

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.05.012

实验研究

枳壳甘草汤对椎间盘退变模型大鼠尾椎间盘髓核组织细胞凋亡及 Hippo-YAP/TAZ 信号通路的影响

朱在师¹, 黄泽灵¹, 陈俊名¹, 徐波¹, 陆斌杰¹, 陈华¹, 段星星¹, 李宇卫^{1,2}, 沈晓峰^{1,2}✉

1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏省苏州市杨素路 18 号, 215009; 2. 苏州市吴门医派研究院骨伤研究所

[摘要] **目的** 基于河马 (Hippo) -Yes 相关蛋白 (YAP) /带有 PDZ 结合基序的转录共激活因子 (TAZ) 信号通路探讨吴门枳壳甘草汤延缓椎间盘退变的可能作用机制。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、枳壳甘草汤低剂量组、枳壳甘草汤高剂量组、枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组, 每组 10 只。假手术组大鼠采用 21G 针头在尾部 Co6/7/8 节段穿刺皮肤和肌肉 (深度约为 2 mm), 不损伤椎间盘, 其余各组大鼠在尾部 Co6/7/8 节段用 21G 针头穿刺尾椎间盘 5 mm 建立椎间盘退变大鼠模型。造模 1 周后, 枳壳甘草汤低、高剂量组分别予 6.24、12.24 g/(kg·d) 枳壳甘草汤灌胃, 枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组大鼠给予 12.24 g/(kg·d) 枳壳甘草汤灌胃后, 按 10 mg/kg 腹腔注射 YAP/TAZ 抑制剂 Verteporfin, 假手术组与模型组大鼠予 5 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。灌胃每日 1 次, 腹腔注射隔日 1 次。各组均连续干预 4 周后, 采用 HE 染色、番红 O-固绿染色及甲苯胺蓝染色观察大鼠尾椎间盘病理改变; 免疫组化法检测椎间盘髓核组织聚集蛋白聚糖 (Aggrecan)、基质金属蛋白酶 3 (MMP3) 表达; Tunel 荧光染色检测髓核组织细胞凋亡, 计算凋亡率; Western blot 法检测髓核组织中 Hippo-YAP/TAZ 信号通路 [包括 YAP、磷酸化 Yes 相关蛋白 (p-YAP)、磷酸化 20 样激酶 1/2 (p-MST1/2)、带有 PDZ 结合基序的磷酸化转录共激活因子 (p-TAZ)] 及凋亡相关蛋白 [包括剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Cleaved Caspase 3)、肿瘤基因 P53 (P53)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)] 水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠椎间盘发生明显退行性改变, 椎间盘髓核组织 Aggrecan、Bcl-2、YAP 蛋白水平降低, p-MST1/2、p-YAP、p-TAZ、P53、Bax、Cleaved Caspase 3、MMP3 蛋白水平及细胞凋亡率均上升 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组椎间盘退变均得到一定恢复, Aggrecan、Bcl-2、YAP 蛋白水平均升高, p-MST1/2、p-YAP、p-TAZ、P53、Bax、Cleaved Caspase 3、MMP3 蛋白水平及细胞凋亡率均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与枳壳甘草汤低剂量组比较, 枳壳甘草汤高剂量组大鼠椎间盘退变恢复更显著, p-MST1/2、p-YAP、p-TAZ、P53、Bax、Cleaved Caspase 3、MMP3 蛋白水平及细胞凋亡率降低, Aggrecan、Bcl-2、YAP 蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与枳壳甘草汤高剂量组比较, 枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组大鼠椎间盘退变恢复程度降低, p-MST1/2、p-YAP、p-TAZ、P53、Bax、Cleaved Caspase 3、MMP3 蛋白水平及细胞凋亡率升高, Aggrecan、Bcl-2、YAP 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 枳壳甘草汤可能通过抑制椎间盘髓核组织 YAP 磷酸化, 维持 Hippo-YAP/TAZ 信号通路功能, 降低髓核细胞凋亡, 从而延缓椎间盘退变。

[关键词] 椎间盘退变; 细胞凋亡; Yes 相关蛋白; 带有 PDZ 结合基序的转录共激活因子; 枳壳甘草汤

基金项目: 国家自然科学基金 (82174399); 江苏省中医药科技发展计划 (ZD202230); 苏州市临床重点病种诊疗技术专项 (LCZX202320); 苏州市科技发展计划 (SKYXD2022053、SKYD2023150); 江苏省医学重点学科和医学重点实验室建设单位 (苏卫科教[2022]17 号)

✉ 通讯作者: 29240818@qq.com

腰痛是一种常见的临床症状,椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是引起腰痛的主要原因之一,是由衰老、代谢和生物力学等多种因素引起的病理过程^[1]。目前,尚无有效方法能够治疗IDD,延缓IDD是治疗腰痛的重点。相较于传统手术治疗,中药复方在治疗IDD方面已有明确的临床疗效,其具有安全性高、疗效确切和副作用小的优势^[2]。枳壳甘草汤是由吴门医派龚正丰教授创立的经验方^[3],其临床运用已被证实对IDD引起的腰椎间盘突出及慢性非特异性腰痛患者的疼痛症状、腰椎功能有显著改善^[4-5]。前期研究显示,枳壳甘草汤可有效延缓大鼠IDD,改善模型大鼠疼痛敏感状态^[6-7]。近年来研究发现,河马(Hippo)-Yes相关蛋白(YAP)/带有PDZ结合基序的转录共激活因子(TAZ)信号通路作为细胞内信使,与正常骨发育、骨重塑等生理病理现象均相关^[8-9]。髓核细胞凋亡被认为在IDD进展过程中起着至关重要的作用,针对细胞凋亡是治疗IDD的重要策略^[10]。因此,本研究从Hippo-YAP/TAZ信号通路进一步探讨枳壳甘草汤治疗IDD的可能机制,为其临床应用提供研究基础。本研究获得苏州市中医医院医学伦理委员会批准(批号:2021伦动批051)。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级SD雄性大鼠50只,6周龄,体质量(220±20)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0011。饲养条件:规律进食,自由饮水,室温(25±2)℃,相对湿度40%~70%,光暗周期12 h/12 h。

1.2 药物

枳壳甘草汤组成:枳壳10g,当归10g,丹参10g,三棱10g,莪术10g,黑丑6g,白丑6g,甘草6g。中药均购自苏州市中医医院药剂科,水煎后使用旋转蒸发仪将药液浓缩成含生药1g/ml。

1.3 主要试剂及仪器

YAP/TAZ抑制剂Verteporfin(Selleck公司,货号:S1786);RIPA裂解液(货号:P0013C)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010),碧云天生物技术有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号:C0105S)、番红O-固绿染色试剂盒(货号:S191031)、甲苯胺蓝染色试剂盒(货号:S191032)、Tunel荧光染色试剂盒(货号:P0017),皮诺飞生物科技有限公司;二氨基联苯胺(货号:K5007),

DAKO公司;即用型免疫组化超敏UltraSensitive™SP试剂盒(货号:KIT-9720),福州迈新生物技术开发有限公司;戊巴比妥钠(货号:W0091),苏州亚科科技股份有限公司;基质金属蛋白酶3(MMP3)多克隆抗体(货号:17873-1-AP)、聚集蛋白聚糖(Aggregan)多克隆抗体(货号:13880-1-AP)、YAP多克隆抗体(货号:13584-1-AP)、磷酸化Yes相关蛋白(p-YAP)多克隆抗体(货号:29018-1-AP)、磷酸化20样激酶1/2(p-MST1/2)多克隆抗体(货号:80093-1-RR)、剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Cleaved Caspase 3)多克隆抗体(货号:25128-1-AP)、肿瘤基因P53(P53)多克隆抗体(货号:60283-2-Ig)、抗凋亡蛋白B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)多克隆抗体(货号:60283-2-Ig)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)多克隆抗体(货号:60283-2-Ig),武汉三鹰生物技术有限公司;带有PDZ结合基序的磷酸化转录共激活因子(p-TAZ)多克隆抗体(货号:AF4315),江苏亲科有限公司;ECL发光液(货号:180-5001),上海天能科技有限公司;蛋白marker(货号:1610375),美国Bio-Rad公司;山羊抗兔、山羊抗小鼠IgG二抗(货号分别为:HY-P8001、HY-P8004),上海MCE有限公司。

扫描仪(Pannoramic SCAN II型,济南丹吉尔电子有限公司);离心机(Heraeus Fresco17型, Thermo Fisher Scientific公司);天平(BSA124S-CW型, Sartorius公司);研磨仪(JXFSTPRP-24型,上海净信科技有限公司);显微镜(DMI3000B型, Leica公司);21G针头(镇江高冠医疗器械公司);ELx800光吸收酶标仪(Tanon 5200型,上海天能科技有限公司)。

1.4 动物分组、造模及干预方法

采用随机数字表法将50只雄性SD大鼠分为假手术组、模型组、枳壳甘草汤低剂量组、枳壳甘草汤高剂量组、枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组,每组10只。各组大鼠以3%戊巴比妥1 ml/kg腹腔注射麻醉,尾部Co6/7/8节段酒精消毒后21G针头穿刺尾椎间盘。假手术组穿刺皮肤和肌肉(深度约为2 mm),不损伤椎间盘,其余各组避开动静脉向椎间盘中心穿刺5 mm,刺入后针头旋转360°并留置10 s,消毒并标记穿刺位置,输液贴保护,建立IDD大鼠模型^[11]。造模1周后,大鼠腰椎X线显示椎间盘高度降低,椎间盘在HE染色下出现髓核脊索细胞明显减少,纤维环板层结构紊乱,则证明造模成功^[12]。

造模成功后, 采用等效剂量系数换算公式^[13]计算给药剂量, 枳壳甘草汤低、高剂量组分别予 6. 24、12. 24 g/(kg·d) 枳壳甘草汤灌胃 (其中低剂量为临床等效剂量); 枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组大鼠给予 12. 24 g/(kg·d) 枳壳甘草汤灌胃后, 按 10 mg/kg 腹腔注射 YAP/TAZ 抑制剂 Verteporfin, 腹腔注射隔日 1 次^[14-15]; 假手术组与模型组按 5 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。灌胃均每日 1 次, 各组均连续干预 4 周。

1. 5 观察指标及方法

药物干预完成后, 3% 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血, 然后快速离断大鼠尾部, 每组采用随机数字表法选择 5 只大鼠尾椎置于 4% 多聚甲醛中固定, 用于病理染色、Tunel 荧光染色及免疫组化; 每组剩余 5 只大鼠尾椎在冰上分离提取 Co6/7/8 椎间盘组织, 置于-80℃冰箱保存, 用于检测蛋白含量。

1. 5. 1 椎间盘组织病理染色 椎间盘组织用 4% 多聚甲醛固定后脱钙, 梯度脱水后透明, 石蜡包埋, 切片, 进行 HE 染色、番红 O-固绿染色及甲苯胺蓝染色, 显微镜下观察椎间盘组织病理改变情况并拍照。

1. 5. 2 免疫组化法检测椎间盘髓核组织 Aggrecan、MMP3 蛋白水平 椎间盘组织用 4% 多聚甲醛固定后脱钙, 梯度脱水后透明, 石蜡包埋, 切片, 抗原修复。将髓核组织切片在 4℃ 下与 MMP3 (1: 100)、Aggrecan (1: 100) 一抗孵育过夜。将切片与免疫组化试剂盒中山羊抗兔 IgG (1: 2500) 孵育 20 min, 然后用链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶试剂孵育 20 min。最后使用二氨基联苯胺检测免疫反应性, 并将切片用苏木精复染。免疫组化染色后, 阳性细胞呈棕褐色, 使用 Image J 1. 53c 软件统计积分光密度。积分光密度是平均光密度与面积的乘积, 阳性细胞染色颜色越深, 面积越大, 积分光密度值越高。

1. 5. 3 髓核组织 Tunel 荧光染色观察细胞凋亡情况 椎间盘组织用 4% 多聚甲醛固定后脱钙, 梯度脱水后透明, 石蜡包埋, 切片, 抗原修复。根据试剂盒说明书进行髓核组织 Tunel 荧光染色。使用 Image J 1. 53c 软件对凋亡细胞数及总细胞数进行定量并计算细胞凋亡率, 细胞凋亡率 (%) = 凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1. 5. 4 Western Blot 法检测椎间盘髓核组织凋亡和 Hippo-YAP/TAZ 通路相关蛋白水平 对髓核组织按照 100 mg/200 μl 加入 RIPA 裂解液, 匀浆 5 min, 4℃、12 000 r/min 离心 30 min (离心半径为 10 cm),

得到上清液。对上清液进行蛋白浓度测定, 加入上样缓冲液后加热使蛋白变性, -20℃保存。以 β-actin 为内参检测蛋白水平, 蛋白上样后凝胶电泳分离, 将印迹转移至 PVDF 膜进行封闭、一抗 (p-MST1/2、YAP、p-YAP、p-TAZ、P53、Bax、Bcl2 及 Cleaved Caspase 3 稀释比例均为 1: 1000) 及相对应的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗 (1: 5000) 孵育。利用化学发光成像仪进行显影, 分析各组 YAP、p-YAP、p-MST1/2、p-TAZ、P53、Bcl-2 和 Bax 蛋白水平情况。

1. 6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8. 0 对数据进行统计分析, 计量资料均符合正态分布且方差齐, 用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P < 0. 05$ 表示差异有统计学意义。

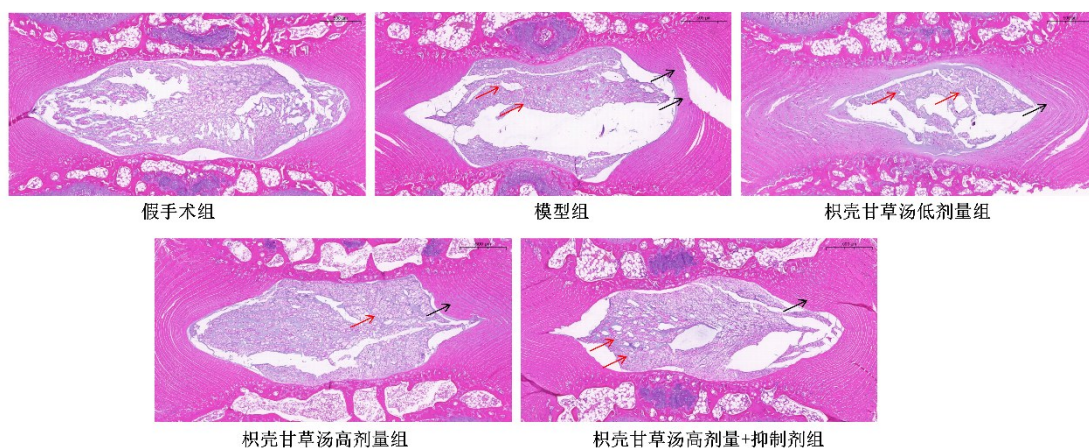
2 结果

2. 1 各组大鼠尾椎间盘病理改变比较

HE 染色 (图 1) 显示: 假手术组大鼠椎间盘组织结构正常, 髓核饱满, 网状结构完整, 与纤维环界限分明, 纤维环结构完整; 模型组大鼠可见明显椎间盘退行性改变, 髓核细胞数量减少, 纤维环排列不规则, 髓核与纤维环界限不清; 枳壳甘草汤低剂量组及枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组大鼠椎间盘组织中结构紊乱较模型组有所恢复, 纤维环结构一定程度恢复完整, 但仍排列不齐; 枳壳甘草汤高剂量组椎间盘组织中退变程度较模型组明显缓解, 纤维环内外层排列较规则, 可见内层纤维环与髓核间界线明显恢复清晰。

番红 O-固绿染色 (图 2) 显示: 假手术组可见椎间盘结构清晰, 髓核软骨基质呈均匀红色, 纤维环与髓核组织分界线清晰; 模型组髓核软骨基质呈红绿相间, 出现空洞, 纤维环与髓核红绿分界不清; 枳壳甘草汤低剂量组及枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组纤维环与髓核红绿分界欠清晰; 枳壳甘草汤高剂量组纤维环髓核红绿分界尚清晰。

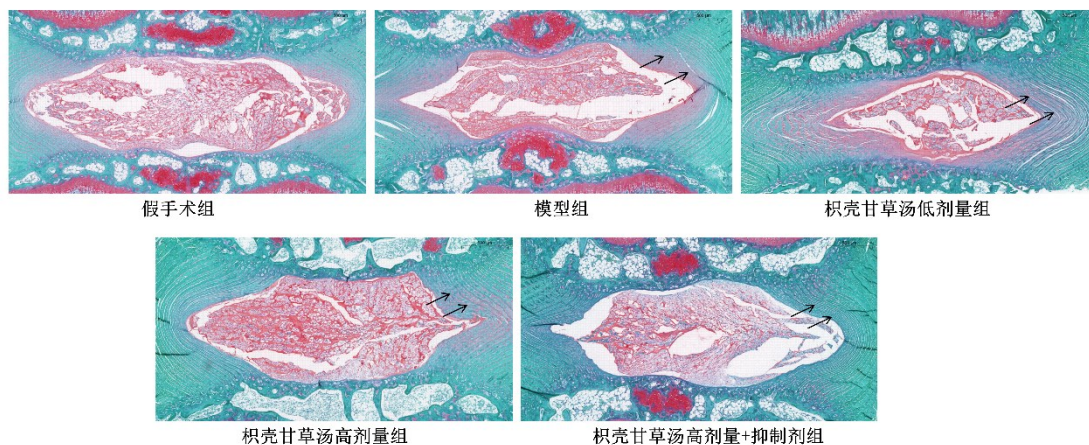
甲苯胺蓝染色 (图 3) 显示: 假手术组椎间盘形态清晰, 上下软骨终板呈蓝紫色; 软骨细胞核染色清晰, 与纤维环分界清楚; 模型组椎间盘上下软骨终板呈蓝紫色, 与纤维环分界不清; 各药物干预组椎间盘上下软骨终板呈蓝紫色, 其中枳壳甘草汤低剂量组及枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组与模型组相比纤维环分界较清晰; 枳壳甘草汤高剂量组恢复较好, 纤维环分界较模型组明显清晰。



注：红色箭头所指部分为髓核细胞，黑色箭头所指部分为纤维环。

图1 各组大鼠尾椎间盘髓核组织 HE 染色图 (×50)

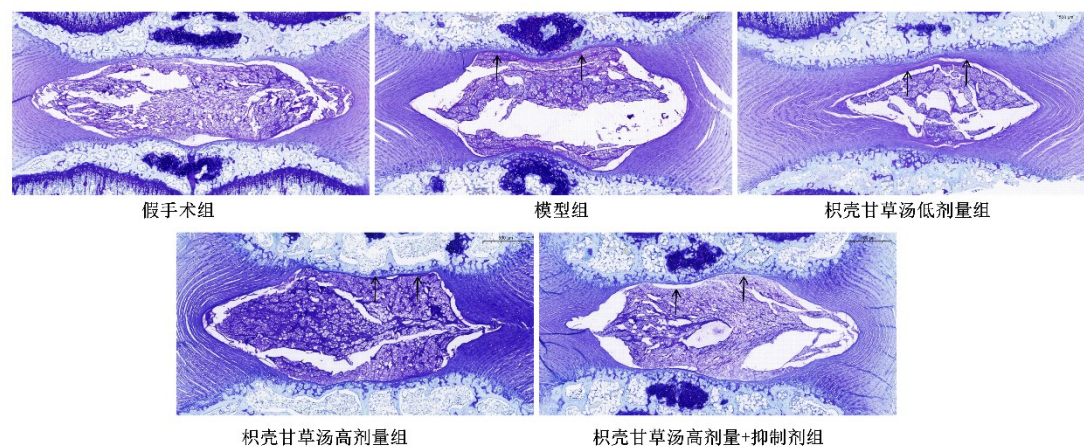
Figure 1 HE staining of nucleus pulposus tissue in the tail intervertebral disc of rats in each group (×50)



注：黑色箭头所指为纤维环与髓核红绿分界部分。

图2 各组大鼠尾椎间盘髓核组织番红 O-固绿染色图 (×50)

Figure 2 Oil Red O-Green staining of nucleus pulposus tissue in the tail intervertebral disc of rats in each group (×50)



注：黑色箭头所指为软骨终板与纤维环交界部分。

图3 各组大鼠尾椎间盘髓核组织甲苯胺蓝染色图 (×50)

Figure 3 Toluidine Blue staining of nucleus pulposus tissue in the tail intervertebral disc of rats in each group (×50)

2.2 各组大鼠尾椎间盘髓核组织 Aggrecan、MMP3 蛋白水平比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠尾椎间盘髓核组织 Aggrecan 蛋白水平降低, MMP3 蛋白水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组大鼠髓核组织 Aggrecan 蛋白水平均升高, MMP3 蛋白水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与枳壳甘草汤低剂量组比较, 枳壳甘草汤高剂量组 Aggrecan 蛋白水平较高, MMP3 蛋白水平较低 ($P<0.01$)。与枳壳甘草汤高剂量组比较, 枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组 Aggrecan 蛋白水平较低, MMP3 蛋白水平较高 ($P<0.05$)。各组大鼠尾椎间盘髓核组织 MMP3、Aggrecan 免疫组化染色见图 4。

2.3 各组大鼠尾椎间盘髓核组织细胞凋亡率比较

各组大鼠尾椎间盘组织 Tunel 荧光染色见图 5。表 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠尾椎间盘髓

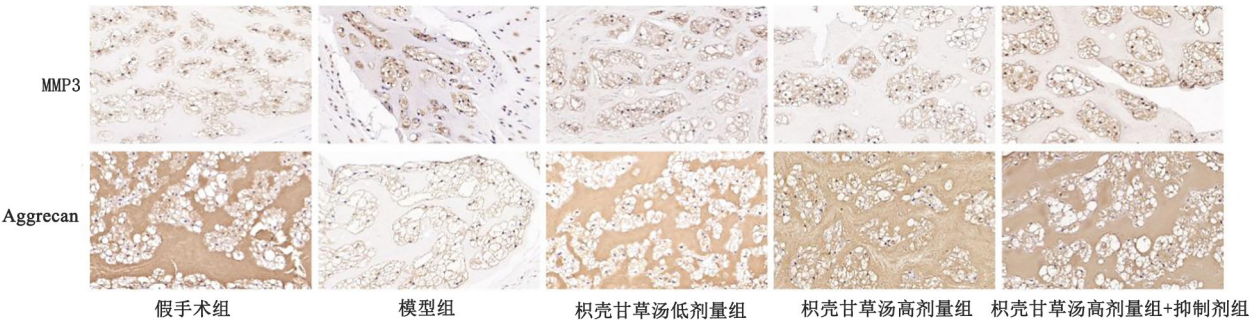
表 1 各组大鼠尾椎间盘髓核组织 Aggrecan、MMP3 蛋白水平比较

Table 1 Comparison of Aggrecan and MMP3 protein levels in the nucleus pulposus tissue of tail intervertebral discs in each group of rats (积分光密度, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Aggrecan	MMP3
假手术组	5	1.093±0.119	0.704±0.115
模型组	5	0.283±0.073 ^{a)}	2.910±0.595 ^{a)}
枳壳甘草汤低剂量组	5	0.498±0.005 ^{b)}	2.019±0.233 ^{b)}
枳壳甘草汤高剂量组	5	0.811±0.008 ^{c) d)}	0.849±0.470 ^{c) d)}
枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组	5	0.614±0.060 ^{c) e)}	1.760±0.187 ^{c) e)}

注: MMP3, 基质金属蛋白酶 3; Aggrecan, 聚集蛋白聚糖。
a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与枳壳甘草汤低剂量组比较, $P<0.01$; e) 与枳壳甘草汤高剂量组比较, $P<0.05$ 。

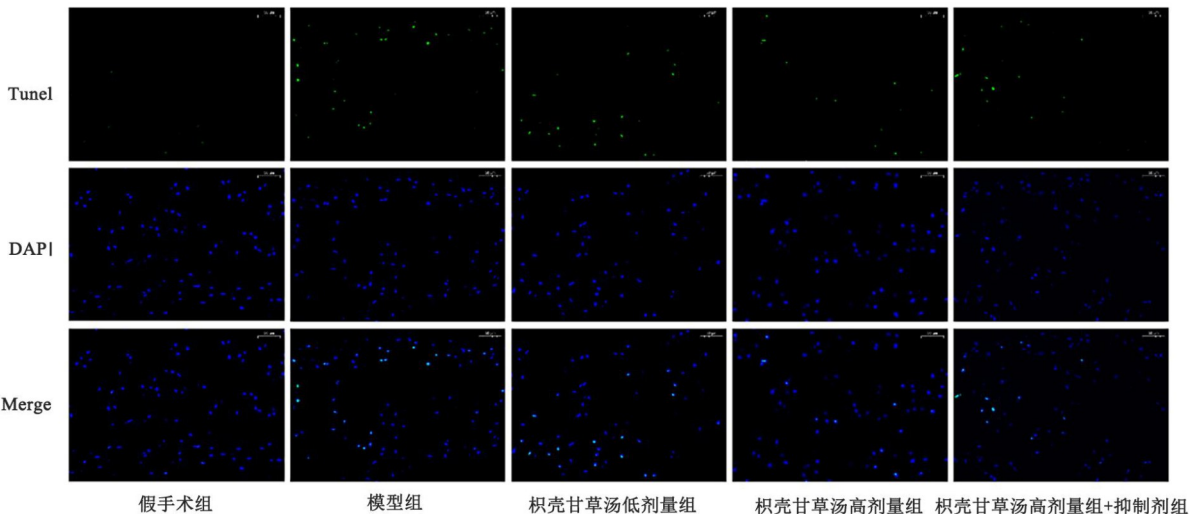
核组织细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组大鼠髓核组织细胞凋亡率显



注: MMP3, 基质金属蛋白酶 3; Aggrecan, 聚集蛋白聚糖。图中棕黄色颗粒染色为 MMP3、Aggrecan 阳性表达。

图 4 各组大鼠尾椎间盘髓核组织 MMP3、Aggrecan 免疫组化染色图 (×400)

Figure 4 Immunohistochemical staining of MMP3 and Aggrecan in the nucleus pulposus tissue of tail intervertebral discs in each group of rats (×400)



注: 图中绿色荧光代表凋亡细胞。

图 5 各组大鼠椎间盘组织 Tunel 荧光染色图 (×400)

Figure 5 Tunel fluorescence staining of intervertebral disc tissue in each group of rats (×400)

著降低 ($P<0.01$)。与枳壳甘草汤高剂量组比较, 枳壳甘草汤低剂量组和枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组大鼠髓核组织细胞凋亡率升高($P<0.01$)。

表2 各组大鼠尾椎间盘组织细胞凋亡率比较

Table 2 Comparison of cell apoptosis rates in the tail intervertebral disc tissue of rats in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

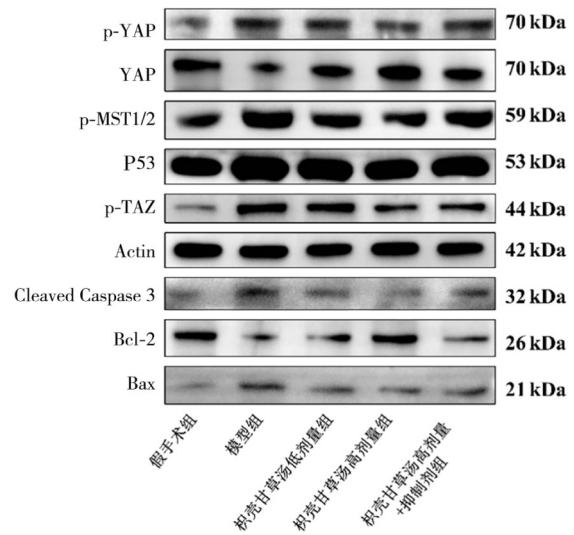
组别	鼠数	细胞凋亡率
假手术组	5	5.78±1.71
模型组	5	26.17±4.15 ^{a)}
枳壳甘草汤低剂量组	5	20.08±3.33 ^{b) c)}
枳壳甘草汤高剂量组	5	12.92±1.63 ^{b)}
枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组	5	19.41±2.33 ^{b) c)}

注: a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与枳壳甘草汤高剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠尾椎间盘髓核组织凋亡及 Hippo-YAP/TAZ 通道相关蛋白水平比较

表3示, 与假手术组比较, 模型组大鼠尾椎间盘髓核组织促凋亡蛋白 Bax、Cleaved Caspase 3、P53 蛋白水平显著升高, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白水平显著降低, p-YAP、p-TAZ、p-MST1/2 蛋白水平显著升高, YAP 蛋白水平显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组大鼠髓核组织 Bax、Cleaved Caspase 3、P53、p-YAP、p-TAZ 及 p-MST1/2 蛋白水平均降低, Bcl-2、YAP 蛋白水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与枳壳甘草汤低剂量组比较, 枳壳甘草汤高剂量组大鼠髓核组织 Cleaved Caspase 3、p-YAP、p-TAZ 及 p-MST1/2 蛋白水平降低, Bcl-2、YAP 蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与枳壳

甘草汤高剂量组比较, 枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组大鼠髓核组织 Bax、Cleaved Caspase 3、P53、p-YAP、p-TAZ 及 p-MST1/2 蛋白水平升高, Bcl-2、YAP 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠尾椎间盘髓核组织凋亡及 Hippo-YAP/TAZ 通道相关蛋白电泳图见图6。



注: Bcl-2, B 淋巴细胞瘤 2; Bax, Bcl-2 相关 X 蛋白; P53, 肿瘤基因 P53; Cleaved Caspase 3, 剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶; YAP, Yes 相关蛋白; p-YAP, 磷酸化 Yes 相关蛋白; p-MST1/2, 磷酸化 20 样激酶 1/2; p-TAZ, 带有 PDZ 结合基序的磷酸化转录共激活因子。

图6 各组大鼠尾椎间盘髓核组织凋亡及 Hippo-YAP/TAZ 通道相关蛋白电泳图

Figure 6 Apoptosis and Hippo-YAP/TAZ pathway-related protein electrophoresis of nucleus pulposus tissue in the tail intervertebral disc of rats in each group

表3 各组大鼠尾椎间盘髓核组织凋亡及 Hippo-YAP/TAZ 通道相关蛋白水平比较

Table 3 Comparison of apoptosis and Hippo-YAP/TAZ pathway-related protein levels in the nucleus pulposus tissue of tail intervertebral discs in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Bax	Bcl-2	Cleaved Caspase 3	P53	p-YAP	YAP	p-MST1/2	p-TAZ
假手术组	5	0.41±0.04	0.87±0.02	0.38±0.08	0.80±0.09	1.24±0.05	1.82±0.08	0.46±0.09	0.43±0.01
模型组	5	1.29±0.21 ^{a)}	0.46±0.01 ^{a)}	0.87±0.05 ^{a)}	1.73±0.38 ^{a)}	2.24±0.12 ^{a)}	0.91±0.03 ^{a)}	0.90±0.04 ^{a)}	1.10±0.08 ^{a)}
枳壳甘草汤低剂量组	5	0.62±0.45 ^{b)}	0.60±0.04 ^{b)}	0.63±0.07 ^{c)}	1.19±0.13 ^{b)}	1.70±0.04 ^{c)}	1.27±0.07 ^{b)}	0.68±0.07 ^{b)}	0.90±0.06 ^{b)}
枳壳甘草汤高剂量组	5	0.56±0.05 ^{c)}	0.79±0.08 ^{c)d)}	0.43±0.09 ^{c)e)}	0.95±0.06 ^{c)}	1.31±0.10 ^{c)d)}	1.57±0.05 ^{c)e)}	0.05±0.05 ^{c)e)}	0.54±0.057 ^{c)e)}
枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组	5	0.93±0.12 ^{b)f)}	0.58±0.05 ^{b)g)}	0.64±0.01 ^{b)f)}	1.21±0.16 ^{b)}	1.65±0.03 ^{c)g)}	1.25±0.20 ^{b)f)}	0.68±0.06 ^{b)f)}	0.74±0.06 ^{c)f)}

注: Bcl-2, B 淋巴细胞瘤 2; Bax, Bcl-2 相关 X 蛋白; P53, 肿瘤基因 P53; Cleaved Caspase 3, 剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶; YAP, Yes 相关蛋白; p-YAP, 磷酸化 Yes 相关蛋白; p-MST1/2, 磷酸化 20 样激酶 1/2; p-TAZ, 带有 PDZ 结合基序的磷酸化转录共激活因子。

a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与枳壳甘草汤低剂量组比较, $P<0.01$; e) 与枳壳甘草汤低剂量组比较, $P<0.05$; f) 与枳壳甘草汤高剂量组比较, $P<0.05$; g) 与枳壳甘草汤高剂量组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

IDD 是一种常见的增龄衰老相关的退行性肌肉骨骼疾病,其本身是一个机体衰老的自然过程。随着年龄的增长,椎间盘含水量、髓核细胞和细胞外基质减少,逐渐失去原有的弹性和功能,临床主要表现为疼痛和致残^[16]。目前,IDD 患者主要通过服用非甾体类抗炎药或肌肉松弛剂来缓解症状^[17]。然而,这些药物无法有效预防 IDD 或减缓其进展。根据 IDD 的增龄衰老的病因及疼痛活动受限等临床症状,中医学多将其归纳在“痹证”“腰痛”“腰腿痛”等范畴。其发病或因外感六淫、外伤跌扑、慢性劳损致经络受阻、气血运行不畅,不通则痛;或因先天禀赋不足、久病体虚致筋脉不荣则痛。针对痹证的病因及临床特点,龚正丰教授以通络止痛为原则,拟方枳壳甘草汤治疗痹证,临床疗效明确^[4-5]。方中枳壳行气化痰,三棱、莪术通经络、破瘀血,黑丑属水主泻肾;白丑主利肺治上焦痰饮,当归、丹参活血补血,甘草和中缓急;枳壳、三棱、莪术、黑丑、白丑皆为辛药,取辛药通络之法。全方共奏逐瘀利水、消肿止痛之功。

椎间盘发生退变后组织形态发生重大变化,髓核细胞凋亡和细胞外基质降解是 IDD 的主要病理特征,由炎性细胞因子驱动的分解代谢增加是导致髓核组织细胞外基质降解的重要因素^[18]。细胞外基质的主要成分包括二型胶原蛋白(Collagen II)和 Aggrecan,其降解与解聚蛋白样金属蛋白酶 4(ADAMTS4)和 MMP3 的活性密切相关。本研究显示,椎间盘针刺造模后,椎间盘髓核组织 Aggrecan 表达降低、MMP3 表达升高,出现髓核组织丢失,纤维环结构紊乱等病理改变,予枳壳甘草汤高、低剂量干预后,椎间盘髓核组织 Aggrecan 表达升高,MMP3 表达下降,椎间盘病理改变减轻。表明枳壳甘草汤可以抑制退变椎间盘髓核细胞外基质降解,延缓 IDD。与枳壳甘草汤低剂量比较,枳壳甘草汤高剂量组 Aggrecan 表达较低,MMP3 表达较高,表明存在一定的量效关系。与枳壳甘草汤高剂量组比较,枳壳甘草汤高剂量+抑制剂组 Aggrecan 蛋白水平较高,MMP3 蛋白水平较低,表明 Hippo-YAP/TAZ 信号通路抑制与细胞外基质降解相关。

Hippo-YAP/TAZ 信号通路在细胞凋亡、增殖和迁移中起重要作用^[9,19]。YAP、TAZ 是该通路的两种转录共激活因子和转录因子,哺乳动物 STE20 样激酶 1/2(MST1/2)是该通路的核心激酶级联,p-MST1/2 是该信号通路传导的重要激活因子^[20]。

Hippo-YAP/TAZ 信号通路主要通过抑制 YAP 磷酸化发挥抑凋亡作用。抑制 YAP 磷酸化、上调 YAP 蛋白水平能够抑制髓核细胞凋亡和细胞外基质退变^[21]。YAP 抑制剂 Verteporfin 能够抑制 YAP 增加细胞凋亡^[22]。因此,调节 YAP 蛋白水平和磷酸化可以通过抑制 IDD 细胞凋亡来改善 IDD。髓核细胞发生凋亡时抗凋亡基因 Bcl-2 表达下降,促凋亡基因 Bax 表达增高^[23];Cleaved Caspase 3 是细胞凋亡的关键介质,在多个凋亡信号传导路径中发挥功能,靶向调控 Cleaved Caspase 3 能有效阻止退变椎间盘细胞凋亡^[24]。P53 是一种重要的凋亡相关因子,P53 的激活可以导致细胞周期停滞,促进细胞凋亡^[25]。

本研究中,模型组大鼠椎间盘髓核组织中 p-YAP、p-TAZ、p-MST1/2 表达升高,说明 YAP 被磷酸化,磷酸化的 YAP 转移到细胞质中被蛋白酶水解,YAP 蛋白表达降低,无法与 TEAD 合作调节下游基因的转录,髓核组织促凋亡蛋白 P53、Bax、Cleaved Caspase 3 表达升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,髓核细胞大量凋亡。予枳壳甘草汤高、低剂量干预后,大鼠椎间盘组织 p-YAP、p-TAZ、p-MST1/2 及 P53、Bax、Cleaved Caspase 3 表达降低,YAP 及 Bcl-2 表达升高,且在降低 Cleaved Caspase 3、p-TAZ 及 p-MST1/2 蛋白水平和升高 Bcl-2 蛋白水平方面枳壳甘草汤高剂量组优于枳壳甘草汤低剂量组,表明枳壳甘草汤可能通过抑制 YAP 磷酸化,维持 Hippo-YAP/TAZ 信号通路活性,抑制髓核细胞凋亡,对 IDD 产生影响,且高剂量效果优于低剂量。我们既往研究已经证实枳壳甘草汤高剂量相较于低剂量对椎间盘退变具有更优的疗效^[26-27],与本研究结果一致,故而本研究选用了枳壳甘草汤高剂量添加抑制剂,进行了对比研究。结果显示,加入 YAP/TAZ 通路抑制剂 Verteporfin 后,枳壳甘草汤高剂量组对 YAP 磷酸化的抑制作用降低,维持 Hippo-YAP/TAZ 信号通路活性的作用减弱,枳壳甘草汤抑制髓核细胞凋亡和椎间盘退变的效果也减弱,进一步佐证了枳壳甘草汤延缓 IDD 的机制与其对 YAP 磷酸化和 Hippo-YAP/TAZ 信号通路的调控有关。

综上所述,枳壳甘草汤通过抑制 YAP 磷酸化,提高 YAP 蛋白表达,维持其转录功能,有效抑制髓核细胞凋亡及细胞外基质降解,延缓椎间盘退变。然而中药复方具有多成分、多靶点的特点,体内动物实验具有其局限性,不能完全明确 Hippo-YAP/TAZ 信号通路是枳壳甘草汤延缓椎间盘退变的关键

途径, 后期将进行细胞实验进一步体外验证。

参考文献

- [1] MOLINOS M, FIORDALISI MF, CALDEIRA J, et al. Alterations of bovine nucleus pulposus cells with aging[J]. Aging Cell, 2023, 22(8):e13873.
- [2] 吕圭源, 陈素红, 王婷. 面向应用是中药研究的核心[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(4): 479-487.
- [3] 龚正丰. 枳壳甘草汤[J]. 江苏中医药, 2011, 43(6):14.
- [4] 陈紫轩, 沈晓峰, 徐波, 等. 枳壳甘草汤结合腰椎斜扳手法治疗慢性非特异性腰痛的临床观察[J]. 中医临床杂志, 2024, 36(2):329-333.
- [5] 刘昱江, 汪松林, 蔡学峰, 等. 基于 Pfirrmann 分级观察枳壳甘草汤治疗腰椎间盘突出症的临床疗效[J]. 浙江中医药大学学报, 2023, 47(6):651-658.
- [6] HUANG Z, CAI X, SHEN X, et al. Identification and experimental verification of immune-related hub genes in intervertebral disc degeneration[J]. Heliyon, 2024, 10(14):e34530.
- [7] 徐波, 刘昱江, 汪松林, 等. 枳壳甘草汤抑制巨噬细胞 M1 极化延缓椎间盘退变的实验研究[J]. 环球中医药, 2023, 16(12):2421-2426.
- [8] VANYAI HK, PRIN F, GUILLERMIN O, et al. Control of skeletal morphogenesis by the Hippo-YAP/TAZ pathway[J]. Development, 2020, 147(21):dev187187.
- [9] HAN J, ZHANG J, ZHANG X, et al. Emerging role and function of Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in musculo-skeletal disorders[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1):386.
- [10] YU C, LI J, KUANG W, et al. PRDM1 promotes nucleus pulposus cell pyroptosis leading to intervertebral disc degeneration via activating CASP1 transcription[J]. Cell Biol Toxicol, 2024, 40(1):89.
- [11] 颜昊, 贾永伟, 翟伟峰. 椎间盘退变动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3):387-392.
- [12] LOTZ JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2004, 29(23):2742-2750.
- [13] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010:69-72.
- [14] 霍雨佳, 阳远舟, 邹成丽, 等. 汉黄芩素调节 Hippo/YAP 信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(15): 2740-2745.
- [15] 高兴强, 窦晓静, 郭燕春, 等. YAP 抑制药 Verteporfin 增强肝细胞癌导管动脉化疗栓塞术治疗大鼠的疗效[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(20):2970-2974.
- [16] XIA Q, ZHAO Y, DONG H, et al. Progress in the study of molecular mechanisms of intervertebral disc degeneration[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174:116593. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116593.
- [17] XIN J, WANG Y, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Orthop Surg, 2022, 14(7):1271-1280.
- [18] ZOU X, ZHANG X, HAN S, et al. Pathogenesis and therapeutic implications of matrix metalloproteinases in intervertebral disc degeneration: a comprehensive review[J]. Biochimie, 2023, 214(Pt B):27-48.
- [19] YANG YH, GU XP, HU H, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits nucleus pulposus cell apoptosis, inflammation and extracellular matrix degradation via the YAP1/TAZ pathway in rats with intervertebral disc degeneration[J]. J Orthop Surg Res, 2022, 17(1):555.
- [20] EDGAR BA. From cell structure to transcription: hippo forges a new path[J]. Cell, 2006, 124(2):267-273.
- [21] LIANG T, QIU J, LI S, et al. Inverse agonist of retinoid-related orphan receptor- α prevents apoptosis and degeneration in nucleus pulposus cells via upregulation of YAP[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021:9954909. doi: 10.1155/2021/9954909.
- [22] WANG Z, CUI M, QU Y, et al. Hypoxia protects rat bone marrow mesenchymal stem cells against compression-induced apoptosis in the degenerative disc microenvironment through activation of the HIF-1 α /YAP signaling pathway[J]. Stem Cells Dev, 2020, 29(20):1309-1319.
- [23] SUDO H, MINAMI A. Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression[J]. J Orthop Res, 2010, 28(12):1608-1613.
- [24] DING F, SHAO ZW, XIONG LM. Cell death in intervertebral disc degeneration[J]. Apoptosis, 2013, 18(7): 777-785.
- [25] 张文捷, 张勇, 史明, 等. 淫羊藿苷调控髓核来源间充质干细胞凋亡修复椎间盘退变[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(24):3803-3809.
- [26] HUANG Z, SHEN X, CHEN H, et al. Zhiqiao Gancao decoction regulated JAK2/STAT3/ macrophage M1 polarization to ameliorate intervertebral disc degeneration[J]. Heliyon, 2024, 10(15):e34715.
- [27] HUANG Z, LU B, ZHANG X, et al. Zhiqiao Gancao decoction ameliorates hyperalgesia in lumbar disc herniation via the CCL2/CCR2 signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17:2239-2257. doi: 10.2147/DDDT.S415127.

The Effect of *Zhiqiao Gancao Decoction* (枳壳甘草汤) on Intervertebral Disc Nucleus Pulposus Cell Apoptosis and the Hippo-YAP/TAZ Signaling Pathway in Tail Intervertebral Disc Degeneration Model Rats

ZHU Zaishi¹, HUANG Zeling¹, CHEN Junming¹, XU Bo¹, LU Binjie¹, CHEN Hua¹, DUAN Xingxing¹, LI Yuwei^{1,2}, SHEN Xiaofeng^{1,2}

1. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, 215009;

2. Orthopaedic and Traumatology Institute, Suzhou Academy of Chinese Medicine WU Sect

ABSTRACT **Objective** To investigate the possible mechanism by which *Zhiqiao Gancao Decoction* (枳壳甘草汤, ZGD) delays intervertebral disc degeneration (IDD) based on the Hippo-yes-associated protein (YAP)/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) signaling pathway. **Methods** A total of 50 SD rats were randomly divided into sham surgery group, model group, low-dose ZGD group, high-dose ZGD group, and high-dose ZGD + inhibitor group, with 10 rats in each group. In the sham surgery group, the rats were pierced in the skin and muscle at the Co6/7/8 segments of the tail with a 21G needle (depth approximately 2 mm) without damaging the intervertebral disc. In the other groups, rats were injected with a 21G needle at the Co6/7/8 segments of the tail to establish an IDD model by piercing the tail intervertebral disc 5 mm. One week after modeling, rats in the low-dose and high-dose ZGD groups were given 6.24 and 12.24 g/(kg·d) of the decoction via gastric gavage, respectively. The high-dose ZGD + inhibitor group was given 12.24 g/(kg·d) of the decoction and an intraperitoneal injection of YAP/TAZ inhibitor Verteporfin 10 mg/kg. The sham surgery and model groups were given 5 ml/(kg·d) of normal saline via gavage. The gavage was given once a day, and the intraperitoneal injection was given every other day. After 4 weeks of continuous intervention, the pathological changes of the tail intervertebral discs were observed using HE staining, Oil Red O-Green staining, and Toluidine Blue staining. Immunohistochemistry was used to detect the expression of aggrecan and MMP3 in the nucleus pulposus. TUNEL fluorescence staining was performed to detect apoptosis in the nucleus pulposus, and the apoptosis rate was calculated. Western blot was used to detect the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway, including YAP, phosphorylated YAP (p-YAP), phosphorylated MST1/2 (p-MST1/2), phosphorylated TAZ (p-TAZ) and apoptosis-related proteins, such as Cleaved Caspase 3, P53, Bcl-2 and Bax. **Results** Compared with sham surgery group, the rats in the model group showed significant degenerative changes in the intervertebral disc. The levels of aggrecan, Bcl-2, and YAP proteins in the nucleus pulposus decreased, while the levels of p-MST1/2, p-YAP, p-TAZ, P53, Bax, Cleaved Caspase 3, MMP3 proteins, and the apoptosis rate increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the drug intervention groups showed partial recovery in intervertebral disc degeneration. The levels of aggrecan, Bcl-2, and YAP proteins increased, while the levels of p-MST1/2, p-YAP, p-TAZ, P53, Bax, Cleaved Caspase 3, MMP3 proteins, and the apoptosis rate decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The high-dose ZGD group showed more significant recovery in intervertebral disc degeneration compared to the low-dose ZGD group, with a decrease in the levels of p-MST1/2, p-YAP, p-TAZ, P53, Bax, Cleaved Caspase 3, MMP3 proteins, and apoptosis rate, and an increase in the levels of aggrecan, Bcl-2, and YAP proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the high-dose ZGD group, the high-dose ZGD + inhibitor group showed a reduced recovery in intervertebral disc degeneration, with an increase in the levels of p-MST1/2, p-YAP, p-TAZ, P53, Bax, Cleaved Caspase 3, MMP3 proteins, and apoptosis rate, and a decrease in the levels of aggrecan, Bcl-2, and YAP proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** ZGD may delay intervertebral disc degeneration by inhibiting the phosphorylation of YAP in the nucleus pulposus, maintaining the function of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway, and reducing apoptosis of nucleus pulposus cells.

Keywords intervertebral disc degeneration; apoptosis; yes-associated protein; transcriptional co-activator with PDZ-binding motif; *Zhiqiao Gancao Decoction* (枳壳甘草汤)

(收稿日期: 2024-11-12; 修回日期: 2024-12-23)

[编辑: 邓媛]