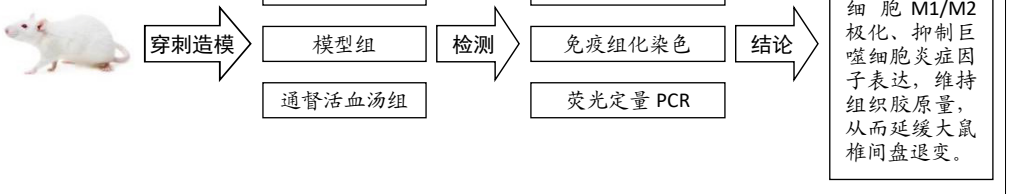
通督活血汤抑制巨噬细胞炎症延缓大鼠椎间盘退变的机制

鄢来军[1, 2]，葛海雅[2]，汪正明[2]，杨宗睿[2]，牛立峰[1]，詹红生[2]

https://doi.org/10.12307/2025.943
投稿日期：2024-09-19
采用日期：2024-12-10
修回日期：2025-02-27
在线日期：2025-03-14
中图分类号：
R459.9；R318；R681.5
文章编号：
2095-4344(2025)32-06851-07
文献标识码：A

文章快速阅读： 通督活血汤对大鼠椎间盘组织巨噬细胞相关炎症因子表达的调控作用



文题释义：

巨噬细胞： 是一种免疫细胞，可分为经典吞噬型的M1促炎型巨噬细胞和具有抗炎介导组织修复功能的M2巨噬细胞，其极化状态与多种疾病的发生发展相关。

椎间盘退变： 是由多种因素引起的椎间盘结构和功能的退变，主要包括髓核、纤维环等组成部分的结构改变，其中髓核含水量丢失及细胞外基质过度降解是椎间盘退变的主要病理特征。

摘要

背景： 腰椎间盘退变是引起下腰痛的主要病因，与免疫炎症介导的细胞外基质分解−合成代谢失衡密切相关。通督活血汤是治疗腰椎间盘退变的验方，其是否通过调控巨噬细胞极化表型抑制椎间盘组织炎症治疗腰椎间盘退变仍不清楚。

目的： 探讨通督活血汤对大鼠椎间盘组织巨噬细胞相关炎症因子表达的调控作用，及其治疗腰椎间盘退变的作用机制。

方法： 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和通督活血汤组 (*n*=8)，后两组采用纤维环穿刺法建立大鼠椎间盘退变模型，假手术组不损伤椎间盘。术后第 1 天通督活血汤组即给予 10.8 g/kg 通督活血汤灌胃，假手术组、模型组给予相同剂量的生理盐水灌胃，1 次 /d。干预 4 周后取材，采用苏木精 − 伊红染色观察大鼠椎间盘组织病理形态变化；免疫组化、qPCR 检测椎间盘组织内 CD68、CD206、白细胞介素 1β、白细胞介素 10、Ⅱ型胶原和基质金属蛋白酶 13 蛋白或 mRNA 表达水平。

结果与结论： ①苏木精−伊红染色显示，模型组椎间盘高度降低，纤维环结构紊乱且出现裂隙，髓核与纤维环分界不清；通督活血汤组大鼠椎间盘纤维环排列相对规整，髓核见皱缩；②免疫组化结果显示，相较于模型组，通督活血汤组CD68、白细胞介素1β与基质金属蛋白酶13均呈低表达，通督活血汤组CD206、Ⅱ型胶原与白细胞介素10的表达明显增加，差异有显著性意义($P < 0.05$或$P < 0.01$)；③qPCR结果显示，3组之间CD68、CD206、白细胞介素1β、基质金属蛋白酶13、Ⅱ型胶原与白细胞介素10 mRNA表达差异显著($P < 0.001$)；④结果表明，通督活血汤可改善腰椎间盘退变模型大鼠椎间盘退变，其机制与抑制退变椎间盘组织中巨噬细胞相关炎症反应有关。

关键词： 通督活血汤；椎间盘退变；髓核；巨噬细胞；炎症；机制；工程化组织构建

Mechanism by which *Tongdu Huoxue* Decoction inhibits macrophage inflammation to delay intervertebral disc degeneration in rats

Yan Laijun[1, 2], Ge Haiya[2], Wang Zhengming[2], Yang Zongrui[2], Niu Lifeng[1], Zhan Hongsheng[2]

[1]Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226000, Jiangsu Province, China; [2]Institute of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Yan Laijun, PhD, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226000, Jiangsu Province, China; Institute of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Corresponding author: Niu Lifeng, Associate chief physician, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226000, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Intervertebral disc degeneration is the main pathological factor causing low back pain, which is closely related to macrophage-mediated immune inflammation. *Tongdu Huoxue* Decoction is a proven prescription for the treatment of intervertebral disc degeneration, but it is still unclear whether it can treat intervertebral disc degeneration by regulating the polarization phenotype of macrophages to inhibit inflammation in intervertebral disc tissue.

OBJECTIVE: To investigate the regulatory effects of *Tongdu Huoxue* Decoction on the expression of macrophage-related inflammatory factors in intervertebral

[1] 南通市中医院，江苏省南通市 226000；[2] 上海中医药大学附属曙光医院骨伤研究所，上海市 201203

第一作者： 鄢来军，男，1992 年生，湖北省监利市人，汉族，博士，主要从中医药防治脊柱与骨关节炎方向的研究。

通讯作者： 牛立峰，副主任医师，南通市中医院，江苏省南通市 226000

https://orcid.org/0000-0001-9110-1701(鄢来军)

基金资助： 南通市卫生和计划生育委员会科研课题 (QA2021025)，项目负责人：鄢来军；上海市临床重点专科建设项目 (shslczdzk03901)，项目负责人：詹红生

引用本文： 鄢来军，葛海雅，汪正明，杨宗睿，牛立峰，詹红生 . 通督活血汤抑制巨噬细胞炎症延缓大鼠椎间盘退变的机制 [J]. 中国组织工程研究，2025，29(32):6851-6857.

disc tissues of rats, as well as its mechanisms for the treatment of intervertebral disc degeneration.
METHODS: Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, and *Tongdu Huoxue* Decoction group, with eight rats in each group. An intervertebral disc degeneration model was established using the annulus fibrosus puncture method in the latter two groups. On the 1st postoperative day, 10.8 g/kg *Tongdu Huoxue* Decoction was given by gavage in the *Tongdu Huoxue* Decoction group, and the same dose of saline was given by gavage in the sham operation group and the model group, once a day. After 4 weeks of intervention, histopathological changes in the intervertebral disc tissues were assessed using hematoxylin-eosin. Immunohistochemistry and quantitative real-time PCR were performed to detect the relative expression levels of CD68, CD206, interleukin 1β, interleukin 10, type II collagen, and matrix metalloproteinase 13 proteins or mRNA in the intervertebral disc tissues.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) Hematoxylin-eosin staining results revealed that the model group exhibited a significant decrease in intervertebral disc height, disorganized annulus fibrosus structure with fissures, and unclear demarcation between the nucleus pulposus and the annulus fibrosus. The *Tongdu Huoxue* Decoction group showed organized arrangement of the annulus fibrosus with pyknosis. (2) Immunohistochemical results demonstrated that, compared with the model group, the *Tongdu Huoxue* Decoction group had significantly lower expressions of CD68, interleukin 1β, and matrix metalloproteinase 13, and significantly higher expressions of CD206, type II collagen and interleukin 10 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). (3) qPCR results showed that there were significant differences in the mRNA expression of CD68, CD206, interleukin 1β, matrix metalloproteinase 13, type II collagen, and interleukin 10 between the three groups ($P < 0.001$). To conclude, *Tongdu Huoxue* Decoction can improve intervertebral disc degeneration in the rat model of intervertebral disc degeneration, and its mechanism is associated with the inhibition of macrophage-related inflammatory responses in the intervertebral discs.
Key words: *Tongdu Huoxue* Decoction; intervertebral disc degeneration; nucleus pulposus; macrophages; inflammation; mechanism; engineered tissue construction

Funding: *Nantong Municipal Health and Family Planning Commission Scientific Research Project, No. QA2021025 (to YLJ); Shanghai Clinical Key Specialty Construction Project, No. shslczdzk03901 (to ZHS)*
How to cite this article: *YAN LJ, GE HY, WANG ZM, YANG ZR, NIU LF, ZHAN HS. Mechanism by which Tongdu Huoxue Decoction inhibits macrophage inflammation to delay intervertebral disc degeneration in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(32):6851-6857.*

0 引言 Introduction

椎间盘退变是一类以椎间盘组织结构改变为特征的慢性退行性疾病[1-2]，是临床引发下腰痛的主要原因[3]。随着国内人口老龄化与社会生活节奏加快，其发病率也逐年升高，且呈现年轻化趋势[4]。椎间盘形态主要由居中的髓核与外周的纤维共同维持。生理状态下，椎间盘髓核与纤维环细胞外基质的合成和分解代谢维持着动态平衡[5]；而炎症相关细胞因子通过介导椎间盘局部炎症瀑布级联反应，刺激细胞外基质分解代谢因子基质金属蛋白酶 13 大量表达，从而抑制细胞外基质蛋白多糖及Ⅱ型胶原合成，由此引发或加重腰椎间盘退变病理进程[6]。

巨噬细胞在参与维持免疫稳态与组织的炎症过程中起着关键作用。当椎间盘纤维环破裂或板微骨折后可引发巨噬细胞局部浸润、驻留，并通过极化为不同功能表型的巨噬细胞在组织炎症中扮演重要角色[7]。如 M1 巨噬细胞通过释放如白细胞介素 1β 等促炎、趋化因子及下调白细胞介素 10 等抗炎因子表达，招募其他免疫细胞到达受损组织，刺激基质金属蛋白酶 13 等分解代谢因子的表达，同时抑制蛋白多糖和Ⅱ型胶原等合成代谢相关因子的表达，从而引发炎症反应介导细胞外基质胶原组织分解－合成代谢紊乱[8]。有研究通过细胞共培养模型发现，M1 巨噬细胞可促进促炎递质分泌、抑制细胞外基质分解，而 M2 巨噬细胞则通过促进抗炎因子表达促进细胞外基质合成，说明巨噬细胞介导的椎间盘组织慢性炎症反应与组织局部细胞外基质降解是腰椎间盘退变病理发展的重要内容[9-10]。通督活血汤是治疗腰椎间盘退变的验方，临床疗效显著[11]。研究表明，通督活血汤干预可抑制纤维环细胞炎症细胞因子表达[12]，但其是否通过调控巨噬细胞极化表型抑制椎间盘组织炎症治疗腰椎间盘退变仍不清楚。因此，通督活血汤治疗腰椎间盘退变的作用机制仍有待深入研究。此次研究旨在从体外实验探究通督活血汤防治腰椎间盘退变是否与抑制椎间盘驻留巨噬细胞相关炎症有关，现报告如下。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体内随机对照动物实验，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 6 月至 2024 年 3 月在上海中医药大学实验动物中心与上海中医药大学附属曙光医院骨伤研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 7 周龄 SD 雄性大鼠 24 只，体质量 190–220 g，由上海中医药大学实验动物中心代购自斯莱克实验动物有限责任公司，动物许可证号码：SCXF (沪)2022-0004。所有大鼠在上海中医药大学实验动物中心 SPF 级环境下饲养，每笼四五只。实验期间给予标准饲料喂养，自由饮水、进食。饲养室温度 (22±2) ℃、湿度 (50±5)%，室内环境通风，光照 12 h 明暗交替。此次实验获得上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批号：PZSHTCM211129021)，动物实验过程严格遵循《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.3.2 实验试剂 通督活血汤颗粒制剂购自上海中医药大学附属曙光医院中药房。苏木精－伊红染色试剂盒 (索莱宝)，CD68(Proteintech)，CD206(Proteintech)，白细胞介素 1β(Proteintech)，白细胞介素 10(Proteintech)、Ⅱ型胶原 (Proteintech)、基质金属蛋白酶 13 (Proteintech) 及 GAPDH (Proteintech)，免疫染色一抗稀释液 (碧云天)，免疫染色二抗稀释液 (碧云天)，通用型组织固定液 (Biosharp)，Trizol(赛默飞)，氯仿 (国药)，异丙醇 (国药)，DEPC 水 (碧云天)，PrimeScript™ RT Master Mix(TaKaRa)，PrimeScript™

RT Master Mix TaKaRa)。

1.3.3 实验仪器 石蜡切片机 (徕卡)，摊片机 (徕卡)，组织研磨仪 (上海必横)，低温离心机 (Thermo，Heraeus Fresco)，正置显微镜 (徕卡)，高速离心机 (Eppendorf)，qPCR 仪 (赛默飞)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠椎间盘退变模型建立与分组干预 适应性喂养 1 周后，将大鼠按随机数字法随机分为假手术组 (*n*=8)、模型组 (*n*=8) 和通督活血汤组 (*n*=8)。大鼠术前 12 h 禁水禁食、称体质量。予以 1.5 mL/kg 的 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，参考现有文献方法 [13]，大鼠麻醉生效后取侧卧位，碘伏消毒后铺巾，自右腹后外侧平髂棘处右侧作纵行切口，分离皮下组织，保护腹腔脏器及血管，从脊柱附着点上，缓慢剥离腰大肌，暴露 $L_{5/6}$ 椎间盘 (髂嵴平对 $L_{5/6}$ 椎间盘或 L_6 椎体)，使用 21G 注射器针头刺入纤维环，停留约 3 s。穿刺成功后检查有无脏器出血，之后逐层缝合肌肉、皮肤，切口碘伏消毒。模型组和通督活血汤组如上述方法造模，假手术组仅切开腹外侧皮肤。所有大鼠在术后 3 d 内予庆大霉素 (4×10^4 U/d) 肌注预防感染。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题	
造模目的	通过建立大鼠椎间盘退变模型，结合中药干预观察椎间盘退变病理进展以及巨噬细胞表型及炎症相关蛋白表达差异
选择动物的条件	7 周龄 SD 大鼠
模型与所研究疾病的关系	纤维环穿刺法是目前公认的制备大鼠椎间盘退变动物模型的方法。研究基于此动物模型，通过灌胃药物来评估通督活血汤治疗椎间盘退变的疗效
动物来源及品系	SD 大鼠代购自上海斯莱克实验动物有限责任公司
造模技术描述	大鼠麻醉后自右腹后外侧平髂棘处右侧作纵行切口，分离皮下组织，暴露 $L_{5/6}$ 椎间盘后使用注射器针头刺入纤维环，停留约 3 s 后拔出穿刺针
动物数量及分组方法	共 24 只大鼠适应性喂养 1 周后，随机分为假手术组、模型组和通督活血汤组 (*n*=8)。假手术组不损伤椎间盘，后两组采用纤维环穿刺法建立椎间盘退变模型。通督活血汤组大鼠在术后第 1 天即给予通督活血汤灌胃，1 次 /d，连续干预 4 周后取材；假手术组、模型组给予生理盐水灌胃，用量及用法同通督活血汤组
造模成功评价指标	造模 4 周后，通过苏木精 – 伊红染色观察大鼠椎间盘组织病理改变情况
造模后观察指标	大鼠椎间盘组织病理改变，免疫组化及 qPCR 检测椎间盘组织中Ⅱ型胶原、基质金属蛋白酶 13 及巨噬细胞炎症相关蛋白、mRNA 的表达
造模后动物处理	麻醉后处死大鼠，取目标椎间盘后动物尸体送回上海中医药大学动物实验中心统一处理
伦理委员会批准	实验方案获得上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批号：PZSHTCM211129021)

通督活血汤组成 [14]：黄芪 18 g，当归 9 g，丹参 18 g，赤芍 9 g，泽兰叶 9 g，杜仲 9 g，苏木 9 g，地龙 9 g，金毛犬脊 12 g，鹿角片 18 g。全方由上海中医药大学附属曙光医院中药制剂室提供，并经浓缩加工后制成颗粒制剂 (符合最新药典规定)，含生药量 10 g/g。按等体表面积换算，则每天灌胃 10.8 g/kg 通督活血汤。为简化计算，使用时将颗粒剂按每 6 g 溶于 100 mL 沸腾的纯水中，则大鼠每次灌胃 5 mL/ 只。通督活血汤组大鼠在术后第 1 天即给予通督活血汤灌胃，1 次 /d，连续干预 4 周后取材。假手术组、模型组给予生理盐水灌胃，用量及用法同通督活血汤组。

1.4.2 实验动物取材与指标检测 所有大鼠于末次干预结束 12 h 后，以 1.5 mL/kg 的 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后取仰卧位，平髂嵴取剥离腰大肌，取出 $L_{5/6}$ 节段椎体及 / 或椎间盘。将标记头尾方向的椎间盘组织迅速放入 40 g/L 多聚甲醛中，后续进行常规石蜡包埋及切片染色；另用手术刀截取 $L_{5/6}$ 椎间盘组织，置于 −80 ℃冰箱保存备用。

苏木精 – 伊红染色：取大鼠 L_{5-6} 组织，40 g/L 多聚甲醛固定 2 d 后换 EDTA 脱钙液，2 周后石蜡包埋制作切片。摊片后依次以二甲苯、体积分数 100%，95%，85% 和 75% 梯度乙醇水化；纯水浸洗后苏木精染液染色，水洗后 PBS 返蓝，0.5% 伊红染液染色复染。之后梯度乙醇脱水，取二甲苯透明后中性树脂、封固，后续镜下观察、拍照。

免疫组化检测椎间盘组织中巨噬细胞标记物及炎症相关因子表达：如上述步骤水化，将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中，置于高压锅中高温高压修复抗原。沸腾后连续煮 20 min 后取出冷却 15 min 至室温。PBS 浸洗后加入 1% 高碘酸，室温 10 min 以灭活内源性酶。加入一抗 CD68(1 ： 2 000)、CD206(1 ： 2 000)、白细胞介素 1β(1 ： 500)、白细胞介素 10(1 ： 500)、Ⅱ型胶原 (1 ： 1 000) 和基质金属蛋白酶 13(1 ： 500) 抗体后 4 ℃过夜，PBS 冲洗 3 次后滴加生物素标记的二抗 (1 ： 200)，室温孵育 30 min 后用 PBS 冲洗 3 次，DAB 显色 5 min 后进行苏木精复染，中性树脂封固，光镜下观察上述指标标记物的表达。采用 Image J 软件通过选取阈值计算阳性细胞面积 (Area) 与积分吸光度值 (*IA*)，按照公式即可计算平均吸光度值 = *IA*/Area，进行量化分析。

qPCR 检测 CD68、CD206、白细胞介素 1β、白细胞介素 10、Ⅱ型胶原和基质金属蛋白酶 13 mRNA 转录情况：采集大鼠 $C_{5/6}$ 椎间盘组织，采用 Trizol Reagent 提取总 RNA。参考 PrimeScript™ RT 试剂盒说明，按两步法反转录合成 cDNA。使用 TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ Kit 以标准协议扩增 cDNA，热循环条件为：95 ℃预变性 30 s 后，同条件变性 5 s，之后在 60 ℃下退火和延伸 30 s(共 40 个循环)，最后在 95 ℃下延伸 15 s，在 60 ℃下延伸 1 min 后继续在 95 ℃下延伸 15 s。以 GAPDH 作为内参分析 mRNA 相对转录表达情况，使用 $-2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算倍数变化。所用引物序列见**表 1**。

表 1 | qPCR 引物序列表
Table 1 | Primer sequences for qPCR

基因名称	上游引物 (5'–3')	下游引物 (5'–3')
CD68	TGT TGC GGA AAT ACA AGC A	GGC AGC AAG AGA GAT TGG TC
CD206	TGA TTC CGG TCG CTG TTC AA	GAA CGG AGA TGG CGC TTA GA
白细胞介素 1β	AAT GCC TCG TGC TGT CTG ACC	AGG GTG GGT GTG CCG TCT TT
白细胞介素 10	CCT CTG GAT ACA GCT GCG AC	GTA GATGCC GGG TGG TTC AA
Ⅱ型胶原	GCC CAA CTG GCA AAC AAG GAG AC	GCA GGGCCA GAA GTA CCC TGA TC
基质金属蛋白酶 13	AGC AGG TTG AGC CTG AAC TGT	GCA GCA CTG AGC CTT TTC ACC
GAPDH	ATG GGA AGC TGG TCA TCA AC	GTG GTT CAC ACC CAT CAC AA

1.5 主要观察指标 椎间盘组织病理观察结果与椎间盘组织目的基因 mRNA 转录水平。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 软件 (美国 GraphPad Software 公司) 进行统计分析与绘图。正态分布数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。*P* < 0.05 提示差异有显著性意义。文章统计学方法已经上海中医药大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 此次实验共纳入大鼠 24 只，每组 8 只。手术造模后 12 h 内 2 只大鼠死亡 (模型组与通督活血汤组各 1 只)，其余大鼠在实验期间均无死亡、下肢瘫痪或切口感染等情况发生。最终每组 7 只大鼠计入结果分析，4 只进行免疫组化检测，3 只进行 qPCR 检测。

2.2 大鼠椎间盘组织病理苏木精－伊红染色结果 **图 1** 苏木精－伊红染色结果显示，假手术组椎间盘形态完好，纤维环排列整齐，无明显断裂或紊乱迹象，髓核基本呈椭圆形、体积饱满，无明显炎症细胞浸润，上下终板厚度一致，连续性好；模型组椎间盘纤维环结构紊乱，髓核形态破碎、缩小，软骨终板变薄、不连续，髓核与纤维环分界不清晰、可见较大裂隙；通督活血汤组椎间盘组织中纤维环排列相较于模型组连续性较好，纤维环可见裂隙，髓核部分皱缩，但中央透明空腔仍存在，表明通督活血汤在一定程度上可以延缓针刺诱导的椎间盘退变。

2.3 大鼠椎间盘组织免疫组化染色结果 **图 2** 免疫组化染色结果显示，CD68 阳性和 CD206 阳性细胞均存在于模型组与通督活血汤组大鼠椎间盘组织中，呈黄褐色阳性表达。在髓核区域观察到假手术组大鼠椎间盘中Ⅱ型胶原高度表达，同时白细胞介素 1β 与白细胞介素 10 阳性染色较浅，反映了椎间盘组织内胶原结构正常，几乎不存在炎症浸润；同时，基质金属蛋白酶 13 的阳性着色区域较少，反映了大鼠椎间盘组织中分解代谢水平较低。模型组大鼠椎间盘中Ⅱ型胶原的染色平均吸光度值减少，基质金属蛋白酶 13 的染色平均吸光度值显著增加，表明椎间盘细胞外基质中胶原分解程度较高；同时可见白细胞介素 1β 染色区域扩大，提示退变椎间盘组织炎症。相较于模型组，通督活血汤组大鼠椎间盘中白细胞介素 10、Ⅱ型胶原蛋白的表达增加，白细胞介素 1β 与基质金属蛋白酶 13 的表达减少，表明通督活血汤对椎间盘组织内巨噬细胞介导的炎症因子表达具有一定的调控作用。

图 3 免疫组化定量分析结果显示，相较于假手术组，模型组椎间盘组织中 CD68 阳性染色平均吸光度值明显增加 (*P*=0.003)；与模型组相比，通督活血汤组 CD68 阳性细胞染色吸光度值较低 (*P*=0.013)。假手术组、模型组及通督活血汤组大鼠椎间盘中 CD206 阳性区平均吸光度值分别为 (0.587±0.297)%、(6.983±0.615)%、(9.938±0.656)%，组间比较差异有显著性意义 (*P* < 0.001)；假手术组、模型组及通督活血汤组大鼠椎间盘组织中Ⅱ型胶原染色平均吸光度值分别为 (54.832±11.761)%、(10.816±3.839)%、(26.565±2.276)%，组间差异有显著性意义 (*P* < 0.001)。与模型组相比，通督活血汤组大鼠椎间盘中白细胞介素 1β、基质金属蛋白酶 13 染色平均吸光度值相对较低 (*P*=0.006，*P*=0.001)；而白细胞介素 10 与Ⅱ型胶原蛋白阳性表达则显著增加 (*P*=0.024，*P* < 0.001)。

2.4 通督活血汤对巨噬细胞相关炎症相对基因表达量的影响 如**表 2** 所示，与假手术组比较，模型组与通督活血汤组椎间盘组织中 M1 巨噬细胞标志物 CD68 mRNA 表达量显著升高 (*P* < 0.001，*P*=0.002)；与模型组相比，通督活血汤组 CD68 mRNA 表达明显下调 (*P*=0.006)，CD206 mRNA 表达显著升高 (*P*=0.039)。相较于假手术组及通督活血汤组，模型组大鼠的椎间盘组织中白细胞介素 1β、基质金属蛋白酶 13 mRNA 表达量明显增加，各组间差异有显著性意义 (*P* < 0.001)；与模型组相比，通督活血汤组大鼠椎间盘组织中白细胞介素 1β 与基质金属蛋白酶 13 mRNA 表达量相对下降 (*P*=0.033，*P*=0.046)。3 组之间白细胞介素 1β 与基质金属蛋白酶 13 mRNA 转录水平差异有显著性意义 (*P* < 0.001，*P*=0.007)。与假手术组相比，模型组大鼠的椎间盘组织中白细胞介素 10 mRNA 转录水平上升 (*P*=0.032)，而Ⅱ型胶原转录水平则相对下降 (*P*=0.015)。

表 2 | 各组椎间盘巨噬细胞标记物及炎症相关基因的相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$，*n*=3)
Table 2 | Comparison of the relative expression levels of intervertebral disc macrophage markers and inflammation genes among groups

指标	假手术组	模型组	通督活血汤组
CD68	0.832±0.156	3.334±0.140[a]	2.317±0.297[ab]
CD206	0.945±0.050	1.240±0.124[a]	1.553±0.130[ab]
白细胞介素 1β	1.052±0.411	6.000±0.723[a]	3.534±1.121[ab]
白细胞介素 10	1.019±0.231	2.059±0.507[a]	4.461±0.743[ab]
Ⅱ型胶原	1.001±0.171	0.297±0.033[a]	0.527±0.091[ab]
基质金属蛋白酶 13	1.103±0.629	4.863±1.460[a]	2.431±0.198[ab]

表注：与假手术组比较，[a]*P* < 0.05；与模型组比较，[b]*P* < 0.05。

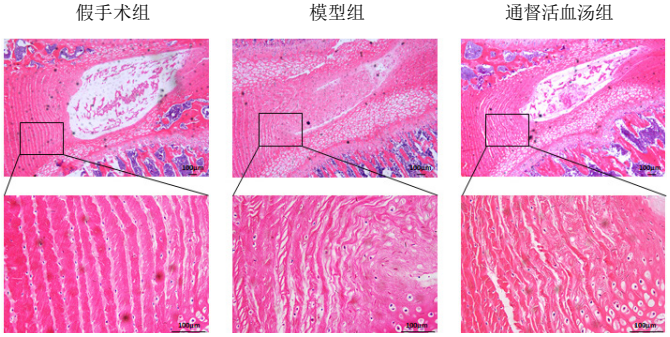


图 1 | 各组大鼠椎间盘组织苏木精－伊红染色结果

Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining of the rat intervertebral disc tissues

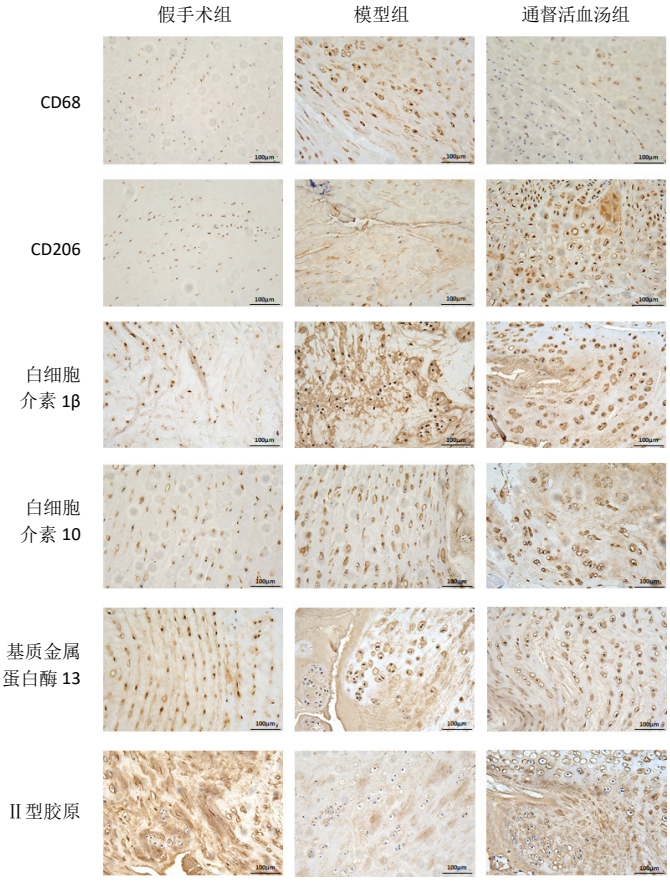


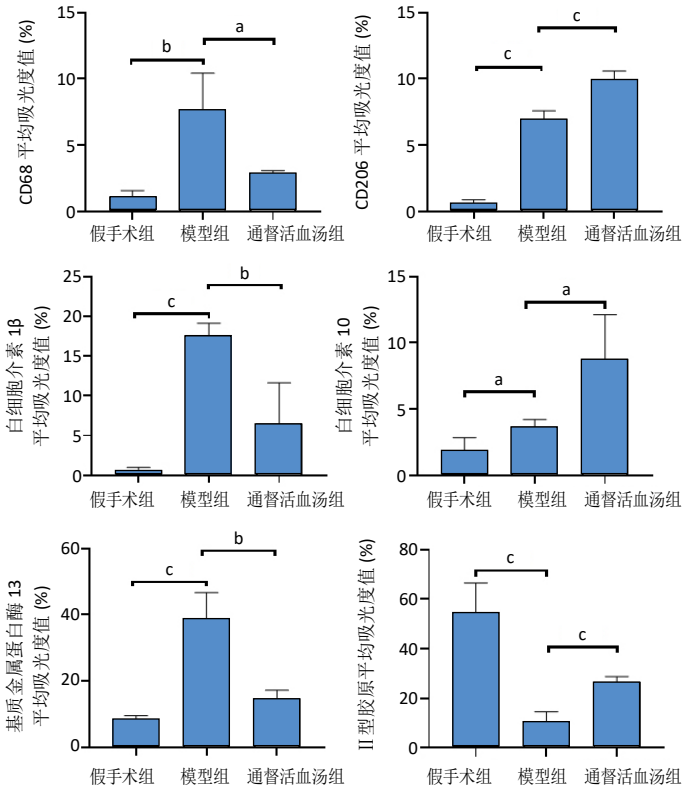
图 2 | 各组大鼠椎间盘组织免疫组化染色结果

Figure 2 | Immunohistochemical staining of the rat intervertebral disc tissues

与模型组相比，通督活血汤干预后大鼠椎间盘组织中白细胞介素 10 及 II 型胶原 mRNA 相对表达量上升 (P=0.010，P=0.046)，3 组间白细胞介素 10 及 II 型胶原 mRNA 表达水平相比差异有显著性意义 (P < 0.001，P < 0.001)。

3 讨论 Discussion

椎间盘是维持人体生物力学的主要功能单位，主要由髓核、纤维环及上下终板三部分组成。椎间盘退变与多种因素相关，一般认为应力介导的软骨终板及纤维环形态结构破坏 [15]，致使组织炎症浸润是诱发或加重腰椎间盘退变的始动因素 [16]。椎间盘中的胶原主要由 II 型胶



图注：^{a}P < 0.05，^{b}P < 0.01，^{c}P < 0.001。

图 3 | 各组大鼠椎间盘组织免疫组化染色定量分析 (n=4)

Figure 3 | Quantitative analysis of immunohistochemical staining of rat intervertebral disc tissues (n=4)

原组成，它为椎间盘提供了弹性和韧性。腰椎间盘退变的组织病理表现是以 I 型胶原的增加、同时伴随纤维排列结构的紊乱、塌陷 [17-18]，这种进程迁延日久，致使髓核、软骨终板及纤维环组织中 II 型胶原被 I 型胶原替代，一方面通过改变椎间盘生物力学引发椎体功能活动障碍 [19]；另一方面通过刺激终板神经末梢或压迫椎管神经根诱发肌肉肢体疼痛 [20-21]。

研究发现，经炎症趋化因子诱导的髓核细胞，会过表达促细胞外基质降解的基质金属蛋白酶和聚蛋白多糖，从而抑制细胞外基质中 II 型胶原合成，改变组织力学性能 [22-23]；而机械应力的增加亦会刺激基质金属蛋白酶表达，减少组织含水量，增加椎间盘压力，加快椎间盘退变 [24]。巨噬细胞是由源于骨髓前体细胞的单核细胞生成，是椎间盘炎症反应中的关键免疫细胞，其极化状态对椎间盘分解－合成代谢具有重要影响。根据表型与功能不同，可将巨噬细胞分为 M1 型与 M2 型。M1 型巨噬细胞通过产生例如白细胞介素 1β 等细胞因子参与组织炎性反应；而巨噬细胞向 M2 型极化时，则通过表达如白细胞介素 10 等抗炎细胞因子，参与组织损伤修复 [25]。一般认为，正常成年人椎间盘组织中无血管生长；而在退变椎间盘内，终板及纤维环组织结构破坏，微血管随新生的肉芽组织生长穿透纤维环及上下终板破裂间隙长入椎间盘。巨噬细胞

向 M1 极化过程中，可导致炎症因子的聚集、趋化和扩散；同时，经炎症因子诱导，外部巨噬细胞亦可募集至椎间盘组织，通过炎症因子刺激促细胞外基质分解代谢因子 (如基质金属蛋白酶等) 大量表达，致使细胞外基质分解－合成代谢失衡，促进椎间盘组织中细胞外基质的降解 [26-27]。

腰椎间盘退变属于中医“痹症”“腰痛”范畴。该病病因繁复，其证多为本虚标实之候，然临床多表现为虚实互见之证。患者或劳累久伤，或因气血虚损，以至气血瘀滞、筋骨失养，则“不通则痛”“不荣则痛”而出现相应临床症状。李同生教授是骨伤名家、湖北名老中医，其临床“损伤首重气血”辨证论治伤科诸疾，治法以活血化瘀、行气养血为主 [28]，李教授认为腰痹多累及督脉和足太阳膀胱经，其中督脉总督全身经络，而膀胱经为多气多血之经；督脉瘀滞而太阳气血不足，治以通督活血为要 [29]。通督活血汤为治疗腰痹之验方，由丹参、黄芪、当归等十余味药物组成，根据“君、臣、佐、使”的原则严密配伍，具有行气活血、通督益髓之效，临床常用于治疗气滞血瘀、督脉枢机不利之腰椎退行性疾病。全方精义在于以黄芪配芍药意在使气行则血行，伍鹿角胶、地龙、犬脊等温阳补益之品，一则为补益肝肾，二则为痛督脉之气，以增强行气化瘀之效。此次研究通过经典的纤维环穿刺法制作大鼠腰椎间盘退变动物模型，病理切片发现，相较于假手术组，模型组与通督活血汤组大鼠髓核组织与纤维环分界不清、出现消失现象，这意味着髓核的体积和形态发生改变；同时，椎间盘纤维环排列变得混乱，并且内部出现裂隙和断裂现象，这可能由于组织细胞死亡或溶解导致。在给予通督活血汤干预 4 周后，大鼠椎间盘组织较模型组在纤维环列、椎间盘高度恢复以及髓核形态等病理形态学表现上均有所改善。通督活血汤可降低作为巨噬细胞标记物的 CD68 表达，抑制巨噬细胞向 M1 极化，抑制局部炎症反应，减少细胞外基质降解，维持椎间盘胶原含量。免疫组化分析发现，针刺造模后，促炎 M1 型巨噬细胞标记物 CD68 及其炎症标记物白细胞介素 1β 在大鼠退变椎间盘内明显高表达；同时，伴随着合成代谢标志物Ⅱ型胶原表达下调，促分解代谢因子基质金属蛋白酶 13 显著增加，这提示组织椎间盘受到巨噬细胞促炎表型增多的影响，其合成与分解代谢失衡诱发腰椎间盘退变病理。而通督活血汤干预后能有效减少椎间盘组织中 M1 型标记物 CD68 以及白细胞介素 1β 的表达，从而增加组织内胶原含量。此外，qPCR 实验也证实模型组椎间盘组织中Ⅱ型胶原转录水平显著降低、基质金属蛋白酶 13 转录水平显著增加，进一步佐证了退变椎间盘组织细胞外基质分解与合成代谢失衡。相较于模型组，通督活血汤组大鼠椎间盘组织中Ⅱ型胶原 mRNA 转录明显增加，基质金属蛋白酶 13 的转录相对减少；作者观察到抗炎因子白细胞介素 10 转录水平明显上升，而白细胞介素 10 表达与巨噬细胞 M2 极化密切相关，提示通督活血汤在一定程度上可通过调控巨噬细胞向 M2 型极化促进抗炎因子的表达，以此抑制细胞外基质降解、维持椎间盘胶原含量。这与既往研究发现通督活血汤能抑制纤维环细胞焦亡，以及相关炎症的研究结果基本一致 [12，30-31]。

此次实验也存在一些不足之处：首先仅从体内动物进行实验研究，对于通督活血汤影响椎间盘组织内巨噬细胞炎症调控的作用机制分析比较浅显，后续实验可结合体外细胞实验，进一步探索通督活血汤靶向调控巨噬细胞 M2 极化相关的信号通路，阐明通督活血汤影响椎间盘极化从而维持椎间盘细胞外基质分解－合成代谢平衡的分子生物学机制；其次，此次模型采用针刺纤维环制备腰椎间盘退变模型，作为一种介入创伤因素，由此导致的椎间盘退变机制与临床病理机制可能并不完全相同 [32]；再者，通督活血汤为复方，其组方中包涵的生物活性成分复杂，具体是何种化合物在抑制巨噬细胞相关炎症中起到关键作用不清楚，仍有待于后续深入探索发掘；最后，此次研究并未设置药物低中高剂量对照组。

综上所述，通督活血汤作为治疗椎间盘退行性疾病的名方，此次研究在体内实验层次验证了巨噬细胞参与椎间盘退变的病理进展，揭示了通督活血汤通过调控椎间盘巨噬细胞极化、抑制 M1 巨噬细胞相关炎症进而延缓椎间盘退变，不仅为通督活血汤临床治疗腰椎退行性疾病提供理论支撑，也丰富了中医“活血通督”治法的理论内涵。实验初步探讨了通督活血汤对维持大鼠退变椎间盘组织结构和抑制巨噬细胞炎症相关因子表达的影响，但并未能揭示巨噬细胞极化表型转换、炎症因子表达水平与通督活血汤剂量依赖相关性以及分子调控机制，因此仍需后续开展体内外实验进一步研究。

致谢：感谢上海中医药大学动物实验中心及上海中医药大学附属曙光医院提供的实验平台。

作者贡献：实验设计、评估及统筹安排为通讯作者牛立峰与第一作者鄢来军，实验实施及结果搜集、论文撰写为第一作者鄢来军、葛海雅，数据分析及图片绘制等为作者葛海雅与汪正明，杨宗睿负责伦理申请，詹红生负责文章审校并提供技术支持。

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中不存在利益冲突。

业反剽窃文献检测系统进行3次查重。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。

4 参考文献 References

[1] WANG F, CAI F, SHI R, et al. Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. Osteoarthritis Cartilage. 2016;24(3):398-408.
[2] SAMANTA A, LUFKIN T, KRAUS P. Intervertebral disc degeneration-Current therapeutic options and challenges. Front Public Health. 2023;11:1156749.
[3] MOHD II, TEOH SL, MOHD NN, et al. Discogenic Low Back Pain: Anatomy, Pathophysiology and Treatments of Intervertebral Disc Degeneration. Int J Mol Sci. 2022;24(1):208.
[4] 郭炯炯 , 杨惠林 , 朱雪松 , 等 . 中国南方人群腰椎间盘退变的影像学和流行病学研究 [J]. 中华骨科杂志 ,2014,34(5):546-552.
[5] OICHI T, TANIGUCHI Y, OSHIMA Y, et al. Pathomechanism of intervertebral disc degeneration. JOR Spine. 2020;3(1):e1076.
[6] KANG L, ZHANG H, JIA C, et al. Epigenetic modifications of inflammation in intervertebral disc degeneration. Ageing Res Rev. 2023;87:101902.
[7] HOU Y, SHI G, GUO Y, et al. Epigenetic modulation of macrophage polarization prevents lumbar disc degeneration. Aging (Albany NY). 2020;12(8):6558-6569.
[8] PARISI L, GINI E, BACI D, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? J Immunol Res. 2018;2018:8917804.
[9] LI XC, LUO SJ, FAN W, et al. Macrophage polarization regulates intervertebral disc degeneration by modulating cell proliferation, inflammation mediator secretion, and extracellular matrix metabolism. Front Immunol. 2022;13:922173.
[10] JAMES G, SLUKA KA, BLOMSTER L, et al. Macrophage polarization contributes to local inflammation and structural change in the multifidus muscle after intervertebral disc injury. Eur Spine J. 2018;27(8):1744-1756.
[11] 熊雨墨 , 李梓宸 , 李瑛 , 等 . 通督活血汤对腰椎间盘突出症急性期患者腰椎功能及血清炎症因子水平的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志 ,2024,30(13):135-141.
[12] 吴子健 , 胡昭端 , 周晓红 , 等 . 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.
[13] 廖瑶 , 涂婷 , 曾惜羽 , 等 . 瑞芬太尼对椎间盘退变模型大鼠椎间盘的影响及机制 [J]. 重庆医科大学学报 ,2023,48(7):760-764.
[14] 李强 , 汤耿民 . 通督活血汤治疗退行性腰椎管狭窄症 [J]. 中国中医骨伤科杂志 ,1990,6(3):19-21.
[15] 孙尚 , 赵振达 , 蒋媛 , 等 . 力学刺激在椎体软骨终板退变中的作用及机制 [J]. 医用生物力学 ,2021,36(4):652-657.
[16] VELNAR T, GRADISNIK L. Endplate role in the degenerative disc disease: A brief review. World J Clin Cases. 2023;11(1):17-29.
[17] VOELKER A, SCHROETER F, STEINKE H, et al. Degeneration of the lumbar spine and its relation to the expression of collagen and elastin in facet joint capsules and ligament flavum. Acta Orthop Traumatol Turc. 2022;56(3):210-216.
[18] NEWTON MD, MAREK AA, PLANALP M, et al. Longitudinal characterization of intervertebral disc remodeling following acute annular injury in a rat model of degenerative disc disease. Connect Tissue Res. 2020;61(6):568-576.
[19] HÖFLSAUER S, BONNAIRE FC, BAMBERGER CE, et al. Changes in stiffness of the extracellular and pericellular matrix in the anulus fibrosus of lumbar intervertebral discs over the course of degeneration. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:1006615.
[20] RISBUD MV, SHAPIRO IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. Nat Rev Rheumatol. 2014;10(1):44-56.
[21] VERWOERD AJ, PEUL WC, WILLEMSEN SP, et al. Diagnostic accuracy of history taking to assess lumbosacral nerve root compression. Spine J. 2014;14(9):2028-2037.
[22] YU ZG, XU N, WANG WB, et al. Interleukin-1 inhibits Sox9 and collagen type II expression via nuclear factor-kappaB in the cultured human intervertebral disc cells. Chin Med J (Engl). 2009;122(20):2483-2488.
[23] WANG Y, CHE M, XIN J, et al. The role of IL-1β and TNF-α in intervertebral disc degeneration. Biomed Pharmacother. 2020;131:110660.
[24] SHI S, KANG XJ, ZHOU Z, et al. Excessive mechanical stress-induced intervertebral disc degeneration is related to Piezo1 overexpression triggering the imbalance of autophagy/apoptosis in human nucleus pulpous. Arthritis Res Ther. 2022;24(1):119.
[25] YUNNA C, MENGRU H, LEI W, et al. Macrophage M1/M2 polarization. Eur J Pharmacol. 2020;877:173090.
[26] 朱健 , 孙凯强 , 史建刚 . 巨噬细胞与椎间盘退变的研究进展 [J]. 第二军医大学学报 ,2019,40(12):1350-1355.
[27] YANG H, LIU B, LIU Y, et al. Secreted Factors from Intervertebral Disc Cells and Infiltrating Macrophages Promote Degenerated Intervertebral Disc Catabolism. Spine (Phila Pa 1976). 2019;44(9):E520-E529.
[28] 张艺翊 , 何伟 . 基于数据挖掘探讨名老中医李同生治疗退变性腰椎管狭窄症的用药规律 [J]. 湖北中医杂志 ,2022,44(2):59-63.
[29] 何伟 , 李博宁 . 李同生名老中医治疗腰椎管狭窄症经验总结 [J]. 中国中医骨伤科杂志 ,2015,23(11):67-69.
[30] 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.
[31] 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.
[32] HE S, ZHANG Y, ZHOU Z, et al. Similarity and difference between aging and puncture-induced intervertebral disc degeneration. J Orthop Res. 2022;40(11):2565-2575.

(责任编辑：GD，ZN，WL，LCH)