

益气活血方对大鼠腰椎间盘突出突出的影响及机制^Δ

白雪^{1,2*}, 孙孝先², 郭杨², 马勇^{1,2}, 刘孟敏¹, 姜宏³, 林顺³, 曹瑞⁴, 袁永丰⁵, 刘锦涛^{3#}(1. 南京中医药大学中西医结合学院, 南京 210023; 2. 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室, 南京 210023; 3. 南京中医药大学附属苏州市中医院骨伤科, 江苏苏州 215008; 4. 泰州市姜堰中医院脊柱骨伤科, 江苏泰州 225300; 5. 南京中医药大学附属医院放射科, 南京 210023)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)10-1186-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.10.06



摘要 目的 探讨益气活血方(YQHX)对大鼠腰椎间盘突出突出的影响及机制。方法 大鼠随机分为假手术组、模型组、核因子κB(NF-κB)抑制剂组(QNZ组, 1 mg/kg)、YQHX组(9.1 g/kg)及联合组(YQHX+QNZ组, 剂量同各单药组), 每组10只。除假手术组外, 其余各组大鼠建立腰椎间盘突出模型, 各给药组大鼠腹腔注射QNZ和/或灌胃YQHX, 每天给药1次, 连续8周。评估各组大鼠椎间盘突出严重程度, 观察椎间盘组织形态学变化、髓核细胞自噬变化, 检测血清中肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平、椎间盘组织中B细胞淋巴瘤2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(BNIP3)、苺氯素1(Beclin-1)阳性细胞百分比, 核因子κB(NF-κB) p65磷酸化水平, 肿瘤坏死因子受体相关因子2(TRAF-2)、TRAF-3、BNIP3、微管相关蛋白轻链3B(LC3B)蛋白表达水平, 以及NF-κB p65、LC3B、p62、BNIP3及Beclin-1 mRNA表达水平。结果 与模型组比较, YQHX组大鼠椎间盘Pfirrmann分级评分显著降低, 病理损伤减轻; 髓核细胞自噬小体数量增加; 血清中TNF-α水平和椎间盘组织中p62 mRNA表达水平均显著降低; 椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比, NF-κB p65磷酸化水平, TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B蛋白表达水平, NF-κB p65、LC3B、BNIP3、Beclin-1 mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$)。加入QNZ可部分逆转YQHX组上述指标的变化。结论 YQHX可能通过激活NF-κB信号通路促进大鼠椎间盘自噬水平升高, 减轻炎症反应, 延缓腰椎间盘突出进展。

关键词 腰椎间盘突出; 炎症反应; NF-κB信号通路; 自噬

Effects and mechanism of Yiqi huoxue decoction on lumbar disc herniation in rats

BAI Xue^{1,2}, SUN Xiaoxian², GUO Yang², MA Yong^{1,2}, LIU Mengmin¹, JIANG Hong³, LIN Shun³, CAO Rui⁴, YUAN Yongfeng⁵, LIU Jintao³ (1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Laboratory of New Techniques of Restoration & Reconstruction of Orthopedics and Traumatology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Dept. of Orthopedics and Traumatology, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Suzhou 215008, China; 4. Dept. of Spinal Orthopedics, Taizhou Jiangyan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Taizhou 225300, China; 5. Dept. of Radiology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects and mechanism of Yiqi huoxue decoction (YQHX) on lumbar disc herniation in rats. **METHODS** Rats were randomly divided into sham operation group, model group, NF-κB inhibitor group (QNZ group, 1 mg/kg), YQHX group (9.1 g/kg) and combination group (YQHX+QNZ group, the same dose as each single drug group), with 10 rats in each group. Except for sham operation group, lumbar disc herniation model of rats was induced in other groups; administration groups were given QNZ intraperitoneally or/and YQHX intragastrically, once a day, for 8 consecutive weeks. The severity of intervertebral disc herniation was evaluated in each group; the pathological changes of intervertebral discs and the changes of autophagy of nucleus pulposus cells were all observed; the level of tumor necrosis factor-α (TNF-α) in serum, and the ratios of Bcl-2/adenovirus E1B interacting protein 3 (BNIP3) and Beclin-1 positive cells in intervertebral disc tissues were detected; the phosphorylation of nuclear factor-κB (NF-κB) p65, the expressions of tumor necrosis factor receptor-associated factor-2 (TRAF-2), TRAF-3, BNIP3 and LC3B protein, and mRNA expressions of NF-κB p65, LC3B, p62, BNIP3 and Beclin-1 were determined. **RESULTS** Compared with model group, Pfirrmann grading score decreased significantly,

Δ 基金项目 国家自然科学基金面上项目(No. 82074467, No. 82374220); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(No. 国中医药人教函[2023]85号); 江苏省中医药领军人才培养项目(No. 苏中医科教[2023]17号); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(No. KYCX23_2202)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中药防治脊柱退行性疾病。E-mail: baixue2021202102@163.com

通信作者 副主任医师, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药防治脊柱退行性疾病的临床与基础研究。E-mail: okdoctor@163.com

the pathological injury of intervertebral disc tissue was relieved in YQHX group; the number of autophagosomes in nucleus pulposus cells increased; serum level of TNF- α and mRNA expression of p62 in intervertebral disc tissue decreased significantly; the ratios of BNIP3 and Beclin-1 positive cells, the phosphorylation of NF- κ B p65, the expressions of TRAF-2, TRAF-3, BNIP3 and LC3B protein as well as the mRNA expressions of NF- κ B p65, LC3B, BNIP3 and Beclin-1 decreased significantly in intervertebral disc tissues ($P < 0.05$). The changes of above indexes in YQHX group were reversed partly in YQHX+QNZ group.

CONCLUSIONS YQHX promotes the elevation of autophagy level of intervertebral discs, slows down the inflammatory response and the progression of lumbar disc herniation by activating the NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS lumbar disc herniation; inflammatory response; NF- κ B signaling pathway; autophagy

腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH)是由椎间盘变性、纤维环破裂、髓核组织突出压迫等引起的一种综合征,常表现为腰部疼痛、肢体麻木以及感觉迟钝^[1]。因其病因复杂,病程延绵反复,给临床治疗带来诸多困难。中医药治疗LDH通过审证求因,强调辨证施治,可有效改善腰腿疼痛症状,提高患者生活质量。江苏省名中医姜宏教授根据多年临床经验,认为LDH发病由肾精不足、精气生化受阻、脊柱和韧带失于濡养、纤维环脆弱易破裂、韧带弹性降低、气血运行不畅所致,基于石氏伤科“以气为主,以血为先”理念及吴门派络病理论拟定益气活血方(Yiqi huoxue decoction, YQHX)治疗LDH,且经研究证实YQHX在缓解腰部疼痛、改善中医症候及腰椎功能障碍等方面疗效确切^[2]。

在LDH的发生发展中,髓核游离暴露在引力失衡和代谢障碍的异常环境下,可导致髓核细胞减少及细胞外基质降解,这与炎症反应密切相关^[3]。自噬是一种保守而紧密协调的细胞自我降解过程,髓核细胞自噬已被证实能维持髓核细胞外基质稳态,缓解其氧化应激状态和拮抗炎症反应^[4]。本课题组前期研究发现,LDH患者椎间盘髓核细胞内自噬囊泡增加,表明髓核细胞在不利环境下受到自噬的保护,促进自噬可能是改善LDH的一种有效路径^[5]。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路参与炎症的发生发展,同时又可以促进细胞自噬的发生^[6]。为此,本研究拟通过建立LDH大鼠模型,基于NF- κ B信号通路探讨YQHX调控髓核细胞自噬对大鼠LDH的影响及机制,以期为临床防治LDH提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括PharmaScan 7.0T型小动物磁共振成像系统(德国Bruker公司);Allsheng型全自动多功能酶标仪(杭州奥胜仪器有限公司);Mastercycle nexus型聚合酶链式反应(PCR)仪(德国Eppendorf公司);MAX-TL型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);IX83型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

1.2 主要药品与试剂

生黄芪、当归、防己、白芥子、川芎、地龙、木瓜饮片均购于江苏省中医院,经南京中医药大学中西医结合学

院陶伟伟教授鉴定均为真品。NF- κ B抑制剂QNZ(EVP4593,批号S4902)购于上海蓝木化工有限公司;异氟烷(批号20220601)购于深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号CR2203163)购于武汉赛维尔生物科技有限公司;大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号AF-01587R1)购于湖南艾方生物科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号WB6501)购于苏州新赛美生物科技有限公司;兔源微管相关蛋白轻链3B(microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B)单克隆抗体(批号GR3338049-29)购于英国Abcam公司;兔源B细胞淋巴瘤2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(Bcl-2/adenovirus E1B interacting protein 3, BNIP3)、苯氯素(Beclin-1)、肿瘤坏死因子受体相关因子2(tumor necrosis factor receptor-associated factor-2, TRAF-2)、TRAF-3、NF- κ B p65、磷酸化NF- κ B p65(phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)单克隆抗体(批号分别为3769S、3495S、C192、D1N5B、8242S、3033T)均购于美国CST公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(批号20536-1)购于武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号923A057)购于爱必信(上海)生物科技有限公司;超敏ECL发光剂(批号S7205020)购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司;RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(批号分别为7E670L2、7F611J2)均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠50只,体重(200 \pm 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0011。本实验经过南京中医药大学实验动物伦理委员会审批,申请号为202210A009。

2 方法

2.1 YQHX的制备

按处方配伍比例称取生黄芪20g、当归10g、防己10g、白芥子6g、川芎15g、地龙15g、木瓜10g,加入10倍量水煎煮1h,煎煮的药渣再次加入8倍量水煎煮1h;合并2次煎煮液,滤过,取上清液浓缩至9.1g/kg(以生药量计),于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

2.2 大鼠分组、建模与给药

大鼠适应性喂养1周后,按照随机数字表法分为假手术组(10只)及造模组(40只)。参照文献及本课题组既往建模方法^[7],采用双上肢去势联合椎间盘刺破纤维环的方式建立LDH大鼠模型。术后2 d(干预前),每组随机选取2只大鼠,进行磁共振成像(MRI)扫描检查,大鼠L₄-L₅、L₅-L₆髓核呈低信号、与纤维环界限模糊即为LDH造模成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组、NF- κ B抑制剂组(QNZ组)、YQHX组及联合组(YQHX+QNZ组),每组10只。术后3 d,按照人与大鼠体表面积换算公式计算给药剂量,QNZ组大鼠腹腔注射1 mg/kg QNZ,YQHX组大鼠灌胃9.1 g/kg(以生药量计,前期研究证实的最佳干预剂量^[8])YQHX,YQHX+QNZ组大鼠同时灌胃YQHX(9.1 g/kg)及腹腔注射QNZ(1 mg/kg),假手术组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天给药1次,连续8周。

2.3 大鼠椎间盘突出严重程度评估

末次给药结束24 h后,每组随机取3只大鼠,经4%异氟烷诱导麻醉,然后进行MRI扫描检查,在T₂WI序列下对L₄-L₅、L₅-L₆椎间盘突出严重程度进行Pfirrmann分级评分^[9]。

2.4 样品采集及大鼠椎间盘组织形态学观察

MRI扫描结束后,各组大鼠于腹主动脉采血3 mL,以3 500 r/min离心15 min,分离上层血清,于-80 °C保存,备用。大鼠脱颈处死,取下附带椎骨的L₄-L₅、L₅-L₆椎间盘,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,于-80 °C保存,备用;随机选取6只大鼠椎间盘组织,置于4%多聚甲醛固定后,脱钙、石蜡包埋,制成4 μ m切片。每组随机选取3张切片,HE染色后,常规脱水、透明、封片,在显微镜下观察大鼠的椎间盘组织形态学变化并采集图像。

2.5 大鼠髓核细胞自噬观察

取“2.4”项下各组大鼠椎间盘组织切片,用PBS冲洗后,以3%戊二醛和1%锇酸固定5 h,然后样品用环氧树脂包埋,制成50 nm超薄切片。每组随机选取3张切片,再用2%醋酸铀和0.2%柠檬酸铅染色后,在透射电子显微镜下观察髓核细胞自噬情况并采集图像。

2.6 大鼠血清中TNF- α 水平检测

取“2.4”项下各组大鼠的血清样品,解冻后,按照ELISA试剂盒说明书操作,以酶标仪检测大鼠血清中TNF- α 在450 nm波长处的吸光度值,利用标准曲线计算TNF- α 水平。

2.7 大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比检测

采用免疫组织化学法检测。取“2.4”项下各组3只大鼠椎间盘组织切片,常规脱水,用3%过氧化氢阻断内

源性过氧化氢酶,用3%牛血清白蛋白室温封闭1 h,然后滴加BNIP3、Beclin-1一抗(稀释比分别为1:200、1:100),于4 °C孵育过夜;以PBS洗涤后滴加二抗(稀释比为1:200),DAB显色,苏木精复染3 min,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。在显微镜下每张切片随机选取3个视野,采用Image J软件分析BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比(以棕黄色为阳性表达)。

2.8 大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、TRAF-2、TRAF-3、BNIP3及LC3B蛋白表达检测

采用蛋白质印迹法检测。取“2.4”项下各组3只大鼠冻存的椎间盘组织,以蛋白裂解液裂解,用BCA法测定蛋白浓度后于95 °C变性10 min。取变性蛋白,电泳分离,转至聚偏二氟乙烯膜上,以5%脱脂奶粉封闭2 h,加入NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B及 β -actin(内参蛋白)一抗(目的蛋白稀释比均为1:1 000,内参蛋白稀释比为1:10 000),于4 °C孵育过夜;洗膜后加入二抗(稀释比为1:10 000),于37 °C孵育1 h后,以ECL化学发光液显色,采用Image J软件对目的蛋白的表达水平进行定量分析,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,再以p-NF- κ B p65与NF- κ B p65蛋白的表达水平比值表示NF- κ B p65磷酸化水平。

2.9 大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、LC3B、p62、BNIP3及Beclin-1 mRNA表达的检测

采用实时定量PCR法检测。取“2.4”项下各组3只大鼠冻存的椎间盘组织,采用柱提法提取总RNA,并将其反转录成cDNA进行PCR扩增。PCR反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性30 s,60 °C退火延伸15 s,共40个循环,12 °C保温40 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算NF- κ B p65、LC3B、p62、BNIP3及Beclin-1 mRNA的表达水平。PCR引物序列及扩增产物见表1。

表1 引物序列及扩增产物

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物/bp
GAPDH	正向引物 TGGTATCGTGAAGGACTCATGAC	185
	反向引物 ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAGC	
NF- κ B p65	正向引物 AGTGTTCCACAGACCTGGCATC	256
	反向引物 TCACCAGGCGAGTTATAGCTT	
LC3B	正向引物 TGTATCCACCCATCGCTGACA	178
	反向引物 CTGACCAGAATCCCAGCCACC	
p62	正向引物 CCTGAACCTCATGGCTGAGA	183
	反向引物 GTCCAAATAATCTCCTCGTCAATC	
BNIP3	正向引物 CTGTCTCATCTGTTAGCCATTG	237
	反向引物 CACAGCTCAGCGTGAATC	
Beclin-1	正向引物 ATGCACAGATACTCTTTAGACC	280
	反向引物 AACAGCGTTTGTAGTCTGACA	

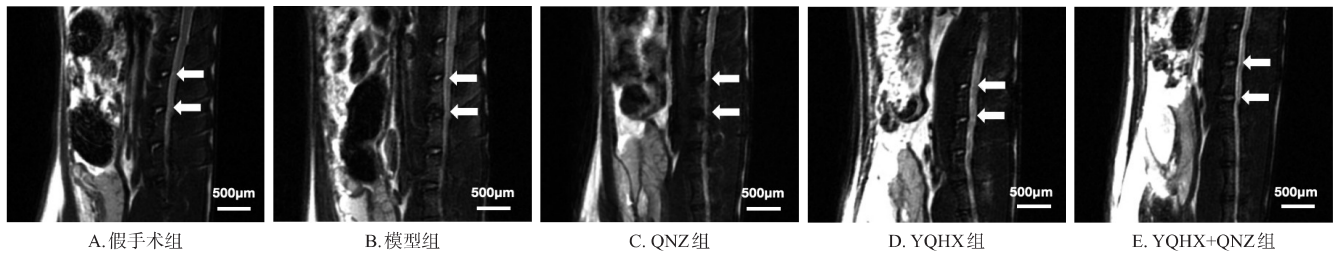
2.10 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用LSD-*t*检验,方差不齐时两两比较采用Dunnett-*T3*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

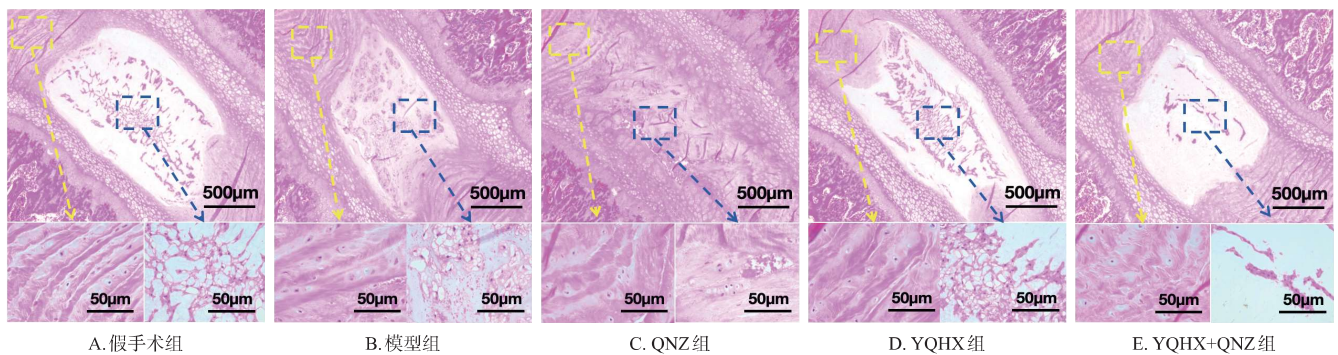
3.1 大鼠椎间盘突出严重程度评分变化

假手术组大鼠L₄-L₅、L₅-L₆髓核呈高信号,纤维环、终板呈低信号,两者界限清晰。与假手术组[(1.25±0.50)分]比较,模型组[(3.25±0.82)分]大鼠L₄-L₅、L₅-L₆椎间盘Pfirrmann分级评分显著升高($P<0.05$),髓核信号强度降低,髓核结构不均,与纤维环界限模糊。与模型组比较,QNZ组[(3.75±0.50)分]大鼠椎间盘Pfirrmann分级评分显著升高($P<0.05$),髓核信号强度降低,与纤维环界限丢失;YQHX组[(1.75±0.50)分]及YQHX+QNZ组[(2.25±0.82)分]大鼠椎间盘Pfirrmann分级评分均显著降低($P<0.05$),髓核信号强度均增加,与纤维环界限清晰。与QNZ组及YQHX+QNZ组比较,YQHX组大鼠椎间盘Pfirrmann分级评分显著降低($P<0.05$),髓核信号强度增加,与纤维环界限清晰。结果见图1。



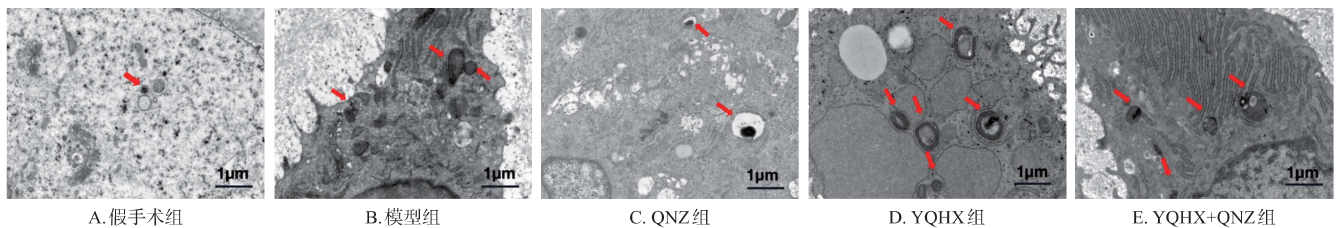
白色箭头:大鼠L₄-L₅、L₅-L₆椎间盘。

图1 各组大鼠椎间盘MRI的T₂WI序列图像



黄色框:纤维环;蓝色框:髓核细胞。

图2 各组大鼠椎间盘组织的HE染色图



红色箭头:自噬小体。

图3 各组大鼠髓核细胞自噬变化的透射电镜图

3.2 大鼠椎间盘组织形态学变化

假手术组大鼠椎间盘组织形态基本保持完整,髓核细胞排列均匀有序,髓核未见皱缩,纤维环结构清晰。模型组大鼠椎间盘组织结构破坏,髓核细胞排列松散无序,髓核皱缩,纤维环结构紊乱。与模型组比较,QNZ组大鼠椎间盘发生明显的病理学改变,纤维环结构破坏,髓核细胞显著减少。YQHX组大鼠椎间盘组织结构完整性较模型组和QNZ组均有明显改善,可见较多团状分布的髓核细胞,且排列较为规整,纤维环结构轻微紊乱。YQHX+QNZ组大鼠椎间盘组织结构可见一定程度破坏,髓核细胞数量较少,纤维环排列松散。结果见图2。

3.3 大鼠髓核细胞自噬变化

假手术组大鼠髓核细胞结构完整,有少量自噬小体。与假手术组比较,模型组大鼠髓核细胞中自噬小体数量增加。与模型组比较,QNZ组大鼠髓核细胞中自噬小体数量减少,YQHX组及YQHX+QNZ组大鼠髓核细胞中自噬小体数量均增加。与QNZ组及YQHX+QNZ组比较,YQHX组大鼠髓核细胞中自噬小体数量增多。结果见图3。

3.4 大鼠血清中TNF- α 水平变化

与假手术组[(730.86 \pm 192.48)pg/mL]比较,模型组[(2 701.11 \pm 515.87)pg/mL]大鼠血清中TNF- α 水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,QNZ组[(1 851.21 \pm 416.49)pg/mL]、YQHX组[(1 063.36 \pm 177.12)pg/mL]及YQHX+QNZ组[(1 777.64 \pm 142.84)pg/mL]大鼠血清中TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$)。与QNZ组及YQHX+QNZ组比较,YQHX组大鼠血清中TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$)。

3.5 大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比变化

与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,QNZ组大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比均显著减少($P < 0.05$)、YQHX组大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比均显著升高($P < 0.05$)、YQHX+QNZ组大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比均无明显变化($P > 0.05$)。与QNZ组比较,YQHX组和YQHX+QNZ组大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比均显著升高($P < 0.05$)。与YQHX+QNZ组比较,YQHX组大鼠椎间盘组织中Beclin-1阳性细胞百分比显著升高($P < 0.05$)、BNIP3阳性细胞百分比无明显变化($P > 0.05$)。结果见表2、图4。

表2 各组大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	BNIP3/%	Beclin-1/%
假手术组	6.49 \pm 2.92	12.82 \pm 3.00
模型组	23.25 \pm 2.29 ^a	36.84 \pm 5.28 ^a
QNZ组	8.73 \pm 4.24 ^b	18.75 \pm 8.14 ^b
YQHX组	36.11 \pm 10.26 ^c	49.91 \pm 6.25 ^{cd}
YQHX+QNZ组	32.43 \pm 9.70 ^c	36.57 \pm 10.34 ^c

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与QNZ组比较, $P < 0.05$; d: 与YQHX+QNZ组比较, $P < 0.05$ 。

3.6 大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、TRAF-2、TRAF-3、BNIP3及LC3B蛋白表达变化

与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘组织中TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B蛋白表达水平和NF- κ B p65磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,QNZ组大鼠椎间盘组织中TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B蛋白表达水平和NF- κ B p65磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$)、YQHX组及YQHX+QNZ组大鼠椎间盘组织中TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B蛋白表达水平和NF- κ B p65磷酸化水平(YQHX+QNZ组显著降低)均显著升高($P < 0.05$)。与QNZ组比较,YQHX组及YQHX+QNZ组大鼠椎间盘组织中TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B蛋白表达水平和NF- κ B p65磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$)。与YQHX+QNZ组比较,YQHX组大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65磷酸化水平显著升高($P < 0.05$)、TRAF-2、TRAF-3、BNIP3及LC3B蛋白表达水平均无明显变化($P > 0.05$)。结果见图5、表3。

3.7 大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、LC3B、p62、BNIP3及Beclin-1的mRNA表达变化

与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、LC3B、BNIP3及Beclin-1的mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$)、p62 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,QNZ组大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、LC3B、BNIP3及Beclin-1的mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$)、p62的mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$)、YQHX组大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、LC3B、BNIP3及Beclin-1的mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$)、p62的mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$)、YQHX+QNZ组大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、LC3B及Beclin-1的mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$)、BNIP3、p62的mRNA表达水平无明显变化($P > 0.05$)。与QNZ组及YQHX+QNZ组比较,YQHX组大鼠椎间盘组织中NF- κ B p65、LC3B、BNIP3及Beclin-1的mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$)、p62的mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表4。

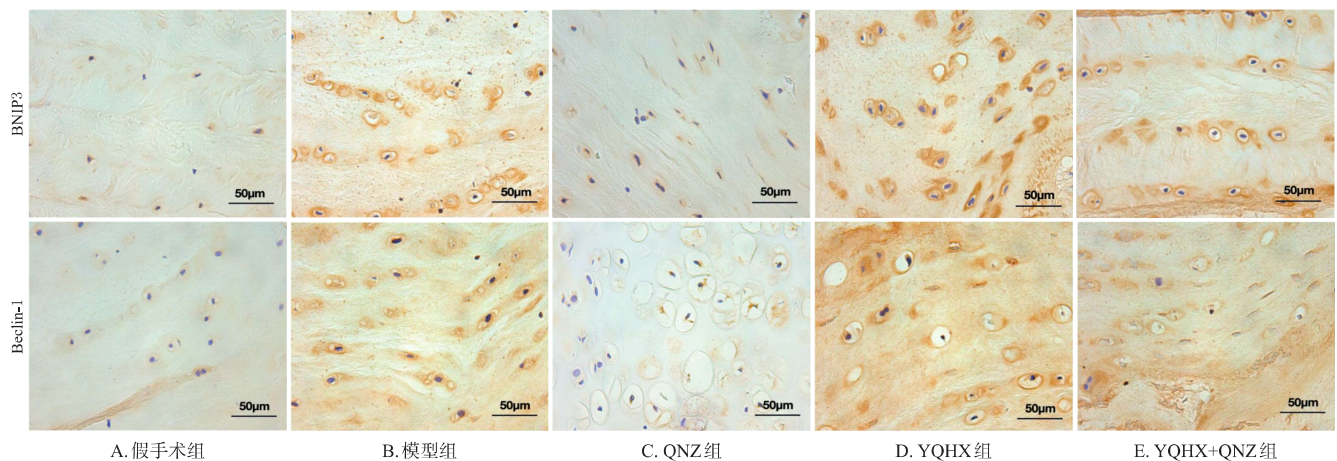


图4 各组大鼠椎间盘组织中BNIP3、Beclin-1阳性细胞表达的染色图

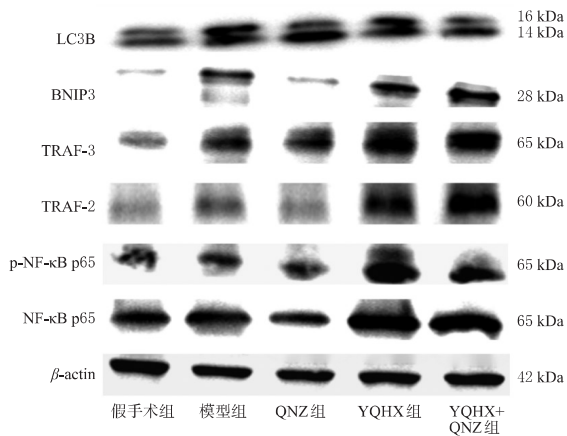


图5 各组大鼠椎间盘组织中NF-κB p65、p-NF-κB p65、TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B蛋白表达的电泳图

表3 各组大鼠椎间盘组织中TRAF-2、TRAF-3、BNIP3、LC3B蛋白表达水平和NF-κB p65磷酸化水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-NF-κB p65/NF-κB p65	TRAF-2	TRAF-3	BNIP3	LC3B
假手术组	0.27 ± 0.02	0.51 ± 0.05	0.45 ± 0.06	0.30 ± 0.23	0.45 ± 0.07
模型组	1.01 ± 0.22 ^a	0.98 ± 0.19 ^a	0.87 ± 0.06 ^a	1.03 ± 0.13 ^a	0.86 ± 0.05 ^a
QNZ组	0.33 ± 0.02 ^b	0.69 ± 0.10 ^b	0.66 ± 0.07 ^b	0.68 ± 0.16 ^b	0.75 ± 0.05 ^b
YQHX组	1.40 ± 0.35 ^{cd}	1.22 ± 0.15 ^{cd}	1.30 ± 0.24 ^{cd}	1.25 ± 0.09 ^{cd}	1.03 ± 0.07 ^{cd}
YQHX+QNZ组	0.57 ± 0.16 ^c	1.31 ± 0.08 ^{cd}	1.11 ± 0.02 ^c	1.33 ± 0.18 ^{cd}	1.00 ± 0.05 ^{cd}

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与QNZ组比较, $P < 0.05$; d: 与YQHX+QNZ组比较, $P < 0.05$ 。

表4 各组大鼠椎间盘组织中NF-κB p65、LC3B、p62、BNIP3及Beclin-1的mRNA表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NF-κB p65	LC3B	p62	BNIP3	Beclin-1
假手术组	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02
模型组	2.30 ± 0.45 ^a	1.52 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.02 ^a	1.51 ± 0.06 ^a	1.39 ± 0.09 ^a
QNZ组	1.25 ± 0.11 ^b	1.01 ± 0.01 ^b	0.78 ± 0.01 ^b	1.15 ± 0.08 ^b	1.08 ± 0.04 ^b
YQHX组	5.00 ± 0.18 ^{cd}	2.03 ± 0.02 ^{cd}	0.21 ± 0.02 ^{cd}	2.23 ± 0.18 ^{cd}	1.96 ± 0.26 ^{cd}
YQHX+QNZ组	2.97 ± 1.17 ^c	1.71 ± 0.06 ^{cd}	0.31 ± 0.03 ^c	1.60 ± 0.15 ^c	1.56 ± 0.18 ^{cd}

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与QNZ组比较, $P < 0.05$; d: 与YQHX+QNZ组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

LDH属中医学“腰痛”“痹证”范畴。古代医家多以“腰痛”论述此病,认为腰与肾关系最为密切。如《素问·脉要精微论》云“腰者,肾之府,转摇不能,肾将惫矣。”姜宏教授临证秉持“不通则痛”“不荣则痛”的理念,在治疗时寓通于补,强调益肾气、祛风湿、止痹痛,并据此总结出YQHX治疗LDH^[10]。方中生黄芪为君药,益气固表;辅以当归补血、活血,防己利水消肿,白芥子温化寒痰,三者共为臣药;川芎行气、活血、止痛,助当归活血、行血,木瓜祛湿、通络,同助生黄芪利水,地龙善软坚通络,共为佐药。诸药合用共奏益气行血、祛风除湿、通络除痹之功效。现代药理学研究表明,黄芪中的黄芪总苷、黄芪多糖、川芎中的洋川芎内酯A及当归中的防己碱具有较强的抗炎作用,能够抑制髓核细胞的炎症反应,减

轻髓核细胞外基质降解,从而延缓LDH的炎症进程;川芎中含有的阿魏酸,可以改善神经根水肿变性,提高机体疼痛阈值,缓解炎症刺激导致的疼痛^[11];木瓜中提取的木瓜凝乳蛋白酶,已被作为髓核溶解剂用于LDH的微创治疗^[12]。因此,YQHX治疗LDH可行。

在LDH的发生发展中,炎症反应是重要的一环。IL-1β、IL-6及TNF-α等作为临床常见炎症因子,均在髓核组织中呈高表达^[13]。自噬作为早期自我适应性机制,可通过清除受损的细胞器来为组织的稳态恢复提供营养物质。有研究表明,自噬与椎间盘疾病密切相关^[14]。此外,自噬还与炎症联系紧密,炎症相关信号通路NF-κB可通过上调Beclin-1和其他自噬相关蛋白的转录,增高自噬,降低炎症反应^[15]。TNF受体相关家族中TRAF-2、TRAF-3是NF-κB非经典通路的重要衔接蛋白。研究发现,NF-κB信号通路在LDH病理过程中被激活,并参与LDH的发病机制,活化的NF-κB信号通路促使TNF-α等促炎因子合成和释放,进而推动炎症级联反应;在炎症过程中,NF-κB信号通路还可通过改变关键自噬调节因子的活性来调控自噬^[16]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘组织中TRAF-2、TRAF-3蛋白表达水平及TNF-α水平、NF-κB p65磷酸化水平均显著升高;经QNZ干预后,大鼠椎间盘组织中上述指标均显著降低;经YQHX干预后,大鼠椎间盘组织中TRAF-2、TRAF-3蛋白表达水平和NF-κB p65磷酸化水平均显著升高,TNF-α水平显著降低,推测YQHX可能进一步促进了NF-κB信号通路活化,并具有良好的抗炎疗效。为验证该推测,本研究在YQHX基础上添加QNZ,结果显示,与YQHX组比较,YQHX+QNZ组大鼠椎间盘组织中TRAF-3蛋白表达水平有降低趋势,NF-κB p65磷酸化水平显著降低,TNF-α水平显著升高,提示YQHX可促进NF-κB信号通路激活,减轻炎症反应。

BNIP3作为Bcl-2家族成员的促凋亡蛋白,可与自噬关键因子Beclin-1竞争结合Bcl-2,使Beclin-1与Bcl-2解离,诱导自噬激活,同时Beclin-1可诱导其他自噬相关蛋白定位到自噬泡,是自噬小体形成过程中的重要分子^[17]。自噬小体作为自噬过程的标志性结构,是检测自噬的唯一金标准,而LC3是自噬体膜蛋白,可作为检测自噬活性的标志物。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘组织中自噬小体数量增加,BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比和LC3B水平均显著升高,p62 mRNA表达水平显著降低;经YQHX干预后,自噬小体数量进一步增加,BNIP3、Beclin-1阳性细胞百分比和LC3B水平均显著升高,p62 mRNA表达水平显著降低,提示YQHX可促进大鼠椎间盘自噬水平升高,其发挥促进椎间盘病理损伤修复作用的机制可能为通过介导NF-κB信号通路促进自噬相关分子表达量增加所致。为验证该推测,本研究在YQHX基础上添加QNZ,结果显示,YQHX促进大鼠椎间盘自噬水平升高作用可被部分逆转。

综上所述, YQHX可能通过激活NF- κ B信号通路促进大鼠椎间盘自噬水平升高,减轻炎症反应,延缓LDH进展。本研究仅在建立LDH大鼠模型的基础上初步探讨了YQHX对NF- κ B信号通路介导的自噬的调节作用,未建立体外模型进一步验证结论;此外NF- κ B信号通路还存在多种不同活化位点,不同的活化位点对自噬是否存在调节作用,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周谋望,岳寿伟,何成奇,等. “腰椎间盘突出症的康复治疗”中国专家共识[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(2): 129-135.
ZHOU M W, YUE S W, HE C Q, et al. China expert consensus on “rehabilitation treatment of lumbar disc herniation” [J]. Chin J Rehabil Med, 2017, 32(2): 129-135.
- [2] 周孝文,刘锦涛,俞峰. 益气活血方治疗破裂型腰椎间盘突出症的机理研究[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(1): 1-4.
ZHOU X W, LIU J T, YU F. Mechanism of Yiqi huoxue decoction in treating ruptured lumbar disc herniation[J]. J Med Theory Pract, 2019, 32(1): 1-4.
- [3] YU P F, JIANG F D, LIU J T, et al. Outcomes of conservative treatment for ruptured lumbar disc herniation[J]. Acta Orthop Belg, 2013, 79(6): 726-730.
- [4] TANG Z H, HU B, ZANG F Z, et al. Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 510.
- [5] XU K, CHEN W J, WANG X F, et al. Autophagy attenuates the catabolic effect during inflammatory conditions in nucleus pulposus cells, as sustained by NF- κ B and JNK inhibition[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(3): 661-668.
- [6] 陶帅,姜宏,王铠,等. 破裂型与未破裂型腰椎间盘突出组织超微结构对比观察[J]. 临床骨科杂志, 2014, 17(5): 604-607.
TAO S, JIANG H, WANG K, et al. Ruptured and unruptured comparative study of lumbar disc tissue ultrastructure[J]. J Clin Orthop, 2014, 17(5): 604-607.
- [7] 孙孝先,白雪,刘孟敏,等. 双上肢去势联合椎间盘刺破诱导建立大鼠椎间盘退变模型[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(35): 5616-5621.
SUN X X, BAI X, LIU M M, et al. Establishing a rat model of intervertebral disc degeneration by castration of both upper limbs combined with intervertebral disc puncture[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(35): 5616-5621.
- [8] KALIYA-PERUMAL A K, ARIPUTHIRAN-TAMILSELVAM S K, LUO C A, et al. Revalidating Pfirrmann’s magnetic resonance image-based grading of lumbar nerve root compromise by calculating reliability among orthopaedic residents[J]. Clin Orthop Surg, 2018, 10(2): 210-215.
- [9] 高春鹏,朱宇,姜宏,等. 益气活血方介导P38MAPK信号通路促进突出椎间盘组织重吸收的机制研究[J]. 江苏中医药, 2018, 50(6): 75-78.
GAO C P, ZHU Y, JIANG H, et al. A mechanic study of Yiqi huoxue decoction mediating P38MAPK signal path in promoting the reabsorption of protruding intervertebral disc tissue[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2018, 50(6): 75-78.
- [10] 沈学强,姜宏. 姜宏教授辨治巨大游离型腰椎间盘突出症经验介绍[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(7): 78-80.
SHEN X Q, JIANG H. Professor Jiang hong’s experience in differentiating and treating huge free lumbar disc herniation[J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop, 2018, 26(7): 78-80.
- [11] 李晓雨,李双凤,刘晓美,等. 当归-川芎药对的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(4): 1415-1426.
LI X Y, LI S F, LIU X M, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of Danggui-Chuanxiong drug pair[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(4): 1415-1426.
- [12] 孙凯,朱立国,魏戌,等. 中药复方及单体成分延缓椎间盘退行性病变的作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2400-2408.
SUN K, ZHU L G, WEI X, et al. Research progress in mechanism of Chinese herbal compounds and monomers in delaying lumbar intervertebral disc degeneration[J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(9): 2400-2408.
- [13] BENZAKOUR T, IGOUMENOU V, MAVROGENIS A F, et al. Current concepts for lumbar disc herniation[J]. Int Orthop, 2019, 43(4): 841-851.
- [14] 徐昕,唐丽玮,金丹,等. 氯胺酮对腰椎间盘突出根性痛大鼠脊髓炎症因子的影响及机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(18): 2119-2121.
XU X, TANG L W, JIN D, et al. Effect of ketamine in spinal cord of rats with lumbar disc herniation and root pain and its mechanism[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(18): 2119-2121.
- [15] XIAO L, DING B Y, GAO J M, et al. Curcumin prevents tension-induced endplate cartilage degeneration by enhancing autophagy[J]. Life Sci, 2020, 258: 118213.
- [16] GE Y, HUANG M, YAO Y M. Autophagy and proinflammatory cytokines: interactions and clinical implications[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 43: 38-46.
- [17] ABRAHAMSEN H, STENMARK H, PLATTA H W. Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression[J]. FEBS Lett, 2012, 586(11): 1584-1591.

(收稿日期:2023-11-29 修回日期:2024-04-18)

(编辑:邹丽娟)