

脉冲电磁场对大鼠椎间盘退变及 A2A 腺苷受体介导的活性氧/PI3K/Akt 信号通路的影响

蔡磊¹ 方为志¹ 黎清波¹ 王正坤¹ 姚智² 魏梦诚² 张诗爽³ 焦红博¹ 刘伟军¹

¹武汉市第四医院脊柱科,武汉 430030; ²华中科技大学同济医学院,武汉 430030; ³江汉大学医学院,武汉 430056

通信作者:刘伟军;Email:iamlu2003@163.com

【摘要】 **目的** 观察脉冲电磁场(PEMF)对椎间盘退行性病变(IDD)大鼠髓核 A2A 腺苷受体(A2AR)的调控效应,并探讨其对 A2AR 介导的活性氧(ROS)/PI3K/Akt 信号通路的影响。**方法** 采用随机数字表法将 50 只 SD 大鼠分为对照组、椎间盘退行性病变组(简称模型组)、A2AR 激动剂 CGS-21680 治疗组(简称激动剂组)、PEMF 组和 PEMF 联合 CGS-21680 治疗组(简称观察组)。除对照组外,其余各组大鼠均制成 IDD 动物模型。制模后激动剂组向 L_{5/6} 椎间盘组织注射 100 μl CGS-21680,PEMF 组给予 PEMF 干预,观察组注射 CGS-21680 后再给予 PEMF 干预,PEMF 干预时间为 14 d。培养大鼠原代髓核细胞,将其分为对照组、IL-1β 模型组(简称 IL-1β 组)、激动剂组、PEMF 组和观察组,各组细胞干预方法同上。于制模 8 周后采用 HE 染色评估各组大鼠椎间盘组织病理形态变化,采用 TUNEL 染色评估髓核细胞凋亡情况,采用免疫组化/免疫荧光法测定 8-OHdG 表达,采用 ELISA 试剂盒等检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及 ROS 含量,采用 Western blot 技术检测 A2AR、PI3K、AKT 及 p-AKT 蛋白水平。**结果** 模型组大鼠髓核细胞明显皱缩、坏死,纤维环断裂;观察组纤维环完整,髓核结构基本趋于正常。激动剂组、PEMF 组及观察组 SOD 水平及 A2AR、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白含量均较模型组明显升高,MDA、ROS 及 8-OHdG 表达均显著降低($P < 0.05$);并且观察组 ROS 水平亦显著低于激动剂组及 PEMF 组($P < 0.05$),p-AKT 磷酸化水平则显著高于激动剂组及 PEMF 组($P < 0.05$)。细胞实验结果显示,激动剂组、PEMF 组及观察组髓核细胞 SOD 水平、A2AR、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白含量均显著高于 IL-1β 组,MDA、ROS 及 8-OHdG 水平均明显降低($P < 0.05$);并且观察组 ROS 表达亦显著低于激动剂组和 PEMF 组($P < 0.05$),A2AR 蛋白含量及 p-AKT 磷酸化水平则明显高于激动剂组及 PEMF 组($P < 0.05$)。激动剂组、PEMF 组及观察组髓核细胞 Bax 水平均较 IL-1β 组显著降低,Bcl-2 表达则明显升高($P < 0.05$),并且观察组细胞凋亡率亦显著低于激动剂组和 PEMF 组,Bcl-2 表达则显著高于激动剂组及 PEMF 组($P < 0.05$)。**结论** PEMF 可通过上调 A2AR 活性,减少 ROS 生成,从而发挥抗氧化应激作用;联合 A2AR 激动剂能进一步激活 PI3K/Akt 磷酸化,下调促凋亡蛋白 Bax 水平,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,从而抑制髓核细胞凋亡,减缓 IDD 恶性进展。

【关键词】 脉冲电磁场; A2A 腺苷受体; 氧化应激; 凋亡; 椎间盘退行性病变

基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2021CFB522);武汉市卫生和计划生育委员会一般项目(WX10C20)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.11.002

Effects of a pulsed electromagnetic field on intervertebral disc degeneration and A2A adenosine receptor-mediated reactive oxygen signaling

Cai Lei¹, Fang Weizhi¹, Li Qingbo¹, Wang Zhengkun¹, Yao Zhi², Wei Mengcheng², Zhang Shishuang³, Jiao Hongbo¹, Liu Weijun¹

¹Department of the Spine, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430030, China; ²Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ³School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, China

Corresponding author: Liu Weijun, Email: iamlu2003@163.com

【Abstract】 Objective To observe any regulatory effect of a pulsed electromagnetic field (PEMF) on A2A adenosine receptors (A2ARs) in the nucleus pulposus of rats with intervertebral disc degeneration (IDD), and to explore any combination with the A2ARs' agonist-mediating ROS/PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** Fifty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group, an intervertebral disc degeneration group (the model group), an A2AR agonist CGS-21680 treatment group (the agonist group), a PEMF group and a PEMF combined

with CGS-21680 treatment group (the observation group). IDD was modeled in all except the rats in the control group. 100 μ L of CGS-21680 (100 μ g/kg) was injected into the L₅₋₆ intervertebral discs of the agonist group, while the PEMF group was given 30 minutes of PEMF intervention daily for 14 days at 1.5mT and 75Hz with a pulse width of 150 μ s. The observation group was injected with CGS-21680 and then given the same PEMF intervention. Primary nucleus pulposus cells from each group (50ng/mL) were cultured and the expressions of 8-OHdG, SOD, MDA and ROS were detected by immunohistochemistry, immunofluorescence or with an ELISA kit. The A2AR, PI3K, AKT and p-AKT protein levels were detected using western blotting. **Results** The nucleus pulposus cells and the annulus fibrosus were obviously wrinkled, necrotic and broken in the model group but the annulus fibrosus was intact and the nucleus pulposus was almost normal in the observation group. Compared with the model group, the levels of SOD and A2AR, PI3K, p-AKT and AKT protein were higher in the agonist, PEMF and observation groups, while the expressions of MDA, ROS and 8-OHdG were weaker. The ROS level in the observation group was significantly lower than that in the agonist and PEMF groups, and the phosphorylation level of p-AKT in the observation group was significantly higher than in the agonist and PEMF groups. The average levels of SOD, A2AR, PI3K, p-AKT and AKT protein in the nucleus pulposus cells of the agonist, PEMF and observation groups were significantly higher than the IL-1 β group's average, while the average levels of MDA, ROS and 8-OHdG were significantly lower. The ROS levels in the observation group were significantly lower than in the agonist and PEMF groups, while the A2AR protein content and p-AKT phosphorylation in the observation group were significantly greater. The average Bax levels in the nucleus pulposus cells of the agonist, PEMF and observation groups were significantly lower than that in the IL-1 β group, and the expression of Bcl-2 was significantly increased. There was significantly less apoptosis observed in the observation group than in the agonist and PEMF groups, while the expression of Bcl-2 was significantly higher. **Conclusions** PEMF plays an anti-oxidative stress role by up-regulating A2AR activity and reducing ROS generation. Treatment with PEMF and A2AR agonist could further activate the phosphorylation of PI3K/Akt, down-regulate Bax and up-regulate Bcl-2, thus inhibiting the apoptosis of nucleus pulposus cells and alleviating the malignant progression of IDD.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields; A2A adenosine receptor; Oxidative stress; Apoptosis; Intervertebral disc degeneration

Funding: Natural Science Foundation of Hubei Province (project 2021CFB522); Wuhan Health and Family Planning Commission (project WX10C20)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.11.002

下背痛(low back pain, LBP)是临床常见病,严重时可能导致残疾,而椎间盘退行性病变(intervertebral disc degeneration, IDD)被认为是诱发 LBP 的重要原因之一^[1]。IDD 的发生、发展受诸多因素影响,炎症因子、细胞凋亡等均参与其中^[2],氧化应激损伤产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)如超氧阴离子等也会促进 IDD,加速其进展^[3]。ROS 主要在线粒体氧化磷酸化过程中产生,其大量释放到胞质后能抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 3(PI3K/Akt)信号通路从而促进细胞凋亡^[4]。腺苷不仅可抑制机体炎症反应,还能与 A2A 腺苷受体(adenosine A2A receptor, A2AR)结合阻断超氧阴离子生成^[5]。在 IDD 形成过程中, A2AR 信号功能缺失会加剧炎症反应及氧化应激损伤^[5]。既往研究表明,上调 A2AR 活性可减轻炎症浸润损伤^[6],但能否抑制 IDD 过程中氧化应激损伤导致的细胞凋亡鲜见报道。

脉冲电磁场(pulsed electromagnetic field, PEMF)在促进细胞增殖、组织再生、减轻炎症水肿等方面具有积极作用^[7]。本课题组前期研究发现,PEMF 干预可

下调 IDD 大鼠椎间盘组织白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平,减轻炎症反应^[6],但其是否也通过抗 IDD 中氧化应激损伤发挥保护作用鲜见报道。基于此,本研究通过构建 IDD 模型大鼠并给予 PEMF 及 A2AR 激动剂联合干预,同时在细胞水平进一步探究其是否通过 ROS/PI3K/Akt 信号通路发挥保护作用,为 IDD 的临床治疗提供参考依据。

材料与方法

一、实验试剂

主要实验试剂包括 A2AR 激动剂 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 Antijie 公司提供)、A2AR、PI3K、AKT 及 p-AKT(美国 Abcom 公司出品)、兔抗大鼠一抗、辣根过氧化物酶二抗(武汉 Antijie 公司)、BCA 法(bicinchoninic acid)蛋白定量检测试剂盒(武汉碧云天有限公司出品)、氧化应激指标超氧化物歧化酶(superoxide dis-

mutase, SOD)、CAT ELISA 试剂盒、荧光活性氧检测试剂盒(ROS assay kit)(北京欣博盛有限公司提供)及水合氯醛(上海国药集团化学试剂有限公司出品)等。

二、动物造模及干预

选取 50 只健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 180~200 g, 由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。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对照组、IDD 模型组(简称模型组)、A2AR 激动剂 CGS-21680 组(简称激动剂组)、PEMF 组及 PEMF 联合 A2AR 激动剂组(简称观察组), 每组 10 只大鼠。

参照文献[1-2]介绍的方法并加以改进, 将模型组、激动剂组、PEMF 组及观察组大鼠制成 IDD 动物模型, 首先麻醉大鼠后备皮, 暴露 L₅₋₆ 椎间盘组织, 采用 30 G 穿刺针向其穿刺并注射 25 μ l IL-1 β (400 ng/kg)。激动剂组及观察组大鼠于制模后 1 h 向 L₅₋₆ 椎间盘组织注射 25 μ l A2AR 激动剂 CGS-21680 (100 μ g/kg); PEMF 组及观察组再给予 PEMF 干预, 具体操作方法如下: 将大鼠置于纸箱中, 纸箱内置 PMFS9 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, 磁刺激脉宽 150 μ s, 大鼠每天曝磁 1 次, 每次持续约 30 min, 连续曝磁 14 d。

三、细胞实验干预

购买大鼠髓核细胞(武汉普诺赛公司提供), 将其转入 25 cm² 细胞培养瓶中, 加入含 1% 青-链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养液, 再置于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养^[7-8]。采用倒置显微镜观察细胞形态, 当细胞融合率达到 90% 时进行传代培养, 取第 3 代细胞接种于 6 孔板、12 孔板及 24 孔板中进行后续实验。将髓核细胞随机分为 5 组, 分别是空白对照组(简称对照组)、IL-1 β 模型组(简称 IL-1 β 组)、IL-1 β +A2AR 激动剂 CGS-21680 组(简称激动剂组)、IL-1 β +PEMF 组(简称 PEMF 组)和 IL-1 β +PEMF+A2AR 激动剂组(简称观察组), 各组细胞干预同上。

四、大鼠椎间盘病理观察及氧化应激指标检测

于 IDD 造模 8 周后, 采用 3% 戊巴比妥钠麻醉处死各组大鼠, 取 L₅₋₆ 椎间盘组织, 部分组织经 4% 多聚甲醛固定后制作石蜡切片(片厚 4 μ m), 切片经脱蜡处理后分别进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色及免疫组化染色^[5], 采用光学显微镜观察并拍照, 应用 IPP 软件进行半定量分析。部分组织经匀浆后采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测椎间盘中 SOD 及丙二醛(malondial-

dehyde, MDA) 含量, 采用荧光活性氧试剂盒(ROS assay kit)检测样本中活性氧生成情况。

五、大鼠髓核细胞凋亡、氧化应激相关指标检测

采用原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)评估髓核细胞凋亡情况, 收集各组细胞后采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)漂洗 2 遍, 经 4% 多聚甲醛固定 30 min, 去除固定液后再经 PBS 漂洗 3 次, 参照 TUNEL 试剂盒说明书进行染色, 于激光共聚焦显微镜下观察、拍照。

采用 ELISA 技术检测各组细胞上清液中 SOD 及 MDA 水平, 采用荧光活性氧试剂盒(ROS assay kit)检测细胞活性氧生成情况, 采用免疫荧光法检测氧化应激 DNA 损伤标志物 8-OHdG 表达水平。

六、大鼠髓核组织 A2AR、Bax 及 Bcl-2 mRNA 检测

取各组大鼠 L₅₋₆ 椎间盘组织并提取细胞总 RNA, 然后采用 cDNA Kit 试剂盒进行逆转录获得 cDNA, 设置 3 个复孔, 并采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术检测样本中 A2AR、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 及 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 等因子 mRNA 水平, 内参为 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。

七、大鼠髓核组织 A2AR、PI3K、AKT 及 p-AKT 蛋白含量检测

采用含有 1% 蛋白酶抑制剂 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 及磷酸酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液 (radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA) 裂解大鼠 L₅₋₆ 椎间盘髓核组织及细胞。于冰面上提取总蛋白后采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度并调平, 加入上样 Buffer 沸水浴中变性 10 min, 各组均取 20 μ l 样品 (蛋白量约 50 μ g) 上样。采用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶电泳分离蛋白、转膜、孵育一抗 A2AR、PI3K、AKT 及 p-AKT, 上述 WB 蛋白免疫印迹 (Western blot) 操作参照文献[5, 9], 计算目标蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的相对比值。

八、统计学方法

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, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 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观察结果比较

各组大鼠椎间盘 HE 染色结果详见图 1, 可见对照

组大鼠椎间盘髓核细胞排列规律,形态结构正常,纤维环完整,与髓核边界清晰;模型组髓核破裂、形状不规则,细胞明显皱缩、凋亡,纤维环断裂,呈现退行性病变特征。与模型组比较,激动剂组髓核细胞皱缩、坏死现象明显改善,纤维环断裂减少;PEMF 组髓核破裂、细胞凋亡现象好转,纤维环-髓核边界较明显;观察组髓核细胞形态正常,纤维环完整无断裂,髓核结构情况基本趋于对照组。

二、各组大鼠椎间盘髓核组织氧化应激水平比较

各组大鼠椎间盘髓核组织 SOD、MDA、ROS 及 8-OHdG 表达水平组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组 SOD 表达水平明显降低 ($P < 0.05$),MDA、ROS 及 8-OHdG 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$);激动剂组、PEMF 组及观察组 SOD 表

达水平均较模型组明显升高 ($P < 0.05$),MDA、ROS 及 8-OHdG 表达水平均较模型组明显降低 ($P < 0.05$),并且观察组 ROS 表达水平亦显著低于激动剂组及 PEMF 组 ($P < 0.05$),具体情况见图 2。

三、各组大鼠椎间盘髓核 A2AR 表达及 PI3K/AKT 信号通路蛋白磷酸化水平比较

各组大鼠椎间盘髓核组织 A2AR、PI3K、p-AKT 及 AKT 蛋白含量组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组大鼠椎间盘组织 A2AR、PI3K、p-AKT 及 AKT 蛋白水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$),激动剂组、PEMF 组和观察组 A2AR、PI3K、p-AKT 及 AKT 蛋白含量均显著高于模型组 ($P < 0.05$),并且观察组 p-AKT 磷酸化水平亦显著高于激动剂组及 PEMF 组 ($P < 0.05$),各组大鼠蛋白免疫印迹结果详见图 3。

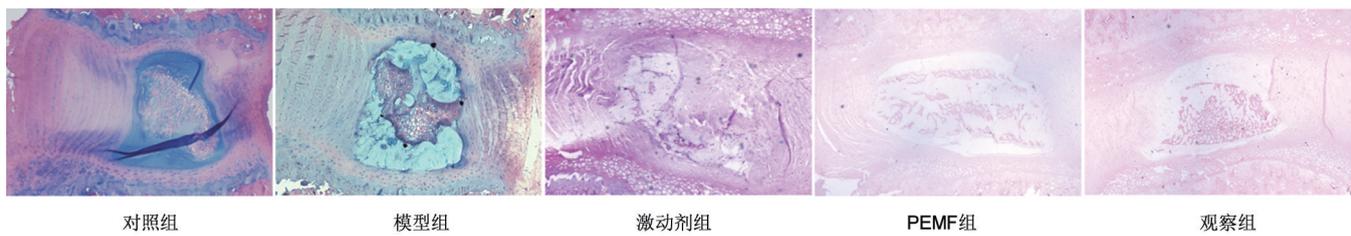
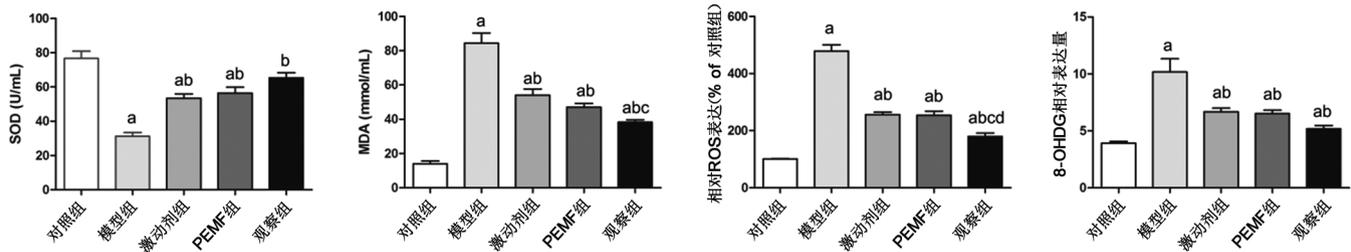
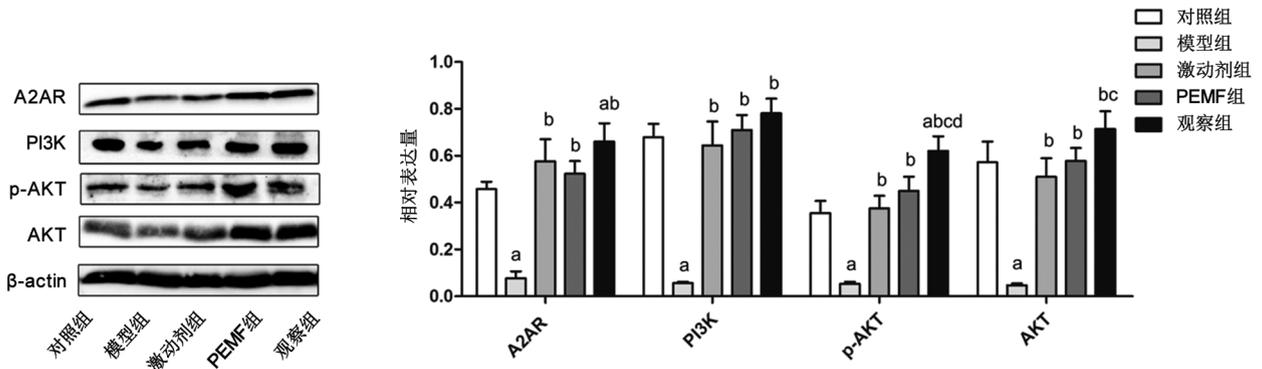


图 1 各组大鼠椎间盘髓核组织病理观察结果比较 (HE 染色, ×50)



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与激动剂组比较,^c $P < 0.05$;与 PEMF 组比较,^d $P < 0.05$

图 2 各组大鼠椎间盘髓核组织氧化应激水平比较



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与激动剂组比较,^c $P < 0.05$;与 PEMF 组比较,^d $P < 0.05$

图 3 各组大鼠椎间盘髓核组织 A2AR、PI3K、p-AKT 及 AKT 蛋白水平比较

四、各组髓核细胞氧化应激水平比较

各组髓核细胞 SOD、MDA、ROS 及 8-OHdG 表达水平组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-1 β 组 SOD 含量较对照组明显下降 ($P < 0.05$), 而 MDA、ROS 及 8-OHdG 水平均显著升高 ($P < 0.05$); 激动剂组、PEMF 组及观察组 SOD 含量均较 IL-1 β 组明显增加 ($P < 0.05$), MDA、ROS 及 8-OHdG 含量均较 IL-1 β 组明显降低 ($P < 0.05$), 并且观察组 ROS 表达亦较激动剂组及 PEMF 组明显降低 ($P < 0.05$), 提示该组髓核细胞氧化应激损伤进一步减轻。具体情况见图 4。

五、各组髓核细胞 A2AR 表达及 PI3K/AKT 蛋白磷酸化水平比较

各组髓核细胞 A2AR、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白含量组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 通过进一步比较发现, IL-1 β 组髓核细胞 A2AR、PI3K、p-AKT 及 AKT 蛋白水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 激动剂组、PEMF 组和观察组 A2AR、PI3K、p-AKT 及 AKT 蛋白含量均显著高于 IL-1 β 组 ($P < 0.05$), 并且观察组 A2AR 蛋白含量及 p-AKT 磷酸化水平也显著高于激动剂组和 PEMF 组 ($P < 0.05$)。具体情况见图 5。

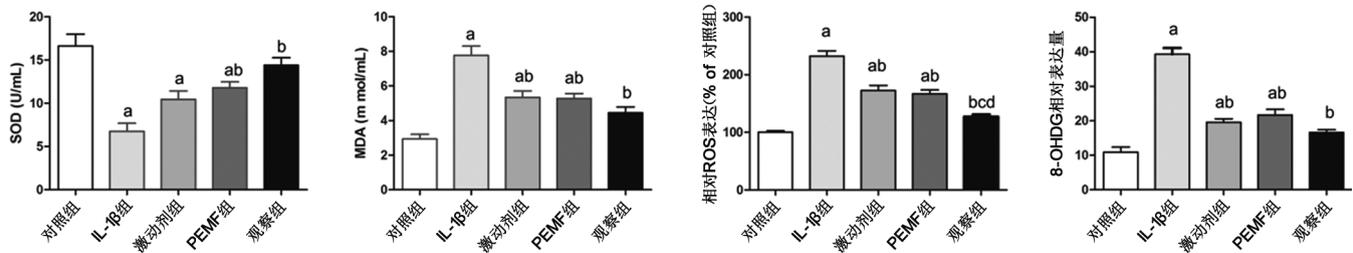
六、各组髓核细胞凋亡情况比较

各组髓核细胞凋亡率、Bax 及 Bcl-2 表达水平组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 通过进一步比较发

现, IL-1 β 组髓核细胞凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 激动剂组、PEMF 组及观察组髓核细胞凋亡率均较 IL-1 β 组明显降低 ($P < 0.05$), 并且观察组髓核细胞凋亡率亦显著低于激动剂组及 PEMF 组 ($P < 0.05$)。另外 IL-1 β 组髓核细胞 Bax 表达较对照组显著升高, Bcl-2 表达则明显降低 ($P < 0.05$); 激动剂组、PEMF 组及观察组髓核细胞 Bax 含量均较 IL-1 β 组显著降低, Bcl-2 表达则明显升高 ($P < 0.05$), 并且观察组 Bcl-2 表达水平亦显著高于激动剂组及 PEMF 组 ($P < 0.05$), 具体情况见图 6。

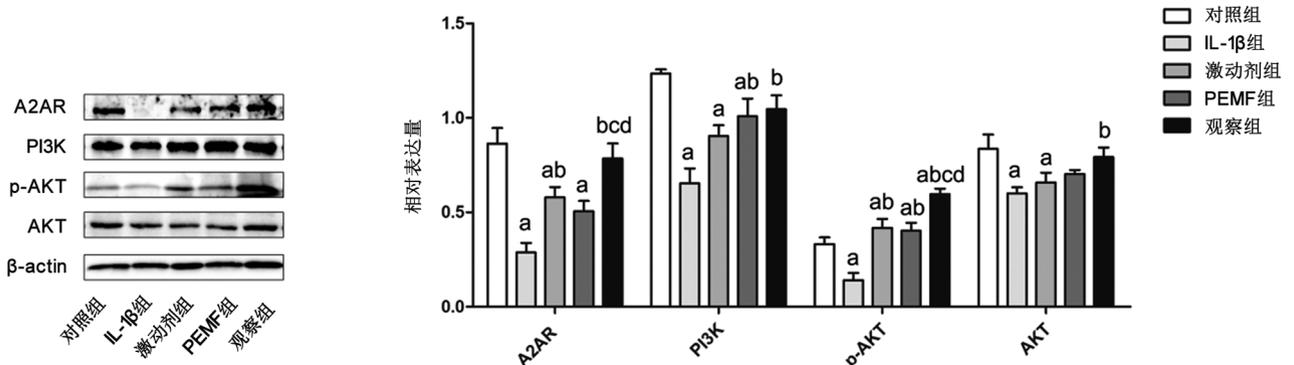
讨 论

IDD 发病机制较复杂, 相关研究显示氧化应激损伤是导致髓核胶原蛋白降解、细胞凋亡、组织坏死的重要原因之一^[7]。机体组织在损伤、退变过程中会产生大量中间氧化物(如活性氧自由基等), 其中 ROS 可穿透细胞膜, 破坏细胞膜完整性, 同时造成线粒体功能障碍, 能导致髓核细胞凋亡^[8]。因此, 抑制氧化应激、减少髓核细胞凋亡对缓解髓核组织损伤、维持椎间盘生物力学稳定及生理功能具有重要意义。有研究表明, 髓核细胞凋亡是 IDD 发生、发展的重要诱因, 而 PI3K/Akt 信号通路在细胞增殖、凋亡过程中发挥重要作用^[4]。本研究结果显示, 由 ROS 介导的 PI3K/AKT 信



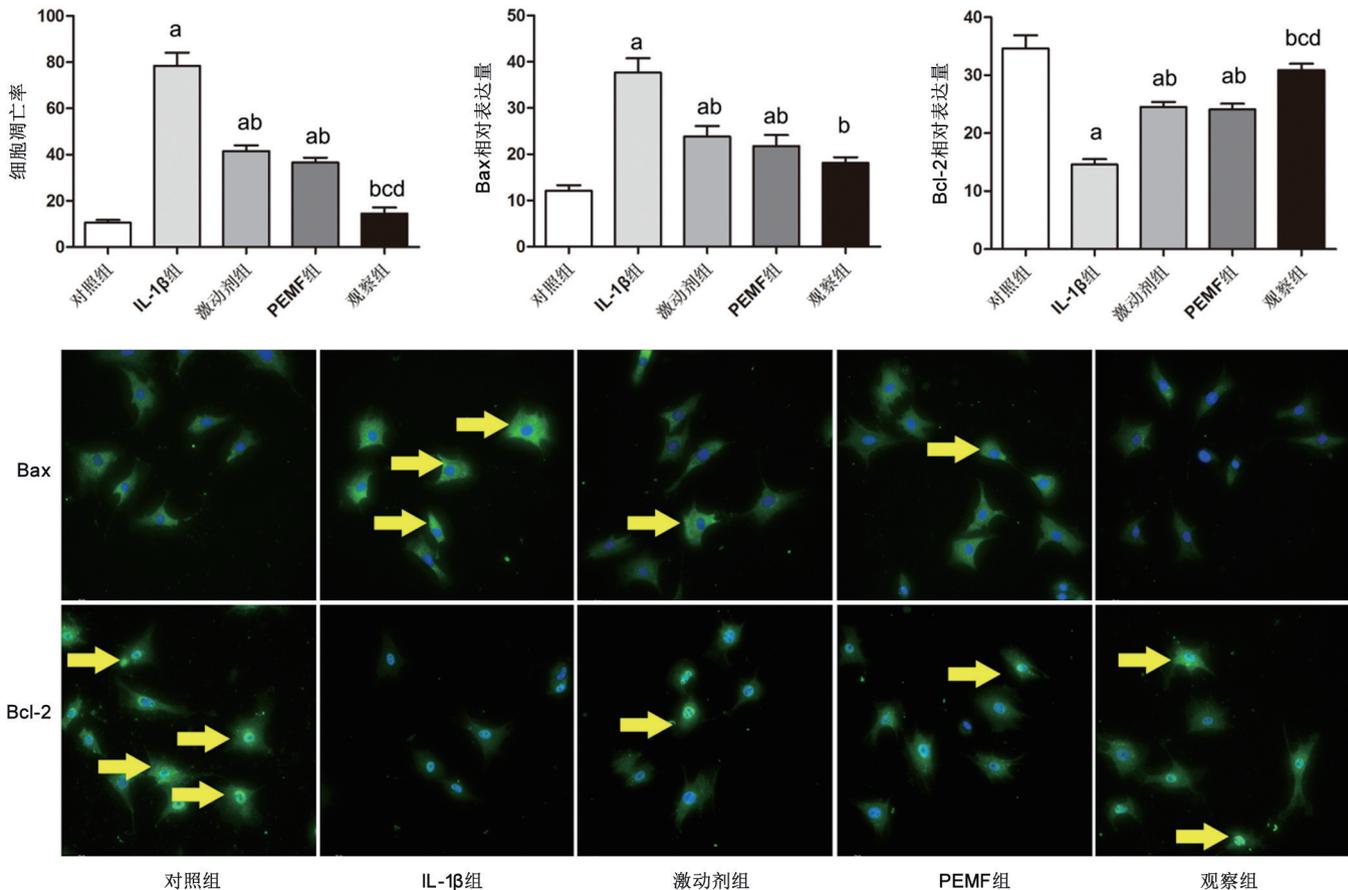
注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IL-1 β 组比较, ^b $P < 0.05$; 与激动剂组比较, ^c $P < 0.05$; 与 PEMF 组比较, ^d $P < 0.05$

图 4 各组髓核细胞氧化应激水平比较



注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IL-1 β 组比较, ^b $P < 0.05$; 与激动剂组比较, ^c $P < 0.05$; 与 PEMF 组比较, ^d $P < 0.05$

图 5 各组髓核细胞 A2AR 表达及 PI3K/AKT 蛋白磷酸化水平比较



注:黄色箭头标记为阳性细胞;与对照组比较,^a $P<0.05$;与 IL-1 β 组比较,^b $P<0.05$;与激动剂组比较,^c $P<0.05$;与 PEMF 组比较,^d $P<0.05$

图6 各组髓核细胞凋亡率、Bax 及 Bcl-2 表达水平比较

号通路参与了大鼠椎间盘髓核细胞凋亡过程,PEMF 干预及注射 A2AR 激动剂均可显著增加大鼠髓核组织 A2AR 含量,减轻氧化应激损伤,提示 PEMF 干预可能是通过增强 A2AR 表达,减少 ROS 生成,上调 PI3K/Akt 信号通路功能而发挥抗氧化应激作用,进而抑制细胞凋亡。

机体内氧化应激反应过度激活会释放大量 ROS,而 ROS 穿透细胞膜时会诱发膜脂质过氧化而产生有害物质 MDA,随后 ROS 会进入细胞损伤 DNA^[9]。本研究结果显示,模型组大鼠椎间盘纤维环破裂,髓核细胞明显皱缩、坏死,且 MDA、ROS 及 8-OHdG (DNA 损伤标志物之一)水平均较对照组显著增高,SOD 含量则明显降低。上述结果提示 ROS 进入胞内能导致髓核细胞损伤及凋亡。本课题组前期研究证实 A2AR 活性与大鼠髓核细胞凋亡密切相关^[8-9],而 A2AR 作为内源性信号分子的作用靶点,能发挥抗氧化效应、减轻氧化应激损伤^[10]。本研究结果显示模型组 A2AR 蛋白及 mRNA 表达均显著下调,同时从细胞水平也证实 A2AR 活性下调后,髓核细胞 SOD 含量随之减少,抗氧化应激能力减弱,MDA、ROS 及 8-OHdG 表达均明显增加,提示该组细胞氧化应激损伤加重。国外学者曾

报道,PEMF 干预对细胞分化、增殖及转录因子水平具有调控作用^[11]。本研究发现给予 A2AR 受体激动剂及 PEMF 干预后,大鼠椎间盘组织 A2AR 蛋白及 mRNA 表达量均较模型组明显升高,MDA、ROS 及 8-OHdG 水平则显著降低,与此同时髓核细胞凋亡情况有所缓解,提示注射 A2AR 受体激动剂联合 PEMF 干预可通过上调 A2AR 活性,有效减少髓核细胞氧化应激分子产生,增强髓核细胞抗氧化能力。本研究观察组大鼠经 PEMF 及 A2AR 受体激动剂联合干预后,其体内 ROS 水平较激动剂组及 PEMF 组进一步降低,同时病理学结果也显示观察组椎间盘纤维环结构完整,髓核细胞皱缩、凋亡情况明显好转,基本趋于正常。

髓核细胞凋亡是椎间盘退变的重要发病机制之一,而氧化应激反应可通过线粒体途径诱导髓核细胞凋亡,细胞凋亡又与 PI3K/AKT 信号通路密切相关^[12]。郭洪涛等^[4]研究发现,激活 PI3K/AKT 信号通路可抑制髓核细胞凋亡,从而减缓 IDD 恶性进展。本研究结果显示,观察组髓核细胞 PI3K、p-AKT、AKT 蛋白含量均显著高于模型组 ($P<0.05$),提示 PEMF 联合 A2AR 受体激动剂不仅能促使 A2AR 活性上调,还能通过活化的 A2AR 与细胞膜上的激动型

G 蛋白(stimulatory protein, Gs) 偶联并激活 PI3K 信号通路^[13-14]。Bax 和 Bcl-2 是 PI3K/Akt 信号通路的下游关键蛋白, 当 PI3K/AKT 信号通路活化后, p-AKT 磷酸化上调可抑制促凋亡蛋白 Bax 表达, 促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达^[9]。Bcl-2 可通过线粒体外膜阻断细胞色素 C 释放, 抑制细胞色素 C 介导的 Caspase 激活, 从而缓解线粒体功能障碍并减少细胞凋亡发生。本研究结果显示, 经干预后观察组髓核细胞 p-AKT 磷酸化水平明显高于模型组、激动剂组及 PEMF 组, 并能有效抑制促凋亡蛋白 Bax 表达, 促进 Bcl-2 含量升高, 表明 PEMF 联合 A2AR 受体激动剂干预可能是通过上调 PI3K/AKT 磷酸化而发挥抑制髓核细胞凋亡作用。

综上所述, 氧化应激损伤时由 ROS 介导的 PI3K/AKT 活性下调参与了髓核细胞凋亡及 IDD 病变过程。PEMF 干预可通过上调 A2AR 活性, 减少 ROS 生成, 进而发挥抗氧化应激作用; 联合 A2AR 激动剂能进一步促进 PI3K/Akt 磷酸化, 下调促凋亡蛋白 Bax 水平, 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 从而抑制髓核细胞凋亡, 减缓 IDD 恶性进展, 为临床治疗椎间盘退行性病变提供了新方向, 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] 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.
- [3] 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.
- [4] 郭洪涛, 郭尔斐, 徐建杰, 等. 17 β -雌二醇通过 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制白介素 1 β 诱导的大鼠椎间盘髓核细胞的凋亡[J]. 生理学报, 2021, 73(1): 62-68. DOI: 10.13294/j.aps.2021.0002

- [5] Cronstein BN, Sitkovsky M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(1): 41-51. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.178.
- [6] 刘伟军, 焦红博, 王威, 等. 电磁场联合 A2A 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[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2021, 43(8): 673-679. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.08.001.
- [7] 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.
- [8] 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, 21(6): 1031-1041. DOI: 10.1016/j.spinee.2021.01.014.
- [9] Wang C, Yu X, Yan Y, et al. Tumor necrosis factor- α : a key contributor to intervertebral disc degeneration [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2017, 49(1): 1-13. DOI: 10.1093/abbs/gmw112.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Chan AK, Ballatori A, Nyayapati P, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate sensorimotor recovery following experimental disc herniation [J]. Spine, 2021, 46(4): 222-233. DOI: 10.1097/BRS.0000000000003762.
- [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.

(修回日期: 2022-07-23)

(本文编辑: 易 浩)