

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.02.009
文章编号: 1005-8982 (2024) 02-0053-07

实验研究·论著

GPR30对大鼠椎间盘退行性病变的作用及其机制研究*

肖权洲, 卿亚龙, 陈特, 刘向阳

[湖南师范大学附属第一医院(湖南省人民医院)骨科, 湖南长沙 410002]

摘要: **目的** 探讨G蛋白偶联受体30(GPR30)通过Nrf2/ARE信号通路抑制白细胞介素1 β (IL-1 β)诱导的大鼠椎间盘髓核细胞的凋亡、炎症反应和氧化应激。**方法** 使用IL-1 β 处理大鼠椎间盘髓核细胞复制体外椎间盘退变模型,将椎间盘髓核细胞分为空白对照(Control)组、IL-1 β 组、IL-1 β +过表达GPR30阴性对照质粒(oe-NC)组、IL-1 β +过表达GPR30质粒(oe-GPR30)组、IL-1 β +oe-GPR30+干扰Nrf2表达阴性对照质粒(si-NC)组、IL-1 β +oe-GPR30+干扰Nrf2表达质粒(si-Nrf2)组,IL-1 β 的处理浓度为10 ng/mL。实时荧光定量聚合酶链反应检测GPR30 mRNA表达;Western blotting检测GPR30、抗重组与合成蛋白(Nrf2)和抗醌NADH脱氢酶(NQO1)和抗血红素加氧酶1(HO-1)蛋白表达;流式细胞术检测细胞凋亡情况;酶联免疫吸附试验检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和IL-6水平;使用ELISA法检测活性氧(ROS)、分光光度法检测超氧化物歧化酶(SOD)水平,比色法检测丙二醛(MDA)水平。**结果** IL-1 β 组髓核细胞GPR30 mRNA、蛋白相对表达量较Control组降低($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30组较IL-1 β +oe-NC组升高($P < 0.05$)。IL-1 β 组髓核细胞核中Nrf2蛋白相对表达量较Control组升高($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30组较IL-1 β +oe-NC组升高($P < 0.05$)。IL-1 β 组Nrf2、HO-1及NQO1蛋白相对表达量较Control组降低($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30组较IL-1 β +oe-NC组升高($P < 0.05$)。IL-1 β 组髓核细胞Nrf2蛋白相对表达量较Control组降低($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30组较IL-1 β +oe-NC组升高($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30+si-Nrf2组较IL-1 β +oe-GPR30+si-NC组降低($P < 0.05$)。IL-1 β 组髓核细胞凋亡率较Control组升高($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30组较IL-1 β +oe-NC组降低($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30+si-Nrf2组较IL-1 β +oe-GPR30+si-NC组升高($P < 0.05$)。IL-1 β 组TNF- α 、IL-6水平较Control组升高($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30组较IL-1 β +oe-NC组降低($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30+si-Nrf2组较IL-1 β +oe-GPR30+si-NC组升高($P < 0.05$)。IL-1 β 组ROS、MDA水平较Control组升高($P < 0.05$),SOD水平较Control组降低($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30组ROS、MDA水平较IL-1 β +oe-NC组降低,SOD水平较IL-1 β +oe-NC组升高($P < 0.05$),IL-1 β +oe-GPR30+si-Nrf2组ROS、MDA水平较IL-1 β +oe-GPR30+si-NC组升高,SOD水平较IL-1 β +oe-GPR30+si-NC组降低($P < 0.05$)。**结论** 上调GPR30表达激活Nrf2/ARE信号通路,能抑制IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡、炎症和氧化应激反应。

关键词: 氧化应激损伤;大鼠椎间盘髓核细胞;GPR30;Nrf2/ARE信号通路;炎症反应

中图分类号: R459.9

文献标识码: A

Role of GPR30 in rat intervertebral disc degeneration and its mechanism*

Xiao Quan-zhou, Qing Ya-long, Chen Te, Liu Xiang-yang

[Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Hunan Normal University (Hunan Provincial People's Hospital), Changsha, Hunan 410002, China]

收稿日期: 2023-07-27

* 基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目(No: 20201755, No: 20201751)

[通信作者] 刘向阳, E-mail: liuxy6905@sina.com

Abstract: Objective To investigate the potential roles of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in inhibiting apoptosis, oxidative stress response and inflammation in rat nucleus pulposus cells induced by interleukin-1 β (IL-1 β) via the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway. **Methods** Rat nucleus pulposus cells were treated with IL-1 β to establish an in vitro model of intervertebral disc degeneration. The nucleus pulposus cells were divided into blank control (control) group, IL-1 β group, IL-1 β + GPR30 overexpression negative control plasmid (oe-NC) group, IL-1 β + GPR30 overexpression plasmid (oe-GPR30) group, IL-1 β + oe-GPR30 + Nrf2 interference negative control plasmid (si-NC) group and IL-1 β + oe-GPR30 + Nrf2 interference plasmid (si-Nrf2) group, and the treatment concentration of IL-1 β was 10 ng/ml. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of GPR30, and Western blotting was used to detect the protein expressions of GPR30, Nrf2, NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1) and heme oxygenase 1 (HO-1). The flow cytometry was performed to detect cell apoptosis. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were measured via enzyme-linked immunosorbent assay, while levels of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured via corresponding commercial kits. **Results** Compared with the control group, the mRNA and protein expressions of GPR30 in nucleus pulposus cells were lower in the IL-1 β group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of GPR30 in nucleus pulposus cells in the IL-1 β + oe-GPR30 group were higher than those in the IL-1 β + oe-NC group ($P < 0.05$). The relative protein expression of Nrf2 in the nucleus of nucleus pulposus cells in the IL-1 β group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), while that in the IL-1 β + oe-GPR30 group was higher than that in the IL-1 β + oe-NC group ($P < 0.05$). The relative protein expressions of Nrf2, HO-1 and NQO1 in nucleus pulposus cells in the IL-1 β group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), and those in the IL-1 β + oe-GPR30 group were higher than those in the IL-1 β + oe-NC group ($P < 0.05$). The relative protein expression of Nrf2 in nucleus pulposus cells in the IL-1 β group was lower ($P < 0.05$), that in the IL-1 β + oe-GPR30 group was higher than that in the IL-1 β + oe-NC group ($P < 0.05$), and that in the IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 group was lower than that in the IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC group ($P < 0.05$). The apoptosis rate of nucleus pulposus cells in the IL-1 β group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), that in the IL-1 β + oe-GPR30 group was lower than that in the IL-1 β + oe-NC group ($P < 0.05$), and that in the IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 group was higher than that in the IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α and IL-6 in the IL-1 β group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), those in the IL-1 β + oe-GPR30 group were lower than those in the IL-1 β +oe-NC group ($P < 0.05$), and those in the IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 group were higher than those in the IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of ROS and MDA were higher and the level of SOD was lower in the IL-1 β group ($P < 0.05$). Compared with the IL-1 β + oe-NC group, the levels of ROS and MDA were lower and the level of SOD was higher in the IL-1 β + oe-GPR30 group ($P < 0.05$). Compared with the IL-1 β + oe-GPR30+si-NC group, the levels of ROS and MDA were higher and the level of SOD was lower in the IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 group ($P < 0.05$). **Conclusions** Up-regulation of the expression of GPR30 activates the Nrf2/ARE signaling pathway and inhibits IL-1 β -induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in nucleus pulposus cells.

Keywords: oxidative stress injury; rat nucleus pulposus cells in the intervertebral disc; G protein-coupled receptor; Nrf2/ARE signaling pathway; inflammatory response

腰痛是肌肉骨骼脊柱疾病最典型的症状,也是导致残疾的主要原因^[1],而椎间盘退行性病变是引起慢性腰痛的主要原因之一。目前关于椎间盘退行性病变的分子机制尚未阐明。研究表明,椎间盘髓核细胞的凋亡、氧化应激和炎症反应在椎间盘退行性病变发挥了重要作用^[2-4]。退行性炎症级联反应通常是由椎间盘中分解代谢和合成代谢过程之间的不平衡引发的^[5]。在腰椎间盘退变发育过程

中,白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 等炎症因子不断积累,破坏髓核细胞稳态,促进活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的积累,诱导氧化应激,导致髓核细胞过度凋亡,加速细胞外基质降解,从而恶化椎间盘的内部微环境^[6-7]。

G 蛋白偶联受体 30 (G protein-coupled receptor, GPR30) 是介导雌激素功能的一种经典的膜受体^[8],而雌激素减少与椎间盘退行性病变显著相关^[9]。然

而, GPR30在人类脊柱中的表达和功能知之甚少。研究发现, GPR30在多种疾病中能减轻氧化应激损伤和炎症反应^[10-11], 并且还可以通过促进炎症消退改善关节炎^[12]。但GPR30是否能通过抗炎和抗氧化应激影响椎间盘退行性病变尚未见报道。本研究采用IL-1 β 处理大鼠椎间盘髓核细胞, 复制椎间盘退变体外模型, 探究GPR30对椎间盘退行性病变的作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源和主要试剂

大鼠椎间盘髓核细胞购自上海康朗生物科技有限公司。DMEM/F12培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、谷氨酰胺、青霉素和链霉素均购自美国GIBCO公司, TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司, Lipofectamine 2000转染试剂购自德国Sigma-Aldrich公司, IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国R&D公司, ROS、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒均购自上海酶联生物公司, Prime Script™ RT预混液购自日本TaKaRa Bio公司, 抗GPR30、抗重组与合成蛋白(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、抗醌NADH脱氢酶(NAD(P)H dehydrogenase quinone 1, NQO1)、抗血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO-1)、抗 β -肌动蛋白(beta actin, β -actin)、抗 α 微管蛋白(α -tubulin)、抗核纤层蛋白B抗体(Lamin B)均购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 将大鼠椎间盘髓核细胞解冻及复苏, 放置在含10% FBS + 100 u/mL青霉素+1%谷氨酰胺+100 μ g/mL链霉素的DMEM/F12培养基中, 在37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳的培养箱中培养, 每周更换3次培养液。

将椎间盘髓核细胞分为空白对照组(Control组)、IL-1 β 组、IL-1 β +过表达GPR30阴性对照质粒组(IL-1 β +oe-NC组)、IL-1 β +过表达GPR30质粒组(IL-1 β +oe-GPR30组)、IL-1 β +oe-GPR30+干扰Nrf2表达阴性对照质粒组(IL-1 β +oe-GPR30+si-NC组)、IL-1 β +oe-GPR30+干扰Nrf2表达质粒组

(IL-1 β +oe-GPR30+si-Nrf2组), IL-1 β 的处理浓度为10 ng/mL。根据制造商的说明书使用Lipofectamine 2000进行实验。使用250 μ L Opti-MEM培养基与2.5 μ g oe-NC、oe-GPR30、si-NC和si-Nrf2质粒单独或同时混合后静置5 min(a液), 5 μ L Lipofectamine 2000转染试剂与250 μ L Opti-MEM培养基充分混合静置5 min(b液), a液与b液充分混匀后室温静置15 min, 加入椎间盘髓核细胞, 转染6 h弃上清液, 更换含有10 ng/mL IL-1 β 的培养液培养24 h。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测GPR30 mRNA表达 使用TRIzol试剂提取各细胞总RNA, 并测浓度。随后, 使用Prime Script™ RT预混液逆转录生成cDNA。cDNA扩增是在PCR仪器上进行, 以GAPDH用作归一化的内部对照。GPR30正向引物: 5'-TGGGGAAGAGGCCACCA-3', 反向引物: 5'-CGTGGAGCTGCTCACTCTCTG-3', 均58 bp; GAPDH正向引物: 5'-AAAGGGTCATCATCTCTG-3', 反向引物: 5'-GCTGTTGTCATACTTCTC-3', 均80 bp。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算GPR30 mRNA相对表达量。

1.2.3 Western blotting检测GPR30、Nrf2、HO-1及NQO1蛋白表达 从细胞中提取总蛋白, 测试浓度以及纯度后。分离蛋白质并且转移至PVDF膜。用磷酸盐缓冲液密封2 h, 加入抗GPR30(1:1 000)、抗Nrf2(1:2 000)、抗HO-1(1:2 000)、抗NQO1(1:2 000)、抗 β -actin(1:2 000)、抗 α -tubulin(1:2 000)、抗Lamin B(1:2 000), 在4 $^{\circ}$ C过夜, 将磷酸盐吐温缓冲液冲洗3次, 5 min/次。接着, 加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:5 000), 并在37 $^{\circ}$ C孵育4 h。显影, 定影。使用Image图像软件分别分析各Nrf2、HO-1、NQO1、GPR30与 β -actin(Lamin B或 α -tubulin)积分光密度的比值作为各蛋白相对表达量。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 洗涤细胞后, 消化离心, 收集细胞。随后用300 μ L结合缓冲液重悬细胞, 并加入10 μ L膜联蛋白V-FITC溶液轻轻混合。将细胞在室温下黑暗孵育15 min, 然后加入5 μ L PI染料和200 μ L结合溶液。通过流式细胞术检测细胞凋亡。

1.2.5 ELISA法检测TNF- α 、IL-6水平 根据试剂盒说明书, 使用ELISA试剂盒检测髓核细胞培养上

清液中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平。读取酶标仪上 450 nm 处的光密度值。

1.2.6 ELISA 法检测 ROS 水平、分光光度法检测 SOD 水平、比色法检测 MDA 水平 收集髓核细胞培养上清液,然后使用从上海酶联生物公司获得的相应试剂盒检测 ROS、SOD 和 MDA 水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

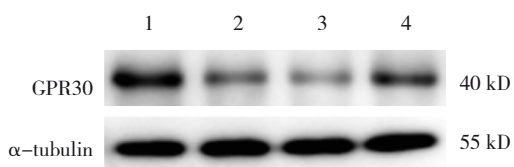
2 结果

2.1 各组髓核细胞 GPR30 mRNA、蛋白相对表达量比较

各组髓核细胞 GPR30 mRNA、蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), IL-1 β 组较 Control 组降低 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 组较 IL-1 β + oe-NC 组升高 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 各组髓核细胞 GPR30 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	GPR30 mRNA	GPR30 蛋白
Control 组	1.00 \pm 0.13	0.92 \pm 0.08
IL-1 β 组	0.19 \pm 0.07a	0.29 \pm 0.10a
IL-1 β + oe-NC 组	0.15 \pm 0.05	0.21 \pm 0.14
IL-1 β + oe-GPR30 组	0.53 \pm 0.12	0.54 \pm 0.09
F 值	48.394	27.746
P 值	0.000	0.000



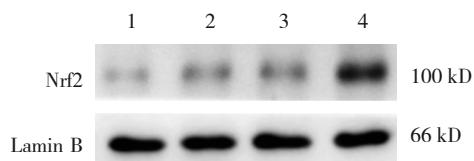
1: Control 组; 2: IL-1 β 组; 3: IL-1 β + oe-NC 组; 4: IL-1 β + oe-GPR30 组。

图 1 各组髓核细胞 GPR30 蛋白条带图

2.2 各组髓核细胞核中 Nrf2 蛋白相对表达量比较

Control 组、IL-1 β 组、IL-1 β + oe-NC 组、IL-1 β + oe-GPR30 组髓核细胞核中的 Nrf2 蛋白相对表达量分别为 (0.18 \pm 0.02)、(0.38 \pm 0.05)、(0.32 \pm 0.09)、(0.74 \pm 0.10), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 32.513, P = 0.000$)。IL-1 β 组较 Control 组升高 ($P <$

0.05), IL-1 β + oe-GPR30 组较 IL-1 β + oe-NC 组升高 ($P < 0.05$)。见图 2。



1: Control 组; 2: IL-1 β 组; 3: IL-1 β + oe-NC 组; 4: IL-1 β + oe-GPR30 组。

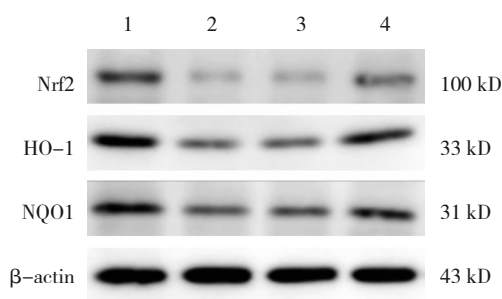
图 2 各组髓核细胞核中的 Nrf2 蛋白条带图

2.3 各组髓核细胞 Nrf2、HO-1 及 NQO1 蛋白相对表达量比较

各组髓核细胞 Nrf2、HO-1 及 NQO1 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-1 β 组较 Control 组降低 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 组较 IL-1 β + oe-NC 组升高 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 3。

表 3 各组髓核细胞的 Nrf2、HO-1 及 NQO1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Nrf2 蛋白	HO-1 蛋白	NQO1 蛋白
Control 组	0.36 \pm 0.06	0.62 \pm 0.08	0.52 \pm 0.06
IL-1 β 组	0.06 \pm 0.07	0.23 \pm 0.09	0.23 \pm 0.08
IL-1 β + oe-NC 组	0.07 \pm 0.06	0.27 \pm 0.07	0.29 \pm 0.05
IL-1 β + oe-GPR30 组	0.25 \pm 0.05	0.54 \pm 0.12	0.48 \pm 0.07
F 值	17.456	13.362	13.849
P 值	0.000	0.002	0.002



1: Control 组; 2: IL-1 β 组; 3: IL-1 β + oe-NC 组; 4: IL-1 β + oe-GPR30 组。

图 3 各组髓核细胞 Nrf2、HO-1 及 NQO1 蛋白条带图

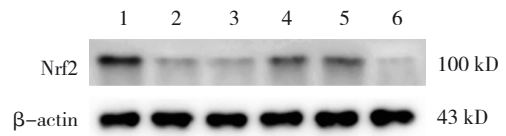
2.4 各组髓核细胞 Nrf2 蛋白相对表达量比较

Control 组、IL-1 β 组、IL-1 β + oe-NC 组、IL-1 β + oe-GPR30 组、IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组、IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组髓核细胞 Nrf2 蛋白相对表达量分别为 (0.40 \pm 0.11)、(0.08 \pm 0.06)、(0.10 \pm 0.04)、

(0.21 ± 0.04)、(0.19 ± 0.07)、(0.04 ± 0.02)比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=12.614, P=0.000$); IL-1 β 组较 Control 组降低 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 组较 IL-1 β + oe-NC 组升高 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组较 IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组降低 ($P < 0.05$)。见图4。

2.5 各组髓核细胞凋亡率比较

Control 组、IL-1 β 组、IL-1 β + oe-NC 组、IL-1 β + oe-GPR30 组、IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组、IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组髓核细胞凋亡率分别为 (5.15 ± 1.74)%、(38.27 ± 3.18)%、(39.19 ± 2.21)%、(25.85 ± 3.63)%、(23.19 ± 2.37)%、(32.16 ± 3.16)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=61.157, P=$



1: Control 组; 2: IL-1 β 组; 3: IL-1 β + oe-NC 组; 4: IL-1 β + oe-GPR30 组; 5: IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组; 6: IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组。

图4 各组髓核细胞 Nrf2 蛋白条带图

0.000), IL-1 β 组较 Control 组升高 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 组较 IL-1 β + oe-NC 组降低 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组较 IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组升高 ($P < 0.05$)。见图5。

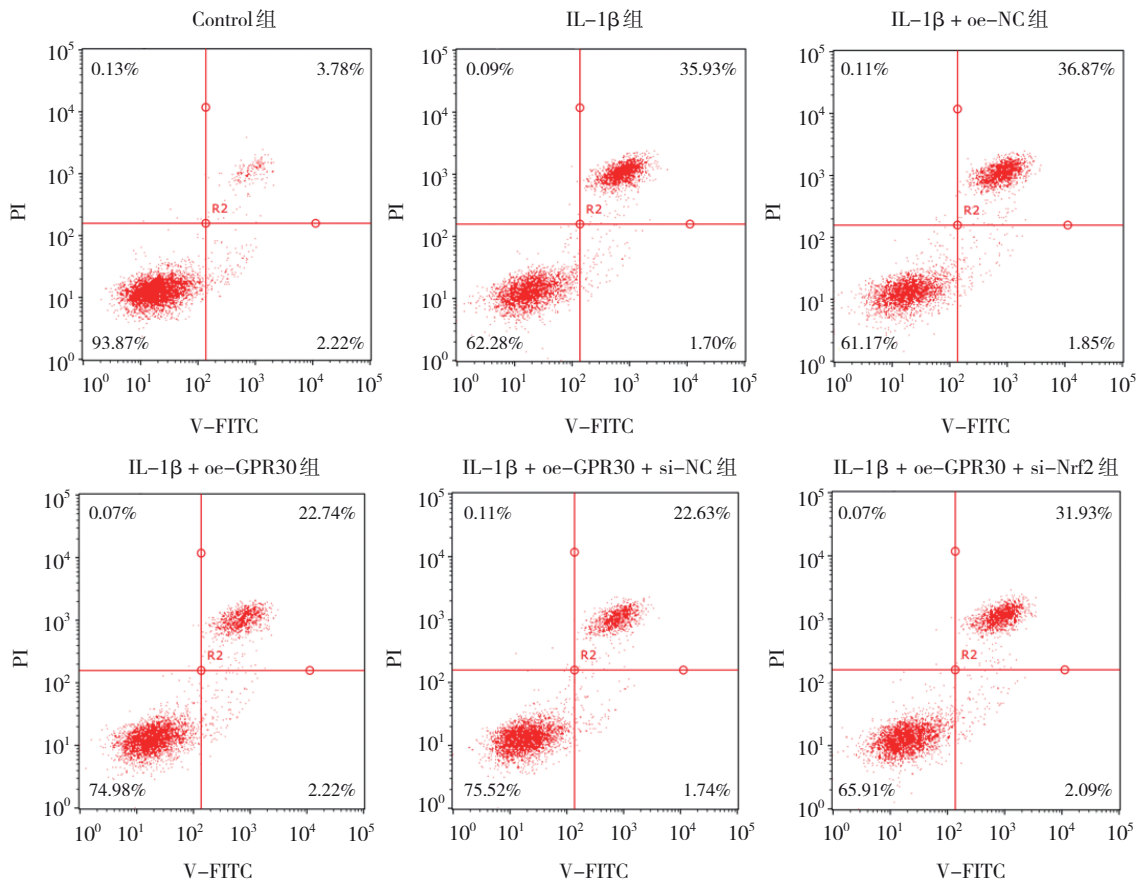


图5 各组髓核细胞流式细胞图

2.6 各组髓核细胞 TNF- α 、IL-6 水平比较

各组髓核细胞 TNF- α 、IL-6 水平比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-1 β 组较 Control 组升高 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 组较 IL-1 β + oe-NC 组降低 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组较 IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组升高 ($P < 0.05$)。见表6。

2.7 各组髓核细胞 ROS、SOD 及 MDA 水平比较

各组髓核细胞 ROS、SOD 及 MDA 水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-1 β 组 ROS、MDA 水平较 Control 组升高, SOD 水平较 Control 组降低 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 组 ROS、MDA 水平较 IL-1 β + oe-NC 组降低, SOD 水平较 IL-1 β +

表 6 各组髓核细胞 TNF- α 、IL-6 水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-6
Control 组	28.82 \pm 8.93	102.68 \pm 17.84
IL-1 β 组	135.20 \pm 24.58	281.72 \pm 51.84
IL-1 β + oe-NC 组	141.32 \pm 37.74	257.49 \pm 41.73
IL-1 β + oe-GPR30 组	73.14 \pm 10.37	133.73 \pm 28.66
IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组	64.71 \pm 12.58	126.81 \pm 35.18
IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组	126.47 \pm 20.42	240.55 \pm 21.36
F 值	13.586	15.023
P 值	0.000	0.000

oe-NC 组升高 ($P < 0.05$), IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组 ROS、MDA 水平较 IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组升高, SOD 水平较 IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组降低 ($P < 0.05$)。见表 7。

表 7 各组髓核细胞 ROS、SOD 及 MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS/ (nmol/L)	SOD/ (u/mL)	MDA/ (nmol/L)
Control 组	43.28 \pm 12.84	28.46 \pm 8.49	4.82 \pm 1.61
IL-1 β 组	250.52 \pm 58.19	9.41 \pm 3.48	15.15 \pm 2.84
IL-1 β + oe-NC 组	264.87 \pm 42.87	10.61 \pm 3.05	16.41 \pm 2.85
IL-1 β + oe-GPR30 组	124.18 \pm 26.58	25.17 \pm 3.46	7.51 \pm 2.16
IL-1 β + oe-GPR30 + si-NC 组	115.41 \pm 31.19	25.37 \pm 2.19	6.48 \pm 1.86
IL-1 β + oe-GPR30 + si-Nrf2 组	217.28 \pm 32.48	12.54 \pm 1.26	13.18 \pm 1.58
F 值	17.223	11.952	14.828
P 值	0.000	0.000	0.000

3 讨论

IL-1 β 处理髓核细胞已被广泛用于体外模拟椎间盘退变的过程^[13]。本研究首先证明 IL-1 β 通过增加大鼠椎间盘髓核细胞凋亡、炎症及氧化应激来诱导髓核细胞损伤。笔者还发现 IL-1 β 抑制髓核细胞中的 GPR30 表达。此外, 笔者将过表达 GPR30 质粒转染入髓核细胞后, 髓核细胞凋亡率下降, 氧化应激损伤及炎症水平被抑制。而干扰 Nrf2 后逆转过表达 GPR30 所抑制的髓核细胞凋亡、氧化应激损伤和炎症水平。总之, 本研究表明 GPR30 可以防止 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡、氧化应激和炎症反应, 其通过调节 Nrf2/ARE 信号通路发挥其功能。

髓核细胞是存在于髓核中的主要细胞类型, 其功能障碍会破坏细胞外基质合成和分解的平衡, 而这对于维持椎间盘的生理功能十分重要^[15]。越来越多的研究证实, 过度的氧化应激和炎症反应在椎间盘退变的病理过程中发挥着关键作用^[15]。IL-1 β 是椎间盘退变的主要危险因素, 被认为通过触发多种促炎介质的释放而导致椎间盘退变并加速其进展^[16]。更重要的是, 受损的髓核细胞会进一步产生与氧化应激和炎症相关的细胞因子, 这可以通过炎症级联反应进一步加剧椎间盘退变的进展^[17]。此外, 在退变椎间盘中广泛检测到过量的 ROS, 这导致脂质过氧化的最终产物 MDA 含量升高, 并导致包括 SOD 在内的重要抗氧化物质水平降低^[18]。

G-1 是一种 GPR30 激动剂, 被发现有改善脊髓损伤诱导的细胞凋亡和增强损伤后运动功能恢复的效果^[19]。更重要的是, GPR30 可减少多种疾病中 ROS 的积累, 以及抑制氧化应激损伤和炎症反应来缓解疾病的进展^[20-21]。与先前研究一致, GPR30 抑制髓核细胞中 ROS 积累, 并抑制 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡、氧化应激和炎症反应。Nrf2/ARE 信号通路是一条经典的抗氧化应激通路, 与椎间盘退变期间的炎症、氧化应激和细胞凋亡密切相关^[22-23]。Nrf2 是个关键的抗氧化调节因子。正常情况下, Nrf2 处于细胞质中, 活性被抑制, 而氧化应激可以增强 Nrf2 活性。激活后的 Nrf2 会转移到细胞核中, 并与小 Maf 蛋白结合形成异二聚体, 该异二聚体与下游的 ARE 相结合, 进而启动 ARE 调控的相关基因, 如 HO-1 和 NQO1 基因的转录^[23]。在本研究中, IL-1 β 诱导髓核细胞氧化应激后, Nrf2 入核蛋白增加, 且 GPR30 进一步促进 Nrf2 入核激活, Nrf2/ARE 信号通路, 随后促进髓核细胞中抗氧化酶 HO-1 和 NQO1 的表达, 对髓核细胞发挥保护作用。

综上所述, 上调 GPR30 表达可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路, 抑制 IL-1 β 诱导的髓核细胞凋亡、炎症和氧化应激。但本研究未探讨 GPR30 在椎间盘退变大鼠体内中的作用及其分子机制, 具有一定局限性。因此, 本研究下一步将探讨 GPR30 在椎间盘退变大鼠体内中的作用及其对 Nrf2/ARE 信号通路的调控作用。

参 考 文 献 :

[1] RAHYUSSALIM A J, ZUFAR M L L, KURNIAWATI T.

- Significance of the association between disc degeneration changes on imaging and low back pain: a review article[J]. *Asian Spine J*, 2020, 14(2): 245-257.
- [2] LIAO Z W, LUO R J, LI G C, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells modulate endoplasmic reticulum stress to protect against nucleus pulposus cell death and ameliorate intervertebral disc degeneration in vivo[J]. *Theranostics*, 2019, 9(14): 4084-4100.
- [3] ZHENG Q Q, SHEN H T, TONG Z R, et al. A thermosensitive, reactive oxygen species-responsive, MR409-encapsulated hydrogel ameliorates disc degeneration in rats by inhibiting the secretory autophagy pathway[J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 147-163.
- [4] XIA C, ZENG Z Y, FANG B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 143: 1-15.
- [5] KIRNAZ S, CAPADONA C, WONG T, et al. Fundamentals of intervertebral disc degeneration[J]. *World Neurosurg*, 2022, 157: 264-273.
- [6] TIAN Y Y, DUAN J Q, CAO Y, et al. Bardoxolone methyl ameliorates compression-induced oxidative stress damage of nucleus pulposus cells and intervertebral disc degeneration ex vivo[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 814040.
- [7] SONG Y X, WANG Z, LIU L, et al. 1,4-Dihydropyridine (DHP) suppresses against oxidative stress in nucleus pulposus via activating sirtuin-1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109592.
- [8] LIU J, YAO R, LU S H, et al. Synergistic effect between LH and estrogen in the acceleration of cumulus expansion via GPR30 and EGFR pathways[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(20): 20801-20816.
- [9] LIU Q, WANG X M, HUA Y, et al. Estrogen deficiency exacerbates intervertebral disc degeneration induced by spinal instability in rats[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2019, 44(9): E510-E519.
- [10] CHEN C, CHEN J Y, TAO X F, et al. Activation of GPR30 with G1 inhibits oscillatory shear stress-induced adhesion of THP-1 monocytes to HAECs by increasing KLF2[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(8): 11942-11953.
- [11] WANG X S, YUE J, HU L N, et al. Activation of G protein-coupled receptor 30 protects neurons by regulating autophagy in astrocytes[J]. *Glia*, 2020, 68(1): 27-43.
- [12] FELIX F B, VAGO J P, FERNANDES D D O, et al. Biochanin a regulates key steps of inflammation resolution in a model of antigen-induced arthritis via GPR30/PKA-Dependent mechanism[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 662308.
- [13] WANG K, CHEN T T, YING X Z, et al. Ligustilide alleviated IL-1 β induced apoptosis and extracellular matrix degradation of nucleus pulposus cells and attenuates intervertebral disc degeneration in vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 398-407.
- [14] 张文捷, 张勇, 史明, 等. 淫羊藿苷调控髓核来源间充质干细胞凋亡修复椎间盘退变[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(24): 3803-3809.
- [15] ZHANG Z, WU J T, TENG C, et al. Orientin downregulating oxidative stress-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction through AMPK/SIRT1 pathway in rat nucleus pulposus cells in vitro and attenuated intervertebral disc degeneration in vivo[J]. *Apoptosis*, 2022, 27(11/12): 1031-1048.
- [16] BAI X L, DING W Y, YANG S D, et al. Higenamine inhibits IL-1 β -induced inflammation in human nucleus pulposus cells[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(6): BSR20190857.
- [17] SLOAN S R Jr, WIPPLINGER C, KIRNAZ S, et al. Combined nucleus pulposus augmentation and annulus fibrosus repair prevents acute intervertebral disc degeneration after discectomy[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(534): eaay2380.
- [18] BAI X L, YAO M Y, ZHU X J, et al. Baicalin suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis, inflammatory response, oxidative stress, and extracellular matrix degradation in human nucleus pulposus cells[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023, 45(4): 433-442.
- [19] CHENG Q, MENG J, WANG X S, et al. G-1 exerts neuroprotective effects through G protein-coupled estrogen receptor 1 following spinal cord injury in mice[J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(4): e00373.
- [20] WANG S C, ZENG M N, LI B K, et al. Raw and salt-processed *Achyranthes bidentata* attenuate LPS-induced acute kidney injury by inhibiting ROS and apoptosis via an estrogen-like pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110403.
- [21] WANG Y, XING Y L, LIU X L, et al. G-protein coupled receptor 30 attenuates myocardial hypertrophy by reducing oxidative stress and apoptosis in ang II-treated mice[J]. *Peptides*, 2022, 157: 170878.
- [22] XIE T, YUAN J, MEI L, et al. Hyperoside ameliorates TNF- α -induced inflammation, ECM degradation and ER stress-mediated apoptosis via the SIRT1/NF- κ B and Nrf2/ARE signaling pathways in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(2): 260.
- [23] LI C, MA X J, NI C F, et al. LncRNA NEAT1 promotes nucleus pulposus cell matrix degradation through regulating Nrf2/ARE axis[J]. *Eur J Med Res*, 2021, 26(1): 11.

(李科 编辑)

本文引用格式: 肖权洲, 卿亚龙, 陈特, 等. GPR30对大鼠椎间盘退行性病变的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(2): 53-59.

Cite this article as: XIAO Q Z, QING Y L, CHEN T, et al. Role of GPR30 in rat intervertebral disc degeneration and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(2): 53-59.