引用:肖赛,宁子柳,冯帅华,杨届,谢芳,文哲,李泽湘,吴官保.补肾活血汤对椎间盘退变模型大鼠Wnt/β-catenin信号通路的影响及机制[J].中医药导报,2025,31(12):20-26.

补肾活血汤对椎间盘退变模型大鼠Wnt/β-catenin信号通路的影响及机制*

肖　赛[1,2],宁子柳[1,2],冯帅华[2],杨　届[2],谢　芳[2],文　哲[2],李泽湘[2],吴官保[2]

(1.湖南中医药大学,湖南　长沙　410208;
2.湖南省中西医结合医院,湖南　长沙　410006)

[摘要]　目的:探讨补肾活血汤通过抑制Wnt/β-catenin信号通路调控椎间盘退变模型大鼠椎间盘退变的分子机制,明确其在抑制炎症反应、减少细胞凋亡中的作用。方法:将54只6周龄SPF级雄性SD大鼠随机分为空白组(n=12)和手术造模组(n=42)。手术造模组通过纤维环穿刺法建立椎间盘退变模型。将40只造模成功大鼠随机分为模型组、中药组、FH535组及中药+FH535组,空白组与模型组每日灌胃生理盐水(10 mL/kg,2次/d);中药组灌胃补肾活血汤(10.44 g/kg,2次/d);FH535组灌胃生理盐水并腹腔注射FH535(25.00 mg/kg,隔日1次,持续20 d);中药+FH535组灌胃补肾活血汤(10.44 g/kg,2次/d)并腹腔注射FH535(25.00 mg/kg,隔日1次,持续20 d)。4周后处死大鼠,摘取大鼠Co4/5、Co5/6、Co6/7节段的椎间盘组织,Masson染色观察椎间盘组织形态结构,TUNEL染色分析大鼠髓核细胞凋亡率,免疫组织化学(IHC)检测椎间盘组织中Ⅱ型胶原蛋白(Col2a1)、性别决定区Y框蛋白9(Sox9)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测椎间盘组织中白细胞介素-6(IL-6)水平,蛋白质印迹法(Western blotting)检测椎间盘组织中β-catenin和Wnt-3α蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组大鼠椎间盘呈现典型退变特征,纤维环结构紊乱,髓核纤维化明显;与模型组比较,中药组、FH535组及中药+FH535组大鼠椎间盘退变均改善。模型组大鼠椎间盘组织中IL-6水平、髓核细胞凋亡率高于空白组(P<0.05);中药组、FH535组及中药+FH535组大鼠椎间盘组织中IL-6水平、髓核细胞凋亡率低于模型组(P<0.05)。模型组大鼠椎间盘组织中Col2a1、Sox9、Bcl-2表达水平低于空白组(P<0.05),Bax表达水平高于空白组(P<0.05);中药组、FH535组及中药+FH535组大鼠椎间盘组织中Col2a1、Sox9、Bcl-2表达水平高于模型组(P<0.05),Bax表达水平低于模型组(P<0.05)。模型组大鼠椎间盘组织中Wnt-3α和β-catenin蛋白相对表达量高于空白组(P<0.05);中药组、FH535组及中药+FH535组大鼠椎间盘组织中Wnt-3α和β-catenin蛋白相对表达量低于模型组(P<0.05)。结论:补肾活血汤可通过调控Wnt/β-catenin信号通路,抑制炎症和细胞凋亡,从而延缓椎间盘退变模型大鼠的椎间盘退变。

[关键词]　椎间盘退变;补肾活血汤;Wnt/β-catenin信号通路;细胞凋亡;炎症;大鼠

[中图分类号]　R285.5　[文献标识码]　A　[文章编号]　1672-951X(2025)12-0020-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.004

Molecular Mechanism of Bushen Huoxue Decoction (补肾活血汤) in Alleviating Intervertebral Disc Degeneration via Regulating the Wnt/β-catenin Signaling Pathway in Rats

XIAO Sai[1,2], NING Ziliu[1,2], FENG Shuaihua[2], YANG Jie[2], XIE Fang[2], WEN Zhe[2], LI Zexiang[2], WU Guanbao[2]

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 2.Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changsha Hunan 410006, China)

[Abstract]　Objective: To investigate the molecular mechanism by which Bushen Huoxue decoction regulates intervertebral disc degeneration through inhibition of the Wnt/β-catenin signaling pathway and clarify its role in

*基金项目:湖南省自然科学基金项目(2022J130025,2023JJ30365);湖南省中医药科研计划项目(A2023016,B2024033);长沙市自然科学基金项目(kq2403134);湖南中医药大学研究生创新课题基金(2023CX42)

通信作者:吴官保,男,教授,研究方向为脊柱脊髓疾病

suppressing inflammatory responses and reducing apoptosis. Methods: Totally 54 6-week-old male Sprague-Dawley (SD) rats of specific pathogen-free (SPF) grade were randomly divided into blank control group (n=12) and surgical modeling group (n=42). The intervertebral disc degeneration model was established in the surgical group via annulus fibrosus puncture. After successful modeling, the 40 successfully modeled rats were randomly divided into model group, traditional Chinese medicine (TCM) group, FH535 group, and TCM+FH535 group. The blank control group and the model group received intragastric administration of normal saline (10 mL/kg, twice daily). The TCM group received intragastric administration of Bushen Huoxue decoction (10.44 g/kg, twice daily). The FH535 group received intragastric administration of normal saline and intraperitoneal injection of FH535 (25.00 mg/kg, every other day for 20 days). The TCM+FH535 group received intragastric administration of Bushen Huoxue decoction (10.44 g/kg, twice daily) and intraperitoneal injection of FH535 (25.00 mg/kg, every other day for 20 days). The rats were euthanized in four weeks, and intervertebral disc tissues from the Co4/5, Co5/6, and Co6/7 segments were harvested. The morphological structure of the intervertebral disc tissues was observed using Masson´s trichrome staining. Apoptosis rates of nucleus pulposus cells were analyzed via TUNEL staining. Immunohistochemistry (IHC) was performed to detect the expression levels of Collagen Type Ⅱ (Col2a1), SRY-related HMG-box 9 (Sox9), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2 Associated X Protein (Bax) in the intervertebral disc tissues. The level of interleukin-6 (IL-6) in the intervertebral disc tissues was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was used to assess the protein expression levels of β-catenin and Wnt-3α in the intervertebral disc tissues. Results: Compared with the blank control group, the model group exhibited typical intervertebral disc degeneration characteristics, including disordered annulus fibrosus structure and obvious nucleus pulposus fibrosis. Compared with the model group, the TCM group, FH535 group, and TCM+FH535 group showed varying degrees of improvement in intervertebral disc degeneration. The model group showed significantly higher levels of IL-6 and apoptosis rate of nucleus pulposus cells in the intervertebral disc tissues than the blank control group (P<0.05). The levels of IL-6 and the apoptosis rate of nucleus pulposus cells in the intervertebral disc tissues of the TCM group, FH535 group, and TCM+FH535 group were lower than those in the model group (P<0.05). The expression levels of Col2a1, Sox9, and Bcl-2 in the intervertebral disc tissues of the model group were lower than those in the blank control group (P<0.05), while the expression level of Bax was higher than that in the blank control group (P<0.05). The expression levels of Col2a1, Sox9, and Bcl-2 in the intervertebral disc tissues of the TCM group, FH535 group, and TCM+FH535 group were higher than those in the model group (P<0.05), while the expression levels of Bax were lower than those in the model group (P<0.05). The relative protein expression levels of Wnt-3α and β-catenin in the intervertebral disc tissues of the model group were higher than those in the blank control group (P<0.05). The relative protein expression levels of Wnt-3α and β-catenin in the intervertebral disc tissues of the TCM group, FH535 group, and TCM + FH535 group were lower than those in the model group (P<0.05).

[Keywords] intervertebral disc degeneration; Bushen Huoxue decoction; Wnt/β-catenin signaling pathway; apoptosis; inflammation; rat

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration,IDD)可引发椎间盘突出、椎管狭窄、椎体滑脱等脊柱疾病,进而导致脊髓或神经受压[1]。IDD是引起下腰痛、颈肩痛等脊柱相关疾病的重要原因之一[2],给患者生活质量和社会经济造成双重负担[3]。

IDD是多因素协同作用所导致的。其中炎症反应和细胞凋亡是IDD的重要机制之一[4]。近年来的研究表明,Wnt/β-catenin信号通路在IDD的发生发展中也起着重要的作用[5-6],因此调控Wnt/β-catenin信号通路可能成为治疗IDD的重要策略。

补肾活血汤源自《伤科大成》,具有补益肝肾、活血化瘀、祛风除湿之功,在临床应用取得了满意的疗效[7]。前期研究发现,补肾活血汤可下调衰老大鼠退变椎间盘模型β-catenin蛋白表达[8],提示其可能通过调控Wnt/β-catenin信号通路发挥作用。无菌性炎症与髓核细胞凋亡之间存在着错综复杂的内在联系,共同推动着IDD的病变进程[9]。为进一步探讨补肾活血汤治疗IDD的分子机制,本研究通过构建大鼠IDD模型,研究补肾活血汤对Wnt/β-catenin信号通路的调控作用,以期阐明其抑制炎症反应及细胞凋亡的多靶点机制。

1 材料与方法

1.1 *实验动物* 54只6周龄健康雄性SPF级SD大鼠(体质量180~200 g),购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证编号:SCXK(湘)2019-0004。经广东省实验动物监测所质量认证,动物质量合格证号:430774110049584。大鼠

饲养于湖南中医药大学动物中心，实验室使用许可证编号：SYXK（湘）2019-0009。大鼠分笼饲养，环境温度（23±2）℃，湿度40%~70%，12 h/12 h光暗循环，自由饮食饮水。实验前适应性喂养1周，全程遵循《关于善待实验动物的指导性意见》及4R原则[10]，经湖南中医药大学伦理委员会批准，批准编号：HNUCM21-2403-26。

1.2　主要仪器　脱色摇床（海门市其林贝尔仪器制造有限公司，型号：TS-92）；电转仪（美国哈佛仪器公司，型号：ECM-830）；生物分析仪（美国安捷伦科技公司，型号：2100）；显微镜荧光（型号：DM2500）、切片机（型号：DM2500）、激光聚焦扫描系统（型号：SP5）、全自动倒置荧光显微镜（型号：DMI6000）均购自德国莱卡显微系统有限公司；脱水机（型号：JJ-12J）、包埋机（型号：JB-P5）、冻台（型号：JB-L5）均购自武汉俊杰电子有限公司；组织摊片机（浙江省金华市科迪仪器设备有限公司，型号：KD-P）；荧光差异蛋白表达分析系统（美国通用电气公司，型号：Ettan DIGE）；低温高速离心机（德国艾本德股份公司，型号：5427R）；酶标仪（芬兰Labsystems公司，型号：352型）；电热恒温干燥箱（上海精宏实验设备有限公司，型号：GNP-9080型）；微型离心机（长沙湘智离心机仪器有限公司，型号：TG16W）；洗板机（型号：AC8）、超低温冰箱（型号：906-ULTS）均购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.3　主要试剂　Masson染色试剂盒（批号：C0189）、抗原修复液（批号：P0083）、苏木素复染液（批号：G1004）均购自上海碧云天生物技术有限公司；PBS（广东环凯生物科技有限公司，批号：XB07）；核固红染色液（广东弘大生物科技有限公司，批号：20231135）；伊红染色剂（长沙艾碧维生物公司，批号：AWI2001）；白细胞介素-6（interleukin，IL-6）酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（艾方生物科技有限公司，批号：AF3066-A）；含蛋白酶抑制剂裂解液（上海沪震实业有限公司，批号：HZ-5028）；BCA试剂盒（上海炎熙生物科技有限公司，批号：PD-BCA-500）；TUNEL检测试剂盒（瑞士罗氏集团，批号：11684817910）；4%多聚甲醛固定液（批号：P0099）、5%正常山羊血清（批号：ZLI-9021）、HRP标记二抗（批号：ZB-2305）、DAB显色试剂盒（批号：ZLI-9018）均购自北京中杉金桥生物技术有限公司；3%过氧化氢溶液（北京索莱宝科技有限公司，批号：H1008）；Ⅱ型胶原蛋白（collagen type Ⅱ，Col2a1）抗体（英国Abcam公司，批号：AB34712）；性别决定区Y框蛋白9（SRY-related HMG-box 9，Sox9）抗体（美国Cell Signaling Technology公司，批号：82630S）；B细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体（美国Santa Cruz Biotechnology公司，批号：sc-7382）；Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，bax）抗体（美国Proteintech公司，批号：50599-2-Ig）；Western blotting试剂盒（批号：RS0024）、ACTIN单克隆抗体（批号：YM3028）、GAPDH单克隆抗体（批号：YM3029）、Dylight 680标记山羊抗小鼠IgG（批号：S23710）、Dylight 800标记山羊抗兔IgG（批号：RS23920）、SDS电泳缓冲液（批号：RS0025）均购自美国Immunoway公司。

1.4　实验药物　补肾活血汤源自《伤科大成》[11]，组成：熟地黄15 g，杜仲10 g，枸杞子10 g，补骨脂15 g，菟丝子10 g，当归10 g，没药10 g，酒山萸肉10 g，肉苁蓉10 g，独活10 g，红花6 g。熟地黄（批号：240902）、补骨脂（批号：241150）、酒山萸肉（批号：240302）、肉苁蓉（批号：240405）、当归（批号：2408021）、红花（批号：240402）均购自湖南南国药都中药饮片有限公司；杜仲（湖南聚仁中药饮片有限公司，批号：24092301）；枸杞子（安徽民顺堂中药科技有限公司，批号：240701）；菟丝子（湖南振兴药业有限公司，批号：24041202）；没药（批号：240821）、独活（批号：241226）均购自湖南华夏湘众医药有限公司。上述中药材饮片均经湖南省中西医结合医院主任药师胥新元鉴定为正品。药液制备：将中药材用清水浸泡20 min，武火、文火各煎煮20 min，滤除药渣后加热浓缩至原有生药材质量浓度为1.044 g/mL，冷却后将其置于4 ℃的冰箱内冷藏备用。注射用青霉素钠（华北制药股份有限公司，批号：20240104）；FH535（美国APExBIO公司，批号：A3413）。

1.5　IDD模型建立与验证　将54只SD大鼠随机分为空白组（n=12）和手术造模组（n=42）。手术造模组采用纤维环穿刺法[12]构建IDD模型：术前1 d禁食禁水，称体质量后以4%~5%异氟烷吸入麻醉，俯卧位固定，腰尾部脱毛备皮。碘伏消毒后，沿标记纵向切开皮肤，分离皮下组织暴露纤维环，21 G针头垂直穿刺Co4/5、Co5/6、Co6/7椎间盘至4 mm深度，匀速旋转针头360°并留置30 s，随后注入40 μL无水乙醇，退针后缝合创口。术后肌内注射青霉素钠（40 U/次，1次/d），连续3 d。每日消毒伤口，大鼠放回标准环境自由活动。空白组不进行手术干预。造模1周后，采用苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色对大鼠IDD模型进行验证。组织学观察结果显示，两组椎间盘结构存在显著差异。空白组大鼠椎间盘纤维环结构较紧密、排列规则，与髓核分界清晰，组织结构完整，表明其处于正常生理状态，基质分布均匀，髓核细胞形态规则，分布较均匀。手术造模组大鼠椎间盘纤维环结构明显松散，局部区域纤维排列紊乱，并出现裂隙，纤维环-髓核边界模糊，基质染色深浅不一，髓核细胞分布紊乱且形态不规则（见图1）。空白组和手术造模组各取2只大鼠，摘取Co4/5、Co5/6、Co6/7节段（每组6个椎间盘），采用Thompson分级系统（0~12分）进行评分[13]。手术造模组大鼠评分高于空白组（P<0.01），提示IDD模型成功建立。

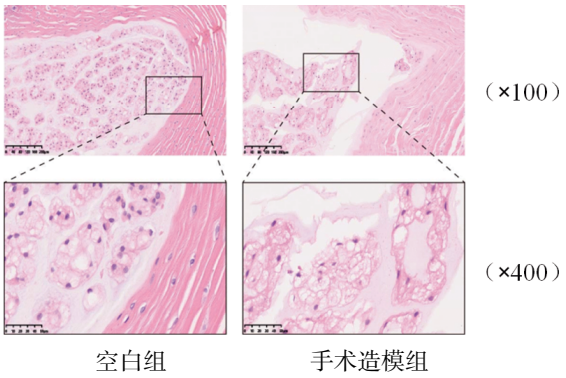


图1　两组大鼠椎间盘HE染色病理图

1.6　分组与给药　将40只造模成功大鼠随机分为模型组、中药组、FH535组及中药+FH535组，每组10只。根据人与动物体表面积折算公式[14-15]，体质量（200±20）g的大鼠等效剂量为

10.44 g/kg，推荐每日灌胃量为10 mL/kg。FH535使用前以无水乙醇温和溶解配制，腹腔注射剂量为25.00 mg/kg。

空白组与模型组大鼠灌胃生理盐水（10 mL/kg），2次/d；中药组灌胃补肾活血汤（10 mL/kg），10.44 g/kg，2次/d；FH535组大鼠灌胃生理盐水（10 mL/kg，2次/d）并腹腔注射FH535（25.00 mg/kg），腹腔注射隔日1次，持续20 d；中药+FH535组大鼠灌胃补肾活血汤（同中药组）并腹腔注射FH535（同FH535组）。给药周期为4周，每日根据大鼠体质量调整给药量，确保剂量精准适配，所有操作均严格统一环境条件，以维持实验一致性。

1.7　标本采集　大鼠给药4周后，禁食24 h，使用过量异氟烷麻醉大鼠以实施安乐死，然后在无菌条件下摘取大鼠Co4/5、Co5/6、Co6/7椎间盘组织。部分椎间盘组织立即放置于-80 ℃冷冻保存，用于Western blotting检测β-catenin和Wnt-3α蛋白表达水平；部分椎间盘组织制备匀浆液，用于检测IL-6水平；剩余的椎间盘组织经4%多聚甲醛固定24 h后，进行石蜡包埋和切片，然后分别用于Masson染色、TUNEL染色及IHC检测。

1.8　观察指标

1.8.1　椎间盘组织形态结构　采用Masson染色观察椎间盘组织形态结构，椎间盘组织样本经固定、脱水、石蜡包埋后切片。切片依次进行核染色（滴加核染液，PBS缓冲液漂洗返蓝）、浆染液染色及分色液处理，复染液覆盖组织后，无水乙醇快速漂洗去除多余染料。切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明化10 min，中性树胶封片。显微镜观察椎间盘组织中各成分的形态和分布。

1.8.2　椎间盘组织IL-6水平　取椎间盘组织样本，切割后称取质量，添加适量的PBS后，迅速利用液氮将样本冷冻。标本融化后，保持2~8 ℃，再加入PBS，充分匀浆之后加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液，使用微型离心机于4 ℃（离心力8 640×*g*）离心15 min，小心收集上清液（组织裂解液）。采用BCA试剂盒测定总蛋白浓度并标准化。按照ELISA试剂盒说明书检测IL-6水平。

1.8.3　髓核细胞凋亡率　采用TUNEL染色分析大鼠髓核细胞凋亡率。4%多聚甲醛固定椎间盘髓核组织24 h，随后依次用不同浓度乙醇（70%、80%、90%、100%）脱水，再用二甲苯透明化，最后将组织包埋于石蜡中，使用切片机将石蜡包埋的组织切成厚度为4~6 μm的切片，在60 ℃烘片1 h。染色前，需将切片置于二甲苯中进行3次脱蜡处理，10 min/次。脱蜡完毕后，依次使用浓度为100%、90%、80%、70%的乙醇进行水化，随后用蒸馏水冲洗。切片浸入3% H_2O_2溶液，室温避光孵育10 min，PBS冲洗3次后用蛋白酶K（20 μg/mL）在37 ℃处理切片15~30 min，切片用PBS冲洗后，按TUNEL试剂盒说明书加反应液，37 ℃避光孵育后PBS洗3次，向样本中添加链霉亲和素-HRP（1:200稀释），在室温环境下孵育30 min，用PBS冲洗样本后加入DAB显色液，并在显微镜下动态监测显色程度，当显色达到预期程度，立即用蒸馏水终止反应。运用苏木素进行细胞核复染，梯度乙醇脱水、二甲苯透明化处理后，采用中性树胶封片。在光学显微镜下，随机选取5个非重叠视野，使用Image J软件，计数TUNEL阳性细胞核与苏木素阳性总细胞核数量，计算各组细胞凋亡率。凋亡率=（TUNEL阳性细胞数/总细胞数）×100%[16]。

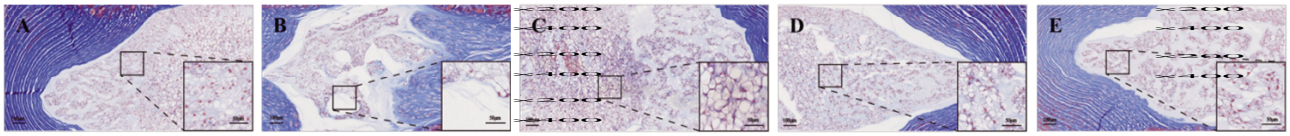
1.8.4　椎间盘组织中Col2a1、Sox9、Bcl-2及Bax表达水平　采用免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）检测椎间盘组织中Col2a1、Sox9、Bcl-2及Bax表达水平。首先用4%多聚甲醛固定椎间盘组织24 h，随后依次脱水、透明化并石蜡包埋，将样本切成厚度为4~6 μm的切片，抗原修复后，使用3%过氧化氢处理切片以消除内源性过氧化物酶活性，然后，采用5%正常山羊血清封闭，按顺序添加特异性一抗（Col2a1、Sox9、Bcl-2、Bax），在4 ℃环境下孵育过夜，经PBS冲洗后加入HRP标记二抗，在室温条件下孵育1 h。DAB显色反应后，利用苏木素复染细胞核，脱水、透明化后中性树胶封片，光学显微镜下观察。Image J软件分析椎间盘组织中Col2a1、Sox9、Bcl-2及Bax的阳性表达面积占比（PAR），以PAR表示Col2a1、Sox9、Bcl-2及Bax的表达水平。PAR=（特异性染色像素数/目标区域总像素数）×100%。

1.8.5　椎间盘组织中β-catenin和Wnt-3α蛋白表达水平　采用Western blotting法检测椎间盘组织中β-catenin和Wnt-3α蛋白表达水平。取15~20 mg椎间盘组织，在液氮环境下充分研磨，随后添加200 μL裂解液充分匀浆，4 ℃，14 000×*g*离心15 min，取上清。按目标蛋白分子量配制SDS-PAGE凝胶，浓缩胶先在80 V电压下电泳30 min，然后梯度（50 V→110 V→120 V）分离胶电泳，直至溴酚蓝迁移至凝胶底部，200 mA恒流转膜90 min将蛋白转移至PVDF膜。5%脱Wnt-3α脂牛奶封闭1h后，之后加入一抗（1:1 000），于4 ℃环境下孵育过夜。次日加入二抗（1:10 000），在37 ℃环境下孵育1 h，TBST洗涤后通过荧光成像系统分析条带灰度值。以目标蛋白与内参灰度值的比值表示β-catenin和Wnt-3α蛋白相对表达量。

1.9　统计学方法　采用SPSS 26.0统计软件分析数据，计量资料以“均数±标准差”（$\bar{x}\pm s$）表示，若数据符合正态分布且方差齐，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法；若数据不符合正态分布或方差不齐，则采用Kruskal-Wallis *H*检验，两两比较采用Dunn′s检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。使用GraphPad Prism、Adobe Illustrator、CaseViewer、K-Viewer和Image J进行数据分析与可视化。

2　结　果

2.1　椎间盘组织病理学评估　Masson染色结果显示，空白组大鼠椎间盘纤维环和髓核结构较为清晰完整，纤维环呈蓝色，排列整齐，髓核呈红色，质地均匀。模型组大鼠椎间盘纤维环结构紊乱，蓝色染色部分出现断裂、稀疏、分布不均匀等情况，髓核红色部分缩小，质地变得不均匀，髓核中的细胞数量减少，出现纤维化区域。与模型组比较，中药组大鼠椎间盘纤维环的蓝色部分较为连续，排列相对整齐，髓核红色部分有所增加，髓核细胞形态较模型组改善；FH535组大鼠椎间盘纤维环的蓝色染色部分有一定程度改善，结构相对较为完整，髓核红色区域呈现增加趋势；中药+FH535组大鼠椎间盘纤维环胶原纤维排列较为有序，纤维环与髓核界限较清晰，髓核细胞分布尚均匀。（见图2）



注：A.空白组；B.模型组；C.中药组；D.FH535组；E.中药+FH535组。

图2　椎间盘组织Masson染色结果

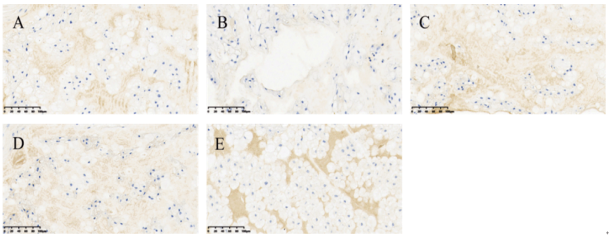
2.2　各组大鼠椎间盘组织IL-6水平比较　模型组大鼠椎间盘组织IL-6水平高于空白组（$P<0.01$）；中药组、FH535组、中药+FH535组大鼠椎间盘组织IL-6水平低于模型组（$P<0.05$或$P<0.01$）；中药+FH535组大鼠椎间盘组织IL-6水平低于中药组及FH535组（$P<0.05$）。（见表1）

表1　各组大鼠椎间盘组织IL-6水平比较　（$\bar{x}\pm s$，pg/mL）

组别	n	IL-6
空白组	10	97.739±8.809
模型组	10	130.082±4.412[a]
中药组	10	119.403±6.206[bd]
FH535组	10	119.987±7.573[bd]
中药+FH535组	10	109.495±8.410[c]
F		28.416
P		0.000

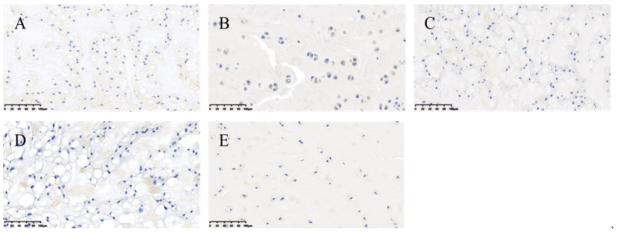
注：与空白组比较，[a]$P<0.01$；与模型组比较，[b]$P<0.05$，[c]$P<0.01$；与中药+FH535组比较，[d]$P<0.05$。

2.3　各组大鼠椎间盘组织Col2a1、Sox9、Bcl-2及Bax表达水平比较　模型组大鼠椎间盘组织Col2a1、Sox9、Bax表达水平低于空白组（$P<0.01$），Bcl-2表达水平高于空白组（$P<0.01$）；中药组、FH535组、中药+FH535组大鼠椎间盘组织Col2a1、Sox9、Bax表达水平高于模型组（$P<0.01$或$P<0.05$），Bcl-2表达水平低于模型组（$P<0.01$）；FH535组大鼠椎间盘组织Bax表达水平高于中药组（$P<0.05$）；中药+FH535组大鼠椎间盘组织Col2a1、Sox9、Bax表达水平高于中药组（$P<0.05$或$P<0.01$），Bcl-2表达水平低于中药组（$P<0.01$）。（见图3~6、表2）



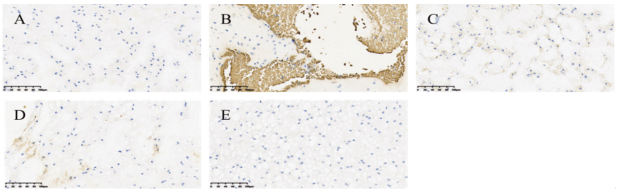
注：A.空白组；B.模型组；C.中药组；D.FH535组；E.中药+FH535组。

图3　大鼠椎间盘组织中Col2a1的免疫组化染色图　（×200）



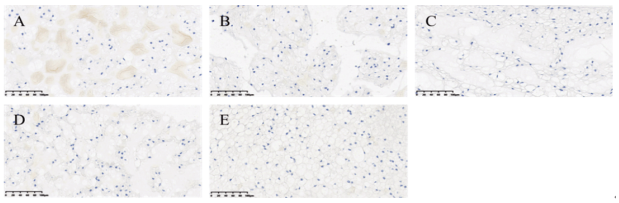
注：A.空白组；B.模型组；C.中药组；D.FH535组；E.中药+FH535组。

图4　大鼠椎间盘组织中Sox9的免疫组化染色图　（×200）



注：A.空白组；B.模型组；C.中药组；D.FH535组；E.中药+FH535组。

图5　各组大鼠椎间盘组织中Bcl-2的免疫组化染色图（×200）



注：A.空白组；B.模型组；C.中药组；D.FH535组；E.中药+FH535组。

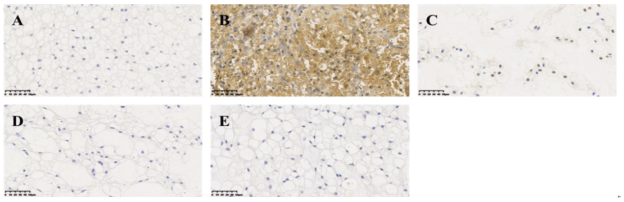
图6　大鼠椎间盘组织中Bax的免疫组化染色图　（×200）

表2　各组大鼠椎间盘组织中Col2a1、Sox9、Bcl-2及Bax表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$，%）

组别	n	Col2a1	Sox9	Bcl-2	Bax
空白组	10	40.419±3.076	27.470±2.777	5.811±1.725	20.892±2.680
模型组	10	12.100±2.379[a]	9.960±2.602[a]	21.153±3.642[a]	4.835±1.115[a]
中药组	10	22.312±6.228[c]	15.289±2.630[c]	14.694±2.987[c]	9.971±1.885[c]
FH535组	10	18.195±3.744[b]	17.488±3.454[b]	15.037±3.163[c]	12.287±2.813[cd]
中药+FH535组	10	26.810±3.765[cd]	21.334±2.591[ce]	10.965±2.040[ce]	15.308±2.615[ce]
F		69.371	53.873	40.658	67.042
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注：与空白组比较，[a]$P<0.01$；与模型组比较，[b]$P<0.05$，[c]$P<0.01$；与中药组比较，[d]$P<0.05$，[e]$P<0.01$。

2.4　各组大鼠髓核细胞凋亡率比较　空白组大鼠椎间盘组织仅见少量凋亡细胞，且分布较均匀，椎间盘组织内细胞凋亡维持在较低水平。模型组大鼠髓核细胞凋亡率高于空白组（$P<0.01$）；中药组、FH535组、中药+FH535组大鼠髓核细胞凋亡率低于模型组（$P<0.01$）；中药+FH535组大鼠髓核细胞凋亡率低于FH535组（$P<0.05$）。（见图7、表3）



注：A.空白组；B.模型组；C.中药组；D.FH535组；E.中药+FH535组。

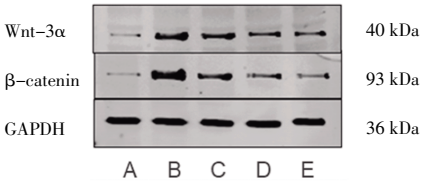
图7　各组大鼠椎间盘组织TUNEL染色　（×400）

表 3　各组大鼠髓核细胞凋亡率比较　($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	髓核细胞凋亡率
空白组	10	11.549±0.781
模型组	10	67.216±2.652[a]
中药组	10	41.345±2.899[b]
FH535组	10	36.109±4.823[b]
中药+FH535组	10	28.703±2.391[c]
F		55.409
P		0.000

注:与空白组比较,[a]$P<0.01$;与模型组比较,[b]$P<0.01$;与FH535组比较,[c]$P<0.05$。

2.5　各组大鼠椎间盘组织Wnt-3α和β-catenin蛋白相对表达量比较　模型组大鼠椎间盘组织Wnt-3α、β-catenin蛋白相对表达量高于空白组($P<0.01$);中药组、FH535组、中药+FH535组大鼠椎间盘组织Wnt-3α、β-catenin蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$或$P<0.01$);中药+FH535组大鼠椎间盘组织 Wnt-3α、β-catenin蛋白相对表达量低于中药组及FH535组($P<0.01$)。(见图8、表4)



注:A.空白组;B.模型组;C.中药组;D.FH535组;E.中药+FH535组。

图 8　各组大鼠椎间盘组织 Wnt-3α、β-catenin 蛋白表达 Western blotting 图

表 4　各组大鼠椎间盘组织 Wnt-3α、β-catenin 蛋白相对表达量比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Wnt-3α	β-catenin
空白组	10	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	10	20.30±4.15[a]	27.26±1.37[a]
中药组	10	14.52±2.62[bd]	18.80±1.80[bd]
FH535组	10	11.08±2.81[cd]	12.11±1.66[cd]
中药+FH535组	10	6.87±2.10[c]	7.13±0.74[c]
F		74.032	104.835
P		0.000	0.000

注:与空白组比较,[a]$P<0.01$;与模型组比较,[b]$P<0.05$,[c]$P<0.01$;与中药+FH535组比较,[d]$P<0.01$。

3　讨　论

IDD及其诱发的一系列疾病呈现高发态势,已成为备受关注的健康难题[17-19]。其病理过程复杂,细胞衰老、细胞凋亡、细胞自噬、细胞代谢失衡、氧化应激及髓核细胞(NPCs)炎症等因素在IDD的发病机理中都具有重要作用[20]。其中,炎症反应加剧及髓核细胞凋亡在IDD的病变中具有关键作用[21-23]。近年来,Wnt/β-catenin信号通路在IDD中的作用逐渐受到关注[24-25]。该通路在正常椎间盘组织中处于相对抑制状态,但在椎间盘退变过程中Wnt/β-catenin信号通路异常激活,导致炎症因子释放增加及细胞凋亡加剧[1]。本研究通过构建大鼠IDD模型,系统探讨了补肾活血汤通过调控Wnt/β-catenin信号通路改善IDD的分子机制,揭示了其在抑制炎症、减少细胞凋亡中的多靶点作用。

IDD在中医学中属于"腰痛"和"痹证"范畴,其病因病机主要与肾虚、血瘀、风寒湿邪侵袭等因素密切相关。肾主骨生髓。肾虚则骨髓失养,导致IDD。血瘀则气血运行不畅,进一步加剧椎间盘的营养供应不足。补肾活血汤中熟地黄、杜仲为君药,补肾填精,强筋壮骨;酒山萸肉、枸杞子、肉苁蓉、补骨脂、菟丝子共为臣药,滋补肝肾,助阳益精,以强化君药补肾之效;当归、没药、红花共为佐药,活血通经,散瘀止痛,助君药畅通气血;独活为使药,祛风除湿,通痹止痛,尤能引诸药之力下行,祛除下焦风湿以缓解经络痹阻。本方以补益肝肾为主,佐以活血化瘀,祛风除湿的药物,契合中医"肾主骨""瘀血不去,新血不生"的理论[7,26]。

本研究采用纤维环穿刺法建立大鼠IDD模型,并用HE染色验证了造模成功。Masson染色结果显示,补肾活血汤与FH535可有效缓解椎间盘退变进程。模型组大鼠椎间盘组织IL-6水平高于空白组,中药组、FH535组及中药+FH535 组大鼠椎间盘组织IL-6水平低于模型组, 表明补肾活血汤和FH535具有抗炎作用。FH535为小分子Wnt/β-catenin信号通路抑制剂[27]。根据FH535组和中药组的结果推测,补肾活血汤可能通过抑制Wnt/β-catenin信号通路来减少炎症因子的释放,从而发挥抗炎作用。

模型组大鼠椎间盘组织Col2a1、Sox9、Bax表达水平低于空白组,而Bcl-2表达水平高于空白组;中药组、FH535组、中药+FH535组大鼠椎间盘组织Col2a1、Sox9、Bax表达水平高于模型组,而Bcl-2表达水平低于模型组。模型组大鼠髓核细胞凋亡率高于空白组,中药组、FH535组、中药+FH535组大鼠髓核细胞凋亡率低于模型组,表明补肾活血汤和FH535可通过调控凋亡相关蛋白(如Bcl-2和Bax)的表达,抑制髓核细胞凋亡。这一发现提示,Wnt/β-catenin信号通路在炎症因子诱导髓核细胞凋亡过程中发挥了关键介导作用。中药+FH535组大鼠髓核细胞凋亡率低于FH535组,表明补肾活血汤可能通过调控Bcl-2/Bax平衡等多重机制,与FH535协同抑制细胞凋亡。这一协同作用为中西医结合治疗IDD提供了实验依据,也提示未来可通过多途径干预更全面地控制椎间盘退变进程。

Wnt-3α和β-catenin蛋白表达水平可评估Wnt/β-catenin信号通路的激活状态。模型组大鼠椎间盘组织Wnt-3α、β-catenin蛋白相对表达量高于空白组,中药组、FH535组及中药+FH535组大鼠椎间盘组织Wnt-3α、β-catenin蛋白相对表达量低于模型组,表明补肾活血汤和FH535能抑制Wnt/β-catenin信号通路的异常激活。这一结果进一步明确了补肾活血汤对髓核细胞凋亡的调控作用,以及与Wnt/β-catenin信号通路的相互作用关系。补肾活血汤可通过抑制Wnt/β-catenin信号通路,抑制因炎症刺激过度引发的髓核细胞凋亡,从而延缓IDD的病理进程。中药+FH535组大鼠椎间盘组织Wnt-3α、β-catenin蛋白相对表达量低于FH535组,提示补肾活血汤的作用机制主要依赖于抑制Wnt/β-catenin信号通路。

综上所述,补肾活血汤能抑制IDD模型大鼠Wnt/β-catenin信号通路激活,降低IL-6表达水平,减轻椎间盘组织的炎症

反应。此外补肾活血汤还能通过调控凋亡相关蛋白(如Bcl-2和Bax)的表达,抑制髓核细胞的凋亡。这些作用共同促进了椎间盘组织结构的改善,从而延缓了IDD的病理进程。中药+FH535组的设置不仅验证了补肾活血汤的作用机制是否依赖于Wnt/β-catenin信号通路,还揭示了其与FH535的协同效应,为中西医结合治疗椎间盘退变提供了实验依据。未来研究需进一步探索中药对其他信号通路的作用及联合疗法的优化潜力。

参考文献

[1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories,1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet,2018,392(10159):1789-1858.

[2] KNEZEVIC N N, CANDIDO K D, VLAEYEN J W S, et al. Low back pain[J]. Lancet,2021,398(10294):78-92.

[3] MAHER C, UNDERWOOD M, BUCHBINDER R. Non-specific low back pain[J]. Lancet,2017,389(10070):736-747.

[4] XIN J G, WANG Y J, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Orthop Surg,2022,14(7):1271-1280.

[5] UKITA K, HIRAHARA S, OSHIMA N, et al. Wnt signaling maintains the notochord fate for progenitor cells and supports the posterior extension of the notochord[J]. Mech Dev,2009,126(10):791-803.

[6] KONDO N, YUASA T, SHIMONO K, et al. Intervertebral disc development is regulated by Wnt/β-catenin signaling[J]. Spine (Phila Pa 1976),2011,36(8):E513-E518.

[7] 戴亚南,陈斌.从《伤科大成》分析清代医家赵濂治疗骨伤科疾病的组方规律及思想[J].中医药临床杂志,2024,36(8):1513-1518.

[8] 谢芳,吴官保,姚红艳,等.补肾活血汤干预衰老大鼠退变椎间盘模型中经典WNT信号通路β-catenin蛋白含量的研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):275-279.

[9] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death[J]. Cell Mol Immunol,2021,18(5):1106-1121.

[10] 史晓萍,宗阿南,陶钧,等.《关于善待实验动物的指导性意见》的研究[J].中国医科大学学报,2007,36(4):493.

[11] 赵濂.伤科大成[M]:上海:上海古籍出版社,1996.

[12] GE J, YAN Q, WANG Y J, et al. IL-10 delays the degeneration of intervertebral discs by suppressing the p38 MAPK signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2020,147:262-270.

[13] HAN B, ZHU K, LI F C, et al. A simple disc degeneration model induced by percutaneous needle puncture in the rat tail[J]. Spine (Phila Pa 1976),2008,33(18):1925-1934.

[14] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010.

[15] 赵伟,孙国志.不同种实验动物间用药量换算[J].畜牧兽医科技信息,2010(5):52-53.

[16] 黄永铨.补肾活血汤基于miR-488/Runx2调节骨代谢改善骨质疏松的临床观察及实验研究[D].广州:广州中医药大学,2023.

[17] BATEMAN R M, SHARPE M D, JAGGER J E, et al. 36th international symposium on intensive care and emergency medicine: Brussels, Belgium. 15-18 March 2016[J]. Crit Care,2016,20(Suppl 2):94.

[18] OICHI T, TANIGUCHI Y, OSHIMA Y, et al. Pathomechanism of intervertebral disc degeneration[J]. JOR Spine,2020,3(1):e1076.

[19] HOY D, BAIN C, WILLIAMS G, et al. A systematic review of the global prevalence of low back pain[J]. Arthritis Rheum,2012,64(6):2028-2037.

[20] XIA Q Q, ZHAO Y, DONG H Z, et al. Progress in the study of molecular mechanisms of intervertebral disc degeneration[J]. Biomed Pharmacother,2024,174:116593.

[21] SHNAYDER N A, ASHHOTOV A V, TREFILOVA V V, et al. High-tech methods of cytokine imbalance correction in intervertebral disc degeneration[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(17):13333.

[22] RISBUD M V, SHAPIRO I M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: Pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol,2014,10(1):44-56.

[23] ZHANG X B, HU Y C, CHENG P, et al. Targeted therapy for intervertebral disc degeneration: Inhibiting apoptosis is a promising treatment strategy[J]. Int J Med Sci,2021,18(13):2799-2813.

[24] 范东东,原向伟.Wnt信号通路在椎间盘退变中的作用机制研究进展[J].医药前沿,2023,13(6):67-70.

[25] 李娜,张鹏,张楠,等.杨梅素调节Wnt/β-catenin信号通路对腰椎间盘突出症大鼠椎间盘退变的影响[J].河北医学,2024,30(10):1634-1639.

[26] YANG X X, SUN Y J, LI X, et al. Rac1 regulates nucleus pulposus cell degeneration by activating the Wnt/β-catenin signaling pathway and promotes the progression of intervertebral disc degeneration[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2022,322(3):C496-C507.

[27] 陈腾飞,刘清泉.浅述中医"正气"理论[J].环球中医药,2016,9(11):1332-1335.

[28] 潘平.近代著名中医骨伤科医家及其著作荐介[J].中医正骨,1995,7(3):14.

[29] LIU L, ZHI Q M, SHEN M, et al. FH535, a β-catenin pathway inhibitor, represses pancreatic cancer xenograft growth and angiogenesis[J]. Oncotarget,2016,7(30):47145-47162.

(收稿日期:2025-05-27 编辑:蒋凯彪)