

• 实验研究 •

右归丸对肝肾亏虚型退变髓核细胞活力及相关炎症因子表达的影响

宋凯¹ 潘乐² 李智斌² 王官林² 孙晓洁² 刘康³ 唐少雄¹ 杨利学^{1△}

[摘要] **目的:**研究右归丸含药大鼠血清对肝肾亏虚型退变髓核细胞活性及 IL-1、TNF- α 表达的影响。**方法:**选取 48 只雌雄各半质量为 180~220 g SD 大鼠,按随机数字表法分为空白对照组、桃红四物汤组及右归丸组,各组药物干预后取血清冻存备用。选 3 例辨证肝肾亏虚型的腰椎间盘突出且需要手术的患者,获取髓核组织细胞并进行细胞培养。各组冻存的含药血清分别配置成 5%、10%、20% 浓度梯度干预髓核细胞,运用 MTT 法获取细胞 OD 值并制作细胞生长曲线,选取各组最佳含药血清浓度。将 2 代髓核细胞分为空白血清组、桃红血清组、右归血清组。选用各组最佳浓度血清分别连续干预 3、7、14 d,Western Blot 检测 2 代髓核细胞中 IL-1、TNF- α 的表达水平。**结果:**10% 空白血清、20% 桃红四物汤含药血清及 20% 右归丸含药血清有利于髓核细胞生长。分别在第 3、7、14 天与空白血清组比较,桃红血清组、右归血清组髓核细胞中 IL-1、TNF- α 的表达水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且右归血清组相比桃红血清组 IL-1、TNF- α 降低更加明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**右归丸大鼠含药血清干预肝肾亏虚型退变髓核细胞可显著提高细胞增殖活力,下调炎症因子 IL-1、TNF- α 的表达,右归丸含药血清干预肝肾亏虚型退变髓核细胞效果优于桃红四物汤含药血清,从侧面进一步论证了辨证论治理论的科学性。

[关键词] 右归丸;桃红四物汤;髓核细胞;炎症因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)07-0012-05

Efficacy of Yougui Pill on Cell Viability and Expression of Related Inflammatory Factors in Degenerative Nucleus Pulposus of Human with Deficiency of Liver and Kidney

SONG Kai¹ PAN Le² LI Zhibin² WANG Guanlin² SUN Xiaojie²
LIU Kang³ TANG Shaoxiong¹ YANG Lixue^{1△}

¹Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi China;

²Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi China;

³Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi China.

Abstract Objective: To study the efficacy of Yougui pill-containing rat serum on the activity of degenerated nucleus pulposus cells and the expression of IL-1 and TNF- α in patients with liver and kidney deficiency type. **Methods:** 48 male and female SD rats with a weight of 180 to 220 g each and divide them into blank control group, Taohong Siwu decoction group and Yougui pill group according to the random number table. Serum of each group is frozen and stored after drug intervention spare. 3 cases of patients with a herniated lumbar intervertebral disc with liver and kidney deficiency and required surgery were selected to obtain nucleus pulposus tissue cells and carry out cell culture. The cryopreserved medicated

serum of each group was configured into 5%, 10%, 20% concentration gradients to interfere with the nucleus pulposus cells. The cell OD value was obtained by the MTT. The cell growth curve was made, and the best drug-containing serum concentration of each group was selected. The 2 generations of nucleus pulposus cells were divided into a blank serum group, a Taohong serum group, and Yougui serum group. The optimal concentration of serum in each group

基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目

(S2018-JC-YB-1870)

¹ 陕西中医药大学(陕西 咸阳, 712000)

² 陕西中医药大学附属医院

³ 陕西中医药大学第二附属医院

[△]通信作者 E-mail: yanglixue@sina.com

was selected for continuous intervention for 3, 7 and 14 d respectively, and the expression levels of IL-1 and TNF- α in the second-generation nucleus pulposus cells were detected by Western Blot. **Results:** 10% blank serum, 20% Taohong Siwu decoction containing serum and 20% Yougui pill containing serum were all beneficial to the growth of nucleus pulposus cells. Compared with the blank serogroup at 3rd, 7th and 14th day, the expression levels of IL-1 and TNF- α in the nucleus pulposus cells of the Taohong serogroup and Yougui serogroup in these times were significantly reduced, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The levels of IL-1 and TNF- α in the Yougui serogroup were significantly lower than those in the taohong serum group. **Conclusion:** The intervention of Yougui pill-containing rat serum on degenerated nucleus pulposus cells with liver and deficiency can significantly increase cell proliferation and down-regulate the expression of inflammatory factors IL-1 and TNF- α . The efficacy of degenerative nucleus pulposus cells of kidney deficiency type intervened by Yougui pill-containing serum is better than that of Taohong Siwu decoction containing medicated serum, which further demonstrates the scientific nature of the theory of syndrome differentiation and treatment from the side.

Keywords: Yougui pill; Taohong Siwu decoction; nucleus pulposus cells; inflammatory factors

腰椎间盘突出症(Lumbar Disc Herniation, LDH)是引起中老年人腰痛的重要因素^[1], LDH 主要由椎间盘的退变引起, 且发现椎间盘细胞的活性变化和炎性变化对椎间盘的退变起重要作用^[2]。研究表明益气活血补肾可以降低炎性因子在退变型髓核细胞中的表达, 使得细胞外基质降解, 加速退变型髓核的重吸收^[3-4]。本实验采用右归丸为补肾方药代表, 桃红四物汤为活血方药代表, 研究各组含药血清干预肝肾亏虚型人退变髓核细胞后细胞活力及炎性因子表达的变化。并根据中医辨证论治理论验证右归丸含药血清干预肝肾亏虚型退变髓核细胞效果优于桃红含药血清组, 从侧面进一步论证了辨证论治的科学性。

1 材料与方法

1.1 病例资料

选择 2019 年 6 月至 2019 年 12 月就诊于陕西中医药大学附属医院脊柱骨科辨证分型为肝肾亏虚型的腰椎间盘突出症手术患者。经医院伦理委员会备案同意, 患者签署知情同意书后, 手术中获取相关废弃髓核组织作为实验材料。

1.2 纳入标准

按照 LDH 的中西医诊断标准进行: 1) 经伦理委员会同意且患者自愿签署知情同意书; 2) 查体符合 LDH^[5]; 3) 经 CT 或 MRI 检查证实; 4) 中医辨证属肝肾亏虚型^[6]; 5) 具备手术适应证, 行椎间盘髓核摘除术; 6) 20~50 岁。

1.3 排除标准

1) 不满足纳入标准的患者; 2) 存在心脑血管、肿瘤等其他严重疾患; 3) 存在结核、乙肝等传染性疾病的疾患; 4) 不愿意参与调查研究治疗流程的患者。

1.4 标本来源

来源于陕西中医药大学附属医院骨科符合纳入标准的住院患者, 共 3 例。手术中获取废弃髓核组织, 将

手术取得的新鲜髓核组织置于含有医用生理盐水的 25 mL 无菌离心管中, 立即送往陕西中医药大学细胞实验室进行细胞分离及培养。

1.5 试剂与仪器

胎牛血清(FBS)(西安博达技术有限公司); 青链双抗(西安博达技术有限公司); BCA 试剂盒(Thermo Scientific 飞世尔科技公司); WB 配胶试剂盒(Bio-Rad 公司); 兔抗人 IL-1 (ABCAM); 兔抗人 TNF- α (ABCAM)。倒置相差显微镜(尼康中国有限公司); CO₂细胞培养箱(皓庄仪器有限公司); 电泳仪、电转仪、电泳槽、PVDF 膜、曝光仪(Bio-Rad 公司)。

1.6 方法

1.6.1 含药血清的制备 选取 6~8 周龄健康 SD 大鼠 48 只, 雌雄各 24 只, 按照随机分配原则分成空白对照组、桃红四物汤组、右归丸组, 每组 16 只(雌性、雄性各 8 只)。右归丸组成: 熟地 24 g, 山萸肉 9 g, 枸杞子 9 g, 当归 9 g, 菟丝子 12 g, 鹿角胶 12 g, 山药 12 g, 杜仲 12 g, 附子 6 g, 肉桂 6 g。桃红四物汤组成: 当归 15 g, 熟地 15 g, 川芎 15 g, 白芍 15 g, 桃仁 10 g, 红花 10 g。药物加水 400 mL, 浸泡 0.5 h, 水煎 30 min, 水煎至 100 mL。根据动物与人体每千克体重折算系数表^[7]计算各组大鼠灌胃药量, 所得右归丸组大鼠每次灌胃量约为 5.72 g/kg(250 g SD 大鼠每次灌胃量约 1.43 mL), 桃红四物汤组大鼠每次灌胃量约 4.17 g/kg(250 g SD 大鼠每次灌胃量约 1.26 mL)。每天 9 点、16 点灌药, 连续 5 d, 最后一次灌胃 1 h 后腹主动脉采血。血样装入离心管, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上层液体, 放在 56 ℃ 恒温水浴锅中灭活 30 min。随后进行过滤、灭菌, 最后置于 -20 ℃ 下冷冻备用, 每次根据要求配制相应浓度。

1.6.2 退变髓核细胞的培养 剪取髓核组织, 采用 0.25% 胰蛋白酶消化, 加入 20% FBS、1% 双抗终止消

化,离心后接种至 25 mL 细胞培养瓶内,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,期间用倒置显微镜观察细胞生长情况,并拍照记录。待细胞生长接近 90% 时进行传代。

1.6.3 MTT 法测定细胞生长曲线 胰酶消化后接种细胞于 96 孔板,按分组进行不同浓度培养,待细胞贴壁后加入含药血清,分别于 6、12、24、48、72 h 进行 MTT 实验,选择 490 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值(OD),记录结果,以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.6.4 Western Blot 检测各时间点 IL-1、TNF-α 表达的变化 实验分组:空白血清组、桃红血清组、右归血清组。不同含药血清梯度浓度干预培养后,分别在第 3、7、14 天收集细胞,进行 Western Blot 检测,主要步骤包括:1)提取细胞蛋白,取出细胞,吸弃培养液,用 PBS 洗一遍,按比例加入 RIPA 裂解液和 PMSF,用移液枪吹打数次。约 2 min 充分裂解后,吸至离心管,

12 000g,4 ℃ 离心 10 min,取上清,用 BCA 法测蛋白浓度,并将上清制备成样品储备液。2)取适量的样品加入上样孔内,进行电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗,每次孵抗体结束后,都用 TBST(1X)洗膜 3 次,每次 10 min。最后将洗后的 PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒检测蛋白条带。用 Image J 软件测定蛋白灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值之比表示目的蛋白的相对表达量,每组重复 6 次,进行统计分析。

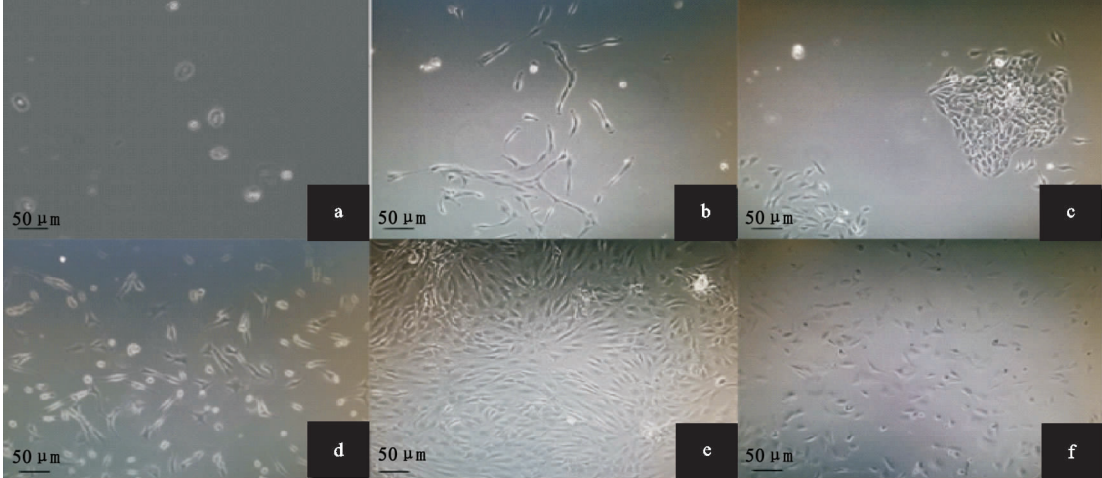
1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间检测指标比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 髓核细胞在不同时间点的生长变化

经胰酶消化法培养后,髓核细胞在不同时间点的生长变化见图 1。



(a)~(d) 分别为第 1、3、7、14 天原代髓核细胞;(f) 二代髓核细胞

图 1 髓核细胞在不同时间点的生长变化

2.2 不同浓度含药血清干预下细胞生长曲线

物汤含药血清及 20% 右归丸含药血清更有利于髓核细胞生长,且含有药物血清的两组细胞生长活力更强。

从图 2-图 4 可以看出,10% 空白血清、20% 桃红四

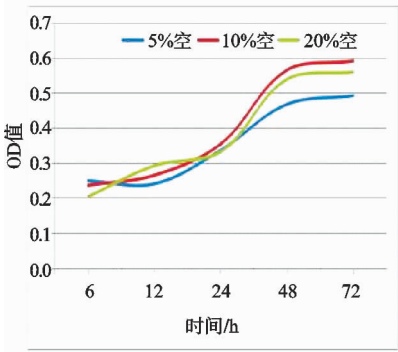


图 2 空白对照组大鼠含药血清干预后 OD 值

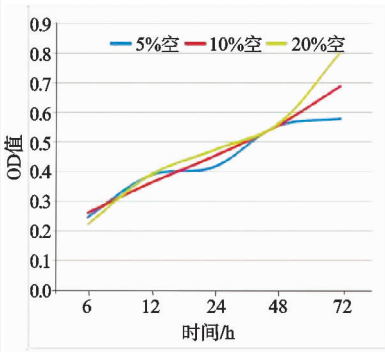


图 3 桃红四物汤组大鼠含药血清干预后 OD 值

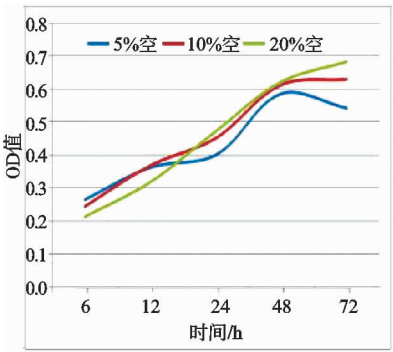


图 4 右归丸组大鼠含药血清干预后 OD 值

2.3 各时间点 IL-1、TNF-α 表达的变化

变化,见图 5-图 7 及表 1-表 2。

Western Blot 检测各时间点 IL-1、TNF-α 表达的

从表 1-表 2 可以看出:3 组细胞经 3、7、14 d 培养

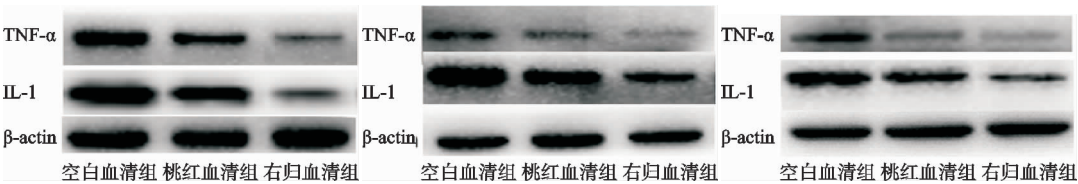


图 5 第 3 天各组 IL-1 和 TNF-α 的表达水平

图 6 第 7 天各组 IL-1 和 TNF-α 的表达水平

图 7 第 14 天各组 IL-1 和 TNF-α 的表达水平

表 1 各组分别在第 3、7、14 天的 TNF-α 表达水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
空白血清组	1.30±0.03	1.38±0.10	1.48±0.06
桃红血清组	1.14±0.02 ¹⁾	1.09±0.01 ¹⁾	0.91±0.07 ¹⁾
右归血清组	1.09±0.04 ¹⁾²⁾	0.95±0.02 ¹⁾²⁾	0.72±0.05 ¹⁾²⁾
F	103.864	62.851	203.565
P	<0.05	<0.05	<0.05

注:1)与同期空白血清组比较, $P<0.05$;2)与同期桃红血清组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组分别在第 3、7、14 天的 IL-1 表达水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
空白血清组	1.85±0.07	1.64±0.06	1.86±0.08
桃红血清组	1.49±0.09 ¹⁾	1.24±0.02 ¹⁾	1.14±0.07 ¹⁾
右归血清组	1.37±0.06 ¹⁾²⁾	1.01±0.01 ¹⁾²⁾	0.90±0.04 ¹⁾²⁾
F	69.148	350.437	321.577
P	<0.05	<0.05	<0.05

注:1)与同期空白血清组比较, $P<0.05$;2)与同期桃红血清组比较, $P<0.05$ 。

后,与空白血清组相比,桃红血清组及右归血清组 IL-1 和 TNF-α 均有下降,经 F 检验,差异有统计学意义 ($P<0.05$);右归血清组较桃红血清组下降更加明显,经 F 检验,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

据腰椎间盘突出症的典型临床症状表现,属中医学中的“腰痛”“痿证”范畴^[8]。《素问·脉要精微论》云“腰者,肾之府,转摇不能,肾将惫矣”。《丹溪心法》云“瘀血而致腰痛者,称沥血腰痛,与跌仆闪挫,或碰撞所伤,或腰痛经久,瘀血凝积而成”。腰痛病主要病机为本虚标实,本虚以肾虚为关键,标实为瘀血、痰饮等,主要表现为“不通则通、不荣则痛”,引起腰骶部的疼痛不适等症状。右归丸^[9]以温补肾阳、填精益髓为功用,主治肾阳不足,命门火衰证。桃红四物汤主要功用为养血活血,主治血虚血瘀证。研究表明^[10]补肾活血中药可促进椎间盘髓核细胞增长,抑制髓核细胞炎症反应,减少炎症因子的合成,缓解髓核细胞的凋亡,并且认为“肝主筋、肾主骨”与 LDH 的发生具有密切联系。

本实验研究表明,右归丸及桃红四物汤大鼠含药血清可以促进体外髓核细胞的生长,并且可以降低 IL-1、TNF-α 表达,且右归丸含药血清在降低同证型患者髓核细胞炎性因子表达方面,效果更为显著。相关研究表明^[11]促进髓核细胞的生长与控制炎症因子的表达对于延缓椎间盘的退变有重要的意义。研究显示椎间盘的内源性稳定遭到破坏,椎间盘内的炎症因子

水平增加,炎症因子的介入可导致蛋白多糖和胶原的降解,并影响多糖和胶原的分泌及生成,最终加快腰椎退变的速度^[12]。炎症因子主要有 IL-1、IL-6、IL-2、IL-4、TNF-α、前列腺素 2(PGE)、IFNγ、趋化因子等,但目前研究较多的为 IL-1 和 TNF-α。IL-1 和 TNF-α 可使基质金属蛋白(metal matrix proteinase, MMPs)的表达上升,该类蛋白降低多糖和Ⅱ型胶原的生成,并促进Ⅰ型胶原的生成,Ⅰ型胶原可促使椎间盘细胞的纤维化,最终出现软骨细胞变性、坏死^[13]。炎症因子可导致并加速椎间盘的退变,腰椎间盘的退变也会诱导炎症因子的水平,二者相互影响。陈江等^[14]通过益肾通络活血方干预椎间盘细胞,通过 NF-κB 信号通路促进 Caspase-3 和 CollagenⅡ 的表达,抑制 MMP-13、NF-κB、p65、ADAMTS-4 来增加细胞活性,减少髓核细胞的凋亡,缓解髓核细胞的退变。Hong 等^[15]发现肉桂水提取物对小鼠血清进行干预可抑制 IL-6 和 TNF-α 水平的表达,降低血清中的炎症因子,可缓解炎症反应。右归丸及桃红四物汤在临床中可以有效的治疗腰椎间盘突出症,可能与增加髓核细胞生长及降低炎性反应有关。

综上所述,本实验通过体外研究证实右归丸含药血清和桃红四物汤含药血清都有利于退变髓核细胞的生长,并可降低炎症因子 IL-1、TNF-α 的表达,且针对肝肾亏虚型退变髓核细胞,右归丸的作用更为显著,这将为临床使用右归丸治疗肝肾亏虚型 LDH 提供理论

依据。同时从侧面反映了同证型方药对该证型退变髓核细胞干预效果较优,进而体现了中医辨证论治的科学性。

参考文献

- [1] 海云翔,文皓楠,宋敏.宋敏教授“术、药、功”并举治疗腰椎间盘突出症经验[J].中国中医骨伤科杂志,2020,28(10):80-82.
 - [2] CHEUNG K M,KARPPINEN J,CHAN D,et al.Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals[J].Spine(Phila Pa 1976),2009,34(9):934-940.
 - [3] 刁志君,姜宏,刘锦涛,等.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[J].中国中医骨伤科杂志,2019,27(5):1-6.
 - [4] 周文明,林一峰,张震,等.补肾壮督方对大鼠退变髓核组织中 miR-155-5p 及凋亡相关蛋白的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(4):1354-1360.
 - [5] 胡星新,刘立岷.临床症状体征与影像学检查分离的腰椎间盘突出症的发生机制研究进展[J].中国骨伤,2015,28(10):970-975.
 - [6] 周仲瑛.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社,2007:498-500.
 - [7] 周文明,林一峰,张震,等.补肾壮督方含药血清对髓核细胞线粒体凋亡通路的影响[J].中国组织工程研究,2020,24(23):3643-3648.
 - [8] 钟敏,肖玲瑄,张瑜,等.火针治疗腰椎间盘突出症有效性与安全性的 Meta 分析[J].广州中医药大学学报,2020,37(6):1181-1189.
 - [9] 梅胜利.小针刀辅助右归丸治疗肾虚型腰椎间盘突出症疗效及对相关血清指标的影响[J].中国合理用药探索,2019,16(12):131-134.
 - [10] 李涛,吴山,范志勇,等.基于 Wnt/ β -catenin 通路中医药疗法治疗骨相关疾病研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(4):117-121.
 - [11] 钟传棋,杨功旭,吴斌,等.通督活血汤治疗肾虚血瘀型腰椎间盘突出症的临床研究[J].中国中医骨伤科杂志,2020,28(10):13-16.
 - [12] 叶伟,黄东生,刘尚礼.炎症因子与椎间盘退变[J].脊柱外科杂志,2003,1(5):294-297.
 - [13] SUN H Y,HU K Z,YIN Z S.Inhibition of the p38-MAPK signaling pathway suppresses the apoptosis and expression of proinflammatory cytokines in human osteoarthritis chondrocytes[J].Cytokine,2017,90:135-143.
 - [14] 陈江,肖辉灯,孙旗,等.人椎间盘髓核细胞增殖活性与益肾活血通络方的干预调控[J].中国组织工程研究,2020,24(8):1200-1206.
 - [15] HONG J W,YANG G E,KIM Y B,et al.Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models[J].BMC Complement Altern Med,2012,12:237.
- (收稿日期:2020-12-14)
-
- (上接第 11 页)
- [26] WANG C Y,MA F L,LIU J T,et al.Protective effect of salvianolic acid A on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats[J].Biological & Pharmaceutical Bulletin,2007,30(1):44-47.
 - [27] WANG T,SHAN S Y,HAN B,et al.Salvianolic acid A exerts anti-amnesic effect on diazepam-induced anterograde amnesia in mice[J].Neurochemical Research,2011,36(1):103-108.
 - [28] FENG S,CONG H,JI L.Salvianolic acid A exhibits anti-inflammatory and antiarthritic effects via inhibiting NF- κ B and p38/MAPK pathways[J].Drug Design Development & Therapy,2020,14:1771-1778.
 - [29] WANG R,SONG F X,LI S N,et al.Salvianolic acid A attenuates CCl₄-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways[J].Drug Design Development & Therapy,2019,13:1889-1990.
 - [30] ZU G,ZHOU T,CHE N,et al.Salvianolic acid A protects against oxidative stress and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion injury through activation of Nrf2/HO-1 pathways[J].Cellular Physiology & Biochemistry,2018,49(6):2320-2332.
 - [31] 牛子冉,徐晓娜,陈俞材,等.丹酚酸 A 对异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血的保护作用及其机制[J].中国药理学通报,2015,31(12):1667-1674.
- (收稿日期:2021-01-05)