

紫檀芪通过促进Nrf2核转移在调节 髓核细胞炎症反应中的作用

吴 畏 章海均* 顾志谦 罗 浩

(宁波大学医学院,宁波市第二医院骨二科,宁波 315010)

摘要 紫檀芪(pterostilbene, PTE)是一种有效的抗炎抗氧化应激的天然药物,但是其对椎间盘髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)的作用以及机制未知。该文培养SD大鼠原代NPCs,采用CCK-8分析PTE的细胞毒性,ELISA、Real-time PCR和Griess方法分析PTE对IL-1 β 诱导的髓核细胞炎症反应的影响,Western blot、免疫荧光、NF-E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)siRNA转染等方法分析Nrf2在PTE抗炎中的作用。结果显示,20 μ mol/L PTE作用24 h对NPCs活力没有影响,PTE可以明显抑制IL-1 β 诱导产生的炎症介质一氧化氮(nitric oxide, NO)和前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)的含量,并抑制环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)mRNA的水平($P < 0.05$)。Western blot结果显示,PTE促进细胞核中Nrf2的升高,却导致胞质中Nrf2的降低($P < 0.05$)。免疫荧光亦显示,Nrf2从细胞质转移到细胞核。转染Nrf2 siRNA后,Western blot证实细胞核中Nrf2的下调。Nrf2下调后的NPCs中,PTE作用下分泌的NO和PGE2的含量以及COX-2和iNOS mRNA的水平相对正常细胞明显升高($P < 0.05$)。该研究结果提示,PTE可能通过促进NPCs中的Nrf2发生核转移导致下游一系列抗氧化应激基因的转录,进而抑制IL-1 β 诱导的炎症反应。

关键词 髓核细胞;紫檀芪;NF-E2相关因子2;炎症反应

Pterostilbene Inhibits Inflammation in Rat Nucleus Pulposus by Promoting the Nuclear Translocation of Nrf2

Wu Wei, Zhang Haijun*, Gu Zhiqian, Luo Hao

(Department of Orthopedics, Ningbo NO.2 Hospital, Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315010, China)

Abstract Pterostilbene (PTE) is a natural drug with the ability of inhibiting inflammation and oxidative stress. However, the effect of PTE on the inflammation in nucleus pulposus cells (NPCs) and the related mechanism have not been reported. In this study, primary NPCs of SD rats were cultured, and the cell viability was analyzed by the CCK-8 analysis. ELISA, Real-time PCR and Griess test were used to detect the effect of PTE on the inflammation induced by IL-1 β . Western blot, immunofluorescence, siRNA for nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) were used to analyze the role of Nrf2 in the inhibitory role of PTE on the inflammation. The results showed that the treatment of 20 μ mol/L PTE for 24 h had no effect on cellular viability. PTE could inhibit the production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2) induced by IL-1 β , as well as the mRNA level of inducible nitric

收稿日期: 2016-06-16 接受日期: 2016-08-16

宁波市科技惠民项目(批准号: 2016C51003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-83870999, E-mail: nb_orthopaedics@163.com

Received: June 16, 2016

Accepted: August 16, 2016

This work was supported by the Ningbo Benefit Project for Science and Technology (Grant No.2016C51003)

*Corresponding author. Tel: +86-574-83870999, E-mail: nb_orthopaedics@163.com

网络出版时间: 2016-10-27 16:42:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161027.1642.004.html>

oxide synthase (*iNOS*) and cyclooxygenase-2 (*COX-2*) ($P<0.05$). The result of Western blot showed that PTE increased the level of nuclear Nrf2 protein but decreased the level of cytoplasmic Nrf2 protein ($P<0.05$). The study by immunofluorescence showed that cytoplasmic Nrf2 was transferred into the nuclei. After transfection of Nrf2 siRNA and validation by Western blot, the inhibitory effect of PTE on those inflammatory mediators was attenuated ($P<0.05$). These results indicated that PTE inhibits the inflammation induced by IL-1 β in NPCs through promoting the nuclear translocation of Nrf2.

Keywords nucleus pulposus cells; pterostilbene; Nrf2; inflammation

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是腰椎间盘突出(intervertebral disc, IVD)突出症、椎管狭窄、腰椎滑脱等各种脊柱退变性疾病共同病理生理基础,更是腰痛的主要病因^[1-2]。椎间盘细胞包括髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)、纤维环细胞和终板软骨细胞,其中NPCs是椎间盘髓核组织的唯一构成细胞,影响着椎间盘退变的发生和发展。近来,越来越多的研究证实,IDD与IVD的炎症具有密切关系^[3]。在退变的椎间盘中发现高水平的各种炎症介质,比如白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)等^[3-4]。髓核组织炎症介质的增多会导致各种金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的升高,从而导致髓核组织中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解,影响椎间盘的退变。因此,缓解髓核细胞的炎症反应具有重要的意义,但是目前尚无有效的可以缓解髓核组织炎症反应的药物。

紫檀芪(pterostilbene, PTE)作为蓝莓的天然组成成分,是一种与白藜芦醇(resveratrol, RSV)类似的植物抗毒素,具有很高的生物活性^[5]。已有研究报道,PTE具有抗炎、抗氧化应激和抗凋亡的作用,如在内皮细胞上,PTE可以抑制IL-1 β 、TNF- α 和MMPs的产生以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成^[6]。同时,PTE在抗癌和抗高脂血症中的作用也有报道^[7]。但是到目前为止仍未见其在椎间盘NPCs中的作用,因此,本研究假设PTE可以缓解NPCs的炎症反应。IL-1 β 是常用促进椎间盘NPCs炎症反应的炎症介质^[8],在本研究中作为促进NPCs炎症反应的细胞因子。

NF-E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是一类亮氨酸拉链转录因子,其主要是通过调节II相解毒酶和蛋白质水平而在细胞应对炎症、氧化应激等微环境中发挥重要的

作用^[9]。细胞受到炎症等刺激时,胞质中的Nrf2发生核转移,促进抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)相关的基因转录,主要包括血红素氧化酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶[NAD(P)H]和过氧化氢酶(catalase, CAT)等^[10]。PTE在肝脏、大脑和心脏中的保护作用已有报道,而在IVD中的作用尚未见报道。Nrf2被报道参与PTE的抗凋亡和氧化作用,但是在抗NPCs炎症反应中两者的相互关系尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 试剂与抗体

PTE、II型胶原酶购自Sigma公司; Nrf2、 β -actin、Lamin B的一抗以及PGE2的ELISA一抗均购自Abcam公司; 免疫荧光试剂(除一抗以外)、Western blot试剂(除一抗以外)、DAPI相关试剂、胞质和核蛋白的提取试剂、NO测试试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司; 细胞培养的试剂包括DMEM(Dulbecco modified Eagle medium)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶均购自Gibco公司; CCK-8(Cell Counting Kit-8)购自Dojindo公司; Real-time PCR试剂包括TRIZol和SYBR Premix Ex Taq购自TaKaRa公司; cDNA合成的试剂购自MBI Fermentas公司。

1.2 原代髓核细胞培养

首先,选取30只来自上海斯莱克动物实验有限公司的SD大鼠,雄性,3月龄,250~300 g,予以3.5 mL/kg体重的10%水合氯醛行过剂量麻醉安乐死。本研究中的动物研究方案获得了宁波市第二医院动物伦理委员会批准。在无菌条件下解剖背部,将L1-L6的整段腰椎完整取出转移到超净工作台, PBS冲洗后去除多余的肌肉组织等。在显微镜下取出每个节段的胶冻状的髓核组织, 0.1% II型胶原酶在37 °C消化4 h, 通过200目的滤器将杂质滤过。使用含10%胎牛血清和

1%青链霉素的DMEM培养基,于37 °C、含5% CO₂的培养箱中培养,后续研究中所有的细胞均为2代细胞。

1.3 研究设计

分析PTE对NPCs炎症介质抑制作用时,细胞分组为Control、IL-1 β 、PTE和IL-1 β +PTE组;当分析Nrf2在PTE抑制炎症介质中的作用时,细胞分组为IL-1、IL-1 β +PTE、IL-1 β +PTE+Control siRNA和IL-1 β +PTE+Nrf2 siRNA组。PTE在IL-1 β 前2 h加入到培养基中。

1.4 CCK-8分析

96孔板每孔铺5 000个细胞,培养过夜后,分别予以1、5、10、20、40、60、80 μ mol/L的PTE作用24 h,20 μ mol/L的PTE分别作用2、4、6、12、24、36、48、72 h。到达作用时间后,96孔板中每孔换成100 μ L的DMEM培养基,再在每个孔中加入10 μ L反应剂,于37 °C培养箱中孵育1 h,再在酶标仪上使用450 nm读取D值,所得值为相对于对照组的数值。

1.5 免疫荧光

10、20 μ mol/L PTE作用NPCs 24 h后,使用4%多聚甲醛在4 °C冰箱中固定NPCs 10 min, PBS洗3遍。使用0.2% Triton X-100孵育细胞30 min以通透细胞膜,再使用5% BSA(albumin from bovine serum)孵育30 min,封闭非特异性抗原。接下来使用Nrf2(1:100稀释)一抗在4 °C冰箱中孵育NPCs过夜, PBS洗3遍后使用FITC标记的二抗孵育2 h。最后使用DAPI染核, PBS清洗后在荧光显微镜下进行观察。

1.6 Western blot

根据上海碧云天生物技术公司推荐的方法提取细胞核和细胞质中的蛋白质,蛋白质浓度通过BCA方法进行测定。细胞核蛋白和细胞质蛋白加到SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)中进行电泳分离,然后通过湿转法将蛋白质转移到PVDF(polyvinylidene difluoride)

膜上(Bio-Rad公司)。5%脱脂牛奶封闭2 h后,使用Nrf2一抗(1:1 000稀释)在4 °C冰箱中孵育过夜, TBST清洗3遍后,使用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育2 h后,再使用ECL发光液(Thermo公司)在成像系统(PerkinElmer, USA)上进行曝光。蛋白质条带的半定量分析使用AlphaEaseFC 4.0软件进行分析。

1.7 Real-time PCR

如研究设计中所描述的进行干预后,6孔板中的NPCs的总RNA通过TRIzol的方法进行提取, RNA进行浓度和纯度测定后,使用1 μ g的总RNA进行逆转录来合成cDNA。上机前需要提前制备反应的体系,本研究使用20 μ L的反应混合物,分别是2 μ L的2倍稀释的cDNA、10 μ L的SYBR Premix Ex Taq混合液、0.4 μ L正/反向引物(0.2 μ mol/L),余下的体积使用去酶的无菌水进行补足。其中,COX-2、iNOS和GAPDH的引物如表1所示。上述20 μ L的反应体系加入到8联管中,再放到LightCycler实时定量PCR系统(Roche, Mannheim, Germany)进行反应,反应程序为:95 °C预变性10 min;95 °C变性15 s,56 °C退火1 min,72 °C延伸1 min,共40个循环。反应结束后导出Ct值,并根据内参基因GAPDH进行标准化, mRNA的半定量使用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}的方法进行计算。

1.8 NO水平定量

培养基上清液中的NO的表达水平使用经典的Griess方法。根据研究设计中描述的方法进行处理后,按照碧云天公司推荐的方法收集上清液后加入到96孔板中, Griess试剂I和II分别加入到96孔板的上清液中,于37 °C中孵育3 min。在酶标仪上使用540 nm的波长测量吸光度。NO的含量通过标准曲线进行计算而得。

1.9 酶联免疫吸附测定(ELISA)分析

按照研究设计的方法处理24 h后,收集细胞的上清液。根据Abcam公司的ELISA方法进行PGE2浓度

表1 COX-2、iNOS和GAPDH引物的序列

表1 Primer sequences for COX-2, iNOS and GAPDH

基因	序列(5'→3')	Pubmed序号
Gene	Sequences (5'→3')	Accession No.
COX-2	Forward	GGT GAA AAC TGT ACT ACG CCG A
	Reverse	ACT CCC TTG AAG TGG GTC AG
iNOS	Forward	GAA ACT TCT CAG CCA CCT TGG
	Reverse	CCG TGG GGC TTG TAG TTG AC
GAPDH	Forward	TGA TTC TAC CCA CGG CAA GT
	Reverse	AGC ATC ACC CCA TTT GAT GT

表2 Nrf2 siRNA的序列

表2 The sequences of small interfering RNAs (siRNA) for Nrf2

引物 Primer	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
Nrf2	Sense	GGC AUU UCA CUG AAC ACA AdTdT
	Antisense	UUG UGU UCA GUG AAA UGC CdGdG
Negative control	Sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT
	Antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT

的测试。PGE2 ELISA试剂的敏感性为 2.8×10^{-9} mol/L。

1.10 Nrf2 siRNA的转染

Nrf2 siRNA的设计参考文献[11], 具体序列见表2, 由上海吉玛制药技术有限公司合成。髓核细胞消化后计数, 在6孔板中每孔加入 2×10^5 细胞, 培养过夜。转染使用Invitrogen公司的Lipofectamine 2000进行转染, 具体转染方法根据Invitrogen公司的操作手册。转染后48 h, 根据研究设计中处理方法进行干预。非特异性的非靶向的siRNA作为对照RNA。转染后, Western blot检测分析转染的效果。

1.11 统计学分析

不同组之间的差异使用方差分析ANOVA进行统计, 使用SPSS 15软件包(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)。如果方差分析有差异, 使用Bonferroni方法进行两两之间的分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

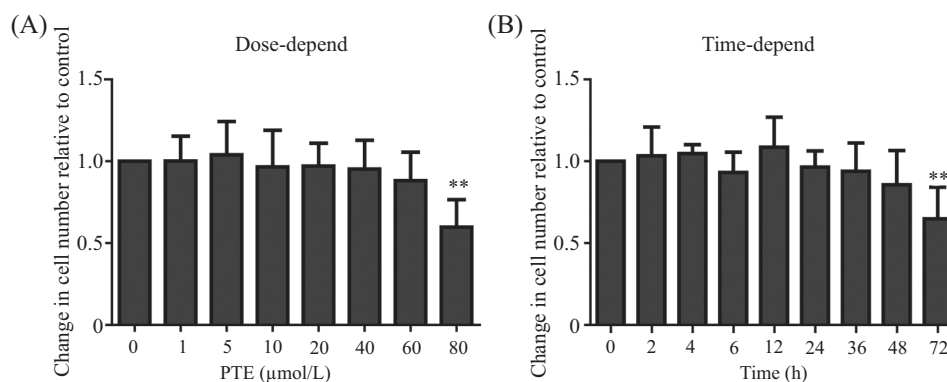
2.1 PTE对原代髓核细胞细胞活力的影响

首先通过CCK-8法分析PTE对NPCs活力的影响。1~80 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的PTE作用24 h后, CCK-8分析

发现, 仅80 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理后的NPCs活力相对于对照组明显下降($P < 0.05$, 图1A), 而1~60 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理后的NPCs活力并没有发生明显的改变。20 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理0~72 h后, 只有处理72 h后的NPCs的细胞活力发生明显的下降($P < 0.05$, 图1B), 这提示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 作用0~48 h对细胞的活力没有影响。因此, 20 $\mu\text{mol/L}$ 作用24 h为后续研究的作用剂量和作用时间。

2.2 紫檀芪抑制髓核细胞中IL-1 β 诱导的炎症介质的水平

NO、PGE2、COX-2和iNOS是常见的炎症介质, 本研究使用这些炎症介质观察PTE对NPCs炎症反应的作用。IL-1 β 可以明显促进NPCs产生大量的NO和PGE2($P < 0.05$, 图2A和图2B)。由于iNOS是产生NO的关键酶, 因此, IL-1 β 可以明显促进iNOS mRNA产生($P < 0.05$, 图2C), 而NPCs中COX-2 mRNA的水平也由于IL-1 β 的作用而明显增加($P < 0.05$, 图2D)。但是, 20 $\mu\text{mol/L}$ PTE的单独作用对NPCs的炎症介质的水平没有明显的影响, 而当IL-1 β 和PTE共同作用时, PTE可以明显抑制IL-1 β 升高的炎症介质的水平($P < 0.05$, 图2A~图2D)。

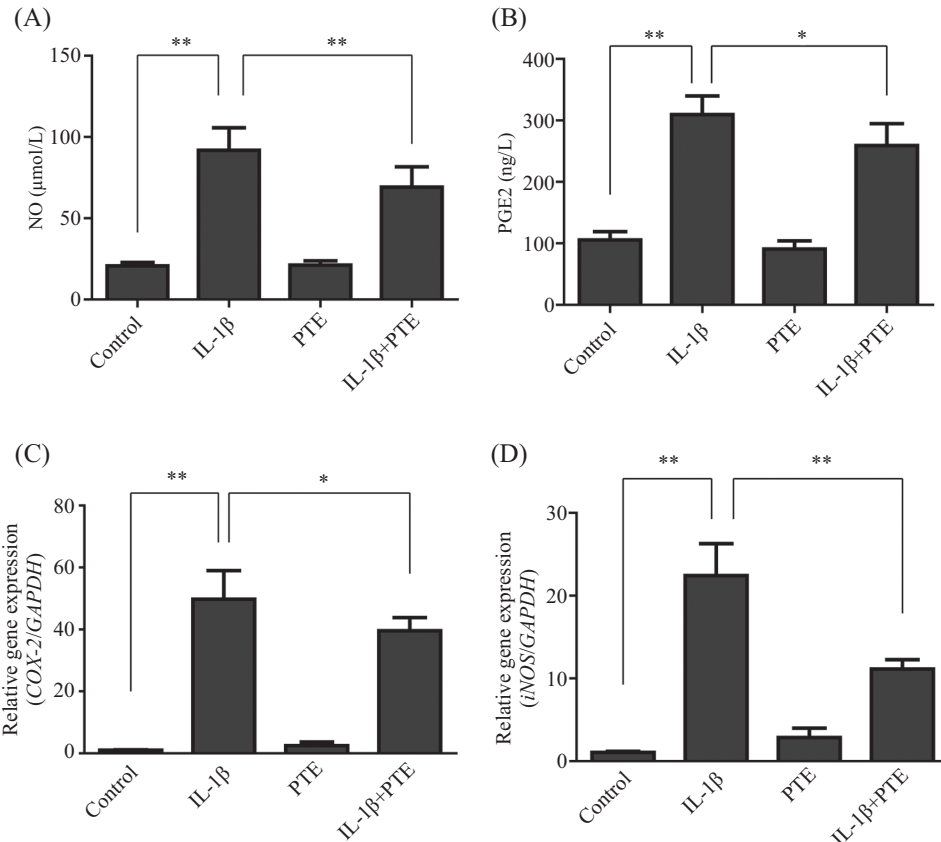


A: 不同剂量的PTE作用24 h后NPCs活力; ** $P < 0.01$, 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ PTE)比较。B: 20 $\mu\text{mol/L}$ PTE作用不同时间后NPCs活力; ** $P < 0.01$, 与对照组(0 h)比较。

A: the viability of NPCs treated with PTE for 24 h; ** $P < 0.01$ compared with control group (0 $\mu\text{mol/L}$ PTE). B: the viability of NPC treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ PTE for different time; ** $P < 0.01$ compared with control group (0 h).

图1 PTE对NPCs活力的影响

Fig.1 Effect of PTE on the viability of nucleus pulposus cells



A: NPCs上清中NO含量; B: NPCs上清中PGE2含量; C: NPCs中COX-2 mRNA水平; D: NPCs中iNOS mRNA水平, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: NO level in the supernatant; B: PGE2 level in the supernatant; C: COX-2 mRNA level in NPCs; D: iNOS mRNA level in NPCs, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 PTE对IL-1 β 作用下NPCs中炎症介质的影响

Fig.2 Effect of PTE on the inflammatory mediators in nucleus pulposus cells treated by the IL-1 β

2.3 紫檀芪促进髓核细胞中Nrf2的核转移

为了探讨PTE抑制NPCs炎症的机制,本研究进一步分析Nrf2的核转移情况。Western blot结果发现,10~40 $\mu\text{mol/L}$ 的PTE作用24 h后,随着PTE浓度的增加,细胞核中Nrf2的含量逐渐升高,而细胞质中Nrf2的含量逐渐下降,尤其是20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的PTE作用下的NPCs($P < 0.05$,图3A~图3D),说明PTE可以促进细胞质中的Nrf2发生核转移。细胞免疫荧光发现,正常组中的Nrf2主要分布在细胞质中,细胞核中的含量较少,而10 $\mu\text{mol/L}$ 的PTE作用24 h后,细胞核中的Nrf2含量逐渐升高,而胞质中的Nrf2含量逐渐下降;20 $\mu\text{mol/L}$ 的PTE作用24 h后,Nrf2主要分布在细胞核中,而细胞质中明显减少,这也进一步说明,PTE促进了NPCs中Nrf2的核转移。

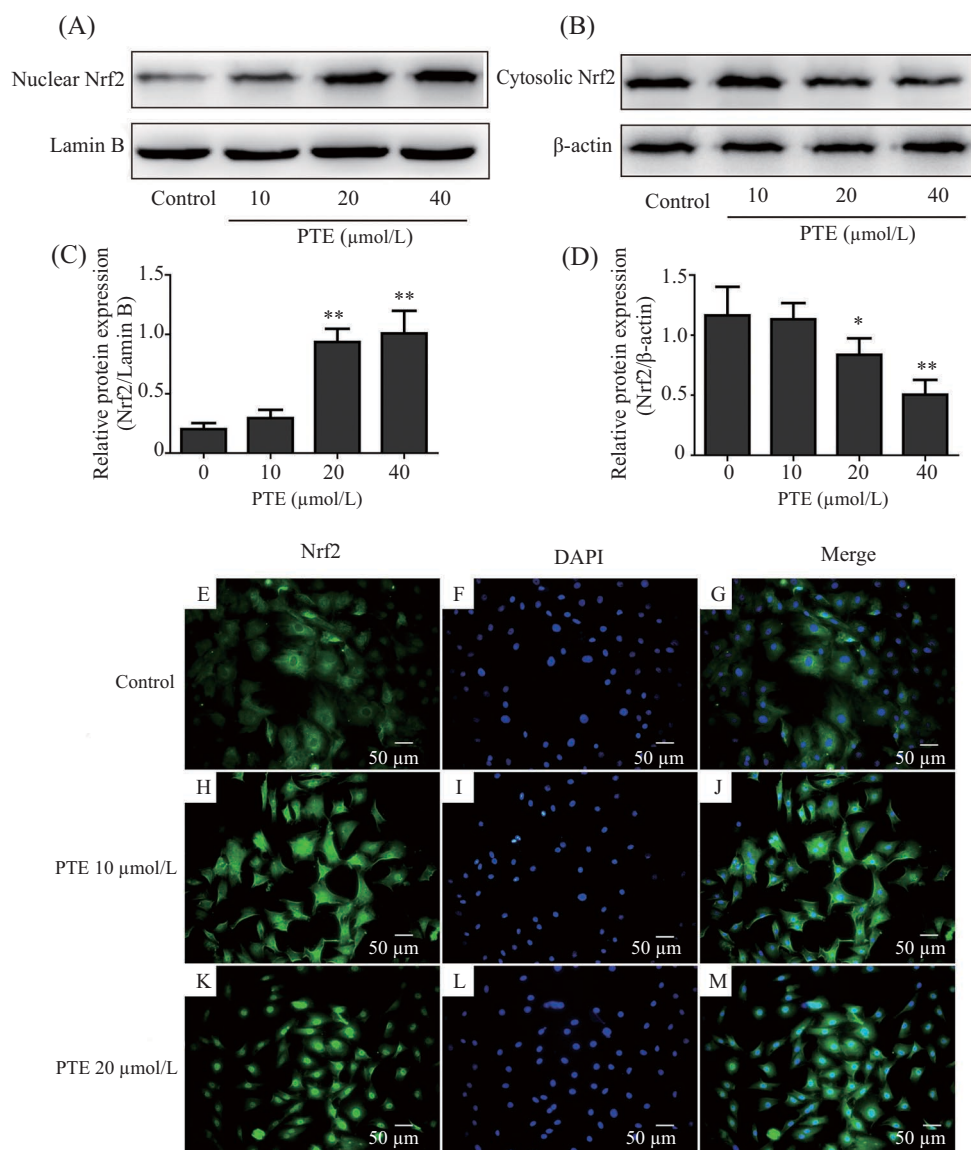
2.4 下调Nrf2抑制紫檀芪对髓核细胞氧化应激的保护作用

通过RNAi的方法来下调细胞核中的Nrf2水平,从而进一步研究Nrf2在其中的作用。将Nrf2 siRNA

转染NPCs 48 h后,使用20 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理24 h,Western blot结果发现,相对于转染Control siRNA的细胞,NPCs细胞核中的Nrf2水平明显下降,而未作用PTE的NPCs核中的Nrf2水平也明显下降($P < 0.05$,图4A和图4B)。细胞核中的Nrf2水平下调后,PTE和IL-1 β 作用下的NPCs中的NO、PGE2、COX-2和iNOS相对于PTE和IL-1 β 作用下的正常细胞中的NO、PGE2、COX-2和iNOS水平明显升高($P < 0.05$,图4C~图4F),这说明Nrf2的下调可以逆转PTE对炎症介质的抑制作用。

3 讨论

下腰痛是骨骼肌肉疾患中最常见的疾病之一,而IDD是下腰痛中最主要的致病因素,因此,缓解IDD具有重要的临床意义。虽然目前大量的研究着眼于如何缓解IDD,但是IDD的机制仍然不明确,缺乏可靠有效的药物。近来,髓核细胞炎症反应及其导致的ECM的降解被认为是导致IDD重要的原因。



A: NPCs核Nrf2水平; B: 胞质Nrf2水平; C: 细胞核Nrf2条带的半定量分析; D: 胞质Nrf2条带的半定量分析; E~M: 免疫荧光分析NPCs中Nrf2的水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组(0 μmol/L)比较。

A: nuclear Nrf2 level in NPCs; B: cytoplasmic Nrf2 level in NPCs; C: semi-quantity analysis of the Nrf2 level in nuclear; D: semi-quantity analysis of the Nrf2 level in cytoplasmic; E-M: immunofluorescence analysis for the content of Nrf2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group (0 μmol/L).

图3 PTE对IL-1β作用下NPCs中Nrf2核转移的作用

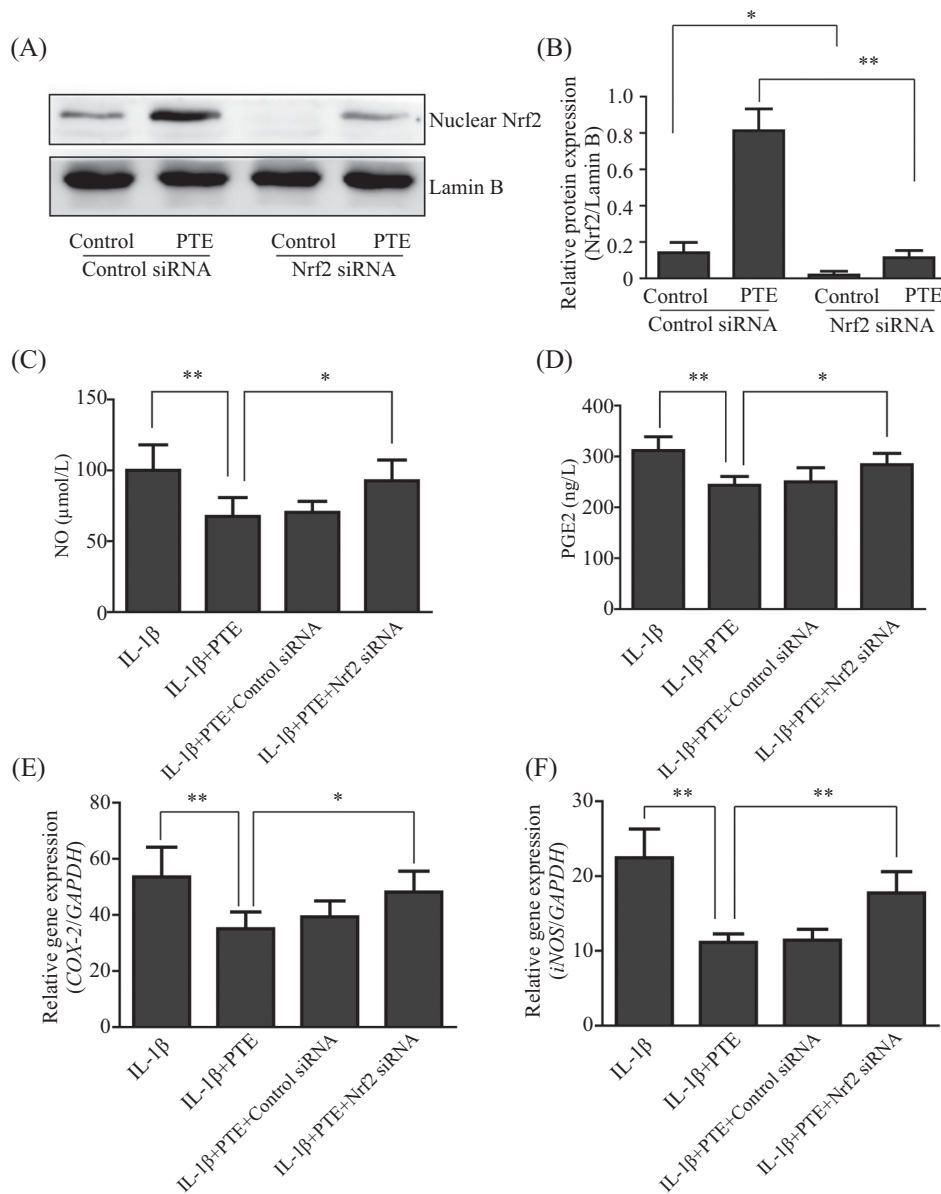
Fig.3 Stimulatory role of PTE on the nuclear translocation of Nrf2 in nucleus pulposus cells

本研究使用天然的抗炎抗分解代谢的PTE来抑制NPCs产生炎症介质、防止MMPs的产生从而抑制ECM的降解, 由此, PTE可能成为潜在的防治IDD的新药物。

由于目前有关PTE在原代NPCs中的研究尚未见报道, 因此, 本研究首先观察其对NPCs细胞活力的影响。研究发现, 20 μmol/L作用24 h对于NPCs的细胞活力没有影响。相似地, Nikhil等^[12]发现, 1~100 μmol/L PTE作用24 h对小鼠巨噬细胞没有毒性, 但是当作用时间延长至72 h时, 30 μmol/L的PTE

即可以抑制巨噬细胞的活力。

IL-1β是经典的促进髓核细胞炎症和分解反应的细胞因子, 本研究亦证实发现, 其可以提高COX-2、NO、PGE2和iNOS的水平。其中, COX-2和PGE2是炎症诱导的盘源性疼痛的重要介质^[3]。PTE可以抑制IL-1β诱导的炎症介质的水平, 这说明PTE可能成为一种缓解盘源性痛的候选药物。但是, 椎间盘中其他的因素和介质也会导致NPCs的炎症反应, 比如P物质、趋化因子、各种晶体的沉积物、过度的机械应力和细胞外基质的降解产物包括纤维连接



A: NPCs核Nrf2水平; B: 细胞核Nrf2条带的半定量分析; C: NPCs上清中NO含量; D: NPCs上清中PGE2含量; E: NPCs中COX-2 mRNA水平; F: NPCs中*iNOS* mRNA水平。* P <0.05, ** P <0.01。

A: nuclear Nrf2 level in NPCs; B: semi-quantity analysis of the nuclear Nrf2 level; C: NO level in the supernatant; D: PGE2 level in the supernatant; E: COX-2 mRNA level in NPCs; F: *iNOS* mRNA level in NPCs. * P <0.05, ** P <0.01.

图4 下调Nrf2抑制紫檀芪对NPCs氧化应激的保护作用

Fig.4 Downregulation of Nrf2 inhibited the protective role of PTE on oxidative stress in nucleus pulposus cells

蛋白(fibronectin)和透明质酸(hyaluronan)等^[3]。这些致炎因子会引起各种分子信号通路的激活, NPCs中的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、核转录因子kappaB(nuclear factor kappa B, NF- κ B)和增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)信号通路, 介导了NPCs中趋化因子CCL3[chemokine (C-C motif) ligand 3]的水平, CCL3通过与相应的受体相结合, 引起巨噬细胞浸润和炎症反应介质的水平, 导致髓核组织的炎症^[13]。

虽然涉及PTE保护作用的机制包括较多的信号通路, 包括去乙酰化酶Sirtuin 1(Sirt1)、ERK(extracellular signal-regulated kinase)和NF- κ B等^[14], 但是Nrf2参与的信号通路仍然是目前较有应用前景的治疗靶点。作为一种自我保护机制, Nrf2的水平与多种炎症和氧化应激的疾病相关。在正常神经元细胞的胞质中含有大量的Nrf2, 但是在阿尔茨海默病患者大脑病灶的神经元细胞中Nrf2的水平却明显下降^[15]; 在炎症和氧化应激的小鼠的肝脏中, 细胞核中的Nrf2

也明显下降^[16]; 在高血压的肠系膜动脉上, Nrf2的核转移明显减少, 伴随着氧化应激的增加^[17]。

在正常的生理状态下, Nrf2主要分布在细胞质中, 并与Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)结合, 因此, 将Nrf2与Keap1相分离是激活Nrf2导致Nrf2核转移的第一个关键步骤^[18]。Ramkumaret等^[18]使用荧光素酶报告基因发现, PTE可以打乱Keap1与Nrf2之间的相互联系, 导致Nrf2发生核转移。本研究进一步证实, PTE可以引起髓核细胞中Nrf2的核转移。Nrf2发生核转移后与ARE结合形成二聚体, 并与转录c-Jun和小Maf蛋白质(G/F/K)结合, 促进抗氧化基因的转录, 来对抗氧化反应的产物如氧自由基等, 进而防止炎症反应的发生^[10]。本研究中, Nrf2的激活可能也是通过抗氧化应激从而进一步防止炎症反应的发生。

综上所述, 一定量的PTE对NPCs的活力没有影响, 并且PTE可以明显抑制IL-1 β 诱导的NO、PGE2的合成, 减少COX-2和*iNOS* mRNA的含量。PTE促进Nrf2的核转移介导了PTE对上述炎症介质的抑制作用。因此, PTE对于NPCs的炎症反应具有一定的保护作用, 有可能成为将来防治IDD的新型药物。

参考文献 (References)

- 1 Luoma K, Riihimäki H, Luukkonen R, Raininko R, Viikari-Juntura E, Lamminen A. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine* 2000; 25(4): 487-92.
- 2 Rihn JA, Kurd M, Hilibrand AS, Lurie J, Zhao W, Albert T, *et al.* The influence of obesity on the outcome of treatment of lumbar disc herniation: Analysis of the spine patient outcomes research trial (SPORT). *J Bone Joint Surg Am* 2013; 95(1): 1-8.
- 3 Molinos M, Almeida CR, Caldeira J, Cunha C, Goncalves RM, Barbosa MA. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. *J R Soc Interface* 2015; 12(104): 20141191.
- 4 Miyamoto H, Saura R, Harada T, Doita M, Mizuno K. The role of cyclooxygenase-2 and inflammatory cytokines in pain induction of herniated lumbar intervertebral disc. *Kobe J Med Sci* 2000; 46(1/2): 13-28.
- 5 Estrela JM, Ortega A, Mena S, Rodriguez ML, Asensi M. Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2013; 50(3): 65-78.
- 6 Li J, Ruzhi D, Hua X, Zhang L, Lu F, Coursey TG, *et al.* Blue-

- 7 berry component pterostilbene protects corneal epithelial cells from inflammation via anti-oxidative pathway. *Sci Rep* 2016; 6: 19408.
- 8 Bhakkiyalakshmi E, Sireesh D, Sakthivadivel M, Sivasubramanian S, Gunasekaran P, Ramkumar KM. Anti-hyperlipidemic and anti-peroxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes. *Euro J Pharmacol* 2016; 777: 9-16.
- 9 Millward-Sadler SJ, Costello PW, Freemont AJ, Hoyland JA. Regulation of catabolic gene expression in normal and degenerate human intervertebral disc cells: Implications for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(3): R65.
- 10 Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 2006; 38(4): 769-89.
- 11 Muller T, Hengstermann A. Nrf2: Friend and foe in preventing cigarette smoking-dependent lung disease. *Chem Res Toxicol* 2012; 25(9): 1805-24.
- 12 Cortese MM, Suschek CV, Wetzel W, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(12): 2002-12.
- 13 Nikhil K, Sharan S, Roy P. A pterostilbene derivative suppresses osteoclastogenesis by regulating RANKL-mediated NF κ B and MAPK signaling in RAW264.7 cells. *Pharmacol Rep* 2015; 67(6): 1264-72.
- 14 Wang J, Tian Y, Phillips KL, Chiverton N, Haddock G, Bunning RA, *et al.* Tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-dependent induction of CCL3 expression by nucleus pulposus cells promotes macrophage migration through CCR1. *Arthritis Rheum* 2013; 65(3): 832-42.
- 15 McCormack D, McFadden D. A review of pterostilbene antioxidant activity and disease modification. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 575482.
- 16 Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, *et al.* Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(1): 75-85.
- 17 Tomobe K, Shinozuka T, Kuroiwa M, Nomura Y. Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3beta in a mouse model of accelerated aging (SAMP8). *Arch Gerontol Geriatr* 2012; 54(2): e1-7.
- 18 Lopes RA, Neves KB, Tostes RC, Montezano AC, Touyz RM. Downregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor and associated antioxidant genes contributes to redox-sensitive vascular dysfunction in hypertension. *Hypertension* 2015; 66(6): 1240-50.
- 19 Ramkumar KM, Sekar TV, Foygel K, Elango B, Paulmurugan R. Reporter protein complementation imaging assay to screen and study Nrf2 activators in cells and living animals. *Anal Chem* 2013; 85(15): 7542-9.