doi:10.11659/jjssx.03E021100

·基础研究·

薯蓣皂苷通过调节人髓核细胞 TLR4/NF-κB 信号通路抑制 IL-1β 诱导的分解代谢和凋亡

高维松,王隆辉,顾运涛,赵 海,齐 昊,吴昌新 (海南医学院第二附属医院骨科,海南 海口 570102)

[摘 要] **目的** 探讨薯蓣皂苷(Dio)对白细胞介素-1β(IL-1β)诱导的人髓核(NP)细胞炎症反应的作用及机制。**方法** 将人 NP 细胞分为 control 组、IL-1β 组、IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1}组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组,用 IL-1β 和不同浓度的 Dio 分别进行体外培养。采用 CCK-8 法、Western blot、免疫荧光染色、Griess 法、ELISA 和 RT-PCR 检测细胞活力、细胞外基质代谢情况、炎症因子及相关信号传导途径。**结果** Dio 能够抑制 IL-1β 刺激下人 NP 细胞的 PGE2、NO、iNOS 和 COX-2 表达($P<0.05$),抑制人 NP 细胞IL-1β激活的分解代谢活性($P<0.05$),抑制 IL-1β 刺激的人 NP 细胞 TLR4/NF-κB 信号通路($P<0.05$),降低炎症介质(IL-6、TNF-α)水平($P<0.05$)。**结论** Dio 通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路以及相关的炎症反应,抑制 IL-1β 诱导的人 NP 细胞炎症和分解代谢活性,为临床治疗椎间盘退变(IDD)提供了新的证据。

[关键词] 细胞凋亡;分解代谢;薯蓣皂苷;炎症;椎间盘退变;TLR4/NF-κB
[中图分类号] R681.5+3 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-03-24

Dioscin inhibits IL-1β-induced catabolism and apoptosis by regulating the TLR4/NF-κB signaling pathway in human nucleus pulposus cells

GAO Wei-song, WANG Long-hui, GU Yun-tao, ZHAO Hai, QI Hao, WU Chang-Xin (Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan 570102, China)

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of dioscin (Dio) on interleukin-1β (IL-1β)-induced inflammatory respone in human nucleus pulposus (NP) cells. **Methods** Human NP cells were divided into the control group, the IL-1β group, the IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1} group and the IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1} group, and they were cultured in vitro with IL-1β and different concentrations of Dio. The CCK-8 method, Western blot, immunofluorescence staining, Griess method, ELISA and RT-PCR were used to detect the cell viability, extracellular matrix metabolism, inflammatory factors and related signal transduction pathway. **Results** Dio can inhibit the expression of PGE2, NO, iNOS and COX-2 in human NP cells stimulated by IL-1β ($P<0.05$), inhibit the catabolic activity of human NP cells activated by IL-1β ($P<0.05$), inhibit the TLR4 /NF-κB signaling pathway of human NP cells stimulated by IL-1β ($P<0.05$), and reduced the inflammatory mediators (IL-6, TNF-α) levels ($P<0.05$). **Conclusion** Dio inhibits IL-1β-induced inflammation and catabolic activity of human NP cells by inhibiting the TLR4/NF-κB signaling pathway and related inflammatory reactions, which provides new evidence for clinical treatment of intervertebral disc degeneration (IDD).

Keywords: apoptosis; catabolism; dioscin; inflammation; intervertebral disc degeneration; TLR4/NF-κB

椎间盘是脊柱结构的重要组成部分,其可吸收、减轻和传递加载在脊柱上的负荷,增加脊柱的活动性[1]。然而,在衰老、外伤、肥胖、机械应力的作用下,椎间盘微环境会出现变化,引起椎间盘细胞功能低下及其结构的破坏,导致椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)相关疾病,如椎间盘源性腰痛和椎间盘突出症[2-3]。而关于 IDD 的具体病理生理机制目前尚不清楚,仍需要进一步研究以制订有效的防治策略。

髓核(nucleus pulposus, NP)细胞存在于含有Ⅱ型胶原和蛋白多糖的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中,后者的保水能力是抵抗脊柱压缩轴向力的必要条件[4-5]。在健康的 NP 组织中,NP 细胞维持ECM的代谢平衡,包括 aggrecan 和胶原,其功能状态以及数量直接关系到 ECM 的代谢平衡[6]。白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)已被证明能够通过触发多种炎症信号通路,如激活核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)和有丝分裂原蛋白激酶通路,从而增强促炎因子的表达,扰乱 ECM 代谢的平衡,促进 ECM 的分解代谢[7]。故抑制 NP 细胞炎症反应以及相应的炎症通路是一个很有前景的治疗 IDD 的策略。

薯蓣皂苷(dioscin, Dio)是一种从草药中提取的天然甾体皂苷[8]。目前大量研究表明,Dio 在各种疾病中具有抗炎、抗凋亡和抗氧化的作用[9-11],其可通过减

[基金项目] 海南省自然科学基金青年项目(820QN406)
[通信作者] 吴昌新,E-mail:changxinwu208@126.cm

少促凋亡蛋白的表达来抑制细胞凋亡,从而减轻二甲基亚硝胺诱导的急性肝损伤[12];也可通过调节细胞凋亡、自噬和 DNA 损伤抑制肝癌[13];还可通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路调节脂质代谢,预防非酒精性脂肪肝[14]。还有研究报道,Dio 可通过抑制 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4,TLR4)信号传导减轻脑缺血/再灌注损伤[15]。故本研究认为 Dio 可能对 IDD 有一定的保护作用。目前,关于 Dio 对 IDD 的潜在影响还未见相关报道。因此,本研究探讨 Dio 对 IL-1β 诱导的人NP 细胞的作用及潜在机制,以期为临床治疗 IDD 提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和抗体

Dio(纯度大于 99%)购自上海陶托生化技术有限公司,IL-1β 购自美国 RD 公司,一抗(Ⅱ型胶原、TLR4、NF-κB p65、IκBα 和 β-actin)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 原代人 NP 细胞培养及处理

人体 NP 组织收集符合海南医学院第二附属医院伦理委员会的指导原则,并取得患者或其亲属对获取椎间盘组织的知情同意书。人 NP 细胞培养参考文献[16],将培养后的第 2 ~ 3 代 NP 细胞用于后续实验。将人 NP 细胞分为 control 组、IL-1β 组、IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1}组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组,IL-1β 组、IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1}组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组分别用 10 ng·mL^{-1} IL-1β、100 ng·mL^{-1} Dio 和 500 ng·mL^{-1}Dio 处理 1 d。

1.3 NP 细胞活力检测

将 NP 细胞接种于 96 孔板(每孔 5×10^3 ~ 6×10^3个细胞)中培养 1 d,用不同浓度的 Dio 和 IL-1β(10 ng·mL^{-1})孵育。孵育 1 d 后,按照 CCK-8 说明书要求,每孔加入 CCK-8 溶液(10 μL)2 h,用分光光度计测定样品在 450 nm 波长处的吸光度。

1.4 免疫荧光分析

Ⅱ型胶原染色时,将 NP 细胞接种于玻片上培养。药物处理后,用 4% 多聚甲醛处理固定 15 min,然后用 0.5% Triton X-100 处理 10 min,随后在含 5% BSA 的封闭缓冲液中孵育 30 min。在 4 ℃下用一抗(抗Ⅱ型胶原)处理过夜,次日用对应的二抗处理 1 h。漂洗后用 DAPI 处理 10 min,然后用抗荧光猝灭剂封片。用激光共聚焦显微镜对免疫染色样品进行拍摄。

1.5 Western blot

药物处理后,细胞样品添加细胞裂解液以提取细胞蛋白,同时用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,并配备标准蛋白上样品。上样品(40 μg)加入 SDS 凝胶进行电泳(100 V),并通过电转膜(300 mA,90 min)转移到 PVDF 膜上。利用 5% 脱脂牛奶封闭阻断非特异性抗原结合位点后,样本在 4 ℃下用一抗(1∶1 000)孵育过夜,在 37 ℃下用二抗(1∶10 000)孵育 60 min。使用 ChemiDoc XRS + 成像系统对条带进行曝光和检测。

1.6 定量 RT-PCR

用 TRIzol 法提取 NP 细胞总 mRNA。用 RNA 样品、Prime-Script RT-PCR 试剂盒反转录合成 cDNAs。用 SYBR-Green-PCR 试剂盒扩增 cDNAs(变性、退火、延伸)。用 2^{-ddCt}法定量 mRNA 表达,计算其与 β-actin 基因的相对表达水平。

1.7 NO 与 PGE2 表达测定

用 Griess 法测定 NO 浓度。Dio 预处理 2 h 后,用 IL-1β(10 ng·mL^{-1})刺激软骨细胞 24 h,用 ELISA 试剂盒检测培养液中前列腺素 E2(prostaglandin E2,PGE2)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)的表达。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行处理,所有结果均进行至少 3 次的独立样本试验。结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析和 *Tukey's post-hoc test*,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Dio 改善 IL-1β 刺激下人 NP 细胞活性

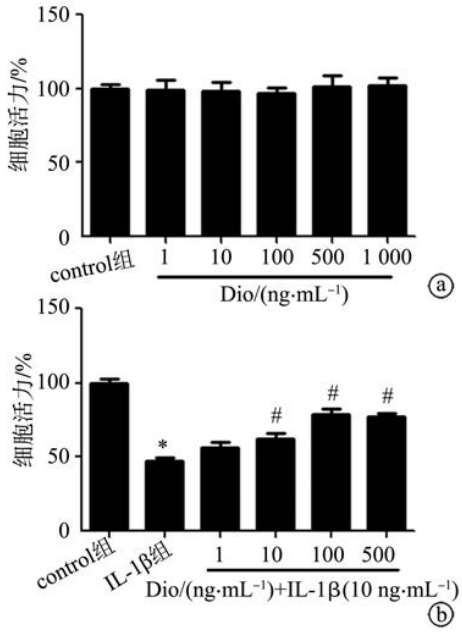
CCK-8 法结果显示,Dio 在 1 ~ 1 000 ng·mL^{-1}剂量下对 NP 细胞活力没有影响(图 1a)。NP 细胞用 IL-1β和不同浓度的 Dio(1、10、100、500 ng·mL^{-1})处理 1 d 后显示,Dio 对 IL-1β 刺激的 NP 细胞活力有剂量依赖性保护作用(图 1b)。

2.2 Dio 降低 IL-1β 刺激下的人 NP 细胞 PGE2 和 NO 生成

与 control 组相比,IL-1β 组 NO 和 PGE2 表达显著增加($P<0.05$);与 IL-1β 组相比,IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1}组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组 PGE2 和 NO 表达受到抑制($P<0.05$),见图 2。

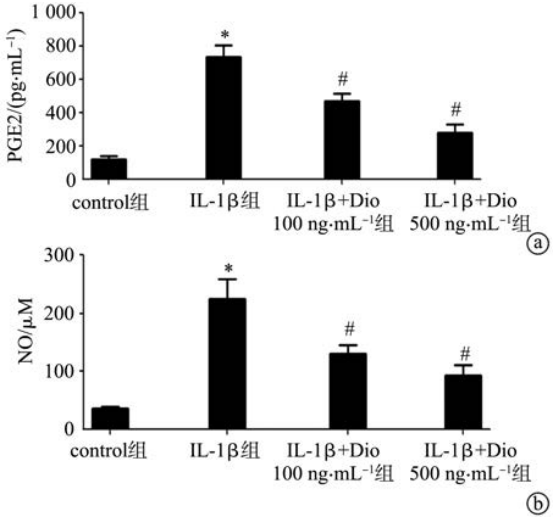
2.3 Dio 抑制 IL-1β 刺激下人 NP 细胞 iNOS 和COX-2 水平

与 control 组相比,IL-1β 组 COX-2 和 iNOS 的表达显著增加($P<0.05$);与 IL-1β 组相比,IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1}组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组COX-2 和 iNOS mRNA 水平降低($P<0.05$),见图 3。



a:CCK-8 法检测不同浓度 Dio 对人 NP 细胞的毒性作用;b:Dio 对 IL-1β 刺激下人 NP 细胞的活性分析 *:与 control 组相比,$P<0.05$;#:与 IL-1β 组相比,$P<0.05$

图 1 Dio 对 IL-1β 刺激下人 NP 细胞活力的影响

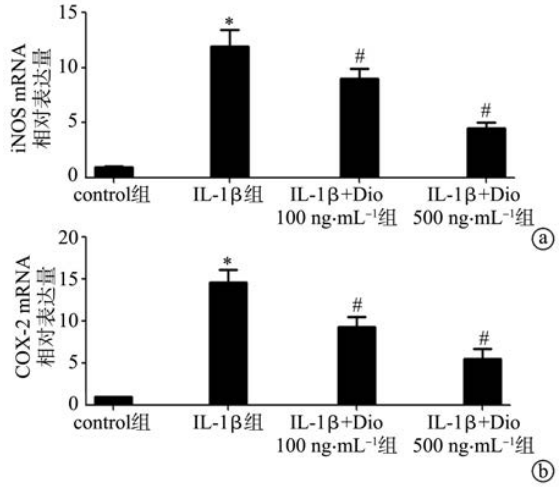


a:ELISA 法测定 PGE2 水平;b:Griess 法测定培养基中 NO 的含量 *:与 control 组相比,$P<0.05$;#:与 IL-1β 组相比,$P<0.05$

图 2 Dio 对 IL-1β 刺激下人 NP 细胞 PGE2 和 NO 表达的影响

2.4 Dio 抑制 IL-1β 刺激下人 NP 细胞的 ECM 降解

与 control 组相比,IL-1β 组 collagen Ⅱ 和 aggrecan 的水平降低($P<0.05$),见图 4a、b;与 IL-1β 组相比,IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1} 组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组 collagen Ⅱ 和 aggrecan mRNA 水平较高。collagen Ⅱ 免疫荧光染色结果与 RT-PCR 检测结果一致(图 4c)。



a:RT-PCR 检测 iNOS mRNA 的表达;b:RT-PCR 检测 COX-2 mRNA的表达 *:与 control 组相比,$P<0.05$;#:与 IL-1β 组相比,$P<0.05$

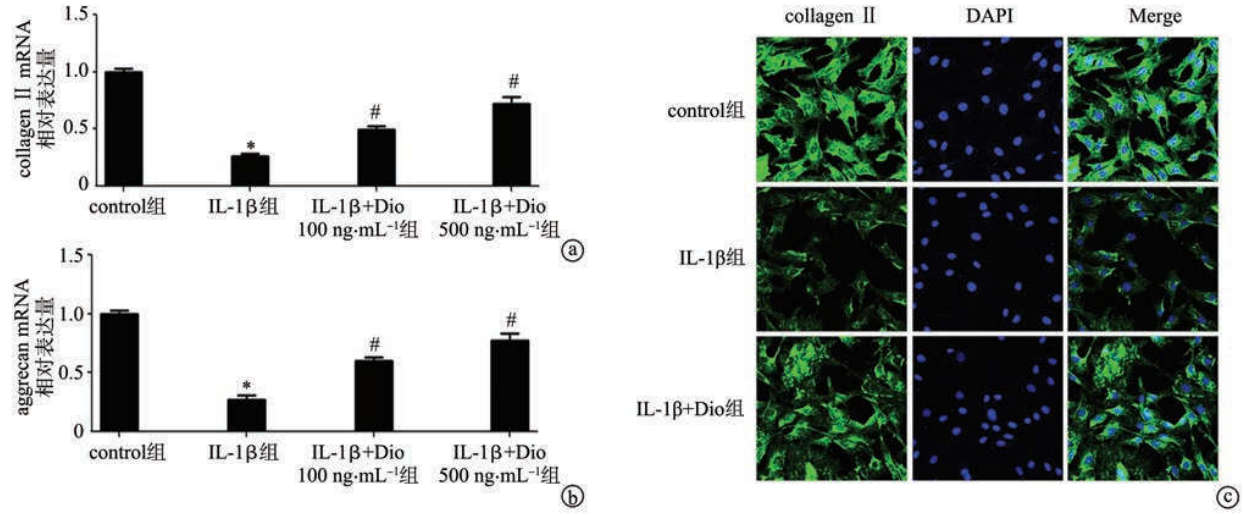
图 3 Dio 对 IL-1β 刺激下人 NP 细胞 iNOS 和 COX-2 表达的影响

2.5 Dio 抑制 IL-1β 刺激下人 NP 细胞的炎症因子以及 NF-κB 信号通路

RT-PCR 结果显示,与 control 组相比,IL-1β 组 IL-6 和 TNF-α 的表达增加($P<0.05$);与 IL-1β 组相比,IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1}组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组 IL-6 和 TNF-α 的表达降低($P<0.05$),见图 5a、b。与 control 组相比,IL-1β 组 TLR4 水平显著上调($P<0.05$);与IL-1β组相比,IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1}组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组 TLR4 水平下调($P<0.05$),见图 5c、d。与 control 组相比,IL-1β 组 NF-κB p65 蛋白表达增加($P<0.05$);与 IL-1β 组相比,IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1} 组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1} 组 NF-κB p65 蛋白表达显著降低($P<0.05$),见图 5c、e。与 control 组相比,IL-1β 组诱导人 NP 细胞 IκBα 降解($P<0.05$);与 IL-1β 组相比,IL-1β + Dio 100 ng·mL^{-1} 组和 IL-1β + Dio 500 ng·mL^{-1}组人 NP 细胞 IκBα 降解被显著抑制($P<0.05$),见图 5c、f。

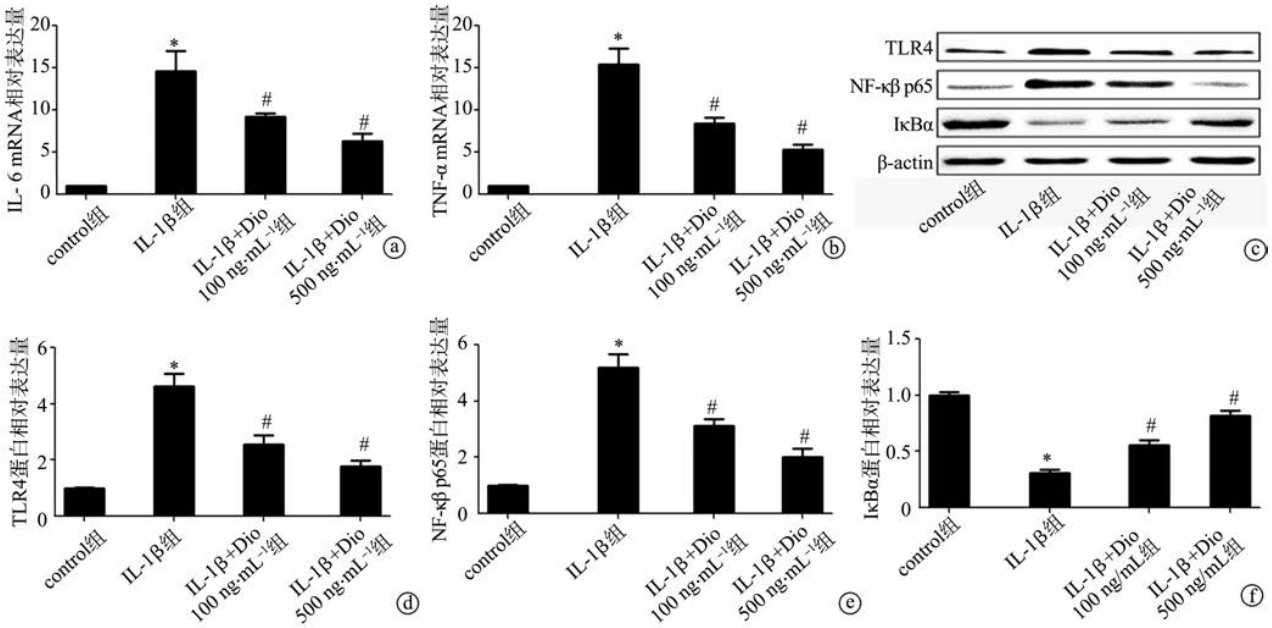
3 讨论

IDD 是引起腰痛的主要原因之一[17]。衰老、代谢失衡、机械应激、炎症与 IDD 的发病有关[18-19]。然而,IDD 的具体病理机制尚未完全阐明。椎间盘组织由中央 NP 组织、周围纤维环组织和软骨终板组成。健康的 NP 组织维持 ECM 的代谢平衡,包括 aggrecan 和胶原,后者保证 NP 正常的生物力学功能。有研究报道,NP 在 IDD 早期表现出退行性表型,如 ECM 丢失、



a:RT-PCR 检测 collagenⅡ的相对 mRNA 水平;b:aggrecan 的相对 mRNA 水平;c:collagenⅡ蛋白(绿色)和细胞核(蓝色)的免疫荧光染色 *:与 control 组相比,$P<0.05$;#:与 IL-1β 组相比,$P<0.05$

图 4 Dio 对 IL-1β 刺激下人 NP 细胞 ECM 降解的抑制作用



a:RT-PCR 检测 IL-6 的相对 mRNA 水平;b:RT-PCR 检测 TNF-α 的相对 mRNA 水平;c~f:Western blot 检测 TLR4、NF-κB p65 和 IκBα 的相对 mRNA 水平 *:与 control 组相比,$P<0.05$;#:与 IL-1β 组相比,$P<0.05$

图 5 Dio 通过调节 NF-κB 抑制 IL-1β 诱导的人 NP 细胞炎性因子释放

NP 细胞数量减少等[1]。故探究 IDD 中 NP 退变的机制以及针对性地增加 NP 细胞的数量和改善其功能是治疗 IDD 的重要策略。

炎症在 IDD 中 NP 细胞凋亡以及功能低下的发生发展中起着关键作用[20]。炎症介质升高可能导致 NP 细胞凋亡以及 ECM 的降解[21]。在这些炎症介质中,IL-1β 在 IDD 的发病机制中起着关键作用[22]。IL-1β 可刺激 NP 细胞以及骨关节炎中的软骨细胞诱导其他炎症介质的释放,包括 PGE2 和 NO,后者可通过触发 MMPs 合成并抑制 IDD 中 NP 细胞的基质合成而被证明是分解代谢因子[23-24]。PGE2 和 NO 的产生可导致 IDD 的发展[25]。NO 被广泛认为是能够触发 MMP 分泌和激活的炎性介质,在 IDD 病理过程中,NO 也可以抑制 aggrecan 和Ⅱ型胶原的产生。PGE2 是炎症和疼痛的主要介质,可在 IDD 发病过程中增强 ECM 降解并抑制 NP 细胞增殖。先前的研究表明,抑制包括 NO

和 PGE2 在内的炎症介质的产生会减弱 IDD 的进展[26]。本研究结果显示,Dio 可显著抑制 IL-1β 刺激下的 NP 细胞 COX-2 和 iNOS 的 mRNA 水平以及 PGE2 和 NO 的生成,同时 Dio 对 IL-1β 诱导的 ECM 的分解代谢也有显著的抑制作用,表明 Dio 可通过抑制 IL-1β 介导的炎性介质的表达,起到保护 NP 细胞功能的作用。

据报道,椎间盘 NP 组织的过度炎症反应与其分解代谢水平的增加密切相关[27-28]。因此,抑制炎症反应可能有助于预防 NP 细胞分解代谢和改善 IDD。TLR 信号通路的激活被证明可以增强炎症介质(如 TNF-α、IL-1 和 IL-6)的表达,从而促进炎症反应[29]。TLR4 在骨关节炎以及 IDD 过程中过表达,在退变过程中起重要作用[30]。同样,体内外研究表明,促进炎症因子(iNOS 以及 COX-2 等)的释放可减少 NP 细胞 ECM 的含量,后者可通过增加 TLR4 的表达来实现[31-32]。配体与 TLR4 结合触发信号级联,促进NF-κB 信号激活,从而增加炎性细胞因子和降解酶的表达。LPS 作为一种 TLR4 的特异性配体,可通过激活 TLR4 信号通路,促进小鼠和人关节软骨细胞 collagen Ⅱ 和 aggrecan 的降解[33]。在相关模型中,抑制 TLR4 可间接抑制 NF-κB 通路,减少 iNOS 以及 COX-2 的转录,从而减少 NO、PGE2、IL-6 和 TNF-α 的释放[34]。IL-1β 可促进 NP 细胞的炎症反应和基质降解酶的释放[35]。先前的研究表明,IL-1β 在 NP 细胞中显著上调,提示 IL-1β在 IDD 过程中可能起关键作用[7]。在本研究中,IL-1β 可显著提高人 NP 细胞 TLR4 水平,激活 NF-κB 信号通路。IL-1β 通过上调基质降解酶促进 ECM 蛋白降解。然而,Dio 可减弱IL-1β刺激的人 NP 细胞 TLR4/NF-κB 通路的激活,逆转细胞外基质蛋白的降解。研究表明,Dio 对多种疾病具有抗炎作用,如 Dio 可通过调节 TLR4/MyD88 信号通路,显著抑制 IL-1β、IL-6、TNF-α 和NF-κB p65 的释放,从而减轻炎症反应[12],其还可通过抑制 NF-κB 途径抑制 TNF-α 激活的血管细胞黏附分子-1 和内皮脂肪酶的表达[36]。本研究结果也显示,Dio 可抑制 IL-1β 触发的炎症因子(TNF-α、IL-6、NO 和 PGE2)的释放,该效应可通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路来实现。

综上,本研究显示 TLR4/NF-κB 信号转导可能与 Dio 抑制 IL-β 激活的 NP 细胞炎症反应和分解代谢有关,Dio 可抑制 IL-1β 触发的炎症因子(TNF-α、IL-6、NO 和 PGE2)的释放。本研究结果为 Dio 的药理作用及机制提供了初步证据,为临床治疗 IDD 提供了新的可能。

[参考文献]

[1] Vergroesen PP, Kingma I, Emanuel KS, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(7): 1057 – 1070. doi: 10.1016/j.joca.2015.03.028.

[2] Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(1): 5 – 10. doi: 10.1093/rheumatology/ken396.

[3] Vo NV, Hartman RA, Patil PR, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs[J]. J Orthop Res, 2016, 34(8): 1289 – 1306. doi: 10.1002/jor.23195.

[4] Craddock RJ, Hodson NW, Ozols M, et al. Extracellular matrix fragmentation in young, healthy cartilaginous tissues[J]. Eur Cell Mater, 2018, 35: 34 – 53. doi: 10.22203/eCM.v035a04.

[5] Molladavoodi S, McMorran J, Gregory D. Mechanobiology of annulus fibrosus and nucleus pulposus cells in intervertebral discs[J]. Cell Tissue Res, 2020, 379(3): 429 – 444. doi: 10.1007/s00441 – 019 – 03136 – 1.

[6] Sivan SS, Tsitron E, Wachtel E, et al. Aggrecan turnover in human intervertebral disc as determined by the racemization of aspartic acid[J]. J Biol Chem, 2006, 281(19): 13009 – 13014. doi: 10.1074/jbc.M600 296200.

[7] Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases[J]. Blood, 2011, 117(14): 3720 – 3732. doi: 10.1182/blood – 2010 – 07 – 273417.

[8] Wuertz K, Vo N, Kletsas D, et al. Inflammatory and catabolic signalling in intervertebral discs: the roles of NF-κB and MAP kinases[J]. Eur Cell Mater, 2012, 23: 103 – 119. doi: 10.22203/ecm.v023a08.

[9] Brautbar N, Williams J 2nd. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms[J]. Int J Hyg Environ Health, 2002, 205(6): 479 – 491. doi: 10.1078/1438 – 4639 – 00175.

[10] 陈朝荣. 穿山龙质量标准研究及其主要成分薯蓣皂苷对氧糖剥夺/复氧损伤保护机制研究[D]. 成都: 成都医学院, 2020. doi: 10.27843/d.cnki.gcdyy.2020.000027.

[11] 侯 娜. 薯蓣皂苷元对糖尿病周围神经病变 N2a 细胞凋亡影响的研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019. doi: 10.27213/d.cnki.glnzc.2019.000555.

[12] 魏志萍, 刘雅珺, 杨树龙. 薯蓣皂苷对 TNF-α 诱导的 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞 COX 表达的影响[J]. 南昌大学学报(医学版), 2020, 60(4): 6 – 9. doi: 10.13764/j.cnki.ncdm.2020.04.002.

[13] Zhang W, Yin L, Tao X, et al. Dioscin alleviates dimethylnitrosamine-induced acute liver injury through regulating apoptosis, oxidative stress and inflammation[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 45: 193 – 201. doi: 10.1016/j.etap.2016.06.002.

[14] Mao Z, Han X, Chen D, et al. Potent effects of dioscin against hepatocellular carcinoma through regulating TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR)-mediated apoptosis, autophagy, and DNA damage[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(7): 919 – 937. doi: 10.1111/bph.14594.

[15] Yao H, Tao X, Xu L, et al. Dioscin alleviates non-alcoholic fatty liver disease through adjusting lipid metabolism via SIRT1/AMPK signaling pathway[J]. Pharmacol Res, 2018, 131: 51 – 60. doi: 10.1016/j.phrs.2018.03.017.

[16] Tao X, Sun X, Yin L, et al. Dioscin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through the downregulation of TLR4 signaling via HMGB-1 inhibition[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 84: 103 – 115. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.003.

[17] Risbud MV, Guttapalli A, Stokes DG, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1 alpha under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(1): 152 – 159. doi: 10.1002/jcb.20765.

[18] Brinjikji W, Diehn FE, Jarvik JG, et al. MRI findings of disc degeneration are more prevalent in adults with low back pain than in asymptomatic controls: a systematic review and Meta-analysis[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2015, 36(12): 2394 – 2399. doi: 10.3174/ajnr.A4498.

[19] Fernandez-Moure J, Moore CA, Kim K, et al. Novel therapeutic strategies for degenerative disc disease: review of cell biology and intervertebral disc cell therapy[J]. SAGE Open Med, 2018, 6: 2050312118761674. doi: 10.1177/2050312118761674.

[20] Qin C, Lv Y, Zhao H, et al. MicroRNA-149 suppresses inflammation in nucleus pulposus cells of intervertebral discs by regulating MyD88[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 4892 – 4900. doi: 10.12659/MSM.915858.

[21] Molinos M, Almeida CR, Caldeira J, et al. Inflammation in intervertebraldisc degeneration and regeneration[J]. J R Soc Interface, 2015, 12(TN.104): 20141191. doi: 10.1098/rsif.2014.1191.

[22] Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, et al. Disc in flames: Roles of TNF-α and IL-1β in intervertebral disc degeneration[J]. Eur Cell Mater, 2015, 30: 104 – 116. doi: 10.22203/ecm.v030a08.

[23] Phillips KL, Jordan-Mahy N, Nicklin MJ, et al. Interleukin-1 receptor antagonist deficient mice provide insights into pathogenesis of human intervertebral disc degeneration[J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(11): 1860 – 1867. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202266.

[24] Shakibaei M, John T, Seifarth C, et al. Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1095: 554 – 563. doi: 10.1196/annals.1397.060.

[25] Rao Z, Wang S, Wang J. Peroxiredoxin 4 inhibits IL-1β-induced chondrocyte apoptosis via PI3K/AKT signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 414 – 420. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.075.

[26] Lin Y, Tang G, Jiao Y, et al. Propionibacterium acnes induces intervertebral disc degeneration by promoting iNOS/NO and COX-2/PGE_2 activation via the ROS-dependent NF-κB pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 3692752. doi: 10.1155/2018/3692752. eCollection 2018.

[27] Bai X, Ding W, Yang S, et al. Higenamine inhibits IL-1β-induced inflammation in human nucleus pulposus cells[J]. Biosci Rep, 2019, 39(6): BSR20190857. doi: 10.1042/BSR20190857.

[28] Wang J, Chen H, Cao P, et al. Inflammatory cytokines induce caveolin-1/β-catenin signalling in rat nucleus pulposus cell apoptosis through the p38 MAPK pathway[J]. Cell Prolif, 2016, 49(3): 362 – 372. doi: 10.1111/cpr.12254.

[29] Lv F, Huang Y, Lv W, et al. MicroRNA-146a ameliorates inflammation via TRAF6/NF-κB pathway in intervertebral disc cells[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 659 – 664. doi: 10.12659/msm.898660.

[30] Shah BS, Burt KG, Jacobsen T, et al. High mobility group box-1 induces pro-inflammatory signaling in human nucleus pulposus cells via toll-like receptor 4-dependent pathway[J]. J Orthop Res, 2019, 37(1): 220 – 231. doi: 10.1002/jor.24154.

[31] Gomez R, Villalvilla A, Largo R, et al. TLR4 signalling in osteoarthritis-finding targets for candidate DMOADs[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11: 159 – 170. doi: 10.1038/nrrheum.2014.209.

[32] Zhang L, Chen Q, Wang H, et al. Andrographolide mitigates IL-1β-induced human nucleus pulposus cells degeneration through the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(6): 5427 – 5436. doi: 10.3892/mmr.2018.9599.

[33] Rajan NE, Bloom O, Maidhof R, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) expression and stimulation in a model of intervertebral disc inflammation and degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(16): 1343 – 1351. doi: 10.1097/BRS.0b013e31826b71f4.

[34] Qi W, Chen Y, Sun S, et al. Inhibiting TLR4 signaling by linarin for preventing inflammatory response in osteoarthritis[J]. Aging, 2021, 13(4): 5369 – 5382. doi: 10.18632/aging.202469.

[35] Bobacz K, Sunk IG, Hofstaetter JG, et al. Toll-like receptors and chondrocytes: the lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(6): 1880 – 1893. doi: 10.1002/art.22637.

[36] Kim JS, Ellman MB, Yan D, et al. Lactoferricin mediates anti-inflammatory and anti-catabolic effects via inhibition of IL-1 and LPS activity in the intervertebral disc[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(9): 1884 – 1896. doi: 10.1002/jcp.24350.

(编辑:贺绍梅)