

· 基础研究 ·

脉冲电磁场对椎间盘退行性病变大鼠 A2A 腺苷受体及 p38 MAPK 信号通路的影响

黎清波¹ 蔡磊¹ 王正坤¹ 方为志¹ 周传坤¹ 周逸驰¹ 姚智² 魏梦诚² 张诗爽³ 刘伟军¹¹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 A2A 腺苷受体(A2AR)及 p38 MAPK 信号通路的影响。方法 采用随机数字表法将 40 只 SD 大鼠分为对照组、IDD 模型组(简称模型组)、PEMF 组和 PEMF 联合 CGS-21680 治疗组(简称观察组)。将模型组、PEMF 组及观察组大鼠制成 IDD 动物模型,PEMF 组于制模后给予 PEMF 干预,观察组则给予 PEMF 干预并注射 A2AR 激动剂 CGS-21680。于造模 8 周后采用番红 O-快绿染色评估各组大鼠椎间盘病理改变,同时检测各组大鼠椎间盘 A2AR、环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶 A(PKA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)、II 型胶原(Col-II)、基质金属蛋白酶-3(MMP3)表达水平。结果 模型组大鼠髓核组织皱缩,纤维成分及软骨细胞增多,观察组大鼠髓核形态基本趋于正常,纤维环完整无破裂。模型组椎间盘组织 A2AR 蛋白表达及 mRNA 水平均高于对照组,观察组 A2AR 蛋白表达及 mRNA 水平均显著高于其他各组($P<0.05$)。PEMF 组和观察组椎间盘 cAMP 含量及 PKA mRNA 表达均较模型组增高,且观察组与模型组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。模型组大鼠椎间盘 p38 MAPK、p-p38 MAPK 含量及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值均显著高于对照组($P<0.05$),PEMF 组和观察组 p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白含量及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值均有不同程度降低,且观察组上述指标数值均显著低于模型组($P<0.05$),p-p38 MAPK 蛋白含量及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值亦显著低于 PEMF 组($P<0.05$)。模型组大鼠 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 表达均显著高于对照组,PEMF 组及观察组上述指标含量均较模型组明显降低($P<0.05$)。模型组大鼠 MMP3 含量较对照组显著升高,Col-II 含量则明显下降;PEMF 组、观察组 MMP3 含量均较模型组降低,Col-II 表达均较模型组增高,并且观察组上述指标含量与模型组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 炎性因子刺激能活化 p38 MAPK 信号通路并诱导细胞凋亡,这也是促进 IDD 大鼠病变的重要原因之一。PEMF 联合 A2AR 激动剂干预能激活 A2AR/cAMP/PKA 信号通路,进而抑制 p38 MAPK 磷酸化,减少髓核细胞凋亡,缓解 IDD 损伤。

【关键词】 脉冲电磁场; A2A 腺苷受体; p38 MAPK; 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(WX18D14);武汉市卫生和计划生育委员会一般项目(WX10C20)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2023.09.001

Pulsed electromagnetic field activation of the A2A adenosine receptors can retard intervertebral disc degeneration

Li Qingbo¹, Cai Lei¹, Wang Zhengkun¹, Fang Weizhi¹, Zhou Chuankun¹, Zhou Yichi¹, Yao Zhi², Wei Mengcheng², Zhang Shishuang³, Liu Weijun¹¹Department 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 explore any effect of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on intervertebral disc degeneration (IDD). Methods Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group, an IDD model group, a PEMF group and an observation group. An IDD model was induced in all except those in the control group. Both the PEMF and observation groups were given PEMF stimulation, while the latter was additionally injected with the A2AR agonist CGS-21680. Eight weeks after the modelling any pathological changes in the morphology of the rats' intervertebral disc tissues were evaluated using saffron solid green staining. The

expression of A2AR, cyclic adenosine phosphate (cAMP), protein kinase A (PKA), cysteine aspartate proteolytic enzyme-3 (Caspase-3), type II collagen (COL-II) and matrix metalloproteinase-3 (MMP3) in the intervertebral discs were evaluated. **Results** The nucleus pulposus had shrunk, while fibrous tissues and chondrocytes had increased in the IDD model group. In the observation group the nucleus pulposus was intact and of basically normal shape. A2AR mRNA and protein levels were higher in the intervertebral disc tissue of the model group than among the control group, on average, while the levels in the observation group were significantly higher than in the other groups. In the PEMF and observation groups cAMP and PKA mRNA were significantly higher than in the IDD model group. The p38 MAPK and P-P38 MAPK levels of the IDD model group and its average P-P38 MAPK/p38 MAPK ratio were significantly higher than in the control group. In the PEMF and observation groups those indices had decreased to varying degrees, with those of the observation group significantly lower than among the model and PEMF groups on average, except for the p38 MAPK values. Caspase-3 and its mRNA were significantly higher in the model group than in the control group, on average, and those values were significantly lower in the PEMF and observation groups than in the IDD model group. The average MMP3 contents of the IDD model group had increased significantly compared with the control group, while the Col-II level had decreased significantly. Compared with the IDD model group, the MMP3 level had decreased but Col-II expression had increased in both the PEMF and observation groups, with significant differences between the IDD model and observation groups. **Conclusions** The activation of the p38 MAPK signaling pathway by inflammatory factors to induce apoptosis is one of the important reasons for the aggravation of IDD lesions. PEMF combined with A2AR agonists can activate the A2AR/cAMP/PKA signaling pathway, inhibit p38 MAPK phosphorylation, reduce apoptosis of nucleus pulposus cells, and relieve IDD damage.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields; A2A adenosine receptor; p38 MAPK; Intervertebral discs; Disc degeneration

Funding: Natural Science Foundation of Hubei Province (project 2021CFB522); Wuhan Health and Family Planning Commission (project WX18D14); Wuhan Health and Family Planning Commission (project WX10C20)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2023.09.001

椎间盘退行性病变 (intertebral disc degeneration, IDD) 是退行性脊柱疾病的重要病因及病理基础^[1]。目前关于 IDD 的发病机制仍未明确, 其临床治疗也主要是缓解症状, 并不能从根本上减缓或阻断退行性病变进程^[1-2]。机体椎间盘主要由髓核 (nucleus pulposus, NP)、纤维环 (annulus fibrosus, AF) 以及覆盖 NP 和 AF 的软骨终板 (cartilage endplate, EP) 三部分构成, 其中 NP 组织富含髓核细胞及细胞外基质, 如 II 型胶原 (type-II collagen, Col-II) 蛋白和聚集蛋白聚糖等^[3]。相关研究表明, 炎症反应过度激活、髓核细胞凋亡等参与了 IDD 的病理生理过程, 最终导致椎间盘结构改变及功能障碍, 如纤维环破裂、髓核细胞外基质降解等^[4]。

腺苷 A2A 受体 (adenosine A2A receptor, A2AR) 因其在机体生理反应及多种炎症疾病中的重要作用而备受关注。既往研究表明^[5-6], A2AR 对退行性疾病阿尔茨海默病具有一定的神经保护作用, 其功能信号缺失将会加剧炎症反应及组织损伤。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 作为蛋白激酶之一, 参与机体炎症、应激、细胞增殖等多种生物学功能的信号转导。有研究报道^[7], 在缺血再灌注组织中 p38 MAPK 被激活, 能诱发炎症反应, 随

后引起线粒体去极化, 并启动促凋亡因子释放, 最终通过 Caspase 级联反应导致细胞死亡。

脉冲电磁场 (pulsed electromagnetic field, PEMF) 是近年来逐渐兴起的无创且安全的物理治疗方法, 机体加载 PEMF 后会对其生物电活动产生影响, 使膜电位发生改变并促使细胞膜通透性增加, 进而缓解微环境炎症损伤^[8]。本课题组前期研究发现 PEMF 能上调 A2AR 活性、减轻炎症浸润^[9-10], 但能否抑制 IDD 过程中 p38 MAPK 信号通路活化, 进而减少细胞凋亡则鲜见报道。基于此, 本研究拟探讨 PEMF 干预对 IDD 模型大鼠椎间盘退变的影响及对 A2AR、P38 MAPK 信号通路的调控作用。

材料与方法

一、实验试剂

本研究主要试剂包括 A2AR 激动剂 CGS-21680 (美国 Sigma 公司出品, 纯度 >95%)、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) ELISA 试剂盒 (购于武汉欣博盛有限公司)、A2AR、p38 MAPK、p-p38 MAPK、Col-II、基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP3) 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔抗大鼠一

抗(均购于武汉 Antijie 生物技术有限公司)等。

二、动物造模及干预

从斯贝福(北京)生物技术有限公司购买健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,体质量 180~200 g。所有大鼠经适应性喂养 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)、PEMF 组及 PEMF 联合 A2AR 激动剂组(简称观察组),每组 10 只大鼠。将模型组、PEMF 组及观察组大鼠制成 IDD 动物模型,首先麻醉大鼠并在 L₅₋₆ 椎体皮肤表面作标记,采用 30G 穿刺针穿刺 L₅₋₆ 椎间盘髓核组织,并按照每千克体重 400 ng 标准注射 25 μl 白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)^[11]。观察组大鼠于制模后 1 h 向 L₅₋₆ 椎间盘组织注射 A2AR 激动剂 CGS-21680(按 100 μg/kg 体重标准),其它各组大鼠则注射等量生理盐水。PEMF 组及观察组大鼠再给予 PEMF 干预^[6],具体操作如下:将大鼠置于安装有 PMFS9 型磁场发生器(上海索莘电子有限公司出品)的纸箱内,大鼠在纸箱内可自由活动,设置磁场强度 1.5 mT,磁场频率 75 Hz,磁刺激脉宽 150 μs,每天曝磁 1 次,每次持续 30 min,连续曝磁 14 d^[8]。

三、大鼠椎间盘番红 O-快绿染色及 cAMP 检测

于造模 8 周后采用 3%戊巴比妥钠麻醉处死各组大鼠,充分暴露并分离 L₅₋₆ 椎间盘组织。采用肝素生理盐水将椎间盘组织残留血渍冲洗干净后置于 4%多聚甲醛中固定,经乙二胺四乙酸(ethylene diamine-tetraacetic acid, EDTA)脱钙处理 1 个月,再进行石蜡包埋并切片(片厚约 4 μm)。各组大鼠切片经脱蜡处理后,参照文献^[11]介绍的方法进行番红 O-快绿染色,主要操作步骤包括:经苏木素染色 1~3 min 后用自来水冲洗,再采用 1%盐酸酒精分化 15~30 s 后经自来水洗涤,继续采用 0.02%固绿染色 3 min 后经 1%冰醋酸洗涤,再采用 0.1%番红 O 染色 3 min 后经 95%乙醇洗涤,最后用中性树胶封片。

取各组大鼠部分 L₅₋₆ 椎间盘组织,经匀浆后采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测其椎间盘组织中 cAMP 含量。

四、大鼠椎间盘组织免疫荧光染色

各组大鼠椎间盘切片经二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、75%乙醇依次梯度脱蜡后,滴加 TritonX-100 破膜处理,然后经牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭 20 min 孵育一抗,包括 A2AR(1:200)、Col-Ⅱ(1:100)及 MMP3(1:200)。再置于 4℃冰箱内孵育过夜后经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤 3 次,孵育兔抗异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和花青染料 3(Cyanine 3, Cy3)二抗 1 h。经 PBS 洗涤 3 次后,滴加 4,6-联脒-2-

苯基吡啶标记细胞核(4,6-diamidino-2-phenyl-indole dihydrochloride, DAPI)孵育 5 min,再滴加抗淬灭剂封片。采用光学显微镜观察并拍照,应用 IPP(Image Pro Plus)图像软件进行半定量分析。

五、椎间盘各因子 mRNA 含量检测

取各组大鼠 L₅₋₆ 椎间盘组织,采用 Trizol 试剂裂解法提取总 RNA,然后选用 cDNA Kit 试剂盒进行逆转录获得 cDNA。采用 qRT-PCR 技术检测各组样本中 A2AR、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase-3)等因子 mRNA 水平,每个样本设置 3 个复孔。具体反应条件如下:95℃预变性 1 min,95℃变性 20 s,55℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,共进行 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT}法计算各组大鼠目标因子 mRNA 相对表达量,具体引物序列情况见表 1。

表 1 各目标基因 qRT-PCR 引物序列

目标基因	引物序列
GAPDH	上游:5'-AACGACAACTCCCATTCTTCC-3'
	下游:5'-TGGTCCAGCGTTTCTTACTCC-3'
A2AR	上游:5'-GCTGACATTGCAGTGGGTGT-3'
	下游:5'-CTAAAGATGGAAGCTCTGCGTGAG-3'
PKA	上游:5'-GATTGGGAGCTTCACTGAGCC-3'
	下游:5'-GTCCACAGCTTTGTTGTAGCCCTT-3'
Caspase-3	上游:5'-GTATGCTTACTCTACCGCACCC-3'
	下游:5'-CAGGGAGAAGGACTCAAATTC-3'

注:PKA 指依赖 cAMP 的蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)

六、大鼠髓核组织 A2AR、p38 MAPK、p-p38 MAPK 及 Caspase-3 蛋白检测

采用含有 1%蛋白酶抑制剂(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和磷酸酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)裂解各组大鼠 L₅₋₆ 椎间盘髓核组织及细胞。于冰上提取总蛋白,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 15 μl 样品(蛋白含量约 30 μg)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、p38 MAPK、p-p38 MAPK 及 Caspase-3,经甲盐缓冲液(tris-buffered saline with tween-20, TBST)洗涤后孵育相应二抗,采用电化学发光液(electrochemiluminescence, ECL)进行显影。

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,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、各组大鼠椎间盘番红 O-快绿染色比较

各组大鼠椎间盘番红 O-快绿染色结果详见图 1, 可见对照组大鼠椎间盘髓核组织排列规律, 纤维环形态结构完整, 与髓核边界清晰; 模型组髓核皱缩 (白色箭头示), 纤维组织及软骨细胞 (黄色箭头示) 增多。与模型组比较, PEMF 组髓核组织破裂有一定程度缓解, 纤维环-髓核边界可区分 (黑色箭头示), 髓核软骨组织较模型组减少; 观察组髓核形态基本趋于正常, 纤维环完整无破裂。

二、各组大鼠椎间盘 A2AR、cAMP 及 PKA 表达比较

通过免疫荧光染色发现, 模型组大鼠椎间盘组织

A2AR 阳性表达 (黄色箭头示) 及 mRNA 水平均高于对照组, PEMF 组 A2AR 阳性表达较模型组进一步升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 观察组 A2AR 阳性表达及 mRNA 水平升高幅度最显著, 与对照组、模型组及 PEMF 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 cAMP 水平显著低于对照组 ($P<0.05$), PEMF 组及观察组 cAMP 含量均较模型组有所回升, 并且观察组 cAMP 含量与模型组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。模型组大鼠椎间盘组织 PKA mRNA 含量略高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), PEMF 组和观察组 PKA mRNA 表达量均较模型组进一步增加, 并且观察组 PKA mRNA 含量与模型组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 具体情况见图 2、图 3。

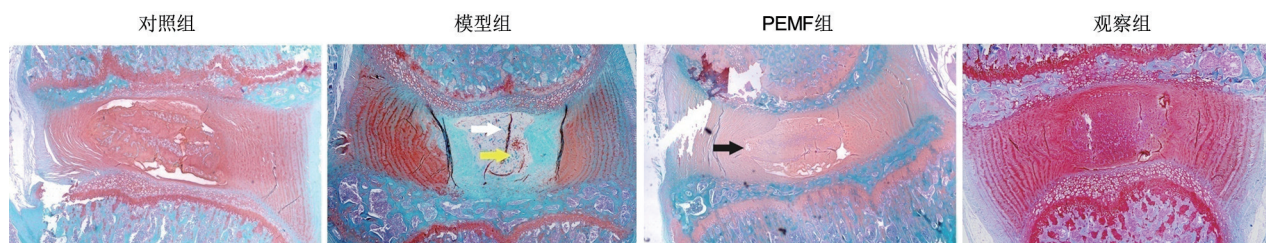
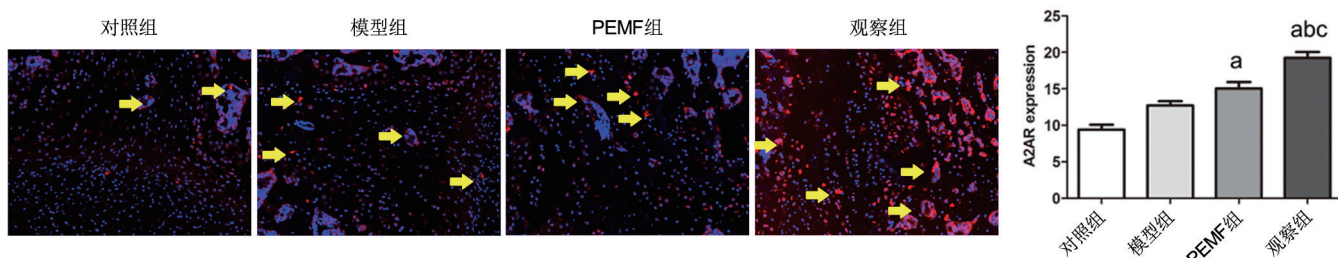
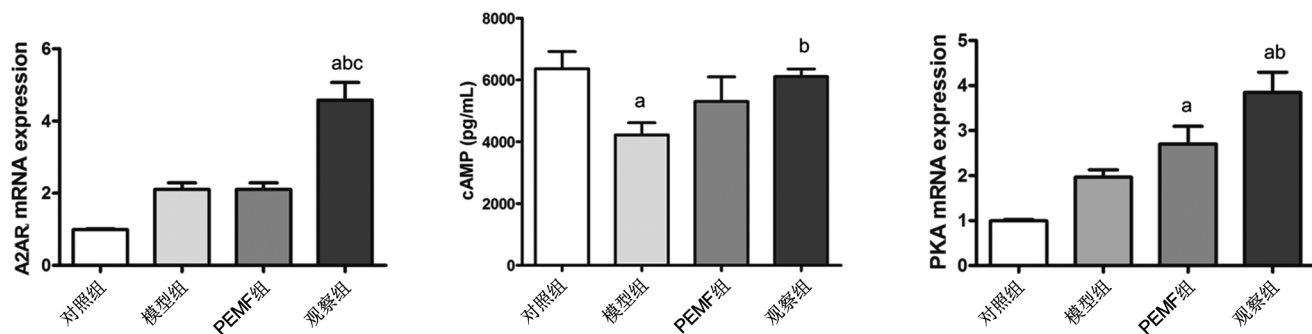


图 1 各组大鼠椎间盘组织病理观察比较 (番红 O-快绿染色, $\times 50$)



注: 黄色箭头示免疫荧光阳性表达; 与对照组比较, $^a P<0.05$; 与模型组比较, $^b P<0.05$; 与 PEMF 组比较, $^c P<0.05$

图 2 各组大鼠椎间盘组织 A2AR 表达比较 (免疫荧光染色, $\times 200$)



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

图 3 各组大鼠椎间盘组织 A2AR、PKA mRNA 及 cAMP 含量比较

三、各组大鼠椎间盘髓核 A2AR 表达及 p38 MAPK 磷酸化水平分析

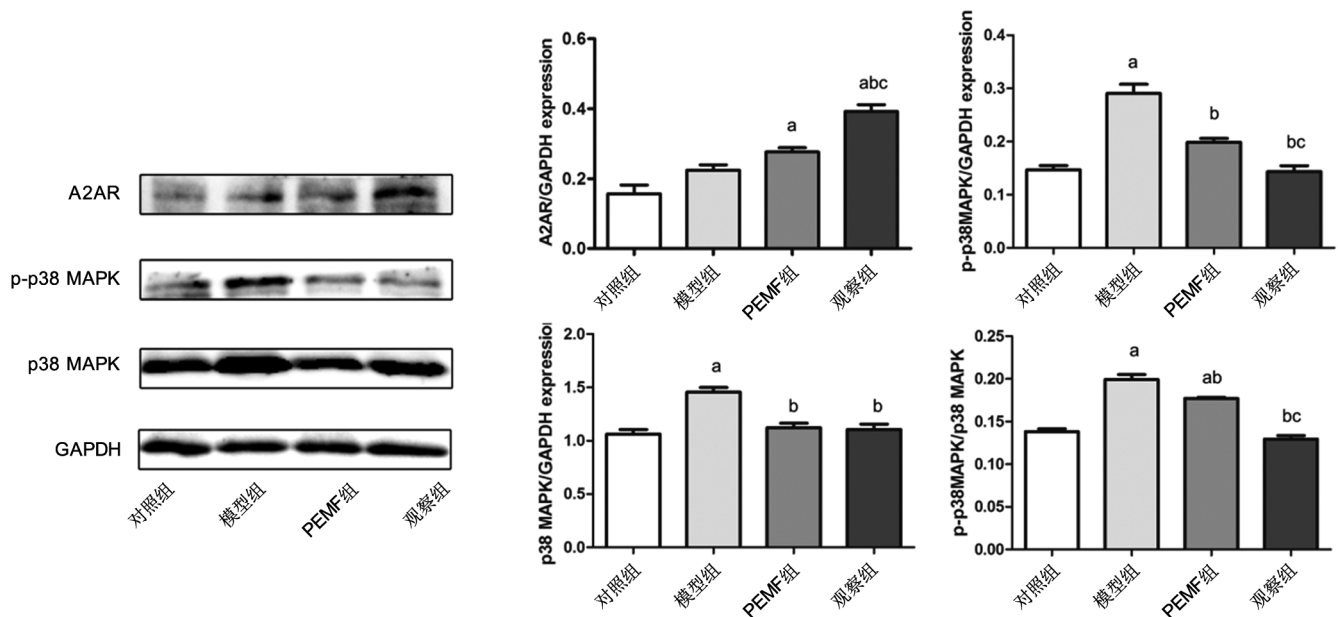
通过分析各组蛋白印迹结果发现,模型组大鼠椎间盘髓核组织 A2AR 蛋白表达略高于对照组 ($P>0.05$), p-p38 MAPK、p38 MAPK 蛋白含量及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值均显著高于对照组水平 ($P<0.05$), PEMF 组及观察组大鼠髓核组织 A2AR 蛋白表达均较模型组显著升高, p-p38 MAPK、p38 MAPK 蛋白含量及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值均较模型组降低,并且观察组上述蛋白表达水平与模型组间差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),同时 p-p38 MAPK 蛋白含量及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值亦显著低于 PEMF 组水平 ($P<0.05$),具体情况见图 4。

四、各组大鼠椎间盘 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 表达比较

通过对各组 Western blot 及 RT-PCR 结果分析后发现,模型组大鼠椎间盘 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 相对表达量均显著高于对照组水平 ($P<0.05$)。与模型组比较,PEMF 组、观察组 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 相对表达量均显著降低 ($P<0.05$),并且观察组 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 相对表达量亦显著低于 PEMF 组水平 ($P<0.05$),具体情况见图 5。

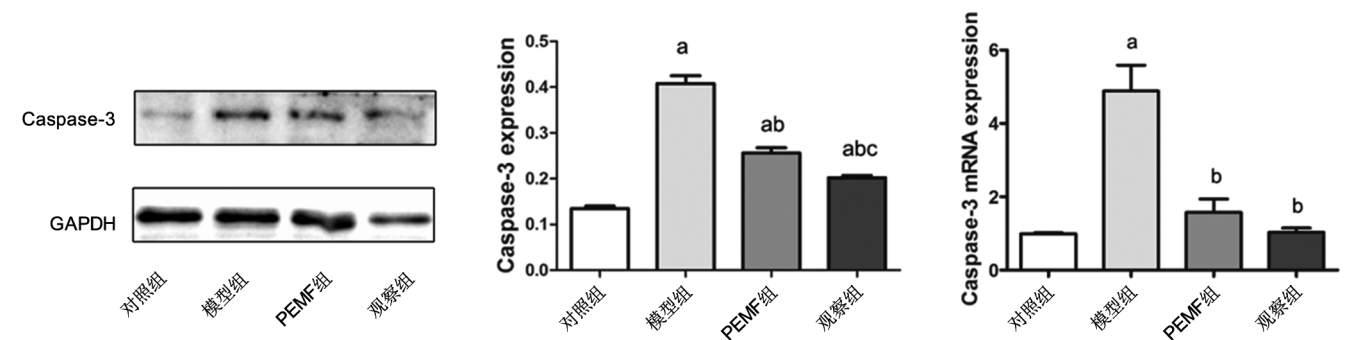
五、各组大鼠椎间盘髓核 MMP3 及 Col-II 表达比较

通过免疫荧光染色发现,模型组大鼠椎间盘髓核 MMP3 含量较对照组显著升高,Col-II 蛋白表达明显降低;PEMF 组、观察组 MMP3 含量均较模型组减少,Col-II 表达则逐渐回升,并且观察组上述指标含量与模型组间差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),具体情况见图 6。



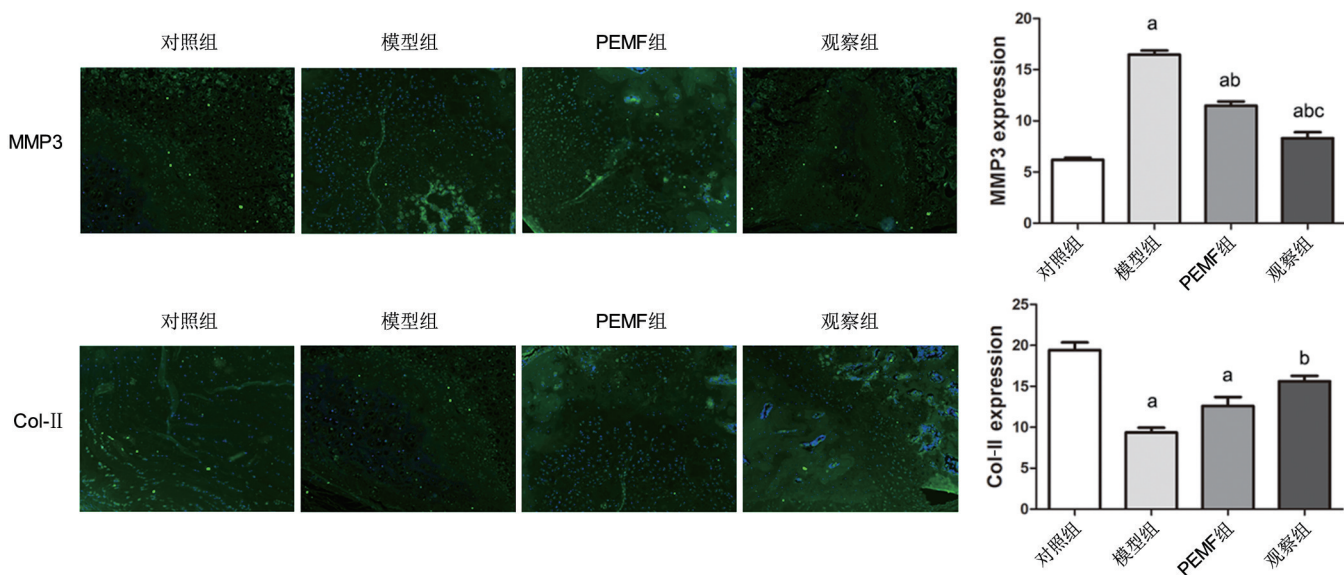
注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 PEMF 组比较,^c $P<0.05$

图 4 各组大鼠椎间盘髓核组织 A2AR、p-p38 MAPK 及 p38 MAPK 蛋白含量比较



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

图 5 各组大鼠椎间盘组织 Caspase-3 蛋白含量及 mRNA 表达比较



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

图6 各组大鼠椎间盘髓核组织 MMP3 及 Col-II 蛋白表达比较(免疫荧光染色,×200)

讨 论

有研究发现,炎症反应激活、细胞凋亡是导致髓核胶原蛋白减少、基质降解的重要原因^[2]。p38 MAPK 参与多种疾病的应激反应、细胞增殖、凋亡及坏死等过程,在机体组织损伤、退变过程中 p38 MAPK 表达增加能诱导炎症瀑布反应,造成线粒体去极化,进而启动 Caspase 级联反应促使细胞凋亡^[7],因此抑制 p38 MAPK 信号通路活化对减少髓核细胞凋亡、缓解椎间盘退变损伤、提高椎体功能具有重要意义。

本课题组前期研究发现,上调 A2AR 活性可减轻炎症因子浸润及髓核细胞凋亡^[9-10]。本研究显示模型组大鼠髓核组织 A2AR 在 IL-1 β 刺激下应激性上升,PKA 略有增加,但下游 cAMP 水平显著下降,表明 A2AR 应激性上调并不能逆转炎症因子浸润损伤,机体 A2AR/cAMP/PKA 信号通路未被激活。与此同时模型组大鼠 p38 MAPK、p-p38 MAPK 表达明显增加,p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值显著升高,表明 p38 MAPK 被磷酸化激活。有学者报道 p38 MAPK 活性上调后能通过线粒体途径促进细胞凋亡^[12]。本研究也获得类似结果,如模型组大鼠经制模处理后其促凋亡因子 Caspase-3 表达明显上调,进一步证实炎症级联反应激活了 p38 MAPK 信号通路进而诱导髓核细胞凋亡。椎间盘髓核组织富含 Col-II 及糖蛋白,在退变过程中由于炎症浸润、髓核细胞凋亡、坏死等原因会导致胶原蛋白含量急剧减少,细胞外基质大量降解^[12]。本研究模型组大鼠制模后其椎间盘组织 MMP3 含量较

对照组显著升高,Col-II 蛋白含量较对照组明显减少,也进一步证实 p38 MAPK 信号通路活化能加剧 IDD 损伤。

国外有文献报道,PEMF 干预对减轻骨关节炎及退行性疾病症状具有一定疗效,其作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路、减少促炎因子释放、减轻炎症损伤有关^[13]。Merighi 等^[8,14]发现:1.5 mT、75 Hz 的 PEMF 干预具有抗炎、抗凋亡作用,能减轻炎症损伤,抑制 IDD 大鼠椎间盘细胞凋亡^[14]。本研究结果显示 1.5 mT、75 Hz 的 PEMF 干预能增加 IDD 大鼠髓核组织 A2AR 表达,其下游 cAMP、PKA 含量也有所升高,而 p38 MAPK 表达及磷酸化水平均显著降低。由于 p38 MAPK 与 cAMP/PKA 通路具有广泛的相互作用^[12],通过抑制 p38 MAPK 信号通路,能减少肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 及 IL-1 β 等炎症因子表达,有助于抑制 Caspase-3 活性及细胞凋亡^[15]。上述结果提示能以 A2AR 为靶点、抑制 p38 MAPK 活化进而发挥治疗作用。本研究观察组大鼠给予 PEMF 及 A2AR 激动剂干预,发现其椎间盘组织 A2AR/cAMP/PKA 通路进一步活化,p38 MAPK 磷酸化明显受到抑制,Caspase-3 表达也显著降低。上述结果表明 PEMF 联合 A2AR 受体激动剂干预可能是通过激活 A2AR/cAMP/PKA 信号通路、抑制 p38 MAPK 表达及磷酸化,减少促凋亡因子释放,进而发挥抑凋亡作用^[16]。另外本研究还发现观察组大鼠经干预后,其椎间盘组织 MMP3 含量显著降低,提示大鼠髓核组织微环境获得改善,有助于胶原及细胞外基质降解减少、

Col-II 含量增加,从而抑制椎间盘退变,改善椎体功能。

综上所述,炎性因子刺激能活化 p38 MAPK 信号通路并诱导细胞凋亡,是加剧 IDD 病变的重要原因之一。PEMF 干预能上调 IDD 模型大鼠 A2AR 活性,抑制 p38 MAPK 活化;如联合 A2AR 激动剂能进一步激活 A2AR/cAMP/PKA 信号通路,进而抑制 p38 MAPK 磷酸化,下调 Caspase-3 水平并减少细胞凋亡,对缓解 IDD 损伤、抑制疾病进展具有重要意义。

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] 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.
- [3] 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.
- [4] Li F, Sun XF, Zheng B, et al. Arginase II promotes intervertebral disc degeneration through exacerbating senescence and apoptosis caused by oxidative stress and inflammation via the NF-kappa B pathway[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 737809. DOI: 10.3389/fcell.2021.737809.
- [5] Effendi WI, Nagano T, Kobayashi K, et al. Focusing on adenosine receptors as a potential targeted therapy in human diseases[J]. Cells, 2020, 9(3): 785. DOI: 10.3390/cells9030785.
- [6] Wu QY, Chen J, Yue JJ, et al. Electroacupuncture improves neuronal plasticity through the A2AR/cAMP/PKA signaling pathway in SNL rats[J]. Neurochem Int, 2021, 145: 104983. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.104983.
- [7] Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. J Neurosci, 2009, 29(47): 14741-14751. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3728-09.2009.
- [8] Merighi S, Gessi S, Bencivenni S, et al. Signaling pathways involved in anti-inflammatory effects of pulsed electromagnetic field in microglial cells[J]. Cytokine, 2020, 125: 154777. DOI: 10.1016/j.cyt.2019.154777.
- [9] 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.
- [10] 蔡磊, 方为志, 黎清波, 等. 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[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2022, 44(11): 966-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.11.002.
- [11] 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.
- [12] Wang H, Guan W, Yang W, et al. Caffeine inhibits the activation of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde via adenosine A2A receptor mediated by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92482. DOI: 10.1371/journal.pone.0092482.
- [13] Yu L, Liu Y, Wu JX, et al. Genipin cross-linked decellularized nucleus pulposus hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of ADSCs and retards intervertebral disc degeneration[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 807883. DOI: 10.3389/fbioe.2021.807883.
- [14] 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.
- [15] Wang XJ, Lv S, Sun JW, et al. Caffeine reduces oxidative stress to protect against hyperoxia-induced lung injury via the adenosine A2A receptor/cAMP/PKA/Src/ERK1/2/p38 MAPK pathway[J]. Redox Rep, 2022, 27(1): 270-278. DOI: 10.1080/13510002.2022.2143114.
- [16] 刘伟军, 姚智, 黎清波, 等. 髓核细胞通过腺苷受体 2a 调控环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 对凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(8): 1542-1544. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20211230-01386.

(修回日期: 2023-06-25)

(本文编辑: 易 浩)