 衰老相关-β-半乳糖苷酶 (senescence-associated-β-galactosidase, SA-β-Gal) 染色检测细胞衰老 按照 2.2 项下细胞分组,干预 48 h 后,按照 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,然后用含有 3.7% 多聚甲醛的 PBS 固定 5 min,固定之后用 PBS 冲洗 3 次,然后每孔加入 1 mL β-半乳糖苷酶染色液 [10 μL 染色液 A+10 μL 染色液 B+930 μL 染色液 C+50 μL 5-溴-4-氯-3-吲哚基-B-D-半乳糖苷 (X-Gal) 溶液],然后置于 37 °C、5% CO₂ 孵育过夜,用显微镜观察拍照。在 1 个视野中数 400 个细胞并记录其中被染成蓝色的数量,蓝色细胞所占百分比即为 SA-β-gal 染色率。

2.7 ELISA 检测炎症因子的表达 收集 2.2 项下各组处理后的 NPCs 上清液,经离心后按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测各组细胞上清液中白细胞介素 (interleukin, IL)-1β、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 和 IL-10 炎症因子的表达情况。

2.8 流式细胞术检测细胞周期与凋亡 收集 2.2 项下各组处理后的 NPCs,0.25% 胰蛋白酶消化,使细胞数调整为 1×10^6 个/mL,取 1 mL 细胞悬液 $1\ 500\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,每 1 mL 细胞悬液加 2 mL PBS,再离心,弃上清后,加入预冷的 70% 乙醇固定细胞,4 °C 过夜。第 2 天用 PBS 洗涤细胞 2 次,取 100 μL 细胞悬液,加入 50 μg 含 RNAase 的 PI 染液,避光 30 min 后用 100 目的尼龙网过滤,流式细胞仪记录激发波长在 488 nm 处红色荧光检测细胞周期。

细胞凋亡能力检测:胰酶消化细胞后离心收集细胞,加入 binding buffer 重悬,然后加入 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光孵育 15 min 后,于流式细胞仪上检测细胞凋亡水平。

2.9 qRT-PCR 检测聚集蛋白聚糖 (aggrecan)、COL2A1、TLR4 及 NF-κB mRNA 表达情况 收集 2.2 项下各组处理后的 NPCs,使用 TRIzol 细胞总 RNA,cDNA 试剂盒进行逆转录合成 cDNA,LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪检测基因的表达,各基因及其内参的扩增引物序列见表 1 (上海生工生物有限公司合成),反应条件按荧光定量 PCR 试剂盒的操作说明进行。具体为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,56 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 20 s,35 个循环。内参使用 GAPDH,数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,实验重复 3 次。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'-3')	引物长度/bp
aggrecan	上游: GTTGATTCCTACTACCGCCCG	21
	下游: TCACACTGCTCATAGCCTGCC	21
COL2A1	上游: GCCCAACTGGCAAACAAGGAGAC	23
	下游: GCAGGGCCAGAAGTACCCTGATC	23
NF-κB	上游: CCACAAGACAGAAGCTGAAG	20
	下游: AGATACTATCTGTAAGTGAACC	22
TLR4	上游: GCCGGA AAGTTATTGTGGTGCT	22
	下游: ATGGGTTTTAGCGCAGACTTT	22
GAPDH	上游: TCTCTGCTCCTCCCTGTTCT	20
	下游: TCCCGTTGATGACCAGCTTC	20

2.10 Western blot 检测 aggrecan、II 型胶原 α1 (collagen type II alpha 1, COL2A1)、TLR4 及 NF-κB 蛋白表达情况 收集 2.2 项下各组处理后的 NPCs,采用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞中总蛋白,测量样品蛋白浓度后,上样电泳。冰浴中给予 250 mA 电流转膜。洗涤 PVDF,5% 脱脂奶粉室温封闭 90 min 后,将 PVDF 膜与稀释的一抗 aggrecan (1 : 1 000)、COL2A1 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 2 000)、IgG (1 : 1 000)、CD9 (1 : 1 000)、CD63 (1 : 200)、TSG101 (1 : 1 000)、calnexin (1 : 1 000)、NF-κB (1 : 1 000)、TLR4 (1 : 1 000) 4 °C 过夜孵育, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗山羊抗兔 IgG (1 : 1 000),室温下孵育 2 h。膜上滴加 ECL 发光显色液后,于化学发光成像系统下进行检测,使用 ImagePro Plus 6.0 软件对蛋白条带进行灰度扫描分析蛋白相对表达量。实验重复 3 次取平均值。

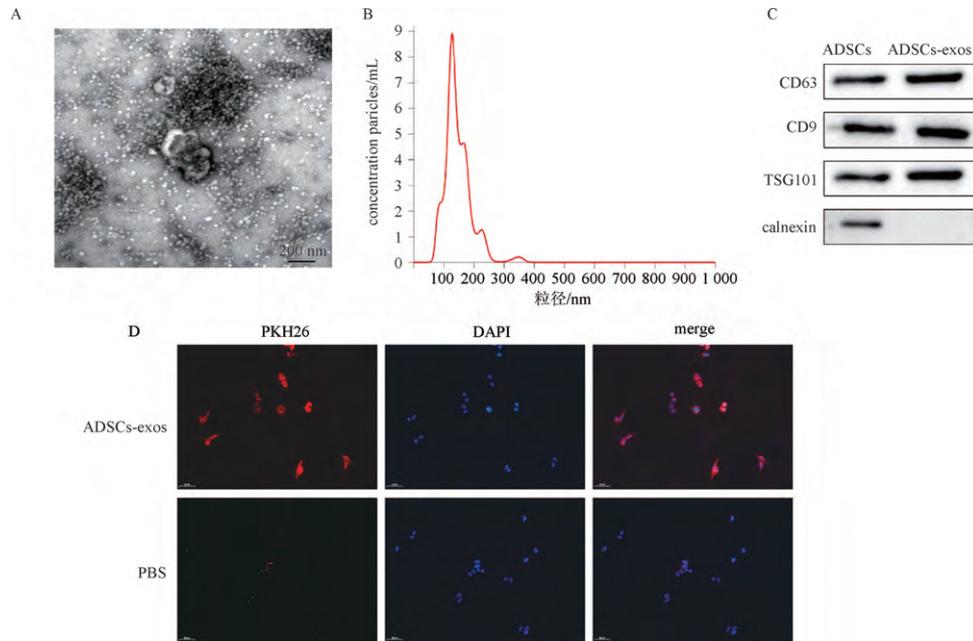
2.11 统计学分析 用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 软件进行统计学分析,所有数据用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组之间的比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析检验,事后检验采用 *t* 多重比较法。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 ADSCs-exos 分离、鉴定及 NPCs 摄取 透射电子显微镜显示,ADSCs-exos 呈现外泌体典型的“茶托样”,具有 ADSCs-exos 的典型特征;纳米颗粒跟踪分析技术发现粒径大小在 100 nm 左右高度富集,符合外泌体粒径分布规律。Western blot 检测表面标志蛋白的表达,结果显示,与 ADSCs 组比较,ADSCs-exos 中 CD9、CD63、TSG101 均显著高表达,但不表达 calnexin。NPCs 对 PKH26 标记定位的外泌体摄取实验

中,荧光显微镜结果显示,12 h 后观察到 NPCs 吸收了大量的外泌体,并在细胞核周围完全分布,而 PBS

组则未观察到 PKH26 标记的荧光。以上结果表明,提取的外泌体纯度高,可用于进一步实验,见图 1。



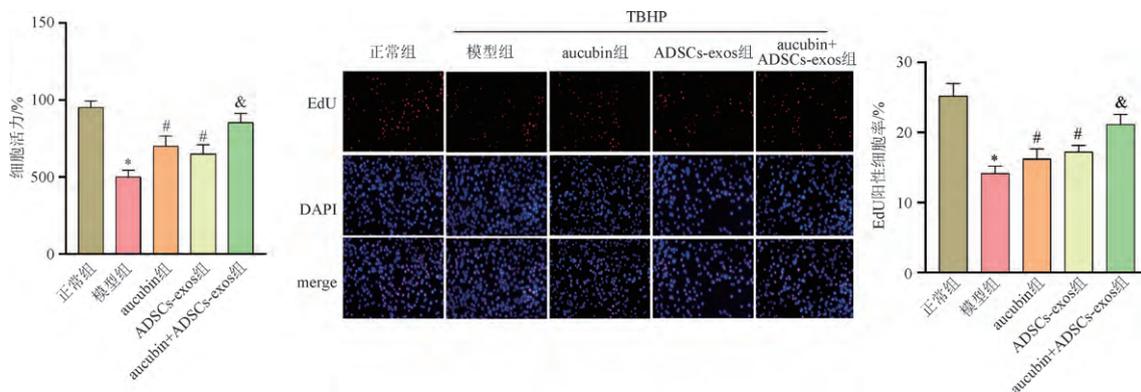
ADSCs. 脂肪间充质干细胞; ADSCs-exos. 脂肪间充质干细胞外泌体(图 2~6、表 2 同); A. 透射电子显微镜(TME)检测 ADSCs-exos 形态; B. 纳米颗粒跟踪分析技术(NTA)粒径检测 ADSCs-exos 粒径大小; C. Western blot 检测所提取外泌体中 CD9、CD63、TSG101、calnexin 的表达; D. 免疫荧光观察髓核细胞(NPCs)对 PKH26 标记的 ADSCs-exos 的摄取情况。

图 1 外泌体的分离、鉴定及摄取

Fig. 1 Isolation, identification and uptake of exosomes

3.2 桃叶珊瑚苷联合 ADSCs-exos 对 NPCs 活力及增殖影响 CCK-8 和 EdU 实验检测 NPCs 活力及增殖情况,结果显示,相比于正常组,模型组 NPCs 活力和增殖显著下降;与模型组比较,单独给予桃叶珊

瑚苷或 ADSCs-exos 治疗后,NPCs 增殖增加,活力增强;与单独给予桃叶珊瑚苷或 ADSCs-exos 处理比较,桃叶珊瑚苷与 ADSCs-exos 联合作用后,NPCs 活力及增殖进一步增加,见图 2。



TBHP. 叔丁基过氧化氢(图 3、4、6 同);与正常组比较* $P < 0.05$;与模型组比较# $P < 0.05$;与单用桃叶珊瑚苷(aucubin)组或 ADSCs-exos 组比较& $P < 0.05$ (图 3~6 同)。

图 2 各组细胞活力及增殖情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Cell viability and proliferation of each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 桃叶珊瑚苷联合ADSCs-exos对NPCs周期以及细胞凋亡影响 流式细胞术结果显示,相比于正常组,模型组NPCs的G₀/G₁期细胞比例显著升高,S期细胞比例显著降低,细胞凋亡增加;与模型组比较,单独给予桃叶珊瑚苷或ADSCs-exos治疗后,2组NPCs

中G₀/G₁期细胞比例显著降低,S期细胞比例显著增加,细胞凋亡率显著降低;与单独给予桃叶珊瑚苷或ADSCs-exos处理比较,桃叶珊瑚苷与ADSCs-exos联合作用后,G₀/G₁期细胞比例进一步降低,S期细胞比例进一步增加,细胞凋亡率进一步降低,见图3。

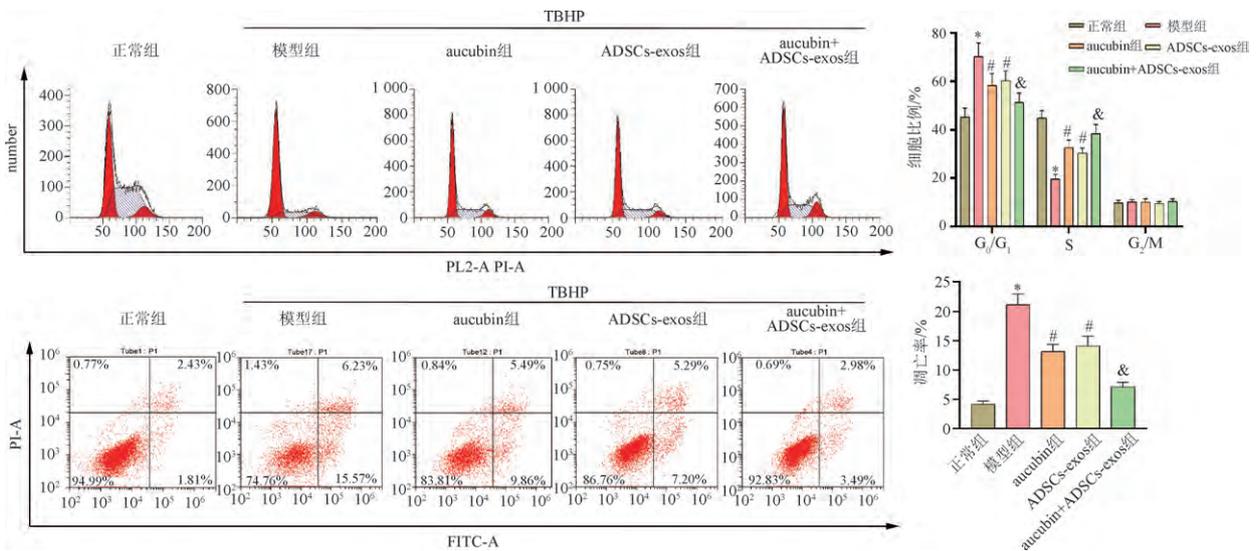


图3 桃叶珊瑚苷联合ADSCs-exos减轻细胞衰老与凋亡($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Aucubin combined with ADSCs-exos reduce cell senescence and apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 桃叶珊瑚苷联合ADSCs-exos对各组NPCs衰老影响 SA-β-Gal结果显示,相比于正常组,模型组SA-β-Gal染色细胞数目及染色率显著升高;与模型组比较,单独给予桃叶珊瑚苷或ADSCs-exos治疗后,2组

NPCs的SA-β-Gal染色细胞数目及染色率均显著降低;与单独给予桃叶珊瑚苷或ADSCs-exos处理比较,桃叶珊瑚苷与ADSCs-exos联合作用后,联合作用组SA-β-Gal染色细胞数目及染色率进一步降低,见图4。

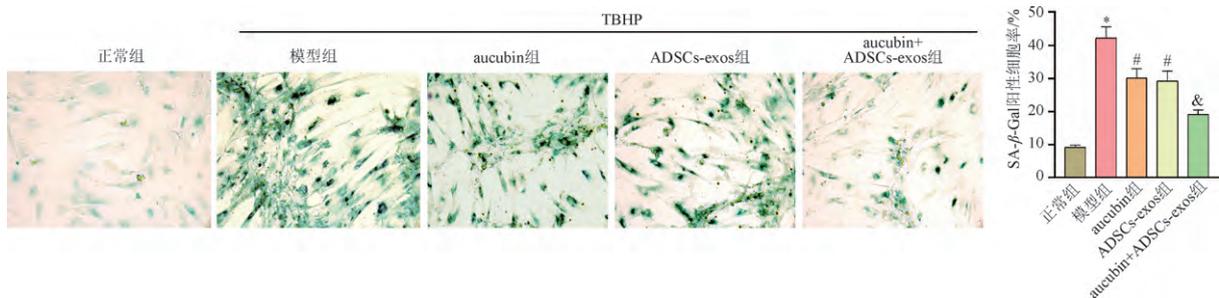


图4 SA-β-Gal染色检测各组细胞衰老情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 SA-β-Gal staining for detection of cell senescence in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 桃叶珊瑚苷联合ADSCs-exos对NPCs炎症因子的影响 ELISA检测促炎因子(IL-1β、TNF-α)及抗炎因子(IL-10)的表达情况,结果显示,与正常组比较,模型组IL-1β、TNF-α水平显著上升,而IL-10

水平显著下降;与模型组比较,单独给予桃叶珊瑚苷或ADSCs-exos治疗后,2组细胞上清中IL-1β、TNF-α水平均显著降低,IL-10水平均显著升高;与单独给予桃叶珊瑚苷或ADSCs-exos处理比较,桃叶珊瑚苷

与 ADSCs-exos 联合作用后,细胞上清中的 IL-1 β 、TNF- α 水平进一步降低,而 IL-10 水平得到进一步升高,见表 2。

表 2 各组细胞培养上清中 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-10 水平($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-10 in cell culture supernatant of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	IL-1 β	TNF- α	IL-10
正常	20.25 \pm 2.23	34.27 \pm 1.98	20.54 \pm 2.04
模型	74.65 \pm 5.67 ¹⁾	88.25 \pm 4.57 ¹⁾	9.45 \pm 0.94 ¹⁾
aucubin	47.24 \pm 3.62 ²⁾	52.14 \pm 3.56 ²⁾	15.24 \pm 1.28 ²⁾
ADSCs-exos	52.19 \pm 3.87 ²⁾	50.28 \pm 3.84 ²⁾	14.23 \pm 1.14 ²⁾
aucubin+ADSCs-exos	33.26 \pm 2.13 ³⁾	41.19 \pm 1.67 ³⁾	18.25 \pm 1.99 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与单用桃叶珊瑚苷或 ADSCs-exos 组比较³⁾ $P<0.05$ 。

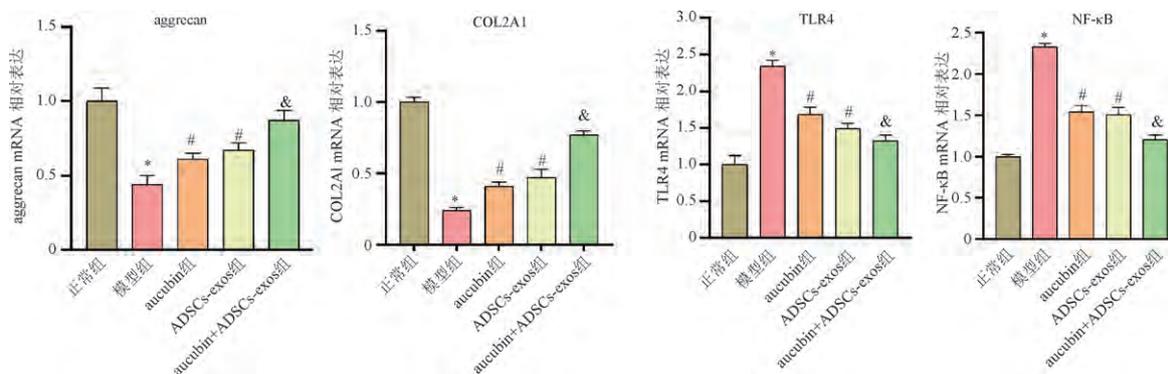


图 5 桃叶珊瑚苷联合 ADSCs-exos 对 aggrecan、COL2A1、TLR4 及 NF- κ B mRNA 表达影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of aucubin combined with ADSCs-exos on the mRNA levels of aggrecan, COL2A1, TLR4, and NF- κ B ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

果显示,相比于正常组,模型组 NPCs 中 aggrecan 和 COL2A1 蛋白的表达显著降低,TLR4 及 NF- κ B 蛋白的表达明显增加;与模型组比较,单独给予桃叶珊瑚苷或 ADSCs-exos 治疗后,2 组 NPCs 中 aggrecan 和 COL2A1 蛋白的表达均显著增加,TLR4 及 NF- κ B 蛋白的表达均显著降低;与单独给予桃叶珊瑚苷或 ADSCs-exos 处理比较,桃叶珊瑚苷与 ADSCs-exos 联合作用后,NPCs 的 aggrecan 和 COL2A1 蛋白的表达显著增加,TLR4 及 NF- κ B 蛋白的表达明显降低,见图 6;以上结果表明桃叶珊瑚苷协同 ADSCs-exos 可以调控 TLR4/NF- κ B 通路对髓核细胞产生保护作用。

4 讨论

现代医学认为腰痛病与 IDD 的关系密切,虽然 IDD 的发生机制还未完全清楚,可能与衰老、机械压

3.6 桃叶珊瑚苷联合 ADSCs-exos 对 aggrecan、COL2A1、TLR4 及 NF- κ B mRNA 影响 qRT-PCR 结果显示,相比于正常组,模型组 aggrecan 和 COL2A1 mRNA 表达显著下降,而 TLR4 及 NF- κ B 的 mRNA 表达显著上升;与模型组比较,单独给予桃叶珊瑚苷或 ADSCs-exos 治疗后,2 组 NPCs 中的 aggrecan 和 COL2A1 mRNA 表达均显著上升,而 TLR4 及 NF- κ B 的 mRNA 表达均显著下降;与单独给予桃叶珊瑚苷或 ADSCs-exos 处理比较,桃叶珊瑚苷与 ADSCs-exos 联合作用后,aggrecan 和 COL2A1 的 mRNA 表达进一步上升,而 TLR4 及 NF- κ B 的 mRNA 表达进一步下降,见图 5。

3.7 桃叶珊瑚苷联合 ADSCs-exos 对 aggrecan、COL2A1、TLR4 及 NF- κ B 蛋白影响 Western blot 结

力、炎症、肥胖和高血糖等因素相关^[19-20],但其主要病理表现是髓核细胞衰老、凋亡增加、炎症因子的累积以及 ECM 的代谢失衡等^[21],炎症因子累积导致的髓核细胞衰老和 ECM 降解在 IDD 的发生发展过程中发挥重要的促进作用^[22-23]。IL-1 β 是白细胞介素 1 家族主要的细胞因子之一,由多种细胞分泌,可以促进一系列促炎细胞因子和趋化因子的释放,介导无菌性炎症反应,而 TNF- α 是炎症反应的主要调节因子,并参与部分炎症和自身免疫性疾病。现代研究证实 IL-1 β 、TNF- α 等细胞炎症因子是引起 IDD 和腰痛的关键介质,在 IDD 中显著上调,并且与各种病理过程密切相关,包括炎性损伤、基质破坏、细胞衰老、自噬、细胞凋亡、焦亡和抑制增殖等^[24-25]。TLR4/NF- κ B 信号通路是近些年研究较多的炎症通路,与 IDD 免疫炎症反应关系密切^[26],TLR4 是 Toll

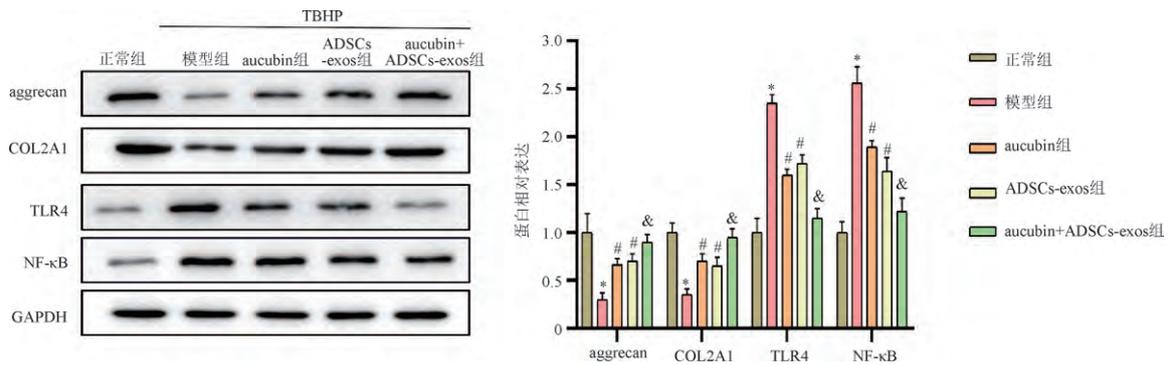


图 6 桃叶珊瑚苷联合 ADSCs-exos 对 aggrecan、COL2A1、TLR4 及 NF- κ B 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of aucubin combined with ADSCs-exos on the protein expression of aggrecan, COL2A1, TLR4, and NF- κ B ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样受体家族的成员之一,也是先天免疫系统中内毒素识别的受体,介导机体固有免疫,能够调节炎症和免疫反应,是人体先天性与获得性免疫之间的桥梁^[27]。NF- κ B 是 TLR4 的下游效应因子,可调节多种免疫炎症相关蛋白的产生,当 TLR4 和配体结合后,可诱导下游 NF- κ B 入核激活 NF- κ B 通路^[28],致使白细胞黏附分子增多,促使 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子释放,最终演变为更加严重的炎症反应,加重 IDD^[29]。IL-10 是体内重要的抗炎因子^[30],其水平与 IDD 程度呈负相关,促进 IL-10 生成或者模拟物可以显著减低 IDD 的炎症水平并产生有效保护作用^[31]。aggrecan 和 COL2A1 是 ECM 的主要成分之一,在正常椎间盘中,aggrecan 和 COL2A1 处于不断的合成和分解动态平衡之中,当 NPCs 数量及功能下降,炎症因子浸润时,就会表现出 aggrecan 和 COL2A1 合成代谢减弱,分解代谢增强,出现 ECM 慢性过度破坏,从而导致 IDD。

目前对于 IDD 尚缺乏有效的方法,而干细胞和纳米材料相结合的生物工程技术是被认为是有潜力的方法,其中干细胞外泌体在骨关节炎^[32]、肿瘤^[33]、创伤修复^[34-35]、脊髓损伤^[36]等疾病展现出的巨大优势,已经受到广泛的关注。相关研究证实干细胞外泌体可以通过抗炎反应和氧化应激损伤^[37]、抑制髓核细胞凋亡与焦亡^[38]、调节自噬^[39]、抑制 ECM 降解^[40]等途径延缓 IDD 的发展。然而,干细胞外泌体移植也面临着一些问题,首要的挑战就是外泌体在退变椎间盘酸性、低糖、低营养、高渗、高炎症因子和活性氧浓度的恶劣微环境中保持结构稳定和生理活性,并发挥相应作用。因此,寻找提高干细胞外泌体治疗效果的药物成为笔者关注的问

题。长期临床实践显示出中医药治疗腰痛病有效性及安全性^[41],中药多靶点、多途径、多效应的特点。桃叶珊瑚苷是杜仲的有效成分之一,前期研究显示其可以抑制由 IL-1 β 和 TNF- α 诱导的髓核细胞凋亡,抑制 ECM 降解^[12-13]。现代研究也证实桃叶珊瑚苷具有抗炎^[42]、抑制细胞凋亡^[43]、减少氧化应激^[44]及抗骨质疏松^[45]等作用。因此,桃叶珊瑚苷可能会促进 ADSCs 外泌体治疗 IDD 的疗效。

研究结果显示,ADSCs 来源丰富,其外泌体可以被髓核细胞摄取,可以作为干细胞外泌体治疗的理想细胞;桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 都能抑制 TBHP 诱导髓核细胞凋亡、增强细胞活性和增殖、减少髓核细胞的衰老,提示桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 都能对髓核细胞产生保护作用,而将桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 联合作用时,较单独使用,其对髓核细胞保护作用增强,两者发挥协同作用;在进一步探究其治疗机制过程中发现 TBHP 诱导髓核细胞,促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 上升明显,抗炎因子 IL-10 下降显著,说明 IDD 过程中伴随着严重的炎症反应,而桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 都能降低 IL-1 β 和 TNF- α 水平,提高 IL-10 释放,反映出桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 均能抑制髓核细胞炎症反应,进而减轻炎症损伤;而两者联合作用,其抗炎作用进一步增强;桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 还可以提高 aggrecan、COL2A1 mRNA 和蛋白的表达水平,说明桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 可以通过促进 ECM 的合成,延缓 IDD,而将两者联合应用,其促进作用被进一步放大;通过对 TLR4 及 NF- κ B 蛋白及 mRNA 的检测,桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 均能抑制 TLR4/NF- κ B 通路的激活,而将两者联合应用,其通路的抑制作用增强,说明两

者联合应用也对 TLR4/NF- κ B 通路抑制起到协同作用。

综上所述,桃叶珊瑚苷和 ADSCs-exos 能够抑制由 TBHP 诱导的髓核细胞凋亡和衰老,促进细胞活性和增殖,抑制炎症反应,促进 ECM 的合成,其保护作用与抑制 TLR4/NF- κ B 通路的激活有关,而将两者联合应用,可以对治疗效果起协同增效作用。

[参考文献]

- [1] KNEZEVIC N N, CANDIDO K D, VLAEYEN J W S, et al. Low back pain[J]. *Lancet*,2021,398(10294):78.
- [2] CHOU R. Low back pain[J]. *Ann Intern Med*,2021,174(8):ITC113.
- [3] WILL J S, BURY D C, MILLER J A. Mechanical low back pain [J]. *Am Fam Physician*,2018,98(7):421.
- [4] 白跃宏. 下腰痛的康复[J]. *中国矫形外科杂志*,2005,13(3):67.
- [5] FRANCISCO V, PINO J, GONZÁLEZ-GAY M, et al. A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration [J]. *Nat Rev Rheumatol*,2022,18(1):47.
- [6] KIRNAZ S, CAPADONA C, WONG T, et al. Fundamentals of intervertebral disc degeneration [J]. *World Neurosurg*, 2022, 157:264.
- [7] ZHAO Y, QIU C, WANG W, et al. Cortistatin protects against intervertebral disc degeneration through targeting mitochondrial ROS-dependent NLRP3 inflammasome activation[J]. *Theranostics*,2020,10(15):7015.
- [8] WU P H, KIM H S, JANG I T. Intervertebral disc diseases PART 2: a review of the current diagnostic and treatment strategies for intervertebral disc disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6):2135.
- [9] WIDJAJA G, JALIL A T, BUDI H S, et al. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes application in the treatment of intervertebral disc disease: a promising frontier[J]. *Int Immunopharmacol*,2022,105:108537.
- [10] BHUJEL B, SHIN H E, CHOI D J, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and intervertebral disc regeneration: review [J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(13):7306.
- [11] LI M, LI R, YANG S, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells prevent acidic pH-induced damage in human nucleus pulposus cells [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26:e922928.
- [12] 杨少锋,朱立国,李兆勇,等. miR-483/CREB1 轴介导桃叶珊瑚苷抑制髓核细胞胞外基质降解的研究[J]. *湖南中医药大学学报*,2020,40(5):550.
- [13] YANG S, LI L, ZHU L, et al. Aucubin inhibits IL-1 β or TNF- α -induced extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cell through blocking the miR-140-5p/CREB1 axis[J]. *J Cell Physiol*,2019,234(8):13639.
- [14] ZHANG J, JIANG H, LI M, et al. Knockdown of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1) inhibits endoplasmic reticulum stress and reduces extracellular matrix degradation and the apoptosis of human nucleus pulposus cells[J]. *Exp Ther Med*,2022,24(4):607.
- [15] HU J, JIANG Y, WU X, et al. Exosomal miR-17-5p from adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits abdominal aortic aneurysm by suppressing TXNIP-NLRP3 inflammasome [J]. *Stem Cell Res Ther*,2022,13(1):349.
- [16] LIU X, JIANG C, LIU G, et al. Sodium butyrate protects against oxidative stress in human nucleus pulposus cells via elevating PPAR γ -regulated klotho expression[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020,85:106657.
- [17] 徐辰. 间充质干细胞来源外泌体促进椎间盘退变修复的作用及机制研究[D]. 上海:第二军医大学,2017.
- [18] GUO Z, SU W, ZHOU R, et al. Exosomal MATN3 of urine-derived stem cells ameliorates intervertebral disc degeneration by antisenescence effects and promotes NPC proliferation and ECM synthesis by activating TGF- β [J]. *Oxid Med Cell Longev*,2021, 2021:5542241.
- [19] LI G, ZHANG W, LIANG H, et al. Epigenetic regulation in intervertebral disc degeneration [J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28(10):803.
- [20] CANNATA F, VADALÀ G, AMBROSIO L, et al. Intervertebral disc degeneration: a focus on obesity and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*,2020,36(1):e3224.
- [21] LI X C, LUO S J, FAN W, et al. Macrophage polarization regulates intervertebral disc degeneration by modulating cell proliferation, inflammation mediator secretion, and extracellular matrix metabolism [J]. *Front Immunol*,2022,13:922173.
- [22] YAMADA K, IWASAKI N, SUDO H. Biomaterials and cell-based regenerative therapies for intervertebral disc degeneration with a focus on biological and biomechanical functional repair: targeting treatments for disc herniation [J]. *Cells*,2022,11(4):602.
- [23] 陈双,吴免汐,王楠,等. 靶向线粒体质量控制防治椎间盘退变的研究进展[J]. *中国中药杂志*,2022,47(23):6256.
- [24] WANG Y, CHE M, XIN J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020,131:110660.
- [25] 赵继荣,杨正汉,马俊飞,等. 中医药干预基质金属蛋白酶表达治疗椎间盘退变研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023,29(5):272.
- [26] WANG Y G, YU X J, QU Y K, et al. Ferrostatin-I inhibits toll-like receptor 4/NF- κ B signaling to alleviate intervertebral disc degeneration in rats [J]. *Am J Pathol*,2023,193(4):430.
- [27] WANG Y, HU H, YIN J, et al. TLR4 participates in sympathetic hyperactivity post-mi in the PVN by regulating NF- κ B pathway and ROS production [J]. *Redox Biol*,2019,24:101186.
- [28] WU L, DU L, JU Q, et al. Silencing TLR4/MyD88/NF- κ B sig-

- naling pathway alleviated inflammation of corneal epithelial cells infected by ISE [J]. *Inflammation*,2021,44(2):633.
- [29] TANG N, DONG Y, XIAO T, et al. LncRNA TUG1 promotes the intervertebral disc degeneration and nucleus pulposus cell apoptosis through modulating miR-26a/HMGB1 axis and regulating NF- κ B activation[J]. *Am J Transl Res*,2020,12(9):5449.
- [30] LI S, HUANG C, XIAO J, et al. The potential role of cytokines in diabetic intervertebral disc degeneration[J]. *Aging Dis*,2022,13(5):1323.
- [31] LI W, LIU T, WU L, et al. Blocking the function of inflammatory cytokines and mediators by using IL-10 and TGF- β : a potential biological immunotherapy for intervertebral disc degeneration in a beagle model[J]. *Int J Mol Sci*,2014,15(10):17270.
- [32] 缪毛毛,王绪平,吴人杰,等. 外泌体 miRNA 介导的细胞间通讯在骨与软骨组织疾病中的作用研究进展[J]. *中国现代应用药学*,2022,39(6):827.
- [33] 李香影,刚乔健,牟力圆,等. 脐带间充质干细胞外泌体在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *实用临床医药杂志*,2022,26(23):108.
- [34] 韩丽,陈思平,赵治戎,等. 脐带间充质干细胞来源的外泌体对大鼠创伤性胰腺炎损伤的修复[J]. *陆军军医大学学报*,2022,44(16):1642.
- [35] 詹小舒,罗冬章,王丙云,等. 犬脐带间充质干细胞来源外泌体修复皮肤创伤[J]. *中国组织工程研究*,2018,22(25):4021.
- [36] 刘京松,史旭,万然,等. 外泌体及其在继发性脊髓损伤中作用的研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*,2020,30(1):71.
- [37] XIA C, ZENG Z, FANG B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects [J]. *Free Radic Biol Med*,2019,143:1.
- [38] ZHANG J, ZHANG J, ZHANG Y, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration through inhibiting pyroptosis [J]. *J Cell Mol Med*,2020,24(20):11742.
- [39] CHEN D, JIANG X, ZOU H. hASCs-derived exosomal miR-155-5p targeting TGF β R2 promotes autophagy and reduces pyroptosis to alleviate intervertebral disc degeneration [J]. *J Orthop Translat*,2023,39:163.
- [40] CHEN D, JIANG X. Exosomes-derived miR-125-5p from cartilage endplate stem cells regulates autophagy and ECM metabolism in nucleus pulposus by targeting SUV38H1 [J]. *Exp Cell Res*,2022,414(1):113066.
- [41] 孙凯,朱立国,魏戎,等. 中药复方及单体成分延缓椎间盘退行性病变的作用机制研究进展[J]. *中国中药杂志*,2022,47(9):2400.
- [42] WANG B W, JIANG Y, YAO Z L, et al. Aucubin protects chondrocytes against IL-1 β -induced apoptosis *in vitro* and inhibits osteoarthritis in mice model [J]. *Drug Des Devel Ther*,2019,13:3529.
- [43] YUE C, JIN H, ZHANG X, et al. Aucubin prevents steroid-induced osteoblast apoptosis by enhancing autophagy via AMPK activation [J]. *J Cell Mol Med*,2021,25(21):10175.
- [44] WANG H, ZHOU X M, WU L Y, et al. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*,2020,17(1):188.
- [45] LI Y, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Aucubin exerts anti-osteoporotic effects by promoting osteoblast differentiation [J]. *Aging (Albany NY)*,2020,12(3):2226.

[责任编辑 陈玲]