

· 基础研究 ·

# 穿心莲内酯对体外大鼠髓核细胞生物行为的影响<sup>△</sup>

汪平, 范明宇\*, 周少怀, 王欣, 邢政, 卞峰, 黄涛, 李静, 黄娅芬, 李嘉琼

(武汉市第三医院骨一科, 湖北武汉 430060)

**摘要:** [目的] 探讨穿心莲内酯 (andrographolide, Andro) 对体外大鼠髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 生物行为的影响及其机制。[方法] 利用叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, TBHP) 处理 NPCs 构建凋亡模型, 不同浓度的 Andro 分别处理正常 NPCs 和 TBHP 诱导的 NPCs, 采用 CCK8 检测毒性以筛选 Andro 的最佳作用浓度和时间。将细胞分为空白对照 (blank control, BC) 组、TBHP (T) 组、TBHP+Andro (TA) 组、TBHP+Andro+PI3K inhibitor (LY294002) (TA-Pih) 组和 TBHP+PI3K inhibitor (T-Pih) 组, 并给予相应体外处理。流式细胞术检测细胞凋亡, ELISA 检测炎症细胞因子水平, Western blot 检测凋亡标志物蛋白的表达水平。[结果] Andro 的最佳作用浓度和时间分别为 18  $\mu\text{mol/L}$  和 24 h。与 BC 组相比, T 组细胞凋亡率、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平、Bax 蛋白水平显著升高 ( $P<0.05$ ), Bcl-2 和 p-Akt 蛋白水平显著降低 ( $P<0.05$ ); 与 T 组相比, TA 组细胞凋亡率、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平、Bax 蛋白水平显著降低 ( $P<0.05$ ), Bcl-2 和 p-Akt 蛋白水平显著升高 ( $P<0.05$ ), T-Pih 组的趋势则相反; 与 T-Pih 组相比, TA-Pih 组细胞凋亡率、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平、Bax 蛋白水平显著降低 ( $P<0.05$ ), Bcl-2 和 p-Akt 蛋白水平显著升高 ( $P<0.05$ )。[结论] Andro 能抑制细胞凋亡, 降低炎症细胞因子的水平, 其机制可能与 Andro 调控 PI3K/Akt 通路有关。

**关键词:** 穿心莲内酯, 髓核细胞, 凋亡, PI3K/Akt 炎症通路

**中图分类号:** R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2023) 03-0256-05

**Effects of andrographolide on biological behavior of rat nucleus pulposus cells in vitro** // WANG Ping, FAN Ming-yu, ZHOU Shao-huai, WANG Xin, XING Zheng, BIAN Feng, HUANG Tao, LI Jing, HUANG Ya-fen, LI Jia-qiong. Department of Orthopedics, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China

**Abstract:** [Objective] To explore the effect of andrographolide (Andro) on the biological behavior of rat nucleus pulposus cells (NPCs) in vitro and its mechanism. [Methods] NPCs were treated with tert-butyl hydroperoxide (TBHP) to construct apoptosis model. The normal NPCs and TBHP-induced NPCs were treated with different concentrations of Andro, CCK8 assay for toxicity was conducted to select the optimal concentration and time of Andro action. The cells were divided into blank control (BC) group, TBHP (T) group, TBHP+Andro (TA) group, TBHP+Andro+PI3K inhibitor (LY294002) (TA-Pih) group and TBHP+PI3K inhibitor (T-Pih) group, and were given corresponding treatment in vitro. The cell apoptosis was detected by flow cytometry, the levels of inflammatory cytokines were detected by ELISA, and the protein expression levels of apoptotic markers were detected by Western blot. [Results] The optimum concentration and reaction time of Andro were 18  $\mu\text{mol/L}$  and 24 h respectively. Compared with the BC group, the apoptosis rate, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 levels and Bax protein level in the T group were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the protein levels of Bcl-2 and p-Akt were significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the T group, the apoptosis rate, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 levels and Bax protein level in the TA group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while the protein levels of Bcl-2 and p-Akt were significantly increased ( $P<0.05$ ), while which as a trend was opposite in the T-Pih group. Compared with the T-Pih group, the apoptosis rate, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 levels and Bax protein level in the TA-Pih group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while the protein levels of Bcl-2 and p-Akt were significantly increased ( $P<0.05$ ). [Conclusion] Andro does inhibit cell apoptosis and reduce the level of inflammatory cytokines, which may be related to the regulation of PI3K/Akt pathway.

**Key words:** andrographolide, nucleus pulposus cells, apoptosis, PI3K/Akt inflammatory pathway

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2023.03.13

<sup>△</sup>基金项目:武汉市卫健委医学科科研项目(编号:WX20Q09)

作者简介:汪平,主治医师,研究方向:脊柱外科,(电话)13476038023,(电子信箱)ryan81@163.com

\*通信作者:范明宇,(电子信箱)21872407@qq.com

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是一种长期且高发的肌肉骨骼疾病, 在全世界都有很高的发病率。因 IDD 引起的慢性颈或腰痛是成人常见的临床疾病, 严重影响患者的经济和生活质量, 给社会带来巨大的经济负担<sup>[1, 2]</sup>。IDD 通常以基质金属蛋白酶和促炎细胞因子表达上调及功能性髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 数量减少为特征<sup>[3]</sup>。目前治疗 IDD 的方法主要有抗炎药物、镇痛药、物理治疗和手术, 但效果均不理想<sup>[4]</sup>。研究发现椎间盘中的 NPCs 是一种有前途的种子细胞资源, 可用于 IDD 修复和再生领域的细胞治疗或组织工程。然而, 退化椎间盘中恶劣的微环境会抑制 NPCs 功能的恢复并导致细胞凋亡<sup>[5]</sup>。因此寻找有效药物抑制 NPCs 的凋亡对于提高 IDD 的治疗水平十分重要。

穿心莲内酯 (andrographolide, Andro) 是从天然植物穿心莲中萃取的二萜类内酯活性化合物, 具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒等功能。Andro 能抑制肿瘤细胞生长, 调节自噬、细胞凋亡和相关信号通路蛋白的表达<sup>[6]</sup>。研究表明, 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路在细胞周期、炎症和细胞凋亡中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。有研究证实 PI3K/AKT 信号通路参与 NPCs 的炎症过程。在炎症环境中, 激活 PI3K/AKT 通路可以保护细胞免于凋亡并促进其增殖<sup>[8]</sup>。因此, 作者推测 PI3K/AKT 信号通路可能参与了细胞的退化, 进而导致 IDD。前期研究证实 Andro 对 PI3K/Akt 通路具有调控作用<sup>[9, 10]</sup>, 但其是否通过 PI3K/Akt 通路调控细胞的凋亡尚未见报道。因此, 本研究通过构建叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, TBHP) 诱导的 NPCs 细胞凋亡模型, 检测 Andro 干预后通过调控 PI3K/Akt 通路对 TBHP 诱导的 NPCs 细胞的影响及作用机制, 为 Andro 在 IDD 的临床治疗提供了重要的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与主要试剂

大鼠椎间盘髓核细胞来源中国科学院上海细胞库。髓核细胞专用培养基购自中国典型培养物保藏中心, PBS、0.25%胰蛋白酶、CCK8、RIPA (强) 组织细胞快速裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司, 叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydrogen peroxide, TBHP) 购自美国 Sigma 公

司, Andro 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 试剂盒、Bcl-2、Bax、p-Akt 和 GAPDH 抗体和辣根过氧化物标记的 IgG 均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司, AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司, Akt 抗体购自 Abcam 公司。

### 1.2 Andro 毒性试验及浓度筛选

用不同浓度的 Andro (0、3、6、9、18、36、72  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理正常 NPCs 细胞, 24、48、72 h 后 CCK8 检测细胞毒性。先用含有 100  $\mu\text{mol/L}$  TBHP 的培养基作用 NPCs 细胞 24 h 构建凋亡模型<sup>[11]</sup>, 再用不同浓度的 Andro (0、3、6、9、18、36、72  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 TBHP 诱导的 NPCs 细胞, 24、48、72 h 后 CCK8 检测细胞活力, 确定 Andro 的最佳处理浓度和时间分别为 18  $\mu\text{mol/L}$  和 24 h。

### 1.3 细胞分组与处理

将 NPCs 细胞随机分成 5 组, 分别是空白对照 (blank control, BC) 组、TBHP (T) 组、TBHP+Andro (TA) 组、TBHP+Andro+PI3K inhibitor (TA-Pih) 组和 TBHP+PI3K inhibitor (T-Pih) 组。BC 组细胞不做任何处理, 正常培养; 其余 4 组先用含有 100  $\mu\text{mol/L}$  TBHP 的培养基作用 NPCs 细胞 24 h, 再进行其他处理: T 组不做其他处理; TA 组用 18  $\mu\text{mol/L}$  Andro 处理 24 h; TA-Pih 组先用 25  $\mu\text{mol/L}$  PI3K inhibitor (LY294002) 预处理 1 h<sup>[12]</sup>, 再用 18  $\mu\text{mol/L}$  Andro 处理 24 h; T-Pih 组用 25  $\mu\text{mol/L}$  LY294002 处理 24 h。

### 1.4 检测方法

#### 1.4.1 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组处理结束的细胞重悬, 加入 1 ml 预冷 PBS 轻轻吹打混匀细胞, 400 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃上清。将细胞重悬于 200  $\mu\text{l}$  PBS, 加入 10  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 10  $\mu\text{l}$  PI, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。加入 300  $\mu\text{l}$  PBS 后随即上流式细胞仪进行流式检测, 使用 Novo Express 分析软件进行分析。

#### 1.4.2 ELISA 检测炎症因子

将细胞上清液离心, 配制标准品溶液, 将 50  $\mu\text{l}$  标准品加入标准品孔内, 40  $\mu\text{l}$  细胞上清液和 10  $\mu\text{l}$  抗体溶液加入检测孔内。所有上样孔内加入 50  $\mu\text{l}$  酶标试剂, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温育 30 min, 洗涤显色后每孔加入终止液 50  $\mu\text{l}$ , 酶标仪测定各孔在 450 nm 处的 OD 值, 绘制标准曲线, 计算样品浓度, 分别检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的水平。

#### 1.4.3 Western blot 检测凋亡与通道标志物

收集细胞，加入 200  $\mu\text{l}$  含蛋白酶和磷酸抑制剂的裂解液充分裂解细胞。4 $^{\circ}\text{C}$  12 000 g 离心 10 min，取上清用 BCA 法测定蛋白质浓度。将配制好的 12% SDS-PAGE 胶放入电泳槽中，上样后电泳，每孔上样量为 20  $\mu\text{g}$ ，湿转膜，5%脱脂奶粉室温封闭 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。根据说明书稀释抗体 Bcl-2、Bax、p-Akt、Akt 和 GAPDH (1:1000)，室温孵育 1 h，PBST 洗涤 3 次。将膜与稀释后的二抗 (1:20 000) 室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次后滴加 ECL 化学发光液，置于全自动化学发光分析仪中检测，TANON GIS 软件读取条带灰度值。

### 1.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 对数据进行分析，多组间比较采用单因素方差分析。实验数据均以  $\bar{x} \pm s$

表示。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Andro 毒性试验及浓度筛选的 CCK-8 检测结果

CCK8 检测 Andro 毒性及 Andro 浓度筛选结果见表 1。低浓度 (3、6  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 Andro 对细胞活力无显著影响，但随着 Andro 浓度的升高，细胞活力逐渐降低，且具有浓度依赖性。TBHP 处理 24 h 后，当 Andro 浓度  $< 18 \mu\text{mol/L}$  时，细胞活力随浓度的增加而升高，Andro 浓度为 18  $\mu\text{mol/L}$  时的细胞活力最高，当 Andro 浓度  $> 18 \mu\text{mol/L}$  时，细胞活力随浓度的增加而降低；TBHP 处理 48、72 h 后，只有低浓度的 Andro 能够提高细胞活力，因此本研究选择 Andro 的处理浓度和时间分别为 18  $\mu\text{mol/L}$ 、24 h。

表 1 不同剂量 Andro 处理 NPCs 的 CCK-8 检测结果 ( $n=3$ ,  $\text{OD} \times 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) 与比较

处理	0 $\mu\text{mol/L}$	3 $\mu\text{mol/L}$	6 $\mu\text{mol/L}$	9 $\mu\text{mol/L}$	18 $\mu\text{mol/L}$	36 $\mu\text{mol/L}$	72 $\mu\text{mol/L}$	P 值
单纯 NPCs								
24 h	8.4 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.1	8.5 $\pm$ 0.1	8.2 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.1	<0.001
48 h	10.7 $\pm$ 0.1	10.6 $\pm$ 0.1	10.7 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 0.1	10.1 $\pm$ 0.1	9.6 $\pm$ 0.1	9.3 $\pm$ 0.1	<0.001
72 h	12.9 $\pm$ 0.2	12.8 $\pm$ 0.1	12.6 $\pm$ 0.3	11.6 $\pm$ 0.2	10.9 $\pm$ 0.2	10.3 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 0.2	<0.001
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
T 处理 NPCs								
24 h	7.5 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.1	8.1 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 0.2	8.9 $\pm$ 0.1	8.5 $\pm$ 0.2	<0.001
48 h	8.2 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.1	9.0 $\pm$ 0.1	8.5 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.0	<0.001
72 h	8.1 $\pm$ 0.2	8.3 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.2	7.5 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.0	6.9 $\pm$ 0.2	<0.001
P 值	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

### 2.2 NPCs 凋亡

流式细胞术检测结果见图 1 和表 2，与 BC 组相比，T 组细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ )；与 T 组相

比，TA 组的细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ )，T-Pih 组的细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ )；与 T-Pih 组相比，TA-Pih 组的细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ )。

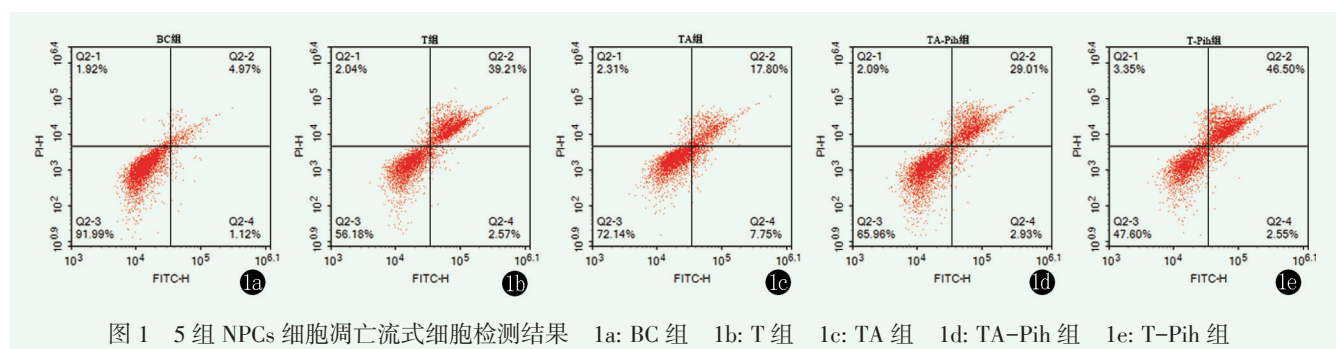


图 1 5 组 NPCs 细胞凋亡流式细胞检测结果 1a: BC 组 1b: T 组 1c: TA 组 1d: TA-Pih 组 1e: T-Pih 组

### 2.3 NPCs 上清炎性因子检测

ELISA 检测 NPCs 上清炎性因子结果见表 2，与 BC 组相比，T 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )；与 T 组相比，TA 组的 TNF- $\alpha$ 、

IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )，T-Pih 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )；与 T-Pih 组相比，TA-Pih 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

表 2 5 组 NPCs 的检测结果 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ ) 与比较

指标	BC 组	T 组	TA 组	TA-Pih 组	T-Pih 组	P 值
流式细胞检测						
凋亡率 (%)	6.5±1.1	41.4±0.6	26.0±0.4	31.9±0.3	49.1±0.4	<0.001
ELESIA 检测						
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	107.6±5.2	376.7±11.0	198.1±6.7	157.6±6.1	452.5±14.0	<0.001
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	47.2±3.9	223.7±3.4	119.8±3.3	97.2±3.1	264.7±3.5	<0.001
IL-6 (pg/ml)	54.2±1.3	240.1±5.1	140.1±3.9	125.1±3.2	287.9±5.2	<0.001
Wester blot 检测						
Bcl-2 (/GAPDH)	0.9±0.0	0.4±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	<0.001
Bax (/GAPDH)	0.2±0.0	0.9±0.0	0.3±0.0	0.6±0.0	0.9±0.0	<0.001
p-Akt (/GAPDH)	0.7±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	<0.001
Akt (/GAPDH)	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.392

### 2.4 NPCs 凋亡和 Akt 标志物检测

Western blot 检测凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 和 PI3K/Akt 通路相关蛋白 Akt、p-Akt 表达结果见表 2, 与 BC 组相比, T 组 Bcl-2 和 p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ ), Bax 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ )。与 T 组相比, TA 组 Bcl-2 和 p-Akt 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ ), Bax 蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ ); T-Pih 组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ ), Bax 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ ), p-Akt 蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与 T-Pih 组相比, TA-Pih 组 Bcl-2 和 p-Akt 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ ), Bax 蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ )。Akt 蛋白表达水平在各组间均差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

炎症、氧化应激和细胞凋亡被认为是 IDD 的主要驱动因素, 目前的保守治疗和手术治疗效果有限, 只能缓解症状, 不能恢复结构和生物学功能<sup>[13]</sup>。因此仍需探索相关机制去寻找新的药物为 IDD 的临床治疗带来新的理论指导。穿心莲的重要组成部分 Andro 已被证实感染、肿瘤和其他疾病中表现出潜在的抗炎和保护作用, 在病理条件下具有减弱异常细胞凋亡的能力<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, Andro 处理后能有效提高 TBHP 诱导的 NPCs 的活力, 表明 Andro 对 TBHP 诱导的 NPCs 具有保护作用。

凋亡是一种程序性细胞死亡, 表现为细胞持续膨胀直到细胞膜破裂, 导致细胞内容物的释放和强烈的炎症反应的激活<sup>[15]</sup>。退行性髓核中存在大量衰老细

胞, 可诱导多种炎症细胞因子和基质降解酶的表达, 影响 NPCs 的生长和功能进而引发更多细胞的凋亡<sup>[16]</sup>。多种异常刺激可使炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平升高, 进而导致合成代谢和分解代谢活性失衡, 进一步引发或加速 IDD 进程<sup>[17]</sup>。因此针对 NP 细胞凋亡的干预可改善 IVDD 退行性变, 可作为治疗 IDD 策略的潜力。本研究检测了 Andro 对 TBHP 诱导的 NPCs 凋亡及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平的影响, 结果显示 Andro 能降低细胞凋亡率和炎症因子水平。IDD 细胞凋亡可通过死亡受体通路、线粒体通路和内质网信号通路发生, 而内源性通路诱导的细胞凋亡最初发现于线粒体, 主要通过 Bcl-2 蛋白质家族<sup>[18]</sup>。作为主要的抗凋亡成员 Bcl-2 可以维持线粒体外膜的完整性<sup>[19]</sup>。相反, Bax 是 Bcl-2 蛋白家族的促凋亡成员, 主要通过破坏线粒体膜的完整性来发挥其调节作用。Bcl-2 蛋白家族可以改变线粒体膜的通透性, 诱导线粒体孔的开放, 从而使凋亡诱导因子、细胞色素 C 和促凋亡蛋白进入细胞质, 最终通过激活 caspase 诱导细胞凋亡<sup>[20]</sup>。本试验发现 Andro 能显著增加 Bcl-2 表达水平, 降低 Bax 的表达水平, 表明 Andro 能够通过调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达来抑制 NPCs 的凋亡。

IDD 已被证明与多种信号通路失调有关。PI3K/Akt 信号通路作为细胞内的主要信号通路, 通过与多个下游靶蛋白相互作用, 调节细胞在生理和病理条件下的增殖、凋亡、自噬和分化<sup>[21]</sup>。PI3K 和 Akt 参与 NPCs 的炎症反应, 降低细胞活性, 诱导细胞外基质变性。PI3K/Akt 信号通路通过抑制通过 I $\kappa$ Ba 的磷酸化, 调节下游细胞靶点的激活。抑制 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路被认为是治疗 IDD 的有效方法<sup>[22]</sup>。研究

发现白藜芦醇与 17 $\beta$  雌二醇共同作用 PI3K/AKT 信号通路可有效抑制 NP 细胞凋亡<sup>[23]</sup>, N-钙粘素介导的 PI3K/Akt-GSK-3 $\beta$  信号通路激活可减弱高强度压缩下的髓核细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究显示, Andro 能显著增加 Akt 蛋白的磷酸化水平, 进一步采用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理 TBHP 诱导的 NPCs, 结果显示, Andro 联合 LY294002 处理与 LY294002 单独处理相比 Akt 蛋白的磷酸化水平明显升高, 提示 Andro 可能是通过调控 PI3K/Akt 信号通路来影响 NPCs 凋亡和炎症反应的。

综上所述, Andro 能抑制细胞凋亡, 降低炎症性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的水平, 其机制可能与 Andro 调控 PI3K/Akt 炎症通路有关, 为临床治疗 IDD 提供了新思路。

### 参考文献

- [1] 杨召, 苑珍珍. 炎症因子在中医药治疗椎间盘退变中的机制研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2021, 29 (24): 2246-2248.
- [2] Wang M, Tsang A, Tam V, et al. Multiparametric MR investigation of proteoglycan diffusivity, T2 relaxation, and concentration in an ex vivo model of intervertebral disc degeneration [J]. J Magn Reson Imaging, 2020, 51 (5): 1390-1400.
- [3] Luo LW, Jian XY, Sun H, et al. Cartilage endplate stem cells inhibit intervertebral disc degeneration by releasing exosomes to nucleus pulposus cells to activate Akt/autophagy [J]. Stem Cells, 2021, 39 (4): 467-481.
- [4] Sun D, Liu P, Cheng J, et al. Correlation between intervertebral disc degeneration, paraspinal muscle atrophy, and lumbar facet joints degeneration in patients with lumbar disc herniation [J]. BMC Musculoskel Disord, 2017, 18 (1): 167-173.
- [5] 童通, 雷涛, 申勇. 椎间盘退行性变中细胞凋亡的分子机制 [J]. 中国矫形外科杂志, 2017, 25 (19): 1788-1792.
- [6] 刘奇章, 龚兴国. 穿心莲内酯诱导胃癌细胞周期抑制和内源性凋亡 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2017, 44 (4): 456-463.
- [7] Li P, Gan Y, Xu Y, et al. The inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  promotes the premature senescence of rat nucleus pulposus cells via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42938.
- [8] 范猛, 韩成龙. 信号通路对髓核细胞调节作用研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20 (21): 1966-1968.
- [9] Vlb A, Jb B, Mrk C, et al. Andrographolide suppresses cisplatin-induced endothelial hyperpermeability through activation of PI3K/Akt and Enos-derived nitric oxide- Science Direct [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28 (23): 115809.
- [10] Li X, Tian R, Liu L, et al. Andrographolide enhanced radiosensitivity by downregulating glycolysis via the inhibition of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in HCT116 colorectal cancer cells [J]. J Int Med Res, 2020, 48 (8): 030006052094616.
- [11] Chen Y, Wu YQ, Shi HX, et al. Melatonin ameliorates intervertebral disc degeneration via the potential mechanisms of mitophagy induction and apoptosis inhibition [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23 (3): 2136-2148.
- [12] Chen H, Huang Y, Huang D, et al. Protective effect of giganol against hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat bone marrow mesenchymal stem cells through the PI3K/Akt pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (2): 3267-3273.
- [13] Zhao YL, Li AM. miR-19b-3p relieves intervertebral disc degeneration through modulating PTEN/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13 (18): 22459-22473.
- [14] Zhang LL, Chen Q, Wang HL, et al. Andrographolide mitigates IL-1 $\beta$  induced human nucleus pulposus cells degeneration through the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 18 (6): 5427-5436.
- [15] Shi J, Gao W, Feng S. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42 (4): 245-254.
- [16] 常献, 陈斌, 李长青. 髓核细胞老化机制研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 15 (1): 40-42.
- [17] Dudek M, Yang N, Ruckshanthi JP, et al. The intervertebral disc contains intrinsic circadian clocks that are regulated by age and cytokines and linked to degeneration [J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76 (3): 576-584.
- [18] Alessandra R, Venera C, Adriana G, et al. Involvement of Bax and Bcl-2 in induction of apoptosis by essential oils of three lebanese salvia species in human prostate cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (1): 292-304.
- [19] Opferman JT, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development [J]. Cell Death Differ, 2018, 25 (1): 37-45.
- [20] Yue B, Lin Y, Ma X, et al. Effect of Survivin gene therapy via lentivirus vector on the course of intervertebral disc degeneration in an invivo rabbit model [J]. Mol Med Rep, 2016, 14 (5): 4593-4598.
- [21] Ouyang ZH, Wang WJ, Yan YG, et al. The PI3K/Akt pathway: a critical player in intervertebral disc degeneration [J]. Oncotarget, 2017, 8 (34): 57870-57881.
- [22] He S, Fu Y, Yan B, et al. Curcumin alleviates the inflammation of nucleus pulposus cells via the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway and delays intervertebral disk degeneration [J]. World Neurosurg, 2021, 155: e402-e411.
- [23] Bai X, Guo X, Zhang F, et al. Resveratrol combined with 17 $\beta$ -estradiol prevents IL-1 $\beta$  induced apoptosis in human nucleus pulposus via the PI3K/AKT/Mtor and PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway [J]. J Invest Surg, 2021, 34 (8): 904-911.
- [24] Li P, Liang Z, Hou G, et al. N-cadherin-mediated activation of PI3K/Akt-GSK-3 $\beta$  signaling attenuates nucleus pulposus cell apoptosis under high-magnitude compression [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44 (1): 229-239.

(收稿:2022-02-16 修回:2022-09-27)

(同行评议专家:程智涛 周伟 张志强)

(本文编辑:宁桦)