

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.21.011

壮腰通络方含药血清对 TNF- α 介导的髓核细胞焦亡恶性循环的影响冯蓬¹, 高春雨[✉], 孙凯¹, 朱立国¹, 高景华¹, 李路广¹, 李建国¹, 车颖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, 100102; 2. 山东中医药大学

[摘要] **目的** 探讨壮腰通络方延缓腰椎间盘突出退变的可能机制。**方法** 利用佛波酯、干扰素 γ 和脂多糖将 THP-1 细胞诱导为 M1 巨噬细胞, 与髓核细胞建立 Transwell 共培养体系。首先以胎牛血清作为对照血清, 采用 MTT 法分析不同体积分数 (5%、10%、15%、20%) 壮腰通络方大鼠含药血清对 M1 和髓核细胞活性的影响, 筛选后续实验药物浓度。随后建立实验一, 分为髓核细胞对照组、M1 巨噬细胞对照组、髓核细胞+壮腰方组、髓核细胞+肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 组、髓核细胞+TNF- α +壮腰方组、共培组、共培+壮腰方组, 每组 3 个复孔。利用 ELISA 法检测各组培养上清白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 18 (IL-18) 含量, 实时荧光定量 PCR 检测髓核细胞中 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达, 细胞免疫荧光法检测髓核细胞中 Gasdermin D (GSDMD) 蛋白表达。实验二利用 TNF- α 过表达质粒或 TNF- α 空载体质粒干预 M1 巨噬细胞, 并在共培养条件下分为共培组、空载体质粒+共培组、空载体质粒共培+壮腰方组、共培+壮腰方组、过表达质粒共培+壮腰方组、过表达质粒+共培组, 每组 3 个复孔。利用实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法检测各组 M1 巨噬细胞中 TNF- α mRNA 和蛋白表达。**结果** 最终筛选出 10% 的壮腰通络方含药血清进行后续实验。实验一结果显示, 与髓核细胞对照组比较, 髓核细胞+壮腰方组 IL-1 β 、IL-18 含量及 mRNA、GSDMD 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而髓核细胞+TNF- α 组和共培组 IL-1 β 、IL-18 含量及 mRNA、GSDMD 表达均显著增加 ($P<0.01$)。与共培组比较, 共培+壮腰方组 IL-1 β 、IL-18 含量及 mRNA、GSDMD 表达均显著降低 ($P<0.01$)。实验二结果显示, 与共培组比较, 空载体质粒+共培组 TNF- α mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与空载体质粒+共培组比较, 空载体质粒共培+壮腰方组 TNF- α mRNA 和蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$)。与共培组和空载体质粒+共培组比较, 共培+壮腰方组 TNF- α mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P<0.01$); 与共培+壮腰方组比较, 过表达质粒共培+壮腰方组 TNF- α mRNA 和蛋白表达均显著增加 ($P<0.01$); 与过表达质粒共培+壮腰方组比较, 过表达质粒+共培组 TNF- α mRNA 和蛋白表达均显著增加 ($P<0.01$)。**结论** 壮腰通络方含药血清能够通过降低 M1 巨噬细胞中 TNF- α 的表达, 抑制由 TNF- α 诱导的髓核细胞焦亡恶性循环, 延缓腰椎间盘突出退变。

[关键词] 腰椎间盘突出退变; 壮腰通络方; M1 巨噬细胞; 髓核细胞; 细胞焦亡; 肿瘤坏死因子 α

腰椎间盘突出退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是腰椎骨骼肌肉疾病的首要病理基础, 退变的椎间盘水分丢失, 细胞外基质结构紊乱, 髓核细胞代谢异常, 最终导致失去其原有的生物学特性^[1]。髓核细胞的焦亡是 IDD 的典型病理改变之

一, 在退变的髓核中以 M1 巨噬细胞浸润为主, 而其浸润是髓核焦亡恶性循环的重要驱动因素^[2-3]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 主要由 M1 巨噬细胞释放, 是死亡受体相关的焦亡信号通路的关键驱动蛋白, 其能诱导髓核细胞焦亡^[2]。髓核细胞的焦亡会诱导白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 18 (IL-18) 的成熟和分泌, 促使其释放更多的可造成细胞死亡和膜穿孔的 Gasdermin D (GSDMD) 蛋白, 细胞内容物释放, 招募大量巨噬细胞, 放大炎症反应, 使

基金项目: 国家自然科学基金 (82205152); 中国中医科学院优秀青年科技人才 (ZZ16-YQ-023); 中国中医科学院望京医院院级科研课题苗圃培育项目 (WJYY-YJKT-2022-03)

✉ 通讯作者: gaochunyu8526@sina.com

腰椎间盘突出持续进展^[4-5]。

壮腰通络方是本团队在总结《外台秘要》腰痛类方的证治特点及用药规律的基础上形成的经验方,具有补益肝肾、活血通络的作用,能够显著降低腰椎间盘突出症患者腰痛症状并改善腰椎活动功能^[6]。前期动物实验^[7]显示,其能够调控IDD模型大鼠血清中TNF- α 的含量,发挥延缓IDD的作用。因此,本研究利用M1巨噬细胞和髓核细胞的Transwell共培养体系,从髓核细胞焦亡角度探讨壮腰通络方延缓IDD的可能作用机制。本研究实验方案经北京隆安实验动物伦理委员会批准(批准号:BJLongan-L-L-024)。

1 材料

1.1 动物及细胞

SPF级雄性SD大鼠12只,8周龄,体质量(200 $\pm$ 20)g,购于中国食品药品鉴定研究院,动物生产许可证号SCXK(京)2017-0005。所有大鼠饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物房,温度20~25℃,湿度40%~50%,光暗12h/12h交替循环,自由摄食饮水。THP-1细胞株由中国医学科学院基础医学研究所提供。人永生髓核细胞由赛百慷(上海)生物技术股份有限公司提供(货号iCell-0028a)。

1.2 药物及含药血清的制备

壮腰通络方组成:杜仲15g,熟地黄15g,当归12g,丹参12g等9味药组成,由中国中医科学院望京医院中药房提供。将中药浸泡1h,然后煎煮1h,获得第一遍药液;再用温水浸泡40min,再煎煮1h,获得第二遍药液。将两次煎煮出的药液混合后进行浓缩,制备成浓度为12.6g/ml的中药溶液。12只SD大鼠采用随机数字表法分为空白组和给药组,每组6只。给药组大鼠给药量以成人(以60kg换算)给药量的7倍计算等效灌胃剂量^[8],即给予浓度为12.6g/ml的壮腰通络方溶液1ml/(100g·d)早、晚灌胃,连续3天。空白组大鼠灌胃1ml/(100g·d)生理盐水。末次灌胃1h后,各组大鼠麻醉后腔静脉取血,4℃冰箱冷藏静置3h后,4℃、3000r/min离心(离心半径为14cm)15min收集血清,经56℃水浴灭活30min后-80℃冰箱存放备用。

1.3 主要试剂和仪器

佛波酯(PMA,货号:P6741)、干扰素 γ (IFN- γ ,货号:P05748)、脂多糖(LPS,货号:L8880)、

人重组TNF- α 蛋白(货号:P02740)、IL-18 ELISA试剂盒(货号:SEKH-0028),Solarbio公司;MTT检测试剂盒(货号:G4101)、BCA蛋白定量检测试剂盒(货号:G2026-200T)、RIPA裂解液(货号:G2002-30ML)、蛋白酶抑制剂(货号:G2006-250UL)、磷酸化蛋白酶抑制剂(货号:G2007-1ML)、苯甲基磺酰氟(PMSF,货号:G2008-1ML)、二甲基亚砜(DMSO,货号:GC203005)、牛血清白蛋白BSA(货号:GC305010)、抗体稀释液(货号:G2025-100ML)、HRP标记的山羊抗兔IgG(货号:GB23303)、免疫组化专用山羊抗兔二抗(货号:G1213)、ECL化学发光试剂盒(货号:G2014-50ML)、DAPI染色试剂(货号:G1012)、DNA去除与逆转录试剂盒(货号:G3337)、TNF- α ELISA试剂盒(货号:GEH0004)、IL-1 β ELISA试剂盒(货号:GEH0002)、兔抗人多克隆GSDMD抗体(货号:GB115429),Servicebio公司;TNF- α 过表达质粒或TNF- α 空载体质粒,上海吉凯基因生物科技有限公司设计并制备(载体编号:CON468);兔抗人多克隆TNF- α 抗体(货号:ab183218),Abcam公司。Transwell小室(Corning公司,货号:3414);垂直电泳仪(Servicebio公司,BV-2型);显微镜(Nikon公司,E100型);PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司,ETC811型);酶标仪(BioTeK公司,Epoch型)。

2 方法

2.1 THP-1细胞诱导成M1巨噬细胞

参考文献[9]采用M1巨噬细胞极化诱导方案,即利用PMA、IFN- γ 和LPS将THP-1细胞诱导为M1巨噬细胞。具体方法为:将THP-1细胞数目扩增至5 $\times$ 10⁶个以上,添加PMA并使其终浓度为100ng/ml,持续诱导时间48h;随后添加IFN- γ 和LPS,分别使其终浓度为20ng/ml和100ng/ml,持续诱导时间为48h。THP-1细胞由悬浮转为贴壁,多伪足,易抱团,即为诱导成功,该表型可维持3天以上^[5]。

2.2 M1巨噬细胞和髓核细胞共培养体系建立

采用Transwell小室(3 μ m膜孔径)构建M1巨噬细胞和髓核细胞共培养体系^[10]。利用细胞刮刀,将M1巨噬细胞转移至Transwell下室中,保证细胞数目至少1 $\times$ 10⁶个以上。将髓核细胞经胰蛋白酶消化后转移至Transwell上室中,细胞数目为1 $\times$ 10⁶个左右。共培养时间为24h。

2.3 MTT法筛选壮腰通络方最佳实验药物浓度

将 M1 巨噬细胞或髓核细胞分别接种于 96 孔板, 分为空白血清组、对照血清组和中药血清组。中药血清组细胞给予壮腰通络方梯度稀释大鼠含药血清, 体积分数分别为 5%、10%、15%、20%, 空白血清组设置相同体积分数空白血清 4 组。对照血清组细胞给予 1640 完全培养基 (10% 胎牛血清)。利用 MTT 法分别检测两种细胞活性。各组在不同体积分数血清中培养 24 h, 每组设置 6 个复孔。处理结束后, 每个孔中加入 20 μ l MTT 工作液体并继续在细胞培养箱内孵育 4 h。用移液枪小心吸除孔板内上清溶液, 每孔加入 100 μ l DMSO, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 左右。使用酶标仪在 570 nm 处检测各孔的光密度值 (OD 值), 用以表示细胞活力。根据 OD 值选择两种细胞活力相对均较强 (OD 值较大) 的含药血清浓度为最适宜的药物浓度进行后续研究。

2.4 实验一: 壮腰通络方含药血清对髓核细胞焦亡的影响

2.4.1 实验方法 在明确最佳实验药物浓度后进行实验一, 分组及干预情况详见表 1, 每组 3 个复孔。

2.4.2 观察指标及方法 1) ELISA 法检测焦亡关键蛋白 IL-1 β 和 IL-18 含量。各组培养或共培养 24 h 后, 收集细胞上清, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 (离心半径 14 cm) 15 min, 检测各组细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 含量, 参照试剂盒说明书操作。2) 实时荧光定量 PCR 检测髓核细胞中 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达。用移液器将 Transwell 小室中培养液吸除干净, 加入 1 ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 溶液, 轻摇洗涤。用移液器将 PBS 吸除干净, 提取 RNA, 再用 15 μ l RNA 溶解液溶解 RNA。步骤按照 DNA 去除与逆转录试剂盒进行, 引物均由武汉塞维尔生物科技有限公司合成, IL-1 β : 上游 CTCAACTGTGAAATGC-

CACC, 下游 GAGTGATACTGCCTGCCTGA, 产物大小 131 bp; IL-18: 上游 GCTCACCACAACCTC-TACCT, 下游 TTCAAGACCAGCCTGACCAA, 产物大小 147 bp; GAPDH: 上游 GGAAGCTTGTTCAT-CAATGGAAATC, 下游 TGATGACCCTTTTGGCTC-CC, 产物大小 168 bp。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 相对定量分析法。

3) 细胞免疫荧光法检测髓核细胞中 GSDMD 蛋白表达。在髓核细胞共培养或单独培养 24 h 后, 细胞爬片轻轻甩干, 加入破膜液, 室温孵育 20 min。随后利用 PBS 缓冲液洗 3 次, 每次 5 min。滴加 3% BSA 牛血清蛋白溶液, 均匀覆盖爬片, 室温封闭 30 min。滴加一抗工作液 (GSDMD, 1 : 200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。于摇床 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。随后滴加对应种属二抗 (1 : 500) 工作液, 室温孵育 50 min。再次于摇床 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。滴加即用型 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min, 后于荧光显微镜下拍照, 结果用平均光密度表示。

2.5 实验二: 壮腰通络方含药血清对 M1 巨噬细胞中 TNF- α 的影响

2.5.1 实验方法 在明确壮腰通络方含药血清对共培养体系下髓核细胞焦亡的作用后进行实验二, 分组及干预方法详见表 2, 每组 3 个复孔。过表达质粒和空载体质粒均提前在 6 孔板中转染 M1 巨噬细胞 24 h, 而后更换含有或不含有壮腰通络方含药血清的完全培养基并添加含有髓核细胞的 Transwell 上室。

2.5.2 观察指标及方法 实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹检测 M1 巨噬细胞中 TNF- α mRNA 和蛋白表达。荧光定量 PCR 检测方法同上, 引物序列 TNF- α : 上游 CCGAGTCTGGGCAGGTCTA, 下游 GTCTGAAGGAGGGGTAAT, 产物大小 252 bp, 结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 相对定量分析法。蛋白免疫印迹检测: 利用细胞刮刀刮取 M1 巨噬细胞于 1.5 ml 离心

表 1 壮腰通络方含药血清对髓核细胞焦亡影响实验分组及干预方法

Table 1 Experimental groups and intervention methods for the effect of Zhuangyao Tongluo Formula (壮腰通络方)-containing serum on apoptosis of nucleus pulposus cells

组别	细胞培养	干预药物
髓核细胞对照组	髓核细胞单独培养	无
M1 巨噬细胞对照组	M1 巨噬细胞单独培养	无
髓核细胞+壮腰方组	髓核细胞单独培养	筛选浓度的壮腰通络方含药血清
髓核细胞+TNF- α 组	髓核细胞单独培养	50 ng/ml 终浓度的 TNF- α 诱导髓核细胞焦亡 ^[11]
髓核细胞+TNF- α +壮腰方组	髓核细胞单独培养	50 ng/ml 终浓度的 TNF- α +筛选浓度壮腰通络方含药血清
共培组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	无
共培+壮腰方组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	筛选浓度壮腰通络方含药血清

表2 壮腰通络方含药血清对 M1 巨噬细胞中 TNF-α 影响的实验分组及干预方法

Table 2 Experimental groups and intervention methods for the effect of Zhuangyao Tongluo Formula (壮腰通络方)-containing serum on TNF-α in M1 macrophages

组别	细胞培养	干预药物
共培组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	无
空载体质粒+共培组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	TNF-α 空载体质粒
空载体质粒共培+壮腰方组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	TNF-α 空载体质粒+壮腰通络方含药血清干预
共培+壮腰方组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	壮腰通络方含药血清
过表达质粒共培+壮腰方组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	TNF-α 过表达质粒+壮腰通络方含药血清
过表达质粒+共培组	M1 巨噬细胞+髓核细胞共培养	TNF-α 过表达质粒

管中，加入蛋白酶抑制剂和 250 μl RIPA 裂解液，充分震荡。冰上裂解 30 min，期间用移液器反复吹打，确保细胞完全裂解。4 ℃、12 000 r/min 离心（离心半径 5 cm）10 min，收集上清，即为总蛋白溶液。利用 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白溶液按照 4：1 的比例加入还原型蛋白上样缓冲液，沸水浴变性 15 min。随后进行 SDS-PAGE 电泳（250 V，25 min）、转膜（300 mA，40 min）。利用牛血清白蛋白室温封闭 30 min，按抗体说明书孵育一抗（1：1000 稀释）和二抗（1：500 稀释），利用 ECL 发光显色，采用相对定量法。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，数据均符合正态分布以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，满足方差齐性者用单因素方差分析方法，组间比较使用 Turkey's 多重对比检验；不满足方差齐性的指标采用 Welch's ANOVA 方法，组间比较采用 Games-Howell's 多重比较。图像数据采用 Image J (V1. 8. 0. 112) 软件分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 壮腰通络方最佳实验浓度筛选结果

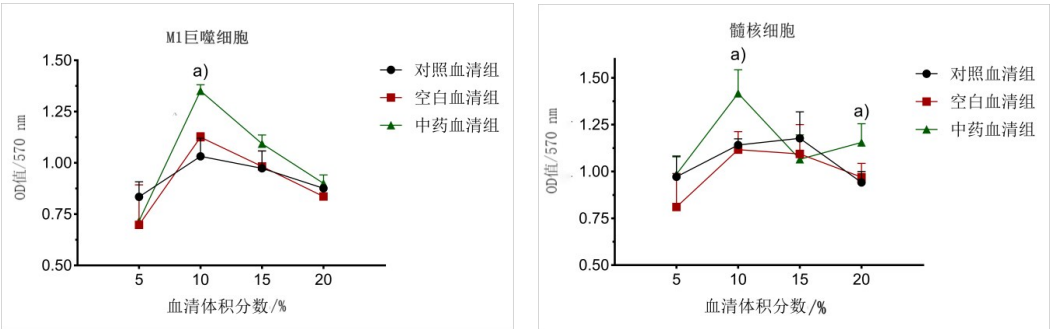
图 1 示，在 10% 血清浓度下，与对照血清组和

空白血清组比较，中药血清组的 M1 巨噬细胞和髓核细胞的细胞活性显著升高 ($P<0.01$)；在 20% 血清浓度下，与对照血清组和空白血清组比较，髓核细胞的细胞活性升高 ($P<0.01$)，但此浓度下 M1 巨噬细胞的细胞活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)。因此，选定 10% 壮腰通络方含药血清作为后续实验浓度。

3.2 实验一结果

由于本研究设置组别较多，根据研究目的选择部分组别进行比较。髓核细胞对照组与髓核细胞+壮腰方组、髓核细胞+TNF-α 组比较，是为了观察壮腰通络方和 TNF-α 对髓核细胞的影响；髓核细胞+TNF-α 组与髓核细胞+TNF-α+壮腰方组比较，是为了观察壮腰通络方能否直接抑制髓核细胞的焦亡而不通过巨噬细胞；髓核细胞对照组、M1 巨噬细胞对照组和共培组比较，是为了观察共同培养的效果；共培组和共培+壮腰方组比较，是为了明确壮腰方含药血清的干预效果。

3.2.1 各组细胞培养上清中 IL-1β 和 IL-18 含量比较 表 3 示，与髓核细胞对照组比较，髓核细胞+壮腰方组 IL-1β 和 IL-18 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)，而髓核细胞+TNF-α 组 IL-1β 和 IL-18 含量均



注：a) 与同浓度的对照血清组和空白血清组比较， $P<0.01$ 。

图1 各组细胞在不同浓度血清干预下细胞活力比较

Figure 1 Comparison of cell viability of M1 macrophages or nucleus pulposus cells in each group

显著增加 ($P < 0.01$)。与髓核细胞+TNF- α 组比较, 髓核细胞+TNF- α +壮腰方组 IL-1 β 和 IL-18 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与髓核细胞对照组和 M1 巨噬细胞对照组比较, 共培组 IL-1 β 和 IL-18 含量均显著增加 ($P < 0.01$)。与共培组比较, 共培+壮腰方组 IL-1 β 和 IL-18 含量均显著减少 ($P < 0.01$)。

表 3 各组细胞培养上清中 IL-1 β 和 IL-18 含量比较

Table 3 Comparison of IL-1 β and IL-18 levels in the supernatant of each cell culture group (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-1 β	IL-18
髓核细胞对照组	3	1.79 $\pm$ 1.68	1.60 $\pm$ 0.73
M1 巨噬细胞对照组	3	11.94 $\pm$ 2.24	3.92 $\pm$ 4.24
髓核细胞+壮腰方组	3	5.96 $\pm$ 1.46	0.93 $\pm$ 0.26
髓核细胞+TNF- α 组	3	101.16 $\pm$ 5.82 ^{a)}	101.89 $\pm$ 2.79 ^{a)}
髓核细胞+TNF- α +壮腰方组	3	101.81 $\pm$ 2.75	101.65 $\pm$ 1.67
共培组	3	67.95 $\pm$ 6.60 ^{a)b)}	79.13 $\pm$ 6.34 ^{a)b)}
共培+壮腰方组	3	33.64 $\pm$ 4.78 ^{c)}	35.18 $\pm$ 8.59 ^{c)}

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-18, 白细胞介素 18。

a) 与髓核细胞对照组比较, $P < 0.01$; b) 与 M1 巨噬细胞对照组比较, $P < 0.01$; c) 与共培组比较, $P < 0.01$ 。

3.2.2 各组髓核细胞中 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达 表 4 示, 与髓核细胞对照组比较, 髓核细胞+壮腰方组 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而髓核细胞+TNF- α 组的 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$)。与髓核细胞+TNF- α 组比较, 髓核细胞+TNF- α +壮腰方组髓核细胞 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与髓核细胞对照组较, 共培组髓核细胞 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达均显著增加 ($P < 0.01$)。与共培组比较, 共培+壮腰方组髓核细胞 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.2.3 各组髓核细胞中焦亡关键蛋白 GSDMD 表达比较 表 5 示, 与髓核细胞对照组比较, 髓核细胞+壮腰方组的 GSDMD 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而髓核细胞+TNF- α 组 GSDMD 表达显著增高 ($P < 0.01$)。与髓核细胞+TNF- α 组比较, 髓核细胞+TNF- α +壮腰方组 GSDMD 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与髓核细胞对照组和髓核细胞+壮腰方组比较, 共培组 GSDMD 表达显著增加 ($P < 0.01$)。与共培组比较, 共培+壮腰方组 GSDMD 表达显著降低 ($P < 0.01$)。

3.3 实验二中各组 M1 巨噬细胞中 TNF- α mRNA 及蛋白表达比较

表 6 示, 与共培组比较, 空载体质粒+共培组

表 4 各组髓核细胞中 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 相对表达量比较

Table 4 Comparison of relative mRNA expression levels of IL-1 β and IL-18 in nucleus pulposus cells of each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-1 β mRNA	IL-18 mRNA
髓核细胞对照组	3	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02
髓核细胞+壮腰方组	3	0.80 $\pm$ 0.00	0.97 $\pm$ 0.03
髓核细胞+TNF- α 组	3	23.15 $\pm$ 0.54 ^{a)}	13.69 $\pm$ 0.22 ^{a)}
髓核细胞+TNF- α +壮腰方组	3	22.67 $\pm$ 2.04	13.76 $\pm$ 0.19
共培组	3	5.02 $\pm$ 1.06 ^{a)}	3.94 $\pm$ 0.07 ^{a)}
共培+壮腰方组	3	2.48 $\pm$ 0.05 ^{b)}	2.40 $\pm$ 0.10 ^{b)}

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-18, 白细胞介素 18。

a) 与髓核细胞对照组比较, $P < 0.01$; b) 与共培组比较, $P < 0.01$ 。

表 5 各组髓核细胞中 GSDMD 表达比较

Table 5 Comparison of GSDMD expression in nucleus pulposus cells of each group (IntDen/Area, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	GSDMD
髓核细胞对照组	3	1.00 $\pm$ 0.04
髓核细胞+壮腰方组	3	1.07 $\pm$ 0.01
髓核细胞+TNF- α 组	3	1.94 $\pm$ 0.01 ^{a)}
髓核细胞+TNF- α +壮腰方组	3	1.97 $\pm$ 0.03
共培组	3	1.91 $\pm$ 0.02 ^{a) b)}
共培+壮腰方组	3	1.31 $\pm$ 0.03 ^{c)}

注: GSDMD, Gasdermin D。

a) 与髓核细胞对照组比较, $P < 0.01$; b) 与髓核细胞+壮腰方组比较, $P < 0.01$; c) 与共培组比较, $P < 0.01$ 。

表 6 各组 M1 巨噬细胞中 TNF- α mRNA 和蛋白的相对表达比较 (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of relative mRNA and protein expression levels of TNF- α in M1 macrophages of each group

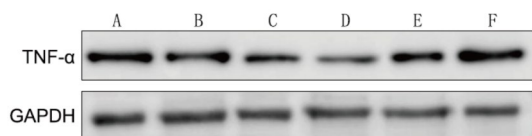
组别	样本数	TNF- α mRNA	TNF- α 蛋白
共培组	3	6.11 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.00
空载体质粒+共培组	3	6.29 $\pm$ 0.46	0.98 $\pm$ 0.05
空载体质粒+共培+壮腰方组	3	3.34 $\pm$ 0.45 ^{a)}	0.63 $\pm$ 0.01 ^{a)}
共培+壮腰方组	3	3.41 $\pm$ 0.17 ^{a) b)}	0.53 $\pm$ 0.06 ^{a) b)}
过表达质粒+共培+壮腰方组	3	5.94 $\pm$ 0.30 ^{c)}	1.15 $\pm$ 0.15 ^{c)}
过表达质粒+共培组	3	10.49 $\pm$ 0.73 ^{d)}	1.76 $\pm$ 0.08 ^{d)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空载体质粒+共培组比较, $P < 0.01$; b) 与共培组比较, $P < 0.01$; c) 与共培+壮腰方组比较, $P < 0.01$; d) 与过表达质粒+壮腰方组比较, $P < 0.01$ 。

TNF- α mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空载体质粒+共培组比较, 空载体质粒+共培+壮腰方组 TNF- α mRNA 和蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$)。与共培组和空载体质粒+共培组比

较, 共培+壮腰方组 TNF- α mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P<0.01$); 与共培+壮腰方组比较, 过表达质粒共培+壮腰方组 TNF- α mRNA 和蛋白表达均显著增加 ($P<0.01$); 与过表达质粒共培+壮腰方组比较, 过表达质粒+共培组 TNF- α mRNA 和蛋白表达均显著增加 ($P<0.01$)。各组 M1 巨噬细胞中 TNF- α 蛋白电泳图见图 2。



注: A, 共培组; B, 空载体质粒+共培组; C, 空载体质粒共培+壮腰方组; D, 共培+壮腰方组; E, 过表达质粒共培+壮腰方组; F, 过表达质粒+共培组; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

图 2 各组 M1 巨噬细胞中 TNF- α 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoretic image of TNF- α protein in M1 macrophages from different groups

4 讨论

IDD 与多种脊柱退行性疾病密切相关, 症状以腰痛为主。根据其临床症状, 可归属于中医学“腰痛”“痹证”等范畴。中医学认为, 腰痛多以肝肾亏虚为本, 风、寒、湿外邪为标。《素问·脉要精微论篇》载:“腰者, 肾之府, 转摇不能, 肾将惫矣”, 从脏腑层面强调了肾与腰的关系。肝主疏泄、利机关, 肝肾亏虚将直接导致腰部筋脉失去濡养, 使腰部筋骨松弛、气血羸弱而难以御邪。风、寒、湿三气乘虚而入, 痹阻腰部经脉, 最终形成腰痛。因此, 补益肝肾、祛风除湿是治疗腰痛的基本治法。壮腰通络方中杜仲甘、微辛、性温, 入肝肾经, 具有补肝肾、强筋健骨的功效, 偏于补阳; 熟地黄性甘、微温, 入肝肾, 滋阴补血, 填精益髓, 偏于补阴。二者共为君药, 阴阳并补, 共奏补肝肾、强筋骨、益精髓功效; 当归补血活血, 归肝、心、脾经, 丹参祛瘀、生新、活血, 归心、肝经, 共同发挥养血活血, 祛风除湿的作用, 全方标本兼治, 在临床中取得良好的临床疗效^[12]。

既往研究发现, 壮腰通络方能够降低 IDD 大鼠血清中 TNF- α 的表达^[7], 然而其具体机制仍不清楚。在实验一中, 壮腰通络方含药血清能够显著抑制该共培养体系导致的 IL-1 β 和 IL-18 蛋白含量的增加, 显著降低髓核细胞中焦亡关键蛋白 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 的表达, 说明 10% 体积分数的壮腰通络方含药血清能够在细胞层面逆转 M1 巨噬细胞和

髓核细胞共培养诱导的髓核细胞焦亡。GSDMD 免疫荧光检测结果显示, 共培+壮腰方组 GSDMD 表达较共培组比较亦显著降低, 也同样证实壮腰通络方含药血清可抑制髓核细胞焦亡。同时我们也注意到, 髓核细胞单独培养时, 无论是否存在壮腰通络方含药血清, 共培养体系培养上清中 IL-1 β 和 IL-18 含量并未见显著的变化, 表明该方不会对髓核细胞产生负面影响; 而壮腰通络方含药血清也没有对 TNF- α 诱导的髓核细胞焦亡产生明显的抑制作用。因此, 壮腰通络方对髓核细胞焦亡的逆转作用可能主要来源于对 M1 巨噬细胞旁分泌 TNF- α 的抑制作用。

为了更加明确 10% 体积分数的壮腰通络方含药血清对 M1 巨噬细胞的干预作用, 在实验二中我们构建了 TNF- α 的过表达质粒并转染 M1 巨噬细胞, 来观察壮腰通络方含药血清能否通过抑制 TNF- α 的表达从而减轻髓核细胞的焦亡。结果显示, TNF- α 过表达质粒的转染显著提高了 TNF- α 的表达水平, 而壮腰通络方含药血清的干预则部分逆转了 TNF- α mRNA 的表达并造成 TNF- α 蛋白合成减少, 这表明壮腰通络方含药血清能够作用于 M1 巨噬细胞并通过 TNF- α 途径抑制髓核细胞焦亡恶性循环。

值得注意的是, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 不仅仅是髓核焦亡恶性循环的重要参与者, 也是引发临床急慢性腰痛的重要原因之一^[13-14]。我们推测, 抑制 TNF- α 介导的髓核焦亡恶性循环是壮腰通络方治疗 IDD 的可能作用机制之一。然而我们的实验数据表明, 壮腰通络方含药血清只能部分抑制髓核细胞的焦亡, 抑制 M1 巨噬细胞的活化, 减轻炎性刺激, 并不能阻断髓核焦亡恶性循环。本研究为体外实验, 并不能完全反映真实的体内情况, 需要更进一步的体内动物实验等进行证实, 并且针对 M1 巨噬细胞仍需要更为深入的研究, 以阐明其内在调控机制。

参考文献

- [1]ZHANG W, LI G, LUO R, et al. Cytosolic escape of mitochondrial DNA triggers cGAS-STING-NLRP3 axis-dependent nucleus pulposus cell pyroptosis [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2): 129-142.
- [2]FENG P, CHE Y, GAO C, et al. Immune exposure: how macrophages interact with the nucleus pulposus [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1155746. doi: 10.3389/fimmu. 2023. 1155746.
- [3]LING Z, LIU Y, WANG Z, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals macrophage involved in the progression of

- human intervertebral disc degeneration [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 833420. doi: 10.3389/fcell. 2021. 833420.
- [4] ZHAO F, GUO Z, HOU F, et al. Magnoflorine alleviates “M1” polarized macrophage-induced intervertebral disc degeneration through repressing the HMGB1/Myd88/NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 701087. doi: 10.3389/fphar. 2021. 701087.
- [5] YING W, CHERUKU PS, BAZER FW, et al. Investigation of macrophage polarization using bone marrow derived macrophages [J]. *J Vis Exp*, 2013(76):50323. doi: 10.3791/50323.
- [6] 孙凯, 朱立国, 魏戌, 等. 壮腰通络方治疗腰椎间盘突出症 45 例 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2021, 29(1): 19-23.
- [7] 孙凯, 魏戌, 朱立国, 等. 壮腰通络方对腰椎间盘突出性病变大鼠病理变化及血清炎症因子表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(7): 93-98.
- [8] NAIR A, MORSY MA, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development [J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(8):373-382.
- [9] VOGEL DY, GLIM JE, STAVENUITER AW, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared [J]. *Immunobiology*, 2014, 219(9): 695-703.
- [10] WANG J, TIAN Y, PHILLIPS KL, et al. Tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-dependent induction of CCL3 expression by nucleus pulposus cells promotes macrophage migration through CCR1 [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(3): 832-842.
- [11] YANG H, LIU H, LI X, et al. TNF-alpha and TGF-beta1 regulate Syndecan-4 expression in nucleus pulposus cells: role of the mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways [J]. *Connect Tissue Res*, 2015, 56(4): 281-287.
- [12] 冯蓬, 朱立国, 孙凯, 等. 壮腰通络方治疗盘源性腰痛的临床研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2023, 31(6): 61-65, 70.
- [13] WANG Y, CHE M, XIN J, et al. The role of IL-1beta and TNF-alpha in intervertebral disc degeneration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110660. doi: 10.1016/j.biopha. 2020. 110660.
- [14] OMAIR A, BALIE, REIKERAS O, et al. An association study of interleukin 18 receptor genes (IL18R1 and IL18RAP) in lumbar disc degeneration [J]. *Open Orthop J*, 2012, 6: 164-171. doi: 10.2174/1874325001206010164.

Effect of *Zhuangyao Tongluo Formula* (壮腰通络方) Containing Serum on TNF- α -mediated Vicious Circle of Pyroptosis of Nucleus Pulposus Cells

FENG Peng¹, GAO Chunyu¹, SUN Kai¹, ZHU Ligu¹, GAO Jinghua¹, LI Luguang¹, LI Jianguo¹, CHE Ying²

1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100102; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Zhuangyao Tongluo Formula* (壮腰通络方, ZTF) in delaying intervertebral disc degeneration. **Methods** M1 macrophages were induced from THP-1 cells using LPS, IFN- γ and PMA. The induced M1 macrophages were then co-cultured with nucleus pulposus cells in a transwell system. Fetal bovine serum was used as the control serum, and the effects of different concentrations (5%, 10%, 15%, 20%) of serum from rats treated with ZTF on the activity of M1 macrophages and nucleus pulposus cells were analyzed using MTT assay. Experiment 1 was established, including the nucleus pulposus cell control group, M1 macrophage control group, nucleus pulposus cell + ZTF group, nucleus pulposus cell + TNF control group, nucleus pulposus cell + TNF + ZTF group, co-culture group, and co-culture + ZTF group. The levels of IL-1 β , and IL-18 in the culture supernatant were detected using ELISA. The mRNA expression of IL-1 β and IL-18 in nucleus pulposus cells was detected using qPCR. Additionally, the expression of GSDMD protein in nucleus pulposus cells was detected using cell immunofluorescence. In experiment 2, co-culture groups were constructed using TNF- α overexpression (OE) or empty vector (EV) plasmids, including co-culture group, TNF-EV + co-culture group, TNF-EV co-culture group + ZTF, co-culture + ZTF group, TNF-OE co-culture group + ZTF, and TNF-OE + co-culture group. The mRNA and protein expression of TNF- α in M1 cells in each group were detected using qPCR and WB. **Results** The ZTF with 10% serum was selected for subsequent experiments. The results of experiment 1 showed that compared to the control

group of nucleus pulposus cells, there was no statistically significant difference in the levels of IL-1 β , IL-18, mRNA, and GSDMD expression in the nucleus pulposus cells + ZTF group ($P>0.05$). However, the TNF- α + co-culture group showed a significant increase in IL-1 β , IL-18 levels, mRNA, and GSDMD expression ($P<0.01$). When compared to the co-culture group, the ZTF+ co-culture group showed a significant decrease in IL-1 β , IL-18 levels, mRNA, and GSDMD expression ($P<0.01$). The results of experiment 2 showed that there was no statistically significant difference in TNF- α mRNA and protein expression between the empty vector plasmids + co-culture group and the co-culture group ($P>0.05$). Compared to the empty vector + co-culture group, the expression of TNF- α mRNA and protein was significantly reduced in the empty vector co-culture + ZTF group ($P<0.01$). Compared to the co-culture group and the empty vector + co-culture group, the expression of TNF- α mRNA and protein was significantly reduced in the co-culture + ZTF group ($P<0.01$). Compared to the co-culture + ZTF group, the expression of TNF- α mRNA and protein significantly increased in the overexpression vector co-culture + ZTF group ($P<0.01$). Compared to the overexpression vector co-culture + ZTF group, the expression of TNF- α mRNA and protein significantly increased in the overexpression vector co-culture group ($P<0.01$). **Conclusion** ZTF serum can inhibit the TNF- α -induced apoptosis of nucleus pulposus cells and delay lumbar disc degeneration by reducing the expression of TNF- α in M1 macrophages.

Keywords intervertebral disc degeneration; *Zhuangyao Tongluo Formula* (壮腰通络方); M1 macrophages; nucleus pulposus cells; cell pyroptosis; tumor necrosis factor- α

(收稿日期: 2023-05-22; 修回日期: 2023-08-11)

[编辑: 邓 媛]

广告

欢迎订阅 2024 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 40.00 元, 全年 960 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

