

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.01.013

芪芍通痹胶囊对腰椎间盘突出退行性改变模型大鼠 Wnt/ β -catenin 通路的影响

薛玉满¹, 徐西林², 韩巍¹, 许嘉霖¹, 许文婷¹, 刘泽霖¹, 张晓峰³✉

1. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江省哈尔滨市南岗区果戈里大街411号, 150000; 2. 黑龙江中医药大学附属第三医院;
3. 黑龙江中医药大学

[摘要] **目的** 探讨芪芍通痹胶囊治疗腰椎间盘突出退行性改变 (IDD) 的可能作用机制。**方法** 75只SD大鼠随机分为对照组, 模型组, 芪芍通痹低、高剂量组, 芪芍通痹高剂量+激动剂组, 每组15只。除对照组外, 其余各组采用纤维环穿刺法制备大鼠IDD模型。造模后芪芍通痹低、高剂量组大鼠给予芪芍通痹胶囊0.2、0.8 g/(kg·d)灌胃; 芪芍通痹高剂量+激动剂组给予芪芍通痹胶囊0.8 g/(kg·d)和SKL2001溶液10 mg/(kg·d)灌胃; 对照组、模型组给予10 ml/(kg·d)蒸馏水灌胃, 各组均每天1次, 连续灌胃4周。最后一次给药后采用X射线和MRI检测各组IDD程度; HE染色、番红O-固绿染色观察椎间盘组织形态; 免疫组化染色法观察椎间盘组织蛋白多糖、Ⅱ型胶原 (COL Ⅱ)、基质金属蛋白酶3 (MMP-3) 蛋白水平; Western Blot法检测椎间盘髓核组织细胞外基质 (ECM) 相关蛋白 [蛋白多糖、COL Ⅱ、MMP-3、基质金属蛋白酶9 (MMP-9)、基质金属蛋白酶13 (MMP-13)]、衰老相关蛋白 (P53、P21、P16)、凋亡相关蛋白 [B细胞淋巴瘤/白血病2 (BCL-2)、BCL-2相关X蛋白 (BAX)、剪切型天冬氨酸-半胱氨酸蛋白酶3 (Cleaved Caspase-3)]、Wnt/ β -catenin通路相关蛋白 [Wnt3a、糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)、 β -catenin] 水平; RT-qPCR检测椎间盘组织 Wnt3a、GSK-3 β 、 β -catenin mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 芪芍通痹低、高剂量组大鼠椎间盘高度指数 (DHI) 升高, MRI Pfirrmann 分级降低, IDD 程度明显减轻, 椎间盘髓核和纤维环结构完整性升高, 髓核细胞数量增多, 椎间盘髓核组织中蛋白多糖、COL Ⅱ、BCL-2、GSK-3 β 蛋白水平升高, MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BAX、Cleaved Caspase-3、Wnt3a、 β -catenin 蛋白水平降低, Wnt3a、 β -catenin mRNA 表达降低, GSK-3 β mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 与芪芍通痹低剂量组比较, 芪芍通痹高剂量组大鼠 DHI 升高, MRI Pfirrmann 分级降低 ($P<0.05$), IDD 程度进一步减轻, 椎间盘髓核和纤维环结构完整性更高, 髓核细胞数量进一步增多, 椎间盘髓核组织中蛋白多糖、COL Ⅱ、BCL-2、GSK-3 β 蛋白水平升高, MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BAX、Cleaved Caspase-3、Wnt3a、 β -catenin 蛋白水平降低, Wnt3a、 β -catenin mRNA 表达降低, GSK-3 β mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 与芪芍通痹高剂量组比较, 芪芍通痹高剂量+激动剂组 DHI 降低, MRI Pfirrmann 分级升高 ($P<0.05$), IDD 程度明显加重, 椎间盘髓核和纤维环结构完整性降低, 髓核细胞数量减少, 椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL Ⅱ、BCL-2、GSK-3 β 蛋白水平降低, MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BAX、Cleaved Caspase-3 蛋白水平升高, GSK-3 β mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 芪芍通痹胶囊能够抑制IDD大鼠椎间盘髓核细胞衰老、凋亡和ECM降解, 其可能通过抑制Wnt/ β -catenin通路发挥作用。

[关键词] 腰椎间盘突出退行性改变; 髓核细胞; Wnt/ β -catenin通路; 芪芍通痹胶囊

基金项目: 全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函〔2022〕75号); 国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目 (2021-2023); 黑龙江中医药大学科研基金项目 (201730); 黑龙江省第二批省级中医师承项目 (2020-2023)

✉ 通讯作者: Zxf9919@163.com

腰椎间盘突出性改变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 是指随着年龄增长, 腰椎间盘突出自然老化、退化的生理病理过程, 临床主要表现为下腰痛和急性下肢神经性疼痛^[1]。髓核是位于两软骨终板与纤维环之间的胶状体, 由髓核细胞及其分泌的蛋白多糖、Ⅱ型胶原蛋白 (COL II)、弹性蛋白等细胞外基质 (ECM) 成分构成, 对椎间盘的营养渗透、结构稳定性和生物力学平衡至关重要^[2]。随着年龄增长, 衰老和凋亡的髓核细胞逐渐增多, 导致 ECM 合成减少、分解增多, 进而促进 IDD 进程^[3]。大量研究显示, 随着 IDD 的加剧, 退变脱出的髓核中细胞衰老标志物 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 表达显著上调^[4-5], 而抑制髓核细胞的衰老和凋亡能够有效延缓 IDD 进程^[6-7]。

芪苈通痹胶囊是黑龙江中医药大学附属第二医院基于临床经验研发的治疗颈椎病、腰椎间盘突出症的院内制剂。临床研究显示, 芪苈通痹胶囊对第三腰椎横突综合征^[8]、腰椎间盘突出症^[9]和神经根型颈椎病^[10]具有良好临床疗效。临床观察发现, 芪苈通痹胶囊对 IDD 疗效较好。Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 通路在细胞生长、发育及分化过程中发挥重要作用^[11]。研究发现, 骨膜蛋白通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进髓核细胞凋亡^[12-13]; 而抑制 Wnt/ β -catenin 通路可以减少髓核细胞凋亡和 ECM 降解, 从而抑制 IDD 进展^[14]。本研究基于 Wnt/ β -catenin 通路从髓核细胞衰老和凋亡角度探究芪苈通痹胶囊治疗 IDD 的可能作用机制, 以期为其临床应用提供实验依据。本研究通过黑龙江中医药大学附属第二医院动物实验伦理委员会批准 (批准号: 20220917)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

75 只 SPF 级 SD 雌性大鼠, 8 周龄, 体质量 180~200 g, 购自哈尔滨医科大学科技园利民生物医药科技发展有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (黑) 2021-005。大鼠饲养于室温 22~23 °C、湿度 45%~55%、12 h 明/暗循环环境中, 并提供无菌饲料和饮用水, 适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药物

芪苈通痹胶囊组成: 黄芪 15 g, 白芍 15 g, 川芎 15 g, 当归 15 g, 盐车前子 15 g, 醋三棱 15 g, 醋莪术 15 g, 泽兰 15 g, 醋延胡索 15 g, 地龙 15 g, 防己 15 g, 杜仲 15 g, 五灵脂 15 g, 枸杞子 15 g,

炒没药 15 g, 由黑龙江中医药大学附属第二医院提供 (黑药制备字 Z20220247000, 规格 0.4 g/粒)。配制成 0.02、0.08 g/ml 芪苈通痹水溶液备用。

1.3 主要试剂和仪器

SKL2001 (货号: HY-101085), 美国 MCE 公司; 戊巴比妥钠 (货号: 57-33-0), 德国 Merck 公司; 4% 多聚甲醛通用型组织固定液 (货号: BL539A), 北京兰杰柯科技有限公司; 枸橼酸抗原修复液 (货号: 314601), 上海桂浦生物科技有限公司; 3% 过氧化氢溶液 (货号: 7722-84-1), 上海懋康生物科技有限公司; 乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙液、HE 染色试剂盒、番红 O-固绿染色试剂盒 (货号: E1171、G1120、G1371), 北京索莱宝科技有限公司; Trizol 试剂 (货号: 15596018), 美国 Thermo 公司; 反转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒 (货号: RR036A、RR420A), 大连宝生物工程有限公司; 兔单抗蛋白多糖 (货号: 28971)、兔单抗剪切型天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶 3 (Cleaved Caspase-3) (货号: 9661)、兔单抗 Wnt3a (货号: 2391)、兔单抗糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β) (货号: 9315)、兔单抗 β -catenin (货号: 8480), 美国 CST 公司; 兔多抗 COL II (货号: BA0533)、兔多抗基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) (货号: PB0265)、兔多抗基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) (货号: PB9669)、兔多抗基质金属蛋白酶 13 (MMP-13) (货号: BA2204), 武汉博士德生物工程有限公司; 兔单抗 P53 (货号: bsm-60806R)、兔单抗 P21 (货号: bsm-60698R)、兔多抗 P16 (货号: bs-23797R)、兔多抗 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (BCL-2) (货号: bs-0032R)、兔多抗 BCL-2 相关 X 蛋白 (BAX) (货号: bs-0127R)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记兔 IgG (货号: bs-0295P-HRP), 北京博奥森生物技术有限公司; 增强型化学发光试剂 (ECL, 货号: ECL-N-100), 上海炎熙生物科技有限公司。

XPRT20 X 型射线机, 美国 KUBTEC 公司; 3.0T MRI 仪, 上海联影医疗设备有限公司; TS100 倒置光学显微镜, 日本 Nikon 公司; NanoDrop OneC 超微量紫外分光光度计, 美国 Thermo 公司; Optima MAX-XP 型超速离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 164-5050 型基础电泳仪、GelDoc XR 型凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 动物造模、分组及给药

75 只大鼠采用随机数字表法分为对照组、模

型组、芪芍通痹低剂量组、芪芍通痹高剂量组、芪芍通痹高剂量+激动剂组，每组 15 只。采用纤维环穿刺法^[15]制备 IDD 大鼠模型，具体如下：大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉，仰卧位固定于手术台上，使用 X 线透视仪定位 L4-L5 椎间盘节段，使用 21G 穿刺针与椎间盘矢状面呈 0°~60°，平行于软骨终板进针，穿刺深度为 2.3 mm。对照组大鼠不进行穿刺。造模 2 周后，对椎间盘组织进行 HE 染色，模型组大鼠存在髓核破裂，纤维环出现明显分层裂隙，对照组大鼠髓核完整且纤维环排列有序时，说明大鼠 IDD 模型制备成功^[16]。所有大鼠均造模成功。根据“人与大鼠体表面积折算等效剂量换算公式”^[17]，计算出芪芍通痹胶囊 0.4 g/(kg·d) 为临床等效剂量，芪芍通痹胶囊低、高剂量分别取等效剂量的 1/2、2 倍。造模成功后芪芍通痹低、高剂量组大鼠分别给予芪芍通痹胶囊 0.2、0.8 g/(kg·d) 灌胃。芪芍通痹高剂量+激动剂组给予芪芍通痹胶囊 0.8 g/(kg·d) 和 SKL2001 溶液 10 mg/(kg·d) 灌胃；对照组、模型组给予 10 ml/(kg·d) 蒸馏水灌胃，均每天 1 次，连续灌胃 4 周。

1.5 观察指标及方法

最后一次灌胃 24 h 后，颈椎脱臼处死大鼠，经右侧后腹膜切开皮肤和组织，留取 L4-L5 椎间盘节段进行相关指标检测。

1.5.1 IDD 程度 X 射线检测：取大鼠椎间盘组织，使用 X 射线机成像，参数设置为 55 kV、72 μA，测量椎间盘前方高度 (a)、中部高度 (b)、后方高度 (c)，上位椎体的矢状直径 (d)，计算椎间盘高度指数 (DHI)， $DHI = [(a+b+c)/d] \times 100\%$ 。

MRI 检测：取大鼠椎间盘组织，使用 3.0T MRI，参数设置为 TR：3000 ms，TE：120 ms。利用影像归档和通信系统 (pacs) 分析图像，评估矢状 T2 加权图像中的信号和结构变化，根据 MRI Pfirrmann 分级^[18]分析退变程度。

1.5.2 椎间盘组织结构变化 HE 染色：采用随机数字表法每组选取 5 只大鼠椎间盘组织，使用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h，10% 乙二胺四乙酸进行脱钙，每 24 h 更换脱钙液，针刺能轻松穿过组织时证明脱钙完成。组织经梯度乙醇（70%、80%、85%、90%、95%、100%）脱水，二甲苯 I/II 透明，浸蜡，修蜡，使用切片机切成 5 μm 薄片。切片放置在温水中展平，随后烘片，二甲苯 I/II 脱蜡，梯度乙醇水化，苏木精染色，盐酸乙醇分化，氨水反

蓝，伊红染色，乙醇脱水，二甲苯透明，中性胶封片，于显微镜（×200）下观察椎间盘组织结构变化。

番红 O-固绿染色：取制备的石蜡切片，常规脱蜡，使用固绿染色，盐酸乙醇分化，番红染色，常规脱水，透明，封片，于显微镜（×200）下观察椎间盘组织结构变化。

1.5.3 免疫组化染色法观察椎间盘组织蛋白多糖、COL II、MMP-3 蛋白水平 取制备的石蜡切片，常规脱蜡，浸入 0.01 mol/L 枸橼酸溶液进行高温修复，自然冷却后，加入 3% 过氧化氢阻断过氧化物酶，使用 3% 胎牛血清室温封闭 1 h，滴加抗体稀释液（蛋白多糖、COL II、MMP-3，稀释 1：200）4℃ 孵育过夜，滴加生物素标记的二抗（稀释 1：2000）室温孵育 1 h，二氨基联苯胺显色液显色，流水冲洗终止显色，苏木精复染，盐酸乙醇分化，氨水返蓝，常规脱水，透明，封片，于显微镜（×200）下观察椎间盘蛋白多糖、COL II、MMP-3 表达情况。使用 Image J 1.8.0 软件进行定量分析，即获得图片中所有阳性信号的累计光密度值 (IOD) 后，计算平均光密度值 (MOD)。MOD=IOD/测量区域的面积。

1.5.4 Western Blot 法检测椎间盘 ECM、衰老、凋亡及 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白水平 采用随机数字表法每组选取 5 只大鼠椎间盘髓核组织约 25 mg，使用 RIPA 试剂充分裂解，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min（离心半径 10 cm），收集蛋白上清液，使用二喹林甲酸法测定蛋白浓度并进行均一化，蛋白中加入上样缓冲液混匀，沸水浴变性 10 min。配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶，胶孔中加入蛋白和蛋白质分子量标准，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，反应条件：浓缩胶 80 V 30 min；分离胶 120 V 40 min。电泳结束后，根据蛋白分子量切胶，按照滤纸→聚偏氟乙烯膜→胶→滤纸的顺序转膜，反应条件为 300 mA，转膜 1 h 后，将聚偏氟乙烯膜置于 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h，滴加抗体稀释液（蛋白多糖、COL II、MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BCL-2、BAX、Cleaved Caspase-3、Wnt3a、GSK-3β、β-catenin，稀释 1：2000）4℃ 孵育过夜，滴加 HRP 标记的二抗（稀释 1：5000）室温孵育 1 h，ECL 显色，曝光，显影，β-actin 为内参，Image Pro Plus 6.0 软件分析各指标蛋白相对水平。

1.5.5 RT-qPCR 检测椎间盘组织 *Wnt3a*、*GSK-3β*、*β-catenin* mRNA 表达 采用随机数字表法每组选取 5 只大鼠椎间盘髓核组织约 25 mg，使用 Trizol 试剂充分研磨，加入氯仿剧烈震荡，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min（离心半径 10 cm），收集上层的 RNA 溶液，加入等量异丙醇混匀，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min（离心半径 10 cm），收集白色 RNA 沉淀，使用 75% 乙醇洗涤 2 次，室温干燥，加入 20 μl DEPC 水溶液 RNA，使用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。使用反转录试剂盒获得 cDNA，反应条件为 37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s。使用 SYBR Green 试剂盒进行扩增，反应条件为 95 ℃ 10 min、95 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s，40 个循环，*β-actin* 校正 Ct 值，2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 相对水平。PCR 引物序列见表 1。

表 1 各组大鼠椎间盘髓核组织 *Wnt3a*、*GSK-3β*、*β-catenin* mRNA 及内参的引物序列

Table 1 Primer sequences for *Wnt3a*, *GSK-3β* and *β-catenin* mRNA in the intervertebral disc NP tissue of each group of rats

基因名称	序列	产物长度 /bp
<i>Wnt3a</i>	上游: 5'-GATCGATGCCAGTCCGAAAG-3'	956
	下游: 5'-GTGTAGTCAGTCAATCAC-3'	
<i>GSK-3β</i>	上游: 5'-GGTCAAACGTCCGTACAA-3'	1306
	下游: 5'-GTATGCCGTTGCCCAAGTTC-3'	
<i>β-catenin</i>	上游: 5'-CCTGTACAGTACCTGAAT-3'	310
	下游: 5'-GTAGTCGTAGGTGACGTG-3'	
<i>β-actin</i>	上游: 5'-TTGACCTGGGAACCCGTAC-3'	304
	下游: 5'-TGATGCCGTGCCAAACGTTCAT-3'	

注: *GSK-3β*, 糖原合酶激酶-3β; *β-catenin*, β-连环蛋白。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布且方差齐，以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 IDD 程度比较

表 2 示，与对照组比较，模型组椎间盘组织 DHI 指数明显降低，MRI Pfirrmann 分级明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，芪芍通痹低、高剂量组椎间盘组织 DHI 指数明显升高，MRI Pfirrmann 分级明显降低 ($P < 0.05$)；与芪芍通痹低剂量组比较，芪芍通痹高剂量组椎间盘组织 DHI 指数明显

升高，MRI Pfirrmann 分级明显降低 ($P < 0.05$)；与芪芍通痹高剂量组比较，芪芍通痹高剂量+激动剂组椎间盘组织 DHI 指数明显降低，MRI Pfirrmann 分级明显升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠椎间盘组织 DHI、MRI Pfirrmann 分级比较
Table 2 Comparison of Comparison of DHI and Pfirrmann MRI grading of intervertebral disc tissue in each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	DHI/%	MRI Pfirrmann 分级
对照组	5	100.00±8.12	1.20±0.45
模型组	5	42.67±6.03 ^{a)}	4.40±0.55 ^{a)}
芪芍通痹低剂量组	5	59.04±10.24 ^{b)}	2.60±0.55 ^{b)}
芪芍通痹高剂量组	5	83.66±10.07 ^{b) c)}	1.60±0.55 ^{b) c)}
芪芍通痹高剂量+激动剂组	5	50.67±4.51 ^{d)}	3.80±0.84 ^{d)}

注: DHI, 椎间盘高度指数。

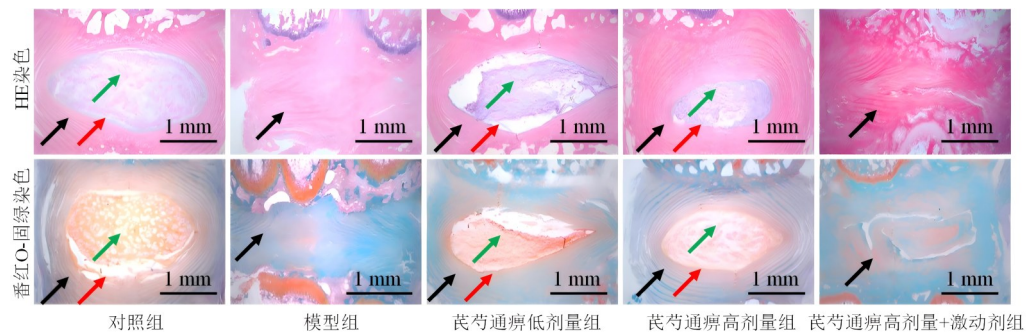
a) 与对照组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$;

c) 与芪芍通痹低剂量组比较, $P < 0.05$; d) 与芪芍通痹高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 示，对照组大鼠椎间盘髓核和纤维环结构完整，髓核细胞数量丰富。与对照组比较，模型组大鼠 IDD 程度明显加重，椎间盘髓核和纤维环结构完整性降低，髓核细胞数量减少。与模型组比较，芪芍通痹低、高剂量组大鼠 IDD 程度明显减轻，椎间盘髓核和纤维环结构较完整，髓核细胞数量增多。与芪芍通痹低剂量组比较，芪芍通痹高剂量组大鼠 IDD 程度进一步减轻，椎间盘髓核和纤维环结构更加完整，髓核细胞数量进一步增多。与芪芍通痹高剂量组比较，芪芍通痹高剂量+激动剂组大鼠 IDD 程度明显加重，椎间盘髓核和纤维环结构完整性降低，髓核细胞数量减少。

2.2 各组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、MMP-3 蛋白水平比较

表 3 示，与对照组比较，模型组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II MOD 值明显降低，MMP-3 MOD 值明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，芪芍通痹低、高剂量组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II MOD 值明显升高，MMP-3 MOD 值明显降低 ($P < 0.05$)；与芪芍通痹低剂量组比较，芪芍通痹高剂量组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II MOD 值明显升高，MMP-3 MOD 值明显降低 ($P < 0.05$)；与芪芍通痹高剂量组比较，芪芍通痹高剂量+激动剂组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II MOD 值明显降低，MMP-3 MOD 值明显升高 ($P < 0.05$)。各组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、



注：图中黑色箭头指示为纤维环，红色箭头指示为髓核，绿色箭头指示为髓核细胞。

图1 各组大鼠椎间盘组织形态比较 [HE 染色 (×200)，番红 O-固绿染色 (×200)]

Figure 1 Comparison of the morphology of intervertebral disc tissue in each group of rats [HE staining (×200), Safranin O-Fast green staining (×200)]

表3 各组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、MMP-3蛋白水平比较

Table 3 Comparison of proteoglycan, COL II and MMP-3 protein levels in the intervertebral disc NP tissue of each group of rats (MOD, $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	蛋白多糖	COL II	MMP-3
对照组	5	0.78±0.06	0.25±0.03	0.11±0.04
模型组	5	0.26±0.05 ^{a)}	0.07±0.03 ^{a)}	0.53±0.04 ^{a)}
芪芍通痹低剂量组	5	0.57±0.05 ^{b)}	0.14±0.04 ^{b)}	0.29±0.04 ^{b)}
芪芍通痹高剂量组	5	0.72±0.08 ^{b) c)}	0.21±0.04 ^{b) c)}	0.18±0.04 ^{b) c)}
芪芍通痹高剂量+激动剂组	5	0.29±0.04 ^{d)}	0.12±0.02 ^{d)}	0.38±0.03 ^{d)}

注：COL II，Ⅱ型胶原蛋白；MMP-3，基质金属蛋白酶3。

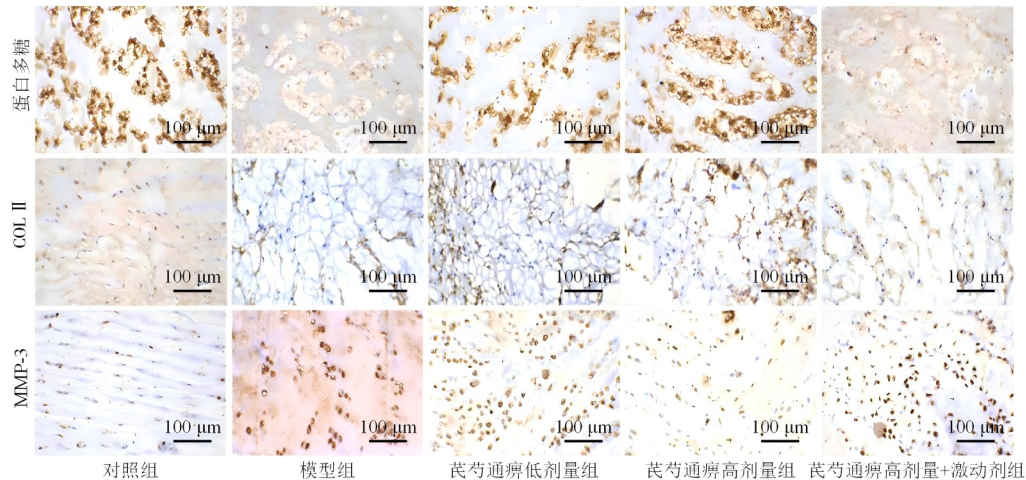
a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与芪芍通痹低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与芪芍通痹高剂量组比较， $P<0.05$ 。

COL II、MMP-3蛋白免疫组化结果见图2，图中阳性染色呈棕黄色，阴性染色呈淡蓝色。

2.3 各组大鼠椎间盘髓核组织ECM、衰老、凋亡及Wnt/β-catenin通路相关蛋白水平比较

表4示，与对照组比较，模型组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、BCL-2、GSK-3β蛋白

水平明显降低，MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BAX、Cleaved Caspase-3、Wnt3a、β-catenin蛋白水平明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，芪芍通痹低、高剂量组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、BCL-2、GSK-3β蛋白水平明显升高，MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BAX、



注：COL II，Ⅱ型胶原蛋白；MMP-3，基质金属蛋白酶3。

图2 各组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、MMP-3蛋白表达结果 (免疫组化×200)

Figure 2 Immunohistochemical images of proteoglycan, COL II and MMP-3 protein in the intervertebral discs NP tissue of rats in each group (Immunohistochemistry×200)

Cleaved Caspase-3、Wnt3a、 β -catenin 蛋白水平明显降低 ($P<0.05$)；与芪苈通痹低剂量组比较，芪苈通痹高剂量组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、BCL-2、GSK-3 β 蛋白水平明显升高，MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BAX、Cleaved Caspase-3、Wnt3a、 β -catenin 蛋白水平明显降低 ($P<0.05$)；与芪苈通痹高剂量组比较，芪苈通痹高剂量+激动剂组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、BCL-2、GSK-3 β 、Wnt3a、 β -catenin 蛋白水平明显降低，MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BAX、Cleaved Caspase-3 蛋白水平明显升高 ($P<0.05$)。各组大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II、MMP-3、MMP-9、MMP-13、P53、P21、P16、BCL-2、BAX、Cleaved Caspase-3、GSK-3 β 、

Wnt3a、 β -catenin 蛋白电泳图见图 3。

2.4 各组大鼠椎间盘髓核组织 Wnt3a、GSK-3 β 、 β -catenin mRNA 表达比较

表 5 示，与对照组比较，模型组大鼠椎间盘髓核组织 Wnt3a、 β -catenin mRNA 表达明显升高，GSK-3 β mRNA 水平明显降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，芪苈通痹低、高剂量组大鼠椎间盘髓核组织 Wnt3a、 β -catenin mRNA 水平明显降低，GSK-3 β mRNA 水平明显升高 ($P<0.05$)；与芪苈通痹低剂量组比较，芪苈通痹高剂量组大鼠椎间盘髓核组织 Wnt3a、 β -catenin mRNA 水平明显降低，GSK-3 β mRNA 水平明显升高 ($P<0.05$)；与芪苈通痹高剂量组比较，芪苈通痹高剂量+激动剂组大鼠椎间盘髓核组织 GSK-3 β mRNA 水平明显降低 ($P<0.05$)。

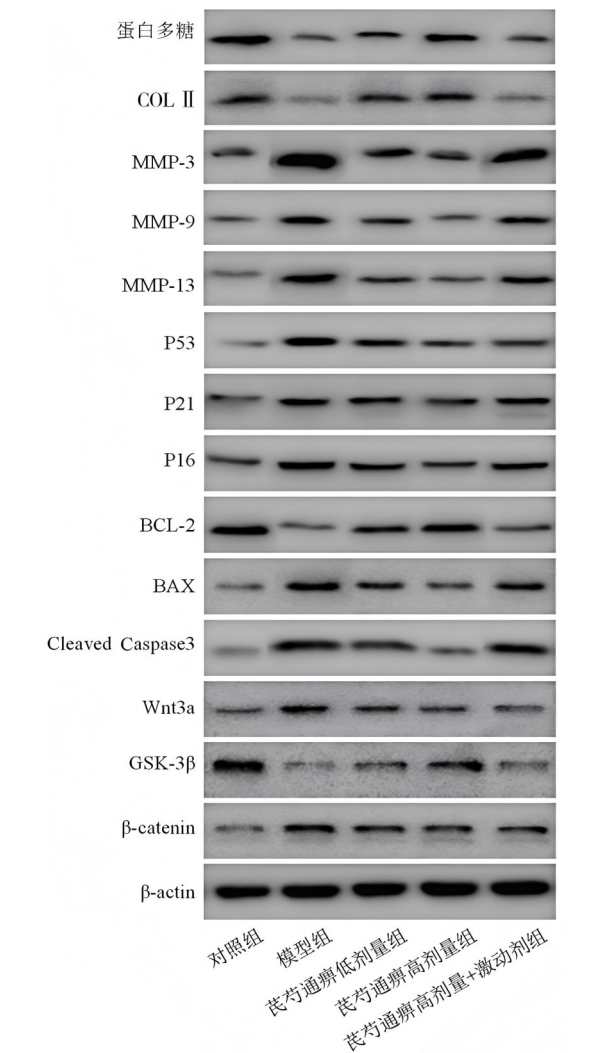
表 4 各组大鼠椎间盘髓核组织 ECM、衰老、凋亡及 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白水平比较

Table 4 Comparison of ECM, aging, apoptosis, and Wnt/ β -catenin pathway related protein levels in the intervertebral disc

NP tissue of rats in each group					(/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	蛋白多糖	COL II	MMP-3	MMP-9
对照组	5	0.74 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02
模型组	5	0.10 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.04 $\pm$ 0.01 ^{a)}	1.30 $\pm$ 0.13 ^{a)}	0.32 $\pm$ 0.04 ^{a)}
芪苈通痹低剂量组	5	0.20 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.25 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.36 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.22 $\pm$ 0.03 ^{b)}
芪苈通痹高剂量组	5	0.42 $\pm$ 0.05 ^{b) c)}	0.30 $\pm$ 0.03 ^{b) c)}	0.26 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.13 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}
芪苈通痹高剂量+激动剂组	5	0.15 $\pm$ 0.02 ^{d)}	0.05 $\pm$ 0.01 ^{d)}	0.94 $\pm$ 0.09 ^{d)}	0.28 $\pm$ 0.03 ^{d)}
组别	鼠数	MMP-13	P53	P21	P16
对照组	5	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02
模型组	5	0.46 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.46 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.32 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.37 $\pm$ 0.04 ^{a)}
芪苈通痹低剂量组	5	0.18 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.30 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.24 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.23 $\pm$ 0.03 ^{b)}
芪苈通痹高剂量组	5	0.12 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.15 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.17 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.15 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}
芪苈通痹高剂量+激动剂组	5	0.27 $\pm$ 0.03 ^{d)}	0.18 $\pm$ 0.02 ^{d)}	0.31 $\pm$ 0.04 ^{d)}	0.30 $\pm$ 0.04 ^{d)}
组别	鼠数	BCL-2	BAX	Cleaved Caspase-3	Wnt3a
对照组	5	0.51 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02
模型组	5	0.10 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.47 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.50 $\pm$ 0.06 ^{a)}	0.32 $\pm$ 0.03 ^{a)}
芪苈通痹低剂量组	5	0.22 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.20 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.32 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.17 $\pm$ 0.02 ^{b)}
芪苈通痹高剂量组	5	0.37 $\pm$ 0.04 ^{b) c)}	0.13 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.11 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.14 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}
芪苈通痹高剂量+激动剂组	5	0.13 $\pm$ 0.02 ^{d)}	0.34 $\pm$ 0.03 ^{d)}	0.45 $\pm$ 0.05 ^{d)}	0.11 $\pm$ 0.02
组别	鼠数	GSK-3 β	β -catenin		
对照组	5	0.92 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.02		
模型组	5	0.04 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.35 $\pm$ 0.04 ^{a)}		
芪苈通痹低剂量组	5	0.12 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.24 $\pm$ 0.03 ^{b)}		
芪苈通痹高剂量组	5	0.37 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.20 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}		
芪苈通痹高剂量+激动剂组	5	0.07 $\pm$ 0.01 ^{d)}	0.18 $\pm$ 0.02		

注：COL II，II 型胶原蛋白；MMP-3，基质金属蛋白酶 3；MMP-9，基质金属蛋白酶 9；MMP-13，基质金属蛋白酶 13；BCL-2，B 细胞淋巴瘤/白血病 2；BAX，BCL-2 相关 X 蛋白；Cleaved Caspase-3，剪切型天冬氨酸-半胱氨酸蛋白酶 3， β -catenin， β -连环蛋白；GSK-3 β ，糖原合酶激酶 3 β 。

a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与芪苈通痹低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与芪苈通痹高剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：COL II，Ⅱ型胶原蛋白；MMP-3，基质金属蛋白酶-3；MMP-9，基质金属蛋白酶9；MMP-13，基质金属蛋白酶13；BCL-2，B 细胞淋巴瘤/白血病 2；BAX，BCL-2 相关 X 蛋白；Cleaved Caspase-3，剪切型天冬氨酸-半胱氨酸蛋白酶 3；β-catenin，β-连环蛋白；GSK-3β，糖原合酶激酶 3β。

图 3 各组大鼠椎间盘髓核组织 ECM、衰老、凋亡及 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis images of ECM, aging, apoptosis and Wnt/β-catenin pathway related protein in the intervertebral disc NP tissue of rats in each group

3 讨论

中医学将 IDD 归属为“腰痛”“痹症”范畴，认为其病机为肝肾亏损、气血瘀滞，治宜补益肝肾、活血化瘀^[19]。芪芍通痹胶囊方中黄芪补气升阳；白芍平肝止痛，亦有活血之功，共为君药。川芎活血行气，祛风止痛；当归补血活血，与川芎、白芍同用，补血而不滞血，活血而不伤血；三棱、莪术破血行气，消积止痛；延胡索、没药活血止痛，共为臣药。车前子、地龙、防己、五灵脂祛风湿，通络止痛；泽兰活血祛瘀，共为佐药。杜仲补肝肾、强筋骨；枸杞子滋补肝肾，与杜仲相伍，增强补益肝肾之力，为使药。全方共奏补益肝肾、活血散寒、行气止痛之效。

本研究采用纤维环穿刺法制备大鼠 IDD 模型，该方法操作相对简单，模型稳定性和重复性较高，纤维环穿刺法诱导的 IDD 过程较为缓慢，且退变程度与损伤大小之间存在明显正相关，这一过程与人类 IDD 的病理变化过程较为相似，是研究 IDD 病因学、病理生理学的有效动物模型^[20]。

髓核细胞过度凋亡及 ECM 破坏被认为是 IDD 的主要病理机制^[21]。在 IDD 过程中，衰老和凋亡的髓核细胞逐渐增加，从而增加炎症因子表达及基质金属蛋白酶（MMPs）分泌，进而加速临近细胞的凋亡和 ECM 降解。蛋白多糖、COL II 是 ECM 的重要组成部分，主要由髓核细胞分泌，蛋白多糖、COL II 蛋白水平降低表明髓核细胞活性降低及 ECM 合成减少^[22]。MMPs 是髓核 ECM 中蛋白多糖、COL II 的重要降解酶，MMPs（MMP-3、MMP-9、MMP-13）水平上升在 ECM 降解和 IDD 进程中发挥重要作用^[23]。P53 是调控端粒短缩、DNA 损伤的关键酶，P21 能够抑制细胞生长，应激损伤能够诱导 P16 表达，P53、P21、P16 在髓核细胞衰老中发挥主导作用^[24]。BCL-2、BAX、Cleaved Caspase-3 是细胞调

表 5 各组大鼠椎间盘髓核组织 Wnt3a、GSK-3β、β-catenin mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of Wnt3a, GSK-3β and β-catenin mRNA levels in the intervertebral disc NP tissue of rats in each group				
(/β-actin, $\bar{x} \pm s$)				
组别	鼠数	Wnt3a	GSK-3β	β-catenin
对照组	5	1.00±0.11	1.00±0.09	1.00±0.12
模型组	5	3.43±0.35 ^{a)}	0.22±0.03 ^{a)}	3.25±0.34 ^{a)}
芪芍通痹低剂量组	5	2.65±0.22 ^{b)}	0.45±0.06 ^{b)}	2.25±0.25 ^{b)}
芪芍通痹高剂量组	5	1.67±0.15 ^{b) c)}	0.67±0.08 ^{b) c)}	1.55±0.15 ^{b) c)}
芪芍通痹高剂量+激动剂组	5	1.60±0.14	0.26±0.04 ^{d)}	1.58±0.14

注：GSK-3β，糖原合酶激酶 3β；β-catenin，β-连环蛋白。
a) 与对照组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与芪芍通痹低剂量组比较， $P < 0.05$ ；d) 与芪芍通痹高剂量组比较， $P < 0.05$ 。

亡相关标志物, BCL-2 水平降低及 BAX、Cleaved Caspase-3 水平上升均说明细胞存在明显凋亡^[25]。本研究发现, IDD 大鼠椎间盘髓核组织蛋白多糖、COL II 蛋白水平降低, MMP-3、MMP-9、MMP-13 蛋白水平升高, 说明 IDD 大鼠 ECM 降解严重; P53、P21、P16 蛋白水平降低, 说明 IDD 大鼠髓核细胞明显衰老; BCL-2 蛋白水平降低, BAX、Cleaved Caspase-3 蛋白水平升高, 说明 IDD 大鼠髓核细胞凋亡明显增多。经过低、高剂量芪苈通痹胶囊治疗后, 大鼠 DHI 值升高, MRI Pfirrmann 分级降低, IDD 程度明显减轻, 椎间盘髓核和纤维环结构较完整, 髓核组织中 ECM 相关蛋白蛋白多糖、COL II 水平升高, MMP-3、MMP-9、MMP-13 水平降低, 衰老相关蛋白 P53、P21、P16 水平降低, 凋亡相关蛋白 BCL-2 蛋白水平升高, BAX、Cleaved Caspase-3 水平降低, 且高剂量芪苈通痹胶囊治疗效果更明显。以上结果说明芪苈通痹胶囊可能通过降低 P53、P21、P16 蛋白水平抑制髓核细胞衰老, 提高 BCL-2 蛋白水平并降低 BAX、Cleaved Caspase-3 蛋白水平抑制髓核细胞凋亡, 进而通过提升蛋白多糖、COL II 蛋白水平并降低 MMP-3、MMP-9、MMP-13 蛋白水平抑制 ECM 降解, 从而缓解 IDD 进程, 且以高剂量效果更佳。

Wnt/ β -catenin 通路是 Wnt 信号通路中的经典途径之一, 与 IDD 关系密切, 这一通路在椎间盘生物学功能和退行性改变过程中发挥重要作用^[26]。GSK-3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在 Wnt/ β -catenin 通路中通过调控 β -catenin 的降解与稳定, 进而影响下游靶基因的转录, 对细胞的增殖、分化、凋亡等过程产生重要影响^[27]。研究显示, 在白细胞介素 1 β 诱导的髓核细胞中, 上调 GSK-3 β 蛋白表达可通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路, 减轻髓核细胞衰老及 ECM 降解^[28]。本研究显示, IDD 大鼠椎间盘髓核组织 *Wnt3a*、 *β -catenin* mRNA 表达和相关蛋白水平升高, *GSK-3 β* mRNA 表达和相关蛋白水平降低, 说明 IDD 大鼠椎间盘髓核组织中 β -catenin 降解减少, Wnt/ β -catenin 通路被激活。经过低、高剂量芪苈通痹胶囊治疗后, 大鼠 *Wnt3a*、 *β -catenin* mRNA 表达和相关蛋白水平降低, *GSK-3 β* mRNA 表达和相关蛋白水平升高, 且以高剂量效果更佳, 说明芪苈通痹胶囊可能通过提高 *GSK-3 β* mRNA 表达及相关蛋白水平, 促进 β -catenin 的降解, 从而抑制 Wnt/ β -catenin 通路的激活。此外, 在芪苈通痹胶囊治疗组中加入 Wnt/ β -catenin 通路激动剂 SKL2001

后, 大鼠 *GSK-3 β* mRNA 表达和相关蛋白水平降低, 且大鼠 IDD 程度加深, 髓核细胞呈现明显衰老和凋亡状态, 说明芪苈通痹胶囊通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路缓解大鼠髓核细胞衰老和凋亡。

综上所述, 芪苈通痹胶囊能够抑制 IDD 大鼠髓核细胞衰老、凋亡和 ECM 降解, 其可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路发挥作用, 这为其临床治疗 IDD 提供了坚实的理论基础。但本研究对于芪苈通痹胶囊影响 Wnt/ β -catenin 通路的具体机制以及这一通路如何进一步影响髓核细胞的衰老、凋亡和 ECM 降解等过程尚未完全阐明, 有待后续进一步探索。

参考文献

- [1] FRANCISCO V, PINO J, MÁGONZÁLEZ-GAY, et al. A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18 (1): 47-60.
- [2] MADHU V, HERNANDEZ-MEADOWS M, BONESKI PK, et al. The mitophagy receptor BNIP3 is critical for the regulation of metabolic homeostasis and mitochondrial function in the nucleus pulposus cells of the intervertebral disc [J]. *Autophagy*, 2023, 19(6): 1821-1843.
- [3] WU JN, CHEN YY, LIAO ZH, et al. Self-amplifying loop of NF- κ B and periostin initiated by PIEZO1 accelerates mechano-induced senescence of nucleus pulposus cells and intervertebral disc degeneration [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(10): 3241-3256.
- [4] DU JC, XU ML, KONG FC, et al. CB2R attenuates intervertebral disc degeneration by delaying nucleus pulposus cell senescence through AMPK/GSK3 β pathway [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(2): 552-567.
- [5] LIANG DB, HONG DG, TANG FY, et al. Upregulated lnc-HRK-2: 1 prompts nucleus pulposus cell senescence in intervertebral disc degeneration [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5251-5261.
- [6] ZHOU WX, SHI YF, WANG H, et al. Exercise-induced FNDC5/irisin protects nucleus pulposus cells against senescence and apoptosis by activating autophagy [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(7): 1038-1048.
- [7] XIE T, PAN RJ, HUANG WZ, et al. Myricetin alleviates H₂O₂-induced senescence and apoptosis in rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2023, 61(2): 98-108.
- [8] 高宇鹤. 芪苈通痹胶囊合麦肯基疗法治疗第三腰椎横突综合征(肝肾亏虚型)的临床观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2023.
- [9] 谢欣昇. 芪苈通痹胶囊治疗气滞血瘀型腰椎间盘突出

- 症的临床观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2019.
- [10]杨祥军. 芪芍通痹胶囊治疗神经根型颈椎病的临床疗效观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2017.
- [11]LIU GF, ZHU GX, WU XY, et al. Thy-1 knockdown promotes the osteogenic differentiation of GMSCs via the Wnt/ β -catenin pathway [J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(23):3805–3815.
- [12]YANG XX, SUN YJ, LI X, et al. Rac1 regulates nucleus pulposus cell degeneration by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway and promotes the progression of intervertebral disc degeneration[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 322(3):C496–C507.
- [13]ZHU DX, WANG ZH, ZHANG GZ, et al. Periostin promotes nucleus pulposus cells apoptosis by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. FASEB J, 2022, 36(7):e22369.
- [14]WU ZL, CHEN YJ, ZHANG GZ, et al. SKI knockdown suppresses apoptosis and extracellular matrix degradation of nucleus pulposus cells via inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway and ameliorates disc degeneration[J]. Apoptosis, 2022, 27(1/2):133–148.
- [15]崔力扬, 刘尚礼, 丁悦, 等. 大鼠腰椎间盘针刺退变模型的建立[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(13):1008–1011.
- [16]黄帆, 邸安琪, 丘明旺, 等. X射线引导建立大鼠椎间盘退变模型[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(35):5652–5657.
- [17]徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1861.
- [18]PFIRRMANN CW, METZDORF A, ZANETTI M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2001, 26(17):1873–1878.
- [19]颜蕊, 吴伊冰, 孙小花, 等. 中医疗法治疗腰椎间盘突出症研究进展[J]. 中国民间疗法, 2024, 32(6):118–122.
- [20]栾静. mTOR 信号通路参与介导富血小板血浆修复大鼠椎间盘退变的机制研究[D]. 天津:天津医科大学, 2021.
- [21]MADHU V, HERNANDEZ-MEADOWS M, BONESKI PK, et al. The mitophagy receptor BNIP3 is critical for the regulation of metabolic homeostasis and mitochondrial function in the nucleus pulposus cells of the intervertebral disc[J]. Autophagy, 2023, 19(6):1821–1843.
- [22]CHEN G, ZHOU XP, LI H, et al. Inhibited microRNA-494-5p promotes proliferation and suppresses senescence of nucleus pulposus cells in mice with intervertebral disc degeneration by elevating TIMP3[J]. Cell Cycle, 2021, 20(1):11–22.
- [23]ZHAO YL, LI AM. miR-19b-3p relieves intervertebral disc degeneration through modulating PTEN/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(18):22459–22473.
- [24]SILWAL P, NGUYEN-THAI AM, MOHAMMAD HA, et al. Cellular senescence in intervertebral disc aging and degeneration: Molecular mechanisms and potential therapeutic opportunities [J]. Biomolecules, 2023, 13(4):686.
- [25]LIU CH, GAO XX, LOU JH, et al. Aberrant mechanical loading induces annulus fibrosus cells apoptosis in intervertebral disc degeneration via mechanosensitive ion channel Piezo1[J]. Arthritis Res Ther, 2023, 25(1):117.
- [26]ZHANG X, LV Z, WEI CJ, et al. Hypo-osmolality activates Wnt/ β -catenin mediated by AQP1 in nucleus pulposus cells degeneration[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2024, 70(1):194–199.
- [27]QIN JJ, NIU MD, CHA Z, et al. TRAIL and celastrol combinational treatment suppresses proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells via targeting Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(4):322–329.
- [28]WANG XB, WANG B, ZOU MX, et al. CircSEMA4B targets miR-431 modulating IL-1 β -induced degradative changes in nucleus pulposus cells in intervertebral disc degeneration via Wnt pathway[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(11):3754–3768.

The Effect of *Qishao Tongbi Capsule* (芪芍通痹胶囊) on the Wnt/ β -catenin Pathway in a Rat Model of Intervertebral Disc Degeneration

XUE Yumen¹, XU Xilin², HAN Wei¹, XU Jiaben¹, XU Wenting¹, LIU Zelin¹, ZHANG Xiaofeng³

1. The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150000; 2. The Third Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine; 3. Heilongjiang University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Qishao Tongbi Capsule* (芪芍通痹胶囊, QTC) in the treatment of intervertebral disc degeneration (IDD). **Methods** Seventy-five rats were randomly divided into control group, model group, low-dose QTC group, high-dose QTC group, high-dose QTC +agonist group, with 15 rats in

each group. Except for the control group, all other groups were subjected to a fibrous ring puncture to prepare an IDD model. After modeling, rats in low-dose QTC group and high-dose QTC group were given QTC at doses of 0.2 and 0.8 g/(kg·d) by gavage, respectively. Rats in high-dose QTC+ agonist group was given QTC at 0.8 g/(kg·d) and SKL2001 solution at 10 mg/(kg·d) by gavage. The control group and model group were given 10 ml/(kg·d) distilled water by gavage. All treatments were given once a day for 4 consecutive weeks. After treatment, X-ray and magnetic resonance imaging (MRI) were used to detect IDD degree. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Safranin O-Fast Green staining were used to observe the morphological changes of the intervertebral disc tissue. Immunohistochemical staining was performed to examine the levels of proteoglycan, type II collagen (COL II), and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in the intervertebral disc tissue. Western blotting was used to detect the extracellular matrix (ECM)-related proteins (proteoglycan, COL II, MMP-3, MMP-9, MMP-13), aging-related proteins (P53, P21, P16), apoptosis related proteins, including B-cell lymphoma/leukemia 2 (BCL-2), BCL-2 related X protein (BAX), Cleaved Caspase-3, and Wnt/ β -catenin pathway related proteins such as Wnt3a, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and β -catenin in the intervertebral disc nucleus pulposus (NP) tissue. Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) was used to assess the mRNA expression of *Wnt3a*, *GSK-3 β* , and *β -catenin* in intervertebral disc tissue. **Results** Compared with the model group, rats in the low-dose QTC group and high-dose QTC group exhibited improved DHI, decreased Pfirrmann grading, and alleviated IDD. The structural integrity of the NP and annulus fibrosus increased, and the number of the NP increased. The levels of proteoglycan, COL II, BCL-2 and GSK-3 β increased, while the levels of MMP-3, MMP-9, MMP-13, P53, P21, P16, BAX, Cleaved Caspase-3, Wnt3a and β -catenin protein decreased. The mRNA expression of *Wnt3a* and *β -catenin* mRNA decreased, while *GSK-3 β* mRNA expression increased ($P<0.05$). Compared with the low-dose QTC group, the high-dose QTC group showed further improvements in DHI, decrease in Pfirrmann grading ($P<0.05$), and greater alleviation of IDD. The structural integrity of NP and annulus fibrosus was further enhanced, and the number of NP cells further increased. The levels of proteoglycan, COL II, BCL-2 and GSK-3 β were higher, while the levels of MMP-3, MMP-9, MMP-13, P53, P21, P16, BAX, Cleaved Caspase-3, Wnt3a and β -catenin were lower. The mRNA expression of *Wnt3a* and *β -catenin* decreased, while *GSK-3 β* mRNA expression increased ($P<0.05$). Compared with the high-dose QTC group, the high-dose QTC +agonist group showed a decrease of DHI, an increase of Pfirrmann grading ($P<0.05$), significant aggravation of IDD, reduction in structural integrity of the NP and annulus fibrosus, a decrease of NP cell count, lower levels of proteoglycan, COL II, BCL-2 and GSK-3 β , and higher levels of MMP-3, MMP-9, MMP-13, P53, P21, P16, BAX and Cleaved Caspase-3. Additionally, *GSK-3 β* mRNA expression decreased ($P<0.05$). **Conclusion** QTC can inhibit NP cell aging, apoptosis, and ECM degradation in IDD rats, and its therapeutic effect may be mediated through the inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway.

Keywords intervertebral disc degeneration; nucleus pulposus cells; Wnt/ β -catenin pathway; *Qishao Tongbi Capsule* (芪芍通痹胶囊)

(收稿日期: 2024-08-17; 修回日期: 2024-09-29)

[编辑: 王利芬]