

# 脂联素通过 AMPK/mTOR 通路抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠髓核细胞凋亡及细胞外基质退变

王 振<sup>1</sup>, 胡峻铮<sup>2</sup>, 范卫民<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>东南大学附属中大医院骨科, 江苏 南京 210009

**[摘要]** 目的:探讨脂联素(adiponectin, APN)对氧化应激下大鼠髓核细胞凋亡和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)退变的保护作用及相关机制。方法:原代培养SD大鼠髓核细胞, CCK-8法检测细胞活力, 以确定APN的最适保护浓度。将细胞分为对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组及Compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组, 流式细胞术检测凋亡率, Western blot检测Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3、基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)及带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5, ADAMTS-5)等蛋白的表达, RT-PCR检测Ⅱ型胶原(collagen type II alpha 1 chain, COL2A1)、蛋白聚糖(aggrecan, ACAN)的mRNA水平, Western blot评估5'-单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的磷酸化水平。结果:1 μg/mL APN对200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致的细胞毒性起最佳拮抗作用。APN预处理显著抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的髓核细胞凋亡。相应地, Bax/Bcl-2比值及Cleaved Caspase-3表达的增加也被APN抑制。尽管对ADAMTS-5无明显抑制作用, APN降低了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的MMP-13的表达。此外, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对COL2A1及ACAN转录的抑制作用也被APN显著缓解。APN还促进AMPK磷酸化并抑制mTOR磷酸化, 而AMPK抑制剂Compound C显著减轻了APN对mTOR磷酸化的抑制作用。APN对凋亡、分解代谢的抑制作用及其对合成代谢的促进作用也均被Compound C逆转。结论:APN通过AMPK/mTOR通路抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的大鼠髓核细胞凋亡及ECM退变。

**[关键词]** 脂联素; 髓核细胞; 凋亡; 细胞外基质退变; AMPK/mTOR通路

**[中图分类号]** R329.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)07-928-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180711

## Adiponectin inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and extracellular matrix degradation in rat nucleus pulposus cells through AMPK/mTOR pathway

Wang Zhen<sup>1</sup>, Hu Junzheng<sup>2</sup>, Fan Weimin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effects of adiponectin (APN) on apoptosis and extracellular matrix (ECM) degradation in rat nucleus pulposus (NP) cells under oxidative stress. **Methods:** Cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) to determine the optimal protective concentration of APN. Cells were randomly divided into the control group, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, the APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and the compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. Apoptosis incidence was evaluated by flow cytometry. The expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5) was detected by Western blot. The mRNA levels of collagen type II alpha 1 chain (COL2A1) and aggrecan (ACAN) were detected by RT-PCR. The phosphorylation levels of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) were evaluated by Western blot. **Results:** One μg/mL APN conferred the optimal protection against the cytotoxicity of 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. APN pretreatment significantly suppressed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in NP cells. Consistently, the increase in Bax/Bcl-2 ratio and the expression of cleaved caspase-3 was also inhibited by APN. Although no notable inhibitory effect on ADAMTS-5 was observed, APN reduced the expression of MMP-13 induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Besides, the inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81672169, 81472079)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fanweimin@vip.sina.com

on the transcription of COL2A1 and ACAN was also notably abated by APN. APN also induced the phosphorylation of AMPK and suppressed the phosphorylation of mTOR. Inhibition of AMPK with compound C alleviated the suppression of APN on mTOR phosphorylation. Moreover, the inhibition of APN on apoptosis and catabolism, together with the promotion of APN on anabolism were also reversed by compound C. **Conclusion:** APN inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and ECM degradation in rat NP cells in an AMPK/mTOR dependent manner.

[Key words] adiponectin; nucleus pulposus cell; apoptosis; extracellular matrix degradation; AMPK/mTOR pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07): 928-933, 961]

腰椎间盘突出是骨科临床中导致下腰痛的主要原因之一。椎间盘由髓核、纤维环及相邻的终板软骨共同组成。凝胶状的髓核组织主要由髓核细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组成。髓核ECM主要由Ⅱ型胶原(collagen type II alpha 1 chain, COL2A1)和蛋白聚糖(aggrecan, ACAN)组成。髓核组织ECM的降解主要由基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族及带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)家族参与完成。髓核细胞的过量凋亡及ECM的退变,均是椎间盘退变的重要诱因。因此,通过建立实验性大鼠髓核细胞凋亡及ECM退变模型,研究髓核退变的发病机制,开发新的干预药物,具有重要的临床意义。

脂联素(adiponectin, APN)是一种脂肪细胞源性的细胞因子。通过对5'-单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的调节,APN可发挥抗炎、抗癌等多种作用<sup>[1-2]</sup>。既往研究表明,APN可抑制白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导的软骨细胞基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase -13, MMP-13)的表达,促进基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase -2, TIMP-2)的表达并抑制软骨细胞凋亡<sup>[3-4]</sup>,提示APN可能发挥软骨保护作用。髓核细胞是软骨样细胞,与软骨细胞具有相似的细胞学行为。而APN对髓核细胞凋亡及ECM退变的作用尚不明确。本研究应用过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)构建大鼠髓核细胞凋亡及ECM退变模型,观察APN对髓核细胞凋亡和ECM退变的作用,并探讨可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

重组大鼠脂联素(Biovision公司,美国), Cell

Counting Kit-8试剂盒(CCK-8, Dojindo公司,日本), Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(南京凯基生物公司), 抗Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3、 $\beta$ -actin抗体(CST公司,美国), 抗MMP-13、ADAMTS-5、p-AMPK(Thr172)、AMPK、p-mTOR(Ser2448)、mTOR抗体(Abcam公司,英国), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Sigma公司,美国), AMPK抑制剂Compound C(Selleck公司,美国), 胎牛血清、青霉素、链霉素、低糖DMEM培养基(Gibco公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠髓核细胞的分离、培养

选择体重225~250 g的SD大鼠(上海西普尔-毕凯实验动物有限公司)予致死量的戊巴比妥钠。无菌条件下,暴露椎间盘并分离出凝胶状的髓核。将髓核剪至1 mm×1 mm×1 mm大小并移至培养皿,用0.1%Ⅱ型胶原酶和2 U/mL透明质酸酶37℃消化4 h。消化结束后,1 000 r/min收集髓核组织。将组织块接种于培养皿,加入含1%青、链霉素及10%胎牛血清的低糖DMEM培养基,置于含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中37℃恒温培养。约1周后,有细胞爬出贴壁。待细胞达90%融合时,用胰酶消化收集细胞并进行传代。第2代髓核细胞被用于后续实验。

#### 1.2.2 实验设计与分组

分别予不同浓度的APN、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及APN+200  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理大鼠髓核细胞, CCK-8实验检测细胞活力以确定APN的毒性作用、用于造模的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度以及APN的最佳保护浓度。将细胞分为对照(Control)组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组及Compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组, 分别以普通培养液、200  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、1  $\mu$ g/mL浓度APN预处理2 h后再加入200  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或10  $\mu$ mol/L Compound C预处理1 h后,用APN和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>共同处理大鼠髓核细胞,流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot检测凋亡相关蛋白和MMP-13、ADAMTS-5的表达, RT-PCR检测COL2A1及ACAN mRNA表达情况,观察APN对髓核细胞凋亡及ECM退变的保护作用; Western blot检测AMPK/mTOR磷

酸化水平,以确定 APN 是否通过 AMPK/mTOR 通路发挥作用。

### 1.2.3 CCK-8检测细胞活力

按照 5 000 个/孔的密度将髓核细胞接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,更换无血清培养基,饥饿处理 24 h 后,按照上述实验方案,予不同实验因素处理细胞 24 h,各组设置 3 个复孔。将 CCK-8 试剂与新鲜培养基按 1:10 的体积比进行预混。每孔加入 100  $\mu$ L 预混液,37  $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h 后,用酶标仪测定 450 nm 波长下各孔的吸光度。实验重复 3 次。

### 1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

将细胞以适当的密度接种于 6 孔板,待细胞达 70% 融合时,予无血清培养基饥饿处理 24 h,随后按上述实验方案处理细胞。24 h 后,用不含 EDTA 的胰酶收集细胞。根据试剂盒说明,予 0.5 mL Binding Buffer 悬浮细胞,随后每个样本中加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI,充分混匀,室温反应 10 min 后上机检测。实验重复 3 次。

### 1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

用含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min。收集细胞裂解液,经 4  $^{\circ}$ C、12 000  $g$  离心 15 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,5 $\times$ 上样缓冲液混匀,煮沸 5 min。取样品蛋白按 30  $\mu$ g/孔上样,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将蛋白转印至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,将 PVDF 膜予相应的一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日予 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,漂洗 3 次后用 ECL 试剂盒显影成像,并用 Bio-Rad 软件进行分析。实验重复 3 次。

### 1.2.6 RT-PCR 检测 mRNA 水平

酶消化法收集细胞,TRIzol 法提取细胞总 RNA。用 Taqman 逆转录试剂盒将 1  $\mu$ g 总 RNA 逆

录成 cDNA。反应体系:SYBR Premix Extaq<sup>TM</sup>(TaKaRa 公司,日本)10  $\mu$ L,模板 5  $\mu$ L,引物 2.5  $\mu$ L,灭菌蒸馏水 2.5  $\mu$ L。使用 Roche Diagnostics 的 LightCycler 480 System 系统进行目的基因的定量 PCR。以  $\beta$ -actin 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行数据分析。实验重复 3 次。引物序列如下:COL2A1 上游引物:5'-GC-CAGGATGCCCGAAAATTAG-3',下游引物:5'-CCA-GCCTTCTCGTCAAATCCT-3';ACAN 上游引物:5'-ATGGCATTGAGGACAGCGAA-3',下游引物:5'-GC-TCGGTCAAAGTCCAGTGT-3'; $\beta$ -actin 上游引物:5'-CCGCGAGTACAACCTTCTTG-3',下游引物:5'-TGA-CCCATACCCACCATCAC-3'。

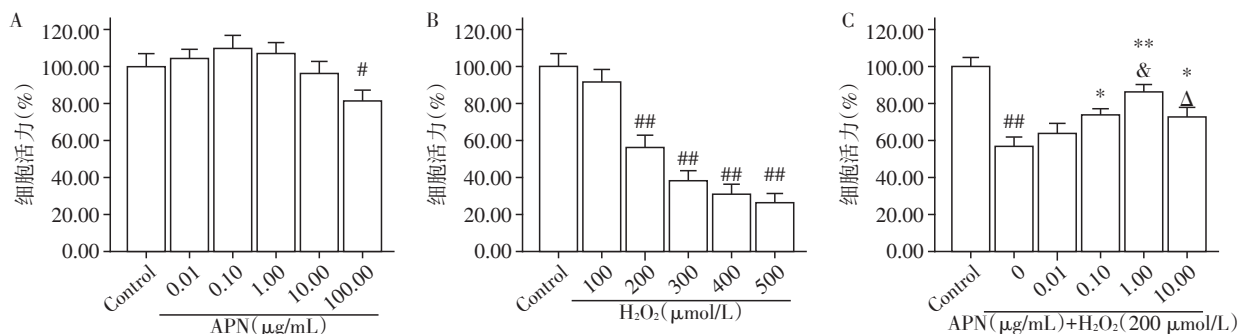
### 1.3 统计学方法

应用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行统计学分析。数值以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),各组间两两比较采用 LSD 法, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 APN 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用下的大鼠髓核细胞起保护作用

CCK-8 结果显示,100  $\mu$ g/mL 的 APN 可显著抑制大鼠髓核细胞活力( $P < 0.05$ ),而 10  $\mu$ g/mL 及以下浓度的 APN 对大鼠髓核细胞无明显毒性作用( $P > 0.05$ )。此外,200  $\mu$ mol/L 浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可显著抑制髓核细胞的活力( $P < 0.05$ ),这一浓度被用于后续实验中氧化损伤模型的建立。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比,0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL APN 预处理组细胞活力显著增加( $P < 0.05$ )。且 1.0  $\mu$ g/mL APN 预处理组细胞活力显著高于 0.1 及 10.0  $\mu$ g/mL APN 预处理组( $P < 0.05$ ,图 1)。即 APN 的最佳保护浓度为 1  $\mu$ g/mL。



A: CCK-8法检测不同浓度 APN 对髓核细胞活力的影响;B: CCK-8 法检测不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对髓核细胞活力的影响;C: CCK-8 法检测不同浓度 APN+ 200  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对髓核细胞活力的影响。与对照组比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.001$ ;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.001$ ;与 0.10  $\mu$ g/mL APN 预处理组比较,\* $P < 0.01$ ;与 1.00  $\mu$ g/mL APN 预处理组比较, $\Delta P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图 1 APN、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对髓核细胞活力的影响

Figure 1 Effects of adiponectin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the viability of nucleus pulposus cells

## 2.2 APN抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的髓核细胞凋亡

与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理显著上调细胞凋亡率( $P < 0.05$ );而与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比,APN预处理显著降低细胞凋亡率( $P < 0.05$ ,图2)。Western blot的结果显示,与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显著上调髓核细胞Bax/Bcl-2及Cleaved Caspase-3的表达水平( $P < 0.05$ ),而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对Bax/Bcl-2比值及Cleaved Caspase-3表达的上调作用均被APN预处理所抑制( $P < 0.05$ ,图3)。

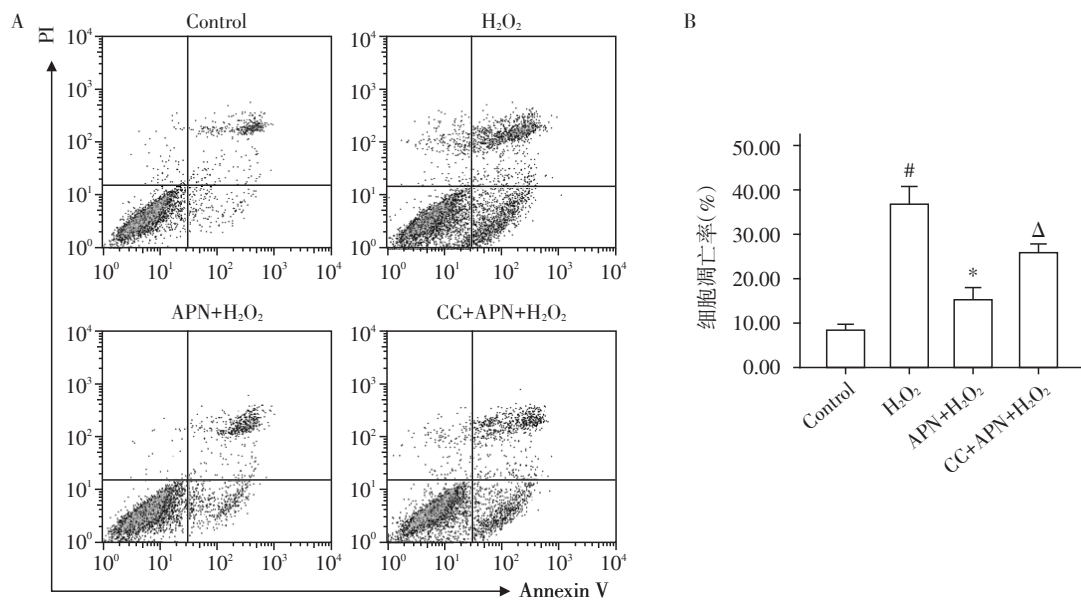
## 2.3 APN抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的MMP-13表达

本研究检测了MMP-13和ADAMTS-5的蛋白表

达。与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理显著上调髓核细胞MMP-13和ADAMTS-5蛋白的表达( $P < 0.05$ )。而与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比,APN预处理组髓核细胞MMP-13的表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),但ADAMTS-5的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图4)。

## 2.4 APN减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对COL2A1及ACAN转录的抑制作用

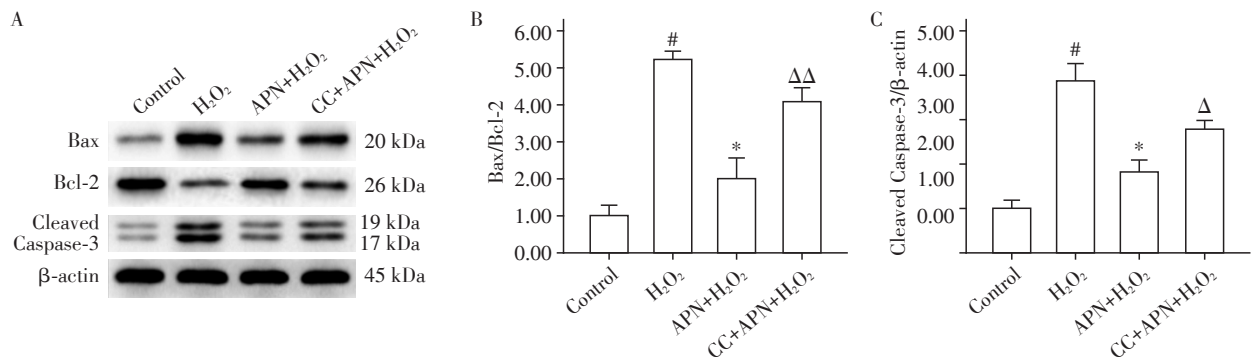
本研究检测了COL2A1及ACAN基因的转录。与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组髓核细胞COL2A1及ACAN的mRNA水平显著降低( $P < 0.05$ )。而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对



A、B:流式细胞术检测髓核细胞凋亡率。与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.001$ ;与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.01$ ;与APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ( $n=3$ )。CC: Compound C。

图2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对髓核细胞凋亡率的影响

Figure 2 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and Compound C+adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on apoptosis incidence in nucleus pulposus cells

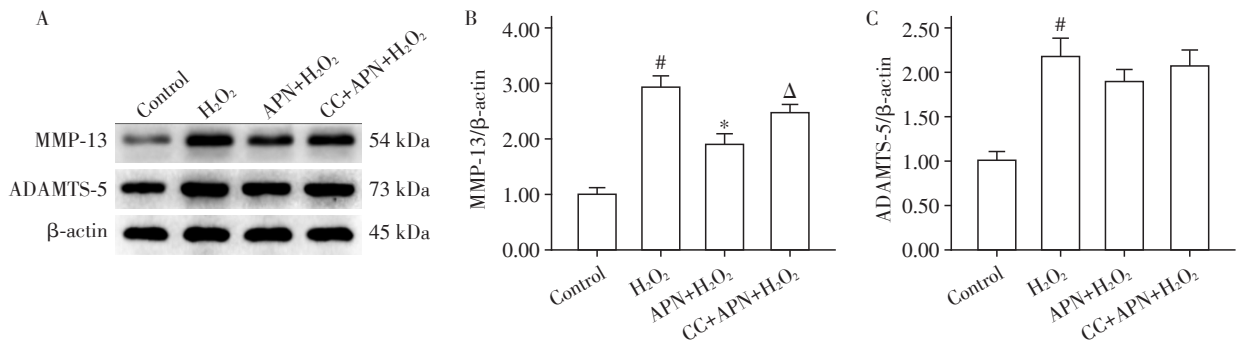


A:Western blot检测Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3的表达;B:Bax/Bcl-2比值相对定量;C:Cleaved Caspase-3蛋白相对表达水平。与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.001$ ;与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.001$ ;与APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.01$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.001$ ( $n=3$ )。CC:Compound C。

图3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对髓核细胞凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2及Cleaved Caspase-3表达的影响

Figure 3 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Compound C+adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the expression of apoptosis-related proteins including Bax, Bcl-2 and cleaved caspase-3 in nucleus pulposus cells





A:Western blot检测MMP-13、ADAMTS-5的表达;B:MMP-13蛋白相对表达水平;C:ADAMTS-5蛋白相对表达水平。与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.001$ ;与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.001$ ;与APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.01$ ( $n=3$ )。CC:Compound C。

图4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对髓核细胞MMP-13及ADAMTS-5表达的影响

Figure 4 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Compound C+adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the expression of MMP-13 and ADAMTS-5 in nucleus pulposus cells

COL2A1及ACAN基因转录的抑制作用均被APN预处理缓解( $P < 0.05$ ,图5)。

### 2.5 APN促进AMPK磷酸化并抑制mTOR磷酸化

与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组AMPK磷酸化水平轻度增高( $P < 0.05$ )。而与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比,APN预处理显著诱导AMPK磷酸化( $P < 0.05$ )。此外,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理轻度抑制mTOR磷酸化( $P < 0.05$ )。而与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比,APN预处理进一步降低mTOR磷酸化水平( $P < 0.05$ ,图6)。

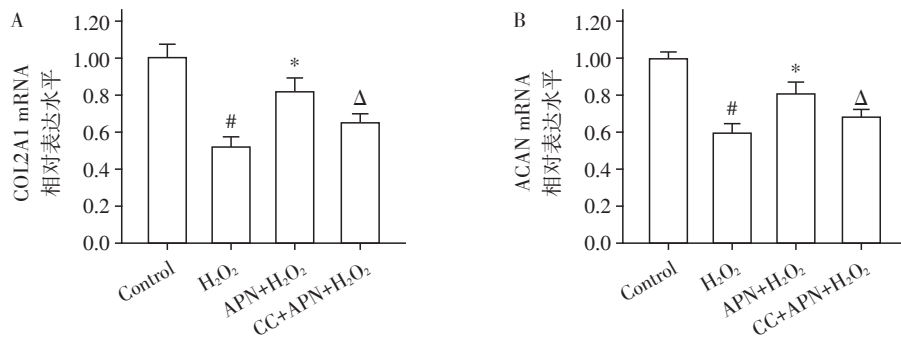
### 2.6 APN通过AMPK/mTOR通路抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的髓核细胞凋亡及ECM退变

Compound C预处理显著抑制AMPK磷酸化( $P < 0.05$ )并促进mTOR磷酸化( $P < 0.05$ ,图6)。与APN及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>共处理组相比,Compound C预处理组细胞凋亡率显著增加( $P < 0.05$ ,图2)。此外,APN对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致Bax/Bcl-2比值及Cleaved Caspase-3表达上调的抑制作用,也被Compound C显著减轻( $P <$

0.05,图3)。Compound C预处理还显著减轻了APN对MMP-13蛋白表达的抑制作用( $P < 0.05$ ,图4)。而APN对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致COL2A1及ACAN转录抑制的缓解作用也被Compound C逆转( $P < 0.05$ ,图5)。

## 3 讨论

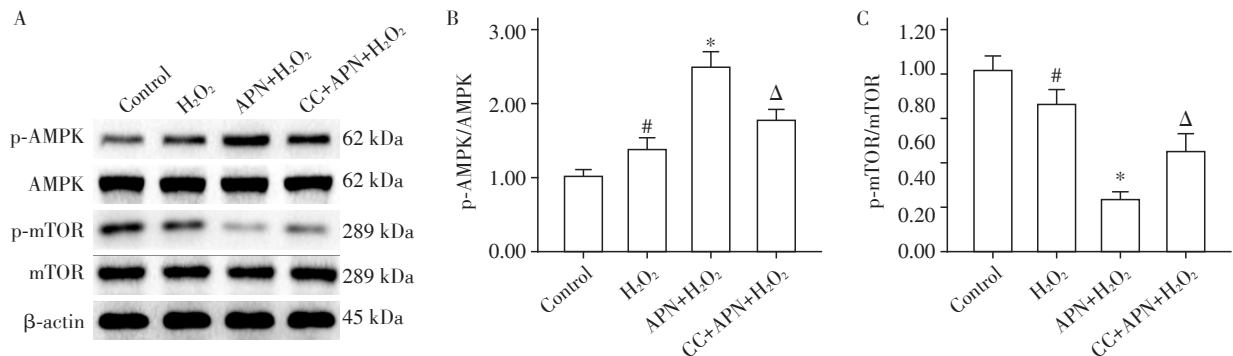
随着椎间盘的衰老、退变,一氧化氮(nitric oxide,NO)、超氧阴离子(superoxide anion,O<sub>2</sub><sup>-</sup>)等活性氧(reactive oxygen species,ROS)在椎间盘组织中蓄积<sup>[5-6]</sup>。这些活性氧进一步导致髓核细胞凋亡、促进分解代谢并抑制合成代谢,从而加速椎间盘的退变<sup>[7-8]</sup>。在本研究中,≥200 μmol/L浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理24 h显著抑制大鼠髓核细胞活力。其中,200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>致细胞活力降低约50%左右,造模效果较为理想,因此该浓度被用于后续实验。流式细胞术检测凋亡率显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显著诱导大鼠髓核细胞凋亡。此外,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>还显著促进MMP-13、ADAMTS-5的表达,



A:RT-PCR检测COL2A1 mRNA相对表达水平;B:RT-PCR检测ACAN mRNA相对表达水平。与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.001$ ;与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.001$ ;与APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ( $n=3$ )。CC:Compound C。

图5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对髓核细胞COL2A1及ACAN基因转录的影响

Figure 5 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Compound C+adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the transcription of COL2A1 and ACAN in nucleus pulposus cells



A:Western blot 检测 p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR 的表达;B: AMPK 磷酸化水平相对定量;C:mTOR 磷酸化水平相对定量。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, <sup>#</sup> $P < 0.001$ ; 与 APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.01$  ( $n=3$ )。CC:Compound C。

图6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Compound C+APN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对髓核细胞 AMPK 及 mTOR 磷酸化的影响

Figure 6 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Compound C+adiponectin+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the phosphorylation of AMPK and mTOR in nucleus pulposus cells

并抑制了 COL2A1、ACAN 等基因的转录,从而导致 ECM 退变。

据 Terashima 等<sup>[9]</sup>报道,髓核细胞及纤维环细胞均表达 I 型及 II 型 APN 受体(adiponectin receptor, AdipoR),且随着椎间盘退变的加重,AdipoR1 及 AdipoR2 的表达量逐渐降低。另一项研究则表明,在退变髓核细胞中,AdipoR1 及 AdipoR2 水平显著增加<sup>[10]</sup>。而两项研究均证实 APN 可以抑制髓核细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的表达<sup>[9-10]</sup>。鉴于氧化应激所致的髓核细胞凋亡及 ECM 退变在椎间盘退变中具有重要意义,本研究探究了 APN 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致髓核细胞凋亡及 ECM 退变的作用。结果显示,APN 预处理显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的髓核细胞凋亡。尽管对蛋白聚糖酶 ADAMTS-5 的表达无明显影响,APN 可抑制胶原酶 MMP-13 的表达。髓核 ECM 退变由 ECM 的降解增加和合成减少共同导致,因此本研究还检测了 APN 对 COL2A1 及 ACAN 等基因表达的影响。结果显示,APN 可显著缓解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 COL2A1、ACAN 等基因转录的抑制作用。

有研究指出,AMPK 的激活对细胞抵御氧化损伤具有重要意义<sup>[11]</sup>。目前,针对 AMPK 的药物已被证实可抑制氧化应激所致的髓核细胞凋亡及 ECM 退变<sup>[12]</sup>。mTOR 是磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路下游一种重要的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。既往研究表明,下调 mTOR 可显著缓解白介素-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导的髓核细胞凋亡和 ECM 退变<sup>[13]</sup>。在本研究中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理轻度上调 AMPK 磷酸化水平并抑制 mTOR 磷酸化,提示 AMPK 活性的上调及 mTOR 活性的下调可能是髓核细胞对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致氧化损伤的适应性反应。而 APN 显著促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露下

髓核细胞 AMPK 的磷酸化并抑制 mTOR 的磷酸化。APN 对 mTOR 磷酸化的抑制作用被 AMPK 抑制剂 Compound C 逆转,即 APN 通过促进 AMPK 磷酸化从而抑制 mTOR 的磷酸化。Compound C 还显著减轻了 APN 对髓核细胞凋亡及 MMP-13 表达的抑制作用。此外,APN 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露下髓核细胞合成代谢的促进作用也被 Compound C 抑制。上述结果表明 APN 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致髓核细胞凋亡及 ECM 退变的保护作用依赖于 AMPK/mTOR 通路。

本研究仅证实 APN 作为预处理因素,对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露的髓核细胞具有保护作用,即仅提示 APN 可能具有预防髓核退变的作用。而对于已经发生的髓核退变,APN 是否具有治疗作用,仍有待进一步研究。

综上所述,APN 可通过促进 AMPK 磷酸化,抑制 mTOR 磷酸化,从而抑制氧化应激下大鼠髓核细胞凋亡及 ECM 的分解代谢,并促进合成代谢。本研究提示 APN 作为一个保护因素,可能具有预防髓核退变的作用。

#### [参考文献]

- [1] Kim MJ, Kim EH, Pun NT, et al. Globular adiponectin inhibits lipopolysaccharide-primed inflammasomes activation in macrophages via autophagy induction: The critical role of AMPK signaling[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1275
- [2] Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K, et al. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway[J]. Int J Oncol, 2009, 34(2): 339-344
- [3] Chen TH, Chen L, Hsieh MS, et al. Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1762(8): 711-718 (下转第 961 页)

- Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(1):146-151
- [21] Lin W, Li Y, Chen F, et al. Klotho preservation via histone deacetylase inhibition attenuates chronic kidney disease-associated bone injury in mice[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46195
- [22] Lau WL, Linnes M, Chu EY, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28(1):62-69
- [23] Hu MC, Shi M, Gillings N, et al. Recombinant alpha-Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy[J]. Kidney Int, 2017, 91(5):1104-1114
- [24] Sun Y, Zhang Y, Zhao D, et al. Rotenone remarkably attenuates oxidative stress, inflammation, and fibrosis in chronic obstructive uropathy [J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014:670106
- [25] Sharma A, Thakur R, Lingaraju MC, et al. Betulinic acid attenuates renal fibrosis in rat chronic kidney disease model[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89:796-804
- [26] Hamasaki Y, Doi K, Maeda-Mamiya R, et al. A 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, sarpogrelate, reduces renal tubulointerstitial fibrosis by suppressing PAI-1 [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305 (12) : F1796-F1803
- [27] Lv W, Booz GW, Fan F, et al. Oxidative stress and renal fibrosis: recent insights for the development of novel therapeutic strategies[J]. Front Physiol, 2018, 9:105
- [28] Santana AC, Degaspari S, Catanozi S, et al. Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice [J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28 (5):1140-1149
- [29] Matsunaga N, Ikeda E, Kakimoto K, et al. Inhibition of G0/G1 Switch 2 ameliorates renal inflammation in chronic kidney disease[J]. EBio Medicine, 2016, 13:262-273
- [30] Askari H, Seifi B, Kadkhodae M. Evaluation of renal-hepatic functional indices and blood pressure based on the progress of time in a rat model of chronic kidney disease [J]. Nephrourol Mon, 2016, 8(3):e37840
- [收稿日期] 2018-03-31

(上接第933页)

- [4] Hu J, Cui W, Ding W, et al. Globular adiponectin attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in rat chondrocytes by inducing autophagy through the AMPK/ mTOR pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(1):367-382
- [5] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin -6, and prostaglandin E2 [J]. Spine (Phila Pa 1976) , 1995, 20 (22):2373-2378
- [6] Nasto LA, Robinson AR, Ngo K, et al. Mitochondrial-derived reactive oxygen species (ROS) play a causal role in aging-related intervertebral disc degeneration [J]. J Orthop Res, 2013, 31(7):1150-1157
- [7] Li K, Li Y, Mi J, et al. Resveratrol protects against sodium nitroprusside induced nucleus pulposus cell apoptosis by scavenging ROS[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5):2485-2492
- [8] Dimozi A, Mavrogatou E, Sklirou A, et al. Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells [J]. Eur Cell Mater, 2015, 30:89-102
- [9] Terashima Y, Kakutani K, Yurube T, et al. Expression of adiponectin receptors in human and rat intervertebral disc cells and changes in receptor expression during disc degeneration using a rat tail temporary static compression model[J]. J Orthop Surg Res, 2016, 11(1):147
- [10] Yuan B, Huang L, Yan M, et al. Adiponectin down-regulates TNF-alpha expression in degenerated intervertebral discs [J]. Spine (Phila Pa 1976) , 2017, 43 (7) : E381-E389
- [11] Han X, Tai H, Wang X, et al. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD(+) elevation [J]. Aging Cell, 2016, 15(3):416-427
- [12] Chen D, Xia D, Pan Z, et al. Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration *in vivo* [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(10):e2441
- [13] Ito M, Yurube T, Kakutani K, et al. Selective interference of mTORC1/RAPTOR protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism with Akt and autophagy induction [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(12):2134-2146
- [收稿日期] 2018-03-27