

益气活血方介导促炎因子促进破裂型 腰椎间盘突出后重吸收的机制研究

刁志君^{1,2} 姜宏² 刘锦涛^{2△} 刘建文³ 李月琪³ 李红卫² 李晓春²

[摘要] **目的:**通过比较益气活血方介导对趋化因子 5(CCL5)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)在破裂及非破裂型髓核细胞中表达的影响,探索益气活血方促进破裂型腰椎间盘突出后重吸收的机制。**方法:**收集破裂型与非破裂型腰椎间盘突出症患者的髓核组织各 6 例,采用酶消化法分离细胞,放入含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养,定期用倒置相差显微镜观察细胞贴壁及生长情况。用 10 只 3 个月龄 SD 大鼠制备含药(益气活血方)血清及无药(生理盐水)血清,用两种血清分别培养破裂型及非破裂髓核细胞。提取两种血清体外给药后的破裂及非破裂原代髓核细胞 RNA。利用实时荧光定量 PCR(实时 qPCR)技术分别检测体外含药血清给药培养后及非含药血清培养后的破裂及非破裂型髓核细胞中 CCL5, TNF- α , IL-1 β mRNA 的表达,记录统计分析数据。提取含药血清及非含药血清体外给药培养后的破裂及非破裂型原代髓核细胞蛋白,利用免疫蛋白印迹(Western Blotting)技术分别检测两种血清体外给药培养后的破裂及非破裂型原代髓核细胞中 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β 蛋白的表达,记录统计分析数据。**结果:**CCL5, TNF- α 及 IL-1 β 在破裂型髓核中的表达明显高于非破裂型($P < 0.05$),在破裂型含药组髓核细胞中的表达显著高于无药组($P < 0.05$)。**结论:**益气活血方可提高促炎因子在破裂型髓核细胞中高表达,有利于髓核细胞的炎性反应,加速细胞外基质(ECM)的降解,从而有利于重吸收现象的发生,且破裂型髓核比非破裂型髓核更容易发生重吸收现象。

[关键词] 益气活血方;破裂型;腰椎间盘突出;重吸收

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)05-0001-06

Mechanism of Yiqi Huoxue Recipe in Promoting Spontaneous Resorption of Ruptured Lumbar Disc Herniation

DIAO Zhijun^{1,2} JIANG Hong² LIU Jintao^{2△} LIU Jianwen³
LI Yueqi³ LI Hongwei² LI Xiaochun²

¹Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

²Suzhou Hospital, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu China;

³East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China.

Abstract Objective: Investigating the mechanism of Yiqi Huoxue recipe in promoting resorption of ruptured lumbar disc herniation, by comparing the expression of CCL5, TNF- α , IL-1 β in ruptured and unruptured nucleus pulposus cells mediated by Yiqi Huoxue recipe. **Methods:** Collecting nucleus pulposus of 6 patients with ruptured lumbar disc herniation and 6 patients with unruptured lumbar disc herniation, separation of cells by enzymatic elimination, primary culture in DMEM/F12 medium containing 20% fetal bovine serum, observing cell attachment and growth regular by inverted phase contrast microscope. Ten three-month-old SD rats were prepared for the preparation of drug-containing serum and drug-free serum, cultured ruptured and unruptured nucleus pulposus cells by these serum. Extraction of ruptured and unruptured primary nucleus pulposus cells RNA used two kinds of serum. Detecting the expression of CCL5, TNF- α , IL-1 β

mRNA in ruptured and unruptured primary nucleus pulposus cells RNA used two kinds of serum by real-time qPCR technology, recording statistical analysis data. Extraction of ruptured and unruptured primary nucleus pulposus cells protein used two kinds of serum, detecting the expression of CCL5, TNF- α , IL-1 β mRNA in ruptured and unruptured primary

基金项目:国家自然科学基金项目(81473691)

¹ 上海中医药大学(上海, 201203)

² 南京中医药大学附属苏州医院

³ 华东理工大学

△通信作者 E-mail: okdoctor@163.com

nucleus pulposus cells RNA used two kinds of serum by Western Blotting technology, recording statistical analysis data.

Results: The expression of CCL5, TNF- α and IL-1 β in ruptured nucleus pulposus was significantly higher than that in unruptured ($P < 0.05$). The expression in the ruptured nucleus pulposus cells of the drug-containing group was significantly higher than that in the drug-free group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yiqi Huoxue Recipe can increase the expression of pro-inflammatory factors in ruptured nucleus pulposus cells, is useful for inflammatory response of nucleus pulposus cells, can accelerate the degradation of extracellular matrix. Thereby facilitating the occurrence of resorption. The ruptured nucleus pulposus is more prone to resorption than the unruptured nucleus pulposus.

Keywords: Yiqi Huoxue recipe; ruptured; lumbar disc herniation; spontaneous resorption

椎间盘退行性改变是脊柱退变性疾病发生的条件和基础,腰椎间盘突出症(Lumbar Disc Herniation, LDH)是最常见的脊椎退变疾病之一^[1]。腰椎间盘突出后的重吸收现象是临床进行保守治疗期盼的结果,本课题组,根据国内外对重吸收研究的最新进展,结合多年临床诊疗经验,将腰椎间盘突出症分为两大类^[2,3]:破裂型腰椎间盘突出症与非破裂型腰椎间盘突出症。所谓破裂型腰椎间盘突出即椎间盘的纤维环破裂,髓核突出并穿破后纵韧带。而非破裂型腰椎间盘突出即通常所指的纤维环未破裂,只是髓核的膨出。前期的实验^[4]及临床随访观察^[5]已经证实相比于非破裂型,破裂型更容易重吸收。益气活血方是在古方“防己黄芪汤”及“补阳还五汤”基础上,化裁而成,在本院已广泛应用于临床,经临床观察随访及动物实验研究证实,此方确能促进椎间盘突出后的重吸收^[6]。此外,经毒理试验证实该方是安全的。研究证明^[7,8]促炎因子可通过加速炎症反应破坏细胞外基质稳态结构,加速 ECM 降解,从而加速重吸收现象的发生。本文通过比较 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β 在药物介入前后破裂与非破裂型髓核细胞中表达的区别,进而分析其意义。

1 材料与方法

1.1 破裂与非破裂型髓核细胞分组培养

1.1.1 取材 收取本院因腰椎间盘突出症行髓核摘除术患者的髓核组织 12 例,根据患者 MRI 所示后纵韧带是否完整将患者分为破裂组和非破裂组,其中破裂型突出及非破裂型突出各 6 例,年龄 35~63 岁,平均年龄 48.7 岁。根据赫尔辛基宣言,实验在所有患者知情同意的前提下进行,并经苏州市中医医院伦理委员会通过。

1.1.2 含药血清制备 益气活血方:生黄芪 20 g,川芎 15 g,地龙 15 g,防己 10 g,木瓜 10 g,当归 10 g,白芥子 6 g。

含药血清制备:3 个月龄 SD 大鼠 10 只,采用 5 倍剂量灌胃,2 次/d、连续 3 d 给药后,最后 1 次灌胃 2 h 后腹主动脉采血,离心灭活(56 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)、过滤、冰冻(-20 $^{\circ}\text{C}$)。

1.1.3 髓核细胞分组培养 I 级分组:破裂型椎间盘

组,非破裂型椎间盘组二组。II 级分组:在 I 级分组基础上,每组再分为益气活血方组和生理盐水组,益气活血方组加入含药血清培养,生理盐水组加入生理盐水血清培养。

在本院手术室无菌条件下收集破裂及非破裂型髓核组织,低温快速带回实验室。用 D-Hank's 液将组织反复洗净,用实验剪刀剔除非髓核组织,剪碎余下的胶冻状髓核组织(约 1 mm³),胰蛋白酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min,再用 II 型胶原酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置消化 4 h,用 200 目不锈钢网过滤未能完全消化的组织,按 1×10^5 个/mL 接种于底面积为 25 cm² 培养瓶中,用含 10% 胎牛血清的 DF12 培养基培养于 37 $^{\circ}\text{C}$, CO₂ 体积分数为 5%,饱和湿度的培养箱中,定期换液,细胞生长达 80% 融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,所有实验所用细胞,传代皆不超过 2 次,以保证遗传信息的稳定性,定期用倒置生物显微镜观察细胞贴壁及生长情况。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基(Gibico 公司),胎牛血清(Gibico 公司),TRIzolTM 试剂(Invitrogen, 美国),One Step PrimeScript[®] cDNA Synthesis Kit(Takara 公司,日本),Taq 酶(Takara 公司),RT-PCR 试剂盒(Takara 公司),乙二醇双乙胺醚-N,N'-四乙酸(EDTA)(Sigma 公司),琼脂糖电泳加样缓冲液(Takara 公司),溴酚蓝(华美生物工程公司),琼脂糖(Genebase 生物工程公司),蛋白酶 K(Amresco 公司),溴化乙啶(EB)(Fluka 公司),GAPDH(Proteintech 公司),BCA 蛋白质测定试剂盒(Beyotime Biotechnology 公司)。SHJ-JP 超净工作台(上海净化设备厂),DDB 型全自动电子蠕动泵(上海之信仪器有限公司),UV7500 紫外/可见分光光度计(无锡科达仪器厂),可调式移液器(Eppendorf 公司),化学发光仪 LipofectAmine 2000TM(Invitrogen 公司),PCR 基因扩增仪(Bio-Rad 公司),发光检测仪(德国 Berthold F12),XSP-17C 倒置生物显微镜(上海长方光学仪器有限公司)。

1.3 实时 qPCR 法检测目的基因

1.3.1 原代细胞总 RNA 提取 常规提取各组髓核细胞总 RNA。将培养皿冰上放置,弃去上清,每孔加入

900 μL Trizol 试剂并反复吹打,室温放置 5 min,再加入 180 μL 氯仿,剧烈摇晃 15 s,室温放置 2~3 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 及 12 000 r/min 条件下离心 15 min,可见液体分 3 层,收集上清至 EP 管中,每管入 500 μL 异丙醇摇匀,室温放置 20 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 及 12 000 r/min 条件下离心 15 min,弃上清并收集 RNA 沉淀,然后加入加预冷的 1 mL 75%乙醇,洗涤,旋涡振荡,再以 4 $^{\circ}\text{C}$ 及 7 500 r/min 条件离心 5 min,收集 RNA 沉淀,空气干燥,溶解于 DEPC 水中以备用。

1.3.2 RNA 反转录 在冰浴中加入模板、oligodT、随机引物和无 RNase 水(总体积 10.75 μL)至 1.5 mL 离心管混和均匀,短暂离心 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温育 5 min,冰浴 2 min,短暂离心,再加入 10 倍反应缓冲液 2 μL 、氯化镁(25 mmol/L)4 μL 、RNase 抑制剂(40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)0.5 μL 、dNTP 混和物(10 mmol/L)2 μL ,混和均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,温育 5 min,加入 0.75 μL AMV 逆转录酶(20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),反应体系总质量为 20 g,然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,温育 60 min,再于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,温育 10 min,离心后于一80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,由此得到 cDNA 模板,保存备用。

1.3.3 实时 qPCR 检测细胞中 CCL5、TNF- α 及 IL-1 β mRNA 的表达 配置反应体系 20 μL ,在冰浴上依次加入下列试剂:上游引物(10 pmol/ μL)0.8 μL ,下游引物(10 pmol/ μL)0.8 μL ,SYBR Premix Ex Taq 10 μL ,ROX Dye II 0.4 μL ,无菌水 6 μL ,模板 2 μL ,利用 FTC-2000 型荧光定量基因扩增仪,测定各样品 CT 值,再按照一下方法计算出各个基因的相对表达量,引物序列以基因管家 GAPDH 为内参,利用 Primer premier 5.0 为待测基因设计引物序列(引物序列见表 1)。

表 1 引物序列	
CCL5-F	AGTGTGTGCCAACCCAGAGAAGAA
CCL5-R	TGTGGTAGAATCTGGGCCCTTCAA
IL-1 β -F	CACGATGCACCTGTACGATCA
IL-1 β -R	GTTGCTCCATATCCTGTCCCT
TNF- α -F	CCAAGCCCTGGTATGAGC
TNF- α -R	GGGCAATGATCCCAAAGTA
GAPDH-F	GGTCGGAGTCAACGGATTTG
GAPDH-R	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT

1.4 Western Blotting 检测 CCL5、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白的表达

1.4.1 蛋白质 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 首先配制丙烯酰胺分离胶,加入至电泳玻璃板之间的空隙中,用双蒸水封闭液面,室温静置 30 min,再配制 5%丙烯酰胺积层胶加入空隙中,插入梳子,再室温静置 30 min,每孔等量蛋白上样,然后以 70 V 电压使溴酚蓝带电泳离开积层胶,再以 110 V 电压至结束然后将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至固相支持体,取出凝胶

切成小块并标记。在海绵上依次叠上 3 张滤纸,在滤纸上叠上 PVDF 膜,在膜上叠上凝胶,放入转膜电泳槽,导入转移缓冲液,接通电源,调整电流到 300 mA,电泳 2 h.然后在 PBST 缓冲液中洗膜并转入自封袋,室温下水平摇床上封闭 1 h.

1.4.2 第一抗体与靶蛋白结合 室温下,将膜在 PBST 缓冲液中漂洗 3 次,每次漂洗 10 min,转入自封袋并加入 1 mL 一抗溶液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下于水平摇床上与靶蛋白结合孵育过夜。

1.4.3 第二抗体与第一抗体结合 室温下,将膜在 PBST 缓冲液中漂洗 3 次,每次漂洗 10 min,转入自封袋并加入 1 mL 二抗溶液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下于水平摇床上结合一抗 2 h.

1.4.4 显影 室温下,将膜在 PBST 缓冲液中漂洗 3 次,每次漂洗 10 min,将膜放到显影液中显影 10~15 min,在 PBST 中清洗,通过计算机图像处理技术(Quantity One)测定各蛋白条带的灰度值,以目的基因灰度面积与内参照 β -actin 的灰度面积的比值为半定量资料,重复 3 次,观察分析结果。

1.5 统计学方法

使用 SPSS21.0 版进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行正态性和方差齐性检验,计量资料采用 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学观察

镜下可见,破裂型与非破裂型髓核细胞,初消化时均为球形悬浮于培养液中,需 2~7 d 完全贴壁。贴壁后非破裂髓核细胞多呈多角形,散在分布,破裂型细胞则呈聚合趋势,多为长梭形,与非破裂型髓核细胞比较,破裂型的髓核显示出明显的形态变性(见图 1)。两型传代后细胞贴壁时间均明显缩短,12 h 可见大部分细胞贴壁,贴壁后的形态与原代细胞相似。

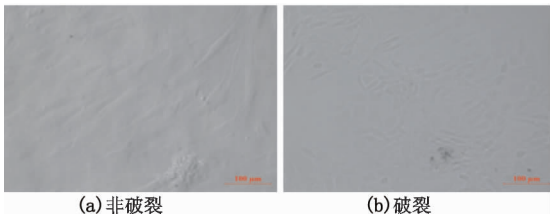


图 1 贴壁后非破裂髓核细胞多呈多角形,散在分布,破裂型细胞则呈聚合趋势,多为长梭形,与非破裂型髓核细胞比较,破裂型的髓核显示出明显的形态变性

2.2 实时 qPCR 检测细胞中 CCL5、TNF- α 及 IL-1 β mRNA 的表达

相较于非破裂型样本椎间盘髓核细胞,CCL5 在破裂型样本椎间盘髓核细胞中 mRNA 表达升高;相较于非破裂型样本椎间盘髓核细胞,TNF- α 和 IL-1 β 在破裂

型样本椎间盘髓核细胞中 mRNA 表达显著升高(见图 2),差异有统计学意义($P<0.05$)。相较于非药组,在药物处理后(益气活血方含药血清),破裂型样本椎间盘髓核细胞中 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),非破裂型样本椎间盘髓核细

胞中 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达没有明显变化;相较于非药组,在药物处理后(益气活血方含药血清),破裂型样本椎间盘髓核细胞中 CCL5 mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$),非破裂型样本椎间盘髓核细胞中 CCL5 mRNA 表达没有明显变化(见图 3-4)。

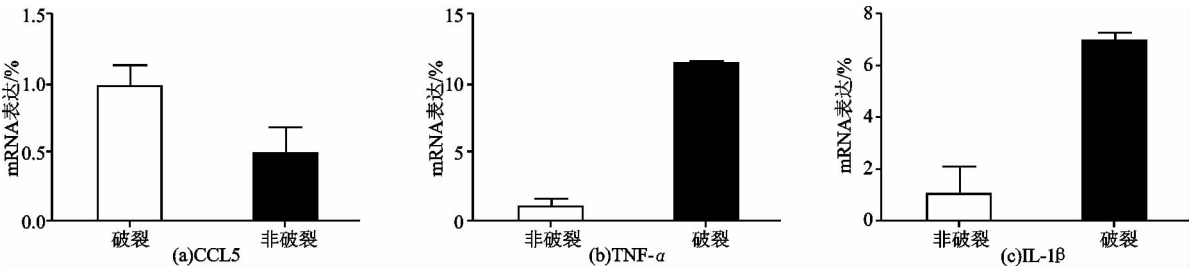


图 2 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β mRNA 在破裂、非破裂型样本椎间盘髓核细胞中的表达

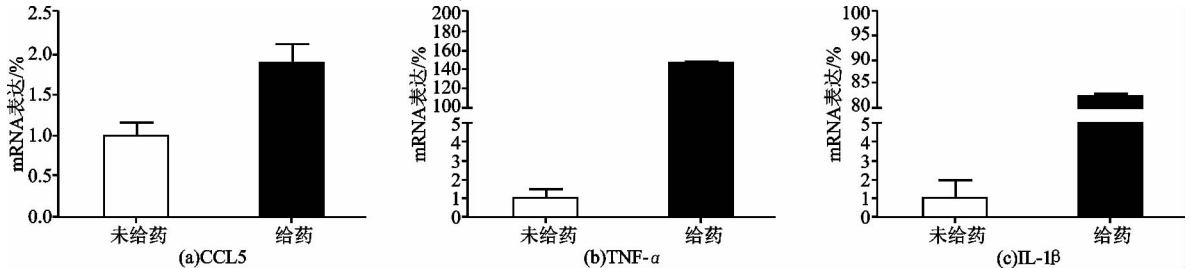


图 3 药物介导对 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β mRNA 在破裂样本椎间盘髓核细胞中表达的影响

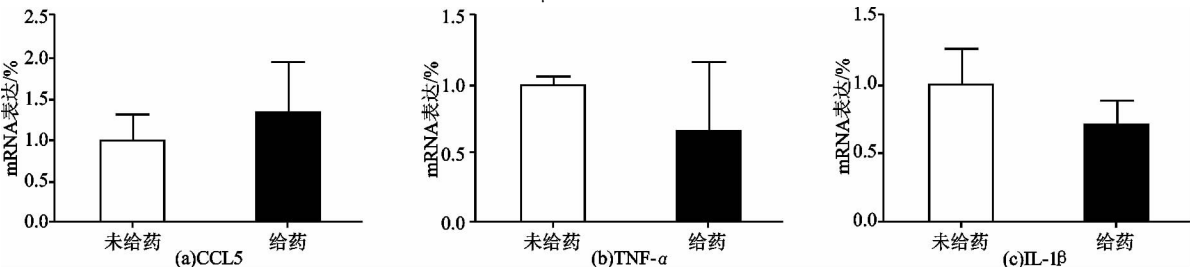


图 4 药物介导对 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β mRNA 在非破裂样本椎间盘髓核细胞中表达的影响

2.3 Western Blotting 检测 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β 表达

相较于非破裂型样本椎间盘髓核细胞,在破裂型样本椎间盘髓核细胞中 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达显著升高, CCL5 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于对照组(生理盐水处理组血清),在药物

处理后(益气活血方含药血清),破裂型样本椎间盘髓核细胞中, TNF- α , IL-1 β 及 CCL5 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);非破裂型样本椎间盘髓核细胞中, TNF- α , IL-1 β 及 CCL5 蛋白表达没有明显变化(图 5-6)。

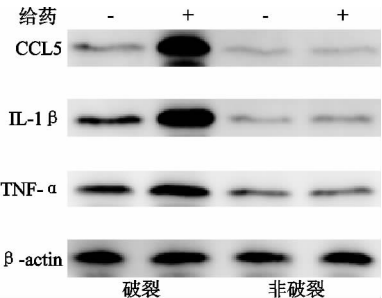


图 5 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β 蛋白分别
在各组样本椎间盘髓核细胞中的表达

益气活血方可提高促炎因子在破裂型髓核细胞中高表达,有利于髓核细胞的炎性反应,加速 ECM 的降解,从而有利于重吸收现象的发生,且破裂型髓核比非破裂型髓核更容易发生重吸收现象。

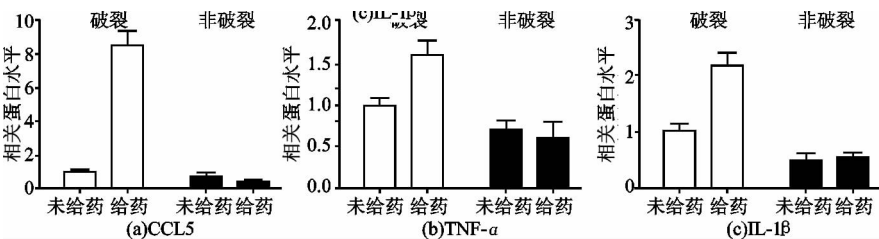


图 6 CCL5, TNF- α 及 IL-1 β 蛋白分别
在各组样本椎间盘髓核细胞中的定量表达

3 讨论

腰痛是一项世界性顽疾,病因十分复杂,尚未明确,但研究显示,约有半数以上的腰痛是由腰椎间盘突出性改变所致^[9]。目前,椎间盘压力的增加、炎症反应

的发生、营养供给的不足以及遗传等因素被认为是导致椎间盘发生退行性变的主要原因^[10]。退变的发生会破坏椎间盘细胞外基质的稳态,正常椎间盘细胞外基质的合成代谢和分解代谢平衡主要是由含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(ADAMTSs)、基质金属蛋白酶(MMPs)、及其天然抑制因子基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)等共同维持,当椎间盘发生退变,细胞因子之间表达失衡,致基质合成减少同时基质降解酶产生增加,由此引发细胞外基质水合状态丢失,最终导致脊柱失稳、椎间盘退变,而且椎间盘压应力增加会影响髓核内基质成分的稳态,减弱其对抗重力的作用,加速退变的进程^[11]。在腰椎间盘突出症的非手术治疗过程中,随着影像学的发展,关于腰椎间盘突出后,在影像学上可发现缩小甚而消失的报道不断增多。重吸收现象的新发现对提高临床疗效,对降低患者的手术风险与经济负担,将有着深远的意义。而相关研究显示^[12-15],CCL5,TNF- α 及 IL-1 β 等因子通过介导炎症反应,可破坏 ECM 稳态,加速其降解,从而有利与重吸收现象的发生。

在 IL-1 家族中,IL-1 β 是一个重要的致炎因子,其一直被视为退变椎间盘中导致蛋白多糖降解,促进 MMPs 高表达的主要因素,是导致椎间盘发生退行性变的重要细胞因子之一^[16]。Urban 等^[17]也证实,IL-1 β 在致炎和软骨细胞凋亡的进程中发挥关键作用,是椎间盘病变的病因之一。Shamji 等^[18]通过检测退变椎间盘中的炎症因子,发现 IL-1 β 和 TNF- α 可同时表达,且相比于 TNF- α ,IL-1 β 及其受体在退变椎间盘髓核组织中表达量更高,并推断 IL-1 β 参与、促进了椎间盘退变的进程,且比 TNF- α 发挥更重要的作用。所以 IL-1 β 可通过致炎反应破坏细胞外基质平衡,加速 ECM 降解,促进重吸收的发生。

TNF- α 又称恶质素,由单核细胞或巨噬细胞产生,其具备选择性杀伤肿瘤细胞的能力,且具有多种调节功能,在众多炎症因子中,其致炎能力尤为突出。Weiler 等^[19]研究发现,TNF- α 是能加速椎间盘退变的炎症因子,其通过研究发现,TNF- α 的表达与年龄呈正相关,与椎间盘的突出程度呈正相关,与纤维环和髓核的退变程度呈正相关。TNF- α 也可与基质金属蛋白酶协同作用,共同介导炎症的发生。有研究发现^[20],在长期压力刺激下的椎间盘细胞表型会发生改变,导致 TNF- α 等炎性介质过度表达,MMPs 大量增殖,并形成一个 TNF- α 与 MMPs 相互促进的正反馈调节,最终导致炎症的发生。Fujita 等^[21]也认为 TNF- α 是诱导 MMPs 等炎性因子产生的诱导剂。Kim 等^[22]利用 IL-1 和 TNF- α 与细胞共培养,诱导髓核细胞老化,发现细胞外基质的稳态被破坏,其中蛋白聚糖及 II 型胶原等基质合成基因的表达显著降低,而 MMP-3 及环氧化酶-2(Cyclooxygenase, COX-2)等炎症因子则高表达。此外,Ohba 等^[14]认为 TNF- α 可作为机体炎症的早期标识物,因而 TNF- α 也可通过炎症

反应破坏 ECM 稳态,促进重吸收。

CCL5 属于 CC 亚家族趋化因子,基因定位于人 17q11-32 染色体上,人体内多种细胞皆可产生 CCL5,是一种可参与炎症过程和免疫调节的分泌蛋白^[23,24]。Ahn 等^[25]首次报道了椎间盘组织中有 CCL5 的表达。同年,Kawaguchi 等^[26]报道在 8 例突出的椎间盘组织中,有 7 例表达 CCL5。Ahn 和 Kawaguchi 等通过研究手术摘除的椎间盘突出物,发现 CCL5 显著表达。Kawaguchi 等通过对比手术摘除的腰椎间盘突出症患者的突出椎间盘组织与脊柱侧弯患者的正常椎间盘组织中 CCL5 的表达,发现当椎间盘退变程度越高,CCL5 的表达越明显,且 CCL5 的表达与腰椎间盘突出症患者症状的严重程度呈正相关。曾有学者通过体外培养细胞,并利用 TNF- α 和 IL-1 β 以及含 1% 胎牛血清的 FBS 模拟退变椎间盘的细胞外环境,发现 CCL5 的表达显著升高^[27]。一些体外实验发现^[28-31],CCL5 也与椎间盘突出患者的疼痛症状密切相关,疼痛明显的患者的椎间盘组织中 CCL5 的表达要比无痛患者的高 4 倍,且 CCL5 与椎间盘的退变程度呈正相关,CCL5 在椎间盘细胞中的表达与 TNF- α 和 IL-1 β 等促炎因子的表达呈正相关,并共同介导炎症反应,破坏 ECM 稳态,加速降解以促进重吸收现象。

本实验通过体外研究证明,髓核细胞可表达 CCL5,TNF- α 及 IL-1 β 等因子,且益气活血方对这些因子的表达具有调节作用。根据本实验结果及对这些因子的认识可见,TNF- α 和 IL-1 β 等促炎因子可以介导 MMPs 等炎性因子的表达诱导炎症反应,破坏 ECM 的平衡,加速 ECM 的降解,而 CCL5 等因子可能与 TNF- α 和 IL-1 β 等促炎因子形成正反馈调节,共同介导炎症反应,促进椎间盘的退变。CCL5,TNF- α 及 IL-1 β 等因子使椎间盘细胞外基质降解加速,由此促进椎间盘重吸收的发生。

参考文献

- [1] KADOW T, SOWA G, VO N, et al. Molecular basis of intervertebral disc degeneration and herniations; what are the important translational questions? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(6): 1903-1912.
- [2] 姜宏, 施杞, 郑清波. 腰椎间盘突出后的自然吸收及其临床意义[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(12): 755-757.
- [3] 李晓春, 姜宏, 刘锦涛. 腰椎间盘突出后再吸收的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(7): 598-600.
- [4] 刘锦涛, 姜宏, 王拥军, 等. 大鼠破裂型椎间盘突出模型的建立及其重吸收机理的研究[J]. 中国骨伤, 2010, 23(5): 370-372.
- [5] 刘锦涛, 姜宏, 徐坤林, 等. 非手术疗法对腰椎间盘突出后重吸收的影响[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2010, 25(11): 978-980.
- [6] KANG L, HU J, WENG Y, et al. Sirtuin 6 prevents matrix degradation through inhibition of the NF- κ B pathway in intervertebral disc degeneration[J]. Experimental Cell Research, 2017, 352(2): 322-332.
- [7] ZHOU Z, TIAN FM, WANG P, et al. Alendronate pre-

- vents intervertebral disc degeneration adjacent to a lumbar fusion in ovariectomized rats[J]. *Spine*, 2015, 40(20): 1073-1083.
- [8] 刘锦涛, 俞鹏飞, 李晓春, 等. 姜宏教授治疗破裂型腰椎间盘突出症临床经验举隅[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2010, 18(8): 57-58.
 - [9] LUOMA K, RIIHIMAKI H, LUUKKONEN R, et al. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration[J]. *Spine*, 2000, 25(4): 487-492.
 - [10] MAITRE C L L, BAIRD P, FREEMONT A J, et al. An in vitro study investigating the survival and phenotype of mesenchymal stem cells following injection into nucleus pulposus tissue[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, 11(1): R20.
 - [11] YASUMA T. Histological changes in aging lumbar intervertebral discs; their role in protrusion and prolapse[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1990, 72(2): 220-229.
 - [12] BINCH A L A, SHAPIRO I M, RISBUD M V. Syndecan-4 in intervertebral disc and cartilage: saint or synner? [J]. *Matrix Biol*, 2016, s52-54: 355-362.
 - [13] ROBUFFO I, TONIATO E, TETTAMANTI L, et al. Mast cell in innate immunity mediated by proinflammatory and antiinflammatory IL-1 family members[J]. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 2017, 31(4): 837-842.
 - [14] OHBA T, HARO H, ANDO T, et al. TNF- α -induced NF- κ B signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010, 27(2): 229-235.
 - [15] PATTAPPA G, PEROGLIO M, SAKAI D, et al. CCL5/rantes is a key chemoattractant released by degenerative intervertebral discs in organ culture[J]. *European Cells & Materials*, 2014, 27(1): 124-136.
 - [16] LI P B, TANG W J, WANG K, et al. Expressions of IL-11 and MMP-9 in degenerated lumbar disc tissues and their clinical significance [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(18): 4007-4013.
 - [17] URBAN J P, ROBERTS S. Degeneration of the intervertebral disc [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2003, 5(3): 120-130.
 - [18] SHAMJI M F, SETTON L A, JARVIS W, et al. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2014, 62(7): 1974-1982.
 - [19] WEILER C, NERLICH A G, BACHMEIER B E, et al. Expression and distribution of tumor necrosis factor α in human lumbar intervertebral discs; a study in surgical specimen and autopsy controls[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(1): 44-53.
 - [20] LIU X G, HOU H W, LIU Y L. Expression levels of IL-17 and TNF- α in degenerated lumbar intervertebral discs and their correlation [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2016, 11(6): 2333-2340.
 - [21] FUJITA K, ANDO T, OHBA T, et al. Age-related expression of MCP-1 and MMP-3 in mouse intervertebral disc in relation to TWEAK and TNF- α stimulation[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2012, 30(4): 599-605.
 - [22] KIM H J, JIN S Y, KOH Y G, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1 [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2014, 32(4): 551-556.
 - [23] HERDER C, ILLIG T, BAUMERT J, et al. RANTES/CCL5 gene polymorphisms, serum concentrations, and incident type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002 [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2008, 158(5): 1-5.
 - [24] LIOU J T, YUAN H B, MAO C C, et al. Absence of C-C motif chemokine ligand 5 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and behavioral hypersensitivity in a murine neuropathic pain model[J]. *Pain*, 2012, 153(6): 1283-1291.
 - [25] AHN S H, CHO Y W, AHN M W, et al. mRNA expression of cytokines and chemokines in herniated lumbar intervertebral discs[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(9): 911-917.
 - [26] KAWAGUCHI S, YAMASHITA T, KATAHIRA G I, et al. Chemokine profile of herniated intervertebral discs infiltrated with monocytes and macrophages[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(14): 1511-1516.
 - [27] MILLWARDSADLER S J, COSTELLO P W, FREEMONT A J, et al. Regulation of catabolic gene expression in normal and degenerate human intervertebral disc cells: implications for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, 11(3): R65.
 - [28] FONG E L S, CHAN C K, GOODMAN S B. Stem cell homing in musculoskeletal injury[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(2): 395-409.
 - [29] KEPLER C K, MARKOVA D Z, DIBRA F, et al. Expression and relationship of proinflammatory chemokine RANTES/CCL5 and cytokine IL-1 β in painful human intervertebral discs[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2013, 38(11): 873-880.
 - [30] HOYLAND J A, LE MAITRE C, FREEMONT A J. Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc[J]. *Rheumatology*, 2008, 47(6): 809-814.
 - [31] BAEK S J, KANG S K, RA J C. In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2011, 43(10): 596-603.

(收稿日期: 2019-01-13)