

· 基础研究 ·

开放获取

4-辛基衣康酸酯对 IL-1 诱导髓核细胞氧化损伤的保护作用

王帅, 陈维杨, 季峰*, 王守国

(南京医科大学附属淮安第一医院, 江苏淮安 223300)

摘要: [目的] 探讨 4-辛基衣康酸酯 (4-octyl itaconate, 4OI) 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞氧化损伤的保护作用及其机制。[方法] 分离培养小鼠髓核细胞。CCK8 法检测小鼠髓核细胞活力。荧光素酶报告基因法、免疫共沉淀、RT-qPCR 和 WB 法检测 4OI 和 IL-1 对 Nrf2 通路的影响。CellROX 探针和 DCF-DA 探针检测细胞 ROS 水平。JC-1 法、ssDNA ELISA、TBAR 检测细胞氧化损伤。LDH ELISA、台盼蓝染色法、TUNEL 法、Annexin V 流式细胞术检测细胞凋亡。通过慢病毒 shRNA 转染和 CRISPR/Cas9 技术研究沉默 Nrf2 和 Keap1 对 4OI 抑制细胞凋亡的影响。[结果] 4OI 促进小鼠髓核细胞 Keap1-Nrf2 解偶联, Nrf2 重新进入细胞核中调控下游基因转录。4OI 显著抑制 ROS 水平, 改善 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞氧化损伤。4OI 逆转 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞活力下降, LDH 增加和死细胞增加, 4OI 显著抑制 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞死亡。4OI 抑制 IL-1 诱导的 Caspase-3 和 Caspase-9 活性增加, 以及蛋白酶 PARP1 裂解片段和细胞色素 C 含量增加, 显著抑制 IL-1 诱导的细胞凋亡。沉默小鼠髓核细胞中 Nrf2 和 Keap1 的表达, 4OI 对 IL-1 诱导的细胞损伤的保护作用被抵消。[结论] 4OI 通过激活 Nrf2 通路保护髓核细胞免受 IL-1 诱导的氧化损伤, 为椎间盘退变的治疗提供了新策略。

关键词: 4-辛基衣康酸酯, 椎间盘退变, 氧化损伤, 核因子 E2 相关因子 2, 细胞凋亡

中图分类号: R687 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2025) 09-0815-10

Protective effect of 4-octyl itaconate on IL-1-induced oxidative damage of nucleus pulposus cells // WANG Shuai, CHEN Wei-yang, JI Feng, WANG Shou-guo. The Affiliated Huai'an No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an 223300, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To investigate the protective effect of 4-octyl itaconate (4OI) on oxidative damage of mouse nucleus pulposus cells induced by IL-1 and its mechanism. [Methods] Mouse nucleus pulposus cells were isolated and cultured, while CCK8 method was used to detect the viability of the cells. The effects of 4OI and IL-1 on Nrf2 pathway were detected by luciferase reporter gene method, immunoprecipitation, RT-qPCR and WB method. In addition, JC-1 assay, ssDNA ELISA and TBAR were used to detect oxidative damage, LDH ELISA, Trypan blue staining, TUNEL assay and Annexin V flow cytometry were used to detect apoptosis. The effect of silencing Nrf2 and Keap1 on apoptosis inhibition by 4OI was studied by lentiviral shRNA transfection and CRISPR/Cas9 technique. [Results] The 4OI promoted the dissociation of KEap1-NRF2 in mouse nucleus pulposus cells, and Nrf2 re-entered the nucleus to regulate downstream gene transcription. The 4OI significantly inhibited ROS levels and improved IL-1-induced oxidative damage of mouse nucleus pulposus cells. 4OI reversed IL-1-induced decline in nucleus pulposus cell viability, increased LDH and increased dead cells. Furthermore, 4OI significantly inhibited IL-1-induced nucleus pulposus cell death, inhibited the increase of IL-1-induced Caspase-3 and Caspase-9 activities, as well as the increase of protease PARP1 cleavage fragment and cytochrome C content, and significantly inhibited IL-1-induced apoptosis. However, silencing the expression of Nrf2 and Keap1 in mouse nucleus pulposus cells negated the protective effect of 4OI on IL-1-induced cell damage. [Conclusion] 4OI protects nucleus pulposus cells from IL-1-induced oxidative damage by activating the Nrf2 pathway, providing a new strategy for the treatment of intervertebral disc degeneration.

Key words: 4-octyl itaconate, intervertebral disc degeneration, oxidative damage, nuclear factor E2 related factor 2, cell apoptosis

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是脊柱退行性疾病的病理基础, 严重影响患者生活质量^[1]。因此, 开发新型 IDD 治疗策略对于提高患者生活质量、减轻社会经济压力具有重要意义。

IDD 的发生发展与髓核细胞功能障碍和细胞外基质改变密切相关, 而氧化应激被认为是引起这些病理变化的重要因素^[2, 3]。核转录因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 是一种关键的抗

DOI:10.20184/j.cnki.issn1005-8478.110786

作者简介: 王帅, 硕士, 研究方向: 骨科, (电子信箱) 17766446188@163.com

* 通信作者: 季峰, (电子信箱) hayyjf@njmu.edu.cn

氧化转录因子，在维持细胞氧化还原平衡、抗炎和抗凋亡等方面发挥着重要作用。研究发现，Nrf2 表达水平的降低与 IDD 的进展呈正相关，而 Nrf2 的过表达可以减少 ROS 的产生，减轻氧化应激损伤，并延缓髓核细胞衰老^[3]。因此，Nrf2 及其信号通路被认为是开发 IDD 治疗策略的重要靶点。

4-辛基衣康酸酯（4-octyl itaconate, 4OI）是一种新型 Nrf2 激活剂，研究发现 4OI 在多种疾病模型中发挥抗氧化和抗炎作用^[4]。4OI 能够通过 Keap1 结合，激活 Nrf2 信号通路，进而上调抗氧化蛋白的表达，减轻氧化应激和炎症反应^[4, 5]。尽管如此，4OI 在 IDD 治疗中的作用及其机制尚不明确。本研究旨在探讨 4OI 是否能够通过激活 Nrf2 信号通路，抑制 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞的氧化损伤和凋亡，从而为 IDD 的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 小鼠髓核细胞的分离与培养

髓核细胞的分离培养操作方法如下：C57BL/6J（上海斯莱克实验动物中心，上海，中国）小鼠脱颈椎处死后，分离出腰椎椎间盘，依次加入胰蛋白酶 37℃消化 15 min，胶原酶 37℃ 30 min 消化至细胞分散，1 000 r/min 离心 3 min，细胞沉淀反复重悬 2~3 次，接种在细胞培养皿中，37℃培养，备用。

1.2 慢病毒转染

Nrf2 shRNA 病毒购自 Santa Cruz Biotech 公司（Mouse Nrf2 shRNA, 5'-CTGGATGAAGAGACCG-GAGAA-3'; Mouse Keap1 shRNA, 5'-GGA CAAACC-GCCTTAATTCTT-3'），根据 MOI 值配制含有 5 μg/mL Polybrene®（SC-134220）的病毒体系，加入小鼠髓核细胞中转染 24 h 后，用含有嘌呤霉素的培养基筛选 Nrf2 敲低细胞，用于后续实验。

1.3 实时荧光定量 PCR

采用 Zhang 等^[6]改良 Trizol 法提取总 RNA。采用 4×gDNA wiper Mix 去除 DNA 污染，随后使用 5×HiS-cript III qRTSuperMix 进行 cDNA 合成。实时荧光定量 PCR 反应体系如下：SYBR qPCR Master Mix 10 μL、Forward Primer 1 μmol/L、Reverse Primer 1 μmol/L、cDNA 2 μL、RNase-free Water 至 20 μL，引物序列见表 1。

1.4 蛋白免疫印迹法

蛋白免疫印迹法（western blot, WB）参考 Wang 等^[7]的方法，具体步骤如下：SDS-PAGE 电泳法于 85 V、110 V 分离蛋白。电泳后运用 PVDF 膜于

4℃，恒压转膜 2 h。5%脱脂奶粉室温封闭 60 min，一抗孵育 4℃过夜，二抗室温孵育 1 h，显影。

表 1. 引物序列 Table 1. Primer sequence	
相关引物	序列
Nrf2	Forward 5'-CTCCCAATTCAGCCGCC-3'
	Reverse 5'-CCAGGGCAAGCGACTCATGG-3'
Keap1	Forward 5'-CCCGTCAAAGCCCCCACTGCATAC-3'
	Reverse 5'-TCCAGAGGAGGAATGAGTGGCGGATG--3'
HO1	Forward 5'-GCAGAGAATGCTGAGTTCATG-3'
	Reverse 5'-CCTCCTCCAGGGCCACATAGATGTG-3'
NQO1	Forward 5'-AATGGGCCAGTACAATCAGG-3'
	Reverse 5'-CCAGCCCTAAGGATCTCTCC-3'
GAPDH	Forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
	Reverse 5'-GGCATGGCATGTGGTCATGAG-3'

1.5 免疫共沉淀分析 Nrf2-Keap1 复合物

裂解液冰上裂解细胞 10 min，细胞裂解液于 4℃，14 000 r/min 离心 15 min 后，取上清与蛋白 A/G 琼脂糖珠按 50 : 1 的比例混合，4℃下孵育 10 min。离心取上清蛋白定量。随后上清与一抗和 Normal IgG 在室温下孵育 2 h，再加入蛋白 A/G 琼脂糖珠 44℃下孵育 1~2 h。孵育后 4℃、2 500 r/min 离心 5 min，收集沉淀，PBS 清洗 3 次，加入上样缓冲液，95℃金属浴加热 10 min 后冷却，离心 60 s，取上清进行 WB。

1.6 荧光素酶活性检测 ARE 和 NQO1 活性

将 1.5 μg 的荧光素酶报告基因融合构建体（Ptl-荧光素酶）、野生型 ARE 和 0.5 μg 的 pCMV-β-半乳糖苷酶对照载体与 WelFect-M™金染色剂共转染小鼠原代髓核细胞。转染 24 h 后，DHA 处理细胞 9 h，用 1×Report 裂解缓冲液裂解细胞。将细胞提取物与荧光素酶底物混合后，用发光仪测量荧光素酶活性。

1.7 CellROX 和 DCF-DA 探针检测细胞内 ROS 水平

采用 CellROX 和 DCF-DA 染色法检测细胞氧化应激^[8]。首先，将细胞给予相应处理。对于 CellROX 染色，按照 1 : 500 的比例将 CellROX 与培养基混合加入细胞中，37℃避光孵育 30 min 后，荧光显微镜观察后取样检测 ROS 水平。对于 DCF-DA 染色，细胞在处理后的，按照 1 : 1 000 的比例将 DCF-DA 与基础培养基混合加入细胞中，避光孵育 20 min，荧光显微镜观察后取样检测 ROS 水平。

1.8 JC-1 染色检测线粒体膜电位

在细胞中加入 1 mL 含有血清和酚红的细胞培养基。随后加入 1 mL JC-1 染色工作液 37℃下孵育 20 min，用 JC-1 染色缓冲液（1X）洗涤细胞两次，加入 2 mL 含

有血清和酚红的细胞培养液，荧光显微镜下观察。

1.9 LDH 检测细胞损伤

待检测细胞加入 10% LDH 释放试剂，37℃下孵育 1 h。离心取上清用于 LDH 活性测定。

1.10 TUNEL 检测细胞凋亡

4℃下用 4%多聚甲醛处理待检测细胞 25 min，待检测细胞使用 20 μg/mL Proteinase K 溶液通透，1×Equilibration Buffer 室温平衡，标记液处理细胞，于 37℃避光孵育 60 min 进行 TdT 反应。随后用 1 μg/mL 的 PI 溶液进行复染，室温静置 5 min，20%甘油封片，荧光显微镜下观察。

1.11 Annexin V 流式细胞术检测细胞凋亡

采用加入不含 EDTA 的胰酶细胞消化液消化细胞后离心，重悬细胞沉淀并计数，加入 Annexin V-PE 结合液重悬细胞，加入 Annexin V-PE 染料，混匀后于室温避光孵育 10~20 min，使用流式细胞仪检测。

1.12 统计学方法

正态分布的定量数据以均数 (Mean) ± 标准差 (S.D.) 表示。使用 GraphPad Prism 版本 7.0 (GraphPad, CA) 进行统计分析。两组间比较采用非配对 *T* 检验 (Student's *t*-test)。两组以上进行比较采用单因素方差分析 (One way ANOVA) 和 Tukey's post hoc test。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4OI 对小鼠髓核细胞中 Nrf2/Keap1 通路的影响

采用荧光素酶报告基因法检测不同浓度 4OI (1、5、10、25、100 μmol/L) 处理的小鼠髓核细胞中 Nrf2 下游信号蛋白 ARE 和 NQO1 的活性。结果表明，随着 4OI 浓度的增加，Nrf2 下游 ARE 和 NQO1 的活性显著增强 (图 1a, 1b)；4OI 对小鼠髓核细胞存活无明显影响，这说明 4OI 能有效激活小鼠髓核细胞中 Nrf2 通路，但不影响细胞存活。

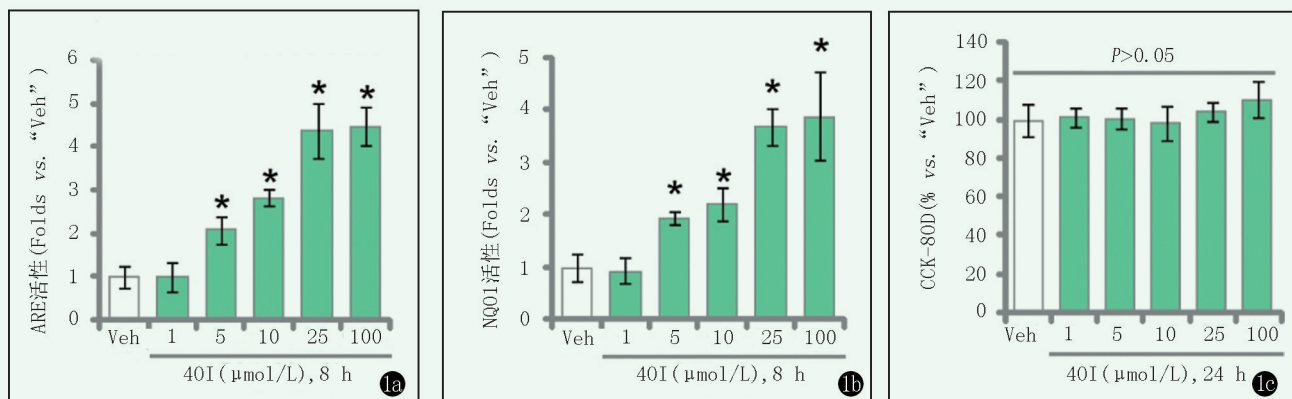
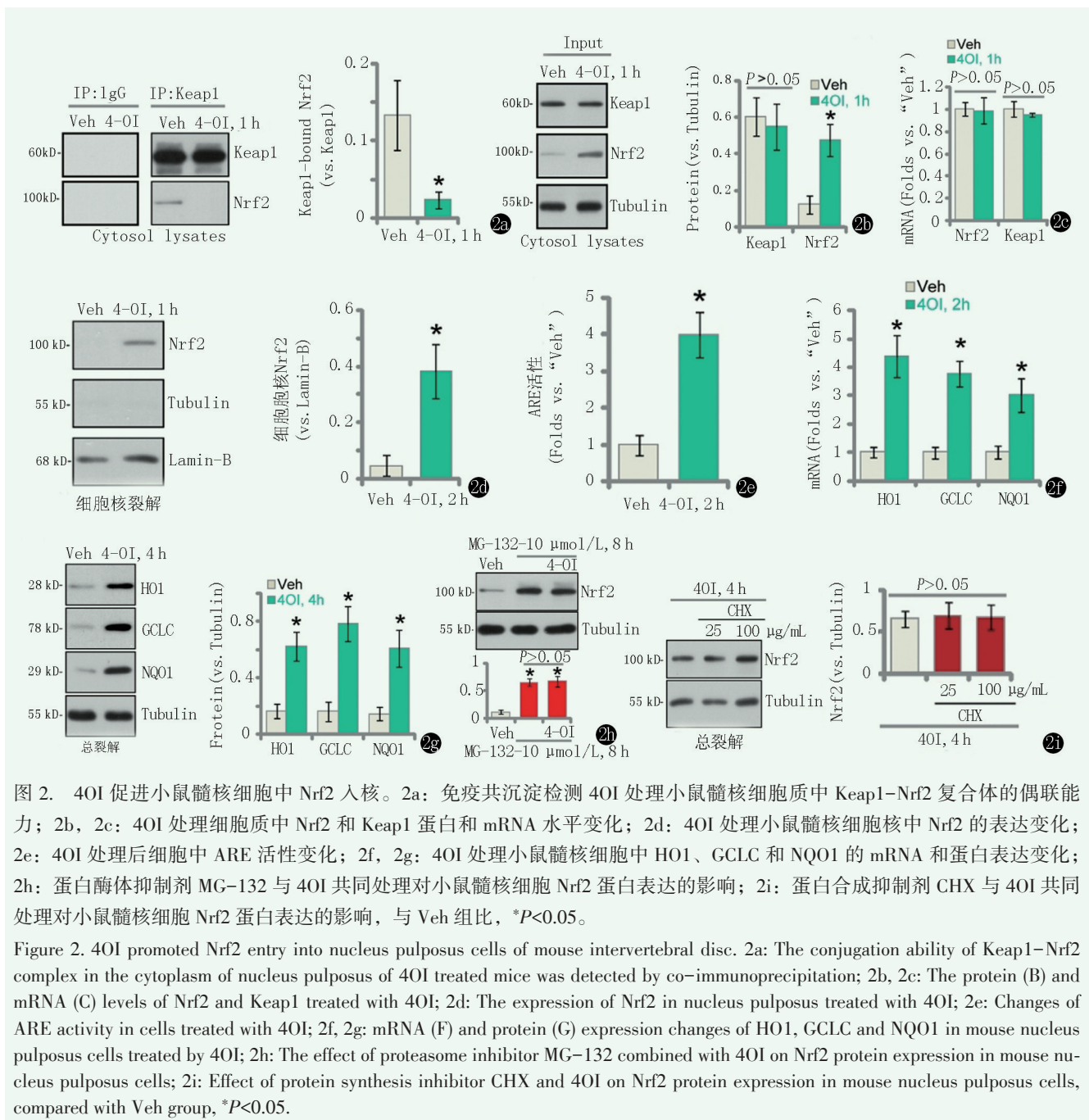


图 1. 4OI 激活小鼠髓核细胞 Nrf2 通路。1a, 1b: 4OI 处理小鼠髓核细胞中 Nrf2 下游关键蛋白 ARE 和 NQO1 活性变化；1c: 4OI 处理的小鼠髓核细胞存活率。与 Veh 组比，*P<0.05。

Figure 1. 4OI activated Nrf2 pathway in mouse intervertebral disc nucleus pulposus cells. 1a, 1b: 4OI treated the activity changes of Nrf2 downstream key proteins ARE (A) and NQO1 (B) in mouse nucleus pulposus cells; 1c: 4OI treated mouse intervertebral disc nucleus pulposus cell survival rate, compared with Veh group, *P<0.05.

采用免疫共沉淀 (Co-IP) 法检测小鼠髓核细胞中 Nrf2-Keap1 复合物。图 2 结果表明，4OI 处理小鼠髓核细胞 1 h，细胞质中并未检测到 Nrf2-Keap1 复合物，提示 Nrf2 与 Keap1 解偶联 (图 2a)；细胞质中 Nrf2 蛋白表达显著升高 (图 2b)；Keap1 和 Nrf2 mRNA 水平无明显变化 (图 2c)。细胞核中 Nrf2 蛋白表达显著升高 (图 2d)，ARE 活性也显著提高 (图 2e)，这提示细胞质中未被降解的 Nrf2 可能重新转移到细胞核中，与 ARE 结合，激活下游基因转录。4OI 处理小鼠髓核细胞 4 h 后发现 Nrf2 下游基因 HO1、GCLC、NQO1 mRNA 和蛋白水平均显著升高 (图 2f,

2g)。为了明确 4OI 调控 Nrf2 与 Keap1 解偶联的机理，采用 10 μmol/L 蛋白酶体抑制剂 MG-132 和 4OI 处理小鼠髓核细胞 8 h，结果发现 MG-132 处理组的 Nrf2 含量显著高于 Veh 组；但单独使用 MG-132 处理和 4OI 与 MG-132 共同处理的 Nrf2 含量无显著性差异 (图 2h)，这暗示着 Nrf2 含量的升高可能是其并未被蛋白酶体所降解。使用蛋白合成抑制剂放线菌酮 CHX 抑制 Nrf2 的合成，结果发现 4OI 处理 4 h 不影响 Nrf2 的表达 (图 2i)。综上所述，在小鼠髓核细胞中，4OI 的处理会使 Keap1-Nrf2 解偶联，并使 Nrf2 重新进入细胞核中调控下游基因转录。



2.2 4OI 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞氧化损伤的保护作用

图 3a, 3b 结果表明, 与对照 (Ctrl) 比, 4OI 处理小鼠髓核细胞 ROS (CellROX 探针红色荧光和 DCF-DA 探针绿色荧光) 水平无显著变化, IL-1 处理细胞 ROS 水平显著增加; 4OI 和 IL-1 共同处理细胞 ROS 水平显著低于 IL-1 单独处理, 这提示 4OI 可改善 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞氧化损伤。进一步探究 4OI 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞线粒体膜电位的影响, 发现 4OI 对线粒体膜电位并无影响, IL-1 使

线粒体膜电位显著降低, 即 JC-1 的绿色荧光增强, 红色荧光减弱; 当 4OI 和 IL-1 共同处理时可以显著提高 IL-1 引起的膜电位降低 (图 3c)。图 3d 结果表明 IL-1 处理导致大量单链 DNA 产生, 提示 DNA 受到损害, 而 4OI 则显著降低 IL-1 对小鼠髓核细胞 DNA 的损伤。TBAR 法检测发现 4OI 的处理在一定程度上增强了脂质自由基的抗氧化能力 (图 3e)。综上所述, 4OI 可显著改善 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞的氧化损伤。

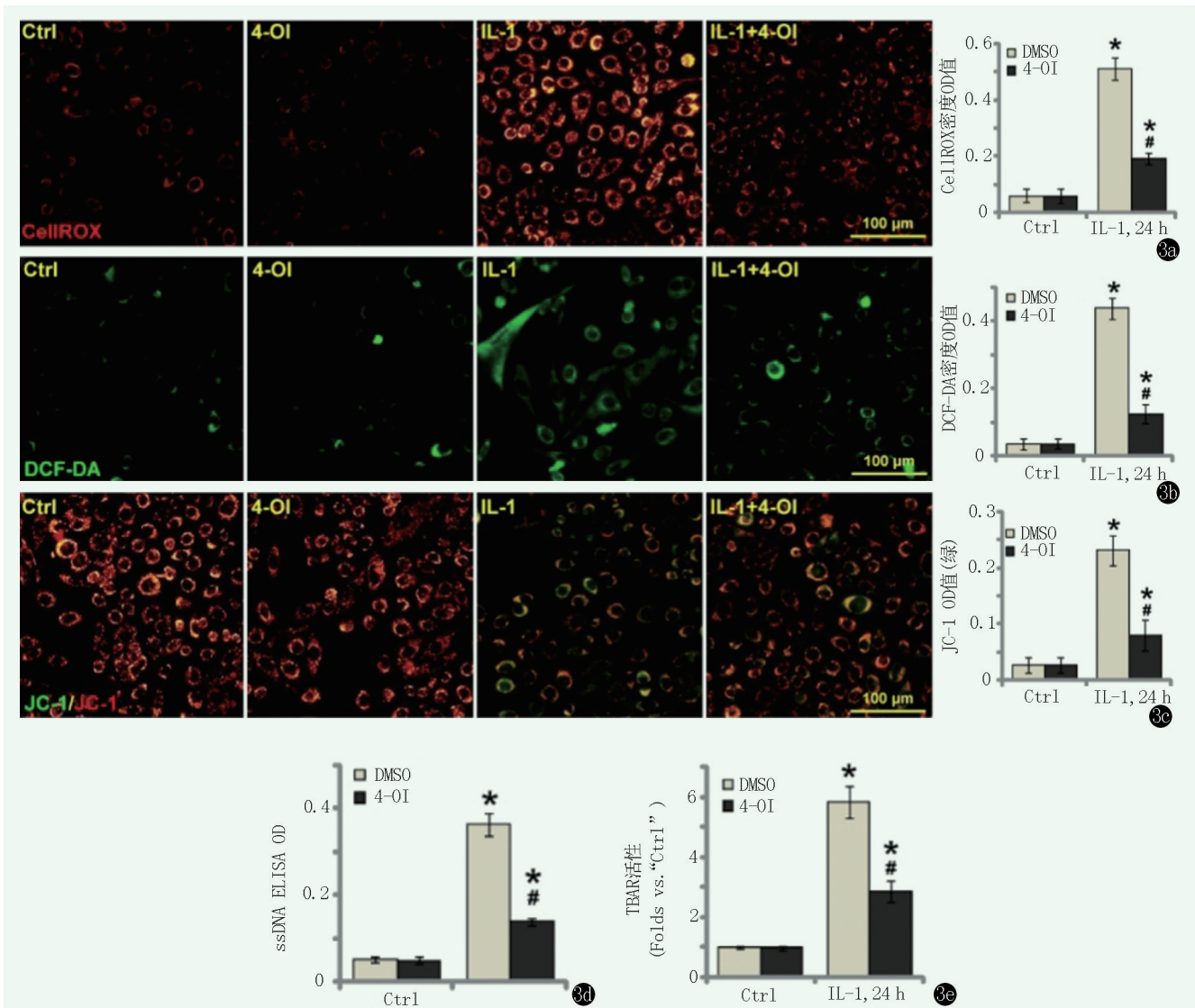


图 3. 4OI 改善 IL1 诱导的小鼠髓核细胞氧化损伤。3a, 3b: CellROX 探针 (红色), DCF-DA 探针 (绿色) 检测 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞中 ROS 水平变化; 3c: JC-1 法检测 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞中线粒体膜电位变化; 3d: ssDNA ELISA 法检测用 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞中 DNA 损伤情况; 3e: TBAR 法检测 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞脂质自由基抗氧化能力。与 Ctrl 组比, * $P<0.05$; 与 IL-1 组比, # $P<0.05$ 。

Figure 3. 4OI improved IL-1-induced oxidative injury of mouse nucleus pulposus cells. 3a, 3b: CellROX probe (A, red) and DCF-DA probe (B, green) were used to detect ROS levels in the cells; 3c: The changes of mitochondrial membrane potential in intervertebral disc nucleus pulposus cells treated with IL-1 and 4OI were detected by JC-1 method; 3d: DNA damage in nucleus pulposus cells treated with IL-1 and 4OI was detected by ssDNA ELISA; 3e: TBAR method was used to detect the free radical antioxidant capacity of lipids in nucleus pulposus cells treated with IL-1 and 4OI, compared with Ctrl group * $P<0.05$, compared with IL-1 group # $P<0.05$.

2.3 4OI 抑制 IL-1 诱导小鼠髓核细胞凋亡

IL-1 处理后细胞存活率显著降低, 而 4OI 和 IL-1 共同处理细胞存活率增加 (图 4a)。为了探明 4OI 逆转 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞活力下降的机制, 图 4b 研究 4OI 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞 LDH 的影响, 结果表明 4OI 处理 LDH 水平无变化, IL-1 处理诱导 LDH 产生, 提示 IL-1 对细胞产生毒害作用; 而 4OI 和 IL-1 共同处理 LDH 的含量显著低于 IL-1 单独处理, 这说明 4OI 能显著降低 IL-1 对鼠髓核细胞的毒性作用。图 4c 台盼蓝 (Trypan) 染色结果表

明, 4OI 可以显著降低由 IL-1 引起的小鼠髓核细胞的死亡。这些结果说明 4OI 显著抑制 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞死亡。

研究 4OI 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞凋亡的影响, 结果表明 IL-1 处理显著增加凋亡关键蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 活性, 而 4OI 会减缓 IL-1 诱导的凋亡作用 (图 4d, 4e)。另外, 蛋白酶 PARP1 裂解片段和细胞色素 C (Cytosol cyto-C) 检测同样也证实了上述结果 (图 4f, 4g)。图 4h 和 4i 中 TUNEL 染色和 Annexin V 流式细胞术结果表明 IL-1 大幅度促进

了细胞的凋亡，而 4OI 的处理则显著降低了由 IL-1 引起的细胞凋亡。总而言之，在小鼠髓核细胞中，4OI 显著抑制 IL-1 诱导的细胞凋亡。

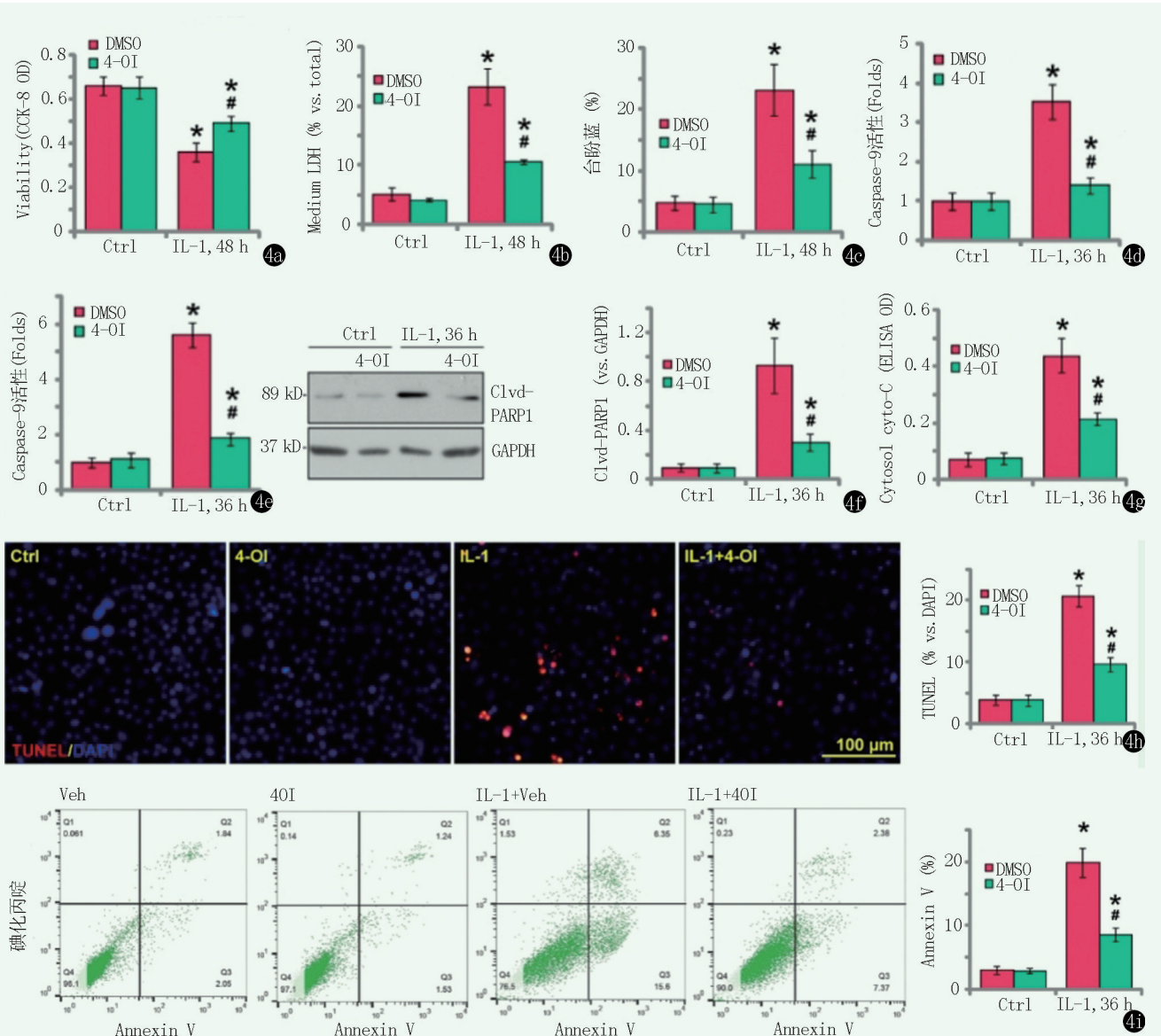


图 4. 4OI 抑制 IL1 诱导的小鼠髓核细胞凋亡。4a: CCK-8 法检测 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞存活率变化; 4b: LDH ELISA 法检测 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞中 LDH 变化; 4c: 台盼蓝 (Trypan) 染色法检测 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞死亡情况; 4d~4g: IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞中凋亡关键蛋白 Caspase-3、Caspase-9 活性变化; Clvd-PARP1 蛋白表达和细胞色素 C 含量变化; 4h, 4i: TUNEL 染色和 Annexin V 流式细胞术检测 IL-1 和 4OI 处理小鼠髓核细胞凋亡情况。与 Ctrl 组比* $P<0.05$ 。与 IL-1 组比# $P<0.05$ 。

Figure 4. 4OI inhibited IL1-induced apoptosis of mouse intervertebral disc nucleus pulposus cells. 4a: CCK-8 method was used to detect the change of survival rate of nucleus pulposus cells treated with IL-1 and 4OI; 4b: LDH changes in the cells treated with IL-1 and 4OI were detected by LDH ELISA; 4c: The death of nucleus pulposus cells in intervertebral discs treated with IL-1 and 4OI was detected by Trypan staining; 4d~4g: IL-1 and 4OI treated the activity changes of Caspase-3 (D) and Caspase-9 (E) in mouse nucleus pulposus cells; The change of Clvd-PARP1 protein expression (F) and cytochrome C content (G); 4h, 4i: Apoptosis of nucleus pulposus cells treated with IL-1 and 4OI was detected by TUNEL staining (H) and Annexin V flow cytometry (I). Compared with Ctrl group * $P<0.05$, compared with IL-1 group, # $P<0.05$.

2.4 Nrf2 沉默后 4OI 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞损伤的影响

采用慢病毒 shRNA 和 Crispr Cas9 技术分别构建敲减和敲除 Nrf2 的小鼠髓核细胞稳定细胞株 (shNrf2

和 koNrf2), shNrf2 和 koNrf2 细胞中 Nrf2 下游基因 NQO1 和 HO1 表达显著降低, 而 Nrf2 的偶联蛋白 Keap1 则无明显变化 (图 5a)。4OI 和 IL-1 处理 shNrf2 和 koNrf2 细胞结果发现, IL-1 诱导的 shNrf2

和 koNrf2 细胞中，细胞活力下降，LDH 和细胞色素 C 含量增加，这提示在沉默 Nrf2 细胞中，IL-1 仍然可诱导细胞凋亡；但是 4OI 不能逆转 IL-1 诱导这些

细胞损伤（图 5b~5d），这说明 4OI 抑制 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞损伤依赖于 Nrf2。

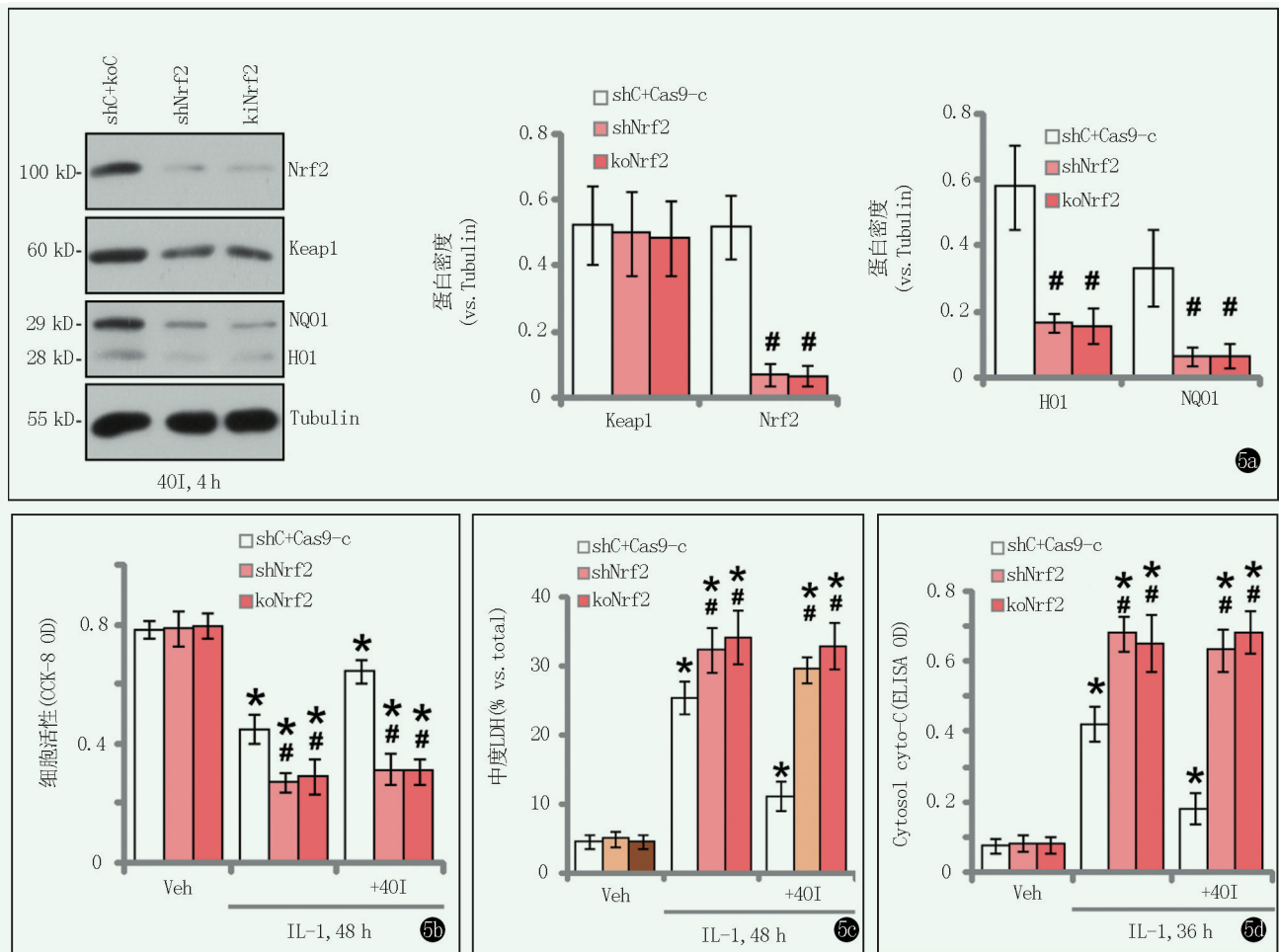


图 5. 4OI 抑制 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞损伤依赖于 Nrf2。5a：利用慢病毒 shRNA 和 Crispr Cas9 技术分别构建 Nrf2 敲减 (shNrf2) 和敲除 (koNrf2) 小鼠髓核细胞，WB 检测 Nrf2、Keap1 及其下游 NQO1 和 HO1 表达变化；5b~5d：4OI 和 IL-1 处理 shNrf2 和 koNrf2 细胞，检测细胞活性、LDH 含量和细胞色素 C 含量，与 Veh 组比* $P<0.05$ ，与 shC+Cas9-C 组比# $P<0.05$ 。

Figure 5. 4OI inhibited IL-1-induced mouse intervertebral disc nucleus pulposus cell damage dependent on Nrf2. 5a: Nrf2 knockout (shNrf2) and knockout (koNrf2) mouse nucleus pulposus cells were constructed by lentivirus shRNA and Crispr Cas9 techniques, respectively, and the expression changes of Nrf2, Keap1 and its downstream NQO1 and HO1 were detected by WB; 5b~5d: shNrf2 and koNrf2 cells were treated with 4OI and IL-1 to detect cell activity (B), LDH content (C) and cytochrome C content (D), compared with Veh group * $P<0.05$, compared with shC+Cas9-C group # $P<0.05$.

2.5 Keap1 沉默后 4OI 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞损伤的影响

采用慢病毒 shRNA 构建敲减 Keap1 的小鼠髓核细胞稳定细胞株 (shKeap1)，shKeap1 细胞中 Keap1 mRNA 和蛋白水平显著降低，Nrf2 mRNA 无明显变化，而蛋白水平显著增加，Nrf2/Keap1 下游基因 HO1 和 NQO1 mRNA 及蛋白水平均显著上升；4OI 处理与无 4OI 处理 shKeap1 细胞中 Nrf2、Keap1、HO1 和 NQO1 变化一致。这表明 Keap1 的敲减，使其与 Nrf2 的偶联减少，使得更多的 Nrf2 得以进入细胞核，激

活下游基因表达（图 6a~6c）。4OI 和 IL-1 处理 shKeap1 细胞结果发现，与 shC 对照组比，IL-1 诱导的 shKeap1 细胞活力增强，LDH 和细胞色素 C 含量下降；然而 4OI 不能逆转 IL-1 诱导的这些现象（图 6d~6f），这些结果再次表明 4OI 抑制 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞凋亡依赖于 Nrf2，而不是 Keap1。

3 讨论

IDD 是引发多种肌肉骨骼和脊柱疾病的首要因

素^[9, 10]。本研究聚焦于 4OI 对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞氧化损伤的保护作用，揭示了 4OI 作为一种新型

抗炎代谢物，通过激活 Nrf2 途径抑制炎症和氧化应激，为 IDD 治疗提供了新思路。

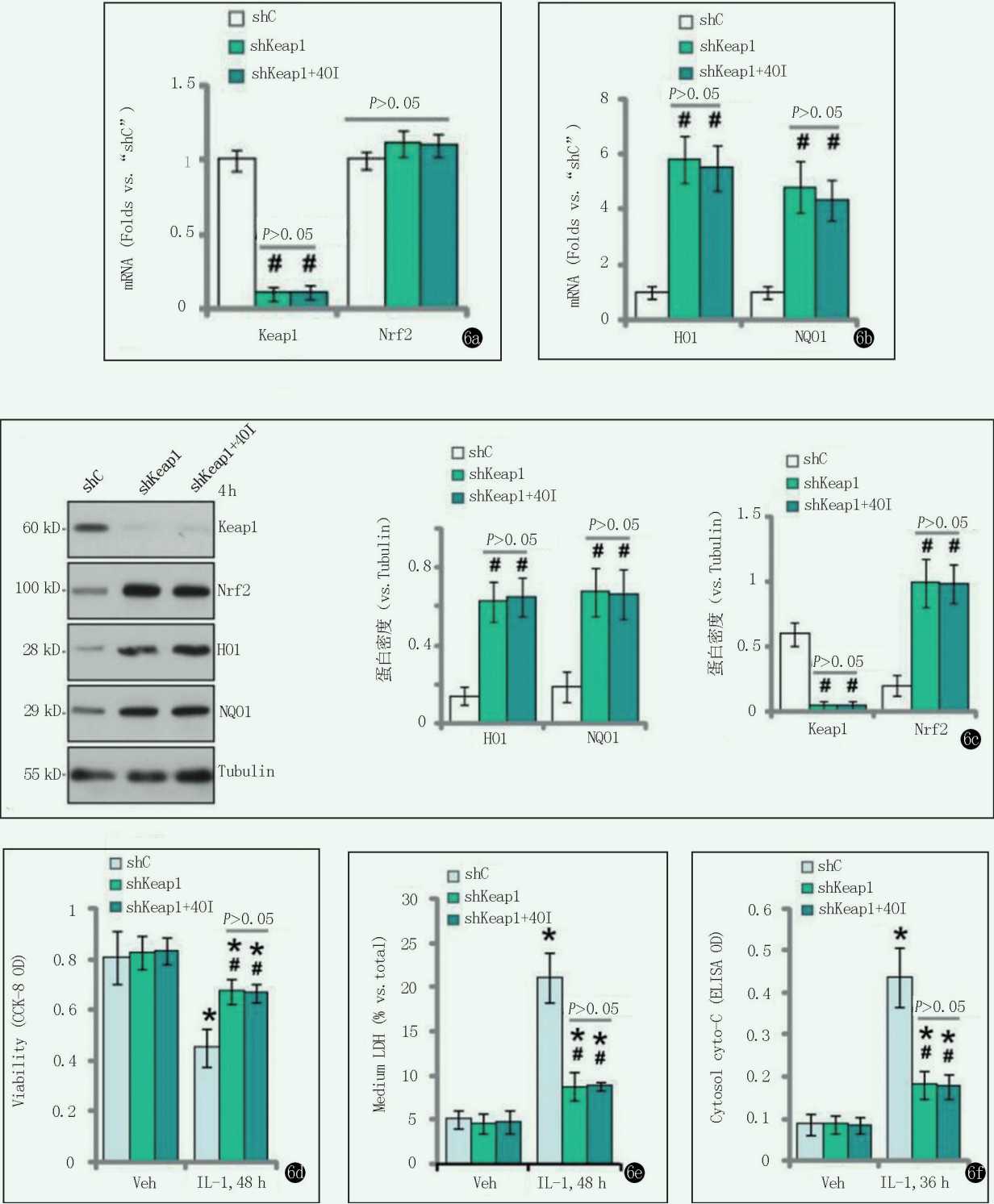


图 6. 4OI 不能抵消 Keap1 沉默对 IL-1 诱导的小鼠髓核细胞凋亡的影响。6a~6c: 利用慢病毒 shRNA 技术构建 Keap1 敲减 (shNrf2) 小鼠髓核细胞株，检测 Nrf2、Keap1 及其下游 NQO1 和 HO1 mRNA 和蛋白表达变化；6d~6f: 4OI 和 IL-1 处理 shKeap1 细胞，检测细胞活性、LDH 含量和细胞色素 C 含量变化。与 Veh 组比* $P<0.05$ ；与 shC+Cas9-C 组比# $P<0.05$ 。

Figure 6. 4OI could not counteract the effect of Keap1 silencing on IL-1-induced apoptosis of mouse nucleus pulposus cells. 6a~6c: lentivirus shRNA technique was used to construct Keap1 knockdown (shNrf2) mouse nucleus pulposus cells, and the mRNA (A-B) and protein (C) expression changes of Nrf2, Keap1 and its downstream NQO1 and HO1 were detected; 6d~6f: shKeap1 cells treated with 4OI and IL-1 were detected the changes of cell activity (D), LDH content (E) and cytochrome C content (F), compared with Veh group * $P<0.05$; compared with shC+Cas9-C group # $P<0.05$.

氧化应激在IDD的发病机制中扮演着重要角色^[11],活性氧(ROS)和抗氧化剂之间的平衡对维持髓核细胞的正常功能和存活至关重要。IL-1作为炎症级联反应的关键启动子,可能通过诱导IL-6、IL-8和IL-17的产生而发挥作用^[12, 13]。本研究发现IL-1能够显著增加小鼠髓核细胞ROS,从而加剧氧化应激。这一发现与先前的研究结果一致^[14]。ROS的过量积累对细胞的核酸、脂质、蛋白质等大分子造成损害,影响细胞的正常活动和功能,最终导致细胞衰老或死亡。因此,IL-1诱导的氧化应激是IDD进展的一个重要因素^[15]。本研究结果发现4OI能够显著下调IL-1诱导的ROS水平。此外,ROS不仅对组织造成损伤,还可能损害细胞器。使用JC-1检测线粒体膜电位的变化,结果显示4OI能够在一定程度上缓解IL-1对线粒体膜电位的应激影响,但仍未能完全恢复至正常水平。ROS还能对细胞内的遗传物质DNA造成不可逆的伤害。通过ssDNA ELISA检测,发现4OI一定程度上可减少短单链DNA的产生,提示4OI可减轻氧化应激引起的DNA损伤。这些发现进一步证实了4OI改善氧化应激治疗IDD方面的巨大潜力。

IDD主要病理改变包括髓核细胞的凋亡和细胞外基质(ECM)的降解细胞凋亡^[16]。ROS的积累可以导致髓核细胞凋亡和ECM降解。氧化应激通过激活NF- κ B通路导致细胞凋亡,从而在IDD中发挥作用^[17]。本研究发现4OI能够显著抑制IL-1诱导的小鼠髓核细胞凋亡。4OI的抗氧化作用可能有助于减轻氧化应激对NP细胞的损伤,从而抑制细胞凋亡。这一发现与已有的研究结果相一致,即4OI通过激活Nrf2信号通路,增强抗氧化反应元件报告基因的活性,并促进Nrf2依赖基因的表达,从而抑制氧化损伤和细胞凋亡^[18]。与本研究不同之处在于,Zheng等^[18]研究发现4OI预处理能够抑制H₂O₂诱导的成骨细胞中活性氧的产生、细胞死亡和细胞凋亡。本研究发现4OI显著抑制了IL-1诱导的Caspase-3和Caspase-9活性增加,以及PARP1裂解片段和细胞色素C含量增加,从而显著抑制了IL-1诱导的细胞凋亡。这些结果表明,4OI可能通过调节与线粒体性凋亡相关的信号通路来保护髓核细胞免受IL-1诱导的损伤。

Nrf2通路参与线粒体介导的细胞凋亡^[19]。本研究发现4OI显著增强Nrf2下游基因ARE和NQO1的表达活性,且无细胞毒性,这提示4OI发挥抗氧化作用与Nrf2通路有关。Hu等^[20]研究表明4OI通过激

活Nrf2通路防止氧化应激诱导的肝损伤。Nrf2/Keap1系统在调节抗氧化和细胞保护基因表达中具有关键作用^[21]。在正常生理状态下,Nrf2的活性受到Keap1的严格调控,Keap1通过介导Nrf2在细胞质中的泛素化依赖性蛋白酶体降解来维持其低水平。然而,在氧化应激条件下,Keap1发生构象变化,释放Nrf2,使得Nrf2能够转位至细胞核,并启动多个抗氧化基因的转录^[22-24]。本团队的Co-IP实验证实,4OI处理小鼠髓核细胞1h后,细胞质中Keap1与Nrf2的复合物减少,表明4OI处理促进了Keap1与Nrf2的解离,从而避免部分Nrf2被Keap1介导的泛素化和蛋白酶体降解。这一现象得到了蛋白酶体抑制剂MG-132和蛋白质合成抑制剂CHX处理的进一步证实。未降解的Nrf2激活了下游抗氧化基因HO1、GCLC和NQO1的转录,解释了4OI处理为何能显著增强Nrf2下游基因的表达。慢病毒介导的shRNA和CRISPR/Cas9挽救实验也证实4OI通过调控Keap1-Nrf2通路减轻氧化应激。

综上所述,4OI通过促进Nrf2与Keap1的解偶联,使Nrf2得以聚集并转位进入细胞核,增强下游抗氧化基因的转录,从而挽救了IL-1对小鼠髓核细胞造成的损伤。这些发现为4OI在预防和治疗IDD中的作用提供了有力的科学依据。本研究的创新之处在于揭示了4OI在IDD治疗中的潜在机制,为未来的临床应用奠定了基础。

利益冲突声明 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 王帅: 酝酿和设计实验、实施研究、数据采集分析及解释、起草文章、统计分析;陈维杨: 酝酿和设计实验、实施研究、数据采集分析及解释、起草文章、统计分析;季峰: 酝酿和设计实验、分析及解释数据、文章审阅、获取研究经费、行政及技术或材料支持、指导、支持性贡献;王守国: 酝酿和设计实验、文章审阅、获取研究经费、行政及技术或材料支持、指导、支持性贡献

参考文献

- [1] 苑珍珍,杨召,许海委. 中药抑制椎间盘退变的分子机制研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2022, 30(1): 44-47. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.01.08.
Yuan ZZ, Yang Z, Xu HW. Molecular mechanism of traditional Chinese medicine in the inhibition of intervertebral disc degeneration [J]. Orthopedic Journal of China, 2022, 30(1): 44-47. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.01.08.
- [2] Li Y, Chen L, Gao Y, et al. Oxidative stress and intervertebral disc degeneration: Pathophysiology, signaling pathway, and therapy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1984742. DOI: 10.1155/2022/1984742.
- [3] Wang DK, Zheng HL, Zhou WS, et al. Mitochondrial dysfunction

- in oxidative stress-mediated intervertebral disc degeneration [J]. *Orthop Surg*, 2022, 14 (8) : 1569-1582. DOI: 10.1111/os.13302.
- [4] Xu L, Cai J, Li C, et al. 4-Octyl itaconate attenuates LPS-induced acute kidney injury by activating Nrf2 and inhibiting STAT3 signaling [J]. *Mol Med*, 2023, 29 (1) : 58. DOI: 10.1186/s10020-023-00631-8.
- [5] Mills EL, Ryan DG, Prag HA, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1 [J]. *Nature*, 2018, 556 (7699) : 113-117. DOI: 10.1038/nature25986.
- [6] Zhang H, Liu Y, Yu B, et al. An optimized TRIzol-based method for isolating RNA from adipose tissue [J]. *Biotechniques*, 2023, 74 (5) : 203-209. DOI: 10.2144/btn-2022-0120.
- [7] Wang Q, Han W, Ma C, et al. Western blot normalization: Time to choose a proper loading control seriously [J]. *Electrophoresis*, 2023, 44 (9-10) : 854-863. DOI: 10.1002/elps.202200222.
- [8] Tam E, Sung HK, Lam NH, et al. Role of mitochondrial iron overload in mediating cell death in H9c2 cells [J]. *Cells*, 2022, 12 (1) : 118. DOI: 10.3390/cells12010118.
- [9] Peng Z, Wang Z, Guo S, et al. An analysis of the transcriptional landscape in hypoxia-treated primary nucleus pulposus cells [J]. *Genes Dis*, 2023, 11 (2) : 558-560. DOI: 10.1016/j.gendis.2023.04.009.
- [10] Li Y, Zhang H, Zhu D, et al. Notochordal cells: A potential therapeutic option for intervertebral disc degeneration [J]. *Cell Prolif*, 2024, 57 (2) : e13541. DOI: 10.1111/cpr.13541.
- [11] Cao G, Yang S, Cao J, et al. The role of oxidative stress in intervertebral disc degeneration [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2166817. DOI: 10.1155/2022/2166817.
- [12] Kang L, Zhang H, Jia C, et al. Targeting oxidative stress and inflammation in intervertebral disc degeneration: Therapeutic perspectives of phytochemicals [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 956355. DOI: 10.3389/fphar.2022.956355.
- [13] 薛忠书, 张小伟, 陈宁杰. 白细胞介素在椎间盘退变中的作用 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2023, 31 (4) : 341-345. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2023.04.11.
- Xue ZS, Zhang XW, Chen NJ. Role of interleukin in intervertebral disc degeneration [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2023, 31 (4) : 341-345. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2023.04.11.
- [14] 周豪, 陈涛, 吴爱悯. 氧化应激对线粒体功能及椎间盘细胞的影响 [J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2024, 55 (2) : 249-255. DOI: 10.12182/20240360201.
- Zhou H, Chen T, Wu AM. Effects of oxidative stress on mitochondrial functions and intervertebral disc cells [J]. *Acta Sichuan University (Medical Science)*, 2024, 55 (2) : 249-255. DOI: 10.12182/20240360201.
- [15] Wang Y, Cheng H, Wang T, et al. Oxidative stress in intervertebral disc degeneration: Molecular mechanisms, pathogenesis and treatment [J]. *Cell Prolif*, 2023, 56 (9) : e13448. DOI: 10.1111/cpr.13448.
- [16] Zhang XB, Hu YC, Cheng P, et al. Targeted therapy for intervertebral disc degeneration: inhibiting apoptosis is a promising treatment strategy [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18 (13) : 2799-2813. DOI: 10.7150/ijms.59171.
- [17] 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, 15 (19) : 1788-1792. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2017.19.12.
- Tong T, Lei T, Shen Y. Molecular mechanism of apoptosis in intervertebral disc degeneration [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2017, 15 (19) : 1788-1792. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2017.19.12.
- [18] Zheng Y, Chen Z, She C, et al. Four-octyl itaconate activates Nrf2 cascade to protect osteoblasts from hydrogen peroxide-induced oxidative injury [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (9) : 772. DOI: 10.1038/s41419-020-02987-9.
- [19] Lu Y, Wei W, Li M, et al. The USP11/Nrf2 positive feedback loop promotes colorectal cancer progression by inhibiting mitochondrial apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15 (12) : 873. DOI: 10.1038/s41419-024-07188-2.
- [20] Hu Z, Xu D, Meng H, et al. 4-octyl itaconate protects against oxidative stress-induced liver injury by activating the Nrf2/Sirt3 pathway through AKT and ERK1/2 phosphorylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 220: 115992. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115992.
- [21] Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation [J]. *Life Sci*, 2022, 291: 120111. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120111.
- [22] Suzuki T, Takahashi J, Yamamoto M. Molecular basis of the KEAP1-NRF2 signaling pathway [J]. *Mol Cells*, 2023, 46 (3) : 133-141. DOI: 10.14348/molcells.2023.0028.
- [23] Wang Y, Wang S, Ma C, et al. Nrf2 depletion enhanced curcumin therapy effect in gastric cancer by inducing the excessive accumulation of ROS [J]. *Sci Rep*, 2024, 14 (1) : 30165. DOI: 10.1038/s41598-024-81375-1.
- [24] Iegre J, Krajcovicova S, Gunnarsson A, et al. A cell-active cyclic peptide targeting the Nrf2/Keap1 protein-protein interaction [J]. *Chem Sci*, 2023, 14 (39) : 10800-10805. DOI: 10.1039/d3sc04083f.

(收稿:2024-11-05 修回:2025-01-26)

(同行评议专家: 赵加力, 王新宏, 胡小吾)

(本文编辑: 闫承杰)