

独活寄生汤对白介素 1β 诱导髓核细胞凋亡和内质网应激的影响周鹄¹ 李艳丽¹ 杜世阳¹ 杨若鹏¹ 夏平² 刘伟^{1△} 冯晶^{1△}

[摘要] 目的:探讨独活寄生汤含药血清对白介素 1β 诱导髓核细胞凋亡和内质网应激及其关键途径 PERK/eIF2 α 通路的影响,探究独活寄生汤对椎间盘退变的作用和分子机制。方法:将 40 只 10 周龄的 SD 大鼠以独活寄生汤灌胃,连续灌胃 2 周后经腹主动脉取血,获取含药血清。采用不同浓度独活寄生汤对髓核细胞进行不同时间的处理,细胞活力检测试剂盒(CCK-8)检测髓核细胞的活性。将髓核细胞随机分成 3 组:对照组(未经 IL- 1β 和独活寄生汤含药血清处理)、IL- 1β 组(加入 10 ng/mL IL- 1β 溶液干预 24 h)和独活寄生汤组(加入 10 ng/mL IL- 1β 溶液和独活寄生汤含药血清干预 24 h)。TUNEL 法检测分析髓核细胞凋亡率;免疫荧光法检测各组 CHOP、GRP78 的表达水平;qRT-PCR 法检测各组 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax、BCL-2 和 PERK、eIF2 α 、ATF4 通路 mRNA 的表达;Western Blot 法检测 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax、BCL-2、PERK、eIF2 α 、p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4 通路蛋白的表达。结果:独活寄生汤能够显著提高髓核细胞的活力,改善髓核细胞凋亡。与对照组相比,IL- 1β 组 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax 和 PERK、eIF2 α 、ATF4 基因表达显著上升,BCL-2 基因表达显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 IL- 1β 组相比,独活寄生汤组 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax 和 PERK、eIF2 α 、ATF4 基因表达显著下降,BCL-2 基因表达显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,IL- 1β 组 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax 和 PERK、eIF2 α 、ATF4、p-PERK、p-eIF2 α 蛋白表达显著上升,BCL-2 蛋白显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 IL- 1β 组相比,独活寄生汤组 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax 和 PERK、eIF2 α 、ATF4、p-PERK、p-eIF2 α 蛋白表达显著下降,BCL-2 蛋白显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:独活寄生汤含药血清能够抑制退变髓核细胞的内质网应激和凋亡,进而延缓椎间盘退变,作用途径可能与抑制 PERK/eIF2 α 通路有关。

[关键词] 独活寄生汤;含药血清;椎间盘退变;内质网应激

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)04-0001-07

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240401

Effects of Duhuo Jisheng Decoction on Interleukin- 1β -Induced Human Nucleus Pulposus Cell Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress

ZHOU Juan¹ LI Yanli¹ DU Shiyang¹ YANG Ruopeng¹ XIA Ping² LIU Wei^{1△} FENG Jing^{1△}

¹ Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China;

² Wuhan No. 4 Hospital, Wuhan 430033, China.

Abstract Objective: To study the effect of Duhuo Jisheng decoction drug-contained serum on interleukin 1β -induced human nucleus pulposus cell apoptosis and endoplasmic reticulum stress, and to explore the mechanism of Duhuo Jisheng decoction in intervening intervertebral disc degeneration. **Methods:** The 40 ten-week-old SD rats were gavaged with Duhuo Jisheng decoction, and the abdominal aorta blood after 2 weeks continuous gavage was collected to obtain drug-contained serum. The nucleus pulposus cells were treated by different concentrations of Duhuo Jisheng decoction for different times. The cell viability test kit (CCK-8) was

基金项目:国家自然科学基金项目(82104899)

武汉市知识创新专项项目(2022020801020531)

武汉市卫计委项目(WX21M02, WZ21C04, WZ21C18)

¹ 武汉市第一医院(武汉, 430022)

² 武汉市第四医院

[△]通信作者 E-mail: fjboys80@qq.com(冯晶)

845030601@qq.com(刘伟)

used to detect the activity of nucleus pulposus cells. The nucleus pulposus cells were randomly divide into three groups: control group (without the treatment of IL-1 β and Duhuo Jisheng decoction drug-contained serum), IL-1 β group (adding 10 ng/mL IL-1 β solution for 24 h), Duhuo Jisheng decoction group (adding 10 ng/mL IL-1 β solution and Duhuo Jisheng decoction drug-contained serum for 24 h). The TUNEL method was used to analyze the apoptosis rate of nucleus pulposus cells. Immunofluorescence assay was used to detect the expressions of CHOP and GRP78 in each group; qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of CHOP, GRP78, Cleaved-caspase3, Bax, BCL-2, PERK, eIF2 α and ATF4 in each group; Western Blot was used to detect CHOP, GRP78, Cleaved-caspase3, Bax, BCL-2, PERK, eIF2 α , p-eIF2 α , p-PERK and ATF4 protein expressions. **Results:** Duhuo Jisheng decoction can significantly enhance the vitality and improve the apoptosis of nucleus pulposus cells. Compared with the control group, the mRNA expression of CHOP, GRP78, Cleaved-caspase3, Bax, PERK, eIF2 α and ATF4 in IL-1 β group was significantly decreased; the mRNA expression of BCL-2 was increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the IL-1 β group, the mRNA expression of CHOP, GRP78, Cleaved-caspase3, Bax, PERK, eIF2 α and ATF4 in Duhuo Jisheng decoction group was significantly increased; the mRNA expression of BCL-2 was decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, CHOP, GRP78, Cleaved-caspase3, Bax, PERK, eIF2 α , ATF4, p-PERK, p-eIF2 α protein expression in IL-1 β group was significantly decreased; the protein expression of BCL-2 was increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the IL-1 β group, the CHOP, GRP78, Cleaved-caspase3, Bax, PERK, eIF2 α , ATF4, p-PERK and p-eIF2 α protein expression in Juhuo Jisheng decoction group was significantly increased; the protein expression of BCL-2 was decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Duhuo Jisheng decoction drug-contained serum can inhibit endoplasmic reticulum stress and apoptosis in degenerated nucleus pulposus cells, thereby delaying intervertebral disc degeneration, which may be related to PERK/eIF2 α pathway.

Keywords: Duhuo Jisheng decoction; drug-contained serum; intervertebral disc degeneration; endoplasmic reticulum stress

全球高达 85% 的成年人经历过腰痛, 而椎间盘退变(Intervertebral Disc Degeneration, IDD)是腰痛的首要原因^[1-3]。前期研究发现, 髓核细胞过度凋亡是诱发椎间盘退变的关键^[4]。内质网应激作为细胞凋亡的途径之一, 在炎症、低氧等外界刺激下活跃, 对椎间盘退变的产生具有重要作用^[5]。独活寄生汤长期应用于腰椎退行性疾病, 在缓解疼痛、减少不良反应等方面发挥优势。本研究旨在观察独活寄生汤对白介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 诱导髓核细胞凋亡、内质网应激及 PERK/eIF2 α 通路的影响, 探讨其对椎间盘退变的作用机制, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 10 周龄 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重大约 200 g, 由湖北省医学科学研究院实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK(鄂)2021-0019, 用于制备含药血清。

1.2 实验药物和试剂

本研究使用的独活寄生汤由武汉市第一医院药房提供, 其中含有独活 9 g, 当归、川芎、牛膝、桑寄生、熟地、肉桂、细辛、防风、杜仲、秦艽、白芍、茯苓、党参、甘草各 6 g。上述药物由武汉市第一医院药剂科制备成含生药 1 g/mL 的药液, 冷却后冷冻保存于 -20 °C 的冰箱。

试剂: IL-1 β 试剂 (PeproTech), CCK-8 试剂盒 (Beyotime), 胎牛血清和 DMEM/F12 细胞培养基

(Gibco), 胰蛋白酶-EDTA 溶液 (Thermo Fisher), RT-PCR 试剂盒 (ABI), Evo M-MLV 反转录试剂盒 (艾科瑞), BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (碧云天), PERK、eIF2 α 、ATF4、p-PERK、p-eIF2 α 、CHOP、GRP78、Cleaved-caspase-3、Bax 和 BCL-2 一抗和山羊抗兔的二抗 (Abcam)。

1.3 实验仪器

DHP-500 电热恒温培养箱 (北京市永光明医疗仪器), LSM 710 型荧光显微镜 (Carl Zeiss), 低速离心机 (Eppendorf), 多功能酶标仪 (TECAN), Nano Drop 2000 型微量分光光度计 (Thermo Fisher) 等。

1.4 方法

1.4.1 含药血清制备 40 只健康 SD 大鼠适应性喂养 7 d, 根据动物和人体表面积折算的等效剂量比率表, 给予 9.3 g/(kg · d) 独活寄生汤进行灌胃^[6]。所有大鼠均为每日灌胃 1 次, 连续用药 14 d。在最后一次给药后 2 h, 经大鼠腹腔注射 2 mL/kg 2% 戊巴比妥钠诱导麻醉, 采集腹主动脉血。收集的血液在 37 °C 恒温水浴箱中灭活 20 min, 然后在 3 000 r/min 转速下离心 20 min。上清液经吸收、过滤、灭菌后, 冷冻保存于 -20 °C 冰箱。

1.4.2 髓核细胞的获取 选取 2021 年 1-12 月在武汉市第一医院骨科行脊柱骨折融合内固定术的 6 例患者 (男 4 例, 女 2 例; 年龄为 25~42 岁), 根据术前腰椎 MRI 检查和 Pfirrmann 分级标准对患者的椎间盘退变

程度进行分级^[7],获得的 6 例标本中,I 级 3 例,Ⅱ级 3 例,均为正常髓核标本。手术过程中收集患者髓核组织,并在 30 min 中保存于液氮罐中,用于后续髓核细胞分离和培养。使用人体组织的研究均获得武汉市第一医院医学伦理委员会的批准(编号为〔2021〕16)。所有参与者及其家属在术前均签署相关知情同意书。

1.4.3 髓核细胞分离与培养 将采集到的髓核组织用 PBS 洗涤 2 次,切成 1 mm³ 髓核组织碎片,放置在 0.2% Ⅱ型胶原酶中消化 4 h,在低速离心机中反复离心后装入含有 15% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基的培养瓶中培养,置于 5% CO₂、37 ℃ 的细胞培养箱中培养,当细胞生长覆盖至 80%~90%,使用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化并传代培养,后续实验均使用第三代髓核细胞。

1.4.4 CCK-8 法检测最佳干预浓度和干预时间 取第三代髓核细胞,以 5 000 个/孔接种于 4 个 96 孔板中,分别标记 0 h 组、12 h 组、24 h 组和 48 h 组,常规培养 24 h 后细胞贴壁,每孔中加入 10 ng/mL IL-1 β 溶液干预 24 h 诱导髓核细胞退变。在每个 96 孔板上标记分组,分别加入不同浓度的独活寄生汤含药血清(0%,5%,10%,20%,40%),在培养箱中培养对应的时间。培养结束后,每孔中加入用 100 μ L 含 CCK-8 试剂的 DMEM,在 37 ℃ 下孵育 2 h,用酶标仪以 450 nm 的波长测量每个孔的吸光度,记录并分析数据。

1.4.5 髓核细胞分组 取第三代髓核细胞,以每孔 5 \times 10⁵ 个接种于 6 孔板中,置于 5%CO₂、37 ℃ 的细胞培养箱中培养,髓核细胞随机分为 3 组:对照组(未经 IL-1 β 和独活寄生汤含药血清处理)、IL-1 β 组(加入 10 ng/mL IL-1 β 溶液干预 24 h)和独活寄生汤组(加入 10 ng/mL IL-1 β 溶液和 10% 独活寄生汤含药血清干预 24 h)。

24 h 后将以上 3 组细胞进行后续相关检测。

1.5 实验指标测定

1.5.1 免疫荧光法检测 各组 CHOP、GRP78 的表达水平 将髓核细胞接种于载玻片上进行培养,用 4% 多聚甲醛固定 15 min,0.5% Triton-X-100 处理髓核细胞 10 min。在含 5% BSA 的封闭缓冲液中孵育 30 min。第 2 天用抗 CHOP(1:100)或抗 GRP78(1:100)在 4 ℃ 下孵育过夜,并用相应的二抗(1:100)处理 1 h。经 PBS 洗涤后,用 DAPI 处理髓核细胞 10 min,再使用抗荧光萃取剂密封。最后使用荧光显微镜随机选取载玻片的 3 个视野进行观察和分析。

1.5.2 TUNEL 法分析髓核细胞凋亡率 采用 TUNEL 试剂盒检测,按照 TUNEL 试剂盒说明书在样品中加入检测液,避光孵育 1 h,洗涤后再用 DAPI 孵育 5 min,再经 PBS 洗涤后用防淬灭封片液封片,使用荧光显微镜观察,计算凋亡细胞占髓核细胞总数的百分比,随机在 5 个不重复的视野中计算,取平均值并作为凋亡指数。

1.5.3 qRT-PCR 法检测 各组 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax、BCL-2 和 PERK/elF2 α 通路 mRNA 的表达 使用 qRT-PCR 法检测:用 Trizol 试剂提取 3 组髓核细胞 RNA,并使用 Nanodrop 分光光度计测总 RNA 浓度。根据反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,根据 PCR 试剂盒说明书设计 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax、BCL-2、PERK、elF2 α 、ATF4 的引物(见表 1),选择 GAPDH 作为内参。95 ℃ 预变性 20 s,以 95 ℃ 1 s,60 ℃ 20 s,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min 为 PCR 反应条件,共进行 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 相对表达水平^[8],每组均重复实验 3 次。

表 1 引物序列

基因名称	引物	序列
Homo GAPDH	前向	5'-AACAGCAACTCCCATTCTTCC-3'
	反向	5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'
Homo PERK	前向	5'-CTCCTGTCTTG GTTG GGTCTG-3'
	反向	5'-GGTCCTTCTTGCGGATG TTC-3'
Homo elF2 α	前向	5'-AGGTCGCAGTTTATGTCCCTG-3'
	反向	5'-GCTATTACCAGCACAGCAGTAGC-3'
Homo ATF4	前向	5'-GTTTAGAGCTGGGAAGTGAGGTT-3'
	反向	5'-CTAACTCCAGGTGGGTCATAAGG-3'
Homo CHOP	前向	5'-TAGCTTG GCTGACTGAGGAGC-3'
	反向	5'-CTTCAGCAAGCTGTGCCACT-3'
Homo GRP78	前向	5'-CCATGCAGTTGTGACTGTACC-3'
	反向	5'-CCCAGATGAGTGTCTCCATTAG-3'
Homo Cleaved-caspase3	前向	5'-GTATGCTTACTCTACCGCACCC-3'
	反向	5'-CAGGGAGAAGGACTCAAATTCC-3'
Homo BCL-2	前向	5'-TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3'
	反向	5'-TTCAGAGACAGCCAGGAGAAATC-3'
Homo Bax	前向	5'-TGA ACTGGACAACAACATGGAG-3'
	反向	5'-AGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC-3'

1.5.4 Western Blot 法检测 CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax、BCL-2 和 PERK/eIF2 α 通路蛋白的表达 采用 Western Blot 法检测:提取 3 组髓核细胞的总蛋白,BCA 法测定总蛋白的浓度,用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转膜到 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶的封闭液浸泡 30 min,将样品与一抗 PERK、eIF2 α 、ATF4、p-PERK、p-eIF2 α 、CHOP、GRP78、Cleaved-caspase3、Bax、BCL-2 在 4 °C 下孵育过夜,GAPDH(1:1 000)作为内参。用含有 Tween 20 的 TBS 洗涤后,加入二抗在室温下孵育 1 h,置于暗室观察。每组均重复实验 3 次,使用 Image J 软件测量条带的灰度值。

1.6 统计学方法

用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。通过单因素方差分析和 Tukey 进行

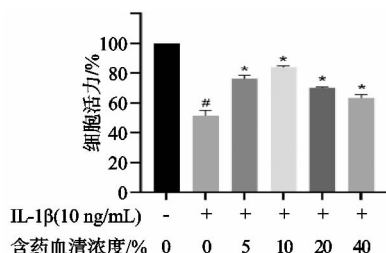
统计学检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 独活寄生汤含药血清干预髓核细胞退变的最佳干预浓度和干预时间

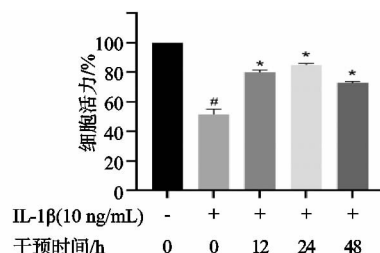
如图 1 所示,CCK-8 法结果显示,IL-1 β 促使髓核细胞活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在独活寄生汤含药血清处理后,髓核细胞活力增强,如图 1a 所示,在独活寄生汤含药血清浓度为 10% 时细胞活性最强。独活寄生汤处理 0~24 h 髓核细胞活力逐渐增强,如图 1b 所示,独活寄生汤含药血清处理 24 h 时细胞活性最强。与经 IL-1 β 处理但未治疗组相比,独活寄生汤不同浓度和不同处理时间后的髓核细胞活性差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 独活寄生汤含药血清对髓核细胞凋亡的影响



注:与未处理组相比, * $P < 0.05$; 与经 IL-1 β 处理但未治疗组相比, * $P < 0.05$ 。

(a) 不同含药血清浓度对髓核细胞活性的影响



(b) 不同含药血清处理时间对髓核细胞活性的影响

图 1 独活寄生汤含药血清对髓核细胞活性的影响

如图 2 和图 3 所示,经过 TUNEL 法检测,与对照组相比,IL-1 β 处理后髓核细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。经独活寄生汤含药血清治疗后,与 IL-1 β 组相比,髓核细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。如图 4 和图 5 所示,经 Western Blot 和 qRT-PCR 检测,与对照组相比,IL-1 β 处理后髓核细胞 Cleaved-caspase3、Bax 基因和蛋白表达升高,BCL-2 基因和蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 IL-1 β 组相比,独活寄生汤处理后髓核细胞 Cleaved-caspase3、Bax 基因和蛋白表达下降,BCL-2 基因和蛋白表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 独活寄生汤含药血清对髓核细胞内质网应激的影响

如图 6 和图 7 所示,经过免疫荧光法检测,与对照组相比,IL-1 β 处理后髓核细胞中内质网应激标志蛋白 CHOP 和 GRP78 的表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。经独活寄生汤含药血清治疗后,与 IL-1 β 组相比,CHOP 和 GRP78 的表达出现明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。如图 8 和图 9 所示,经 Western Blot 和 qRT-PCR 检测,独活寄生汤对髓核细胞内质网应激标志物 CHOP 和 GRP78 的基因和蛋白的表达影响与免疫荧光结果一致。

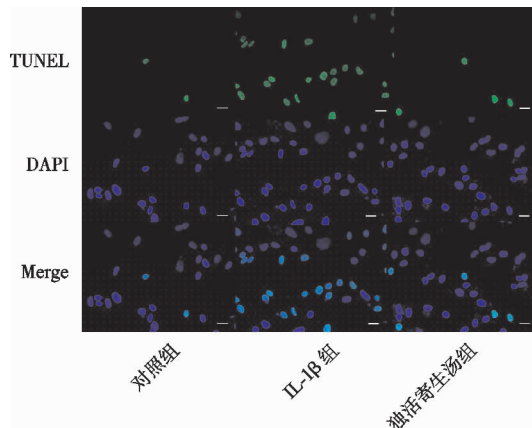
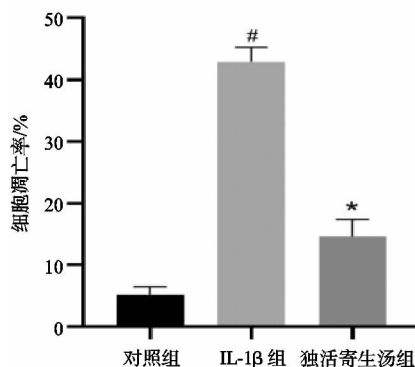


图 2 TUNEL 染色荧光图像(×400)



注:与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 IL-1 β 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 髓核细胞凋亡率

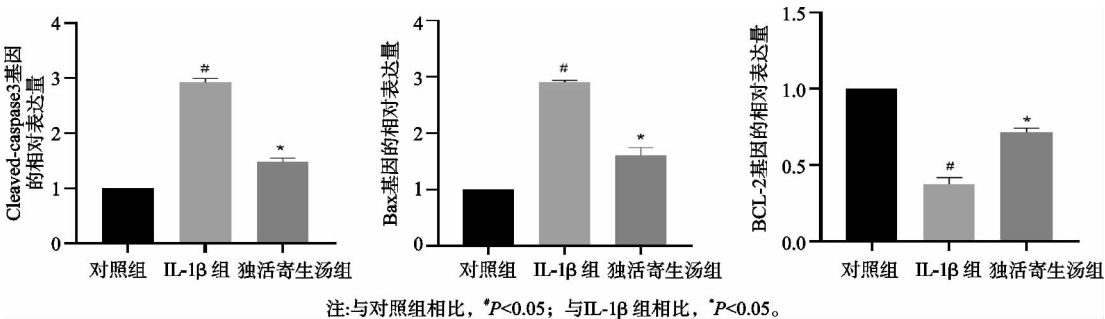


图 4 Cleaved-caspase3、Bax 和 BCL-2 基因的相对表达量

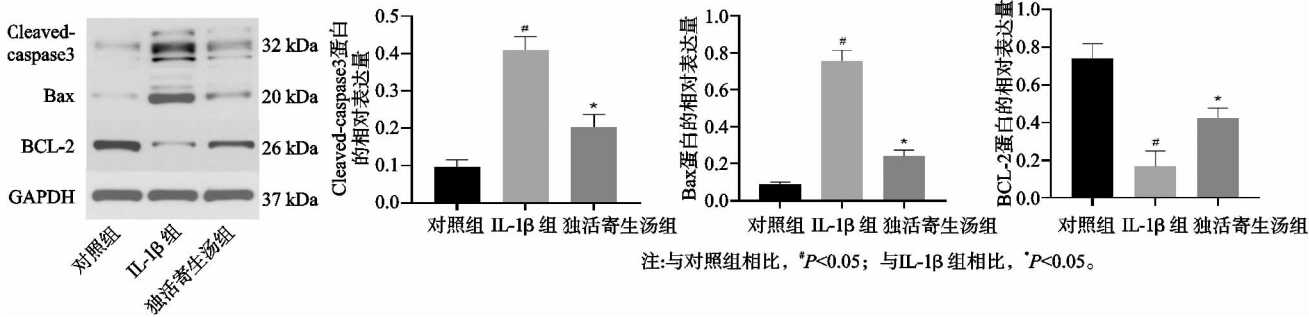


图 5 Cleaved-caspase3、Bax 和 BCL-2 蛋白条带及蛋白相对表达量

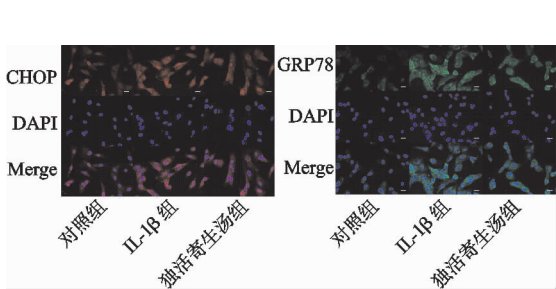


图 6 CHOP 和 GRP78 表达荧光图($\times 400$)

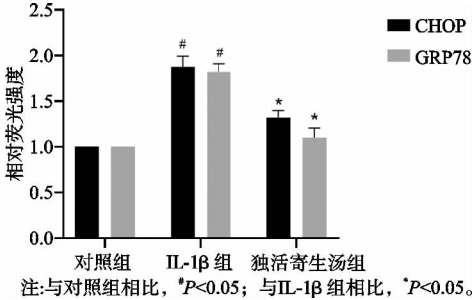


图 7 CHOP 和 GRP78 相对荧光强度

2.4 独活寄生汤含药血清对髓核细胞 PERK/eIF2 α 通路的影响

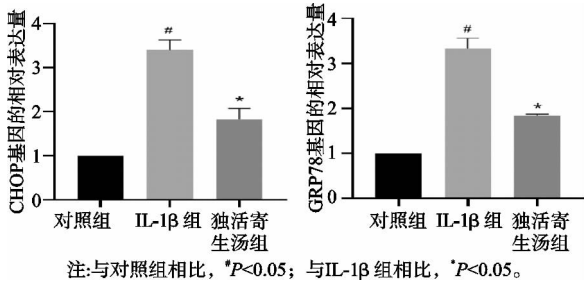


图 8 CHOP 和 GRP78 基因的相对表达量

如图 10-图 12 所示,经过 qRT-PCR 检测,与对照组相比,IL-1 β 处理后髓核细胞中 PERK、eIF2 α 、ATF4 的基因表达显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);并且 PERK、eIF2 α 、ATF4、p-PERK、p-eIF2 α 的蛋白表达也显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。经独活寄生汤含药血清治疗后,与 IL-1 β 组相比,PERK、eIF2 α 、ATF4 的基因相对表达显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$);同时 PERK、eIF2 α 、ATF4、p-PERK、p-eIF2 α 的蛋白表达也显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

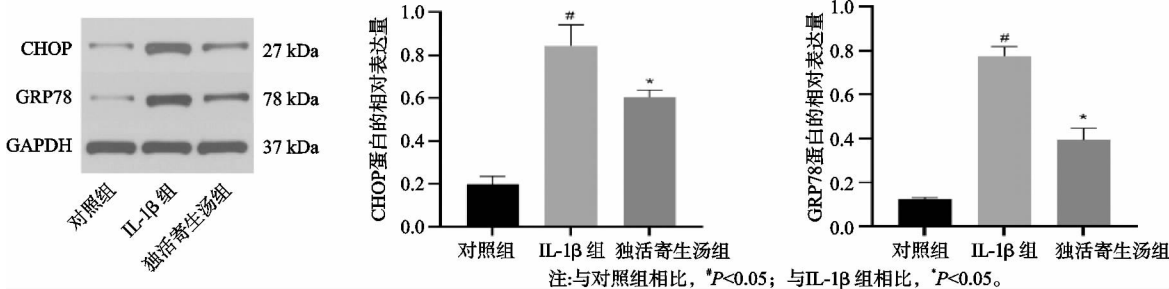


图 9 CHOP 和 GRP78 蛋白条带和相对表达量

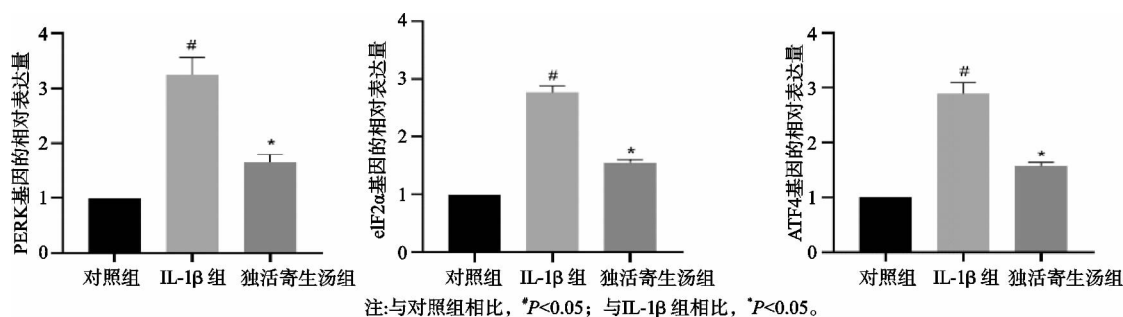


图 10 PERK、eIF2α 和 ATF4 基因的相对表达量

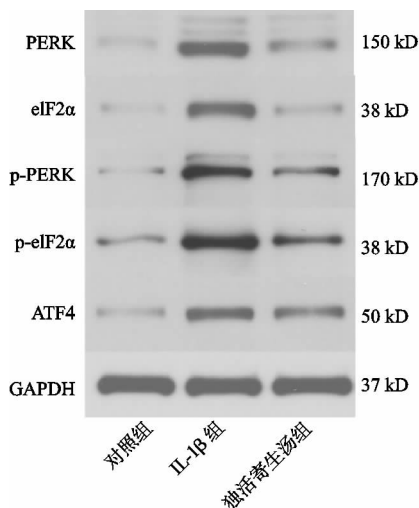


图 11 PERK、eIF2α、ATF4、p-PERK 和 p-eIF2α 蛋白条带

3 讨论

一般认为腰椎间盘突出症的主要原因是椎间盘退行性改变。椎间盘由中央髓核和周围的纤维环组成,髓核细胞是位于髓核中的主要细胞成分。当椎间盘受到外界的刺激时,局部会发生一系列炎症反应,导致髓核细胞凋亡,从而诱导椎间盘退变^[9]。根据细胞凋亡启动阶段的不同,可将细胞凋亡分为三种途径:线粒体途径、死亡受体途径和内质网应激^[10]。一些外源性因素或内源性因素促使内质网中错误折叠蛋白或未折叠蛋白的增加,继而导致内质网应激。在一定条件下,内质网应激有利于细胞内环境的平衡和稳定。然而,过度的未折叠蛋白反应会造成 GRP78 异位,激活内质网应激感受器(IRE1α、PERK、ATF6),进一步激活下游

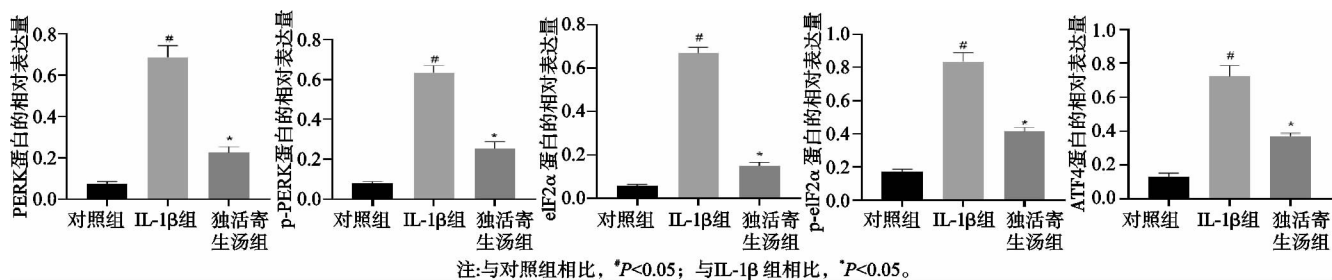


图 12 PERK、eIF2α、ATF4、p-PERK 和 p-eIF2α 蛋白的相对表达量

信号而导致细胞凋亡^[11]。内质网应激过于严重则 ATF4 会启动 CHOP 的转录,促凋亡程序促使细胞凋亡^[12]。因此,改善内质网应激在减少髓核细胞凋亡、延缓椎间盘退变中具有重要意义。

中医药历史悠久,临床应用广泛,通过减轻疼痛和改善功能障碍来治疗椎间盘退行性疾病得到了普遍认可。腰椎间盘突出属于中医“痹证”范畴,而独活寄生汤出自孙思邈《备急千金要方》,用以消除痹痛、善治顽痹^[13]。现代药理学研究显示,独活寄生汤具有抗炎镇痛、改善氧化应激、改善循环、调节免疫的作用,在各种腰膝疾病的临床治疗中取得较好疗效^[14-15]。本课题组前期研究提示,独活寄生汤能够改善髓核细胞外基质降解以延缓椎间盘退变,但是能否改善凋亡和具体作用机制仍旧未知。本研究检测独活寄生汤含药血清不同浓度和不同处理时间下的髓核细胞活性,发现独活寄生汤对髓核细胞活力的影响具有时间和浓度依赖

性,10%为最佳浓度,24 h 为最佳处理时间。根据笔者的研究,独活寄生汤能够显著减少髓核细胞凋亡率,减少凋亡细胞因子的产生。当 IL-1β 刺激髓核细胞时,细胞中未折叠蛋白反应标志物 CHOP 和 GRP78 的表达增加,这些结果与之前的研究结果一致。经独活寄生汤含药血清处理后,髓核细胞中 CHOP 和 GRP78 的表达均下降,提示独活寄生汤可降低 IL-1β 刺激髓核细胞引起的未折叠蛋白反应,从而改善内质网应激和细胞凋亡。

内质网应激包括 IRE1α-xbp1 通路、PERK 通路、ATF6 通路,PERK 信号通路是内质网应激最经典的途径,与肝癌、糖尿病等多种疾病的发生发展密切相关^[16]。PERK 作为内质网中活跃的 II 型跨膜蛋白,可以通过二聚化和磷酸化转化为激活的 PERK,然后参与真核翻译起始因子(eIF2α)的磷酸化,这一过程将导致 GTP-GDP 转化障碍,从而阻断蛋白质合成^[17]。eIF2α

的磷酸化激活转录因子 4 (ATF4) 的表达, 促进 GADD153 表达, 导致钙通道激活, 促使半胱天冬酶 (Caspase) 的激活, 最终导致髓核细胞凋亡^[18]。Wen 等^[19]证明, PERK 在髓核细胞内质网应激未折叠蛋白反应中发挥重要作用, 可能是椎间盘退变的潜在治疗靶点。Chen 等^[20]研究表明, PERK/eIF2 α 信号通路在髓核细胞出现炎症早期诱导细胞自噬, 提高细胞存活率, 但过度的炎症刺激会导致 PERK/eIF2 α 诱导的未折叠蛋白反应和细胞凋亡增加。本研究在 IL-1 β 作用下, 髓核细胞 PERK/eIF2 α 通路的活性显著增强。然而独活寄生汤含药血清能够显著降低 PERK/eIF2 α 通路的活性, 对髓核细胞具有保护作用。因此, 笔者推论独活寄生汤含药血清能够抑制退变髓核细胞的内质网应激和细胞凋亡, 进而延缓椎间盘退变, 作用途径可能和抑制 PERK/eIF2 α 通路有关。本研究可为独活寄生汤治疗椎间盘退变提供理论依据和实验基础。

本实验研究也存在一些不足之处, 对于独活寄生汤影响髓核细胞内质网应激的作用机制分析比较浅显, 后续实验可靶向干预内质网应激和 PERK/eIF2 α 通路, 进一步证实独活寄生汤通过调控 PERK/eIF2 α 通路抑制髓核细胞内质网应激, 从而减少髓核细胞凋亡, 达到延缓椎间盘退变的疗效。本研究仅从体外细胞进行实验研究, 后续实验可结合动物实验同步验证, 使证据更为充分。综上所述, 本研究首次实验验证独活寄生汤通过影响髓核细胞内质网应激, 细胞凋亡和 PERK/eIF2 α 通路进而延缓椎间盘退变, 探讨了独活寄生汤治疗作用的分子机制, 为中医药治疗腰椎退行性疾病提供依据和思路。

参考文献

- [1] KHAN A N, JACOBSEN H E, KHAN J, et al. Inflammatory biomarkers of low back pain and disc degeneration: a review[J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1410(1): 68-84.
- [2] HOY D, BROOKS P, BLYTH F, et al. The epidemiology of low back pain[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010, 24(6): 769-781.
- [3] 张云辉, 于栋, 时宗庭, 等. 椎间盘退变程度与脊柱内镜手术治疗腰椎间盘突出症临床疗效的相关性研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(6): 36-40.
- [4] LIU W, JIN S, HUANG M, et al. Duhuo Jisheng decoction suppresses matrix degradation and apoptosis in human nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in a rat model[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 250: 112494.
- [5] 俞臻, 诸磊, 朱正桓, 等. 内质网应激在椎间盘退变过程中的作用[J]. 江苏医药, 2022, 48(10): 1064-1069.
- [6] 卢磊, 刘晓丹, 张培影. 中药血清药理学及血清药物化学研究进展[J]. 中国中医急症, 2018, 27(1): 178-181.
- [7] PFIRRMANN C W, METZDORF A, ZANETTI M, et al.

Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2001, 26(17): 1873-1878.

- [8] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] CHENG X, ZHANG L, ZHANG K, et al. Circular RNA VMA21 protects against intervertebral disc degeneration through targeting miR-200c and X linked inhibitor-of-apoptosis protein[J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(5): 770-779.
- [10] HE R, WANG Z, CUI M, et al. HIF1A alleviates compression-induced apoptosis of nucleus pulposus derived stem cells via upregulating autophagy[J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3338-3360.
- [11] URRÁ H, DUFEY E, LISBONA F, et al. When ER stress reaches a dead end[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12): 3507-3517.
- [12] 廖太阳, 杨楠, 张力, 等. 白杨素对离体培养致炎大鼠软骨细胞凋亡及内质网应激 GRP78/PERK/CHOP 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(12): 2197-2204.
- [13] 常斌, 马斌祥, 关永林, 等. 独活寄生汤治疗腰椎间盘突出症的研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(10): 1976-1979.
- [14] 吴广文, 褚剑锋, 许惠凤, 等. 独活寄生汤的药理作用及其在治疗骨性关节炎中的应用[J]. 中医正骨, 2012, 24(1): 37-39.
- [15] 唐智强, 韩雪花, 李敏, 等. 独活寄生汤治疗骨科疾病的临床应用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2023, 39(22): 3903-3906.
- [16] 翟天宇, 张灿, 赵琳. 内质网应激的调节方式及其在脊髓损伤中的靶向作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, 39(11): 1534-1542.
- [17] WANG W, QING X, WANG B, et al. Tauroursodeoxycholic acid protects nucleus pulposus cells from compression-induced apoptosis and necroptosis via inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018: 6719460.
- [18] NOVAIS E J, CHOI H, MADHU V, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α regulate endoplasmic reticulum stress in nucleus pulposus cells: implications of endoplasmic reticulum stress for extracellular matrix secretion[J]. Am J Pathol, 2021, 191(3): 487-502.
- [19] WEN T, XUE P, YING J, et al. The role of unfolded protein response in human intervertebral disc degeneration: perk and IRE1- α as two potential therapeutic targets[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021: 6492879.
- [20] CHEN L, HUANG Q, BAI Q, et al. Chlamydia psittaci induces autophagy in human bronchial epithelial cells via PERK and IRE1 α , but not ATF6 pathway[J]. Infect Immun, 2022, 90(5): e0007922.