

电磁场联合A_{2A}腺苷受体激动剂CGS-21680对大鼠椎间盘退变髓核细胞凋亡及炎症反应的影响

刘伟军 焦红博 王威 黎清波 蔡磊 王正坤

武汉市第四医院,华中科技大学同济医学院附属普爱医院脊柱二·骨肿瘤科,武汉 430030

通信作者:刘伟军;Email:iamliu2003@163.com

【摘要】 目的 观察脉冲电磁场(PEMF)联合 A_{2A}腺苷受体激动剂 CGS-21680 对大鼠椎间盘退变髓核细胞凋亡及炎症反应的影响。方法 采用随机数字表法将 48 只 SD 大鼠分为假手术组、模型组、A_{2A}腺苷受体激动剂 CGS-21680 治疗组(简称激动剂组)和 PEMF 联合 CGS-21680 治疗组(简称观察组)。除假手术组外,其余各组均制成椎间盘退行性病变(IDD)大鼠模型。制模后激动剂组向 L₅₋₆椎间盘注射 100 μl CGS-21680 (100 μg/kg),观察组注射 CGS-21680 后再给予 PEMF 干预,磁场强度 1.5 mT,磁场频率 75 Hz,脉宽 150 μs,暴磁 30 min/次/d,连续干预 14 d,假手术组及模型组同期注射等量生理盐水。于实验进行 8 周后采用 HE 染色观察椎间盘组织病理形态变化,采用免疫组化法检测 II 型胶原(Col-Ⅱ)蛋白表达,采用 ELISA 及 RT-PCR 法检测炎症因子白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量及 mRNA 表达,采用 Western blot 及 RT-PCR 法检测 A_{2A}R、NLRP3、Caspases-3 蛋白含量及 mRNA 水平。结果 模型组髓核及纤维环退变明显,观察组髓核细胞皱缩、坏死及纤维环断裂情况显著缓解。干预后观察组椎间盘髓核 Col Ⅱ 阳性表达、A_{2A}R 蛋白含量及 mRNA 相对表达量均较模型组、激动剂组明显增加(P<0.05);而促炎因子 IL-6、TNF-α 水平及 mRNA 表达量均较模型组、激动剂组显著降低(P<0.05);另外观察组大鼠椎间盘组织 NLRP3、Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 相对表达量亦较模型组、激动剂组明显降低(P<0.05)。结论 PEMF 联合 A_{2A}腺苷受体激动剂 CGS-21680 能协同上调 IDD 模型大鼠 A_{2A}R 活性,下调促炎因子 IL-6、TNF-α 及 NLRP3、Caspase-3 表达,抑制髓核细胞凋亡,减轻炎症反应,有助于椎间盘退变病情缓解。

【关键词】 脉冲电磁场; A_{2A}腺苷受体; 椎间盘退行性病变; 凋亡; 炎症反应

基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2018CFB720)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.08.001

The effects of combining pulsed electromagnetic field stimulation with A_{2A} adenosine receptor agonist CGS-21680 on apoptosis and inflammation of nucleus pulposus cells in rats with intervertebral disc degeneration

Liu Weijun, Jiao Hongbo, Wang Wei, Li Qingbo, Cai Lei, Wang Zhengkun

The Second Department of the Spine, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Liu Weijun, Email: iamliu2003@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of combining pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation with A_{2A} adenosine receptor agonist CGS-21680 on apoptosis and inflammation of nucleus pulposus cells in cases of intervertebral disc degeneration. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham operation group (Sham group), an intervertebral disc degenerative disease group (Model group), an A_{2A} adenosine receptor agonist CGS-21680 group (Agonist group), and a group in which PEMF was combined with CGS-21680 (Observation group). The rat model of intervertebral disc degeneration (IDD) was established in all other groups than the sham operation group. The rats in the Agonist group were injected with 100 μL of CGS-21680 (100 μg/kg) at the L₅₋₆ intervertebral disc. The Observation group was injected with CGS-21680 similarly but then received 14 consecutive days of PEMF stimulation (30min/time). The Sham and Model groups were injected with the same amount of normal saline solution. Eight weeks later, HE staining was used to evaluate the pathological changes in the intervertebral disc tissues. The expression of type II collagen was determined by immunohistochemistry. The content and mRNA expression of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were determined using enzyme-linked immunosorbent assays and reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs). The protein and mRNA levels of A_{2A}, NLRP3 and caspase-3 were determined by western blotting and RT-PCR. **Results** The degeneration in the nucleus pulposus and annulus fibrosus in the Model group was significant, while significantly less

shrinkage, necrosis and fibrous annulus rupture was observed in the Observation group. Compared with Model and Agonist groups, the positive expression of Col II in the nucleus pulposus, A_{2A}R protein levels and relative expression of its mRNA had all increased significantly in the Observation group, while the average levels and mRNA expression of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α had decreased significantly. The average protein level and mRNA expression of NLRP3 and caspase-3 in the intervertebral disc tissues of the Observation group were significantly lower than in the Model and Agonist groups. **Conclusions** Combining pulsed electromagnetic field stimulation with A_{2A} adenosine receptor agonist CGS-21680 can inhibit the apoptosis of nucleus pulposus cells, alleviate disease response and delay IDD by up-regulating the activity of A_{2A} receptors and down-regulating the expressions of pro-inflammatory factors IL-6, TNF- α , NLRP3 and caspase-3 in nucleus pulposus cells.

【Key words】 Electromagnetic stimulation; A_{2A} adenosine receptor; Intervertebral disc degeneration; Apoptosis; Inflammation

Funding: Natural Science Foundation of Hubei Province (2018CFB720)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.08.001

椎间盘退行性病变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 表现为终板软骨细胞坏死、纤维环破裂及髓核细胞凋亡^[1], 炎症反应参与了整个椎间盘退变病理过程^[2]。在 IDD 发生发展过程中, 炎症小体 NLRP3 激活炎症反应^[3], 巨噬细胞、中性粒细胞等浸润椎间盘病变组织, 促进炎症因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 等释放^[4], 诱导椎间盘弹性蛋白 II 型胶原 (type-II collagen, Col-II) 降解, 最终导致软骨终板钙化、纤维环破裂及髓核细胞凋亡, 加剧椎间盘退变^[5-6]。A_{2A}腺苷受体 (adenosine A_{2A} receptor, A_{2A}R) 是细胞膜表面最主要的抗炎受体蛋白之一^[9], 前期研究表明 A_{2A}R 活性上调可抑制髓核细胞炎症因子释放, 从而减轻炎症浸润损伤^[10]。脉冲电磁场 (pulsed electromagnetic field, PEMF) 近年来被广泛应用于治疗骨折、骨折不愈合及骨关节炎患者, 并发现具有不错疗效^[11-12], 但目前关于 PEMF 联合 A_{2A}R 激动剂 CGS-21680 治疗 IDD 患者鲜见报道。基于此, 本研究通过构建 IDD 大鼠模型, 并观察 PEMF 联合 A_{2A}R 激动剂 CGS-21680 对大鼠椎间盘退变髓核细胞凋亡及炎症反应的影响。

材料与方 法

一、实验动物及试剂

共选取健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只, 体质量 180~200 g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供; 其它主要实验试剂包括 CGS-21680 (美国 Sigma 公司出品, 纯度 > 95%)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (武汉安特捷公司提供)、A_{2A}R、Col-II、NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase-3) (美国 Abcom 公司提供)、兔抗大鼠一抗、辣根过氧化物酶二抗 (武汉安特捷公司提供)、BCA (bicinchoninic acid) 法蛋白定量检测试剂盒

(武汉碧云天有限公司提供) 及 TNF- α 、IL-6 ELISA 检测试剂盒等 (北京欣博盛有限公司提供)。

二、动物造模及干预

上述实验大鼠经适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法将其分为假手术组、IDD 模型组 (简称模型组)、A_{2A}R 激动剂 CGS-21680 组 (简称激动剂组) 及 PEMF 联合 A_{2A}R 激动剂组 (简称观察组), 每组 12 只大鼠。参照文献^[1-2]介绍的方法制作 IDD 大鼠模型: 大鼠经称重后按每千克体重 10 ml 腹腔注射 4% 水合氯醛进行麻醉, 背部备皮, 暴露大鼠 L₅₋₆ 椎间盘组织, 采用 30G 穿刺针穿刺并注射 100 μ l IL-1 β (400 ng/kg), 假手术组则向 L₅₋₆ 椎间盘组织注射 100 μ l 生理盐水。

假手术组及模型组于制模后 1 h 向 L₅₋₆ 椎间盘组织注射 100 μ l 生理盐水, 激动剂组及观察组则向 L₅₋₆ 椎间盘组织注射 100 μ l A_{2A}R 激动剂 CGS-21680 (100 μ g/kg), 观察组于注射完毕后还给予 PEMF 干预, 具体干预方法如下: 将大鼠置于纸箱中 [内置 PMF S9 型磁场发生器 (上海索莘电子有限公司出品)], 磁场强度设置为 1.5 mT, 磁场频率 75 Hz, 脉宽 150 μ s, 曝磁 30 min/次/d, 连续曝磁 14 d。

三、椎间盘组织病理切片染色

于实验进行 8 周后各组大鼠经腹腔注射过量 4% 水合氯醛处死, 暴露并分离 L₅₋₆ 椎间盘组织, 经生理盐水清洗后置入 4% 多聚甲醛中固定, 制作石蜡包埋切片 (片厚 4 μ m)。切片经脱蜡处理后, 参照文献^[5]介绍的方法分别进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色及免疫组化染色, 采用光学显微镜观察并拍照, 应用 IPP 软件进行半定量分析。

四、椎间盘组织炎症因子检测

取各组大鼠 L₅₋₆ 椎间盘组织, 根据试剂盒说明书要求处理样本后, 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测各组大鼠椎间盘组织中 TNF- α 及 IL-6 含量。

五、椎间盘组织各因子 mRNA 水平检测

取各组大鼠 L₅₋₆ 椎间盘组织, 选用 Trizol 试剂裂解法提取总 RNA, 然后采用 cDNA Kit 试剂盒进行逆转录获得 cDNA, 设置 3 个复孔采用 qRT-PCR 技术检测样本中 A_{2A}R、IL-6、TNF- α 、NLRP3、Caspase-3 等因子 mRNA 水平。具体引物序列情况见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列
GAPDH	上游: 5'-AACAGCACTCCCATTCTCC-3' 下游: 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'
A _{2A} R	上游: 5'-GCTGACATTGCAGTGGGTGT-3' 下游: 5'-CTAAAGATGGAAGTCTGCGTGAG-3'
IL-6	上游: 5'-GCCAGAGTCATTGAGCAAT-3' 下游: 5'-GTTGGTCTTAGCCACTCTCT-3'
TNF- α	上游: 5'-TGATCGGTCCCAACAAGGAG-3' 下游: 5'-GGTTGTCTTTGAGATCCATGCC-3'
NLRP3	上游: 5'-AACCAGAGCCTCACTGAACTGG-3' 下游: 5'-AGAGCAGATGCTTCACTCCAC-3'
Caspase-3	上游: 5'-GTATGCTTACTCTACCGCACCC-3' 下游: 5'-CAGGGAGAAGGACTCAAATTCC-3'

六、椎间盘组织 A_{2A}R、NLRP3 蛋白含量检测

取各组大鼠 L₅₋₆ 椎间盘组织, 置入含有 1% 蛋白酶抑制剂 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的蛋白裂解缓冲液 (radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA) 中, 经 4 °C 孵育 30 min、10000 r/min 离心 10 min 后取上清。采用 BCA 试剂盒检测上清液蛋白含量, 再置入到上样染料中沸水浴 10 min。取 15 μ l 样品 (蛋白量约 45 μ g) 进行 WB 蛋白免疫印迹检测 (Western blot), 具体操作方法参照文献 [5, 10], 计算目标蛋白条带灰度与 GAPDH 条带灰度的相对比值。

七、统计学分析

本研究所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 21.0 版统计学软件包进行数据分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Tukey 检验或 Games-Howell 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠椎间盘病理形态学观察

通过 HE 染色发现, 假手术组椎间盘髓核形态、结构正常, 细胞排列分布均匀, 纤维环-髓核边界清晰, 纤维环完整; 模型组髓核形状不规则, 髓核细胞有明显聚集、皱缩、坏死现象, 细胞基质减少, 纤维环断裂, 出现严重裂隙, 呈现退变特征样改变。与模型组比较, 激动剂组髓核细胞皱缩程度有所改善, 纤维环-髓核边界较明显, 且纤维环断裂减少; 观察组纤维环断裂、髓核细胞坏死情况进一步好转, 纤维环结构趋于正常。具体情况见图 1。

二、各组大鼠椎间盘髓核 Col- II 蛋白表达比较

如图 2 所示, 4 组大鼠椎间盘髓核 Col- II 蛋白表达组间差异具有统计学意义 ($F = 41.460, P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组大鼠 Col- II 蛋白表达明显降低 [(26.05 \pm 4.87) % vs (8.31 \pm 1.31) %, $P < 0.05$]; 激动剂组及观察组大鼠 Col- II 蛋白表达 [分别为 (16.41 \pm 3.55) % 和 (20.91 \pm 2.38) %] 均较模型组明显增加, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 并且观察组大鼠 Col- II 蛋白表达亦显著高于激动剂组水平, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

三、各组大鼠椎间盘组织 A_{2A}R 蛋白含量及 mRNA 表达比较

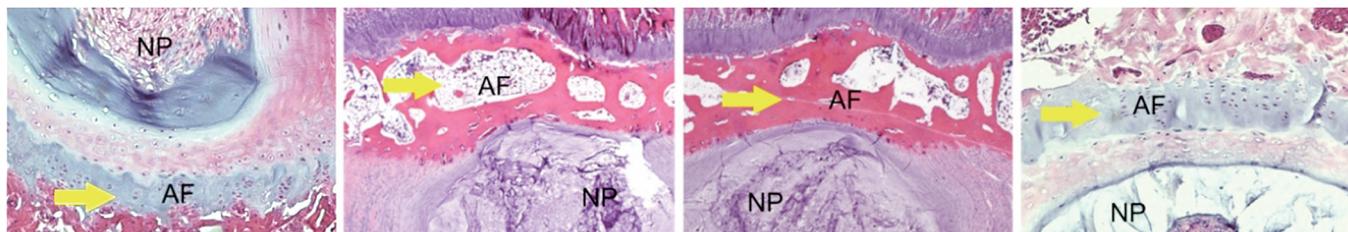
如图 3 所示, 4 组大鼠椎间盘组织 A_{2A}R 蛋白含量及 mRNA 表达组间差异均具有统计学意义 ($F = 36.878, P < 0.05$; $F = 48.520, P < 0.05$); 其中模型组大鼠椎间盘组织 A_{2A}R 蛋白含量及 mRNA 相对表达量分别为 (0.28 \pm 0.05) 和 (1.46 \pm 0.29), 均显著低于假手术组水平 [分别为 (0.59 \pm 0.09) 和 (6.02 \pm 1.41)], 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 激动剂组、观察组椎间盘组织 A_{2A}R 蛋白含量 [分别为 (0.45 \pm 0.05) 和 (0.54 \pm 0.05)] 及 mRNA 相对表达量 [分别为 (2.74 \pm 0.49) 和 (3.34 \pm 0.36)] 均显著升高, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 并且观察组椎间盘组织

假手术组

模型组

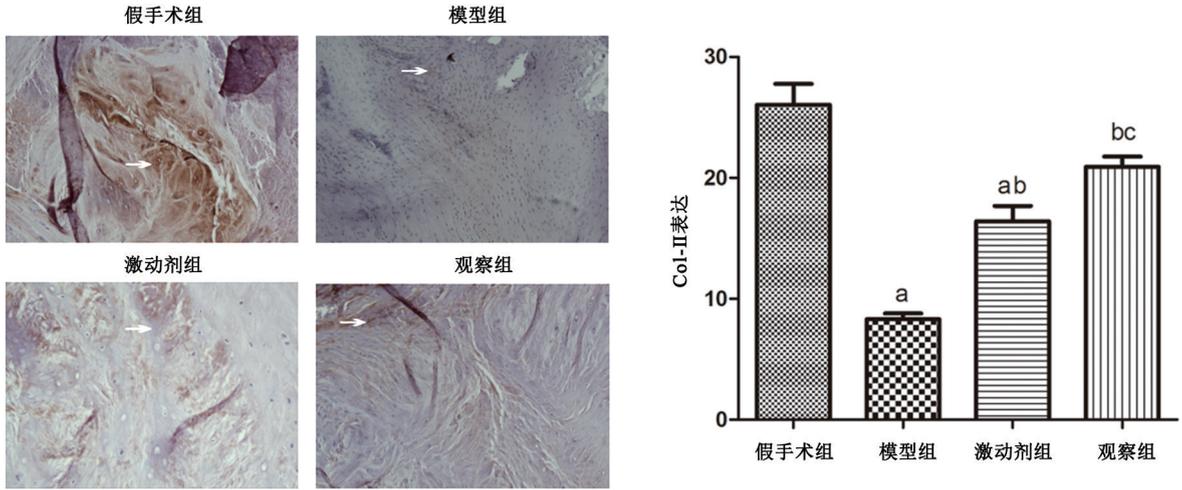
激动剂组

观察组



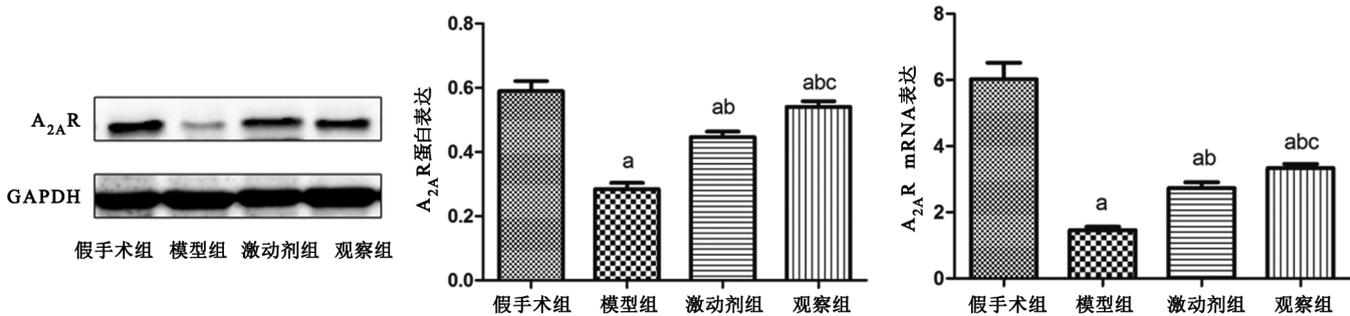
注: NP 指髓核 (nucleus pulposus); AF 指纤维环 (annulus fibrosus); 箭头处为胶原纤维细胞

图 1 各组大鼠椎间盘组织病理形态学观察 (HE 染色, $\times 200$)



注:箭头所指为阳性染色区域;与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与激动剂组比较,^c $P<0.05$

图2 各组大鼠椎间盘髓核 Col-II 蛋白表达比较(免疫组化染色,×200)



注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与激动剂组比较,^c $P<0.05$

图3 各组大鼠椎间盘组织 A_{2A}R 蛋白及 mRNA 表达比较(条带图为 A_{2A}R 蛋白电泳图)

A_{2A}R 蛋白含量及 mRNA 相对表达量亦显著高于激动剂组水平,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

四、各组大鼠椎间盘组织 IL-6 及 TNF-α 比较

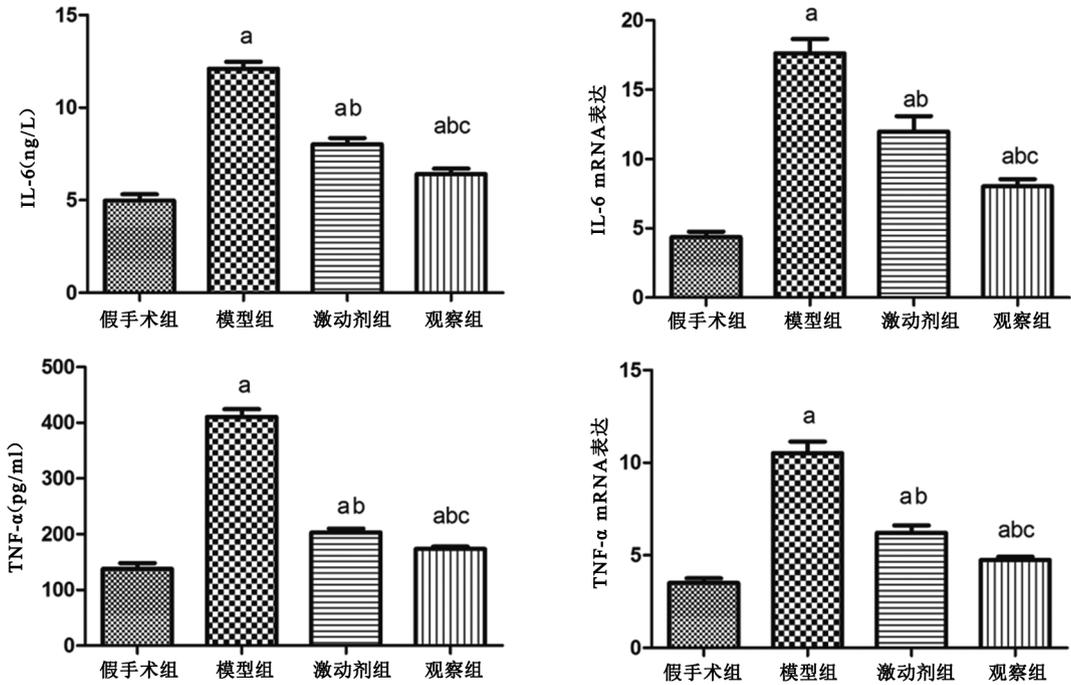
如图 4 所示,各组大鼠椎间盘组织中炎症因子 IL-6、TNF-α 含量及 mRNA 表达量组间差异均具有统计学意义 ($F = 81.784, 46.206, P < 0.05; F = 166.387, 58.163, P < 0.05$)。模型组大鼠 IL-6 含量及 mRNA 表达量分别为 (12.10 ± 1.08) ng/L 和 (17.62 ± 2.9518), TNF-α 含量及 mRNA 表达量分别为 (410.75 ± 38.80) pg/ml 和 (10.52 ± 1.74), 均较假手术组显著升高 ($P < 0.05$)。激动剂组 IL-6 含量及 mRNA 表达量分别为 (8.01 ± 0.96) ng/L 和 (11.97 ± 3.19), TNF-α 含量及 mRNA 表达量分别为 (203.25 ± 19.66) pg/ml 和 (6.22 ± 1.16); 观察组 IL-6 含量及 mRNA 表达量分别为 (6.41 ± 0.83) ng/L 和 (8.02 ± 1.49), TNF-α 含量及 mRNA 表达量分别为 (173.50 ± 12.32) pg/ml 和 (4.74 ± 0.52), 上述指标结果均较模型组显著降低, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 并且观察组 IL-6 含量及 mRNA 表达量、TNF-α 含量及 mRNA 表达量亦显著低于激动剂组水平, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

五、各组大鼠椎间盘组织 NLRP3 蛋白含量及 mRNA 表达比较

Western blot 结果及 RT-PCR 结果如图 5 所示, 4 组大鼠椎间盘组织 NLRP3 蛋白含量及 mRNA 表达量组间差异均具有统计学意义 ($F = 83.408, P < 0.05; F = 41.775, P < 0.05$)。模型组 NLRP3 蛋白含量及 mRNA 相对表达量分别为 (0.39 ± 0.07) 和 (2.66 ± 0.52), 显著高于假手术组水平 [分别为 (0.12 ± 0.02) 和 (1.05 ± 0.15)], 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。激动剂组、观察组 NLRP3 蛋白含量 [分别为 (0.20 ± 0.03) 和 (0.16 ± 0.02)] 及 mRNA 相对表达量 [分别为 (1.95 ± 0.14) 和 (1.65 ± 0.17)] 均较模型组明显降低, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 并且观察组 NLRP3 蛋白含量及 mRNA 相对表达量亦显著低于激动剂组水平, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

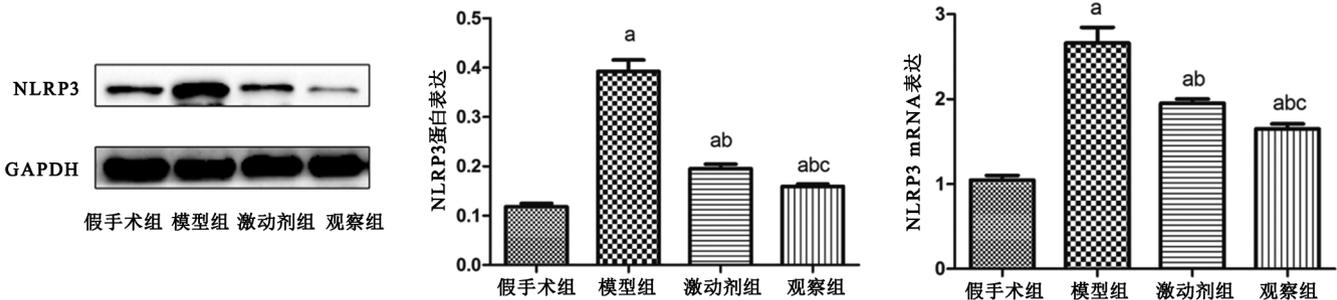
六、各组大鼠椎间盘组织 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 表达比较

Western blot 结果及 RT-PCR 结果如图 6 所示, 4 组大鼠椎间盘 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 表达量组间差异均具有统计学意义 ($F = 50.519, P < 0.05; F =$



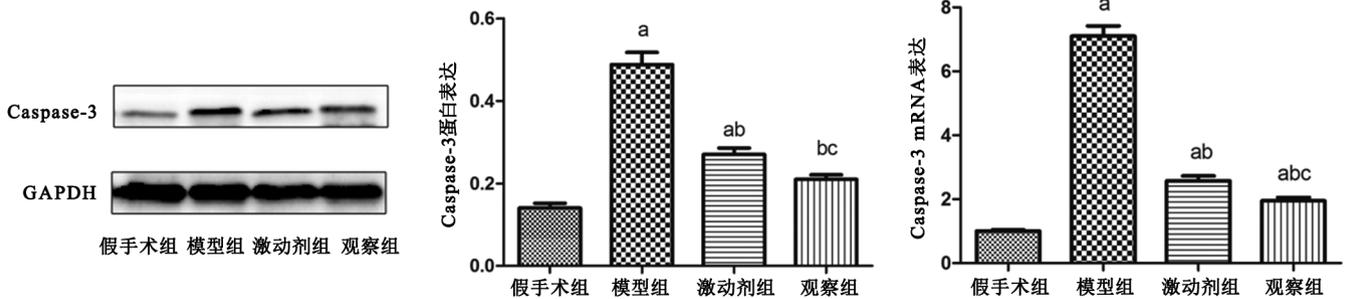
注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与激动剂组比较,^c $P < 0.05$

图 4 各组大鼠椎间盘组织 TNF- α 、IL-6 含量及 mRNA 表达比较



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与激动剂组比较,^c $P < 0.05$

图 5 各组大鼠椎间盘组织 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达比较(条带图为 NLRP3 蛋白电泳图)



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与激动剂组比较,^c $P < 0.05$

图 6 各组大鼠椎间盘组织 Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达比较(条带图为 Caspase-3 蛋白电泳图)

206.192, $P < 0.05$)。模型组大鼠椎间盘 Caspase-3 蛋白及 mRNA 相对表达量[分别为(0.49±0.08)和(7.10±0.91)]均显著高于假手术组水平[分别为(0.20±0.04)和(1.00±0.12)],组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,激动剂组、观察组 Caspase-3 蛋

白含量[分别为(0.27±0.04)和(0.21±0.03)]及 mRNA 相对表达量[分别为(2.58±0.44)和(1.95±0.31)]均明显下调($P < 0.05$),组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$);并且观察组 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 相对表达量亦明显低于激动剂组水平,组间差异均具有统

计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

椎间盘由髓核、纤维环及软骨终板等组成,其中髓核含有大量胶原蛋白、弹性纤维,在椎间盘内形成网架结构,具有较强的吸水性,对维持髓核弹性及椎间盘生物力学稳定性具有重要作用^[1,5]。椎间盘退变通常与多种因素有关,而髓核胶原蛋白降解、炎症反应激活是导致髓核细胞外基质合成减少的重要原因之一^[6],因此抑制炎症反应、减少髓核细胞凋亡、促进胶原蛋白合成是针对椎间盘退行性疾病的重要研究方向。

本研究结果显示,模型组大鼠髓核形状不规则,细胞明显皱缩、坏死,纤维环断裂,且椎间盘髓核 Col-Ⅱ表达较假手术组明显减少,呈现退变特征样改变。Col-Ⅱ是椎间盘髓核的重要组成部分,在退行性疾病进展过程中,髓核细胞在炎症等应刺激下,基质金属蛋白酶活化使得胶原及糖蛋白降解减少,细胞随之坏死、凋亡^[13]。本研究发现,模型组大鼠 A_{2A}R 蛋白及 mRNA 表达均显著下调,提示 A_{2A}R 活性与大鼠髓核细胞凋亡密切相关。有研究指出,在炎症反应中腺苷作为一种重要的内源性信号转导分子,可作用于 A_{2A}R 并发挥抑炎作用^[14];本研究结果显示模型组 A_{2A}R 活性下调,而炎症小体 NLRP3 蛋白含量及 mRNA 表达、促炎因子 IL-6、TNF- α 水平及 mRNA 表达均显著上调,提示 A_{2A}R 在 IDD 模型中起负调控作用;经给予 A_{2A}R 受体激动剂处理后,发现大鼠椎间盘组织 A_{2A}R 蛋白含量及 mRNA 相对表达量均较模型组明显升高;与此同时大鼠髓核细胞皱缩有所缓解,纤维环断裂减少,髓核 Col-Ⅱ含量明显增加,证实上调 A_{2A}R 活性能有效增加髓核胶原蛋白合成,抑制细胞凋亡。Reihani 等^[11]曾报道,PEMF 作为一种安全有效的无创干预手段,可作用于 A_{2A}R,通过抑制核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路减少促炎因子释放,缓解炎症损伤。本研究也获得类似结果,如干预后观察组大鼠椎间盘组织 A_{2A}R 蛋白含量及 mRNA 表达量均较模型组、激动剂组显著上调,病理学结果也显示观察组髓核细胞皱缩、坏死情况好转,纤维环结构趋于正常,Col-Ⅱ合成较激动剂组明显增加,进一步证实 PEMF 协同 A_{2A}R 激动剂能促使髓核细胞 A_{2A}R 活性增强。

相关研究指出,大鼠髓核细胞炎症反应与 NLRP3 相关,炎症或脂质过氧化刺激椎间盘会持续损伤脊髓或神经根组织,激活 NF- κ B 信号通路,调控下游 NLRP3、IL-6 及 TNF- α 的合成、释放,进而诱导细胞坏死、凋亡^[14-15]。Wang 等^[6]研究发现,阻断 NF- κ B 磷酸化激活能有效抑制 IL-6、TNF- α 及 NLRP3 等因子表达,从而缓解炎症损伤。本研究结果显示,与激动剂组

比较,干预后观察组椎间盘 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达均明显下调,促炎因子 IL-6、TNF- α 水平也显著降低($P < 0.05$),提示 PEMF 与 CGS-21680 联用能促使 A_{2A}R 活性进一步增强,活化的 A_{2A}R 与细胞膜上的激动型 G 蛋白(stimulatory protein, Gs) 偶联,能激活经典的 Gs-腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)-蛋白激酶 A (protein kinase A) 信号通路,抑制 NF- κ B 的磷酸化过程,阻断 NLRP3、IL-6、TNF- α 等炎症因子的转录、翻译,从而减轻炎症浸润损伤^[9]。由于髓核细胞过早衰老、凋亡是椎间盘退变的重要发病机制之一,而炎症联级反应可通过线粒体途径诱导髓核细胞凋亡,细胞凋亡又与 Caspase-3 信号转导通路有关。本研究结果显示,与激动剂组比较,经 PEMF 及 A_{2A}R 激动剂处理后的 IDD 大鼠其髓核组织中 Caspase-3 蛋白及 mRNA 相对表达量均显著下调,表明联合干预能发挥协同效应,较单纯使用 A_{2A}R 激动剂(CGS-21680)具有更强的抑髓核细胞凋亡作用。

综上所述,本研究结果表明,PEMF 联合 A_{2A} 受体激动剂 CGS-21680 可协同上调 IDD 模型大鼠 A_{2A} 腺苷受体活性,促进胶原蛋白合成,减少炎症介质 NLRP3、IL-6、TNF- α 释放,下调 Caspase-3 表达,从而减轻炎症损伤,抑制髓核细胞凋亡,这为临床治疗椎间盘退行性病变提供了一个新的方向,值得进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Kos N, Gradisnik L, Velnar T. A brief review of the degenerative intervertebral disc disease [J]. Med Arch, 2019, 73(6): 421-424. DOI: 10.5455/medarh.2019.73.421-424.
- [2] Zhang Y, Yi W, Xia H, et al. A20 regulates inflammation through autophagy mediated by NF- κ B pathway in human nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in vivo [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 549: 179-186. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.115.
- [3] 张鹏, 尹志良, 朱献忠, 等. 地黄梓醇对椎间盘髓核细胞 NLRP3 炎症体的调控作用 [J]. 中成药, 2020, 42(1): 61-68. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.014.
- [4] Wang Y, Che M, Xin J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110660. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110660.
- [5] Kim H, Hong JY, Lee J, et al. IL-1 β promotes disk degeneration and inflammation through direct injection of intervertebral disk in a rat lumbar disk herniation model [J]. Spine J, 2021, 16: S1529-9430(21) 00022-X. DOI: 10.1016/j.spinee.2021.01.014.
- [6] Wang C, Yu X, Yan Y, et al. Tumor necrosis factor- α : a key contributor to intervertebral disc degeneration [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(1): 1-13. DOI: 10.1093/abbs/gmw112.
- [7] Borea PA, Gessi S, Merighi S, et al. Pharmacology of adenosine receptors: the state of the art [J]. Physiol Rev, 2018, 98(3): 1591-1625. DOI: 10.1152/physrev.00049.2017.
- [8] Cronstein BN, Sitkovsky M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases [J]. Nat Rev Rheu-

- matol, 2017, 13(1):41-51. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.178.
- [9] Wu T, Jia X, Feng H, et al. ACTG1 regulates intervertebral disc degeneration via the NF- κ B-p65 and Akt pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 545:54-61. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.01.057.
- [10] 刘伟军, 王威, 黎清波, 等. 脉冲电磁场对人退变髓核细胞 A_{2A} 腺苷受体的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(11): 818-822. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.11.004.
- [11] Reihani KH, Pourghazi M, Mahani SE. Effects of pulsed electromagnetic field on intervertebral disc cell apoptosis in rats [J]. Electromagn Biol Med, 2014, 33(3): 246-249. DOI: 10.3109/15368378.2013.843059.
- [12] Chan AK, Ballatori A, Nyayapati P, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate sensorimotor recovery following experimental disc herniation [J]. Spine, 2021, 46(4): E222-E233. DOI: 10.1097/BRS.0000000000003762.
- [13] 史锐, 朱振军, 杨永波. 牛磺酸调节白介素水平对椎间盘退变大鼠模型髓核细胞凋亡、炎症和氧化应激的保护作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9): 1097-1102. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2020.09.014.
- [14] Navone SE, Marfia G, Giannoni A, et al. Inflammatory mediators and signalling pathways controlling intervertebral disc degeneration [J]. Histol Histopathol, 2017, 32(6): 523-542. DOI: 10.14670/HH-11-846.
- [15] 丁岩, 吕世桥, 郝岩. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 抑制剂通过影响微小 RNA-155/白细胞介素-10 保护脊髓损伤大鼠 [J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(8): 1495-1497. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-201909271-01063.

(修回日期: 2020-06-23)

(本文编辑: 易浩)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益, 现将中华医学会系列杂志对一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下:

1. 本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处, 但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿, 应向有关期刊编辑部做出说明。

2. 如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表, 除非文种不同, 否则不可再将该文投寄给他刊。

3. 请作者所在单位在来稿介绍信中注明文稿有无一稿两投问题。

4. 凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿, 则表明稿件仍在处理中, 作者欲投他刊, 应事先与该刊编辑部联系并申述理由。

5. 编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核实后再通知作者, 同时立即进行退稿处理, 在做出处理决定前请作者就此问题做出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时, 应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

6. 一稿两用一经证实, 期刊编辑部将择期在杂志中刊出其作者姓名和单位及撤销该论文的通告; 对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿, 中华医学会系列杂志 2 年内将拒绝其发表; 并就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中华医学会杂志社