

基础研究

柚苷对髓核间充质干细胞生物学性能的影响及其相关机制

南利平^{1,2,3}, 王静成^{2,3}, 王 峰^{1,2,3}, 周诗丰^{2,3}, 刘 洋^{1,2,3}, 王曙光^{1,2,3},
陈 东^{2,3}, 蔡同川^{1,2,3}, 冯新民^{2,3}, 张 亮^{2,3}

(1 大连医科大学研究生院 116000 大连市; 2 扬州大学临床医学院 225001 扬州市;
3 江苏省苏北人民医院骨科研究所 225001 扬州市)

【摘要】 目的:探讨柚苷对人退变椎间盘来源髓核间充质干细胞(human nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cell, hNP MSC)生物学性能的影响及其可能机制。**方法:**收集腰椎间盘突出患者的退变髓核组织,分离培养 hNP MSC 并进行体外扩增。通过细胞形态学观察、细胞免疫表型检测及三系分化进行间充质干细胞的鉴定。取 P3 代 hNP MSC 分为对照组(正常培养基培养)、柚苷组(以含 20 μ g/mL 柚苷的培养基培养)和 LY294002 组(用含 20 μ g/mL 柚苷及 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 的培养基培养),培养 6d 后通过流式细胞仪检测细胞凋亡率, TUNEL 荧光检测 TUNEL 染色阳性细胞率, Western Blot 检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白 p-Akt、Akt 和 p53 的表达, RT-PCR 检测 II 型胶原及蛋白多糖的 mRNA 表达。**结果:**来自人退变椎间盘髓核的原代细胞贴壁生长,呈不规则多边形,传代后以梭形为主;高表达干细胞相关阳性表面抗原分子 CD73、CD90 及 CD105,低表达 CD45 及 CD34;茜素红染色、油红 O 染色及甲苯胺蓝染色证实经诱导后可向骨、脂肪及软骨细胞分化,符合间充质干细胞的表型。与对照组比较,柚苷组细胞凋亡率、TUNEL 染色阳性细胞率、p53、Caspase-3 和 Bax 蛋白表达显著性下降, p-Akt 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著性增加($P<0.05$); LY294002 干预后可以逆转这种改变($P<0.05$)。与对照组比较,柚苷组 hNP MSC 中 II 型胶原及蛋白多糖的 mRNA 表达显著性增加; LY294002 组中 II 型胶原及蛋白多糖的 mRNA 表达较柚苷组显著性减少($P<0.05$)。**结论:**柚苷可通过激活 PI3K/Akt 信号通路减少细胞凋亡,促进 hNP MSC 向髓核细胞分化。

【关键词】髓核间充质干细胞;柚苷;椎间盘退变;凋亡;PI3K/Akt 信号通路

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.04.11

中图分类号: R681.5 文献标识码 A 文章编号: 1004-406X(2019)-04-0364-07

Biological effect and mechanism of naringin on human degenerative nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cell/NAN Liping, WANG Jingcheng, WANG Feng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(4): 364-370

【Abstract】 Objectives: To investigate the biological effect of naringin on human degenerative nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cell(hNP MSC), and to explore the possible mechanism. **Methods:** The nucleus pulposus tissue of patients with lumbar degenerated disc disease was collected, and hNP MSCs were isolated and cultured in vitro. MSC identification was performed on the isolated cells by observing cell morphology, flow cytometric immunophenotypic assay, and multilineage differentiation. The third generation hNP MSCs were divided into different groups depending on culture medium: control group in normal medium, naringin group in medium with certain concentration of naringin, LY294002 group in medium with certain concentration of naringin and LY294002 (PI3K/Akt pathway inhibitor), and the hNP MSCs in each group were incubated for 6 days separately. The apoptosis was detected by flow cytometry and TUNEL staining. The protein expressions of Caspase-3, Bcl-2, Bax and PI3K/Akt signaling pathway-related proteins p-Akt, Akt and p53 were detected by Western Blot. The mRNA expressions of collagen type II and aggrecan were detected by RT-PCR. **Re-**

基金项目:国家自然科学基金(81401830);江苏省青年医学人才项目(QNRC2016342)

第一作者简介:男(1994-),住院医师,医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(0514)87373342 E-mail:nlpgwkys@sina.com

通讯作者:张亮 E-mail:zhangliang6320@sina.com;冯新民 E-mail:fxmspine@sina.com

sults: The primary cells showed adherent growth in irregular polygons and transformed into fusiform after passage. The immune phenotype showed that the stem cell-associated positive surface antigen molecules CD73, CD90 and CD105 were highly expressed, but CD45 and CD34 were low expressed. Cells showed osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation after induced by alizarin red stain, Oil red O stain and toluidine blue stain respectively. Compared with the control group, the apoptosis rate, the rate of TUNEL positive cells, protein expressions of Caspase-3, Bax and p53 in the naringin group were significantly decreased, and the protein expressions of p-Akt and Bcl-2 were significantly increased ($P < 0.05$), but the effect could be reversed by LY294002. The mRNA expressions of collagen type II and aggrecan were significantly increased in the naringin group when compared with the control group, but the effect could be weakened by LY294002 ($P < 0.05$). **Conclusions:** Naringin can inhibit apoptosis by activating PI3K/Akt signaling pathway in hNPMSCs and promote differentiation into NP cells.

【Key words】 Nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells; Naringin; Disc degeneration; Apoptosis; PI3K/Akt signaling pathway

【Author's address】 Department of Orthopedics, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou, 225001, China

腰痛(low back pain, LBP)严重影响人们日常生活,带来巨大的经济和社会负担^[1]。虽然目前 LBP 的发生机制尚未完全明确,但一般认为椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是其主要原因^[2]。目前的常规治疗手段(保守治疗或手术)均只是对症治疗,难以修复重建退变椎间盘的结构及功能^[3]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)移植为基础的生物疗法在治疗 IDD 方面表现出较好的前景,但移植后的 MSC 难以长期存活成为目前 MSC 生物学治疗的主要障碍^[4];内源性 MSC 主导的修复越来越受到研究者的重视。退变椎间盘的局部不利环境导致髓核内源性间充质干细胞(nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells, NPMSC)数量减少及功能下降,从而不能发挥内源性修复作用可能是椎间盘退变的主要原因^[2-5]。柚苷(naringin)是从番茄、葡萄柚及相关柑橘类水果中提取的生物类黄酮,具有抗氧化、改善细胞凋亡、抗炎及调节细胞自噬等功能。有研究发现柚苷可以减少髓核细胞凋亡,促进脂肪 MSC 增殖并调节其分化^[6,7]。本研究在体外对人退变椎间盘来源的髓核间充质干细胞(hNPMSC)施加柚苷干预,探讨柚苷对 hNPMSC 增殖及凋亡的影响,并探讨其可能的机制,为治疗和预防 IDD 提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

培养瓶、6 孔及 96 孔培养板(Corning, 美国); LY294002 (MedChemexpress, 美国); 柚苷

($C_{27}H_{32}O_{14}$, 分子量:580.53, Sigma Aldrich)、II 型胶原酶、磷酸缓冲液(PBS)、二甲基亚砜(DMSO) (Sigma, 美国); DMEM/F12 培养基 (Hyclone, 美国); 胰蛋白酶(Solaibo, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国); CD34-APC、CD45-PE、CD73-FITC、CD90-FITC、CD105-PE、HLA-DR-APC 抗体 (eBioscience, 美国); 人 MSC 成骨、成脂、成软骨诱导培养液 (Cyagen, 中国); CCK-8 试剂盒 (Tokyo, 日本); Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、TUNEL 试剂盒、全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白试剂盒 (Beyotime, 中国); Real time PCR 仪 (Applied Biosystem, 美国); 荧光显微镜 (Olympus, 日本); FC500 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国); 抗体 Akt、p-Akt (Proteintech, 美国), Bax、Bcl-2、 β -actin、Caspase-3 及 p53 (AB-clonal, 中国); HiScript[®] Q RT SuperMix for qPCR、AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒 (Vazyme, 南京); RT-PCR 引物 (吉凯, 中国)。

1.2 hNPMSC 的分离培养

经医院伦理委员会同意并签署患者知情同意书,在术中收集 4 例腰椎间盘突出症患者手术切除的髓核组织(男 2 例,女 2 例;年龄 37~53 岁; L4/5 2 例, L5/S1 2 例。手术椎间盘 Pfirrmann 分级均为 IV 级)。显微镜下分离除去标本中混杂的韧带及纤维环组织,获取收集胶冻状髓核组织。将髓核组织切成小于 $1 \times 1 \times 1$ mm 组织团,加入 0.2% II 型胶原酶 37°C 消化 2h,用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤网过滤掉碎片组织。1500 转/min 离心 5min (离心半径

13.5cm), 弃去上清, 加入含 20% 胎牛血清的标准 MSC 培养基, 接种至 75cm² 培养瓶, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。每 2~3d 换液, 待细胞铺满瓶底 80% 后传代, P3 代细胞用于后续实验。

1.3 hNPMSC 的鉴定

1.3.1 细胞表型检测 取 P3 代细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 每管取 1ml 细胞, 用 PBS 洗涤离心后, 分别加入 100μl 用 PBS 稀释配制的 CD34-APC、CD73-FITC、CD45-PE、CD90-FITC、CD105-PE 及 HLA-DR-APC 单抗重悬细胞, 每管均设同型对照。混匀后室温下避光孵育 30min, PBS 清洗离心后重悬于 500μl 的 PBS 中, 上流式细胞仪检测。

1.3.2 三系诱导分化 将 P3 代 hNPMSC 以 5×10^5 个/ml 的密度重悬, 并以 1ml/孔的量接种在 6 孔板中。细胞达 80% 融合时, 按照操作说明用成骨、成脂和成软骨诱导培养液分别诱导。达到预定时间后, 用 PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定 30min, 然后用茜素红、油红 O 及甲苯胺蓝分别染色, 并在显微镜下观察拍照。

1.4 实验分组及干预

取 P3 代 hNPMSC 分为 3 组, 对照组: 正常培养基培养; 柚苷组: 根据前期预实验结果, 以含 20μg/ml 柚苷的培养液培养; LY294002 组: 以含有 20μg/ml 柚苷及 LY294002 的培养液培养, 各培养 6d 后收集细胞。以下实验项目中检测所用细胞均按照此方法干预, 实验均重复 3 次。

1.5 柚苷对 hNPMSC 凋亡的影响

hNPMSC 按 5×10^5 个/孔接种在 6 孔板中, 细胞融合达 80% 时, 施加不同干预后收集细胞, 根据 Annexin-V/PI 试剂盒说明书操作, PBS 洗涤 2 次, 消化离心后重悬细胞于 500μl 缓冲液中, 充分吹散细胞, 各加入 5μl 的 Annexin-VFITC 液, 室温避光孵育 15min, 再加入 5μl 的 PI 染色液, 室温避光反应 5min 后在流式细胞仪上机检测细胞凋亡情况。

hNPMSC 按照 1.5×10^5 个/孔接种至 24 孔板, 细胞达 70%~80% 融合时, 施加不同干预, PBS 洗涤 1 次, 4% 多聚甲醛于 37℃ 固定 30min, PBS 洗涤 3 次, 再用 0.1% Triton X-100 作用 5min, PBS 洗涤 3 次后分别加入 50μl TUNEL 液, 37℃ 避光孵育 60min, PBS 洗涤, 加入抗荧光淬灭封片液封片, 置于 40 倍荧光显微镜下随机选取 10 个视野

分别计数 TUNEL 阳性细胞数和总细胞数目, 并观察拍照。

1.6 柚苷对凋亡及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

收集各组按照前述方法处理后的细胞, 全蛋白试剂盒提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 调整上样量为 25μg 总蛋白/孔, 上样, 电泳, 转膜, 封闭后, 分别加入一抗 (Akt 1:5000; p-Akt 1:1000; Bax 1:500; Bcl-2 1:500; β-actin 1:10000; Caspase-3 1:500; p53 1:500), 4℃ 过夜, TBST (Trisbuffered saline+Tween 20) 洗涤 3 次, 加入发光液后用 BIO-RAD ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统拍照, Image J 软件分析条带灰度值。每组设 3 个复孔, 重复实验 3 次。

1.7 柚苷对蛋白多糖和 II 型胶原 mRNA 表达的影响

收集各组按照前述方法干预后的细胞, Trizol 法提取各组细胞的总 RNA, 多功能酶标仪检测提取 RNA 浓度和纯度。严格按逆转录试剂盒操作合成 cDNA。以得到的 cDNA 为模板, β-actin 为内参, 按照 SYBR Green 试剂盒操作说明进行扩增检测, PCR 引物见表 1。反应条件: 95℃, 5min; 40 个循环 (95℃, 10s; 60℃, 30s); 终止 (95℃, 15s; 60℃, 60s, 95℃, 15s)。每组设 3 个复孔, 重复 3 次。按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析 II 型胶原及蛋白多糖的 mRNA 表达。

1.8 统计学分析

数据采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料使用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hNPMSC 细胞形态观察及鉴定

原代细胞接种 3d 后开始贴壁, 呈不规则多边

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

名称 name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
蛋白多糖 Aggrecan	F: TCCACAAGGAGAGAGGGTA R: GTAGGTGGTGGCTAGGACGA-3
II 型胶原 Collagen type II	F: CATCCACCCCTCTCACAGTT R: ACCAGTTAGTTTCTGCCTCTG
β-actin	F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG R: GATGGACTTGAAGGTAGTTTCG

形。5d 后贴壁细胞迅速增多,增殖细胞从岛状的细胞集落分化而来,细胞核类圆盘状,分界清楚,核仁明显,胞浆较淡(图 1)。传代后细胞形态以梭形为主,细胞增殖速度明显加快。流式细胞仪免疫表型检测 P3 代 hNPMSC 高表达 MSC 相关阳性表面抗原分子 CD105(99.14%)、CD90(98.36%)及 CD73(98.77%),低表达相关阴性抗原分子 CD45(0.93%)及 CD34(1.35%)。成脂诱导油红“O”染色后可见点状红染的脂滴泡(图 2a);成骨诱导并用茜素红染色可见大量红染沉积的矿盐(图 2b);成软骨诱导甲苯胺蓝染色后可见蓝染的软骨样细胞(图 2c)。说明从退变椎间盘髓核中分离的细胞符合国际细胞治疗学会关于 MSC 的鉴定标准。

2.2 柚苷对 hNPMSC 凋亡的影响

柚苷组细胞凋亡率 $[(7.47 \pm 0.65)\%]$ 较对照组 $[(12.53 \pm 1.40)\%]$ 显著性下降($P < 0.05$),而 LY294002 组细胞凋亡率 $[(10.25 \pm 0.67)\%]$ 较柚苷组有所增加,但仍低于对照组($P < 0.05$,图 3)。柚苷组中 TUNEL 染色阳性细胞比率 $[(4.06 \pm 1.57)\%]$ 较对照组 $[(11.51 \pm 2.56)\%]$ 显著性下降($P < 0.05$),而 LY294002 组 TUNEL 染色阳性细胞比率 $[(7.69 \pm 1.28)\%]$ 较柚苷组显著性上升($P < 0.05$,图 4)。

2.3 柚苷对凋亡及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达情况的影响

与对照组比较,柚苷组促凋亡蛋白 Caspase-

3、Bax 及 PI3K/Akt 信号通路下游 p53 蛋白表达减少,p-Akt 及抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加($P < 0.05$,图 5 和表 2)。与柚苷组比较,LY294002 组促凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 及 p53 蛋白表达增加,而 p-Akt 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少($P < 0.05$,图 5 和表 2)。

2.4 柚苷对蛋白多糖和 II 型胶原 mRNA 表达的影响

三组细胞 II 型胶原及蛋白多糖 mRNA 的表达量见表 3。与对照组比较,柚苷组中 II 型胶原及蛋白多糖的 mRNA 表达显著性增加;LY294002 组中 II 型胶原及蛋白多糖的 mRNA 表达较柚苷组减少($P < 0.05$,表 3)。

3 讨论

3.1 柚苷对 hNPMSC 增殖及凋亡的影响

以 MSC 移植为基础的生物疗法在治疗 IDD 方面表现出较好的前景^[8]。然而由于退变椎间盘局部的低氧、低糖及高渗的不利微环境,移植后的 MSC 难以长期存活成为目前 MSC 生物学治疗的主要障碍^[9]。内源性 MSC 为主导的修复在 IDD 的修复与重建中越来越受到研究者的重视。自 2010 年 Blanco 等^[10]首次证实存在退变椎间盘中存在内源性 MSC 后,研究发现髓核来源的 MSC(nucleus pulposus-derived MSC,NPMSC)较其他类型的 MSC 可以更好地耐受椎间盘退变后的低氧、低糖

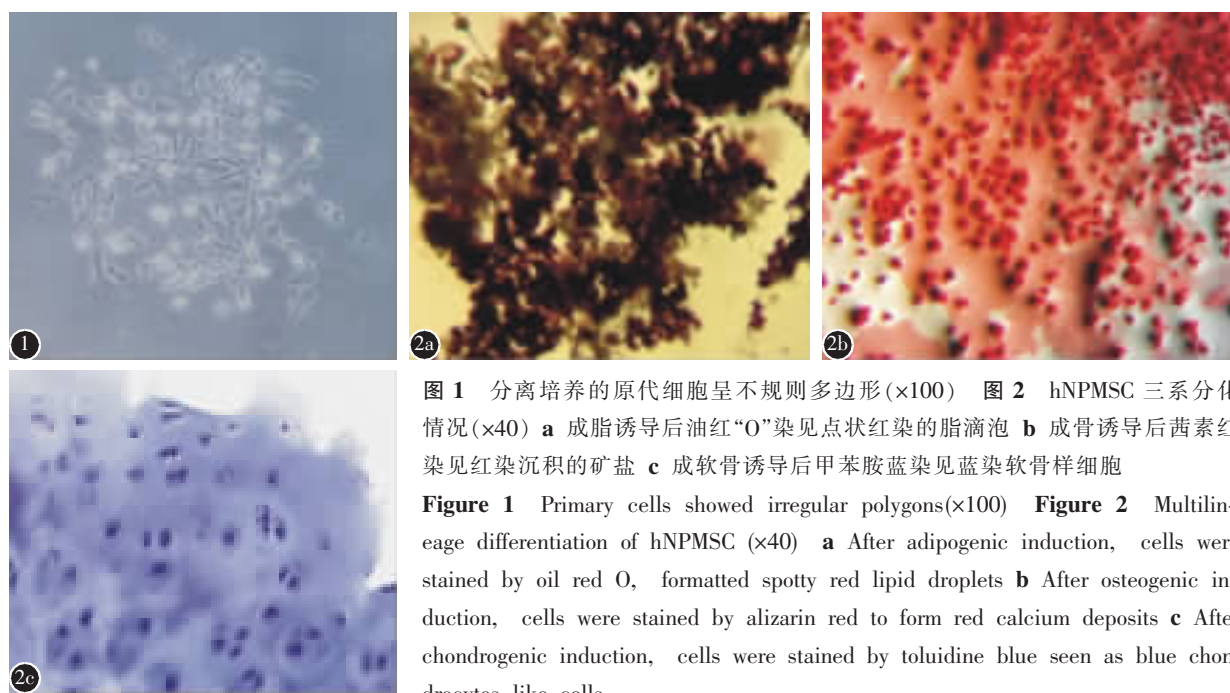


图 1 分离培养的原代细胞呈不规则多边形($\times 100$) 图 2 hNPMSC 三系分化情况($\times 40$) a 成脂诱导后油红“O”染见点状红染的脂滴泡 b 成骨诱导后茜素红染见红染沉积的矿盐 c 成软骨诱导后甲苯胺蓝染见蓝染软骨样细胞

Figure 1 Primary cells showed irregular polygons($\times 100$) **Figure 2** Multilineage differentiation of hNPMSC ($\times 40$) **a** After adipogenic induction, cells were stained by oil red O, formatted spotty red lipid droplets **b** After osteogenic induction, cells were stained by alizarin red to form red calcium deposits **c** After chondrogenic induction, cells were stained by toluidine blue seen as blue chondrocytes-like cells

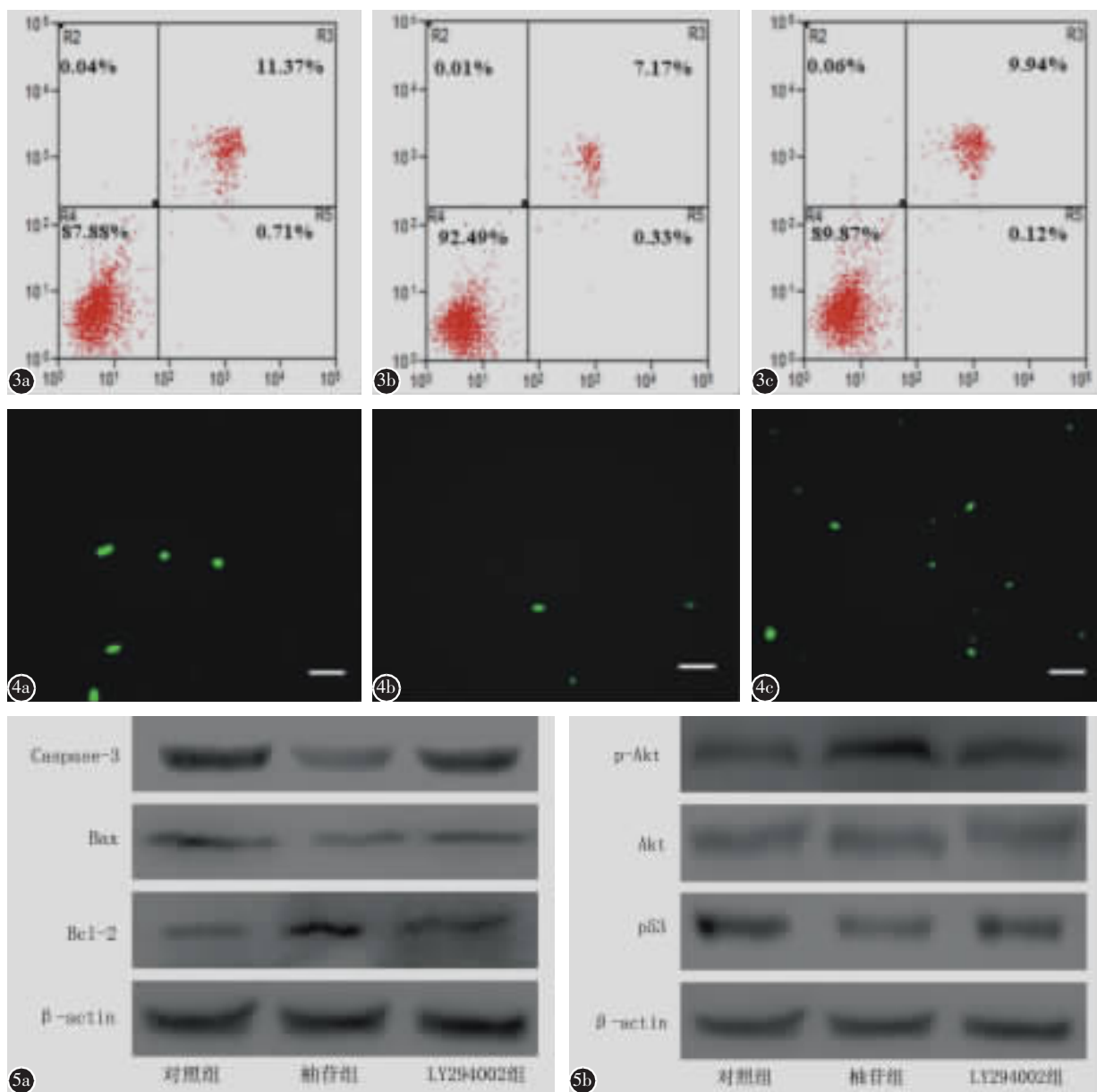


图 3 不同组别细胞凋亡率 **a** 对照组 **b** 柚苷组,细胞凋亡率较对照组下降 **c** LY294002 组,细胞凋亡率较柚苷组升高 **图 4** TUNEL 荧光检测结果 **a** 对照组 **b** 柚苷组,TUNEL 阳性染色细胞率较对照组下降 **c** LY294002 组,TUNEL 阳性染色细胞率较柚苷组升高 **图 5** 蛋白检测结果 **a** 凋亡相关蛋白表达情况:柚苷组促凋亡蛋白 Caspase-3 及 Bax 较对照组下降,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加,而 LY294002 加入后这一作用被抑制 **b** PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达情况:柚苷组 p-Akt 蛋白表达较对照组上升,而 p53 表达下降,而 LY294002 加入后这一作用被抑制

Figure 3 Cell apoptosis rate in different groups **a** Control group **b** The cell apoptosis rate of the naringin group was lower than that of the control group **c** The cell apoptosis rate of LY294002 group was higher than that of the naringin group **Figure 4** TUNEL fluorescence **a** TUNEL fluorescence in control group **b** The rate of TUNEL positive staining cells of the naringin group was lower than that of the control group **c** The rate of TUNEL positive staining cells of LY294002 group was higher than that of the naringin group **Figure 5** Expressions of protein **a** The expression of apoptosis related proteins: the pro-apoptotic protein of Caspase-3 and Bax decreased, and the proteins expressions of anti-apoptosis proteins Bcl-2 increased in the naringin group compared with those in the control group, but this effect was inhibited when pretreated with LY294002 **b** The expression of PI3K/Akt signaling pathway related proteins: the expressions of p-Akt increased, and the p53 decreased in the naringin group compared with those in the control group, but this effect was inhibited when pretreated with LY294002

及高渗的不利微环境^[11,12]。同时在动物模型中 NPMSC 移植较髓核细胞移植表现出更好的椎间盘退变修复效果^[13]。然而,随着衰老及椎间盘退变程度加重,椎间盘中内源性的 NPMSC 数量减少,增殖能力减弱^[14,15]。我们在前期的动物模型研究中发现退变椎间盘来源的 NPMSC 表现出增殖能力减弱、干细胞干性维持能力下降及细胞凋亡增加的生物学特性^[5]。退变椎间盘的局部不利环境导致 NPMSC 数量减少及功能下降,由此导致的内源性修复失败被认为可能是椎间盘退变的主要原因之一^[16]。因此,维持 NPMSC 的数量及功能在椎间盘退变内源性修复过程中至关重要。

有研究发现某些分子可以调控内源性干细胞增殖与分化,促进其存活或诱导其分化为内源性修复所需要的特定细胞^[17]。柚苷是一种天然的植物抗毒素,其在不同的细胞类型中具有广泛的保护作用^[18]。有研究表明,柚苷可以有效促进髓核细胞增殖,促进髓核细胞外基质 mRNA 表达,提示

柚苷可能在延缓和/或再生椎间盘退变中发挥重要作用^[6]。然而柚苷对 NPMSC 影响的研究少有报道。本研究结果显示从人退变椎间盘髓核中分离培养的细胞符合 MSC 定义标准。通过预实验选择 20 μ g/ml 的柚苷,发现柚苷可以降低退变椎间盘髓核来源的 hNPMSC 凋亡率及 TUNEL 染色阳性细胞率,减少促凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax 表达,促进抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达。说明合适浓度的柚苷可以减少 hNPMSC 凋亡。

3.2 柚苷改善 hNPMSC 凋亡的机制

有研究发现柚苷可靶向降低氧化应激对髓核细胞及 MSC 造成的损伤^[7,17],而 PI3K/Akt 通路参与髓核细胞及 MSC 凋亡的调控,并且在 IDD 中发挥关键作用^[19]。Bcl-2 作为最主要的抗凋亡蛋白,Bax 作为促凋亡蛋白,当细胞受损或增殖功能受抑制时 Bcl-2 表达减少,Bax 表达增加,Bcl-2/Bax 比例失调^[20,21]。Caspase-3 处于细胞凋亡级联反应的下游,Bcl-2/Bax 下降时,Caspase-3 作为凋亡的最终执行者其表达随之增加^[22]。本研究发现柚苷可以减少 PI3K/Akt 通路相关蛋白 p53 及促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达,同时增加 PI3K/Akt 通路相关蛋白 Akt 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,而应用 PI3K/Akt 信号通路的特异性抑制剂 LY294002 可以逆转这一效应。说明柚苷可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥抗 hNPMSC 凋亡作用。

3.3 柚苷对 hNPMSC 向髓核细胞分化的影响

有研究发现柚苷可以调节 MSC 分化^[7],促进髓核细胞中 II 型胶原及蛋白多糖的表达^[6]。Sheng 等^[23]的研究证实激活 PI3K/Akt 信号通路可以调节骨髓 MSC 向内皮细胞分化,并促进内皮细胞的旁分泌功能。我们前期在细胞实验及动物模型研究均证实激活 PI3K/Akt 信号通路可以促进髓核细胞表达细胞外基质^[24]。本研究发现 20 μ g/ml 的柚苷可以促进 hNPMSC 中 II 型胶原及蛋白多糖的表达,而 PI3K/Akt 信号通路的特异性抑制剂 LY294002 可以降低柚苷的这一作用。说明柚苷可能可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进 hNPMSC 向髓核细胞分化。

综上所述,合适浓度的柚苷可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路改善细胞凋亡,同时一定程度上促进 hNPMSC 向髓核细胞分化。但由于本实验对柚苷的作用机制仅停留在细胞水平,具有一定

表 2 三组细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression level of apoptosis and PI3K/Akt signaling pathway related proteins

	对照组 Control group	柚苷组 Naringin group	LY294002 组 LY294002 group
p-Akt	1.00 $\pm$ 0.01	1.75 $\pm$ 0.23 ^①	1.37 $\pm$ 0.19 ^②
p53	1.00 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.22 ^①	0.86 $\pm$ 0.06 ^②
Caspase-3	1.00 $\pm$ 0.00	0.70 $\pm$ 0.04 ^①	0.84 $\pm$ 0.06 ^②
Bax	1.00 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.14 ^①	0.71 $\pm$ 0.03 ^②
Bcl-2	1.00 $\pm$ 0.02	1.76 $\pm$ 0.15 ^①	1.35 $\pm$ 0.07 ^②

注:①与对照组比较 $P < 0.05$; ②与柚苷组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$; ②Compared with naringin group, $P < 0.05$

表 3 三组细胞蛋白多糖和 II 型胶原的 mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The expressions of aggrecan and collagen type II of the three groups

	蛋白多糖 Aggrecan	II 型胶原 Collagen type II
对照组 Control group	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.08
柚苷组 Naringin group	1.43 $\pm$ 0.09 ^①	1.34 $\pm$ 0.05 ^①
LY294002 组 LY294002 group	1.09 $\pm$ 0.02 ^②	1.09 $\pm$ 0.03 ^②

注:①与对照组比较 $P < 0.05$; ②与柚苷组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with control group, $P < 0.05$; ②Compared with naringin group, $P < 0.05$

局限性。另外,本研究 hNPMSC 是在常氧条件下培养,这与 hNPMSC 所处的椎间盘退变后的低氧、低糖及高渗的实际环境不符;且是体外研究,尚需动物模型进一步研究证实柚苷的保护作用。

4 参考文献

- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1545–1602.
- Ma K, Chen S, Li Z, et al. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(1): 41–48.
- Chen BL, Guo JB, Zhang HW, et al. Surgical versus non-operative treatment for lumbar disc herniation: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Rehabil*, 2018, 32(2): 146–160.
- Noriega DC, Ardura F, Hernandez-Ramajo R, et al. Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled trial[J]. *Transplantation*, 2017, 101(8): 1945–1951.
- 刘洋, 王静成, 冯新民, 等. 正常与退变椎间盘来源髓核间充质干细胞的生物学性能比较[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(6): 1111–1114.
- Zhang Z, Wang C, Lin J, et al. Therapeutic potential of naringin for intervertebral disc degeneration: involvement of autophagy against oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells[J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(7): 1561–1580.
- Wang L, Zhang YG, Wang XM, et al. Naringin protects human adipose-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteogenic differentiation [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 242: 255–261.
- Kumar H, Ha DH, Lee EJ, et al. Safety and tolerability of intradiscal implantation of combined autologous adipose-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid in patients with chronic discogenic low back pain: 1-year follow-up of a phase I study[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 262.
- Sakai D, Andersson GB. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(4): 243–256.
- Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2010, 35(26): 2259–2265.
- Han B, Wang HC, Li H, et al. Nucleus pulposus mesenchymal stem cells in acidic conditions mimicking degenerative intervertebral discs give better performance than adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cells Tissues Organs*, 2014, 199(5–6): 342–352.
- Li H, Tao Y, Liang C, et al. Influence of hypoxia in the intervertebral disc on the biological behaviors of rat adipose- and nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 2013, 198(4): 266–277.
- Chen X, Zhu L, Wu G, et al. A comparison between nucleus pulposus-derived stem cell transplantation and nucleus pulposus cell transplantation for the treatment of intervertebral disc degeneration in a rabbit model [J]. *Int J Surg*, 2016, 28: 77–82.
- Jia Z, Yang P, Wu Y, et al. Comparison of biological characteristics of nucleus pulposus mesenchymal stem cells derived from non-degenerative and degenerative human nucleus pulposus[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 3574–3580.
- Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc[J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1264.
- Clouet J, Fusellier M, Camus A, et al. Intervertebral disc regeneration: From cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, [Epub ahead of print].
- Qin H, Zhao A, Fu X. Chemical modulation of cell fates: in situ regeneration[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(10): 1137–1150.
- Viswanatha GL, Shylaja H, and Moolemath Y. The beneficial role of Naringin: a citrus bioflavonoid, against oxidative stress-induced neurobehavioral disorders and cognitive dysfunction in rodents: a systematic review and meta-analysis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 909–929.
- 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.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49–63.
- Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26–34.
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases[J]. *Science*, 1997, 278(5345): 1966–1968.
- Sheng L, Mao X, Yu Q, et al. Effect of the PI3K/AKT signaling pathway on hypoxia-induced proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1): 55–62.
- Cheng X, Zhang G, Zhang L, et al. Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 261–276.

(收稿日期:2019-01-24 末次修回日期:2019-03-11)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)