

## 通督活血汤含药血清可抑制椎间盘纤维环细胞的焦亡

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3517>吴子健<sup>1</sup>, 胡昭端<sup>1</sup>, 周晓红<sup>1</sup>, 李佳<sup>1</sup>, 李柏村<sup>2</sup>, 蔡国伟<sup>2</sup>, 彭锐<sup>1</sup>

2095-4344.3517

投稿日期: 2020-07-01

送审日期: 2020-07-04

采用日期: 2020-08-07

在线日期: 2020-10-16

中图分类号:

R459.9; R318; R283

文章编号:

2095-4344(2021)14-02148-07

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章亮点一

△ 阐明椎间盘退变与纤维环细胞焦亡以及细胞焦亡与炎症反应的相关性;

△ 探讨通督活血汤治疗椎间盘突出症的作用机制, 可能通过调节半胱氨酸蛋白酶1、Gasdermin D(GSDMD)、NOD样受体蛋白3、白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18的表达量, 抑制椎间盘纤维环细胞焦亡起作用。

## 含药血清的制备:

(1) 健康10周龄SD大鼠予通督活血汤连续灌胃7d;  
(2) 在末次灌胃2h后行腹主动脉取血。

提取4周龄SD大鼠的椎间盘纤维环细胞, 随机分组:  
(1) 空白组;  
(2) 模型组: 诱导形成细胞焦亡模型;  
(3) 低、中、高剂量组: 采用5%、10%、20%通督活血汤含药血清干预焦亡状态下的椎间盘纤维环细胞。

## 检测:

(1) 采用流式细胞术检测细胞焦亡率;  
(2) 采用ELISA法检测白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18的表达量;  
(3) 采用qRT-PCR及Western Blot法检测各组半胱氨酸蛋白酶1、GSDMD、NOD样受体蛋白3基因和蛋白的表达量。

## 文题释义:

**细胞焦亡:** 是一种不同于细胞凋亡和细胞坏死的另一种程序性死亡方式, 它由炎症性半胱氨酸蛋白酶(如Caspase-1/4/5/11)介导, 可在胞质内产生炎症小体, 进而活化炎症递质(如白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18)并破坏细胞膜形成孔洞, 导致细胞逐渐膨胀破裂, 炎症物质渗出而激发强烈的炎症反应, 因与炎症反应密切相关, 所以又称之为炎症性死亡。

**中药含药血清:** 是指经动物灌胃给予中药及制剂, 经胃肠道吸收后进入机体血液循环, 在一定时间内采集血液, 此时分离所得的血清必定含有一定量的该药物成分, 其血药浓度反映了机体的真实血药浓度, 将此血清加入到体外细胞培养体系, 观察其药理作用的一种体外实验方法。

## 摘要

**背景:** 椎间盘退变是椎间盘突出症的主要病理改变, 与椎间盘纤维环细胞的程序性死亡密切相关。既往研究表明, 通督活血汤治疗腰椎间盘突出症疗效显著, 其是否通过抑制椎间盘纤维环细胞焦亡起作用值得深入研究。

**目的:** 通过观察通督活血汤含药血清对脂多糖/ATP诱导的椎间盘纤维环细胞焦亡的影响, 探讨通督活血汤治疗腰椎间盘突出症的可能作用机制。

**方法:** 将36只10周龄SD大鼠以通督活血汤灌胃, 连续灌胃7d后腹主动脉取血, 制备含药血清。提取4周龄SD大鼠的椎间盘, 采用机械-酶消化法提取椎间盘纤维环细胞, 培养至第2代后采用甲苯胺蓝染色法和II型胶原免疫组化染色法进行鉴定。之后将第2代细胞随机分为空白组、模型组、含药血清低、中、高剂量组, 除空白组外, 其余4组予脂多糖/ATP制造细胞焦亡模型, 成模后低、中、高剂量含药血清组分别予5%、10%、20%通督活血汤含药血清干预, 空白组不采取任何干预措施。采用MTT法摸索含药血清干预椎间盘纤维环细胞焦亡的最佳干预浓度和最佳干预时间; 采用流式细胞术Annexin V FITC/PI双染测定细胞焦亡率; 采用ELISA法检测各组细胞上清液的白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18的表达量; 采用qRT-PCR检测各组半胱氨酸蛋白酶1、Gasdermin D(GSDMD)、NOD样受体蛋白3基因的表达量; 采用Western Blot法检测各组半胱氨酸蛋白酶1、GSDMD、NOD样受体蛋白3蛋白的表达量。

**结果与结论:** ①MTT结果显示: 通督活血汤含药血清干预椎间盘纤维环细胞焦亡的最佳干预浓度为10%, 最佳干预时间为24h; ②流式细胞术结果显示: 与空白组相比, 其他4组细胞焦亡比率明显增加; 与模型组相比, 含药血清各剂量组细胞焦亡比率明显下降; 与低、高剂量组相比, 中剂量组细胞焦亡比率明显下降; ③ELISA、qRT-PCR、Western Blot结果显示: 与空白组相比, 其他4组白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18的表达量、半胱氨酸蛋白酶1、GSDMD、NOD样受体蛋白3的基因及蛋白表达量均显著升高; 与模型组相比, 含药血清各剂量组均显著降低; 各剂量组间比较, 中剂量组表达量显著低于低、高剂量组; 以上差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ); ④提示通督活血汤含药血清可有效缓解脂多糖/ATP诱导的椎间盘纤维环细胞发生焦亡, 减轻炎症反应; 中剂量组在延缓细胞焦亡、减轻炎症反应方面疗效最佳。

**关键词:** 通督活血汤; 含药血清; 椎间盘突出症; 纤维环细胞; 细胞焦亡

**缩略语:** NOD样受体蛋白3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3

## Tongdu Huoxue Decoction-medicated serum inhibits pyroptosis in annulus fibrosus cells of the intervertebral disc

Wu Zijian<sup>1</sup>, Hu Zhaoduan<sup>1</sup>, Zhou Xiaohong<sup>1</sup>, Li Jia<sup>1</sup>, Li Bocun<sup>2</sup>, Cai Guowei<sup>2</sup>, Peng Rui<sup>1</sup><sup>1</sup>湖北中医药大学, 湖北省武汉市 430065; <sup>2</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院针灸科, 湖北省武汉市 430020

第一作者: 吴子健, 博士, 主要从事骨与关节疾病的防治研究。

通讯作者: 彭锐, 教授, 博士生导师, 湖北中医药大学, 湖北省武汉市 430065

<https://orcid.org/000-0003-1568-9202>(吴子健)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81774410), 项目负责人: 蔡国伟

引用本文: 吴子健, 胡昭端, 周晓红, 李佳, 李柏村, 蔡国伟, 彭锐. 通督活血汤含药血清可抑制椎间盘纤维环细胞的焦亡[J].

中国组织工程研究, 2021, 25(14):2148-2154.



## Abstract

**BACKGROUND:** Lumbar disc degeneration is the main pathological change of lumbar disc herniation, which is closely related to the programmed death of intervertebral disc annulus fibrosus cells. Previous clinical studies have shown that *Tongdu Huoxue* Decoction has a significant effect in the treatment of lumbar disc herniation, and it is worth further studying whether it can play a role by inhibiting the pyrolysis of annulus fibrosus cells.

**OBJECTIVE:** To investigate the inhibitory effect of *Tongdu Huoxue* Decoction-mediated serum on the pyroptosis of annulus fibrosus cells in the intervertebral disc induced by lipopolysaccharide/adenosine triphosphate (ATP), so as to explore the possible mechanism of *Tongdu Huoxue* Decoction in the treatment of lumbar disc herniation.

**METHODS:** Thirty-six 10-week-old Sprague-Dawley rats were gavaged with *Tongdu Huoxue* Decoction, and blood samples were taken from the abdominal aorta after 7-day continuous gavage to prepare drug-containing serum. Four-week-old Sprague-Dawley rats were taken to extract their lumbar intervertebral discs, and then the annulus fibrosus cells were extracted from the intervertebral disc tissues by mechanical-enzymatic digestion. The cells cultured to the second generation were identified by toluidine blue staining and type II collagen immunohistochemical staining. After that, the second-generation cells were randomly divided into blank group, model group, and low-, middle-, and high-dose serum-containing groups. Except for the blank group, the remaining four groups were given lipopolysaccharide/ATP to make the cell pyroptosis model. After modeling, 5%, 10%, and 20% of *Tongdu Huoxue* Decoction medicated serum were administered in the low-, middle-, and high-dose serum-containing groups, respectively, and no intervention measures were taken in the blank group. We then used the MTT method to find the best concentration and time for the intervention of pyroptosis of annulus fibrosus cells with the drug-containing serum. Flow cytometry and Annexin V FITC/PI double staining were used to measure the rate of cell pyroptosis. ELISA method was used to detect the expression of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18 in cell supernatant. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of Caspase-1, Gasdermin D, and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3).

**RESULTS AND CONCLUSION:** MTT showed that the best intervention concentration of *Tongdu Huoxue* Decoction medicated serum for the pyroptosis of annulus fibrosus cells was 10%, and the best intervention time was 24 hours. Flow cytometry results showed that compared with the blank group, the pyroptosis rate in the other four groups was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the pyroptosis rate in the three drug-containing serum groups was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the low- and high-dose groups, the pyroptosis rate of the middle-dose group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Results from ELISA, qRT-PCR, and western blot assay indicated that compared with the blank group, the expression levels of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-18, Caspase-1, Gasdermin D, NLRP3 mRNAs and proteins were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while compared with the model group, these expression levels were significantly decreased in the three drug-containing serum groups ( $P < 0.05$ ). Moreover, the expression levels of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-18, Caspase-1, Gasdermin D, NLRP3 in the middle-dose group were significantly lower than those in the low- and high-dose groups ( $P < 0.05$ ). Therefore, *Tongdu Huoxue* Decoction-mediated serum can effectively relieve lipopolysaccharide/ATP induced pyroptosis of intervertebral disc annulus fibrosus cells and reduce inflammation. The middle-dose group has the best effect in delaying cell pyroptosis and reducing inflammation.

**Key words:** *Tongdu Huoxue* Decoction; medicated serum; lumbar disc herniation; annulus fibrosus cells; pyroptosis

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81774410 (to CGW)

**How to cite this article:** WU ZJ, HU ZD, ZHOU XH, LI J, LI BC, CAI GW, PENG R. *Tongdu Huoxue* Decoction-mediated serum inhibits pyroptosis in annulus fibrosus cells of the intervertebral disc. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(14):2148-2154.

## 0 引言 Introduction

腰椎间盘突出症是骨伤科常见病和多发病,其发病多因突发性暴力、持久性应力不均或病理性改变等因素致椎间盘组织退变,进而导致纤维环部分或全部破裂,髓核突出刺激或压迫对应节段的神经根、马尾神经从而引起的一系列临床症状,包括腰部酸、胀、痛感明显,马尾综合征、坐骨神经痛、下肢麻木等症状。在诸多致病因素中,椎间盘的退变是其主要的病理改变<sup>[1-2]</sup>。近年来,大量研究表明致炎因子的分泌与椎间盘退变密切相关,炎症因子(如白细胞介素1、白细胞介素6、白细胞介素18、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等)在椎间盘退变中呈现高表达,这些炎症因子一方面在局部产生自身免疫炎症反应,加速椎间盘的退变;另一方面可通过诱导基质金属蛋白酶的合成和抑制基质金属蛋白酶抑制剂的合成,降解细胞外基质,破坏椎间盘的稳定性,进而影响其生物应力,加速椎间盘突出症的病理进展<sup>[3]</sup>。除此之外,炎症因子还通过诱导神经、血管的长入及对神经末梢产生炎性刺激来产生疼痛的症状<sup>[4]</sup>。因此,控制炎症对于预防和延缓椎间盘的退变、控制其临床症状至关重要。

近年来值得关注的是,在骨关节炎的发病进程中,炎症与细胞焦亡密切相关。相关研究表明,细胞焦亡(pyroptosis)是一种不同于细胞凋亡和细胞坏死的另一种程序性死亡方式,它由炎症性半胱氨酸蛋白酶(如Caspase-1/4/5/11)介导,可在胞质内产生炎症小体,进而活化炎症递质(如白细胞介

素1 $\beta$ 、白细胞介素18)并破坏细胞膜形成孔洞,导致细胞逐渐膨胀破裂、炎性物质渗出而激发强烈的炎症反应,因与炎症反应密切相关,所以又称之为炎症性死亡。因细胞焦亡的发生与炎症反应密切相关,找出其通路的抑制剂可能成为控制炎症的治疗靶点<sup>[5-6]</sup>。

通督活血汤为骨伤科泰斗李同生的祖传秘方,自1990年贡献于世后,已有研究者从临床研究和基础实验上证实该方在治疗腰椎间盘突出症、退行性腰椎管狭窄症以及腰椎手术失败综合征等方面疗效显著,可通过调节椎间盘突出症患者局部微循环和灌注量,控制炎症反应,发挥抗炎镇痛作用<sup>[7-9]</sup>。为进一步明确其作用机制,文章就通督活血汤含药血清从控制椎间盘纤维环细胞的焦亡方面进行体外实验,现报道如下。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2019年1至12月在湖北中医药大学实验动物中心和针灸研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 10周龄清洁级SD大鼠36只,体质量约200g,雌雄不限,用于制备含药血清;4周龄清洁级SD大鼠30只,体质量约80g,雌雄不限,用于提取细胞,均由湖北省医学科学研究院实验动物中心提供[合格证号:SCXK

(鄂)2019-0018], 经湖北中医药大学实验伦理委员会批准, 将动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心。

1.3.2 仪器 高速低温离心机(Eppendorf), CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Fisher), 倒置荧光数码显微镜(Leica), Elx800酶标仪(Bio-Tek), Infinite M200多功能酶标仪(Tecan), 9600型DNA扩增仪(PE), 凝胶成像系统(Bio-Rad)等。

1.3.3 药品与试剂 II型胶原酶(Sigma), 0.25%胰蛋白酶(Gibco), 胎牛血清(Gibco), DMEM低糖培养基(Hyclone), PBS(Hyclone), 青霉素-链霉素双抗混合液(Hyclone), MTT试剂盒(Biosharp), qRT SuperMix for qPCR(Vazyme), ELISA试剂盒(中国西塘公司), 反转录反应试剂盒(Fermentas), NOD样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)一抗(CST), Caspase-1一抗(Santa Cruz), Gasdermin D(GSDMD)一抗(Abcam),  $\beta$ -actin抗体(Proteintech), 二抗(Proteintech), 脂多糖(Biosharp), ATP(Solarbio)。

通督活血汤药物组成如下: 鹿角片 18 g、金毛狗脊 12 g、杜仲 9 g、黄芪 18 g、当归 9 g、苏木 9 g、泽兰叶 9 g、地龙 9 g、赤芍 9 g、丹参 18 g。以上中药由湖北中医药大学附属国医堂提供并由湖北省中医院药剂科制备成含生药 1 g/mL 的药液, 常温冷却后 -20 °C 保存备用。

#### 1.4 方法

1.4.1 通督活血汤含药血清的制备 健康 10 周龄 SD 大鼠 36 只, 适应性喂养 7 d 后, 参照“动物和人体表面积折算的等效剂量比率表”进行换算, 按 10.8 g/(kg·d) 的量给予通督活血汤灌胃, 连续灌胃 7 d, 最后 1 d 连续灌胃 2 次, 中间间隔 2 h。采血前需禁食 12 h, 在末次灌胃 2 h 后行腹主动脉取血, 每只取血约 8 mL, 将所取全血放至 37 °C 恒温水浴箱中水浴 20 min, 随后 3 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清, 过滤除菌后分装, -20 °C 保存备用。

1.4.2 椎间盘纤维环原代细胞的分离与培养 4 周龄 SD 大鼠进实验室后立行腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉处死, 逐层分离并剔除腰椎两旁的肌肉, 暴露腰椎, 咬骨钳取出腰椎, 尽量剥离椎体周围附着的肌肉, 逐个取出椎间盘。剔除中间髓核, 余下纤维环用眼科剪剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小的碎片, 将组织碎片至于装有 1×PBS 的离心管中, 4 °C 下 1 200 r/min 离心机中离心 2 min, 漂洗 2 次后小心倒尽 PBS, 用 0.2% II 型胶原酶 3 mL, 置于 37 °C 恒温箱中消化, 每隔 2 h 提取一次上清液, 1 000 r/min 离心 5 min 后倒掉上清液, 收集细胞沉淀。共收集 3 次, 将收集到的细胞沉淀用含体积分数 10% 的胎牛血清和 100 U/mL 青-链霉素的细胞培养液重悬, 后分装至培养瓶, 置于 37 °C 恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。密切观察细胞, 约 48 h 细胞贴壁后首次换液, 隔天换培养液 1 次, 待细胞铺满培养瓶底约 90% 时进行传代。

#### 1.4.3 纤维环细胞的鉴定

(1) 甲苯胺蓝染色: 将第 2 代细胞调整个数为  $2.6 \times 10^6$  L<sup>-1</sup> 种板在 6 孔板中的无菌盖玻片上, 待细胞铺满玻片时, 吸弃

培养液并用 PBS 漂洗 3 次, 每孔用 1 mL 40 g/L 的多聚甲醛固定 30 min, 吸尽多聚甲醛, 用 PBS 漂洗 3 次, 每孔滴入 500  $\mu$ L 甲苯胺蓝染色液, 室温 30 min, 自来水冲洗, 加入冰醋酸进行分化, ddH<sub>2</sub>O 冲洗 3 次后, 快速加入无水乙醇漂洗 1 次, 常温下风干后中性树脂胶封固, 光学显微镜下观察形态并进行鉴定。

(2) II 型胶原免疫组化染色: 同上, 将第 2 代细胞种板、漂洗、固定, PBS 漂洗 3 次后加入 50  $\mu$ L 的 0.1% 破膜剂处理细胞, 20 min 后 PBS 漂洗 3 次, 在盖玻片上滴加 50  $\mu$ L 3% 的双氧水室温静置 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每片滴加 5% BSA 封闭 30 min 后, 阳性组滴加 II 型胶原一抗 (1 : 200) 反应过夜, 阴性组用 PBS 替代, 一抗孵育完成后, PBS 漂洗 3 次, 加入二抗约 50  $\mu$ L (1 : 200) 室温静置 30 min, PBS 漂洗 3 次后吸净。将 50  $\mu$ L DAB 溶液均匀滴加在每片玻片上, 10 min 后自来水漂洗 3 次, 经苏木精复染, PBS 漂洗 3 次, 于含体积分数 5% 盐酸乙醇溶液中返蓝 2 s, 常温下晾干后脱水、透明、中性树脂胶封固, 光学显微镜下观察形态并进行鉴定。

1.4.4 脂多糖 /ATP 诱导纤维环细胞焦亡模型的建立 参照制造细胞焦亡模型相关文献<sup>[10]</sup>, 将第 2 代纤维环细胞培养液中加入 1 mg/L 的脂多糖处理 6 h 后, 更换 ATP (3 mmol/L) 1 h 后形成细胞焦亡模型。

1.4.5 MTT 法检测最佳干预浓度和干预时间 取第 2 代纤维环细胞, 以  $5 \times 10^3$  个 / 孔接种于 3 块 96 孔板中, 分别标记为 12 h 组、24 h 组、48 h 组, 常规培养 48 h 后加入 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 细胞培养基同步化细胞, 饥饿培养 24 h 后吸净 DMEM, 加入培养液并滴加 1 mg/L 的脂多糖 6 h 后更换 3 mmol/L 的 ATP 1 h 后造模。成模后在 96 孔板上标记分组, 每组设立 8 个复孔, 分别加入 0, 5%, 10%, 20%, 40% 的含药血清, 对应培养时间结束后, 吸净培养液, 每孔分别加入 100  $\mu$ L MTT (浓度为 1 g/L)。37 °C 下培养 5 h 后弃 MTT, 向每孔中加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜, 于震荡仪上均匀震荡 10 min 后在酶标仪上以 570 nm 波长下对各孔吸光度 (A) 值进行检测, 记录并分析数据。

1.4.6 流式细胞术检测细胞焦亡比例 将第 2 代细胞以  $1 \times 10^6$  个 / 孔接种于 5 块 6 孔板中, 细胞贴壁后分为空白组、模型组、含药血清低、中、高剂量组。除空白组外, 其余 4 组予脂多糖 /ATP 制造细胞焦亡模型, 成模后低、中、高剂量含药血清组分别予 5%, 10%, 20% 通督活血汤含药血清干预, 空白组不采取任何干预措施。分组干预结束后用不含 EDTA 的胰酶消化, 离心后吸弃上清液, PBS 清洗后离心, 收集细胞沉淀, 用试剂盒中的缓冲液重悬细胞, 调整浓度为  $1 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>, 参照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书进行处理, 采用 Cell Quest 软件获取  $1 \times 10^4$  个细胞, 将 UR 象限细胞认定为发生焦亡的细胞<sup>[11]</sup>。

1.4.7 ELISA 法检测各组细胞上清液白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 18 表达量 取第 2 代纤维环细胞, 以  $3 \times 10^8$  L<sup>-1</sup> 接种于 6 孔板中, 常规培养 48 h 后分为空白组、模型组、含药血清低、

中、高剂量组。空白组培养液为常规培养液 (10% 胎牛血清 + DMEM), 模型组培养液为含脂多糖和 ATP 的培养液 (常规培养液 +1 mg/L 脂多糖 +3 mmol/L ATP), 含药血清低、中、高剂量组分别为含 5%, 10%, 20% 含药血清的培养液 (常规培养液 +5%/10%/20% 含药血清), 培养 24 h 后, 收集细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组上清液中白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 18 的表达量。

**1.4.8 qRT-PCR 法检测各组细胞 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 基因的表达量** 将干预完成的各组细胞用 PBS 漂洗 3 次后, 再将 1 mL Trizol 滴入 25 mL 培养瓶中反应 5 min, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 再将提取的 mRNA 进行反转录反应。反应条件为: 50 °C 进行 15 min, 85 °C 进行 2 min, 反应结束后采用实时荧光定量 PCR 检测各组 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 基因的表达量, 扩增反应条件如下: 95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环, 得到扩增曲线与 CT 值。95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共 40 个循环, 得到溶解曲线。以 GAPDH 为对照, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各组基因 mRNA 的相对表达量。Caspase-1、GSDMD、NLRP3 引物见表 1。

表 1 | 各指标引物设计

Table 1 | Primer design for each index

Gene	Genebank	Upstream primer (5'-3')	Downstream primer (5'-3')
Caspase-1	NM-012762	TCG GAG AGT CCG AGC TGA TGT T	CTC TGG GCA GGC AGC AAA TTC T
GSDMD	NM-024736	TGC TTG CCG TAC TCC ATT CCA TC	AGT TCT GAA GAG CCT GCC TCC A
NLRP3	NM-145827	CCA GAC CTC CAA GAC CAC GAC T	CCA TCC GCA GCC AAT GAA CAG A
GAPDH	NM-017008	GGC CTT CCG TGT TCC TAC C	ACT CGA CAC CTG CCC TCA

表注: Caspase-1 为半胱氨酸蛋白酶 1, GSDMD 为 Gasdermin D, NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3

**1.4.9 Western Blot 法检测各组细胞 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白的表达量** 采用 RIPA 裂解液获取各组细胞蛋白, 参照蛋白凝胶试剂盒制备凝胶, 上样完成后以 20 V 10 min、50 V 30 min、100 V 70 min 完成跑胶, 将凝胶切割后采用半干转膜法转至 PVDF 膜上, TBST 漂洗 3 次后, 置于脱脂牛奶中封闭 2 h; 封闭完成后 TBST 漂洗 3 次, 将洗好的膜放入已配置好的一抗 [ $\beta$ -actin(1 : 2 000)、Caspase-1(1 : 1 000)、GSDMD(1 : 1 000)、NLRP3(1 : 1 000)] 中, 4 °C 摇床过夜, 孵育完成后 TBST 漂洗 3 次, 置于装有二抗 (1 : 5 000) 的自封袋中室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次后采用高效显影液显影, Image Lab 软件分析并记录。

**1.5 主要观察指标** ① MTT 法观察通督活血汤含药血清干预纤维环细胞焦亡的最佳浓度和最佳时间; ② 流式细胞术检测各组细胞焦亡率; ③ ELISA 法检测各组细胞上清液中白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 18 的表达量; ④ qRT-PCR 法检测各组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 基因的表达量; ⑤ Western Blot 法检测各组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白的表达量。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 所得实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。所得数据若符合正态分布, 则采用单因素方

差分析; 若不符合正态分布, 则采用非参数检验。以  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 椎间盘纤维环细胞的形态学观察** 如图 1, 镜下观察可见, 原代细胞培养 12 h 后开始贴壁生长, 24 h 后细胞贴壁现象逐渐增多, 细胞形态多为菱形或类圆形, 部分细胞伸出触手向周边延伸, 出现分裂现象; 约 8 d 后细胞呈梭形或铺路石状铺满瓶底约 90%, 可进行传代。

**2.2 椎间盘纤维环细胞的鉴定** 如图 2A, 经甲苯胺蓝染色后, 细胞呈梭形或多边形, 细胞核被染成深蓝色, 细胞质被染成浅蓝色, 呈异染性。如图 2B, II 型胶原免疫组化结果显示, 纤维环细胞 II 型胶原呈黄褐色阳性表达, 与图 2C 阴性对照组相比差异显著。

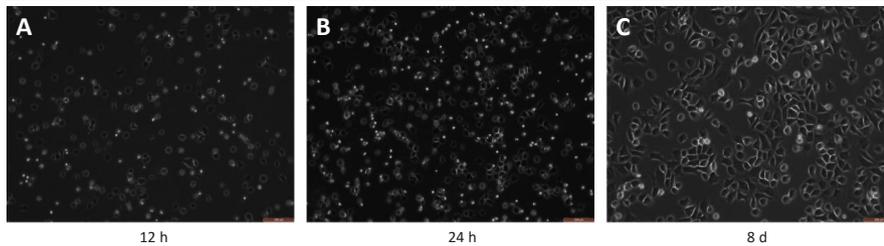
**2.3 通督活血汤含药血清干预纤维环细胞焦亡的最佳干预浓度和干预时间** 如图 3, MTT 法检测结果显示, 与空白组相比, 模型组和各浓度梯度含药血清细胞活性较低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 各浓度梯度含药血清细胞活性明显升高 ( $P < 0.05$ )。各浓度梯度含药血清组间比较, 含 10% 通督活血汤的含药血清组高于其他组 ( $P < 0.05$ ), 且培养 24 h 的各浓度含药血清组均高于培养 12 h 和 48 h 的含药血清组 ( $P < 0.05$ ), 差异有显著性意义。说明通督活血汤含药血清干预炎症纤维环细胞的最佳干预浓度为 10%, 最佳干预时间为 24 h。

**2.4 通督活血汤含药血清对纤维环细胞焦亡率的影响** 如图 4, 流式细胞术检测结果显示, 与空白组相比, 模型组 and 不同浓度干预组细胞焦亡比率明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 不同浓度干预组细胞焦亡比率明显下降 ( $P < 0.01$ ); 与低、高剂量组相比, 中剂量组细胞焦亡比率明显下降 ( $P < 0.01$ ); 差异均有显著性意义。

**2.5 通督活血汤含药血清对纤维环细胞培养液中白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 18 表达量的影响** 如图 5, ELISA 法检测结果显示, 与空白组相比, 模型组和不同浓度干预组细胞培养液中白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 18 的质量浓度明显增加; 与模型组相比, 不同浓度干预组细胞培养液中白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 18 的质量浓度明显下降; 与低、高剂量组相比, 中剂量组细胞培养液中白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 18 的质量浓度明显下降; 差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.6 通督活血汤含药血清对纤维环细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 基因表达量的影响** 如图 6, qRT-PCR 法检测结果显示, 与空白组相比, 模型组和不同浓度干预组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 基因表达量明显增加; 与模型组相比, 不同浓度干预组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 基因表达量明显下降; 与低、高剂量组相比, 中剂量组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 基因表达量明显下降; 差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.7 通督活血汤含药血清对纤维环细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达量的影响** 如图 7, Western Blot 法检测结



图注：图 A 示，原代细胞培养 12 h 后开始贴壁生长；图 B 示，24 h 后细胞数量增多，部分细胞开始出现分裂现象；图 C 示，约 8 d 后细胞铺满瓶底约 90%，可进行传代

图 1 | 椎间盘纤维环细胞的形态学观察 (×100)

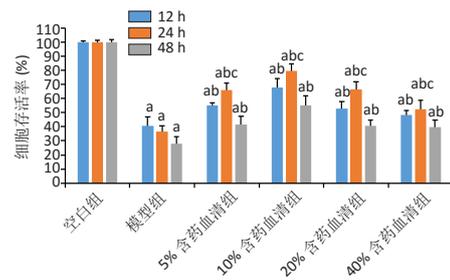
Figure 1 | Morphological observation of annulus fibrosus cells (×100)



图注：图 A 示经甲苯胺蓝染色后，细胞核被染成深蓝色，胞质被染成浅蓝色；图 B 示经 II 型胶原免疫组化处理后，细胞呈黄褐色阳性表达；图 C 为未使用 II 型胶原处理的阴性对照组。以上两种染色结果符合纤维环细胞的特异性染色，可鉴定为纤维环细胞

图 2 | 椎间盘纤维环细胞的鉴定 (×100)

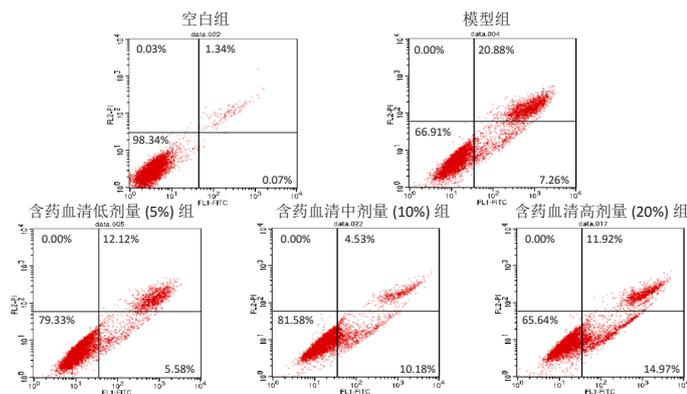
Figure 2 | Identification of annulus fibrosus cells (×100)



图注：与空白组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；在相同浓度组中与 12 h、48 h 组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$

图 3 | 各组细胞活性比较

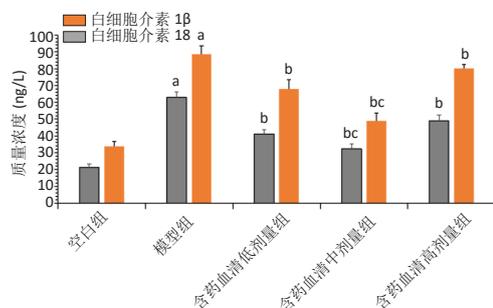
Figure 3 | Comparison of cell activity among groups



图注：采用流式细胞术检测各组细胞焦亡率，图中 UR 象限为发生焦亡的细胞

图 4 | 各组细胞焦亡率比较

Figure 4 | Comparison of pyroptosis rate among groups



图注：与空白组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与含药血清低、高剂量组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$

图 5 | 各组细胞培养液中白细胞介素 1β、白细胞介素 18 的表达量比较

Figure 5 | Expression levels of interleukin-1β and interleukin-18 in cell culture medium

果显示，与空白组相比，模型组和不同浓度干预组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达量明显增加；与模型组相比，不同浓度干预组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达量明显下降；与低、高剂量组相比，中剂量组细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达量明显下降；差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论 Discussion

腰椎间盘突出症是一种因腰椎间盘退变而导致的纤维环破裂、髓核突出、压迫或刺激神经根而产生的一系列以腰部酸、胀、痛感明显、坐骨神经痛、下肢麻木为主要临床表现的综合征。研究表明，此病与年龄和应力因素密切相关，随着月龄的增长，大鼠纤维环细胞的凋亡率增加，细胞数量下降，椎间盘开始退变<sup>[12]</sup>。在退变的椎间盘中，大量细胞内的白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 等炎症因子释放到细胞外，引起细胞外基质中金属蛋白酶及金属肽酶含血小板反应蛋白这两类酶的高表达<sup>[13-14]</sup>。然而，这两类酶对椎间盘细胞外基质起破坏作用，具体表现为细胞外基质中蛋白多糖、II 型胶原含量的大量丢失，I 型胶原含量增加<sup>[15]</sup>，这将导致大鼠椎间盘纤维环中的胶原纤维容易出现增生、排列紊乱等病理改变。加之静息应力和剪切力的存在，使得细胞、细胞外基质和生物力学应力这种维持椎间盘稳态的平衡作用被破坏，容易产生胶原纤维断裂和纤维环出现裂隙等细微结构的变化，极大地增加了椎间盘纤维环破裂的风险<sup>[16]</sup>。由此看来，椎间盘纤维环细胞的病理改变作为椎间盘退变的主要因素之一，对其在椎间盘退变中作用机制的研究具有十分重要的意义。

细胞焦亡早在 20 世纪 80 年代末和 90 年代初就有研究者提及，在巨噬细胞对细菌的吞噬作用中记录了一种细胞死亡的形式。然而，由于 Caspase-1 的参与，使得这种死亡方式被误认为是细胞凋亡<sup>[5]</sup>。直到将 GSDMD 作为炎症性 caspases 的磷酸化底物，才彻底改变了对焦亡的认识。GSDMD 作

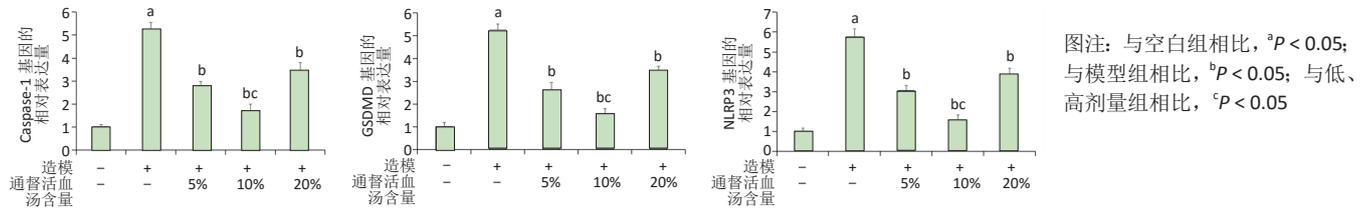
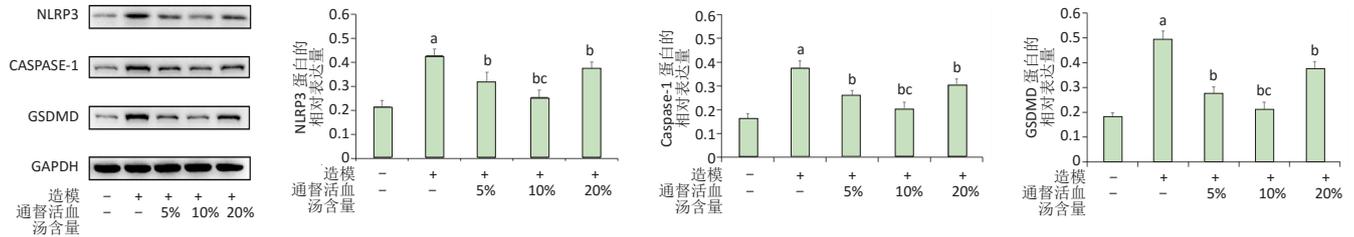


图6 | 各组细胞中半胱氨酸蛋白酶1(Caspase-1)、Gasdermin D(GSDMD)、NOD样受体蛋白3(NLRP3)基因的表达量比较  
Figure 6 | Expression levels of Caspase-1, Gasdermin D and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 genes in annulus fibrosus cells



图注: 与空白组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与低、高剂量组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$   
图7 | 各组细胞中半胱氨酸蛋白酶1(Caspase-1)、Gasdermin D(GSDMD)、NOD样受体蛋白3(NLRP3)蛋白的表达量比较  
Figure 7 | Expression levels of Caspase-1, Gasdermin D and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 proteins in annulus fibrosus cells

为打孔蛋白,其N端结构域具有破膜作用,能够将细胞内活化的炎症因子释放到细胞外,引起局部炎症反应<sup>[17]</sup>。因此,细胞焦亡被定义为一种由炎症递质介导的程序性细胞死亡信号途径<sup>[18]</sup>。与细胞凋亡不同的是,细胞焦亡与炎症反应密切相关,其具体的作用机制可能为:当细胞受到外界刺激后活化炎症小体(包括NLRP1、NLRP3、AIM2等),活化的NLRP3能够通过接头蛋白ASC活化Caspase-1。这种级联反应所产生的结果就是,一方面,被激活的Caspase-1又被称为白细胞介素的转换酶,能使白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18等炎症因子活化<sup>[19]</sup>;另一方面,活化的Caspase-1能切割GSDMD的N端和C端结构域,使释放N端结构域的片段能识别并结合胞膜上的磷脂类分子,导致细胞膜形成孔洞,最终引起细胞膜裂解,炎症因子渗出,发生细胞焦亡并伴随炎症反应的加剧<sup>[17]</sup>。因此,细胞焦亡为关节中炎症的产生和细胞的死亡提供了一种合理的解释,而且已有研究表明,脂多糖能通过刺激软骨细胞中NLRP3的表达,增强Caspase-1活性,引起细胞焦亡发生。令人鼓舞的是,已有研究者在中医药领域对细胞焦亡展开研究。例如,ZU等<sup>[20]</sup>发现,淫羊藿可通过抑制NLRP3介导的Caspase-1信号通路,减轻骨关节炎大鼠软骨细胞损伤。由此看来,从中医药领域中找出对NLRP3介导的细胞焦亡通路起抑制作用的药物可能成为治疗骨关节炎一种具有潜力的靶向疗法。此文以此为据,选用脂多糖/ATP制造纤维环细胞焦亡模型,试图找出通督活血汤治疗腰椎间盘突出症的可能作用机制。

中医学认为,腰椎间盘突出症属“痹症”“腰痛”的范畴。《素问·痹论》中记载:“风寒湿三气杂至,合而为痹”。此病多因素体精气亏虚,复感风、寒、湿之外邪,邪气积聚腰部而发病。然腰为肾之府,致其病位多在肾。肾主先天之精气,为人体元气化生之根,肾精消耗日久易使元阳亏虚,督脉为人体阳气汇聚之地,阳气不足则督脉失于濡养,出现

腰痛不可俯仰,乃至牵引腿足之症。因此,此病发病原因为肾精亏虚,痹阻督脉,治疗宜补肾通督,行气活血。此次研究所用之通督活血汤,为骨伤泰斗李同生之祖传秘方,方中选用鹿角片、金毛狗脊、杜仲以补肾益精填髓,黄芪、当归补气活血,加之苏木、泽兰叶以活血祛瘀、利尿消肿。然恐补益剂中温阳之力太过,产生热甚伤阴之象,由此选用活络剂中寒凉之品地龙、赤芍、丹参,既可活络祛瘀,又可凉血以中和药性,可谓组方严谨,用药精到。目前,已有大量研究表明,通督活血汤在治疗腰椎间盘突出症、椎管狭窄症、腰椎手术失败综合征方面临床疗效显著<sup>[21-23]</sup>,可能通过改善椎间盘局部微循环和灌注量、促进神经系统损伤的神经功能恢复、控制损伤后的炎症反应等方面起作用<sup>[24-26]</sup>。此次研究通过体外实验表明,模型组细胞上清液中白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18表达量以及细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD的表达量显著高于空白组,说明细胞中由炎症小体NLRP3介导的Caspase-1信号通路被激活,部分炎症因子释放到细胞外,这与邵峰院士研究团队揭示的细胞焦亡中相关通路的激活和细胞因子的表达结果相一致<sup>[27-28]</sup>,采用脂多糖/ATP干预椎间盘纤维环细胞能够成功制造细胞焦亡模型。含药血清各剂量组细胞上清液中白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素18表达量以及细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD的表达量均显著低于模型组,这说明通督活血汤含药血清能够通过有效抑制NLRP3介导的纤维环细胞焦亡,从而减轻腰椎间盘突出症的炎症反应。各剂量组组间比较发现,中剂量组在延缓细胞焦亡、减轻炎症反应方面疗效最佳,值得临床推广。

综上所述,此次研究表明,通督活血汤含药血清能够通过降低NLRP3炎症小体介导的Caspase-1信号通路相关细胞因子的表达量,抑制脂多糖/ATP诱导的细胞焦亡,控制炎症因子的释放,这可能是通督活血汤能有效控制腰椎间盘突出症患者炎症反应的作用机制之一。然此次研究仍存在以下

不足之处: ①实验采用SD大鼠的纤维环细胞作为观察对象, 大鼠为爬行类哺乳动物, 其椎间盘纤维环所承受的应力与人体存在明显差异, 且应力因素在此病发生和发展中起到重要作用, 下一步实验计划将采用人体纤维环细胞作为研究对象; ②此实验为体外实验, 通督活血汤在体内的作用机制有待于进一步验证; ③通督活血汤为复方, 组方中的有效成分复杂, 在细胞焦亡中具体起作用的成分有待于深入研究。

**作者贡献:** 吴子健、胡昭端、周晓红负责实验设计, 吴子健、李柏村负责实验实施, 李佳、蔡国伟、彭锐负责文章审核。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81774410)”的基金资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: 20180911055。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 本研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经湖北中医药大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] 黑龙, 赵建国, 马莉琼, 等. 腰椎间盘突出症患者突出椎间盘及相邻椎间盘退变程度的MRI分析[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016,26(9): 807-812.

[2] 马金超, 伍骥, 郑超, 等. 腰椎椎间盘退变的临床及实验室评价方法研究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2016,14(1): 53-57.

[3] CARLA C, ANA JS, PAULO P, et al. The Inflammatory Response in the Regression of Lumb-ar Disc Herniation. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1): 251.

[4] IVAN CG, TATIANA CG, GIANCARLO MP, et al. Inflammation in the Intervertebral Disc Her-niation. *Neurocirugia(Astur).* 2020;10(20): S1130-1473.

[5] SHI JJ, GAO WQ, SHAO F, et al. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(4): 245-254.

[6] 邢栋, 王焕焕, 吕勃. 细胞程序性坏死与细胞焦亡[J]. 生理科学进展, 2020,51(2):113-116.

[7] 鄢来军, 颜浪辉, 林庆宾, 等. 通督活血汤对大鼠脊髓损伤后内质网应激信号表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020,28(5):1-4+9.

[8] 蒋顺琬, 陈天宇, 麦庆春. 通督活血汤治疗腰椎手术失败综合征临床研究[J]. 中华中医药学刊, 2018,36(7):1640-1642.

[9] 黄导, 丑钢, 谢添, 等. 通督活血汤配合经皮椎弓根螺钉内固定治疗腰椎骨折[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2018,24(1):92-94.

[10] ZHAO LR, XING RL, WANG PM, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LP-S/ATP-induced pyropt-osis in knee osteoarthritis. *Mol Med Reports.* 2018;17(4):5463-5469.

[11] 纪雪霞, 郭远波, 邱倩琪, 等. 丙泊酚抑制内毒素血症中巨噬细胞发生焦亡的分子机制[J]. 南方医科大学学报, 2020,40(4):525-530.

[12] 金新蒙, 杨铁毅, 王雷. 纤维环退变机制及生物学治疗的研究综述[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2019,12(2):156-160.

[13] PURMESSUR D, WALTER BA, ROUGHLEY PJ, et al. A role for TNFa in intervertebral disc degeneration: a non-recoverable catabolic shift. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;433(1):151-156.

[14] V VO N, HARTMAN RA, YURUBE T, et al. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine.* 2013;13(3):331-341.

[15] WEILER C, SCHIETZSCH M, KIRCHNER T, et al. Age-related changes in human cervical, th-oracal and lumbar intervertebral disc exhibit a strong intra-individual correlation. *Eur Spine.* 2012;21(6):S810-818.

[16] VERGROESEN PP, KINGMA I, EMANUEL KS, et al. Mechanics and Biology in Intervertebral Disc Degeneration: A Vicious Circle. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(7):1057-1070.

[17] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Deter-mines Pyroptotic Cell Death. *Nature.* 2015;526(7575): 660-665.

[18] MIAO EA, RAJAN JV, ADEREM A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 2011;243(1):206-214.

[19] JORGENSEN I, MIAO EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev.* 2015;265(1):130-142.

[20] ZU Y, MU Y, LI Q, et al. Icarin Alleviates Osteoarthritis by Inhibiting NLRP3-mediat-ed Pyroptosis. *Orthop Surg Res.* 2019;14(1):307.

[21] 杨留志, 杨娜. 通督活血汤联合针刺治疗腰椎间盘突出症的临床研究[J]. 哈尔滨医药, 2017,37(5):472-473.

[22] 梁平, 周绍稳. 通督活血汤治疗退行性腰椎管狭窄症 112 例[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014,22(8):55-56.

[23] 王婷, 戴冀斌. 盘龙七片联合通督活血汤治疗风湿痹阻型腰椎管狭窄症临床观察[J]. 中国药业, 2019,28(2):64-66.

[24] 颜浪辉, 鄢来军, 林庆宾, 等. 通督活血汤对大鼠急性脊髓损伤后炎症反应影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(4):51-54.

[25] 吴昊, 董秋梅. 通督活血汤抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中医研究, 2016,29(1):63-65.

[26] 丁兵. 通督活血汤治疗腰椎间盘突出症的临床研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.

[27] SHI J, GAO W, SHAO F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(4):245-254.

[28] WANG K, SUN Q, ZHONG X, et al. Structural Mechanism for GSDMD Targeting by Au-toprocessed Caspases in Pyroptosis. *Cell.* 2020;180(5): 941-955.