

枳壳甘草汤调控炎性小体改善腰椎间盘突出症痛敏的实验研究

张擎天¹ 黄泽灵¹ 陈华¹ 段星星¹ 陆斌杰¹ 沈晓峰¹ 李宇卫¹ 徐波^{1△}

[摘要] 目的:探讨髓核组织 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体活化对酸敏感离子通道 3(ASIC3)所介导痛敏环节的激活作用,研究枳壳甘草汤改善腰椎间盘突出症(Lumbar Disc Herniation,LDH)疼痛的干预机制。方法:将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、Caspase-1 抑制剂组、中药低剂量组(生药 3 g/kg)、中药中剂量组(生药 6 g/kg)、中药高剂量组(生药 12 g/kg)每组 10 只。除空白组外,各组大鼠进行腰椎间盘突出症造模 5 d 后,进行相应干预及灌胃给药,持续 20 d。于造模前及造模后 5, 12, 19 d 测定各组大鼠机械与冷刺激缩足阈值。取材后用苏木精-伊红(HE)染色检测椎间盘退变程度,免疫组化检测髓核组织 Caspase-1p10 的表达,ELISA 法检测血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的含量,蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测椎间盘组织 NLRP3、Caspase-1p10 与背根神经节(Dorsal Root Ganglion, DRG)中 ASIC3 的表达,实时聚合酶链式反应(RT-PCR)检测背根神经节中 ASIC3 的 mRNA 表达。结果:机械与冷刺激缩足阈值结果:腰椎间盘突出症模型组大鼠表现出典型的冷痛敏和机械痛敏状态,抑制剂组、枳壳甘草汤治疗各组中大鼠痛敏状态均获缓解,冷刺激与机械刺激缩足阈值均较模型组有明显改善,差异有统计学意义($P<0.05$)。HE 染色结果:腰椎间盘突出症模型组大鼠纤维环排列紊乱,部分肿胀断裂;抑制剂组及枳壳甘草汤治疗各组与模型组相比,纤维环排列均较为有序,且纤维环无明显断裂。免疫组化结果:与模型组相比,枳壳甘草汤治疗组免疫组化 Caspase-1p10 平均光密度更弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。ELISA 检测结果:治疗各组较模型组炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。PCR 结果:抑制剂组及枳壳甘草汤治疗各组与模型组相比,ASIC3 的 mRNA 表达均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western Blot 结果:抑制剂组及枳壳甘草汤治疗各组与模型组相比,NLRP3、Caspase-1p10、ASIC3 蛋白表达水平均出现显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:NLRP3 炎性小体的活化能够调控 ASIC3 的转录及功能,进而构建并维持腰椎间盘突出症的痛敏状态。枳壳甘草汤改善腰椎间盘突出症痛敏的机制与其对 NLRP3 炎性小体/ASIC3 信号通路的调控有关。

[关键词] 枳壳甘草汤;腰椎间盘突出症;炎性小体;酸敏感离子通道

[中图分类号] R681.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)01-0013-07

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240103

Experimental Study of Zhiqiao Gancao Decoction in Regulating Inflammatory Bodies to Improve Pain Sensitivity of Lumbar Intervertebral Disc Herniation

ZHANG Qingtian¹ HUANG Zeling¹CHEN Hua¹ DUAN Xingxing¹LU Binjie¹ SHEN Xiaofeng¹LI Yurwei¹ XU Bo^{1△}

基金项目:国家自然科学基金项目(82174399)

江苏省自然科学基金项目(BK20211084)

江苏省中医药科技发展计划青年项目(QN202007)

江苏省科教能力提升工程:江苏省医学重点学科/

实验室建设单位项目(苏卫科教[2022]17 号)

苏州市中西医结合学会科研项目(SKJYD2021227)

苏州市科技发展计划项目(SKYXD2022053)

第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目

(国中医药人教函[2022]76 号)

中医骨伤重点实验室建设项目(JSDW202253,

SZS2022019)

¹ 南京中医药大学附属苏州中医医院(江苏 苏州,215100)

[△]通信作者 E-mail:xubo12080@163.com

¹ Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215100, Jiangsu China.

Abstract Objective: To elucidate the activation of Nod-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammatory corpuscles in nucleus pulposus tissue on the activation of pain sensitive links mediated by acid-sensing ion channel 3 (ASIC3), and to explore the intervention mechanism of Zhiqiao Gancao decoction in improving the pain of lumbar disc herniation (LDH). **Methods:** 60 SD rats were randomly divided into blank group, model group, Caspase-1 inhibitor group, low dose group of Zhiqiao Gancao decoction (crude drug 3 g/kg), medium dose group of Zhiqiao Gancao decoction (crude drug 6 g/kg), and high dose group of Zhiqiao Gancao decoction (crude drug 12 g/kg), with 10 rats in each group. Except for blank group, the LDH model was established in all other groups of rats. 5 d after modeling, the rats in each group were given corresponding intervention and intragastric administration for 20 d. The threshold of mechanical and cold stimulation foot shrinkage contraction of rats in each group was measured before modeling and 5, 12 and 19 d after modeling. After extraction, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the degree of intervertebral disc degeneration; immunofluorescence was used to detect the expression of Caspase-1p10 in nucleus pulposus tissue; ELISA was used to detect IL-6, TNF- α and IL-1 β content; Western Blot was used to detect the expression of NLRP3, Caspase-1p10 in intervertebral disc tissue and ASIC3 in dorsal root ganglia (DRG). The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of ASIC3 in DRG. **Results:** Mechanical and cold stimulation foot shrinkage threshold results: The LDH model group rats showed typical cold and mechanical pain sensitivity states, and the pain sensitivity state of the rats in the inhibitor group and Zhiqiao Gancao decoction treatment groups were relieved, and the cold stimulation and mechanical stimulation foot shrinkage threshold were significantly improved compared with the model group ($P < 0.05$). HE staining results: In the LDH model group, the fibrous rings were arranged in disorder, and some of them were swollen and broken. Compared with the model group, the arrangement of fibrous rings in the inhibitor group and the Zhiqiao Gancao decoction treatment groups were more orderly, and the fibrous rings were not significantly broken. Immunohistochemistry: Compared with the model group, the average optical density of Caspase-1p10 in the treatment group of Zhiqiao Gancao decoction was weaker, with a significant difference ($P < 0.05$). ELISA results: The inflammatory factors IL-6, IL-1 β and TNF- α in the treatment groups decreased significantly compared with model group, with statistical differences ($P < 0.05$). PCR results: Compared with the model group, the expression of ASIC3 mRNA in the inhibitor group and the Zhiqiao Gancao decoction treatment groups decreased significantly, with statistical difference ($P < 0.05$). Western Blot results: Compared with the model group, the expression levels of NLRP3, Caspase-1p10 and ASIC3 protein in the inhibitor group and Zhiqiao Gancao decoction treatment groups were significantly decreased, with statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** The activation of NLRP3 inflammatory corpuscles can regulate the transcription and function of ASIC3, and thereby construct and maintain the pain sensitivity state of LDH. The mechanism of Zhiqiao Gancao decoction in improving LDH pain is related to its regulation of NLRP3 inflammatory body/ASIC3 signal pathway.

Keywords: Zhiqiao Gancao decoction; lumbar disc herniation; NLRP3 inflammatory body; acid-sensing ion channels (ASICs)

腰椎间盘突出症(Lumbar Disc Herniation, LDH)在临床中极为常见,但其发病机制尚不清晰。在临床实践中发现,疼痛是腰椎间盘突出症的典型症状,对患者疼痛症状的干预是治疗腰椎间盘突出症的一个重要环节^[1]。吴门医派枳壳甘草汤为本院名老中医龚正丰教授所创,收录于《国家级名医秘验方》,前期临床研究已经证实该方能够有效改善腰椎间盘突出症患者的疼痛症状^[2-4],但其具体机制有待研究。Nod样受体结构域蛋白3(Nod-Like Receptor Thermal Protein Domain Associated Protein 3, NLRP3)小体可以通过调控各型炎症因子,启动细胞焦亡,参与椎间盘退变的形成^[5],在临床观察中腰椎间盘突出症患者NLRP3炎性小体的表达明显上调^[6],但NLRP3小体与腰椎间盘突出症患者痛敏状态的相关性尚不清楚。本实验通过制备的腰椎间盘突出症大鼠模型,研究NLRP3炎性小体与ASIC3所介导痛敏的关系,同时探讨枳壳甘草汤抑制腰椎间盘突出

出症痛敏的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取2月龄SFP级SD大鼠60只,雌雄各半,体重为200~250 g(北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号为北京SYXK(京)2017-0033)。饲养环境温度 $18\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度为28%,每天光照12 h。

1.2 实验药物及试剂

枳壳甘草汤(专利号为201910496548.2)组成:枳壳10 g、甘草6 g、当归10 g、丹参10 g、三棱10 g、莪术10 g、制黑白丑各6 g。饮片购自苏州市中医医院药剂科,常规煎煮浓缩至浓度为生药1.2 g/mL。NLRP3(affbiotech, DF7438), Caspase-1p10(bioss, bs-20617R), 酸敏感离子通道3(ASIC3, abcam, AB302776), β -Actin抗体(proteintech, 20536-1-AP), SYBR GreenI 荧光染料, 通用荧光定量PCR试剂盒(南京诺唯赞生物科技有

限公司),苏木精-伊红(HE)染液试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,KGA224),DAB Kit(福州迈新生物科技有限公司,DAB-1031),abbit-anti-Caspase-1p10(武汉三鹰,22915-1-AP),PBS(江苏凯基生物技术股份有限公司,KGB5001),LAPUDA(拉普达,LA167616H(96t),LA167616S(48t))。

1.3 实验仪器

酶标仪(Mini-PROTEANTetra,biorad);化学发光成像系统(上海天能,Tanon5200);ELx800 光吸收酶标,ELx50 微孔板全自动洗板机;LightCycle96 实时荧光定量 PCR 仪(北京科普兴业科技发展有限公司);倒置显微镜(日本 Olympus,CKX41);数字病理切片扫描仪(日本 Olympus,VS200);台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司,THZ-312),电热扶风干燥箱(上海圣欣科学仪器有限公司,101AS-3)。

1.4 方法

1.4.1 分组方法 将大鼠随机分为空白组、模型组、Caspase-1 抑制剂组及枳壳甘草汤低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 10 只。

1.4.2 造模方法 以 3%戊巴比妥 1 mL/kg 腹腔注射麻醉后,将大鼠背部被毛发用剃毛器刮除,在尾端距离大鼠肛门约 1 cm 处切断尾椎,取出尾椎髓核及椎间盘后缝合伤口。以 L₅ 棘突为标志点行正中纵行切口,剥离两侧骶棘肌,暴露 L_{4/5} 椎板。咬除 L_{4/5} 棘突及右侧椎板,将取出的自体髓核放置于硬膜外腔,平行于 L_{4/5} 神经根部位,然后缝合伤口。单笼喂养 3 d,同时腹腔注射青霉素 8×10⁴ U/只,使大鼠尾部伤口基本收口结痂^[7]。

1.4.3 干预方法 空白对照组:无造模,无药物干预。模型组:造模后无药物干预。Caspase-1 抑制剂组:造模后 5 d 腹腔注射抑制剂,1 mg/kg,1 次/d,持续 1 周。中药低剂量组:造模后 5 d 以生药 3 g/kg 枳壳甘草汤灌胃干预,持续 20 d。中药中剂量组:造模后 5 d 以生药 6 g/kg 枳壳甘草汤灌胃干预,持续 20 d。中药高剂量组:造模后 5 d 以生药 12 g/kg 枳壳甘草汤灌胃干预,持续 20 d。

1.4.4 标本制作方法 药物干预完成后,腹腔注射 3%戊巴比妥钠麻醉,预冷凝管腹主动脉采血。安乐死大鼠,消毒后剥离背侧皮肤、肌肉,暴露椎板,咬骨钳掀开椎板,迅速用外科镊分离膨大突起的 L₄/L₅ 背根神经节组织,分离保存相应椎间盘组织。一部分椎间盘组织经固定、脱钙、脱水、透明、石蜡包埋后切片,用于苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色,其余组织-80℃冰箱保存备用。

1.5 实验指标测定

机械刺激缩足阈值:以造模前、造模后 5,12,19 d

为时间节点,测定机械刺激缩足阈值,于上午 11:00 采用 von Frey 丝测试缩足阈值。待大鼠安静后置于金属笼内,分别用 2,4,8,16,26,60,100 g 质量的 von Frey 丝刺激大鼠,使丝针呈 S 形,持续 6~8 s,若大鼠出现快速缩足反应、舔舐患足或嘶叫,则判定为阳性反应,不同质量的 von Frey 丝分别重复刺激 10 次,间隔 5 s,以达到至少 5 次阳性反应的最小值作为该大鼠的缩足阈值。从最小力度开始刺激,若没有缩足反应,则加重刺激力度^[8-9]。

冷刺激缩足阈值:分别于造模前、造模后 5,12,19 d 检测冷刺激缩足阈值。所有大鼠的行为测试都在 9~12 点进行,冷板温度设置为(0±3)℃,记录从接触冷板至大鼠首次出现快速缩足或者舔舐反应的时间,每次测量间隔时间为 10 min,每只大鼠至少测量 3 次^[10]。

苏木精-伊红染色:取各组椎间盘组织切片,按常规方法进行脱蜡,水合;将切片用二甲苯浸泡 5 min,更换二甲苯后再浸泡 5 min;然后分别于无水乙醇中浸泡 5 min,95%乙醇中浸泡 5 min,85%乙醇中浸泡 5 min,70%乙醇中浸泡 5 min,PBS 浸洗 3 min×3 次;常规 HE 染色;晾片、封片后,光学显微镜下观察拍照。

免疫组织化学染色:取各组椎间盘组织切片,进行常规脱蜡、水合后,进行抗原修复,BSA 封闭液室温孵育封闭 30 min。加入一抗 4℃孵育过夜,次日加入二抗室温孵育 20 min。DAB 显色液避光显色后,苏木精复染细胞核。晾片、封片后,光学显微镜下观察拍照。利用 Image J 软件测量平均光密度。

酶联免疫吸附检测(ELISA):依据 ELISA 试剂盒说明,对标椎品进行浓度梯度稀释,绘出标准曲线。设立标准、空白、样品等三孔,各重复 3 次;依次加样后覆膜,37℃孵育 90 min;清洗孔板,改用酶结合液覆膜孵育 30 min;洗板,加入显色液后避光孵育 15 min,最后放入终止液。酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度值。

蛋白免疫印迹(Western Blot)法:样品称重后按每 100 mg/200 μL 加入 RIPA 裂解液,球磨仪碾磨 15 min。冰上静置 30 min 后 4℃离心取上清。BCA 法测定蛋白浓度,随后蛋白变性仪将蛋白煮沸,-20℃保存。根据蛋白浓度进行配平,加样电泳,溴酚蓝至胶底部后结束电泳,转膜 60 min,加 5%脱脂奶粉室温封闭,放入一抗后室温摇床孵育过夜。次日洗膜后加入二抗,室温摇床孵育 2 h,ECL 显色液曝光,结果以 GAPDH 为内参半定量计算。

PCR:Trizol 法提取样本总 RNA,用分光光度计测定 RNA 的光密度值,评价 RNA 纯度并做定量分析。Prime Script RT reagent Kit 20 μL 反应体系逆转录,

-20℃保存。检索 GenBank 中相应的基因序列, Oligov6.6软件设计引物(表1)。5×Prime Script RT Master Mix 20 μL 体系扩增,结果按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 半定量计算。

表 1 目标分子引物序列

基因	序列
ASIC3	F:5'-CTTGAGGACATGTTGTTGGA-3' R:5'-CATTCGAGTAAAGATCACTGTG-3'
GAPDH	F:5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3' R:5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'

1.6 统计学方法

实验数据符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,用 SPSS 26.0 统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用 Bonferroni 事后比较法, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠机械刺激缩足阈值与冷刺激缩足阈值比较

与空白组比较,19 d 时模型组大鼠机械刺激缩足阈值显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),呈现典型痛敏状态;经药物干预后,与模型组比较,19 d 时抑制剂组与中药中、高剂量组大鼠机械刺激缩足阈值提高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),痛敏状态明显改善,见图 1。

与空白组比较,19 d 时模型组大鼠冷刺激缩足阈值显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);经药物干预后,与模型组比较,19 d 时抑制剂组与中药各剂量

组大鼠冷刺激缩足阈值均有提高,冷痛敏明显改善,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

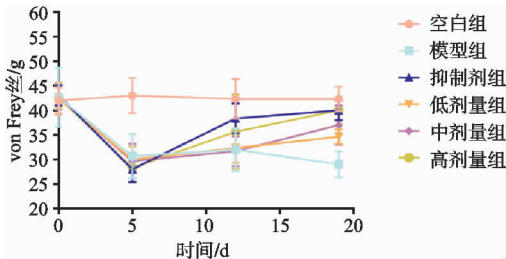


图 1 大鼠机械刺激缩足阈值

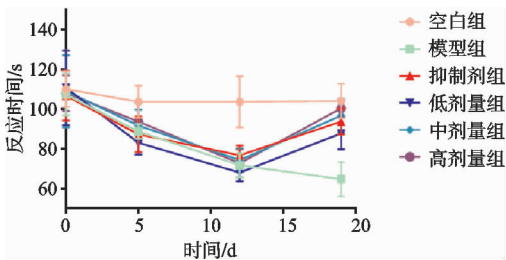
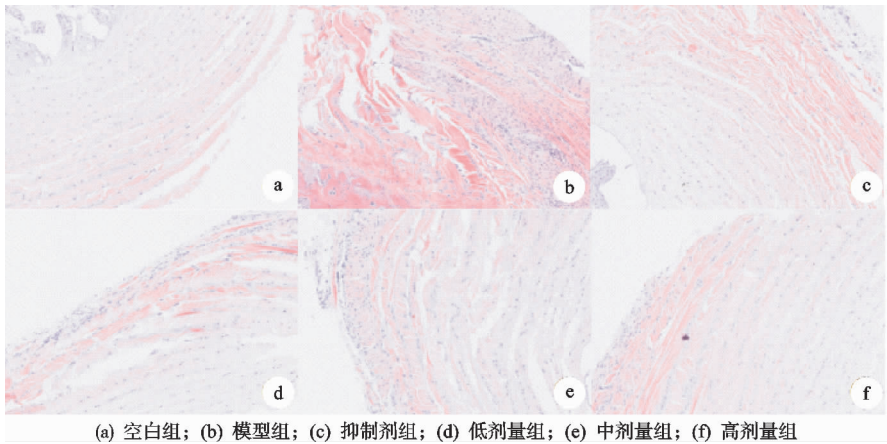


图 2 大鼠冷刺激缩足阈值

2.2 各组大鼠椎间盘组织病理染色结果比较

HE 染色结果显示:空白组椎间盘纤维环排列整齐有序,层次结构明确,髓核间隔清晰;模型组纤维环排列完全无序,细胞肿胀变性且排列紊乱;抑制剂组与高剂量组纤维环排列稍紊乱,极少部分细胞肿胀变性,纤维环结构层次尚属明确;低、中剂量组之椎间盘纤维环也出现明显紊乱,部分细胞出现变形,然较模型组的完全无序稍好,见图 3。



(a) 空白组; (b) 模型组; (c) 抑制剂组; (d) 低剂量组; (e) 中剂量组; (f) 高剂量组

图 3 各组大鼠组织病理学 HE 染色(×100)

2.3 各组大鼠椎间盘组织 Caspase-1p10 免疫组化染色结果比较

免疫组化结果显示:与空白组比较,模型组 Caspase-1p10 阳性区域平均光密度明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,中药中、高剂量组 Caspase-1p10 阳性区域平均光密度明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。

2.4 各组大鼠血清炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达比较

ELISA 结果显示:与空白组比较,模型组大鼠血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达均明显上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,抑制剂组与中药各剂量组大鼠血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达均有明显下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 5。

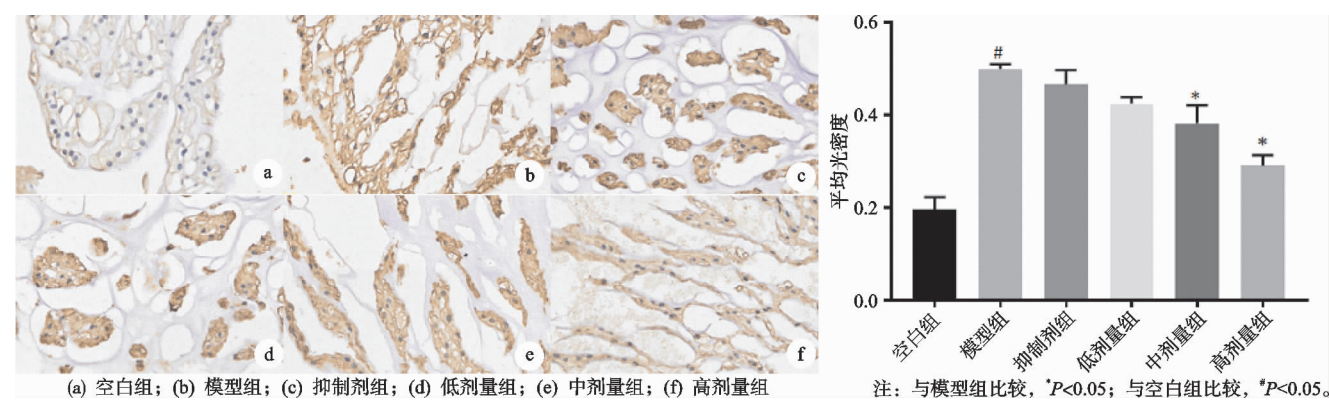


图 4 各组大鼠椎间盘组织 Caspase-1p10 免疫组化染色结果 (×400)

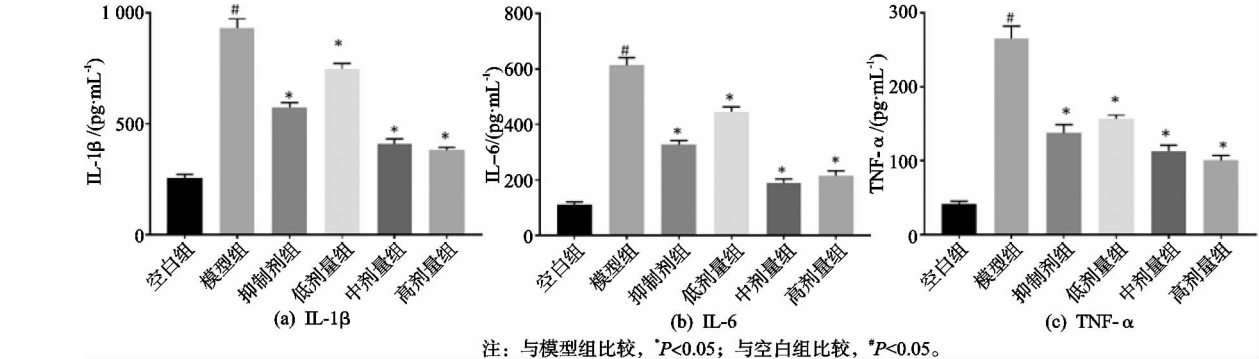


图 5 椎间盘髓核组织炎症因子表达

2.5 各组大鼠背根神经节 ASIC3 mRNA 表达比较

PCR 结果显示：与空白组比较，模型组大鼠背根神经节 ASIC3 mRNA 表达明显上调，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与模型组比较，抑制剂组与中药各剂量组大鼠背根神经节 ASIC3 mRNA 表达均明显下调，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与抑制剂组比较，中药低剂量组大鼠背根神经节 ASIC3 mRNA 表达较高 ($P<0.05$)，中药中、高剂量组表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 6。

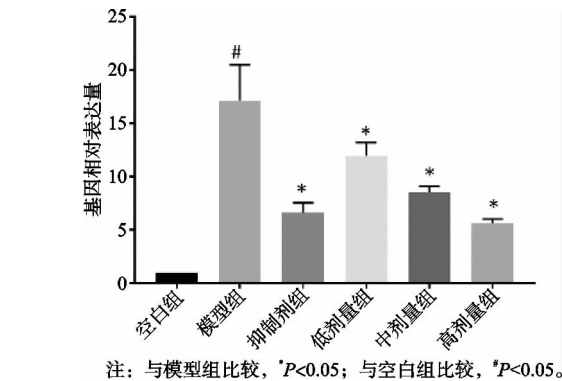


图 6 椎间盘髓核组织 ASIC3 的 mRNA 表达

2.6 各组大鼠椎间盘髓核组织 NLRP3、Caspase-1p10 与背根神经节 ASIC3 蛋白表达比较

各组大鼠椎间盘髓核组织 NLRP3、Caspase-1p10 与背根神经节 ASIC3 蛋白表达比较见图 7。Western Blot 结果显示：与空白组比较，模型组大鼠髓核组织

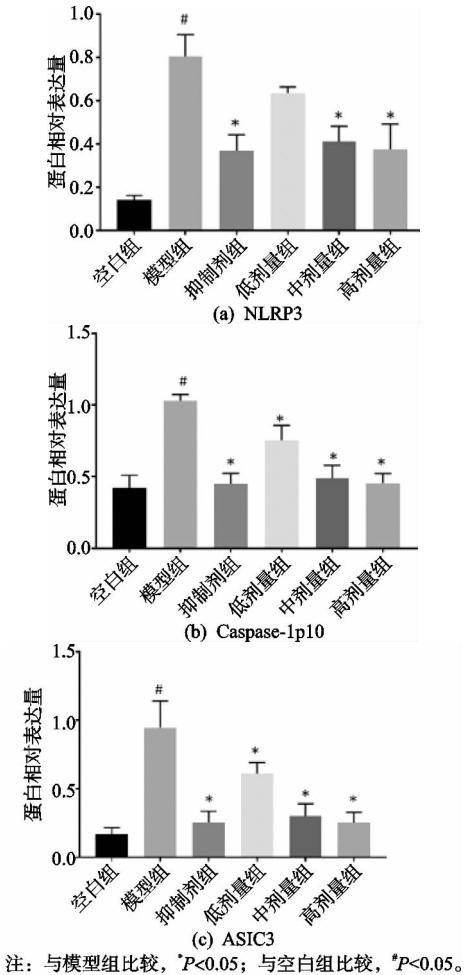


图 7 椎间盘髓核组织 NLRP3、Caspase-1p10 与背根神经节上 ASIC3 的蛋白表达

NLRP3、Caspase-1p10 与背根神经节上 ASIC3 的蛋白表达均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,抑制剂组大鼠髓核组织 NLRP3、Caspase-1p10 与背根神经节上 ASIC3 的蛋白均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,中药低剂量组大鼠髓核组织 Caspase-1p10 与背根神经节上 ASIC3 的蛋白表达降低($P < 0.05$),中药中、高剂量组大鼠髓核组织 NLRP3、Caspase-1p10 与背根神经节上 ASIC3 的蛋白均降低($P < 0.05$);与中药中、高剂量组比较,抑制剂组 NLRP3、Caspase-1p10、ASIC3 的蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

疼痛是腰椎间盘突出症最典型的症状,几乎所有腰椎间盘突出症患者均有不同程度的腰背部疼痛。引起腰椎间盘突出症疼痛的因素有很多,诸如神经根机械压迫、神经根炎性刺激、细胞凋亡等。与传统认为腰椎间盘突出症的疼痛仅来源于机械压迫不同,近年来由于大量的临床研究证实腰椎间盘突出症的疼痛与髓核压迫并不完全呈现出一致性^[11-12],故而更多地关注炎症领域。

背根神经节位于脊神经后根上,是产生根性痛的关键结构^[13]。酸敏感离子通道(Acid-Sensing Ion Channels, ASICs)是一类主要调控痛觉、酸味觉等多项生理功能的质子门控阳离子通道。位于背根神经节上的亚型 ASIC3 与缺血、炎症或组织酸中毒相关疼痛的传导密切相关^[14],研究表明 ASIC3 的表达和功能可被促炎因子调控,如 TNF- α 、IL-1 β 等^[15-16]。NLRP3 炎性小体主要由 NLRP3 蛋白(Nod 样受体结构域蛋白 3)、凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD, ASC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 1 前体(pro-Caspase-1)三种蛋白组装构成,NLRP3 炎性小体的活化可以使 pro-Caspase-1 水解成为 Caspase-1,而 Caspase-1 是调控 IL-1 β 成熟与分泌的关键酶,Caspase-1 能将 IL-1 β 的前体剪切为其成熟形式并释放至胞外,启动炎症级联反应^[17-19],这表明 NLRP3 炎性小体的活化与 ASIC3 的激活密切相关。

本研究通过注射 Caspase-1 抑制剂干扰腰椎间盘突出症模型大鼠体内 NLRP3 的活化,借此观察 NLRP3 炎性小体与 ASIC3 的激活及腰椎间盘突出症痛敏状态的关系,结果显示:模型组大鼠的机械与冷刺激缩足阈值较空白组而言出现明显下降,呈现典型痛敏状态,HE 染色下纤维环排列完全无序,细胞肿胀变性且排列紊乱。大鼠椎间盘 NLRP3 和 Caspase-1p10 蛋白表达与背根神经节组织中 ASIC3 蛋白及 mRNA 表达明显升高,大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症

因子的含量上升。这表明 NLRP3 炎性小体的活化可以调控 ASIC3 的转录与功能,进而形成痛敏状态。用 Caspase-1 抑制剂后,大鼠的机械与冷刺激缩足阈值较模型组而言均得到明显改善,HE 染色下纤维环排列整齐、结构有序,且抑制剂能够显著下调模型大鼠椎间盘 NLRP3 和 Caspase-1p10 蛋白表达并下调背根神经节组织 ASIC3 蛋白及 mRNA 表达,降低大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的含量,表明抑制 NLRP3 炎性小体活化,可以抑制 ASIC3 的转录,从而改善腰椎间盘突出症痛敏状态。

中医多把腰椎间盘突出症归类为“腰痛”范畴,其病因病机主要归责于虚、瘀^[20],临床治疗也多采用补虚、祛湿、化瘀等治疗手段^[21]。然而古语云不通则痛,无论风寒湿热虚,皆需瘀阻脉络方能致痛,故腰痛的治疗化瘀应始终贯穿其中。枳壳甘草汤全方由枳壳、甘草、制黑白丑、莪术、三棱、丹参、当归组成。方中枳壳理气止痛,三棱、莪术破血行气、化瘀止痛,当归、丹参活血通络,黑白两丑化瘀利水,甘草调和诸药、理气止痛。全方以吴门医派“久痛入络”之观点为核心,结合“络以通为用”,最终治以理气化瘀,利水通络止痛。主要运用活血化瘀利水等手段将久塞之络脉畅通,最终达到镇痛的目的。现代药理学也证明方中三棱、莪术等药物能够下调炎症因子的表达^[22-23],达到抑制炎症的目的。在前期基础研究中证实枳壳甘草汤能够抑制 TNF- α 等炎症因子的形成^[24],且能显著降低 ASIC3 的表达。本研究显示灌服不同剂量的枳壳甘草汤后,腰椎间盘突出症大鼠的机械与冷刺激缩足阈值均有所提高,大鼠痛敏状态得到改善;椎间盘病理染色也显示该方可以延缓腰椎间盘突出症大鼠椎间盘退变,且与剂量存在一定的相关性。枳壳甘草汤高剂量组同抑制剂组一样,也能够显著下调模型大鼠椎间盘 NLRP3 和 Caspase-1p10 蛋白表达,下调背根神经节组织 ASIC3 蛋白及 mRNA 表达,降低大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的含量,表明枳壳甘草汤可以通过抑制 NLRP3 炎性小体的形成来阻止 ASIC3 的激活,进而调控腰椎间盘突出症的痛敏状态,缓解腰椎间盘突出症的疼痛症状。

综上所述,NLRP3 炎性小体可以通过释放炎症因子来调控 ASIC3 的功能,借此维持腰椎间盘突出症的痛敏状态,而枳壳甘草汤正是通过抑制 NLRP3 炎性小体/ASIC3 通路来治疗腰椎间盘突出症疼痛的。然而中药复方化学成分复杂,具有多成分、多靶点特点,仅从 NLRP3 炎性小体方面研究其抑制腰椎间盘突出症疼痛的机制是不完备的,其余可能涉及的机制还有待进一步探索。

参考文献

- [1] AMMERMAN J,WATTERS W C,INZANA J A,et al. Closing the treatment gap for lumbar disc herniation patients with large annular defects;a systematic review of techniques and outcomes in this high-risk population[J]. Cureus,2019,11(5):e4613.
- [2] 徐坤林,姜宏. 枳壳甘草汤治疗急性腰椎间盘突出症 64 例[J]. 中医正骨,2010,22(9):67.
- [3] 李红卫,张志刚,徐坤林,等. 枳壳甘草汤加减治疗腰椎间盘突出症 30 例[J]. 河南中医,2011,31(2):170-171.
- [4] 汤晓晨,龚正丰,李宇卫,等. 枳壳甘草汤治疗中青年腰腿痛 26 例临床观察[J]. 中医临床研究,2016,8(31):59-60.
- [5] BAI Z B,LIU W,HE D S,et al. Protective effects of autophagy and NFE2L2 on reactive oxygen species-induced pyroptosis of human nucleus pulposus cells[J]. Aging, 2020,12(8):7534-7548.
- [6] ZHANG A,WANG K,DING L,et al. Bay11-7082 attenuates neuropathic pain via inhibition of nuclear factor- κ B and nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 inflammasome activation in dorsal root ganglions in a rat model of lumbar disc herniation[J]. Pain Res,2017,13(10):375-382.
- [7] 沈晓峰,龚正丰,梁国强,等. 吴门枳壳甘草汤对腰椎间盘突出大鼠酸敏离子通道及相关因子影响的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(1):36-39.
- [8] BIDDLESTONE L,CORBETT A D,DOLAN S. Oral administration of Ginkgo biloba extract, Egb-761 inhibits thermal hyperalgesia in rodent models of inflammatory and post-surgical pain[J]. Br J Pharmacol,2007,151(2):285-291.
- [9] 王玥,张玉函,王家益,等. 银质针导热治疗肌筋膜疼痛综合征大鼠骨骼肌线粒体和 SIRT3 表达的变化[J]. 中国组织工程研究,2024,28(14):2202-2208.
- [10] 邢润麟,王培民,茆军,等. 基于 thermoTRP 介导冷痛敏机制对膝关节炎虚寒冷痛的研究[J]. 南京中医药大学学报,2016,32(4):347-351.
- [11] COSAMALÓN-GAN I,COSAMALÓN-GAN T,MATOS-PIAGGIO G,et al. Inflammation in the intervertebral disc herniation[J]. Neurocirugia,2021,32(1):21-35.
- [12] 李长海,汪青春,周兵,等. 腰椎间盘突出症临床症状体征的严重度与髓核突出大小的关系[J]. 实用医学杂志,2009,25(6):918-920.
- [13] LIU Y,LI J,LI H,et al. AMP-activated protein kinase activation in dorsal root ganglion suppresses mTOR/p70S6K signaling and alleviates painful radiculopathies in lumbar disc herniation rat model[J]. Spine (Phila Pa 1976),2019,44(15):E865-E872.
- [14] LI W G,XU T L. ASIC3 channels in multimodal sensory perception[J]. ACS Chem Neurosci,2011,2(1):26-37.
- [15] ZHAO K,AN R,XIANG Q,et al. Acid-sensing ion channels regulate nucleus pulposus cell inflammation and pyroptosis via the NLRP3 inflammasome in intervertebral disc degeneration[J]. Cell Prolif,2021,54(1):e12941.
- [16] ROSS J L,QUEME L F,COHEN E R,et al. Muscle IL-1 β drives ischemic myalgia via ASIC3-mediated sensory neuron sensitization[J]. J Neurosci,2016,36(26):6857-6871.
- [17] KONG R,SUN L,LI H,et al. The role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of rheumatic disease[J]. Autoimmunity,2022,55(1):1-7.
- [18] MANGAN M S J,OLHAVA E J,ROUSH W R,et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. Nature Reviews Drug Discovery,2018,17(8):588-606.
- [19] HUANG Y,XU W,ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. Cell Mol Immunol,2021,18(9):2114-2127.
- [20] 聂颖,卢敏,杨雷,等. 基于“虚、瘀”和筋骨失衡理论论治腰椎间盘突出症的经验[J]. 湖南中医药大学学报,2021,41(6):907-910.
- [21] 陈志芬,韦成玉,陈广辉,等. 中药内服治疗腰椎间盘突出症常用方的选择策略[J]. 临床医学研究与实践,2022,7(14):188-190.
- [22] 黄礼闯,赵梦亭,桑夏楠,等. 三棱-莪术药对化学成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志,2021,36(11):6612-6616.
- [23] 栾希英,李珂珂,韩兆东,等. 三棱、莪术对肝纤维化大鼠 IL-1、IL-6、TNF- α 的影响[J]. 中国免疫学杂志,2004(12):834-837.
- [24] 杨志新,申云杰. 枳壳甘草汤加减辅助椎板开窗减压术对退行性椎管狭窄症患者腰椎功能及血清炎症因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(28):3097-3099.

(收稿日期:2023-06-05)