

• 实验研究 •

基于炎症小体信号通路探讨和营通气片对大鼠
腰椎间盘突出症寒凝证的作用机制

徐丽¹ 李孝林² 张朝驹¹ 何川^{1△}

[摘要] 目的:探讨和营通气片对大鼠腰椎间盘突出症(LDH)寒凝证的影响,基于 NLRP3/NF-κB 炎症小体信号通路探讨其可能的作用机制。方法:将 30 只 SD 雄性大鼠进行腰椎间盘突出症造模,然后随机挑选 24 只进行寒冷刺激,随后分成对照组(LDH 大鼠模型)、模型组(LDH 寒凝证大鼠模型)、和营通气片低剂量组、和营通气片高剂量组及吲哚美辛组,每组 6 只,干预 28 d。用神经功能评分评价寒邪对腰椎间盘突出症的影响,用 ELISA 法检测 IL-1β 和 TNF-α 的含量,用 Western Blot 法和实时 PCR 检测 NLRP3、NF-κB、ASC、IL-1β、TNF-α 蛋白和 mRNA 的表达水平,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果:寒邪促进腰椎间盘突出症的发展,与对照组比较,模型组髓核组织 PLA2 活性升高,痛阈降低,神经根组织中 NLRP3、NF-κB、ASC、IL-1β、TNF-α 蛋白和 mRNA 表达水平均提高,细胞凋亡增加($P<0.05$);与模型组比较,吲哚美辛组及和营通气片组大鼠神经根组织中髓核组织 PLA2 活性降低,痛阈升高, NLRP3、NF-κB、ASC、IL-1β、TNF-α 蛋白和 mRNA 表达水平均降低,细胞凋亡减少($P<0.05$)。结论:和营通气片可能通过抑制 NLRP3/NF-κB 相关表达,缓解腰椎间盘突出症寒凝证大鼠髓核炎症及细胞凋亡,提高大鼠痛阈, NLRP3/NF-κB 信号调控通路是和营通气片对大鼠腰椎间盘突出症寒凝证的可能作用机制。

[关键词] 炎症小体;信号通路;和营通气片;寒邪;腰椎间盘突出症;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)04-0021-06

DOI:10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 250405

Exploring the Mechanism of Action of Heyingtongqi Tablets on
Cold Coagulation Syndrome of Lumbar Disc Herniation in
Rats Based on Inflammasome Signaling Pathway

XU Li¹ LI Xiaolin² ZHANG Chaoju¹ HE Chuan^{1△}

¹ Jingzhou Institute of Traditional Chinese Medicine (Jingzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine), Jingzhou 434000, Hubei China;

² Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei China.

Abstract Objective: To explore the effect of Heyingtongqi tablets on cold coagulation syndrome in rats with lumbar disc herniation (LDH), and exploring its possible mechanism of action based on the NLRP3/NF-κB inflammasome signaling pathway. **Methods:** 30 SD male rats were modeled for lumbar disc herniation, and 24 rats were randomly selected for cold stimulation. Then they were divided into control group (LDH rat model), model group (LDH rat model of cold coagulation syndrome), Heyingtongqi tablet low-dose group, Heyingtongqi tablet high-dose group and indomethacin group, with 6 animals in each group. The intervention lasted for 28 d. Neural function score was used to evaluate the effect of cold evil on

LDH, ELISA was used to detect the contents of IL-1β and TNF-α, and Western Blot and real-time PCR were used to detect the expression levels of NLRP3, NF-κB, ASC, IL-1β and TNF-α protein and mRNA. The apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:** Cold pathogens promoted the development of LDH. Compared with the control group, PLA2 activity in nucleus pulposus tissue was increased, pain threshold was decreased, NLRP3, NF-κB, ASC, IL-1β, TNF-α

基金项目:全国名老中医专家传承工作室建设项目(国中医药人教函〔2022〕75 号)
湖北省中医药管理局中医药科研面上项目
(ZY2023M051)

¹ 荆州市中医药研究所/荆州市中医医院(湖北 荆州, 434000)

² 长江大学

[△]通信作者 E-mail:hc78960968@sina.com

protein and mRNA expression levels in nerve root tissue were increased in the model group, and apoptosis was increased ($P<0.05$). The activity of PLA2 in nucleus pulposus decreased, the pain threshold increased, the expression levels of NLRP3, NF- κ B, ASC, IL-1 β , TNF- α protein and mRNA decreased, and the apoptosis decreased ($P<0.05$) in intomethacin group and Heyingtongqi tablet group. **Conclusion:** Heyingtongqi tablets may alleviate nucleus pulposus inflammation and cell apoptosis in LDH cold coagulation syndrome rats by inhibiting NLRP3/NF- κ B related expression, and increase the pain threshold of rats. Therefore, the NLRP3/NF- κ B signaling regulatory pathway is a potential mechanism of Heyingtongqi tablets in treating cold coagulation syndrome of lumbar disc herniation in rats.

Keywords: inflammasome; signal pathway; Heyingtongqi tablet; cold evil; lumbar disc herniation; apoptosis

腰椎间盘突出症 (Lumbar Disc Herniation, LDH) 是因椎间盘退化或外力作用引起的内外压力失衡, 导致纤维环破裂, 不及时治疗可能严重影响患者健康^[1]。中医药在腰椎间盘突出症的防治中具有显著疗效和较高安全性^[2], 和营通气片为本院治疗腰椎间盘突出症临床应用广泛、疗效较好的自制药。早期研究表明, 和营通气片能显著改善腰椎间盘突出症疼痛、麻木和乏力等症状^[3]。相关研究表明 NLRP3 炎症小体在识别细胞内和细胞外的病原体、损伤信号及炎症刺激时发挥关键作用^[4]。NF- κ B 通常以抑制形式存在于细胞质中, NF- κ B 的释放会启动促炎细胞因子的转录。这些细胞因子不仅在微环境中引发炎症反应, 还能诱导髓核细胞的凋亡, 从而加重椎间盘的损伤^[5]。

本实验旨在发现和营通气片对大鼠腰椎间盘突出症寒凝证的炎症指标、细胞学、组织免疫学等的影响, 探讨 NLRP3/NF- κ B 炎症小体信号调控通路在和营通气片治疗作用中的可能机制, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只 6 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体重为 (200 \pm 30)g, 由长江大学医学院实验动物中心提供。所有动物均严格按照动物饲养规则喂养, 饲养环境温度为 21~26 $^{\circ}$ C, 湿度为 50%~60%。动物实验操作参考科技部关于善待实验动物的指导性意见, 符合实验动物的伦理要求。

1.2 药品和试剂

和营通气片组方如下: 丹参、郁金、当归、青皮、麝香、川芎、香附、玄胡、枳壳、广香、沉香、小茴、砂仁、三七、法夏、聚维酮适量、硬脂酸镁适量、蔗糖, 由本院根据该方配伍剂量制成成品片剂。吡哆美辛胶囊 (四川科伦药业股份有限公司, 75 mg/粒, 国药准字 H20053357); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (CSB-E06998Rb)、白细胞介素 (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (CSB-E08054m) 购于武汉华美生物工程有限公司; 兔抗 NLRP3 (68102-1-Ig)、兔抗 NF- κ B (10745-1-AP)、兔抗 ASC (10500-1-AP)、兔抗 TNF- α (17590-1-AP) 购于 Proteintech 公司; 兔抗 Cleaved-caspase3

(9661T) 购于 CellSignalingTechnology 公司; 兔抗 IL-1 β 抗体 (12703S)、羊抗兔 IgG 二抗 (4970S) 购于 CST 公司; TRIzol 试剂 (15596026) 购于 Invitrogen 公司; RNA 反转录试剂盒 (RR036A) 购于 TaKaRa 公司; SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒 (RR820A) 购于北京智杰方远科技有限公司; 注射用青霉素钠 (XJNZSY010001) 购于杭州高晟生物科技有限公司。

1.3 实验仪器

LightCycler480 II 型实时荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司); VE-180 型免疫印迹系统 (Bio-Rad 公司); Chem Studio 515 型化学发光仪 (Bio-Rad 公司); 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司)。

1.4 方法

1.4.1 腰椎间盘突出症寒凝证大鼠模型的构建

1.4.1.1 腰椎间盘突出症大鼠模型的构建 参照自体髓核移植法^[6]进行造模, 适应性饲养 1 周, 经腹腔注射 10% 水合氯醛 (3.5 mL/kg) 进行麻醉, 在无菌条件下取出每只大鼠第三、四尾椎间盘的髓核, 并将一根无菌“L”形不锈钢柱 (直径约 0.4 mm, 长度 4 mm) 插入椎间孔, 进而对背根神经节造成稳定的压迫, 造模后将大鼠放置在室温下复苏, 苏醒后单笼饲养。造模后连续 3 d 腹腔注射青霉素钠 20 万单位/(只 \cdot d), 预防伤口感染。于造模术后第 3 天观察大鼠的行为表现, 观察有无精神烦躁, 后肢有无跛行, 饮食、饮水、大便等。观察实验大鼠在造模前后及实验干预期间的进食、精神状态、休息等一般行为学指标, 为判定造模是否成功提供参考。采用 Siegal 等^[6]推荐的神经功能判断六级分法进行评分 (见表 1), 评分超过 2 级即提示造模成功。

表 1 神经功能评分表

级别	行为表现	神经功能评分/分
0	正常	2
1	后肢萎软, 甩尾无力	4
2	后肢无力, 行走时有轻度困难	6
3	后肢无力, 行走时有明显不稳定性	8
4	站立不稳, 但后肢能够移动	10
5	瘫痪, 后肢无自主移动	12

1.4.1.2 寒邪刺激的腰椎间盘突出症大鼠模型的构建 每天 12:00—16:00 将造模成功的腰椎间盘突出症大鼠放入人工气候箱(温度为 $(4.0\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 $50\%\pm2\%$)中饲养 4 h,剩余时间按常规室温饲养,连续 1 周。

1.4.2 实验动物分组及给药方法 将造模成功后的腰椎间盘突出症模型大鼠随机分成 5 组,包括对照组(LDH 模型大鼠)、模型组(LDH 寒凝证模型大鼠)、和营通气片低剂量组、和营通气片高剂量组及吡哌美辛组,每组 6 只。和营通气片低剂量组给予 6.24 g/kg 剂量灌胃,和营通气片高剂量组给予 12.48 g/kg 剂量灌胃,吡哌美辛组按 7.5 mg/kg 的剂量给予大鼠灌胃吡哌美辛悬液,模型组给予等量的生理盐水,1 次/d,共持续 28 d。

1.4.3 疼痛阈值检测

1.4.3.1 热痛阈值检测 采用足底热刺激仪将辐射热光源经底部玻璃板聚焦到一侧足底的后半部,记录从开始照射到产生缩爪的时间,每次测试间隔至少 5 min,测量 3 次取平均值。

1.4.3.2 机械痛阈值检测 用 YLS-3E 型疼痛分析仪的有机玻璃圆锥体钝头接触大鼠左右前掌,线性逐渐增大压力,大鼠嘶叫挣扎试图抽回后爪时,仪器自动记录的压力值(g)记为大鼠机械性痛阈值。

1.4.4 用流式细胞仪检测各组大鼠髓核细胞的凋亡情况 收集大鼠神经根部组织,置于含有胰酶(如 0.25%胰酶-EDTA 溶液)的培养皿中, 37°C 下培养 30 min,轻轻吹打使细胞完全消化。将消化后的细胞悬液转移至离心管中,设置离心机转速为 1 000 r/min,离心 10 min。小心去除上清液,加入适量的培养基重悬细胞并充分混匀。用 PBS 洗涤细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI 染料,避光孵育 10~15 min。使用流式细胞仪分析。

1.4.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 IL-1 β 和 TNF- α 的含量 取大鼠外周血, 4°C 下 3 000 r/min 离心 15 min,取上清,按照 ELISA 检测试剂盒说明书测 IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

1.4.6 PLA2 活性检测 从各组中取出髓核组织,分别置于两只 25 mL 烧杯中,标记为 A 管和 B 管。向 B 管加入 8 mL 底物缓冲液,1.1 mL 乙二胺四乙酸和 0.4 mL 样本;向 A 管加入 8 mL 底物缓冲液,0.2 mL CaCl_2 溶液和 0.4 mL 样本。将两管在 37°C 水浴中孵育后,向 B 管再加入 0.2 mL CaCl_2 溶液,向 A 管再加入 1.1 mL 乙二胺四乙酸,混匀后使用高灵敏度 pH 计测量两管的 pH 值。然后,用微量吸枪将新标定的稀盐酸滴定至 B 管的 pH 值与 A 管相同,PLA2 的活性通过消耗的盐酸量来测定。

1.4.7 Western Blot 法检测大鼠神经根部组织中 NLRP3、NF- κB 、ASC、IL-1 β 、TNF- α 、Cleaved-caspase3 蛋白的表达 干预结束后,取 50 mg L_{5/6} 棘突处神经根组织,用 RIPA 强裂解液 4°C 下裂解 15 min,12 000 r/min 离心 15 min,取蛋白上清,BCA 测定蛋白浓度,加入 5 倍上样缓冲液 100°C 下 10 min 变性。通过 SDS-PAGE 电泳及电转移装置将蛋白质转移至 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉对其进行封闭,敷一抗过夜,敷二抗,TBST 洗后进行电化学发光,用 Image J 软件检测灰度值。

1.4.8 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 NLRP3、NF- κB 、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达情况 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA,随后逆转录。用 SYBR Green qPCR Master Mix、引物及样本混合物在实时 PCR 系统上进行分析, β -actin 作为内参。通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 NLRP3、NF- κB 、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达情况。所用引物由 Sangon Biotech 合成,具体序列见表 2。

表 2 引物序列

引物	正向序列(5'→3')	反向序列(3'→5')	长度/bp
NLRP3	CTGCATGCCGTATCTGGTTG	CTGCATGCCGTATCTGGTTG	167
NF- κB	AGTGTTACACAGACCTGGCATC	TCACCAGGCGAGTTATAGCTT	256
ASC	CTTGTCAGGGGATGAACTCAAAA	GCCATACGACTCCAGATAGTAGC	154
IL-1 β	GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	TTGGTGGTTTGTGAGTGTGAG	228
TNF- α	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT	89
β -actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154

1.5 统计学方法

用 GraphPad Prism 10.0.1 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模成功后大鼠神经功能评分

造模完成后,模型组大鼠全部存活,无死亡、瘫痪、感染案例,均纳入结果统计分析,样本无脱落。术后第 3 天均有明显症状,神经功能评分均在 3 级以上(见表

3)。模型组在寒冷条件下刺激 7 d,第 7 天时模型组出现乏力、站立不稳,且精神萎靡、目光呆滞、声音低微等情况更明显,说明寒邪能明显加重腰椎间盘突出症的既有症状,并影响其自然康复进度。

表 3 术后第 3 天和第 10 天大鼠神经功能评分($\bar{x}\pm s$,分)

组别	术后第 3 天	术后第 10 天
模型组	10.19±1.23	9.34±0.95
对照组	10.98±1.41	7.51±1.08 ¹⁾²⁾

注:1)与对照组术后第 3 天比较, $P<0.05$;2)与模型组术后第 10 天比较, $P<0.05$ 。

2.2 和营通气片对大鼠热痛及机械痛的影响

与对照组比较,模型组患足热痛和机械痛阈值降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,吡哌美辛组及和营通气片组患足热痛和机械痛阈值升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与吡哌美辛组比较,高剂量和营通气片组患足热痛和机械痛阈值升高,差异无统计学意义($P>0.05$);与吡哌美辛组比较,低剂量和营通气片组患足热痛和机械痛阈值降低,差异

有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

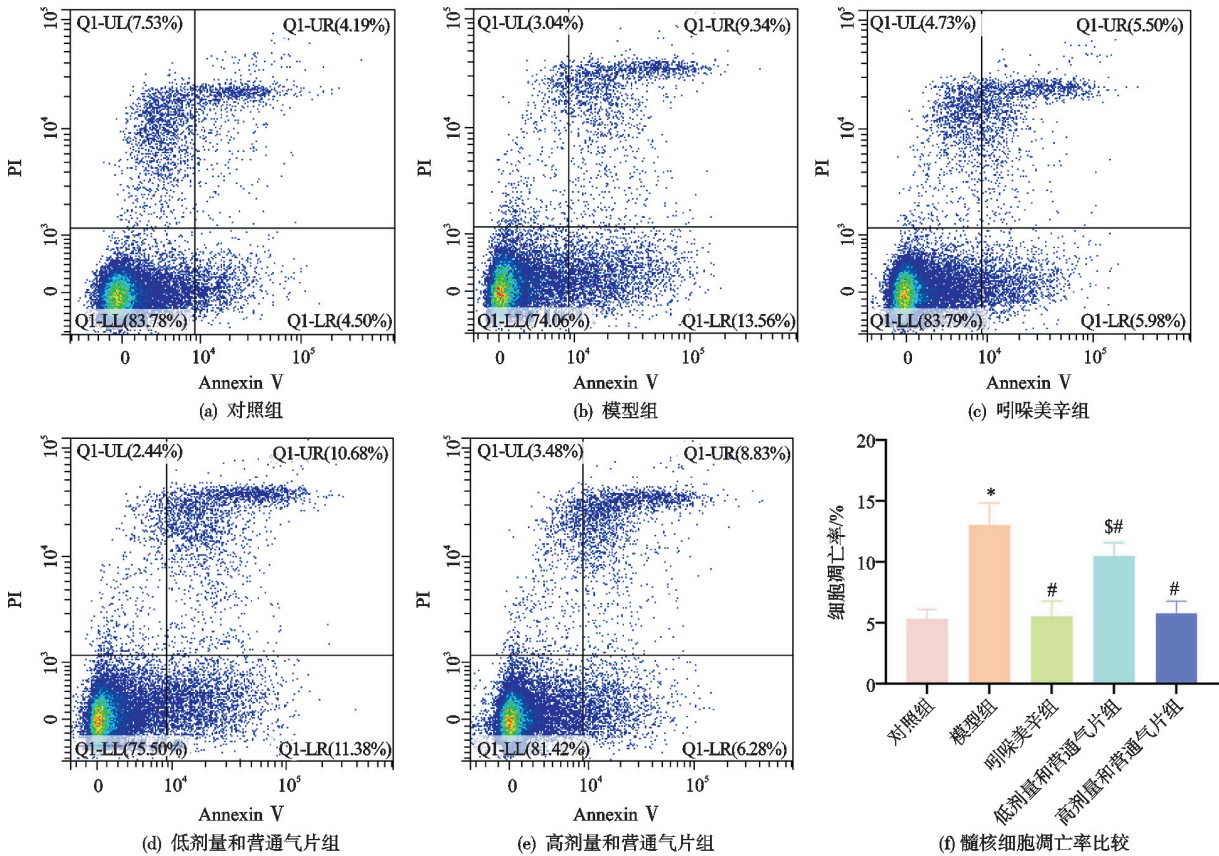
表 4 各组大鼠热痛及机械痛阈值比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	热痛阈值/s	机械痛阈值/g
对照组	28.25±1.50	825.92±16.53
模型组	12.04±2.17 ¹⁾	620.45±24.88 ¹⁾
吡哌美辛组	17.79±2.70 ²⁾	796.28±42.34 ²⁾
低剂量和营通气片组	13.85±2.26 ²⁾³⁾	715.09±17.34 ²⁾³⁾
高剂量和营通气片组	20.38±4.90 ²⁾	807.40±33.13 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与吡哌美辛组比较, $P<0.05$ 。

2.3 和营通气片对大鼠髓核细胞凋亡的影响

与对照组比较,模型组细胞凋亡水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,吡哌美辛组及和营通气片组细胞凋亡水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量和营通气片组凋亡水平与吡哌美辛组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与吡哌美辛组比较,低剂量和营通气片组细胞凋亡水平较高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$;与吡哌美辛组比较, $^{\$}P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠神经根组织髓核细胞凋亡率($n=6$)

2.4 和营通气片对大鼠神经根部组织中 PLA2 活性的影响

与对照组比较,模型组 PLA2 活性升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,吡哌美辛组及和营通气片组 PLA2 活性降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量和营通气片组 PLA2 活性水平与吡哌美

辛组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与吡哌美辛组比较,低剂量和营通气片组 PLA2 活性较高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

2.5 和营通气片对大鼠神经根部组织中 IL-1 β 和 TNF- α 含量的影响

与对照组比较,模型组 IL-1 β 和 TNF- α 的含量升

表 5 各组大鼠 PLA2 活性比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

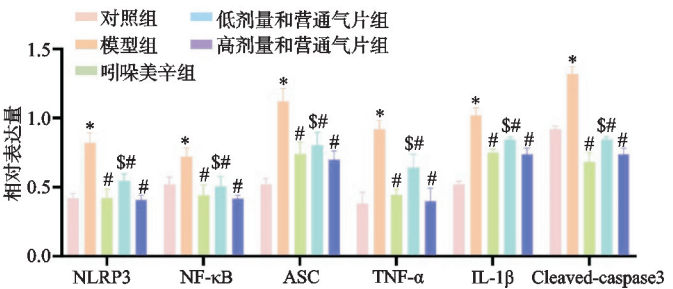
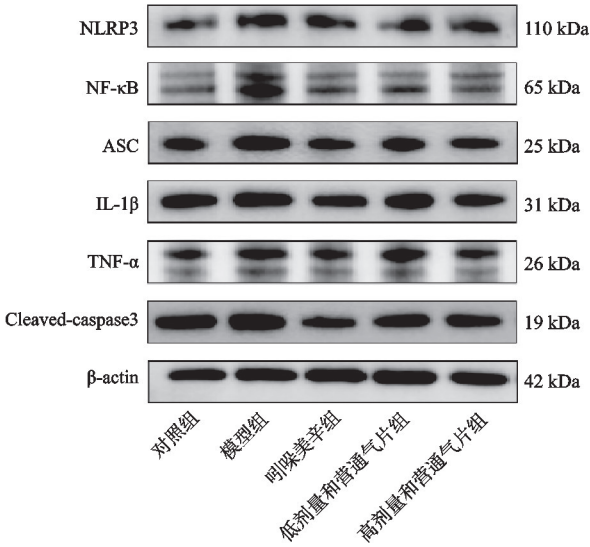
组别	PLA2 活性
对照组	38.45±2.62
模型组	63.60±2.56 ¹⁾
吡哌美辛组	33.61±1.75 ²⁾
低剂量和营通气片组	46.70±1.65 ²⁾³⁾
高剂量和营通气片组	35.98±3.34 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与吡哌美辛组比较, $P<0.05$ 。

高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,吡哌美辛组及和营通气片组 IL-1 β 和 TNF- α 的含量降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量和营通气片组 IL-1 β 和 TNF- α 的含量与吡哌美辛组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与吡哌美辛组比较,低剂量和营通气片组 IL-1 β 和 TNF- α 的含量升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 6。

2.6 和营通气片对大鼠神经根部组织中 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α 、Cleaved-caspase3 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与吡哌美辛组比较,\$ $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠神经根组织中 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α 、Cleaved-caspase3 蛋白的表达水平($n=3$)

2.7 和营通气片对 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响

与对照组比较,模型组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,吡哌美辛组及和营通气片组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达含量

表 6 各组大鼠 IL-1 β 和 TNF- α 含量比较($n=6, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	IL-1 β	TNF- α
对照组	19.78±2.02	11.35±1.15
模型组	42.87±1.38 ¹⁾	22.59±1.01 ¹⁾
吡哌美辛组	23.51±1.92 ²⁾	12.85±1.36 ²⁾
低剂量和营通气片组	32.78±1.46 ²⁾³⁾	17.93±1.30 ²⁾³⁾
高剂量和营通气片组	20.14±1.18 ²⁾	10.83±0.90 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与吡哌美辛组比较, $P<0.05$ 。

1 β 、TNF- α 、Cleaved-caspase3 蛋白表达均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,吡哌美辛组及和营通气片组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α 、Cleaved-caspase3 蛋白表达含量降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量和营通气片组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α 、Cleaved-caspase3 蛋白表达与吡哌美辛组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与吡哌美辛组比较,低剂量和营通气片组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α 、Cleaved-caspase3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量和营通气片组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达与吡哌美辛组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与吡哌美辛组比较,低剂量和营通气片组 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 7。

表 7 各组大鼠神经根组织中 NLRP3、NF- κ B、ASC、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	NLRP3	NF- κ B	ASC	IL-1 β	TNF- α
对照组	1.00±0.23	1.00±0.10	1.00±0.12	1.00±0.09	1.00±0.04
模型组	2.02±0.28 ¹⁾	1.87±0.19 ¹⁾	3.18±0.20 ¹⁾	2.86±0.21 ¹⁾	2.37±0.21 ¹⁾
吡哌美辛组	1.29±0.29 ²⁾	1.26±0.16 ²⁾	1.83±0.24 ²⁾	1.62±0.17 ²⁾	1.27±0.09 ²⁾
低剂量和营通气片组	1.72±0.37 ²⁾³⁾	1.53±0.22 ²⁾³⁾	2.33±0.10 ²⁾³⁾	2.14±0.23 ²⁾³⁾	1.85±0.19 ²⁾³⁾
高剂量和营通气片组	1.31±0.23 ²⁾	1.19±0.30 ²⁾	1.70±0.08 ²⁾	1.51±0.10 ²⁾	1.14±0.11 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与吡哌美辛组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

中医学认为腰椎间盘突出症属于“腰腿痛”“腰痹”等范畴,属本虚标实之证,多因肝肾亏虚、正气不足,外感风寒湿邪,导致气血运行不畅、经络阻滞,形成“痹证”^[7]。其病因复杂多样,有风邪、寒邪、湿邪、湿热、痰浊、体虚、肾虚、闪挫、跌扑劳伤等。《济生方》云:“皆因体虚腠理空疏,受风寒湿气而成痹也。”肝肾亏虚是发病的根本,而寒湿阻滞是其表现形式之一。寒湿邪气阻滞经络,导致气血凝滞,不通则痛,进一步加重了腰椎间盘的退行性改变和突出症状^[8]。《素问·举痛论篇》中云:“寒气客于脉外则脉寒,脉寒则缩踈,缩踈则脉绌急,则外引小络,故卒然而痛,得炅则痛立止。”寒性凝滞,寒邪侵扰在脉外,经脉受寒而蜷缩不展,蜷缩不展后进而痉挛。《张氏医通》曰“诸寒为痛”,提出“不温则痛、不松则痛”的观点。临床中大都以活血化瘀、祛寒除湿、清热利湿、补益肝肾等为主要治疗原则。彭光远等^[9]运用寒痉治疗寒凝证腰椎间盘突出症,取得良好的临床疗效。荆州市中医医院自制药物和营通气片主要由当归、郁金、沉香、丹参、川芎、木香、三七、砂仁等中药组成,在临床及动物研究中有诸多应用。何川等^[10]应用和营通气片可明显改善椎动脉型颈椎病气滞血瘀证患者的临床症状。张朝驹等^[11]研究表明,和营通气片可以显著抑制醋酸引起的扭体反应,缓解二甲苯所致小鼠耳廓肿胀度,改善急性血瘀模型大鼠的全血黏度和血浆黏度。疼痛阈值的降低是腰椎间盘突出症患者常见的临床表现之一,本研究中和营通气片能够显著提高大鼠的疼痛阈值,表明了其在改善疼痛症状方面的有效性,这可能与其抗炎作用密切相关,因为降低炎症水平往往能减轻疼痛感。通过减少 NLRP3/NF- κ B 信号通路的激活,和营通气片不仅减轻了细胞损伤,还可能通过降低神经元的敏感性,促进疼痛缓解。

NLRP3 炎症小体作为细胞内重要的免疫感应器,其激活通常是由细胞内或细胞外的多种刺激引起的。NLRP3 炎症小体的组装和激活通常由多种内源性或外源性刺激诱导,包括寒邪引起的细胞损伤。一旦激活, NLRP3 会招募其他组分(如 ASC 和 Caspase-1),形成活化的炎症小体,并促使 Caspase-1 的激活,随后转化为成熟的炎症因子^[12]。这些促炎因子的释放不仅加剧局部炎症反应,还通过循环系统影响远端组织,进一步恶化病情。NF- κ B 作为一种转录因子,通常以抑制形式存在于细胞质中,通过与 I κ B 蛋白结合而保持非活性状态。刺激因素(如 NLRP3 激活、细胞应激和促炎因子)会导致 I κ B 的降解,释放 NF- κ B 并促使其转位至细胞核中,启动促炎细胞因子的转录。这些细胞因子不仅在局部微环境

中引发炎症反应,还能诱导髓核细胞的凋亡,从而加重椎间盘的损伤^[5]。此外, NLRP3 炎症小体和 NF- κ B 信号通路之间存在复杂的相互调控关系。一方面, NF- κ B 可以上调 NLRP3 的表达,增强其对炎症的响应;另一方面, NLRP3 的激活也能通过促炎因子进一步刺激 NF- κ B 通路。这种双向调节机制使得腰椎间盘突出症中的炎症反应和细胞凋亡形成恶性循环^[13]。

在本研究的实验中,寒邪刺激显著增强了 NLRP3 的表达,导致髓核细胞释放大量促炎因子(如 IL-1 β 、TNF- α),进一步加重局部炎症反应和细胞损伤^[14],和营通气片的应用抑制了这一过程,降低了 NLRP3 及其下游因子的水平,这一结果与已有研究关于 NLRP3 在慢性炎症和组织损伤中的作用相符,支持了和营通气片作为抗炎药物的观点^[15]。此外, NF- κ B 信号通路在炎症反应和细胞存活中发挥着核心作用,笔者发现和营通气片显著降低了 NF- κ B 的活化,这一发现与 NLRP3 的抑制效果相一致。NF- κ B 的激活通常伴随 I κ B 蛋白的降解,释放出活性 NF- κ B 并进入细胞核,从而促进促炎因子的转录^[16]。和营通气片通过阻止这一激活过程,明显减少了促炎因子的产生,减轻了细胞凋亡,这一机制说明了 NLRP3 和 NF- κ B 之间的相互作用,暗示二者在腰椎间盘突出症中的协同作用。在本研究中,和营通气片的应用显著降低了 PLA2 的活性,这与笔者观察到的 NLRP3 和 NF- κ B 信号通路的抑制效果相一致。通过抑制 PLA2 的活性,和营通气片可能减少了脂肪酸的生成,从而降低了促炎因子的释放,进一步减轻了细胞损伤和炎症反应,这为和营通气片的抗炎机制提供了新的见解,提示 PLA2 在腰椎间盘突出症寒凝证中可能起到重要的促进作用。腰椎间盘突出症的发病机制复杂,而寒邪刺激引发的炎症和细胞凋亡被认为是主要病因之一。笔者发现和营通气片能够明显抑制 NLRP3 炎症小体的激活,减轻髓核细胞凋亡,提示其在该疾病治疗中的潜力。

本研究采用寒邪刺激建立腰椎间盘突出症寒凝证大鼠模型,从 NLRP3/NF- κ B 的角度探讨和营通气片对炎症的抑制作用及对髓核细胞凋亡的影响,结果发现和营通气片能够通过调节 NLRP3/NF- κ B 信号通路,缓解腰椎间盘突出症寒凝证大鼠髓核炎症及细胞凋亡,同时显著提高大鼠的疼痛阈值,改善病情,展现出良好的治疗潜力。这一发现不仅为中医药的临床应用提供了支持,也为相关机制的深入研究指明了方向。

研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(8): 4257-4260.

- [22] CHERIAN J J, HARRISON P E, BENJAMIN S A, et al. Do the effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on knee osteoarthritis pain and function last? [J]. J Knee Surg, 2016, 29(6): 497-501.

(上接第 26 页)

参考文献

- [1] HASVIK E, HAUGEN A J, GRØVLE L. Pinprick and light touch are adequate to establish sensory dysfunction in patients with lumbar radicular pain and disc herniation[J]. Clin Orthop Relat Res, 2021, 479(4): 651-663.
- [2] 李满意, 刘红艳, 陈传榜, 等. 腰痹的证治[J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(4): 49-52.
- [3] 张朝驹, 徐昌伟, 涂扬茂, 等. 和营通气片治疗不同证型腰椎间盘突出症 200 例[J]. 中国临床康复, 2003(14): 2119.
- [4] 吴海波, 钟前波, 邓寒冰, 等. 夹脊电针抑制 P2X4/NLRP3 炎性小体通路对神经根型颈椎病大鼠的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(18): 4574-4580.
- [5] 王柯, 叶寒露. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探究结筋点刃针松解法对膝关节炎兔股四头肌生物力学行为和炎症反应的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(17): 4312-4316.
- [6] KANEUCHI Y, SEKIGUCHI M, KAMEDA T, et al. Temporal and spatial changes of μ -opioid receptors in the brain, spinal cord and dorsal root ganglion in a rat lumbar disc herniation model[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2019, 44(2): 85-95.
- [7] 苏友贤, 段嘉豪, 杨少锋. 杨少锋运用补肾活血法从六经辨治腰椎间盘突出症经验[J]. 湖南中医杂志, 2024, 40(1): 66-68.
- [8] 尹晨东, 仇湘中. 补肝健腰方对腰椎间盘突出大鼠血清代

- [23] 吴毅, 俞晓杰, 胡永善, 等. 膝关节骨关节炎患者的本体感觉及其与疼痛和功能障碍间的相关性研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29(5): 334-338.

- [24] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.

(收稿日期: 2024-11-15)

谢组学的影响研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(9): 7-14.

- [9] 彭光远, 何晓辰, 苏敬彬, 等. 王金榜教授平脉辨证治疗寒凝证型腰椎间盘突出症的经验[J]. 天津中医药, 2021, 38(9): 1174-1177.

- [10] 何川, 张朝驹, 徐昌伟, 等. 和营通气片治疗椎动脉型颈椎病气滞血瘀证的疗效观察[J]. 湖北中医杂志, 2015, 37(3): 13-14.

- [11] 张朝驹, 李孝林. 和营通气片治疗腰椎间盘突出症的实验研究[J]. 中医药学刊, 2005, 23(4): 641-642.

- [12] 袁一鸣, 王艳, 裴飞, 等. NLRP3 炎性小体与周围神经损伤关系的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2023, 52(5): 735-741.

- [13] 胡焱, 冯丹, 田佳玉, 等. 黄芩苷通过抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻带状疱疹后遗神经痛大鼠神经炎症[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(24): 6073-6078.

- [14] MANGAN M S J, OLHAVA E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(8): 588-606.

- [15] CHEN J, CHEN Z J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation[J]. Nature, 2018, 564(7734): 71-76.

- [16] WU S, ZHOU Y, LIANG J, et al. Upregulation of NF- κ B by USP24 aggravates ferroptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. Free Radic Biol Med, 2024, 210: 352-366.

(收稿日期: 2024-11-08)