

身痛逐瘀汤对不同静水压下人退变髓核细胞形态及凋亡的影响

刘志超^{1,2} 张帆³ 孙旗³ 康晓乐³ 袁巧妹³ 柳根哲⁴ 陈江^{3,5△}

[摘要] 目的:比较身痛逐瘀汤对不同静水压下人退变髓核细胞形态及凋亡的影响。方法:选取 2 只雄性新西兰兔,体质量分别为 3.2 kg 和 3.8 kg,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,计算出兔的中药颗粒给药剂量,将颗粒溶于水后灌胃,灌胃结束后腹主动脉采血,制备身痛逐瘀汤含药血清。将人髓核细胞分为两组:单纯压力组(不加任何药物)和中药组(15%身痛逐瘀汤含药血清),比较两组髓核细胞在 0.3,1.0,3.0 MPa 压力下作用 2,4,6 h 后的细胞形态变化,采用 TEM 观察两组髓核细胞超微结构的变化及差异;采用 Annexin V-FITC/PI 检验两组髓核细胞的凋亡状况。结果:两组髓核细胞在 0.3,1.0,3.0 MPa 静水压下作用后突起均有断裂,断裂程度随压力增加而增加。同一压力和作用时间下,中药组比压力组髓核细胞形态及超微结构保存更完整,差异有统计学意义($P<0.05$);中药组和压力组髓核细胞凋亡率随压力和作用时间的增加而增加。同一压力及作用时间下中药组髓核细胞凋亡率比单纯压力组降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。3.0 MPa 下两组髓核细胞的凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:身痛逐瘀汤含药血清在低静水压(0.3,1.0 MPa)下能一定程度上减少髓核细胞凋亡,而高静水压下(3.0 MPa)效果有限,说明本方对早期椎间盘退变有防治作用。

[关键词] 身痛逐瘀汤;静水压;髓核细胞;形态学;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)01-0005-05

Efficacy of Shentong Zhuyu Decoction on Morphology and Apoptosis of Human Degenerative Nucleus Pulposus Cells under Different Hydrostatic Pressure

LIU Zhichao^{1,2} ZHANG Fan³ SUN Qi³ KANG Xiaole³YUAN Qiaomei³ LIU Genzhe⁴ CHEN Jiang^{3,5△}

¹ Department of The Frist Orthopedics, Southern District of Guanganmen Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102600, China;

² Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

³ Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

⁴ Department of Orthopedics, Beijing Traditional Chinese Medicine Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010, China;

⁵ Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China.

Abstract Objective: To compare the efficacy of Shentong Zhuyu decoction on the morphology and apoptosis of human de-

generative nucleus pulposus cells under different hydrostatic pressure. **Methods:** Two male New Zealand rabbits with body mass of 3.2 kg and 3.8 kg were selected. According to the conversion method of “rabbit surface area/human surface area=rabbit dose/human dose”, the dosage of traditional chinese medicine granules was calculated. The granules were dissolved in water and then administered by gavage. After gavage, blood was collected from abdominal aorta to prepare the medicated serum of Shentong Zhuyu decoction. Human

基金项目:国家自然科学基金项目(81603638)

¹ 中国中医科学院广安门医院南区骨一科(北京,102600)

² 北京中医药大学

³ 北京中医药大学东直门医院骨伤科一区

⁴ 首都医科大学附属北京中医医院骨伤科

⁵ 湖南中医药大学

△通信作者 E-mail:42691631@qq.com

nucleus pulposus cells were divided into two groups; simple pressure group (without any drugs) and traditional Chinese medicine group (15% Shentong Zhuyu decoction containing serum). The morphological changes of nucleus pulposus cells in the two groups were compared after 2, 4 and 6 h under the pressure of 0.3, 1.0 and 3.0 MPa. The changes and differences of ultrastructure of nucleus pulposus cells in the two groups were observed by TEM; Annexin V-FITC/PI was used to test the apoptosis of nucleus pulposus cells in the two groups. **Results:** The processes of nucleus pulposus cells in both groups were broken under hydrostatic pressure of 0.3, 1.0 and 3.0 MPa, and the degree of fracture increased with the increase of pressure. Under the same pressure and action time, the morphology and ultrastructure of nucleus pulposus cells in traditional Chinese medicine group were more intact than those in pressure group ($P < 0.05$); The apoptosis rate of nucleus pulposus cells in traditional Chinese medicine group and pressure group increased with the increase of pressure and action time. Under the same pressure and action time, the apoptosis rate of nucleus pulposus cells in traditional Chinese medicine group was lower than that in simple pressure group ($P < 0.05$). The apoptosis rate of nucleus pulposus cells in the two groups increased significantly at 3.0 MPa. **Conclusion:** The medicated serum of Shentong Zhuyu decoction can reduce the apoptosis of nucleus pulposus cells to a certain extent under low hydrostatic pressure (0.3, 1.0 MPa), but the efficacy is limited under high hydrostatic pressure (3.0 MPa), indicating that this prescription has a preventive and therapeutic efficacy on early intervertebral disc degeneration.

Keywords: Shentong Zhuyu decoction; hydrostatic pressure; nucleus pulposus cells; morphology; apoptosis

下腰痛是骨科常见的疾病, 40% 的病例涉及椎间盘退变 (Intervertebral Disc Degeneration Disease, IVDD)^[1-2]。而椎间盘 (Intervertebral Disc, IVD) 细胞, 尤其是髓核 (Nucleus Pulposus, NP) 细胞的过度凋亡在椎间盘退变中起着重要作用^[3-4]。因此, 减缓或逆转椎间盘退行性过程中髓核细胞的凋亡具有重大意义。中医经典方剂身痛逐瘀汤治疗下腰痛以活血化瘀为基本原则。本研究拟采用体外静水压加载系统诱导的退变髓核细胞模型, 检测髓核细胞形态变化及凋亡情况, 并应用 Western Blot 和 RT-PCR 等方法检测身痛逐瘀汤含药血清对退变髓核细胞相关指标表达的影响, 探讨身痛逐瘀汤对防止椎间盘退变的作用机制, 为临床治疗椎间盘退变提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

实验动物: 2 只足月龄雄性新西兰兔, 体质量分别

为 3.2 kg 和 3.8 kg, 由中国中医科学院实验动物中心提供, 适应性饲养 1 周, 观察无异常者进行中药灌胃。实验分为两组: 单纯压力组和中药组。单纯压力组: 含有人椎间盘髓核细胞的培养基中不加任何药物。中药组: 将新西兰兔中药灌胃后制备身痛逐瘀汤含药血清, 将中药复方含药血清加入含有人椎间盘髓核细胞的培养基中。

1.2 实验试剂和仪器

培养基及添加剂: 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium Dulbecco, DMEM) (GIBCO, 美国); 生长因子 (Smooth Muscle Cell Growth Supplement, SMC GS) (Sciencell, 美国)。

试剂盒: 凋亡试剂盒 (Beyotime, 美国)。

实验仪器: 医用恒温静水压压力罐 (柳根哲教授设计, 专利号为 ZL 20 152 010 8857.5; 北京世纪森朗实验仪器有限公司), 见图 1。

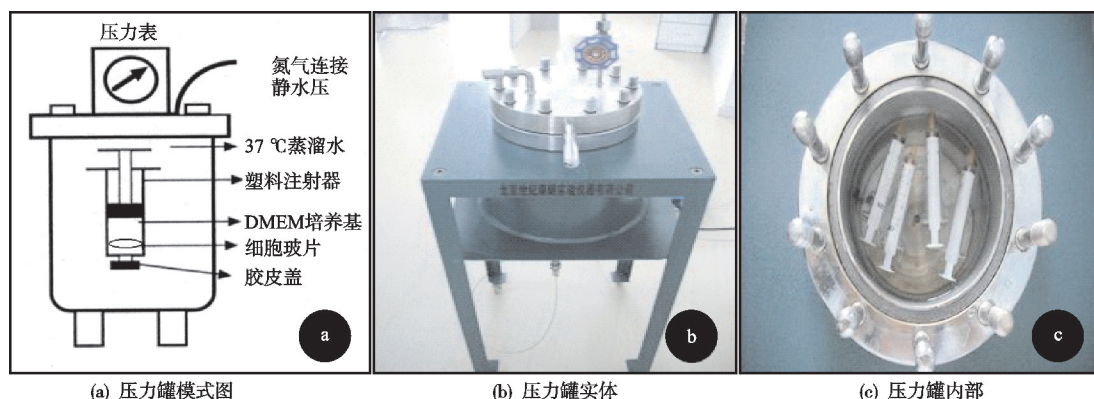


图 1 体外静水压加载系统示意图及细胞加载

1.3 身痛逐瘀汤含药血清制备

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, 计算出兔的颗粒剂给药剂量 3.50 g/(kg · d), 为了保证身痛逐瘀汤方含药血清干

预最佳浓度,笔者在髓核细胞培养基中加入身痛逐瘀汤血清的改良 Eagle 培养基,进行 5%,10%,15% 三种血药浓度梯度预实验,采用噻唑蓝(Methyl Thiazolyl Tetrazolium,MTT)比色法筛选干预药物最佳的给药浓度为 15%,药物干预时间为 24 h,最终确定兔的颗粒剂给药剂量为 28 g/(kg·d)(原给药剂量的 8 倍)。新西兰兔饲养于中国中医科学院基础理论研究所动物房,中药组两只雄性兔子本质量分别为 3.2 kg 和 3.8 kg,颗粒药物 180 g 溶于 130 mL 纯水中,以 20 mL/(kg·d)灌胃,连续灌胃 3 d,最后 1 d 灌胃结束 1 h 后,腹主动脉取血,每只家兔取血约 50~60 mL,4℃静置数小时后,离心 3 500 r/min 15 min,取血清,56℃灭活 30 min,过滤分装后保存。身痛逐瘀汤组成:秦艽 3 g,川芎 6 g,桃仁 9 g,红花 9 g,甘草 6 g,羌活 3 g,没药 6 g,当归 9 g,香附 3 g,牛膝 9 g,川乌 3 g,地龙 6 g。

1.4 分组及干预方法

将人椎间盘髓核细胞(购买于创亚化工上海有限公司,ScienCell Research Laboratories,ScienCell)分离培养、鉴定及传代后,分为单纯压力组和中药组。

单纯压力组:不加任何药物在 0.3,1.0,3.0 MPa 压力下加压 2,4,6 h。

中药组(1 次性加入浓度为 15%身痛逐瘀汤方含药血清 2 mL):药物干预时间为 24 h,然后在 0.3,1.0,3.0 MPa 压力下加压 2,4,6 h。

两组髓核细胞在医用恒温静水压压力罐中进行干预,比较在 0.3,1.0,3.0 MPa 压力下作用 2,4,6 h 后的细胞形态变化,采用透射电子显微镜(TEM)观察两组髓核细胞超微结构的变化及差异;采用磷脂酰丝氨酸蛋白抗体(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(Propidium Iodide,PI)双染法流式细胞术检验两组髓核细胞的凋亡状况。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 使用透射电镜观察两组髓核细胞超微结构的变化 将购买的人椎间盘髓核细胞分为两组,加入身痛逐瘀汤含药血清的为中药组,不加身痛逐瘀汤含药血清的为压力组,将两组髓核细胞放入压力装置在不用静水压下作为 2,4,6 h,然后分别制作压力组和中药组不同静水压下作用 2,4,6 h 的髓核细胞电镜样本,观察静水压加压前后髓核细胞的超微结构。压力分别为 0.3,1.0,3.0 MPa,以模拟人体不同体位下椎间盘压力环境,每个静水压分别作用时间 2,4,6 h。取出细胞玻片后用 2.5%戊二醛溶液固定,电镜下观察。

1.5.2 使用流式细胞仪检测髓核细胞凋亡情况

1)髓核细胞离心 2 000 r/min,5 min,后用不含乙二胺四乙酸胰酶消化;用磷酸盐缓冲溶液洗涤后收集 $1 \times$

$10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞,添加 500 μ L 的结合缓冲液悬浮细胞,加入 5 μ L 磷脂酰丝氨酸蛋白抗体混匀后,加入 5 μ L 碘化丙啶,混匀后室温、避光、反应 5~15 min,在 1 h 内进行流式细胞仪的观察和检测。2)用流式细胞仪检测,激发波长 $E_x = 488$ nm;发射波长 $E_m = 530$ nm。3)磷脂酰丝氨酸蛋白抗体的绿色荧光通过第 1 个荧光通道检测;碘化丙啶荧光(流式 $E_x = 488$ nm, $E_m \geq 630$ nm)通过第 3 个荧光通道检测。4)荧光补偿调节。

正常的活细胞不被磷脂酰丝氨酸蛋白抗体/碘化丙啶染色;凋亡早期的细胞仅被磷脂酰丝氨酸蛋白抗体染色,碘化丙啶染色呈阴性;坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被磷脂酰丝氨酸蛋白抗体和碘化丙啶染色。

1.6 统计学方法

采用统计软件 SPSS20.0 进行统计学处理,定量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对压力组和中药组两组间比较符合正态分布、方差齐采用独立样本 t 检验,两组之间的比较不符合正态分布、方差不齐使用秩和检验;单组数据中,对于不同时间、不同压力分组,进行方差分析中多个样本的两两比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 髓核细胞超微结构变化

正常髓核细胞分散于细胞外基质中,髓核细胞呈椭圆形,多个突起从细胞的四周发出,突起的长短和粗细不一,突起向基质中延伸,随着压力增加,髓核细胞突起出现断裂。两组髓核细胞突起断裂程度随着作用时间和压力的增加而增加,其中压力组突起断裂的数目多于中药组。在 3.0 MPa 静水压下两组髓核细胞结构破坏更甚,说明在 3.0 MPa 静水压下由于压力较大,细胞的完整性几乎破坏,身痛逐瘀汤方含药血清作用有限,不能很好地保护髓核细胞,见图 2-图 4。

图 2-图 4 红色箭头所指均为细胞突起断裂,表明细胞结构的破坏。图 2 断裂的细胞突起较细,图 3 断裂的细胞突起较粗,图 4 两个红色箭头显示断裂的细胞突起更甚,代表细胞破裂程度更严重。

2.2 髓核细胞的凋亡情况

髓核细胞凋亡率与作用压力和时间正相关,同一压力和作用时间下压力组较中药组的细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 5。

3 讨论

现代椎间盘退行性疾病发病率趋向年轻化,因此研究椎间盘内压力对预防椎间盘退变具有重要意义。本研究中体外静水压加载系统能够体外模拟椎间盘的压应力,并且能够进行培养和分化,取样、更换培养基和添加补充剂均很容易。本研究的主旨是探讨身痛逐

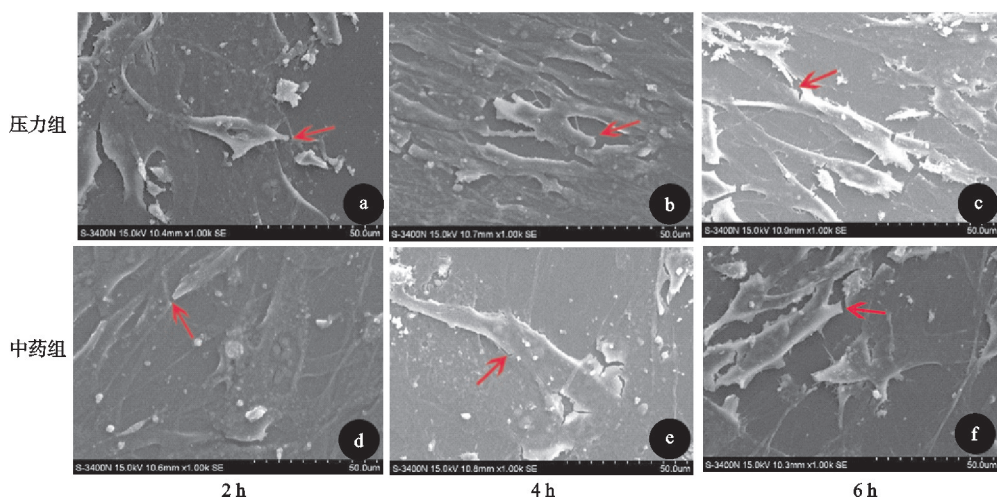


图2 两组髓核细胞在 0.3 MPa 下作用 2,4,6 h 超微结构变化($\times 10^4$)

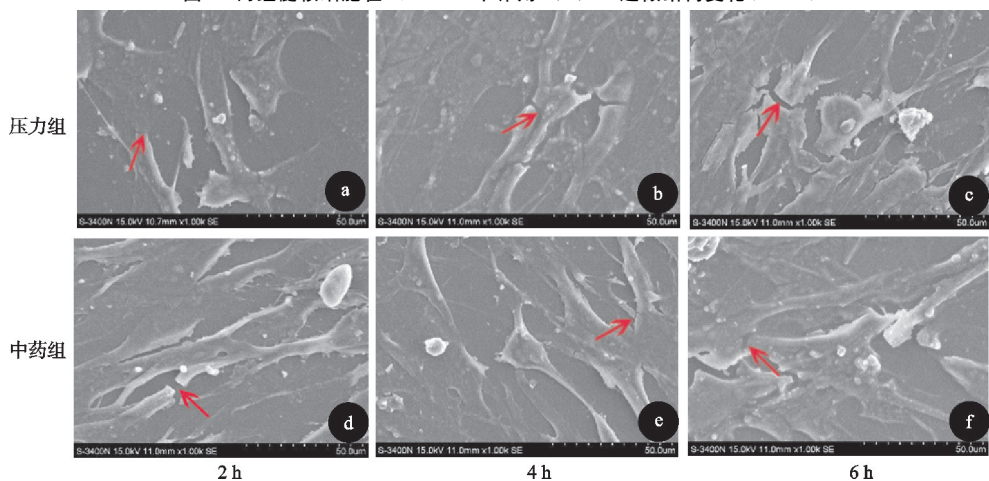


图3 两组髓核细胞在 1.0 MPa 下作用 2,4,6 h 超微结构变化($\times 10^4$)

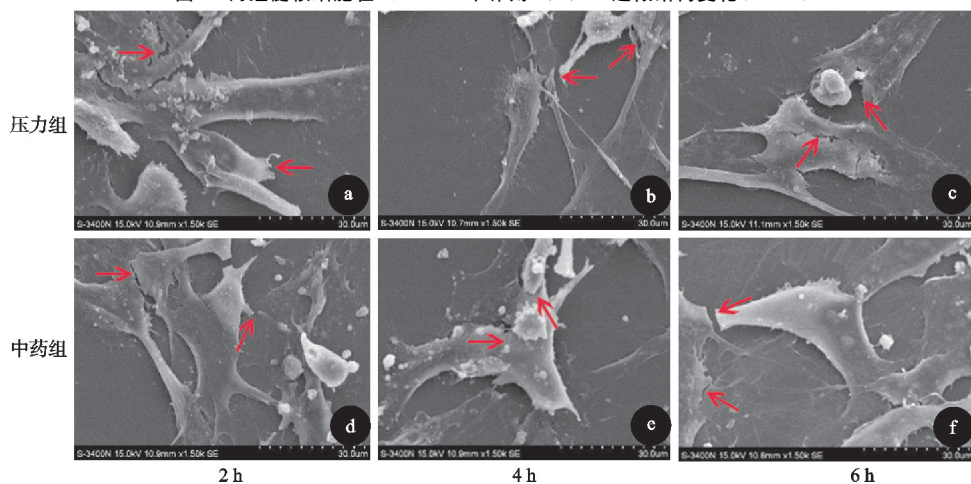


图4 两组髓核细胞在 3.0 MPa 下作用 2,4,6 h 超微结构变化($\times 15\ 000$)

瘀汤方治疗不同压力及作用时间下椎间盘退变性疾病
的疗效机制及作用靶点,从微观领域探索中医药改善
椎间盘退变的分子生物学机制。为椎间盘退变性疾病
的临床治疗,阐释挖掘经典名方疗效科学内涵及中药
现代化研究提供新思路。本研究结果表明压力负荷是
诱导椎间盘退变的主要因素^[5-6]。前期研究结果及国
外文献均显示^[7-8]髓核细胞随着静水压越大,髓核细胞

凋亡率越高。本研究结果显示在随着静水压增加
(0.3,1.0,3.0 MPa)髓核细胞凋亡率明显增加,细胞
结构破坏程度增加,而人体在坐位状态下人体椎间盘
的压力大于人平躺时椎间盘的压力,椎间盘退变速度
更快^[9]。课题前期研究结果也显示:髓核细胞在
0.3 MPa静压负荷下细胞活性较好,而在3.0 MPa高
负荷下,髓核细胞凋亡率增加。这些结果同国外研究

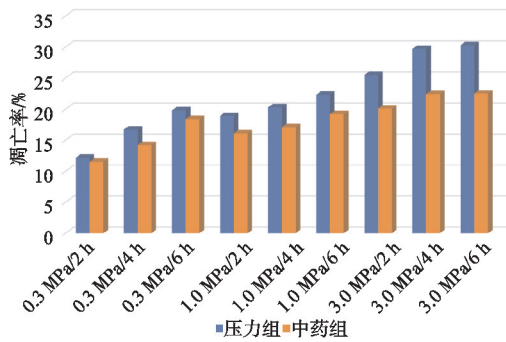


图 5 单纯压力组和中药组髓核细胞在不同静水压下培养 2,4,6 h 后的凋亡率比较

者的研究结果一致^[10-11]。研究显示随着作用时间的增加压力组和中药组髓核细胞凋亡率和细胞突出断裂程度增加。前期研究及有关文献报道^[12-13]对髓核细胞培养后显示,在 4 h 内细胞凋亡速度增加缓慢,而超过 4 h 后,髓核细胞凋亡逐渐增加,说明髓核细胞在 4 h 节点上出现退变,因此试验选择 2 h,4 h,6 h 作为对照来研究中草药对椎间盘退变早期的作用。

历代医家运用中医药治疗椎间盘退变多从活血化瘀等角度辨证论治,身痛逐瘀汤功效以活血化瘀见长^[14-15]。现在医学认为腰腿痛的主要原因是体内大量炎症因子的释放所致,而身痛逐瘀汤中牛膝等中药的活性成分具有抗炎、镇痛、抗氧化等功能^[16-18]。本实验结果证明,身痛逐瘀汤可降低髓核细胞凋亡率,改善不同压力下髓核细胞超微结构的破坏,从而“保护”髓核细胞,延缓椎间盘退变,以达到中医药预防和治疗椎间盘退行性疾病的目。

综上所述,本研究部分探明了静水压对椎间盘髓核细胞形态变化及凋亡的影响,部分揭示了身痛逐瘀汤治疗椎间盘退变的疗效,为中医药治疗椎间盘退变提供新的生物力学证据。

参考文献

[1] MA X, LIN Y, YANG K, et al. Effect of lentivirus-mediated survivin transfection on the morphology and apoptosis of nucleus pulposus cells derived from degenerative human disc in vitro[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(1): 186-194.

[2] MISTRY J, FALLA D, NOBLET T, et al. Clinical indicators to identify neuropathic pain in low back-related leg pain: protocol for a modified Delphi study[J]. *BMJ Open*, 2020, 10(2): e033547.

[3] ZHANG H, ZHANG M, MENG L, et al. Investigation of key miRNAs and their target genes involved in cell apoptosis during intervertebral disc degeneration development using bioinformatics methods[J]. *J Neurosurg Sci*, 2020, 2(4): 3-6.

[4] WANG Y, SONG Q, HUANG X, et al. Long noncoding

RNA GAS5 promotes apoptosis in primary nucleus pulposus cells derived from the human intervertebral disc via Bcl-2 downregulation and caspase-3 upregulation[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2164-2172.

[5] 朱立国, 张平, 宋庆慧, 等. 补肾活血方对沙鼠增龄过程中腰椎软骨终板钙化干预作用的初步研究[J]. *中国骨伤*, 2017, 30(10): 926-932.

[6] 朱立国, 展嘉文, 朱宏伟, 等. 兔椎间盘器官与脊柱运动节段离体培养条件下髓核组织的变化[J]. *中国骨伤*, 2015, 28(9): 824-831.

[7] 刘志超, 张帆, 陈江, 等. 身痛逐瘀汤对静水压下人髓核细胞凋亡和基质相关蛋白表达的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(8): 1108-1113.

[8] PAUL P L, EMANUEL K S, KINGMA I, et al. Changes in intervertebral disk mechanical behavior during early degeneration[J]. *J Biomech Eng*, 2018, 140(9): 091008.

[9] 周林杰, 杨民, 张俊宇, 等. 退变性腰椎滑脱中腰椎-骨盆结构参数的特点分析[J]. *中国骨伤*, 2020, 33(9): 862-866.

[10] LIN Y Z, JIAO Y C, YUAN Y, et al. Propionibacterium acnes induces intervertebral disc degeneration by promoting nucleus pulposus cell apoptosis via the TLR2/JNK/mitochondrial-mediated pathway[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 29323102.

[11] BOWDEN J A, BOWDEN A E, WANG H, et al. In Vivo correlates between daily physical activity and intervertebral disc health[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(5): 1313-1323.

[12] ZHAO Q L, QUAN Z, XU H G, et al. Expression of AMP-activated protein kinase in subcultured rat endplate chondrocytes[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2016, 20(29): 4297-4302.

[13] 刘志超, 张帆, 祝永刚, 等. 身痛逐瘀汤方对椎间盘退变中 PI3K/AKT 通路影响的研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(10): 14-19.

[14] 刁志君, 姜宏, 刘锦涛. 细胞自噬对腰椎间盘突出后重吸收的意义[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(4): 386-390.

[15] 李渊, 石俊俊, 任捷, 等. 肥胖与青少年腰椎间盘突出症发病关系[J]. *中国骨伤*, 2020, 33(8): 725-729.

[16] 展嘉文, 朱立国, 冯敏山, 等. 补肾活血方含药血清对离体兔脊柱运动节段压力退变模型的影响[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(7): 627-634.

[17] 孙凯, 朱立国, 齐保玉, 等. 身痛逐瘀汤治疗腰椎间盘突出症疗效和安全性的系统评价和 Meta 分析[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(5): 1159-1166.

[18] 石雷, 林新晓, 李立华, 等. 内外兼治法对血瘀气滞型腰痛病腰腿痛症状改善的影响[J]. *世界中医药*, 2017, 12(9): 2080-2083.