

Pravastatin激活自噬抑制糖皮质激素引起的髓核细胞凋亡

王小英¹ 焦丽艳¹ 付治安¹ 王彦华^{2*}

(¹河北工程大学附属医院, 邯郸 056002; ²河北工程大学医学院 生理教研室, 邯郸 056002)

摘要 地塞米松注射可以缓解椎间盘退变引起的腰痛症状, 但是具有一定的副作用。普伐他汀(Pravastatin)被发现可以缓解骨关节炎的炎症和症状, 但是其对髓核细胞及椎间盘退变的作用及其机制尚不清楚。该文培养SD大鼠原代髓核细胞, 用不同浓度地塞米松(dexamethasone, DXM)作用髓核细胞48 h后, DCFH-DA和MitoSOX Red染色分析细胞总活性氧(reactive oxygen species, ROS)和线粒体ROS水平, Annexin V/PI流式和DAPI染色分析细胞凋亡水平, N-acetyl-L-cysteine(NAC)抑制ROS水平。Western blot检测LC3-II、Beclin-1和P62等自噬相关蛋白质水平, ATG5 siRNA转染抑制自噬。结果显示, 随着DXM处理浓度的增加, 髓核细胞内总ROS和线粒体ROS水平及凋亡率升高($P < 0.05$)。Pravastatin增加DXM处理下髓核细胞中LC3-II和Beclin-1蛋白质水平, 降低P62蛋白质水平($P < 0.05$)。Pravastatin可以抑制DXM诱导的髓核细胞中的ROS产生和细胞凋亡, 而ATG5 siRNA抑制自噬后, 显著逆转Pravastatin对细胞的保护作用($P < 0.05$)。该研究结果提示, Pravastatin可能通过激活髓核细胞自噬抑制DXM诱导的ROS产生从而减少细胞凋亡。

关键词 髓核细胞; 普伐他汀; 地塞米松; 氧化应激

Pravastatin Inhibits Apoptosis of Primary Rat Nucleus Pulposus Cells by Reducing ROS Production via Activating Autophagy

Wang Xiaoying¹, Jiao Liyan¹, Fu Zhian¹, Wang Yanhua^{2*}

(¹Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056002, China;

²Department of Physiology, School of Medicine, Hebei University of Engineering, Han Dan 056002, China)

Abstract Dexamethasone (DXM) injection can partially relieve the symptoms of low back pain caused by intervertebral disc degeneration (IDD), but the DXM has some side effects. Pravastatin has been found to relieve inflammation and symptoms of osteoarthritis, however, its role in nucleus pulposus (NP) and IDD remains unclear. In this study, primary nucleus pulposus cells of SD rats were collected and cultured. NP cells were treated with different concentrations of dexamethasone DXM for 48 h, and then DCFH-DA and MitoSOX Red staining were used to analyze the production of total reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial ROS. Annexin V/PI and DAPI staining were used to detect the apoptotic levels. N-acetyl-L-cysteine (NAC) was used to inhibit ROS production. The expression of autophagy-related proteins including LC3-II, Beclin-1, and

接受日期: 2018-09-03 收稿日期: 2018-11-03

邯郸市科技局计划内项目(批准号: 1723208067-2)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0310-8579628, E-mail: TSWangXiaoYing2008@163.com

Received: September 3, 2018 Accepted: November 3, 2018

This work was supported by the Handan Municipal Science and Technology Bureau (Grant No.1723208067-2)

*Corresponding author. Tel: +86-310-8579628, E-mail: TSWangXiaoYing2008@163.com

网络出版时间: 2018-12-28 17:08:58

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181228.1708.016.html>

P62 was analyzed by Western blot, and ATG5 siRNA transfection was used to inhibit autophagy. The results showed that the total and mitochondrial ROS level, as well as apoptosis percentage, were increased by DXM in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Pravastatin enhanced LC3-II and Beclin-1 expression in nucleus pulposus cells treated with DXM, but inhibited P62 protein expression ($P < 0.05$). Pravastatin inhibited ROS production and apoptosis in nucleus pulposus cells treated by DXM, but ATG5 siRNA transfection inhibited autophagy and significantly reversed the protective effect of Pravastatin on ROS and apoptosis ($P < 0.05$). The results of this study suggest that Pravastatin may inhibit DXM-induced apoptosis by reducing ROS production via activating autophagy in nucleus pulposus cells.

Keywords nucleus pulposus cells; pravastatin; dexamethasone; oxidative stress

研究显示, 导致临床上腰痛症状的主要原因是椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)^[1]。椎间盘是一个无血管器官, 由三个相互关联的结构组成——中央髓核(nucleus pulposus, NP)、周围纤维环、和两侧的软骨和骨质终板, 确保椎间盘可以承受脊柱上轴向压力, 并允许脊柱的多轴旋转^[2]。在健康椎间盘中, NP是一种高度水合的组织, 产生大量的蛋白聚糖和胶原蛋白II等维持椎间盘正常生理功能; 而椎间盘退变时, 细胞基质降解, 水分丢失, 髓核细胞发生炎症反应, 诱发髓核细胞内的氧化应激诱导活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)大量产生, 并促进细胞凋亡, 功能丧失^[3]。

糖皮质激素可以缓解椎间盘退变引起的腰部短期疼痛^[4], 这可能与其抑制局部的炎症反应具有一定的关系, 但是糖皮质激素具有一定的副作用。髓核组织与软骨组织具有一定的相似性, 长期使用糖皮质激素地塞米松(dexamethasone, DXM)会导致体内的软骨组织和体外培养的软骨细胞凋亡^[5-6]。我们前期的研究^[7]发现, DXM可以诱导髓核细胞发生衰老和功能丧失, 但是DXM与髓核细胞的氧化应激及凋亡目前尚不清楚。

近来发现, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂或他汀类药物, 不仅可以治疗高胆固醇, 而且具有缓解炎症性疾病的潜力^[8]。他汀类药物普伐他汀(Pravastatin)可以减少软骨中金属蛋白酶(matrix Metalloproteinases, MMPs)的表达, 降低细胞外基质的分解, 缓解骨关节炎的进展^[9], 而相似的MMPs在椎间盘也有表达。Pravastatin与透明质酸联合使用可以缓解脂多糖诱导的软骨细胞凋亡和炎症反应^[9], 因此, Pravastatin对于缓解软骨退变具有一定的潜在价值, 但是在椎间盘中尚不明确。本文拟使用DXM和Pravastatin作用髓核细胞并检

测ROS、凋亡和自噬等指标水平来分析DXM和Pravastatin对髓核细胞的影响, 深入探讨自噬在其中所扮演的作用。

1 材料与方法

本研究的动物实验方案获得了河北工程大学附属医院动物伦理委员会批准。

1.1 试剂与抗体

细胞培养试剂, 包括胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、高糖DMEM(dulbecco modified Eagle medium)、0.25%胰酶购于Gibco公司; N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)、Pravastatin、II型胶原酶购于Sigma公司; P62、LC3b、自噬相关基因5(autophagy related 5, ATG5)、Beclin-1和 β -actin的一抗均购于CST公司; DCFH-DA染色试剂盒、膜联蛋白V/碘化丙啉(Annexin V/PI)流式试剂盒、Western blot相关试剂、DAPI、细胞蛋白的提取试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司; MitoSOX Red购于Invitrogen公司。

1.2 大鼠原代髓核细胞的培养

根据本课题的前期研究^[7], 我们购买了30只雄性SD大鼠(3个月, 250~300 g), 常规安乐死后, 将大鼠的L1~L6的整段腰椎取出。在超净台中, 显微镜下将胶冻状髓核组织提取到磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)中。接下来, 髓核组织在37 °C水浴锅中使用0.1% II型胶原酶孵育4 h, PBS清洗3次后使用200目的滤器滤过。10% FBS和1%青链霉素的高糖DMEM培养基在37 °C、5%二氧化碳的培养箱中培养。本实验中所有的细胞均为2代细胞, 这是为了防止髓核细胞的去分化现象。

1.3 实验设计

分析DXM对髓核细胞ROS生成和细胞凋亡的影响。分别使用1、25、50 μ g/mL DXM作用髓

核细胞48 h; 分析ROS在DXM诱发凋亡中的作用, 5 mmol/L NAC处理1 h后, 再与DXM共同处理48 h。分析Pravastatin对髓核细胞自噬水平, 分为Control组、DXM组、Pravastatin处理组和DXM+Pravastatin组, 处理时间48 h。DXM+Pravastatin组中首先使用25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DXM处理1 h后, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Pravastatin再与DXM共同处理48 h。分析自噬在Pravastatin缓解DXM引起的髓核细胞氧化应激和凋亡中的作用, 分组为Control组、DXM组、DXM+Pravastatin组、DXM+Pravastatin+Control siRNA组、DXM+Pravastatin+ATG5 siRNA组, 处理时间为48 h。

1.4 DCFH-DA染色

24孔板中, 5×10^4 髓核细胞培养过夜后, 1、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DXM处理髓核细胞48 h, 10 mol/L的DCFH-DA在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育20 min。再使用0.25%胰酶蛋白消化细胞, 在流式细胞仪(FACSCaliber, Becton Dickinson, Heidelberg)上, 使用激发光波长488 nm和发射光波长525 nm, 分析荧光强度。

1.5 MitoSOX Red染色

MitoSox Red染色主要是用于分析线粒体超氧阴离子(O_2^-)水平。髓核细胞(5×10^4 个)是在24孔板中培养过夜并如实验设计进行处理后。5 mmol/L MitoSOXTM Red(Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国)在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理20 min, 再使用DAPI染液在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育5 min, 随即加入新鲜的DMEM。在荧光显微镜下观察细胞用绿色和紫外线激发滤光片。荧光强度由ImageJ软件(NIH, USA)量化。

1.6 Annexin V/PI染色

5×10^4 细胞在24孔板中培养过夜后, 根据实验设计进行处理后, 0.25%的胰蛋白酶将细胞消化后, 1 000 $\times\text{g}$ 的转速将细胞离心5 min, 在冰上使用Annexin V-FITC染液染色10 min后, 再使用PI染液在冰上染色10 min。最后使用流式细胞仪(FACSCaliber, BD公司)分析细胞的凋亡率。

1.7 DAPI染色

5×10^4 细胞在24孔板中培养过夜后, 按照试验设计中的方法处理细胞后, 10%多聚甲醛于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞30 min, PBS清洗3遍, 0.1% Triton X-100在冰上孵育2 min, DAPI染液孵育5 min。PBS清洗后在倒置荧光显微镜下观察。

1.8 Western blot

使用RIPA(Radio-Immunoprecipitation Assay, 上海碧云天生物技术有限公司)提取细胞内总蛋白, 其中含有1%的PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)。使用BCA(bicinchoninic acid)方法来测定蛋白的浓度。提取的蛋白用SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)分离, 湿转方法将分离的蛋白转移到PVDF(polyvinylidene difluoride)膜上(BIO-RAD USA)。5%的脱脂牛奶在常温下封闭2 h后, TBST(Tris-buffered Saline with Tween 20)缓冲液洗3次。将上述的PVDF用Beclin-1、LC3b、ATG5和P62一抗(1:1 000, CST公司, 美国)在4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中孵育过夜, 第2天再使用TBST清洗3遍后, 辣根过氧化物酶标记的二抗在常温条件下孵育2 h, ECL发光液(碧云天公司)浸润PVDF膜后在成像系统(PerkinElmer, USA)上进行曝光。AlphaEaseFC 4.0软件行蛋白质条带半定量分析。

1.9 ATG5 siRNA的转录

1 mL的 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 髓核细胞加入到6孔板中, 培养过夜。根据Invitrogen公司的操作手册, 使用Lipofectamine 3000(Invitrogen公司, 美国)进行转染。ATG5 siRNA的设计具体序列见表1(上海吉玛制药技术有限公司), 对照RNA是非特异性的非靶向siRNA。转染48 h后, 提取细胞总蛋白行Western blot验证转染效果。转染成功后, 根据实验设计中的方法使用DXM和Pravastatin进行干预。

1.10 统计学分析

统计软件为SPSS 15软件包(SPSS Inc., Chicago,

表1 ATG5 siRNA的序列
Table 1 Sequence of ATG5 siRNA

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
Atg5	Sense: GGC CUU UCA UUC AGA AGC UTT Antisense: AGC UUC UGA AUG AAA GGC CTT
Negative control	Sense: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT Antisense: ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

IL, USA), 不同组之间的差异使用方差分析ANOVA进行统计, 本研究的数据均重复3次以上。如果方差分析的分析结果具有统计学意义, 再使用LSD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

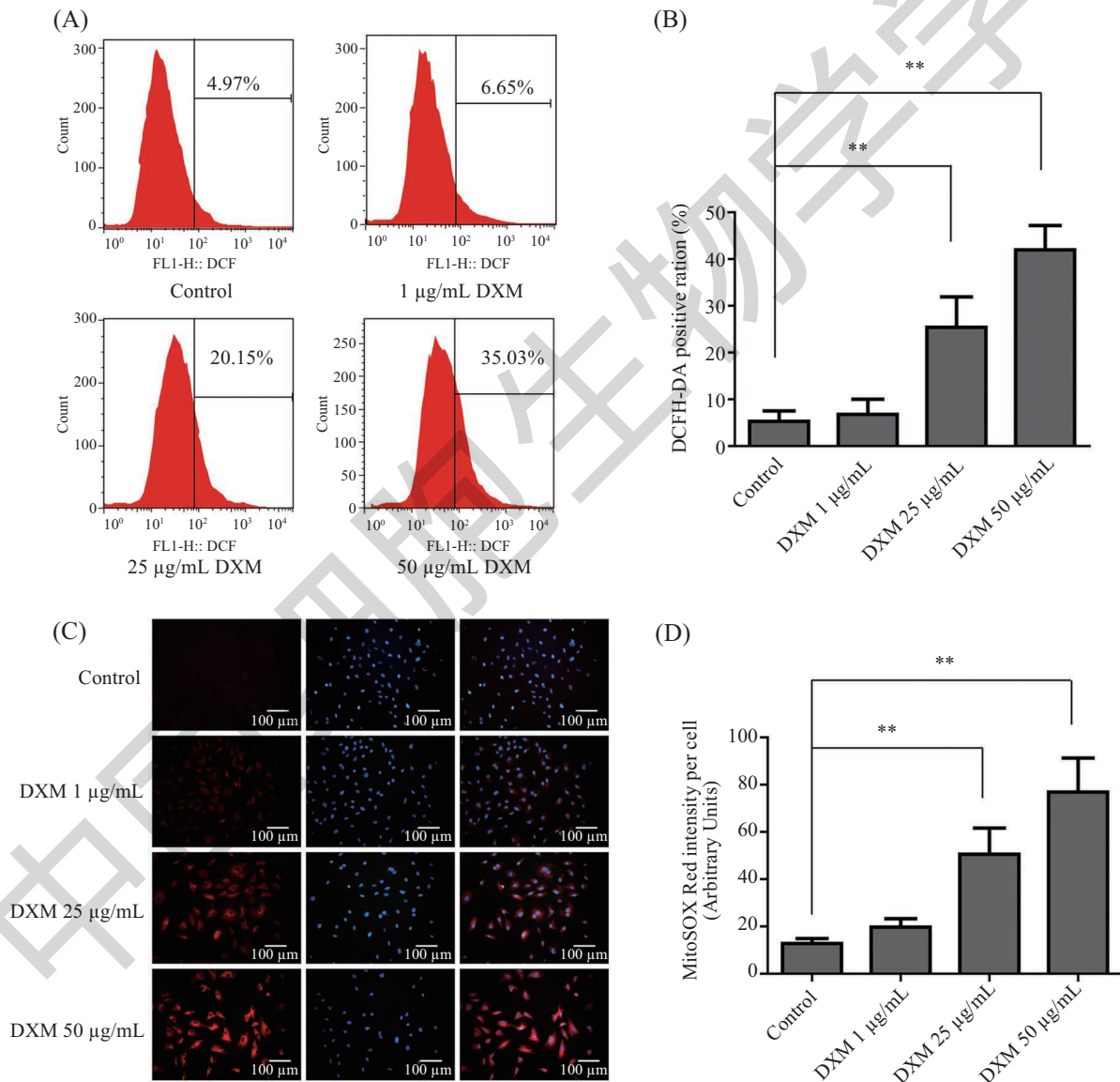
2.1 DXM促进髓核细胞内ROS生成

首先本实验使用DCFH-DA染色和MitoSOX Red染色分析DXM是否促进髓核细胞内ROS生

成。25 $\mu\text{g/mL}$ 和50 $\mu\text{g/mL}$ 的DXM处理细胞48 h后, DCFDA染色细胞的阳性率明显增加, 证实DXM显著提高细胞内的总ROS水平($P < 0.05$, 图1A和图1B)。MitoSOX Red染色是新型的线粒体ROS特异性染色, 与DCFDA染色结果相似, 25 $\mu\text{g/mL}$ 和50 $\mu\text{g/mL}$ 的DXM显著提高细胞中MitoSOX Red染色的荧光强度($P < 0.05$, 图1C和图1D)。上述两个实验共同证实DXM可以促进髓核细胞内ROS生成。

2.2 DXM促进髓核细胞凋亡

Annexin V/PI染色分析Pravastatin对髓核细胞

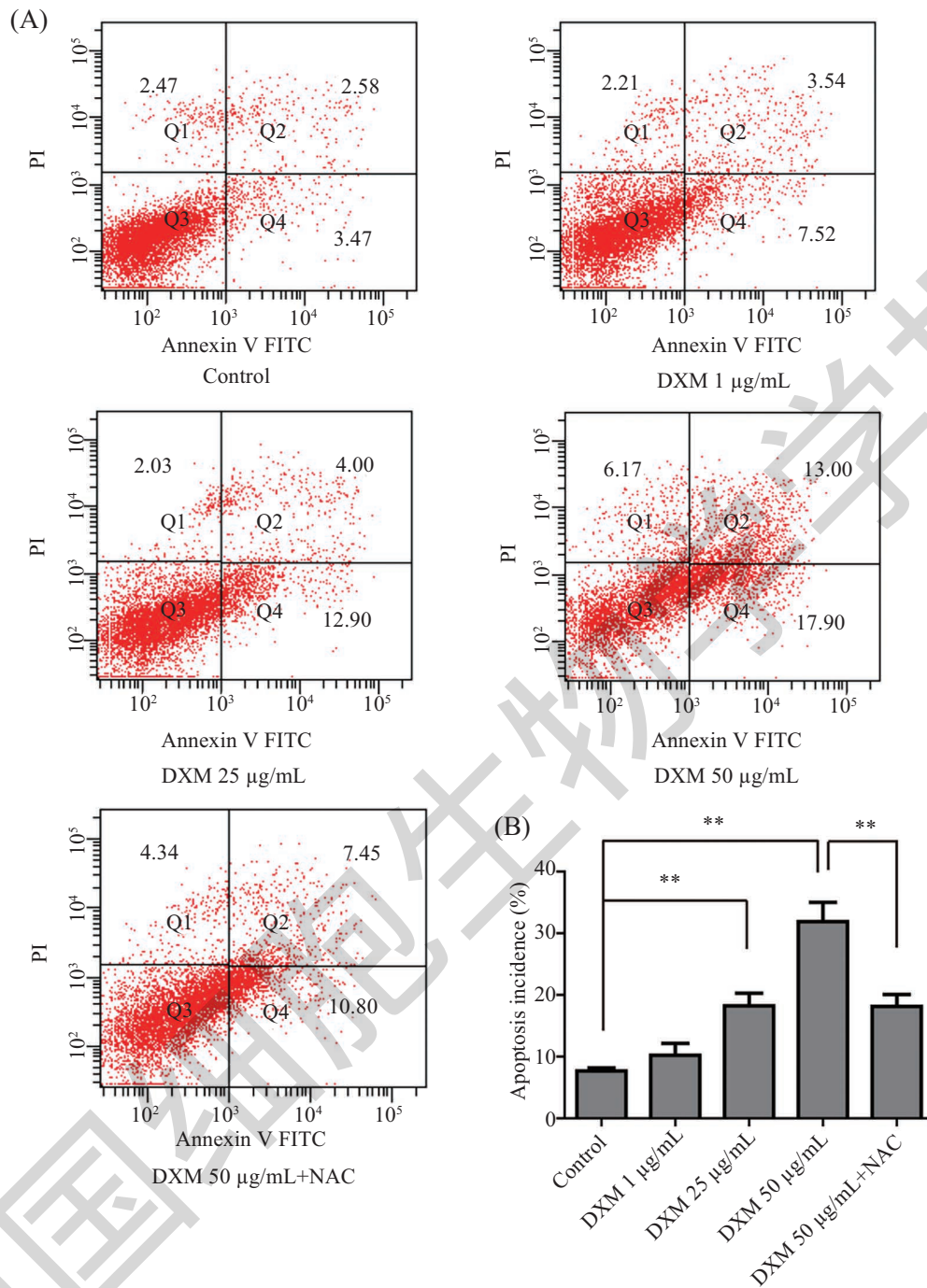


A: 地塞米松(dexamethasone, DXM)处理后髓核细胞后DCFH-DA染色的流式分析; B: DCFH-DA染色的半定量分析结果; C: DXM处理后髓核细胞的MitoSOX Red染色; D: MitoSOX Red染色的半定量分析。 $**P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: DCFH-DA staining of NP cells treated with DXM (dexamethasone); B: Semi-quantity analysis of DCFH-DA staining; C: MitoSOX Red staining of NP cells treated with DXM; D: Semi-quantity analysis of MitoSOX Red staining. $**P < 0.01$, $n = 6$.

图1 地塞米松对髓核细胞内ROS生成的影响

Fig.1 Effect of dexamethasone on the ROS production of nucleus pulposus cells



A: Annexin V/PI染色分析髓核细胞凋亡水平; B: Annexin V/PI染色的半定量分析。 ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: Annexin V/PI staining for analyzing the apoptotic level; B: Apoptosis incidence according to the Annexin V/PI stainin. ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

图2 地塞米松对髓核细胞凋亡的作用

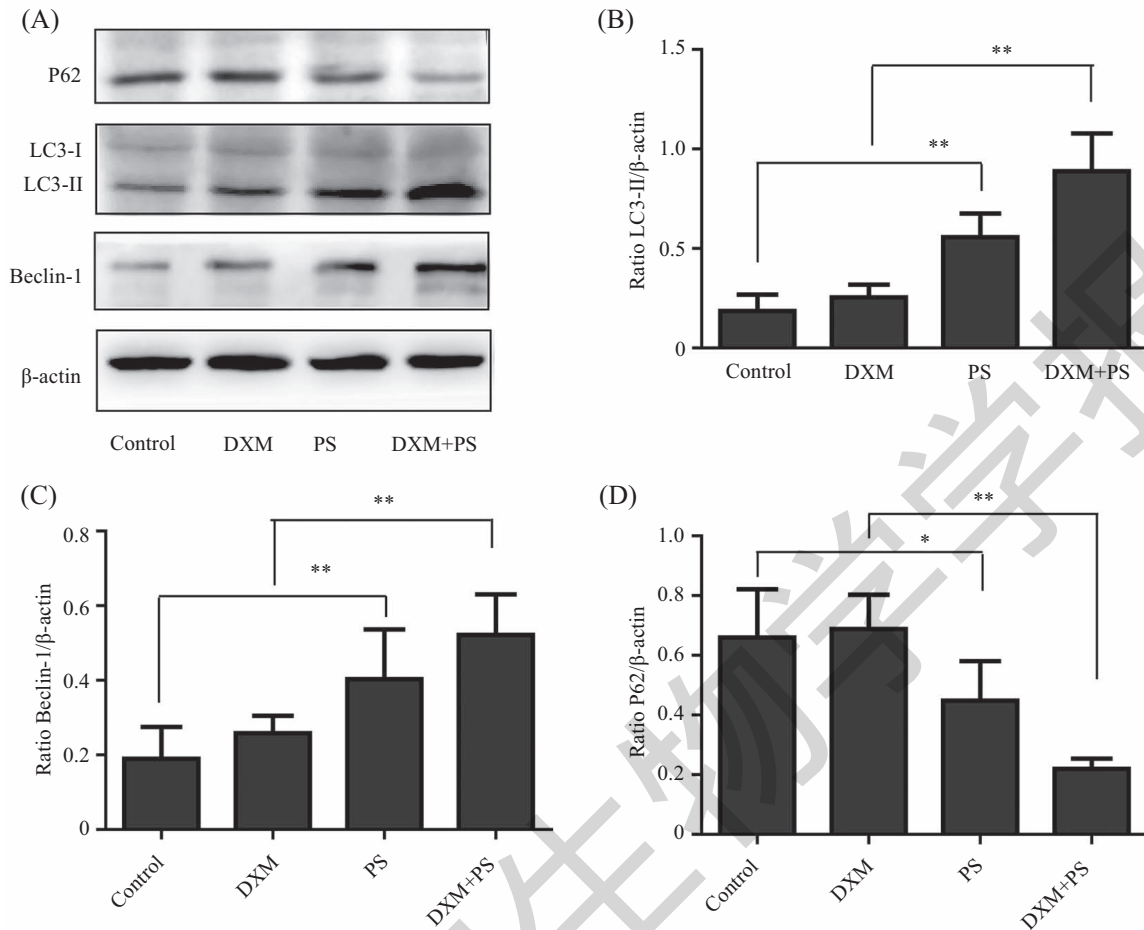
Fig.2 Effect of dexamethasone on the apoptosis of nucleus pulposus cells

凋亡的影响。25 μg/mL和50 μg/mL的DXM作用细胞48 h后, 细胞的凋亡率从(7.693±0.489)%提高到(18.26±2.02)%和(31.90±3.11)%, DXM显著增加了细胞的凋亡率($P < 0.05$, 图2)。为进一步分析DXM促进髓核细胞凋亡的机制, 使用公认的氧化应激抑制剂NAC作用细胞, 可以显著地逆转DXM诱导的细胞凋

亡, 说明ROS水平升高可能是DXM诱导髓核细胞凋亡的机制之一($P < 0.05$, 图2)。

2.3 Pravastatin对髓核细胞自噬的作用

为分析Pravastatin对髓核细胞自噬的影响, 采用Western blot方法分析LC3-II、Beclin-1和P62蛋白质表达水平。与对照组相比, 5 μmol/L Pravastatin



A: Pravastatin(PS)处理后, Western blot分析自噬标志蛋白质LC3-II、Beclin-1和P62水平; B: LC3-II条带的半定量分析; C: Beclin-1条带的半定量分析; D: P62条带的半定量分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: protein levels of LC3-II, Beclin-1 and P62 in NP cells treated with Pravastatin (PS); B: Semi-quantity analysis of LC3-II level; C: Semi-quantity analysis of Beclin-1 level; D: Semi-quantity analysis of P62 expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

图3 Pravastatin对DXM处理下髓核细胞中自噬相关蛋白质表达的影响

Fig.3 Effect of Pravastatin on the levels of autophagy related protein in NP cells treated with DXM

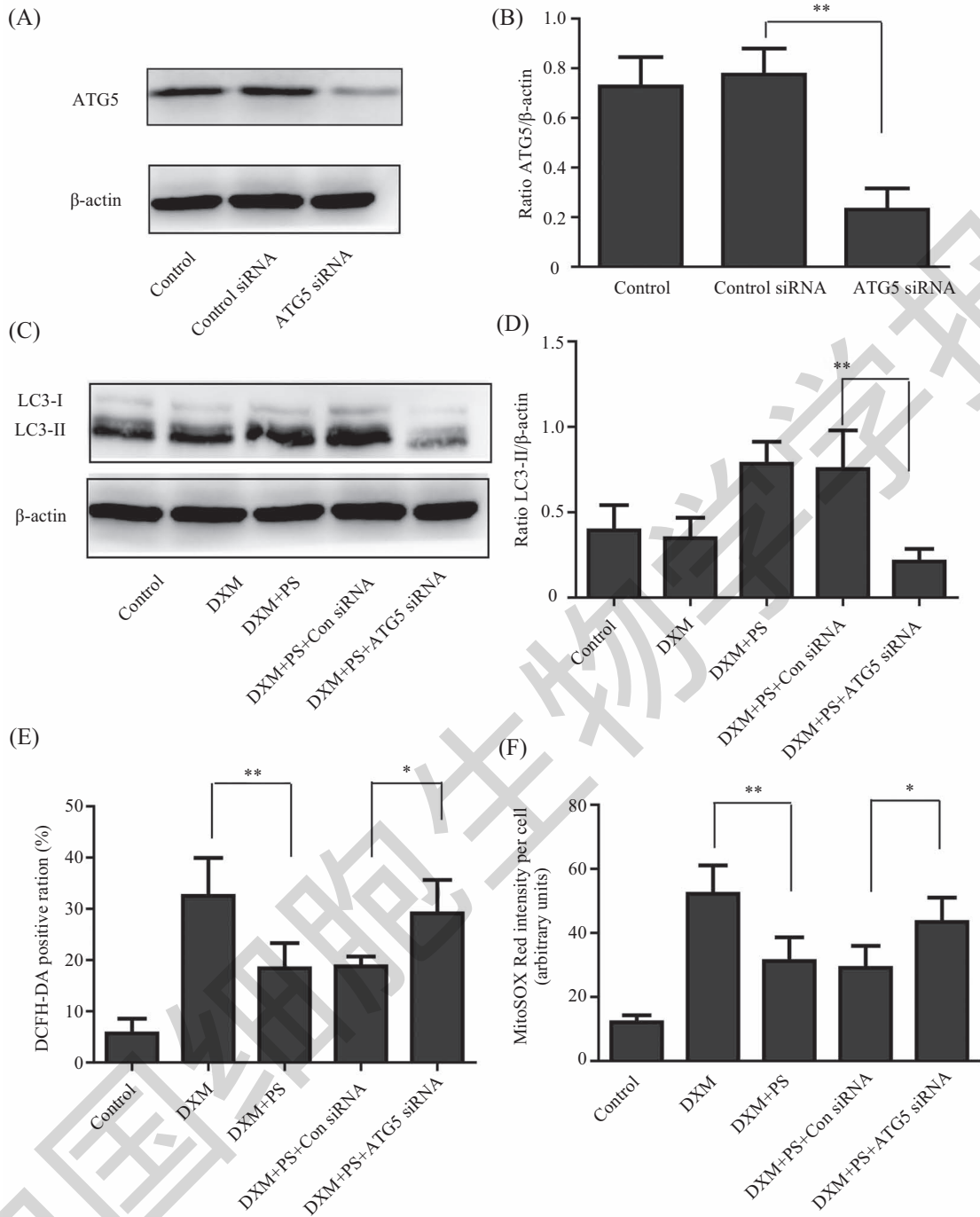
作用48 h后明显增加髓核细胞中LC3-II水平,更重要的是,DXM+Pravastatin中的LC3-II水平相比单纯DXM组明显升高,这说明Pravastatin不仅可以单独促进髓核细胞产生LC3-II蛋白,而且可以进一步提高DXM处理条件下细胞中的LC3-II表达水平($P < 0.05$,图3A和图3B),Beclin-1水平变化与LC3-II相似($P < 0.05$,图3A和图3C)。由于P62是自噬降解特异性蛋白质的“运输者”,因此,随着Pravastatin浓度的增加,P62水平反而逐渐下降,这也证实了Pravastatin激活DXM作用下髓核细胞自噬($P < 0.05$,图3A和图3D)。

2.4 RNAi抑制自噬逆转Pravastatin对髓核细胞氧化应激的作用

通过沉默ATG5抑制自噬来进一步分析自噬

在Pravastatin缓解DXM对髓核细胞的促凋亡作用。ATG5 siRNA转染细胞48 h后,Western blot结果发现,ATG5水平明显下降($P < 0.05$,图4A和图4B)。ATG5 siRNA显著抑制Pravastatin+DXM作用下的LC3-II水平,证实ATG5 siRNA导致自噬水平的下降($P < 0.05$,图4C和图4D)。

与单纯DXM组相比,DXM+Pravastatin明显降低了髓核细胞中DCFH-DA和MitoSOX Red染色的阳性率,这说明Pravastatin可以减少DXM诱导生成的细胞总ROS和线粒体ROS($P < 0.05$,图4E);然而ATG5 siRNA的转染却可以逆转Pravastatin对ROS生成的抑制作用($P < 0.05$,图4E和图4F),这说明自噬可能介导了Pravastatin对ROS生成的抑制作用。



A: ATG5 siRNA 转染后 ATG5 水平; B: 细胞 ATG5 条带的半定量分析; C: ATG5 沉默后髓核细胞中 LC3-II 水平; D: LC3-II 条带的半定量分析; E: DCFH-DA 染色分析细胞内总 ROS 的水平; F: MitoSOX Red 染色分析细胞内线粒体 ROS 的水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: ATG5 level after ATG5 siRNA transfection; B: Semi-quantity analysis of the ATG5 level; C: LC3-II level after ATG5 silence; D: Semi-quantity analysis of LC3-II level; E: DCFH-DA staining of nucleus pulposus cells; F: MitoSOX Red staining of nucleus pulposus cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

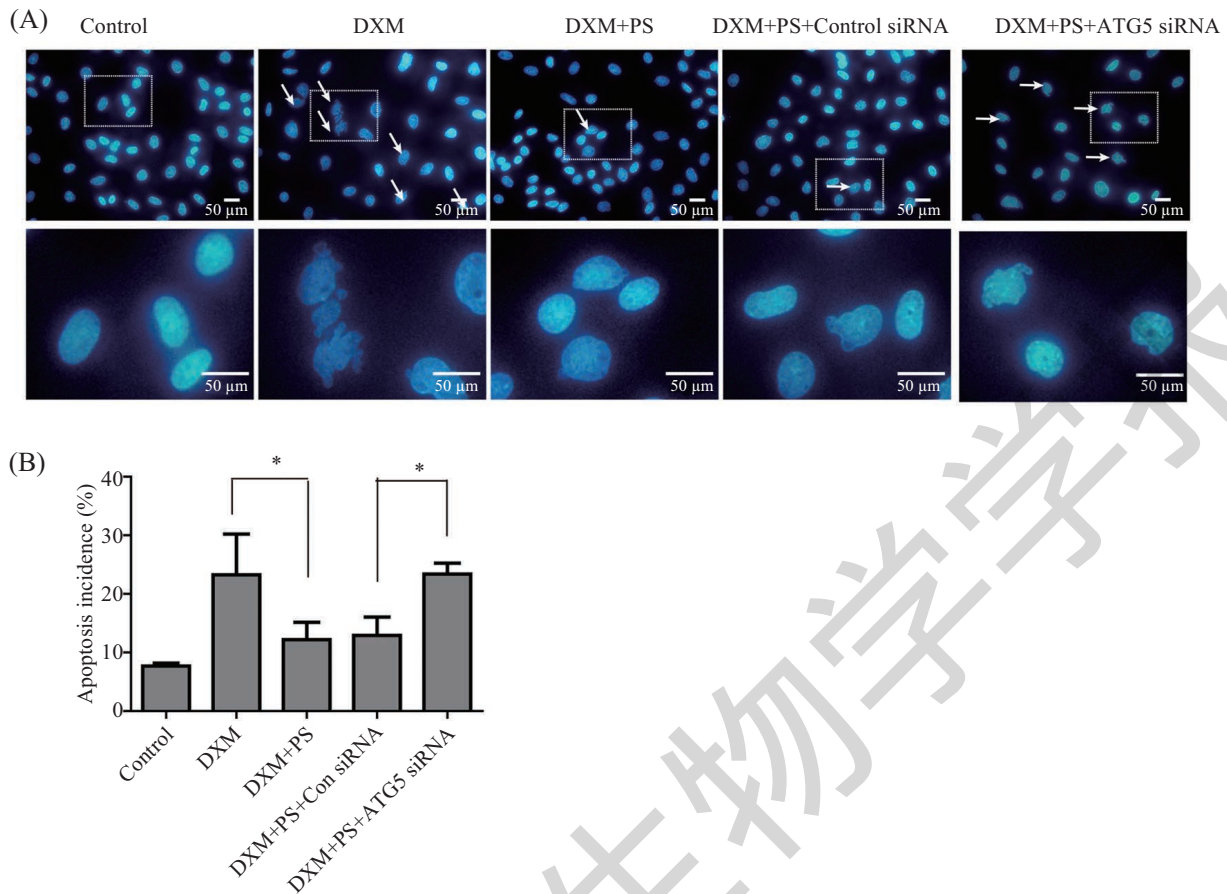
图4 抑制自噬逆转Pravastatin对髓核细胞ROS生成的调控作用

Fig.4 Effect of autophagic inhibition on the ROS regulated by Pravastatin in NP cells

2.5 RNAi抑制自噬逆转Pravastatin对髓核细胞凋亡的作用

DAPI染色和Annexin V/PI染色流式分析自噬在Pravastatin对髓核细胞凋亡的作用中的作用。

Pravastatin显著降低了DXM诱导的细胞凋亡 ($P < 0.05$, 图5A和图5B), 但是RNAi抑制自噬后可以逆转Pravastatin对髓核细胞凋亡的调控作用 ($P < 0.05$, 图5A和图5B), 这说明自噬可能介导了



A: 髓核细胞的DAPI染色,箭头处表示凋亡细胞; B: 根据Annexin V/PI染色结果进行凋亡率的半定量分析。* $P < 0.05$, $n = 6$ 。

A: DAPI staining for nucleus pulposus cells, apoptotic cells are shown at the arrow; B: apoptosis percentage according to the result of Annexin V/PI staining. * $P < 0.05$, $n = 6$.

图5 抑制自噬逆转Pravastatin对髓核细胞凋亡的调控作用

Fig.5 Effect of autophagic inhibition on the apoptosis regulated by Pravastatin in NP cells

Pravastatin对细胞凋亡的抑制作用。

3 讨论

髓核细胞凋亡是参与椎间盘退变的重要机制之一。髓核细胞发生凋亡,导致髓核细胞数量减少,功能降低,从而引起细胞外基质合成减少,椎间盘发生病理性改变^[10]。与正常椎间盘相比,退变的椎间盘髓核组织中凋亡细胞数量和凋亡执行分子caspase-3表达量明显增加^[11]。凋亡涉及的主要信号通路包括死亡受体和线粒体通路均在髓核细胞有报道^[12]。异常应力刺激、炎症刺激和微环境改变均可以引起髓核细胞凋亡,而本文通过Annexin V/PI和DAPI染色发现,DXM可以引起髓核细胞凋亡。软骨细胞与髓核细胞的生物学特征相似,Xing等^[6]和Huang等^[13]均发现,DXM同样可以促进软骨细胞凋亡。

氧化应激是指细胞内产生的氧化自由基和抗氧化能力之间的不平衡,细胞内累积大量的ROS,产生细胞毒性和导致组织损伤^[14]。研究发现,过量产生的ROS可以通过线粒体信号通路,包括激活caspase-3/9等分子,诱导髓核细胞凋亡,并导致髓核组织的DNA损伤、脂质氧化、细胞生长停滞等,从而引起椎间盘退变^[15]。本研究使用DCFH-DA流式和MitoSOX Red染色发现,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DXM可以促进髓核细胞中总ROS和线粒体ROS大量产生,而使用NAC抑制ROS产生后却可以部分逆转髓核细胞的凋亡,这证实DXM可能通过促进细胞内产生大量的ROS从而诱导髓核细胞凋亡。其中,线粒体功能的完整性可能是髓核细胞内ROS大量产生的主要机制之一,但是如何参与细胞凋亡尚不清楚。Huang等^[13]发现,NOX4[Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) (NADPH) oxidase 4]/ROS/

p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinase)信号通路可能介导了DXM诱发的软骨细胞凋亡,但是DXM诱导髓核细胞凋亡的机制尚需进一步研究。

细胞凋亡和自噬均是程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),并且两者密切相关。自噬是一种高度保守的溶酶体降解途径,适量的自噬主要通过溶酶体降解细胞质中的错构蛋白质和细胞器,从而维持细胞内平衡并保护细胞免受过度的应激反应伤害^[16]。自噬已被证明对多种疾病具有保护作用,包括神经变性,癌症,心脏病,感染和代谢疾病等^[17]。在椎间盘退变中,自噬也具有一定的保护作用,激活自噬可以抑制髓核细胞外基质的降解,抑制细胞凋亡^[18-19]。本文使用Western blot检测自噬相关蛋白LC3-II, Beclin-1和P62表达水平证实,5 $\mu\text{mol/L}$ Pravastatin不仅单独可以激活髓核细胞自噬,更与DXM联用可以激活DXM作用下髓核细胞中的自噬。Baker等^[9]使用1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ Pravastatin作用人软骨细胞未发现任何细胞毒性,与本研究相似。自噬激活的机制通常分为mTOR依赖性的和非依赖性的信号通路^[20]。Liao等^[21]发现,AMPK-mTOR信号通路介导了Pravastatin激活内皮祖细胞自噬,但是在髓核细胞中的具体机制尚需要进一步研究。

Pravastatin被发现可以抑制肾小管上皮细胞和微血管的氧化应激^[22],而本实验通过DCFH-DA流式和MitoSOX Red染色证实,Pravastatin抑制髓核细胞中ROS生成。自噬是细胞面对ROS大量产生的自我调节代偿机制。Wu等^[23]在骨关节炎软骨中发现自噬处于低水平,而ROS相对于正常软骨则表达量过大。雷帕霉素激活自噬可以抑制软骨细胞中IL-1 β 诱导的ROS产生,并参与调节软骨细胞的代谢功能^[24]。Shen等^[25]发现,自噬的缺乏会导致细胞内ROS的大量集聚。ATG5是自噬形成过程中关键的分子,本研究使用RNAi方法成功沉默ATG5,抑制自噬水平后发现,Pravastatin对ROS产生的抑制作用被部分逆转,这也充分说明Pravastatin可能是通过激活髓核细胞自噬从而抑制细胞内的ROS生成。由于ROS是髓核细胞凋亡的重要机制,因此Pravastatin可能通过激活自噬抑制ROS生成,最终抑制细胞凋亡,本研究最后通过Annexin V/PI和DAPI染色证实了这一点。我们发现,沉默ATG5后,Pravastatin对髓核细胞凋亡的抑制作用被部分逆转,这说明了自噬介导了Pravastatin对凋亡的所用。

自噬和凋亡受到类似的应激刺激,可以在某些生理过程中共存,并且都参与椎间盘退变。机械压力、营养剥夺和高糖环境等各种应激均可以刺激髓核细胞自噬和凋亡,然而近来越来越多的研究发现,自噬往往抑制凋亡。3-MA抑制自噬后会增加压力诱导的髓核细胞凋亡^[22],相反地,通过沉默mTORC1来激活自噬可以保护炎症诱导的髓核细胞的凋亡以及细胞外基质的降解^[26]。

综上所述,本研究发现,DXM通过促进髓核细胞内总ROS和线粒体ROS的生成诱导细胞凋亡,而5 $\mu\text{mol/L}$ 的Pravastatin可激活DXM作用下的髓核细胞自噬。Pravastatin不仅降低细胞中ROS水平,更抑制细胞凋亡,但是沉默ATG5以抑制自噬水平却可以逆转Pravastatin对髓核细胞的保护作用。本研究结果提示,Pravastatin可能激活自噬减少ROS产生从而抑制DXM引起的髓核细胞凋亡。

参考文献 (References)

- 1 Chou D, Samartzis D, Bellabarba C, Patel A, Luk KD, Kisser JM, *et al*. Degenerative magnetic resonance imaging changes in patients with chronic low back pain: a systematic review. *Spine (Phila Pa 1976)* 2011; 36(21 Suppl): S43-53.
- 2 Rampersaud YR, Bidos A, Fanti C, Perruccio AV. The need for multidimensional stratification of chronic low back pain (LBP). *Spine (Phila Pa 1976)* 2017; 42(22): E1318-25.
- 3 Guo MB, Wang DC, Liu HF, Chen LW, Wei JW, Lin Y, *et al*. Lupeol against high-glucose-induced apoptosis via enhancing the anti-oxidative stress in rabbit nucleus pulposus cells. *Eur Spine J* 2018; doi: 10.1007/s00586-018-5687-9.
- 4 Nguyen C, Boutron I, Baron G, Sanchez K, Palazzo C, Benchimol R, *et al*. Intradiscal glucocorticoid injection for patients with chronic low back pain associated with active discopathy: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2017; 166(8): 547-56.
- 5 Nakazawa F, Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Katayama R, Kimura T. Corticosteroid treatment induces chondrocyte apoptosis in an experimental arthritis model and in chondrocyte cultures. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20(6): 773-81.
- 6 Xing W, Hao L, Yang X, Li F, Huo H. Glucocorticoids induce apoptosis by inhibiting microRNA cluster miR1792 expression in chondrocytic cells. *Mol Med Rep* 2014; 10(2): 881-6.
- 7 王小英, 焦丽艳, 付治安, 贺靖澜. 甲状腺激素通过激活自噬调节糖皮质激素引起的髓核细胞衰老及其机制. *中国细胞生物学学报*(Wang Xiaoying, Jiao Liyan, Fu Zhian, He Jinglan. PTH inhibits senescence in primary rat nucleus pulposus cells by activating autophagy via m-TOR pathway. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2018; 40(7): 1111-9.
- 8 Baker JF, Walsh P, Mulhall KJ. Statins: a potential role in the management of osteoarthritis? *Joint Bone Spine* 2011; 78(1): 31-4.
- 9 Baker JF, Walsh PM, Byrne DP, Mulhall KJ. Pravastatin

- suppresses matrix metalloproteinase expression and activity in human articular chondrocytes stimulated by interleukin-1 β . *J Orthop Traumatol* 2012; 13(3): 119-23.
- 10 Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration. *Apoptosis* 2006; 11(12): 2079-88.
- 11 Wang D, Hu Z, Hao J, He B, Gan Q, Zhong X, *et al.* SIRT1 inhibits apoptosis of degenerative human disc nucleus pulposus cells through activation of Akt pathway. *Age (Dordr)* 2013; 35(5): 1741-53.
- 12 Chen S, Zhao L, Deng X, Shi D, Wu F, Liang H, *et al.* Mesenchymal stem cells protect nucleus pulposus cells from compression-induced apoptosis by inhibiting the mitochondrial pathway. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 9843120.
- 13 Huang Y, Cai GQ, Peng JP, Shen C. Glucocorticoids induce apoptosis and matrix metalloproteinase-13 expression in chondrocytes through the NOX4/ROS/p38 MAPK pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018; 181: 52-62.
- 14 He R, Cui M, Lin H, Zhao L, Wang J, Chen S, *et al.* Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. *Life Sci* 2018; 199: 122-30.
- 15 Li Z, Chen S, Ma K, Lv X, Lin H, Hu B, *et al.* CsA attenuates compression-induced nucleus pulposus mesenchymal stem cells apoptosis via alleviating mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Life Sci* 2018; 205: 26-37.
- 16 Tang JY, Farooqi AA, Ou-Yang F, Hou MF, Huang HW, Wang HR, *et al.* Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects-involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration. *Semin Cancer Biol* 2018; pii: S1044-579X(18)30084-1.
- 17 Doria A, Gatto M, Punzi L. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368(19): 1845.
- 18 Chen K, Lü X, Li W, Yu F, Lin J, Ma J, *et al.* Autophagy is a protective response to the oxidative damage to endplate chondrocytes in intervertebral disc: implications for the treatment of degenerative lumbar disc. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 4041768.
- 19 Jiang L, Jin Y, Wang H, Jiang Y, Dong J. Glucosamine protects nucleus pulposus cells and induces autophagy via the mTOR-dependent pathway. *J Orthop Res* 2014; 32(11): 1532-42.
- 20 Alayev A, Holz MK. mTOR signaling for biological control and cancer. *J Cell Physiol* 2013; 228(8): 1658-64.
- 21 Liao Y, Zhang P, Yuan B, Li L, Bao S. Pravastatin protects against avascular necrosis of femoral head via autophagy. *Front Physiol* 2018; 9: 307.
- 22 Ishibashi Y, Yamagishi S, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Takeuchi M, *et al.* Pravastatin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced proximal tubular cell apoptosis and injury by reducing receptor for AGEs (RAGE) level. *Metabolism* 2012; 61(8): 1067-72.
- 23 Wu C, Zheng J, Yao X, Shan H, Li Y, Xu P, *et al.* Defective autophagy in chondrocytes with Kashin-Beck disease but higher than osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2014; 22(11): 1936-46.
- 24 Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, *et al.* Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2012; 64(6): 1920-8.
- 25 Shen C, Cai GQ, Peng JP, Chen XD. Autophagy protects chondrocytes from glucocorticoids-induced apoptosis via ROS/Akt/FOXO3 signaling. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23(12): 2279-87.
- 26 Ito M, Yurube T, Kakutani K, Maeno K, Takada T, Terashima Y, *et al.* Selective interference of mTORC1/RAPTOR protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism with Akt and autophagy induction. *Osteoarthritis Cartilage* 2017; 25(12): 2134-46.