

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.16.012

舒筋健腰丸对腰椎黄韧带纤维化模型大鼠 黄韧带中巨噬细胞 M1/M2 极化的影响

冯蓬¹, 高春雨¹, 李路广¹, 李建国¹, 高景华¹, 刘海英²✉

1. 中国中医科学院望京医院, 北京市朝阳区望京中环南路6号, 100020; 2. 广州白云山陈李济药厂有限公司

[摘要] **目的** 探讨舒筋健腰丸对腰椎黄韧带纤维化的影响及可能作用机制。**方法** 将30只SD大鼠随机分为正常组、模型组、阴性对照组、阳性对照组和舒筋健腰丸组, 每组6只。除正常组外其余各组大鼠均采用腰椎失稳损伤法建立大鼠黄韧带纤维化模型。造模手术后72 h开始, 舒筋健腰丸组给予舒筋健腰丸1.5 g/(kg·d)灌胃, 其余各组给予生理盐水30 ml/(kg·d)灌胃, 每日1次, 持续8周。阴性对照组和阳性对照组灌胃的同时, 分别于造模后即刻、2周、4周和6周于原切口皮下注射5 mg/ml PBS脂质体0.5 ml和5 mg/ml 氯磷酸二钠脂质体0.5 ml。采用Masson染色观察大鼠黄韧带病理学情况, 计算胶原容积分数(CVF), 采用免疫组化染色法检测黄韧带中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体(F4/80)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)蛋白表达, 采用免疫荧光双标法检测黄韧带M2巨噬细胞标记物F4/80和TGF- β_1 表达。**结果** 与正常组相比, 模型组、阴性对照组和舒筋健腰丸组Masson染色可见弹性纤维不同程度断裂, 胶原纤维不同程度堆积, CVF显著升高, 腰椎黄韧带iNOS、TNF- α 、F4/80和TGF- β_1 表达显著增多($P<0.01$); 与模型组相比, 阳性对照组和舒筋健腰丸组胶原纤维堆积均减少, 胶原纤维和弹性纤维交联松散, CVF显著降低, 阳性对照组iNOS、TNF- α 、F4/80和TGF- β_1 表达显著减少, 舒筋健腰丸组iNOS表达显著增多, TNF- α 、F4/80和TGF- β_1 表达显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与阳性对照组相比, 舒筋健腰丸组胶原纤维堆积相对较多, CVF显著升高, 腰椎黄韧带iNOS、TNF- α 、F4/80和TGF- β_1 表达均显著增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。免疫荧光结果显示, 正常组和阳性对照组均未见F4/80与TGF- β_1 表达, 模型组F4/80与TGF- β_1 大量表达并共定位, 舒筋健腰丸组可见较多F4/80表达, 但TGF- β_1 表达较少。**结论** 舒筋健腰丸能够抑制大鼠黄韧带纤维化进展, 影响纤维化黄韧带中巨噬细胞的M1/M2极化平衡, 使极化向M1类型偏移, 并抑制M2巨噬细胞旁分泌纤维化关键因子TGF- β_1 , 发挥抗黄韧带纤维化作用。

[关键词] 黄韧带肥厚; 黄韧带纤维化; 腰椎; 巨噬细胞极化; 舒筋健腰丸

腰椎管狭窄症(lumbar spinal canal stenosis, LSCS)是常见的脊柱退行性疾病, 引发腰腿疼痛和活动功能受限。黄韧带是覆盖椎管后壁和侧壁的一种弹性韧带, 紧贴硬膜囊并邻近神经根, 其增厚能够挤压有限的椎管空间, 引发腰痛和间歇性跛行, 被认为是LSCS的重要致病因素之一^[1]。黄韧带肥厚的本质病理改变为纤维化, 过度的细胞外基质堆积会导致黄韧带纤维化从而增厚, 椎管继发狭窄, 可以压缩50%~80%的腰椎管有效容积, 是重

要的脊柱手术适应症之一^[2,3]。巨噬细胞是免疫细胞, 在发育、修复、组织稳态和宿主防御方面具有多种功能, 是纤维化病理改变的重要调控者^[4]。巨噬细胞主要表现为经典活化的M1型和替代活化的M2型, 两种类型的巨噬细胞可因微环境改变而相互转化, 共同维持机体稳态^[5]。现有证据表明, 黄韧带中巨噬细胞的极化平衡对减轻成纤维细胞刺激和黄韧带细胞外基质堆积具有重要意义^[6]。

舒筋健腰丸是上市药物, 临床应用多年, 具有补益肝肾、强健筋骨、祛风除湿、活络止痛的功效。临床研究^[7]表明, 舒筋健腰丸能够显著降低

基金项目: 中国中医科学院望京医院院级科研课题(2021-HX-7)

✉ 通讯作者: 49936228@qq.com

腰椎管狭窄症患者的腰腿疼痛评分,改善患者的运动功能。前期开展的前瞻性、大样本、多中心的安全性评价表明舒筋健腰丸单独使用或联合用药均具有极低的不良反应发生率,这使得其临床应用有了更加可靠的循证依据^[8]。然而,舒筋健腰丸成分较为复杂,其干预腰椎管狭窄症的机制尚未明确。因此,本研究从巨噬细胞极化角度探讨舒筋健腰丸对腰椎黄韧带纤维化的干预作用,为其临床应用提供实验依据。本研究通过北京隆安实验动物伦理委员会审查(伦理批号:BJLongan-L-L-003)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,8 周龄,体质量 220~250 g,购于北京隆安实验动物养殖中心,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2017-0005,饲养于中国中医科学院基础理论研究所,保持通风良好,温度 20~25℃,湿度 40%~50%,光照 12 h 与黑暗 12 h 交替循环,自由进食水。所有动物均适应性饲养 1 周。

1.2 药物

舒筋健腰丸(广州陈李济药厂,规格:120 g/瓶,批号:20210112),组成:狗脊、金樱子、鸡血藤、千斤拔、黑老虎、牛大力、女贞子、桑寄生、菟丝子、延胡索、两面针、乳香、没药,药物为浓缩水蜜丸。丸剂经过 4℃、24 h 蒸馏水密封浸泡,后经充分搅拌,制成含药浓度为 0.05 g/ml 的混悬液,所有药液均在使用前 24 h 配置并于 4℃冰箱保存。氯磷酸二钠脂质体(荷兰 LIPOSOMA 公司,货号:C-005)。头孢呋辛钠(北京索莱宝科技有限公司,货号:C7340)。

1.3 主要试剂及仪器

中性甲醛(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0099);10%EDTA、苏木素染液、伊红染液、Weiger 铁苏木素 A/B 液、丽春红酸性品红染液、磷钼酸溶液、苯胺蓝染液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为 E1171、G1080、G1100、G1142、P0012、P9220、G3665);EDTA (pH 8.0) 抗原修复液、柠檬酸(pH 6.0)抗原修复液、PBS 缓冲液、牛血清白蛋白(BSA)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 兔单克隆抗体、小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体(F4/80)兔多克隆抗体、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 兔单克隆抗体、山羊抗兔二抗、DAB 显色试剂盒、DAPI

染色试剂、抗荧光淬灭封片剂、组化笔(Service-bio 公司,货号分别为 G1206、G1202、G0002、G5001、GB13028、GB11027、GB11119、GB11188、G1213、G1212、G1012、G1401、G6100);PBS 脂质体(荷兰 LIPOSOMA 公司,货号 C-005)。

石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号:RM2235);脱水机(意大利 DIAPATH 公司,型号:Donatello);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);脱色摇床、涡旋混合器、掌上离心机(武汉赛维尔公司,型号:TSY-B, MX-F, D1008E);正置荧光显微镜(日本尼康公司,型号:Nikon Eclipse C1)。

1.4 动物造模及评价

大鼠腰椎黄韧带纤维化模型采用持续腰椎失稳微损伤法^[9]:完全切除大鼠 L5 和 L6 棘突,磨削双侧 L5/6 小关节,切除整个 L5—L6 椎旁肌,直至椎板暴露,随后缝合切口。术后大鼠自由摄食、摄水,术后给予连续 3 日腹腔注射头孢呋辛钠 10 mg/(kg·d) 抗感染处理,8 周后进行模型评价。取大鼠 L5/6 节段,沿水平位垂直切片制作石蜡组织切片,利用 Masson 染色,计算大鼠黄韧带胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。模型评价标准:CVF 显著增高(CVF>30%),黄韧带组织结构紊乱^[9]。

1.5 分组及给药

采用随机数表法将 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、阴性对照组、阳性对照组和舒筋健腰丸组,每组 6 只。除正常组外,其余各组大鼠均建立腰椎黄韧带纤维化模型。各组于造模手术后 72 h 开始灌胃,舒筋健腰丸组给予舒筋健腰丸混悬液 1.5 g/(kg·d) 灌胃,灌胃剂量为按照人与大鼠体表面积关系^[10]换算出大鼠等效剂量,其余各组大鼠均灌胃生理盐水 30 ml/(kg·d),每日 1 次,持续 8 周。阴性对照组和阳性对照组灌胃等量生理盐水的同时,分别于造模后即刻、2 周、4 周和 6 周于原切口皮下注射 5 mg/ml PBS 脂质体 0.5 ml 和 5 mg/ml 氯磷酸二钠脂质体 0.5 ml。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 Masson 染色观察黄韧带病理情况 灌胃结束后次日取材,分离大鼠腰椎 L5/6 节段,将大鼠腰椎组织固定、脱钙、切开(去除脊柱前柱部分)、脱水、包埋和切片。Masson 染色:切片水化后,Weigert 铁苏木素染液染色 5 min,盐酸分化 2 s 至返蓝,双蒸水冲洗,丽春红品红染色液染色 15 min,磷钼酸溶液洗 3 min,苯胺蓝染液中染色 3 min,冰

醋酸洗 1 min, 脱水, 透明, 中性树胶封固。显微镜下观察, 将同等放大倍数的镜下图像导出, 采用 Image J (V1. 8. 0. 112) 软件测量。每组随机选取 3 张 Masson 染色图片测算 CVF 并取平均值。

1. 6. 2 免疫组织化学法检测黄韧带 iNOS、TNF- α 、F4/80 和 TGF- β_1 蛋白表达 黄韧带石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复后, 室温封闭 30 min, 在切片上滴加 iNOS、TNF- α 、F4/80 和 TGF- β_1 一抗 (均为 1: 1000), 切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1: 200) 室温孵育 50 min, DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 随后脱水封片, 置于白光显微镜下进行结果判读。

1. 6. 3 免疫荧光双标法检测黄韧带 M2 巨噬细胞标记物 F4/80 和 TGF- β_1 表达 石蜡切片脱蜡至水, 组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 8. 0) 的修复盒中于微波炉内进行抗原修复, 用组化笔在组织周围画圈, 滴加 BSA, 封闭 30 min。轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加 F4/80 和 TGF- β_1 一抗 (均为 1: 1000), 4 °C 孵育过夜。随后滴加二抗 (1: 200), 避光室温孵育 50 min。DAPI 复染细胞核, 抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下扫描拍照, 使用 Image J (V1. 8. 0. 112) 软件统计分析荧光面积。

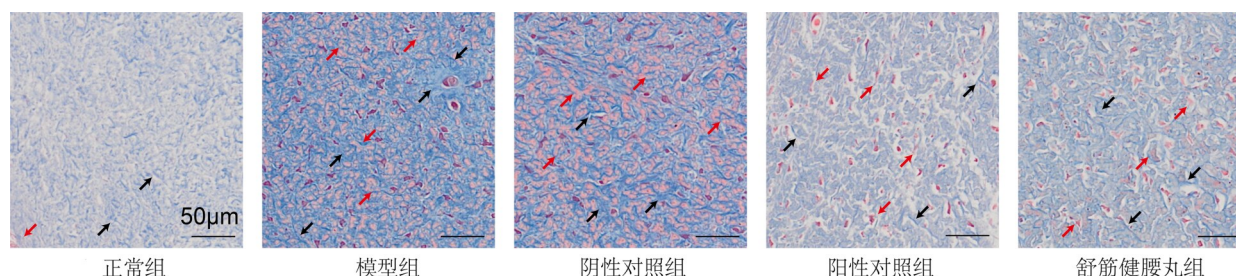
1. 7 统计学方法

采用 SPSS 21. 0 软件处理实验数据。本研究数据均符合正态分布, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。方差齐时多组比较运用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, 方差不齐则多组比较运用 Tamhane's T2 检验, 两两比较使用 Dunnett's *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0. 05$ 。

2 结果

2. 1 各组大鼠腰椎黄韧带病理情况及其 CVF 比较

Masson 染色切片中, 含有胶原纤维的结构呈



注: 图中蓝色为胶原纤维 (黑色箭头所指), 红色为弹性纤维 (红色箭头所指)。

图 1 各组大鼠腰椎黄韧带组织病理学表现 (Masson 染色, $\times 400$)

Figure 1 Histopathology of lumbar ligamentum flavum in rats in each group (Masson, $\times 400$)

蓝色, 弹性纤维呈红色。图 1 示, 正常组蓝色胶原纤维染色整体较浅, 弹性纤维和胶原纤维排列规则、整齐, 未见大量断裂和扭曲, 未见炎性细胞浸润。模型组和阴性对照组蓝色胶原纤维染色整体较深, 胶原纤维堆积较正常组明显增多, 胶原纤维和弹性纤维交联紧密, 同时可见其弹性纤维直径粗细不均, 排列紊乱, 纤维断裂、扭曲, 韧带结构变形, 伴随炎性细胞浸润。阳性对照组和舒筋健腰丸组蓝色胶原纤维染色整体均较浅, 胶原纤维堆积较模型组明显减少, 胶原纤维和弹性纤维交联松散, 同时可见弹性纤维扭曲、断裂, 未见炎性细胞浸润。舒筋健腰丸组与阳性对照组相比蓝色胶原纤维染色更深, 胶原纤维堆积相对增多。表 1 示, 与正常组相比, 模型组、阴性对照组及舒筋健腰丸组 CVF 显著升高 ($P<0. 01$); 与模型组相比, 阴性对照组 CVF 差异无统计学意义 ($P>0. 05$), 阳性对照组和舒筋健腰丸组 CVF 显著降低 ($P<0. 05$); 与阳性对照组相比, 舒筋健腰丸组 CVF 显著升高 ($P<0. 05$)。

表 1 各组大鼠黄韧带组织胶原容积分数 (CVF) 比较

Table 1 Collagen Volume Fraction (CVF) of ligamentum flavum in each group ($\%$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CVF
正常组	6	17. 13 $\pm$ 1. 55
模型组	6	39. 06 $\pm$ 4. 03 ^{a)}
阴性对照组	6	40. 07 $\pm$ 4. 09 ^{a)}
阳性对照组	6	24. 95 $\pm$ 2. 71 ^{b)}
舒筋健腰丸组	6	32. 66 $\pm$ 3. 71 ^{a) b) c)}

注: a) 与正常组比较, $P<0. 01$; b) 与模型组比较; $P<0. 05$; c) 与阳性对照组比较, $P<0. 05$ 。

2. 2 各组大鼠腰椎黄韧带 iNOS、TNF- α 、F4/80 和 TGF- β_1 蛋白表达比较

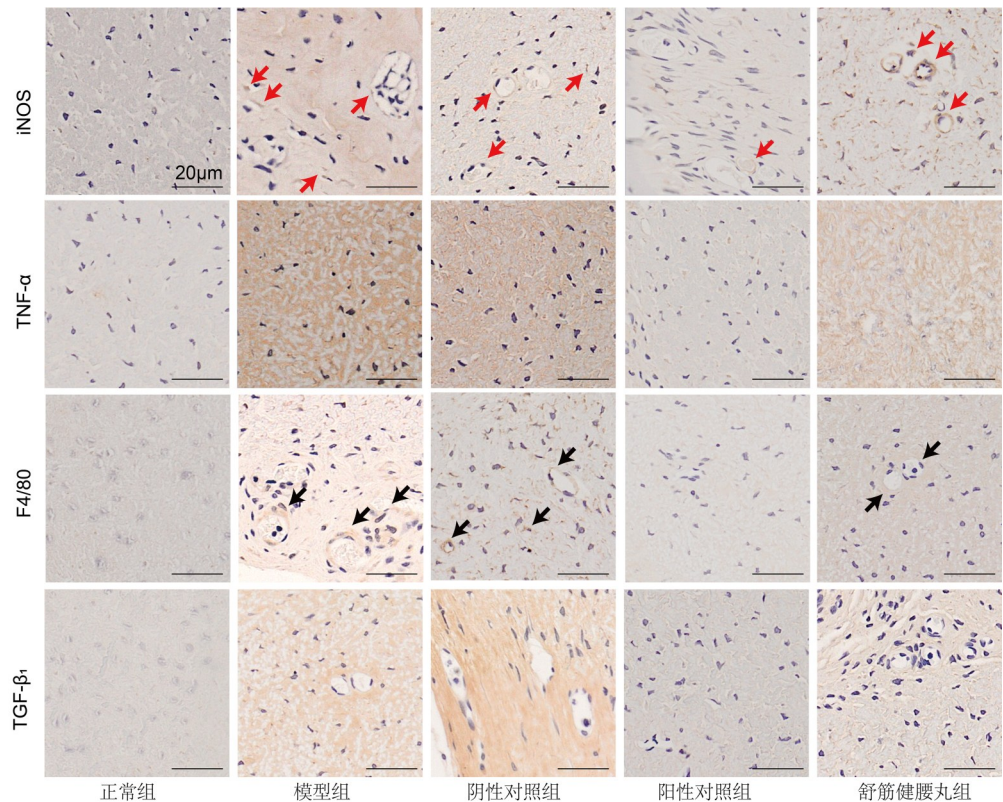
图 2 示, 正常组光镜下未观察到 iNOS、TNF- α 、F4/80 和 TGF- β_1 蛋白表达; 模型组和阴性对照组均在光镜下观察到 iNOS、TNF- α 、F4/80 和 TGF- β_1 蛋

白表达，其中 iNOS 主要定位于 M1 巨噬细胞胞质中，TNF-α 和 TGF-β₁ 主要定位于细胞外基质，F4/80 主要定位在 M2 巨噬细胞细胞膜；阳性对照组光镜下观察到 iNOS 少量表达，未见 TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 蛋白表达；舒筋健腰丸组也可以观察到 iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 蛋白表达。表 2 示，与正常组比较，模型组 iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 表达显著增多 ($P<0.01$)；与模型组比较，阴性对照组 iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)，阳性对照组中 iNOS、

TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 表达显著减少，舒筋健腰丸组中 iNOS 表达显著增多，TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 表达显著减少 ($P<0.01$)；与阳性对照组比较，舒筋健腰丸组中 iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 表达均显著增多 ($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠腰椎黄韧带 F4/80 与 TGF-β₁ 荧光共定位结果

免疫荧光染色图中，蓝色为 DAPI 细胞核染色，绿色为 F4/80 染色，红色为 TGF-β₁ 染色。图 3 示，正常组和阳性对照组均未见 F4/80 与 TGF-β₁ 表达；



注：iNOS，诱导型一氧化氮合酶；TNF-α，肿瘤坏死因子α；F4/80，小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体；TGF-β₁，转化生长因子β₁；红色箭头代表 iNOS 表达定位，黑色箭头代表 F4/80 表达定位，TNF-α 和 TGF-β₁ 定位在细胞外基质中。

图 2 各组大鼠黄韧带中 iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 染色结果（免疫组化法，×400）

Figure 2 Immunohistochemical staining results of iNOS, TNF-α, F4/80 and TGF-β₁ in the ligamentum flavum of rats in each group (immunohistochemical staining, ×400)

表 2 各组大鼠黄韧带组织中 iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 蛋白水平比较

Table 2 Comparison of iNOS, TNF-α, F4/80 and TGF-β ₁ protein levels in ligamentum flavum tissue of rats in each group (IOD/Area, $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	iNOS	TNF-α	F4/80	TGF-β ₁
正常组	6	0.0114±0.0018	0.0029±0.0006	0.0024±0.0009	0.0119±0.0012
模型组	6	0.0211±0.0015 ^{a)}	0.0471±0.0017 ^{a)}	0.0401±0.0029 ^{a)}	0.0510±0.0051 ^{a)}
阴性对照组	6	0.0220±0.0013	0.0469±0.0011	0.0411±0.0021	0.0519±0.0067
阳性对照组	6	0.0091±0.0003 ^{b)}	0.0009±0.0002 ^{b)}	0.0074±0.0003 ^{b)}	0.0094±0.0008 ^{b)}
舒筋健腰丸组	6	0.0414±0.0201 ^{b)c)}	0.0201±0.0013 ^{b)c)}	0.0256±0.0311 ^{b)c)}	0.0400±0.0107 ^{b)c)}

注：iNOS，诱导型一氧化氮合酶；TNF-α，肿瘤坏死因子α；F4/80，小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体；TGF-β₁：转化生长因子β₁。
 a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与阳性对照组比较， $P<0.01$ 。

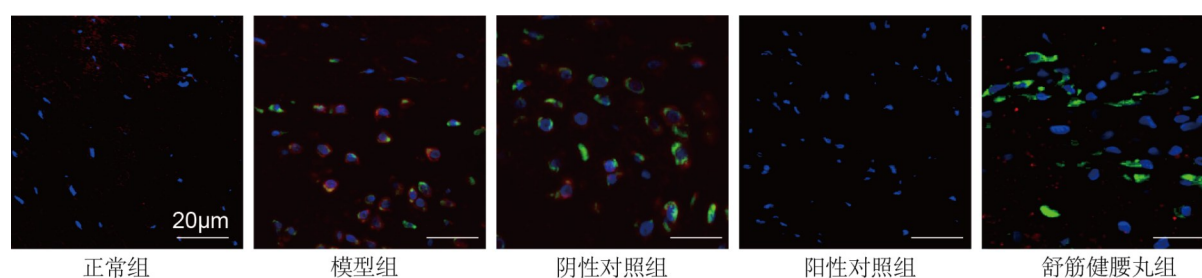


图3 各组大鼠黄韧带小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体 (F4/80) 和转化生长因子β1 (TGF-β1) 免疫荧光双标共定位结果 (×400)

Figure 3 Colocalization analysis of F4/80 and TGF-β1 double-immunofluorescence in ligamentum flavum of rats in each group (×400)

模型组和阴性对照组中可见 F4/80 与 TGF-β₁ 大量表达并共定位, M2 巨噬细胞的浸润呈局部聚集性, 细胞核大而圆, TGF-β₁ 主要表达在 M2 巨噬细胞细胞质和细胞外基质中; 舒筋健腰丸组可见较多 F4/80 表达, 但 TGF-β₁ 表达较少。

3 讨论

根据黄韧带肥厚腰椎管狭窄症临床症状, 可将其归于中医学“腰腿痛”“腰痛病”“痹证”等。本团队认为, “阳化气”不足和“阴成形”太过是黄韧带肥厚腰椎管狭窄症的中医发病机制^[11]。《素问·阴阳应象大论篇》曰:“故积阳为天, 积阴为地。阴静阳躁, 阳生阴长, 阳杀阴藏。阳化气, 阴成形”。LSCS 多见于老年患者, 这是因为人身之阳气随着年龄增大由盛转衰, 失去了原有的推动、固摄、营养和温煦作用, 腰部筋脉随之迟缓而易感邪气, 无法有效发挥固定骨骼、运动和抵御外邪的作用; 加之“阴”相对偏盛, 风寒湿积聚, 使功能性病变逐渐发展为有形的病理产物堆积, 进一步阻碍阳气运行。因此, 在治疗上应以扶阳抑阴为 LSCS 的总体治疗原则。舒筋健腰丸多用补肝肾、强腰膝的狗脊、女贞子、桑寄生、牛大力和菟丝子, 固护肝肾之本, 强筋活络; 利用行气活血止痛的鸡血藤、延胡索、黑老虎、乳香和没药疏通经络; 利用祛风湿止痹痛的千斤拔和两面针, 驱散风寒湿邪气。诸药协同而作, 共同发挥补益肝肾, 强健筋骨, 驱风除湿, 活络止痛的作用。

从 Masson 染色结果和 CVF 值可以看出, 舒筋健腰丸能够显著降低大鼠持续微损伤黄韧带的胶原纤维的堆积, 使胶原纤维和弹性纤维交联松散, 显著降低模型大鼠黄韧带持续微损伤所造成的 CVF 升高。因此, 舒筋健腰丸能够一定程度上抑制大鼠黄韧带纤维化的进展, 抑制黄韧带病理产物的持续堆积, 抑制弹性纤维和胶原纤维过度交联。巨噬细

胞的极化是一个多因素的过程, 通常将巨噬细胞的极化类型分为 M1 型和 M2 型, 两种类型在一定条件下可相互转化, 其中与组织重塑相关的主要是 M2 巨噬细胞^[12-13], 其能够释放纤维化中心介质 TGF-β₁ 以促进成纤维细胞分泌细胞外基质, 促进组织瘢痕愈合, 诱导纤维化发生^[14-15]。iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 是常用的巨噬细胞标志物, 当单核细胞向 M2 类型极化时, F4/80 表达显著增加并定位于细胞膜, 而对应 iNOS 表达减少, TGF-β₁ 表达增加; 当单核细胞向 M1 类型极化时, iNOS 则会表达增加并定位于细胞质中, 而对应 F4/80 表达会减少, TNF-α 表达增加^[16]。因此, iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 常用于分别表征两种巨噬细胞活性和位置。在免疫组化和免疫荧光结果中, 舒筋健腰丸能显著增加大鼠微损伤黄韧带中 iNOS 表达, 降低 F4/80 表达, 抑制 TNF-α 和 TGF-β₁ 表达, 提示舒筋健腰丸能够显著抑制 F4/80, 减少巨噬细胞向 M2 类型极化, 抑制 TGF-β₁ 的表达; 同时, 增加 iNOS 表达, 促进向 M1 类型极化并减少 TNF-α 表达, 改变了微损伤黄韧带中的巨噬细胞极化平衡, 最终降低细胞外基质的堆积和重塑, 降低纤维化程度。这表明, 舒筋健腰丸对大鼠微损伤黄韧带的调控作用可能主要作用于巨噬细胞, 而后间接对成纤维细胞的细胞外基质分泌产生调控作用。

巨噬细胞的耗竭是研究巨噬细胞功能的重要研究方法, 本研究所用的阳性药物氯磷酸二钠脂质体可以利用巨噬细胞内吞机制, 将脂质体包裹的氯磷酸二钠带入细胞内, 利用“特洛伊木马机制”达到去除巨噬细胞的目的, 同时利用 PBS 脂质体作为阴性对照以排除脂质体外壳对实验的混杂干扰^[17]。本结果表明, 舒筋健腰丸组与阳性对照组均可见弹性纤维扭曲、断裂, 但与阳性对照组比较, 舒筋健腰丸组胶原纤维染色相对较深, CVF 显著增高, iNOS、TNF-α、F4/80 和 TGF-β₁ 蛋白均显著增加。

这表明舒筋健腰丸组的抑制微损伤黄韧带纤维化的能力不及氯磷酸二钠脂质体。但氯磷酸二钠脂质体会使得组织损伤区域脱离免疫细胞的监控,这有可能带来更为严重的免疫和组织修复问题^[18]。舒筋健腰丸的抑制细胞外基质堆积的能力虽不及氯磷酸二钠脂质体,但不存在免疫破坏和严重的不良反应,临床应用较为安全^[8]。在免疫组化和免疫荧光研究中,氯磷酸二钠极大地抑制了TGF- β_1 的表达,这将有可能会损害TGF- β_1 的其他有益作用,而舒筋健腰丸对TGF- β_1 表达的抑制较弱,保留了其继续发挥有益功能的可能性。同时阴性对照组胶原纤维染色深而多,胶原纤维和弹性纤维交联紧密,可见弹性纤维纤维断裂、扭曲,排列紊乱,韧带结构变形,与模型组结果基本一致;CVF值及iNOS、TNF- α 、F4/80、TGF- β_1 蛋白与模型组相比也未见显著差异,表明脂质体外壳没有显著的药理学作用,排除了其对微损伤黄韧带修复的影响。

综上所述,舒筋健腰丸能够抑制大鼠黄韧带纤维化进展,影响黄韧带中巨噬细胞的M1/M2极化平衡,使极化向M1类型偏移,并抑制M2巨噬细胞旁分泌纤维化关键因子TGF- β_1 ,发挥抗黄韧带纤维化作用。然而,本研究具有一定的局限性,如未对舒筋健腰丸调控巨噬细胞旁分泌TGF- β_1 和TNF- α 进行机制探索,需要进一步深入研究。

利益冲突声明

本研究由广州白云山陈李济药厂有限公司提供药理学实验相关经费。

参考文献

- [1]YOSHIDA M, SHIMA K, TANIGUCHI Y, et al. Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. Pathogenesis and morphologic and immunohistochemical observation [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1992, 17(11): 1353-1360.
- [2]MACK M. Inflammation and fibrosis [J]. Matrix Biol, 2018, 68-69: 106-121. doi: 10.1016/j.matbio. 2017. 11. 010.
- [3]YABE Y, HAGIWARA Y, TSUCHIYA M, et al. Decreased elastic fibers and increased proteoglycans in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis [J]. J Orthop Res, 2016, 34(7): 1241-1247.
- [4]DAVIES LC, JENKINS SJ, ALLEN JE, et al. Tissue-resident macrophages [J]. Nat Immunol, 2013, 14(10):

- 986-995.
- [5]YUNNA C, MENGROU H, LEI W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 877: 173090. doi: 10.1016/j.ejphar. 2020. 173090.
- [6]SAITO T, HARA M, KUMAMARU H, et al. Macrophage infiltration is a causative factor for ligamentum flavum hypertrophy through the activation of collagen production in fibroblasts [J]. Am J Pathol, 2017, 187(12): 2831-2840.
- [7]王宝剑, 高景华, 高春雨, 等. 舒筋健腰丸治疗腰椎管狭窄症(肝肾不足, 风湿瘀阻证)的中医证候疗效观察 [J]. 海南医学院学报, 2020, 26(7): 519-523.
- [8]崔鑫, 黎元元, 陈卫衡, 等. 3033例基于主动监测的舒筋健腰丸真实世界安全性医院集中监测研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 102-110.
- [9]WANG B, GAO C, ZHANG P, et al. The increased motion of lumbar induces ligamentum flavum hypertrophy in a rat model [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2021, 22(1): 334.
- [10]徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:202-203.
- [11]李建国, 高春雨, 王宝剑, 等. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨退行性腰椎管狭窄症的中医论治 [J]. 中医药导报, 2021, 27(10): 174-177.
- [12]FUNES SC, RIOS M, ESCOBAR-VERA J, et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity [J]. Immunology, 2018, 154(2): 186-195.
- [13]LIU Y C, ZOU XB, CHAI YF, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(5): 520-529.
- [14]FRANKLIN RA. Fibroblasts and macrophages: collaborators in tissue homeostasis [J]. Immunol Rev, 2021, 302(1): 86-103.
- [15]BIERNACKA A, DOBACZEWSKI M, FRANGOGI-ANNIS NG. TGF-beta signaling in fibrosis [J]. Growth Factors, 2011, 29(5): 196-202.
- [16]CHAVEZ-GALAN L, OLLEROS ML, VESIN D, et al. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169(+) and TCR(+) macrophages [J]. Front Immunol, 2015, 6: 263. doi:10.3389/fimmu. 2015. 00263.
- [17]MORENO SG. Depleting macrophages in vivo with clodronate-liposomes [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1784: 259-262. doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_23.
- [18]PAKSHIR P, HINZ B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication [J]. Matrix Biol, 2018, 68-69: 81-93. doi:10.1016/j.matbio. 2018. 01. 019.

Effect of *Shujin Jianyao Pills* (舒筋健腰丸) on M1/M2 Polarization of Macrophages in Ligamentum Flavum of Lumbar Ligamentum Flavum Fibrosis Model Rats

FENG Peng¹, GAO Chunyu¹, LI Luguang¹, LI Jianguo¹, GAO Jinghua¹, LIU Haiying²

1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100020; 2. Guangzhou Baiyunshan Chenliji Pharmaceutical Factory Co., Ltd

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of *Shujin Jianyao Pills* (舒筋健腰丸) on fibrosis of lumbar ligamentum flavum and the possible mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into normal group, model group, negative control group, positive control group and *Shujin Jianyao Pills* group, with six rats in each group. Lumbar instability injury method was used to establish rat models of ligamentum flavum fibrosis in all groups except the normal group. Seventy-two hours after the modeling, the *Shujin Jianyao Pills* group was given $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of *Shujin Jianyao Pills* by intragastric administration, while the other groups were given $30 \text{ ml/kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of normal saline by intragastric administration, once a day for 8 weeks. Besides, in the negative control group and the positive control group, PBS liposomes (5 mg/ml, 0.5 ml) and clophosphate liposomes (5 mg/ml, 0.5 ml) were subcutaneously injected into the original incision respectively at once, 2 weeks, 4 weeks and 6 weeks after the modeling. The rat ligamentum flavum was evaluated histologically by Masson staining, and the collagen volume fraction (CVF) was calculated. Immunohistochemical staining was used to detect inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), mouse growth factor-like phantom-containing mucus-like hormone-like receptor (F4/80) and transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) protein expression in ligamentum flavum. The expressions of F4/80 and TGF- β_1 , the markers of M2 macrophages in the ligamentum flavum, were detected by immunofluorescence double labeling. **Results** Compared to those in the normal group, the Masson staining of the model group, the negative control group and the *Shujin Jianyao Pills* group showed elastic fiber breakage and collagen accumulation, and the CVF, as well as the expression of iNOS, TNF- α , F4/80 and TGF- β_1 in the lumbar ligamentum flavum increased significantly ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the collagen fibers in the positive control group and *Shujin Jianyao Pills* were reduced, while the cross-linking of collagen fibers and elastic fibers was loose, and the CVF was significantly reduced; the expressions of iNOS, TNF- α , F4/80 and TGF- β_1 in the lumbar ligamentum flavum were significantly reduced in the positive control group; the expression of iNOS in the *Shujin Jianyao Pills* group significantly increased, while TNF- α , F4/80 and TGF- β_1 expressions decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the positive control group, the *Shujin Jianyao Pills* group had more collagen fibers, significantly increased CVF, and significantly increased expressions of iNOS, TNF- α , F4/80 and TGF- β_1 in the lumbar ligamentum flavum ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Immunofluorescence results showed that there was no expression of F4/80 and TGF- β_1 in the normal group and the positive control group. In the model group, F4/80 and TGF- β_1 were massively expressed and co-localized. The expression of F4/80 was higher in the *Shujin Jianyao Pills* group, but the expression of TGF- β_1 was less. **Conclusion** *Shujin Jianyao Pills* can inhibit the progression of fibrosis of ligamentum flavum in rats, affect the M1/M2 polarization balance of macrophages in the fibrotic ligamentum flavum, shift the polarization to the M1, and inhibit M2 macrophage paracrine fibrosis key factor TGF- β_1 , thereby playing an anti-fibrosis role in the ligamentum flavum.

Keywords hypertrophy of ligamentum flavum; fibrosis of ligamentum flavum; lumbar; macrophage polarization; *Shujin Jianyao Pills* (舒筋健腰丸)

(收稿日期: 2022-05-12; 修回日期: 2023-01-17)

[编辑: 果 彤, 王利芬]