

• 实验研究 •

羟基红花黄色素 A 对白细胞介素-1 β 诱导的
髓核细胞凋亡和炎症反应的影响机制探讨白龙¹ 赵泽恪¹ 王明源¹ 温静^{2△}

[摘要] 目的:探讨羟基红花黄色素 A(HSYA)对白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导的髓核细胞(NPC)凋亡和炎症反应及核转录因子- κ B(NF- κ B)/NOD样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路的影响。方法:将髓核细胞随机分为正常(CK)组、髓核细胞(Model)组(10 ng/mL IL-1 β 处理)、低剂量羟基红花黄色素 A(L-HSYA)组(10 ng/mL IL-1 β +25 μ mol/L HSYA)、中剂量羟基红花黄色素 A(M-HSYA)组(10 ng/mL IL-1 β +50 μ mol/L HSYA)、高剂量羟基红花黄色素 A(H-HSYA)组(10 ng/mL IL-1 β +100 μ mol/L HSYA)、H-HSYA+NF- κ B激活剂脂多糖(LPS)(H-HSYA+LPS)组(10 ng/mL IL-1 β +100 μ mol/L HSYA+4.0 μ g/mL LPS)。流式细胞术、Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡,CCK-8 法、ELISA 法及 Western Blot 分别检测细胞活性、TNF- α 、IL-6、IL-8、NO 水平以及 COX-2、iNOS、Bax、Bcl-2、Caspase-3、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达。结果:与正常组比较,髓核细胞组细胞光密度(OD)值、Bcl-2 蛋白表达降低,凋亡率、TNF- α 、IL-6、IL-8、NO 水平、COX-2、iNOS、Bax、Caspase-3、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达升高($P<0.05$);与髓核细胞组比较,L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA组 OD 值、Bcl-2 蛋白表达升高,凋亡率、TNF- α 、IL-6、IL-8、NO 水平、COX-2、iNOS、Bax、Caspase-3、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达降低($P<0.05$);与 H-HSYA 组比较,H-HSYA+LPS 组 OD 值、Bcl-2 蛋白表达降低,凋亡率、TNF- α 、IL-6、IL-8、NO 水平、COX-2、iNOS、Bax、Caspase-3、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达升高($P<0.05$)。结论:羟基红花黄色素 A 可能通过抑制 NF- κ B/NLRP3 信号通路进而减轻 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡和炎症反应。

[关键词] 羟基红花黄色素 A;核转录因子- κ B/NOD 样受体蛋白 3 信号通路;白细胞介素-1 β ;髓核细胞;凋亡;炎症反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)10-0008-07

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.251002

The Mechanism Explore for Hydroxysafflor Yellow A on Apoptosis and Inflammatory Response of Nucleus Pulposus Cells Induced by Interleukin-1 β

BAI Long¹ ZHAO Zeke¹ WANG Mingyuan¹ WEN Jing^{2△}

¹ Taiyuan Traditional Chinese Medicine Hospital, Taiyuan 030009, China;

² Jinzhong First People's Hospital, Jinzhong 030600, Shanxi China.

Abstract Objective: To investigate the effects of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on interleukin-1 β (IL-1 β)-induced apoptosis and inflammatory response of nucleus pulposus cells (NPCs), as well as the nuclear factor- κ B (NF- κ B)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) signaling pathway. **Methods:** NPCs stochastically divided into normal (CK) group, NPC (Model) group (treated with 10 ng/mL IL-1 β), low-dose HSYA (L-HSYA) group (10 ng/mL IL-1 β + 25 μ mol/L HSYA), medium dose HSYA (M-HSYA) group (10 ng/mL IL-1 β + 50 μ mol/L HSYA), high-dose HSYA (H-HSYA) group (10 ng/mL IL-1 β + 100 μ mol/L HSYA), and H-HSYA+NF- κ B activator Lipopolysaccharide (LPS) (H-HSYA+LPS) group (10 ng/mL IL-1 β + 100 μ mol/L HSYA + 4.0 μ g/mL LPS). Detect cell apoptosis by flow cytometry and Hoechst 33258 staining, CCK-8 method, ELISA method, and Western Blot were performed to detect cell viability, TNF- α , IL-6, IL-8, NO levels, and COX-2, iNOS, Bax, Bcl-2,

¹ 太原市中医医院(太原,030009)

² 晋中市第一人民医院

[△]通信作者 E-mail:13753149630@163.com

Caspase-3, p-NF- κ B p65, NF- κ B p65, and NLRP3 protein expression. **Results:** Compared with CK group, the OD value and Bcl-2 protein expression were lower in Model group, while the apoptosis rate, TNF- α , IL-6, IL-8, NO levels, COX-2, iNOS, Bax, Caspase-3, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, and NLRP3 protein expression were higher ($P < 0.05$). Compared with Model group, the OD value and Bcl-2 protein expression were higher in L-HSYA, M-HSYA, and H-HSYA groups, while the apoptosis rate, TNF- α , IL-6, IL-8, NO levels, COX-2, iNOS, Bax, Caspase-3, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, and NLRP3 protein expression were lower ($P < 0.05$). Compared with H-HSYA group, the OD value and Bcl-2 protein expression were lower in H-HSYA+LPS group, while the apoptosis rate, TNF- α , IL-6, IL-8, NO levels, COX-2, iNOS, Bax, Caspase-3, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, and NLRP3 protein expression were higher ($P < 0.05$). **Conclusion:** HSYA may alleviate IL-1 β -induced NPC apoptosis and inflammatory response by inhibiting NF- κ B/NLRP3 signaling pathway.

Keywords: hydroxysafflor yellow A; NF- κ B/NLRP3 signaling pathway; IL-1 β ; nucleus pulposus cells; apoptosis; inflammatory response

临床上腰痛极为常见,全球至少 80% 的人曾经历过^[1],椎间盘退变(Intervertebral Disc Degeneration, IDD)是其主要病因^[2],其发生发展与髓核细胞(Nucleus Pulposus Cell, NPC)过度凋亡、炎症等相关^[3]。白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)等炎症因子上调推动椎间盘退变进程^[4]。目前椎间盘退变相关腰痛治疗缺乏特效药,寻找抑制髓核细胞凋亡和炎症的药物意义重大。羟基红花黄色素 A(Hydroxysafflor Yellow A, HSYA)有抗凋亡、抗炎等作用^[5-6],且能调节核转录因子- κ B(Nuclear Factor κ B, NF- κ B)/NOD 样受体蛋白 3(NOD-like Receptor Protein 3, NLRP3)通路^[7]。本研究探究羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡和炎症反应的影响,分析其机制是否与 NF- κ B/NLRP3 通路有关,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 髓核细胞(赛百慷,货号为 LY0104)。

1.1.2 实验主要试剂 DMEM 培养基(益普,货号为 PM150210),羟基红花黄色素 A(碧云天, SM2009),脂多糖(LPS,伊塔,货号为 YT1319),TNF- α ELISA 试剂盒(优利科,货号为 YLK1341E),白细胞介素(Interleukin, IL) 6 ELISA 试剂盒(普健,货号为 ATK00014),IL-8 ELISA 试剂盒(酶研,货号为 EK-H10356),一氧化氮(Nitric Oxide, NO)ELISA 试剂盒(科艾博,货号为 CB11614-Hu),环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、Bax、Bcl-2、Caspase-3、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、NLRP3、GAPDH 抗体及 IgG 二抗(Abcam, ab188183、ab283655、ab270742、ab218123、ab197202、ab239882、ab307839、ab283819、ab110305、ab205718)。

1.1.3 实验主要仪器 离心机(知信,型号为 SL02),流式细胞仪(Cytek Biosciences,型号为 NL-CLC 1L-3L),凝胶成像仪(UVItect,型号为 SilverUVIpro),酶

标仪(赛默飞,型号为 Multiskan SkyHigh)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取髓核细胞进行复苏后,加入含有 10% 血清的 DMEM 培养基中,并置于培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中培养,用胰蛋白酶进行消化及传代,进行实验研究。

1.2.2 髓核细胞退变模型构建及分组 将髓核细胞进行随机分组。1)正常组:髓核细胞在正常培养基中培养。2)髓核细胞组:髓核细胞在加入 10 ng/mL 的 IL-1 β 培养基中培养^[8]。3)低剂量羟基红花黄色素 A(L-HSYA)组:在 10 ng/mL IL-1 β 的基础上,加入 25 μ mol/L 羟基红花黄色素 A^[9] 培养髓核细胞。4)中剂量羟基红花黄色素 A(M-HSYA)组:在 10 ng/mL IL-1 β 的基础上,加入 50 μ mol/L 羟基红花黄色素 A^[10] 培养髓核细胞。5)高剂量羟基红花黄色素 A(H-HSYA)组:在 10 ng/mL IL-1 β 的基础上,加入 100 μ mol/L 羟基红花黄色素 A^[10] 培养髓核细胞。6)H-HSYA+NF- κ B 激活剂 LPS(H-HSYA+LPS)组:在 10 ng/mL IL-1 β 的基础上,加入 100 μ mol/L 羟基红花黄色素 A 和 4.0 μ g/mL LPS^[11] 共同培养髓核细胞。

1.2.3 CCK-8 实验细胞活性检测 收集各组处理后的髓核细胞,调整细胞浓度,以 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 下贴壁孵育 24 h,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L,室温黑暗条件下孵育 120 min,检测 OD_{450 nm}。

1.2.4 流式细胞术、Hoechst 33258 染色细胞凋亡检测 流式细胞术:对各组处理后的髓核细胞进行收集,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,离心半径为 9 cm,2 000 r/min 离心 5 min,按照试剂盒说明书操作,先加入 AnnexinV-FITC 5 μ L 混合均匀,再加入 10 μ L 碘化丙啶(PI)进行混合,黑暗条件下充分反应 10 min。用流式细胞仪对细胞凋亡进行观察、检测。Hoechst 33258 染色:收集各组细胞,根据 Hoechst 33258 染色

试剂盒说明书对细胞染色,荧光显微镜观察,随机选取不同视野统计凋亡细胞数,并计算细胞凋亡率。

1.2.5 ELISA 检测细胞中 TNF- α 、IL-6、IL-8、NO 水平 收集各组髓核细胞,4℃下 4 000 r/min 离心 8 min,离心半径为 12 cm,收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-6、IL-8、NO 水平。

1.2.6 Western Blot 法检测 COX-2、iNOS、Bax、Bcl-2、Caspase-3、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、NLRP3 蛋白的表达水平 收集各组细胞对总蛋白进行提取,二辛可宁酸(BCA)试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离等量的蛋白样品,印迹到聚偏二氯乙烯(PVDV)膜上封闭 2 h。随后在 4℃下膜与一抗 COX-2、iNOS、Bax、Bcl-2、Caspase-3、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、NLRP3、GAPDH 结合 24 h,洗膜,37℃下与二抗反应 2 h。用 Image Lab™ 定量蛋白条带,以目标蛋白灰度值与内参灰度值的比值作为相对表达量。

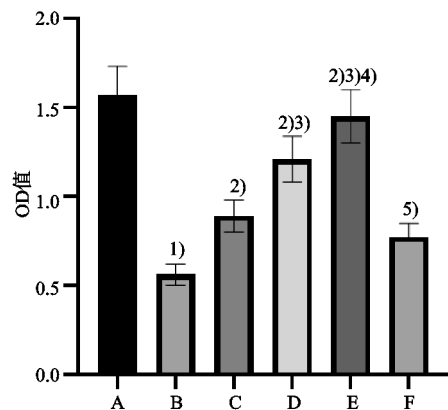
1.3 统计学方法

用 SPSS 25.0 软件分析数据。用 Shapiro-Wilk 检验对所有数据进行正态性检验, $P<0.05$ 则判定数据符合正态分布,表示为 $\bar{x}\pm s$ 形式,符合正态分布且方差齐的数据,多组间比较用单因素方差分析,多组间两两比较用 SNK- q 检验校正。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞活性的影响

羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞活性的影响见图 1 和表 1。髓核细胞组较正常组细胞光密度(OD)值降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与髓核细胞组相比,L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA 组细胞 OD 值逐渐升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H-HSYA 组相比,H-HSYA+LPS 组细胞 OD 值降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。



注: A-正常组; B-髓核细胞组; C-L-HSYA组; D-M-HSYA组; E-H-HSYA组; F-H-HSYA+LPS组(下同)

图 1 羟基红花黄色素 A 对细胞活性的影响

表 1 羟基红花黄色素 A 对细胞活性的影响($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	OD 值
正常组	1.57±0.16
髓核细胞组	0.56±0.06 ¹⁾
L-HSYA 组	0.89±0.09 ²⁾
M-HSYA 组	1.21±0.13 ²⁾³⁾
H-HSYA 组	1.45±0.15 ²⁾³⁾⁴⁾
H-HSYA+LPS 组	0.77±0.08 ⁵⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与髓核细胞组相比, $P<0.05$;3)与 L-HSYA 组相比, $P<0.05$;4)与 M-HSYA 组相比, $P<0.05$;5)与 H-HSYA 组相比, $P<0.05$ 。

2.2 羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡的影响

羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡的影响见表 2 和图 2-图 4。髓核细胞组与正常组比较,细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$);L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA 组与髓核细胞组比较,细胞凋亡率逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$);H-HSYA+LPS 组与 H-HSYA 组比较,细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 羟基红花黄色素 A 对细胞凋亡率的影响($n=6, \bar{x}\pm s, \%$)

组别	流式细胞术	Hoechst 33258 染色
正常组	8.26±0.87	3.67±0.42
髓核细胞组	35.37±3.62 ¹⁾	39.58±4.06 ¹⁾
L-HSYA 组	26.11±2.71 ²⁾	28.53±2.96 ²⁾
M-HSYA 组	17.36±1.81 ²⁾³⁾	19.42±2.03 ²⁾³⁾
H-HSYA 组	10.98±1.12 ²⁾³⁾⁴⁾	8.31±0.92 ²⁾³⁾⁴⁾
H-HSYA+LPS 组	30.64±3.09 ⁵⁾	32.71±3.36 ⁵⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与髓核细胞组相比, $P<0.05$;3)与 L-HSYA 组相比, $P<0.05$;4)与 M-HSYA 组相比, $P<0.05$;5)与 H-HSYA 组相比, $P<0.05$ 。

2.3 羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞炎症指标的影响

羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞炎症指标的影响见图 5 和表 3。与正常组比较,髓核细胞组 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与髓核细胞组相比,L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA 组 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);H-HSYA+LPS 组 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平较 H-HSYA 组升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞中 COX-2、iNOS 蛋白表达及上清液中 NO 水平的影响

羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞中 COX-2、iNOS 蛋白表达及上清液中 NO 水平的影响见

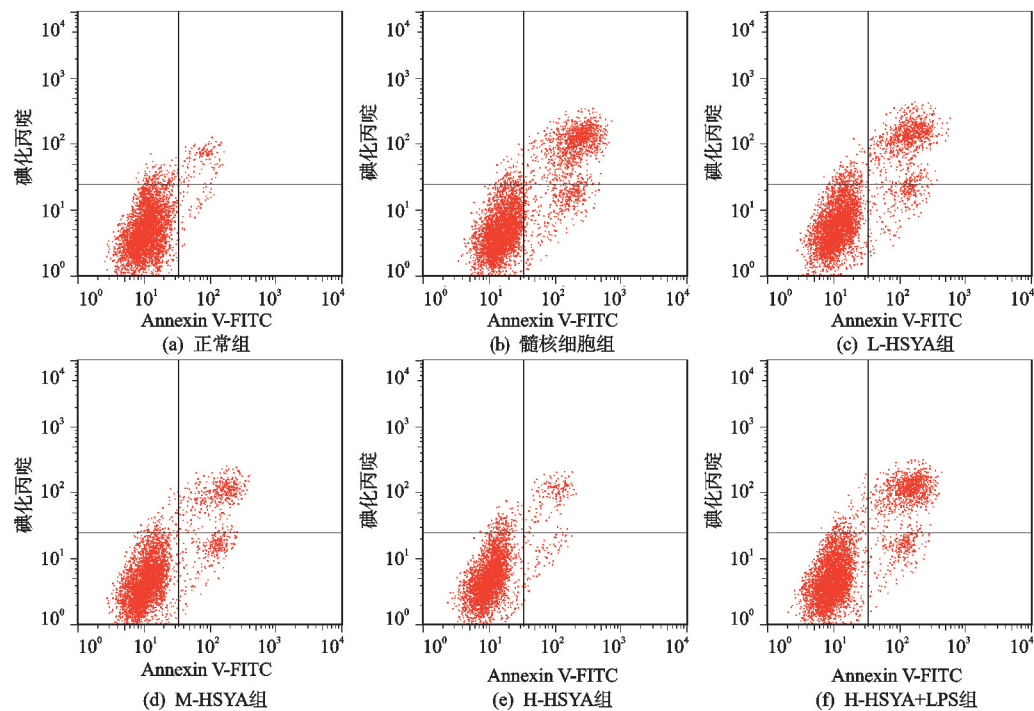


图 2 细胞凋亡检测(流式细胞术)

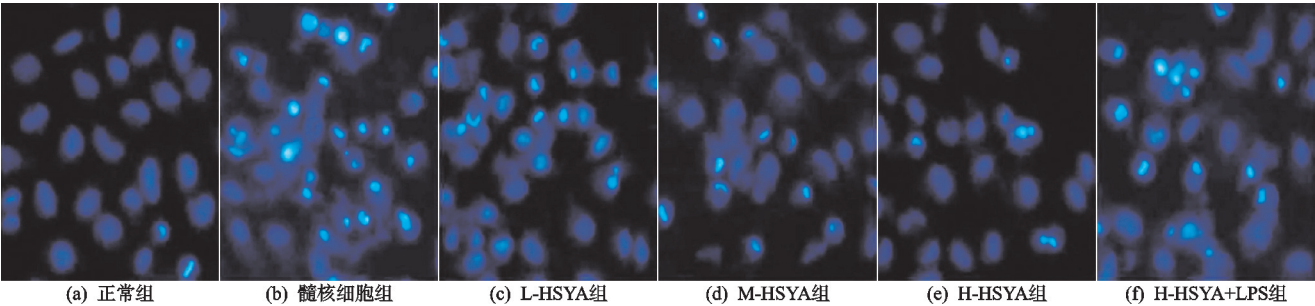


图 3 细胞凋亡检测(Hoechst 33258 染色,×400)

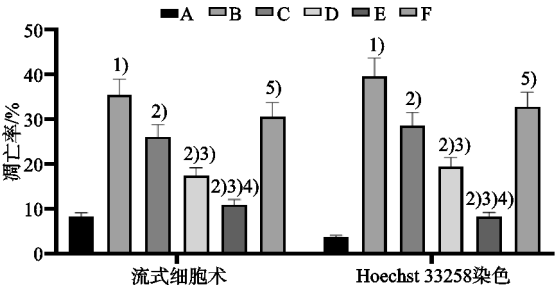


图 4 羟基红花黄色素 A 对细胞凋亡率的影响

图 6-图 8 和表 4。髓核细胞组与正常组比较,COX-2、iNOS 蛋白表达及 NO 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA 组与髓核细胞组比较,COX-2、iNOS 蛋白表达及 NO 水平逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$);H-HSYA+LPS 组与 H-HSYA 组比较,COX-2、iNOS 蛋白表达及 NO 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

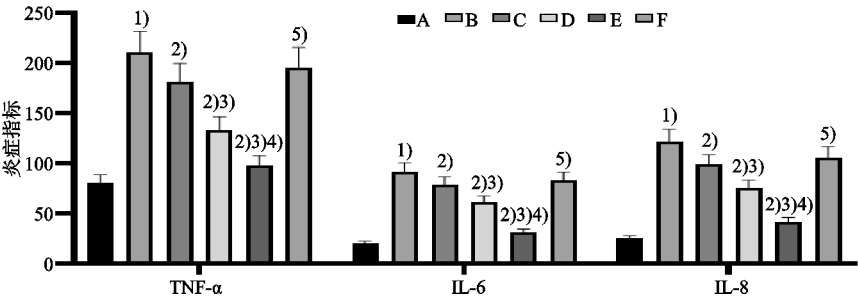


图 5 羟基红花黄色素 A 对炎症反应的影响

表 3 羟基红花黄色素 A 对炎症反应的影响($n=6, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-6	IL-8
正常组	80.23 $\pm$ 8.12	20.33 $\pm$ 2.11	25.16 $\pm$ 2.63
髓核细胞组	210.37 $\pm$ 21.36 ¹⁾	91.27 $\pm$ 9.23 ¹⁾	121.53 $\pm$ 12.57 ¹⁾
L-HSYA 组	181.24 $\pm$ 18.52 ²⁾	78.63 $\pm$ 7.98 ²⁾	98.62 $\pm$ 9.95 ²⁾
M-HSYA 组	132.65 $\pm$ 13.65 ²⁾³⁾	61.45 $\pm$ 6.25 ²⁾³⁾	75.32 $\pm$ 7.68 ²⁾³⁾
H-HSYA 组	97.56 $\pm$ 9.87 ²⁾³⁾⁴⁾	31.06 $\pm$ 3.19 ²⁾³⁾⁴⁾	41.59 $\pm$ 4.31 ²⁾³⁾⁴⁾
H-HSYA+LPS 组	195.63 $\pm$ 19.83 ⁵⁾	82.67 $\pm$ 8.32 ⁵⁾	105.37 $\pm$ 11.28 ⁵⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与髓核细胞组相比, $P<0.05$;3)与 L-HSYA 组相比, $P<0.05$;4)与 M-HSYA 组相比, $P<0.05$;5)与 H-HSYA 组相比, $P<0.05$ 。

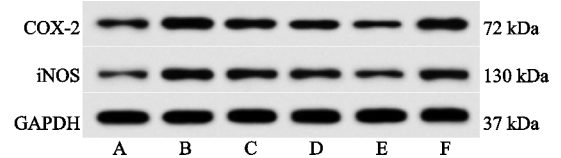


图 6 Western Blot 检测髓核细胞中 COX-2 和 iNOS 蛋白表达

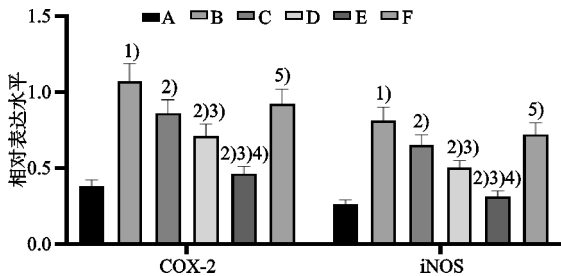


图 7 羟基红花黄色素 A 对细胞中 COX-2 和 iNOS 蛋白表达的影响

表 4 羟基红花黄色素 A 对细胞中 COX-2、iNOS 蛋白表达及上清液中 NO 水平的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	COX-2/GAPDH	iNOS/GAPDH	NO/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
正常组	0.38 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03	81.26 $\pm$ 8.21
髓核细胞组	1.07 $\pm$ 0.12 ¹⁾	0.81 $\pm$ 0.09 ¹⁾	236.27 $\pm$ 23.85 ¹⁾
L-HSYA 组	0.86 $\pm$ 0.09 ²⁾	0.65 $\pm$ 0.07 ²⁾	207.51 $\pm$ 21.72 ²⁾
M-HSYA 组	0.71 $\pm$ 0.08 ²⁾³⁾	0.50 $\pm$ 0.05 ²⁾³⁾	153.27 $\pm$ 15.74 ²⁾³⁾
H-HSYA 组	0.46 $\pm$ 0.05 ²⁾³⁾⁴⁾	0.31 $\pm$ 0.04 ²⁾³⁾⁴⁾	101.36 $\pm$ 11.56 ²⁾³⁾⁴⁾
H-HSYA+LPS 组	0.92 $\pm$ 0.10 ⁵⁾	0.72 $\pm$ 0.08 ⁵⁾	215.33 $\pm$ 22.52 ⁵⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与髓核细胞组相比, $P<0.05$;3)与 L-HSYA 组相比, $P<0.05$;4)与 M-HSYA 组相比, $P<0.05$;5)与 H-HSYA 组相比, $P<0.05$ 。

表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA 组 Bcl-2 蛋白表达较髓核细胞组升高,Bax、Caspase-3 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$);H-HSYA+LPS 组 Bcl-2 蛋白表达较 H-HSYA 组降低,Bax、Caspase-3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

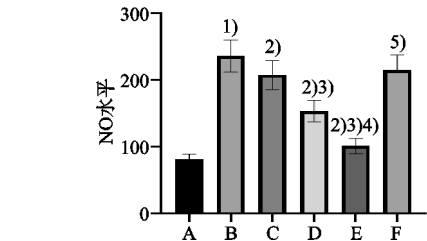


图 8 羟基红花黄色素 A 对细胞上清液中 NO 水平的影响

2.5 羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡相关蛋白的影响

羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡相关蛋白的影响见图 9、图 10 和表 5。与正常组比较,髓核细胞组 Bcl-2 蛋白表达降低,Bax、Caspase-3 蛋白

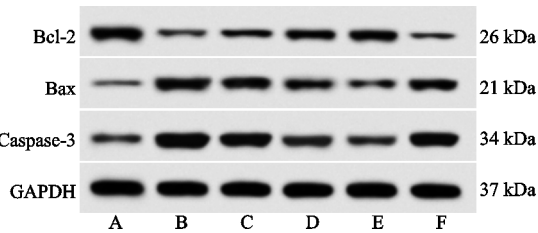


图 9 Western Blot 检测髓核细胞中凋亡相关蛋白表达

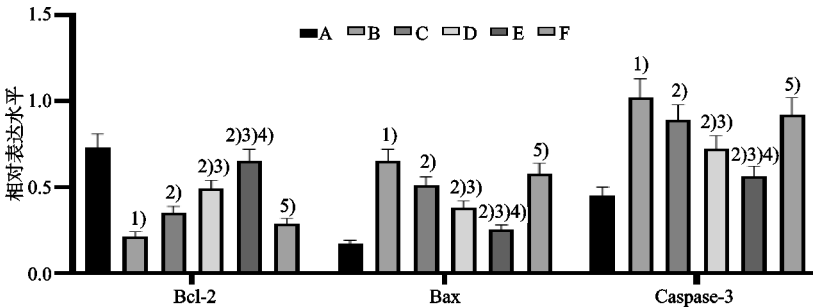


图 10 各组细胞中凋亡相关蛋白相对表达水平

表 5 各组细胞中凋亡相关蛋白相对表达水平($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
正常组	0.73±0.08	0.17±0.02	0.45±0.05
髓核细胞组	0.21±0.03 ¹⁾	0.65±0.07 ¹⁾	1.02±0.11 ¹⁾
L-HSYA 组	0.35±0.04 ²⁾	0.51±0.05 ²⁾	0.89±0.09 ²⁾
M-HSYA 组	0.49±0.05 ²⁾³⁾	0.38±0.04 ²⁾³⁾	0.72±0.08 ²⁾³⁾
H-HSYA 组	0.65±0.07 ²⁾³⁾⁴⁾	0.25±0.03 ²⁾³⁾⁴⁾	0.56±0.06 ²⁾³⁾⁴⁾
H-HSYA+LPS 组	0.29±0.03 ⁵⁾	0.58±0.06 ⁵⁾	0.92±0.10 ⁵⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与髓核细胞组相比, $P<0.05$;3)与 L-HSYA 组相比, $P<0.05$;4)与 M-HSYA 组相比, $P<0.05$;5)与 H-HSYA 组相比, $P<0.05$ 。

2.6 羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞 NF- κ B/NLRP3 通路相关蛋白的影响

羟基红花黄色素 A 对 IL-1 β 诱导的髓核细胞 NF- κ B/NLRP3 通路相关蛋白的影响见图 11、图 12 和表 6。与正常组比较,髓核细胞组 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 及 NLRP3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与髓核细胞组相比,L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA 组 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 及 NLRP3 蛋白表达逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$);H-HSYA+LPS 组 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 及 NLRP3 蛋白表达较 H-HSYA 组升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

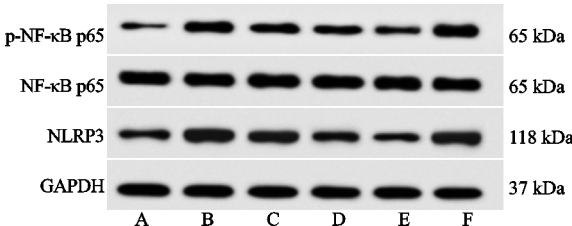


图 11 Western Blot 检测 NF- κ B/NLRP3 通路相关蛋白表达

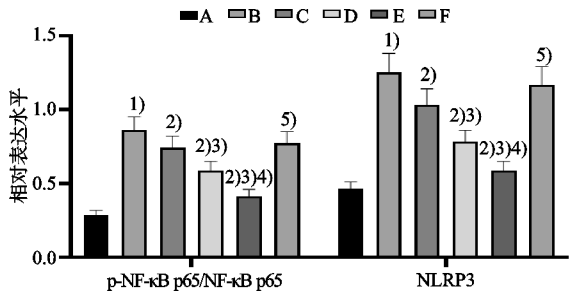


图 12 各组细胞中 NF- κ B/NLRP3 通路相关蛋白相对表达水平

表 6 各组细胞中 NF- κ B/NLRP3 通路相关蛋白相对表达水平($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	p-NF- κ B p65/NF- κ B p65	NLRP3/GAPDH
正常组	0.29±0.03	0.46±0.05
髓核细胞组	0.86±0.09 ¹⁾	1.25±0.13 ¹⁾
L-HSYA 组	0.74±0.08 ²⁾	1.03±0.11 ²⁾
M-HSYA 组	0.59±0.06 ²⁾³⁾	0.78±0.08 ²⁾³⁾
H-HSYA 组	0.41±0.05 ²⁾³⁾⁴⁾	0.59±0.06 ²⁾³⁾⁴⁾
H-HSYA+LPS 组	0.77±0.08 ⁵⁾	1.17±0.12 ⁵⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与髓核细胞组相比, $P<0.05$;3)与 L-HSYA 组相比, $P<0.05$;4)与 M-HSYA 组相比, $P<0.05$;5)与 H-HSYA 组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

椎间盘退变引起的腰痛给患者造成极大的痛苦,且髓核细胞的过度凋亡在椎间盘退变中发挥关键作用^[3]。已有研究发现,椎间盘退变会促进 TNF- α 、IL-1 β 等炎症细胞因子的分泌,引起髓核细胞凋亡,进一步加剧椎间盘退变的病理过程^[12]。因此,寻找药物抑制髓核细胞凋亡及其炎症反应,可能是治疗椎间盘退变的有效手段。

据相关研究报道,在动脉粥样硬化小鼠中,羟基红花黄色素 A 可通过抑制巨噬细胞中 NF- κ B 及 AKT/mTOR 通路来调节淋巴管的生成及炎症^[10]。Feng 等^[13]研究发现,羟基红花黄色素 A 对溃疡性结肠炎的预防是通过 TLR4/NF- κ B 信号通路发挥作用。Li 等^[14]研究发现,羟基红花黄色素 A 可通过抑制细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路减轻胶原蛋白诱导的关节炎大鼠的炎症反应。以上研究均说明羟基红花黄色素 A 可参与炎症反应过程。本研究发现,髓核细胞组中细胞活性减弱、凋亡、炎症反应增加,羟基红花黄色素 A 处理后,TNF- α 、IL-6、IL-8 水平降低,说明羟基红花黄色素 A 可抑制炎症反应。研究发现持续性的脊髓压迫可激活 iNOS,进而产生 NO,加重髓核细胞的过度凋亡及椎间盘退变进展^[15]。张强等^[16]研究发现,COX-2 属于炎症反应介质的一种,对椎间盘退变的发生发展有促进作用。Bax、Caspase-3、Bcl-2 是极具代表性的凋亡相关基因,Bax 是主要的促凋亡基因,当其含量增加时,会进一步对凋亡过程进行启动^[17],Bcl-2 可与 Bax 结合发挥抗凋亡作用^[18],而 Caspase-3 则是在凋亡过程中发挥关键作用的酶^[19]。本研究给予不同浓度的羟基红花黄色素 A 处理后,细胞 OD 值增加,表明羟基红花黄色素 A 可促进细胞的增殖,而细胞的凋亡率、NO 水平及 COX-2、iNOS 蛋白表达均降低,表明羟基红花黄色素 A 对细胞凋亡和炎症反应具有抑制作用。

在细胞质中 NF- κ B 通常与抑制蛋白 I κ B 结合而处于失活状态,当炎症刺激作用于细胞时,I κ B 激酶被激活并使 I κ B 磷酸化,进而发生降解,释放出 NF- κ B 二聚体,游离的 NF- κ B 二聚体入核后,与 NLRP3 基因启动子区的 κ B 响应元件结合,通过增强转录活性来

促进 NLRP3 的 mRNA 合成,最终提升 NLRP3 蛋白的表达水平。研究发现在特发性肺纤维化中,黄芩素对博来霉素诱导的肺纤维化中的炎症反应和上皮间质转化的抑制是通过抑制 NF- κ B/NLRP3 信号通路实现的^[20]。Deng 等^[21]研究发现,Kinsenoside 可通过抑制 NF- κ B/NLRP3 通路来减轻非酒精性脂肪肝炎小鼠的炎症反应。以上研究说明 NF- κ B/NLRP3 通路炎症反应相关。本研究发现经 IL-1 β 诱导的细胞 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达升高,说明模型激活了 NF- κ B/NLRP3 通路。经羟基红花黄色素 A 处理后,p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达降低,表明羟基红花黄色素 A 可抑制 NF- κ B/NLRP3 通路的激活。经羟基红花黄色素 A 和 NF- κ B 激活剂 LPS 共同处理,发现其 OD 值、Bcl-2 蛋白表达降低,凋亡率、TNF- α 、IL-6、IL-8、NO 水平、COX-2、iNOS、Bax、Caspase-3、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、NLRP3 蛋白表达升高,表明加入通路激活剂后,细胞增殖降低,凋亡及炎症反应增加,提示羟基红花黄色素 A 可能通过抑制 NF- κ B/NLRP3 信号通路,减轻 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡和炎症反应。

综上所述,羟基红花黄色素 A 可能通过对 NF- κ B/NLRP3 信号通路进行抑制,减轻 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡和炎症反应。但是本研究仅在细胞水平上进行,未在动物体内进行实验验证,后续会进一步在体内进行更加深入的研究。

参考文献

- [1] KNEZEVIC N N, CANDIDO K D, VLAEYEN J W S, et al. Low back pain[J]. The Lancet, 2021, 398(10294): 78-92.
- [2] 张云辉, 于栋, 时宗庭, 等. 椎间盘退变程度与脊柱内镜手术治疗腰椎间盘突出症临床疗效的相关性研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(6): 36-40.
- [3] 朱健, 邓易, 胡棚策, 等. 椎间盘退变分子机制及相关信号转导通路的研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2020, 41(1): 27-31.
- [4] WANG Y J, CHE M X, XIN J G, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration[J]. Bio-medicine & Pharmacotherapy, 2020, 131: 110660.
- [5] YU L, JIN Z, LI M C, et al. Protective potential of hydroxysafflor yellow A in cerebral ischemia and reperfusion injury: an overview of evidence from experimental studies[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1063035.
- [6] ZHANG Z Y, HUO Y F, ZHOU Z J, et al. Hydroxysafflor yellow A (HSYA) protects endplate chondrocytes against IL-1 β -induced injury through promoting autophagy[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 6326677.
- [7] 李伟慷, 崔清卓, 郑玉光, 等. 基于 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路的羟基红花黄色素 A 抑制血管紧张素 II 诱导的血管外膜成纤维细胞迁移研究[J]. 中草药, 2023, 54(5): 1478-1486.
- [8] 岳宗进, 于露, 刘汝银, 等. 西红花酸对白细胞介素-1 β 诱导的髓核细胞退变的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(16): 3525-3528.
- [9] 蒋洁, 王立群, 刘雪茹, 等. 羟基红花黄色素 A 抑制血管紧张素 II 介导的心脏成纤维细胞肌化[J]. 西南医科大学学报, 2024, 47(4): 306-310.
- [10] 张飘, 罗引幸, 李涛, 等. NF- κ B 信号通路激活剂 LPS/抑制剂 SN50 对鸭肠炎病毒增殖影响的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(3): 302-309.
- [11] 何至, 颜端国, 严林. 人退变椎间盘髓核组织中 miR-146a 的表达及对 NP 细胞增殖、凋亡和炎性细胞因子的影响作用机制[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(1): 72-76.
- [12] FENG X T, DU M, LI S J, et al. Hydroxysafflor yellow A regulates lymphangiogenesis and inflammation via the inhibition of PI3K on regulating AKT/mTOR and NF- κ B pathway in macrophages to reduce atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154684.
- [13] FENG Z B, ZHOU P, WU X, et al. Hydroxysafflor yellow A protects against ulcerative colitis via suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Chem Biol Drug Des, 2022, 99(6): 897-907.
- [14] LI D W, WANG X T, MU B C, et al. Effects of hydroxysafflor yellow A on rats with collagen-induced arthritis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 570: 26-34.
- [15] XIE C L, MA H W, SHI Y F, et al. Cardamonin protects nucleus pulposus cells against IL-1 β -induced inflammation and catabolism via Nrf2/NF- κ B axis[J]. Food Funct, 2021, 12(6): 2703-2714.
- [16] 张强, 刘萍, 秦飞, 等. 香叶木素通过抑制髓核细胞凋亡和炎症反应缓解椎间盘退变大鼠神经根性疼痛[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(12): 1046-1052.
- [17] SPITZ A Z, GAVATHIOTIS E. Physiological and pharmacological modulation of BAX[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2022, 43(3): 206-220.
- [18] 吴华, 吴艳, 张玉萍, 等. 甲地孕酮通过调节凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 的表达治疗宫颈癌的研究[J]. 中国性科学, 2024, 33(11): 82-86.
- [19] LI X, HU L, ZHU X R, et al. The effect of caspase-3 in mitochondrial apoptosis activation on degradation of structure proteins of *Esox lucius* during postmortem storage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 367: 130767.
- [20] PENG L, WEN L, SHI Q F, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation[J]. Cell Death Dis, 2020, 11: 978.
- [21] DENG Y F, XU Q Q, CHEN T Q, et al. Kinsenoside alleviates inflammation and fibrosis in experimental NASH mice by suppressing the NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154241.

(收稿日期: 2025-03-19)