

过载静压下益肾活血通络含药血清对人椎间盘髓核细胞凋亡的影响

肖辉灯¹, 柳根哲¹, 孙旗², 张帆², 祝永刚¹, 刘志超¹, 郭菲宇¹, 康晓乐², 袁巧妹², 邸学士², 龙水文², 陈江²

(1.首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010;2.北京中医药大学东直门医院,北京 100700)

【摘要】 目的:探讨在过载静压应力下益肾活血通络方含药血清对人椎间盘髓核细胞凋亡的影响及其相关机制。方法:将人椎间盘髓核细胞分为3组,空白组无任何干预,模型组和中药血清干预组在体外3 MPa 压应力干预下作用2、4、6 h后,观察椎间盘髓核细胞的形态、生长状况、超微结构的变化及差异;检测椎间盘髓核细胞的凋亡率及髓核细胞内核因子 κ B p65(nuclear factor kappa-B p65, NF- κ B p65), Y染色体中性别决定区相关的高迁移率框9(SRY-related high mobility group-box 9, SOX9), C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP), 基质金属蛋白酶-13(matrix metalloprotein-13, MMP-13)蛋白和相对应基因表达情况。结果:同一作用时间下模型组髓核细胞与空白组比较:体积缩小、胞浆减少、生长状况更差;中药血清干预组髓核细胞较模型组体积稍大,形态保存更完整,胞浆更丰富,生长状况更好。同一作用时间下空白组髓核细胞超微结构完整,主级突起、次级突起结构未见断裂,模型组与中药血清干预组超微结构破坏,主级突起、次级突起可见不同程度断裂,两组超微结构未见明显差异。相同作用时间下模型组髓核细胞凋亡率高于空白组,而中药血清干预组髓核细胞凋亡率低于模型组($P<0.05$);随作用时间增加,空白组、中药血清干预组椎间盘髓核细胞凋亡率未见明显差异,模型组椎间盘髓核细胞凋亡率增加。相同作用时间下,中药血清干预组较模型组NF- κ B p65、CHOP、MMP-13表达减少,SOX9表达增多($P<0.05$);随作用时间的增加,空白组、模型组髓核细胞的NF- κ B p65、CHOP、MMP-13表达增多,SOX9表达减少,且模型组表达程度较空白组大($P<0.05$);通过基因表达总体来看,在相同作用时间下,中药血清干预组髓核细胞基因NF- κ B p65、CHOP、MMP-13相对定量较模型组均减少,而SOX9相对定量增多($P<0.05$);空白组髓核细胞基因NF- κ B p65、CHOP、MMP-13相对定量比模型组减少,而SOX9相对定量增多($P<0.05$);随作用时间的增加,空白组、模型组髓核细胞的NF- κ B p65、CHOP、MMP-13相对定量增多,SOX9相对定量减少($P<0.05$)。结论:益肾活血通络方能减少过载静压下髓核细胞的凋亡,具有延缓髓核细胞退变的作用,其机制可能通过抑制髓核细胞NF- κ B p65信号通路,使CHOP、MMP-13表达减少,SOX9表达增加有关。

【关键词】 中草药; 髓核; 细胞; 过载静压压力; 细胞凋亡

中图分类号:R274.9

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2021.11.012

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Efficacy of *Yishen Huoxue Tongluo* (益肾活血通络) medicated serum on apoptosis of nucleus pulposus cells of human intervertebral disc under overload static pressure XIAO Hui-deng, LIU Gen-zhe, SUN Qi, ZHANG Fan, ZHU Yong-gang, LIU Zhi-chao, GUO Fei-yu, KANG Xiao-le, YUAN Qiao-mei, DI Xue-shi, LONG Shui-wen, and CHEN Jiang*. *Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

ABSTRACT Objective: To explore the efficacy of *Yishen Huoxue Tongluo* (益肾活血通络) decoction containing serum on the apoptosis of human disc nucleus pulposus cells under the overload static pressure stress and its related mechanism. **Methods:** Human nucleus pulposus cells were divided into three groups. The blank group had no intervention. The model group and traditional Chinese medicine serum intervention group were treated with 3 MPa compressive stress in vitro for 2, 4 and 6 hours. The changes and differences of morphology, growth status and ultrastructure of intervertebral disc nucleus pulposus cells were observed. The apoptosis rate of nucleus pulposus cells and nuclear factor kappa-B p65 (NF- κ B p65), SRY-related high mobility group-box 9 (SOX9), C/EBP-homologous protein (CHOP), matrix metalloprotein-13 (MMP-13) and corresponding

基金项目:国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(编号:81603638);中国博士后科学基金面上项目(编号:2019M662791);中央高校基本科研业务费专项资金资助(编号:2018-JYB-XJQ010);北京中医药大学2019年度基本科研项目(编号:2019-JYB-JS-042);北京中医药大学东直门医院青苗人才项目(编号:DZMYS-201702)

Fund program: Youth Science Fund Project of National Natural Science Foundation (No.81603638)

通讯作者:陈江 E-mail:42691631@qq.com

Corresponding author: CHEN Jiang E-mail:42691631@qq.com

gene expression were detected. **Results:** At the same time, compared with the blank group, the nucleus pulposus cells in the model group were smaller in volume, less in cytoplasm and worse in growth; the nucleus pulposus cells in the traditional Chinese medicine serum intervention group were slightly larger in volume, more complete in morphology, richer in cytoplasm and better in growth. Under the same action time, the ultrastructure of nucleus pulposus cells in blank group was complete, and the structures of primary and secondary processes were not broken; and the ultrastructure of model group and traditional Chinese medicine serum intervention group were damaged, the main and secondary processes were broken to varying degrees, and there was no significant difference between the two groups. At the same time, the apoptosis rate of nucleus pulposus cells in model group was higher than that in blank group, while the apoptosis rate of nucleus pulposus cells in the traditional Chinese medicine serum intervention group was lower than that in model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); with the increase of action time, there was no significant difference in the apoptosis rate of nucleus pulposus cells between blank group and traditional Chinese medicine serum intervention group, and the apoptosis rate of nucleus pulposus cells in model group was increased. Compared with model group, the expression of NF- κ B p65, CHOP, MMP-13 were decreased and SOX9 was increased in traditional Chinese medicine serum intervention group at the same time ($P < 0.05$); with the increase of action time, the expression of NF- κ B p65, CHOP and MMP-13 were increased, and the expression of SOX9 was decreased in blank group and model group ($P < 0.05$), and the expression level of model group was higher than that of blank group ($P < 0.05$). Overall observation by gene expression, under the same action time, the relative quantifications of NF- κ B p65, CHOP and MMP-13 in traditional Chinese medicine serum intervention group were lower than that in model group, while SOX9 was increased ($P < 0.05$); compared with model group, the relative quantifications of NF- κ B p65, CHOP and MMP-13 in blank group were decreased ($P < 0.05$), and the relative quantification of SOX9 was increased ($P < 0.05$); with the increase of action time, the relative quantifications of NF- κ B p65, CHOP and MMP-13 of nucleus pulposus cells in blank group and model group were increased and SOX9 was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Yishen Huoxue Tongluo* (益肾活血通络) decoction can reduce the apoptosis of nucleus pulposus cells under overload and static pressure, and has the effect of delaying the degeneration of nucleus pulposus cells. Its mechanism may be related to the decrease of CHOP, MMP-13 expression and the increase of SOX9 expression by inhibiting NF- κ B p65 signal pathway of nucleus pulposus cells.

KEYWORDS Drugs, Chinese herbal; Nucleus pulposus; Cells; Overload static pressure; Apoptosis

椎间盘髓核细胞凋亡是椎间盘退行性疾病发生的重要病理机制之一^[1]。髓核细胞内核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路在椎间盘髓核细胞增殖、凋亡中起着重要的作用^[2-3]。当髓核细胞受到静压应力、氧化应激等因素影响,无活性的 NF- κ B 三聚体发生磷酸化、泛素化,由细胞质转移到细胞核内,无活性状态被激活,p65 亚基上的 DNA 位点被暴露,NF- κ B 与 κ B 序列结合,从而发挥基因转录、蛋白质表达作用。益肾活血通络方具有消补并用、益肾强骨、活血通络的功效,能延缓椎间盘退变进程,但目前尚未探明其确切的疗效作用机制。前期研究发现^[4-6]椎间盘髓核细胞基质代谢及相关炎症因子的释放与静压应力大小、作用时间、药物之间存在“压力-时间-药物”调节轴,长时间异常过载静压可破坏细胞结构及基质分解,引起细胞凋亡。本研究拟通过观察益肾活血通络方含药血清对过载静压下人椎间盘髓核细胞凋亡的影响,探索益肾活血通络方治疗椎间盘退行性疾病可能的作用机制,为治疗椎间盘退行性疾病的提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 实验药物及试剂

NPCM 基础培养基(美国 Sciencell 公司,Cat No: 4801); 双抗 P/S Solution (美国 Sciencell 公司,Cat

No:0503); 胎牛血清(美国 Sciencell 公司,Cat No: 0010); Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒(Beyotime 公司,货号:C1063);NF- κ B p65 多克隆抗体(英国 Abcam 公司,Cat No:ab16502);SOX9 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,Cat No:ab185966);TRUEscript RT MasterMix(北京 Aidlab 公司,货号 PC5802);2 \times SYBR Green qPCR Master Mix(美国 Bimake 公司,货号 B21203);益肾活血通络方临床常用剂量均在《中华人民共和国药典》规定范围内,其组成中药均由北京中医药大学东直门医院药剂科提供。

1.2 主要设备仪器

医用恒温静水压压力罐(柳根哲设计,专利号: ZL201520108857.5,图 1);倒置相差显微镜及成像系统(中国麦克奥迪实业集团有限公司,型号 AE2000);流式细胞仪(美国 Beckman,型号 Cytomics FC500);扫描电子显微镜(日本日立公司,型号 S-3400N);Mini-PROTEAN Tetra Cell 型电泳槽系统,PowerPac universal power supply 型通用电泳仪电源,Trans-blot sp cell 型半干转印槽,ChemiDoc Imaging System 多功能成像系统(美国 Bio-Rad 公司);Western Blot 分析仪(美国 ProteinSimple 公司,Simon);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号 T100);Real-Time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号 CFX Connect)。

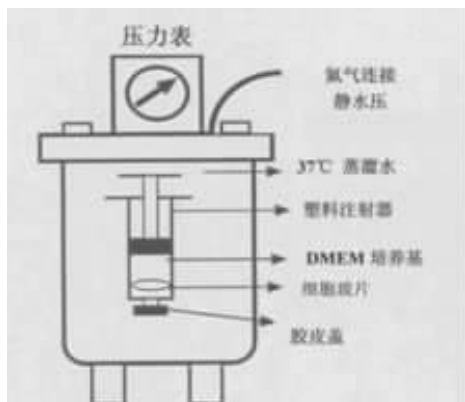


图 1 医用恒温静水压力罐(专利号:ZL201520108857.5)

Fig.1 Medical constant temperature hydrostatic pressure tank (Patent number:ZL201520108857.5)

1.3 实验方法

1.3.1 髓核细胞来源及培养传代 人椎间盘髓核细胞由 Sciencell Research Laboratories 提供, Cat NO: 4800。先将液氮中的椎间盘髓核细胞取出, 立即置于 37℃ 恒温水浴中, 等其完全融化后取出, 并使用移液器将髓核细胞重悬后以 1 000 r/min 离心 5 min, 将上清液丢弃后传代培养椎间盘髓核细胞, 并使用倒置相差显微镜观察椎间盘髓核细胞的形态、生长状况, 当细胞生长面积占据瓶底约 90% 时进行传代, 取第 3 代髓核细胞进行实验。

1.3.2 分组 本研究将第 3 代人椎间盘髓核细胞共分为 3 组(空白组、模型组和中药血清干预组)。空白组: 常压环境, 单纯 DMEM 培养组; 模型组: 3 MPa 静压应力环境, 单纯 DMEM 培养组; 中药血清干预组: 3 MPa 静压应力环境, DMEM+ 中药血清干预。依据 Nachemson^[7] 的经典实验, 已证实人椎间盘内的静压应力随体位和活动量的不同而发生改变: 弯腰搬重物可达 3 MPa。故本实验压力值选择 3 MPa, 另设空白组为常压(1 atm≈0.1 MPa)作为对照。随负荷增加及反复负荷的加载, 椎间盘组织可能发生不可逆性损伤。静压应力作用 4 h, 随压力上升, 分解基因表达大于抗分解基因(合成基因), 总体表现为分解大于合成趋势, 基于此, 压力负荷加载作用 4 h 以上, 椎间盘髓核细胞发生退变, 可保证建模成功。因此, 本实验将静压应力作用时间设定为 2、4、6 h。每个静压应力下分别作用时间 2、4、6 h, 在干预结束后进行有关指标检测并进行分析。

1.3.3 干预措施 将第 3 代髓核细胞铺片连同培养基装入规格为 10 ml 的注射器中, 然后放入体外静压应力加载装置中, 向该加载装置中加入氮气形成压力, 直至压力仪表数值加载至 3 MPa, 另设空白组为常压, 每个静水压下分别作用时间 2、4、

6 h, 并通过智能温控装置使加载装置内环境温度始终在 37℃ 左右。满足加压数值及相应加压时间后, 排空静压压力加载装置中的气体, 在该加载装置内部压力与外界压力相同时(即恢复常压时), 拧开螺帽, 打开加载装置容器盖, 将注射器取出, 并从注射器中把细胞玻片取出后, 使用 PBS 溶液将细胞玻片冲洗 3 遍, 以清除玻片上残留的培养基, 然后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 在显微镜下对髓核细胞的形态及生长状况进行观察。

1.3.4 益肾活血通络方含药血清的制备 益肾活血通络方药物组成: 肉苁蓉 30 g, 杜仲 15 g, 怀牛膝 15 g, 骨碎补 15 g, 川芎 15 g, 全蝎 5 g, 威灵仙 10 g, 鸡血藤 25 g, 地龙 10 g, 当归 15 g, 丹参 15 g, 甘草 10 g 组成, 药材来源于北京中医药大学东直门医院药剂科, 按“兔表面积/人的表面积=兔的给药量/人的给药量”的换算方法, 计算出兔的给药剂量为 0.93 g/(kg·d) 颗粒剂, 为了保证含药量, 尽量调高血清的含药量, 最终兔的给药剂量为 7.44 g/(kg·d) 颗粒剂(原给药剂量的 8 倍)。颗粒药物 180 g 溶于 160 ml 纯水中, 以 7 ml/(kg·d) 灌胃, 连续灌胃 3 d, 最后 1 d 灌胃结束 1 h 后, 耳缘静脉取血, 每只家兔取血 50~60 ml, 4℃ 静置数小时后, 3 500 r/min 离心 15 min, 取血清, 置于 56℃ 环境下灭活 30 min, 过滤分装, -80℃ 保存。

1.4 实验指标检测

1.4.1 髓核细胞形态和生长状况及超微结构的变化 经倒置相差显微镜及扫描电镜观察常压与 3 MPa 静压应力下椎间盘髓核细胞形态、生长状况及超微结构的变化和差异性。

1.4.2 髓核细胞凋亡变化检测 运用 Annexin V-FITC/Propidium Iodide 凋亡试剂盒对椎间盘髓核细胞进行双染检测, 观察并统计髓核细胞的凋亡变化。

1.4.3 Western Blot 法检测髓核细胞 NF-κB 信号通路相关蛋白表达 经组织蛋白提取后应用 BCA 法测定相关蛋白的含量。将蛋白通过凝胶电泳、转膜、孵育及显影曝光成像后记录图像, 以 GAPDH 为内参(GAPDH 即甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 广泛用作 Western Blot 蛋白质标准化的内参), 对比各组组间差异, 进行记录并对结果分析。以髓核细胞内核因子 κB p65(nuclear factor kappa-B, NF-κB p65), C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP), Y 染色体中性性别决定区相关的高迁移率组框(SRY-related high mobility group-box 9, SOX9), MMP-13 特异性抗体标记相关蛋白, 运用 Western Blot 法检测相关蛋白含量的变化。

1.4.4 Real-time PCR 检测相关基因表达 干预髓

核细胞完成后, 取各组髓核细胞样品, Trizol 一步法提取总 RNA, 反转录成 cDNA, 设计合成调控 NF-κB p65、CHOP、SOX9、MMP-13 的特异性 PCR 引物, 并利用 Real-time PCR 技术检测各组髓核细胞中各个基因的表达情况, 对比组间差距, 进行结果分析。PCR 引物序列见表 1。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 其中定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组样本数据若各组符合正态分布, 则采用单因素方差分析, Levene 法检验方差齐性; 若方差齐, 采用 LSD 法进行两两比较; 若方差不齐, 采用 Tamhane 法; 若各组均非正态分布, 则采用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 髓核细胞形态和生长状况及超微结构的变化

2.1.1 髓核细胞形态和生长状况 随作用时间增加, 3 组髓核细胞形态、突起未表现出明显差异。同一作用时间下, 模型组髓核细胞体积较空白组缩小; 模型组髓核细胞形态多呈不规则形、长梭形, 胞浆减少, 空白组髓核细胞形态多呈短梭形、多角形、类圆

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 PCR primer sequence

基因名称	引物序列
NF-κB p65	F: 5'-ATAGGAAGAGCAGCGTGGGA-3' R: 5'-GATCTTGAGCTCGGCAGTGT-3'
CHOP	F: 5'-GGAAACAGACTGGTCATTCCC-3' R: 5'-CTGCTTGAGCCGTTTCACTTC-3'
SOX9	F: 5'-GACTTCTGAACGAGAGCCGAGA-3' R: 5'-CGTCTTCACCGACTTCCTCC-3'
MMP-13	F: 5'-TGTGCCATTTGTGGTGTG-3' R: 5'-ACTATGCCTGGCTGGAAC-3'

形, 胞浆丰富, 生长状况更好; 中药血清干预组髓核细胞较模型组体积稍大, 形态保存更完整, 胞浆更丰富, 生长状况更好。见图 2-4。

2.1.2 髓核细胞超微结构的变化 相同作用时间下, 空白组髓核细胞超微结构完整, 主级突起、次级突起结构未见断裂, 模型组与中药血清干预组超微结构破坏, 主级突起、次级突起可见不同程度断裂, 两组超微结构未见明显差异; 随作用时间延长, 3 组髓核细胞超微结构未表现出明显差异。见图 5-7。

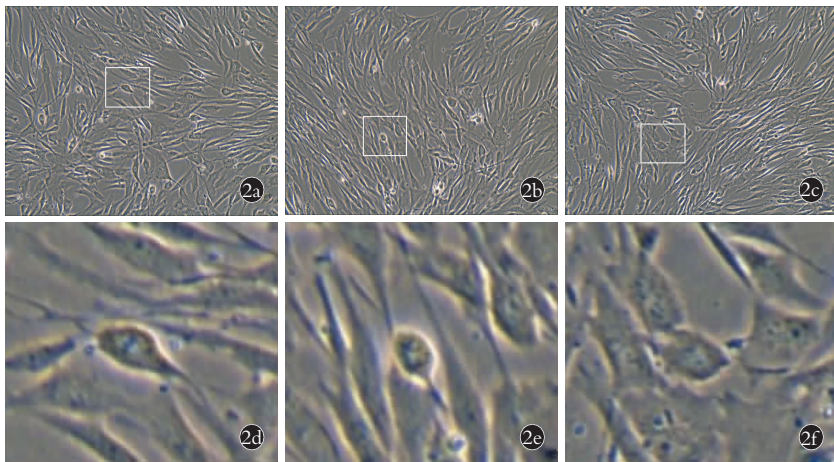


图 2 倒置相差显微镜下空白组髓核细胞形态及生长变化 2a, 2b, 2c. 静压应力下的作用时间分别为 2、4、6 h (倒置相差显微镜×100) 2d, 2e, 2f. 静压应力下的作用时间分别为 2、4、6 h (倒置相差显微镜×400)

Fig.2 Morphological and growth changes of nucleus pulposus cells in blank group under inverted phase contrast microscope 2a, 2b, 2c. The action time under static pressure was 2, 4 and 6 h respectively, and the inverted phase contrast microscope was 100 times 2d, 2e, 2f. The action time under static pressure was 2, 4 and 6 h respectively, and the inverted phase contrast microscope was 400 times

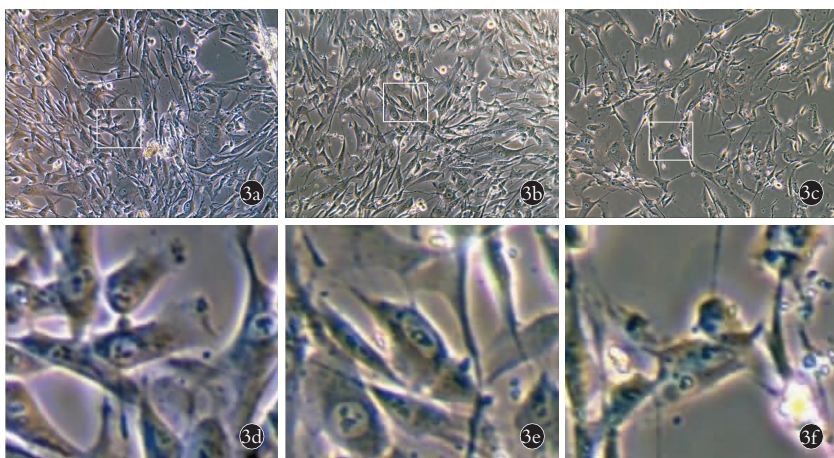


图 3 倒置相差显微镜下模型组髓核细胞形态及生长变化 3a, 3b, 3c. 静压应力下的作用时间分别为 2、4、6 h (倒置相差显微镜×100) 3d, 3e, 3f. 静压应力下的作用时间分别为 2、4、6 h (倒置相差显微镜×400)

Fig.3 Morphological and growth changes of nucleus pulposus cells in model group under inverted phase contrast microscope 3a, 3b, 3c. The operating time under static pressure was 2, 4 and 6 h, and the inverted phase contrast microscope was 100 times 3d, 3e, 3f. The operating time under static pressure was 2, 4 and 6 h, and the inverted phase contrast microscope was 400 times

2.2 Annexin V-FITC/Propidium Iodide 凋亡试剂盒检测髓核细胞凋亡率

随着作用时间的增加,空白组、中药血清干预组椎间盘髓核细胞凋亡率未见明显差异,模型组椎间盘髓核细胞凋亡率增加。相同作用时间下,模型组髓核细胞凋亡率高于空白组,而中药血清干预组髓核细胞凋亡率低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 8,表 2。

2.3 Western Blot 法检测髓核细胞 NF-κB 信号通路相关蛋白表达情况

随着作用时间的增加,空白组、模型组髓核细胞的 NF-κB p65、CHOP、MMP-13 表达增多,SOX9 表达减少,且模型组表达程度较空白组大 ($P < 0.05$);相同作用时间下,中药血清干预组较模型组 NF-κB

表 2 静压应力下不同作用时间各组髓核细胞凋亡率变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 The changes of apoptosis rate of nucleus pulposus cells in three groups under static pressure for different action times ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	2 h	4 h	6 h
空白组	3	20.1±0.2 [#]	21.3±0.4 [#]	19.2±0.2 [#]
模型组	3	21±0.4	22.3±0.2	25.7±0.1
中药血清干预组	3	17.1±0.2 [*]	16.7±0.1 [*]	17.1±0.1 [*]

注:与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{*} $P < 0.05$

Note: Compared with model group,[#] $P < 0.05$,^{*} $P < 0.05$

p65、CHOP、MMP-13 表达减少,SOX9 表达增多 ($P < 0.05$)。见图 9,表 3。

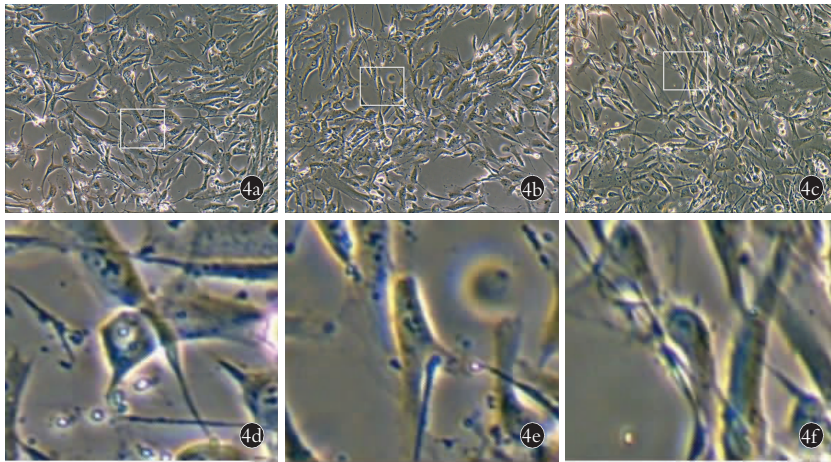


图 4 倒置相差显微镜下中药血清干预组髓核细胞形态及生长变化 4a,4b,4c. 静压应力下的作用时间分别为 2、4、6 h(倒置相差显微镜×100) 4d,4e,4f. 静压应力下的作用时间分别为 2、4、6 h(倒置相差显微镜×400)

Fig.4 Morphological and growth changes of nucleus pulposus cells in traditional Chinese medicine serum intervention group under inverted phase contrast microscope 4a,4b,4c. The action time under static pressure was 2,4 and 6 h respectively, and the inverted phase contrast microscope was 100 times 4d,4e,4f. The action time under static pressure was 2,4 and 6 h respectively, and the inverted phase contrast microscope was 400 times

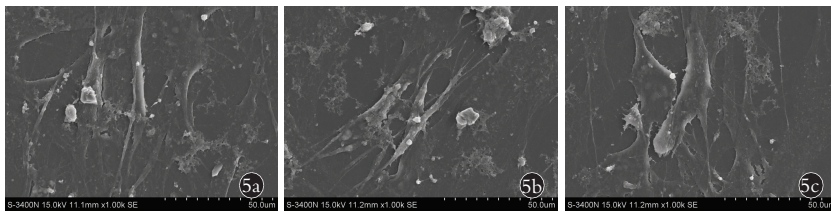


图 5 静压应力下不同作用时间空白组髓核细胞超微结构的变化(扫描电镜×1 000) 5a,5b,5c. 作用时间分别为 2、4、6 h

Fig.5 The ultrastructural changes of nucleus pulposus cells in blank group (scanning electron microscope×1 000) 5a,5b,5c. The action times under static pressure were 2,4 and 6 h respectively

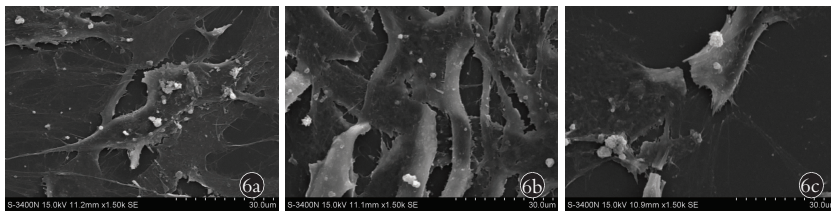


图 6 静压应力下不同作用时间模型组髓核细胞超微结构的变化(扫描电镜×1 500) 6a,6b,6c. 作用时间分别为 2、4、6 h

Fig.6 The ultrastructural changes of nucleus pulposus cells in model group (scanning electron microscope×1 500) 6a,6b,6c. The action times under static pressure were 2,4 and 6 h respectively

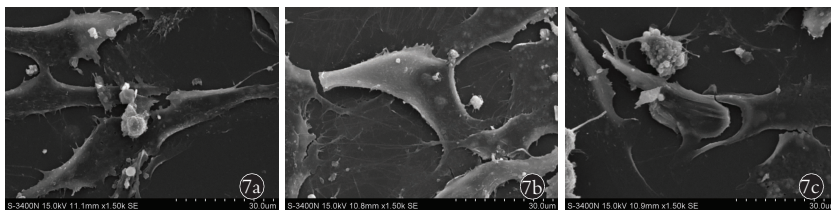


图 7 静压应力下不同作用时间中药血清干预组髓核细胞超微结构的变化(扫描电镜×1 500) 7a,7b,7c. 作用时间分别为 2、4、6 h

Fig.7 The ultrastructural changes of nucleus pulposus cells in traditional Chinese medicine serum intervention group (scanning electron microscope×1 500) 7a,7b,7c. The action times under static pressure were 2,4 and 6 h respectively

2.4 Real-time PCR 检测相关基因表达

通过基因表达总体来看,在相同作用时间下,中药血清干预组髓核细胞基因 NF- κ B、CHOP、MMP-13 相对定量较模型组均减少,而 SOX9 相对定量增多 ($P<0.05$);空白组髓核细胞基因 NF- κ B、CHOP、MMP-13 相对定量比模型组减少,而 SOX9 相对定

量增多 ($P<0.05$);随作用时间的增加,空白组、模型组髓核细胞的 NF- κ B p65、CHOP、MMP-13 相对定量增多,SOX9 相对定量减少 ($P<0.05$)。见表 4,5。

3 讨论

诸多因素均与椎间盘退变密切相关,其中应力为重要因素之一,有关文献提到应力包括静压应力、

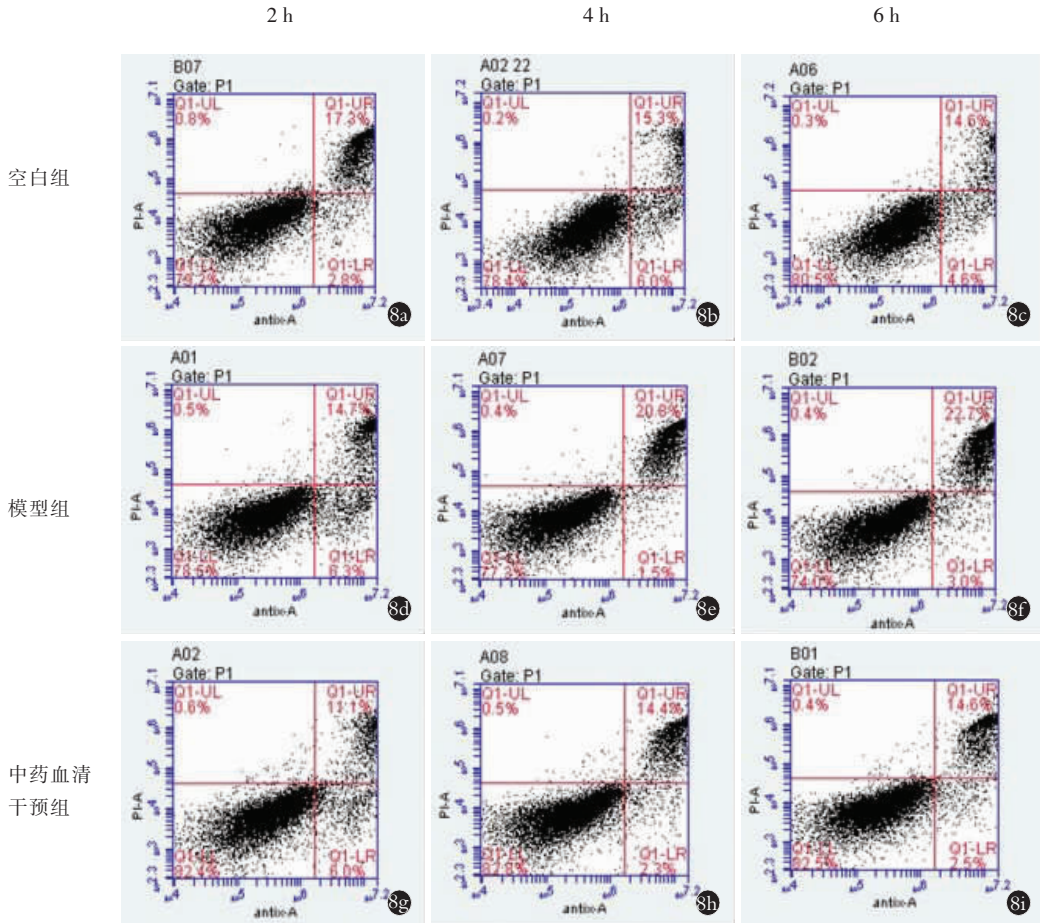


图 8 静压应力下各组在不同作用时间 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测的髓核细胞凋亡率 8a,8b,8c. 作用时间分别为 2,4,6 h 空白组的髓核细胞凋亡率 8d,8e,8f. 作用时间分别为 2,4,6 h 模型组的髓核细胞凋亡率 8g,8h,8i. 作用时间分别为 2,4,6 h 中药血清干预组的髓核细胞凋亡率

Fig.8 The apoptosis rate of nucleus pulposus cells in each group detected by Annexin V-FITC/PI apoptosis kit in different action times under static pressure 8a,8b,8c. The apoptosis rate of nucleus pulposus cells of blank group in action time of 2,4,6 h respectively 8d,8e,8f. The apoptosis rate of nucleus pulposus cells of model group in action time of 2,4,6 h respectively 8g,8h,8i. The apoptosis rate of nucleus pulposus cells of traditional Chinese medicine serum intervention group in action time of 2,4,6 h respectively

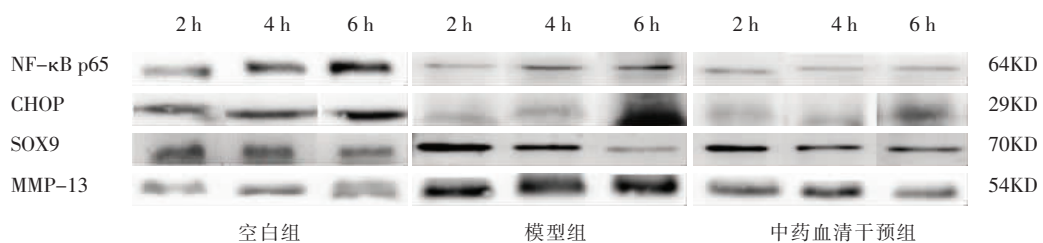


图 9 静压应力下的作用时间分别为 2,4,6 h 各组髓核细胞 NF- κ B p65、CHOP、SOX9、MMP-13 表达情况(KD:千道尔顿,氨基酸分子量单位) Fig.9 The expressions of NF- κ B p65,CHOP,SOX9 and MMP-13 in nucleus pulposus cells in three groups under static pressure for action time of 2,4,6 hours(KD:kilodalton,molecular weight unit of amino acid)

渗透压应力、压缩应力及剪切应力等。其中,椎间盘髓核细胞主要受静压应力及压缩应力的作用^[8]。有关研究表明,当异常过载的压力加载到椎间盘上时,椎间盘会发生形变,导致椎间盘组织内的水分减少,进而椎间盘细胞外基质分解速度加快,椎间盘内环境倾向于恶化,从而促进椎间盘退变^[9-10]。本研究实验结果表明,倒置相差显微镜下观察模型组髓核细胞体积较空白组缩小、胞浆减少,而空白组髓核细胞形态完整,胞浆丰富,生长状况良好;扫描电镜下空白组髓核细胞超微结构完整,模型组主级突起、次

级突起可见不同程度断裂;模型组髓核细胞凋亡率高于空白组;这些结果同国内外学者的研究结果一致^[11-13],相关研究均表明静压应力因素对于椎间盘组织的发育成熟及退变进程具有重要的相关性,对椎间盘髓核细胞的体积、胞浆、生长状况、超微结构、凋亡和基质代谢发挥着重要的作用。

椎间盘髓核细胞凋亡是椎间盘退行性疾病发生的重要病理机制之一,腰椎间盘退变性疾病主要临床表现为腰痛,从中医角度分析,不通则痛,不荣则痛,而腰部疼痛与肾关系密切,故治腰痛,益肾为治

表 3 静压应力下的不同作用时间各组髓核细胞 NF-κB p65、CHOP、SOX9、MMP-13 表达 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 The expressions of NF-κB p65, CHOP, SOX9 and MMP-13 in nucleus pulposus cells of three groups in different action times under static pressure ($\bar{x}\pm s$)

项目	空白组 (n=3)			模型组 (n=3)			中药血清干预组 (n=3)		
	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
NF-κB p65	0.62±0.12 [#]	0.73±0.08 [#]	0.90±0.05 [#]	0.50±0.09	0.60±0.10	0.70±0.09	0.50±0.07 [*]	0.48±0.06 [*]	0.45±0.05 [*]
CHOP	0.68±0.13 [#]	0.70±0.16 [#]	0.80±0.21 [#]	0.40±0.07	0.50±0.08	0.80±0.22	0.46±0.06 [*]	0.52±0.07 [*]	0.69±0.17 [*]
SOX9	0.73±0.23 [#]	0.70±0.24 [#]	0.68±0.18 [#]	1.10±0.05	1.04±0.04	0.50±0.10	1.06±0.21 [*]	0.90±0.18 [*]	0.90±0.16 [*]
MMP-13	0.40±0.04 [#]	0.60±0.13 [#]	0.58±0.17 [#]	1.08±0.07	0.98±0.08	1.03±0.12	0.69±0.08 [*]	0.70±0.09 [*]	0.62±0.12 [*]

注:与模型组同期比较,[#]P<0.05,^{*}P<0.05

Note: Compared with model group at the same time, [#]P<0.05, ^{*}P<0.05

表 4 静压应力下的不同作用时间各组髓核细胞 NF-κB p65、CHOP、SOX9、MMP-13 基因 CT 值 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 The CT values of NF-κB p65, CHOP, SOX9 and MMP-13 genes of three groups in different action times under static pressure ($\bar{x}\pm s$)

项目	空白组 (n=3)			模型组 (n=3)			中药血清干预组 (n=3)		
	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
NF-κB p65	22.02±0.10 [#]	23.28±0.06 [#]	22.42±0.04 [#]	33.96±0.10	35.24±0.10	34.29±0.09	32.76±0.08 [*]	37.29±0.05 [*]	32.12±0.05 [*]
CHOP	32.06±0.10 [#]	32.78±0.13 [#]	31.16±0.20 [#]	45.40±0.06	33.91±0.07	43.40±0.14	41.67±0.08 [*]	35.68±0.06 [*]	44.28±0.12 [*]
SOX9	24.41±0.20 [#]	24.69±0.17 [#]	25.34±0.14 [#]	31.40±0.07	34.01±0.08	32.17±0.14	31.68±0.20 [*]	35.72±0.14 [*]	33.29±0.15 [*]
MMP-13	32.59±0.06 [#]	32.17±0.10 [#]	32.35±0.12 [#]	33.39±0.10	33.69±0.12	33.90±0.07	33.29±0.05 [*]	33.81±0.08 [*]	33.90±0.10 [*]

注:与模型组同期比较,[#]P<0.05,^{*}P<0.05

Note: Compared with model group at the same time, [#]P<0.05, ^{*}P<0.05

表 5 静压应力下不同作用时间各组髓核细胞 NF-κB p65、CHOP、SOX9、MMP-13 基因的相对定量表达 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 The relative quantitative expression of NF-κB p65, CHOP, SOX9 and MMP-13 in nucleus pulposus cells of three groups in different action times under static pressure ($\bar{x}\pm s$)

项目	空白组 (n=3)			模型组 (n=3)			中药血清干预组 (n=3)		
	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
NF-κB p65	0.84±0.14 [#]	5.22±0.15 [#]	5.54±0.09 [#]	0.74±0.07	8.45±0.14	5.72±0.12	0.16±0.13 [*]	5.52±0.07 [*]	1.1±0.09 [*]
CHOP	1.15±0.23 [#]	0.48±0.17 [#]	0.52±0.08 [#]	1.68±0.14	0.38±0.12	0.29±0.17	0.23±0.12 [*]	0.36±0.22 [*]	0.37±0.18 [*]
SOX9	1.34±0.15 [#]	2.79±0.18 [#]	0.97±0.27 [#]	0.55±0.09	2.65±0.17	1.41±0.10	4.80±0.17 [*]	2.18±0.16 [*]	1.53±0.10 [*]
MMP-13	0.30±0.16 [#]	0.59±0.11 [#]	0.30±0.17 [#]	0.56±0.12	1.32±0.10	1.71±0.05	0.63±0.15 [*]	0.33±0.05 [*]	0.40±0.09 [*]

注:与模型组同期比较,[#]P<0.05,^{*}P<0.05

Note: Compared with model group at the same time, [#]P<0.05, ^{*}P<0.05

本,舒邪为指标,标本兼顾,而以补肾为先,兼以活血通络。用药根本是补肾,核心是活血,关键是通络。益肾活血通络方具有消补兼顾、补不壅滞、攻不伤正的治法特点,方以肉苁蓉、杜仲、怀牛膝、骨碎补益肾强骨,川芎、全蝎、威灵仙、鸡血藤、地龙、当归、丹参活血通络,同时补而不滞。现代药理学研究,肉苁蓉等益肾类中药具有提高免疫、促进创伤愈合等药用功效^[14],地龙、丹参等药物具有促进修复、改善血液流变、抗凋亡的作用^[15-16]。

椎间盘的退变机制复杂,目前大多数学者认为其主要病理变化为椎间盘髓核细胞的减少和细胞外基质分解。基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein, MMPs)具有分解细胞外基质中所有成分的能力^[17]。其中 MMP-13 对 II 型胶原(椎间盘组织主要成分)的分解是 MMPs 家族中功能最强大的。CHOP 作为凋亡调节子之一,在导致髓核细胞凋亡、促进椎间盘退变中具有重要作用。而 SOX9 则参与椎间盘细胞的分化增殖、分泌功能、凋亡等过程,调控椎间盘的退变进程。目前相关研究已证实 MMPs、CHOP、SOX9 与椎间盘退行性变的发生及发展密切相关^[18-19]。有关文献记载 MMPs、CHOP 的表达与活性水平与椎间盘退变严重程度呈正相关趋势^[20]。而 SOX9 表达降低,则提示着椎间盘退变程度的加重,两者呈负相关趋势^[21]。本研究通过益肾活血通络方干预异常过载静压应力下的椎间盘髓核细胞,表明中药含药血清对髓核细胞形态、超微结构有保护作用,且能降低髓核细胞凋亡率。且通过 Western Blot 法和 Real-time PCR 表达总体来看,中药血清干预组髓核细胞与模型组比较发现,NF- κ B p65、CHOP、MMP-13 表达减少,而 SOX9 表达增多,表明加入中药含药血清虽不能逆转椎间盘退变过程,但明显延缓了其进程,其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路的表达相关。这些结果与有关学者的研究结果一致^[22-23]。

通过对实验结果的分析可以看出椎间盘髓核细胞对静压应力反应灵敏。实验中所采用医用静水压压力罐能精准控制髓核细胞所设定的静压应力大小及作用时间,且该装置操作方便、安全,加压过程中能维持环境中低氧、恒温(37℃)、药物浓度等重要因素。但是,该系统仍有不足之处,如人体运动过程中椎间盘所受的剪切应力、拉伸应力等该系统不能实现;实验所采用的单层培养细胞代谢活性会降低;而这些因素又与椎间盘组织代谢密切相关,这也说明需要对装置不断升级改进,构建更接近生理状态的椎间盘退变模型,对未来尽可能模拟髓核细胞在人体内状态提供技术上的支持,同时使实验数据可靠性大大提高,必要时构建相关动物模型完成体内实验。

综上,中药益肾活血通络方可能通过抑制 NF- κ B 信号通路,从而延缓椎间盘退变。其作用主要在具有延缓椎间盘核心结构——髓核组织细胞退变的效果,其机制主要表现在其可以保持更好的细胞形态、结构,良好的生长状况,同时可以降低过载静压下髓核细胞的凋亡率,减少髓核细胞胞外基质分解,这对于延缓椎间盘退变具有一定的意义。益肾活血通络方中药可改善人椎间盘髓核组织细胞自身功能及调节胞外基质功能状态,从而起到延缓椎间盘退变的效果,但因人体细胞因子表达变化和细胞因子具体信号传导通路的复杂性,其确切的疗效机制需要在今后的研究中进一步深入挖掘,以便于为中医药治疗椎间盘退变性疾病提供更多的科学证据。

参考文献

- [1] Xi YM, Ma JF, Chen Y. PTEN promotes intervertebral disc degeneration by regulating nucleus pulposus cell behaviors[J]. Cell Biology Intern, 2020, 44(2): 583-592.
- [2] 陈江,肖辉灯,孙旗,等. 人椎间盘髓核细胞增殖活性与益肾活血通络方的干预调控[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(8): 1200-1206.
CHEN J, XIAO HD, SUN Q, et al. Effect of *Yishen Huoxue Tongluo* recipe on proliferation of human nucleus pulposus cells[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2020, 24(8): 1200-1206. Chinese.
- [3] Annemann M, Plaza-Sirvent C, Schuster M, et al. Atypical I κ B proteins in immune cell differentiation and function[J]. Immunol Lett, 2016, 171: 26-35.
- [4] 陈江,贾育松,柳根哲,等. 体外静水压环境下细胞因子诱导骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(2): 191-196.
CHEN J, JIA YS, LIU GZ, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus like cells induced by cytokines under hydrostatic pressure in vitro[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2016, 20(2): 191-196. Chinese.
- [5] 陈江,刘志超,张帆,等. 身痛逐瘀汤对人髓核细胞模型 PI3K/Akt 信号通路 Bad、Caspase-9、GSK-3 β 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(9): 48-54.
CHEN J, LIU ZC, ZHANG F, et al. Effect of *Shentong Zhuyu* decoction on the expression of bad, caspase-9 and GSK-3 β in PI3K/Akt signaling pathway of human nucleus pulposus cell model[J]. Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi, 2019, 26(9): 48-54. Chinese.
- [6] 刘志超,祝永刚,肖辉灯,等. 益气活血方对静水压下兔椎间盘软骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 环球中医药, 2019, 12(10): 1470-1475.
LIU ZC, ZHU YG, XIAO HD, et al. Effect of *Yiqi Huoxue* recipe on Wnt/ β -catenin signaling pathway of rabbit intervertebral disc chondrocytes under hydrostatic pressure[J]. Huan Qiu Zhong Yi Yao, 2019, 12(10): 1470-1475. Chinese.
- [7] Nachemson AL. Disc pressure measurements[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1981, 6(1): 93-97.
- [8] 赵学千,陈江,贾育松,等. 应力对椎间盘不同结构的影响及机制研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(3): 82-85.
ZHAO XQ, CHEN J, JIA YS, et al. Effect of stress on different structures of intervertebral disc and its mechanism[J]. Zhongguo Zhong

- Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 2019, 27(3):82-85. Chinese.
- [9] 陈李培. 离体椎间盘模型中压应力对髓核组织的生物效应及促退变机制的研究[D]. 上海: 第三军医大学, 2017.
CHEN LP. Biological effect of middle pressure stress on nucleus pulposus tissue in vitro model of intervertebral disc and its mechanism of accelerating degeneration[D]. Third Military Medical University, 2017. Chinese.
- [10] Bridgen DT, Fearing BV, Jing L, et al. Regulation of human nucleus pulposus cells by peptide-coupled substrates[J]. Acta Biomater, 2017, 55:100-108.
- [11] 陈江, 柳根哲, 徐林, 等. 静水压对椎间盘髓核细胞形态及基质表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(13):2281-2286.
CHEN J, LIU GZ, XU L, et al. Effects of hydrostatic pressure on morphology and matrix expression of nucleus pulposus cells in human intervertebral disc[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2012, 16(13):2281-2286. Chinese.
- [12] 柳根哲, 孙旗, 陈江, 等. 高静水压下益气活血汤通过 p38MAPK 信号通路对兔椎体终板软骨细胞的调控作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(10):1027-1030, 1034.
LIU GZ, SUN Q, CHEN J, et al. Regulation of *Yiqi Huoxue* decoction on rabbit vertebral endplate chondrocytes through p38MAPK signal pathway under high hydrostatic pressure[J]. Xian Dai Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2018, 27(10):1027-1030, 1034. Chinese.
- [13] Hirata H, Yurube T, Kakutani K, et al. A rat tail temporary static compression model reproduces different stages of intervertebral disc degeneration with decreased notochordal cell phenotype[J]. J Orthop Res, 2014, 32(3):455-463.
- [14] 星学军, 刁治民, 许正泽. 药用植物肉苁蓉生物学特性及应用价值[J]. 青海草业, 2018, 27(2):17-20, 29.
XING XJ, DIAO ZM, XU ZZ. Biological characteristics and application value of *Cistanche deserticola*[J]. Qi Hai Cao Ye, 2018, 27(2):17-20, 29. Chinese.
- [15] 黄敬文, 高宏伟, 段剑飞. 地龙的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2018, 24(12):104-107.
HUANG JW, GAO HW, DUAN JF. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of earthworm[J]. Zhong Yi Yao Dao Bao, 2018, 24(12):104-107. Chinese.
- [16] 王梦梦, 吉兰芳, 崔树娜. 丹参功效的物质基础研究进展[J]. 中医学报, 2019, 34(5):944-949.
WANG MM, JI LF, CUI SN. Research progress on material basis of *salvia miltiorrhiza*[J]. Zhong Yi Xue Bao, 2019, 34(5):944-949. Chinese.
- [17] 叶雨辰, 张长春, 朱坤. 基质金属蛋白酶 3 在椎间盘退变中的作用[J]. 安徽医学, 2017, 38(5):661-664.
YE YC, ZHANG CC, ZHU K. Role of matrix metalloproteinase-3 in intervertebral disc degeneration[J]. An Hui Yi Xue, 2017, 38(5):661-664. Chinese.
- [18] Wen KC, Xiao HY, Wei Y, et al. lncRNAs: novel players in intervertebral disc degeneration and osteoarthritis[J]. Cell Prolif, 2017, 50(1):1365-2184.
- [19] 梁鹤, 董双海, 夏天, 等. NF- κ B 信号通路的激活与椎间盘退变的关系[J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(5):458-462.
LIANG H, DONG SH, XIA T, et al. Relationship between activation of NF- κ B signaling pathway and intervertebral disc degeneration[J]. Zhongguo Jiao Xing Wai Ke Za Zhi, 2015, 23(5):458-462. Chinese.
- [20] Weber KT, Alipui DO, Sison CP, et al. Serum levels of the proinflammatory cytokine interleukin-6 vary based on diagnoses in individuals with lumbar intervertebral disc diseases[J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18(1):3.
- [21] 方建波. I 型胶原、II 型胶原、SOX9、TGF- β 1、BMP-2、TIMP-1、HIF-2 与椎间盘退变的相关性研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2015.
FANG JB. Correlation between type I collagen, type II collagen, SOX9, TGF- β 1, BMP-2, TIMP-1, HIF-2 and intervertebral disc degeneration[D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2015. Chinese.
- [22] Chen J, Liu GZ, Sun Q, et al. Protective effects of ginsenoside Rg3 on TNF- α -induced human nucleus pulposus cells through inhibiting NF- κ B signaling pathway[J]. Life Sci, 2019, 216:1-9.
- [23] 刘宗超, 蒋燕, 黄陈翼, 等. 独活寄生汤延缓人椎间盘髓核细胞退变机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(13):2764-2769.
LIU ZC, JIANG Y, HUANG CY, et al. Mechanism of *Duhuojisheng* decoction on delaying degeneration of nucleus pulposus cells in human intervertebral disc[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2018, 43(13):2764-2769. Chinese.

(收稿日期:2020-09-16 本文编辑:王宏)