

· 基础研究 ·

# 补肾活血方对腰椎间盘退变小鼠腰椎终板软骨的影响及其作用机制

张若谷, 葛钦文, 邹凯奥, 厉驹, 金红婷, 童培建, 王萍儿

(浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053)

**摘要** **目的:**探讨补肾活血方对腰椎间盘退变小鼠腰椎终板软骨的影响及其作用机制。**方法:**将 18 只 10 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠随机分为空白对照组、模型组、补肾活血方组, 每组 6 只。模型组和补肾活血方组采用腰椎失稳术构建腰椎间盘退变模型。造模后第 2 天, 补肾活血方组小鼠用补肾活血方中药提取液灌胃, 空白对照组和模型组小鼠用生理盐水灌胃, 各组小鼠均每天灌胃 1 次, 连续灌胃 8 周。灌胃结束后, 脱颈处死各组小鼠, 切取小鼠 L<sub>4</sub> 和 L<sub>5</sub> 椎体, 进行 Micro-CT 分析, 并计算腰椎间盘相对高度。常规进行小鼠腰椎终板软骨组织病理学观察, 计算小鼠的腰椎终板软骨组织形态学评分, 测定小鼠腰椎终板软骨组织中 II 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链 (collagen type II  $\alpha 1$  chain, Col2 $\alpha 1$ )、基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 和 pSmad2 的表达情况。**结果:**①小鼠腰椎 Micro-CT 分析结果。空白对照组和补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨骨化区域的骨体积分数均低于模型组 ( $P=0.000, P=0.022$ ), 骨小梁数量均少于模型组 ( $P=0.002, P=0.001$ ), 腰椎间盘相对高度均高于模型组 ( $P=0.000, P=0.000$ )。补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨骨化区域的骨体积分数高于空白对照组 ( $P=0.003$ ), 骨小梁数量、腰椎间盘相对高度与空白对照组的差异均无统计学意义 ( $P=0.882, P=0.794$ )。②小鼠腰椎终板软骨组织病理学观察结果。空白对照组小鼠的腰椎终板软骨细胞异质性较小, 软骨厚度正常, 骨化面积较小。与空白对照组相比, 模型组小鼠的腰椎终板软骨细胞异质性显著增大, 软骨明显变薄, 骨化面积增大。与模型组相比, 补肾活血方组小鼠的腰椎终板软骨细胞异质性较小, 软骨厚度有所增加, 骨化面积有所减小, 但均未达到空白对照组的水平。空白对照组和补肾活血方组小鼠的腰椎终板软骨组织形态学评分均低于模型组 ( $P=0.000, P=0.000$ ), 空白对照组与补肾活血方组小鼠的腰椎终板软骨组织形态学评分差异无统计学意义 ( $P=0.591$ )。③小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 和 Col2 $\alpha 1$  表达水平测定结果。空白对照组和补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 阳性细胞数占比均低于模型组 ( $P=0.002, P=0.010$ ), Col2 $\alpha 1$  阳性表达面积占比均高于模型组 ( $P=0.000, P=0.026$ )。空白对照组与补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 阳性细胞数占比的差异无统计学意义 ( $P=0.226$ )。空白对照组小鼠腰椎终板软骨组织中 Col2 $\alpha 1$  阳性表达面积占比高于补肾活血方组 ( $P=0.000$ )。④小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 表达水平测定结果。空白对照组小鼠腰椎终板软骨组织中可见大量 pSmad2 阳性细胞。空白对照组和补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 阳性细胞数占比均高于模型组 ( $P=0.014, P=0.040$ )。空白对照组与补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 阳性细胞数占比的差异无统计学意义 ( $P=0.444$ )。**结论:**补肾活血方可延缓小鼠腰椎间盘退变的病理进程, 其作用机制可能与补肾活血方能够通过促进腰椎终板软骨细胞中 Smad2 的磷酸化, 下调 MMP-13 的表达并上调 Col2 $\alpha 1$  的表达有关。

**关键词** 椎间盘退化; 腰椎; 补肾活血方; 终板软骨; 小鼠; 动物实验

## Effects and mechanism of Bushen Huoxue Fang (补肾活血方) on lumbar endplate cartilage in mice with intervertebral disc degeneration: an experimental study

ZHANG Ruogu, GE Qinwen, ZOU Kaiao, LI Ju, JIN Hongting, TONG Peijian, WANG Pinger

The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

**ABSTRACT** **Objective:** To observe the effects of Bushen Huoxue Fang (补肾活血方, BSHXF) on lumbar endplate cartilage in mice with intervertebral disc degeneration (IVDD), and to explore its underlying mechanism. **Methods:** Eighteen 10-week-old SPF-grade male C57BL/6J mice were randomized into blank control group, model group, and BSHXF group, 6 cases in each group. All mice but the ones in blank control group were modeled by lumbar spine instability (LSI) surgery for inducing IVDD. The next day after successful modeling, the mice in BSHXF group were intervened by intragastric administration with BSHXF extract, while the ones in blank control group and model group with the same dose of normal saline, once a day for consecutive 8 weeks. After the end of the last intervention, all mice were sacrificed by

基金项目: 浙江省自然科学基金探索项目 (LY23H270005)

通讯作者: 王萍儿 E-mail: apple63209321@126.com

cervical dislocation, and their L<sub>4</sub> and L<sub>5</sub> vertebrae were harvested for Micro-CT examination, and the relative height of the L<sub>4-5</sub> intervertebral disc was calculated. Furthermore, the pathological changes of the lumbar endplate cartilage tissues were observed, and the morphological score of lumbar endplate cartilage tissues was calculated, meanwhile, the expression levels of collagen type II alpha 1 chain (Col2α1), matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), and pSmad2 in the lumbar endplate cartilage tissues were detected. **Results:** ①The Micro-CT analysis results of the lumbar vertebrae. The blank control group and BSHXF group presented lower bone volume fraction (BVF) and fewer trabecular number (Tb. N) in the ossification area of lumbar endplate cartilage, and higher relative height of intervertebral disc compared to model group ( $P=0.000, P=0.022; P=0.002, P=0.001; P=0.000, P=0.000$ ). Moreover, the BSHXF group exhibited higher BVF compared to blank control group ( $P=0.003$ ), while, there was no significant differences between the 2 groups in the Tb. N and relative height of intervertebral disc ( $P=0.882, P=0.794$ ). ②The pathological observation of the lumbar endplate cartilage tissues. In blank control group, the lumbar endplate chondrocytes presented as low heterogeneity, normal cartilage thickness, and a small ossified area. Compared with that of blank control group, the changes in the lumbar endplate chondrocytes, manifesting as significantly increased heterogeneity, thinned cartilage layer, and an enlarged ossified area, were observed in mice of model group; while, compared with that of model group, the changes in the lumbar endplate chondrocytes, manifesting as reduced heterogeneity, increased cartilage thickness, and a decreased ossified area, were observed in mice of BSHXF group, but all these did not reach the levels of blank control group. Besides, the morphological score of lumbar endplate cartilage tissues was lower in blank control group and BSHXF group compared to model group ( $P=0.000, P=0.000$ ), with no significant difference between blank control group and BSHXF group ( $P=0.591$ ). ③The expression levels of MMP-13 and Col2α1 in the lumbar endplate cartilage tissues. The proportion of MMP-13-positive cells was lower, while the ratio of Col2α1-positive expression area was higher in blank control group and BSHXF group compared to model group ( $P=0.002, P=0.010; P=0.000, P=0.026$ ). Furthermore, the ratio of Col2α1-positive expression area was higher in blank control group compared to BSHXF group ( $P=0.000$ ), while there was no significant difference in the proportion of MMP-13-positive cells between the 2 groups ( $P=0.226$ ). ④The expression level of pSmad2 in the lumbar endplate cartilage tissues. A high percentage of pSmad2-positive cells were observed in the lumbar endplate cartilage tissues of blank control group. The proportion of pSmad2-positive cells in the lumbar endplate cartilage tissues was higher in blank control group and BSHXF group compared to model group ( $P=0.014, P=0.040$ ), with no significant difference between blank control group and BSHXF group ( $P=0.444$ ). **Conclusion:** BSHXF can delay the pathological progression of lumbar IVDD in mice. It may work by down-regulating the expression of MMP-13, and up-regulating the expression of Col2α1 through promoting the phosphorylation of Smad2 in lumbar endplate chondrocytes.

**Keywords** intervertebral disc degeneration; lumbar vertebrae; Bushen Huoxue Fang; endplate cartilage; mice; animal experimentation

腰椎间盘突出是导致腰痛的常见因素之一,其具体发病机制尚不完全明确,但主要与遗传、衰老及营养不良等因素有关<sup>[1-2]</sup>。终板软骨在维持椎间盘内环境平衡中起着至关重要的作用,它能够为椎间盘运输营养物质,并促进载荷均匀分布<sup>[3-5]</sup>。在腰椎间盘突出过程中,腰椎终板软骨细胞常表现为细胞外基质的合成代谢与分解代谢失衡,可导致腰椎终板软骨组织结构破坏,进而加速腰椎间盘退变进程。因此,维持腰椎终板软骨细胞基质的稳态对退变腰椎间盘的修复具有重要意义<sup>[6]</sup>。目前,针对腰椎间盘突出变的治疗方案仍相对匮乏<sup>[7]</sup>。补肾活血方由补阳方剂右归饮化裁而成<sup>[8]</sup>。前期研究<sup>[9-10]</sup>表明,补肾活血方可以通过促进软骨细胞外基质的合成和抑制其降解,发挥对退变软骨组织的保护作用。然而,补肾活血方对腰椎终板软骨组织的具体调控作用,目前尚不清楚。

为了深入探讨补肾活血方对腰椎间盘突出小鼠腰椎终板软骨的影响及其作用机制,我们开展了此项研究,现报告如下。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

10 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只,体质量 ( $25 \pm 5$ ) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。动物的饲养和实验均在浙江中医药大学动物实验研究中心进行,动物使用许可证号:SYXK(浙)2021-0012。实验方案由浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查通过,伦理批件号:IACUC-202310-05。

### 1.2 实验主要试剂

4% 多聚甲醛(货号:E672002,上海生工生物工程股份有限公司),乙二胺四乙酸二钠(货号:A100105,

上海生工生物工程股份有限公司), 阿尔辛蓝(货号: A5268, 美国 Sigma 公司), 苏木素(货号: H3136, 美国 Sigma 公司), 橙黄 G(货号: O7252, 美国 Sigma 公司), II 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链(collagen II type  $\alpha 1$  chain, Col2 $\alpha 1$ ) 一抗(货号: ab34712, 英国 Abcam 公司), 兔抗鼠基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 单克隆抗体(货号: ab39012, 英国 Abcam 公司), 胰蛋白酶(货号: ZLI-9010, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 中性树脂(货号: ZLI-9555, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.3 实验主要仪器

Histocentre3 石蜡包埋机、HM-340E 石蜡切片机(美国赛默飞世尔公司), VIP 5Jr 组织脱水机(日本樱花公司), SkyScan1176 Micro-CT(比利时 Bruker 公司), Zeiss Axio ScopeA1 荧光正置显微镜及拍摄系统(德国蔡司公司), XS-205DU 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

## 2 方法

### 2.1 补肾活血方浓缩液制备

补肾活血方药物组成: 熟地黄 9 g、杜仲 6 g、炮附片 6 g、枸杞子 6 g、肉桂 3 g、山萸肉 3 g、桃仁 6 g、红花 3 g、山药 6 g、炙甘草 3 g。先将熟地黄、杜仲、炮附片、枸杞子、山萸肉、红花、山药、炙甘草加 12 倍量的水回流提取 3 次; 再将肉桂和桃仁加 10 倍量的 60% 乙醇回流提取 3 次; 最后将获得的醇提物和水提物混合均匀, 通过减压浓缩技术制成每毫升含 3.5 g 生药的浓缩液。

### 2.2 动物分组、造模与干预

**2.2.1 分组方法** 将 18 只小鼠称重后, 按照体质量由小到大进行排序, 并以此为基准均分为 6 个区间, 每个区间包含 3 只小鼠。从每个区间中随机抽取 1 只小鼠, 分别分配入空白对照组、模型组和补肾活血方组, 每组最终包含 6 只小鼠。

**2.2.2 造模方法** 模型组和补肾活血方组采用腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠, 剂量为  $0.03 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。待小鼠麻醉后, 将其以俯卧位固定于手术台上, 剔除腰背部(上至胸椎、下至尾部)毛发, 并用 75% 酒精消毒。用手定位小鼠腰椎棘突和骶骨, 以  $L_5$  或  $L_6$  棘突为切入点, 沿后正中中线用圆刀片向上切开皮肤, 必要时稍向下延长切口, 使切口总长度为

2.0 ~ 2.5 cm, 以充分暴露皮下组织。于  $L_3 \sim L_5$  棘突两侧旁开 1.0 mm 处, 分别切 2 个长度为 1.5 ~ 2.0 cm 的纵向切口, 切开皮下组织。分离  $L_3 \sim L_5$  椎体附近的后椎旁组织, 切除  $L_3 \sim L_5$  椎体的脊上韧带和棘间韧带, 暴露腰椎。将小鼠腰椎前屈, 用眼科弯头剪剪除  $L_3 \sim L_5$  部分棘突。局部用生理盐水冲洗后, 逐层缝合皮下组织及皮肤, 并用 75% 酒精消毒。

**2.2.3 干预方法** 造模完成后第 2 天, 补肾活血方组小鼠给予补肾活血方浓缩液灌胃, 灌胃剂量为 0.5 mL(含中药生药  $3.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); 空白对照组和模型组小鼠给予等量生理盐水灌胃。各组小鼠均每日灌胃 1 次, 连续 8 周。参考“人和动物间体表面积折算的等效剂量比值”<sup>[11]</sup> 计算小鼠补肾活血方的灌胃给药量。补肾活血方的人口服剂量为  $51 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ , 通过体表面积折算得出小鼠的等效剂量为  $1.75 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

### 2.3 实验指标观察

干预 8 周后, 采用脱颈法处死小鼠。将小鼠摆放为俯卧位, 腰背部用 75% 酒精消毒。先用圆头刀片切开皮肤, 再用眼科直头剪分离  $T_{13} \sim S_1$  椎体两侧的肌肉组织, 然后用线剪分离  $T_{13}$  上端与  $S_1$  下端, 最后取出  $T_{13}$  至  $S_1$  椎体, 并用眼科直头剪剥离椎体周围残留的肌肉组织。将脊柱样本置于 4% 多聚甲醛中固定 3 d, 将固定完成的小鼠脊柱样本进行 Micro-CT 扫描分析。完成扫描分析后, 将脊柱样本用 14% 乙二胺四乙酸二钠脱钙 14 d, 每天更换脱钙液。脱钙结束后, 将脊柱样本用流水冲洗 4 h 后脱水, 保留  $L_3 \sim L_5$  节段, 去除其余节段, 常规进行石蜡包埋和切片, 切片厚度为  $3.5 \mu\text{m}$ 。组织切片用阳离子载玻片捞起后晾干, 以备后续实验使用。

**2.3.1 小鼠腰椎终板软骨组织结构观察及腰椎间盘相对高度计算** 将固定完成的小鼠脊柱样本用保鲜膜包裹后, 沿矢状位方向置于 Micro-CT 载物台上, 以  $L_4$  和  $L_5$  椎体为中心对样本进行二维扫描。采用 CTvox3.0 软件进行三维重建, 并用 CTAn1.10 软件分析腰椎终板软骨的骨体积分数、骨小梁数量及  $L_{4-5}$  椎间盘的相对高度。椎间盘相对高度的计算方法参考文献[12]。如图 1 所示, 绿线表示相邻椎体之间的距离( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ), 蓝线表示相邻椎体高度( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$  和  $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ ), 椎间盘相对高度 =  $2(\beta_1 + \beta_2 + \beta_3) / (\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 + \gamma_1 + \gamma_2 + \gamma_3)$ 。

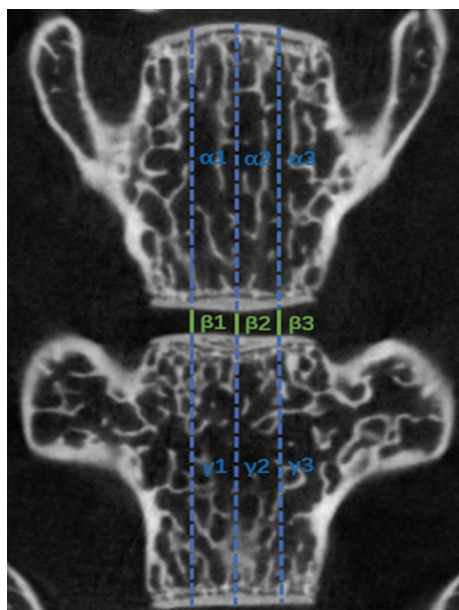


图 1 小鼠  $L_{4-5}$  椎间盘相对高度计算方法示意图

**2.3.2 小鼠腰椎终板软骨组织病理学观察** 随机选取部分小鼠腰椎组织切片,放入  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥。对烘干后的组织切片进行脱蜡和复水处理,然后将其浸入  $1\%$  盐酸乙醇中  $30\text{ s}$ 。取出切片,用干净卫生纸吸去多余水分,将切片浸入阿尔辛蓝-苏木素染液中染色  $1\text{ h}$ 。用纯水浸洗切片  $3$  次,每次  $3\text{ min}$ 。取出切片,将其浸入  $1\%$  盐酸乙醇中  $3\text{ s}$ ,然后用纯水浸洗  $3$  次,每次  $3\text{ min}$ 。将切片浸入  $0.5\%$  氨水中  $15\text{ s}$ ,然后用纯水浸洗  $2$  次,每次  $3\text{ min}$ 。将切片浸入  $95\%$  乙醇中  $1\text{ min}$ ,然后用橙黄 G 染色  $90\text{ s}$ ,最后用  $95\%$  乙醇浸洗切片  $3$  次,每次  $1\text{ min}$ 。将切片置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘干,并用中性树脂封片。使用显微镜观察腰椎终板软骨组织的病理学改变情况,并依据文献[13]中的组织形态学评分标准评估腰椎终板软骨退变情况。

**2.3.3 小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 和 Col2 $\alpha$ 1 表达水平测定** 随机选取各组小鼠腰椎组织切片,依次进行烤片、脱蜡及复水处理,然后滴加胰蛋白酶液,并置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱中  $20\text{ min}$ ,以完成抗原修复。用 PBS 浸洗切片  $3$  次,每次  $3\text{ min}$ 。将切片平铺于湿盒中,加入过氧化氢阻断剂,在室温下孵育  $15\text{ min}$ 。用 PBS 浸洗切片后,分别滴加 MMP-13 一抗和 Col2 $\alpha$ 1 一抗稀释液(稀释比例均为  $1:200$ ),在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜。次日取出切片,复温  $20\text{ min}$ ,用 PBS 浸洗后滴加免疫球蛋白 G 二抗,在室温下孵育  $20\text{ min}$ 。用 PBS 浸洗切片,滴加二氨基联苯胺显色液显色  $5\text{ min}$ 。用苏木素复染,然后依次进行  $1\%$  盐酸乙醇分化、 $0.5\%$  氨水返蓝和二甲苯透明化处理。中性树脂封片后,使

用显微镜观察并采集图像。采用 ImageJ 软件分析图像,计算 MMP-13 阳性细胞数占总细胞数的百分比和 Col2 $\alpha$ 1 在腰椎终板软骨中的阳性表达面积占比。

**2.3.4 小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 表达水平测定** 随机选取各组小鼠腰椎组织切片,依次进行烤片、脱蜡及复水处理。将切片浸泡于柠檬酸钠溶液中,并在  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下加热  $5\text{ min}$ ,以修复抗原。自然冷却至室温后,用 PBS 浸洗切片  $3$  次,每次  $3\text{ min}$ 。将切片平铺于湿盒中,加入过氧化氢阻断剂,在室温下孵育  $15\text{ min}$ 。用 PBS 浸洗切片,滴加 pSmad2 一抗稀释液(稀释比例为  $1:200$ ),在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜。次日取出切片,复温  $20\text{ min}$ ,用 PBS 浸洗后,在避光条件下滴加山羊抗小鼠荧光二抗,在室温下孵育  $20\text{ min}$ 。此后,全程避光操作。用 PBS 浸洗切片  $3$  次,滴加  $4',6$ -二脒基-2-苯基吲哚 ( $4',6$ -diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液,于室温下染色  $5\text{ min}$ 。用 PBS 浸洗切片  $3$  次,加入抗荧光淬灭封片剂封片,使用显微镜观察并采集图像。采用 ImageJ 软件分析图像,计算 pSmad2 阳性细胞数占总细胞数的百分比。

## 2.4 数据统计

采用 SPSS26.0 软件对收集到的数据进行统计分析。空白对照组、模型组、补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨骨化区域的骨体积分数、骨小梁数量,腰椎终板软骨组织形态学评分,腰椎终板软骨组织中 MMP-13 阳性细胞数占比、Col2 $\alpha$ 1 阳性表达面积比、pSmad2 阳性细胞数占比,以及腰椎间盘相对高度的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD- $t$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 小鼠腰椎 Micro-CT 分析结果

实验过程中,所有小鼠活动状态正常,未出现感染或死亡情况。Micro-CT 分析结果显示,空白对照组、模型组和补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨骨化区域的骨体积分数、骨小梁数量、腰椎间盘相对高度的组间总体比较,差异均有统计学意义。空白对照组和补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨骨化区域的骨体积分数均低于模型组 ( $P = 0.000, P = 0.022$ ),骨小梁数量均少于模型组 ( $P = 0.002, P = 0.001$ ),腰椎间盘相对高度均高于模型组 ( $P = 0.000, P = 0.000$ )。空白对照组小鼠腰椎终板软骨骨化区域的骨体积分数低于补肾活血方组 ( $P = 0.003$ ),骨小梁数量、腰椎间盘



相对高度与补肾活血方组的差异均无统计学意义 ( $P=0.882, P=0.794$ )。见图 2、表 1。

3.2 小鼠腰椎终板软骨组织病理学观察结果

阿尔辛蓝-苏木素/HE-橙黄 G 染色结果(图 3)显示:空白对照组小鼠的腰椎终板软骨组织细胞异质性较小,软骨厚度正常,骨化面积较小。与空白对照组相比,模型组小鼠的腰椎终板软骨组织细胞异质性显著增大,软骨明显变薄,骨化面积增大。与模型组相比,补肾活血方组小鼠的腰椎终板软骨组织细胞异质性较小,软骨厚度有所增加,骨化面积有所减小,但均未达到空白对照组的水平。各组小鼠腰椎终板软骨组织形态学评分的总体比较,差异有统计学意义。空白对照组和补肾活血方组小鼠的腰椎终板软骨组织形态学评分均低于模型组 ( $P=0.000, P=0.000$ ),空白对照组与补肾活血方组小鼠的腰椎终板软骨组织形态学评分差异无统计学意义 ( $P=0.591$ ),见表 2。

3.3 小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 和 Col2α1 表达水平测定结果

各组小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 阳性细胞数占比和 Col2α1 阳性表达面积比的总体比较,差异均有统计学意义。空白对照组和补肾活血方组小

鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 阳性细胞数占比均低于模型组 ( $P=0.002, P=0.010$ ), Col2α1 阳性表达面积比均高于模型组 ( $P=0.000, P=0.026$ )。空白对照组与补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 阳性细胞数占比的差异无统计学意义 ( $P=0.226$ )。空白对照组小鼠腰椎终板软骨组织中 Col2α1 阳性表达面积比高于补肾活血方组 ( $P=0.000$ )。见图 4、图 5、表 3。

3.4 小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 表达水平测定结果

小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 表达水平的免疫荧光光检测结果(图 6)显示:空白对照组小鼠腰椎终板软骨组织中可见大量 pSmad2 阳性细胞(表现为蓝色 DAPI 染色核与绿色荧光染色胞质重叠)。各组小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 阳性细胞数占比的总体比较,差异有统计学意义。空白对照组和补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 阳性细胞数占比均高于模型组 ( $P=0.014, P=0.040$ )。空白对照组与补肾活血方组小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 阳性细胞数占比的差异无统计学意义 ( $P=0.444$ )。见表 4。

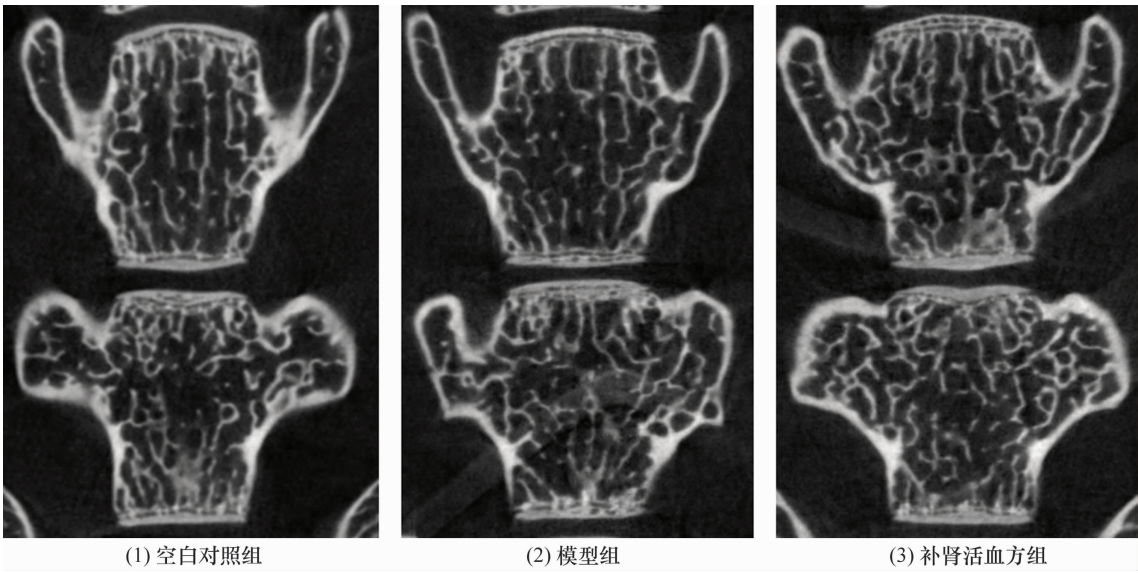


图 2 小鼠腰椎冠状位 Micro-CT 图像

表 1 小鼠腰椎 Micro-CT 分析结果

组别	样本量/只	腰椎终板软骨骨化区域骨体积分数/ $(\bar{x} \pm s, \%)$	腰椎终板软骨骨化区域骨小梁数量/ $(\bar{x} \pm s, \text{个} \cdot \text{mm}^{-1})$	腰椎间盘相对高度/ $(\bar{x} \pm s, \%)$
空白对照组	6	78.399 ± 1.420	8.479 ± 0.388	8.755 ± 0.642
模型组	6	88.859 ± 3.233	9.640 ± 0.421	6.567 ± 0.403
补肾活血方组	6	84.605 ± 1.360	8.439 ± 0.304	8.848 ± 0.582
F 值		23.188	13.275	27.364
P 值		0.000	0.002	0.000

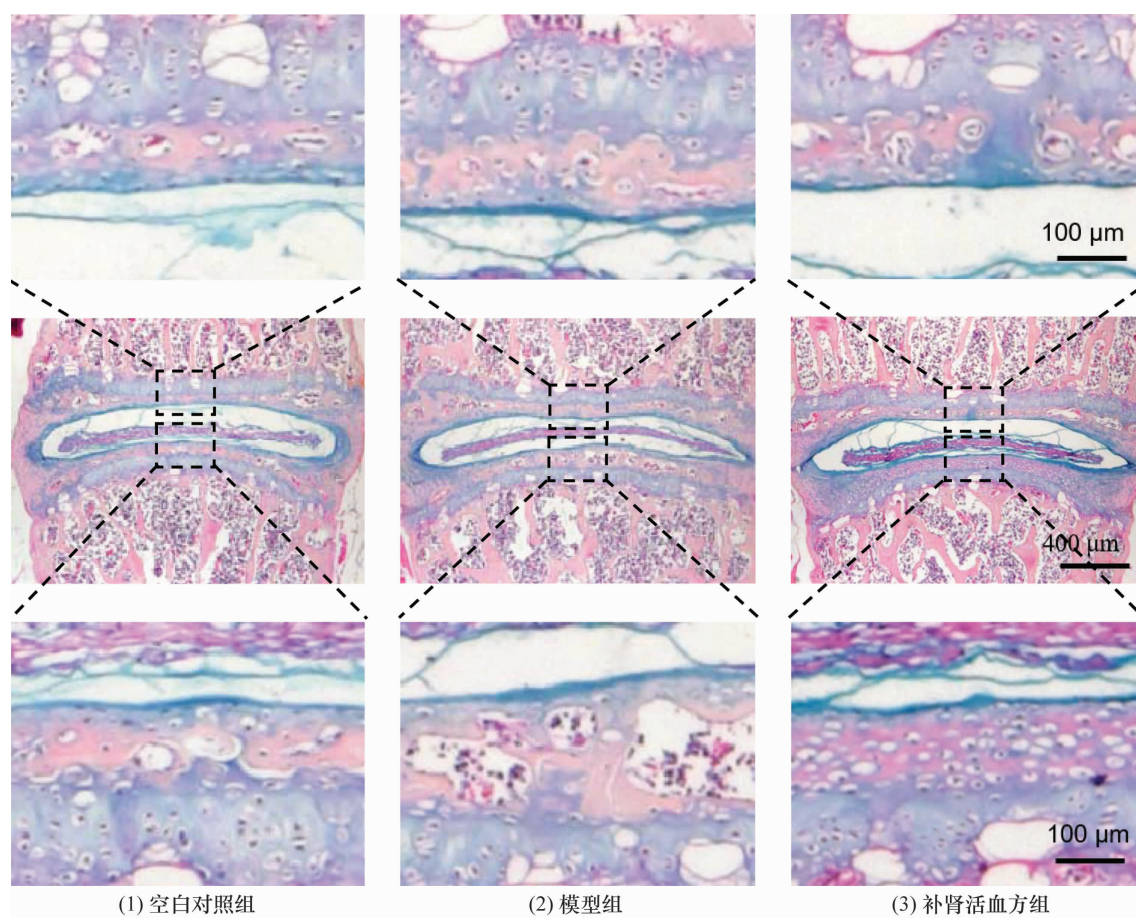


图 3 小鼠腰椎终板软骨组织阿尔辛蓝-苏木素/HE-橙黄 G 染色结果

表 2 小鼠腰椎终板软骨组织形态学评分

组别	样本量/只	软骨组织形态学评分/ $(\bar{x} \pm s, \text{分})$
空白对照组	6	$1.250 \pm 1.500$
模型组	6	$6.500 \pm 1.290$
补肾活血方组	6	$1.750 \pm 0.957$
$F$ 值		20.845
$P$ 值		0.000

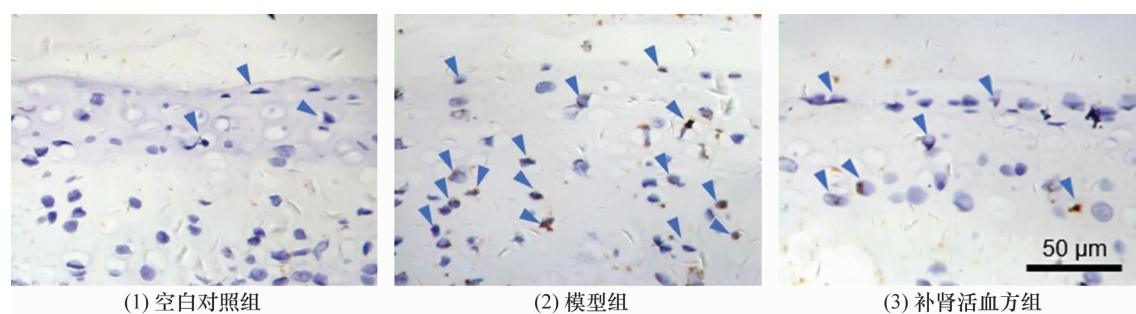


图 4 小鼠腰椎终板软骨组织中基质金属蛋白酶-13 表达水平的免疫组织化学检测结果

#### 4 讨 论

腰椎间盘突出是中老年人常见的骨骼肌肉系统疾病。研究<sup>[14-16]</sup>表明,腰椎终板软骨退变可导致腰椎间盘突出内物质运输障碍和力学反应异常,进而引起腰椎间盘突出结构与功能的改变,这一病理过程被认为是腰椎间盘突出退变的重要发生机制之一。然而,目前腰椎终

板软骨退变的具体机制尚不明确。在腰椎间盘突出退变的治疗方面,尽管阿片类止痛药和非甾体抗炎药等药物可暂时缓解症状,但无法从根本上恢复腰椎间盘的结构和功能<sup>[17]</sup>。因此,深入探讨腰椎终板软骨的退变机制并寻找潜在的治疗靶点,对腰椎间盘突出退变的诊疗具有重要意义。



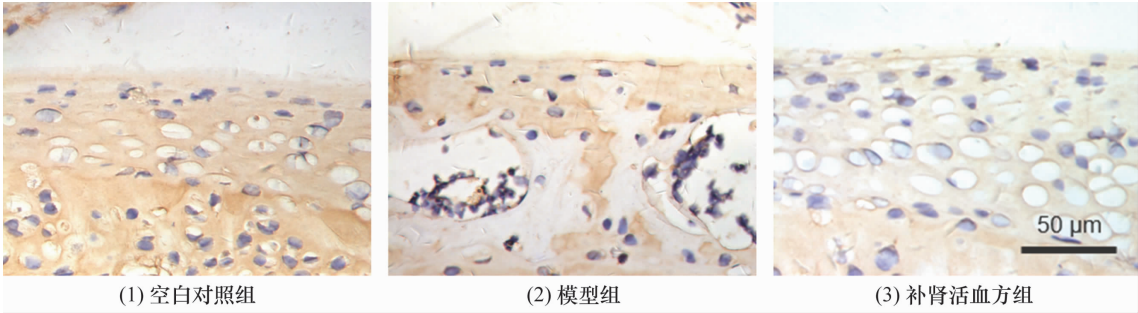


图 5 小鼠腰椎终板软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白 α1 链表达水平的免疫组织化学检测结果

表 3 小鼠腰椎终板软骨组织中基质金属蛋白酶-13 阳性细胞数占比和Ⅱ型胶原蛋白 α1 链阳性表达面积比

组别	样本量/只	MMP-13 <sup>1)</sup> 阳性细胞数占比/( $\bar{x} \pm s, \%$ )	Col2α1 <sup>2)</sup> 阳性表达面积比/( $\bar{x} \pm s, \%$ )
空白对照组	6	31.930 ± 9.783	11.447 ± 1.459
模型组	6	58.035 ± 4.012	2.010 ± 0.872
补肾活血方组	6	38.925 ± 3.072	4.783 ± 0.940
<i>F</i> 值		13.555	55.278
<i>P</i> 值		0.006	0.000

注:1) 基质金属蛋白酶-13;2) Ⅱ型胶原蛋白 α1 链。

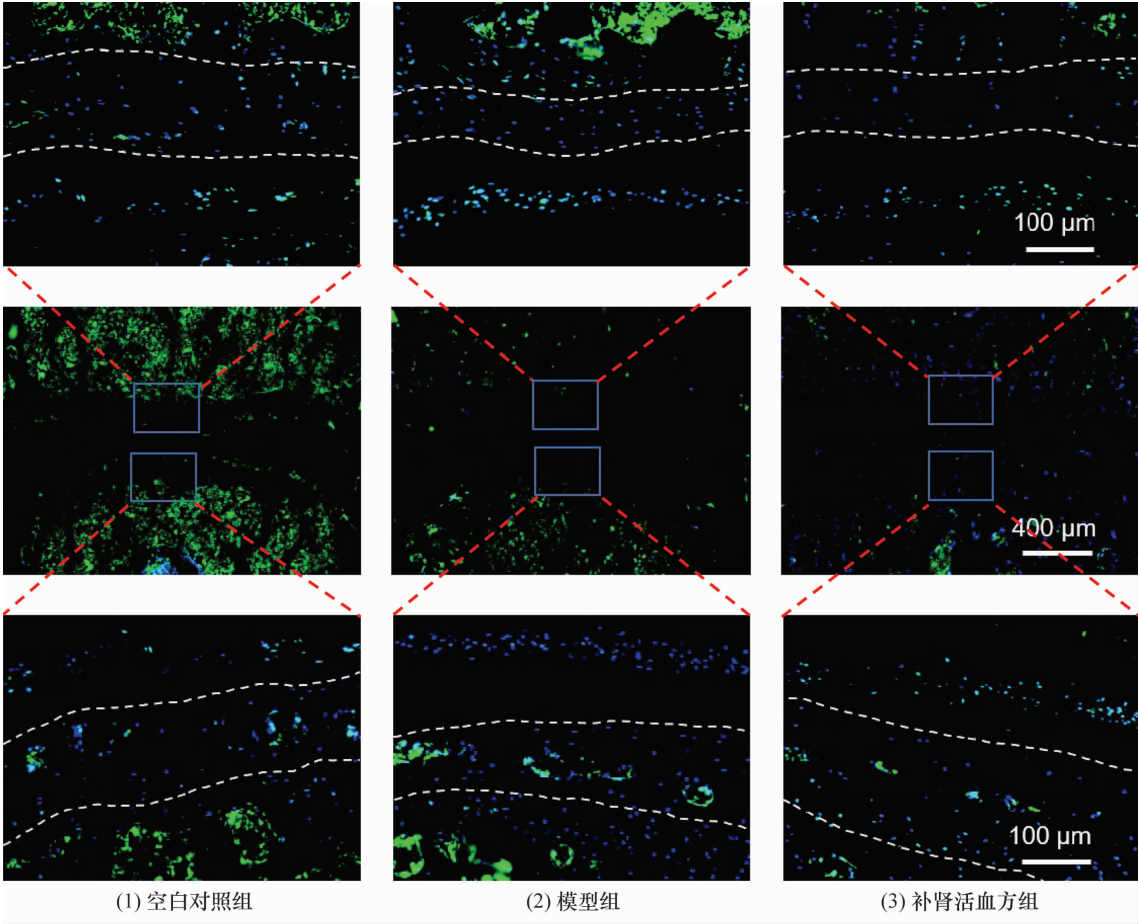


图 6 小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 表达水平的免疫荧光检测结果

腰椎终板软骨作为一种软骨样组织,具有细胞数量少但细胞外基质丰富的特点<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>表明,椎间盘退变的发生与细胞外基质的代谢失衡关系密切。在椎间盘退变过程中,腰椎终板软骨细胞通常表现为

细胞外基质分解代谢增强而合成代谢减弱的特征性改变。其中,MMP-13 和 Col2α1 作为软骨代谢的重要生物学标志物,对评估腰椎终板软骨退变程度具有重要的参考价值<sup>[20]</sup>。本研究发现,腰椎失稳造模可导

表 4 小鼠腰椎终板软骨组织中 pSmad2 阳性细胞数占比

组别	样本量/只	pSmad2 阳性细胞数占比/ ( $\bar{x} \pm s, \%$ )
空白对照组	6	44.768 $\pm$ 15.751
模型组	6	12.820 $\pm$ 5.576
补肾活血方组	6	37.137 $\pm$ 10.592
F 值		6.401
P 值		0.032

致小鼠腰椎终板软骨组织中 MMP-13 表达水平升高,同时伴随 Col2 $\alpha$ 1 表达水平降低。

转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta$  是一个重要的生长因子家族,通过抑制细胞外基质降解并促进其合成,参与软骨细胞的增殖和分化,从而在椎间盘退变的修复过程中起关键调控作用<sup>[21]</sup>。在经典信号通路中, TGF- $\beta$  能够磷酸化 Smad2 并将其释放到细胞质中,从而促进椎间盘基质合成<sup>[22]</sup>。有研究<sup>[23]</sup>表明,在椎间盘退变过程中, TGF- $\beta$ /Smad2 信号通路的活性受抑制。这一结果在本研究中也得到了验证:小鼠腰椎失稳造模后,腰椎终板软骨组织中 pSmad2 的表达水平明显降低,提示 TGF- $\beta$ /Smad2 信号传导在椎间盘退变过程中受到抑制。基于上述研究并结合本研究结果,可以推断腰椎终板软骨细胞 TGF- $\beta$ /Smad2 信号传导抑制所引起的细胞外基质代谢失衡,可能是腰椎终板软骨退变的关键机制之一。因此,通过调节腰椎终板软骨细胞 TGF- $\beta$ /Smad2 信号通路的活性,恢复细胞外基质代谢平衡,可能是延缓腰椎间盘退变的新途径。

中医学认为,肾藏精,主骨生髓,是人体骨骼生长发育的根本<sup>[24-26]</sup>。腰椎间盘退变的根本病机为“肾虚”,在治疗上应以“补肾”为主<sup>[27-28]</sup>。补肾活血方由补肾名方右归饮化裁而成,方中熟地黄补肝肾、益精髓;山药、山萸肉、枸杞子、肉桂、杜仲补益肝肾、舒筋活络;桃仁、红花行气活血、通络止痛;炮附片温阳、散寒、止痛,与熟地黄合用,可滋阴助阳、益肾填髓;诸药合用,共奏补肝肾、益精髓、通经活络、行气活血之功。

本研究发现,补肾活血方能延缓小鼠腰椎间盘退行性改变,其机制可能是通过激活腰椎终板软骨细胞内的 TGF- $\beta$ /Smad2 信号通路,抑制 MMP-13 的表达并促进 Col2 $\alpha$ 1 的表达,进而调节腰椎终板软骨细胞的细胞外基质合成与分解代谢,维持细胞外基质稳态,从而保护腰椎终板软骨组织结构。这一发现提示, TGF- $\beta$ /Smad2 信号传导在维持腰椎终板软骨组织的

正常生理结构和功能中具有重要作用,而 Smad2 的磷酸化水平调控可能是补肾活血方发挥作用的关键靶点,这为延缓腰椎间盘退变提供了潜在的治疗策略。

本研究结果显示,补肾活血方可延缓小鼠腰椎间盘退变的病理进程,其作用机制可能与补肾活血方能够通过促进腰椎终板软骨细胞中 Smad2 的磷酸化,下调 MMP-13 的表达并上调 Col2 $\alpha$ 1 的表达有关。

## 参考文献

- [1] DE SIMONE M, CHOUCHA A, CIAGLIA E, et al. Discogenic low back pain: anatomic and pathophysiologic characterization, clinical evaluation, biomarkers, AI, and treatment options[J]. J Clin Med, 2024, 13(19): 5915.
- [2] BEATTIE P F. Current understanding of lumbar intervertebral disc degeneration: a review with emphasis upon etiology, pathophysiology, and lumbar magnetic resonance imaging findings[J]. J Orthop Sports Phys Ther, 2008, 38(6): 329-340.
- [3] PYE S R, REID D M, LUNT M, et al. Lumbar disc degeneration: association between osteophytes, end-plate sclerosis and disc space narrowing[J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(3): 330-333.
- [4] TESSIER S, TRAN V A, OTTONE O K, et al. TonEBP-deficiency accelerates intervertebral disc degeneration underscored by matrix remodeling, cytoskeletal rearrangements, and changes in proinflammatory gene expression[J]. Matrix Biol, 2020, 87: 94-111.
- [5] 何嘉辉, 甘延池, 龚焱, 等. 龟板通过抑制炎症反应改善小鼠软骨终板退变[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(7): 949-952.
- [6] AMELOT A, MAZEL C. The intervertebral disc: physiology and pathology of a brittle joint[J]. World Neurosurg, 2018, 120: 265-273.
- [7] WU P H, KIM H S, JANG I T. Intervertebral disc diseases part 2: a review of the current diagnostic and treatment strategies for intervertebral disc disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2135.
- [8] 岑芊瑶, 刘江源, 曾庆贺, 等. 补肾活血方联合人脐带血间充质干细胞修复小鼠膝关节软骨缺损的实验研究[J]. 中医正骨, 2023, 35(12): 5-13.
- [9] HU S, GE Q, XIA C, et al. Bushenhuoxue formula accelerates fracture healing via upregulation of TGF- $\beta$ /Smad2 signaling in mesenchymal progenitor cells[J]. Phytomedicine, 2020, 76: 153256.
- [10] DONG R, YING J, XU T, et al. Bushenhuoxue formula facil-



- itates articular cartilage repair and attenuates matrix degradation by activation of TGF- $\beta$  signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 2734581.
- [11] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharm, 2016, 7(2): 27-31.
- [12] ZHOU C, YAO S, FU F, et al. Morroniside attenuates nucleus pulposus cell senescence to alleviate intervertebral disc degeneration via inhibiting ROS-Hippo-p53 pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 942435.
- [13] MAERZ T, NEWTON M, MAREK A A, et al. Dynamic adaptation of vertebral endplate and trabecular bone following annular injury in a rat model of degenerative disc disease [J]. Spine J, 2018, 18(11): 2091-2101.
- [14] XIE Y, ZHANG J, YANG S, et al. Role of Bushen Huoxue Formula and transplanted endothelial progenitor cells play in promoting endplate microcirculation and attenuating intervertebral disc degeneration [J]. Heliyon, 2024, 10(6): e28095.
- [15] URBAN J P, SMITH S, FAIRBANK J C. Nutrition of the intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2004, 29(23): 2700-2709.
- [16] SUN Y, LI Z, DUAN J, et al. From structure to therapy: the critical influence of cartilaginous endplates and microvascular network on intervertebral disc degeneration [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2024, 12: 1489420.
- [17] XIN J, WANG Y, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration [J]. Orthop Surg, 2022, 14(7): 1271-1280.
- [18] 罗海杰, 柯松坚, 林彩娜, 等. 运动训练对椎间盘退变模型大鼠疼痛及细胞外基质合成的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20): 3176-3182.
- [19] ROUGHLEY P J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2004, 29(23): 2691-2699.
- [20] 姚之肖. Salubrinal 在人髓核细胞中抑制 IL-17 介导的椎间盘退变机制的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [21] LING H, ZENG Q, GE Q, et al. Osteoking decelerates cartilage degeneration in DMM-induced osteoarthritic mice model through TGF- $\beta$ /smad-dependent manner [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 678810.
- [22] XIONG Y, YANG Y L, GAO Y S, et al. Histological changes of cervical disc tissue in patients with degenerative ossification [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2022, 65(2): 186-195.
- [23] HU B, XU C, CAO P, et al. TGF-beta stimulates expression of chondroitin polymerizing factor in nucleus pulposus cells through the Smad3, RhoA/ROCK1, and MAPK signaling pathways [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 566-579.
- [24] 郑冬阳, 于静, 金明秀. 基于肾藏精主骨生髓论治骨关节炎 [J]. 光明中医, 2023, 38(22): 4347-4349.
- [25] 胡雪琴, 金红婷, 施振宇, 等. 髓病理论及其在骨病学中的应用 [J]. 中医正骨, 2018, 30(11): 39-42.
- [26] 胡雪琴, 金红婷, 肖鲁伟, 等. “浙派中医”骨伤学家肖鲁伟辨治“髓系骨病”的学术经验 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10): 1071-1073.
- [27] 郭泽华, 李兆勇, 陈龙, 等. 补肾活血方促进脂肪间充质干细胞类髓核分化的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25): 3974-3980.
- [28] 李凯明, 朱立国, 李玲慧, 等. 补肾活血方对兔退变椎间盘模型经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6001-6005.

(收稿日期: 2024-10-10 本文编辑: 郭毅曼)